

領域略称名:運動マシナリー
領域番号:3407

平成26年度科学研究費補助金「新学術領域研究
(研究領域提案型)」に係る中間評価報告書

「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」

平成24年度～平成28年度

平成26年6月

宮田真人 (大阪市立大学・大学院理学研究科・教授)

目 次

研究領域全体に係る事項

1. 研究領域の目的及び概要	2
2. 研究組織(公募研究を含む)と各研究項目の連携状況	4
3. 研究の進展状況	6
4. 若手研究者の育成に関する取組状況	10
5. 研究費の使用状況(設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む)	11
6. 総括班評価者による評価	12
7. 主な研究成果(発明及び特許を含む)	14
8. 研究成果の公表の状況(主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等)	17
9. 今後の研究領域の推進方策	24

研究領域全体に係る事項

1. 研究領域の目的及び概要（2ページ程度）

研究領域の研究目的及び全体構想について、応募時に記述した内容を簡潔に記述してください。どのような点が「我が国の学術水準の向上・強化につながる研究領域」であるか、研究の学術的背景（応募領域の着想に至った経緯、これまでの研究成果を発展させる場合にはその内容等）を中心に記述してください。

【どのような点が「我が国の学術水準の向上・強化につながる研究領域」であるか、および研究の学術的背景】

“動くこと”は生命の本質である。クジラのような大きな動物から、細胞、細菌に至るまで、全ての生物は動くことにより、栄養やよりよい環境を得、増殖し、逆に捕食者や劣悪な環境から逃れている。生体運動は、進化や環境までも含む様々な生命現象を理解する鍵となり、時として、医学、産業などに重要なヒントを与える。

われわれヒトをはじめとする真核生物の生体運動の多くは、ミオシンやキネシン、あるいはダイニンといった“狭義のモータータンパク質”（以下、**モータータンパク質**、と省略）が担っている。この、きわめて重要で精巧な微小マシナリーは、1950年代に発見されて以来、卓越した研究者たちを魅了し続け、ついに今、その全貌をわれわれの前に現しつつある。モータータンパク質研究は、副産物としてわれわれに多くの研究方法と微小マシナリーに対するアイデアを与えた。そこには、タンパク質化学をはじめ、遺伝子操作、構造解析技術、一分子計測などといった、様々なものが含まれる。

ところで、モータータンパク質を解明しつつある今、**全ての生体運動メカニズム**はわれわれ人類の手中にあるのだろうか？答えはノーである。時として、種の生き残りに決定的な意味を持つ生体運動は、進化の歴史の中で、様々な局面から発生した。そこには、細菌のべん毛運動をはじめとして、細菌のべん毛に依存しない遊泳運動や固体表面上の運動、原生生物の運動など、枚挙にいとまがない。これらの運動は、これまで注目されなかった、あるいは、注目されてもそのマシナリーが高次に組織化されていて、解明があまり進んでいなかったものである。その中で最も解明が進んでいたのは“細菌のべん毛運動”である。しかし、レーウエンフックが350年前に発見していたこの現象でさえ、10年前までは、「プロトンやナトリウムなどの陽イオンが細胞外から細胞内へ流れることによってべん毛基部にあるモーターが回転する」という理解に限られていた。

ところが！である。モータータンパク質研究が大きく進展した波及効果により、この**10年で状況は一変**した。これまで全くの謎とされてきた多様な生体運動メカニズムが、次々と明らかになりつつあるのである。その代表が細菌のべん毛運動である。べん毛の基部には電気モーターに似た構造が存在するが、固定子の中を陽イオンが流れると、固定子に構造変化が起こり、それにより回転子の特定の部位が動かされることなどが、驚異的なペースで明らかになった。現在、この研究テーマは、最大の山場を迎えている。従来、これらの進展の中で、日本人研究者が果たす役割は大きかったが、その比重は年々大きくなりつつある（Sowa et al. Nature 2005 437: 916-9（本領域計画班代表、本間らによる、以下、班員の著作である場合に名前のみ示す）、Kojima et al. PNAS 2008 105: 7696-701（本間）、Terahara et al. PNAS 2008 105: 14359-64（伊藤））。ここで彼らの研究をさらに推進すれば、レーウエンフック以来人類350年の謎が、日本人の手によって解明されることも可能である。新しい運動メカニズムの解明という流れは、べん毛運動にとどまらず、**他の生体運動についても見られる**。その中で日本人の貢献として、(1) 病原細菌、マイコプラズマの滑走運動について、滑走の装置の構造やエネルギー源を次々に明らかにし、ついには力発生メカニズムの本質に迫れるようになった（Miyata Annu Rev Microbiol 2010 64: 519-37（宮田））、(2) 多くの細菌は、繊維状の構造物を膜を横切るように押し出したり引き込んだりすることで動くが、その動き発生のメカニズムの本質に迫りつつある（Tsukazaki, Mori et al. Nature 2011

474: 235-8(森), Minamino & Namba Nature 2008 451: 485-8(南野)), (3) 動物細胞やアメーバなどの運動の力発生にはモータータンパク質によるもの以外に細胞骨格繊維の重合・脱重合によるものが存在し、後者の方が進化的に古く、より基盤的であると考えられている。これらの運動を理解するには、重合・脱重合が起こる位置や方向が決定されるメカニズムを明らかにする必要がある。またこのことは、細菌細胞内における超分子複合体の運動にも当てはまる(Yamamoto et al. PNAS 2010 107: 9382-7(福森))。これを理解するには、細胞骨格繊維の構造とそのダイナミックな変化を明らかにすることが重要であるが、現在この分野の研究も急速に達成されつつある(Murakami et al. Cell 2010 143: 275-87(上田); Fujii, Namba et al. Nature 2010 467: 724-9)。

これら新奇の生体運動メカニズムは全て、高度に組織化された数多くの部品からなる“運動超分子マシナリー”によるもので、マシナリーは内部での調和を保ちながら大きく動いており、さらにその多様性には35億年の生命の歴史が刻まれている。運動超分子マシナリーの研究を推進することは、微小マシナリーの新たな作動原理と、医学や産業における応用へのヒントをわれわれ人類にもたらすであろう。

[研究期間内に何をどこまで何をどこまで明らかにしようとするのか?]

本領域は、日本人の貢献により山場を迎えつつある運動超分子マシナリーの研究を強力に推進し、それぞれの力発生メカニズムの中核を明らかにすること、先端研究との交流と支援を通じて様々な段階にある当該分野研究の全てを底上げすること、5-10年後に大きな発展が期待できるオリジナリティーの高い萌芽的研究を育てること、を本領域における研究の目的とする。

[どのような取り組み(共同研究や研究人材の育成等)を通じて当該領域をどのように発展させるか? また本領域の発展がどのように学術水準の向上・強化につながるか?]

生体運動は、広範な生物種で見られるため、生体運動を実際に研究している、あるいは興味を抱いている研究者らは、様々な視点を持ちながら様々な分野に分散しており、時としてお互いの存在と研究対象すら知らない。そのため本領域では、あえて所属学会や投稿雑誌などの異なる研究グループを計画班に採用した。本領域の遂行をきっかけとして、**将来の日本、そして海外へ続く新たな研究交流の場**を作ること目標とする。実際には、この領域独自の国内会議や国際学会を開催する一方、既存の学会や研究会へ積極的に働きかける。

啓発活動や公募研究の推奨により、新規参入者の発掘を行う。特に、最先端の知識と技術、そして意欲をもつ、**モータータンパク質研究者の参入**に期待する。過去に、モータータンパク質分野の研究者がこの分野へ参入して、短期間で顕著な業績をあげているケースは多い。実際には、新規参入で成功した研究者の招聘、研究対象の可能性を議論するワークショップ、DVD製作、などを計画している。計画班は、細菌の運動を扱うものが多いが、研究は微生物や原核生物に限定するものではない。

研究は、遺伝子操作、ゲノムサイエンス、光学顕微鏡技術、結晶構造解析、タンパク質化学、電子顕微鏡観察、など、それぞれの研究においてもっとも適した技術を用いて展開する。総括班は領域内での共同研究や技術協力を積極的に推奨し、旅費の支援なども行う。

電子線クライオトモグラフィー、急速凍結フラクチャー電子顕微鏡観察法、および高速 AFM、の**3つの技術**は、当該分野の研究においてしばしば決定的な情報を与える。しかし残念なことに、それぞれの事情から、現時点では一般の研究者が試すことのできる状態ではない。本領域では、総括班に技術支援部を設けて、これらの技術の**運動超分子マシナリー**研究への応用方法の開発と技術の提供を行う。

2. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況（2ページ程度）

領域内の計画研究及び公募研究を含んだ研究組織と領域において設定している各研究項目との関係を記述し、研究組織間の連携状況について組織図や図表などを用いて具体的かつ明確に記述してください。

当領域は、総括班、7つの計画班、そして現在は28の公募班から構成されている。

【総括班】

宮田 真人(大阪市立大学): 領域代表、急速凍結レプリカ電子顕微鏡法、質量分析、3Dプリンターの生物学的利用
本間 道夫(名古屋大学): 事務、電子線クライオトモグラフィー
加藤 貴之(大阪大学): 電子線クライオトモグラフィー
伊藤 政博(東洋大学): オンラインビデオライブラリー
森 博幸(京都大学): 学術集会報告書作成
中山 浩次(長崎大学): 携帯端末アプリケーション開発
福森 義宏(金沢大学): 名簿および紹介冊子作成 高速原子間力顕微鏡
上田 太郎(産業技術総合研究所): 領域会議プログラム
小嶋 誠司(名古屋大学): 事務、会計
片山 栄作(大阪市立大学): 急速凍結レプリカ電子顕微鏡法
古寺 哲幸(金沢大学): 高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)
田岡 東(金沢大学): 高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)
川上 勝(山形大学): 3Dプリンターの生物学的利用
神山 勉(名古屋大学): 構造解析協力
西坂 崇之(学習院大学): 光学顕微鏡

石渡 信一(早稲田大学) 生物物理学: 評価委員、領域アドバイザー
北 潔(東京大学) 生化学/寄生虫学: 評価委員、領域アドバイザー
笹川 千尋(東京大学) 細胞微生物学: 評価委員、領域アドバイザー
難波 啓一(大阪大学) 構造生物学: 評価委員、領域アドバイザー

【計画研究】

A01 反復マシナリー

マイコプラズマ滑走運動のメカニズム / 宮田 真人(大阪市立大学)
タンパク質の分泌を駆動する反復モータの作動原理の解明 / 森 博幸(京都大学)

A02 回転マシナリー

べん毛超分子モーターの運動エネルギー変換メカニズム / 本間 道夫(名古屋大学)
ハイブリッド型生物モーターのイオン選択透過分子機構の解明 / 伊藤 政博(東洋大学)

A03 複雑系マシナリー

バクテロイデーテス細菌の滑走運動マシナリーの構造とダイナミクス / 中山 浩次(長崎大学)
磁気感应運動マシナリーの構造機能相関 / 福森 義宏(金沢大学)
アメーバ運動を統御するアクチン構造多型マシナリー / 上田 太郎(産業技術総合研究所)

【公募研究】

A01 反復マシナリー

膜運動を生み出す小胞形成マシナリーの作動機構の解明 / 佐藤 健(東京大学)
モーター超分子複合体の分子構築と運動制御機構の解明 / 豊島 陽子(東京大学)
マイコプラズマGli349タンパク質の構造ダイナミクス解析 / 新井 宗仁(東京大学)
ESR動的解析法による筋運動スイッチマシナリーと常磁性イオン流モーターの解明 / 荒田 敏昭(大阪大学)
イカダケイソウのミオシン様タンパク質の同定 / 園部 誠司(兵庫県立大学)
真核生物鞭毛の滑走運動: その生理的意味とメカニズム / 神谷 律(学習院大学)
アクチンレッドリングによるアメーバ細胞運動の原子構造解析に基づく解明 / 若林 健之(帝京大学)
線虫精子のアメーバ運動メカニズム / 島袋 勝弥(宇部工業高等専門学校)
肺炎マイコプラズマの接着滑走マシナリーの微細構造解明と構成タンパク質の構造解析 / 見理 剛(国立感染症研究所)
極限環境下にある超好熱始原菌の運動観察 / 西山 雅祥(京都大学)

A02 回転マシナリー

ATP合成酵素を中心としたイオン駆動型分子モーターの普遍的作動原理の解明 / 渡邊 力也(東京大学)

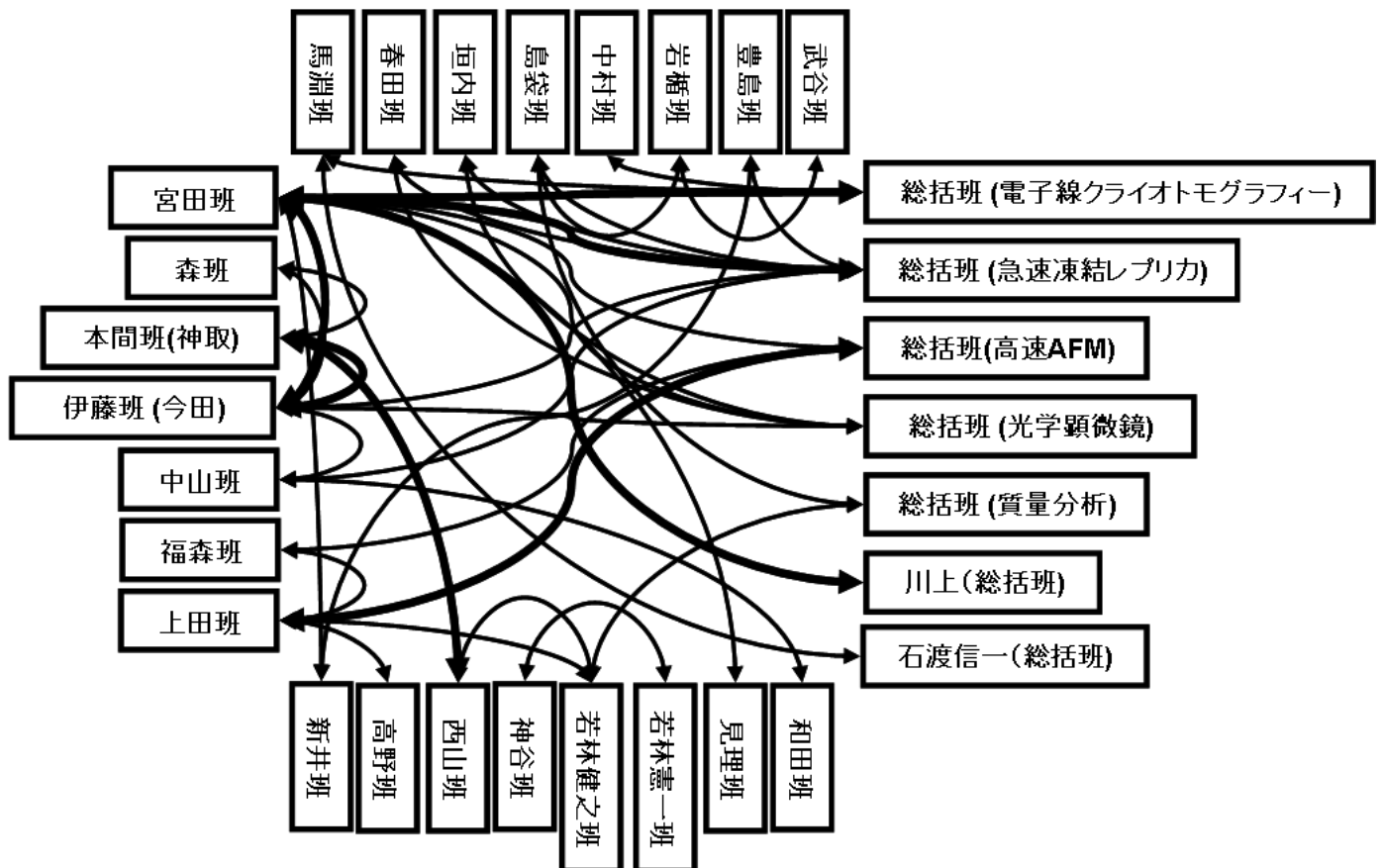
A03 複雑系マシナリー

スピロヘータの推進力発生メカニズム / 中村 修一(東北大学)

真核生物鞭毛軸系における運動調節超分子の規則的配列機構 / 若林 憲一 (東京工業大学)
 黄色ブドウ球菌の新規移動様式の分子機構 / 垣内 力 (東京大学)
 青色光に依存したシアノバクテリア光走性の分子メカニズム / 増田 真二 (東京工業大学)
 細胞質分裂をつかさどる逆平行微小管超分子マシナリーが動く仕組み / 上原 亮太 (北海道大学)
 ミドリムシにおける走光性制御マシナリーの解明 / 岩崎 憲治 (大阪大学)
 繊毛群のメタクロナルウェーブ伝達機構 / 岩楯 好昭 (山口大学)
 筋肉の超分子マシナリー「サルコメア」の構築と恒常性維持機構 / 武谷 立 (宮崎大学)
 新たな染色体分配因子の運動と機能の分子機構解析 / 片山 勉 (九州大学)
 運動マシナリーとしてのAAA型分子シャペロン / 小椋 光 (熊本大学)
 糸状性光合成細菌クロロフレクサス アグリガンスの高速滑走運動を可能にする分子機構 / 春田 伸 (首都大学東京)
 プラスミド分配を制御するTubZ重合分子モーターの構造機能解析 / 林 郁子 (横浜市立大学)
 分裂酵母収縮環のin vitro収縮系を用いた細胞質分裂の機構解明 / 馬淵 一誠 (学習院大学)
 アクチンの構造多型性・協同性・応答特性の分子機構 / 高野 光則 (早稲田大学)
 バクテリア滑走マシナリーの幾何学と力学 / 和田 浩史 (立命館大学)
 バクテリア細胞骨格タンパク質複合体の構築と制御機構の解析 / 塩見 大輔 (立教大学)
 精子競争により進化し多様化した運動マシナリーのモデル化 / 野口 立彦 (防衛医科大学校)

【連携状況】

これら研究組織間で、下図に示すように41件の課題が共同研究として行われた。下に共同研究俯瞰図を示す。図中の矢印は共同研究で線の太さは件数を反映している。総括班(質量分析)については単純測定による支援を含まない。また、全てにおいて現時点でまだ計画中のものは含まない。



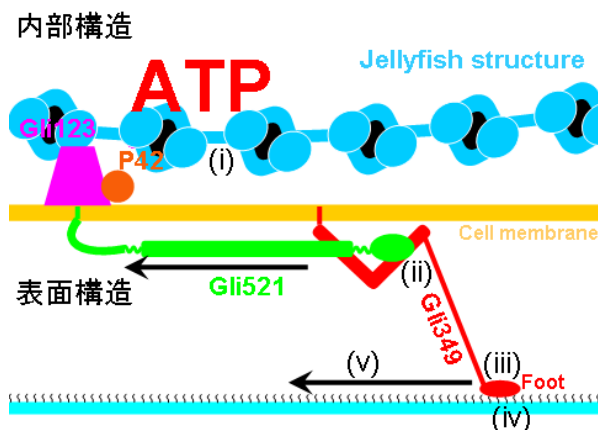
3. 研究の進展状況 [設定目的に照らし、研究項目又は計画研究毎に整理する] (3 ページ程度)

研究期間内に何をどこまで明らかにしようとし、現在どこまで研究が進んでいるのか記述してください。また、応募時に研究領域として設定した研究の対象に照らして、どのように発展したかについて研究項目又は計画研究毎に記述してください。

【A01 反復マシナリー】

宮田計画班「マイコプラズマ滑走運動のメカニズム」

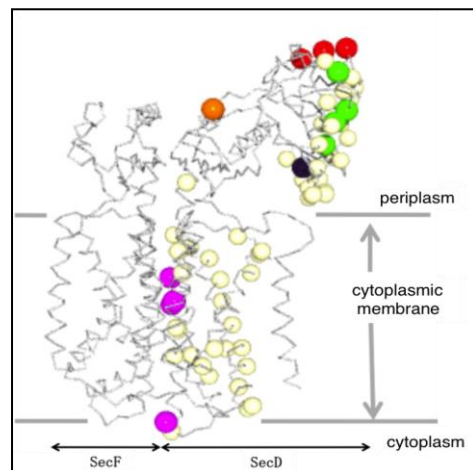
最小の生物や病原菌などとして知られるマイコプラズマは、ユニークなメカニズムで滑走運動を行う。これまでに最速種であるマイコプラズマ・モービレについて研究を行い、装置とメカニズムについて図に示すモデルを提案した。すなわち、滑走装置は3つの巨大なタンパク質からなる表面構造と約 10 のタンパク質からなる内部構造で構成される。ATP が加水分解されることで生じた内部構造の動きが“あし”のタンパク質 Gli349 に伝わり、足場に存在するシアル酸オリゴ糖(SO)をあしが引っ張ることで、菌体は前に進む。本研究ではこのモデルの具



体像を得るために図に示す(i)-(v)について研究を行った。(i) F1-ATPase とチューブリンそれぞれのホモログが滑走装置内部構造に含まれていることを、遺伝子操作法と蛍光タンパク質ラベル法を開発・適用することで明らかにした。(ii) 表面構造の巨大分子である Gli521 と Gli349 の形状と液中での動きを、電子顕微鏡および高速 AFM で明らかにした。Gli349 が、“クランク”として働く Gli521 に多くの点で支えられることにより装置の表面から大きく突き出ていることを、化学架橋および急速凍結レプリカ電子顕微鏡観察により明らかにした。(iii) Gli349 タンパク質先端のドメイン、“foot”の組換えタンパク質の調製に成功した。得られた試料は 40-70 pN の SO 結合活性を有していた。(iv) SO の認識は主に非還元末端の構造で行われており、認識には三糖が必要条件であること、また結合力は滑走の前方向と後方向で約二倍異なることを光学顕微鏡と光ピンセットを用いた解析から明らかにした。(v) 滑走運動は ATP 加水分解にカップルした 70 nm を単位とする動きの繰り返して起こっていることを、菌体と膜透過化モデル、“滑走ゴースト”の動きの詳細な解析から明らかにした。

森計画班「タンパク質の分泌を駆動する反復モータの作動原理の解明」

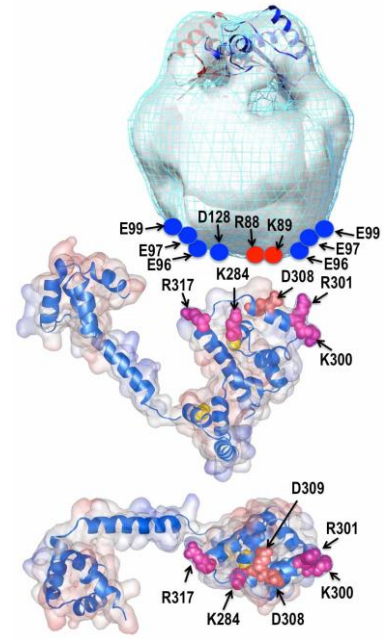
細菌のタンパク質膜透過においては、SecYEG 膜透過チャネルの両側に位置する2つの反復モータ SecA ATPase と SecDF が中心的役割を果たす。本研究課題では、これら反復モータの作動原理の解明を目指し、現在までに以下の成果を挙げている。(i) SecD をターゲットとした網羅的 *in vivo* 光架橋実験により(右図参照)、ア)膜透過基質タンパク質との相互作用部位(緑)、イ)分子シャペロンとの相互作用部位(赤)、ウ) SecF との近接部位(マゼンタ)を同定した。また、エ)分子内架橋(オレンジ)形成効率の変化を指標に、PMF(プロトン駆動力)を用いた SecD 可動ドメインの構造変化を支持する結果を得た。(ii) 電子顕微鏡観察により、SecDF が2つの主要な構造状態を持つことを明らかにした。(iii) ビブリオ属細菌は、イオン特異性を異にする2種類の SecDF パラログを広く持つ事を見いだした。ビブリオ菌中では、Na⁺駆動型の V.SecDF1 は恒常的に発現しているのに対し、H⁺駆動型の V.SecDF2 はタンパク質膜透過能が低下した際に特異的に発現誘導される。V.*secD2* の上流に位置する遺伝子 *vemP* によってコードされる分泌タンパク質 VemP (*Vibrio export monitoring polypeptide*)が、分泌モニターとして働き、分泌能低下時に自身のタンパク質合成(翻訳)の停止を介して、下流の V.SecDF2 の発現を上昇させている事を明らかにした。ビブリオ属細菌は、翻訳停止を利用した極めてユニークな発現調節機構により、菌の分泌能を安定に保持する巧妙なメカニズムを持つと考えられる。(iv) *in vivo* 光架橋実験を用いて、膜タンパク質組み込み因子 YidC 内の基質タンパク質相互作用部位を同定した。



【A02 回転マシナリー】

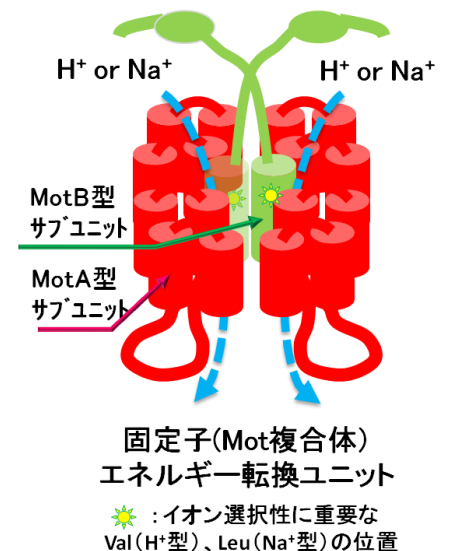
本間計画班「べん毛超分子モーターの運動エネルギー変換メカニズム」

べん毛超分子モーターは固定子と回転子という二つの部位から構成される。運動エネルギー変換に最も重要な回転子構成タンパク質は FliG である。固定子は 4 回膜貫通型タンパク質 MotA と 1 回膜貫通型タンパク質 MotB からなり、固定子へのイオンの流入と共役して MotA の細胞質側領域が FliG の C 末端ドメインと相互作用することで、回転力が発生すると考えられている。本研究課題において以下の5点について、モーター機能を明らかにした。(i)大腸菌やサルモネラ菌の H⁺駆動型モーターの回転力産生のための回転子-固定子間相互作用において、FliG と MotA の荷電残基間の静電的相互作用が重要であることが示唆されている。FliG および MotA オルソログである PomA の保存荷電残基およびその周辺残基に着目し、それらの残基の機能解析を行った結果、Na⁺駆動型べん毛モーターでは、大腸菌の H⁺駆動型モーターとは異なり、1 残基-1 残基間相互作用というよりは多残基-多残基間の荷電相互作用がモーター機能に重要である事が判明した。(ii)エネルギー変換素子である固定子複合体の構造を決定するため、超好熱菌である *A. aeolicus* ゲノム配列を解析し、固定子遺伝子として1つの *motA* 遺伝子と2つの *motB* 遺伝子(*motB*₁, *motB*₂)があることが分かった。それら遺伝子をクローニングし、MotAについては、大量精製にはじめて成功した。ペリプラズム領域を大腸菌の MotB と置き換えた *A. aeolicus* キメラ固定子が、大腸菌中で機能をした。この固定子がナトリウムイオンの運動能依存性を示すことが出来た。これにより、*A. aeolicus* の持つべん毛モーターがナトリウム型であることを証明できた。(iii)べん毛モーターの固定子である MotA/B 複合体は負荷感受性のプロトンチャネルとして働き、回転子の周りに配置される固定子の数もプロトン透過活性も外部負荷に依存して巧みに制御されることを明らかにした。(iv)電子線クライオトモグラフィー法により細菌べん毛の膜に埋まったインタクトな状態で構造解析した結果、これまで単離精製が困難だったタンパク質輸送装置の立体構造が明らかになった。(v)サルモネラ菌内でも機能できる枯草菌の Na⁺駆動型固定子である MotP/S 複合体を単離精製することに成功した。



伊藤計画班「ハイブリッド型生物モーターのイオン選択透過分子機構の解明」

近年、本計画班により外環境に応答して H⁺と Na⁺の二種類の共役イオンを使い分ける新奇なハイブリッド型べん毛モーターが好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌から発見されて以来、この分野は新たな時代に入ったといえる。本研究は、伊藤がエネルギー変換ユニットであるべん毛モーター固定子タンパク質のハイブリッド型と単一イオン利用型のアライメント解析からイオン選択に関与すると推定される固定子複合体のアミノ酸残基を選定して、変異導入実験を行うことでイオン選択に重要な領域を同定すること、そして連携研究者の今田と協力し、*Bacillus alcalophilus* の K⁺と Na⁺で駆動するべん毛モーター固定子 MotPS の X 線結晶構造解析を行うことでイオン選択透過分子機構の解明することを目指している。これまで、*Bacillus* 属べん毛モーター固定子のイオン選択透過に重要なアミノ酸残基の同定と新規なべん毛固定子の探索を行った。イオン選択透過に重要なアミノ酸残基として *B. alcalophilus* 由来の Na⁺/K⁺駆動型固定子サブユニット MotS の膜貫通領域に変異を導入することでイオン選

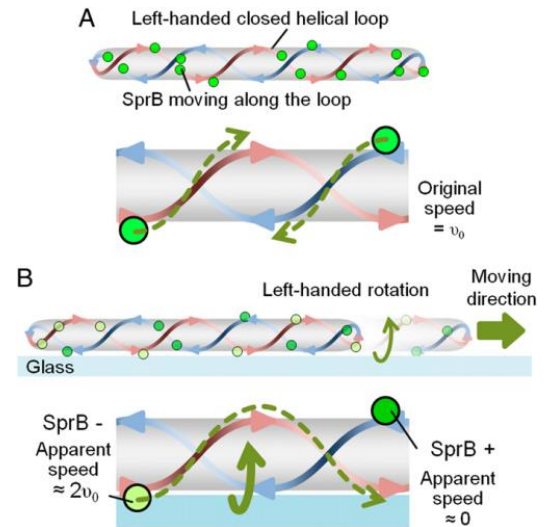


択性が変化することを明らかにした。現在、詳細な解析を行っている。また、新規に二価カチオンを利用してべん毛を駆動させる菌体を自然界から分離した。この菌の固定子の塩基配列の同定に成功し、現在、遺伝子工学的手法が容易な枯草菌の系でこの固定子の詳細な機能を検討している。この他に、*B. alcalophilus* の Na^+/K^+ 駆動型固定子 MotPS の大腸菌での大量発現系の確立と MotS サブユニットの最小機能領域の確定と結晶化が比較的容易であることが期待される MotS サブユニットの C 末端側の親水性領域の結晶化を目指して高発現化を行っている。今後もこれらの研究を推進することで駆動力と共役イオンとしてのカチオン選択性を解明する。

【A03 複雑系マシナリー】

中山計画班「バクテロイデーテス細菌の滑走運動マシナリーの構造とダイナミクス」

歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* の病原因子の分泌についての研究から本菌をはじめとするバクテロイデーテス細菌に新規の分泌機構(9型分泌機構、T9SS)が存在することが示唆された。本細菌群に属する歯周病細菌 *Tannerella forsythia* や *Prevotella intermedia* についても T9SS を構成するタンパク質の遺伝子を破壊した変異株では、病原因子の分泌に異常があることから、これらの細菌においても T9SS が機能していることがわかった。一方、バクテロイデーテス細菌 T9SS 構成タンパク質は一部のバクテロイデーテス細菌の有する滑走運動能にも必要であることがわかっていて、滑走細菌 *Flavobacterium johnsoniae* の菌体表面には、滑走時にはアドヘジンとして機能すると考えられている 700 kDa と巨大な線維状タンパク質、SprB が存在する。生菌を用いて SprB を直接蛍光標識し、そのダイナミクスを詳しく調べた結果、SprB は菌体表面上を一定の速度で SprB の進行方向に対して左ラセン回転しながら移動し、極で方向を変え、同一の速度で逆方向に左ラセン回転しながら移動していることがわかった。この結果は SprB が菌体表面をラセン運動すると同時に基面に接着することで推進力が生じることを示唆している。また、菌体表面タンパク質を同様に蛍光標識して菌が並進運動しているときの菌体表面タンパク質の動きを追うと菌が進行方向に向かって左回転しながら滑走していることがわかった。*F. johnsoniae* は寒天平板上を滑走して大きな集落を形成する(コロニー Spredding, CS)が、10 mM グルコース含有平板では CS はみられず、小さな集落を形成する。トランスポゾン変異導入株からグルコース存在下でも CS を示す株を複数得た。それらの株の解析から CS を示す変異株では培地中に4種類のタンパク質(CSF)が分泌されていることがわかった。マイクロアレイ解析からこの4種類の CSF 遺伝子の発現は野生株をグルコース含有平板で培養すると顕著に減少することがわかった。



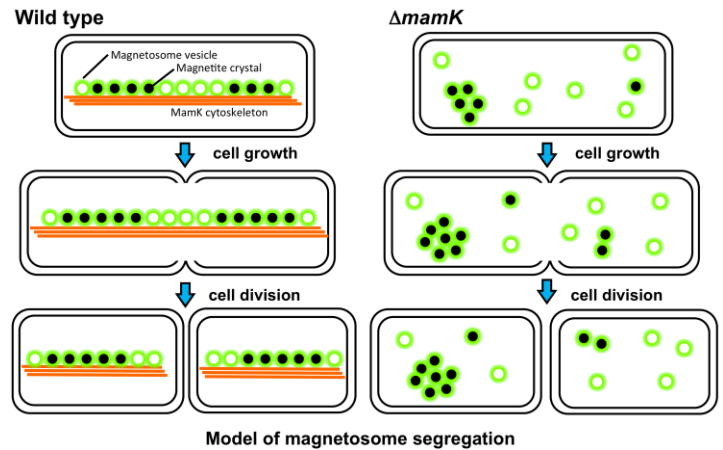
福森計画班「磁気感応運動マシナリーの構造機能相関」

磁気感応細菌は世界中の淡水域に存在しているにもかかわらず、その磁気感応が研究されたことはほとんどなかった。本計画班では、*Magnetospirillum magneticum* AMB-1 の磁気感応のメカニズムを明らかにするべく以下の研究を行い結果を得た。

(i) 新しい走磁性評価法の開発。これまでの走磁性の評価法(光散乱法)では、運動性を評価できない為、野生株と *mamK* 欠損株の表現型に差が無い。しかし、本研究で開発した走磁性評価法(Magnetic Swimming Assay)では、両株間に表現型の違いが観察され、「細胞骨格蛋白質(MamK)繊維」が細胞分裂の際にマグネトソームの安定分配に関与することが示唆された。

(ii) 生きた磁性細菌のマグネトソームの可視化と動態解析。斜光照明法を用いた生細胞蛍光イメージングにより、

マグネトソームを可視化し、その細胞周期(倍加時間約 8 時間)を通じた細胞内動態を野生株と *mamK* 欠損株で解析した。その結果、野生株では、マグネトソームは細胞長軸に沿った直鎖状に配置され、その後に行った細胞分裂により娘細胞へ安定して分配された(図)。一方、*mamK* 欠損株では、マグネトソームは細胞内をランダムに移動、または凝集体を形成し、結果として娘細胞に不均等に受け渡されていた(図)。以上の結果から、「細胞骨格蛋白質(MamK)繊維」が細胞分裂の際に「マグネトソーム」の娘細胞への安定分配を担っていることが重ねて示唆された。

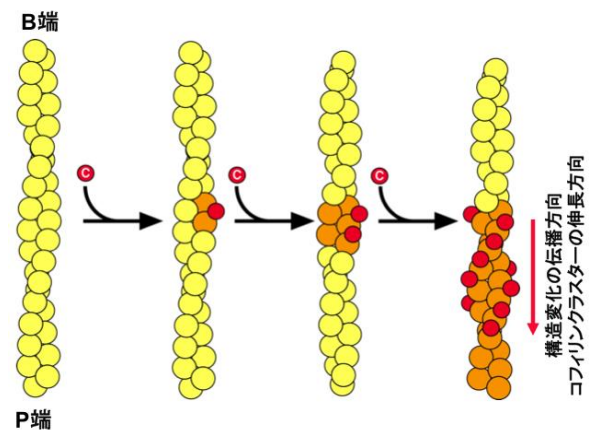


(iii) 高速 AFM によるグラム陰性細菌の細胞表層構造の動態解析。*M. magneticum* AMB-1 の外膜表面は、ネット状の分子構造で覆われていることが高速

AFM 観察により明らかとなった。この構造はポーリン分子で構成されていることが示唆された。また、この新規な表層構造は、*E. coli* や *R. sphaeroides* でも観察されることからグラム陰性細菌の特徴であることが示唆された。

上田計画班「アメーバ運動を統御するアクチン構造多型マシナリー」

(i) コフィリンはアクチンフィラメントと協同的に結合してクラスターを形成し、らせんピッチを短くすることが知られていた。そこでコフィリン結合に伴うアクチンフィラメントのらせんピッチの変化を高速 AFM によりライブ観察したところ、コフィリン結合によるらせんピッチの短縮は、フィラメントの P 端方向の bare zone に一方向的に伝播することが判明した(右図、橙色の部分)。コフィリンクラスターの伸長も、同様に P 端方向へ一方向的であった。この結果は、アクチン結合タンパク質の結合によるアクチン



フィラメントの構造変化を初めてライブ観察した成果であり、アクチンフィラメントの協同的構造変化が長距離にわたってアクチン結合タンパク質の結合を制御し、新規の信号伝達系となる可能性を示唆した。

(ii) われわれは、ミオシンモータードメインもアクチンフィラメントと協同的に結合することを示してきたが、蛍光顕微鏡により、コフィリンとミオシンモータードメインが相互排他的に溶液中のアクチンフィラメントと協同的に結合することを実証した。相互排他的な協同的結合を定量的および経時的に解析するため、ガラス基板の上に固定したアクチンフィラメントにコフィリン、ミオシンモータードメインが協同的に結合できる実験条件を確立した。

(iii) 分子内構造変化を検出できる分子内 FRET 標識アクチンを調製して細胞に導入し、蛍光顕微鏡観察したところ、細胞内のアクチンの構造は局所的に異なることを見出した。

(iv) 種々のアクチン結合タンパク質のアクチン結合ドメインを GFP 融合タンパク質として発現し、細胞前部や後部に局在するものを見出した。アクチン結合ドメインはアクチン結合活性をもった小さなタンパク質ドメインなので、そうしたアクチン結合ドメインが細胞内の特定のアクチンフィラメントと結合するということは、アクチンフィラメントの構造の差異を認識している可能性が高く、今後詳細な in vitro 観察を進める予定である。さらにこの目的のため、多色同時観察が可能な TIRF 顕微鏡を構築した。

4. 若手研究者の育成に係る取組状況（1 ページ程度）

領域内の若手研究者の育成に係る取組状況について記述してください。

若手研究者を育成するために、領域名を冠したシンポジウムを行い、積極的に領域内の若手研究者を発表者や座長として登用している。これまでにのべ 12 名の 40 歳未満の研究者が発表を行った。リストを以下に示す。

【第 50 回日本生物物理学会年会】シンポジウム"Harmonized supramolecular machinery for motility and its diversity" (2012 年 9 月 3 日)、**佐藤啓子(中山班)**: Secretion and Gliding in Bacteroides

【第 45 回日本原生動物学会大会】シンポジウム「滑走運動の生物学」(2012 年 1 月 25 日)、**山岡望海(園部班)**: イカダケイソウの滑走運動(兵庫県立大学大学院生命理学研究科)、**中根大介(中山班)**: バクテロイデーテス細菌の滑走運動について

【第 85 回日本生化学会大会】シンポジウム「運動超分子マシナリーの機能メカニズム」(2012 年 12 月 15 日)、**中根大介(中山班)**: フラボバクテリアの滑走運動マシナリー: 表面タンパク質のらせん流で動くバクテリア、**古寺哲幸(総括班)**: 高速 AFM で捉えた運動マシナリー

【第 86 回日本細菌学会総会】ワークショップ「細菌構造研究の新展開: 分泌装置, 細胞骨格, 運動装置, 細菌表層の構造体を中心に」(2012 年 12 月 15 日)、**田岡 東(福森班)**: 「生きた細菌細胞表層のナノオーダー構造解析」

【日本農芸化学会2014年度大会】「生体超分子の視覚化による新しい世界の発見」**田岡 東(福森班)**: 高速原子間力顕微鏡 (High-speed AFM) を用いた微生物細胞表層の可視化、**中根大介(中山班)**: 戦車のような仕組みで動くバクテリア

【第 87 回 日本細菌学会総会】シンポジウム「変貌しつつある細菌の細胞像」(2014 年 3 月 27 日)、**塩見大輔(公募班代表)**: 座長、**垣内 力(公募班代表)**: 黄色ブドウ球菌のコロニー Spredding、**塩見大輔(公募班代表)**: 細胞骨格タンパク質を含む超分子複合体による細菌細胞形態制御機構、**中村修一(公募班代表)**: 力学で考えるレプトスピラの運動メカニズム

若手研究者育成と研究推進のために若手人材の雇用を行っている。以下に示すようにこれまでに 20 歳代と 30 歳代の若手研究者それぞれ 10 名と 14 名を研究者としてフルタイムで雇用した。独立した研究者として自立させるために育成に努め、その結果、すでに多くの発表が雇用した研究者によりなされている。以下に実名をリストする。

5. 研究費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）（1 ページ程度）

領域研究を行う上で設備等（研究領域内で共有する設備・装置の購入・開発・運用・実験資料・資材の提供など）の活用状況や研究費の効果的使用について総括班研究課題の活動状況と併せて記述してください。

運動超分子マシナリーの研究においてその有用性が明白で、時として決定的な意味を持つ3つの方法、すなわち、(i) 電子線クライオトモグラフィー、(ii) 急速凍結レプリカ電子顕微鏡法、(iii) 高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）について、総括班活動として技術開発・提供を行っている。またこれら可視化技術とは別に、(iv) タンパク質の質量分析による解析を全班員に無償で提供している。(iii)については総括班からの支出がないため、それ以外の実績を報告する。

(i) 総括班、加藤貴之（大阪大）、川本晃大（大阪大、博士研究員）、本間道夫（名古屋大）を中心に、大阪大学生命機能研究科の FEI 社製 Titan Krios にて技術の開発と提供を行っている。総括班で川本博士研究員を雇用している。これまでに 4 研究グループの研究者と、試料調製及び電子線クライオトモグラフィー解析を行った。技術開発の結果、電子線クライオトモグラフィーは試料に対する制限が少ない反面、一つ一つのトモグラムに関しては分解能が低いが、複数のデータから同じ分子を切り出し、平均化することで高分解能の構造解析が可能となることが明らかになった。4グループの試料のうち、2つは平均化に成功し、3つは単独のトモグラムにおいて興味深いデータを得た。1つに関しては試料調製を検討中である。また、一編は現在投稿中である（Kawamoto A, Matsuo L, Kato T, Yamamoto H, *Namba K, *Miyata M. Identification of P1 adhesin and structural periodicities in the attachment-gliding organelle of *Mycoplasma pneumoniae*.)。

(ii) 総括班の宮田真人（大阪市大）、片山栄作博士研究員（大阪市大）を中心に急速凍結レプリカ電子顕微鏡法の技術開発と提供が行われている。2012 年度末に急速凍結レプリカ法による電子顕微鏡観察を行うための装置一式を共用の機器として導入した。また、2010 年に東京大学を退職した片山栄作元教授を 2012 年より博士研究員として雇用し、技術指導を提供している。技術開発・提供にかかわる費用は全て総括班が負担している。また、2013 年度より、この方法の発案者で、ワシントン大学および京都大学教授の John Heuser 教授からの助言も受けられるようになった。さらに、共通点の多いロータリーシャドーイング電子顕微鏡観察法の技術開発・提供も行っている。これまで、11 研究グループに所属する研究者が大阪市立大学を訪れて実験を行い、その活動状況は可能な範囲で FaceBook に公開している。

<https://www.facebook.com/freeze.fracture>

従来、この方法で用いる急速凍結装置は液化ヘリウムを回収しないことを前提としているため、2012 年に始まった世界的な液化ヘリウム使用の制限への対応を余儀なくされた。対応は容易ではなかったが、2013 年度半ばごろから、液化ヘリウムの使用量を極力抑えることと、試料に応じて液化ヘリウムの代わりに液体窒素を用いることでの対応が可能となった。現在では急速凍結レプリカ電子顕微鏡法の装置一式は、領域内研究者によりほぼフル稼働の状態になっている。これまでに多くの有用な構造情報を得ることに成功し、その中で一つの論文が現在投稿中となっている（Yamamoto H, Tahara YO, Katayama E, Kasai T, and *Miyata M. Analyzing leg structures of gliding bacterium, *Mycoplasma mobile* by electron microscopy and gliding mutants)。

(iv) 総括班の宮田真人（大阪市大）、タンパク質の質量分析による解析、宮田真人（大阪市大）が担当 2012 年度末に Bruker Daltonics autoflex speed MS/MS を総括班の機器として大阪市立大学に導入し、無償での技術提供を行っている。これまでに 11 研究グループから依頼された計 798 の試料を解析した。その中には、受託会社などでは対応できない特殊な解析も多数含まれていた。

6. 総括班評価者による評価（2ページ程度）

総括班評価者による評価体制や研究領域に対する評価コメントを記述してください。

1) 笹川千尋 委員による評価

私は2011年秋の領域提案時に、領域代表の宮田氏から依頼を受けて以来、本研究の申請、採択、立ち上げ、運営等、評価委員として領域全般の進展を見守ってきました。今回、宮田領域代表よりいただいた書面をもとに、これまでの運営と進展具合について評価を行いました。

1. 独創性について:「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」は、生体運動の中でもこれまでにあまり注目されてこなかった微生物における運動現象の解明に取り組み、新学術領域の中のみならず、細胞生物学領域でもユニークな課題であります。総括班、7つの計画班、そして現在は28の公募班から構成され、微生物のみならず多細胞生物(粘菌)まで課題は網羅しています。また総括班においては、技術提供・開発など、研究に直結する重要な役割を持たせていることも特徴のひとつです。

2. 研究成果について:計画班とこれまでに採択された公募班の研究テーマは、領域の目的に合致したユニークなものと認められます。また今回の研究の進捗状況を見ると、いずれも領域研究開始以前にそれぞれの研究者が得意の専門分野で蓄積された研究基盤を十分活用して発展させたものであることが特徴であると思われれます。その結果、2カ年という期間に155編の論文発表が行われたことは、本領域のメンバーの研究力の高さを反映したもとと考えられます。今後の研究期間でもさらなる成果が十分期待できると思われれます。

3. 大型機器類の有機的な運用について:共同利用を目的として総括班で購入された質量分析器、急速凍結装置、凍結切断装置、などの大型機器類は、本領域研究において大きな推進力として十分に活用されています。加えて、各研究機関から共同利用に提供された既存の先端的機器類、電子線クライオトモグラフィー用の電子顕微鏡、高速原子間力顕微鏡など、いずれも個々の研究の推進力となっています。さらにこれらの共同利用により、領域内の有機的な連携が促進され、あらたな領域の創成に繋がることが期待されます。大型機器類の共同利用は本領域の活動として特筆されるべき点であると思われれます。

4. 共同研究によるシナジーについて:班員間の連携から生まれたあらたな研究の展開も、当報告書に挙げられているだけでも41件を数えることができます。新学術領域の使命である“シナジー効果”も十分に達成されていることが伺われれます。

5. 若手研究者の育成:本事業の目指す「新領域創成に繋がる」成果も若手研究者を中心に認められ、それらは領域名を冠したシンポジウムなどに40歳未満の若手研究者がのべ12件の発表およびオーガナイズを行っていることにも評価されます。

以上、本領域が当初の理念に従い、目標を達成しつつあると結論しました。

2) 石渡信一 委員による評価

生物運動の分子機構に関する研究は、この数 10 年、1 分子計測のための顕微技術が開発され、細胞内輸送を担う 1 分子で機能する分子モーターが発見されたことから、大きく進展した。それまでは、1954 年に二人の Huxley によって独立に明らかになった、筋収縮の滑り運動機構を柱とし、筋収縮運動や原形質流動などの、眼に見える運動形態の仕組みを分子レベル、つまりアクチンとミオシン (II) の相互作用 (結合・解離、酵素活性など) という観点から研究するのが主流だった。

ところが、1 分子計測技術が開発されてみると、筋収縮分子モーターであるミオシン (II) は、1 分子では機能できない、多分子が働くことで初めて方向性のある運動をひき起こすことができる特殊な分子モーターであることが分かってきた。アクチンに対してはミオシン (V) や (VI) など、微小管に対してはキネシン分子モーターが、純粋に 1 分子で動くことができる分子機械であることが証明され、1990 年代から 10 数年間は、1 分子モーター研究の全盛期を迎えることとなった。

この流れに沿った研究は、現在、微小管上を働くダイニン分子モーターの研究に引き継がれているが、ある定常段階に達した感がある。その中であって、生物運動系の研究に新たな地平を広げようというのが、この新学術領域研究の趣旨だと理解し、期待をもって注目してきた。

とりわけ、マイコプラズマの匍匐運動を担う、新種の分子モーターが宮田領域代表グループによって発見されたことで、「運動超分子が織りなす調和と多様性」というテーマの中心核ができ、生物運動研究の近未来に向けた指針を与えていると言える。

さて、本新学術領域研究が始まって 3 年目を迎えた今の段階で、中間評価をすることとなった。これまでの活動報告や活動状況を拝見した上で、私なりの評価を述べる。

新学術領域に期待されることは、1) 掲げたテーマでの研究成果、2) 新しい分野を切り拓くための試み (新たな共同研究・出会いの場の創設、新しい研究の芽の育成など)、3) アウトリーチ活動 (社会に向けた情報発信)、そして 4) 将来を託す若手研究者の育成といったところだろう。それらがどの程度実現しているか、それをもとに将来への期待が持てるかを評価することになる。

- 1) 発表論文などの研究成果は、質・量ともに高いレベルにあると評価する。ただ、まだ研究領域としての活動が始まって道半ばなので、本領域によって新たに始まった共同研究については、後半での成果発表を期待する。
- 2) 本領域における研究レベルを大幅に向上させる上で、3つの基本技術「クライオトモグラフィー電子顕微鏡観察法」「急速凍結フラクチャー電子顕微鏡観察法」そして「高速原子間力顕微鏡 (AFM) 法」を、領域に参加している全ての研究グループに無償で提供し、十二分に活用されている点を高く評価する。また、代表者のところに設置されたタンパク質の質量分析器も班員に開かれ活用されている。今後、世界レベルの研究成果が次々と生まれる予感がある
- 3) 生物運動の研究には動画 (ビデオ) が欠かせない。研究現場で、定量的な解析に必須であるだけでなく、一般人にも一目で理解されるという強みがある。その強みを十二分に活用できる、ビデオライブラリーの充実と、それをスマートフォンアプリとして展開するだけでなく、ゲームアプリまで開発中とのこと。常識を超えるユニークな活動を進めている点を高く評価する。
- 4) 大きな舞台での発表の場や著名研究者たちとの議論の場が用意され、新しいグループや未知の研究に飛び込むことが奨励されるなど、若手研究者へのきめ細かな心配りをみることができる。

以上を総合して私は、本領域は中間段階では十分に当初目標を達成していると評価する。世界レベルの研究成果、新しい研究の芽、新しい協力関係の構築、若手の育成といった点で、後半の研究期間の活動に期待するところ大である。

7. 主な研究成果（発明及び特許を含む）[研究項目毎に計画研究・公募研究の順に整理する]

（3 ページ程度）

現在実施している新学術領域研究(公募研究含む)の研究課題を元に発表した研究成果(発明及び特許を含む)について、現在から順に発表年次をさかのぼり、図表などを用いて研究項目毎に計画研究・公募研究の順に整理し、具体的に記述してください。なお、領域内の共同研究等による研究成果についてはその旨を記述してください。

【A01 反復マシナリー】

(1) Kinoshita Y, Nakane D, Sugawa M, Masaike T, Mizutani K, *Miyata M and *Nishizaka T. Unitary step of gliding machinery in *Mycoplasma mobile*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* in press (2014). ATPの加水分解によっておこるマイコプラズマ滑走運動を理解するには、その反応と動きの素課程をとらえる必要がある。本研究では、菌体の膜を透過化することにより、滑走の装置に供給するATPの量をコントロールすることのできる系、“滑走ゴースト”に注目した。また、マイコプラズマには数百の“あし”が存在するために、結合対象であるシアル酸オリゴ糖を遊離の状態に加えることにより、働いている“あし”の数をコントロールした。その結果、ATPの加水分解によっておこる滑走運動が、約70 nmの速い動きを単位とすることが明らかになった。さらにこの単位は、生きた菌体において“あし”の数を制限することでも観察された。本研究は今後の素課程解析の礎となった。

(2) Tulum I, Yabe M, Uenoyama A and *Miyata M. Localization of P42 and an F1-ATPase α -subunit homolog of the gliding machinery in *Mycoplasma mobile* revealed by newly developed gene manipulation and fluorescent protein tagging. *J Bacteriol.*, 196, 1815-24 (2014) (selected for cover). マイコプラズマ滑走運動の研究の最もよい材料であるマイコプラズマ・モービレは、これまで遺伝子操作が全く不可能であった。本研究では不可能にしていた3つの原因それぞれを解決し、遺伝子操作を可能にした。さらに、蛍光タンパク質融合ラベル法を開発し、ATP合成酵素の α と β ユニットのそれぞれのホモログと、チューブリンのホモログが滑走装置の構成成分であることを証明した。このことは、これらユニバーサルなタンパク質が、これまでは全く想像だにできなかった役割を果たしていることを示唆している。本研究は、今後のマイコプラズマ滑走運動の研究に新たな展開を与えるものである。

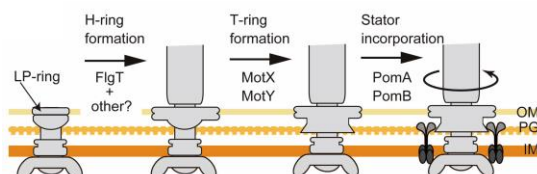


(3) Kumazaki, K., Chiba, S., Takemoto, M., Furukawa, A., Nishiyama, K., Sugano Y., Mori, T., Dohmae, N., Hirata, K., Nakada-Nakura, Y., Maturana, A., Tanaka, Y., Mori, H., Sugita, Y., Arisaka, F., Ito, K., Ishitani, R., *Tsukazaki, T and *Nureki O. Structural basis for Sec-independent membrane protein insertion by YidC. *Nature* 509(7501): 516-20 (2014). *Bacillus halodurans* 由来の膜タンパク質組み込み因子 YidC の立体構造を、X線結晶構造解析の手法により 2.4Å 分解能で明らかにした。立体構造に基づいた遺伝学的解析と部位特異的 *in vivo* 光架橋実験による生化学的解析を組み合わせ、YidC の膜貫通領域内に基質膜タンパク質が結合する親水性のクレバスが存在することを明らかにした。これらの結果に基づき、YidC による膜タンパク質組み込みの新規作業仮説を提案した。

(4) *Mio, K., Tsukazaki, T., Mori, H., Kawata, M., Moriya, T., Sasaki, Y., Ishitani, R., Ito, K., *Nureki, O. and *Sato, C. Conformational variation of the translocon enhancing chaperone SecDF. *J. Struct. Funct. Genomics*. DOI 10.1007/s10969-013-9168-4 in press (2014). 電子顕微鏡を用いた単粒子解析と electron tomography 解析を行い、*Thermus thermophilus* HB8 由来の SecDF が可溶化条件下で2つの主要な構造状態(F型, I型)を持つことを明らかにした。森らが提案した SecDF によるタンパク質膜透過促進の作業仮説を支持する成果と言える。

【A02 回転マシナリー】

(5) *Sowa Y, Homma M., Ishijima A, *Berry RM. Hybrid-fuel bacterial flagellar motors in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111(9):



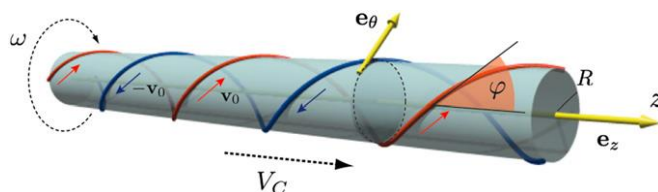
3436-3441 (2014). 自然界では水素イオンのみをエネルギー源として利用する大腸菌べん毛モーターを、ナトリウムイオンも同時に利用できるハイブリッドモーターとして機能させることに成功した。このべん毛モーターはタンパク質で作られた生物界最小回転モーターである。運動エネルギー変換の心臓部であるエンジン部分の各イオンに対応するユニットを一台の車に2種類積み込んだようなものを作ることによって実現した。回転の様子を特殊な方法で計測することで、ハイブリッドモーターの性質を明らかにした。生体膜を介した水素イオンとナトリウムイオンの運動エネルギー変換の機構解明に大きく寄与すると期待される。

(6) Terashima H, Li N, Sakuma M, Koike M, Kojima S, *Homma M and *Imada K. Insight into the assembly mechanism in the supramolecular rings of the sodium-driven *Vibrio* flagellar motor from the structure of FlgT. **Proc Natl Acad Sci USA**, 110(15): 6133-8 (2013). X線結晶構造解析法1と電子顕微鏡観察により、1分間に10万回転という超高速で回転するビブリオ菌のべん毛モーターを解析し、超高速回転を支える構造体ができるしくみを原子レベルで明らかにした。大腸菌にはないビブリオ菌に特異的 FlgT というタンパク質を解析することで、高負荷に耐えながら高い効率でエネルギー変換を行う分子機構の解明につながる。本成果は、微小ナノモーターの基本的作動原理を解明するにも重要な手がかりとなる。本間班と伊藤班の共同研究として行われた。

【A03 複雑系マシナリー】

(7) Nakane D, Sato K, Wada H, McBride MJ, and *Nakayama K Helical flow of surface protein required for bacterial gliding motility. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 110(27): 11145-11150 (2013).

バクテロイデーテス細菌の一部は固体表面上を長軸方向に前後に並進運動を行う(滑走運動 gliding motility と呼ばれる)。この滑走運動のメカニズムについてはほとんど解明されていなかった。バクテロイデーテス細菌 *Flavobacterium johnsoniae* の滑走運動のメカニズムを菌体表面のアドヘジンタンパク質 SprB を生菌にて蛍光標識して解析したところ、SprB (150 nm の長さのフィラメント状タンパク質) がプロトン駆動力をエネルギー源として菌体表面を極から極へ、左巻きのらせんに沿ってループ状に動いていることがわかった。SprB が床と接着することにより、左回転しながら菌体の長軸方向への並進運動が生じることが示唆された。中山班と和田班との共同研究として行われた。

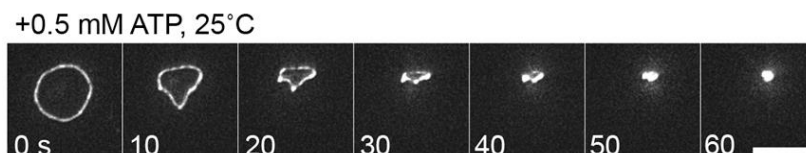


(8) Yamashita, H., Taoka A, Uchihashi, T., Asano, T., Ando, T., and *Fukumori, Y. Single-molecule imaging on living bacterial cell surface by high-speed AFM, **J. Mol. Biol.** 422:300-309 (2012).

微小な細菌細胞での運動マシナリーの解析には、生きた細胞で分子構造動態イメージングを行うことが必須である。本研究では高速 AFM を用いて、生きた磁性細菌の表層構造とそのダイナミクスをナノオーダーの解像度でとらえることを試みた。その結果、細胞の表層が網目状の構造体により完全に被われ、さらに、精製した外膜において、AFM 探針を用いた微解剖実験を行ったところ、網目状構造はポーリン分子により構成されており外膜表面をゆっくりとランダムに移動することを明らかにし、細菌外膜の新しい動態構造を提案することができた。

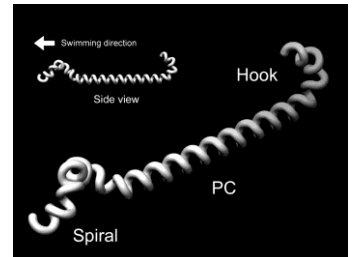
(9) #Mishra, M., #Kashiwazaki, J., Takagi, T., Srinivasan, R., Huang, Y., *Balasbramanian, M. K., and *Mabuchi, I.. *In vitro* contraction of cytokinetic ring depends on myosin II but not on actin dynamics. **Nat. Cell Biol.** 15: 853-859 (2013). #equal contribution. 真核細胞の細胞

質分裂を行う“収縮環”がどのような経路で形成され、そしてどのような分子過程で収縮



するかを調べるため、分裂酵母から蛍光ラベルした収縮環が、外部から ATP を加えることで収縮する、“細胞ゴースト”を調製した。この収縮環は ATP を加えると、生きた細胞中の収縮環の 20-30 倍の速度で収縮した。収縮の際、収縮環はゴーストの細胞膜から離れて収縮した。収縮中にアクチン繊維は脱重合したか少なくとも小単位に解離したが、この過程そのものは収縮に必須でないことがわかった。また分裂酵母のアクチン繊維架橋タンパク質をゴーストに加えたところ収縮は阻害された。この系は、収縮環におけるアクトミオシンの挙動を遺伝学を利用して調べていくための礎となった。

(10) *Nakamura S., Leshansky A., Magariyama Y., Namba K., *S. Kudo. Direct measurement of helical cell motion of the spirochete *Leptospira*. **Biophys. J.** 106: 47-54 (2014). らせん細菌、レプトスピラはピッチの小さい右巻き螺旋を呈し、推進方向に対して前方の細胞末端をピッチの大きな左巻きらせん形 (Spiral) に、後方の末端を鉤状 (Hook) に変形させる。斜光暗視野照明法を用いて一細胞ごとの遊泳速度と回転速度を計測した結果、Spiral と PC の最高回転速度はともに約 150 Hz に達することが分かった。Hook の回転方向を正確に決めるため、レプトスピラ運動を 2 焦点で同時に解析可能な 3 次元運動解析システムを構築し、ある細胞では、遠位 (PC の逆側) から見て時計回りに Hook が回転している様子が観察された。これらの結果の数値解析により、「両末端の回転の力学的変化が相互に伝搬され、細胞全体の力学バランスがとられる」という仮説を提案した。



(11) Noi, K., Yamamoto, D., Nishikori, S., Arita-Morioka, K., Kato, T., Ando, T., and *Ogura, T. High-speed atomic force microscopic observation of ATP-dependent rotation of the AAA+ chaperone p97. **Structure**, 21: 1992-2002 (2013). 6量体のリング構造をとり、基質タンパク質のアンフォールディングや脱凝集・脱会合などを行う AAA 型分子シャペロン、p97 の ATP 依存的構造変化を高速 AFM により、詳細に観察した。その結果、ATP 存在下で、時計回りと反時計回りの運動を小刻みに繰り返し、ブルブルと振動するように動くことを発見した。

8. 研究成果の公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）（5 ページ程度）

現在実施している新学術領域研究（公募研究含む）の研究課題を元に発表した研究成果（主な論文、書籍、ホームページ、主催シンポジウム等の状況）について具体的に記述してください。論文の場合、現在から順に発表年次をさかのぼり、計画研究・公募研究毎に順に記載し、研究代表者には二重下線、研究分担者には一重下線、連携研究者には点線の下線を付し、corresponding author には左に*印を付してください。また、一般向けのアウトリーチ活動を行った場合はその内容についても記述してください。

主な論文

【計画研究】

2014年

- Kinosita Y, Nakane D, Sugawa M, Masaike T, Mizutani K, *Miyata M and *Nishizaka T. Unitary step of gliding machinery in *Mycoplasma mobile*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** in press (2014).
- *Mio, K., Tsukazaki T, Mori H, Kawata, M., Moriya, T., Sasaki, Y., Ishitani, R., Ito, K., *Nureki, O. and *Sato, C. Conformational variation of the translocon enhancing chaperone SecDF. **J. Struct. Funct. Genomics**. DOI 10.1007/s10969-013-9168-4 in press (2014).
- Takahashi Y., Koyama K. and *Ito M Suppressor mutants from MotB-D24E and MotS-D30E in the flagellar stator complex of *Bacillus subtilis*. **J Gen Appl Microbiol**. in press (2014).
- Takahashi Y. and *Ito M. Mutational analysis of charged residues in the cytoplasmic loops of MotA and MotP in the *Bacillus subtilis* flagellar motor. **J Biochem**. in press (2014).
- Kumazaki, K., Chiba, S., Takemoto, M., Furukawa, A., Nishiyama, K., Sugano Y., Mori, T., Dohmae, N., Hirata, K., Nakada-Nakura, Y., Maturana, A., Tanaka, Y., Mori H, Sugita, Y., Arisaka, F., Ito, K., Ishitani, R., *Tsukazaki T and *Nureki O. Structural basis for Sec-independent membrane protein insertion by YidC. **Nature** 509(7501): 516-20 (2014).
- Tulum I, Yabe M, Uenoyama A and *Miyata M. Localization of P42 and an F1-ATPase α -subunit homolog of the gliding machinery in *Mycoplasma mobile* revealed by newly developed gene manipulation and fluorescent protein tagging. **J Bacteriol.**, 196, 1815-24 (2014). (selected for cover).
- *Sowa Y, Homma M, Ishijima A, *Berry RM. Hybrid-fuel bacterial flagellar motors in *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci USA**, 111(9): 3436-3441 (2014).
- Takekawa N, Kojima S and *Homma M. Contribution of many charged residues at the stator-rotor interface of the Na⁺-driven flagellar motor to torque generation in *Vibrio alginolyticus*. **J Bacteriol**. 196(7)1377-85 (2014).
- Nonaka M, Shoji M, Kadowaki T, Sato K, Yukitake H, Naito M, *Nakayama K Analysis of a Lys-specific serine endopeptidase secreted via the type IX secretion system in *Porphyromonas gingivalis*. **FEMS Microbiol Lett**. 354:60-68 (2014).
- *Shoji M, Sato K, Yukitake H, Naito M, Nakayama K Involvement of the Wbp pathway in the biosynthesis of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide with anionic polysaccharide. **Scientific Reports** 4:5056 (2014).
- Noguchi, A, Ikeda, A., Mezaki, M., Fukumori, Y. and *Kanemori, M.. "DnaJ-promoted binding of DnaK to multiple sites on σ 32 in the presence of ATP", **J. Bacteriol.**, 196(9):1694-1703 (2014).
- *福森義宏, 田岡 東「磁性細菌オルガネラ「マグネトソーム」の構造機能相関の解明」, 生物物理 54(1):11-14 (2014).
- 寺原直矢, 佐野元彦, *伊藤政博 第3のイオンで動くハイブリッドナノマシン. 生物物理 54:22-23 (2014).

2013年

- Kasai T, Nakane D, Ishida H, Ando H, Kiso M and *Miyata M. Binding in *Mycoplasma mobile* and *Mycoplasma pneumoniae* gliding analyzed through inhibition by synthesized sialylated compounds. **J Bacteriol**, 195, 429-35. (2013). (selected for cover)
- *森 博幸, 塚崎智也「細菌のタンパク質分泌を促進する膜タンパク質 SecDF の構造と機能」化学と生物 51(No.1):28-35, (2013)
- Kawamoto A, Morimoto Y.V, Miyata T, Minamino T, Hughes K.T, Kato T and *Namba K. Common and distinct structural features of Salmonella injectisome and flagellar basal body. **Scientific Reports**, 3: 3369 (2013).
- Terashima H, Li N, Sakuma M, Koike M, Kojima S, *Homma M and *Imada K. Insight into the assembly mechanism in the supramolecular rings of the sodium-driven *Vibrio* flagellar motor from the structure of FlgT. **Proc Natl Acad Sci USA**, 110(15): 6133-8 (2013).
- Fujinami S., Takeda K., Onodera T., Satoh K., Sano M., Narumi I., and *Ito M. Draft Genome Sequence of Sodium-Independent Alkaliphilic *Microbacterium* sp. Strain TS-1. **Genome Announc**. 1(6),e01043-13 (2013).
- Sato K, Yukitake H, Narita Y, Shoji M, Naito M, and *Nakayama K Identification of *Porphyromonas gingivalis* proteins secreted by the Por secretion system, **FEMS Microbiol. Lett**. 338(1): 68-76 (2013).

- Nakane D, Sato K, Wada H, McBride MJ, and *Nakayama K Helical flow of surface protein required for bacterial gliding motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110(27): 11145-11150 (2013).
- Sakaguchi, S., Taoka A., and *Fukumori, Y. Analysis of magnetotactic behavior by swimming assay, *Biosci. Biotech. and Biochem.*, 77:940-947 (2013).
- Umeki, N., Nakajima, J., Noguchi, T.Q.P., Tokuraku, K., Nagasaki, A., Ito, K., Hirose, K. and *Uyeda, T.Q.P. Rapid nucleotide exchange renders Asp11 mutant actins resistant to depolymerizing activity of cofilin, leading to dominant toxicity *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 288:1739-1749 (2013).
- *Plaza, G.R. and Uyeda, T.Q.P. Contraction velocity of the actomyosin cytoskeleton in the absence of cell membrane. *Soft Matter*, 9: 4390-4400 (2013).

2012年

- Adan-Kubo J, Yoshii SH, Kono H and *Miyata M. Molecular structure of isolated Mvspl, a variable surface protein of the fish pathogen *Mycoplasma mobile*. *J Bacteriol*, 194: 3050-7 (2012). (selected for cover)
- Ruan J, Kato T, Santini C-L, Miyata T, Kawamoto A, Zhang W-J, Bernadac A, Wu L-F and *Namba K. Architecture of a flagellar apparatus in the fast-swimming magnetotactic bacterium MO-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(50), 20643-20648 (2012).
- Terahara N., Sano M., and *Ito M. A *Bacillus* flagellar motor that can use both Na⁺ and K⁺ as a coupling ion is converted by a single mutation to use only Na⁺, *PLOS ONE*, 7(9) e46248 (2012).
- Yamashita, H., Taoka A., Uchihashi, T., Asano, T., Ando, T., and *Fukumori, Y. Single-molecule imaging on living bacterial cell surface by high-speed AFM, *J. Mol. Biol.* 422:300-309 (2012).
- Suzuki H., Ikeda, A., Tsuchimoto, S., Adachi, K., Noguchi A., Fukumori, Y., and *Kanemori, M. Synergistic binding of DnaJ and DnaK chaperone to the heat shock transcription factor σ^{32} assures its characteristic high metabolic instability: Implications for the heat shock protein 70 (Hsp70)-Hsp40 mode of function, *J. Biol. Chem.* 287:19275-19283 (2012).
- Noguchi, T.Q.P., Komori, T., Umeki, N., Demizu, N., Ito, K., Hikikoshi-Iwane, A., Tokuraku, K., Yanagida, T. and *Uyeda, T.Q.P. G146V mutation at the hinge region of actin reveals a myosin class-specific requirement of actin conformations for motility. *J. Biol. Chem.*, 287: 24339-24345 (2012).
- 以上 29 編, その他 61 編

【公募研究】

2014年

- Ohori, Y., Okazaki H, Watanabe, S., Tochio, N., Arai, M., Kigawa, T., & *Nishimura, C. Flexible and rigid structures in HIV-1 p17 matrix protein monitored by relaxation and amide proton exchange with NMR. *Biochim. Biophys. Acta*, 1844(3): 520-526 (2014).
- *Nishiyama M. High-pressure microscopy for studying molecular motors. *High Pressure Bioscience – Basic Concepts, Applications and Frontiers*, 20 pages, Springer, in press. (2014).
- *Kamiya, R. and Yagi, T. Functional diversity of axonemal dyneins as assessed by in vitro and in vivo motility assays of *Chlamydomonas* mutants. *Zool. Sci.*, in press (2014).
- *Aoyagi T[†], *Kaito C[‡] (†equally contribution), Sekimizu K, Omae Y, Saito Y, Mao H, Inomata S, Hatta M, Endo S, Gu Y, Tokuda K, Yano H, Kitagawa M, Kaku M: Impact of *psm-mec* in the Mobile Genetic Element on the Clinical Characteristics and Outcome of SCCmec-II Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Japan. *Clin Microbiol Infect.* Jan 30. doi: 10.1111/1469-0691.12575 in press (2014).
- Kubo, T., Yanagisawa, H.A., Liu, Z., Shibuya, R., Hirono, M., and *Kamiya, R. A conserved flagella-associated protein in *Chlamydomonas*, FAP234, is essential for axonemal localization of tubulin polyglutamylase TLL9. *Mol. Biol. Cell* 25: 107-117 (2014).
- *Ishikawa, H., Ide, T., Yagi, T., Jiang, X., Hirono, M., Sasaki, H., Yanagisawa, H., Wemmer, K.A., Stainier, D.Y., Qin, H., Kamiya, R., and *Marshall, W.F. TTC26/DYF13 is an intraflagellar transport protein required for transport of motility-related proteins into flagella. *eLife* e01566 (2014).
- Ito, M., Kabir, A.M.R., Inoue, D., Torisawa, T., Toyoshima, Y.Y., Sada, K. and *Kakugo, A. Formation of ring-shaped microtubule assemblies through active self-organization on dynein. *Polymer J.* 46, 220–225 (2014).
- 古田健也、鳥澤嵩征、*豊島陽子 バイオイメーキングと光ピンセットを用いた微小管系モータータンパク質の協働的活性化に関する解析. *生化学* 86, 184-191 (2014).
- 柏崎 隼、*馬淵一誠 (2014). 収縮環の *in vitro* 収縮系の開発. 生物物理, (2014)印刷中。
- Yasuda S., Yanagi T, Yamada MD, Ueki S, Maruta S, Inoue A, and *Arata T. Nucleotide-dependent displacement and dynamics of the α -1 helix in kinesin revealed by site-directed spin labeling EPR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 443:911-916 (2014).

- Ishii, K., S. Terauchi, R. Murakami, J. Valencia Swain, R. Mutoh, H. Mino, K. Maki, *T. Arata, and *M. Ishiura. Site-directed spin labeling-electron spin resonance mapping of the residues of cyanobacterial clock protein KaiA that are affected by KaiA-KaiC interaction. **Genes Cells**, 19:297-324 (2014).
- *馬淵一誠, 柏崎隼. 細胞質分裂における収縮環の収縮: *in vitro*系の開発. 細胞工学, 33: 660-665 (2014).
- Numata S, Nagata M, Mao H, Sekimizu K, *Kaito C: CvfA and PNPase act in an opposing manner to regulate *Staphylococcus aureus* virulence. **J Biol Chem**. 289(12):8420-31. (2014)
- Omae Y, Sekimizu K, *Kaito C: Identification of *Staphylococcus aureus* colony-spreading stimulatory factors from mammalian serum. **PLoS ONE**. 9(5): e97670. (2014).
- Watanabe, R., & *Noji, H. "Timing of inorganic phosphate release modulates the catalytic activity of ATP-driven rotary motor protein" **Nature Communications** 5, 3486 (2014).
- Watanabe, R., & *Noji, H. "Characterization of the temperature-sensitive reaction of F₁-ATPase by using single-molecule manipulation" **Scientific Reports** 4, 4962 (2014).
- *Nakamura S., Leshansky A., Magariyama Y., Namba K., *S. Kudo. Direct measurement of helical cell motion of the spirochete *Leptospira*. **Biophys. J**. 106: 47-54 (2014).
- Yuzawa, Y., *Shimajima, M., Sato, R., Mizusawa, N., Ikeda, K., Suzuki, M., Iwai, M., Hori, K., Wada, H., Masuda, S. and Ohta, H.. Cyanobacterial monogalactosyldiacylglycerol- synthesis pathway is involved in normal unsaturation of galactolipids and low-temperature adaptation of *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Biochim. Biophys. Acta**,1841: 475-483 (2014).

2013年

- Oikawa, H., Suzuki, Y., Saito, M., Kamagata, K., Arai, M., & *Takahashi, S. Microsecond dynamics of an unfolded protein by a line confocal tracking of single molecule fluorescence. **Scientific Reports**, 3, 2151 (2013).
- *新井宗仁 NMRによるタンパク質-リガンド相互作用の定量解析法. 生物物理 53(6), 305-308 (2013).
- *新井宗仁タンパク質の揺らぎと機能 ~結合と触媒~ 「揺らぎ・ダイナミクスと生体機能 ~物理化学的視点から見た生体分子~」(寺嶋正秀 編) 第17章 pp.267-280, 化学同人 (2013).
- Okuno D, *Nishiyama M and *Noji H. Single molecule analysis of the rotation of F₁-ATPase under high hydrostatic pressure. **Biophys J** 105: 1635-1642 (2013).
- *Watanabe TM and Nishiyama M. et al. (10名中4番), Glycine insertion makes yellow fluorescent protein sensitive to hydrostatic pressure. **PLOS ONE** 8: e73212 (2013).
- *Nishiyama M, Sowa Y, Kimura Y, Homma M, Ishijima A and Terazima M. High hydrostatic pressure induces counterclockwise to clockwise reversals of the *Escherichia coli* flagellar motor. **J Bacteriol**, 195(8): 1809-14 (2013).
- *西山雅祥, 曾和義幸. 細胞内の水で生命活動を操る! -高圧力下で観るタンパク質水和変調イメージング 化学 68 (8): 31-36 (2013).
- *西山雅祥. バクテリア・べん毛モーターが高圧力下で逆向きに回り出す!? 生物物理 53(5): 264-65 (2013).
- Yamamoto, R., Song, K., Yanagisawa, H., Fox, L., Yagi, T., Wirschell, M., Hirono, M., Kamiya, R., Nicastro, D., and *Sale, W.S.. The MIA complex is a conserved and novel dynein regulator essential for normal ciliary motility. **J. Cell Biol**. 201: 263-278 (2013).
- Ide, T., Owa, M., King, S.M., Kamiya, R., and *Wakabayashi, K. Protein-protein interactions between intermediate chains and the docking complex of *Chlamydomonas* flagellar outer arm dynein. **FEBS Lett**. 587:2143-2149 (2013).
- *Furuta, K., Furuta, A., Toyoshima, Y.Y., Amino, M., Oiwa, K., and Kojima, H. Measuring collective transport by defined numbers of processive and nonprocessive kinesin motors. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 110, 501-506 (2013).
- Matsuo, T., Arata T., Oda T., and *Fujiwara S. Difference in hydration structures between F-actin and myosin subfragment-1 detected by small-angle X-ray and neutron scattering. **BIOPHYSICS**, 9:99-106 (2013).
- Ueda K., Kimura-Sakiyama C, Aihara T, Miki M, and *Arata T. Calcium-dependent interaction sites of tropomyosin on reconstituted muscle thin filaments with bound myosin heads as studied by site-directed spin-labeling. **Biophys. J.**, 105:2366-2373 (2013).
- Nishigami, Y., Ichikawa, M., Kazama, T., Kobayashi, R., Shimmen, T., Yoshikawa, K. and *Sonobe, S Reconstruction of active regular motion in amoeba extract: Dynamic cooperation between sol and gel states. **PLOS ONE** 8, e70317. (2013).
- *島袋勝弥. *Ascaris* 精子をもちいたアメーバ運動装置の *in vitro* 再構成生物物理 53 巻 5 号、p266-267 (2013).
- Gomibuchi, Y., Uyeda, T. Q. P., *Wakabayashi, T. Bulkiness or aromatic nature of tyrosine-143 of actin is important for the weak binding between F-actin and myosin-ADP-phosphate. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 441:844-848 (2013).
- Kakoi, S., Yorimitsu, T., and *Sato, K. COPII machinery cooperates with ER-localized Hsp40 to sequester misfolded membrane proteins into ER-associated compartments. **Mol. Biol. Cell**, 24: 633-642 (2013).
- *Mishra, M., #Kashiwazaki, J., Takagi, T., Srinivasan, R., Huang, Y., *Balasubramanian, M. K., and *Mabuchi, I.. *In vitro*

- contraction of cytokinetic ring depends on myosin II but not on actin dynamics. **Nat. Cell Biol.** 15: 853-859 (2013). #equal contribution.
- *Nakase, Y., Nakase, M., Kashiwazaki, J., Murai, T., Otsubo, Y., Mabuchi, I., Yamamoto, M., Takegawa, K., and Matsumoto, T. Fission yeast Any1, a β -arrestin-like protein, is involved in TSC-Rheb signaling and regulates amino acid transporters. **J. Cell Sci.** 126: 3972-3981 (2013).
- Watanabe, R., Hayashi, K., Ueno, H., *Noji, H. "Catalysis-enhancement via rotary fluctuation of F₁-ATPase" **Biophysical Journal** 105, 2385-91 (2013).
- Shiomi D., *Niki H. A mutation in the promoter region of *zipA*, a component of the divisome, suppresses the shape defect of RodZ-deficient cells. **Microbiologyopen**. Oct; 2 (5): 798-810 (2013).
- Wada H., Nakane D., and Chen H-Y. Bidirectional bacterial gliding motility powered by the collective transport of cell surface proteins, **Physical Review Letters**, 111: 248102 (2013).
- *Kaito C., Saito Y, Ikuo M, Omae Y, Mao H, Nagano G, Fujiyuki T, Numata S, Han X, Obata K, Hasegawa S, Yamaguchi H, Inokuchi K, Ito T, Hiramatsu K, Ōkumizu K. Mobile genetic element SCC_{mec}-encoded *psm-mec* RNA suppresses translation of *agrA* and attenuates MRSA virulence. **PLoS Pathog.** 9(4):e1003269 (2013).
- Omae Y, Hanada Y, Ōkumizu K., *Kaito C. Silkworm apolipoprotein protein inhibits hemolysin gene expression of *Staphylococcus aureus* via binding to cell surface lipoteichoic acids. **J Biol Chem.** 288(35):25542-50 (2013).
- *Masuda, S., Nakatani, Y., Ren, S. and Tanaka, M. Blue light-mediated manipulation of transcription factor activity *in vivo*. **ACS Chem. Biol.**, 8: 2649-2653 (2013).
- *Masuda, S., Hori, K., Maruyama, F., Ren, S., Sugimoto, S., Yamamoto, N., Mori, H., Yamada, T., Sato, S., Tabata, S., Ohta, H. and Kurokawa, K.. Whole-genome sequence of the purple photosynthetic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*. **Genome Announcements**, 1: e00577-13 (2013).
- Yamamoto A, Takeya R., Matsumoto M, Nakayama K, *Sumimoto H. Phosphorylation of Noxo1 at threonine-341 regulates its interaction with Noxa1 and the superoxide-producing activity of Nox1. **FEBS J.**, 280, 5145-5159 (2013).
- Arimura T, Takeya R (CO-FIRST AUTHER), Ishikawa T, Yamano T, Matsuo A, Tatsumi T, Nomura T, *Sumimoto H, *Kimura A. Dilated cardiomyopathy-associated FHOD3 variant impairs the ability to induce activation of transcription factor SRF. **Circ. J.**, 77, 2990-2996 (2013).
- *Uehara, R., Tsukada, Y., Kamasaki, T., Poser, I., Yoda, K., Gerlich, D.W., and *Goshima, G. Aurora B and Kif2A control microtubule length for assembly of a functional central spindle during anaphase. **Journal of Cell Biology** 202:623-636 (2013). (selected for "In Focus")
- 荒井 祐介, 若林 憲一, 吉川 雅英, 奥 寛雅, *石川 正俊(2013) 暗視野顕微鏡法におけるクラミドモナスの三次元トラッキング **日本ロボット学会誌** Vol. 31 No. 10 p. 1028-1035 (2013)
- Tsugiyama, H., Okimura, C., Mizuno, T. and *Iwadate, Y. Electroporation of adherent cells with low sample volumes on a microscope stage. **J. Exp. Biol.** 216: 3591-3598 (2013).
- Ōsato Y., Akitsu M, Amano Y, Yamashita K, Ide M, Shimada K, Yamashita A, Hirano H, Arakawa N, Maki T, Hayashi I., Ohno S, *Suzuki A A novel PAR-1-binding protein, MTCL1, plays critical roles in organizing microtubules in polarizing epithelial cells. **J Cell Sci**, 126, 4671-83 (2013).
- Ozaki, S., Matsuda, Y., Keyamura, K., Kawakami, H., Noguchi, Y., Kasho, K., Nagata, K., Masuda, T., Sakiyama, Y., and *Katayama, T. A replicase clamp-binding dynamin-like protein promotes colocalization of the nascent DNA strands and equipartitioning of chromosomes in *E. coli*. **Cell Reports** 4:985-995 (2013).
- Su'etsugu, M., Harada, Y., Keyamura, K., Matsunaga, C., Kasho, K., Abe, Y., Ueda, T., and *Katayama, T. The DnaA N-terminal domain interacts with Hda to facilitate replicase clamp-mediated inactivation of DnaA. **Environ. Microbiol.** 15:3183-3195 (2013).
- Noi, K., Yamamoto, D., Nishikori, S., Arita-Morioka, K., Kato, T., Ando, T., and *Ogura, T. High-speed atomic force microscopic observation of ATP-dependent rotation of the AAA+ chaperone p97. **Structure**, 21: 1992-2002 (2013).
- 以上, 55 編, その他 10 編

共催、協賛シンポジウム(下線は領域所属の研究者)

2014 年 03 月 30 日日本農芸化学会 2014 年度大会シンポジウム「生体超分子の視覚化による新しい世界の発見」世話人:

伊藤政博(東洋大)、福森義宏(金沢大)

2014 年 03 月 26 日第 87 回日本細菌学会総会シンポジウム「変貌しつつある細菌の細胞像」オーガナイザー: 宮田真人(大阪市立大学)、塩見大輔(立教大学)

2014 年 03 月 24 日広島大学国際シンポジウム「真核生物の細胞分裂機構の多様性」

2014 年 03 月 01 日 2013 年度べん毛研究交流会

2013 年 12 月 18 日日本生体エネルギー研究会討論会

2013 年 10 月 28 日第 51 回日本生物物理学会年会「Prof Berg's featured lecture and dancing harmonized motility machineries」オーガナイザー: 宮田真人(大阪市立大学)、佐藤啓子(長崎大学)

2013年09月01日 IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions

2013年06月20日第10回21世紀大腸菌研究会

2013年05月25日第77回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム

2013年03月18日第86回日本細菌学会総会「細菌構造研究の新展開:分泌装置,細胞骨格,運動装置,細菌表層の構造体を中心に」コンビーナー: 本間道夫(名大・理・生命理学)、福森義宏(金沢大・理工研究域)

2013年03月03日2012年度べん毛研究交流会

2012年12月15日第85回日本生化学会大会シンポジウム「運動超分子マシナリーの機能メカニズム」オーガナイザー: 小嶋誠司(名大理)、森博幸(京大ウイルス研)

2012年11月25日第45回日本原生動物学会大会シンポジウム「滑走運動の生物学」オーガナイザー: 園部誠司(兵庫県大)

2012年11月09日第49回日本細菌学会中部支部大会

2012年09月23日第50回日本生物物理学会年会シンポジウム「Harmonized supramolecular machinery for motility and its diversity」オーガナイザー: 宮田真人(阪市大)、南野徹(阪大)

アウトリーチ活動

(1) 領域ホームページ: 領域を俯瞰、情報の共有、発信を目指して運営している。

<http://bunshi5.bio.nagoya-u.ac.jp/~mycmobile/index.php>

(2) オンラインビデオライブラリー: 分野外の研究者、教員、中高生、一般市民などに生体運動研究を親しんでもらうことを目的として、当領域に関連のあるビデオをYouTubeで公開し、オンラインビデオライブラリーを作成している。

<http://bunshi5.bio.nagoya-u.ac.jp/~mycmobile/video/>

(3) スマートフォンアプリ「生体運動オンラインビデオライブラリー(仮称)」: 若年層のインターネット利用環境に対応すべく、閲覧用のスマートフォンアプリを開発、公開した。

(4) スマートフォンアプリ「生体運動マシナリー図鑑(略称:細胞運動図鑑)」: 若年層のインターネット利用環境に対応すべく、閲覧用のスマートフォンアプリを開発、公開した。

(5) 汎用3Dプリンターの生物学的利用法開発の活動内容をFacebookで公開している。

<https://www.facebook.com/motility.machinery>

(6) 急速凍結レプリカ電子顕微鏡法の活動内容をFacebookで公開している。

<https://www.facebook.com/freeze.fracture>

9. 今後の研究領域の推進方策（2ページ程度）

今後どのように領域研究を推進していく予定であるか、研究領域の推進方策について記述してください。また、領域研究を推進する上で問題点がある場合は、その問題点と今後の対応策についても記述してください。また、目標達成に向け、不足していると考えているスキルを有する研究者の公募班での重点的な補充や国内外の研究者との連携による組織の強化についても記述してください。

本研究領域は申請時の理念と方針にのっとり問題なく展開している。一年目は、領域の立ち上げに多くの時間と労力を費やしたが、二年目からはとどこおりなく運営され、論文発表も、研究結果も順調に得ることができている。そのため、今後も特に大きな変更はせず、残りの二年間で少しでも多くの結果を残せるようにしたい。以下、いくつかの事項について解説する。

(1) 世界的に深刻な液化ヘリウム不足

総括班として技術開発、提供を行っている急速凍結レプリカ電子顕微鏡法では従来、液化ヘリウムを回収せずに用いてきた。しかし、昨今の状況から、回収システムのない装置では液化ヘリウムの使用が許可されなくなった。本領域では、液化ヘリウムを回収する方法と、代わりに液体窒素を用いる方法の両方を検討した。その結果、目的に応じて二つの方法を使い分け、新しく開発した工夫を行うことで、必要な品質を持つ像を得ることに成功した。今後は、この前半二年間で培った技術を進展させ、少しでも多くの運動超分子マシナリーを解析する。

(2) 電子線クライオトモグラフィー装置不足

凍った状態で電子顕微鏡観察を行い試料を傾けて像を得る同方法は、高解像度で生体試料の三次元像を得ることに適しており、本領域でもすでにいくつかの論文発表がなされつつある。しかし、装置はきわめて高額で、国内に数台しか存在しない。現在、本領域の解析は、大阪大学生命理学研究科・難波研究室の装置を借りて行っているが、試料の準備が整っても観察が数カ月先になることもしばしばである。今後、他研究機関の装置の利用や、新たな装置の導入に領域、として取り組んでいく必要がある。計画班代表者の本間は現在、電子線クライオトモグラフィー装置の名古屋大学への導入を大学に要求している。

(3) 総括班組織見なおし

伊藤計画班の今田勝巳教授(大阪大)と宮田計画班の西坂崇之教授(学習院大)はそれぞれ、タンパク質結晶構造解析と光学顕微鏡解析での技術相談を領域の様々なメンバーから受けるようになってきている。これらの実態に合わせるために、両名を三年目より総括班メンバーとする。ただし、それに付随した予算の再配分は行わない。

(4) 南野計画班設置

回転マシナリーのテーマであるバクテリアべん毛モーターは、遊泳という生体運動のみではなく、タンパク質を細胞の外の遠い位置にまで送り出す輸送装置でもある。三年目まで本間班の連携、あるいは分担研究者であった南野 徹氏は、モーターの回転メカニズムと同時に輸送装置(輸送マシナリー)としてのべん毛モーターにも注目し、輸送の過程の明確な観察を可能にした。そこで、四年目から新たに、バクテリアのべん毛モーターにおける輸送マシナリーのメカニズムを明らかにするべく、“南野計画班”を設置する。南野班の研究から、同じく輸送マシナリーをテーマとする森班や中山班とのシナジー効果が

期待される。

(5) 総括班アクティビティーの共有性

総括班活動のうち、急速凍結レプリカ電子顕微鏡観察法と3Dプリンターの生物学的応用においてFacebookによる情報の公開・共有を行っているが、Facebookは、総括班アクティビティーの領域内での公開・共有に大変に効果的である。三年目からは電子線クライオトモグラフィーや、人材育成などの他の総括班活動にもFacebookを用いた情報の公開・共有を進める。

(6) 領域研究のまとめと終了後

数多く存在する生体運動メカニズムとそれぞれの由来について議論した英文総説を領域関係者の多くが参加する形で著す予定である。領域代表がそれぞれのテーマの研究者に執筆をお願いし、最先端の研究からうかがえる多様性と、領域として研究するで見えてくる普遍性の両方に配慮した総説を想定している。また、急速凍結レプリカ電子顕微鏡観察法とオンラインビデオライブラリーについて、領域終了後にもより発展させる形で残せる方法を模索していきたい。