

## 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 斉・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。*Chlamydomonas* の鞭毛の軸糸ダイニンを主な対象にして、そ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、軸糸ダイニンの力学的・酵素学的特性を単一分子計測や試験管内再構成実験を使って解析している。軸糸ダイニンには複数の亜種が存在し、それぞれ異なる運動特性を持つ。これらの亜種を混合したときに生じるダイニン間の協働的運動の解析を行うことで、軸糸内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依存した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た。また、ダイニン分子の機能する場である軸糸とダイニン腕については、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ことで、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・岩崎一輝・古田茜・大岩和弘・古田健也  
Ibusuki, R., Matsuda, Y., Morishita, T., Iwasaki, K., Furuta, A.,  
Oiwa, K. Furuta, 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 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きた。

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、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。また、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で自己抑制的に運動活性

を低下させるが、外部から力が加わることで抑制状態が解除され、再帰的に運動活性が回復するというダイニン分子の運動活性自己抑制システムのメカニズムを明らかにした。

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新奇のダイニン分子を創出、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・長谷川初範・小嶋寛明

Tanaka, H., Hasegawa, H., Kojima, H.

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指す分子通信技術や、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生体にやさしい材料を用いて、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.

タンパク質モータの機能解析に用いてきた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。再構成系において、運動する微小管の表面密度を上げると、微小管同士の衝突頻度が向上する。軸糸ダイニンで駆動される微小管の場合、微小管同士の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、微小管が束化し、さらに蛇行することで渦構造を創出する。直径 400  $\mu\text{m}$  にも及ぶメゾスコピックな渦構造が、実験槽のガラス表面に array 状に形成されるのである。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が、ネマティック相互作用を介して集団として共有されていく過程が明らかになった。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、かつ集団的挙動も観測できるため、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注目されている。また、微小管を架橋する能力のあるキネシン-5を微小管と混合すると、微小管がノードでつながったネットワークが形成される。この微小管ネットワークはキネシンの濃度依存的にその構造をダイナミックに変化させることを明らかにした。これらの研究は、集団運動やアクティブマターと呼ばれる物理学の新分野の研究に、生物学の視点から関わることもできる実験系を構築したものである。

## 発表論文 List of Publications

- I-1. K. Ishibashi (Osaka Univ), H. Sakakibara (NICT), K. Oiwa : Force-generating mechanism of axonemal dynein in solo and ensemble. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 2843 (2020)
- I-2. M. Shiraga, J. Kirima, N. Kanatani, Y. Shimizu (NICT), H. Sakakibara (NICT), K. Oiwa : *In Handbook of Dynein*, 2<sup>nd</sup> Edition (ed. K. Hirose), Pan Stanford Publishing, Chapter 9, (2019)
- I-3. K. Oiwa, H. Iwamoto (JASRI), H. Sakakibara (NICT) : Changes in the helical symmetry of the axoneme of *Chlamydomonas* flagella coupled with Ca<sup>2+</sup> concentrations. The American Society for Cell Biology/European Molecular Biology Organization 2019 Meeting, (Washington DC, USA) , 2019
- I-4. K. Oiwa, K. Shiba (Tsukuba Univ), K. Inaba (Tsukuba Univ), H. Iwamoto (JASRI), H. Sakakibara (NICT) : Change in the helical symmetry of *Chlamydomonas* and *Ciona* flagellar axonemes coupled with the change in Ca<sup>2+</sup> concentrations revealed by X-ray fiber diffraction. 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society (San Diego, USA), 2020
- I-5. K. Oiwa, K. Shiba (Tsukuba Univ), K. Inaba (Tsukuba Univ), H. Iwamoto (JASRI), H. Sakakibara (NICT) : Structural changes of *Chlamydomonas* and *Ciona* flagellar axonemes coupled with the change in [Ca<sup>2+</sup>] studied with X-ray fiber diffraction. 日本生物物理学会第 57 回年会 (宮崎県シーガイアコンベンションセンター)、2019
- I-6. 榊原 斉(NICT)・小嶋 寛明(NICT)・大岩 和弘 : The flagellar waveforms of *mbol* “a mutant moving backward only” in the presence/absence of Ca<sup>2+</sup>. 日本生物物理学会第 57 回年会(宮崎県シーガイアコンベンションセンター)、 2019
- I-7. 榊原 斉(NICT)・小嶋 寛明(NICT)・大岩 和弘 : Ca<sup>2+</sup> 存在下/非存在下における *mbol* (後退運動変異株) の鞭毛波形. 第 13 回 クラミドモナス研究会(東京工業大学すずかけ台キャンパス)、2019
- II-1. R. Ibusuki, M. Shiraga, A. Furuta (NICT), M. Yoshio (NICT), H. Kojima (NICT), K. Oiwa, K. Furuta(NICT) : Collective motility of dynein linear arrays built on DNA nanotubes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 523, 1014-1019 (2020)
- II-2. S.R. Nasrin, T. Afrin, A.M.R. Kabir, D. Inoue, T. Torisawa, K. Oiwa, K. Sada, A. Kakugo : Regulation of biomolecular-motor-driven cargo transport by microtubules under mechanical stress. *ACS Applied Bio Materials* 3 (4), 1875-1883 (2020)
- II-3. T. Kaneko (Kyoto Univ), K. Furuta (NICT), K. Oiwa, H. Shintaku (Kyoto Univ), H. Kotera (Kyoto Univ), R. Yokokawa (Kyoto Univ) : Different motilities of microtubules driven by kinesin-1 and kinesin-14 motors patterned on nanopillars. *Science Advances* 6 (4), eaax7413 (2020)
- II-4. T. Kaneko (Kyoto Univ), S. Ando (Kyoto Univ), K. Furuta (NICT), K. Oiwa, H. Shintaku (Kyoto Univ), H. Kotera (Kyoto Univ), R. Yokokawa (Kyoto Univ) : Transport of microtubules according to the number and spacing of kinesin motors on gold nano-pillars. *Nanoscale* 11 (20), 9879-9887 (2019)
- II-5. T. Kaneko (Kyoto Univ), K. Furuta (NICT), K. Oiwa, H. Shintaku (Kyoto Univ), H. Kotera (Kyoto Univ), R. Yokokawa (Kyoto Univ) : Molecular nano-patterning reveals different coordination of kinesin-1 and kinesin-14 motors. 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society, (San Diego, USA), 2020
- II-6. 熊谷 優佑(長岡技科大)・柴田 桂太朗(NICT)・古田 健也(NICT)・本多 元(長岡技科大・生物機能)・小嶋 寛明(NICT) : Cytoplasmic dynein stepping on crowded microtubules

resolved using dark-field imaging with high spatio-temporal resolution. 日本生物物理学会第57回年会(宮崎県シーガイアコンベンションセンター)、2019

- II-7. 森下 達矢(NICT)・指宿 良太(NICT)・古田 茜(NICT)・大岩 和弘(NICT)・小嶋 寛明(NICT)・古田 健也(NICT) : Systematic studies on the relation between binding kinetics and speed of movement using engineered DNA-based dynein motor. 日本生物物理学会第57回年会 (宮崎県シーガイアコンベンションセンター)、2019
- II-8. 指宿 良太(NICT)・森下 達矢(NICT)・古田 茜(NICT)・大岩 和弘(NICT)・小嶋 寛明(NICT)・古田 健也(NICT) : Creating artificial transport systems by using engineered dynein that moves along DNA nanofilament. 日本生物物理学会第57回年会(宮崎県シーガイアコンベンションセンター)、2019
- II-9. 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2回領域会議(九州大学 筑紫キャンパス 筑紫ホール), 2019
- III-1. K. Jindai (Kansai Univ), K. Nakade (Kansai Univ), K. Masuda (Kansai Univ), T. Sagawa (NICT), H. Kojima (NICT), T. Shimizu (Kansai Univ), S. Shingubara (Kansai Univ), T. Ito (Kansai Univ) : Adhesion and bactericidal properties of nanostructured surfaces dependent on bacterial motility. RSC Adv., 10, 5673-5680 (2020)
- III-2. 田中 裕人: 微生物を活用した化学物質識別法開発と化学的影響評価の可能性. 月刊クリンテクノロジー 6月号 (2019)
- III-3. 神代啓輔(関西大院シス理工)・増田恭介(関西大院シス理工)・富成 征弘(NICT)・田中 秀吉(NICT)・小嶋 寛明(NICT)・清水智弘(関西大院シス理工)・新宮原正三(関西大院シス理工)・伊藤健(関西大院シス理工) : ナノ構造が発現する抗菌作用のリアルタイム観察の試み. 応用物理学会秋季学術講演会 (北海道大学札幌キャンパス)、2019
- III-4. 神代啓輔(関西大・システム理工)・増田恭介(関西大・システム理工)・小嶋 寛明(NICT)・佐川貴志(NICT)・清水智弘(関西大・システム理工)・新宮原正三(関西大・システム理工)・伊藤健(関西大・システム理工) : ナノ構造表面の濡れ性が抗菌作用に及ぼす影響. 第46回年次大会 防菌防黴学会(千里ライフサイエンスセンター)、2019
- III-5. 田中 裕人(NICT)・数田 恭章(NICT)・小嶋 寛明(NICT) : Quantitative analysis of *E. coli* chemotaxis adaptation process that changes depending on temperature conditions. 日本生物物理学会第57回年会(宮崎県シーガイアコンベンションセンター)、2019
- III-6. 小嶋 寛明(NICT) : 細胞は動くマイクロ機械～つまむ技・動きを観る技～ けいはんな情報通信フェア 2019(けいはんなプラザ)、2019
- III-7. 小嶋 寛明(NICT) : 細胞は動くマイクロ機械・動きを観る技・つまむ技. けいはんな情報通信フェア 2019(けいはんなプラザ)、2019
- VI-1. S. Tanida (Tokyo Univ), K. Furuta (NICT), K. Nishikawa (Tokyo Univ), T. Hiraiwa (Tokyo Univ), H. Kojima (NICT), K. Oiwa, M. Sano (Tokyo Univ) : Gliding filament system giving both global orientational order and clusters in collective motion. Physical Review E 101 (3), 032607 (2020)

## 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

(大阪大学大学院生命機能研究科)

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

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

学部 4 年生

岩崎 一輝：DNA nanotube 上を運動する新規分子モーターを創る

長谷川 初範：英語リスニング時の脳波応答の速さと母語の語彙力との関係

## 科学研究費補助金等

- 1 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）