

MEthodSサンプルサイズを事前に決定するための統計的手法は用いなかった。実験は無作為化されておらず、研究者は実験中および結果評価中の割り当てについて盲検化されていない。構築物の設計、タンパク質の発現および標識。アミノ酸 1219-4093 (予測分子量331kDa; Dynと呼ぶ) をコードするN末端切断S. cerevisiae細胞質ダイニン遺伝子 (DYN1) を変異誘発のテンプレートとして使用した。ストーク領域の遺伝子合成によりコンストラクトを調製した。DNA断片は、URA3カセットを置換するために、相同組換えによってハプロイド酵母細胞のゲノムに挿入した (Extended Data Fig.2)。S. cerevisiae株はR. Vale (UCSF)から受け取ったもので、認証やマイコプラズマ汚染の検査は行っていない。精製用にZZアフィニティタグとTEVプロテアーゼ切断部位をN末端に挿入し、標識用にDHAタグをN末端またはC末端に挿入した4 (Extended Data Table 1b)。構築物は、細胞溶解液をIgGビーズに結合させ、Tevプロテアーゼでビーズからタンパク質を切断することで精製した4。モーターは、IgGビーズに結合したときに塩化アルキルで機能化した10μMの蛍光色素で標識し、過剰な色素はTev切断の前に除去した。電子顕微鏡サンプルの準備。凍結乾燥したブタ脳チューブリン (細胞骨格) をMES-MT緩衝液 (30 mM MES pH 6.5, 70 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) 中に10 mg ml<sup>-1</sup>に再懸濁し、分注した。重合は、6mM GTP (Sigma) を添加したMES-MTバッファーで2倍に希釈し、37°Cで90分インキュベートした。さらに20μMのタキソールを添加したMES-MTバッファーで2倍希釈し、微小管を室温で一晩放置した。単量体DynまたはDynRK+7hepを冷BRB10 (10 mM PIPES pH7.0, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.1% Tween-20) に5倍希釈し、Amicon 100 MWCO 0.5 ml遠心濃縮器で元の容量に濃縮。希釈と濃縮をさらに2回繰り返すことで完全な緩衝液交換を行い、総希釈倍率を125倍とした。微小管は20,000r.c.f.で10分間ベレット化し、室温のBRB10に再懸濁した。グリッド凍結の3分前に、1μMの微小管と150nMのダイニンを含む混合物を室温のBRB10で作り上げた。次に、このサンプル4μlを、湿度100%、22°Cに設定したFEI Vitrobot IIIチャンバー内に保持したQuantifoil Au300 R1.2/1.3グリッドに塗布した。4~4.5秒のプロットイングの後、グリッドを液体エタンに突っ込み、イメージングまで液体窒素で保存した。電子顕微鏡イメージングとデータ分析。グリッドはGatan 626クライオホルダーにセットし、Falcon II検出器を備えた200 kVで動作するFEI F20 TEMでイメージングし、単一の統合平均を読み出した。画像はEPUで半自動的に取得し、デフォーカス-4μm、フラックス50e Å<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>、露出1.5秒、ピクセルサイズ2.06 Å<sup>2</sup>である。マイクロチューブリン上のダイニンの解析は、既述の14.に従って実施した。コントラスト伝達関数はGCTFを用いて決定し、顕微鏡写真はRelionで適宜位相反転させた。微小管の極性はFJ127で決定し (拡張データ図5c-g)、微小管はそのプラス端が画像の右を向くように新しい画像にボックス化された。微小管は複製され、すべてのユニークな粒子が上端にあることを確認するために、長軸を通して反射された。単量体ダイニンはRelionで手動でピクシ、歪が微小管の上端に到達するポイントでセンタリングした。ストークの根元のキंकが観察されない場合、または隣接する粒子が重なっている場合、粒子は無視された。2次元分類でそれぞれ1つのクラスに分類 (DynとDynRK+7hepについて) することで、粒子同士を整列させた。微小管上のモーターの投影をシミュレートするために、以下のPDBエントリーを使用した: 3VKG10 (ストーク)、4AI611 (リングとリンカーのADP結合状態)。座標は、EMANプログラム「pdb2mrc」を使ってシミュレーションした電子密度体積に変換した。このボリュームを「bfilter」を使って30Åから500Åの間でバンドパスフィルターをかけ、Relionでさまざまな方向に投影した。蛍光顕微鏡を用いた。アッセイは、Nikon Ti-Eclipse 倒立顕微鏡本体、パーフェクトフォーカスシステム、1.49 NA 100×油浸対物レンズを備えた特注のオブジェクティブ型全内部反射蛍光 (TIRF) 顕微鏡で行った (ニコン)。蛍光色素は488nm (GFPとQDs)、561nm (TMRとCy3)、633nm (Cy5) のレーザーで励起し、蛍光信号は有効画素サイズ106nmのEM-CCDカメラ (Ixon, Andor) により検出した。動画は1Hzで記録した。デュアルカラーイメージングのために、蛍光発光は、Optosplit II (Cairn) イメージスプリッターを用いてCCDカメラ上で2つのチャンネルに分離された。Microtubule-bridge assays.微小管ブリッジのビーズ運動性アッセイは、既述の通り実施した19。簡単に説明すると、直径2μmのポリスチレンビーズをEDC-NHS架橋を用いて抗GFP抗体 (Covance社) でコーティングした。このビーズを0.5μM SRS85:82-GFP23とインキュベートし、ビーズをベレット化することで過剰なタンパク質を除去した。ビーズはフローチャンバーの表面に非特異的に吸着し、表面を1mg ml<sup>-1</sup>カゼインを補充した30μlの10%グリセロール) で予めブロックした。)

DLBC (DLBバッファー (30mM HEPES pH7.4, 1mM EGTA, 2mM MgCl<sub>2</sub>)、Cy3標識微小管 (0.015mg ml<sup>-1</sup>) をチャンバー内に飛ばしました。10分後、未結合の微小管は30μlのDLBC洗浄で除去した。抗GFP抗体コートビーズ (直径0.5μm) を5-10nM GFP-dyneinと氷上で10分間インキュベートし、イメージングバッファーの中でチャンバー内に飛ばした。Nikon Ti-E Eclipse顕微鏡本体、Nikon 100×1.49 NA油浸対物レンズ、Nikon 1.4 NA油浸コンデンサー、LED白色光照明器 (Sutter) を備えた明視野顕微鏡に試料を設置した。サンプルは、10μmより長く、2ピクセル以下の振動をする微小管ブリッジをスキャンした。自由に拡散するダイニン被覆ビーズの自発的な付着と微小管橋に沿った過程的な運動は、CMOSカメラ (浜松) を用いて、10Hz、有効画素数57nmで撮影した。貨物ビーズは、MATLABのガウスフィッティングアルゴリズムを用いて追跡した。ヘリカルピッチ (λ) は、ピークからピークへの位置間のトレースのx-y投影の周期性から計算された19。微小管シリンダーの中心からダイニンのリンカードメインのピボットポイントまでの距離 (r) は27nmと見積もられた。ピッチ角はtan<sup>-1</sup>(2πr/λ)と定義した。ビーズのz位置は、ピエゾ式対物レンズキャナー (Physik Instrumente) を用いて顕微鏡対物レンズをz方向に±250 nm、25 nm刻みで動かしながら、表面固定化した0.5μmビーズの強度を測定して校正した。グライドアッセイ。微小管を極性マークするために、N-エチルマレイミド (NEM) 修飾チューブリンを、BRB80 (80 mM PIPES pH 6.8, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) 中の10 mg ml<sup>-1</sup>非標識チューブリン (ブタ脳28から精製) と1 mM NEMおよび0.5 mM GTPを氷上に10分間混合して調製した。氷上で30分間、8 mM β-メルカプトエタノール (βME) で反応をクエンチする。BRB80 中で 0.4 mg ml<sup>-1</sup> Cy3 標識チューブリン、0.5 mg ml<sup>-1</sup> 非標識チューブリン、1 mM GMP-CPP (Jena BioSciences) および 1 mM DTT を37 °Cで15分間インキュベートして、明瞭な標識微小管シードを重ねた。1.5μlの種子を、BRB80中の0.1 mg ml<sup>-1</sup> Cy3-tubulin、1 mg ml<sup>-1</sup> unlabelled tubulin、1 mg ml<sup>-1</sup> NEM-modified tubulin、1 mM GTPおよび1 mM DTTを含む混合物に加え、37°Cでインキュベーションした。混合直後に、2μM、20μMおよび200μMのタキソールを10分間の休憩を挟んで2μl添加した。37°Cでさらに15分間インキュベートした後、微小管を300μlの30%グリセロールクッション上で65,000g、10分間ベレット化した。このベレットを20μMタキソールおよび1mM DTTを含むBRB80に再懸濁し、室温で暗所に保存した。微小管グライディングアッセイ4では、ウサギモノクローナル抗GFP抗体 (~0.4 mg ml<sup>-1</sup>, Covance) をアッセイチャンバーに飛ばし、5分間インキュベートした。チャンバーを60μlのバッファーDLBCT (20μMタキソールを添加したDLBC) で洗浄した。その後、DLBCT中の20nM GFPタグ付きモーター10μlをチャンバーに添加した。3分間のインキュベーションの後、30μlのDLBCT洗浄によって未結合のモーターを除去した。次に、10μlの200nMの新鮮に重合した極性標識微小管をチャンバーに飛ばし、2分間ダイニンと結合させた。チャンバーを100μlのDLBCTで洗浄した。最後に、所望のKCl濃度を含む30μlのイメージングバッファー (2.5mM PCA (プロトカテク酸)、50nM PCD (プロトカテク酸-3, 4-ジオキシゲナーゼ) および1mM ATPを補充したDLBCT) を、チャンバーに飛ばした1分子の運動アッセイ。ウニ軸系をフローチャンバー内のガラスカバースリップ上に固定化した。チャンバーを50μlのDLBCで洗浄した。GFPタグ付き変異型ダイニン (0.2 nM) およびTMRタグ付き野生型ダイニン (0.2 nM) をDLBCでチャンバー内に加え、微小管と3分間結合させた。その後、チャンバーを100μlのDLBCと20μlのイメージングバッファーで洗浄した。高解像度トラッキングアッセイのために、655nmのアミン標識QD (Invitrogen) を、架橋試薬としてスルホSMCC (sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate) を使用して抗GFP抗体でコートした。QD (100nM) を25μMのスルホSMCC (~250倍モル過剰) と混合して1時間インキュベートした。過剰なスルホSMCCは、30k MWCOスピンコンセントレーターを用いて、DLBに3連続希釈して除去した。抗GFP抗体 (0.4 mg ml<sup>-1</sup>) を4 mM TCEP (トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン) で30分間還元し、QDsと混合した。1時間後、25mMホウ酸ナトリウム緩衝液pH8.0に3回連続希釈し、スピンフィルターで過剰抗体を除去し、5μMに濃縮して保存した。抗GFP抗体で標識したQD (5 mM) を100 nM GFPタグ付きダイニンと1:1の比率で混合し、氷上で15分インキュベートした。ピオチン化BSAとストレプトアビジンを用いて、極性マークとピオチン化微小管をカバースリップ上に固定化した。ダイニン-QD混合物を100倍に希釈し、チャンバー内に飛ばした。3分間のインキュベーション後、チャンバーを100μlのDLBCと5-10μMのATPを含む20μlのイメージングバッファーで洗浄した。Cy3ラベルの微小管とQDの2つの蛍光チャンネルを重ね合わせ、方向性を決定した。