

学位論文（要約）

ヒト細胞質ダイニン 1 分子の  
パワーストロークに伴う変位の測定

(Single molecular measurement of displacement driven  
by power stroke of human cytoplasmic dynein)

平成 28 年 12 月博士（理学）申請

東京大学大学院 理学系研究科  
物理学専攻

木下 慶美



## 目次

### 第 1 章 序論

1.1 背景 .....	1
1.1.1 ダイニンの性質 .....	1
1.1.2 ダイニンの分子構造 .....	2
1.1.3 ダイニンの運動機構 .....	6
1.2 本論文の目的と概要 .....	7

### 第 2 章 材料調製と測定方法

2.1 タンパク質の調製 .....	8
2.1.1 チューブリン・微小管の調製 .....	8
2.1.1.1 チューブリンの精製 .....	8
2.1.1.2 微小管のラベル化 .....	11
2.1.1.3 極性微小管の作製 .....	13
2.1.2 組換え体・変異ダイニンの調製 .....	15
2.1.3 変異キネシンの調製 .....	21
2.2 モータータンパク質の活性測定方法 .....	23
2.2.1 微小管の滑り運動による活性測定方法 .....	23
2.2.2 共沈実験による微小管結合能測定方法 .....	24
2.3 FRET 法によるダイニンの構造の評価 .....	26
2.3.1 FRET 効率の導出 .....	26
2.3.2 測定方法 .....	30
2.4 光ピンセットを用いたダイニン 1 分子の運動測定方法 .....	32
2.4.1 顕微鏡装置の概要 .....	32
2.4.2 タンパク質ビーズの調製 .....	35
2.4.3 ダブルトラップによる 1 分子測定方法 .....	40
2.4.4 シングルトラップによる 1 分子測定方法 .....	43
2.4.5 ダイニン-微小管結合時間領域を特定する方法 .....	44

## 第3章 実験結果

3.1 精製したダイニンの性質 .....	49
3.1.1 負染色法によるダイニンの電子顕微鏡像観察 .....	49
3.1.2 微小管の滑り運動による活性測定結果 .....	50
3.1.3 共沈実験による微小管結合能測定結果 .....	51
3.2 FRET 法によるダイニンの構造の評価 .....	53
3.2.1 ヌクレオチド固定状態での FRET 効率 .....	53
3.2.2 ATP 濃度依存的 FRET 効率変化 .....	54
3.3 光ピンセットを用いたダイニン 1 分子の運動測定結果 .....	55
3.3.1 ダイニン 1 分子が微小管と結合した際の運動距離 .....	55
3.3.2 ダイニン 1 分子と微小管との結合時間 .....	59

第4章 考察 .....	61
--------------	----

第5章 まとめ .....	62
---------------	----

参考文献

謝辞

## 略語

AAA+: ATPase associated with diverse cellular activities

AcMNPV: *A*utographa *c*alifornica *m*ulticapsid *n*ucleo*p*olyhedro*v*irus

ADP: adenosine diphosphate

AMPPNP: adenosine-5'-[( $\alpha$ ,  $\beta$ )-methylene] triphosphate

ATP: adenosine triphosphate

BFP: blue fluorescent protein

bcBSA: biotinamido-caproyl Bovine Serum Albumin

BCCP: biotin carboxyl carrier protein

Biotin-X-X-NHS: biotinamidohexanoyl-6-aminohexanoic acid N-hydroxysuccinimide ester

BSA: bovine serum albumin

CBB: Coomassie Brilliant Blue

DTT: dithiothreitol

*E. coli*: *Escherichia coli*

EDC: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride

EGTA: ethylene glycol tetracetic acid

FBS: fetal bovine serum

FRET: fluorescence resonance energy transfer

GDP: guanosine diphosphate

GFP: green fluorescent protein

GMPCPP: guanosine-5'-[( $\alpha$ ,  $\beta$ )-methylene] triphosphate

GST: glutathione S-transferase

GTP: guanosine triphosphate

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

IPTG: isoproryl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside

LB: Luria-Bertani

MTBD: microtubule binding domain

NEM: N-ethylmaleimide

PBS: phosphate buffered saline

PCB: phosphocellulose buffer

PCR: polymerase chain reaction

PDB: Protein Data Bank

Pi: phosphate

PIPES: piperazine-1, 4-bis(2-ethanesulfonic acid)

PMSF: phenylsulfonyl fluoride

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis

SOC: super optimal broth with catabolite repression

sulfo-NHS: *N*-hydroxysulfosuccinimide

Vi: vanadate

X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl,  $\beta$ -D-galactopyranoside

# 第1章 序論

## 1.1 背景

### 1.1.1 ダイニンの性質

生命活動を維持するためには、生体分子モーターと呼ばれるタンパク質の機能が欠かせない。真核細胞では、微小管系モータータンパク質のキネシン・ダイニンが、細胞運動・細胞内物質輸送・軸索輸送・有糸分裂・繊毛鞭毛運動などの生体運動に必須な機能を担っている。さらにアクチン系モーターのミオシンは、細胞運動や細胞内物質輸送だけでなく筋肉収縮運動にも寄与する。いずれのモータータンパク質も ATP 加水分解エネルギーを力学的仕事に変換して運動することが明らかとなっている。G タンパク質型モーターであるキネシン・ミオシンと比較して、AAA+ファミリータンパク質に属するダイニンは複雑で巨大な構造であるが故に、分子運動や制御機構に関して不明な点が多い。

ダイニンはテトラヒメラの鞭毛の屈曲運動に関わる蛋白質として Gibbons らが 1963 年に発見し、1965 年命名した[Gibbons 1963, Gibbons&Rowe 1965]。1987 年 Vallee ら[Paschal et al. 1987]は牛の脳から細胞質ダイニンを単離精製することに成功した。その後の研究によって、ダイニンは、細胞内の物質輸送や有糸分裂を担う 1 種類の細胞質ダイニン(cytoplasmic dynein-1)、鞭毛内物質輸送を担う 1 種類の細胞質ダイニン(intraflagellar dynein ; cytoplasmic dynein-2)、繊毛・鞭毛の運動を担う 14 種類（ヒトの場合）の軸糸ダイニンに大きく分類される[Yagi 2009]。本論文では、断りがない限り本研究で使用した cytoplasmic dynein-1 を以降「細胞質ダイニン」または単に「ダイニン」と表記する。細胞質ダイニンの変異と、アルツハイマー病、脊髄性筋萎縮症、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患との関連が報告されているが、ダイニン分子の機能との関係性は明確には解明されていない[Lipka et al. 2013]。

### 1.1.2 ダイニンの分子構造

細胞質ダイニンは分子量約 1.5 MDa の巨大なモータータンパク質であり、モーターの機能をもつ重鎖(Heavy Chains), 中間鎖(Intermediate Chains; IC), 中間軽鎖(Light Intermediate Chains; LIC), 3 種類の軽鎖(Light Chains; Tctex1, LC8, LC7/Roadblock)で構成されたホモダイマー複合体である(図 1.1a). 中間鎖・中間軽鎖・軽鎖は運動機能の制御や小胞の選別を行うサブユニットである[Pfister et al. 2006]. ダイニン重鎖 (~500 kDa, ~5000 アミノ酸)は AAA+ファミリーに属し, ATP 結合や加水分解に関わる AAA リングは円盤状の構造をとる. AAA リングは 6 つの構造が異なる AAA ドメイン(AAA1-AAA6)で構成され, 各 AAA ドメインは構造の大きな  $\alpha/\beta$  ドメイン ( $\alpha$  ヘリックス H0-H4 と  $\beta$  シート S1-S5) と小さな  $\alpha$  ドメイン ( $\alpha$  ヘリックス H5-H9) で構成される[Kon et al. 2012, Schmidt et al. 2012, Schmidt et al. 2015]. AAA1-AAA4 の 4 つの  $\alpha/\beta$  ドメインは 1 つずつ ATP 結合部位を含み, 特に AAA1 の ATP 結合部位は, ダイニンの運動活性において必須である[Kon et al. 2004, Cho et al. 2008]. AAA2 は ATP 加水分解にかかわるアミノ酸が欠如しているため加水分解反応をしないと考えられている. AAA3, 4 は AAA1 と連動して加水分解反応せず, AAA3 では微小管解離を促進するとの示唆があるが[Dewitt et al. 2015], 詳細な役割や協同性は未だによく分かっていない. AAA5, 6 は ATP 結合部位を持たず, ダイニン全体の構造変化に関わっていると推定されている. ダイニン重鎖には AAA リングの他に, AAA4 から突出した微小管結合部位 (MTBD; microtubule binding domain), AAA リング(AAA4)と MTBD 間を結ぶ 2 本のコイルドコイルで構成された Stalk, AAA リング(AAA5)と stalk を結んで運動機構の補強を担う Strut (又は Butress と呼ばれている), AAA リングの C 末端側にある C-terminal ドメイン, AAA リングの N 末端側にある力発生のギアに相当する linker, linker の N 末端側にある二量体形成部位を含む tail で構成される (図 1.1 a). 特に, 重鎖から tail を除いたモータードメイン (哺乳類では分子量~380 kDa) は, 運動活性を残した最小ドメインと考えられており, 構造や運動機構を理解するための実験によく用いられてきた. これまでに, 粘菌(*Dictyostelium discoideum*)由来[Nishiura et al. 2004], 出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)由来 [Reck-Peterson et al. 2006], 哺乳類 (ヒト・マウス) 由来 [Trokter et al. 2012, McKenney et al. 2014, Torisawa et al. 2014, Schlager et al. 2014, Nicholas et al. 2015] の細胞質ダイニン組換体の精製成功が報告された.

電子顕微鏡や X 線結晶解析によって, ATP 加水分解中間体におけるダイニンの構造は解明された. 天然の軸系ダイニン (クラミドモナス *C. reinhardtii* 由来軸系内腕ダイニン c) の負染色電子顕微鏡を用いて, ダイニンの全体構造が初めて観測された. 特に ADP-Vi 状態 (ADP-Pi 状態を模倣) と apo 状態 (no nucleotide 状態に相当) で大きく構造が異なり, 像



を tail で重ね合わせると、MTBD が~16 nm 移動する結果を得た。その結果を踏まえて、リングの回転説が提唱された[Burgess et al. 2003]。一方、粘菌由来のダイニンモータードメインを用いた生化学的実験による FRET 効率の測定により、linker に相当する部位がリングに対して位置変化することから、linker のスイング運動がその後は有力視されてきた[Kon et al 2005]。実際、linker の N 端に相当する部位をガラス面に固定したとき、ATP 加水分解反応中に微小管を運動させたことから、linker は力発生に関する重要な部位であることが推定された[Shima et al. 2006]。クライオ電子顕微鏡観察により、リングに対して linker の N 末端部位は、ADP-Vi 状態と ADP/apo 状態間で 3 次的に~17 nm 移動すると報告された[Roberts et al. 2009]。そして X 線結晶構造解析により、linker がリングの上に乗った構造をとることが初めて分かり、ダイニンモータードメインは、ADP 状態で linker の N 端側が AAA4 と相互作用し（粘菌由来, PDB 3VKH）[Kon et al. 2012]、apo 状態と AMPPNP 状態では linker の N 端側が AAA5 と相互作用（出芽酵母由来, PDB 4AKI, 4W8F）[Schmidt et al. 2012, Bhabha et al. 2014] すると報告された。上記 3 状態のいずれにおいても linker はまっすぐ伸びた構造であった。それに対し、ADP-Vi 状態では linker は折れ曲がり、linker の N 端側は AAA2 と相互作用した構造（ヒト由来 dynein-2, PDB 4RH7）をとった [Schmidt et al. 2015]。また、どの状態でも AAA2  $\alpha/\beta$  ドメインから突出した 2 本の  $\beta$ -hairpin が linker と接触していることが確認された（図 2.2 b）。

これらの結果から、ADP-Vi 状態から ADP 状態に遷移する過程で、ダイニンの linker が曲がった構造から伸びた構造をとると考えられ、この構造変化は「パワーストローク」と呼ばれており[Burgess et al. 2003]、ダイニンの力発生に伴う運動に関与すると考えられている。Apo 状態のダイニンに ATP が結合し加水分解（ADP-Pi 状態）すると、linker は伸びた構造から曲がった構造に構造変化し、力発生前の構造をとるということから、この構造変化は「リカバリーストローク」と呼ばれている。

微小管存在下である軸糸内のダイニンの構造をクライオ電子線トモグラフィーで取得し、パワーストローク前の状態（おそらく ADP-Vi 状態）とパワーストローク後の状態（apo 状態）において像を比較したところ、ダイニンのリング回転や並進に伴い約 8-12nm の位置変化が観察された。[Roberts et al. 2012, Lin et al. 2014]。ただし、これらの研究では、Stalk 部分の像が観察できなかつたので、ダイニン頭部全体構造の変化の観察はできていない。また、粘菌由来の二量体ダイニンを微小管と相互作用させたとき、パワーストローク後の構造をとるダイニンでしか微小管との相互作用が報告されていないことから、パワーストローク前のダイニンの微小管相互作用時の構造が不安定であることが推定できる[Imai et al. 2015]。

ダイニンは微小管上を運動する上で、ATP 加水分解サイクルに伴い微小管から結合・解

離を繰り返す。特に ADP-Vi 状態でのみ微小管と弱結合状態であることから、化学状態に伴うダイニンの化学反応サイクルは図 1.1b のように予想されている[Imamura et al. 2007]。予想されているモデルは、ダイニンは ADP-Pi 状態からリン酸解離過程で微小管と結合し、この過程でパワーストロックし、ADP を解離し ATP 結合後加水分解すると、微小管から解離してパワーストロック前の構造に戻る、というサイクルである。しかし、このモデルにおける構造変化、微小管との結合解離、ヌクレオチド状態の関係を直接証明した研究はない。

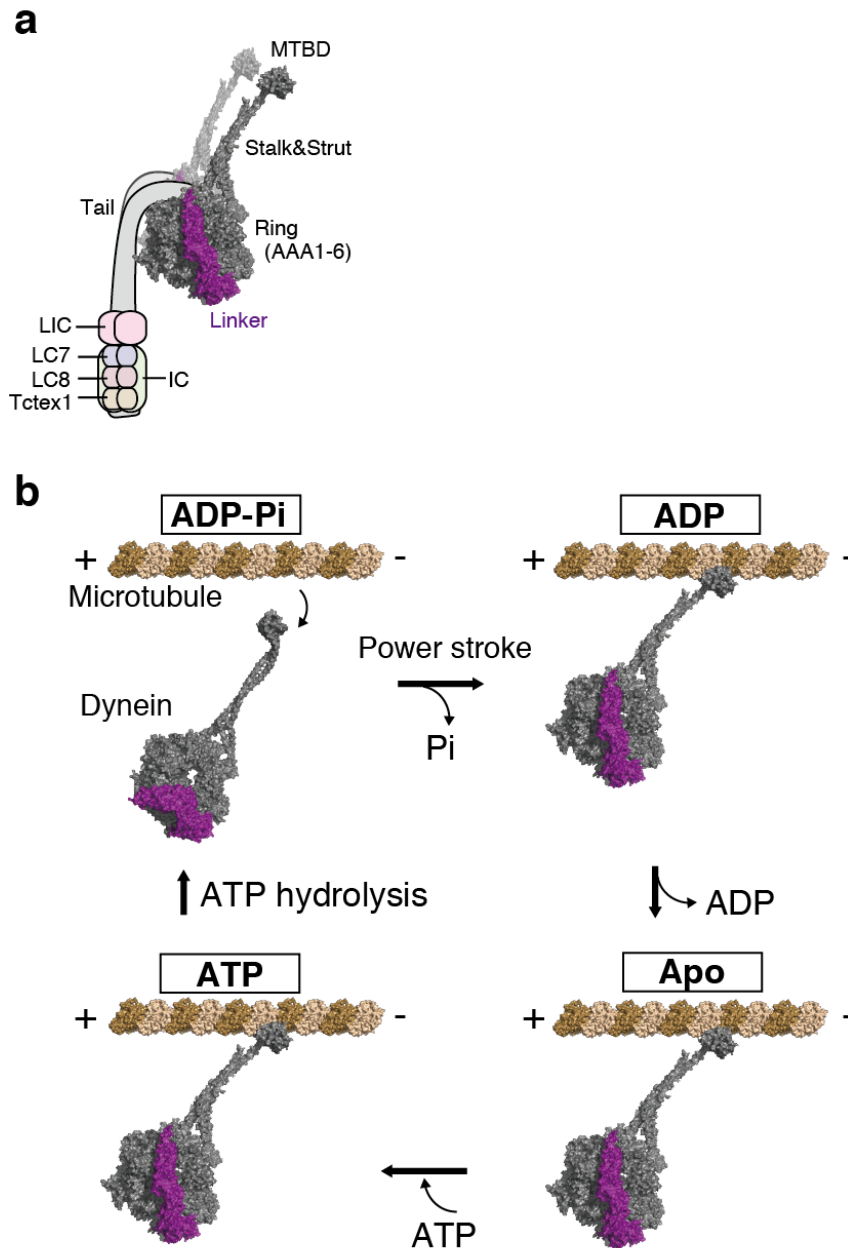


図 1.1 ダイニンの構造と化学反応サイクル

(a) 天然ダイニンの構造. パワーstroke後のモータードメイン構造 (PDB 3VKH, ADP 状態) に tail および中間鎖(IC), 中間軽鎖(LIC), 軽鎖(Tctex1, LC8, LC7)が結合している.

(b) 推定されているダイニンの構造と化学反応サイクルモデル[Roberts et al. 2013 を参考にし改変]. ADP-Pi 状態からリン酸放出過程でダイニンが微小管 (PDB 1JFF) に結合し, パワーstrokeする (PDB 3VKH). ADP を放出し ATP 結合後加水分解すると, ダイニンが微小管から解離し, パワーstroke前の状態 (PDB 4RH7) に戻ると考えられている.

### 1.1.3 ダイニンの運動機構

ダイニン分子の運動特性を根本から理解するために、運動以外の機能をそぎ落としたダイニンモータードメインのみで構成された組換え体単頭ダイニンを用いた分子運動の理解が進められてきた。一方、ダイニン双頭分子の運動メカニズムを理解するにあたり、微小管やダイニン分子を蛍光標識し、光ピンセット法や全反射蛍光顕微鏡を用いた *in vitro* 1 分子実験系の測定が行われてきた。

出芽酵母・粘菌由来のダイニンは微小管のマイナス端方向に長距離運動したことから、ダイニンは processive モーターと呼ばれている [Reck-Peterson et al. 2006, Imai et al. 2015]。これに対し、哺乳類由来のダイニンは、ダイニン単体では processivity があると主張する研究 [Toba et al. 2006, Nicholas et al. 2015] と、processivity がないと主張する研究があり意見が分かっている [Trokter et al. 2012, McKenney et al. 2014, Torisawa et al. 2014, Schlager et al. 2014]。Processivity をもたない哺乳類由来のダイニンの場合には、様々な制御タンパク質（ダイナクチンや Bicaudal-D2 など）と複合体を形成することで processivity をもつようになった [McKenney et al. 2014, Belyy et al. 2016]。アクセサリタンパク質が結合することで、C-terminal ドメインや二量体間に働く抑制機構が解消されるため、processivity を獲得すると推定されている [Torisawa et al. 2014, Nicholas et al. 2015]。

Processivity をもつ哺乳類由来のダイニン 1 分子の歩幅は~8 nm であり、二量体チューブリン間隔 8.2 nm に一致した [Toba et al. 2006, Nicholas et al. 2015]。一方、酵母由来のダイニンの歩幅の多くは、~8 nm であるが、4~24 nm の歩幅も観測された [Gennerich et al. 2007]。これらの結果をもとに、ダイニンの歩行メカニズムは、キネシン (kinesin-1) の場合のように頭部を交互に前に出す hand-over-hand 機構で、歩幅 ~8 nm で運動することを主張する研究と [Toba et al. 2006, Yildiz et al. 2004]、hand-over-hand 機構以外の歩行様式もとることを主張する研究とがある [Qiu et al. 2012, Dewitt et al. 2012]。多様な歩行様式をとる理由として、2 つの頭部間距離が 0 nm から 16 nm まで取りえることが構造研究からも指摘されている [Imai et al. 2015]。

## 1.2 本論文の目的と概要

双頭ダイニンが微小管上を一方向に運動することが、ダイニンモータードメインがパワーストロークを生じることと何らかのつながりがあると考えられている[Roberts et al. 2013]. 実際、キネシン-1 やミオシン V の場合、単量体モーター頭部のパワーストローク（キネシンの場合は、ネックリンカードッキング）が二足歩行運動において重要な役割をもつことが示唆されている[Kamei et al. 2005, Sellers & Veigel 2010]. しかし、ダイニンが微小管に結合し、パワーストロークによって運動が引き起こされることを示す報告はない。

本研究では、ダイニンが微小管に結合してどのくらいの運動変位が生じるかを明らかにするために、ATP 存在下で単量体のヒト由来ダイニンモータードメインが微小管上を運動した変位を光ピンセットによって測定した。さらに、この変位とダイニンの構造変化（パワーストローク）の関係を、FRET 法を用いた測定および反応モデル計算によって明らかにした。本研究で単量体ダイニンを用いた理由は、双頭ダイニンでは、頭部間が相互作用する可能性があり、個々の頭部の変位のみを抽出することが困難であるが、単量体ダイニンでは、頭部の変位をより直接的に抽出できると考えたからである。

本論文は5章からなり、構成は次の通りである。第1章では、本研究の研究背景、目的、概要を述べた。第2章では、タンパク質の調製方法と測定方法を説明した。第3章で精製したダイニンの性質を示す実験結果、FRET 法を用いた構造変化の ATP 濃度依存性、単量体ダイニン1分子が微小管に結合した後に起こる変位の ATP 濃度依存性について述べた。第4章では、ATP 濃度依存性を中心に考察し、二足歩行モデルを提案した。第5章では、本論文のまとめを述べた。

## 第2章 材料調製と測定方法

### 2.1 タンパク質の調製

#### 2.1.1 チューブリン・微小管の調製

##### 2.1.1.1 チューブリンの精製

微小管は動物細胞内で中心体から放射状に伸びた細胞骨格としての機能を持っている。細胞内では重合・脱重合を行うことで細胞の形態の維持や形態変化に関わる動的なタンパク質である。微小管は神経軸索内に多く存在し、微小管には、多数の微小管結合蛋白質 (MAPs ; microtubule associated protein, タウタンパク質など) が結合している。

微小管は  $\alpha$  チューブリンと  $\beta$  チューブリンが非共有結合した約 8.2 nm のヘテロ二量体をサブユニットとして重合することで形成され、チューブリン二量体 ( $\alpha$ ,  $\beta$  チューブリン) とが一直線に並んだプロトフィラメント約 13 本から形成された中空円筒構造(直径約 25 nm) をとる [Ray et al. 1993]。  $\alpha$  チューブリンのある側をマイナス端、  $\beta$  チューブリンのある側をプラス端とよび、細胞中心体側が微小管のマイナス端に相当する。チューブリンは GTP 結合蛋白質であり、重合すると微小管として構造が安定する。 Paclitaxel (パクリタキセル) は、微小管形成を安定化し、脱重合を阻害する。

本実験では豚脳からチューブリンを精製した。精製の概要は、豚脳を切って不純物を除いた後、微小管重合→脱重合→重合→脱重合と繰り返した。不純物として取り除く MAPs の等電点がチューブリンの等電点より大きいことから、陽イオン交換クロマトグラフィーによりチューブリンを精製した [Castoldi & Popov 2003]。以下に詳細のプロトコルを示す。

##### 豚脳内の不純物除去

精製当日に東京芝浦臓器 (株) にて豚脳 2 個を受け取り、ハサミで切って血管と脳膜を取り除いた。これを Washing solution 溶液 500 ml で洗った。Washing solution 溶液の構成は、0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (#197-02865, Wako), 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (#197-09705, Wako), 0.24 M Sucrose (#196-00015, Wako), 1 mM  $\text{MgSO}_4$  (#137-12335, Wako), pH 6.8 である。その後、1 mM ATP (#A3377, Sigma-Aldrich), 0.5 mM PMSF (#36978, Thermo), 0.5 mM DTT (#43815, Sigma-Aldrich) と PCB (phosphocellulose buffer) 溶液の計 140 ml を加え、ミキサー内で 15

秒回転したのち 20 秒休みを 6 回繰り返して塊がないことを確認した。PCB 溶液の構成は、0.1 M PIPES (#P6757, Sigma-Aldrich), 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM EGTA (#346-01312, Dojindo), pH 6.8 である。5 分氷上に置いた後、8,000 rpm (6,500×g, 超遠心機#CP70MX, 最高回転数 19 krpm のアングルローター#P19A 使用, HITACHI)で 20 分 2 °C で遠心し、回収した上清を更に 42,500 rpm (132,500×g, 最高回転数 70 krpm のアングルローター#P70AT 使用, HITACHI)で 30 分超遠心した。

#### 1 回目の重合, 脱重合

遠心後の上清 (~110 ml) に終濃度 0.5mM GTP (#G8877, Sigma-Aldrich), 終濃度 1mM ATP を含んだ glycerol (#075-00616, Wako) を~55 ml をかき混ぜながら加え、脱重合したチューブリンを 35 °C で 45 分重合した後に 40 krpm (117,300×g) で 30 分超遠心して微小管を沈殿させた。この沈殿物に対して、PCB 溶液と終濃度 0.2 mM GTP を加え、氷上で超音波破碎 (超音波分散器#UH-50, SMT Co., Power : 7 で 2 秒破碎したのち 30 秒休みを 30 回繰り返した) することで、微小管を短く断片化し、脱重合した後、50 krpm (183,400×g)で 30 分超遠心して上清のチューブリンを回収した。

#### 2 回目の重合・脱重合

上清 (30 ml) に対し、終濃度 1 mM GTP を含んだ glycerol を 15 ml 加えて 35 °C で 30 分静置し、チューブリンを重合させた。50 krpm (183,400×g)で 20 分超遠心し、微小管を沈殿させ、この沈殿物に終濃度 0.2 mM GTP を含んだ PCB 溶液 (6 ml)を加えた。氷上で超音波破碎 (Power : 7, 2 秒破碎後 15 秒休憩を 30 回繰り返した) してチューブリンに再度脱重合し、80 krpm (265,000×g, 超遠心機#CS100GXL, アングルローター#S100AT4 使用)で 20 分超遠心して、上清のチューブリンを回収した。

#### 陽イオンカラムクロマトグラフィー精製

陽イオン交換セルロース担体 (リン酸セルロース, Whatman P11, #4071, GE Lifescience) を 0.5 N NaOH (#198-13765, Wako), MilliQ, PCB 溶液, 終濃度 0.1 mM GTP を含む PCB 溶液の順で吸引濾過により洗浄した。このセルロース担体に、上記で回収したチューブリンを流し入れ、1 ml/min の速度でフラクションコレクター (#2110, Bio-rad) にて回収し、UV モニター (#731-8300, Bio-rad) により検知した波長 280 nm での吸光度が 0.5 以上のフラクションに終濃度 1 mM MgSO<sub>4</sub> と終濃度 0.5 mM GTP を加え、液体窒素で急冷凍結して -80 °C で保存した。

チューブリンの正確な濃度は、Bradford 法にて測定した。タンパク質濃度の定量法である

Bradford 法に用いられる CBB G-250 色素はタンパク質の定量分析に用いられる物質であり、タンパク質と結合すると、波長 595 nm で吸収が極大となり、青色を呈色する。本定量測定は、サンプルを Bradford 溶液(#23200, Thermo)で 50 分の 1 に希釈し、波長 595 nm での吸光度を測定した。これとは別に、BSA (#A3059, Sigma-Aldrich)の濃度と吸光度の関係から蛋白質濃度を決定した。



### 2.1.1.2 微小管のラベル化

微小管を可視化するために、官能基 NHS エステル (N-hydroxysuccinimide-ester)を含んだ蛍光分子ローダミン(TAMRA, #C1171, Molecular Probes)で微小管を蛍光ラベル標識した。ローダミンは蛍光標識色素として汎用的に用いられ、最大励起波長は 550 nm, 最大蛍光波長は 575 nm である。また、微小管のビオチン化には、アビジンとの結合における立体障害を低減するために 14 個の-CH<sub>2</sub>-を含んだ長いスペーサーアームをもつ Biotin-X-X-NHS (#B3295, Sigma-Aldrich) で微小管をラベル標識した。いずれにも含まれている官能基 NHS エステルは、チューブリンのアミノ酸側鎖のアミノ基 (リシンなど) と反応する際に標識部位と共有結合する役割をもつ。微小管のラベル化には pH 8.6 の溶液を用い、微小管をグリセロールと混合することで微小管を重合促進させた。脱重合や保存時の溶液は pH 6.8 である。以下に作製方法を述べる[Hyman et al. 1991].

#### 微小管の作製

精製したチューブリン 100  $\mu$ l に glycerol を 45  $\mu$ l 加えて 30 分 37 °C に静置して微小管重合を行ったのち、high pH cushion 溶液 150  $\mu$ l を敷いた上に微小管溶液をのせて、45 krpm (74,000 $\times$ g), 35 °C, 10 分超遠心した。High pH cushion 溶液の構成は、0.1 M Na-HEPES (#17514-86, nacalai tesque), 60% v/v glycerol, 1 mM MgCl<sub>2</sub> (#135-00165, Wako), 1 mM EGTA, pH 8.6 である。沈殿物を labeling buffer 溶液(0.1 M Na-HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 40% v/v glycerol, pH 8.6) 200  $\mu$ l でリンスした後、同 solution 100 $\mu$ l 加えて沈殿した微小管を溶解した。

#### 蛍光色素・ビオチンの混合

微小管濃度 (~70%回収と仮定) の約 15 倍量に相当するローダミン (終濃度~725  $\mu$ M) 又は Biotin-X-X-NHS (終濃度 2 mM) を微小管溶液に加え終濃度 1 mM GTP と混合したのち、37 °C で 35 分ローテーターに取り付けて混ぜ合わせた。その後、反応停止剤として quench 溶液 100  $\mu$ l を加えた。遠心チューブに low pH cushion 溶液 100  $\mu$ l を敷いた上にラベルされた微小管溶液をのせて、80 krpm (235,000 $\times$ g), 35 °C で 10 分超遠心し、ラベルされた微小管を沈殿させた。なお、チューブリンやフリーのローダミンと混ざったり、ラベルされた微小管が遠心チューブ壁面に強く押されて変性したりするのを防ぐため、高濃度グリセロールを含んだ cushion を敷いた。Quench 溶液の構成は、160 mM PIPES, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA, 100 mM K-glutamate (#G1501, Sigma-Aldrich), 40% v/v glycerol, pH 6.8 である。Low pH cushion 溶液の構成は 80 mM PIPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 60% v/v glycerol, 1 mM GTP, 1 mM

MgSO<sub>4</sub>, pH 6.8 である.

#### 脱重合と保存

ラベルされた微小管を含んだ沈殿物に対して BRB80 溶液 (80 mM PIPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, pH 6.8) 400 μl でリンスした後, 同溶液 30 μl を加えて沈殿物を溶解した. 5 分おきに 10 回氷上でピペッティングすることで微小管を脱重合させたのち, 80 krpm (235,000×g), 2 °C で 10 分超遠心した. 上清にある脱重合したチューブリンを 2 μl ずつに分注し, 液体窒素で急速冷凍して -80 °C に保存した.

#### 蛍光チューブリンの濃度測定

チューブリン濃度と蛍光ラベル率は分光光度計 (#V-530, Jasco) を用いて算出した. 波長 280 nm におけるチューブリンの吸光係数は 115,000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> である. ローダミンの吸光係数は 95,000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> であり, 波長 280 nm での吸光度 (ABS 280) は波長 550 nm での吸光度 (ABS 550) の 0.21 倍である. そのため, チューブリンの濃度を算出する際, 波長 280 nm でのローダミンの吸光度を除く必要がある. チューブリン濃度・蛍光チューブリン濃度・蛍光ラベル率は以下の 3 式から計算した. なお, 蛍光チューブリンの濃度は, チューブリンと結合していないフリーのローダミンは含まれていないと仮定して算出した. また, ビオチン化チューブリンの濃度は Bradford 法により測定した.

- ・ 蛍光チューブリン濃度 :  $(\text{ABS } 550) \times \text{希釈率} / 95,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- ・ チューブリン濃度 :  $[(\text{ABS } 280) - (\text{ABS } 550) \times 0.21] \times \text{希釈率} / 115,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (1)
- ・ 蛍光ラベル率 :  $(\text{蛍光チューブリン濃度}) / (\text{チューブリン濃度})$

### 2.1.1.3 極性微小管の作製

極性のない蛍光微小管を作製する際は、蛍光チューブリンと蛍光標識していないチューブリンを混合し、37 °C、30 分で重合して、1 mM GTP を含んだ 50  $\mu$ M paclitaxel (#169-18611, Wako)を加えて室温で保存した。

ダイニンは微小管のマイナス端方向に運動するという特性があるため、蛍光ラベル率の違いから極性が分かる微小管を作製した。まず、極性微小管作製方法の概要を述べる。GTP の非加水分解アナログである GMPCPP (#NU-405, Jena Bioscience)を含み、蛍光ラベル率の高い (~16 %) 蛍光チューブリンを重合させることで微小管の核を形成した。以降これを GMPCPP seed と呼ぶ。37 °C で 5 分静置してできた GMPCPP seed 1  $\mu$ l を 50 回程度強くピペッティングして短くした後、NEM 化されたチューブリン 0.5  $\mu$ l を加えて 5 分更に静置した。NEM は、チューブリンのシステイン残基 (SH 基)と特異的に結合することで、微小管がマイナス端から伸長するのを防止する[Phelps et al. 2000]。混合溶液のうち 0.5  $\mu$ l を、蛍光ラベル率の低い 5 %以下の蛍光チューブリン 2  $\mu$ l と混合して 37 °C で 30 分静置することで、seed のプラス端から微小管を伸長させた。重合後、1 mM GTP を含む終濃度 50  $\mu$ M paclitaxel を加えて室温で遮光保存した。このとき、ラベル率の高い方がマイナス端、低い方がプラス端となる[Hyman 1991] (図 2.1)。

次に、極性微小管作製に用いた各種のチューブリン作製方法を詳細に述べる。GMPCPP seed は終濃度 80  $\mu$ M、蛍光ラベル率 20 %であり、終濃度 2 mM GMPCPP を混合した上で、100 krpm (383,000 $\times$ g)、5 min、2 °C で超遠心した上清を液体窒素で急速冷凍した後 -80 °C で保存した。

NEM 化されたチューブリンは、蛍光標識していないチューブリン、70 mM GTP、70 mM NEM (#058-02061, Wako)を混合して 10 分氷上に静置し反応させた後、NEM 化停止のため終濃度 20 mM DTT を加えた。微小管と化学反応しなかったフリーの NEM と DTT が極性微小管作製に影響を与えるのを防ぐため、6 kDa 以下の化合物を除去できる Micro Bio-Spin 6 chromatography カラム (#732-6221, Bio-rad)を用いてフリーの化合物を除去した。カラム内部に初めに含まれていた溶液を遠心で除去し、BRB80 溶液で 4 回遠心してカラム内の溶液が 99.9 %以上の高効率で交換された後、NEM 化されたチューブリン溶液をカラム内にアプライして 1000 $\times$ g (3,300 rpm)、4 min、2 °C で遠心した。塊を除去するため、100 krpm (383,000 $\times$ g)、5 min、2 °C で超遠心し、上清の NEM 化されたチューブリンを液体窒素で急速冷凍した後 -80 °C で保存した。

蛍光ラベル率が 5 %以下と低い蛍光チューブリンは、seed から伸長させる必要がある。チューブリンの重合反応は、ある一定濃度 (臨界濃度 1.8  $\mu$ M) 以上で促進され[Gaskin & Cantor

1974], 極性微小管を効率よく作製するために, 臨界濃度より高く適切な終濃度  $22 \mu\text{M}$  で適応した. この蛍光チューブリンに終濃度  $1 \text{ mM}$  GTP が含まれており, 液体窒素で急速冷凍した後  $-80^\circ\text{C}$  で保存した. ビオチン化した極性微小管を作製する場合は, ビオチン化チューブリンが各種チューブリンに対して全体の  $50\%$  程度含まれるように作製した.

作製した極性微小管の極性の正確性は, 微小管の滑り運動測定 (詳細の実験手法は 2.2.1 章に記載) で検証した.  $1 \text{ mM}$  ATP 条件下で微小管の滑り運動測定を行った結果, ダイニンをガラス面に固定した時,  $86$  本の極性微小管のうち  $80$  本 ( $\sim 93\%$ ) の極性微小管がマイナス端方向に動いている動画が観察できた (図 2.1).

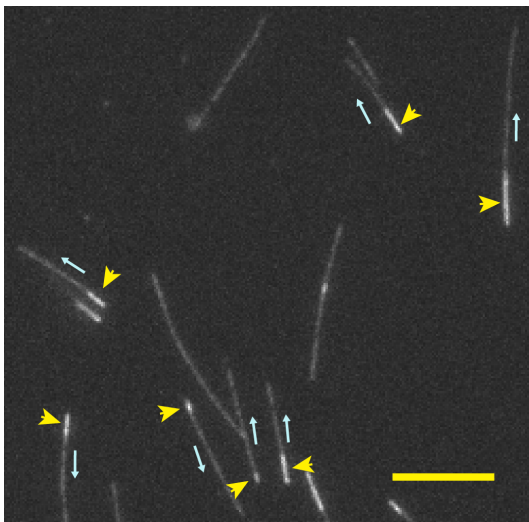


図 2.1 極性微小管の蛍光像

微小管のマイナス端 (黄色矢印先端で位置表示) を濃い蛍光ラベル率で標識した. 2.2.1 章に述べる微小管の滑り運動測定によりダイニンが微小管をマイナス端方向に動くために, ガラス面に固定されたダイニン(D384)は微小管をプラス端側に動かした (水色矢印方向側). スケールバーは  $5 \mu\text{m}$ .

## 2.1.2 組換え体・変異ダイニンの調製

### 作製したダイニンコンストラクト

ヒト細胞質ダイニン組換え体は、cytoplasmic dynein 1 の cDNA (KIAA0325 ; かずさ DNA 研究所より取得) を用いて、本研究室で作製方法が独自に検討されてきた。本研究で作製したダイニンコンストラクトのアミノ酸配列を図 2.2a に示しており、主にモータードメインで構成された分子量 384 kDa の単量体のダイニン D384 (Gly<sup>1288</sup>-Glu<sup>4646</sup>, 3359 アミノ酸) を主な実験対象分子とした。ダイニン tail の一部に含まれている 32 のアミノ酸残基 Gly<sup>1288</sup>-Val<sup>1319</sup> は、微小管に対するダイニンの方向性の制限を与えないフレキシブルな部位として挿入されており、二量体化に関わるアミノ酸残基は含まれていない。D384 の N 端側には、ダイニンの単離精製用に His<sub>6</sub> タグと Flag タグ、そしてアビジンとの強結合に有用な BCCP が N 末端から順に導入してある。

さらに、オワンクラゲ(*Aequorea coerulescens*)由来の AcGFP1 (pAcGFP1 vector, clontech, 以降 GFP と表記, 239 アミノ酸) を BCCP とモータードメインの間に導入したダイニン (D384G) と、D384 または D384G に対してオワンクラゲ(*Aequorea victoria*)由来の BFP (pRSET vector, Invitrogen, 239 アミノ酸) を Glu<sup>2404</sup>-Gly<sup>2405</sup> 間に導入したダイニン (D384B, D384GB, 表 2.1) を作製した。また、linker とリング間で相互作用する AAA2 ドメイン内の β ループを削った変異ダイニンとして、ダイニンコンストラクト D384GB に対して PS-I insert (Leu<sup>2324</sup>-Leu<sup>2335</sup>, 12 アミノ酸) を GlyGly に置き換えた D384GB- Δ PSI, H2 insert (Thr<sup>2267</sup>-Asp<sup>2277</sup>, 11 アミノ酸) を GlyGly に置き換えた D384GB- Δ H2, 双方の β ループを GlyGly に置き換えた D384GB- Δ PSI Δ H2 の 3 種類を作製した [Kon et al. 2012, Schmidt et al. 2015] (図 2.2b)。さらに、二量体ダイニンとして GST タグを BCCP とダイニンモータードメインの間に導入したダイニン (DG384) を作製し、単量体ダイニンとの活性測定による比較のみに用いた。作製したこれらのダイニン DNA の塩基配列解析はファスマック (株) に依頼し、塩基配列が正しいことを遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX<sup>®</sup> Ver. 11 を用いて確認した。

### 組換え体・変異ダイニンの発現

哺乳類由来の細胞質ダイニンの発現・精製方法は 5 つの研究グループが既に報告しており [Trokter et al. 2012, McKenney et al. 2014, Torisawa et al. 2014, Schlager et al. 2014, Nicholas et al. 2015] , うち 4 研究グループは、我々と同様に昆虫細胞発現系を用いている。我々も、分子量の大きいダイニンを大量に発現するため、バキュロウイルス (*Autographa californica* 核多角体病ウイルス (AcMNPV)) を昆虫細胞 (Sf9, *Spodoptera frugiperda* 由来の蛾の卵巣細胞) に用いた Bac-to-Bac 発現系を用いた (Invitrogen)。

まず、組換えバキュロウイルス DNA を作製した。pFastBac1 ベクターに組み込まれた細胞質ダイニン及び変異体 DNA を、大腸菌株 DH10Bac に導入し、42 °C で 30 秒ヒートショックさせ、氷上 2 分で形質転換効率を上げ、SOC 培地を加えて 4 時間 37 °C で振盪培養後、カナマイシン (50 µg/ml, #117-00341, Wako), ゲンタマイシン (7 µg/ml, #078-04981, Wako), テトラサイクリン (10 µg/ml, #203-08892, Wako), X-gal (100 µg/ml, #B-4252, Sigma-Aldrich), IPTG (40 µg/ml, #099-02534, Wako) 入りの寒天培地にまいて 48 時間 37 °C に培養してコロニーを形成させた。形成されたコロニーのうち白いコロニーの大腸菌を、液体培地に植菌し 6~16 時間 37 °C で振盪培養後、組換えバキュロウイルス作製の bacmid DNA を溶出した。

次に、組換えバキュロウイルスを作製した。Sf9 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  細胞/ml) を、FBS (Gibco<sup>®</sup>, Qualified, Thermo) を含んだ PSFM-J1 培地 (#160-25851, Wako) 2 ml で 6 穴プレートを用いて培養した。細胞が底面に付着しているのを確認して培地を取り除き、PSFM-J1 培地で 2 度洗ったのち、Cellfectin<sup>®</sup> II と組換えバキュロウイルス DNA 溶液を含んだ PSFM-J1 培地を加えて、トランスフェクションした。6 時間 27 °C で静置した後、培地を取り除き、10 % FBS を含む PSFM-J1 培地を加え、3 日間 27 °C で静置して、500×g で 5 分遠心した上清を P0 ウイルスストックとして回収した。

次に、組換えバキュロウイルスを増殖した。Sf9 細胞 ( $\sim 2 \times 10^6$  細胞/ml, 60-70%程度) を、10 % FBS を含む PSFM-J1 培地で培養し、P0 ウイルスストックを加えた。48 時間 27 °C で静置した後、500×g で 5 分遠心した上清を組換えバキュロウイルス (P1 ウイルスストック) として回収した。

最後に、Sf9 細胞 ( $\sim 2 \times 10^6$  細胞/ml, 60-70%程度) を、10 % FBS を含む PSFM-J1 培地 25 ml で 175 cm<sup>2</sup> のラージフラスコ (#661160, greiner bio-one) を用いて培養し、組換えバキュロウイルス 100 µl を加えた。72 時間 27 °C で組換えダイニンを含んだ細胞を大量培養した後、2000 rpm (500×g), 7 分, 4 °C で遠心し、沈殿した感染細胞を回収して液体窒素で急速冷凍した後 -80 °C で保存した。

### 組換え体・変異ダイニンの精製

ダイニン DNA に導入された Flag タグを用いたプルダウン法でダイニンを精製するため、Flag タグの付いたダイニン蛋白質を Flag 抗体レジンと結合させて、洗浄した後 FLAG peptide でダイニンを溶出する手法をとった。

### 活性の維持されたダイニンの抽出と濃度算出

精製した組換え体ダイニン (D384, D384G, D384GB, DG384) に関して、高 ATP 濃度で微小管から不活性ダイニンを除去するために、ATP 存在下で微小管アフィニティーを行った。

なお、D384B は BFP の特性を知るためだけに用い、活性測定には用いなかったため、微小管アフィニティーを行わなかった。微小管をダイニンの 3 倍以上の濃度で 100  $\mu$ M ATP 存在下で混合し、80 krpm (235,000 $\times$ g), 10 分, 25  $^{\circ}$ C で超遠心したときに微小管から解離した上清を、活性の維持されたダイニンとして測定に用いた。この時に沈殿したダイニンは、微小管から解離しない不活性ダイニンとアグリゲーション化したダイニンが含まれていると考えられる。精製したダイニンと微小管アフィニティー処理をしたダイニンを、Bromophenol Blue (#021-02911, Wako) を含むマーカー色素溶液と混合し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。CBB-R250 を含む染色液 (#299-50101, Wako) で染色した結果は図 2.2c の通りである。ダイニンの濃度は Bradford 法により測定した。微小管アフィニティー時のダイニンの濃度は、ソフトウェア ImageJ (NIH) を用いて SDS-PAGE したゲルのバンドをデジタルカメラで撮影した像の濃淡から、濃度決定を行った。

インターネット公表に関する同意が  
得られなかったため非公表

## 図 2.2 作製したダイニン

- (a) 作製した 8 種のダイニンコンストラクトのアミノ酸配列の構造と分子構造。右列に示したダイニンモータードメイン, GFP, BFP, BCCP, GST の構造は各々 PDB 3VKH, 1GFL, 1BFP, 1BDO, 1VF4 より編集した。
- (b) リングと linker の相互作用部位拡大図 (PDB 3VKG より編集)。AAA2 ドメイン (水色) から突出した 2 つのループ (H2, PS-I insert, 青色) が linker (紫色) と相互作用する。AAA1 の ATP 結合部位と 2 つのループは比較的近い位置にある。
- (c) 精製したダイニンの SDS-PAGE 結果。分子量マーカーを MK (Marker, #161-0373, bio-rad), 溶出したダイニン溶液を Elu (Elution) と表記した。微小管アフィニティーによる遠心により得られた、上清にある活性の高いダイニンを s (supernatant), 沈殿したダイニンと微小管の混合物を p (pellet) と示した。

表 2.1 ダイニン D384GB のアミノ酸配列

一重下線(HHHHHH)は His<sub>6</sub> タグ，二重下線(DYKDDDDK)は Flag タグ，波線(129 アミノ酸)は BCCP，緑色(239 アミノ酸)は GFP，青色(239 アミノ酸)は BFP，赤色は AAA2 H2 insert，橙色は AAA2 PS-I insert，紫色は linker，薄紫色は tail (32 アミノ酸)の一部である．左の数字は，D384GB の残基一番左の番号を示す（挿入部分は番号を振っていない）．

```

MSYYHHHHHHHDYKDDDDKNIPTTENLYFQGAMGMKLVTVNGTAYDVDVDVDKSHENPMG
TILFGGGTGGAPAPAAGGAGAGKAGEGEIPAPLAGTVSKILVKEGDTVKAGQTVLVLEAM
KMETEINAPTDKVEKVLVKERDAVOGGGLIKIGDLELEIGRNSCRSTLEDPRVPVATM
VSKGAELFTGIVPILIELNGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTL
VTTLSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFEDDGNYSRAEVKFEGDTLV
NRIELTGTDFKEDGNILGNKMEYNYNAHNVYIMTDKAKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD
HYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMIYFGFVTAAAITHGMDELYKNS
KAYVDELTSRGR
1288      GRLKDDREKCAKAKEALELTDTGLLSGSEERVQVALEELQDLKGVSELSKVW
1341      EQIDQMKEQPWVSVQPRKLRQNLDALLNQLKSFPARLRQYASYEFVQRLLKGYMKINMLV
1401      IELKSEALKDRHWKQLMKRLHVNVVSELTLGQIWDVLDLQNEAIVKDVLLVAQGEMALE
1461      EFLKQIREVWNTYELDLVNYQNKRLIRGWDDLFNKVKEHINSVSAMKLSPHYKVFEEDA
1521      LSWEDKLNRIMALFDVWIDVQRRWVYLEGIFTGSADIKHLLPVETQRFQSISTEFLALMK
1581      KVSKSPLVMDVLNIQGVQRSLERLADLLGKIQKALGEYLERERSSPFRFYFVGDEDLLEI
1641      IGNSKNVAKLQKHFKMFAGVSSIILNEDNSVVLGISSREGEEVMFKTPVSITEHPKINE
1701      WLTLVKEMRVTLAKLLAESVTEVEIFGKATSIDPNTYITWIDKYQAQLVVLSAQIAWSE
1761      NVETALSSMGGGGDAAPLHSVLSNVEVTLNVLADSVLMEQPPLRRRKLEHLITELVHQRD
1821      VTRSLIKSKIDNAKSFEWLSQMRFYFDPKQTDVLQQLSIQMANAKFNYGFEYLGVQDKLV
1881      QTPLTDRCYLTMTQALEARLGGSPFGPAGTGKTESVKALGHQLGRFVLVFNCDETFDFQA
1941      MGRIFVGLCQVGAWGCFDEFNRLEERMLSAVSQVQCIQEALREHSNPNYDKTSAPITCE
2001      LLNKQVKVSPDMAIFITMNPGYAGRSNLPDNLKKLFRSLAMTKPDRQLIAQVMLYSQGFR
2061      TAEVLANKIVPFFKLCDEQLSSQSHYDFGLRALKSVLVSAGNVKRERIQIKREKEERGE
2121      AVDEGEIAENLPEQEILIQSVCETMVPKLVAEDIPLLFSLLSDVFPGVQYHRGEMTALRE
2181      ELKKVCQEMYLTYGDGEEVGGMWVEKVLQLYQITQINHGLMMVGPSGSGKSMAWRVLLKA
2241      LERLEGVEGVAHIIDPKAISKDHLYGTLDPNTREWTDGLFTHVLRKIIDSVRGELQKRQW

```



2301 IVFDGDVDPEWVENLNSVLDDNKLLTLPNGERLSLPPNVRIMFEVQDLKYATLATVSRCG  
 2361 MVWFSEDVLSTDMIFNNFLARLRSIPLDEGEDEAQRRRKGKEDE  
 MVSKGEEELFTGVVPILEVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPT  
 LVTTLSHGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTL  
 VNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFNSHNVYIMADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLA  
 DHYQQNTPIGDGPVLLPDSHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK  
 2405 GEEAASPMLQIQRDAATIMQPYFTSNGLVTKALEHAFQLEHIMDLTRLRCLGSLFS  
 2461 MLHQACRNVAQYNANHPDFPMQIEQLERYIQRYLVYAILWSLSGDSRLKMRAELGEYIRR  
 2521 ITTVPLPTAPNIPIIDYEVSI SGEWSPWQAKVPQIEVETHKVAAPDVVVPTLDTVRHEAL  
 2581 LYTWLAEHKPLVLCGPPGSGKTMTLFSALRALPDMEVVGLNFSSATTPELLLLKTFDHYCE  
 2641 YRRTPNGVV LAPVOLGKWLVLFCDEINLPMDKYGTQRVISFIRQMVEHGGFYRTSDQTW  
 2701 VKLERIQFVGACNPPTDPGRKPLSHRFLRHVPVVYVDYGPASLTQIYGTFNRAMLRLLIP  
 2761 SLRTYAEPLTAAMVEFYTMSQERFTQDTQPHYIYSPREMTRWVRGIFEALRPLETLPVEG  
 2821 LIRIWAHEALRLFQDRLVEDEERRWTDENIDTVALKHFPNIDREKAMSRPILYSNWL SKD  
 2881 YIPVDQEELRDYVKARLKVFYEEELDVPLVLFNEVL DHVLRIDRIFRQPQGHLLLI GVS  
 2941 AGKTTL SRFVAMNGLSVYQIKVHRKYTGEDFDEDLRTVLR RSGCKNEKIAFIMDES NVL  
 3001 DSGFLERMNTLLANGEVPG LFEGDEYATLMTQCKE GAQKEGLMLDSHEELYKWF TSQVIR  
 3061 NLHVVF TMNPSSEGLKDRAATSPALFNRCVLNWF GDWSTEALYQVGKEFTSKMDLEKPNY  
 3121 IVPDYMPVVYDKLPQPPSHREAI VNSCVFVHQT LHQANARLAKRGGRTMAITPRHYLDFI  
 3181 NHYANLFHEKRSELEEQQMHLNVGLR KIKETVDQVEELRRDLRIKSQELEVKNAAA NDKL  
 3241 KKMVKDQQEAEKKKVM SQEIQEQ LHKQQEVIADKQMSVKEDLDKVEPAVIEA QNAVKSIK  
 3301 KOHLVEVRSMANPPAAVKLALESICLLLGESTTDWKQIRSIIMRENFIPTIVNFS AEEIS  
 3361 DAIREKMKNYMSNPSYNYEIVNRASLACGPMVKWAI AQLNYADMLKRVEPLRNELQKLE  
 3421 DDAKDNQQKANEVEQMIRDLEAS IARYKEEYAVLISEAQAIKADLA AVEAKVNRSTALLK  
 3481 SLSAERERWEKTSETFKNQ MSTIAGDCLLSAAF IAYAGYFDQQMRQNLFTTWSHHLQOAN  
 3541 IQFRTDIARTEYLSNADERLRWQASSLPADDLCTENAIMLKR FNRYPLIIDPSGQATEFI  
 3601 MNEYKDRKITR TSFLDDAFRKNLESALRFGNPLL VQDVESYDPVLNPNV LNREVRRTGGRV  
 3661 LITLGDQDIDLSPSFVIFLSTRDPTVEFPDLC SRVTFVNF TVTRSSLOSQCLNEVLKAE  
 3721 RPDVDEKRSDLLKLOGEFQLRLRQLEKSL LQALNEVKGRILDDDTIIT TLENLKREAAEV  
 3781 TRKVEETDIVMQEVETVSQQYLPLSTACSSIYFTMESL KQIHFLYQYSLQOFFLDIYHNVL  
 3841 YENPNLKGVT DHTQRLSIIITKDLFQVAFNRVARGMLHQDHITFAMLLARIK LKGTVGEPT  
 3901 YDAEFQHFLRGNEIVLSAGSTPRIQGLTVEQAEAVVRLSCLPAFKDLIAKVQADEQFGIW

3961 LDSSSSPEQTVPYLWSEETPATPIGQAIHRLLLIQAFRPDRLLAMAHMFVSTNLGESFMSI  
4021 MEQPLDLTHIVGTEVKPNTFVLMCSVPGYDASGHVEDLAAEQNTQITSIAIGSAEGFNQA  
4081 DKAIN TAVKSGRWMLKNVHLAPGWLMOLEKKLHSLQPHACFRLFLTMEINPKVPVNLRLR  
4141 AGRIFVFEPPPGVKANMLRTFSSIPVSRICKSPNERARLYFLLAWFHAI IQERLRYAPLG  
4201 WSKKYEFGESDLRSACDTVDTWLDDTAKGRQNI SPDKIPWSALKTLMAQSIYGGRVDNEF  
4261 DQRLNNTFLERLFTTRSFDSEFKLACKVDGHKDIQMPDGI RREEFVQWVELLPDTQTPSW  
4321 LGLPNNAERVLLTTOGVDMISKMLKMQMLEDEDDLAYAETEKKTRTDSTSDGRPAWMRTL  
4381 HTTASNWLHLIPQTLSHLKRTVENIKDPLFRFFEREVKMGAKLLQDVRQDLADVQVCEG  
4441 KKKQTNYLRTLINELVKGILPRSWSHYTVPAGMTVIQWVSDFSERIKQLQNI SLAAASGG  
4501 AKELKNIHVCLGGLFVPEAYITATROQYVAQANSWSLEELCLEVNVTTTSGATLDACSEFGV  
4561 TGLKLQGATCNNKLSLSNAISTALPLTQLRWVKQTNTEKKASVVTLPVYLNFTRADLIF  
4621 TVDFE IATKEDPRS FYERGVAVLCTE

### 2.1.3 変異キネシンの調製

#### 作製したキネシンコンストラクト

キネシンは ATP をエネルギー源として微小管上を歩行運動する分子モーターである。キネシン頭部とコイルドコイル(Met<sup>1</sup>-Ala<sup>490</sup>)で構成された二量体の組換え体キネシン K490 (分子量 75 kDa, kinesin-1 ファミリーに属する KIF5A, マウス由来)のコンストラクトが、本研究室で作製されていた (図 2.3a)。この組換え体キネシンの C 末端には、単離精製用の His<sub>6</sub> タグと BCCP が順に導入されている。本研究ではダブルトラップ法 (詳細は 2.4.3 章で述べる) で微小管とビーズを固定するための変異 (不活性) キネシンを作製した (図 2.3a)。

作製したキネシン DNA の塩基配列解析はファスマック (株) に依頼し、塩基配列が正しいことを遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX<sup>®</sup> Ver. 11 を用いて確認できた。

#### 変異キネシンの発現

大腸菌 *E. coli* 自体の外来 DNA 取り込み能力を上げた大腸菌コンピテントセル BL21(DE3) にキネシン DNA を導入し、42 °C で 30 秒ヒートショックさせ、氷上 2 分で形質転換効率を上げ、SOC 培地を加えて 1 時間以上 37 °C で静置後、カナマイシン耐性の寒天培地に菌をまいて一晩 37 °C に保管してコロニーを形成させた。BL21 (DE3) 株は広く使われている大腸菌発現システムの宿主で、BL21 株の染色体 DNA に λファージ DE3 遺伝子が取り込まれた大腸菌株である。λファージ DE3 遺伝子には T7 lac プロモーターと lacI オペロンが配置されており、ベクター pET30c (Novagen) を BL21 (DE3) に形質転換することで T7 RNA ポリメラーゼにより目的の蛋白質遺伝子が mRNA に転写される。また、目的遺伝子発現に用いると、lac リプレッサーが宿主染色体の lacUV5 プロモーターに働き、宿主ポリメラーゼによる T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子の転写を抑制し、T7 RNA ポリメラーゼによる目的遺伝子の転写も阻害される。IPTG 添加で T7 RNA ポリメラーゼは誘導され、T7 プロモーターから lacZ 遺伝子の翻訳領域にある目的蛋白質遺伝子の転写を引き起こし、発現が行われる。

この原理を用いて、終濃度 50 µg/ml カナマイシンを含んだ LB 培地溶液 10 ml に形質転換したコロニー 3 つを拾い入れ、37 °C で一晩振盪した。この培養液を終濃度 50 µg/ml カナマイシンを含んだ LB 培地溶液 500 ml に加え、波長 600 nm での吸光度が 0.6 以上になるまで約 2.5 時間 37 °C で振盪した。その後、終濃度 0.4 mM IPTG と終濃度 20 µM Biotin (BCCP タグへの Biotin 結合, #B4639, Sigma-Aldrich) を加え、23 °C で 5 時間振盪することでキネシンを発現誘導させた。振盪終了後、遠心により菌体を回収し、液体窒素で急凍凍結して -80 °C で保存した。

### 変異キネシンの精製

キネシンに導入された His<sub>6</sub> タグは Ni イオンが結合したアフィニティー担体とキレートして複合体を形成し、キネシン以外のタンパク質を洗い流した後、Ni イオンとの親和性がより高く、ヒスチジン側鎖で構成された Imidazole を添加することでキネシンを溶出するというシステムをとった。

キネシンの精製確認と濃度決定は SDS-PAGE (図 2.3b) と Bradford 法にて行い、組換え体・変異キネシンが精製できたことを確認した。

インターネット公表に関する同意が  
得られなかったため非公表

### 図 2.3 作製したキネシン

- (a) キネシンのコンストラクトと構造. キネシンと BCCP の構造は各々 PDB 3KIN (1-372 アミノ酸), 1BDO より編集.
- (b) 精製したキネシンの SDS-PAGE 結果. 分子量マーカーを MK (Marker), 溶出したキネシン溶液を Elu (Elution) と表記した.

## 2.2 モータータンパク質の活性測定方法

### 2.2.1 微小管の滑り運動による活性測定方法

本研究で精製した組換え体・変異ダイニンやキネシンの運動活性を確認するため、最も基礎的な手法である微小管の滑り運動測定を行った。これは、ダイニンやキネシンといったモータータンパク質をカバーガラス上に固定して微小管を滑り運動させる手法である。

大きさ 1.8×1.8cm と 2.4×3.6cm の 2 枚のカバーガラス（松浪硝子工業株式会社）を厚さ 30 μm の両面テープ（#5603, 日東電工株式会社）で接着したフローセルチャンバー(容量 3-4μl)を用いて微小管の滑り運動測定を行った。チャンバー内に 2 mg/ml bcBSA (ビオチン化 BSA, #A6043, Sigma-Aldrich) → 2-4 mg/ml casein (#1.02244, Merck) → 1 mg/ml Streptavidin (2 回, #S0951, 東京化成工業株式会社) → >100 nM dynein/ kinesin (2 回) → 蛍光微小管（ダイマーチューブリン ~100 nM 相当, 蛍光ラベル率~2%）→ ATP の順で一方から流し入れ、他方からろ紙で溶液を吸い取り、2 分待つ、を順々に行った。光励起により蛍光色素が退色するのを防ぐため、脱酸化剤を含んだ溶液を用いた。溶液構成は 25 mM PIPES, 25 mM K-acetate, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM EGTA, 20 μM glucose (#041-00595, Wako), 20 μg/ml catalase (#039-12901, Wako), 100 μg/ml glucose oxidase (#074-02401, Wako), 140 μM β-mercaptoethanol, 10 μM paclitaxel, 0.2 mg/ml casein, pH 7.2 である。

蛍光微小管の運動を以下の倒立型落射蛍光顕微鏡(Olympus IX70)にて観察した。その顕微鏡の詳細は、水銀ランプ (出力 100 W, #USH-103D, Ushio)からの緑の輝線をダイクロイックミラーと倍率 100 倍の油浸対物レンズ UPlanFL N (N.A. 1.3, Olympus)を通して、サンプルを励起し、得られた蛍光は EMCCD (電子増倍型, 79 nm/pixel に相当, 画素数 1002×1004 pixel)カメラ(Andor Luca)にて撮影し、デスクトップコンピューターにて画像を取得した。露光時間 100 ms で 60 秒間 (25 ± 0.5 °C) 撮影した。微小管の蛍光はまだらであったので、微小管の蛍光の強い部位を二次元ガウシアンフィッティングすることで位置を解析した (Mark2, 情報通信研究機構 古田健也研究員より提供)。

微小管運動速度の ATP 濃度依存性は、以下のミカエリス-メンテン式を用いてフィッティングした。

$$V = \frac{V_{max} \cdot [ATP]}{K_m^V + [ATP]} \quad (2)$$

$V_{max}$ は最大速度、 $K_m^V$ はミカエリス-メンテン定数を示し、運動活性を評価した。

## 2.2.2 共沈実験による微小管結合能測定方法

本研究で精製したダイニンや変異キネシンについて、微小管との結合能を評価するため、ダイニン・キネシンが微小管と結合する割合を知るための共沈実験を行った。定常状態で微小管に結合しないダイニンの濃度を測定することで、微小管結合率を算出し、結合能を評価するための解離定数を算出した。

### 共沈実験方法

本研究では、須藤・昆らのグループの実験手法[Imamura et al. 2007]と同様に、微小管に結合しないダイニンの濃度を、ダイニンに導入された GFP の蛍光強度から測定する手法をとった。GFP が導入された組換え体ダイニン D384G, D384GB と、変異ダイニン D384GB- $\Delta$ PSI, D384GB- $\Delta$ H2 について測定を行った。1 mM ATP, 1 mM ADP (#A2754, Sigma-Aldrich), 1 mM AMPPNP (ATP 非加水分解アナログ, #2647, Sigma-Aldrich), ADP-Vi (0.2 mM ATP と 1 mM Sodium orthovanadate の混合溶液, vanadate は#S6508, Sigma-Aldrich), apo (ヌクレオチドなし) の 5 つのヌクレオチド状態でのサンプルを用いて、微小管とダイニンの共沈実験を以下のように行った。終濃度 2 mM GMPCPP を含むチューブリンを 37 °C で 30 分重合後に終濃度 100 $\mu$ M paclitaxel を加えて 33 krpm で 10 分遠心し、沈降した重合している微小管のみを回収した。次に、0-5  $\mu$ M 微小管, 終濃度 200 nM ダイニン, 終濃度 1 mM ヌクレオチド, 終濃度 5  $\mu$ M paclitaxel を遠心チューブ内で混ぜ、10 分室温(25 °C)においたあと 80 krpm (245 k $\times$ g) で 10 分超遠心した。微小管と結合したダイニンは沈降し、微小管から解離したダイニンは上清として回収することで、分離した。以上の条件は、電気泳動法による結果をもとに決定した。また、変異キネシンについても、同様の電気泳動法により微小管結合能を確認した。

超遠心により得られた上清のダイニン溶液を、脱酸化剤を含む溶液 (25 mM PIPES, 25 mM K-acetate, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM EGTA, 20  $\mu$ M glucose, 20  $\mu$ g/ml catalase, 100  $\mu$ g/ml glucose oxidase, 140  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol, 5  $\mu$ M paclitaxel, pH 7.2) で 4 倍希釈し、ダイニンの濃度 (最高 50 nM) を蛍光分光光度計 (#FP-6600, Jasco) で測定した GFP の蛍光強度から算出した。測定条件は、励起バンド幅 3 nm, 蛍光バンド幅 6 nm, 測定波長 510 nm の高感度での蛍光固定波長測定である。同一条件での測定は 2-3 回行った。蛍光強度(a.u.)は GFP が導入されたダイニン(D384G)の濃度(nM)の約 4.1 倍であるという線形関係を用いて(相関係数 R=0.9971), 微小管と結合した率を算出した。

### 解離定数の導出

ADP 結合時の場合、ダイニンが微小管と結合する速度定数 $k_+$ と微小管から解離する速度定数 $k_-$ は、式(3)で表せる。 $[Mt]$ ,  $[Dyn \cdot ADP]$ ,  $[Mt \cdot Dyn \cdot ADP]$  は各々、微小管の濃度、微小管から解離しているダイニンの濃度、微小管と結合しているダイニンの濃度を示している。

$$\frac{d[Mt \cdot Dyn \cdot ADP]}{dt} = k_+[Mt][Dyn \cdot ADP] - k_-[Mt \cdot Dyn \cdot ADP] \quad (3)$$

平衡時、ダイニンの結合速度と解離速度は等しいため、式(3)はゼロに等しい。よって、微小管からダイニンが解離する解離定数 $K_d$ は、解離速度定数 $k_-$ と結合速度定数 $k_+$ の比で表すことができる。

$$K_{d(ADP)} = \frac{[Mt][Dyn \cdot ADP]}{[Mt \cdot Dyn \cdot ADP]} = \frac{k_{-(ADP)}}{k_{+(ADP)}} \quad (4)$$

よって、ダイニンの微小管結合率 $R_{bound}$ は、式(5)で表すことができる[Imamura et al. 2007].

$$R_{bound} = \frac{[Mt \cdot Dyn \cdot ADP]}{[Dyn]_{total}} = 1 - \frac{[Dyn \cdot ADP]}{[Dyn]_{total}} = \frac{[Mt]}{K_d + [Mt]} \quad (5)$$

$$([Dyn]_{total} = [Mt \cdot Dyn \cdot ADP] + [Dyn \cdot ADP])$$

$[Dyn]_{total}$ はダイニンの全濃度である。微小管から解離するダイニン濃度 $[Dyn \cdot ADP]$ を測定することで、解離定数 $K_d$ を算出した。解離定数が小さいと微小管との結合能が大きく、逆に解離定数が大きいと微小管との結合能が小さいと判断できる。

## 2.3 FRET 法によるダイニンの構造の評価

本研究で精製したヒト由来の細胞質ダイニン-1 について、ヌクレオチド状態に伴う linker のスイングに関する構造知見がないため、ヒト由来の細胞質ダイニンが図 2.4a に示すように、ヌクレオチド状態に伴い linker がリングに対して構造変化することを明らかにした。ダイニン D384GB の linker が折れ曲がったパワーストロック前の構造では、GFP と BFP 間距離が近いこと FRET 効率が大きく、linker が伸びたパワーストロック後の構造では FRET 効率が小さいと予想される (図 2.4a)。本研究では、須藤・昆らのグループの実験手法 [Kon et al. 2005] と同様に、蛍光タンパク質 BFP と GFP を粘菌ダイニンのアミノ酸配列と同等の位置に挿入したダイニンを対象として、蛍光分光光度計により BFP と GFP の蛍光強度を測定し、FRET 効率を算出した。

なお、粘菌・出芽酵母由来の細胞質ダイニン-1 や、ヒト由来の細胞質ダイニン-2 ではこうした構造的知見があり、同等であることを本研究で確認した。さらに、linker の構造状態には ATP 濃度依存性があることを本研究で明らかにした。

### 2.3.1 FRET 効率の導出

#### FRET の原理

タンパク質分子内・分子間の構造変化を検出する手法の一つとして、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET ; Fluorescence Resonance Energy Transfer) 法を利用した研究は数多く報告されている。FRET は、近接した異なる 2 つの蛍光分子間に生じるエネルギー移動現象である。1940 年代に Förster により FRET の理論が確立され、10-100 Å の範囲で 2 分子間相対距離を算出できることから、蛋白質間相互作用や分子構造の解析に応用されている。

光照射により励起された蛍光分子は、分子内緩和により第一励起状態に緩和し、蛍光発光と無放射遷移が競合してエネルギーを放出することで基底状態に緩和する (図 2.4b)。ここで、異なる蛍光分子が近くに存在した場合、光照射により励起状態に遷移したドナーは、エネルギーの一部をアクセプターに移動 (FRET) することで、励起状態にあるアクセプターは蛍光を発する。この FRET 現象により、FRET 効率  $E$  は 2 蛍光分子間距離  $r$  の 6 乗に反比例した式で定義される。

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (6)$$

フェルスター (Förster) 半径  $R_0$  は、FRET 効率が 50 % での 2 蛍光分子間距離として、式(7)から導出される。



$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2\phi_d J(\nu)}{128\pi^6 n^4 N_A} = (8.79 \times 10^{17}) n^{-4} \kappa^2 \phi_d J(\nu) \quad (7)$$

$$J(\nu) = \int F_d(\nu) \varepsilon_a(\nu) \nu^{-4} d\nu$$

$N_A$ はアボガドロ数,  $n$ は溶媒の屈折率(=1.33),  $\kappa^2$ はドナーの双極子とアクセプターの双極子との配向因子 (0 から 4 の範囲, 両遷移モーメントが自由回転する場合は 2/3 である),  $\phi_d$ はアクセプター非存在下でのドナーの蛍光量子効率,  $J$ は FRET スペクトルの重なり積分,  $\nu$ は振動数,  $F_d$ はドナーの蛍光強度,  $\varepsilon_a$ はアクセプターの吸光係数である. よって, FRET が生じるためには, ドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの吸収スペクトルが重なっていることが必要となる.

### BFP と GFP の特性

ドナー-BFP とアクセプター-GFP の蛍光波長特性について述べる. BFP と GFP の蛍光波長特性を知るため, D384B と D384G を含んだ溶液を用いて, 励起波長 380 nm または 488 nm で励起したときの蛍光スペクトルを, 蛍光分光光度計 (#FP-6600, Jasco) を用いて測定した (図 2.4c). 測定は, 終濃度 100 nM のダイニンを含む脱酸化剤入り溶液 (25 mM PIPES, 25 mM K-acetate, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM EGTA, 20 μM glucose, 20 μg/ml catalase, 100 μg/ml glucose oxidase, 140 μM β-mercaptoethanol, pH 7.2)で行った. いずれのサンプル(~50μl)も, 励起バンド幅 3 nm, 蛍光バンド幅 6 nm, 走査速度 200 nm/min で測定した.

FRET 効率を算出する上で必要な値である, BFP と GFP の量子効率とモル吸光係数を以下の手法で測定・算出した. 量子収率とは, 物質が吸収した励起光の光子数に対する, 蛍光発光時に放出した光子数の割合を示す. 光電子増倍管印加電圧を 600V での溶液非存在時と, D384B の波長 380 nm 前後 (377-389 nm) での吸収度の和を各々  $S_0$  と  $S_1$ , D384GB-ΔG の波長 444 nm 前後 (500-600 nm) での吸収度の和を  $S_2$  とする. このとき, BFP の量子収率  $\phi^{BFP}$  は,  $S_2/(S_0-S_1) \times 100(\%)$  の式で 0.17 と算出され, 文献値 0.17-0.26 の範囲内の値であった [Tsien 1998]. また, GFP の量子効率  $\phi^{GFP}$  は, 既知値 0.82 を用いた (clontech).

モル吸光係数とは, 溶液層 1 cm にある 1M の溶液を吸収する度合いを示す. ランベルト-ベール法則より, 吸光度はモル吸光係数  $\varepsilon$  と溶液濃度  $c$  とセルの光路長 ( $l=1\text{cm}$ ) の積に相当する. モル吸光係数を算出する上で, D384B と D384G 溶液を用いて, BFP と GFP の励起スペクトルを分光光度計 (#V-530, Jasco) でまず測定した (図 2.4c). BFP のモル吸光係数  $\varepsilon^{BFP}(380)$  は, 波長 380nm での D384B と D384 の吸収度の差から 27,000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> と算出され, 文献値 26,300-31,000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> の範囲内の値であった [Tsien 1998, Kon et al. 2005]. また, GFP の波長 488 nm でのモル吸光係数  $\varepsilon^{GFP}(488)$  の実験値は, 38,600 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> であり, 他の報告 32,500

$M^{-1}cm^{-1}$  (clontech)に近い値であった. 波長 380 nm でのモル吸光係数 $\epsilon^{GFP}(380)$ は, 実験値  $2,810 M^{-1}cm^{-1}$ であり, この数値を解析に用いた.

### FRET 効率の導出

蛍光強度と FRET 効率の関係について述べる. 最大励起波長 380 nm かつ最大蛍光波長 444 nm の BFP をドナー, 最大励起波長 488 nm で最大蛍光波長 505 nm の GFP をアクセプターとし, BFP と GFP が導入されたダイニンを対象とした. 波長 380 nm で励起したときの波長 505 nm での蛍光強度 $F_{total}(505)$ は, FRET 由来の蛍光強度 $F_{FRET}(505)$ , GFP の (FRET 由来ではない) 直接的な蛍光強度 $F_{dir-GFP}(505)$ , BFP の直接的な蛍光強度 $F_{dir-BFP}(505)$ の和として表せ, 測定した.

$$\begin{aligned} F_{total}(505) &= F_{FRET}(505) + F_{dir-GFP}(505) + F_{dir-BFP}(505) \\ \therefore F_{total}(505) - F_{dir-BFP}(505) &= F_{FRET}(505) + F_{dir-GFP}(505) \\ &= [Dyn](\epsilon^{BFP}(380)E + \epsilon^{GFP}(380))\varphi^{GFP} \end{aligned} \quad (8)$$

$E$ は FRET 効率,  $\epsilon$ はモル吸光係数,  $\varphi$ は量子収率,  $[Dyn]$ はダイニンの濃度を示す. また, 励起波長 488 nm による波長 505 nm での GFP の蛍光強度 $F_{GFP}^{Ex488}(505)$ は式(9)の関係にあり, GFP のみが導入されたダイニン D384G を用いて測定した.

$$F_{GFP}^{Ex488}(505) = [Dyn]\epsilon^{GFP}(488)\varphi^{GFP} \quad (9)$$

式(8), (9)から, FRET 効率  $E$  は, 蛍光強度と各モル吸光係数を用いて, 式(10)で計算できる.

$$\begin{aligned} \frac{F_{total}(505) - F_{dir-BFP}(505)}{F_{GFP}^{Ex488}(505)} &= \frac{\epsilon^{BFP}(380)E + \epsilon^{GFP}(380)}{\epsilon^{GFP}(488)} \\ \therefore E &= \left( \frac{F_{total}(505) - F_{dir-BFP}(505)}{F_{GFP}^{Ex488}(505)} - \frac{\epsilon^{GFP}(380)}{\epsilon^{GFP}(488)} \right) \frac{\epsilon^{GFP}(488)}{\epsilon^{BFP}(380)} \end{aligned} \quad (10)$$

FRET 効率算出により, 式(6)から 2 蛍光分子間距離  $r$  が算出できる[Clegg 1992]. BFP と GFP の FRET スペクトルの重なり積分  $J$  は図 2.4c より,  $7.8 \times 10^{-14} M^{-1}cm^3$  と算出できる. しかし, GFP と BFP の配置はダイニンの構造により回転角度に制限があるため, 配向因子の制限により  $R_0$  の値は, 回転角度の制限がないとき 4.1 nm であり ( $\kappa^2 = 2/3$ ), 最大 5.5 nm ( $\kappa^2 = 4$ ) まで変化しうる. そのため, GFP と BFP 間距離  $r$  の正確な値は算出できないが, ダイニン 1 分子内にある GFP と BFP 間距離は FRET が十分起こるほど近い距離 (10 nm 以下) にあるため, 他分子のダイニンに導入された蛍光タンパク質同士で生じる分子間 FRET のシグナルは無視できるほど小さいと考えた.

なお, 測定ごとにダイニンの濃度の誤差により蛍光強度の差が生じて FRET 効率に変化することを避けるため, ダイニンの濃度を固定して測定された蛍光強度を次のように補正し

た. 波長 505 nm での BFP の直接的な蛍光強度は, 式(11)で示される.

$$F_{dir-BFP}(505) = [\text{Dyn}] \varepsilon^{BFP}(380) \varphi^{BFP} (1 - E) \quad (11)$$

式(8)と式(11) を連立すると, FRET 効率 $E$ に依存しない式(12)が示せる.

$$\begin{aligned} F_{total}(505) + \left( \frac{\varphi^{GFP}}{\varphi^{BFP}} - 1 \right) F_{dir-BFP}(505) \\ = [\text{Dyn}] (\varepsilon^{BFP}(380) + \varepsilon^{GFP}(380)) \varphi^{GFP} \end{aligned} \quad (12)$$

波長 380 nm で励起したときの波長 444 nm での GFP(D384G)の蛍光強度は非常に小さいため, D384GB の蛍光強度 $F_{total}(444)$ は BFP の蛍光強度 $F_{dir-BFP}(444)$ に近似できる ( $F_{total}(444) \cong F_{dir-BFP}(444)$ ). よって, 式(12)の左辺第 2 項に含まれる $F_{dir-BFP}(505)$ の値は, 波長 444, 505 nm での BFP (D384B)の蛍光強度 $F_{BFP}^{Ex380}(444)$ と $F_{BFP}^{Ex380}(505)$ の比を用いて, 式(12)は式(13)に変換できる.

$$\begin{aligned} F_{total}(505) + \left( \frac{\varphi^{GFP}}{\varphi^{BFP}} - 1 \right) \frac{F_{BFP}^{Ex380}(505)}{F_{BFP}^{Ex380}(444)} F_{total}(444) \\ = [\text{Dyn}] (\varepsilon^{BFP}(380) + \varepsilon^{GFP}(380)) \varphi^{GFP} \quad (13) \\ \left( \frac{F_{BFP}^{Ex380}(505)}{F_{BFP}^{Ex380}(444)} \approx 0.26 \text{ で一定} \right) \end{aligned}$$

式(13)を用いて, ダイニンの濃度を固定し, 測定された蛍光強度を補正算出した.

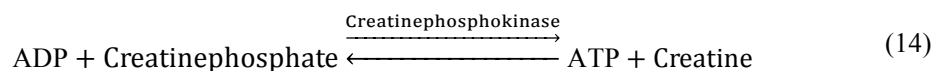
### 2.3.2 測定方法

#### 組換え体・変異ダイニンの固有ヌクレオチド状態での FRET 効率測定

GFP と BFP が導入された、終濃度 100 nM の組換え体ダイニン D384GB または変異ダイニン 3 種類 D384GB- $\Delta$  PSI  $\Delta$  H2, D384GB- $\Delta$  PSI, D384GB- $\Delta$  H2 を含む脱酸化剤入り溶液に対し、1 mM ATP, 1 mM ADP, 1 mM AMPPNP (ATP 非加水分解アナログ), 0.2 mM ATP + 1 mM Vanadate (ADP-Vi), apo (ヌクレオチドなし) の 5 状態のサンプルを各々作製し、室温 (~25 °C) で 5-10 分以上静置した。その後、波長 380 nm で励起したときの波長 400-600 nm (走査速度 200 nm/min) での蛍光強度スペクトル測定を 5 回以上行い、平均値から FRET 効率を算出した。蛍光分光光度計の励起バンド幅 3 nm, 蛍光バンド幅 6 nm で測定した。

#### 組換え体ダイニン D384GB の ATP 濃度依存的な FRET 効率測定

組換え体ダイニン D384GB について、ATP 濃度を変化させて蛍光強度の測定を行い、ATP 濃度依存的な FRET 効率の値からダイニンの構造と ATP 濃度の関係を明らかにした。ダイニンに ATP を添加すると、ダイニンは ATP を加水分解するため、徐々に ATP 濃度は低下し ADP 濃度が上昇する。これを防ぎ ATP 濃度を一定にするためにクレアチンリン酸による ATP 合成反応を利用した。クレアチンリン酸 (Creatinephosphate; #C3755, Sigma-Aldrich) は、ATP 加水分解により産出・放出された ADP と反応することで、ATP が再合成され、クレアチンホスホキナーゼ (Creatinephosphokinase; #P7936, Sigma-Aldrich) によりこの反応は促進され、反応式は、



と書ける。生体内では筋肉等でもこの化学反応は行われている。

インターネット公表に関する同意が  
得られなかったため非公表

#### 図 2.4 ダイニンの FRET 効率測定方法と原理

(a) ダイニン D384GB 分子内の BFP-ring と GFP-linker 相対位置関係. パワーストロックすると, 相対位置関係が遠くなる. ダイニンモータードメインのパワーストロック前(pre-state)・後(post-state), GFP, BFP の構造は各々 PDB 4RH7, 3VKH, 1GFL, 1BFP より編集.

(b) FRET を表すエネルギー状態図 (Jablonski diagram). 基底状態(S0), 励起状態(S1)での各蛍光分子の固有状態を線で表しており, ドナー分子は励起するとエネルギーが高い状態になる. ドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの励起スペクトルの重なり積分 $J$ が大きい場合, ドナーの励起エネルギーの一部はアクセプター分子に移動(FRET)することで, アクセプターは蛍光を発する.

(c) BFP と GFP の励起・蛍光スペクトラム. 各スペクトラムの最大値を 100 に正規化した. BFP の励起・蛍光スペクトラムを各々紫色・青色, GFP の励起・蛍光スペクトラムを各々赤色・緑色で表記した. いずれも D384B と D384G を用いて測定した.

## 2.4 光ピンセットを用いたダイニン 1 分子の運動測定方法

### 2.4.1 顕微鏡装置の概要

#### 光ピンセットの概要

光ピンセットは Ashkin によって提案され[Ashkin 1970], 集光したレーザー光で微小粒子を捕獲し, 微粒子を三次元的に自由自在に操作できる技術である. 特に近年, 生体分子の 1 分子計測や細胞内の粒子の運動測定などの生物物理学分野で幅広く応用されている.

本研究のように粒子径(200 nm)がレーザー光の波長(1064 nm)より小さい場合のトラップ力は, 主に電磁気学的に扱うことができる. 電磁場内でのビーズを双極子とみなしたときに働くローレンツ力はレーザー光の強度の勾配に比例する. そして, レーザーの最大強度位置に相当する焦点方向へ粒子に力が働く. この光の強度分布により発生する勾配力と光の散乱により発生する散乱力が釣り合う位置でトラップされる.

粒子に働くトラップ力は, トラップ中心から距離が $\sim 300$  nm の範囲では線形バネで近似的に説明でき, 外力などにより発生したビーズの捕獲中心からの距離 $x$ とトラップ弾性率 $k$ の積で計算される. トラップされたビーズは周囲の水分子などとの衝突によりブラウン運動し, エネルギー等分配の法則に従い, ばねに蓄えられたエネルギーが熱揺らぎのエネルギーに等しいとして式(15)で示される.

$$\frac{1}{2}k\langle x^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B T \quad (15)$$

$k$ はバネ定数,  $\langle x^2 \rangle$ は二乗変位の平均,  $k_B$ はボルツマン定数,  $T$ は絶対温度であり, 室温 25 °C で $k_B T = 4.14$  pN · nmである. 実験で用いたトラップ弾性率は数 $\sim$ 数百 fN/nm であった.

## 構築した顕微鏡装置の概要

本研究では光ピンセット法によるポリスチレンビーズの捕獲操作とビーズの散乱像の位置を検出し、同時に微小管やビーズの蛍光像を観察するために、図 2.5 に示す顕微鏡装置を構築した。

微小管やビーズの蛍光像観測には発振波長 532 nm の励起用レーザー(50 mW, Snake Creek Lasers)を用い、蛍光発光した光は EMCCD カメラ(Andor iXon<sup>EM</sup>+ 897)で検出した。

ビーズの光ピンセットには生物組織にダメージを与えにくい波長 1064 nm のレーザー(Nd:YAG, 800mW, Spectra-Physics)を 2 台用いた。一方のレーザー光のみ、電動で角度操作(Intelligent Controller, SIGMA KOKI 社, #PC-5K)が可能であるミラーを設置し、1/2 波長板で直線偏光を回転させた(図 2.5a)。ビームスプリッターで 2 つのレーザー光を合流させ、倍率 60 倍の油浸対物レンズ Olympus PlanApo (N.A. 1.4, 単層コートの特注品)を介して、試料面下面近傍に焦点を合わせてビーズを捕獲した。レーザーの出力強度は、信号発生器(Multi Function Generator, エヌエフ回路設計ブロック社, #WF1974)の電圧で調整した。

固定ミラーを経由するビーズの捕獲位置に対し、発振波長 690 nm の斜光照明用レーザー(50 mW, CrystaLaser)の照射位置が重なるよう調整した。ビーズに照射した 690 nm レーザーの散乱光は、チャンバーの上部に設置した倍率 100 倍の油浸対物レンズ Olympus UPlanApo (N.A. 0.5-1.35) と凹レンズ(焦点距離 -10)を用いて 4 分割フォトダイオード(QPD : quadrant photo detector)上に 1000 倍に拡大して結像された(図 2.5b)。4 分割フォトダイオード内の各フォトダイオードでは、光を電圧に変換し、左右または上下のフォトダイオードの電圧値の差からビーズの x-y 平面の位置に比例した電圧値として出力し、これを AD ボードである PowerLab (ADInstruments)に入力し、ソフトウェア(LabChart, ADInstruments)によって解析した。電圧と位置の換算は 4 分割フォトダイオードを 100  $\mu\text{m}$  間隔(試料面で 100 nm に相当)で動かすことで、キャリブレーションを行った。

4 分割フォトダイオード上の像を観察するために、一部の散乱光は 4 分割フォトダイオードと同一の距離に置かれた CCD カメラ(#CS8310B, 東芝 teli 製)で観察した。試料ステージは、3 軸水圧マニピュレーター(成茂科学器械研究所)で操作した。

測定時の外部ノイズの影響を除くため、エアコンなどの電源を切り、測定装置に必要なパソコンなどの光の漏れを最小限にした。

インターネット公表に関する同意が  
得られなかったため非公表

### 図 2.5 光ピンセットを用いた光学装置の光路図

(a) 真上から見た，サンプル集光までの光路図．発振波長 532 nm, 690 nm, 1064 nm のレーザー光の光路を緑，赤，茶色で示した．M はミラー，IR-M は赤外レーザー対応のミラー，DM はダイクロックミラー，f はレンズの焦点距離を示す．角度操作可能なレンズ(operable-M)により，トラップ位置の一方を移動できる．

(b) 横から見た，サンプル集光位置周辺と検出装置の光路図．発振波長 532 nm, 690 nm レーザー光は下部のダイクロックミラー，発振波長 1064 nm レーザー光は上部のダイクロックミラーを介して，60 倍対物レンズを通してサンプル面で照射した．蛍光（オレンジ色で光路を示した）は，60 倍の対物レンズを介して EMCCD カメラで結像．散乱光は 100 倍の対物レンズで集光され，1000 倍に拡大された像として 4 分割フォトダイオードで検出．



## 2.4.2 タンパク質ビーズの調製

### アビジン化されたビーズの作製

光トラップに用いるビーズの条件は、532 nm レーザー照射時にビーズの蛍光像をモニターで観測でき、トラップしてから操作するために 1064 nm レーザー照射時の蛍光退色が遅いことである。この条件を満たした直径 200 nm のポリスチレンビーズ(最大励起波長 505 nm, 最大蛍光波長 515 nm, yellow-green, Molecular Probes) を、ダブルトラップ実験系において変異キネシンでコートするためのビーズとして用いた。ダイニンでコートさせたビーズについては、変異キネシンビーズと区別する必要があるため、蛍光像がより暗い直径 1  $\mu\text{m}$  のポリスチレンビーズ (最大励起波長 365 nm, 最大蛍光波長 415 nm, blue, Molecular Probes) を選択した。また、シングルトラップでは、ダブルトラップで用いたものと同じ直径 200 nm のビーズを用いた。

ダイニンや変異キネシンをビーズとアビジン-ビオチン系で結合させるために、ビーズをアビジンで予めコーティングする必要がある。以下にアビジン化されたビーズの作製方法を述べる。

直径 200 nm カルボキシル標識ビーズ 5  $\mu\text{l}$  又は直径 1  $\mu\text{m}$  カルボキシル標識ビーズ 30  $\mu\text{l}$  を終濃度 10 mg/ml EDC (#22980, Thermo) と混合し(計 250  $\mu\text{l}$ )、15 分室温で反応させた。そして 50 mg/ml sulfo-NHS (#24510, Thermo) を 25  $\mu\text{l}$  加えて 10 分室温で反応させた。このとき、ビーズ表面のカルボキシル基は EDC のカルボジイミド基と結合し、sulfo-NHS を加えることで、アミンと高効率に反応できる状態となる。EDC と sulfo-NHS はいずれも反応促進に適した pH 5.0 条件下で、両者を組み合わせて 50 mM MES (#349-01623, Dojindo) 溶液中で標識反応させた。その後、15 krpm (20,400 $\times$ g), 16 分 25  $^{\circ}\text{C}$  で遠心し、沈殿したビーズに 0.1 M HEPES (pH 7.8) を 200  $\mu\text{l}$  加えて超音波破碎 (power: 9, 1s $\times$ 12 回, 以下同条件) して、倒立型落射蛍光顕微鏡 (Olympus IX70) でビーズが単離できていることを確認した。10 mg/ml NeutrAvidin (#31000, Thermo) を 150  $\mu\text{l}$  加えて 45 分室温において、アビジンとビーズのアミド結合反応を促進させた。その後 50 mg/ml BSA 50 $\mu\text{l}$  加えて 5 分以上氷上に静置してアビジン-ビオチン結合反応を停止させ、超音波破碎して顕微鏡で確認し、2 mg/ml casein で表面コーティングされたエッペンチューブを用いて 15 krpm (20,400 $\times$ g), 8 分, 4  $^{\circ}\text{C}$  で遠心した。沈殿したビーズに 0.6 M KCl, 20 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA を 500  $\mu\text{l}$  加え、超音波破碎して顕微鏡で確認した。同条件で遠心し、沈殿したビーズに 0.3 M KCl, 20 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA を 300  $\mu\text{l}$  加えて超音波破碎と顕微鏡でビーズの確認を 3 回繰り返した後、3 $\mu\text{l}$  ずつ分注して液体窒素で急速冷凍後 -80  $^{\circ}\text{C}$  で保存した [Kaya & Higuchi 2010]。

### タンパク質ビーズ 3 種類の作製

ビオチン化されているダイニンまたは変異キネシンを、アビジン化ビーズと混合し、20 分間室温 (~25 °C) でアビジン-ビオチン反応を促進させたのち、0.2 mg/ml casein で希釈して、液体窒素で急速冷凍後-150 °C または-80 °C で保存した。

タンパク質とビーズの混合比を確定するために、蛍光微小管と結合するビーズの割合を光ピンセット装置により評価した。直径 200 nm のビーズの場合、チャンバーに 10 mg/ml casein を入れてガラス表面を十分にコーティングし、1 mM ADP 存在下でダイニンまたは変異キネシンが結合したビーズと蛍光微小管の混合溶液をチャンバーに流して封をした。浮遊したビーズ 1 つを光捕獲し、微小管と相互作用させ、10 秒程度微小管と結合している場合、ダイニンまたは変異キネシンが微小管に強結合状態にあり、ビーズ上にモータータンパク質が存在すると判断した。ランダムに選択したダイニンビーズ約 40 個中微小管に結合した回数を割合として図 2.6 a に示した。ここで算出した結合率は高々 40 個(=N)を対象として算出した値であり、式(16)に示すように結合率  $m$  に対して誤差を含んだ値としてプロットした[Svoboda & Block 1994].

$$(\text{Bound ratio}) = m \pm \sqrt{\frac{m(1-m)}{N}} \quad (16)$$

#### 1. 直径 200 nm の変異キネシンビーズの微小管結合について

ダブルトラップで微小管と結合するために用いた変異キネシンビーズ (~240 pM) は、変異キネシンがビーズの 1000 倍以上の濃度比で混合した場合、ほぼ全てのビーズが微小管と結合した。微小管と結合するキネシンの個数が 1 つまたは複数で長時間結合させるため、本実験では 5000 倍の濃度比で混合したビーズを用いて測定を行うこととした。

#### 2. 直径 200 nm のダイニンビーズの微小管結合について

ビーズが微小管と結合する場合、多分子が相互作用する可能性は含まれているが、同時に 2 分子以上結合しない確率はポアソン分布から説明できる。微小管と相互作用するビーズ上のタンパクの個数を  $n$ 、 $n$  の平均値を  $m$  としたとき、平均  $m$  回起こる事象が  $n$  回発生する確率  $P(n)$  は、以下の式で与えられる。

$$P(n) = \frac{m^n e^{-m}}{n!} \quad (17)$$

1 分子以上のタンパクが微小管に結合する確率は、タンパクとビーズの混合比を  $x$ 、混合率の平均数を  $\lambda$  としたとき式(18)で与えられ、図 2.6 a は式(18)でフィッティングした。

$$P(n \geq 1) = 1 - P(0) = 1 - e^{-m} = 1 - e^{-x/\lambda} \quad (18)$$

トラップされたダイニンビーズがガラスに固定された微小管と相互作用する確率が 0.2 であったとき、式(18)より

$$P(n \geq 1) = 1 - e^{-m_1} = 0.2 \quad (19)$$

であるから、ビーズに結合している平均分子数 $m_1$ は $\sim 0.22$ である。

2分子のダイニン (30 nm とする) が直径 200 nm のビーズ上に同時に結合できる最大結合角は式(20)より約  $80^\circ$ であった。よって、同時に相互作用できる最大表面積は立体角を用いて表せ、ビーズ全体の表面積の $\sim 0.116 (=R_1)$ 倍である (式(21))。

$$2 \cos\left(\frac{100 \text{ nm}}{100 \text{ nm} + 30 \text{ nm}}\right) = 79.44^\circ \approx 80^\circ \quad (20)$$

$$R_1 = \frac{2\pi(1 - \cos 40^\circ)(100 \text{ nm})^2}{4\pi(100 \text{ nm})^2} \approx 0.116 \quad (21)$$

以上から、2分子以上のダイニンが同時に微小管と相互作用できる確率は、式(22)より $\sim 0.0028$ と算出された。なお、5分子以上のダイニンがビーズに結合する確率は $4 \times 10^{-6}$ 以下と非常に小さいので、2分子以上のダイニンが同時に微小管と相互作用できると見積もった。

$$\begin{aligned} & P(2) \times R_1 + P(3) \times (R_1(1 - R_1) {}_3C_2 + R_1^2 {}_3C_3) \\ & + P(4) \times (R_1(1 - R_1)^2 {}_4C_2 + R_1^2(1 - R_1) {}_4C_3 + R_1^3 {}_4C_4) \\ & + P(n \geq 5) \approx 0.0028 \quad (m = m_1 \text{を代入}) \end{aligned} \quad (22)$$

1分子以上のダイニンが結合しているビーズのうち2分子以上のダイニンと同時に相互作用可能な確率は $\sim 1.4\%$  ( $=0.0028/0.2$ ) 程度と低頻度であった。ダイニンを直径 200 nm のアビジン化ビーズ ( $\sim 240 \text{ pM}$ ) の $\sim 100$ 倍の濃度比で混合した場合、ビーズと微小管が結合する確率が 0.2 以下であり、シングルトラップを行う上で1分子測定に適した条件であると判断した (図 2.6 a) [Block et al. 1990].

### 3. 直径 $1 \mu\text{m}$ のダイニンビーズの微小管結合について

直径  $1 \mu\text{m}$  のダイニンビーズについて、ダイニンをビーズ ( $\sim 4.5 \text{ pM}$ ) の 6000 倍の濃度比で混合したとき、ガラスに固定したビーズが微小管と相互作用する確率は 27 % (282 個中 77 個) であった。このとき、ビーズに結合している平均分子数 $m_2$ は式(19)と同様に計算して  $\sim 0.315$  であった。

このとき、2分子以上のダイニンが微小管に相互作用する確率が極めて低いことを示す。ダイニンビーズはガラスに固定されているため、微小管をビーズの上から近づけた際、微小管はビーズ上半球でダイニンと相互作用できるとした。さらに、微小管はガラス面に対してほぼ平行な状態でビーズ表面に配置させるため、ガラス面に固定されたダイニンビー

ズの上部に位置する複数のダイニン分子が十分離れていれば、微小管と相互作用することはできない。微小管の直径が 25 nm、ダイニンの大きさを~30 nm としたとき、微小管短軸方向（図 2.6 b の Side view）からみて結合可能な角度は、最大 40°である。

$$2 \cos \frac{500 \text{ nm}}{500 \text{ nm} + 30 \text{ nm}} \approx 38.74^\circ < 40^\circ \quad (23)$$

ビーズ上半円弧 1570 nm ( $\cong 1000 \text{ nm} \times \pi/2$ ) と微小管長軸方向の円弧 349 nm ( $\cong 1000 \text{ nm} \times \pi \times 40^\circ/360^\circ$ ) の面積内で、微小管はダイニンと結合するとした。1 分子のダイニンが面積内にあり、2 分子目が、円弧 85 nm (= 25 nm + ~30 nm  $\times$  2 分子) の 2 倍の 170 nm（図 2.6 b の Front view）と微小管長軸方向の円弧 349 nm の面積内に位置すると、同時に微小管と相互作用する（図 2.6 b の展開図 Development view）。よって、同時に相互作用できる最大表面積はビーズ全体の表面積の~0.108 (=R<sub>2</sub>)倍である（式(24)）。

$$R_2 = \frac{170 \text{ nm} \times 349 \text{ nm}}{1570 \text{ nm} \times 349 \text{ nm}} \approx 0.108 \quad (24)$$

よって、2 分子以上のダイニンが同時に微小管と相互作用できる確率は、式(22)の R<sub>1</sub> を R<sub>2</sub> に、m<sub>1</sub> を m<sub>2</sub> に変換して計算した結果、~0.0052 と算出された。1 分子以上のダイニンが微小管と相互作用できるビーズのうち 2 分子以上のダイニンと同時に相互作用可能な確率は、~1.9% (=0.0052/0.27) 程度と低頻度である。よって、自由回転しないビーズを用いた 1 分子測定を行う上で適した条件であったと判断した。

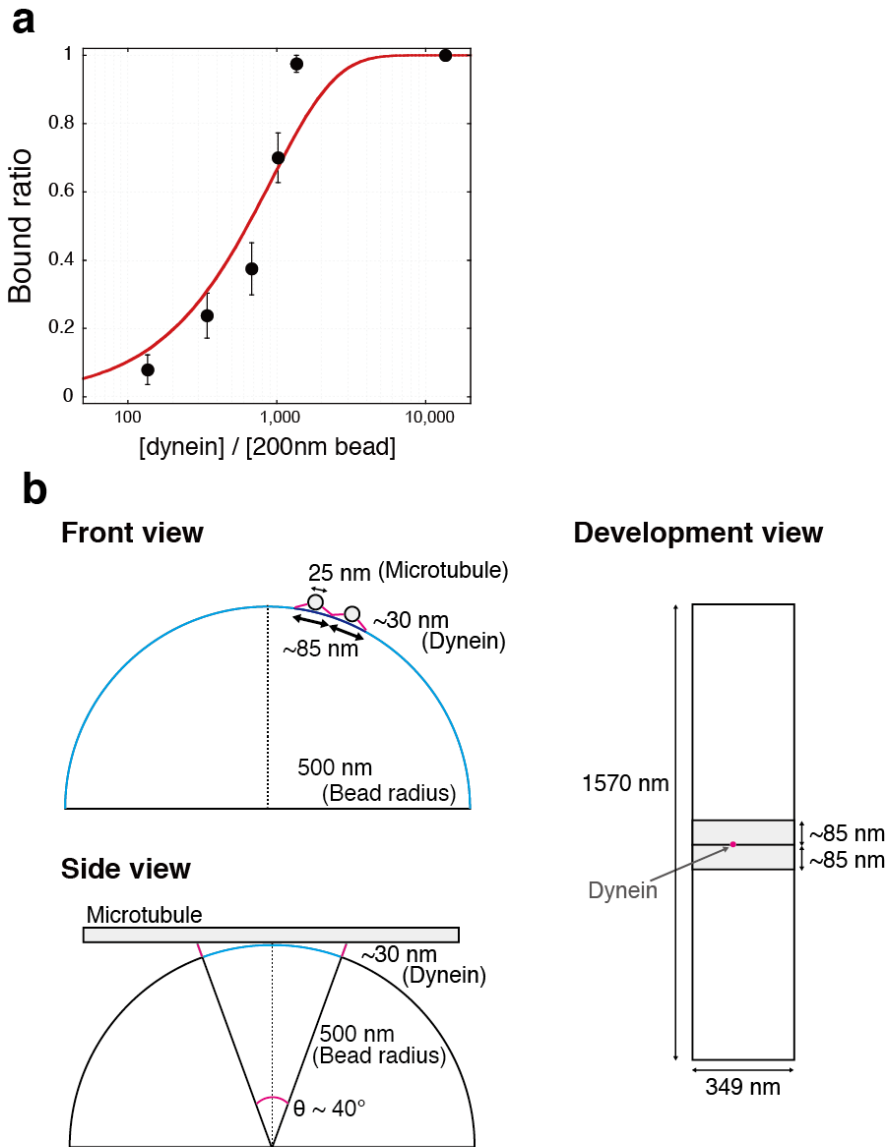


図 2.6 タンパクビーズの微小管結合率評価

(a) ダイニンビーズ（直径 200 nm）の濃度比と結合率の関係．約 40 個のビーズのうち微小管と結合する確率を結合率として誤差を式(16)に従いプロットし，式(18)でフィッティングした． $\lambda = 916.8 \pm 163.7$ （誤差は標準偏差），相関係数  $R = 0.950$ ．

(b) ダイニンビーズ（直径 1  $\mu\text{m}$ ）の上半球と微小管，ダイニンの幾何学的配置．ダブルトラップでの測定時，微小管長軸・短軸方向からみた配置を各々Front view, Side view として表記した．微小管を灰色，ダイニンを赤色の直線で示した．水色で示した円弧と微小管は相互作用できる．1つのダイニンから青色の円弧内（Front view, 前後合わせて $\sim 170$  nm）に他のダイニンが位置すると，複数のダイニンが微小管と相互作用する．また，ダイニンが相互作用できる領域を展開図(Development view)として示した．1570 nm $\times$ 349 nmの面積内で170 nm $\times$ 349 nmの面積内にダイニンが 2 分子以上位置すると，同時に相互作用しうる．

### 2.4.3 ダブルトラップによる 1 分子測定方法

大きさ  $1.8 \times 1.8 \text{ cm}$  と  $2.4 \times 3.6 \text{ cm}$  の 2 枚のカバーガラス（松浪硝子工業株式会社）を厚さ  $10 \mu\text{m}$  の両面テープ（#5601, 日東電工株式会社）で接着したフローセルチャンバー（容量  $2 \mu\text{l}$  程度）を用いて、図 2.7 a に示す測定系を構築した。

蛍光像を確認しつつ、変異キネシンビーズを発振波長  $1064 \text{ nm}$  レーザーにより 2 ヶ所で捕獲した。変異キネシンビーズ 2 つを極性微小管の両端（間隔  $\sim 8 \text{ nm}$ ）で結合させ、微小管にたわみが無いようかつ引っ張りすぎてトラップ中心位置から大きくずれないように、トラップビーズ位置を調整した。ビーズを介して微小管位置を 2 ヶ所で固定したことで、ビーズに結合した単量体ダイニンが一旦微小管から解離しても、微小管が近くにあるため、短時間で再結合できた。これは、ダイニンからみて微小管濃度が高い状態にあることに相当する。その後、トラップしたビーズに結合した微小管をガラスに固定しているダイニンビーズに近づけて、微小管がダイニンと結合するようチャンバーの高さ調整を行った。トラップしているビーズは、ガラス下面に近付けすぎてトラップから外れたり、ガラス面と相互作用したりすることがないように注意した。このときの蛍光像は、図 2.7 b に示すとおり、極性微小管（右端が蛍光ラベル率の濃いマイナス端）上にトラップされたビーズ 2 つが固定され、中心に蛍光強度の弱いダイニンビーズが配置されている。

斜光照明用レーザー光入射により、トラップされた一方のビーズ（図 2.7 a）の散乱光を 4 分割フォトダイオード面に結像することで、トラップビーズの位置変位を測定した。ダイニンと微小管の結合/非結合領域を特定することで、ダイニンが微小管を動かした距離を算出した（次の 2.4.4 章で詳細を述べる）。ダイニンは微小管マイナス端方向に運動するが、本研究ではダイニンを固定した測定であるため、トラップビーズが微小管プラス端方向に運動するので、この方向を正として解析した。本研究で用いた単量体ダイニンの N 端には、微小管に対するダイニンの方向性が維持できるようなフレキシブルな部位が含まれているため、ビーズに対してダイニンは自由に回転できると考えられる。チャンバー付近の温度は  $25 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  であった。

2 つのトラップビーズで微小管を固定し、ダイニンビーズの存在しない領域で、 $100 \text{ nm}$  間隔の変位を与え出力電圧との関係をキャリブレーションした。その後、ダイニンビーズを 2 つのトラップビーズのほぼ中心に位置するよう配置した後、4 分割フォトダイオードでトラップビーズの散乱強度、ビーズの二次元方向の変位、結合位置を見やすくするために変位データを  $50 \text{ Hz}$  のハイパスフィルターを通した値などを、サンプリング周波数  $20 \text{ kHz}$ （サンプル時間間隔  $50 \mu\text{s}$ ）で数～数十分間取得した。トラップされたビーズからの斜光照

明強度出力の電圧値が、ビーズ 1 個で~1.5 V, ビーズ 2 個で~3.0 V であったことから, ~1.5 V となる時単一ビーズを捕獲できているとして測定を進めた.

以下の条件で実験を行った. 100  $\mu\text{M}$  より高い ATP 濃度では, ダイニンが微小管に結合する時間が短すぎて結合した領域を抽出できなかったため, 100  $\mu\text{M}$  以下 (0.5~100  $\mu\text{M}$ ) の ATP 濃度および ATP を加えない条件で, 単量体ダイニン D384 の変位実験を行った. さらに, 変位が linker の運動と関連するかどうかを検証するため, FRET 測定で linker が (ほぼ) スイングしないことを確認した変異ダイニン(D384GB- $\Delta\text{PSI}\Delta\text{H2}$ , D384GB- $\Delta\text{PSI}$ )の 1 mM ATP 存在下での変位を測定した. さらに, 変異ダイニンに導入された GFP と BFP が微小管の運動を阻害していないことを検証するため, D384 に GFP と BFP が導入された組換えダイニン D384GB を用いて 100  $\mu\text{M}$  ATP で変位測定を行った. また, 微小管結合時間が ATP 濃度と関連があるか検証するために, 以上の条件でダイニンが微小管と結合する時間を, 同時に解析した.

インターネット公表に関する同意が  
得られなかったため非公表

### 図 2.7 ダブルトラップによる測定系

(a) チャンバー内測定系の模式図. 2箇所をトラップした変異キネシンビーズ(直径 200 nm)を極性微小管と相互作用させ, ガラスに非特異結合したダイニンビーズ(直径 1  $\mu\text{m}$ )と微小管を相互作用させた. ダイニンのパワーstroke運動を考慮して, 極性微小管はマイナス端を図の右側になるよう位置させた. 赤色の斜光照明をトラップビーズ 1 つに入射したときの散乱光を検出することで, ビーズの変位を測定した. ダイニン・キネシン・微小管の PDB は各々 3VKH, 3KIN, 1JFF である. なお, 測定系全体を見やすくするために, 変異キネシンビーズは $\sim 3.5$  倍, ダイニンビーズは $\sim 12.5$  倍縮小して図示した.

(b) ビーズと微小管の蛍光像. 2つのトラップビーズが極性微小管の両端に結合し, ダイニンビーズと相互作用させた状態を蛍光像から確認して測定を開始した. スケールバーは 5  $\mu\text{m}$ .



#### 2.4.4 シングルトラップによる1分子測定方法

ダブルトラップ法では、固定されたビーズに結合したダイニンを用いているため、微小管に対して、正しい方向（結合しやすい方向）を向いていないダイニンが含まれている可能性が考えられる。ミオシン分子の研究から、ミオシン分子が正しくない方向を向いていると、変位が小さくなるとの結果が得られている[Tanaka et al. 1998]。シングルトラップ法を用いれば、ダイニンビーズは自由に回転できるので、ダイニンが結合しやすい方向をとれると考え、シングルトラップにおけるダイニンの変位測定を行った。

シングルトラップ法では、フローチャンバー内(容量~2  $\mu$ l)で図 2.8 に示す系を構築した。

インターネット公表に関する同意が  
得られなかったため非公表

#### 図 2.8 シングルトラップによる測定系

(a) チャンバー内測定系の模式図。トラップしたダイニンビーズ（直径 200 nm）を、ガラスにアビジン-ビオチン系で固定した極性微小管と相互作用させた。赤色の斜光照明をトラップビーズに入射したときの散乱光を検出することで、ビーズの変位を測定した。なお、測定系全体を見やすくするために、ダイニンビーズは~3 倍縮小して図示した。

(b) ビーズと微小管の蛍光像。トラップビーズを極性微小管上に位置させた状態を蛍光像から確認して測定を開始した。スケールバーは 5  $\mu$ m。

## 2.4.5 ダイニン-微小管結合時間領域を特定する方法

微小管長軸方向のトラップビーズ位置変位の例は、図 2.9 で示される。ダブルトラップ法での測定の場合、ビーズ表面上のダイニンが微小管と相互作用しない間はトラップビーズがブラウン運動している。ところどころ、ブラウン運動が小さくなる時間領域が測定された。これは、ダイニンが微小管と相互作用すると、ダイニン-微小管間に働くバネ定数が増えることでビーズのブラウン運動に伴う変位の標準偏差はエネルギー等分配の法則に従い小さくなったと考えられる。ダイニンと微小管が結合/非結合していることを判断するために、低周波数の変位を減じるため位置変位データを 50 Hz のハイパスフィルターを通した値を LabChart に出力させ、標準偏差が他の領域と比較して~0.7 以下に減少した領域が高頻度に現れれば、微小管がダイニンと相互作用したものとして解析の対象とした。シングルトラップ測定でも同様の手法で行った。

次に実験データの数値解析方法を述べる。微小管長軸方向へのビーズの位置に対し、微小管-ダイニン結合時間領域を検出する解析方法は 1995 年 Molloy らによって始められ、定量的な解析方法として用いられてきた[Molloy et al 1995, Smith et al. 2001]。ダイニン-微小管の結合/非結合反応が起きた範囲のデータを 20-30 秒間隔に区切り、テキスト形式で保存した。このデータをもとにダイニンと微小管が結合している領域を独自のプログラム (MATLAB) によって解析を行った。まず、装置のドリフトを除去するために、20-30 秒区間内のデータの中のダイニンが微小管に結合していない領域 2 エリア (1 秒間) の平均位置を 0 nm にとり、ドリフトが直線的に起こると仮定して、ドリフト成分を除去した。

バネ定数は式(15)に従い位置標準偏差の二乗に反比例するため、ダイニンが微小管に結合した部位のバネ定数の値が増え、バネ定数は大きな値を取るはずである。そこで、ダイニンが微小管と結合する領域を見つけるために、24 ミリ秒間 (481 データに相当) のビーズの標準偏差およびバネ定数を算出し、時間を 12 ミリ秒ずらしてまた算出することを繰り返した。こうして、バネ定数が大きくなる部分が観られ、連続して 2 点以上バネ定数が高い領域で微小管と結合しているとして解析した。なお、長時間 (48 ミリ秒間以上) でのバネ定数を算出した場合、短時間での結合領域を抽出し損ねる確率が高く、逆に短時間 (12 ミリ秒間以下) でのバネ定数を算出した場合、測定上のノイズを拾う可能性が高かったため、最適な 24 ミリ秒間でのバネ定数を算出した。

ダイニンが微小管に結合/非結合したときにトラップビーズにかかるバネ定数は、次に示す関係性から計算することができ、以下で議論する全てのバネ定数は、式(15)を満たしている。まず、ダイニンビーズ非存在領域での測定系にかかるバネ定数は、図 2.10a のように書ける。各ビーズにかかるトラップ弾性率を各々  $k_{\text{trap}1}$ ,  $k_{\text{trap}2}$  とし、微小管を剛体棒と仮定し、

微小管とビーズ間にかかるバネ定数を各々 $k_{M1}, k_{M2}$ とする。このとき右側のトラップビーズにかかる全体のバネ定数を $k_{D-unbind}$ とすると、図 2.10b のとおり「バネ定数 $k_{trap2}, k_{M1}, k_{M2}$ のバネを直列に並べたもの」と「バネ定数 $k_{trap1}$ のバネ」を並列に並べたバネとして、式(25)で書くことができる[Veigel et al. 1998].

$$k_{D-unbind} = k_{trap1} + \frac{1}{\frac{1}{k_{trap2}} + \frac{1}{k_{M1}} + \frac{1}{k_{M2}}} \quad (25)$$

2 つのビーズのトラップ弾性率 $k_{trap1}, k_{trap2}$ はほぼ等しく( $\equiv k_{trap}$ )であり、今回微小管と 2 つのトラップビーズを結合した状態で測定したバネ定数 $k_{D-unbind}$ の平均値は、 $k_{trap}$ の約 2 倍であった。これらの結果から、微小管左右にかかるバネ定数 $k_{M1}, k_{M2}$ はほぼ等しく、かつトラップ弾性率と比較して十分大きいと近似できる ( $k_{trap} = k_{trap1} = k_{trap2} \ll k_{M1}, k_{M2}$ )。これら近似を用いると測定系全体にかかるバネ定数 $k_{D-unbind}$ は、トラップ弾性率の 2 倍に近似できた ( $k_{D-unbind} \approx 2k_{trap}$ )。

次に、ダイニン結合時の測定系全体にかかるバネ定数 $k_{D-bind}$ を算出する。ダイニンが微小管に結合した時、ダイニンとビーズ間のバネ定数を $k_{dynein}$ とし、ダイニンなしの場合の近似式を用いて、式(26)で書くことができる (図 2.10) [Veigel et al. 1998].

$$\begin{aligned} k_{D-bind} &= k_{trap1} + \frac{1}{\frac{1}{k_{M1}} + \frac{1}{k_{dynein} + \frac{1}{\frac{1}{k_{trap2}} + \frac{1}{k_{M2}}}}} \\ &\approx k_{trap1} + \frac{1}{\frac{1}{k_{M1}} + \frac{1}{k_{dynein} + k_{trap2}}} \approx 2k_{trap} + k_{dynein} \\ &\quad (k_{trap} = k_{trap1} = k_{trap2} \ll k_{M1}, k_{M2}) \end{aligned} \quad (26)$$

ダイニン結合時に系全体にかかるバネ定数 $k_{D-bind}$ は、ダイニン非結合時の系全体でのバネ定数 $k_{D-unbind}$ と、ダイニン-ビーズ間にかかるバネ定数 $k_{dynein}$ の和として表記できる。

以上のとおり、光トラップされたビーズには、トラップによる弾性率だけでなく、ビーズと微小管間に働く弾性など様々な弾性要素が含まれており、それら全ての弾性要素を考慮に入れた上で、ダイニンの微小管との相互作用を考える必要がある。さらに、測定したビーズの変位はダイニンが微小管を動かす距離にバネの伸びが加わっているため、ビーズの位置変位に実験系に存在するバネの伸びを見積もり、ダイニンが微小管を動かした位置変位を算出する必要がある。ダイニンが微小管に結合した時、一方のトラップビーズにかかるトラップ力とダイニンの力の釣合の関係から、図 2.10a の概略図に基づいて、ダイニンの変位 $x_{dynein}$ は式(27)で書き表せる[Veigel et al. 1998].

$$\begin{aligned}
k_{D-\text{unbind}} \cdot x_{\text{bead}} &= k_{\text{dynein}}(x_{\text{dynein}} - x_{\text{bead}}) \\
&= (k_{D-\text{bind}} - k_{D-\text{unbind}})(x_{\text{dynein}} - x_{\text{bead}}) \\
\therefore x_{\text{dynein}} &= \left( \frac{k_{D-\text{bind}}}{k_{D-\text{bind}} - k_{D-\text{unbind}}} \right) x_{\text{bead}} = \left( \frac{1}{1 - \frac{k_{D-\text{unbind}}}{k_{D-\text{bind}}}} \right) x_{\text{bead}}
\end{aligned} \tag{27}$$

以上より，ダイニンの変位は，測定したビーズの変位 $x_{\text{bead}}$ に対し，ダブルトラップによるダイニン非結合時での系全体のバネ定数 $k_{D-\text{unbind}}$ と，ダイニン結合時での系全体のバネ定数 $k_{D-\text{bind}}$ を用いた補正係数を掛けることで見積もった．補正係数を小さくするためにはトラップ弾性率を小さくすることで改善することは理論上可能だが，トラップ弾性率が小さすぎるとチャンバー内でトラップビーズを動かすための操作性が悪くなるため，以上の条件をもとに測定を行うこととした．

インターネット公表に関する同意が  
得られなかったため非公表

**図 2.9 微小管長軸方向へのビーズの位置と、微小管-ダイニン結合の時間領域**  
(a)ダブルトラップと(b)シングルトラップによる, 100  $\mu$ M ATP 条件下で微小管長軸方向への  
トラップビーズの位置の生データを黒で示した. 微小管-ダイニン結合領域を赤色帯で示し,  
結合・非結合領域の平均位置を赤色・灰色の太線で示した.

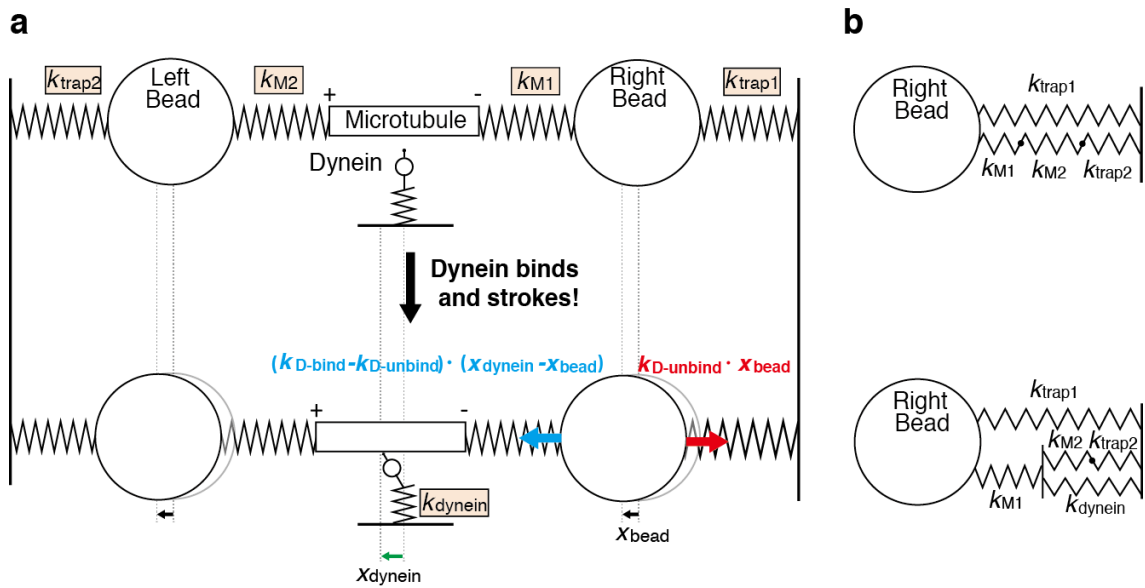


図 2.10 ダブルトラップでのバネ定数の関係性

(a) 測定系全体にかかるバネ定数. 光ピンセットのバネ定数を  $k_{\text{trap1}}$ ,  $k_{\text{trap2}}$ , 微小管を剛体としたときの微小管とビーズ間のバネ定数を  $k_{M1}$ ,  $k_{M2}$ , ダイニン-ビーズ間のバネ定数を  $k_{\text{dynein}}$  とおく. ダイニンが微小管と結合し距離  $x_{\text{dynein}}$  運動した時, ビーズが距離  $x_{\text{bead}}$  動いたとすると, トラップビーズにかかる力の釣り合いは式(27)で表せる.

(b) (a)を簡単にするため, 一方のトラップビーズのみにかかるバネを測定系全体としてまとめた. ダイニン結合・非結合時でのトラップビーズにかかるバネ定数  $k_{D\text{-bind}}$ ,  $k_{D\text{-unbind}}$  は式(25), (26)で表せる.

## 第3章 実験結果

### 3.1 精製したダイニンの性質

#### 3.1.1 負染色法によるダイニンの電子顕微鏡像観察

精製したダイニンモノマーが単一分子となっていることを確認・実証するため、産業技術総合研究所の広瀬恵子研究員のご指導のもと、Tecnai F20 透過型電子顕微鏡[Ueno et al. 2008]を用いた負染色法による単量体ダイニン D384 の像を観察した。

インターネット公表に関する同意が  
得られなかったため非公表

#### 図 3.1 ダイニンの負染色電子顕微鏡像

単量体ダイニン(D384)を橙色の矢印で表示，スケールバーは 60nm. 左上の像は，1 分子の D384 を拡大した像であり，MTBD を黄色矢印で表示，スケールバーは 10nm.

### 3.1.2 微小管の滑り運動による活性測定結果

本研究で精製した組換え体・変異ダイニンやキネシンの運動活性を確認するため、最も基礎的な手法である微小管の滑り運動測定を行った。

表 3.1 に以上の結果をまとめた。

また、精製した変異キネシンが ATP 存在下で運動しないことを同様に測定した。1 mM ATP 条件下で行った結果、組換え体キネシンでは微小管は速度  $924 \pm 3$  nm で運動するのに対し、変異キネシンでは微小管は全く運動せず、不活性であることが確認できた (表 3.1)。

インターネット公表に関する同意が  
得られなかったため非公表

### 図 3.2 ダイニンによる微小管の滑り運動速度の ATP 濃度依存性

ダイニン単量体 D384 (■・赤線フィッティング) と D384GB (●・青点線フィッティング) による速度 (誤差バーは標準誤差)。ミカエリス-メンテン式 (式(2)) によるフィッティングを行った。

### 表 3.1 各種ダイニン・キネシンによる微小管の滑り運動速度の一覧表

図 3.2 から算出した D384 と D384GB の最大速度  $V_{\max}$  とミカエリス-メンテン定数  $K_m^V$  の誤差を標準誤差で示す。2 mM ATP (キネシンの場合 1 mM ATP) での運動速度は、ガウス関数フィッティングにより算出した中心値であり、誤差は標準誤差で表記し、解析した微小管本数を右端に表記。D384B は測定していない。

インターネット公表に関する同意が  
得られなかったため非公表



### 3.1.3 共沈実験による微小管結合能測定結果

本研究で精製したダイニンや変異キネシンについて、微小管との結合能を評価するため、ダイニン・キネシンが微小管と結合する割合を知るための共沈実験を行った。はじめに、200 nM ダイニン(D384)と 1.53  $\mu$ M 微小管を含む混合溶液を超速心後、微小管が上清にどの程度あるのかを SDS-PAGE で確認した(図 3.3a)。特に ADP-Vi 条件では、ダイニン沈降量はバンドでは確認できないため、弱結合状態であることが推測できる。

次に、GFP を導入させたダイニン D384G を用いた共沈実験を行い、微小管濃度に対し、微小管と結合するダイニンの割合をプロットした結果が図 3.3c であり、式(5)でフィッティングした。微小管濃度を上げると、微小管と結合するダイニン量も増加し、解離定数 $K_d$ は各々、1 mM ADP で 0.2  $\mu$ M, 1 mM AMPPNP (#2647, Sigma-Aldrich)で 0.5  $\mu$ M, apo (ヌクレオチドなし) で 1.25  $\mu$ M, ADP-Vi (0.2 mM ATP と 1 mM Sodium orthovanadate の混合溶液, vanadate は#S6508, Sigma-Aldrich) で >10  $\mu$ M (フィッティング不可能)と算出された。よって、ADP, AMPPNP 状態ではダイニンは微小管と強結合、ADP-Vi 状態では弱結合であり、apo 状態は ADP 状態よりも若干弱結合であることが分かった。同様に、2 種類の変異ダイニン D384GB- $\Delta$ PSI と D384GB- $\Delta$ H2, そして D384GB で共沈実験を行った結果が図 3.3d, e であり、以上の結果を表 3.2 にもまとめた。D384GB は D384G と同等の傾向がみられることから微小管との結合能は維持されており、2 種の変異ダイニンではヌクレオチド状態によらず微小管と強結合であった。特に D384GB- $\Delta$ PSI は D384GB- $\Delta$ H2 と比較して ADP-Vi 状態での解離定数は小さいため、より微小管結合が強いと判断できた。これら 2 種の変異ダイニンと比較して、D384GB- $\Delta$ PSI $\Delta$ H2 は微小管アフィニティーが非常に強いことが光ピンセット測定から明らかになったため、共沈実験は行わなかった。

また、ダブルトラップ法による光ピンセット測定にて微小管とビーズ間の固定に用いる変異キネシン K490 G235A が、ヌクレオチド状態によらず微小管と常に強結合であることを確認するため、ダイニン同様の共沈実験を行った。条件はダイニンと同様に、チューブ内で 2  $\mu$ M 変異キネシン, 10  $\mu$ M 微小管, 終濃度 10  $\mu$ M paclitaxel, 終濃度 1 mM ヌクレオチド (apo 状態は buffer で代用) を混合して超速心し、SDS-PAGE を行った結果が図 3.3b である。ImageJ でキネシンのバンドの濃淡から濃度を定量評価した結果、いかなるヌクレオチド状態でも微小管に結合しないキネシン (上清) は 5-10 %以下であり、変異キネシンは微小管と強結合したことで沈殿したことが確認できた。以上より、この変異キネシンは光ピンセット法による微小管-ビーズ間の固定として使用できると判断した。

インターネット公表に関する同意が  
得られなかったため非公表

### 図 3.3 ダイニンと変異キネシンの微小管結合率

(a) ダイニン D384 の微小管アフィニティーSDS-PAGE 結果. 微小管がダイニンの約 7 倍の濃度の場合, AMPPNP・ADP・Apo・ADP-Vi 条件での微小管結合率は各々 64 %, 74 %, 58 %, 5 %以下であった. 分子量マーカーを MK, 遠心後の上清を s (supernatant), 沈殿物を p (pellet) と示す.

(b) 変異キネシン K490 G235A の微小管アフィニティーSDS-PAGE 結果. 微小管がダイニンの約 7 倍の濃度の場合, AMPPNP・ADP・Apo・ADP-Vi・ATP 条件での微小管結合率は 5-10 %以下であった.

(c) ダイニン D384G, (d) D384GB- $\Delta$ PSI, (e) D384GB- $\Delta$ H2 の ATP 濃度依存的微小管結合濃度率. 生データを全てプロットした. D384G の ADP-Vi 状態を除く全ての条件について, 式(5)でフィッティングを行った.

### 表 3.2 組換え体・変異ダイニンの解離定数 $K_d$

図 3.3 と式(5)より算出した解離定数の一覧表. 誤差は標準誤差であり, 単位は  $\mu$ M である. D384G でのみ, AMPPNP での測定を行った.

インターネット公表に関する同意が  
得られなかったため非公表

## 3.2 FRET 法によるダイニンの構造の評価

### 3.2.1 ヌクレオチド固定状態での FRET 効率

本研究で精製したヒト由来の細胞質ダイニンがヌクレオチド状態に伴い linker がリングに対して構造変化することを示すため、FRET 法による測定を行った。ダイニン D384GB では、特に ADP-Vi と ADP 状態での波長 400-600 nm での蛍光強度スペクトルは図 3.4a となり、波長 505 nm での蛍光強度  $F_{total}$  は ADP 状態より ADP-Vi 状態の方が高いことが読み取れる。各ヌクレオチド条件での FRET 効率を算出した結果、AMPPNP, apo, ADP 状態に対する FRET 効率は~17 % と低いものに対し、ADP-Vi, ATP 状態での FRET 効率は~51 % と大きな値をとった (図 3.4b)。これは、ADP-Vi 状態と ATP 状態で linker が折れ曲がり、他の 3 状態で linker がまっすぐに伸びた構造をとると推測でき、これまでの構造研究の知見に一致した [Kon et al. 2005]。また、1mM ATP, ADP-Vi 状態での FRET 効率値がほぼ等しく大きいことから、リン酸放出は律速であると推定される。本実験では、FRET 効率は 15-52 % の範囲で測定された。GFP と BFP の動きがランダムであると仮定すると、GFP-BFP 間距離は式(6)と図 3.4b より 4.0-5.5nm の範囲にあると算出された。

また、パワーストローク機構に関わると考えられている linker と接触した 2 本のループ ( $\beta$ -hairpin) の一方、あるいは両方を削った 3 種類の変異ダイニン (D384GB- $\Delta$ PSI $\Delta$ H2, D384GB- $\Delta$ PSI, D384GB- $\Delta$ H2) を用いて同様に測定した。前者 2 種のダイニンの ADP-Vi と ADP 状態での蛍光強度スペクトル  $F_{FRET}$  は図 3.4a となった。また、各ヌクレオチド状態での FRET 効率は図 3.4b に示した。

インターネット公表に関する同意が  
得られなかったため非公表

### 図 3.4 ダイニン分子内 FRET の測定

(a) 各種ダイニンの蛍光強度スペクトル。ADP-Vi と ADP での蛍光強度の平均値を赤丸と黒四角で各々プロットした。誤差バーは標準偏差である。

(b) 各種ダイニンの各ヌクレオチド条件での FRET 効率。誤差バーは標準誤差である。

### 3.2.2 ATP 濃度依存的 FRET 効率変化

組換え体ダイニン D384GB について、ATP 濃度を変化させて蛍光強度の測定を行い、ATP 濃度依存的な FRET 効率の値からダイニンの構造と ATP 濃度の関係を明らかにした。3.2.1 章より、ダイニンが 1 mM ATP 濃度で FRET 効率が高いのに対して、apo 状態では FRET 効率が低くなった。ATP 濃度とともに FRET 効率に変化するならば、ダイニンの加水分解サイクルにおいて ATP 濃度は重要な要素であると推定できる。そこで、本章では、ATP 濃度を変化させて蛍光強度の測定を行い、ATP 濃度依存的な FRET 効率の値からダイニンの構造と ATP の関係を明らかにした。

解析の詳細は第 4 章で述べる。

インターネット公表に関する同意が  
得られなかったため非公表

図 3.5 ダイニン D384GB の ATP 濃度依存的 FRET 効率

### 3.3 光ピンセットを用いたダイニン 1 分子の運動測定結果

#### 3.3.1 ダイニン 1 分子が微小管と結合した際の運動距離

双頭ダイニンが微小管上を一方向に運動するうえで、単量体ダイニンの運動寄与がパワーstrokeと関連する可能性があるが、単量体ダイニンの運動寄与を示す報告はない。本研究では、ダイニンが微小管に結合してどのくらいの運動変位が生じるかを明らかにするために、ATP 存在下で単量体のヒト由来ダイニンモータードメインが微小管上を運動した変位を光ピンセットによって測定した。

#### ダブルトラップによる結果

ダブルトラップ法により、ダイニンが微小管と結合後に起こるビーズの変位距離を解析した。ダイニンがパワーstrokeにより微小管マイナス端方向に運動する変位を正とするために、ダブルトラップ測定時にビーズが微小管のプラス端方向に運動する方向を正として解析を行った (図 2.9a)。100  $\mu$ M ATP 存在下でのビーズの変位をビン幅は 3 nm でヒストグラムに表したものが図 3.6 の左上である。ビーズの変位  $x$  はガウス分布に従い、ガウス関数の一種である正規分布  $f(x|\mu, \sigma)$  を用いてフィッティングを行った。 $\mu$  はビーズの変位の中心値、 $\sigma$  はビーズの変位の標準偏差である。

$$f(x|\mu, \sigma) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \cdot \exp\left(-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (28)$$

ガウス分布によるフィッティングではビン幅を 2, 3, 4 nm と変化すると、フィットしたガウス分布の中心位置が最大 1nm 変化した。測定された変位の分解能は~0.1 nm であるので、ビン幅に依存しない変位の中心値を算出するために、ガウス関数を積算した誤差関数で表現された累積分布関数 (式(29)) でフィッティングを行った。

$$\begin{aligned}
\varphi(x) &= \int_{-\infty}^x f(x'|\mu, \sigma) dx' = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \int_{-\infty}^x \exp\left(-\frac{(x' - \mu)^2}{2\sigma^2}\right) dx' \\
&= \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \int_{-\infty}^m \exp\left(-\frac{m'^2}{2\sigma^2}\right) dm' = \frac{1}{\sqrt{\pi}} \int_{-\infty}^t \exp(-t'^2) dt' \\
&= \frac{1}{\sqrt{\pi}} \int_{-\infty}^0 \exp(-t'^2) dt' + \frac{1}{\sqrt{\pi}} \int_0^t \exp(-t'^2) dt' \quad (29) \\
&= \frac{1}{2} \left(1 + \operatorname{erf}\left(\frac{x - \mu}{\sqrt{2}\sigma}\right)\right) \equiv \frac{\delta_1}{2} \left(1 + \operatorname{erf}\left(\frac{x - \mu}{\sqrt{2}\sigma}\right)\right) - \delta_2
\end{aligned}$$

$$x - \mu = m = \sqrt{2}\sigma t, \quad \text{誤差関数: } \operatorname{erf}(a) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^a e^{-k^2} dk$$

$\varphi(x)$ は0から1の範囲、 $\mu$ はビーズの変位の中心値、 $\sigma$ はビーズの変位の標準偏差、 $\delta_1, \delta_2$ はデータ数が有限であるために必要なパラメーター ( $\delta_1 \approx 1, \delta_2 \approx 0$ ) である。

ダイニンの変位は補正式(27)により補正した変位に対して、式(28), (29)で同様にフィッティングをした。その結果は、図 3.7a-c に示し、全条件での値は表 3.3 に掲載した。フィッティングにより算出したダイニンの変位の中心値は、単量体ダイニンが微小管上を一段階で運動した距離に相当し、見かけのステップサイズと表現されることもある。

インターネット公表に関する同意が  
得られなかったため非公表

図 3.6 ダブルトラップによる，ビーズの変位分布

インターネット公表に関する同意が  
得られなかったため非公表

図 3.7 ダブルトラップによる，ダイニンの変位分布

### シングルトラップによる結果

ダブルトラップ法では、固定されたビーズに結合したダイニンを用いているため、微小管に対して、正しい方向（結合しやすい方向）を向いていないダイニンが含まれている可能性が考えられる。これは、ミオシン分子の研究から、ミオシン分子が正しくない方向を向いていると、変位が小さくなるとの結果が得られていることを踏まえてである[Tanaka et al. 1998]。シングルトラップ法を用いれば、ダイニンビーズは自由に回転できるので、ダイニンが運動する正確な距離を算出することはできないが、ダイニンが結合しやすい方向をとれる。よって、シングルトラップにおけるダイニンの変位測定を行い、運動距離がダブルトラップ法に近い値として算出されるか、ATP 濃度依存的であるかを確認した。

ダブルトラップと同様に、ダイニンが微小管と結合時に運動したダイニンの変位距離を解析した。

インターネット公表に関する同意が  
得られなかったため非公表

図 3.8 シングルトラップによる、ダイニンの変位分布



### 3.3.2 ダイニン 1 分子と微小管との結合時間

ダイニンの微小管結合時間が ATP 濃度と関連があるか検証するために、シングルトラップ・ダブルトラップ法において、ダイニンが微小管と結合する時間を解析した。

#### ダブルトラップによる結果

ダイニンが微小管と結合する時間を解析した。結合時間をビン幅 48 ms でヒストグラムにしたものが、図 3.9 である。結合時間  $t$  は指数関数的に減衰する分布をとり、一次の指数関数で示した式(30)を用いてフィッティングを行った。 $\psi, \psi_0$ は頻度、 $\tau$ は(指数関数的)時定数である。

$$\psi(t) = \psi_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (30)$$

#### シングルトラップによる結果

ダブルトラップと同様に、ダイニンが微小管と結合する時間を解析した。

インターネット公表に関する同意が  
得られなかったため非公表

図 3.9 ダブルトラップによる、ダイニンの微小管との結合時間

インターネット公表に関する同意が  
得られなかったため非公表

図 3.10 シングルトラップによる、ダイニンの微小管との結合時間。

### 表 3.3 トラップのデータ一覧

ダブルトラップとシングルトラップで測定したダイニン分子の変位・結合時間とヌクレオチド条件の一覧。ビーズとダイニンの変位，ダイニン-微小管結合時間の時定数について，誤差はいずれも標準誤差である。抽出したデータ数，解析対象としたダイニンビーズ数と微小管の本数を表記し，一番下の行は，全データ数である。同一微小管を用いて複数のダイニンビーズでの測定を行ったものが含まれるため，微小管の本数はダイニンビーズ数以下の値となった。

インターネット公表に関する同意が  
得られなかったため非公表

## 第4章 考察

本章については、5年以内に  
雑誌などで刊行予定のため非公開

## 第5章 まとめ

本章については、5年以内に  
雑誌などで刊行予定のため非公開

## 参考文献

- Ashkin, A. (1970) Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys. Rev. Lett.* **24**, 156-159
- Belyy, V., Hendel, N. L., Chien, A. and Yildiz, A. (2014) Cytoplasmic dynein transport cargos via load-sharing between the heads. *Nat. Comm.* 10/1038/ncomms6544
- Belyy, V., Schlager, M. A., Foster, H., Reimer, A. E., Carter, A. P. & Yildiz, A. (2016) The mammalian dynein-dynactin complex is a strong opponent to kinesin in a tug-of-war competition. *Nat. Cell Biol.* **18** 1018-1024
- Bhabha, G., Cheng, H., Zhang, N., Moeller, A., Liao, M., Speir, J. A., Cheng, Y. & Vale, R. D. (2014) Allosteric communication in the dynein motor domain. *Cell* **159** 857-868
- Block, S. M., Goldstein, S. B. & Schnapp, B. J. (1990) Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature* **348** 348-352
- Burgess, S. A., Walker, M. L., Sakakibara, H., Knight, P. J. & Oiwa, K. (2003) Dynein structure and power stroke. *Nature* **421**, 715-718
- Castoldi, M. & Popov, A. V. (2003) Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization-depolymerization in a high-molarity buffer. *Protein Expression & Purification* **32** 83-88
- Cho, C., Reck-Peterson, S. L. & Vale, R. D. (2008) Regulatory ATPase sites of cytoplasmic dynein affect processivity and force generation. *J. Biol. Chem.* **283** 25839-25845
- Cleary, F. B., Dewitt, M. A., Bilyard, T., Htet, Z. M., Belyy, V., Chan, D. D., Chang, A. Y. and Yildiz, A. (2014) Tension on the linker gates the ATP-dependent release of dynein from microtubules. *Nat. Comm.* 10.1038/ncomms5587
- Clegg, R. M. (1992) Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods Enzymol.* **211**, 353-388
- Dewitt, M. A., Chang, A. Y., Combs, P. A. & Yildiz, A. (2012) Cytoplasmic dynein moves through uncoordinated stepping of the AAA+ ring domains. *Science* **335**, 221-225
- Dewitt, M. A., Cypranowska, C. A., Cleary, F. B., Belyy, V. & Yildiz, A. (2015) The AAA3 domain of cytoplasmic dynein acts as a switch to facilitate microtubule release. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22** 73-80
- Finer, J. T., Simmons, R. M. & Spudich, J. A. (1994) Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature* **368**, 113-119

- Gaskin, F. and Cantor, C. R. (1974) Turbidimetric studies of the *in vitro* assembly and disassembly of porcine neurotubules. *J. Mol. Biol.* **89** 737-758
- Gennerich, A., Carter, A. P., Reck-Peterson, S. L. & Vale, R. D. (2007) Force-induced bidirectional stepping of cytoplasmic dynein. *Cell* **131** 952-965
- Gibbons, I. R. (1963) Studies on the protein components of cilia from *Tetrahymena pyriformis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 1002-1010
- Gibbons, I. R. & Rowe, A. J. (1965) Dynein: A protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. *Science*. **149**, 424-426
- Holzbaur, E. L. F. & Johnson, K. A. (1989) Microtubules accelerate ADP release by dynein. *Biochemistry* **28** 7010-7016
- Hyman, A. (1991) Preparation of marked microtubules for the assay of the polarity of microtubule-based motors by fluorescence. *J. Cell Science* **14** 125-127
- Hyman, A., Drechsel, D., Kellogg, D., Salser, S., Sawin, K., Steffen, P., Wordeman, L. & Mitchison, T. (1991) Preparation of modified tubulins. *Methods in Enzymology* **196** 478-485
- Imai, H., Shima, T., Sutoh, K., Walker, M. L., Knight, P. J., Kon, T. & Burgess, S. A. (2015) Direct observation shows superposition and large scale flexibility within cytoplasmic dynein motors moving along microtubules. *Nat. Comm.* 10.1038/ncomms9179
- Imamura, K., Kon, T., Ohkura, R. & Sutoh, K. (2007) The coordination of cyclic microtubule association/dissociation and tail swing of cytoplasmic dynein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 16134-16139
- Johnson, K. A. & Porter M. E. (1982) Transient state kinetic analysis of the dynein ATPase. *Cell Motility Supplement* **1** 101-106
- Johnson, K. A. (1983) The pathway of ATP hydrolysis by dynein. *J. Biol. Chem.* **258** 13825-13832
- Johnson, K. A. (1985) Pathway of the microtubule-dynein ATPase and the structure of dynein: a comparison with actomyosin. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **14** 161-188
- Kamei, R., Kakuta, S. & Higuchi, H. (2005) Biased binding of single molecules and continuous movement of multiple molecules of truncated single-headed kinesin. *Biophys J.* **88** 2068-2077
- Kaya, M. and Higuchi, H. (2010) Nonlinear elasticity and an 8-nm working stroke of single myosin molecules in myofilaments. *Science* **329** 686-689
- Kon, T., Nishiura, M., Ohkura, R., Toyoshima, Y. Y. & Sutoh, K. (2004) Distinct functions of nucleotide-binding/hydrolysis sites in the four AAA modules of cytoplasmic dynein. *Biochemistry* **43**, 11266-11274
- Kon, T., Mogami, T., Ohkura, R., Nishiura, M. & Sutoh, K. (2005) ATP hydrolysis cycle-dependent

- tail motions in cytoplasmic dynein. *Nat. Struc. Mol. Biol.* **12**, 513-519
- Kon, T., Oyama, T., Shimo-Kon, R., Imamura, K., Shima, T., Sutoh, K. & Kurisu, G. (2012) The 2.8Å crystal structure of the dynein motor domain. *Nature* **484**, 345-350
- Lin, J., Okada, K., Raychev, M., Smith, M. C. & Nicastro, D. (2014) Structural mechanism of the dynein power stroke. *Nature Cell Biology* **16** 479-485
- Lipka, J., Kuijpers, M., Jaworski, J. & Hoogenraad, C. C. (2013) Mutations in cytoplasmic dynein and its regulators cause malformations of cortical development and neurodegenerative diseases. *Biochem. Soc. Trans.* **41** 1605-1612
- McKenney, R. J., Huynh, W., Tanenbaum, M. E., Bhabha, G. & Vale, R. D. (2014) Activation of cytoplasmic dynein motility by dynactin-cargo adapter complexes. *Science* **345** 337-341
- Mogami, T., Kon, T., Ito, K. & Sutoh, K. (2007) Kinetic characterization of tail swing steps in the ATPase cycle of *Dictyostelium* cytoplasmic dynein. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 21639-21644
- Molloy, J. E., Burns, J. E., Kendrick-Jones, J., Tregear, R. T. & White, D. C. (1995) Movement and force produced by a single myosin head. *Nature* **378**, 209-212
- Nicholas, M. P., Hook, P., Brenner, S., Wynne, C. L., Vallee, R. B. & Gennerich, A. (2015) Control of cytoplasmic dynein force production and processivity by its C-terminal domain. *Nat. Commu.* **6**:6206
- Nishiura, M., Kon, T., Shiroguchi, K., Ohkura, R., Shima, T., Toyoshima, Y. Y. & Sutoh, K. (2004) A single-headed recombinant fragment of *Dictyostelium* cytoplasmic dynein can drive the robust sliding of microtubule. *J. Cell Biol.* **279**, 22799-22804
- Omoto, C. K. & Johnson, K. A. (1986) Activation of the dynein adenosinetriphosphatase by microtubules. *Biochemistry* **25** 419-427
- Paschal, B. M., Shpetner, H. S. & Vallee, R. B. (1987) MAP 1C is a microtubule-activated ATPase that translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *J. Cell Biol.* **105**, 1273-1282.
- Pfister, K. K., Shah, P. R., Hummerich, H., Russ, A., Cotton, J., Annuar, A. A., King, S. M. & Fisher, E. M. C. (2006) Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families. *PLoS Genetics* **2**(1) e1
- Phelps, K. K. & Walker, R. A. (2000) NEM Tubulin Inhibits Microtubule Minus End Assembly by a Reversible Capping Mechanism. *Biochemistry* **39**, 3877-3885
- Qiu, W., Derr, N. D., Goodman, B. S., Villa, E., Wu, D., Shih, W. & Reck-Peterson, S. L. (2012) Dynein achieves processive motion using both stochastic and coordinated stepping. *Nat. Struc.*

- Mol. Biol.* **19**, 193-200
- Ray, S., Meyhöfer, E., Milligan, R. A. & Howard, J. (1993) Kinesin follows the microtubule's protofilament axis. *J. Cell Biol.* **121** 1083-1093
- Reck-Peterson, S.L., Yildiz, A., Carter, A. P., Gennerich, A., Zhang, N. & Vale, R.D. (2006) Single-molecule analysis of dynein processivity and stepping behavior. *Cell* **126**, 335-348
- Redwine, W. B., Hernández-López, R., Zou, S., Huang, J., Reck-Peterson, S. L. & Leschziner, A.E. (2012) Structural basis for microtubule binding and release by dynein. *Science* **337**, 1532-1536
- 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. (1999) A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature* **402** 778-784
- Roberts, A. J., Numata, N., Walker, M. L., Kato, Y. S., Malkova, B., Kon, T., Ohkura, R., Arisaka, F., Knight, P. J., Sutoh, K. & Burgess, S. A. (2009) AAA+ ring and linker swing mechanism in the dynein motor. *Cell* **136**, 485-495
- Roberts, A. J., Malkova, B., Walker, M. L., Sakakibara, H., Numata, N., Kon, T., Ohkura, R., Edwards, T. A., Knight, P. J., Sutoh, K., Oiwa, K. & Burgess, S. A. (2012) ATP-driven remodeling of the linker domain in the dynein motor. *Structure* **20**, 1670-1680
- Roberts, A. J., Kon, T., Knight, P. J., Sutoh, K. & Burgess, S. A. (2013) Functions and mechanics of dynein motor domains. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* **14** 713-726
- Saito, K., Aoki, T., Aoki, T. & Yanagida, T. (1994) Movement of single myosin filaments and myosin step size on an actin filament suspended in solution by a laser trap. *Biophysical Journal* **66**, 769-777
- Schlager, M. A., Hoang, H. T., Urnavicius, L., Bullock, S. L. & Carter, A. P. (2014) In vitro reconstitution of a highly processive recombinant human dynein complex. *EMBO J.* **33** 1855-1868
- Schmidt, H., Gleave, E. S. & Carter, A. P. (2012) Insights into dynein motor domain function from a 3.3-Å crystal structure. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 492-497
- Schmidt, H., Zalyte, R., Urnavicius, L. & Carter, A. P. (2015) Structure of human cytoplasmic dynein-2 primed for its power stroke. *Nature* **518** 435-438
- Sellers, J. R. & Veigel, C. (2010) Direct observation of the myosin-Va power stroke and its reversal. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17** 590-595
- Shima, T., Kon, T., Imamula, K., Ohkura, R. & Sutoh, K. (2006) Two modes of microtubule sliding driven by cytoplasmic dynein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 17736-17740
- Smith, D. A., Steffen, W., Simmons, R. M. & Sleep, J. (2001) Hidden-markov-methods for the



- analysis of single-molecule actomyosin displacement data: the variance-hidden-markov method. *Biophysical Journal* **81**, 2795-2816
- Steffen, W., Smith, D. & Sleep, J. (2003) The working stroke upon myosin-nucleotide complexes binding to actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 6434-6439
- Svodoba, K. & Block, S. M. (1994) Force and velocity measured for single kinesin molecules. *Cell* **77** 773-784
- Tanaka, H., Ishijima, A., Honda, M., Saito, K. & Yanagida, T. (1998) Orientation dependence of displacements by a single one-headed myosin relative to the actin filament. *Biophys. J.* **75** 1886-1894
- Trocter, M., Mucke, N. & Surrey, T. (2012) Reconstitution of the human cytoplasmic dynein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 20895-20900
- Toba, S., Watanabe, T. M., Yamaguchi-Okimoto, L., Toyoshima, Y. Y. & Higuchi, H. (2006) Overlapping hand-over-hand mechanism of single molecular motility of cytoplasmic dynein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 574-5745
- Tomishige, M., Stuurman, N. & Vale, R. D. (2006) Single-molecule observations of neck linker conformational changes in the kinesin motor protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13** 887-894
- Torisawa, T., Ichikawa, M., Furuta, A., Saito, K., Oiwa, K., Kojima, H., Toyoshima, Y. Y. & Furuta, K. (2014) Autoinhibition and cooperative activation mechanisms of cytoplasmic dynein. *Nat. Cell Biol.* **16** 1118-1124
- Toropova, K., Zou, S., Roberts, A. J., Redwine, W. B., Goodman, B. S., Reck-Peterson, S. L. & Leschziner, A. E. (2014) Lis1 regulates dynein by sterically blocking its mechanochemical cycle. *eLIFE* **3**:e03372
- Tsien, R. Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67** 509-544
- Uchimura, S., Fujii, T., Takazaki, H., Ayukawa, R., Nishikawa, Y., Minoura, I., Hachikubo, Y., Kurisu, G., Sutoh, K., Kon, T., Namba, K. & Muto, E. (2015) A flipped ion pair at the dynein-microtubule interface is critical for dynein motility and ATPase activation. *J. Cell Biol.* **208** 211-222
- Uemura, S., Higuchi, H., Olivares, A. O., De La Cruz, E. M. and Ishiwata, S. (2004) Mechanochemical coupling of two substeps in a single myosin V motor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11** 877-883
- Ueno, H., Yasunaga, T., Shingyoji, C. & Hirose, K. (2008) Dynein pulls microtubules without rotating its stalk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** 19702-19707
- Veigel, C., Bartoo, M. L., White, D. C. S., Sparrow, J. C. & Molloy, J. E. (1998) The stiffness of

- rabbit skeletal actomyosin cross-bridges determined with an optical tweezers. *Biophysical Journal* **75** 1424-1438
- Veigel, C., Molloy, J. E., Schmitz, S. & Kendrick-Jones, J. (2003) Load-dependent kinetics of force production by smooth muscle myosin measured with optical tweezers. *Nature Cell Biology* **5** 980-986
- Veigel, C., Wang, F., Bartoo, M. L., Sellers, J. R. & Molloy, J. E. (2002) The gated gait of the processive molecular motor, myosin V. *Nature Cell Biology* **4** 59-65
- Yagi, T. (2009) Bioinformatic approaches to dynein heavy chain classification. *Methods Cell Biol.* **92** 1-9
- Yildiz, A., Forkey, J. N., McKinney, S. A., Ha, T., Goldman, Y. E. & Selvin, P. R. (2003) Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* **300** 2061-2065
- Yildiz, A., Tomishige, M., Vale, R. D. & Selvin, P. R. (2004) Kinesin walks hand-over-hand. *Science* **303** 676-678

## 謝辞

本学位論文の執筆にあたり、本研究のご指導を頂きました樋口秀男教授に心より深く感謝します。茅元司助教には、アビジンビーズの作製手法、顕微鏡装置の構築手法、解析手法をご指導して頂き、解析プログラムも作製して頂きました。幅広くご指導を頂きましたことに感謝します。技術員の西川香里さんには、数多くの組換え体ダイニン・変異ダイニンを作製して頂きましたこと、感謝します。近藤雄一くんには、顕微鏡装置の構築と調整を定期的には行っていただき、低周波ノイズ削減への工夫を凝らして頂きありがとうございました。上記の方々をはじめ、樋口研究室の皆様には研究だけでなく私生活の一部としても大変お世話になりました。

また、本研究室以外に現在所属する以下の方々にも大変お世話になりました。神原丈敏博士（理研 QBiC・元樋口研 PD）には、ダイニン・キネシンの作製手法のご指導、修士時代に本研究のご指導をして頂きありがとうございました。また、ダイニンの発現精製方法を確立していただきました。島知弘助教（東大・理学生物科学・元樋口研 PD）には、微小管の作製方法のご指導や、FRET 測定におけるご相談を頂きありがとうございました。広瀬恵子博士（産総研・バイオメディカル研究部門）には、産総研の顕微鏡施設を用いたダイニンの負染色顕微鏡観察のご指導をして頂きありがとうございました。

樋口研究室に関わる皆様には修士から 5 年間大変お世話になりましたことを深く感謝致します。世界的にヒト由来のダイニンの研究が盛んに進み始めた時期に研究室に属すことができ、研究課題にじっくり取り組めた 5 年間でした。心身共に苦勞することが多かった博士課程 3 年間は、論文投稿を意識した進め方と書き方を学べ、視野を広げて研究を進めるためのノウハウを得られた貴重な期間でした。さらにリーディング大学院 MERIT プログラムでは金銭支援だけでなく、共同研究をはじめとして他研究室との交流の機会を頂いたことを感謝します。皆様の多大なるご支援ご協力のもと本博士論文が執筆できたことを、心より深く感謝致します。本当にありがとうございました。