

## X 線 1 分子追跡法によるダイニン 1 分子の 3 次元的運動測定

木下慶美、松下祐福

概要：微小管と結合したダイニンが、ADP 状態・Free 状態間で生じる微小な運動を、X 線 1 分子追跡法(Diffracted X-ray Tracking; DXT)で測定した。本研究を通して、50–100  $\mu\text{s}$  間におけるダイニン分子の 3 次元ダイナミクスにおいて、通常のおよそ 3–6 倍程度大きな運動( $\theta$ : 0.79 mrad,  $\chi$ : 1.26 mrad)が共存していることを確認した。本ダイナミクスは ADP/Free 状態の転移過程に相当するリンカー部位の重要なダイナミクス機構であり、現在まで 1 分子レベルで確認されていなかった 3 次元立体のダイナミクス観測において極めて重要な知見を与えることに成功した。

### 1. 著者紹介

木下慶美：理学系研究科物理学専攻樋口研究室に所属。近年注目を浴びているダイニン分子に特化して、運動特性の解明に取り組んでいる。本研究では、この分子を対象とした研究デザインと蛋白調整を担当した。

松下祐福：新領域創成科学研究科物質系専攻佐々木研究室に所属。X 線 1 分子追跡法(Diffracted X-ray Tracking; DXT)を用いた過飽和溶液中の局所ダイナミクス構造解析に取り組んでいる。本研究では計測系のアレンジメントとデータ解析を担当した。

### 2. 背景と目的

細胞質ダイニン（以下ダイニンと記載）は、細胞内に張り巡らされた微小管をレールとして、ATP 加水分解エネルギーを利用して二足歩行し、物質輸送を担うタンパク質である（図 1(A)）。ダイニンをはじめとするモータータンパク質の運動機構解明は、蛍光観察や光ピンセット法などを用いて 1990 年代から盛んに取り組まれてきた。これらの方法では基板平面に対する垂直方向の精度が低いため、2 次元運動（数～数十 nm 精度）を中心とした力学的測定が中心に行われてきた。ダイニンは力発生前（ATP 加水分解状態）と力発後に相当する状態で大きく構造が異なる<sup>1</sup>。力発後に相当する ADP 状態と Free 状態を比較すると、ダイニンの構造は図 1(B)のように少し異なることが結晶構造から知られている<sup>2, 3</sup>。しかし、この 2 状態間に起こる微小な動的構造変化は、3 次元レベルを含み、全く観察されていない。

3 次元的運動測定手法として、本研究では、X 線 1 分子追跡 (Diffracted X-ray Tracking; DXT) 法を用いた。タンパク質分子に結合した金ナノ結晶 (20-50nm) を X 線照射により得られるラウエ回折点追跡することで、高い時間分解能 (マイクロ秒) と高い位置決定精度 (ピコメートル) を達成する。これまでに、DXT 法により、免疫系タンパク質 MHC の微小な 1 分子動態計測と免疫反応機構の関係性<sup>4</sup>、膜タンパク質 nAChR のリガンド結合の詳細な構造変化の観察<sup>5</sup>、グループ II シヤペロニンの ATP 結合時における共同的開閉機構の解明<sup>6</sup>など、様々なタンパク質の構造変化・ダイナミクス研究において多くの成果をあげてきた。

本研究では、高い時間空間分解能での DXT 測定特性を利用して、ダイニンが ADP 状態と Free 状態間で引き起こされる微小な 3 次元的な運動を捉えることを目標とした。今回測定対象とするのは、ダイニンの片足の基本部位となる ATP 結合部位を含んだモータードメインであり、モータードメインの N 端に金ナノ結晶を結合させてその運動を追った。微小管を基板に固定した上で、微小管と相互作用しているダイニンが運動する様子を低 ADP 濃度で測定することで、金ナノ結晶からの回折斑点の微小回転運動 ( $\theta$ 、 $\chi$ ) を測定した。



図 1 (A) ダイニン分子全体の構造模式図 (参考文献<sup>7</sup>より改訂)。複数のドメインで構成されており、赤丸で囲んだ部位が、モータードメインと呼ばれる運動に重要な部位。(B) 結晶構造に基づく、ダイニンモータードメインの微小な構造変化 (参考

文献<sup>8</sup>より改訂)。本来は、**2** 構造の先端に微小管結合部位が存在する。リングに対して、力発生に関わるリンカー（紫色）の先端（図の上側に相当、モータードメインの N 端）が僅かに動くことが、**2** 構造から推測できる。

### 3. 実験方法

#### 3.1 顕微鏡観察による DXT 実験系の確立

本実験で用いたダイニンはヒト由来の組換え体細胞質ダイニンであり、モータードメイン 384kDa で構成され、N 端にビオチンが融合されている。バキュロウイルス系で発現精製し、運動活性があることを他の実験系により確認している。微小管は豚の脳から粗精製し、予備実験では、蛍光物質ローダミンで標識された微小管を用いた。

まず予備実験として、サンプル固定に関する条件決めや濃度調整を行った。DXT 測定では、X 線照射によるダメージのないポリイミドフィルムを基板として測定を行うが、発光性のあるこのフィルムでは蛍光観察や散乱光観察が難しいため、カバーガラスを用いて顕微鏡を用いた蛍光像・散乱像による条件決めを行った<sup>8</sup>。

予備実験として、図 2(A)の系を 2 枚のカバーガラス間で以下の手順で構築した。カバーガラス表面を 3 分プラズマ洗浄処理後、アミノシラン(Shin-Etsu)で 30 分、50mg/ml BS<sup>3</sup> (Thermo)で一晩室温反応させることで、DXT 測定時同様にアミノ基が基板表面上にある状態にした。その後、微小管 (ダイマーチューブリン 2 $\mu$ M 相当)を 5 時間以上室温反応させ、2mg/ml カゼイン (表面コーティングに作用)、20nM ダイニン+50pM アビジン化された金コロイド(直径 30nm)の順で、室温で 5 分結合反応させ、20 $\mu$ M ADP 条件下で観察した。まず、図 2(B)のように基板から浮遊している微小管上に金コロイドがダイニンを介して強く結合し配置できることから、ダイニンの N 端にアビジン-ビオチン系で強結合した金コロイドは比較的基板近くに位置するものの立体障害は起こしていないと判断した。図 2(A)の系で測定した結果、図 2(C)のように微小管上に金コロイドが位置する像が得られ、本予備実験条件を基に、DXT 実験を行った。

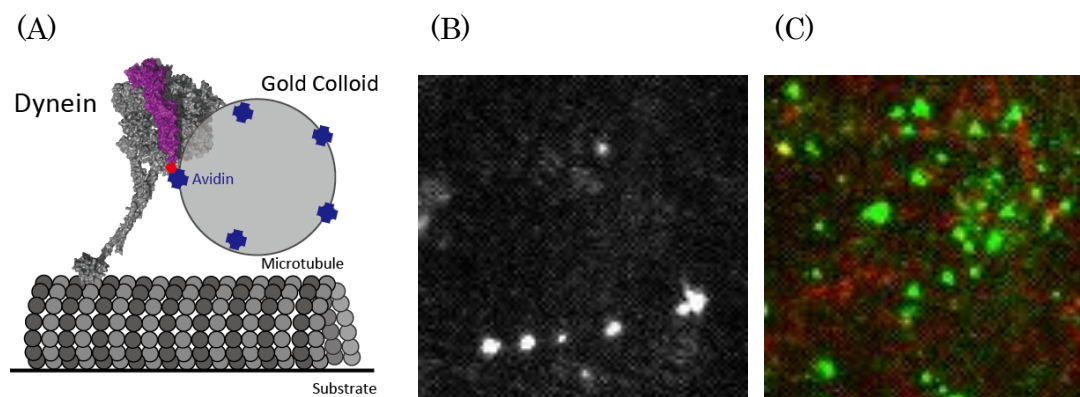


図 2 (A) 顕微鏡を用いた観察系(ダイニン pdb: 3VKH)。 (B)基板から浮遊した微小管上に並んだ金コロイドの散乱像。 (C) 微小管の蛍光像 (赤色) と金コロイドの散乱像 (緑色) を重ね合わせた像。(B,C: スケール 19.3 $\mu$ m $\times$ 19.3 $\mu$ m)。

## 3.2 DXT 測定用のサンプル作成

### 3.2.1 金ナノ結晶のアビジン化

佐々木研究室で作製した金結晶（劈開 KCl (111) 結晶）3 枚を、バッファー1ml に溶かし、0.015pM の金ナノ結晶溶液を作製した。AFM 観察により、金ナノ結晶の大きさは 20~80nm である<sup>5</sup>。2mg/ml NeutrAvidin を混ぜて 4°C 条件下で一晩放置することで、金ナノ結晶のアビジンコーティング作業をした。フリーのアビジンを除くため、7200×g で 2 分の遠心を 2 回行い、沈殿物をバッファー1ml に置換することで、アビジン化金ナノ結晶を作製した<sup>9</sup>。

### 3.2.2 基板表面処理とサンプル結合工程

ポリイミドフィルムに金を蒸着し、金表面に 80mM SPDP / EtOH 400μl を滴下して、4°C 条件下で 12 時間以上放置した。以下、タンパク質固定の過程を含めて、図 3(A) のように 2 枚のフィルムで重ねる手法を取り（タンパク質溶液 5μl あれば十分）、固定終了後はバッファーで洗浄してエアダスターで残った溶液を除去している。

表面処理終了後、予備実験と同様に、微小管（ダイマーチューブリン 2μM 相当）、2mg/ml カゼイン、20nM ダイニン、金ナノ結晶の順で固定した。金ナノ結晶以外は各々結合時間待ちを室温で 5 分とし、金ナノ結晶は測定する直前まで結合放置させた。その後、20μM ADP 条件で溶液を加えたら、図 3(B) のようにサンプルを固定して、X 線測定装置に固定した。

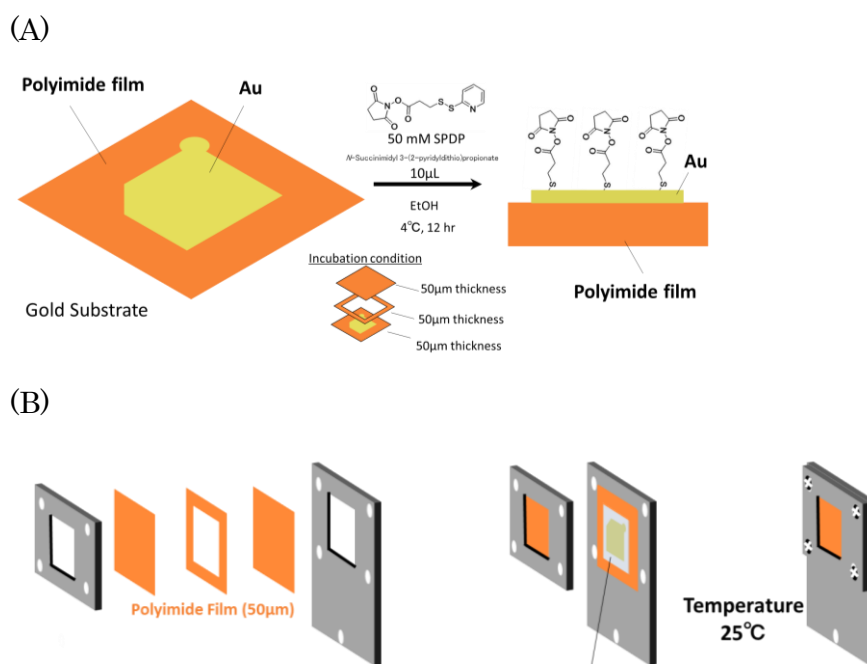


図 3 (A) 基板表面処理の工程 (B) サンプル調整後のフィルムの固定化

### 3.3 X線1分子追跡法(Diffracted X-ray Tracking; DXT)

DXTは14.0–16.5 keVの高輝度白色X線(エネルギー幅2%)を用いて、溶液中に存在する金ナノ結晶1粒子の運動を $\theta$ ,  $\chi$ 方向の2軸回転運動として高精度( $\theta$ : 0.18 mrad,  $\chi$ : 0.79 mrad)に検出する1分子計測手法である。図.4にDXTの概念図と本実験で取り扱うダイニン分子へ結合した金ナノ結晶の動態モデルを示す。25, 50, 100  $\mu$ s/frame (Total: 10 ms)の時分割測定をSPring-8 BL40XUで、2015年12月17日と2016年6月28日の2度実施した。

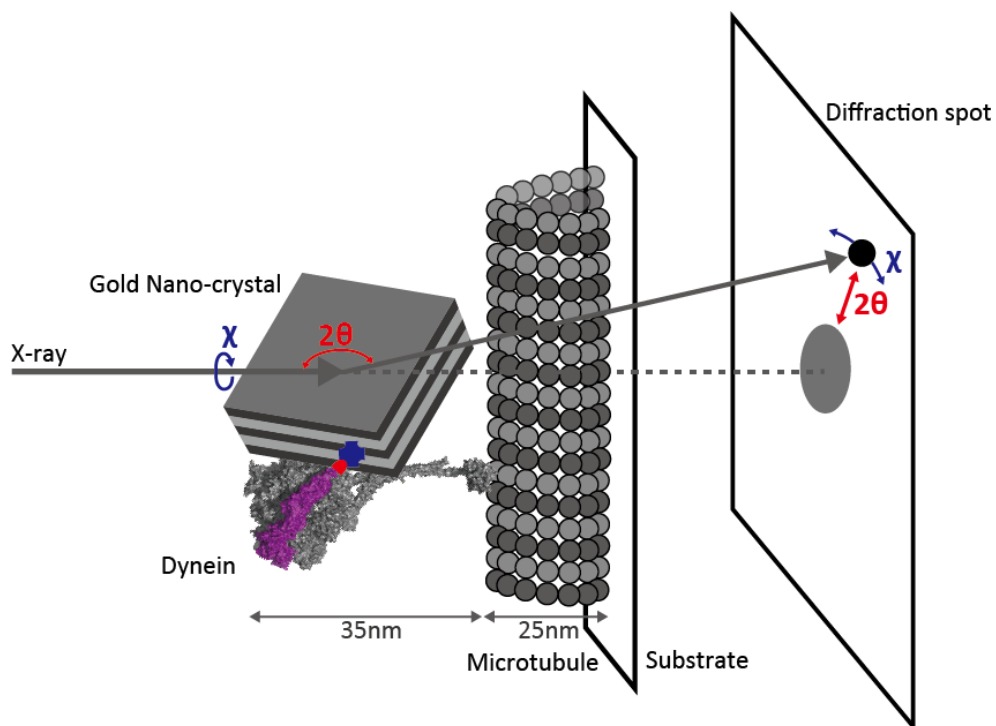


図4 DXTによるダイニンに結合した金ナノ結晶の $\theta$ ,  $\chi$ 軸方向の動態測定系

#### 4. 実験結果と考察

図.5 に各時分割測定におけるダイニン 1 分子に固定された金ナノ結晶 1 粒子からの X 線回折点の時分割トレースを示す。100, 50, 25  $\mu\text{s}/\text{f}$  より得られた回折点の総数はそれぞれ、5936, 2538, 1692 トレースを取得した。 $\theta$  方向は Bragg の回折条件より、観測できる最大角は 29 mrad 程度であるが、全 3 条件のうち、25 mrad を超えるトレースはなかった。一方で、 $\chi$  方向の運動角度は大きいもので、100 mrad 程度のトレースも存在している。 $\chi$  方向のダイナミックレンジでは原理的にブラッグ条件の制限を受けないため、最大で  $360^\circ$  の回転角を観測することが可能である。本実験データの統計処理で取り扱う時間領域は最大で 0.2 ms とした。

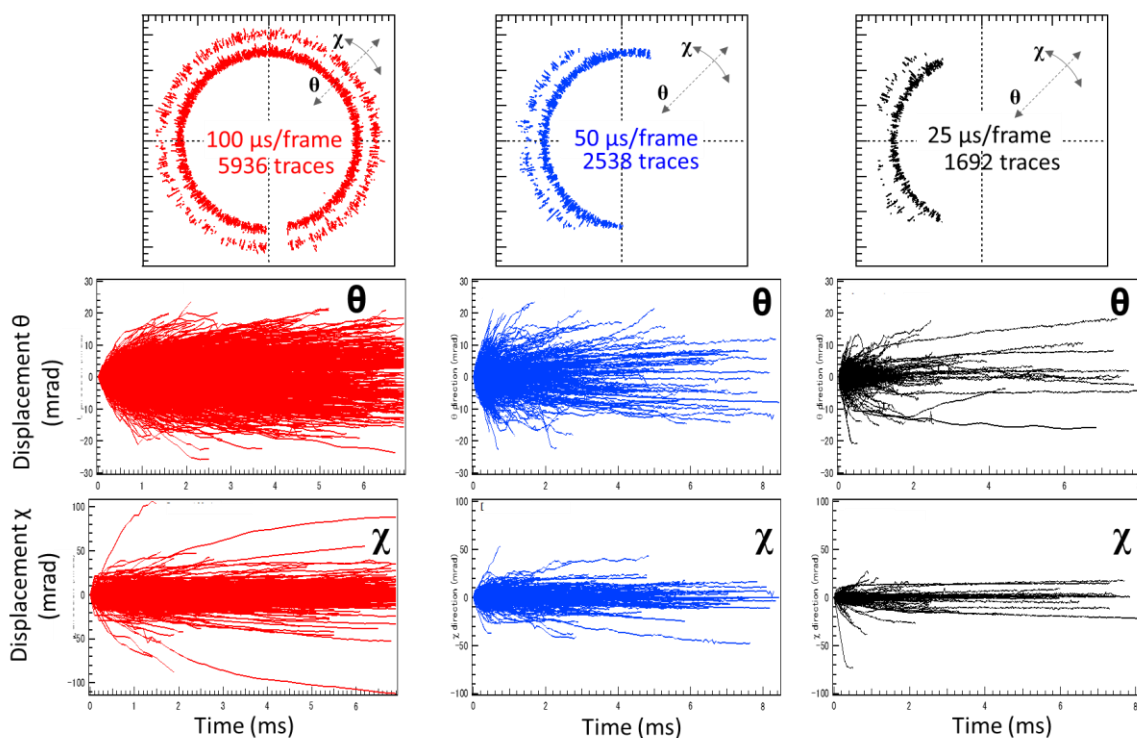


図. 5DXT より得られた X 線回折点のトレースと  $\theta$ 、 $\chi$  方向の時間変化に対する回転角度の推移

図.6 に各時分割条件における 0.2 ms までの平均二乗変位 (Mean Square Displacement: MSD (mrad<sup>2</sup>))を示す。また、得られた MSD 曲線を一次元軸の拡散式

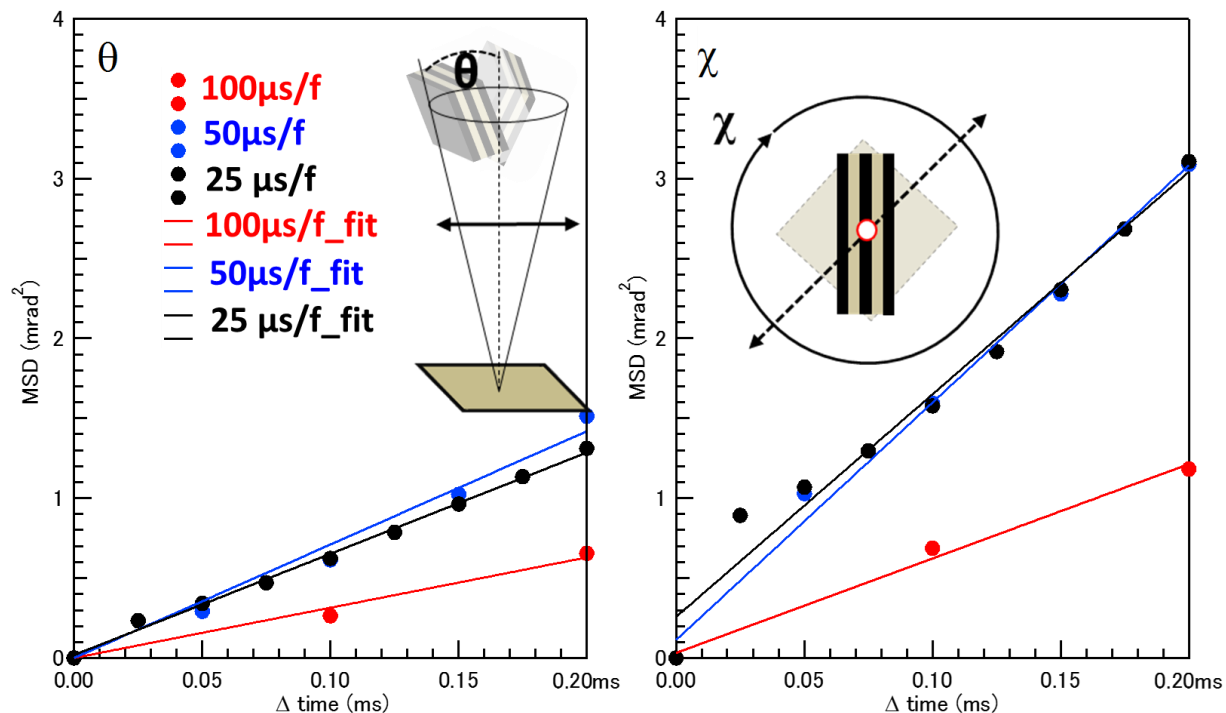


図 6  $\theta$ ,  $\chi$  方向における平均二乗変位(MSD)曲線

(1)<sup>10</sup>よりフィッティングを行った。

$$MSD = y + 2Dt \quad (1)$$

$y$ ,  $D$ ,  $t$ はそれぞれ、切片、拡散係数(mrad<sup>2</sup>/ms)、時間(ms)である。本フィッティングより得られた値を表 1 に示す。

		$D$	$Y$
		[mrad <sup>2</sup> /ms]	[mrad <sup>2</sup> ]
$\theta$ direction	100 $\mu$ s	1.57 $\pm$ 0.20	0.00 $\pm$ 0.05
	50 $\mu$ s	3.55 $\pm$ 0.28	0.00 $\pm$ 0.07
	25 $\mu$ s	3.17 $\pm$ 0.07	0.02 $\pm$ 0.02
$\chi$ direction	100 $\mu$ s	2.96 $\pm$ 0.28	0.03 $\pm$ 0.07
	50 $\mu$ s	7.43 $\pm$ 0.39	0.11 $\pm$ 0.10
	25 $\mu$ s	6.97 $\pm$ 0.41	0.26 $\pm$ 0.10

表 1  $\theta$ ,  $\chi$  方向における平均二乗変位のフィッティング結果



本結果より、 $100 \mu\text{s}/f$  の条件のみ、 $\theta, \chi$  の両回転軸における回転角度が低く推移していることが確認される。一方、 $50, 25 \mu\text{s}/f$  では顕著な差は見られない。さらに、時分割を増やしていくことで、切片  $y$  が増加する傾向にあることが確認される。これは本実験より速い時間領域で、運動が上昇していることを示しており、サブマイクロ秒オーダーの計測が必要であることを示唆する結果である。一方、ここでは  $100 \mu\text{s}$  と  $50 \mu\text{s}$  領域での差が顕著に表れたことに対してさらに考察を進めていく。

本実験によって得られた時分割条件差について、より詳細に解析するため、各時間における  $\theta, \chi$  における回転角度の運動分布を算出した (図.7)。本結果より、 $100 \mu\text{s}$  間の運動分布の比較から、 $25, 50 \mu\text{s}/f$  の条件では  $100 \mu\text{s}/f$  の分布よりも右にシフトしていることが確認できる。特に、その傾向は  $\chi$  方向において、顕著にみられる。これは、 $100 \mu\text{s}/f$  では、ダイナミックレンジに収まらない金ナノ結晶が存在しているため、見かけ上運動が低下していると考えられる。また、 $25, 50 \mu\text{s}/f$  の条件間では優位な差は殆ど見受けられなかった。このことより、 $100 - 50 \mu\text{s}$  の時間スケールにおいて、ダイニン 1 分子の

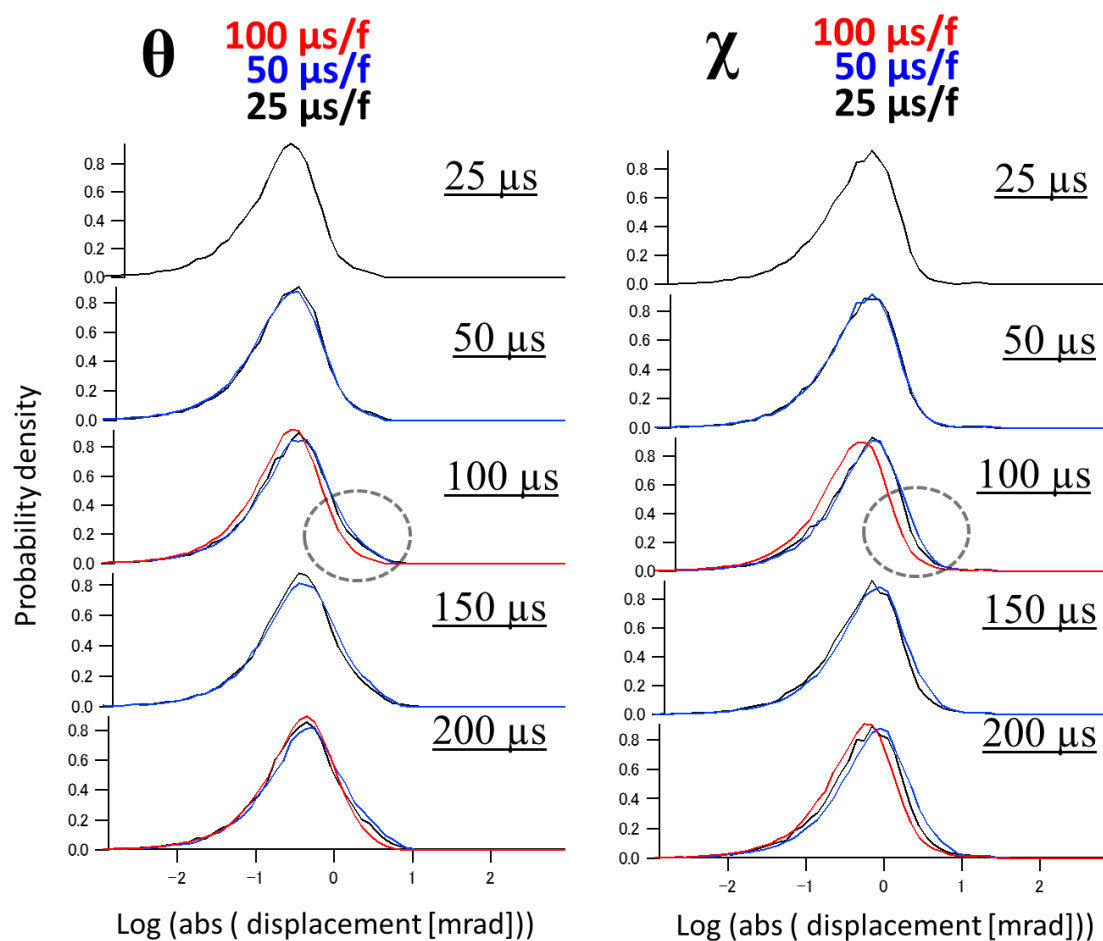


図. 7 各時間軸条件における運動分布図の比較

運動に特異的な動的挙動が存在することを、本実験を通して明らかにすることに成功した。

本結果を具体的なダイニン分子の3次元運動挙動として表現するため、図8(A), (B)にそれぞれ、100, 50  $\mu\text{s}/\text{f}$  の  $\theta$ ,  $\chi$  方向における運動分布を重ね合わせた2次元ヒストグラムを示す。また、2条件の差分ヒストグラムを図8(C)に示す。50と100  $\mu\text{s}/\text{f}$  における  $\theta, \chi$  の2ピーク位置はそれぞれ、 $\theta: 0.28 \text{ mrad}$   $\chi: 0.38 \text{ mrad}$  と  $\theta: 0.29 \text{ mrad}$   $\chi: 0.57 \text{ mrad}$  であった。また、差分ヒストグラムにおいては、100  $\mu\text{s}/\text{f}$  (赤)は  $\theta: 0.20 \text{ mrad}$ ,  $\chi: 0.25 \text{ mrad}$  であり、50  $\mu\text{s}/\text{f}$  (青)は  $\theta: 0.79 \text{ mrad}$ ,  $\chi: 1.26 \text{ mrad}$  の2つのピーク位置に分割されていることがわかる。

以上より、100 – 50  $\mu\text{s}$  の間には  $\theta$  方向ではおよそ3倍、 $\chi$  方向では6倍程度速い運動が存在していることが明らかとなった。これはダイニン分子のFree状態とADP状態の転移過程におけるリンカーの3次元ダイナミクスに関連する重要な時間オーダー

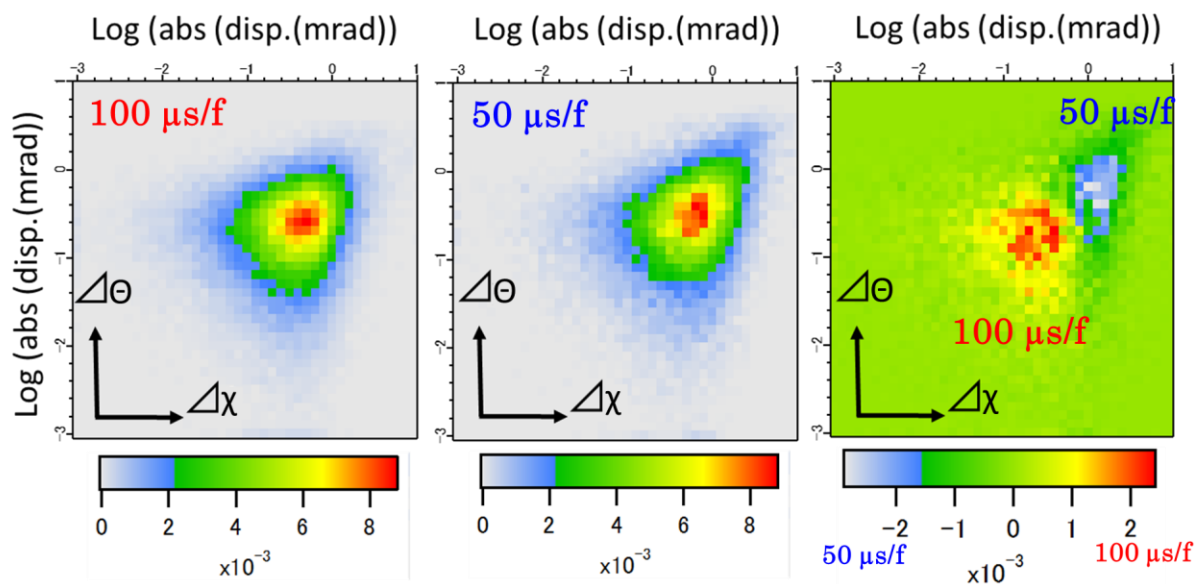
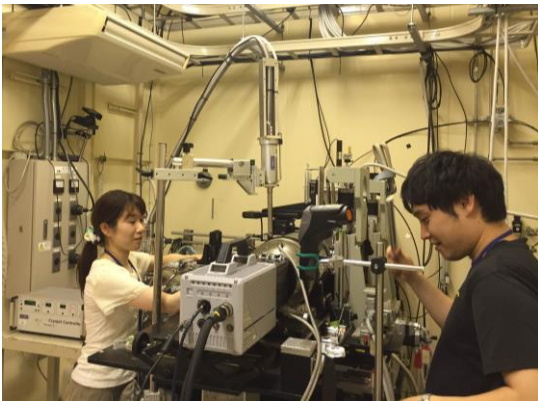


図. 8  $\theta$ 、 $\chi$  方向における運動分布の比較

である可能性がある。今後はより詳細なダイナミクス研究を進めるため、再現性や時間お一だ、ダイナミックレンジの調整を通してDXTによるダイニン研究を進めていきたい。

## 5. まとめと今後の展望

DXT 計測を通して、ダイニン 1 分子のマイクロ秒計測より ADP 状態と Free 状態間における構造変化に関連した 3 次元構造ダイナミクス計測に世界で初めて成功した。本研究はタンパク質構造研究分野でとりわけ複雑な運動を有すると考えられるダイニンの運動機構全体を解明する上で、大きな貢献ができると期待される。本研究を糧に、DXT より得られるパラメーターとそれから類推される詳細な運動モデルの確立は、分子モータータンパク質（ダイニン・キネシン・ミオシンなど）の複雑な構造変化機構解明へのアプローチとして、1 分子生物物理学分野において大きなインパクトを与えられると期待される。今後は金ナノ結晶のラベル位置の変更や、ADP 濃度依存性、さらにはより高い時分割測定を進めていくことで、複雑なダイニン分子のダイナミクスについて研究を進めていきたい。



大型放射光施設 SPring-8 BL40XU での作業の様子。写真左が木下、右が松下。

## 6. 謝辞

本自発融合研究の遂行にあたり、指導教員の樋口秀男先生、佐々木裕次先生、そして副指導教員の橋本和仁先生、野崎京子先生、野地博行先生にご支援・ご協力いただきましたことを深く感謝します。佐々木研究室内のビームタイム中に DXT 測定させていただけたこと、同じく分子モーターの研究を行っている佐々木研究室の池崎圭吾助教に助言いただけたこと、そして高輝度光科学研究センターの関口博史様には DXT 測定時に助言いただけたことを深く感謝します。本機会を与えてくださいました MERIT プログラムに深く感謝いたします。

## 7. 参考文献

- <sup>1</sup> Burgess, S.A., Walker, M.L., Sakakibara, H., Knight, P.J. and Oiwa, K. Dynein structure and power stroke. *Nature* **421** 715-718 (2003)
- <sup>2</sup> Kon, T., Oyama, T., Shimo-Kon, R., Imamula, K., Shima, T., Sutoh, K. and Kurisu, G. The 2.8 Å crystal structure of the dynein motor domain. *Nature* **484** 345-350 (2012)
- <sup>3</sup> Schmidt, H., Gleave, E.S. and Carter, A.P. Insights into dynein motor domain function from 3.3-Å crystal structure. *Nat. Struc. Mol. Biol.* **19** 492-497 (2012)
- <sup>4</sup> Kozono, H., Matsushita, Y., Ogawa, N., Kozono, Y., Miyabe, T., Sekiguchi, H., Ichianagi, K., Okimoto, N., Taiji, M., Kanagawa, O. and Sasaki, Y.C. Single-molecule motions of MHC class II rely on bound peptides. *Biological J.* **108** 350-359 (2015)
- <sup>5</sup> Sekiguchi, H., Suzuki, Y., Nishino, Y., Kobayashi, S., Shimoyama, Y., Cai, W., Nagata, K., Okada, M., Ichianagi, K., Ohta, N., Yagi, N., Miyazawa, A., Kubo, T. and Sasaki, Y.C. Real time ligand-induced motion mappings of AChBP and nAChR using x-ray single molecule tracking. *Sci. rep.* **4** 6384 (2014)
- <sup>6</sup> Sekiguchi, H., Nakagawa, A., Moriya, K., Makabe, K., Ichianagi, K., Nozawa, S., Sato, T., Adachi, S., Kuwajima, K., Yohda, M. and Sasaki, Y.C. ATP dependent rotational motion of group II chaperonin observed by x-ray single molecule tracking. *PLoS ONE* **8** e64176 (2013)
- <sup>7</sup> Carter, A.P. Crystal clear insights into how the dynein motor moves. *J. Cell Sci.* **126** 705-713 (2013)
- <sup>8</sup> Schmidt, H. Dynein motors: How AAA+ ring opening and closing coordinates microtubule binding and linker movement. *Bioessays* **37** 532-543 (2015)
- <sup>8</sup> Ueno, H., Nishikawa, S., Iino, R., Tabata, K.V., Sakakihara, S., Yanagida, T. and Noji, H. Simple dark-field microscopy with nanometer spatial precision and microsecond temporal resolution. *Biophys. J.* **98** 2014-2023 (2010)
- <sup>9</sup> Nishikawa, S., Arimoto, I., Ikezaki, K., Sugawa, M., Ueno, H., Komori, T., Iwane, A.H. and Yanagida, T. Switch between large hand-over-hand and small inchworm-like steps in myosin VI. *Cell* **142** 879-888 (2010)
- <sup>10</sup> Saxton, M. J. & Jacobson, K. Single-particle tracking: applications to membran dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 373-399 (1997).