

クラミドモナスとボルボックスの鞭毛運動調節

若林 憲一*・井手 隆広・植木 紀子

クラミドモナスとボルボックス

単細胞緑藻クラミドモナス(和名コナミドリムシ)と多細胞緑藻ボルボックス(和名オオヒゲマワリ)は、緑藻綱ボルボックス目に属する淡水性の植物プランクトンである(図1)。クラミドモナスは直径約5–10 μm の細胞に2本の鞭毛が生えており、それらを人間の平泳ぎの腕のように動かして泳ぐ。ボルボックスは直径数百 μm ~数mmの球状の多細胞生物で、クラミドモナスによく似た構造をした数千個の体細胞が球の表層に一層に配列し、その内側に次世代のボルボックスになる生殖細胞がある(なお、よく「クラミドモナスが集まるとボルボックスになる」「ボルボックスをばらばらにするとクラミドモナスになる」という誤解があるが、これらは近縁ではあるがまったく別の生物である)。

クラミドモナスとボルボックスは、それぞれが実験生物としての多くの特長を持つため、多様な研究分野でモデル生物として用いられている。たとえば、クラミドモナスは後述する鞭毛運動や光行動の他、光合成や有性生殖の研究によく用いられている。ボルボックスは光行動・有性生殖・発生様式 of 多細胞化進化の他、形態が球形に

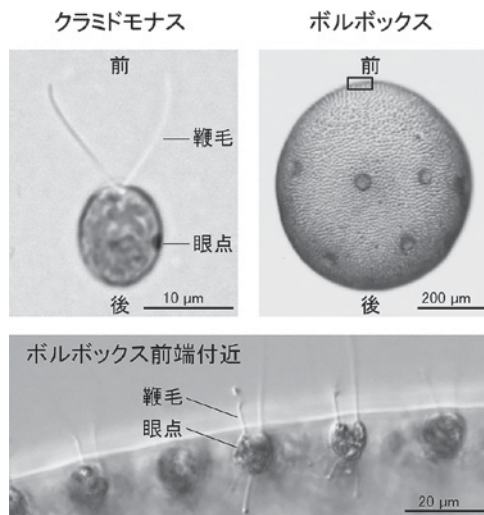


図1. クラミドモナス(左上)とボルボックス個体(右上), およびボルボックスの前端部(右上図の四角)を拡大した顕微鏡像。どちらの生物も一つの細胞あたり2本の鞭毛と一つの眼点を持つ。

近い。ため、流体力学の研究でもよく用いられる。

真核生物の鞭毛・繊毛

真核生物の鞭毛・繊毛は、細胞から生えた毛のような細胞小器官である。波打ち運動を行って微生物や精子の推進装置として働いたり、組織表面の粘液を動かすための起流装置として働いたりなど、生体にとって重要な働きを行う。一つの細胞から概ね10 μm 以上の長いものが数本生えている場合は鞭毛、それよりも短いものが多数生えている場合は繊毛と呼ぶ習慣があるが、これらは本質的に同じものである。本稿では以下鞭毛と呼ぶ。

真核生物鞭毛の内部構造(軸糸)は、いくつかの例外はあるものの、基本的には生物種を越えて普遍的に9 + 2構造を持つ(図2)。9組の周辺2連微小管が2本の中心対微小管を囲むためにそう呼ばれる。周辺2連微小管上にはモータータンパク質ダイニンの外腕と内腕が長さ方向に周期的に結合している。ダイニンは隣接する周辺2連微小管に対してATPの加水分解エネルギーを使って滑り運動を行う。これが鞭毛の波動運動の原動力である。

鞭毛研究の材料には、ウニやホヤなどの海産動物の精子、繊毛虫テトラヒメナなどさまざまな生物が用いられるが、クラミドモナスがモデル生物と見なされていると言って良いだろう。その大きな要因は遺伝学的手法が使えることにある。特にダイニンの多数の分子種の発見や、その構成サブユニットの同定には、クラミドモナスの低速遊泳ミュータントを用いた研究が大きく貢献した¹⁾。2005年には全生物種を通じて初めて鞭毛プロテ

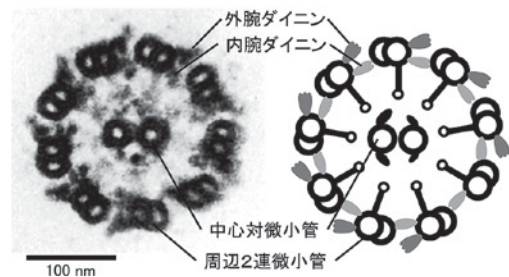


図2. クラミドモナス鞭毛軸糸の超薄切片法による透過電子顕微鏡像(左)とその模式図(右)。特徴的な9 + 2構造を持つ。2本の鞭毛は、1組存在する外腕ダイニンがない周辺2連微小管の場所を向かい合わせにして生えている。

*著者紹介 東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所(准教授) E-mail: wakaba@res.titech.ac.jp

オームの、2007年にはゲノムのデータベースがそれぞれ公開された^{2,3)}。また、2005年頃からクライオ電子線トモグラフィーによる鞭毛の高次構造の研究が盛んになったが、これにもクラミドモナス鞭毛の単離精製が容易な点や、鞭毛構造の欠損ミュータントの存在が大きく貢献した^{4,6)}。

このようにして鞭毛研究はこの10年ほどの間に大きな飛躍を遂げたが、鞭毛運動がどのように調節されるのか、すなわちさまざまな刺激に応答してどのように運動様式を変化させるのか、その分子機構に関わる知見はまだ少ない。私達は、クラミドモナスやボルボックスなどの緑藻類が光行動を示す際の鞭毛運動調節機構を明らかにすることで、真核鞭毛に共通する運動調節の分子機構を紐解くことを目指している。

クラミドモナスの光行動と鞭毛運動

クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) は眼点と呼ばれる器官によって光受容を行う(図3)。眼点は葉緑体内のカロテノイド顆粒層と、その直上の細胞膜に局在するチャネルロドプシンから成る。カロテノイド顆粒はチラコイド膜と交互に層を成すことによって多層反射膜として機能し、光をよく反射する。チャネルロドプシンはその名の通り、光受容に際してチャネルとして機能し、陽イオンを透過するタンパク質である。これら二つが組み合わさることで、眼点は指向性の高い光受容装置として機能する。また、クラミドモナスの2本の鞭毛の打面は互いにわずかにずれているため、細胞は自転遊泳を行う。その結果、眼点はまるでレーダーのパラボラアンテナのように周囲をサーチすることになる。このため、クラミドモナス細胞は光源方向を正確に察知することができるのである⁷⁾。

クラミドモナスは光を感知した後、主として2種類の

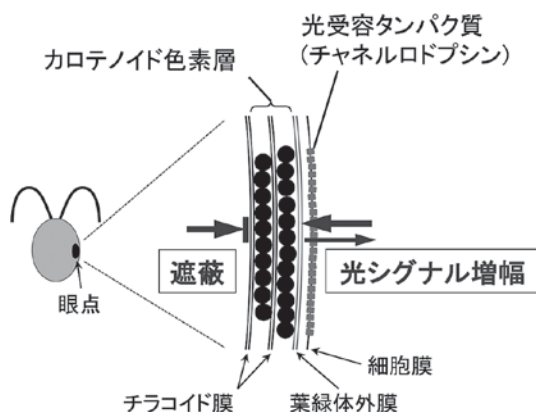


図3. クラミドモナス眼点の模式図

光行動を示す。この時の鞭毛運動の変化が私達の注目する現象である。一つ目は光驚動反応(光忌避反応)である。急激に強い光を感じると、鞭毛は波形を織毛型(非対称型とも呼ばれる)から鞭毛型(対称型とも呼ばれる)に変換し、後退遊泳(細胞側を前にして遊泳)する(図4)。これは大量のCa²⁺が細胞内に流入し、細胞内濃度が10⁻⁴ M以上に上昇することで起こると考えられている⁸⁾。もう一つは走光性(光走性)である。一定方向からの光を感じると、細胞は平泳ぎをしている2本の鞭毛の打つ強さのバランスを変えることで遊泳方向を変化させ、光源方向に向かう正の走光性か、逆に光源から逃げる負の走光性のどちらかを示す。これは細胞内に少量のCa²⁺流入が起きることによると考えられている。2本の鞭毛は、眼点に近いシス鞭毛と遠いトランス鞭毛に区別される。細胞内Ca²⁺濃度が10⁻⁷ M以上に上昇するとトランス鞭毛が、それ以下だとシス鞭毛がそれぞれ他方よりも強く(高い鞭毛打頻度と大きな振幅で)打つ⁹⁾。

このようなCa²⁺による調節は、除膜細胞モデルを用いた運動再活性化実験によって明らかにされた。クラミドモナスを非イオン性界面活性剤処理によって除膜すると、細胞は死ぬが、軸糸の9+2構造は保持されている。ここにATPを添加することによって、試験管内で鞭毛軸糸の運動を再活性化させるのである。外液のCa²⁺濃度を変化させることによって、波形変換や2本の鞭毛打のバランスがCa²⁺制御を受けていることが明らかにされてきた。

光受容後に流入するCa²⁺によって2本の鞭毛の打つ強さを調節し、方向転換を行うしくみは巧妙だが、上記の眼点と鞭毛の性質から考えると、光受容後は必ずトラン

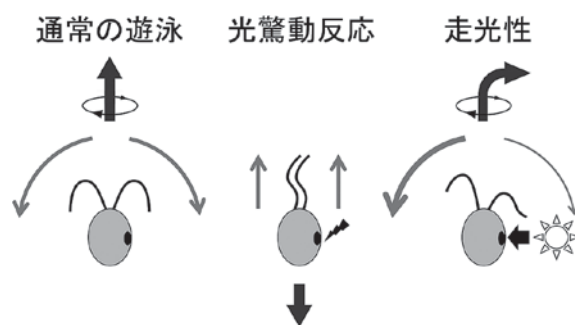


図4. クラミドモナスの遊泳様式(細胞の前後の黒矢印は遊泳方向を示す)、鞭毛運動様式と、鞭毛が生み出す推進力(灰色矢印:太さは強さを示す)の関係。(左)通常遊泳時は2本の鞭毛が織毛型波形で、自転しながら平泳ぎを行う。(中)急激な強い光を浴びると波形が鞭毛型に変換され、細胞は後退遊泳を行う。これを光驚動反応と呼ぶ。(右)一定方向からの光を感じると2本の鞭毛は織毛型のままバランスが変化し、遊泳方向が変化する。この図の場合、右からの光照射に対してトランス鞭毛が強く打ち、正の走光性を示している。

ス鞭毛を強く打つことになる。このルールでは正の走光性しか示せない。

負の走光性はどのようにして起こるのだろうか。強い負の走光性を示すことが知られている *aggl* ミュータント(負の走光性によって、試験管の底に凝集 aggregate する)の細胞をマイクロピペットで保持して光刺激を行った実験では、*aggl* 細胞は光刺激後にシス鞭毛を強く打っていたことがわかった¹⁰⁾。これは、正の走光性を示しやすい野生株がトランス鞭毛を強く打つのと逆である。では、この光受容時の強打鞭毛の株ごとの違いは何から生じるのだろうか。私達は *aggl* 株の2本の鞭毛の Ca^{2+} 感受性について除膜細胞モデルを用いて調べたが、野生株と変わらず、 Ca^{2+} が高いとトランス優勢、低いとシス優勢であった。つまり、軸糸の Ca^{2+} 感受性は野生株と変わりがないと考えられる¹¹⁾。

クラミドモナスの走光性の正負の符号の切り替えは、古くから研究者の興味の対象であった。概日リズムや培地の組成など、さまざまな条件が走光性の符号に影響を与えることは知られていたが、決定的な因子はわかっていなかった。私達は、光合成活性が走光性の符号に影響を与えるという研究に着想を得て¹²⁾、その因子が細胞内レドックス(reduction-oxidation; 酸化還元)状態であることを突き止めた¹¹⁾。細胞質は通常はグルタチオンなどによって還元的に保たれているが、呼吸や光合成の活性変化によって酸化的になったり、あるいは過剰に還元したくなったりと変化する。クラミドモナスは細胞が酸化的になると正、還元になると負の走光性を示すのである。これは自らの光合成活性を細胞内レドックス状態として出力し、いまもっと光を浴びて光合成を活発化させるべきなのか、逆に光から逃げるべきなのかを制御するという生存戦略であると考えられる。さらに *aggl* 変異株の原因遺伝子を同定したところ、コードされたタンパク質は機能不明だったものの、配列からはミトコンドリア局在が示唆された¹³⁾。*aggl* 株の呼吸活性が野生株と異なり、そのため細胞質のレドックス状態が野生株のそれに比べより還元的可能性がある。

では、同一の株がレドックスシグナルによって走光性の正負を切り替えるメカニズムはどうなっているのだろうか。私達は現在レドックス状態を人為的に変化させた際の2本の鞭毛の使い分けを解析中である。2本の鞭毛打のバランス制御には、 Ca^{2+} だけでなく cAMP のシグナルやダイニンのリン酸化が関与しているという報告もある^{14,15)}。複数のシグナルが協奏する複雑な制御機構を明らかにすることが今後の課題である。

ボルボックスの光行動と鞭毛制御

ボルボックスが単なるクラミドモナス様細胞の寄せ集めではないことは、その巧みな光行動を見るとよくわかる。私達が主な研究材料にしているボルボックス・ルーセレティ(*Volvox rousselletii*)は約5000細胞から成り、もっとも大型のグループの一種である。本稿ではこの種を以下でボルボックスと呼ぶ。球の表面にシート状に並ぶボルボックスの体細胞一つひとつには、クラミドモナスと同様に眼点があり、2本の鞭毛が生えている(図1)。しかし、銘々がクラミドモナスのように平泳ぎ型で鞭毛を打つのではない。この巨大な球体には明確な前後軸があり、約1万本の鞭毛はすべて後ろに向かって打つ。それによって後方への大きな水流が生じ、約5000細胞が一つの個体として前進する。さらに、その鞭毛打面は前後軸に対してわずかに傾いているため、個体は自転遊泳を行う。自転によって明暗の変動を感じて光源方向を感知する点がクラミドモナスと同じということは興味深い。単細胞性の祖先が用いていた戦略を、多細胞の球体に進化した後も採用していると考えられる。

しかし、ボルボックス細胞の光受容後の鞭毛運動調節は、クラミドモナスとは異なる。クラミドモナス鞭毛が2本の間の強さのバランスを変える、もしくは波形を繊毛型から鞭毛型に変換するのに対し、ボルボックス鞭毛は打つ方向を逆転させる(前方向に打つ)。このとき波形は繊毛型のままであるので、この現象は「繊毛打逆転」と呼ばれる。繊毛打逆転はボルボックスの前半球でしか起きず、前端に近いほど顕著である。この「光に応じて繊毛打逆転をする」「光への応答性が球体前後で異なる」というたった二つの性質によって、多細胞生物としての光行動が実現する。つまり、ボルボックス球体に強い光が当たると、反応性の高い前半球の鞭毛が一斉に繊毛打逆転を行う。すると前向きに打つ前半球の鞭毛が生み出す力と後ろ向きに打ち続ける後半球の鞭毛が生み出す力が拮抗し、個体の動きが停止する(光驚動反応)。また、たとえば真横から光を浴びているとき、球体の自転によって細胞が影側から光源側に移動したときに光量の増加を感知する。その結果、反応性の高い前半球かつ光源側の鞭毛だけが繊毛打逆転を行う。すると、光源側と影側で鞭毛が生み出す力に不均衡が生じ、個体は光源側に進路を変える(走光性)¹⁶⁾(図5)。この球の前後の反応性の違いは眼点のサイズで説明されてきた。眼点は前端部の細胞でもっとも大きく、後端部付近の細胞でもっとも小さい。この眼点サイズの勾配により、前半球の細胞は後半球の細胞よりも光の感受性が高くなってい

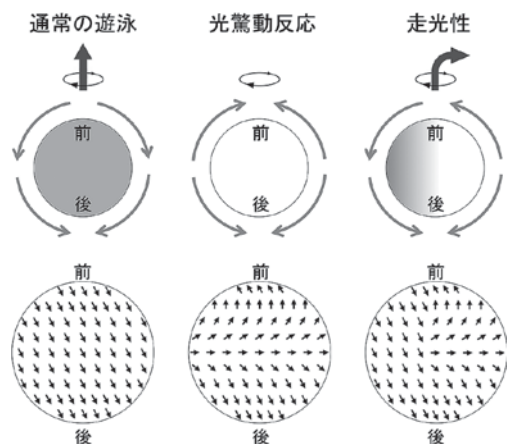


図5. ボルボックス個体の遊泳様式(上)と鞭毛運動が起こす推進力の方向(下)の関係。通常遊泳時(左)は、すべての鞭毛が斜め後方に打つため、個体は自転しながら遊泳する。光驚動反応時(中)は鞭毛運動方向を回転させるが、このとき前端部はほぼ180度、赤道面付近はほぼ90度、後端部はほぼ0度と、前後軸に沿って回転角度に勾配がある。このため前後半球で推進力が拮抗して個体は遊泳を停止し、その場で自転する。走光性時(右)は、光源側(この場合右側)半球の鞭毛だけが光驚動反応時と同様の運動方向変化を行う。その結果、光源側と影側で推進力の不均衡が生じ、個体は右側へ方向転換する。

ると考えられる。

それでは、繊毛打逆転を生み出すシグナルはなんだろうか。第一候補はクラミドモナスの鞭毛運動調節で重要な役割を果たす Ca^{2+} である。繊毛打逆転は、クシクラゲの繊毛やウニのプルテウス幼生の繊毛などでも見られ、 Ca^{2+} によって調節されることが示唆されてきたが、直接的な証明はなかった^{17,18)}。

私達は、ボルボックスにおいてもクラミドモナスのような除膜細胞モデルによる試験管内運動再活性化の実験系が必要であると考えた。しかし、クラミドモナスが遠心分離で細胞を集めて溶液交換できるのに対し、ボルボックスを沈殿させることは難しい。試行錯誤した末、金魚すくいの要領で個体を持ち上げて溶液交換する手法を確立した。培地に細胞ストレーナ(ふるい)を沈め、その上でボルボックスを泳がせる。ふるいを持ち上げて界面活性剤入りのバッファに沈めると、ボルボックスは除膜されて死ぬが、鞭毛軸系の構造はクラミドモナスと同様に保持される。ここにATPを加えることで鞭毛運動を再活性化させ、約5000もの細胞から成るボルボックス個体をまるごと、まるでゾンビのように再び泳がせることに成功した。

この「ゾンビ・ボルボックス」の外液の Ca^{2+} 濃度を変化させたところ、球体の前端付近で 10^{-6} Mで繊毛打逆転が起きた¹⁹⁾。これにより、繊毛打逆転が Ca^{2+} によって

制御されていることが初めて直接的に証明された。さらに興味深いことに、後半球ではこの Ca^{2+} 依存的な繊毛打逆転は起きなかった。詳しい観察を行った結果、 Ca^{2+} 添加時の鞭毛運動方向変化は前端部付近の鞭毛では180度(逆転)、赤道面付近では90度、後端部付近では0度(変化なし)と、角度に勾配があることがわかった(図5)。つまり、それまでボルボックス球体の前後の反応の差を生み出すものは眼点サイズだけだと考えられていたが、それに加えて鞭毛の Ca^{2+} 依存的な運動方向変化の角度にも勾配があることが明らかになった。この2段階の前後分化によって、前半球は光に応じた舵取り機能、後半球は光に依らない推進機能を担い、多細胞生物としての機敏な光行動を実現していると考えられる。

まとめと今後の展望

私達のクラミドモナス光行動の研究から、 Ca^{2+} だけでなくレドックスシグナルも鞭毛運動調節に大きな役割を果たしていることが明らかになった。また、ボルボックス光行動の研究から、繊毛打逆転も Ca^{2+} による調節であることが分かった。しかし、 Ca^{2+} やレドックスを感受して運動変化を司るタンパク質の解明には至っていない。また、cAMPやリン酸化などの他のシグナルが行う鞭毛調節と、 Ca^{2+} やレドックスによるそれがどのように協奏しているのかも未解明である。クラミドモナスのゲノムやプロテオームのデータベースがある現在、予想ターゲットタンパク質欠損株を用いる逆遺伝学が強力なツールになるだろう。一方で、未解明な部分の多い鞭毛調節については、光行動が異常になる新規変異株のスクリーニングという順遺伝学的なアプローチもまだまだ大きな役割を果たしそうだ。

謝 辞

本研究は科学研究費補助金15H01206, 15H01314, 16K14752の支援を受けて行った。

文 献

- 1) Kamiya, R.: *Int. Rev. Cytol.*, **219**, 115 (2002).
- 2) Pazour, G. J. et al.: *J. Cell Biol.*, **170**, 103 (2005).
- 3) Merchant, S. S. et al.: *Science*, **318**, 245 (2007).
- 4) Nicastro, D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15889 (2005).
- 5) Ishikawa, T. et al.: *J. Mol. Biol.*, **368**, 1249 (2007).
- 6) Oda, T. and Kikkawa, M.: *J. Struct. Biol.*, **183**, 305 (2013).
- 7) Foster, K. W. and Smyth, R. D.: *Microbiol. Rev.*, **44**, 572 (1980).
- 8) Bessen, M. et al.: *J. Cell Biol.*, **86**, 446 (1980).
- 9) Kamiya, R. and Witman, G. B.: *J. Cell Biol.*, **98**, 97

- (1984).
- 10) Ruffer, U. and Nultsch, W.: *Cell Motil. Cytoskeleton*, **18**, 269 (1991).
- 11) Wakabayashi, K. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 11280 (2011).
- 12) Takahashi, T. and Watanabe, M.: *FEBS Lett.*, **336**, 516 (1993).
- 13) Ide, T. *et al.*: *Biochem. Biophys. Rep.*, **7**, 379 (2016).
- 14) King, S. J. and Dutcher, S. K.: *J. Cell Biol.*, **136**, 177 (1997).
- 15) Saegusa, Y. and Yoshimura, K.: *Cytoskeleton*, **72**, 412 (2015).
- 16) Ueki, N. *et al.*: *BMC Biol.*, **8**, 103 (2010).
- 17) Nakamura, S. and Tamm, S. L.: *J. Cell Biol.*, **100**, 1447 (1985).
- 18) Wada, Y. *et al.*: *J. Exp. Biol.*, **200**, 9 (1997).
- 19) Ueki, N. and Wakabayashi, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E1061 (2018).