

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。

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

渡利洋平・村中智之・古田健也・古田茜・小嶋寛明・大岩和弘
Watari, Y., Muranaka, T., 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。独自に蛍光 ATP を合成して、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し、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開始している。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。ここでは、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。

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・佐川貴志・平林美樹・小嶋寛明・大岩和弘
Tanaka, H., Sagawa, T., 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有望なアプローチの一つといえる。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 タンパク質モーター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-organizing pattern formation of protein motors and protein filaments

鳥澤嵩征・金谷直樹・大岩和弘
Torisawa, T., Kanatani, N., 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小管密度を上げて微小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小管は、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、微小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(微小管同士の衝突)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。

Ⅴ 昆虫の記憶形成神経回路の分子細胞学的解析

Molecular cell biological approaches for studying mechanism of memory formation in insect brains

桜井 晃・小嶋寛明・大岩和弘・吉原基二郎
Sakurai A., Kojima H., Oiwa, K., Yoshihara, M.

神経細胞数約 20 万でありながら、多様な行動を示し、高い記憶形成能力を持つキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の脳は、脳機能の厳密な解析にとって極めて有用な研究対象である。加えて、キイロショウジョウバエは遺伝学の優れた実験材料であり、洗練された遺伝学的ツールが豊富に存在するため、最も高い精度と効率で単一細胞レベルの解像度で神経ネットワークの解析

を行うことができる。このモデル動物を使って、摂食行動を引き起こす神経細胞への入力統合の様式、また、その統合状態の変化による記憶形成を解析、記憶形成を担う神経ネットワークの実態に迫り、記憶形成の基本原則を解明する。記憶形成を直接的に担うシナプスを同定、特定の感覚入力特異的に記憶が形成される過程における可塑的变化をリアルタイムでとらえることを目指している。

発表論文 List of Publications

- I-1 Y. Shimizu(NICT), H. Sakakibara(NICT), H. Kojima(NICT), K. Oiwa: Slow axonemal dynein e facilitates the motility of faster dynein c. *Biophys. J.*, **106**, 2157-2165 (2014)
- I-2 清水 洋輔(NICT)・榊原 斉(NICT)・小嶋 寛明(NICT)・大岩 和弘: Slow axonemal dynein e facilitates the motility of faster dynein c, 第 52 回日本生物物理学会 (札幌), 2014
- I-3 大岩 和弘: 真核生物鞭毛の運動機構解明に向けたボトムアップ的アプローチ、平成 26 年度「分子システム研究」研究報告会 (東京), 2015
- II-1 T. Torisawa(NICT, CREST), M. Ichikawa(Univ. Tokyo), A. Furuta(NICT), H. Saito(Univ. Tokyo), K. Oiwa, H. Kojima(NICT), Y. Y. Toyoshima(Univ. Tokyo): Autoinhibition and cooperative activation mechanisms of cytoplasmic dynein. *Nature Cell Biol.*, **16**, 1118-1124 (2014)
- II-2 R.P. Diensthuber (Med. Hoch. Hannover), M. Tominaga(RIKEN), M. Preller(MHH), F.H. Hartmann(MHH), H. Orii, I. Chizhov(MHH), K. Oiwa, G.Tsiavaliaris(MHH): Kinetic mechanism of *Nicotiana tabacum* myosin-11 defines a new type of a processive motor. *The FASEB J.*, **29**, 81-94 (2015)
- II-3 L.K. Gunther (Wayne State Univ), K. Furuta(NICT), J. Bao (Wayne State Univ), M. Urbanowski (Wayne State Univ), H. Kojima(NICT), H.D. White (Eastern Virginia Med. Sch.), T. Sakamoto (Wayne State Univ): Coupling of two non-processive myosin 5c dimers enables processive stepping along actin filaments, *Scientific Reports*, **4**, 4907 (2014)
- II-4 K. Adachi(Waseda Univ), K. Oiwa, M. Yoshida(Kyoto Sangyo Univ), K. Jr. Kinoshita (Waseda Univ) : Coupling scheme of the rotary motor thermophilic F₁, 第 59 回米国生物物理学会年会 (Baltimore, MD, USA), 2015
- II-5 K. Oiwa: Autoinhibition and cooperative activation mechanisms of cytoplasmic dynein, Gordon Research Conference "Muscle & Molecular Motors" (Mount Snow, VT, USA), 2014 (Invited)
- II-6 K. Oiwa: Auto-regulation mechanism of mammalian cytoplasmic dynein. Pennsylvania Muscle Institute Seminar, University of Pennsylvania (Philadelphia, PA, USA), 2015
- II-7 K. Oiwa: Auto-regulated and cooperative activity of cytoplasmic dynein. Special Biology Seminar, John Hopkins University (Baltimore, MD, USA), 2015
- II-8 鳥澤 嵩征(NICT, CREST)・古田 健也(NICT)・小嶋 寛明(NICT) : Autoinhibition and cooperative activation mechanisms of cytoplasmic dynein 第 52 回日本生物物理学会年会 (札幌), 2014
- II-9 鳥澤 嵩征(NICT, CREST)・豊島陽子(東京大学)・古田 健也(NICT): 細胞質ダイニンの自己制御の機構および協同的な活性化. ライフサイエンス新着論文レビュー <http://first.lifesciencedb.jp/archives/9358> (2014)
- II-10 古田 健也 (NICT): 細胞質ダイニンの協同的な運動機構、第 4 回分子モーター討論会、(大阪)、2014
- II-11 K. Furuta(NICT) : Autoinhibition and cooperative activation mechanisms of cytoplasmic dynein, Gordon Research Conference "Muscle & Molecular Motors", (Mount Snow, VT, USA), 2014
- II-12 古田 健也(NICT)・鳥澤 嵩征(NICT, CREST)・豊島 陽子(東京大学大学院): バイオイメージングと光ピンセットを用いた微小管系モータータンパク質の協働的活性化に関する解析, 生化学 **86**, 184-191 (2014)
- II-13 K. Adachi(Waseda Univ), K. Oiwa, M. Yoshida(Kyoto Sangyo Univ), K. Jr. Kinoshita(Waseda Univ) : Coupling scheme of the rotary motor thermophilic F₁, The 18th IUPAB Congress (Brisbane, Australia), 2014

- III-1 M. Hirabayashi(NICT), S. Kinoshita(NICT), S. Tanaka(NICT), H. Honda(NICT), H. Kojima(NICT), K. Oiwa: Cellular automata approach for characterizing of DNA tile computing. *J. Cellular Automata* **9**. 111-123 (2014)
- III-2 T. Sagawa(NICT), Y. Kikuchi(Univ Tohoku), Y. Inoue(Univ Tohoku), T. Takahashi(Univ Tohoku), T. Muraoka(Univ Tohoku), K. Kanehara(Univ Tohoku), A. Ishijima(Univ Tohoku): Single-cell *E. coli* response to an instantaneously applied chemotactic signal. *Biophys. J.*, **107**, 730 - 739. (2014)
- III-3 M. Hirabayashi(NICT), S. Tanaka(NICT), H. Kojima(NICT): Analysis on breathing dynamics of DNA circuits, Biomedical Circuits and Systems Conference, 2014 IEEE, 288 - 291 (2014) 10.1109/BioCAS.2014.6981719
- III-4 平林 美樹 (NICT) : Observation of phenotypic differences in DNA structures driven by THz waves, 日本赤外線学会第 69 回定例研究会 (神戸)、2014
- III-5 M. Hirabayashi(NICT), J. Hamasaki(NICT), Y. Irimajiri(NICT), T. Sekine(NICT), I. Hosako(NICT), M. Hagiya(東京大学), S. Tanaka(NICT): AFM analysis on THz communications between DNA devices, 20th International Conference on DNA Computing and Molecular Programming (京都), 2014
- III-6 平林 美樹(NICT)・田中 秀吉(NICT)・小嶋 寛明(NICT): *In vivo* control mechanisms of the characteristic vibration in a DNA double strand, 第 37 回日本分子生物学会年会 (横浜)、2014
- III-7 平林 美樹(NICT)・小嶋 寛明(NICT)・大橋 弘忠 (東京大学): Multiscale modeling of neural mechanism of evaluation for control of cognitive bias in communication systems, 第 37 回日本神経科学大会 (横浜)、2014
- III-8 田中 裕人(NICT)・松川 忠司(NICT)・富成 征弘(NICT)・成瀬 康(NICT)・梅原 広明(NICT)・佐川 貴志(NICT)・小嶋 寛明(NICT): 大腸菌回転運動の高効率なビデオ計測系の開発とその応用, 走化性勉強会 (仙台)、2014
- III-9 佐川 貴志 (NICT): 大腸菌の走化性受容体は忌避・誘因刺激を積算する? 走化性勉強会 (仙台)、2014
- III-10 田中 裕人(NICT): Construction and Application of high-throughput video measurement system for rotational motion of *E.coli* 2014 年度べん毛交流会 (三重)、2015
- III-11 佐川 貴志 (NICT): 大腸菌が化学刺激に应答できない時間を計測する. 2014 年度べん毛交流会 (三重)、2015
- III-12 田中 裕人(NICT)・松川 忠司(NICT)・佐川 貴志(NICT)・富成 征弘(NICT)・小嶋 寛明(NICT): Statistical analysis of rotational motion properties of tethered *E. coli* by video measurement, 第 52 回日本生物物理学会年会 (札幌)、2014
- III-13 佐川 貴志(NICT)・田中 裕人(NICT)・松川 忠司(NICT)・曾和 義幸(法政大学)・川岸 郁朗(法政大学)・小嶋 寛明(NICT): Quantitative measurement of the cellular response of *Escherichia coli* using photolysis of the caged chemoattractant., 第 52 回日本生物物理学会年会 (札幌)、2014
- IV-1 N. Kanatani, K. Oiwa: Emergence of large-scale vortices of microtubules collectively driven by axonemal dyneins., 第 59 回米国生物物理学会年会(Baltimore, MD. USA), 2015
- IV-2 大岩 和弘 (NICT): 生体高分子の自己組織化能を用いた機能体の構築、第 4 回バイオテンプレート研究会講演会 (東京)、2014
- IV-3 N. Kanatani(NICT), H. Kojima(NICT), K. Oiwa: *In vitro* dynamic alignment and vortex formation of microtubules driven by axonemal dyneins. 9th Weber Symposium (Luhue, HI, USA), 2014
- V-1 M. Yoshihara (NICT): The *Drosophila* feeding circuit to connect synaptic plasticity to memory., Cold Spring Harbor Laboratory Course, *Drosophila* Neurobiology (Cold Spring Harbor, NY, USA), 2014 (Invited)
- V-2 吉原 基二郎 (NICT): The *Drosophila* feeding circuit to connect synaptic plasticity to memory. 自然科学研究機構生理学研究所・研究会「シナプス・神経ネットワークの機能ダイナミクス」(岡崎), 2014 (Invited)
- V-3 櫻井 晃(NICT)・小嶋 寛明(NICT)・吉原 基二郎(NICT): ショウジョウバエの新規古典的条件付け法と条件付けに伴う摂食コマンドニューロン活動の可塑的变化. 自然科学研究機構生理学

- 研究所・研究会「シナプス・神経ネットワークの機能ダイナミクス」、(岡崎)、2014
- V-4 M. Yoshihara (NICT): The Drosophila feeding circuit to connect synaptic plasticity to memory. 11th International Congress of Neuroethology, (札幌), 2014 (Invited)
- V-5 吉原 基二郎(NICT): The Drosophila feeding circuit to connect synaptic plasticity to memory. 自然科学研究機構 新分野創成センターシンポジウム「生命現象を全体として理解する新しい科学の創成」(岡崎)、2015 (Invited)

大学院生命理学研究科

博士前期課程

金谷直樹：タンパク質モータを用いた集団運動形成メカニズムの研究

渡利洋平：モータ蛋白質の動作原理解明に向けた分子進化的機能再構成

ピコバイオロジー専攻博士課程 2年

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

学部4年生

村中智之：キネシン5の単一分子力学測定

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 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 科学研究費補助金基盤C (平成26年度～平成28年度) 課題番号 26440089
研究課題 自己組織的構成法による真核生物鞭毛の運動機構の解明
研究代表者 大岩和弘 (兵庫県立大学、情報通信研究機構)
- 3 武田科学振興財団 2014年度 生命科学研究助成
研究課題 鞭毛波形成に関わる軸糸ダイニンの協同性創出機構の解明
研究代表者 大岩和弘 (兵庫県立大学、情報通信研究機構)