

Functional Nanometry of Biological Macromolecules

生体高分子超精密計測学

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

松本奈央・石橋健太・佐川美咲・榊原 齊・小嶋寛明・大岩和弘
Matsumoto N, Ishibashi, K., 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。

これまで、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ている。

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

中山慎太郎・指宿良太・古田 茜・大岩和弘・古田健也
Nakayama, S., Ibusuki, R., Yamawaki, 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 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 技術を活用し、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、細胞質ダイニンは、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を低下させる。しかし、外部から力が加わることでこの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や DNA 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や DNA チューブ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や DNA チューブ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・小嶋寛明・大岩和弘
Tanaka, H., 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 μm 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の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 S. Nakayama (大阪大), T. Yano (大阪大), T. Namba (東京大.), S. Konishi (大阪大), M. Takagishi (Univ. Texas), E. Herawati(Univ. Sebelas Maret), T. Nishida (J. Tex. Prod. Qual. Technol. Ctr.), Y. Imoto (J. Tex. Prod. Qual. Technol. Ctr.), S. Ishihara (東京大), M. Takahashi(名古屋大), K. Furuta (NICT), K. Oiwa, A. Tamura (大阪大), S. Tsukita (大阪大): Planar cell polarity induces local microtubule bundling for coordinated ciliary beating, *J Cell Biol*, 220, e202010034 (2021) <https://doi.org/10.1083/jcb.202010034>
- I-2 S. Thayyil (北海道大), Y. Nishigami (北海道大), Md J. Islam (北海道大), P.K Hashim (北海道大), K. Furuta (NICT), K. Oiwa, J. Yu (北海道大), M. Yao (北海道大), T. Nakagaki (北海道大), N. Tamaoki (北海道大) : Dynamic control of microbial movement by photoswitchable ATP. *Chemistry—A European Journal*, e202200807 (2022) <https://doi.org/10.1002/chem.202200807>
- I-3 I. Guido (MPI), K. Ishibashi (NICT), E. Bodenschatz(MPI), A. Vilfan(Jozef Stefan Inst), R. Golestanian(MPI), H. Sakakibara(NICT), K. Oiwa : Active beating of a reconstituted dynein-microtubule complexes. 日本生物物理学会 第 59 回年会 (Online), 2021
- I-4 H. Sakakibara(NICT), K. Ishibashi(NICT), H. Iwamoto(JASRD), H. Kojima(NICT), K. Oiwa: The flagellar waveforms of mbo1 a mutant moving backward only in the presence/absence of Ca²⁺. Dynein2021: International Workshop (Online), 2021
- I-5 K. Oiwa, Summary talk at Dynein 2021: Reply to the letters from Leeuwenhoek., Dynein2021: International Workshop (Online), 2021
- II-1 R. Ibusuki, T. Morishita, A. Furuta(NICT), S. Nakayama, M. Yoshio(NICT), H. Kojima(NICT), K. Oiwa, K. Furuta(NICT), "Programmable molecular transport achieved by engineering protein motors to move on DNA nanotubes", *Science*, 375, 1159-1164, 2022, <https://doi.org/10.1126/science.abj5170>
- II-2 K. Furuta (NICT), Engineering motor proteins to recognize DNA codes for programmable transport on DNA nanotubes. 3rd Conference on Biomotors, Virus Assembly, and Nanobiotechnology Applications (Online), 2021
- II-3 K. Furuta (NICT), Re-designing and measuring biomolecular motors. 日本生物物理学会 第 59 回年会 (Online), 2021
- III-1 H. Tanaka (NICT), Y. Kazuta (NICT), Y. Naruse (NICT), Y. Tominari (NICT), H. Umehara (NICT), Y. Sowa (法政大), T. Sagawa (NICT), K. Oiwa, M. Okada (東京大), I. Kawagishi (法政大), H. Kojima (NICT), "Bayesian-based decipherment of in-depth information in bacterial chemical sensing beyond pleasant/unpleasant responses", *Sci Rep*, 12, 2965 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06732-4>
- IV-1 大岩和弘: 脳情報通信融合研究センターのこれまでの 10 年とこれからの 10 年. 第 11 回 CiNet シンポジウム (東京), 2021

大学院生命理学研究科

博士後期課程

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

松本奈央 : 軸糸ダイニンと細胞質ダイニンの微小管結合部位の違いの運動特性への影響
 中山慎太郎 : 試験管内分子進化手法を用いた DNA モーターの運動創出メカニズムの解析

科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金 (令和2年度～令和5年度) 挑戦的研究 (開拓) 課題番号 20K20583
研究課題名 クシクラゲ櫛板の分子構造の解明と運動性フォトニック結晶開発に向けた基盤研究
研究代表者 稲葉一男 (筑波大学)
研究分担者 大岩和弘

- 2 科学研究費補助金 (令和3年度～令和6年度) 基盤研究(B) 課題番号 21H02455
研究課題名 昆虫精子鞭毛の運動解析から明らかにする鞭毛波形成・伝播の普遍的メカニズム
研究代表者 大岩和弘