

## 【特別推進研究】

### 生物系



#### 研究課題名 クライオ電子顕微鏡による 生体分子モーターの立体構造と機能の解明

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授 なんば けいいち  
難波 啓一

研究分野： 生物物理学

キーワード： 生物物理、ナノバイオ、ナノマシン、分子モーター

#### 【研究の背景・目的】

生命機能は、タンパク質や核酸などの立体構造によって規定された生体分子機械としての動作機構と、ダイナミックな結合解離をとともう相互作用に支えられている。多くの生体分子は状況に応じて相互作用する相手を認識して超分子を形成し、あるいは結合解離を繰り返すことで、より複雑で巧妙に制御された機能を発揮しつつ、生命機能を支えるエネルギー・物質・情報ネットワークのダイナミクスを構築する。よって生命機能のしくみを理解するには、生体分子や超分子の立体構造に基づいて分子機械の動作機構や結合解離の制御のしくみを解明することが必須である。本研究課題の目的は、クライオ電子顕微鏡像の解析技術をより一層進歩させ、生体超分子の立体構造解析における到達分解能の向上と時間短縮により、アクチン・ミオシン、微小管・ダイニン、微小管・キネシン複合体や細菌べん毛モーターなど、超分子モーターの立体構造をできるだけ原子分解能に近づけて信頼性の高い原子モデルを構築することである。超分子モーター複合体での分子間相互作用と解離状態での分子構造を詳細に比較することで、力発生に関わるモーター分子の構造変化を捉えるとともに、一分子光学ナノ計測法による変異体の機能解析を組合せることで力発生とその制御のメカニズムを解明する。膜貫通構造であるため高分解能の立体構造解析が容易でない細菌べん毛モーターにおいても、様々な変異体べん毛モーターの一分子光学ナノ計測法による回転ステップ素過程の計測と、べん毛基部体のクライオ電子顕微鏡法による立体構造解析を組合せることで、トルク発生と双方向回転スイッチのしくみの解明を目指す。

#### 【研究の方法】

高効率なクライオ電子顕微鏡単粒子像解析法により、繊維状の構造を持つ生体超分子モーターの立体構造解析を進める。リング状の構造を持つべん毛モーターでは、解析に適した変異体の構造解析と並行して一分子光学ナノ計測による機能解析も行う。構成蛋白質のX線結晶構造解析も併用することで、クライオ電子顕微鏡像解析法による立体像の検証と、信頼性の高い超分子の原子モデル構築に役立てる。試料調整、クライオ電子顕微鏡像の撮影条件、画像解析法の精度向上と効率化などの工夫を重ね、構成タンパク質の主鎖や側鎖が見える3Åの達成を目指す。遺伝子工学的手法で捉えた様々な機能変異体

についても高時間空間分解能の光学顕微ナノ計測システムによる機能解析を進め、構造と機能の相関からトルク発生のメカニズムに迫る。

#### 【期待される成果と意義】

本研究で解析の対象とする生体分子モーターは、筋収縮や細胞運動、細胞の形態形成、細胞内物質輸送、細菌の運動など、どれも生命機能にとって極めて重要なものである。クライオ電子顕微鏡像解析法のさらなる工夫によって生体超分子の構造を原子レベルで解明できれば、構造生物学、分子生物学、細胞生物学、生物物理学などの研究分野に極めて大きなインパクトをもたらす。生理的機能を有する状態での分子モーター複合体の立体構造が解明可能になると、構成分子の様々な突然変異によって引き起こされる疾病の治療を可能にする創薬基盤となり、人工システムとは桁違いの省エネルギーで動作するシステムの実現につながる可能性も秘めている。

#### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

Ruan, J., Kato, T., Santini, C.-L., Miyata, T., Kawamoto, A., Zhang, W.-J., Bernadac, A., Wu, L.-F. & Namba, K. (2012)

Architecture of a flagellar apparatus in the fast-swimming magnetotactic bacterium MO-1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **109**, 20643-20648.

Gayathri, P., Fujii, T., Møller-Jensen, J., van den Ent, F., Namba, K., Löwe, J. (2012)

A bipolar spindle of antiparallel ParM filaments drives bacterial plasmid segregation. *Science* **338**, 1334-1337.

Fujii, T., Iwane, A. H., Yanagida, T. & Namba, K. (2010)

Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy. *Nature* **467**, 724-729, 2010.

Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. & Namba, K. (2003)

Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* **424**, 623-650.

#### 【研究期間と研究経費】

平成25年度-29年度  
442,700千円

#### 【ホームページ等】

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/02/>

## 【特別推進研究】

## 生物系



## 研究課題名 保存された染色体分配の制御機構

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

わたなべ よしのり  
渡邊 嘉典

研究分野：生物学

キーワード：遺伝学、ゲノム

## 【研究の背景・目的】

染色体は、生命現象を支配するゲノム情報を担う生体物質である。増殖分裂する細胞では、ゲノム情報を担う染色体は、複製とそれに続く均等分裂によって正確に娘細胞へ受け継がれていく。この過程に間違いが起きやすくなるのが、細胞のがん化の引き金になると考えられている。一方、生殖細胞では、減数分裂という特殊な染色体分配によって、最終的に一組の染色体の組み合わせをもつ半数体の配偶子(卵および精子)が形成される。ヒトの先天性疾患であるダウン症候群および早期流産の多くが、この減数分裂の染色体分配異常に起因する。染色体分配の制御機構を分子レベルで理解することは、基礎生物学および医学いずれの見地からもきわめて重要な意義をもつ。

我々は、分裂酵母を用いた研究から、セントロメア中央領域が接着されることにより動原体が同じ方向を向くという「動原体接着による一方向性モデル」を証明することに成功した。本研究では、酵母における動原体制御の分子機構をさらに詳細に明らかにするとともに、マウスの新規動原体因子の解析を進めることにより、分裂酵母で明らかになったコンセプトについてその保存性を検証する。最近の我々の研究から、動原体とスピンドルの間違った結合を修正するオーロラキナーゼのセントロメア局在が、シュゴシンによって担われていることが明らかになり、インナーセントロメア・シュゴシン (ICS) ネットワークの発見に至った(図1)。本研究では、染色体分配の「守護神」ともいえる真核生物に広く保存されたセントロメアタンパク質シュゴシンの制御機構の詳細を明らかにするとともに、シュゴシンの機能不全ががん細胞に広く見られる染色体不安定性の原因になっている可能性についても検証する。これらの解析により、ヒトのがん細胞の産生過程に頻繁に見られる染色体不安定性のメカニズムの中核を明らかにすることを目指す。

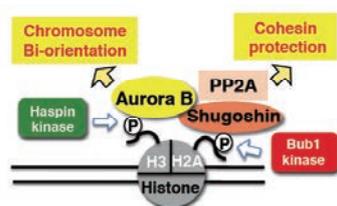
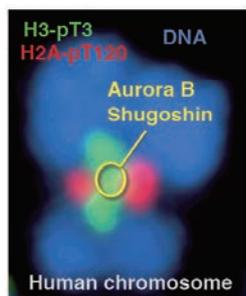


図1 ICSネットワーク  
2つのヒストンのリン酸化の交界り部分に  
インナーセントロメアが形成される

## 【研究の方法】

分裂酵母の動原体の一方向性を決定づける動原体因子の分子機能を、分子遺伝学的手法を駆使して解明する。さらに、マウスの生殖細胞で特異的に発現する新規動原体因子について、ノックアウトマウスの作成等によりその分子機能を明らかにする。その際、分裂酵母で明らかにしてきた分子機構が、高等動物でどこまで保存されているかが一つの焦点となる。

酵母および動物細胞を使って、動原体の構造の可塑性が染色体の方向性の制御に与える影響について調べる。さらに、正常細胞とがん細胞で ICS ネットワークの構成因子の局在を比べることにより、がん細胞固有の異常を探る。さらに、がん細胞で異常が見られた因子については、その因果関係について分子機構を調べる。

## 【期待される成果と意義】

哺乳動物の減数分裂における動原体の一方向性制御および接着の維持機構について、分子レベルの解明が進み、染色体異数性の原因が明らかになることが期待される。また、体細胞分裂におけるシュゴシンに依存した動原体の二方向性の保証のメカニズムが、ヒト細胞において明らかになることが期待される。さらに、がん細胞発生のメカニズムに関わる染色体分配不全について、ICS ネットワークの関与、およびその分子機構が明らかになることが期待される。

## 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- 1) Sakuno, T., Tada, K., and Watanabe, Y. Kinetochores geometry defined by cohesion within the centromere. *Nature* 458, 852-858 (2009).
- 2) Yamagishi, Y., Honda, T., Tanno Y., and Watanabe, Y. Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science* 330, 239-243 (2010).

## 【研究期間と研究経費】

平成 25 年度 - 29 年度  
416,400 千円

## 【ホームページ等】

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/watanabe-lab/>  
[ywatanab@iam.u-tokyo.ac.jp](mailto:ywatanab@iam.u-tokyo.ac.jp)

## 【特別推進研究】

### 生物系



## 研究課題名 シナプスにおける逆行性シグナルが生後発達期の機能的神経回路形成に果たす役割の解明

東京大学・大学院医学系研究科・教授

かのう まさのぶ  
狩野 方伸

研究分野：神経生理学・神経科学一般

キーワード：分子・細胞神経科学

### 【研究の背景・目的】

生まれたばかりの動物の神経系には、シナプスが過剰に存在するが、成長につれて、必要なシナプスは強められて残存し、不必要なシナプスは除去されて、成熟した機能的神経回路が完成する（シナプス刈り込み）。これまで私たちは、生後発達期の小脳登上線維-プルキンエ細胞シナプスをモデルとして、この分野で世界をリードしてきた。機能的神経回路形成において、シナプス後部の活動が重要であることは明らかになっているが、シナプス後部の神経細胞の情報をシナプス前部に伝える逆行性シグナルについては、殆どわかっていない。

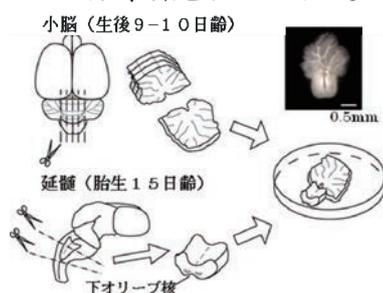


図1 延髄-小脳共培養標本

私たちは、最近、登上線維の起始核である下オリーブ核を含む脳幹と小脳を共培養して、シナプス刈り込みを *in vitro* で再現することに成功した（図1）。この標本を使って、シナプス刈り込みの新規候補遺伝子の網

羅的スクリーニングが可能になった。また、ウイルスベクターを新生児マウスの小脳に注入してプルキンエ細胞特異的に候補分子を操作し、その影響を *in vivo* で調べる方法も確立している。

本研究では、これらのスクリーニング法を駆使し、生後発達期の小脳登上線維シナプスの刈り込みに関与する逆行性シグナルを明らかにする。さらに、内因性カンナビノイドのうちで、成熟脳における主要な逆行性シナプス伝達物質である 2-arachidonoylglycerol (2-AG) が、発達期の機能的神経回路形成に果たす役割を解析する。これらにより、生後発達期の機能的神経回路形成に、逆行性シグナル伝達が果たす役割とその機構の解明を目指す。

### 【研究の方法】

延髄-小脳の共培養系において、レンチウイルスノックダウンベクターを用いて、プルキンエ細胞特異的に標的分子をノックダウンし、プルキンエ細胞の電気生理学的解析によって、登上線維シナプス刈り込みに影響を与えるものを絞り込む。これら候補分子のシナプス刈り込みへの関与を、さらに *in vivo*

におけるウイルスによるノックダウンや遺伝子改変マウスを用いた解析によって検証し、プルキンエ細胞側の逆行性シグナル分子を同定する。

次に、同定した分子が作用する受容体のうちで登上線維またはグリア細胞に発現するものを、ウイルスによる *in vivo* でのノックダウンにより検索する。また、同定した逆行性シグナル分子の遺伝子改変マウスにおいて、小脳神経回路の動作を、*in vivo* で解析する。さらに、2-AG に関連するノックアウトマウスの小脳シナプス刈り込みと大脳皮質の神経回路動作を解析し、2-AG シグナルの機能的神経回路形成における役割を明らかにする。

### 【期待される成果と意義】

本研究によって、生後発達期のシナプス刈り込みに関わる逆行性シグナルが同定されれば、そのシグナルの発生するシナプス後部の機構と、そのシグナルを受容するシナプス前部の機構の解明につながる。私たち独自の新たなスクリーニング方法により、本研究期間内に、多くの新たな分子が同定され、シナプス刈り込みを担う逆行性シグナルの機構が明らかになり、発達期の神経系における機能的神経回路形成の機構や基本原理解明につながる事が大いに期待できる。

### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Uesaka N, Mikuni T, Hashimoto K, Hirai H, Sakimura K, Kano M: Organotypic coculture preparation for the study of developmental synapse elimination in mammalian brain. *J Neurosci* 32:11688-11699, 2012.
- Mikuni T, Uesaka N, Okuno H, Hirai H, Deisseroth K, Bito H, Kano M: Arc/Arg3.1 is a postsynaptic mediator of activity-dependent synapse elimination in the developing cerebellum. *Neuron* 78: 1024-1035, 2013

### 【研究期間と研究経費】

平成 25 年度-29 年度  
425,400 千円

### 【ホームページ等】

[http://plaza.umin.ac.jp/~neurophy/Kano\\_lab/Top.html](http://plaza.umin.ac.jp/~neurophy/Kano_lab/Top.html)  
mkano-tky@m.u-tokyo.ac.jp

