

I 軸系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・鳥羽 栞・志鷹裕司・大岩和弘
Sakakibara, H., Kojima, H., Toba, S., Shitaka, Y., Oiwa.

軸系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電子顕微鏡解析や X 線小角散乱、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力学計測を行ない、ダイニンの運動機構と協同性を解析している。我々は、鞭毛軸系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を示し、ダイニン亜種 c、f が他の典型的なタンパク質モーター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、ネガティブ染色法を用いた電子顕微鏡観察と単粒子解析、X 線溶液散乱解析によって、ヌクレオチド状態による内腕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作業仮説を提唱している。また、クライオ電子線トモグラフィー技術や X 線回折技術によって鞭毛軸系、特にダイニン腕の 3 次元構造を明らかにした。さらに、ヌクレオチド状態におけるダイニンの構造変化の検出を進めている。

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イ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、ムラサキイ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。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している。

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・志鷹裕司・鳥羽 栞
Oiwa, K., Kojima, H., Shitaka, Y., Toba, S.

ミオシン、ダイニンによる 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、単一蛍光分子の位置を光学顕微鏡によってナノメートルの精度で計測するシス
テム (FIONA) を構築して、ダイニン分子の微小管上での運動様式について検討を行なっている。
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。

発表論文 List of Publications

- I-1 K. H. Bui(ETH Zurich), H. Sakakibara(NICT), T. Movassagh(ETH Zurich), K. Oiwa, T. Ishikawa(ETH Zurich) : Molecular architecture of inner dynein arms *in situ* in *Chlamydomonas reinhardtii* flagella, *Journal of Cell Biology* 183, 923-932 (2008)
- I-2 K. Oiwa, H. Kojima(NICT) : "Force-generating mechanisms of dynein revealed through single molecule studies" in *Single Molecule Biology*, Chapter 3, Academic Press, London, UK. (Ed. A. E. Knight), 61-105 (2008)
- I-3 鳥羽 栞(NICT)・榊原 斉(NICT)・志鷹裕司(NICT)・小嶋寛明(NICT)・大岩和弘 : ヘテロ2量体である鞭毛内腕ダイニン亜種 f の運動特性, 特定領域「生体ナノシステム」下田ダイニン分子研究会 (筑波大学)、2008

- I-4 K. Oiwa : Conformational changes of dynein arms *in situ* studied using X-ray diffractions of *Chlamydomonas* flagellar axonemes, Gordon Research Conference, Muscle & Molecular Motors (米国、ボストン), 2008
- I-5 大岩和弘:タンパク質モーター・ダイニンの構造と運動発生機構, 筑波大学細胞生物学セミナー (筑波大学)、 2008
- I-6 大岩和弘:タンパク質モーターを用いたナノメートル・マイクロメートルサイズの機能素子、第174委員会第26回研究会(京都)、2008
- I-7 大岩和弘:脳や生き物の情報処理・通信機能に学ぶ-バイオ ICT グループの研究開発、ITU ジャーナル 38, 12-16、(2008)
- I-8 鳥羽 栞(NICT)・榊原 斉(NICT)・小嶋 寛明(NICT)・大岩 和弘: Mechanical and enzymatic properties of the heterodimeric axonemal dynein-f, 2nd International Symposium on Bio-nanosystems (東京大学) 2008
- I-9 H. Sakakibara(NICT), T. Ishikawa(ETH Zurich), K. Oiwa : Variety in structures of inner arm dyneins in *Chlamydomonas* axonemes, ERATO ワークショップ、アクチンフィラメント: 構造からメカニズムへ、(名古屋大学) 2008
- I-10 H. Kojima(NICT), A. Kayasuga(NICT), K. Oiwa : Laser trap nanometry with non-spherical shaped probe, 日本生物物理学会(福岡), 2008
- I-11 S. Toba(NICT), L. A. Fox (Emory Univ.), H. Sakakibara(NICT), M. E. Porter(Univ. Minnesota), K. Oiwa, W. S. Sale(Emory Univ.) : Distinct roles of 1 α and 1 β heavy chains of the inner arm dynein II of *Chlamydomonas* flagella, 日本生物物理学会第46回年会(福岡)、2008
- I-12 鳥羽 栞(NICT): 活性の異なる2つのモーター部を持つ軸糸ダイニン f の運動特性から鞭毛内機能を探る, 第5回 生命・情報セミナー タンパク質 2 分子計測ワークショップ (東京大学), 2008
- I-13 H. Sakakibara(NICT), S. Toba(NICT), H. Iwamoto(JASRI), K. Oiwa : Helical Rearrangement of the axonemal components in *Chlamydomonas* flagella coupled with Ca²⁺ concentrations revealed by X-ray fiber diffractions ,The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting (San Francisco), 2008
- I-14 S. Toba(NICT), L. A. Fox(Emory Univ.), H. Sakakibara(NICT), M. E. Porter(Univ. Minnesota), W. S. Sale(Emory Univ.), K. Oiwa : Distinct roles of 1 α and 1 β Heavy Chains of the II Inner Arm Dynein of *Chlamydomonas* Flagella, 48th The American Society for Cell Biology Annual Meeting (San Francisco), 2008
- I-15 鳥羽 栞(NICT)・榊原 斉(NICT)・小嶋 寛明(NICT)・大岩和弘: 活性の異なる2つのモーター部を持つ軸糸ダイニン f の運動特性、2009 年生体運動研究合同班会議(東京大学)、2009
- II-1 田場登志希(九州大学)・枝松正樹(東京大学)・鳥羽 栞(NICT)・Shibata Keitaro(東京大学)・今福泰浩(九州大学)・豊島陽子(東京大学)・太和田勝久(九州大学)・山田 章(NICT) : Direction and speed of microtubule movements driven by kinesin motors arranged on catchin thick filaments, Cell Motility and The Cytoskeleton 65, 816-826, (2008)
- II-2 池谷知昭(東工大)・山田 章(NICT)・田守正樹(東工大)・大岩和弘・本川達雄(東工大) : ナ

マコのキャッチ結合組織に働く新規硬化因子、日本動物学会 第 79 回大会 (福岡大学)、 2008

- II-3 平林美樹(NICT)・大岩 和弘：クロストークネットワーク実現のための二成分情報伝達系の再構築、日本分子生物学会 (神戸)、 2008
- III-1 T. Masaike(学習院大学), F. Koyama-Horibe(学習院大学), K. Oiwa, M. Yoshida(東京工業大学), T. Nishizaka(JST) : Cooperative three-step motions in catalytic subunits of F1-ATPase correlate with 80° and 40° substep rotations, Nature Structural & Molecular Biology 15, 1326-1333, (2008)
- III-2 K. Oiwa: Development of bio-nano-devices based on protein motors'function, The 5th International Symposium on Organic Molecular Electronics (兵庫県立大学), 2008
- III-3 K. Oiwa : Fluorescence based single molecule imaging and nanometry on axonemal dyneins, 7th International Weber Symposium (米国 Kauai), 2008
- III-4 J. Q. Liu(NICT), K. Oiwa : A dynamical network model inspired by molecular motors “The 9th International Conference on Systems Biology (Sweden) 2008”
- III-5 K.Oiwa, H. Kojima(NICT) : Molecular Motors: Keep on moving, Nature Nanotechnology, 3, 531-532, (2008)
- III-6 大岩和弘:ナノ・バイオ ICT 研究が拓く未来の情報通信、第 4 回 産学官連携セミナー (大阪)、 2008
- III-7 大岩和弘：生物に学ぶナノメートルスケールの情報処理・伝達システムー分子通信技術の研究開発の現状ー、電子情報通信学会 2008 ソサイエティ大会チュートリアル (明治大学)、 2008

科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金(平成 16～20 年度) 特定領域研究 課題番号：16083207
研究課題 ダイニン・ナノシステムの運動と制御の分子メカニズム
研究代表者 大岩和弘
- 2 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