

### 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・金谷直樹・榊原 斉・清水洋輔・小嶋寛明・大岩和弘  
Kirima, J., Kanatani, N., Sakakibara, H., Shimizu Y., 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。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。個々の素過程(微小管同士の衝突)の正確な記述が可能であり、かつ集団挙動を観測できる新たな実験系として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ている。

## 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

渡利洋平・古田健也・古田茜・小嶋寛明・大岩和弘  
Watari, Y., 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ってきた。このシステムでは、背景迷光が極限的に除去された結果、溶液中の単一蛍光分子をリアルタイムで観察することが可能となり、単一蛍光分子のタンパク質上での配向を約 5 度の精度で決定できる。ATP の特性を損なうことなく蛍光色素で標識した蛍光 ATP を合成して、これを用いて蛍光 ATP の結合・解離と F<sub>1</sub>-ATPase の回転運動とを同時計測することに成功、F<sub>1</sub>-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。

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 技術を活用して、タンパク質モーター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ーが創出する協働性を評価する研究を開始しており、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してタンパク質モーターの運動特性に新たな知見を見出している。

## 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・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

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.

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行い、この分子機構の解明を進めた。

#### 発表論文 List of Publications

- I-1 Oiwa, K. : Large-scale vortex lattice of dynein-driven microtubules induced by local interactions, CTEAM13 (Max-Planck-Institute, Dresden, Germany), 2013, (Invited Talk)
- I-2 永井 健(東京大)・住野 豊(愛知教育大)・大岩 和弘: ダイニンに駆動された微小管の集団運動、生物物理 53、149-152、2013
- I-3 Kanatani, N.(NICT)・Watari, Y. (NICT)・Furuta K.(NICT)・Kojima, H.(NICT)・Oiwa, K. :

- Dynamic Alignment of Microtubules Driven by Inner Arm Dynein g, Dynein 2013 international workshop (オルビスホール、神戸ファッション美術館 (神戸市))、 2013
- I-4 Nishiura, M.(NICT) ・ Toba, S (大阪市立大) ・ Takao D. (自然科学研究機構) ・ Miyashiro D. (東京大) ・ Sakakibara, H. (NICT) ・ Matsuo, T. (日本原子力研究開発機構) ・ Kamimura, S. (中央大) ・ Oiwa, K. ・ Yagi, N. (JASRI) ・ Iwamoto, H.(JASRI) : X-ray diffraction recording from complete single eukaryotic flagella axonemes, Dynein 2013 international workshop (オルビスホール、神戸ファッション美術館 (神戸市))、 2013
- I-5 Shimizu, Y. (NICT) ・ Sakakibara, H. (NICT) ・ Kojima, H. (NICT) ・ Oiwa, K. : Dynein e, a slow motor protein with no retardation effects on faster dyneins: implication of indirect cooperation with fast dynein c, Dynein 2013 international workshop (オルビスホール、神戸ファッション美術館 (神戸市))、 2013
- I-6 Shimizu, Y. (NICT) ・ Sakakibara, H. (NICT) ・ Kojima, H. (NICT) ・ Oiwa, K. : Dynein e, a slow motor protein with no retardation effects on faster dyneins: implication of indirect cooperation with fast dynein c, 2013 American Society on Cell Biology Annual Meeting (New Orleans, USA)、 2013
- I-7 Oiwa, K. : Reconstitution of dynamic complexity of an axoneme by the bottom-up strategy、 第1回ピコバイオロジー研究所国際シンポジウム(理研 Spring-8 (佐用町))、 2013 (Invited Talk)
- I-8 Kanatani, N. (NICT) ・ Kojima, H. (NICT) ・ Oiwa, K. : Dynamic alignment of microtubules driven by inner arm dynein g, 第1回ピコバイオロジー研究所国際シンポジウム(理研 Spring-8 (佐用町))、 2013
- I-9 Watari, Y. (NICT) ・ Furuta, K. (NICT) ・ Oiwa, K. ・ Kojima, H. (NICT) : Effects of deformation of a microtubule on motility of microtubule motors, dynein and kinesin、 第1回ピコバイオロジー研究所国際シンポジウム(理研 Spring-8 (佐用町))、 2013
- I-10 Oiwa, K. : Reconstitution of dynamic complexity of an axoneme by the bottom-up strategy、 Biophysical Society 58th Annual Meeting (Moscone Center, San Francisco, US)、 2013、 (Invited Talk)
- I-11 Shimizu, Y. (NICT) ・ Sakakibara, H. (NICT) ・ Kojima, H. (NICT) ・ Oiwa, K. : Slow dynein E with no retardation effects: implication of indirect cooperation with fast Dynein C、 Biophysical Society 58th annual meeting (Moscone Center, San Francisco, US)、 2013
- II-1 Furuta, K. (NICT) ・ Torisawa, T. (NICT) ・ Furuta, A. (NICT) ・ Ichikawa, M (東京大) ・ Saito, H. (東京大) ・ Oiwa, K. ・ Kojima, H. (NICT) ・ Toyoshima, Y.Y. (東京大) : Self-regulation of cytoplasmic dynein、 Dynein 2013 International Workshop (オルビスホール、神戸ファッション美術館 (神戸市))、 2013
- II-2 Furuta, K. (NICT) ・ Torisawa, T. (NICT) ・ Furuta, A. (NICT) ・ Ichikawa, M. (東京大) ・ Saito, H. (東京大) ・ Oiwa, K. ・ Kojima, H. (NICT) ・ Toyoshima Y. (東京大) : Self-regulation of cytoplasmic dynein、 2013 American Society on Cell Biology Annual Meeting (New Orleans, USA)、 2013
- II-3 古田 健也(NICT) ・ 鳥澤 嵩征(NICT) ・ 市川 宗巖(東京大) ・ 古田 茜 (NICT) ・ 斎藤 慧(東京大) ・

大岩 和弘 ・小嶋 寛明(NICT)・豊島 陽子(東京大)：細胞質ダイニンの自己阻害と協同的な活性化、生体運動合同班会議 (千葉大)、2013

- III-1 Hirabayashi, M. (NICT) ・ Kawamata, I. (東京大) ・ Hagiya, M. (東京大学) ・ Kojima, H. (NICT) ・ Oiwa, K. : DNA ナノマシンのためのテラヘルツアプリケーションに関する解析、The 38th International Conference on Infrared, Millimeter and Terahertz Waves IRMMW-THz 2013、(Congress Center Mainz (Rheingoldhalle), Mainz, Germany)、2013
- III-2 Hirabayashi, M. (NICT) ・ Kojima, H. (NICT) ・ Oiwa, K. ・ Ohashi, H. (東京大学) : ノイズを利用した正常化バイアスに対する危険認識増強効果のモデリング、International Symposium on Computational Models for Life Sciences (CMLS-13)、(Auditorium CSIRO Sydney, Australia)、2013
- III-3 平林美樹(NICT) , 小嶋寛明(NICT) , 大岩和弘 , 大橋 弘忠(東京大学) : 確率共鳴を導入した入力情報が危険認識の際のヒューリスティックな意思決定に与える効果のモデリング、第36回日本神経科学大会(国立京都国際会館)、2013
- III-4 平林美樹(NICT) ・ 川又 生吹(東京大) ・ 萩谷 昌己(東京大学) ・ 小嶋 寛明(NICT) ・ 大岩和弘 : DNA ナノ構造がもつ常磁性特性に関する解析、第36回分子生物学会年会、(神戸ポートアイランド (神戸国際会議場) )、2013
- III-5 平林美樹(NICT) , 小嶋寛明(NICT) , 大岩和弘 , 大橋 弘忠(東京大学) : テラヘルツ波による分子マシンシステムのコントロールに向けて—ソリトンを利用したバイオナノネットワークの制御—、計測自動制御学会論文集 SSI2012 特集号第49巻 (2013年11月号 Vol.49 No11. 1082-1084)、2013
- IV-1 Yamada, A. (NICT) ・ Yoshio, M.(NICT) ・ Oiwa, K.: Myosin Mg-ATPase of molluscan muscles is slightly activated by F-actin under catch state *in vitro*. Journal of Muscle Research and Cell Motility 34, 115-123, 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  
ピコバイオロジー専攻博士課程 桐間惇也  
学部4年生 金谷直樹、渡利洋平

## 科学研究費補助金等

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)