

博士論文(要約)

軸系外腕ダイニンに駆動される繊毛打の
三次元運動に関する研究

山口 真

略語

本文中で以下の略語を用いた

ATP	adenosine 5'-triphosphate
ADP	adenosine 5'-diphosphate
BSA	bovine serum albumin
DTT	1,4-dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ehtylenglcol-bis(2-aminoethyl ether)N,N,N',N',-tetraacetic acid
GTP	guanosine 5'-triphosphate
GFP	green fluorescent protein
MES	2-morpholinoethanesulfonic acid
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PIPES	piperazin-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
SDS	sodium dodecyl sulfate
Tris	tris-(hydroxymethyl)aminomethan
UTR	untranslated region
SD	standard deviation

序章	4
第 1 章 絨毛を駆動する外腕ダイニンの三次元的な運動の解明	9
1.1 序論	9
1.1.1 研究の背景.....	9
1.1.2 研究の目的と戦略.....	13
1.2 実験方法	15
1.2.1 テトラヒメナ培養.....	15
1.2.2 軸系外腕ダイニン及びそのサブユニットの精製.....	17
1.2.3 三次元位置検出顕微鏡 3 次元位置検出顕微鏡の構築.....	24
1.2.4 グライディングアッセイ	30
1.3 実験結果	40
1.3.1 三次元位置検出光学系.....	40
1.3.2 外腕ダイニン及びそのサブユニットの精製.....	45
1.3.3 外腕ダイニンによるグライディングアッセイ	54
1.3.4 外腕ダイニン及びそのサブユニットの微小管滑り回転運動.....	61
1.4 考察	70
1.4.1 外腕ダイニンによるトルク発生.....	70
1.4.2 外腕ダイニンによる微小管曲げの考察.....	73
1.4.3 外腕ダイニン及びそのサブユニットによる ATP 濃度依存的なピッチの変化.....	77
1.4.4 2つのサブユニットの協調的な運動機構.....	81
1.4.5 本研究のまとめと今後の展望.....	88
第 2 章 三次元計測によるテトラヒメナ絨毛打メカニズムの解明	90
総括	91

参考文献	92
謝辭	98

序章

繊毛運動と生体機能

生物が生きていく上で、細胞分裂や細胞運動などの動的な機能はなくてはならないものである。このような動的な機能は、非常に複雑な分子機械を構成する様々なタンパク質の物理的、化学的な性質の組み合わせによって成し遂げられていると言える。繊毛や鞭毛(本論文では、特定の生物種について言及する際場合を除き合わせて繊毛と書く)はそのような複雑かつ精巧な分子機械の一つで、真核生物の細胞から突起上に突き出た細胞器官である。これは真核生物に広く保存された共通の構造を持ち、モータータンパク質の一種、軸糸ダイニンによって周期的に、かつ規則的な波形で運動している。この周期運動によって起こる水流は、原生生物や精子などの細胞運動(Gibbons and Gibbons, 1972; Corkidi et al., 2008)、気管上皮細胞などの異物の除去(Ueno et al., 2012; Yoshiba and Hamada, 2014)、発生時のノード流による体左右軸の決定(Hirokawa et al., 2006; Nonaka et al., 1998; Okada et al., 2005)など、多様な機能を担っている。

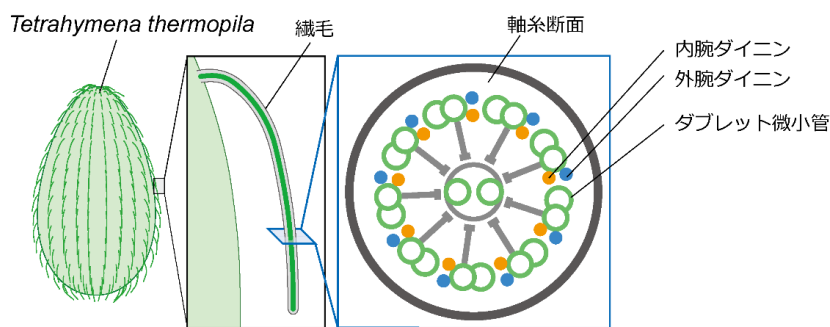


Figure 1 繊毛虫テトラヒメナ及びその軸糸断面図

繊毛虫テトラヒメナは多数の繊毛を体表上に持つ。繊毛内部の軸糸構造は図のようにダブルレット微小管とそれを保持するタンパク質で構成された9+2構造を持つ。ダブルレット微小管のA小管上には軸糸ダイニンが軸糸長軸にそって2列に配置しており、外周側に局在するものが外腕ダイニン、内周側に局在するものが内腕ダイニンと呼ばれる。これらが隣接するダブルレット微小管のB小管に対してチックから発生することで繊毛運動が駆動される。

繊毛は軸糸とそれを覆う細胞膜で形成され、この軸糸は微小管が束状になった 9+2 構造 (**Figure 1**)を持つ(Ishikawa, 2015)。この構造は、外周に並んだ 9 本のダブルレット微小管と、中心対微小管及びそれらを保持するタンパクを骨格としている。また隣接するダブルレット微小管の間にはモータータンパク質の一種である軸糸ダイニンが局在する。真核生物の繊毛運動は、基部に回転装置を持ち鞭毛自体は受動的に運動するバクテリアの鞭毛などとは異なり、繊毛全長にわたって存在する軸糸ダイニンが運動素子となり、この運動によって駆動されている。

異なる生物種や細胞においてもこのような 9+2 構造は良く保存されているにも関わらず、その繊毛運動の形態は様々である(**Figure 3**)。例えば精子の鞭毛は生物種や環境によって平面の波打ち運動やらせん状の運動を示し(Woolley and Vernon, 2001)、二本の鞭毛を持つ単細胞生物クラミドモナスではこの鞭毛が平面上で平泳ぎのような波形で運動する(Sartori et al., 2016)。また、パラメシウムやテトラヒメナなどの多数の繊毛を細胞表面にもつ繊毛虫では、進行方向へ進む有効打では細胞から遠い位置を繊毛先端が通過し、もとの位置に戻る回復打では細胞表面の近くを先端が通過する三次元的な波形で運動する(Mashemer, 1972; Sugino and Naitoh, 1982)。このように、二次元、三次元の複雑な繊毛打波形が殆ど同様の軸糸構造によって駆動されるメカニズムは未だ明らかになっていない。

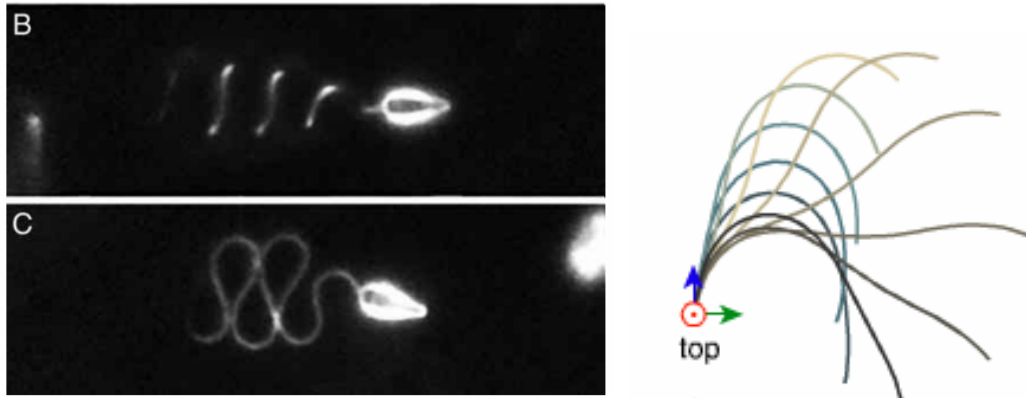


Figure 3 様々な生物種での繊毛打波形

左図：Woolley らによる論文の Figure1 B, C より引用(Woolley and Vernon, 2001)。B、Cはそれぞれ $1.5 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 、 $4 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ の粘度での人工海水中でのウニ静止の運動。B では螺旋、C では平面で精子鞭毛が運動している。右図：Sartori らによる論文の Figure3 (b)より引用(Sartori et al., 2016)。左右対称に運動するクラミドモナスの2本の鞭毛の内の1本の繊毛打波形。

繊毛運動のモデル生物

このような繊毛運動およびそれを駆動するダイニンについての研究には、いくつかのモデル生物が用いられている。最も一般的なのは2本の鞭毛を持つクラミドモナスであり、これは繊毛運動に関わる非常に多くの変異株が確立されていること、また2次元平面上で運動する2本の繊毛の運動計測が比較的容易であることが要因として挙げられる。

また別種のモデル生物として、テトラヒメナやパラメシウムなどの繊毛虫もモデル生物として用いられている。テトラヒメナはダイニンが初めて発見された生物であり(Gibbons and Rowe, 1965)、細胞表面に多数の繊毛を持ちダイニンの精製が容易であるという利点がある。またこれらの繊毛はクラミドモナスとは異なり三次元的な波形で運動していると考えられているものの、その運動の正確な計測は未だされていない。

繊毛の構造と軸系ダイニン

ダイニンは ATP の加水分解による化学エネルギーを利用して構造変化し、微小管上を結合、解離を繰り返しながらマイナス端方向に運動するモータータンパク質である (Schmidt and Carter, 2016)。繊毛を駆動する軸系ダイニンは、その局在によって内腕ダイニンと外腕ダイニンに大別され (King, 2016)、**Figure 1** のように、9+2 構造を断面で見たときに、軸系の中心側に局在するのが内腕ダイニン、外周側に局在するのが外腕ダイニンと呼称される。これらは、軸系ダブルレット微小管の A 小管上に 96 nm の周期で配置されている (**Figure 4**)。内腕ダイニンは a から g に分類される各種が 96 nm の周期で一つずつ配置されるのに対し、外腕ダイニンはこの 96 nm 周期中に 4 つが 24 nm の周期で配置している。このような周期構造は、異なる生物種においてもほとんど同一である (Pigino et al., 2012)。

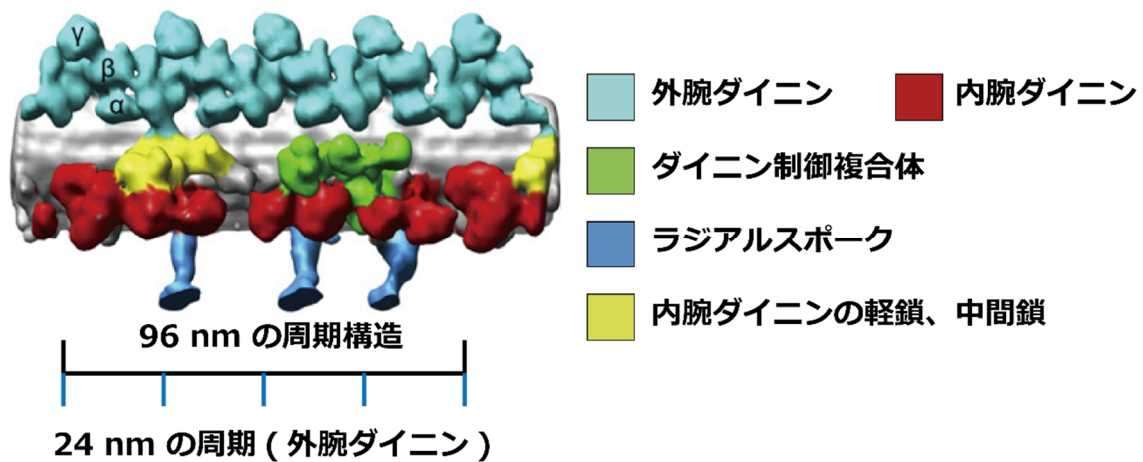


Figure 4 ダブルレット微小管上に周期的に局在する軸系ダイニン

Pigino らによる論文の Figure 6 D を改変した (Pigino et al., 2012)。テトラヒメナの軸系構造のクライオトモグラフィ像。軸系の構成要素がダブルレット微小管長軸上に 96 nm の周期で配列している。外腕ダイニン(水色、図中の α 、 β 、 γ は外腕ダイニンの各頭部)は同種の三量体が 24 nm 周期で配列し、内腕ダイニン(赤色)は 96 nm 中にそれぞれ異なる 7 種の単量体と 1 種の 2 量体が配列している。

軸系ダイニンによる繊毛の屈曲

繊毛の屈曲は、ダブルレット微小管の A 小管上に配置された軸系ダイニンが B 小管に対して ATP の加水分解とカップルして力発生し、ダブルレット微小管同士を互いに滑らせることに駆動されている。脱膜した軸系の一部に ATP を与えると、その区間では屈曲が起きずに両側に同じ大きさで逆向きの屈曲が形成されること(Shingyoji et al., 1977)、プロテアーゼによる分解でネキシンなどのダブルレット微小管同士を架橋している構造を破壊すると軸系が屈曲せずに一部のダブルレット微小管が滑り出す現象があること(Kamimura and Takahashi, 1981) などから、ダブルレット微小管の間の架橋構造により軸系ダイニンによるダブルレット微小管を滑らせる運動が軸系の屈曲に変換されると考えられている。

しかしながら、ダイニンは軸系の 9 本のダブルレット微小管の間に局在しており、これらが無秩序に力発生しても特定の方向への軸系の屈曲は起きえない。そのため、軸系上の何らかの力学的な特性により、特定の方向にあるダイニンが周期的に活性化され、秩序だった屈曲、並びにそれによる複雑な繊毛打波形が生み出されると考えられる。

このような屈曲のメカニズムの詳細は未だ明らかになっていない。繊毛運動を理解するためには、軸系内で力発生している運動素子である軸系ダイニンの運動機構と、またそれによって駆動されている繊毛自体の運動について両面から調べる必要がある。

第1章 繊毛を駆動する外腕ダイニンの三次元的な運動の解明

1.1 序論

1.1.1 研究の背景

1.1.1.1 繊毛運動における外腕ダイニンの機能

繊毛運動を駆動する軸糸ダイニンのなかでも、内腕ダイニンと外腕ダイニンは繊毛運動に対し異なる機能を持つことがクラミドモナスでの欠損体の研究から示唆されている。内腕を欠損した変異体では、繊毛打の波形が変わり、より振幅の小さい繊毛打となる。また、複数の内腕ダイニンを欠損した変異体では、周期的な繊毛打そのものが見られなくなり、繊毛全体が震えるだけの形質を示す(Walczak and Nelson, 1994)。対して、外腕ダイニンを欠損した変異体では、繊毛打の波形は変化しないものの、繊毛打の周波数が減少する(Kamiya, 1995; Sakakibara et al., 1993)。また、細胞から分離した繊毛を脱膜し、高塩濃度の処理によって外腕ダイニンを抽出した軸糸を用いた実験では、ATPを加えてこの軸糸を再活性化すると、この抽出操作によって繊毛打運動の周波数が減少し、また抽出した外腕ダイニンを再び混合することで軸糸に再結合することでこの周波数の減少が回復することがわかっている(Gibbons and Gibbons, 1976, 1973; Takada et al., 1992)。このことから、内腕ダイニンは繊毛打の波形を調製する機能を、外腕ダイニンは繊毛打の速度を上げる機能を持つと考えられている(Kamiya, 1995)。

1.1.1.2 外腕ダイニンの構造

ダイニンは、AAA+スーパーファミリーに属するタンパク質であり(King, 2000)、単量体で500 kDaほどもある巨大なタンパク質である。このダイニン本体は重鎖と呼ばれ、中間鎖や軽鎖と分類される他の多様なタンパクと複合体を形成して機能していることが知られている。

ダイニン重鎖は、ATPを結合し加水分解を行って構造変化する頭部ドメインと、この頭

部から突出した構造を持ち、構造変化の伝達や、微小管と結合、解離を行うストーク、及びダイニン重鎖間の二量体化、三量体化や他のタンパク質との結合を担う尾部ドメインからなる。

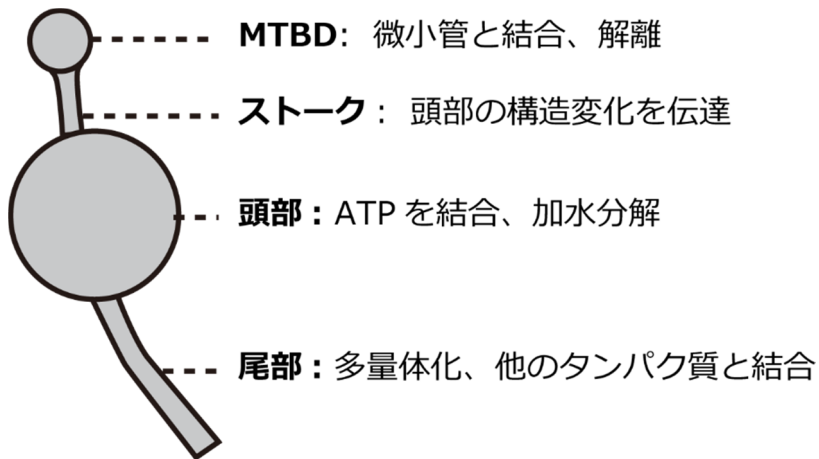


Figure 5 ダイニン分子の構造

微小管と結合、解離する MTBD(微小管結合ドメイン)、頭部の構造変化を MTBD に伝達するストーク、ATP を加水分解し構造変化する頭部、ダイニン間の二量体、三量体化や他のタンパク質との結合を担う尾部からなる。

外腕ダイニンは哺乳類を含む多くの生物種ではヘテロ二量体の二頭構造を持つのに対し、クラミドモナスや本研究で用いる繊毛虫テトラヒメナでは、ATP 加水分解を行う頭部ドメインを三つ持つヘテロ三量体からなる三頭構造を持ち、これらは尾部で三つの頭部が束ねられた構造の電子顕微鏡観察結果からブーケット構造と呼ばれる(Johnson and Wall, 1983) 。三頭構造の外腕ダイニンの各重鎖はそれぞれ α 、 β 、 γ とよばれ、遺伝子配列の相同性からテトラヒメナの α 頭部と他の二頭の生物種の α 頭部が近縁であり、またテトラヒメナの β 頭部及び γ 頭部が二頭の生物種の β 頭部と近縁だと考えられている(2004; Rajagopalan and Wilkes, 2016) 。

1.1.1.3 外腕ダイニンの各頭部の運動性

ダイニンの機能の定量は、脱膜した軸糸再活性化、軸糸や軸糸から抽出、分離したダイニンによる ATP 加水分解計測、同じく抽出したダイニンによる微小管滑り運動アッセイ（グライディングアッセイ）などによって行われている。なかでも、個別のダイニンについて、*in vitro* の実験系で運動の観察が行える点から、各ダイニンの運動特性はグライディングアッセイという再構成系によって多く調べられている。

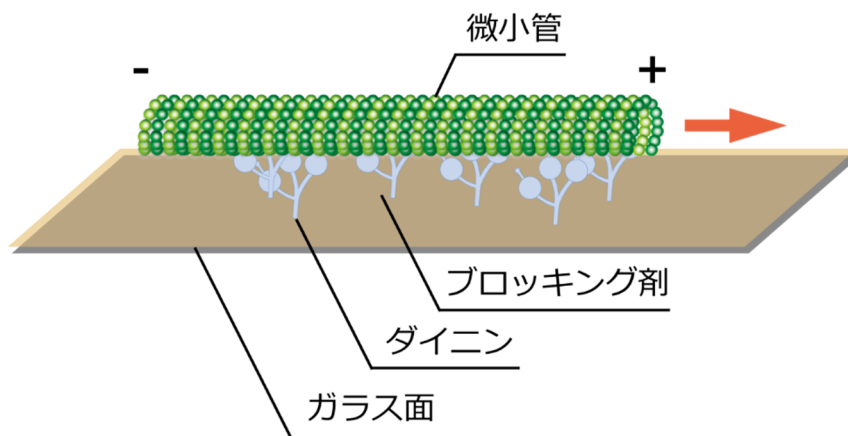


Figure 6 ダイニンによるグライディングアッセイ

チャンバー内のガラス面上にダイニン、カゼインなどのブロッキング剤、微小管を順に流し入れ、最後に ATP を含む溶液を流し入れることでダイニンを活性化し、滑り運動する微小管を観察する。ダイニンが微小管マイナス端に運動するため、微小管はプラス端を先頭に向けて滑り運動する。

グライディングアッセイは、**Figure 6** の様にスライドガラス及びカバーガラスで作製したチャンバー内に精製したダイニンを流し入れて付着させ、続いて他のタンパクなどの非特異吸着を防ぐブロッキング剤、微小管、ATP を含む溶液を順に流し入れて観察する方法である。ガラス面に付着しているダイニンに微小管が結合し、またダイニンが ATP の加水分解による化学エネルギーを利用して微小管の長軸マイナス端方向に運動することで、ガラ

ス面上では微小管のプラス端が先頭になって滑り運動する。これにより微小管の滑り速度を計測することで、ガラス面上に結合した多数のダイニンが微小管をその長軸方向にどの様に運動させるか調べることができる。三頭構造を持つテトラヒメナ外腕ダイニンについても、このような実験系での運動計測がおこなわれている(Vale and Toyoshima, 1989)。

また、テトラヒメナなどのヘテロ三量体構造を持つ外腕ダイニンについて、その各頭部がどのような機能を持つかについても定量が試みられているものの、明確には明らかになっていない。テトラヒメナの外腕ダイニンについては、その一つの方法として精製された外腕ダイニンをプロテアーゼの一種であるキモトリプシンで部分分解することで単頭の α サブユニットと二頭の $\beta\gamma$ サブユニットに分け、陰イオン交換カラムやショ糖密度勾配遠心により分離精製する方法がある(Toyoshima, 1987a, 1987b)。この方法で精製されたサブユニットはもとの重鎖より短いものの、それぞれが ATP 加水分解活性を有しモータードメインは保持されていると考えられている。しかしながら $\beta\gamma$ サブユニットでは微小管の滑り運動がみられるものの、 α サブユニットでは微小管の滑り運動は報告されていない。

また別の方法として、Urea によって変性することで同様に α 重鎖と $\beta\gamma$ 重鎖に分け、その後 Urea を取り除いて活性を戻す方法も報告されている(Toyoshima, 1987a, 1987b)。この方法でも、ATP 加水分解活性はみられるものの、 α サブユニットについては運動が報告されていない(Vale and Toyoshima, 1989, 1988)。

1.1.1.4 ダイニンによるトルク発生

グライディングアッセイは主にダイニンの微小管長軸方向への力発生について調べる方法であった(Figure 6)。しかしながら、ダイニンやその他の微小管上を運動するモータータンパク質については、近年微小管長軸と垂直な方向への力発生、すなわち微小管に対するトルク発生についても注目されている。

そのようなトルク発生を示す実験結果として、微小管のコークスクリュウ運動が挙げら

れる。これは通常の微小管に替えて軸糸の断片から伸長した微小管を用いたグライディングアッセイの実験系で調べられたもので、微小管末端の軸糸断片を立体的なマーカーとして微小管の滑り運動を計測すると、テトラヒメナやクラミドモナスの内腕ダイニンが微小管を長軸周りに回転させながら滑らせることが報告されている(Kagami and Kamiya, 1992; Vale and Toyoshima, 1988)。このような運動は、外腕ダイニンが微小管の長軸方向のみならず、長軸に垂直な方向にも力発生していることによると考えられている。

また、そのような同様にダイニンのトルクによる運動として、グライディングアッセイにおける滑り微小管が一定方向に曲がりながら滑る運動についても報告されている(Kikushima and Kamiya, 2008)。繊毛運動を駆動する素子としての軸糸ダイニンの運動について理解するためには、微小管長軸方向への運動だけではなく、ダイニンのトルクによる運動についても正確に計測する必要がある。

1.1.2 研究の目的と戦略

本研究では、外腕ダイニンの微小管に対する運動を、微小管長軸方向のみならず長軸に垂直な方向についても定量することで、繊毛運動を駆動する軸糸ダイニンの一つである外腕ダイニンの運動素子としての特性を明らかにすることを目的とした。

そのような三次元的な運動を正確に定量するにあたり、既存のグライディングアッセイの実験系を改良した系と、近年開発された三次元の位置検出が可能な光学系を用いることとした。先行研究では非常に大きく運動への影響が懸念される軸糸断片を立体的なマーカーとして用いていたのに対し、本研究では量子ドットと呼ばれる非常に小さい蛍光プローブを付加することで微小管の運動の計測を行った。また、プリズムを光路に挿入して像を分割し、得られた2つの像を解析することで三次元の位置情報の取得が可能な光学系を用いることで、外腕ダイニンによる微小管の運動をナノメートルの精度で計測することができた。

また本研究では、繊毛虫テトラヒメナから精製した外腕ダイニンと、キモトリプシンで部分分解して分離精製したその α サブユニットおよび $\beta\gamma$ サブユニットを用いた。このそれぞれの運動特性をトルク発生の計測を含めて行うことで、各頭部の運動特性から外腕ダイニンの運動素子としての特性をより深く理解する事を目指した。

1.2 実験方法

1.2.1 テトラヒメナ培養

本研究では外腕ダイニン及びそのサブユニットは、全て *Tetrahymena thermophilla* SB255 株から精製した。テトラヒメナ は一般に刺激に応じてムコシストと呼ばれる粘着物質を分泌するが、本株ではこれが起きず、繊毛を単離する際などに繊毛がムコシストと不溶化して収率が落ちることがない。培養には、テトラヒメナの増殖の速い SPP 培地 (1% Proteose Peptone NO.3、0.2% Glucose、0.1% Yeast Extract、0.003% Fe-EDTA、1% Antibiotic antimycotic solution) と、飽和時の細胞密度が高くなる PYD 培地 (1% Proteose Peptone NO.3、0.87% Glucose、0.5% Yeast Extract、0.001% Ampicillin)を用いた。また、ポンプ培養の際には気泡により培地が漏れることを防ぐため、終濃度 0.03%の消泡剤(Dow Corning Toray, FS Antiform DB-110N)を加えた。培養の手順を以下に記す。

培養手順

- (1) 300 ml 三角フラスコを用い SPP 培地 50 ml にストックとして 15°C で培養していたテトラヒメナを 1 ml 加え、37°C、1 日間静置で前培養を行った。
- (2) 前培養したテトラヒメナに SPP 培地 400 ml を加え 2 L 三角フラスコに移し、37°C、2 日間、100 回/分の振盪速度で培養した。
- (3) 振盪培養したテトラヒメナを 4.5 L の PYD 培地が入った 5 L の三角フラスコ 2 本ものに約 200 μ l ずつ移した。Figure 7 のような装置で、37°C で 2 日間ポンプ培養を行った。

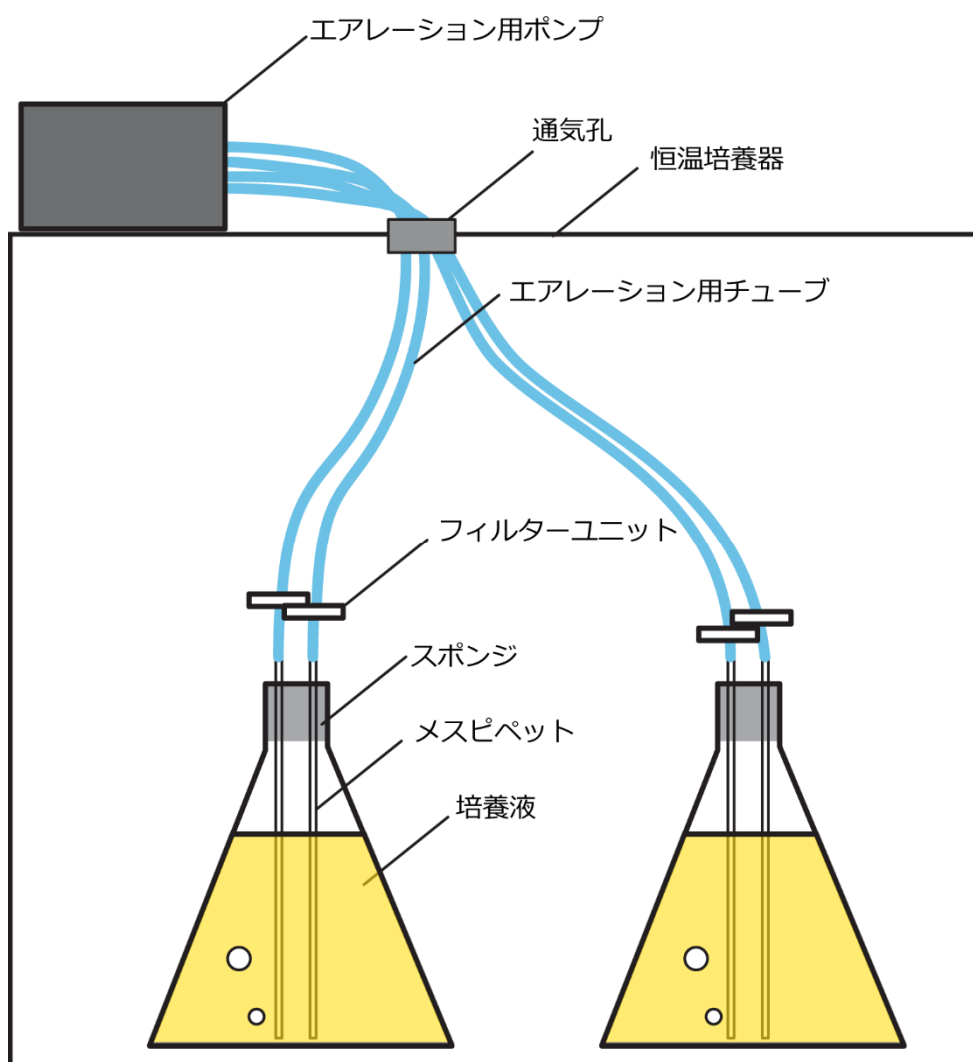


Figure 7 テトラヒメナポンプ培養の模式図

図のような組み立てでポンプ培養を行った。エアレーション用のポンプから、チューブ(外径 6 mm 内径 4 mm、シリコン)をつないで恒温培養器(Yamamoto、IC602)の通気孔から内部に通し、0.2 μm のフィルター(Millipore、Millex-FG 50 mm)、メスピペット(10 ml)の順につなぎ、フラスコの底まで差し込んでスポンジでフラスコに栓をした。ポンプは NISSO HP α 10000 を 1 台と NISSO カ-6000 を 2 台使い、2 つのフラスコへの排気量が等しくなるようにつないだ。また培養器内部の結露を防ぐため、小型の除湿機(スリーアップ、TU-400)を恒温器内部に設置して使用した。

1.2.2 軸糸外腕ダイニン及びそのサブユニットの精製

フローチャートに従って行った(Figure 8)。

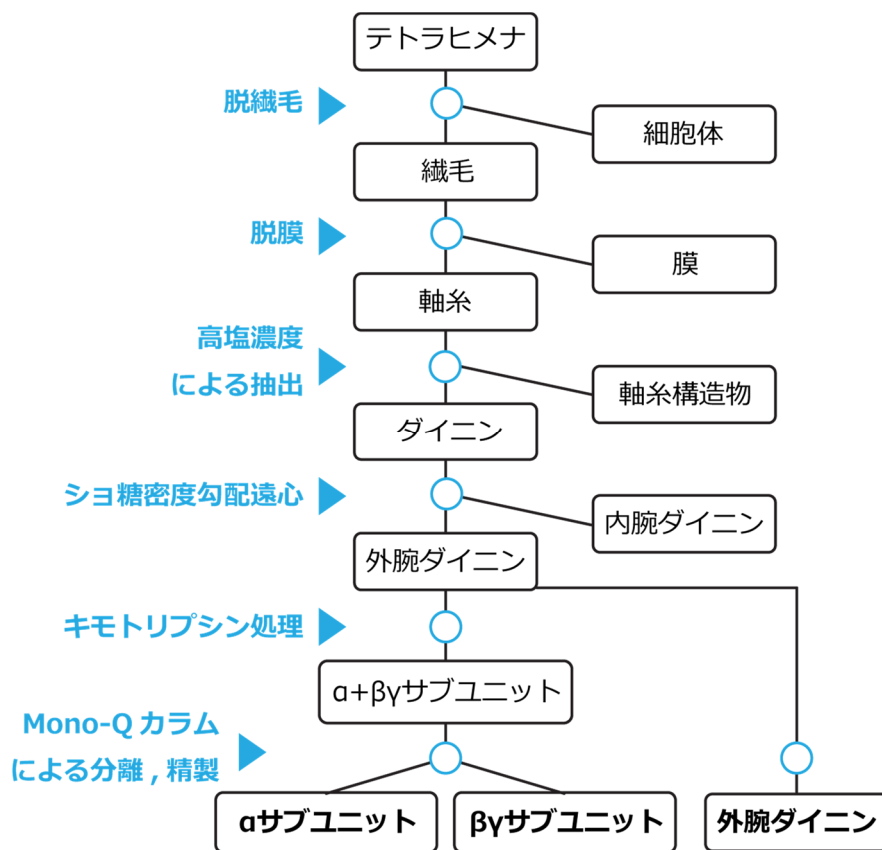


Figure 8 ダイニン精製のフローチャート

外腕ダイニン及びそのサブユニットの精製を、この様な手順で行った。

1.2.2.1 細胞回収、脱繊毛

まず培養したフラスコの内一つをポンプ培養から取り外し、氷水中で 20 分間冷やした。10 分後、遠心による回収を始める直前にもう 1 本の培養したフラスコをポンプから取り外し、氷水中で冷やしておいた。先に冷やしておいたフラスコから 500 ml の遠心管に約 400 ml ずつ培養液を注ぎ、遠心分離を行った (2000 rpm、2 分間、2°C、Beckman J2-M、rotor: JA10)。

上清を捨て、各遠心管に残りの培養液を約 400 ml ずつ加えてペレットを懸濁し、再度遠心分離した (2000 rpm、2 分間、2°C、Beckman J2-M、rotor: JA10)。上清を捨てた後、NK 溶液 (34 mM NaCl、1 mM KCl) を各遠心管に 100 ml ずつ注いで懸濁し、別フラスコに移して氷水中に置いた。残りの培養フラスコについても、同様に二回の遠心分離を行った。遠心後のペレットに最初のフラスコから回収した菌体を加えて懸濁し、6 本の遠心管に均等になるように分け、各遠心管に 400 ml 程度まで NK 溶液を加えてもう一度遠心した (2000 rpm、2 分間、2°C、Beckman J2-M、rotor: JA10)。

上清を捨て、各遠心管に NK 溶液 100 ml を加えてペレットを懸濁し 5 L のバッフルつきフラスコに移す。さらに 400 ml の NK 溶液で遠心管を再度洗い、これを加えて合計 1 L とし氷水中に置いた。

この 1 L の細胞懸濁液に A 溶液 (10 mM EDTA、50 mM Sodium Acetate、酢酸を用い pH 5.0 になるように調製) 500 ml を加え、フラスコを回転させて氷水中で 1 分間良くかき混ぜた。次に冷やした MiliQ 水を 500 ml 加えて 1 分間同様にかき混ぜた。最後に B 溶液を 20 ml 加え、泡が立つ程度の強さで 5 分間、1 分ごとに 20 回ずつ氷水中でかき混ぜた。

この懸濁液を 6 本の遠心管に分け、繊毛と細胞体を分離するため遠心分離した (2500 rpm、5 分間、2°C、Beckman J2-M、rotor: JA10)。繊毛を含む白濁した上清画分を採取し、繊毛を遠心分離した。 (8000 rpm、15 分間、2°C、Beckman J2-M、rotor: JA10)。上清を捨て、白色の繊毛の沈殿を得た。

1.2.2.2 軸糸分離

10 ml の prep buffer (10 mM HEPES、4 mM MgSO₄、1 mM EGTA、100 mM NaCl、NaOH を用い pH 7.4 になるように調製) で沈殿を穏やかに懸濁した。1 本の遠心管で懸濁した後、それを残りの遠心管に移してもう一度懸濁した。最終的に 40 ml 程度になるようにし、50 ml の tube に移し、400 µl の 0.1 M PMSF 及び、プロテアーゼインヒビターカクテル (Roche,

cOmplete)1錠を加えた。ここに 10% NP-40 を終濃度 0.3%になるように加え、30 分氷上で静置して脱膜した。

反応終了後、遠心分離により脱膜された軸糸を沈殿させた(12000 g、15 分間、4 °C、Kubota6500、rotor: AG-508CA)。上清を取り除いた後、沈殿を 20 ml の prep buffer で懸濁し、再度遠心分離を行った(12000 g、15 分間、4 °C、Kubota6500、rotor: AG-508CA)。上清を捨て、軸糸のペレットを得た。

1.2.2.3 軸糸ダイニン抽出

沈殿を prep 溶液 7 ml で懸濁したのち、終濃度 0.1 mM の PMSF、終濃度 0.6 M の NaCl を順に加え 30 分間静置することで、高塩濃度により軸糸ダイニンを抽出した。反応後、ダイニンと残りの軸糸を遠心分離した (5000 rpm、10 分間、4°C、Beckman TLA 100.2)。上清として、抽出した軸糸ダイニンを得た。

1.2.2.4 ショ糖密度勾配遠心による軸糸ダイニンの分離

ショ糖密度勾配遠心法を用いて、抽出液中の外腕ダイニン、14S ダイニンをその密度の違いにより分離した。prep buffer に 5%と 20%のショ糖及び 0.1 mM の ATP を溶かした溶液を調製し、これをグラジエントメーカーで混合して 30 ml、5-20%のショ糖密度勾配を遠心管 (Hitachi、40PA チューブ)に作製した。このショ糖密度勾配の上に抽出したダイニン溶液を重層し、遠心分離した。(26000 rpm、16 時間、2°C、Hitachi CP70MX、rotor: P28S-1053)

遠心管の底からペリスタポンプ(ATTA、SJ-1211H)で 9 番の設定の速度でくみ上げて 1.5 ml ずつサンプルを回収した。SDS-PAGE もしくはタンパク定量によるピークの位置から外腕ダイニンを含む 4~6 つの分画を決定した。

1.2.2.5 キモトリプシン処理と HPLC による精製

前項で分離した外腕ダイニンに対しキモトリプシンによるプロテアーゼ処理を行うことで、3 頭の外腕ダイニンを単頭の α サブユニット、2 頭の $\beta\gamma$ サブユニットに分解した。方法は先行研究 (Toyoshima 1987a)を参考にした。外腕ダイニン 0.34 mg/ml に対し、 α サブユニット精製の際にはキモトリプシン濃度 0.02 mg/ml で 6 分間、 $\beta\gamma$ サブユニット精製の際には 0.1 mg/ml で 6 分間、どちらも 25°C で処理を行った(キモトリプシン処理条件の決め方は後述)。終濃度 1 mM の PMSF により反応を停止した。

1.2.2.6 Mono-Q カラムによる精製

低圧液体クロマトグラフィーシステム(以下 AKTA)を用いてキモトリプシン処理後のサンプルを Mono-Q カラムによって各サブユニットに分離精製した。カラムには陰イオン交換カラム(GE、Mono-Q 5/50)を用いた。またキモトリプシン処理をしていない外腕ダイニンについても、キモトリプシン処理をしたサブユニットと精製条件をそろえるため同様にカラムを用いて精製した。外腕ダイニン及びキモトリプシン処理後のサンプルは、0.2 μm のフィルターでろ過してから用いた。溶液 A (10 mM HEPES、4 mM MgSO_4 、1 mM EGTA、10% sucrose、0.1 mM ATP、1 mM DTT、NaOH を用いて pH 7.4 になるように調製)と溶液 B (溶液 A+1 M NaCl)を用意し、カラムの平衡化、溶出に用いた。カラムの平衡化、ダイニンのカラムへの吸着、溶出は以下の手順で行った。

- (1) カラムを通る流路にし、0.5 ml/s 程度の流速で流しながら、カラムを上流、下流の順に空気が入らないように AKTA に接続した。
- (2) 流路を 0.5 ml/s 程度の流速で MiliQ 水に置換した。
- (3) スーパーループを通る流路に切り替え、0.5 ml/s 程度の流速で流しながら空気が入らないように 50 ml スーパーループ(GE)の上流を AKTA に接続した。
- (4) フィルターを通したサンプルを泡が立たないように注ぎスーパーループを閉じた。

- (5) 0.5 ml/s 程度の流速で流しながら空気が入らないようにスーパーループの下流を接続した。
- (6) 溶液 A、溶液 B をポンプにつなぎ、ポンプウォッシュした。
- (7) カラムのみを通る流路に切り替え、1 ml/s の流速で、溶液 B で 5 ml、溶液 A で 5 ml、再び溶液 B で 5 ml 流し、カラムの平衡化を行った。
- (8) スーパーループ、カラムを通る流路に切り替え、1 ml/s でカラムにダイニンを吸着させた。
- (9) カラムを通る流路に切り替え、ウォッシュのため、溶液 B 5% (50 mM NaCl) を流速 2 ml/s で 5 CV (CV=Column Volume, 1 CV= 0.982 ml) 流した。
- (10) 20 CV、5%-60% の直線の濃度勾配、流速 1 ml/s で吸着したダイニンを溶出した。

おおよそ溶出塩濃度 190 mM 前後で α サブユニット、260 mM 前後で $\beta\gamma$ サブユニット及び外腕ダイニンが溶出した。

1.2.2.7 ダイニンの濃縮

Mono-Q カラムにより分離したダイニンを、限外濾過により溶液置換、濃縮を行った。限外濾過には Amicon Ultra 0.5ml Ultracel-100k Membrane を用いた。2 ml 程度のサンプルを順にチューブに注ぎながら複数回遠心分離し、(14000 rpm、5 分間、4°C、TE-2000-V)50 μ l 程度まで濃縮した。さらに前述の溶液 A を加えて 500 μ l 程度にし、もう一度同条件で遠心して 50 μ l 程度まで濃縮する操作を 2 回繰り返すことで、NaCl 濃度がほぼ 0 M になるように溶液を交換した。最終的に得られたサンプルを液体窒素で凍結し、7.5 μ l ずつ液体窒素に保存した。

1.2.2.8 SDS-PAGE、SDS-urea-PAGE

SDS-PAGE は、(Laemmli, 1970)の方法を用いた。

泳動後のゲルをイオン交換水ですすぎ、電子レンジで沸騰する直前まで過熱し、染色液 (Wako、Quick-CBB PLUS、178-000551)を 20 ml 加えて同様に電子レンジで加熱したのち、30 分間振盪して染色した。染色後もう一度イオン交換水に交換して同様に加熱し、半日程度振盪することで脱色した。

SDS-urea-PAGE は、(Toyoshima, 1987a)を参考にした。Sample buffer (urea 8 M、SDS 10%、EDTA 5 mM、Tris-HCl (pH 8.0)、 β -mercaptoethanol 5%、bromophenol blue 10%)をサンプルに等量加え、95°Cで 3 分間加熱して泳動用サンプルとした。またゲルは urea 6 M、Acrylamide mix 3.2%、10 \times 泳動用溶液 (Tris 0.25 M、Glycine 1.92 M、SDS 0.5%)10%、glycerol 5%、APS 0.1333%、TEMED 0.1% の組成で作製した。泳動は 300 V、40 mA、45 分間の条件で行った。染色、脱色は SDS-PAGE と同様に行った。

1.2.2.9 タンパク濃度測定

タンパク濃度の測定は、基本的にブラッドフォード法により行った。染色液は Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate を 5 倍希釈し、600 μ l に対して 10 μ l のサンプルを反応させ、595 nm の吸光度を測定した。濃度の計算には、0.1 mg/ml から 1 mg/ml の範囲で BSA 溶液(Thermo scientific #23209 BSA Standards)により作製した標準曲線を用いた。

精製したダイニンについてはダイニン重鎖のみのタンパク濃度を測定するため、SDS-PAGE によるバンドから濃度の定量を行った。サンプル buffer と合わせて 0.0125 mg/ml から 0.5 mg/ml の濃度に希釈した BSA 溶液をスタンダードとして、バンドの濃さがその範囲内になるように希釈した α サブユニット、 $\beta\gamma$ サブユニット、外腕ダイニンをスタンダードと同時に電気泳動した。(7.5% Acrylamid gel、300 V、40 mA 50 分間、16 穴コーム、各 1 μ l ずつロード)

ゲルはガラス版にのせて LED Viewer(Sinkosha Pro HR-1)で下から照明し、カメラ(Toshiba CSFX36BC3)で撮影した。画像に含まれるカメラや照明によるバックグラウンドを、ゲルを

乗せないで撮影した画像を用いて画像の除算により取り除いた。この画像を **Quantiy One** により解析し、スタンダードから得られた標準曲線にフィッティングして目的のタンパク濃度を定量した。

1.2.3 三次元位置検出顕微鏡 三次元位置検出顕微鏡の構築

3次元位置検出顕微鏡の構築は、先行研究(Yajima et al., 2008) を参考に行った。

1.2.3.1 原理

本研究で構築した 3次元位置検出顕微鏡の原理は、ナイフエッジ法と呼ばれる天体観察などでピントを合わせる際に用いられる方法を基にしている。ナイフエッジ法は光束をナイフのエッジで遮ることによる像の変化によりレンズの焦点が光軸方向のどちらにずれているのかを知る方法である。この光学系ではそのナイフに当たる部分にプリズムを用い、像として見える光はプリズムを通らない光として、エッジにより遮られる光はプリズムを通過して曲げられる光として両者をカメラに同時に結像させることで、光軸方向の位置 (ここでは z 平面) を取得することができる。

Figure 9 において(1)の光路に、平行光線となっている光束の半分が通過し、対物レンズの後焦点面となる位置にプリズムを設置する。このときプリズムを通らない光 (図中の赤い光線) がナイフエッジ法で観察する光にあたる。赤い光線だけに注目し、(2) $z=0$ で像を結ぶ位置を基準に考えると、像がゆがむだけではなく、(3) $z < 0$ では像の中心が y 軸正方向に、(4) $z > 0$ では y 軸負方向にずれることがわかる。このように、光路の途中で光を一部遮ることで、観察対象の輝点の z 軸方向の変位を、カメラ上での像の y 軸方向への変位として定量することができる。しかしこれだけでは、輝点の y 軸方向の変位と z 軸方向の変位がともにカメラ上での y 軸方向の変位として観察されてしまうため、3次元の位置情報を得ることはできない。またナイフエッジ法では観察対象がほぼ静的な天体であるため、ナイフエッジを挿入する前の像との変化からピントがどちらにずれているか (焦点に対して観察対象が z 方向どちらに位置するか) 知ることができるが、この方法ではリアルタイムで運動する輝点を観察することはできない。

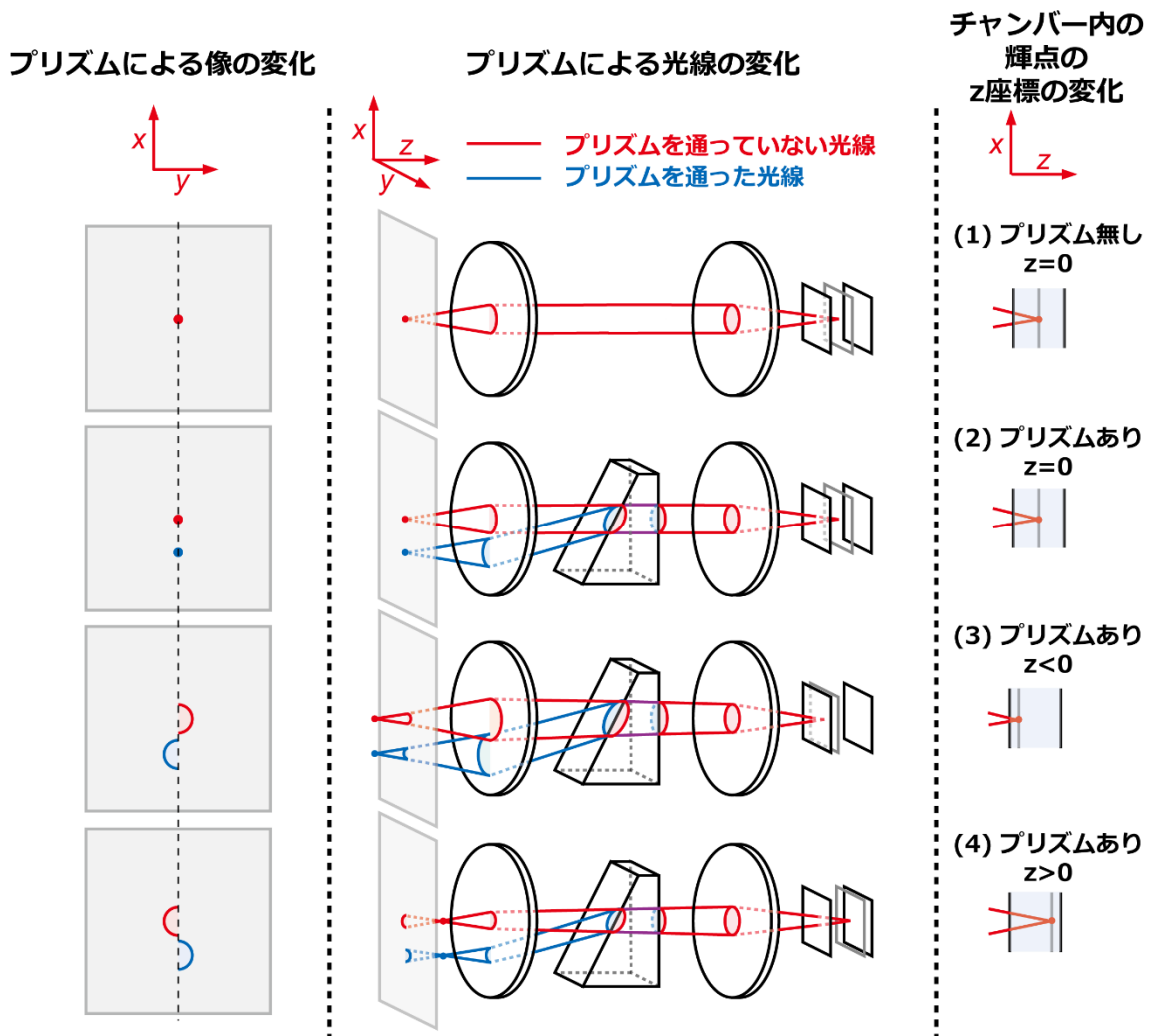


Figure 9 三次元観察の原理

図の中央のように2枚のレンズで構成され、その間が平行光線となっている光学系と、そのレンズの間にプリズムが挿入された光学系での光線の変化を考える。図の右のようにチャンバー内の観察対象が光軸方向（ここではz方向）に移動すると、この光学系によってできる像は図の左のように変化する。

そこでこの光学系では、プリズムを通った光（図中の青い光線）による像を同時に観察することで、この問題を解決した。観察対象がz軸方向に変位した際のこの像（青の像）のy軸方向の変位は、図に示されているようにちょうど前述のプリズムを通らない光による像（赤

い像)の変位と逆方向になる。そのため、この2つの像の y 座標の平均から実際の y 座標が、その差から z 座標の情報を得ることができる。このように既存の光学系にプリズムのみを挿入することで、通常の観察とほぼ同等の時間分解能で 3 次元位置検出を可能にしているのが、この光学系の特徴である。

1.2.3.2 プリズムの設計及び光学系の確立

顕微鏡のカメラポートから来た光が 2 枚のレンズとその間のプリズムを通った後にカメラ受光部へと進む光路を設計した。2 つのレンズの焦点距離はそれぞれ 50 mm、120 mm で、プリズムはそのどちらからも焦点距離で、かつ光束のちょうど半分がプリズムを通過し、カメラ上で 2 つの像が等しい強度になるように設置した。

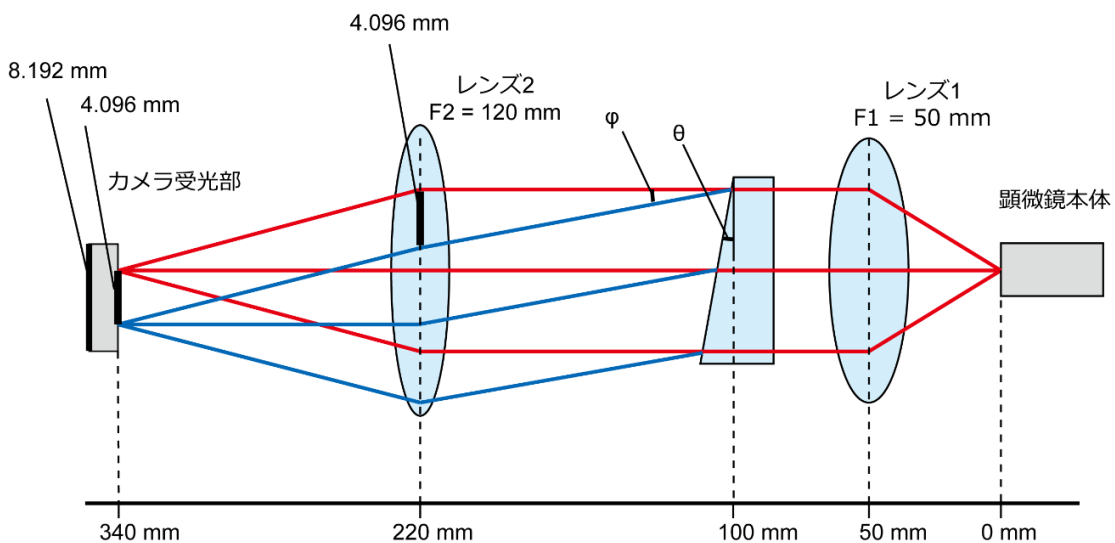


Figure 10 光路の設計

図のように顕微鏡(Nikon TE-2000-U)のカメラポート、レンズ 1 (シグマ光機 DLB-25.4-50PM、球面アクロマティックレンズ、焦点距離 50 mm)、プリズム(夏目光学、後述のように特注)、レンズ 2(シグマ光機 DLB-25-120PM 球面アクロマティックレンズ、焦点距離 50 mm)、カメラ(Andor iXon X3 DU-897)。レンズ 1、レンズ 2 はそれぞれ顕微鏡のカメラポートとカメラ受光部から焦点距離の位置に、またプリズムはレンズ 1、レンズ 2 の両者から焦点距離の位置に設置した。

またプリズムの角度は、2つの像を同時にカメラ上で同時に観察できるように、プリズムを通った光が元の光に対してカメラ受光部で受光部全体の半分の距離ずれるように設計した(Figure 11)。カメラ受光部の素子は縦横 512×512 個、素子 1 つの大きさは 8 μm × 8 μm で全体として 8.192 mm なので、4.096 mm ずつずらせばよい。プリズムはレンズ 2 から焦点距離にあるため、プリズムを通らない光 (赤) と通った光 (青) はレンズ 2 とカメラ受光部の間で互いに平行であり、レンズ 2 上で 4.096 mm のずれが必要となる。

プリズムの角度を θ 、このときに光線の曲げられる角度を φ とおき、

$$4.096 = 120 \times \tan\varphi$$

またプリズム面で屈折する光線に対するスネルの法則より、

$$n \sin\theta = \sin(\theta + \varphi)$$

これより計算すると、 $\theta = 3.71^\circ$ となった (プリズムに用いたガラスの材質は BK7、 $n = 1.52$)。

精度の関係上、実際は $\theta = 3.5^\circ$ で作製した(Figure 12)。

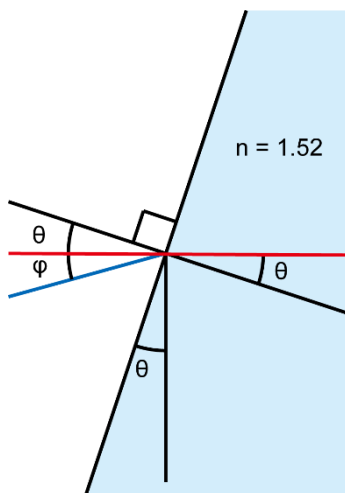


Figure 11 プリズム前後の光線の拡大図

θ はプリズムの角度、 φ はプリズムを通った光線と通らなかった光線のなす角度。プリズムの材質は BK7 なので、屈折率は 1.52 として計算した。

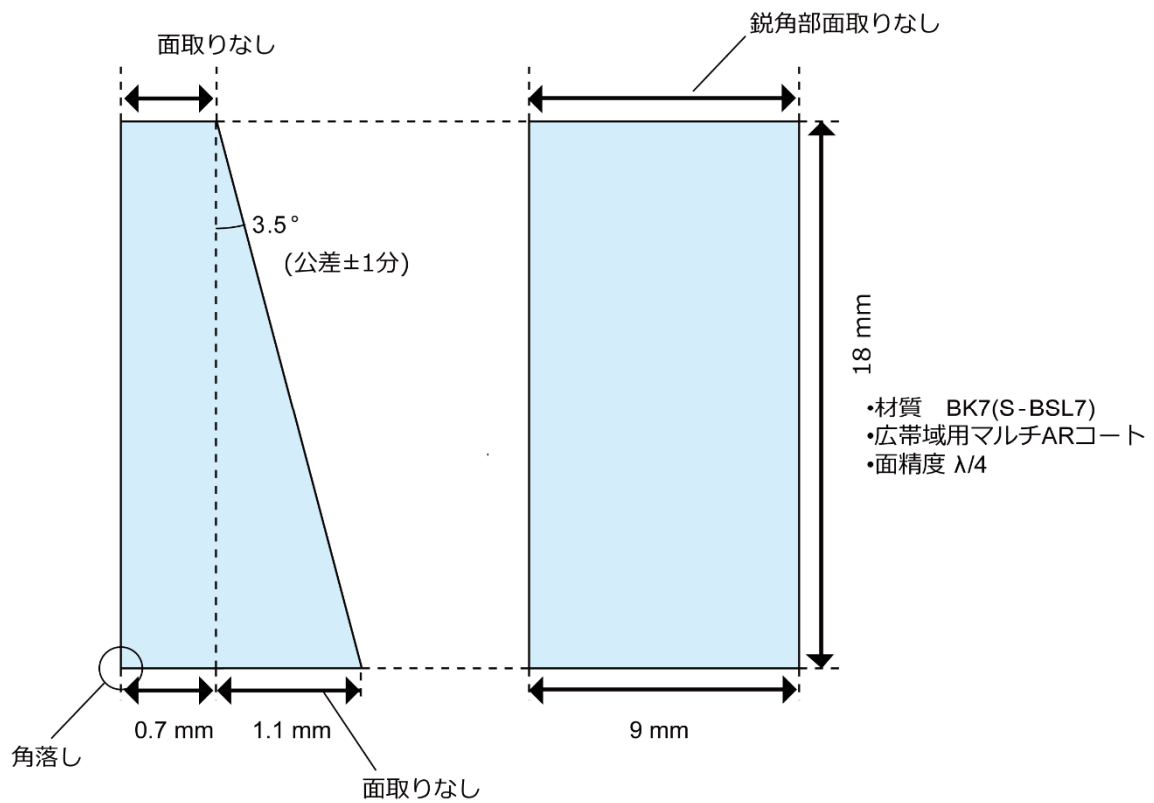


Figure 12 プリズムの設計の詳細

図のような設計で、夏目光学にて特注として製作した。

1.2.3.3 光学系の全体図

前述のプリズム、及び光路の設計を元に、顕微鏡のカメラポートとカメラの間に光学素子を組み合わせて光学系を構築した(Figure 13)。

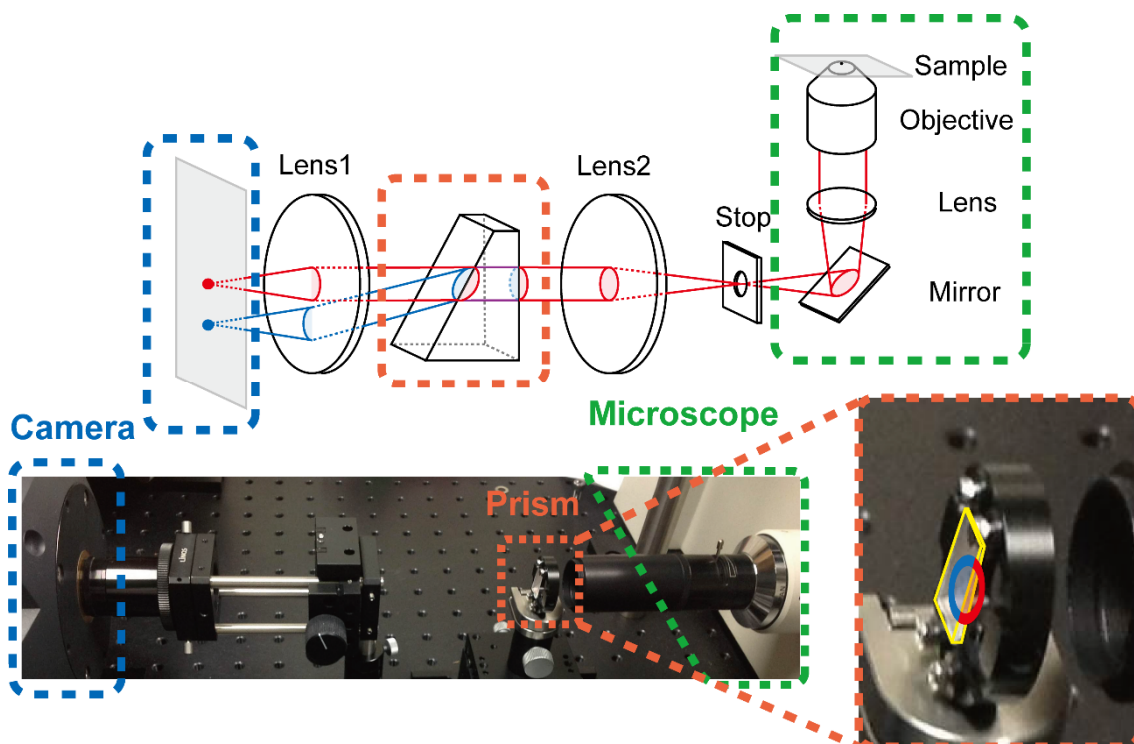


Figure 13 実際の光路の写真

顕微鏡本体のカメラポートから出た光路に対し、2枚のレンズとプリズムをレンズチューブやホルダーを利用して固定し、設計の光路を構築した。計測時には、光路に外から光が入らない様にカバーを設置して計測を行った。

1.2.3.4 三次元位置検出の精度の測定

後述のグライディングアッセイの実験方法と同様にチャンバーを作製し、最後の ATP 溶液の代わりに ATP のみを除いた溶液を流し入れ、滑り運動しない静止した MT 上に結合した QD525 を観察した。この QD525 の輝点を 10 frames/s, 及び 30 frames/s で 20 秒間計測 (それぞれ 200 点, 600 点)し、位置精度を調べた。また得られた座標の分布に対して以下のガ

ウス分布の式でフィッティングし、SDを得た。

$$y = A \cdot \exp \left[-\frac{(x - x_0)^2}{2\sigma^2} \right]$$

1.2.4 グライディングアッセイ

図のようにガラス面上のダイニンによって駆動される微小管を微小管に付加した Q-dot (Qdot 525 Streptavidin Conjugate、Molecular probes、以下 QD525 と記述)を観察することでダイニンの運動活性を調べた。

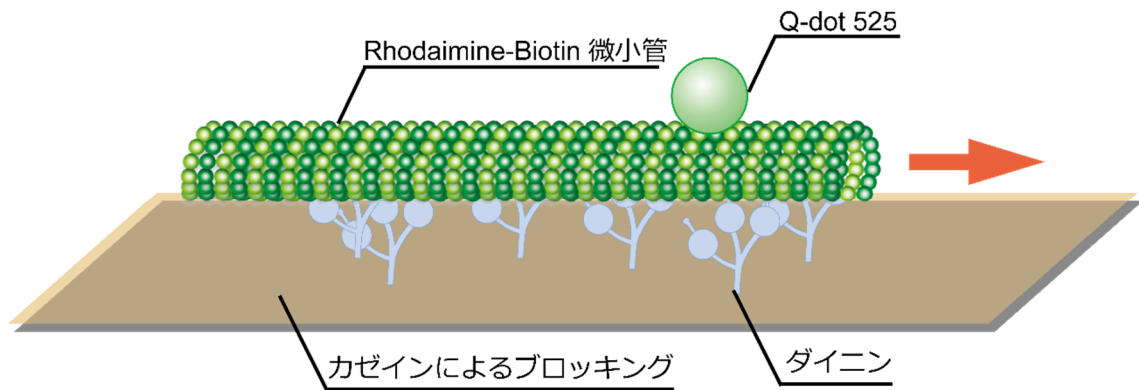


Figure 14 グライディングアッセイ模式図

ローダミン、ビオチンで修飾された微小管を用いることで、ローダミンの蛍光により微小管を確認し、アビジンでコートされた QD525 をビオチンに結合させることで微小管の運動マーカーとして観察した。

1.2.4.1 チューブリン精製

運動活性測定に用いるチューブリンは、(Vallee, 1986)の方法に従ってブタ脳から精製した。ブタ脳をホモジナイズして得た可溶画分について、温度をコントロールすることでチューブリンを2回重合脱重合させて微小管結合タンパク以外を取り除き、さらに phosphocellulose カラム(Whatman Cellulose Phosphate P1)にかけることで精製チューブリンを得た。

1.2.4.2 チューブリンの修飾

精製したチューブリンを修飾することで、運動活性測定に用いるためのビオチン修飾したチューブリン、ローダミン修飾したチューブリン、アレクサ 488 修飾したチューブリンを作製した。それぞれの修飾には、チューブリンを重合した状態で微小管表面にアミノ基反応性の試薬を用いて化学修飾する方法を用いた。修飾用試薬はそれぞれ以下のものを用いた。

ビオチン: Biotin-(AC5)2-Sulfo-OSu、同仁、341-06801

アレクサ 488: Alexa Fluor(R)488 carboxylic acid succinimidyl ester mixed isomers、Molecular Probes、RO-A20000

ローダミン: 5-(and-6)-carboxy-X-Rhodamine、Molecular Probes、C1309

修飾の手順を以下に示す。

(1) 3 ml 程度のチューブリン溶液をチューブにプールし、後で glycerol を加えた時の総量に対し BRB80 (80 mM PIPES、1 mM EGTA、1 mM MgCl₂、pH 6.8)が 2 倍希釈、MgCl₂が 3.5 mM、GTP が 1 mM になるように加え、5 分間氷上に置いた。

(2) 37°C にしておいた 100% glycerol を 33% になるように加え、溶液全体が混ざるようにやさしく混ぜ、30 分間 37°C の恒温槽で重合させた。

(3) 37°C にしておいた 0.1 M High pH Cushion (Na-HEPES (pH 8.6)、1 mM MgCl₂、1 mM EGTA、60% glycerol)を 2 本の Beckman TLA 100.4 用遠心管 (以下 100.4 遠心管)に 1.3 ml ずつ入れ、その上に重合した微小管溶液を約 3 ml ずつのせて遠心分離した。(80000 rpm、30 分間、35°C、Beckman TLA 100.4)

(4) 上清の溶液を取り除き、37°C にしておいた BRB80 溶液 200 µl で Cushion の上の界面を 2 回 wash した後、ペレットを 37°C にしておいた Labeling 溶液 (0.1 M Na-HEPES (pH8.6)、1 mM MgCl₂、1 mM EGTA、40% glycerol)200 µl で 2 回 wash し、Cushion をできる限り取り除いた。

(5) 37°C にしておいた 200 µl の Labeling 溶液を加え、微小管のペレットがな

くなるまで懸濁した後、1本の100.4遠心管にまとめた(合計400 μ l)。

(6) 使用したチューブリンのモル量の10倍のモル量の色素(おおよそ100 nmol程度のチューブリンに対し、1 μ mol程度の色素)を加え、37°Cで30分間反応させた。3分ごとに10回ピペッティングを行い混合した。

(7) 37°Cにしておいた400 μ lのQuench Solution(2倍濃度のBRB80、100 mM K-Glutamate、40% glycerol)を加え、5分間37°Cで静置した。

(8) 37°CにしておいたLow pH Cushion (BRB80、60% glycerol)1.5 mlの上に修飾した微小管0.8 mlをのせ、遠心分離した(80000 rpm、20分間、35°C、Beckman TLA 100.4)。

(9) (4)の操作と同様にCushionを取り除いた。

(10) ペレットをInjection 溶液(K-Glutamate、0.5 mM MgCl₂)200 μ lで2回washした。

(11) 4°Cにしておいた140 μ lのInjection 溶液で微小管のペレットがなくなるまで泡立てないように気をつけながら懸濁した。溶液をBeckman TLA 100.2用遠心管に移し、40分間氷上に静置して脱重合させた。5分ごとにピペッティングを30回行った。

(12) 遠心分離を行った(80000 rpm、10分間、2°C、Beckman TLA 100.2)

(13) 上清を1.5 mlチューブに取り、5倍濃度のBRB80を35 μ l(最終濃度1倍)、1 MのMgCl₂を0.7 μ l(最終濃度1 mM)、100 mMのGTPを1.75 μ l(最終濃度1 mM)加えて3分間氷上に置いた。

(14) チューブを37°Cの恒温槽に移し2分間おいた。

(15) 37°Cにしておいたglycerolを89 μ l加え、溶液全体が混ざるようにやさしく混ぜ、30分間37°Cの恒温槽で重合させた。

(16) 37°CにしておいたLow pH Cushion 0.5 mlの上に微小管を270 μ lのせ、

遠心分離した。(75000 rpm、20 分間、37°C、Beckman TLA 100.2)

(17) Cushion 上の溶液を抜き、Cushion 上を 37°C にしておいた Injection 溶液 200 μ l で界面を 2 回 wash した後、Cushion を取り除いた。

(18) 37°C にしておいた Injection 溶液 200 μ l でペレットを 2 回 wash した後、4°C にしておいた 60 μ l の Injection 溶液で微小管のペレットがなくまるまで懸濁した。

(19) 新しいチューブに上清を移し、30 分間 氷上に静置して脱重合させた。10 分間ごとにピペティングを 30 回行い混合した。

(20) 遠心分離を行った。(80000 rpm、10 分間、2°C、Beckman TLA 100.2)

(21) 上清を 0.5 ml チューブに取り、5 倍濃度の BRB80 を 6 μ l 加えて 100 μ l ずつ分注し、液体窒素で凍結し、液体窒素中に保存した。

精製の結果、それぞれ以下の濃度、染色率のチューブリンが得られた。タンパク濃度は CBB 染色によるブラッドフォード法で求めた。またローダミンとアレクサ 488 に関して、それぞれの色素の吸光波長での吸光度とモル吸光係数から染色率を求めた(ローダミン: 吸光波長 576 nm、モル吸光係数 82000 L/mol \cdot cm、アレクサ 488: 吸光波長 495 nm、モル吸光係数 71000 L/mol \cdot cm)。

ビオチン修飾したチューブリン: 16 mg/ml

ローダミン修飾したチューブリン: 18.6 mg/ml、染色率 78.6%

アレクサ 488 修飾したチューブリン: 34.6 mg/ml、染色率 16.8%

1.2.4.3 微小管の重合

上記の修飾チューブリンと未修飾のチューブリンを混合して重合し、グライディングアッセイ及びビーズアッセイで用いる微小管を作製した。

グライディングアッセイで用いたローダミン-ビオチン 微小管はチューブリン: ローダミン修飾チューブリン: ビオチン修飾チューブリン = 170: 5: 1 になるように混合した。混合の操作はできるだけチューブリンの重合が進まぬように氷上ですばやく行った。

目的の比率に混合したチューブリン 100 μ l に対し、100 mM GTP を 1 μ l (最終濃度 1 mM)、1 M MgCl₂ を 1 μ l (最終濃度 1 mM) 加え、37°C で 30 分間重合させた。重合後に taxol を 40 μ M になるように加え、室温で 30 分間静置した後、4°C で 1 週間程度保存した。

また GMPCPP で安定化した微小管の重合には、チューブリン精製時に混入している GTP を取り除いてから重合を行った。まず前述と同様の比率でチューブリンを混合したもの 50 μ l に対し 0.4 ml BRB80 を加えて限外濾過フィルターチューブ(ミリポア、Amiconn ultra0.5, Ultracel-30 membrane)を用いて限外濾過した(14000 rpm、5 分間、4°C、eppendrf 5424R)。次に 20 mM GMPCPP (Jena Bioscience, GpCPP, Nu405S)を溶かした BRB80 を 0.4 ml 加え、同様に限外濾過する操作を 2 回繰り返した。最後にユニット中のチューブリン溶液 50~100 μ l を回収し、25 μ l のチューブリン溶液に対して終濃度 0.4 mM となるように GMPCPP を加えて混合し、37°で 60 分重合を行った。重合後のサンプルは、通常の微小管と同様に保存した。

1.2.4.4 カゼイン溶液の作製

カゼイン (Casein from Milk, nacalai, 07319-82)を Casein 溶液 (25 mM HEPES-NaOH pH8.6, 50mM K-Acetate)に 20 mg/ml で溶かし、低温室でチューブを回転させながら 30 分間攪拌した。溶液を 100.2 の遠心管に入れて遠心分離し、上清を分離した(100000 rpm、2°C、Beckman TLA 100.2)。さらに上清をフィルターし (Ultrafree-MC Centrifugal Filter Units、0.1 μ m)、11~14 mg/ml のカゼイン溶液を得た。濃度はブラッドフォード法により測った。作製後 1 週間程度、冷蔵保存した。グライディングアッセイで使用する際は、50 K-Ace 溶液(10 mM PIPES、50 mM K-acetate、4 mM MgSO₄、1 mM EGTA、pH 7.4、0.2 μ m のフィルターでろ過)で 1 mg/ml になるように希釈して用いた。

1.2.4.5 ローダミン-ビオチン 微小管への QD525 の付加

BRB80t (BRB80 + 20 μ M taxol)でローダミン-ビオチン 微小管を 50 倍に希釈、QD525 を 100 倍に希釈した。希釈した微小管は常温に、希釈した QD525 は氷上に置いた。希釈した QD525 を 3 μ l とってチューブに移し、希釈した微小管を 3 μ l とって加えた。ゆっくりと 3 回ピペッティングして混合し、そのまま常温で 20 分から 60 分反応させた。グライディング グアッセイでチャンバーに流し込む直前にカゼイン (最終濃度 0.4 mg/ml)を加え、BRB80t で 50 μ l に希釈した。

1.2.4.6 チャンバー作製

24 \times 36 mm のカバーガラス(Matsunami NEO Micro cover glass、Thickness NO.1)の上に、両面テープ (ナイスタック、NW-25、幅 25 mm \times 厚さ 100 nm)を 5 mm \times 25 mm 程度の大きさに 2 枚切り、約 3~4 mm の幅で貼り付けた。その上に 18 \times 18 mm のカバーガラス(Matsunami Micro cover glass、Thickness NO.1)を貼り付け、長さ 25 mm、幅 3~4 mm、厚み 100 nm のチャンバーとした。全てのバッファーを流し終えた後、液体の蒸発を防ぐためマニキュアをチャンバーの両端に塗った。チャンバーの容量は約 7.5 μ l だった。

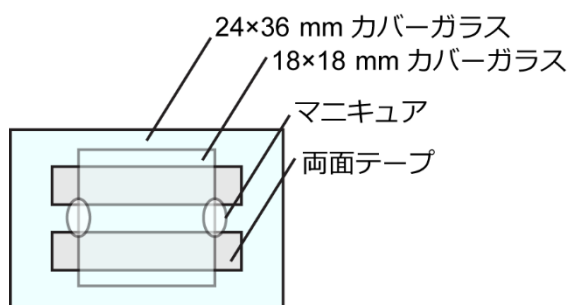


Figure 15 チャンバーの模式図

二枚のカバーガラスの間に 2 列の両面テープを並べて貼って流路を作製し、最後にマニキュアで 2 つの出口を封じてチャンバーとした

1.2.4.7 ATP 溶液の組成

グライディングアッセイで最後に流し入れる ATP 溶液は、蛍光退色を防ぐ試薬(スカベンジャー)、ATP 濃度を一定に保つための ATP 再生系試薬を 50 K-Ace 溶液に加えた溶液を用いた。50 K-Ace 溶液 は、計測前に常温にした。酵素反応による pH の変化を避けるため、基質となるグルコースはチャンバーに流し入れる直前に加えた。

Table 1 ATP 溶液の組成

試薬	加える量	ストックの濃度	終濃度
Catalase	1 μ l	20%	0.2%
Glucose oxidase	1 μ l	2500 U/ml	25 U/ml
Creatine kinase	1 μ l	30 mg/ml	0.3 mg/ml
Creatine phosphate	1 μ l	500 mM	5 mM
taxol	1 μ l	2 mM	20 μ M
DTT	1 μ l	100 mM	1 mM
ATP	1-10 μ l	1 mM or 0.1 mM	1-100 μ M
Glucose	3 μ l	150 mg/ml	4.5 mg/ml
50 K-Ace	82-91 μ l		

50 K-Ace 溶液に上記の退色防止剤(Catalase, Glucose oxidase, Glucose)、ATP 再生系試薬 (Creatin kinase, Creatine phosphate)などを加え、最終的に 100 μ l となるように調製した。

1.2.4.8 チャンバーへの流し入れの手順

チャンバーに、試薬を (1)~(6)の順に流し入れ、観察を行った。チャンバーにはピペットマンを用いて常に片側から試薬を流し入れ、反対側からろ紙で吸引した。溶液の交換が十分

に行われるよう、流しいれは 30 秒以上かけてゆっくりと行った。

- (1) ダイニン、7.5 μ l、3 分
- (2) カゼイン、30 μ l、2 分
- (3) 50 K-Ace 溶液、30 μ l
- (4) QD525 付加微小管、15 μ l、2 分
- (5) 50 K-Ace 溶液、15 μ l
- (6) ATP 溶液、15 μ l

試薬を流し終えたチャンバーの出入り口にマニキュアで封をして顕微鏡にセットして観察した。

1.2.4.9 観察方法

顕微鏡は Nikon TE2000-U、光源は Nikon Intensilight C-HGFIE、カメラは Andor Technology、iXon X3 DU-897 を用いた。室温は 23°C から 25°C になるようにし、観察時間は最大 30 分程度とした。

まずローダミン観察用のフィルターをセットして微小管を探し、撮影をスタートした。すぐに QD525 観察用のフィルターに切り替えて撮影を続け、最後にもう一度ローダミン観察用のフィルターに切り替えて微小管の位置を確認し、撮影を終了した。露光時間は観察する条件により 0.03 秒から 2 秒の範囲とし、減光フィルターを挿入して露光時間あたりの光量が等しくなるようにして観察した。

z 軸方向の変位を定量する場合、光路にプリズムを挿入し、2 つの像が重ならないように視野全体の四分の一程度に像を絞って観察した。像を 2 つに分けて観察するため、光量を通常の観察に比べ倍程度に増やして観察を行った。観察の手順は通常の観察と同様に行った。

1.2.4.10 解析方法

得られた SIF 形式の動画を TIFF 形式で出力し、目的の QD525 の輝点の位置を解析した (Igor)。2次元での観察の場合、Igor のマクロを用いて輝点の輝度情報をガウス分布でフィッティングし、ナノメートルの精度で 2次元の位置情報を得た。得られた輝点の変位を x 軸が微小管の運動方向となるように座標を回転し、最終的な xy 座標とした。この輝点の x 座標を経過時間に対してプロットし、直線で近似することで速度を見積もった。輝点の運動が y 方向に周期的な振動を示している場合、この xy 座標の軌跡をサインカーブで近似し、3周期以上運動する輝点について回転しているとみなしてピッチ、回転速度などのデータを見積もった。ただし例外として、各輝点が平均で 1 μm 以上の長周期で振動する条件では、3周期以上振動する輝点のデータを取得するのが困難であったため、2周期以上運動するものを回転しているとみなした。

3次元観察によって得られた動画については、同様の手順で 2つの像の輝点をそれぞれガウス分布でフィッティングすることでそれぞれの見かけの位置情報を得た。この二つの見かけの xy 座標の平均値から実際の xy 座標を、また 2つの見かけの y 座標の差に前述の方法で求めたキャリブレーションファクターを乗じたものを実際の z 座標として xyz 座標を求めた。この計算は、解析ソフト Igor 上のマクロを用いておこなった。また、2次元の際と同様に x 軸方向が微小管の運動方向となるように xy 座標を回転し、最終的な位置情報を得た。

1.2.4.11 滑り運動する微小管の曲がりの定量

三頭の外腕ダイニン、ATP 濃度 10 μM の条件で、前述と同様に作製した微小管に QD525 を付加せずに BRB80t で 5000 倍希釈し、その他は同様の手順でチャンバーに流し入れ、観察に用いた。

倒立顕微鏡(Nikon, TE2000-U)の右ポート(三次元位置検出光学系を設置していないポー

ト)に倍率 0.6 倍の縮小レンズを入れ、三次元計測に用いていたカメラ(Andor iXon X₃ DU-897)を付けかえて視野を広くした状態でローダミンの蛍光から微小管の滑り運動を観察した。(1 pixel : 66.7 nm → 261 nm)。expposure time 5 s, cycle time 60 s, ND32 のフィルターを使用。蛍光の退色を抑えて長時間観察するため、露光の際のみ手動でシャッターを開けて撮影した。

滑り運動する微小管の内、折れておらず、他の微小管と重ならずに進む微小管のみを対象とし、微小管全長が視野内に収められているフレームにおける微小管先端の座標を手動で取得し、xy 座標の軌跡を得た。得られた全ての微小管の軌跡を、1 frame 目から 2 frame 目までの移動方向が x 軸方向となるように回転移動して規格化し、解析に用いた。また、各 frame 間での移動角度を算出し、その分布を調べた。

1.3 実験結果

1.3.1 三次元位置検出光学系

1.3.1.1 三次元位置検出のキャリブレーション

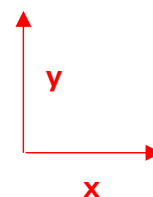
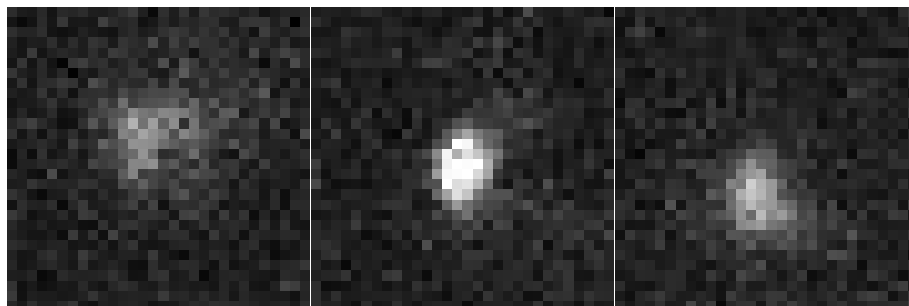
3次元観察光学系について、1.2.3.2の様にプリズムで分割した2つの像からz座標を求めるためにキャリブレーションを行った。ステージ制御コントローラ(中央精機、QT-CM2)を用いて対物レンズを一定速度で上下に移動させることで、ガラス面上に置いたQD525の相対位置を一定速度で上下させた。このときの2つの像は**Figure 16**のように変化した。これらの像の輝点の中心位置をガウスフィッティングにより求め、y座標の差の変化(図10を参照)と、対物レンズの移動速度から見積もったz座標の変化の間の比例定数(キャリブレーションファクター)を**Figure 17**の方法で計算した。

プリズムを通過していない像 (Right)

$z = -400 \text{ nm}$

$z = 0 \text{ nm}$

$z = +400 \text{ nm}$



プリズムを通った像 (Left)

$z = -400 \text{ nm}$

$z = 0 \text{ nm}$

$z = +400 \text{ nm}$

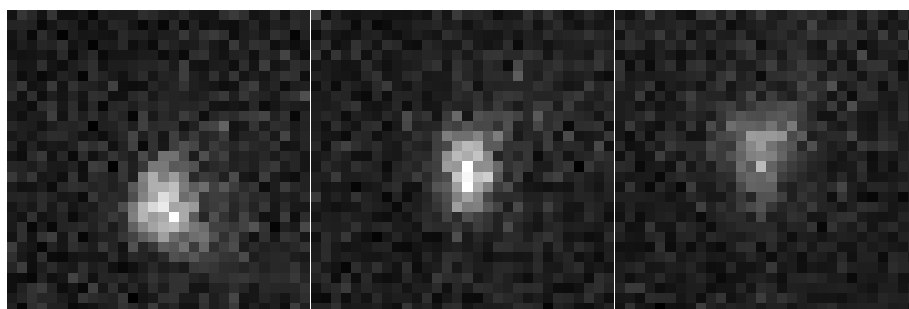


Figure 16 対物レンズの上下移動による静止した QD525 像の変化

1.2.3.4 に記述したように、微小管が運動しない条件で微小管に結合した量子ドットを観察し、焦点の位置から対物レンズを上下 400 nm ずつ動かしたときの像の変化。上段の連続写真がプリズムを通過していない光による像、下段がプリズムを通った光による像。カメラ上の画像の位置関係から、それぞれを Right、Left とした。

Right と Left について、それぞれ左から対物レンズを 400 nm 上方(チャンバーに近づく方向)に移動させた位置での像、焦点位置での像、対物レンズを下方(チャンバーから離れる方向)に 400 nm 移動させた像。

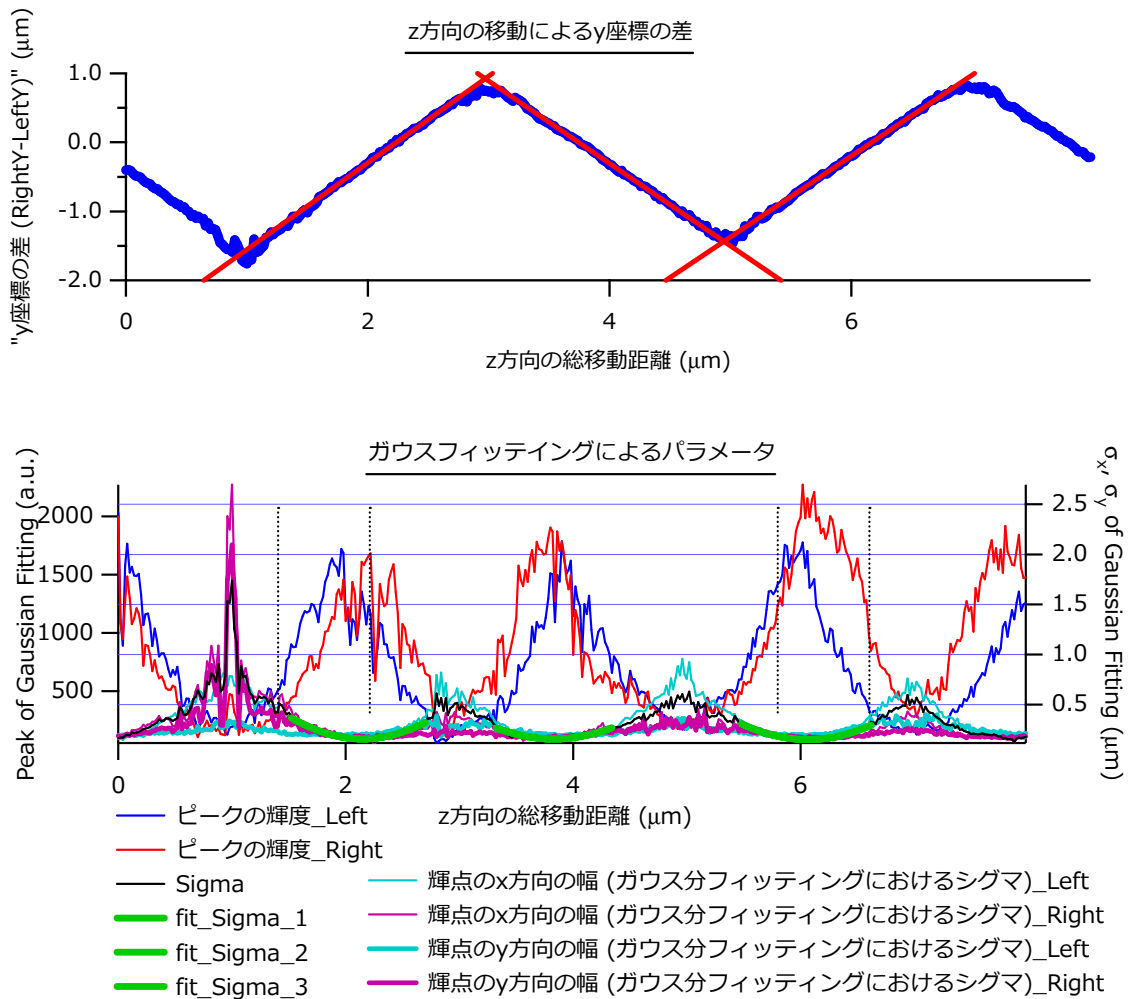


Figure 17 キャリブレーションファクターの算出

対物レンズを一定速度で移動させた際の像(Figure 16 を参照)についてガウスフィッティングにより中心座標などを求め、キャリブレーションファクターの算出を行った。

上図: 対物レンズの移動に対する左右の像の y 座標の差のプロット。ジャストピントから対物レンズを 1 μm 上げ、その後 2 μm ずつ下げる、上げるを繰り返した。速度 1 μm/s, exposure time 0.1, 800 枚、2 枚を平均化して解析した。

下図: ガウスフィッティングにより得られた輝点の強度及び分布の幅。Sigma の極小値三箇所をガウスでフィッティングし、fit_Sigma_1, 2, 3 からそれぞれ極小のポイントをさがした。

3 点の前後 20 ポイント(上下 400 nm に相当)の範囲で、上図を直線でフィッティングすることで、その傾きとしてキャリブレーションファクターを求めた。それぞれの傾きの絶対値は 1.26, 1.20, 1.18 となった。平均を取り、キャリブレーションファクターは $1.19 \approx 1.2$ とした。

1.3.1.2 三次元位置検出の精度

no nucleotide 状態でダイニン上に静止した微小管に結合した QD525 について、位置精度の計測を行った。

より高速で行った 30 frame/s の計測の方が精度が悪いものの、どちらの frame rate においても、xy で 5 nm, z で 10 nm 程度の精度が得られた。また、x 座標に比べ y 座標の方が計測精度が低い傾向が見られた。

Table 2 各 frame rate における xyz 座標の位置精度

20 秒計測の SD		
座標	10 frames/s	30 frames/s
x	3.9 nm	6.2 nm
y	5.5 nm	9.3 nm
z	10.1 nm	15.5 nm

静止した QD525 について 10 frames/s, 30 frames/s で 20 秒間の三次元計測を行い、xyz の各座標を分布をガウス分布でフィッティングすることで、それぞれの SD を得た。

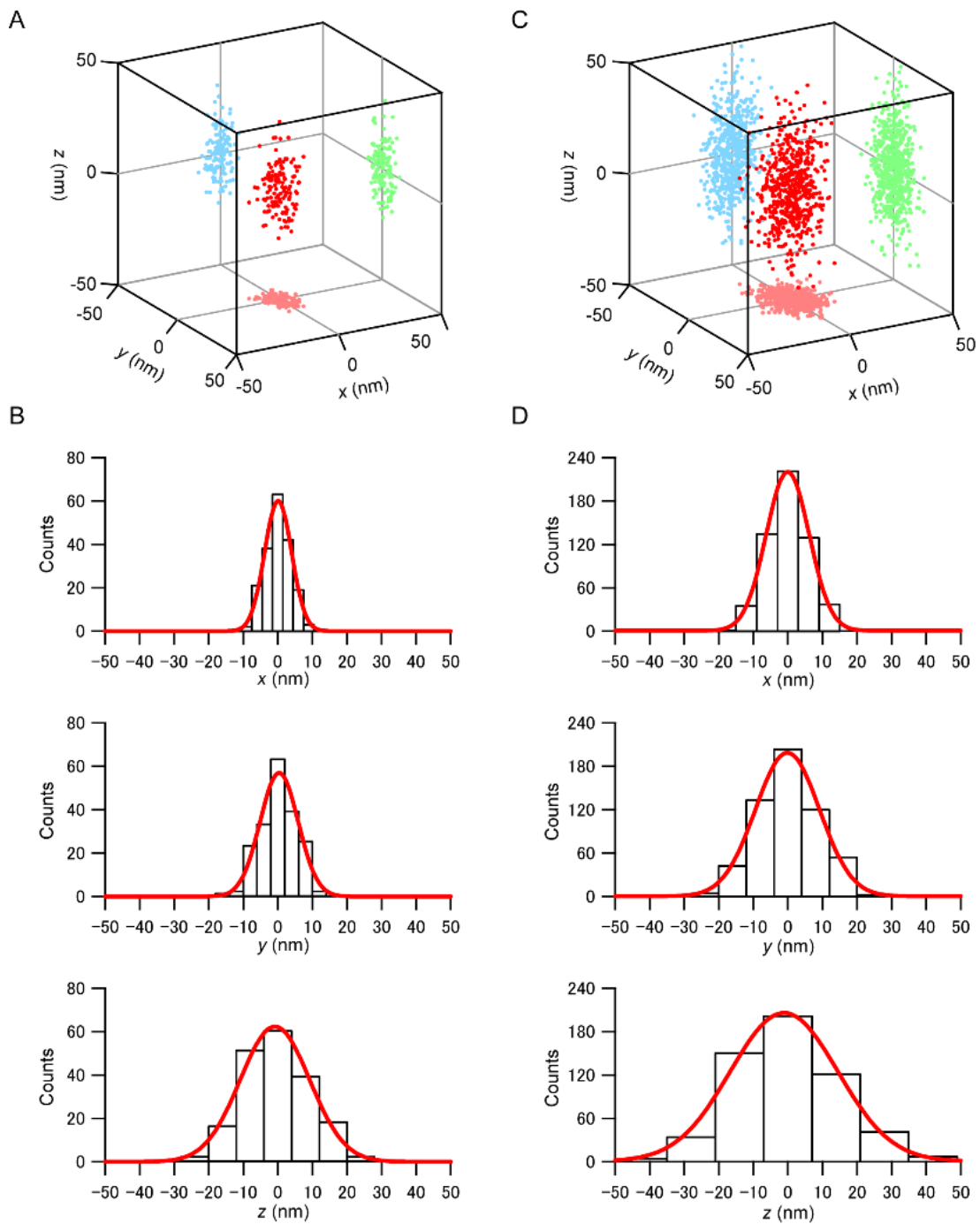


Figure 18 三次元位置検出の位置精度

10 frame/s での計測 (A, B) 及び 30 frame/s での計測 (C, D) について、各座標の計測座標の分布を 3D plot (A, C) 及び二次元のヒストグラム (B, D) で示した。また各ヒストグラムについてガウス分布でフィッティングして(赤線)分布の SD を調べた。

1.3.2 外腕ダイニン及びそのサブユニットの精製

1.3.2.1 外腕ダイニンの単離

シヨ糖密度勾配遠心によって、外腕ダイニンと内腕ダイニンを分離した。

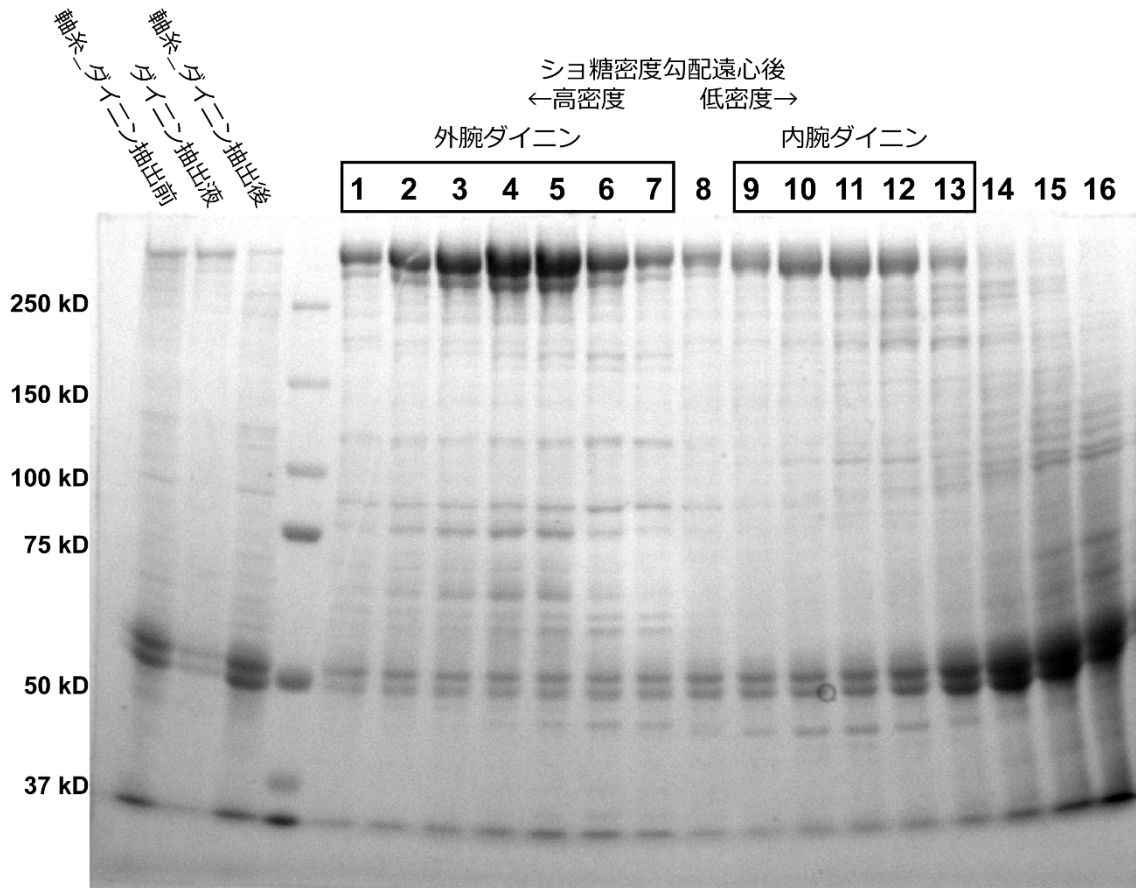


Figure 19 シヨ糖密度勾配遠心による分離の結果

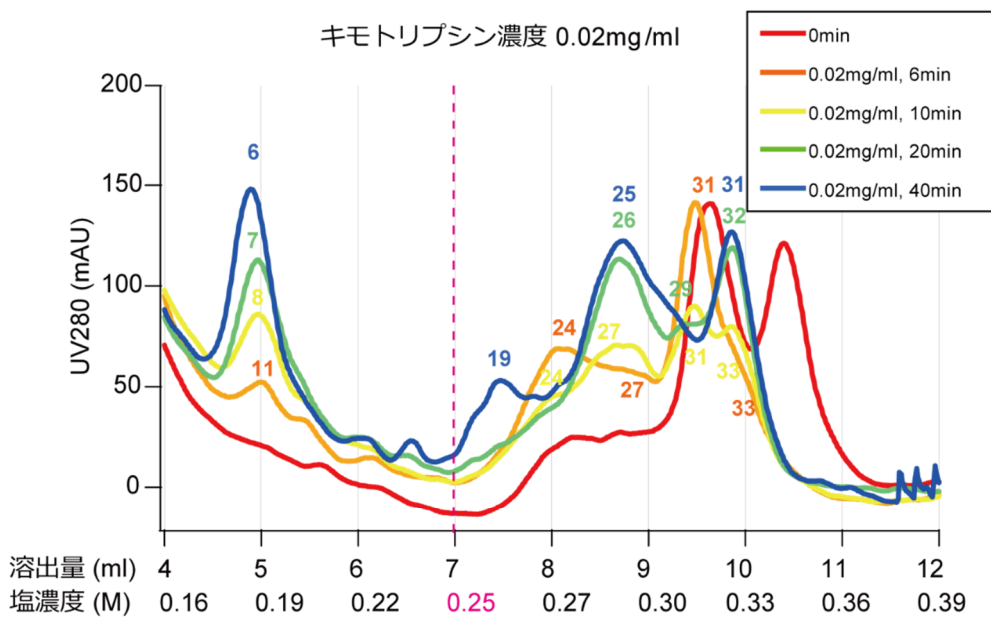
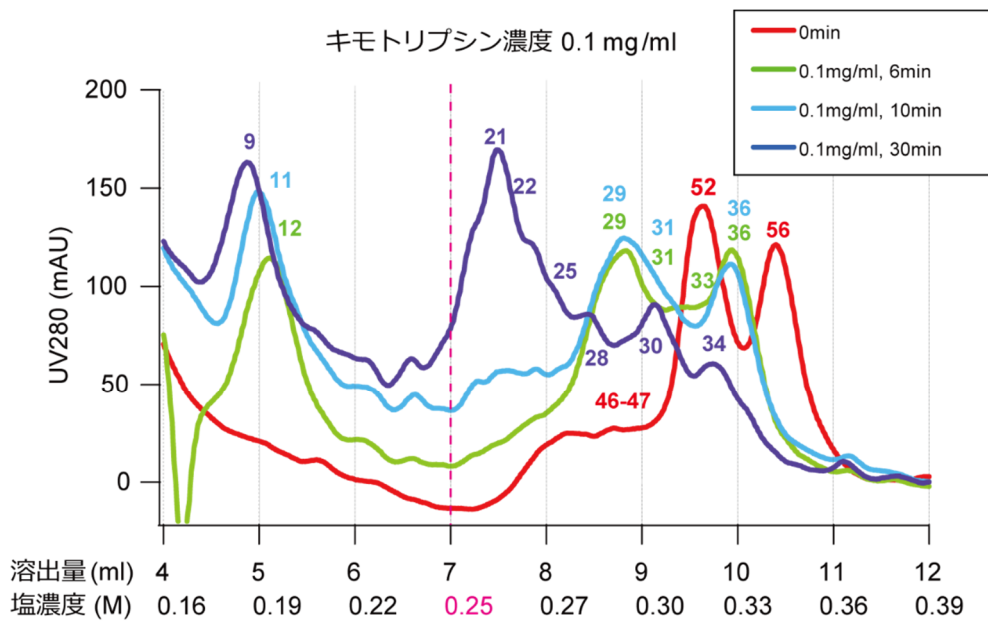
軸糸(50 kDa 程度のチューブリンを多く含む)から高塩濃度処理によってダイニンを抽出した(左側 3 つのレーンを参照)。抽出したダイニンをシヨ糖密度勾配遠心にかけることで、密度の高い分画から順に外腕ダイニン、内腕ダイニン、チューブリンなどがそれぞれ分離された。

遠心分離後、図 16 に示すように内腕ダイニン、外腕ダイニンがそれぞれ得られた。そのうち高密度側の分画 (各 1.5 ml) から 1-7 番目程度までを集め、キモトリプシン処理、Mono-Q カラムによる精製に用いた。ブラッドフォード法により測ったダイニン濃度は 0.2~0.5

mg/ml 程度だった。

1.3.2.2 キモトリプシン処理と Mono-Q カラムによる精製

外腕ダイニンを2つのサブユニットに分離するためキモトリプシン処理を行った。処理時間とキモトリプシン濃度を变化させ、それぞれの条件で AKTA によりタンパク質が溶出する塩濃度がどう变化するか調べた。サンプルに用いたショ糖密度勾配遠心後の外腕ダイニンは、0.34 mg/ml であった。グラフ縦軸は AKTA によって測った 280 nm の吸光度 (単位は任意単位)。グラフ中の色付きの数字は各回の分画番号で、横軸とは対応していない。色、番号は後述の電気泳動の結果と対応している。



各ダイニンの溶出濃度

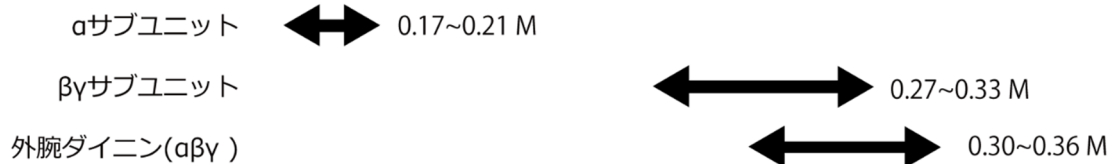


Figure 20 キモトリプシン処理条件による各ダイニンの溶出ピークの変化

各処理条件のサンプルを AKTA で塩濃度勾配によって溶出した際の溶出ピーク。縦軸は AKTA により計測した吸光度(任意単位)、横軸は溶出を始めてからの溶出量と塩濃度を示している。また各溶出ピークについて、後述する電気泳動での確認を行った。各ピークに併記した番号はそれぞれの精製の際の分画番号。番号及び処理条件の色分けは Figure 21 ~ Figure 23 と共通。マゼンダの点線で示した 0.25 M を境にそれぞれの分画を低濃度での溶出分画、高濃度での溶出分画とし、Figure 22 でのキモトリプシン処理によるバンドの推移の分析に用いた。また、後述の SDS-urea-Page の結果から、それぞれのダイニンについて図中の溶出濃度で精製した。

キモトリプシン処理を進めると未処理の時には検出されなかった溶出塩濃度 0.17 ~ 0.21 M のピークのタンパク濃度が増加し、さらに処理を進めるにつれて溶出塩濃度 0.27 ~ 0.36 M のピークが高塩濃度のピークから順に減少しより低塩濃度のピークのタンパク濃度が増加する傾向が見られた。

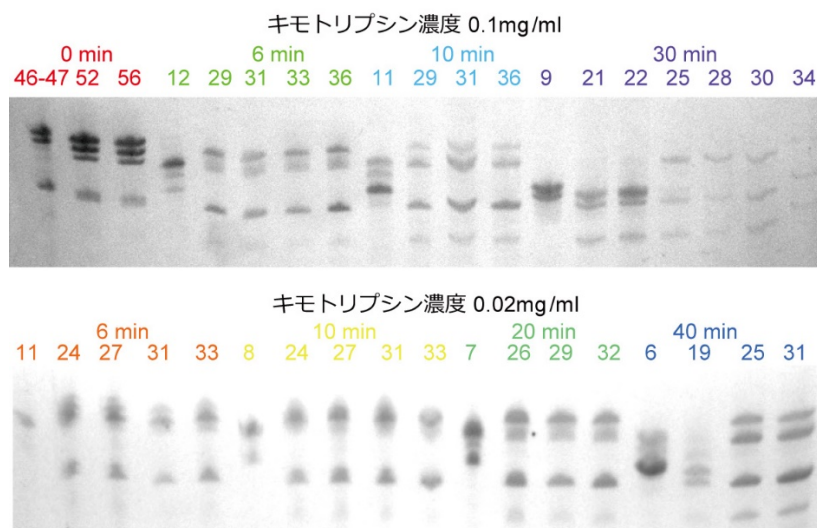


Figure 21 キモトリプシン処理条件によるバンドの変化(SDS-urea-PAGE)

それぞれのピークについて、SDS-urea-PAGE により各ダイニン重鎖のバンド構成の変化を調べた。2 つのキモトリプシン濃度について、左から処理時間の短い順に、また同条件の中で溶出塩濃度の低い順に並べてある。

これらのピークについて、主要なもの（グラフ中に番号の振ってあるピーク）について、SDS-PAGE、SDS-urea-PAGEによりバンドを比較した。先行研究により、SDS-urea-PAGEを行うことで各ダイニン重鎖のバンドが分離して見えることが報告されている(Toyoshima, 1987a, 1987b)。

この結果について、この先行研究を参考に考察した。SDS-urea-PAGEにおける未処理の段階の上から3本の濃いバンドは、それぞれ α 、 β 、 γ 重鎖のもので、その下にある薄いバンドも γ 重鎖のバンドであることが先行研究により示されている。溶出塩濃度 190 mM 付近で検出されるピーク、溶出塩濃度 250 mM 以上で検出されるピークはそれぞれ先行研究で密度勾配遠心によって分離された低密度の分画、高密度の分画とそれぞれほぼ同じバンドの推移を示していた。このことから、先行研究による各バンドがどの重鎖由来のものであるかの帰属を元に、キモトリプシン処理によって生じた各バンドを以下に示すようにそれぞれ α 、 β 、 γ に帰属した。1 から 6 までの番号は、先行研究に準じている。3.5、4.5 のバンドについては先行研究では言及されていなかったが、その他のバンドとの相対的な位置関係から帰属した。これらのバンドが先行研究で見えなかったのは、3.5 に関しては 3 と 4 の中間の状態のためメインバンドになる条件がないこと、4.5 に関してはこのバンドが見える条件まで長く処理していなかったことなどが原因として考えられる。

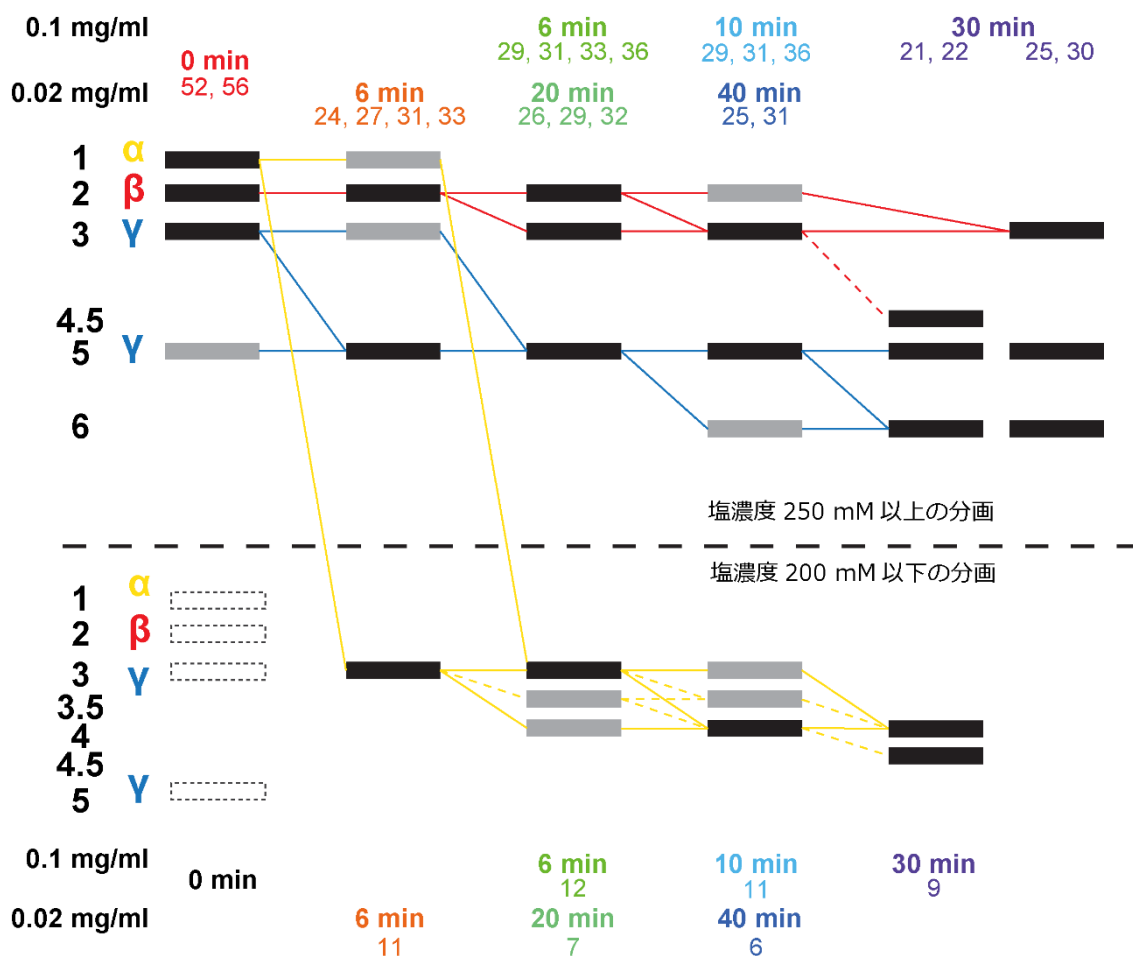


Figure 22 SDS-urea-PAGE の各バンドの帰属

色分けおよび分画番号は図 17 と共通。上半分は高溶出塩濃度で検出されるピークのバンド構成、下半分は低溶出塩濃度で検出されるピークのバンド構成を示している。濃く見えるバンドについては黒、薄く見えるバンドについてはグレーで表している。処理時間の下の数字は、そのバンド構成に近いピークの数値番号。

またこのサンプルについて、SDS-PAGE によりダイニン重鎖以外のバンドの比較も行った。重鎖のバンドに関しては、同一条件の高塩濃度にある複数のピークに違いは見られなかったが、外腕ダイニンに付属するタンパクと見られる 80 kDa、110 kDa 程度のタンパクがそれぞれ溶出塩濃度 0.29 M 付近と 0.33 M 付近のピークに特徴的に見られた。

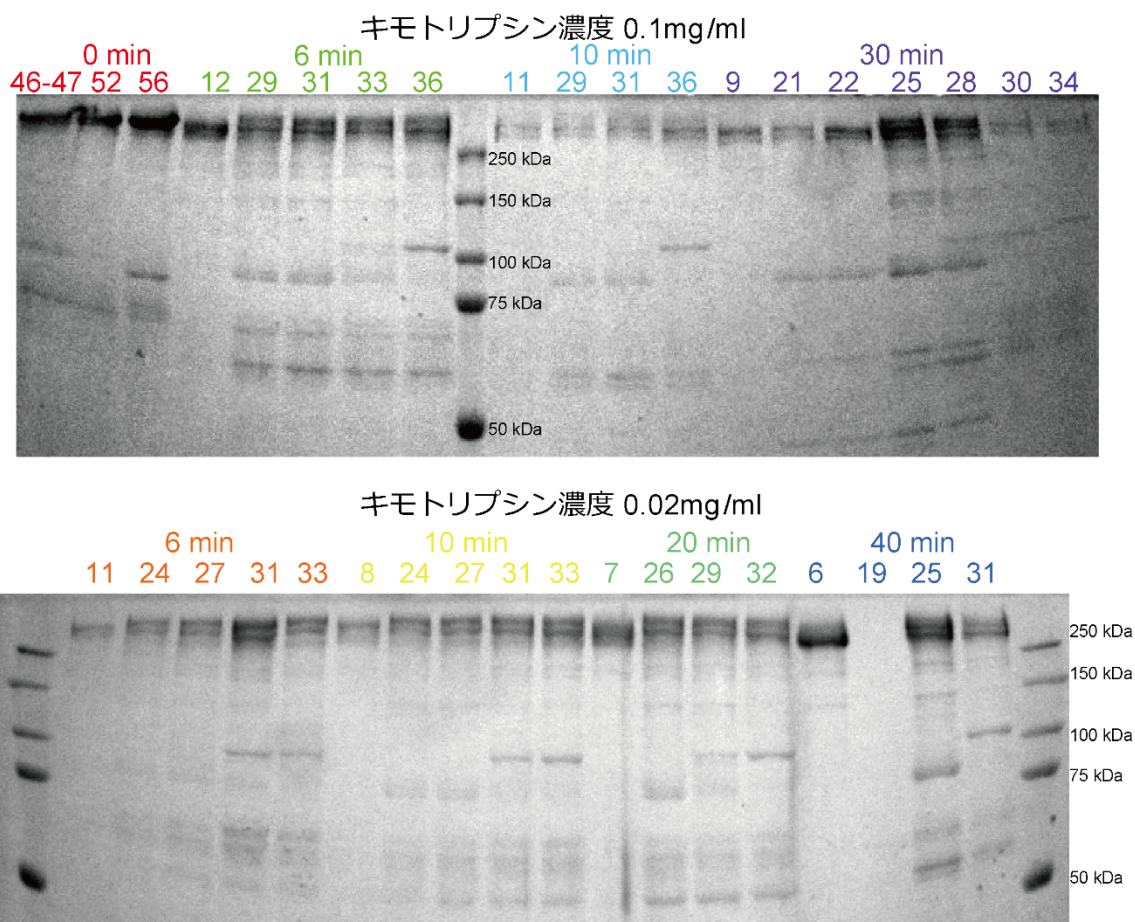


Figure 23 キモトリプシン処理条件によるバンドの変化(SDS-PAGE)

それぞれのピークについて、SDS-PAGEにより各ダイニン重鎖以外のバンド構成の変化を調べた。ゲル濃度 10%、300 V、40 mA、50 分。

2 つのキモトリプシン濃度について、左から処理時間の短い順に、また同条件の中で溶出塩濃度の低い順に並べてある。

これらの結果から、 α サブユニット、 $\beta\gamma$ サブユニットを精製する際のキモトリプシン処理条件を決めた。 α サブユニットに関しては、元の重鎖が 530 kDa なのに対し、3 番が 410 kDa、4 番が 390 kDa であるため、できるだけ機能を保存していると考えられる 3 番のバンドがメインバンドとなる条件、すなわちキモトリプシン 0.02 mg/ml、処理時間 6 分の条件が適当

だと判断した。また $\beta\gamma$ サブユニットに関しては、処理が足りないと α のバンドが高塩濃度側のピークにも残っている (すなわちまだキモトリプシンによって分離していない 3 頭の外腕ダイニンが残っている) こと、また処理をしすぎるとバンドの構成が変わりより短くなった 6 番のバンドが出てきてしまうことから、その中間の条件として 2、3、5、のバンドがメインになる条件、すなわちキモトリプシン 0.1 mg/ml、処理時間 6 分の条件が適当だと判断した。実際それぞれのサブユニットを精製する際は、キモトリプシン処理前の外腕ダイニンの濃度が異なるため、その濃度に応じて処理時間を調節した。複数のピークからなる部分に関しては、重鎖のバンドに違いが見られないピークは基本的に混合してから保存した。外腕ダイニンに関しては、270 から 300 mM 付近でピークが肩になっている部分 (0 分 46-47、**Figure 20** 参照) では重鎖のバンドに違いが見られた (後半のピークのバンドは 1、2、3 と 5 の薄いバンドなのに対し、1、2、5 のバンドであった。**Figure 22** 参照) ため、後半の 2 つのピークを含む分画を混合してサンプルとした。

1.3.2.3 各ダイニンの精製結果

Mono-Q カラムによる分離精製で、外腕ダイニンとそのサブユニットが目的の状態に精製できた。電子顕微鏡観察により確かめたところ、それぞれが3頭構造、2頭構造、単頭構造を持ったダイニンであった。

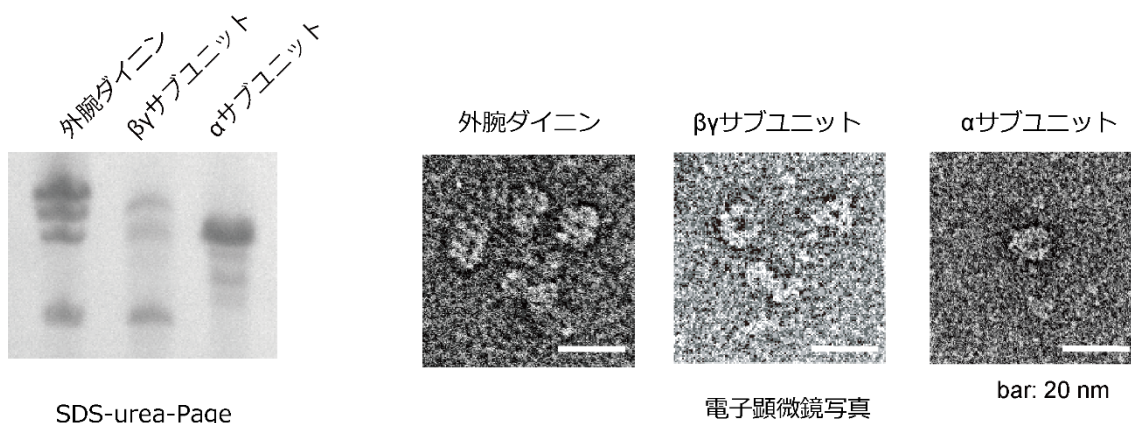


Figure 24 各ダイニンの精製結果

左側は精製した各ダイニンの SDS-urea PAGE のゲル写真。右側は各ダイニンを電子顕微鏡による負染色観察したものの代表的な画像。画像右下のスケールバーがそれぞれ 20 nm。

ダイニンの電子顕微鏡観察は、以下の方法で豊島研究室齋藤氏に依頼して行った。まず、観察用グリッドの製作については、真空蒸着装置（真空デバイス社、VE-2020）で使用直前に切断して表面が一様なマイカ基盤上に蒸着し、カーボンの薄膜を水面に剥離させて浮かべたものを、アセトンで超音波処理した銅グリッド(VECO 社グリッド、Cu Hexagonal H-400)に貼り付け、乾燥させた。

作製したグリッドは、使用直前に親水化し、密度勾配遠心後のサンプル溶液を 20 nM 程度の濃度に希釈して 10 μ l 載せた。約 60-70 μ l の MME バッファー（30 mM MOPS, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, pH 7.4）で十分にリンスした後、1.5% 酢酸ウラン溶液約 20 μ l で染色し、迅速に乾燥させた。精製したタンパク質サンプルの濃度が十分に高い場合は、MME バッファーに 200 mM KCl を加えた希釈用バッファーで適当な濃度(5 ~ 10 μ g/ml)に希釈して観察した。

観察は、透過型電子顕微鏡(Hitachi、H7500) を用いて 80 kV、40,000 倍で行った。撮影は CCD カメラ (Fast-scan-F114) によって行った。

1.3.3 外腕ダイニンによるグライディングアッセイ

1.3.3.1 外腕ダイニンによる微小管滑り回転運動

三頭の外腕ダイニンをガラス面に付着させ、QD525 を付加した微小管、ATP を流し入れたチャンバーを前述の三次元位置検出顕微鏡で観察をおこなった。結果、**Figure 25** のようにローダミン修飾微小管が滑り運動することに加え、微小管に結合した QD525 の運動が観察された。

この QD525 の軌跡を前述の方法で軌跡の解析することで、**Figure 26** のように外腕ダイニンによって微小管が長軸方向に滑りながら回転運動するコークスクリュー運動をすることがわかった。このような外腕ダイニンによるコークスクリュー運動は、本研究で初めて見つかったものである。また回転の向きは右ねじの方向、すなわち微小管を長軸進行方向の後ろ側からみて時計回りに回転する方向であった。この回転の向きは、先行研究(Vale and Toyoshima, 1988)で報告されていた内腕ダイニンによるコークスクリュー運動と同方向であった。

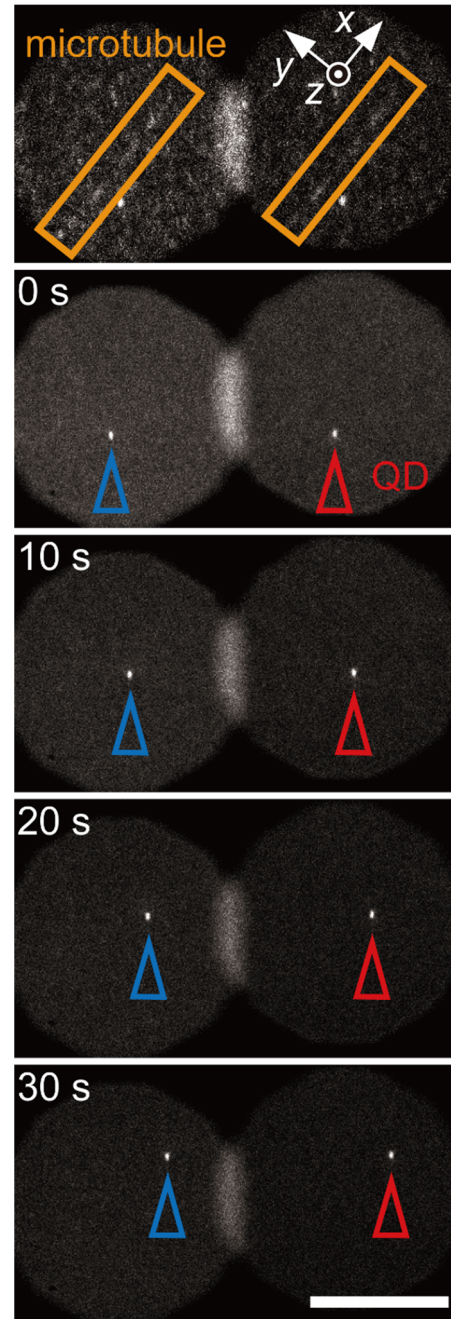


Figure 25 グライディングアッセイの三次元計測

一番上がローダミンによる微小管の蛍光像、その後順に 10 秒ごとの QD525 の像。左側、青の矢頭がプリズムを通った像、右側、赤の矢頭がプリズムを通過していない像の QD525 を示している。bar: 10 μ m

このコークスクリュウ運動は速度、回転速度ともに等速の運動であり、このとき軌跡の xy plot は **Figure 26** のように sin 波様の軌跡となった。これを sin 波にフィッティングすることで回転のピッチを得た。回転のピッチは、微小管が 1 回転するごとに並進方向に進む距離($\mu\text{m}/\text{rev}$)で表される。

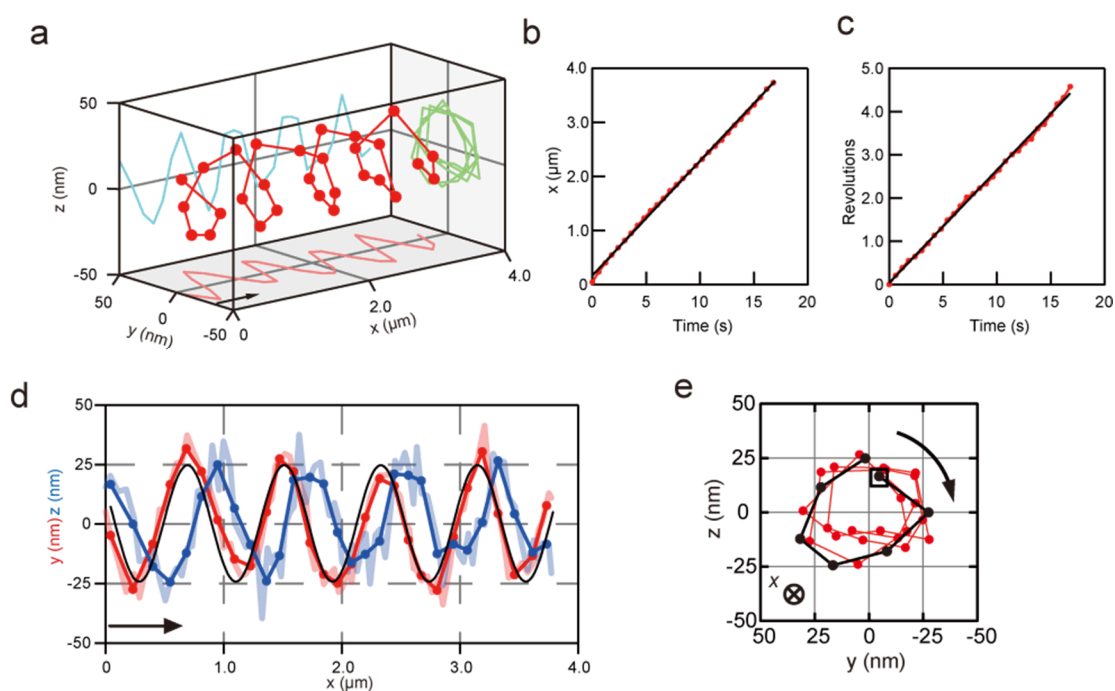


Figure 26 外腕ダイニンによる微小管のコークスクリュウ運動

a: 外腕ダイニンによるコークスクリュウ運動の三次元プロット。外腕ダイニンによって滑り運動する微小管が、右ねじの方向に回転している。矢印は微小管の滑り方向。b: 微小管の x 座標(滑り方向)の時間変化。等速で並進運動している。c: 微小管の回転数の時間変化。等速で回転運動している。d:x 座標に対する y 座標、z 座標の変化。どちらもサイン波様に周期的に変化している。z 座標の方が 1/4 周期遅れていることは、右ねじ方向に回転していることによる。xy のグラフをサイン波でフィッティングすることで、回転運動のピッチを求めた。e: コークスクリュウ運動の yz プロット。微小管を滑り運動する方向の逆側から見て、時計回りに微小管が回転している。回転の振幅はおよそ 25 nm で、これは微小管の直径、QD525 の直径から予想される大きさと一致している。

1.3.3.2 滑り回転運動の微小管長さ依存性の有無

異なる長さの微小管に対して、コークスクリー運動に違いが見られるかどうかを検証した。結果、外腕ダイニンでは、ピッチ(**Figure 27**)、並進速度(**Figure 28**)、回転速度(**Figure 29**)のいずれにおいても微小管の長さ依存性は見られなかった(**Table 3**)。

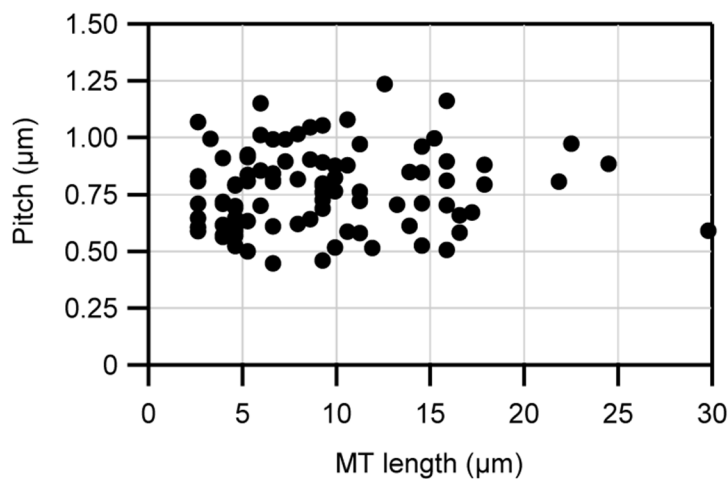


Figure 27 微小管長さに対するピッチの変化

外腕ダイニンの ATP 濃度 10 μM でのグライディングアッセイにおいて、微小管の長さに対してピッチの値をプロットした。

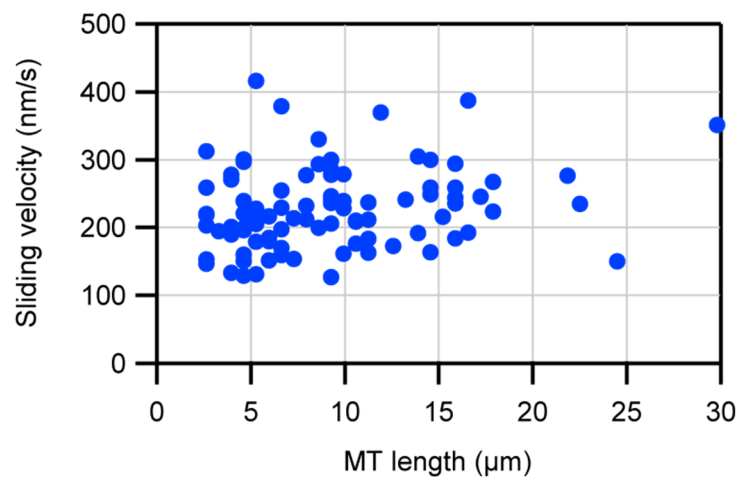


Figure 28 微小管長さに対する並進速度の変化

外腕ダイニンの ATP 濃度 10 μM でのグライディングアッセイにおいて、微小管の長さに対して並進速度の値をプロットした。

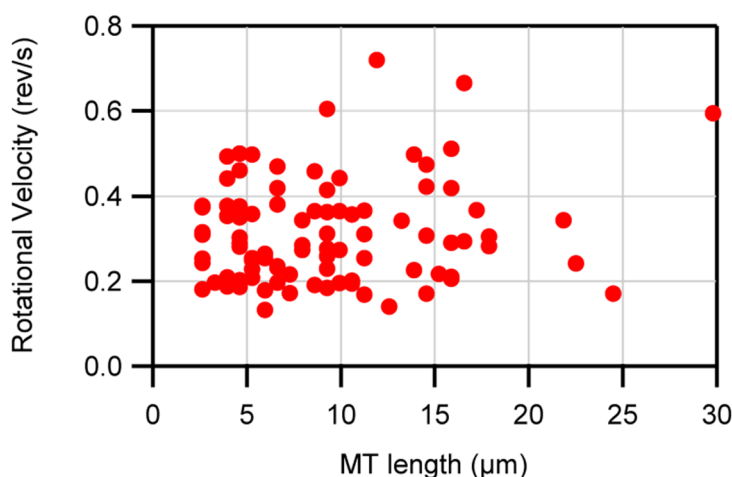


Figure 29 微小管長さに対する回転速度の変化

外腕ダイニンの ATP 濃度 10 μM でのグライディングアッセイにおいて、微小管の長さに対して回転速度の値をプロットした。

Table 3 微小管長さに対する各指標の相関係数

	ピッチ	並進速度	回転速度
相関係数	0.08	0.25	0.18

微小管の長さに対して、ピッチ、並進速度、回転速度のそれぞれについて相関係数を求めた。いずれも、微小管の長さに対する相関は見られなかった。

1.3.3.3 GMPCPP 微小管での微小管滑り回転運動との比較

微小管は複数のプロトフィラメントが周上に束ねられた構造を持ち、このプロトフィラメントの数によりそれ自体がねじれの構造を持つ。このねじれの有無及びピッチは微小管のプロトフィラメント数によって異なり、またそのプロトフィラメント数は下図のように微小管を安定化する方法によって異なる。taxol で固定した微小管では 14 本もしくは 13 本のプロトフィラメントを持つ物が主となり、重合時に GTP の代わりに GMPCPP を用いることで安定化した微小管では、プロトフィラメント数が 14 本となる。このとき微小管は 14 本では左ねじの方向に 7 μm のピッチでねじれ、13 本ではねじれの無い構造を持つ。

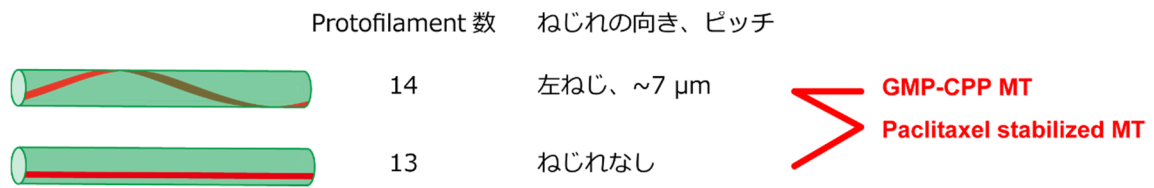


Figure 30 安定化法の違いによる微小管の pf 数とピッチの変化

14 プロトフィラメントの微小管は左ねじの方向に 7 μm のピッチでプロトフィラメントがねじれた構造となる(上)のに対し、13 プロトフィラメントの微小管ではプロトフィラメントがねじれない構造(下)となる。赤いラインは 1 本のプロトフィラメントについて図示したものの、GMPCPP を用いて重合させた微小管では 14 プロトフィラメントで構成された微小管となるのに対し、taxol で安定化した微小管では 14, 13 プロトフィラメントで構成された微小管となる。

この微小管自体のねじれの構造の差異がコークスクリュウ運動に対して顕著な影響を与えているか知るために、それぞれの方法で重合、安定化した微小管を用いて三頭外腕ダイニンによるグライディングアッセイを行った。

結果、2 種の微小管を用いたグライディングアッセイでのピッチの分布は下図のようになった。これらの分布について t 検定を行ったが、顕著な差は見られなかった(p value = 0.52)

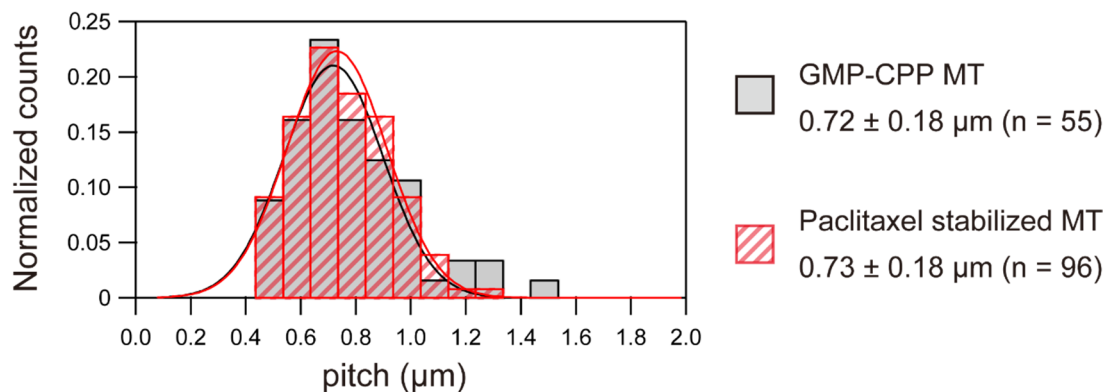


Figure 31 GMP-CPP 微小管と taxol 微小管での回転運動のピッチの比較

GMP-CPP 微小管及び taxol 微小管での ATP 10 μM での三頭の外腕ダイニンによるコークスクリュー運動のピッチのヒストグラム。GMP-CPP 微小管(n=55, グレー)と taxol 微小管 (n=95, 赤)について、総数が 1 となる様に規格化し、0.1 μm の各区間の比率をプロットした。また、それぞれについて解析ソフト Igor 上でガウス分布に対してフィッティングを行った。

1.3.3.4 外腕ダイニンにより滑り運動する微小管の曲がり

ダイニンによる微小管長軸方向以外の方向への力発生を示唆する減少として、一部の内腕ダイニンで報告されている滑り運動する微小管が方向を一定方向に曲げながら進む減少について外腕ダイニンでも見られるかどうかについて、実験を行った。

滑り運動する微小管を低倍で長時間観察した結果、各微小管の軌跡は以下のようになった。それぞれの軌跡は、最初と次のフレームの間の変位が図の x 軸方向となるように回転した。分布に広がりはあるものの、ダイニン、微小管の乗っているガラス面を上から見たときに、全体として進行方向に左方向に曲がって滑るのが確認できた。

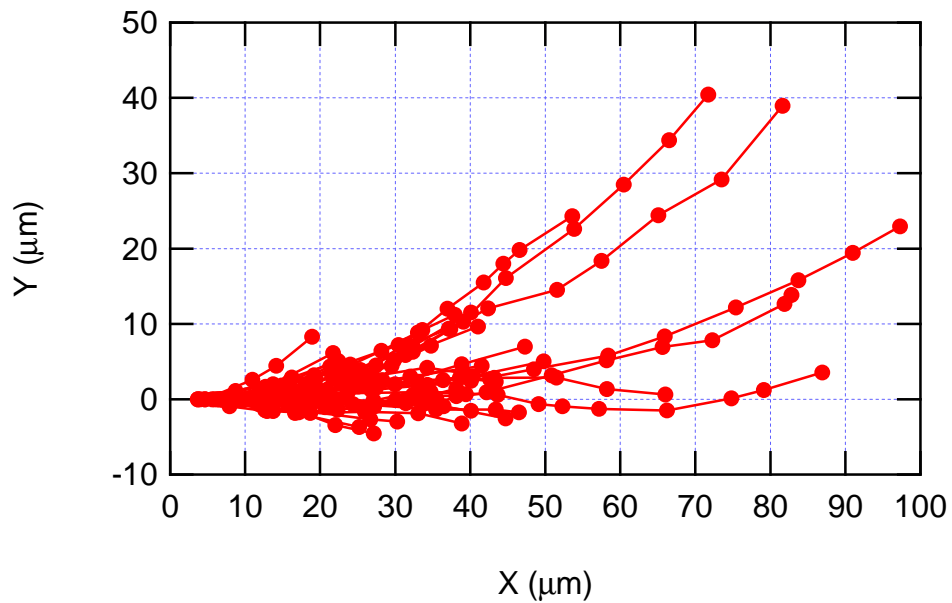


Figure 32 曲がりながら滑り運動する微小管の軌跡

外腕ダイニンの ATP 濃度 $10 \mu\text{M}$ のグライディングアッセイにおいて、各微小管の先端をトラッキングし、1 フレーム 1 min の撮影の最初の 2 フレーム間の移動方向が x 軸方向になるように座標変換して各軌跡をプロットした。

次に、各フレーム間の微小管の滑り方向の角度を算出し、前後のフレームの間でその差を調べることで、1 フレーム=1 分でどの程度微小管の進行方向が変位しているのか調べ、その角度変化ヒストグラムでプロットした(**Figure 33**)。Igor でガウス分布にフィッティングしたところ平均値は 3.2 度となった。

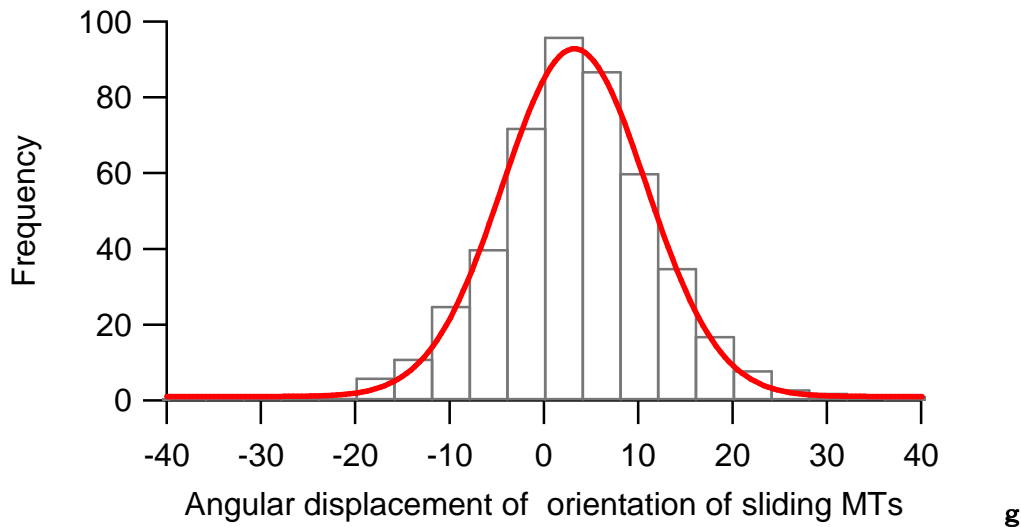


Figure 33 滑り運動する微小管における、1分間の滑り角度の変化量

外腕ダイニンの ATP 濃度 $10 \mu\text{M}$ のグライディングアッセイにおいて、各微小管の先端をトラッキングし、1 フレーム 1 min の撮影の各フレーム間の移動方向を算出した。その各フレーム間の移動の角度変化のヒストグラムを図示した。平均値は 3.2 度。

1.3.4 外腕ダイニン及びそのサブユニットの微小管滑り回転運動

1.3.4.1 α サブユニットによる微小管滑り運動におけるブロッキング剤の影響

先行研究(Vale and Toyoshima, 1989)では、キモトリブシン処理によって分離、精製した α サブユニットについて、グライディングアッセイによる運動が報告されていなかった。そのため、ダイニン濃度、ブロッキング法による α サブユニットの運動の有無を調べた。

結果、本研究では、Casein によるブロッキング、ダイニン濃度 $0.8 \mu\text{M}$ の条件で、初めて α サブユニットによる微小管滑り運動が観察された。使用した Casein によるガラス表面のブロッキングでは、本研究より低濃度で、先行研究と同等のダイニン濃度 $0.12 \mu\text{M}$ でも、グライディングアッセイによる微小管滑り運動が観察された。また、先行研究で用いられていた BSA でのブロッキングでも、本研究で使用したダイニン濃度では滑り運動が観察された。

Table 4 表 濃度、ブロッキング法による微小管滑り運動の有無

α サブユニットの濃度	Casein (1.0 mg/ml)	BSA (0.5 mg/ml)
0.12 μM	○	×
0.5 μM	未計測	○
0.8 μM	○	○

Casein 及び BSA をブロッキング剤として用いた際の微小管滑り運動の有無をダイニン濃度 0.12 μM , 0.5 μM , 0.8 μM で調べた。それぞれの条件で、○は微小管の滑り運動が見られたもの、×は見られなかったもの。また Casein によるブロッキング、ダイニン濃度 0.5 μM では計測していない。

1.3.4.2 $\beta\gamma$, α サブユニットによる微小管回転運動

三頭の外腕ダイニンと同様の条件で、 $\beta\gamma$ サブユニット及び α サブユニットによる微小管の運動を三次元位置検出顕微鏡により計測した。結果、それぞれにおいて、同様のコークスクリュウ運動が初めて観察された。この運動の回転の向きは、三頭の外腕ダイニンと同様に右ねじの方向であった(Figure 34)。

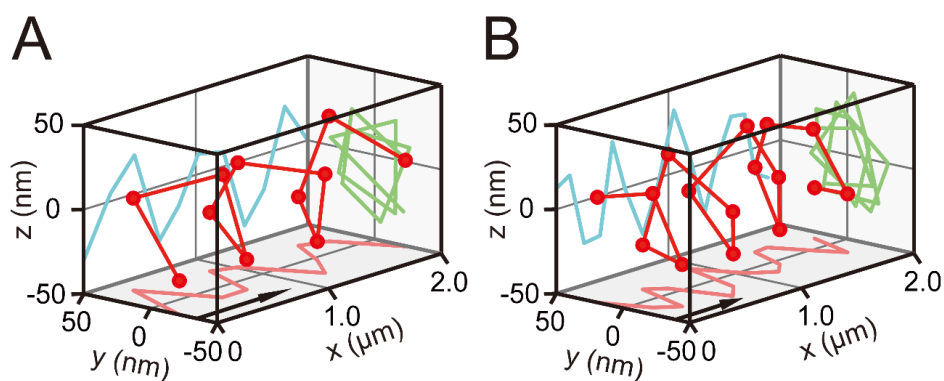


Figure 34 $\beta\gamma$ 及び α サブユニットによる微小管コークスクリュウ運動

$\beta\gamma$ サブユニット(A), α サブユニット(B)コークスクリュウ運動の 3d plot。それぞれ ATP 濃度 10 μM で計測を行った。

1.3.4.3 微小管回転運動の ATP 濃度依存性

外腕ダイニ及び各サブユニットについて、最終溶液の ATP 濃度を 1, 3, 10, 30, 100 μM で変動させ、グライディングアッセイを行った。結果、ATP 濃度の上昇に伴って並進、回転速度が上昇するのみならず、一部のダイニンでは回転のピッチが変化することがわかった (Figure 35)。低 ATP 濃度の条件、ATP 濃度 1 μM では三頭の外腕ダイニン及び α サブユニットで 10 μM の条件の倍以上の長さにピッチが増大したのに対し、 $\beta\gamma$ サブユニットは ATP 濃度によってあまりピッチが変化しなかった (Figure 36、

Table 5、Table 6)。並進速度は ATP 濃度 1 μM 以外の条件では各サブユニット間ではほぼ同様の値を示した。

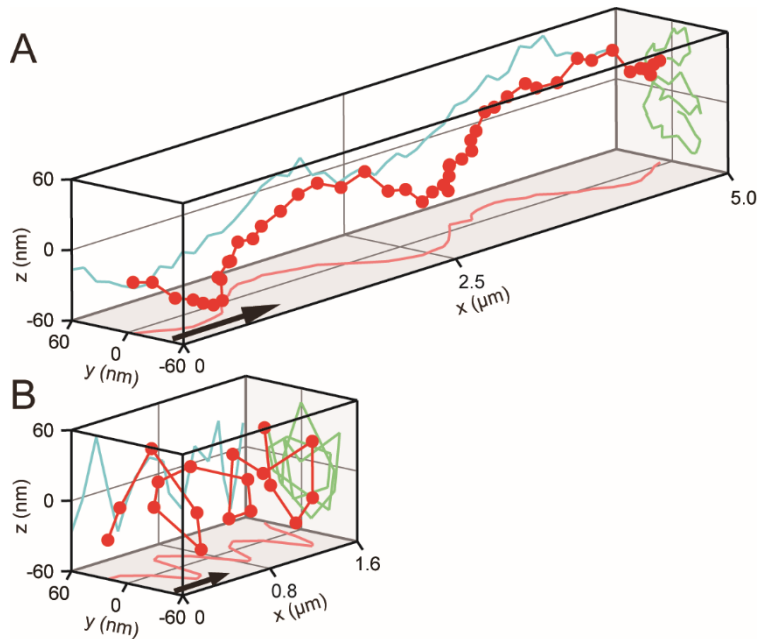


Figure 35 1 μM , 100 μM での外腕ダイニンによるコークスクリュウ運動

A: ATP 濃度 1 μM でのコークスクリュウ運動の 3D plot。0.5 frame/sec で撮影し、5 frame を平均化した。矢印は 100 秒間の移動方向と距離。ピッチ 2.0 μm 。

B: ATP 濃度 100 μM でのコークスクリュウ運動の 3D plot。10 frame/sec、平均化はしていない。矢印は 0.5 秒間の移動方向と距離。ピッチ 0.50 μm 。

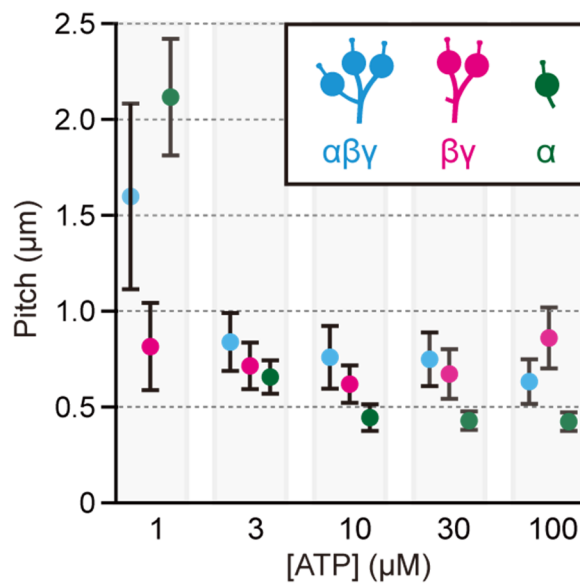


Figure 36 ATP 濃度の変化に対する各サブユニットによる運動のピッチの変化

ATP 濃度の変化に対する各ダイニンのピッチをプロットした。各点は平均値、エラーバーは SD。

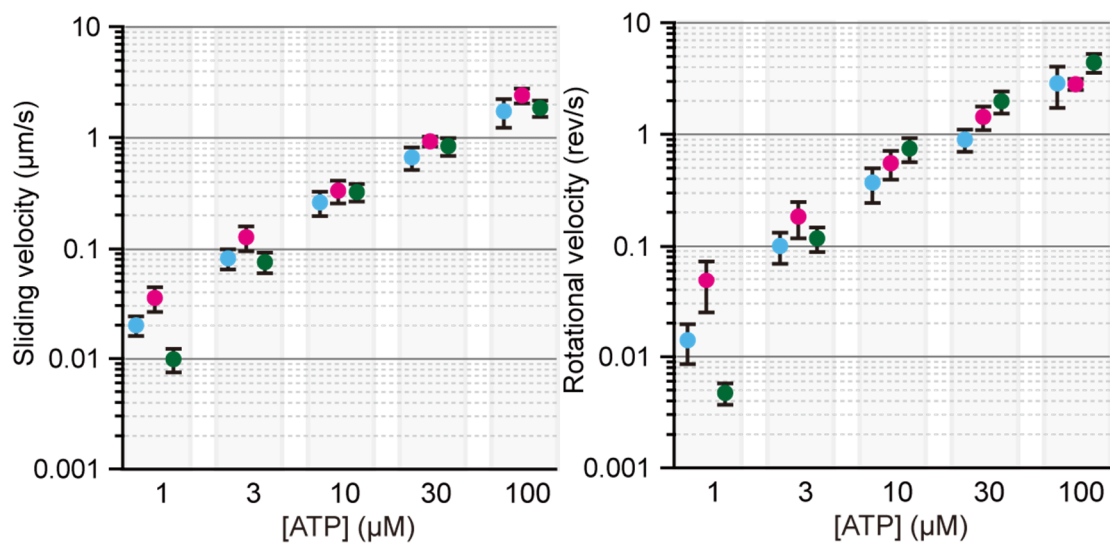


Figure 37 ATP 濃度の変化に対する各サブユニットの並進速度、回転速度の変化

ATP 濃度の変化に対する各ダイニンの並進速度(左図)、回転速度(右図)をプロットした。縦軸の速度は左右とも対数表示。各点は平均値、エラーバーは SD。

Table 5 各 ATP 濃度での外腕ダイニンによる微小管のコークスクリュー運動

ATP	$\alpha\beta\gamma$		
concentration	pitch	sliding velocity	rotational velocity
μM	μm	$\mu\text{m/s}$	rev/s
1	1.6 ± 0.5 (13/15)	0.020 ± 0.04	0.014 ± 0.005
3	0.84 ± 0.15 (16/16)	0.082 ± 0.017	0.10 ± 0.03
10	0.76 ± 0.17 (96/101)	0.23 ± 0.06	0.32 ± 0.13
30	0.75 ± 0.14 (6/6)	0.66 ± 0.15	0.90 ± 0.20
100	0.61 ± 0.12 (5/5)	1.7 ± 0.5	2.9 ± 1.1

各 ATP 濃度における外腕ダイニンによる微小管のコークスクリュー運動のピッチ、並進速度、回転速度。カッコ内の数字は右が計測した微小管の本数、左がそのうちコークスクリュー運動が計測できたものの本数。

Table 6 各 ATP 濃度での α 及び $\beta\gamma$ サブユニットによる微小管のコークスクリュウ運動

ATP		α		
concentration	Pitch	sliding velocity	rotational velocity	
μM	μm	$\mu\text{m/s}$	rev/s	
1	2.1 ± 0.3 (9/12)	0.010 ± 0.002	0.005 ± 0.001	
3	0.66 ± 0.09 (15/15)	0.076 ± 0.016	0.12 ± 0.03	
10	0.45 ± 0.07 (15/15)	0.32 ± 0.06	0.75 ± 0.18	
30	0.43 ± 0.05 (19/19)	0.84 ± 0.16	2.0 ± 0.4	
100	0.42 ± 0.05 (12/13)	1.8 ± 0.3	4.4 ± 0.9	
ATP		$\beta\gamma$		
concentration	pitch	sliding velocity	rotational velocity	
μM	μm	$\mu\text{m/s}$	rev/s	
1	0.81 ± 0.23 (19/27)	0.035 ± 0.009	0.049 ± 0.024	
3	0.71 ± 0.12 (8/11)	0.13 ± 0.03	0.18 ± 0.07	
10	0.62 ± 0.10 (27/34)	0.33 ± 0.08	0.55 ± 0.16	
30	0.67 ± 0.13 (13/13)	0.93 ± 0.10	1.4 ± 0.3	
100	0.86 ± 0.16 (8/14)	2.4 ± 0.4	2.8 ± 0.3	

各 ATP 濃度における α 及び $\beta\gamma$ サブユニットによる微小管のコークスクリュウ運動のピッチ、並進速度、回転速度。カッコ内の数字は右が計測した微小管の本数、左がそのうちコークスクリュウ運動が計測できたものの本数。

1.3.4.4 α 、 $\beta\gamma$ サブユニットが共存する条件でのグライディングアッセイ

三頭の外腕ダイニンの運動機能において、2頭の $\beta\gamma$ サブユニット、単頭の α サブユニットがそれぞれどのように寄与するのか調べるため、 $\beta\gamma$ サブユニットと α サブユニットを混合した条件でガラス面にまいて同様の実験を行った。

まず、各サブユニットが等モルで混在する条件で、ATP濃度に対する運動の変化を調べた。結果、等モルで混在しているにも関わらず、殆ど α サブユニットが単独でガラス面に存在する条件と同様のピッチ、並進速度、回転速度が見られた(**Figure 38**)。

また、 $\beta\gamma$ サブユニットと α サブユニットの間で顕著にピッチ、並進速度、回転速度が異なる $1\ \mu\text{M}$ ATPの条件において、合計のダイニン濃度を変わらずに混合比を変えた際の運動の変化を調べた。結果、全体の1/8程度の α サブユニットが混在する条件でも、 $\beta\gamma$ サブユニットのみの条件に比べて2倍程度のピッチでの運動が見られた(**Figure 39**)。

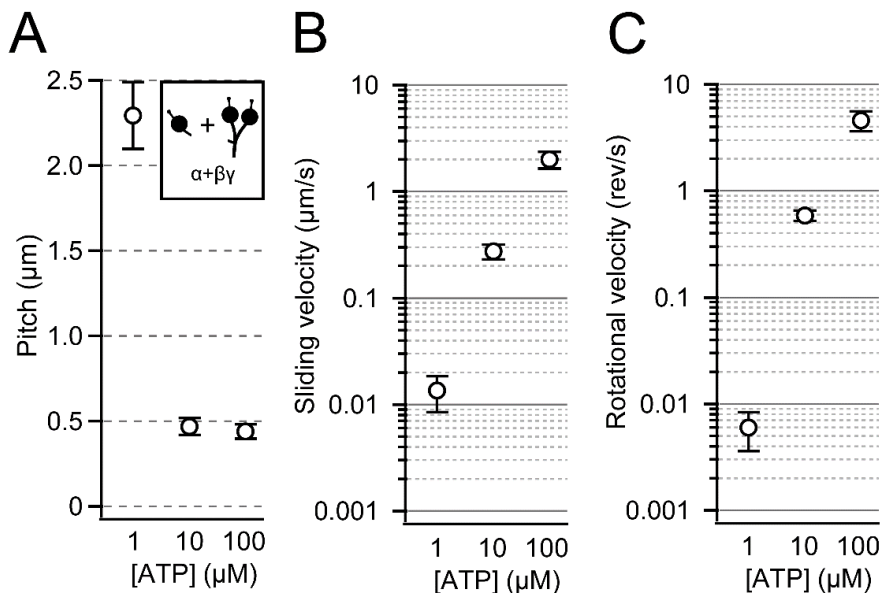


Figure 38 ATP濃度の変化に対する2つのサブユニットが混在する条件での運動

1, 10, 100 μM ATPで、各サブユニットが0.4 μM ずつ混在する条件で計測した。ピッチの変化(A)、並進速度の変化(B)、回転速度の変化(C)。並進速度、回転速度のグラフは縦軸が対数表示。

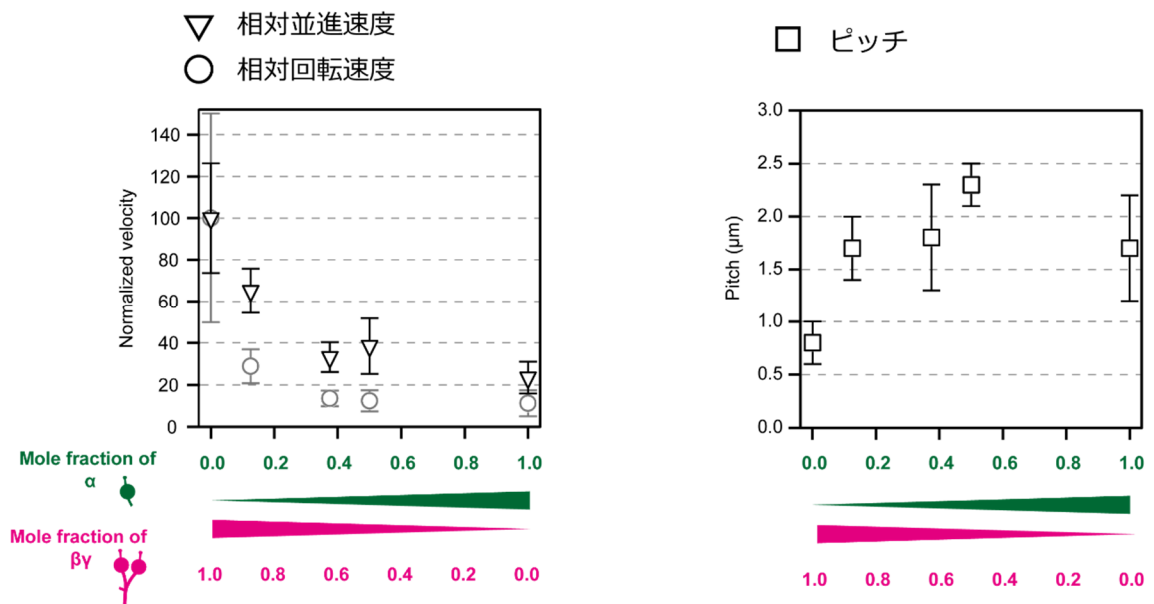


Figure 39 混合比が変化に対する $1 \mu\text{M}$ ATP での運動

2つのサブユニットの合計濃度が $0.8 \mu\text{M}$ になるように、 $\beta\gamma:\alpha$ の混合比を $1:0, 7:1, 5:3, 1:7, 0:1$ に変化させて計測を行った。横軸がそれぞれの混合比。左図は $\beta\gamma$ のみの実験での並進速度、回転速度を 100 としたときの相対速度を混合比に対してそれぞれ示している。右図はピッチを各混合比に対して示している。各点は平均値、エラーバーは SD 。

1.4 考察

1.4.1 外腕ダイニンによるトルク発生

1.4.1.1 外腕ダイニンによるコークスクリュウ運動の三次元計測

テトラヒメナの繊毛軸糸から抽出し、陰イオン交換カラムによって精製することで得た外腕ダイニンについて、グライディングアッセイを行ったところ、微小管にマーカとして付加した QD525 の三次元計測により、滑り運動する微小管が長軸周りに回転する、コークスクリュウ運動が観察された。このようなコークスクリュウ運動は、先行研究ではテトラヒメナやクラミドモナスの内腕ダイニンにおいて観察されているが(Kagami and Kamiya, 1992; Vale and Toyoshima, 1989) 、外腕ダイニンについては初めての結果である。

従来のコークスクリュウ運動の計測は、軸糸断片を核として一方向に微小管を伸長させることで作製した極性微小管を用いて行っていた。Figure 1 で示した 9+2 構造を持つ軸糸断片は微小管に比べてかなり大きく、また多少屈曲している。この極性微小管の滑り運動を暗視野顕微鏡で観察すると、末端の軸糸断片が回転する際にその投射像が周期的に変化することから、この二次元の像の変化を利用して回転が検出できる。このような実験系では、二次元の投射像での回転の計測が難しいうえ、軸糸断片が回転の際にガラス面と物理的に接触し回転の障害となって正確な計測が出来ていなかった可能性がある。対して本研究で用いた方法では、微小管に付加した QD525 は 20~30 nm と小さく、ガラス面に存在するダイニンが 30-50 nm 程度であることを考えると、ガラス面との干渉によるコークスクリュウ運動への影響は非常に少ないと考えられる。また実際に特定の周期で回転が遅延するような現象は確認されなかった(Figure 26)。従来の研究で外腕ダイニンについてコークスクリュウ運動が検出されなかったのは、本研究に比べ回転への干渉の大きい実験系であったことが原因かもしれない。

微小管コークスクリュウ運動は、外腕ダイニンが微小管の長軸方向のみならず、長軸に垂直な方向への力、トルクを発生していることを示唆している。この微小管コークスクリュウ

運動は、先行研究において内腕ダイニンでのみ報告されており(Kagami and Kamiya, 1992)、トルク発生は内腕ダイニンのみの特徴だと考えられていた。しかしながら外腕ダイニンもトルクを発生しているという本研究の結果から、軸系ダイニンが全てこのような力発生を行っている可能性がある。大半の、もしくは全ての軸系ダイニンによって発生するトルクは、実際の繊毛打の制御においても関わっている可能性がある。

この外腕ダイニンのトルク発生は、微小管の長さによってピッチや並進速度、回転速度を変化させなかった(Figure 27-29)。これは、コークスクリュウ運動が並進方向、回転方向に対して等速運動となっていることと合わせて、微小管の単位長さ当たりに作用するダイニンによる力発生と、同様に微小管と結合している運動していないダイニンによる負荷が釣り合っていることによると考えられる。

また、GMP-CPP で安定化した微小管と taxol で安定化した微小管でのコークスクリュウ運動の比較では、両者に顕著な差異は見られなかった。本研究と同様の条件で重合した先行研究(Yajima et al., 2008) から、taxol で固定した微小管は、13本と14本のプロトフィラメントで構成されたものが5:3で混合していると考えられる。特にねじれの無い13本のプロトフィラメントで構成された微小管を3/8含むtaxolで固定した微小管についても、14本のプロトフィラメント数で構成されたGMPCPP微小管での運動と同様のピッチでのコークスクリュウ運動が見られたことから、このコークスクリュウ運動は微小管のプロトフィラメントのねじれに起因する、もしくはそのねじれを増幅するようなメカニズムではないと考えられる。

しかしながら、このプロトフィラメントのねじれがコークスクリュウ運動のピッチに影響していないかどうかは定かではない。プロトフィラメント数14本の微小管のねじれのピッチは左ねじの方向(ダイニンとは逆方向)に7 μm と非常に微小なねじれである。微小管の表面で、このピッチのらせんが微小管の長軸となす角を計算してみる。これは微小管の周長を $25 \cdot \pi = 79 \text{ nm}$ としたとき、 $\text{atan}(79/7000) = 0.011 \text{ rad}$ の角度に相当する。対して、三頭

の外腕ダイニンによる ATP 濃度 $10 \mu\text{M}$ での GMPCPP 微小管でのピッチは $0.73 \mu\text{m}$ であり、同様に計算するとこれは 0.107 rad に相当する。これが、14 プロトフィラメントの微小管でのコークスクリュウ運動におけるねじれの角度である。

仮に、外腕ダイニンのトルク発生が「微小管のプロトフィラメントに対して一定の角度で力発生する」というようなメカニズムであった場合、14 プロトフィラメントの微小管におけるコークスクリュウ運動のねじれの角度は、プロトフィラメントに対する外腕ダイニンの運動によるねじれの角度と微小管のねじれの角度の加算で求められる。このとき、ねじれの向きが逆であることを踏まえると、外腕ダイニンの運動によるねじれ、すなわちねじれない 13 プロトフィラメントの微小管でのコークスクリュウ運動のねじれの角度は 0.118 rad と見積もれる。

ここからピッチを逆算すると、13 プロトフィラメント でのコークスクリュウ運動のピッチは $0.66 \mu\text{m}$ となる。この値は、taxol 固定の微小管でのコークスクリュウ運動のピッチ、 $0.72 \pm 0.18 \mu\text{m}$ と大きな差がない。すなわち、taxol 固定の微小管が全て 13 プロトフィラメントだとしても、今回の実験結果からは、微小管自体のねじれの差異がコークスクリュウ運動のピッチに影響するという仮説を明確に否定することはできないと言える。

Table 7 微小管とコークスクリュウ運動のねじれ角度の概算

	微小管のねじれ (14 pf)	コークスクリュウ (14 pf)	コークスクリュウ (13 pf)
ピッチ	7 μm	0.73 μm	0.66 μm
ねじれの角度	-0.011 rad	0.107 rad	0.118 rad

微小管のピッチは先行研究、14 プロトフィラメントの微小管におけるコークスクリュウ運動のピッチは GMPCPP 微小管でのピッチの数値を用いた。赤字はこれらから概算したねじれの無い 13 プロトフィラメントの微小管でのコークスクリュウ運動のねじれの微小管長軸に対する角度及びピッチを概算したもの。

1.4.2 外腕ダイニンによる微小管曲げの考察

また、外腕ダイニンによる滑り微小管の観察において、コークスクリュウ運動よりかなり大きなスケールで、微小管がゆっくりと滑る角度を変化させる、微小管が曲がりながら滑る現象が観察された。この曲がりの方向は、ガラス面上のダイニンとその上に乗っている微小管に対して微小管の側から見たときに、進行方向に対して左に曲がる向きであった。この微小管の曲がりかどのような力によって起きているかはわからないが、コークスクリュウ運動を駆動しているトルクによって説明できるか考察してみる。

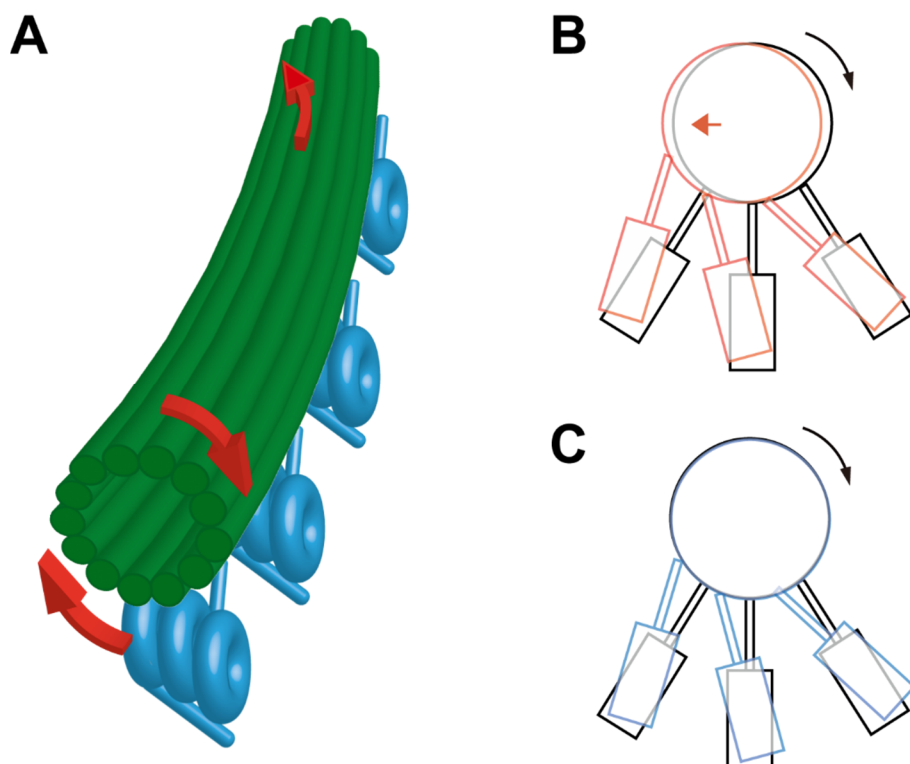


Figure 40 微小管のコークスクリュー運動と曲がりの方向

A: 右ねじ方向のコークスクリュー運動と左回りの微小管の曲がり。B: 微小管の横滑りがあるときの、微小管長軸マイナス端方向から見たダイニンが微小管長軸と垂直に運動したときの微小管の動き。C: 微小管の横滑りが無いときの、ダイニンが微小管と垂直に運動したときの微小管の動き。

右ねじの方向にコークスクリュー運動しているとき、ガラス面上のダイニンは微小管のガラス面側の面に対して結合し、微小管長軸方向に加えて、微小管の進行方向左側に向かって力発生していると考えられる(**Figure 40**)。全てのダイニンがこのような運動すると、微小管は単に長軸方向に滑り運動するのではなく、斜めに横滑りすることになる。しかし実際にはコークスクリュー運動における微小管の横滑りは本研究及び内腕ダイニンにおける先行研究(Vale and Toyoshima, 1989) のいずれにおいても観察されていない。

コークスクリュー運動する微小管がなぜ横滑りしないのかについては結論が出ていないが、微小管に結合する力発生していないダイニンによる抵抗である可能性が有力である。先

行研究では、運動する微小管が水から受ける抵抗や、ダイニンが微小管のらせんに沿って運動することなどをその他の候補として挙げているものの、水から受ける抵抗は横滑りより長軸周りの回転の方が大きいこと、またコークスクリュー運動のピッチが微小管のねじれのピッチと比べかなり短いことなどから、どちらも否定されると考えられている(Vale and Toyoshima, 1989)。微小管に強く結合するダイニンのうち、ガラス面の離れた位置から結合しているダイニンについては、回転方向への運動はダイニンと微小管の距離を変化させないのに対して、横滑り方向への運動はダイニンと微小管の結合に対して垂直に解離させる方向に働く。このようなダイニンが回転方向に比べ横滑り方向に大きな負荷となることで、微小管の横滑りに対する抵抗となっていると考えられる。

微小管の滑り運動の曲がり、先端が微小管の曲がり、滑り運動する微小管の先端で起きている可能性が考えられる。先端だけでなぜ曲げの力がかかるかについては、以下の仮説が挙げられる。滑り運動をしている微小管では先端部以外では平均としてダイニンのトルク発生と抵抗が釣り合っているが、微小管先端には常にダイニンが結合していない部位があり、一番先端近くのダイニンがトルク発生を行うと、先端部はダイニンのトルク発生の方向に微小に曲がり、微小管は左回りに曲がって滑り運動する、というメカニズムである(Figure 41)。このとき反時計周りに曲がり、起きるトルクはコークスクリュー運動を駆動するトルク発生の向きと同一であり、同様のトルクを起源として微小管のコークスクリュー運動と曲がり、起きるとして説明できる。もしこのようなメカニズムで曲がり、起きているなら、よりダイニンを低濃度でまいた条件では先端側の抵抗となるダイニンが存在しない部分が長くなることから、より曲がり、大きくなることが予想される。

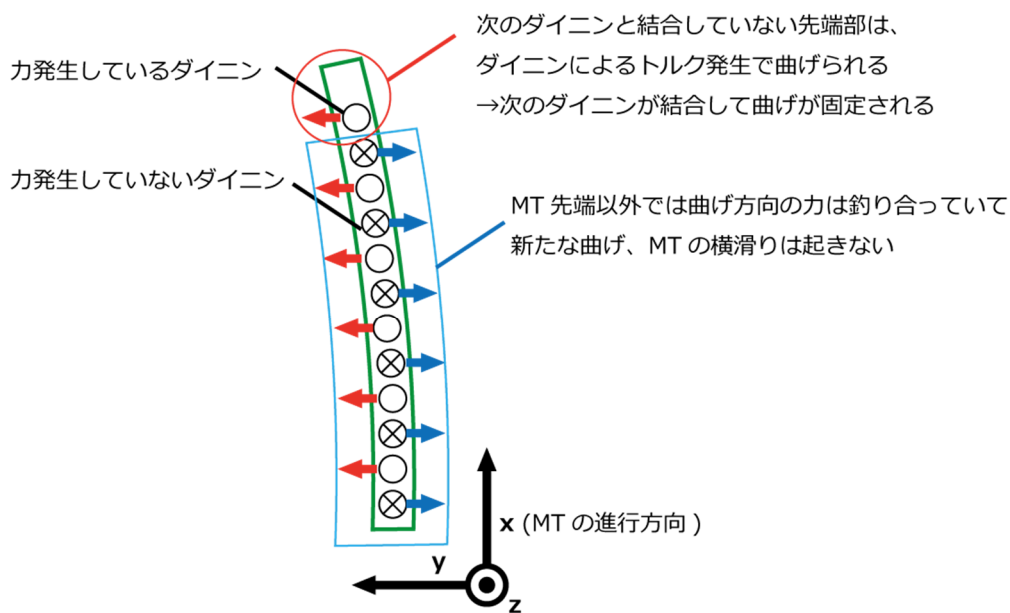


Figure 41 微小管先端付近のダイニンの力発生により、微小管の曲がり起きる仮説

微小管の殆どの部分では、結合して力発生していないダイニンによる負荷と、力発生しているダイニンによるトルクが釣り合っている。

微小管が曲がりながら滑り運動する現象は、先行研究でクラミドモナスにおける内腕ダイニン d, g において報告されている(Kikushima and Kamiya, 2008)。ただし、他のコークスクリュウ運動が見られている内腕ダイニンについては、このような曲がり観察されていない。また、微小管コークスクリュウ運動の回転方向は現在まで報告されている全てのダイニンで共通であるにも関わらず、内腕ダイニンにおいて報告されている曲がりの方向と本研究で観察された曲がりの方向は逆方向であった。このようなことから、今回の実験で見られた微小管の曲がり、先行研究において一部の内腕ダイニンで見られている現象とが同様のものであるかどうか、またこれらが微小管コークスクリュウ運動と同様のトルク発生によって起きる現象なのかについては不明な点も残っている。

1.4.3 外腕ダイニン及びそのサブユニットによる ATP 濃度依存的なピッチの変化

1.4.3.1 各サブユニットでの運動

テトラヒメナ繊毛軸糸から抽出した外腕ダイニンをキモトリプシンで部分分解し、陰イオン交換カラムで精製することで、二量体の $\beta\gamma$ サブユニットと、単量体の α サブユニットを得た。キモトリプシンでの処理ではキモトリプシン濃度、時間によって分解産物の長さが増えるため、SDS-Urea-PAGE で見られるそれぞれの重鎖のバンドと、カラム精製時のタンパク質溶出ピークが、処理の条件に応じてどのように推移するかを調べた。この結果を元に、できるだけ分解が弱く、かつ未分解の三頭の外腕ダイニンが混入せず精製できる条件を検討し、精製を行った。

これらのサブユニットについて、三頭の外腕ダイニンを用いた実験と同様にグラディエーションアッセイの三次元計測を行った。先行研究(Toba and Toyoshima, 2004; Vale and Toyoshima, 1989) では運動が見られなかった α サブユニットに関しては、ブロッキング剤及び流し入れるダイニン濃度を変えることで運動が見られたので、本研究では各サブユニット及び三頭の外腕ダイニンについてこの条件で実験を行った。

その結果、各サブユニットについても外腕ダイニンと同様に右ねじ方向のヨークスクリュー運動が観察された。単頭の α サブユニットでもヨークスクリュー運動が起きることから、トルク発生は三頭の特徴的な構造に起因するものではなく、外腕ダイニンの各頭部の持つ運動特性である可能性が高い。

1.4.3.2 ヨークスクリュー運動のピッチの ATP 濃度依存性

次に外腕ダイニンの三つの頭部がどの様に運動特性を知るために、各サブユニット及び三頭の外腕ダイニンについて 1~100 μM の範囲で ATP 濃度を変化させて実験を行った。その結果、それぞれについて異なるピッチの ATP 濃度依存的な変化が観察された。

三頭の外腕ダイニン及び単頭の α サブユニットは、ATP 濃度が下がるにつれてピッチが

長くなる、より長周期のヨークスクリュウ運動を駆動することがわかった。対して、二頭の $\beta\gamma$ サブユニットでは ATP 濃度の変化によるピッチの変化は見られなかった。単頭の α サブユニットと α 頭部を含む三頭の外腕ダイニンで低 ATP 濃度でのピッチの上昇が見られたことから、 α 頭部が β 頭部や γ 頭部とは異なる運動特性を有している可能性が示唆された。

ATP 濃度の変化によるヨークスクリュウ運動のピッチの変化が、どのような運動メカニズムによって起きるのかについて考察する。ヨークスクリュウ運動におけるピッチは、微小管の並進運動速度、回転運動速度との間に以下の関係がある。

$$\text{ピッチ}[\mu\text{m}/\text{回転数}] = \frac{\text{並進速度}[\mu\text{m}/\text{s}]}{\text{回転速度}[\text{回転数}/\text{s}]} \quad (1)$$

三頭の外腕ダイニン及び α サブユニットの運動における低 ATP 濃度条件下でのピッチの増大は、並進速度と回転速度の比が ATP 濃度によって変化し、低 ATP 濃度で並進速度の回転速度に対する比が大きくなったことを意味している。

等速で滑り運動する微小管には、運動方向へ与えられる力 F と速度 V 、抵抗係数 b の間に、力のつりあいから以下の式が成り立つ。

$$F = bV \quad (2)$$

$$V = F/b \quad (3)$$

本研究で計測されたヨークスクリュウ運動では、回転、並進の両方向にそれぞれ等速運動していた。回転方向と並進方向の速度を V_s 、 V_r 、微小管を駆動するダイニンが微小管の並進方向、回転方向に与える力をそれぞれ、 F_s 、 F_r 、並進方向、回転方向にかかる抵抗係数を b_s 、 b_r とおくと、(3)から並進方向、回転方向についてそれぞれ以下が成り立つ。

$$V_s = F_s/b_s \quad (4)$$

$$V_r = F_r/b_r \quad (5)$$

微小管に近接しているダイニンは、ATP の加水分解サイクルに従って結合状態が変化しているため、全てのダイニンが力発生しているわけではない。ダイニン 1 分子が微小管の並

進方向、回転方向に与える力をそれぞれ f_s 、 f_r とし、並進方向、回転方向に力を発生しているダイニンの個数を N とする。このとき、(4)、(5)は以下のように書ける。

$$V_s = N \cdot f_s / b_s \quad (6)$$

$$V_r = N \cdot f_r / b_r \quad (7)$$

また抵抗係数について詳しく考えると、これは微小管に結合している主に力発生していないダイニンにより微小管が受ける抵抗による。ダイニンをバネとみなせば、並進方向、回転方向のバネ定数を k_s 、 k_r 、並進方向と回転方向それぞれに対するダイニン分子の微小管への結合時間を t_s 、 t_r 、微小管に結合しているダイニンの数を M とすると、 b_s 、 b_r は以下のように書ける。

$$b_s = M \cdot k_s \cdot t_s \quad (8)$$

$$b_r = M \cdot k_r \cdot t_r \quad (9)$$

(6)(7)(8)(9)より、ピッチを P と置き(1)式は以下のように書きなおすことができる。

$$P = \frac{(N \cdot f_s)(M \cdot k_r \cdot t_r)}{(N \cdot f_r)(M \cdot k_s \cdot t_s)} \quad (10)$$

この式をもとに、ATP 濃度に依存してピッチが変化する要因を考察する。まず明らかに ATP 濃度に依存して変化するのは N 、 M であり、低 ATP 濃度では M が大きくなり高 ATP 濃度では N が大きくなる。しかし分子分母の N 、 M は共通であるため、ピッチはこれらの値に依存しないことがわかる。また f_s 、 f_r は一分子のダイニンが運動方向に出す力であり、これらがダイニンの構造変化によって生み出されているならば、ATP 濃度によらず一定であると考えられる。

したがって、 k_s と k_r もしくは t_s と t_r の比が ATP 濃度によって変化していると考えられる。それぞれが変化している場合の運動機構は、以下のようになっていると考えられる。

(A)バネ定数 k_s と k_r の比が変化している場合

k_s は微小管の長軸方向に対するダイニン分子の固さ、 k_r は微小管の長軸と垂直な方向に対

するダイニン分子の固さを表している。例えば ATP 濃度が下がるとダイニン分子がより回転方向に固い構造となるならば、ピッチが長くなる。

(B)微小管への結合時間 t_s と t_r の比が変化している場合

t_s と t_r は 1 つの運動サイクルの中では同一であり通常等しい値をとる。しかし、ダイニン分子が微小管の長軸方向にステップし微小管上の異なる結合部位に結合する時、ダイニンが微小管の長軸方向にステップした場合と微小管の長軸と垂直な方向にステップした場合で結合時間が異なるとすれば、 t_s と t_r は異なる値をとる。例えば ATP 濃度が下がると直進したときはより微小管上に長く結合するが、左右に運動したときはより結合時間が短くなるといった場合、ピッチが長くなる。

(A)(B)どちらの場合でも、ATP の加水分解サイクルとは別の部分でダイニン分子の物性が ATP 濃度に応じて変化することに起因すると考えられる。このような現象を起こす機構として、ダイニン分子の ATP 加水分解部位以外の ATP 結合部位による機能の調節が挙げられる。

ダイニン分子の頭部ドメインは 6 つの AAA モジュールによって構成されるが、このうち AAA1-AAA4 には ATP 結合部位である walker A モチーフが保存されている。このうち AAA1 がもつ walker A、walker B モチーフが、主に ATP 加水分解を担っているとされる。残りの ATP 結合部位のうち、細胞質ダイニンによる実験で AAA3 が運動機構に特に重要な役割を担うとされている。また軸糸ダイニンにおいては ADP の濃度を上げることでダイニンの運動活性があがることも報告されており、これは AAA1 以外の ATP 結合部位に ADP が結合することによると考えられている。

本研究での低 ATP 濃度条件では ATP 再生系試薬により ADP 濃度は常に低く保たれているため、低 ATP 濃度の条件では高 ATP 濃度の条件に比べ、ATP 結合部位が apo 状態(No ATP 状態)になっているダイニンの比率が多く、これによりダイニンが異なる構造をとっている可能性が高い。

このような ATP 加水分解部位以外の ATP 結合部位による調節機構については、ATP 再生系のない条件で、ADP 量を変化させる方法によりその影響を見積もることができると考えられる。ATP 結合部位による加水分解を伴わない調節機構はいまだ良くわかっていない。微小管の長軸に垂直な方向への力発生とこの ATP 結合部位による調節機構の関係については未だ報告がないため、これを調べることで、新たな知見が得られる可能性がある。

またこの調節機構は、ダイニンのプロセッシブな運動にも関わっている。AAA4 に変異を導入した細胞質ダイニンでは、ダイニン分子と微小管との結合力が増大し、高いプロセッシビティを示すことが報告されており、複数の頭部が協調的に運動する機構に一定の役割を持っていると考えられる。

1.4.4 2つのサブユニットの協調的な運動機構

低 ATP 濃度条件下第二人による微小管のコークスクリュウ運動のピッチの増加から、 α 頭部が他の頭部と異なる運動特性を持つことが示唆されたものの、これが三頭の外腕ダイニンの運動においてどのように機能しているのかは明らかではない。そこで、 α サブユニットと $\beta\gamma$ サブユニットがガラス面に共在する条件でグライディングアッセイを行い、これらが三頭の状態で存在する外腕ダイニン自体の運動との比較を行った。

1.4.4.1 二つのサブユニットが共在する条件でのピッチの ATP 濃度依存性

まず、二つのサブユニットが等モルで存在する条件で、1, 10, 100 μM でのコークスクリュウ運動を調べた。結果、図のようにこれらは α サブユニット単体での運動と非常に近いピッチの変化を示した。また、このピッチの値は三頭の外腕ダイニンのピッチの値とも異なっていた。もし三頭構造の外腕ダイニンにおいて各頭部が独立して運動している場合、外腕ダイニンによるコークスクリュウ運動のピッチは、 α サブユニット、 $\beta\gamma$ サブユニットが共在する条件でのピッチと同様になることが予想されるため、この結果は三頭構造を持つことで各

頭部の運動が何らかの協調をしていることを示唆している。

1.4.4.2 二つのサブユニットが混合比のコークスクリュウ運動への影響

また、 α サブユニットと $\beta\gamma$ サブユニットが等モルで共存する条件でのピッチがそれぞれ単独の条件での運動の平均値とならなかったことから、これらの頭部には単純な加算では説明できない運動特性の違いがある可能性がある。

特にコークスクリュウ運動に違いが見られたのは ATP 濃度 $1 \mu\text{M}$ の条件だったので、この ATP 濃度で α サブユニットと $\beta\gamma$ サブユニットの総数を変えずに混合比を変えて実験を行ったところ、より少量の α サブユニットでもピッチが α サブユニット単独の結果と近くなる、混合比に対して非線形なピッチの変化が見られた。

1.4.4.3 混合比による速度、ピッチの変化に関する考察

α サブユニットと $\beta\gamma$ サブユニットの運動の違いが、どのような特性の違いによるのかを、この混合比の変化に対する速度、ピッチの変化の実験結果から考察してみる。等速運動する微小管において、ATP の加水分解によってダイニンが発生する力(F)と結合するダイニンの抵抗による力(F_{drag})は釣り合っている。

$$F + F_{\text{drag}} = 0 \quad (11)$$

ここで F_{drag} は微小管の運動速度に比例するので、抵抗係数を b とすると以下のように書ける。

$$F - b \cdot V = 0 \quad (12)$$

このとき、ガラス面上のダイニンの性質によって、 F 及び b は異なる値をとる可能性がある。そこで、各サブユニットについてそれぞれが異なる場合を考えてみる。

(A)各サブユニットの力発生は変わらないが、抵抗が異なる場合

まず、各サブユニットが等しい力発生を行うが、微小管との結合による抵抗が異なる場合を考える。ここでダイニンの結合による抵抗は、微小管に作用する個々のダイニンによる抵抗の加算であり、二種のサブユニットが混在する条件では、それぞれの混合比に比例した抵抗がかかると考えられる。全体のダイニンに対する α の比率を a とおくと、 $\beta\gamma$ サブユニットの比率は $1-a$ で与えられるので、を α のみの条件での抵抗の値を b_α 、 $\beta\gamma$ のみの条件での抵抗を $b_{\beta\gamma}$ とすると、全体の抵抗 b は以下のように表せる。

$$b = b_\alpha \cdot a + b_{\beta\gamma} \cdot (1 - a) \quad (13)$$

ここで、 F が変動しないという仮定を踏まえると、 $\beta\gamma$ のみの条件での速度を $V_{\beta\gamma}$ とおいて、以下が成り立つ。

$$b_{\beta\gamma} \cdot V_{\beta\gamma} = b \cdot V \quad (14)$$

これを用いて(12), (13)より V について下のように表せる。

$$V = \frac{b_{\beta\gamma}}{b_\alpha \cdot a + b_{\beta\gamma} \cdot (1 - a)} V_{\beta\gamma} \quad (15)$$

ここで、 $\beta\gamma$ が与える抵抗に対する α が与える抵抗の比 $b_\alpha / b_{\beta\gamma}$ を r と置いて(14)を簡略化すると下の様に表せる。

$$V = \frac{1}{r \cdot a + (1 - a)} V_{\beta\gamma} \quad (16)$$

コークスクリュー運動が並進、回転の両方向に等速運動であったことから、(15)は、並進速度 V_{slid} 、回転速度 V_{rot} 、 $\beta\gamma$ が並進方向に与える抵抗に対する α が並進方向に与える抵抗の比 r_{slid} 、回転方向への抵抗 r_{rot} を用いて、両方向に同様に書ける。

$$V_{\text{slid}} = \frac{1}{r_{\text{slid}} \cdot a + (1 - a)} V_{\beta\gamma, \text{slid}} \quad (17)$$

$$V_{\text{rot}} = \frac{1}{r_{\text{rot}} \cdot a + (1 - a)} V_{\beta\gamma, \text{rot}} \quad (18)$$

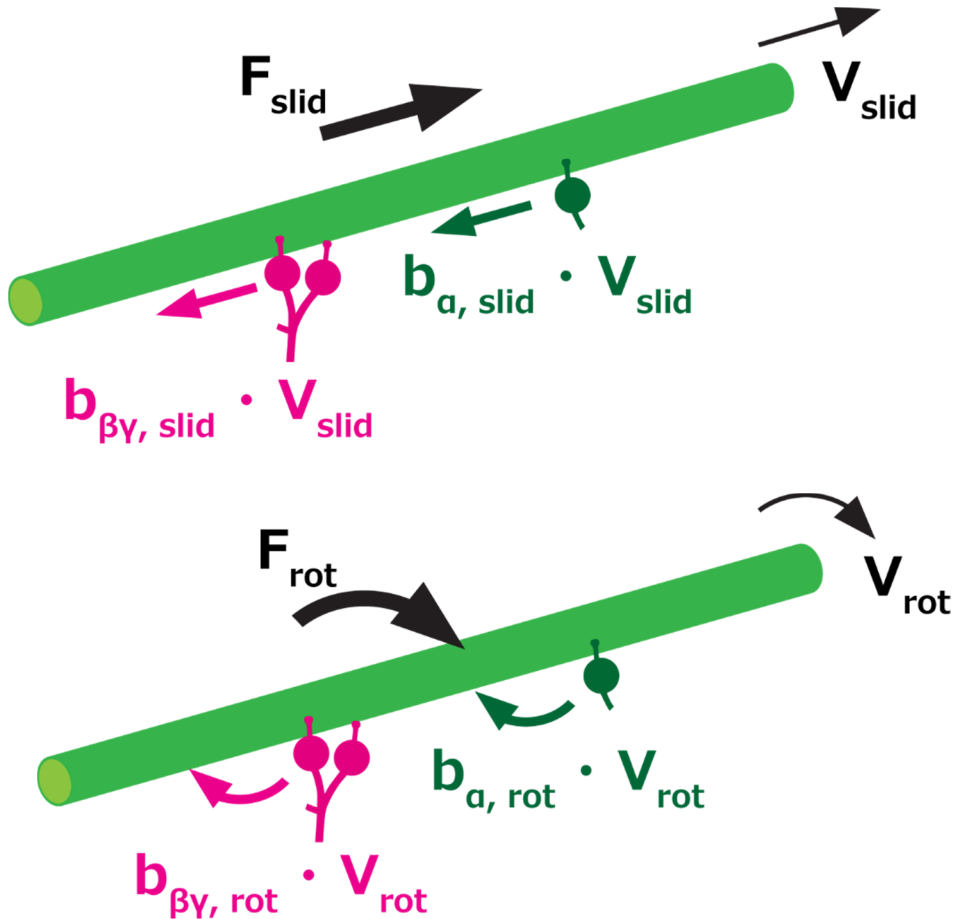


Figure 42 並進方向、回転方向に対するダイニンの力発生と抵抗

並進方向(上図)、回転方向(下図)について、それぞれの方向に対するダイニンの力発生と抵抗が釣り合っている。

(17)、(18)を用いて、 r_{slid} 、 r_{rot} 、を未知数として V_{slid} 及び V_{rot} について混合比 a と速度のグラフに対してフィッティングを行った。結果、 r_{slid} が 5.2 ± 1.9 、 r_{rot} が 12 ± 3.7 となり、実験結果に良くフィッティングされた。またピッチは(1)のように並進速度と回転速度で表せるので、 $\beta\gamma$ のみの条件でのピッチを $P_{\beta\gamma}$ と置き、(17)、(18)の式から以下のように書ける。

$$P = \frac{r_{\text{rot}} \cdot a + (1 - a)}{r_{\text{slid}} \cdot a + (1 - a)} P_{\beta\gamma} \quad (19)$$

この r_{slid} 、 r_{rot} に前述のフィッティングで求めた値を用いて、混合比 a とピッチのグラフ上に図示したところ、**Figure 43** の様に実験結果と良く一致した。

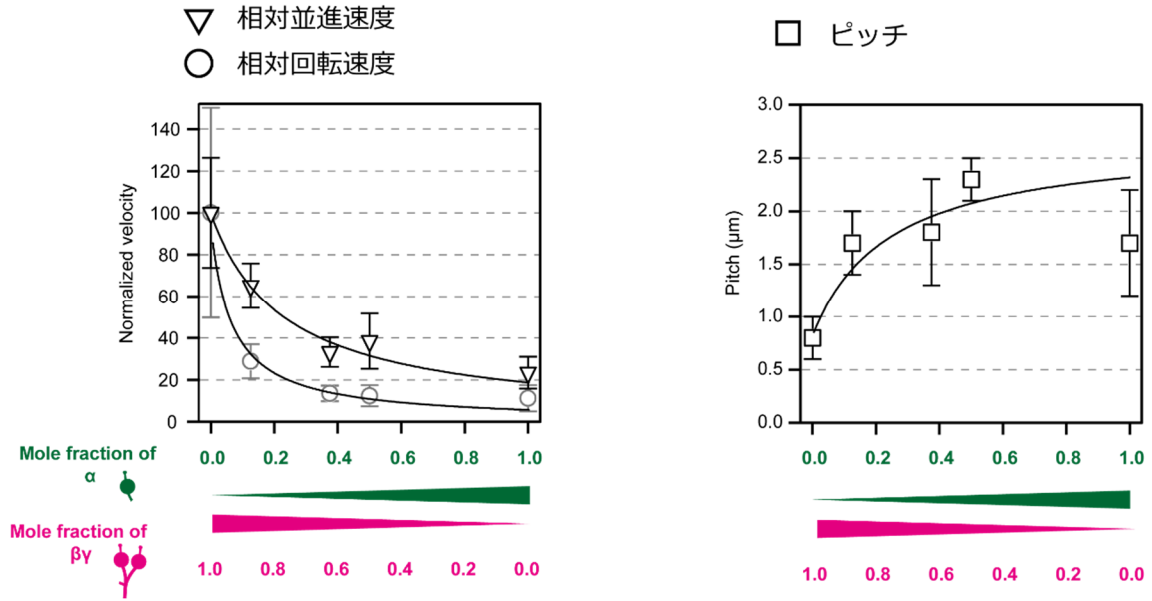


Figure 43 抵抗がサブユニットごとに異なる場合の速度とピッチに対するフィッティング

(17), (18)を用いて、並進速度、回転速度と混合比に対して解析ソフト Igor 上でフィッティングを行い、 r_{slid} 、 r_{rot} を求めた。速度には、 $\beta\gamma$ のみの条件での速度を 100 として規格化した相対値を用いた。横軸は全体のダイニンに対する α 、 $\beta\gamma$ サブユニットの比率。またピッチのグラフに対しては、速度のフィッティングで求めた r_{slid} 、 r_{rot} の値から計算した近似曲線を図示した。

このフィッティングによって求めた r は $\beta\gamma$ サブユニットが微小管に与える抵抗に対する α サブユニットが微小管に与える抵抗の比なので、これが 1 を大きく上回ったことは、ATP 濃度 $1 \mu\text{M}$ の条件において α サブユニットが $\beta\gamma$ サブユニットより微小管に対して強い負荷となっていることを示唆している。また、 r_{slid} に比べて r_{rot} が大きな値となっているため、 α

サブユニットによる負荷は、並進方向より回転方向により強くなっていると考えられる。

(B)各サブユニットの発生する力 F が異なる場合

次に、各サブユニットが微小管に与える抵抗 b は変わらないが、ダイニンによる力発生 F がサブユニットごとに異なる場合を考える。前述の抵抗に関する考察と同様に、各ダイニン分子が独立して運動している時、 F は各ダイニン分子が発生している力の加算であると考えられるので、ダイニン密度が同様であるなら、混合比が異なるときの F は各サブユニットのみの条件のときの力 F_α 及び $F_{\beta\gamma}$ の混合比に比例し、以下のように書ける

$$F = a \cdot F_\alpha + (1 - a) \cdot F_{\beta\gamma} \quad (20)$$

また(12)より、 b がサブユニットごとに変動しないならば、 V について以下が成り立つ。

$$\frac{V}{F} = \frac{V_{\beta\gamma}}{F_{\beta\gamma}} \quad (21)$$

このとき $\beta\gamma$ サブユニットの発生する力に対する α サブユニットの与える力の比 $F_\alpha / F_{\beta\gamma}$ を s と置くと、(20)、(21)より V が以下のように表せる。

$$V = \{a \cdot s + (1 - a)\} \cdot V_{\beta\gamma} \quad (22)$$

コークスクリュー運動が等速運動であることから、前項と同様に並進方向、回転方向のそれぞれについて成り立つので、並進方向に発生する力の比を s_{slid} 、回転方向に発生する力の比を s_{rot} とすると、並進方向、回転方向のそれぞれについて以下のように表せる。

$$V_{\text{slid}} = \{a \cdot s_{\text{slid}} + (1 - a)\} \cdot V_{\beta\gamma, \text{slid}} \quad (23)$$

$$V_{\text{rot}} = \{a \cdot s_{\text{rot}} + (1 - a)\} \cdot V_{\beta\gamma, \text{rot}} \quad (24)$$

(23)、(24)を用いて、 s_{slid} 及び s_{rot} を未知数として、前項同様に並進、回転速度と α サブユニットの混合比 a に対して解析ソフト Igor 上でフィッティングを行った結果、 $s_{\text{slid}} = 0.3 \pm 0.1$ 、 $s_{\text{rot}} = 0.4 \pm 0.3$ となった。また、このときピッチは以下のように表せる。

$$P = \frac{a \cdot s_{\text{slid}} + (1 - a)}{a \cdot s_{\text{rot}} + (1 - a)} P_{\beta\gamma} \quad (25)$$

(25)にフィッティングで求めた s_{slid} 、 s_{rot} の値を入れることで、前項同様にピッチに対しての近似曲線を **Figure 44** の様に示した。

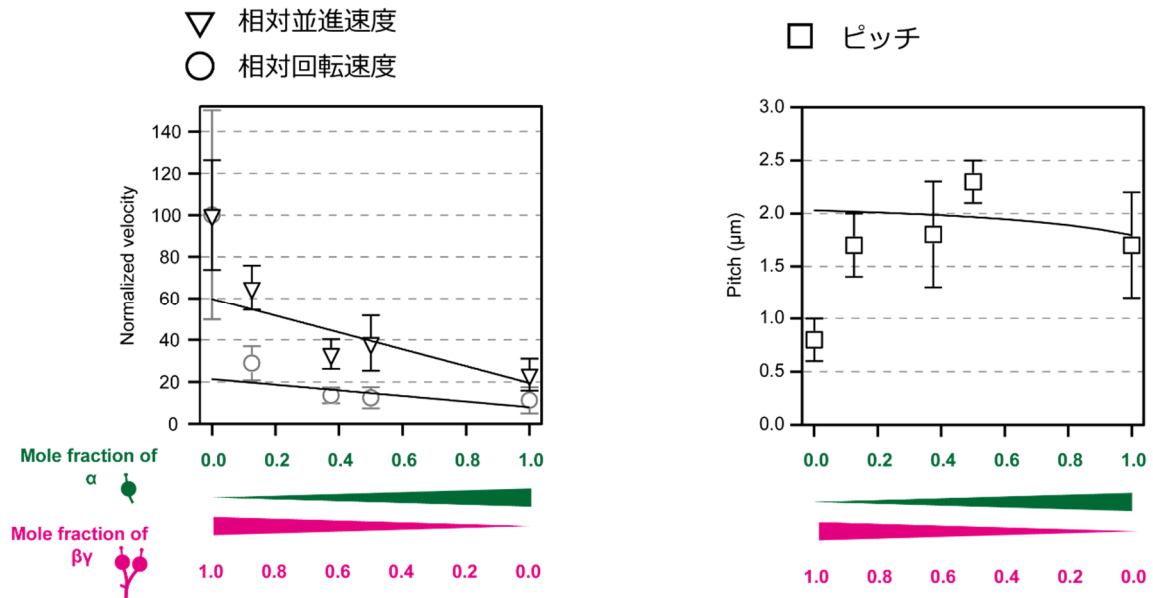


Figure 44 力発生がサブユニットごとに異なる場合の速度とピッチに対するフィッティング

(23)、(24)を用いて、並進速度、回転速度と混合比に対して解析ソフト Igor 上でフィッティングを行い、 s_{slid} 、 s_{rot} を求めた。速度には、 $\beta\gamma$ のみの条件での速度を 100 として規格化した相対値を用いた。横軸は全体のダイニンに対する α 、 $\beta\gamma$ サブユニットの比率。またピッチのグラフに対しては、速度のフィッティングで求めた s_{slid} 、 s_{rot} の値から計算した近似曲線を図示した。

結果、(A)の抵抗が異なる場合とは違い、このモデルでは α サブユニットが少量混在しただけで大きく速度が変わる実験結果のような傾向は再現されなかった。(23)及び(24)が s の値によらず速度 V が混合比 a に比例するため、これはフィッティングの条件などによらないと考えられる。

(A)及び(B)の結果から、ATP 濃度 1 μM の条件において、各サブユニットの抵抗が異なるというモデルで、混合比によって非線形に速度、回転速度が変化する実験結果を再現することができた。またこの結果は、各サブユニットの抵抗が等しく、力発生のみが異なるというモデルでは再現できなかった。この考察からは、各サブユニットの力発生が異なる可能性は全く否定できないが、少なくとも各サブユニットの抵抗が異なることが大きな運動特性の違いである可能性が示唆された。

このような運動特性の違いは、ATP 濃度依存的なピッチの変化について考察したように、ATP 濃度の変化による AAA2-4 のヌクレオチド状態の変化による構造変化に起因する可能性がある。今後の研究では、テトラヒメナの相同組み替え技術によりこの部位に特異的に変異を導入することで、実際に運動がどのように変化するか調べる事ができると考えられる。

また、 α 頭部の異なる運動特性の要因としては α 頭部のストークに特異的に結合するタンパク質 LC1 などが寄与している可能性がある。これは真核生物に広く保存されており、このストークへの結合によって α 頭部の MTBD が強結合状態となることが最近の研究で示唆されている (Ichikawa et al., 2015)。

1.4.5 本研究のまとめと今後の展望

本研究により、テトラヒメナの外腕ダイニンが微小管の長軸方向のみならず長軸に垂直な方向にも力発生していることが明らかになった。このようなトルクは軸糸内腕ダイニンにおいても従来から知られていたものであるが、軸糸ダイニンのほぼ全てがこのようなねじれの力を発生している事は、今後の繊毛運動の周期運動メカニズムを考える上で重要な要素になると考えている。

また、キモトリプシンでの部分分解を利用して精製したサブユニットの実験から、このトルク発生の運動特性を調べる事で各頭部がことなる運動特性を持つ事が明らかとなった。低 ATP 濃度で並進方向と回転方向に異方的に運動特性が変化するという結果は、主な加水

分解部位でない ATP 結合部位が構造に与える変化と合わせて、ダイニンの運動を理解する上で重要だと考えられる。

しかし本研究で明らかとなったような繊毛運動の運動素子についての特性が、実際に繊毛運動にどのように寄与しているかはわかっていない。これを理解するためには、ダイニンの変異株などの繊毛運動の計測と合わせて、運動素子の特性の変化が実際の繊毛運動にどのように影響するのかについて調べる必要がある。

第2章 三次元計測によるテトラヒメナ繊維毛打メカニズムの解明

本章の内容については、後日の出版を予定しているため省略する。

総括

本研究では、第 1 章では繊毛打運動を駆動する軸糸外腕ダイニンの運動素子としての特性について、新たな実験系を構築することで三次元的な運動の計測を行った。この三次元的な計測の結果から、外腕ダイニンについては 3 つの頭部間の運動特性の違いについて新たな知見を得ることができた。第 2 章で明らかとなった内容に関しては、本要約では省略する。

立体的な構造を持ち、三次元の空間で活動する細胞や細胞器官の機能を理解する上で、本研究で調べた三次元的な運動の正確な計測は欠かせないものだが、その難しさから従来は二次元的な計測に基づいて間接的に議論を行うことしかできなかった。本研究で三次元的な計測を行う実験系を構築し、実際にその正確な運動を計測できたことは、今後の研究に大いに役立つと考えられる。

しかしながら、本研究で得られた運動素子の特性と、繊毛打運動の波形、速度が、実際にどのように結びついているのかは未だ明らかになっていない。今回作製が上手く行かなかった軸糸ダイニンの一部を欠損する変異体での繊毛打運動計測を行うことができれば、繊毛打運動に多種の軸糸ダイニンがどのように寄与しているかについてさらに重要な知見を得ることが期待される。また、特定の軸糸ダイニンが繊毛打運動に特徴的な寄与をしていることがわかれば、その運動特性を改めて調べることで、ダイニンのどのような運動特性が繊毛打運動を駆動しているのか知ることができると考えられる。

参考文献

- Asai, D.J., Rajagopalan, V., Wilkes, D.E., 2009. Dynein-2 and ciliogenesis in *Tetrahymena*. *Cell Motil. Cytoskeleton* 66, 673–7.
- Asai, D.J., Wilkes, D.E., 2004. The dynein heavy chain family. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51, 23–9.
- Bell, W.E., Hallworth, R., Wyatt, T.A., Sisson, J.H., 2015. Use of a novel cell adhesion method and digital measurement to show stimulus-dependent variation in somatic and oral ciliary beat frequency in *Paramecium*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 62, 144–8.
- Busch, C., Vogt, A., Mochizuki, K., 2010. Establishment of a Cre/loxP recombination system for N-terminal epitope tagging of genes in *Tetrahymena*. *BMC microbiology* 10.
- Carter, A.P., Cho, C., Jin, L., Vale, R.D., 2011. Crystal structure of the dynein motor domain. *Science* 331, 1159–65.
- Corkidi, G., Taboada, B., Wood, C.D., Guerrero, A., Darszon, A., 2008. Tracking sperm in three-dimensions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373, 125–9.
- Gibbons, B., Gibbons, I., 1976. Functional recombination of dynein 1 with demembrated sea urchin sperm partially extracted with KCl. *Biochemical and biophysical research Communications* 73, 1–6.
- Gibbons, B.H., Gibbons, IR, 1972. Flagellar movement and adenosine triphosphatase activity in sea urchin sperm extracted with Triton X-100. *The Journal of Cell Biology* 54, 75–97.
- Gibbons, B.H., Gibbons, I., 1973. The effect of partial extraction of dynein arms on the movement of reactivated sea-urchin sperm. *Journal of Cell Science* 13, 337–357.
- Gibbons, I.R., Rowe, A.J., 1965. Dynein: A Protein with Adenosine Triphosphatase Activity from Cilia. *Science* 149, 424–6.

Hirokawa, N., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., 2006. Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell* 125, 33–45.

Ichikawa, M., Saito, K., Yanagisawa, H.-A.A., Yagi, T., Kamiya, R., Yamaguchi, S., Yajima, J., Kushida, Y., Nakano, K., Numata, O., Toyoshima, Y.Y., 2015. Axonemal dynein light chain-1 locates at the microtubule-binding domain of the γ heavy chain. *Mol. Biol. Cell* 26, 4236–47.

Ishikawa, T., 2015. Cryo-electron tomography of motile cilia and flagella. *Cilia* 4, 3.

Jinkerson, R.E., Jonikas, M.C., 2015. Molecular techniques to interrogate and edit the *Chlamydomonas* nuclear genome. *Plant J.* 82, 393–412.

Johnson, K.A., Wall, J.S., 1983. Structure and molecular weight of the dynein ATPase. *J. Cell Biol.* 96, 669–78.

Kagami, O., Kamiya, R., 1992. Translocation and rotation of microtubules caused by multiple species of *Chlamydomonas* inner-arm dynein. *Journal of Cell Science* 103, 653–664.

Kamimura, S., Takahashi, K., 1981. Direct measurement of the force of microtubule sliding in flagella. *Nature* 293, 566–8.

Kamiya, R., 1988. Mutations at twelve independent loci result in absence of outer dynein arms in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol* 107, 2253–2258.

Kamiya, R., 1995. Exploring the function of inner and outer dynein arms with *Chlamydomonas* mutants. *Cell Motil. Cytoskeleton* 32, 98–102.

Kataoka, K., Schoeberl, U.E., Mochizuki, K., 2010. Modules for C-terminal epitope tagging of *Tetrahymena* genes. *J. Microbiol. Methods* 82, 342–6.

Kikushima, K., Kamiya, R., 2008. Clockwise translocation of microtubules by flagellar inner-arm dyneins in vitro. *Biophys. J.* 94, 4014–9.

King, S.M., 2000. The dynein microtubule motor. *Biochim. Biophys. Acta* 1496, 60–75.

King, S.M., 2016. Axonemal Dynein Arms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8.

Liu, Z., Takazaki, H., Nakazawa, Y., Sakato, M., Yagi, T., Yasunaga, T., King, S.M., Kamiya, R., 2008. Partially functional outer-arm dynein in a novel *Chlamydomonas* mutant expressing a truncated gamma heavy chain. *Eukaryotic Cell* 7, 1136–45.

Mashemer, H., 1972. Ciliary activity and the origin of metachrony in *Paramecium*: effects of increased viscosity. *Journal of Experimental Biology* 57, 239–259.

Mogami, Y., Pernberg, J., Machemer, H., 1992. Ciliary beating in three dimensions: steps of a quantitative description. *Journal of mathematical biology* 30, 215.

Mussgnug, J., 2015. Genetic tools and techniques for *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Microbiol Biot* 99, 5407–5418.

Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., 1998. Randomization of left–right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 95, 829–837.

Okada, Y., Takeda, S., Tanaka, Y., Belmonte, J., 2005. Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. *Cell* 121, 633–644.

Pigino, G., Maheshwari, A., Bui, K.H., Shingyoji, C., Kamimura, S., Ishikawa, T., 2012. Comparative structural analysis of eukaryotic flagella and cilia from *Chlamydomonas*, *Tetrahymena*, and sea urchins. *J. Struct. Biol.* 178, 199–206.

Poole, C., Flint, M., Beaumont, B., 1985. Analysis of the morphology and function of primary cilia in connective tissues: a cellular cybernetic probe? *Cell motility* 5, 175–193.

Rajagopalan, V., Wilkes, D.E., 2016. Evolution of the Dynein Heavy Chain Family in Ciliates. *J. Eukaryot. Microbiol.* 63, 138–41.

Sakakibara, H., Takada, S., King, S.M., Witman, G.B., Kamiya, R., 1993. A Chlamydomonas outer arm dynein mutant with a truncated beta heavy chain. *J. Cell Biol.* 122, 653–61.

Sartori, P., Geyer, V.F., Howard, J., Jülicher, F., 2016. Curvature regulation of the ciliary beat through axonemal twist. *Phys Rev E* 94, 042426.

Schmidt, H., Carter, A.P., 2016. Review: Structure and mechanism of the dynein motor ATPase. *Biopolymers* 105, 557–67.

Segal, R., Huang, B., Ramanis, Z., 1984. Mutant strains of *Chlamydomonas reinhardtii* that move backwards only. *The Journal of cell biology* 98, 2026–2034.

Shingyoji, C., Murakami, A., Takahashi, K., 1977. Local reactivation of Triton-extracted flagella by iontophoretic application of ATP. *Nature* 265, 269–70.

Sugino, K., Naitoh, Y., 1982. Simulated cross-bridge patterns corresponding to ciliary beating in *Paramecium*. *Nature* 295, 609–611.

Takada, S., Sakakibara, H., Kamiya, R., 1992. Three-Headed Outer Arm Dynein from *Chlamydomonas* That Can Functionally Combine with Outer-Arm-Missing Axonemes. *Journal of biochemistry* 111, 758–62.

Teunis, P.F., Machemer, H., 2009. Analysis of three-dimensional ciliary beating by means of high-speed stereomicroscopy. *Biophysical Journal* 67, 381–394.

Toba, S., Toyoshima, Y.Y., 2004. Dissociation of double-headed cytoplasmic dynein into single-headed species and its motile properties. *Cell Motil. Cytoskeleton* 58, 281–9.

Toyoshima, Y., 1987a. Chymotryptic digestion of *Tetrahymena* ciliary dynein. II. Pathway of the degradation of 22S dynein heavy chains. *The Journal of cell biology* 105, 897–901.

Toyoshima, Y., 1987b. Chymotryptic digestion of *Tetrahymena* 22S dynein. I.

Decomposition of three-headed 22S dynein to one-and two-headed particles. *The Journal of cell biology* 105, 887–895.

Ueno, H., Ishikawa, T., Bui, K.H., Gonda, K., Ishikawa, T., Yamaguchi, T., 2012. Mouse respiratory cilia with the asymmetric axonemal structure on sparsely distributed ciliary cells can generate overall directional flow. *Nanomedicine* 8, 1081–7.

Vale, R., Toyoshima, Y., 1989. Microtubule translocation properties of intact and proteolytically digested dyneins from *Tetrahymena* cilia. *The Journal of cell biology* 108, 2327–34.

Vale, R.D., Toyoshima, Y.Y., 1988. Rotation and translocation of microtubules in vitro induced by dyneins from *Tetrahymena* cilia. *Cell* 52, 459–69.

Walczak, C.E., Nelson, D.L., 1994. Regulation of dynein-driven motility in cilia and flagella. *Cell Motil. Cytoskeleton* 27, 101–7.

Wood, C.R., Hard, R., Hennessey, T.M., 2007. Targeted gene disruption of dynein heavy chain 7 of *Tetrahymena thermophila* results in altered ciliary waveform and reduced swim speed. *J. Cell. Sci.* 120, 3075–85.

Woolley, D., Vernon, G., 2001. A study of helical and planar waves on sea urchin sperm flagella, with a theory of how they are generated. *Journal of Experimental Biology* 204, 1333–45.

Yajima, J., Mizutani, K., Nishizaka, T., 2008. A torque component present in mitotic kinesin Eg5 revealed by three-dimensional tracking. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 1119–21.

Yamamoto, R., Hirono, M., Kamiya, R., 2010. Discrete PIH proteins function in the cytoplasmic preassembly of different subsets of axonemal dyneins. *The Journal of Cell Biology* 190, 65–71.

Yoshihara, S., Hamada, H., 2014. Roles of cilia, fluid flow, and Ca²⁺ signaling in breaking of left–right symmetry. *Trends Genet* 30, 10–17.

謝辞

本研究を行うにあたり、矢島潤一郎先生には科学的なアドバイスのみならず、研究の進め方から研究室の運営のことまで含め根気強く指導して頂きありがとうございました。矢島研究室で最初の学生として後輩達の模範となるような研究はなかなか出来ませんでした。不出来な私に最後まで丁寧に指導して頂いたことに、誠に感謝しています。

また豊島陽子教授、小林琢也博士にはテトラヒメナやダイニンに関わることのみならず、広く生物、物理に関する重要なアドバイス、実験の指導をして頂き、ありがとうございました。

豊島研究室の卒業生、市川博士には、テトラヒメナの形質転換の指導をして頂き、ありがとうございました。

矢島研究室の助教、須河光弘博士には、三次元位置計測光学系などの計測技術について協力して頂き、ありがとうございました。

その他矢島研究室、豊島研究室の皆様には、日々の研究、実験について様々な協力をして頂き、ありがとうございました。