

I 鞭毛と軸糸ダイニンの構造と運動機構の解明

Molecular Structure and Mechanism of Axonemal Dyneins

榊原 齊・小嶋寛明・西浦昌哉・大岩和弘
Sakakibara, H., Kojima, H., Nishiura, M., Oiwa, K.

軸糸ダイニンは微小管との間で滑り力を発生する ATPase であり、真核生物の繊毛や鞭毛の運動の原動力となっている。このダイニンの構造をクライオ電子線トモグラフィ、クライオ電子顕微鏡解析、X 線小角散乱や X 線繊維回折法を用いて解析するとともに、力学的・酵素学的特性に関して単一分子レベルでの計測を行ない、ダイニンの運動機構と協同性を解析している。これまでに、鞭毛軸糸から単離精製した内腕ダイニン亜種 c や亜種 f が連続的に微小管上を運動する事や、ダイニン亜種 c、f が他の典型的なタンパク質モータとは極めて異なる方法で機能している事を明らかにした。また、ダイニンの構造解析では、ヌクレオチド状態によるダイニンの分子構造変化を見出し、ダイニンの微小管滑り運動機構に関するモデルを提唱している。また、軸糸を対象としたクライオ電子線トモグラフィや X 線繊維回折によって軸糸内のダイニン腕の 3 次元構造を明らかにし、ヌクレオチド状態に依存したダイニン腕のグローバルな構造変化を明らかにしている。

II 軟体動物平滑筋のキャッチ機構に関する研究

In Vitro Reconstitution of the 'Catch' State of Molluscan Smooth Muscle

山田 章・大岩和弘
Yamada, A., Oiwa, K.

二枚貝の貝柱の筋肉は ATP をほとんど消費することなく張力を維持できる。これを「キャッチ」収縮と呼ぶ。このキャッチ収縮がどのような機構で生じるかを明らかにするために *in vitro* 機能再構成技術を使った研究を行なっている。我々は、この過程でムラサキガイのミオシンフィラメントに含まれ、ミオシンの配向に関わる新しいタンパク質を精製した。分子生物学的手法によってこのタンパク質の塩基配列を明らかにし *catchin* と命名した。また、ムラサキガイ前足系牽引筋から *thick filament*, *thin filament*、及び可溶性画分を分離して、顕微鏡下に *catch* 維持状態を再現、精製したタンパク質要素でキャッチ収縮を再現することに成功した。これによって、キャッチ収縮に必要な最

小限のタンパク質要素を myosin, actin, twitchin の 3 種類に特定した、キャッチ制御に関わるリン酸化の標的タンパク質が twitchin であることも明らかにした。この結果、キャッチ機構のほぼ全容を明らかにしつつある。さらに、titin/connectin 様タンパク質である twitchin が、広く動物界に存在していることに着目、これらの twitchin の生理学的役割を上述の *in vitro* 機能再構成技術で明らかにする試みを進めている。また、棘皮動物にみられるキャッチ現象についても、コラーゲン繊維間の架橋を促進する因子の精製を進めて、この分子機構の解明を進めている。

III 単一分子観察・測定技術による ATPase 機構の解析

Single-Molecule Enzymology and Nanometry of ATPases

大岩和弘・小嶋寛明
Oiwa, K., Kojima, H.

タンパク質モータによる ATP 加水分解過程を単一分子レベルで可視化するためにエバネッセント光を利用した蛍光顕微鏡システムを開発して、さらにその改良を行なってきた。このシステムにおいて、背景迷光は極限的に除去され、単一蛍光分子を溶液中で観察することが可能となったほか、単一蛍光分子のタンパク質上での配向を約 5 度の精度で決定することができるようになった。基質となる ATP 分子は蛍光色素で修飾を行ない、ある種のタンパク質モータによる分解反応に対して ATP と同程度、あるいは加水分解可能な基質能があることを明らかにした。これまでに、蛍光 ATP と F₁-ATPase の回転運動とを同時計測することに成功、F₁-ATPase の運動機構の一端を明らかにした。また、光ピンセット法を用いた単一分子レベルの力学測定によって、植物ミオシンや細胞質ダイニンの張力発生、ステップ距離を測定し、その分子機構に関する新たな知見を得ている。

IV 生体分子を用いた分子通信技術の研究開発

Molecule Communication Technology Based upon Protein Motors' Functions

平林美樹・小嶋寛明・大岩和弘
Hirabayashi, M., Kojima, H., Oiwa, K.

分子通信技術は、バイオサイエンス、ナノテクノロジー、および情報技術を融合する技術開発の一つであり、生体構成要素（細胞など）に見られる情報伝達や信号発信のメカニズムを応用して、ナノスケール機器間の情報伝達の実現を目標とする研究開発である。ナノスケール機器間の情報伝達においては、このサイズの電気装置、光学装置および動力源を作製するのは極めて困難であり、現行の情報伝達技術を直接応用することは事実上不可能であるため、生体構成要素に見られるメカニズムの応

用がもっとも有望なアプローチといえる。本研究分野では、生体信号および生体情報伝達のメカニズムを理解して、生体材料や非生体材料もしくはバイオフィレンドリな材料を用いて、ナノスケールコミュニケーションに必要な生体信号や生体情報伝達のメカニズムを人工的に再現、さらにナノスケールコミュニケーションに向けて、新しい理論的基礎を確立することを目指している。この研究開発は、分子コンピュータにおけるナノスケールのゲート間での情報伝達、ピンポイントでの薬物送達など、医学的応用、現行の情報伝達技術では伝えられない感情や現象をも伝える情報伝達などの応用を視野に入れたものである。

発表論文 List of Publications

- I-1 鳥羽 栞 (NICT) ・ Laura A. Fox (Emory Univ) ・ 榎原 斉 (NICT) ・ Mary E. Porter (Univ. Minnesota) ・ 大岩和弘 ・ Winfield S. Sale (Emory Univ.) : Distinct roles of 1alpha and 1beta heavy chains of the inner arm dynein I1 of Chlamydomonas flagella. *Molecular Biology of the Cell*, 22, 342-53, 2011
- I-2 Tandis Movassagh (スイス連邦工科大学) ・ Khanh Huy Bui (スイス連邦工科大学) ・ 榎原 斉 (NICT) ・ 大岩和弘 ・ 石川 尚 (スイス連邦工科大学) : Nucleotide-induced global conformational changes of flagellar dynein arms revealed by in situ analysis, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2010.5, Vol.1832, P1-8
- I-3 榎原 斉 (NICT) ・ 大岩和弘 : 繊毛鞭毛の構造と運動機構、 *Therapeutic Research* 2010年 vol. 31 No.8 P.1104-1108 、 2010
- I-4 清水洋輔(NICT) ・ 吉雄麻喜(NICT) ・ 伊藤恭平 (長岡技術科学大学) ・ Pinfen Yang (Marquette 大学) ・ 小嶋寛明(NICT) ・ 大岩和弘 ・ 榎原 斉(NICT) : Radial spokes の head-tail ジョイントはそのフレキシビリティに方向依存性を持つ、鞭毛・ダイニン機能研究会 (東京大学) 、 2010
- I-5 山本大輔 (金沢大学) ・ 宮城 篤 (金沢大学) ・ 大岩和弘 ・ 安藤敏夫 (金沢大学) ・ 榎原 斉(NICT) : 高速 AFM によりクラミドモナス内腕ダイニン C を「解剖」する、 第 5 回鞭毛ダイニン研究会 (東京大学) 、 2010
- I-6 西浦昌哉(NICT) ・ 岩本裕之(SPring-8 ・ JASRI) ・ 小嶋寛明(NICT) ・ 大岩和弘 : マイクロビーム X 線回折による単一の鞭毛軸糸の構造解析、 生体運動研究合同班会議 (大阪市立大)、 2011
- I-7 山本大輔 (金沢大学) ・ 宮城 篤 (金沢大学) ・ 大岩和弘 ・ 安藤敏夫 (金沢大学) ・ 榎原 斉(NICT) : Nano-dissection of inner-arm dynein-c by high-speed AFM、 第 14 回 クラミドモナス細胞と分子生物学国際会議 (Wheaton College, Norton, MA, USA)、 2010
- I-8 大岩和弘 : 軸糸ダイニンの構造と機能 運動性繊毛の構造と運動機構 —ダイニンの構造・機能解析を中心に—、 第 9 回肺サーファクタント分子病態研究会 (札幌医科大学記念ホール)、 2010
- I-9 清水洋輔(NICT) ・ 榎原 斉(NICT) ・ 小嶋寛明(NICT) ・ 大岩和弘 : Highly purified inner-arm dynein e from Chlamydomonas reinhardtii studied with in vitro motility assay、 第 48 会生物物理学学会年会 (東北大学)、 2010
- I-10 山本大輔 (金沢大学) ・ 宮城 篤 (金沢大学) ・ 大岩和弘 ・ 安藤敏夫 (金沢大学) ・ 榎原 斉(NICT) : 高速 AFM によるクラミドモナスダイニン C 頭部のナノ領域解剖、 日本生物物理学学会第 48 回

- 年会 (東北大学)、 2010
- I-11 西浦昌哉(NICT)・岩本裕之(Spring-8・JASRI)・小嶋寛明(NICT)・大岩和弘：マイクロビーム X 線回折による真核生物単一鞭毛軸系の構造解析、日本生物物理学会年会(東北大学)、2010
- I-12 山本大輔(金沢大学)・宮城 篤(金沢大学)・大岩和弘・安藤敏夫(金沢大学)・榊原 斉 (NICT)：Nano-dissection of the head of *Chlamydomonas* dynein-c using high-speed AFM, 米国細胞生物学会第 50 回年会 (Philadelphia Convention Center, Philadelphia, US)、 2010
- I-13 榊原 斉 (NICT)：電子顕微鏡及び AFM による、タンパク質モーター、“ダイニン”、分子形態変化のイメージング、 International Symposium on Bioimaging and Surface Science (Center for Advanced Science & Technology HYOGO)、 2011
- I-14 清水洋輔 (NICT)・榊原 斉 (NICT)・小嶋寛明 (NICT)・大岩和弘：Highly purified inner-arm dynein e from *Chlamydomonas reinhardtii* studied with in vitro motility assay, Biophysical Society 55th Annual Meeting (Baltimore, US)、 2011
- I-15 大岩和弘：Structural and mechanical basis for coordinated activities of dyneins of *Chlamydomonas* flagella, 8th International Weber Symposium (Lihue, US)、 2011
- II-1 山田 章(NICT)・田守正樹(東京工業大学)・池谷知昭(東京工業大学)・大岩和弘・本川達雄(東京工業大学)：A novel stiffening factor inducing the stiffest state of holothurian catch connective tissue., *Journal of Experimental Biology*, 213, 3416-3422, 2010
- II-2 山田 章(NICT)・吉雄麻喜(NICT)・小嶋寛明(NICT)：二枚貝以外の「キャッチ機構」、生体運動研究合同班会議(中央大学)、2010
- II-3 山田 章(NICT)・吉雄麻喜(NICT)・小嶋寛明(NICT)：二枚貝以外の軟体動物のキャッチ機構、日本生物物理学会第 48 回年会 (東北大学)、2010
- II-4 山田 章(NICT)・吉雄麻喜(NICT)・小嶋寛明(NICT)：軟体動物主要綱の「キャッチ機構」、生体運動研究合同班会議 (大阪市立大)、2011
- III-1 Katayama, T. (群馬大学), Watanabe, M. (群馬大学), Tanaka, H. (群馬大学), Hino, M. (群馬大学), Miyakawa, T. (群馬大学), Ohki, T. (群馬大学), Ye, L. H., (群馬大学) Xie, C. (群馬大学), Yoshikawa, S. (群馬大学), Nakamura, A. (群馬大学), Ishikawa, R. (群馬大学), Tanokura, M. (東京大学), Oiwa, K. & Kohama, K. (群馬大学)：Stimulatory effects of arachidonic acid on myosin ATPase activity and contraction of smooth muscle via myosin motor domain. *American Journal of Physiology and Heart Circulation Physiology*, 298, H505-14. 2010.
- II-2 小嶋寛明(NICT)：生体分子のナノスケール顕微測定と制御、第 14 回 N2RC 拠点セミナー「最先端ナノ光科学による異分野融合と次世代技術の創出」(大阪府立大学中百舌鳥キャンパス)、2010
- III-3 古田健也(NICT)・小嶋寛明(NICT)：相対するモータータンパク質同士の分子綱引き、日本生物物理学会 (東北大学)、2010

- III-4 小嶋寛明(NICT)・古田健也(NICT)・松川忠司(NICT)・大岩和弘：生体分子配置制御による構成的機能構築、第20回Σ産学交流会、第5回KARC-Σ連携セミナー(情報通信研究機構神戸研究所)、2010
- III-5 小嶋寛明(NICT)：生体分子のナノスケール測定と制御 人工知能学会 分子生物情報研究会(SIG-MBI)およびKARCコロキウム(共催)(情報通信研究機構神戸研究所)、2010
- III-6 小嶋寛明(NICT)：タンパク質モーターのナノ計測と制御、第1回先端ナノバイオフィオーラム(兵庫県立大学 高度産業科学技術研究所)、2010
- III-7 小嶋寛明(NICT)：生物に学ぶ分子通信技術、生体分子ナノマシンのデバイス化、nanotech2010(東京ビックサイト)、2010
- III-8 古田健也(NICT)・豊島陽子(東京大学)・小嶋寛明(NICT)・大岩和弘：Reconstitution of collective transport by defined numbers of kinesin-1 and kinesin-14, two opposing motor proteins, The Biophysical Society, 55th Annual Meeting(Baltimore Convention Center, Baltimore, Maryland)、2011
- IV-1 平林美樹(NICT)・小嶋寛明(NICT)・大岩和弘：生体分子を用いたソフトウェア、ハードウェア一体型計算システムの暗号化処理への応用、計測自動制御学会 SSI2009 特集 一次世代のシステム知を拓くシステムー、情報技術 Vol.46 No.11 730-732、2010
- VI-2 Takatsuki, H., Rice, K. M., Asano, S., Day, B. S., Hino, M., Oiwa, K., Ishikawa, R., Hiratsuka, Y., Uyeda, T. Q., Kohama, K. & Blough, E. R., Utilization of myosin and actin bundles for the transport of molecular cargo. *Small*, 6, 452-7、2010.
- IV-3 平林美樹(NICT)：ユビキタスセンサーネットワークと分子通信ナノロボット -Toward Interspecies Communication in Bacteria and More- , 分子ロボティクス研究会(東工大)、2010
- IV-4 小嶋寛明(NICT)・古田健也(NICT)・平林美樹(NICT)・田中秀吉(NICT)・大岩和弘：生体分子配置制御による構成的機能構築、ナノ学会 第8回大会(自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター)、2010
- IV-5 平林美樹(NICT)：DNA-Based Integrated Hardware and Software Solutions for Unconventional Computing -Toward the Realization of a Molecular-Communication Robot- , 9th International Conference on Unconventional Computation Satellite Workshops, DNA Nanotechnology toward Molecular Robotics (東京大学)、2010
- IV-6 平林美樹(NICT)・小嶋寛明(NICT)・大岩和弘・大橋弘忠(東京大学)：リスク回避行動における戦略的な意思決定のメタヒューリスティックな特性に関する解析 一次世代型コミュニケーションのデザインに向けて一、日本神経科学会(神戸コンベンションセンター)、2010
- IV-7 平林美樹(NICT)・西川明男(法政大学)・田中文昭(東京大学)・萩谷昌巳(東京大学)・小嶋寛明(NICT)・大岩和弘：次世代情報セキュリティに向けたDNA論理計算のためのタイルシークエンシングの実装、The IEEE Fifth International Conference on Bio-Inspired Computing: Theories and Applications (BIC-TA 2010), (Liverpool Hope University, Liverpool, United Kingdom)、2010

- IV-8 平林美樹(NICT)・西川明男(法政大学)・田中文昭(東京大学)・萩谷昌巳(東京大学)・小嶋寛明(NICT)・大岩和弘: DNAモチーフによる転写前制御における分子機構の解析、第37回国際核酸化学シンポジウム(はまぎんホール、ヴィアマーレ横浜、みなとみらい)、2010
- IV-9 平林美樹(NICT)・西川明男(法政大学)・田中文昭(東京大学)・萩谷昌巳(東京大学)・小嶋寛明(NICT)・大岩和弘: DNAモチーフによる転写前制御における分子機構の解析、第37回国際核酸化学シンポジウム(はまぎんホール、ヴィアマーレ横浜、みなとみらい)、2010
- IV-10 平林美樹(NICT)・西川明男(法政大学)・田中文昭(東京大学)・萩谷昌巳(東京大学)・小嶋寛明(NICT)・大岩和弘: 分子通信機能を持つDNAロボットを用いたユビキタスセンサーネットワークの構築、第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学大会合同大会(神戸ポートアイランド)、2010
- IV-11 平林美樹(NICT)・西川明男(法政大学)・田中文昭(東京大学)・萩谷昌巳(東京大学)・小嶋寛明(NICT)・大岩和弘: DNA-based Crosstalk Nanorobot Mimicking Amoeba Type of Slime Funguses、IEEE NANO 2010 (KINTEX, Seoul, Korea)、2010
- IV-12 平林美樹(NICT): DNAナノ構造体を用いたインテリジェントシステムのAFM画像解析、北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科 技術セミナー(北陸先端科学技術大学院大学)、2011

科学研究費補助金等

平成19年度グローバルCOEプログラム(平成19年~23年度) 拠点番号:A12

研究課題 ピコバイオロジー: 原子レベルの生命科学

拠点リーダー 吉川信也