

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K20583

研究課題名（和文）クシクラゲ櫛板の分子構造の解明と運動性フォトニック結晶開発に向けた基盤研究

研究課題名（英文）Basic research for molecular construction of ctenophore comb plates and development of motile photonic crystals

研究代表者

稲葉 一男（Inaba, Kazuo）

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：80221779

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,700,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、クシクラゲの櫛板を材料として、隔小板の構成成分の同定、構造のX線繊維回折、及び試験管内形成を行い、繊毛微細構造の解明と生物構造体形成の原理を明らかにすることを目的とした。その結果、櫛板を構成する新規の隔小体タンパク質を合計で5種類同定し、これらによる櫛板の二段構造を明らかにした。また、櫛板がタンパク質結晶にも匹敵する高度な結晶性を示すこと、その結晶性が凍結や化学固定で失われることを明らかにした。さらに、様々な角度からX線を照射した場合の回折パターンより、分解能が低いながらも3D再構成を世界で初めて成功させ、屈曲運動に伴う生の状態の構造変化も部分的に明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、有櫛動物が多数の繊毛を束ねることにより、驚くべき結晶性の構造を形成していることが証明された。固定や凍結ではその高い結晶性が失われることから、この構造体が生の状態でしかも運動性を持っていることが重要であることが示された。これは、生物が作り出す構造の未知で重要な機能の存在を示唆している。流体と連動した新たな運動装置の原理や、生物間コミュニケーションにおける新たな伝達方法の可能性などが考えられる。今後の研究により、新たな生物機能の原理の発見に結びつくことが期待される。この構造体は、フォトニック結晶の性質を持っているため、新たな通信技術の開発に大きなブレークスルーをもたらす可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we identified the components of comb plates to link cilia, conducted X-ray fiber diffraction analysis of its structure, and performed in vitro formation of comb plates to elucidate the fine structure of cilia and the principles of biological structural formation. As a result, we identified a total of five novel comb plate proteins comprising the comb plates, revealing their two-compartmented structure. Furthermore, we demonstrated that the comb plates exhibit a high degree of crystallinity comparable to protein crystals, and that this crystallinity is lost through freezing or chemical fixation. Additionally, by irradiating X-rays from various angles and analyzing diffraction patterns, we successfully achieved 3D reconstruction for the first time in the world, albeit with low resolution, and partially elucidated structural changes in the live state associated with ciliary bending movements.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：クシクラゲ 櫛板 X線繊維回折 軸系 ダイニン フォトニック結晶 分子モーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

繊毛は、高速の波打ち運動を司る細胞小器官である。ヒトでは精子や気管支、脳室などにみられ、繊毛の異常は繊毛病などの疾患を引き起こす。繊毛の構造解明は、生物が形作る構造の理解につながるだけでなく、繊毛に由来する疾患の原因解明や治療にも重要である。クシクラゲの櫛板は、数万本の繊毛が束化しており、繊毛の構造を解明するのに適した材料である。その不思議さや構造色から、100年以上も前から注目されていたにもかかわらず、その分子構築や方向性を持った繊毛配置のメカニズムはほとんど明らかにされてこなかった。

2. 研究の目的

本研究では、櫛板の分子構築と結晶構造を明らかにし、その応用として試験管内で巨大な繊毛を作り上げ、運動するフォトニック結晶作製の可能性も探る。具体的には、櫛板の分子構築と結晶構造を明らかにする目的で、クシクラゲの1種カプトクラゲを用いて、4年間で以下の研究項目を進めることとした。

- 研究項目1：櫛板内で繊毛をつなげる構造である隔小体の成分の同定と分子構築の解明
- 研究項目2：櫛板の結晶構造の解読
- 研究項目3：CL成分の添加による軸系の試験管内束化と巨大結晶化
- 研究項目4：巨大結晶の構造の解読と光学的特性の解析。

3. 研究の方法

研究項目1では、すでにゲノム解析やトランスクリプトーム解析、プロテオーム解析によりリストアップしてある隔小体成分の候補に対する抗体を作成し、免疫電子顕微鏡により局在を調べた。さらに、タンパク質をロックダウンした際の櫛板の運動解析を行った。研究項目2では、X線繊維回折を用いることにより、櫛板内での繊毛の分布と周期性、各繊毛内の軸系構造の回折像を解析した。これにより、これまで用いられてきた電子顕微鏡では得られない、生の状態での繊毛構造を明らかにすることとした。さらに、運動中の軸系成分の動的変化やタンパク質構造櫛板の結晶構造の解読を試みた。研究項目3では、隔小体成分の添加による軸系の試験管内束化と巨大結晶化を試みることにした。研究項目4では、試験管内で出来上がった巨大結晶の構造を電子顕微鏡とX線繊維回折により解読し、そのフォトニック結晶としての光学的特性を調べることとした。

4. 研究成果

研究項目1では、櫛板の隔小体を構成する5種類の新規タンパク質を同定し、それらが近位あるいは遠位に明確な境界を持って存在する二段構造をとっていることを明らかにした。また、遺伝子ロックダウンを用いて、遠位側は繊毛型非対称波の形成、メタクロール波の形成に必須であり、近位側は櫛板内の繊毛の配向を決定するという知見も明らかにした(図1)。これは、櫛板の長軸で束化の機能が異なっていることを示唆しており、今後、流体力学的にも新たな知見が見出される可能性が期待される。

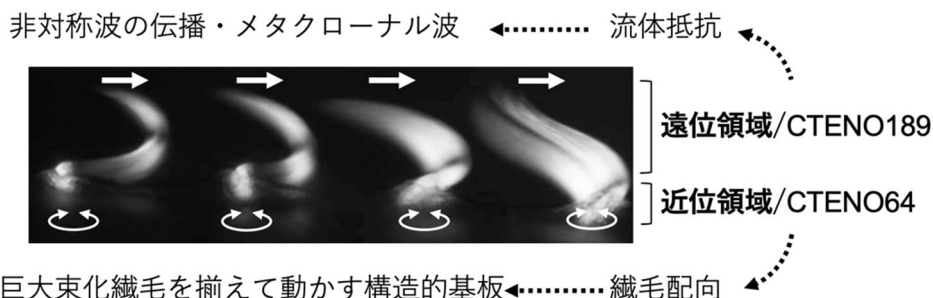


図1：櫛板の二段構造。近位領域の隔小板は、櫛板根本の繊毛の配向を揃える基板的な役割、遠位領域は流体力学的抵抗に打ち勝ち、正常な非対称波を形成・伝播させ、メタクロール波を維持する役割がある。

研究項目2では、SPring8のビームライン(BU40XU)を用いて、生の状態の単離櫛板のX線繊維回折を行い、40次という高い結晶性の回折パターンを得た(図2)。トモグラフィーを目的として、凍結した櫛板を1度ずつ回転させた時の回折像を取得し、赤道反射のパターンから角度を推定したデータを加算することにより、分解能が低いながらも3D再構成を世界で初めて成功させた。さらに、生の櫛板に一定時間X線を照射しても運動を継続することを発見した。この発見は、照射条件を調節することにより、繊毛運動中の構造変化をX線繊維回折により検出できることを示している。詳細な条件検討の結果、運動している櫛板にX線を照射した場合の回折パターンをリアルタイムで動画撮影し、それと同期した櫛板の屈曲運動もハイスピードカメラで記録することに成功し、繊毛周期に伴う回折パターンの変化が特定の層線で観察された(図3)。これは、繊毛内の軸系構造の変化を生で観察したことを示す。

一方、赤道反射のデータを用い、屈曲角や位相と関連づける試みも行ったが、これについては完成に至っていない。また、研究項目3と4にある試験管内の櫛板形成については、同定した隔小板タンパク質を単離繊毛軸系に加えるなど種々の条件を試行錯誤したが、現在まだ成功に至っていない。

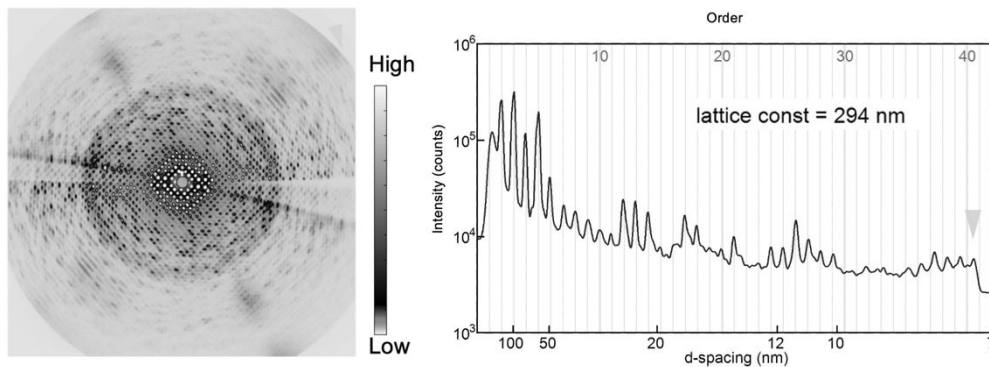


図2：生の櫛板の エンドオン反射。40次という高い反射が観察される。化学固定剤を用いた場合や凍結櫛板ではこのような結晶性の反射は認められない。

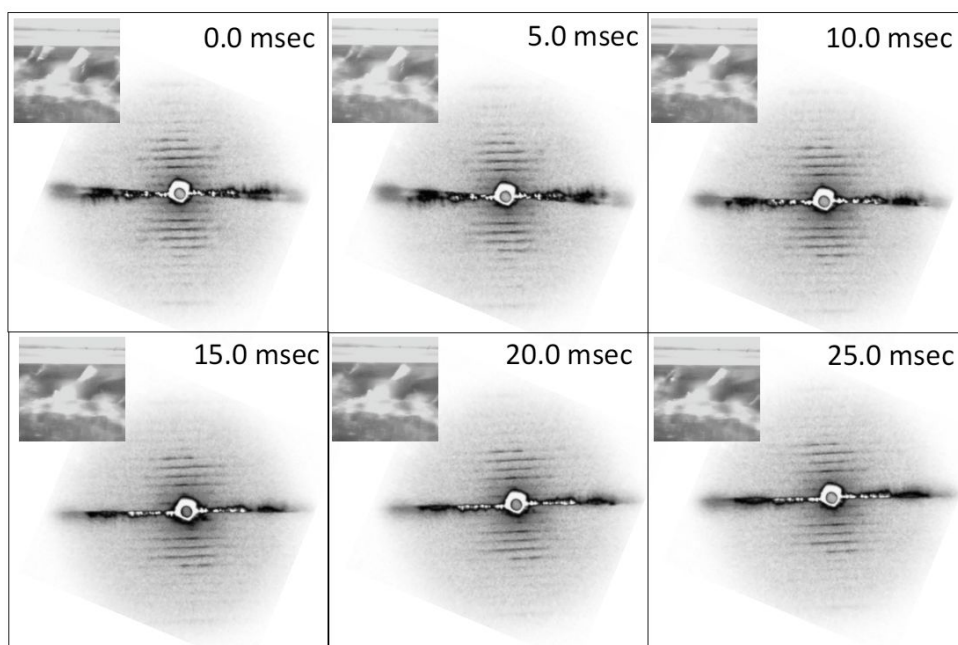


図3：櫛板が屈曲運動している間に示す層線反射パターンの変化。層線線は非対称な反射パターンを示し、そのパターンは櫛板の屈曲サイクルにより変化する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7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 Hayakawa Eisuke, Guzman Christine, Horiguchi Osamu, Kawano Chihiro, Shiraishi Akira, Mohri Kurato, Lin Mei-Fang, Nakamura Ryotaro, Nakamura Ryo, Kawai Erina, Komoto Shinya, Jokura Kei, Shiba Kogiku, Shigenobu Shuji, Satake Honoo, Inaba Kazuo, Watanabe Hiroshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Mass spectrometry of short peptides reveals common features of metazoan peptidergic neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 1438 ~ 1448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41559-022-01835-7	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

1. 著者名 Jokura Kei, Sato Yu, Shiba Kogiku, Inaba Kazuo	4. 巻 32
2. 論文標題 Two distinct compartments of a ctenophore comb plate provide structural and functional integrity for the motility of giant multicilia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 5144 ~ 5152.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2022.09.061	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 稲葉一男	4. 巻 86
2. 論文標題 繊毛から眺める海の生き物	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 エブオブ	6. 最初と最後の頁 2-5
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 Konno A, Inaba K.	4. 巻 37
2. 論文標題 Region-Specific Loss of Two-Headed Ciliary Dyneins in Ascidian Endostyle.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Zoolog Sci.	6. 最初と最後の頁 512-518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs200095	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 Jokura K, Inaba K.	4. 巻 77
2. 論文標題 Structural diversity and distribution of cilia in the apical sense organ of the ctenophore <i>Bolinopsis mikado</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytoskeleton (Hoboken)	6. 最初と最後の頁 442-455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cm.21640	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 Iwamoto Hiroyuki, Oiwa Kazuhiro, Shiba Kogiku, Inaba Kazuo	4. 巻 21
2. 論文標題 X-ray diffraction recording from a small amount of fibrous protein materials oriented by a micro shear-flow cell	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v21.0014	査読の有無 無
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 稲葉一男	4. 巻 56
2. 論文標題 繊毛の多様化と動物進化	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 9-13
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17件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 柴田 大輔, 大畑 雅江, 小高 友実, 中村 千華, 加納 穂澄, 北之坊 仁美, 小坂 実央, 柴 小菊, 稲葉 一男
2. 発表標題 カプトクラゲの実験動物化に向けた継代飼育系の確立
3. 学会等名 日本動物学会第93回早稲田大会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩本 裕之, 城倉 圭, 大岩 和弘, 稲葉 一男
2. 発表標題 クシクラゲ櫛板のX線回折像から繊毛軸系の3次元構造を復元する
3. 学会等名 日本動物学会第93回早稲田大会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩本 裕之, 城倉 圭, 大岩 和弘, 稲葉 一男
2. 発表標題 真核生物鞭毛・繊毛軸系構造の X線回折トモグラフィー：クシクラゲ櫛板の利用
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲葉一男、城倉圭、佐藤友、小坂実央、柴小菊
2. 発表標題 クシクラゲ櫛板内で軸系集合体が波打つための分子基盤
3. 学会等名 2023年生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩本裕之、稲葉一男、大岩和弘
2. 発表標題 クシクラゲ櫛板の繊毛打に伴う軸系構造変化を高速 X線回折測定で見る
3. 学会等名 2023年生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuo Inaba
2. 発表標題 Structure, motility regulation and evolution of eukaryotic cilia and flagella
3. 学会等名 Biofluid Symposium as part of RIMS Research Project Biofluids 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 城倉圭, 佐藤友, 柴 小菊, 稲葉 一男
2. 発表標題 クシクラゲ櫛板の構築とその繊毛運動におけるCTEN0189の役割
3. 学会等名 第92回日本動物学会オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤友, 城倉圭, 柴 小菊, 稲葉 一男
2. 発表標題 クシクラゲ櫛板を構成する新規タンパク質BmBTBD19およびCTEN078により示された繊毛間リンクの2段構造
3. 学会等名 第92回日本動物学会オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kogiku Shiba, Kazuo Inaba
2. 発表標題 The role of CNG channel in the regulation of flagellar motility in the ascidian sperm
3. 学会等名 The virtual Dynein 2021 International Workshop (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kei Jokura, Yu Sato, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba
2. 発表標題 A novel protein CTEN0189 is involved in the maintenance of asymmetric ciliary movements in the comb plates of ctenophores
3. 学会等名 The virtual Dynein 2021 International Workshop (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲葉 一男
2. 発表標題 海洋生物の細胞イメージングを支援する
3. 学会等名 ABiS Symposiumイメージングデータ解析が拓く生命科学の新時代 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuo Inaba
2. 発表標題 Structural and functional diversification of cilia in evolutionary adaptation to aquatic environments
3. 学会等名 Michael Sars Symposium 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuo Inaba
2. 発表標題 Diversification of ciliary structure and function during eukaryotic evolution
3. 学会等名 SMBE Satellite Meeting on Mechanisms of Cellular Evolution (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小坂実央、柴小菊、稲葉一男
2. 発表標題 クシクラゲの櫛板隔小板を構成する新規タンパク質成分の同定
3. 学会等名 日本動物学会第94回山形大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 稲葉一男
2. 発表標題 高速繊毛非対称波の起源について
3. 学会等名 第13回繊毛研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩本 裕之、小坂 実央、横屋 稜、城倉 圭、大岩 和弘、稲葉 一男
2. 発表標題 繊毛打中のクシクラゲ櫛板の軸系からのミリ秒時間分解X線回折像記録
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩本 裕之、小坂 実央、横屋 稜、城倉 圭、大岩 和弘、稲葉 一男
2. 発表標題 運動中のクシクラゲ櫛板の有効打・回復打におけるX線回折像の違い
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議2024
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 稲葉一男	4. 発行年 2021年
2. 出版社 光文社	5. 総ページ数 273
3. 書名 毛 生命と進化の立役者	

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学下田臨海実験センター稲葉研究室HP https://inaba-lab-shimoda.jimdofree.com
--

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	大岩 和弘 (Oiwa Kazuhiro) (10211096)	国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所・主管研究員 (82636)	
研究分担者	岩本 裕之 (Iwamoto Hiroyuki) (60176568)	公益財団法人高輝度光科学研究センター・回折・散乱推進室・客員研究員 (84502)	

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
---------	---------