

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・山野 優・榊原 斉・小嶋寛明・大岩和弘
Kirima, J., Shiraga, M., Yamano, 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ー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ーの運動機構の解析

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、タンパク質モーター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 つのモーター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小管結合部位 (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・佐川貴志・佐藤 花・藤井奈緒・小嶋寛明・大岩和弘
Tanaka, H., Higashi, Y., Sagawa, T., Sato H., Fujii N., 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・大岩和弘
Torisawa, T., 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 $400 \mu\text{m}$ 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。

発表論文 List of Publications

- I-1. S. Toba (NICT), K. Oiwa : X-Ray diffraction patterns from flagellar axonemes of *Chlamydomonas*, SPring8/SACLA Research Frontier 2015, 30-31 (2016)
- I-2. M. Shiraga, J. Kirima, H. Kojima (NICT), K. Oiwa : Reconstitution of eukaryotic flagellar axonemes by the bottom-up strategy. Biophysical Society, 61st Annual Meeting, New Orleans, USA, 2017
- I-3. K. Oiwa : Structure and dynamics of flagellar axonemes studied with synchrotron radiation X-ray diffraction. 87th Meeting of the Zoological Society of Japan, Ginowan, Okinawa, 2016, (Invited).
- I-4. M. Shiraga, J. Kirima, H. Kojima (NICT), K. Oiwa : Reconstitution of eukaryotic flagellar axonemes by the bottom-up strategy. 第 54 回日本生物物理学会年会、つくば国際会議場、つくば市, 2016
- I-5. J. Kirima, M. Shiraga, H. Kojima (NICT), K. Oiwa : Searching a putative protein responsible for switching waveform of *Chlamydomonas* flagella. 第 54 回日本生物物理学会年会、つくば国際会議場、つくば市, 2016
- I-6. J. Kirima, H. Kojima(NICT), K. Oiwa : Characterization of a putative Ca²⁺ binding protein FAP85 of *Chlamydomonas* flagella. The American Society for Cell Biology 2016, Moscone Center,, San Francisco, USA, 2016
- I-7. H. Sakakibara (NICT), Y. Shimizu (NICT), Y. Pinfen, H. Kojima (NICT) : Properties of the purified radial spoke of *Chlamydomonas* flagella. The 28th CDB Meeting. “Cilia and Centrosomes” (繊毛・中心体 国際会議) 理化学研究所, 神戸, 2016
- I-8. H. Sakakibara (NICT), Y. Shimizu (NICT), Y. Pinfen, H. Kojima (NICT) : Properties of the purified radial spoke of *Chlamydomonas* flagella. 第 54 回日本生物物理学会年会、つくば国際会議場、つくば市, 2016
- I-9. H. Sakakibara (NICT), Y. Shimizu (NICT), H. Kojima (NICT) : Properties of the purified radial spokes of *Chlamydomonas* flagella. 第 17 回 クラミドモナス細胞と分子生物学国際会議, 京都国際会館, 京都, 2016
- 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, 233–237, (2017) doi:10.1038/nnano.2016.238 (査読あり)
- II-2. 古田健也 (NICT) : 人為的に設計した新しい生物分子モーターの合成, 日本化学会 第 97 春季年会, 慶應義塾大学, 日吉, 東京, 2017
- II-3. K. Furuta (NICT) : Engineering approaches to molecular motors based on protein building blocks. 第 54 回日本生物物理学会年会、つくば国際会議場、つくば市, 2016
- II-4. A. Furuta (NICT), K. Oiwa, H. Kojima (NICT), K. Furuta (NICT): Engineering novel actin-based molecular motors from the microtubule-based motor dynein. 第 54 回日本生物物理学会年会、つくば国際会議場、つくば市, 2016
- II-5. K. Furuta (NICT): Creating novel biomolecular motors based on dynein and actin-binding proteins. The Engineering Approaches to Biomolecular Motors: From *in vitro* to *in vivo*, Biophysical Society Thematic Meeting, Simon Frasier University, Canada, 2016
- II-6. K. Oiwa, A. Furuta (NICT), T. Torisawa (NICT), H. Kojima (NICT), K. Furuta (NICT), Motility and regulation of dyneins studied by means of the bottom-up strategy. 4th Kanazawa Bio-AFM Workshop 2016, Kanazawa, Ishikawa, 2016 (Invited)

- II-7. K. Furuta (NICT): Creating novel biomolecular motors based on dynein and actin-binding proteins. Gordon Research Conference "Muscle & Molecular Motors", Mount Snow West Dover, VT, USA, 2016
- II-8. K. Furuta (NICT): Creating novel biomolecular motors based on dynein and actin-binding proteins. 分子研研究会「超機能分子の創成：合成、計測、数理が織りなす社会実装分子の戦略的設計と開発」, 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎, 愛知, 2016
- II-9. K. Oiwa: Motility and regulation of dyneins studied by means of the bottom-up strategy. Seminar at Mill Hill Laboratory, The Francis Crick Institute, London, UK, 2016
- III-1. H. Tanaka (NICT), Y. Kazuta(NICT), Y. Sowa (Hosei Univ.), I. Kawagishi (Hosei Univ.), Y. Naruse (NICT), M. Tominari (NICT), M. Okada (Tokyo Univ.), K. Oiwa, H. Kojima (NICT): Quantitative evaluation of chemical recognition of *Escherichia coli* in a data-driven manner. Bacterial Flagella, Injectisomes and Type III Secretion Systems, OIST, Okinawa, 2017
- III-2. 小嶋寛明 (NICT)：細胞を活用した化学物質センシング、日立東大ラボセミナー、日立東大ラボ (東京大学先端科学技術研究センター, 東京, 2017
- III-3. 小嶋寛明 (NICT)：細胞の仕組みを活用した ICT, けいはんな情報通信フェア 2016, けいはんなプラザ、京都, 2016
- III-4. H. Tanaka (NICT), Y. Kazuta (NICT), T. Matsukawa (NICT), Y. Naruse (NICT), M. Tominari (NICT), M. Okada (Tokyo Univ.), Y. Sowa (Hosei Univ.), I. Kawagishi (Hosei Univ.), K. Oiwa, H. Kojima (NICT): *Escherichia coli* identify amino-acid species : unicellular organism's chemical perception revealed by using a data-driven approach, 日本生物物理学会 2016 56, S311 つくば国際会議場, つくば市, 2016
- III-5. H. Sato, N. Fujii, T. Sagawa (NICT), H. Tanaka (NICT), K. Oiwa, H. Kojima (NICT): Modification of ligand specificity in bacterial biosensor with hybrid chemoreceptors. 第54回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場, つくば市, 2016
- III-6. T. Sagawa (NICT), Y. Sowa(Hosei Univ.), Ikuro Kawagishi (Hosei Univ.), K. Oiwa, H. Kojima (NICT) : Simulation of delays in repellent responses of *Escherichia coli* using a conformational spread model. 第54回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場, つくば市, 2016
- III-7. Tanaka, H. (NICT) : An improved understanding of chemical recognition of *E. coli* with a data-driven method. WASEDA International Symposium. Waseda University,, Nishi-Waseda Campus, Tokyo, 2016
- III-8. Y. Higashi, Y. Yokota (NICT), Y. Naruse (NICT) : Evaluation of wearable EEG system with dry electrodes and estimation of error-related negativity. 38th Annual International conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Orlando, FL, USA, 2016
- III-9. 佐川貴志 : 大腸菌の走化性応答の高精度・高時間分解能計測、東北大学工学研究科佐々木研究室セミナー、東北大学工学研究科, 仙台, 2016
- IV-1. T. Torisawa (NICT), D. Taniguchi (Meiji Univ.), S. Ishihara (Meiji Univ.), K. Oiwa : Spontaneous formation of a globally connected contractile network in a microtubule-motor system. *Biophysical Journal* 111, 373-385 (2016) doi:10.1016/j.bpj.2016.06.010 (査読あり)
- IV-2. M. Jin, O. Pomp, T. Shinoda, S. Toba, T. Torisawa, K. Furuta, K. Oiwa, T. Yasunaga, D. Kitagawa, S. Matsumura, T. Miyata, T.T. Tan, B. Reversade, S. Hirotsune : Katanin p80, NuMA and cytoplasmic dynein cooperate to control microtubule dynamics. *Scientific Reports* 7, 39902, (2017) doi:10.1038/srep39902 (査読あり)
- IV-3. K. Oiwa : Soft matters composed of protein motors and microtubules spontaneously generate various types of large-scale active patterns. Colloquium at University of Utah, University of Utah, Salt Lake City, USA, 2016

- IV-4. T. Torisawa (NICT), K. Furuta (NICT), K. Oiwa, H. Kojima (NICT) : Diffusive component in directed movements of cytoplasmic dynein. 第 54 回日本生物物理学学会年会, つくば国際会議場, つくば市, 2016
- IV-5. S. Tanida (Tokyo Univ.), K. Furuta (NICT), K. Nishikawa (Tokyo Univ.), H. Kojima (NICT), M. Sano (Tokyo Univ.) : Configuring Dynamic Patterns of Microtubules Driven by Kinesins. 第 54 回日本生物物理学学会年会, つくば国際会議場, つくば市, 2016
- IV-6. 大岩和弘 : 科学研究費を獲るために 4 - オリンピックから学ぶ科研費獲得のコツ -, H29 年度 科研費獲得講演会, 情報通信研究機構 小金井 東京, 2016
- IV-7. K. Oiwa : Soft matters containing nanometer-scale protein motors and micrometer-scale protein filaments spontaneously generate various types of large-scale active pattern "公益社団法人 日本化学会コロイドおよび界面化学部会 第 67 回コロイドおよび界面化学討論会"旭川 北海道 北海道教育大学旭川校 9/24/2016 2016/9/22-24 国内 (招待講演)
- IV-8. K. Oiwa : Spontaneous formation of a globally connected contractile network in a microtubule-motor system, Gordon Research Conference (Muscle & Molecular Motors) Mount Snow, West Dover, VT, USA, 2016 (Invited)
- IV-9. K. Oiwa : Soft matters containing self-propelled nanometer and micrometer-scale particles spontaneously generate large-scale mechanical network THERMEC'2016: 9th International Conference on Processing & Manufacturing of Advanced Materials, Graz, Austria, 2016 (Invited)

大学院生命理学研究科

ピコバイオロジー専攻博士課程 4 年

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

博士課程前期

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

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

佐藤 花 : 大腸菌走化性受容体のドメイン交換法による特異性の改変

藤井奈緒 : 大腸菌走化性受容体の細胞内分子進化

山野 優 : 高速原子間力顕微鏡による生体高分子複合体の構造解析

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 26 年度~平成 28 年度) 基盤研究(C) 課題番号 26440089
研究課題名 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)