

博士論文

繊毛虫テトラヒメナの繊毛運動機構に関する研究  
—ダイニンの生化学的解析—

平成8年1月

増山 鏡子

①

博士論文

繊毛虫テトラヒメナの繊毛運動機構に関する研究  
ーダイニンの生化学的解析ー

平成8年1月

増山悦子

目 次

第1章	総合序論	1
第2章	テトラヒメナ繊毛における	
	外腕・内腕ダイニンの分析	12
	要 旨	13
	序 論	15
	材料と方法	18
	結 果	24
	考 察	28
	図 表	31
第3章	外腕ダイニンの二つの頭部フラグメントの精製	40
	要 旨	41
	序 論	44
	材料と方法	47
	結 果	52
	考 察	57
	図 表	60

第4章	軸系内における外腕ダイニン重鎖位置の検証	71
	要    旨	72
	序    論	73
	材料と方法	74
	結    果	75
	考    察	78
	図    表	80
第5章	外腕ダイニンの二つの頭部フラグメントの酵素的諸性質	86
	要    旨	87
	序    論	88
	材料と方法	90
	結    果	92
	考    察	94
第6章	要約と結論	96
参考文献		102
謝    辞		110

【モーター・タンパク質ファミリー】

運動運動において運動の機構は、ミオシン分子で構成されるミオフィラ  
メントと、アクチン分子で構成されている細いフィラメントによる滑り運動で  
成ると、そのメカニズムは、

## 第 1 章

### 総 合 序 論

10年前でミオシンとは異なるタンパク質が発見され、これら一部のタンパク  
質はモーター・タンパク質と呼ばれるようになった。これらは細胞内の筋  
成分解で得られたモーター・タンパク質を利用して、一定の方向に動くことのできるタン  
パク質と示されている。細胞運動の機序内蔵システムの研究から、まずミオシ  
ンが運動のモーター・タンパク質として発見され、次に細胞質ダイニンが別種の

細胞モーター・タンパク質として発見された。これらは微小管をレールとして  
目的地のある方向へ運動を誘導するモーター・タンパク質である。例えば、  
赤血球は片状赤血球へ細胞核を運ぶのに対して、細胞質ダイニンは微小管を  
レールとして細胞核や細胞内の成分を細胞核へ運んでいる (Walker et al.

1980; Vale and Cole, 1980; Walker and Sledge, 1981)。現在のところモーター  
・タンパク質は、ミオシン、ダイニン、キネシンの3つのファミリーに分け  
られており、ダイニンとキネシンの2つは、細胞核運動や細胞分裂でミオシン

の働きに多く似ていると推定されている。ミオシンは、細胞核運動や細胞分裂  
の際、ダイニン、キネシンのような、細胞運動の成分-膜を構成する細胞  
質ダイニン、細胞質ダイニンの存在が早くから細胞核運動を制御するタンパク質」と

## 【モーター・タンパク質ファミリー】

生体運動において代表的な筋収縮は、ミオシン分子で構成される太いフィラメントと、アクチン分子で構成されている細いフィラメントによる滑り運動で起こる。そのメカニズムは、ミオシン分子がATPを加水分解して得た化学エネルギーを運動という力学エネルギーに変換することが基本となっている。このようなミオシン分子が生体運動の主役を担うと考えられてきたが、最近の10年間でミオシンとは異なるタンパク質が発見され、これら一群のタンパク質はモーター・タンパク質と呼ばれるようになった。それらは、「ATPの加水分解で得た化学エネルギーを利用して、一定の方向に動くことのできるタンパク質」と定義されている。神経細胞の軸索内輸送系の研究から、まずキネシンが輸送モーター・タンパク質として発見され、次に細胞質ダイニンが同様の輸送モーター・タンパク質として同定された。これらは微小管をレールとして利用し、各々逆方向へ担体を輸送するモーター・タンパク質である。例えば、キネシンは神経終末側へ膜顆粒を運ぶのに対して、細胞質ダイニンは多小胞体、ラメラ体などの多様な分解系の膜成分を逆に細胞体側へ運んでいる (Vallee *et al.* 1989; Vale and Goldstein, 1990; Walker and Sheetz, 1993)。現在のところモーター・タンパク質は、ミオシン、ダイニン、キネシンの3つのファミリーに分けられており、ダイニンとキネシンの分子構造は、細長く頭部分を持つミオシンの構造によく似ていると推定されている。

一方、ダイニン・ファミリーのうち、真核生物の繊毛・鞭毛を構成する軸系ダイニンは、細胞質ダイニンの同定より早い時期に「力を出すタンパク質」と

して名づけられた (Gibbons and Rowe, 1965)。繊毛・鞭毛は生物体にとって筋肉とならぶ重要な運動器官であり、以前から盛んに研究されている分野である。材料が得やすい軸系ダイニンに関する研究は、繊毛・鞭毛運動機構の解明はもとより、ダイニン・ファミリーの運動機構を理解するうえでも重要である。

### 【真核生物の繊毛と鞭毛】

多くの真核生物の繊毛や鞭毛は、細胞自体の運動、食餌の輸送、異物の排除などに携わっている運動器官である。繊毛と鞭毛はともに細胞表面の一部が細長く伸びた構造を持つ。両者の違いは主として形態的なもので、短くて多数生えているのを繊毛と呼び、長くて少数生えている場合を鞭毛と呼んでいる。繊毛はゾウリムシ、テトラヒメナなどを含む原生動物の繊毛虫類、多細胞生物の初期胚、哺乳類の気管や卵管などにみられる。繊毛の基部のみに屈曲が生じて、そのまま一方向に倒れていく有効打と、屈曲が根元で発生しそれが先端に伝わることにより抵抗が少ない様式で元の位置にもどる回復打の繰り返しで繊毛運動が行われる。一方、鞭毛は動物の精子や植物の雄性配偶子、原生動物、単細胞藻類などにみられ、鞭毛の根元で正弦波状の屈曲が発生し、それが先端に向かって伝わることにより駆動力が発生する。繊毛運動も鞭毛運動も共に屈曲を引き起こすことが必須と考えられている。繊毛、鞭毛ともに次に述べるように、同一の内部構造をしており、基本的には ATP のエネルギーを使って屈曲波を根元から先端方向に正しく伝播する機構を持っていると理解されている。

### 【繊毛・鞭毛の微細構造】

運動の詳しいメカニズムを明らかにするために、Afzelius (1959) は独自に開発した特殊な固定液を使用し、繊毛や鞭毛の微細形態を電子顕微鏡で詳細に観察している。それによると繊毛、鞭毛ともにその構造は基本的には同じで、周囲は膜に囲まれ軸系と呼ばれる内部は、主として微小管によって構成されている。軸系では2本のシングレット微小管（中心小管）を9対の周辺微小管で取り囲んだ独特な構造がみられ、それは一般的に9+2構造とよばれている（図1-1）。対を形成した周辺微小管のうち、完全に円筒型で閉じているのをA小管とよび、不完全でしかも不安定な微小管はB小管とよばれる。軸系中

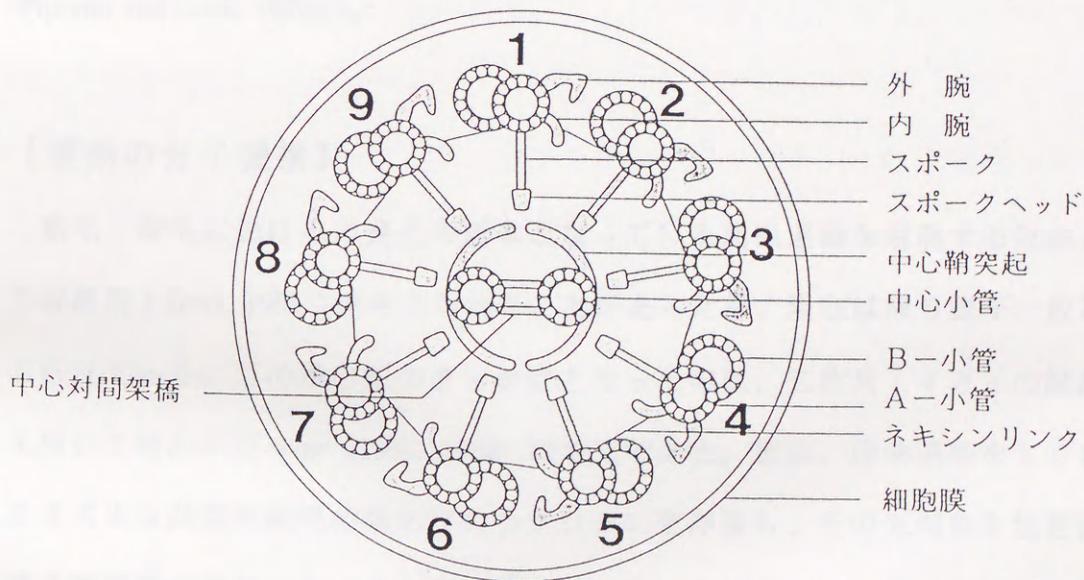


図1-1 繊毛・鞭毛の横断面模式図 (稲葉・毛利, 1989)

には微小管同士を結合する構造として、隣接する二つの周辺微小管の間にネキシ  
ンリンク、周辺微小管と中心小管の間にはスポークという構造がある。また  
A小管からは2本の突起が隣のB小管のほうに突出している。これらの突起は  
腕とよばれ、外側のものを外腕、内側のものを内腕とよんでいる。これら微小  
管結合タンパク質は微小管の上に規則正しい周期で配列している。軸系構造内  
の基本的な周期は 96 nm で、この周期の間に1つのネキシンリンク、3つのス  
ポーク (24, 32, 40 nm ごと)、4つの外腕、内腕はまだよく分かっていないが  
3種のものが1組ずつ存在するという報告がある (Piperno and Ramanis, 1991;  
Smith and Sale, 1992)。軸系はこのように規則正しい構造をしているが、それ  
らを構成している成分は非常に多い。クラミドモナス鞭毛を使った詳しい解析  
によると、軸系全体としては 200 種類以上のポリペプチドより構成されている  
(Piperno and Luck, 1979a)。

### 【運動の分子機構】

繊毛・鞭毛における力発生の基本となっている屈曲運動を説明する仮説とし  
て収縮説 (Gray, 1955) が考えられたことがあったが、現在は滑り説が一般に信  
じられている。この滑り説のきっかけとなったのは、二枚貝・イガイの鰓繊毛  
を用いて行われた Satir (1965, 1968) の研究である。彼は、屈曲運動をしている  
さまざまな時期の繊毛の輪切りのセクションを作製し、その先端部を注意深く  
電子顕微鏡で観察した。そして、周辺微小管の先端部においては、外側より内  
側の微小管のほうに常に先に突出していることを見出した。この観察の結果か

ら、微小管自体の収縮による繊毛の屈曲は考えられないことを明らかにし、Afzelius (1959) が提唱していた滑り説を支持した。

さらに Summers and Gibbons (1971) は Triton X-100 を用いたウニ精子の鞭毛脱膜モデル (トリトン・モデル) を作製し直接的に滑り運動を観察した。軸系をトリプシンで軽く処理すると、スポークとネキシンリンクが分解され、周辺微小管同士の結合が弱くなるが、そのサンプルに ATP と  $Mg^{2+}$  を加えたところ、周辺微小管が滑り出してくることを暗視野顕微鏡により観察した。次に、ウニ精子鞭毛の外腕ダイニンにより、チューブリンのみからなるウシ脳のシングレット微小管が移動することが暗視野顕微鏡下で観察された (Paschal *et al*, 1987)。このことは、微小管の滑り運動が、ダイニンと微小管のみの構成ではじめて *in vitro* で再構成されたことを意味している。このようにして、滑り運動は微小管のレールとダイニンというモーター・タンパク質のみで起こるということが明らかにされた。

繊毛・鞭毛運動が微小管どうしの滑り運動に由来することは確定したが、その滑り運動が規則正しい波動運動に変換されるメカニズムはまだ解明されていない。Shingyoji ら (1977) は、繊毛と鞭毛の屈曲運動は微小管の間の滑り量が全長にわたって等しくないということが生じることを、イオノフォレイシスを使い ATP を局所的に与えた研究で明らかにした。ダイニンと微小管の滑りの活性化・不活性化の制御は、ダイニンと微小管との相互作用を両者のメカニカルな、いわゆる屈曲率の大小が on-off 状態を決定すると考え、さらに軸系に弾性があると仮定して、Brokaw (1971, 1972) はコンピューター・シミュレーションで正常に近い鞭毛運動を発生させることができた。

それでは、滑り運動から屈曲運動への変換には軸系内のどの構造が必要とされるのかという問いに対しては、Luckら(1977)によってクラミドモナスの突然変異株を使った研究によって、中心小管とスポークは不必要であることが明らかにされた。さらに、Kamiya and Okagaki (1986)の研究では、クラミドモナスの鞭毛を界面活性剤で処理して作製した細胞モデルをATPを含む液の中で運動させておくと、軸系が縦に割れたうちの2本の周辺微小管が振動運動を引き起こすことがわかった。このことは、屈曲の発現は周辺微小管とダイニンのみで生じることを証明している。

ダイニンは周辺微小管のA小管から突出している腕様の構造をしている。外腕と内腕は構造的にも機能的にも同じとみなされてきたが、最近のクラミドモナスの二重変異をもつ変異株の研究から、外腕と内腕の機能的な差異が明らかになった(Kamiya *et al*, 1989)。そのクラミドモナスの変異株では鞭毛の屈曲運動はおこらない(泳げない)が、脱膜してタンパク質分解酵素で処理すると、周辺微小管は野生株に近い速度で滑り運動を開始した。このことは、外腕の存在で滑り運動は可能であるが、鞭毛の屈曲運動には変換できないことを意味している。すなわち、内腕が滑り運動の屈曲運動への変換に大きな役割を演じているということを示唆している。

### 【ダイニンの構造と機能】

モーター・タンパク質であるダイニンは、1965年にGibbonsらが発見したタンパク質複合体である(Gibbons and Rowe, 1965)。テトラヒメナ繊毛から膜を界

面活性剤で取り除くことによって、ATPase 活性が抽出可能になることを見出し、その酵素を力の単位 dyne にちなんでダイニン (dynein) と名付けた。さらに、ダイニンを抽出した軸系の電子顕微鏡観察により、周辺微小管上の2つの突起が失われることが観察されたので、その突起がダイニンの存在部位であると結論された。これまで、外腕は非常に詳しく研究されているが、高分解能を持つ SDS ポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS-PAGE) が用いられるようになり、外腕は複数のタンパク質を含む複雑なものであることがわかってきた。すなわち、外腕は各々が ATPase 活性をもつ分子量 40 万以上の重鎖が 2 本から 3 本で構成され、分子量 6-8 万程度の中鎖、2 万以下の複数の軽鎖から構成されている。重鎖やそれを構成するポリペプチド鎖の構造およびそれぞれの役割については研究が進められているが、まだ確定していない。重鎖の数はウニ精子の鞭毛やその他の多細胞生物の繊毛・鞭毛、細胞質ダイニンでは 2 本であり、テトラヒメナ、ゾウリムシ、クラミドモナスなどの原生動物の繊毛・鞭毛では 3 本である (Gibbons, 1988)。重鎖のうち、 $\alpha$  鎖や  $\beta$  鎖は繊毛・鞭毛では共通に存在するが、ATPase 活性を持つ 3 本目のいわゆる  $\gamma$  鎖の役割については未だ解析されていない。

ダイニンの高次構造は、Johnson and Wall (1982, 1983) によって、はじめて明らかにされた。彼らは走査型透過電子顕微鏡による観察を行い、単離したテトラヒメナの外腕ダイニンが 3 つの茎をもった花束状に見えることを報告した。そして、外腕 1 個の全質量は約 150 万ダルトンであった。花束状の頭部の数と外腕ダイニンの重鎖の数が一致することや分子量から頭部が重鎖であると考えられている。ところが、外腕ダイニンは単離した状態では開いた形をしている

が、軸系内においてどのような形態をとっているのかは詳しく調べられていない。

最近では、Gibbonsら(1991)やOgawa(1991)によってダイニン $\beta$ 鎖の一次構造がcDNAから決定され、ATP結合部位がダイニン分子の中央に存在するばかりでなく、4カ所存在することもわかった。これがどのような意味をもつのかについては不明であるが、性質の異なるATPaseが複数含まれていると推定されることから、滑りから屈曲への調節機構が存在する可能性も考えられている。また、他のダイニン重鎖に共通するものであるか否かについても不明である。Goodenough and Heuser(1982)は急速凍結ディープ・エッチング法による電子顕微鏡観察を行ったところ、テトラヒメナやクラミドモナス軸系の外腕は、いくつかの球状サブユニットと細長いサブユニットからなる複雑な構造をしていることがわかった。これまで、外腕の形態については多数の報告があるが、内腕については形態上の観察が難しく詳細な報告は少ない。その後Goodenough and Heuser(1985)の観察によって、それらの内腕は外腕と分子構築は似ているが、微小管への配列様式が外腕と異なっていることが示された。すなわち2つ頭をした内腕2組と3つ頭の内腕1組がA小管に沿って交互に並んでいるという報告をしている。また、Mutoら(1991)は試料傾斜法を使った内腕の詳しい観察を行い、クラミドモナス鞭毛では内腕は1列ではなく2列に並んでいることを示した。外腕は、形態的にも構成するポリペプチド鎖にも均一性がみられるが、内腕は非常に複雑であるといえる。内腕ダイニンについては量的にも得難いことや精製法が確立されていないことから、構成タンパク質については不明な点が多いが、最近の研究によると、Piperno(1979b, 1992)はクラ

ミドモナス内腕には、低分子量サブユニットとしてカルシウム受容タンパク質カルラクチンが含まれていることを見出した。また、アクチンもサブユニットとして含まれていることを報告している。最近、テトラヒメナ内腕ダイニンのショ糖密度勾配遠心と FPLC を使った Mono Q カラムクロマトグラフィーによる精製が試みられている。それによると、内腕のサブユニットの1つにアクチン分子が含まれていることが報告されている (Muto *et al*, 1994)。そのような内腕ダイニンを構成するポリペプチド鎖の多様性は、機能の複雑性を示唆していると考えられる。

以上述べたように、テトラヒメナ繊毛運動機構の解明のためには、まずダイニンの構造と機能の研究が重要であると考えられる。本研究においては、材料が豊富に得られるテトラヒメナ繊毛の高分子量を持つダイニンを、いろいろな角度から検討することにより、繊毛運動機構の解明を試みた。まず、効率良く外腕、内腕ダイニンを分離精製するために、高分解能を持つ電気泳動法による精製法を開発した。その結果、ATPase 活性を保持した状態で、アガロースゲル上で外腕と主要な2種の内腕ダイニンを分離することができ、その構成ペプチド鎖等を比較検討することができた(第2章)。さらに滑り運動を担う外腕ダイニンの各々の重鎖の役割を検討する目的で、タンパク質分解酵素サーモリシンによる重鎖の限定分解を行い、2種類の ATPase 活性の高いフラグメントを精製し、その分子形態を考察した。次にそのフラグメントのポリクロナール抗体を作成し、どの重鎖に由来しているのかを明らかにした(第3章)。さらに、引き続いてそれら重鎖の軸系内の位置を検討するとともに、軸系内での外腕ダイニンの分子形態を推定した(第4章)。ダイニン外腕の頭に相当する3

本の重鎖の各々には多数の ATP 結合部位が存在する。その意義を明らかにするためにも、分子量の小さいフラグメントの状態の酵素的諸性質を明らかにしていく必要がある。そこで2種の重鎖由来のフラグメントの諸性質を検討し、微小管やチューブリンとの相互作用についても解析した。(第5章)。このように多角的にダイニン ATPase の生化学的諸性質を検討することにより、繊毛運動におけるダイニンの機能を明らかにすることを試みた。

## 第 2 章

### テトラヒメナ繊毛における 外腕・内腕ダイニンの分析

## 要 旨

繊毛虫テトラヒメナの繊毛軸系を構成するダイニンを分析する目的で、まずはじめに2段階の方法でダイニンを抽出した。軸系を高塩濃度の緩衝液で短時間の抽出を行った後、その軸系をさらに低イオン強度の緩衝液で透析した。2段階の方法で抽出されたダイニンを未変成の状態であガロースゲル電気泳動を行い、泳動後のゲルをタンパク質染色と ATPase 活性染色を行うことによりダイニン ATPase を同定した。さらにそのタンパク質バンドを切り出し、SDS ポリペプチドアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にかけて、それを構成するポリペプチド鎖組成の分析を行った。アガロースゲル電気泳動の結果、高塩濃度で短時間の抽出分画には高い ATPase 活性を持つ主要なタンパク質が1種類 (N1 バンド) とマイナーなその他の5種類のタンパク質がバンドとして検出された。抽出後の軸系をさらに低イオン強度の緩衝液で透析した場合は、高い ATPase 活性を持つ3種類の主要なタンパク質 (T1、T3、T4 バンド) とマイナーな3種類の活性を持たないタンパク質が分離された。ATPase と判明したバンドを切り出して、構成する高分子領域のポリペプチド鎖を SDS-PAGE で検討してみると、移動度の小さい N1 と T1 バンドは外腕ダイニン特有の3本の重鎖 ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  鎖) を持つタンパク質であった。移動度が大きい T3 と T4 バンドは  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  鎖よりやや移動度が大きいそれぞれ2本と1本の内腕重鎖が検出された。さらに外腕ダイニンと2種類の内腕ダイニンとのポリペプチド鎖

の比較を SDS-PAGE で検討してみると、T1 バンド外腕ダイニンには、76, 78 kDa の中間鎖と 55 kDa のチューブリンがほぼ等量含まれており、20 kDa 付近に軽鎖が数本得られた。2 種類の内腕ダイニンのうち的一方 (T3 バンド) は、180, 110 kDa のタンパク質を持っていた。ともに  $\alpha$ 、 $\beta$  チューブリンを多く結合しており、T4 バンドには 43 kDa のタンパク質も多く結合している。

調製用スラブゲル電気泳動を行い、ゲルよりダイニンバンドを切り出し、タンパク質を溶出することを試みた。強度を保持したポアサイズの大きいアガロースゲルを用いた電気泳動法は、ダイニンのような高分子量を持つ複雑なタンパク質複合体の構成成分の解析に最適な方法と考えられる。

## 序 論

ダイニンは ATP を分解してその化学エネルギーを繊毛や鞭毛運動に変換する ATPase である。モーターであるダイニンとそのレールになる微小管すなわちチューブリンとの相互作用の結果、繊毛・鞭毛運動の基本となる滑りが引き起こされる (Summers and Gibbons, 1971)。繊毛・鞭毛運動機構の解明のためには、ダイニンそれ自体の構造や機能が詳しく調べられる必要がある。ところが、ダイニンの分子量は 1,200k から 1,900kDa と非常に大きいタンパク質複合体である (Johnson and Wall, 1983)。そのため、従来の精製法とは別の、しかもマイルドな方法が要求されておりダイニンの精製をより困難にしている。

A 小管の外側を約 23 nm の間隔で結合している外腕ダイニンは、軸糸を短時間の高塩濃度緩衝液による抽出で選択して得られることや量的にも多いことから、他の微小管結合タンパク質に比べて構造や機能の解析が進んでいる。いままでの報告から、ウニ精子の外腕ダイニンはゲル濾過法とハイドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィー (Ogawa and Mohri, 1972; Ogawa and Gibbons, 1976) を用いて、またテトラヒメナ繊毛は DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィー (Porter and Johnson, 1983) を用いて精製されている。しかしながら、これらの方法については、ダイニンが長時間にわたって高塩濃度の溶液にさらされることから、解離や凝集の恐れがあると考えられる。そのためダイニンの精製法としては、ショ糖密度勾配遠心法 (Gibbons, 1966) による分別が一般的に行われている。この方法の場合は、調製に長時間かかり精度が悪いという短所

がある。

一方、内腕ダイニンはいままで量が少なかったり、外腕のように特異的に抽出される性質がないことなどの理由から研究が遅れていた。ところが、クラミドモナスの変異株の外腕欠損株を用いてようやく精製がおこなわれるようになり、分子種やそのポリペプチド組成も明らかにされるようになった ( Piperno, 1988 ; Piperno et al., 1990 )。クラミドモナスにおける内腕ダイニンの重鎖は6種類同定されており ( 1a, 1b, 2, 2', 3, 3' )、各々の重鎖は外腕ダイニンの  $\alpha$ 、 $\beta$  や  $\gamma$  鎖に比べて量は少なく、ほぼ同じ領域の高分子量 ( $> 400\text{kDa}$ ) を持っている。外腕ダイニン欠損株のうち、さらに内腕ダイニン重鎖の存在の有無と電子顕微鏡による観察の結果によって、96 nm の間隔に複雑に位置する3種類の内腕ダイニン ( I1, I2, I3 ) が同定された (Mastrorade et al., 1992)。それらの重鎖組成は I1 には重鎖 1a, 1b を含む3頭構造をしており、I2 は重鎖 2 ( 繊毛の場所により重鎖 2' )、I3 は重鎖 3 ( 繊毛の場所により重鎖 3' ) でともに2頭構造をしている。

テトラヒメナ繊毛における内腕ダイニンについては、Marchese-Ragona ら (1988) によって 14S ダイニンから免疫的に異なる2種類の ATPase が同定され、STEM で球状の粒子に柄のついた構造が明らかにされた。さらに最近、Muto ら (1994) は、テトラヒメナ繊毛軸系より 0.6M NaCl で抽出した粗ダイニン分画を DEAE-Sephacel で精製し、さらにショ糖密度勾配遠心して得た 14S ダイニンを Mono Q カラムクロマトグラフィーにかけて数種類のタンパク質画分を得た。重鎖組成の異なる3種を SDS-PAGE で解析してみると、それぞれにアクチンを含んでいることが明らかになった。純粋培養が可能で増殖率の高いテトラヒ

メナは、期待される試料量が得られ易いことから、生化学的な研究材料としては重要であるが、クラミドモナスのような変異株が作製されていないため、内腕ダイニンの組成については重鎖も含めてほとんど明らかにされていない。

本研究においては、テトラヒメナ内腕ダイニンの分別も含めた高分子量域の分離を目的として、高分解能をもつ電気泳動法に着目した。ゲル強度の高い低融点のアガロースを 1.85% の濃度にゲル化させ、電気泳動の支持体として用いた。テトラヒメナ繊毛軸系を 2 段階で抽出したのち、未変成の状態での支持体を用いて電気泳動したところ、1,200 から 1,900k ダルトンの領域を持つとされる外腕ダイニンと内腕ダイニン 2 種を効果的に分離することができた。しかもこの濃度のアガロースゲルは弾性もあるので取り扱いも安易である。アガロースはゲル化が簡単で重合剤も不用であるため、安全でマイルドな条件下での電気泳動が可能である。さらに再現性も高く、ゲルを活性染色することによりダイニンバンドの同定が簡単に行える。この新しく開発した未変成の電気泳動による分析の結果、高塩濃度の緩衝液で粗ダイニンを抽出したテトラヒメナ繊毛軸系をさらに低イオン強度下で透析することにより、内腕ダイニンが効果的に抽出されることが明らかとなった。さらに、非常に活性の高い 2 種の内腕ダイニンの構成ポリペプチドも明らかにした。

## 材料と方法

### テトラヒメナ繊毛の調製法

繊毛虫テトラヒメナ (*Tetrahymena pyriformis* strain GL) を、0.3% glucose を加えた PY 培地 (1% proteose peptone, 0.1% yeast extract, 0.1% sodium acetate) 2.5 l 中で 22℃ の定温下において静置無菌培養した。定常期に達したテトラヒメナを 1,000 xg で 10 分間の遠心操作により集めた。

繊毛の単離方法については、Thompson ら (1974) によって開発されたジブカイン法に従った。ジブカイン反応条件はテトラヒメナの種によって異なることから、詳細に検討した結果 *pyriformis* GL 株においては、0.5 mg/ml ジブカインの濃度で 4~6 分間のマイルドな作用を施した方が細胞体の損傷が少なく、遠心操作のみで乳白色の繊毛が選択的に得られた。

集めたテトラヒメナをプロテアーゼ阻害剤 (0.1 mM TLCK, 0.1 mM *p*-ABSF) を直前に加えた 200 ml の PY 培地に細胞を損傷しないように緩やかに懸濁した後、少量の PY 培地に 100 mg のジブカイン塩酸を溶かしゆっくり攪拌しながら加えた。繊毛の単離は約 4~6 分後で完了するが、完全に脱離したかどうかを位相差顕微鏡で手早く確認した。直ちに 600 ml の PY 培地を加えてジブカインの作用を弱めた。以下の遠心操作を含む調製は 4℃ で行った。この懸濁液を 1,000 xg で 10 分間の遠心に 2 回かけ、細胞体を取り除いた後、上清を 10,000 xg, 20 分間の遠心操作で繊毛を回収した。

### 軸系（アクソネーム）の調製

軸系は繊毛を以下の除膜操作を行うことにより得た。0.2 % Nonidet P40 を含む HMEDK 溶液（10 mM HEPES, 5 mM  $MgSO_4$ , 0.5 mM EDTA, 0.2 mM DTT, 100 mM KCl, pH 7.4）にプロテアーゼ阻害剤（0.1 mM TLCK, 0.1 mM *p*-ABSF）を加えた溶液で繊毛を5分間サスペンドし 10,000  $xg$ , 10分間遠心した。その操作を2回繰り返した後、Nonidet P40 を取り除くために HMEDK 溶液で沈殿を洗う操作を3回繰り返して軸系標品とした。

### ダイニンATPaseの調製

軸系を 0.6 M NaCl を含む緩衝液（10 mM HEPES, 4 mM  $MgCl_2$ , 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM *p*-ABSF, pH 7.4）で 0 °C, 30分間抽出した後、20,000  $xg$  で30分間遠心した。上清の粗ダイニン中の NaCl を取り除くために短ゲル濾過カラム（Hi-Trap カラム, Pharmacia 社）を通した。以下これを NaCl 抽出ダイニンと呼ぶことにする。その溶出緩衝液は 10 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM *p*-ABSF, pH 8.0 であった。高イオン強度抽出後の軸系をさらに、2 mM Tris/HCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM *p*-ABSF, pH 8.0 の低イオン強度の緩衝液で17時間透析をした。45,000  $xg$  で30分間遠心して上清を Tris/EDTA 抽出ダイニンとした。

### アガロースゲル電気泳動によるダイニンの分離

高分子量を持つダイニンは、ポリアクリルアミドゲルを支持体に用いた電気

泳動では、ゲルトップに留まってしまい泳動することができない。ゲル強度を保持した低融解アガロースを支持体にするにより、数種のダイニン ATPase をディスク型電気泳動で分離することが可能となった。まず、低融点アガロース (Low Melt Preparative Grade, BIO RAD 社) を 37.5 mM Tris/HCl (pH 8.8) に 1.85 % になるように加温して溶解し、内径 7 mm, 高さ 7 cm のゲルカラム内で重合させた。ゲルを乾燥させないために、ゲル化した後にラップをしておいた。泳動時にガラスカラム管からゲルの落下を防ぐため、ゲルカラム底部をガーゼ片でおおい、シリコンチューブでシールをしておいた。この方法は泳動槽にゲルカラムの装着の際、気泡が発生しにくい利点もある。泳動緩衝液は Laemmli (1970) に従い、30-100  $\mu$ l の試料に 1/10 量の 1 M ショ糖と BPB 混液を加えた試料溶液を重層し 100 V, 90 分間, 5 $^{\circ}$ C で泳動した。また回収に用いるため、調製用にスラブ型電気泳動 (100 x 120 mm) を行ったが、あらかじめゲル板には底部に 1 cm の厚さの 5 % アクリルアミドゲルを重合させた後、1.85 % アガロースをゲル化させコームは用いなかった。

電気泳動後のゲルの取り出しは、ガーゼ片を取り除き、カラム管にゴム帽をつけ軽く押し出すだけで容易に行える。タンパク質染色は、Bradford (1976) による CBB G250 で染色をし、7 % 酢酸で脱色した。ATPase 活性染色は、ゲルを ATPase 反応液 (1 mM ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris/HCl, pH 8.0) に入れ、27 $^{\circ}$ C, 20 分間反応させた。反応液中に 10 mM CaCl<sub>2</sub> を添加することによって、ATP 分解後のリン酸をリン酸カルシウムとしてゲル内に白沈を生じさせ固定させた。反応後、蒸留水で洗浄したゲルにリン酸発色試液 (0.04 % アミドール, 1.5 % 硫酸, 0.33 % モリブデン酸アンモニウム) を加えて、

リン酸結合部位をリンモリブデンブルーの濃青色バンドとして検出した。このリン酸発色法は時間の経過に伴いバックグラウンドもブルーを帯びてくるため、目的に応じてリン酸発色液を加える前のリン酸カルシウムの白色バンドに固定しておいた状態でゲルを保存した（4℃下で1週間安定）。

### ダイニンの電気泳動による精製

ダイニン抽出液を調製用スラブ型アガロース電気泳動で分離した後、ゲルを2カ所ほど短冊状に切り取り、タンパク質染色・ATPase 活性染色を施した。ダイニンバンドに相当するバンドを切り出しタンパク質回収装置（AE-6580型、アトー社）で回収した。回収用泳動緩衝液は Laemmli (1970) に従った。回収側の透析膜に吸着するのを防ぐために、1 M ショ糖を500  $\mu$ lとり、それをあらかじめ透析膜上に載せておき、5℃, 75 V, で1時間通電した。回収後のダイニンは HMEDK 緩衝液中で透析し、さらに 20,000 xg で遠心分離を行い、その上清を回収ダイニンとした。

### SDS—PAGE

ダイニン重鎖の分離には 3-8 M 尿素, 3-5 % ポリアクリルアミドゲルを作成し、ダイニン中間鎖・軽鎖の分離には 10-20 % のポリアクリルアミドグラディエントゲルを作成した。試料の調製以外はすべて Laemmli (1972) の電気泳動の系に従った。アガロースゲル電気泳動後、分析を行うタンパク質バンドを切り取った後、そのゲル片に同量のタンパク質処理液 (0.17 M Tris/HCl, pH 6.5, 3.3

% SDS, 0.16 %  $\beta$ -mercaptoethanol) を加えて、95℃で3分間加熱処理した。50℃前後に加温した試料を含むアガロース混液を、ゲル化する前に SDS-PAGE のサンプルコームにアプライした。ポリペプチド鎖の分子量を推定するために、ミオシン (200,000),  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (116,000), BSA (66,000), アルドラーゼ (42,000), 炭酸脱水素酵素 (30,000), ミオグロビン (17,000) を標準タンパク質として用いた。銀染色は銀染色キット (Pharmacia 社) を用いた。

### 二次元電気泳動

一次元目の電気泳動は、内径 1 mm の細管を用いてアガロースゲル電気泳動を行った。泳動後は、シールしたガーゼをカラム管より取り外し、軽く圧をかけることにより、泳動後のアガロースゲルが容易に得られるし、そのゲルは弾性もあるために取り扱いが容易である。そのゲルをタンパク質処理液に7分間浸し平衡化した。その後、二次元用の5-20%の SDS-PAGE 用ミニスラブゲル (90 x 80 mm) に載せたが、SDS-PAGE 用ゲルとアガロースゲルの間に加温した1%アガロース・平衡化液を入れ、密着させて通常に泳動を行った。泳動後のゲルは銀染色を行った。

### ATPase活性の測定法

最終濃度が 1 mM ATP, 3 mM  $MgSO_4$ , 20 mM Tris/HCl, pH 8.0 の反応液に酵素を加えて反応開始とした。反応停止と生成したリン酸の定量は、リン酸発色試液 (0.04% アミドール, 1.5% 硫酸, 0.33% モリブデン酸アンモニウム、各々

最終濃度で示す。) に 1% になるように SDS を加えてタンパク質を可溶化し 623 nm の波長で吸光度を測定した (Nakamura *et al*, 1982)。

### タンパク質の定量法

タンパク質濃度は、BSA を標準としてクーマシーブルー色素測定法の Bradford (1976) の方法に従って求められた。

## 結 果

テトラヒメナからジブカイン法によって単離した繊毛は、図2-1 aに示すように純度の高い標品であることがわかる。その繊毛を脱膜して得た軸系横断面の電子顕微鏡図（図2-1 b）をみると、中央の2本のシングレットの微小管を取り囲んで周辺に9対のダブルット微小管があり、その完全な管のA小管から外側と内側に突出している腕様の構造が外腕ダイニン・内腕ダイニンである。テトラヒメナ繊毛から2段階に分けてダイニンを抽出した画分を、今回新たに開発したアガロースゲル電気泳動を用いて高分子量域のタンパク質組成の解析を試みた。繊毛を除膜して得られた軸系を、まずはじめに0.6 M NaClを含む緩衝液（10 mM HEPES, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM *p*-ABSF, pH 7.4）で短時間抽出して得た粗ダイニン（NaCl抽出ダイニン）を未変成の状態でディスク型のアガロースゲル電気泳動を行った。4℃で90分間の泳動後のゲルをクーマシーブリリアントブルー G250によりタンパク質染色したところ、6本のタンパク質バンドを認めることができた（図2-2 A）。移動度の小さい方からバンド N0, N1, N2, N3, N4, N5 と名付けた。さらに別のゲルをATPase反応液中で27℃で20分間酵素反応させた。ATP分解反応後生じたPiは反応液中のCa<sup>2+</sup>と結合してリン酸カルシウムの白沈を生じた。そのゲルをリンモリブデンブルーの青色呈色反応を行い、リン酸存在部位を検出した。その結果、バンド N1はタンパク質含量も多く、非常に高いATPase活性を示した。また薄いタンパク質バンドが検出されたN2とN3もATPase活性がわずかに見いだされたが、バンド N0とN4, N5は全くATPase活性は観察されなかった。特に、

ゲル上部に泳動されずにとどまっているタンパク質とバンド N0 は塩濃度の変化によるタンパク質の凝集によるものと考えられる。

次に、0.6 M NaCl で抽出した軸系をさらに低イオン強度の緩衝液 (2 mM Tris/HCl, 0.1 mM EDTA, 0.2 mM DTT, 0.2 mM *p*-ABSF, pH 8.0) に対して 17 時間透析した後、遠心した上清 (Tris/EDTA 抽出ダイニン) のアガロースゲル電気泳動を行った (図 2-2 B)。この抽出画分には、高分子量域に 6 種類のタンパク質が含まれていた。移動度の小さい方からバンド T1 から T6 まで名付けると、主要な ATPase 活性を持つ 3 本のバンド T1, T3, T4 が得られた。そのうち、バンド T3 と T4 についてはタンパク質はほぼ等量抽出されているが、バンド T4 のほうが ATPase 活性は高いことが観察された。バンド T2 は量的にも少ないが ATPase 活性もわずかながら認められた。バンド T5, T6 は全く活性を持たないタンパク質であった。この電気泳動法により、これら 2 種類のダイニン抽出画分に含まれる高分子量域のタンパク質はシャープなバンドとして得られ、それより小さい分子量域のタンパク質はゲル底部に移動しているのが観察された。軸系を 2 段階のタンパク質抽出法の比較を行うと、軸系を 0.6 M NaCl で短時間抽出することにより、高い ATPase 活性を持つダイニン (バンド N1) が効果的に抽出されていた。また NaCl で抽出後の軸系を低イオン強度下でさらに長時間抽出することにより、はじめてダイニン ATPase のバンド T3, T4 が軸系より抽出された。以上の結果は、段階的に軸系から抽出を行うことにより何種類ものダイニンを効果的に分別できることを示している。表 2-1 は軸系より抽出したタンパク質量、ダイニン ATPase 活性値の割合を示した。またゲル強度の高い低融点のアガロースは、ダイニンのような高分子量を持つタンパ

ク質を電気泳動するための最適な支持体であることが判明した。

ATPase 活性を持つ主要なバンド N1, T1, T3, T4 のダイニン重鎖を検討するために、3-5 % のアクリルアミド濃度で 3-8 M 尿素を加えたグラディエントゲルを用い SDS-PAGE を行った (図 2-3)。バンド N1 と T1 は外腕ダイニンの特徴的な 3 本の重鎖 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  鎖, いずれも  $> 400$  kDa) が得られ、バンド T3 は  $\gamma$  鎖より移動度の大きい 2 本の重鎖と 140 kDa のバンドが得られた。この 2 本の重鎖は非常に接近しており、それぞれ重鎖 1, 1' と名付けた。またそれらよりやや移動度の大きい重鎖 3 が薄いながらも認められた。バンド T4 は 1 本の重鎖 2 からなり、わずかに重鎖 3 が存在していた。バンド T3 と T4 は外腕の重鎖とは異なることから、内腕由来と考えられる。また、外腕ダイニンバンド N1 と T1 の SDS-PAGE パターンから、内在性のプロテアーゼによる重鎖の切断が全くみられないことから、この T3, T4 のバンドも内在性のプロテアーゼの影響はほとんどないと考えられる。

次に、外腕と内腕ダイニンの中間鎖と軽鎖の構成を検討するために、10-20 % のゲル濃度の SDS-PAGE を行った (図 2-4)。バンド N1 と T1 の中間鎖は 2 本の 78 k と 76 kDa のバンドが得られた。軽鎖は 20 kDa 付近に多数みられた。これらは外腕ダイニンの典型的なポリペプチド鎖組成を示している。ところが、バンド T3 と T4 はバンド N1 と T1 とかなり異なったポリペプチド鎖のパターンを示している。バンド T3 と T4 は 116-30 kDa の範囲に多数のポリペプチド鎖がみられ、20 kDa 付近の軽鎖ポリペプチドは外腕ダイニンに比べて少ない。特にチューブリンに相当する 55 kDa は特徴的である。バンド N1 と T1 は 78 k や 76 kDa ポリペプチド鎖とほぼ等量のチューブリンに相当する 55

kDa ポリペプチド鎖を含んでいる。ところが、バンド T3 と T4 の 55 kDa ポリペプチド鎖含量は外腕ダイニンの N1 と T1 に比べてかなり多いといえる。重なっているが、 $\alpha$  と  $\beta$  チューブリンが得られていた。また、バンド T4 にはアクチンに相当する 43 kDa のポリペプチド鎖が主要成分に含まれている。その他 17 kDa 以下のポリペプチド鎖も T3 と T4 バンドにみられる。

NaCl 抽出ダイニンと Tris/EDTA 抽出ダイニンを一次元目にアガロースゲル電気泳動を行い、二次元目に SDS-PAGE で分析したパターンをみると、抽出された画分には、ダイニンとチューブリンの含量に著しい差がみられる (図 2-5、2-6)。NaCl 抽出ダイニンは、チューブリンに比べてダイニンが多く抽出されており、Tris/EDTA 抽出ダイニンのほうはチューブリンを多く含み、高分子領域に 3 つの山が得られている。ATPase 活性染色で全く染まらなかったバンドには次のような特徴的なバンドがみられた。110 kDa のチューブリンダイマーは共にアガロースゲルの底部に泳動された。それより少し移動度の小さい約 116 kDa ポリペプチド鎖がみられた。少し移動度が小さい位置に分子量 200 k から 30 kDa までのポリペプチド鎖を含むタンパク質が泳動されていた。アガロースゲル泳動パターンから、これはバンド T6 とバンド T5 に相当するものと推定される。これらは、低イオン強度で抽出されやすいネキシンリンク、スポークの分子量やポリペプチド組成が同じである (Piperno *et al.*, 1981) ことから、外腕・内腕ダイニンのみならず軸系タンパク質の分析にアガロースゲル電気泳動は有効な方法だと考えられる。また、現在までのところアガロースゲルバンドから電気泳動によるタンパク質の回収は、約 55 % 程度であり、精製手段として利用しうるためにはタンパク質の回収率を高めていく必要がある。

## 考 察

今回テトラヒメナ繊毛軸系より、未変成の状態の外腕と内腕ダイニンをはじめて電気泳動的に分別することを試みた。ダイニンは分子量が大きいため、アクリルアミドゲルの濃度を薄くしてポアサイズの大きいゲルを用いなくてはならないが、そうしたゲルは、もろくてしかもシャープなバンドが得られないため、電気泳動による分離は不可能とされていた。しかし Nakamura and Masuyama (1979), Nakamura ら (1982) は、支持体に改良を加えることにより、未変成の状態のダイニンを電気泳動することが可能となった。網目の大きい低濃度のアクリルアミドゲルに補強体として1%アガロースを混合したゲルを支持体として用いた。このゲル組成では、ダイニン高分子量域から低分子量域まで幅広い分離が可能のため、全抽出タンパク質の組成を検討するには適している(図2-7)。また、ゲルをATPase活性染色をすることにより直ちにダイニンATPaseのバンドを同定することが可能であった。これは、外腕ダイニンの主要な分離法として用いられるが、内腕ダイニンの分別には利用できなかった。またゲル化の条件が異なるため、泳動用ゲルの作製は複雑であった。今回は、ゲル強度の大きい低融解のアガロースゲルのみを用いることにより、ゲル作製も簡単でしかも高分子領域のみを選択して分別できるので、ダイニンのような巨大なタンパク質複合体の分析には適していることが判明した。しかも、アガロースゲルよりバンドを切り出し、簡単にSDS-PAGE用に試料が作成できるため、構成するポリペプチド鎖組成の検討には少量の試料で非常に簡単に行うことがで

きる。

Muto ら (1994) によると、テトラヒメナ内腕もクラミドモナス内腕と同様にアクチンを結合していることを報告している。アクチン様タンパク質としては Piperno and Luck (1979b) が報告したのがはじめてである。その後、最近の Piperno らの報告 (1992) によれば、この軸系のアクチンは、“ダイニン調節複合体”の一部をなし、その複合体は、カルシウムイオンの細胞内濃度調節下でダイニン内腕と相互作用の調節を受けることが示唆されている。今回もテトラヒメナ繊毛軸系より2段階で抽出し、電気泳動的に分離した主要な2種類の内腕ダイニンのうちT4バンドにも43 kDaのアクチン様タンパク質が含まれていた。テトラヒメナ内腕ダイニンT4バンドは、クラミドモナスの内腕のうち重鎖は1本で構成されアクチン様タンパク質を含んでいる内腕ダイニンI2かI3 (Piperno *et al*, 1992) と非常に類似している。

また、チューブリンについては、外腕ダイニンと内腕ダイニンは特徴的な結合をしていると思われる。外腕ダイニンの方は、チューブリンは中間鎖と比べてみるとほぼ1:1で結合している。すなわち外腕ダイニン1分子につき1分子のチューブリンが結合していることが予想され、しかも移動度の小さい $\beta$ チューブリン (Nakamura *et al*, 1990) が結合していると思われる (図2-8)。内腕ダイニンの方はチューブリン含有量が多く、 $\alpha$ と $\beta$ チューブリンの両方を含んでいると思われる。内腕ダイニンについては抽出されにくいことや、外腕ダイニンとは異なり微小管上に横たわっている電子顕微鏡像が報告されている (Mastrorade, 1992) ことからチューブリン含量は多いと考えられる。それぞれの内腕に結合しているチューブリンアイソザイムの分析 (Nakamura *et al*, 1990)

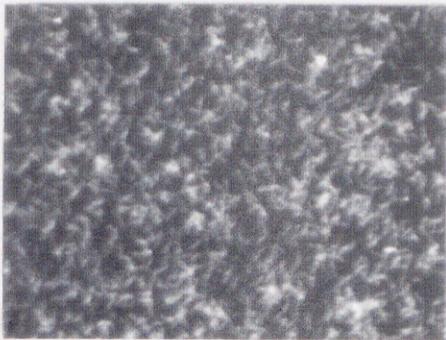
が必要だと考えられる。

電気泳動後のゲルの ATPase 活性染色には Ca イオンを添加しており、2 種類の内腕ダイニンのうち移動度の大きい T4 バンドは ATPase 活性が高いことから、Ca イオンによる活性化の可能性も考えられる。このような複雑な構成・形状をしている内腕ダイニンの研究を進めるには、精製方法が確立ししかも試料が豊富に得られることが必要である。本研究において、テトラヒメナ繊毛から外腕ダイニンや内腕ダイニンを効果的に抽出したのち、それらが電気泳動的に分別できることを明らかにした。今後、精製されたダイニンを用いることにより、詳細な運動機構の解明がはかられることが期待される。

表2-1 テトラヒメナ軸系から抽出される粗ダイニン分画の割合

軸系	タンパク質量	ATPase 活性
	相対値 (%)	相対値 (%)
軸系	100	100
粗 NaCl 抽出ダイニン	50	76
粗 Tris/EDTA 抽出ダイニン	18	12
抽出後の軸系	30	10

a



b

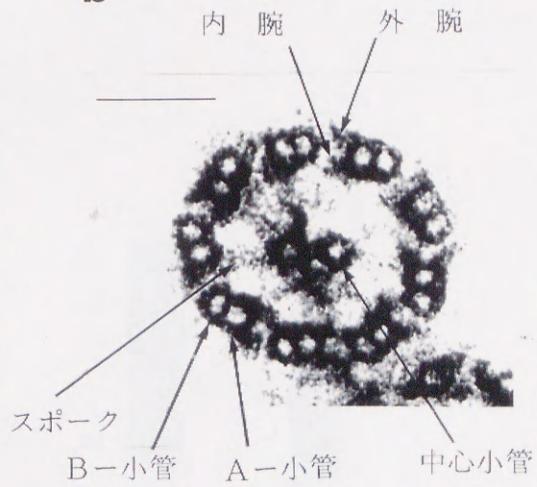


図2-1 単離したテトラヒメナ繊毛と繊毛軸系

- a *Tetrahymena pyriformis* strain GLをジブカインで処理し単離した繊毛  
暗視野顕微鏡で撮影 (x1,000) しているので実際より大きくなる。
- b 同上繊毛軸系横断面の電子顕微鏡像  
9+2構造、外腕・内腕ダイニン、スポークが観察できる。  
(方法は第4章で説明する。スケールバーは100nmを示す。)

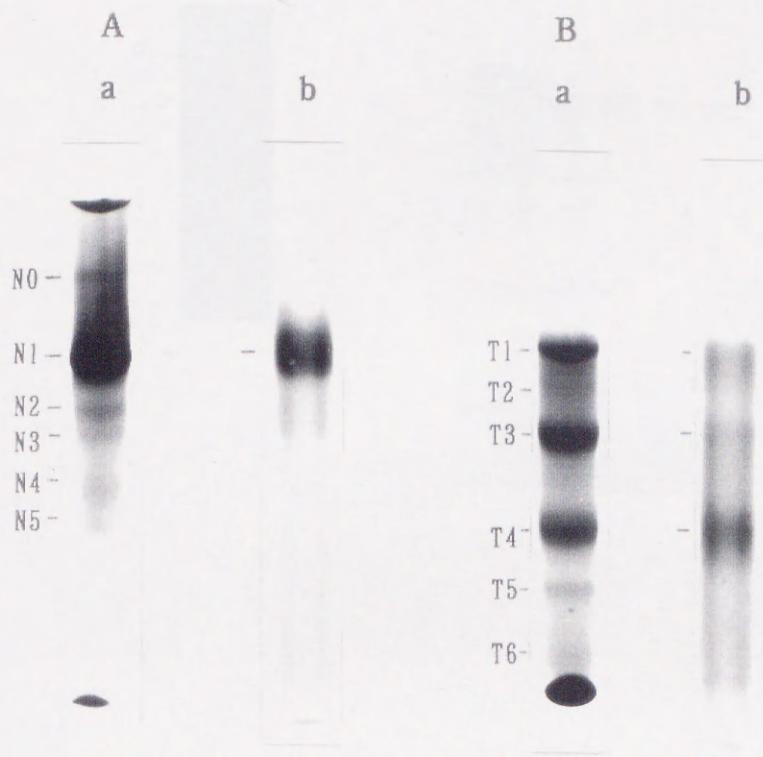


図2-2 テトラヒメナ軸系より抽出した粗ダイニンの  
アガロースゲル電気泳動パターン

A : NaCl 抽出ダイニン画分 (50  $\mu$ g)

B : Tris/EDTA 抽出ダイニン画分 (50  $\mu$ g)

a : タンパク質染色

b : ATPase 活性染色

レーン a の左側の記号は移動度の小さいタンパク質バンドから順  
につけている。

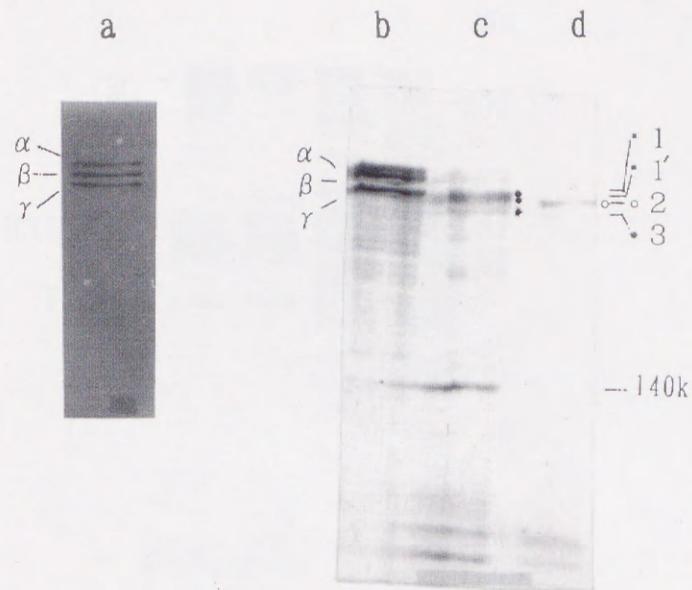


図2-3 ダイニン ATPase の高分子領域ポリペプチド鎖の解析  
 アガロースゲル電気泳動後のダイニン ATPase のバンドを切り  
 取り SDS-urea -PAGE にかけた。1 レーンは  $30\mu\text{l}$   
 a NaCl 抽出ダイニン ; N1バンド  
 b Tris/EDTA 抽出ダイニン ; T1バンド  
 c Tris/EDTA 抽出ダイニン ; T3バンド  
 d Tris/EDTA 抽出ダイニン ; T4バンド  
 レーン左は外腕ダイニン重鎖を示す  
 レーン右は内腕ダイニン重鎖と140k ポリペプチド鎖を示す

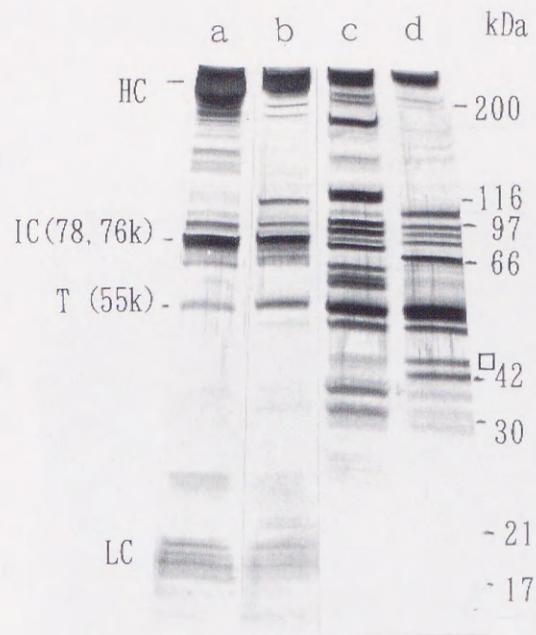


図2-4 ダイニン ATPase の低分子量域ポリペプチド鎖の解析

アガロースゲル電気泳動後のダイニン ATPase のバンドを切り取り SDS-PAGE (10-20%) にかけた。1 レーンは  $30 \mu\text{l}$

- a NaCl 抽出ダイニン ; N1バンド
- b Tris/EDTA 抽出ダイニン ; T1バンド
- c Tris/EDTA 抽出ダイニン ; T3バンド
- d Tris/EDTA 抽出ダイニン ; T4バンド

HC;重鎖, IC;中間鎖, LC;軽鎖, T ;チューブリン

□ ; 43 kDaポリペプチド

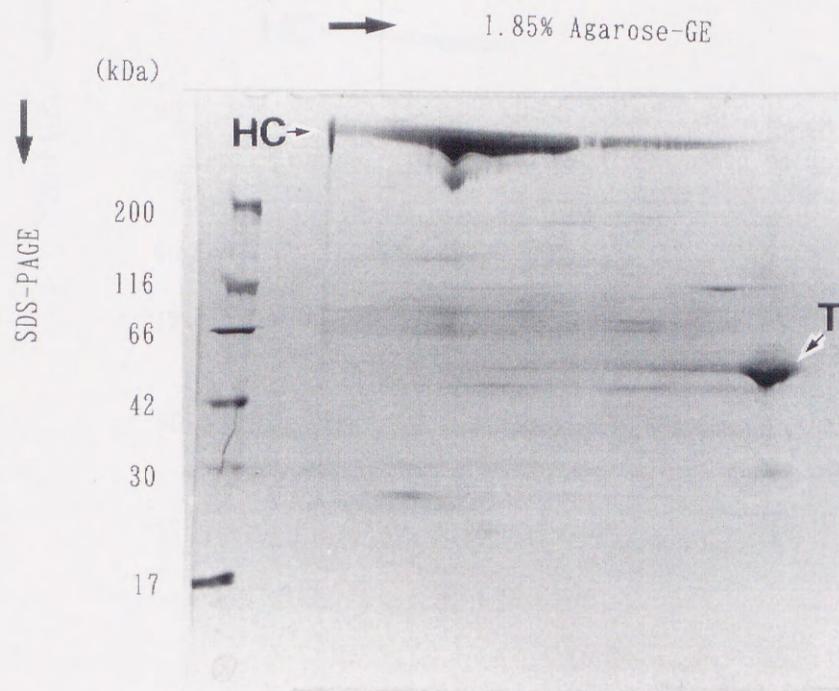


図2-5 NaCl抽出ダイニンの二次元電気泳動パターン  
 一次元目 未変成1.85%アガロースゲル電気泳動  
 二次元目 5-20% SDS-PAGE  
 左側のレーンは分子量マーカーのバンドと分子量を示す。  
 HC; 重鎖, T; チュープリン

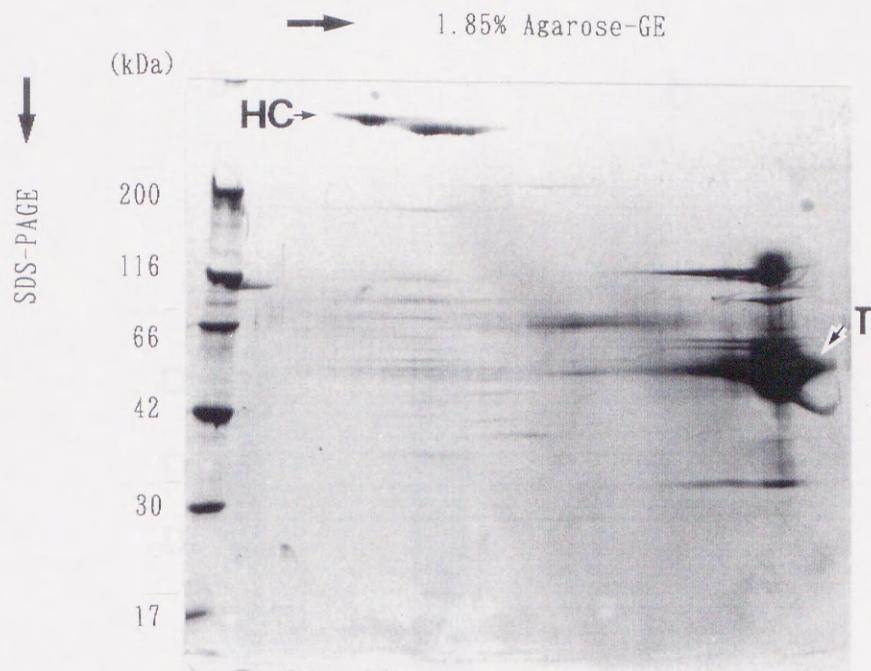


図2-6 Tris/EDTA抽出ダイニンの二次元電気泳動パターン  
 一次元目 未変成1.85%アガロースゲル電気泳動  
 二次元目 5-20% SDS-PAGE  
 左側のレーンは分子量マーカーのバンドと分子量を示す。  
 HC; 重鎖, T; チューブリン

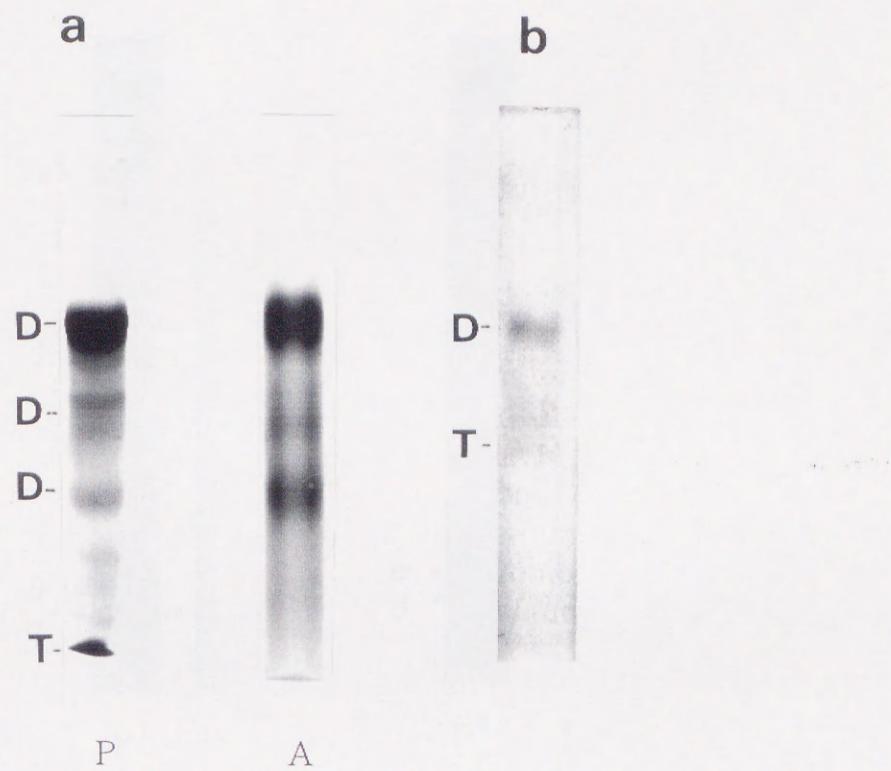


図2-7 電気泳動法の違いによるダイニンの分離

a アガロースゲル

b アガロース・ポリアクリルアミドゲル

ともに第3章で述べる Tris/EDTA ダイニンを泳動した。

P タンパク染色

A ATPase 活性染色

D, ダイニンバンド.

T, チューブリンダイマー.

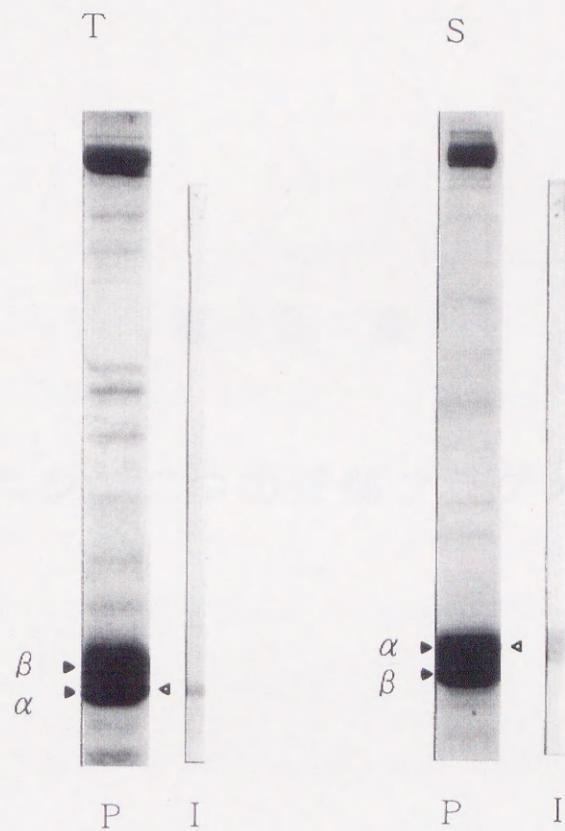


図2-8 軸系 $\alpha$ ,  $\beta$ -チューブリンのSDS-PAGEパターン

テトラヒメナ繊毛軸系 (T), ウニ精子鞭毛軸系 (S) を8%アクリルアミドの分離ゲルで泳動した。

P ; タンパク質染色

I ; ニトロセルロース膜に転写後、モノクローナル抗体-ヒト脳 $\alpha$ チューブリンで反応させた。

▶ ;  $\alpha$ ,  $\beta$ -チューブリンを示す

### 第 3 章

#### 外腕ダイニンの二つの頭部フラグメントの精製

## 要 旨

繊毛・鞭毛運動は周辺微小管相互間の滑りが基本となっている。その運動の重要な役割を担っているのは、軸系の腕の部分構成するダイニン ATPase である。現在までのところ、研究の進んでいる外腕ダイニンの構造と機能の解析の結果、構成しているサブユニットの重鎖 (> 400 kDa) の各々は ATP 結合部位、ATP 反応部位を持っており、構造上の頭に対応しているものと考えられている (Ogawa, 1991; Gibbons, 1991)。滑り運動の分子メカニズムを考えるにあたって、重鎖の各々が ATP 結合部位、ATP 反応部位をもっているという事実があるにもかかわらず、これまで外腕ダイニン全体を用いて議論されている。運動のメカニズムをより詳細に解明するには、ダイニンの各々の頭部の機能的役割を明らかにしていく必要がある。しかも外腕ダイニンは、種によって 2 頭構造や 3 頭構造をしている (Gibbons, 1988) ことから、ダイニンの重鎖の機能的差異の研究は進化を考える上でも非常に重要であると思われる。そこで、頭部の機能的差異を探るためには、ダイニン外腕の頭部のみを取り出した簡単な系を用いることが必要であると考え、まず外腕ダイニンから効果的に頭部を取り出す方法の開発とその精製を試みた。

テトラヒメナ繊毛軸系から低イオン強度下の緩衝液で透析して得た粗ダイニンをタンパク質分解酵素サーモリシンで限定分解すると、ダイニン重鎖の分解に伴って約 4 倍程度の ATPase の活性化がみられた。未変成の状態では電気泳動をした後に、ゲルに ATPase 活性染色を施す方法でダイニンの分解過程を解析

してみると、2本の安定した ATPase 活性を持ったフラグメントが生成された。他のフラグメントの生成は少ないことから、サーモリシンによる限定分解はダイニン外腕から ATPase を保持したフラグメントの生成に非常に効果的であった。

試行錯誤の結果、サーモリシンによるダイニンの限定分解の最適な条件を見出し、その条件下で調製したダイニンフラグメントを Q-Sepharose イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製を行った。HEPES 緩衝液を含む 0.15 M と 0.25 M NaCl による溶出で高い比活性を持つフラグメントが 2 種溶出した。ゲル濾過でその分子量を推定すると、共に約 400 kDa を示した。電気泳動でも分子量を推定した結果、約 500 と 460 kDa と推定された。比活性は、共に 8-9  $\mu$  mol Pi / mg protein であった。次いで、精製したこれらのフラグメントのポリクロナール抗体を作成した。このフラグメントの抗体は、SDS-urea PAGE にかけて分離した外腕ダイニンの 3 本の重鎖 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  鎖) のうち  $\beta$  鎖と  $\gamma$  鎖と交叉した。これら 2 種類のフラグメントのサブユニット構成を SDS-PAGE で分析した結果、178 k と 126 kDa のポリペプチド鎖が等量の割合で含まれていること、および 178 k, 89 k, 50 kDa ポリペプチド鎖が同じく等量ずつ含まれていることを明らかにした。この 2 種のフラグメントの重鎖由来を明らかにするために、フラグメントのポリクロナール抗体を作成した。さらに、抗体をニトロセルロース膜上で精製を行い、各々のフラグメントの 178 k ポリペプチド鎖に交叉する抗体を作製した。各々の 178 k ポリペプチド鎖は抗原性を異にすることがわかったが、ダイニン分子間においてきわめて保守性の高いポリペプチド鎖だと推定される。2 種のフラグメントの抗体は外腕ダイニン重

鎖のうち $\beta$ 鎖と $\gamma$ 鎖を認識することが明らかになった。 $\gamma$ 鎖からフラグメントが精製されたのは初めてである。これら2種のフラグメントは分子量的にも構成するポリペプチド鎖も非常に似通っていることを明らかにした。

さらにダイニンの調製法の違いにより、ダイニンに対するサーモリシンの分解のしかたが異なることから、単離されたダイニンはコンパクトな形状をしているものと類推された。

## 序 論

真核生物の繊毛・鞭毛運動を担うダイニンは、1965年に Gibbons らによりはじめてテトラヒメナ繊毛軸系より精製された ATPase である。その後ウニ (Mohri, *et al*, 1969)、クラミドモナス (Piperno and Luck, 1979)、ゾウリムシ (Schroeder, *et al*, 1990)、ニジマス (Ogawa, *et al*, 1980)、ウシ (Ragona, *et al*, 1987) などから外腕ダイニンが精製されており、その生化学的・生理学的性質やその微細構造などの研究が進められてきた。

さらに、外腕ダイニンの反応機構の解析から、ダイニンの ATP 分解過程は基本的にはミオシンによるもの (Kanazawa, and Tonomura, 1965) と類似していることが明らかになってきた。ダイニンの ATP 分解反応過程は速い基質結合・分解過程と、分解産物のゆっくりした離脱過程からなる (Holzbaur, and Johnson, 1986 ; Shimizu and Katsura, 1988)。ダイニンと微小管は ATP の非存在下で強固な複合体を形成し、ATP 存在下で解離する性質を持っている。ダイニンと微小管による ATP 分解経路は、Lymn and Taylor (1971) が定式化したアクチン・ミオシンによる ATP 分解経路と基本的には同じものである。しかし、これらはすべて外腕ダイニン全体を用いて得られたものであり、外腕中の 3 種の重鎖がすべて似ていることを前提にしている。ダイニン重鎖のうち  $\alpha$  鎖は酵素活性も低く、リン酸化されているという報告 (King and Witman, 1989) があり、ダイニン重鎖各々の機能的差異を詳しく検討し直した上で議論される必要がある。

また、外腕ダイニンの微細構造をみると、原生動物に属するテトラヒメナ

(Johnson and Wall, 1983) やクラミドモナス (Goodenough and Heuser, 1984)、ゾウリムシ (Schoroeder, *et al.*, 1990) では3頭構造をしており、ウニ (Sale, *et al.*, 1985)、ニジマス (Gatti, *et al.*, 1989)、ウシ (Ragona, *et al.*, 1987) では2頭構造をしている。外腕ダイニンが3頭構造であっても2頭構造であっても大きな運動上の差異は認められないが、進化の過程を考える上でも、各々の頭の機能的差異を検討することは非常に興味ある問題である。

本章においては、3頭構造を持つテトラヒメナ繊毛の外腕ダイニンの重鎖の機能的差異を明らかにするために、タンパク質分解酵素による消化を用いて重鎖単位で取り出し精製することを試みた。現在までの研究において、Ogawa and Mohri (1975) は、2頭構造を持つウニ精子鞭毛の外腕ダイニンをトリプシン消化させ、頭部 $\beta$ 鎖由来の活性フラグメント (fragment-A) を精製した。さらに、Ow *et al.* (1987) と Mocz and Gibbons (1992) は分解された $\beta$ 鎖は12 S (fragment-A) と6 S (fragment-B) に沈降し、それらはそれぞれダイニン分子中の頭部の先端部と基部に相当することを明らかにした。

本研究の過程において、同様なトリプシンによる分解を3頭構造を持つテトラヒメナ繊毛の外腕22 Sダイニンで試みたが、限定的な分解がおこなわれず、フラグメントを生成するに至らなかった。Hoshino (1977) も同様に限定的な消化ができないことを報告している。最近では、Niino and Miki-Noumura (1992) が、テトラヒメナの外腕ダイニンを軽くキモトリプシン消化して生成した2頭構造と1頭構造のうち、2頭構造 ( $\beta$ ,  $\gamma$ 鎖) をさらにサーモリシンで消化することにより、 $\beta$ 鎖,  $\gamma$ 鎖のどちらにもATPase活性中心があることを報告している。この場合のように2頭構造にしても活性フラグメントを生成するよう

な限定分解はできなかった。

本研究においては、3頭構造を持つテトラヒメナ繊毛外腕ダイニンに対するタンパク質分解酵素の効果を検討した結果、ダイニンの抽出法とタンパク質分解酵素反応に最適な条件を見だし、頭部よりやや小さい活性フラグメントを精製することができた。すなわち、テトラヒメナ繊毛の軸系を低イオン強度の緩衝液で透析して得た粗ダイニンに対してサーモリシンを作用させることにより、頭部1個に相当するATPase活性を保持した状態のフラグメントを2種類精製することができた。つまり外腕ダイニンの重鎖の各々を取り出すことに成功し、今後の比較生化学やタンパク質化学的研究に寄与できると考えられる。

## 材料と方法

### 繊毛の調製

テトラヒメナ (*Tetrahymena pyriformis* strain GL) を PYG 培地で 22 °C で静置培養したのち、細胞を低速の遠心分離で細胞が緩い状態で集めた。繊毛を単離する方法としては calcium-ethanol 法に従い、繊毛を細胞から取り外した。12 % (v/v) エタノール含有 Tris/HCl 緩衝液 (1 mM EDTA, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 4mM KCl, 20mM CH<sub>3</sub>COONa, 10mM Tris/HCl) にタンパク質分解酵素阻害剤 0.1 mM TLCK と 0.1 mM *p*-ABSF を添加した溶液 4 容に対して、1 容のテトラヒメナ細胞液を細胞を破壊しないように氷槽中で緩やかに懸濁した。次に 20 mM のカルシウム濃度になるように 1 M CaCl<sub>2</sub> を加え、静かに混ぜる。その懸濁液を 0 °C で 30 分間放置し、脱繊毛をうながした。以下の操作は 4 °C で行った。母体を低速の遠心操作 (1,000 xg, 15 分間) を 3 回行って取り除いた。その上清を 10,000 xg で 15 分間遠心して乳白色の繊毛を沈殿として得た。さらに繊毛を 0.2 % Nonidet P40 を含む HMEDK 溶液で可溶化した後、10,000 xg で 10 分間遠心した沈殿に再び同様な処理をし、さらに HMEDK 溶液で沈殿を洗う操作を 3 回施して Nonidet P40 を取り除いた標品を軸系とした。

### ダイニンの抽出および精製

得られた軸系を少量の低イオン強度の Tris/EDTA 緩衝液 (1 mM Tris/HCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM *p*-ABSF, pH 8.2) に懸濁した後、その外液に対して 17 時間透析した。さらに、45,000 xg で 30 分間遠心して、その上清を粗ダイニンと

した。4.5 ml の HMEDK を含む 5-20 % の密度勾配のショ糖溶液の上層に 0.5 ml の粗ダイニン液を載せ 25,000 rpm で 18 時間の密度勾配遠心による精製を行った。その時の沈降係数を推定するためのマーカートンパク質として、ウシチログロブリン (19.0 S)、ウシカタラーゼ (11.3 S)、アルドラーゼ (7.9 S) を用いた。遠心終了後、7 滴ずつ分注したのち、ショ糖を取り除くために 22 S と 14 S ダイニンを HMEDK 緩衝液で透析した。

#### サーモリシンによる限定分解

サーモリシンはまずはじめに約 1 mg/ml の濃度になるように、安定化のためにカルシウムを加えた 10 mM HEPES, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.0 の緩衝液に溶解された。低イオン強度で軸系を透析して得た粗ダイニンと精製した 22 S ダイニンはいろいろな濃度比のサーモリシンで 27 °C で 30 分間消化された。消化の終了は EDTA を 5 mM になるように反応液に加えて、直ちに 10,000 xg で遠心し、氷冷した。

#### ダイニンフラグメントの精製

粗ダイニンに対して 1/10 量のサーモリシンで 27 °C、30 分間消化した後、EDTA で停止した試料を遠心した上清を Q-Sepharose イオン交換クロマトグラフィー (5ml のベッドボリューム) にかけて。内径 1 cm のカラムは、70 mM を含むカラム溶出液 (5 mM HEPES, 5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 5 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, pH 7.4) で平衡化した。フラグメントダイニン溶液にカラム溶出液を

含む 1 M NaCl を加えて 70 mM NaCl にしカラムに供した。30 ml の 70 mM NaCl カラム溶出液で洗ったのち、ステップワイズ法で各々 30 ml の 0.15 M, 0.25 M, 1.0 M NaCl カラム溶出液で溶出し、それぞれ 0.7 ml ずつ試験管に分取した。タンパク質定量と ATPase 活性測定も行った。0.1 M から 0.3 M の NaCl カラム溶出液のグラディエントによる溶出を試みたが、電気泳動では分離できた 2 種のダイニンフラグメントは、重なって溶出されたので、効率良く分取できるステップワイズ法を用いた。このフラグメントの分子量を推定するために、Sephacryl S 300 カラム (1 cm x 45 cm) のゲル濾過を上記の溶出液で行った。分子量を推定するためにウシチログロブリン (670,000), フェリチン (460,000), カタラーゼ (240,000), ヘモグロビン (64,550) を標準タンパク質として同様に溶出した。

## 電 気 泳 動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (5-15% SDS-PAGE) は Laemmli (1970) の方法に従って行った。ダイニン重鎖の高分子量域を分離するために高い分解能を持つ 3.5-5 % のアクリルアミドゲル勾配に 3-8 M の尿素濃度勾配の 1 mm のスラブ型で 8 mA 16 時間の電気泳動を行った。泳動後のゲルはクーマシーブリリアントブルー R 250 で染色した。ポリペプチド鎖の分子量を推定するために、ミオシン (20,000),  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (116,000), BSA (66,000), アルドラーゼ (42,000), 炭酸脱水素酵素 (30,000), ミオグロビン (17,000) を標準として用いた。

ダイニンフラグメントの生成過程を分析するために, SDS を含まない 5% の

ポリアクリルアミドゲルを用い、Laemmli法(1970)のTris/glycine泳動緩衝液組成で、4℃下でディスク型電気泳動を行った。分離したタンパク質バンドはクーマシーブリリアントブルーG 250染色液(Bradfordのタンパク質染色液)を用いて検出した。バックグラウンドの脱色は7%の酢酸で行った。ATPase活性を保持しているバンドの検出には、ATP反応液(1 mM ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris/HCl, pH 8.0)に27℃で30分間反応させた。次に反応後のゲルを蒸留水で軽く洗浄し、分解生成物のリン酸を発色させた。リン酸発色液は10-20分以内に濃青色を呈したが、1時間後にはバックグラウンドも染まってしまった。ATP反応後のゲル中の遊離したリン酸は、リン酸カルシウムとして白色沈殿としてゲル内で固定されており、低温下で保存可能であった。

### 抗体の調製

白色系雄のウサギの背に、フラグメントダイニン(50-100 μg)をFreundの完全アジュバンドと1:1(v/v)で混合したものを数カ所注射した。2週間おきに5回ブースター注射をし、最後の注射から2週間以内に採血を行い、血清を分離した。その血清は57℃30分間インキュベーションしたのち、-80℃で保存した。

### 転写

スラブ型電気泳動ゲルを取り出し、セミドライ型のプロッター(Sertoblot,

Sartorius GmbH, Germany) でニトロセルロース膜に転写した。はじめに 100-200 倍 PBS で希釈した抗体でインキュベーションした後、抗原は Vectastain ABC kit (Vector Labs., Inc., CA, USA) で検出した。また、ニトロセルロース膜のタンパク質染色は AuroDye (Amersham, Inc., Amersham, UK) で行った。

### ニトロセルロース膜に転写したタンパク質から抗体のアフィニティー精製法

転写したニトロセルロース膜を軽くアミドブラック染色をしたのち、178 k ポリペプチド鎖を切り取り抗体を結合させた。pH を下げることによって結合している特異抗体をはずし、pH を中性付近に調整したのち、PBS で透析し必要に応じて濃縮した。

## 結 果

ダイニンフラグメントを生成するために、テトラヒメナよりカルシウムーエタノール法で繊毛を分離させ、Nonidet-P40 で除膜した軸系を低イオン強度のトリス塩酸の緩衝液 (1 mM Tris/HCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, pH 8.0) に対して一晩透析を行って粗ダイニンを調製した。さらに粗ダイニンを 20-5 % のショ糖密度勾配遠心を行い、精製を行った (図 3-1)。22 S ダイニンは約 65 %, 14 S ダイニンは約 20 % で ATPase 活性を持たない 4 S 分画は約 15 % 含んでいた。精製した 22 S ダイニンと粗ダイニンをそれぞれ 27 °C でサーモリシンの量を変えて消化させ、30 分後に最終濃度が 5 mM になるように EDTA を添加し消化を停止させた。すぐに 4 °C で遠心し、その上清をサンプルとした。SDS-PAGE を行いダイニン重鎖の分解パターンを解析した。また ATPase 活性も測定し分解過程を追跡した (図 3-2, 図 3-3)。これら 2 種のダイニンはダイニン重鎖の分解パターンが非常によく似ており、主要な 3 本のポリペプチド (178, 126, 89 kDa) を生成した。サーモリシンの消化の間、共にダイニン ATPase 活性は活性化がみられ、最大約 3-4 倍活性化された。特に 22 S ダイニンの場合、最適条件はダイニン : サーモリシンが 10 : 1 の割合で 30 分間消化したときである。次に内腕ダイニンといわれる 14S ダイニンを同様にサーモリシン消化させると、ATPase 活性は活性化は見られず低下していた。また、10 : 1 の濃度比のサーモリシンで消化させた場合、SDS-PAGE のパターンから 120 kDa 付近に 1 本のポリペプチドバンドが得られているが、22 S ダイニンの

分解バンドとは異にしている。

フラグメントダイニンの生成を確かめるために、粗ダイニンをサーモリシンで消化させた後、5%ゲル濃度のPAGEを行った。泳動後のゲルをATPase活性染色とタンパク質染色したのちに解析を行った(図3-5)。濃度比が100:1, 50:1のときには多くの分解産物が現れている。さらに10:1のときには高いATPase活性を引き起こすと共に2本の主要なフラグメントに分解されている。2本のフラグメントは移動度の小さいほうからTH-AとTH-Bフラグメントと名付けた。詳しく解析すると、2本のフラグメントの生成過程には差がみられることがわかる。TH-Bは初期の段階の100:1ですでに現れており、10:1まで安定して維持している。またTH-AはTH-Bよりゆっくりと生成され、10:1でシャープなバンドになり2:1まで安定して存在する。以上の結果により精製する試料としては、共に安定してTH-AとTH-Bバンドを生成する10:1の濃度比で粗ダイニン分画を27℃, 30分間のサーモリシンによる消化を行うことにした。

これら2種のフラグメントを精製するために、陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーを行った(図3-6)。10:1の割合でサーモリシンで消化されたダイニンを70 mM NaClを含むHEPES緩衝液(10 mM HEPES, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, pH 7.4)で平衡化したQ Sepharose カラム(1 cm X 5 cm)に供した。70 mM NaClで充分溶出した後、150 mM NaClと続いて250 mM NaClを含むHEPES緩衝液でステップワイズ法で溶出した。図3-6 A, Bをみると、150 mMと250 mM NaClを含むHEPES緩衝液で同量のタンパク質が溶出されたのがわかる。また、ATPase活性値も同様に高い値が

得られた。その比活性は  $8-9 \mu \text{ mol/mg per min per } 1 \text{ mM ATP}$  であった。タンパク質ピークをそれぞれ PAGE で解析すると (図 3-6 a, b) 一本のバンドが検出された。150 mM NaCl で溶出されたのは TH-A フラグメントで 250 mM NaCl で溶出されたのは TH-B フラグメントであると同定された。それぞれの分子量は Sephacryl S 300 ゲル濾過法により 400 kDa と推定された。またグラディエントゲル PAGE では約 460-500 kDa と推定された。次にこれらカラムで精製されたフラグメントの構成ポリペプチド鎖組成を SDS-PAGE で解析してみると、図 3-7 A で示すように TH-A フラグメントは 178 k, 89 k, 50 kDa のポリペプチド鎖が等量比で得られ、TH-B フラグメントは 178 k, 126 kDa のポリペプチド鎖が同じく等量比で得られた。また  $\beta$ -メルカプトエタノール非存在下で同じく SDS-PAGE を行ったところ、同様なポリペプチド鎖が得られたことから、1本の外腕ダイニン重鎖はサーモリシンによってすでに分子内切断されていたと思われる。重鎖およびフラグメントの分子量から、フラグメントを構成するポリペプチド鎖は各々1本ずつ含まれているものと推測される。

そのフラグメントが外腕ダイニンのどの重鎖由来なのか起源を探るために、カラムで精製した各々の TH-A, TH-B フラグメントに対するポリクロナール抗体をウサギより作成し、イムノブロッティング法を用いて TH-A と TH-B フラグメントのみに反応する抗体であることを確かめた (図 3-8)。さらにこれらのフラグメントが共通に含まれている 178 kDa ポリペプチド鎖を特異的に反応する抗体をニトロセルロース膜上で精製を行った。図 3-7 B で示されるように、抗 178 k (TH-A) は TH-A フラグメントの 178 kDa ポリペプチドを認識し、抗 178 k (TH-B) は TH-B フラグメントの 178 kDa ポリペプチドを認識

した。これら2つのフラグメントは、高いATPase活性を持ち分子量がほぼ等しいことや、178 kDaポリペプチドを共に持つなど構成するポリペプチド組成が似ているにもかかわらず、2つのフラグメントは免疫学的には異なることが明らかになった。

次にはこれらのフラグメントの起源を免疫電気泳動の手法を使って同定するために、ダイニン重鎖の分解がほとんどみられないダイニンの調製法を検討した。テトラヒメナ細胞の中にはタンパク質分解酵素を多く含んでおり、調製の段階ですでにダイニン重鎖を分解する可能性があるため、その影響が少ない調製法を検討した。その結果、第2章で調製したように繊毛の脱離にはジブカインを用い、タンパク質分解酵素の阻害剤を加えて軸糸から短時間で高塩濃度によるダイニンの抽出法を用いることにより、重鎖の分解はさけることができた。図3-9 Aであらわすように、22 SダイニンはSDS-urea-PAGEによると $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ の3本の重鎖に分かれた。それをニトロセルロース膜に転写しそれぞれの精製した178 kDaポリペプチド鎖で反応させると、抗178 k(TH-A)は外腕ダイニン重鎖の $\gamma$ 鎖に一致し、抗178 k(TH-B)は $\beta$ 鎖に一致した。以上、外腕ダイニンより $\beta$ 鎖と $\gamma$ 鎖の2つの頭部よりなるフラグメントを精製することができた。以後、TH-Aはフラグメント $\gamma$ 、TH-Bはフラグメント $\beta$ と呼ぶことにする。今回フラグメントを作成したダイニンをさらに精製した22 Sダイニンの重鎖組成を高分解能SDS-urea-PAGEで解析してみると、図3-9 Bのように重鎖のうちでも $\gamma$ 鎖が薄く、分解バンドとして380 kDaの存在が明らかである。同様にフラグメントの抗体と反応してみると、抗-178 k  $\gamma$ は重鎖の $\gamma$ 鎖と380 kDaポリペプチド鎖と反応し、抗-178 k  $\beta$ は重鎖 $\beta$ 鎖とのみ反

応した。さらにこの2種類で調製したダイニンをサーモリシンで消化してみると、図3-10で示すように、2種類で調製したダイニンの5% PAGEの分解パターンには相違がみられた。重鎖の分解が見られないAにおいては、TH-AとTH-Bバンドより他にその中間産物とみられるバンドが数多くみられた。また、 $\gamma$ 鎖の分解のみられたBにおいてはTH-AとTH-Bフラグメントのみが得られることが分かった。以上のことから、 $\gamma$ 鎖がまず内在性のプロテアーゼによって、一部切断されることにより、サーモリシンで切断されやすい部位が露出し、フラグメント $\beta$ とフラグメント $\gamma$ が生成できるとも考えられる。また、単離した外腕ダイニンは開いたブーケ状というより、コンパクトに畳まれた状態とも考えられる。

## 考 察

本研究において、フラグメントダイニンを作成するために種々のプロテアーゼで検討を行った結果、サーモリシンによる消化がダイニンを限定的に消化しフラグメント生成には最適であることがわかった。そのサーモリシンは熱耐性の金属エンドペプチダーゼである。それは亜鉛依存性で疎水性アミノ酸を特異的に切断するが、亜鉛に依存することから、タンパク質分解酵素のサーモリシンは、キレート試薬（例えば EDTA のような試薬）の添加で瞬時に効果的に不活性化できる。テトラヒメナ細胞には多くの内在性のタンパク質分解酵素が含まれているため、繊毛から軸系タンパク質を調製する場合、全部の調製試薬にタンパク質分解酵素阻害剤（TLCK, PMSF, *p*-ABSF など）を添加する必要がある。サーモリシンによる限定分解をした場合、阻害剤を完全に取り除くことなしに行える利点がある。疎水性のアミノ酸はネイティブな球状タンパク質の内部に存在する傾向にあるため、3次構造がほどけた部位に効果的に作用するので、限定的な分解ができる。ダイニンの場合、抽出法を検討した結果、低イオン強度による長時間の透析によって調製した粗ダイニンに対して効果的に分解し、フラグメントの生成が可能となった。

低イオン強度による長時間の透析によって調製した粗ダイニンをショ糖密度勾配遠心して生成した 22 S ダイニンの SDS-PAGE パターンから解釈すると、 $\gamma$ 鎖が調製の時点で、すでに内在性のタンパク質分解酵素の影響を受けて、380 kダルトンのポリペプチドに分解されている。これだけでは断定できないが、

サーモリシンの限定分解を受けやすくなったと考えられる。3頭構造から2頭構造と1頭構造に分解し、2頭構造をさらにサーモリシンで分解した報告では、多数のフラグメントの中間体が生成されていることから類推してみると以上のことが考えられる。 $\gamma$ 鎖が380 kダルトンに分解されることがフラグメントの作成に必須で、それによって $\beta$ 鎖の分解が始まり、次に380 kダルトンの $\gamma$ 鎖が分解されるとも推測される。

いままでに、フラグメントダイニン<sub>1</sub>は Ogawa and Mohri (1975) によって、ウニ精子鞭毛ダイニンをトリプシン消化して得られた fragment A がある。これは2頭構造をした外腕ダイニンの $\beta$ 鎖由来である。分子量は約400 kダルトンであり、構成するポリペプチドは190 kと120 kダルトンの2本のポリペプチドで構成され、分子内切断をしている。高いATPase活性化をするなど今回テトラヒメナ繊毛外腕ダイニンの $\beta$ -フラグメントに非常によく似た諸性質を持っていることがわかる。

最近、Ogawa (1991) や Gibbons ら (1991) によって cDNA の解析からウニ精子外腕ダイニン $\beta$ 鎖の全アミノ酸配列が明らかになった。それによると中央の3分の1 (Mドメイン) に ATP 結合の P ループが4カ所存在し、そのうちN末に近い1カ所が酵素反応部位で、あとの3カ所は潜在的なヌクレオチド結合サイトであると推論づけている。トリプシン分解部位の検討から、N末から3分の1 (Nドメイン) は Tail 部分でウニ精子の fragment A に相当する。また他の種の $\beta$ 鎖の配列と比較検討した結果、Nドメインは可変性が高いと結論している。残り3分の2は保守性が高いいわゆるモーター部分であることを結論づけている。またC末から3分の1 (Cドメイン) には  $\alpha$ -helical structure で

hairpin structure が 2 カ所存在し、ATP 依存性の微小管結合部位が存在することを推論している。また、クラミドモナス外腕ダイニン  $\beta$  鎖と  $\gamma$  鎖、ウニ精子外腕ダイニン  $\beta$  鎖のアミノ酸配列を比較してみると、種が異なっても  $\beta$  鎖同士のほうが相同性が高いことが報告されている。

今回テトラヒメナより  $\beta$  鎖由来のフラグメント -  $\beta$  を精製したが、分子量的にも構成するポリペプチド鎖の組成や ATPase 活性の活性化などの点で fragment B に非常に似通っていることから、ウニ精子と同じく Mドメイン、Cドメインを含む保守性の高い部分のフラグメントが生成されたものと推測される。テトラヒメナ  $\gamma$  鎖由来のフラグメント -  $\gamma$  も分子量と構成するポリペプチド鎖のうち 178 kダルトンを共通に持つことから、その中でも 178 kダルトンの領域は保守性が一段と高いことが予想される。図 3-11 にダイニン重鎖の活性断片の模式図を示した。ウニ精子重鎖の  $\beta$  鎖は fragment-A, -B が得られているが、テトラヒメナの場合活性断片がやや小さいことや、fragment-B に相当するフラグメントが得られていないことから、ウニ精子  $\beta$  鎖より消化が進んでいるとも考えられる。

2種のフラグメントをさらに諸性質を明らかにしていく必要があるが、酵素活性においても活性化の程度は両者ともに同じであることから、モーターの部分は非常に類似していると考えられる。

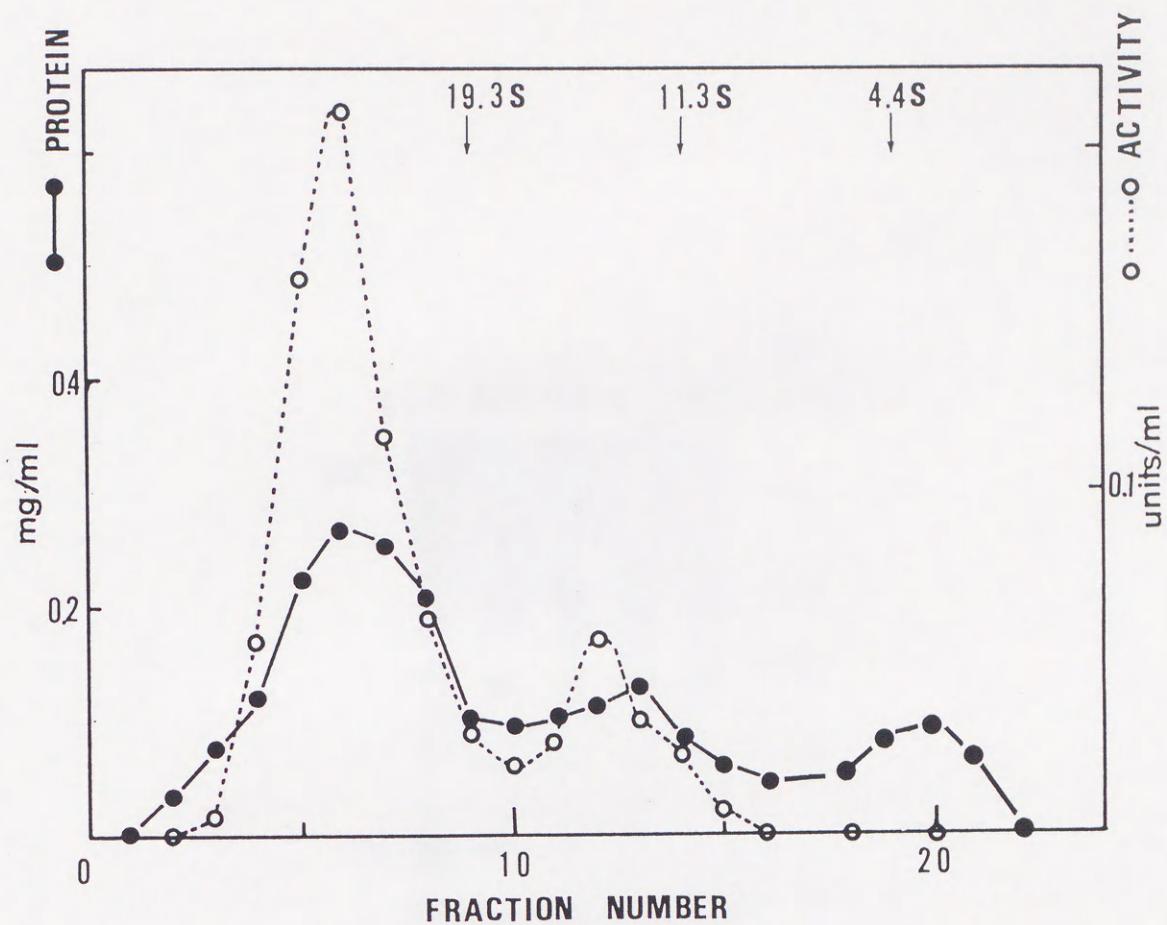


図3-1 粗ダイニンのショ糖密度勾配遠心による精製

4.5mlの5-20%のショ糖密度勾配溶液に対して0.5mlの粗ダイニンを重層し、25,000 rpm で18時間遠心を行った。分注した後、タンパク濃度とATPase活性を測定した。

2つのATPase活性のピークはマーカーの移動から22Sと14Sダイニンである。

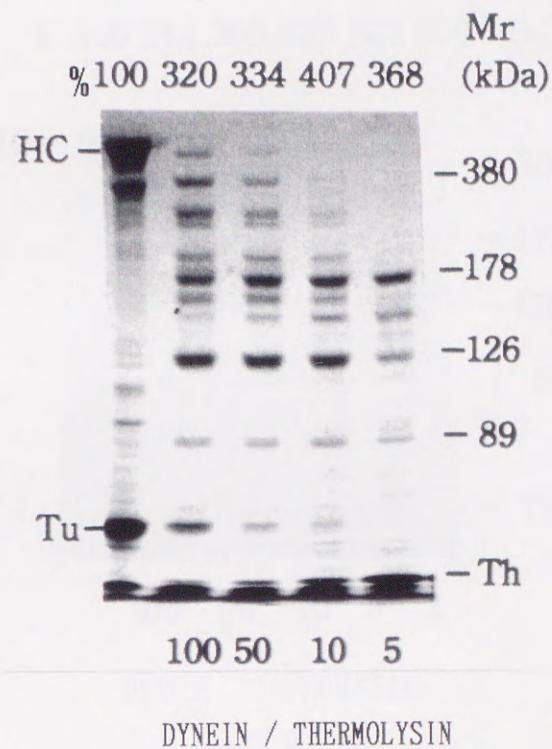


図3-2 粗ダイニンのサーモリシンによる限定分解

粗ダイニン (1mg/ml) に対してそれぞれの重量比のサーモリシンで 27°C で 30 分間消化した。反応停止は最終濃度 5mM になるように EDTA を添加した。遠心操作の後、5-10% のアクリルアミドゲル濃度の SDS-PAGE にかけた。上部には相対 ATPase 活性値を%で示す。右端は主要なバンドの分子量を示している。

HC ; 重鎖バンド, Tu ; チューブリンバンド

Th ; サーモリシンバンド

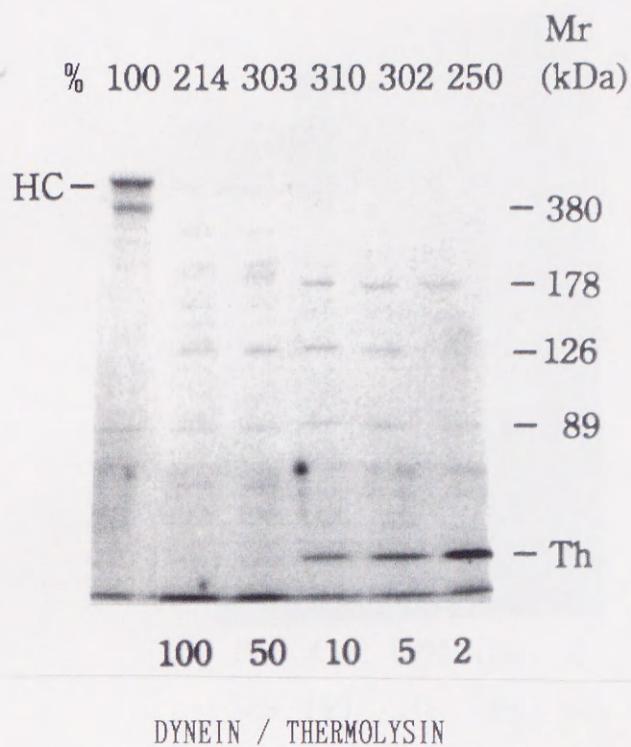


図3-3 22S ダイニンのサーモリシンによる限定分解  
 22S ダイニン (1mg/ml) に対してそれぞれの重量比のサーモリシンで  
 27°Cで 30分間消化した。反応停止は最終濃度5mM になるように  
 EDTA を添加した。遠心操作の後、5-10% のアクリルアミドゲル濃度  
 の SDS-PAGE にかけた。上部には相対 ATPase 活性値を%で示す。右  
 端は主要なバンドの分子量を示している。

HC ; 重鎖バンド,

Th ; サーモリシンバンド

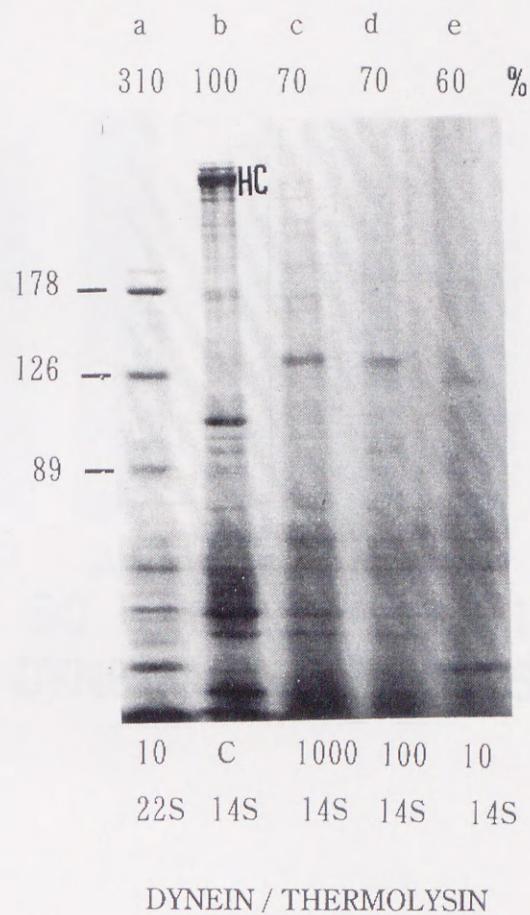


図3-4 14S ダイニンのサーモリシンによる限定分解  
 14S ダイニン (1mg/ml) に対してそれぞれの重量比のサーモリシンで  
 27°Cで 30分間消化した。反応停止は最終濃度5mMになるように  
 EDTAを添加した。遠心操作の後、5-10%のアクリルアミドゲル濃度  
 の SDS-PAGE にかけた。上部には相対 ATPase 活性値を%で示す。左  
 端は22S ダイニンのサーモリシンによる分解バンドをあらわしている。  
 HC：重鎖バンド

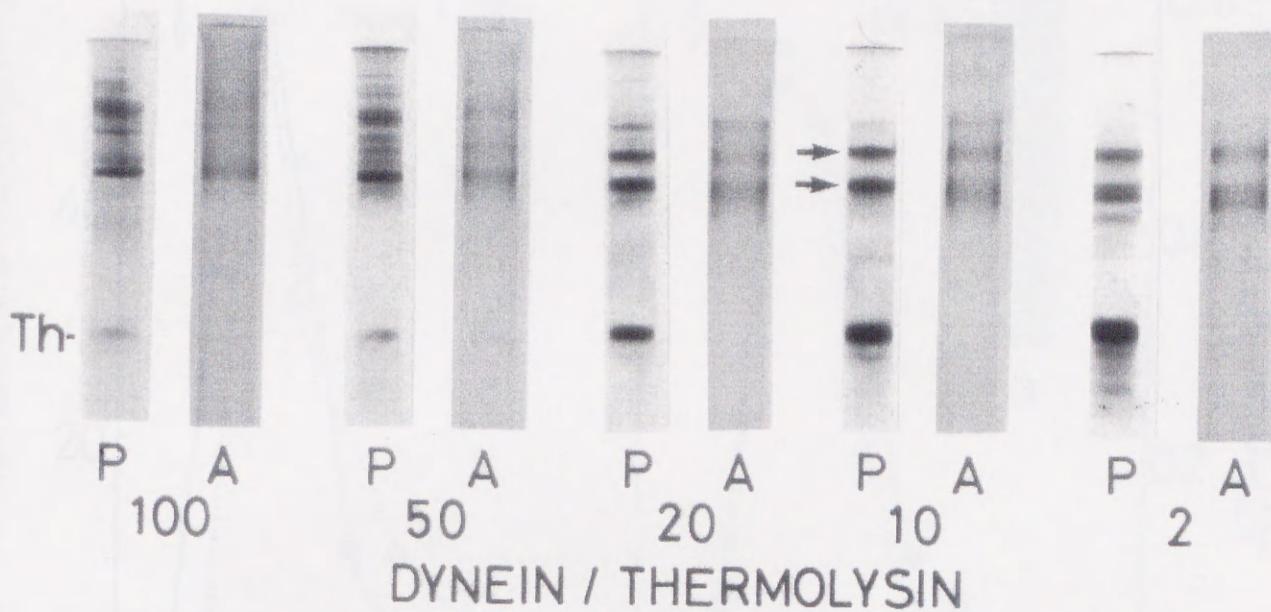


図3-5 活性フラグメントの生成過程

粗ダイニンをそれぞれの重量比のサーモリシンで消化した後、未変成 5 % PAGE にかけた。図3-2でATPase活性化のみられる 10 : 1 の重量比でフラグメントが2種類生成されている。矢印は移動度の小さいほうからTH-A, TH-Bバンドを示す。

P ; タンパク質染色, A ; ATPase活性染色,

Th ; サーモリシンバンド

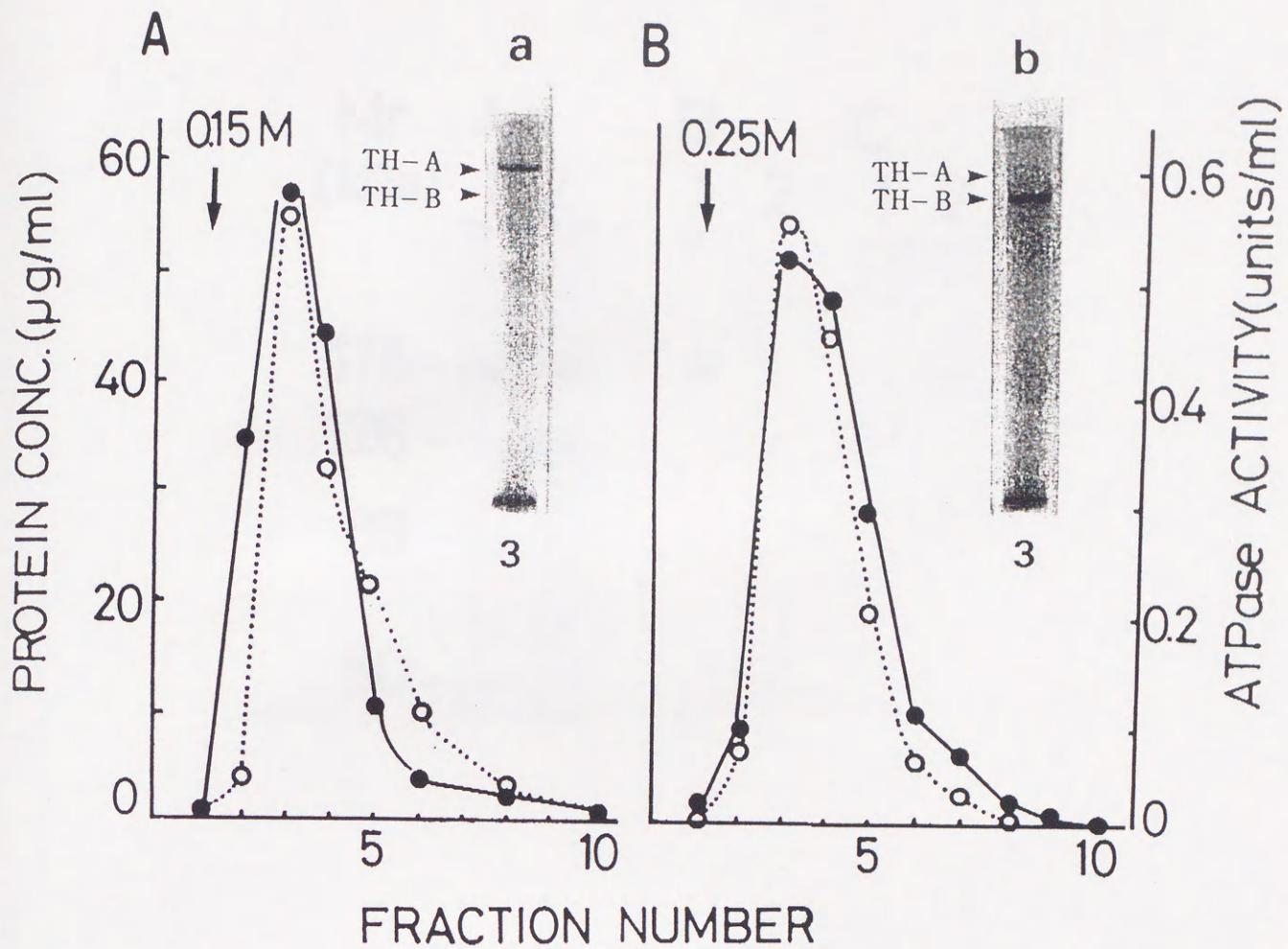


図3-6 Q-セファロース イオン交換クロマトグラフィーによるフラグメントの精製

粗ダイニンを10:1の濃度比のサーモリシンで消化した後、NaCl濃度によるステップワイズ法で溶出した。0.07 M, 0.15 M, 0.25 M, 1.0 Mの順のNaCl濃度の緩衝液で溶出した。0.15 Mと0.25 MのNaClでのみATPase活性が見出された。挿入のゲルはピークのタンパク質を5%PAGEで分析した。矢印はTH-AとTH-Bのバンドの位置を指し示す。

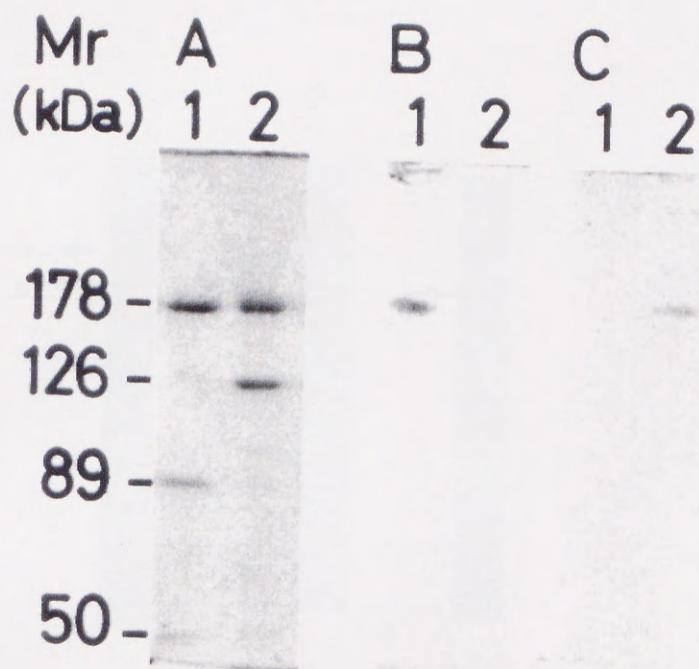


図3-7 カラム精製フラグメントダイニンの構成ポリペプチド鎖

A : SDS-PAGE ゲルを CBB 法でタンパク染色を施した。  
 B, C : SDS-PAGE 後ニトロセルロース膜へ転写後、抗 178 k (TH-A) と反応させた (B) ものと抗 178 k (TH-B) と反応させた (C) もの。

レーン 1 : 0.15 M NaCl で溶出させた TH-A フラグメント

レーン 2 : 0.25 M NaCl で溶出させた TH-B フラグメント

左端はポリペプチド鎖バンドの分子量示す。

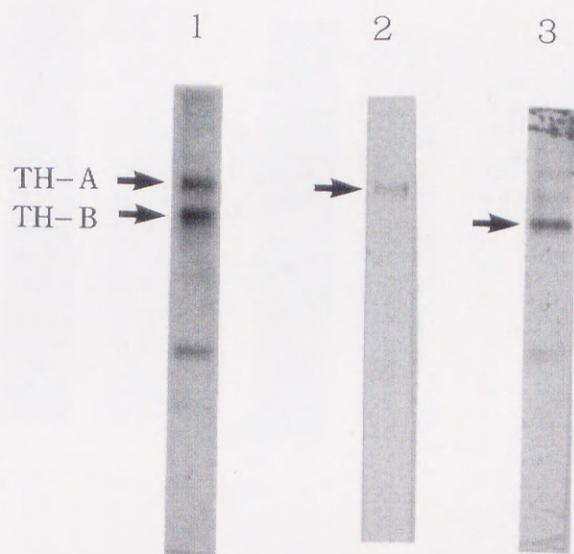


図3-8 TH-AとTH-Bフラグメントに対するポリクロナール抗体作成  
 レーン1；サーモリシン消化ダイニンを5% PAGEしタンパク染色した。  
 レーン2, 3； レーン1をニトロセルロース膜へ転写後、抗-TH-A  
 (レーン2), 抗-TH-B (レーン3) で反応させた。  
 矢印はTH-A, TH-Bを示す。

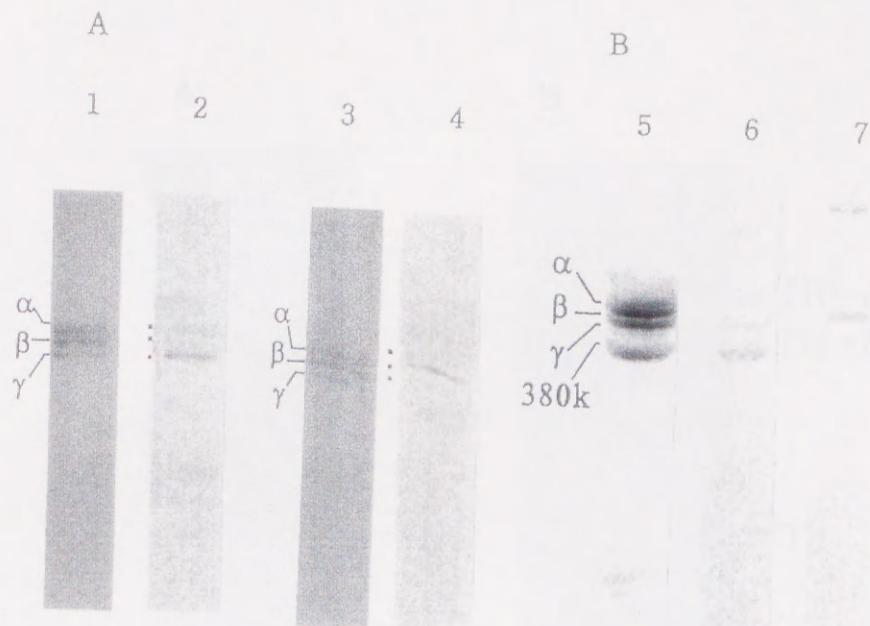


図3-9 22 S ダイニン重鎖の抗体認識部位

A; ジブカインで脱繊毛後、高塩濃度で軸系を短時間抽出した 22 S ダイニンを SDS-urea-PAGE にかき、重鎖を分離させた。

B; カルシウム-エタノール法で脱繊毛後、低イオン強度下で長時間透析して得た 22 S ダイニンを SDS-urea-PAGE にかき、重鎖を分離させた。

A; レーン 1 と 2, レーン 3 と 4 の二重のニトロセルロース膜に転写し、1 枚目はオーロダイによるタンパク質染色 (レーン 1, 3) をし 2 枚目は抗体 (レーン 3, 4) と反応させた。

B; レーン 5 はオーロダイによるタンパク質染色, レーン 6, 7 は抗体と反応させた。

レーン 2, 6 ; 抗 178 k (TH-A), レーン 4, 7 ; 抗 178 k (TH-B)

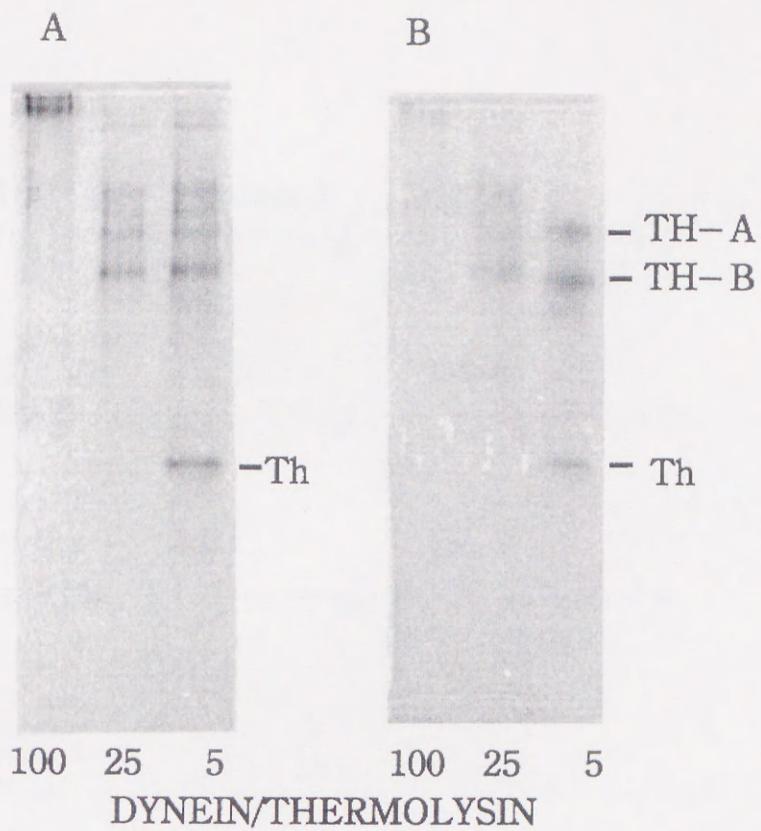


図3-10 2種類のダイニン調製法によるサーモリシン消化の差異

図3-9 A, Bと同様なダイニンの調製法を用いた。サーモリシンの重量比を変えて粗ダイニンを27℃, 30分間サーモリシン消化させた。反応停止はEDTAを最終濃度で5mMになるように添加した。矢印はTH-A, TH-Bフラグメントを示す。Th;サーモリシン

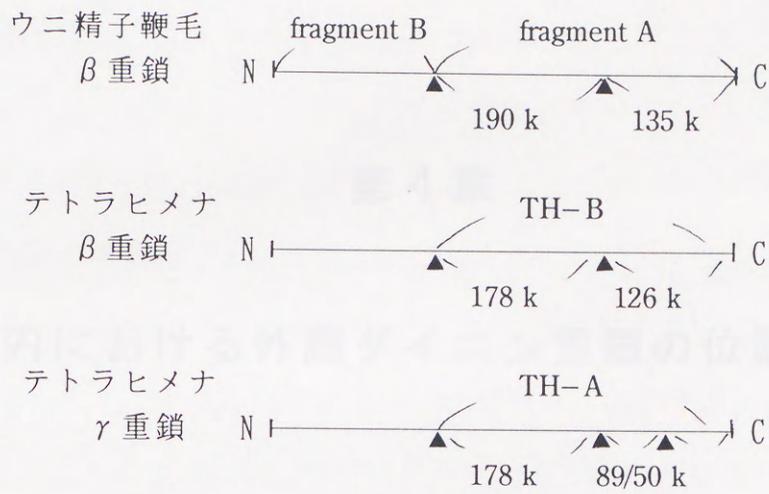


図3-11 外腕ダイニン重鎖の活性断片の模式図  
 ウニ精子については Ogawa (1991), Mocz (1993) を参考にした。  
 ▲ ; プロテアーゼ反応部位

## 第 4 章

### 軸系内における外腕ダイニン重鎖の位置の検証

## 要 旨

繊毛・鞭毛運動の基本である滑りという現象を詳しく解析するために、ダイニンモーターの ATPase をもつ各々の頭の役割を知ることは重要である。テトラヒメナ繊毛外腕は3つの頭（重鎖）をどのように使い分けて微小管の上を滑っているのか、それらの重鎖の機能的差異を探るために、ダイニン抗体を用いて軸系内での重鎖の位置を電子顕微鏡で観察した。

第3章で述べたように、外腕ダイニンの $\beta$ 鎖と $\gamma$ 鎖由来のフラグメントを精製した。そのうち特に各々の178 kDaポリペプチド鎖を認識する抗体を作成し、その抗体に金粒子の標識結合させたものを用いた。 $\beta$ 鎖・ $\gamma$ 鎖の178 kDaの抗体はともに外腕の基部から3分の1のところには結合しないで、先端部分の3分の2の外腕の外側に沿って楕円状に位置していた。両者の結合には大きな差はみられないが、 $\beta$ 鎖の178 kDaの抗体のほうがやや隣のB小管に近接して金粒子が反応し、 $\gamma$ 鎖の178 kDaの抗体は根元のA小管に近い根元の部分に観察された。また $\gamma$ 鎖の178 kDaの抗体は、周辺微小管の5-6番目において膜方向にはなれて金粒子が特徴的に観察された。その反応する構造は特定できなかったが、繊毛運動の屈曲面を構成する位置にもあり、今後の詳しい解析が必要とされる。

## 序 論

外腕ダイニンの高次構造は単離した状態で3つの茎を持った花束状に見えることが Porter and Johnson (1983) によって報告されている。ところが、Goodenough and Heuser (1982) は彼らが開発した急速凍結ディープエッチ法と呼ばれる新しい電子顕微鏡法を用いて軸系微小管に結合した状態のダイニン像を立体的に観察した。その結果、外腕ダイニンはコンパクトな構造をとり、しかも外腕ダイニンと隣あったB小管の間が細い棒のような構造を介して結合しているように見えた。ATP非存在下のリゴール状態いわゆるダイニンと微小管が強く相互作用をしている条件下でも、相互作用をしていない条件でもこの棒様の結合は観察されている。in vitroの系をもとに、ミオシンとアクチン運動系にならって、ダイニンとチューブリンもATP分解と供役した結合と離脱のサイクルの繰り返しであると考えられてきたが、新たな疑問が生じてきた。

これらの疑問を解決する糸口として、本研究では第3章で述べた $\beta$ 鎖と $\gamma$ 鎖由来のフラグメントに対する抗体を用いて、軸系内での外腕ダイニンの位置関係を探ることを試みた。さらに第3の頭としての $\gamma$ 鎖の役割を検討するうえで軸系内の位置を明らかにしていくことが重要であると考えられる。

## 材料と方法

### 軸系の調製

テトラヒメナ繊毛の単離はカルシウムエタノール法に従った。0.02% Nonidet P40 を含む HEMEDK 緩衝液で除膜したのち、HEMEDK 緩衝液を使って遠心操作により Nonidet P40 を取り除いた。軸系は 4% パラフォルムアルデヒドで 30 分間軽く固定した。LR White で包埋したのち超薄切片を作った。切片をグリッドの上に置き抗体と反応させる方法を行った。まずグリッド上で 0.6% BSA で 30 分間室温でブロックさせたのち、抗体と室温で一晩反応させた。

グリッドは 4 回ブロッキング緩衝液で洗ったのち、プロテイン A-コロイド金で 4 時間室温でさらに PBS で 3 回置き換えた。それから 3 回ブロッキング緩衝液で洗った後、PBS で 3 回置き換えた。

### 電子顕微鏡

試料を 1% グルタルアルデヒドで固定したのち、リン酸緩衝液を取り除くために蒸留水で軽く洗ったのちウラニルアセテート染色施した。そのグリッドはカーボン蒸着をして安定させた。

## 結 果

第3章において、テトラヒメナ繊毛外腕ダイニン $\beta$ 鎖と $\gamma$ 鎖由来のフラグメントを精製した。その2種類のフラグメント $-\beta$ とフラグメント $-\gamma$ から抗体を作成した。さらに精製を行い抗体の認識するポリペプチド鎖を同定したところ、抗フラグメント $-\beta$ はフラグメント $-\beta$ のうち178 kDaのポリペプチド鎖を認識し、抗フラグメント $-\gamma$ はフラグメント $-\gamma$ のうちの178 kDaのポリペプチド鎖のみ認識した。各々の精製した抗フラグメントを抗-178 $\beta$ と抗-178 $\gamma$ とよぶことにする。

次に、テトラヒメナ繊毛軸系内の外腕ダイニン重鎖の178 kDaポリペプチド鎖の位置を検索するためにコロイド金粒子を結合させたプロテインAを二次標識抗体として用いた。軸系の免疫反応を妨げないようにマイルドな固定法としてパラフォルムアルデヒドで軸系の固定を行った。包埋のための樹脂も低温で重合可能なようにLR-whiteを用いた。軸系を包埋した樹脂の超薄切片を作成し、メッシュのうえに固定した後、2種類の抗体を反応させた。その後、プロテインAに10 nmのコロイド金を結合させた二次標識抗体のプロテイン-A-goldを反応させ、通常の染色を行い抗原を明らかにした。

図4-1と図4-2は、抗体と反応させた軸系の低倍率での電顕像をあらわしている。金粒子の結合位置を観察すると、抗-178 $\beta$ も抗-178 $\gamma$ も特異的に軸系に結合し、アーティファクトな金粒子は非常に少ないことがわかる。軸系に結合している金粒子の個数が少ないのは、超薄切片上に露出する178 kDa

の抗原部位が限られていることと、アフィニティー精製により抗体濃度が薄くなり反応性が悪くなったためとも考えられる。図4-3は軸系を縦断した電顕像で、ともに周辺微小管に沿って金粒子が確認できる。さらに軸系内の結合位置を詳しく探るため、軸系の横断面図を拡大してみると、図4-4および図4-5に示すようになり、ともに金粒子は外腕のみと反応しており、内腕やその他の軸系内構成タンパク質とは結合していないことがわかる。なお、ここで写真内の数字は周辺微小管の番号を示している。これは、中心微小管を結ぶ線分の二等分線上にちょうど位置する微小管を1番とし、腕の出る方向に順番に番号をつけたものである。抗-178 $\beta$ の金粒子は外腕のみをそれぞれ認識しており、断定はできないが、外腕のやや外側に金粒子が位置している傾向がある。また、図4-5から抗-178 $\gamma$ も外腕のみを認識しているが、抗-178 $\beta$ と比べてやや外腕の根元の方に位置していると思われる。この観察をもとに、位置を測定し模式化した軸系上に金粒子の位置をあらわしてみると、図4-6のように抗-178 $\beta$ 結合の金粒子は外腕のやや外側に位置しており、抗-178 $\gamma$ 結合の金粒子は外腕のやや内側に位置している傾向のあることがわかる。結合している外腕の位置はさまざまである。抗-178 $\gamma$ 結合の金粒子は上記の結合様式より異なった結合が高い頻度で観察された。図4-7をみると外腕の5番目と6番目の間に外腕とは離れて金粒子が観察された。膜方向へ伸びている構造は周辺微小管の5番と6番の間に限られており、アーティファクトとは考えにくい。この5、6番目の間には特別の構造体ははっきりと観察されないが、 $\gamma$ 鎖の機能を考える上で何か参考になるかもしれない。

以上、3頭構造を持つテトラヒメナ外腕ダイニン中の2つの頭を *in situ* で抗



## 考 察

免疫電子顕微鏡を用いたダイニンの軸系内での位置の検討は、Ogawa and Mohri (1975) によって抗 fragmen A を用いてウニ精子軸系内で外腕を認識することを報告している。また、テトラヒメナ軸系内のダイニンの位置は、Crossley ら (1991) により 22 S ダイニンと 14 S ダイニンをショ糖密度勾配遠心で調製して作成した抗 22 S ダイニンと抗 14 S ダイニンを用いて、外腕と内腕の位置を示した報告のみである。

今回、テトラヒメナの外腕の重鎖、いわゆる3つの頭構造のうち $\beta$ と $\gamma$ の位置を免疫電顕によって初めて示すことができた。しかも頭部のなかでも機能的に重要な意味をもつと考えられる保守性の高い 178 kDa の位置を推定することができた。それによると、 $\beta$ 鎖は外腕の外側に位置して、 $\gamma$ 鎖の 178 k ポリペプチド鎖はやや内側に存在することから、等価の力が出せるとしたら、微小管を滑らせるのに同時に動くのか、時間差を持って微小管を滑らせているのかは興味のある問題である。

また、抗-178  $\gamma$  の金粒子は微小管の5番目と6番目の間にみられることから、今までにはこのような報告はなく、より詳しい解析が待たれる。クラミドモナス鞭毛軸系では、5番目の微小管から隣の微小管へ突出している外腕は欠除しているという報告ある。また、ウニ精子鞭毛では5番目と6番目はつながった構造をしており抗体も反応しなかった。

最近 Sakakibara ら (1993) によってクラミドモナス突然変異株の中で外腕重鎖

の各々の欠損株を調製し、電子顕微鏡により詳しい解析をしている。それによると、外腕の先端のB-小管に近い部分に $\alpha$ 鎖がみられ、それより少しA-小管よりも $\beta$ 鎖が中央よりも $\gamma$ 鎖がみられると報告している。今回得られた結果と比較してみると、抗体と Protein A、10 nm の金粒子の大きさをあわせると約 20 nm あるが、それぞれの金粒子は 20 nm の範囲内で分布していることがわかり、 $\gamma$ 鎖は $\beta$ 鎖よりやや内側に位置していることが推定できる。

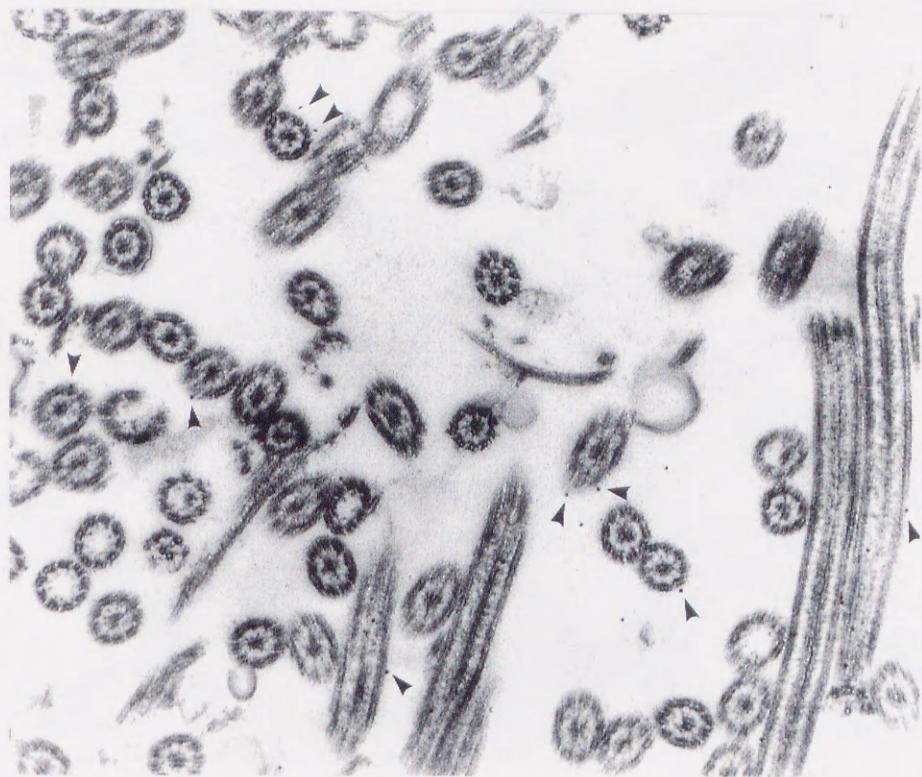


図4-1 テトラヒメナ軸系内の178 $\beta$ ポリペプチド鎖の同定

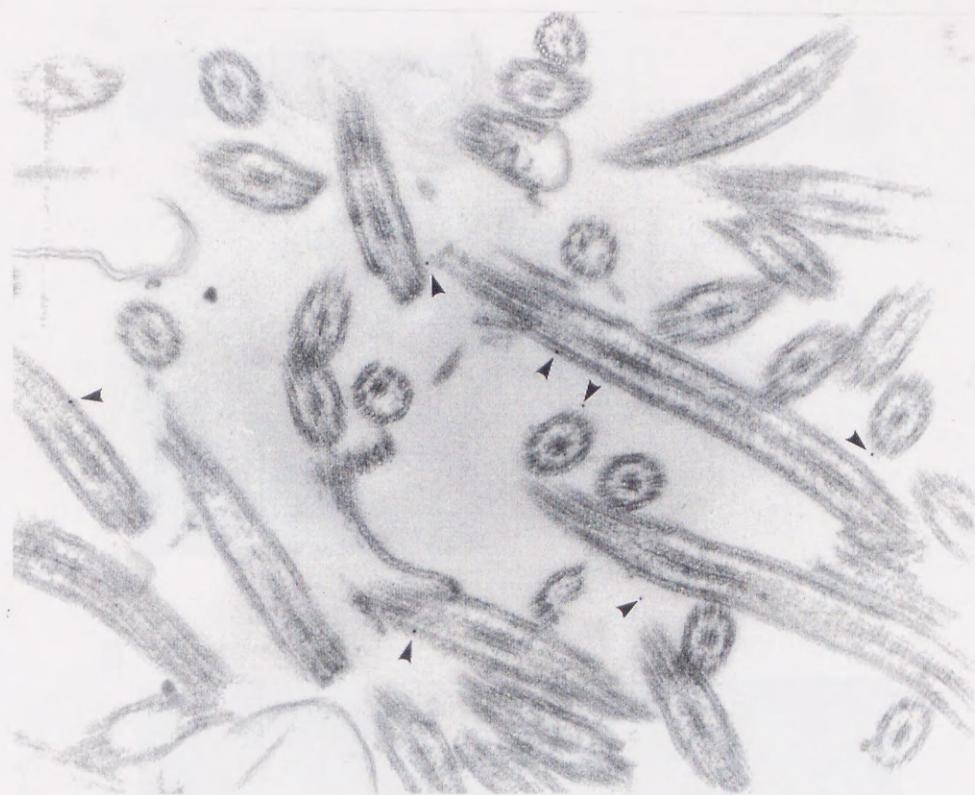
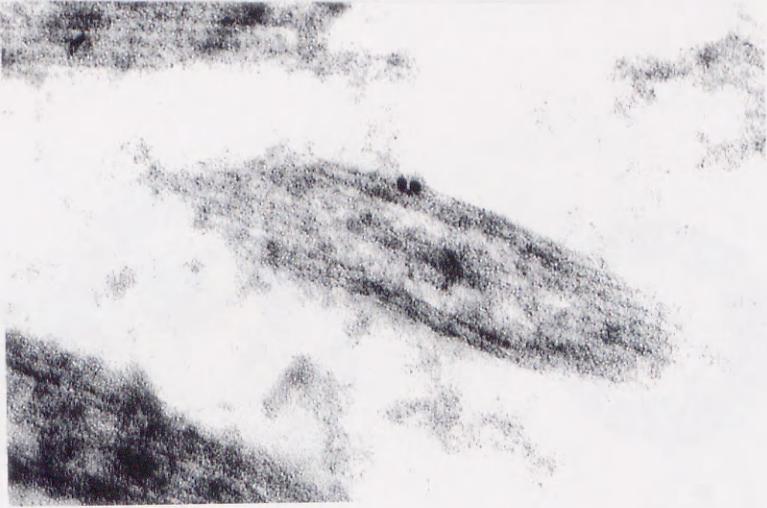


図4-2 テトラヒメナ軸系内の178 $\gamma$ ポリペプチド鎖の同定

A



B

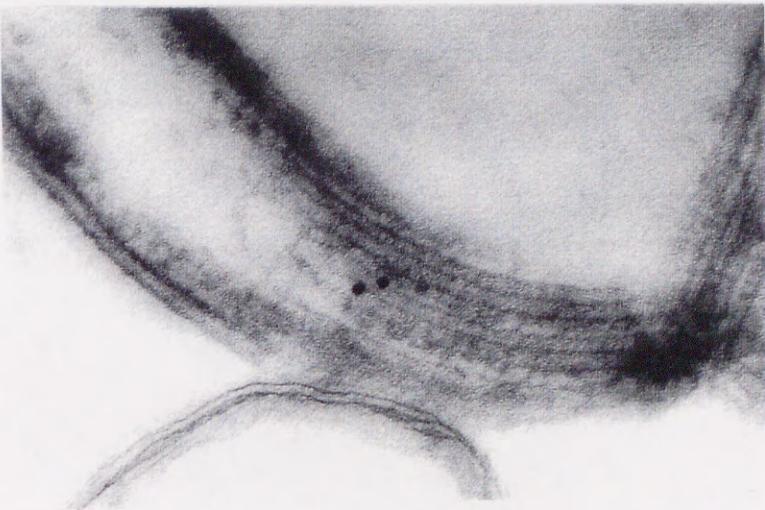


図4-3 A テトラヒメナ軸系内の178 $\beta$ ポリペプチド鎖の同定

B テトラヒメナ軸系内の178 $\gamma$ ポリペプチド鎖の同定

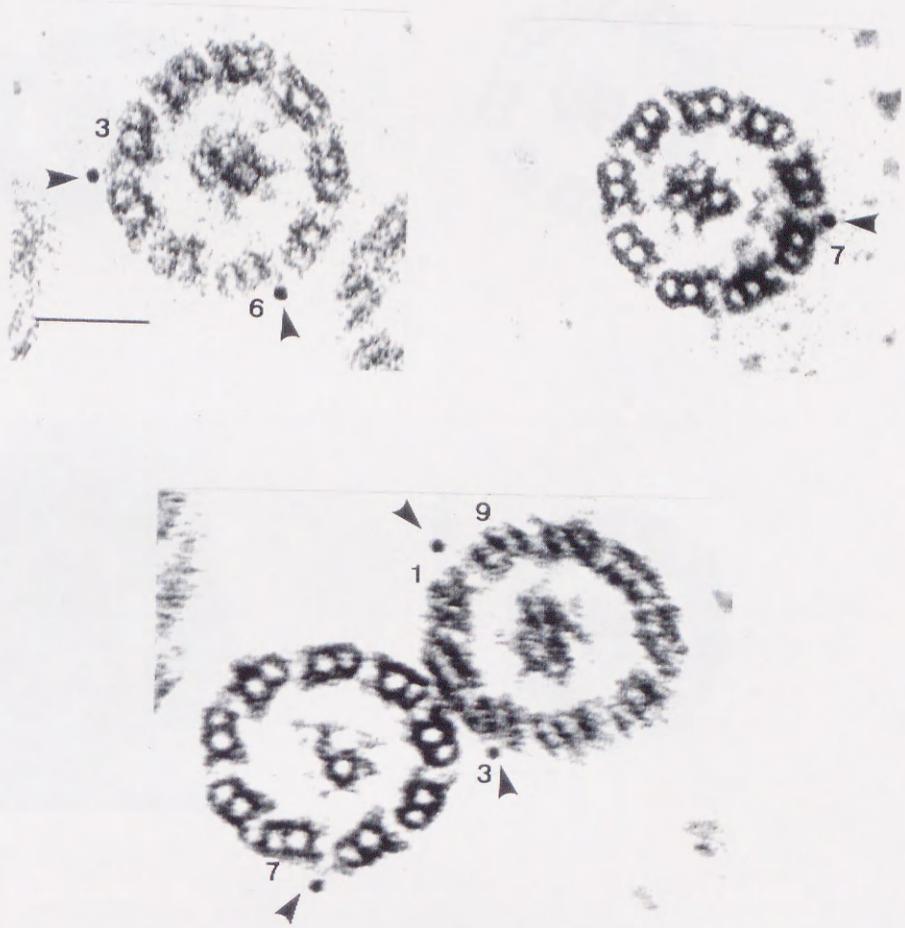


図4-4 テトラヒメナ軸系内の178 $\beta$ ポリペプチド鎖の同定  
 軸系内の番号は微小管の番号を示す。スケールバーは100nm

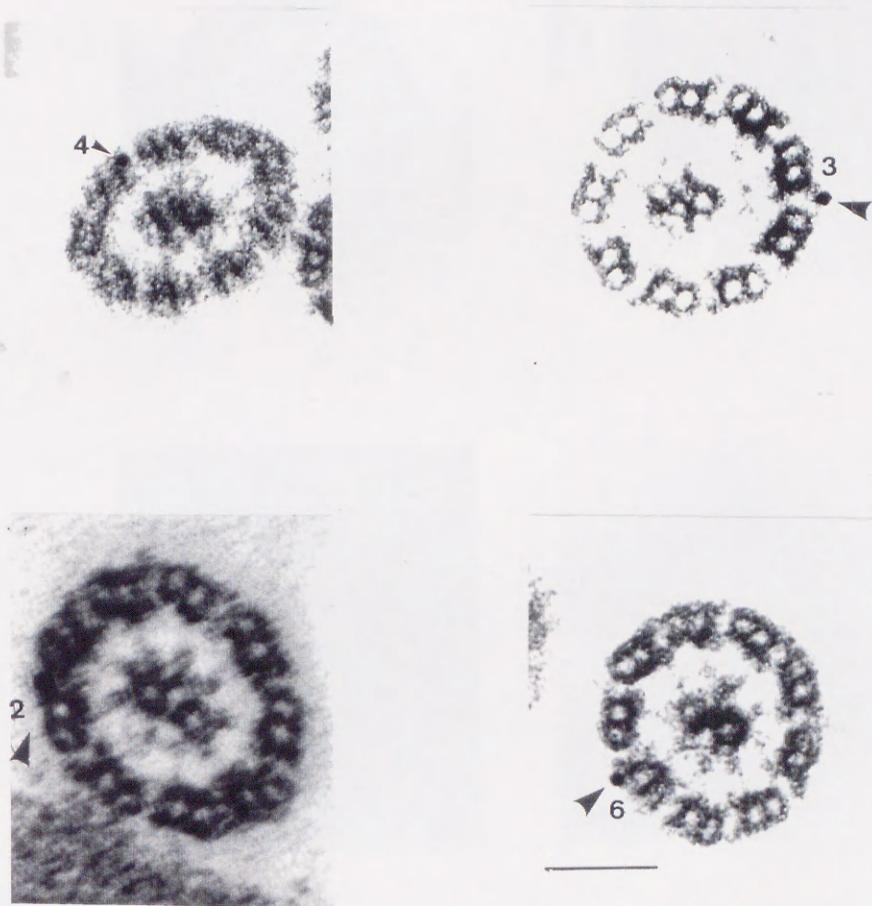


図4-5 テトラヒメナ軸系内の178 $\gamma$ ポリペプチド鎖の同定

軸系内の番号は微小管の番号を示す。スケールバーは100nm

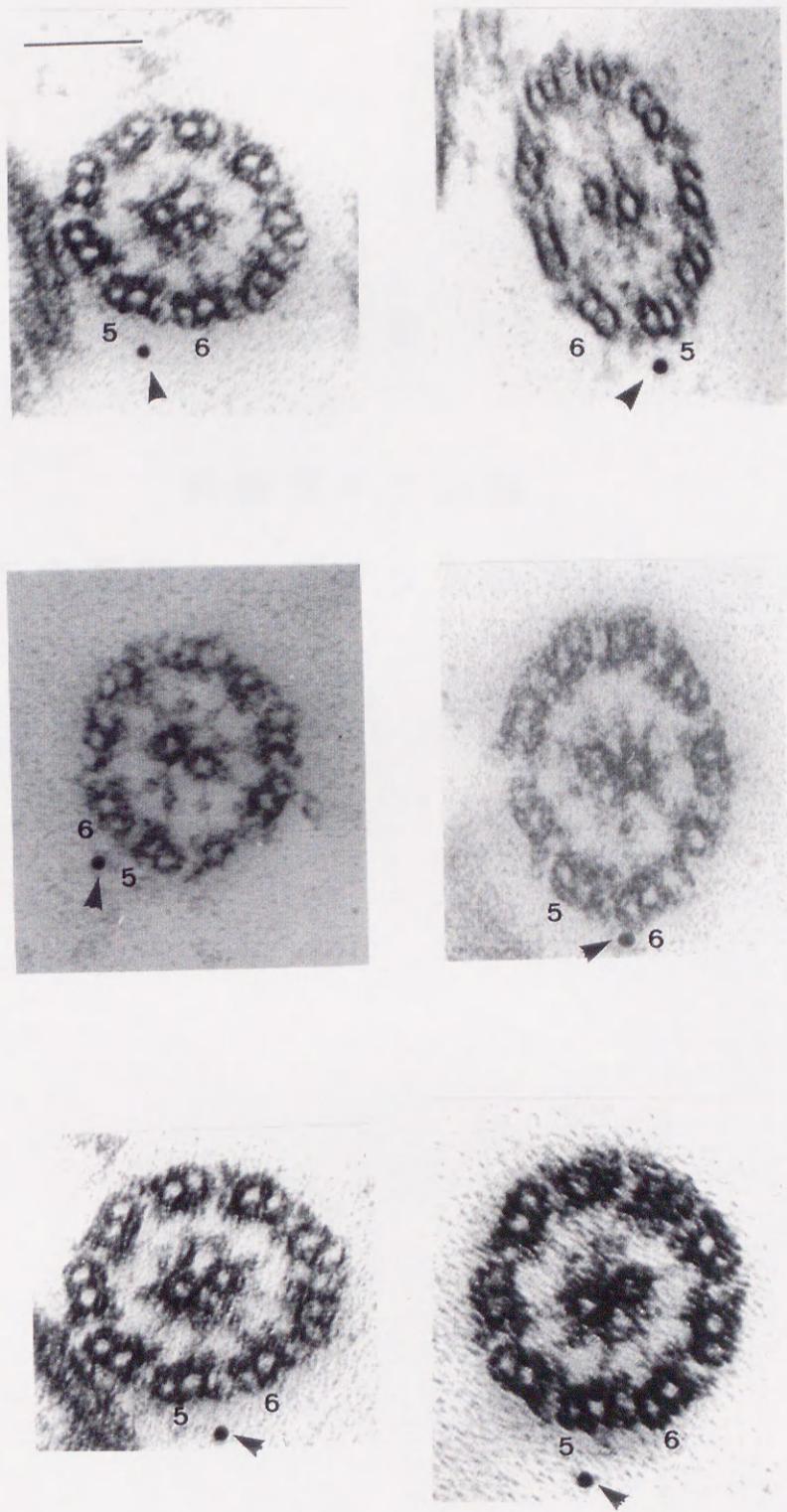


図4-6 テトラヒメナ軸系内の178 $\gamma$ ポリペプチド鎖の同定  
 軸系内の番号は微小管の番号を示す。スケールバーは100nm

## 第 5 章

### 外腕ダイニンの 二つの頭部フラグメントの酵素的諸性質

## 要 旨

ダイニンの酵素化学的諸性質はミオシンに非常に類似している。ミオシンサブフラグメント1と同様に機能を保持したダイニンのフラグメントを得る目的で、巨大な分子量を持ち、複雑なタンパク質複合体の外腕ダイニンをプロテアーゼで消化させることにより、フラグメントを2種類精製した。

それらのフラグメントが機能を保持しているか、調べたところチューブリンダイマーによる活性化がみられ、チューブリン相互作用部位は保持されていることが推定された。またバナデイトによる阻害効果も著しく、ダイニン特有のATP反応機構を保持していることが推測された。

また、これら2種類のフラグメント（フラグメント $\beta$ 、フラグメント $\gamma$ ）の諸性質を検討してみると、pH依存性など非常に類似性が高いことがわかった。また第3章で述べたように、分子量、構成するポリペプチド鎖などの形状もきわめて類似性が高いことから、機能的部位は保守的に保たれており、その他の微小管結合部位などが可変部になって、滑り運動を引き起こしているものと推定される。

## 序 論

外腕ダイニンの解析から、ダイニンの ATP 分解過程は基本的にはミオシンによるものと類似している (Kanazawa and Tonomura, 1965) ことが明らかになっている。ダイニンの ATP 分解過程も速い基質結合・分解過程と、分解産物のゆっくりした離脱過程からなる。ダイニンからもっとも遅く解離するのは ADP である (Holzbaur and Johnson, 1986)。また、ダイニンと微小管は ATP の非存在下で強固な複合体を形成し、ATP 存在下で解離する性質を持つ。ストップフロー法で実測されたこの解離過程の速度は非常に速い (Porter and Johnson, 1983) などミオシンの場合と同様である。

また、ダイニンが ATP 分解のエネルギーを効率よく運動エネルギーに変換するためには、それらの ATP 分解速度が運動の起こっていないときには低く、微小管と相互作用して運動を生じるときにだけ高まる性質がなくてはならない。この現象は、微小管によるダイニン ATPase の活性化として観察されるが、Omoto and Johnson (1986) は高濃度の微小管の存在下においてはじめて、ダイニン ATPase が最大 6 倍程度活性化されることを示した。この微小管によるダイニン ATPase の活性化は、反応速度論的には律速段階である生成物 ADP のゆっくりした解離過程の加速現象としてとらえられる。

筋肉におけるアクチンとミオシンの相互作用に伴うミオシンの活性の増大と類似の現象がみられるが、ミオシンよりはるかに大きく複雑で量的にも少ないという数々の障害があるが、機能的部位を保持したミオシンサブフラグメント

1 (S1) に相当するダイニンのフラグメントが容易に調製可能となることは、タンパク質化学的研究に寄与するものと考えられる。

本章においては、第3章で述べたフラグメント- $\beta$ 、フラグメント- $\gamma$ が機能的部位を保持しているかどうかを検証し、さらにこれら2種類のフラグメントの酵素的諸性質を比較検討した。

## 材料と方法

### ダイニン、フラグメントダイニンの精製

ダイニンはカルシウム-エタノール法で単離した繊毛を除膜したのち、低イオン強度の Tris/EDTA 緩衝液で 17 時間透析して得た。5-20 % ショ糖密度勾配遠心で 22 S として精製した。フラグメントダイニンは第 3 章で述べたようにダイニンをサーモリシン消化したのち、カラムクロマトグラフィーを行って精製した。

### チューブリンダイマーの精製

チューブリンダイマーは、ダイニンを抽出した軸系をさらに低イオン強度の Tris/EDTA 緩衝液で透析した後、少量の 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 3 mM MgSO<sub>4</sub> を加えて 40 °C で加温し、3 分間ピペッティングにより抽出した。さらに Q-Sepharose カラムクロマトグラフィーによる精製を行った。チューブリンダイマーは 1 M NaCl で溶出した。

### ATPase 活性の測定

通常は 1 mM ATP, 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) の反応液に酵素を加えて反応開始した。27 °C で 20 分間の反応後の反応停止には分解産物のリン酸の呈色を兼ねて硫酸酸性のモリブデン酸アンモニウム・SDS 混液を加えた (第 2・3 章と同様)。

pH依存性の測定には、Goods 緩衝液を用いた (MES : pH 5.5, 6.0, 6.5; HEPES : pH 7.0, 8.0; CHES : pH 9.0; CAPS : pH 10.0)。

阻害剤バナデイト (Vi) は 0-100  $\mu$  M の濃度になるように反応液中に加えておき、酵素と 27°C で 30 分間インキュベートした後に酵素反応を行った。

チューブリンダイマーと 5 mM MgSO<sub>4</sub> の存在下でダイニンと 27°C で 30 分間インキュベートした後、ATPase 活性を測定した。

## 結 果

フラグメントがチューブリンによる ATPase 活性化を持つかどうか、すなわち機能的部位を保持しているか否かを検討するために、テトラヒメナ軸系を低イオン強度の Tris/EDTA 緩衝液 (1 mM Tris/HCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM p-ABSF, pH 8.2) で十分にダイニン分画を透析による抽出後、さらに 40 °C で加温しながら 3 分周辺微小管を間抽出した。この方法は低イオン強度の緩衝液で中心小管を除去したのち周辺微小管の不完全な管である B-小管由来のチューブリンを加温し抽出しようとするものである。ダイニンフラグメントとチューブリンを Mg<sup>2+</sup> 存在下でインキュベーションの後、ATPase 活性を測定した。その結果フラグメントダイニン 1 mol に対して 10 mol のチューブリンダイマーで 2-3 倍活性化がみられた。22 S ダイニンも同程度の活性化がみられた。B 小管からチューブリンダイマーの抽出量があまり多くないため、それ以上のチューブリンの添加ができず、ATPase 活性化の効果が追跡不能であるが未だ上昇する傾向がみられた。このことから、2種のフラグメントダイニンとチューブリンの相互作用の結果、構造変化を引き起こしダイニン ATPase の活性化をもたらしたと推定される。

ダイニンの阻害剤であるバナデイトによる効果を調べてみると、非常に低濃度のバナデイトで阻害される。50 % の ATPase 阻害効果でみると 22 S ダイニンもフラグメントダイニンも 30-45 nM のバナデイト濃度でみられる。

表 5-1 にフラグメント- $\beta$  , フラグメント- $\gamma$  , 22 S ダイニンの酵素的性

質をまとめた。

表5-1 各種ダイニンの酵素的性質

	フラグメント-β	フラグメント-γ	22 S ダイニン
分子量	約 400 kDa	約 400 kDa	約 1,900 kDa
S 値	11 S	11 S	22 S
ポリプロテイン	178 k, 126 k	178 k, 89 k, 50 k	400-500 kDa
比活性 (units/mg)	9.6	8.6	0.5
Km 値 (M)	$6.5 \times 10^{-4}$	$1.3 \times 10^{-4}$	$1.5 \times 10^{-5}$
至適 pH	7.0, 9.0	6.5, 9.0	7.0
50% Vi 阻害 (nM)	30	45	35
フェブリンによる 活性化	2-3 倍	2-3 倍	2-3 倍

## 考 察

筋肉におけるアクチンとミオシンの相互作用に伴うミオシン ATPase 活性の増大と類似の微小管によるダイニン ATPase の活性化が繊毛運動には不可欠のものと考えられ、そのような活性化の検出がなされてきた (Ogawa, 1973; Hoshino, 1976)。しかし、できるかぎり精製された均一な微小管とダイニンを用い、生理学的条件下で活性化が明確に示されたのは、最近のことである。Omoto and Johnson は、in situ におけるダイニンの ATPase 活性近傍の微小管の濃度はきわめて高いと考え、最高 50 mg/ml の微小管存在下では 5-7 倍に及ぶ活性化がみられた。この場合でも頭打ちの傾向がみられないため、in situ における活性化の度合いはまだ上昇するものと思われる。今回も 22 S ダイニンにおいて同様に活性化がみられ、上昇する傾向がみられることから、チューブリン添加により活性化の度合いは大きいことが予想される。また、2種の精製したフラグメントにも同様な ATPase 活性化傾向がみられることから、フラグメントにしてもチューブリンによる相互作用部位を保持していると推測される。

バナデイトのダイニンにたいする阻害効果が Gibbons (1978) によって調べられた。50% 阻害を与えるバナデイトの濃度は  $0.03 \sim 1 \mu\text{M}$  とかなり低いことを明らかにした。さらに Shimizu (1987) は発展させて、tight-binding inhibition に属すること、非拮抗型であることを示した。バナデイトはリン酸の類似物として E · ADP 中間体に結合して、E · ADP · Vi 複合体を形成するために、阻害がもたらされることを明らかにした。今回フラグメントダイニンに対してバ

ナデイトの阻害効果を調べたところ、低濃度のバナデイトで阻害され感受性が高いという結果を得た。本研究で作成したフラグメントダイニンは、ダイニンが *in situ* における機能すなわち ATPase 活性の発現やチューブリンによる活性化などを保持した状態のフラグメントであることが推定できた。

次に、これらフラグメント- $\beta$ とフラグメント- $\gamma$ の間の酵素化学的差異について検討を行った。pH 依存性を調べてみると、フラグメントダイニンはどちらも中性付近と弱アルカリ性側に至適 pH がえられた。22S ダイニンでは中性付近にしか至適 pH が現れていないことから、活性中心は中性付近が機能的に重要だと考えられる。また、Km値はフラグメントになると上昇する傾向がウニ精子鞭毛 (Ogawa, 1975) でも得られているが、今回も 10 倍以上多くなっている。

以上機能を保持したフラグメントが得られたが、複雑なタンパク質複合体であるダイニンを解析する上で、これらのフラグメントダイニンは蛍光エネルギー移動による機能部位の測定などのタンパク質化学の研究にも有用であると思われる。



繊毛や鞭毛は生物にとって筋肉とならぶ重要な運動器官である。繊毛・鞭毛運動は、ともに ATP のエネルギーを使って屈曲波を根元から先端方向に正しく伝播する機構を持っていると理解されている。この屈曲運動も筋肉と同様に滑りが基本になっており、ダイニン・チューブリン系が繊毛・鞭毛運動の主角を担っている。すなわち、9 + 2 構造をしている微小管と、それから突出している腕様の構造体の外腕と内腕ダイニンの相互作用の結果、滑りを引き起こすとされている。さらに、屈曲への変換機構については未だ明らかにされていないが、他の軸系構成タンパク質ではなく、内腕ダイニン自体の関与が類推されている。

そこで本研究においては、繊毛運動機構の解析を進めるためには、まずモーター・タンパク質であるダイニン ATPase の形態・機能を明らかにする必要があると考えて、純粋培養が可能で増殖率の高い繊毛虫テトラヒメナを用い、独自の手法でダイニン ATPase の解析を行った。その結果、テトラヒメナ繊毛のダイニン数種を電気泳動的に簡単に分離精製することが可能となった。さらに、いままでテトラヒメナでは明らかにされていない、内腕ダイニンを構成する重鎖組成や屈曲の調節に関与していると考えられるポリペプチド鎖も分析することができるようになり、微小管との相互作用の研究にも発展が期待できる。

また、外腕ダイニンのフラグメントを容易に調製することができるようになり、ミオシン S 1 で解析が進んでいるようなタンパク質化学的な研究の方向性も見出すことができるようになった。

## 第 1 章

テトラヒメナ繊毛による電子顕微鏡の観察で 9 + 2 構造が観察され、さらに 1965 年に 9 対の微小管から突出しているダイニン ATPase が抽出され

て以来、急速に研究が進みさまざまな知見が得られてきたことを中心に現在の問題点を探っている。繊毛・鞭毛運動機構において、収縮説ではなく滑り説が一般に信じられるようになり、ダイニンと微小管のみで滑りが起こるとされているが、屈曲に関してはそれを調節している構造体すなわちタンパク質の解明に関心が深まっている。

また、ダイニンは筋肉ミオシンと異なり、非常に複雑な構造を持つタンパク質ということが明らかになってきている。ダイニンは繊毛の軸系の腕を構成する分子量 190 万から 120 万の巨大なタンパク質複合体であるが、電子顕微鏡を駆使してその形態が明らかにされた。それによると種によって違うが、2つか3つの頭を持った花束状の構造を持っている。さらに、それぞれの重鎖に相当する頭に ATPase があり、それぞれに機能が違うことも示唆されている。

## 第 2 章

繊毛運動を担っているダイニンの構造と機能を解析する目的で、テトラヒメナ繊毛のすべてのダイニンの抽出・精製を試みた。テトラヒメナは培養法も確立し、多量に得られることから、本研究では高分解能を持つ未変成の電気泳動法による解析を試みた。ダイニンは 190 万の分子量をもつために、その精製が困難とされていたが、支持体に低融点で強度の大きいアガロースゲルを用いることにより、ダイニンのような高分子領域のタンパク質も分離精製することが可能となった。さらにダイニンを構成するポリペプチド鎖の解析から、内腕ダイニンは外腕ダイニンに比べて多様な機能を持つことが類推されるような結果を得た。さらに、外腕・内腕ダイニンのみならず、軸系構成タンパク質の解析に有効な方法を確立することができた。

## 第 3 章

外腕ダイニンの3つの頭の各々の役割については、それらが互いに異なるのではないかと推測されているが、その各々の頭を取り出して解析する方法はまだ確立していない。本研究においては、外腕ダイニンをプロテアーゼで処理することにより、重鎖の機能部位を取り出すことを試みた。プロテアーゼ・サーモリシンがテトラヒメナ外腕ダイニンに効果的に作用し、その結果として、ATPase活性のきわめて高い2種類のフラグメントが生成された。さらに精製を行い、構成するポリペプチド鎖から重鎖の機能部位についても考察をおこなった。その2種類のフラグメントは高ATPase活性を持ち、分子量でも構成するポリペプチド鎖（178kDaのポリペプチド鎖を保持する）など2種類のフラグメント間の類似性は高かった。またそれら2種類のフラグメントの抗体を作成して重鎖由来についても検討を行ったところ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 鎖のうち $\beta$ 鎖と $\gamma$ 鎖由来の活性フラグメントを精製することができた。ウニ精子鞭毛外腕ダイニンの $\beta$ 鎖以外にはフラグメントとして調製されていないし、今回のこのような $\gamma$ 鎖由来のフラグメントの精製は初めてである。3つ頭と2つ頭の外腕ダイニンを考える上で、これらのフラグメントの比較は重要であると考えられる。

また、単離された外腕ダイニンはどのような高次構造をとっているのか、2種類の方法によって抽出されたダイニンをサーモリシンによる分解パターンで検討してみると、花束様の開いた構造ではなく、きわめてコンパクトな形態をとっているものと推測された。

#### 第 4 章

テトラヒメナの3つ頭を持つ外腕ダイニンは軸糸内においてどのような構造をもっているのか検討するために、重鎖フラグメントの178kDaを認識するポリクロナール抗体を用いて電子顕微鏡による観察を行った。二次標識と

してプロテインAにコロイド金粒子を結合させ、その金粒子の分布で重鎖の位置関係を類推した。2種類の抗体はともに外腕を認識しており、その分布に特徴ある傾向がみられた。今後、運動と関連した状態での軸系内の頭の位置を調べることにより、重鎖の機能的差異の解明が計られることが期待できる。

## 第 5 章

精製した2種の外腕ダイニン重鎖フラグメントの酵素的諸性質の比較検討を行ったところ、両者ともに非常によく似ていた。また、2種のフラグメントに微小管との相互作用能を保持しているかを検討してみるために、チューブリンと  $Mg^{2+}$  の存在下においてフラグメントの ATPase 活性を測定したところ、著しい ATPase 活性化がみられた。つまりフラグメントは ATPase としての機能単位とチューブリン相互作用部位を保持した状態であることが明らかになった。これら2種のフラグメントを用いたタンパク質化学的な研究に期待できる。

以上、本研究においては、生化学的手法を使ってダイニン ATPase の構造と機能を考察することにより、繊毛軸系内のモーター部の位置および機能的差異を検討した。その結果、原生動物のみに見られる3頭構造のうち特殊な存在である  $\gamma$  鎖のモーター部と細胞質ダイニンから広く存在する  $\beta$  鎖のモーター部と比較すると、共に 178 kDa のポリペプチド鎖を含み酵素的諸性質において非常に類似性が高いことを明らかにした。このことは、タンパク質分解酵素による分解パターンの全く異なる  $\alpha$  鎖のモーター部より  $\gamma$  鎖と  $\beta$  鎖のモーター部は非常に類似性が高く、進化の過程で  $\beta$  鎖のみにその機能を集約されていったものと推定される。また、 $\beta$  鎖と  $\gamma$  鎖のモーター部の ATP 結合部位や ATP 加水分解部位を含む主要な部位の 178 kDa ポリペプチド鎖以外

のC末付近においては、 $\beta$ 鎖と $\gamma$ 鎖ともにタンパク質分解酵素による切断箇所が異なるが、チューブリンとの活性化能には影響を及ぼさないことを明らかにした。A小管と結合しているN末付近は $\beta$ 鎖と $\gamma$ 鎖ともに、タンパク質分解酵素に対して感受性が高いためフラグメントとしては得られなかったが、軸糸への結合部位に違いが認められたので、チューブリンアイソタイプへの結合を異にしていると考えられる。内腕、外腕ダイニンともにチューブリンを結合していることを明らかにしたが、さらにそのアイソタイプを解析することにより、微小管上でのダイニン腕の配置を考察する手がかりとなると思われる。このように、ダイニン ATPase の機能および構造を生化学的手法を用いて明らかにすることは、繊毛運動の基本となる微小管とダイニン腕との相互作用を考える上で重要であると思われる。

Alcalá, H. (1959): Electron microscopy of the sperm cell. *J. Roy. Microsc. Soc.*  
*Cytol.* 5, 291-298.

Blair, J. J. (1971): Development of a binding protein in chick and flagella. *J. Theor. Biol.*  
*30*, 257-264.

Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation  
of microgram quantities of protein utilizing a principle of  
protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

### 参 考 文 献

Braken, C. J. (1971): Head progression by a sliding filament model for flagella. *J.*  
*Exp. Biol.* 55, 297-304.

Braken, C. J. (1972): Flagellar movement: a sliding filament model. *Science* 176,  
76-78.

Garr, J.-L., King, S. M., Moss, A. G. and Wilson, G. B. (1982): Oyster sperm dynamics  
from ultra-structural, biochemical, polyacrylamide gel electrophoresis, and  
enzyme properties. *J. Biol. Chem.* 257, 11450-11457.

Gibbons, I. R. (1958): Studies on the adenosine triphosphatase activity of 14S and  
8S dyonin from cells of *Tetrahymena*. *J. Biol. Chem.* 231, 5395-5398.

Gibbons, I. R., Casson, M. P., Evans, J. A., Gibbons, B. H., Hough, B., Marston, K. H.,  
Giles, W. S. and Tang, W.-J. Y. (1972): Potent inhibition of dyonin  
nucleoside triphosphatase and of the motility of chick and sperm flagella by  
vanadate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 2229-2234.

Gibbons, I. R. (1965): Dyonin ATPase as nucleoside triphosphate. *J. Biol. Chem.* 240,  
13337-13340.

Gibbons, I. R. and Rows, A. J. (1958): Dyonin: A protein with adenosine  
triphosphatase activity from chick. *Science* 129, 134-135.

Gibbons, I. R., Gibbons, B. H., Moss, G. and Arai, G. J. (1974): Multiple nucleoside  
binding sites in the sequence of dyonin: A  $\beta$ -type class. *Nature* 252,

- Afzelius, B. (1959): Electron microscopy of the sperm tail. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5, 269–278.
- Blum, J. J. (1971): Existence of a breaking point in cilia and flagella. *J. Theor. Biol.* 33, 257–263.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the protein quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brokaw, C. J. (1971): Bend propagation by a sliding filament model for flagella. *J. Exp. Biol.* 55, 289–304.
- Brokaw, C. J. (1972): Flagellar movement: a sliding filament model. *Science* 156, 76–78.
- Gatti, J.–L., King, S. M., Moss, A. G. and Witman, G. B. (1989): Outer arm dynein from trout spermatozoa. Purification, polypeptide composition and enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* 264, 11450–11457.
- Gibbons, I. R. (1966): Studies on the adenosine triphosphatase activity of 14S and 30S dynein from cilia of *Tetrahymena*. *J. Biol. Chem.* 241, 5590–5596.
- Gibbons, I. R., Cosson, M., P., Evans, J., A., Gibbons, B. H., Houck, B., Martinson, K. H., Sale, W. S. and Tang, W.–j. Y. (1978): Potent inhibition of dynein adenosine triphosphatase and of the motility of cilia and sperm flagella by vanadate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2220–2224.
- Gibbons, I. R. (1988): Dynein ATPases as microtubule motors. *J. Biol. Chem.* 263, 15837–15840.
- Gibbons, I. R. and Rowe, A. J. (1965): Dynein: A protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. *Science* 149, 424–426.
- Gibbons, I. R., Gibbons, B. H., Mocz, G. and Asai, D. J. (1991): Multiple nucleotide binding sites in the sequence of dynein  $\beta$  –heavy chain. *Nature* 352,

640-643.

- Goodenough, U. W. and Heuser, J. E. (1982): Substructure of outer dynein arms. *J. Cell Biol.* 95, 798-815.
- Goodenough, U. W. and Heuser, J. E. (1984): Structural comparison of purified dynein proteins with in situ dynein arms. *J. Mol. Biol.*, 180, 1083-1118.
- Goodenough, U. W. and Heuser, J. E. (1985): Substructure of inner dynein arms, radial spokes, and the central pair/projection complex of cilia and flagella. *J. Cell Biol.* 100, 2008-2018.
- Gray, J. (1955): The movement of sea-urchin spermatozoa. *J. Mol. Biol.* 194, 481-494.
- Holzbaumer, E. L. F. and Johnson, K. A. (1986): Rate of ATP synthesis by dynein. *Biochemistry* 25, 428-434.
- Hoshino, M. (1977): Tryptic fragmentation of 30 S dynein from *Tetrahymena* cilia. *Biochim. Biophys. Acta* 492, 70-82.
- 稲葉一男, 毛利秀雄 (1989): 鞭毛・繊毛運動の分子機構, 蛋白質・核酸・酵素, 34, 1505-1512.
- Johnson, K. A., and Wall, J. S. (1982): The structure and molecular weight of 30S dynein from *Tetrahymena*. *J. Submicrosc. Cytol.* 15, 181-186.
- Johnson, K. A. and Wall, J. S. (1983): Structure and molecular weight of dynein ATPase. *J. Cell Biol.* 96, 669-678.
- Kamiya, R., and Okagaki, T. (1986): Cyclical bending of two outer-doublet microtubules in frayed axonemes of *Chlamydomonas*. *Cell Motil.* 6, 580-585.
- Kamiya, R., Kurimoto, E., Sakakibara, H., and Okagaki, T. (1989): A genetic approach to the function of inner and outer arm dynein. In *Cell Movement Vol. 1.* (eds. Warner, F. D., Satir, P., and Gibbons, I. R.) Alan

- Liss Inc. New York. pp 209–218.
- King, S. M. and Witman, G. B. (1989): Molecular structure of *Chlamydomonas* outer arm dynein. In *Cell Movement Vol. 1.* (eds. Warner, F. D., Satir, P., and Gibbons, I. R.) Alan Liss Inc. New York. pp 61–75.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 256, 680–685.
- Marchese–Ragona, S. P., Wall, J. S., and Johnson, K. A. (1988): Structure and mass analysis of 14 S dynein obtained from *Tetrahymena* cilia. *J. Cell Biol.* 106, 127–132.
- Mastrorade, D. N., O'Toole, E. T., McDonald, K. L., McIntosh, J. R., and Porter, M. E. (1992): Arrangement of inner dynein arms in wild-type and mutant flagella of *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* 118, 1145–1162.
- Mocz, G. and Gibbons, I. R. (1993): ATP-insensitive interaction of the amino-terminal region of the  $\beta$  heavy chain of dynein with microtubules. *Biochemistry* 32, 3456–3460.
- Mohri, H., Hasegawa, S., Yamamoto, M. and Murakami, S. (1969): Flagellar adenosine triphosphatase (dynein) from sea urchin spermatozoa. *Sci. Art. Coll. Gen. Educ., Univ. Tokyo* 19, 195–217.
- Muto, E., Kamiya, R., and Tsukita, S. (1991): Double-rowed organization of inner dynein arms in *Chlamydomonas* flagella revealed by tilt-series thin-section electron microscopy. *J. Cell Sci.* 99, 57–66.
- Muto, E., Edamatsu, M., Hirono, M., and Kamiya, R. (1994): Immunological detection of actin in the 14S ciliary dynein of *Tetrahymena*. *FEBS Letters*, 343, 173–176.
- Nakamura, K. and Masuyama, E. (1979): Studies of dynein from *Tetrahymena* cilia using agarose polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim. Biophys.*

Acta, 578, 54–60.

- Nakamura, K., Masuyama, E., Suzaki, T. and Shigenaka, Y. (1982): Flagellar adenosine triphosphatases from annelid spermatozoa: electrophoretic identification of dyneins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 214, 172–179.
- Nakamura, K., Masuyama, E., Wada, S. and Okuno, M. (1990): Application of stains—all staining to the analysis of axonemal tubulins: identification of  $\beta$ -tubulin and  $\beta$ -isotubulins. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 21, 237–245.
- Niino, Y. and Mili-Noumura, T. (1992): ATPase sites in two-headed fragment of *Tetrahymena* 22S ciliary dynein. *Biochim. Biophys. Acta*, 1100, 146–154.
- Ogawa, K. and Mohri, H. (1972): Studies on flagellar ATPase from sea urchin spermatozoa. I. Purification and some properties of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 256, 142–155.
- Ogawa, K. and Mohri, H. (1975): Preparation of antiserum against a tryptic fragment (Fragment A) of dynein and an immunological approach to the subunit composition of dynein. *J. Biol. Chem.* 251, 5739–5801.
- Ogawa, K., and Gibbons, I. R. (1976): Dynein 2. A new adenosine triphosphatase from sea urchin sperm flagella. *J. Biol. Chem.* 251, 5739–5801.
- Ogawa, K., Negishi, S. and Obika, M. (1980): Dynein 1 from rainbow trout spermatozoa: immunological similarity between trout and sea urchin dynein 1. *Arch. Biochem. Biophys.* 203, 196–203.
- Ogawa, K. (1991): Four ATP-binding sites in the mid region of the  $\beta$ -heavy chain of dynein. *Nature* 352, 643–645.
- Ow, R., A., Tang, W. J. Y., Mocz, G. and Gibbons, I. R. (1987): Tryptic digestion of dynein 1 in low salt medium: Origin and properties of fragment A. *J.*

- Biol. Chem. 262, 3409–3414.
- Paschal, B. M., King, S. M., Moss, A. G., Collins, C. A., Vallee, R. B., and Witman, G. B. (1987): Isolated flagellar dynein translocates brain microtubules in vitro. *Nature* 330, 672–674.
- Piperno, G., and Luck, D. J. (1979a): Axonemal adenosine triphosphatases from flagella of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 254, 3084–3090.
- Piperno, G., and Luck, D. J. (1979b): An actin-like protein is a component of axonemes from *Chlamydomonas* flagella. *J. Biol. Chem.* 254, 2187–2190.
- Piperno, G., Huang, B., Ramanis, Z. and Luck, D. J. (1981): Radial spokes of *Chlamydomonas* flagella: polypeptide composition and phosphorylation stalk components. *J. Cell Biol.* 88, 73–79.
- Piperno, G. (1988): Isolation of a sixth dynein subunit adenosine triphosphatase of *Chlamydomonas* axonemes. *J. Cell Biol.* 106, 133–140.
- Piperno, G., Ramanis, Z., E. F. Smith, and Sale W.S. (1990): Three distinct inner dynein arms in *Chlamydomonas* flagella: molecular composition and location in the axoneme. *J. Cell Biol.*, 110, 379–389.
- Piperno, G., and Ramanis, Z. (1991) : The proximal portion of *Chlamydomonas* flagella contains a distinct set of inner dynein arms. *J. Cell Biol.* 112, 701–709.
- Piperno, G., Mead, K., and Shestak, W. (1992): The inner dynein arms I2 interact with a “dynein regulatory complex” in *Chlamydomonas* flagella. *J. Cell Biol.* 118, 1455–1463.
- Porter, M. E., and Johnson, K. A. (1983): Characterization of the ATP-sensitive binding of *Tetrahymena* 30S dynein to bovine brain microtubules. *J. Biol. Chem.* 258, 6575–6581.
- Sakakibara, H., Takada, S., King, S. M., Witman, G., B. and Kamiya, R. (1993): A

- Chlamydomonas* outer arm dynein mutant with a truncated  $\beta$  heavy chain. J. Cell Biol. 122, 653–661.
- Sale, W. S., Goodenough and Heuser, J.E. (1985): The substructure of isolated and in situ outer dynein arms of sea urchin sperm flagella. J. Cell Biol., 101, 1400–1412.
- Satir, P. (1965): Studies on cilia II . J. Cell Biol. 26, 805–834.
- Satir, P. (1968): Studies on cilia III . Further studies on cilium tip and a “ sliding filament ” model of ciliary motility. J. Cell Biol. 39, 77–94.
- Schroeder, C. C., Fok, S. A. and Allen, R. D. (1990): Vesicle transport along microtubular ribbons and isolation of cytoplasmic dynein from *Paramecium* J. Cell Biol. 11, 2553–2562.
- Shingyoji, C., Murakami, A., and Takahashi, K. (1977): Local activation of Triton–extracted flagella by ionophoretic application of ATP. Nature 265, 269–270.
- Smith, E. F., and Sale, W. S. (1992): Structural and functional reconstitution of inner dynein arms in *Chlamydomonas* flagellar axonemes. J. Cell Biol. 117, 573–581.
- Summers, K. E., and Gibbons, I. R. (1971): Adenosine triphosphate–induced sliding of tubules in trypsin–treated flagella of sea–urchin sperm. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 3092–3096.
- Thompson, Jr., G. A., Baugh, L.C., and Walker, L. F. (1974): Nonlethal deciliation of *Tetrahymena* by a local anesthetic and its utility as a tool for studying cilia regeneration. J. Cell Biol. 61, 253–257.
- Vale, R. D., and Goldstein, L. S. B. (1990): One motor, many tails: An expanding repertoire of force–generating enzymes. Cell 60, 883–885.
- Vallee, R. B., Shpetner, H. S., and Paschal, B. M. (1989): The role of dynein in

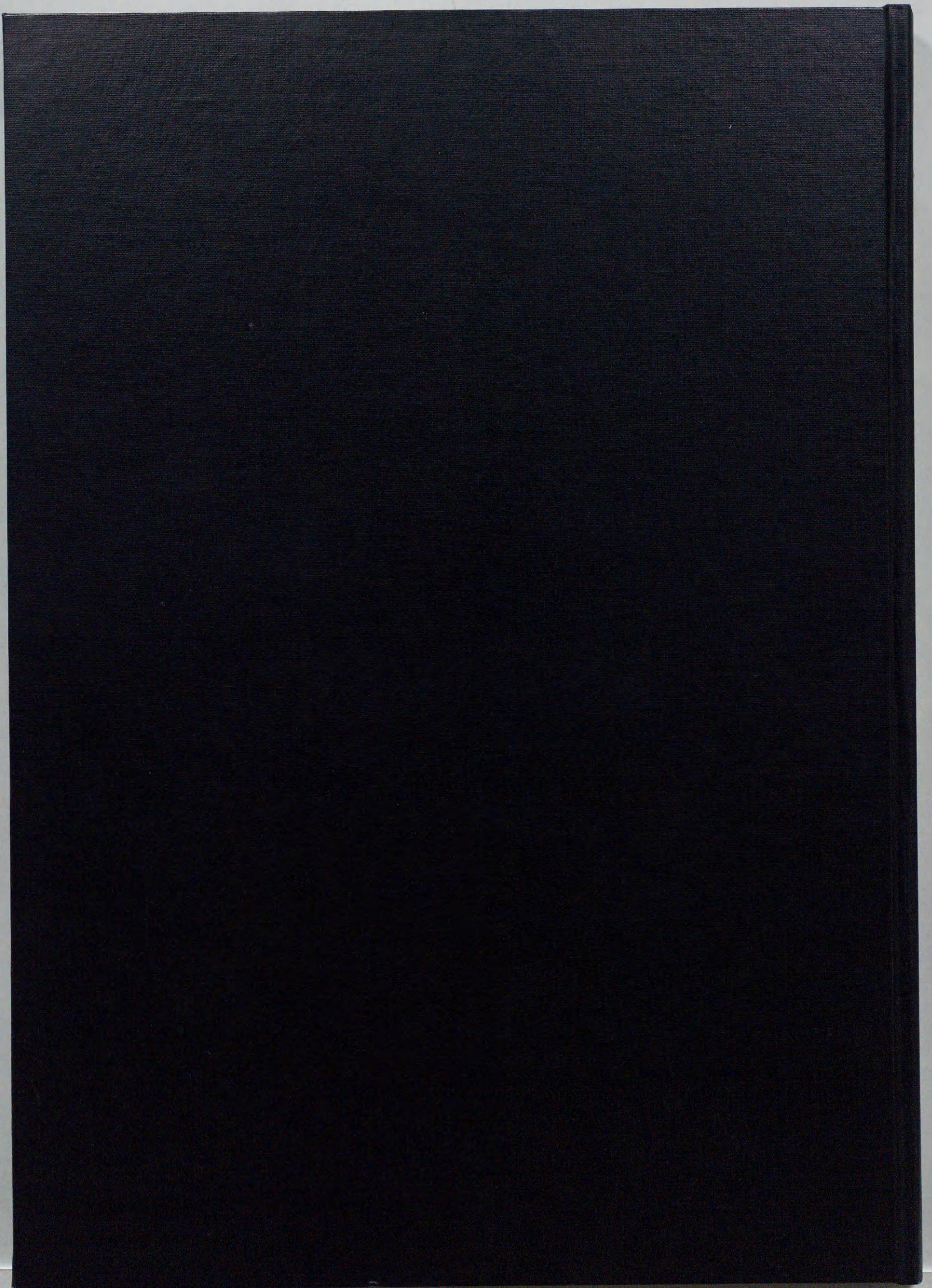
retrograde axonal transport. *TINS* 12, 66–70.

Walker, R. A., and Sheetz, M. P. (1993): Cytoplasmic microtubule-associated motors. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 429–451.

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました広島大学 重中義信教授、広島女子大学 中村健一教授に心より感謝申し上げます。また、遂行するにあたっていろいろ御相談・御指導いただきました洲崎敏伸博士を始めとする広島大学 総合科学部 細胞生理学研究室の皆様方に厚くお礼申し上げます。抗体の作成に関しまして、御協力いただきました島根大学の石田秀樹様に、電子顕微鏡観察の御指導をいただきました、ハワイ大の石田正樹博士に厚くお礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、終始あたたかく励ましてくださいました広島女子大学健康科学科 草野敬久教授、菅原芳明教授、元広島女子大学教授・広島経済大学 新川英明教授に感謝いたします。



inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

