

博士論文(要約)

モータータンパク質キネシンの  
運動方向を決定する機構の解明

**A study of determinants of direction of kinesins**

平成 28 年度

東京大学大学院 総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系

山岸 雅彦

## 目次

目次.....	1
略語.....	4
序章.....	5
本論文の概要.....	25
第 1 章: kinesin-14 Ncd の運動方向を決定する分子機構の解明	
1.1. 序論.....	27
1.2. 実験方法	
1.2.1. 単量体キメラキネシンの作製.....	33
1.2.1.1. 単量体キメラキネシンの DNA コンストラクト作製.....	33
1.2.1.2. 単量体キメラキネシンの形質転換.....	41
1.2.1.3. 単量体キメラキネシンのタンパク質精製.....	44
1.2.1.4. 単量体キメラキネシンのタンパク質評価.....	51
1.2.2. 微小管の調製.....	53
1.2.2.1. チューブリンの精製.....	53
1.2.2.2. 微小管の重合.....	63
1.2.2.3. 極性微小管の作製.....	63
1.2.3. 蛍光顕微鏡による単量体キメラキネシンの <i>In vitro</i> giding 運動観察.....	66
1.2.3.1. 蛍光顕微鏡装置.....	67
1.2.3.2. 温度コントロール装置.....	68
1.2.3.3. KOH 処理カバーガラスの作製.....	69
1.2.3.4. ガラスチャンバーの作製および運動観察.....	70
1.2.3.5. 位置解析.....	72

1.2.4.	クライオ電子顕微鏡による構造解析.....	74
1.2.4.1.	構造解析用単量体キメラキネシン nKn664, nKn669 の作製.....	74
1.2.4.2.	構造解析用チューブリンの精製.....	74
1.2.4.3.	電子顕微鏡サンプルグリッドの作製とクライオ EM 像.....	74
1.2.4.4.	クライオ EM 画像の画像処理と 3 次元再構成.....	75
1.2.4.5.	原子モデルフィッティング.....	77
1.2.5.	X 線結晶構造解析による構造解析 .....	77
1.3.	実験結果	
1.3.1.	単量体キメラキネシンの DNA コンストラクト作製と精製および評価.....	79
1.3.2.	単量体 C 末変異キメラキネシンの DNA コンストラクト作製と精製および評価	80
1.3.3.	チューブリンの精製および評価.....	81
1.3.4.	網羅的キメラキネシンの運動方向観察.....	81
1.3.5.	C 末部位変異キメラキネシンの運動方向観察.....	84
1.3.6.	キメラキネシン nKn664-ADP の X 線結晶構造解析.....	86
1.3.7.	キメラキネシンのクライオ EM 構造解析.....	88
1.4.	考察	
1.4.1.	キメラキネシンの運動方向.....	92
1.4.2.	運動方向性の異なるキメラキネシン.....	93
1.4.3.	キメラキネシンの構造解析.....	93
1.4.3.1.	nKn664 キメラキネシンの ADP → free 状態遷移における構造変化.....	94
1.4.3.2.	nKn664 キメラキネシンの Free → ATP 状態遷移における構造変化.....	96
1.4.3.3.	nKn669 キメラキネシンの Free → ATP 状態遷移における構造変化.....	96
1.4.4.	nKn664 の微小管マイナス端方向への運動メカニズム.....	97
1.4.5.	nKn669 の微小管プラス端方向への運動メカニズム.....	100

第 2 章: キネシン motor core の運動方向性の実証.....	104
総括と今後の展望.....	105
参考文献.....	106
謝辞 .....	116

## 略語集

a.a.	amino acid
ADP	adenosine diphosphate
AMP- PNP	adenosine 5'-( $\beta$ , $\gamma$ -imido) triphosphate
ATP	adenosine triphosphate
BSA	Bovine Serum Albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CCD	charge-coupled device
DMSO	dimethyl sulfoxide
DTT	1,4-dithiothreitol
EGTA	O,O'-bis(2-aminoethyl)-1-ethylenglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EM	electron microscopy
GFP	green fluorescent protein
GMPCPP	guanosine-5'-[( $\alpha$ , $\beta$ )-methylene]triphosphate
GTP	guanosine triphosphate
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D(-)-thiogalactopyranoside
LB	Luria-Bertani
ND	not detected
NEM	N-ethylmaleimide
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PIPES	piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
Rn	Rattus nidulans
ROI	range of interest
SDS	sodium dodecyl sulfate
SD	standard deviation

## 序章

### モータータンパク質とは

モータータンパク質とは、ATP を加水分解し、真核細胞内でさまざまな機能を果たすタンパク質の総称である。原核細胞では、内部での物質輸送は主に拡散により行われ、また、DNA などの物質の局在は緩やかな形で存在する。対して、真核細胞は原核細胞とは内部構造が異なり、また、一般的にはるかに大きい (~数百倍)。真核細胞は核やミトコンドリアなどの細胞小器官と呼ばれる内部構造を持ち、細胞周期に応じて物質の局在が厳密に調整される必要があるため、物質輸送には拡散以外の手段も用いられる。この物質輸送を主に担うのがモータータンパク質である。生体内のエネルギー通貨と呼ばれる ATP を基質とするタンパク質は多いが、ATP の化学エネルギーを仕事に変換し、熱ゆらぎ環境下で一方方向性の運動を行うという点でモータータンパク質は他とは一線を画する。いわば、モータータンパク質とは熱ゆらぎ環境下において ATP の化学エネルギーを利用し、一方方向性の仕事を取り出すナノマシンといえる (Dinu et al., 2007)。

### 3 種類のモータータンパク質 (ミオシン、ダイニン、キネシン)

現在、細胞骨格と協働する細胞骨格依存性のモータータンパク質は大きくミオシン・ダイニン・キネシンの 3 種類に分類される。これら 3 種のモータータンパク質は細胞骨格上を 1 次元の運動をすることからリニアモーターとも呼ばれる。リニアモーター以外にも回転モーターである F1-ATPase などのモータータンパク質がある。以下ではモータータンパク質はリニアモーターのミオシン・ダイニン・キネシンを指すものとする。ここでは、3 種類のモータータンパク質についてそれぞれ簡単に説明する。

モータータンパク質として最も身近なものはミオシンである。ミオシンは筋組織において細胞骨格のアクチンフィラメントと協働して筋収縮を行い我々の運動を可能としている。また、細胞質内で細胞質分裂やアメーバ運動に関わるミオシンも存在している。

ダイニンとは細胞骨格の微小管上を運動するモータータンパク質である。ダイニンは細胞質ダイニンと軸系ダイニンに大きく分けられる。細胞質ダイニンは2種類が同定されている。わずかに2種類で細胞分裂や小胞輸送など様々な機能を果たす仕組みとして、細胞質ダイニンは多種の中鎖・軽鎖などのサブユニットの組み合わせにより機能の切り替えを行っていると考えられている (Stuchell-Brereton et al., 2011)。軸系ダイニンは鞭毛・繊毛の波打ち運動を駆動し、外腕ダイニン1種、内腕ダイニン7種が知られている (Kamiya and Yagi, 2014)。

キネシンは、本論文で主に扱うモータータンパク質であり、3種のモータータンパク質の中では最後に発見された (Vale et al., 1985)。キネシンはダイニンと同じく細胞骨格の微小管上を運動する。上記のように細胞質ダイニンは細胞質内では通常2種類のみであり、多種の機能は多くのアダプタータンパク質により切り替えていると考えられているのに対し、キネシンは多くの種類に分かれており、種類ごとに機能を分けていると考えられている (Miki et al., 2005)。

ミオシンとキネシンは相互作用する細胞骨格が異なるが、その活性部位 (Walkerモチーフ) は相同であり、シグナル伝達に関わるGタンパク質とも祖先を共有すると考えられている (Kull et al., 1998; Rayment, 1996)。キネシンの頭部は通常4 nmの球状 (約330 a.a., 約40 kDa)であるのに対し、ミオシンはより大きい (~20 nm: 約800 a.a., 約95 kDa)。ダイニンはキネシン・ミオシンとはその祖先を別としていると考えられている (Kull et al., 1998)。ダイニンの頭部はキネシンの頭部に比べるとはるかに大きく約20 nm (約4600 a.a., 約530 kDa)の大きさである (図1)。

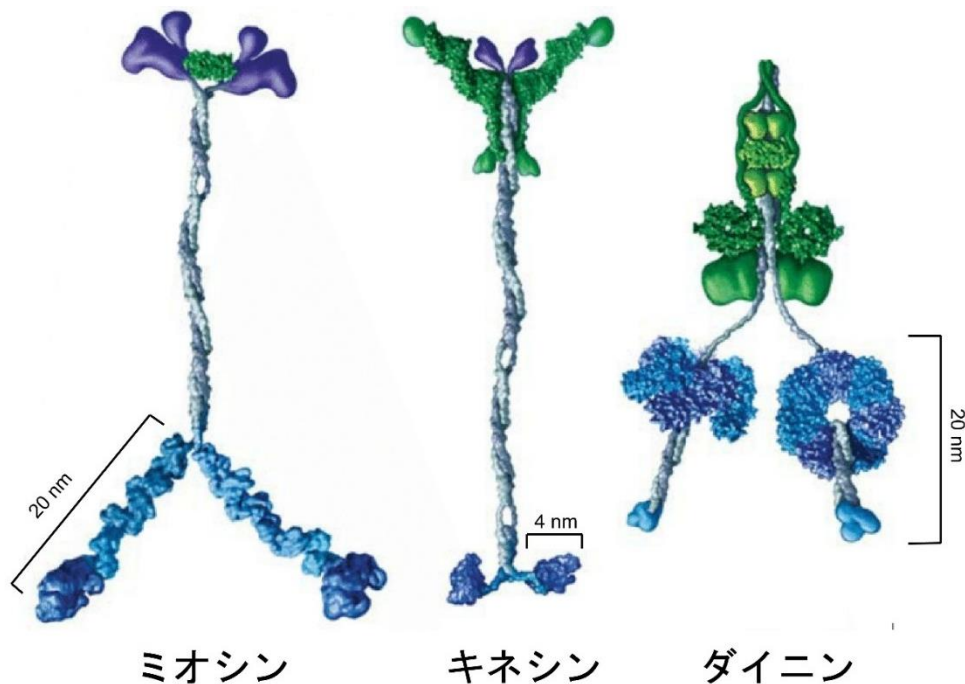


図 1. ミオシン、キネシン、ダイニンの構造 ((Vale, 2003)より一部改変)

ミオシン (左)、キネシン (中央)、ダイニン (右)の全体の構造および頭部の大きさを示す。

細胞内にはこの 3 種それぞれに複数の類似したモータータンパク質があり、それぞれ固有の働きを担っている。それら個々のモータータンパク質の機能と調節のしくみの解明は、細胞生物学の大きな課題である。一方、生物物理学分野での中心的課題の一つは、化学的エネルギーがどのようにして力学的エネルギーに変換されるのかという問題がある。最近では、1 分子タンパク質の運動を、ATP の分解をモニターしながらナノメートルの精度で計測する実験が可能になり、より精細な研究が精力的に行われている。例えば、これまでミオシンは ATP1 分子の加水分解ごとに 1 回運動 (ステップ)すると考えられていた (Coy et al., 1999)。しかし、最近では運動には熱ゆらぎの寄与が大きく、運動のステップ数は ATP の加水分解数と必ずしも一致しないという考えも検証されつつある (Kitamura et al., 1999)。また、ダイニンにおいてはどのようにステップしているかはまだ不明な点がある。そして、キネシンについては 1 ステップ 約 8 nm 毎に運動していることは確認されている (Svoboda et al., 1993)



が、そのステップのメカニズムやどのようにして方向性の運動が生まれるのかは、未だ謎である。

### キネシンの構造

キネシンは一般に頭部 (motor domain), ストーク, 尾部の3つの部位からなる構造を持つ。初めに電子顕微鏡によりキネシンの全体像が得られた際にキネシンは3つの構造 (大きい球状構造、棒状構造、小さい球状構造)を有することが判明した (Amos, 1987)。後に大きい球状構造は微小管および ATP と結合し運動を担う部位であることが分かり、頭部 (motor domain)と呼ばれている。尾部は電子顕微鏡像では、頭部より小さな球状構造を持つ部位であり、キネシンの輸送の際に荷物 (カーゴ)と結合する部位である。カーゴはキネシンの機能に応じて微小管、小胞、細胞小器官、DNA、mRNA などである。ストークは主にアルファヘリックス構造により形成されている棒状の構造であり、coiled-coil 構造をとり多量体化を担うことが分かっている (図 2)。

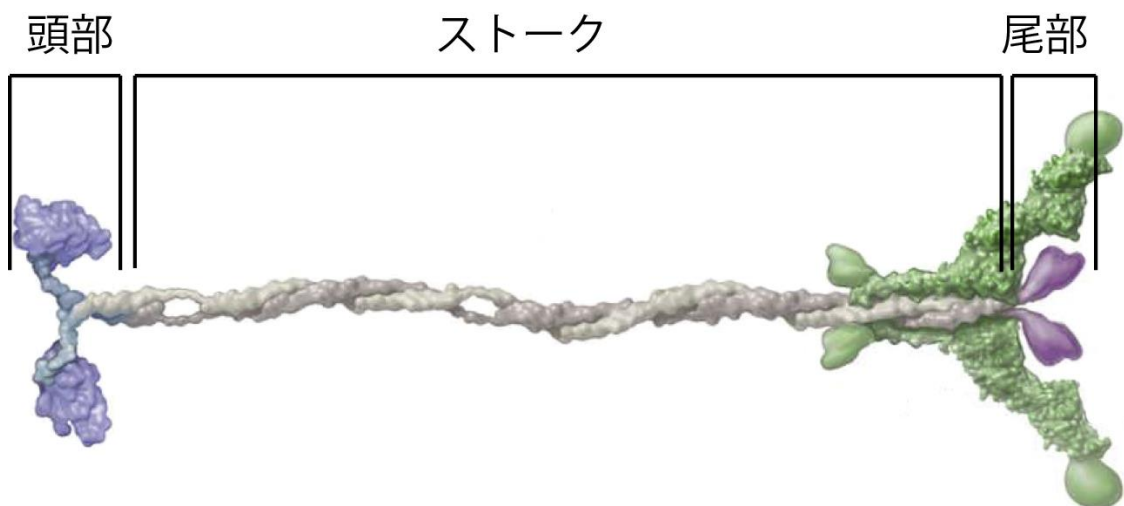


図 2. キネシンの構造 ((Vale, 2003)より一部改変)

頭部 (青色)は運動活性を担う。ストーク (灰色)により二~ 四量体化する。尾部(紫色)はカーゴと結合する。

キネシン軽鎖 (緑色)はカーゴの結合を調整する。

頭部 (motor domain)は更に 3 つの部位に分けることができる。ATP 結合部位や微小管結合部位を持ち運動活性のコアとなる motor core, キネシンの種類によって特有の構造 (アミノ酸配列)を持ち motor core の外側にある neck 部位、そして、motor core から突き出ている部位のうち、neck とは異なる末端にある N/C 末部位である (図 3)。

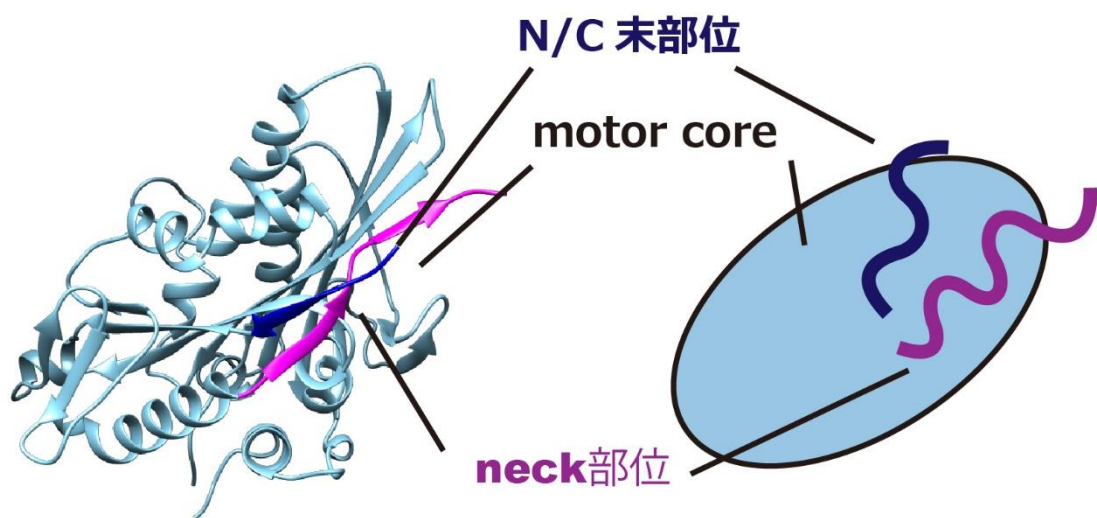


図 3. キネシン頭部の構造

キネシン頭部の 3 次元構造 (リボンモデル, PDB: 2KIN) (左)と模式図 (右)。

キネシン頭部は motor core (シアン)の外側に neck 部位 (マゼンタ)、N 末または C 末部位 (青色)が飛び出した構造を取る。

キネシンのアミノ酸配列上の特徴は種類の異なるキネシン間の motor core の高い相同性 (~40%)である。この高い相同性はキネシンが共有する幾つかのモチーフを持つことに依る。それらは、Walker によって提唱された、多くのヌクレオチド結合タンパク質に共通して存在する GXXXXGKT/S (x は任意のアミノ酸残基)をコンセンサス配列に持つ Walker モチーフ A (P ループともよばれる)や、ヌクレオチドのリン酸基と結合し、疎水性のアミノ酸の配列のあ

とに負電荷のアミノ酸が配列する Walker モチーフ B (hhhhD; h は疎水性アミノ酸残基)などである (Walker et al., 1982)。これら Walker モチーフを有する Walker フォールドは、8つの平行  $\beta$  シート構造を、その両側に3つずつ存在する  $\alpha$  ヘリックスがサンドイッチ状に挟むように位置する (図4)。

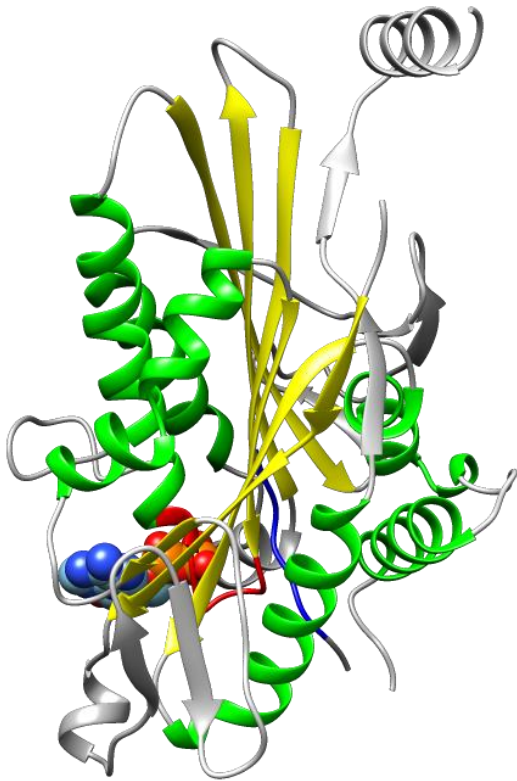


図4. キネシン motor core の構造

キネシン motor core (リボンモデル)と ADP (充填モデル)。Motor core は8つの平行  $\beta$  シート (黄色)を3つずつの  $\alpha$  ヘリックス (緑色)が両側から挟んでいる構造 (walker フォールド)を取っている。ADP と接する2つの共通モチーフ: Walker A モチーフ (赤色)および Walker B モチーフ (青色)。

#### キネシンの分類と機能

キネシンは多くの種類に分かれており、例えばヒトを含むほ乳類では45種類同定されている (Hirokawa et al., 2009)。これら多種のキネシンをまとめてキネシンスーパーファミリーと呼び、アミノ酸配列比較により14のサブファミリーに分類が行われている (Lawrence

et al., 2004)。14のサブファミリーはそれぞれ特徴的な構造を持ち、「構造 = 機能」と考えられているタンパク質では各サブファミリーはそれぞれ異なった機能を果たしていると考えられている (図 5)。例えば、kinesin-4 は DNA と結合できる部位を持ち、主に染色体の腕部に局在している (Sekine et al., 1994)。Kinesin-5 は 4 量体を形成し、紡錘体形成に働く (Kashina et al., 1996)。Kinesin-13 は微小管の端に結合する部位を持ち、微小管の脱重合を行う (Desai et al., 1999)。このように、キネシンを構造により分類することは多くのキネシンを把握するうえで有用であるが、多くの研究により必ずしも各サブファミリーに属するキネシンが特定の機能のみを果たすわけではないこともわかってきている (Tokai et al., 1996)。これはキネシンの基本的構造が同じであることと、生物のもつ冗長性選好によるものと考えられる。しかしながら、構造による分類は依然有効であり、今後も増え続けるキネシンを把握するためには有用であろう。以後、キネシンスーパーファミリー全般に関しての言及ではキネシンと呼び、各サブファミリーに関しての言及では kinesin-xx (xx は 1~ 14) と呼ぶ。

サブファミリー	代表例	構造の特徴	機能
kinesin-1	KIF5C		小胞体・細胞小器官輸送
kinesin-2	KIF3A/3B	ヘテロ三量体	軸糸内輸送
kinesin-3	KIF1A	単量体、FHAドメイン	細胞小器官輸送
kinesin-4	KIF4	DNA結合部位	染色体運動
kinesin-5	cin8	ホモ四量体	紡錘体形成
kinesin-6	KIF20		細胞質分裂、紡錘体極形成
kinesin-7	CENP-E		動原体・微小管結合
kinesin-8	KIF18B		核移動、ミトコンドリア輸送
kinesin-9	KIF6		鞭毛機能
kinesin-10	Kid	Helix-hairpin-helixDNA結合モチーフ	染色体凝集
kinesin-11	KIF26A	motor coreの多様性	シグナル伝達
kinesin-12	KIF12	相同性の高い尾部	細胞小器官輸送
kinesin-13	MCAK	motor domainが中央に位置する	微小管脱重合
kinesin-14	Ncd, KlpA	motor domainがC末端に位置する	染色体分離

図 5. キネシンの分類と機能 ((Miki et al., 2005)より改変)

また、キネシンを **motor domain** のアミノ酸配列上の位置により 3 つに分ける分類も有効である。アミノ酸配列上の N 末側に **motor domain** が存在する N-キネシン、C 末側の C-キネシン、配列の中ほどに存在する M-キネシン (I-キネシンとも呼ばれる)である。サブファミリーの分類との対応は、**kinesin-1~ -12** が N-キネシン、**kinesin-13** が M-キネシン、**kinesin-14** が C-キネシンである。

更に、微小管上での運動方向による分類も行われている。微小管上をプラス端方向へ運動するキネシン (**kinesin-1~ 12**)はプラスキネシン、微小管上をマイナス端方向へ運動するキネシン (**kinesin-14**)はマイナスキネシンと呼ばれる。

## 微小管とキネシン

微小管はモータータンパク質キネシンの線路として機能する。微小管の構造は直径 25 nm の中空の管状ポリマーである。微小管は  $\alpha$  チューブリンと  $\beta$  チューブリンの 2 種類のタンパク質からなるヘテロ二量体が重合してできている。ヘテロ二量体は  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ ・・・と線上に並んだ繊維 (プロトフィラメント)が並行に 13 本束になっている。このため、微小管には方向性 (極性)があり、端が  $\alpha$  チューブリンの側をマイナス端と呼び、重合速度が遅い。一方、端が  $\beta$  チューブリンの側をプラス端と呼び、重合速度が速い (図 6A)。多くのキネシンはこのプラス端方向へ運動する。ヘテロ二量体 1 つにつきキネシンとの結合部位が 1 つ存在する。プロトフィラメントを構成するヘテロ二量体の周期は約 8 nm なので、キネシンは 8 nm 毎に結合することができる (図 6B)。

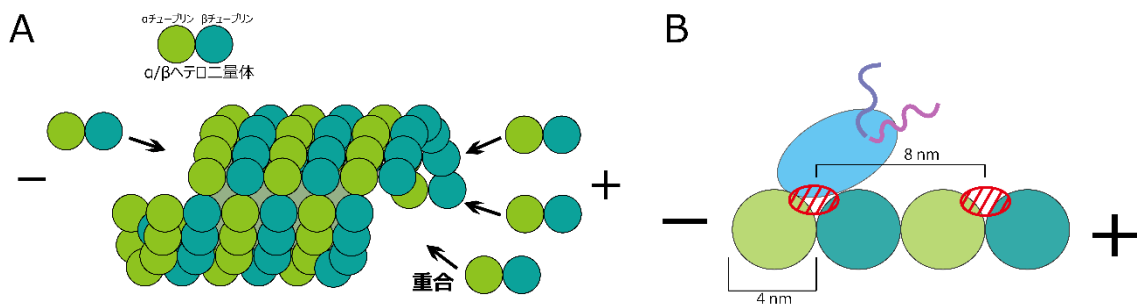


図 6. 微小管の構造とキネシン結合サイト

(A) 微小管は $\alpha$  チューブリン (黄緑)と $\beta$  チューブリン (緑)からなる $\alpha/\beta$ ヘテロ二量体が重合した、13本のプロトフィラメントからなる中空の構造を取る。微小管は重合速度の速いプラス端と重合速度の遅いマイナス端の極性を持つ。

(B) 微小管は $\alpha/\beta$ ヘテロ二量体毎に1つのキネシン結合サイト(赤斜線)を持つ。キネシン(シアン)。

#### ATP サイクルに伴うキネシンの構造変化および微小管との結合性

モータータンパク質キネシンは、ATPase の一種であり ATP の化学エネルギーを運動エネルギーに変換し仕事をしていると考えられている。その作用機序はまだ不明な点が多いが、ATP の加水分解サイクル (ATP サイクル)に応じたキネシンの構造が変化している点についてはコンセンサスが得られている。更に、このキネシンの ATP サイクルに応じた構造変化と微小管との結合性の変化が共役することで、キネシンは微小管上を運動することができる。ここでは、ATP サイクルとキネシンの構造変化および微小管との結合性の変化について述べる。

ATP はアデニン骨格にリン酸基が3つ結合している化合物であり、生体内のエネルギー通貨とも呼ばれるように、生体内でのエネルギー源として一般に利用されている。ATP の加水分解の自由エネルギーの勾配 (生体内で $\sim 20\text{k}_B\text{T}$ )により  $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$  (無機リン酸)  $\rightarrow$   $\text{ADP}$  の順に反応が進み、ATP 合成酵素により  $\text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow \text{ATP}$  と再生産されることで1巡

りする ATP サイクルを形成している。逆反応はエネルギー的に自発的に起こりにくい反応であるため、ATP 合成酵素などを介しない限り生体内では生じることはないと考えられている。また、生体内での熱ゆらぎは～数  $k_bT$  程度であるため、この ATP サイクルの一方向性が、生体内の熱ゆらぎ環境下での一方向性の運動の源であると考えられる。

キネシンは ATP サイクルの各段階に応じてそれぞれ固有の構造 (ヌクレオチド状態)をとる。キネシンはヌクレオチド状態として、ATP と結合した ATP 状態、ATP を加水分解した ADP・Pi 状態、無機リン酸が抜けた ADP 状態、ADP が抜けた Free 状態を順に経た後、ATP と再び結合してサイクルを回す。

また、キネシンと微小管との結合性には、微小管と強く結合する強結合、微小管と弱く結合する弱結合、微小管から解離する解離状態を取りうる。

ATP サイクルにおける各ヌクレオチド状態と微小管との結合性の対応は以下となる (図 7)。

1. キネシンは ATP と結合した ATP 状態と呼ばれる構造を取る際に、微小管との結合性が向上し、微小管と強結合する。
2. ついで、ADP+Pi 状態で結合性が低下し、微小管と弱結合する。
3. ADP 状態では微小管との結合性が低下し、解離状態となる。
4. Free 状態では再度、微小管と強結合する。

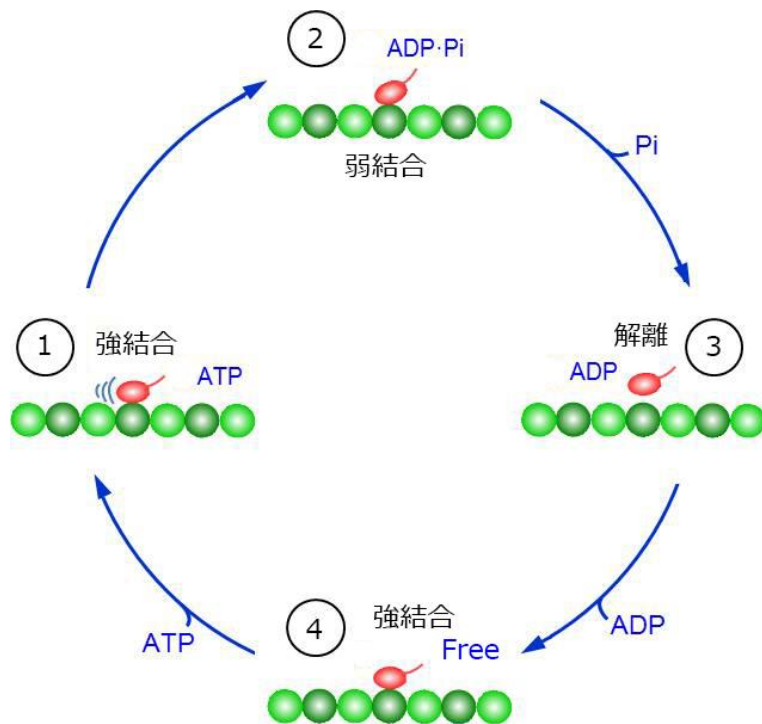


図 7. ATP サイクルと微小管結合様式 (<http://peter-hook.squarespace.com/mechanochemistry/>より一部改変)

ATP サイクルに応じて①から④の順に、ヌクレオチド状態と微小管との結合性が共役して変化する。キネシン (赤色)、微小管 (緑色)。

### キネシンの運動メカニズム

キネシンが微小管上で効率よく仕事を成すためには、微小管上を一定距離の間、解離せずに運動する(プロセッシブ性を持つ)必要がある。キネシンが ATP サイクルに応じて微小管と結合・解離することが判明した後、キネシンがどのようにして、ADP 状態を経ても解離せずに運動できるかについて研究が行われた。ほとんどのキネシンは二量体化による 2 頭構造を取っており、ミリ秒程度の早い反応を検出するストップド・フロー法によって、1 頭ずつ微小管と解離することが示され、1 頭ずつ順番に微小管に結合・解離することで 2 頭が同時に微小管から解離しないメカニズムを持つのではないかと推測された。例として、2 頭構造をもつ kinesin-1 はプロセッシブ性であり、微小管から解離するまでに 8 nm ステップを 1 秒間



に最大で 100 回以上繰り返す (Howard et al., 1989)。Kinesin-1 は、1 回の 8 nm ステップで 1 回の ATP 加水分解を伴うと考えられている (Coy et al., 1999)。このプロセッシブ性と、ATP 加水分解と共役したステップ運動を説明するために以前から提案されているのが、Hand-over-hand モデルである。これは 2 つの頭部を ATP サイクルと上手く共役させて前進する歩行運動モデルである。つまり、ATP 加水分解中の各ヌクレオチド状態と対応して単頭結合と 2 頭結合を交互に繰り返す (図 8)。このモデルの重要な点は、前頭部と後頭部が交互に入れ替わるので、頭部の前後を認識して協同性を引き起こす仕組みが備わっていると考える点である。

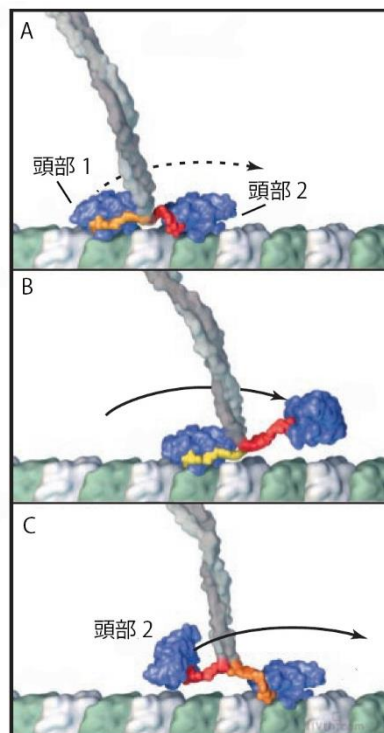


図 8. Hand-over-hand モデル (Vale and Milligan, 2000)より改変

- (A) 頭部 1 が微小管から解離し、2 頭結合から単頭結合へ移行する。
- (B) 頭部 1 が頭部 2 を越えて進行方向へ移動し、微小管に結合し、両頭結合する。
- (C) 次に、頭部 2 が微小管から解離し、頭部 1 を越えて進行方向へ移動する。

この Hnad-over-hand モデルがどのようにして実現しているかは、まだ明らかとなっていないが、そのメカニズムに関わらず、本質はいかに各頭部が微小管上を一方向に運動するかである。もし、各頭部が継続的に一方向に運動しなければ、キネシンは仕事を成すことができないはずである。この各頭部の一方向性を生み出すモデルは 2 通り (Power-stroke モデルと Brownian Ratchet モデル)が考えられている。

### Power-stroke モデル

このモデルは構造変化による力発生に基づく運動モデルである。Power-stroke モデルは元来、ミオシンの運動メカニズムを説明するのに考えられたモデルである。ミオシンでは lever-arm と呼ばれる構造が存在しており (図 1 左)、ATP の加水分解に応じて  $100 \text{ \AA}$  ほどスイング (power-stroke) することで運動するというものである。対して、キネシンはミオシンとそのコアの構造が似ているが、ミオシンで見られるような lever-arm が無いため少し異なり、lever-arm の代わりとなる neck 部位と呼ばれる構造 (図 3)が、ATP 加水分解のエネルギーにより構造変化 (power-stroke) することで運動すると考えられている (図 9)。頭部の neck 部位の構造変化により、プロセッシブキネシンではもう一方の頭部に (図 9A)、非プロセッシブキネシンではカーゴに (図 9B)力を伝達し一方向の運動を実現する。しかし、このモデルではキネシンの neck 部位の大きさがミオシンに比べて小さく、neck 部位の構造変化による仕事ではステップに不十分であると考えられている。また、単頭キネシンの運動を説明できない。

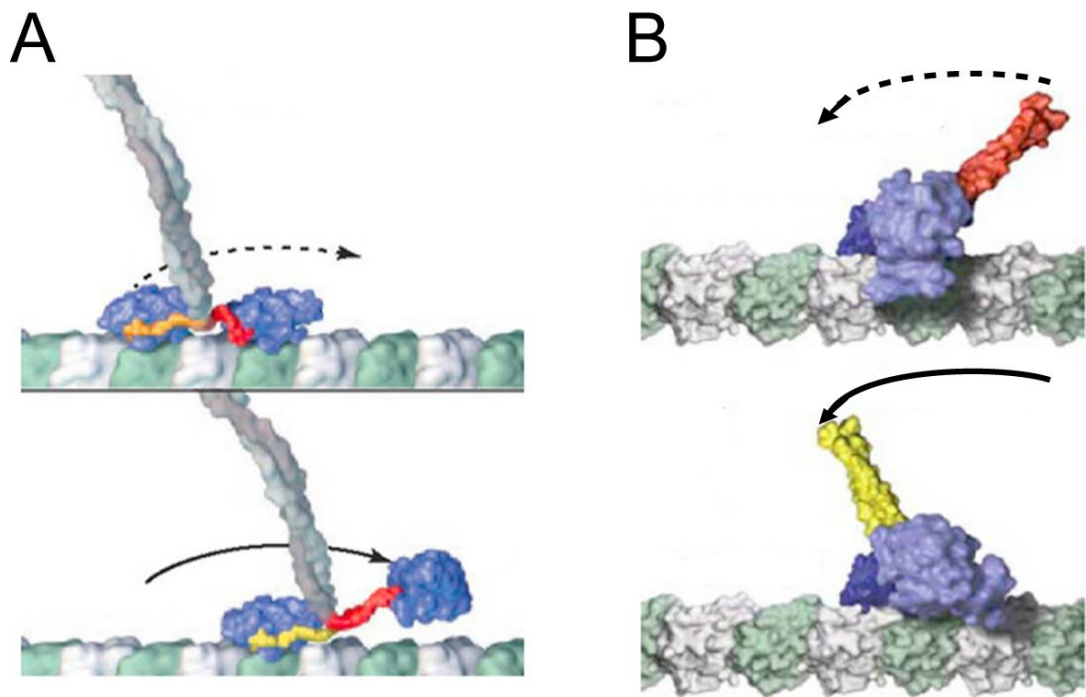


図 9 プロセッシブキネシンと非プロセッシブキネシンの power-stroke モデル

((Vale and Milligan, 2000)および (Endres et al., 2006)より一部改変)

(A) プロセッシブキネシンは、ヌクレオチド状態に応じて、前方頭部の neck 部位である neck-linker が、Pre-stroke 状態 (上図赤色)から Post-stroke 状態 (下図黄色)へと構造変化することにより、一方の頭部を微小管のプラス端方向へ運動させる。

(B) 非プロセッシブキネシンは、ヌクレオチド状態に応じて、neck 部位である neck-helix が、Pre-stroke 状態 (上図赤色)から Post-stroke 状態 (下図黄色)へと構造変化することにより、neck 部位に結合しているカーゴを微小管のマイナス端方向へ運動させる。

### Brownian Ratchet モデル

もう 1 つのモデルが Brownian Ratchet モデルである。Brownian Ratchet モデルはモータータンパク質と細胞骨格との結合に非対称なポテンシャルの存在を仮定し、ブラウン運動を利用して一方向性の運動を実現させるというものである (図 10)。このモデルでは ATP の加水分解エネルギーは、モータータンパク質と細胞骨格との結合・解離に使われるか、あるいは

は、結合ポテンシャルを変化させ、ポテンシャル障壁をさげることで、1次元ブラウン運動によってポテンシャル障壁を乗り越え、結合部位を前進方向へと変化させることに使われているかである。このモデルを支持するような研究報告が、単頭キネシン様モータータンパク質 kinesin-3 KIF1A で報告されている (Okada, Y. & Hirokawa, N. 1999, Okada, Y et al. 2003)。単頭の KIF1A が微小管から解離せずに平均 1  $\mu\text{m}$  も微小管のプラス端方向に運動することが報告された。KIF1A は他のキネシンと同様の微小管結合部位の他に、リジンに富むループ (K-loop と呼ばれ、+電荷を持つ) をもっていて、このループがチューブリンのグルタミン酸に富む C 末端 (E-hook と呼ばれ、-電荷を持つ) と相互作用する。この弱い静電的相互作用によってブラウン運動を1次元に制限し、微小管から解離せずにプロセッシブ性を高めていると考えることができる。実際、このループを欠損したり変異させたりした場合、プロセッシブ性が減少した。さらに単量体化させた従来型キネシン (そのままでは非プロセッシブ) の K-loop をリジン 6 個分だけ伸ばすと、KIF1A と同様にプロセッシブモーターに改変することができた (Okada and Hirokawa, 2000)。この時、KIF1A の移動ステップは ATP の加水分解と 1: 1 に対応しなかった。無負荷の時でさえ、1 ステップの間に数個の ATP が分解した。これらのことは、KIF1A の運動に、微小管に沿った拡散 (ブラウン) 運動が大きな役割を演じていることを示唆する。つまり、分子モーターは自らの構造変化だけでなくブラウン運動を巧みに利用して方向性をともなった運動を生み出しているというのがこのモデルの特徴である。

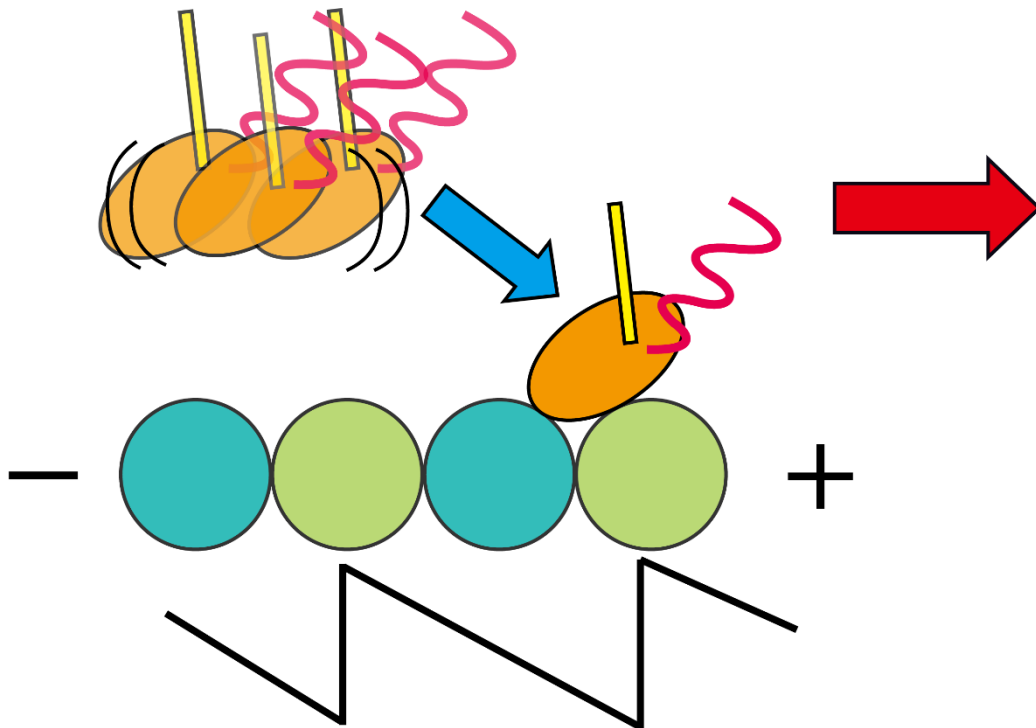


図 10. Brownian-ratchet model

モータータンパク質 (上)は非対称性のポテンシャル (下)の中をブラウン運動し、ATP 加水分解によりポテンシャルに応じて一方向 (矢印)に運動する。

これら、2 つの運動メカニズムは共に支持する結果が得られており、互いに背反するものではないと思われる。これらを統合した運動メカニズムが必要とされる。

## キネシン観察手法

モータータンパク質の研究において、その観察手法の発展は非常に重要であった。現在では、モータータンパク質の遺伝子を大腸菌内で発現させ、純粋なタンパク質を精製し、そのタンパク質の運動・構造を各種の観察手法により調べる、といった実験方法は一般的に行われている。ここでは、本研究で用いた観察手法について述べる。

## *In vitro* gliding 運動観察法

モータータンパク質の運動機能評価の手法として、*In vitro* gliding 運動観察法が 1980 年代に確立された。それまでは、モータータンパク質による細胞内の運動は、細胞内にビーズなどを入れ、モータータンパク質により運動させることで可視化していたが、コントラストや他のタンパク質の存在による雑音など、効率的な観察には不适当であった。対して、*In vitro* gliding 運動観察法では、生体試料から精製したモータータンパク質（キネシン、ミオシン、ダイニン等）をカバーガラス表面に非特異的に吸着あるいは特異的に結合させる。その後、細胞骨格（微小管やアクチンフィラメント）をそのモータータンパク質の表面に結合させ、エネルギー源である ATP を加えることにより、モータータンパク質による微小管の滑り運動を生じさせる。これを顕微鏡により観察する（図 11）。

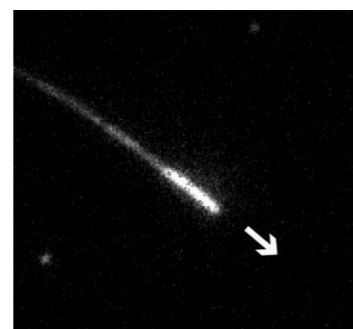
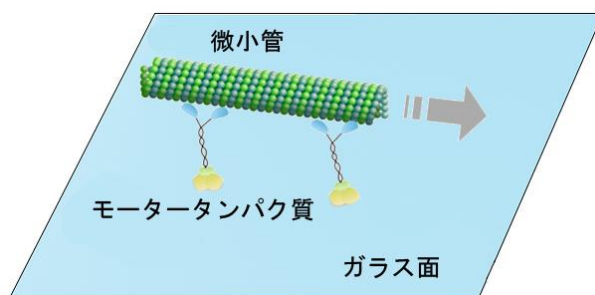


図 11. *In vitro* gliding 運動観察法の模式図と観察像

ガラス面に吸着（結合）させたモータータンパク質による微小管の滑り運動（左）。微小管滑り運動の蛍光顕微鏡画像（右）。

## クライオ電子顕微鏡法

クライオ電子顕微鏡法とは、高性能な透過型電子顕微鏡 (TEM: Transmission electron microscopy)を用いて、生体試料を凍らせ (氷に包埋)、低温 (-160~-270°C) のまま観察する方法である。クライオ電子顕微鏡の特徴は生体内の構造を染色することなく生理条件に近い構造を観察できる点である。クライオ電子顕微鏡法には目的に応じて主に二つの手法があり、細胞や組織などの生体試料の内部構造を立体的に観察することを目的とした電子線トモグラフィ法と、均一に精製された試料を用いて、微細構造を見ることを目的とした単粒子解析法がある。

## 電子線トモグラフィ

TEM で観察される画像は、投影像であり、厚み方向の情報が重なっている。この情報の重なった 2 次元の像から重なりを解消した 3 次元の像に再構築するのが電子線トモグラフィである。厚み方向に重なった像は、二枚の角度の違う投影像を使うことで立体視が可能になるが、試料の角度を変えつつ画像を取得し、投計算機上で立体像として再構成することで、厚み方向に分離したデジタルスライス像を得ることができ、より詳細な検討が可能になる。試料の厚みとしては 1 マイクロメートル以下のものに限定されるが、薄ければ薄いほどより細かな構造が再現される。

## 単粒子解析法

精製した生体分子複合体試料のクライオ電子顕微鏡像は、均一な形状をもつ粒子の様々な方向からの投影像になる。十分に多くの投影像を集めることにより可能な限りすべての方向からの投影像を観察し、それらを逆投影することで、もとの単粒子の立体構造を再構成するのが、単粒子解析法である。一般に、生体内ではタンパク質は多様な構造を取りえ、結晶化が難しいが、クライオ電子顕微鏡においては、近年の計算機技術の発展により、大量の粒

子像から立体構造を再構成をする過程で、構造の違う粒子をそれぞれ分類していくことが可能になり、それぞれの構造をより高分解能で得ることが可能になった。このことから、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析法は、結晶化が難しい多分子複合体試料の高分解能構造解析法として有効である。

近年、クライオ電子顕微鏡の解像度は向上しており、 $\alpha$ ヘリックスが同定できる  $6 \text{ \AA}$  を越えて、アミノ酸側鎖が同定できる  $3 \text{ \AA}$  以下も実現されている。この解像度では原子モデルはかなり精密に再構成可能である。 $6 \text{ \AA}$  程度の場合は  $\alpha$ ヘリックスを手がかりに既知の原子モデルをフィッティングすることが行われる。

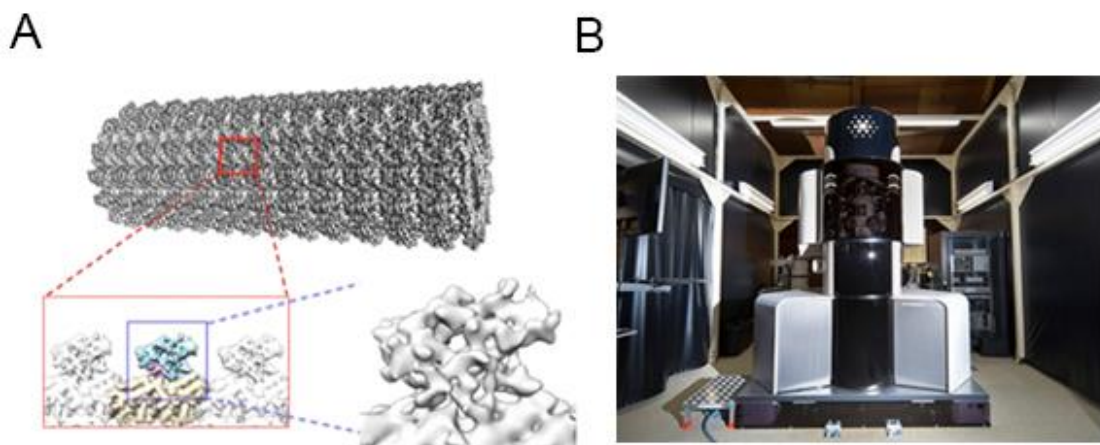


図 12. クライオ EM 像およびクライオ電子顕微鏡

([http://www.clst.riken.jp/ja/science/tech/cryo\\_microscopy/](http://www.clst.riken.jp/ja/science/tech/cryo_microscopy/)より一部改変)

(A) 多分子複合体 (微小管と微小管結合タンパク質)のクライオ EM 像

(B) クライオ電子顕微鏡装置 Tecnai Arctica (理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤センター)





## 本論文の概要

本論文では、キネシンが微小管上を運動する方向を決定するメカニズムの解明を目指し、まず第 1 章では、網羅的キメラキネシンおよび変異キメラキネシンの作製とその運動方向の観察および、X 線結晶構造解析およびクライオ EM 像構造解析を用いて、マイナスキネシン kinesin-14 の運動方向決定の分子メカニズムの解明を、続く第 2 章では、kinesin-1, kinesin-14 を始めとする多くの単量体キネシンの固定端を変えた運動観察を行うことで、全てのキネシンの運動方向は、全てのキネシンにおいて共通な構造を持つ **motor core** で決定されていることを示す。

## 第 1 章: kinesin-14 Ncd の運動方向決定する分子機構の解明

### 1.1. 序論

真核生物の細胞内では恒常性の維持をはじめ、細胞分裂・小胞輸送など様々な機能が空間的・時間的に制御されている。これらの制御は細胞小器官の配向や各種タンパク質成分の局在により実現されている。この局在は主にモータータンパク質と細胞骨格の協働により行われている。このモータータンパク質の 1 種であるキネシンは、イカの神経軸索流の順行性輸送を担うタンパク質として、1985 年にカルフォルニア大の Ronald Vale らによって初めて同定され、ギリシア語で「動く」という意味の“kinein”からキネシンと名付けられた (Vale et al., 1985)。キネシンのアミノ酸配列の同定以降、多くの真核生物において配列の相同性の高い同種のタンパク質が存在することが次々と明らかとなってきた。これらのキネシン様タンパク質を総称してキネシンスーパーファミリーという。これらキネシンスーパーファミリーに属するタンパク質の大きな特徴は、高いアミノ酸配列の相同性 (~40%) をもつ部位 (motor domain) の存在である。キネシンスーパーファミリーは、その配列の比較から 14 のサブファミリーに分けられている (Lawrence et al., 2004)。これらサブファミリーはそれぞれアミノ酸配列 (構造) による特徴を持つが、そのなかでも kinesin-14 サブファミリーに属するキネシンは、他のキネシンとは異なる大きな特徴を有している。kinesin-1 サブファミリーに属するキネシンに代表される他のキネシンは、motor domain がアミノ酸配列上の N 末側に位置し、主に微小管上をプラス端方向に運動するプラスキネシンであるのに対し (図 13A)、kinesin-14 は motor domain がアミノ酸配列上の C 末側に位置し、微小管上をマイナス端方向に運動するマイナスキネシンである (図 13B)。この kinesin-14 に属するモータータンパク質として主に研究されてきたのが、1990 年に発見されたショウジョウバエの Ncd である (McDonald et al., 1990; Walker et al., 1990)。

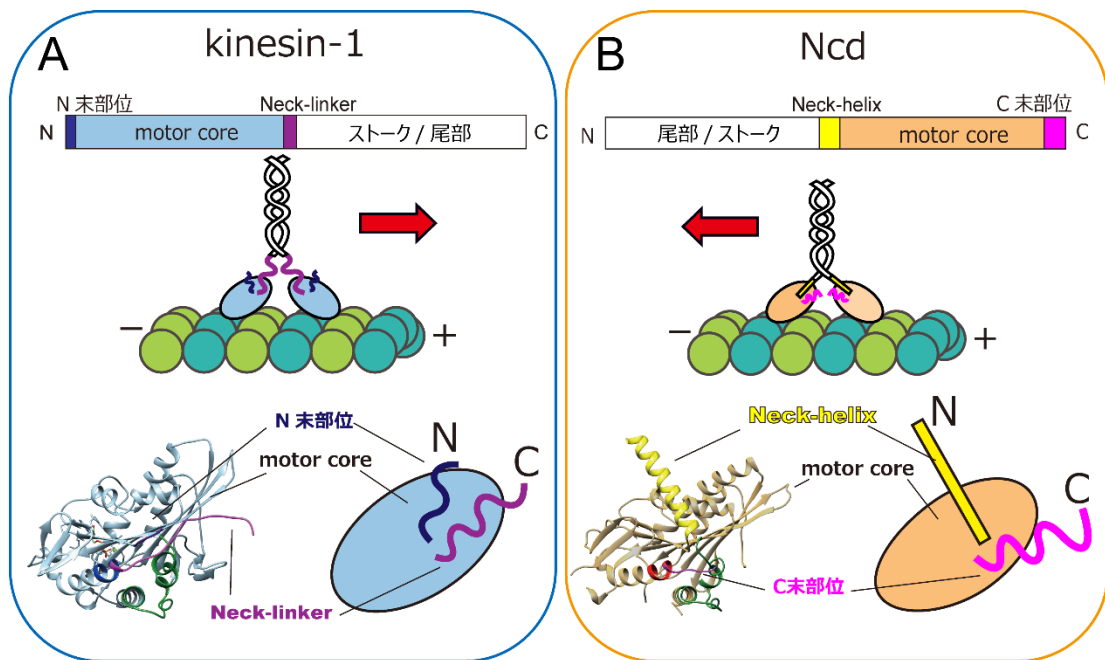


図 13. Kinesin-1 と Ncd のアミノ酸配列、運動方向および 3 次元構造 (リボンモデルと模式図)

(A) Kinesin-1 は motor domain がアミノ酸配列上の N 末側に位置している (上段)。

Kinesin-1 は微小管上をプラス端方向へ運動する (中央)。

Kinesin-1 motor domain の 3 次元構造 (リボンモデル) と模式図。Motor core (シアン) に対し、N 末端に N 末部位 (青色)、C 末端に neck 部位 (neck-linker) (紫色) がそれぞれ位置している (下段)。

(B) Ncd は motor domain がアミノ酸配列上の C 末側に位置している (上段)。

Ncd は微小管上をマイナス端方向へ運動する (中央)。

Ncd motor domain の 3 次元構造 (リボンモデル) と模式図。Motor core (オレンジ色) に対し、N 末端に neck 部位 (neck-helix) (黄色)、C 末端に C 末部位 (マゼンタ色) がそれぞれ位置している (下段)。

興味深いことに kinesin-1 と Ncd の motor core の結晶構造は、3 次元構造がほとんど同じであることが明らかになった (Kull et al., 1996; Sablin et al., 1996) (図 13)。構造が等しいが

運動方向が異なるということは、「構造 = 機能」と考えられているタンパク質の理解から外れている。そこで、Kinesin-1 と Ncd の運動方向の違いを生み出す機構の解明を目的とした研究が行われた。特に、キメラキネシンを用いた研究が 3 つ続けて行われた。これらのキメラキネシンの研究は、配列上で運動機能を有する motor domain のアミノ酸配列上の位置の違いに着目している。Kinesin-1 は motor domain をアミノ酸配列上の N 末側に有しているのに対し、Ncd は motor domain を C 末側に有していることから、motor domain の位置が運動方向を決定しているのではないかと考えられた。実際に、アミノ酸配列上の C 末側に位置する Ncd の motor domain (motor core + neck-helix)に、kinesin-1 の N 末側 (Neck-linker + ストーク部位)を融合させることにより、motor domain をアミノ酸配列上の N 末側に位置させたキメラキネシン ncd-Nkin は、微小管のプラス端方向に運動することが示された (Henningsen and Schliwa, 1997) (図 14)。

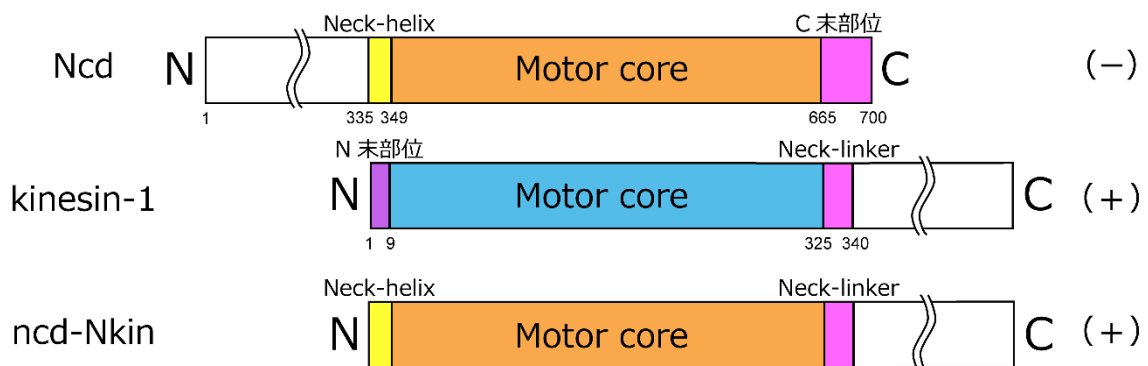


図 14. キメラキネシンの先行研究 1

Dm Ncd (上段)、Neurospora crassa kinesin-1 (中段)および、キメラキネシン ncd-Nkin (下段)のコンストラクト。ncd-Nkin: Ncd motor domain (333- 664 a.a.: Neck-helix + Motor core) + kinesin-1 C 末側 (321- 926 a.a.: Neck-linker + ストーク部位)

続いて行われたキメラキネシンの研究は、kinesin-1 と ncd の立体構造において相同性の高い motor core の外側に位置する、比較的相同性の低い部位 (neck 部位)に着目して行われた。マイナスキネシン Ncd の motor core に対し、Ncd の neck 部位 (Neck-helix)に相当するプラスキネシン kinesin-1 の neck 部位 (Neck-linker)を付加したキメラキネシン NK-1 は、微小管のプラス端方向に運動した (Case et al., 1997) (図 15)。

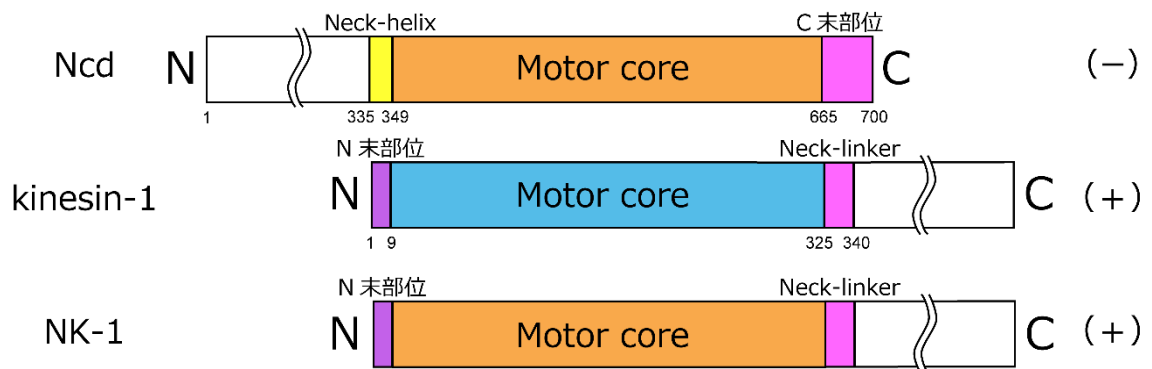


図 15. キメラキネシンの先行研究 2

Ncd (上段)、Human kinesin-1 (中段)およびキメラキネシン NK-1 (下段)のコンストラクト。NK-1:

kinesin-1 (1- 7 a.a.: N 末部位) + Ncd (348- 667 a.a.: motor core) + kinesin-1 (323- 560 a.a.: Neck-linker

+ ストーク部位)

更に、キメラキネシン NK-1 と同様な実験が kinesin-1 に対しても行われた。プラスキネシンである kinesin-1 の motor core にマイナスキネシン Ncd の neck 部位を付加したキメラキネシン NcdKHC1 は、微小管マイナス端方向に運動した (Endow and Waligora, 1998) (図 16)。

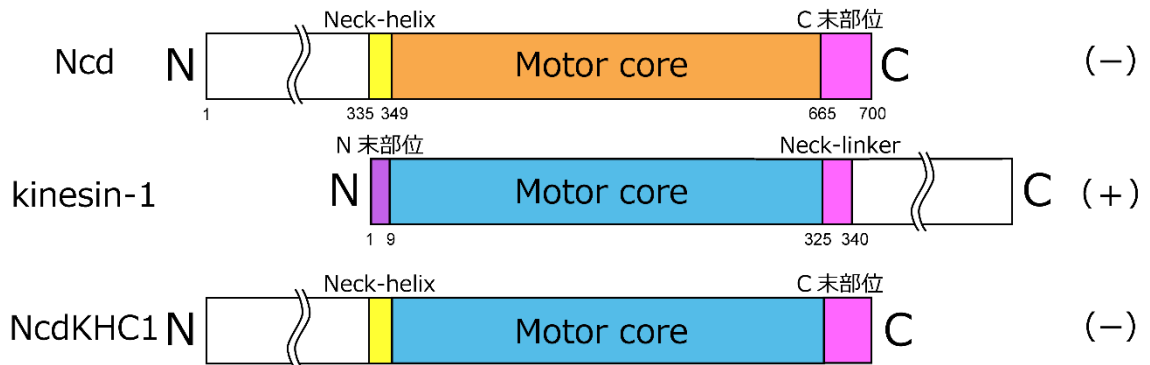


図 16. キメラキネシンの先行研究 3

Ncd (上段)、Drosophila kinesin-1 (中段)、キメラキネシン NcdKHC1 (下段)のコンストラクト。

NcdKHC1: Ncd (194- 348 a.a.: Neck-helix + ストーク部位) + kinesin-1 (13- 327 a.a.: motor core) +

Ncd (664- 700 a.a.: C 末部位)

以上のキメラキネシンを用いた研究より、motor domain のアミノ酸配列上の位置というよりも motor domain の外側の部位 (neck 部位)が運動方向を決定する部位であること、即ち、Neck-linker が微小管プラス端方向性を Neck-helix が微小管マイナス端方向性を決定する部位であるというモデルが提唱された (図 17)。

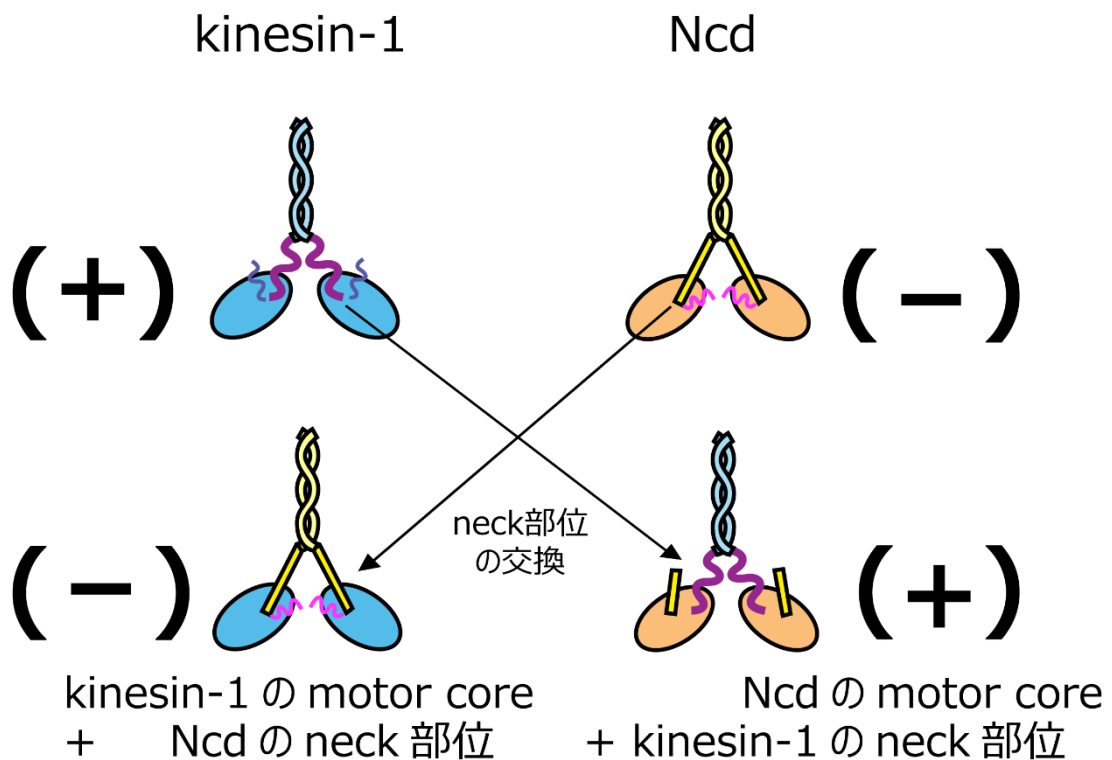


図 17. キメラキネシンの模式図

Neck 部位の入れ替えたのキメラキネシンの模式図。Kinesin-1 の neck 部位 (紫色)と Ncd の neck 部位 (黄色)をそれぞれ入れ替えたキメラキネシンは、運動方向がそれぞれ変化した。

neck 部位により運動方向が決定されるという可能性は、続く kinesin-1 と Ncd の運動メカニズムの研究によりさらに検証された。Kinesin-1 が微小管上をプラス端方向へ運動するメカニズムとしては、neck 部位 (neck-linker)が ATP サイクルに応じて微小管上のプラス端側に構造変化することで (neck-linker docking)、2 頭構造の他の一方を微小管のプラス端側に投げ出すことにより微小管プラス端方向へ運動する (Power-stroke モデル、図 9A)ことが、クライオ EM 像 (Rice et al., 1999)、1 分子運動観察 (Yildiz et al., 2004)により支持されてきた。対して、Ncd が微小管上をマイナス端方向へ運動するメカニズムとしては、neck 部位 (neck-helix)が微小管のプラス端側からマイナス端側に構造変化して傾くことで微小管マイナス端方向へ運動するメカニズム (power-stroke モデル、図 9B)が、クライオ EM 像 (Wendt et al.,



2002)などの実験を通して提唱されてきた。しかし、Ncd に関しては、その詳細な構造は得られておらず、この構造変化の分子メカニズムはいまだ検証されていない。

本研究では、先行研究で作成されたキメラキネシンを網羅的に作製し、それらの運動方向を調べた。その結果、先行研究とは異なり Ncd の微小管マイナス端方向の運動には Ncd の neck-helix のみではなく、Ncd の C 末部位も必要であることが判明した。さらに、この C 末部位 (40 a.a.)のどのアミノ酸が運動方向を逆転させるのに十分であるのかを調べ、C 末部位の基部 (motor core とのつなぎ目付近)の 5 残基を変えることにより運動方向が再度逆転することが判明した。続いて、neck-helix と C 末部位の基部がどのようにして微小管マイナス端方向への運動方向を決めているのか、また、その構造変化の分子メカニズムを解明するために、共同研究者 (仁田亮 博士、理化学研究所)とともにこのキメラキネシンの X 線結晶構造解析およびクライオ EM 像構造解析を行い、微小管のマイナス端方向への分子メカニズムの構造的基盤を明らかにした。

## 実験方法

### 1.1.1. 単量体キメラキネシンの作製

#### 1.1.1.1. 単量体キメラキネシンの DNA コンストラクト作製

ヒスチジンアフィニティータグ (His タグ)および大腸菌内でビオチン化される配列 GLNDIFEAQKIEWHE をコードした (AviTag)を N 末に付加したキネシンのコンストラクトを作製した。PCR により、制限酵素サイトと終止コドンを導入したキメラキネシンの配列を作製し、6xHis タグと AviTag を N 末側に付加するように改変した pColdIII ベクター (Takara #3363)とライゲーションさせた (図 18)。作製した plasmid はクローニング用細胞に形質転換し、コロニーPCR によりコンストラクトを確認、シーケンスにより配列を確認した。以下、DNA コンストラクト作製手順を大まかに記す。


#### PCR

ポリメラーゼ PrimeSTAR GXL (Takara #R050A)を使用し、キメラキネシンを作製すると共に、*EcoRI* および *XhoI* または *SphI* 制限酵素サイト、ストップコドン PCR した。

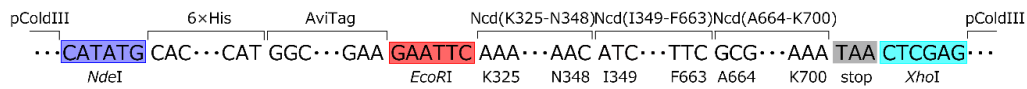
#### PCR 反応溶液

組成	使用量	ストック	備考
滅菌水	50 $\mu$ l に合わせた		
バッファー	10 $\mu$ l	x5	
dNTP mixture	4 $\mu$ l	200 $\mu$ M	
1 fmol 鋳型 DNA	1 $\mu$ l	1 fmol/ $\mu$ l	1 fmol/ $\mu$ l に希釈
0.5 $\mu$ M F プライマー	0.5 $\mu$ l	50 $\mu$ M	
0.5 $\mu$ M R プライマー	0.5 $\mu$ l	50 $\mu$ M	
ポリメラーゼ	1 $\mu$ l	1.25 U/ $\mu$ l	

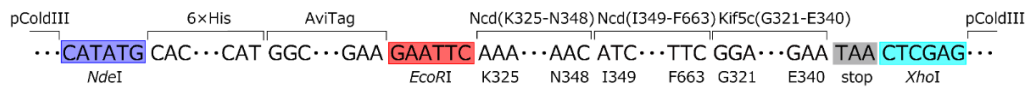
#### PCR 条件

segment1 (変性):	98°C, 10 秒	 x 30 サイクル
segment2: Step1. (解離):	98°C, 10 秒	
Step2. (アニーリング):	55°C, 15 秒	
Step3. (伸長):	68°C, 1~2 分	
segment3 (冷却):	4°C	

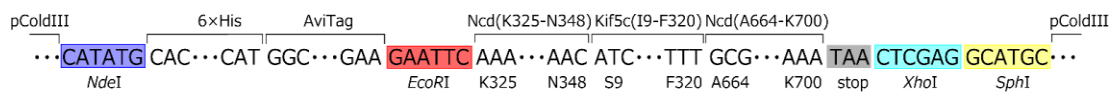
### nNn



### nNk



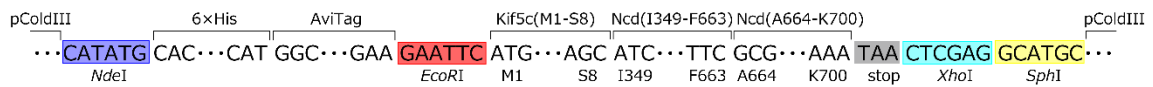
### nKn



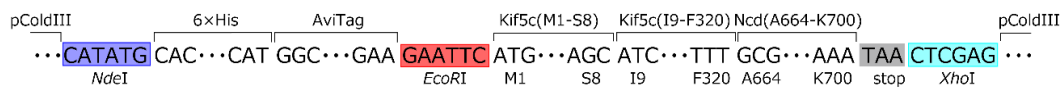
### nKk



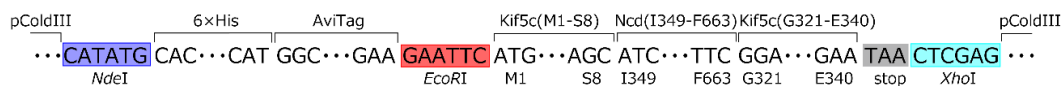
### kNn



### kKn



### kNk



### kKk

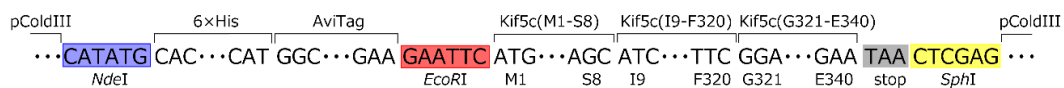


図 18. キメラキネシンの DNA コンストラクト

pColdIII ベクター (*NdeI* と *EcoRI* 制限酵素サイトの間に 6×Histag および AviTag が挿入されている)に *EcoRI* と *XhoI* または *SphI* サイトの間にキメラキネシンコンストラクトおよび stop コドン挿入した。

PCR 精製: DNA 精製スピнкаラム EconoSpin (ジーンデザイン # EP-11201)を使用し、Qiagen の手法 ([https://public.wsu.edu/~kahn\\_sci/Flow/E2-QIAprep\\_Miniprep\\_Handbook.pdf](https://public.wsu.edu/~kahn_sci/Flow/E2-QIAprep_Miniprep_Handbook.pdf))に従って、滅菌水 50  $\mu$ l で溶出した。以下、適時 DNA 濃度を微量サンプルガラスセル (SCINCO Nano Stick)を用いて吸光度計 (Shimadzu UV-1800)で計測した。

#### 制限酵素処理

PCR 産物および改変した pColdIII ベクターを *EcoRI* と *XhoI* または *SphI* で 37°C, 4 時間制限酵素処理した。

#### PCR 産物

組成	使用量	ストック
滅菌水	50 $\mu$ l に合わせた	
バッファー	5.3 $\mu$ l	×10
1~ 4 $\mu$ g PCR 産物	40~ 47 $\mu$ l	
20U <i>EcoRI</i>	1 $\mu$ l	20 U/ $\mu$ l
20U <i>XhoI/SphI</i>	1 $\mu$ l	20 U/ $\mu$ l

#### pColdIII ベクター

組成	使用量	ストック
滅菌水	50 $\mu$ l に合わせた	
バッファー	5.3 $\mu$ l	×10
~ 2 $\mu$ g pColdIII ベクター	44 $\mu$ l	
10U <i>EcoRI</i>	0.5 $\mu$ l	20 U/ $\mu$ l
10U <i>XhoI/SphI</i>	0.5 $\mu$ l	20 U/ $\mu$ l

#### 電気泳動・ゲル切り出し

1% アガロースゲル (DNA 染色試薬 GreenView (リライオン #N100) 1/20,000 量添加)を用いて 100 V, 30 分間で電気泳動した。

### 1%アガロースゲル 60 ml

組成	使用量	ストック	備考
1%アガロース	0.6 g	×10	Agarose S (ニッポンジーン # 312-01193)
TAE	60 ml		

ゲル精製: ゲル精製スピнкаラム EconoSpin (ジーンデザイン # EP-11201)で処理し、

Qiagen の手法 ([https://public.wsu.edu/~kahn\\_sci/Flow/E2-](https://public.wsu.edu/~kahn_sci/Flow/E2-)

QIAprep\_Miniprep\_Handbook.pdf)に従って、滅菌水 20  $\mu$ l で溶出した。

### ライゲーション

リガーゼ Quick Ligation Kit (NEB # M2200)を用いてライゲーションを行った。ベクターは~30 fmol, インサートはベクターとモル比で 10: 1 程度になるようにした。全体量が 10  $\mu$ l になるように滅菌水で調整した。

コントロールとして下記のように、コントロール 1 (インサートなし)、コントロール 2 (インサートとリガーゼなし)を用いた。

### ライゲーション反応条件

	インサート	ベクター	リガーゼ
サンプル	300 fmol	30 fmol	1 $\mu$ l
コントロール 1		30 fmol	1 $\mu$ l
コントロール 2		30 fmol	

25°C, 15 分間反応させた。

### 形質転換

- コンピテントセル NovaBlue (Novagen #69825) 100  $\mu$ l × 3 を氷上で解凍した。
- コンピテントセル 100  $\mu$ l にライゲーション産物を加え 氷上で, 40 分間静置した。
- 42°C, 45 秒間静置した。

- d. 氷上で, 2 分間静置した。
- e. 37°Cに予熱した LB 培地 1 ml を加え、37°C, 30 分間静置した。
- f. 卓上遠心機 (Eppendorf minispin plus)を用いて、6 krpm で 1 分間遠心した。
- g. 少量を残して上清をすて、懸濁させた
- h. LB プレートにまき 37°C, 一晚静置した。
- i. コロニー数がサンプルにおいてコントロール 1、2 よりも十分 (10 倍~)多いことを確認した。


### コロニーPCR

- a. 形質転換プレートからシングルコロニーを~8 個拾い、LB プレート (マスタープレート)に植え、同時にコロニーPCR を行った。コロニーPCR 用ポリメラーゼ Taq polymerase (NEB # M0267)を使用した。プライマーは PCR に用いたプライマーセットを用いた。

### コロニーPCR 反応溶液 20 µl

試薬	使用量	ストック	備考
滅菌水	17.4 µl		
ポリメラーゼ	0.1 µl		
バッファー	2 µl	×10	
0.5 µM F プライマー	0.25 µl	50 µM	
0.5 µM R プライマー	0.25 µl	50 µM	
コロニー			チップの先でつつき、ピペッティング

### PCR 条件

- segment1 (変性): 98°C, 10 秒間
  - segment2: Step1. (解離): 98°C, 10 秒間
  - Step2. (アニーリング): 55°C, 30 秒間
  - Step3. (伸長): 68°C, 1~2 分間
  - segment3 (冷却): 4°C
- 

- b. 電気泳動でインサートが入っているコロニーを確認した。

**目的 DNA コンストラクトが挿入されたベクターの精製**

- a. マスタープレートからインサートの入っているコロニーを拾い、LB 培地 2 ml を用い、37°C, 200 rpm で 14 時間培養した。
- b. DNA 精製スピнкаラムを使用し、Qiagen の手法 ([https://public.wsu.edu/~kahn\\_sci/Flow/E2-QIAprep\\_Miniprep\\_Handbook.pdf](https://public.wsu.edu/~kahn_sci/Flow/E2-QIAprep_Miniprep_Handbook.pdf))に従って、ミニプレップした。
- c. 約 200~ 400 ng/μl のプラスミドを得た。

**シーケンス**

- a. 下記の pCold 用 F/R プライマーでシーケンス (Eurofin Genomics 社のシーケンスサービス)にかけた。

pCold 用 F プライマー: 5'- CGTTGATACCCCTCGTAGTG -3'

pCold 用 R プライマー: 5'- ACGCGATCGATTATTTATTTTCCTG -3'

**シーケンス溶液 21 μl**

組成	使用量	ストック
滅菌水	21 μl に合わせた	
600~ 900 ng DNA	1.5~ 4.5 μl	200~ 400 ng/μl
プライマー	2 μl	5 μM

- b. シーケンス結果をアライメントソフトウェア CLC Sequence Viewer (CLC bio)を用いて確認した。

### 1.1.1.2. 単量体キメラキネシンの形質転換

作製したプラスミドを発現用大腸菌株 (ビオチンリガーゼ共発現細胞)に形質転換した。

#### 1.1.1.2.1. ビオチンリガーゼ共発現細胞の作製

AviTag を持つモータータンパク質を十分にビオチン化するためには、大腸菌の内在性のビオチンリガーゼでは不十分である。そこで、ビオチンリガーゼを発現するプラスミド (BirA プラスミド) を発現細胞に導入し、共発現することで、AviTag を十分にビオチン化する発現用細胞を作製した。

まず、BirA プラスミドを保持する大腸菌株 (XL-Blue)から BirA プラスミドを取得し、これを発現用株 BL21star(DE3)に導入し、クロラムフェニコールで選別をかける。できたコロニーからコンピテントセルを作製した。コンピテンシーを確認した。手法は、村松正実, 岡山博人 (1991), 「実験医学 別冊 遺伝子工学ハンドブック」, p. 46~51, 羊土社を参考とした。

以下、共発現 発現用細胞の作製と形質転換の手順を大まかに記す。

#### **BirA plasmid の取得**

- a. Electrocompetent cell of E.coli Strain AVB99 (Avidity #EVB99)を培養・ミニプレップし、電気泳動・ゲル切り出しを行い、BirA プラスミド (7,901 bp)を抽出した。
- b. 切り出されたプラスミドを PCR で増幅した。

#### **形質転換**

- a. 発現用コンピテントセル BL21star (DE3) (Invitrogen # C6010-03 ) 100 µl を氷上で解凍した。
- b. コンピテントセルに BirA プラスミド 5 µl を加え 氷上で、30~分間静置した。



- c. 42°C, 45 秒間静置した。
- d. 氷上で, 2 分間静置した。
- e. 37°Cに予熱した LB 培地 1 ml を加え、37°C, 40 分間静置した。
- f. 卓上遠心機 (Eppendorf minispin plus)を用いて 7 krpm, 1 分間遠心した。
- g. 少量を残して上清をすて、懸濁させた
- h. LB プレート (アンピシリンなし、クロラムフェニコールなし)にまき 37°Cで一晩静置した。

#### 2nd selection

- a. plate から再度別の LB プレート (アンピシリンなし、17 µg/ml クロラムフェニコール) に数コロニー分をリストークした。
- b. 10~15 個のコロニーを拾い、17 µg/ml クロラムフェニコールを添加した SOB 培地 250 ml で培養した。 18°C, 120 rpm で振盪した。
- c. 適時、濁度計 (Shimadzu UV-1800)を用いて濁度を計測し、OD<sub>600</sub>= 0.4 ~0.8 になるまで ~50 時間培養した。
- d. 氷上で, 10 分間静置した後, 50 ml チューブ (滅菌)×5 に分けた。
- e. 遠心機 (KUBOTA 6500)および遠心ローター (AG508AC)を用いて、4,800 rpm (3,090×g)、4 °Cで 10 分間遠心した。
- f. 上清を捨て、0°C (氷水)に予冷した TB バッファー 84 ml で懸濁し、氷上で, 10 分間静置した。

### TB バッファー (pH 6.7) 500 ml

組成	使用量	ストック
10 mM PIPES	1.5 g	
15 mM CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.1 g	
250 mM KCl	9.3 g	
55 mM MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	5.45 g	
脱イオン水	500 ml に合わせた	

- g. 遠心機 (KUBOTA 6500)および遠心ローター (AG508AC)を用いて、4,000 rpm (2,090×g)、4 °Cで 10 分間遠心した。
- h. 上清を捨て、0°Cに予冷した TB バッファー 40 ml で懸濁し、氷上で、10 分間静置した。
- i. DMSO 3 ml (7%)を加え、氷上で、10 分間静置した。
- j. 100 µl ずつ分注し、液体窒素で凍結させ、-80°Cで保存した。

### コンピテンシー確認

- a. ビオチンリガーゼ共発現細胞 100 µl ×2 を氷上で解凍した。
- b. 50 µl ×4 に分け、コントロール用プラスミド (5,547 bp) を希釈し 100 ng, 10 ng, 1 ng, 0.1 ng をそれぞれ加え 氷上で、30 分間静置した。
- c. 42°C, 45 秒間静置した。
- d. 氷上で、2 分間静置した。
- e. 37°Cに予熱した LB 培地 0.5 ml を加え、37°C, 40 分間静置した。
- f. 卓上遠心機 (Eppendorf minispin plus)を用いて、6 krpm で 1 分間遠心した。
- g. 少量を残して上清をすて、懸濁させた
- h. LB プレート (17 µg/ml クロラムフェニコール、100 µg/ml アンピシリン)にまき 37°C, 一晚静置した。
- i. コロニー数: 100ng: 無数, 10ng: 無数, 1ng: 504 個, 0.1ng: 45 個を得た。

j. コンピテンシーは  $5 \times 10^5$  cfu/ $\mu$ g となった。

#### 1.1.1.2.2. ビオチンリガーゼ共発現細胞の形質転換

- a. LB プレートに 17  $\mu$ g/ml のクロラムフェニコールを適量塗布した。
- b. ビオチンリガーゼ共発現コンピテントセル 100  $\mu$ l に、各キメラキネシンのプラスミド 1 ng を加え 氷上で、30 分間静置した。
- c. 42°C, 45 秒間静置した。
- d. 氷上で、2 分間静置した。
- e. 37°C に予熱した LB 培地 0.5 ml を加え、37°C, 40 分間静置した。
- k. 卓上遠心機 (Eppendorf minispin plus) を用いて、6 krpm で 1 分間遠心した。
- f. 少量を残して上清をすて、懸濁した。
- g. プレート (LBGA+17  $\mu$ g Cam 100  $\mu$ l) にまき 37°C, o/n 静置した。

#### 1.1.1.3. 単量体キメラキネシンの精製

本研究で用いたモータータンパク質は全て 6xHistag と AviTag を付加したタンパク質である。大腸菌での過剰発現はビオチンリガーゼ共発現で行った。精製は 2 段階で行い、粗精製は AKTA システムで Histag アフィニティーカラムを用い、精製はモータータンパク質と微小管とのヌクレオチド状態依存的な結合・解離の性質を用いた精製 (微小管アフィニティー精製) をバッチ処理で行った。各単量体キメラキネシンはそれぞれ、独立に 1~ 3 回精製を行った。以下、精製の手順を大まかに記す。

#### 培養・誘導

- a. 前培養: 形質転換したプレートまたは、グリセロールストックから 30 ml LB 培地にリストックし、振盪機 (TAITEC BR-21FP) で 37°C, 11~12 時間培養した。

#### 前培養用培地 30 ml

組成	使用量	ストック
LB 培地	26 ml	
1% (w/v) グルコース	0.75 ml	40%
20 mM phosphate-KOH (pH 7.4)	3 ml	200 mM
100 µg/ml Carbenicillin	30 µl	100 mg/ml
17 µg/ml Chloramphenicol	15 µl	34 mg/ml

- b. 本培養: 前培養した培地を 500 ml 培地に移し、振盪機 (TAITEC BR-300LF) で 37°C、濁度 OD<sub>600</sub> が 0.4 ~ 0.6 になるまで (約 30 分間) 培養した。

#### 本培養用培地 500 ml

組成	使用量	ストック	備考
LB 培地	450 ml		500 mL 分として調製
20 mM K-Pi (pH 7.4)	50 ml	200 mM	
100 µg/ml Ampicillin	500 µl	100 mg/ml	
17 µg/ml Chloramphenicol	250 µl	34 mg/ml	

- c. 冷却: 氷水に浸し、培地を急冷した。15°C まで下がった後 30 分間静置した。
- d. 誘導: 培地に以下の試薬を加え、振盪機で 15°C, 24 時間誘導した。

組成	使用量	ストック	備考
培養液	550 ml		
0.1 mM IPTG	55 µl	1 M	
50 µM ビオチン	6.0 mg		MW: 244.31

#### 集菌・破碎

- a. 培地を 250ml 遠心チューブに分ける。
- b. 低速遠心機 (Hitachi Himac CR20E) およびローター (R14AF) を用いて 4,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心した。

- c. 上清を捨て、沈殿を懸濁バッファーで懸濁する。

**懸濁バッファー 1000 ml**

組成	使用量	ストック
20 mM K-Pi (pH 7.4)	100 ml	200 mM
4 mM MgCl <sub>2</sub>	4 ml	1 M
1 mM EGTA	5 ml	0.2 M
脱イオン水	1000 ml に合わせた	

- d. 遠心機 (KUBOTA 6500)およびローター (AG508CA)を用いて 6,000 rpm (4,830×g), 5 分間、4°Cで遠心する。
- e. 懸濁バッファーで再懸濁した。
- f. 遠心機 (KUBOTA 6500)およびローター (AG508CA)を用いて、6,000 rpm (4,830×g), 5 分間、4°Cで遠心した。
- g. 破碎バッファーで懸濁した。

破碎バッファー 20 ml

組成	使用量	ストック	備考
1 × BRB80 (pH 6.8)	4 ml	× 5	
500 mM NaCl	2 ml	5 M	
10% グリセロール	2 ml	100%	
0.1% CHAPS	200 µl	10%	
5 mM ATP	200 µl	100 mM	
5 mM MgCl <sub>2</sub>	100 µl	1 M	
0.1% Tween20	20 µl	100%	
2 mM DTT	20 µl	1 M	
1 mM AEBSF	50 µl	400 mM	
5 µg/ml Aprotinin (0.34 µM)	90.9 µl	1.1 mg/ml	
3 µg/ml PepstatinA (14.6 µM)	12 µl	5 mg/ml	
3 µg/ml Leupeptin (21 µM)	12 µl	5 mg/ml	
3 µg/ml Antipain (2.4 µM)	12 µl	5 mg/ml	
0.1 mg/ml Lysozyme	200 µl	10 mg/ml	PBS 50% グリセロール
MilliQ			20 ml に合わせた

- h. 超音波破碎機 (TOMY UD-201 (TP-040 チップ))で強度: 4, ON/OFF レート: 30/70, 15 分間ソニケーションを掛けた。
- e. 100.4 遠心チューブ (Beckman)に分けた。
- i. 遠心機 (Beckman Optima TLX)およびローター (TLA-100.4)を用いて、75 krpm (305 k×g), 2°Cで 20 分間遠心した。
- j. 上清を 50ml チューブに取り、5%B (50 mM Imidazole)に合わせるため、100%B を 1/20 量加えた。

5% B 溶液 10 ml

組成	使用量	ストック	備考
100%B	0.5 ml	100%B	
0%B		0%B	10 ml に合わせた

### Ni<sup>2+</sup>アフィニティー精製

a. AKTA (GE AKTA purifier 10)により精製を行った。

スーパーループの下側(メモリ小)を上にしてサンプル充填し、5%B 3 ml 程度を上静かに乗せ、泡を吸い取る。スーパーループの蓋を閉め、injection で 0.5 ~1 ml/min 液送り、上から気泡が完全に抜けたら止める。

条件: Histrap HP 1ml (GE #17-5247)を 5%B で平衡化、サンプル量: 20 ml

洗浄: 5%B, 10~15 カラムボリューム, 流速: 1.0 ml/min, フラクションサイズ 4 ml

溶出: Stepwise 様式: 5%→25%, 流速: 1 ml/min, フラクションサイズ 1 ml

最後は 100%B で wash

### I0 バッファー(pH 7.4) 1000 ml

組成	使用量	ストック	備考
50 mM K-Pi (pH7.4)	250 ml	0.2 M	
350 mM NaCl	20.46 g	FW: 58.44	
1 mM MgCl <sub>2</sub>	1 ml	1 M	
100 μM ATP (pH7.4)	1 ml	100 mM	
1 mM DTT	1 ml	1 M	
MilliQ	1000 ml にメスアップ		フィルター後脱気した
0.025% Tween20	250 μl	100%	

### I1000 バッファー (pH 7.4) 500 ml

組成	使用量	ストック	備考
1 M IMD	34.05 g	MW: 68.1	
50 mM K-Pi (pH7.4)	125 ml	0.2 M	
350 mM NaCl	10.227 g	FW: 58.44	
1 mM MgCl <sub>2</sub>	500 μl	1 M	
100 μM ATP	500 μl	100 mM	
1 mM DTT	0.5 ml	1 M	
MilliQ	500 ml にメスアップ		フィルター後脱気した
0.025% Tween20	125 μl	100%	

- b. AKTA の波形ピークのフラクションを 1 ~ 8 ml 分ブールした。

**濃縮**

濃縮スピンカラム Amicon ultra-2 30K (Millipore #UFC203024)を用いて、1 ml 強に濃縮した。

**脱塩処理**

- a. 脱塩カラム (GE Hitrap Desalting #17-1408-5) (8% D1000 buffer = 80 mM NaCl で溶出)

sample loop 1ml を使用。2.5ml ガラスシリンジで取る。

条件: 溶出濃度: 8%B, 流速:1 ml/min, フラクションサイズ: 0.5 ml

**D0 バッファー 1000 ml**

組成	使用量	ストック	備考
20 mM K-Pi (pH7.4)	100 ml	0.2 M	
1 mM MgCl <sub>2</sub>	1 ml	1 M	
20 μM ATP	200 μl	100 mM	
1 mM DTT	1 ml	1 M	
MilliQ	メスアップ		フィルター後脱気した

**D1000 バッファー 500 ml**

組成	使用量	ストック	備考
1 M NaCl	29.22 g	FW: 58.44	
20 mM K-Pi (pH7.4)	50 ml	0.2M	
1 mM MgCl <sub>2</sub>	500 μl	1M	
20 μM ATP	100 μl	100 mM	
1 mM DTT	500 μl	1 M	
MilliQ	メスアップ		フィルター後脱気した



- b. AKTA の波形ピークのフラクション 2.5 ml をプールした。

微小管アフィニティー精製

- a. プールした溶液および以下の試薬を混合し、モータータンパク質と微小管とを AMP・PNP 状態で結合させた。室温で 15 分間静置した。

組成	使用量	ストック
MB	3000 $\mu$ l に合わせた	
1 mM AMP-PNP	30 $\mu$ l	100 mM
sample	2500 $\mu$ l	
MT	500 $\mu$ l	68 $\mu$ M

- b. 遠心機 (Beckman Optima TLX) およびローター (TLA-100.4) を用いて、75 krpm (305 kxg), 20 分間, 23°C で遠心した。
- c. 上清を捨て、沈殿を Taxol を加えた MB で洗浄した後、以下の試薬を加え、懸濁させ、100.2 チューブに移した。室温、10 分間静置した。

組成	使用量	ストック
MB	120 $\mu$ l	
70 $\mu$ M Taxol	5.25 $\mu$ l	2 mM
10 mM ATP	15.6 $\mu$ l	96 mM
10 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5 $\mu$ l	1 M
250 mM K-Ace	15 $\mu$ l	2.5 M

- d. 遠心機 (Beckman Optima TLX) およびローター (TLA-100.4) を用いて、75 krpm (305 kxg), 20 分間, 23°C で遠心した。
- e. 上清を分注し、液体窒素中で保存した。

#### 1.1.1.4. 単量体キメラキネシンのタンパク質評価

##### 1.1.1.4.1. SDS-PAGE 電気泳動

精製して得られたタンパク質の分子量と純度を SDS-PAGE 電気泳動により確認した。

SDS-PAGE は Laemmli の方法 (Laemmli, 1970)を用いた。泳動後 CBB で染色し、脱色後、分子量と純度を確認した。以下、電気泳動の手順を大まかに記す。

- a. ガラス板 1 組、パッキン、コームを 70% EtOH で拭いた。
- b. ガラス板を組み立てる (クリップが土台となるようにスペーサーに上から押える)  
コームを差し込み、コーム下 1 cm 程度の位置にマジックでしるしをつた。
- c. ミニビーカーに分離ゲルと濃縮ゲル (TEMED はまだ加えない)を調製した。

##### 10% polyacrylamide 分離ゲル (1 枚あたり)

組成	使用量	ストック
MilliQ	2.805 ml	
10% acrylamide mix	2.333 ml	30%
375 mM Tris-HCl (pH8.8)	1.75 ml	1.5 M
0.1% SDS	70 $\mu$ l	10%
0.05% APS	35 $\mu$ l	10%
TEMED	7 $\mu$ l	

##### 10% polyacrylamide 濃縮ゲル (1 枚あたり)

組成	使用量	ストック
MilliQ	1.7 ml	
5% acrylamide mix	0.5 ml	30%
125 mM Tris-HCl (pH6.8)	0.75 ml	0.5 M
0.1% SDS	30 $\mu$ l	10%
0.05% APS	17.5 $\mu$ l	10%
TEMED	3 $\mu$ l	

- d. 分離ゲルをコーム下 1 cm まで泡が立たないように流し込んだ。1ml ピペットマンで MilliQ 水を静かに重層し、30~40 分間静置した。
- e. ゲルが固まっていることを確認して、MilliQ 水をデカントで捨て、ろ紙でゲル上の水分を除去した。
- f. ミニビーカーに濃縮ゲルを調製し(TEMED を加える)、流し込む。コームを水平に差し込み、20~30 分間静置した。
- g. ゲルが固まったら脱イオン水ですすぎながらコームを抜き、クリップを外し、パッキンをとる。
- h. 下泳動槽に 1x泳動バッファーを入れ、ガラス板を凹面が内側になるように泳動槽にセットし、クリップで固定した。

#### 10x泳動バッファー 2 L

組成	使用量	ストック
250 mM Tris	60.5 g	
1.92 M グリシン	288.2 g	
1% (w/v) SDS	20 g	100%
MilliQ	2 L に合わせた	

- i. 上泳動槽に泳動バッファーをウェルが十分に浸る程度に入れた。
- j. ピペットマンでウェル内部をクリーニングした。
- k. ウェルにサンプルをアプライした。
- l. 電源装置 (ATTA #AE-8135)を用いて、定電流モードで 300 V, 40 mA の電流を 50 分間流した。
- m. 色素のラインがゲル板の下まで行ったら電源を切った。
- n. 染色ボックス内にゲルを入れ、脱イオン水で濯ぎ、電子レンジで 1.5 分間 (沸騰する寸前まで)加熱した後、脱イオン水で濯いだ。これを 2 回繰り返した。

- o. CCB 染色液 Quick CBB PLUS (Wako # 178-00551)を加え、電子レンジで 30 秒間加熱した後、10 分間程度振盪した。
- p. 脱イオン水に置き換え、一晚、振盪脱色した。

#### 1.1.1.4.2. タンパク定量

タンパク質の濃度は Bradford 法により求めた。BSA 標準曲線を作製し、Bradford 試薬にタンパク質試料を加え、595 nm における吸光度を測定し、標準曲線により定量した。

##### 1.1.1.4.2.1. BSA 標準曲線の作成

BSA 溶液 (Thermo #23209)を MilliQ で希釈し、希釈系列溶液を調製した。Bradford 試薬 (BioRad #500-0006JA) 600  $\mu$ l に対し、希釈系列溶液 10  $\mu$ l を加え、分光光度計 (Shimadzu UB-1800)のタイムスキャン計測により吸光度 A595 のピーク(5~10min 後)を計測した。計測値を横軸に、加えた BSA 濃度を縦軸にプロットし、2 次式で近似することにより標準曲線を得た。

##### 1.1.1.4.2.2. タンパク質試料の濃度定量

Bradford 試薬 600  $\mu$ l に対し、タンパク質試料 10  $\mu$ l を加え、分光光度計のタイムスキャンにより吸光度 A595 のピーク(5~10 分後)を計測した。計測値を標準曲線の 2 次式に代入することで、濃度を得た。

#### 1.1.2. 微小管の調製

##### 1.1.2.1. チューブリンの精製

微小管の重合に用いるチューブリンは Weingarten の方法によりブタ脳から精製した (Weingarten et al., 1975)。ブタ脳から血管や脳膜を除去してから破碎・遠心し、37°C での微

小管重合および 4°C での微小管脱重合を 2 回繰り返す、さらに、phosphocellulose カラムにより精製し、液体窒素中に保存した。以下、チューブリン精製の手順を大まかに記す。

**buffer 作成**

**Buffer1(脳破碎用) 500 ml**

組成	使用量	ストック
100 mM PIPES-KOH pH 6.9	50 ml	1 M
0.5 mM MgCl <sub>2</sub>	250 μl	1 M
2 mM EGTA	5 ml	0.2 M
0.1 mM EDTA	250 μl	0.2 M
1 mM ATP gradell	5 ml	100 mM
0.1 mM GTP	500 μl	100 mM
1 mM DTT	500 μl	1 M
5 μM 3, 4 DCI	250 μl	10 mM
10 μg/ml Leupeptin	1 ml	5 mg/ml
10 μg/ml PepstatinA	1 ml	5 mg/ml
1.2 μg/ml Aprotinin	545 μl	1.1 mg/ml
0.2 mM PMSF	500 μl	200 mM

**Buffer2 (pH 6.9) 50 ml**

組成	使用量	ストック
100 mM PIPES-KOH pH 6.9	5 ml	1 M
0.5 mM MgCl <sub>2</sub>	25 μl	1 M
2 mM EGTA	0.5 ml	0.2 M
0.1 mM EDTA	25 μl	0.2 M
0.1 mM GTP	50 μl	100 mM
4 mM DTT	200 μl	1 M
5 μM 3, 4 DCI	25 μl	10 mM
10 μg/ml Leupeptin	100 μl	5 mg/ml
10 μg/ml Pepstatin A	100 μl	5 mg/ml
1.2 μg/ml Aprotinin	54.5 μl	1.1 mg/ml

**Buffer3 (pH 6.9) 4500 ml**

組成	使用量	ストック
50 mM PIPES-KOH pH6.9	225 ml	1 M
1 mM EGTA	22.5 ml	0.2 M
0.2 mM MgCl <sub>2</sub>	900 $\mu$ l	1 M
MilliQ	4500 ml に合わせた	

Buffer3 を 3000 ml (カラム作製用), 1000 ml (平衡操作用), 500 ml (精製用)に分け、1000 ml と 500 ml はフィルター・脱気にかける。

使用前に 100 mM GTP 300  $\mu$ l (カラム作製用) (0.01mM GTP), 100 $\mu$ l (平衡操作用) (0.01mM GTP), 500  $\mu$ l (精製用) (0.1 mM GTP)を各々加える。

**PC カラム作製**

- a. カラム (XK26 20cm)を組み立て、MilliQ で満たし、実際に AKTA で圧力をかけ、カラムの液漏れ等の確認をした。
- b. 樹脂 Whatman P11 10 g を量り取った。
- c. 0.5 M NaOH 250 ml を 1L ビーカーに入れ、その中に樹脂を入れ、素早くよくかき混ぜ、5 分間静置した。
- d. なるべく上澄みを捨てて、2L ビーカーに一杯に入れた脱イオン水に移してから漏斗に注いだ。
- e. 吸引しながら脱イオン水を 4.5 L 注ぐ、pH が 11 以下になるまで続ける。
- f. 0.5 N HCl 500 ml に樹脂を入れ、5 分間静置する。
- g. 吸引しながら脱イオン水を 3L 注ぐ、pH が 3 以上になるまで続ける。
- h. 吸引しながら Buffer3 (カラム作製用)を~2L 注ぐ、pH が 5.5 以上になるまで続ける。
- i. 500ml tall ビーカーに移し変える。低温室で 1 時間程度、静置する。
- j. 上澄みを 10ml ディスポーザブルピペットでできる限り捨てる。

- k. AKTA に上蓋のみ接続し、下蓋にはキャップをした。十分に沈殿してから上蓋を閉める (通常、上部のフィルター部分とカラムの間に溶液の隙間ができる。)カラムの上部(赤)を反時計まわりに回し、棒の上部のねじ(黒)を同様に緩め、黒い取っ手をおして棒の部分を自動的におろす。2 度ほど行った (各 10 分間程度)。取手を放さずカラム上部の黒い部分を時計回りに回して締める。取手を放す。カラム本体との接触部分を閉める。もう一度棒についている黒いねじを締める。
- l. 0.5 ml/min の流速で Buffer3 (平衡用)を一晩、流し続ける。
- m. Day2 の AKTA 使用前にカラムに 1 ボリューム分 Buffer3 (0.1 mM GTP)を流す。

**チューブリン精製**

- a. 発砲スチロール容器(大)× 1 に氷をいれ、豚脳を取りに行く。
- b. 以下の試薬を **Buffer1** 500 ml に加えた。

組成	使用量	ストック	備考
1 mM ATP	5 ml	100 mM	
0.1 mM GTP	500 $\mu$ l	100 mM	
1 mM DTT	500 $\mu$ l	1 M	
5 $\mu$ M 3, 4 DCI	250 $\mu$ l	10 mM	
10 $\mu$ g/ml Leupeptin	1 ml	5 mg/ml	
10 $\mu$ g/ml PepstatinA	1 ml	5 mg/ml	
1.2 $\mu$ g/ml Aprotinin	545 $\mu$ l	1.1 mg/ml	
200 $\mu$ M PMSF	500 $\mu$ l	200 mM	直前に調製、最後に加える

- c. 豚脳 4 つを右脳、左脳、小脳+脊髄にはさみで分けピンセットとキムワイプで手早く血の塊や血管・髄膜を取り除く。
- d. 豚脳と buffer 1 400 ml をブレンダーで破碎した。10 krpm で 20 秒、休止 20 秒を 10 セット繰り返し
- e. 破碎溶液を 250 PC ボトル×4 に移した。

- f. 遠心機 Hitachi HimacCR20E・R14AF ローターを用いて 7000 rpm (8960x g) で 4°C で 1 時間遠心した。
- g. 遠心の際に恒温槽とグリセロールを 37°C に予熱しておく。

**重合 1 回目**

- a. 上清 310 ml をとり、以下の試薬を加え 37°C で 50 分間重合させる。

組成	使用量	ストック
1 mM GTP	4.8 ml	100 mM
5 mM MgCl <sub>2</sub>	2.4 ml	1 M
5 μM 3,4 DCI	240 μl	10 mM
33% グリセロール	160 ml	100%

- b. 重合溶液を 80 PC ボトル × 6 に移した。
- c. 遠心機 (Hitachi CP70MX) およびローター (RP42) を用いて、31,000 rpm (106,000x g)、37°C で 1 時間 50 分間遠心した。
- d. 遠心の際に以下の試薬を buffer 2 50 ml に加え、予冷した。

組成	使用量	ストック
0.1 mM GTP	50 μl	100 mM
4 mM DTT	200 μl	1 M
20 μg/ml Leupeptin	100 μl	5 mg/ml
10 μg/ml Pepstatin A	100 μl	5 mg/ml
1.2 μg/ml Aprotinin	54.5 μl	1.1 mg/ml
5 μM 3,4 DCI	25 μl	10 mM

**脱重合 1 回目**

- a. 沈殿を 50ml ホモジナイザーに移した。
- b. 3.2 krpm、8 往復を 10 分間隔で 3 セット行った。
- c. その間に遠心機 (HITACHI CP70MX) を 4°C に予冷した。



- d. 脱重合溶液を 30PC ボトル×2 に移した。20 分間氷上に静置した。
- e. 遠心機 (Hitachi CP70MX)およびローター (PR50-2)を用いて、43.3 krpm (207 k × g)、4°Cで 50 分間遠心した。
- f. 上清をとり、氷上で o/n で静置した。

#### 重合 2 回目

- a. 上清に以下の試薬を加え、37°Cで 40 分間重合させた。

組成	使用量	ストック
1 mM GTP	600 $\mu$ l	100 mM
5 mM MgCl <sub>2</sub>	300 $\mu$ l	1 M
5 $\mu$ l 3,4-DCI	30 $\mu$ l	10 mM
33% グリセロール	20 ml	100%

- b. 重合溶液を 30 PC ボトル×2 に移した。
- c. 遠心機 (Hitachi CP70MX)およびローター (RP50-2)を用いて、43.3 krpm (145 k × g)、37°Cで 60 分間遠心した。

#### 脱重合 2 回目

- a. 37°Cに予熱した Buffer3 5 ml で沈殿の表面をさっと洗う。  
水分を除去した。  
Buffer3 (0.1 mM GTP 添加) 7.5 ml で沈殿を再懸濁した。
- b. 20ml ホモジナイザーに移し、8 往復×3 セット、10 分置きにホモジナイズした。
- c. ホモジナイズする間に AKTA システムを立ち上げ、スーパーループおよび XK26 カラムをセットし、buffer3 (0.1 mM GTP 添加)で平衡化した。
- d. 脱重合したチューブリン溶液を 100.4 遠心チューブに分ける。

- e. 遠心機 (Beckman Optima-TLX)およびローター (TLA-100.4)を用いて、46 krpm (88 k ×g)、2°Cで 30 分間遠心した。
- f. 上清をスーパーループに移す。

#### **AKTA**

- a. AKTA を用いて、溶出した。  
溶出条件: 流速: 1.0 ml/min, フラクションサイズ: 1.5 ml
- b. 上清を分注し、液体窒素中で保存した。
- c. SDS-PAGE で純度確認した。
- d. UV 法および Bradford 法で濃度を定量した。  
チューブリンモル吸光係数: 115,000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

#### **1.1.2.2. 蛍光標識チューブリンの作製**

微小管を蛍光顕微鏡で観察できるようにチューブリンを x-rhodamine (Molecular Probes #C1309)で染色した。重合させた微小管と色素を反応させたのち、重合・脱重合を 2 回繰り返すことで未反応の色素や変性チューブリンを除去した。以下、染色チューブリンの作製手順を大まかに記す。

#### **重合 1 回目**

- a. 2 mg 程度のチューブリン溶液を使用して、Beckman TLA 100.4 用遠心管 (以後、100.4 遠心管)に後でグリセロールを加えた時の総量に対し 0.5 × BRB80, 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM GTP になるように調製し、氷上に 5 分間静置した。
- b. 37°C のグリセロールを 33%になるように加え、30 分間、37°C で重合させた。

- c. 37°C の High pH Cushion を 2 本の 100.4 遠心管に等量に分け、その上に重合した微小管溶液を載せた。

#### High pH Cushion 3 ml

組成	使用量	ストック
100 mM Na-HEPES pH8.6	0.3 ml	1 M
1 mM MgCl <sub>2</sub>	3 μl	1 M
1 mM EGTA	15 μl	200 mM
60% グリセロール	1.8 ml	100 % (v/v)
MilliQ water	0.882 ml	

- d. 遠心機 (Beckman Optima-TLX)およびローター (TLA-100.4)を用いて、80000 rpm, 30 分, 35°C 遠心した。
- e. 上清を取り除き、37°C の BRB80 200 μl で Cushion の上の界面を 2 回洗浄したのち、Cushion をできるだけ取り除いた。沈殿を 37°C の Labeling 溶液 200 μl で 2 回洗浄した。

#### Labeling Buffer 1 ml

組成	使用量	ストック
100 mM Na-HEPES pH8.6	100 μl	1 M
1 mM MgCl <sub>2</sub>	1 μl	1 M
1 mM EGTA	5 μl	200 mM
40% グリセロール	400 μl	100 % (v/v)
MilliQ water	0.494 ml	

- f. 37°C の Labeling 溶液 200 μl を加え、微小管の沈殿がなくなるまで懸濁したのち、1 本の 100.4 遠心管にまとめた。

### 色素による染色

- a. 使用したチューブリンに対し、モル比で 10 倍の色素 (DMSO に溶解させた)を加え、37°C で 30 分間反応させた。3 分ごとに 10 回ピペティングを繰り返した。
- b. 37°C の Quench 溶液 400  $\mu$ l を加え、5 分間、37°C で静置した。

#### Quench Solution 0.5 ml

組成	使用量	ストック
2x BRB80	0.2 ml	5x
100mM K-Glutamate	25 $\mu$ l	2 M
40% グリセロール	0.2 ml	100 % (v/v)
MilliQ water	75 $\mu$ l	

- c. 37°C の Low pH Cushion 1.5ml の上に微小管重合溶液をのせた。

#### Low pH cushion 2.5 ml

組成	使用量	ストック
1x BRB80	0.5 ml	5x
60% グリセロール	1.5 ml	100 % (v/v)
MilliQ water	0.5 ml	

- j. 遠心機 (Beckman Optima-TLX)およびローター (TLA-100.4)を用いて、80000 rpm, 30 分, 35°C 遠心した。
- k. e の操作と同様に Cushion を取り除いた。
- l. 沈殿を 37°C の Injection 溶液 200  $\mu$ l で 2 回洗浄した。

### IB (Injection Buffer) 2 ml

組成	使用量	ストック
50mM K-Glutamate	50 $\mu$ l	2 M
0.5mM MgCl <sub>2</sub>	1 $\mu$ l	1 M
MilliQ water	1.949 ml	

#### 脱重合 1 回目

- 4°C の Injection 溶液 140  $\mu$ l で微小管の沈殿がなくなるまで懸濁した。溶液を Beckman TLA 100.2 用遠心管 (以下、100.2 遠心管)に移し、40 分間氷上に静置し、脱重合させた。5 分間ごとに 30 回ピペッティングを繰り返した。
- 遠心機 (Beckman Optima-TLX)およびローター (TLA-100.2)を用いて、80000 rpm, 10 分, 2°C 遠心した。
- 上清を 1.5 ml チューブにとり、1  $\times$  BRB80, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM GTP に調製し、氷上で 3 分間静置した。
- チューブを 37°C の恒温槽に移し、2 分間静置した。

#### 重合 2 回目

- 37°C のグリセロール 33%になるように加え、30 分間、37°C で重合させた。
- 7°C の Low pH Cushion 0.5ml の上にのせた。
- 遠心機 (Beckman Optima TLX)およびローター (TLA-100.2)を用いて、75000 rpm, 20 分間, 37°C で遠心した。
- Cushion の上の溶液を除き、界面を 37°C の Injection 溶液 200  $\mu$ l で 2 回洗浄したのち、Cushion を取り除いた。
- 37°C の Injection 溶液 200  $\mu$ l で沈殿を 2 回洗浄したのち、4°C の Injection 溶液 60  $\mu$ l で微小管の沈殿がなくなるまで懸濁した。

### 脱重合 2 回目

- a. 別の 100.2 遠心管に上清を移し、30 分間氷上で静置し、脱重させた。10 分ごとにピペッティングを 30 回繰り返した。
- b. 遠心機 (Beckman Optima-TLX) およびローター (TLA-100.2) を用いて、80000 rpm, 10 分, 2°C 遠心した。
- c. 上清を 0.6 ml チューブにとり 0.5 × BRB80 に希釈後 1 µl ずつ分注し、液体窒素中に保存した。

### 染色率・濃度の定量

チューブリン濃度は Bradford 法により求め、色素濃度(染色されたチューブリン濃度)は吸収波長での吸光度と以下のモル吸光係数からもとめ、染色率を算出した。

x-rhodamine; 吸収波長: 576 nm, モル吸光係数: 82000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

#### 1.1.2.3. 微小管の重合

チューブリン(7.0~ 9.0 mg/ml)に 1 mM GTP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>を加え、x-rhodamine により染色されたチューブリンと 100: 1 (v/v)で混合し 37°C で 30 分間重合させた後、20 µM Taxol を加え 30°Cで 30 分間安定化させた。使用前に、遠心機 (Beckman Optima-TLA)により遠心ローター (Beckman TLA-120.2 rotor)に遠心チューブ (Beckman 100.2 tube)を用いて、遠心(45,000 rpm, 15 分間, 35°C)し、沈殿を BRB80+ 20 µM Taxol 100 µl で懸濁した。

#### 1.1.2.4. 極性微小管の作製

モータータンパク質の微小管上の運動方向性を確認するために、マイナス端の蛍光が特に明るくなるようにした極性微小管を重合した。Mitchison の作製法を参考にした (<http://mitchison.med.harvard.edu/index.html>)。

x-rhodamine 染色チューブリンと非染色のチューブリンをモル比で 1: 2 になるよう調整した明るい重合核溶液と 1: 9 で混合し、NEM により伸長しやすくした暗い伸長溶液を作製した。まず、重合核溶液を重合させ明るいマイナス端側をつくり、その後伸長溶液を加え重合させることで、明るいマイナス端側から暗いプラス端側を伸長させた。重合の際 GMPCPP (Jena Bioscience #NU-405)を加えることで安定化させた。以下、極性微小管の手順を大まかに記す。

**1 mM GMP · BRB80 25  $\mu$ l**

組成	使用量	ストック
1x BRB80	5 $\mu$ l	5x
1 mM GMPCPP	2.5 $\mu$ l	10 mM
MilliQ	17.5 $\mu$ l	

**20  $\mu$ M rho-tubulin 8  $\mu$ l**

組成	使用量	ストック
20 $\mu$ M rho-tubulin	3 $\mu$ l	186 $\mu$ M
0.5 mM GMP · BRB80	14 $\mu$ l	1 mM
MilliQ	11 $\mu$ l	

10  $\mu$ l を①に、12  $\mu$ l を③に使用した。

**20  $\mu$ M Bright GMPCP Seed Mix 30  $\mu$ l**

組成	使用量	ストック	備考
6.67 $\mu$ M rho-tubulin	10 $\mu$ l	20 $\mu$ M	
13.3 $\mu$ M tubulin	20 $\mu$ l	20 $\mu$ M	
20 $\mu$ M tubulin	8 $\mu$ l	50 $\mu$ M	5 mg/ml = 50 $\mu$ M
0.5 mM GMP · BRB80	10 $\mu$ l	1 mM	
MilliQ	2 $\mu$ l		

2  $\mu$ l  $\times$  14 分注し、液体窒素で凍結・保存した。50 mM NEM 1ml

組成	使用量
50 mM NEM	6.26 mg
MilliQ	0.9957 ml

#### NEM CPP-tubulin 50 $\mu$ l

組成	使用量	ストック	備考
45.5 $\mu$ M tubulin	45.5 $\mu$ l	50 $\mu$ M	
0.5 mM GMPCPP	2.5 $\mu$ l	10 mM	
1 mM NEM	1 $\mu$ l	50 mM	
8 mM $\beta$ -Me	1 $\mu$ l	400 mM	100%を 1/36.75 希釈

氷上で NEM まで混ぜる。10 分間静置した。

$\beta$ -Me を加え氷上で、10 分間静置した。

#### Dim GMPCPP Polar elongation Mix (1: 9) 280 $\mu$ l

組成	使用量	ストック
1 $\mu$ M rho-tubulin	14 $\mu$ l	20 $\mu$ M
9 $\mu$ M tubulin	50.4 $\mu$ l	50 $\mu$ M
8 $\mu$ M NEM CPP tubulin	49.3 $\mu$ l	45.5 $\mu$ M
0.5 mM GMPCPP	14 $\mu$ l	10 mM
1 mM DTT	2.8 $\mu$ l	100 mM
1x BRB80	56 $\mu$ l	5x
MilliQ	93.5 $\mu$ l	

氷上で、10 分間静置した。

- d. 遠心機 (Beckman Optima-TLX)およびローター (TLA-120.1)を用いて、85,000 rpm, 7 分, 2°C 遠心した。
- e. 上清を 20  $\mu$ l ずつ 14 本分注し、液体窒素で凍結・保存した。

#### 重合

- a. Bright GMPCPP Seed Mix 2  $\mu$ l に 37°Cに予熱した 1 mM DTT/BRB80 18  $\mu$ l を加えた。



- b. 恒温槽において 37°C で 45 分間重合した。
- c. Dim tubulin 20  $\mu$ l に 37°C に予熱した 1 mM DTT/BRB80 180  $\mu$ l を加え、37°C で 20 秒間温めた。
- d. 混合し、37°C で 2 時間重合させた。
- e. 遠心機 (Beckman) およびローター (TLA-120.1) を用いて、53 krpm, 15 分間、35°C で遠心した。
- f. 上清を捨て、沈殿を 0.5 mM GMPCPP/BRB80 50  $\mu$ l で懸濁した。
- g. 暗所で保存した。

### 1.1.3. 蛍光顕微鏡による *In vitro* giding 運動観察

精製したタンパク質の運動活性および運動方向を *In vitro* giding 運動観察で調べた。KOH 処理カバーガラスでフローチャンバーを作製し、チャンバー内のガラス面をビオチン化 BSA (Sigma #A6043) で覆い、ストレプトアビジン (Sigma #S4762) を介して、タンパク質を固定し、更に極性微小管、および ATP を含む溶液を加えることで、モータータンパク質による微小管の滑り運動を観察した (図 19)。観察は蛍光顕微鏡で行った。水銀スペクトル光をフィルターを通すことで、蛍光修飾の励起光を当て、その光を CCD カメラで検出し、画像取得ソフト上で観察を行い、データの取得を行った。取得した画像データは画像解析ソフトで処理し、その後、位置追跡ソフトを用いて微小管の移動速度を計測した。また、単量体キメラキネシンの運動速度が比較的遅かったため、長時間観察が可能なように温度コントロール装置を導入した。

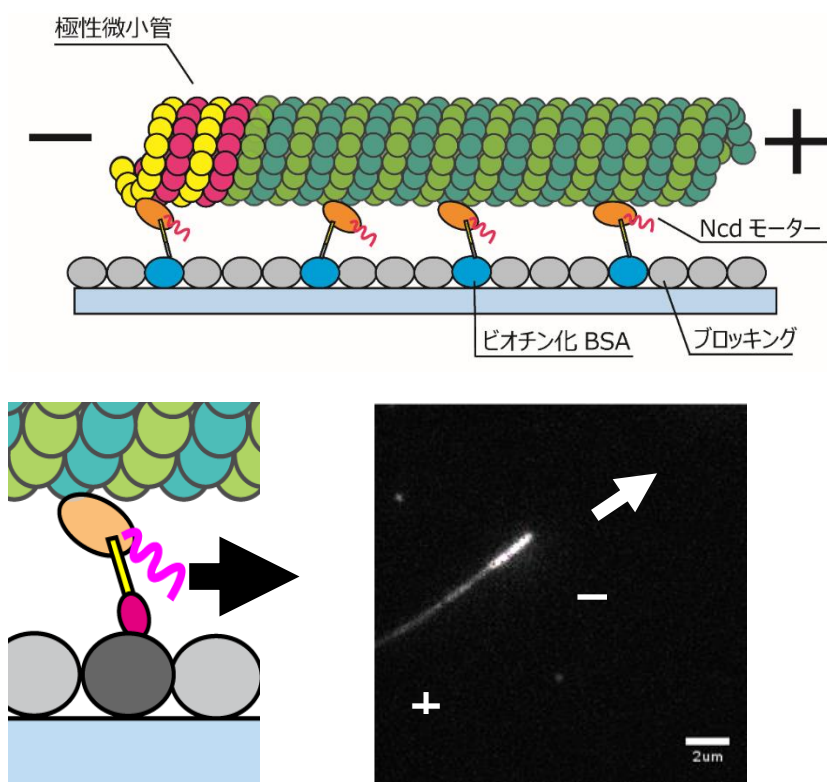


図 19. *In vitro* giding 運動観察の模式図と極性微小管の運動方向

ガラス面上にビオチン化 BSA とストレプトアビジンを介して AviTag を付加した単量体キメラキネシンによる ATP 溶液中での極性微小管の滑り運動を観察した (上)。プラスキネシンが極性微小管のプラス端方向 (暗い側)へ運動すると、極性微小管の明るい端(マイナス端)を先頭に滑り運動し、マイナスキネシンは極性微小管の暗い端(プラス端)を先頭に滑り運動させる (下)。

### 1.1.3.1. 蛍光顕微鏡装置

運動観察には蛍光顕微鏡 (顕微鏡: Nikon TE-2000-U, 対物レンズ: Nikon ApoTIRF 100 × /1.49 Oil, 光源: Nikon Intensilight C-HGFIE, EM-CCD カメラ: Andor Technology iXon X3 DU-897)を用い、x-rhodamine (微小管)の観察に 632.8 nm のフィルターセットを使用した。また、露光時間と録画時間をそれぞれ設定するために、シャッターコントローラー (シグマ光器 SSH-C2B)を使用した (図 20)。

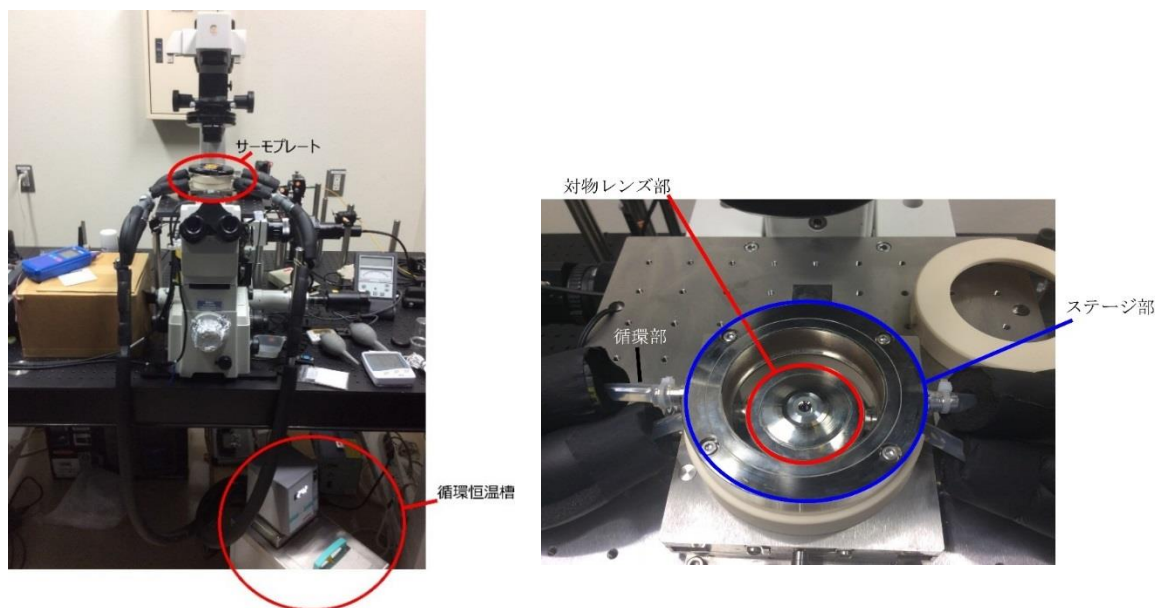


図 20. 蛍光顕微鏡および温度コントロール装置

(右) 蛍光顕微鏡全体と温度コントロール装置 (赤丸印: サーモプレート、循環恒温槽)。(左) ステージ上 (赤丸印: 対物レンズ部、青丸印: ステージ部)。

### 1.1.3.2. 温度コントロール装置

長時間観察におけるドリフト (顕微鏡の熱変化による視野全体のズレ)を抑えるために、顕微鏡のステージ上の温度を一定に保つ装置を用いた (図 24)。ステージ上の対物レンズおよびガラスチャンバーを覆うサーモプレートに、循環恒温槽 (Julabo F12-ED)から一定温度 ( $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ )の温水を循環させることで温度を調整した。その結果、長時間(~ 60 分間)の観察において、ドリフトは~100 nm 前後に抑えることができた (図 21)。

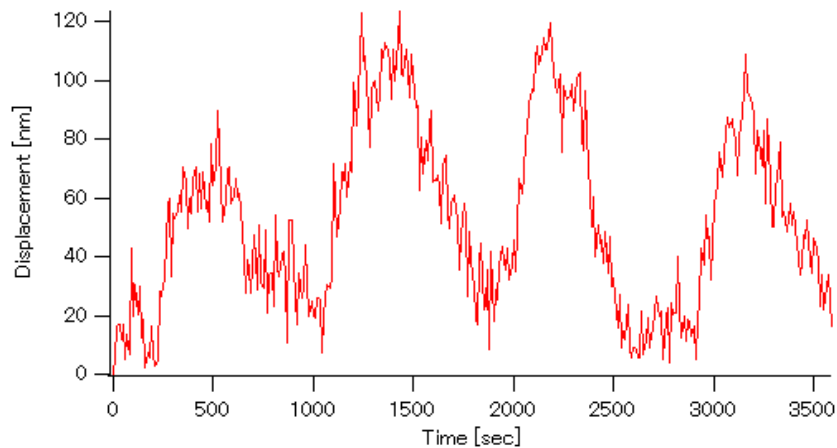


図 21. 温度コントロールによるドリフト抑制

温度コントロールにより長時間(~ 60 分間)の観察において、ドリフトは~100 nm 前後に抑えることができる。

### 1.1.3.3. KOH 処理カバーガラスの作製

運動観察に用いるガラスを作製した。ガラスは KOH で表面を洗浄した。以下、その手順を大まかに記す。

- a. カバーガラス (Matsunami 32 x 24 mm, Thickness No.1, #C)を陶器製のガラスホルダーにセットし、5 N KOH に浸し、一晩、静置した。
- b. ガラスホルダーを KOH 溶液から取り出し、200 ml ビーカーの MilliQ に浸し、超音波洗浄器 (Yamato #2510J-DHT)を用いて、10 分間ソニケーションを掛けた。
- c. ビーカーの MilliQ を交換し、10 回出し入れし、ガラスをすすぐ。この操作を 10 回繰り返した。
- d. ガラスホルダーからカバーガラスを取り出し、ホコリがつかないように乾燥させた。

#### 1.1.3.4. ガラスチャンバーの作製および観察

KOH 処理したガラスを用いて、ガラスチャンバーを作製した。以下に、その手順を大まかに記す。

- a. KOH 処理カバーガラスに両面テープ (ニチバン #NW-25)を約 3 mm 間隔をあけて貼り、その上に未処理カバーガラス 18 × 18 mm, Thickness No.1 (マツナミ #C218181)を接着することでガラスチャンバーを作製した (図 22)。流路の容量は約 5  $\mu$ l となった。

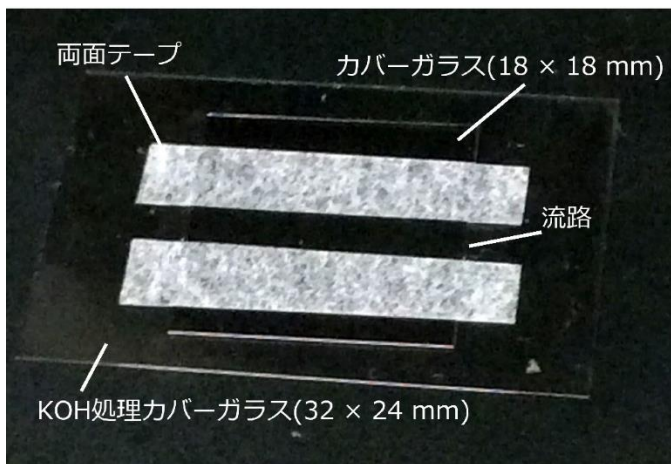


図 22. ガラスチャンバー

カバーガラス (32 × 24 mm)とカバーガラス(18 × 18 mm)の間に約 3 mm の流路が形成されている。

- b. ビオチン化 BSA のガラス面上への吸着

MB (20 mM PIPES-KOH (pH 7.4), 25 mM K-Acetate, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM EGTA)により

5 mg/ml に調製したビオチン化 BSA (Sigma #A8549) 5  $\mu$ l を流し入れ 5 分間静置し、

ガラス面上をビオチン化 BSA で覆った。

- c. 洗浄: MB 20  $\mu$ l を流し入れ、余分なビオチン化 BSA を除去した。

- d. ビオチン化 BSA へのストレプトアビジン結合

MBにより希釈した 5 mg/ml ストレプトアビジン (Wako #194-17863) 10  $\mu$ l を流し入れ 5 分間静置し、ビオチン化 BSA にストレプトアビジンを特異的に結合させた。

e. 単量体キメラキネシンのガラス面上への固定

1  $\mu$ M に調整したモータータンパク質溶液 20  $\mu$ l を流し入れ 3 分間静置し、未反応で残っているストレプトアビジンを除去すると共に、AviTag を持つモーターをストレプトアビジンとビオチン化 BSA を介してガラス面上に固定した。

f. 極性微小管と Ncd モーターとの結合

BRB80 により 1/200 に希釈した極性微小管溶液 20  $\mu$ l を流し入れ 3 分間静置し、極性微小管を Ncd モーターに結合させた。

微小管溶液

組成	使用量	ストック	備考
BRB80	94 $\mu$ l		室温
0.5 mg/ml BSA	5 $\mu$ l	10 mg/ml	
20 $\mu$ M Taxol	1 $\mu$ l	2 mM	
ATP	~0.5 $\mu$ l	96 mM	
Rhodamine-labeled MT	2 $\mu$ l		cfg, 50 $\mu$ l 懸濁 (50 $\mu$ M Taxol)

g. Assay バッファー 30  $\mu$ l を流し入れた。

### Assay バッファー

組成	使用量	ストック	備考
MB	50 $\mu$ l	2x	
MQ	31 $\mu$ l		
600 mM KCl	20 $\mu$ l	1 M	
0.5 mg/ml BSA	5 $\mu$ l	10 mg/ml	
20 $\mu$ M Taxol	1 $\mu$ l	2 mM	
1 mM DTT	1 $\mu$ l	0.1 M	
50 U/ml Glucose Oxidase	1 $\mu$ l	5,000 U/ml	
0.2% Catalase	1 $\mu$ l	20%	Catalase: グリセロール: D.W. = 2: 5: 3
0.3 mg/ml Creatine kinase	1 $\mu$ l	30 mg/ml	要事調製
5 mM Creatine phosphate	1 $\mu$ l	500 mM	
3 mM ATP	3 $\mu$ l	96 mM	
4.5 mg/ml Glucose	3 $\mu$ l	150 mg/ml	

#### h. 蛍光顕微鏡観察

蛍光顕微鏡を用い、x-rhodamine (微小管)の観察に 632.8nm のフィルターセットを使用した。十分な滑り運動が観察できるように、滑り速度に応じて露光時間 1~15 秒の間と観察時間 5~60 分間でキャプチャソフト(Andor Solis)によりビデオ画像を取得した。

#### 1.1.3.5. 位置解析

取得したビデオ画像をキャプチャソフト上で TIFF ファイル形式に変換後、解析ソフト ImageJ (Wayne Rasband, NIH)により画像のコントラストなどを調整後、avi ファイル形式で出力し、輝点の位置を自動追跡システム Mark 2 (Ken'ya Furuta, NICT)により運動の軌跡・速度を解析した(Furuta and Toyoshima, 2008)。取得した画像の解析は、フレームごとに ROI に含まれる輝点の輝度を 2次元ガウス分布でフィッティングして輝点の中心を求めることにより、輝点の追跡を自動で行った (図 23)。

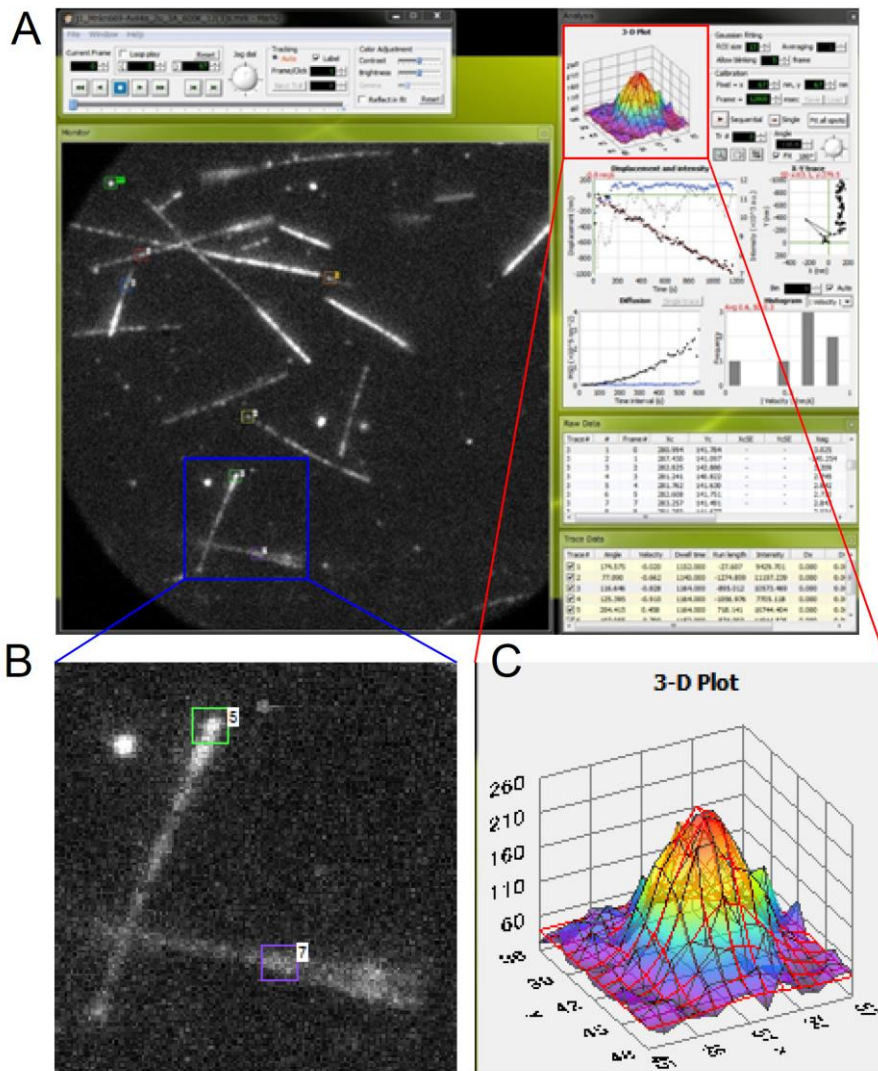


図 23. 輝点自動追跡システム

(A) 輝点自動追跡システム (Mark2)の PC 画面。

(B) 微小管上の輝点を選択すると、輝点を選択される。

(C) 選択された輝点の輝度の 2 次元ガウスフィッティングにより輝点の中心座標を nm オーダーで取得した。この中心座標を各フレーム毎に自動的に取得することで、輝点の軌跡・速度を算出した。



#### 1.1.4. クライオ EM 像の取得

以下にクライオ電子顕微鏡画像取得および、構造解析の手順について大まかに述べる。以下の実験手順は共同研究者 (仁田亮 博士)によるものである。

##### 1.1.4.1. 構造解析用単量体キメラキネシン nKn664, nKn669 の作製

N 末端ヒスチジンアフィニティータグおよびタバコエッチウイルス (TEV)プロテアーゼ切断部位融合キメラの発現プラスミドは、大腸菌無細胞系を用いて発現させた。発現したタンパク質を TEV プロテアーゼ処理に続き  $N^{2+}$ イオンアフィニティーカラム HisTrap (GE Healthcare)を用いて精製した。切断されたヒスチジンアフィニティータグは、HisTrap カラムを通すことによって除去した。フロースルー画分を、陽イオン交換クロマトグラフィーカラム Mono S (GE Healthcare)を用いてさらに精製した。更に、透析バッファー (10 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 20% (w/v) スクロース)を用いて透析濃縮することによりキメラキネシン nKn664 21 mg/ml と nKn669 66 mg/ml をそれぞれ得た。

##### 1.1.4.2. 構造解析用チューブリンの精製

構造解析用チューブリンは、重合および脱重合を 6 回繰り返すことにより、ブタ脳から精製した。高濃度の PIPES バッファーを用いて、微小管関連タンパク質の混入を除去した (Castoldi and Popov, 2003)。PEM-GTP バッファー (100 mM PIPES-KOH (pH 6.8), 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EGTA, 1 mM GTP)で溶出し、液体窒素中で凍結し、 $-80^{\circ}C$ で保存した。35 mg/ml のチューブリンを得た。

##### 1.1.4.3. 電子顕微鏡サンプルグリッドの作製とクライオ EM 像の取得

重合バッファー (PEM-GTP および 7% DMSO)中でチューブリン (20  $\mu$ M)を  $37^{\circ}C$ で 60 分間重合させた。タキソールを最終濃度 20  $\mu$ M まで段階的に添加した。キメラキネシン nKn

を、希釈バッファー (10 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM AMP-PNP)で 100 μM に希釈した。重合した微小管 (3~ 10 μM) 5 μl を、グロー放電した穴のある炭素グリッド (R2 / 2、Quantifoil)上に置いた。30 秒後、溶液をろ紙 (Whatman No. 0)を用いて拭き取った。キメラキネシン nKn (10~ 30 μM) 5 μ を直後に加えた。さらに 60 秒後、グリッドを 5 mM AMPNP を含む PEM バッファーで洗浄するか、または非ヌクレオチド nKn について 10 U/ ml アピラーゼを含む PEM バッファーと 90 秒間反応させ、そして液体エタンに、27°Cで湿度 100%で 5 秒間の半自動化ガラス化装置 (Vitrobot Mark IV, FEI)を用いて実施した。データ取得ソフトウェア Serial EM (Mastronarde, 2005)を用いて低線量条件下で FEI Falcon II 直接検出カメラを用いて 78,000 倍公称倍率で 200 kV 電界放出クライオ EM (Tecnai Arctica, FEI)を用いてデータ取得を行った。すべてのデータは、ピクセルサイズ 1.28 Å/ピクセルで 30e-1 /Å<sup>2</sup> の合計電子線量を有する 7 つのサブフレームを有する映画として収集された。データセットのデフォーカス範囲は、-1.5- 2.5 μm の範囲に設定した。

#### 1.1.4.4. クライオ-EM 画像の画像処理と 3 次元再構成

すべての動画データは、ソフトウェア MotionCorr (Li et al., 2013)を使用してモーション補正を行った。CTFFIND3 (Mindell and Grigorieff, 2003)を使用することにより、合計された画像をそのデフォーカスおよび非点収差を分析し、有意なドリフトおよび非点収差のない画像をさらなる分析に使用した。初期の低分解能モデル (約 20Å) を生成するために、14 本のフィラメントモーター微小管複合体の画像を選択し、Ruby-Helix の "unbend" プログラム (Metlagel et al., 2007)を用いて半自動的に直線化した。非対称らせん再構成を用いて 3 次元構造を生成した (Kikkawa, 2004)。この最初の 3D 構造は、以前に記載されているように単一粒子解析のために使用された (Shang et al., 2014)。256x256 ピクセルのボックスサイズを使用して 80Å の間隔でセグメントを抽出し、3D モデルへのテンプレートマッチングによって初期 XY シフトおよびオイラー角を決定した。記載されているように (Sindelar and Downing,

2007)、1本の微小管から抽出されたセグメント画像のセットを用いて、微小管の継ぎ目（シーム）の位置を決定した。その後、パラメータを精緻化し、FREALIGN パッケージ (Grigorieff, 2007) を使用して対称性を持たずに 3D 構造を再構成した。得られたパラメータはマップに適用し、ヘリカルパラメータは非対称マップから決定した。分解能の向上を伴う 10 回の精密化を行った。有効解像度およびオーバーフィッティングの有無を評価するために、個々の画像の高分解能成分 (>12Å) の位相を無作為化し (Chen et al., 2013)、3D 構造を構築し、フーリエ・シェル相関 (Fourier Shell Correlation (van Heel, 1987)) を用いて解析を行った。電子密度マップと原子モデルとの間の比較に基づき、分解能に依存するスケールリングを適用した。結果は表 2 を参照。

表 2. クライオ EM によるキメラキネシンの 3 次元再構成

キメラキネシン とヌクレオチド 状態	チューブリン ダイマーの数	FSC total*	FSC true*	CCC model (PDB ID)#	initial CCC finial model#
nKn664-ATP	229,516	6.6	6.7	0.886 (4HNA)	0.910
nKn664-free	149,814	5.8	5.8	0.827 (4LNU)	0.828
nKn669-ATP	128,254	6.2	6.3	0.918 (4HNA)	0.929
nKn669-free	203,826	6.1	6.1	0.929 (4LNU)	0.929

\* 標準 FSC (FSC total)により推定された 0.143 でのカットオフでの分解能、および

HRnoise 置換試験 (FSC true)で補正された分解能が示されている (Chen et al., 2013)。

# UCSF キメラの Fit In Map ツールを使用して算出された、再構成されたモデルの Global cross correlation 係数。初期の剛体適合モデル (CCC 初期モデル)の CCC と、柔軟適合モデルおよび MDFF と Modeller を使用したの最終フィッティング (CCC 最終モデル)。カッコ内は参照モデルのための PDB 番号。

#### 1.1.4.5. 原子モデルフィッティング

クライオ/X線結晶ハイブリッド法を用いて、微小管に結合したキメラキネシンの原子モデルを再構成した。チューブリンの原子構造 (PDB ID : 1JFF) (Löwe et al., 2001)をチューブリンの初期モデルとして使用し、UCSF キメラ (Pettersen et al., 2004)の Fit in Map ツールを用いてクライオ EM 密度に厳密に適合させた。キメラキネシン nKn664 および nKn669 については、Fit in Map および Modeller v9.12 (Eswar et al., 2006)を用いて、KIF5 motor domain の原子構造 (ATP 状態のキメラキネシンに対しては PDB ID: 4HNA, chain 4、ヌクレオチドフリー状態のキメラキネシンに対しては PDB ID: 4LNU (Cao et al., 2014))および、Ncd の neck-helix、neck-linker (PDB ID : 3U06、chain B) (Liu et al., 2012)を組み合わせることで得た。nKn キメラのヌクレオチドフリー状態のための。MDFF (Trabuco et al., 2008)を用いて剛体適合モデルを EM 密度にさらに適合させた。NAMD のバージョン 2.10 を分子動力学計算に使用した(Phillips et al., 2005)。原子衝突および立体化学を確認し、最終モデルを得るためにタンパク質 X線結晶構造解析用モデリングソフト COOT を用いて、電子密度マップへの自動フィッティングを行った (Emsley and Cowtan, 2004)。

#### 1.1.4.6. 単量体キメラキネシン nKn664 の結晶構造の取得

nKn664-ADP の結晶は、20°Cで蒸気拡散法により成長させた。12.5 mg/mlの各 2 µl タンパク質溶液を、29% PEG3350, 2.2 M 硫酸アンモニウム, 0.1M HEPES を含む 2 µl のリザーババッファーと混合した。上記溶液には、2% ベンザミジン-HCl (pH 7.5)および 5 mM ADP を含む。SPring-8 の BL26B2 で-180°Cで X線回折データを収集した。すべてのデータは、HKL2000 (Otwinowski and Minor, 1997)を用いて索引付けした。nKn664-ADP の構造は、出発モデルとして kinesin-1-ADP (PDB ID : 1BG2)の原子座標を利用して PHASER (McCoy et al., 2007)を用いた分子置換によって解決した。COOT (Emsley and Cowtan, 2004)と PHENIX (Adams et al., 2010)を用いて、数回の反復モデルの構築と改良を行った。最終的に

nKn664-ADP は 2.9 Å 分解能をもち、結晶モデルは、0.223 / 0.295 の R<sub>work</sub> / R<sub>free</sub> を有する。データ収集および精密化の統計を表 1 に示す。

表 1. データ収集および精密化の統計

	nKn664-ADP
Data collection	BL26B2
Space group	I4 <sub>1</sub> 22
Cell dimensions	
a, b, c (Å)	112.86, 112.86, 72.11
a, b, c (°)	90.0, 90.0, 120.0
Resolution (Å)	50-2.85(2.90-2.85)
R <sub>merge</sub>	0.134(0.848)
I / σ	18.9(3.2)
Completeness (%)	100.0(100.0)
Redundancy	5.7(3.5)
Refinement	
Resolution (Å)	19.5-2.9
No. reflections	11,667
R <sub>work</sub> / R <sub>free</sub>	0.223/0.295
No. atoms	
Protein	2,371
Ligand/ion	28
Water	0
B-factors (Å <sup>2</sup> )	47.0
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.011
Bond angles (°)	1.569

### 1.3. 実験結果

#### 1.3.1. 単量体キメラキネシンの DNA コンストラクト作製と精製および評価

本研究では、プラスキネシン kinesin-1 (Rn Kif5c) とマイナスキネシン Ncd のキメラキネシンを作製した。Kinesin-1, Ncd をそれぞれアミノ酸配列の相同性の高い motor core: Kif5c (9-320 a.a.), Ncd (349-664 a.a.) と、相同性の低い neck 部位、N/C 末部位: Kif5c (1-8 a.a.), Ncd (325-437 a.a.)/ Kif5c (321-340 a.a.), Ncd (665-700 a.a.) に分けた(図 24)。 これらをそれぞれ機械的に入れ替えることで 8 種類のキメラキネシンを作製し(図 25)、その DNA コンストラクトの塩基配列をシーケンスにより確認した。

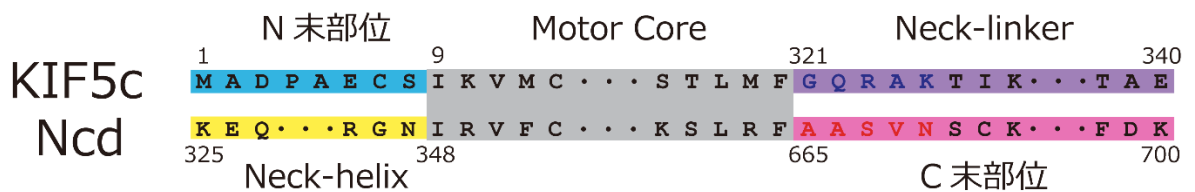


図 24. Kinesin-1, Ncd の motor core, neck 部位および N/C 末部位の分割

Kinesin-1 (KIF5C), Ncd の motor domain をアミノ酸配列における相同性の高い Motor core (灰色)を基準に N 末部位 (シアン)/ neck-helix (黄色), neck-linker (紫色)/ C 末部位 (マゼンタ)に分けた。Kinesin-1 Neck-linker と Ncd C 末部位の根本の 5 残基をそれぞれ青色と赤色で記してある。

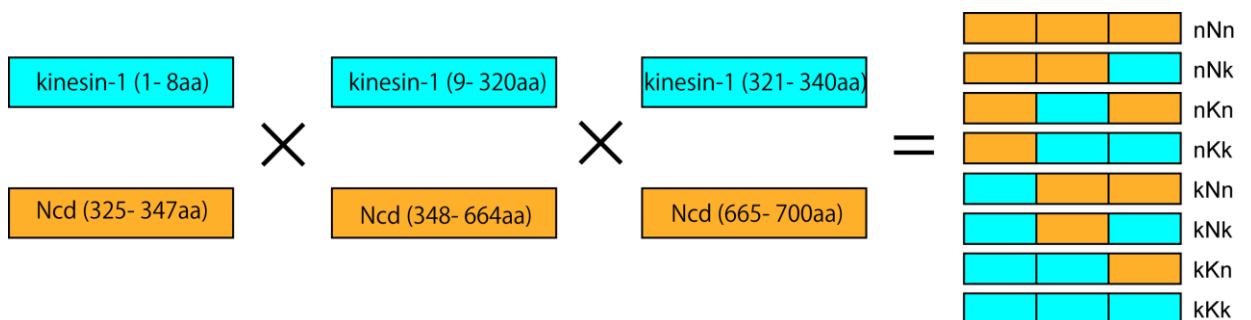


図 25. キメラキネシンの網羅的作製

Kinesin-1, Ncd の 3 つに分けた部位をそれぞれ組み合わせにより 8 種類のキメラキネシンを作製した。

単量体キメラキネシンを精製し、そのタンパク質の分子量および純度を SDS-PAGE (図 26) で、濃度を Bradford 法により確認した。8 種類のうち 7 種類は精製できたが、1 種類のキメラキネシン kNk は発現せず精製が出来なかった。

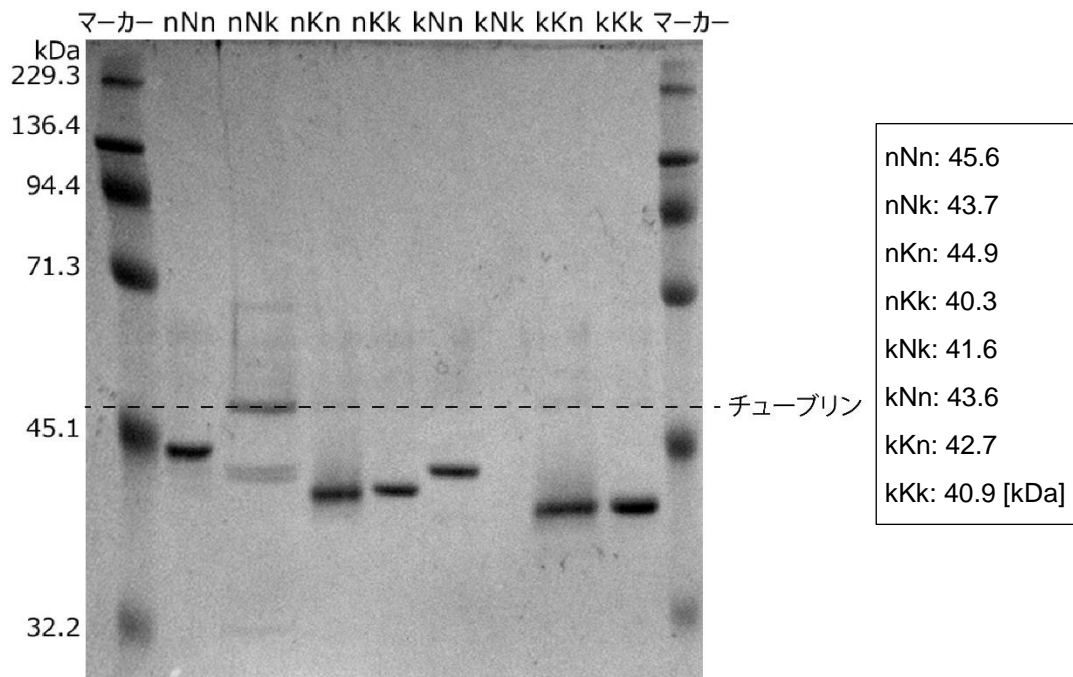


図 26. 網羅的キメラキネシンの SDS-PAGE ゲル

8 種類のキメラキネシンの分子量および純度の確認。kNk は精製できなかったため空レーン。

nNk においてはチューブリンが混入している。ゲルは CBB 染色されている。

### 1.3.2. 単量体 C 末変異キメラキネシンの DNA コンストラクト作製と精製および評価

キメラキネシン nKn の C 末部位の根本 5 残基を 1 残基ずつ kinesin-1 の相当する残基に置換した変異キメラキネシンを作製し (図 27) 、その DNA コンストラクトの塩基配列をシーケンスにより確認した。



図 27. 単量体 C 末変異キメラキネシンのコンストラクト

キメラキネシン nKn の 664~668 番目のアミノ酸を順番に 1 つずつ Ncd の配列 (赤色) から kinesin-1 の配列 (青色) に置換し、6 種類の C 末置換キメラキネシンを作製した。



単量体 C 末変異キメラキネシンを精製し、そのタンパク質の分子量および純度を SDS-PAGE (図 28)で、濃度を Bradford 法により確認した。6 種類の C 末変位キメラキネシンのうち 4 種類 (nKn664, nKn666, nKn667, nKn669)が精製できたが、2 種類 (nKn665, nKn668)は発現せず精製できなかった。

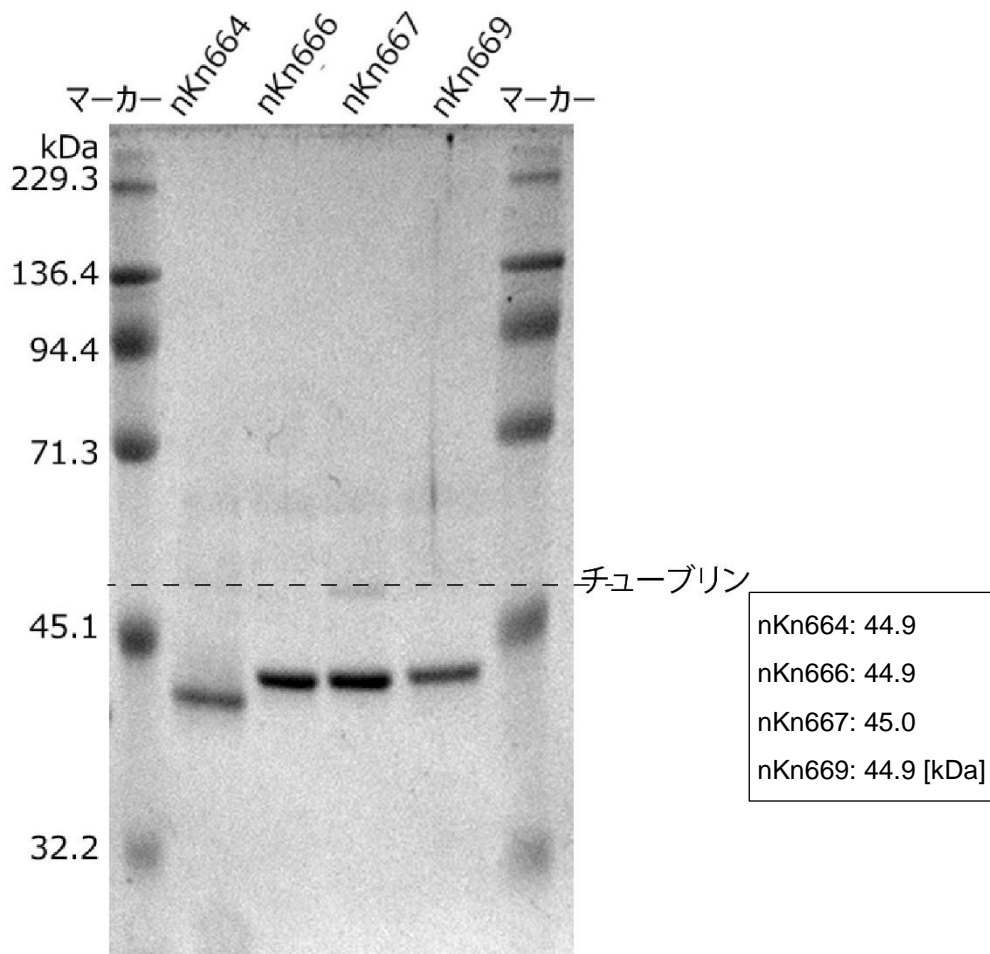


図 28. 単量体 C 末変異キメラキネシンの SDS-PAGE ゲル

6 種類のうち 4 種類の単量体 C 末変異キメラキネシンの分子量および純度確認。チューブリンが混入している。ゲルは CBB 染色されている。

### 1.3.3. チューブリンの精製

チューブリンを精製し、純度を SDS-PAGE (図 29)で確認した。チューブリンに蛍光標識を加え、極性微小管を作製した。

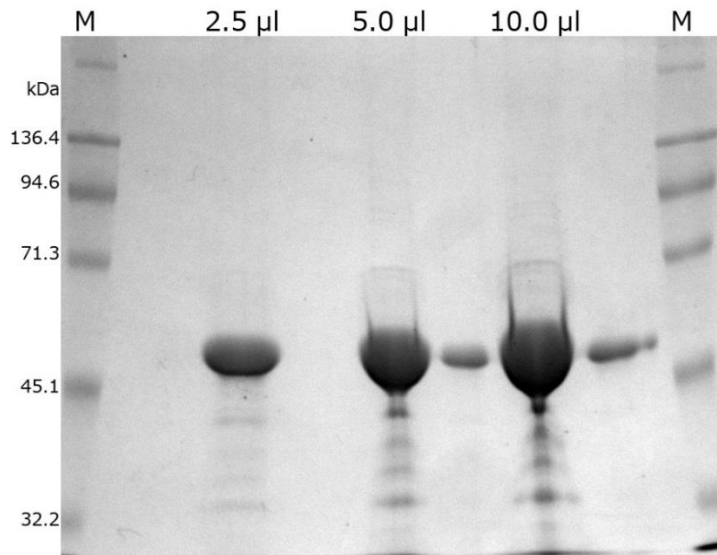


図 29. チューブリン純度確認の SDS-PAGE ゲル

チューブリンの純度の確認。3つのレーンにそれぞれ量を変えて流している。ゲルは CBB 染色されている。

### 1.3.4. 網羅的キメラキネシンの運動方向観察

極性微小管を用いた *In vitro* gliding 運動観察をそれぞれ独立に 3~4 回行い、キメラキネシンの運動方向を調べた (図 30)。図 30 に示すように、野生型 Ncd の単量体である nNn は微小管マイナス端方向、野生型の kinesin-1 の単量体である kKk は微小管プラス端方向へ、過去の報告同様にそれぞれ運動した。8 種類のうち 3 種類のキメラキネシン (nNk, kNn, kKn) は、微小管との結合は見られたが滑り運動は見られず、運動活性を示さなかった。

キメラキネシン nKn は Endow らの先行研究 (Endow and Waligora, 1998)で用いられたキメラ NcdKHC1 の単量体であり、先行研究と同じように微小管マイナス端方向へ運動した (図 31)。

nKk は nKn の C 末部位が kinesin-1 から Ncd へ置換されていないキメラである。このキメラが微小管プラス端方向へ運動したこと (図 31) から、先行研究で述べられた、「Ncd の neck 部位により微小管のマイナス端方向へ運動する」という主張は正確ではなく、微小管のマイナス端方向へ運動するには、Ncd の neck 部位のみではなく、同時に Ncd の C 末部位も必要であることが明らかとなった。

また、それぞれのコンストラクトは個々に運動方向を示しており、運動方向は単量体レベルで決定されていることが示された。









コンストラクト	運動方向	速度 [nm/sec]
nNn 	( - )	4.6 ± 1.7 (n= 86)
nNk 	ND	ND
nKn 	( - )	0.17 ± 0.07 (n= 19)
nKk 	( + )	2.5 ± 0.4 (n= 36)
kNn 	ND	ND
kNk 	ND	ND
kKn 	ND	ND
kKk 	( + )	28.5 ± 9.2 (n= 93)

図 30. 網羅的キメラ運動観察結果 (運動方向および速度)

微小管のプラス端方向へ運動したキメラキネシンは(+)、マイナス端方向へは(-)、運動が見られなかった場合は ND と記す。n は観察した微小管の数を示す。

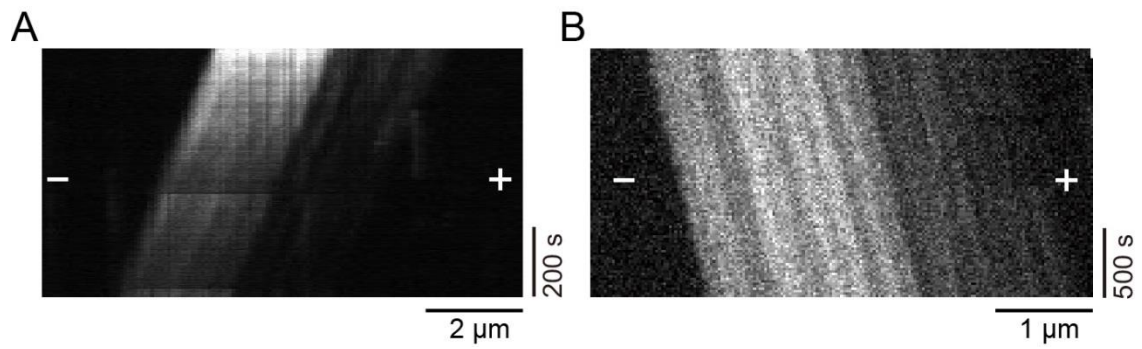


図 31. キメラキネシン nKk、nKn の運動方向観察

キメラキネシン nKk、nKn のカイモグラフ (微小管の位置の時間変化を上から下へ表した図。縦軸は時間、横軸は位置)。図中の+及び-はそれぞれ微小管の極性方向を示している。

(A) 時間経過に従い、極性微小管のマイナス端 (明るい側)を先頭に運動していることから、キメラキネシン nKk はプラスキネシンである。

(B) 時間経過に従い、極性微小管のプラス端 (暗い側)を先頭に運動していることから、キメラキネシン nKn はマイナスキネシンである。

### 1.3.5. C末部位変異キメラキネシンの運動方向観察

先行研究 (Endow and Waligora, 1998)において、kinesin-1 の motor core に Ncd の neck 部位と C末部位を付加することにより運動方向が微小管マイナス端方向へ変化したキメラキネシンは、neck 部位の 2 残基 GN (neck-motor junction)の変異により運動方向が、微小管のマイナス端方向からプラス端方向へ戻るといった報告がされた。このことは、微小管マイナス端方向への運動には neck 部位の 2 残基 (neck-motor junction)が重要であると解釈されている。

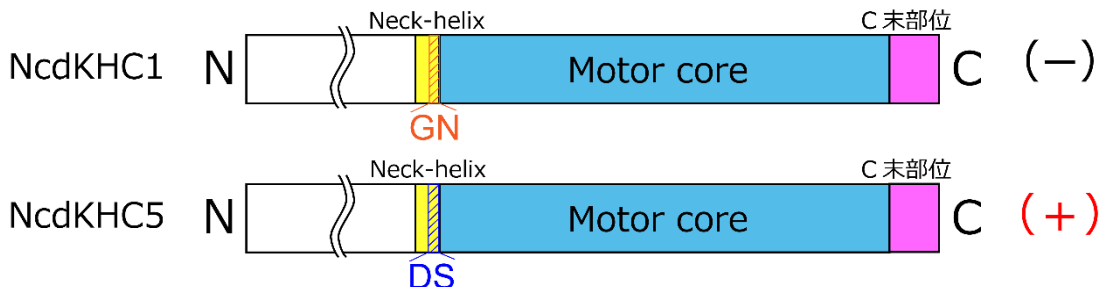


図 32. Neck-motor junction 変異キメラキネシン

Kinesin-1 motor core(青色)、neck 部位(neck-helix: 黄色)、neck-motor junction (GN, 黄色斜線)および C末部位 (マゼンタ)。Ncd Neck-helix の 2 残基 GN を *Drosophila* kinesin-1 の相当する残基 DS に置換した変異体 NcdKHC5 は微小管のプラス端方向へ運動した。

今回、Kinesin-1 の motor core を持つキメラキネシンが微小管マイナス端方向へ運動するのには、Ncd の neck のみならず Ncd の C末部位も必要であるという結果 (図 30 nKn)から、次に Ncd の C末部位のどの残基が微小管マイナス端方向への運動に重要であるかの同定を試みた。C末部位の根本を順次置換したキメラを作製し、その運動方向を調べた (図 33)。ここで、上記までの nKn キメラキネシンは nKn664 とした。

コンストラクト	運動方向	速度 (nm/s)
664 <b>AASVN</b>	(-)	0.17 ± 0.07 (n= 19)
665 <b>GAASN</b>	(N/A)	N/A
666 <b>GQSVN</b>	(+)	0.8 ± 0.1 (n= 8)
667 <b>GQRVN</b>	(+)	0.6 ± 0.2 (n= 4)
668 <b>GQRAN</b>	(N/A)	N/A
669 <b>GQRAK</b>	(+)	0.4 ± 0.2 (n= 18)

図 33. C 末置換キメラコンストラクトの運動方向

Ncd の C 末部位の根本の残基をそれぞれ kinesin-1 の相当する残基に置き換えたコンストラクト

nKn664-669。運動方向、速度は平均値±SD (nm/s)、n は観察した微小管数、N/A はデータなし。

これらのキメラキネシンの運動方向観察の結果、nKn669, 668, 667 は微小管のプラス端方向へ運動し、nKn664 のみ微小管のマイナス端方向へ運動した。マイナスキネシン nKn664 とプラスキネシン nKn666 の結果より、微小管マイナス端方向への運動には C 末部位基部の A 残基 (あるいは nKn665 の観察結果がないため、AA 残基) が特に重要であることが示唆される。

しかしながら、今回の実験では、この 1 残基 (あるいは 2 残基) のみが微小管マイナス端方向への運動に必要なかは判断できなかった。より精細に必要な十分な残基を特定するためには、更なる変異体を用いて実験を行う必要がある。

本研究では、キメラキネシン nKn のうち微小管マイナス端方向への運動には、Ncd の C 末部位と motor core との間にあたる根本の多くとも 5 残基で十分であると考え、以後、この 5 残基を基準にマイナスキネシン nKn664 とプラスキネシン nKn669 を用いて研究を進めた。

Ncd の neck 部位 (neck-motor junction) の 2 残基および Ncd の C 末部位の根本 5 残基 (AASVN) によりキメラキネシンが、微小管のマイナス端方向へ運動する分子メカニズムを解明するために、微小管マイナス端方向へ運動したキメラキネシン nKn664 とプラス端方向へ運動したキメラキネシン nKn669 の両キメラキネシンの立体構造情報を得ることを目指した。共同研究者の仁田亮博士 (理化学研究所) のご協力により、両キメラキネシンの ADP 状態における結晶構造、および、ヌクレオチドフリー状態と ATP 状態における微小管との結合状態のクライオ EM 像を取得した。

### 1.3.6. キメラキネシン nKn664-ADP 状態の結晶構造解析

キネシンは ADP 状態では微小管とは弱結合であるため、他のヌクレオチド状態と同じようなクライオ EM 像を取得することが困難である。そこで、キメラキネシンの ADP 状態の詳細な立体構造を得るため、X 線結晶構造解析を行った。nKn664-ADP (解像度 2.9 Å) の結晶構造を得た。しかし、nKn669-ADP は結晶化ができなかったため結晶構造を得ることができなかった。

得られた nKn664-ADP の結晶構造と kinesin-1/Ncd と比較して、ADP 状態の nKn664 の構造をここで論じる。nKn664-ADP において、スイッチ II ループ L11 の一部を有する短いヘリックス  $\alpha 4$  が観察された。C 末側にある neck-mimic は、安定な構造をとらないため、結晶構造では見えなかった (図 34A)。これらの構造的特徴は、kinesin-1 と nKn664 との間で完全に保存されていた (図 34B) (Cao et al., 2014; Kull et al., 1996)。また、ADP 状態の Ncd (Sablin et al., 1998) において観察されたように、nKn664-ADP における neck-helix の根元の C 末端側は、スイッチ II ループ L13 との相互作用し、neck-helix を微小管のプラス端側を指すような配置で安定化させていた (図 34C)。kinesin-1-ADP の cover-strand がループ L13 との相互作用により安定化されることを考慮すると (Kull et al., 1996)、ADP 状態における neck-helix

の方向は、kinesin-1 または kinesin-14 のコアとの N-K/ N-R 結合によって決定されていると考えられる (図 34D, E)。

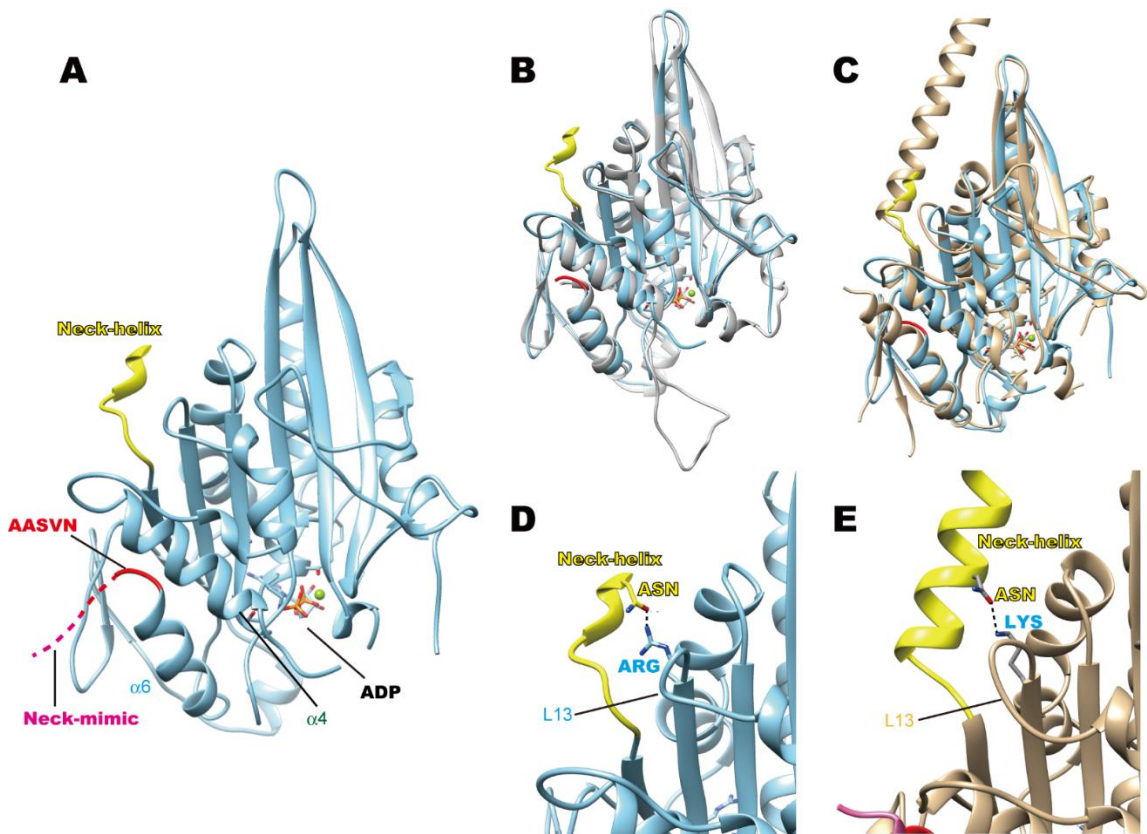


図 34. nKn664-ADP と kinesin-1-ADP/ Ncd-ADP の構造の比較

(A) 微小管結合面から見た nKn664-ADP の立体構造。Neck-helix (黄色)、C 末部位の根本 5 残基 (赤色)。Neck-mimic (マゼンタ)は推測による。

(B) nKn664-ADP (シアン色)と kinesin-1-ADP (灰色, PDB: 1BG2)の重ね合わせ。

(C) nKn664-ADP (シアン色)と Ncd-ADP (茶色, PDB: 3U06)の重ね合わせ。

(D) nKn664-ADP における neck-helix の拡大図。neck-helix (N 残基)と nKn664 motor core (R 残基)との相互作用により、neck 部位は微小管のプラス端方向を向いて安定化されている。

(E) Ncd-ADP における neck-helix の拡大図。neck-helix (N 残基)と Ncd motor core (K 残基)との相互作用により、neck 部位は微小管のプラス端方向を向いて安定化されている。



### 1.3.7. キメラキネシン nKn664, nKn669 のクライオ EM 構造解析

キメラキネシン nKn664, nKn669 についてそれぞれ free 状態 (図 35A, B)、AMP-PNP (ATP) 状態 (図 35C, D) のクライオ EM 像を得た。

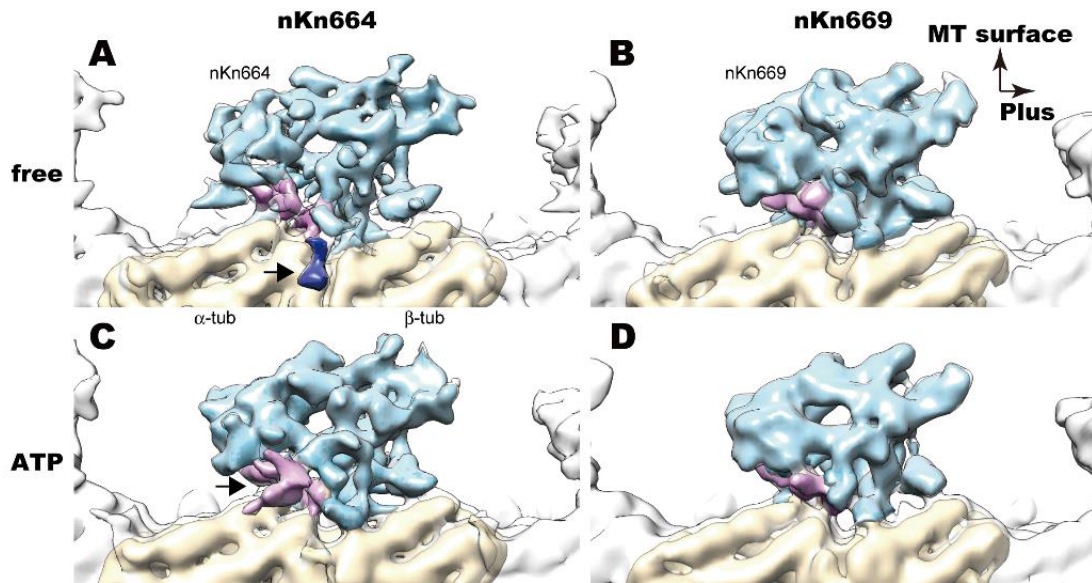


図 35. 2 状態の nKn664, nKn669 のクライオ EM 像

微小管と結合したキメラキネシン nKn664 および nKn669 のヌクレオチドフリー (free) 状態と ATP 状態の電子密度マップ。

(A) free 状態の nKn664 (シアン)。Neck-helix (マゼンタ) および、チューブリン E-hook (青色) が観察される。

(B) free 状態の nKn669 (シアン)。

(C) ATP 状態の nKn664 (シアン)。Neck-helix (マゼンタ) が突き出た構造を取る。

(D) ATP 状態の nKn669 (シアン)。

得られたクライオ EM 像を元に原子モデルフィッティングを行い、3 次元原子モデルを構築した。nKn664-free では 6.6 Å (PDB: 5HNX), nKn664-AMPPNP では 6.6 Å (PDB: 5HNW),

nKn669-free では 5.8 Å (PDB: 5HNZ), nKn669-AMPPNP では 6.3 Å (PDB: 5HNY)の解像度で 3次元構造を構築することができた (図 36)。

nKn669-free と nKn664-free の構造と非常に類似した構造を示す (図 37A, C)。共に、neck 部位および C 末部位は観察されず、ヌクレオチドフリー状態において安定化されていないことがわかる。

一方、ATP 状態においては、neck 部位、C 末部位に大きな構造的差異が生じた。

nKn664-ATP では、neck 部位と C 末部位 (AASVN)は安定化された (図 37B)。nKn669-ATP では、free 状態と同様に neck 部位および C 末部位は安定化されていなかった。

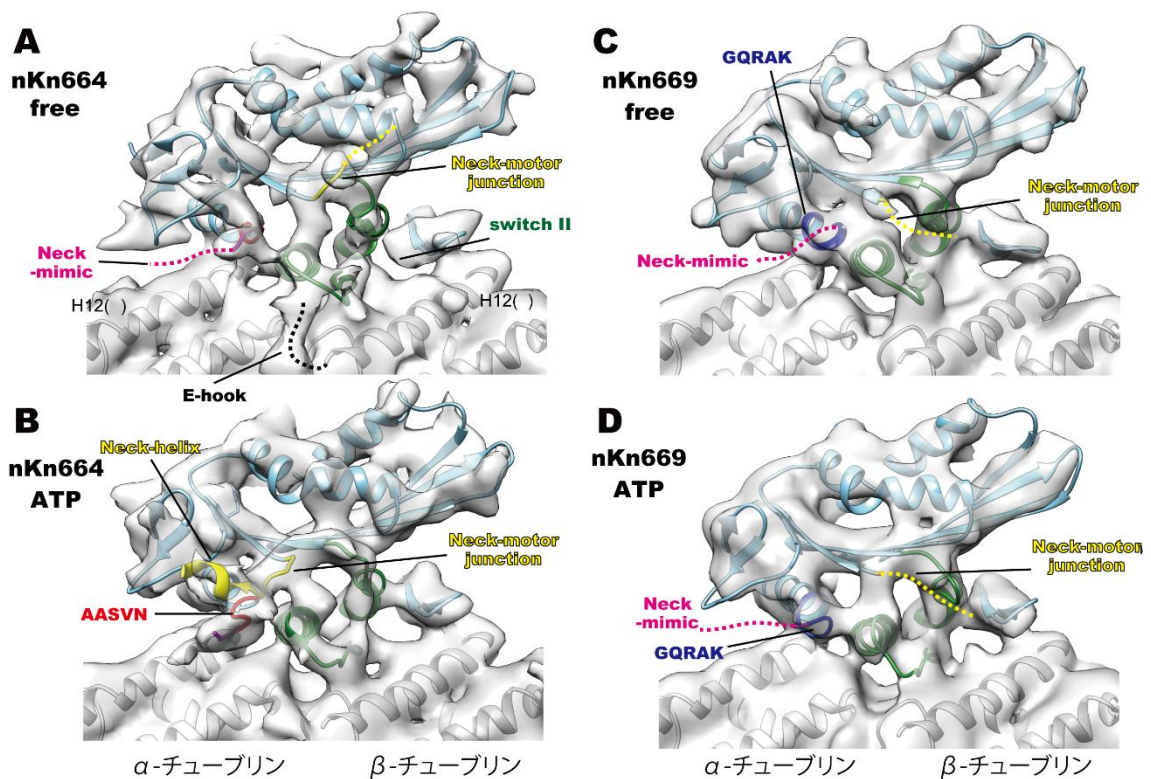


図 36. 2 状態の nKn664, nKn669 の 3 次元構造

再構成されたキメラキネシン nKn664 および nKn669 のヌクレオチドフリー (free)状態と ATP 状態の原子モデル。

- (A) free 状態の nKn664 (シアン)。Neck-motor junction (黄色)および neck-mimic (マゼンタ)は特定の構造をとっておらず、構造として観察されない。微小管の E-hook (黒色)と SwitchII 部位 (緑色)が相互作用している。
- (B) ATP 状態の nKn664 (シアン)。Neck 部位 neck-helix (黄色)および、C 末部位 neck-mimic の 5 残基 (AASVN) (赤色)が安定な構造をとっている。
- (C) free 状態の nKn669 (シアン)。Neck-motor junction (黄色)および C 末部位 neck-mimic (マゼンタ)は特定の構造をとっておらず、構造として観察されない。
- (D) ATP 状態の nKn669 (シアン)。Neck-helix (黄色)および、neck-mimic の 5 残基 (GQRAK) (青色)は特定の構造をとっていない。

nKn664-ATP の構造について更に詳しく論じる。nKn664-ATP において、neck 部位と C 末部位は互いに近接して安定化され、微小管のマイナス端方向を向いている (図 37A)。neck 部位付近の電子密度マップを見ると、GN を含む neck 部位の根本と C 末部位の根本の 5 残基 (AASVN) が相互作用していることがわかる (図 37B)。この相互作用により、neck 部位が微小管のマイナス端方向へ向いて安定化されていることから、マイナスキネシン kinesin-14 の微小管マイナス端方向運動に重要な構造であると考えられる。ここで、このマイナスキネシンに特有な構造を kinesin-14 bundle と名付ける。また、この構造解析の結果より、C 末部位基部の 5 残基のうち 2 残基 (AA) だけでなく残りの 3 残基も重要であることがわかった。

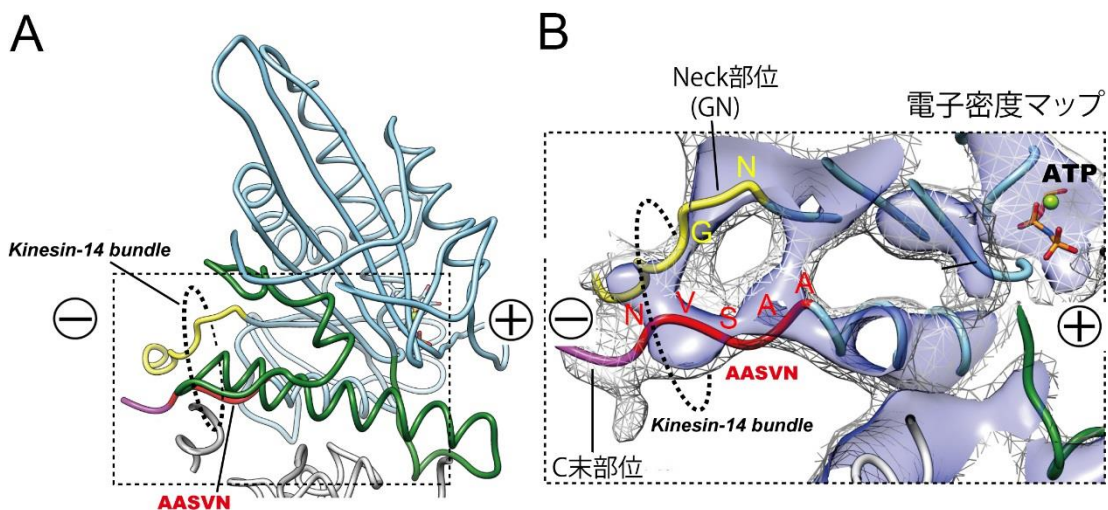


図 37. nKn664 の ATP 状態における kinesin-14 bundle 構造

- (A) nKn664-ATP の 3 次元構造 (微小管結合部位 (緑色)側から見た図)。Neck 部位 (黄色)と C 末部位 (マゼンタ)が微小管のマイナス端側を向いて安定化されている。
- (B) Neck 部位付近の電子密度マップ。GN を含む neck 部位の根本と C 末部位の根本の 5 残基 (赤色) が相互作用し、kinesin-14 bundle を形成している。

## 1.4. 考察

### 1.4.1. キメラキネシンの運動方向

kinesin-1 および kinesin-14 のキメラを利用した Endow らのグループの先行研究は、 $\beta 1$  の直前の GN 残基を含む N 末側 neck-helix および neck-motor junction が微小管マイナス端方向運動性に必要であることを明らかにした (Endow and Waligora, 1998)。これらのキメラキネシンは同時に、その C 末端 kinesin-1 neck-linker を Ncd C 末部位 (neck-mimic) で置換していた。運動活性に対する neck-mimic の寄与も最近報告されており (Szczęsna and Kasprzak, 2012)、微小管マイナス端方向への運動決定部位の特定が改めて必要であった。

第 1 章ではキメラキネシンを網羅的に作製し、その運動方向を観察し、キメラキネシンの運動方向決定機構の分子メカニズムの解明を目指した。kinesin-1 または kinesin-14 の単量体はそれぞれ微小管のプラスおよびマイナス端方向に向かって移動することができたので、kinesin-1 および kinesin-14 の単量体キメラキネシンを作製するためにタンパク質工学を利用した。作製した単量体キメラキネシンの運動方向の観察の結果、kinesin-1 の motor core に Ncd の C 末部位を付加したキメラキネシン nKn は、微小管のマイナス端方向に運動するが、この C 末部位を置換しないキメラキネシン nKk は微小管のプラス端方向へ運動することがわかった (図 32)。このことは、kinesin-1 の motor core を有するキメラキネシンが微小管のマイナス端方向へ運動するには Ncd の neck-helix のみならず、Ncd の C 末部位もまた必要であることを意味する。そして、これは先行研究において主張されている運動方向は neck 部位のみで決定されるというわけではない事を示しており、キネシンの運動方向決定部位の特定において従来の説とは異なる結果である。

本研究の単量体キメラキネシンは、単量体 Ncd より単量体の Ncd (4 nm/s) や kinesin-1 (80 nm/s) と比較して非常に (~30 倍) 小さい (図 31) 運動速度を示したが、単量体 Ncd および kinesin-1 と同様な範囲で微小管依存性の ATPase 活性を示した。これは、C 末側 neck-mimic が Ncd 運動速度に寄与することが報告されているため (Szczęsna and Kasprzak, 2012)、Ncd

neck-helix、kinesin-1 motor core および neck-mimic の間の不完全な相互作用の結果と考えられる。

また 2 量体で行っていた先行研究の運動方向を、本研究で用いた単量体でも再現を取ることができた。運動方向は単量体レベルで決定されていることを改めて示され、単量体の構造内に運動方向決定部位が存在することを意味している。

#### 1.4.2. 運動方向性の異なるキメラキネシン

キメラキネシン nKk と nKn の比較により、Ncd の C 末部位に着目し、C 末部位の変異体を作製した。これらキメラキネシンの運動方向を調べた結果、キメラキネシン nKn において、ヘリックス  $\alpha 6$  と neck-mimic-AASVN および GQRAK の接合部における僅か 5 残基の差異が、キメラキネシン nKn の方向性を逆転させることを見出した (図 34)。AASVN を有する nKn664 は微小管のマイナス端方向に向かって移動し、一方 GKRAK を有する nKn669 は微小管のプラス端方向に向かって移動する。これは、C 末側 Ncd neck-mimic の基部にある AASVN 残基が微小管マイナス端方向運動性に必要であることを明確に示している。

Ncd の C 末部位はその配列が kinesin-1 の neck-linker と僅かな相同性があることから neck-mimic とも呼ばれており、その機能について未知であったが、この結果より、neck-mimic の少なくとも根本の 5 残基は neck-helix と相互作用することで微小管マイナス端方向への運動を決定する部位であることが特定された。微小管マイナス端方向への運動のための kinesin-14 の C 末部位 neck-mimic と N 末側 neck-helix が微小管依存性の ATPase サイクルを介して、どのように協調しているのだろうか？

### 1.4.3. キメラキネシンの構造解析

共同研究者の仁田亮博士 (理化学研究所)のご協力の下、キメラキネシン nKn664 および nKn669 について ATP サイクルにおける各ヌクレオチド状態のクライオ EM 像および結晶構造を得た。nKn664 キメラキネシンにおいては結晶構造 (nKn664-ADP)、クライオ EM 像 (nKn664-free, nKn664-AMPPNP)を、nKn669 においてはクライオ EM 像 (nKn669-free, nKn669-AMPPNP)をそれぞれ得た。これら元に、キメラキネシン nKn664 および nKn669 の各ヌクレオチド状態の 3 次元構造を再構築した。

以下では、各ヌクレオチド状態の構造および状態遷移における構造変化について詳細に論じる。

#### 1.4.3.1. キメラキネシン nKn664 の ADP → free 状態遷移における構造変化

モータータンパク質と微小管との結合は、nKn664 からの ADP の放出を引き起こす。ADP 放出過程の立体構造変化は、kinesin-1 と nKn664 とで著しく類似している (図 38A, C)。ヘリックス  $\alpha 4$  は、ループ L11 側で 4 ターンから 6.5 ターンまで伸びていた。これは、ヘリックス  $\alpha 5$  およびループ L13 の立体配座変化を生じ、ループ L13 から neck-helix の解離を引き起こした。結果として、neck-helix はフレキシブルな状態となった (クライオ EM 像に現れない)。微小管結合はさらに、ヘリックス  $\alpha 6$  の C 末端部分 (AASVN)がヘリックス  $\alpha 4$  に近づくように、ヘリックス  $\alpha 6$  の立体配座変化を引き起こし、neck-mimic は微小管プラス端側に少し傾く。この配置では、ヘリックス  $\alpha 4$  は、neck-motor junction と neck-mimic との間の相互作用を媒介していた。

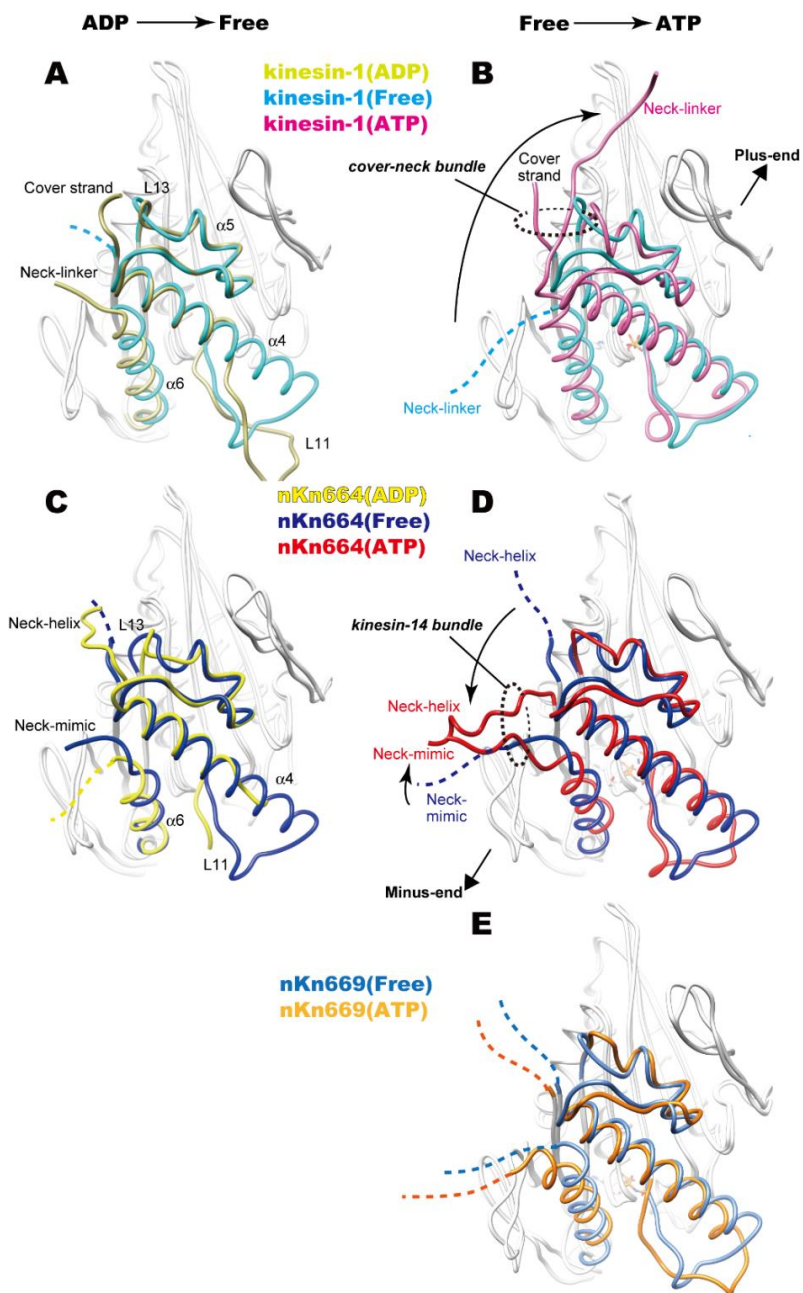


図 38. ADP / ATP 交換中の kinesin-1、nKn664 および nKn669 の構造変化

(A) ADP 放出前後の kinesin-1 の構造変化。Kinesin-1-ADP (黄色, PDB: 1BG2)、kinesin-1-free (シアン, PDB: 4LNU)。

(B) ATP 結合前後の kinesin-1 の構造変化。Kinesin-1-free (シアン), kinesin-1-ATP (マゼンタ, PDB: 4HNA)。Neck-linker の微小管プラス端方向への構造変化 (シアン破線からマゼンタ実線)が生じる。



- (C) ADP 放出前後の nKn664 の構造変化。nKn664-ADP (黄色), nKn664-free (青色)
- (D) ATP 結合前後の nKn664 の構造変化。nKn664-free (青色)、nKn664-ATP (赤色)。Neck-helix および C 末部位 (neck-mimic) の微小管マイナス端方向への構造変化 (青破線から赤色実線) が生じる。
- (E) ATP 結合前後の nKn669 の構造変化。nKn669-free (青色)、nKn669-ATP (オレンジ)。C 末部位は motor core にドッキングしない。

#### 1.4.3.2. キメラキネシン nKn664 の free → ATP 状態遷移における構造変化

ヌクレオチドフリーから ATP 状態に至るまで、ループ L11 周りの小さな構造変化は、kinesin-1 と同様のスイッチ II ヘリックス  $\alpha 4$  の反時計回りの回転を誘発した (図 38B, D)。これにより、ヘリックス  $\alpha 4$  の C 末端と neck-mimic の最初の部分との間の疎水性相互作用が生じる。kinesin-1 では、ヘリックス  $\alpha 4$  の更なる回転を引き起こし、motor core への neck-linker のドッキングおよび、N 末部位 (cover-strand) と neck-linker との cover-neck bundle が生じる (図 38B) (Atherton et al., 2014)。しかし、nKn664 の neck-mimic は、以下に論じる neck-mimic において保存されたイソロイシン残基の欠如のために、ヘリックス  $\alpha 4$  のさらなる回転を引き起こすことができなかつたと考えられる (図 38D)。代わりに、ヘリックス  $\alpha 6$  の同じ方向への回転を誘発する。結果として、neck-mimic は、微小管のマイナス末端側を指し示すような立体配置に制限され、neck-mimic (AASVN) が neck-motor junction (GN) に近接し、これによって形成される kinesin-14 bundle は、微小管のマイナス端方向を指していた (図 38D)。

#### 1.4.3.3. キメラキネシン nKn669 の free → ATP 状態遷移における構造変化

ATP のキメラキネシンへの結合は、スイッチ II クラスタールおよびヘリックス  $\alpha 6$  の nKn664 と同様の立体配座変化を誘導した。しかし、 $\alpha 6$ -neck-mimic の接合部における AASVN (nKn664) と GQRAK (nKn669) との間の局所的差異は大きな違いを生む。ヘリックス  $\alpha 6$  は、

nKn664 の場合と同様に反時計回りに回転するが、GKRAK-neck-mimic は、nKn664 の kinesin-14 bundle のような neck-motor junction と相互作用しなかった (図 38E)。また、kinesin-1 の場合のように motor core にドッキングもしなかった (図 38E)。したがって、neck-helix、neck-motor junction、および neck-mimic は、互いに結合しないので、ATP が nKn669 のヌクレオチド結合ポケットに入った後でも柔軟性が残った (クライオ EM 像に現れない)。

以上の状態遷移における構造変化に基づき、以下に nKn664 および nKn669 の ATP サイクルに応じた運動方向を伴う運動メカニズムの詳細を論じる。

#### 1.4.4. nKn664 の微小管マイナス端方向への運動メカニズム

まず、キメラキネシン nKn664 の微小管のマイナス端方向への運動性の原子メカニズムについて議論する。

本研究の構造解析は、GN 残基および  $\alpha 6$ -neck-mimic (AASVN または GQRAK) を含む neck-motor junction が neck-helix のスイング角度を決定するのに重要な役割を果たすことを示している。neck-mimic の基部に kinesin-1 配列 GQRAK を有する nKn669 においてさえ、neck-mimic は、微小管プラス端方向性のキネシン (N-キネシン) のように motor core にはドッキングしない。N-キネシンの neck-linker 中に高度に保存された Ile の欠如および、代わりに kinesin-14 で保存されている Cys / Thr の存在のためであることに起因すると考えられる (図 41A)。nKn669-ATP では、neck-mimic は、クライオ EM 構造においては見えなかったため、ATP 状態では、その柔軟性を増加させるようである。しかし、nKn664-ATP では、AASVN と neck-motor junction との間の kinesin-14 bundle の形成によって neck-mimic が安定化され、neck 部位が微小管のマイナス端側に向くようにさらに安定化する。Neck 部位が微小管のプラス端に向く nKn664-ADP の結晶構造を考慮すると、ADP / ATP 交換中に kinesin-14 bundle の形成による neck-helix の power-stroke が、nKn664 の方向性を決定すると考えられる。

構築した詳細な 3 次元構造を元に、各ヌクレオチド状態間の比較を行うことで、ATP サイクルに応じた構造変化を再構成した (図 39)。その結果、微小管マイナス端方向へ運動するキメラキネシン nKn664 では ADP 状態において、motor core との相互作用により微小管のプラス端方向に向いている neck 部位が (図 39A, D)、free 状態において motor core から解離し (図 39B, E)、ATP 結合状態においては kinesin-14 bundle が形成され、neck 部位が微小管のマイナス端方向へ向いていることがわかった (図 39 C, F)。この動きは結果的に、ADP 状態から ATP 状態への遷移において neck-helix を微小管のプラス端側からマイナス端側に power-stroke することが示唆される。

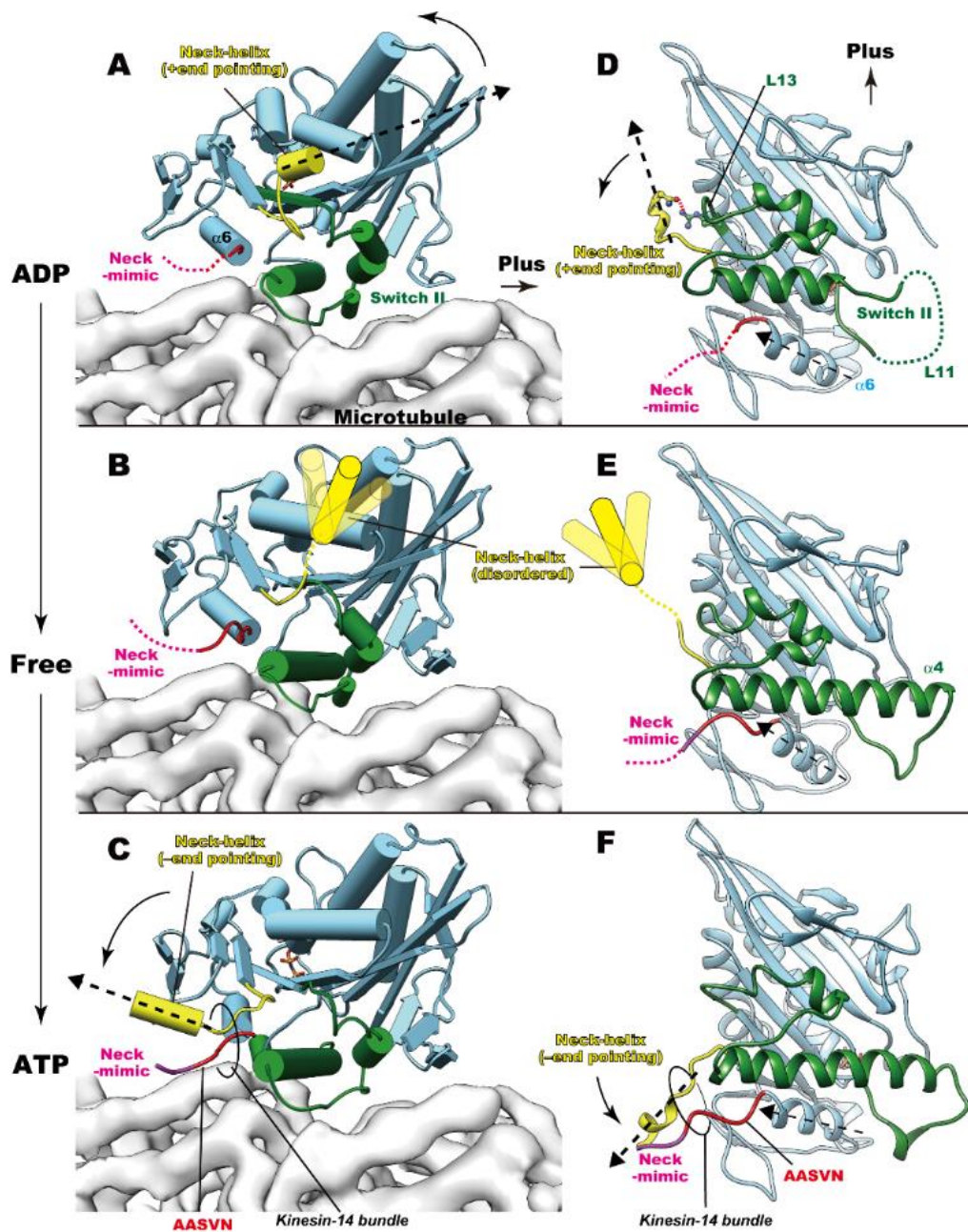
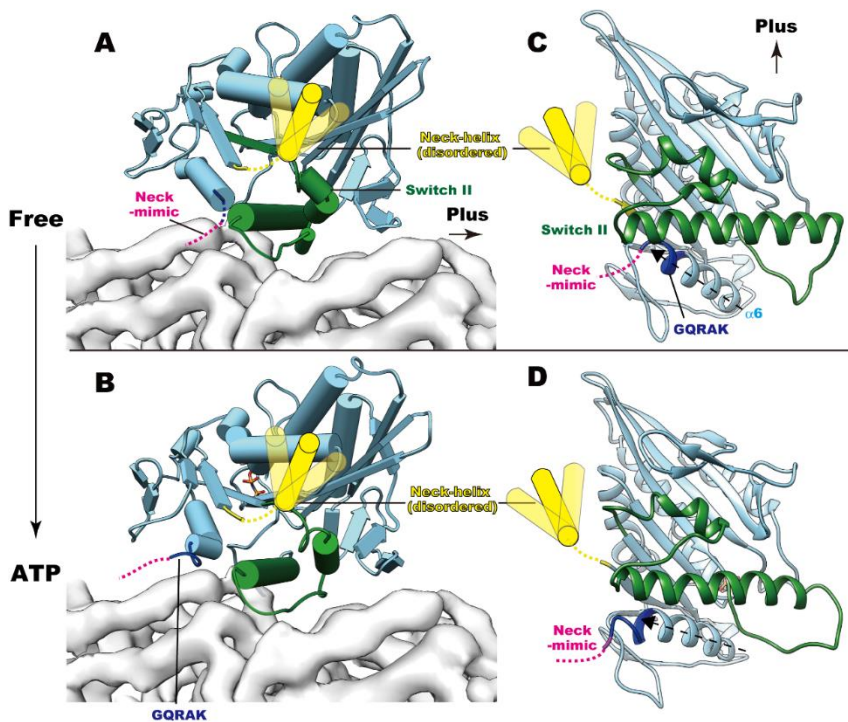


図 39. キネシンの微小管のマイナス端方向への運動モデル

ATP サイクルにおいて、ADP 状態では neck 部位 (neck-helix, 黄色)は微小管のプラス端方向へ向いている。C 末部位 (neck-mimic, マゼンタ)は安定化していない(A, D)。 Free 状態になると、neck 部位は motor core から解離し、安定化しない(B, D)。 ATP 状態になると、neck 部位と C 末部位は共に、kinesin-14 bundle を形成し、結果、neck 部位は微小管のマイナス端方向へ power-stroke する。点線の矢印はヘリックス  $\alpha 6$  の軸を示す。

#### 1.4.5. nKn669 の微小管プラス端方向への運動メカニズム

続いて、nKn669 の微小管プラス端方向への運動性を決定するメカニズムについてここで検討する。nKn669-ATP では、neck-helix と neck-mimic の両方が柔軟性を保っている。つまり、GQRAK-neck-mimic は、kinesin-1 のような cover-neck bundle も、nKn664 のような kinesin-14 bundle も形成しなかった (図 38E)。kinesin-1 のような neck-mimic のドッキングが生じない理由は、ATPase サイクルに必要であると報告されている neck-linker の根本部分で保存された Ile 残基の欠如である可能性がある (Nitta et al., 2008)。AASVN 配列は、nKn664 のような立体構造を形成することが必要とされる。いずれの場合も、neck-helix の運動は、微小管のプラス端に向かう nKn669 の方向運動を生じないと考えられる。その代わりに、微小管と結合した状態の motor core コア中の小さな微小管プラス端方向性の立体構造変化 (Case et al., 1997)、または微小管から解離中の motor core コアの微小管のプラス端側への偏った結合 (Endow and Higuchi, 2000)などが原因と考えられる。



#### 図 40. ATP 結合中の nKn669 の立体構造変化

- (A) 微小管上の nKn669-free は、右端のプラス端で表される。 Neck-helix と neck-mimic の両方はフレキシブルである。
- (B) 微小管上の nKn669-ATP は、その右端のプラス端で表される。 Neck-helix と neck-mimic の両方がフレキシブルな状態。
- (C) 微小管結合側から示される nKn669-free の立体構造。
- (D) 微小管結合側から示される nKn669-ATP の立体構造。 点線の矢印はヘリックス  $\alpha 6$  の軸を示す。

最後に、kinesin-14 の微小管マイナス端方向への運動メカニズムをここで論ずる。キメラキネシン nKn664 における構造解析で観察された ADP / ATP 交換中の neck-helix のスイング運動は、低分解能クライオ EM 実験において kinesin-14 Ncd で報告されたものと類似している (Endres et al., 2006; Wendt et al., 2002)。しかし、nKn664 の立体構造、特にスイッチ II および  $\alpha 6$ -neck-mimic の立体配座は、いくつかの微小管プラス端方向運動性キネシンで報告された ATP 状態における立体配座 (Chang et al., 2013; Gigant et al., 2013; Nitta et al., 2004; Parke et al., 2010; Sindelar et al., 2002)とは異なっており、motor core にドッキングしていない。同様に、ADP 状態でありながらも ATP 様立体配座をとる 2 種類の Ncd 変異体 (Heuston et al., 2010; Kikkawa et al., 2001; Liu et al., 2012)において報告された構造とも異なっている。最近報告された ATPase 活性を持たない kinesin-14 Kar3 関連タンパク質 Vik1 では、neck-mimic はドッキングした構造をとるが (Duan et al., 2012)、ATP 状態における立体配座をとる野生型 kinesin-14 の高分解能構造の報告は今までなかった。

ヘリックス  $\alpha 6$  と neck-linker/ neck-mimic との間の接合部での配列アラインメントは、微小管プラス端方向性キネシンとマイナス端方向性キネシンとの間の興味深い差異を示している (図 41A)。配列 xxRAR / Kxl は、kinesin-1 および kinesin-3 を含む微小管プラス端方向性 N-キネシンの間で完全に保存されているが、配列 AxxVNxT / C は微小管マイナス端方向性 C-

キネシン (kinesin-14) の間で完全に保存されている。N-キネシンについては、neck-linker が motor core にドッキングすると、neck-linker の根元付近の Ile 残基が、ヘリックス  $\alpha 4$  において完全に保存された Leu 残基と疎水性相互作用する (Nitta et al., 2008; Sablin and Fletterick, 2004)。この Ile 残基の変異は、ADP 放出速度の減少により運動速度を有意に低下させることが報告されている (Nitta et al., 2008)。この残基は Vik1 においても保存されており、その neck-linker は N-キネシンのように motor core にドッキングすることができるが、残りの配列はキネシンモーターのそれとは非常に異なる。

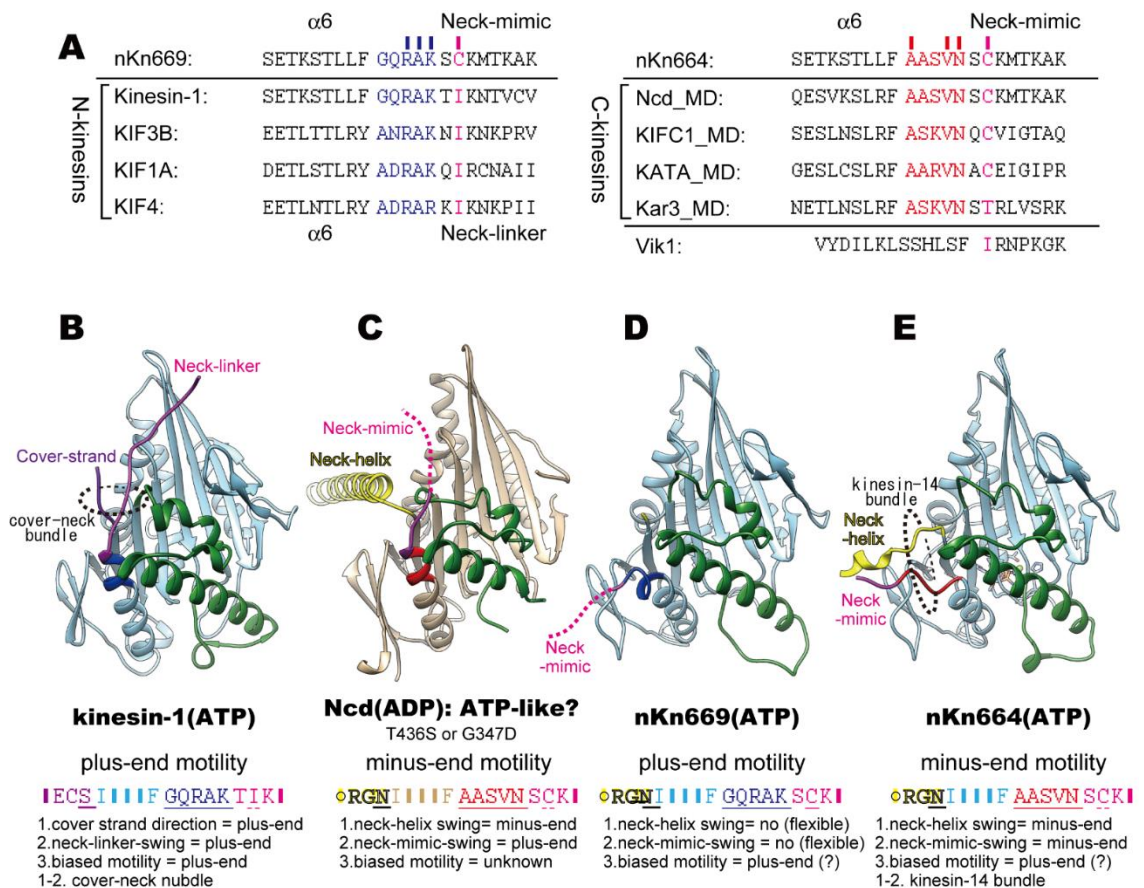


図 41. 微小管マイナス端運動性 C-キネシンおよび微小管プラス端運動性 N-キネシンの neck-linker 配列と neck-mimic 配列との比較

(A) ヘリックス  $\alpha 6$  および neck-linker/ neck-mimic 領域のアミノ酸配列アライメント。 xxRAK / RxI は、左の列に記載されている N-キネシンの間で保存されている。 AxxVNxC / T は、右の列に列挙されている C キネシンの間で保存されている。 参考として、nKn664、nKn669、および Vik1 の配列も示す。

(B-E) ATP 状態のキネシンモーターの構造(微小管結合側から見たアングル)および、その構造的特徴と運動方向のリスト。(B) kinesin-1-ATP (PDB ID : 4HNA) 、(C) Ncd-ADP (ATP 様立体配座、PDB ID : 3U06)、(D) nKn669-ATP、(E) nKn664-ATP が示されている。

現在の段階では、AASVN neck-mimic 配列を有する nKn664 キメラキネシンが、微小管のマイナス端方向側に向かう kinesin-14 bundle の形成を介して neck-helix を安定化することによって微小管マイナス端方向への運動性を獲得することが明らかである。 kinesin-14 モーターの中の AxxVNxT / C の完全な保存は、kinesin-14 サブファミリーにおける方向性決定へのこのメカニズムの一般化を示唆している。 このモデルを一般化するために、微小管と複合体を形成した ATP 状態の野生型 kinesin-14 モーターの高分解能クライオ EM 研究が待たれている。



## 第 2 章: キネシン motor core の運動方向性の実証

本章の内容については、5 年以内の出版を予定している。

## 総括と今後の展望

モータータンパク質キネシンの最大の特徴は、方向性を伴った運動である。本研究では、この運動方向性の決定機構について、第 1 章では、キネシンスーパーファミリーに属する微小管のマイナス端方向へ運動する kinesin-14 サブファミリーの運動方向決定機構を、キメラキネシンの網羅的作製・運動観察およびクライオ EM 像観察・X 線結晶構造解析を用いた構造解析により解き明かし、kinesin-14 が微小管のマイナス端方向へ運動するには従来考えられていた neck 部位のみならず、C 末部位の基部の 5 残基が必要であり、この 5 残基が neck 部位の基部である neck-motor junction と ATP 状態で相互作用し、kinesin-14 に特有な kinesin-14 bundle を形成することで neck-helix を微小管のプラス端方向からマイナス端方向へ構造変化させることにより、微小管マイナス端方向への運動を実現させていることを示した。

以下、第 2 章については省略

## 引用文献

- Adams, P.D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C., Zwart, P.H., 2010. PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 66, 213–221. doi:10.1107/S0907444909052925
- Amos, L.A., 1987. Kinesin from pig brain studied by electron microscopy. *J. Cell Sci.* 87 ( Pt 1), 105–11.
- Atherton, J., Farabella, I., Yu, I.-M., Rosenfeld, S.S., Houdusse, A., Topf, M., Moores, C.A., 2014. Conserved mechanisms of microtubule-stimulated ADP release, ATP binding, and force generation in transport kinesins. *Elife* 3, e03680. doi:10.7554/eLife.03680
- Cao, L., Wang, W., Jiang, Q., Wang, C., Knossow, M., Gigant, B., 2014. The structure of apo-kinesin bound to tubulin links the nucleotide cycle to movement. *Nat. Commun.* 5, 5364. doi:10.1038/ncomms6364
- Case, R.B., Pierce, D.W., Hom-Booher, N., Hart, C.L., Vale, R.D., 1997. The directional preference of kinesin motors is specified by an element outside of the motor catalytic domain. *Cell* 90, 959–66.
- Castoldi, M., Popov, A. V., 2003. Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization- depolymerization in a high-molarity buffer. *Protein Expr. Purif.* 32, 83–88. doi:10.1016/S1046-5928(03)00218-3
- Chang, Q., Nitta, R., Inoue, S., Hirokawa, N., 2013. Structural Basis for the ATP-induced Isomerization of Kinesin. *J. Mol. Biol.* 1–12. doi:10.1016/j.jmb.2013.03.004

- Chen, S., McMullan, G., Faruqi, A.R., Murshudov, G.N., Short, J.M., Scheres, S.H.W., Henderson, R., 2013. High-resolution noise substitution to measure overfitting and validate resolution in 3D structure determination by single particle electron cryomicroscopy. *Ultramicroscopy* 135, 24–35. doi:10.1016/j.ultramic.2013.06.004
- Coy, D.L., Wagenbach, M., Howard, J., 1999. Kinesin takes one 8-nm step for each ATP that it hydrolyzes. *J. Biol. Chem.* 274, 3667–3671. doi:10.1074/jbc.274.6.3667
- Desai, A., Verma, S., Mitchison, T.J., Walczak, C.E., 1999. Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell* 96, 69–78. doi:10.1016/S0092-8674(00)80960-5
- Dinu, C.Z., Chrisey, D.B., Diez, S., Howard, J., 2007. Cellular motors for molecular manufacturing. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 290, 1203–12. doi:10.1002/ar.20599
- Duan, D., Jia, Z., Joshi, M., Brunton, J., Chan, M., Drew, D., Davis, D., Allingham, J.S., 2012. Neck rotation and neck mimic docking in the noncatalytic Kar3-associated protein Vik1. *J. Biol. Chem.* 287, 40292–301. doi:10.1074/jbc.M112.416529
- Düselder, A., Fridman, V., Thiede, C., Wiesbaum, A., Goldstein, A., Klopfenstein, D.R., Zaitseva, O., Janson, M.E., Gheber, L., Schmidt, C.F., 2015. Deletion of the Tail Domain of the Kinesin-5 Cin8 Affects Its Directionality. *J. Biol. Chem.* 290, 16841–50. doi:10.1074/jbc.M114.620799
- Emsley, P., Cowtan, K., 2004. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 60, 2126–2132. doi:10.1107/S0907444904019158
- Endow, S.A., Higuchi, H., 2000. A mutant of the motor protein kinesin that moves in both directions on microtubules. *Nature* 406, 913–6. doi:10.1038/35022617
- Endow, S.A., Waligora, K.W., 1998. Determinants of kinesin motor polarity. *Science* 281, 1200–1202. doi:10.1126/science.281.5380.1200

- Endres, N.F., Yoshioka, C., Milligan, R.A., Vale, R.D., 2006. A lever-arm rotation drives motility of the minus-end-directed kinesin Ncd. *Nature* 439, 875–8.  
doi:10.1038/nature04320
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M.S., Eramian, D., Shen, M.-Y., Pieper, U., Sali, A., 2006. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr. Protoc. Bioinformatics* Chapter 5, Unit 5.6. doi:10.1002/0471250953.bi0506s15
- Furuta, K., Toyoshima, Y.Y., 2008. Minus-end-directed motor Ncd exhibits processive movement that is enhanced by microtubule bundling in vitro. *Curr. Biol.* 18, 152–7.  
doi:10.1016/j.cub.2007.12.056
- Gerson-Gurwitz, A., Thiede, C., Movshovich, N., Fridman, V., Podolskaya, M., Danieli, T., Lakämper, S., Klopfenstein, D.R., Schmidt, C.F., Gheber, L., 2011. Directionality of individual kinesin-5 Cin8 motors is modulated by loop 8, ionic strength and microtubule geometry. *EMBO J.* 30, 4942–54. doi:10.1038/emboj.2011.403
- Gigant, B., Wang, W., Dreier, B., Jiang, Q., Pecqueur, L., Plückthun, A., Wang, C., Knossow, M., 2013. Structure of a kinesin-tubulin complex and implications for kinesin motility. *Nat. Struct. Mol. Biol.* doi:10.1038/nsmb.2624
- Grigorieff, N., 2007. FREALIGN: High-resolution refinement of single particle structures. *J. Struct. Biol.* 157, 117–125. doi:10.1016/j.jsb.2006.05.004
- Henningsen, U., Schliwa, M., 1997. Reversal in the direction of movement of a molecular motor. *Nature* 389, 93–6. doi:10.1038/38022
- Heuston, E., Bronner, C.E., Kull, F.J., Endow, S.A., 2010. A kinesin motor in a force-producing conformation. *BMC Struct. Biol.* 10, 19. doi:10.1186/1472-6807-10-19
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., Niwa, S., 2009. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 682–96. doi:10.1038/nrm2774

- Howard, J., Hudspeth, A.J., Vale, R.D., 1989. Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature* 342, 154–8. doi:10.1038/342154a0
- Kamiya, R., Yagi, T., 2014. Functional diversity of axonemal dyneins as assessed by in vitro and in vivo motility assays of *Chlamydomonas* mutants. *Zoolog. Sci.* 31, 633–44. doi:10.2108/zs140066
- Kashina, A.S., Baskin, R.J., Cole, D.G., Wedaman, K.P., Saxton, W.M., Scholey, J.M., 1996. A bipolar kinesin. *Nature* 379, 270–2. doi:10.1038/379270a0
- Khalil, A.S., Appleyard, D.C., Labno, A.K., Georges, A., Karplus, M., Belcher, A.M., Hwang, W., Lang, M.J., 2008. Kinesin's cover-neck bundle folds forward to generate force. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 19247–52. doi:10.1073/pnas.0805147105
- Kikkawa, M., 2004. A new theory and algorithm for reconstructing helical structures with a seam. *J. Mol. Biol.* 343, 943–955. doi:10.1016/j.jmb.2004.08.051
- Kikkawa, M., Sablin, E.P., Okada, Y., Yajima, H., Fletterick, R.J., Hirokawa, N., 2001. Switch-based mechanism of kinesin motors. *Nature* 411, 439–45. doi:10.1038/35078000
- Kitamura, K., Tokunaga, M., Iwane, H., Yanagida, T., 1999. A single myosin head moves along an actin filament with regular steps of 5.3 nanometres. *Nature* 397, 129–134. doi:10.2142/biophys.40.89
- Kull, F.J., Sablin, E.P., Lau, R., Fletterick, R.J., Vale, R.D., 1996. Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature*. doi:10.1038/380550a0
- Kull, F.J., Vale, R.D., Fletterick, R.J., 1998. The case for a common ancestor: Kinesin and myosin motor proteins and G proteins. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 19, 877–886. doi:10.1023/A:1005489907021

- Lawrence, C.J., Dawe, R.K., Christie, K.R., Cleveland, D.W., Dawson, S.C., Endow, S.A., Goldstein, L.S.B., Goodson, H. V., Hirokawa, N., Howard, J., Malmberg, R.L., McIntosh, J.R., Miki, H., Mitchison, T.J., Okada, Y., Reddy, A.S.N., Saxton, W.M., Schliwa, M., Scholey, J.M., Vale, R.D., Walczak, C.E., Wordeman, L., 2004. A standardized kinesin nomenclature. *J. Cell Biol.* 167, 19–22.  
doi:10.1083/jcb.200408113
- Li, X., Mooney, P., Zheng, S., Booth, C.R., Braunfeld, M.B., Gubbens, S., Agard, D.A., Cheng, Y., 2013. Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM. *Nat. Methods* 10, 584–590.  
doi:10.1038/nmeth.2472
- Liu, H.-L., Pemble Iv, C.W., Endow, S.A., 2012. Neck-motor interactions trigger rotation of the kinesin stalk. *Sci. Rep.* 2, 236. doi:10.1038/srep00236
- Löwe, J., Li, H., Downing, K.H., Nogales, E., 2001. Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 313, 1045–1057. doi:10.1006/jmbi.2001.5077
- Mastrorarde, D.N., 2005. Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *J. Struct. Biol.* 152, 36–51.  
doi:10.1016/j.jsb.2005.07.007
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., Read, R.J., 2007. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* 40, 658–674.  
doi:10.1107/S0021889807021206
- McDonald, H.B., Stewart, R.J., Goldstein, L.S., 1990. The kinesin-like ncd protein of *Drosophila* is a minus end-directed microtubule motor. *Cell* 63, 1159–65.

- Metlagel, Z., Kikkawa, Y.S., Kikkawa, M., 2007. Ruby-Helix: An implementation of helical image processing based on object-oriented scripting language. *J. Struct. Biol.* 157, 95–105. doi:10.1016/j.jsb.2006.07.015
- Miki, H., Okada, Y., Hirokawa, N., 2005. Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol.* 15, 467–76. doi:10.1016/j.tcb.2005.07.006
- Mindell, J. a., Grigorieff, N., 2003. Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 142, 334–347. doi:10.1016/S1047-8477(03)00069-8
- Nitta, R., Kikkawa, M., Okada, Y., Hirokawa, N., 2004. KIF1A alternately uses two loops to bind microtubules. *Science* 305, 678–83. doi:10.1126/science.1096621
- Nitta, R., Okada, Y., Hirokawa, N., 2008. Structural model for strain-dependent microtubule activation of Mg-ADP release from kinesin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 1067–75. doi:10.1038/nsmb.1487
- Okada, Y., Hirokawa, N., 2000. Mechanism of the single-headed processivity: diffusional anchoring between the K-loop of kinesin and the C terminus of tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 640–5.
- Okada, Y., Hirokawa, N., 1999. A processive single-headed motor: kinesin superfamily protein KIF1A. *Science* 283, 1152–1157. doi:10.1126/science.283.5405.1152
- Otwinowski, Z., Minor, W., 1997. Macromolecular Crystallography Part A. *Methods Enzymol.* 276, 307–326. doi:10.1016/S0076-6879(97)76066-X
- Parke, C.L., Wojcik, E.J., Kim, S., Worthylake, D.K., 2010. ATP hydrolysis in Eg5 kinesin involves a catalytic two-water mechanism. *J. Biol. Chem.* 285, 5859–67. doi:10.1074/jbc.M109.071233



- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612. doi:10.1002/jcc.20084
- Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kalé, L., Schulten, K., 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 26, 1781–1802. doi:10.1002/jcc.20289
- Popchock, A.R., Tseng, K.-F., Wang, P., Karplus, P.A., Xiang, X., Qiu, W., 2016. The mitotic kinesin-14 KlpA contains a context-dependent directionality switch. doi:10.1101/058602
- Rayment, I., 1996. Kinesin and myosin: molecular motors with similar engines. *Structure* 4, 501–504. doi:10.1016/S0969-2126(96)00055-X
- Rice, S., Lin, a W., Safer, D., Hart, C.L., Naber, N., Carragher, B.O., Cain, S.M., Pechatnikova, E., Wilson-Kubalek, E.M., Whittaker, M., Pate, E., Cooke, R., Taylor, E.W., Milligan, R.A., Vale, R.D., 1999. A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature* 402, 778–84. doi:10.1038/45483
- Roostal, J., Hentrich, C., Bieling, P., Telley, I. a., Schiebel, E., Surrey, T., 2011. Directional switching of the kinesin Cin8 through motor coupling. *Science* 332, 94–9. doi:10.1126/science.1199945
- Sablin, E.P., Case, R.B., Dai, S.C., Hart, C.L., Ruby, A., Vale, R.D., Fletterick, R.J., 1998. Direction determination in the minus-end-directed kinesin motor ncd. *Nature* 395, 813–6. doi:10.1038/27463
- Sablin, E.P., Fletterick, R.J., 2004. Coordination between Motor Domains in Processive Kinesins. *J. Biol. Chem.* 279, 15707–15710. doi:10.1074/jbc.R300036200

- Sablin, E.P., Kull, F.J., Cooke, R., Vale, R.D., Fletterick, R.J., 1996. Crystal structure of the motor domain of the kinesin-related motor ncd. *Nature* 380, 555–9.  
doi:10.1038/380555a0
- Sekine, Y., Okada, Y., Noda, Y., Kondo, S., Aizawa, H., Takemura, R., Hirokawa, N., 1994. A novel microtubule-based motor protein (KIF4) for organelle transports, whose expression is regulated developmentally. *J. Cell Biol.* 127, 187–201.  
doi:10.1083/jcb.127.1.187
- Shang, Z., Zhou, K., Xu, C., Csencsits, R., Cochran, J.C., Sindelar, C. V, 2014. High-resolution structures of kinesin on microtubules provide a basis for nucleotide-gated force generation. *Elife* 3. doi:10.7554/eLife.04686
- Sindelar, C. V., Downing, K.H., 2007. The beginning of kinesin's force-generating cycle visualized at 9-?? resolution. *J. Cell Biol.* 177, 377–385. doi:10.1083/jcb.200612090
- Sindelar, C. V, Budny, M.J., Rice, S., Naber, N., Fletterick, R., Cooke, R., 2002. Two conformations in the human kinesin power stroke defined by X-ray crystallography and EPR spectroscopy. *Nat. Struct. Biol.* 9, 844–8. doi:10.1038/nsb852
- Stuchell-Brereton, M.D., Siglin, A., Li, J., Moore, J.K., Ahmed, S., Williams, J.C., Cooper, J.A., 2011. Functional interaction between dynein light chain and intermediate chain is required for mitotic spindle positioning. *Mol Biol Cell* 22, 2690–2701.  
doi:10.1091/mbc.E11-01-0075
- Svoboda, K., Schmidt, C.F., Schnapp, B.J., Block, S.M., 1993. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature* 365, 721–727.  
doi:10.1038/365721a0

- Szczęśna, E., Kasprzak, A. a, 2012. The C-terminus of kinesin-14 Ncd is a crucial component of the force generating mechanism. *FEBS Lett.* 586, 854–8.  
doi:10.1016/j.febslet.2012.02.011
- Tokai, N., Fujimoto-Nishiyama, A., Toyoshima, Y., Yonemura, S., Tsukita, S., Inoue, J., Yamamoto, T., 1996. Kid, a novel kinesin-like DNA binding protein, is localized to chromosomes and the mitotic spindle. *EMBO J.* 15, 457–467.
- Trabuco, L.G., Villa, E., Mitra, K., Frank, J., Schulten, K., 2008. Flexible fitting of atomic structures into electron microscopy maps using molecular dynamics. *Structure* 16, 673–83. doi:10.1016/j.str.2008.03.005
- Vale, R.D., 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112, 467–80.
- Vale, R.D., Milligan, R.A., 2000. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* 288, 88–95.
- Vale, R.D., Schnapp, B.J., Mitchison, T.J., Steuer, E., Reese, T.S., Sheetz, M.P., 1985. Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro. *Cell* 43, 623–32.
- van Heel, M., 1987. Similarity measures Between Images. *Ultramicroscopy* 21, 95–100.  
doi:10.1016/0304-3991(87)90010-6
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M., Gay, N.J., 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1, 945–951. doi:6329717
- Walker, R.A., Salmon, E.D., Endow, S.A., 1990. The *Drosophila* claret segregation protein is a minus-end directed motor molecule. *Nature* 347, 780–2. doi:10.1038/347780a0
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., Kirschner, M.W., 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 1858–62.

- Wendt, T.G., Volkman, N., Skiniotis, G., Goldie, K.N., Müller, J., Mandelkow, E., Hoenger, A., 2002. Microscopic evidence for a minus-end-directed power stroke in the kinesin motor ncd. *EMBO J.* 21, 5969–78.
- Yildiz, A., Tomishige, M., Vale, R.D., Selvin, P.R., 2004. Kinesin walks hand-over-hand. *Science* 303, 676–8. doi:10.1126/science.1093753

## 謝辞

本論文は筆者が東京大学大学院 総合文化研究科 広域科学専攻 博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。

本論文を作成するにあたり、指導教員の矢島潤一郎 准教授から、丁寧かつ熱心なご指導を賜りました。挫けそうになる度に叱咤激励を頂けなければ、本論文を終えることはできませんでした。ここに感謝の意を表します。

本論文の審査を担当して頂きました、豊島陽子 教授、大杉美穂 准教授、佐藤健 准教授、並びに若杉桂輔 准教授の皆様方には多くの適切な指摘を頂きました。感謝いたします。

助教の須河光弘 博士には顕微鏡実験について、また、日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂きました。感謝申し上げます。

以下の共同研究者の理化学研究所の方々には、クライオ電子顕微鏡・X線結晶構造解析のご協力をいただきました。特に仁田亮 博士には投稿論文の執筆において多大な助力を頂きました。大変ありがとうございました。

吉川 雅英 教授、白水 美香子 博士、仁田 亮 博士、重松 秀樹 博士、横山 武司 博士、青木 真理 博士

豊島陽子 教授には学部生の頃から長く暖かく見守って頂きました。ご心配をおかけしました。大変ありがとうございました。

豊島研究室の小林琢也 博士には実験における多くの示唆をいただきました。大変ありがとうございました。

矢島研究室・豊島研究室の皆様

日頃の研究生生活において、多くのサポートをいただきました。ありがとうございました。