

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

石橋健太・松田祐佳・佐川美咲・榊原 齊・小嶋寛明・大岩和弘
Ishibashi, K., Matsuda, Y., Sagawa, M., 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・松田祐佳・森下達矢・古田健也・古田茜・小嶋寛明・大岩和弘
Ibusuki, R., Matsuda, Y., Morishita, 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。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・坪本理沙・木場有希・小嶋寛明・大岩和弘

Tanaka, H., Tsubomoto, R., Kiba, Y., Kojima, H., Oiwa, K.

生体における情報処理を情報通信技術に活かす取り組み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る。生体構成要素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分子通信技術や、脳波など微弱な生体信号を精度よく効率的に収集する装置の開発などがこの研究に含まれる。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、生体信号や生体情報伝達のメカニズムを明らかにするとともに、生体-マシン間コミュニケーション技術として、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

石橋健太・大岩和弘

Ishibashi, K., 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 にも及ぶメソ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的研究と捉えられ、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。

発表論文 List of Publications

- I-1 Shiraga, M. Kirima, J., Shimizu, Y., Sakakibara, H. (NICT). and Oiwa, K.: Motility of axonemal dyneins. *In: Handbook of Dynein*, 2nd edition (eds. Hirose, K. and Amos, L), Pan Stanford Publishing, London, Chapter 10 (2019)
- I-2 Oiwa, K., Sakakibara, H. (NICT), Furuta, K. (NICT) : Electron microscopy of isolated dynein complexes and the power stroke mechanism, *In Dyneins: Dynein Mechanics, Dysfunction, and Disease*, 3, 2nd edition (ed. King, S), Academic Press, Boston, Chapter 12 (2018)
- I-3 Zhu, X., Poghosyan, E., Rezabkova, L., Mehall, B., Sakakibara, H. (NICT), Hirono, M. (Hosei Univ), Kamiya, R., Ishikawa, T., Yang, P.: The roles of a flagellar HSP40 ensuring rhythmic beating. *Molecular Biology of the Cell*, 30, 228-241 (2019)
- I-4 Oiwa, K. Iwamoto, H., (JASRI, SPring-8): Ca²⁺ dependent changes in helical symmetry of axonemal components of *Chlamydomonas* flagella studied by X-ray fiber diffraction. 第 56 回生物物理学会年会 (岡山大学), 2018
- I-5 Ishibashi, K. (Osaka Univ), Oiwa, K.: High-speed atomic force microscopic observations on demembrated *Chlamydomonas* axonemes and dynein arms. 第 56 回生物物理学会年会 (岡山大学), 2018
- I-6 Sagawa, M., Shiraga, M., Sakakibara, H. (NICT), Oiwa, K.: Repetitive buckling of microtubules driven by axonemal dynein arrays reconstituted on a microtubule. 第 56 回生物物理学会年会 (岡山大学), 2018
- I-7 Sakakibara, H., Kojima H. (NICT): The String-like structure on the tip of dynein-c tail. 第 56 回生物物理学会年会 (岡山大学), 2018
- II-1 Kaneko, T. (Kyoto Univ.), Ando, S. (Kyoto Univ.), Furuta, K. (NICT), **Oiwa, K.**, Shintaku, H. (Kyoto Univ.), Kotera, H. (Kyoto Univ.), Yokokawa, R. (Kyoto Univ.) : Transport of microtubules according to the number and spacing of kinesin motors on gold nano-pillars. *Nanoscale* **11**, 9879-9887, doi:10.1039/c9nr01324e (2019).
- II-2 Yano, T. (Osaka Univ.), Torisawa, T. (NICT, CREST), **Oiwa, K.** Tsukita, S. (Osaka Univ.): AMPK-dependent phosphorylation of cingulin reversibly regulates its binding to actin filaments and microtubules. *Sci Rep* **8**, 10, doi:10.1038/s41598-018-33418-7 (2018).
- II-3 古田 健也 (NICT) : 生物分子マシンをつくって理解する, 現代化学 **567**, 30-35 (2018)
- II-4 Oiwa, K., Ibusuki, R., Furuta, A. (NICT), Furuta, K. (NICT): Creation of protein-based molecular motors moving on DNA nanostructure. 16th International Alpbach Workshop on Molecular Motors (Alpbach, Austria), 2019 (Invited)
- II-5 Oiwa, K., Ibusuki, R., Furuta, K. (NICT) Creation of protein-based molecular motors moving on DNA nanostructure. *International Conference on processing and manufacturing of advanced materials, THERMEC2018* (Paris, France), 2018 (Invited)
- II-6 Oiwa, K. : Learning from the complexity of dynein. "Mechanisms of Muscle Contraction and Motility" Symposium commemorating Prof. Bernhard Brenner (Hannover Medical School, Germany) 2018 (Invited)
- II-7 Kojima H. (NICT): Micro-Force measurement method with optical feedback. "Mechanisms of Muscle Contraction and Motility" Symposium commemorating Prof. Bernhard Brenner (Hannover Medical School, Germany) 2018 (Invited)
- II-8 Ibusuki, R., Furuta, A., Oiwa, K., Kojima, H. (NICT), Furuta, K. (NICT): Re-design of linear molecular motors. 63th Biophysical Society Annual Meeting (Baltimore, MD,

- USA) 2019 (Invited)
- II-9 Oiwa, K., Ibusuki, R., Furuta, K.(NICT): Creation of novel molecular motors on the basis of dynein function, Seminar Series in Crick Institute (London, UK), 2018
- II-10 Oiwa, K.: Creation of novel molecular motors on the basis of dynein function. Seminar Series, Max Planck Institute Goettingen, University of Goettingen (Goettingen, Germany) 2018
- II-11 古田健也(NICT) : 生物分子モーターを再設計する, 第 15 回 原子・分子・光科学 (AMO) 討論会 (東北大学 仙台) 2018
- II-12 Oiwa, K., Torisawa, T.(NICT, CREST): TPPP3 promotes microtubule bundling and networking via weak interactions which enable the microtubule network to adapt the external stress changes. American Society for Cell Biology Annual Meeting (San Diego, CA, USA) 2018
- II-13 Oiwa, K., Torisawa, T.(NICT, CREST), Ishihara, S. (Tokyo Univ): Tubulin polymerization-promoting protein family member 3 (TPPP3) facilitates microtubule bundling and network formation via its weak interaction with microtubules. 63th Biophysical Society Annual Meeting, (Baltimore, MD, USA) 2019
- II-14 Ibusuki, R., Furuta, A.(NICT), Oiwa, K., Kojima, H.(NICT), Furuta, K.(NICT): Re-design of biomolecular motors. 第 56 回生物物理学会年会 (岡山大学), 2018
- II-15 Matsuda, Y., Furuta, A.(NICT), Kojima, H.(NICT), Oiwa, K., Furuta, K.(NICT): DNA-templated assembly of axonemal outer arm dynein complexes in vitro, 第 56 回生物物理学会年会 (岡山大学), 2018
- II-16 Kaneko, T.(Kyoto Univ), Oba, S.(Kyoto Univ), Furuta, K.(NICT), Oiwa, K., Shintaku, H.(Kyoto Univ), Kotera, H.(Kyoto Univ), Yokokawa, R.(Kyoto Univ.): Investigating coordination of kinesin-1 and Ncd using their selective immobilization on gold nano-pillars, 第 56 回生物物理学会年会 (岡山大学), 2018
- II-17 Ibusuki, R., Furuta, A.(NICT), Oiwa, K., Kojima, H.(NICT), Furuta, K.(NICT): Re-design of biomolecular motors, 第 56 回生物物理学会年会 (岡山大学), 2018
- II-18 Ibusuki, R., Furuta, A.(NICT), Morishita, T., Oiwa, K., Kojima, H.(NICT), Furuta, K.(NICT): Engineering motor proteins to move along DNA nanotubes. 第 56 回生物物理学会年会 (岡山大学), 2018
- II-19 古田健也(NICT): Re-design of biomolecular motors. 第 79 回 岡崎コンファレンス Synthetic, Biological, and Hybrid Molecular Engines, (分子研・岡崎) 2018
- II-20 古田健也(NICT) : Re-design of linear molecular motors. 仙台ワークショップ "An Update on Molecular Motors: Open Challenges and New Perspectives", (東北大学) 2018
- II-21 古田健也(NICT) : 生体発動分子の創成 : 自然界の生体分子の改造とゼロからの設計, 発動分子科学 第一回領域会議、(東京工業大学、東京) 2018
- II-22 古田健也(NICT): 天然のタンパク質機械を基に新しい分子モーターをデザインする, 第 1 回 岡崎発動分子セミナー, (分子科学研究所, 岡崎) 2018
- II-23 古田健也(NICT): タンパク質ブロックを組み合わせて新しい生物分子モーターをデザインする, 第 4 回発動分子科学セミナー, (東京工業大学, 東京) 2018
- II-24 柴田桂太朗(NICT): 渋滞微小管中のダイニンの運動活性. 第 8 回分子モーター討論会, 東京大学本郷キャンパス

- II-25 柴田桂太朗(NICT),古田 健也(NICT),小嶋 寛明(NICT),豊島 陽子(東京大学): 渋滞微小管上のダイニン 1 分子運動解析, 2019 年 生体運動研究合同班会議 (福岡大学, 福岡) 2019
- III-1 中出一輝(関西大), 神代啓輔(関西大), 佐川貴志(NICT), 小嶋寛明(NICT), 清水智弘(関西大), 新宮原正三(関西大), 伊藤 健(関西大): Adhesion and Bactericidal Properties of a Wettability-Controlled Artificial Nanostructure, ACS Applied Nano Materials,1 (10), pp 5736-5741, (2018)
- III-2 田中裕人(NICT), 數田恭章(NICT), 坪本梨沙, 小嶋寛明(NICT): 微生物を用いた化学物質識別デバイスの開発と味判定の可能性. 美味技術学会誌, 17(2), 74-76 (2018)
- III-3 田中裕人(NICT): 微生物を用いた化学物質識別デバイスの開発と味判定の可能性, 2018FOOMA 美味技術学会シンポジウム (東京ビッグサイト, 東京) 2018
- III-4 田中裕人(NICT), 數田恭章(NICT), 富成征弘(NICT), 成瀬康(NICT), 岡田真人, 坪本梨沙, 梅原広明(NICT), 曾和義幸(Hosei Univ), 川岸郁朗(Hosei Univ), 田中秀吉(NICT), 小嶋寛明(NICT): 微生物を使った化学物質評価法の開発, 第 79 回応用物理学会秋季学術講演会 (名古屋国際会議場, 名古屋) 2018
- III-5 中出一輝(関西大), 神代啓輔(関西大), 佐川貴志(NICT), 小嶋寛明(NICT), 清水智弘(関西大), 新宮原正三(関西大), 伊藤 健(関西大): ナノ構造が発現する抗菌作用に付着力が及ぼす影響, 第 79 回応用物理学会秋季学術講演会 (名古屋国際会議場, 名古屋) 2018
- III-6 Tanaka, H.(NICT), Kazuta, Y.(NICT), Tsubomoto, R., Oiwa, K., Kojima, H.(NICT): Parameters describing CW bias time traces of adaptation of chemotaxis of cells of *E. coli* correlate to OD 600 value at cell culture stop. 第 56 回生物物理学会年会 (岡山大学), 2018
- VI-1 Tanida,S. (Tokyou Univ), Furuta,K.(NICT), Nishikawa,K. (Tokyou Univ), Hiraiwa, T. (Tokyou Univ), Kojima, H.(NICT), Oiwa, K., Sano, M. (Tokyou Univ): Gliding filament system giving both orientational order and clusters in collective motion. arXiv preprint arXiv:1806.01049 (2018)
- VI-2 Oiwa, K.: Biological soft matters containing nanometer-scale protein motors and micrometer-scale protein filaments spontaneously generate various types of large-scale active networks. Physical Department Colloquim Series in Oregon State University (Oregon, USA) 2019
- VI-3 Oiwa, K.: Cytoskeletal proteins : an excellent toolbox to study active matter physics. International Workshop:Advances in Physics on Emergent Order of Active Matter(石川四高記念文化交流館, 金沢), 2018 (Invited)
- VI-4 Torisawa, T. (NICT), Ishihara, S.(Tokyou Univ), Oiwa, K.: Cell-like movement of self-organized microtubule aster, 第 56 回生物物理学会年会 (岡山大学), 2018
- VI-5 Tanida,S. (Tokyou Univ), Furuta, K.(NICT), Nishikawa, K. (Tokyou Univ), Hiraiwa, T. (Tokyou Univ), Kojima, H.(NICT), Oiwa, K., Sano, M. (Tokyou Univ): The role of steric interaction in collective motion of microtubules driven by kinesins. 第 56 回生物物理学会年会 (岡山大学), 2018

大学院生命理学研究科

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

石橋健太: 軸糸ダイニンの協働性創発メカニズムの解明

博士課程前期

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

- 森下 達矢：構成論的手法による新奇分子モーターの創製
学部 4 年生
- 木場 有希：ヒトの認知機能に対する飲料の効果の評価法
- 坪本 梨沙：バクテリア化学走性を利用した化学物質センサー：
ヒトの味覚の評価への応用
- 佐川 美咲：真核生物鞭毛の屈曲形成・伝播メカニズムの理解のための再構築実験系開発

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）
- 3 平成 29 年度 公益財団法人ひょうご科学技術協会 研究助成
研究課題名 高輝度X線マイクロビームを用いた真核生物鞭毛軸糸の構造ダイナミクスの
解析
研究代表者 大岩和弘（兵庫県立大学、情報通信研究機構）