

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770172

研究課題名（和文）三次元トラッキング顕微鏡を用いた鞭毛運動の定量解析

研究課題名（英文）Statistical analysis of flagella beating by 3-D tracking microscopy

研究代表者

山野 隆志 (YAMANO TAKASHI)

京都大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：70570167

研究成果の概要（和文）：三次元トラッキング顕微鏡の開発により、緑藻クラミドモナスを三次元空間で追尾しながら、同時に鞭毛の動きを安定に観察することが可能となった。クラミドモナスの位置(x,y,z)情報と画像に対して、1回の鞭毛打で進む距離、x,y,z方向への瞬間的な速度、曲率、クラミドモナスの回転とその周期、三次元空間における泳動軌跡を容易に計算できるシステムを構築した。これを用いて、異なる光条件下における野生株、既存のダイニン変異株の鞭毛運動の定量的なデータを得る系を構築した。

研究成果の概要（英文）：We developed 3D-tracking microscopy by a new image processing algorithm to achieve high-speed autofocusing of *Chlamydomonas reinhardtii*, a motile green alga. Using this algorithm and high-speed visual feedback, we could pursue a single *Chlamydomonas* cell to keep it at the center of the field and depth of view, and visualize the two flagella continuously along with tracking it at high spatiotemporal resolution.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：運動・輸送、クラミドモナス、三次元トラッキング顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

真核生物の鞭毛/繊毛は、進化の過程で高度に保存された運動・感覚器官である。例えば精子、輸卵管表面、気管などでは、鞭毛は水流を作り出し、運動器官としての役割を果たす。また哺乳類の発生初期においては、回転する繊毛がノード流を作り出し、身体の左右性を決定することが知られている。一方、腎

臓の尿細管では繊毛が原尿の流れる方向を感知し、尿細管細胞はその方向にそって細胞分裂を行うなど、感覚器官としての役割を果たす。鞭毛/繊毛の働きの異常によって引き起こされる先天性疾患には、多発性嚢胞腎や精子の運動/形態形成異常などがあり、広く繊毛症と呼ばれている。

この鞭毛と繊毛に共通する構造は「軸糸」

と呼ばれ、微小管の「9+2 構造」を芯として、600 種類以上ものタンパク質から構成されている。軸糸タンパク質をコードする遺伝子の多くは、本研究で用いる緑藻クラミドモナスからヒトに至るまで保存されていることから、クラミドモナスの鞭毛をモデルとした分子遺伝学的解析が可能である。

軸糸タンパク質の中でも、微小管上に並んでいるダイニン複合体は、ATP を加水分解して、周辺微小管の間に滑り運動を起こさせる役割を果たす。この微小管の滑り運動が鞭毛の鞭打ち運動に変換されるためには、ダイニンの活性化を軸糸内の決まった場所かつ決まったタイミングで協調して起こさせる制御機構が不可欠である。さらにクラミドモナスは、鞭打ちの周波数が異なる 2 本の鞭毛を持ち、2 本の鞭毛運動を同期させて泳ぐ。この鞭毛運動の制御及び同期メカニズムについては、カルシウム濃度の調節を受けて、ダイニン制御複合体が関与することが分かっているのみで、詳細は不明である。

これまでに得られたクラミドモナス変異株から、鞭毛運動について多くの知見が得られているが、その多くは野生株に比べて「遅い」、「動きがおかしい」、「動かない」などの定性的な観察に頼っていた。クラミドモナスの鞭毛は 60-70Hz と高速で鞭打っているため、泳いでいる状態で 2 本の鞭毛の協調運動が損なわれた変異株を単離することは難しい。これを可能にするためには、クラミドモナスの 2 本の鞭毛運動を定量的に解析することが必要である。

2. 研究の目的

真核生物の鞭毛/繊毛は、生殖、発生、呼吸、感覚など様々な機能に関わる細胞内小器官であり、繊毛病と呼ばれる多くの先天性遺伝子疾患と関連がある。モーター分子ダイニンから発生する力が伝播されることにより、鞭毛/繊毛は鞭打つことができるが、その制御機

構についてはほとんど分かっていない。

そこで本研究の目的は、三次元トラッキング顕微鏡という新しい技術を分子遺伝学と組み合わせることによって、鞭毛運動を制御する遺伝子を同定することである。

3. 研究の方法

以下の 2 つの解析を並行して行う。

1. 三次元トラッキング顕微鏡による鞭毛運動の定量解析

通常の培養条件において、クラミドモナスは進行方向にある 2 本の鞭毛運動を同期させ、平泳ぎで泳ぐ。この運動は推進力を生み出す有効打と、それを元の位置に戻す回復打の繰り返しとして観察されるが、この一連の鞭打ちかが 1 秒間に 60-70 回(60-70Hz)と非常に早いため、人間の目で直接観察することはできない。そこで、この鞭毛運動を定量的に観察するために、高速ビジョンカメラを備えた三次元トラッキング顕微鏡と鞭毛運動の定量解析システムを開発する。またクラミドモナスは、強い光などの刺激に応じて、40 ミリ秒以内に平泳ぎから精子のような動きに転換したり、約 20 回の鞭打ちの間に、cis 鞭毛と trans 鞭毛が非同期運動を起こしたりするなど、複雑な鞭毛制御システムが存在する。三次元トラッキング顕微鏡は、この鞭毛運動の転換の様子についても高解像度で定量的に解析することができる。このシステムを応用して、今までは単離が難しかった 2 本の鞭毛運動の制御に異常をきたした変異株をスクリーニングする。

2. 鞭毛運動の制御遺伝子の同定

本研究では、鞭毛を持つモデル生物として緑藻クラミドモナスを用いる。紫外線照射及び遺伝子タギングにより変異を導入し、三次元トラッキング顕微鏡を用いたスクリーニングにより、鞭毛運動の制御が損なわれた変異株を単離し、その遺伝子を同定する。この

順遺伝学的手法に加えて、人工マイクロ RNA や遺伝子タギングを用いた遺伝学的手法による鞭毛調節変異株の単離も行う。

4. 研究成果

クラミドモナスを三次元空間で追尾しながら、同時に鞭毛の動きを安定に観察することが可能となった。一次データとして得られる 1 ミリ秒ごとのクラミドモナスの位置 (x,y,z) 情報と画像に対して、統計処理ソフトウェア R 及び Matlab を利用した数値・画像解析により、1 回の鞭毛打で進む距離、x,y,z 方向への瞬間的な速度、曲率、クラミドモナスの回転とその周期、三次元空間における泳動軌跡を容易に計算できるシステムを構築した。これを用いて、異なる光条件下における野生株、既存のダイニン変異株の鞭毛運動の定量的なデータを得た。

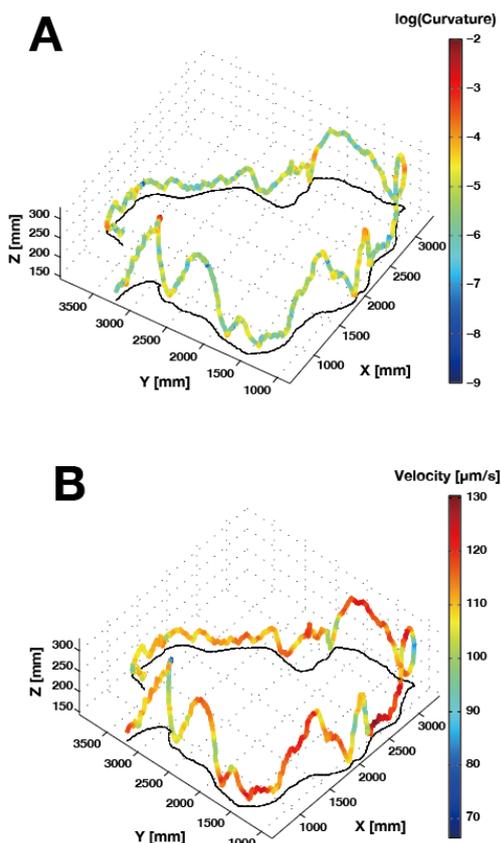


図 1. 遊泳するクラミドモナスの速度 (A) と曲率 (B) の三次元プロット

Molnar et al. 2007 によって報告された人工マイクロ RNA 法 (amiRNA 法) が、クラミド

モナス鞭毛構成遺伝子についても適用できるかを検討した。ダイニン軽鎖遺伝子を amiRNA 法によってノックダウンした株を作成し、トラッキング顕微鏡にて鞭毛運動を観察したところ、既知の報告と同様な表現型が観察された。このことから、amiRNA 法は鞭毛遺伝子のノックダウンとその機能解析に有効であることが示唆された。

また、クラミドモナスの細胞壁の有無は鞭毛運動に影響を与えるため、細胞壁を持つ株を研究に利用することが必要である。これまでは、細胞壁があるクラミドモナス株を形質転換するためには、自ら調整したガメトライシン酵素を用いて細胞壁を融解させる必要があるため、形質転換に時間と手間がかかっていた。そこで細胞壁を有する株を簡便に形質転換するために、矩形波パルスを用いたエレクトロポレーターの電気条件を詳細に検討し、細胞壁がある株に直接形質転換する場合でも、高い形質転換効率で迅速に薬剤耐性株が得られる系を確立した。また、電気パルスの条件検討に使用した雄株 C-9 の他に、雄株 CC-124、雌株 CC-1690、雌株 CC-125 についても同様の効率で形質転換できることを確認した。これによってクラミドモナス両性の野生株を高効率で形質転換することが可能となり、交配による育種を行う基盤が確立された。以上の形質転換系の構築の研究結果を論文に投稿した (Yamano et al. J. Biosci. Bioeng. 2013)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

(1) Takashi Yamano, Hiro Iguchi, Hideya Fukuzawa, Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal, Journal of Bioscience and Bioengineering, 115: 691-694, 2013
doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.12.020.

〔学会発表〕（計 1 件）

(1) 奥寛雅、清川博貴、山野隆志、吉川雅英、
石川正俊「位相差顕微鏡法における遊泳細胞
の三次元トラッキング」 第 17 回画像セン
シングシンポジウム、2011 年 6 月

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/molecule/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山野 隆志 (YAMANO TAKASHI)

京都大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：70570167

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし