

I 鞭毛軸糸と軸糸ダイニンの構造と運動機構の解明

Molecular Structure and Mechanism of Flagellar Axonemes and Axonemal Dyneins

榊原 斉・清水洋輔・西浦昌哉・小嶋寛明・大岩和弘
Sakakibara, H., Shimizu Y., Nishiura, M., Kojima, H., 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。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分子レベルでの計測を行ない、ダイニンの運動機構と協働性を解析している。これまでに、*Chlamydomonas* の鞭毛を材料として、この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機能を持つ事を明らかにした。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きた。また、生理学的条件で構造解析を可能とする X線繊維回折を鞭毛に適用する実験系を開発、これを用いて生理学的条件下での軸糸構成要素の構造周期を精密に測定することに成功した。これらの成果は、ダイニンと軸糸構造の研究分野において先導的かつ創造的研究であり、著名な国際学術誌に論文が掲載されている。

さらに、ダイニン機能の試験管内再構成実験を発展させた新たな実験系を開発した。これは、再構成実験での微小管の密度を上げることで、ネマティック相互作用としての微小管同士の衝突頻度を上げ、その結果、微小管の持つわずかな運動軌跡のバイアスを、集団として共有させることにある。この結果、メゾスコピックな渦構造の創発を確認した。これは、個々の素過程(微小管同士の衝突)の正確な記述が可能で、かつ集団挙動を観測できる新たな実験系であり、複雑系物理学の理論と実験を結ぶ橋渡しの研究である。

II 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

古田健也・古田茜・小嶋寛明・大岩和弘
Furuta, K., Furuta, A., Kojima, H., Oiwa, K.

タンパク質モーターによる 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、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リアルタイム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。ATP 分子のリボースの水酸基を蛍光色素で標識した蛍光 ATP を合成、タンパク質モーターによる加水分解の反応速度定数を明らかにして、ATP と同程度の基質特性を持つ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。

III 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

田中裕人・平林美樹・小嶋寛明・大岩和弘
Tanaka, H., 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。

IV 軟体動物平滑筋のキャッチ収縮および

棘皮動物のキャッチ組織に関する研究

In Vitro Reconstitution of the ‘Catch’ State of Molluscan Smooth Muscle and Connective Tissue of Echinoderms

山田 章・大岩和弘
Yamada, A., Oiwa, K.

ニ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、ミオシン分子のフィラメント内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、ムラサキガイ前足糸牽引筋から 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。キャッチ機構のほぼ全容が明らかになりつつある。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、棘皮動物の結合組織が示す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。

発表論文 List of Publications

- I-1 Nishiura, M.(NICT), Toba, S.(NICT), Takao, D.(自然科学研究機構), Miyashiro, D.(東京大), Sakakibara, H.(NICT), Matsuo, T.(日本原研), Kamimura, S.(中央大), Oiwa, K., Yagi, N.(JASRI), Iwamoto, H.(JASRI): X-ray diffraction recording from single axonemes of eukaryotic flagella. *Journal of Structural Biology* **178**, 329-337, 2012
- I-2 Mizuno, K.(筑波大), Shiba, K. (筑波大), Okai, M. (東京大), Takahashi, Y. (東京大), Shitaka, Y.(NICT), Oiwa, K., Tanokura, M.(東京大), Inaba, K. (筑波大): Calaxin drives sperm chemotaxis by Ca²⁺-mediated direct modulation of a dynein motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 20497-20502, 2012.

- I-3 Roberts, A.(Harvard大), Malkova, B.(Leeds大), Walker, M.(Leeds大), Sakakibara, H.(NICT), Numata, N.(東京大), Kon, T.(東京大), Ohkura, R.(東京大), Edwards, T.(Leeds大), Knight, P.(Leeds大), Sutoh, K.(東京大), Oiwa, K., Burgess, S.(Leeds大): ATP-driven remodeling of the linker domain in the dynein motor. *Structure* 20, 1670-1680, 2012.
- I-4 Oiwa, K: Mechanism of dynein motility. *In*: Roberts, G. editor. Encyclopedia of Biophysics, vol.1, Dynein Motility: Mechanism. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 558-572, 2013.
- I-5 清水 洋輔(NICT) ・小嶋寛明(NICT) ・大岩和弘 ・榊原 斉(NICT) : In vitro analyses on two adjacent inner-arm dyneins, subspecies e and c, 第 50 回 日本生物物理学会(名古屋大学 東山キャンパス、名古屋、愛知) 、2012
- I-6 榊原 斉(NICT) ・大岩和弘 ・小嶋寛明(NICT) : IC138 リン酸化によるクラミドモナスダイニン-f テールの形態変化、第 50 回 日本生物物理学会 (名古屋大学 東山キャンパス、名古屋、愛知) 、2012
- I-7 榊原 斉(NICT) ・大岩和弘 ・小嶋寛明(NICT) : IC138 リン酸化によるクラミドモナスダイニン-f テールの形態変化、2013 年生体運動合同班会議 (広島大学理学部、東広島、広島) 、2013
- I-8 Sakakibara, H. (NICT), Oiwa, K., Kojima, H.(NICT) : Configuration changes of *Chlamydomonas* dynein-f tail coupled with IC138 phosphorylation, American Society for Cell Biology Annual Meeting (San Francisco, USA), 2012
- I-9 大岩和弘 : 軸糸ダイニンによる微小管滑り運動が創発する巨大な渦構造、第 49 回人工知能学会分子生物情報研究会 (SIG-MBI) (未来 ICT 研究所、神戸、兵庫)、2012
- I-10 大岩和弘 : 軸糸ダイニンによる微小管滑り運動が創発するメゾスコピック 2 次元渦、第 85 回日本生化学会 (福岡国際会議場、博多、福岡)、2012 (Invited)
- I-11 Oiwa, K. : Large-scale vortex lattice emerging from collectively moving microtubules driven by axonemal dynein, 14th International Alpbach Motors (Alpbach, Austria), 2013
- I-12 Oiwa, K. : Large-scale vortex lattice emerging from collectively moving microtubules driven by axonemal dynein, Structural Biology Seminar (National Institute for Medical Research, London, UK), 2013
- I-13 Oiwa, K : Large-scale vortex lattice emerging from collectively moving microtubules driven by axonemal dynein, MPIB Seminar 2013(Max Planck Institute of Biochemistry, Munchen, Germany), 2013

- II-1 Tominaga, M.(理化学研究所), Kojima, H.(NICT), Yokota, E., Nakamori, R.(NICT), Anson, M.(NIMR), Shimmen, T., Oiwa, K.: Calcium-induced mechanical change in the neck domain alters the activity of plant myosin XI. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 30711-30718, 2012.
- II-2 Adachi, K.(早稲田大), Oiwa, K., Yoshida, M.(京産大), Nishizaka, T.(学習院大), Kinoshita, K.(早稲田大): Controlled rotation of the F₁-ATPase reveals differential and continuous binding changes for ATP synthesis. *Nature Communications* **3**, 1022, 2012.
- II-3 Furuta, K.(NICT), Furuta, A.(NICT), Toyoshima, Y.(東京大), Amino, M.(NICT), Oiwa, K., Kojima, H.(NICT): Measuring collective transport by defined numbers of processive and nonprocessive kinesin motors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 501-506, 2013.
- II-4 Nakai, T., Sugano, Y.(東工大), Shoda, M.(東工大), Sakakibara, H.(NICT), Oiwa, K., Tuzi, S., Imai, T.(京都大), Sugiyama, J.(京都大), Takeuchi, M., Yamauchi, D., Mineyuki, Y: Formation of highly twisted ribbons in a carboxymethylcellulase gene-disrupted strain of a cellulose-producing bacterium. *Journal of Bacteriology* **195**, 958-964, 2013.
- II-5 Furuta, K.(NICT), Furuta, A.(NICT), Toyoshima, Y.(東京大), Amino, M.(NICT), Oiwa, K., Kojima, H.(NICT): Measuring collective transport by defined numbers of processive and nonprocessive kinesin motors. *Biophysical Journal* **104**, 383A, 2013
- II-6 Adachi, K.(早稲田大), Oiwa, K., Yoshida, M.(京産大), Kinoshita, K.(早稲田大): Binding changes and associated torque in F₁-ATPase. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1817**, S9-S10, 2012.
- III-1 Hirabayashi, M.(NICT), Kawamata, I.(東京大), Hagiya, M.(東京大), Kojima, H.(NICT), Oiwa, K.: *In Silico* design control of the trade-off balance in robustness and fragility of logical circuits using DNA nanostructures. *12th IEEE Conference on Nanotechnology (IEEE-Nano)*, (Birmingham, United Kingdom), 2012
- III-2 Hirabayashi, M.(NICT), Kinoshita, Y.(長岡技術科学大), Tanaka, S. (NICT), Honda, H. (長岡技術科学大), Kojima, H.(NICT), Oiwa, K., Cellular automata analysis on self-assembly properties in DNA tile computing. *ACRI 2012 Conference (Cellular Automata for Research and Industry)* **7495**, 544. (Santorini, Greece), 2012.
- III-3 Hirabayashi, M.(NICT), Kawamata, I.(東京大), Hagiya, M.(東京大), Kojima, H.(NICT), Oiwa, K.: Control of bio-nanonetworks using solitons. *SSI 2012* (Nagoya, Japan), 2012

- III-4 平林美樹(NICT)・小嶋寛明(NICT)・大岩和弘・大橋弘忠(東京大学)：ヒューリスティックな意思決定において普遍性をもたらす戦略的な記憶形成にかかわる神経回路の役割とそれに基づく行動予測の可能性、第35回日本神経科学大会(名古屋国際会議場、名古屋、愛知)、2012
- III-5 平林美樹(NICT)・川又生吹(東京大学)・萩谷昌己(東京大学), 小嶋寛明(NICT)・大岩和弘：機能性 DNA モチーフのナノネットワークの設計と制御された DNA Breathing の効果、ISNAC2012 第39回国際核酸化学シンポジウム(名古屋大学 豊田講堂、名古屋、愛知)、2012
- III-6 平林美樹(NICT)・川又生吹(東京大学)・萩谷昌己(東京大学)・小嶋寛明(NICT)・大岩和弘：医療応用のための分子マシンの設計、6th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2012) (くにびきメッセ、松江、島根)、2012
- III-7 平林美樹(NICT)・川又生吹(東京大学)・萩谷昌己(東京大学), 小嶋寛明(NICT)・大岩和弘：機能性 DNA モチーフのナノネットワークにおけるコミュニケーションモデリング、第35回日本分子生物学会年会 (福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、博多、福岡)、2012
- III-8 平林美樹(NICT)・川又生吹(東京大学)・萩谷昌己(東京大学)・小嶋寛明(NICT)・大岩和弘：生体分子マシンの総合設計のためのモジュール化アルゴリズムの検証 (広島大学 東広島キャンパス、東広島、広島)、2013

大学院生命理学研究科

博士課程後期	該当なし
博士課程前期	該当なし

科学研究費補助金等

該当なし