

飯 野 亮 太（教授）（2014 年 6 月 1 日着任）

A-1) 専門領域：生物物理学，分子モーター，分子機械，1 分子計測，タンパク質工学

A-2) 研究課題：

- a) 回転分子モーター V_1 の化学力学エネルギー変換機構を解明
- b) 光学顕微鏡によるマルチカラー高速高精度 1 分子観察を実現

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) 高速高精度な 1 分子解析を用い，高分解能の構造情報が得られている腸球菌由来の V_1 モーターを対象とし，回転運動の詳細な 1 分子解析を行うことに成功した。具体的には， V_1 モーターの回転軸に直径 40 nm の金ナノ粒子を回転運動の可視化プローブとして取り付け，独自に開発した対物レンズ型全反射照明暗視野レーザー顕微鏡を用いて 100 マイクロ秒の時間分解能で回転運動を 1 分子解析することに成功した。1 分子解析の結果，1 個の ATP の加水分解に相当する 120° の回転がさらに， 40° と 80° のより小さな角度の回転（サブステップ）に分離できることを初めて発見した。また，ATP 加水分解が遅い変異体を用い，さらに反応生成物の ADP を加えた実験では，本来の回転方向（ V_0 部分からみて反時計回り）とは逆向きに -80° もしくは -40° 回転する様子が観察された。回転運動中の停止時間の分布を解析することで， 40° サブステップ前の停止では 3 つ， 80° サブステップ前の停止では 1 つ，合計で 4 つの時定数が得られ，これらの時定数が ATP 加水分解反応の 4 つの素過程（ATP の結合，ATP のリン酸結合の開裂，反応生成物 ADP の解離，反応生成物リン酸の解離）に対応することを明らかにした。さらに，1 分子解析で得られた結果を X 線結晶構造解析による構造情報と組み合わせることで， V_1 の化学力学共役機構のモデルを提案した。本研究で明らかにした V_1 の化学力学共役機構では，反応生成物のリン酸が先に V_1 から解離し，もう一つの反応生成物の ADP は後から解離する。類縁の F_1 モーターとの比較で興味深いのは， F_1 ではこの順番が逆（ADP が先，リン酸が後）な点である。細胞内には ATP と ADP の両方が存在し，しかも ATP の濃度は ADP の 10 倍程度高いことが知られている。 F_1 が細胞内で ATP 加水分解の逆反応である ATP 合成を行うためには，このような細胞内環境下で ATP ではなく ADP を選択的に結合する必要がある。 F_1 は逆反応の ATP 合成時，リン酸を先に結合することで ATP の結合を防いでいると考えられる。他方，細胞内での V_1 の役割は ATP 加水分解によるイオンの能動輸送（電気化学ポテンシャルの形成）であり，この場合はリン酸と ADP のどちらが先に解離しても問題ない。このように， F_1 と V_1 の化学力学共役機構の違いは，それぞれの生理的な役割と密に関係していることが示唆された。
- b) 光学顕微鏡によるマルチカラー高速 1 分子イメージングを実現した。銀ナノ粒子は紫色光に，金銀合金ナノ粒子（金と銀を 1 : 1 で混合）は青色光に共鳴し，それらの光を強く散乱する。光の波長によって散乱の効率が異なる特性を利用することで，金，銀，金銀合金ナノ粒子を見分けられると考えた。3 種のナノ粒子の散乱光を選択的に捉えるため，マルチカラー全反射暗視野顕微鏡を開発した。照明光学系は共鳴波長に合致した複数のレーザー（404 nm, 473 nm, 561 nm）で構成され，3 種のナノ粒子を同時に照明することができる。また，検出光学系にスリットを開いた分光器を用いることで，高速 CMOS カメラの受光面の異なる部分に，各波長の散乱像を同時に結像できる。プローブには，直径 30 nm の銀ナノ粒子，30 nm の金銀合金ナノ粒子，40 nm の金ナノ粒子を用いた。本装置では，銀ナノ粒子は 404 nm，金銀合金ナノ粒子は 473 nm，金ナノ粒子は 561 nm のチャンネルでそれぞれ，高いコントラストの散乱像が得られた。また得られた散乱像のシグナル／ノイズ比は高く，100 マイクロ秒の時間分解能で 2 nm, 1 ミリ

秒の時間分解能で 0.6 nm の位置決定精度を達成できた。次に、開発した装置で生体分子の観察を行った。まず、ガラス基板上に形成した人工生体膜中を拡散運動するリン脂質の様子を観察した。金、銀、金銀合金ナノ粒子で標識されたリン脂質の挙動を、100 マイクロ秒の時間分解能で同時に追跡することに成功した。また、膜上の金ナノ粒子と金銀合金ナノ粒子が近接して粒子対を形成する様子を観察することができた。金属ナノ粒子は、お互いが非常に近接すると相互作用して、共鳴波長が長波長（赤色）側へシフトすることが知られている。開発装置に赤色（649 nm）のレーザー光をさらに追加して計測したところ、粒子対の近接に伴って赤色の散乱光が増大する様子も捉えられた。粒子対が近接する時間は数ミリ秒程度であり、開発装置はこのような一過的な現象を詳細に捉えることを可能にした。さらに、生体内で物質輸送を担うモータータンパク質キネシンの観察も行った。キネシンの片足に金、銀、金銀合金ナノ粒子を結合させ、100 マイクロ秒の時間分解能で動きを観察した。先行研究と一致する 16 nm の歩幅で、レールである微小管の上を直進する様子を捉えることができた。

B-1) 学術論文

J. ANDO, A. NAKAMURA, M. YAMAMOTO, C. SONG, K. MURATA and R. IINO, “Multicolor High-Speed Tracking of Single Biomolecules with Silver, Gold, Silver-Gold Alloy Nanoparticles,” *ACS Photonics* **6**, 2870–2883 (2019). DOI: 10.1021/acsphotonics.9b00953

T. IIDA, Y. MINAGAWA, H. UENO, F. KAWAI, T. MURATA and R. IINO, “Single-Molecule Analysis Reveals Rotational Substeps and Chemo-Mechanical Coupling Scheme of *Enterococcus hirae* V₁-ATPase,” *J. Biol. Chem.* **294**, 17017–17030 (2019). DOI: 10.1074/jbc.ra119.008947

Y. ZHANG, Y. MINAGAWA, H. KIZOE, K. MIYAZAKI, R. IINO, H. UENO, K.V. TABATA, Y. SHIMANE and H. NOJI, “Accurate High-Throughput Screening Based on Digital Protein Synthesis in a Massively Parallel Femtoliter Droplet Array,” *Sci. Adv.* **5**, eaav8185 (11 pages) (2019). DOI: 10.1126/sciadv.aav8185

B-3) 総説, 著書

中村彰彦, 岡崎圭一, 古田忠臣, 櫻井 実, 飯野亮太, 「キチン加水分解酵素は熱ゆらぎを利用して1方向に動きながら結晶性バイオマスを分解する」, *生物物理* **59**, 330–333 (2019).

B-4) 招待講演 (* 基調講演)

R. IINO, “Single-molecule dynamics of motor proteins visualized by plasmonic nanoprobe,” 2nd NIBB-Princeton Joint Symposium, Okazaki (Japan), October 2019.

R. IINO, “Watching dynamic motions of protein motors with plasmonic nanoprobe,” Seminar at School of Chemistry, University of Southampton, Southampton (U.K.), October 2019.

R. IINO, “Watching dynamic motions of protein motors with plasmonic nanoprobe,” Seminar at School of Chemistry,, University of Manchester, Manchester (U.K.), October 2019.

R. IINO, “Watching dynamic motions of protein motors with plasmonic nanoprobe,” PhysChem seminar, School of Chemistry, University of Edinburgh, Edinburgh (U.K.), October 2019.

R. IINO, “Watching dynamic motions of protein motors with plasmonic nanoprobe,” Seminar at School of Chemistry, University of Bristol, Bristol (U.K.), October 2019.

R. IINO, “Watching dynamic motions of hydrolysis-powered protein motors with plasmonic nanoprobe,” The 10th Toyota RIKEN international workshop, Nagakute (Japan), September 2019.

R. IINO, “Visualizing dynamic motions of protein molecular motors with plasmonic nanoprobe,” 2019 Japan-Korea Molecular Science Symposium, Nagoya (Japan), July 2019.

R. IINO, “Watching motor protein dynamics with plasmonic nanoprobe,” 2nd East Asian Symposium on Single-Molecule Biological Sciences, Seoul (Korea), July 2019.

R. IINO, “Single-molecule dynamics of protein molecular motors visualized by plasmonic nanoprobe,” The workshop in NCCR, University of Basel, Basel (Switzerland), February 2019.

R. IINO, “Dynamics of Protein Molecular Motors Visualized with Plasmonic Nanoprobe,” LaSIE Seminar, Osaka University, Osaka (Japan), January 2019.

飯野亮太, 「プラズモニクナノプローブでタンパク質分子モーターの動きを観る」, OCU 先端光科学シンポジウム, 大阪市立大学, 大阪, 2019年10月.*

飯野亮太, 「プラズモニクナノ粒子を用いた分子モーターの高速高精度1分子イメージング」, 第9回分子モーター討論会, 国立遺伝学研究所, 三島, 2019年6月.

飯野亮太, 「バイオマス多糖を効率的に分解する生体分子モーターの作動原理」, 高分子学会バイオミメティクス研究会, 産総研臨海副都心センター, 東京, 2019年6月.

飯野亮太, 「1分子計測, 構造解析, シミュレーションで探るタンパク質分子モーターの作動機構」, 第24回べん毛研究交流会, ホテル明山荘, 蒲郡, 2019年3月.

中村彰彦, 「ATPに頼らず動く新規リニアモーター酵素」, 生体エネルギー研究会第45回討論会, 九州工業大学, 福岡, 2019年12月.

B-6) 受賞, 表彰

中村彰彦, 日本生物物理学会若手奨励賞 (2019).

飯田龍也, 日本生物物理学会学生発表賞 (2019).

中村彰彦, ATI (公益財団法人新世代研究所) 研究奨励賞 (2019).

中村彰彦, 第32回セルラーゼ研究会ポスター賞 (2018).

飯田龍也, 日本生物物理学会中部支部講演会最優秀発表賞 (2018).

石渡大貴, 日本化学会東海支部長賞 (2017).

安藤 潤, 日本分光学会平成29年度年次講演会若手講演賞 (2017).

R. IINO, Emerging Investigator. Lab on a Chip., The Royal Society of Chemistry, U.K. (2012).

B-7) 学会および社会的活動

学協会役員等

日本生物物理学会理事 (2019.6–2021.5).

日本生物物理学会中部支部長 (2019.5–2021.4).

日本化学会東海支部常任幹事 (2019.3–2020.2).

日本生物物理学会分野別専門委員 (E-04. タンパク質工学) (2018).

日本分光学会中部支部幹事 (2017.10-). (安藤 潤)

日本生物物理学会分野別専門委員 (E-04. タンパク質工学) (2016).

日本生物物理学会分野別専門委員 (A-13. モータータンパク質) (2014).

日本生物物理学会代議員 (2014–2016).

日本生物物理学会中部支部会計 (2019.6–2020). (中村彰彦)

学会の組織委員等

第 25 回日本バイオイメーシング学会学術集会副大会長 (2016).

学会誌編集委員

日本生物物理学会学会誌「生物物理」編集委員 (2014–2015).

Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, Associate Editor (2015.4.29-).

その他

公益財団法人新世代研究所バイオ単分子研究会委員 (2012.4.2–2020.3).

日本生物物理学会小中高校への講師派遣サポート事業講師 (2016.11-).

出前授業「温度と分子の状態」岩津中学校 (2017). (中村彰彦)

公益財団法人新世代研究所水和ナノ構造研究会委員 (2019.4.2–2020.3).

B-10) 競争的資金

住友財団環境研究助成, 飯野亮太 (2019 年).

自然科学研究機構 ExCELLS 特別共同研究, 飯野亮太 (2019 年).

科研費新学術領域研究「発動分子科学」(計画研究), 「生体・人工発動分子によるエネルギー変換過程の 1 分子計測法の開発」, 飯野亮太 (2018 年–2022 年).

科研費基盤研究(B), 「生体 1 分子オンゲストローム計測法の開発」, 飯野亮太 (2018 年–2020 年).

科研費新学術領域研究「レゾナンスバイオ」(公募研究), 「プラズモニックナノ粒子を用いたマルチカラー 1 分子観察法の開発」, 飯野亮太 (2018 年).

科研費基盤研究(B), 「金属ナノ粒子によるタンパク質ドメインの高速高精度イメージング技術の開発」, 安藤潤 (2018 年–2020 年).

自然科学研究機構若手研究者による分野間連携研究プロジェクト, 「独立に進化した動物・植物・微生物の糖質消化システムを分子機能構造から読み解く」, 中村彰彦 (2018 年).

科研費挑戦的研究(萌芽), 「結晶性多糖表面を動きながら連続的に分解する酸化還元型酵素を創る」, 飯野亮太 (2017 年–2018 年).

自然科学研究機構新分野創成センターイメージングサイエンス研究分野プロジェクト, 「プラズモニックナノ粒子による生体分子のマルチカラー 1 分子イメージング法の開発」, 安藤 潤 (2017 年).

自然科学研究機構新分野創成センターイメージングサイエンス研究分野プロジェクト, 「金ナノプローブ表面の電場増強を利用した生体分子モーターの動きと化学反応の複合 1 分子計測法の開発」, 飯野亮太 (2016 年).

科研費新学術領域研究「動的秩序と機能」(公募研究), 「糖質加水分解サイボグリア分子モーターの創生」, 飯野亮太 (2016 年–2017 年).

科研費新学術領域研究「柔らかな分子系」(公募研究), 「金属ナノプローブを用いた分子モーターの運動と構造変化の高速 1 分子計測」, 飯野亮太 (2016 年–2017 年).

科研費若手研究(B),「高速高精度一分子観察による結晶性糖質分解機構の解明」,中村彰彦(2016年–2017年).

科研費新学術領域研究「動的構造生命」(公募研究),「高時空間分解能一分子観察と理論解析を組み合わせた分子モーター運動解析法の開発」,中村彰彦(2016年–2017年).

自然科学研究機構新分野創成センターイメージングサイエンス研究分野プロジェクト,「金ナノロッドの高速高精度光学イメージングによる生体分子モーターの複合1分子計測」,飯野亮太(2015年).

科研費基盤研究(B),「ナトリウムイオン輸送性 V-ATPase のエネルギー変換機構の解明」,飯野亮太(2015年–2017年).

科研費研究活動スタート支援,「セルロース分解酵素のモーター運動に寄与する構造要素の解明」,中村彰彦(2015年–2016年).

科研費新学術領域研究「動的秩序と機能」(公募研究),「ATP 駆動サイボーグ回転分子モーターの創生」,飯野亮太(2014年–2015年).

科研費新学術領域研究「柔らかな分子系」(公募研究),「金ナノロッドを用いた分子モーター構造ダイナミクスの高速1分子計測」,飯野亮太(2014年–2015年).

科研費特別研究員奨励費,「ダブルドメインセルラーゼの吸着バランス制御による結晶性多糖構造分解反応の促進」,中村彰彦(2013年–2014年).

科研費基盤研究(B),「リニアモータータンパク質糖質加水分解酵素の1ナノメートルステップの1分子計測」,飯野亮太(2012年–2014年).

科研費挑戦的萌芽研究,「生体・人工ハイブリッドナノモーターの創製」,飯野亮太(2012年–2013年).

科研費新学術領域研究「揺らぎと生体機能」(公募研究),「分子モーターの構造揺らぎを調べる超高速配向イメージング法の開発」,飯野亮太(2011年–2012年).

科研費特定領域研究「高次系分子科学」(公募研究),「生細胞内1分子FRET 法による回転モータータンパク質のダイナミクス計測」,飯野亮太(2010年–2011年).

科研費新学術領域研究「揺らぎと生体機能」(公募研究),「モータータンパク質の揺らぎと性能の相関を調べる超高速光学顕微鏡の開発」,飯野亮太(2009年–2010年).

科研費若手研究(B),「プロトン駆動力で回転する ATP 合成酵素を1分子技術とマイクロデバイスで可視化する」,飯野亮太(2009年–2010年).

科研費若手研究(B),「プロトン駆動力で回転する生体分子モーター ATP 合成酵素の1分子計測」,飯野亮太(2006年–2008年).

日本学術振興会二国間交流事業共同研究,「生細胞内で働く ATP 合成酵素の回転速度を1分子技術で計測する」,飯野亮太(2010年–2011年).

C) 研究活動の課題と展望

回転分子モーターについては、今後は V_1 部分だけでなく、V-ATPase (V_o と V_1 の複合体全体)を対象とし、エネルギー変換機構、エネルギー変換効率および可逆性について理解したいと考えている。V-ATPase は、ナノサイズのエネルギー変換装置であり、ナノサイズの発電装置とも言える。本研究を、V-ATPase のエネルギー変換の仕組みの研究へとさらに発展させることで将来、生体に適合した発電装置の開発等に繋がる可能性が期待される。また、金属ナノ粒子を用いたマルチカラーイメージングでは、複数種の生体分子により発現される生命現象を、マイクロ秒の時間分解能とナノメートルの位置決定精度で詳細に捉えることを可能にする。また、モータータンパク質をはじめとする生体分子機械は、複数の部品が複合体を形成して機能する。今後は、モータータンパク質内部の複数の部品がいかに協調して直進運動や回転運動を実現するのか、その仕組みを解明する。