

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440089

研究課題名(和文)自己組織的構成法による真核生物鞭毛の運動機構の解明

研究課題名(英文)Motility of eukaryotic flagella studied with the bottom-up strategy

研究代表者

大岩 和弘(Oiwa, Kazuhiro)

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所・主管研究員

研究者番号：10211096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：医学的重要性が高まっている真核生物の繊毛・鞭毛の構造・機能・制御について、これまで研究代表者が進めてきた「構成要素に分解してその特性を調べる要素還元型研究」に加えて、「特性を明らかにした機能要素を順次組み上げていく構成生物学的研究手法による試験管内での鞭毛運動の再現」を行い、機能要素が自己組織的・協働的に構造化して、滑りと屈曲という機能を創出する鞭毛運動のモデルシステムを作り上げ、いくつかの力学パラメータを決定した。

研究成果の概要(英文)：The complexity of the eukaryotic flagellar axoneme is derived from 200-600 types of modular building blocks assembled hierarchically. These building blocks are precisely arranged along doublet microtubules(MTs) and regulated in a coordinated fashion to produce periodic flagellar beating. To reveal the mechanism, we have carried out in vitro reconstitution of axonemal structures in a bottom-up manner. To MTs polymerized from fragmented axonemes, we added crude outer-arm dynein extract from Chlamydomonas axonemes. These dyneins formed regular arrays on the MTs in the self-organized manner and stiff MT-bundles. Addition of ATP occasionally elicited association and dissociation cycles of MTs. When both ends of a MT bundle were clamped, shear between MTs at the middle part forced MTs to loop out from the bundle and the characteristic S-shaped bending was formed. These cyclic interactions between dynein and MTs will be an essence of the beating mechanism of the axoneme.

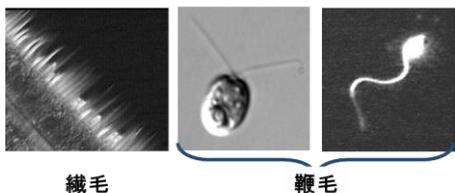
研究分野：生物物理学

キーワード：ダイニン 鞭毛運動 再構成実験系 自己組織化

1. 研究開始当初の背景

鞭毛・繊毛は、精子の運動の駆動力であり、気管上皮細胞、卵管上皮細胞、脳室上衣細胞などにおいては粘液の流れを作りだして、異物排泄、物質輸送や体液循環を担う細胞小器官である。鞭毛・繊毛の運動性障害は異物排泄機能低下による気管支拡張症や副鼻腔炎、精子の運動性欠如による男性不妊、難病指定されている多発性のう胞腎、胚の原始結節における物質輸送の非対称性が欠如することによる内臓逆位などの症状として現れる。このような疾患群は「繊毛病」と名付けられ、特に繊毛・鞭毛の動きが悪くなることで起こる病気を原発性線毛機能不全 (PDC) と呼び、これらは医学における重要な研究課題になっている。繊毛・鞭毛に関する研究論文の発表数は 2001 年を境に急増し、2016 年には 4 倍に達している。このように医学的重要性が高まっている真核生物の繊毛・鞭毛の構造・機能・制御については、その解明が待たれていた。

鞭毛・繊毛は医学的に重要な研究課題



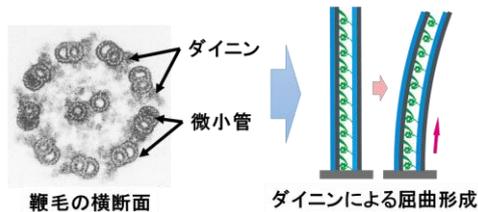
鞭毛・繊毛の機能不全は様々な疾病を引き起こす  
 原発性線毛機能不全 (Primary ciliary dyskinesia, PCD)  
 繊毛病は1000人に1人が罹患する高頻度

鞭毛・繊毛の機能の理解は医学的に重要な課題  
 鞭毛・繊毛に関する論文は2001年から約3倍に増加

2. 研究の目的

繊毛・鞭毛の波打ち運動では、周辺微小管側壁から隣接する周辺微小管に向かって突出する 2 列のダイニン腕が微小管の間に作り出す「ずり」を原動力としている。このずりが時間的・空間的に制御されて軸糸の規則的な屈曲を生じさせ、鞭毛波を作り出すとされているが、このメカニズムの詳細は明らかになっていない。一方で、鞭毛軸糸は、それを構成するタンパク質が 200-600 種類程度と考えられており、構成生物学的研究手法が使える簡潔性と、システムとしての機能の複雑性を有する格好の研究対象である。そこで、本研究課題では、これまで研究代表者が進めてきた「構成要素に分解してその特性を調べる要素還元型研究」に加えて、「特性を明らかにした機能要素を順次組み上げていく構成生物学的研究手法による試験管内での鞭毛運動の再現」を行い、要素が自己組織的・協働的に構造と機能を創出する鞭毛システムの解明に迫ることを目的とした。

鞭毛・繊毛の屈曲メカニズムは未解決の課題



鞭毛の屈曲波の形成メカニズムの詳細は未知

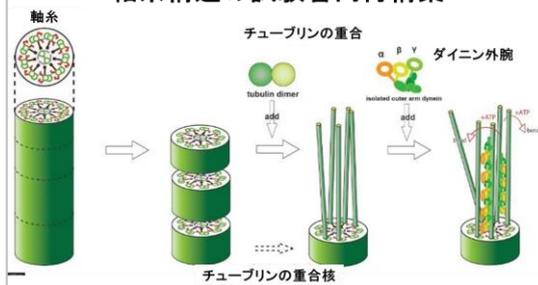
鞭毛構造の解析だけでは  
 そのメカニズムに迫るのは難しい

鞭毛波形成メカニズムを  
 試験管内で再構築する  
 ボトムアップ的研究が求められている

3. 研究の方法

材料はモデル生物としての知見と変異株の蓄積がある単細胞緑藻のクラミドモナスを用いた。細胞体から鞭毛を切り取り、回収後、脱膜して鞭毛モデルとする。軸糸の構造要素の配置については、シンクロトロン放射光を用いた X 線小角散乱で解析した。鞭毛試料を 2% メチルセルロースを含む緩衝液に分散させて、2 枚のガラス円盤を向かい合わせたときにできる隙間に流し込み、円盤を回転させた。この回転によって生じるずりせん断流れによって軸糸を流動配向させた。この軸糸を高輝度 X 線を照射して繊維回折像を得た。一方、鞭毛運動の再構築には、上記軸糸をピペティングすることで得られる断片を鋳型として用いた。この鋳型から蛍光染色したチューブリンを添加して、シングレット微小管を伸長させタキソールで安定化した。次に、クラミドモナス野生株鞭毛から得た運動活性を持つ外腕ダイニン粗抽出分画を添加することで、24nm 構造周期を持つ外腕ダイニン-微小管複合体を再構築した。この構造については電子顕微鏡観察で周期構造を確認した。蛍光顕微鏡下で、この複合体に ATP を添加して一部の微小管に滑り運動を起こし、微小管の座屈現象を確認した。また、ダイニンが微小管上に規則的に配列することで協働性が向上して、滑り速度が向上することを予想して、微小管の滑り速度を測定した。この場合、ダイニン腕を配列させた微小管と、その上を動く微小管とを区別するために、2 色に蛍光修飾を行い、外腕ダイニン粗抽出分画の添加順序にも配慮した。

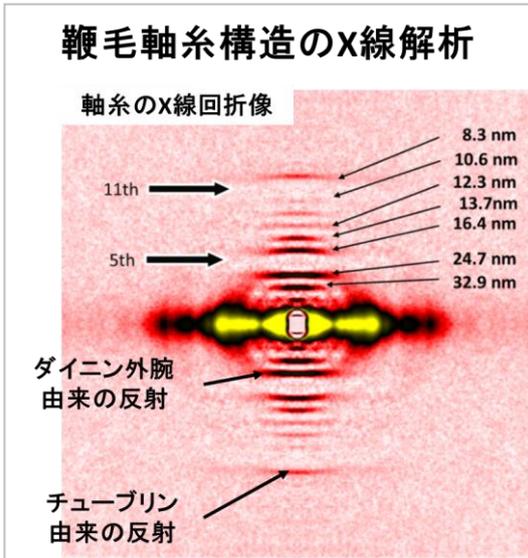
軸糸構造の試験管内再構築



#### 4. 研究成果

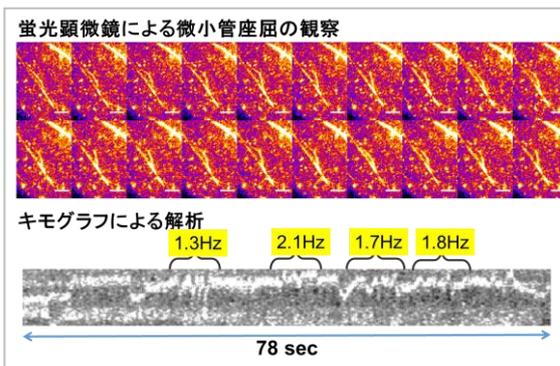
(1) X線繊維回折による鞭毛軸系の主要構造の構造周期の決定

生体に近い環境下で、原子レベルの空間分解能で時間的構造変化をも検出でき、周期構造の解析に適したシンクロトロン放射光によるX線回折解析を進めた。鞭毛軸系を流動配向させる技術を導入して、鞭毛軸系からの繊維回折を得ることに成功、クラミドモナスの鞭毛変異株を活用することで、X線回折解析の中で難しいとされる反射の帰属を明らかにした。

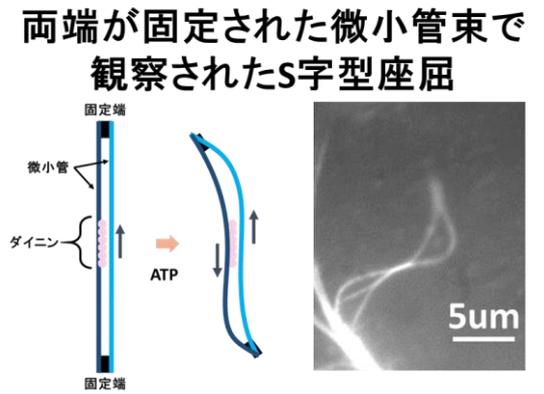


(2) 軸系構造の再構成系による微小管の連続座屈運動

軸系断片を鋳型として伸長させたシングルレット微小管にクラミドモナス野生株鞭毛から得た運動活性を持つ外腕ダイニン粗抽出分画を添加することで、24nm 構造周期を持つ外腕ダイニン-微小管複合体を再構築した。この複合体はATP添加によって一部の微小管が滑り運動を起こして、いくつかの場合において、微小管の座屈を起こす現象を確認した。座屈は、ダイニンが微小管から解離することで解消するが、再び微小管滑り運動が生じて周期的に座屈を繰り返した。座屈の繰り返し運動の周期と座屈量の解析データを蓄積することができた。



また、再構築軸系の両端が固定された軸系で生じたシグモイド型の微小管の座屈から、ダイニン外腕の発生している力を推定でき、先行研究と同程度の1pNという推定値を得た。



#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7件)

- ① Jin, M., Pomp, O., Shinoda, T., Toba, S., Torisawa, T., Furuta, K., Oiwa, K., Yasunaga, T., Kitagawa, D., Matsumura, S., Miyata, T., Tan, T. T., Reversade B., Hirotsune, S. Katanin p80, NuMA and cytoplasmic dynein cooperate to control microtubule dynamics. *Scientific Reports* 7 (2017): 39902. doi:10.1038/srep39902 (査読あり)
- ② Furuta, A., Amino, M., Yoshio, M., Oiwa, K., Kojima, H., and Furuta, K. Creating biomolecular motors based on dynein and actin-binding proteins. *Nature Nanotechnology* 12, 233-237, (2017) doi:10.1038/nnano.2016.238 (査読あり)
- ③ Torisawa, T., Taniguchi, D., Ishihara, S., Oiwa, K. Spontaneous formation of a globally connected contractile network in a microtubule-motor system. *Biophysical Journal* 111, 373-385, (2016) doi:10.1016/j.bpj.2016.06.010 (査読あり)
- ④ Diensthuber, R.P., Tominaga M., Preller M., Hartmann, F.H., Orii, H. Chizhov I., Oiwa, K. Tsiavaliaris, G. Kinetic mechanism of *Nicotiana tabacum* myosin-11 defines a new type of a processive motor. *The FASEB Journal*, 29, 81-94, (2015). doi: 10.1096/fj.14-254763 (査読あり)
- ⑤ Toba, S., Iwamoto, H., Kamimura, S., Oiwa, K. X-ray fiber diffraction recordings from oriented demembrated

*Chlamydomonas* flagellar axonemes. *Biophysical Journal*, 108, 2843-2853, (2015) doi:10.1016/j.bpj.2015.04.039 (査読あり)

⑥ Torisawa, T., Ichikawa, M., Furuta A., Saito H., Oiwa, K., Kojima, H., Toyoshima, Y.Y. Autoinhibition and cooperative activation mechanisms of cytoplasmic dynein. *Nature Cell Biology.*, 16, 1118-1124, (2014). doi:10.1038/ncb3048 (査読あり)

⑦ Shimizu, Y. Sakakibara, H., Kojima, H., Oiwa K. Slow axonemal dynein e facilitates the motility of faster dynein c. *Biophysical Journal*, 106, 2157-2165 (2014). doi: 10.1016/j.bpj.2014.04.009 (査読あり)

[学会発表] (計 11 件)

① Misaki Shiraga, Junya Kirima, Hiroaki Kojima, Kazuhiro Oiwa, Reconstitution of eukaryotic flagellar axonemes by the bottom-up strategy. *Biophysical Society*, 61st Annual Meeting, 2017/2/11-15, New Orleans, USA

② Misaki Shiraga, Junya Kirima, Hiroaki Kojima, Kazuhiro Oiwa, Reconstitution of eukaryotic flagellar axonemes by the bottom-up strategy. 第 54 回日本生物物理学会年会 2016/11/25-27, つくば国際会議場, 茨城県, つくば市

③ Kazuhiro Oiwa, Structure and dynamics of flagellar axonemes studied with synchrotron radiation X-ray diffraction. 87th Meeting of the Zoological Society of Japan, 2016/11/15-19, Okinawa Convention Center, Ginowan, Okinawa

④ Kazuhiro Oiwa, Akane Furuta, Takayuki Torisawa, Hiroaki Kojima, and Ken'ya Furuta., Motility and regulation of dyneins studied by means of the bottom-up strategy. 4th Kanazawa Bio-AFM Workshop 2016, 2016/10/4-10/6, KKR-Kanazawa, Kanazawa, Ishikawa (招待講演)

⑤ Kazuhiro Oiwa, Soft matters containing nanometer-scale protein motors and micrometer-scale protein filaments spontaneously generate various types of large-scale active pattern "公益社団法人 日本化学会コロイドおよび界面化学部会 第 67 回コロイドおよび界面化学討論会", 2016/9/22-24, 旭川教育大学, 北海道 旭川市 (招待講演)

⑥ Kazuhiro Oiwa, Spontaneous Formation of a Globally Connected Contractile Network in a Microtubule-Motor System, Gordon Research Conference (Muscle & Molecular Motors) 2016/7/17-22, Mount Snow, West Dover, VT, USA (招待講演)

⑦ Kazuhiro Oiwa, Soft matters containing self-propelled nanometer and micrometer-scale particles spontaneously generate large-scale mechanical network THERMEC' 2016: 9th International Conference on Processing & Manufacturing of Advanced Materials, 2016/5/29-6/3, Graz, Austria, (招待講演)

⑧ Naoki Kanatani, Hiroaki Kojima, Kazuhiro Oiwa, Dynamic Alignment and Millimeter-scale Vortex Formation of Microtubules Driven by Different Types of Dynein. 9th EAI International Conference on Bio-inspired Information and Communications Technologies, Keynote Talk, 2015/12/5, Columbia University, New York, USA (招待講演)

⑨ Kazuhiro Oiwa, Spatiotemporal dynamics of a multiscale contractile network in a motor-driven microtubule system and its physical properties American Society for Cell Biology, Annual Meeting, 2015/12/16-20, San Diego, CA, USA

⑩ 桐間 惇也, 白髪美咲, 小嶋寛明, 大岩和弘, Reconstruction of flagellar motility by the bottom up strategy, 第 53 回日本生物物理学会年会、2015/9/13-15、金沢大学、石川県金沢市

⑪ 大岩和弘、真核生物鞭毛の運動機構解明に向けたボトムアップ的アプローチ、分子システム研究会、2015/2/24、理化学研究所、埼玉県 和光市 (招待講演)

[その他]

ホームページ等

<http://www2.nict.go.jp/frontier/seitai/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大岩 和弘 (OIWA, Kazuhiro)

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来 ICT 研究所・主管研究員

研究者番号：10211096

### (2) 研究協力者

桐間 惇也 (KIRIMA, Junya)

白髪 美咲 (SHIRAGA, Misaki)