

細胞質ダイニンの制御機構に関する研究
Studies on Regulatory Mechanism of Cytoplasmic Dynein

鳥澤 嵩征
Takayuki Torisawa

東京大学大学院 総合文化研究科
広域科学専攻 生命環境科学系

目次

略語.....	6
序章.....	8
第1章 細胞質ダイニンの自己制御機構について.....	15
1.1 序論.....	15
1.2 実験手法.....	17
1.2.1 タンパク質の発現精製, および蛍光標識.....	17
1.2.1.1 ヒト細胞質ダイニン組換え体の遺伝子構築.....	17
1.2.1.2 ヒト細胞質ダイニン組換え体の精製.....	19
1.2.1.3 チューブリンの精製, 蛍光標識, および微小管, 極性微小管の重合.....	20
1.2.1.4 ブタ脳からの天然細胞質ダイニンの精製.....	21
1.2.1.5 キネシンの精製.....	21
1.2.1.6 酵母細胞質ダイニン組換え体の精製.....	21
1.2.2 DNA ナノチューブダイニン複合体の作製.....	22
1.2.2.1 DNA ナノチューブの設計および構築.....	22
1.2.2.2 モータータンパク質のDNA ナノチューブへの結合.....	23
1.2.2.3 ゲルシフトアッセイ.....	24
1.2.3 顕微鏡観察および解析.....	25
1.2.3.1 ベンジルグアニン化量子ドットの作製.....	25
1.2.3.2 分子および多分子のモータータンパク質の運動観察.....	25
1.2.3.3 微小管滑り運動観察.....	27
1.2.3.4 光ピンセットの構築.....	28
1.2.3.5 ダイニン分子のビーズへの吸着.....	30
1.2.3.6 光ピンセットによるダイニンの最大力, および力学応答の測定.....	30
1.2.4 定常状態におけるATP加水分解活性の測定.....	31
1.2.5 電子顕微鏡観察および画像処理.....	32

1.3 実験結果.....	34
1.3.1 全長細胞質ダイニン 1 分子の運動の性質.....	34
1.3.1.1 全長ダイニン 1 分子が微小管上で示す拡散運動.....	34
1.3.1.2 微小管滑り運動観察および力測定によるダイニンの活性の確認.....	38
1.3.1.3 ブタ脳から精製した天然ダイニンによる拡散運動との比較.....	39
1.3.2 多分子の全長ヒト細胞質ダイニンが示す一方向性運動.....	40
1.3.2.1 量子ドット上で複数分子化したダイニンの一方向性運動.....	40
1.3.2.2 DNA ナノチューブに結合した複数ダイニンの一方向性運動.....	41
1.3.3 拡散的運動とダイニンのヌクレオチド条件の関係.....	44
1.3.4 拡散的な状態に特徴的なダイニンの形態.....	46
1.3.4.1 ダイニンの形態および微小管上での振舞いとヌクレオチド状態の関係.....	46
1.3.4.2 電子顕微鏡から得られたスタック構造と結晶構造の比較.....	48
1.3.5 尾部を短縮したダイニン組換え体の微小管上での振舞いおよび形態.....	50
1.3.6 頭部間の相互作用を制御したダイニン組換え体の微小管上での振る舞い及び形態.....	53
1.3.7 2分子のダイニンの運動が示す自己阻害の解除.....	55
1.3.8 ダイニン頭部が示す力学応答.....	57
1.4 考察.....	62
1.4.1 自己阻害状態の構造と機能.....	62
1.4.2 自己阻害状態の形成と解除.....	63
1.4.3 生体内における自己阻害状態の役割.....	63
第2章 LIS1 および NDEL1 による細胞質ダイニンの運動制御機構.....	67
2.1 序論.....	67
2.2 実験手法.....	70
2.2.1 LIS1 および NDEL1 の組換えタンパク質のクローニング, 発現および精製.....	70
2.2.1.1 大腸菌発現系による NDEL1 の 2 つの断片(NN, NC)の発現, 精製.....	70
2.2.1.2 昆虫細胞系による LIS1, NDEL1 全長, および N 末端除去 LIS1 の発現, 精製.....	71

2.2.3 密度勾配遠心およびゲルろ過を用いた分子量決定.....	72
2.2.4 密度勾配遠心によるダイニンとの結合実験.....	72
2.2.5 G S Tプルダウンアッセイ.....	73
2.3 実験結果.....	73
2.3.1 組換えタンパク質の発現と精製.....	73
2.3.2 組換えタンパク質のオリゴマー状態.....	74
2.3.3 タンパク質間相互作用の確認.....	75
2.3.4 NDEL1のC末端側領域によるダイニンの微小管からの解離.....	77
2.3.5 LIS1が起こすダイニン運動機能の障害のNDEL1N末側領域による回復.....	81
2.3.6 LIS1によるダイニンの運動機能障害に対するLIS1の二量体化の寄与.....	82
2.4 考察.....	85
総括.....	88
参考文献.....	90
付録：DNAナノチューブに使用したオリゴDNA配列.....	102

略語

a.a. , amino acid

AAA, ATPases associated with various cellular activities

ACTN, actinin

ADP, adenosine diphosphate

AMPPNP, adenosine 5'-(β - γ -imido)triphosphate

ATP, adenosine triphosphate

a.u. , arbitrary unit

BSA, bovine serum albumin

DDS, Diphenyldimethoxysilane

DTT, dithiothreitol

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

EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA, ethyleneglycolbis(2-aminoethyl ether)tetraacetic acid

FRET, Fluorescence resonance energy transfer

GFP, green fluorescent protein

GST, glutathione S-transferase

IPTG, isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside

LDS, lithium dodecyl sulfate

LIS1, lissencephaly 1

NDEL1, nuclear distribution gene E homolog (*A.nidulans*)-like 1

MAPs, microtubule associated proteins

MSD, mean square displacement

MT, microtubule

MTBD, Microtubule Binding Domain

PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis

PCR, polymerase chain reaction

PEG, polyethylene glycol

PEI, Polyethyleneimine

Pi, phosphate

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

PMSE, Phenylmethylsulfonyl fluoride

SBP, streptavidin-binding peptide

S.D., standard deviation

SDS, sodium dodecyl sulfate

Sulfo-NHS, N-hydroxysulfosuccinimide

TIRFM, total internal reflection fluorescence microscopy

Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane

Vi, vanadate

序章

細胞質ダイニンとは

生命が備える重要な特徴の一つとして、“自律的な運動”を挙げることができる。単細胞生物や動物の個体運動は当然のこととして、植物においてもその内部では種々の物質の絶え間ない輸送が行われており、生命現象と運動は切っても切り離せない関係にある。生体分子モーターは、このような運動をタンパク質レベルのミクロな階層から担っている分子であり、一般に ATP の加水分解から発生する化学エネルギーや生体膜の内外の電気化学的勾配を利用して力学的エネルギーを生み出すことによって駆動する。これまでに、その運動の様式から大きく分けて、レールとなる構造体の上を直線的に運動するリニアモーターと、回転運動を引き起こす回転モーターの 2 種類の存在が確認されている。リニアモーターとしては、DNA/RNA ポリメラーゼやミオシン、キネシン、ダイニンといった分子があり、回転モーターとしては真正細菌の鞭毛モーターや F_1 -ATP 合成酵素などが知られている。リニアモーターのうちミオシン、キネシン、そして本研究の主たる対象となるダイニンの 3 種は、アクチンや微小管といった細胞骨格上を運動するモーターであり、細胞の運動や細胞内の物質輸送、さらに細胞分裂など、多岐にわたる重要な生体運動に関わっている[1]。

細胞骨格系モーターのうち、ミオシンやキネシンはともに G タンパク質から進化したと考えられており、これらのスーパーファミリーの酵素反応の核となる部分の構造に関しては類似点が多い[2, 3]。それに対して、ダイニンは AAA+ (ATPases associated with various cellular activity) スーパーファミリーに属するタンパク質であり[4]、AAA+スーパーファミリーに特徴的なリング状の構造を持つ[5-7](図 1)。ダイニンは細胞骨格の微小管の上をマイナス端方向に運動するモーターであることが知られており[8, 9]、真核生物の鞭毛や繊毛の運動の駆動に関与する軸糸ダイニンと、細胞質内で機能する細胞質ダイニンの二つに大別される[10]。さらに細胞質ダイニンには、細胞内での輸送や細胞分裂に関わる 1 型と繊毛内輸送に関わる 2 型が存在している[11]。以下本論文では、とくに断りが無い場合ダイニンと記した場合は細胞質ダイニン 1 型を指すものとする。

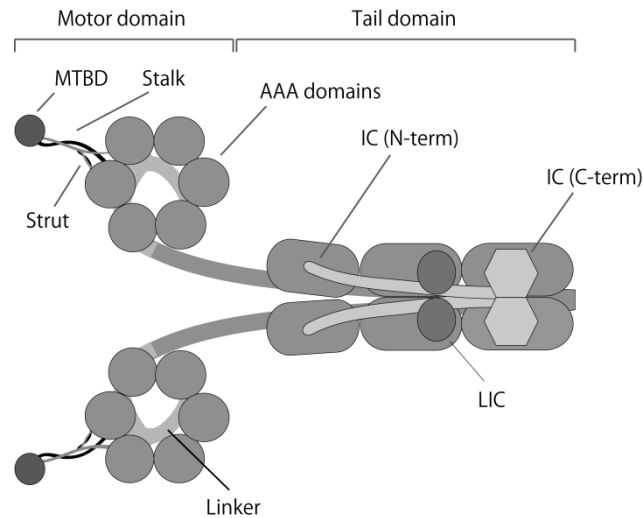


図1. 細胞質ダイニン1型の構造

細胞質ダイニンの重鎖は一本のポリペプチドから構成され、N末端側の尾部ドメイン (Tail domain) に中間鎖 (IC) や中間軽鎖 (LIC), 軽鎖 (LC) などが結合している。C末端側は6つのAAAドメインによって形成されるリング構造やコイルドコイル構造からなるストーク、ストラットおよび微小管結合領域 (MTBD) を形成している。また尾部と頭部の間の領域にはリンカーと呼ばれる構造が存在している。

細胞質ダイニンの構造と運動機構の関係

細胞質ダイニンは重鎖(Heavy Chain; HC)に中間鎖(Intermediate Chain; IC), 中間軽鎖(Light Intermediate Chain; LIC), 軽鎖(Light Chain; LC)などが結合して構成されるタンパク質複合体であり[12], 重鎖は前述のように6つのAAAドメインからなるリング構造を持っている。6つのAAAドメインのうち、N末側から数えて1番目、3番目、4番目のAAAドメイン (AAA1, AAA3, AAA4) には ATP の結合および加水分解部位が存在している。一方、2番目のAAAドメイン (AAA2) は ATP を結合することができるが、加水分解能を持っていない[6]。加水分解能を有するAAAドメインのうち、AAA1でのATP加水分解のみが運動にとって必須であり、残りの3つのドメインは運動の制御に関係しているといわれている[13-15]。AAA4とAAA5の間からはストークと呼ばれるコイルドコイル状の構造が突き出しており、この先端に存在する微小管結合ドメインでダイニンは微小管と相互作用する[5, 16]。また、AAA5からはストラットと呼ばれるL字型のコイルドコイル構造が突き出しており、その先端がストークとヘリックスバンドルを形成している[6]。このストラットは、AAAリングの片側の面に存在するC末ドメインと共にAAA1

での加水分解による構造変化と微小管結合ドメインの構造変化を連携させる役割を担っている可能性が示唆されており[6], ATP の加水分解部位と微小管との結合部位が構造上大きく離れているダイニンがどのように ATP の加水分解エネルギーを利用して運動を引き起こしているのかというメカニズムを解き明かすための重要な鍵となると考えられている. C 末ドメインが存在する面の逆側にはリンカーと呼ばれる領域が存在しており, AAA リングに横たわるように配座して AAA1 へと繋がっている[6, 7]. この部分が ATP の加水分解サイクルに対応して AAA リングに対する相対位置を変化させる (パワーストローク) ことによってダイニンの運動が生み出されていると考えられている(図 2; [16, 17]).

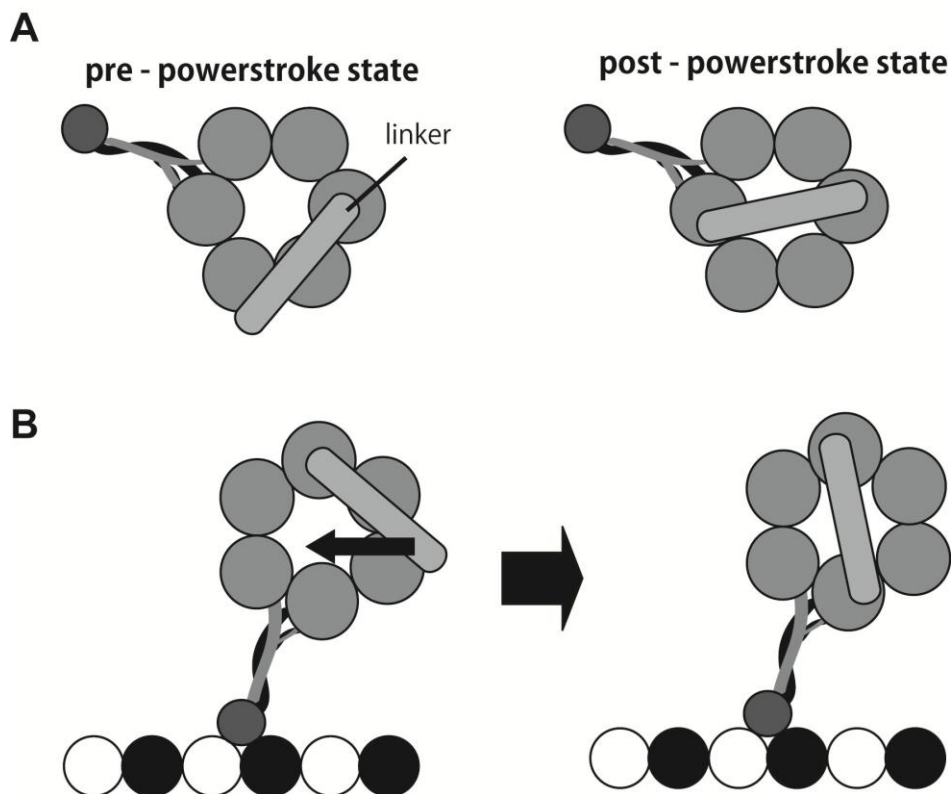


図 2. リンカーの構造変化と運動の関係

(A) AAA リングに対するリンカーの相対位置の変化. リンカーは AAA1 に接続する領域であり, AAA1 における加水分解に伴って AAA リング上でその配座を大きく変化させる. この構造変化がパワーストロークであると考えられている. (B) パワーストロークと運動の関係についての現在のモデル. 白丸と黒丸が連なった構造は微小管を表し, 微小管に結合した状態でダイニンがパワーストロークすることで運動を引き起こす力の発生が起こる様子を表している.

細胞内でのダイニンの機能と制御

真核生物の細胞内におけるダイニンの機能は、オルガネラやRNAなどの様々な荷物の細胞内での輸送や、有糸分裂時の紡錘体の配置や染色体分離、神経上皮における細胞運動など、非常に多岐にわたっている[18-24]。このような多様な働きにもかかわらず、ダイニンは1つの遺伝子によってコードされたものが細胞周期全体を通じて活動しており[25]、同じ微小管上を運動するモータータンパク質であるキネシンが細胞周期と機能に応じて働く15のサブファミリーからなるスーパーファミリーを形成していること[26]と著しい対照を成している。例えば、ヒトにおいては合計45種にもおよぶ多様なキネシンの遺伝子が確認されており、mRNA スプライシングによるアイソフォームの存在も合わせると、タンパク質としてはさらに多くの種類が存在していると考えられている[26]。これらのうち、ダイニンと同じく微小管のマイナス端方向に運動する唯一の kinesin-14 ファミリーに属するキネシンは、分裂期においてのみの発現、機能が支配的であるため、間期におけるマイナス端方向への輸送および力発生のほとんど全てをダイニン1種類が担っていることになる。

一方で、細胞質ダイニンには多くの制御タンパク質が存在していることが知られており[27]、ダイニンにおいては、キネシンのようにモーターの種類を増やすことで多機能性を実現しているのではなく、制御タンパク質として多種多様な分子を用意することで様々な場所やタイミングで要求される機能を果たしているものと考えられる。そういった制御タンパク質の中でも特に知られているものとして、ダイナクチンや LIS1 および NDE1/NDEL1, Bicaudal D といったタンパク質が挙げられる[28-32]。これらのタンパク質は、ダイニンと荷物の間のリンカーとして機能する、ダイニンの ATP 加水分解活性を直接調節する、またダイニンに負荷がかかった状態で微小管と間の結合力を強めるなど、様々な機構でダイニンの機能を制御していることが分かってきている。

また近年の研究では、ダイニンにおいては前述した制御タンパク質による制御に加えて、細胞上層に係留されることで振る舞いに変化するという、他の制御因子を必要としない状況依存的な制御方式の存在が示唆されており[33]、ダイニンの運動機能の制御にある種の階層性が存在していることを示唆している。このような制御の階層性の各段階、すなわちダイニン分子のみによ

って成される制御と、他のタンパク質によってなされる制御のそれぞれについて、その詳細な機構を明らかにするとともに、それらの階層の間関係がどうなっているのかについて調べることは、ダイニンという多様な文脈で働くタンパク質の機能を探る上で重要な観点だと考えられる。

細胞質ダイニンの微小管上での振舞い

生体内でのダイニンが関与する様々な運動の観察に加えて、*in vitro*の再構成系によるダイニンの運動観察から、ダイニンの運動機構について様々なことが分かってきている。細胞質ダイニンの運動活性は、初め多分子のダイニンによる微小管滑り運動観察によって確認され、約 $1 \mu\text{m/s}$ の速度で滑り運動させることが観察された[8]。マクロな数の分子が駆動する運動としての滑り運動の観察が報告されたのは1987年であったが、その後1分子のダイニンの微小管上での運動が直接観察されるまでは約20年の時を要した[34]。この間、ポリスチレンビーズなどを観察プローブとして、これに動物の脳などから精製した天然のダイニンを結合させた状態で運動を観察した実験などが報告されているが[28, 35]、厳密に1分子のダイニンの運動が観察されたのは出芽酵母のダイニンの組換え体を用いた報告が初めてのものである。このようにダイニンにおいて1分子の運動観察が遅れたことは、ダイニンの分子構造が複雑かつ巨大であり、運動に必要なモータードメイン全体を含む組み換え体を用いた研究が開始されるのが遅れたということが理由の一つとして考えられる。組み換え体のダイニンを発現させる技術は、初め細胞性粘菌を用いた系で確立され[36]、次いで出芽酵母を用いた系が確立された[13]。出芽酵母のダイニンの1分子運動観察では、微小管から解離せずに一方向に運動する様子が確認され、その後も運動中の2つの頭部の挙動の関係など、様々なことが分かってきている[37, 38]。

出芽酵母のダイニンの研究では、どのグループにおいても一方向性の安定した運動が観察され[39, 40]、その歩行メカニズムについての統一的な見解が確立されつつあるが、高等生物のダイニンに関しては、その微小管上での振舞いや発生する力について、いくつかの異なる結果の報告がなされているという現状がある。微小管の上での挙動としては、一方向に運動するという報告[30, 41, 42]がある一方で、マイナス端だけでなくプラス端方向も含んだ両方向性の運動を示すという報告[28, 35, 43-45]も存在している。ダイニンが発生する力に関しても、7 pN程度とキネシンと同等の力を発生できるとする報告[42, 46]もある一方で、1 pN程度の力しか発生できな

いとす報告[45, 47, 48]もある。また、一方向性運動と両方向性運動を報告しているそれぞれのグループが強い力と弱い力を報告しているグループに対応しているというわけでもなく、統一的な描像の確立には遠い現状がある。さらに、ダイニンの機能と制御の項で述べたように、分裂酵母の細胞内において両方向的に振舞っているダイニンが、膜上に係留されることによって一方向性の運動を顕在化させるという報告もあり[33]、ダイニンの振舞いに関する混乱は、出芽酵母以外の広い範囲の種のダイニンに存在しているとも見られる。

上記のようなダイニンの微小管上での振舞いに関する混乱の理由として、種々のグループの間で使用しているダイニンの由来が異なることや、ダイニンを観察するために使用しているプローブが異なっているということが考えられる。2000年台前半には組み換え体の発現系が確立していた出芽酵母に比べると、高等生物のダイニンの発現系が確立したのは近年になってからであり[49, 50]、運動の観察においては、ウシやブタ、マウスなどの脳から精製した天然のダイニンに対してビーズや量子ドット、また蛍光標識したダイナクチンの一部を結合させた状態での観察がほとんどであり、単独の細胞質ダイニンの微小管上での振舞いに関する研究はほとんどなされていなかった。

前述のように、細胞質ダイニンは多様な制御タンパク質による調製を受けることで多種多様な細胞における機能を担っているタンパク質であり、そのような制御機構を研究するに先立って、まず単分子のダイニンの運動に対する明確な特徴付けをすることが重要であると考えられる。すなわち、先行研究において見られた複数の振舞いがそれぞれどのような状況で現れるのか、統一的な視点から説明可能な描像を確立することが必要となる。そのようなダイニン単体の振舞いに関する描像の上に立って、その上で制御タンパク質と相互作用したときにどのような運動機能の制御が行われるかという、いわばダイニンの運動機能制御に関するある種の階層性を意識して研究を進めていった。まず本研究の第1章では、哺乳類培養細胞 HEK293 から組換えダイニン重鎖を含む細胞質ダイニン複合体を精製する技術[49]を利用し、荷物も制御タンパク質も結合していない状態のダイニンの運動を全反射顕微鏡や光ピンセットを用いて観察し、さらに電子顕微鏡を用いた形態観察を併用することによって、1分子のダイニンが示す質的に異なる振舞いがそれぞれどのような条件で現れてくるのか調べることにした。結果として、哺乳類の細胞質ダイニ

ンは微小管上での拡散運動を基本的な運動モードとしており、さらに、そのような状態において特徴的な形態をとることによって、自己制御的に拡散的な振舞いを安定化させていることが分かった。このような自己阻害状態は、実際に細胞内で輸送を担っているときのように、単一の荷物上でダイニンが集団化している際には解除されて一方向性の運動が顕在化していることが明らかとなり、この阻害状態の解除には、ダイニンが持つ力学特性が大きく関与している可能性が示唆された。

哺乳類のダイニンでは、自己制御的に運動が調整されていることが明らかとなったことを受けて、本研究の第2章では、そのさらに上の階層の制御として LIS1 および NDEL1 による運動機能の制御に関する研究を行った。具体的には、それぞれのタンパク質の機能領域と推定されている部位毎の断片を作成し、それらのダイニンへの影響を観察することで、機能領域の特徴付けを行うとともに、ダイニン、LIS1、NDEL1 の3つのタンパク質間の分子間相互作用の詳細を調べた。運動観察と微小管共沈実験などの生化学実験の結果から、LIS1 はダイニンの運動を阻害する機能を持っており、NDEL1 はその阻害を解除する役割を持っていること、また、NDEL1 は単独ではダイニンの運動を阻害するということが確認された。さらに新たな結果として、NDEL1 の2つの役割、すなわち LIS1 による阻害の解除と単独でのダイニンの運動の阻害という機能は、それぞれ NDEL1 の N 末側領域と C 末側領域に局在していることも示された。LIS1 に関しても、ダイニンの運動制御機能には、C 末側の WD40 リピートで構成される β プロペラ構造のみがあればよいということが分かった。

第1章 細胞質ダイニンの自己制御機構について

1.1 序論

序章にも述べたように、出芽酵母のダイニンを除く種々のダイニンにおいて、その微小管上での振舞いと発生する力に関して、少なからぬ混乱が存在している。例えば、ニワトリ胚から精製したダイニンにポリスチレンビーズを結合させた実験では、飽和 ATP 存在下で拡散的な振舞いが見られたのに対し、ウシの脳から精製したダイニンを用いた研究では一方向性の運動が支配的であると報告されている[30]。しかし、同じようにウシの脳から精製したダイニンを用いても、別の研究グループからは両方向性の運動が報告されている[45]。これらの混乱を解決し、ダイニン単分子の振舞いを解明するためには、量子ドットやビーズといった人工的な荷物となるものを結合させていない状態でダイニンの運動をまず観察する必要がある。このためには、ダイニン分子を直接標識可能な組換え体の発現系を利用することが重要であると考えられる。既に HEK293 細胞において、組み換え細胞質ダイニン重鎖を発現させる発現系は確立されており[49]、本研究ではこの発現系を利用してダイニン本来の性質に迫ることを試みた。

細胞内におけるダイニン駆動の輸送現象では、基本的には一方向性の運動が観察されている。基本的に、と述べたのは、細胞内輸送においては同一の荷物にキネシンも同時に結合している場合がほとんどのため、運動方向の切り替わりも生じているためである[51]。この場合の両方向性は、対となるモーターの存在によっているので、再構成系で観察されている拡散運動とは明らかに質的に異なる運動であると言える。仮に一分子のダイニンの振舞いが拡散的であるとすると、生体内で見られる一方向運動への転換がどのような機構によって起こるのかということが今度の問題となる。一分子のモーターにおいて拡散的な振舞いと一方向的な運動の両者が状況に応じて転換するという現象は、既にキネシンやミオシン V において報告があり[52-54]、これらのモーターにおいては、尾部領域が頭部領域と相互作用することによって一方向性の運動を阻害し、振舞いが拡散的になると言われている。ダイニンにおいても、その尾部領域における変異が運動に影響を与えるという報告もあり[41]、また尾部領域が膜上に係留されることで運動様式が変化するという現象も観察されており[33]、同じようなある種の自己制御機構が存在しているかどうかは興味深い課題である。

また、生体内で輸送などの機能を担う際には、ダイニンは基本的に複数の分子が同時に単一の荷物に結合した状態で働いており[55]、このように複数分子化することが一方向性が現出する主要因であるという可能性もある。複数分子が同時に働く、より生体内に近い状況でダイニン分子が数に応じてどのように振る舞いを変えるのかという点も重要な観点となってくる。

本研究では、上記の問題点を念頭に置いた上で、先述の HEK293 細胞による発現系を利用して精製した組換え細胞質ダイニン複合体を用いて、1 分子および複数分子の微小管上での挙動の直接観察、さらには電子顕微鏡を用いた構造解析を行った。その結果、ダイニンにはキネシンやミオシン V と全く異なる制御機構が存在しており、2 つの頭部が積み重なるような特殊な形態をとることで自己阻害的に運動が拡散的になっていることが明らかとなった。また、この自己阻害状態は、外力や複数分子化した際に他のダイニンから及ぼされる力学的摂動によって解除されることも分かり、この阻害の解除にはダイニンが力に応答して内部状態を変化させる性質や、力が及ぼされる方向に依存して応答を変化させるという特殊な力学応答性を備えていることが寄与していることも明らかとなった。これらの結果は、ダイニンが自己制御的な機構と数による制御の 2 つの制御機構を利用しているということを示している。本研究の遂行においては、複数分子のダイニンの運動観察に関して、情報通信研究機構の古田健也主任研究員との共同研究で実験を行った。電子顕微鏡観察では、東京大学豊島研究室の市川宗巖氏および斎藤慧氏の協力の下、観察と解析を行った。また、単頭の酵母ダイニンを精製するための株は、豊島研究室の柴田桂太郎氏から提供されたものを使用した。

1.2 実験手法

1.2.1 タンパク質の発現精製, および蛍光標識

1.2.1.1 ヒト細胞質ダイニン組換え体の遺伝子構築

実験に用いた一連のコンストラクト群 (図 3. A)のうち, 全長 (Full), モータードメインのみの組換え体 (D382), 尾部を短縮して GST で人工的に二量体化させた組換え体のシリーズ (GST-D425, GST-D417, GST-D405, GST-D382), および α アクチニンで人工的に二量体化をさせた組換え体 (ACTN-D382)に関しては, HEK293 細胞を用いた安定発現系を用いた. ヒト細胞質ダイニン全長および組換え体の安定発現系を構築するために, まずは pcDNA5/FRT/TO ベクター (Invitrogen) のマルチクローニングサイトに改変を加えた. 具体的には, 元々のマルチクローニングサイトの始点の上流に NheI 認識配列を導入し, さらに BamHI 認識配列と BstXI 認識配列の間に MluI 認識配列を導入した. ここで導入した NheI, MluI 切断サイトの間に Kozak 配列, SBP-tag (Sigma-Aldrich), そして SNAP-tag (SNAP26m, New England Biolabs)を挿入し, 精製用タグおよび蛍光標識用タグをダイニンに付加するための汎用ベクターとした. これ以後, この汎用ベクターのことを pcDNA5-SBP-SNAPベクターと呼ぶ. ヒト細胞質ダイニン 1 全長(DYNC1H1)のクローニングは, 遺伝子全長をコードしている cDNA(FXC04846, かずさ DNA 研究所)から行い, pcDNA5-SBP-SNAP ベクターの MluI, NotI 切断サイトの間に挿入した. 尾部を切除した人工ダイマーを構築する際には, まず全長をコードしているプラスミドから D425 (1004-4646 a.a.), D417 (1004-4646), D405 (1110-4646), そして D382 (1306-4646)のそれぞれの配列を PCR で増幅し, pcDNA5-SBP-SNAP ベクターの MluI, NotI 切断サイトの間に挿入した. その後, pGEX-2T ベクター(GE Healthcare)由来の GST の配列を MluI サイトに挿入した. 作成した各プラスミドの配列はシーケンスによって確認した. ACTN-D382 を構築する際には, ニワトリ由来の α -actinin のロッド領域 (270-720 a.a.; 図 3. B) を GST で二量体化させた人工ダイマーを作る際に出来た単頭ダイニンをコードしているプラスミド (pcDNA5-SBP-SNAP-D382) の MluI サイトに挿入した.

コンストラクト群のうち, ACTN-D382 のアクチニンとダイニンの間にフレキシブルリンカーを挿入した人工ダイマー (ACTN-14GS-D382), GST-D425 の C 末端に GFP を挿入した人工ダイマ

ー (GST-D425-GFP) に関しては, HEK293 細胞に対してプラスミドを直接導入する一過性発現系を利用した. また, 全長ダイニンについても, DNA ナノチューブを用いた運動観察に用いる際のタンパク質は一過性発現系で精製したものをを用いた. これは, 一過性発現系の方が培養量のスケールアップが容易であり, DNA ナノチューブとの反応に十分な高濃度のタンパク質溶液を得ることが比較的容易に可能なためである. ダイニン組換え体の一過性発現系を確立するためには, まず pcDNA3.4 ベクター (Invitrogen) を改変し, 8xHis-tag, FLAG-tag (Sigma-Aldrich), SBP-tag (Sigma-Aldrich), StrepII-tag (IBA), そして SNAPf-tag (New England Biolabs) を In-Fusion (Clontech) もしくは Gibson Assembly (New England Biolabs) を挿入した. 改変したベクターに対してさらに ACTN-14GS-D382 の場合には ACTN のロッドドメインとリンカーである 14GS 配列を In-fusion で挿入し, GST-D425-GFP の場合には GST-tag (GE Healthcare) と EGFP (Clontech) を同じく In-fusion で挿入した. 改変した各ベクターに対して, 対応するダイニンの配列を挿入することで一過性発現用の組換えダイニンプラスミドを構築した.

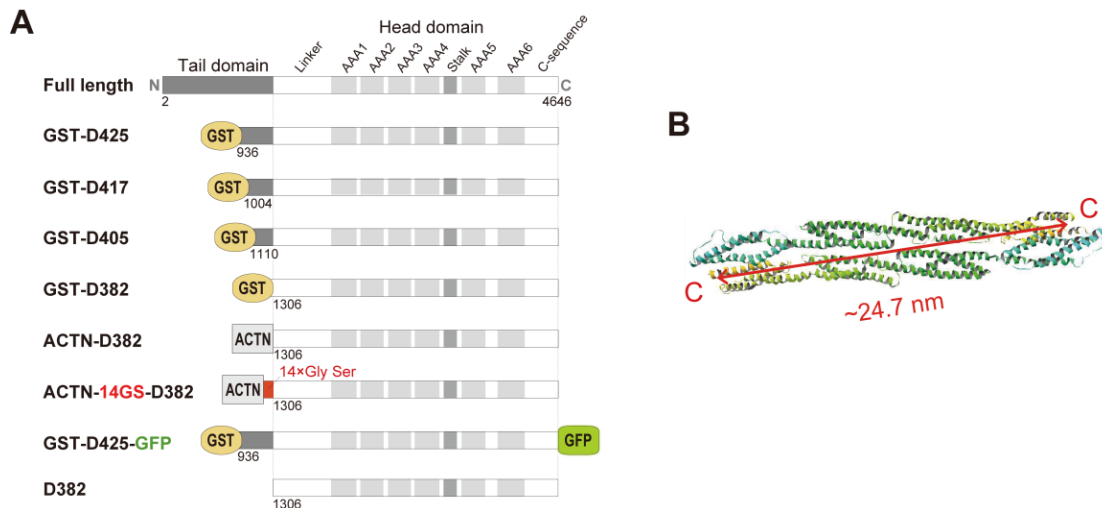


図 3. 研究に用いたコンストラクト

(A) 実験に用いたダイニン組換え体の模式図. すべてのコンストラクトの N 末端には精製用の SBP-tag および蛍光標識・BG との結合用の SNAP-tag が付加されている. 3 桁の数字はそのコンストラクト中のダイニン重鎖部分のみの分子量を表している. Full length から ACTN-D382 までは安定発現株から精製し, ACTN-14GS-D382 および GST-D425 は浮遊細胞系を用いて精製した. (B) ACTN-D382 に使われているニワトリ由来の α -アクチニンのロッドドメイン断片(270-740 a.a.)の二量体構造. 図中の"C"は各ロッドドメインの C 末端を示す. C 末端間の距離はクライオ電子顕微鏡から得られた構造 (PDB: 1SJ) 上の距離をソフトウェア (RasMol) で計測したもの.

1.2.1.2 ヒト細胞質ダイニン組換え体の精製

安定発現系を用いた HEK293 細胞への遺伝子の導入は、市川ら[49]の方法にしたがって行い、Flp-In System (Invitrogen) を使用した。導入は、まず 60 mm 培養皿に 2.0×10^6 個の HEK293 細胞を DMEM 培地 (Nacalai) 中で培養し、1 μg のプラスミド DNA とリポフェクトアミン試薬 (Invitrogen) 10 μL およびプラス試薬 (Invitrogen) 10 μL の混合溶液を添加した。その後、3 時間、37°C、5% 二酸化炭素環境下で培養し、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のブラスチジジン、および 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のハイグロマイシンを含む培地に交換し、選択を行った。

ダイニン組換え体の発現の際は、まず薬剤選択後のダイニン組換え体安定発現株を 10% のウシ胎児血清、100 unit/mL のペニシリン、および 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のストレプトマイシンを添加した DMEM 培地中で 37°C、5% 二酸化炭素の環境下で培養した。細胞が 80% コンフルエントになった段階で 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のドキシサイクリンを培地中に添加し、発現誘導を行った。誘導後 48 時間経過した後、細胞を遠心 (193 \times g, 5 min, 25°C) によって回収した。回収した細胞はヒトダイニンバッファーA (50 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, 100 μM ATP, and 1 mM DTT) に懸濁し、さらにプロテアーゼインヒビターカクテル (cOmplete EDTA-free, Roche Diagnostics) を添加し、ホモゲナイザーで破碎した。破碎液を超遠心 ($\sim 84k \times$ g, 20 min, 4°C) した後、上清をヒトダイニンバッファーA で平衡化した Strep-Tactin Sepharose resin (IBA) 1 mL (bed volume) に通した。カラムに載せた上清がすべて流れ切った後、合計 20 mL のヒトダイニンバッファーA でレジンを洗浄し、最終濃度 2.5 mM の desthiobiotin を含むヒトダイニンバッファーA で溶出した。

一過性発現系では、Expi293F 細胞 (A14635, Invitrogen) を用いた。細胞への遺伝子の導入は、PEI (Polysciences) および OptiPro SFM (Invitrogen) を用いる方法で行った。まず、導入するプラスミド DNA を 40 μg 取り、3 mL の OptiPro SFM 中で 150 μL の PEI と混合して 15 分間静置した。その後、フリースタイル 293 発現培地中 (Invitrogen) で $1.0 - 2.0 \times 10^6$ cell/mL まで培養した Expi293F 細胞培養液に混合液を添加することで遺伝子を導入した。溶液を添加してから 4 時間後に培地 30 mL、および最終濃度 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のデキストラン硫酸ナトリウムを新たに添加して細胞の凝集を抑制した。遺伝子を導入してから 48 時間経過した後、遠心 (193 \times g, 5

min, 25°C) によって細胞の回収を行った。回収した細胞は最終濃度 1 mM PMSF および cComplete EDTA-free を添加したヒトダイニンバッファーB (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 100 μM ATP, 10%(w/v) スクロース, 10 mM imidazole-HCl pH 7.5, and 0.5 mM DTT)に懸濁した。懸濁した細胞を超音波破碎機 (Sonifier 250, Branson) を用いて破碎し, 超遠心 (~21k × g, 45 min, 4°C)の後上清を回収した。回収した上清は Ni-IMAC レジン (Bio-rad) に吸着させ, His タグ溶出バッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 100 μM ATP, 10%(w/v) スクロース, 250 mM imidazole-HCl pH 7.5, and 0.5 mM DTT) で溶出させた。続いて溶出液を抗 FLAG アガロース (A2220, Sigma-Aldrich) に吸着させ, 350 μg/mL の 3X FLAG ペプチドを添加したヒトダイニンバッファーB で溶出させた。溶出したタンパク質溶液は遠心式フィルターユニット (UFC5 100 08, Millipore) を用いて約 10 倍の濃度まで濃縮し, 同時に 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 100 μM ATP, 10w/v% sucrose, および 1 mM DTT を含むバッファーに溶液置換した。

一分子蛍光観察に用いるタンパク質は, 溶出液に SNAP-Surface Alexa Fluor 488 (New England Biolabs) を加え, 4°Cで 16 時間回転攪拌して SNAP-tag を標識した。SNAP-tag と反応しなかった余剰の色素は, Zeba Spin Desalting Columns (Thermo Scientific) を用いて除いた。最終的に得られたタンパク質溶液は分注した後, 液体窒素で瞬間凍結し, -80°Cで保存した。標識タンパク質のラベル率は 280 nm および 494/650 nm の吸光度からタンパク質および色素の濃度を計算し, 比を求めることで決定した。

1.2.1.3 チューブリンの精製, 蛍光標識, および微小管, 極性微小管の重合

チューブリンは, Williams ら[56]の方法にしたがってブタ脳から精製した。ブタ脳から血管と脳膜を取り除いて破碎し, 遠心した上清を用いて重合脱重合のサイクルを 2 回繰り返した後, 陽イオン交換カラム (P11 phosphocellulose, Whatman) によって MAPs を取り除いて精製した。蛍光顕微鏡観察に用いるためのチューブリンの蛍光標識は, 重合した状態で Cy5 (PA25001, GE Healthcare) もしくは Cy3 (PA23001, GE Healthcare) と反応させ, その後重合脱重合のサイクルを 2 回繰り返すことで行った。Cy5 微小管, および Cy3 微小管を重合する際には, 蛍光強度

を調製するために未標識のチューブリンと標識済みのチューブリンを 5 : 1 の濃度比で混合して重合させた。未標識、標識済みに関わらず、微小管を重合する際には最終濃度 5 mM MgSO₄, 1 mM GTP の存在下で 37°C の水浴に 30 分静置して重合反応を進行させた。重合後の微小管溶液には最終濃度 40 μM のパクリタキセル (Sigma-Aldrich) を添加し、微小管構造を安定化させた。極性微小管は、通常の蛍光標識チューブリンよりも標識率を高くした Cy3 標識クラミドモナス軸糸[57]から微小管を重合させることで作製した。NEM で処理した未標識のチューブリン、NEM 非処理の未標識チューブリン、Cy3 標識チューブリン (標識率: 19%) の 2.3 : 3.7 : 1 の濃度比で混合し、これをさらに Cy3 標識軸糸と混合し 37°C に 20 分間静置することで重合させた。重合後の溶液には通常と同様に最終濃度 40 μM のパクリタキセルを添加し、微小管構造を安定化させた。

1.2.1.4 ブタ脳からの天然細胞質ダイニンの精製

細胞質ダイニンは、Bingham ら[58]の方法に従い精製した。まずブタ脳から血管と脳膜を取り除いて破碎し遠心したのち、陰イオン交換カラム (UnoQ-1; Bio-Rad) によって精製した。精製した細胞質ダイニンは、24% スクロースを含む HPLC バッファー (35 mM Tris-HCl, 5 mM MgSO₄, 1 mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 μM ATP, pH 7.2) 中で保存した。

1.2.1.5 キネシンの精製

C 末側の配列を取り除いたホモ 2 量体のラット由来のキネシン 1 (1-430 a.a.) の C 末端に SNAP-tag および 6xHis-tag を付加し、大腸菌 (Rosetta2 (DE3), Novagen) に形質転換し、精製した[59]。ここで用いたキネシン 1 は、7 残基目のシステインがセリンに置換されているが、この変異はキネシン 1 の運動に影響を与えないことが分かっている[60]。

1.2.1.6 酵母細胞質ダイニン組換え体の精製

酵母遺伝資源センターから取得した *Saccharomyces cerevisiae* BY2777 株中の細胞質ダイニンのモータードメイン (331 kDa) をコードしている配列の上流に URA3, GAL, 6xHis, FLAG, そ

して SNAP-tag を挿入し, SNAP-tag 付きの酵母細胞質ダイニンのモータードメインのみを発現する安定株を得た.

精製の手順は柴田ら[40]の方法にしたがって行い, まず SD 培地中で OD₆₀₀ が 1.4 になるまで酵母を培養し, 遠心 (9600 × g, 5 min, 4°C) により回収した. 回収した酵母は, 酵母破碎用バッファー (50 mM HEPES-KOH pH 7.2, 200 mM 酢酸カリウム, 2 mM 酢酸マグネシウム, 0.1 mM DTT, 0.5 mM ATP, 0.5 mM MgSO₄, 0.05 % triton X-100, and 10% グリセロール) に懸濁し, さらにプロテアーゼインヒビターカクテル (cOmplete Mini EDTA-free, Roche)を添加した. 懸濁液とガラスビーズを混合し, 激しく攪拌することによって細胞を破碎した. 得られた破碎液を遠心し (300,000 × g, 15 min, 4°C), 上清を Ni-IMAC レジン (156-0133, Bio-Rad) と混合し 4°C で 35 分間回転攪拌した. Ni-IMAC レジンは上清と混合する前に酵母ダイニンバッファー (50 mM HEPES-KOH pH 7.2, 200 mM 酢酸カリウム, 2 mM 各酸マグネシウム, 0.1 mM DTT, 0.05% Triton X-100, and 10% グリセロール) で平衡化しておいた. レジンを 10 mL の酵母ダイニンバッファーで洗浄した後, 300 mM イミダゾールを添加した酵母ダイニンバッファーでダイニンを溶出した. 溶出液を anti-FLAG agarose (A2220, Sigma) と混合し, 4°C で 1 時間回転攪拌した後, 0.5 mg/mL の 3 X FLAG peptide (F4799, Sigma) を添加した酵母ダイニンバッファーで溶出した. 一分子蛍光観察のために, 溶出されたタンパク溶液に SNAP-Surface Alexa Fluor 488 (S9129S, New England Biolabs) を加え, 4°C で 16 時間回転攪拌して酵母ダイニンに付加された SNAP-tag を標識した. SNAP-tag と反応しなかった余剰の色素は, Zeba Spin Desalting Columns (Thermo Scientific) を用いて除いた. 最終的に得られたタンパク質溶液は分注した後, 液体窒素で瞬間凍結し, -80°C で保存した.

1.2.2 DNA ナノチューブ-ダイニン複合体の作製

1.2.2.1 DNA ナノチューブの設計および構築

DNA オリガミ技術を用いた DNA ナノチューブの設計は, Bui ら[61]の方法を参考にいくつかの変更を施した上で行った. DNA オリガミ技術とは, 約 7000 塩基からなるウイルス由来の一本鎖 DNA (M13mp18, Bayou Biolabs) とその相補鎖となる約 200 種類の短い一本鎖 DNA (ステ

ープル DNA; 末尾の付録に配列掲載) の自己組織的な集合によってデザインした構造を形成させる技術であり, 今回作成した DNA ナノチューブは, 直径 6 ナノメートル, 長さ約 400 ナノメートルのチューブ上の構造になっている. チューブは 6 本のヘリックス構造が円周上に並ぶことで構成されており, そのうち 2 本のヘリックスに 58 ナノメートルごとにベンジルグアニンで修飾されたステープル DNA が組み込まれていて, SNAP-tag が付加されたモータータンパク質を結合させるための足場になっている. ステープル DNA のうち, ヘリックス 6 の 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72 および 84 番のステープル DNA とヘリックス 4 の 1, 13, 25, 37, 49, 61, 73, 85 番のステープル DNA に BG を導入し (末尾の付録”ベンジルグアニン化および蛍光標識に使用したオリゴ DNA”参照), モーター 1 分子に対して 2 個のベンジルグアニンを導入することで DNA ナノチューブとダイニンの結合効率の向上を計った. ステープル DNA の BG 化は古田ら[59]の方法に従って行った. BG 化を行ったステープル DNA はゲルろ過スピンカラム (Micro Bio-Spin column 6, Bio-rad) に通した後, さらにエタノール沈殿を行って精製した. 蛍光顕微鏡観察用に Alexa Fluor 647 を DNA ナノチューブの片方の端にあたるステープル DNA であるヘリックス 3 の 1 番 (以下”3_1”と表記), 1_2, 2_2 および 5_3 のステープル DNA に修飾した. もう一方のナノチューブの端を標識するためには 3_85, 5_84, 2_83, および 1_83 のステープル DNA に Alexa Fluor 647 を修飾した. DNA ナノチューブ上のダイニン結合サイトの数の変更は, 対応する未修飾ステープル DNA を BG 修飾したステープル DNA に置換することで行った. DNA ナノチューブの形成は, 250 nM の未修飾ステープル DNA および Alexa 647 修飾済みのステープル DNA と 450 nM の BG 化ステープル DNA および BG 未修飾ステープル DNA, そして 50 nM のウイルス DNA (M13mp18, Bayou Biolabs) を TAE Mg²⁺ バッファー (40 mM Tris-acetate pH 8.0, 1 mM EDTA, and 12.5 mM Mg(OAc)₂) 中で混合し, 急速に加温 (80°C 中で 5 分間) したのちに 2 段階の速さで冷却 (80°C から 60°C までは 5 分間に 1°C ずつ冷却, 60°C から 25°C までは 10 分間に 0.5°C ずつ冷却) していくことで DNA を自己組織的に集合させて行った.

1.2.2.2 モータータンパク質の DNA ナノチューブへの結合

モータータンパク質を結合させるに際して, まずは DNA ナノチューブ溶液を卓上遠心機

(5424R, Eppendorf) で遠心 (15000 × g, 15 min, 22°C) し, 大きな凝集物を除き, 遠心の上清をアガロースゲル電気泳動し, さらに PEG 沈殿を行うことで精製を行った. アガロースゲル電気泳動は 0.5-1.0%のアガロースゲル (SeaKem Gold, Lonza) を使用し, 11 mM MgCl₂ および 0.1% LDS を添加した 1×TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA) 中で 24-25°Cの温度下で 50 V, 70 分間泳動した. 通電による温度上昇を抑えるために, 泳動装置は 4L の水を張った水浴の中に静置した. 泳動後のゲルから DNA ナノチューブのバンドをナイフで切り出し, 透析チューブ (D-tube dialyzer, Merck) を用いて電気溶出して精製した. PEG 沈殿は DNA ナノチューブの溶出液に 24%(w/v)の PEG8000 (MP Biomedicals) と最終濃度 30 mM MgCl₂を添加し, 遠心 (15,000 × g, 15 min, 22°C) することで行った. DNA ナノチューブ構造体に組み込まれていない過剰のステープル DNA を除くために, PEG 沈殿は計 2 回行った. PEG 沈殿後の DNA ナノチューブの沈殿をモータータンパク質溶液 (>13 μM) 5 μL と混合し, 27°Cで 1 時間静置して反応させた. モータータンパク質と DNA ナノチューブ上の結合サイトのモル比は 6:1 から 10:1 の条件下で行った. 反応後の溶液は TAE Mg²⁺バッファーで 3 倍に希釈し, スピнкаラムに詰められた約 450 μL のゲルろ過クロマトグラフィー担体 (Sephacryl S-500 HR, GE Healthcare) に充填した後, 遠心 (1000× g, 7 sec, 4°C) することで遊離のモータータンパク質を除いた.

二本鎖 DNA に対して SNAP-tag 付きダイニンを結合させる際は, 古田ら[59]の手法に従って行った. 使用した配列は,

5'-T[Amino-C6dT]CTTGCCGAACTGAAGTGATCCAGCTTATAGATATGGGCACGTAAACAAGCA[Amino-C6dT]-3'

および

5'-[Cy5]ATGCTTGTTTACGTGCCCATATCTATAAGCTGGATCACTTCAGTTCGGCCAAGAA -3'

である. [Amino-C6dT] は アミノ修飾剤 C6 dT を表す.

1.2.2.3 ゲルシフトアッセイ

Derr ら[62]の方法を参考にし, DNA ナノチューブにモータータンパク質が共有結合することによる分子量変化をアガロース電気泳動における DNA ナノチューブ-ダイニン複合体のバンド

位置の変化として検出することで、ダイニンの数の制御が成功しているかどうかを確認した。0.5%-1.0%のアガロースゲル (SeaKem Gold, Lonza) を使用し、24-25°Cの環境下で 11 mMの $MgCl_2$ および 0.1% LDS を添加した TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA) 中で 50 Vの電圧で 70 分間泳動を行った。通電による温度上昇を抑えるために、泳動装置は 4 Lの水を張った水浴の中に静置した。DNA ナノチューブに結合した Alexa Fluor 647 の蛍光をゲル画像撮影装置 (ChemiDoc MP imager system, Bio-rad) で観察し、バンド位置の移動を確認した。

1.2.3 顕微鏡観察および解析

1.2.3.1 ベンジルグアニン化量子ドットの作製

SNAP-tag 付きのダイニンを特異的に結合させるため、表面に SNAP-tag の基質であるベンジルグアニンを修飾した量子ドットを作製した。まずは、ホウ酸バッファー (50 mM borate-NaOH, pH 8.5) 中で、最終濃度 1 μ Mのカルボキシル化量子ドット を 1 mMの EDC, および 1 mMの sulfo-NHS と混合し、30 分間静置した。その後、最終濃度で 6.5 mM になるように BG-NH₂ (New England Biolabs) を加え、さらに 2 時間静置することで量子ドット表面にベンジルグアニンを修飾した。過剰分の BG-NH₂ は NAP5-column (GE Healthcare) を用いて除いた。

1.2.3.2 1 分子および多分子のモータータンパク質の運動観察

蛍光標識したダイニン分子およびDNAナノチューブの微小管上での振舞いは TIRFMによって観察した[59]。観察用のフローチャンバーは 2 枚のカバーガラス (18×18 mm and 24×32 mm, thickness No.1; Matsunami Glass) を厚み 80 μ m の両面テープ (W-12, Scotch 3M) をスペーサーとして貼り合わせることで作製した。両面テープは 3 mmの間隔を空けて 2 枚配置し、幅 3 mm, 長さ 18 mm, 高さ 80 μ m, 容量約 4.3 μ L のチャンバーを作製した。24×32-mmのカバーガラスは Helenius ら[63]の方法を改変した方法でシラン化したものを使用した。未処理のカバーガラスをアセトンに浸し、50°Cに保った温水中で 20 分間超音波処理を行い、超純粋でアセトンを洗い流した後、超純粋で希釈した 2% ガラス洗浄液 (Hellmanex II, Hellma) に浸してさらに 20 分超音波処理した。その後、70°Cに加温したアンモニア水と過酸化水素水の 1:1 混合液に浸し

て 20 分間処理することでガラス表面を洗浄した. 続いてシラン化に先立ってガラス表面をプラズマクリーナー (PDC-32G, Harrick) で 1 分間プラズマ処理した後, DDS の中に 1 時間以上静置することでシラン化を行った.

観察時は, まずはじめに微小管をガラス表面に固定するために BRB80 バッファーで希釈した 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗 β チューブリン抗体 (SC-58884, Santa Cruz) 溶液をチャンバーに流し込み, 5 分間静置することで抗体をガラスに吸着させた. 次いで BRB80 バッファーに溶かした 1% (w/v) Pluronic F-127 溶液を流し込み 5 分間静置することでブロッキングを行った. BRB80 バッファーで希釈した 0.6–0.7 mg/mL のカゼイン溶液でチャンバーを洗い流した後, Cy3 もしくは Cy5 で標識された微小管を流し込み, 5 分間静置して抗体を介して微小管をガラス表面に固定した. 固定されなかった微小管を 0.6–0.7 mg/mL のカゼイン溶液で洗い流した後, モータータンパク質を含むイメージング溶液 (12 mM PIPES-KOH pH 6.8, 2 mM MgSO_4 , 1 mM EGTA, 25 mM 酢酸カリウム, 10 μM パクリタキセル, 0.7 mg/mL カゼイン, 2 mM DTT, 25 mM グルコース, 21.3 U/mL グルコースオキシダーゼ, 800 U/mL カタラーゼ) をチャンバーに流し込み, 観察を行った. イメージング溶液には, 実験に応じて ATP や ADP などのヌクレオチドを更に添加した. タンパク質の運動観察後には kinesin-GFP をチャンバーに流し込むことで微小管の極性を確認した. 動画は 1 フレーム 70 ms もしくは 100 ms 毎に取得し, スペックルノイズを軽減させるために 4 フレームずつ平均化を行った. 各フレームにおける蛍光輝点の位置は解析用ソフトウェア (Mark, [57]を参照)を用いて 2 次元ガウス分布によるフィッティングで行った. なお, 微小管上に 4 フレーム以上滞在した輝点のみを解析の対象とした. 1 分子のダイニン分子の運動解析の際には, 各運動の軌跡に対して最小二乗法による線形近似を行って速度を求め, 合わせて連続する 2 つのフレーム間の変位にフレームレートを乗ずることで瞬間速度を計算した. 拡散係数を求める際には, 平均自乗変位 (MSD) のプロットに対して以下の式でフィッティングを行った.

$$\langle x^2 \rangle = v^2 t^2 + 2Dt + \delta$$

ここで $\langle x^2 \rangle$ は MSD, D は拡散係数, v はドリフト速度, δ は切片を表す. 切片 δ は輝点の位置決定における誤差を反映している. 両方向性の運動を示すコンストラクトの解析においては, 移動距離のヒストグラムをガウス分布によって近似し, その分布の中心として平均移動距離を決定し

た. なお, ヒストグラムを作成する際のビンの幅は Wand の方法[64]によって決定した. 一方, 一方向性の運動が支配的なコンストラクトの解析においては, 移動距離の累積密度分布を作製し, これを単一指数関数で近似することで求めた. なお, 本実験においては移動距離に対して蛍光退色を考慮した補正[65]を行ってはいない.

1.2.3.3 微小管滑り運動観察

ガラス表面上に固定されたモーターによる微小管の滑り運動は, 40 倍の対物レンズ (UPlan FL, Olympus) により, 暗視野顕微鏡 (BX-51; Olympus) で水銀ランプ (Olympus) の照明を用いて観察した. 観察像は ICCD カメラ (Ikegami) を使って撮影し, ADVC-300 アナログ-デジタルビデオ変換機 (Canopus) を通して映像編集ソフトウェア (Adobe Premiere Pro1.5, Adobe) でキャプチャしたものをソフトウェア (Mark2) を使用して解析した.

観察に使用したチャンバーは, スライドガラス (Matsunami) にスペーサーとして両面テープ (W-12; Scotch 3M) を 5 mm の間隔を空けて張り付けた上に, カバーガラス (thickness No.1; Matsunami) を乗せて作成したものであり, 容量は約 7 μL である. バッファーは全てグライディングバッファー (10 mM PIPES-KOH, 50 mM 酢酸カリウム, 4 mM MgSO_4 , 1 mM EGTA, 1 mM DTT, pH 6.8) を使用し, 実験に用いる直前に遠心式フィルターユニット (UFC5 100 08, Millipore) に通すことで暗視野観察の際に邪魔になるゴミを除いた. チャンバーには初めにグライディングバッファーに溶かした 5 mg/mL BSA を 7 μL 流し込んで 5 分静置し, スライドガラス表面上をブロックした. 次に グライディングバッファーで 25 nM に希釈した細胞質ダイニン溶液を 14 μL 流し込んで 3 分間静置し, ダイニンをガラス表面上に固定した. 20 μM パクリタキセル, さらに実験条件に応じて 10 μM から 2 mM までの濃度の ATP を添加したグライディングバッファー 21 μL を流し込むことでチャンバー内の余剰のダイニン分子を除いた後, パクリタキセルと ATP を添加したグライディングバッファーで 0.3 μM になるように希釈した微小管を 14 μL 流し込み, 2 分静置した. 最後にパクリタキセルと ATP を添加したグライディングバッファーのみを 21 μL 流し込んでチャンバー内の余剰の微小管を除いた後, 観察に持ち込んだ.

なお, 速度解析は解析用ソフトウェア (Mark; [57]) を用いて行い, ガラス表面上を連続的に

20 秒以上滑り運動した微小管に対して 50 フレーム毎に先端の位置を手動でプロットし，得られた軌跡を最小二乗法によって線形近似することで速度を決定した．途中で滑り運動が止まったり，滑り運動を全く示さなかった微小管は解析対象から除外した．

1.2.3.4 光ピンセットの構築

光ピンセット (図 4) の構築は岩城らの研究[66]を参考に行った．ビーズの把持および移動は $60\times/\text{NA}1.45$ 油浸対物レンズ (特注品，赤外領域の光の透過率を向上させている; PlanApo, Olympus) を通して集光させた Nd:YAG レーザー (1064 nm, ATLAS, Coherent) によって行った．高速スキャン実験ではトラップ光を電気光学偏向器 (electro-optic deflector; Model 41, Quantum Technology) を通過させ，マルチファンクションジェネレータ (WF1974, NF Corporation) によって電場を変化させてトラップ位置を操作した．ビーズの位置のシグナルを得るためには，まずビーズに対して赤色レーザー (644 nm; Excelsior-640C-60-CDRH, Spectra Physics) を斜光照明した．ビーズによる散乱光を対物レンズによって集光し，対物直下に配置された穴あきミラー (特注，対物レンズ側から見たときの中心に 5 mm の穴が空いている用に設計されている; Sigma Koki) を通した[67]．ミラーの穴を通過したビーズの暗視野像を差分アンプ (OP711G-2, Sentec) に接続された四分割フォトダイオード (S994-13, Hamamatsu Photonics) に投影することでビーズの位置情報を検出した．ビーズ投影像の変位は 24 kHz の時間分解能で取得し，11 kHz のアンチエイリアスフィルターを通した後，16 ビット A/D 変換モジュール (USB-6251, National Instruments) によってデジタル値に変換した．Cy3 標識された微小管およびトラップ操作のためのビーズの暗視野像は半導体レーザー (532 nm; μ Green-SLM, JDS Uniphase) を用いて TIRFM の下で観察した．微小管とビーズの同一画面での観察のために，ダイクロイックミラーによって像を 2 つに分割し，EMCCD カメラ (DU-897E, Andor Technology) 上に投影した．露光時間およびフレームレートは 70 ms 毎フレームである．

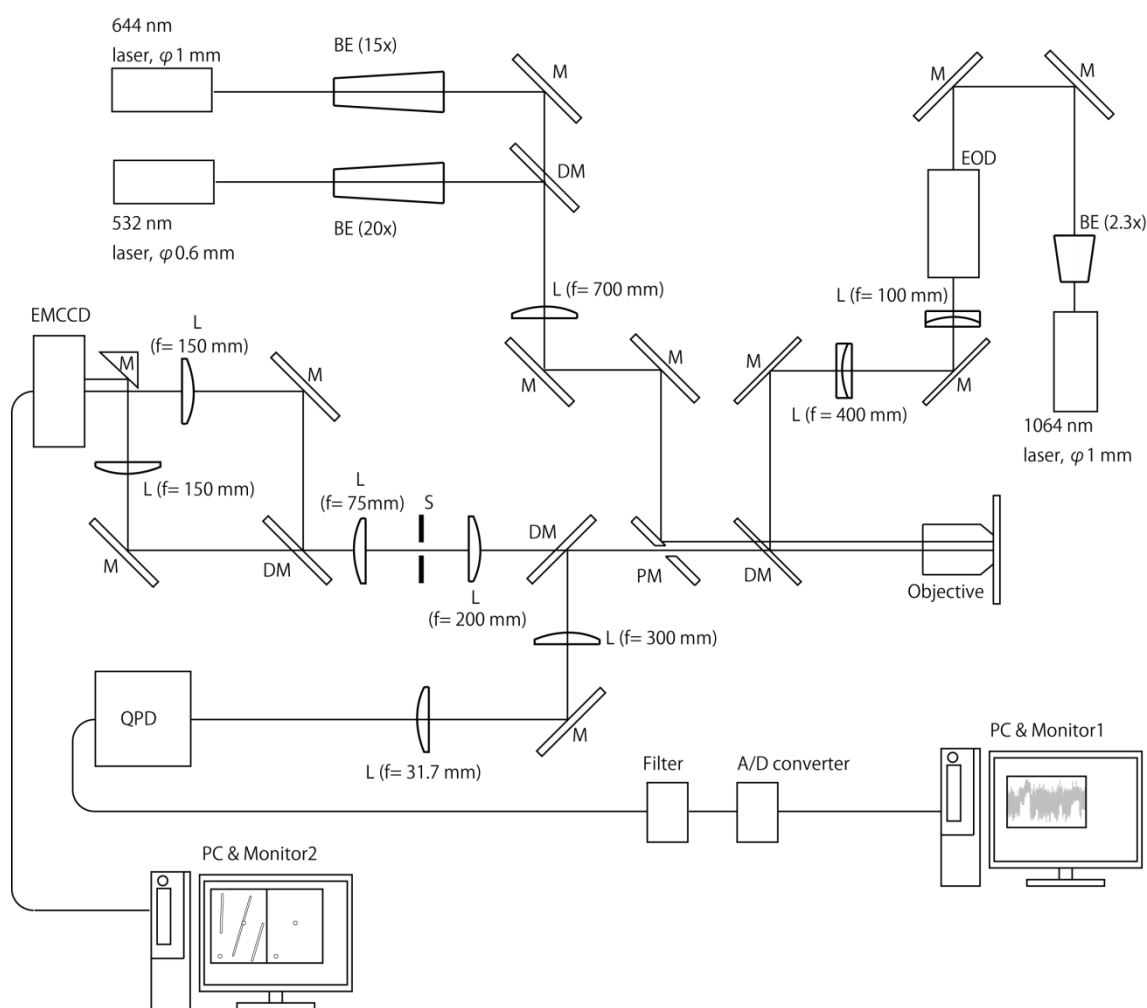


図4. 光ピンセットの構築

略号は、M；ミラー，L；レンズ，DM；ダイクロイックミラー，PM；ピンホールミラー，BE；ビームエキスパンダー，S；スリットをそれぞれ表す。

サンプルはピエゾステージ (P-517.3CL, Physik Instrumente) の上に固定した状態で観察した。このピエゾステージを用いて正弦波状の変位をビーズに与え、フォトダイオードの応答を解析することによってフォトダイオードを通して取得されたビーズの変位と実際のビーズの変位との関係が線形である領域を決定し、その値は ± 200 nmであった。

フォトダイオードを通して得られた信号と変位の関係の校正は、観察したビーズ毎に行った。具体的には、ピエゾステージを用いてビーズにステップ状の変位を与え、与えたステップ変位と得られた信号に現れるステップの差分を比べることによって行った[68]。光ピンセットのトラップ強度はエネルギー等分配則を仮定し、ビーズの熱揺動から計算した。この計算方法の妥当性は、

ビーズの変位のパワースペクトルから計算したトラップ強度[69]と比較することで検証した。

1.2.3.5 ダイニン分子のビーズへの吸着

SNAP-tag を持つダイニン組換え体の特異的に吸着させるビーズを作製するため、まずは SNAP-tag を特異的に認識する抗体 (P9310S, New England Biolabs) をビーズに吸着させた。直径 200 nm のカルボキシル化ポリスチレンビーズ (F8811, Invitrogen) の 2% 溶液を BRB80 バッファー (80 mM PIPES-KOH pH 6.8, 2 mM MgCl₂, and 1 mM EGTA) で 0.5% 溶液に希釈した 20 μ L の溶液を 0.6 μ L の抗 SNAP-tag 抗体と混合し、BRB80 バッファーで 50 μ L にメスアップした状態で室温で 20 分間回転攪拌した。さらに 7 mg/mL の飽和カゼイン (Nacalai,) 溶液を 8.3 μ L 加え 10 分間回転攪拌することでビーズの表面をブロッキングした。ブロッキング後のビーズ溶液に 500 μ L の BRB80 バッファーを加え、タッピングにより攪拌し、卓上遠心機 (5424R, Eppendorf) で遠心 (14 krpm, 5 分, 4°C) した。チューブの底に集められたビーズを残して上清を捨て、さらに 500 μ L の BRB80 バッファーを加えてタッピングで懸濁し、遠心するという過程を 3 回繰り返して余剰分の抗体およびカゼインを除いた。3 回目の遠心後の上清を捨てた後、BRB80 バッファー 50 μ L にタッピングで懸濁し、さらに超音波処理 (Velvo-Clear, VS-25) を 10 秒間施すことで溶液を均一化させた。

上記の操作によって得られた抗体コートビーズを SNAP-tag 付きのダイニンと混合し、室温で 15 分静置することでダイニン分子をビーズ表面へ吸着させた。その後、BRB80 バッファー 100 μ L を加えて遠心 (14,000 rpm, 5 分, 4°C) する過程を 2 回繰り返すことで遊離のダイニンを除き、運動観察および力測定に使用した。1 分子のダイニンの力を測定する際には、微小管と相互作用するビーズの割合が全ビーズの 30% 以下になるようにビーズとダイニンの混ぜ比を調整した。このような条件では、微小管上をビーズが運動するという事象が観察された際にその運動が 1 分子のダイニンによって行われている確率は 90% 以上と推定することができる[70]。

1.2.3.6 光ピンセットによるダイニンの最大力、および力学応答の測定

観察用のフローチャンバーの作製法は"1.2.3.2 1 分子および多分子のモータータンパク質の

運動観察"と同様に行った。2枚のカバーガラスの間のスペーサーに両面テープではなくパラフィルム (Heathrow Scientific LLC) を用いた点だけが異なっている。パラフィルム自体に接着力は無いが、パラフィルムを2枚のカバーガラスの間に配置した状態でチャンバーを98°Cのホットプレートの上で一瞬熱して癒着させることで、チャンバーを作製することが出来た。実験は $24 \pm 1^\circ\text{C}$ の環境下で行い、モーターの力および微小管との結合時間はLabVIEW (National Instruments) で作製したソフトウェアを用いて解析した。ダイニンの最大力の平均はダイニンの力発生時の波形の最大値のヒストグラムをガウス分布で近似した際の分布の平均の値として決定した。各波形の最大力を計測は、計測に先立って生データを25 Hzのローパスフィルターに通してから行った。

1.2.4 定常状態におけるATP加水分解活性の測定

ダイニンの定常状態におけるATP加水分解活性の測定にはEnzchek (Invitrogen) を使用した [57]。ダイニンによる加水分解で放出されるリン酸のみを検出するため、測定に先立って微小管溶液からはGTPを除去した。具体的には、25%スクロースを含むBRB80バッファーの上に重合後の微小管溶液を重層して遠心(75,000 rpm, 15 min, 27°C; Beckman Coulter TL100.2 ローターを使用)した後、25KAceバッファー(10 mM PIPES-KOH, 25 mM potassium acetate, 2 mM MgSO_4 , 1 mM EGTA, 10 μM パクリタキセル, pH 6.8) で沈殿を2回洗浄してから40 μL から60 μL の25KAceバッファーで沈殿を懸濁した。反応は、20 nMのダイニンを0~36 μM の微小管を含むATPaseバッファー(10 mM PIPES-KOH pH 6.8, 25 mM potassium acetate, 2 mM MgSO_4 , 1 mM EGTA, 20 μM taxol, 1 mM ATP, 200 μM 2-amino-6-mercapto-7-methyl-purine riboside, 1 U/ml purine nucleoside phosphorylase) と混合することによって開始し、360 nmの吸光度を分光光度計(DU640, Beckman) で25°Cの環境下で計測することによって行った。計測は分光光度計の自動サンプリング機能を用いて10.6 s毎に行い、全体で30分間計測した。また、モーターを混合してから2分後に計測を開始することによって、定常状態におけるリン酸の放出を計測した。

1.2.5 電子顕微鏡観察および画像処理

透過型電子顕微鏡像の撮影に用いたマイクログリッドは坂戸ら[71]の方法に従って作製した。プラズマクリーナー (PDC-32G, Harrick) で親水化したマイクログリッドに 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のダイニン分子を含む 10 μL のサンプルを載せ、リンスバッファー (20 mM MOPS pH 7.4, 2 mM MgSO_4 , 1 mM EGTA) 60 μL で洗浄した後、1.35%もしくは 1.5%(w/v)の酢酸ウラニルで染色を行った。観察は透過型電子顕微鏡 (H7500, Hitachi) を用いて行い、加速電圧は 80 kV として、通常の観察では透過像を 1024 ピクセル \times 1024 ピクセルの CCD カメラ (FastScan-F114, Tietz Video and Image Processing Systems) を用いて記録した。観察時の倍率は 25,000 倍もしくは 40,000 倍であり、このときのスケールは 1 ピクセルあたりそれぞれ 5.1 および 3.2 \AA となる。

一粒子解析の際には、画像は CCD カメラではなく電子顕微鏡フィルム (FG, Fujifilm) に記録し、スキャナ (Nikon SUPER COOLSCAN 9000 ED, Nikon) を用いてデジタル化した。スタック構造をとっているダイニンを目視によってフィルム画像から選び出し、総計 961 個の粒子をプログラム (X3D, [72]を参照) を用いて切り出した。切り出した画像の処理には画像処理ソフト SPIDER[73]を使用した。まず、すべてのダイニン分子の向きを揃えた後に K 平均法[74]によってクラス分けを行い、各々のクラス毎に再度ダイニンの向きを揃え、尾部領域を目視でマスクし平均化を行った。

ダイニンの 2 つのモータードメイン間の距離測定およびスタック構造の判定は、LabVIEW (National Instruments) で作製したオリジナルソフトウェアを使用して行った。具体的には、40,000 倍の倍率で撮影した画像を 7 \times 7 ピクセルの領域ごとに平均化してから二値化を行い、さらに二値化の結果検出された画像中の物体中に穴が検出された場合、その穴を埋めた。この手順は、典型的なダイニンの電子顕微鏡像ではモータードメインの中心部にリング構造の穴が見えているため、これを消去してモータードメインを穴の無い領域として処理するために行っている。穴を埋めた後に、手動で設定した閾値 ($<1000 \text{ pixel}^2$) よりも面積が小さい物体を除き、最終的に領域内に検出された物体の数が 2 のときは "Separated", 1 つのときは "Stacked" と判定した。"Separated" と判定された場合に関しては、さらに 2 つの物体の重心間の距離を計測した。スタ

ック分子の割合は、解析した全分子に対する"Stacked"と判定された分子の割合として計算し、
この際スタック分子の向き ("Side view"および"Top view") は考慮しなかった。

1.3 実験結果

1.3.1 全長細胞質ダイニン 1 分子の運動の性質

1.3.1.1 全長ダイニン 1 分子が微小管上で示す拡散運動

HEK293 細胞から精製した全長ヒト細胞質ダイニン (以下ダイニン) は, ブタ脳から精製した細胞質ダイニンと同様に中間鎖 (IC), 中間軽鎖 (LIC), および軽鎖 (LC) を含む複合体であり, またダイナクチンや LIS1 といった制御タンパク質が結合していないことが確認された (図 5. A). このダイニンを N 末に付加された SNAP-tag を利用して Alexa 488 で蛍光標識し, 1 mM ATP 存在下における微小管上での振舞いを TIRFM の下で観察し, カイモグラフに示されているように全長ダイニンは微小管上を拡散的に運動した (図 5. B, C).

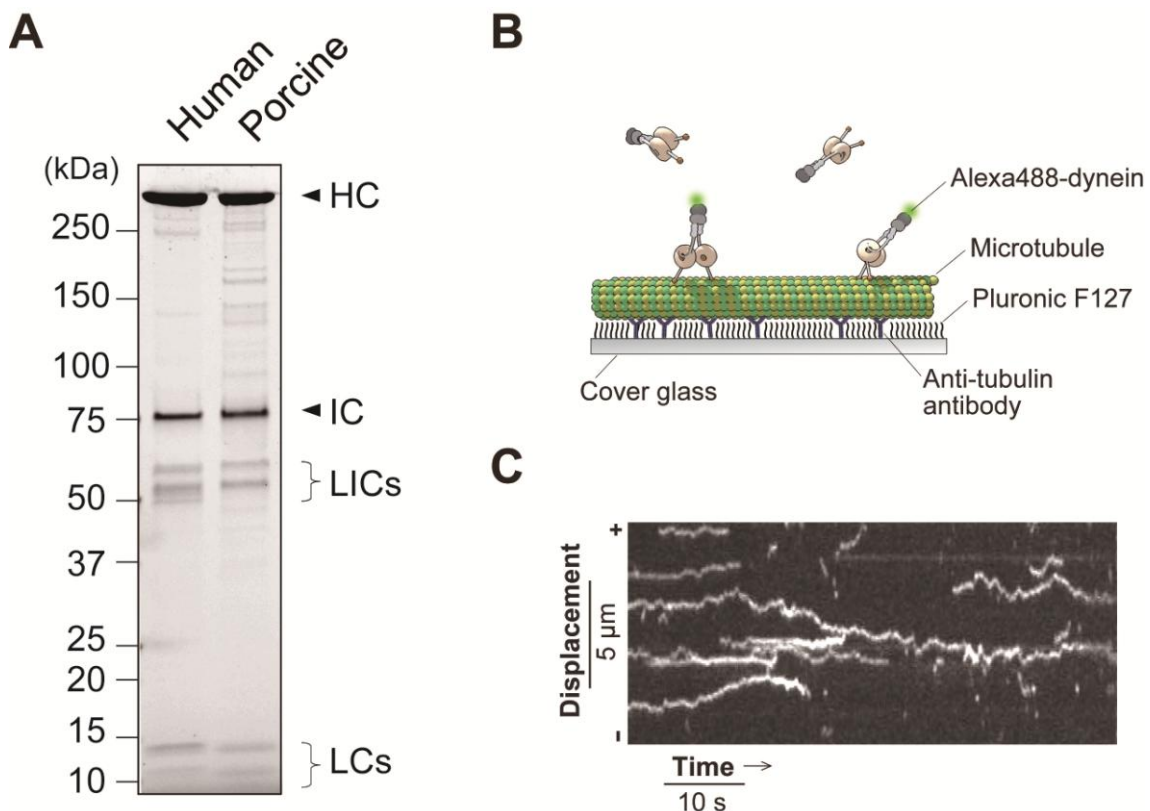


図 5. 全長細胞質ダイニンが微小管上で示す拡散運動

(A) HEK293 細胞から精製された全長ヒト細胞質ダイニン複合体 (Human) とブタ脳から精製された天然の細胞質ダイニン複合体 (Porcine) の構成を比較する SDS-PAGE 画像. ゲルは 4-15% のグラジエントゲルを使用している. バンドは Stain-Free テクノロジー (Bio-Rad) によって可視化. (B) TIRFM によるダイニン 1 分子の運動観察の模式図. (C) 1 mM ATP 存在下における Alexa488 で標識した全長ダイニンの運動の軌跡. カイモグラフの左側に記して

ある+および-の記号は微小管の極性に対応している。

このような微小管上での拡散運動は多くの先行研究で見られた振舞いと同様のものであり、先行研究で用いられた解析手法を適用した結果も同様のものであった (図 6; [28, 33, 35, 43-45, 50, 75]). これらの結果は、精製されたダイニンが先行研究において使用された天然のタンパク質と同様の活性を保持していることを示していると考えられる。

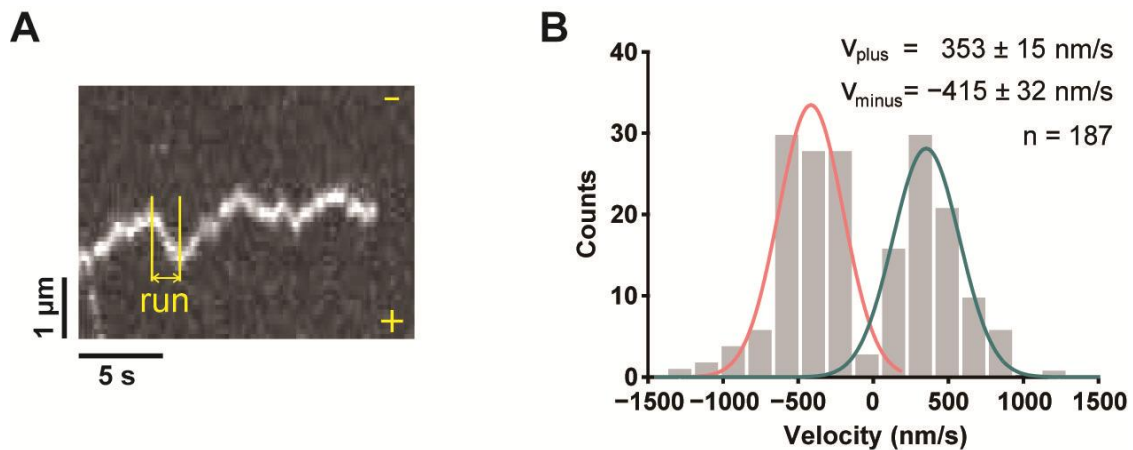


図 6. 拡散運動を一方方向性の"Run"に分割したときのダイニンの速度分布

(A) 先行研究[41, 43, 45]で用いられていた解析方法を例示するカイモグラフ。拡散運動を一方方向性のセグメントの集合と捉え、個々のセグメントの速度を解析する方法。軌跡は目視によって一方方向性のセグメントに分け、200 nm 以上運動したセグメントを"Run"として定義し (黄色線で区切られた範囲が"Run"), その速度を計測した。図中の符号は微小管の極性を示している。(B) "Run 解析"によって得られた速度のヒストグラム。速度は"Run"と判定されたセグメントに対して線形近似を行って決定した。ヒストグラムは 2 つのガウス分布の足し合わせ ($y = A * \exp(-(x - x_1)^2 / 2\sigma_1^2) + B * \exp(-(x - x_2)^2 / 2\sigma_2^2)$) としてフィッティングした。速度の符号は微小管の極性に対応している。

この拡散運動に含まれる一方方向性の成分を抽出するために、ダイニンの運動の全軌跡から特定の時間幅における移動距離 ("1.2.3.2 1 分子および多分子のモータータンパク質の運動観察"を参照) を計算し、その分布を求めた (図 7. A)。振舞いが拡散的であることを反映して、移動距離の分布は幅広い分布となったが、軌跡中の動きが止まっている区間を反映した成分である "Stationary" と運動中の方向性を反映した "Directional" の 2 つの成分の和としてよくフィットできた (図 6 A)。さらに、移動距離を計算する時間窓の幅を変化させて、ダイニンの移動距離の分布の時間変化を求めたところ、"Directional" 成分のピークの位置が時間経過に従って増大し、ま

た拡散的な振舞いを反映して分布の広がりも時間経過に伴って増大していく傾向が観察された (図 7. B). これらの結果から, ダイニンの拡散運動が平均として微小管のマイナス端方向への方向性を有していることが確認され, ビーズや Qdot といったカーゴ, またダイナクチンといった制御タンパク質が結合していない状態でも 1 分子のダイニンがマイナス端モーターとしての性質を有していることが明らかとなった. さらに, 平均としてのマイナス端方向への方向性成分の大きさを瞬間速度 ("1.2.3.2 1 分子および多分子のモータータンパク質の運動観察"を参照) として計算し, その ATP 濃度への依存性を観察した. 瞬間速度の大きさは ATP 濃度の増加に従って増大し, ミカエリスメンテン式によってよくフィットできた (図 7. C; 表 1). 飽和 ATP 濃度下におけるマイナス端方向への方向性成分の大きさは約 23.3 nm/s と計算されたが, これは細胞内におけるダイニンが駆動する細胞内輸送の典型的な速度 (数百 nm/s ~ 数 μ m/s) から比べると十分の一以下と遅いものであった. しかし一方で, 先行研究において計測された *in vitro* におけるダイニンの ATP の加水分解速度は遅く ($1 - 7 \text{ s}^{-1}$, [28, 76, 77]), このことに加えてダイニンの基本的なステップサイズが 8 もしくは 16 nm であると仮定して考えると整合的であり, 細胞内輸送に携わっているときと, 一分子で存在しているときとでダイニンの活性が変化している可能性を示唆しているものと考えられる.

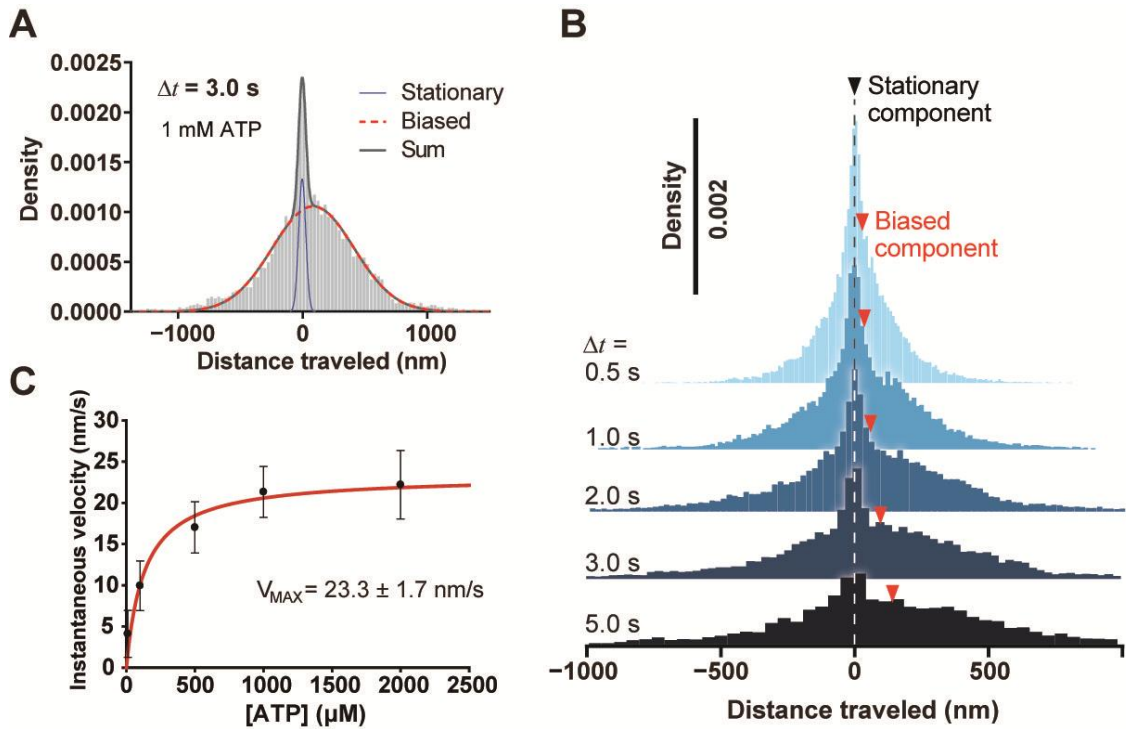


図 7. ダイニンが示す拡散運動における方向性成分の抽出

(A) 1 mM ATP の存在下におけるダイニンの拡散運動の軌跡から計算された移動距離のヒストグラム. 移動距離を計算する時間窓の幅は 3.0 s である. 移動距離における符号の正負は, ダイニンの移動方向を考慮し, 進行方向 (微小管のマイナス端方向) を正としている. 分布は 2 つのガウス分布の和 () としてフィッティングした. 青線は 0 付近の "Stationary" な成分を表し, 赤線は "Biased" な成分を表す. (B) 時間窓の幅を変化させたときの移動距離の変化の様子を表すヒストグラム群. 赤い矢頭は "Biased" 成分のピークが時間経過に従って移動していくことを示している. (C) ダイニンの瞬間速度の ATP 濃度依存性を示すグラフ. 観察は [ATP] = 10, 50, 100, 500, 1000, 2000 μM の条件下で行い, 平均値および測定誤差をプロットしている. プロットはミカエリスメンテン式; $V = (V_{\text{max}} \times [\text{ATP}]) / (K_{\text{m, ATP}} + [\text{ATP}])$ によってフィッティングした.

[ATP]	Instantaneous Velocity	Distance Traveled	Duration	Diffusion Coefficient	n
μM	nm/s	nm	s	$\times 10^3 \text{ nm}^2/\text{s}$	
10	4.1 ± 2.8 (0.1491)	-41 ± 13	3.5 ± 0.1	17 ± 0.02	302
100	9.9 ± 3.0 (<0.0001)	-69 ± 14	3.5 ± 0.03	18 ± 0.04	293
500	17.0 ± 3.1 (<0.0001)	-36 ± 15	3.0 ± 0.03	22 ± 0.05	303
1000	21.3 ± 3.1 (<0.0001)	-100 ± 16	3.8 ± 0.04	28 ± 0.02	330
2000	22.2 ± 4.2 (<0.0001)	-105 ± 32	3.4 ± 0.02	30 ± 0.03	280

表 1. ATP 濃度とダイニン 1 分子の運動の間の関係

瞬間速度 (Instantaneous Velocity) の平均値は、フィッティングではなく生データの加算平均によって計算し、平均および標準誤差を表示している。カッコ内の数字は"平均は 0 nm/s である"という帰無仮説に対する p 値を表している。移動距離 (Distance traveled) は、各々の軌跡における正味の移動距離のヒストグラムをガウス分布によって近似した際の平均と SD を表示している。微小管上での滞在時間 (Duration) は、累積分布に対して 1 次の指数減衰をフィッティングして求めた[65]。拡散係数は MSD プロットに対するフィッティングから決定した。n は運動を解析した分子の数を表している。

1.3.1.2 微小管滑り運動観察および力測定によるダイニンの活性の確認

HEK293 細胞から本研究において精製したヒト組換え体ダイニンが示した偏りを持つ拡散運動は、多くの先行研究において見られた運動と同じものであると考えられる。この 1 分子が示す振る舞いに加えて、さらに複数の観点から本研究におけるヒト組換え体ダイニンが活性を保っていることを確認するために、微小管滑り運動実験および光ピンセットによるダイニン 1 分子の力発生の観察を行った。微小管滑り運動実験では、HEK293 細胞から精製したダイニンは先行研究[8]と同等の速度で微小管の滑り運動を引き起こした (図 8. A)。一方、光ピンセットによる力発生の観察でも、先行研究と同様の力発生の様子が観察され (図 8. B)、最大力 ("1.2.3.6 光ピンセットによるダイニンの最大力、および力学応答の測定"を参照) の平均値も先行研究と同様と値であった (図 8. C)。これらの結果は、本研究において HEK293 細胞から精製されたヒト組換え体細胞質ダイニンが天然のものと同等の活性を有しており、1 分子のダイニンが示す拡散運動がダイニンの本性を反映したものである蓋然性が高いことを示唆していると考えられる。

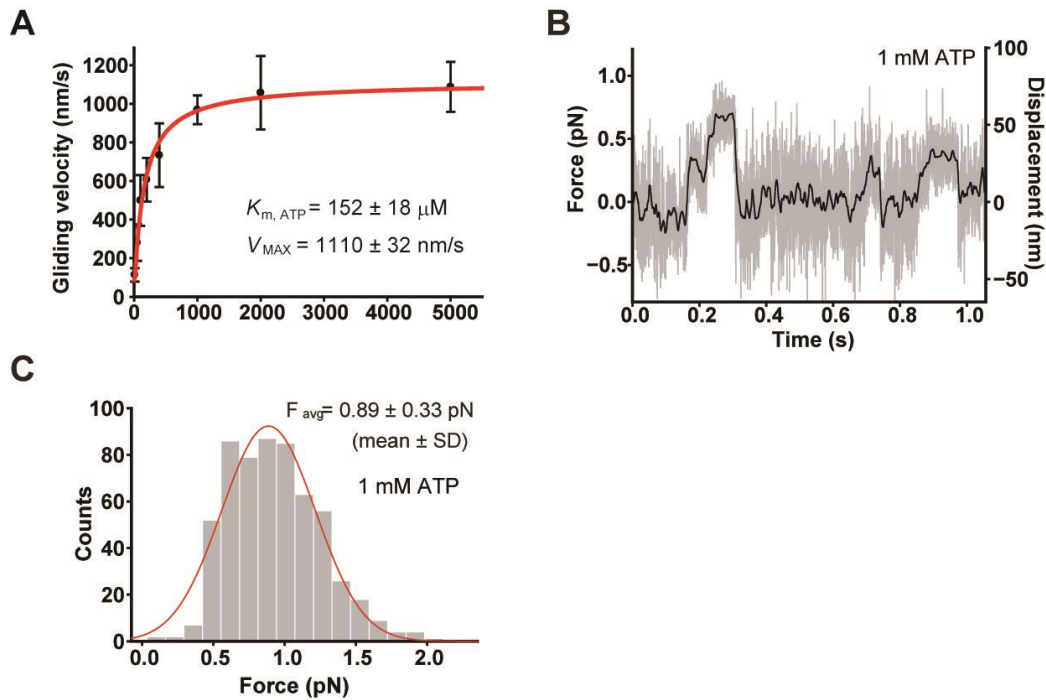


図 8. HEK 細胞から精製した全長ダイニンによる微小管滑り運動と力発生

(A) ダイニンによる微小管滑り運動速度の ATP 依存性を示すグラフ. 観察は $[\text{ATP}] = 10, 50, 100, 200, 400, 500, 1000, 2000, 5000 \mu\text{M}$ の条件下で行い, 平均値および SD をプロットしている. 速度を解析した微小管の数は 103 - 165. プロットはミカエリスメンテン式; $V = (V_{max} \times [\text{ATP}]) / (K_{m,ATP} + [\text{ATP}])$ によってフィッティングした. ここで, V は所与の ATP 濃度における微小管の滑り運動速度を表し, V_{MAX} は飽和 ATP 存在下における最大速度を表している. また, $K_{m,ATP}$ は最大速度の半分の速度を達成するのに必要な ATP 濃度を表している. $K_{m,ATP}$ および V_{MAX} の値はグラフ中に記してある. (B) 直径 200 nm のポリスチレンビーズに結合した 1 分子のダイニンによる 1 mM ATP 存在下における力発生の様子を表す変位の時系列データ. 灰色の線は生データ (24 kHz で取得) を表し, 黒線は 25 Hz のローパスフィルターを通した後のデータを示している. (C) ダイニンが発生した最大力のヒストグラム. 赤線はガウス分布 ($y = A * \exp(-(x - x_0) / 2\sigma^2)$) による近似を表す. 図中の F_{avg} はその近似によって得られた分布の平均 (x_0) と標準偏差 (σ) を表す.

1.3.1.3 ブタ脳から精製した天然ダイニンによる拡散運動との比較

HEK293 細胞から精製された組換え体ダイニンの拡散運動が, ダイニン 1 分子の微小管上で本来の振舞いを反映したものであることをさらに確認するため, ブタ脳から精製した天然の細胞質ダイニンの微小管上での振舞いと比較を行った. TIRFM による天然のダイニンの観察のために, カルボキシル化 Qdot をブタ脳ダイニンに非特異的に吸着させてその運動を観察し, また対照実験としてヒト細胞質ダイニンも同様に Qdot に吸着させ, 両者の運動を観察した. カイモ

グラフに示されているように、どちらのダイニンも微小管上で拡散的に振舞い、運動の拡散係数を計算したところ、同等の値を持っていた (図 9)。これらの結果からも、HEK293 細胞から精製されたダイニンが 1 分子で示す拡散運動が、ダイニンの本来の性質を反映したものであると考えることができる。

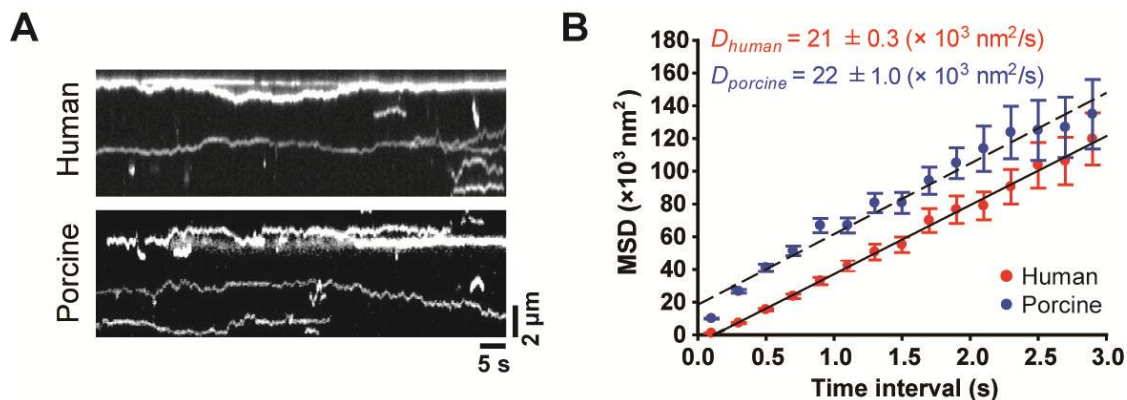


図 9. ブタ脳ダイニンとヒト組換え体ダイニンの拡散運動の比較

(A) ヒトダイニン、およびブタ脳ダイニンが吸着した Qdot の微小管上での軌跡。ATP 濃度は 1 mM である。(B) ヒトダイニンとブタ脳ダイニンの拡散運動の MSD プロット ($n = 76$; ヒトダイニン, $n = 65$; ブタ脳ダイニン)。黒線および黒点線は 1 次多項式によるフィッティングを表す。2 次の項までを含むフィッティング (1.2.3.2 1 分子および多分子のモータータンパク質の運動観察を参照)を行った場合は、2 次の項の寄与がほとんど見られなかったため。

1.3.2 多分子の全長ヒト細胞質ダイニンが示す一方向性運動

1.3.2.1 量子ドット上で複数分子化したダイニンの一方向性運動

1 分子のダイニンが微小管上で示した偏りのある拡散運動は、*in vitro*における多くの先行研究と整合的な振る舞いであったが、*in vivo*において観察されているオルガネラの輸送のような一方向性運動とは大きく異なるものであった。そこでまず、ダイニンがミオシン V やキネシンといった他のモーターと同様に、荷物を結合したときに活性化して一方向の輸送を実現できるかどうかを調べた。図 9 で示されていたように、人工的な荷物として量子ドットを結合させただけでは一方向性の運動は達成されないが、荷物に対するダイニンの混ぜ比を増加させていくと、一方向性の運動が顕著になることがわかった (図 10. A)。これは複数のダイニンが荷物に結合して同時に働く場合には、ダイニンが一方向性を獲得する可能性を示唆している。また、量子ドッ

ト上で複数分子化しているダイニンの速度分布は、*in vivo*での速度分布と同じように、早い速度領域に長い尾を引く非ガウスの分布であり、混ぜ比を増やしていても分布は大きくは変化しなかった(図 10. B ; [78-87]). 量子ドットに対するダイニンの結合は確率的な事象であり、1つの量子ドットに結合しているダイニンの数は一定ではない。そこで、DNA オリガミ技術を用いて荷物に結合するダイニンの数を厳密に制御して、一方向性を獲得できるダイニンの分子数の見積りと速度分布の分子数に対する依存性を観察することにした。

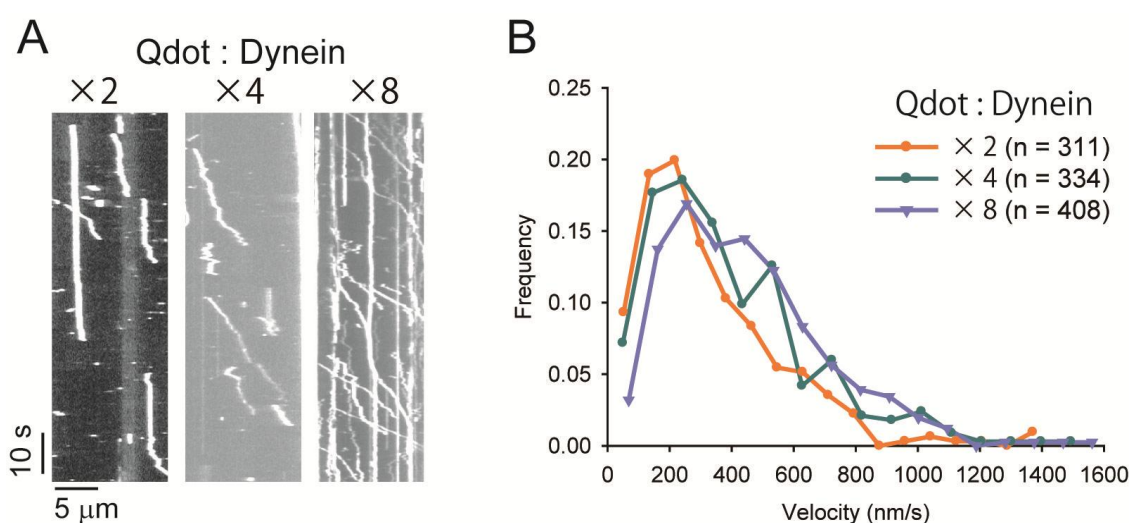


図 10. Qdot 上で多分子化したダイニンが示す運動

(A) ダイニンが結合した Qdot の運動を示すカイモグラフ。画像直上の数字は、Qdot に対するダイニンの比を表す。(B) A で示した各比における Qdot の運動速度の分布。速度は各軌跡に対して線形近似を行い決定したもの。

1.3.2.2 DNA ナノチューブに結合した複数ダイニンの一方向性運動

決められた数のダイニン分子を結合させるために、DNA オリガミ技術を用いて、直径 6 nm、長さ 410 nm のチューブ構造を構築した ("1.2.2.1 DNA ナノチューブの設計および構築"を参照)。オリガミ上には、SNAP-tag 付きダイニンの結合部位となるベンジルグアニン修飾された DNA が 1 列に 58 nm 毎に配置可能な設計になっている。この DNA ナノチューブを過剰量の SNAP-tag 付きダイニンと反応させたところ、設計された数のダイニンが DNA ナノチューブに結合していることがゲルシフトアッセイによって確認できた (図 11. A)。この DNA ナノチューブ - ダイニ

ン複合体を用いて、微小管上での運動観察を行ったところ、量子ドット上で複数分子化したときと同じように一方向性の運動を示した (図 11. B). 一方で、ダイニンを結合した DNA ナノチューブ運動の速度分布も量子ドットを用いたときと同じように速い速度領域に長い尾を引く分布となり、さらに 4 分子と 8 分子の分布の間には大きな差は認められなかった (図 11. C). この結果から、ダイニンが一方向性を獲得するためには、少数個の分子が荷物に同時に相互作用していれば十分であることがわかった. さらに、厳密に数を制御した状況下における長く尾を引く速度分布は、ダイニンの速度分布における非ガウス性が観察している運動に参与しているダイニンの数のばらつきによって生じているのではないことを意味している. これは、同様に数を厳密に制御したキネシン 1 (図 11. D-F) や先行研究で見られた Ncd の運動[59]の場合には見られなかった性質であり、ダイニンの運動の性質の特異性を反映したものであると考えられる.

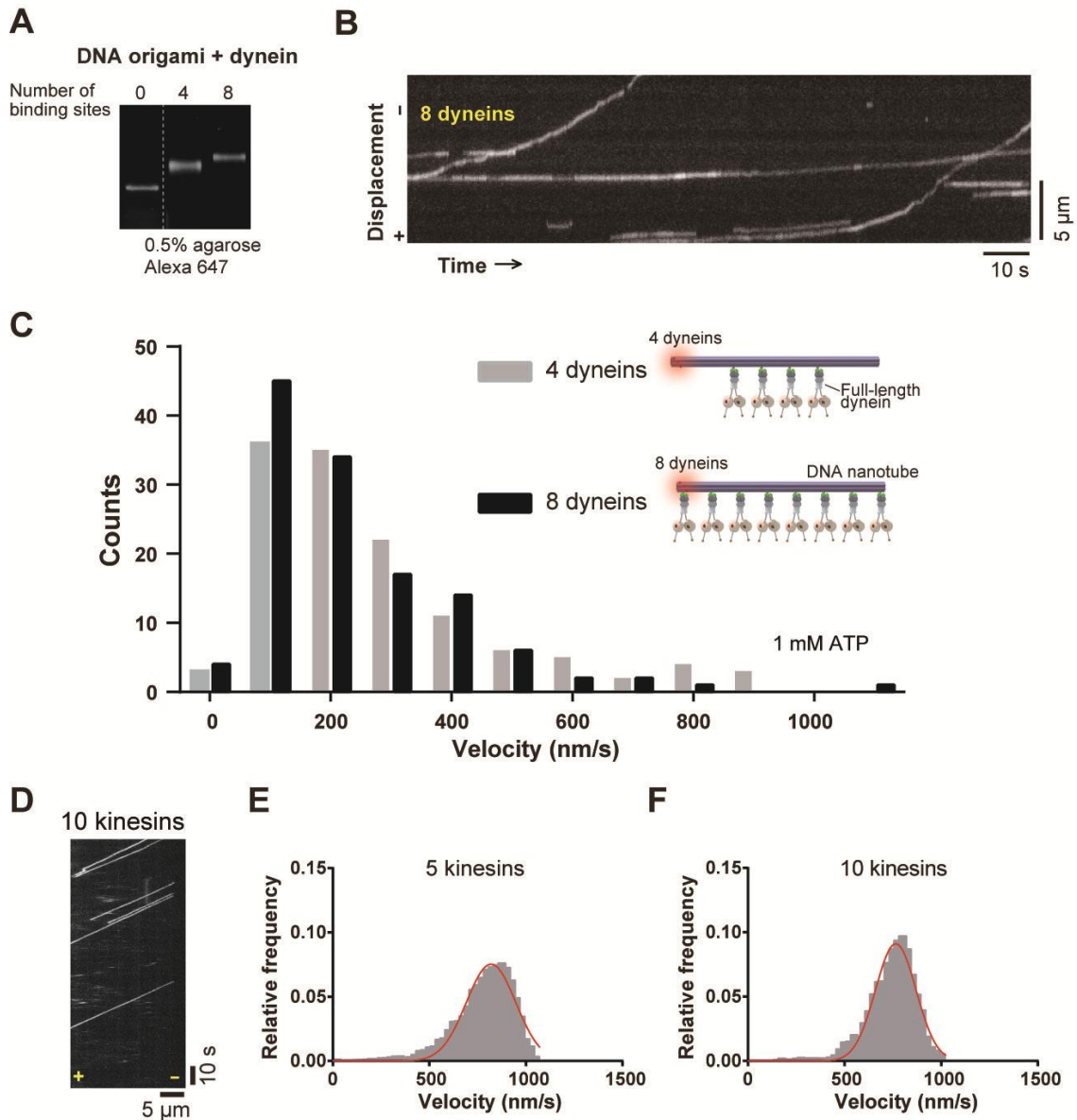


図 11. DNA ナノチューブに結合した複数ダイニンが示す一方向性運動

(A) DNA ナノチューブに結合したダイニンの数制御を確認するためのゲルシフトアッセイ。ゲルの上方に書かれている数字は DNA ナノチューブ上のダイニン結合サイトの数を表す。

(B) 8 分子のダイニンが結合した DNA ナノチューブの運動の様子を示すカイモグラフ。

(C) 4 分子および 8 分子のダイニンが結合した DNA ナノチューブの運動速度分布。速度は軌跡に対する線形近似から決定した。図中のイラストは、それぞれの個数のダイニンが DNA ナノチューブ上で集合している様子を示す模式図。(D) DNA ナノチューブ上に集合した 10 個の kinesin-1 の運動の様子を示すカイモグラフ。符号は微小管の極性を示す。(E), (F) 5 分子 (E) および 10 分子 (F) の kinesin-1 の速度分布。速度は軌跡に対する線形近似から決定した。赤線はガウス分布によるフィッティングを表し、どちらの速度分布もガウス分布によってよく近似できることが見て取れる。

1.3.3 拡散的運動とダイニンのヌクレオチド条件の関係

1 分子のダイニンが ATP 存在下で微小管上を拡散しているときに、どのような状態が支配的なかを調べるために、運動観察時の溶液のヌクレオチド条件を固定して運動の観察を行った。ATP の存在下ではダイニンは定常的に ATP を加水分解しており、ATPase サイクルの各段階 (apo 状態, ATP 状態, ADP・Pi 状態, ADP 状態) を経巡っている。そこで、運動観察時の溶液のヌクレオチド条件を固定することで、サイクル中のどの状態が拡散運動に寄与しているのかを検証できると期待できる。具体的な条件としては、ヌクレオチド無し (apo), 1 mM AMP-PNP 存在下 (AMP-PNP; ATP 状態のモデル。[88]を参照), 1 mM ATP および 1 mM Vi 存在下 (ATP + Vi; ADP・Pi 状態のモデル。[89]を参照), 1 mM ADP (ADP) の 4 条件の下で実験を行った。観察の結果, apo, AMP-PNP, ADP の 3 条件ではダイニンは微小管上の一点に留まる傾向を見せたのに対して, ATP+Vi 条件においては, 激しく微小管上を拡散的に振る舞った(図 11)。拡散係数の値を ATP 存在下での値と比較したところ, (apo, AMP-PNP, ADP) < ATP < ATP+Vi という大小関係が確認された (図 12B; 表 2)。この事実は, ダイニンの拡散運動に対して ADP・Pi 状態が支配的に寄与していることを示すものであり, 同時に ATP 存在下におけるダイニンの状態としても ADP・Pi 状態が支配的であることを示唆するものであると考えられる。

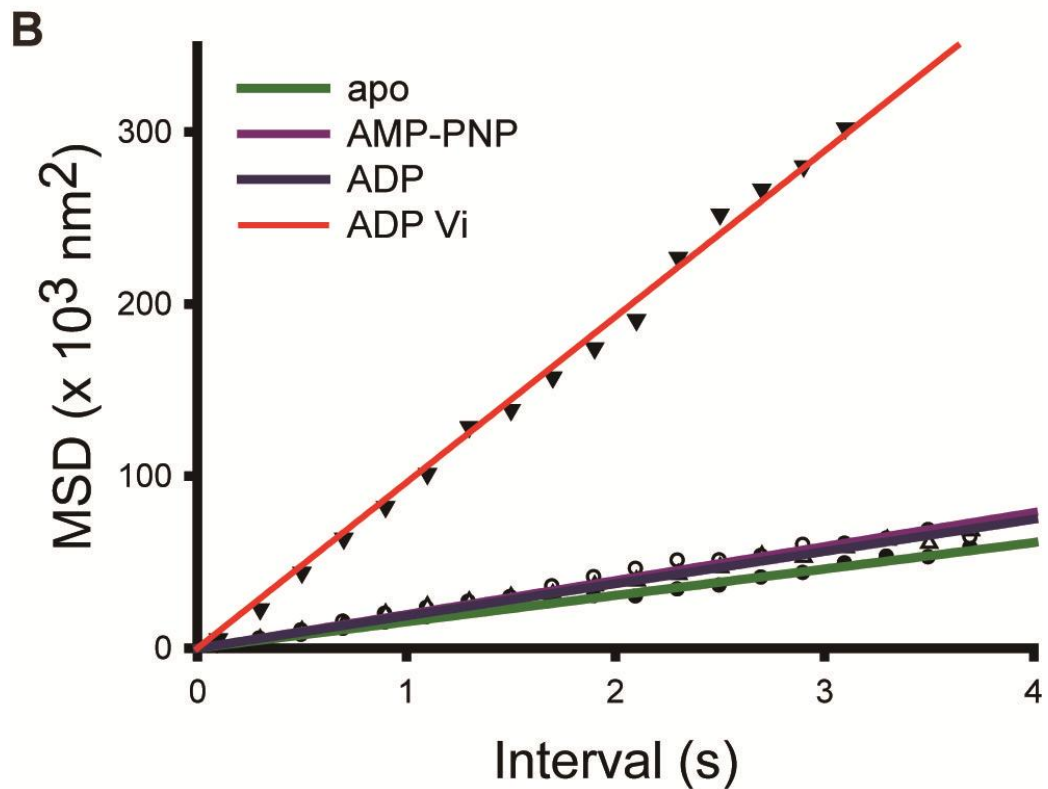
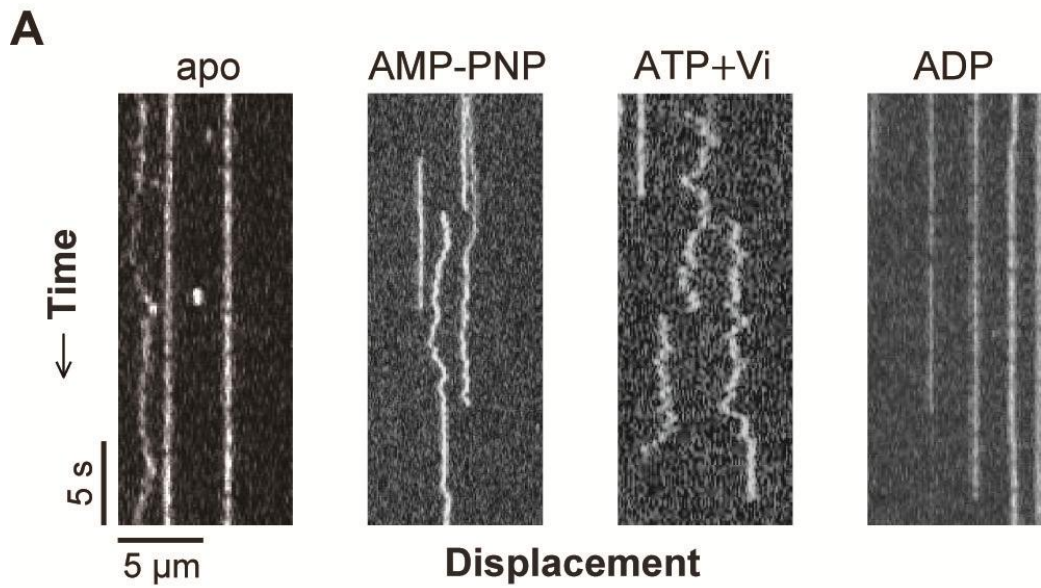


図 12. ヌクレオチド条件を固定したダイニンの微小管上での運動

(A) ヌクレオチド条件を固定した状態のダイニンの振舞いを TIRFM で観察した際のカイモグラフ。(B) 各ヌクレオチド条件における運動から得られた平均自乗変位の時間に対するプロット。各プロットを一次近似 (グラフ中の直線) することで拡散係数を求めた。

Nucleotide	Instantaneous	Distance	Duration	Diffusion	n
Condition	Velocity	Traveled		Coefficient	
	<i>nm/s</i>	<i>nm</i>	<i>s</i>	$\times 10^3 \text{ nm}^2/\text{s}$	
apo	-0.3 ± 1.5 (0.8512)	-24 ± 24	7.6 ± 0.1	7.8 ± 0.1	223
AMP-PNP	0.3 ± 1.7 (0.8581)	-31 ± 27	8.7 ± 0.1	8.3 ± 0.2	229
ATP + Vi	-0.6 ± 5.0 (0.8980)	65 ± 40	3.5 ± 0.01	48.1 ± 0.4	278
ADP	1.2 ± 1.8 (0.5087)	21 ± 30	8.2 ± 0.1	9.0 ± 0.1	231

表 2. ヌクレオチド条件とダイニンの微小管上での振舞いの関係

ヌクレオチド条件を固定した際のダイニンの運動の性質をまとめたもの。瞬間速度以下各項目の値の計算方法は表 1 に同じ。

1.3.4 拡散的な状態に特徴的なダイニンの形態

1.3.4.1 ダイニンの形態および微小管上での振舞いとヌクレオチド状態の関係

前節の結果から、ATP 存在下および ADP・Vi 状態でのみ、ダイニンが拡散的な運動を示すことが分かった。これに対応して、ATP 存在下および ADP・Vi 状態でダイニンが他の状態と異なるコンパクトな構造をとっていることが、負染色透過型電子顕微鏡画像から明らかとなった (図 13. A, B)。このコンパクトな構造は、L.Amos によって" ϕ 型構造"と名付けられた構造[90]とよく似たものであった。本論文では、このダイニンの構造を 2 つの頭部が積み重なったように見えるということから"Stacked 構造"または単にスタック構造と新たに呼ぶことにした。このスタック構造を取っている分子の割合と拡散係数を同時にプロットしてみると、2 つの量の間に関係が見られた (図 13. C; 表 3)。この結果は、ダイニンの 2 つの頭部が取っている形態と運動の様式の間に関係があることを表しており、ATP 存在下で微小管上を拡散的に運動しているときのダイニンは、ADP・Pi 状態でスタック構造を取っている可能性を示唆している。なお、ここで観察、解析されたスタック構造は、グリッド上の遊離のダイニンのものであったが、ADP・Vi 状態のダイニンがスタック構造を保ったまま微小管と相互作用していると思われる様子も観察されている (図 14)。

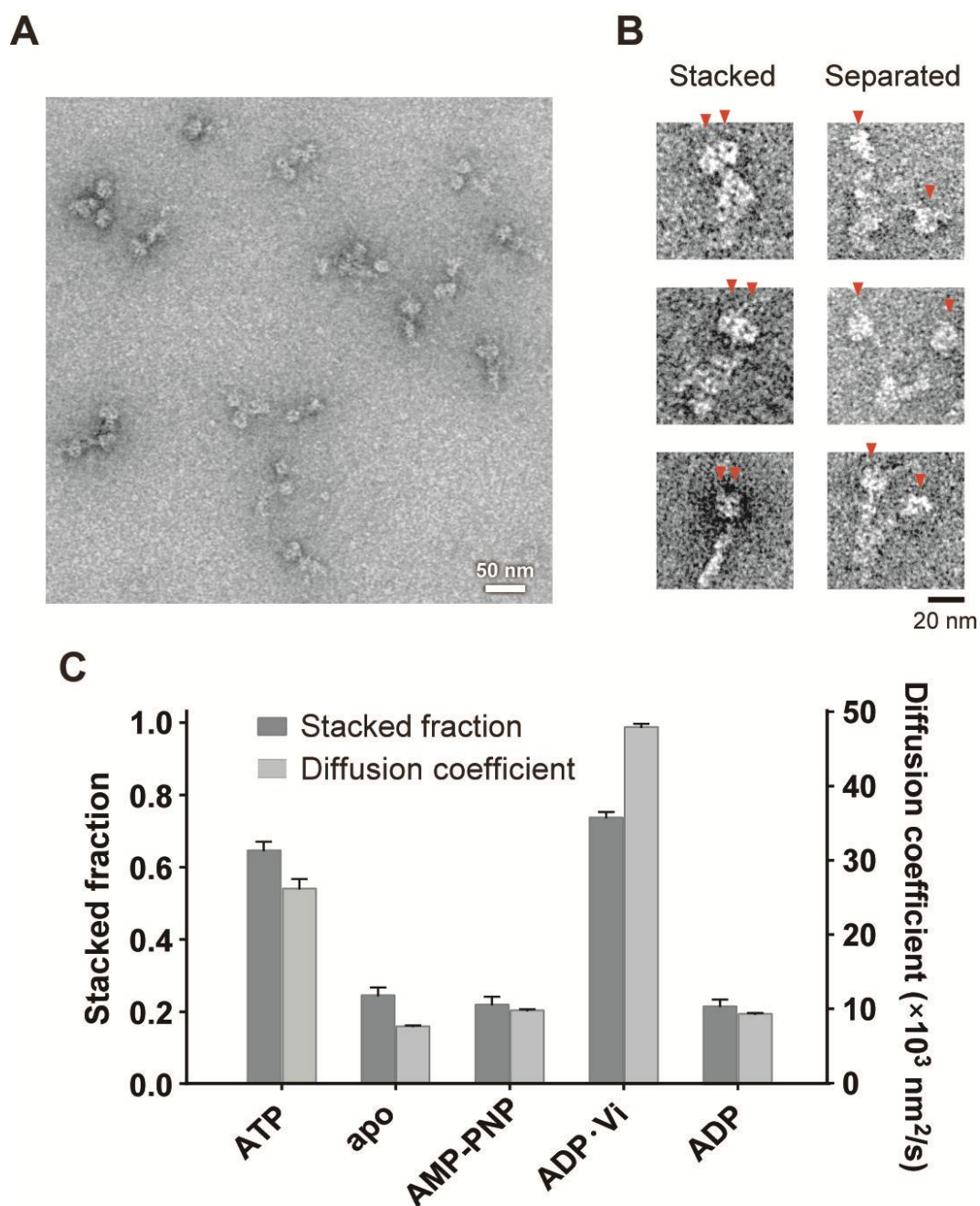


図 13. 拡散的な状態に特徴的なダイニンの形態

(A) 1 mM ATP 存在下の条件で撮影した負染色電子顕微鏡画像 (25,000 倍). (B) "Stacked" はコンパクトな構造のダイニンを表し, "Separated" はそれ以外の構造を表し, それぞれの形態の代表的な画像を示すギャラリー. 赤い矢印はダイニン分子中の 2 つの頭部ドメインを示す. (C) 各ヌクレオチド状態におけるスタック分子の割合と微小管上の運動の拡散係数. グレーのバーはスタック分子の割合を表し, ライトグレーのバーは微小管上での拡散係数を示す. 形態解析を行った粒子の数は 424 (ATP), 411 (apo), 364 (AMP-PNP), 867 (ADP·Vi), 510 (ADP). スタック分子の割合のエラーバーはブートストラップ法により決定した. 拡散係数のエラーバーは MSD プロットに対するフィッティングのエラーを表示している.

Nucleotide	Total	Stacked	Separated	Stacked Fraction
ATP	424	274	150	0.64 ± 0.02
apo	411	101	310	0.25 ± 0.02
AMP-PNP	364	80	284	0.22 ± 0.02
ATP + Vi	867	640	227	0.74 ± 0.01
ADP	510	111	399	0.22 ± 0.02

表3. ダイニンにおけるヌクレオチド状態と形態の関係

“Total”は解析を行った分子の総数. “Stacked”と“Separated”はそれぞれに判定された分子の数. “Stacked Fraction”は解析を行った分子全体のうち、スタック分子と判定されたものの割合を表す. 値はブートストラップ法による平均値と標準誤差を示している.

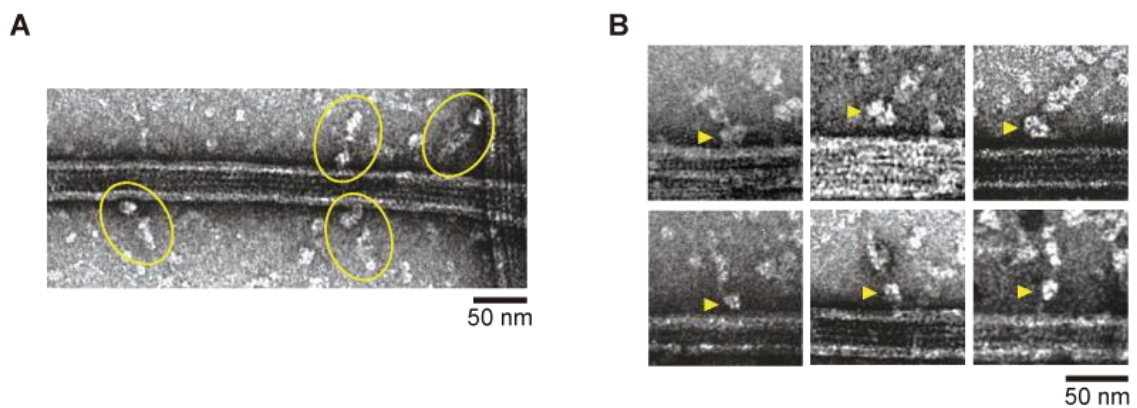


図14. 微小管状でスタックしたダイニン分子

(A) 1 mM ATP および 1 mM Vi 存在下で微小管と相互作用しているダイニン (ADP・Vi 状態) の負染色電子顕微鏡画像. 黄色の楕円は、スタック状態を保ったまま微小管と相互作用していると想定される分子を示している. 遊離の状態でも ATP+Vi 条件ではダイニンはスタック構造を取りうるので、そのように遊離のスタックダイニンが偶発的に微小管の近くに観察されているだけという可能性も完全に排除することは出来ない. (B) 微小管上でスタックしていると想定されるダイニン分子の負染色電子顕微鏡画像のギャラリー. 黄色の矢頭は、ダイニンの頭部を示している.

1.3.4.2 電子顕微鏡から得られたスタック構造と結晶構造の比較

電子顕微鏡によって得られたスタック構造をとっているダイニンの画像に対して、単粒子解析

を行ったところ、既に結晶構造が得られている細胞性粘菌の結晶学的な二量体構造[6]に非常に似た構造が得られた (図 15). この結晶学的二量体構造では、2つのダイニン頭部はC末ドメインが存在する面を向かい合わせており、拡散状態に特異的なスタック構造においても同様にC末側を向かい合わせている可能性が示唆された.

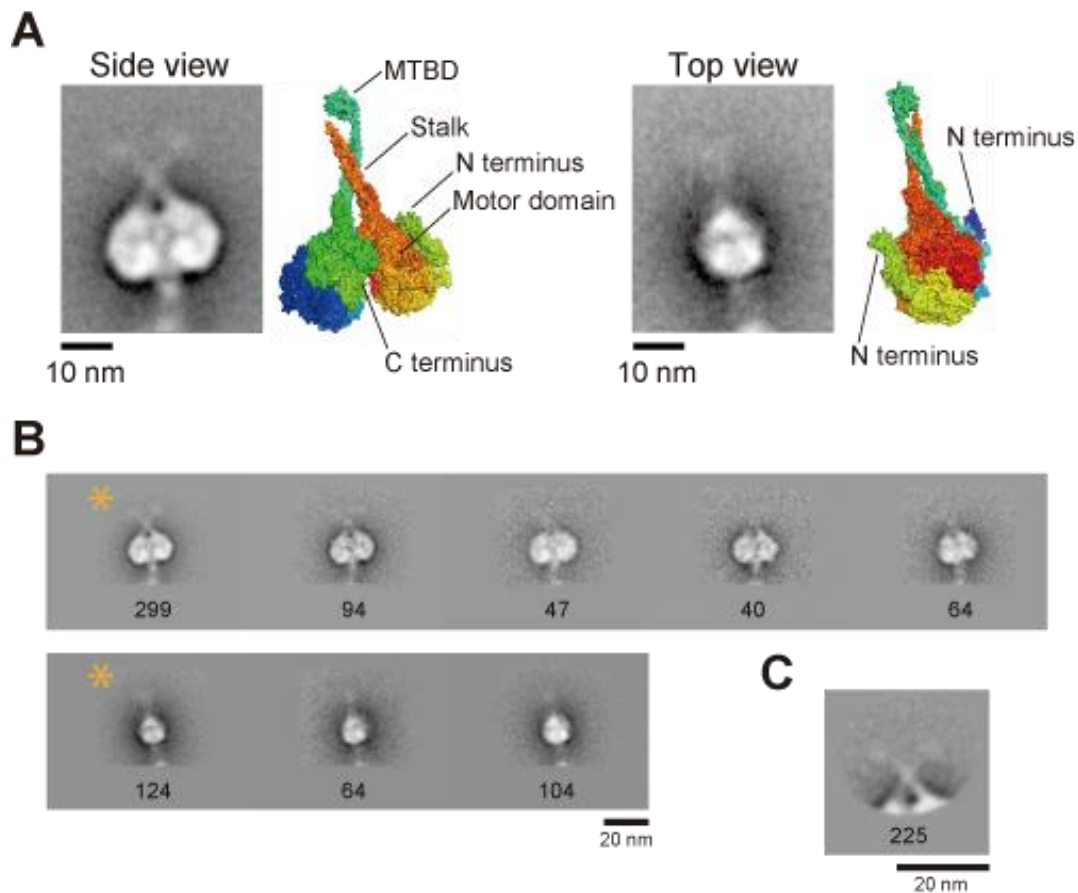


図 15. スタックしたダイニン画像の一粒子解析

(A) "Side view"および"Top view"のダイニンの主要な平均像とC末端が存在する面を合わせる形で相互作用している2つのモータードメインの結晶構造 (PDB: 3VKH; [6])との比較. 平均化に使われた画像の数は299 (Side view) および124 (Top view) である. モータードメイン全体の形状, そしてストークが交差している点などに相似点が見られる. (B) 単粒子解析によるスタック構造のサブクラス分け ("1.2.5 電子顕微鏡観察および画像処理"を参照) の結果. 上側の列が"Side view", 下側の列が"Top view"の平均像になる. 各画像の下に記されている数字は, 平均化に使用された画像の枚数を表している.

1.3.5 尾部を短縮したダイニン組換え体の微小管上での振舞いおよび形態

これまでの結果が示すように、ダイニンの拡散的な振舞いと形態の間には強い相関が見られ、ダイニンの 2 つの頭部ドメインの相互的な位置関係がダイニンの拡散状態に関係している可能性がある。このことを検証するために、ダイニンの尾部を段階的に削っていき、GST で人工的に二量体化させた組換えダイニンコンストラクトのシリーズ (GST-D382, D405, D417, D425; 図 15. A) を作製し、微小管上での運動と構造の間関係を調べた (図 16. B)。最も尾部が長いコンストラクトである GST-D425 は、全長と同様に ADP・Vi 状態において 2 つの頭部同士が重なったスタック構造を取っている分子の割合が高かったが、一方でそれより尾部が短い GST-D417, D405, D382 では 2 つの頭部が別れているものが大勢を占めた (図 16. C)。この形態上の違いに対応して、GST-D425 が微小管上で拡散的に振舞ったのに対して、さらに尾部が短いコンストラクトにおいては、一方向性の運動が顕著であった。ここにおいても、スタック分子の割合と拡散係数の値の間に強い相関がみられ (表 4), 2 つの頭部がスタック構造をとることで、ダイニンは拡散的な状態に陥っている可能性がさらに強まった。また、スタック分子の割合と拡散係数の両方において、GST-D425 と GST-D417 の間に値の大きな隔たりが見られるが (図 16. C 点線; 表 4, 5), これは GST-D425 よりも尾部が短い場合は構造的な余裕が無いためにスタック構造を取ることが出来ない、あるいは GST-D425 と D417 の間にスタックするために重要な領域が含まれていることを示唆している。D425 よりも尾部が短いコンストラクトでは、スタック構造に陥ることが無いために一方向性の運動が顕著になり、逆にスタック構造をとることができる D425 では拡散的な振舞いが支配的になってしまっているという可能性が考えられ、これを検証するために頭部間の相互作用を制御したコンストラクトを作製し、観察を行うことにした。

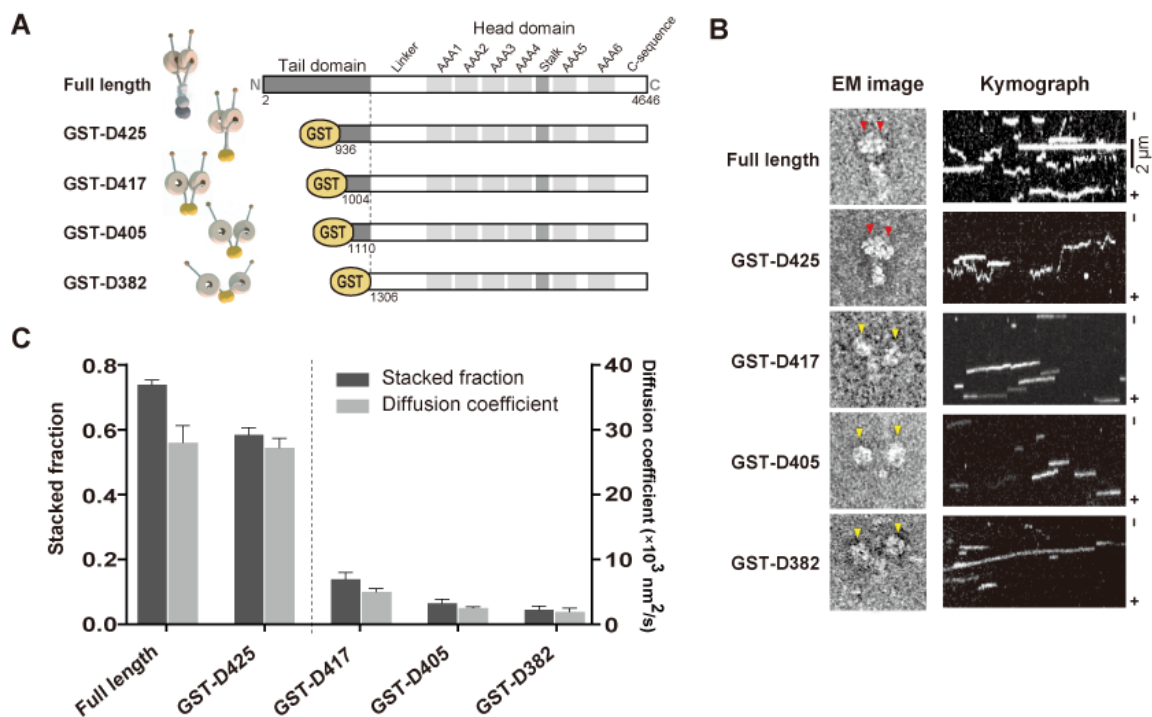


図 16. 尾部短縮ダイニンの運動と構造の関係

(A) 尾部を短縮した組換えダイニンコンストラクトの概略. コンストラクト名中の数字は, そのコンストラクト中のダイニン配列の分子量を示している. 配列の下にある数字は, アミノ酸の残基番号を表す. なお, すべてのコンストラクトの N 末には SBP-tag および SNAP-tag が付加されている ("1.2.1.1 ヒト細胞質ダイニン組換え体の遺伝子構築"参照). 点線は酵母ダイニンとの配列比較から決定された尾部領域と頭部領域の境界を示している. (B) 各コンストラクトの典型的な負染色透過型電子顕微鏡像(倍率: 40,000×)と 1 mM ATP 存在下における運動の様子を示すカイモグラフ. 電子顕微鏡像は 1 mM ATP と 1 mM Vi 存在下 (ADP・Vi 状態)で撮影されたもの. 赤い矢印はスタック構造にあるダイニン頭部を示し, 黄色い矢印は頭部が開いた状態にあるダイニンの頭部を示している. (C) 各コンストラクトにおけるスタック分子の割合と微小管上での拡散係数. 濃いグレーのバーはスタック分子の割合を表し, 1 mM ATP と 1 mM Vi 存在下 (ADP・Vi 状態)での値を示している. 薄いグレーのバーは拡散係数を表し, 1mM ATP 存在下での運動から計算された値を示している.

Constructs	Velocity	Instantaneous	Distance	Duration	Diffusion	n
	<i>nm/s</i>	Velocity <i>nm/s</i>	Traveled <i>nm</i>	<i>s</i>	Coefficient $\times 10^3 \text{ nm}^2/\text{s}$	
GST-D425	24.8 ± 8.7	17 ± 2	-80 ± 19	8.1 ± 0.1	27.3 ± 1.8	374
GST-D417	63.7 ± 5.3	37 ± 1	-330 ± 30	7.7 ± 0.3	5.0 ± 0.5	221
GST-D405	64.1 ± 3.1	49 ± 1	-554 ± 38	11.3 ± 0.2	2.5 ± 0.2	197
GST-D382	50.7 ± 3.2	31 ± 1	-283 ± 25	8.4 ± 0.1	1.9 ± 0.6	293
GST-D425-GFP	130.5 ± 9.3	80 ± 1	-681 ± 25	9.6 ± 0.2	10.6 ± 0.8	176
ACTN-D382	97.1 ± 4.3	86 ± 1	-600 ± 38	6.6 ± 0.5	2.6 ± 0.6	230
ACTN-14GS-D382	95.1 ± 6.9	60 ± 1	-367 ± 21	4.4 ± 0.03	7.9 ± 0.2	254

表 4. 尾部短縮および頭部を引き離したダイニンコンストラクトの運動の性質
速度("Velocity")は各コンストラクトの 1 分子の運動の軌跡に対して線形近似を行って決定している。瞬間速度から以下の項目に関しては、表 1 および表 2 に同じ。

	Total	Stacked	Separated	Stacked Fraction
GST-D425	515	301	214	0.58 ± 0.02
GST-D417	267	37	230	0.14 ± 0.02
GST-D405	358	23	335	0.06 ± 0.01
GST-D382	334	15	319	0.04 ± 0.01
GST-D425-GFP	410	79	331	0.19 ± 0.02
ACTN-D382	282	5	277	0.02 ± 0.01
ACTN-14GS-D382	321	7	314	0.02 ± 0.01

表 5. 尾部短縮および頭部を引き離したダイニンコンストラクトの形態
表の各値の意味、計算方法は表 3 に同じ。

1.3.6 頭部間の相互作用を制御したダイニン組換え体の微小管上での振る舞い及び形態

ダイニンの 2 つの頭部がスタック構造の形成が解かれたときに一方向性が顕著になるという可能性を検証するために、剛性が高く、長さのあるリンカーを用いて頭部ドメインを引き離れたコンストラクトを作製することにした。リンカーとしては α -アクチニン (ACTN) のロッドドメイン (270-720 a.a) を使用し、作製したコンストラクトを ACTN-D382 と名づけた (図 17. A; "1.2.1.1 ヒト細胞質ダイニン組換え体の遺伝子構築"参照)。電子顕微鏡像から明らかなように、ACTN-D382 は 2 つの頭部がはっきりと別れた分子として観察され、スタック構造をとることができなくなっていることが確認できた (図 17. B, C; 表 5)。1 分子の ACTN-D382 は微小管上で安定した一方向性の運動を示し、その運動の速度は GST ダイマーシリーズのどのコンストラクトよりも速かった (図 17. B, C; 表 3)。さらに、微小管で活性化される ATP の加水分解活性を測定したところ、ACTN-D382 は全長の約 2 倍の活性を持っていることが分かった (図 17. D)。これらの結果は、2 つの頭部がスタック構造を形成することによって運動の障害が生じ、拡散的な振舞いが支配的になるという仮説を支持している。

しかしながら、上記の結果は 2 つの頭部がスタック構造を形成できなくなったことによるのではなく、ACTN の剛性によって頭部間の張力が効率的に働き、kinesin-1 で見られたように張力が前方へのステップを促進しているという仮説でも説明可能である[91]。そこで、頭部同士がスタッキングできない状態を保ったまま頭部間の張力を弱めたコンストラクトを作製し、その運動と形態を観察することにした。具体的には、ACTN-D382 の ACTN とダイニン間にフレキシブルなリンカーとしてグリシンとセリンがそれぞれ 14 個交互に連なった配列 (14×Gly-Ser; 14GS リンカー) を挿入したコンストラクト (ACTN-14GS-D382) を作製し、スタッキング形成の有無と微小管上での振舞いを観察した。電子顕微鏡像からは、14GS リンカーを挿入してもスタック形成ができない状態が保たれていることが確認され、さらに安定した一方向性の運動を行う能力も保たれていることが確認された (図 17. B, C)。ACTN-D382 に比した場合に、拡散係数の値に若干の上昇が見られたことは、頭部間の張力が運動の性質に対して全く寄与していないというわけではないということを示しているが (図 17. C; 表 3)、運動が拡散的になるかどうかは 2 つの頭部がスタック構造を形成するかどうかにかつ定的に影響されるということが分かった。

さらにスタック構造の形成と拡散的な振舞いの間の関係を調べるために、通常ではスタック構造を取ることができる GST-D425 の C 末に GFP を挿入したコンストラクト (GST-D425-GFP) を作製することにした。これは、「1.3.4.2 電子顕微鏡から得られたスタック構造と結晶構造の比較」において議論されたようにダイニン頭部がスタック構造を形成している際には C 末側が存在する面を向かい合わせている可能性が高く (図 14. A), C 末側に立体障害となるものを挿入することでスタック構造の形成を阻害が起こることを期待したものである。結果として、GST-D425-GFP ではスタック構造を形成している分子の割合が GST-D425 に対して 58 %から 19%と大幅に減少し、またその運動においては一方方向性が支配的になった (図 17. B, C; 表 4, 5)。これらの結果は、やはり頭部同士がスタック構造を形成することが、1 分子のダイニンにおける微小管上での拡散運動を引き起こす要因になっていることを示すものであると考えられる。

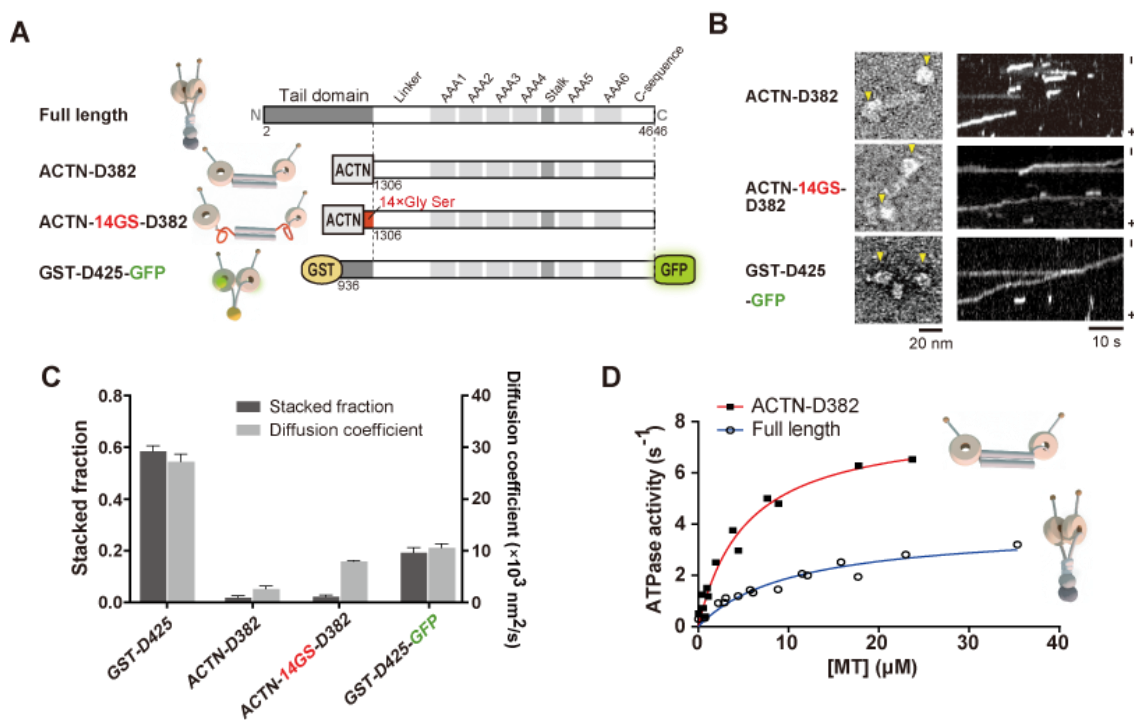


図 17. 頭部間の相互作用を制御したコンストラクトの運動と形態

(A) コンストラクトの模式図. ACTN-D382 および ACTN-14GS-D382 は ACTN を通じて二量体化しており、また N 末側に蛍光標識のための SNAP-tag が付加されている。(B) 頭部間の相互作用を制御したコンストラクトの ADP・Vi 状態での典型的な電子顕微鏡像および 1 mM ATP 存在下での運動の様子を示すカイモグラフ. 電子顕微鏡画像中の矢印は各コンストラクトにおける頭部の位置を示している。カイモグラフ横の符号は微小管の極性を表す。(C) ス

タック分子の割合と微小管上での拡散係数. 濃いグレーのバーはスタック分子の割合を表し, ADP・Vi 状態での値を示している. 薄いグレーのバーは拡散係数を表し, 1mM ATP 存在下での運動から計算された値を示している. ACTN-D382 および ACTN-14GS-D382 でスタック分子と判定されたものは, 自動判定による疑陽性である. (D) 全長および ACTN-D382 の 1 mM ATP 存在下における定常状態 ATP 加水分解活性を示すグラフ. グラフ横のイラストは各コンストラクトの模式図. 微小管の濃度は α -チューブリンと β -チューブリンのヘテロダイマーの分子量から計算した値を用いている. プロットに対してミカエリスメンテン式によるフィッティングを行ったところ, ACTN-D382 の分子活性 (k_{cat}) は $8.0 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$, 全長は $3.9 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$ となった. 一方, ミカエリス定数 ($K_{m,MT}$) は ACTN-D382 で $5.3 \pm 1.0 \text{ }\mu\text{M}$, 全長で $10.5 \pm 2.3 \text{ }\mu\text{M}$ となった.

1.3.7 2分子のダイニンの運動が示す自己阻害の解除

これまでの結果から, 1分子の全長ダイニンは2つの頭部をスタックさせて微小管上を拡散するある種の自己阻害状態にあり, このスタック構造が解けることで一方向性の運動が現出することが明らかとなった. これに加えて, 一つの荷物の上で多分子化したダイニンは一方向性の運動を示すことから, 多分子化に伴うダイニン間の相互作用によって阻害状態の解除が起こっている可能性が考えられる. そこで, 他のダイニンが存在することによって阻害状態の解除が起こるかどうかを調べるために, 最小の単位である2分子が同時に働く状況において自己阻害状態からの解除が起こるかどうか確かめることにした. 2分子の全長ダイニンを二本鎖のDNAに約20 nmの間隔を空けて結合させ, その運動を観察した (図 18. A, B). 2分子のダイニンは1分子のときと異なり, 微小管上でしばしば停止する時間を挟みながらマイナス端方向へ速い一方向性の運動を示した (図 18. C). 停止と停止の間, すなわち軌跡中で一方向性の運動が持続するセグメントの時間の平均は $\tau = 6.6 \text{ s}$ であり, 平均の速度は 360 nm/s であった (図 18. D, E). 速度分布は4分子, 8分子の場合と同じく速い速度領域に長い尾を引く形であり, 平均の速度にも大きな違いは見られなかった (図 18. D). これは, ダイニンだけが多分子化した際に見られる一方向性の運動には, 分子数の多寡はほとんど影響しないことを示している. また, 停止している時間の平均は $\tau = 3.8 \text{ s}$ であった (図 18. F). 1分子と2分子の速度分布を比較してみると, 1分子のときに見られたプラス端方向への運動が明らかに減少し, 代わりにゼロ付近のマイナス端方向への運動が増加した (図 18. G). これは, 一分子で見られたプラス端方向への運動が抑えられた分がゼロ付近のマイナス端方向への運動に転化した可能性を示唆している. もしくは, プラス端方向への

拡散が抑えられたことによって、ATPaseにカップルしたパワーストロークによる比較的遅い運動が顕在化したという可能性もある。一方で、マイナス端方向への速い速度の割合はほとんど変化しておらず、この速い速度領域に関して2つの分子が複合体化した効果はほとんど認められなかった。2つの分子を単純に結合させただけで、1分子で見られたような激しい拡散運動が抑えられ、一方向性の運動が顕著になったということは、単純に2つの分子がつながったことで生まれる効果の中に自己障害状態の解除につながる要因があるということを示している。一つの可能性として、2分子が連結していることによって、2つの分子が互いに引っ張り合ったり押し合ったりという力学的な相互作用が生じ、これによる力学的な摂動によって自己障害状態が解除されるという描像があり得る (図 18. H)。この仮説を検証するために、1分子のダイニンに対して実際に力学的な摂動を与えることで、障害の解除が起こりうるかどうか確かめることにした。

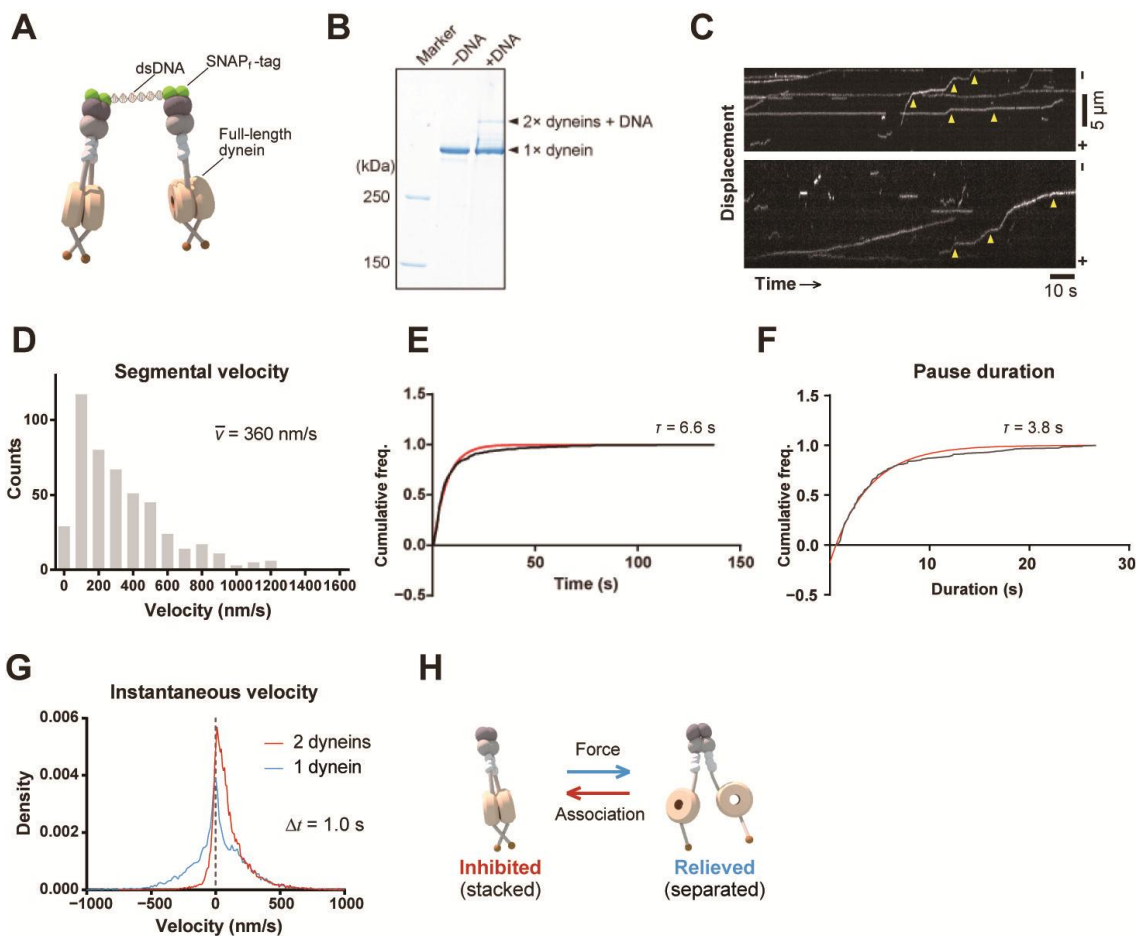


図 18. 他のダイニンの存在による障害状態の解除

(A) 二本鎖 DNA (dsDNA) を通じて結合した二分子の全長ダイニンの模式図。DNA の末端は

ベンジルグアニンで修飾されており、ダイニンN末のSNAP-tagと共有結合を形成している。(B) SDS-PAGEによる2分子ダイニン複合体の形成の確認。サンプルは5%のアクリルアミドゲルに泳動し、Coomassie G-250染色をベースにした試薬 (GelCode Blue Stain Reagent, Thermo Scientific) によって染色した。(C) DNAを介して結合した2分子のダイニンの1 mM ATP存在下での運動の様子を示すカイモグラフ。矢印は運動中に停止が起こる時点を示している。(D) 運動中の一方向性のセグメントの速度の分布。速度は、一方向性の運動を開始してから微小管から解離するもしくは停止するまでの軌跡に対する線形近似によって決定した。また、200 nm以上の変位が記録されたもののみ速度を計測した。速度の符号はダイニンの運動方向に対応してマイナス端方向を正としている。(E) 一方向性の運動を示しているセグメントの持続時間の累積密度分布。持続時間の時定数は、累積分布に対して1次の指数減衰をフィッティングして求めた。(F) 2分子ダイニン複合体の運動に見られる停止時間の累積密度分布。停止時間の時定数は、(E)に同じく累積分布に対して1次の指数減衰をフィッティングして求めた。(G) 1分子(青)と2分子(赤)のダイニンの速度分布の比較するグラフ。プロットしてある速度は時間窓の幅として1 sを採用した際の瞬間速度である。点線は速度0の位置を表す。(H) ダイニンの自己阻害とその解除についてのモデル。

1.3.8 ダイニン頭部が示す力学応答

力学的摂動によって自己阻害状態が解除される機構として、ダイニン分子に力がかかることによってダイニンの状態が変化するというものが一つの可能性として考えられる。ヌクレオチド状態を固定した運動観察および形態観察の結果から、自己阻害状態にあるダイニンはADP・Vi状態にトラップされて弱結合状態のまま微小管上を拡散している可能性が示唆されていた。そこで、ダイニンに対して力が加えられた際には弱結合状態(ADP・Pi状態)からの遷移が促進され、強結合状態(ADPもしくはapo状態)に移行することで、自己阻害の解除が起こるのではないかと、この仮説を立て、これを検証する実験を行った。

実験では、図19Aに示すように、モータードメインだけを含む単頭のダイニンであるSNAPf-D382を結合した直径200 nmのポリスチレンビーズを光ピンセットで補足し、微小管の上を高速で往復させた[66]。高速でのビーズ移動は、電気光学偏向器を用い、電場を掛けた結晶中で光の向きを変化させることで実現している("1.2.3.5 光ピンセットの構築"参照)。微小管上をスキャンする際に、確率的に微小管とダイニンの間に結合が生じるので、そのときの結合の持続時間とダイニンにかけられている力の大きさを計測し、負荷をかける速度(Loading rate; 以下負荷速度)に対する依存性を計測した(図19.B, C)。なお、ビーズを高速で動かしたのは、ビ

一ズの移動が遅く、負荷速度が小さい場合はビーズの回転自由度のためにダイニンに十分な力がかかる前に微小管からダイニンが解離してしまう可能性が高く、力による結合状態の変化を検知できない可能性が指摘されているからである[66]. 実験は 1 mM ATP の存在下で行い、1 分子の全長の観察から基本的に弱結合状態に留まっていると想定されるダイニンが、負荷の下で強結合状態に移行しやすくなるかどうかを調べた。

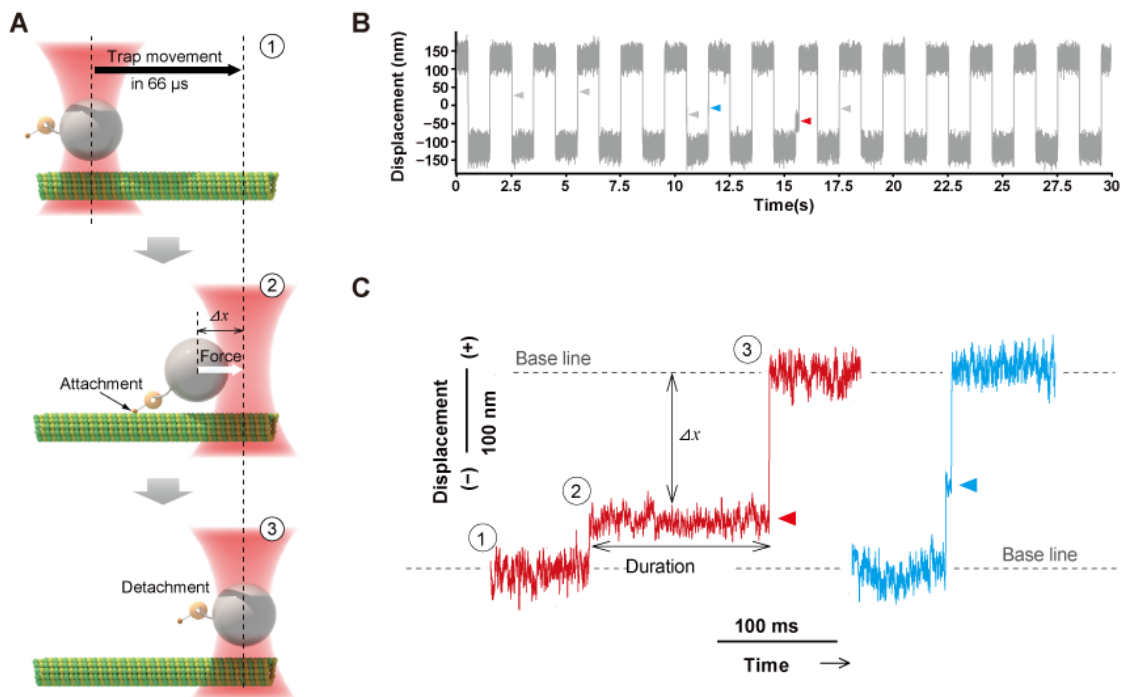


図 19. 光ピンセットによる高速スキャン実験

(A) ダイニンに対して力学的な摂動を与えるための高速スキャン実験の模式図. (B) 微小管上を高速でスキャンするビーズの変位を示す時系列データ (負荷速度 = 0.127 pN/μs). 矢印は、ダイニンと微小管の間の結合が確認された時点を示している (次項 C 参照). (C) B の矢印 (赤と青) で示されるダイニンと微小管の間の結合の様子の拡大図. それぞれのデータにおける矢印は結合している間のデータを示している.

計測を行った結果、異なる 3 つの負荷速度 (0.016 pN/μs, 0.075 pN/μs, 0.127 pN/μs) の条件において、プラス端方向に力をかけた場合とマイナス端方向に力をかけた場合も合わせて合計 2016 個の結合を観察することができた. 結合時間の分布をヒストグラムとして表してみると、明らかに 1 変数の指数関数では近似できず、少なくとも 2 つ以上の指数関数の足し合わせでな

ければ近似できなかった (図 20. A). これは、おそらく計測された結合事象が、強結合状態と弱結合状態による2つの確率過程が重ね合わせになっているからであると想定される. そこで、各条件 (負荷速度、力をかける向き) での結合の持続時間を2つの指数関数で近似し、異なる2つの時定数を計算することにした. その結果、短い方の時定数が0.1–0.2 msであったのに対して、長い方の時定数は、1 ms以上のオーダーであった (図 20. B). ここから、1ミリ秒以上の結合時間をもつイベントを強結合と定義して全結合イベントの中の強結合イベントの割合を計算し、負荷速度と力がかかる方向に対する依存性を見ることにした.

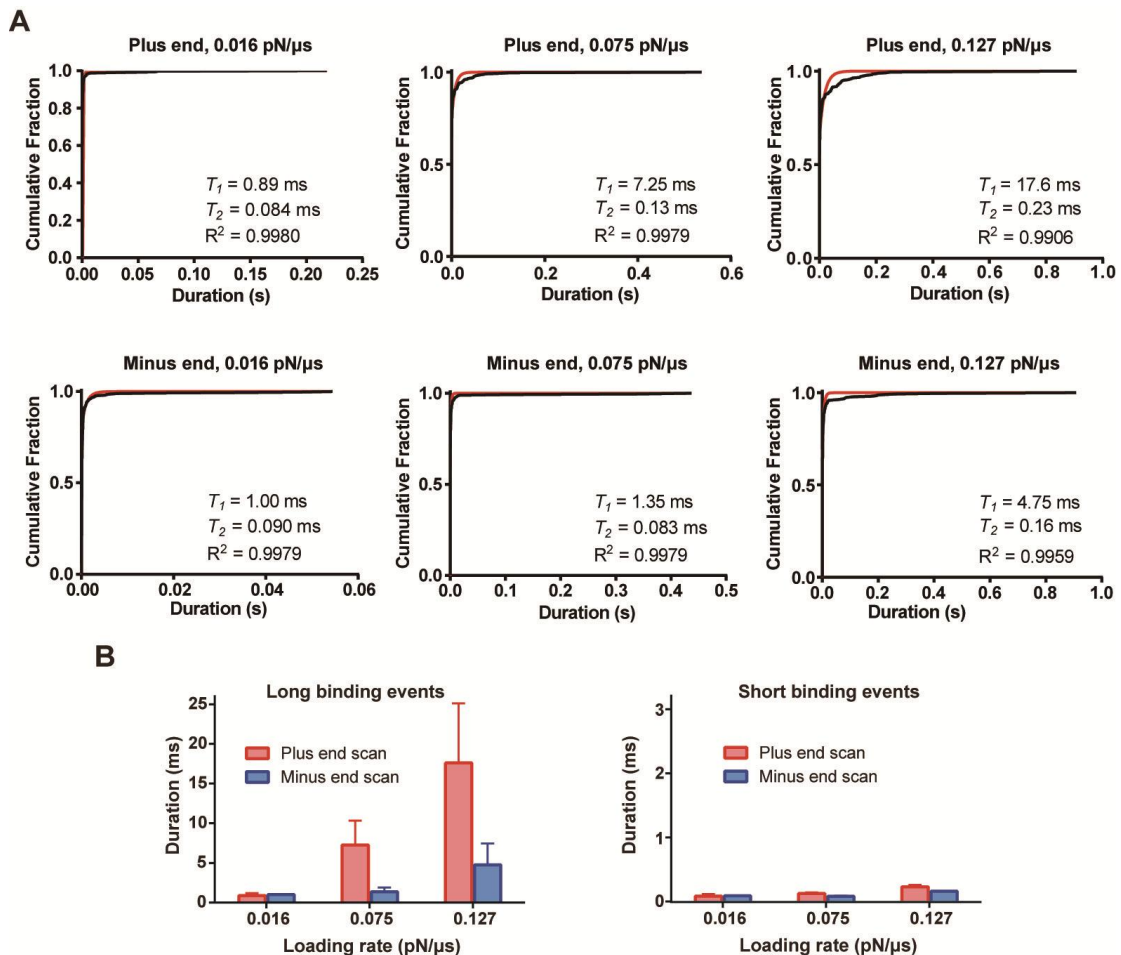


図 20. 異なる3つの負荷速度における結合時間

(A) 3つの異なる負荷速度におけるダイニンと微小管との間の結合時間を力をかける向きごとに示したヒストグラム. 上段の3つのグラフがプラス端に向かってダイニンを引いたとき ("Plus end"), 下段の3つがマイナス端に向かって引いたとき ("Minus end") のヒストグラムとなっている. (B) 結合時間のヒストグラムを2つの指数関数の和で近似したときの長

い方の時定数 ("Long binding events") と短い方の時定数 ("Short binding events") の負荷速度に対する依存性を示すグラフ。

負荷速度と力の向きごとに定義に従って強結合の割合を計算したところ、負荷速度の増大にともなって強結合の割合が増加していくことが分かった (図 21. A). 一方で、力をかける向きに対する大きな違いは見られず、これらの結果から、ダイニンは負荷の向きにほぼ関係なく、力を加えられたときに弱結合状態から強結合状態へ移行する確立が上昇するということを示唆している。さらに、ダイニンに掛かった力に対して強結合の結合時間をプロットしたところ、マイナス端に向かって力をかけた場合は、力に対する結合時間の依存性は認められなかったが、プラス端に向かって力をかけた場合は、力に対する結合時間の依存性は認められなかったが、プラス端に向かって引いた際には、力が強いほど結合時間が長くなるという傾向が観察された。以上の結果は、ダイニンが、結合時間が引っ張られる方向に強く依存するようなラチェット様の機構と、逆方向に引っ張られれば引っ張られるほど結合時間が長くなるようなキャッチボンド型の機構を有していることを示している (図 21. B). 力を加えられたときに弱結合状態から強結合状態への遷移が促進される性質によって、多分子の複合体中でダイニン同士の間には掛かる力が阻害状態から活性化状態への遷移の誘起していると考えられ、ラチェット様の機構は、ダイニンが集合した時にプラス端への拡散を抑制し、一方向への運動を促進するのに寄与していると考えられる。

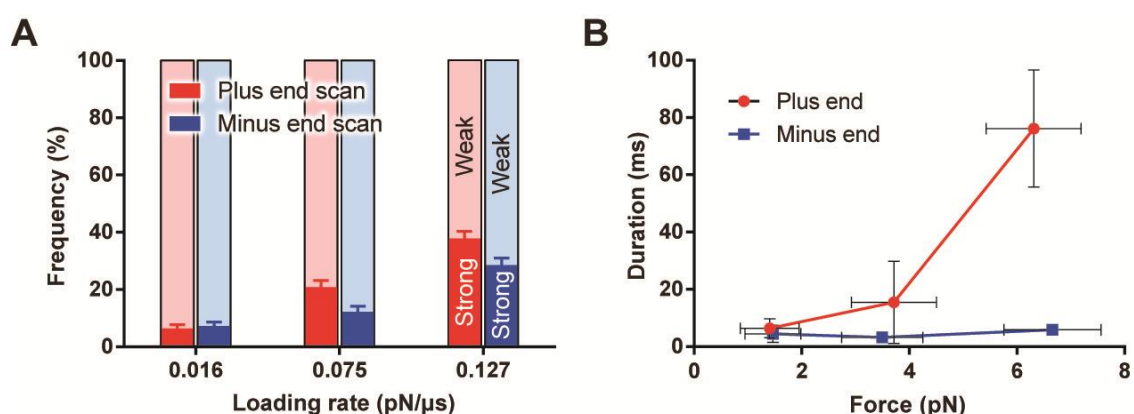


図 21. ダイニンが示す力学応答

(A) 3つの負荷速度における強結合 (1 ms 以上の持続時間を持つ結合) の割合. "Plus end scan"はプラス端に向かって負荷をかけた場合, "Minus end scan"はマイナス端に向かって負荷をかけた場合を表す. (B) 負荷速度が 0.127 pN/μs で観察された結合に関して、ダイニン

におよぼされた力の大きさとそのときの結合の長さの関係を示すグラフ.

1.4 考察

1.4.1 自己阻害状態の構造と機能

本研究において、哺乳類の細胞質ダイニンは 2 つの頭部を重ねあわせた形態をとって微小管状を拡散的に運動する、特徴的な自己阻害状態にあることが明らかとなった。このような自己制御の形式は、ミオシン V やキネシンのような、尾部領域が頭部領域に結合することによって運動を阻害する機構とは大きく異なるものである[52-54]。ダイニンにおいて、尾部領域が阻害に重要な寄与をしていないということは、微小管に結合したダイニンの電子顕微鏡像において、尾部領域が頭部領域に接触しているような像が全く観察されなかったことや (図 13)、量子ドットといった人工的な荷物が尾部に結合しただけでは拡散的な運動から一方向性の運動への転換が起こらなかったこと (図 8) から確認できる。

スタック構造をとっているダイニンの一粒子解析の結果と結晶構造の比較から、スタックしているダイニンの 2 つの頭部は、C 末ドメインが存在する面同士を向かい合わせる形で相互作用していると考えられる(図 14. A)。これは、スタック構造の平均像において 2 本のストークが交差する形になっていることから支持される (図 14. B)。これらのことから、スタック構造中のダイニンの 2 つの微小管結合ドメインは互いに逆の方向を向いている可能性が示唆される。この場合、微小管と正しい方向で結合できる微小管結合ドメインは、一方のストークが 180° 回転しない限り、片方のものに限られることになる。そのため、スタック状態にあるダイニンは 2 つの微小管結合部位が同時に微小管に結合できないために、1 つの分子の中において頭部同士が互いに力を及ぼし合うという状況が作れず、結果的に力による阻害状態の解除が困難な状態になっていると推定される。すなわち、自己阻害状態における構造自体が自己阻害状態の安定化にフィードバック的に寄与している可能性がある。

また、C 末ドメインは AAA5 から突き出した構造であるストラットと共に、AAA1 における加水分解状態と微小管結合部位の親和性の変化の連携を担っているとされており[6]、C 末が存在する面同士が相互作用することで、この連携に影響が及び、ダイニンが弱結合状態にとどまりやすくなっているという可能性も考えられる。

1.4.2 自己阻害状態の形成と解除

光ピンセットを用いた高速スキャン実験から、ダイニンの自己阻害状態の解除は力学的摂動によって起こりうることを示された (図 21). 一方で、自己阻害状態の形成のメカニズムがどのようなになっているのかに関しては確定的な証拠はないが、ここでは2つの可能性を挙げる事ができる. すなわち、状態が構造を誘起するか、構造が状態を誘起するかという2つの可能性である. 状態が構造を誘起するというのは、ダイニンのモータードメインが弱結合状態、すなわち ADP・Pi 状態のときに2つの頭部同士が相互作用しやすくなることでスタック構造が形成されるという描像であり、構造が状態を誘起するというのは、状態に関係なく自発的に2つのモータードメインがスタック構造を形成した際に、ADP・Pi 状態の安定性が高まるという描像である. これらの2つの描像は相互排他的なものではなく、構造と状態が互いにフィードバックして両者がともに自己阻害状態の形成、安定に寄与している可能性が高い. それは、全長ダイニン1分子が数秒以上に渡って飽和 ATP 存在下において微小管上を拡散し続けられるという観察 (図 5. C; 表 1) とも整合的である. 複数分子化した際には、他のダイニンなどから力を受けることによって、強結合状態への遷移が促進されることで上記のような描像で安定化した自己阻害状態が解除されるものと考えられる. これからの研究においては、FRET や架橋実験など、自己阻害状態の形成を直接観察できる技術や自己阻害状態を固定化する技術などを用いることで、阻害の解除機構に関してより多くの知見を得られるものと期待される.

1.4.3 生体内における自己阻害状態の役割

今回の研究によって、ダイニン分子は複数分子化することで、その振舞いを大きく変えるという自己制御機構を備えていることが明らかとなった. このような制御機構は、他の制御タンパク質による個々のモーター活性の制御を必要とせずに運動のオンとオフを切り替えられるという点において、細胞質ダイニンの制御機構の階層性のもっとも基礎を成すものであると考えることができる. さらに、多分子化による一方向性輸送の現出の上に LIS1 や NDEL1, またダイナクチンによる個々のダイニンの活性の制御が働くことで、様々な場所やタイミングにおいて必要とされる最適な運動様式を達成しているのかもしれない. このような描像は、細胞質ダイニンが 1

種類のタンパク質としては驚くべきほどに多種多様な場面において機能を果たしているという観察事実から考えても蓋然性が高いものに思われる。さらに、一定の移動距離以下においては能動的な運動よりも拡散の方が効率的に運動を行えるということもあり[63], ダイニンが微小管上で拡散的な振舞いをする状態に留まることで、輸送の対象となる荷物との出会いを効率化しているという可能性もある。また、状況に応じた拡散と一方向運動の転換の存在は、過去の先行研究において見られた振舞いの混乱に対して、統一的な見方を提供しうるものであると考えられる。すなわち、先行研究で見られた拡散運動は自己障害状態にあるダイニンの挙動を観察したものであり、一方向性の運動は、観察プローブとして用いられた量子ドットやビーズ上で、ダイニンが偶然多分子化した際の振舞いを見ていたものであると解釈することができる。

2分子のダイニンが複合体化した段階で、一分子においては見られなかった顕著な一方向性が現れたという観察事実 (図 18. C, D) は、運動に質的な変化が起こるためには多分子化の最小単位である 2 分子のダイニンが複合体化するだけで十分であることを示している。速度分布に関しても、2 分子、4 分子、8 分子の間に質的に大きな違いは見られず (図 11. C, 図 18. D), 1 分子と 2 分子の間に 1 方向性の輸送が達成される決定的な転換点があることを支持している。多分子のダイニンが示す速度分布は、過去に *in vivo* で観察された速度分布と同じように、速い速度領域に長い尾を引くような非ガウスの速度分布 ([78-87]) になっており、今回観察された多分子の挙動が生体内での輸送に近い状況のものであることを表していると考えられる。この長く尾を引く速度分布は、多分子のキネシンの速度分布 (図 11. E, F) とは明らかに異なるものであり、ダイニンの運動の特異性を示している。1 分子と 2 分子のダイニンの速度分布の比較 (図 18. G) から、上記の非ガウスの速度分布は、1 分子が示す 1 次元での拡散運動におけるプラス端方向への拡散が集団においては抑制され、結果的にマイナス端方向に運動が整流された結果であることが示唆されている。もし仮にこの描像が正しいとすれば、拡散運動を整流することによってエネルギー効率のよい輸送が達成されているのかもしれない。また、このような拡散運動の方向の整流には、モータードメインの力学応答の性質として明らかとなったラチェット様の性質、すなわち力がかかる向きによって結合の強さが異なるという性質 (図 21. B) が寄与しているということも考えられる。ラチェット様の性質と同時に明らかになったキャッチボンド型の力

学応答性 (図 21. B) の役割には、未だ不明の部分も多いが、多分子のダイニンが強い力を発生するとき、多分子複合体が微小管から一度に解離せずに運動すること[48]に寄与している可能性が考えられる。

今回は、ブタおよびヒトのダイニンを用いた種々の実験から自己阻害状態の存在を示すことが出来たが、このような制御機構がより他種のダイニンにも存在する一般的な機構であるかどうかについては疑問が残る。実際、出芽酵母のダイニンでは 1 分子においても一方向性の運動が支配的であることが示されており[34]、哺乳類ダイニンと同様の自己阻害状態を持っているとは考えにくい。出芽酵母とヒトのモータードメインの微小管に対する親和性を直接 TIRFM で観察したところ、出芽酵母ダイニンのモータードメインの方が 5 倍以上の時間微小管に結合することができ (図 22)、この高い親和性が安定した一方向性の運動の達成に寄与していると想定される。仮に出芽酵母のダイニンが哺乳類のダイニンと同じようにスタック構造を伴う自己阻害状態を取りうるとしても、このような強結合状態における親和性の高さによって、1 分子の中においても直ちに阻害状態が解除されてしまい、事実上阻害状態が存在しない機構になっているのかもしれない。このような哺乳類と出芽酵母のダイニンの振舞いの違いは、それぞれのダイニンの生体内での機能の違いを反映しているのかもしれない。すなわち、哺乳類においてはダイニンは多様な荷物を運ぶ役割を担っているが、出芽酵母においては細胞表層や紡錘極体にアンカーされた状態で微小管を牽引する役割を主に担っており[92]、微小管に結合した状態で活性をオフにする必要が無いということが要因になっている可能性がある。もしかすると、哺乳類のダイニンで観察された自己阻害状態は高等生物のダイニンが多様な生体機能に関与する能力を備える過程で進化した性質なのかもしれない。

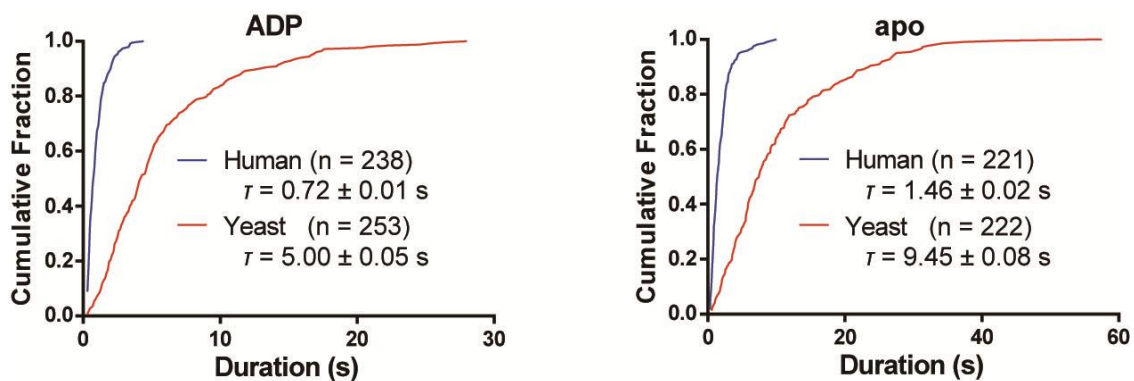


図 22. 哺乳類と出芽酵母のダイニンの微小管に対する親和性の違い

強結合状態である ADP および apo 状態における微小管に対する親和性の違いを、微小管との結合時間の違いとして示したグラフ。"ADP"は 1 mM ADP 存在下, "apo"はヌクレオチド非存在下で行った実験の結果である。計測した結合時間から累積密度分布を作製し、1 変数の指数減衰でフィッティングを行い、時定数を計算した。

第2章 LIS1 および NDEL1 による細胞質ダイニンの運動制御機構

2.1 序論

LIS1 は滑脳症という発達障害疾患において変異が確認される遺伝子の産物として同定されたタンパク質である[93, 94]. 滑脳症は, 神経系の発達の障害によって脳の表面に脳回がなくなり, その名の通り脳が平滑になることを特徴としている. 神経上皮細胞において行われている核のエレベーター運動には, ダイニンが関与していると言われており[19], LIS1 に変異が生じることでこの運動におけるダイニン機能の制御が上手く働かなくなり, 正常な神経発達が阻害されると考えられている. マウスを用いた研究では, LIS1 を完全に欠損した場合には致死となることが分かっており, 同じくダイニンの制御タンパク質として知られる NDEL1 についても同様の現象が報告されている[95, 96]. LIS1 は全体で 410 残基のアミノ酸から構成されるタンパク質であり(図 23), その C 末端側約 300 残基は合計 7 個の WD リpeatモチーフ[97, 98]を含んでおり, β プロペラ構造を形成して細胞質ダイニンおよび NDEL1 と相互作用している[99]. N 末端側約 40 残基には二量体ドメインとして知られる LisH モチーフ (Lis1 Homology motif, 8-37 a.a.) が存在し, 二量体に寄与している[100]. この他に, LisH モチーフの下流 55 番目の残基であるトリプトファンも二量体化に大きく寄与しているという報告もなされている. LisH モチーフと WD リpeatの間にはコイルドコイル領域 (58-81 a.a.) が存在しているが[101], この領域によって形成されるコイルドコイル安定性は高いものではなく, NMR を用いた構造研究から, 二量体 LIS1 分子には, この領域がコイルドコイルを形成した“closed”状態と, 2 本の α ヘリックスにほどけた“open”状態の 2 つの構造が存在する可能性が示唆されている (図 24; [102]).

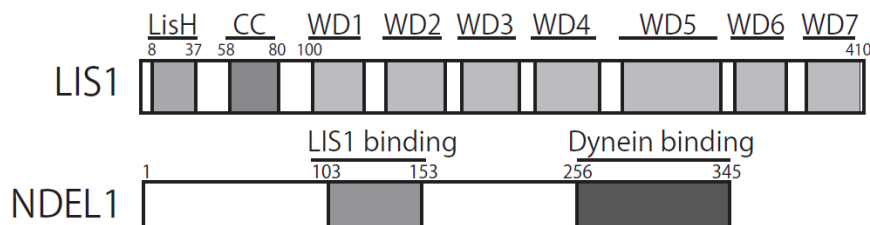


図 23. LIS1, NDEL1 の配列の概略図

LIS1 および NDEL1 のアミノ酸配列上での領域と機能の対応関係を表したものである. LisH は LIS1 の二量体化に大きく寄与していると推測される LisH モチーフを, CC はコイルドコイル領域を, WD は WD40 リpeat領域を表している.

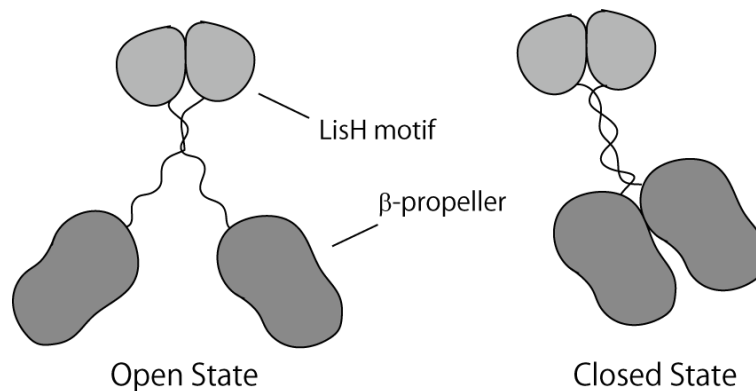


図 24. LIS1 の構造として想定される二状態

WD40 リピート領域を除いた、N 末端からコイルドコイル領域までのコンストラクトを用いた NMR から示唆される LIS1 の“open”状態と“closed”状態. “open”と“closed”はコイルドコイル領域がコイルを形成しているかどうかに対応している. LIS1 分子の構造は非対称なので“closed”状態として 2 つの構造があり得る.

一方 NDEL1 は 345 残基のアミノ酸から構成されるタンパク質であり、N 末端側約 200 残基は LIS1 との相互作用部位を含むコイルドコイル領域を形成している[103]. C 末端側の領域では細胞質ダイニンと相互作用することが分かっている[104]. LIS1 と NDEL1 はヘテロテトラマーを形成して細胞質ダイニンと相互作用し、3 者複合体を形成することも確かめられている[31, 101].

前述したように、LIS1 と NDEL1 は特に神経細胞において細胞質ダイニンに関わる現象に寄与していることが分かっている. 神経前駆細胞において LIS1, NDEL1 の発現量を減ざると核と中心体の距離が広がり、LIS1 をノックダウンすると中心体の運動が阻害される[105]. この中心体の運動は核の運動と連動しており[19], LIS1 に変異が生ずることで神経発達に障害が生じる機構の中心に位置していると考えられている. また別の研究では LIS1 のノックダウンは細胞体の移動の阻害を引き起こすことが観察されている[106]. さらに神経細胞以外で確認されている LIS1/NDEL1 が関与する現象として、有糸分裂期の細胞において LIS1 と NDEL1 をノックダウンすると、核膜消失前の膜陥入が阻害されることが分かっている[107]. 一方、再構成系を用いた運動観察実験としては山田らの研究[31]があり、この研究では、微小管滑り運動実験において LIS1 はダイニンによる微小管の滑り運動を阻害し、NDEL1 はダイニンを微小管から解離させる一方、両者が同時にダイニンに作用する場合には運動性が回復することが観察されており、生化学実験でも同様の効果が報告されている.

上記のように、LIS1 および NDEL1 によってダイニンの運動機能が制御されること、さらに LIS1 はダイニンによる微小管の滑り運動を阻害する効果を持ち、NDEL1 はダイニンを微小管から解離させる効果を持つことが明らかになっている。その一方で、制御の具体的な分子機構についての知見は未だ少なく、LIS1、NDEL1 が関与している多様な現象に対して統一的に説明できるような制御モデルは構築されていない。そこで本研究では、制御機構の詳細を解明し細胞レベルでの観察事実を分子レベルから基礎づけることを目指し、LIS1 と NDEL1 分子の機能領域と推定される部分を切り分けた断片を作成し、再構成系における運動観察および生化学実験を行った。なお、本研究のうち、昆虫細胞から精製された LIS1 および NDEL1 は、大阪市立大学の広常真治教授並びに山田雅巳准教授から提供されたものを使用し、大腸菌で作製した NDEL1 の断片の設計は、東京大学豊島研究室の中山明子氏並びに情報通信研究機構の古田健也主任研究員の協力の下で行った。

2.2 実験手法

2.2.1 LIS1 および NDEL1 の組換えタンパク質のクローニング, 発現および精製

2.2.1.1 大腸菌発現系による NDEL1 の 2 つの断片(NN, NC)の発現, 精製

ヒト NDEL1 の N 末端側断片 (NN; 44-183 a.a.) を cDNA から PCR によって増幅し, pET-17b expression vector (Novagen) の Nde I /EcoR I 部位に挿入した. PCR で増幅をおこなう際に N 末端に 6xHis-tag を付加した. 同様に, ヒト NDEL1 の C 末端側断片 (NC; 156-345 a.a.) を pCold-ProS2 vector (Takara Bio) の Nde I /Pst I 部位に挿入した. NC の N 末端側には, ベクター由来の 6xHis タグおよびそれに続いて, 可溶性を向上させる ProS2 タグが付加されている. 上記 2 つのプラスミド DNA を BL21-CodonPlus (DE3) RIL (Stratagene) ホスト菌株に形質転換した後, 形質転換した大腸菌を 1000 mL の LB 培地で吸光光度計 (DU-640; Beckman) の 600 nm の波長の OD が 0.6 に達するまで 37°C で震盪培養した. その後, 培養温度を NN については 20°C, NC については 15°C まで下げたのち, IPTG を NN に対しては 0.1 mM, NC に対しては 1 mM 添加して発現誘導をかけ, NN については 3 時間, NC については 20 時間さらに培養した後, 遠心によって細胞を回収した. 回収した細胞をプロテアーゼインヒビターカクテル (Roche) を加えた溶解バッファー (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 20 mM imidazole, pH 7.0) で懸濁し, 超音波処理によって破碎して破碎液を遠心し, 上清に含まれる組換えタンパク質を Ni-IMAC resin (Bio-Rad) に 4°C で吸着させた後, 溶出バッファー (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 300 mM imidazole, pH 7.0) によって溶出・回収した. 溶出液はさらに NAP-5 カラム (GE Healthcare) に通すことで, 溶出バッファーから imidazole を除いたバッファーに溶液を置換した. なお NC に関しては, N 末端側に付加されている ProS2 タグを除去するために NAP5 カラム後のタンパク質溶液に HRV3C protease (Novagen) を加え, 4°C の環境下で 16 時間処理した. タグを除去した後は HRV3C に付加されている His-tag を利用して, Ni-IMAC に対する素通り画分を回収することで最終的な目的のタンパク質溶液を得た.

組換えタンパク質の濃度決定には改良ブラッドフォード法[108]を用いたが, NC の最終溶液には分解物が含まれていたため, その濃度決定には SDS-PAGE を合わせて用いた. 改良ブラッドフォード法では, Coomassie Brilliant Blue 試薬 500 μ L にタンパク質溶液を 10 μ L 加え, 分光光

度計で混合溶液の 595 nm の吸光度を測定した。定量の為の標準曲線の作成には純粋に溶かした 2 BSA 溶液の希釈系列を用いた。SDS-PAGE を用いた濃度定量では電気泳動後のタンパク質のバンドの濃さをソフトウェア (Quantity One; Bio-Rad) を用いて定量した。標準となるタンパク質溶液としては、改良ブラッドフォード法と同様に BSA 溶液の希釈系列を使用した。

2.2.1.2 昆虫細胞系による LIS1, NDEL1 全長, および N 末端除去 LIS1 の発現, 精製

GST-LIS1 全長, GST-NDEL1 全長, GST が付加された N 末端除去 LIS1(Δ N-LIS1)は Bac-to-Bac baculovirus system (Invitrogen) と SF-9 inst cells, および High Five inst cells (BD Biosciences)を用いて精製した。全長 LIS1 (1-410 a.a.), 全長 NDEL1 (1-345 a.a.), および Δ N-LIS1 (57-410 a.a.) をコードしている cDNA に GST タグを付加し, pF_{AST}B_{AC}HTa (Invitrogen) の EcoR I 部位に挿入後, DH10BA cells (Invitrogen) にトランスフェクションした。GST は可溶性の向上とアフィニティー精製のために付加した。精製したバキュロウイルスシャトルベクターDNA を LipoTAXI (Stratagene) を用いて SF-9 cells にトランスフェクションして増幅させたのち, High Five inst cells に感染させ, 培養した細胞から目的タンパク質を精製した。精製には GST-Sepharose (GE Healthcare) を用い, 細胞由来の GST を除くためにさらに TSKgel G3000SWXL (Tosoh) によってゲルろ過し, ゲルろ過バッファー (10 mM PIPES-KOH, 300 mM potassium acetate, 4 mM MgSO₄, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, pH 6.8) に保存した。また, 単量体の LIS1 を得るために, ゲルろ過後の GST- Δ N-LIS1 溶液に thrombin (Sigma) を加え, 22°C で 4 時間処理した後に GST bind Resin (Novagen) の素通り画分を回収することで GST を除き, Δ N-LIS1 として保存した。

2.2.2 微小管共沈実験

3mM ATP および 20 μ M パクリタキセルを含む共沈バッファー (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10% グリセロール, pH 8.0) 中で, 50 nM ダイニンおよびモル比で 10 倍量の NN, NC, および NDEL1 全長のいずれかを混合し, さらに 0.25~12 μ M の微小管を加えて 10 分間室温で静置したのち, スピнкаラム (Ultrafree Centrifugal Filters, Durapore

PVDF 0.1 μm ; MLLIPORE) で混合溶液を卓上遠心機 (himac CT 13R, HITACHI) で遠心 (13,000 rpm, 5 min, 25°C) し, 微小管のみをカラムにトラップした. もとの混合溶液と等量の共沈バッファーを含むように計算したサンプルバッファーでメンブレンをよく洗ってトラップされたタンパク質を回収したのち, 素通り画分と合わせて SDS-PAGE を行った. ゲル中のダイニン重鎖バンドをソフトウェア (Quantity One, Bio-Rad) で解析し, 微小管に結合していたダイニンと素通りのダイニンの和に対する微小管結合ダイニンの割合を計算することで, 微小管と結合したダイニンの割合を求めた.

2.2.3 密度勾配遠心およびゲルろ過を用いた分子量決定

NN, NC, GST- ΔN -LIS1, および ΔN -LIS1 のアッセイバッファー (12 mM PIPES-KOH, 2 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 1 mM DTT, pH 6.8) 中での沈降係数 (S) を, 10-40%(w/v) のスクロース密度勾配遠心によって決定した. 遠心は各タンパク質の溶液を 4.0 mL の密度勾配溶液の上に重層したのち, Hitachi P50S2 スイングローターで 40,000 rpm, 2°C で 20 時間行った. 標準タンパク質として, β -アミラーゼ (S = 8.9), アルコール脱水素酵素 (S = 7.4), BSA (S = 4.3), 炭酸脱水素酵素 (S = 3.2), チトクロム c (S = 1.9) を用いた.

ストークス半径 (r) の決定は, TSKgel G3000SWXL (Tosoh) ゲルろ過カラムを用いたゲルろ過によって行った. ゲルろ過用のバッファーは, アッセイバッファーにゲルろ過担体へのタンパク質の非特異的吸着を抑える目的で 300 mM 酢酸カリウムを添加したものを使用した.

決定された沈降係数およびストークス半径を次の式[109]に代入し, 溶液中における各タンパク質の分子量を計算した.

$$M = 6\pi N\eta_0 \times r_{\text{Stokes}} \times s_{20,w} / (1 - v\rho)$$

ここで, π は円周率 (3.14), η_0 は溶媒の粘性係数 (1.0×10^{-2} g/cm/s), N はアボガドロ数 (6.03×10^{23}), v は偏比容 (0.725 cm³/g), そして ρ は溶媒の密度 (1.0 g/cm³) を表している.

2.2.4 密度勾配遠心によるダイニンとの結合実験

1 mM ATP を添加したアッセイバッファーで細胞質ダイニンを 25 nM に希釈し, モル比で

10 倍量の NN, NC, ΔN-LIS1 または 30 倍量の GST-ΔN-LIS1 を加え混合した溶液を 10-40%(w/v) のスクロース密度勾配溶液に重層し遠心を行った。遠心は Hitachi P50S2 スイングローターで 33,000 rpm, 2℃で 18 時間行った。遠心後の溶液を 16 のフラクションに分け, SDS-PAGE を行い, 泳動後のゲルを銀染色した。ダイニン非存在時の溶液も同様に遠心・泳動し, 各タンパク質のバンドの変化を観察した。

2.2.5 GST プルダウンアッセイ

プルダウンアッセイは 50 mM KAc バッファーを用いて行い, GST-LIS1 を GST-bind Resin を混合し, 25℃の環境下で 30 分間回転攪拌することで GST-LIS1 をレジンに固定した。混合溶液に NN または NC を添加し, さらに室温の環境下で 30 分間回転攪拌した後に溶液をスピнкаラム (Micro Bio spin, Bio-Rad) に移し, 卓上遠心機を用いて遠心 (1,500 ×g, 2 min, 25℃) した。GST-LIS1 に結合したまま残ったタンパク質を泳動用サンプルバッファーに溶かし, 素通り画分と同時に SDS-PAGE を行った。

2.3 実験結果

2.3.1 組換えタンパク質の発現と精製

大腸菌および昆虫細胞の発現系を用い, N 末に GST を付加した LIS1 および NDEL1 全長 (GST-LIS1, GST-NDEL1), GST 付き N 末端側領域除去型 LIS1 (GST-ΔN-LIS1, 57-410 a.a.), NDEL1N 末端側領域断片 (NN, 44-183 a.a.), および NDEL1C 末端側領域断片 (NC, 156-345 a.a.) を精製した (図 25)。さらに, GST-ΔN-LIS1 に対する Thrombin 処理により, GST 無しの N 末端側領域除去型 LIS1 (ΔN-LIS1) を得た。

大腸菌から精製された NN および NC のうち, NN は安定に発現されたが, NC は不安定であり, その溶液には分解物と思われる夾雑物が存在していた (図 25. B 矢印)。これら夾雑物を除くためにゲル濾過を行ったが, 夾雑物は分解されていない NC と同時に溶出されてしまい, 分離することはできなかった。このような分解物が出来てしまうのは, NC の大部分が天然変性領域を含んでいるためであると推測される。

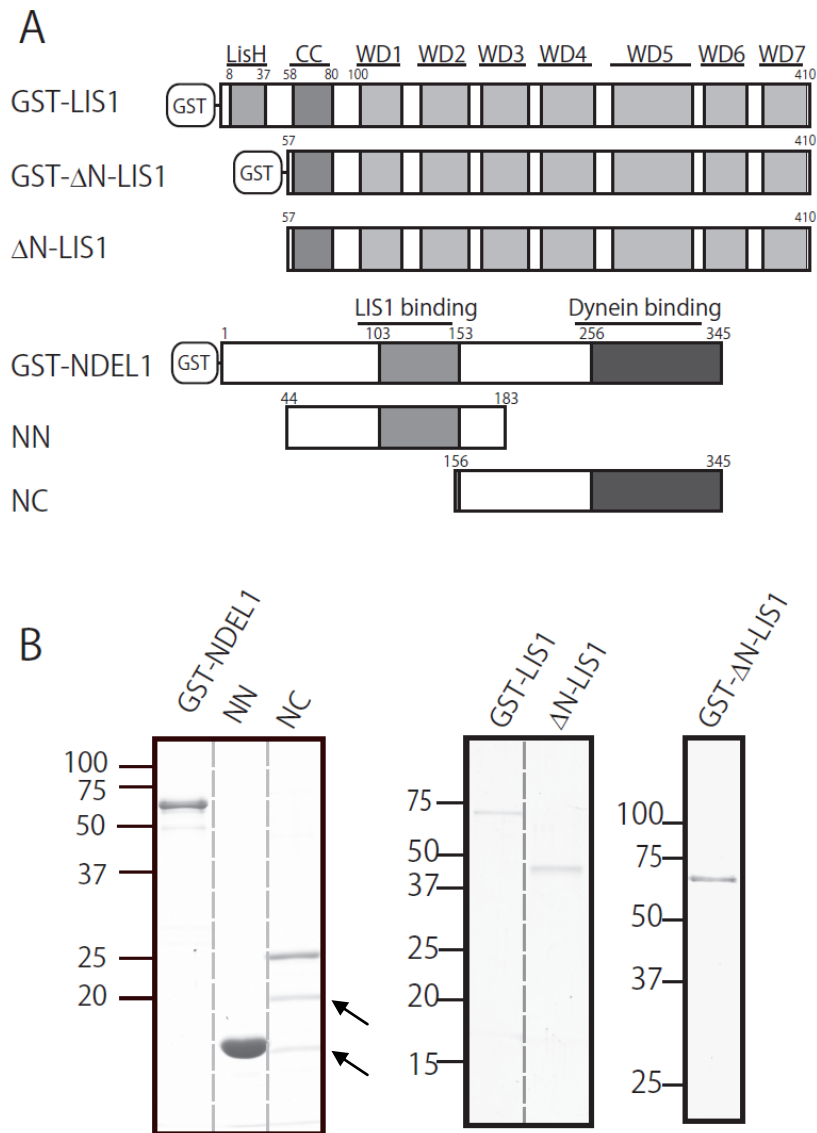


図 25. 作製したコンストラクトの模式図と精製時の電気泳動写真

(A) 実験に使用した LIS1 および NDEL1 全長とその断片の模式図. 図中の LisH は LisH モチーフを, CC はコイルドコイル領域を, WD は WD40 リピード領域を表している.

(B) LIS1, NDEL1 の精製時の SDS-PAGE 画像. 並んでいる 3 枚のゲルは, 左から 12.5%, 10%, 12.5% アクリルアミドゲルを CBB 染色したもの. NC のレーンでメインバンドの下に見えているバンド(図中矢印)は分解物と推定されるもの.

2.3.2 組換えタンパク質のオリゴマー状態

密度勾配遠心とゲルろ過から得られた NN, NC, GST-□N-LIS1, および ΔN-LIS1 の沈降係数とストークス半径から, 溶液中の各タンパク質の分子量を求め, アミノ酸配列から計算される分子量との比を取ることによって, オリゴマー状態を決定した (表 6). これにより, NN と GST-ΔN-LIS1

は二量体を形成しているが、NN とΔN-LIS1 は単量体として溶液中に存在していることが分かった。特に、GST-ΔN-LIS1 が二量体であったのに対して、ΔN-LIS1 が単量体であったことから、LIS1 のN 末側に存在している LisH モチーフが二量体化に必須であり、コイルドコイル領域の二量体化への寄与は小さいということが分かった。

Constructs	r_{Stokes}	$S_{20,w}$	Estimated	Polypeptide	Ratio	Oligomeric
			M_r	M_r		state
	<i>nm</i>	$\times 10^{-13}s$				
NN	4.2	1.9	32,900	16,500	2.0	Dimer
NC	3.0	1.5	18,600	22,100	0.84	Monomer
GST-ΔN-LIS1	5.1	5.8	122,000	65,300	1.9	Dimer
ΔN-LIS1	3.3	3.4	45,700	40,000	1.1	Monomer

表 6. 組換えタンパク質のオリゴマー状態

r_{Stokes} はストークス半径を表し、 $S_{20,w}$ は沈降係数を表す。“Ratio”の項の値は NN と GST-ΔN-LIS1 が二量体、NC とΔN-LIS1 が単量体であることを示している。

2.3.3 タンパク質間相互作用の確認

ダイニン・LIS1・NDEL1 の三者の間の相互作用の関係を調べるために密度勾配遠心を用いたダイニンとの結合実験、および GST-LIS1 との GST プルダウンアッセイを行ったところ、NDEL1N 末端側断片 (NN; 44-183 a.a.) は LIS1 とのみ相互作用し、C 末端側断片 (NC; 156-345 a.a.) はダイニンとのみ相互作用することが分かった (図 26)。

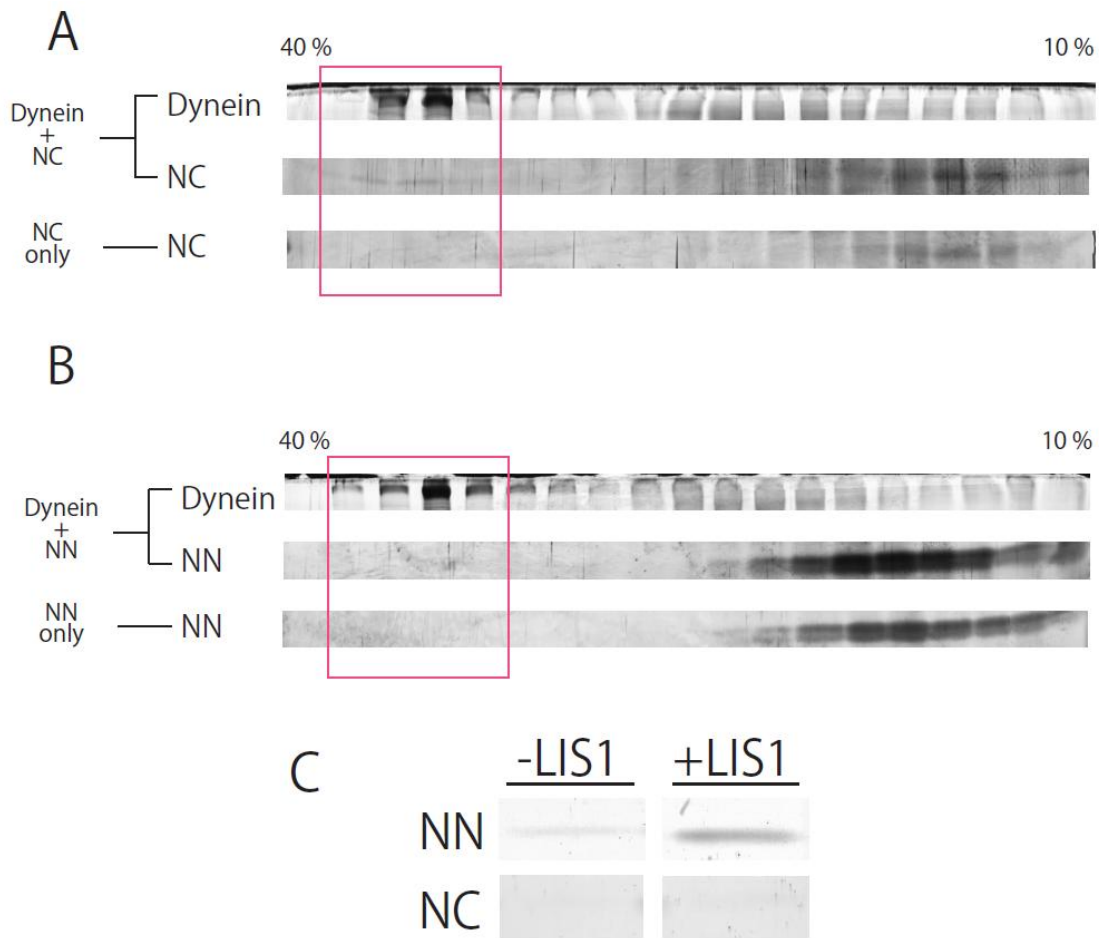


図26. ダイニンと NDEL1 断片間, および NDEL1 断片と LIS1 間の相互作用

ダイニンと NC(A)およびダイニンと NN(B)の間の相互作用の有無を調べるために行った10%-40%スクロース密度勾配遠心の SDS-PAGE で得られたゲルを銀染色したもの. 図中の赤枠はダイニンが沈降した付近のフラクションを示す. (A)と(B)を比較することにより NC はダイニンと相互作用するが, NC はしないことが分かる. スクロースの密度を各ゲル写真の上部に示す. (C) GST プルダウンアッセイで得られた CBB 染色の SDS-PAGE 写真. NN のみが GST-LIS1 と相互作用していることを示している.

また同様の方法によってダイニンと GST- Δ N-LIS1 および Δ N-LIS1 の間の結合を調べたところ, GST- Δ N-LIS1, Δ N-LIS1 とともに, ダイニンと相互作用することが分かった (図 27).

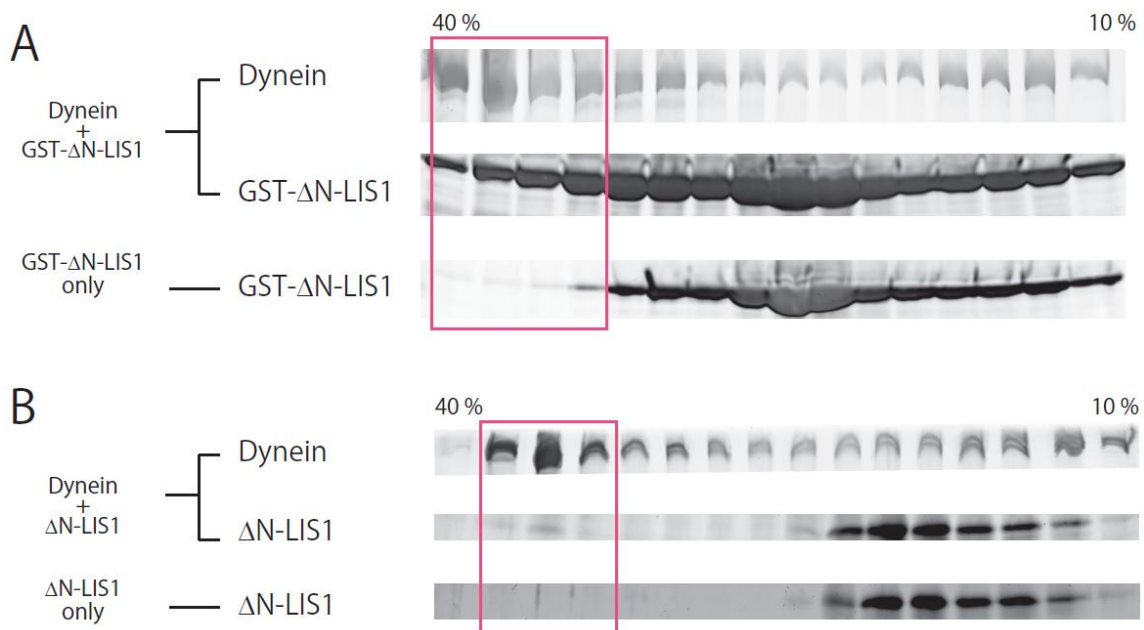


図 27. ダイニンと GST-ΔN-LIS1 および ΔN-LIS1 の間の相互作用

ダイニンと GST-ΔN-LIS1 (A) および ダイニンと ΔN-LIS1 (B) の間の相互作用の有無を調べるために行った 10% - 40% スクロース密度勾配遠心の SDS-PAGE で得られたゲルを銀染色したもの。図中の赤枠は図 5 と同様にダイニンが沈降した付近のフラクションを示す。GST-ΔN-LIS1・ΔN-LIS1 とともに、ダイニンと相互作用することを示している。

2.3.4 NDEL1 の C 末端側領域によるダイニンの微小管からの解離

これらの NDEL1 断片のダイニン運動機能への影響を調べるために、微小管滑り運動実験を行った。まずコントロールとしてチャンバーにダイニンだけを流し込んで観察を行ったところ、平均速度として $0.46 \pm 0.15 \mu\text{m/s}$ (mean \pm SD) の滑り運動が観察された。次に、ダイニンに対してモル比で 10 倍量の NN を加えた条件において実験を行ったところ、コントロールと同様の滑り運動 ($0.44 \pm 0.13 \mu\text{m/s}$) が観察された (図 28. A)。一方、ダイニンに対して 10 倍量の NC 存在下で観察を行ったところ、ガラス表面上のダイニンと相互作用する微小管はほとんど観察されなかった (図 28. B)。

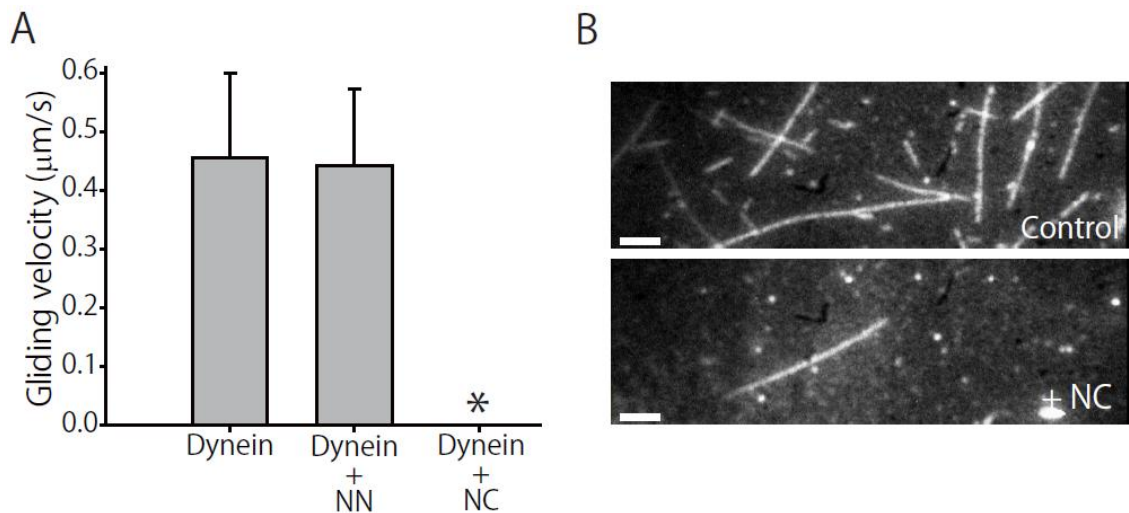


図 28. NDEL1 断片のダイニンによる微小管滑り運動に対する影響

(A) NDEL1 断片存在時における微小管滑り運動速度の変化. ダイニンのみのコントロール($n = 55$), NN 存在時($n = 55$)で滑り運動速度の有意な変化はなかった. グラフ中のエラーバーは標準偏差を表す. “*”はダイニンと相互作用して連続的に滑り運動を示す微小管が観察されなかったことを表す. (B) コントロール(図上)および NC 存在時(図下)における暗視野顕微鏡像. NC 存在時の像にある微小管は, 連続的に運動することなくガラス表面から解離してしまうものが一時的にガラス表面に寄ってきているときの様子を示している. 図中のスケールバーの長さは $5 \mu\text{m}$ に対応している.

しかしながら興味深いことに, バッファーから ATP を抜いた条件で観察を行ったところ, NC 存在下においてもコントロールと同等の数の微小管が視野中に観察された. さらに, この状態でチャンバーに 1 mM ATP を含んだバッファーを流し込むと, 微小管はガラス表面上から解離し始めた. 同様の結果は NC の代わりに NDEL1 全長を用いた実験でも観察され, 微小管とダイニンの解離現象が ATP の存在に依存したものであることが分かった. これらの結果から, NDEL1 全長が持つダイニンと微小管の解離を引き起こすという機能には, C 末端側領域だけで十分であることが示された. また以上の結果により, 微小管の解離現象は NDEL1 がストークヘッドに結合することでダイニンと微小管の間の障害物となることで起こるといった単純に物理的な機構によるものではないことも示唆された.

以上の結果を確認するため, 微小管共沈実験を行った. NC 非存在下のコントロール条件では, ダイニンと微小管の解離定数(K_d)は $2.5 \pm 0.5 \mu\text{M}$ であったのに対し, NC 存在下では解離定数は $3.4 \pm 0.7 \mu\text{M}$ に上昇したが (図 29), 有意な違いがあるとは言えないものであった.

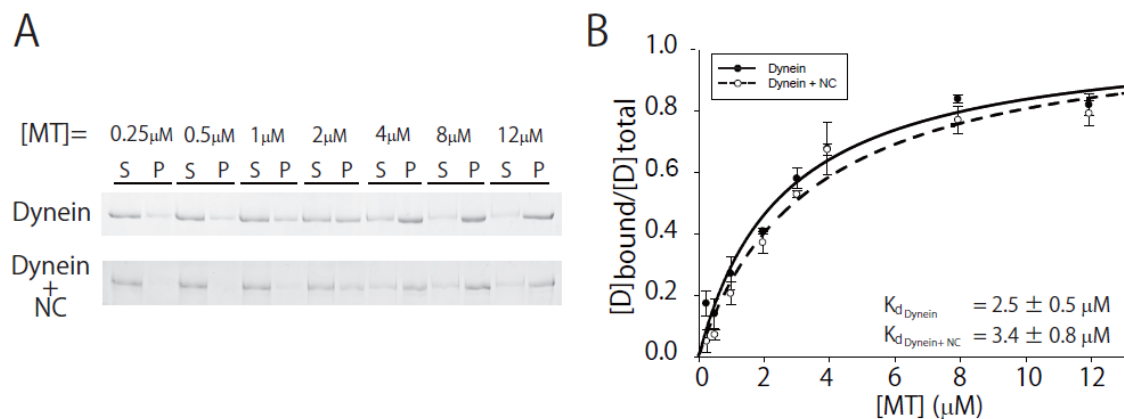


図 29 NDEL1C 末端側断片のダイニン—微小管間の相互作用への影響

(A) 共沈実験におけるダイニン重鎖の SDS-PAGE のバンド. コントロール条件(Dynein)と, NC 存在時(Dynein + NC)の 2 種類の実験について示す. 最上段の[MT]はチューブリンダイマー単位での微小管濃度を表し, S と P は各微小管濃度条件における微小管非結合画分と結合画分をそれぞれ表している. (B) コントロール条件(Dynein)と NC 存在下(Dynein + NC)それぞれにおける結合解離曲線. 縦軸の $[D]_{\text{bound}}/[D]_{\text{total}}$ は微小管と結合したダイニンの割合を示す. 解離定数はコントロールでは $2.5 \pm 0.5 \mu\text{M}$, NC 存在下では $3.4 \pm 0.7 \mu\text{M}$ であった. グラフ中のエラーバーは 3 回の実験から得られた標準偏差である.

さらに, 微小管の濃度を $3 \mu\text{M}$ に固定した条件で, NN, NDEL1 全長も合わせたダイニン - 微小管相互作用への影響の比較を行った (図 30 A). NDEL1 全長存在時に微小管に結合していたダイニンの割合は $47.9 \pm 0.6\%$ (mean \pm SD) であり, これは NC 存在下における割合 ($49.6 \pm 0.6\%$) と同等のものであった. また, これはコントロール条件 ($54.3 \pm 0.8\%$) に比べて有意に低いものであった ($p < 0.005$, スチューデントの t 検定より). 一方, 微小管滑り運動に対する影響から推測されたとおり, NN はダイニン - 微小管相互作用にほとんど影響を与えなかった.

ATP 非存在時の微小管滑り運動実験において, NC および NDEL1 全長が解離作用を示さなかったことを受けて, ATP 非存在条件において共沈実験を行ったところ NC, NDEL1 全長共にダイニン—微小管相互作用の強さは変化せず, 微小管滑り運動と同様の傾向を示した (図 30 B).

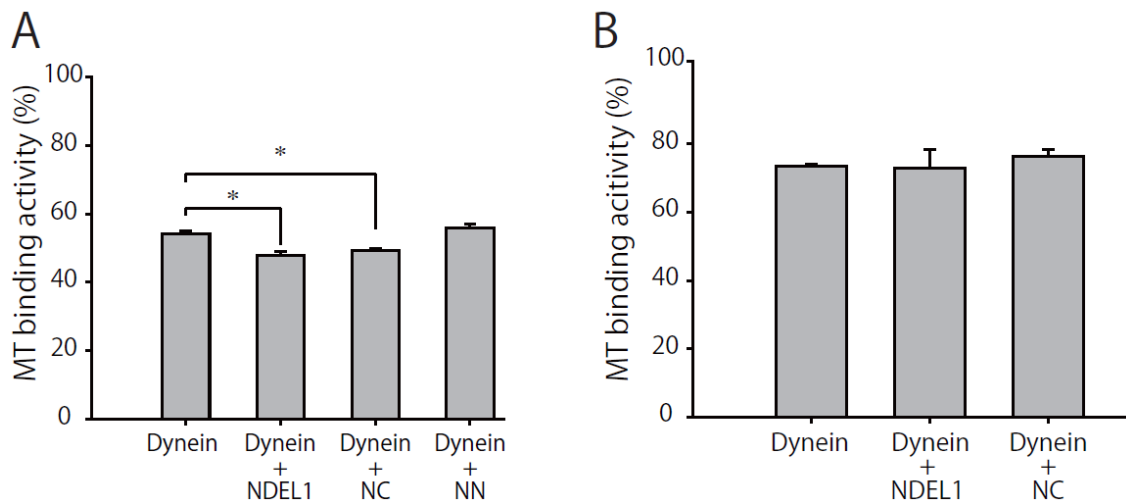


図 30 NDEL1 全長および断片のダイニン—微小管相互作用への影響

3 mM ATP 存在時(A)および ATP 非存在下(B)における NDEL1 全長および断片の影響。エラーバーは 3 回の実験で得られた数値から計算した標準偏差を表す。p 値はスチューデントの t 検定より計算(*, $p < 0.005$)。

しかしながら、解離定数および微小管に結合していたダイニンの割合の NC の存在／非存在による変化は、暗視野顕微鏡での観察においてガラス表面と相互作用している微小管がほとんど観察されなかったという微小管滑り運動実験の結果から想像されるよりも低いものであった。この共沈実験で観察された NDEL1 全長及び NC の滑り運動実験に比した際の弱い効果は、両実験におけるダイニンの空間的自由度の差に起因するものと推測される。すなわち、過去の Amos の研究[90]において、ダイニンは溶液中において微小管を束化する性質をもっていることが報告されており、通常の実験条件下ではダイニンが二量体以上の多量体を形成することはないということと合わせると、これはダイニンが主な微小管結合部位であるストークヘッドだけでなく、尾部を通しても微小管と相互作用するという可能性を示唆している。微小管滑り運動実験においては、ダイニンはガラス表面に主に尾部を通じて固定されると考えられているため、上述の尾部を通じた微小管との相互作用は顕在化しにくい。共沈実験ではダイニンが溶液中に遊離の状態が存在しているために尾部を通じての相互作用の効果が表れ、見かけ上 NDEL1 および NC の効果が弱まったと考えられる。いずれにせよ、上記微小管滑り運動実験および共沈実験の結果から、ダイニン—微小管の相互作用を弱めるには、NC に含まれる領域だけで十分なことが示された。

また、NCは単量体であるので(表6)、NDEL1の二量体化は微小管からのダイニンの解離に必須ではないということも示された。

2.3.5 LIS1が起こすダイニン運動機能の阻害のNDEL1N末側領域による回復

2.3.3で示されたように、NNはダイニンの運動機能には影響を与えなかった。しかしながら、NNにはLIS1結合部位が含まれており、LIS1によるダイニン運動機能の阻害に影響を与えることが予想される。そこで影響の有無を調べるため、LIS1とNDEL1断片が同時に存在する状況下での微小管滑り運動実験を行った。まず、LIS1のみをダイニンと混合した条件で実験を行ったところ、滑り運動の速度は $0.12 \pm 0.07 \mu\text{m/s}$ まで減少し、多くの滑り運動を見せない微小管が視野中に存在していた(図31.A)。なお、先行研究[31]において、このような微小管の滑り運動の阻害は、LIS1が微小管をガラス表面にアンカーすることによってではなく、LIS1がダイニンの運動機能を直接阻害することによって起こることがすでに確認されている。次に、LIS1とNNを同時にダイニンと混合した条件で実験を行ったところ、微小管は $0.48 \pm 0.15 \mu\text{m/s}$ の速度でガラス表面上を動き、NDEL1全長において確認されているものと同様の阻害の解除が観察された。一方、LIS1とNCを同時に混合した条件では阻害の回復は観察されなかった。以上の結果から、LIS1によって引き起こされるダイニン運動機能の阻害を回復するには、NNに含まれる領域のみで十分であるということが強く示唆された。

また、密度勾配遠心によるダイニンとの結合実験およびGSTプルダウンアッセイの結果からNNはLIS1には結合するが、ダイニンには結合しないことが確認されており、NNによる阻害回復は、NNがダイニンではなくLIS1に相互作用して起こることが推測される。これを検証するため、微小管滑り運動実験において、用いるタンパク質をすべて混合した溶液を用いるのではなく、各タンパク質を個別に調整して順次チャンバー内に流し込むという方法で観察を行った。この方法においては、チャンバー内にまずダイニン溶液を流し込み、次いでチャンバー内をアッセイバッファーで洗ったのちにLIS1もしくはNDEL1/NNを流し込み、最後にもう一度チャンバーを洗ってからもう一種の制御タンパク質を流し込むので、ダイニンの次に流し込んだタンパク質がダイニンに結合しない場合、そのタンパク質は洗い流されることになる。これによって、阻

害回復の効果が LIS1 に作用して起こるのかダイニンに直接作用して起こるのかを確かめることができる。

まず、NDEL1 もしくは NN を LIS1 より先に流し込んだ条件下で観察を行ったところ、微小管の滑り運動は回復せず、微小管はガラス表面上で止まったままであった (図 31. B)。一方、LIS1 を先に流し込んだ条件では、微小管の滑り運動が観察された。したがって、LIS1 による障害の回復は NDEL1 のうち NN に含まれている領域が LIS1 に直接結合して起こることが確認された。

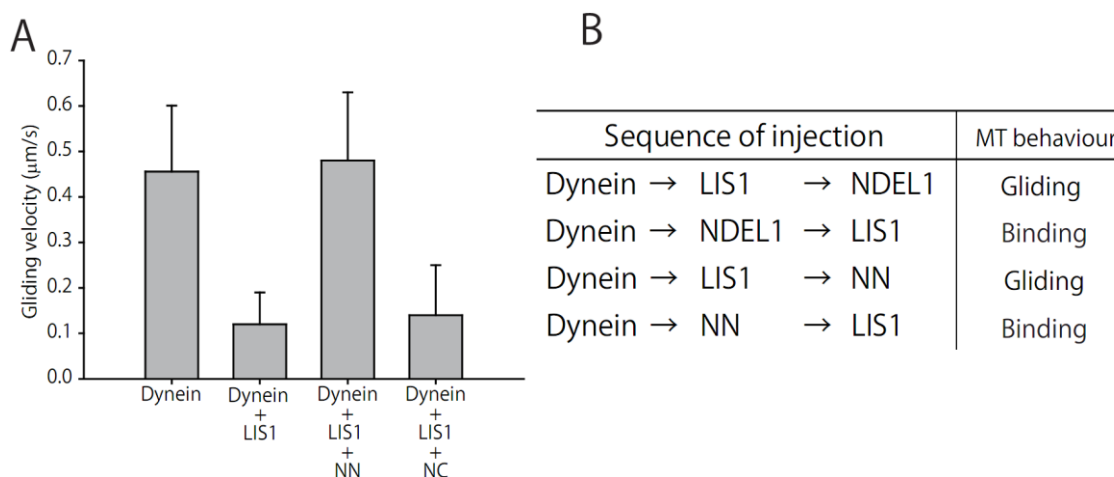


図 31 LIS1 によるダイニンの運動機能障害に対する NDEL1 断片の影響

(A) ダイニン, LIS1, NDEL1 断片を同時に混合して行った微小管滑り運動実験における滑り運動速度を示すグラフ。各グラフの下に混合したタンパク質を示す。エラーバーは標準偏差を表す。(B) チャンバー内に流し込むタンパク質の順番を変化させて微小管滑り運動実験を行った際の微小管の挙動。“Gliding”は滑り運動が観察されたことを、“Binding”はほとんどの微小管がガラス表面上についたまま動かなかったことを示している。

2.3.6 LIS1 によるダイニンの運動機能障害に対する LIS1 の二量体化の寄与

細胞レベルでの観察から、LIS1 の機能には二量体化が重要であるという可能性が示唆されていること[107]を受けて、LIS1 の N 末端に存在している二量体化を担う領域を除去したコンストラクトを作製し、再構成系における微小管滑り運動実験によって、二量体化とダイニンの運動機能制御の関係について調べた。1.1 でも述べたように、LIS1 の二量体化には N 末端側領域の LisH モチーフおよび 55 番目の残基のトリプトファンが重要であり、コイルドコイル領域の寄与は大

きくないことが分かっているので、二量体化への寄与が大きい領域を除去した単量体 LIS1 (Δ N-LIS1) を精製し、微小管滑り運動実験におけるダイニンの運動機能への影響を調べた。また、精製の途中で得られる GST 付きのコンストラクト (GST- Δ N-LIS1) を用いて、人工的な二量体化させた場合についての制御機能も合わせて調べた。

Δ N-LIS1 存在下における微小管滑り運動実験ではダイニンによる滑り運動の阻害は見られず、滑り運動の速度はダイニンのみの条件での速度 ($0.44 \pm 0.10 \mu\text{m/s}$) と同等であった ($0.42 \pm 0.11 \mu\text{m/s}$, 図 32)。密度勾配遠心によるダイニン結合実験 (図 27) に示されるように Δ N-LIS1 はダイニンへの結合能を保持しているため、この結果は LIS1 のダイニン制御機能において二量体化が重要であることを再構成系で改めて示したものと考えられる。一方で、GST によって本来とは異なる形で二量体化させた GST- Δ N-LIS1 の存在下では、有意に滑り運動の速度の低下がみられ ($0.07 \pm 0.09 \mu\text{m/s}$, $p < 0.001$)、ダイニンの運動機能の阻害が起こった。さらに、この運動機能の阻害は、LIS1 全長の場合と同様に NN の添加によって回復した ($0.41 \pm 0.11 \mu\text{m/s}$)。以上の結果から、LIS1 によるダイニンの運動機能の阻害においては LIS1 の二量体化が重要であり、さらにもともとの LIS1 が持っている二量体化領域は運動機能の阻害およびその NDEL1 による回復の双方にとって必須ではないということが示された。

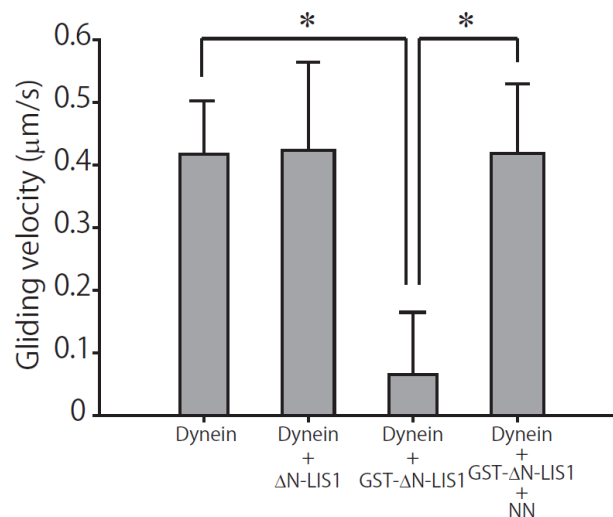


図 32. N 末側領域除去型 LIS1 のダイニンによる微小管滑り運動に対する影響

N 末側領域除去型 LIS1 存在時における微小管滑り運動速度の変化。ダイニンのみのコントロール ($n = 55$)、 Δ N-LIS1 存在時 ($n = 68$) で滑り運動速度の有意な変化はなかったが、

GST- ΔN-LIS1 存在時(n=66)は明らかな運動の阻害が観察された. この阻害は NN の添加時 (n=61)には回復した. グラフ中のエラーバーは標準偏差を表す. p 値はスチューデントの t 検定より計算(*, $p < 0.001$).

2.4 考察

本研究では、ダイニンの制御タンパク質である NDEL1 を2つの断片に切り分け、それぞれの断片がダイニンの活性に与える影響を調べることで、ダイニンに結合する C 末側断片である NC だけでダイニンと微小管の解離を引き起こすことができ、LIS1 と結合する N 末側断片である NN だけで LIS1 によるダイニンの運動機能阻害を回復させることが出来ることを示した。これにより、NDEL1 の N 末側領域と C 末側領域は NDEL1 の二つの機能、すなわちダイニンと微小管を解離させる機能と LIS1 による阻害を回復させる機能を独立に担っていることが示された。

また、本研究で得られた結果から LIS1 の二量体化がその制御機能に重要であり、また LIS1 がもともと持っている二量体化領域は制御機能には必須ではないということが示された。さらに、GSTによって人工的に二量体化させたコンストラクト(GST- Δ N-LIS1)においても制御機能が確認されたことから、LIS1 の制御機能においては C 末端側領域が形成する二つの β プロペラ構造の間の協調関係が重要であるという可能性が示唆されるが、これについては後述する。

図 32 に示されている模式図は本研究での結果を考慮に入れた LIS1 および NDEL1 によるダイニンの運動機能制御機構を表している。(A)が LIS1 および NDEL1 の全長による制御を表し、(B)は N 末側領域除去型の LIS1 および NDEL1 断片による制御を表している。

まず、LIS1 全長の機能としてダイニンに結合することで運動能を阻害することができるが、N 末側領域を除去して単量体化させた Δ N-LIS1 は阻害能を持たない。 Δ N-LIS1 はダイニンと結合することはできるので、これは LIS1 のダイニン結合部位を含む C 末端領域がダイニンに結合しただけでは阻害作用は発揮されず、N 末を通して二つの C 末端領域が繋がっていて、何らかの協調的な機構が作用できることが阻害機能にとって重要であることを示唆している。人工的であっても二量体化させることで2つの C 末端領域が繋がっている GST- Δ N-LIS1 は阻害能を持っていたことも、この可能性を支持している。さらに、2.1 で述べたように、LIS1 二量体分子中の C 末端領域の位置関係については、コイルドコイルドメインがコイルを形成しているかないかに対応して“Open”状態と“Closed”状態が存在すると言われており、このような構造可塑性が制御機能においてなんらかの役割を担っている可能性もある。具体的には、“Open”状態か“Closed”状態のどちらかがダイニンの運動を阻害する構造であり、NDEL1 分子が LIS1 に結合することによ

でもう一方の構造に LIS1 がシフトし、障害が回復されるという描像があり得る。このような仮説を検証するためには、ダイニン分子と LIS1 が結合した分子やさらにそこに NDEL1 分子が結合した複合体の構造生物学的な研究が必要とされるであろう。

NDEL1 に関しては、まずは C 末端側断片 NC に含まれる領域によってダイニンと微小管の解離を引き起こされることが示された。ATP 非存在下ではダイニンが微小管と結合可能であったことから、NDEL1 の解離促進の効果はダイニンの微小管相互作用部位であるストークヘッドを NDEL1 が塞いでしまうことによって起こるという単純な物理的效果ではないことが分かり、同時に解離促進効果は ATP の存在に依存していることが示された。さらに、NC は単量体なので、NDEL1 に関しては二量体化は機能に必須ではないということも分かった。

LIS1 によるダイニンの運動機能の障害は NDEL1 の N 末側領域の LIS1 への結合によって回復することがわかったが、ダイニン・LIS1・NDEL1 が複合体を形成しているとき(図 33A 右)に NDEL1 の C 末側領域が果たす役割についてはさらなる研究が必要である。先行研究において、LIS1 が存在する際には NDEL1 がダイニンと相互作用する量が大きく増大することがわかっており、もしかしたら複合体中では NDEL1 の C 末側領域はダイニンと相互作用していないのかもしれない。

また、微小管滑り運動実験においてはダイニンのみの状態とダイニン、LIS1、NDEL1 がともに存在している状態の間に運動性の違いを見出すことが出来なかったが、McKenney らの報告 [30]によると、光ピンセットを用いてダイニン 1 分子に外部負荷を印加した際には、ダイニンのみの状態に比べてダイニンと LIS1、そして NDEL1 のホモログである NDE1 がともに存在している状態のほうが、負荷がかかった際により長い時間微小管に結合していられるという結果が得られている。このような違いを説明するため、ダイニン側のどの部分に LIS1 や NDEL1 が相互作用しているのか、また複合体を形成することによって起こるダイニンの構造変化の詳細など、1 分子レベルの階層でおこる現象を細胞質ダイニンの組換え体発現技術や一分子運動観察技術を研究することが求められている。

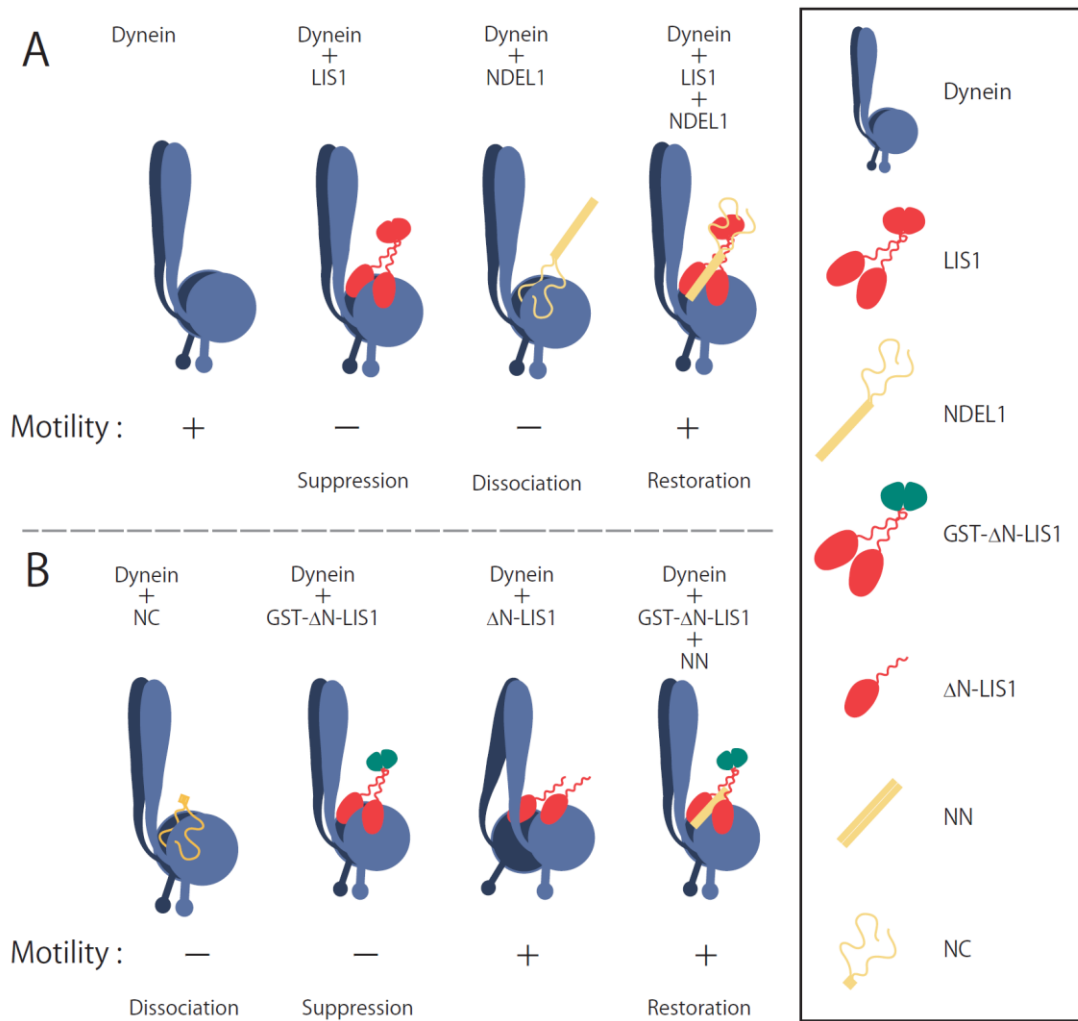


図 33. ダイニンの運動機能制御の模式図

(A) LIS1 および NDEL1 の全長による制御. (B) N 末側領域除去 LIS1 および NDEL1 断片による制御. 各タンパク質のサイズについては, 図の見易さのため適宜変更してある.

総括

ダイニンの自己制御

本研究の結果から、細胞質ダイニンに自己制御機構が存在していることが新たに明らかとなった。この自己制御機構は、ダイニンの2つの頭部が積み重なるような特殊な形態（スタック状態）をとることで自己阻害的に弱結合状態が安定化され、拡散的な振舞いをするようになるというものである。このような制御機構は、尾部と頭部の相互作用によって運動の制御がなされているキネシンやミオシン V とは全く異なっており、ダイニンに特異的な仕組みの存在が明らかになったことになる。さらに、このような自己阻害状態の解除には、ダイニンの持つ力学特性が寄与していることも明らかとなった。ダイニンは、外力などの力学的摂動が加わったときに、弱結合状態からの遷移が促進されるという力学応答性を持っており、一つの荷物の上で多分子化が起こったときには、ダイニン分子同士が互いに力を及ぼし合うことで互いが互いの自己阻害状態を解除しあい、生体内で見られているような一方向性の運動が達成されているという描像を得ることが出来た。また、上述の力学特性に加えて、力を加えられた向きに依存して結合の強さが変化するラチェット的な性質を持っていることも分かった。この性質があることによって、1分子の拡散的な振舞いを多分子による協同的な輸送に効率よく利用している可能性も示唆された。多種多様な制御タンパク質による機能制御に先立って、このような自己制御機構をダイニンが備えていることは、1種類のダイニンがほとんどの微小管のマイナス端方向への輸送および力発生を担うのに、重要な性質なのかもしれない。

LIS1 および NDEL1 によるダイニンの運動制御

また、LIS1 と NDEL1 という制御タンパク質の作用によって、ダイニンの運動機能が大きく変化するということが明らかとなった。LIS1 はダイニンの運動を停止させる方向に作用する一方で、NDEL1 はダイニンを微小管から解離させる働きを持ち、さらに LIS1 による阻害を解除する役割も持っていることが分かった。さらに、NDEL1 の2つの機能は N 末側と C 末側にそれぞれ局在しており、ダイニンを解離させる働きは C 末側に、LIS1 による阻害を解除する役割は N 末側に存在していることが明らかとなった。LIS1 についてもダイニンを制御する機能は、C 末側

のβプロペラ構造に局在していることが示された。これらの結果は、LIS1 と NDEL1 のそれぞれのダイニンに対する影響を明らかにしたと同時に、各タンパク質の機能がどの領域に局在しているのかを明らかにしたものと位置づけることができる。また、LIS1 と NDEL1 がそれぞれ単独でダイニンの運動を制御する機能を持っている上で、ダイニン - LIS1 - NDEL1 の3者複合体になったときには、さらに異なる制御機能が発露するということを表しており、ダイニンがそれ自体の自己制御の上に制御タンパク質による制御機構を備え、さらに制御タンパク質の組み合わせによって異なる機能を発現するという、階層性を備えた制御機構を持っていることを示している。

ダイニンの制御における階層性

ダイニン自体の状態や数によって運動が変化するという基底を成す運動制御の上に、種々の制御タンパク質による制御が存在しているという、制御に階層性を明示的に考える観点は、多様な場面とタイミングで機能を担うダイニンというタンパク質を統御する仕組みを考察する上で、重要になってくると考えられる。また、これまでのダイニンの運動観察においては、TIRFM による1分子の観察と微小管滑り運動実験などによる多分子の挙動の観察の中間の分子数の領域で起こる現象を調べることは技術的に難しく、複数分子による協調の問題にはなかなかアクセスできなかった。一方で、実際の生体内でダイニンが関与しているオルガネラなどの輸送に代表される現象は、まさにこの中間領域である少数分子による協同現象が支配的である可能性が高く、これからのダイニンの研究においては、この少数分子の領域で起こる現象のメカニズムを知ることが重要であると考えられる。本論文において用いられた、分子数やその配置を制御できる実験技術によって、少数分子による協同現象について、またそのような状況下において他のタンパク質から受ける制御の影響に関して、さらに詳細な分子機構についての新たな知見が得られることが期待される。

参考文献

1. Howard, J., *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton*. 2001, Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, Publishers. xvi, 367 p.
2. Kull, F.J., E.P. Sablin, R. Lau, R.J. Fletterick, and R.D. Vale, *Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin*. *Nature*, 1996. **380**(6574): p. 550-5.
3. Rayment, I., *Kinesin and myosin: molecular motors with similar engines*. *Structure*, 1996. **4**(5): p. 501-4.
4. Neuwald, A.F., L. Aravind, J.L. Spouge, and E.V. Koonin, *AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes*. *Genome Res*, 1999. **9**(1): p. 27-43.
5. Asai, D.J. and M.P. Koonce, *The dynein heavy chain: structure, mechanics and evolution*. *Trends Cell Biol*, 2001. **11**(5): p. 196-202.
6. Kon, T., T. Oyama, R. Shimo-Kon, K. Imamula, T. Shima, K. Sutoh, and G. Kurisu, *The 2.8 Å crystal structure of the dynein motor domain*. *Nature*, 2012. **484**(7394): p. 345-50.
7. Schmidt, H., E.S. Gleave, and A.P. Carter, *Insights into dynein motor domain function from a 3.3-Å crystal structure*. *Nat Struct Mol Biol*, 2012. **19**(5): p. 492-7, S1.
8. Paschal, B.M., H.S. Shpetner, and R.B. Vallee, *MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties*. *J Cell Biol*, 1987. **105**(3): p. 1273-82.
9. Paschal, B.M. and R.B. Vallee, *Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C*. *Nature*, 1987. **330**(6144): p. 181-3.
10. Hook, P. and R.B. Vallee, *The dynein family at a glance*. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 21): p. 4369-71.
11. Pfister, K.K., P.R. Shah, H. Hummerich, A. Russ, J. Cotton, A.A. Annuar, S.M. King, and E.M. Fisher, *Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families*. *PLoS Genet*, 2006.

- 2(1): p. e1.
12. Vale, R.D., *The molecular motor toolbox for intracellular transport*. Cell, 2003. **112**(4): p. 467-80.
 13. Reck-Peterson, S.L. and R.D. Vale, *Molecular dissection of the roles of nucleotide binding and hydrolysis in dynein's AAA domains in Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(6): p. 1491-5.
 14. Takahashi, Y., M. Edamatsu, and Y.Y. Toyoshima, *Multiple ATP-hydrolyzing sites that potentially function in cytoplasmic dynein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(35): p. 12865-9.
 15. Kon, T., M. Nishiura, R. Ohkura, Y.Y. Toyoshima, and K. Sutoh, *Distinct functions of nucleotide-binding/hydrolysis sites in the four AAA modules of cytoplasmic dynein*. Biochemistry, 2004. **43**(35): p. 11266-74.
 16. Burgess, S.A., M.L. Walker, H. Sakakibara, P.J. Knight, and K. Oiwa, *Dynein structure and power stroke*. Nature, 2003. **421**(6924): p. 715-8.
 17. Roberts, A.J., N. Numata, M.L. Walker, Y.S. Kato, B. Malkova, T. Kon, R. Ohkura, F. Arisaka, P.J. Knight, K. Sutoh, and S.A. Burgess, *AAA+ Ring and linker swing mechanism in the dynein motor*. Cell, 2009. **136**(3): p. 485-95.
 18. Vallee, R.B., J.C. Williams, D. Varma, and L.E. Barnhart, *Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport*. J Neurobiol, 2004. **58**(2): p. 189-200.
 19. Vallee, R.B., G.E. Seale, and J.W. Tsai, *Emerging roles for myosin II and cytoplasmic dynein in migrating neurons and growth cones*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(7): p. 347-55.
 20. McNally, F.J., *Mechanisms of spindle positioning*. J Cell Biol, 2013. **200**(2): p. 131-40.
 21. Allan, V.J., *Cytoplasmic dynein*. Biochem Soc Trans, 2011. **39**(5): p. 1169-78.
 22. Strom, A.L., J. Gal, P. Shi, E.J. Kasarskis, L.J. Hayward, and H. Zhu, *Retrograde axonal transport and motor neuron disease*. J Neurochem, 2008. **106**(2): p. 495-505.

23. Yadav, S. and A.D. Linstedt, *Golgi positioning*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(5).
24. Hunt, S.D. and D.J. Stephens, *The role of motor proteins in endosomal sorting*. Biochem Soc Trans, 2011. **39**(5): p. 1179-84.
25. Kobayashi, T. and T. Murayama, *Cell cycle-dependent microtubule-based dynamic transport of cytoplasmic dynein in mammalian cells*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7827.
26. Hirokawa, N., Y. Noda, Y. Tanaka, and S. Niwa, *Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(10): p. 682-96.
27. Kardon, J.R. and R.D. Vale, *Regulators of the cytoplasmic dynein motor*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(12): p. 854-865.
28. King, S.J. and T.A. Schroer, *Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(1): p. 20-4.
29. Huang, J., A.J. Roberts, A.E. Leschziner, and S.L. Reck-Peterson, *Lis1 acts as a "clutch" between the ATPase and microtubule-binding domains of the dynein motor*. Cell, 2012. **150**(5): p. 975-86.
30. McKenney, R.J., M. Vershinin, A. Kunwar, R.B. Vallee, and S.P. Gross, *LIS1 and NudE Induce a Persistent Dynein Force-Producing State*. Cell. **141**(2): p. 304-314.
31. Yamada, M., S. Toba, Y. Yoshida, K. Haratani, D. Mori, Y. Yano, Y. Mimori-Kiyosue, T. Nakamura, K. Itoh, S. Fushiki, M. Setou, A. Wynshaw-Boris, T. Torisawa, Y.Y. Toyoshima, and S. Hirotsune, *LIS1 and NDEL1 coordinate the plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein*. EMBO J, 2008. **27**(19): p. 2471-83.
32. Splinter, D., D.S. Razafsky, M.A. Schlager, A. Serra-Marques, I. Grigoriev, J. Demmers, N. Keijzer, K. Jiang, I. Poser, A.A. Hyman, C.C. Hoogenraad, S.J. King, and A. Akhmanova, *BICD2, dynactin, and LIS1 cooperate in regulating dynein recruitment to cellular structures*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(21): p. 4226-41.
33. Ananthanarayanan, V., M. Schattat, S.K. Vogel, A. Krull, N. Pavin, and I.M.

- Tolic-Norrelykke, *Dynein motion switches from diffusive to directed upon cortical anchoring*. Cell, 2013. **153**(7): p. 1526-36.
34. Reck-Peterson, S.L., A. Yildiz, A.P. Carter, A. Gennerich, N. Zhang, and R.D. Vale, *Single-molecule analysis of dynein processivity and stepping behavior*. Cell, 2006. **126**(2): p. 335-48.
35. Wang, Z. and M.P. Sheetz, *One-dimensional diffusion on microtubules of particles coated with cytoplasmic dynein and immunoglobulins*. Cell Struct Funct, 1999. **24**(5): p. 373-83.
36. Nishiura, M., T. Kon, K. Shiroguchi, R. Ohkura, T. Shima, Y.Y. Toyoshima, and K. Sutoh, *A single-headed recombinant fragment of Dictyostelium cytoplasmic dynein can drive the robust sliding of microtubules*. J Biol Chem, 2004. **279**(22): p. 22799-802.
37. DeWitt, M.A., A.Y. Chang, P.A. Combs, and A. Yildiz, *Cytoplasmic dynein moves through uncoordinated stepping of the AAA+ ring domains*. Science, 2012. **335**(6065): p. 221-5.
38. Qiu, W., N.D. Derr, B.S. Goodman, E. Villa, D. Wu, W. Shih, and S.L. Reck-Peterson, *Dynein achieves processive motion using both stochastic and coordinated stepping*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(2): p. 193-200.
39. Markus, S.M. and W.L. Lee, *Regulated offloading of cytoplasmic dynein from microtubule plus ends to the cortex*. Dev Cell, 2011. **20**(5): p. 639-51.
40. Shibata, K., M. Miura, Y. Watanabe, K. Saito, A. Nishimura, K. Furuta, and Y.Y. Toyoshima, *A single protofilament is sufficient to support unidirectional walking of dynein and kinesin*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42990.
41. Ori-McKenney, K.M., J. Xu, S.P. Gross, and R.B. Vallee, *A cytoplasmic dynein tail mutation impairs motor processivity*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(12): p. 1228-34.
42. Toba, S., T.M. Watanabe, L. Yamaguchi-Okimoto, Y.Y. Toyoshima, and H. Higuchi, *Overlapping hand-over-hand mechanism of single molecular motility of cytoplasmic dynein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(15): p. 5741-5.

43. Ross, J.L., K. Wallace, H. Shuman, Y.E. Goldman, and E.L. Holzbaur, *Processive bidirectional motion of dynein-dynactin complexes in vitro*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(6): p. 562-70.
44. Dixit, R., J.L. Ross, Y.E. Goldman, and E.L. Holzbaur, *Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau*. Science, 2008. **319**(5866): p. 1086-9.
45. Mallik, R., D. Petrov, S.A. Lex, S.J. King, and S.P. Gross, *Building complexity: an in vitro study of cytoplasmic dynein with in vivo implications*. Curr Biol, 2005. **15**(23): p. 2075-85.
46. Walter, W.J., M.P. Koonce, B. Brenner, and W. Steffen, *Two independent switches regulate cytoplasmic dynein's processivity and directionality*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(14): p. 5289-93.
47. Mallik, R., B.C. Carter, S.A. Lex, S.J. King, and S.P. Gross, *Cytoplasmic dynein functions as a gear in response to load*. Nature, 2004. **427**(6975): p. 649-52.
48. Rai, A.K., A. Rai, A.J. Ramaiya, R. Jha, and R. Mallik, *Molecular adaptations allow dynein to generate large collective forces inside cells*. Cell, 2013. **152**(1-2): p. 172-82.
49. Ichikawa, M., Y. Watanabe, T. Murayama, and Y.Y. Toyoshima, *Recombinant human cytoplasmic dynein heavy chain 1 and 2: observation of dynein-2 motor activity in vitro*. FEBS Lett, 2011. **585**(15): p. 2419-23.
50. Trokter, M., N. Mucke, and T. Surrey, *Reconstitution of the human cytoplasmic dynein complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(51): p. 20895-900.
51. Bryantseva, S.A. and O.N. Zhapparova, *Bidirectional transport of organelles: unity and struggle of opposing motors*. Cell Biol Int, 2012. **36**(1): p. 1-6.
52. Verhey, K.J. and J.W. Hammond, *Traffic control: regulation of kinesin motors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(11): p. 765-77.
53. Liu, J., D.W. Taylor, E.B. Kremontsova, K.M. Trybus, and K.A. Taylor, *Three-dimensional structure of the myosin V inhibited state by cryoelectron tomography*. Nature, 2006.

- 442(7099): p. 208-11.
54. Thirumurugan, K., T. Sakamoto, J.A. Hammer, 3rd, J.R. Sellers, and P.J. Knight, *The cargo-binding domain regulates structure and activity of myosin 5*. Nature, 2006. 442(7099): p. 212-5.
 55. Hendricks, A.G., E. Perlson, J.L. Ross, H.W. Schroeder, 3rd, M. Tokito, and E.L. Holzbaur, *Motor coordination via a tug-of-war mechanism drives bidirectional vesicle transport*. Curr Biol, 2010. 20(8): p. 697-702.
 56. Williams, R.C., Jr. and J.C. Lee, *Preparation of tubulin from brain*. Methods Enzymol, 1982. 85 Pt B: p. 376-85.
 57. Furuta, K. and Y.Y. Toyoshima, *Minus-end-directed motor Ncd exhibits processive movement that is enhanced by microtubule bundling in vitro*. Curr Biol, 2008. 18(2): p. 152-7.
 58. Bingham, J.B., S.J. King, and T.A. Schroer, *Purification of dynactin and dynein from brain tissue*. Methods Enzymol, 1998. 298: p. 171-84.
 59. Furuta, K., A. Furuta, Y.Y. Toyoshima, M. Amino, K. Oiwa, and H. Kojima, *Measuring collective transport by defined numbers of processive and nonprocessive kinesin motors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(2): p. 501-6.
 60. Rice, S., A.W. Lin, D. Safer, C.L. Hart, N. Naber, B.O. Carragher, S.M. Cain, E. Pechatnikova, E.M. Wilson-Kubalek, M. Whittaker, E. Pate, R. Cooke, E.W. Taylor, R.A. Milligan, and R.D. Vale, *A structural change in the kinesin motor protein that drives motility*. Nature, 1999. 402(6763): p. 778-784.
 61. Bui, H., C. Onodera, C. Kidwell, Y. Tan, E. Graugnard, W. Kuang, J. Lee, W.B. Knowlton, B. Yurke, and W.L. Hughes, *Programmable periodicity of quantum dot arrays with DNA origami nanotubes*. Nano Lett, 2010. 10(9): p. 3367-72.
 62. Derr, N.D., B.S. Goodman, R. Jungmann, A.E. Leschziner, W.M. Shih, and S.L. Reck-Peterson, *Tug-of-war in motor protein ensembles revealed with a programmable*

- DNA origami scaffold*. Science, 2012. **338**(6107): p. 662-5.
63. Helenius, J., G. Brouhard, Y. Kalaidzidis, S. Diez, and J. Howard, *The depolymerizing kinesin MCAK uses lattice diffusion to rapidly target microtubule ends*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 115-9.
64. Wand, M.P., *Data-based choice of histogram bin width*. American Statistician, 1997. **51**(1): p. 59-64.
65. Thorn, K.S., J.A. Ubersax, and R.D. Vale, *Engineering the processive run length of the kinesin motor*. J Cell Biol, 2000. **151**(5): p. 1093-100.
66. Iwaki, M., A.H. Iwane, T. Shimokawa, R. Cooke, and T. Yanagida, *Brownian search-and-catch mechanism for myosin-VI steps*. Nat Chem Biol, 2009. **5**(6): p. 403-5.
67. Ueno, H., S. Nishikawa, R. Iino, K.V. Tabata, S. Sakakihara, T. Yanagida, and H. Noji, *Simple dark-field microscopy with nanometer spatial precision and microsecond temporal resolution*. Biophys J, 2010. **98**(9): p. 2014-23.
68. Kojima, H., E. Muto, H. Higuchi, and T. Yanagida, *Mechanics of single kinesin molecules measured by optical trapping nanometry*. Biophys J, 1997. **73**(4): p. 2012-22.
69. Tolic-Norrelykke, S.F., E. Schaffer, J. Howard, F.S. Pavone, F. Julicher, and H. Flyvbjerg, *Calibration of optical tweezers with positional detection in the back focal plane*. Review of Scientific Instruments, 2006. **77**(10).
70. Block, S.M., L.S.B. Goldstein, and B.J. Schnapp, *Bead Movement by Single Kinesin Molecules Studied with Optical Tweezers*. Nature, 1990. **348**(6299): p. 348-352.
71. Sakato, M., H. Sakakibara, and S.M. King, *Chlamydomonas outer arm dynein alters conformation in response to Ca²⁺*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(9): p. 3620-34.
72. Conway, J.F. and A.C. Steven, *Methods for reconstructing density maps of "single" particles from cryoelectron micrographs to subnanometer resolution*. J Struct Biol, 1999. **128**(1): p. 106-18.
73. Frank, J., M. Radermacher, P. Penczek, J. Zhu, Y. Li, M. Ladjadj, and A. Leith, *SPIDER and*

- WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields.* J Struct Biol, 1996. **116**(1): p. 190-9.
74. Davies, D.L. and D.W. Bouldin, *A cluster separation measure.* IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell, 1979. **1**(2): p. 224-7.
75. Miura, M., A. Matsubara, T. Kobayashi, M. Edamatsu, and Y.Y. Toyoshima, *Nucleotide-dependent behavior of single molecules of cytoplasmic dynein on microtubules in vitro.* FEBS Lett, 2010. **584**(11): p. 2351-5.
76. Shpetner, H.S., B.M. Paschal, and R.B. Vallee, *Characterization of the microtubule-activated ATPase of brain cytoplasmic dynein (MAP 1C).* J Cell Biol, 1988. **107**(3): p. 1001-9.
77. Shimizu, T., Y.Y. Toyoshima, M. Edamatsu, and R.D. Vale, *Comparison of the motile and enzymatic properties of two microtubule minus-end-directed motors, ncd and cytoplasmic dynein.* Biochemistry, 1995. **34**(5): p. 1575-82.
78. Pilling, A.D., D. Horiuchi, C.M. Lively, and W.M. Saxton, *Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in Drosophila motor axons.* Mol Biol Cell, 2006. **17**(4): p. 2057-68.
79. Kieran, D., M. Hafezparast, S. Bohnert, J.R. Dick, J. Martin, G. Schiavo, E.M. Fisher, and L. Greensmith, *A mutation in dynein rescues axonal transport defects and extends the life span of ALS mice.* J Cell Biol, 2005. **169**(4): p. 561-7.
80. Zimyanin, V.L., K. Belaya, J. Pecreaux, M.J. Gilchrist, A. Clark, I. Davis, and D. St Johnston, *In vivo imaging of oskar mRNA transport reveals the mechanism of posterior localization.* Cell, 2008. **134**(5): p. 843-53.
81. Macosko, J.C., J.M. Newbern, J. Rockford, E.N. Chisena, C.M. Brown, G.M. Holzwarth, and C.E. Milligan, *Fewer active motors per vesicle may explain slowed vesicle transport in chick motoneurons after three days in vitro.* Brain Res, 2008. **1211**: p. 6-12.
82. Gu, Y. and C. Gu, *Dynamics of Kv1 channel transport in axons.* PLoS One, 2010. **5**(8): p.

- e11931.
83. Salinas, S., L.G. Bilsland, D. Henaff, A.E. Weston, A. Keriell, G. Schiavo, and E.J. Kremer, *CAR-associated vesicular transport of an adenovirus in motor neuron axons*. PLoS Pathog, 2009. **5**(5): p. e1000442.
 84. Malik, B., N. Nirmalanathan, L.G. Bilsland, A.R. La Spada, M.G. Hanna, G. Schiavo, J.M. Gallo, and L. Greensmith, *Absence of disturbed axonal transport in spinal and bulbar muscular atrophy*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(9): p. 1776-86.
 85. Encalada, S.E., L. Szpankowski, C.H. Xia, and L.S. Goldstein, *Stable kinesin and dynein assemblies drive the axonal transport of mammalian prion protein vesicles*. Cell, 2011. **144**(4): p. 551-65.
 86. Reis, G.F., G. Yang, L. Szpankowski, C. Weaver, S.B. Shah, J.T. Robinson, T.S. Hays, G. Danuser, and L.S. Goldstein, *Molecular motor function in axonal transport in vivo probed by genetic and computational analysis in Drosophila*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(9): p. 1700-14.
 87. Maday, S., K.E. Wallace, and E.L. Holzbaur, *Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons*. J Cell Biol, 2012. **196**(4): p. 407-17.
 88. Kon, T., T. Mogami, R. Ohkura, M. Nishiura, and K. Sutoh, *ATP hydrolysis cycle-dependent tail motions in cytoplasmic dynein*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(6): p. 513-9.
 89. Shimizu, T. and K.A. Johnson, *Presteady state kinetic analysis of vanadate-induced inhibition of the dynein ATPase*. J Biol Chem, 1983. **258**(22): p. 13833-40.
 90. Amos, L.A., *Brain dynein crossbridges microtubules into bundles*. J Cell Sci, 1989. **93** (Pt 1): p. 19-28.
 91. Yildiz, A., M. Tomishige, A. Gennerich, and R.D. Vale, *Intramolecular strain coordinates kinesin stepping behavior along microtubules*. Cell, 2008. **134**(6): p. 1030-41.

92. Adames, N.R. and J.A. Cooper, *Microtubule interactions with the cell cortex causing nuclear movements in Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol, 2000. **149**(4): p. 863-74.
93. Reiner, O., R. Carrozzo, Y. Shen, M. Wehnert, F. Faustinella, W.B. Dobyns, C.T. Caskey, and D.H. Ledbetter, *Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats*. Nature, 1993. **364**(6439): p. 717-21.
94. Wynshaw-Boris, A., *Lissencephaly and LIS1: insights into the molecular mechanisms of neuronal migration and development*. Clin Genet, 2007. **72**(4): p. 296-304.
95. Hirotsune, S., M.W. Fleck, M.J. Gambello, G.J. Bix, A. Chen, G.D. Clark, D.H. Ledbetter, C.J. McBain, and A. Wynshaw-Boris, *Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality*. Nat Genet, 1998. **19**(4): p. 333-9.
96. Sasaki, S., D. Mori, K. Toyo-oka, A. Chen, L. Garrett-Beal, M. Muramatsu, S. Miyagawa, N. Hiraiwa, A. Yoshiki, A. Wynshaw-Boris, and S. Hirotsune, *Complete loss of Ndel1 results in neuronal migration defects and early embryonic lethality*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(17): p. 7812-27.
97. Smith, T.F., C. Gaitatzes, K. Saxena, and E.J. Neer, *The WD repeat: a common architecture for diverse functions*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(5): p. 181-5.
98. Li, D. and R. Roberts, *WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(14): p. 2085-97.
99. Sasaki, S., A. Shionoya, M. Ishida, M.J. Gambello, J. Yingling, A. Wynshaw-Boris, and S. Hirotsune, *A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system*. Neuron, 2000. **28**(3): p. 681-96.
100. Gerlitz, G., E. Darhin, G. Giorgio, B. Franco, and O. Reiner, *Novel functional features of the Lis-H domain: role in protein dimerization, half-life and cellular localization*. Cell Cycle, 2005. **4**(11): p. 1632-40.
101. Tarricone, C., F. Perrina, S. Monzani, L. Massimiliano, M.H. Kim, Z.S. Derewenda, S.

- Knapp, L.H. Tsai, and A. Musacchio, *Coupling PAF signaling to dynein regulation: structure of LIS1 in complex with PAF-acetylhydrolase*. *Neuron*, 2004. **44**(5): p. 809-21.
102. Mateja, A., T. Cierpicki, M. Paduch, Z.S. Derewenda, and J. Otlewski, *The dimerization mechanism of LIS1 and its implication for proteins containing the LisH motif*. *J Mol Biol*, 2006. **357**(2): p. 621-31.
103. Derewenda, U., C. Tarricone, W.C. Choi, D.R. Cooper, S. Lukasik, F. Perrina, A. Tripathy, M.H. Kim, D.S. Cafiso, A. Musacchio, and Z.S. Derewenda, *The structure of the coiled-coil domain of Ndel1 and the basis of its interaction with Lis1, the causal protein of Miller-Dieker lissencephaly*. *Structure*, 2007. **15**(11): p. 1467-81.
104. Niethammer, M., D.S. Smith, R. Ayala, J. Peng, J. Ko, M.S. Lee, M. Morabito, and L.H. Tsai, *NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein*. *Neuron*, 2000. **28**(3): p. 697-711.
105. Tsai, J.W., K.H. Bremner, and R.B. Vallee, *Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue*. *Nat Neurosci*, 2007. **10**(8): p. 970-9.
106. Tsai, J.W., Y. Chen, A.R. Kriegstein, and R.B. Vallee, *LIS1 RNA interference blocks neural stem cell division, morphogenesis, and motility at multiple stages*. *J Cell Biol*, 2005. **170**(6): p. 935-45.
107. Hebbar, S., M.T. Mesngon, A.M. Guillotte, B. Desai, R. Ayala, and D.S. Smith, *Lis1 and Ndel1 influence the timing of nuclear envelope breakdown in neural stem cells*. *J Cell Biol*, 2008. **182**(6): p. 1063-71.
108. Read, S.M. and D.H. Northcote, *Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein*. *Anal Biochem*, 1981. **116**(1): p. 53-64.
109. Andrews, P., *Estimation of molecular size and molecular weights of biological compounds by gel filtration*. *Methods Biochem Anal*, 1970. **18**: p. 1-53.

付録：DNA ナノチューブに使用したオリゴ DNA 配列

Plate 1

No.	Sequence Name	Sequence (5' -> 3')
1	1_2	GCCAGAGGGGGTAAAGACTCCTTATTACAACGCAAAGACACC
2	1_5	CAATACTGCGGAATAACGCAATAATAACATAGAAAATTCATA
3	1_8	AAATGCTTTAAACATAAGCAGATAGCCGCGACATTCAACCGA
4	1_11	AAAAATCAGGTCTTAAATAGCAATAGCTAAATTATTCATTAA
5	1_14	GCGGATTGCATCAACAAGAATTGAGTTAGCCATTTGGGAATT
6	1_17	CAAATATCGCGTTTAGTCAGAGGGTAATTTACCATTAGCAAG
7	1_20	GGAAGCAAACCTCCAGAAGCGCATTAGACATAGCAGCACCGTA
8	1_23	TTGCTCCTTTTGATTGAAAATAGCAGCCTTAGCGTCAGACTG
9	1_26	GCTTAATTGCTGAACCCAATCCAATAAATAGCCCCCTTATT
10	1_29	ATATGCAACTAAAGGCCTAATTTGCCAGTCACCGGAACCAGA
11	1_32	AACAGTTGATTCCCTTTATCCTGAATCTCCGCCACCTCAGA
12	1_35	ACCATTAGATACATCCTTAAATCAAGATGAGCCGCCACCAGA
13	1_38	TATATTTTCATTTGAGGCGTTTAGCGAACAGGAGTTAGACT
14	1_41	TCTACTAATAGTAGCAAATCAGATATAGATCCTTTGCCCGAA
15	1_44	GCAAGGCAAAGAATTTTATTTTCATCGTATTATCATTTTGCG
16	1_47	GCATAAAGCTAAATATTAACCAAGTACATTATCATCATATT
17	1_50	TAATACTTTTGCGGATCAATAATCGGCTAATATAATCCTGAT
18	1_53	AAAATTTTGTAGAACAAAATAATATCCCAGGGTTAGAACCTA
19	1_56	GTAATGTGTAGGTAAGAACGCGCCTGTTAGAAATAAAGAAAT
20	1_59	GACAGTCAAATCACTCTGTCCAGACGACTGAATATACAGTAA
21	1_62	TGATAAATTAATGCAGTAATAAGAGAATAACGGATTGCGCTG

22	1_65	TACAAAGGCTATCAAACAACGCCAACATGCGCAGAGGCGAAT
23	1_68	AAGAGAATCGATGACCAACGCTCAACAGAGATGATGAAACAA
24	1_71	CATATGTACCCCGGTTTAGTATCATATGTAACAATTTTCATTT
25	1_74	GAAGATTGTATAAGATAAGAATAAACACATAAATCAATATAT
26	1_77	TTTGTTAAAATTCGTAATGGTTTGAAATCGTCGCTATTAATT
27	1_80	TTTTAACCAATAGGTTTCAAATATATTTAGCGATAGCTTAGA
28	1_83	CCTTCCTGTAGCCATGATGCAAATCCAAATTTATCAAAATCA
29	2_2	TATCATAACCCTCGCGTCTTTCCAGACGGTACAAACTACAAC
30	2_5	CATAACGCCAAAAGTTGCTAAACAACCTCCAATAGGAACCCA
31	2_8	TCAGTTGAGATTTAAAGGAACAATAAACCACCCTCAGAGCC
32	2_11	AACGAACTAACGGATGAAAATCTCCAAAGGTTTAGTACCGCC
33	2_14	TATACCAGTCAGGAGTATCGGTTTATCAATATAAGTATAGCC
34	2_17	ATCATTGTGAATTAAGCTTGATACCGATTTTTGCTCAGTACC
35	2_20	CGAGTAGTAAATTGGCCCACGCATAACCAGAGGCTGAGACTC
36	2_23	TCATTCACTGAATAGAGTTAAAGCCGCTGCCTATTTCCGAA
37	2_26	AGAACCGGATATTCAAAGACAGCATCGGGTGCCTTGAGTAAC
38	2_29	GGCGCATAGGCTGGTTGAGGACTAAAGAGATGATACAGGAGT
39	2_32	TGACCAACTTTGAAGGGTAAAATACGTATCTCTGAATTTACC
40	2_35	GCCGGAACGAGGCGCGAAAGAGGCAAAACAAACAAATAAATC
41	2_38	GATAAATTGTGTCGCCAGCGATTATACAGAAGTAGTTGAGG
42	2_41	TTTGCGTATTGGGCTCTTTTCACCAGTGAATAGATTAGAGC
43	2_44	CCAGCTGCATTAATCGCCTGGCCCTGAGTTGAGGAAGGTTAT
44	2_47	GTTGCGCTCACTGCTTGCCCCAGCAGGCAATCAATATCTGGT
45	2_50	AGCCTGGGGTGCCTATCGGCAAAATCCCATCTAAAGCATCAC

46	2_53	CACAATTCCACACAGGGTTGAGTGTGTGCCTGCAACAGTGC
47	2_56	ATCATGGTCATAGCAAGAACGTGGACTCAGCAGAAGATAAAA
48	2_59	GTCGACTCTAGAGGCAGGGCGATGGCCCTAGCCCTAAAACAT
49	2_62	CGTTGTAAAACGACTTTTTGGGGTCGAGCAATATTTTTGAAT
50	2_65	AGGCGATTAAGTTGAAAGGGAGCCCCGAGAACCCTTCTGAC
51	2_68	TCCTCGCTATTACGAACGTGGCGAGAAACACACGACCAGTAA
52	2_71	TTCAGGCTGCGCAAGCTAGGGCGCTGGCAATCGTCTGAAATG
53	2_74	ACCGCTTCTGGTGCACCACACCCGCCGAACAGGAAAAACGC
54	2_77	GTATCGGCCTCAGGTATGGTTGCTTTGACTTGCTGGTAATAT
55	2_80	GCATCGTAACCGTGAGAATCAGAGCGGAATAACATCACTTG
56	2_83	GGATTGACCGTAATTTTAGACAGGAACGATCACGCAAATTA
57	3_1	ATCTAAAGTTTTGTTTTACCAGACGACGGCAAAGAAGTTTT
58	3_4	TTCTGTATGGGATTGAATTACGAGGCATGACTGGATAGCGTC
59	3_7	GGAGTGAGAATAGAGGAATACCACATTCATTGAATCCCCCTC
60	3_10	TAATTTTTTTCACGTACAACATTATTACAAATGACCATAAATC
61	3_13	AGGAGCCTTTAATTCGTTGGGAAGAAAATAGTCAGAAGCAAA
62	3_16	TGAATTTCTTAAACCCTTATGCGATTTTAGCCGAAAGACTT
63	3_19	TGACAACAACCATCGGCTTGAGATGGTTAAGCGAACCAGACC
64	3_22	CTGAGGCTTGCAGGAGGCTTGCCTGACGAGAGTACCTTTAA
65	3_25	CACCCTCAGCAGCGATTACCCAAATCAAGCGGATGGCTTAGA
66	3_28	CGGCTACAGAGGCTCTGACCTTCATCAATCAACATGTTTTAA
67	3_31	AGTTTCCATTAAACAGAGGACAGATGAAGTTTCATTCCATAT
68	3_34	GCACCAACCTAAAACAGACGGTCAATCAGTAGATTTAGTTTG
69	3_37	ACTCATCTTTGACCAAATCCGCGACCTGATAACCTGTTTAGC

70	3_40	AGTACAATGGTTTTGCCAGGGCGGAGATAAGGTGGCATCAAT
71	3_43	TGATTGCCCTTACGAATCGGCCAACGCAATAAATCATACAG
72	3_46	CGGTCCACGCTGGTCCGCTTCCAGTCAATAAAGCCTCAGA
73	3_49	ATGGTGGTTCCGAAAATGAGTGAGCTAAACATTATGACCCTG
74	3_52	AATAGCCCGAGATAACATACGAGCCGGATCAACGCAAGGATA
75	3_55	AGAGTCCACTATTATGTTTCCTGTGTGAAATGCAATGCCTGA
76	3_58	GAAAAACCGTCTATATCCCCGGGTACCGTGAGAAAGGCCGGA
77	3_61	CACCCAAATCAAGTGGCCAGTGCCAAGCTCAACCGTTCTAGC
78	3_64	TAAATCGGAACCCTGGTAACGCCAGGGTATTTTTGAGAGATC
79	3_67	GGGAAAGCCGGCGCCAGCTGGCGAAAGAGTCTGGAGCAAAC
80	3_70	CGAAAGGAGCGGGCCTGTTGGGAAGGGCACTAGCATGTCAAT
81	3_73	CGCTGCGCGTAACCCGAAACCAGGCAAAGCCCCAAAAACAG
82	3_76	TACAGGGCGCGTACAAGATCGCACTCCAGTAAACGTTAATAT
83	3_79	GTGCTTTCCTCGTTCATCTGCCAGTTTGTAATCAGCTCATT
84	3_82	CCGATTAAAGGGATGGGATAGGTCACGTTAATTCGCGTCTGG
85	3_85	TGAGAAGTGTTTTTCGTCGGATTCTCCGTAAATGTGAGCGAG

Plate 2

No.	Sequence Name	Sequence (5' -> 3')
1	4_1	GCCTGTAGCATTCCCAACATATAAAAAGAGCAGTATGTTAGCA
2	4_4	TGTACCGTAACACTTTTTGTGCACAATCAGGAATACCCAAAAG
3	4_7	ACCACCTCATTTCAAAGACAAAAGGGAACAAAGTTACCAG
4	4_10	ACCCTCAGAACCGCGTAAATATTGACGGATCTTACCGAAGCC
5	4_13	CGGAATAGGTGTATCGTCACCGACTTGAAGCCCAATAATAAG
6	4_16	AGGCGGATAAGTGCCACCAGTAGCACCATGAGCGCTAATATC
7	4_19	CTCAAGAGAAGGATCAATGAAACCATCGGGGAGAATTAAGT
8	4_22	CCTATTATTCTGAAAATCAAGTTTGCCTTTTACAGAGAGAAT
9	4_25	AGTGCCCGTATAAACGGCATTTCGGTCGAAACGATTTTTTG
10	4_28	GTAAGGTAATAAGTTTCATAATCAAATTACAAAATAAACA
11	4_31	GTTCCAGTAAGCGTCGCCTCCCTCAGAGTACCAACGCTAACG
12	4_34	CTCATTAAGCCAGAGCCACCACCCTCATAGTTGCTATTTTG
13	4_37	CAGGTCAGACGATTCGCCGCCAGCATTGACCTCCCGACTTGC
14	4_40	CGTCAATAGATAATACAACCTCGTATTAAGGCTTATCCGGT
15	4_43	CTAAAATATCTTTAAAAGTTTGAGTAACAGGAATCATTACCG
16	4_46	CAGTTGGCAAATCACCAGAAGGAGCGGACGCACTCATCGAGA
17	4_49	CTTGCTGAACCTCAGATGGCAATTCATCGTCTTCCTTATCA
18	4_52	CACGCTGAGAGCCATTCTGAATAATGGAATCCTAATTTACGA
19	4_55	CAGAGGTGAGGCGGTTTGCACGTAAAACCTATCAACAATAGAT
20	4_58	CGCCATTAATAATAGGTTTAAACGTCAGAGACAATAAACAACA
21	4_61	GGCTATTAGTCTTTTCGGGAGAAAACAATATAAAGTACCGACA
22	4_64	CTGAAAGCGTAAGACAAGTTACAAAATCGTAATTTAGGCAGA

23	4_67	TAAAAGGGACATTCACCTGAGCAAAAGATAGGGCTTAATTGA
24	4_70	GATTATTTACATTGAAATTAATTACATTCGTTATACAAATTC
25	4_73	TCATGGAAATACCTAATGGAAACAGTACCGGAATCATAATTA
26	4_76	CCAGAACAATATTATTGCTTCTGTAAATACCGACCGTGTGAT
27	4_79	CCTGAGTAGAAGAAATCCTTGAAAACATTAGTTAATTCATC
28	4_82	CCGTTGTAGCAATAAGAGTCAATAGTGATCGCAAGACAAAGA
29	4_85	TGAGGCCACCGAGTTACCTTTTTAACCTGTTGGGTATATAA
30	5_3	ACGGAATAAGTTTAGAGTTTCGTCACCATTAGTAAATGAATT
31	5_6	TGGTTTACCAGCGCCAGGGATAGCAAGCTCAACAGTTTCAGC
32	5_9	TTGAGGGAGGAAGCACCTCAGAACCGGAATTGCGAATAA
33	5_12	AGGTGAATTATCACCACCGTACTCAGGAAAAAAGGCTCCAAA
34	5_15	AGAGCCAGCAAAATCGTCGAGAGGGTTGGCTTGCTTTCGAGG
35	5_18	GCCGAAACGTCACTAGGATTAGCGGGGAGTTGCGCCGACAA
36	5_21	ATCAGTAGCGACAGACATGAAAGTATTAGATATATTCGGTCG
37	5_24	TAGCGCGTTTTTCATCAGTTAATGCCCCCTTTTGC GGATCGT
38	5_27	AGCGTTTGCCATCTTTTTAACGGGTCAAACGAGGGTAGCAA
39	5_30	GCCACCACCGGAACCATACATGGCTTTTCTTTTTCATGAGGA
40	5_33	ACCGCCACCCTCAGAATGGAAAGCGCAGATGCCACTACGAAG
41	5_36	ACCACCACCAGAGCGGCCTTGATATTCAGAATACACTAAAAC
42	5_39	TTACAAACAATTCGACATTTGAGGATTTCAAGCGGAAACAA
43	5_42	CGTTATTAATTTTAGGAGCTAACAACAGACGGGCAACAGC
44	5_45	GAACAAAGAAACCAACAGTTGAAAGGAAAGAGTTGCAGCAAG
45	5_48	CCTGATTATCAGATAATATCAAACCCTCGAAAATCCTGTTTG
46	5_51	TGTTTGGATTATACGCAGCAAATGAAAATTATAAATCAAAG

47	5_54	CCATATCAA AATTATCAGTATTAACACCTCCAGTTTGAACA
48	5_57	TGCGTAGATTTTCACCGAACGAACCACCCAACGTCAAAGGGC
49	5_60	CAGTACCTTTTACAAATGCGGGAAGTGAAGTACGTGAACCAT
50	5_63	ATTGCTTTGAATACATACGTGGCACAGAGTGCCGTAAAGCAC
51	5_66	TATTCATTTCAATTTGGCCAACAGAGATATTTAGAGCTTGAC
52	5_69	ACATCAAGAAAACAGCAGATTCACCAGTGGAAGGGAAGAAAG
53	5_72	GAATTACCTTTTTTACATTTTGACGCTCAAGTGTAGCGGTCA
54	5_75	GTGAGTGAATAACCCCGCCAGCCATTGCGCTTAATGCGCCGC
55	5_78	AATTTTCCCTTAGACTCAA ACTATCGGCCGAGCACGTATAAC
56	5_81	TTAAGACGCTGAGACTTCTTTGATTAGTAGCTAAACAGGAGG
57	5_84	TAGGTCTGAGAGACAAAAGAGTCTGTCCGTACGCCAGAATCC
58	6_3	AACTGGCATGATTATAGTAAAATGTTTAAGTAAGAGCAACAC
59	6_6	AAGGAAACCGAGGACGTCATAAATATTCAACTAATGCAGATA
60	6_9	CTTTTTAAGAAAAGGTTTCAGAAAACGAGGGTAGAAAGATTCA
61	6_12	AGCAAGAAACAATGTACCCTGACTATTAATCTACGTTAATAA
62	6_15	AGAGAGATAACCCAAAAGATTAAGAGGAAAGAACTGGCTCAT
63	6_18	AACACCCTGAACAATAATTCGAGCTTCATAATTTCAACTTTA
64	6_21	AACATAAAAACAGGACAGGTCAGGATTAGAGAAACACCAGAA
65	6_24	TTTAACGTCAAAAAAAGAGGTCATTTTTCGTAACAAAGCTGC
66	6_27	GCCATATTATTTATTATAATGCTGTAGCGAGTAATCTTGACA
67	6_30	AGCGTCTTTCCAGATACGGTGTCTGGAACGGTGTACAGACCA
68	6_33	CACCCAGCTACAATAATTCTGCGAACGATAAGGGAACCGAAC
69	6_36	GGGAGGTTTTGAAGTTCGCAAATGGTCACTCCATGT TACTTA
70	6_39	ATTCTAAGAACGCGGGGCGGAGCTGAATTGTATCATCGCCT

71	6_42	CGCCAATAGCAAGTAGCATTAAACATCCGCGGGGAGAGGCGG
72	6_45	ACAAGCAAGCCGTTTAGCAAAATTAAGCGGAAACCTGTTCGTG
73	6_48	TTCCAAGAACGGGTCGGTTGTACCAAACTCACATTAATTGC
74	6_51	GCATGTAGAAACCAGAGAAGCCTTTATTAGCATAAAGTGTA
75	6_54	AAGTCCTGAACAAGCCTCATATATTTTAAATTGTTATCCGCT
76	6_57	TGTTTCAGCTAATGCAAGATTCAAAAGGGAGCTCGAATTCGTA
77	6_60	AAAGGTAAAGTAATCATCAATATGATATTTGCATGCCTGCAG
78	6_63	GGCATTTCGAGCCCGGAGAGGGTAGCTTTTCCAGTCACGA
79	6_66	GAATCGCCATATTTGGTCATTGCCTGAGGGGGATGTGCTGCA
80	6_69	TTACCAGTATAAAGACGGTAATCGTAAAGATCGGTGCGGGCC
81	6_72	CTAGAAAAAGCCTGTTGATAATCAGAAAAGCGCCATTCGCCA
82	6_75	AAATAAGGCGTTAACAATATTTAAATTGCCAGCTTTCGGC
83	6_78	TTCTGACCTAAATTCATTAAATTTTGTAGGGGACGACGACA
84	6_81	ACGCGAGAAAACCTTAACGCCATCAAAAATGGTGTAGATGGGC
85	6_84	CTATATGTAAATGCGCTTTCATCAACATTGGGAACAAACGGC

ベンジルグアニン化および蛍光標識に使用したオリゴ DNA

No.	Sequence Name	Sequence (5' -> 3')
1	4_1-3xNH2	GCCTGTAGCATTCCCAACATATAAAAAGAGCAGTATGTTAGCATTTTT [Amino-C6dT]T[Amino-C6dT]T[Amino-C6dT]
2	4_13-3xNH2	CGGAATAGGTGTATCGTCACCGACTTGAAGCCCAATAATAAGTTTT T[Amino-C6dT]T[Amino-C6dT]T[Amino-C6dT]
3	4_25-3xNH2	CTCAAGAGAAGGATCAATGAAACCATCGGGGAGAATTAAGTGT T[Amino-C6dT]T[Amino-C6dT]T[Amino-C6dT]
4	4_37-3xNH2	CAGGTCAGACGATTCGCCGCCAGCATTGACCTCCCGACTTGCTTTT T[Amino-C6dT]T[Amino-C6dT]T[Amino-C6dT]
5	4_49-3xNH2	CTTGCTGAACCTCAGATGGCAATTCATCGTCTTTCCTTATCATT T[Amino-C6dT]T[Amino-C6dT]T[Amino-C6dT]
6	4_61-3xNH2	GGCTATTAGTCTTTTCGGGAGAAACAATATAAAGTACCGACATTTT T[Amino-C6dT]T[Amino-C6dT]T[Amino-C6dT]
7	4_73-3xNH2	TCATGGAAATACCTAATGGAAACAGTACCGGAATCATAATTATTTT T[Amino-C6dT]T[Amino-C6dT]T[Amino-C6dT]
8	4_85-3xNH2	TGAGGCCACCGAGTTACCTTTTTAACCTGTTGGGTTATATAATTTT T[Amino-C6dT]T[Amino-C6dT]T[Amino-C6dT]
9	NH2-6_0	[Amino]TTTTTAACGTAGAAAATACAGCGAGAGGCTTTTATAAAAAC CAAAAT
10	NH2-6_12	[Amino]TTTTTAGCAAGAAACAATGTACCCTGACTATTAATCTACGT TAATAA
11	NH2-6_24	[Amino]TTTTTTTTAACGTCAAAAAAAGAGGTCATTTTTTCGTAACA AAGCTGC
12	NH2-6_36	[Amino]TTTTTGGGAGGTTTTGAAGTTCGCAAATGGTCACTCCATG TACTTA
13	NH2-6_48	[Amino]TTTTTTTCCAAGAACGGGTTCGGTTGTACCAAACTCACATT AATTGC
14	NH2-6_60	[Amino]TTTTTAAAGGTAAAGTAATCATCAATATGATATTTGCATGC CTGCAG

15	NH2-6_72	[Amino]TTTTTCTAGAAAAAGCCTGTTGATAATCAGAAAAGCGCCAT TCGCCA
16	NH2-6_84	[Amino]TTTTTCTATATGTAAATGCGCTTTCATCAACATTGGGAACA AACGGC
17	Alexa647-3_1	[Alexa647]ATCTAAAGTTTTGTTTTACCAGACGACGGCAAAGAAG TTTT
18	Alexa647-1_2	[Alexa647]GCCAGAGGGGGTAAAGACTCCTTATTACAACGCAAAGA CACC
19	2_2-Alexa647	TATCATAACCCCTCGCGTCTTCCAGACGGTACAACTACAAC[Alexa 647]
20	Alexa647-5_3	[Alexa647]ACGGAATAAGTTTAGAGTTTCGTCACCATTAGTAAATG AATT
21	1_83-Alexa647	CCTTCCTGTAGCCATGATGCAAATCCAAATTTATCAAAATCA[Alexa 647]
22	Alexa647-2_83	[Alexa647]GGATTGACCGTAATTTTAGACAGGAACGATCACGCAAA TTAA
23	3_85-Alexa647	TGAGAAGTGTTTTTTCGTCGGATTCTCCGTAAATGTGAGCGAG[Alexa 647]
24	5_84-Alexa647	TAGGTCTGAGAGACAAAAGAGTCTGTCCGTACGCCAGAATCC[Alexa 647]

謝辞

本研究を遂行するにあたり、お世話になった全ての方々にまずは感謝申し上げます。

私を学究の道へと導いて下さった豊島陽子先生には、本当に感謝の思いは尽くせません。温かくも厳しく不才の私を指導して頂き、ありがとうございました。この博士論文が先生の下で受けた7年間の薫陶の一つの証となっていることを切に願います。

情報通信研究機構の古田健也主任研究員には、学部生のときから、研究全般についての議論や種々の技術、手法に関する指導をして頂きました。本論文における、DNA を用いた複数ダイニンの観察や光ピンセットによる実験は、古田氏の協力無しでは遂行できないものでした。心から感謝申し上げます。

豊島研・矢島研の両研究室の方々には、様々な点において研究に対する助言を頂きました。大変にありがとうございました。特に、市川宗巖氏並びに斎藤慧氏には、電子顕微鏡観察において多大な協力を頂きました。ありがとうございます。

大阪市立大学の広常真治教授ならびに山田雅巳准教授には、LIS1 および NDEL1 のタンパク質を提供して頂きました。大変にありがとうございました。

最後に、どんなときも私を支え、励まし続けてくれた家族に心からの感謝を捧げたいと思います。本当にありがとう。