

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02566

研究課題名(和文) リズミカルな鞭毛運動を誘起する分子マシナリの力学制御

研究課題名(英文) Mechanical control of rhythmic flagellar beating motions

研究代表者

西山 雅祥(Nishiyama, Masayoshi)

近畿大学・理工学部・准教授

研究者番号：10346075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物の鞭毛は滑らかな波打ち運動を生み出す運動器官であり、その運動は個体の生命活動に大きく貢献している。本研究では、動物とほぼ同じ構造の鞭毛を使って泳ぐ単細胞生物「緑藻クラミドモナス」を調べた。鞭毛に欠陥があるため泳げない細胞に、深海6000メートル相当の静水圧をかけたところ、鞭毛を滑らかに動かして泳ぎ出す様子を観察できた。これは、特殊な薬剤や遺伝子操作を使わない新しい細胞操作技術を創出できたことになる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの体の中ではたらく繊毛や鞭毛が動かなくなると、「繊毛病」と呼ばれる病気の症状が現れる。例えば、精子の鞭毛が動かなくなると不妊症になる。今回、調べた「緑藻クラミドモナス」は、ヒトの繊毛や鞭毛とほぼ同じ仕組みで動いている。今回、明らかにした静水圧による鞭毛運動の活性化法を応用すれば、なんらかの理由で動かないヒトの鞭毛や繊毛の不調を回復させ、不妊治療などにつなげられる可能性が出てくる。

研究成果の概要(英文)：The beating of eukaryotic flagella depends on the sliding movements between microtubules powered by dynein. In flagella of most organisms, microtubule sliding is regulated by the internal structure of flagella comprising the central pair of microtubules (CP) and radial spokes (RS). *Chlamydomonas paralyzed-flagella* (pf) mutants lacking CP or RS are non-motile under physiological conditions. Here, we show that high hydrostatic pressure induces vigorous flagellar beating in pf mutants. The beating pattern at 40 MPa was similar to that of wild type at atmospheric pressure. In addition, at 80 MPa, flagella underwent an asymmetric-to-symmetric waveform conversion, similar to the one triggered by an increase in intra-flagella Ca^{2+} concentration during cell's response to strong light. Thus, our study establishes that neither beating nor waveform conversion of flagella requires the presence of CP/RS in the axoneme.

研究分野：ナノバイオサイエンス

キーワード：鞭毛 高圧力顕微鏡 運動マシナリ 分子操作 ナノバイオ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鞭毛は繊毛と共に、細胞外に伸張させた繊維状の構造体である。繊毛や鞭毛が生み出す波打ち運動は、細胞レベルから個体レベルにいたるまで様々な生命活動に大きく貢献している。鞭毛や繊毛が正常に動かなくなると、繊毛病と呼ばれる様々な疾患が生じることが知られている。その代表例として、心臓などの臓器の配置異常や、慢性気管支炎、遺伝的な水頭症などが挙げられる。さらに、精子鞭毛の異常による男性不妊症も深刻な症例となっていた。

日本産婦人科学会の調査によれば、2019年に体外受精で誕生した新生児は約6万人に達しており(新生児14人のうち1人)、革新的な不妊治療技術の創出が望まれていた。このような中、申請者らは、ブタ精子に圧力処理を施すことで、凍結&再解凍後に良好に泳ぐ精子の割合を引き上げる文献に着目した。この静水圧を用いた鞭毛運動の活性化機構について、分子科学に立脚した詳細なメカニズムは明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

研究代表者は、世界にさきがけて高精細な画像を取得できる高圧力顕微鏡を開発し、多くの研究者と連携することで、分子から細胞に至るまで様々な階層の圧力応答を実時間観察する研究を実施してきた。本研究では、これまで培ってきた高圧力顕微鏡法を活用し、高圧力により鞭毛運動がどのように変調されるのかを調べる研究に取り組んだ。研究代表者がこれまで開発してきた高圧力顕微鏡法を柱として、研究対象となる鞭毛の調製に長けた3名の研究分担者と研究を推進した。

3. 研究の方法

真核生物の鞭毛・繊毛の構造は種を超えてほぼ同じであり、研究目的に応じて適した生物種を選んで実験した。単細胞生物・緑藻クラミドモナスは突然変異に由来する鞭毛変異体のライブラリーが充実していて、遺伝子操作も可能である。次に、ウニ精子は発生生物学に基づく長い歴史があり過去の知見は豊富にある。ヒト精子は不妊治療に直結する。研究代表者が開発してきた高圧力顕微鏡を利用して、高圧力下にある鞭毛運動を直接観察する事で、鞭毛運動がどのように変化するか調べた。

4. 研究成果

4.1 クラミドモナス鞭毛の運動解析

クラミドモナスの突然変異株の代表例である *pf18* 株は、鞭毛の中心小管を欠失している(図1A)。この細胞の鞭毛は、まっすぐに伸びきったままとされており、動きは見られない。しかしながら、この鞭毛変異株のダイニンは微小管を滑らせる活性が保持されていて、鞭毛をナノメートル程度のわずかな振幅で高速に振動させていることが明らかにされている。本研究では、これまで開発してきた高圧力顕微鏡法を利用して、高圧力下でクラミドモナスの変異株 *pf18* を観察した。

常圧力下(0.1MPa)では、変異株 *pf18* の鞭毛はまっすぐにのびたままであった(図1B)。圧力を0.1MPaから80MPa(水深8,000mの静水圧)にあげたところ、約6割の細胞が鞭毛を滑らかに動かし泳ぎ始めた(図1C)。このような運動能の活性化は、鞭毛内のスポークを欠失して動かなくなった *pf14* 株(図1A)でも40-80MPaで観察された(図1D)。これは、高圧力をかけることで、失われたはずの鞭毛中心部分の役割が補われたことになる。ただし、この実験を野生型のクラミドモナスで行ったところ、高圧力をかけることで運動能がさらに向上するのではなく、むしろ抑制されてしまった。したがって、高圧力下で単にダイニンの運動能が活性化されたわけではなさそうである。

構造的に欠陥のある鞭毛が、高圧力下で動き始めるメカニズムについて考える。1つ目のモデルでは、欠陥のある鞭毛の運動を高圧力が直接誘起すると考える。2つ目のモデルでは、細胞の生理活性が高圧力下で変わることで、鞭毛の運動が間接的に活性化されると考えるものである。どちらが正しいのかを検証するため、*in Vitro* の実験を行った(図1E)。培養した細胞から鞭毛を外した。鞭毛の周りには細胞膜を界面活性剤で除去し、水溶液に加えたATPが直接鞭毛内にあるダイニンに結合し、鞭毛振動を行える実験系を構築した。その結果、0.1MPaでは動かなかった *pf14* 株の鞭毛が、40MPa下では野生型の鞭毛がみせるようなリズムカルな波打ち運動をはじめた。このように細胞からとり外した鞭毛にも圧力効果が明確に表れたことから、高圧力は、鞭毛を構成するタンパク質に直接作用し、波打ち運動を発生させたと言えよう。また、鞭毛には内腕と外腕2種類のダイニンが含まれているが(図1A)、高圧力下で誘起される変異株の運動には、外腕ダイニンが重要なはたらきをすることが明らかになった。

生理的条件下で動かない鞭毛が動き出すメカニズムのヒントは鞭毛の構造にある。軸系の中心構造(中心小管やスポーク)は軸系全体の構造を調整することで、ダイニンと微小管の距離を適切にたもち、滑らかな振動を生み出しているという仮説が提唱されている。したがって、高圧力下で軸系内のダイニンなどの水和がうまく調整されれば、軸系の中心構造がなくても、ダイニンと微小管の距離が適切となれば動き出しても不思議はない。研究分担者である八木らは、過去の実験で溶液中にアルコールや糖を混ぜることで *pf18* や *pf14* 株の鞭毛が動き出すことに成功している。高圧力は鞭毛を構成するダイニンや微小管などの分子間相互作用を適切に整えるはたらきがあると考えられる。

4.2 その他の生物種の鞭毛運動

ムラサキウニから採取した精子を用いて、高圧力下での運動観察を行った。ウニ精子の鞭毛は、圧力増加と共に波打ち運動を低下させていった。この結果は、野生型のクラミドモナス鞭毛と同じであり、生理的条件下で正常にはたらく鞭毛に対して、圧力負荷は運動能を向上させないことを意味する。その一方で、ウニ精子の場合、高圧力を負荷すると、細胞内の Ca^{2+} 濃度が水溶液中の Ca^{2+} 濃度に一致する方向に変化する結果が得られた(現在、検証中)。こうしたクラミドモナス鞭毛やウニ精子から得られた知見を活用して、高圧力処理を施すことで、ヒト精子運動の活性化を行えるように研究を推進させている。ヒト精子の運動能を向上させることができれば、人工授精に応用することで新しい不妊治療技術の創出につなげられるだろう。

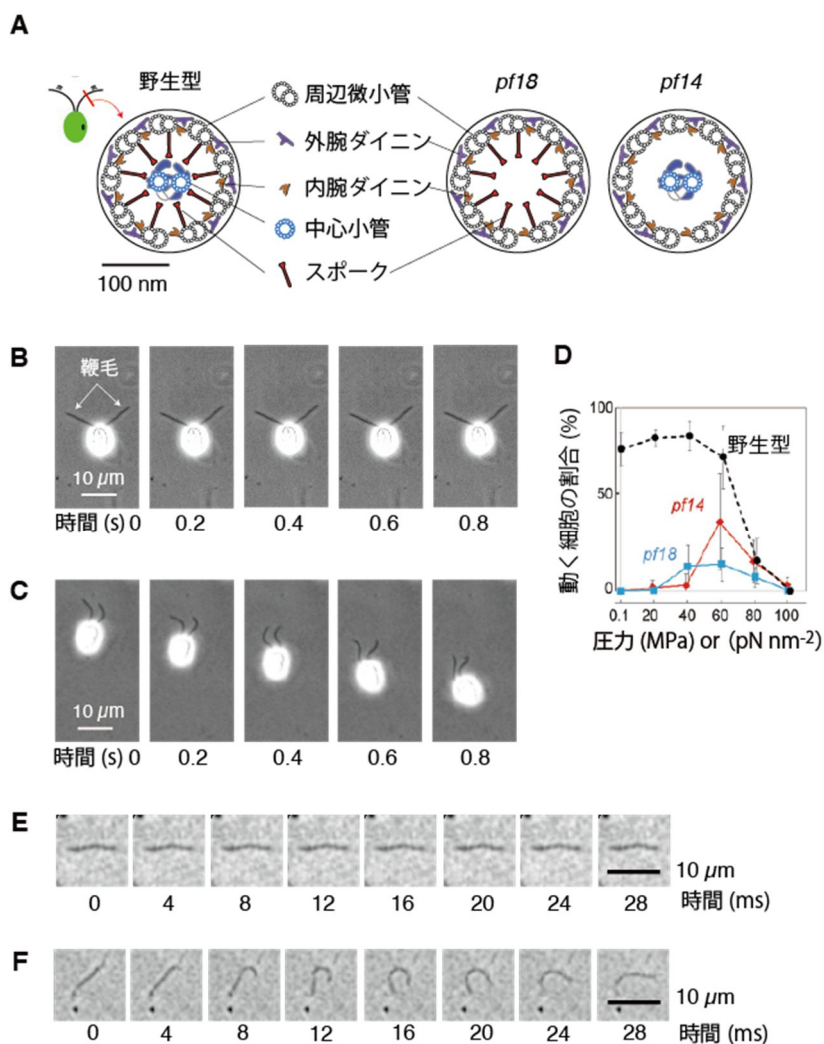


図1 構造欠陥のある鞭毛の運動 A) クラミドモナス鞭毛の断面図 B) 常圧力下(0.1MPa)では動かない *pf18* 株(鞭毛の中心小管を欠失している)。C) 80MPa で泳ぎ始めた *pf18* 株 D) 動き出す細胞の割合の圧力依存性。E) 常圧力下(0.1MPa)では動かない *pf14* 株の鞭毛。F) 40MPa で動き出した *pf14* 株の鞭毛運動。in Vitro の実験では、まず、細胞本体から鞭毛を外し、次に、鞭毛表面にある細胞膜を取り除く。鞭毛は溶液中にある ATP を利用して屈曲運動を発生できる。化学 76, 41-45 を改変して転載。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Okamoto K, Watanabe TM, Horie M, Nishiyama M, Harada Y, Fujita H	4. 巻 10
2. 論文標題 Pressure-induced changes on the morphology and gene expression in mammalian cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 bio058544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.058544	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 Morikawa TJ, Nishiyama M, Yoshizawa K, Fujita H, Watanabe TM	4. 巻 18
2. 論文標題 Glycine insertion modulates the fluorescence properties of Aequorea victoria green fluorescent protein and its variants in their ambient environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 145 ~ 158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v18.016	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 八木俊樹, 西山雅祥	4. 巻 76
2. 論文標題 高圧力下で蘇る鞭毛運動	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 化学	6. 最初と最後の頁 41 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 八木俊樹, 西山雅祥	4. 巻 31
2. 論文標題 高圧力下での鞭毛運動の活性化イメージング	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 高圧力の科学と技術	6. 最初と最後の頁 66 ~ 73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4131/jshpreview.31.66	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 八木俊樹, 藤田洋介, 上村慎治, 岩本裕之	4. 巻 9
2. 論文標題 温度変化によって生じる鞭毛軸系の構造変化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Spring8/SACLA利用研究成果集	6. 最初と最後の頁 375-379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18957/rr.9.6.375	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 Yagi T. & Nishiyama M.	4. 巻 10
2. 論文標題 High hydrostatic pressure induces vigorous flagellar beating in Chlamydomonas non-motile mutants lacking the central apparatus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2072-9pages
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58832-8	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 Watanabe N., Morimatsu M., Fujita A., Teranishi M., Sudevan S., Watanabe M., Kagi H., Nishiyama M., Naruse K. & Higashitani A	4. 巻 523
2. 論文標題 Increased hydrostatic pressure induces nuclear translocation of DAF-16 / FOXO in C. elegans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 853-858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hata H., Nishihara Y., Nishiyama M., Sowa Y., Kawagishi I. & Kitao A.	4. 巻 10
2. 論文標題 High pressure inhibits signaling protein binding to the flagellar motor and bacterial chemotaxis through enhanced hydration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2351-13pages
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59172-3	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 Hata H. & Nishiyama M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Session 1SHA-control of biological functions with hydrostatic pressure stimulation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 2pages
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-020-00658-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hata H., Nishiyama M. & Kitao A.	4. 巻 1864
2. 論文標題 Molecular dynamics simulation of proteins under high pressure: Structure, function and thermodynamics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BBA - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129395-10pages
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.07.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Okamoto K, Watanabe TM, Horie M, Nishiyama M, Harada Y, Fujita H
2. 発表標題 Pressure-induced changes on the morphology and gene expression in mammalian cells
3. 学会等名 66th Annual Meeting of Biophysical Society, USA (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kondo Y, Ogawa T, Kanno E, Hirono M, Kato-Minoura T, Kamiya R, Yagi T
2. 発表標題 A novel Chlamydomonas mutant harboring a point mutation in Intermediate Chain 2 of outer-arm dynein displays lowered motility
3. 学会等名 Dynein 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤裕祐, 八木俊樹
2. 発表標題 クラミドモナスにおける軸系ダイニンの活性調節
3. 学会等名 第92回 日本動物学会(オンライン)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐原歩奈, 小松大洋, 八木俊樹
2. 発表標題 クラミドモナス鞭毛マイナーダイニンの解析
3. 学会等名 第92回 日本動物学会(オンライン)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kondo Y, Yagi T
2. 発表標題 Regulation of axonemal dynein motor activity in Chlamydomonas
3. 学会等名 第59回 日本生物物理学会(オンライン)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nishiyama M.
2. 発表標題 Activation of the motility machineries using high-pressure techniques.
3. 学会等名 57th Annual Meeting of Biophysical Society of Japan(招待講演)(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山 雅祥
2. 発表標題 静水圧を力学刺激とする生命操作技術の開発
3. 学会等名 日本メカノバイオロジー研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

失った細胞機能を水圧で再生 https://www.kindai.ac.jp/news-pr/news-release/2020/02/019291.html 失った細胞機能を水圧で再生 https://www.pu-hiroshima.ac.jp/site/press-release/200206kenhiro-shobara.html
--

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	八木 俊樹 (Yagi Toshiki) (40292833)	県立広島大学・生命環境学部・教授 (25406)	
研究分担者	今井 洋 (Imai Hiroshi) (60391869)	大阪大学・理学研究科・助教 (14401)	
研究分担者	松浦 宏治 (Matsuura Koji) (70443223)	岡山理科大学・生命科学部・教授 (35302)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	上之家 由美子 (Kaminoe Yumiko)	近畿大学・理工学部・研究員 (34419)	

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