

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650048

研究課題名(和文) 繊毛波打ち運動を制御するダイニン分子による力伝達機構の解明

研究課題名(英文) Force Transmission Mechanism by Dynein Molecules That Controls Ciliary Beating Movement

研究代表者

豊島 陽子 (TOYOSHIMA, Yoko)

東京大学・総合文化研究科・教授

研究者番号：40158043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：繊毛虫テトラヒメナの繊毛一本の波打運動を3次元空間でイメージングできる顕微計測システムを確立し、一本の繊毛の運動の軌跡を定量した。繊毛内のダイニンやダイニン結合タンパク質、繊毛が細胞体から生える起点となる基底小体関連タンパク質に、それぞれGFPが融合したタンパク質の遺伝子をテトラヒメナ内に形質転換して発現する方法を確立し、繊毛打運動に関与するタンパク質に自在に変異の導入が可能となった。本研究の結果より、軸系内のダイニン分子の活性に応じた繊毛打運動の応答を定量でき、繊毛波打ち運動システムにおけるダイニン分子の機能が定量できるようになった。

研究成果の概要(英文)：We have developed an optical microscopic imaging system that is able to observe the 3-dimensional motion of individual cilia in *Tetrahymena thermophile* with high spatial precision, and that detected the beating pattern. The genes encoding axonemal dyneins, dynein binding proteins and basal body localized proteins fused to EGFP were successfully translated into *Tetrahymna*. Our results suggest that responses of ciliary movement depending on dynein activities localized to the axoneme are quantified and therefore dynein functions in a ciliary motion system can be quantified.

研究分野：生物物理学

キーワード：繊毛運動 軸系 微小管 ダイニン 基底小体

## 1. 研究開始当初の背景

繊毛が波打ち運動するには、軸糸を構成する分子モーター・ダイニンが微小管と相互作用して局所的に活性化され、軸糸内でダイナミックに時空の制御が行われる必要がある。この制御機構には、軸糸内部にある化学的なシグナル伝達経路が間違いなく重要な役割を果たしている。しかしながら、化学的な物質の勾配などだけでは、繊毛の速い波打ち運動を説明することができず、機械的な刺激を伝達する機構の存在が提唱されてはいるが、その実体は謎である。その理由としては、繊毛が形態変化（屈曲）することで、伝播されてきた負荷に対し、内部のダイニンや微小管がいつ、どこで、どのように応答するのかが不明な点が挙げられる。本申請者および分担者は、これまでに2次元光ピンセット力学測定技術(Hirakawa Toyoshima et al. *PNAS*, 2003)、ダイニンなどの組換え体発現系の開発(Ichikawa Toyoshima et al. *FEBS* 2011)や1分子イメージング技術、3次元位置検出技術(Yajima et al. *Nat Struct Mol Biol*, 2008)により、ダイニン分子の外部負荷に依存して起こる化学・力学反応の特性の解明を目指す研究に従事してきた。これらの要素技術を基に、1本の繊毛とその内部のダイニン分子を計測対象とし、軸糸ダイニンの変異体を発現させ、波打ち運動の特性を繊毛内部から変え、繊毛の波うち運動を3次元的に定量することで、これまで謎であった繊毛波打ち運動システムの一端を解明するといった着想に至った。

## 2. 研究の目的

繊毛軸糸を構成するダイニン分子は、軸糸の形態変化（屈曲）に応じて活性化され、軸糸を構成する2連微小管を滑らせる。軸糸内の微小管と相互作用しているダイニン分子が活

性化される個所が周期的に切り替わることで、繊毛打運動をされると考えられている。しかしこの軸糸を構成する微小管の屈曲が、どのように局所的にダイニン分子を活性化させ、軸糸内で屈曲を伝播し波うち運動を制御するのか、不明である。そこで本研究の目的は、本研究申請者等が確立してきた上述の要素技術を基に、繊毛打運動に関わる軸糸ダイニン分子が、周期的に切り替わる軸糸の形態変化（屈曲）に応じて活性化される機構、及びダイニン分子の活性化の伝播により、繊毛の波うち運動が制御される機構を明らかにすることであった。

## 3. 研究の方法

(1) 繊毛虫テトラヒメナへの目的遺伝子の導入：繊毛虫テトラヒメナは1個体あたり500~600本程度の多数の繊毛をもつ単細胞真核生物である。このテトラヒメナの大核ゲノムへ目的遺伝子を導入するため、テトラヒメナ大核の無糸核分裂を利用し、パーティクルガン法を用いて内在性の標的タンパク質との組み替えを行った。目的遺伝子にはEGFP、His-tag (Kobayashi et.al. 2008) がテトラヒメナ用のコドンに最適化して組み込まれ、同時に薬剤耐性 neo4 遺伝子の形質転換も行った。

(2) 組換えた目的ダイニン分子や中心子マーカータンパク質等のテトラヒメナ内での局在：導入したタンパク質はGFPが融合されており、GFPの蛍光を共焦点顕微鏡により観察した。

(3) 組換えた目的タンパク質の精製：薬剤耐性遺伝子とそれぞれ目的のタンパク質を導入したテトラヒメナ株を作成し、大量培養を行い、精製単離方法を検討した。

(4) テトラヒメナから精製したタンパク質の機能評価：①電子顕微鏡による観察

精製したタンパク質は His-tag が融合されており、His-tag 金粒子ラベルによって、透過型電子顕微鏡像を用いて、形態観察を行った。

#### ②ダイニン分子の運動機能評価

繊毛打運動に動力を与える軸系ダイニン分子の運動を *in vitro* 再構成系で定量した。

(5) 1本の繊毛観察系の構築：テトラヒメナから生えている1本の繊毛を計測するため、①テトラヒメナを生きのまま固定する方法を検討し、②固定したテトラヒメナから一本の繊毛を計測する方法を検討した。適度な界面活性剤で処理し、1本の繊毛に1個のビーズを結合させた。ビーズは非特異的に繊毛に結合するが、より特異的に結合させるために、軸系膜外部のタンパク質を化学的にビオチン化修飾し、アビジン-ビオチン系を利用してビーズを繊毛に結合させた。

(6) 繊毛運動の3次元位置測定：①3次元計測可能な顕微システム的确立を行った。Olympus IX71 顕微鏡の入射ポートから2波長のレーザーを入射し、それぞれの光の波長で3次元計測するためのキャリブレーションカーブの作成を行った。②繊毛全体の波うち運動、繊毛に結合させたマーカービーズ、繊毛の基部位置を同時に3次元空間で測定する最適化条件を検討した。

### 4. 研究成果

(1) 繊毛虫テトラヒメナへの目的遺伝子の導入：テトラヒメナに目的遺伝子（①軸系ダイニンストーク結合タンパク質、②軸系外腕ダイニン、③中心子マーカータンパク質）に GFP 及び His-tag をコードする DNA 塩基配列を導入することに成功した。目的遺伝子を導入したテトラヒメナのゲノム DNA を精製

し、電気泳動法によって、導入効率を定量した。

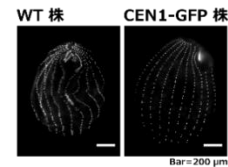
(2) 組換えた目的タンパク質のテトラヒメナ内での局在：目的タンパク質に融合した

GFP を局在マーカー

として、テトラヒメナ

内での局在を確認し

た。GFP が導入されていない野生株のテトラヒメナでは、蛍光抗体法により局在を確認し、目的遺伝子導入株での局在と比較した。



(3) 組換えた目的タンパク質の精製：目的タンパク質が発現しているテトラヒメナ株を大量培養し、アフィニティークラムクロマトグラフィーやショ糖密度遠心勾配法を用いて目的タンパク質の精製を行い、電気泳動法によりその純度を確認した。

(4) テトラヒメナから精製したタンパク質の機能評価：①電子顕微鏡による観察

精製した目的タンパク質をネガティブ染色像でその形態を確認した。さらに、His-tag を有する目的タンパク質の詳細な構造を決定するため、Ni-NTA ナノ金粒子で標識して撮影し、金粒子間の距離を定量した。

#### ②ダイニン分子の運動機能評価

*in vitro* 再構成微小管滑り運動実験方法によ

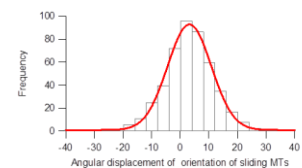
って、ダイニン分

子が微小管を長軸

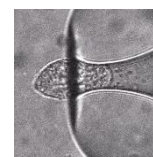
方向に滑らせなが

ら、微小管を曲げ

ることが、ダイニン分子の新たな特性としてあることが分かった。

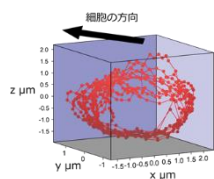


(5) 1本の繊毛観察系の構築：様々な条件を検討したが、マイクロマニピレーターでの吸引方法が活性を保ったままのテトラヒメナの固定には最も適していることが分かった。さらに、固定したテトラヒメナの繊毛は



低温状態でビオチン化することで、1本の繊毛に適量のビーズが固定できる条件を見出した。

(6) 繊毛運動の3次元位置測定: 一本の繊毛に結合したビーズの変位を3次元位置検出顕微鏡で定量した。一本の繊毛に結合した一つのビーズの軌跡を定量するのに、予想以上に時間を要したため、多角的に繊毛打運動を行うための条件検討に費やす時間は不十分であった。



本研究課題は、これまでの成果に基づき、活性を保ったままのテトラヒメナの一本の繊毛運動の3次元空間での定量が可能と考えているが、以下について更なる改良・検討が必要である。計測系については、ビーズ、繊毛、軸糸内蛍光タンパク質の3種の状態を同時に3次元的に測定する必要がある。高速で励起光の切り替えができるようなシャッターシステムの導入とともに、これに伴い計測中に生じるドリフトを取り除く必要がある。生体試料に関しては、繊毛打運動波形に影響を及ぼす軸糸タンパク質を網羅的にラベルし、繊毛打運動過程で各々の軸糸内タンパク質の動的な振る舞いを3次元空間で定量する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Axonemal Dynein Light Chain-1 Locates at the Microtubule Binding Domain of the  $\gamma$  Heavy Chain. Ichikawa M, Saito K, Yanagisawa H, Yagi T, Kamiya R, Yamaguchi S, Yajima J, Kushida Y, Nakano N, Numata O and Toyoshima, Y. Y. *Mol. Biol. Cell.* 査

読有, 巻 26, 発行年 2015, Page 4236-4247, 10.1091/mbc.E15-05-0289.

- ② Shin Yamaguchi, Kei saito, Miki Sutoh, Takayuki Nishizaka, Yoko Y Toyoshima, Junichiro Yajima. Torque generation by axonemal outer-arm dynein. *Biophysical Journal.* 査読有, 巻 108, 発行年 2015, Page 872-879, 10.1016/j.bpj.2014.12.038.

[学会発表] (計7件)

- ① ○須河光弘、山口真、高木拓明、柴田桂太郎、豊島陽子、矢島潤一郎 Off-axis motion of yeast cytoplasmic dynein takes a biased random walk. 第53回日本生物物理学会年会、金沢大学 (石川県、金沢市)、2015/9/13~15
- ② ○Ichikawa M., Saito K., Yanagisawa H., Yagi, T., Kamiya, R., Yamaguchi S., Yajima, J., Kushida Y., Nakano, K., Numata, O. and Toyoshima, Y. Y. Axonemal Dynein Light Chain-1 Locates at the Microtubule Binding Domain of the  $\gamma$  Heavy Chain. 第53回日本生物物理学会年会、金沢大学 (石川県、金沢市) 2015/9/13~15
- ③ M. Ichikawa, K. Saito, H. Yanagisawa, T. Yagi, R. Kamiya, Y. Kushida, K. Nakano, O. Numata, ○Y. Y. Toyoshima, Dynein light chain 1 locates at the stalk of the outer arm dynein. The 2014 ASCB/IFCB Meeting, 2014.12.6-10., Philadelphia, USA
- ④ ○Shin Yamaguchi, Kei saito, Miki Sutoh, Takayuki Nishizaka, Yoko Y Toyoshima, Junichiro Yajima, Torque generation by axonemal outer-arm

dynein. 第52回日本生物物理学会年会  
2014.9.13-15., 札幌コンベンションセン  
ター (北海道、札幌市)

- ⑤ ○Muneyoshi Ichikawa, kei Saito, Haru-  
aki Yanagisawa, Toshiki Yagi, Ritsu  
Kamiya, Yasuharu Kushida, Kentaro  
Nakano, Osamu Numata, and Yoko Y.  
Toyoshima, as LC1 binds to the stalk  
of the outer arm dynein. 第52回日本生  
物物理学会年会2014.9.13-15., 札幌コン  
ベンションセンター (北海道、札幌市)
- ⑥ ○Shin Yamaguchi, Kei saito, Miki  
Sutoh, Takayuki Nishizaka, Yoko Y.  
Toyoshima, Junichiro Yajima, Torque  
generation of axonemal outer arm  
dyneins. Biophysical Society 58th  
Annual Meeting 2014/02/15-19, San  
Francisco, USA
- ⑦ Muneyoshi Ichikawa, Yasuharu  
Kushida, Kentaro Nakano, Osamu  
Numata, Takuya Kobayashi, Yoko Y.  
Toyoshima, Manipulating  
Tetrahymena outer dynein arm  
components. “International Workshop:  
Dynein 2013”, 2013.11.1.-11.3., オルビ  
スホール (兵庫県、神戸市)

[その他]

ホームページ : [http://toyoshima-lab.c.u-  
tokyo.ac.jp/index.html](http://toyoshima-lab.c.u-tokyo.ac.jp/index.html)

## 6. 研究組織

### (1)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・教授  
研究者番号 : 4 0 1 5 8 0 4 3

### (2)研究分担者

矢島 潤一郎 (YAJIMA, Junichiro)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授  
研究者番号 : 0 0 4 5 3 4 9 9

### (3)研究協力者

須河 光弘 (SUGAWA, Mitsuhiro)  
小林 琢也 (KOBAYASHI, Takuya)  
市川 宗巖 (ICHIKAWA, Muneyoshi)  
山口 真 (YAMAGUCHI, Shin)  
斎藤 慧 (SAITO, Kei)  
小磯 由里加 (KOISO, Yurika)