

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

桐間惇也・白髪美咲・松田祐佳・榊原 齊・小嶋寛明・大岩和弘
Kirima, J., Shiraga, M., Matsuda, Y., Sakakibara, H., 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である。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一分子レベルでの計測や試験管内再構成実験を行ない、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、e、f が連続的に微小管上を運動する事や、ダイニン亜種 c、e、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、特性の異なるこれらの亜種を混合したときに生じる協働的運動の解析を行い、軸糸内でのダイニン亜種の協働性に関する知見を積み上げている。

ダイニン分子の構造解析では、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。さらに、生理学的条件下での構造解析を可能とする X 線繊維回折法を鞭毛軸糸に適用する実験系を開発、これを用いて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。また、周辺微小管の構造安定化に関わる因子として FAP85 を見出し、これが微小管内壁に結合する MIPs の一つであることを明らかにした。

II 単一分子観察・測定技術によるタンパク質モータの運動機構の解析

Single-molecule enzymology and nanometry of protein motors

指宿良太・古田健也・古田茜・小嶋寛明・大岩和弘
Ibusuki, R., Furuta, K., Furuta, A., Kojima, H., Oiwa, K.

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、さらにその高性能化・高機能化を進めてきた。蛍光 ATP を独自に合成、これを用いて蛍光 ATP の結合・解離と 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てきた。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との組み合わせによって、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、その分子機構に関する新たな知見を得ている。

近年では、DNA の相補的結合を利用してナノメートルスケールの高次構造を設計・構築できる DNA origami 技術を活用、タンパク質モータの集団的挙動を解析する実験系を構築して構造的束縛や数的束縛下でのタンパク質モータが創出する協働性を評価する研究を行った。運動方向の異なるキネシン 1 とキネシン 14 を一本の DNA tube に特定の数を結合させることで、分子間綱引きを行わせる実験系を確立、タンパク質モータの運動特性に新たな知見を見出した他、細胞質ダイニンの運動活性の自己制御機構を明らかにした。細胞質ダイニンの 2 つのモータ領域が密接に結合した状態を取ることによって自己抑制的に運動活性が低下するが、外部からの力が加わるとこの抑制状態は解除されて、再帰的に活性化が進むことを明らかにした。

また、タンパク質モータの運動機能を構成論的に解析する実験系として、細胞質ダイニンの微細管結合部位 (MTBD) をアクチン結合タンパク質と置換することで、アクチンフィラメントを滑走させることができるダイニンを創出、アクチンフィラメントの運動方向も簡易に操作することができることを示した。この結果は、タンパク質モーター一般が方向性のある運動を創出するメカニズムに迫るために重要な知見を与えている。

III 生体分子を用いたバイオ情報処理技術の研究開発

Molecular signal processing technology inspired by cellular and protein functions

田中裕人・東佑一朗・森下達矢・佐川貴志・小嶋寛明・大岩和弘
Tanaka, H., Higashi, Y., Morishita, T., Sagawa, T., 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こと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難しい。そこで生体構成要素のメカニズムの応用が有望なアプローチの一つとなる。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 タンパク質モータとタンパク質フィラメントの相互作用による自己組織的パターン形成

Self-organized pattern formation of protein motors and protein filaments

鳥澤嵩征・目戸綾乃・大岩和弘
Torisawa, T., Medo, A., Oiwa, K.

ダイニンの運動機能の評価法としての試験管内再構成実験を発展させて、自己駆動粒子の集団運動など自己組織的パターン形成のメカニズムを明らかにする試みを行っている。再構成系のガラス表面での微細管密度を上げて微細管同士の衝突頻度を向上させた。軸糸ダイニンで駆動される微細管は、衝突時にネマティック相互作用を示す。この相互作用の結果、直径 400 μm にも及ぶメゾスコピックな渦構造が array 状に形成されることを見出した。数値計算によるシミュレーションから、微細管が示すわずかな運動軌跡のバイアスを、ネマティック相互作用に拠って集団として共有する過程を明らかにした。この実験系は、個々の素過程(微細管同士の衝突)を正確に記述することが可能であり、かつ集団挙動を観測できるもので、複雑系物理学の理論と実験を結ぶ橋渡しの研究と捉えられ、注目されている。また、「回転運動を行う自己駆動粒子による空間パターン創出の実験系」として、単細胞緑藻クラミドモナスの単鞭毛変異体である uni1-1 を様々な細胞密度で遊泳させて、それが創出する時空間パターンを観察した。高細胞密度条件下では、粒子が密になっている領域(クラスター)と疎になっている領域が出現し、さらにクラスターの動的な変形、分裂、集合が観察された。詳細な解析の結果、これらのパターンの素過程が回転運動による近傍粒子の重心運動にあることが明らかとなった。

発表論文 List of Publications

- I-1. J. Kirima, K. Oiwa: Flagellar-associated protein FAP85 is a microtubule inner protein that stabilizes microtubules. *Cell Structure and Function* **43**, 1-14, (2018) DOI: 10.1247/csf.17023 (査読あり)
- I-2. K. Oiwa, H. Sakakibara (NICT), K. Furuta (NICT): Electron microscopy of isolated dynein complexes and the power stroke mechanism. In “Dyneins: Dynein Mechanics, Dysfunction, and Disease”, ed. S. King (2017). ISBN: 9780128094709
- I-3. J. Kirima, H. Kojima (NICT), K. Oiwa: The flagellar associating protein FAP85 of *Chlamydomonas* is one of the inner microtubule proteins. 2017 Annual Meeting of American Society for Cell Biology, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2017
- I-4. M. Shiraga, Y. Matsuda, J. Kirima, K. Oiwa : High-speed atomic force microscopic observations on demembrated *Chlamydomonas* axoneme and dynein arms. The 62nd Annual Meeting of Biophysical Society, San Francisco, California, USA, 2018
- I-5. M. Shiraga, Y. Matsuda, J. Kirima, K. Oiwa: Repetitive buckling of microtubules driven by dynein arms reconstituted on singlet microtubules, 第 55 回日本生物物理学会 年会, 熊本大学, 熊本, 2017
- I-6. M. Shiraga, Y. Matsuda, J. Kirima, K. Oiwa : Repetitive buckling of microtubules driven by axonemal dynein arrays reconstituted on a microtubule, , Annual Meeting of American Society for Cell Biology, 2017.12.5-8, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2017
- I-7. K. Oiwa, M. Shiraga, J. Kirima, H. Iwamoto (JASRI): Structural responses of *Chlamydomonas* flagellar axonemes to Ca^{2+} studied with X-ray fiber diffraction. 第 55 回日本生物物理学会 年会, 熊本大学, 熊本, 2017
- I-8. 大岩 和弘: 微小針・軸糸・軸糸ダイニン, 真行寺先生ご退職記念ミニシンポジウム, 東京大学理学部, 東京, 2018
- I-9. K. Oiwa: Helical arrangement of axonemal components is a key for determination and Ca^{2+} -dependent switching of waveforms of *Chlamydomonas* flagella. International Workshop Dynein 2017, 淡路夢舞台国際会議場, 淡路市, 2017
- I-10. J. Kirima, H. Kojima (NICT), K. Oiwa: Flagellar-associated protein in *Chlamydomonas* flagella,, FAP85 is one of the microtubule inner proteins (MIPs). 第 55 回日本生物物理学会 年会, 熊本大学, 熊本, 2017
- I-11. 榊原 斉(NICT): The CTF correction of negative-staining electron micrographs by using the CTF extracted from the background image. 第 55 回日本生物物理学会年会, 熊本大学, 熊本, 2017
- I-12. H. Sakakibara (NICT): The CTF correction of negative-staining electron micrographs of dyneins by using background image. International Workshop Dynein2017, 淡路夢舞台国際会議場, 淡路市, 2017
- I-13. M. Kikumoto (Nagoya Univ), R. Nakamori (NICT), H. Kojima (NICT), H. Sakakibara (NICT): The contribution of electrostatic interactions to the processivity of inner-arm dynein c. The 62nd Annual Meeting of Biophysical Society, San Francisco, California, USA, 2018
- II-1. A. Furuta (NICT), M. Amino (NICT), M. Yoshio (NICT), K. Oiwa, H. Kojima (NICT), K. Furuta (NICT): Creating biomolecular motors based on dynein and actin-binding proteins. *Nature nanotechnology* **12**, 233 (2017). DOI:10.1038/nnano.2016.238
- II-2. E.B. Krementsova (Univ.Vermont), K. Furuta (NICT), K. Oiwa, K.M. Trybus (Univ.Vermont), M.Y. Ali (Univ.Vermont): Small teams of myosin Vc motors coordinate their stepping for efficient cargo transport on actin bundles. *Journal of Biological Chemistry*, **M117**. 780791 (2017). DOI: 10.1074/jbc.M117.780791(査読あり)
- II-3. K. Furuta (NICT), A. Furuta (NICT) : Re-engineering of protein motors to understand mechanisms biasing random motion and generating collective dynamics. *Current Opinion in Biotechnology*, **51**, 39-46 (2017) DOI: 10.1016/j.copbio.2017.11.009 (査読あり)

- II-4. S. Toba (NICT), M. Jin (Osaka City Univ), M. Yamada (Osaka City Univ), K. Kumamoto (Osaka City Univ), S. Matsumoto (Osaka City Univ), T. Yasunaga (Kyushu Inst. Technol), Y. Fukunaga, A. Miyazawa, S. Fujita(NIST), K. Itoh (Kyoto Prefect.Univ), S. Fushiki(Kyoto Prefect. Univ), H. Kojima(NICT), H. Wanibuchi (Osaka City Univ), Y. Arai (Osaka Univ), T. Nagai (Osaka Univ), S. Hirotsune (Osaka City Univ) : Alpha-synuclein facilitates to form short unconventional microtubules that have a unique function in the axonal transport, *Scientific Reports*, **7**, 16386 (2017)
DOI:10.1038/s41598-017-15575-3 (査読あり)
- II-5. K. Taikopaul (Kyoto Univ), K. Sasakura (Kyoto Univ), K. Furuta (NICT), K. Oiwa, H. Shintaku (Kyoto Univ), H. Kotera (Kyoto Univ), R. Yokokawa (Kyoto Univ): Integration of Au nano-pillars and SAM enables protein patterning with designed spacing at single molecule level. 17th IEEE International Conference on Nanotechnology, Pittsburgh, USA, 2017
- II-6. Kaneko Taikopaul(京都大学), 大庭 将太郎(京都大学), 古田 健也(NICT), 大岩 和弘, 新宅 博文(京都大学), 小寺 秀俊(京都大学), 横川 隆司(京都大学) : 分子パターンニングを用いたキネシンの協働性の評価, 分子パターンニングを用いたキネシンの協働性の評価, 第 34 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム論文集, 広島国際会議場, 広島, 2017
- II-7. S. Toba (NICT), M. Jin (Osaka City Univ), M. Yamada (Osaka City Univ), K. Kumamoto (Osaka City Univ), S. Matsumoto (Osaka City Univ), T. Yasunaga (Kyushu Inst. Technol), Y. Fukunaga, A. Miyazawa, S. Fujita(NIST), K. Itoh (Kyoto Prefect.Univ), S. Fushiki (Kyoto Prefect. Univ), H. Kojima(NICT), H. Wanibuchi (Osaka City Univ), Y. Arai (Osaka Univ), T. Nagai (Osaka Univ), S. Hirotsune (Osaka City Univ) : Alpha-synuclein binds unconventional microtubules that have a unique function, 第 55 回日本生物物理学会年会, 熊本大学, 熊本, 2017
- II-8. 指宿 良太, 大岩 和弘, 古田 茜 (NICT), 古田健也 (NICT): 新しいタンパク質モーターを創り運動メカニズムについて考える, 2018 年 生体運動研究合同班会議, 法政大学市谷キャンパス, 東京, 2018
- II-9. 古田 健也 (NICT): Designing a biomolecular motor that directly drives unidirectional movement of synthetic DNA nanotubes, 日本蛋白質科学会年会, 仙台国際センター, 仙台, 2017
- II-10. 古田 健也 (NICT): Designing a biomolecular motor that directly drives unidirectional movement of synthetic DNA nanotubes, 第 7 回分子モーター討論会, 東京大学本郷キャンパス, 東京, 2017
- II-11. K. Furuta (NICT): Engineering dynein to move along different tracks: to understand the mechanisms generating directional movement. International Workshop Dynein2017, 淡路夢舞台国際会議場, 淡路市, 2017
- II-12. R. Ibusuki, K. Oiwa, H. Kojima (NICT), A. Furuta (NICT), K. Furuta (NICT): Creating protein-based molecular motors that move along DNA nanotubes. The 62nd Annual Meeting of Biophysical Society, San Francisco, California., USA, 2018
- III-1. T. Sagawa (NICT), R. Mashiko (Nagaoka Univ. Technol.), Y. Yokota (NICT), Y. Naruse (NICT), M. Okada (Univ. Tokyo), H. Kojima(NICT): Logistic regression of ligands of chemotaxis receptors offers clues about their recognition by bacteria, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **5**, 88 (2018) DOI:10.3389/fbioe.2017.00088
- III-2. 田中 裕人(NICT), 小嶋 寛明(NICT): 生きた細胞で化学物質を識別する, 応用物理学会 有機分子・バイオエレクトロニクス分科会 3 月研究会, **29**, 16 - 19, (2017)
- III-3. 田中 裕人 (NICT), 数田 恭章 (NICT): Construction of aqueous solution discrimination method based on analysis of bacterial chemotactic response. バクテリア走化性応答の解析に基づく水溶液識別法の構築, 第 55 回日本生物物理学会年会, 熊本大学, 熊本, 2017

大学院生命理学研究科

ピコバイオロジー専攻博士課程

桐間惇也 : Reconstitution of structure and functions of an eukaryotic flagellum with bottom-up strategies

博士課程後期

指宿良太：構成論的手法によるタンパク質モーターの運動メカニズムの探求

博士課程前期

白髪美咲：構成論的手法を用いた鞭毛運動の必須要素の特定

東佑一朗：ウェアラブル脳波計を用いた実環境での脳波計測

学部4年生

松田 祐佳：*Chlamydomonas* のゲノム編集のためのビジュアルスクリーニング系の確立

目戸 綾乃：自己駆動回転粒子の集団運動による空間パターン

森下 達矢：細胞内分子進化によるべん毛モーターの機能改変

科学研究費補助金等

1 CREST 戦略的創造研究推進事業（平成25年度～平成30年度）研究分担者

「生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出」研究領域

研究課題名 細胞間接着・骨格の秩序形成メカニズムの解明と上皮バリア操作技術の開発

研究代表者 月田早智子（大阪大学大学院）

2 科学研究費補助金（平成29年度～平成31年度）基盤研究(C) 課題番号 17K07376

研究課題名 軸糸ダイニンの構造ダイナミクスと協働性

研究代表者 大岩和弘（兵庫県立大学、情報通信研究機構）