

戦略的創造研究推進事業
ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ

研究領域「ソフトナノマシン等の高次機能構造
体の構築と利用」

研究課題「振動するバイオナノマシンの原理と
構築」

研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成20年3月

研究代表者 神谷 律

(東京大学大学院理学系研究科・教授)

1 研究実施の概要

本研究は、高速波動運動を行う真核生物の鞭毛・繊毛運動に着目し、その運動が発生する機構を解明すると同時に、純化したタンパク質を用いて振動運動を発生する人工運動系を構築することを目的にした。その実施過程において、鞭毛運動装置（軸系）の形成機構、運動発生の基本であるダイニン分子の作動機構、タンパク質の熱揺らぎによる運動発生現象の解析、鞭毛軸系構造の新たな構造解析技術の開発、などの研究に取り組み、それぞれ後に詳述するような成果を挙げた。

真核生物の鞭毛・繊毛の内部構造（軸系）は約200種のタンパク質から形成され、図1に示したような精緻な構造を持つ。その運動は微小管とダイニン内腕と外腕中に存在するモーター蛋白質ダイニン（10種以上の類似タンパク質が含まれる）の間の滑り運動によって生じるが、屈曲波が形成される機構はまだわかっていない。重要であると考えられるのは、鞭毛軸系の精巧な構造と、ダイニンの特殊な運動発生特性である。そこで、本研究では、まず、軸系構築機構の解析・再構成を中心テーマとした軸系構築グループと、ダイニンの動作機構の解析を中心テーマとした機能素子グループによって研究を開始した。さらに、研究進展とともに、タンパク質が運動を発生する基本原理を追及する人工運動系グループと、軸系の新しい構造解析方法を開発する分子ナノ振動解析グループの参加を得て、研究の深化をはかった。

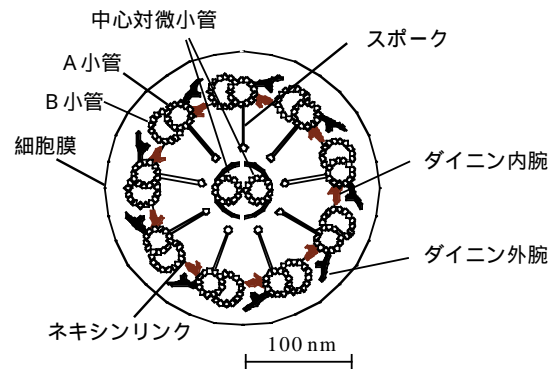


図1．真核生物鞭毛。繊毛の横断面模式図

ダイニン分子は、分子量50万という巨大で複雑な分子構造をもち、その動作機構はまだよくわかっていない。しかし、一次構造と電子顕微鏡像の解析から、このタンパク質はN末の尾部とC末側の頭部（力発生部位）からなり、頭部はAAA+と呼ばれるドメイン6個が形成するリング構造と、そこから突出した微小管結合部位（ストーク）からなることが示されている（図）。また、電子顕微鏡観察から、リング部位がATPの加水分解とともに回転して、尾部とストークとの位置関係を変える、という力発生機構のモデルが提唱されている。しかし、そのモデルは負染色法による電子顕微鏡観察に基づくもので、運動機構を解明するには、よりダイナミックな観察を行う必要がある。そのためには、まず、組換えダイニンを発現するシステムを開発することが必要であったが、本研究では、細胞性粘菌を用いて、世界で初めて運動活性を維持した組換え体を作成してその機能解析を進め、上記リング回転モデルを支持する結果を得るとともに、ATP加水分解がストーク先端における微小管結合の強度を変化させる機構に関して、多くの重要な知見を得た。

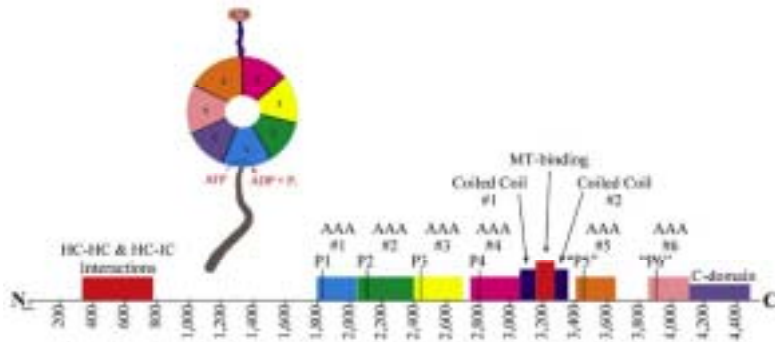


図2 .ダイニン重鎖のドメイン構造とおれたたみ構造の模式図(King, 2000)

軸系の運動発生機構に関しては、運動異常突然変異株の鞭毛構造・運動性の解析と、人為的に解体した軸系における運動の解析を通して、ダイニン・微小管の相互作用が波動を発生する機構の理解をめざした。その結果、2本の微小管とダイニンが適当な空間配置を保っていれば、ATP存在下において、鞭毛でみられるような振動運動を発生することが明らかになった。また、その知見をもとに、重合した微小管にダイニンを加えた系を用いて振動的運動を発生させる試みを行い、低頻度ながら、そのような運動が発生することを確認した。振動する分子機械の構築には、軸系中におけるような規則正しい微小管・ダイニンの配列が必要である。そのため、軸系構造の構築の基礎となる微小管結合タンパク質の検索を行い、その結果、数種の新規タンパク質の同定に成功した。そのうち、とくに微小管間を架橋するタンパク質（ネキシン）が同定されたことは、鞭毛・繊毛研究において初めてであり、きわめて重要である。

本研究は、単に鞭毛繊毛運動機構の理解というだけでなく、高次機能複合体の集合機構や、振動現象の発生機構の理解の基礎を提供するものである。また、未解明の部分が多いダイニンの動作機構の理解も大きく進んだ。これらの知見をもとにして、将来、振動するバイオナノマシンを効率良く作製することも可能になるであろう。そのようなバイオマシンには、微小なアクチュエーターなど、多くの分野で利用される可能性がある。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

本研究では、鞭毛軸系の振動運動に着目して、振動運動が発生する機構を解明すると同時に、純化したタンパク質を用いて振動運動を発生する人工運動系を構築することを目的にした。その研究では、ダイニンそれ自体、ダイニン・微小管相互作用、ダイニン・微小管の作り出す高次機能複合体（軸系）という、異なる階層の問題にとりくむ必要があると考えられるので、発足時には、軸系構築グループ（神谷）と機能素子グループ（豊島・須藤）の2グループがほぼ独立して主に次の3つの方向の研究を行うこととした。

1) 軸系ダイニン・微小管の運動

クラミドモナス、テトラヒメナから単離した外腕ダイニンを材料にして、微小管の *in vitro* 滑り運動の解析を行う。このような研究はすでに行われているが、ここでは特に次のことを問題にする。

A. 一分子および多分子ダイニンの力発生特性の解析 (神谷、豊島)

負荷、ATP濃度をさまざまに変化させて、力発生特性を測定する。これにより、ダイニンそれ自体に振動子としての潜在的な能力が有るか否かを確認する。

B. 細胞性粘菌におけるダイニン重鎖の発現とその運動性検定 (豊島)

運動性のある組み換えダイニン重鎖を発現することを目標にする。そのようにして得られた高純度のダイニン重鎖は微小管との運動性再構築実験に供する。また、さらに重鎖内の各所に人為的変異を導入して、各部位の機能的意味に関する研究へと発展させる。

2) 単純化軸系の運動性解析 (神谷)

軸系の高速微小振動と波動運動に必要な最低限の要素を見極めるために、様々な変異株軸系を抽出・解体して、ATP存在下における運動性を解析する。

3) 軸系ダイニン・微小管複合体を用いた振動的運動の再構築 (神谷)

a ダイニン・微小管による束形成

微小管にダイニン外腕を加えることにより、複数の微小管の束化が期待できる。その系にATPを加えた際の運動性を、caged ATPの光分解法などを用いて解析する。

b 微小管架橋蛋白質の導入

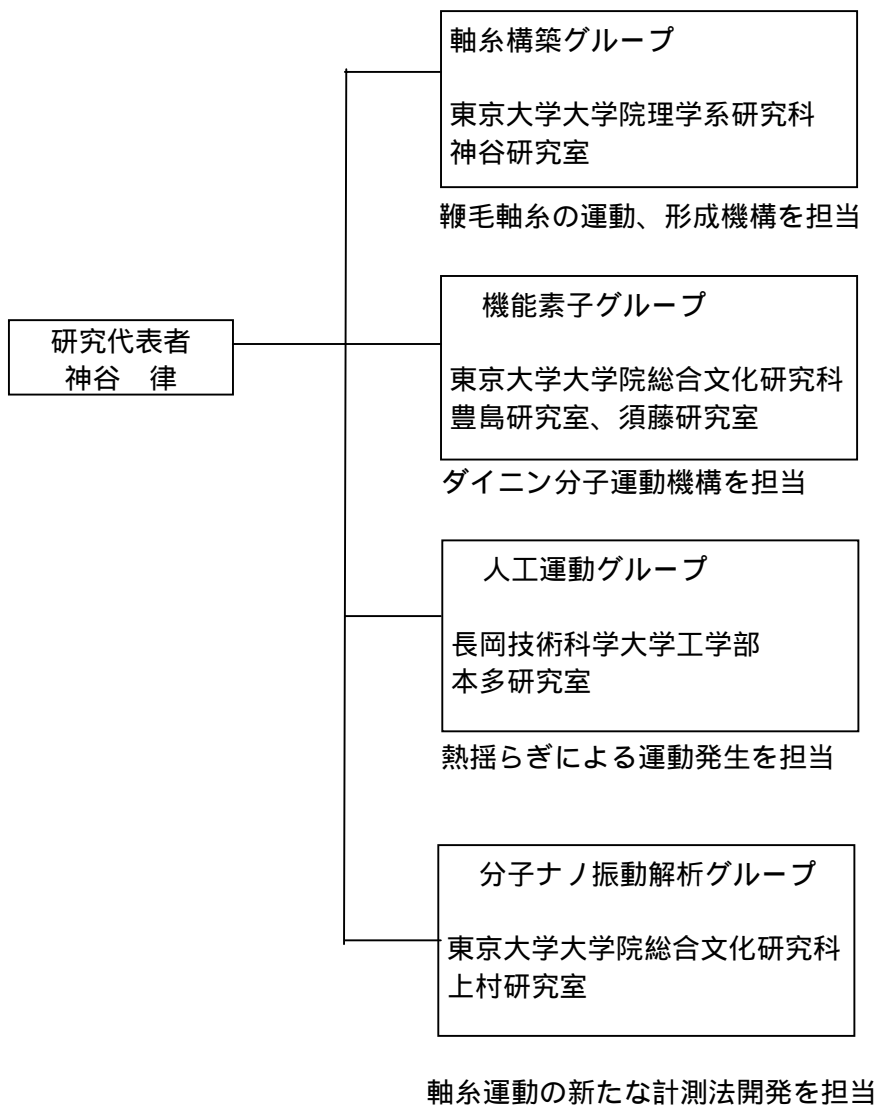
上記の系では複数の微小管を含む構造はATP添加とともに速やかに解離してしまう可能性がある。そこで微小管同士を架橋する実験系を構築する。様々な微小管結合性蛋白質によって架橋をテストすると同時に、実際に軸系内で架橋タンパク質として働いているタンパク質ネキシンを単離する。現在まだその実体は明らかになっていないので、その同定も同時に追求する。

その後、発足1年後に、モータータンパク質の運動発生機構に関する根源的な問題提起を行っている本多元博士(長岡科学技術大学工学部)と、発足3年後に、鞭毛軸系の運動を高精度で測定する斬新な技術開発を行っている上村慎治博士(東京大学大学院総合文化研究科)が参加して、それぞれの課題を追及した。これらの研究は、ダイニン、ダイニン・微小管運動機構の基礎を解明する上で、新たな視点を与えるものである。

上記課題の多くが順調に展開したが、振動発生実験に使用できる微小管架橋タンパク質を見出すことはできなかった。そのため、軸系構造の構築機構について、当初の想定より多くの努力を払い、その結果、軸系内で架橋構造として働いていると考えられているネキシンについて、はじめてその有力なタンパク質を同定することに成功した。この成果は鞭毛・繊毛研究において画期的なものであると言える。また、ダイニン-微小管による束形成実験では、配列した外腕ダイニンによる微小管の滑り運動が、離散的に存在するダイニ

ンによる滑り運動より数倍高速になるという興味深い運動が観察された。この運動活性化現象は、ダイニン間の相互作用の重要性を示すものとして重要であると考えられるので、その機構解明を新たな目標とした。

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

3.1 軸系構築機構 (東京大学 神谷グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

3.1.1 in vitro 運動系による軸系運動機構の解明と運動系再構成

1) 単純化した軸系における振動運動の解析

鞭毛軸系は200種ものタンパク質で構成され、9本の周辺微小管と2本の中心対微小管を含む複雑な構造(9+2構造)を持つ(図1)。運動の基礎は、周辺微小管上に配列した複数種のダイニンが隣接した微小管と局所的に滑り運動を起こすことである。その滑りがどのようにしてコントロールされているかが鞭毛纖毛運動機構の本質であり、大きな謎である。

9+2構造はほぼすべての生物種の鞭毛纖毛において保存されているが、波動運動の発生にはその完全な構造が必要であるとは考えられない。我々および他の研究者の以前の研究から、中心対微小管や、スポーク構造を欠失した軸系も特殊な環境下では波動運動ができることが示されているからである。それではどの程度の構造があれば、軸系は本来の振動的運動、あるいは波動運動ができるのであろうか。この問いに答えるため、クラミドモナスの鞭毛軸系をタンパク質分解酵素によって部分的に分解してからATP存在下におき、解離した微小管束中で運動が起こるか否かを検討した。観察には、高輝度の光源と高速度ビデオシステムを用いた。その結果、わずか2本の周辺微小管だけで、新しいタイプの周期的運動を発生することが見いだされた(図2)(Aoyama and Kamiya, 2005)。この運動のモデルとして、下図のようなモデルが考えられる。すなわち、2本の微小管が結合している基部には、微小管末端方向に位置するダイニンの滑り力による大きな曲げのモーメントがかかるが、その力によって微小管ダイニンの結合が不安定になって、2本の微小管の解離が起こる。そして、解離部分が先端まで進行すると、2本が完全に解離し、根元から再結合が始まって、周期的運動が完結する、というモデルである(下図)。そのような考えは、ダイニンの力発生過程が、ダイニン自体に作用する力によって敏感に影響されること、すなわち、力発生過程がフィードバックループにくみこまれていることが波動発生機構の基礎であることを強く示唆する。この研究結果から、振動的運動を発生するバイオマシンの作製の鍵は、微小管とダイニンを適当な空間配置におくことにあると考えられる。

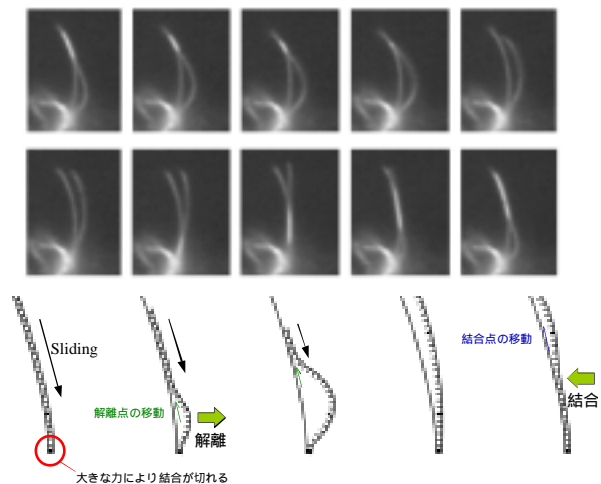


図3. 2本の周辺微小管による周期的相互作用。5 msec 毎の連続写真(上)と、運動発生モデル(下)

2) 外腕ダイニンによる微小管の束形成と、振動的運動の発生

振動的運動を発生する人工システムの構築をめざして、クラミドモナス軸系から単離したダイニン（主として外腕ダイニン）と微小管が形成する束が ATP 存在下で示す運動を観察・解析する研究を行った。以前の研究において、微小管に外腕ダイニンを加えると束が形成され、ATP 添加によって解離することは報告されていたが、解離の過程で微小管の運動が起こるかどうかは知られていなかった。今回、ケージド化合物を用い、光照射によって瞬間的に ATP 濃度を上昇させる方法により、その過程を観察した。その結果、束中の微小管が多様な運動を行うことが見いだされた。単純な滑り運動のほか、屈曲が伝播する運動も観察された。また、軸系断片から微小管を重合させて作った束にダイニンを加える系においては、微小管の束がはっきりとした周期的振動運動を行うことが認められた。すなわち、ほぼ純化した試料を用いて振動する運動系が構築されたことになる（青山、神谷、論文準備中）。

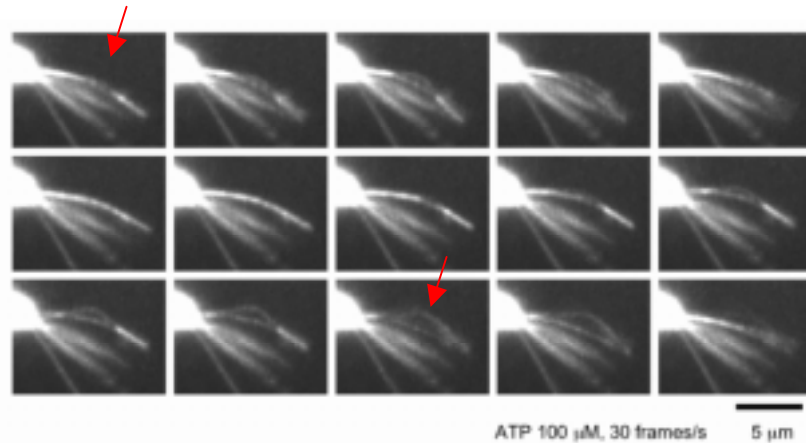


図4．軸系断片から重合させた微小管とダイニン外腕による周期的相互作用の発生

その研究の副産物として、外腕ダイニンの運動性に関して興味深い結果が得られた。ダイニン外腕を結合した微小管同士の滑り速度が、通常の *in vitro* 運動実験系における微小管滑走速度より 2・3 倍高速になることが見出されたのである（論文準備中）。これまで、単離したダイニン外腕による *in vitro* 運動検定実験では、外腕ダイニンに期待される運動速度の半分以下の速度の運動しか観察されていなかった。そのことは複数の研究者によって確認されていたが、理由は不明であった。今回の実験は、ダイニンが微小管上に規則正しく配列することが、重要であることを示唆している。最近軸系微小管上に配列したダイニン外腕の構造が高分解能で解析され、ダイニン間を架橋する構造が存在すると報告されている。そのようなダイニン間の架橋の意味は不明であるが、今回の我々の結果は、その相互作用が外腕ダイニンを活性化し、活性化したダイニンが微小管の速い滑走を生じるといふ仮説を支持するものである。

3) 内腕ダイニンによる新規な運動性

上記の実験は、軸系から抽出したままのダイニンをを用いたもので、微小管を束化する活性は主として外腕ダイニンによると考えられる。一方、抽出されたダイニンをイオン交換クロマトカラムで分画して、ダイニン内腕の特定の分子種による *in vitro* 運動性を解析したところ、思い掛けない現象が観察された。内腕ダイニンの主要な分子種は合計 7 種類存在する。いずれもガラス表面にコートすると、その上で ATP 依存的に微小管の滑走運動を発生させる活性がある。今回発見されたのは、ある種の内腕ダイニンは微小管を右方向に回転させつつ前進させる、という現象である。このことは、ある種のダイニンはそれ自体で微小管を屈曲させる能力を持ち、軸系の屈曲発生に直接的に働く可能性を示唆している (Kikushima and Kamiya, 2008)。軸系運動機構を考える上で重要な知見であると考えられる。

3・1・2 突然変異株軸系を用いたダイニン機能の追及

1) クラミドモナスの新規ダイニン異常突然変異株の単離

現在、鞭毛・繊毛のタンパク質と遺伝子の研究は、単細胞緑藻クラミドモナスの突然変異株を用いて最も精力的に進められている。この生物の鞭毛中には外腕ダイニン 1 種 (3 種の重鎖を含む) と、複数の内腕ダイニンが存在する。性質の異なる多種のダイニンが共存することは鞭毛運動機構にとって本質的であると考えられるが、個々のダイニンがどのような機能を持つかは、まだよく分かっていない。この問題に関して、今回、ダイニン c と呼ばれる内腕ダイニンの重鎖を欠失した突然変異株を単離し、その重鎖をコードする遺伝子を同定した。また興味深いことに、この突然変異株は、高粘度溶液中で遊泳速度が野生株に比べて極端に大きく低下した。したがってダイニン c は大きな負荷の下での力発生に重要な働きをしていると結論された。このような性質を持つダイニンが同定されたのは、これが初めてである (Yagi et al., 2005)。

2) クラミドモナス全軸系ダイニンの遺伝子同定と、新規内腕ダイニンの発見

鞭毛・繊毛を持つほぼすべての生物は、ゲノム中に 15 種程度の軸系ダイニン重鎖遺伝子を持つが、それらと対応する重鎖タンパク質が決定された例はごく一部にすぎない。クラミドモナスにおいては、14 種の重鎖遺伝子が知られているが、重鎖タンパク質は 11 種だけしか知られておらず、また、特定のダイニン重鎖と遺伝子が対応されたものは 6 種にすぎなかった。我々は知られているすべてのダイニン重鎖の遺伝子を決定するとともに、残り 3 種の重鎖遺伝子の産物を軸系内で同定することに成功した。興味深いことに、その 3 種は軸系中にごく微量しか含まれておらず、また、抗体染色により、少なくともその 1 つは鞭毛の基部だけに局在していることが明らかになった。これらの重鎖は鞭毛基部において、屈曲形成の開始反応などの特殊な機能を担っているものと予想される。これまで鞭毛の根元とそれ以外の部分においてダイニン内腕の組成が異なることを示唆した研究はあ

ったが、このように、根本付近にだけ局在するダイニンがあることを直接免疫蛍光法観察

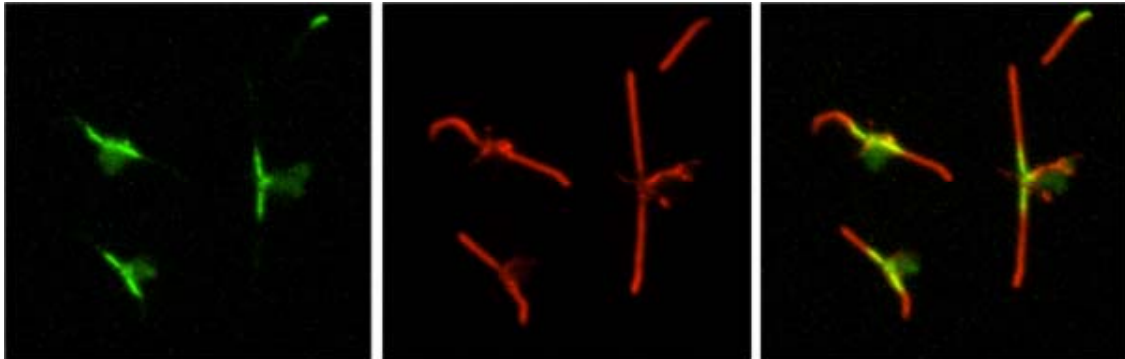


図5 . クラミドモナスダイニン重鎖の一つ DHC11 の局在。2本の鞭毛、基部体、核からな複合体の蛍光顕微鏡像。左から、DHC11 蛍光、 チューブリン蛍光、両者を重ね合わせたもの。スケールこの重鎖は根本の 2 μm 程度の部分にしか存在しない。スケールは 5 μm 。

で示したのは、これが初めてである（八木、神谷、論文準備中）。

3・1・3 軸系構造の構築機構

1) ダイニンの機能的再結合

鞭毛軸系のような振動する分子機械を人為的に構築する目標に向けて、軸系構造の部分的再構築を試みてきた。その一つは、特定のダイニンを欠失した変異株軸系に粗抽出したダイニンを加えて、正常な機能を持つ軸系を再構築する試みである。古く 1980 年代に、ダイニン外腕欠失変異株軸系に外腕ダイニンを加える実験において、そのことが可能であることを示した。今回、ダイニン内腕を部分欠失した軸系に対して、再結合が可能か否かを検討した。その結果、ダイニン外腕と、2つの重鎖を持つ内腕ダイニン f (I1 と呼ばれる) を欠失した変異株の軸系に、外腕欠失軸系の高塩濃度溶液を加えると、ダイニン f が回復し、ATP 添加によって波動運動を発生するようになることが示された (Yamamoto et al., 2006)。ダイニン f を欠失した軸系にダイニン f を機能的に再結合させる実験は、かつてアメリカの研究者によって行われ、微小管滑り速度の増大がおこることが示されていたが、波動運動の能力が回復することはできないと報告されていた。本実験は、ダイニン f を機能的に完全な状態で再構成できることを初めて示したものである。

2) ダイニン外腕ドッキング複合体の協同的結合

軸系周辺微小管上では、ダイニン外腕は特定のチューブリン素繊維上に一列に、24 nm 周期で結合している。この配列の基礎となっているのがダイニン外腕ドッキング複合体 (ODA-DC) で、約 10 年前に我々の研究室で発見されたものである。この複合体は DC1-DC3

の3種のサブユニットからなり、微小管に直接結合することが示されているが、その結合定数や、微小管への結合様式に関してはよく分かっていなかった。組み換えタンパク質として発現すると、多くが不溶性となって、実験が困難だったのである。しかし昆虫培養細胞の発現系を用いて一定程度の可溶化に成功し、その試料を用いていくつかの興味深い性質が明らかになった。まず、この複合体は単体では約50nmの紐状の形態を持つことが明らかになった。ダイニン外腕の結合周期の2倍である。さらに、蛍光標識した試料を微小管に加えると、微小管上に協同的に結合することがわかった。すなわち、同一試料中に、ODA-DCが結合した微小管と、結合していない微小管が混在するという状態が現れたのである。そのような協同性は、ODA-DCの端間相互作用によるものと想像されるが、そのことの検証は今後の課題である。いずれにせよ、この性質は、ダイニン外腕が微小管上に一列に配列することと深く関係するものと考えられる。

3) ダイニン内腕のドッキングに関わるタンパク質の同定

軸系の周辺微小管上にはダイニン外腕と多種の内腕ダイニンがそれぞれ一定間隔で配列している。そのような規則的配列のしくみを理解することは、振動する人工装置を作製する上でも、バイオナノマシン一般の形成機構理解の上でも重要である。上記のように、我々は以前、外腕の微小管上への規則的結合に重要な役割を果たすと考えられるドッキング複合体を同定し、それが周期性発生の基礎であることを示した。今回、同様に内腕の結合に関与する蛋白質を同定する試みを行い、分子量58kの新規蛋白質が特定のダイニン内腕分子種の微小管結合に重要であることを見いだした。この蛋白質のcDNAを解析したところ、以前ほかの生物の鞭毛繊毛において発見されていた蛋白質テクチンと相同の配列を持つことがわかった。他の生物のテクチンは軸系微小管の構築に必須であると考えられているが、クラミドモナスのこの蛋白質は、その量が正常の1/10以下になっても軸系構造が正常に保たれることなど、他の生物のテクチンとは大きく性質が異なることが判明した。これらの結果は、ダイニン内腕の微小管への結合機構の解明に重要であるとともに、軸系微小管構築におけるテクチンの役割について再考を迫るものである (Yanagisawa and Kamiya, 2004)。

ダイニン内腕の微小管結合に関して、7種ある内腕ダイニンのうちの一つ、ダイニンdに結合している2つの軽鎖(p38とp44)の遺伝子クローニングを行い、一次構造を決定するとともに、抗体を得た。軸系内の存在状態を解析したところ、思いがけないことに、これらのタンパク質はダイニンdを欠失している変異株軸系にも存在することが明らかになった。これらの結果から、ダイニンdを微小管上に結合させるドッキング複合体としての機能を持つことが示唆された (Yamamoto et al., 2006; Yamamoto et al., 2008)。

4) 鞭毛軸系構築に関わる新規蛋白質の同定

軸系周辺微小管を構成するタンパク質として、以前、我々の研究室ではRib72と呼ばれ

るタンパク質を同定した。今回、Rib72 と相互作用するクラミドモナス軸系タンパク質を検索した結果、ヒトの PACRG と呼ばれる蛋白質のホモログが検出された。興味深いことに、最近この遺伝子に変異があるマウスでは精子形成が異常になることが報告され、また、ある種の原生動物の研究から、PACRG は周辺微小管を架橋するタンパク質そのものであるという仮説が提唱されている。我々は、クラミドモナス PACRG の特異的抗体を得て、初めて電子顕微鏡レベルの局在検定を行った。その結果、このタンパク質は主に周辺微小管 B 小管内に局在する構造タンパク質であるが、周辺微小管間の架橋構造そのものでは無いと結論された(Ikeda et al., 2007)。

このような軸系構築の研究を行う目的の一つは、微小管間の架橋タンパク質を同定することである。その目的のために、新たな視点から研究を行い、候補蛋白質 2 種を得た。そして、それらの局在を同定したところ、そのうちの 1 つ、120 kDa のタンパク質 (p120) が、求めていた微小管間の架橋構造を形成するタンパク質であることを強く示唆する結果を得た。まず、蛍光抗体法により、このタンパク質は基部約 2 μm の部分を除く、軸系全長にわたって局在することが明らかになった。これまで他のタンパク質でこのような局在が観察されたことはない。また、免疫電子顕微鏡法により、微小管間を結合すると思われる細い繊維上に局在することも判明した。すなわちこの蛋白質はこれまで長く求められていた周辺微小管間を結合するネキシンリンクと呼ばれる構造を構成している可能性が大きい (柳沢、神谷、論文準備中)。

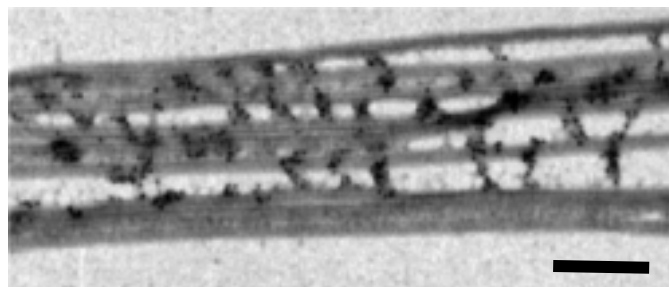


図6 .ネキシン候補タンパク質 p120 の軸系中の局在。免疫電子顕微鏡像。微小管間の細い繊維上に金コロイド標識が見られる。スケール： 0.5 μm

5) 鞭毛基部体 (basal body) 構成蛋白質

真核生物鞭毛・繊毛の構築機構における謎の一つは、9本の周辺微小管が環状に配列した構造ができる仕組みである。この対称性は、鞭毛基部体(中心子と相同の細胞器官)の構造に由来する。その形成機構は現在の細胞生物学における大問題の一つとして、多数の研究者によって追及されているが、まだ全く未解明であると言ってよい。約200種あると考えられる構成蛋白質のうち、同定されたものは数種類に過ぎない。我々は数年前、基部体がほぼ完全に欠失していながら致死にならないクラミドモナス変異株 *blb10* を単離し、

その変異遺伝子がコードする蛋白質が基部体のカートホイール構造に局在することを示した(Matsuura et al., 2004)。カートホイールは基部体形成過程の最初に現れる9回対称性の構造で、中央部のハブと、そこから伸びるスポークと呼ばれる構造からなる。

その蛋白質の性質を明らかにする目的で、*bld10* 変異株を様々な長さの蛋白質をコードする cDNA によって形質転換し、それぞれの表現型を調べた。その結果、N末端を40%程度欠失した *bld10p* 蛋白質によって変異はほぼ完全に相補されることが判明したが、50%欠失した蛋白質では相補されず、基部体の9回対称構造が正常に保持されなくなることが明らかになった。それらの電子顕微鏡観察により、*bld10p* 蛋白質はカートホイールを構成するスポーク構造と3連の微小管との結合に関与する蛋白質であり、その存在が3連微小管の安定性に大きな影響を与えることが明らかになった(Hiraki et al., 2007)。また、*Bld10* 突然変異株の表現形を参考にして、新たな変異株を検索したところ、基部体の3連微小管

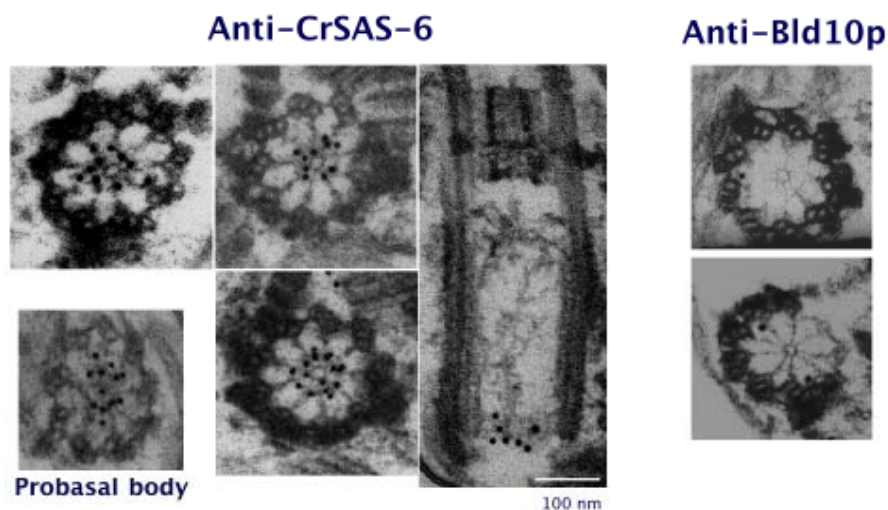


図7．鞭毛基部体 SAS-6 と *Bld10* タンパク質の局在。両者ともカートホイール構造上に局在するが、その領域は異なる。

の数が9本に固定されない、新しいタイプの変異株が単離された。意外なことに、この株の変異遺伝子は、最近線虫などの研究によって中心子形成に必須であると報告されている SAS-6 であった (Nakazawa et al., 2007)。さらに、免疫電子顕微鏡法により、この遺伝子の産物もカートホイールに局在することが判明した。ただし、*bld10p* と比べると、カートホイール構造のより中央部に近い部分に局在する。このように、中心子構築において本質的に重要であると考えられているカートホイール構成タンパク質が2種類同定されたことは、今後の研究に明るい見通しを与えるものである。

(2) 研究成果の今後期待される効果

1) 微小管とダイニンによる振動運動系の開発

本研究では、微小管とダイニンから振動する分子機械を作製するという当初の目的にそって、細胞質性微小管と軸系ダイニンの組み合わせによって、実際に振動が起こることを示した。その現象が起こる頻度はまだ少ないが、実現の可能性は十分検証されたと言ってよいであろう。運動発生の頻度は、微小管を軸系の断片から成長させることによって増大したので、2本の微小管が正しい位置関係に保持されていることが重要であると考えられる。今後は、そのような、微小管の相対的位置を保って特定の部位から成長させる技術の開発が必要になると考えられる。そのような技術が開発されれば、微小管によって特定の超構造を作る新しいテクノロジーが生まれることであろう。

2) 軸系構築機構の理解の深化

安定した振動運動を作り出すために、微小管間を何らかの方法で架橋する可能性が考えられたが、既存のタンパク質で適当な架橋能を持つものを見出すことはできなかった。しかし、その過程で、軸系内で周辺微小管を架橋しているタンパク質ネキシリンクについて、その候補タンパク質が得られた。これまで長い間存在が予想されていたが、確認されたのはこれが初めてである。鞭毛繊毛研究にとって重要であるばかりでなく、微小管を材料として高次構造の構築をめざす研究にとっても価値がある発見であると思われる。また、この架橋因子は、運動性のある鞭毛繊毛の基部側小部分には存在せず、先端側にだけ存在した。このことは、基部にはこれとは別の架橋因子が存在することを想像させる。最近、運動性の無い繊毛が多細胞生物の感覚受容器官として重要な役割を果たしていることが徐々にあきらかになってきているが、そのような繊毛には、また別の種類の架橋因子が存在する可能性がある。今後、架橋因子に注目した研究が多く現れることと想像される。

鞭毛構築過程で最も重要と考えられるのは、9本の微小管が環状構造を作る土台、すなわち、鞭毛基部体の形成である。この基部体が9本の微小管の配置を決定し、微小管間のすべり運動による運動の発生を可能にしている。また、基部体は動物細胞一般に見られる中心子と相同の器官で、細胞分裂に際して一回だけ複製されるという不思議な性質を持つ。これまで多くの形態学的研究が行われてきたが、その形成の分子機構は謎に包まれており、現代生物学の大きな謎とされている。とくに、その形成過程で最初に現れる9回対称構造、カートホイール、の構造については、これまでその構成タンパク質はまったくわかっていなかった。したがって、本研究でその構成タンパク質2種を同定したことは重要である。これをきっかけにして、カートホイールの構造および、基部体構造形成の初期過程の解明が一気に進むことが期待できる。近い将来に、試験管内でカートホイールを形成させて、それを核にして運動に最適な配置をもつ微小管束を作ることも可能になるであろう。

本プロジェクトでは、主としてダイニン外腕を用いた振動運動系の作製を試みたが、その過程で、軸系中に存在すると考えられる全ダイニン分子種を同定する試みを行い、それに成功した。ひとつの生物で、全軸系ダイニン分子種が生化学的に同定され、それぞれが遺伝子と対応づけられたのは、初めてのことである。鞭毛の運動は多種の特性の異なるダイニンの協調した働きによって発生すると考えられるので、全ダイニン分子種が決定されたことは、その運動機構理解の基礎としてき

わめて大きな意味を持つ。特に、鞭毛基部にだけ存在するダイニンが存在することはこれまで知られていなかったため、今後鞭毛基部における屈曲形成開始機構について、新たな考えが必要になるものと考えられる。

最後に付け加えると、最近、繊毛の異常による遺伝病が多数同定され、たとえば、男性不妊症などのこれまで知られている疾病のほかに、腎嚢胞症、水頭症などの予想外の疾病が繊毛異常によることが明らかにされている。本研究によって鞭毛繊毛の運動と構築機構の理解が進んだことは、医学的にも大きな意味があることであろう。

3.2 機能素子グループ (東京大学 豊島グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

3.2.1 組換えダイニン重鎖の発現とその機能解析

1) ダイニン重鎖の構造変化と運動活性

分子モーターの運動は一般に、ATP 加水分解サイクルに応じてトラックとの結合解離と方向性のある変位発生が協調して繰り返される、いわゆるクロスブリッジサイクルにより引き起こされると考えられる。ダイニンの場合、ATP 加水分解サイクルの各中間状態と微小管との結合解離との関係はある程度対応づけられていたが、変位発生機構については最近まで明らかではなかった。2003 年に Burgess らによりその構造的知見が初めてもたらされ、2つのヌクレオチド状態で異なったダイニンの構造が検出された(図1a)。変位発生前の構造を模倣する ADP·Vi 状態と変位発生後の構造である apo(ヌクレオチドなし)状態を比較することにより、ヘッド(およびストーク)に対してテールがスウィングすることでダイニンは変位および力を発生するという、パワーストロークモデルが提唱された。

この結果はダイニンの変位発生について非常に重要な構造的基盤を与えたが、クロスブリッジサイクルの詳細を明らかにするためには、溶液中で ATP 加水分解サイクルに対応したこの構造変化を捉える必要がある。そこで我々は、組換え 380-k ダイニンの利点を生かして、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法による構造変化検出を試みた(Kon ら、2005)。具体的にはテールに GFP を、ヘッド内に BFP を挿入した 2重蛍光ラベルダイニンを作成し、GFP - BFP 間の FRET 効率を測定した(図1b)。その結果、ダイニンは ATP 依存的に変化する少なくとも 2つの FRET 状態(State I と State II) すなわち構造状態を取ることが明らかになった(図1c)。2つの FRET 状態と実際の構造との対応は現時点では不明だが、挿入した蛍光タンパク質の位置から考えて、電子顕微鏡観察で予測されたテールとヘッドとの間の相対的な角度変化を FRET 変化が反映していると推測される。

これら構造状態を検出する蛍光プローブを利用することで、ATP 加水分解サイクルの各中間状態と構造状態および微小管結合状態との対応をつけることが可能となった。ヌクレオチドアナログや変異体を用いて ATP 加水分解サイクルの中間状態にダイニンをトラップした(図1d)。ダイニンは apo 及び ADP 結合状態では微小管に強く結合し、State I 状態にあり、ATP 及び ADP·Vi 結合状態では微小管に弱く結合し、State II 状態をとることが明らかになった。これらの結果および速度論的解析を FRET 変化と微小管結合解離に適用した結果(Mogami ら、2007)を基にしたダイニンのクロスブリッジサイクルモデル(図1d)は、apo 状態ではダイニンは微小管に強く結合し、構造状態は State I をとる。ATP を結合すると、その加水分解前にダイニンは微小管から解離し、続いて構造を State I から State II に変化させる。加水分解後の ADP·Pi 状態では弱い結合かつ State II 状態をとる。Pi 放出後の ADP 状態でダイニンは再び強い結合状態に入り、その構造を State II から State I に変化させる。ADP 放出後にステップに戻る。このモデルでは、微小管の変位を生み出すとされるパワーストロークは、ステップで起こることになる。

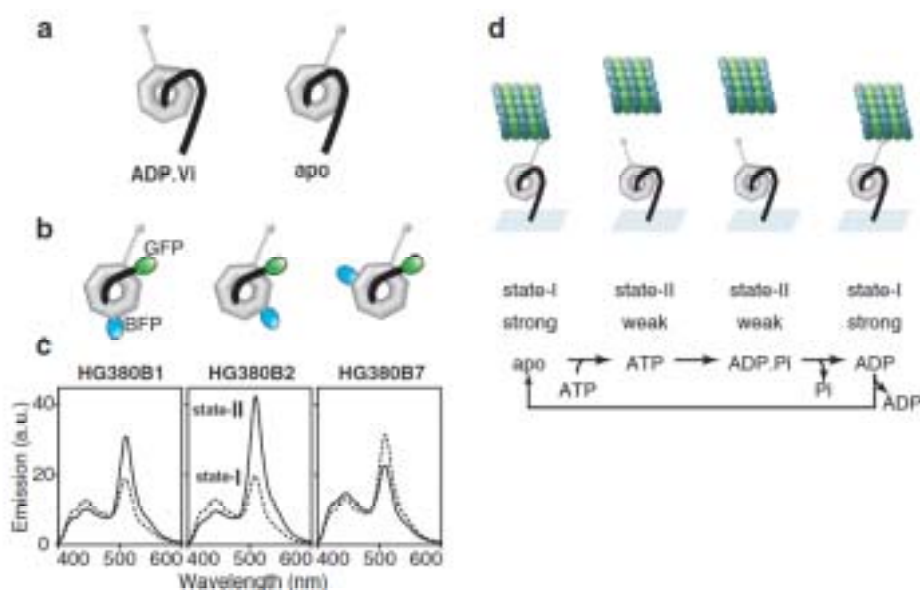


図1 ATP 加水分解に伴う重鎖の構造変化. (a) アポ状態と ADP.Vi 状態にあるダイニンの電子顕微鏡図(Burgess2003 より引用). (b) FRET センサー (FRET 供与体と受容体ペア) をもつダイニン重鎖の設計. FRET 受容体である GFP はテール N 末端に, FRET 供与体である BFP はリング中に挿入した. (c) FRET センサーを融合したダイニンの蛍光スペクトル. 200 μ M ADP あるいは ATP 添加後, State I and State II と名づけたふたつの状態があることがわかる. (d) 電子顕微鏡像と FRET に基づいたダイニクロスブリッジサイクルのモデル.

以上の結果から、ATP 加水分解サイクル中にテールがヘッドに対して動くことは確かだと思われる。しかし、このテールの“動き”がダイニンの“運動活性”にどの程度寄与するのは明らかではなかった。そこで次に微小管滑り運動活性評価系を工夫することで、この点を検討することにした(Shima ら、2006)。通常の運動活性評価系では、ダイニンのテール末端を特異的にガラス表面に固定し、その上で微小管を滑らせる(図 2b)。我々はテールの動きを限定もしくはキャンセルさせるために、ダイニンのガラスへの固定部位を変化させることにした。具体的には、まずテール内およびヘッド内の異なった位置にピオチン化タグを挿入した 8 種類の組換え 380-k ダイニンを作成した(図 2a)。次にこれらのダイニンをアビジン-ピオチン系により部位特異的にガラスに固定したのち、その微小管滑り運動活性を測定した。この系でヘッドを固定した場合、テールドメインの“動き”は微小管滑り運動に反映されない(図 2c)。これらのダイニンは、テール末端近傍を固定したときのみ速い運動速度(1-3 μ m/s)を示したことから(図 2d)、この顕著な運動活性にはテールドメインの“動き”が必要であることが明らかになった。一方、ヘッドを固定した場合、3 種類のコンストラクトの全てが遅い速度(0.05 μ m/s)で微小管を滑り運動させた(図 2d, R1, R2, R7)。この結果は、テールの動き、すなわちパワーストローク以外に、ダイニンの遅い運動活性を担う第二の機構が存在することを示唆している。この第二の運動機構の詳細は不明

であるが、いくつかの可能性が考えられる。例えば、ミオシンやキネシンの運動機構の一部であると考えられている方向性のあるブラウン運動によるのかもしれない。また、ストークドメインがヘッドに対して動くことに起因する可能性も考慮する必要がある。

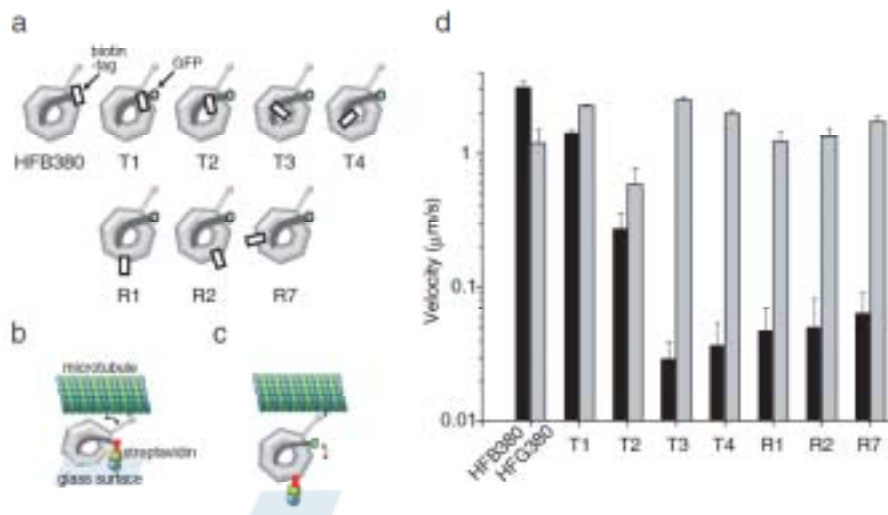


図2 部位特異的ピオチン化ダイニンの滑り運動アッセイ(a) ピオチン化ダイニンの設計. ピオチンタグはテールかヘッド1箇所に挿入. (b, c) 滑り運動アッセイの想像図. (b)ではテールのピオチンタグが (c)ではヘッドのピオチンタグがガラス上に固定されたストレプトアビジンに結合している. (d) MT 滑り速度. ダイニンをピオチンタグを介してストレプトアビジンに固定すると, 滑り速度は固定位置に依って劇的に変化する.

2) 複数の ATP 結合・加水分解部位の機能

ダイニン重鎖は6つの AAA+モジュールをもち、複数の ATP 結合・加水分解部位をもつ。Walker A (P-loop と呼ばれる)は ATP 結合に必須であり, Walker B モチーフ後者はその加水分解に必要である。ダイニンのヘッドを形成する6個の AAA+モジュールを見ると, N 末側の4個, AAA1-AAA4 にはこれらのモチーフが一般的に保存されており, AAA5 と AAA6 には存在しないので, ダイニン重鎖は最大で4個の ATP 結合・加水分解部位を持つことが示唆される。実際, 軸系ダイニンの1種では重鎖1本当たり, 4分子の ATP/ADP が結合することが示され, また, 細胞質ダイニンでは, 少なくとも AAA1 と AAA3 モジュールが実際に ATP 加水分解活性をもつことが示唆されている (Kon ら、2005)。これら4個の ATP 結合・加水分解部位のモーター活性への寄与を明らかにするために, それぞれの Walker A モチーフに変異を入れた変異体の解析を細胞性粘菌の細胞質ダイニンで行った (Kon ら、2004)。これらの研究では Walker-A モチーフへの変異導入が ATP 結合を阻害することを利用している。まず, 変異体の細胞内局在の様子から, 少なくとも AAA1 と AAA3 モジュールの ATP 加水分解サイクルがダイニンの機能に重要であることが明らかになった。例として図3aに細胞性粘菌由来 380-k ダイニンの Walker A 変異体の細胞内局在を示した。細胞内には数 mM レベルの ATP が存在するため, 野生型の組換えダイニンは微小管と共同在せず, 細胞質全体に広

がる。しかし、AAA1 もしくは AAA3 モジュールへの ATP 結合が変異により阻害されると、微小管と強く共局在することから、モーター活性に重篤な障害が生じることが示唆された。

次に、各変異体のモーター活性を実際に評価したところ、AAA1 と AAA3 モジュールでの ATP 加水分解サイクルの機能は等価ではないことが明らかになった (kon ら、2004)。図 3 b に示すように、AAA1 の変異体は微小管滑り運動活性を完全に失った。しかし、AAA3 の変異体では、速度は野生型の 1/20 以下と大きく減少するものの、運動活性自体は残存していた。

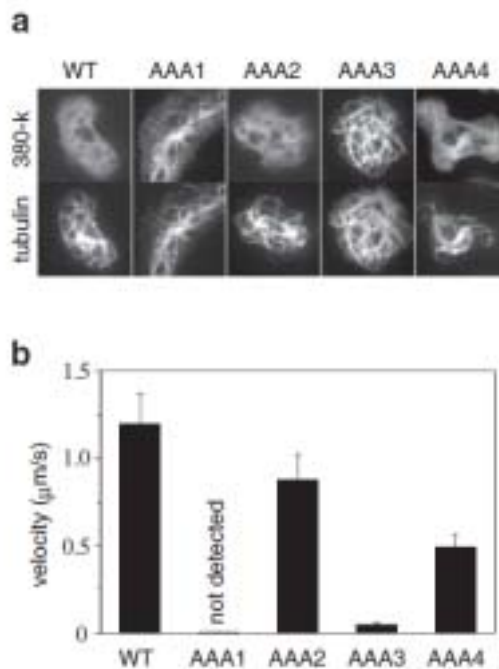


図3 ダイニンヘッドに存在する4箇所のATP結合・加水分解部位の役割. (a) 野生型およびWalker-A変異体を発現している細胞の姿. (b) 野生型およびWalker Aダイニンの滑り運動速度.

また、微小管結合解離および FRET 変化を指標として、クロスブリッジサイクルを解析した結果、AAA1 変異体ではサイクルが全く進行しないことを見出した。一方、AAA3 変異体では、サイクルのステップ から まで ATP 依存的な微小管からの解離、および State I から State II への構造変化 は進行するが、その後のステップに問題を生じることが明らかになった。以上の結果から、AAA1 の ATP 加水分解サイクルはダイニンの運動活性に必須であり、おそらくクロスブリッジサイクルに直接関与するものと思われる。また、AAA3 での ATP 結合・加水分解もモーター活性に重要な役割を果たし、AAA1 により駆動されるクロスブリッジサイクルを直接もしくは間接に制御していると考えられる。さらに、AAA2 または AAA4 への変異導入も微小管滑り運動活性に影響を与えたことから、この 2 つの ATP 結合・加水分解部位も制御機構を担っている可能性がある。実際、軸系ダイニンでは ATP もしくは ADP が制御因子として働き、モーター活性を変化させることが報告されている。これらの制御は AAA2-AAA4 モジュールに ATP/ADP が結合することにより引き起こされると推測さ

れる。

3・2・2 ダイニン・微小管相互作用と *in vitro* 運動の解析

1) ダイニンストークヘッドと微小管の複合体の構造解析

ダイニンはモータードメインのリング構造から突き出したストークの先端（ヘッド）で微小管と相互作用することが知られているが、その構造的基盤は明らかにされていない。ダイニンストークヘッドと微小管の複合体を作製し、氷包埋電子顕微鏡法により複合体の画像を得て、らせん対称性を利用した3次元構造解析を行った結果、微小管上のダイニン結合部位を同定することができた（図4）。チューブリンドライマーあたり1分子のダイニンストークヘッドが結合しており、ダイマー内の、チューブリンに対応している2ヶ所でコンタクトをもっていた。特に、チューブリンのヘリックス12とコンタクトしていることが明らかになった。この微小管上の結合部位は、キネシンが結合する部位とオーバーラップしており、モーター以外のMAPsが結合する部位とは異なるものであった。この結果は、ダイニンストークヘッドとキネシンが微小管との共沈実験で競合するという正化学実験の結果と一致する。このことから、微小管上を運動するモーター分子がその機能を生み出すためには、微小管上の特定の部位を認識することが必要なのではないかと推測される。

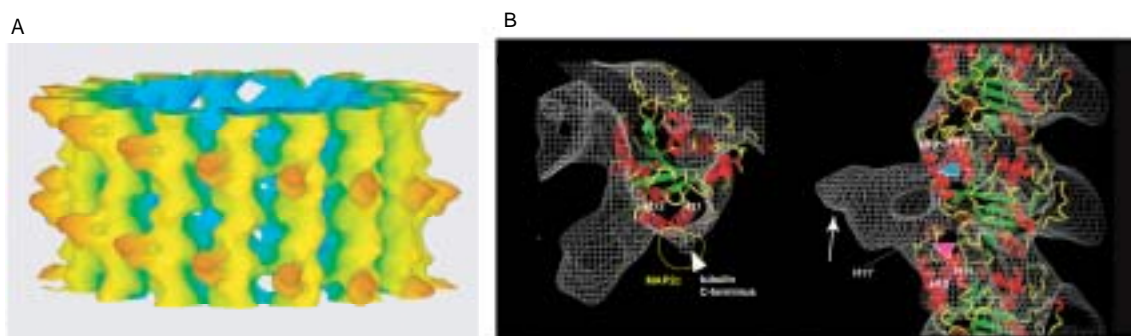


図4 ダイニンストークヘッドと微小管複合体の構造解析 A:ダイニンストークヘッドと微小管複合体の3次元再構成像。チューブリンドライマーあたり1個のストークヘッドの結合（オレンジ部分）がみられる。B:複合体の密度マップにチューブリンの分子構造を重ねたもの。左はtop view、右はside view。ストークはチューブリンドライマー内のチューブリン（赤矢頭）とチューブリン（青矢頭）の2ヶ所でコンタクトしている。ストーク結合領域はMAPsの結合領域（白矢頭）とは異なる。

2) ダイニンストークの微小管上の挙動

ダイニン運動発生メカニズムの鍵となるダイニンと微小管の相互作用を明らかにするために、ダイニンの微小管結合部位であるストークのコイル部の長さの異なる一連の組換え体を作製した。可溶化されたフラグメントのCD測定を行い、ヘリックス含量を算出し、短いフラグメント（DSH159）はほとんどコイル部がなく、長いフラグメント（DSH278）はcoiled-coil構造をとるものと推測された。これらのフラグメントの微小管に対する親和性を共沈実験で調べたところ、DSH159よりDSH278のほうが親和性が低いことがわかった。

DSH278 の解離定数は、Gibbons *et al.* (2005) の報告 で強い結合とされるストークの解離定数と同程度であるが、パワーストロークを生み出すための結合はさらに強いものであると考えられる。また、これらの分子をゲルゾリntagを用いて可視化し、微小管との相互作用を直接観察した結果、DSH278 のほうが微小管上の滞在時間（結合してから解離するまでの時間）が短いことが明らかになった（図5）。以上の結果は、コイル部の構造変化により微小管との結合解離が調節されていることを示唆しており、研究項目1のダイニン組換え体の結果を支持している。

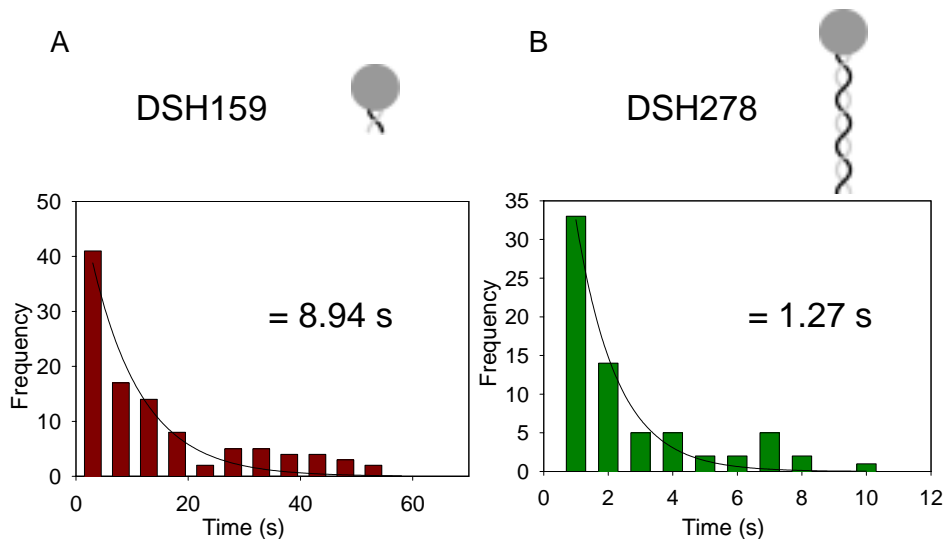


図5 ダイニンストークヘッド 1 分子が微小管上に滞在する時間のヒストグラム A:コイル部がないストークフラグメント(DSH159) B:コイルドコイルをもつストークフラグメント(DSH278)

3) ダイニン 1 分子の可視化と微小管上の挙動

ダイニンに結合するダイナクチン p150 のダイニン結合部位をタグとして用いることにより、ブタ脳から精製した native 細胞質ダイニン 1 分子を蛍光顕微鏡下で可視化することに成功した（図 6 A）。そこで、1 分子細胞質ダイニンの微小管上の運動観察を試みたが、キネシンで見られるような運動連続性は観察されなかった。この系ではダイニンは少量のタグとなる分子がついているのみで、積荷や負荷を負っていない。以下に示すように、ビーズを積荷とし光ピンセットで負荷を与えた場合には、1 分子ダイニンが運動連続性を示すことから、ダイニンは負荷をかけることによって運動連続性を生み出していることが考えられる。この無負荷の系では、ヌクレオチド状態による微小管との結合親和性の違いが明確に区別され、ADP・Pi 状態でもっとも弱く、No nucleotide、ADP の順で強くなり AMPNP 状態が最も強いことが明らかになった（図 6 B）。また、相互作用している時間の解析（図 6 C）から、ダイニンの ADP・Pi 状態における微小管との親和性は、単離したダイニンストークでコイル部分を長く持つものと微小管の親和性が同程度であることがわかり、コイルを巻いたストークのデフォルト状態は弱い結合状態であることが示唆された。

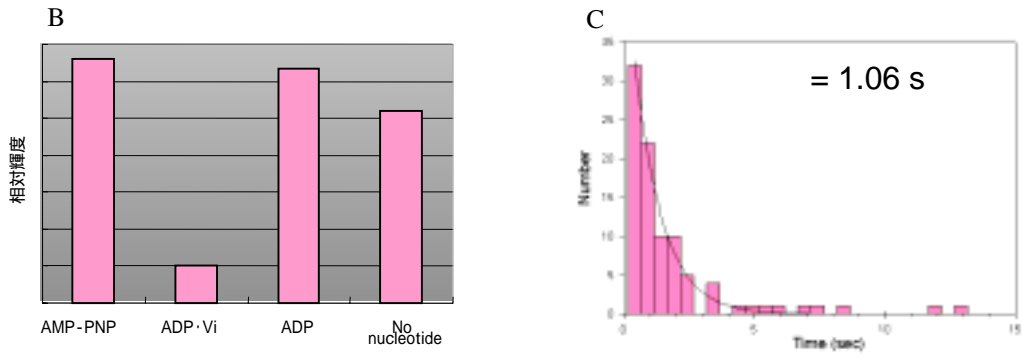
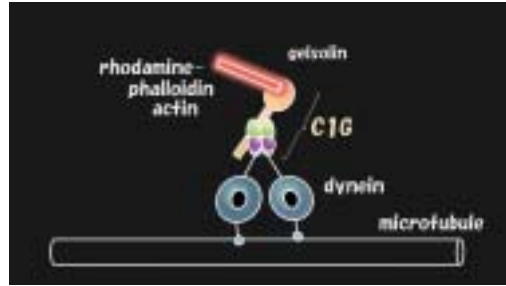


図6 細胞質ダイニン1分子の微小管相互作用の直接観察 A: ダイナクチン p150 フラグメントとゲルゾリンタグを利用して1分子の細胞質ダイニンを可視化する方法の模式図 B: 各ヌクレオチド存在下で微小管上に結合する細胞質ダイニンの量(相対輝度)の比較 C: ADP·Vi 存在下でのダイニンの微小管上の滞在時間のヒストグラム(平均寿命は 1.06 sec)

4) 細胞質ダイニン1分子の力学計測

細胞質ダイニン1分子の運動特性を詳細に調べるために、ブタ脳から精製した native 細胞質ダイニンをビーズに付着させ、光ピンセットを用いたナノメートル運動計測系で調べた。その結果、ダイニンは連続運動性を有し、また 8 nm のステップを刻みながら微小管のマイナス端に向かって動き、最大力 7 pN を出すことが明らかになった(図7)。ATP 濃度の広い領域(20-2000 μM)で、および 0.1 - 7 pN の負荷の領域で、ステップサイズは変わらず 8 nm であった。ステップとステップの間の時間間隔は1次のエクスponentialにフィットし、ステップ発生過程が1つの律速段階からなるスキームで行われていることが示唆された。これらの挙動は、以前に報告した軸系外腕ダイニン1分子の挙動とよく似ており、また微小管上の極性は異なるがキネシン1分子の挙動とも極めて似ていて、ATP 濃度や負荷によってステップサイズを変換するギアが存在するという報告(Mallik *et al.* 2004)とは相容れないものであった。このことは、ダイニンがキネシンと分子構造が大きく異なるにもかかわらず、キネシンと同様な hand-over-hand メカニズムで運動していることを示唆しており、双頭構造の頭部のそれぞれが直径 15 nm であることを考慮すると、双頭がオーバーラップしながら交互に前進することが考えられる。

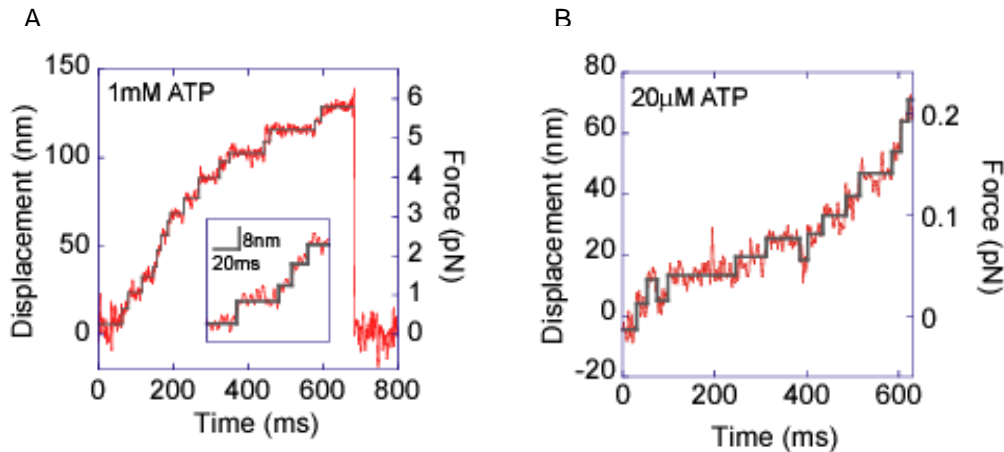


図7 ビーズに結合させた細胞質ダイニン 1 分子の運動の光ピンセットを用いた計測
 A: 1 mM ATP 存在下での運動の軌跡 8nm のステップサイズ、約 6pN の最大力を示している。
 B: 20 μ M ATP 存在下での運動の軌跡 1mM ATP 存在下と同様に 8nm のステップサイズを示している。

5) ダイニンの運動に必要な微小管プロトフィラメントの配向と本数

ダイニンが結合する微小管上の部位は上記の研究で明らかになったが、これはおそらくダイニンが微小管に最も安定に結合している状態を反映していると考えられる。実際に運動を行う時に必要とする微小管側の構造はこの部位だけとは限らず、たとえば同じ向きに配向した 2 本のプロトフィラメントにまたがる領域を認識しているかもしれない。また、双頭のダイニン分子が運動するために、2 本のフィラメントにまたがっているかもしれない。ダイニンの運動に何本のプロトフィラメントが必要であるか、1 本のプロトフィラメントでも運動を発生することができるのかどうかを明らかにするために、微小管とは異なるプロトフィラメントのアレンジメントをもつチューブリンのポリマーを作製した。Zn シートは微小管を形成したときのプロトフィラメントの外側と内側が反転して 1 本おきに交互に並び、さらにプラス端とマイナス端の向きも 1 本おきに反転したシート状の構造であり、Zn マクロチューブはシートが巻き上がってチューブ上になったものである。構造上、ストークが結合するヘリックス 12 はこれらの構造体のプロトフィラメント間に埋もれており、Zn シートでは一方の端にのみ露出しているが、Zn マクロチューブでは露出しているところがない。これらの構造体をダイニンの *in vitro* motility assay で調べたところ、Zn シートは微小管とほぼ同じ速度で、しかしカーブを描きながら運動した(図 8)が、Zn マクロチューブは全くダイニンに結合できなかった。Zn マクロチューブがダイニンと結合できないことは、ダイニンがヘリックス 12 が露出していないプロトフィラメントの構造には相互作用できないことを示唆している。また Zn シートがカーブを描きながら運動するのは、Zn シートが微小管とは異なり柔らかく曲がりやすい構造であることと、ダイニンが Zn シートの端の

み相互作用していることを示唆している。これらの結果は、ダイニンの運動発生にはプロトフィラメント1本で十分であることを表している。

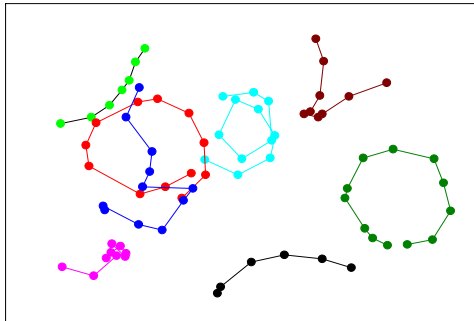


表 3種類のチューブリンポリマーの *in vitro* motility assay

MT	$0.81 \pm 0.22 \mu\text{m/s}$
Zn-sheet	$0.81 \pm 0.38 \mu\text{m/s}$
Zn-macrotube	No movement

図8 ダイニンをコートしたガラス上の Zn シートの運動の軌跡 微小管はほぼ直線状の軌跡を示したが、Zn シートはカーブした軌跡を示した。カーブの向きは右と左がほぼ半々であった。

(2) 研究成果の今後期待される効果

ダイニンは独特の構造と運動様式を有する AAA+型分子モーターであるので、その運動機構の解明は、細胞骨格系モータータンパク質の運動メカニズムについて新たな知見を与えるのみならず、多様な機能をもつ AAA+ファミリーの作動機構理解にも大きく貢献するものと期待される。我々の生物物理学・生化学的技術の進展はこの運動機構解明に多大な貢献をしており、ダイニンの構造変化やクロスブリッジサイクルについては、ようやく概要が見えてきたと言えよう。

しかし、今後明らかにしなくてはならない点が多い。例えば、微小管結合部位であるストーク先端に存在する微小管結合部位と AAA1 モジュール内の ATP 加水分解部位との間の直線距離は 20 nm 以上にも及び、ダイニンが運動活性を発揮するためには、この長距離にわたり、しかも長いコイルドコイルを介した情報伝達を行う必要があるが、これがどのような機構によるのかは大きな謎である。また、テールドメインの一部であるリンカーは、ヘッド内の複数の AAA+モジュールと相互作用していると推測され、これがパワーストローク発生には重要であると考えられるが、その詳細は明らかではない。これらを含む多くの問題を解決するには、ダイニンの構造についての知見は不十分であり、今後の最重要課題のひとつはダイニンの構造を原子レベルの分解能で明らかにすることであろう。前者について我々のグループは、すでに組換え体の大量発現によりストークのコイルドコイルを含めた領域の結晶化に成功しており、その解析を進めている。この構造が解き明かされ、クロスブリッジサイクルに対応した構造変化を捉えることができると、ダイニンの作動原理の理解が大きく進むものと思われる。

我々のグループのこれまでの研究は、細胞質ダイニンを主体にしたものであった。細胞質ダイニンと軸系ダイニンは基本的におそらく同じ機構で作動していると考えられるが、運動の速さや ATP・ADP による制御などにおいて異なる性質が観察されている。また、軸系ダイニンではダイニン分子間の相互作用や協同性が注目される。今後、細胞質ダイニンで得られた結果を基盤に、軸系ダイニンの作動原理についても明らかにする必要がある。この点では、我々がこの研究課題の当初から手がけていてなかなか進まなかった繊毛虫テトラヒメナを発現系とした軸系ダイニンの組換え体の作製に、最近、ようやく成功しており、今後、解析が進むことが見込まれている。さらに、この軸系タンパク質の発現系は、当研究チームの課題である「振動するバイオナノマシンの原理と構築」で進められてきた他のグループの研究成果に基づいて、次の段階のバイオナノマシンの研究を発展させるための大きなツールとなることが期待される。

3.3 熱エネルギー拡散による人工的なナノ滑り運動の実現（長岡技術科学大学 本多グループ）

(1) 研究実施内容及び成果

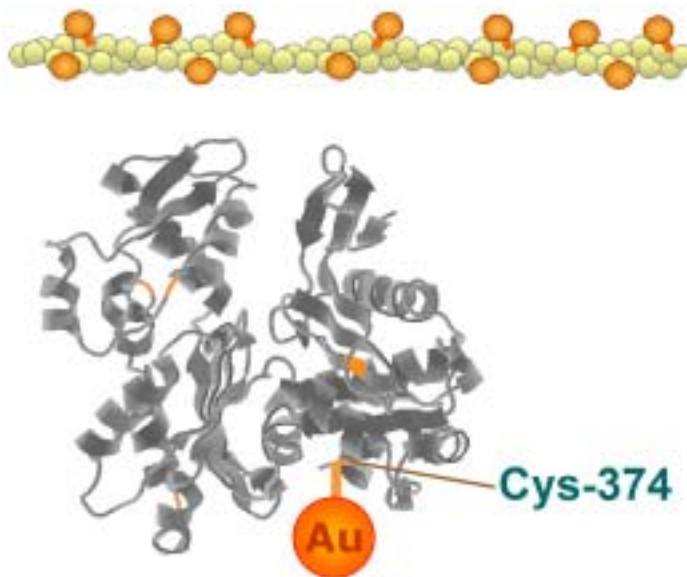
実施内容

細胞内フィラメント系は、モータータンパク質と対を成し生物の代表的運動である滑り運動を担っている。代表的な生体フィラメントであるアクチン繊維に、1.4 nm の金属微粒子（ナノゴールド）を化学結合させ、赤外レーザー光を照射することにより、特定のアクチン繊維と、その周囲の間に温度差（エネルギー差）を作る。この温度差に従ってエネルギー移動するときに、アクチン繊維のすべり運動が発生すると考えた。

すべり運動の分子機構についての「サーマルラチェットモデル」は実験的な証明が難しい。本研究テーマでは、たんぱく質であるアクチン分子に金属を共有結合させることで、特定の繊維に対するエネルギーの注入を試みた。これが実現すれば、モータータンパク質であるミオシンの ATP 加水分解のエネルギーなしに、アクチン繊維の運動が実現することになり、すべり運動の分子機構を知る上できわめて重要な結果をもたらすと考えられる。

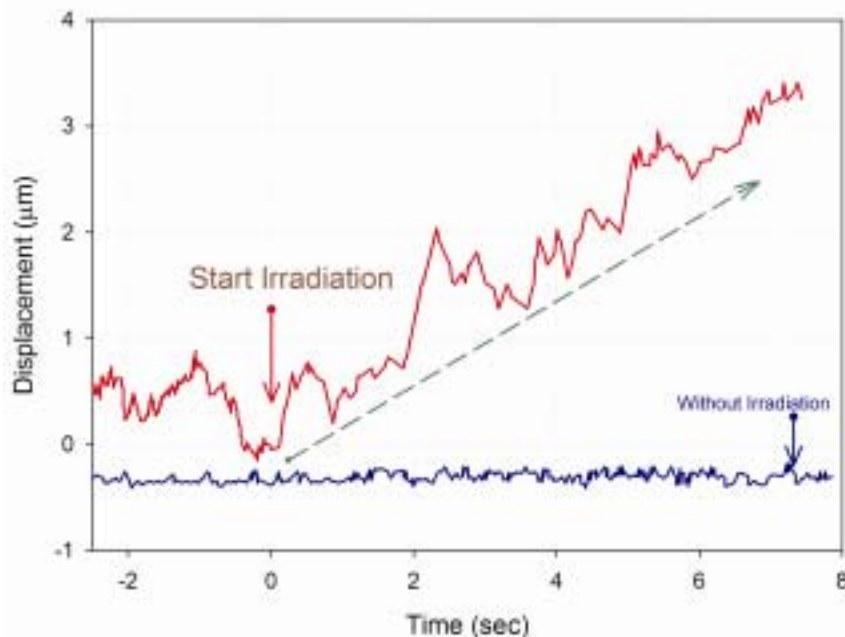
実験方法

アクチン分子のシステイン 373 に、マレイイミド基を介して 1.4 nm の微小な金粒子を結合させる（図）。このアクチンを約 20% 含む共重合アクチン繊維を作成し、顕微鏡下で観察するために一様な蛍光標識をする（図）。この繊維を他の繊維状重合体（たとえば金粒子を結合させていないアクチン繊維や、メチルセルロース重合体など）の中に懸濁する。蛍光を発する繊維は、いわゆる「レプテーション」と呼ばれる一次元の熱運動を示す。蛍光顕微鏡に取り付けた赤外線レーザーを照射すると、金粒子は周りの水に比べて温度が上昇する。予備的なアッセイにより約 10 度程度の温度差ができることが推測された。



実験成果

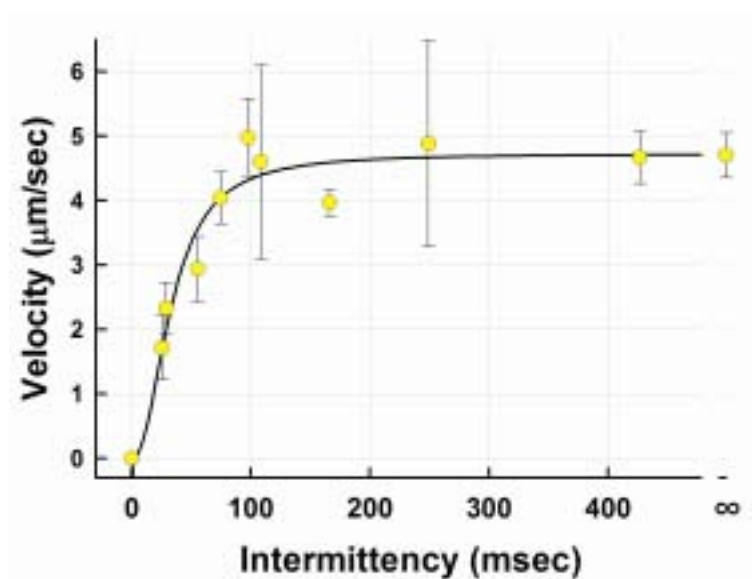
赤外線レーザーを照射し続けても運動は実現しないが、偶然、周期的に照射をとめることで運動することがわかった。10 ミリ秒間隔で波長 1062 nm 出力 600 mW のレーザーを当てたところ、毎秒約 5 μm の速さで、長さに沿った一方向の運動を起こした。図に示したものは、時刻 0 でレーザーの间歇照射を開始したところ、照射しないものに比べて十分な速さで一方向に運動していることを示している。この速さは、骨格筋の収縮速度に匹敵するため、生理的な運動間こうと深いかわりを持っている可能性が強いことが強く示唆された。



観察された運動は滑らかな運動ではなく往復運動を伴うものであった。また、観察できる全繊維のうち、一方向運動を示すものは約 10%程度であった。しかしながら、明るく標識した短いアクチン繊維に、暗い標識アクチンを重合させることで運動中に繊維の極性を観察できるようにしたところ、運動を示した繊維はすべて、生体内と同じマイナス端方向に動くことがわかった。この人工運動の方向はアクチン繊維のわずかな構造的異方性により、決定的に定められていることがわかった。このエネルギー拡散を伴う人工滑り運動は、タンパク質からなる生体ナノマシンに共通する動作機構である可能性がある。

この人工運動が実現するためには、適切な時間照射をとめる必要があった。これは、運動には、エネルギーの注入だけでなく、その放出(緩和)が必要であることを示している。緩和時間を定量的に調べたところ(図)、数十ミリ秒以上の緩和期間がないと運動しないこと

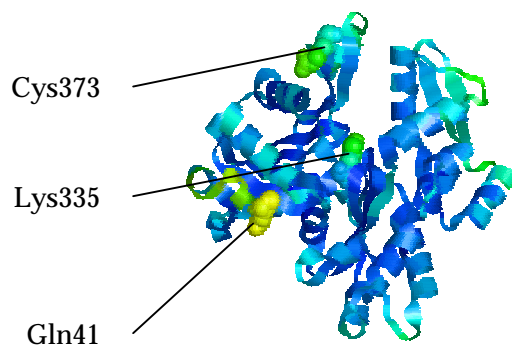
がわかった。この時間は、生理的な ATP 加水動実現のメカニズムを知る上で重要である。



アクチン分子の Ly 分解サイクルの時間と同じオーダーであり、運 s335 や、Gln41 残基にナノゴールドを導入したが、意外なことに、いずれの場合も有意な一方向運動は実現しなかった。Cys373 が、ミオシン結合部位に極めて近いことを考えると、アクチンの立体構造上エネルギーの受け取りに優位な位置があると考えられるばかりでなく、今回実現された人工すべり運動が生体内でミオシン分子モータにより行われている運動と同種のものである可能性がさらに強くなった。レーザー照射により実現された人工運動は、タンパク質からなる生体ナノマシンに共通する動作機構により実現している可能性がさらに強くなった。

結果の位置づけ

本グループの研究結果は、レーザーのような人工的なエネルギーを用いてタンパク質ナノマシンの運動が実現できることを示している。化学力学エネルギー変換の分子機構に関するまったく新しい知見を与えることになる。国内、国外においても類似の研究はまったく行われておらず、純粋に人工的に生体運動を実現した世界で最初の例であると考えられる。



(2) 研究成果の今後期待される効果

生理的な運動との関わり

この人工運動が生理的な運動と同じ機構で動作しているかについては、本研究期間内に解明することはできなかった。技術上の問題点は、1.4 nm の金属ではレーザーのエネルギーを十分吸収できないという点である。この理由でアクチン繊維周囲にできる温度勾配(エネルギー勾配)は、生体内でミオシン ATP により作られるものに比べてかなり小さくなっている可能性がある。十分なエネルギー勾配が与えられるようになれば、本領域のテーマであるソフトナノマシンを人工的に作成できたことになるばかりでなく、エネルギーを外部から導入できるという点で、生物のものよりもさらに進んだ微小機械を作成できる可能性も秘めている。

繊維の極性と運動との関係

本研究で用いたアクチン繊維は構造上の違方法性を持っている。残念ながらこのタンパク質以外での運動を実現できなかったが、観察された運動が繊維状タンパク質の構造違方法性に基いていることは明らかである。今日の微細加工技術の発展により、タンパク質以外でも違方法性を持った数ナノメートルのフィラメントを作ることができれば、100%人工的で、生体と同じ動作をする人工アクチュエーターを作成することも可能であろう。

3.4 振動解析装置の開発と応用実験(東京大学 上村グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

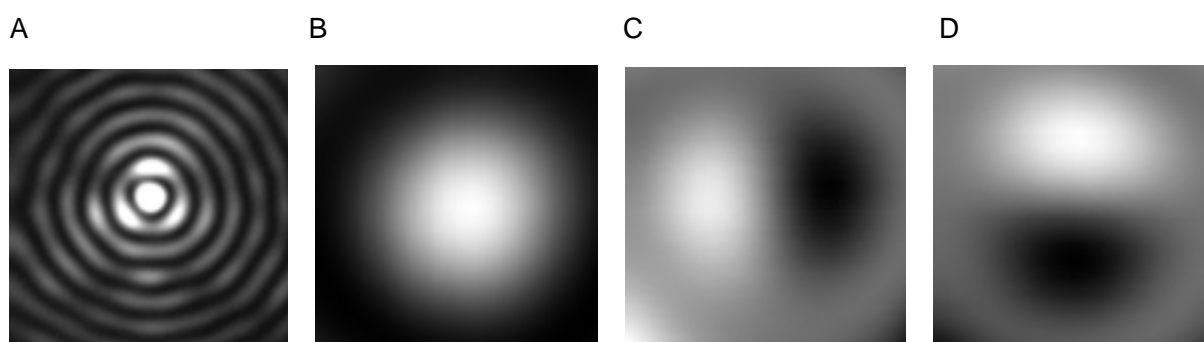


図1 レーザー暗視野照明法を用いたマイクロビーズ変位計測の例。アキシコンレンズを通して環状にしたレーザー光を顕微鏡下のマイクロビーズに集光させたのち、マイクロビーズを2次元に走査するとAのような輝度変化データが得られる(一辺 4 μm)。その中心付近(B, 一辺 0.5 μm の範囲)でX, Y方向へ変位させ、4分割フォトダイオードで変位を計測したものがCおよびDである。信号の変化を明暗のパターンで示している。計測に最適の'sweet spot'を正確に見出し、再現性よく安定した位置計測ができるようになった。

光学顕微鏡下で高い精度の位置計測法を目指すには、高い輝度の観察像を得ること、観察像の輝度分布を精密に評価すること、この2点が最重要課題である。本研究では、レー

レーザー光を光源に、アキシコンレンズを使った暗視野照明法を開発し、ショットノイズの原因となる背景光を減らすと同時に、高い輝度の観察像を得ることに成功した。さらに、LabViewソフトを用い高性能ナノポジショナーを精密制御することで、安定して、正確な輝度分布を調べ、最適な計測条件を見つける手法を確立できた。図1にその例を示す。まず、2次元的に観察試料となるマイクロビーズを走査しながら、その散乱光データを収集し、計測に最適のレーザー集光点(暗視野照明の輝度の最も高い位置)を再現性よく見つけ出すことができるようになった。計測範囲は100nm四方の狭い範囲であるが、XY方向の2次元変位を安定して計測できることがわかった。

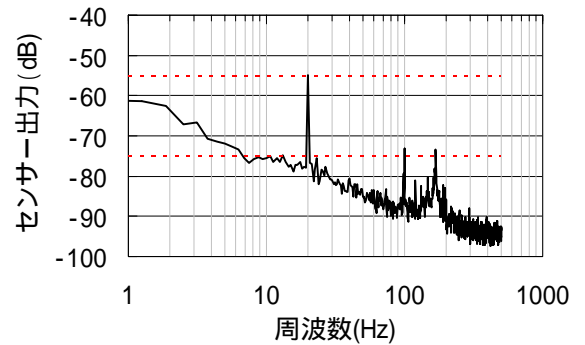
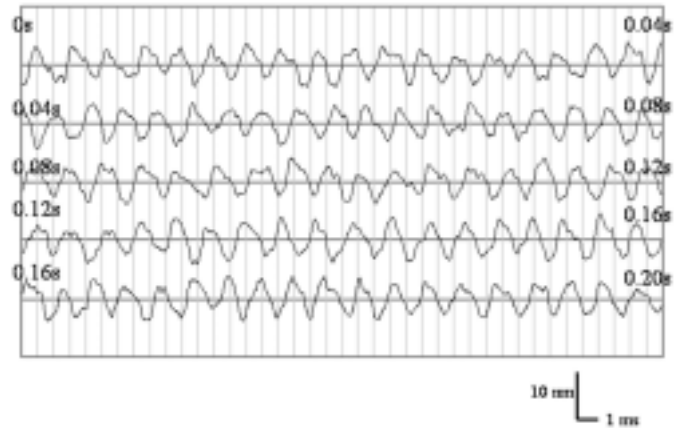


図2 レーザー暗視野照明法を用いたマイクロビーズ変位計測の精度を示す例。1nmの振幅でマイクロビーズを人為的に振動移動させた計測例を示す。0.1nm(10-10,000Hz)の精度が得られることがわかった。

図2に計測の精度を評価した例を示す。0.1nmの位置計測精度，10kHzの時間分解能を達成できた。現在、3次元計測のための装置へシステムアップを試みているが、2次元的な位置計測精度に関しては、当研究室の開発してきた従来型的手法(Kamimura & Kamiya, 1992)に比べて100倍、また、対物レンズ後焦点面での散乱光計測(Rohrbach & Stelzer, 2002)や臨界角プリズムを使った変位計測法(Higurashiら, 1998)など、他の光学系を使った手法に比べて10倍以上、精度を向上させることができた。また、アキシコンを使った暗視野照明方法としては、すでに特許取得が行われているが(守谷、#160723, 1994)、本研究により実用的な照明方法としてはじめて実現できた。

図3に、ウニ精子ペン毛軸系的高速微小振動の計測例を示す。従来手法では観察の難しかった振動波形の詳細が見えてきた。このような解析から、振動現象は単純なサイン波波形の繰り返しではなく、峰別れのパターンでいくつかに分類できることがわかった。この峰別れは、ダイニンによる滑り力発生過程の協同現象、および、そのゆらぎを反映したものと考えている。また、滑り運動中のサブステップを観察している可能性も高く、実験溶液条件を変えることで、この2つをうまく区別することができるのではないかと考えている。ダイニン分子が振動的な振る舞いをするメカニズムの解析に関して新しい知見が得られるものと期待している。



3 ウニ精子軸系における高速微小振動を計測した結果。

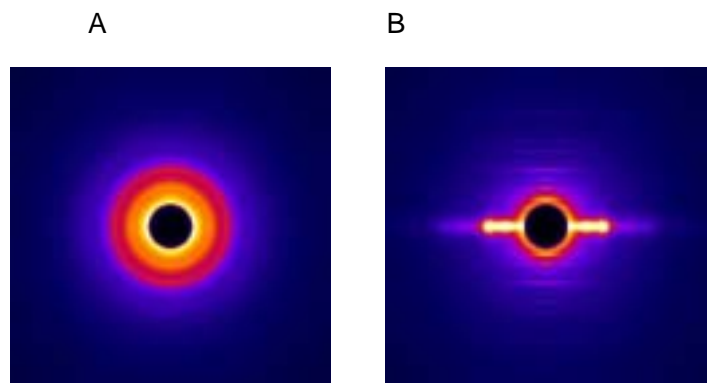


図4. X線小角回折の観察。ウニ精子鞭毛を一定方向へ配向させ、波長1.6のX線で回折を調べた。Aは、配向させる前のもの、Bは本研究で開発した流動配向法で配向させたものから得られた回折。縦方向が子午線回折で、ペン毛軸系の長軸方向の周期構造を反映した層線が多数見られる。

3-2) X線回折による軸系構造ダイナミクスの解析

AFM を使った先行研究(Sakakibara ら,2004)により、ベン毛軸系は長軸方向への微小管滑り運動だけではなく、3次元的な構造変化をしていることが示唆されている。そのような構造変化をX線回折で検出する研究も行った。X線回折でベン毛軸系のような繊維構造を解析する場合、多数の軸系を一方向へ配向させることが必須である。本研究では、非ニュートン流体中での流動配向させる技術をあたらしく開発した。これにより、5度以

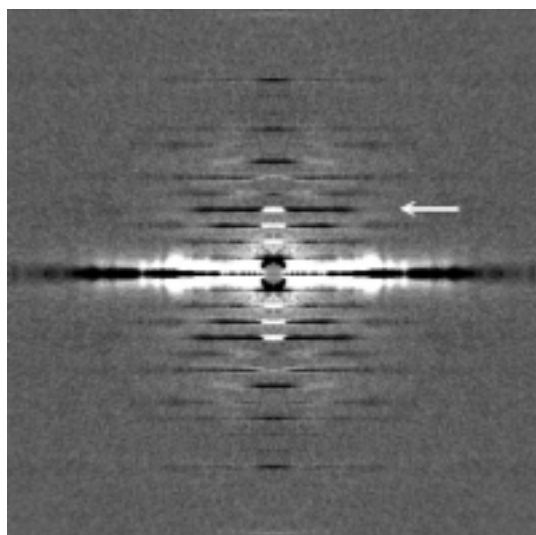


図6. ベン毛軸系の構造変化を示すX線回折。ダイニンが微小管と強く結合する条件(ATP なしの条件)と、結合をなくす条件(ATP バナジン酸)での回折パターンの差を示す。24nm の信号はダイニン外腕の信号を示すが、この信号の子午線上のピークが強度を減少させる(白矢印)のと共に、他の多数の層線が黒いスポットとして現れてくる。これは架橋を解離したダイニンを含め、他の多数の軸系内コンポーネントがラセン的な配置をとることを意味している。

内の角度誤差で軸系を一方向へ配向できることがわかった(図4)。この手法は、一般の生体繊維構造の繊維回折の研究への応用も期待されている(図5)。特記すべき特長は、数秒~数十秒で配向が完了できる点である。これは従来の低速遠心法や磁場配向法(Stubbs, 1999)が日~週の長い期間を要したのに比べて画期的な進展である。特に生理活性を維持したままの生物試料を調べる応用研究として今後期待される。医学的な検査方法としての確立も望まれる。

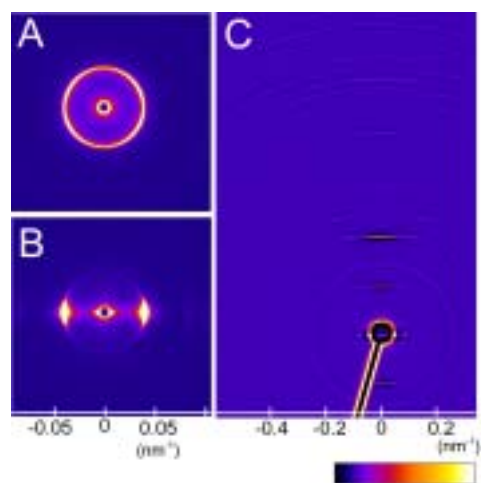


図5. 本研究で開発した新しい配向方法の他の生物試料への応用。ここではTMVを使った例を示す。A, 配向前。B、C配向後。数秒間の配向処理でこのような高い繊維配向が達成できるのが大きな特長である。

本研究から、ペン毛軸系の周期的構造に関する多くの情報がX線回折から得られることがわかった。特に、96nm 周期のスポーク頭部、24nm 周期のダイニン外腕は、周期性は一定であるが、溶液条件によって、らせん状の配置を取ったり、長軸方向に垂直な面内に配置したりといったダイナミックな変化が、本研究で明らかとなった(図6)。また、シミュレーション解析から、この構造変化は、図7の2つの構造間の遷移現象としてうまく説明できることもわかった。赤道方向のX線回折の信号は複雑ではあるが、軸系の直径方向のダイナミックな変化に関する情報を得ることができると期待している。今後、光学顕微鏡下の精密三次元解析のデータと照合させる研究へと発展させる計画である。

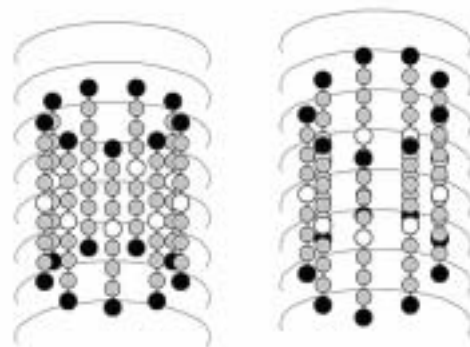


図7. 構造変化を示すモデル。左はダイニン外腕が長軸に平行な円盤上に配置するモデル。右は、約20度の傾斜角を持つ円盤上に配置する場合。図6の変化とこのモデルはよく一致することを回折パターンシミュレーションで確かめた。

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究では、光学顕微鏡を使った高い精度の2次元位置計測技術に関して、0.1 nm / 10 kHzという精度が達成できることを実験的に示すことができた。単分子計測などの生物物理学的な研究へ、新しい手法として応用できる可能性が高い。特に主要な改善点はショットノイズ(光電流の統計的なゆらぎに由来する)を相対的に軽減できたことに由来するが、精度が向上した点で、機械的な振動や照明光学系の厳密な最適化など、これまでノイズに埋もれて問題視する必要のなかった課題を浮き彫りにすることができた。この点を解決することで、より安定した計測手法として確立できるものと考えている。

X線回折は、ペン毛軸系のような小さな構造物では配向が難しく、これまでほとんど研究がなされていない。本研究により、繊維試料が効率よく配向できることがわかり、その成果は繊維回折の研究分野の発展に大きく貢献できると期待している。DNAやRNA分子、微小管や微小繊維など、多くの生物試料が繊維構造を形成している。あるいは、その付随物として多くの生体分子が存在し、活性を示すケースも多く、それらの構造を生理的な条件下で解析できるメリットは大きい。さらに、アミロイド繊維など疾病に関係する繊維形成も多く知られており、微量な試料を迅速に分析できる点でも、本研究で開発した手法は優れている。ナノマシンとしてのペン毛軸系の構造変化は、電子顕微鏡を使った研究が進んでいるが、リアルタイムで構造変化を追跡できる点はX線回折法の特長である。周辺微小管が互いにずれ合っ配置を変え、ダイニンと微小管の間の架橋形成の有無によって、安定した2種類の配置構造を取り得ることが、本研究で示された。このことは運動の

調節機構に深く関わっているものと推測している。電子顕微鏡観察、X線回折の両者の研究成果を融合させて、さらなるナノマシンとしての軸系運動機構の解明に貢献できると期待している。

4 研究参加者

軸系構築グループ（軸系構造形成の研究）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
神谷 律	東京大学大学院 理学系研究科	教授	研究総括	平成 14 年 11 月～ 平成 20 年 3 月
広野雅文	東京大学大学院 理学系研究科	准教授	鞭毛構築機構	平成 14 年 11 月～ 平成 20 年 3 月
八木俊樹	東京大学大学院 理学系研究科	助教	ダイニン機能	平成 14 年 11 月～ 平成 19 年 6 月
〃	京都大学大学院 理学系研究科	准教授	ダイニン機能	平成 19 年 7 月～ 平成 20 年 3 月
若林憲一	東京大学大学院 理学系研究科	助教	軸系構築機構	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
池田一穂	東京大学大学院 理学系研究科	Crest 技術員	軸系構築機構	平成 15 年 4 月～ 平成 16 年 3 月
大川 茜	東京大学大学院 理学系研究科	研究補助員	ダイニン機能	平成 15 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
〃	東京大学大学院 理学系研究科	大学院生	ダイニン機能	平成 18 年 3 月～ 平成 20 年 3 月
柳澤春明	東京大学大学院 理学系研究科	大学院生	軸系構築機構	平成 14 年 11 月～ 平成 16 年 3 月
〃	東京大学大学院 理学系研究科	Crest 研究員	軸系構築機構	平成 16 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
植木紀子	東京大学大学院 理学系研究科	大学院生	ダイニン機能	平成 14 年 11 月～ 平成 17 年 3 月
池田 隆	東京大学大学院 理学系研究科	大学院生	軸系構築機構	平成 15 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
〃	東京大学大学院 理学系研究科	博士研究員	軸系構築機構	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
河野崇宏	東京大学大学院 理学系研究科	大学院生	軸系構築機構	平成 15 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
菊島健児	東京大学大学院 理学系研究科	大学院生	in vitro 運動系	平成 15 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
〃	東京大学大学院 理学系研究科	研究補助員	in vitro 運動系	平成 19 年 3 月～ 平成 20 年 3 月

中澤友紀	東京大学大学院 理学系研究科	大学院生	軸系構築機構	平成 16 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
平木まどか	東京大学大学院 理学系研究科	大学院生	軸系構築機構	平成 17 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
青山 晋	東京大学大学院 理学系研究科	大学院生	in vitro 運動系	平成 17 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
劉 中美	東京大学大学院 理学系研究科	大学院生	ダイニン機能	平成 17 年 10 月 ~ 平成 20 年 3 月
白土 玄	東京大学大学院 理学系研究科	大学院生	軸系構築機構	平成 18 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
山本遼介	東京大学大学院 理学系研究科	大学院生	ダイニン機能	平成 17 年 10 月 ~ 平成 20 年 3 月
宮本直美	東京大学大学院 理学系研究科	研究補助員	遺伝子解析	平成 18 年 6 ~ 平成 20 年 3 月

機能素子グループ(ダイニン運動機構の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
豊島陽子	東京大学大学院 総合文化研究科	教授	ダイニン・微小管の相互作用と in vitro 運動の解析	平成 14 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
須藤和夫	東京大学大学院 総合文化研究科	教授	組み換えダイニン重鎖の発 現	平成 14 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
枝松正樹	東京大学大学院 総合文化研究科	助教	ダイニン・微小管の相互作用 と in vitro 運動の解析	平成 14 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
昆 隆英	東京大学大学院 総合文化研究科	助教	組み換えダイニン重鎖の発 現	平成 14 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
大倉玲子	JST	CREST 技術員	組み換えダイニン重鎖の発 現	平成 14 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
小野寺弥生	東京大学大学院 総合文化研究科	研究補助員	ダイニン・微小管の相互作用 と in vitro 運動の解析	平成 16 年 1 月 ~ 平成 20 年 3 月
須藤恵子	東京大学大学院 総合文化研究科	研究補助員	組み換えダイニン重鎖の発 現	平成 14 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
藤井美樹	東京大学大学院 総合文化研究科	事務員	研究事務	平成 14 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
城口克之	東京大学大学院	大学院生	ダイニン・微小管の相互作用	平成 14 年 11 月 ~

	総合文化研究科		と in vitro 運動の解析	平成 15 年 3 月
西浦昌哉	東京大学大学院 総合文化研究科	大学院生	組み換えダイニン重鎖の発現	平成 14 年 11 月 ~ 平成 17 年 3 月
鳥羽栞	東京大学大学院 総合文化研究科	大学院生	ダイニン・微小管の相互作用 と in vitro 運動の解析	平成 14 年 11 月 ~ 平成 17 年 6 月
水野直子	東京大学大学院 総合文化研究科	大学院生	ダイニン・微小管の相互作用 と in vitro 運動の解析	平成 14 年 11 月 ~ 平成 18 年 3 月
小林琢也	東京大学大学院 総合文化研究科	大学院生	ダイニン・微小管の相互作用 と in vitro 運動の解析	平成 14 年 11 月 ~ 平成 18 年 3 月
安達英輔	東京大学大学院 総合文化研究科	大学院生	組み換えダイニン重鎖の発現	平成 14 年 11 月 ~ 平成 15 年 3 月
古田健也	東京大学大学院 総合文化研究科	大学院生	ダイニン・微小管の相互作用 と in vitro 運動の解析	平成 17 年 4 月 ~ 平成 19 年 10 月
五十川泰史	東京大学大学院 総合文化研究科	大学院生	組み換えダイニン重鎖の発現	平成 14 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
井上 毅	東京大学大学院 総合文化研究科	大学院生	組み換えダイニン重鎖の発現	平成 14 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
高橋良典	東京大学大学院 総合文化研究科	大学院生	ダイニン・微小管の相互作用 と in vitro 運動の解析	平成 14 年 11 月 ~ 平成 19 年 3 月
高橋良典	JST	研究補助員	ダイニン・微小管の相互作用 と in vitro 運動の解析	平成 19 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
最上聡文	東京大学大学院 総合文化研究科	大学院生	組み換えダイニン重鎖の発現	平成 14 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
今村謙司	東京大学大学院 総合文化研究科	大学院生	組み換えダイニン重鎖の発現	平成 16 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
島 知弘	東京大学大学院 総合文化研究科	大学院生	組み換えダイニン重鎖の発現	平成 16 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
沼田直己	東京大学大学院 総合文化研究科	大学院生	組み換えダイニン重鎖の発現	平成 17 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
林 伝周	東京大学大学院 総合文化研究科	大学院生	ダイニン・微小管の相互作用 と in vitro 運動の解析	平成 17 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
三枝秀彰	東京大学大学院 総合文化研究科	大学院生	ダイニン・微小管の相互作用 と in vitro 運動の解析	平成 17 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
岩崎 聡	東京大学大学院 総合文化研究科	大学院生	ダイニン・微小管の相互作用 と in vitro 運動の解析	平成 18 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月

三浦未知	東京大学大学院 総合文化研究科	大学院生	ダイニン・微小管の相互作用 と in vitro 運動の解析	平成 19 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
梶 芳朗	東京大学大学院 総合文化研究科	大学院生	ダイニン・微小管の相互作用 と in vitro 運動の解析	平成 19 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月

人工運動系グループ(光照射による運動発生の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
本多 元	長岡技術科学大学 工学部	准教授	研究計画・光照射による運動 発生	平成 15 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
今井栄一	長岡技術科学大学 工学部	助教	光学系の調整・最適化	平成 15 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
川口友彰	長岡技術科学大学 大学院・工学研究科	大学院生	光照射による運動発生	平成 15 年 11 月 ~ 平成 16 年 3 月
川口友彰	長岡技術科学大学 大学院・工学研究科	CREST 技術員	光照射による運動発生	平成 16 年 4 月 ~ 平成 17 年 12 月
水野裕昭	長岡技術科学大学 大学院・工学研究科	大学院生	標識蛋白質の調整	平成 16 年 4 月 ~ 平成 18 年 3 月
中川真一	長岡技術科学大学 大学院・工学研究科	大学院生	運動の方向性	平成 16 年 4 月 ~ 平成 17 年 3 月
坂牧潤一	長岡技術科学大学 大学院・工学研究科	大学院生	運動の解析	平成 16 年 4 月 ~ 平成 17 年 3 月
倉富敏史	長岡技術科学大学 大学院・工学研究科	大学院生	光照射による運動発生	平成 16 年 4 月 ~ 平成 18 年 3 月
鷹巣光	長岡技術科学大学 大学院・工学研究科	大学院生	標識蛋白質の調整	平成 16 年 4 月 ~ 平成 19 年 3 月
島崎雄介	長岡技術科学大学 大学院・工学研究科	大学院生	運動の方向性	平成 17 年 4 月 ~ 平成 19 年 3 月
田口洋介	長岡技術科学大学 大学院・工学研究科	大学院生	運動の解析	平成 17 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
塚野 峻	長岡技術科学大学 大学院・工学研究科	大学院生	光照射による運動発生	平成 18 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
西尾勇樹	長岡技術科学大学 大学院・工学研究科	大学院生	標識蛋白質の調整	平成 19 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
森 一貴	長岡技術科学大学	大学院生	運動の方向性	平成 19 年 4 月 ~

	大学院・工学研究科			平成 20 年 3 月
長谷田慧子	長岡技術科学大学 大学院・工学研究科	大学院生	運動の解析	平成 19 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月

分子ナノ振動解析グループ(軸系運動高分解能計測の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
上村慎治	東京大学大学院 総合文化研究科	准教授	研究計画・ナノ計測・軸系構造解析	平成 18 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
野田直紀	東京大学大学院 総合文化研究科	研究補助員 (大学院生)	ナノ計測	平成 18 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
高尾大輔	東京大学大学院 総合文化研究科	研究補助員 (大学院生)	ナノ計測・軸系構造解析	平成 18 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
宮代大輔	東京大学大学院 総合文化研究科	研究補助員 (大学院生)	ナノ計測・軸系構造解析	平成 18 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
野口朋子	東京大学大学院 総合文化研究科	技術員	ナノ計測	平成 18 年 10 月 ~ 平成 20 年 3 月

5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
該当無し			

6 . 研究成果の発表

(1) 原著論文発表

軸系構築グループ (国内誌 0 件、国際誌 22 件)

国際誌

Padma, P., Satouh, Y., Wakabayashi, K., Hozumi, A., Ushimaru, Y., Kamiya, R., and Inaba, K.
Identification of a novel leucine-rich repeat protein as a component of flagellar radial spoke in the
ascidian *Ciona intestinalis*. *Mol. Biol. Cell* 14:774-785, 2003.

Ikeda, K., Brown, J., Yagi, T., Norrander, J., Hirono, M., Eccleston, E., Kamiya, R., and Linck, R.
Rib72, a conserved protein associated with the ribbon compartment of flagellar A-microtubules and
potentially involved in the linkage between outer doublet microtubules. *J. Biol. Chem.*
278:7725-7734, 2003.

Hirono, M., Uryu, S., Ohara, A., Kato-Minoura, T., and Kamiya, R.
Expression of conventional and unconventional actins in *Chlamydomonas reinhardtii* upon
deflagellation and sexual adhesion. *Euk. Cell* 2:486-493, 2003.

Casey, D.M., Inaba, K., Pazour, G.J., Takada, S., Wakabayashi, K., Wilkerson, C.J., Kamiya, R., and
Witman, G.B.
DC3, the 21-kD subunit of the outer dynein arm-docking complex (ODA-DC), is a novel EF-hand
protein important for assembly of both the outer arm and the ODA-DC. *Mol. Biol. Cell*
14:3650-3663, 2003.

Casey, D. M., Yagi, T., Kamiya, R., and Witman, G. B.
DC3, the smallest subunit of the *Chlamydomonas* flagellar outer dynein arm-docking complex, is a
redox-sensitive calcium-binding protein. *J. Biol. Chem.* 278:42652-42659, 2003.

Yanagisawa, H. and Kamiya, R.
A tektin homologue is decreased in *Chlamydomonas* mutants lacking an axonemal inner-arm dynein.
Mol. Biol. Cell 15:2105-2115, 2004.

Kikushima, K., Yagi, T. and Kamiya, R.
Slow ADP-dependent acceleration of microtubule translocation produced by an axonemal dynein.
FEBS Lett. 563:119-122, 2004.

Blomberg-Wirschell, M., Pazour, G., Yoda, A., Hirono, M., Kamiya, R., and Witman, G.
Oda5p, a novel axonemal protein required for assembly of the outer dynein arm and an associated
adenylate kinase. *Mol. Biol. Cell* 15:2729-2741, 2004.

Matsuura, K., Lefebvre, P.A., Kamiya, R. and Hirono, M.

Bld10p, a novel protein essential for basal body assembly in *Chlamydomonas*: localization to the cartwheel, the first nine-fold symmetrical structure appearing during assembly. *J. Cell Biol.* 165: 663-671, 2004.

Watanabe, Y., Hayashi, M., Yagi, T., and Kamiya, R.

Turnover of actin in *Chlamydomonas* flagella detected by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). *Cell Struct. Funct.* 29: 67-72, 2004.

Ikeda, T., Ikeda, K., Enomoto, M., Park, M. K., Hirono, M., and Kamiya, R.

The mouse ortholog of EFHC1 implicated in juvenile myoclonic epilepsy is an axonemal protein widely conserved among organisms with motile cilia and flagella. *FEBS Lett.* 579: 819-822, 2005.

Okita, N., Isogai, N., Hirono, M., Kamiya, R., and Yoshimura, K.

Phototactic activity in *Chlamydomonas* “non-phototactic” mutants deficient in Ca²⁺-dependent control of flagellar dominance or in inner arm dynein. *J. Cell Sci.* 118: 529-537, 2005.

Aoyama, S. and Kamiya, R.

Cyclical interactions between two outer doublet microtubules in split flagellar axonemes. *Biophys. J.* 89: 3261-3268, 2005.

Yagi, T., Minoura, I., Fujiwara, A., Saito, R., Yasunaga, T., Hirono, M. and Kamiya, R.

An axonemal dynein particularly important for flagellar movement at high viscosity: implications from a new *Chlamydomonas* mutant deficient in the dynein heavy chain gene *Dhc9*. *J. Biol. Chem.* 280: 41412-41420, 2005.

Yang, P. Diener, D. R., Yang, C., Kohno, T., Pazour, G. J., Dienes, J. M., Agrin, N., King, S. M., Sale, W. S., Kamiya, R., Rosenbaum, J. R., and Witman, G. B.

Radial spoke proteins of *Chlamydomonas* flagella. *J. Cell Sci.* 119:1165-1174, 2006.

Yamamoto, R., Yagi, T. and Kamiya, R.

Functional binding of inner-arm dyneins with demembrated flagella of *Chlamydomonas* mutants. *Cell Motil. Cytoskeleton* 63: 258-265, 2006.

Yamamoto, R., Yanagisawa, H., Yagi, T. and Kamiya, R.

A novel subunit of axonemal dynein conserved among lower and higher eukaryotes. *FEBS Lett.*

580: 6357-6560, 2006.

Ikeda, K., Ikeda, T., Morikawa, K. and Kamiya, R.
Axonemal Localization of *Chlamydomonas* PACRG, a Homologue of the Human
Parkin-Coregulated Gene Product. *Cell Motil. Cytoskeleton* 64: 814-821, 2007.

Hiraki, M., Nakazawa, Y., Kamiya, R. and Hirono, M.
Bld10p constitutes the spoke tip of the cartwheel, a crucial structure that stabilizes the 9-fold
microtubule arrangement in the centriole. *Curr. Biol.* 17:1778-1783. 2007.

Nakazawa, Y., Hiraki, M., Kamiya, R. and Hirono, M.
SAS-6 is a cartwheel protein that establishes the 9-fold symmetry of the centriole. *Curr. Biol.* 17:
2169-2174, 2007.

Yamamoto, R., Yanagisawa, H., Yagi, T. and Kamiya, R.
A novel 44-kDa subunit of axonemal dynein conserved from *Chlamydomonas* to mammals. *Euk.
Cell* 7:154-161, 2008.

Kikushima, K. and Kamiya, R.
Clockwise translocation of microtubules by flagellar inner-arm dyneins in vitro. *Biophys. J.*

機能素子グループ (国内誌0件、国際誌26件)

国際誌

Shiroguchi, K., Ohsugi, M., Edamatsu, M., Yamamoto, T. and Toyoshima, Y. Y.
The second microtubule-binding site of monomeric Kid enhances the microtubule affinity. *J. Biol.
Chem.* 278, 22460-22465, 2003.

Ohsugi, M., Tokai-Nishizumi, N., Shiroguchi, K., Toyoshima, Y. Y., Inoue, J. I. and Yamamoto, T.
Cdc2-mediated phosphorylation of Kid controls its distribution to spindle and chromosomes. *EMBO J.*
22, 2091-2103, 2003.

Ando, T., Kodera, N., Naito, Y., Kinoshita, T., Furuta, K. and Toyoshima, Y. Y.
A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules in action. *Chem.
Phys. Chem.* 4, 1196-1202, 2003.

Toba, S., Gibson, T. M., Shiroguchi, K., Toyoshima, Y. Y. and Asai, D. J.

Properties of the full-length heavy chains of *Tetrahymena* ciliary outer arm dynein separated by urea treatment. *Cell Motil. Cytoskeleton* 58, 30-38, 2004.

Nishiura, M., Kon, T., Katsuyuki Shiroguchi, K., Ohkura, R., Shima, T., Toyoshima, Y. Y. and Sutoh, K.

A Single-headed Recombinant Fragment of *Dictyostelium* Cytoplasmic Dynein Can Drive the Robust Sliding of Microtubules. *Biol. Chem.* 279, 22799-22802, 2004.

Sosuke Iwai, S., Ishiji, A., Mabuchi, I. and Sutoh., K.

A Novel Actin-bundling Kinesin-related Protein from *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 279, 4696-4704, 2004.

Toba, S., Gibson, T.M., Shiroguchi, K., Toyoshima, Y.Y. & Asai, D.J.

Properties of the full-length heavy chains of *Tetrahymena* ciliary outer arm dynein.separated by urea treatment. *Cell Motil. Cytoskeleton* 58. 30-38, 2004.

Nishiura, N., Kon, T., Shiroguchi, K., Ohkura, R., Shima, T., Toyoshima, Y.Y. & Sutoh, K.

A single-headed recombinant fragment of *Dictyostelium* cytoplasmic dynein can drive the robust sliding of microtubules. *J. Biol.Chem.* 279, 22799-22802, 2004.

Mizuno, N., Toba, S., Edamatsu, M., Watai-Nishii, J., Hirokawa, N. Toyoshima, Y. Y. and Kikkawa, M.

Dynein and kinesin share an overlapping microtubule-binding site. *EMBO J.* 23, 2459-2467, 2004.

Toba, S. and Toyoshima, Y. Y.

Dissociation of double-headed cytoplasmic dynein into single-headed species and its motile properties. *Cell Motil. Cytoskeleton* 58, 281-289, 2004.

Kon, T., Nishiura, M., Ohkura, R., Toyoshima, Y. Y.and Sutoh, K.

Distinct functions of nucleotide-binding/hydrolysis sites in the four AAA modules of cytoplasmic dynein. *Biochemistry* 43, 11266-11274, 2004.

Takahashi, Y., Edamatsu, M. and Toyoshima, Y. Y.

Multiple ATP-hydrolyzing sites that potentially function in cytoplasmic dynein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 12865-12869, 2004.

- Kon, T., Mogami, T., Ohkura, R., Nishiura, M., Sutoh, K.
ATP hydrolysis cycle-dependent tail motions in cytoplasmic dynein. *Nature Struct. Mol. Biol.* 12, 513-519. 2005.
- Isogawa, Y., Kon, T., Inoue, T., Ohkura, R., Yamakawa, H., Ohara, O. and Sutoh, K.
The N-terminal domain of MYO18A has an ATP-insensitive actin-binding site. *Biochemistry* 44, 6190-6196. 2005.
- Morii, H., Shimizu, T., Mizuno, N., Edamatsu, M., Ogawa, K., Shimizu, Y. and Toyoshima, Y. Y.
Removal of tightly bound ADP induces distinct structural changes of the two tryptophan-containing regions of the ncd motor domain.
J Biochem 138, 95-104. 2005.
- Toyo-oka, K., Shinji Sasaki, S., Yano, Y., Mori, D., Kobayashi, T., Toyoshima, Y. Y., Tokuoka, S. M., Ishii, S., Shimizu, T., Muramatsu, M., Hiraiwa, N., Yoshiki, A., Wynshaw-Boris, A. and Hirotsune, S..
Recruitment of Katanin P60 by Phosphorylated NDEL1, a LIS1 interacting protein, is essential for mitotic cell division and neuronal migration. *Hum Mol Genet.* 14, 3113-3128. 2005.
- Kobayashi, T., Shiroguchi, K., Edamatsu, M. and Toyoshima Y. Y.
Microtubule-binding properties of dynactin p150 expedient for dynein motility. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 23-28. 2006.
- Inoue, T., Kon, T., Ajima, R., Ohkura, R., Tani, M., Yokota, J. and Sutoh, K.
MYO18B interacts with the proteasomal subunit Sug1 and is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 342, 829-834. 2006.
- Toba, S., Watanabe, T.M., Yamaguchi-Okimoto, L., Toyoshima, Y.Y. and Higuchi, H.
Overlapping hand-over-hand mechanism of single molecular motility of cytoplasmic dynein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 5741-5745, 2006
- Shima, T., Kon, T., Imamula, K., Ohkura, R. and Sutoh, K.
Two modes of microtubule sliding driven by cytoplasmic dynein. *PNAS* 103, 17736-17740, 2006.
- Shima, T., Imamula, K., Kon, T., Ohkura, R. and Sutoh, K.

Head-head coordination is required for the processive motion of cytoplasmic dynein, an AAA+ molecular motor. *J. Struc. Biol.* 156, 182-189, 2006.

Mori D, Yano Y, Toyo-oka K, Yoshida N, Yamada M, Muramatsu M, Zhang D, Saya H, Toyoshima, Y.Y., Kinoshita, K, Wynshaw-Boris, A. and Hirotsune, S.
NDEL1 phosphorylation by Aurora-A kinase is essential for centrosomal maturation, separation, and TACC3 recruitment. *Mol Cell Biol.* 27, 352-367, 2007.

Mogami, T., Kon, T., Ito, K. and Kazuo Sutoh, K .
Kinetic characterization of tail swing steps in the ATPase cycle of Dictyostelium cytoplasmic dynein .
J. Biol. Chem. 282, 21639 – 21644, 2007.

Naoko Mizuno, Akihiro Narita, Takahide Kon, Kazuo Sutoh, and Masahide Kikkawa
Three-dimensional structure of cytoplasmic dynein bound to microtubules. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 104, 20832-20837, 2007.

Imamura, K, Kon, T., Ohkura, R., and Sutoh, K.
The coordination of cyclic microtubule association/dissociation and tail swing of cytoplasmic dynein.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 104, 16134-16139, 2007.

Furuta, K. and Toyoshima, Y.Y.
Minus-end-directed motor Ncd exhibits processive movement that is enhanced by microtubule bundling in vitro. *Curr. Biol.* 18, 152-157, 2008.

人工運動系グループ (国内誌0件、国際誌3件)

国際誌

Hatori, K., Tamura, T., Kawano, K., Tamura, M., and Honda, H.
Significance of kinetic degrees of freedom in operation of the actomyosin motor. *Biosystems* 78, 149-53, 2004.

Kawaguchi, T., Honda, H., Hatori, K., Imai, E., and Matsuno, K.
Fourier's law of heat transfer and its implication to cell motility. *BioSystems* 81, 19–24, 2005.

Kawaguchi T., Honda H.
Unidirectional movement of an actin filament taking advantage of temperature gradients. *BioSystems* 90, 253-262. (2007)

分子ナノ振動解析グループ (国内誌0件、国際誌3件)

国際誌

Nishimura, Y., Hamazaki, T.S., Komazaki, S., Kamimura, S., Okochi, H. and Asashima, M.

Ciliated cells differentiated from mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*, 24:1381-1388. (2006)

Inoda, T., Tajima, F., Taniguchi, H., Saeki, M., Numakura, K., Hasegawa, M. and Kamimura, S.
Temperature-dependent regulation of mating and reproduction in diving beetles, *Dytiscus sharpi*
(Coleoptera: Dytiscidae). *Zool. Sci.* (2007 in press).

Noda, N. and Kamimura, S. A new microscope optics for laser darkfield illumination applied to
high precision two dimensional measurement of specimen displacement. *Review of Scientific
Instruments*, in press.

(2) その他の著作物

軸糸構築グループ (国内1件、国外0件)

神谷 律 鞭毛・繊毛運動のしくみ 「細胞の生物学」(シリーズ21世紀の動物科学6)
(鈴木、神谷共編) pp. 152-184 培風館 (2007)

機能素子グループ (国内4件、国外0件)

豊島陽子 タンパク質に訊いてみる. シリーズニューバイオフィジックスII 10巻
生物物理学とはなにか. pp. 247-251 共立出版 (2003)

豊島陽子 細胞内物質輸送とモーター蛋白質. 蛋白質・核酸・酵素 49巻7号 細胞
における蛋白質の一生 pp. 935-937 共立出版 (2004)

馬淵一誠、池辺光男、伊藤知彦、豊島陽子 細胞骨格タンパク質. タンパク質科学イ
ラストレイテッド pp. 182-199 羊土社 (2005)

豊島陽子. キネシン 微小管相互作用の多様なパフォーマンス. 蛋白質・核酸・酵素 51.
573-578 (2006)

人工運動系グループ (0件)

分子ナノ振動解析グループ (国内1件、国外1件)

国内

上村慎治 空と海の生物に学ぶ バイオメカニクスの挑戦、遺伝、61:30-32
(2007)

国外

Kamimura, S., Sugiyama, T., Sugimoto, Y., Walabayashi, K.

Dynamic flow alignment of flagellar axonemes for low-angle X-ray fiber diffraction analysis.

Photon Factory Activity Report 2005 #23 Part B, 236/1-3 (2006)

(3) 学会発表

招待講演

軸系構築グループ (国内会議 1 件、国際会議 7 件)

国内会議

神谷 律 クラミドモナス変異体で探る繊毛の形成と運動機構 第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会、大分 (平成 2 0 年 3 月 2 7 日)

国際会議

Kamiya, R.

“Organization and functioning of diverse dynein motors in flagellar axonemes”, COE International Conference 2003 “Molecular Mechanism of Intracellular Transports: The Roles of Kinesin and Dynein Superfamily Proteins”, Hakone, Japan (November 4-8, 2003)

Kamiya, R.

“Functioning of diverse dynein motors in flagellar axonemes”, The 19th International Symposium in Conjunction with Award of the International Prize for Biology, Nara, Japan (December 3-4, 2003)

Kamiya, R.

“Functioning of diverse dynein motors in eukaryotic flagella”, International Symposium on the Biology of Sperm Cell – from Basic to Clinical Aspects, Tokyo (January 24-25, 2004)

Yagi, T. and Kamiya, R.

“Identification of heavy chains of *Chlamydomonas* inner-arm dyneins by peptide-mass fingerprinting and their phylogenetic analysis”, International Workshop Dynein 2005, Kobe, Japan (October 31-November 3, 2005)

Kamiya, R.

“Structural and functional diversities of axonemal dyneins”, International Symposium on Bio-nanosystems, Matsushima, Japan (September 1–3, 2006)

Kamiya, R.

“Diversity of *Chlamydomonas* Axonemal Dyneins: Novel Species and Novel Motor Properties”,
2007 FASEB Summer Research Conferences Biology of Cilia and Flagella, Saxtons River, Vermont,
U.S.A. (August 4 –9, 2007)

Kamiya, R.

“Novel Species and Novel Motor Properties of Axonemal Dyneins”, International Conference
Molecular Mechanism of Intracellular Transport: The Roles of Kinesin and Dynein Superfamily
Proteins, Tomakomai, Japan (August 23-36, 2007)

機能素子グループ (国内会議 2 件、国際会議 7 件)

国内会議

豊島陽子 ダイニン分子の構造と機能. 日本分子生物学会第 27 回年会、神戸 (平成 16 年 12
月 9 日)

豊島陽子 微小管モーターの振る舞い, 第 16 回バイオ高分子シンポジウム, 上智大学、東
京 (平成 18 年 8 月 1 日)

国際会議

Sutoh, K.

“Molecular mechanism of force generation by cytoplasmic dynein as revealed by fully active
recombinant motor domain”, Gordon Research Conference on Muscle: Contractile Proteins. New
London, USA. (July 6, 2005)

Sutoh, K.

“Force generation by cytoplasmic dynein, a microtubule-based motor protein that belongs to the
AAA+ family”, 6th International Conference on AAA proteins. Shuloss Segau, Austria (September
18, 2005.)

Sutoh, K.

“Mutational Structure-Function Analysis of Recombinant Cytoplasmic Dynein”,
International Workshop Dynein 2005. Kobe, Japan (October 31, 2005)

Sutoh, K.

“Structure and Function of Dynein, A Huge Microtubule-based AAA+ Motor”,
Biophysical Society 50th Annual Meeting. Salt Lake City, Utah, U.S.A. (February, 2006)

Toyoshima, Y., Y.

“Regulation of Cytoplasmic dynein motility by its associated proteins”,

International Symposium on Bio-nanosystems, Hotel Matsushima Taikanso, Matsushima, Miyagi, Japan (September 2, 2006)

Kon, T. and Sutoh, K.

“Molecular dissection of motor functions of cytoplasmic dynein”,

International Symposium on Bio-nanosystems. Hotel Matsushima Taikanso, Matsushima, Miyagi, Japan. (September 2, 2006)

Sutoh, K.

“Biochemical dissection of motor functions of cytoplasmic dynein”, Biophysical Society 51st Annual Meeting. Baltimore, Maryland, USA. (March 3, 2007)

人工運動系グループ (国内会議 0 件、国際会議 0 件)

分子ナノ振動解析グループ (国内会議 0 件、国際会議 0 件)

口頭発表

軸系構築グループ (国内会議 4 件、国際会議 3 件)

国内会議

白土 玄、神谷 律、広野雅文 “クラミドモナス *UW11* 遺伝子領域にコードされる新規中心子蛋白質の同定” 日本動物学会第 77 回大会、松江 (平成 18 年 9 月 21 ~ 24 日)

中澤友紀、神谷 律、広野雅文 “中心子の三連微小管数が揺らぐクラミドモナス突然変異株 *blid120* の変異遺伝子” 日本動物学会第 78 回大会、弘前 (平成 19 年 9 月 20 ~ 22 日)

平木まどか、神谷 律、広野雅文 “クラミドモナス蛋白質 *Blid10p* の部分配列発現による 8 回対称性中心子の形成” 日本動物学会第 78 回大会、弘前 (平成 19 年 9 月 20 ~ 22 日)

柳澤春明、池田一穂、池田 隆、神谷 律 “ネキシンリンクの実体” 日本動物学会第 78 回大会、弘前 (9 月 20 ~ 22 日)

国際会議

Kamiya, R.

“*Chlamydomonas* motility in Tokyo: 21 years after the Physiology Course” Microtubule symposium”, Woods Hole, U.S.A. (August 2, 2003)

Yagi, T., Minoura, I., Fujiwara, A., Saito, R., Yasunaga, T., Hirono, M. and Kamiya, R.
“Inner-arm dynein c is a powerful motor that contains the Dhc9 heavy chain and localizes to the base of the S2 radial spoke”, 11th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, Kobe, Japan (May 11-15, 2004)

Nakazawa, Y., Kamiya, R. and Hirono, M.
“A novel *Chlamydomonas* mutant that assembles flagellar axonemes with variable numbers of outer doublet microtubules”, 12th International conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, Portland, Oregon, USA (May 9-14, 2006)

機能素子グループ (国内会議 0 件、国際会議 5 件)
国際会議

Mizuno, N., Toyoshima, Y.Y. and Kikkawa, K.
“High-resolution 3D reconstruction of dynein stalk-microtubule complex by asymmetric helical reconstitution”, International Workshop Dynein 2005. Kobe, Japan (October 31,2005)

Mogami, T., Kon, T., Ohkura R., Sutoh, K.
“Kinetic Analysis of Tail Motions of Cytoplasmic Dynein Motor Domain”, International Workshop Dynein 2005. Kobe, Japan (October 31,2005)

Otsubo, A., Okawa, A., Hirota, K., Furuta, K., Kobayashi, T., Toba, S., Edamatsu, Toyoshima, Y.Y.
“Direct observation of dynein-microtubule interaction”, International Workshop Dynein 2005. Kobe, Japan (October 31,2005)

Toba, S., Watanabe, T., Toyoshima, Y.Y., Higuchi, H.
“Single molecules of Cytoplasmic dynein produce 8nm steps and 7pN force”, International Workshop Dynein 2005. Kobe, Japan (October 31,2005)

Toyoshima, Y.Y.
“Interaction of dynein and microtubules: Protofilament arrangements required for dynein motility”, Alpbach Workshop on Molecular Motors 2007, Alpbach, Austria (March 27, 2007)

人工運動系グループ (国内会議 0 件、国際会議 0 件)

分子ナノ振動解析グループ（国内会議 1 件、国際会議 1 件）

国内会議

上村 慎治、杉山 貴紹、杉本 泰伸、若林克三、新しい流動配向法によるウニ精子鞭毛 X 線回折の観察、社団法人日本動物学会第77回大会、松江（平成18年9月21～24日）

国際会議

Kamimura, S. and Iwamoto. H.

“Dynein arm arrangement in flagellar axonemes and its dynamic change revealed by small-angle X-ray diffraction analysis. The 56th Fujihara Seminar”, International Conference on Molecular Mechanism of Intracellular Transport: The Roles of Kinesin and Dynein Superfamily, Tomakomai, Hokkaido, Japan (August 23-26, 2007)

ポスター発表

軸系構築グループ（国内会議 17 件、国際会議 30 件）

国内会議

松浦公美、平木まどか、Paul Lefebvre*、神谷 律、広野雅文（東京大学；*ミネソタ大学）“クラミドモナス鞭毛基部体の形成初期に働く Bid10 蛋白質の会合状態” 日本細胞生物学会第 56 回大会、大津（平成 15 年 5 月 14 日～16 日）

渡辺友美、林 真人、神谷 律（東京大学）“クラミドモナス生細胞における軸系構成蛋白質のターンオーバーの観察” 日本動物学会第 74 回大会、函館（平成 15 年 9 月 17 日～19 日）

柳沢春明、神谷 律（東京大学）“内腕ダイニン - 軸系構造の結合に関与する蛋白質の同定と機能解析” 日本動物学会第 74 回大会、函館（平成 15 年 9 月 17 日～19 日）

青山 晋、神谷 律（東京大学）“2本の軸系周辺微小管による周期的運動の発生” 生物物理学会第 41 回大会、新潟（平成 15 年 9 月 23 日～25 日）

菊島健児、八木俊樹、神谷 律（東京大学）“鞭毛内腕ダイニン運動性の ADP によるゆっくりとした活性化” 生物物理学会第 41 回大会、新潟（平成 15 年 9 月 23 日～25 日）

八木俊樹、箕浦逸史*、藤原明子、斎藤良**、安永卓生**、広野雅文、神谷律（東京大学、*理研、**九州工業大学）“クラミドモナス鞭毛内腕ダイニン c の遺伝子、軸系内局在と機能的性質” 生物物理学会第 41 回大会、新潟（平成 15 年 9 月 23 日～25 日）

池田一穂・森川桂子・八木俊樹・広野雅文・神谷律 “軸系構造蛋白質 Rib72 の昆虫細胞による発現と結合蛋白質の探索” 日本動物学会第 75 回大会、神戸、甲南大学（平成 16 年 9

月 10 日 ~ 12 日)

中澤友紀・松浦公美・神谷律・広野雅文 “ クラミドモナス鞭毛基部体突然変異株の単離と解析 ” 日本動物学会第 75 回大会、神戸、甲南大学 (平成 16 年 9 月 10 ~ 12 日)

河野崇宏, 神谷 律, 広野雅文 “ 軸系スポークヘッドにおけるタンパク間相互作用の研究 ” 日本動物学会第 76 回大会、筑波 (平成 17 年 10 月 6 ~ 8 日)

劉中美, 中澤友紀, 八木俊樹, 神谷 律 “ ダイニン外腕 重鎖を欠失した新規クラミドモナス変異株の単離と解析 ” 日本生物物理学会第 43 回年会、札幌 (平成 17 年 11 月 23 ~ 25 日)

八木俊樹, 広野雅文, 神谷律 “ 単頭型クラミドモナス鞭毛ダイニン重鎖のアミノ酸配列の決定と解析 ” 日本生物物理学会第 43 回年会、札幌 (平成 17 年 11 月 23 ~ 25 日)

山本遼介, 八木俊樹, 神谷 律 “ 除膜クラミドモナス鞭毛への内腕ダイニンの機能的再結合 ” 日本生物物理学会第 43 回年会、札幌 (平成 17 年 11 月 23 ~ 25 日)

若林憲一, 大川茜, 八木俊樹, 神谷 律 “ ダイニン外腕を軸系微小管上に結合させるタンパク質複合体 ODA-DC の構造と性質 ” 日本生物物理学会第 43 回年会、札幌 (平成 17 年 11 月 23 ~ 25 日)

Hiraki, M., Kamiya, R and Hirono, M..

“Formation of Abnormal Centrioles with Eight-fold Symmetry in *Chlamydomonas* Cells Expressing Truncated Bld10p, a Component of the Centriolar Cartwheel” 日本細胞生物学会第 59 回大会、福岡 (平成 19 年 5 月 28 ~ 30 日)

Liu, Z., Takazaki, H., Nakazawa, Y., Yagi, T., Yasunaga, T. and Kamiya, R..

“A *Chlamydomonas* Outer Arm Dynein Mutant with a Truncated Gamma Heavy Chain” 日本生物物理学会第 45 回年会、横浜 (平成 19 年 12 月 21 ~ 23 日)

Okawa, A., Yagi, T. and Kamiya, R..

“Motile Properties of *Chlamydomonas* Outer Arm Dynein Studied Using a Novel Labeling Method” 日本生物物理学会第 45 回年会、横浜 (平成 19 年 12 月 21 ~ 23 日)

Yagi, T. and Kamiya, R..

“Identification of Three Minor Inner-Arm Dynein Heavy Chains in *Chlamydomonas* flagella” 日本生物物理学会第 45 回年会、横浜 (平成 19 年 12 月 21 ~ 23 日)

国際会議

Yagi, T., Minoura, I.*, Fujiwara, A., Saito, R.**, Yasunaga, R.**, Hirono, M. and Kamiya, R.

“*Chlamydomonas* flagellar inner-arm dynein c: gene, axonemal localization, and motility properties studied with the mutant ida9” COE International Conference 2003 “Molecular Mechanism of Intracellular Transports: The Roles of Kinesin and Dynein Superfamily Proteins”, Hakone, Japan (November 4-8, 2003)

Ueki, N., Isogai, N., Hirono, M., Yoshimura, K. and Kamiya, R.

“Phototactic activity observed in *Chlamydomonas* "non-phototactic" mutants deficient in Ca²⁺-dependent control of flagellar dominance or lacking inner arm dynein f”, 11th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, Kobe, Japan (May 11-15, 2004)

Yanagisawa, H. and Kamiya, R.

“A tektin homologue is decreased in *Chlamydomonas* mutants lacking an axonemal inner-arm dynein”, 11th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*. Kobe, Japan (May 11-15, 2004)

Kato-Minoura, T., Okumura, M., Hirono, M. and Kamiya, R.

“A novel family of unconventional actins in volvoclean algae”, 11th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, Kobe, Japan (May 11-15, 2004)

Aoyama, S. and Kamiya, R.

“Cyclical association/dissociation waves produced by a pair of outer-doublet microtubules in split axonemes of *Chlamydomonas*: implications for the bend propagation mechanism”, 11th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, Kobe, Japan (May 11-15, 2004)

Watanabe, Y., Hayashi, M., Yagi, T. and Kamiya, R.

“Turnover of actin in *Chlamydomonas* flagella detected by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)”, 11th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, Kobe, Japan (May 11-15, 2004)

Kohno, T., Hirono, M. and Kamiya, R.

“Rescue of spokehead-deficient mutants by electroporation-mediated introduction of recombinant proteins”, 11th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, Kobe, Japan (May 11-15, 2004)

Yoshimura, K., Matsuo, Y. and Kamiya, R.

“Gravitaxis studied with behavioral mutants, ptx and gtx”, 11th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, Kobe, Japan (May 11-15, 2004)

Hiraki, M., Matsuura, K., Kamiya, R. and Hirono, M.

“The bld10 mutation can be rescued by expression of truncated products lacking 20-30% segments at either N- or C-terminus”, 11th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, Kobe, Japan (May 11-15, 2004), Biophysical Society 49TH Annual Meeting, Long Beach, CA, U.S.A. (February, 2005)

Hiraki, M., Matsuura, K., Kamiya, R. and Hirono, M.

“Filament-forming properties of Bld10p, a coiled-coil protein that constitutes the *Chlamydomonas* basal-body cartwheels”, 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology, Omiya, Japan (June 15-17, 2005)

Nakazawa, Y., Kamiya, R. and Hirono, M.

“A new *Chlamydomonas* mutant that assembles flagellar axonemes with abnormal numbers of outer doublet microtubules”, 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology, Omiya, Japan (June 15-17, 2005)

Kohno, T., Diener, D., Rosenbaum, J. and Kamiya, R.

“Subunit interactions within the *Chlamydomonas* flagellar spokehead”, International Workshop Dynein 2005, Kobe, Japan (October 31-November 3, 2005)

Yamamoto, R., Yagi, T. and Kamiya, R.

“Functional binding of inner-arm dyneins with demembrated flagella of *Chlamydomonas* mutants”, International Workshop Dynein 2005, Kobe, Japan (October 31-November 3, 2005)

Kikushima, K. and Kamiya, R.

“Generation of torque by *Chlamydomonas* inner-arm dyneins around an axis perpendicular to the microtubule length”, International Workshop Dynein 2005, Kobe, Japan (October 31-November 3, 2005)

Liu, Z., Nakazawa, Y., Yagi, T. and Kamiya, R.

“A *Chlamydomonas* Flagellar Mutant with Abnormal Outer Dynein Arms Lacking Functional Gamma Heavy Chain”, International Workshop Dynein 2005, Kobe, Japan (October 31-November 3, 2005)

Nakazawa, Y., Kamiya, R. and Hirono, M.

“A novel *Chlamydomonas* mutant having flagellar axonemes with irregular numbers of outer doublet microtubules”, 45th ASCB Annual Meeting, San Francisco, CA, U.S.A. (December 10-14, 2005)

Hiraki, M., Nakazawa, Y., Kamiya, R. and Hirono, M.

“A possible role of Bld10p in connecting the triplet microtubules to the cartwheel within the basal body”, 12th International conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, Portland, Oregon, USA (May 9-14. 2006)

Yagi, T. and Kamiya, R.

“Gene identification of all known *Chlamydomonas* inner-arm dynein heavy chains”, 12th International conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, Portland, Oregon, USA (May 9-14. 2006)

Yanagisawa, H. and Kamiya, R.

“Novel longitudinal compartmentalization in the axoneme revealed by localization of putative interdoublet link components”, 12th International conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, Portland, Oregon, USA (May 9-14. 2006)

Ikeda, K., Ikeda, T., Morikawa, K. and Kamiya, R.

“Proteins possibly associated with Rib72, a component of the stable protofilament ribbons in outer doublet microtubules”, 12th International conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, Portland, Oregon, USA (May 9-14. 2006)

Okawa, A., Yagi, T., Watanabe, T., Higuchi, H. and Kamiya, R.

“Single-molecule observation of the in vitro movement of flagellar outer dynein arm complex”, Fifth East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan (November 12-16, 2006)

Yagi, T. and Kamiya, R.

“Identification of two novel inner-arm dynein heavy chains in *Chlamydomonas* flagella”, Fifth East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan (November 12-16, 2006)

Aoyama, S. and Kamiya, R.

“A dynein/microtubule system that can partially mimic the motile properties of flagellar axonemes”, Fifth East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan (November 12-16, 2006)

Wakabayashi, K., Ide, T. and Kamiya, R.

“Calcium-Dependent Activation of *Chlamydomonas* Flagellar Beating upon Mechanical Agitation”, 46th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Diego, CA. U.S.A. (December

9-13, 2006)

Yagi, T. and Kamiya, R.

“Identification of the Genes of All Known *Chlamydomonas* Inner-Arm Dynein Heavy Chains”, 46th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Diego, CA. U.S.A. (December 9-13, 2006)

Nakazawa, Y., Hiraki, M., Kamiya, R. and Hirono, M.

“Centrioles with Aberrant “Numbers of Triplet Microtubules Formed in a Novel *Chlamydomonas* Mutant that Lacks the Centriolar Cartwheel”, 2007 FASEB Summer Research Conferences Biology of Cilia and Flagella, Saxtons River, Vermont, U.S.A. (August 4 –9, 2007)

Wakabayashi, K., Okawa, A., Usukura, J., Witman, G. B. and Kamiya, R.

“Structural And Biochemical Properties Of The Outer-Dynein-Arm Docking Complex (ODA-DC) Studied Using Recombinant Proteins”, 2007 FASEB Summer Research Conferences Biology of Cilia and Flagella, Saxtons River, Vermont, U.S.A. (August 4 –9, 2007)

Yamoto, R., Yanagisawa, H., Yagi, T. and Kamiya, R.

“Identification of novel subunits of inner arm dynein conserved among various eukaryotes”, 2007 FASEB Summer Research Conferences Biology of Cilia and Flagella, Saxtons River, Vermont, U.S.A. (August 4 –9, 2007)

Okawa, A., Yagi, T. and Kamiya, R.

“In Vitro Motility of *Chlamydomonas* Outer Arm Dynein Studied Using a Novel Labeling Method”, 2007 FASEB Summer Research Conferences Biology of Cilia and Flagella, Saxtons River, Vermont, U.S.A. (August 4 –9, 2007)

Aoyama, S. and Kamiya, R.

“High-speed inter-microtubule sliding driven by aligned axonemal outer-arm dynein”, International Conference Molecular Mechanism of Intracellular Transport: The Roles of Kinesin and Dynein Superfamily Proteins , Tomakomai, Japan (August 23-36, 2007)

Yamamoto, R., Yanagisawa, H., Yagi, T. and Kamiya, R.

“Identification of novel subunits of inner arm dynein conserved among various eukaryotes”, International Conference Molecular Mechanism of Intracellular Transport: The Roles of Kinesin and Dynein Superfamily Proteins , Tomakomai, Japan (August 23-36, 2007)

機能素子グループ (国内会議 27 件、国際会議 39 件)

国内会議

鳥羽菜、佐々木慎二、徳岡涼美、清水孝雄、広常真治、豊島陽子 “ LIS1, Nudel タンパク質による細胞質ダイニンの *in vitro* 運動活性の制御 ” 日本生物物理学会第 41 回年会、新潟 (平成 15 年 9 月 23-25 日)

須藤美樹、豊島陽子 “ テトラヒメナ外腕サブユニットの性質 ” 日本生物物理学会第 41 回年会、新潟 (平成 15 年 9 月 23-25 日)

昆隆英、西浦昌哉、大倉玲子、豊島陽子、須藤和夫 “ 遺伝子組み換え型細胞質ダイニンを用いた ATP 結合部位の機能解析 ” 日本生物物理学会第 41 回年会、新潟 (平成 15 年 9 月 23-25 日)

西浦昌哉、昆隆英、城口克之、大倉玲子、豊島陽子、須藤和夫 “ 細胞質ダイニンモータードメインの機能解析 ” 日本生物物理学会第 41 回年会、新潟 (平成 15 年 9 月 23-25 日)

Toba, S., Toyo-oka, K., Hirotsune, S., Toyoshima, Y.Y.

“LIS1 and NUDEL directly regulate the motility of cytoplasmic dynein in cooperation” 日本細胞生物学会第 57 回大会、大阪 (平成 16 年 5 月 26 日)

Hirota, K., Edamatsu, M., Toyoshima, Y.Y.

“Interaction between cytoplasmic dynein stalk head and microtubules” 日本細胞生物学会第 57 回大会、大阪 (平成 16 年 5 月 26 日)

水野直子・豊島陽子・吉川雅英 “ ダイニンストークとキネシンの微小管結合様式の共同性 ” 日本生物物理学会第 42 回年会、京都 (平成 16 年 12 月 15 日)

高橋良典・枝松正樹・豊島陽子 “ 細胞質ダイニンの潜在的な機能を有する複数の ATP 加水分解部位について ” 日本生物物理学会第 42 回年会、京都 (平成 16 年 12 月 15 日)

廣田健介・枝松正樹・豊島陽子 “ 細胞質ダイニンストークと微小管の相互作用 ” 日本生物物理学会第 42 回年会、京都 (平成 16 年 12 月 15 日)

鳥羽菜・豊岡和人・広常真治・豊島陽子 “ LIS1, Nudel 蛋白質は細胞質ダイニンのモーター活性を強調して制御する ” 日本生物物理学会第 42 回年会、京都 (平成 16 年 12 月 15 日)

昆隆英・須藤和夫 “ 遺伝子組み換えダイニンを用いた総合研究 ” 日本生物物理学会第 42 回年会、 京都 (平成 16 年 12 月 15 日)

今村謙士・昆隆英・大倉玲子・須藤和夫 “ 変異細胞質ダイニンを用いた AAA1, AAA3 モジュールの機能解析 ” 日本生物物理学会第 42 回年会、 京都 (平成 16 年 12 月 15 日)

島知弘・昆隆英・大倉玲子・須藤和夫 “ 単量体細胞質ダイニン重鎖の連続運動性 ” 日本生物物理学会第 42 回年会、 京都 (平成 16 年 12 月 15 日)

最上聡文・昆隆英・伊藤光二・大倉玲子・須藤和夫 “ 蛍光エネルギー移動 (FRET) 法を用いた, 細胞質ダイニンシステム. のスイングの検出 ” 日本生物物理学会第 42 回年会、 京都 (平成 16 年 12 月 15 日)

西浦昌哉・昆隆英・大倉玲子・須藤和夫 “ 細胞質ダイニンの最小モーター領域 ” 日本生物物理学会第 42 回年会、 京都 (平成 16 年 12 月 15 日)

Kobayashi, T., Shiroguchi, K., Edamatsu, M., Toyoshima, Y.Y.

“Analysis of dynactin p150 microtubule binding mechanism” 第 58 回日本細胞生物学会大会、大宮 (平成 17 年 6 月)

Otsubo, A., Toba, S., Edamatsu, M., Toyoshima, Y.Y.

“Real-time observation of the interaction between single cytoplasmic dynein molecules and microtubules” 第 58 回日本細胞生物学会大会、大宮 (平成 17 年 6 月)

鳥羽菜、渡邊朋信、豊島陽子、樋口秀男 “ 細胞質ダイニン 1 分子の 8nm step と ADP による協同的な step の発生 ” 日本生物物理学会第 43 回年会、札幌 (平成 17 年 11 月 24 日)

廣田健介、枝松正樹、豊島陽子 “ ダイニンストークが微小管との親和性を変化させる仕組みについて ” 日本生物物理学会第 43 回年会、札幌 (平成 17 年 11 月 24 日)

古田健也、前田有里菜、高橋良典、枝松正樹、豊島陽子 “ 分裂酵母のマイナス端モータータンパク質 Pkl1 の in vitro 運動活性 ” 日本生物物理学会第 43 回年会、札幌 (平成 17 年 11 月 24 日)

最上聡文, 昆隆英, 大倉玲子, 須藤和夫 “ 細胞質ダイニン構造変化のキネティクス解析 ” 日本生物物理学会第 43 回年会、札幌 (平成 17 年 11 月 24 日)

今村謙士, 昆隆英, 大倉玲子, 須藤和夫 “細胞質ダイニンと微小管との親和性のヌクレオチド依存的変化” 日本生物物理学会第 43 回年会、札幌 (平成 17 年 11 月 24 日)

岩崎聡、古田健也、高倉かおる、豊島陽子 “ マイナス端モータータンパク質 PKL1 の運動特性の直接観察 ” 日本生物物理学会第 43 回年会、札幌 (平成 17 年 11 月 24 日)

小林琢也、城口克之、枝松正樹、豊島陽子 “ 微小管結合の側面から見たダイナクチン p150 の役割 ” 日本生物物理学会第 43 回年会、札幌 (平成 17 年 11 月 25 日)

昆隆英、大倉玲子、須藤和夫 “ 分子内の微小管結合部位と ATP 加水分解部位との間のストロークコイルドコイルを介した情報伝達機構 ” 日本生物物理学会第 43 回年会、札幌 (平成 17 年 11 月 25 日)

島 知弘, 今村謙士, 昆 隆英, 大倉玲子, 須藤和夫 “ ダイニンのパワーストロークに対応する構造変化はどこで起こっているか ” 日本生物物理学会第 43 回年会、札幌 (平成 17 年 11 月 25 日)

沼田直己、昆隆英、大倉玲子、須藤和夫 “ 細胞質ダイニンの尾部と AAA リングの相互作用 ” 日本生物物理学会第 43 回年会、札幌 (平成 17 年 11 月 25 日)

国際会議

Nishiura, M., Kon, T., Shiroguchi, K., Mogami, T., Toyoshima, Y. Y. and Sutoh, K.

“Characterization of a recombinant fragment of the Dictyostelium cytoplasmic dynein heavy chain”, Biophysical society 48th annual meeting, Baltimore convention center, Baltimore, Maryland, U.S.A. (February 14-18, 2004)

Inoue, T., Kon, T., Ohkura, R., Yamakawa, H., Ohara, O. and Sutoh, K.

“Interaction of myosin VI with a transmembrane Ser/Thr kinase KPI-2. The American Society for Cell Biology 44th Annual Meeting, Washington, DC. , U.S.A. (December, 2004)

Kon, T., Mogami, T., Nishiura, M., Ohkura, R., Toyoshima, Y. Y. and Sutoh, K.

“Distinct Roles of the Four Nucleotide-Binding/Hydrolysis Sites in the Motor Activities of Cytoplasmic Dynein”, The American Society for Cell Biology 44th Annual Meeting, Washington, DC., U.S.A. (December, 2004)

Ohkura,R., Kon, T., Shima, T. and Sutoh, K.

“Active Participation of the Stalk Coiled-coil in Communication between ATPase and MT-binding Sites of cytoplasmic Dynein”, Biophysical Society 49TH Annual Meeting, Long Beach, CA., U.S.A. (February, 2005)

Mogami, T., Kon, T., Ohkura, R., Ito, K. and Sutoh, K.

“Kinetic Analysis of FRET changes of Recombinant Dynein Motor Domain”, Biophysical Society 49TH Annual Meeting, Long Beach, CA., U.S.A. (February, 2005)

Kon, T., Mogami, T., Ohkura, R. and Sutoh, K.

“ATP-hydrolysis cycle dependent stem motion in cytoplasmic dynein”, Biophysical Society 49TH Annual Meeting, Long Beach, CA., U.S.A. (February, 2005)

Toba, S., Toyooka, K., Hirotsune, S., Toyoshima, Y.Y.

“LIS1 and NUDEL cooperatively regulate the motility of cytoplasmic dynein”, Biophysical Society 49TH Annual Meeting, Long Beach, CA, U.S.A. (February, 2005)

Kon, T., Ohkura, R. and Sutoh, K.

“ATP-hydrolysis cycle-dependent stem motions in cytoplasmic dynein”, Gordon Research Conference on Muscle: Contractile Proteins, New London, U.S.A. (July 6, 2005)

Nishimura, A., Toyoshima, Y.Y.

“The motility of Cytoplasmic dynein and the arrangement of protofilaments in microtubule”, International Workshop Dynein 2005, Kobe (October 31, 2005)

Kobayashi, T., Shiroguchi, K., Edamatsu, M., Toyoshima, Y.Y.

“Dynactin p150 supports dynein movement by binding to microtubules without disturbing the motility”, International Workshop Dynein 2005, Kobe (October 31, 2005)

Imamura, K., Kon, T., Ohkura, R. and Sutoh, K.

“Nucleotide dependent microtubule affinity of cytoplasmic dynein”, International Workshop Dynein 2005, Kobe (October 31, 2005)

Kon, T., Imamura, K., Ohkura, R. and Sutoh, K.

“Intra-molecular communications between the ATP-hydrolysis sites and microtubule-binding site in the dynein heavy chain”, International Workshop Dynein 2005, Kobe (November 1, 2005)

Shima, T., Imamula, K., Kon, T., Okura, R. and Sutoh, K.

“Structural changes responsible for the dynein power stroke”, International Workshop Dynein 2005, Kobe, Japan (November 1, 2005)

Mogami, T., Kon, T., Ohkura, R. and Sutoh, K.

“Kinetic Analysis of Tail Motions of Cytoplasmic Dynein Motor Domain”, The American Society for Cell Biology 45th Annual Meeting, San Francisco, CA, U.S.A. (December 12, 2005)

Kon, T., Imamula, K., Ohkura, R. and Sutoh, K.

“Dissection of Intra-molecular Communications between the ATPase Site and Microtubule-binding Site in the Dynein Heavy Chain”, The American Society for Cell Biology 45th Annual Meeting, San Francisco, CA, U.S.A. (December 12, 2005)

Imamula, K., Kon, T., Ohkura, R. and Sutoh, K.

“Nucleotide-Dependent Microtubule Affinity of Cytoplasmic Dynein”, Biophysical Society 50TH Annual Meeting, Salt Lake City, Utah, U.S.A. (February 19, 2006)

Mogami, T., Kon, T., Ohkura, R. and Sutoh, K.

“Kinetic Analysis of Tail Motions of Cytoplasmic Dynein Motor Domain”, Biophysical Society 50TH Annual Meeting, Salt Lake City, Utah, U.S.A. (February 19, 2006)

Hirota, K., Otsubo, A., Edamatsu, M., Toyoshima, Y. Y.

“The mechanism of regulating the interaction between dynein stalk and microtubule”, Biophysical Society 50TH Annual Meeting, Salt Lake City, Utah, U.S.A. (February 19, 2006)

Kobayashi, T., Shiroguchi, K., Edamatsu, M., Toyoshima, Y. Y.

“Dynactin p150 supports dynein movement by binding to microtubules without disturbing the motility”, Biophysical Society 50TH Annual Meeting, Salt Lake City, Utah, U.S.A. (February 19, 2006)

Shima, T., Kon, T., Ohkura, R. and Sutoh, K.

“Two modes of microtubule-sliding driven by cytoplasmic dynein”, International Symposium on Bio-nanosystems, Hotel Matsushima Taikanso, Matsushima, Japan (September 2, 2006)

Imamula, K., Kon, T., Ohkura, R. and Sutoh, K.

“Kinetic Analysis of Dynein-MT Interaction”, International Symposium on Bio-nanosystems”, International Symposium on Bio-nanosystems, Hotel Matsushima Taikanso, Matsushima, Japan (September 2, 2006)

Toyoshima, Y. Y. & Nishimura, A.

“ Interaction of dynein and microtubules: Protofilament arrangements required for dynein motility ” , 2006 Biophysical Society Discussions, Asilomar Conference Center, Asilomar, California , U.S.A. (October 19-22, 2006)

Kon, T., Imamura, K., Ohkura, R. and Sutoh, K.

“Dissection of Intra-molecular Communications between the Catalytic Head and Microtubule-binding Site in the Dynein Heavy Chain”, 2006 Biophysical Society Discussions, Asilomar Conference Center, Asilomar, California, U.S.A. (October 19-22, 2006)

Tomohiro Shima, Takahide Kon, Reiko Ohkura, and Kazuo Sutoh,

“Two modes of microtubule-sliding driven by cytoplasmic dynein”, Fifth East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan (November 12-16, 2006)

Naoki Numata, Takahide Kon, Reiko Ohkura and Kazuo Sutoh.

“Identification of Minimal Motor Domain of Cytoplasmic Dynein”, Fifth East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan (November 12-16, 2006)

Kenji Imamura, Takahide Kon, Reiko Ohkura, and Kazuo Sutoh,

“NUCLEOTIDE DEPENDENT MICROTUBULE AFFINITY OF CYTOPLASMIC DYNEIN”, Fifth East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan (November 12-16, 2006)

Takahide Kon, Kenji Imamura, Reiko Ohkura, and Kazuo Sutoh.

“ Dissection of Intra-molecular Communications between the Catalytic Head and Microtubule-binding Site in the Dynein Heavy Chain”, Fifth East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan (November 12-16, 2006)

Hirata, D., Taba, T., Edamatsu, M., Toyoshima, Y. Y., Yamada, A., Imafuku, Y., and Tawada, K.

“Fluctuation analysis of microtubule sliding over kinesin thick filaments *in vitro*”, Fifth East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan (November 12-16, 2006)

Nishimura, A. & Toyoshima, Y. Y.

“Dynein movement on zinc-induced tubulin sheets”, Fifth East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan (November 12-16, 2006)

Miura, M., Matsubara, A.O., Kobayashi, T., Furuta, K., Edamatsu, M. & Toyoshima, Y. Y. “Behavior of single molecules of Cytoplasmic dynein on microtubules *in vitro*”, Fifth East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan (November 12-16, 2006)

Furuta, K., Edamatsu, M. & Toyoshima, Y. Y.

“Processive movement of minus end-directed microtubule motor protein PK11”, Fifth East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan (November 12-16, 2006)

Saegusa, H., Furuta, K., Edamatsu, M. & Toyoshima, Y. Y.

“Effect of adenosine nucleotide on dynein motility”, Fifth East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan (November 12-16, 2006)

Iwasaki, S., Furuta, K., Sakuma, T., Edamatsu, M. and Toyoshima, Y. Y.

“Analysis of single molecule motility of mitotic kinesins”, Fifth East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan (November 12-16, 2006)

Numata, N., Kon, T., Ohkura, R., Roberts, A., Burgess, S., Knight, P. and Sutoh, K..

“Are Six AAA Modules Sufficient to Form the AAA Ring of Dynein”, Biophysical Society 51st Annual Meeting, Baltimore, Maryland, U.S.A. (March 6, 2007)

Imamura, K., Kon, T., Ohkura, R. and Sutoh, K..

“Kinetic Analysis of Dynein-MT Interaction”, Biophysical Society 51st Annual Meeting, Baltimore, Maryland, U.S.A. (March 6, 2007)

Shima, T., Kon, T., Imamura, K., Ohkura, R. and Sutoh, K..

“Two Modes of Microtubule-Sliding Driven by Cytoplasmic Dynein”, Biophysical Society 51st Annual Meeting, Baltimore, Maryland, U.S.A. (March 6, 2007)

Kon, T., Imamula, K., Ohkura, R. and Sutoh, K..

“Dissection of Intra-Molecular Communications Between the Catalytic. Head and Microtubule-Binding Site in the Dynein Heavy Chain”, 56th Fujihara Seminar: The Molecular Motor Conference 2007(August 23-26, 2007)

Nakayama A, Torisawa T, Furuta K, Edamatsu M, Hirotsune S & Toyoshima YY.

“The Regulation of Dynein Motility by LIS1 and NDEL1”, 56th Fujihara Seminar: The Molecular Motor Conference 2007(August 23-26, 2007)

人工運動系グループ（国内会議 5 件、国際会議 1 件）

国内会議

川口友彰、本多元、羽鳥晋由、嶋田勝彦、松野孝一郎

“熱エネルギーによるアクチン繊維の一方向運動” 日本生物物理学会 40 回年会、名古屋（平成 14 年 11 月）

川口友彰、本多元、羽鳥晋由、松野孝一郎

“ATP 加水分解無しでのアクチン繊維の一方向性運動” 日本細胞生物学会第 56 回大会、大津、（平成 15 年 5 月）

川口友彰、本多元、羽鳥晋由、嶋田勝彦、松野孝一郎

“熱エネルギーによるアクチン繊維の一方向性運動 (Short Laser Irradiation moves an actin Filament Uni-directionally)” 日本生物物理学会 41 回年会、新潟、（平成 15 年 9 月）

倉富敏史、川口友彰、羽鳥晋由、本多元、松野孝一郎

“熱パルスによって駆動するアクチン繊維” 日本生物物理学会 42 回年会、京都（平成 16 年 12 月）

川口友彰、本多元

“アクチン繊維の熱エネルギー誘導性一方向運動とアクチン繊維の構造との関係” 日本生物物理学会 43 回年会、札幌（平成 17 年 11 月）

国際会議

Kawaguchi, T. and Hajime Honda, H.

“Heat-induced unidirectional movement of actin filament”, 50th Biophysical Society Annual Meeting, Salt Lake City, Utah, U.S.A. (February, 2006)

分子ナノ振動解析グループ (国内会議 0 件、国際会議 7 件)

国際会議

Kamimura, S., Sugiyama, T., Sugimoto, Y., and Wakabayashi, K.

“Dynamic flow alignment of flagellar axonemes for low-angle X-ray fiber diffraction analysis”, The 3rd International Symposium on Aero Aqua Bio-mechanisms, Ginowan, Okinawa, Japan (July, 3-7 2006)

Kamimura, S., Tamura, T., Wakayama, J., Noda, N., Sugiyama, T., Fujisawa, T. and Iwamoto, H.

“X-ray diffraction analysis of the axonemal structure of sea-urchin sperm flagella”, XIII International Conference on Small-angle Scattering, Kyoto, Japan (July 9-12, 2006)

Kamimura, S., Fujisawa, T. and Iwamoto, H.

“X-ray diffraction from dynein motors and microtubules in sea-urchin sperm flagellar axonemes”, Fifth East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan (November 12-16, 2006)

Noda, N. and Kamimura, S.

“3-D measurement of the nanometer displacement of microspheres under optical microscope”, Fifth East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan (November 12-16, 2006)

Kamimura, S., Iwamoto, H. and Fujisawa, T.

“Analysis of small-angle X-ray diffractions from the flow-aligned axonemes of sea-urchin spermatozoa”, 51st Annual Meeting of Biophysical Society U.S.A., Baltimore, MA, U.S.A. (March 3-7, 2007)

Kamimura, S. and Iwamoto, H.

“Dynamic change of axonemal structure and dynein arm arrangement in sea-urchin sperm flagella revealed by small-angle X-ray diffraction analysis”, 2007 FASEB Summer Research Conferences Biology of Cilia and Flagella, Saxtons River, Vermont, U.S.A. (August 4 –9, 2007)

Takao, D. and Kamimura, H.

“Determination of calcein diffusion rate in the flagella of sea-urchin spermatozoa. ”, 2007 FASEB

Summer Research Conferences Biology of Cilia and Flagella, Saxtons River, Vermont, U.S.A.
(August 4 –9, 2007)

(4)特許出願

国内出願 (0 件)

海外出願 (0 件)

(5)受賞等

受賞(0 件)

新聞報道(0 件)

その他(0 件)

7 研究期間中の主な活動（ワークショップ・シンポジウム等）

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 15 年 12 月 20 日	第 1 回鞭毛・ダイニン 機能研究会	東京大理学部 2 号館講堂	38	真核生物の鞭毛・繊毛運動 機構と、ダイニンの構造と機 能に関する研究発表とディ スカッションを行った。
平成 16 年 12 月 25 日	第 2 回鞭毛・ダイニン 機能研究会	東京大理学部 2 号館講堂	42	同上
平成 19 年 2 月 24 日	第 3 回鞭毛・ダイニン 機能研究会	東京大理学部 2 号館講堂	51	同上
平成 18 年 7 月 3 ~ 7 日	The 3rd International Symposium on Aero Aqua Bio-mechanisms	沖縄県 宜野湾市	1 2 0 名	エアロ・アクアバイオメカ ニズム研究会代表者とし て分子ナノ振動解析グル ープの上村慎治が流体力 学と生体運動の融合的な 研究会を JSPS 国際研究集 会の補助によって主催し た。

8 研究成果の展開

(1)他の研究事業への展開

なし

(2) 実用化に向けた展開

なし。

9 他チーム、他領域との活動とその効果

(1) 領域内の活動とその効果

2003 年から 3 回にわたり鞭毛・ダイニン機能研究会を開催した。軸系構築グループ、機能素子グループのメンバーを中心に、国内の主要な真核生物鞭毛・ダイニン研究者を集めて、この分野の最先端の研究発表・情報交換を行った。また、2005 年には、通信総合研究機構大岩和弘博士とともに、国際会議 Dynein 2005 (オーガナイザー代表：神谷 律)を開いたが、ここでも軸系構築グループ、機能素子グループによる多くの研究発表が行われた。この国際会議には、海外からの参加者 40 名を含め、計 145 名が参加した。

これらの研究集会における情報交換は各グループの研究進展に大きく貢献し、たとえば、軸系構築グループで同定された鞭毛ダイニンの微小管結合部位を、機能素子グループの組み換え体ダイニン発現の系で解析する実験へと発展している(研究は現在進行中である)。

(2) 領域横断的活動とその効果

我々の学会発表がきっかけとなって、複数の工学系研究者が鞭毛・ダイニンの運動に興味をもちはじめている。個別に、鞭毛運動をマイクロ流路形成に応用する研究や、細胞そのものによって基盤のパターンニングを行う実験を開始しているとのことである。今後、より緊密に連絡を取りあって共同研究を行うことによって、思いがけない研究の芽が生まれることも期待できよう。

10 研究成果の今後の貢献について

(1) 科学技術の進歩が期待される成果

最近、国内外の研究者の間で、新たなナノ技術の可能性として、細胞骨格繊維とモータータンパク質による人工運動系の構築を試みる研究が多く行われるようになってきた。そのような方向の研究がいつごろどのような内容で実用に移されるか、まだ判断は難しいが、細胞骨格タンパク質の使用がバイオナノテクノロジーの大きな流れの一つであることは間違いない。

これまでのところ、その方向の研究には、多くの研究結果の蓄積があるアクチンとミオシン、あるいは微小管とキネシンの系が用いられ、微小管とダイニンの系はほとんど用いられて来ていなかった。本プロジェクトの大きな成果は、そのダイニンの系の使用に道を開いたことであると言えよう。具体的には、微小管とダイニンによって実際に人工的運動が発生できることが示されたことと、ダイニン重鎖を組み換え体として発現することに成功したことが特に重要である。人工運動系の形成は鞭毛・繊毛運動機構の理解に本質的であり、組み換え体としてのダイニンの発現は、この謎に包まれているモータータンパク質

の動作機構の研究にブレークスルーをもたらすものである。また、アクチンの系においては、光照射による熱エネルギーの付与が繊維の一方向性の運動を作り出すというめざましい現象が発見された。この研究は生体運動の基礎を考える上でも、ナノバイオ技術の新しい展開としても、きわめて興味深いものである。その他、途中参加のナノ計測グループによって、ナノメートルスケールの運動解析法に大きな改良がなされたことも、今後の研究に大きな意味を持つと考えられる。

(2) 社会・経済の発展が期待される成果

上記のような基礎研究の成果は、将来的には、微小管とダイニンから人工的運動を発生させる技術や、ナノメートルスケールのパターン形成を行う技術の開発につながると考えられる。それらは、生体内部あるいは外部で機能するマイクロマシンとして応用される可能性が考えられる。

1 1 結び

前述のとおり、本プロジェクトでは鞭毛・繊毛をヒントにして、振動的運動を行う人工運動系の構築を目指し、実際に微小管とダイニンによる振動運動の発生を確認した。低頻度ながらそのような運動が観察されたことは重要であり、今後この方向の研究がさらに飛躍することを期待させるものである。また、この目標に向けて鞭毛軸系の構築とモータータンパク質ダイニンの動作機構に関する基礎研究を進めたが、その過程でなされたいくつかの発見はこの分野に飛躍をもたらすもので、生物学全体としても大きな意味を持つ。たとえば、軸系構築に関連して発見された微小管間の架橋タンパク質は、40年以上にわたり、世界中の多くの研究者が追い求めていたものであった。また、ダイニンに関して、その重鎖を組み換え体として発現することに世界で初めて成功し、その動作原理にせまる基本的研究が行われたことは、画期的と言ってよいであろう。間接的な効果として挙げなくてはならないのは、このプロジェクトにおいて、複数の研究室のチームが連携して研究を進めたことにより、タンパク質の分子レベルから軸系の構造レベルにいたる幅広い問題を議論する機会が増え、各チームのメンバー個々の理解が深まると同時に、鞭毛とダイニン研究全体の存在感が非常に高まったことである。国際会議での発表も増えた結果、鞭毛・ダイニンは、我が国が世界をリードする研究分野になってきたと言ってよい。これら、当初の予想を超えた成果を出すことができたのは、5年間にわたって、比較的自由に使える研究経費を提供してくれた戦略的創造研究推進事業のおかげであることは、言うまでもない。遠くに実用化の芽を求めながら、基礎研究に重心をおいた研究を進めることを許す姿勢が、特にありがたいことであった。