

クラミドモナスを用いた鞭毛運動の多角的解析 —電子顕微鏡から細胞生物学まで—

Multi-method Analysis of *Chlamydomonas* Flagellar Motility —From Electron Microscopy to Cell Biology—

小田 賢 幸, 吉 川 雅 英

Toshiyuki Oda and Masahide Kikkawa

東京大学大学院医学系研究科 細胞生物学・解剖学講座 生体構造学分野

要 旨 鞭毛は多くの真核生物が持つ精巧な細胞小器官である。鞭毛の動きは多くの鞭毛タンパク質によって制御されているが、その複雑な機構は個々の分子を機能解析しただけでは捉えることができなかった。緑藻のクラミドモナスは長きに渡る研究の積み重ねにより、生化学、遺伝学、細胞生物学および構造生物学的手法によって鞭毛運動を追究することができる稀有なモデル生物である。私たちはこのクラミドモナスを用いて、鞭毛運動を駆動する分子モーターであるダイニンの制御機構を明らかにした。

キーワード：鞭毛, クライオ電子顕微鏡, ダイニン, トモグラフィー

1. はじめに

鞭毛はその屈曲運動によって液体の流動を生み出す細胞小器官であり、多くの真核生物の細胞運動および発生に重要な役割を担っている¹⁾。哺乳類の場合鞭毛の動きが、発生初期における体の左右非対称性の決定、気管上皮からの異物除去、卵管内での卵子の輸送、精子の運動性、脳室内の脳脊髄液流動等に必要であることが知られている^{2,3)}。典型的な鞭毛には9本の周辺微小管と1対の中心微小管からなる「9+2構造」が存在し、これを軸糸 axoneme と呼ぶ(図1)。鞭毛が屈曲運動をするには、周辺微小管の間にあるダイニン分子がすべり運動することで、鞭毛の屈曲運動を生む。クラミドモナスは一秒間に50から60回程度鞭毛を波打たせているわけだから、非常に多くの蛋白質で構成される10 μ mの軸糸をミリ秒単位で統率するためには、複雑かつ精巧は制御機構が必要である。

鞭毛運動の制御機構を追求する上で最も重要な分子の一つがダイニンである。鞭毛ダイニンはATPの加水分解によって鞭毛運動を駆動するATPaseであり、軸糸上の位置から外腕および内腕ダイニンに分類される。クラミドモナスの外腕ダイニンは2MDaに及ぶ巨大な複合体であり、ATPase活性およびモーター活性を持つ3つの重鎖(α , β , γ HC), WDリピードドメイン(β プロペラ構造が円環状に並んだタンパ

ク質間相互作用の足場となるドメイン)を持ち複合体を束ねる役割を持つと推測される2つの中間鎖(IC1, IC2), 細胞内カルシウムや酸化還元状態等に応答するとされる9つの軽鎖(LC1-9), 微小管との結合に必要な3つのドッキングコンプレックスタンパク質(DC1-3)から構成される⁴⁾。外腕ダイニンは周辺微小管上に24nm周期で整列している単一種のダイニンなのに対し、内腕ダイニンは周辺微小管上に96nm周期で7種のmajor subspeciesと3種のminor subspeciesが各々1分子ずつ配置される(10種すべてが同時に配置されることはない)複雑な構成を成す(図2)⁵⁾。

クラミドモナスの変異体の研究から、外腕および内腕ダイ

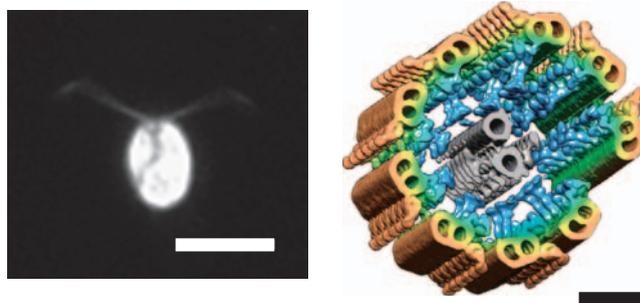


図1 クラミドモナス配偶子の暗視野像と9+2構造の3次元像
左, 光合成能をもつ細胞体から2本の運動性鞭毛が生えている。Bar = 10 μ m 右, クライオ電子トモグラフィーを用いて周辺微小管と中心対微小管の3次元構造を別々に平均化した後、それぞれを組み合わせて9+2構造を再現した。9本の周辺微小管に外腕ダイニン(黄色)と内腕ダイニン(茶色)が結合する。Bar = 50 nm

〒113-0033 文京区本郷7-3-1
TEL & FAX: 03-5841-3339
E-mail: mkikkawa@m.u-tokyo.ac.jp
2013年4月15日受付

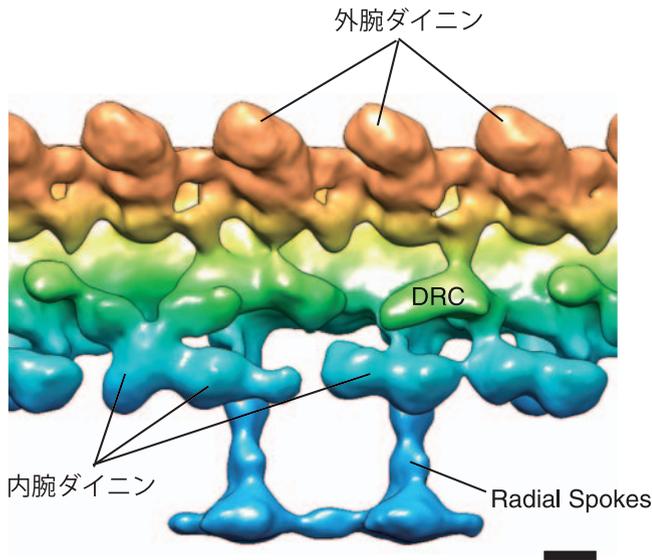


図2 周辺微小管における鞭毛ダイニンの構成
クライオ電子トモグラフィーによる軸糸の3次元構造から一本の周辺微小管を取り出して表示する。周期的に並ぶような外腕ダイニンと多様な構成を見せる内腕ダイニンが見える。
Bar = 10 nm

ニンは屈曲運動の駆動において大まかな役割分担をしていることが分かっており、外腕ダイニンが周波数、内腕ダイニンが振幅を主に制御している⁶⁾。しかしながら、外腕—内腕ダイニン間に機能的相互作用があるのかは多くの研究者が想像こそすれ、その存在を確かめるには至っていなかった。なぜならば、外腕ダイニンと内腕ダイニンの機能は、それぞれの欠損株の表現型や、強塩抽出により軸糸から精製されたダイニンの生化学的活性によって解析されてきたが、これらの方法では外腕—内腕ダイニン間の軸糸内 (*in situ*) での協働性を調べることができないからである。私達は外腕ダイニンの中間鎖 IC2 に小さなタグを付加して軸糸内で発現させる方法を用いて、この課題を克服した。その結果、IC2 が外腕—内腕ダイニン間に連絡架橋を作ることを発見し、二種の鞭毛ダイニンが協調して機能していることを示したので、以下に詳しく説明をする⁷⁾。

2. クライオ電子顕微鏡を用いた外腕ダイニン中間鎖の位置特定

クラミドモナスには鞭毛運動に関わる遺伝子が欠損した変異株が多数存在する。欠損している遺伝子を外部から細胞に導入すれば、野生型の表現型に戻すだけでなくタグや変異を加えた遺伝子を発現させることができる。私達は外腕ダイニンの中間鎖を欠損した株にビオチン化タグを付加した中間鎖遺伝子を導入して、すべての外腕ダイニンがタグ付き中間鎖を持つ株を得た。外腕ダイニンはチューブリンと共重合してらせん構造をとることが知られている (図3)^{8,9)}。電子顕微鏡によるタンパク質構造の3次元再構成は、対象の様々な角度からの投影像を得ることが必要である。らせん構造の場合、

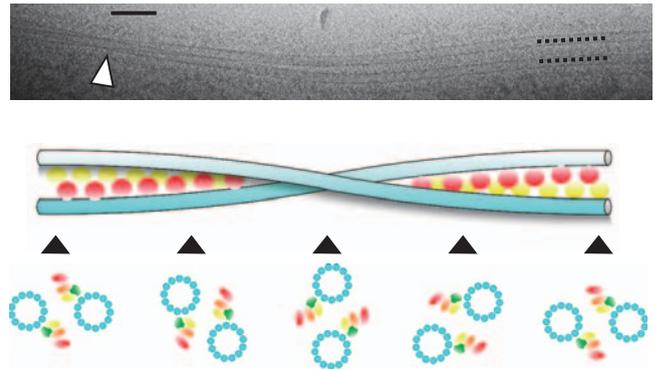


図3 外腕ダイニン—微小管複合体のらせん構造
上、クライオ電子顕微鏡で撮影した外腕ダイニン—微小管複合体。点線で示した2本の微小管が外腕ダイニンによって架橋され、白矢印のところで交差している。Bar = 100 nm 下、らせん構造の電子顕微鏡像は様々な角度からの投影像を含んでいる。

一枚の電子顕微鏡像に多くの角度からの投影像が含まれているから、3次元再構成は比較的容易である。さらに外腕ダイニン—微小管複合体は、らせんの回転ともなって投影像の太さが大きく変化するため、reference 無しに回転角を求めることができる (図3)。私達はビオチン化された中間鎖を持つ外腕ダイニンと微小管の複合体をつくり、ストレプトアビジンで中間鎖の位置をラベルした。単粒子解析を応用して外腕ダイニン—微小管複合体の3次元構造を再構成し、ラベルされた構造とラベルされていない構造を比較すれば、ラベルの位置を余分な“出っ張り”として特定することができる。この“出っ張り”が統計的に有意であることを示すために、t検定を行った。一つの3次元像は約4000セグメントの投影像から再構成されているので、このデータセットをランダムに3等分して、それぞれから3次元像を求め、個々のボックスを独立な標本とみなして自由度4の検定を行った (図4)。私達はこの方法を用いて IC1 のアミノ末端、IC2 のアミノ末端、カルボキシル末端の位置を特定した (図5)。同様にビオチン化 ADP とバナジン酸を用いて重鎖の ATPase 活性部位の位置も特定した。これらの結果の中で私達が注目したのは IC2 のアミノ末端の位置である。外腕ダイニンの端から内腕ダイニンの方向へ飛び出すような位置にある IC2 のアミノ末端は、軸糸のクライオ電子トモグラフィーによって観察されていた外腕—内腕ダイニン連絡の位置と丁度一致していたのである (図5)。

IC2 が外腕—内腕ダイニン連絡の構成要素ではないかという仮説は IC2 が dynein regulatory complex (DRC: 内腕ダイニンと隣接し、周辺微小管の間を連絡するとされる複合体) と化学架橋されるといふ実験結果によって証明された。さらに、IC2 のアミノ末端に付加されたビオチン化タグは、この IC2-DRC 連絡を破壊ないし変質させることが分かった。クライオ電子顕微鏡による3次元構造再構成と化学架橋の組み合わせにより、軸糸内の分子間連絡が物理的に存在することを証明することができたのである。

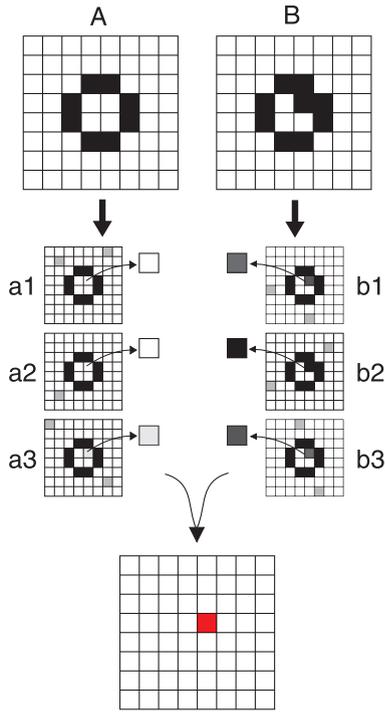


図4 ラベル位置を決めるためのt検定

3次元像を2次元に落として説明する。再構成によって、ラベルされていないA像とラベルされているB像を求める。A像を構成するデータセットを三等分し、それぞれからa1~3像を得る。同様にB像のデータセットからb1~3像を得る。対応するピクセルを計6個の標本とみなし、そのシグナル強度を分散と平均からt値を求める。自由度 $6-2=4$ として、統計的に優位な(1%以下)t値をisosurfaceのしきい値として描画する。

3. 高速度カメラを用いたクラミドモナスの鞭毛波形解析

次に私達は暗視野顕微鏡と高速度カメラにより、この外腕—内腕ダイニン間連絡がどのような機能を持っているか解析した(図6)。暗視野顕微鏡は、明視野でははっきり見ることができない運動している鞭毛を高いコントラストで観察することができるため、60 Hzの屈曲運動をする鞭毛を600–1,200 fpsで撮影しても十分な明るさを確保できる。鞭毛の波形から振幅を計測することにより¹⁰⁾、私達は鞭毛ダイニンとくに内腕ダイニンの活性が変異株で変化しているかを調べた。

IC2のアミノ末端にビオチン化タグを付加した外腕ダイニンを持つクラミドモナス変異体は、野生株と比べて遊泳速度がほぼ半分に低下していた。そこで変異株の波形を高速度カメラで観察すると、振幅が野生株の半分になっていた(図6)。外腕ダイニンは波形の振幅に寄与しないので、IC2変異株では内腕ダイニンの活性が低下していることが示唆された。外腕ダイニンの構成要素であるIC2にタグを付加したにもかかわらず、内腕ダイニンの活性が変化するという結果はIC2が外腕—内腕ダイニン連絡を成すという構造上の観察を機能面から支持するものである。

IC2と内腕ダイニンの関係を証明するために、私達は遺伝学的手法を用いた(図7)¹⁾。IC2の変異株において、ある特定の内腕ダイニンの活性が低下しているならば、その内腕ダイニンを欠損した変異株と掛け合わせてできる二重変異株の振幅は元の変異株と同じはずである。逆にIC2の変異株において、活性が変化していない内腕ダイニンを欠損した変異株との二重変異株は、元の変異株よりもさらに小さな振幅を示

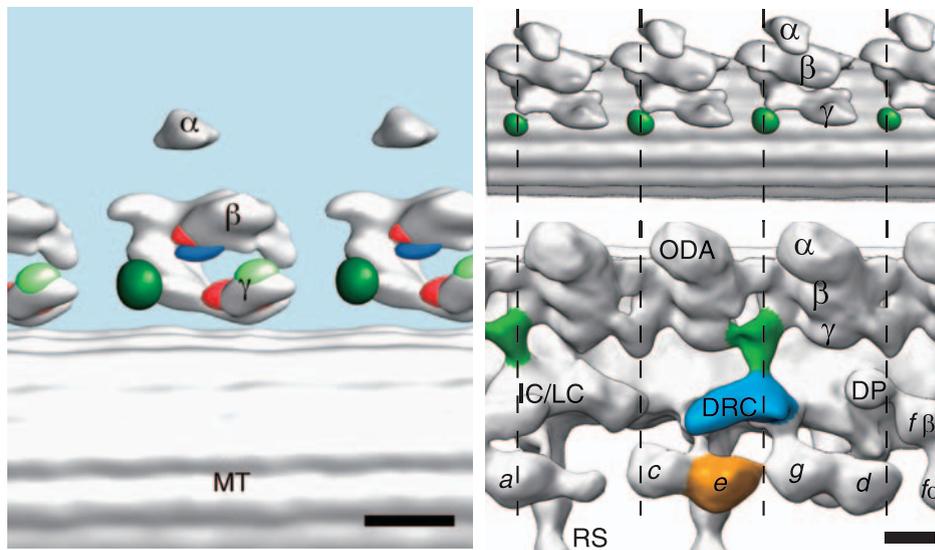


図5 クライオ電子顕微鏡による外腕ダイニン—微小管複合体の三次元再構成とストレプトアビジンラベルによるビオチン化タグの位置同定

左、外腕ダイニンが微小管(MT)に24 nm周期で結合している。ラベルの位置は、IC2のアミノ末端が濃緑、カルボキシル末端が薄緑、IC1のアミノ末端が青、ATPase活性部位が赤で示されている。3つの重鎖(α, β, γ)と中間鎖の相対位置が見取れる。右、外腕ダイニン—微小管複合体(上)とクライオ電子トモグラフィー(下)による軸系3次元像の比較。IC2アミノ末端(上、緑)の位置と外腕—内腕ダイニン連絡(緑、下)の位置が合致している(破線)。Bars = 10 nm。

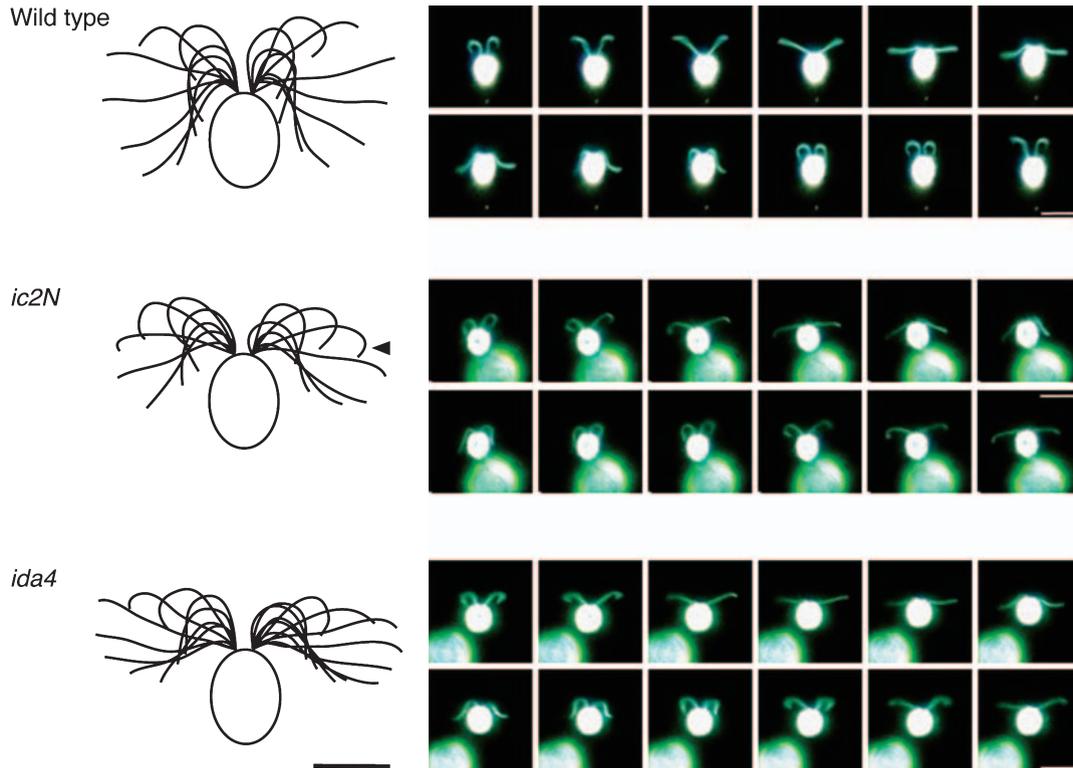


図6 高速度カメラによるクラミドモナス鞭毛波形解析

遊泳中のクラミドモナス配偶子を暗視野下 600 fps で撮影した。IC2 アミノ末端にタグを付けた変異株 (*ic2N*) は野生型よりも振幅が小さく、波形は内腕ダイニン欠損株 (*ida4*) に似る。矢印は *ic2N* 鞭毛先端部の伸張が弱いことを示す。Bars = 5 μm (左), 10 μm (右)。

すと予想される。

IC2 の変異株と内腕ダイニンの一つである subspecies e が欠損した株 (*ida6*) を掛けあわせた二重変異株は、元の変異株とほぼ同じ振幅と遊泳速度を示した。これに対し、subspecies f を欠損した株 (*ida3*) および subspecies a, c, d を欠

損した株 (*ida4*) との二重変異株は元の変異株よりも更に小さい振幅と遊泳速度を示した。これら結果は IC2 の変異株においては内腕ダイニンの subspecies e の活性が低下していることを示している。subspecies e は DRC と近接していることがクライオ電子トモグラフィーにより観察されており、IC2 が DRC と結合しているという前章で述べた私達の結果とも一致する。

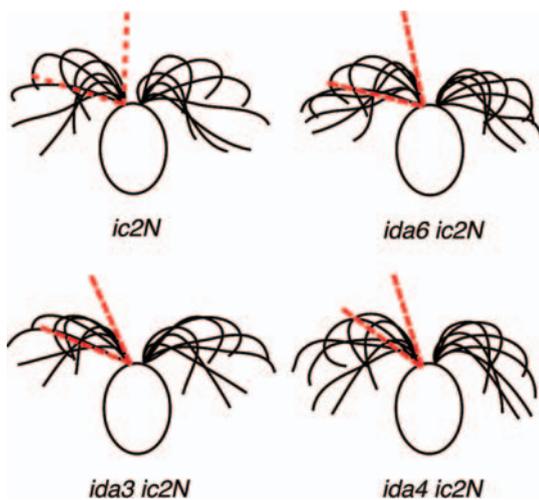


図7 変異株の掛け合わせによる内腕ダイニンの活性解析

IC2 変異株においてどの内腕ダイニンの活性が低下しているか、遺伝学的に解析した。赤破線が変異株の鞭毛打振幅を示す。*ic2N* と *ida6 ic2N* の鞭毛打振幅がほぼ等しいことから、*ic2N* と *ida6* の原因遺伝子が同じ制御経路にあることが推測される。

4. 暗視野顕微鏡による鞭毛ダイニンのモーター活性の測定

暗視野顕微鏡は動いている鞭毛の観察だけでなく、微小管のすべり運動も蛍光色素無しに直接観察することができる。鞭毛の研究においては軽いプロテアーゼ処理をした軸糸に ATP を加えると、鞭毛ダイニン特に外腕ダイニンのモーター活性により周辺微小管がすべり運動を起こし 9+2 構造が壊れる sliding disintegration という現象が用いられる¹²⁾。生理的な条件に近い 1 mM ATP 存在下では外腕ダイニンの活性はほとんどの周辺微小管上で抑えられており、1-2 本の周辺微小管が軸糸から滑り出る程度である。ATP の濃度を 20 μM まで落とすと外腕ダイニンが活性化し、ほとんどの周辺微小管が滑り出して 9+2 構造が完全にバラバラになることが知られている¹³⁾。

興味深いことに、私達の作った IC2 の変異体から得た軸糸は 1 mM ATP 存在下でも 9+2 構造がバラバラになるほど外腕ダイニンが活性化していた (図 8)。IC2 のアミノ末端に

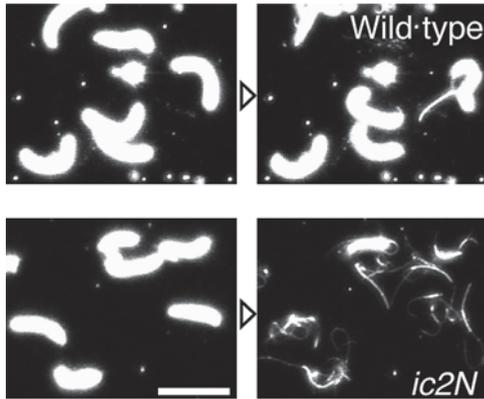


図8 暗視野顕微鏡による軸糸滑り活性の観察
軸糸にATPとタンパク質分解酵素を加えると、周辺微小管がダイニンのモーター活性によって滑る。左がATP添加前、右が添加してから1分後の軸糸。太い軸糸から細い周辺微小管が滑り出ているのがわかる。1 mM ATP存在下ではIC2変異株において顕著な滑り活性増大が観察された。Bar = 10 μm。

ビオチン化タグを付加することは内腕ダイニン*e*の活性を低下させるだけでなく、外腕ダイニンの非特異的な活性化も引き起こすところがあった。ところが、外腕ダイニンの微小管滑り活性を軸糸から単離、精製した後に測定すると、野生型とIC2変異体との間に差が無くなってしまった。これは外腕ダイニンの活性制御が他の軸糸タンパク、すなわち外腕-内腕ダイニン連絡の存在に依存していることを示唆している。

5. 鞭毛運動の周波数測定

第一章で外腕ダイニンが鞭毛運動の周波数に寄与していることにふれた。周波数は個々の細胞の動きを高速度カメラで撮影し、鞭毛の屈曲運動の回数を直接数えることで測定することは可能であるが、多くのサンプルを集めるには煩雑である。周波数を短時間かつ容易に測定するために、私達はクラミドモナスの細胞体の振動を輝度の変化として観測し、FFTにより周波数を測定した(図9)¹⁴⁾。これはクラミドモナスが二本の鞭毛を使って平泳ぎをしているため、鞭毛を後方へ掻いて前進するフェイズと、鞭毛を後方から前方へ戻す際にやや後退するフェイズの二相が存在する性質を利用している。低倍率の明視野では鞭毛の動きを直接観察することはできないが、細胞体の振動を観測することは容易であるから、鞭毛運動の周波数の分布を短時間で数百から数千の細胞から得ることができる。

私達が得たIC2の変異体では前章で述べたように、外腕ダイニンの非特異的な活性化が起こっているから、外腕ダイニンに関わる周波数にも変化があるはずである。驚くべきことにIC2の変異体は野生型よりも周波数が上昇していた。同様な表現型を示す変異体は*ida6*のように鞭毛の長さが短くなり粘性抵抗が低下することによって周波数が上がる例しか報告されていない。IC2の変異体は野生型と鞭毛の長さには違いないので、外腕ダイニンの非特異的活性化が周波数の上昇に関わっていると予想される。

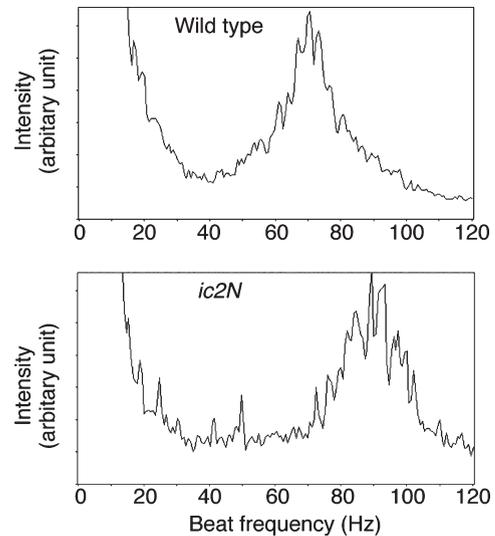
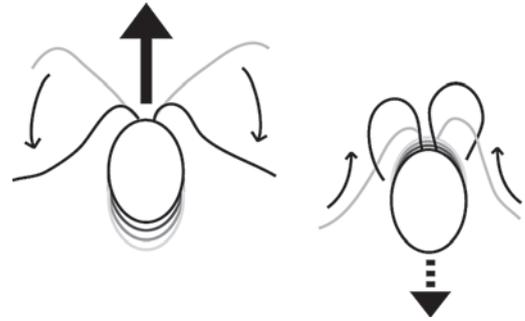


図9 クラミドモナス細胞体の振動を利用した鞭毛打周波数の測定

クラミドモナスは平泳ぎをするので、大きな前進と小さな後退を繰り返す。これを輝度の変化として観測し、FFTを行えば周波数の分布(下)を得ることができる。IC2変異体(*ic2N*)は野生株よりも顕著に周波数が上昇している。

6. おわりに

構造生物学の発展によりタンパク質の三次元構造が次々に明らかとなっている。しかし、得られた構造と機能を結びつけることは必ずしも容易ではない。クラミドモナスは鞭毛運動の研究において、数多くの分子生物学、生化学、細胞生物学、および遺伝学的手法が適用可能である。このため、クラミドモナスの鞭毛は、クライオ電子顕微鏡による構造解析を機能面から解釈する上で、他のモデル生物と比較して非常に有利と言える。事実、鞭毛の分子機構の解明はクラミドモナス分野において他の追随を許さないほど進んでいる。今後さらに高次の制御機構を解明するにあたり、クラミドモナスは中心的役割を担い続けるであろう。

文 献

- 1) Gibbons, I.R.: *J. Cell Biol.*, 91, 107s-124s (1981)
- 2) Hirokawa, N., Tanaka, Y., Okada, Y. and Takeda, S.: *Cell*, 125, 33-45 (2006)

- 3) Pazour, G.J. and Rosenbaum, J.L.: Intraflagellar transport and cilia-dependent diseases. *Trends Cell Biol.*, **12**, 551–555 (2002)
- 4) Kamiya, R.: Functional diversity of axonemal dyneins as studied in Chlamydomonas mutants. *Int. Rev. Cytol.*, **219**, 115–155 (2002)
- 5) Bui, K.H., Yagi, T., Yamamoto, R., Kamiya, R. and Ishikawa, T.: *J. Cell Biol.*, **198**, 913–925 (2012)
- 6) Brokaw, C.J. and Kamiya, R.: *Cell. Motil. Cytoskeleton*, **8**, 68–75 (1987)
- 7) Oda, T., Yagi, T., Yanagisawa, H.A. and Kikkawa, M.: Identification of the Outer-Inner Dynein Linker as a Hub Controller for Axonemal Dynein Activities. *Cur. Biol.*, **23**, 656–664 (2013)
- 8) Haimo, L., Telzer, B. and Rosenbaum, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5759–5763 (1979)
- 9) Oda, T., Hirokawa, N. and Kikkawa, M.: *J. Cell Biol.*, **177**, 243–252 (2007)
- 10) Brokaw, C.J. and Luck, D.J.: Bending patterns of Chlamydomonas flagella I. Wild-type bending patterns. *Cell Motil.*, **3**, 131–150 (1983)
- 11) Dutcher, S.K. and Lux 3rd, F.G.: Genetic interactions of mutations affecting flagella and basal bodies in Chlamydomonas. *Cell Motil. Cytoskeleton.*, **14**, 104–117 (1989)
- 12) Okagaki, T. and Kamiya, R.: Microtubule sliding in mutant Chlamydomonas axonemes devoid of outer or inner dynein arms. *J. Cell Biol.*, **103**, 1895–1902 (1986)
- 13) Omoto, C.K., Yagi, T., Kurimoto, E. and Kamiya, R.: Ability of paralyzed flagella mutants of Chlamydomonas to move. *Cell Motil. Cytoskeleton.*, **33**: 88–94 (1996)
- 14) Kamiya, R.: *Methods.*, **22**, 383–387 (2000)