

## 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)

VISOOTSAT, Akasit (特任研究員)

KEYA, Jakia Jannat (特任研究員)

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) V-ATPase のエネルギーカップリング機構の高速高精度1分子計測
- b) 生体・人工ハイブリッドキネシンの創成と高速高精度1分子計測による特性解析
- c) PET 分解酵素の熱安定性および PET 分解活性の向上と機構解明

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) V-ATPase ( $V_0V_1$ ) は, ATP の化学エネルギーを利用して細胞膜を介するイオンの能動輸送を行う分子ポンプであり, ATP 加水分解反応を触媒する  $V_1$  とイオン輸送を担う  $V_0$  の2つの回転分子モーターの複合体である。我々は, 独自に開発した高速高精度1分子計測を用い, イオン輸送時の  $V_0V_1$  複合体の回転運動の素過程を可視化することに初めて成功した。その結果,  $V_0$  は10回対称,  $V_1$  は3回対称という構造対称性の不一致 ( $10/3=3.3$ ) を持つにも関わらず, 両モーター間の結合は“硬く”, 繋がった  $V_0V_1$  の回転子や固定子サブユニットが大きく振じれることなく, スムーズに回転できることを明らかにした (論文投稿中)。
- b) 2本足で歩く分子モーターキネシン-1は, 後足が前足を常に追い越すいわゆるハンドオーバーハンド機構で, レールである微小管上を直進運動する。微小管上にはキネシン結合部位が前後左右に多数存在するにも関わらず, 後足が前足を追い越して常に前方に結合する機構は不明である。我々は, 人工分子ポリエチレングリコール (PEG) でキネシンの2つの足を繋いだ生体-人工ハイブリッドキネシンを創成し, 高速高精度1分子計測でその運動素過程を解析した。その結果, 柔らかい PEG リンカーで繋いだ場合にも, 天然型と同様のハンドオーバーハンド機構で正確に直進運動し, 2つの足を繋ぐリンカーの剛直性は不要であることを明らかにした (論文準備中)。
- c) プラスチックの完全リサイクルやプラスチックによる環境汚染の解決策としてプラスチック分解酵素が注目されている。我々は, ポリエチレンテレフタレート (PET) 分解酵素を改変することにより熱安定性および PET 分解活性を大幅に向上させ, X線結晶構造解析を用いて熱安定性向上の構造的基盤を明らかにするとともに, 1分子蛍光イメージングを用いて PET 分解活性向上のメカニズムを明らかにした (*ACS Catalysis* 2021; 特願 2021-168388)。本成果に基づき, 2022年1月から自然科学研究機構, キリンホールディング, 静岡大学の3者で共同研究契約を結び, PET 分解酵素を用いた PET リサイクルの実用化に向けた共同研究を推進している。

B-1) 学術論文

- J. ANDO, H. KAWAGOE, A. NAKAMURA, R. IINO and K. FUJITA**, “Label-Free Monitoring of Crystalline Chitin Hydrolysis by Chitinase Based on Raman Spectroscopy,” *Analyst* **146(12)**, 4087–4094 (2021). DOI: 10.1039/d1an00581b
- A. NAKAMURA, N. KOBAYASHI, N. KOGA and R. IINO**, “Positive Charge Introduction on the Surface of Thermostabilized PET Hydrolase Facilitates PET Binding and Degradation,” *ACS Catal.* **11(14)**, 8550–8564 (2021). DOI: 10.1021/acscatal.1c01204
- T. KOSUGI, T. IIDA, M. TANABE, R. IINO and N. KOGA**, “De Novo Design of Allosteric Control into Rotary Motor  $V_1$ -ATPase by Restoring Lost Function,” *bioRxiv* 2020.09.09.288571 (2020). DOI: 10.1101/2020.09.09.288571
- T. UMAKOSHI, S. FUKUDA, R. IINO, T. UCHIHASHI and T. ANDO**, “High-Speed Near-Field Fluorescence Microscopy Combined with High-Speed Atomic Force Microscopy for Biological Studies,” *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1864(2)**, 129325 (2020). DOI: 10.1016/j.bbagen.2019.03.011
- T. URUI, M. MIZUNO, A. OTOMO, H. KANDORI and Y. MIZUTANI**, “Resonance Raman Determination of Chromophore Structures of Heliorhodopsin Photointermediates,” *J. Phys. Chem. B* **125(26)**, 7155–7162 (2021). DOI: 10.1021/acs.jpcc.1c04010

B-3) 総説, 著書

- 飯野亮太, 「はたらく分子マシン 10 : 生体分子モーターの予想外の動きを観る」, *現代化学*, 7月号, 19–23 (2021).
- 金原 数, 飯野亮太, 竹内正之, 前多裕介, 「はたらく分子マシン: ナノの世界のエネルギー変換へ」, *現代化学*, 3月号, 46–50 (2022).
- J. J. KEYA, A. KUZUYA and A. KAKUGO**, “Molecular Swarm Robot Realized by the Intelligence of a Biomolecular Motor System and DNA,” *生物物理 (SEIBUTSU BUTSURI)*, **61(5)**, 330–331 (2021).

B-4) 招待講演 (\* 基調講演)

- R. IINO**, “Watching dynamic motions of individual protein motors,” The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (Pacifichem 2021), “Molecular engines based on energy conversion: From design to autonomous functions,” Honolulu (U. S. A.) (online), December 2021.
- R. IINO**, “Engineering linear molecular motor kinesin-1,” 3<sup>rd</sup> Conference on Biomotors, Virus Assembly, and Nanobiotechnology Applications, Ohio (USA) (Online), December 2021.
- J. J. KEYA, A. VISOOTSAT, A. OTOMO, S. HAN, K. KINBARA and R. IINO**, “Engineering of hybrid kinesin-1 dimer with synthetic linker by tuning the neck linker length,” Japan-US symposium on cytoskeletal motor proteins and their associated proteins, the 59<sup>th</sup> annual meeting of the Biophysical Society of Japan, Sendai (Japan) (Online), November 2021.
- R. IINO**, “Visualization and Engineering of the Motions of Protein Molecular Motors,” Seminar at Mechanobiology Institute, National University of Singapore, Singapore (Online), July 2021.
- R. IINO**, “Watching dynamic motions of natural and engineered molecular motor proteins,” Workshop on single-molecule biophysics, the School of Pharmacy, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (China) (Online), September 2021.
- 飯野亮太, 「話題提供 : 生命科学の立場から」, 公開シンポジウム : アト秒レーザー科学研究施設 (ALFA) 計画の現状と展望, 分子研, オンライン開催, 2022年3月.

飯野亮太,「マクロな機械とナノサイズの分子機械に共通な仕組みはあるか」, ソフトロボット×発動分子科学ジョイントシンポジウム, 東工大, オンライン開催, 2022年2月.

飯野亮太,「レーザー暗視野顕微鏡を用いた高速高精度生体1分子イメージング」, レーザー学会学術講演会第42回年次大会, 神戸(オンライン開催), 2022年1月.

飯野亮太,「タンパク質分子モーターを観る, 壊す, 創る」, 第5回分子ロボティクス年次大会, 仙台(オンライン開催), 2021年11月.\*

大友章裕,「1分子計測法で明らかにする回転型V-ATPaseのイオン輸送と共役した回転機構」, 名古屋工業大学生命・応用化学専攻神取研究室外部招聘セミナー, 名古屋, 2021年5月.

飯野亮太,「生体分子モーターを観る, 壊す, 創る」, 新学術「生命金属科学」領域会議, ウィンクあいち, 名古屋, 2021年4月.

#### B-5) 特許出願

US10809257B2, “Method for detecting target molecule,” H. NOJI, R. IINO and S. ARAKI (NINS), United States (Granted on October 20, 2020).

特願 2021-168388,「蛋白質, ポリヌクレオチド, 組換えベクター, 形質転換体, ポリエチレンテレフタレート分解用組成物, 及びリサイクル品の製造方法」, 中村彰彦, 飯野亮太(自然科学研究機構), 2021年.

#### B-6) 受賞, 表彰

大友章裕, 日本生物物理学会中部支部令和2年度講演会最優秀発表賞 (2021).

#### B-7) 学会および社会的活動

学協会役員等

日本生物物理学会ウェブサイト編集委員長 (2021–2022).

日本生物物理学会理事 (2019.6–2023.5).

日本生物物理学会中部支部長 (2019.5–2021.4).

学会誌編集委員

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

その他

岡崎市小中学校理科作品展「未来の科学者賞」選考委員 (2021). (大友章裕)

#### B-10) 競争的資金

科研費若手研究,「一分子計測法で明らかにするV-ATPaseの機能と構造の相関」, 大友章裕 (2021年–2024年).

科研費基盤研究(B),「バクテリアべん毛モーター固定子複合体の「回転モデル」を1分子計測で実証する」, 飯野亮太 (2021年–2023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).

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,「ナトリウムイオン輸送型 EhV-ATPase の動的分子機構の解明」(代表: Song Chihong), 大友章裕(研究分担者)(2020年-2022年).

新分野創成センター先端光科学研究分野共同研究プロジェクト,「超高速・超広帯域近接場光顕微鏡による機能性材料および生体材料の先端的ナノスケール顕微分光」(代表: 西田 純), 大友章裕(研究分担者)(2021年-2022年).

自然科学研究機構分野融合型共同研究事業,「生体機能を凌駕するサイボーグ型分子機械の構築」(代表: 金原 数), 飯野亮太(研究分担者)(2020年-2021年).

#### B-11) 産学連携

共同研究, キリンホールディングス(株),「PET 分解酵素の開発」, 飯野亮太(2022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, ブラウン運動の克服や活用等, 全く異なる作動原理で働く。今後は, 天然の分子モーターを計測して機構を調べるだけでなく, 天然に存在しない分子モーターを積極的につくることで, その作動原理と設計原理をさらに深く理解する。例えば, これまでに作製した非天然型キネシンに, 我々が開発した高速高精度マルチカラー1分子計測を適用し, 2本の足の動きを同時に可視化してその歩行運動の仕組みをさらに深く理解する。また, 改変体の高速高精度1分子計測を進めることで, 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  $V_0$  のエネルギー変換カップリングの機構の理解を深める。さらに, 天然型の V-ATPase だけでなく, 異種のイオンを輸送する V-ATPase や, 1回転で2倍のイオンを輸送する V-ATPase をつくることで, そのエネルギー変換機構の設計原理を理解する。