

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19252

研究課題名（和文）繊毛打運動によって統御される繊毛虫の行動原理の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the behavioral mechanism of ciliates organized by ciliary beating

研究代表者

豊島 陽子（Toyoshima, Yoko）

東京大学・大学院総合文化研究科・名誉教授

研究者番号：40158043

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：繊毛虫テトラヒメナ個体の遊泳を3次元空間で定量し、テトラヒメナが自由に螺旋遊泳する過程を詳細にとらえることができ、個体の長軸周りに右回転に自転しつつ、右巻き螺旋遊泳することを明らかにした。さらに、個体内へのカルシウムイオンの流入によって、遊泳方向や螺旋方向が制御されていることがわかった。また、テトラヒメナから単離した軸系構成モータータンパク質・外腕ダイニンがin vitro再構成系で微小管を運動させる際、微小管が進行方向に対し左に旋回する運動特性を有することを新たに見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

繊毛虫であるテトラヒメナの遊泳は、ダイニン分子によって駆動される繊毛の屈曲波運動によって実現されるが、詳細な分子機構は明らかではなかった。特に個体の螺旋遊泳に関しては、長年の間、錯視により螺旋方向を特定できていなかった。本研究により、3次元空間での個体の遊泳が直接定量できたこと、カルシウムイオンの個体内への流入によって螺旋方向が制御されること、さらに軸系構成タンパク質外腕ダイニンの新たな運動特性を見出したことは学術的な意義がある。

研究成果の概要（英文）：We quantified the swimming of ciliate *Tetrahymena* cell in three-dimensional space and were able to clarify the process of their helical swimming behavior, and found that they performed right-handed helical swimming while rotating right around the longitudinal axis of the cell. The influx of calcium ions into the cilia changed the direction of swimming and helical motion. In addition, we newly found that an axonemal motor protein, outer-arm dynein, isolated from *Tetrahymena*, had the property of turning microtubules to the left in the direction of movement when the microtubules moved in an in vitro reconstituted system.

研究分野：生物物理学

キーワード：繊毛虫 テトラヒメナ 繊毛運動 外腕ダイニン 3次元位置検出光学顕微システム

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

繊毛虫の行動は、個体全体を覆う繊毛が、状況に応じて適切なタイミングで適切な向きに屈曲波運動をすることで、効率よく遊泳したり方向転換したり、時には止まり個体の行動を制御している。繊毛の構成要素であるモータータンパク質や細胞骨格が制御され、600本程度ある繊毛が全体として、あるいは部分的に調和のとれた屈曲波運動を行い、個体の3次元的な行動に繋がる。繊毛虫・テトラヒメナは、螺旋遊泳をすることが100年以上も前から顕微鏡下で観察されてきたが、これまでに3次元空間で微小物体の運動を高分解能で観察する技術が繊毛虫の遊泳の定量に適用された例はなく、従来の平面的な観察からでは錯視のため螺旋遊泳の巻き方といった単純な行動過程すら同定できなかった。繊毛虫等では細胞体が分厚いため細胞表面付近での動きを検出する方法がなく、繊毛の周期的な高速運動(特に回復打)の詳細な定量は困難である。これまでにテトラヒメナの繊毛軸系を構成するタンパク質は数多く同定され、構成因子の立体構造や3次元空間配置が、クライオ電子顕微鏡技術の利用により急速に進んできたが、軸系構成タンパク質がテトラヒメナ個体の遊泳にどのような影響を与えるのかについての知見は乏しい。また、微小管依存性モータータンパク質はトルク発生をすることが知られているが、繊毛運動を駆動する外腕ダイニンのトルク発生機構の詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

繊毛虫テトラヒメナにおいて、「個体の螺旋遊泳」、「繊毛運動」、「繊毛を駆動する軸系構成タンパク質」を直接関連付け、テトラヒメナの遊泳の統御機構を明らかにすることを旨とする。このため、テトラヒメナ個体が自由に3次元空間を遊泳している様子を、螺旋の遊泳方向が検出できる程度な高時間・空間分解能で追跡できる3次元位置検出光学系を確立し、螺旋遊泳の巻き方向、および、個体の回転方向を定量する。カルシウムイオンに依存した個体螺旋遊泳方向の定量、および、軸系構成因子に変異を導入した個体の螺旋遊泳方向の定量を行い、螺旋遊泳機構を明らかにする。さらに、テトラヒメナ個体からは600本程度の繊毛が生えているが、その1本の繊毛の周期的な運動を検出できる3次元位置検出光学系を確立し、高速屈曲波を詳細に定量する。また、細胞質ダイニンとは異なる外腕ダイニン特有の運動を *in vitro* 再構成系で3次元観察によって明らかにする。

3. 研究の方法

(1) テトラヒメナ個体3次元空間観察系の確立

モータータンパク質等の運動の3次元空間での振る舞いを検出することを主目的として開発された3次元位置検出光学顕微技術¹を、体長が50~300マイクロメートルある細胞体の遊泳の3次元空間での振る舞いを定量できるように、低倍率の対物レンズ等を選択し光学系を確立した。また、3次元(主に光軸方向)位置情報をサブミリメートル範囲で計測するための位置校正に使用する蛍光ビーズをアガロースゲル内に封入した状態で行った。細胞個体の追跡マーカーはテトラヒメナ個体に取り込ませた蛍光ビーズを用い、個体の自転方向の定量の際には、1個体に2個の蛍光ビーズを取り込むように調整した。また、変異体テトラヒメナも同様の方法で計測した。

(2) 一部膜除去したドーピング細胞の作成

細胞を完全に除膜して自発的な運動を止め外部より Mg^{2+} と ATP を与えて運動を再活性化させる細胞モデルの手法に対し、本研究では遊泳中の生細胞に少量の界面活性剤を与えることで部分的に除膜し細胞内に Ca^{2+} を流入させる“ドーピング細胞”を作成した。ドーピング細胞では、細胞に内在する ATP が使われるため外部から ATP を与える必要はなく、また細胞膜の大部分は残ったままであり、より自然に近い状態でのテトラヒメナの運動観察ができる。

(3) 軸系構成タンパク質のテトラヒメナ変異体の作成

テトラヒメナへの目的 DNA 断片の導入は、遺伝子銃でテトラヒメナに金粒子に付加して打ち込む方法を用いた²。テトラヒメナが持つ大核に目的遺伝子が相同組換えされ、薬剤濃度を徐々に上げながら植継ぎ、変異を含む遺伝子の比率を増やすアソートメントを行った。外腕ダイニンや軸系構成タンパク質等の一部を欠損した DNA を導入した。

(4) 1 繊毛運動観察

繊毛打軌跡の取得のため、繊毛をピオチン修飾し、アビジン修飾した蛍光ビーズを混合することによって、アビジンとピオチンが特異的に結合する性質を用いて、テトラヒメナの繊毛に蛍光ビーズを付着させた。

(5) 外腕ダイニンの *in vitro* 再構成運動実験

軸系外腕ダイニン特有の運動性を明らかにするため、凹凸のあるガラス基板表面に、丸太橋状にアビジン-ピオチン系を利用して微小管を固定し、微小管のあらゆる側面を移動できる運動アッセイ系を用いて、微小管に沿って移動する外腕ダイニン、および、細胞質ダイニンの軌跡を3次元空間で追跡した。

4. 研究成果

テトラヒメナ個体の3次元螺旋遊泳の定量

3次元位置検出顕微鏡を用いて、テトラヒメナが自由に遊泳する軌跡を3次元的に取得した(図1)。平面的な観察からは判別がつかなかった螺旋の巻き方向が明らかとなり、*Tetrahymena thermophila*、及び、*Tetrahymena pyriformis*の2種において右巻きであった。3次元の位置情報から、個体の回転のピッチ等詳細な運動定量を行った(図2)。また、1個体に複数の蛍光ビーズを撮取させた場合、蛍光ビーズの相対位置から螺旋遊泳中の個体の自転方向が定量でき、個体長軸に対して右方向に回転運動していることが明らかになった(図3)。変異体テトラヒメナにおいては、いずれも並進及び回転速度が減少したが、軸系結合タンパク質においては、並進速度の減少率が大きく螺旋遊泳のピッチが短くなるとともに、方向転換の上昇がみられる変異体個体を見出した。別の繊毛虫であるゾウリムシでも同様の計測を行い、螺旋遊泳の回転は一定の方向であることを明らかにした。

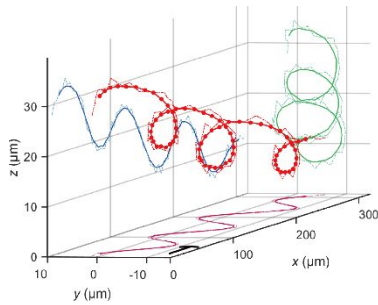


図1 繊毛虫 *T. thermophilus* の3次元遊泳軌跡

T. thermophila の3次元遊泳軌跡と、各平面へのその投影図を示した(赤:3次元軌跡、マゼンタ:x-y平面軌跡、青:x-z平面軌跡、緑:y-z平面軌跡)。11.21ミリ秒ごとに取得した測定値を点線で示し、6フレームごとに移動平均した値を実線(3次元軌跡のみ移動平均した値の各点も赤の点で記載)で示した。x-y平面上の矢印で100ミリ秒の間に進んだ距離を示した。

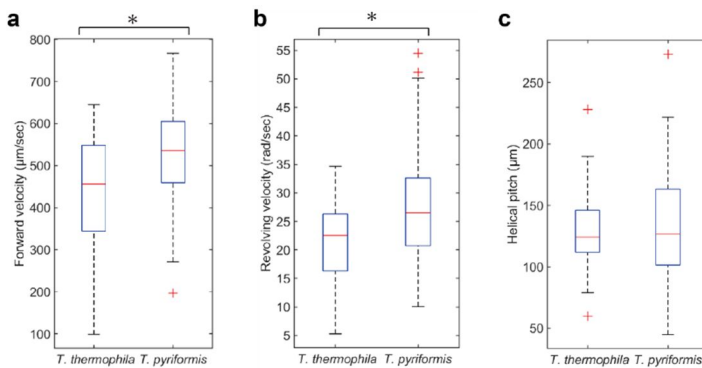


図2 *T. thermophila* と *T. pyriformis* における遊泳パラメーターの比較

- (a)前進速度の比較
- (b)回転速度の比較
- (c)螺旋ピッチ長の比較

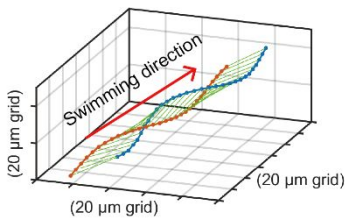


図3 螺旋遊泳している1細胞内の2輝点の軌跡
赤と青の軌跡はそれぞれの細胞後方と細胞前方に位置していた輝点を示し、それを各時点において緑の線で結んだ。右回転していることがわかる。

(2) ドーピング細胞の螺旋遊泳の定量

細胞膜の一部を除去したドーピング細胞を用いて、細胞内へのカルシウムイオンの流入に対応した螺旋遊泳を3次元空間で定量した。前進、後進、前後両方向に遊泳する個体が観察され、螺旋の巻き方向も、左右両方向が観察された。

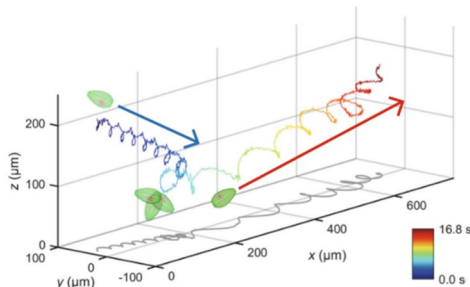


図4 テトラヒメナ細胞の右螺旋後進遊泳
カルシウムイオン刺激を受けた細胞は、右螺旋の後ろ向き遊泳(青)を示し、数秒後にその場で回転しながら方向転換をはじめ、その後は刺激に順応して元のような右螺旋の前向き遊泳(緑から赤)を示した。x-y平面上には投影した軌跡を示し、カラーバーで観察開始からの時間経過を示した。

(3) 外腕ダイニンの in vitro 再構成運動実験

ダイニン分子が微小管のあらゆる側面と相互作用できるように微小管を丸太橋状に配置可能な実験系を確立し、ダイニン分子が微小管上を動く様子を3次元空間で定量した(図5左)。外腕ダイニン(22Sダイニン)では、一方向に右螺旋運動することが明らかになり(図5右)。これは微小管滑り運動アッセイにおいて報告されている運動様式と同等であった^{3,4}。一方で、細胞質ダイニン分子では、外腕ダイニンとは異なり左右どちらの方向にも螺旋運動し、外腕ダイニンとの相違が明らかとなった。

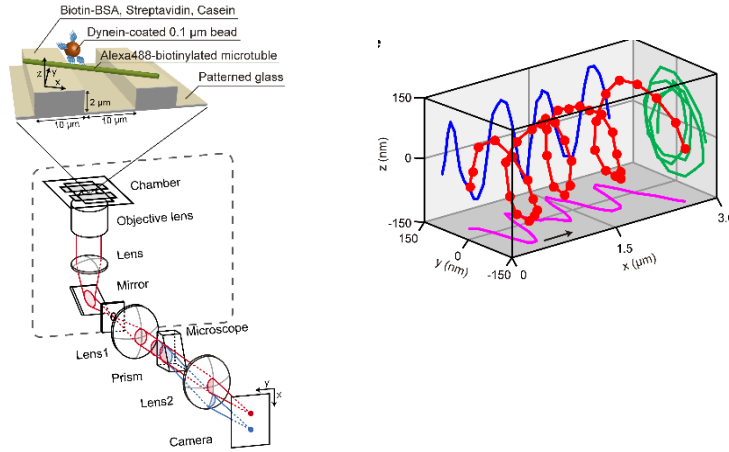


図5 ダイニンが微小管のあらゆる側面を運動できる実験系

(左)凸凹のガラス基板に微小管を結合し、丸太橋状に微小管を固定した。蛍光ビーズ(直径0.1 μm)に外腕ダイニン、もしくは、細胞質ダイニンを固定し、それぞれのビーズがATP存在下で微小管上を運動する様子を3次元位置検出顕微鏡を用いて計測した。(右)外腕ダイニンが結合した蛍光ビーズの微小管に沿った動いた3次元軌跡。微小管に沿って右巻き螺旋運動を行っていることがわかる。(赤:3次元軌跡、マゼンタ:x-y平面軌跡、青:x-z平面軌跡、緑:y-z平面軌跡)。螺旋の周期は $0.65 \pm 0.36 \mu\text{m}$ (平均 SD)であった。

(参考文献)

1. A torque component in mitotic kinesin Eg5 revealed by three-dimensional tracking. Yajima, J., Mizutani, K., and Nishizaka, T. *Nature Structural & Molecular Biology* 15, 1119-1121. (2008)
2. Axonemal dynein light chain-1 locates at the microtubule-binding domain of the γ heavy chain. Ichikawa, M., Saito, K., Yanagisawa, H., Yagi, T., Kamiya, R., Yamaguchi, S., Yajima, J., Kushida, Y., Nakano, K., Numata, O., and Toyoshima, Y.Y. *Molecular Biology of the Cell* 26: 4236-4247. (2015)
3. Torque generation by axonemal outer-arm dynein. Yamaguchi, S., Saito, K., Sutoh, M., Nishizaka, T., Toyoshima, Y.Y., Yajima, J. *Biophysical Journal* 108, 872-879. (2015)
4. Rotational and translocation of microtubules in vitro induced by dyneins from Tetrahymena cilia. Vale, R.D. & Toyoshima, Y.Y. *Cell* 52: 459-469. (1988)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Marumo Akisato, Yamagishi Masahiko, Yajima Junichiro	4. 巻 4
2. 論文標題 Three-dimensional tracking of the ciliate Tetrahymena reveals the mechanism of ciliary stroke-driven helical swimming	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02756-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamagishi Masahiko, Sumiyoshi Rieko, Drummond Douglas R., Yajima Junichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Anchoring geometry is a significant factor in determining the direction of kinesin-14 motility on microtubules	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-19589-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi Shin, Yamagishi Masahiko, Yajima Junichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Torque generating properties of Tetrahymena ciliary three-headed outer-arm dynein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-21001-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sugawa Mitsuhiro, Maruyama Yohei, Yamagishi Masahiko, Cross Robert A., Yajima Junichiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Motor generated torque drives coupled yawing and orbital rotations of kinesin coated gold nanorods	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-04304-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸茂 哲聖, 山岸 雅彦, 矢島 潤一郎
2. 発表標題 繊毛虫Tetrahymenaにおける螺旋遊泳行動の三次元観察
3. 学会等名 第54回日本原生生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akisato Marumo, Masahiko Yamagishi, and Junichiro Yajima
2. 発表標題 Direct three-dimensional observation of helical swimming behavior of the ciliate Tetrahymena
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須河光弘, 丸山洋平, 山岸雅彦, Robert A. Cross, 矢島潤一郎
2. 発表標題 キネシンのパワーstrokeのトルク成分による自転運動について
3. 学会等名 2022年生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	矢島 潤一郎 (Yajima Junichiro) (00453499)	東京大学・大学院総合文化研究科・教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------