

博士論文

論文題目 **ダイニン複合体のサブユニット分子構築の研究**

Studies on Subunit Architecture of Dynein Complex

氏名 市川 宗巖

目次

目次.....	1
略語集.....	4
序章.....	6
第1章 外腕ダイニンにおける軽鎖 LC1 の局在と調節機構.....	12
1.1 序論.....	12
1.2 実験手法.....	16
1.2.1 テトラヒメナ形質転換の系の構築.....	16
1.2.2 電子顕微鏡観察.....	23
1.2.3 生化学実験用コンストラクト構築.....	27
1.2.4 生化学実験用タンパク質の精製.....	29
1.2.5 SDS-PAGE, 抗体作製, ウェスタンブロット.....	31
1.2.6 生化学的手法による結合実験.....	32
1.2.7 アミノ酸配列解析・構造予測.....	34
1.3 結果.....	35
1.3.1 電子顕微鏡観察による LC1 の位置同定.....	35
1.3.2 生化学実験による結合様式の検証.....	42
1.4 考察.....	49
1.4.1 ストーク上構造についての考察.....	49
1.4.2 本研究結果から得られた LC1 結合のモデル.....	49
1.4.3 LC1 の γ MTBD 結合様式についての考察.....	51
1.4.4 γ MTBD の構造予測.....	53
1.4.5 LC1 が γ MTBD の微小管へのアフィニティーを下げる機構の考察.....	54

1.4.6 LC1 のダイニンの運動制御機構についての考察.....	56
第 2 章 細胞質ダイニン複合体の構造解析.....	58
2.1 序論.....	58
2.2 実験手法.....	65
2.2.1 全長コンストラクト発現用ベクターの構築.....	65
2.2.2 サブユニット位置同定用コンストラクト構築.....	66
2.2.3 細胞培養.....	67
2.2.4 遺伝子導入.....	68
2.2.5 タンパク質精製.....	68
2.2.6 電子顕微鏡観察.....	70
2.2.7 <i>in vitro</i> 運動活性測定.....	71
2.3 結果及び考察.....	73
2.3.1 組換え体ヒト細胞質ダイニン重鎖.....	73
2.3.2 組換え体細胞質ダイニンのコンポーネント.....	73
2.3.3 組換え体ヒト細胞質ダイニン 2 のコンポーネントについての考察.....	76
2.3.4 組換え体ヒト細胞質ダイニン 1 重鎖の運動活性.....	77
2.3.5 組換え体ヒト細胞質ダイニン 2 重鎖の運動活性.....	79
2.3.6 組換え体ヒト細胞質ダイニン 2 重鎖の運動活性についての考察.....	81
2.3.7 組換え体ヒト細胞質ダイニンの分子形態.....	82
2.3.8 ダイニン 1 とダイニン 2 の尾部の構造の違いについての考察.....	85
2.3.9 ヒト細胞質ダイニン 1 尾部のサブドメイン構造.....	85
2.3.10 ヒト細胞質ダイニン 1 尾部サブユニットの分子構築.....	89
2.3.11 ヒト細胞質ダイニン 1 尾部サブユニットの分子構築についての考察.....	97

2.3.12 尾部の開閉とサブドメインの関係についての考察.....	98
総括.....	100
参考文献.....	102
謝辞.....	118

略語集

aa	amino acid
AAA	ATPase associated with various cellular activities
ADP	Adenosine 5'-(trihydrogen diphosphate)
AFM	Atomic Force Microscope
ATP	Adenosine 5'-(tetrahydrogen triphosphate)
a.u.	arbitrary unit
bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
CC	coiled coil
CCD	charge coupled device
DHC	dynein heavy chain
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMP	dimethyl pimelimidate
DTT	1,4-dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethyleneglycol-bis(2-aminoethyl ether) N, N, N', N'-teraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
Flp	Flippase recombination enzyme
FRT	Flp Recombination Target
GFP	green fluorescent protein
GST	glutathione S-transferase
GTP	guanosine triphosphate
HC	heavy chain
HEK	human embryonic kidney
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
His-tag	polyhistidine tag
hsGFP	His-SBP-GFP
IC	intermediate chain
IFT	intraflagellar transport
IMCD	inner medullary collecting duct
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LC	light chain
LIC	light intermediate chain

LRR	Leucine-rich repeat
MCS	multiple cloning site
MOPS	3-morpholinopropanesulfonic acid
MTBD	microtubule binding domain
n.d.	not detected
NEM	N-ethylmaleimide
Ni-NTA	nickel-nitrilotriacetic acid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ODA	outer dynein arm
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCD	primary ciliary dyskinesia
PCR	polymerase chain reaction
PDB	protein data bank
PIPES	piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)
Pm	Paromomycin
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PKA	protein kinase A
ppt	precipitation
PVDF	PolyVinylidene DiFluoride
RMSD	Root Mean Square Deviation
RNAi	RNA interference
rpm	rotation per minute
SBP	streptavidin-binding peptide
SD	standard deviation
SE	standard error
SDS	sodium dodecyl sulfate
sGFP	SBP-GFP
S/N	signal-to-noise
SRS	seryl-tRNA synthetase
TCA	trichloroacetic acid
TE buffer	Tris-EDTA buffer
TIRFM	total internal reflection fluorescence microscope
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
WDR34	WD40 domain repeat protein 34

序章

モータータンパク質について

真核細胞では、高度に組織化された細胞骨格系と、細胞骨格上で ATP 加水分解に伴う構造変化を用いて力発生するモータータンパク質が存在している。モータータンパク質は、アクチンフィラメント上で力発生するミオシンと、微小管骨格上で力発生するキネシン・ダイニンの 3 種類に大きく分けられる。キネシン・ミオシンが G タンパク質と類似した構造を持つ(Rayment, 1996)のに対し、ダイニンは AAA+タンパク質に属している(Neuwald *et al.*, 1999)。キネシン・ミオシンについてはその運動機構についての詳細が明らかとなってきたのに対し、ダイニンの運動機構や制御機構は未だ十分には理解されていない。これは、ダイニンの巨大なサイズが原因であったと考えられる。キネシン重鎖のモータードメインのサイズが~40 kDa であり(Kuznetsov *et al.*, 1989)、大腸菌でも発現することができるのに対し、ダイニン重鎖のモータードメインのサイズは 300 kDa 以上と巨大であり、ダイニン重鎖の組換え体の発現系はこれまで細胞性粘菌や酵母の細胞質ダイニンに限られていた(Nishiura *et al.*, 2004; Reck-Peterson *et al.*, 2006)。また、ダイニン重鎖は、他のサブユニットとともにダイニンの種によっては 2 MDa にも及ぶ巨大なタンパク質複合体を形成しているが、このサブユニット構造が明らかとなっていないこともダイニンの制御機構を理解することの妨げとなっていた。本研究では、組換え体としてダイニン複合体を精製することのできる系を構築し、その性質、特にそのサブユニット構造を明らかとすることを目的とした。

モータータンパク質研究と電子顕微鏡法

電子顕微鏡観察で得られるのは、タンパク質の各状態のスナップショットであり、動的な構造変化を検出することはできない。しかしながらモータータンパク質の研究で電子顕微鏡が果たしてきた貢献は大きい。例えば、Walker らはアクチンフィラメント上でのミオ

シンの電子顕微鏡観察から 2000 年にミオシン V の歩行機構を提唱していた(Walker *et al.*, 2000)が、この十年後に高速 AFM でミオシン V の実際の運動がリアルタイムで観察され、想定されたモデルとよく合うことが分かった(Kodera *et al.*, 2010)。また、キネシン・ミオシンでは、頭部ドメインと尾部ドメインが相互作用したコンパクトな形態と、頭部ドメインと尾部ドメインが離れて伸長した形態の 2 つの形態をとることが電子顕微鏡観察によって見出されており(Hackney *et al.*, 1992; Thirumurugan *et al.*, 2006)、これらのモータータンパク質が積荷分子と結合していない状態では不要な ATP の消費を防ぐために自己抑制状態をとっていると考えられている。このように、構造を知ることによってモータータンパク質の運動様式や制御機構への示唆を得ることが可能である。

近年のモータータンパク質の構造研究では、生物試料を氷包埋して溶液中での構造を観察することのできるクライオ電子顕微鏡法や X 線結晶構造解析による高分解能での構造解析法を用いることが主流となりつつある。しかしながら、上述したようにダイニン複合体は複数のサブユニットからなる非常に巨大な複合体であり、そのサブユニット構造をクライオ電子顕微鏡法や X 線結晶構造解析から解明することは困難である。一方、重原子によってタンパク質を染色するネガティブ染色法は簡便であるとともに、Ni-NTA ナノ金粒子標識(Kitai *et al.*, 2011)や単粒子解析法(Roberts *et al.*, 2009)と組み合わせることでタンパク質複合体の構造を理解する上では重要なツールである。本研究では、ダイニン複合体のサブユニット構造に焦点をあてることにしたため、ネガティブ染色法を用いた電子顕微鏡観察を採用した。

ダイニン研究と電子顕微鏡法

ダイニンは微小管マイナス端方向への力を発生するモータータンパク質であり、複数のサブユニットから構成された複合体である。細胞内の役割によって大きく細胞質ダイニンと軸糸ダイニンに分けられる。細胞質ダイニンは細胞内での小胞輸送や、オルガネラの配

置、細胞分裂などで機能し、さらにダイニン 1 とダイニン 2 に分類される(Pfister *et al.*, 2006)。軸系ダイニンは繊毛・鞭毛の軸系 9+2 構造に組み込まれており軸系の屈曲を引き起こすタイプであり、外腕ダイニン・内腕ダイニンに分類される。第 1 章では外腕ダイニン、第 2 章では細胞質ダイニンについて述べる。

ダイニンは複数のサブユニットからなるタンパク質複合体である。ATP 加水分解活性・モーター活性をもつのは AAA+ファミリーに属すダイニン重鎖であり、その基本的なドメイン構造は全ての種のダイニンで共通している(Fig. 1a)。ダイニン複合体は約 50 nm と巨大であるため、電子顕微鏡観察による分子形態が調べられてきた(Goodenough and Heuser 1984; Goodenough *et al.*, 1987; Vallee *et al.*, 1988)。その結果、ダイニンの構造は大きく尾部ドメイン・頭部ドメインに分けられることが明らかとされ、さらにダイニンの種によっては尾部ドメインで多量体化し単頭から三頭構造をとることが示された。また、頭部リングから約 15 nm のストーク構造が突出していることが明らかとされ、その先端に位置する MTBD 領域で微小管と相互作用することも明らかとなった(Gee *et al.*, 1997) (Fig. 1b)。ダイニンの電顕像に単粒子解析手法を適用することで S/N 比を上げ、より高分解能での構造解析も行われてきた。Burgess らはクラミドモナスから精製した天然の内腕ダイニン c をヌクレオチド無し条件または ADP・Vi 条件(ADP・Pi 状態を模倣)で単粒子解析を行い、ATP 加水分解前後で頭部と尾部の相対角度が変化していることを示した(Burgess *et al.*, 2003)。また、Roberts らは単粒子解析による構造解析から、ATP 加水分解前後でリンカーが中央付近で折れ曲がることを示した(Roberts *et al.*, 2012)。これらの研究結果から、ATP 加水分解に伴いリンカーの構造変化が起こり(パワーストローク)、ダイニンは力発生すると考えられている。

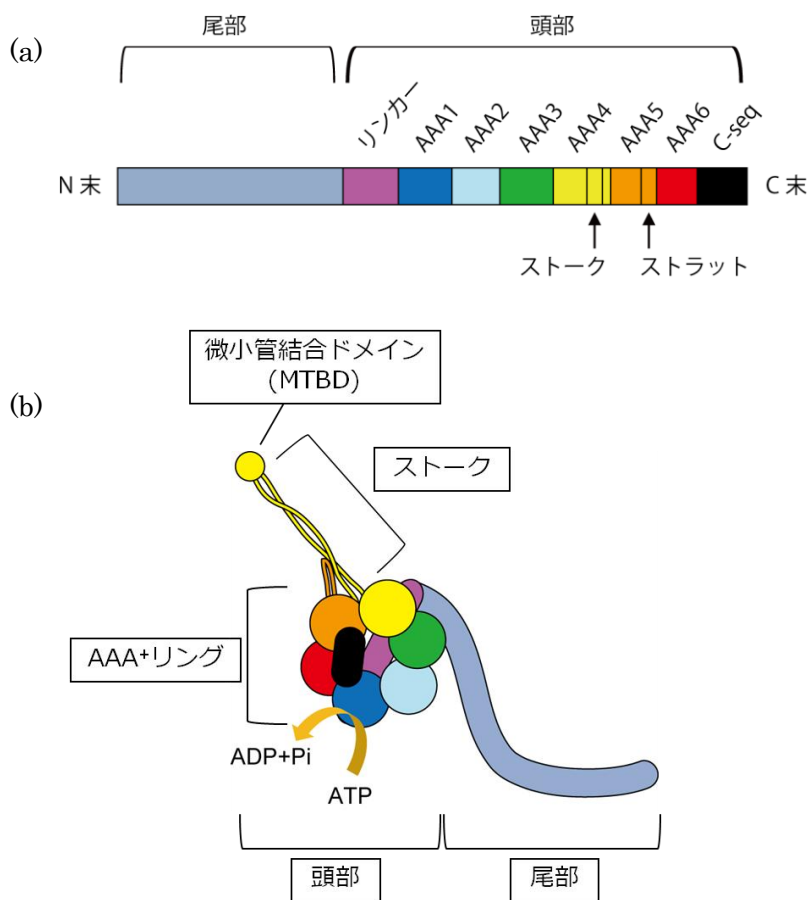


Fig.1 ダイニン重鎖のドメイン構造
(a) ダイニン重鎖の配列の模式図
(b) ダイニン重鎖の構造の模式図

構造的視点からみたダイニンの運動機構

ダイニン分子中で ATP 加水分解が起こるのは重鎖の頭部ドメインであるが、この頭部ドメインについては近年 X 線結晶構造解析によって高分解能での構造情報が得られてきた (Carter *et al.*, 2011; Kon *et al.*, 2011; Kon *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2012)。その結果、頭部ドメインはリンカー、AAA+リング、ストーク、MTBD、ストラット、C 末端ドメインの領域から構成されていることが明らかとなった (Fig. 1b)。AAA+リングは他の AAA+スーパーファミリータンパク質と同様に 6 つの AAA サブドメイン (AAA1-AAA6) がリング状に並んでいる。これはキネシン・ミオシンなどのモータータンパク質が G タンパク質に類似し

た構造を持つのと大きく異なっている。ダイニンではこの6つのAAAサブドメインのうち、AAA1-AAA4にヌクレオチドが結合可能である。このうちAAA2-AAA4は運動の制御に関わると考えられており、実際の運動に寄与しているのはAAA1でのATP加水分解である(Kon *et al.*, 2004; Kon *et al.*, 2012) (Fig. 1b)。このAAA1でのATP加水分解が前述のパワーストロークを引き起こす。しかしながら、パワーストロークのみではダイニンの運動を説明することはできない。微小管上のtubulinダイマーの次の結合サイトに移行するためには、微小管から一度解離する必要があるためである。これを実現するために、ダイニンはATP加水分解サイクルと同期して微小管に対するアフィニティーを変化させる。ここで重要な点は、AAA1からストークの先端にあるMTBDまでの長い距離(~20 nm)を情報が伝達されるということである。AAA1からストークの基部までは、C末端ドメイン・ストラットを介して構造変化が伝わることを提唱されている(Kon *et al.*, 2012)。さらに、15 nmに及ぶストークの逆平行コイルドコイルのレジストリがずれることでストークからMTBDへの情報伝達が達成されていると考えられている。このモデルを裏付けるように、セリルtRNA合成酵素(SRS)のコイルドコイルとストークのキメラタンパク質を作製してレジストリを規定することで、MTBDの微小管に対するアフィニティーを弱結合型(+ β レジストリ)または強結合型(α レジストリ)にロックすることが可能である(Gibbons *et al.*, 2005; Carter *et al.*, 2008)。近年、弱結合型または強結合型レジストリをとったストークの結晶構造がそれぞれ報告されていることもストークが2つの状態を取りうることを示唆している(Carter *et al.*, 2008; Kon *et al.*, 2012; Nishikawa *et al.*, 2014)。

ダイニン構造と運動制御

上記のような複雑な機構でダイニンの頭部ドメインはマイナス端方向への力発生を行っていると考えられている。しかしながら、これだけではダイニンの運動を完全に理解することはできない。なぜならダイニンの活性は環境や分子の置かれた状況に応じて適切に制

御される必要があるからである。モーター活性の制御は重鎖以外のサブユニットや、種々の制御タンパク質によって担われている。

軸系ダイニンでは、中間鎖(IC)や軽鎖(LC)が主にこのモーター活性の制御を担っている。外腕ダイニン複合体の IC は中心体・ラジアルスポークからのシグナル伝達を受け、ダイニンの活性を制御していることが示唆されている(Oda *et al.*, 2013)。また、外腕ダイニンの軽鎖の中には Ca^{2+} やレドックス(酸化還元)感受性のものがあり鞭毛打を制御することが知られている。このうち、LC4 は Ca^{2+} が結合することで構造変化し、外腕ダイニン γ 重鎖の尾部の形態を変化させることが電子顕微鏡観察の結果すでに明らかとなっている(Sakato *et al.*, 2007)。

また、細胞質ダイニン 1 には多くの制御タンパク質が存在している。例えばダイナクチンはダイニンの IC に結合し、その一方向連続運動性(プロセッシビティ)を上げることが知られている(King and Schroer, 2000)。また、Lis1, Ndel は協同して高負荷でのダイニンの運動を補助していると考えられているが、Lis1 は AAA+リングに、Ndel は LC8, IC, AAA+リングに結合することが知られている(Kardon and Vale, 2009; McKenney *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012)。

このようにダイニンのサブユニットや制御タンパク質がダイニンの活性を制御することは現象レベルでは明らかとなっているが、その機構は十分には明らかとされていない。これは、ダイニン複合体のサブユニット構造が未だ十分に解明されていないため、サブユニット、または、それと結合する制御タンパク質がダイニン複合体中のどの領域で働くのかが分かっていないためであった。そこで、本研究ではダイニンのサブユニット構造を明らかとすることで、ダイニンの制御機構を理解するための構造的基盤を確立すること目的とした。第 1 章では軽鎖 LC1 の位置同定を通じて外腕ダイニンの制御機構に迫った。また、第 2 章では細胞質ダイニンの尾部において、ダイニン重鎖とともに中間鎖 IC, 中間軽鎖 LIC, 軽鎖 LC の位置を同定し、尾部のサブユニットの分子構築を調べた。

第 1 章：外腕ダイニンにおける軽鎖 LC1 の局在と調節機構

1.1 序論

1.1.1 外腕ダイニンについて

繊毛・鞭毛は真核生物で広く保存された運動駆動装置である。細胞から突出した構造体であり、繊毛は数 μm 、鞭毛は数十 μm の長さである。繊毛・鞭毛は 600 種類以上のタンパク質から構成されており (Pazour *et al.*, 2005)、どちらも中心対微小管の周りをさらに 9 つのダブルレット微小管が取り囲んだ 9+2 構造の軸糸構造をもつ (Pigino *et al.*, 2012)。繊毛・鞭毛は全体として屈曲することで単細胞生物や精子の運動における推進力を生み出すだけでなく、気管上皮や脳室上皮において繊毛は水流発生など、ヒトなどの高等真核生物の体内でも繊毛は重要な機能を果たしている。また、胚発生の際にノード繊毛が引き起こす水流は、左右軸の決定に重要であることも明らかとなっている (Essner *et al.*, 2002; Goetz and Anderson, 2010)。このため、繊毛タンパク質の異常は、ヒトにおける重篤な病態 (繊毛病) を引き起こすことが知られている (Kurkowiak *et al.*, 2014)。

軸糸の屈曲を引き起こしているのは、軸糸ダイニンである。軸糸ダイニンは、ダブルレット微小管 A 小管に尾部で組み込まれており、隣り合うダブルレット微小管 B 小管とストロークの先端の MTBD で相互作用している。軸糸ダイニンは外腕ダイニンと内腕ダイニンに分類されるが、本研究ではこのうち繊毛打頻度に関わり、主な推進力を生み出す外腕ダイニン (ODA) 複合体に着目した。外腕ダイニン複合体は、鞭毛・繊毛打の推進力の ~80% を担っていると考えられており、そのコンポーネントの変異はヒトの原発性繊毛運動不全症 (PCD) の原因ともなる (Kurkowiak *et al.*, 2014)。外腕ダイニン複合体はクラミドモナス・テトラヒメナでは三種類の重鎖がヘテロライマーをつくった三頭構造をとっており、ウニ軸糸やヒトの繊毛では二種類のヘテロダイマーが二頭構造をとっている。クラミドモナスにおいて三種類の重鎖は、それぞれ α , β , γ 重鎖と呼ばれている (本文中では基本的にはこのクラミドモナスの命名法を用いる)。重鎖は基本的には同じドメイン構造をしているのにも関わ

らず、 α , β , γ 重鎖はそれぞれ異なる性質を示すことが知られている。先行研究のユニ軸糸外腕ダイニンの二頭を分離して性質を調べた結果、または、三頭のうちいずれかの頭部を欠損した変異体を用いた実験から、 γ 重鎖は *in vitro* での微小管滑り運動速度・ATPase 活性を下げる事が知られている (Moss *et al.*, 1992a,b; Furuta *et al.*, 2009)。また、三頭のうち β 重鎖が主に力発生を行っていると考えられている。

クラミドモナスの場合、外腕ダイニンの重鎖には、さらに二種類の間鎖(IC)、及び、11種類の軽鎖(LC)が結合していて軸糸微小管への組み込みや、モーター活性の調節を行っていると考えられている (Sakato and King, 2003; Oda *et al.*, 2013)。 α 重鎖には LC5、 β 重鎖には LC3、 γ 重鎖には LC4・LC1 が特異的に結合している。ほぼ全ての IC・LC が尾部ドメインに結合するのに対し、LC1 のみが γ 重鎖の頭部ドメインに結合することが生化学的に示されていた (Benashski *et al.*, 1999)。頭部ドメインに結合するサブユニットは LC1 以外に知られておらず、機能的にも重要であることが推測される。そこで、本研究ではこの LC1 に着目した。

1.1.2 外腕ダイニンにおける軽鎖 LC1 の機能

LC1 が、ATP 加水分解活性をもつ頭部ドメインに結合するという結果は、LC1 が γ 重鎖のモーター活性を直接制御する可能性を示唆しており、非常に興味深いものである。この推測を裏付けるように、LC1 は真核生物で広く保存されており、適切な繊毛打・鞭毛打の形成に重要であることが分かっている。LC1 の欠損株はどの生物種でもこれまで得られていないが、LC1 の RNAi によるノックダウン・変異体 LC1 の発現を行うと、繊毛打・鞭毛打の波形が異常になる、鞭毛打頻度が下がる、などの影響が出ることが複数のモデル生物を用いた研究で明らかとなっている。また、生物種によっては、LC1 をノックダウンすると、外腕ダイニンが軸糸への組み込みに影響が出て、軸糸内の外腕ダイニンが一部欠損することも知られている (Baron *et al.*, 2007; Patel-King and King, 2009; Rompolas *et al.*,

2010; Mazor *et al.*, 2011; Kutomi *et al.*, 2012)。さらに、ヒトにおける LC1 の変異はヒトの原発性繊毛運動不全症 (PCD) を引き起こすことも知られている (Horváth *et al.*, 2005; Mazor *et al.*, 2011)。

このように LC1 が繊毛・鞭毛打の制御に関わることはわかってきたが、その制御機構は明確にされてはいない。これは、LC1 と γ 重鎖の結合の実体が明らかとなっていなかったためであった。LC1 単独の構造は NMR によって解かれており、ロイシンリッチリピート (LRR) 構造をとり、約 3×7 nm のサイズで、N 末と C 末が長軸方向の両端に位置することが分かっている (Wu *et al.*, 2000) が、LC1 がどのように γ 重鎖に結合するかについてはほとんど明らかとなっていなかった。LC1 は γ 重鎖の頭部ドメインのうち、AAA+リングに結合すると推定されてきた (Wu *et al.*, 2000; Patel-King and King, 2009) (Fig. 2a) が、構造的な証拠は得られていなかった。また、LC1 は微小管に結合することから、軸糸ダブレット微小管 A 小管と γ AAA+リングを係留するアンカーとして働くのではないかと提唱されていた (Patel-King and King, 2009) (Fig. 2b) が、これも根拠の乏しい推測にすぎなかった。本研究では、電子顕微鏡を用いた構造解析と、生化学的実験を用いて、 γ 頭部ドメイン内の LC1 の位置を同定し、さらに γ 頭部ドメインの制御機構について明らかとすることを目指した。

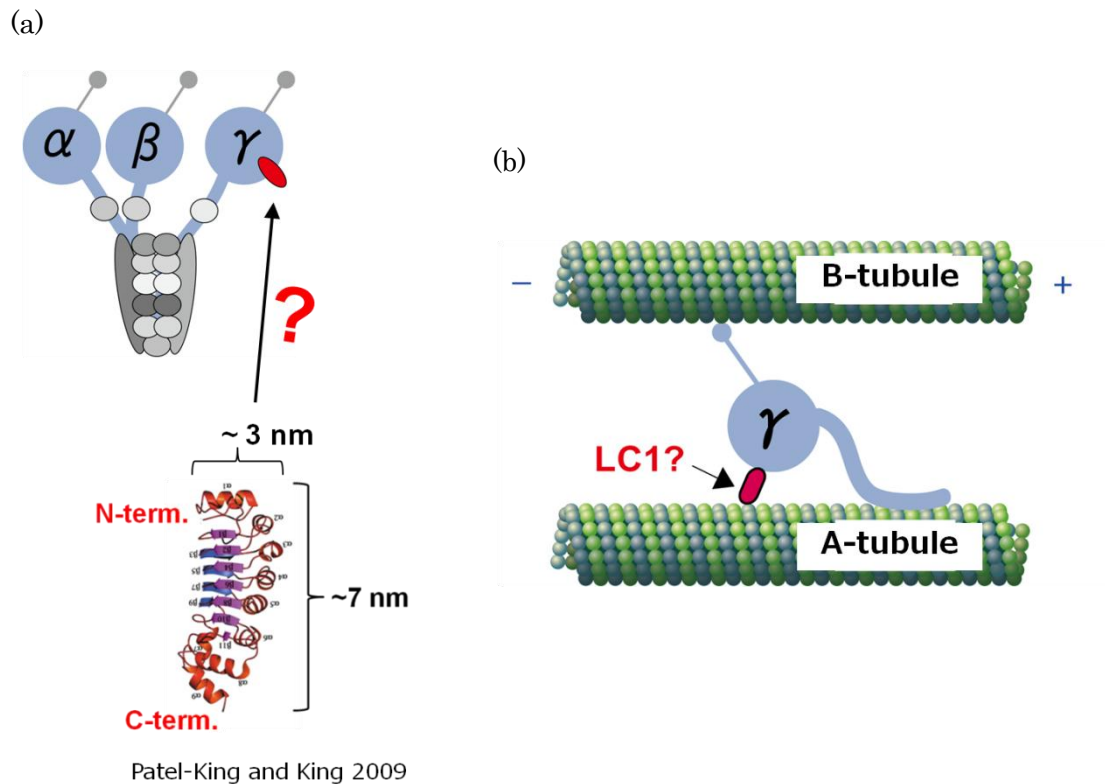


Fig.2 先行研究での LC1 の局在のモデル

(a) LC1 の NMR 構造と頭部ドメイン内での局在のモデル. LC1 が γ 重鎖の頭部 AAA+リングに結合すると考えられていたが、構造的な証拠はなかった。LC1 の構造は Patel-King and King, 2009 より引用した。(b) LC1 の軸糸構造内での局在のモデル. LC1 は γ 重鎖を軸糸ダブレット微小管 A 小管側にアンカーするというモデルが提唱されていたが、明確な証拠は得られていなかった。

1.2 実験手法

1.2.1 テトラヒメナ形質転換の系の構築

1.2.1.1 hGFP-Neo4 ベクター, hsGFP-Neo4 ベクターの構築

テトラヒメナ繊毛内に組換え体ダイニン複合体が組み込まれているかを確認しやすくするため、His-tag とともに GFP も導入することとした。ここで、GFP の Asp173 の後ろのループ部分に、His-tag や SBP-tag などのタグを挿入しても、GFP のフォールディングや蛍光には影響しないことがすでに分かっている(Kobayashi *et al.*, 2008)。そこで、テトラヒメナ用にコドン最適化された EGFP 配列と薬剤耐性の neo4 遺伝子のカセットの入ったベクター(pEGFP-neo4 ベクター) (Kataoka *et al.*, 2010)を改変し、インバース PCR によって、GFP のループ部分に 8×His-tag を導入し、phGFP-neo4 ベクターとした。また、さらに 8×His-tag の後ろに GS のリンカーを介して、テトラヒメナ用にコドンを改変した SBP-tag 配列をインバース PCR によって挿入し、phsGFP-neo4 ベクターを構築した。以下、PCR で作製した断片については全てシーケンスを行い配列を確認した。

1.2.1.2 テトラヒメナからのゲノム DNA の精製

テトラヒメナ大核からのゲノム DNA の精製は基本的に Guo らの方法(Guo *et al.*, 2008)に従って行った。1×Antibiotic Antimycotic (A5955, SIGMA)を含む SPP 培地 (1% ProteosePepton No.3, 0.2% Glucose, 0.1% Yeast Extract, 0.003% Fe-EDTA) 中で 3~5×10⁵ cells/ml まで増やしたテトラヒメナ細胞溶液を~1.5 ml 準備した。遠心で回収した細胞を Urea buffer (0.35 M NaCl, 10 mM Tris-pH 7.4, 10 mM EDTA, 1% SDS, 42% Urea)で溶解し、フェノールクロロホルム抽出し、イソプロパノールで沈殿した DNA を 100 µg/ml の RNase を含む TE buffer 30 µl で溶解した。~1-2 µg/ml のゲノム DNA が抽出された。

1.2.1.3 テトラヒメナ形質転換用コンストラクト作製

テトラヒメナの大核への相同組換えに用いるため、hGFP-neo4 配列または hsGFP-neo4 配列の両端にテトラヒメナのゲノムと相同な配列を付加した断片を作製した(Fig. 3a)。この手順は、基本的には Kataoka らの方法(Kataoka *et al.*, 2010)に従って行った。まず、phGFP-neo4 ベクターまたは phsGFP-neo4 ベクターから、GFP-neo4-F-primer, GFP-neo4-R-primer を用いて hGFP-neo4 領域(hGFP-neo4-fragment)または hsGFP-neo4 領域(hsGFP-neo4-fragment)を PCR で増幅した。また、テトラヒメナ β HC の C 末をコードする領域の終始コドン直前までの領域 1,085 bp (β HC-5'-fragment)と、 β HC をコードする領域の下流の 1,500 bp (β HC-3'-fragment)をそれぞれ PCR で増幅した。また、LC1 をコードする領域の上流から LC1 の終始コドン直前までの 1,263 bp の領域(LC1-5'-fragment)と、LC1 をコードする領域の下流の 1,475 bp (LC1-3'-fragment)をそれぞれ PCR で増幅した。この際、5'-fragment の 5'末端には overlap-outer-F-primer と、3'-fragment の 3'末端には overlap-outer-R-primer と重複する配列を付加した。また、5'-fragment の 3'末端と、3'-fragment の 5'末端には、hGFP-neo4-fragment または hsGFP-neo4-fragment と重複する配列を付加した。さらに、得られた 3 種類の fragment と overlap-outer-F-primer, overlap-outer-R-primer を用いて overlap PCR を行い、5'-fragment, hGFP-neo4-fragment または hsGFP-neo4-fragment, 3'-fragment の 3 断片を繋げ、一つの断片とした。使用した primer の一覧は、(Table 1) である。得られた目的の PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動で分離し、Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega)または FavorPrep Gel purification mini kit (FAVORGEN)で精製した。得られた DNA 断片は、使用するまで氷上で保存した。

Table 1 テトラヒメナ形質転換用コンストラクト作製に用いた primer 一覧

primer名称	配列
GFP-neo4-F-primer	5'-GGTGGTATGGTTTCTAAGGGTGAAGAAGCTTTCCTACTGGTGTGTTT
GFP-neo4-R-primer	5'-AAGCTTGATATCGAATTCAGATCCCCCGGGCTGCATTTTTCCAGT
8HC-5'-fragment-F	5'-GCTGATGGCGATGAATGAACACTGGTTTCCGTACAGACTAATGTAA
8HC-5'-fragment-R	5'-AAGTTCTTCACCCTTAGAAACCATCCACCTTTTTATCTTTCTTAACTTCATCAGAGAC
8HC-3'-fragment-F	5'-CCCGGGGGATCTGAATTCGATATCAAGCTTGAAAAATCATAAAAAATTTAAAATAATAAACATTTCTATA
8HC-3'-fragment-R	5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACTTCCTGATAAACCTTCAGAATAAGG
LC1-5'-fragment-F	5'-GCTGATGGCGATGAATGAACACTGTATTTTACCAGTCAATCAATCTGATAGAA
LC1-5'-fragment-R	5'-AAGTTCTTCACCCTTAGAAACCATACCACCAAGTTATTTAGCTGAAATAGGGATATCTG
LC1-3'-fragment-F	5'-CCCGGGGGATCTGAATTCGATATCAAGCTTTATGTTTTCCATCTATGCGATAAATTATGC
LC1-3'-fragment-R	5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACTGTGGGAGAAGGCGACAATTA
overlap-outer-F	5'-GCTGATGGCGATGAATGAACACTG
overlap-outer-R	5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACT

マゼンダは C 末と GFP の間の GG のリンカー配列に対応する、
 緑の領域は、hGFP-neo4 断片または hsGFP-neo4 断片の 5'側と重複する配列、
 青の領域は、hGFP-neo4 断片または hsGFP-neo4 断片の 3'側と重複する配列である。
 黒の斜体は、overlap-outer-F primer, overlap-outer-R primer と重複する配列を示す。

1.2.1.4 テトラヒメナ形質転換用金粒子の調製と DNA のコーティング

形質転換の際に用いる金粒子を以下のように調製した。0.6 μm 金粒子(165-2262, BioRad) 60 mg を 1.5 ml チューブに測り取り、1 ml の 70% EtOH を加え、3 min ボルテックスし、10 min 静置した。卓上スイング遠心機で 5 sec 遠心し、上清を除いた。さらに、ペレットに 1 ml の滅菌水を加え、1 min ボルテックスし、1 min 静置、遠心(5,000 rpm, 2 sec)し、上清を除くステップを計 3 回繰り返した。最後に金粒子を滅菌済 50%グリセロール 1 ml に懸濁した。金粒子溶液は使用するまで 0.6 ml チューブに 50 μl ずつ分注し、-20°C で保存した。

次に、項目 1.2.1.3 で得た DNA 断片を金粒子にコートした。0.6 ml チューブに入った金粒子をボルテックスし、精製した DNA 溶液 約 30 μl を加え再度ボルテックスした。20 μl の 2.5 M CaCl₂を加えてボルテックスし、20 μl の 0.1 M スペルミジンを加えた後、1 min ごとに 1 回ボルテックスをしながら氷上に 10 min 置いた。卓上スイング遠心機で 2-3 sec 遠心し、上清を除き、100 μl の 70% EtOH で懸濁した。再度遠心して 100 μl の 100% EtOH で懸濁した。さらに遠心し、10 μl の 100% EtOH で懸濁した。超音波洗浄機で 10 sec 処理し、ピペッティングして粒子を分散させた。マクロキャリアホルダー(165-2322, BioRad)

にセットしたマクロキャリアー(165-2335, BioRad) の中央から直径 1 cm 程度の領域に分散させた金粒子をピペットマンで塗布した。金粒子を塗布したマクロキャリアーは、シリカゲルを敷いた容器内で 10 分以上乾燥させた。

1.2.1.5 テトラヒメナへの形質転換

テトラヒメナの大核への形質転換は、基本的には Dave *et al.*, 2009 の手順に従って遺伝子銃(PDS-1000/He biolistic delivery system, BioRad)を用いて行った。ストック溶液からテトラヒメナ野生株(B2086 株) 200 μ l を、5 ml SPPA 培地 (1 \times Antibiotic Antimycotics を含む SPP 培地)に植継ぎ、15 ml チューブ中で 30 $^{\circ}$ C で 1-2 日間前培養した。前培養液 200-500 μ l を 300 ml フラスコ内の SPPA 培地 25 ml に植継ぎ、さらに 30 $^{\circ}$ C で一晩静置培養した。細胞密度が 4×10^5 cells/ml まで増えたところで遠心(1700 g, 5 min, 室温)し、一度 10 mM Tris-HCl pH 7.5 で洗い、再度遠心して 50 ml の 1 \times Antibiotic Antimycotics を含む 10 mM Tris-HCl pH 7.5 でペレットを懸濁した。この状態で一晩 30 $^{\circ}$ C で静置し、細胞を飢餓状態とした。

テトラヒメナ細胞が飢餓状態となったことは、倒立顕微鏡(CK, Olympus)で観察し、細胞の形が細長くなっていたことから確認した。飢餓状態のテトラヒメナを 50 ml チューブに移して遠心(1700 g, 5 min, 室温)して上清を捨て、チューブの底に残った 10 mM Tris-HCl pH 7.5 (約 500 μ l)を用いて細胞ペレットを懸濁した。あらかじめシャーレのフタの上に置いたろ紙の中央を 750 μ l の 10 mM Tris-HCl pH 7.5 で湿らせておき、ここに細胞懸濁液を塗布した。細胞を載せたろ紙をホルダーに入れ、PDS-1000/He にセットした。細胞のセットされているチャンバー内を減圧し、ラプチャーディスク(165-2328, Bio-Rad)を介してヘリウムガスによって圧力をかけ、圧力差でラプチャーディスクが割れる衝撃で DNA がコートされた金粒子を細胞に打ち込んだ。金粒子を打ち込む際のヘリウムの圧力は 900 psi で行った。打ち込み後に、ろ紙を培地の入ったフラスコに移し、細胞を培地中に移し、30 $^{\circ}$ C

で 2 hr 静置した。薬剤耐性遺伝子の発現を誘導するため、終濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ CdCl_2 を加え、 30°C で 60 min 静置した。さらに、終濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ のパロモマイシン(Pm)を加え、100 μl ずつ 96 well プレートに分注し、3 日間 30°C で培養することで形質転換体を選抜した。

1.2.1.6 テトラヒメナ組換え体のフェノティピックアソートメント

テトラヒメナは大核内に染色体を 45 コピー持つため組換え体遺伝子の割合を上昇させる必要がある。テトラヒメナ大核は無糸核分裂を行うため、段階的に選抜条件を厳しくしながら植継ぎを行うフェノティピック・アソートメントという工程によって組換え体遺伝子の割合を上げた。まず、薬剤耐性遺伝子の発現を誘導する Cd^{2+} の濃度を段階的に 0.01 $\mu\text{g/ml}$ まで下げ、その後、パロモマイシンの濃度を段階的に上昇させた。最終的なパロモマイシンの濃度条件は、 $\beta\text{HC-hGFP}$ の株については 600 $\mu\text{g/ml}$ 、LC1-hsGFP 株については 850 $\mu\text{g/ml}$ まで進めた。組換え体テトラヒメナから項目 1.2.1.2 の手順に従って、ゲノム DNA を精製し、PCR によって野生型と組換え型の遺伝子の割合を調べたところ、 $\beta\text{HC-hGFP}$ 株についてはほぼ全ての遺伝子が組換え体型になっており、LC1-hsGFP 株については約 60% が組換え体型に置き換わったことが確認された(Fig. 3b)。さらに、 $\beta\text{HC-hGFP}$ については、SPP 培地で希釈し、96 well plate で培養することで一細胞由来の株を得た。このうちの一種類は、選抜薬剤なしの条件で長期間培養しても野生株遺伝子が検出されなかったことから、45 コピー全ての遺伝子が組換え体に置き換わった株として樹立できたと考えられる(Fig. 3b 上段右)。

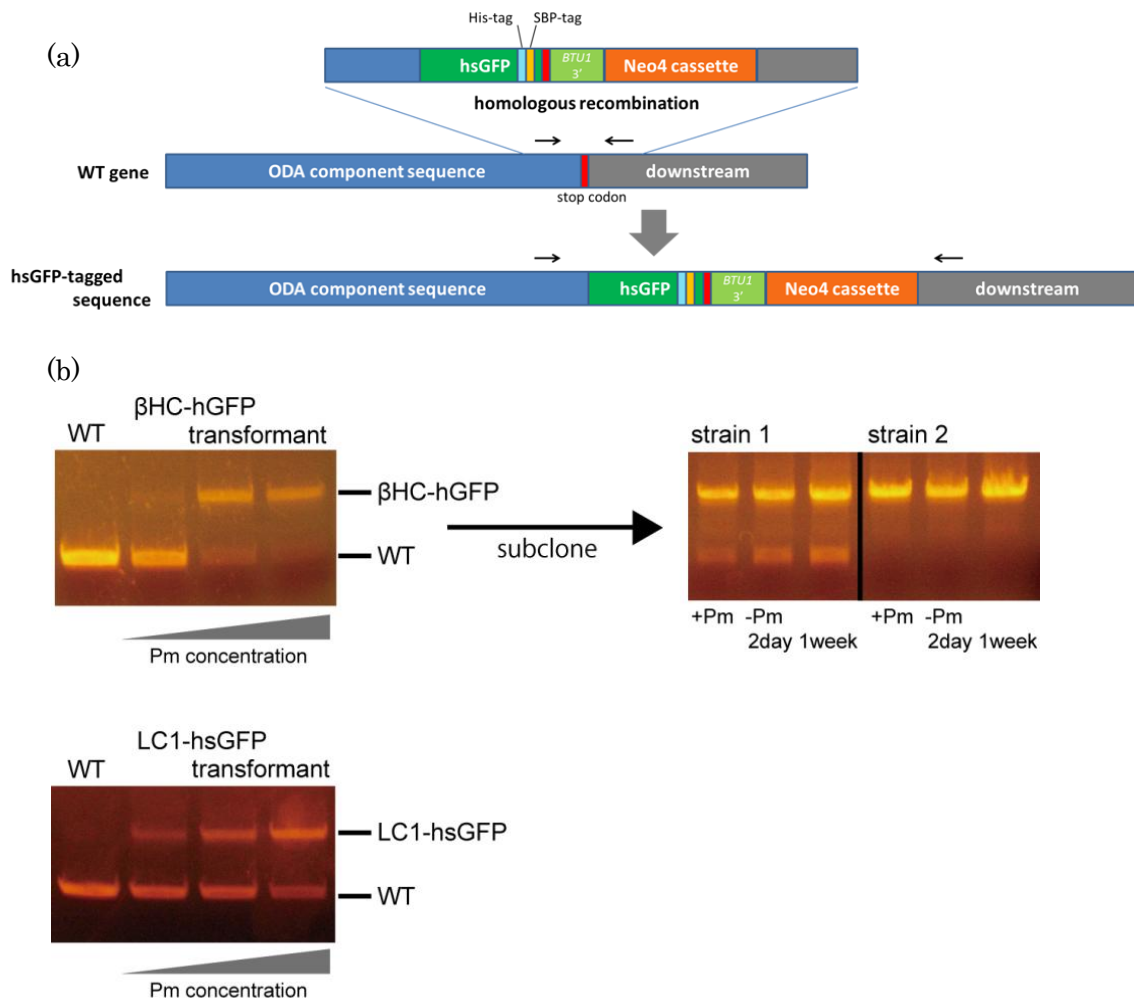


Fig.3 テトラヒメナにおける相同組換え

(a) 相同組換えの概要

hGFP または hsGFP と neo4 の相同組換え用カセットの両端に、PCR によってゲノム DNA と相同な配列を付加した。この断片を用いて相同組換えを行うことで、 β HC あるいは LC1 の C 末に hGFP または hsGFP と薬剤耐性の配列を挿入した。黒の矢印の位置に hGFP または hsGFP と薬剤耐性配列を挟むようにプライマーを設計し、PCR することによって野生型遺伝子と組換え体遺伝子を見分けられるようにした。

(b) 組換え体遺伝子の割合の変化

(a)の黒矢印の位置の位置にプライマーを設計し、PCR を行い、PCR 産物のサイズで野生型と組換え体型を見分けた。選抜薬剤のパロモマイシン(Pm)濃度を上げていくに従い、組換え体型遺伝子の割合が増加した。 β HC-hGFP 株について一細胞を単離し、株を得た。strain1 では Pm 無しの培地で培養したところ、野生型遺伝子の割合が増加したが、strain2 では Pm 無しの培地で培養しても野生型遺伝子のバンドは検出されず、大核内の遺伝子が全て変異体型に置き換わったと考えられる。

1.2.1.7 テトラヒメナの観察

組換え体テトラヒメナの GFP の蛍光観察を行うには、CSU10 共焦点ユニット (Yokogawa)を取り付けた IX70 (Olympus)を用い、iXonEM DV860 CCD カメラ (Andor) で撮影した。テトラヒメナを Biotin-(AC₅)₂-sulfo-OSu でビオチン化し、非特異的にアビジンを吸着させたガラス面に結合させた上で観察を行った。テトラヒメナのビオチン化については、豊島研究室の小林琢也博士に協力頂いた。

1.2.1.8 組換え体テトラヒメナからの繊毛精製

テトラヒメナ培養液 400 µl を SPP 培地 40 ml に植継ぎ、30°Cで一晩振とう培養し、1×10⁶ cells/ml 程度まで増やした。細胞培養液を遠心(1700 g, 5min, 室温)し、PYD 培地(1% Proteose Peptone No.3, 0.87% Glucose, 0.5% Yeast Extract) 40 ml で懸濁して、25°C できらに一晩振とう培養し、3×10⁶ cells/ml まで増やした。以下の作業は全て 4°C環境で行った。培養したテトラヒメナ溶液を氷水中で 15-20 min 冷やし、終濃度 0.1mM PMSF を加えた。培養液を遠心(Hitachi himac CR20E, R20A2 rotor, 2500 rpm, 3min, 2°C)し、細胞を回収した。細胞ペレットを cOmplete mini EDTA-free (Roche)を含む NK 溶液 (34 mM NaCl, 1 mM KCl) 10 ml で懸濁し、フラスコへ移した。ここに終濃度 2 mM PMSF, 2 µg/ml アプロチニン, 2 µg/ml ロイペプチンを加えた。ここに A 溶液(10 mM EDTA, 50 mM sodium acetate, pH 5.0 by 酢酸)を 5 ml 加えてフラスコを回転させ 1 分間かき混ぜた。さらに、冷やした milliQ 水を 5 ml 加えて 1 分間かき混ぜた。終濃度 2 mM CaCl₂ を加えて泡が出る程度の強さで 5 分間 1 分ごとに 20 回ずつ混ぜた。その後、20 mM EGTA を含む milliQ 水 20 ml を加えて薄めて脱繊毛を止め、終濃度 2 mM になるように PMSF を加えた。細胞体を遠心(Hitachi himac CR20E, R20A2 rotor, 2500 rpm, 3 min, 2°C)で落とし、繊毛のある上清画分を得た。さらに、遠心(Hitachi himac CR20E, R20A2 rotor, 12,000 rpm, 20 min, 2°C)し、繊毛のペレットを得た。繊毛ペレットを 500 µl の 0.5 mM PMSF を含む prep buffer

(10 mM HEPES-NaOH pH 7.4, 4 mM MgSO₄, 5 mM EGTA, 100mM NaCl)で懸濁した。

1.2.1.9 組換え体テトラヒメナ繊毛からのダイニン精製

繊毛溶液に終濃度 0.1%の NP-40 と 1 mM PMSF を加え、よく混ぜて氷上で 30 min インキュベートし、脱膜した。遠心(Optima TLX ultracentrifuge, Beckman, 100.2 rotor, 40,000 rpm, 5 min, 4°C)で脱膜した繊毛を回収した。繊毛ペレットを prep buffer 150 µl で懸濁し、終濃度 0.1 mM PMSF を加えた。ここに、終濃度 0.5 M の NaCl を加え、on ice 30min インキュベートし、外腕ダイニンを溶出した。遠心(Optima TLX ultracentrifuge, Beckman, 40,000 rpm, 5 min, 4°C, 100.2 rotor)により、軸糸構造を落とし、溶出されたダイニンを含む上清画分を得た。この上清画分から、His-tag または SBP-tag によって組換え体外腕ダイニン複合体の精製を行った。β HC-hGFP については、あらかじめ平衡化しておいた Profinity IMAC Ni-Charged Resin (BIO-RAD)に結合させた後、His-tag ウォッシュバッファー(50 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM NaCl, 20 mM imidazole)で 3 回ウォッシュし、His-tag 溶出バッファー(50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 300 mM imidazole)で溶出した。得られた画分をさらに、NAP5 columns (GE Healthcare, 17-0853-01)によって脱塩し、Imidazoleを除いた。LC1-hsGFPについては、あらかじめ平衡化しておいた Strep-tactin resin (IBA)に結合させ、buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM MgSO₄, 10% sucrose, 0.1 mM ATP, 1 mM DTT)で 5 回ウォッシュした後、2.5 mM desthiobiotin を含む buffer A で溶出した。

1.2.2 電子顕微鏡観察

1.2.2.1 精製タンパク質の電子顕微鏡観察

銅グリッド(Cu Hexagonal, H-400, VECO 社)に、真空蒸着で作製したカーボン膜をはり、使用直前にプラズマクリーナー(PDC-32G, Harrick Plasma)を用いて親水化した。200 mM

KCl を含んだ MME バッファー(30mM MOPS, 5mM MgCl₂, 1mM EGTA, pH 7.4)で~30 µg/ml に希釈した精製タンパク質 8-10 µl を親水化したカーボングリッド上に載せ、~50 µl の MME バッファーでリンスした後、1.5% (w/v) 酢酸ウラン~25 µl でネガティブ染色した。試料は透過型電子顕微鏡 (H-7500, Hitachi)を用いて 80 kV、40,000 倍で観察し、1,024×1,024 pixel の CCD カメラ(FastScan-F114)またはフィルム(富士電子顕微鏡用 FG フィルム 8.2×11.8 cm, 富士フィルム社)を用いて撮影した。電頭の倍率については、微小管中の tubulin の周期 41 Å (Baker and Amos, 1978)を元にキャリブレーションを行った。その結果、CCD で 40,000 倍で撮影した場合のスケールは 2.6 Å/pixel であった。フィルムで 40,000 倍で撮影し、スキャナー(Nikon SUPER COOLSCAN 9000 ED)を用いて取り込んだ場合のスケールは、1.6 Å/pixel であった。

1.2.2.2 Ni-NTA ナノ金粒子によるラベリングと解析

His-tag を標識するための直径 4.3 nm の Ni-NTA ナノ金粒子は Kitai *et al.*, 2011 に従って作製した。直径 2.6 nm の Ni-NTA ナノ金粒子は秦智紀修士論文 2011 年にしたがって作製した。His-tag が導入された組換え体外腕ダイニン(15-30 µg/ml) ~20 µl に対し、1-2 µl の Ni-NTA ナノ金粒子とを混合し、氷上で 30 min インキュベートした後、項目 1.2.2.1 の方法でネガティブ染色し、電子顕微鏡観察した。金粒子の結合位置の解析では、CCD カメラで撮影し、ダイニン頭部リングの中心からストーク上構造に結合した金粒子中心までの距離を ImageJ (NIH)を用いて計測した。

1.2.2.3 単粒子解析

単粒子解析を行う際は、電頭像はフィルムで撮影し、スキャナーで取り込んだものを使用した。キモトリプシン処理したテトラヒメナ DYH3 頭部は、矢島研究室の山口真氏から提供して頂いた。ストーク上構造についての単粒子解析は以下の手順で行った。DYH3 頭

部のうち、ストック上構造が確認できた分子について、1,486 分子を X3d (Conway *et al.*, 1999)で切り出した。切り出した画像を SPIDER プログラム(Frank *et al.*, 1996)で処理した。まず、一つのリファレンス画像(Fig. 4a)に従って全ての画像をアラインメントし、K 平均法によって 60 個のクラスに分類し、それぞれのクラスの平均像を得た(Fig. 4b)。この中で画像数が多く、ストック上構造が確認できた 7 種類の平均像をリファレンスとし、1486 分子をアラインメントして平均像を得た(Fig. 4c)。さらにこのうちの 6 種類の平均像をリファレンス画像とし再度アラインメントを行った(Fig. 4d)。得られた平均像のうち最も画像数の多かった group 1 は、先行研究の細胞質ダイニン頭部の平均像(Roberts *et al.*, 2009)と類似した形態を示した。そこでこの group 1 について K 平均法によって 5 つのサブグループに分類した(Fig. 4e)。さらに、頭部ドメインの大部分をマスクし、ストック領域についてのみで画像をアラインメントした(Fig. 4f)。ストック領域アラインメントした平均像に頭部ドメインを統合し、最終的な DYH3 頭部平均像を得た(Fig. 4g)。

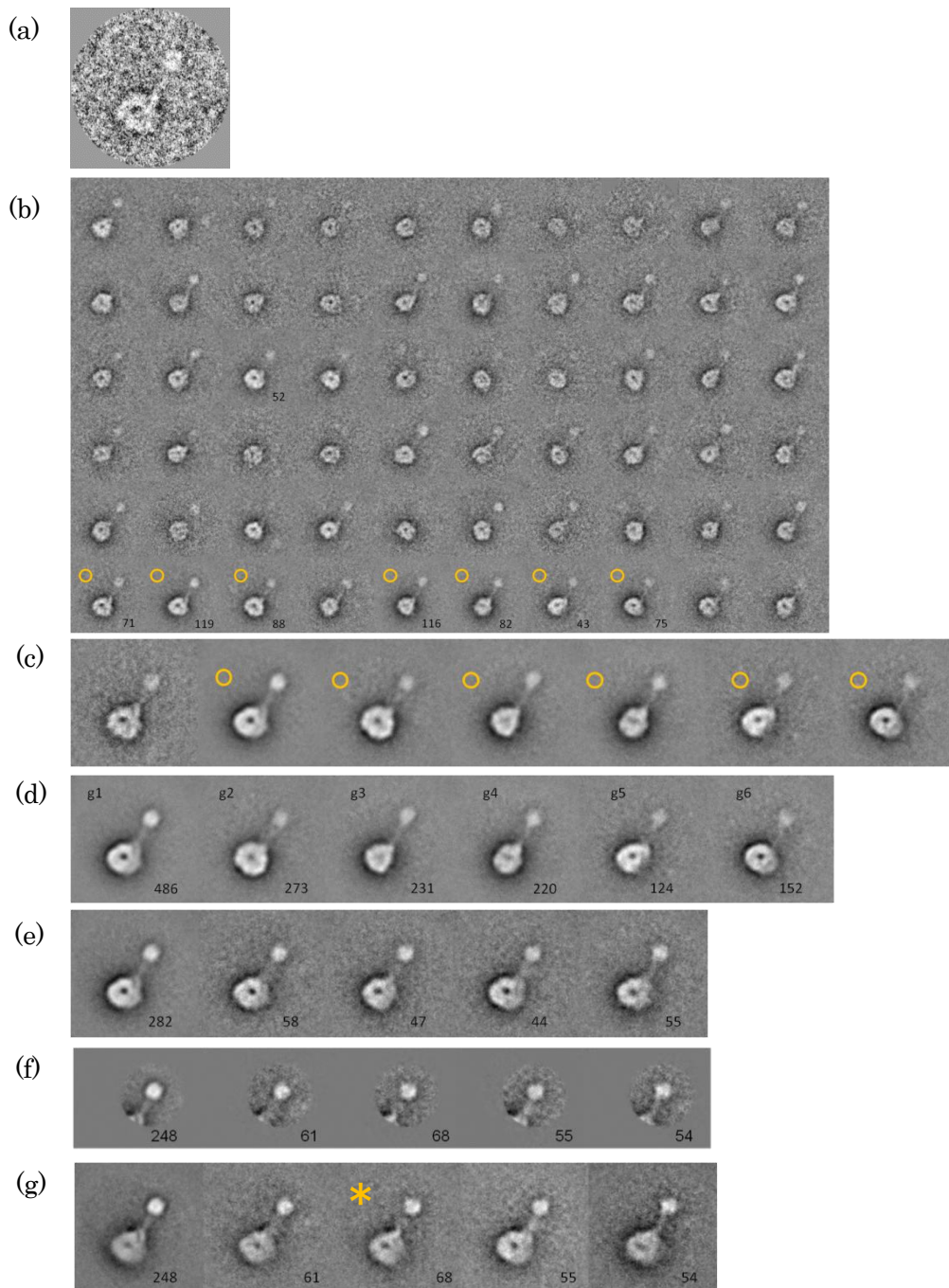


Fig.4 DYH3 頭部の単粒子解析

(a) リファレンスに用いた単一の電顕像. (b) 一つの画像にしたがってアラインメントし、60個のクラスに分けたときの平均像. 下段の数字は画像数を示す. (c) 複数の画像にしたがってアラインメントし、7個のクラスに分けたときの平均像. (b)のオレンジの丸で示す平均像をリファレンスとした. (d) 複数の画像にしたがってアラインメントし、6個のクラスに分けたときの平均像. (c)のオレンジの丸で示す平均像をリファレンスとした. g1-6は、group1-6を表す. (e) group 1を5つのサブグループに分けたときの平均像. (f) 頭部ドメインをマスクし、ストーク領域でアラインメントを行ったときの平均像. (g) 頭部領域の画像を統合した最終的な平均像. オレンジのアスタリスクは、Fig. 10cに使用した平均像を示す。

1.2.3 生化学実験用コンストラクト構築

1.2.3.1 ストークコンストラクト・LC1 全長コンストラクト

クラミドモナス α 重鎖, β 重鎖, γ 重鎖のストーク~MTBD 領域(Fig. 5a)のコンストラクト(α ストーク, β ストーク, γ ストークと呼称する)・LC1 全長コンストラクト・SRS- γ ストーク(85:82)コンストラクトについては、県立広島大学の八木俊樹教授に作製して頂いた。ストークコンストラクトは、coiled coil の CC1 が 85 残基・CC2 が 82 残基となるように、クラミドモナス α 重鎖の 2,965~3,259 aa 領域・ β 重鎖の 3,126~3,419 aa 領域・ γ 重鎖の 3,049~3,350 aa 領域をコードする領域が pColdI ベクターにクローニングされている(pColdI- α stalk, pColdI- β stalk, pColdI- γ stalk) (Fig. 5b)。LC1 コンストラクトについては、LC1 全長(198 aa)をコードする領域が pGEX-6P-2 ベクターにクローニングされている。精製用の GST-tag 配列と LC1 の間には PreScission サイトがあり、GST-tag を切断可能である(Fig. 5b)。SRS- γ ストーク(85:82)は、 γ 重鎖の 3,049~3,350 aa 領域をコードする領域が pET24aSRS ベクターにクローニングされている。

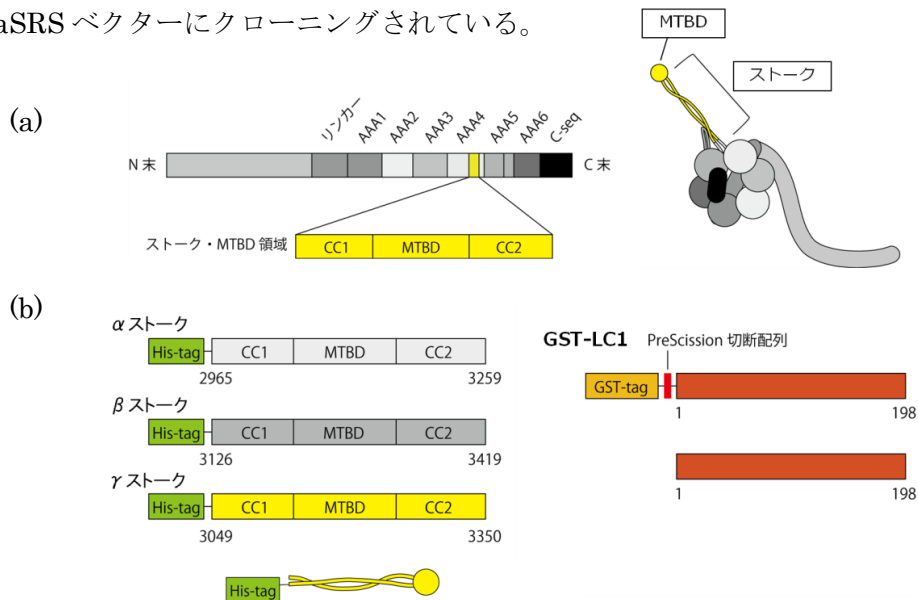


Fig.5 ストークコンストラクト・LC1 全長コンストラクトの概要

(a) ストーク~MTBD 領域の模式図

ストークは、CC1 と CC2 からなる coiled coil 構造であり、先端に MTBD が位置している。

(b) ストークコンストラクト・LC1 全長コンストラクトの模式図

ストークコンストラクトは全て N 末に精製用 His-tag が付加されている。

LC1 全長コンストラクトは GST-LC1 または GST を切断した LC1 全長として精製した。

1.2.3.2 キメラストークコンストラクトの構築

LC1 結合領域のマッピングを行うために、 β ストークと γ ストークのキメラコンストラクトシリーズを構築した(Fig. 6)。CC1, CC2 中の入れ替える領域については、先行研究の細胞質ダイニンストークコンストラクト(Carter *et al.*, 2008)を参考とし、キメラストークコンストラクトの名称は、CC1・CC2 に含まれるアミノ酸残基の数から名付けた。基部側が β ストーク・先端側が γ ストークのコンストラクトについては、 γ ストークの先端領域または MTBD 領域を pColdI- γ stalk ベクターから PCR で増幅し、インバース PCR で開環した pColdI- β stalk ベクターに平滑末端でライゲーションすることで構築した。また、基部側が γ ストーク・先端側が β ストークのコンストラクトについては、 β ストークの先端領域または MTBD 領域を pColdI- β stalk ベクターから PCR で増幅し、インバース PCR で開環した pColdI- γ stalk ベクターに平滑末端でライゲーションすることで構築した。H2H3 間のループ部分を入れ替えたコンストラクトでは、インバース PCR で対応する配列を挿入した。

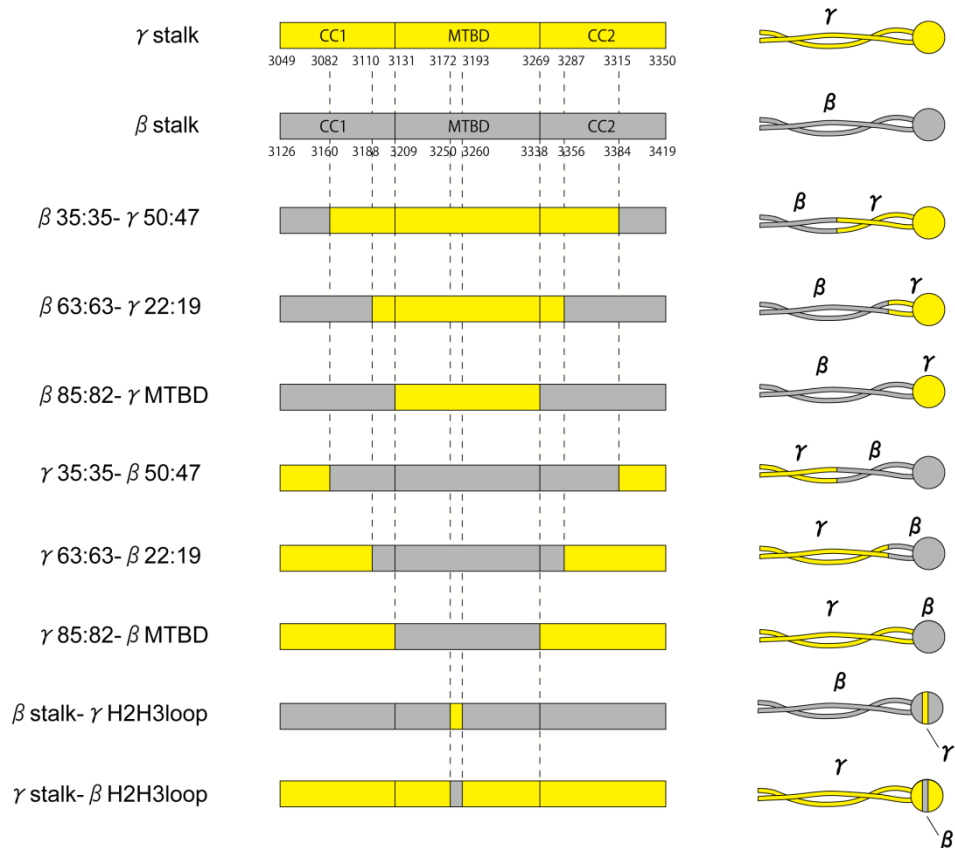


Fig.6 キメラストークコンストラクトの概要

黄色は γ 重鎖の領域・灰色は β 重鎖の配列を表す。コンストラクト名の数字は、CC1・CC2に含まれるアミノ酸残基の数を表す。例えば、 β 35:35- γ 50:47であれば、CC1の基部側35残基、CC2の基部側35残基が β 重鎖であり、CC1の先端側50残基、MTBD領域、CC2の先端側47残基が γ 重鎖の配列となっている。配列の下の数字は、重鎖全体におけるアミノ酸の残基番号を表している。全てN末に導入したHis-tagで精製を行った。コンストラクトの模式図ではHis-tagは省略してある。

1.2.4 生化学実験用タンパク質の精製

1.2.4.1 大腸菌からのタンパク質精製

タンパク質発現用ベクターはBL21-CodonPlus (DE3) RIL (Stratagene)株に形質転換した。pColdIベクター・pGEX-6P-2ベクターにクローニングしたコンストラクトについては、50 $\mu\text{g/ml}$ のアンピシリンを含むLB培地で、pET24aベクターにクローニングしたコンストラクトについては、30 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシンを含むLB培地でそれぞれ培養した。上記コ

ンストラクトを形質転換した大腸菌を LB 培地 25 ml に植継いで 37°C で一晩前培養し、LB 培地 500 ml に植継ぎ、37°C で 1~2 hr、OD₆₀₀=0.4~0.5 になるまで振盪培養した。pColdI ベクターのコンストラクトについては、大腸菌培養液を氷上で冷やし、終濃度 0.1 mM の IPTG を加えて 15°C で 24 hr 振盪培養した。pGEX-6P-2 ベクター、pET24a ベクターのものについては、大腸菌培養液を氷上で冷やし、終濃度 0.4 mM の IPTG を加え、20°C で 3 hr 振盪培養した。大腸菌を遠心で回収し、液体窒素で急速凍結した。回収した大腸菌はタンパク質精製まで -80°C で保存した。

ストークコンストラクト・キメラストークコンストラクト・SRS- γ ストーク(85:82)は、His-tag による精製を行った。大腸菌ペレットを His-tag lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 20 mM imidazole) で再懸濁し、プロテアーゼインヒビターを加えて超音波破碎し、超遠心(Beckman 100.4, 85 krpm, 15 min, 4°C)した上清を精製に用いた。Profinity IMAC Ni-Charged Resin (156-0133, BIO-RAD) とともに 30 min, 4°C で回転攪拌して結合させ、His-tag wash buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 20 mM Imidazole) で 3 回洗い、His-tag elution buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 300 mM Imidazole) で溶出した。

LC1 全長コンストラクトは GST-tag によって精製を行った。GST-LC1 を精製する場合は、大腸菌ペレットを 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 5 mM ATP を含む PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.3) で再懸濁した。ここで、MgSO₄, ATP は DnaK の混入を防ぐために加えた。上記同様に超音波破碎・超遠心した上清を、GST・Bind Resin (70541, Novagen) とともに 4°C で 60 min 回転攪拌して結合させ、1 mM DTT を含む PBS で 3 回ウォッシュし、GST elution buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM 還元型 Glutathione) で溶出した。また、GST を切断し、LC1 全長として精製する場合は、PBS の代わりに PreScission base buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) を用い、タンパク質を GST・Bind Resin に結合させた状態で、1 mM DTT

と PreScission protease 160 units を含む PreScission base buffer を加えて 4°C で一晩回転攪拌することで GST-tag を切断した。

タンデムアフィニティーを精製する場合は、His- γ stalk と GST-LC1 を発現させた大腸菌破碎溶液を混合し、4°C で 1hr 回転攪拌することで両者を結合させ、ストークに導入した His-tag と GST-LC1 の GST-tag で二段階で精製を行った。

得られたタンパク質溶液は、全て NAP5 columns (GE Healthcare, 17-0853-01) を用いて、NAP5-buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl) に溶液を交換した。

1.2.4.2 ブタ脳チューブリンの精製

チューブリンは、Vallee らの方法 (Vallee *et al.*, 1986) に従って、ブタ脳から重合・脱重合のステップを 2 回繰り返した後、phosphocellulose (P11, Whatman) カラムを用いて精製した。精製したチューブリン (2-4 mg/ml) は 100 μ l ずつに分注し、液体窒素で急速凍結し、液体窒素中で保存した。

1.2.5 SDS-PAGE, 抗体作製, ウェスタンブロット

精製したタンパク質は、10%あるいは 12.5%のポリアクリルアミドゲルでの SDS-PAGE (Laemmli, 1970) を用いて確認した。

テトラヒメナの LC1 に対する抗血清については、テトラヒメナ LC1 (GenBank accession number XP_001017497) の 131-144 aa の領域に対応するのペプチド (NWEELDKLKDLPEL) の合成とウサギ抗血清の作製をオペロン社に委託した。

ウェスタンブロットについては、SDS-PAGE で分離したタンパク質を PVDF 膜に転写し、適切な一次抗体と二次抗体の組み合わせで検出した。発色については BCIP/NBT system (KPL) を用いた。使用した抗体及び希釈条件は以下の通りである； GFP 抗体 (012-22541, Wako, 1:1,000), β HC 抗体 (Toyoshima, 1987b, 1:100), テトラヒメナ LC1 抗血清 (1:100),

ラビット二次抗体(AP-1000, VEC, 1:1,000), マウス二次抗体(4751-1806, KPL, 1:1,000)。

1.2.6 生化学的手法による結合実験

1.2.6.1 His-tag によるプルダウンアッセイ

ストックコンストラクト、キメラストックコンストラクトに導入した His-tag で LC1 とのプルダウンアッセイを行う際は、Dynabeads His-Tag Isolation and Pulldown (Life Technologies, Novex)を用いた。結合条件は、基本的には結合バッファー(50 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl, 0.01% Tween20) 中に行い、高塩濃度条件での結合を調べる場合のみ NaCl 濃度を 200 mM, 400 mM, 600 mM とした。ストックコンストラクトまたはキメラストックコンストラクト・LC1 を濃度がそれぞれ 2.1 μ M, 4.3 μ M、全体量が 50 μ l となるように混合し、10 min 25°Cでインキュベートし、Dynabead を加えさらに 10 min 25°Cでインキュベートした。磁気分離によって Dynabeads を分離し、unbound 画分として回収した。Dynabeads を一度、wash buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 90 mM NaCl, 20 mM imidazol, 0.01% Tween20) 800 μ l でウォッシュし、磁気分離した Dynabeads を 1×電気泳動用サンプルバッファーで煮て、bound 画分とした。

1.2.6.2 GST-tag によるプルダウンアッセイ

GST-LC1 の GST-tag を用いてストックコンストラクト、キメラストックコンストラクトとのプルダウンアッセイを行う際は、GST・Bind Resin (70541, Novagen)を用いた。結合条件は、結合条件は、1 mM DTT を含む PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.3) 中に行い、ストックコンストラクトまたはキメラストックコンストラクト・GST-LC1 を濃度がそれぞれ 229 nM, 316 nM、全体量が 450 μ l となるように混合し、30 min 25°Cでインキュベートした。GST・Bind Resin を加えて 30 min 4°C で回転攪拌した。遠心(15,000 rpm, 4°C, 2min)して unbound 450 μ l を回収し、GST・Bind

Resin を一度、1 mM DTT を含む PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.3) 450 μ l でウォッシュし、再度遠心し、GST・Bind Resin を回収した。さらに、GST elution buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl, 10 mM 還元型 Glutathione) 30 μ l 加え、5 min 25°Cで静置し、遠心によって GST・Bind Resin を除くことで bound 画分を得て、4×電気泳動用サンプルバッファーを 10 μ l 加えることで泳動サンプルとした。unbound 画分 450 μ l については、TCA 沈殿を行い、1×電気泳動用サンプルバッファー40 μ l で溶かして泳動用サンプルとした。

1.2.6.3 定量 GST プルダウンアッセイ

定量 GST プルダウンアッセイは、GST-LC1 が 158 nM で行ったことと、 γ ストック濃度を 52.6-631 nM の範囲で振ったこと以外は、基本的には 1.2.6.2 と同様の手順で行った。濃度既知の γ ストックを泳動してバンドの輝度と濃度の検量線を引き、バンドの輝度から unbound 画分にきた free の γ ストック濃度を算出した。bound 画分での γ ストックと GST-LC1 のモル比は、両者のバンドの輝度の比から算出した。

1.2.6.4 微小管共沈実験

項目 2.2.4 で精製したチューブリン 100 μ l に対して 1 mM GTP, 5 mM MgSO₄ を加え、37°C で 30 min インキュベートすることで重合させ、微小管とした。重合後は 40 μ M paclitaxel を加えて安定化した。精製した γ ストック、または、LC1 と共精製した γ ストックを 5 μ M の微小管と 15 μ M paclitaxel を含む NAP5-buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl) 45 μ l 中で混合し、30 min 25°Cでインキュベートした。超遠心(Optima TLX ultracentrifuge, Beckman, 120.2 rotor, 75 krpm, 10 min, 27°C)によって上清画分と沈殿画分に分離し、上清画分 45 μ l には、4×電気泳動用サンプルバッファーを 15 μ l 加え、沈殿画分は 1×電気泳動用サンプルバッファーを 60 μ l で懸濁することで泳動用サンプルを調整

した。電気泳動したゲルのバンドを定量し、上清画分と沈殿画分のバンドの比と、input の濃度から各画分の濃度を算出した。

1.2.6.5 バンド定量・グラフの作成・統計処理

バンド定量には ImageJ (NIH) または Quantity One (BioRad) を用いた。結果については Excel, Sigmaplot, GraphPad Prism 6 で解析し、グラフを作成した。統計は GraphPad Prism6 を用いて Student's t-test, Dunnett's test を行った。

1.2.7 アミノ酸配列解析・構造予測

アミノ酸配列のアラインメントは Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) を用いて行った。コイルドコイルの heptad repeat の予測には、Paircoil2 (McDonnell *et al.*, 2006) を用いた。 γ MTBD の構造予測には、Swiss Model Server (Arnold *et al.*, 2006) を用いた。

1.3 結果

1.3.1 電子顕微鏡観察による LC1 の位置同定

1.3.1.1 金粒子標識による LC1 の位置同定

外腕ダイニン複合体中の LC1 の位置を特定するために、LC1 に His-tag を導入し、Ni-NTA ナノ金粒子による標識(Kitai *et al.*, 2011)を用いた電子顕微鏡観察を行うこととした。このために、まず、His-tag が付加された外腕ダイニンを発現することのできる系の構築を目指した。外腕ダイニン複合体は合計で 16 種類ものタンパク質からなる~2 MDa と巨大なタンパク質複合体であるため、*in vitro* で人為的に再構成することは困難であった。そこで、His-tag を含む組換え体 LC1 を繊毛虫テトラヒメナ内で発現し、組換え体 LC1 が組み込まれた外腕ダイニン複合体を精製するというアプローチをとった。

テトラヒメナでは相同組換えによるタグ付加が可能である(Kataoka *et al.*, 2010)ため、実験手法項目 1.2.1 に従って、LC1 の C 末に hsGFP を付加した組換え体テトラヒメナ(LC1-hsGFP 株)、及びコントロール実験用に β HC の C 末に hGFP を付加した組換え体テトラヒメナ(β HC-hGFP 株)を得た。得られた形質転換体を蛍光観察したところ、 β HC-hGFP 株、LC1-hsGFP 株ともに GFP の蛍光が繊毛に確認でき、 β HC-hGFP または LC1-hsGFP が繊毛内に組み込まれていることが分かった(Fig. 7a)。組換え体テトラヒメナから繊毛を単離しウェスタンブロットをした結果でも組換え体外腕ダイニンサブユニットが繊毛に組み込まれていることが確認できた(Fig. 7b)。

まず、テトラヒメナ外腕ダイニン複合体中において GFP のループ部分に挿入した His-tag が機能しているかについての検証を行った。 β HC-hGFP 株の繊毛から粗精製したダイニン画分を Ni-NTA カラムで精製したところ、 β HC-hGFP を含む組換え体外腕ダイニン(β HC-hGFP-ODA)が精製された(Fig. 7b)。野生株の繊毛から粗精製した外腕ダイニン画分を用いた場合は、Ni-NTA カラムに結合しなかった(Fig. 7b)。この結果から、外腕ダイニン中の GFP ループ部分の His-tag が Ni-NTA に結合可能であることが分かった。

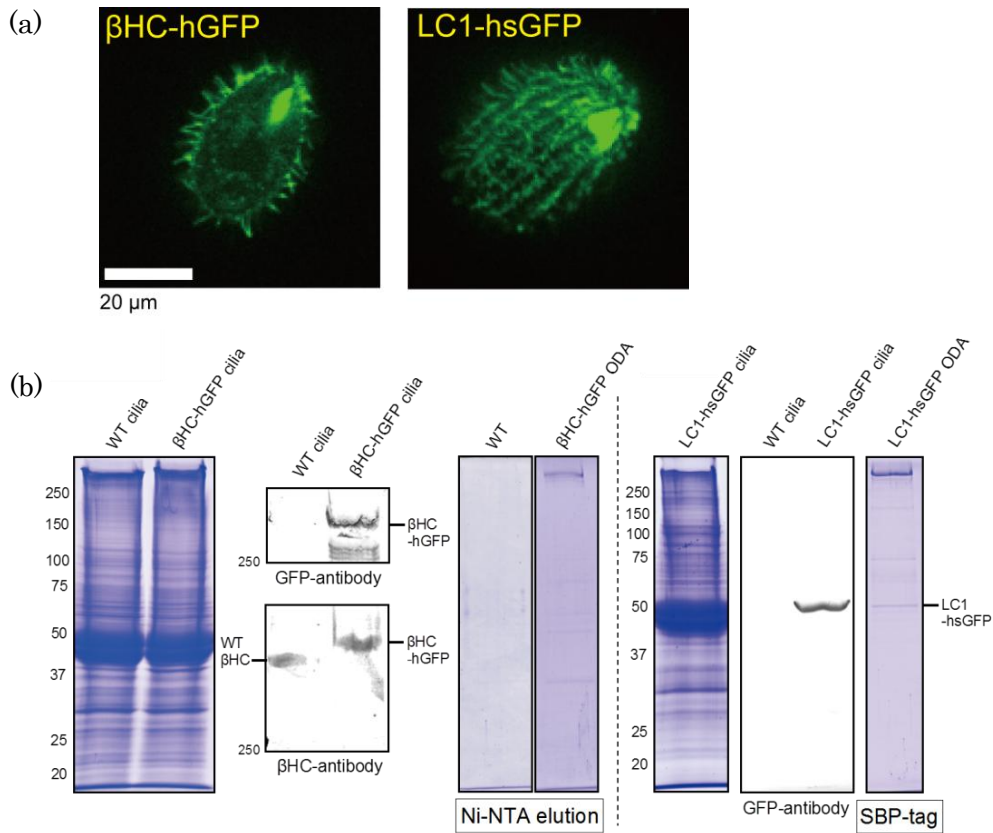


Fig.7 組換え体テトラヒメナからの組換え体ダイニン複合体の精製

(a) 組換え体テトラヒメナの蛍光観察. β HC-hGFP 株・LC1-hsGFP 株ともに繊毛に蛍光が観察され、組換え体外腕ダイニンコンポーネントが繊毛内に組み込まれていることが分かった。**(b) SDS-PAGE, ウェスタンブロット.** 野生型あるいは β HC-hGFP 株から精製した繊毛タンパク質の SDS-PAGE・ウェスタンブロットの結果。野生株あるいは β HC-hGFP 株のダイニン画分の Ni-NTA カラムでの精製結果。LC1-hsGFP 株から精製した繊毛タンパク質の SDS-PAGE・ウェスタンブロットの結果。LC1-hsGFP 株のダイニン画分の SBP-tag による精製結果。

精製した β HC-hGFP を Ni-NTA でコートしたナノ金粒子(Ni-NTA ナノ金粒子)で標識を行い、電子顕微鏡観察を行ったところ、頭部リングの端が金粒子標識された外腕ダイニン複合体が観察された(Fig. 8a)。 β HC の C 末は AAA+リング内にあるため、これは妥当な結果であると考えられる。次に、LC1-hsGFP 株の繊毛から精製した組換え体外腕ダイニン複

合体(LC1-hsGFP-ODA)の Ni-NTA ナノ金粒子標識を行い、電子顕微鏡観察を行った。LC1 が AAA+リングに結合している場合、 β HC-hGFP の結果と同様にリングが金粒子標識されることが予想されるが、実際には、LC1-hsGFP では、頭部リングではなく、ストークが金粒子標識された(Fig. 8b)。また、金粒子標識されていない外腕ダイニン分子についても、三頭のうち一頭のみにもストーク上に何らかの構造体が確認できた(Fig. 8b 赤矢じり)。以降、この構造体をストーク上構造と呼称する。

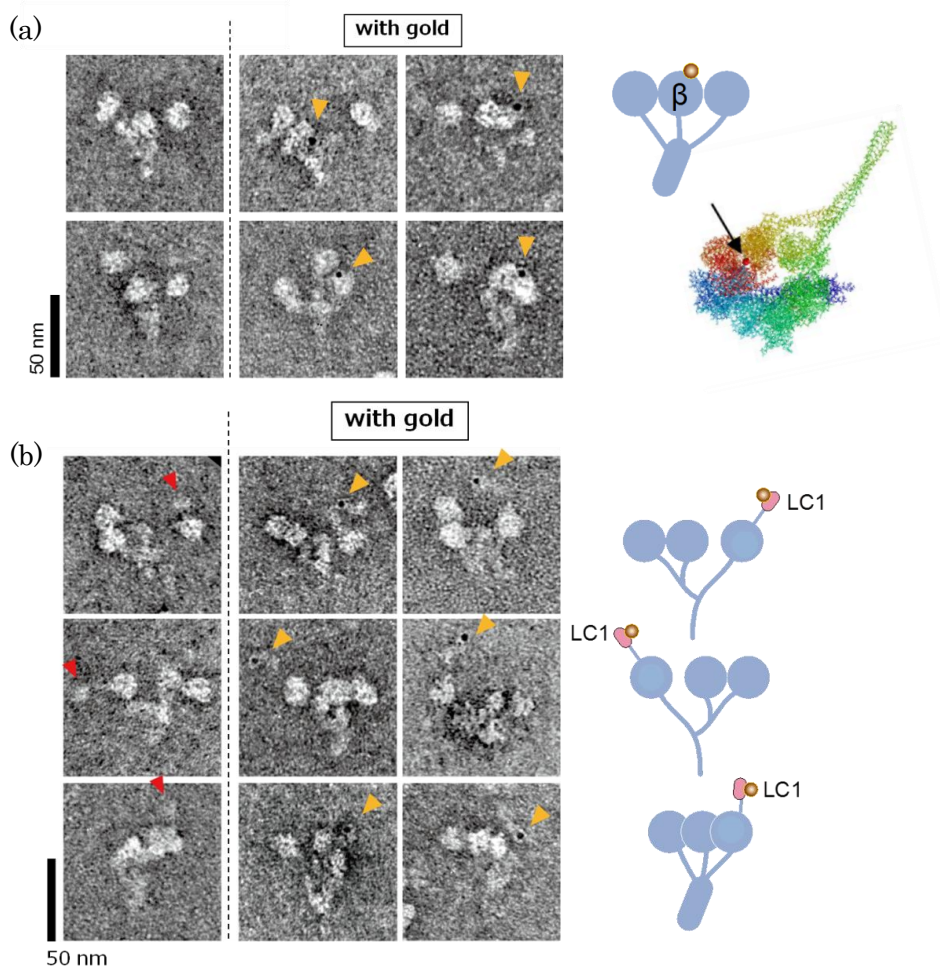


Fig.8 組換え体テトラヒメナの Ni-NTA-ナノ金粒子ラベル

(a) β HC-hGFP 外腕ダイニン複合体. 頭部リングの端が金粒子標識された。金粒子を黄色の矢じりで示す。参考に細胞質ダイニン頭部ドメインの C 末の位置を黒矢印で示す(PDB:3VKG)。

(b) LC1-hsGFP 外腕ダイニン複合体. ストークが金粒子標識された。金粒子を黄色の矢じりで、ストーク上構造を赤の矢じりで示す。

1.3.1.2 ストーク上構造の解析

上述したストーク上構造は、クラミドモナス外腕ダイニン複合体でも見出された(Fig. 9a)。このストーク上構造が三頭のうちのどの重鎖に対応するのかを同定するために、クラミドモナス変異体から精製した外腕ダイニンを用いて電子顕微鏡観察を行った。その結果、oda11株外腕ダイニン(α 重鎖欠損, β γ 二頭構造) (Fig. 9b), oda4-s7株外腕ダイニン(β 重鎖頭部欠損, α γ 二頭構造) (Fig. 9c)の両方においてストーク上構造が観察された。この結果から、ストーク上構造は、 γ 重鎖のストーク上に存在していると特定できた。クラミドモナス変異体は、東京大学神谷研究室(当時)の神谷律教授・柳澤春明氏に提供して頂いた。また、クラミドモナスダイニン複合体の電子顕微鏡観察は、斉藤慧氏の協力を得た。

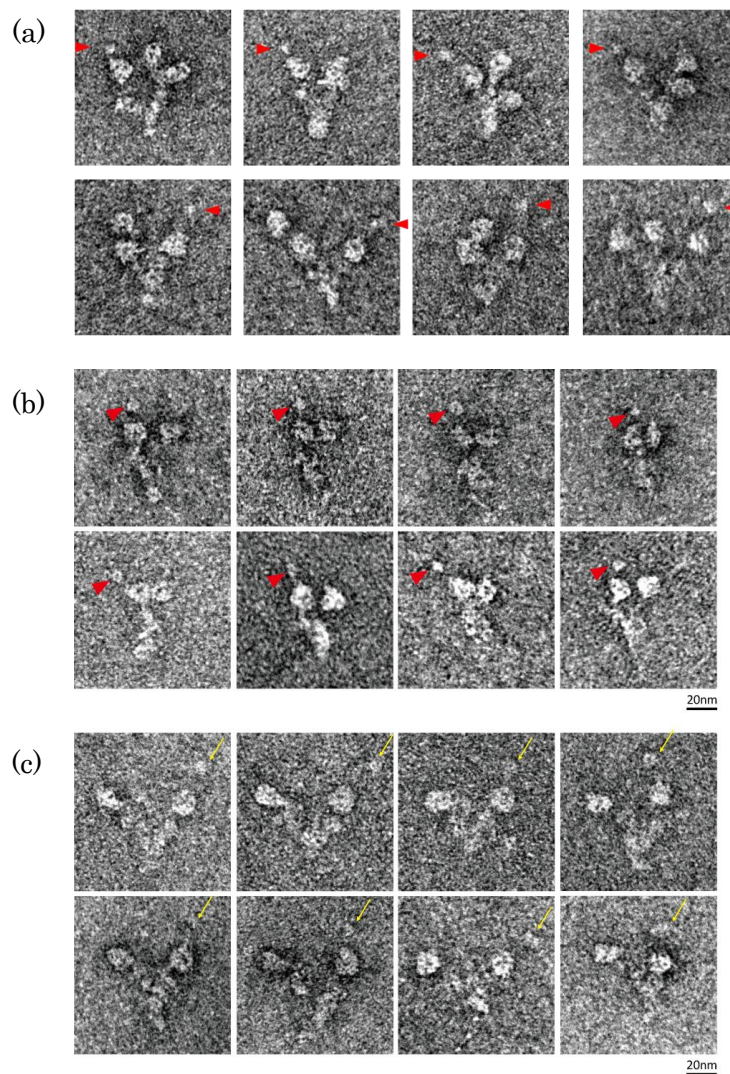


Fig.9 クラミドモナスにおけるストーク上構造

(a) クラミドモナス野生株外腕ダイニン複合体. 三頭のうち一頭のストーク上にもみ構造体が確認できる。ストーク上構造を赤の矢じりで示す。(b) クラミドモナス *oda11* 株外腕ダイニン複合体片方の頭部にストーク上構造(赤矢じり)が観察された。(c) クラミドモナス *oda4-s7* 株外腕ダイニン複合体. 片方の頭部にストーク上構造(黄矢印)が観察された。

さらに詳細にストーク上構造を調べるため、テトラヒメナ外腕ダイニン複合体からキモトリプシン処理で DYH3 頭部 (クラミドモナス γ 頭部に相当) 領域の断片を得て、単粒子解析を行うこととした(Fig. 10a)。単離した DYH3 頭部に LC1 が結合していることは、ウェスタンブロットによって確認した(Fig. 10b)。DYH3 頭部のみの電頭像から平均像を得て、さらにストーク領域に着目してアラインメントを行うことで、ストーク上構造が明瞭な平均像を得た(画像処理の手順については実験手法項目 1.2.5.3 を参照されたい)。単粒子解析によって得られた DYH3 頭部の平均像を、先行研究の細胞質ダイニン(LC1 無し)の平均像 (Robrets *et al.*, 2009)と比較したところ、ストーク先端の MTBD 領域付近に構造体が付随していることが分かった(Fig. 10c, 赤矢じり)。

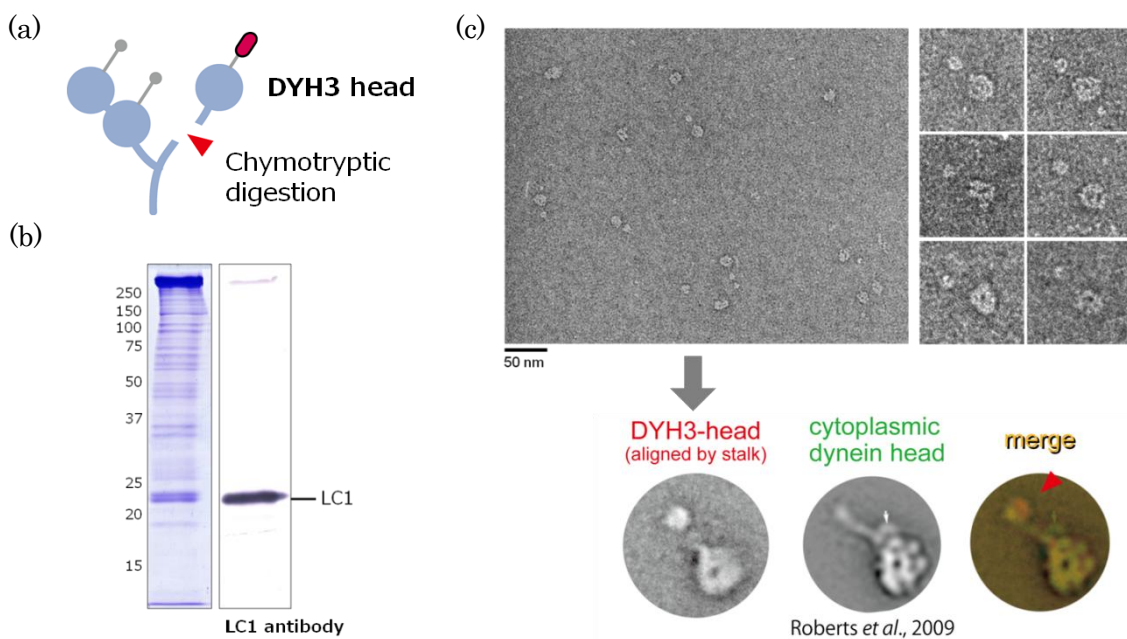


Fig.10 テトラヒメナ DYH3 頭部でのストーク上構造の解析

(a) テトラヒメナ DYH3 頭部の切断の概要. (b) テトラヒメナ DYH3 頭部断片の SDS-PAGE, ウェスタンブロット. テトラヒメナ DYH3 頭部断片には LC1 が結合していた. (c) テトラヒメナ DYH3 頭部の単粒子解析. 上段左: 全体像、上段右: 個々の電頭像, 下段左: DYH3 頭部平均像, 下段中央: 細胞質ダイニンの平均像 (Robrets *et al.*, 2009 より引用), 下段右: 重ね合わせた結果 (赤: DYH3 頭部・緑: 細胞質ダイニン頭部)。DYH3 頭部に特徴的な領域を赤矢じりで示す。

1.3.1.3 ストック上での LC1 の配向決定

次に、LC1 が MTBD 領域にどのような配向で結合しているかを調べた。LC1-hsGFP を用いた金粒子標識では、GFP のサイズ分 (~2×4 nm) の自由度があったため、より詳細に LC1 の配向を決定するために、クラミドモナスにおいて N 末に His-tag のみが直接付加された His-LC1, C 末に His-tag が直接付加された LC1-His を発現し、外腕ダイニンを精製した上で金粒子標識を行った。その結果、クラミドモナスでもテトラヒメナ同様にストック上構造が金粒子標識された。ここで、His-LC1 ではストック上構造の先端側が金粒子標識された(Fig. 11a)のに対し、LC1-His ではストック上構造の基部側が金粒子標識された(Fig. 11b)。これを定量的に示すために頭部の中心から金粒子の中心までの距離を測定した結果のグラフが Fig. 11c である。LC1 は長軸方向の両端に N 末と C 末が位置した構造をとっているため、N 末側を先端側・C 末側を基部側に向けて結合していると考えられる。

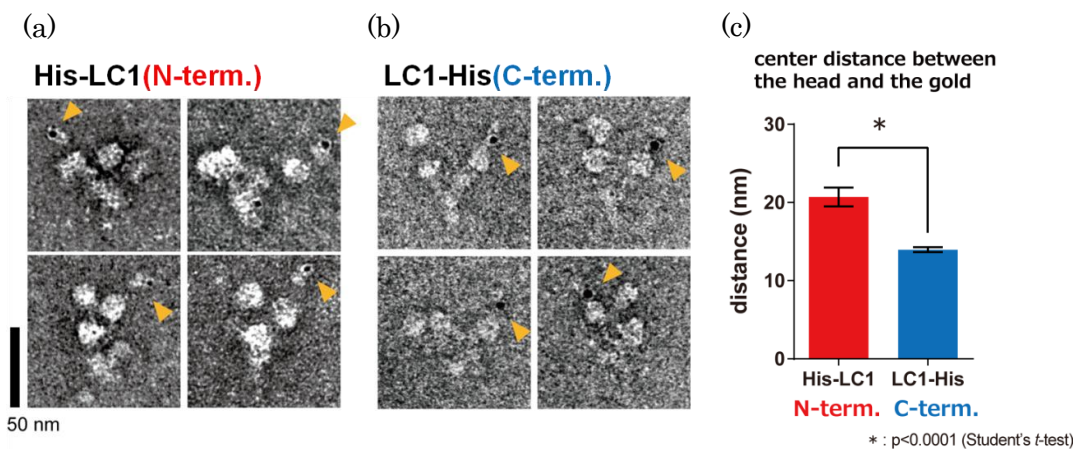


Fig.11 クラミドモナス LC1 の金粒子標識結果

(a) His-LC1 外腕ダイニン複合体の金粒子標識. ストック上構造の先端側が金粒子標識された。金粒子を黄色の矢じりで示す。**(b) LC1-His 外腕ダイニン複合体の金粒子標識.** ストック上構造の基部側が金粒子標識された。金粒子を黄色の矢じりで示す。**(c) リングの中心から金粒子中心までの距離測定結果.** 距離測定結果の平均値。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。アスタリスクは t 検定による p 値が 0.0001 より低いことを表す。

1.3.2 生化学実験による結合様式の検証

1.3.2.1 LC1 結合の特異性の検証

電子顕微鏡観察によって得た構造的知見を、生化学的アプローチによっても確かめることを目指した。まず、電子顕微鏡観察の結果、 γ 重鎖の MTBD のみに LC1 が結合していると考えられたので、結合の特異性を調べるために α 、 β 、 γ 重鎖のストーク~MTBD 領域のコンストラクト(α ストーク、 β ストーク、 γ ストークと呼称する)を構築し、大腸菌から精製した。大腸菌で発現・精製した LC1 と混合し、ストーク断片に付加した His-tag でプルダウンアッセイを行った。その結果、LC1 は γ ストークのみに結合した(Fig. 12)。また、結合条件の NaCl 濃度を 100 mM から 600 mM まで上げて結合をみたところ、弱いながらも 600 mM 塩濃度条件でも γ ストークと LC1 の結合がみられた(Fig. 13)。

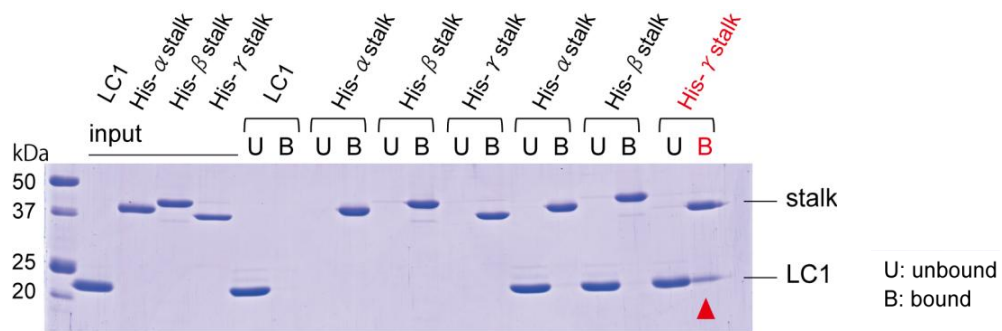


Fig.12 His-tag によるプルダウンアッセイによる、結合の特異性の検証

γ ストークのみに LC1 が結合した。bound 画分の LC1 のバンドを赤矢じりで示す。

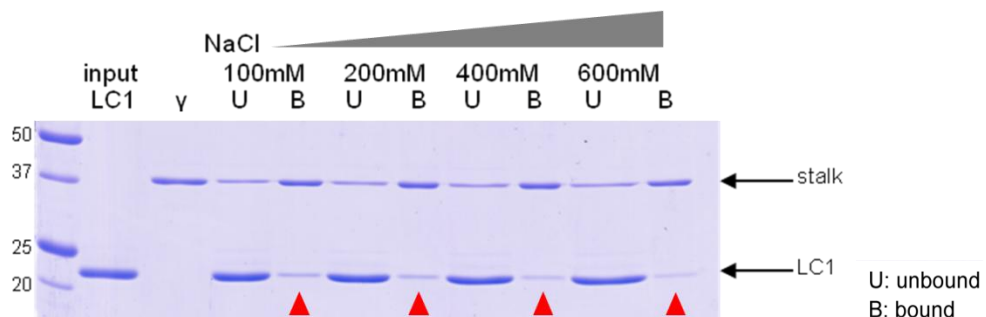


Fig.13 結合の塩濃度依存性

NaCl 濃度を 100 mM から 600 mM まで上げたときの結合の様子。bound 画分の LC1 のバンドを赤矢じりで示す。600 mM NaCl 存在条件でも結合がみられた。

次に、 γ ストーク上に LC1 が何分子結合しているかを調べるために、LC1 と γ ストークの結合のストイキオメトリーを調べる実験を行った。 γ ストークに導入した His-tag と LC1 に導入した GST-tag を用いてタンデムアフィニティー精製を行ったところ、 γ ストークと GST-LC1 はモル比約 1:1 の複合体として精製された(Fig. 14a)。また、定量的 GST プルダウンアッセイによって最大結合量 B_{\max} を求めたところ、 B_{\max} での $[\gamma\text{ストーク}] / [\text{GST-LC1}]$ の値は 1.0 となった(Fig. 14b)。これらの結果から、 γ ストークと LC1 はモル比 1:1 で結合すると考えられる。また、定量的 GST プルダウンアッセイから、結合の解離定数 K_d は 1.8 nM と分かった。この結果から、LC1 と γ ストークの結合は安定であると考えられる。

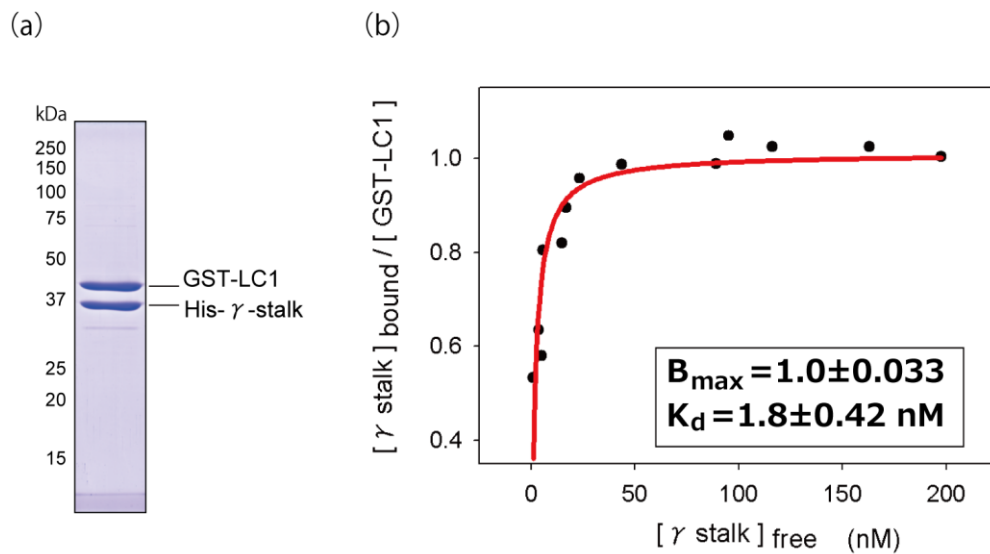


Fig.14 LC1 と γ ストークの結合のストイキオメトリー

(a) タンデムアフィニティー精製の結果の SDS-PAGE. (b) 定量的 GST-プルダウンアッセイの結果. X 軸に unbound 画分の free の γ ストーク濃度を取り、Y 軸に溶出画分での γ ストークと GST-LC1 のモル比を plot し、 $Y = B_{\max} * X / (K_d + X)$ で近似した。フィッティングの R^2 値は 0.813 であった。

1.3.2.1 キメラコンストラクトを用いた結合領域のマッピング

DYH3 頭部の単粒子解析の結果から、LC1 は MTBD 領域に結合すると考えられた。これを検証するために γ ストークと β ストークのキメラコンストラクトシリーズ(Fig. 6 参照)を構築し、GST プルダウンアッセイによって GST-LC1 との結合を調べた。実験結果の電気泳動ゲル・定量化したグラフ・結合結果のまとめは(Fig. 15)である。ストークの先端~MTBD が γ 重鎖のものコンストラクトは LC1 と結合し、 β のコイルドコイルに γ の MTBD を融合したキメラコンストラクト(β 85:82- γ MTBD)でも LC1 結合がみられた。また、 γ のコイルドコイルに β の MTBD を融合したコンストラクト(γ 85:82- β MTBD)では LC1 結合はほとんどみられなかった。これらの結果から、LC1 の結合には γ 重鎖の MTBD 領域があれば十分であることが示された。また、 γ 重鎖の MTBD 領域をもつコンストラクトのうち、 γ 重鎖の coiled coil の 3,082~3,110 aa, 3,287~3,315 aa までの領域 (Fig. 15c の点線の領域)を含むコンストラクトでは、この領域を含まないコンストラクトに比べて結合量が二倍程度となっていた。この領域を有していても、 γ MTBD 領域がなければ LC1 結合が起こらないことから、この領域は何らかの形で MTBD での LC1 結合をサポートしていると考えられる。さらに、 γ MTBD 領域のみのコンストラクトを構築し、LC1 とプルダウンアッセイを行ったところ、このコンストラクトでも LC1 と結合可能であった(Fig. 16)。

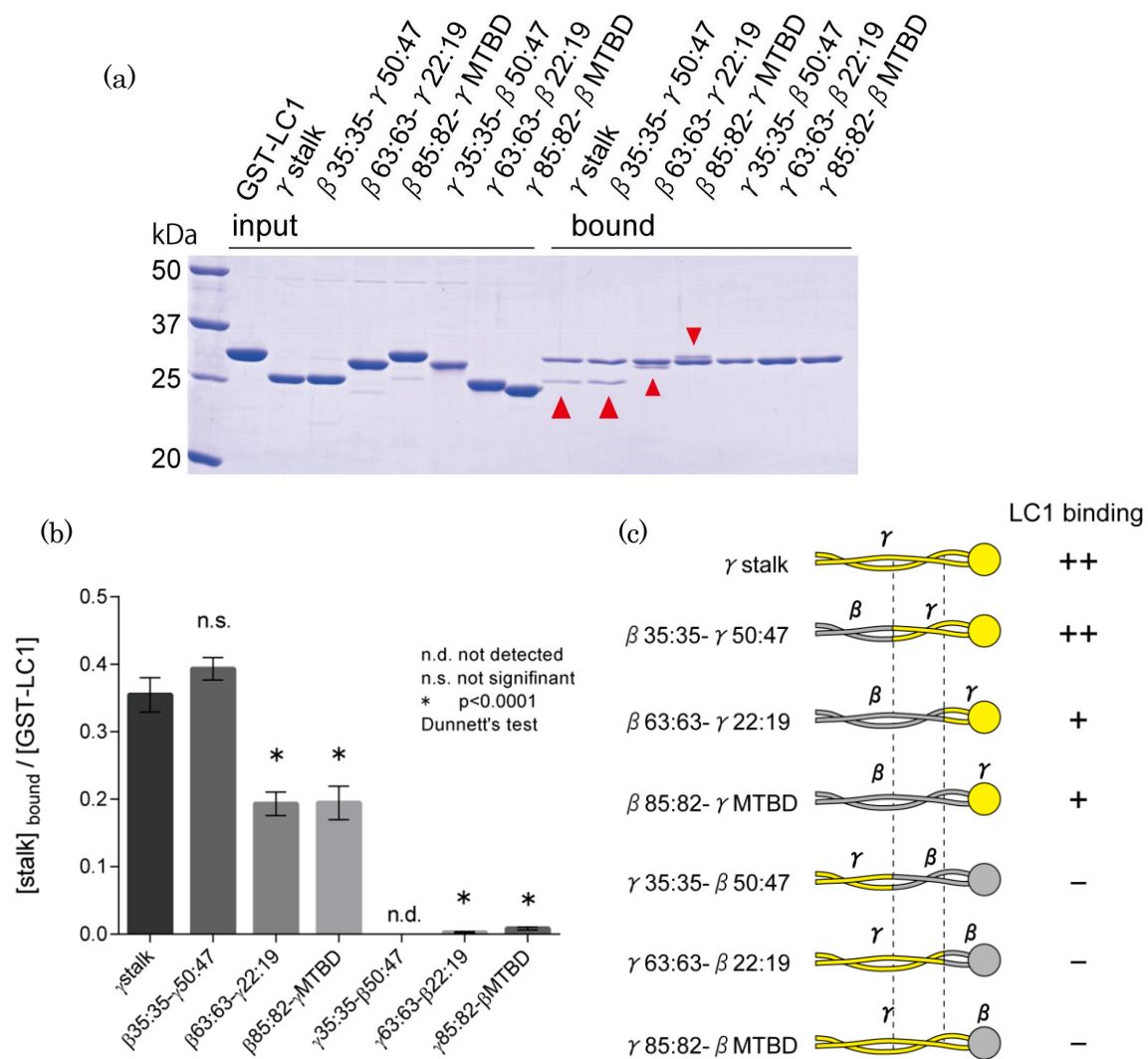


Fig.15 キメラストークを用いた結合領域のマッピング

(a) GST-pull down アッセイの SDS-PAGE. GST-LC1 と結合し、bound 画分に来たストークコンストラクトのバンドを赤の矢じりで示す。(b) bound 画分のストークコンストラクトと GST-LC1 のモル比。エラーバーは、3つの独立した実験の平均値の標準誤差を表す。アスタリスクは、 γ ストークの結果との p 値(Dunnett's test)が 0.0001 より低いことを表す。(c) 結果の概要。 γ ストークと同等の結合がみられたコンストラクトを++, 半分程度の結合がみられたコンストラクトを+, ほとんど結合がみられなかったコンストラクトを-で示す。点線の間領域は、++と+のコンストラクトで異なっている領域を示す。

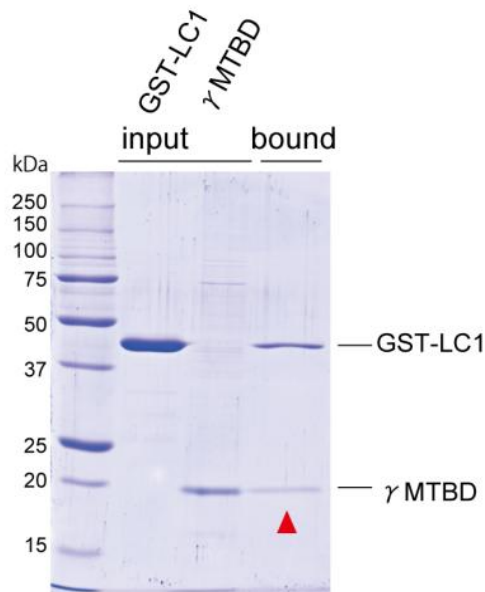


Fig.16 γ MTBD 領域断片を用いた GST プルダウンアッセイ
bound 画分にみられた γ MTBD 領域断片のバンドを赤の矢じりで示す。

1.3.2.2 LC1 の微小管結合への影響

MTBD はダイニンが微小管と相互作用する重要な領域である。上記の結果から、LC1 が γ 重鎖の MTBD 領域に結合することが明らかとなったので、その微小管結合への影響を調べた。 γ ストックのみ、あるいは、LC1 と共精製した γ ストックを用いて微小管共沈実験を行ったところ、 γ ストックのみのときに比べて、LC1 と共精製した γ ストックでは微小管に対するアフィニティーが下がっていることが分かった(Fig. 17a,b)。これは、LC1 が微小管結合能をもつという先行研究の結果と一見矛盾する結果であったため、LC1 と微小管のアフィニティーについても検証した(Fig. 18a,b)。その結果、LC1 単独のときは、微小管に結合するものの、そのアフィニティーは γ ストックのみ、LC1 と共精製した γ ストックと比べて低いものであった(Fig. 18b)。そこで、これらの微小管へのアフィニティーの比較を行った。ここで、 $[S] < K_d$ のとき $B_{max} * [S] / (K_d + [S])$ は、 $B_{max} * [S] / K_d$ で近似できるため、Fig.18b

のプロットを線形近似したときの傾き B_{\max}/K_d でアフィニティーを比較した(Fig.18c, Table2)。その結果、LC1 と共精製した γ ストックでは γ ストック単独の時の半分程度の値であった(Fig.18c, Table2)。また、LC1 単独のときは γ ストックの 1/7 程度の微小管への値であった(Fig.18c)。

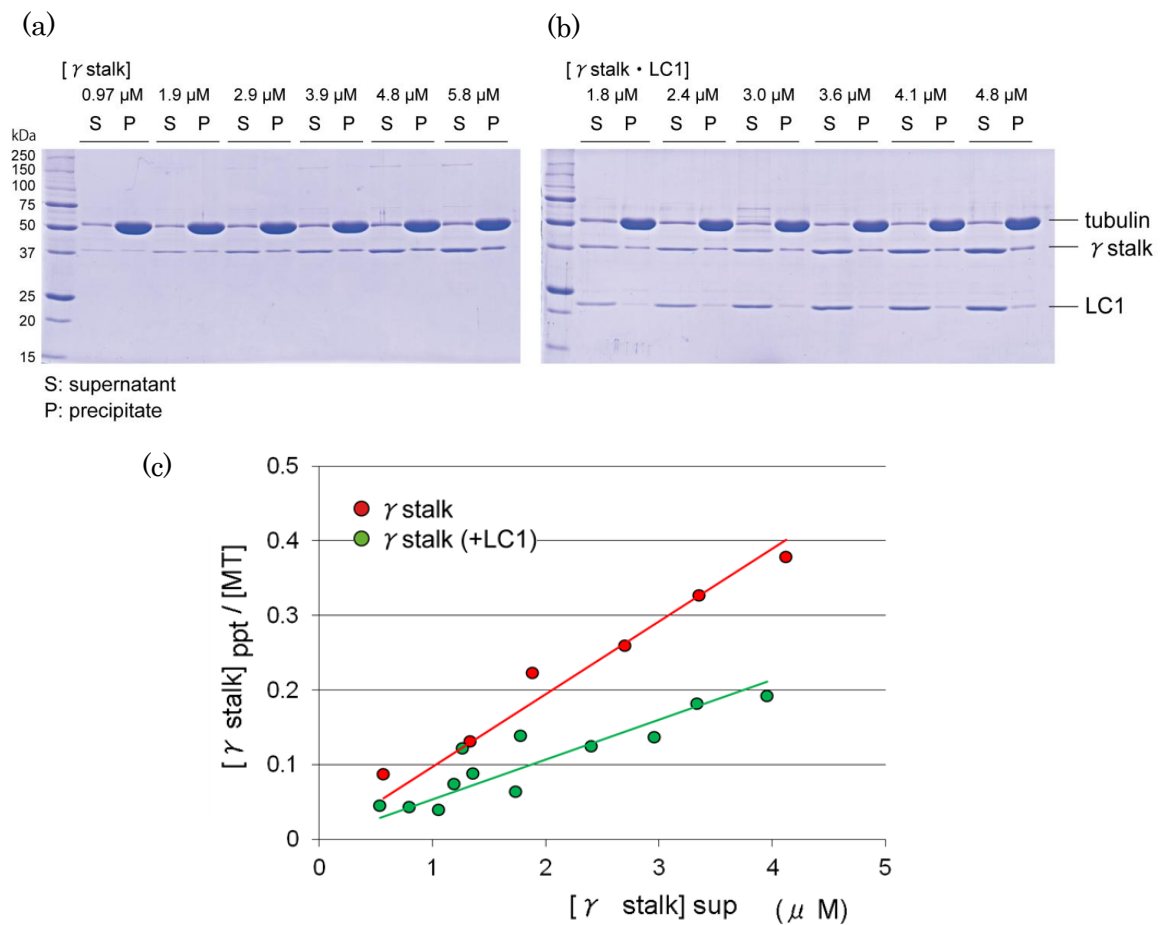


Fig. 17 γ ストックの微小管共沈実験

(a) γ ストック単独のときの微小管共沈実験の SDS-PAGE. (b) LC1 と共精製した γ ストックの微小管共沈実験の SDS-PAGE. (c) γ ストックの結合結果. X 軸に sup 画分にきた γ ストックの濃度を、Y 軸に ppt 画分での γ ストックと微小管のモル比をとり、線形近似した。赤が γ ストック単独の結果、緑が LC1 と共精製した γ ストックの結果である。

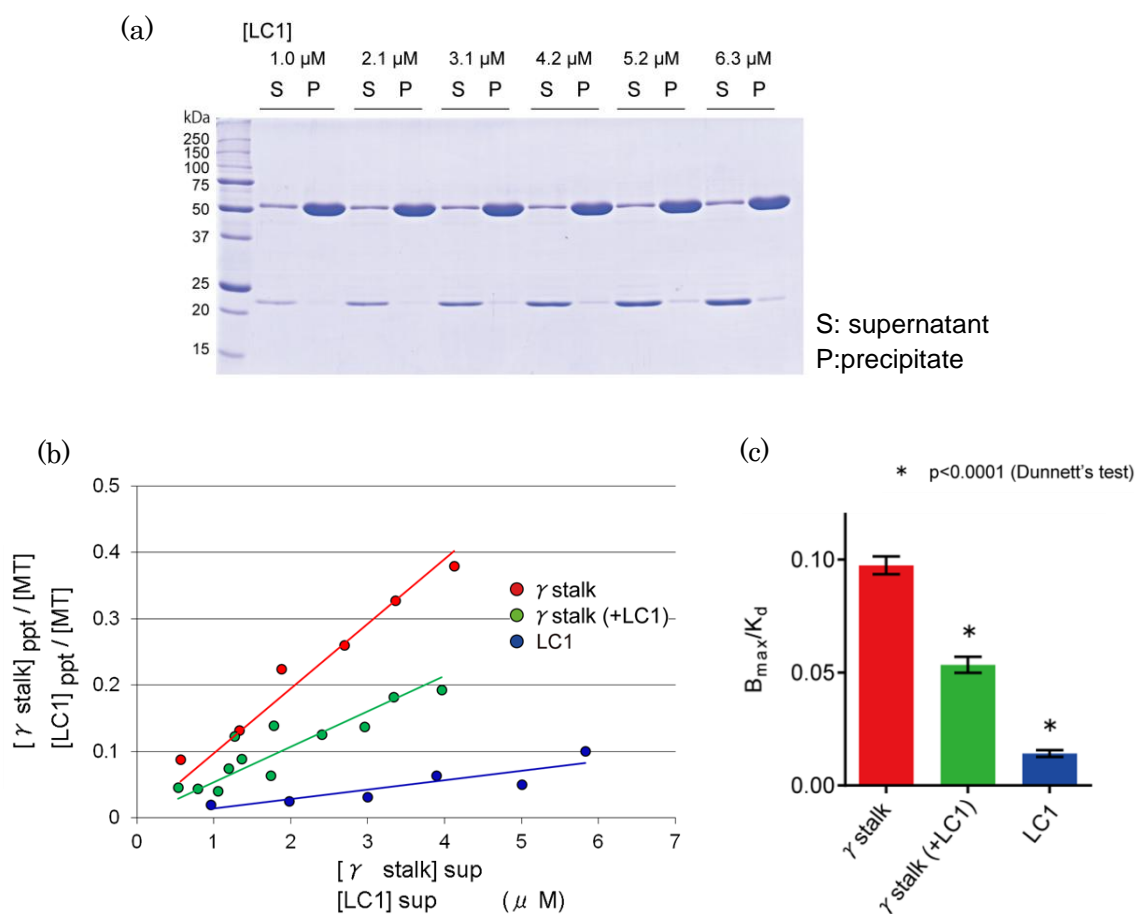


Fig.18 LC1 の微小管共沈実験

(a) LC1 単独のときの微小管共沈実験の SDS-PAGE. (b) LC1 の結合結果. X 軸に sup 画分に来た LC1 の濃度を、Y 軸に ppt 画分での LC1 と微小管のモル比をとった。青の点が LC1 単独のときの結果である。Fig.17 と同様に線形近似した。また、Fig.17 の結果(赤が γ ストック単独の結果、緑が LC1 と共精製した γ ストック)についても比較のために再掲した。(c) 微小管に対するアフィニティーの比較. (b) で線形近似したときの傾き (B_{max}/K_d) で微小管に対するアフィニティーを比較した。アスタリスクは γ ストックの結果との p 値 (Dunnett's test) が 0.0001 より低いことを表す。

Table 2 微小管に対するアフィニティー

	γ stalk	γ stalk(+LC1)	LC1
B_{max}/K_d	0.097	0.053	0.014
K_d (μM)	10	19	-

Fig.18(b) の線形近似した傾きから求めた微小管結合の B_{max}/K_d の値と、ストックの微小管結合の B_{max} を 1 としたときの K_d の値。

1.4 考察

1.4.1 ストック上構造についての考察

本研究における電子顕微鏡観察の結果、 γ ストック上のみが存在する構造が見出された。このストック上構造は、先行研究のロータリーシャドウィングを用いた電子顕微鏡観察の結果(Goodenough and Heuser, 1984)とも一致するものであったが、これまで見落とされてきた。単粒子解析の結果から、ストック上構造は MTBD 領域にさらに別の構造体が付随した構築となっていると考えられる。MTBD に付随した構造体のサイズは約 7 nm であり、すでに報告されている LC1 の NMR 構造と一致するサイズであった(Wu *et al.*, 2000)。金粒子標識の結果と合わせて考えると、ストック上構造は LC1 に対応している可能性が高いと考えられる。

1.4.2 本研究結果から得られた LC1 結合のモデル

本研究で行った、金粒子標識を用いた電子顕微鏡観察と生化学的マッピングにより、LC1 は γ 重鎖の MTBD 領域に結合することが分かった(Fig. 19a)。これは、LC1 が AAA+リングに結合しているという先行研究のモデル(Wu *et al.*, 2000; Patel-King and King, 2009) (Fig. 2a)とは異なるものであった。しかしながら、このモデルは、LC1 と γ 重鎖を架橋剤 DMP によって架橋した上で、AAA1 の P1 サイトで UV-cleavage で切断して頭部と尾部に分離すると、LC1 が γ 頭部側断片側に検出されるという結果(Benashski *et al.*, 1999)をもとにしている。ここで、 γ 頭部側断片は AAA+リングだけでなく、ストック・MTBD 領域も含むため、本研究で示した LC1 が γ 重鎖の MTBD 領域に結合するというモデルはこれと矛盾しないものである。

N 末あるいは C 末に直接 His-tag を付加した LC1 の金粒子標識の結果から、LC1 は γ MTBD 上で N 末を先端側、C 末を基部側に向けていることが分かった(Fig. 19a)。この配向の場合、LC1 の N 末側が微小管近傍に位置することが予想される。これは、先行研究で

変異体 LC1 を用いた軸糸との共沈実験から、LC1 の N 末領域のアミノ酸残基が微小管結合に重要であると示されていること(King and Patel-King, 2012)とも一致する。

タンデムアフィニティ精製・定量 GST プルダウンアッセイの結果から、 γ ストック上に結合している LC1 は一分子であると考えられる(Fig. 19a)。また、LC1 の γ ストックへの結合は K_d が 1.8 nM と非常に低く、両者の結合は安定であると考えられる。また、LC1 と γ ストックの結合が 600 mM NaCl 存在条件でも確認されたが、これは、天然の外腕ダイニンを軸糸構造から高塩濃度条件(600mM NaCl)で溶出した際に LC1 が共精製されることとも一致している。

先行研究のモデルでは、LC1 は AAA+リングに結合すると考えられていたため、AAA+リングから~6 nm と距離的に近い軸糸ダブレット微小管 A 小管側に結合していると考えられていた。しかしながら、本研究の結果を踏まえると、LC1 は γ MTBD とともに軸糸ダブレット微小管 B 小管に結合していると考えるのが妥当であろう。以上の結果をまとめた LC1 の結合のモデル図が Fig.19 である。

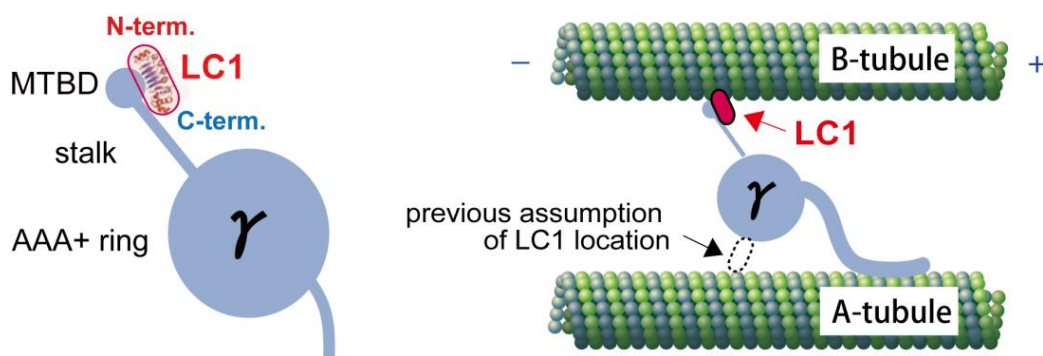


Fig.19 LC1 の局在と軸糸内での構造のモデル

(a) γ 頭部での LC1 の局在のモデル. 一分子の LC1 が N 末を先端側・C 末に基部側に向けて γ MTBD 上に結合していると考えられる。(b) 軸糸構造内での LC1 の局在のモデル. LC1 は γ MTBD とともに軸糸ダブレット微小管 B 小管側に結合していると考えられる。

本研究では、 γ 重鎖の MTBD 領域が結合に関わることまで絞り込めたが、具体的に MTBD のどの領域に結合しているかまでは特定には至らなかった。 γ 重鎖の MTBD の配列を他の外腕ダイニンの配列と比較したところ、MTBD 領域のヘリックス 2 (H2)とヘリックス 3 (H3)の間のループ部分のアミノ酸残基数が α 重鎖で 9 残基、 β 重鎖で 11 残基、 γ 重鎖で 22 残基となっており、 γ 重鎖で特に長いことが分かった(Fig. 20)。H2H3 間のループ部分が長いという特徴は、複数の生物種の γ 重鎖で保存されていた。そこで、この H2H3 間のループ部分が LC1 結合に関わっているのではないかと考え、H2H3 間のループ部分を β 型の配列にした γ ストークコンストラクト(γ stalk- β H2H3loop)を構築し、LC1 との結合を調べるためのプレリミナリーな実験を行った。その結果、LC1 との結合は野生型の半分程度となった(Fig. 21a,b)。しかしながら、H2H3 間のループ部分を γ 型の配列にした β ストークコンストラクト(β stalk- γ H2H3loop)を構築したところ、このコンストラクトでは、LC1 結合はみられず(Fig. 21a,b)、この H2H3 間のループ部分のみでは LC1 の結合には十分ではないことが分かった。

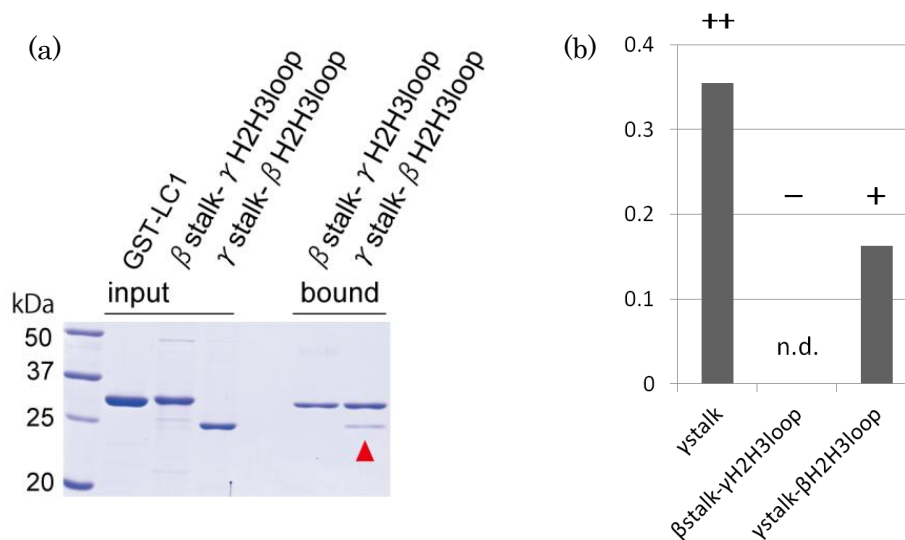


Fig.21 H2H3 ループ領域キメラコンストラクトを用いた GST プルダウンアッセイ
(a) SDS-PAGE の結果. bound 画分にみられたバンドを赤の矢じりで示す。
(b) bound 画分のストークコンストラクトと GST-LC1 のモル比. ++, +, -については Fig.15 と同様の基準である。

1.4.4 γ MTBD の構造予測

LC1 が γ MTBD にどのように結合しているかについて推測するため、 γ 重鎖の MTBD 領域の構造予測を行った。ここで、内腕ダイニン c でも MTBD の H2H3 間のループ部分が長い(20 残基)ことが知られている。すでに報告されているクラミドモナス内腕ダイニン c の MTBD の NMR 構造とマウス細胞質ダイニンの MTBD の結晶構造を比較したところ、MTBD 全体としては基本的には同等な構造をとっており、この H2H3 間のループ部分のみが突出していた(Fig. 22)。そこで、ダイニン c の構造を元に Swiss Model Server を用いてクラミドモナス γ MTBD の構造モデルを構築した(Fig. 23)。その結果、 γ MTBD でも H2H3 間のループ部分が外側に突出した構造をとることが予測された(Fig. 23)。また、それ以外の領域に着目すると、本来 α helix となるはずの H3 領域が、 γ MTBD では α helix をとらないことが予想された(Fig. 23)。これはあくまで構造予測の結果ではあるが、この本来 H3 をとる領域が γ MTBD で特徴的な構造をとっていて、LC1 結合を担っているのかもしれない。今後さらに、H3 領域を入れ替えたキメラストークコンストラクトで LC1 結合を調べること、MTBD のどの領域に結合しているかについても示唆を得ることができるだろう。

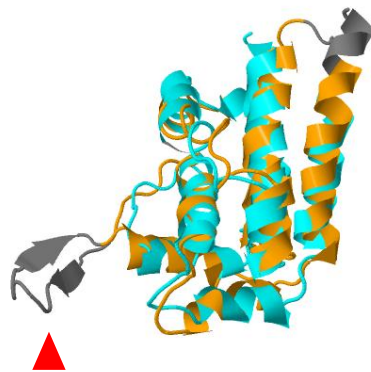


Fig.22 内腕ダイニン c とマウス細胞質ダイニンの MTBD 構造の比較
ダイニン c の MTBD 構造をオレンジ/グレーで、細胞質ダイニンの MTBD をシアンで示す。両者の重ね合わせた領域の構造の RMSD は 2.11 Å であった。H2H3 間のループ部分を赤の矢じりで示す。

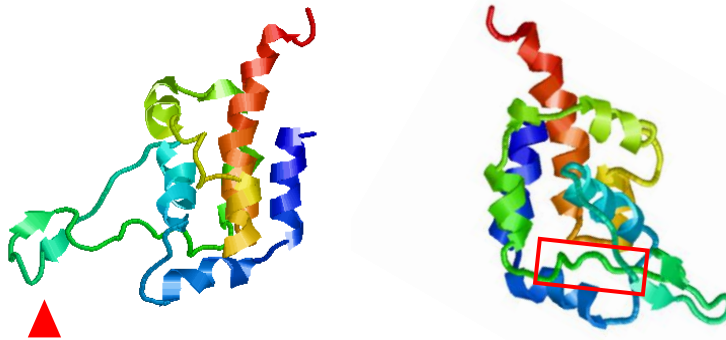


Fig.23 γ MTBD の構造モデル

Swiss Model Server を使ってダイニン ϵ -MTBD を元にして作成した γ MTBD 構造モデル。突出している H2H3 間のループ部分の領域を赤の矢じりで示す。他のダイニンでは、 α helix をとる H3 の領域(赤枠部分)が α helix をとらないことが予想された。

1.4.5 LC1 が γ MTBD の微小管へのアフィニティーを下げる機構の考察

先行研究の生化学実験、構造解析の結果から、ダイニンストークは微小管のチューブリンダイマーとモル比 1:1 で結合していると考えられる(Mizuno *et al.*, 2004; Carter *et al.*, 2008; McNaughton *et al.*, 2010; Redwine *et al.*, 2012)。そこで、 $B_{\max}=1$ であるという仮定の下、Fig.18 で求めた B_{\max}/K_d の値から、 γ ストーク, LC1 と共精製した γ ストークの微小管に対する K_d 値を求めると、それぞれ 10 μ M, 19 μ M となった(Table 2)。これは、ストークの微小管へのアフィニティーとしては妥当な値である(Mizuno *et al.*, 2004; Gibbons *et al.*, 2005; Shimizu *et al.*, 2008; McNaughton *et al.*, 2010)。また、LC1 のチューブリンダイマーへの結合の B_{\max} は現時点では不明であるが、1 以上であるとする、LC1 の微小管へのアフィニティーは γ ストークの 1/7 以下と考えられる。

LC1 自体は弱いものの微小管に対する結合能を有しているため、本来であれば LC1 が結合することで γ ストークは微小管に対するアフィニティーは加算的に上昇することが予想される。しかしながら、実際には LC1 と共精製した γ ストークでは微小管に対するアフィニティーが下がった。この理由として考えられる可能性は 2 つある。一つ目は、LC1 が γ ストークの微小管結合に関わるアミノ酸残基を一部覆い隠してしまっている可能性である。

二つ目は、LC1 が結合することで、 γ MTBD が MT 弱結合型構造で安定化される可能性である。ここで、LC1 が γ MTBD の微小管へのアフィニティーを下げている機構についての示唆を得るため、SRS と融合させて MT 強結合型レジストリに規定した γ ストックコンストラクト(SRS- γ 85:82)を用いて実験を行った。この SRS- γ 85:82 を用いてプルダウンアッセイを行ったところ、プレリミナリーな結果ではあるが LC1 結合はみられなかった(Fig. 24)。

SRS で固定していない γ ストックコンストラクトは、MT 弱結合状態と MT 強結合状態の二状態の構造を取りうることが予想される。この γ ストックコンストラクトに LC1 が結合することで γ ストックの微小管アフィニティーが下がったこと、及び、MT 強結合型の γ ストック(SRS- γ 85:82)には LC1 が結合しなかったことから、LC1 が γ MTBD の MT 弱結合型構造を認識して結合し、MT 弱結合型構造を安定化している可能性が考えられる。今後、LC1- γ ストック複合体の高分解能での構造情報を得ることでこの点について明らかとすることができよう。

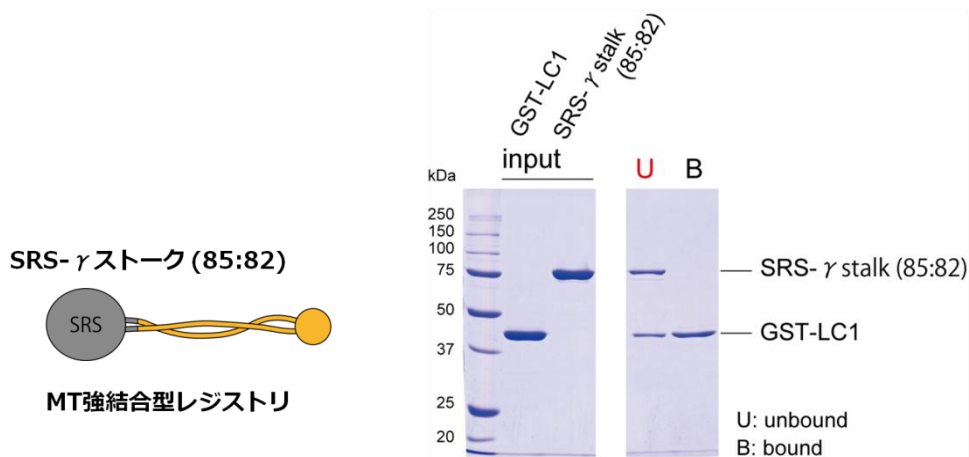


Fig.24 SRS- γ ストック(85:82)を用いた GST プルダウンアッセイ
強結合型レジストリに規定した γ ストックは GST-LC1 との結合はみられなかった。

1.4.6 LC1 のダイニンの運動制御機構についての考察

先行研究でのモデルでは、LC1 が γ 重鎖と軸系ダブレット微小管とのアンカーとして働くことが推測されていたが、本研究結果から LC1 が γ ストックの微小管へのアフィニティーを下げることが明らかとなったため、LC1 が微小管へのアンカーとして働くことは考えにくい。それでは、LC1 の機能は一体何であろうか。LC1 は γ ストックの微小管アフィニティーを下げていることが分かった。ここから LC1 が γ 重鎖を運動に参加しにくい状態にしていることが推測されるが、この生物学的意義は何であろうか。

先行研究で、ゾウリムシの外腕ダイニンの 29 kDa の軽鎖が、cAMP 依存的にプロテインキナーゼ A (PKA) によってリン酸化を受けることが明らかとなっている (Hamasaki *et al.*, 1991; Barkalow *et al.*, 1994)。このゾウリムシの 29 kDa の軽鎖は、テトラヒメナ DYH3 頭部に結合可能である (Barkalow *et al.*, 1994)。また、ゾウリムシで LC1 を RNAi でノックダウンすると、この 29 kDa の軽鎖のリン酸化は検出されなくなる (Kutomi *et al.*, 2012)。これらのことを総合して考えると、このゾウリムシの 29 kDa の軽鎖は LC1 に対応していると考えられる。ここで、ゾウリムシの 29kDa の軽鎖がリン酸化されると、外腕ダイニン複合体による微小管の滑り運動速度、ゾウリムシの遊泳速度が上昇する (Hamasaki *et al.*, 1991; Barkalow *et al.*, 1994)。これらの知見と、LC1 が MTBD に結合するという本研究での結果をもとにすると、リン酸化された LC1 は γ MTBD の性質を変えることで、外腕ダイニン複合体の活性を上げることが予想される。この機構としては、以下の 2 つの可能性が考えられる。一つ目は、リン酸化 LC1 が γ MTBD の微小管に対するアフィニティーをさらに下げ、 $\alpha \beta$ 重鎖が運動活性を十分に発揮できるようにするという可能性である。この場合、 γ 重鎖は通常、 $\alpha \beta$ 重鎖の運動を阻害していることとなる。また、二つ目としては、LC1 がリン酸化されると γ MTBD は本来の微小管へのアフィニティーを取り戻し、 $\alpha \beta \gamma$ 三頭が揃って運動に寄与できるようになるというものである。この点を明らかにするために、今後、人為的にリン酸化した LC1 を用いて、 γ ストック-LC1 複合体の微小管へのア

イニテーターがどのように変化するかを調べる必要がある。

また、MTBD の状態と AAA+リングでの ATPase 活性は共役していることが知られている(Kon *et al.*, 2009)。LC1 が MTBD に結合することで、AAA+リング側にフィードバックが起こり、モーター活性や ATPase 活性に影響を及ぼす可能性も考えられる。この点について調べるため、第二章に述べる HEK293 細胞を用いた細胞質ダイニン 1 重鎖の発現系を応用する予定である。HEK293 細胞において、 γ ストークをもつヒト細胞質ダイニン 1 モータードメインのキメラコンストラクトを発現・精製し、LC1 と共精製することで、LC1 のモーター活性、ATPase 活性への影響についても明らかとすることができるだろう。

第 2 章：細胞質ダイニン複合体の構造解析

2.1. 序論

2.1.1 細胞質ダイニンの機能

細胞質ダイニンは、軸糸構造に組み込まれた軸糸ダイニンとは異なり、微小管上を歩行するタイプのダイニンである。細胞質内で働くダイニン 1 と繊毛・鞭毛内での輸送に関わるダイニン 2 が存在している。

ダイニン 1 は細胞分裂、小胞輸送、オルガネラの輸送、脳の発達における核運動など多岐に渡る重要な役割を果たしている。ダイニン 1 複合体が細胞内で機能を果たす上ではダイナクチン、Lis1, Ndel1 などの制御タンパク質が働いている(Karki and Holzbaur, 1999; Shu *et al.*, 2004)。そのため、ダイニン 1 複合体のコンポーネントやその制御タンパク質の異常は多くのヒトの疾患にも関わるということが明らかとなっている(Wynshaw-Boris *et al.*, 2007; Weedon *et al.*, 2011; Eschbach and Dupuis, 2011)。

一方、ダイニン 2 は、細胞内で広く存在しているダイニン 1 と異なり、鞭毛・繊毛内輸送(IFT)で特異的に働く細胞質ダイニンである。これは、ダイニン 2 重鎖の発現が、脱繊毛後にその発現量が上昇すること(Gibbons *et al.*, 1994)や、ダイニン 2 重鎖の欠損株・発現抑制を行った細胞で正常な鞭毛形成ができなくなることから明らかとなった。複数の生物種において、ダイニン 2 が機能できないと、先端が膨らんだ異常な鞭毛・繊毛が形成されることが明らかとなっている(Pazour *et al.*, 1999; Porter *et al.*, 1999; Krock *et al.*, 2009; Huangfu and Anderson, 2005; Delaval *et al.*, 2011)。このため、ダイニン 2 は軸糸基部方向への輸送である逆行性毛内輸送(IFT)で働くと考えられている。つまり、ダイニン 2 が機能できないと、kinesin-2 (kinesin-II, KIF17) による順行性 IFT によって軸糸先端に輸送された IFT 積荷分子が細胞質に戻ってくることができずに鞭毛先端で溜まってしまっていると考えられたのである。このように、ダイニン 2 は繊毛形成に関わるが、繊毛は単なる運動駆動装置としてだけでなく、ノード繊毛の回転による左右軸決定や、シグナル伝達

などにも重要であり、ダイニン 2 重鎖の変異がヒトの繊毛病である窒息性胸郭異形成症や短肋骨多指症候群タイプ 3 を引き起こすことも報告されている(Dagoneau *et al.*, 2009)。

2.1.2 細胞質ダイニン複合体のサブユニット

ダイニン 1 複合体は~530 kDa のダイニン 1 重鎖 HC に、~74 kDa の中間鎖 IC、~53-59 kDa の中間軽鎖 LIC (LIC1, LIC2)、~8-14 kDa の 3 種類の軽鎖 LC (Roadblock, LC8, TcTex1)が結合した~1.2 MDa の巨大なタンパク質複合体である。各サブユニットはそれぞれ二量体を形成していると考えられている。ダイニン 1 複合体は~50 nm と巨大な分子であるため、その分子全体の形態についてはこれまで電子顕微鏡法によって調べられてきた (Vallee *et al.*, 1988; Amos, 1989)。ダイニン 1 の構造は大きく分けて、頭部ドメインと尾部ドメインに分けられる。頭部ドメインは序章で述べたように ATP 加水分解活性・微小管結合を担う領域である。ダイニン 1HC どうしは尾部ドメインで二量体化するため、ダイニン 1 複合体は二頭構造をとる。ダイニン 1HC の尾部ドメインは、二量体化だけでなく IC, LIC との結合の足場としても働く (Tynan *et al.*, 2000a) (Fig. 25)。また、IC を介して LC もまた尾部ドメインに結合している (Lo *et al.*, 2001; Mok *et al.*, 2001; Susalka *et al.*, 2002) (Fig. 26)。細胞質ダイニン 1 の結晶構造が報告され、頭部ドメインの高分解能での構造情報が明らかとなってきている (Carter *et al.*, 2011; Kon *et al.*, 2011; Kon *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2012) のに対し、尾部ドメインの構造解析はほとんど進んでいないのが現状である。

また、ダイニン 2 の構造について得られている知見は非常に限られたものである。配列情報から、ダイニン 2 重鎖にも、ダイニン 1 重鎖と同様に 6 つの AAA ドメインからなる頭部ドメイン、coiled coil のストーク構造があり、先端に MTBD があると推測されている (Mikami *et al.*, 2002; Carter *et al.*, 2008) (Fig. 25)。しかしながら、ダイニン 2 の尾部ドメインについては、二量体化領域があるかどうか、サブユニット結合領域がどこに対応するかなどを含めて明らかとなっていない。また、ダイニン 2 の構造情報が得られていなかった

たため、ダイニン 2 のオリゴマー状態についてはシヨ糖密度勾配遠心法で求めた沈降係数(S 値)から二量体をとるだろうという推測がなされているだけである(Perrone *et al.*, 2003; Rompolas *et al.*, 2007)。ダイニン 2 のコンポーネントの中で、ダイニン 2 重鎖の次によく調べられているコンポーネントは、LIC3 である。LIC3 はダイニン 2 特異的な LIC であり、ダイニン 2HC と強く結合していることが生化学的に示されている(Grissom *et al.*, 2002; Mikami *et al.*, 2002)だけでなく、ダイニン 2 が機能する上でも不可欠なコンポーネントであることが知られている(Hou *et al.*, 2004; Rana *et al.*, 2004; Rajagopalan *et al.*, 2009)。さらに、クラミドモナス、ゼブラフィッシュ、テトラヒメナにおいて、ダイニン 2 に特異的な中間鎖(ダイニン 2IC)が特定されている(Rompolas *et al.*, 2007; Krock *et al.*, 2009; Rajagopalan *et al.*, 2009)。ヒトにおいてはこのダイニン 2IC のホモログタンパク質 WDR34 が存在することが分かっている(Rompolas *et al.*, 2007)。また、軽鎖 LC8 についてはすでにクラミドモナスダイニン 2 が逆行性 IFT で機能する上で不可欠なコンポーネントであることが明らかとなっている(Pazour *et al.*, 1998)。

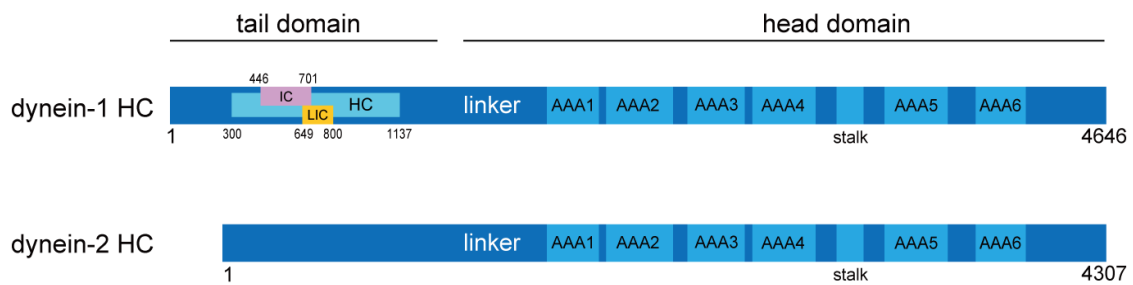


Fig.25 ヒトダイニン 1 重鎖・ダイニン 2 重鎖のドメイン構造

重鎖のドメイン構造を示す。ダイニン 1HC 尾部内の二量体領域・IC 結合領域・LIC 結合領域は Tynan *et al.*, 2000a を参考とした。ヒトダイニン 2HC はヒトダイニン 1HC に比べて 339 アミノ酸短い。また、ダイニン 2HC 尾部の配列のサブユニット結合領域は特定されておらず、また、二量体化領域があるかどうかも分かっていない。

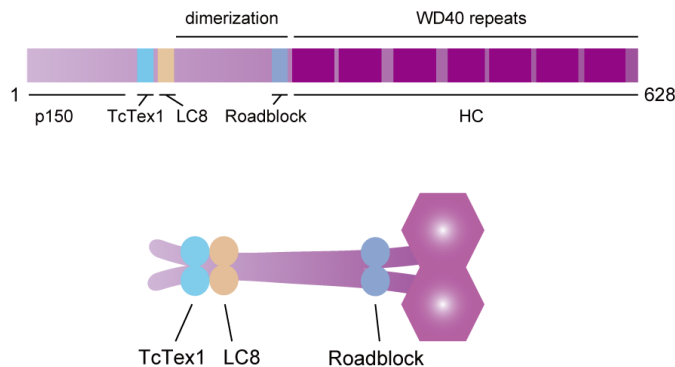


Fig.26 IC のドメイン構造と構造のモデル図

N 末領域にダイナクチン p150, TcTex1, LC8 結合領域が存在している。
中央付近に Roadblock 結合領域があり、C 末は WD repeat 構造をとる。

2.1.3 ダイニンの運動機構

ダイニン 1 の運動様式については微小管グライディングアッセイ、全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) による一分子運動観察などによって次第に明らかとなってきた (Paschal *et al.*, 1987; Mallik *et al.*, 2004; Toba *et al.*, 2006; Reck-Peterson *et al.*, 2006; DeWitt *et al.*, 2011; Qiu *et al.*, 2012)。一分子運動観察の結果、酵母ダイニンが一分子で微小管上を解離することなく一方向連続的な運動を示す (Reck-Peterson *et al.*, 2006) のとは異なり、哺乳類のダイニン 1 は積荷による負荷がかかっていない一分子の状態では微小管上で拡散的に動くという性質が明らかとなってきた (Ross *et al.*, 2006; Miura *et al.*, 2010)。

哺乳類のダイニン 1 に特徴的な運動機構を明らかとするためには哺乳類のダイニン 1 重鎖の組換え体を作製することが必要不可欠であるが、これまで細胞質ダイニン 1 重鎖の発現系は細胞性粘菌や酵母など下等真核生物に限られていたため、哺乳類のダイニン 1 重鎖は内在性のものしか得ることでできなかった。

また、ダイニン 2 の *in vitro* でのダイニン 2 の運動活性は、全く明らかとなっていなかった。ダイニン 2 の逆行性 IFT における機能を示唆する状況的証拠は多く得られており、ダイニン 2 が IFT で機能していることは確実だと考えられているにも関わらず、ダイニン

2の運動活性について *in vitro* で示した結果はこれまで得られていなかった。これはダイニン2を *in vitro* で性質を調べるのに堪えるだけの純度、量で精製することのできる系がこれまで確立されていなかったためであった。

2.1.4 ダイニン1の尾部の機能について

ダイニン1HCの尾部ドメインには、IC、LIC、LCが結合しているが、これらのサブユニットは様々な種類のタンパク質と結合することが知られている。例えば、ICは細胞表層に局在するNum1に結合することが知られている(Farkasovsky and Kuntzel, 2001)。LICは、LIC1とLIC2の2つのタイプがあるが、このうちLIC1は中心体タンパク質であるペリセントリンに結合し(Tynan *et al.*, 2000b)、LIC2は細胞極性形成に関わるPar3に結合する(Schmoranzner *et al.*, 2009)ことが知られている。LIC1のC末領域がアダプタータンパク質であるFIP3、RILP、BicD2に結合することもごく最近示された(Schroeder *et al.*, 2014)。また、軽鎖TcTex1はロドプシンに結合し(Tai *et al.*, 1999)、軽鎖LC8は、Bim1、swallow、ウィルスタンパク質などに結合する(Puthalakath *et al.*, 1999; Schnorrer *et al.*, 2000; Raux *et al.*, 2000; Alonso *et al.*, 2001)。このため、ダイニン1複合体は尾部ドメインを介して種々の積荷分子に結合することが可能である。

さらに、これらのサブユニットの役割は積荷分子との結合だけに留まらず、制御タンパク質との結合も担っている。ダイニン1の一方向連続運動性を上げることが知られているダイナクチンはICのN末領域に結合する(Karki and Holzbaur, 1995; Vaughan and Vallee, 1995)。また、Lis1と協働するNdelは、ICのN末・LC8・頭部AAA1領域と、ダイニン1複合体の複数の箇所と結合することが分かっている(Kardon and Vale, 2009; McKenney *et al.*, 2011)。これらの制御タンパク質が結合することで、ダイニン1複合体は運動様式を変化させるが、この機構についての詳細は分かっていない。これは、尾部のサブユニットの分子構築が明らかとなっていないためであると考えられる。

また、近年、マウスのダイニン 1 重鎖の尾部ドメインに変異をもつ細胞質ダイニン 1 複合体 (Loa 変異体) の運動解析によって、尾部ドメインがダイニン 1 の微小管上での一方向連続運動性に影響することも分かり (Ori-McKenney *et al.*, 2010)、尾部ドメインの運動への寄与も示唆されている。

2.1.5 ダイニン 1 複合体の尾部ドメインのサブユニット分子構築

ダイニン 1 重鎖尾部に IC, LIC, LC が結合することは生化学的に分かっていたが、尾部サブユニットの分子構築については明確には調べられていなかった。免疫電顕法によって、尾部の中で IC の位置を金粒子ラベルされた抗体で標識した結果はあったものの、抗体自体のサイズ (~10 nm) のため、十分な分解能では位置同定ができていなかった (Steffen *et al.*, 1996)。そのため、これまで提唱されているダイニン 1 複合体の尾部の構造モデルは、あくまで推定されたモデルであった。これまでの推定モデルでは、多くの場合、IC が N 末を尾部の末端・C 末を頭部側に向けて結合していると考えられていた (Fig. 27)。それゆえ、IC の N 末領域に結合する LC についても尾部の末端側に結合すると考えられてきた (Fig. 27)。また、LIC は IC よりも頭部側に結合すると考えられてきた (Vale, 2003; Barbar, 2012; Siglin *et al.*, 2013) (Fig. 27)。

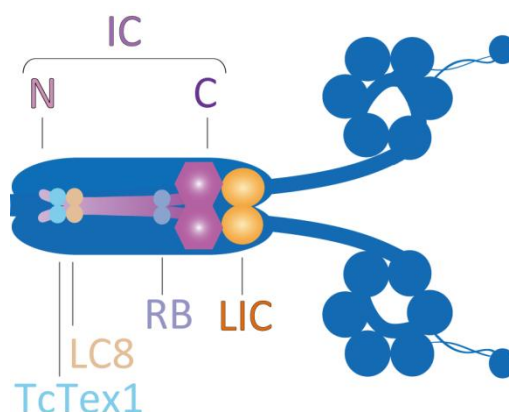


Fig.27 ダイニン 1 複合体のサブユニット構築の推定モデル

ダイニン 1 尾部に IC, LIC, LC が結合しており、IC は N 末を尾部末端・C 末を頭部側に向けて結合していると考えられてきた。また、LIC は IC よりも頭部側にあると考えられてきた。

2.1.6 本研究の目的とストラテジー

まず、これまで構築されていなかった、ヒト細胞質ダイニン1・ヒト細胞質ダイニン2重鎖組換え体の発現系を構築し、*in vitro*での性質、特にそのサブユニット構造を明らかとすることを目指した。さらに、ダイニン1複合体については、尾部に結合しているサブユニットの位置同定を行うことでその運動制御機構への示唆を得ることを目的とした。

発現系としてはヒト由来の細胞株である HEK293 細胞を選択した。これは、ダイニン1重鎖・ダイニン2重鎖が~500 kDa と巨大なタンパク質であり、大腸菌では発現することが不可能であるためである。また、昆虫細胞で発現した場合、異なる種のダイニンサブユニットが混入する可能性が排除できなかったからである。HEK293 細胞を用いることで、細胞由来の内在性サブユニットとの複合体としてダイニンを精製することが可能であることはすでに報告されている(Kobayashi and Murayama, 2009)。また、HEK293 細胞は細胞周期の中で運動性のない一次繊毛を形成することが知られており(Gerdes *et al.*, 2007; Dawe *et al.*, 2007; Newell *et al.*, 2008)、ダイニン2複合体の研究にも応用可能であると考えた。

精製に使用するタグの選択については、先行研究で IC に導入した SBP-tag (38 aa) でダイニン1複合体を HEK293 細胞から高純度で精製できることが明らかとなっていた(Kobayashi and Murayama, 2009)ため、本研究では組換え体ダイニン複合体の精製に用いるタグとして SBP-tag を用いた。さらに、ダイニン重鎖全長コンストラクトについては、一分子での観察のための蛍光分子、ビーズ、Q-dot などの特異的な結合などの拡張性を持たせるために、BG 誘導体に特異的に反応して結合する SNAP-tag (~20 kDa) を導入することとした。また、尾部サブユニットの分子構築を調べるためには、Ni-NTA ナノ金粒子標識を行うための His-tag を各サブユニットの N 末または C 末に導入することとした。

2.2 実験手法

2.2.1 全長コンストラクト発現用ベクターの構築

2.2.1.1 SBP-SNAP-DHC1-full

まず、pcDNA5/FRT/TO ベクター (Invitrogen)を改変し、マルチクローニングサイト (MCS)内に Nhe I, Mlu I 制限酵素サイトを加えた。Kozak 配列, SBP-tag 配列, SNAP-tag 配列を Nhe I, Mlu I サイトで pcDNA5/FRT/TO ベクターに挿入した(以下 pcDNA5-SBP-SNAP ベクター)。pcDNA5-SBP-SNAP ベクターの構築については豊島研究室所属(当時)の鳥澤嵩征氏の協力を得た。

ダイニン 1 重鎖全長をコードした cDNA はかずさ DNA 研究所から得た。ダイニン 1HC の配列は非常に巨大であるため、3 断片 ; DHC1-1 フラグメント(1-1,274 bp), DHC1-2 フラグメント(1,203-13,875 bp), DHC1-3 フラグメント(13,369-13,938 bp)に分割した。DHC1-1 フラグメントと DHC1-3 フラグメントは PCR によって作製し、DHC1-1 フラグメントの 5' 末端には Mlu I サイトを、DHC1-3 フラグメントの 5'末端には EcoR V と 3' 末端に Not I サイトをそれぞれ付加した。まず、DHC1-3 フラグメントを EcoR V, Not I サイトで pcDNA5-SBP-SNAP ベクターに挿入した(pcDNA5-SBP-SNAP-DHC1-3)。次に、DHC1-1 フラグメントを 5' Mlu I サイトと内在性の EcoR V サイトで pcDNA5-SBP-SNAP-DHC1-3 ベクターに挿入した(pcDNA5-SBP-SNAP-DHC1-1&3)。最後に DHC1-2 フラグメントを内在性の EcoT22 I サイトと Csp45 I サイトで pcDNA5-SBP-SNAP-DHC1-1&3 ベクターに挿入した(pcDNA5-SBP-SNAP-DHC1-full)。完成した pcDNA5-SBP-SNAP-DHC1-full は、Kozak 配列, SBP-tag 配列, SNAP-tag 配列, 12 aa リンカー(FSSLLEGPERDT)配列, ダイニン 1 重鎖全長配列を MCS にタンデムに含んでいる。ダイニン 1 重鎖全長配列は、Mlu I と Not I サイトで切り出すことが可能である。

2.2.1.2 SBP-His-DHC1-full

pcDNA/FRT/TO ベクターの Nhe I, Mlu I サイトに Kozak 配列, SBP-tag 配列, His-tag 配列を含んだベクター(pcDNA5-SBP-His ベクター)に、ダイニン 1 重鎖全長配列を Mlu I と Not I サイトでクローニングすることで pcDNA5-SBP-His-DHC1-full ベクターを作製した。完成した pcDNA5-SBP-His-DHC1-full は、Kozak 配列, SBP-tag 配列, His-tag 配列, ダイニン 1 重鎖全長配列(2-4,646 aa)を MCS にタンデムに含んでいる。pcDNA5-SBP-His ベクターの構築については順天堂大学医学部薬理学教室の村山尚博士の協力を得た。

2.2.1.3 SBP-SNAP-DHC2-full

発現ベクターの構築に先立って pcDNA5-SBP-SNAP ベクター内の Xho I サイトを Klenow fragment (Takara)を用いて除いた。ダイニン 2 重鎖全長をコードした cDNA は、かずさ DNA 研究所から得た。構築の際は、ダイニン 1 と同様に、3 断片; DHC2-1 フラグメント(4-1,101 bp), DHC2-2 フラグメント(1,075-12,846 bp), DHC2-3 フラグメント(12,355-12,921 bp)に分割した。DHC2-1 フラグメントと DHC2-3 フラグメントは PCR で作製し、DHC2-1 フラグメントの 5'末端には Mlu I サイトを 3'末端には EcoR V サイトをそれぞれ付加した、DHC2-3 フラグメントの 5'末端には EcoR V を 3'末端には Not I サイトをそれぞれ付加した。DHC2-1 フラグメントを pcDNA5-SBP-SNAP の Mlu I-EcoR V に挿入し、続いて DHC2-3 フラグメントを EcoR V-Not I に挿入した。最後に、DHC2-2 フラグメントを Xho I-BstE II サイトで挿入した。

完成した pcDNA5-SBP-SNAP-DHC2-full ベクターは、Kozak 配列, SBP-tag 配列, SNAP-tag 配列, ダイニン 2 重鎖全長配列(2-4,307 aa)を MCS にタンデムに含んでいる。

2.2.2 サブユニット位置同定用コンストラクト構築

細胞質ダイニンのサブユニットをコードする cDNA を HEK293 細胞から RT-PCR で増幅し、pcDNA/FRT/TO ベクターにクローニングした。精製用の SBP-tag または Ni-NTA

ナノ金粒子ラベル用の His-tag をそれぞれの N 末または C 末に導入した。使用したタンパク質の一覧は Table 3 である。サブユニット位置同定用コンストラクト作製は順天堂大学医学部薬理学教室の村山尚准教授の協力を得た。

Table 3 使用したダイニンサブユニットの一覧

Protein	Gene	Accession	No. residues
LC8	DYNLL1	NM_001037494	89
Roadblock	DYNLRB1	NM_014183	96
TcTex-1	DYNLT1	NM_006519	113
LIC1	DYNC1L1	NM_016141	523
IC1B	DYNC111	NM_001135556	628

2.2.3 細胞培養

本研究で用いた HEK293 細胞は培養用 dish の底に接着した状態で 5% CO₂, 37°C 環境で培養を行った。培養用の培地には 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin を含んだ DMEM を用いた(以下この条件の DMEM を単に DMEM と呼称する)。遺伝子導入前の HEK293 細胞は 10 µg/ml Blasticidin と 100 µg/ml Zeosin を含んだ DMEM 中で、遺伝子導入後の HEK293 細胞は 10 µg/ml Blasticidin と 100 µg/ml Hygromycin を含んだ DMEM 中でそれぞれ培養した。遺伝子導入用 FRT サイトの HEK293 細胞への導入については、順天堂大学医学部薬理学教室の村山尚准教授の協力を得た。

遺伝子導入、タンパク質精製に先立って HEK293 細胞を増やす際には 10 cm dish を用いた。細胞の状態及び増え具合については倒立顕微鏡(CK, Olympus)で確認した。細胞が 90~100%コンフルエントの状態になった場合は、培地を捨て、PBS 4 ml で 2 回ウォッシュし、TrypLE Express (Invitrogen) 1 ml を加えて 5% CO₂, 37°C に 5 min 静置した後、DMEM を加えて dish の底から細胞を剥がして植継ぎを行った。細胞をストックする場合は、剥した細胞を遠心(×1,000 rpm, 5 min, SX4250 rotor, Beckman)して回収した後、セルリザーバーワン(Nacalai)を 600 µl/dish になるように加え、200 µl 分注して-80°C で保存した。

2.2.4 遺伝子導入

遺伝子導入の 24 hr 前に HEK293 細胞を 6 cm dish に 2.0×10^6 cells/dish になるように蒔いた。遺伝子導入は、Lipofectamine reagent, Plus reagent (Invitrogen)を用いて製造者のプロトコルに従って行い、ダイニンサブユニットコンストラクトの遺伝子配列を HEK293 細胞のゲノム内に導入した。安定発現株は 100 μ g/ml Hygromycin を含む培地で培養することでコロニーを得て選別した。

2.2.5 タンパク質精製

2.2.5.1 組換え体ヒト細胞質ダイニンの精製

HEK293 細胞からの組換え体ダイニン複合体の精製は全て SBP-tag を用いたアフィニティ精製で行った。項目 2.2.4 で確立した安定発現株 HEK293 細胞を DMEM 培地 20 ml を含む 15 cm dish に植え継ぎ、2 μ g/ml doxycycline を培地中に加えて 48 時間培養することでタンパク質の発現を誘導した。

細胞回収ではピペッティングにより物理的に細胞を dish の底から剥がし、遠心($\times 1000$ rpm, 5 min, SX4250 rotor, Beckman)して培地を捨てた後、PBS でリンスして遠心($\times 1000$ rpm, 5 min, SX4250 rotor, Beckman)する手順を 2 回繰り返した。すぐにタンパク質を精製しない場合は細胞ペレットを液体窒素で急速凍結し、 -80°C で保存した。

以下の精製の工程は全て氷上、あるいは 4°C 環境で行った。凍結保存した細胞を 0.05% Triton X-100 と complete mini protease inhibitor cocktail (Roche)を含んだ buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 10% sucrose, 5 mM MgSO_4 , 0.1 mM ATP, 1 mM DTT)に懸濁し、ホモジェナイズし、遠心(45 krpm, 20 min, 4°C , TLA 100.4 rotor, Beckman)、ろ過 (孔径 0.45 μm)をして細胞破砕液とした。

アフィニティカラムとしては、StrepTrap HP column (GE Healthcare)または Strep-Tactin Sepharose resin (IBA)を用いた。細胞破砕液を buffer A で平衡化しておいた

カラムにロードし、非特異的に吸着したタンパク質を除くため buffer A でウォッシュした後、カラム内の担体に特異的に結合した組換え体タンパク質複合体を 2.5 mM Desthiobiotin を含んだ buffer A で溶出して分注した。SDS-PAGE 及び改良 Bradford 法 (Read *et al.*, 1981) によるタンパク質濃度測定を行ってピークを決定し、ピークフラクションをさらに分注して液体窒素で急速凍結後-80°Cで保存した。尾部サブユニット位置同定用コンストラクトの精製は、順天堂大学所属の村山尚准教授、豊島研究室所属の小林琢也博士の協力を得た

2.2.5.2 ブタ脳細胞質ダイニンの精製

組換え体ヒト細胞質ダイニン 1 の構造を評価する上でのコントロールとして使用するために、内在性のブタ脳細胞質ダイニン 1 を (Toba and Toyoshima, 2004) の方法に従ってショ糖密度勾配遠心と UnoQ 陰イオン交換カラムの手順で精製し、液体窒素で急速凍結して液体窒素中で保存した。

2.2.5.3 SDS-PAGE, ウェスタンブロット

SDS-PAGE・ウェスタンブロットについては、第 1 章項目 1.2.5 と同様に行った。使用した抗体及び希釈条件は以下の通りである；SNAP-tag 抗体 (GenScript, A00684, 1:1,000), IC 抗体 (Abcam, ab6304, 1:2,000), LC8 抗体 (EP1660Y, abcam, ab51603, 1:5,000), ダイニン 2 重鎖抗体 (基礎生物学研究所の小川和男博士から譲渡して頂いた, 1:1,000), LIC3 抗体 (ProteinTech, 15949-1-AP, 1:500), WDR34 抗体 (H00089891-B01, Abnova, 1:1,000) ラビット二次抗体 (AP-1000, VEC, 1:1,000), マウス二次抗体 (4751-1806, KPL, 1:1,000)。

2.2.6 電子顕微鏡観察

2.2.6.1 精製タンパク質の電子顕微鏡観察

電子顕微鏡観察は、第 1 章項目 1.2.2 と同様に行った。15,000 倍または 40,000 倍で観察し、CCD カメラまたはフィルムを用いて撮影した。ダイニン 2 頭部ドメインどうしの距離測定では、2 つの頭部ドメインの中心間の距離を ImageJ (NIH) を用いて計測した。

2.2.6.2 Ni-NTA 金粒子によるラベリングと解析

Ni-NTA 金粒子は Kitai *et al.*, 2011 または、秦智紀修士論文 2011 年に従って作製した。ダイニンの金粒子標識は、第 1 章の項目 1.2.2.2 と同様に行った。金粒子の結合位置の解析は、CCD カメラで撮影し、ダイニン 1 分子の尾部末端から金の中心までの距離と尾部の長さを ImageJ (NIH) を用いてそれぞれ測定し、金粒子の位置を尾部の中での割合で示した。測定には尾部の長さが 25 nm 以上の尾部が閉じているダイニン 1 分子を用いた。尾部サブユニットの金粒子標識の結果の一部は、豊島研究室の渡辺裕多氏の協力を得た。

2.2.6.3 単粒子解析

単粒子解析用の画像は第 1 章項目 1.2.2.3 と同様にフィルムで撮影した。開いた尾部の単粒子解析については豊島研究室の渡辺裕多氏の協力を得た。閉じた尾部の平均像を得るには、まずダイニン 1 複合体(SBP-SNAP-DHC1-full)を、1 mM ATP, 1 mM vanadate と 30 min 室温でインキュベートし、ネガティブ染色することで二頭がスタックしたダイニン分子の電頭像を得た。第 1 章項目 1.2.2.3 と同様の手順で、1 つのリファレンス像に従って分類してアラインメントし、得られた複数の平均像をリファレンスとしてさらにアラインメントを行った。ミスアラインメントされた分子を目で判定して除き、最終的に 8 つのクラスに分類した。頭部ドメインにマスクを適用することで、尾部ドメインについてさらにアラインメントを行った。

2.2.7 *in vitro* 運動活性測定

2.2.7.1 極性マーク微小管の調製

第1章項目 1.2.4.2 に従って、精製したチューブリン溶液 100 μ l に対して 1 mM NEM を加え、氷上で 5 min 静置後に 10 mM DTT を加えてさらに氷上で 10 min 静置し、NEM チューブリン(Phelps and Walker, 2000)を作製した。NEM チューブリン, 通常のコウブリン, テトラヒメナ繊毛軸糸を適切な比で混合し、1 mM GTP, 5 mM MgSO₄ 加えて 37°C に 30 min 静置することでテトラヒメナ繊毛軸糸から+端方向のみに微小管を重合して極性マーク微小管を作製した。NEM チューブリン, 通常のコウブリン, テトラヒメナ軸糸の混合比はコウブリンの状態によって異なるため、作製の度に数条件を試した。暗視野顕微鏡観察では、軸糸のある一端側が太く、明るく見えることから極性を判別した。

2.2.7.2 微小管グライディングアッセイ及び微小管運動速度の解析

2.2.7.2.1 SBP-SNAP-DHC1-full

微小管グライディングアッセイには、スライドガラス(Matsunami)に両面テープ(W-12, Scotch 3M)を 5 mm 間隔で張り付けた上にカバーガラス(thickness No.1, Matsunami)を乗せて作製した容量~7 μ l のチャンバーを用いた。

バッファーには 50 mM K-acetate を含む buffer B (10 mM PIPES-KOH, 4 mM MgSO₄, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 10 μ M paclitaxel, 1 mM ATP, pH 7.0)を用いた。チャンバーにまず 10 mg/ml BSA in 50 KAc バッファーを 7 μ l 流し込んで 5 min 静置してガラス表面をブロッキングした。次に、精製した SBP-SNAP-DHC1-full 溶液(~75 μ g/ml)14 μ l を流し込んで 3 min 静置するステップを 4 回繰り返す、ダイニン 1 をガラス表面上に非特異的に結合させた。50 mM K-acetate を含む buffer B 21 μ l を流し込むことでチャンバー内を洗浄し、50 mM K-acetate を含む buffer B で希釈した微小管を 14 μ l 流し込んで 2 min 静置した後、50 mM K-acetate を含む buffer B を 21 μ l 流し込んでチャンバー内を洗い、観察を

行った。

微小管のグライディングは、暗視野顕微鏡(BX-51, Olympus)で40倍の対物レンズ(UPlan FL, Olympus)により、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(Adobe Premiere Pro1.5 または WinDV)でキャプチャした。取り込んだ動画は解析用ソフトウェア Mark 2 (Ken'ya Furuta, NICT)を使用して解析した。解析に用いた微小管はガラス表面上を 20 sec 以上に渡って連続的に進んだものだけに限り、ガラス表面上で動かなかった微小管は速度の解析からは除外した。

2.2.7.2.2 SBP-SNAP-DHC2-full

ダイニン2の微小管グライディングアッセイではバッファーにはKAceを含まないbuffer B(項目 2.2.7.2.1 参照)を用い、~60 µg/ml のダイニン2溶液をチャンバーに流し込み、3 min 静置するステップを2回繰り返すことでガラス面に非特異的に結合させた。これ以外の条件については項目 2.2.7.2.1 と同様である。運動観察についても項目 2.2.7.2.1 と同様に行い、2 µm 以上にわたって滑り運動した微小管のみを速度の解析に用いた。解析の方法も項目 2.2.7.2.1 と同様に行った。

2.3 結果及び考察

2.3.1 組換え体ヒト細胞質ダイニン重鎖

ヒト細胞質ダイニン 1 重鎖全長(4,646 a.a., ~530 kDa)・ヒト細胞質ダイニン 2 重鎖全長(4,307 a.a., ~490 kDa)をコードする遺伝子配列は非常に巨大である(13,938 bp, 12,921 bp)ため、項目 2.2.1 のように 3 断片に分けることで発現ベクターを構築した。これらの発現ベクターを HEK293 細胞に遺伝子導入し、それぞれ安定発現株を樹立した。まず、確立した安定発現株から組換え体ダイニン 1 重鎖の精製を行ったところ、N 末に導入した SBP-tag で HEK293 ライセートから高純度で精製することができた(Fig. 28)。収量は、SBP-SNAP-DHC1-full で約 20 µg/dish であった。これは、*in vitro* での実験にも十分な量であった。次に、確立したダイニン 2 重鎖組換え体安定発現株 HEK293 細胞から精製を行ったが、ダイニン 2 の収量は全長の SBP-SNAP-DHC2-full で約 0.56 µg/dish とダイニン 1 の収量と比較して著しく低かった。ダイニン 2 の機能は繊毛に限定されているため、細胞内で多く発現する必要はなく、遺伝子配列内に発現に対してネガティブに働く配列が多い可能性がある。また、過剰なダイニン 2 の分解経路があることが推測されている(Williamson *et al.*, 2011)。これらの理由により本研究で得られたダイニン 2 の収量は少なかったことが推測される。そこで、SBP-SNAP-DHC2-full では細胞の培養量を 55-60 dish 程度に増やすことで *in vitro* での実験にも十分な量のダイニン 2 を得た。SBP-tag によって、ダイニン 2 についても高い純度で精製できた(Fig. 26)。

2.3.2 組換え体細胞質ダイニンのコンポーネント

SDS-PAGE の結果、SBP-SNAP-DHC1-full には HEK293 細胞の内在性のダイニンサブユニットと思われるバンドが確認できた。そこで、SDS-PAGE 及びウェスタンブロットを用いて精製された SBP-SNAP-DHC1-full のコンポーネントを調べた。その結果、精製された SBP-SNAP-DHC1-full とともに内在性のサブユニット IC, LIC, LC が共精製されている

ことが分かった(Fig. 28a,c)。ICについては SDS-PAGE, ウェスタンブロットの両方で確認した。LICについては SDS-PAGE で先行研究(Kobayashi and Murayama, 2009)と一致したバンドパターンが確認できた。LC8, TcTex-1についてはウェスタンブロットで確認した。本研究では Roadblock の存在の確認には至らなかったものの、LC は IC を介して HC と結合している(Williams *et al.*, 2006)ことと、3種類の軽鎖のうち、LC8, Tctex-1の2種類の軽鎖が組換え体ダイニン 1 重鎖と共精製されていたことから、Roadblock の存在も推測される。

また、精製された SBP-SNAP-DHC2-full の SDS-PAGE 及びウェスタンブロットの結果、組換え体ダイニン 2 重鎖とともに内在性のダイニン 2 中間軽鎖 LIC3 が共精製されていることが分かった(Fig. 28b,c)。LIC3 のバンドは~37 kDa の位置に検出された、これは計算上のヒト LIC3 の分子量(Mr=39 kDa)と一致していた。本研究で精製されたダイニン 2HC 全長には LIC3 以外のコンポーネントは確認できなかった。精製されたダイニン 2 のウェスタンブロットを行ったところ、軽鎖 LC8, TcTex1 は検出できなかった(Fig. 26a)。

このウェスタンブロットの結果から、精製されたダイニン 2 複合体の中にダイニン 1 のサブユニットは検出されず、ダイニン 1 複合体が混入していないと考えられる。本研究で得られたダイニン 2 重鎖の発現系は、ダイニン 2 複合体のみを純度よく産生することができる系であることを示している。

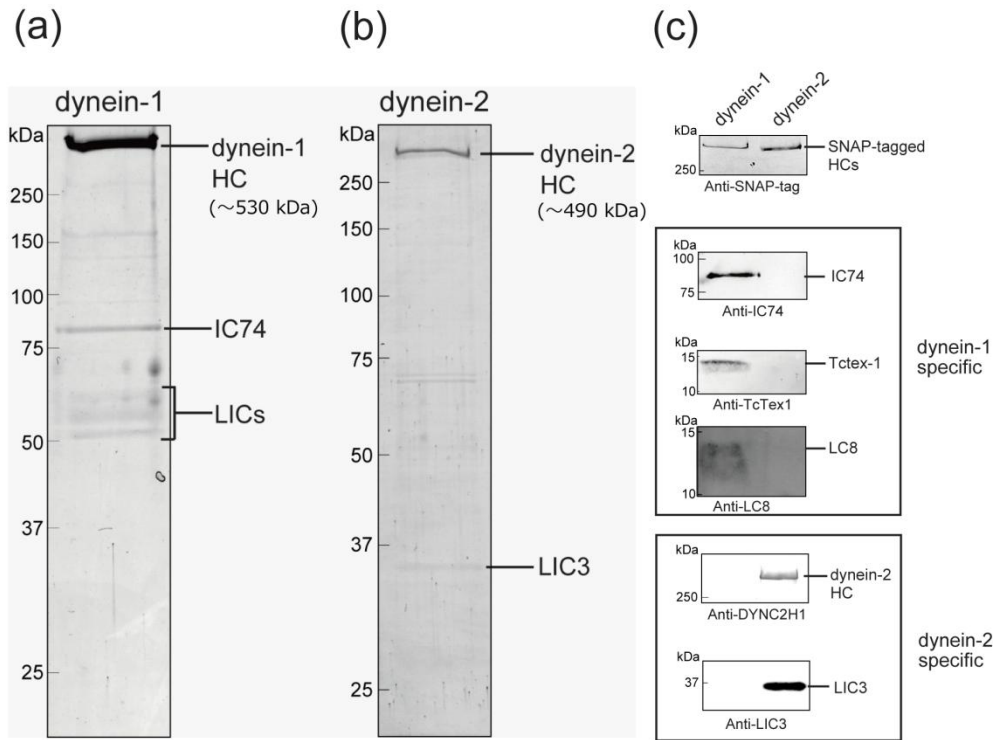


Fig. 28 ダイニン重鎖コンストラクトの精製結果

(a) SBP-SNAP-DHC1-full の SDS-PAGE. (b) SBP-SNAP-DHC2-full の SDS-PAGE.

(c) ウェスタンブロットの結果. SBP-SNAP-DHC1-full は、内在性の IC, LICs, LC (Tctex1, LC8)と共精製されていた。SBP-SNAP-DHC2-full は内在性の LIC3 と共精製されていた。SBP-SNAP-DHC2-full には、IC, Tctex-1, LC8 は検出されなかったため、精製されたダイニン 2 にはダイニン 1 は混入していないと考えられる。

2.3.3 組換え体ヒト細胞質ダイニン 2 のコンポーネントについての考察

先行研究において、クラミドモナス・ゼブラフィッシュ・テトラヒメナではダイニン 2IC が生化学的に特定されている(Rompolas *et al.*, 2007; Krock *et al.*, 2009)。また、このホモログタンパク質 WDR34 がヒトに存在することが分かっていた(Rompolas *et al.*, 2007)。ごく最近、この WDR34 がヒトダイニン 2IC であるという研究結果が報告された(Asante *et al.*, 2014)。ところが、SDS-PAGE の結果、本研究で精製されたダイニン 2 複合体にはダイニン 2IC と思われるバンドは確認できなかった。また、順天堂大学の村山尚准教授の協力を得て WDR34-hsGFP を HEK293 細胞で発現し、精製した。精製された WDR34-hsGFP をポジティブコントロールとし、精製されたダイニン 2 のウェスタンブロットを行ったが、SBP-SNAP-DHC2-full と共精製された WDR34 は検出できなかった(Fig. 29)。

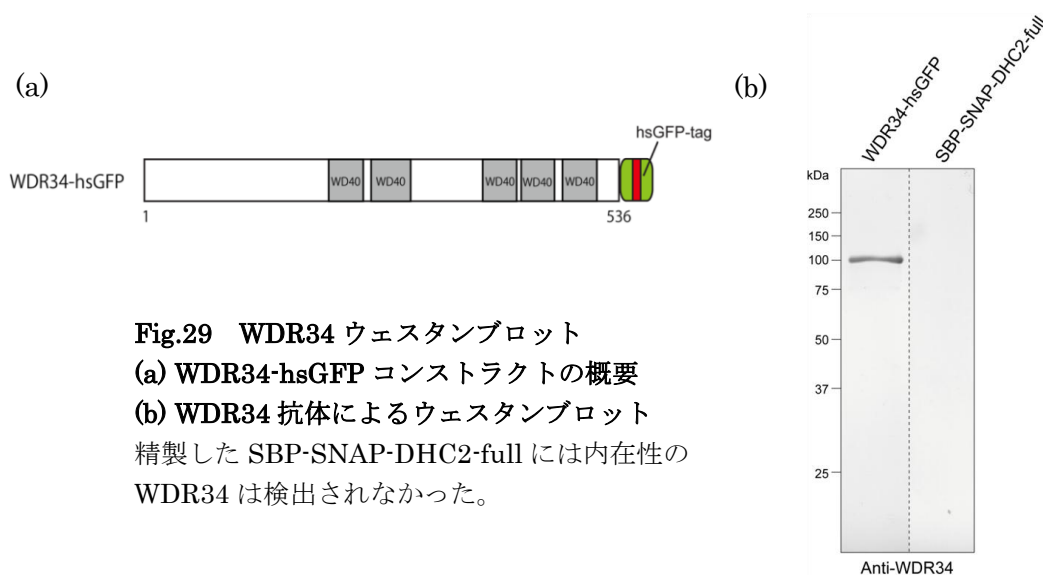


Fig.29 WDR34 ウェスタンブロット

(a) WDR34-hsGFP コンストラクトの概要

(b) WDR34 抗体によるウェスタンブロット

精製した SBP-SNAP-DHC2-full には内在性の WDR34 は検出されなかった。

クラミドモナスにおける先行研究において、ダイニン 2 重鎖とダイニン 2IC の相互作用は弱く、ダイニン 2IC はダイニン 2 重鎖から容易に解離してしまうことが示されている(Rompolas *et al.*, 2007)。そのため、本研究で用いた精製条件では、精製の過程で組換え体ダイニン 2HC から内在性ダイニン 2IC が解離してしまい、共精製することが出来なかったことが推測される。

また、精製されたダイニン 2 複合体を用いて軽鎖 LC8, TcTex-1 のウェスタンブロットを

行ったが、精製されたダイニン 2 複合体にこれらの LC は検出できなかった。LC8 はダイニン 2 複合体のコンポーネントであることが分かっているが、LC8 がクラミドモナスダイニン 2IC に強く結合しており、クラミドモナスダイニン 2IC とともにダイニン 2 重鎖から容易に解離してしまうことが示されている(Rompolas *et al.*, 2007)。本研究においても LC8 は WDR34 とともにダイニン 2 重鎖から解離してしまったことが推測される。

2.3.4 組換え体ヒト細胞質ダイニン 1 重鎖の運動活性

精製された組換え体ヒトダイニン 1HC の運動活性を *in vitro* 微小管グライディングアッセイで評価した。精製した SBP-SNAP-DHC1-full を非特異的にガラス表面に結合させて微小管グライディングアッセイを行ったところ、1 mM ATP 存在下で非常にロバストな微小管の滑り運動が観察された。観察された微小管の大部分(97.2%, n=138 / 142)がガラス表面上を滑り運動していた。運動を示した微小管の速度を計測したところ、 905 ± 152 nm/s (mean \pm S.D., n=120)であった(Fig.30)。これは先行研究のブタ脳ダイニン 1 の速度 940 ± 170 nm/s (Toba and Toyoshima, 2004), SBP-tag を付加した組換え体 IC と共精製された内在性ヒトダイニン 1 重鎖の速度 $1,110 \pm 148$ nm/sec (Kobayashi and Murayama, 2009) の結果とも一致したものであった。

運動している微小管の方向性は、極性マーク微小管を用いることで決定した。その結果、大分部(97.8%, n=88/90)の極性マーク微小管はプラス端を先に動いていた(Fig. 31)。これは、ダイニン 1 のマイナス端方向への運動を反映している。極少数、マイナス端を先頭にして動いていると判定された極性マーク微小管(2.2%, n=2/90)については、重合後に折れるなどしたため不適切にマークされた極性マーク微小管と考えて妥当な割合である。

本研究で得られた組換え体ヒトダイニン 1HC は、微小管グライディングアッセイにおいて *in vitro* での運動活性を示した。運動の方向性の結果から、微小管の滑り運動を引き起こしたのは HEK293 細胞由来のプラス端方向へのモータータンパク質のキネシンの混入によ

るものではなく、精製された組換え体ヒトダイニン 1 複合体によるものであることも示された。

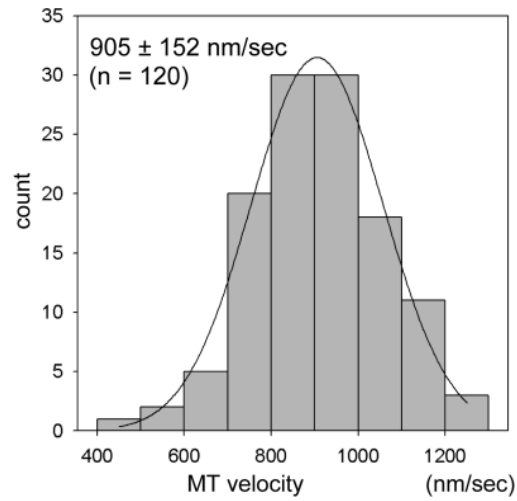


Fig.30 SBP-SNAP-DHC1-full による微小管滑り運動の速度分布ヒストグラム
速度分布のヒストグラムをガウス分布で近似した。

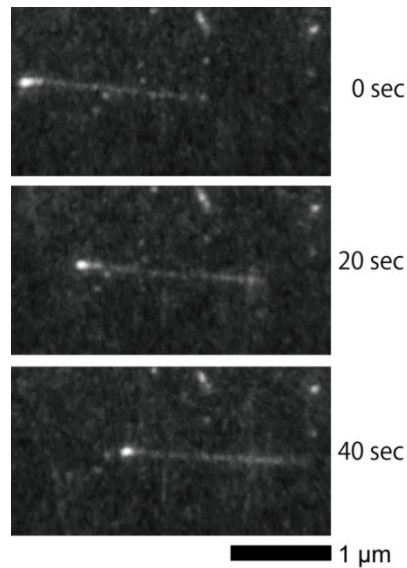


Fig. 31 SBP-SNAP-DHC1-full による極性マーク微小管の滑り運動

微小管の明るく見える側が軸糸でマークされたマイナス端側であり、極性マーク微小管はプラス端を先頭に進んでいた。これは、ダイニン 1 のマイナス端方向への運動活性を反映している。

2.3.5 組換え体ヒト細胞質ダイニン 2 重鎖の運動活性

ダイニン 1 の結果から、HEK293 細胞でダイニン重鎖を発現するストラテジーが有用であることが分かった。そこで、精製されたダイニン 2 の運動活性についても微小管グライディングアッセイによって調べた。精製した SBP-SNAP-DHC2-full を非特異的にガラス表面に結合させて微小管グライディングアッセイを行ったところ、1 mM ATP 存在下で複数の微小管が滑り運動している様子が観察された。しかしながら、ガラス表面上で滑り運動を示した微小管の数は少なく、ガラス表面上で止まってしまい滑り運動していない微小管の割合も高かった上に、動いている微小管もしばしば途中で運動を止めてしまった。また、ダイニン 2 でコートされたガラス面から微小管は容易に解離してしまった。

そこで、ダイニン 2 のグライディングアッセイの最適条件を調べるために、バッファー条件(KAce 濃度)、ブロック条件(BSA, カゼイン)、ダイニン 2 溶液をチャンバー内に流し入れる回数などを検討した。その結果、項目 2.2.7.2.2 の実験条件において、試した範囲では最も安定的に微小管のグライディングが観察できた。この条件下で、43.3% (n=114 / 263)の微小管がガラス表面上で滑り運動または形状を変えるなどの動きを示した。これら以外の微小管(56.7%, n=149 / 263)はガラス表面上に止まっており、全く動かなかった。動きを示した微小管のうち、少なくとも 2 μm 以上にわたって滑り運動した微小管 (n=53 / 114)の平均の速度は $69.6 \pm 41.0 \text{ nm/s}$ (mean \pm S.D. n=53) (Fig. 32)であった。2 μm に満たない滑り運動しかなかった微小管や、ガラス表面上で形を変えていた微小管などは速度の解析には含まれていないが、これらの動きもダイニン 2 の運動活性を反映していると考えられる。

次に、微小管の運動の方向性を極性マーク微小管によって調べたところ、滑り運動した極性マーク微小管は全てプラス端を先頭にして動いていた(n=16) (Fig. 33)。ウェスタンブロットの結果、精製されたダイニン 2 にはダイニン 1 は混入していなかった(Fig. 28)ため、微小管のグライディングはダイニン 2 によるものと考えられる。これらの結果から、ダイ

ニン 2 はモーター活性を持ち、ダイニン 2 は他のダイニンアイソフォームと同様に、マイナス端方向へのモータータンパク質であると結論付けた。

ダイニン 2 の *in vitro* での運動活性はこれまでどの生物種でも明らかとなっていなかったため、本研究がダイニン 2 のモーター活性を示す初めての結果である。

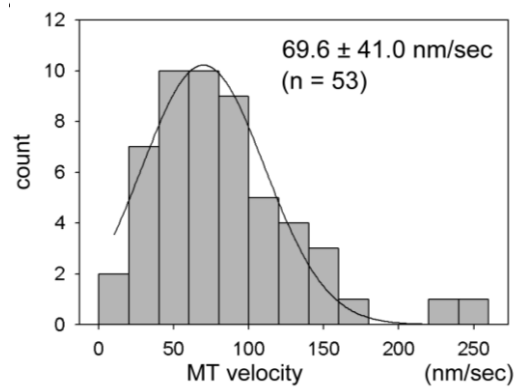


Fig.32 SBP-SNAP-DHC2-full による微小管滑り運動の速度分布ヒストグラム
速度分布のヒストグラムをガウス分布で近似した。

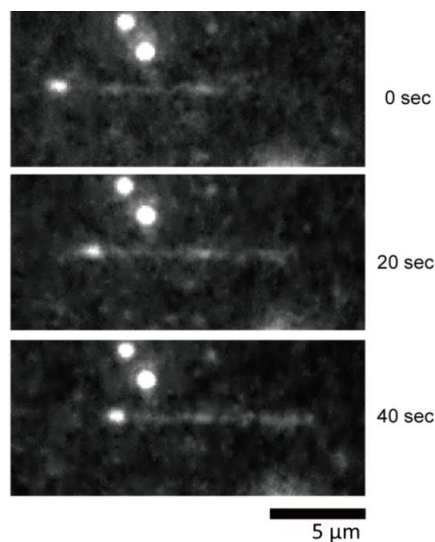


Fig. 33 SBP-SNAP-DHC2-full による極性マーク微小管の滑り運動

軸糸で明るく標識されている側がマイナス端であり、微小管はプラス端を先導して動いていた。これはダイニン 2 がマイナス端方向へのモーター活性をもつことを示している。

2.3.6 組換え体ヒト細胞質ダイニン 2 重鎖の運動活性についての考察

本研究によって、ダイニン 2 が運動活性をもつことが *in vitro* で初めて明らかとなった。また、極性マーク微小管を用いた結果、ダイニン 2 は微小管マイナス端方向のモータータンパク質であることも示された。これは、ダイニン 2 が *in vivo* でマイナス端方向の逆行性 IFT を担っているというこれまでの考えを *in vitro* 運動活性の面から強く支持する結果である。

本研究で得られたヒトダイニン 2 による微小管のグライディング速度は 69.6 ± 41.0 nm/s とダイニン 1 による微小管グライディング速度 905 ± 152 nm/s と比較して非常に遅いものだった。また、ダイニン 2 の速度を反映していると考えられる *in vivo* での逆行性 IFT の速度は、*C.elegans* で ~ 1 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (Signor *et al.*, 1999), マウス IMCD 細胞一次繊毛では $\sim 500\text{-}700$ nm/sec (Tran *et al.*, 2008; Besschetnova *et al.*, 2010) である。これらの *in vivo* での速度と比較しても本研究で得られた速度は遅いものであった。しかしながら、ダイニン 2 のグライディングアッセイの最適条件を探す過程において、いくつかの条件で速い速度 ($760, 814$ nm/s, どちらも $n=1$) で滑り運動した微小管が観察された (Fig. 34)。これらの速度は *in vivo* での速度とも一致する結果であった。この結果から、ダイニン 2 は本来、速い速度を出しうる能力を持っているが、本研究で用いた運動アッセイではダイニン 2 の能力が最大限発揮されていなかったと推測される。繊毛内で順行性 IFT で繊毛の先端に運ばれる間はダイニン 2 は不活性な状態になっており、逆行性 IFT のときにのみ活性状態になるように厳密に制御されていることが知られている (Rosenbaum and Witman, 2002)。ダイニン 2 が十分に運動能を発揮するためには、何らかの方法で活性化が起こる必要があるのかもしれない。

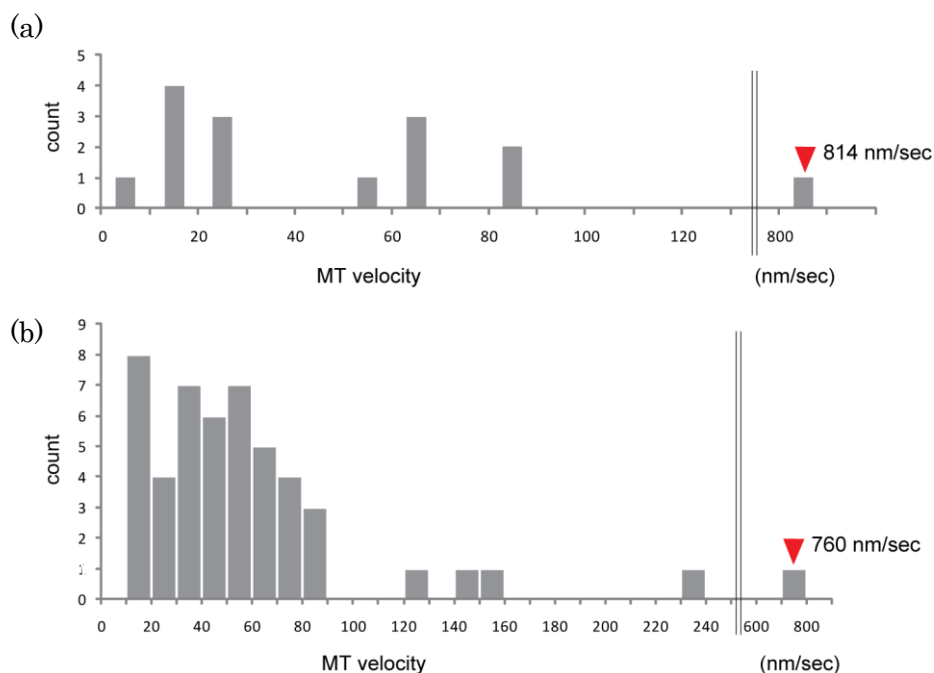


Fig. 34 速い速度で滑り運動した微小管の例

ダイニン 2 のグライディングアッセイの最適条件を探す過程で観察された、速い速度 (760, 814 nm/sec, どちらも $n=1$) で滑り運動した微小管を赤の矢じりで示す。Fig.32 の条件では、ダイニン 2 溶液 (~60 $\mu\text{g/ml}$) をチャンバー内に 2 回流し混んでいるが、(a) では 1 回、(b) では 4 回流し込んでいる。ダイニン 2 は本来この程度の速い速度で運動する能力をもつと考えられる。

2.3.7 組換え体ヒト細胞質ダイニンの分子形態

次に、精製された組換え体ヒトダイニン 1 複合体の分子形態をネガティブ染色法による電子顕微鏡観察によって調べた。組換え体ヒトダイニン 1 複合体の形態を評価するため、ブタ脳から精製した内在性のブタ脳ダイニン 1 複合体も電子顕微鏡観察した。その結果、精製された組換え体ダイニン 1 複合体は安定的に二量体構造をとっており、頭部・尾部・ストークの構造も確認できた。さらに得られた組換え体ダイニン 1 複合体は内在性ブタ脳ダイニン 1 複合体と同等の構造をとっていることが分かった(Fig. 35a)。項目 2.3.2 の内在性サブユニットの存在と併せて、全長の SBP-SNAP-DHC1-full は重鎖単独ではなく、内在

性のサブユニット(IC, LIC, LC)とともにダイニン 1 複合体として適切な構造をとっていることを強く示唆している。これらの結果から、本研究で構築した HEK293 細胞を用いたダイニン 1 重鎖の発現系はダイニン 1 複合体の構造研究にも使用可能であると結論付けた。

次に、ダイニン 2 の分子形態を明らかとするため、精製された組換え体ダイニン 2 複合体を電子顕微鏡観察した。その結果、ダイニン特有の頭部ドメインの AAA+リング構造が確認できた(Fig. 35b)。また、ダイニン 2 頭部ドメインは二頭構造をとっている様子が観察された(Fig. 35b)。ダイニン 2 の尾部ドメインはネガティブ染色像では見えにくく、明瞭に確認することができない分子が多かったが、細い尾部ドメインと思われる構造も確認できた(Fig. 35b)。ここで、尾部ドメインが観察しにくいダイニン 2 の場合、最隣接の 2 つの頭部ドメインモノマーを 1 つのダイマーとして誤認する可能性が排除できなかったため、比較的低い濃度(~15 $\mu\text{g/ml}$)のダイニン 2 をグリッド上に載せて電子顕微鏡観察を行った。この観察条件では分子どうしが直接的な相互作用をしていなければ、均一に散在することが予想されたためである。その結果、薄い条件であっても頭部ドメインは 2 個ペアで存在していた(Fig. 35b)。さらに、この観察条件で『2 つの頭部ドメインどうしが中心間距離で 30 nm 以下にある、あるいは明らかに尾部ドメインによってつながっている 2 つの頭部ドメイン』を二量体として判定するという基準を設けたところ、73.2% (n = 240 / 328)の頭部ドメインが二量体構造と分類された。これらの結果から、ダイニン 2 重鎖は二量体構造をとると結論付けた。これは、ダイニン 2 の分子形態を初めて明らかとした結果である。

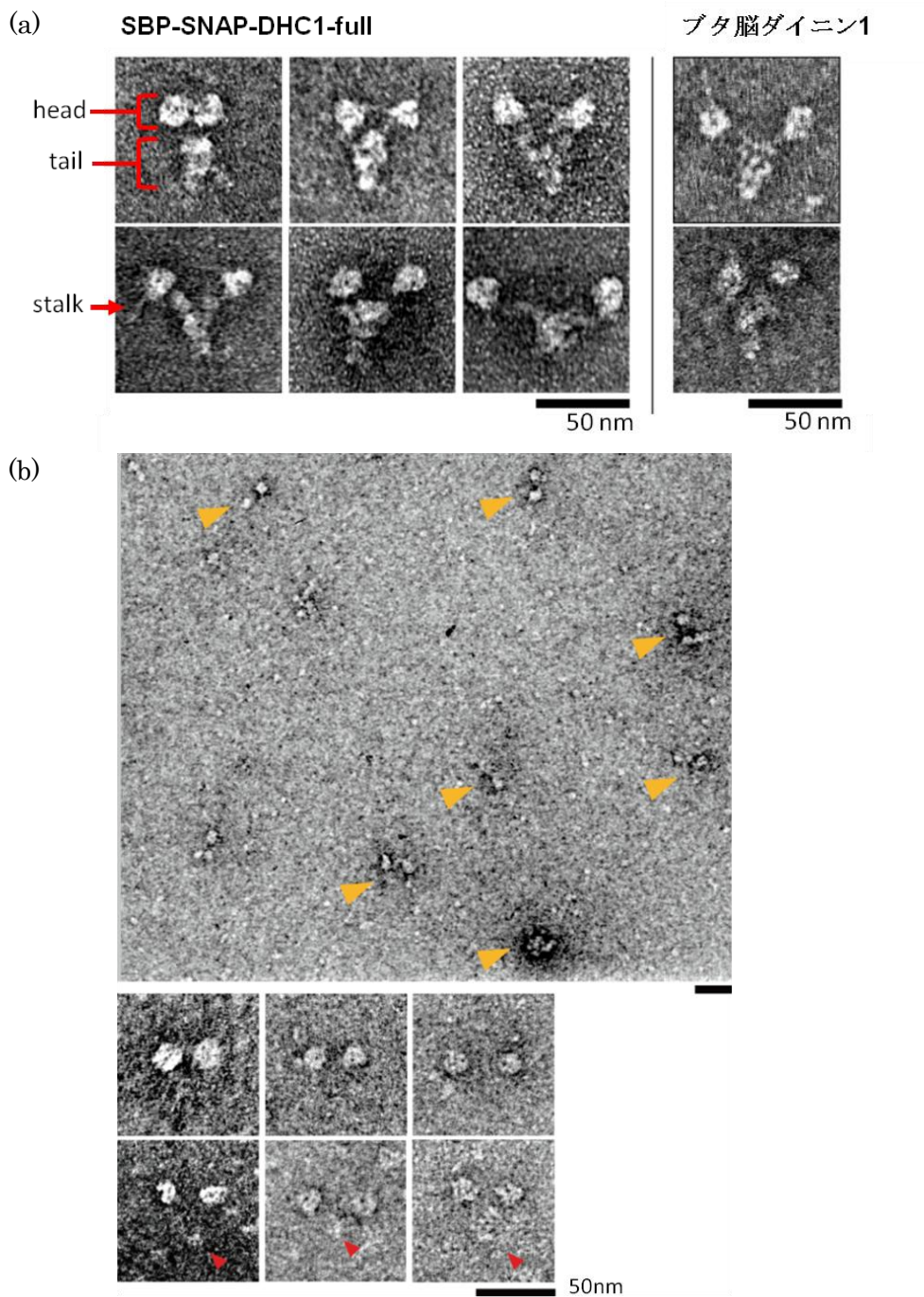


Fig. 35 精製された細胞質ダイニン複合体の電顕像

(a) ダイニン1複合体の電顕像. 左側に本研究で精製された組換え体ダイニン1複合体の電顕像を、右側にブタ脳から精製した内在性の細胞質ダイニン1複合体の電顕像を示す。両者は類似した構造を保持していた。**(b) ダイニン2複合体の電顕像.** 上段: 低倍率で撮影した全体像, 下段: 個別のダイニン2の電顕像。ダイニン2の二頭構造をオレンジの矢じりで示す。ダイニン特有の頭部モータードメインが観察された。ダイニン2の尾部ドメインはネガティブ染色像では見えにくかった。細い尾部ドメインと考えられる構造を赤矢じりで示す。

2.3.8 ダイニン 1 とダイニン 2 の尾部の構造の違いについての考察

本研究で精製されたダイニン 1 とダイニン 2 の頭部ドメインの形態は類似した構造であったが、これは、両者の頭部ドメインの配列が高度に保存されていること(Mikami *et al.*, 2002)とも一致した結果である。一方、ダイニン 1 とダイニン 2 の尾部ドメインの形態には大きな違いが見出された。ダイニン 1 が明瞭な尾部ドメインをもつのに対し、ダイニン 2 の尾部ドメインは細く、明瞭に観察することはできなかった。ダイニン 1 とダイニン 2 の尾部の形態の違いを生み出している要因は何であろうか。一つ目の可能性は尾部ドメインのサブユニットの違いである。本研究で精製されたダイニン 2 は IC を欠いていた。この尾部サブユニットの違いが尾部のネガティブ染色像における見え方の違いを反映している可能性がある。しかしながら、近年、IC, LC を欠いた HC, LIC のみのダイニン 1 複合体が、全てのサブユニットをもつ完全なダイニン 1 複合体と同等の明瞭な尾部ドメインをもつことが電子顕微鏡観察によって明らかとなった(Trocter *et al.*, 2012)。このため、IC はネガティブ染色像において、尾部の見え方に大きく寄与していないと考えられ、IC の有無だけではダイニン 1 とダイニン 2 の尾部の見え方の違いを説明することは難しい。二つ目の可能性としては、ダイニン 1HC, ダイニン 2HC の違いである。尾部ドメインの配列はダイニン 2 とダイニン 1 の間であまり保存されていないことが知られている(Mikami *et al.*, 2002)。また、ダイニン 2 重鎖はダイニン 1 重鎖に比べて 339 アミノ酸残基分短く、ダイニン 1HC 尾部の長さの約 2/3 程度である。この尾部領域の HC の配列の違いが尾部ドメインの形態の違いとして反映されている可能性が考えられる。ダイニン 1HC は尾部領域にドメイン構造をもつのに対し、ダイニン 2HC はドメイン構造をもたないのかもしれない。

2.3.9 ヒト細胞質ダイニン 1 尾部のサブドメイン構造

序論に述べたように、ダイニン 1 複合体は一種類で多様な機能を果たしている。これは、キネシンが細胞内での機能に対応した多くのサブクラスをもつのと対照的である。ダイ

ニン 1 複合体が多彩な機能を果たすには、制御タンパク質によってその活性を制御されることが重要であると考えられている。そのため、これらの制御タンパク質が結合する尾部ドメインは機能的にも重要な領域であると考えられる。そこで、ダイニン 1 の尾部ドメインの構築について調べた。

ヌクレオチド無し条件でネガティブ染色を行い、ダイニン 1 複合体の構造を観察したところ、2つの頭部ドメインが離れている様子が観察された(Fig. 36a)。さらに尾部ドメインについて着目すると、何らかのサブドメインがあることが見出された(Fig. 36b)。そこで、尾部のサブドメイン構造について調べるため、尾部ドメインの単粒子解析を行った。まず、二頭が開いている V 型の分子について画像を集めた(Fig. 36b)。ここで、頭部が開いている分子では、頭部の開き具合や、頭部ドメインの回転方向の自由度のため、分子全体の平均像を得ることは困難であった。そこで、頭部ドメインのマスクを行い、1,488 分子の尾部ドメインの画像を比較的多い数 (30 個) のクラスに分けることで尾部の平均像を得た。得られた平均像は、V 型の形状をとっており、それぞれが 3 つの領域から構成されていた(Fig. 36c)。ここで、この 3 つの領域を尾部の末端から順にドメイン 1、ドメイン 2、ドメイン 3 と呼称することとした(Fig. 36d)。開いている尾部の平均像において、各ドメインのおよその長さはドメイン 1; 約 10 nm, ドメイン 2; 約 10 nm, ドメイン 3; 約 7 nm であった。ドメイン 1 の部分では、尾部は完全に一体化しており、隣り合う 2 つのドメイン 2 どうしは隣接していた。また、2 つのドメイン 3 は離れていた(Fig. 36d)。

ダイニン 1 の電子顕微鏡観察の過程において、ダイニン 1 は、1 mM ADP・Vi 条件で二頭がスタックした形態をとることが見出された(Torisawa *et al.*, 2014) (Fig. 36e,f)。この形態を以下、スタック構造と呼称する。1 mM ADP・Vi 条件でスタック構造をとっていた分子の割合は 53.5%であり、ヌクレオチド無し条件の割合 26.8%の約二倍程度であった(ヒト細胞質ダイニン 1 の結果)。頭部が閉じた分子では、尾部全体も閉じていることが分かった(Fig. 36f)。スタック構造は、Amos が報告した ϕ 型構造に対応するものと考えられる(Amos,

1989)。ダイニン 1 のこの性質を応用し、閉じた尾部の平均像を得ることとした。スタック構造のダイニン 1 複合体は均質な構造をとっていたため、この形態のダイニン 1 分子について単粒子解析を行い、961 画像を 8 つのクラスに分類することで、分子全体の平均像を得ることができた(Fig. 36g, 37a)。二頭がスタックしたダイニン 1 の形態は大きく分けて 2 つの見え方があった(type-1, type-2) (Fig.36g, 37a)。ここで、細胞性粘菌の細胞質ダイニン 1 の頭部ドメインモノマーの結晶構造が報告されているが(Kon *et al.*, 2011; Kon *et al.*, 2012)、結晶のパッキングとして 2 つの頭部ドメインが結晶学的ダイマーを形成している。得られたスタック構造の平均像の頭部ドメインを、この結晶学的ダイマーと比較したところ、type-1 は結晶学的ダイマーをリング側面側からみた場合、type-2 はリング上面側からみた際の形態とよく類似していた(Torisawa *et al.*, 2014) (Fig. 37c)。さらに、尾部ドメインの平均像を洗練するために、頭部ドメインにマスクをし、尾部ドメインについてアライメントを行った(Fig. 37b)。得られた 2 種類の尾部の平均像は、尾部ドメインを異なる向きから見たものであると考えられる(Fig. 36h,i)。平均像において、尾部は type-1 で 26.7 nm、type-2 で 26.5 nm の棒状の構造をとっていた。閉じた尾部の平均像でも尾部ドメインは 3 つのサブドメインに分かれていた。また、頭部が開いているときの平均像とは異なり、頭部が閉じるに従って 2 つのドメイン 3 とうしが会合していることが分かった。閉じた尾部での 3 つドメインのおよその長さはドメイン 1; 約 10 nm, ドメイン 2; 約 10 nm, ドメイン 3; 約 7 nm であった。

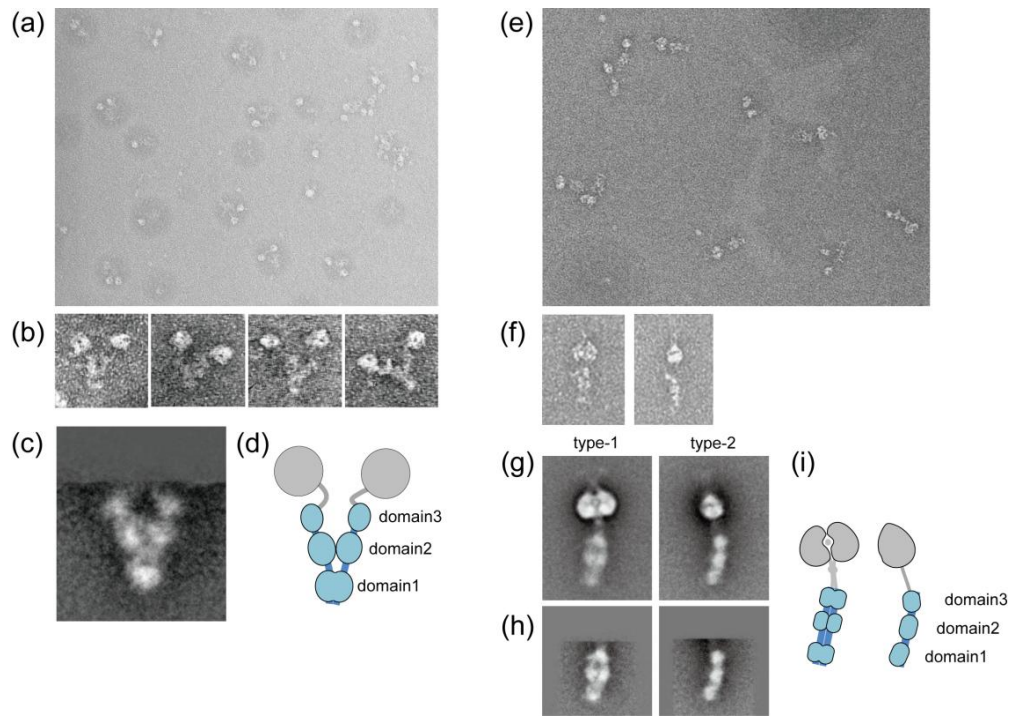


Fig.36 ダイニン 1 複合体の単粒子解析

- (a) ヌクレオチドを固定しない場合のダイニン 1 の全体像
- (b) ヌクレオチドを固定しない場合のダイニン 1 の個々の電頭像
- (c) 開いた尾部の平均像
- (d) 開いた尾部のサブドメインの模式図
- (e) ADP・Vi 条件でのダイニンの 1 の全体像
- (f) ADP・Vi 条件で二頭がスタックダイニン 1 の個々の電頭像
- (g) スタックしたダイニン 1 の分子全体の平均像
- (h) スタックしたダイニン 1 の尾部の平均像
- (i) スタックしたダイニン 1 のサブドメインの模式図

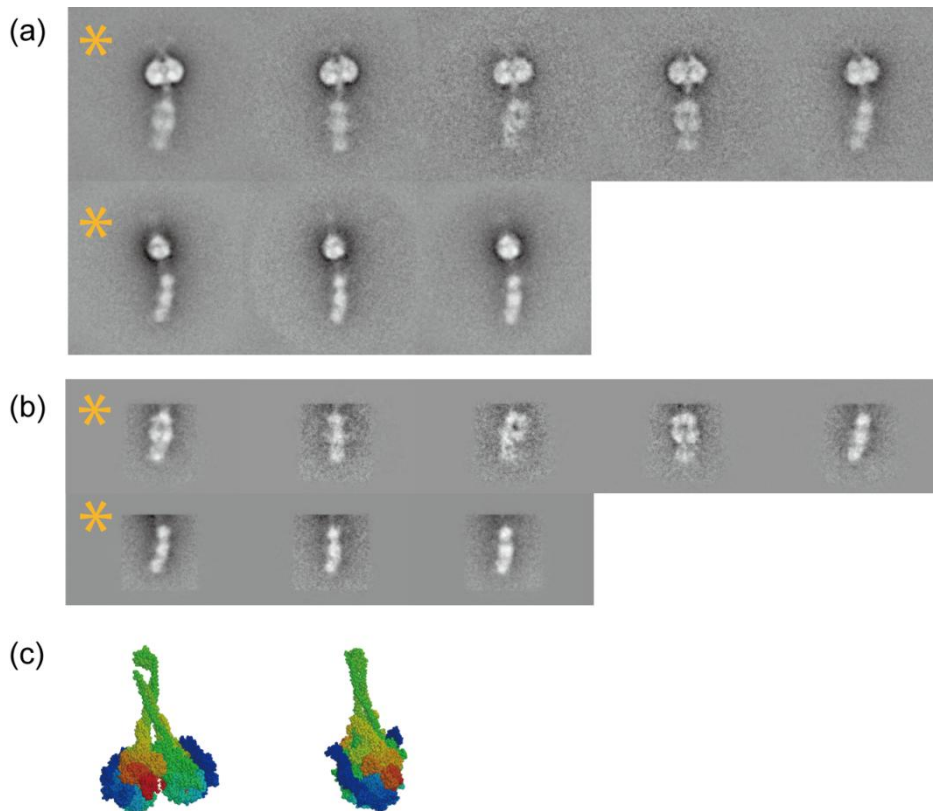


Fig. 37 スタックしたダイニン1の単粒子解析の結果

(a) スタックしたダイニン1の分子全体の平均像. 上段が Fig. 36 の type-1 に、下段が type-2 に対応する。オレンジのアスタリスクは、Fig. 36g に示した典型的なサブグループである。
 (b) スタックしたダイニン1の尾部についての平均像. (a)の分子全体の平均像の頭部ドメインをマスクし、尾部ドメインについてアラインメントした平均像を得た。オレンジのアスタリスクは、Fig. 36h に示した典型的なサブグループである。
 (c) 細胞性粘菌ダイニン1頭部の結晶学的ダイマー. リング側面側から見た場合(左)とリング上面側からみたとき(右)の頭部ドメインの結晶学的ダイマー(PDB:3VKH)。それぞれ type-1, type-2 に対応すると考えられる。

2.3.10 ヒト細胞質ダイニン1尾部サブユニットの分子構築

さらに、ダイニン1複合体の尾部のサブユニットの分子構築の詳細を明らかとするため、各サブユニット(HC, IC, LIC, LC)のN末またはC末に精製用 SBP-tag と Ni-NTA ナノ金粒子標識用に His-tag を付加したコンストラクトシリーズを構築した(Fig. 38a)。これらのコンストラクトを HEK293 細胞で発現し、各サブユニットのN末あるいはC末に導入した SBP-tag によって精製したところ、十分な純度でダイニン複合体が精製された。

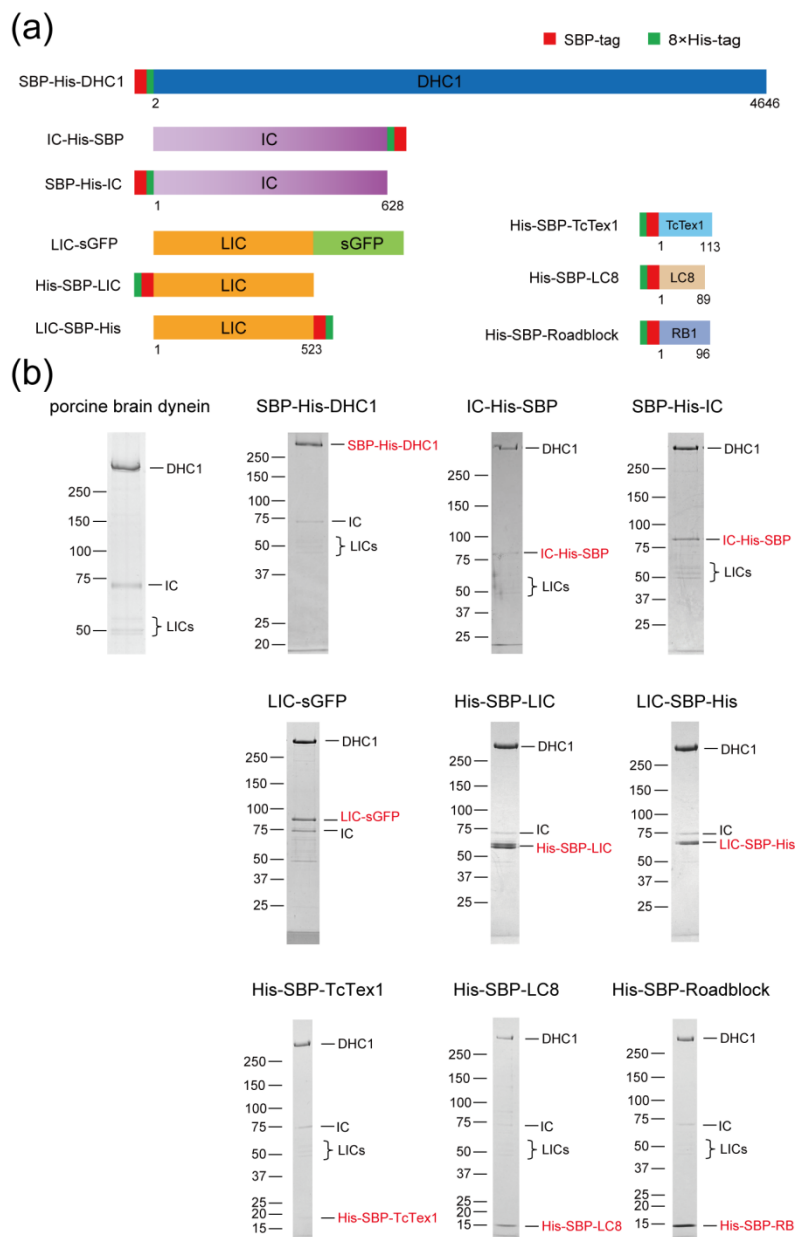


Fig. 38 尾部サブユニット位置同定用コンストラクト

(a) 尾部サブユニット位置同定用コンストラクトの概要. N 末あるいは C 末に精製用 SBP-tag と Ni-NTA ナノ金粒子標識用の His-tag が導入されている。(b) 尾部サブユニットの精製結果 各サブユニットに導入した SBP-tag によって十分な純度で精製できた。組換え体サブユニットのバンドについては赤文字で示す。

精製された各コンストラクトについてそれぞれ金粒子標識を行ったところ、各コンストラクトで異なる金粒子の局在がみられた(Fig. 39a-h)。HC の N 末(SBP-His-DHC1-full)では、Ni-NTA ナノ金粒子が尾部の末端付近に結合している様子が観察された(Fig. 39a)。IC の N 末・C 末をそれぞれ金粒子標識した場合、IC の N 末(SBP-His-IC)では尾部の頭部側が、IC の C 末(IC-His-SBP)では尾部の末端側がそれぞれ金粒子標識された(Fig. 38b,c)。LIC の N 末(His-SBP-LIC)では尾部の頭部側が金粒子標識され(Fig. 38d)、LIC の C 末(LIC-SBP-His)では、尾部の中央付近に幅広く結合がみられた(Fig. 39e)。LC8 の N 末(His-SBP-LC8), TcTex1 の N 末(His-SBP-TcTex1)を金粒子標識したところ尾部の頭部側への結合がみられ(Fig. 39f,g)、また、Roadblock の N 末(His-SBP-Roadblock)を金粒子標識したところ、尾部の中央付近に結合がみられた。

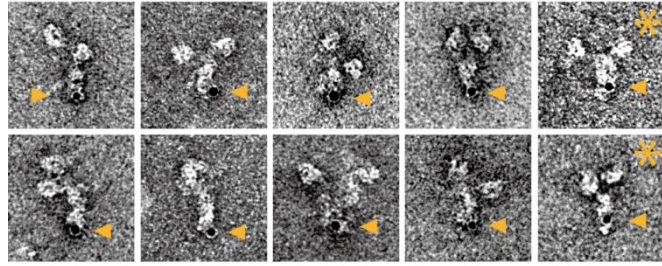
各サブユニットの位置関係を調べるため、尾部末端から金粒子中心までの距離を尾部全体の長さに対する割合(%)として定量し(Fig. 40, Table 4)、平均像の長さ(Fig. 36h, type-1)と金粒子の尾部の中での割合からその位置情報を求めた(Table 4)。HC の N 末(SBP-His-DHC1-full)のピークの位置は尾部の末端から 5.8 ± 2.8 nm の位置であった(Table 4)。IC の N 末のピークは 21.1 ± 2.7 nm であり(Table 4)、IC の C 末のピークは 7.6 ± 1.8 nm であった(Table 4)。LIC の N 末(His-SBP-LIC)では金粒子の位置のピークは 21.5 ± 2.3 nm であった(Table 4)。LIC の C 末(LIC-SBP-His)では、金粒子の位置のピークは 14.9 ± 7.1 nm であった(Table 4)。LC8 の N 末(His-SBP-LC8), TcTex1 の N 末(His-SBP-TcTex1)の金粒子の位置のピークはそれぞれ 21.2 ± 2.2 nm, 22.2 ± 2.2 nm であった。また、Roadblock の N 末(His-SBP-Roadblock)での金粒子の位置のピークは 16.7 ± 4.1 nm となった(Table 4)。

HC, IC, LIC, LC8, TcTex1 の N 末では、尾部末端から 5-11 nm 程度の領域にも金粒子の結合が観察された(Fig. 39a,b,d,f,g のアスタリスク)。このピークは、メジャーなピークに比べて割合が低かった(Fig. 40)こと、及び、複数のコンストラクトで観察されたことから、特

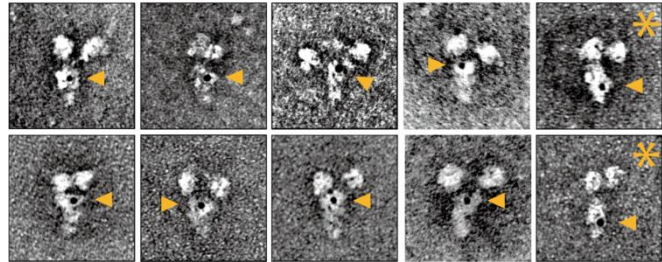
異的な結合ではなく非特異的な結合であると考えている。この領域で構造的にヒスチジン残基が多くなっていて、His-tagのように働き、Ni-NTA ナノ金粒子が結合しやすかったと推測される。IC の C 末のピークはこの領域と重なっているが、金粒子の標識率を比較したところ、His-tag を含まないコンストラクト(LIC-sGFP)の標識率が 11.0%だったのに比べ、IC-His-SBP の標識率が 28.5%と高かったため、特異的な結合であると考えている。

さらに、サブユニットとサブドメインの位置の対応を調べたところ、ドメイン 1 には HC の N 末, IC の C 末が、ドメイン 2 には LIC の C 末, Roadblock の N 末が、ドメイン 3 には IC の N 末, TeTex1 の N 末, LC8 の N 末が存在していることがわかった(Fig. 41a)。これらの結果をまとめたダイニン 1 尾部サブユニットの分子構築のモデル図を Fig. 39b に提案する。

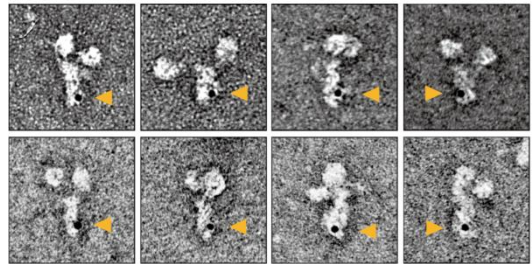
(a) SBP-His-DHC1-full



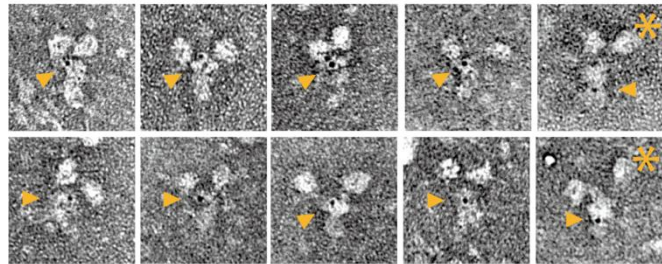
(b) SBP-His-IC



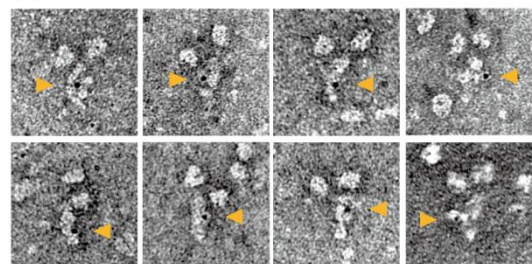
(c) IC-His-SBP



(d) His-SBP-LIC



(e) LIC-SBP-His



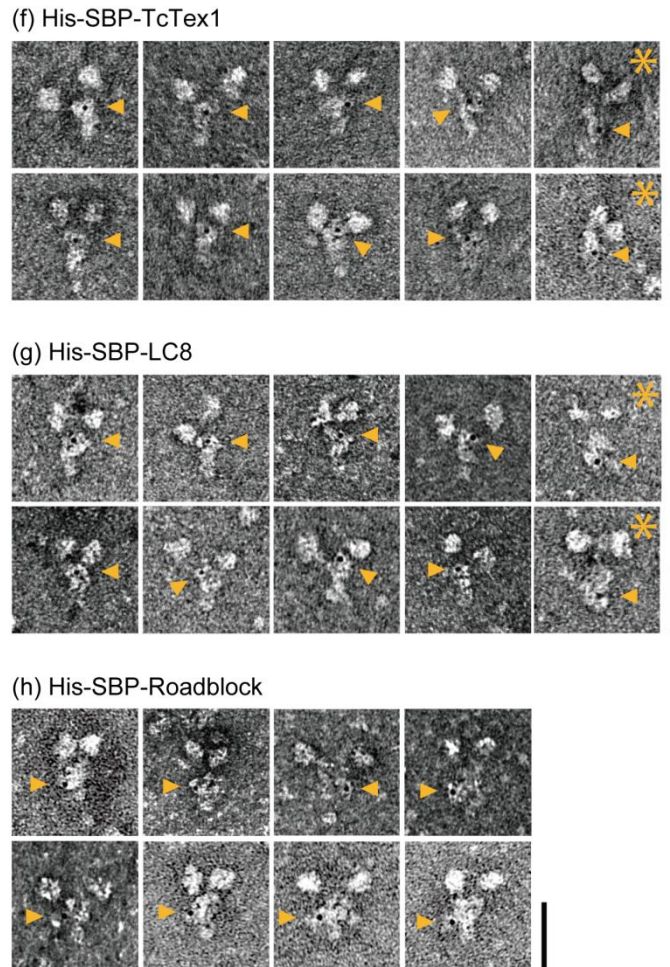


Fig.39 金粒子標識の電顕像

(a) SBP-His-DHC1-full の金粒子標識の電顕像

(b) SBP-His-IC の金粒子標識の電顕像

(c) IC-His-SBP の金粒子標識の電顕像

(d) His-SBP-LIC の金粒子標識の電顕像

(e) LIC-SBP-His の金粒子標識の電顕像

(f) His-SBP-TcTex1 の金粒子標識の電顕像

(g) His-SBP-LC8 の金粒子標識の電顕像

(h) His-SBP-Roadblock の金粒子標識の電顕像

オレンジの矢じりは金粒子の位置を示す。

オレンジのアスタリスクは複数のコンストラクトでみられた domain-1 付近への金粒子の結合を表す。スケールバーは 50 nm である。

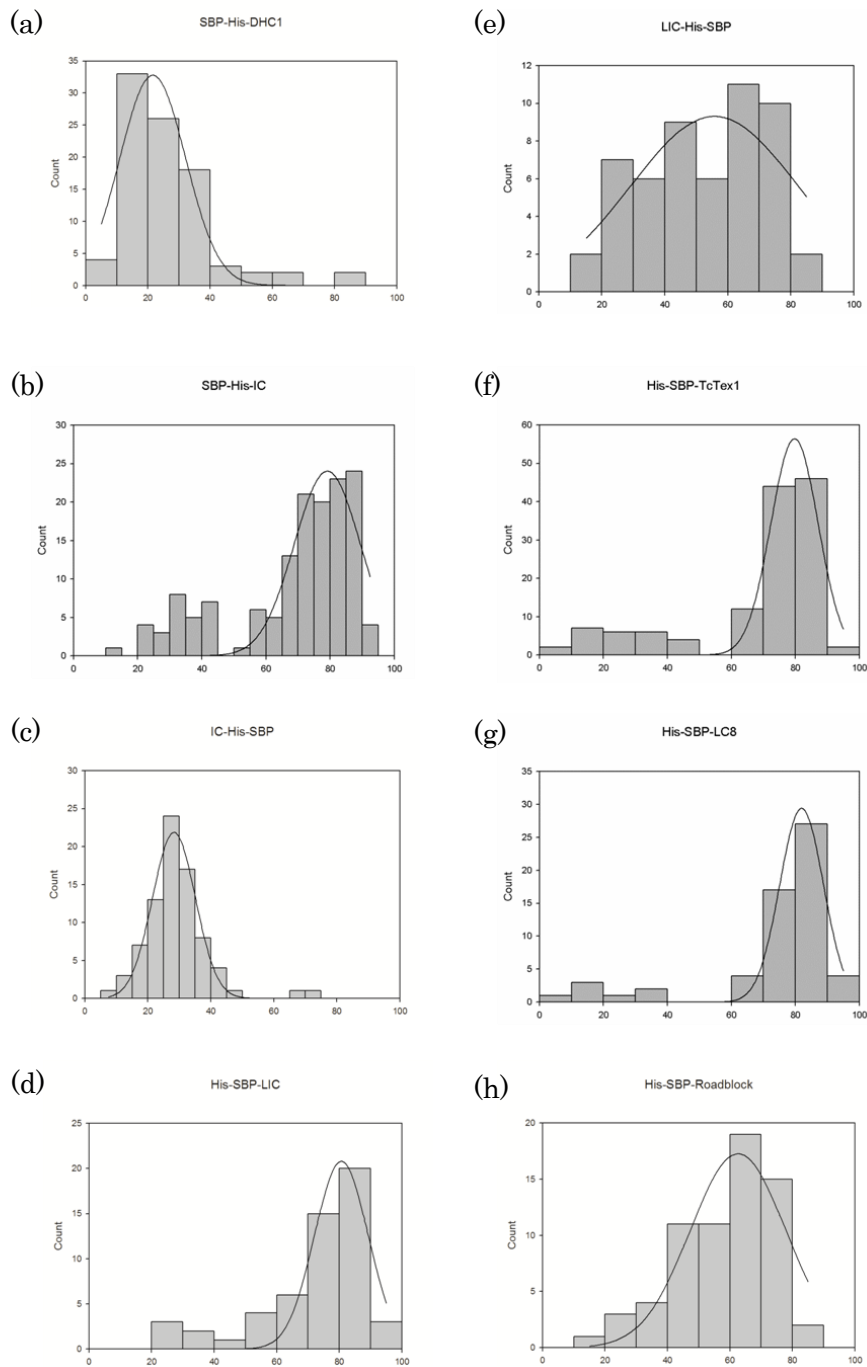


Fig.40 金粒子の尾部の中での位置(%)

(a) SBP-His-DHC1-full. (b) SBP-His-IC. (c) IC-His-SBP. (d) His-SBP-LIC.

(e) LIC-SBP-His. (f) His-SBP-TcTex1. (g) His-SBP-LC8. (h) His-SBP-Roadblock.

各ダイニン分子の電頭像について、尾部末端から金粒子中心までの距離と尾部の長さを測定し、尾部の中での位置を割合として求めた。

Table 4 各サブユニットの金粒子の位置

	金粒子の位置のピーク (mean±SD)	金粒子の位置のピーク (mean±SD)	ドメインとの対応
	尾部の中での割合	尾部末端からの距離	
SBP-His-DHC1-full	21.5 ± 10.6%	5.75 ± 2.82 nm	ドメイン1
SBP-His-IC	79.1 ± 10.2%	21.1 ± 2.73 nm	ドメイン3
IC-His-SBP	28.3 ± 6.81%	7.55 ± 1.82 nm	ドメイン1
His-SBP-LIC	80.6 ± 8.58%	21.5 ± 2.29 nm	ドメイン3
LIC-SBP-His	55.7 ± 26.5%	14.9 ± 7.07 nm	ドメイン2
His-SBP-TcTex1	79.3 ± 8.26%	21.2 ± 2.21 nm	ドメイン3
His-SBP-LC8	83.3 ± 8.23%	22.2 ± 2.20 nm	ドメイン3
His-SBP-Roadblock	62.6 ± 15.3%	16.7 ± 4.09 nm	ドメイン2

Fig.40 で gaussian で fit した値からピークの値を決定し、尾部末端からの距離に換算した。電子顕微鏡のスケールを tubulin の周期 4.1 nm で合わせているため、本文中では小数第一位までの値を載せた。

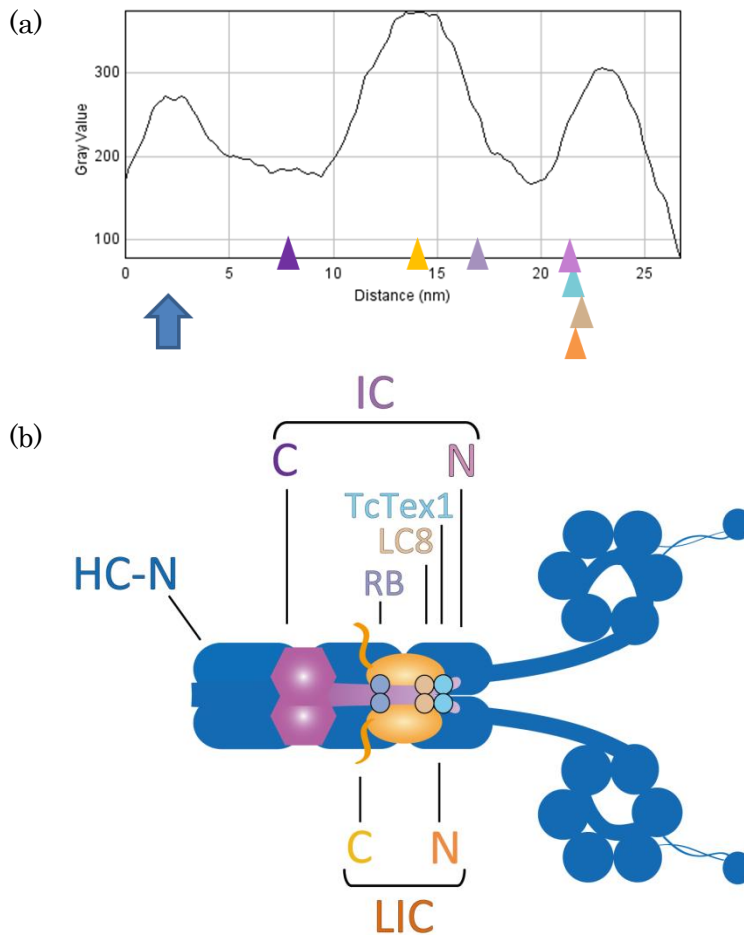


Fig.41 ダイニン 1 尾部ドメインのサブユニットの分子構築

(a) 尾部のサブドメインとサブユニットの位置関係。各サブユニットの金粒子の位置のピークを平均像の輝度から作成したプロット上にマッピングした。(b) 尾部サブユニットの分子構築のモデル図

2.3.11 ヒト細胞質ダイニン 1 尾部サブユニットの分子構築についての考察

重鎖 N 末を金粒子標識した結果、金粒子のピークは尾部末端から 5.8 ± 2.8 nm となった。これは、必ずしも重鎖 N 末が尾部の内側にあることを意味しない。重鎖 N 末の標識に用いた Ni-NTA ナノ金粒子が 4.3 nm であるため、その半径分(2.2 nm 程度)はずれが生じる可能性があるためである。また、尾部の端から突出した金粒子も観察された(Fig. 39a)ことから、重鎖 N 末は尾部の末端にあることが推測される(Fig. 41a,b)。ダイニン 1 重鎖の N 末が尾部の末端付近にあることから、ダイニン 1 重鎖は尾部全体に渡って IC, LIC の結合の足場となっていることが分かる。

IC は、ドメイン 1 からドメイン 3 に渡って存在しており、C 末をドメイン 1、N 末をドメイン 3 に向けて結合していることが分かった(Fig. 41a,b)。これは、先行研究の想定モデル(Fig. 27)とは逆向きであった。IC の N 末側に結合する LC8, TeTex1 を金粒子標識したところドメイン 3 への局在がみられ、IC の中央付近に結合する Roadblock を金粒子標識したところドメイン 2 への局在がみられた結果は、この IC の配向を支持する結果である(Fig. 41b)。IC の N 末にはダイナクチンの p150 が結合することが知られているが、IC がこの配向で尾部ドメインに結合している場合、ダイナクチンが尾部ドメイン内の頭部モータードメインに近い位置に結合することとなる。p150 が IC の N 末を介してドメイン 3 付近に結合することで、頭部ドメインに何らかの構造変化が伝わり、ダイニン 1 の運動様式が制御される可能性が考えられる。また、Ndel は、IC の N 末, LC8 に結合するが、IC の N 末と LC8 がダイニン尾部内で位置的に近いという本研究結果は、これと矛盾しないものである。

LIC は、ドメイン 2 の後半からドメイン 3 に渡って結合していると考えられる。これは、ごく最近報告された LIC の保存された N 末側の Ras タンパク質様ドメインのサイズとも大きくは矛盾しない(結晶構造でみえている領域の N 末と C 末の距離が 5.1 nm) (Schroeder *et al.*, 2014)。LIC の C 末の金粒子標識の結果、金粒子のピークの位置が 14.9 ± 7.1 nm と他のサブユニットの金粒子標識の結果と比べて SD が大きく、ブロードなピークを示した。

ここで、LICのC末領域は天然変性領域となっていることが予測されており(Schroeder *et al.*, 2014)、LICのC末は尾部の中で特定の位置に定まっておらず、揺らいでいる可能性がある(Fig. 41b)。

ドメイン3の中には、ICのN末、TcTex1のN末、LC8のN末、LICのN末が存在していることは分かったが、これらの位置のピークの差はSDの範囲内であり、ドメイン3の中でこれらのサブユニットの位置関係までは本研究結果からは特定できなかった。今後、結晶構造解析などを行い、さらに高分解能での構造解析を行うことでこれらのサブユニットの位置関係を確実に示すことができるだろう。

2.3.12 尾部の開閉とサブドメインの関係についての考察

電子顕微鏡観察の結果、ダイニン1の頭部ドメインは、開いた状態と二頭がスタックした状態の二状態をとりうるということが分かった。この遷移は、先行研究とも一致している(Amos, 1989)。また、尾部ドメインについても開いた形態と閉じた形態をとることが分かった。単粒子標識の結果、開いた尾部・閉じた尾部ともに十分な平均像を得ることができ、どちらの場合でも3つのサブドメインから構成されていることが明らかとなった。

これまで、ダイニン全長の単粒子解析は、単頭のクラミドモナス内腕ダイニンcに限られており(Burgess *et al.*, 2003)、細胞質ダイニンでは、頭部ドメインのみコンストラクトについてしか単粒子解析は行われていなかった(Samsó *et al.*, 1998; Samsó and Koonce 2004; Roberts *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2012; Roberts *et al.*, 2012)。本研究において、ホモダイマーであるダイニン1の尾部ドメインの平均像を初めて得たものである。

ドメイン1の領域では、尾部の状況に関わらず常に2つのホモダイマーが結合しており、この領域でダイニン1重鎖の二量体化が安定的に起こっていることが予想される。ドメイン3では、尾部ホモダイマーは安定的な結合をしておらず、分離した状態をとりうる。

ICのRoadblock結合領域とLC8結合領域の間には、ICの二量体化領域がある。このIC

の二量体化領域は、ドメイン 2-3 の領域に存在することが予想される(Fig. 40b)。また、LIC もドメイン 2-3 の領域に存在すると考えられる(Fig. 40b)。これは、IC, LIC がダイニン複合体の安定化に寄与しているという先行研究の見解(Troster *et al.*, 2012)とも矛盾しない。IC, LIC のいずれかを欠いたダイニン 1 複合体では、尾部の末端(本研究でのドメイン 1 領域付近)以外の領域で会合が起きにくく、尾部の頭部側領域(本研究でのドメイン 2-3 領域)で尾部ドメインが開裂してしまうことが電子顕微鏡観察から明らかとなっている(Troster *et al.*, 2012)。これは、ドメイン 2-3 の領域で IC, LIC の二量体化が起こることで、ダイニン 1 複合体の尾部が適切な構造をとるのを補助していたためと考えられる。

IC の N 末領域は、通常は α -helix をとるが、ダイナクチンサブユニットの p150 と結合することでコイルドコイルをとり二量体化することが知られている(Morgan *et al.*, 2011)。IC の N 末はドメイン 3 にあり、IC の二量体化が尾部の開閉を制御している可能性が考えられる。

本研究から、各サブユニットが 3 つのサブドメインのどこに対応するかを特定することができた。しかしながら、完全に尾部ドメインの構造を理解するためには、重鎖のどの領域が 3 つのサブドメインに対応するかを調べることも重要である。今後さらに、本研究で構築したダイニン重鎖の組換え体発現系を用いることで、ダイニン 1 重鎖の各所に構造解析用に GFP などのタグを挿入した上で単粒子解析を行うことで、ダイニン 1 重鎖の配列とサブドメインの対応を明らかとすることができるだろう。

総括

本研究では、電子顕微鏡観察を用いて、外腕ダイニン複合体および細胞質ダイニンのサブユニットの分子構築を調べた。この過程で、軸糸ダイニンおよび細胞質ダイニンの組換え体の発現系をそれぞれ構築した。

ダイニン 1 とダイニン 2 の尾部ドメインの構造の違いは本研究のアプローチを用いることで初めて明らかとなったものである。また、ダイニン 2 については *in vitro* での運動活性を初めて示すことができた。本研究で構築したヒト細胞質ダイニン重鎖の発現系は、これまで酵母や細胞性粘菌に限られていたダイニン重鎖の発現系の枠組みを広げ、特に哺乳類のダイニン研究の可能性を大きく拓いたものである。HEK 細胞を用いた発現系で人為的に構築したヒトダイニン重鎖変異体を得ることも初めて可能となった。すでに、本研究で構築した細胞質ダイニン 1 重鎖の発現系を用いてダイニン 1 の運動様式と構造の関係を明らかとすることもできた(Torisawa *et al.*, 2014)。本研究で構築した組換え体ダイニン重鎖の発現系は、ダイニンの運動機構・構造を調べる上で必要不可欠なものであり、今後さらに細胞質ダイニンの研究を発展させるものだと確信している。

テトラヒメナでの形質転換を用いた軸糸ダイニン複合体の組換え体の発現についても、今後大きく発展することが予想される。これまで、巨大な軸糸ダイニン重鎖を遺伝子組換えによって操作する手段がなかったため、軸糸ダイニンの理解はクラミドモナスの欠損株を用いた研究によるところが大きかった。今後、本研究で構築したテトラヒメナの相同組み換えによる組換え体発現の系を応用し、ダイニン重鎖の組換え体をテトラヒメナ内で発現させることができるだろう。重鎖に変異を入れた組換え体軸糸ダイニン複合体を精製し、*in vitro*での運動活性を調べることでその運動機構を調べるのが可能である。また、近年、軸糸 3 次元構造がクライオ電子線トモグラフィーによって調べられているが、600 種類以上の軸糸を構成するタンパク質の局在はほとんど明らかとなっていない。本研究で用いた相同組み換えによるタグ付加を応用することで、軸糸構成タンパク質に構造解析用のタグを

付加して構造解析を行うことで、その位置を同定することができるだろう。

本研究において、Ni-NTA ナノ金粒子標識・単粒子解析と組み合わせた解析を行うことで、外腕ダイニン複合体では、LC1 が γ 重鎖の MTBD 領域に結合することを明らかにした。また、細胞質 1 ダイニン尾部のサブドメイン構造と、サブユニットとの対応を明らかにすることができた。LC1 についてはこれまで外腕ダイニン複合体の運動を制御することが知られていたが、その機構については明らかとなっていなかった。本研究で得られた構造的基盤から、LC1 が外腕ダイニンの微小管へのアフィニティーを制御することで活性を制御する可能性が示唆され、生化学的手法によってこのモデルが正しかったことも確認できた。また、ダイニン 1 尾部サブユニットの分子構築を明らかとすることで、制御タンパク質が結合する領域が尾部の中の頭部モータードメインに近い領域に結合することが明らかとなった。これらのサブユニットが機能を果たすうえで理に適ったサブユニットの分子構築になっていると考えられる。

Ni-NTA ナノ金粒子による標識は、ダイニンのような巨大な複合体中でのサブユニットの位置同定に有用であった。また、本研究において、ダイニン複合体中のサブユニットの分子構築を理解することで、その制御機構を明らかにする上で重要な構造的基盤を提示することができたことは非常に意義がある。今後、Ni-NTA ナノ金粒子標識や単粒子解析などの手法を応用することで、さらに、ダイニン・ダイナクチン複合体のような、制御タンパク質とダイニンとの複合体の分子構築を明らかとし、ダイニンの運動制御機構の詳細について明らかとすることも可能だろう。

参考文献

- Alonso, C., Miskin, J., Hernáez, B., Fernandez-Zapatero, P., Soto, L., Cantó, C., Rodríguez-Crespo, I., Dixon, L., & Escribano, J. M. (2001). African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein. *Journal of Virology*, *75*(20), 9819-9827.
- Amos, L. A. (1989). Brain dynein crossbridges microtubules into bundles. *Journal of Cell Science*, *93*(1), 19-28.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., & Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, *22*(2), 195-201.
- Asante, D., Stevenson, N. L., & Stephens, D. J. (2014). Subunit composition of the human cytoplasmic dynein-2 complex. *Journal of Cell Science*, *127*(21), 4774-4787.
- Baker, T. S., & Amos, L. A. (1978). Structure of the tubulin dimer in zinc-induced sheets. *Journal of Molecular Biology*, *123*(1), 89-106.
- Barbar, E. (2012). Native disorder mediates binding of dynein to NudE and dynactin. *Biochemical Society Transactions*, *40*(5), 1009.
- Barkalow, K., Hamasaki, T., & Satir, P. (1994). Regulation of 22S dynein by a 29-kD light chain. *The Journal of Cell Biology*, *126*(3), 727-735.
- Baron, D. M., Kabututu, Z. P., & Hill, K. L. (2007). Stuck in reverse: loss of LC1 in *Trypanosoma brucei* disrupts outer dynein arms and leads to reverse flagellar beat and backward movement. *Journal of Cell Science*, *120*(9), 1513-1520.
- Benashski, S. E., Patel-King, R. S., & King, S. M. (1999). Light chain 1 from the *Chlamydomonas* outer dynein arm is a leucine-rich repeat protein associated with the motor domain of the γ heavy chain. *Biochemistry*, *38*(22), 7253-7264.
- Besschetnova, T. Y., Kolpakova-Hart, E., Guan, Y., Zhou, J., Olsen, B. R., & Shah, J. V.

(2010). Identification of signaling pathways regulating primary cilium length and flow-mediated adaptation. *Current Biology*, 20(2), 182-187.

Burgess, S. A., Walker, M. L., Sakakibara, H., Knight, P. J., & Oiwa, K. (2003). Dynein structure and power stroke. *Nature*, 421(6924), 715-718.

Carter, A. P., Garbarino, J. E., Wilson-Kubalek, E. M., Shipley, W. E., Cho, C., Milligan, R. A., Vale, R. D. & Gibbons, I. R. (2008). Structure and functional role of dynein's microtubule-binding domain. *Science*, 322(5908), 1691-1695.

Carter, A. P., Cho, C., Jin, L., & Vale, R. D. (2011). Crystal structure of the dynein motor domain. *Science*, 331(6021), 1159-1165.

Conway, J. F., & Steven, A. C. (1999). Methods for reconstructing density maps of "single" particles from cryoelectron micrographs to subnanometer resolution. *Journal of Structural Biology*, 128(1), 106-118.

Dagoneau, N., Goulet, M., Geneviève, D., Sznajder, Y., Martinovic, J., Smithson, S., Huber, C., Baujat, G., Flori, E., Tecco, L., Cavalcanti, D., Delezoide, A.-L., Serre, V., Merrer, M. L., Munnich, A. & Cormier-Daire, V. (2009). *DYNC2H1* Mutations Cause Asphyxiating Thoracic Dystrophy and Short Rib-Polydactyly Syndrome, Type III. *The American Journal of Human Genetics*, 84(5), 706-711.

Dave, D., Wloga, D., & Gaertig, J. (2009). Manipulating Ciliary Protein-Encoding Genes in *Tetrahymena thermophila*. *Methods in Cell Biology*, 93, 1-20.

Dawe, H. R., Smith, U. M., Cullinane, A. R., Gerrelli, D., Cox, P., Badano, J. L., Blair-Reid, S., Sriram, N., Katsanis, N., Attie-Bitach, T., Afford, S. C., Copp, A. J., Kelly, D. A., Gull, K. & Johnson, C. A. (2007). The Meckel-Gruber syndrome proteins MKS1 and meckelin interact and are required for primary cilium formation. *Human Molecular Genetics*, 16(2), 173-186.

Delaval, B., Bright, A., Lawson, N. D., & Doxsey, S. (2011). The cilia protein IFT88 is required for spindle orientation in mitosis. *Nature Cell Biology*, 13(4), 461-468.

DeWitt, M. A., Chang, A. Y., Combs, P. A., & Yildiz, A. (2012). Cytoplasmic dynein moves

through uncoordinated stepping of the AAA+ ring domains. *Science*, 335(6065), 221-225.

Eschbach, J., & Dupuis, L. (2011). Cytoplasmic dynein in neurodegeneration. *Pharmacology & Therapeutics*, 130(3), 348-363.

Essner, J. J., Vogan, K. J., Wagner, M. K., Tabin, C. J., Yost, H. J., & Brueckner, M. (2002). Left-right development: Conserved function for embryonic nodal cilia. *Nature*, 418(6893), 37-38.

Farkasovsky, M., & Küntzel, H. (2001). Cortical Num1p interacts with the dynein intermediate chain Pac11p and cytoplasmic microtubules in budding yeast. *The Journal of Cell Biology*, 152(2), 251-262.

Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M., & Leith, A. (1996). SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *Journal of Structural Biology*, 116(1), 190-199.

Furuta, A., Yagi, T., Yanagisawa, H. A., Higuchi, H., & Kamiya, R. (2009). Systematic comparison of in vitro motile properties between *Chlamydomonas* wild-type and mutant outer arm dyneins each lacking one of the three heavy chains. *Journal of Biological Chemistry*, 284(9), 5927-5935.

Gee, M. A., Heuser, J. E., & Vallee, R. B. (1997). An extended microtubule-binding structure within the dynein motor domain. *Nature*, 390(6660), 636-639.

Gerdes, J. M., Liu, Y., Zaghoul, N. A., Leitch, C. C., Lawson, S. S., Kato, M., Beachy, P. A., Beales, P. L., DeMartino, G. N., Fisher, S., Badano, J. L. & Katsanis, N. (2007). Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response. *Nature Genetics*, 39(11), 1350-1360.

Gibbons, B. H., Asai, D. J., Tang, W. J., Hays, T. S., & Gibbons, I. R. (1994). Phylogeny and expression of axonemal and cytoplasmic dynein genes in sea urchins. *Molecular Biology of the Cell*, 5(1), 57-70.

Gibbons, I. R., Garbarino, J. E., Tan, C. E., Reck-Peterson, S. L., Vale, R. D., & Carter, A.

- P. (2005). The affinity of the dynein microtubule-binding domain is modulated by the conformation of its coiled-coil stalk. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(25), 23960-23965.
- Goetz, S. C., & Anderson, K. V. (2010). The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nature Reviews Genetics*, *11*(5), 331-344.
- Goodenough, U., & Heuser, J. (1984). Structural comparison of purified dynein proteins with *in situ* dynein arms. *Journal of Molecular Biology*, *180*(4), 1083-1118.
- Goodenough, U. W., Gebhart, B., Mermall, V., Mitchell, D. R., & Heuser, J. E. (1987). High-pressure liquid chromatography fractionation of *Chlamydomonas* dynein extracts and characterization of inner-arm dynein subunits. *Journal of Molecular Biology*, *194*(3), 481-494.
- Grissom, P. M., Vaisberg, E. A., & McIntosh, J. R. (2002). Identification of a novel light intermediate chain (D2LIC) for mammalian cytoplasmic dynein 2. *Molecular Biology of the Cell*, *13*(3), 817-829.
- Guo, L., Fu, C., & Miao, W. (2008). Cloning, characterization, and gene expression analysis of a novel cadmium metallothionein gene in *Tetrahymena pigmentosa*. *Gene*, *423*(1), 29-35.
- Hackney, D. D., Levitt, J. D., & Suhan, J. (1992). Kinesin undergoes a 9 S to 6 S conformational transition. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(12), 8696-8701.
- Hamasaki, T., Barkalow, K., Richmond, J., & Satir, P. (1991). cAMP-stimulated phosphorylation of an axonemal polypeptide that copurifies with the 22S dynein arm regulates microtubule translocation velocity and swimming speed in *Paramecium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(18), 7918-7922.
- Horváth, J., Fliegau, M., Olbrich, H., Kispert, A., King, S. M., Mitchison, H., Zariwala, M. A., Knowles, M. R., Sudbrak, R., Fekete, G., Neesen, J., Reinhardt, R., & Omran, H. (2005). Identification and analysis of axonemal dynein light chain 1 in primary ciliary dyskinesia patients. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *33*(1), 41-47.

- Hou, Y., Pazour, G. J., & Witman, G. B. (2004). A dynein light intermediate chain, D1bLIC, is required for retrograde intraflagellar transport. *Molecular Biology of the Cell*, *15*(10), 4382-4394.
- Huang, J., Roberts, A. J., Leschziner, A. E., & Reck-Peterson, S. L. (2012). Lis1 acts as a “clutch” between the ATPase and microtubule-binding domains of the dynein motor. *Cell*, *150*(5), 975-986.
- Huangfu, D., & Anderson, K. V. (2005). Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(32), 11325-11330.
- Kardon, J. R., & Vale, R. D. (2009). Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *10*(12), 854-865.
- Karki, S., & Holzbaur, E. L. (1995). Affinity chromatography demonstrates a direct binding between cytoplasmic dynein and the dynactin complex. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(48), 28806-28811.
- Karki, S., & Holzbaur, E. L. (1999). Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Current Opinion in Cell Biology*, *11*(1), 45-53.
- Kataoka, K., Schoeberl, U. E., & Mochizuki, K. (2010). Modules for C-terminal epitope tagging of *Tetrahymena* genes. *Journal of Microbiological Methods*, *82*(3), 342-346.
- King, S. J., & Schroer, T. A. (1999). Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nature Cell Biology*, *2*(1), 20-24.
- King, S. M., & Patel-King, R. S. (2012). Functional architecture of the outer arm dynein conformational switch. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(5), 3108-3122.
- Kitai, T., Watanabe, Y., Toyoshima, Y. Y., Kobayashi, T., Murayama, T., Sakaue, H., Suzuki, H. and Takahagi, T. (2011). Simple Method of Synthesizing Nickel-Nitrilotriacetic Acid Gold Nanoparticles with a Narrow Size Distribution for Protein Labeling. *Japanese Journal of Applied Physics*, *50*(9), 095002.

Kobayashi, T., Morone, N., Kashiyama, T., Oyamada, H., Kurebayashi, N., & Murayama, T. (2008). Engineering a novel multifunctional green fluorescent protein tag for a wide variety of protein research. *PLoS One*, *3*(12), e3822.

Kobayashi, T., & Murayama, T. (2009). Cell cycle-dependent microtubule-based dynamic transport of cytoplasmic dynein in mammalian cells. *PLoS One*, *4*(11), e7827.

Kodera, N., Yamamoto, D., Ishikawa, R., & Ando, T. (2010). Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature*, *468*(7320), 72-76.

Kon, T., Nishiura, M., Ohkura, R., Toyoshima, Y. Y., & Sutoh, K. (2004). Distinct functions of nucleotide-binding/hydrolysis sites in the four AAA modules of cytoplasmic dynein. *Biochemistry*, *43*(35), 11266-11274.

Kon, T., Imamula, K., Roberts, A. J., Ohkura, R., Knight, P. J., Gibbons, I. R., Burgess, S. A., & Sutoh, K. (2009). Helix sliding in the stalk coiled coil of dynein couples ATPase and microtubule binding. *Nature Structural & Molecular Biology*, *16*(3), 325-333.

Kon, T., Sutoh, K., & Kurisu, G. (2011). X-ray structure of a functional full-length dynein motor domain. *Nature Structural & Molecular Biology*, *18*(6), 638-642.

Kon, T., Oyama, T., Shimo-Kon, R., Imamula, K., Shima, T., Sutoh, K., & Kurisu, G. (2012). The 2.8 Å crystal structure of the dynein motor domain. *Nature*, *484*(7394), 345-350.

Krock, B. L., Mills-Henry, I., & Perkins, B. D. (2009). Retrograde intraflagellar transport by cytoplasmic dynein-2 is required for outer segment extension in vertebrate photoreceptors but not arrestin translocation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *50*(11), 5463-5471.

Kurkowiak, M., Ziętkiewicz, E., & Witt, M. (2014). Recent advances in primary ciliary dyskinesia genetics. *Journal of Medical Genetics*, jmedgenet-2014.

Kutomi, O., Hori, M., Ishida, M., Tominaga, T., Kamachi, H., Koll, F., Cohen, J., Yamada, N., & Noguchi, M. (2012). Outer Dynein Arm Light Chain 1 Is Essential for Controlling

the Ciliary Response to Cyclic AMP in *Paramecium tetraurelia*. *Eukaryotic Cell*, *11*(5), 645-653.

Kuznetsov, S. A., Vaisberg, Y. A., Rothwell, S. W., Murphy, D. B., & Gelfand, V. I. (1989). Isolation of a 45-kDa fragment from the kinesin heavy chain with enhanced ATPase and microtubule-binding activities. *Journal of Biological Chemistry*, *264*(1), 589-595.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680-685.

Lo, K. W. H., Naisbitt, S., Fan, J. S., Sheng, M., & Zhang, M. (2001). The 8-kDa dynein light chain binds to its targets via a conserved (K/R) XTQT motif. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(17), 14059-14066.

Mallik, R., Carter, B. C., Lex, S. A., King, S. J., & Gross, S. P. (2004). Cytoplasmic dynein functions as a gear in response to load. *Nature*, *427*(6975), 649-652.

Mazor, M., Alkrinawi, S., Chalifa-Caspi, V., Manor, E., Sheffield, V. C., Aviram, M., & Parvari, R. (2011). Primary Ciliary Dyskinesia Caused by Homozygous Mutation in *DNAL1*, Encoding Dynein Light Chain 1. *The American Journal of Human Genetics*, *88*(5), 599-607.

McDonnell, A. V., Jiang, T., Keating, A. E., & Berger, B. (2006). Paircoil2: improved prediction of coiled coils from sequence. *Bioinformatics*, *22*(3), 356-358.

McKenney, R. J., Weil, S. J., Scherer, J., & Vallee, R. B. (2011). Mutually exclusive cytoplasmic dynein regulation by NudE-Lis1 and dynactin. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(45), 39615-39622.

McNaughton, L., Tikhonenko, I., Banavali, N. K., LeMaster, D. M., & Koonce, M. P. (2010). A low affinity ground state conformation for the Dynein microtubule binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(21), 15994-16002.

Mikami, A., Tynan, S. H., Hama, T., Luby-Phelps, K., Saito, T., Crandall, J. E., Besharse, J. C. & Vallee, R. B. (2002). Molecular structure of cytoplasmic dynein 2 and its distribution in neuronal and ciliated cells. *Journal of Cell Science*, *115*(24), 4801-4808.

- Miura, M., Matsubara, A., Kobayashi, T., Edamatsu, M., & Toyoshima, Y. Y. (2010). Nucleotide-dependent behavior of single molecules of cytoplasmic dynein on microtubules in vitro. *FEBS Letters*, *584*(11), 2351-2355.
- Mizuno, N., Toba, S., Edamatsu, M., Watai-Nishii, J., Hirokawa, N., Toyoshima, Y. Y., & Kikkawa, M. (2004). Dynein and kinesin share an overlapping microtubule-binding site. *The EMBO journal*, *23*(13), 2459-2467.
- Mok, Y. K., Lo, K. W. H., & Zhang, M. (2001). Structure of Tctex-1 and its interaction with cytoplasmic dynein intermediate chain. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(17), 14067-14074.
- Morgan, J. L., Song, Y., & Barbar, E. (2011). Structural dynamics and multiregion interactions in dynein-dynactin recognition. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(45), 39349-39359.
- Moss, A. G., Gatti, J. L., & Witman, G. B. (1992). The motile beta/IC1 subunit of sea urchin sperm outer arm dynein does not form a rigor bond. *The Journal of Cell Biology*, *118*(5), 1177-1188.
- Moss, A. G., Sale, W. S., Fox, L. A., & Witman, G. B. (1992). The alpha subunit of sea urchin sperm outer arm dynein mediates structural and rigor binding to microtubules. *The Journal of Cell Biology*, *118*(5), 1189-1200.
- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L., & Koonin, E. V. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Research*, *9*(1), 27-43.
- Newell, A. E. H., Fiedler, S. E., Ruan, J. M., Pan, J., Wang, P. J., Deininger, J., Corless, C. L. & Carr, D. W. (2008). Protein kinase A RII-like (R2D2) proteins exhibit differential localization and AKAP interaction. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, *65*(7), 539-552.
- Nishikawa, Y., Oyama, T., Kamiya, N., Kon, T., Toyoshima, Y. Y., Nakamura, H., & Kurisu, G. (2014). Structure of the Entire Stalk Region of the Dynein Motor Domain. *Journal of Molecular Biology*, *426*(19), 3232-3245.

Nishiura, M., Kon, T., Shiroguchi, K., Ohkura, R., Shima, T., Toyoshima, Y. Y., & Sutoh, K. (2004). A single-headed recombinant fragment of Dictyostelium cytoplasmic dynein can drive the robust sliding of microtubules. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(22), 22799-22802.

Oda, T., Yagi, T., Yanagisawa, H., & Kikkawa, M. (2013). Identification of the outer-inner dynein linker as a hub controller for axonemal Dynein activities. *Current Biology*, *23*(8), 656-664.

Ori-McKenney, K. M., Xu, J., Gross, S. P., & Vallee, R. B. (2010). A cytoplasmic dynein tail mutation impairs motor processivity. *Nature Cell Biology*, *12*(12), 1228-1234.

Paschal, B. M., Shpetner, H. S., & Vallee, R. B. (1987). MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *The Journal of Cell Biology*, *105*(3), 1273-1282

Patel-King, R. S., & King, S. M. (2009). An outer arm dynein light chain acts in a conformational switch for flagellar motility. *The Journal of Cell Biology*, *186*(2), 283-295.

Pazour, G. J., Wilkerson, C. G., & Witman, G. B. (1998). A dynein light chain is essential for the retrograde particle movement of intraflagellar transport (IFT). *The Journal of Cell Biology*, *141*(4), 979-992.

Pazour, G. J., Dickert, B. L., & Witman, G. B. (1999). The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly. *The Journal of Cell Biology*, *144*(3), 473-481.

Pazour, G. J., Agrin, N., Leszyk, J., & Witman, G. B. (2005). Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *The Journal of Cell Biology*, *170*(1), 103-113.

Perrone, C. A., Tritschler, D., Taulman, P., Bower, R., Yoder, B. K., & Porter, M. E. (2003). A novel dynein light intermediate chain colocalizes with the retrograde motor for intraflagellar transport at sites of axoneme assembly in Chlamydomonas and mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell*, *14*(5), 2041-2056.

- Pfister, K. K., Shah, P. R., Hummerich, H., Russ, A., Cotton, J., Annuar, A. A., King, S. M. and Fisher E. M. C. (2006). Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families. *PLoS Genetics*, *2*(1), e1.
- Phelps, K. K., & Walker, R. A. (2000). NEM tubulin inhibits microtubule minus end assembly by a reversible capping mechanism. *Biochemistry*, *39*(14), 3877-3885.
- Pigino, G., Maheshwari, A., Bui, K. H., Shingyoji, C., Kamimura, S., & Ishikawa, T. (2012). Comparative structural analysis of eukaryotic flagella and cilia from *Chlamydomonas*, *Tetrahymena*, and sea urchins. *Journal of Structural Biology*, *178*(2), 199-206.
- Porter, M. E., Bower, R., Knott, J. A., Byrd, P., & Dentler, W. (1999). Cytoplasmic dynein heavy chain 1b is required for flagellar assembly in *Chlamydomonas*. *Molecular Biology of the Cell*, *10*(3), 693-712.
- Puthalakath, H., Huang, D., O'Reilly, L. A., King, S. M., & Strasser, A. (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Molecular Cell*, *3*(3), 287-296.
- Qiu, W., Derr, N. D., Goodman, B. S., Villa, E., Wu, D., Shih, W., & Reck-Peterson, S. L. (2012). Dynein achieves processive motion using both stochastic and coordinated stepping. *Nature Structural & Molecular Biology*, *19*(2), 193-200.
- Rajagopalan, V., Subramanian, A., Wilkes, D. E., Pennock, D. G., & Asai, D. J. (2009). Dynein-2 affects the regulation of ciliary length but is not required for ciliogenesis in *Tetrahymena thermophila*. *Molecular Biology of the Cell*, *20*(2), 708-720.
- Rana, A. A., Barbera, J. P. M., Rodriguez, T. A., Lynch, D., Hirst, E., Smith, J. C., & Beddington, R. S. (2004). Targeted deletion of the novel cytoplasmic dynein mD2LIC disrupts the embryonic organiser, formation of the body axes and specification of ventral cell fates. *Development*, *131*(20), 4999-5007.
- Raux, H., Flamand, A., & Blondel, D. (2000). Interaction of the rabies virus P protein with the LC8 dynein light chain. *Journal of Virology*, *74*(21), 10212-10216.

- Rayment, I. (1996). Kinesin and myosin: molecular motors with similar engines. *Structure*, 4(5), 501-504.
- Read, S. M., & Northcote, D. H. (1981). Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Analytical Biochemistry*, 116(1), 53-64.
- Reck-Peterson, S. L., Yildiz, A., Carter, A. P., Gennerich, A., Zhang, N., & Vale, R. D. (2006). Single-molecule analysis of dynein processivity and stepping behavior. *Cell*, 126(2), 335-348.
- Redwine, W. B., Hernández-López, R., Zou, S., Huang, J., Reck-Peterson, S. L., & Leschziner, A. E. (2012). Structural basis for microtubule binding and release by dynein. *Science*, 337(6101), 1532-1536.
- Roberts, A. J., Numata, N., Walker, M. L., Kato, Y. S., Malkova, B., Kon, T., Ohkura, R., Arisaka, F., Knight, P. J., Sutoh, K. and Burgess S. A. (2009). AAA+ Ring and linker swing mechanism in the dynein motor. *Cell*, 136(3), 485-495.
- Roberts, A. J., Malkova, B., Walker, M. L., Sakakibara, H., Numata, N., Kon, T., Ohkura, R., Edwards, T. A., Knight, P. J., Sutoh, K., Oiwa, K., & Burgess, S. A. (2012). ATP-driven remodeling of the linker domain in the dynein motor. *Structure*, 20(10), 1670-1680.
- Rompolas, P., Pedersen, L. B., Patel-King, R. S., & King, S. M. (2007). Chlamydomonas FAP133 is a dynein intermediate chain associated with the retrograde intraflagellar transport motor. *Journal of Cell Science*, 120(20), 3653-3665.
- Rompolas, P., Patel-King, R. S., & King, S. M. (2010). An outer arm Dynein conformational switch is required for metachronal synchrony of motile cilia in planaria. *Molecular Biology of the Cell*, 21(21), 3669-3679.
- Rosenbaum, J. L., & Witman, G. B. (2002). Intraflagellar transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(11), 813-825.

- Ross, J. L., Wallace, K., Shuman, H., Goldman, Y. E., & Holzbaur, E. L. (2006). Processive bidirectional motion of dynein-dynaactin complexes in vitro. *Nature Cell Biology*, 8(6), 562-570.
- Sakato, M., & King, S. M. (2004). Design and regulation of the AAA⁺ microtubule motor dynein. *Journal of Structural Biology*, 146(1), 58-71.
- Sakato, M., Sakakibara, H., & King, S. M. (2007). Chlamydomonas outer arm dynein alters conformation in response to Ca²⁺. *Molecular Biology of the Cell*, 18(9), 3620-3634.
- Samsó, M., Radermacher, M., Frank, J., & Koonce, M. P. (1998). Structural characterization of a dynein motor domain. *Journal of Molecular Biology*, 276(5), 927-937.
- Samsó, M., & Koonce, M. P. (2004). 25Å Resolution Structure of a Cytoplasmic Dynein Motor Reveals a Seven-member Planar Ring. *Journal of Molecular Biology*, 340(5), 1059-1072.
- Schmidt, H., Gleave, E. S., & Carter, A. P. (2012). Insights into dynein motor domain function from a 3.3-Å crystal structure. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(5), 492-497.
- Schmoranzer, J., Fawcett, J. P., Segura, M., Tan, S., Vallee, R. B., Pawson, T., & Gunderson, G. G. (2009). Par3 and dynein associate to regulate local microtubule dynamics and centrosome orientation during migration. *Current Biology*, 19(13), 1065-1074.
- Schnorrer, F., Bohmann, K., & Nüsslein-Volhard, C. (2000). The molecular motor dynein is involved in targeting swallow and bicoid RNA to the anterior pole of Drosophila oocytes. *Nature Cell Biology*, 2(4), 185-190.
- Schroeder, C. M., Ostrem, J. M., Hertz, N. T., & Vale, R. D. (2014). A Ras-like domain in the light intermediate chain bridges the dynein motor to a cargo-binding region. *eLife*, 3, e03351.
- Shimizu, Y., Kato, Y., Morii, H., Edamatsu, M., Toyoshima, Y. Y., & Tanokura, M. (2008).

The dynein stalk head, the microtubule binding-domain of dynein: NMR assignment and ligand binding. *Journal of biomolecular NMR*, 41(2), 89-96.

Shu, T., Ayala, R., Nguyen, M. D., Xie, Z., Gleeson, J. G., & Tsai, L. H. (2004). Ndel1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. *Neuron*, 44(2), 263-277.

Siglin, A. E., Sun, S., Moore, J. K., Tan, S., Poenie, M., Lear, J. D., Polenova, T., Cooper, J. A., & Williams, J. C. (2013). Dynein and Dynactin Leverage Their Bivalent Character to Form a High-Affinity Interaction. *PLoS One*, 8(4), e59453.

Signor, D., Wedaman, K. P., Orozco, J. T., Dwyer, N. D., Bargmann, C. I., Rose, L. S., & Scholey, J. M. (1999). Role of a class DHC1b dynein in retrograde transport of IFT motors and IFT raft particles along cilia, but not dendrites, in chemosensory neurons of living *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Cell Biology*, 147(3), 519-530.

Steffen, W., Hodgkinson, J. L., & Wiche, G. (1996). Immunogold localisation of the intermediate chain within the protein complex of cytoplasmic dynein. *Journal of Structural Biology*, 117(3), 227-235.

Susalka, S. J., Nikulina, K., Salata, M. W., Vaughan, P. S., King, S. M., Vaughan, K. T., & Pfister, K. K. (2002). The roadblock light chain binds a novel region of the cytoplasmic dynein intermediate chain. *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), 32939-32946.

Tai, A. W., Chuang, J. Z., Bode, C., Wolfrum, U., & Sung, C. H. (1999). Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1. *Cell*, 97(7), 877-887.

Thirumurugan, K., Sakamoto, T., Hammer, J. A., Sellers, J. R., & Knight, P. J. (2006). The cargo-binding domain regulates structure and activity of myosin 5. *Nature*, 442(7099), 212-215.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.

- Toba, S., & Toyoshima, Y. Y. (2004). Dissociation of double-headed cytoplasmic dynein into single-headed species and its motile properties. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, *58*(4), 281-289.
- Toba, S., Watanabe, T. M., Yamaguchi-Okimoto, L., Toyoshima, Y. Y., & Higuchi, H. (2006). Overlapping hand-over-hand mechanism of single molecular motility of cytoplasmic dynein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(15), 5741-5745.
- Torisawa, T., Ichikawa, M., Furuta, A., Saito, K., Oiwa, K., Kojima, H., Toyoshima, Y. Y., & Furuta, K. Y. (2014). Autoinhibition and cooperative activation mechanisms of cytoplasmic dynein. *Nature Cell Biology*, *16*(11), 1118-1124.
- Toyoshima, Y. Y. (1987). Chymotryptic digestion of Tetrahymena ciliary dynein. II. Pathway of the degradation of 22S dynein heavy chains. *The Journal of Cell Biology*, *105*(2), 897-901.
- Tran, P. V., Haycraft, C. J., Besschetnova, T. Y., Turbe-Doan, A., Stottmann, R. W., Herron, B. J., Chesebro, A. L., Qui, H., Scherz, P. J., Shah, J. V., Yoder, B. K. & Beier, D. R. (2008). THM1 negatively modulates mouse sonic hedgehog signal transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia. *Nature Genetics*, *40*(4), 403-410.
- Trocker, M., Mücke, N., & Surrey, T. (2012). Reconstitution of the human cytoplasmic dynein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(51), 20895-20900.
- Tynan, S. H., Gee, M. A., & Vallee, R. B. (2000). Distinct but overlapping sites within the cytoplasmic dynein heavy chain for dimerization and for intermediate chain and light intermediate chain binding. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(42), 32769-32774.
- Tynan, S. H., Purohit, A., Doxsey, S. J., & Vallee, R. B. (2000). Light intermediate chain 1 defines a functional subfraction of cytoplasmic dynein which binds to pericentrin. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(42), 32763-32768.
- Vale, R. D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*, *112*(4),

467-480.

Vallee, R. B. (1986). Reversible assembly purification of microtubules without assembly-promoting agents and further purification of tubulin, microtubule-associated proteins, and MAP fragments. *Methods in Enzymology*, *134*, 89-104.

Vallee, R. B., Wall, J. S., Paschal, B. M., & Shpetner, H. S. (1988). Microtubule-associated protein 1C from brain is a two-headed cytosolic dynein. *Nature*, *332*(6164), 561-563.

Vaughan, K. T., & Vallee, R. B. (1995). Cytoplasmic dynein binds dynactin through a direct interaction between the intermediate chains and p150Glued. *The Journal of Cell Biology*, *131*(6), 1507-1516.

Walker, M. L., Burgess, S. A., Sellers, J. R., Wang, F., Hammer, J. A., Trinick, J., & Knight, P. J. (2000). Two-headed binding of a processive myosin to F-actin. *Nature*, *405*(6788), 804-807.

Weedon M.N., Hastings R., Caswell R., Xie W., Paszkiewicz K., Antoniadis T., Williams M., King C., Greenhalgh L., Newbury-Ecob R. & Ellard, S. (2011). Exome Sequencing Identifies a *DYNC1H1* Mutation in a Large Pedigree with Dominant Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease. *The American Journal of Human Genetics*, *89*(2), 308-312.

Williams, J. C., Roulhac, P. L., Roy, A. G., Vallee, R. B., Fitzgerald, M. C., & Hendrickson, W. A. (2007). Structural and thermodynamic characterization of a cytoplasmic dynein light chain-intermediate chain complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(24), 10028-10033.

Williamson, S. M., Silva, D. A., Richey, E., & Qin, H. (2012). Probing the role of IFT particle complex A and B in flagellar entry and exit of IFT-dynein in *Chlamydomonas*. *Protoplasma*, *249*(3), 851-856.

Wu, H., Maciejewski, M. W., Marintchev, A., Benashski, S. E., Mullen, G. P., & King, S. M. (2000). Solution structure of a dynein motor domain associated light chain. *Nature Structural & Molecular Biology*, *7*(7), 575-579.

Wynshaw-Boris, A. (2007). Lissencephaly and LIS1: insights into the molecular mechanisms of neuronal migration and development. *Clinical Genetics*, 72(4), 296-304.

謝辞

本研究を行うに当たって多くの方々から大変お世話になりました。

豊島陽子先生には、人間的にも未熟である私に根気強く指導して頂きました。また、一学生に過ぎない私のために親身に接して頂き、感謝してもしきれません。

順天堂大学医学部薬理学教室の村山尚准教授には、ダイニン重鎖のコンストラクト構築の指導をして頂くとともに、尾部のサブユニットの位置同定用コンストラクトを作製して頂きました。感謝申し上げます。

豊島研究室の小林琢也博士には、コンストラクト構築やタンパク質の精製をご協力頂いただけでなく、普段から研究結果の解釈の方法や、研究の進め方、研究への姿勢を丁寧に教えて頂き、大変感謝しております。

クラミドモナスからのダイニン複合体の精製・クラミドモナスにおける組換え体 LC1 の発現については、東京大学神谷研究室(当時)の神谷律教授・柳澤春明博士に協力して頂きました。また、クラミドモナスストーク・LC1 のクローニングについては県立広島大学の八木俊樹教授に協力して頂きました。大変ありがとうございました。

テトラヒメナへの形質転換については、筑波大学沼田研究室の沼田治教授・中野賢太郎博士、榎田康晴氏にご指導を頂きました、大変ありがとうございました。

豊島研・矢島研の皆様方からも研究に対する多くのご指摘をいただきました。また、電子顕微鏡観察では、豊島研究室の渡辺裕多氏及び斎藤慧氏に協力頂きました。大変ありがとうございました。

最後になりましたが、応援して下さった家族と、支えてくれた趙一夢さんに感謝を述べたいと思います。