

飯野 亮太 (教授) (2014年6月1日着任)

大友 章裕 (助教)
KIM, Ju-Young (特任研究員)
野島 達也 (特任研究員)
VISOOTSAT, Akasit (特任研究員)
武田 公利 (特任研究員)
HONSA, Monique (インターンシップ)
YANG, Ling (インターンシップ)
飯田 龍也 (大学院生)
大国 泰子 (技術支援員)
今 弥生 (技術支援員)
中根 香織 (事務支援員)

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) リニア分子モーターダイニンの高速高精度1分子計測
- b) リニア分子モータープロセシブキチナーゼの1分子計測とタンパク質工学

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) 二本足で歩くリニア分子モーターダイニンの運動の高速高精度1分子観察を達成した。直径30ナノメートルの金ナノ粒子をプローブとし、独自に開発した全反射型暗視野レーザー顕微鏡で1分子観察を行った。100マイクロ秒の時間分解能と1ナノメートル以下の位置決定精度で、細胞内の条件に近い高濃度ATPでのダイニンの速い歩行運動の一步一步を可視化することに初めて成功した。観察試料には、微小管に結合した状態の分子構造の詳細が以前の低温電子顕微鏡観察で明らかとなっている、キメラダイニンを利用した。マイクロ秒レベルの高速1分子観察の結果、以前のミリ秒レベルの低速1分子観察と同様、ダイニンの歩行運動は前進だけでなく後退や横方向への動きを多く含む、酔っ払いのようなふらふらした歩き方であることを確認した。しかし以前の観察とは異なり、歩幅が小さくその分布がシャープであることが初めて明らかになった。この結果は、従来の低速1分子観察では歩行運動の一步一步を分解して可視化できていなかったことを強く示唆する。歩幅の大きさは、微小管に沿った方向が前後ともに8nm、微小管に垂直な方向が左右ともに5nmであり、レールである微小管上のダイニン結合部位間の最小間隔と同等であることが明らかになった。興味深いことに、前進する確率(27%)は後退する確率(15%)の高々1.8倍程度であり、さらに横に進む確率(左右共に25%)と同程度であった。残りは同じ場所に再び結合するか(6%)、斜めに進んだ(2%)。この挙動は、ほぼ100%の確率で一步一步前進するキネシンとは大きく異なる。また、一步一步の時間間隔は10ミリ秒程度で、1個のATPが分解されるのに要する時間と同程度であった。本結果は、ATPが1個分解されると一步一步動くというモデルを支持する。さらに一步一步の時間間隔の分布から、ダイニンではそれぞれの足が協調せずに独立に動くモデルが支持された。これらの結果は、2本の足が高度に協調して後ろ足が常に前足を追い越しながら16nmの歩幅で正確に歩行するキネシンとは全く異なっている。このように、ダイニンとキネシンでは歩行運動の仕組みが大きく異なることが明らかとなった。

- b) 結晶性多糖のキチンは昆虫や甲殻類の外殻を構成する構造多糖であり、セルロースに次いで地球上の賦存量が多いバイオマスである。プロセスキチナーゼは常温常圧という温和な条件でキチンを加水分解するため、キチンの効率的分解と有効利用を目的とした観点で基礎・応用研究の両方が精力的に行われている。本課題では、全反射蛍光顕微鏡および高速原子間力顕微鏡を用いた1分子計測により、セラチア菌由来のプロセシブキチナーゼ *SmChiA* の変異体 *SmChiA*(F232W/F396W) の高活性化機構を解明した。具体的には、*SmChiA*(F232W/F396W) はキチン鎖の末端に結合した後、解離するまでに天然型よりも多く加水分解反応サイクルを繰り返すため（反応の連続性すなわちプロセシビティが高い）、より高いキチン分解活性を示すことを明らかにした。さらに、Multiple sequence alignment, Site-saturation mutagenesis, および分注ロボットを用いた試料調製とキチン分解活性測定自動化を組み合わせた効率的タンパク質工学により、さらに活性の高い変異体、*SmChiA*(F232W/F396W/S538V) の創出に成功した。

B-1) 学術論文

A. VISOOTSAT, A. NAKAMURA, T.-W. WANG and R. IINO, “Combined Approach to Engineer a Highly Active Mutant of Processive Chitinase Hydrolyzing Crystalline Chitin,” *ACS Omega* **5**, 26807–26816 (2020). DOI: 10.1021/acsomega.0c03911

A. NAKAMURA, D. ISHIWATA, A. VISOOTSAT, T. UCHIYAMA, K. MIZUTANI, S. KANEKO, T. MURATA, K. IGARASHI and R. IINO, “Domain Architecture Divergence Leads to Functional Divergence in Binding and Catalytic Domains of Bacterial and Fungal Cellobiohydrolases,” *J. Biol. Chem.* **295**, 14606–14617 (2020). DOI: 10.1074/jbc.RA120.014792

S. YAMAGUCHI, R. TAKAGI, T. HOSOGANE, Y. OHASHI, Y. SAKAI, S. SAKAKIHARA, R. IINO, K. V. TABATA, H. NOJI and A. OKAMOTO, “Single Cell Array Enclosed with a Photodegradable Hydrogel in Microwells for Image-Based Cell Classification and Selective Photorelease of Cells,” *ACS Appl. Bio Mater.* **3**, 5887–5895 (2020). DOI: 10.1021/acsabm.0c00583

K. OKAZAKI, A. NAKAMURA and R. IINO, “Chemical-State-Dependent Free Energy Profile from Single-Molecule Trajectories of Biomolecular Motor: Application to Processive Chitinase,” *J. Phys. Chem. B* **124**, 6475–6487 (2020). DOI: 10.1021/acs.jpcc.0c02698

J. ANDO, T. SHIMA, R. KANAZAWA, R. SHIMO-KON, A. NAKAMURA, M. YAMAMOTO, T. KON and R. IINO, “Small Stepping Motion Of Processive Dynein Revealed by Load-Free High-Speed Single-Particle Tracking,” *Sci. Rep.* **10**, 1080 (11 pages) (2020). DOI: 10.1038/s41598-020-58070-y

A. VISOOTSAT, A. NAKAMURA, P. VIGNON, H. WATANABE, T. UCHIHASHI and R. IINO, “Single-Molecule Imaging Analysis Reveals the Mechanism of a High-Catalytic-Activity Mutant of Chitinase A from *Serratia marcescens*,” *J. Biol. Chem.* **295**, 1915–1925 (2020). DOI: 10.1074/Jbc.RA119.012078

B-3) 総説, 著書

A. NAKAMURA, K. OKAZAKI, T. FURUTA, M. SAKURAI, J. ANDO and R. IINO, “Crystalline Chitin Hydrolase is a Burnt-Bridge Brownian Motor,” *Biophys. Physicobiol.* **17**, 51–58 (2020). DOI: 10.2142/biophysico.BSJ-2020004

R. IINO, K. KINBARA and Z. BRYANT, “Introduction: Molecular Motors,” *Chem. Rev.* **120**, 1–4 (2020). DOI: 10.1021/acs.chemrev.9b00819

飯野亮太, 「生きものが機械でもいいじゃない」, *生物物理* **61**, 1 (2021).

安藤 潤, 飯野亮太, 「銀, 金, 銀金合金ナノ粒子の光散乱を利用したマルチカラー生体1分子追跡」, フォトニクス ニュース **6**, 132–136 (2021).

中村彰彦, 岡崎圭一, 古田忠臣, 櫻井 実, 飯野亮太, 「セラチア菌由来キチン加水分解酵素の運動機構」, 応用糖質 科学 **10**, 89–95 (2020).

安藤 潤, 中村彰彦, 山本真由子, ソンチホン, 村田和義, 飯野亮太, 「多色・高速1分子イメージング 金銀ナノ 粒子による多色・高速生体1分子イメージング」, 光学 **49**, 249 (2020).

B-4) 招待講演

R. IINO, “Watching Unexpected Motions of Protein Molecular Motors,” Serendipity Symposium 2020, Shimizu (Japan), December 2020.

R. IINO, “Watching Dynamic Motions of Protein Molecular Motors One at A Time,” Colloquium in the Department of Physics, Oregon State University, Corvallis, Oregon (USA), February 2020.

R. IINO, “Processive Chitinase: A Burnt-Bridge Brownian Motor Hydrolyzing Crystalline Polysaccharide,” The Symposium “Molecular Motors” At the Biophysical Society 64th Annual Meeting, San Diego, California (USA), February 2020.

R. IINO, “Visualizing Dynamic Motions of Protein Molecular Motors With Plasmonic Nanoprobes,” The 1st International Symposium on Molecular Engine, Chiba (Japan), January 2020.

飯野亮太, 「生体分子モーターを観る, 壊す, 創る」, 東北大学大学院工学研究科応用物理学セミナー, オンライン開催, 2020年11月.

飯野亮太, 「タンパク質分子モーターを観る, 壊す, 創る」, 東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻「ハイブリッドレクチャー」, オンライン開催, 2020年11月.

飯野亮太, 「タンパク質の基礎」, 新学術領域合同シンポジウム——ソフトロボット学と発動分子科学の境界——, オンライン開催, 2020年11月.

B-7) 学会および社会的活動

学協会役員等

日本生物物理学会分野別専門委員 (A-13. モータータンパク質) (2020).

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 (2019.3–2021.2).

学会誌編集委員

米国生物物理学会誌 *Biophysical Journal*, Editorial Board Member (2020–2022).

Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, Associate Editor (2015.4.29–2020.6).

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 (2012.4–2021.3).

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–).

B-8) 大学での講義, 客員

大阪大学大学院工学研究科, 非常勤講師, 「生命化学特別講義I」, 2020年.

東北大学大学院工学研究科, 非常勤講師, 「応用物理学特別講義」, 2020年.

B-9) 学位授与

VISOOTSAT, Akasit, 「Single-molecule analysis and engineering of chitinase A from *Serratia marcescens*」, 2020年9月, 博士(理学).

B-10) 競争的資金

科研費特別研究員奨励費, 「V-ATPaseが電気化学ポテンシャルによって回転する機構の解明」, 大友章裕 (2020年-2023年).

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-2020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).

C) 研究活動の課題と展望

生体分子モーター等の細胞内で働くナノサイズの生体分子機械は, 人間が作ったマクロなサイズの機械と比べてはるかに小さく, ブラウン運動の活用等, 全く異なる作動原理で働くと考えられる。ダイニンの研究成果により, 細胞内で働くリニア分子モーターの動きは必ずしも正確でないことが明らかになった。本成果は, 細胞内物質輸送という機能の達成は, 不正確な動きでも可能であることを示している。人工分子でナノサイズのリニアモーターを設計する上での制限が大きく緩和され, その実現可能性が向上したと考えられる。今後は, 我々が最近開発した高速高精度マルチカラー1分子観察法を適用し, ダイニンの2本の足の動きを同時に可視化してその歩行運動のメカニズムをさらに深く理解したいと考えている。また, プロセシブキチナーゼについては, 得られた高活性変異体の加水分解反応の素過程を解明し, 高活性化の機構の解明に取り組む。さらに, 回転分子モーター V-ATPase における ATP 加水分解モーター V_1 とイオン輸送モーター V_o のエネルギー変換カップリングの機構を解明する。