

ヒメゾウリムシ繊毛の波形の調節における外腕・内腕ダイニンの役割

久富 理¹, 井上 桂那子², 堀 学², 野口 宗憲¹(¹富山大・院理工・地球生命環境科学, ²山口大・院理工・環境共生系)Roles of outer and inner dynein arms in the control of ciliary waveform in
*Paramecium tetraurelia*Osamu KUTOMI¹, Kanako INOUE², Manabu HORI² and Munenori NOGUCHI¹
(¹Grad. Sch. Sci. Engn., Univ. Toyama, ²Grad. Sch. Sci. Engn., Yamaguchi Univ.)**SUMMARY**

In *Paramecium*, a ciliary beat cycle consists of an effective and a recovery stroke. A normal ciliary waveform is necessary for normal swimming behavior. However, the molecular mechanism for controlling the ciliary waveform remains unclear. We specifically examined genes termed the outer dynein arm light chain 1 (ODA LC1) and the inner dynein arm intermediate chain 1 (IDA IC1). We examined the ciliary movements in *Paramecium tetraurelia*, in which the individual genes were silenced using RNAi with the feeding method. The reactivated cilia on the cortical sheets from non-silenced cells showed the normal beat cycle that consists of an effective and a recovery stroke in the presence of micromolar cGMP, but not without cGMP, which indicates that cGMP is necessary for the normal ciliary waveform. In the case of the ODA LC1-silenced cells, the change in the ciliary waveform in response to cGMP was quite normal. In contrast, the reactivated cilia from the IDA IC1-silenced cells showed a simple gyration without the phase of the effective stroke, irrespective of cGMP concentration. These results indicate that the IDA is responsible for controlling the ciliary waveform in response to cGMP.

【目的】ゾウリムシ (*Paramecium*) の繊毛は、有効打と回復打のサイクルからなる三次元的な運動を示す¹⁾。有効打は回復打よりも水に対する抵抗が大きいので、有効打が打ち終わる方向が繊毛打方向である。したがって、ゾウリムシの正常な遊泳には、繊毛が有効打一回復打のサイクルを正常に示すことが必要であるが、分子レベルでの繊毛の波形の制御機構についてはよくわかっていない。我々は、細胞表層シート上の繊毛運動の様子を高速度カメラで記録することにより、繊毛一本単位で運動を詳細に観察できることを示した²⁾。今回、ヒメゾウリムシ (*P. tetraurelia*) の軸糸ダイニン (外腕と内腕) に注目し、これらを構成するいくつかのサブユニットを食餌による RNAi でノックダウンして、そのヒメゾウリムシの遊泳行動と繊毛運動を解析し、ゾウリムシ繊毛の波形の制御機構について調べた。

【材料と方法】標的遺伝子のノックダウンは、前大会と同様に食餌による RNAi を用いて行った³⁾。ノックダウンをしていないヒメゾウリムシ (*P. tetraurelia*, 7.2B) をコントロールとした。生細胞における遊泳行動は、位相差顕微鏡下で観察し、高速度カメラを用いて 100 fps で記録した。得られた動画から遊泳速度を決定した。遊泳の軌跡の決定は、光学顕微鏡下で記録した動画をもとに行った。繊毛運動の観察は、細胞表層シートを用いて行った⁴⁾。調製した細胞表層シート上の繊毛の再活性化は、インタクトな状態で再活性化溶液を順次灌流することで行った。基本的な再活性化溶液の組成は、1 mM Mg-ATP, 1 mM EGTA, 50 mM K-acetate, 10 mM Tris-maleate (pH 7.0) で、これに cAMP や cGMP を実験に応じて目的の濃度となるように加えた。再活性化した細胞表層シート上の繊毛運動の様子を、暗視野顕微鏡下で観察して、高速度カメラを用いて 600 fps で記録し、繊毛の波形、繊毛打頻度、そして繊毛打方向を決定した。

【結果と考察】これまで、ゾウリムシ繊毛の波形の制御には、cGMP が重要であると考えられている⁵⁾。まずこのことを確かめるため、コントロールにおける cGMP 濃度変化に伴う繊毛運動の変化について調べた。cGMP 非存在下では、細胞表層シート上の繊毛は、有効打一回復打のサイクルを示さない振幅の狭い運動を示し、このとき生細胞では示さない 9 時方向を示した。これに対して、数マイクロモル濃度の cGMP 存在下では繊毛は有効打一回復打のサイクルを示し、繊毛打方向は細胞後端部を示した。これらの結果は、ゾウリムシの繊毛が有効打一回復打のサイクルを正常に示すには cGMP が必須であることを示している。同様に cAMP 濃度変化に伴う繊毛運動変化について調べた。この実験では、5 μ M cGMP 存在下で細胞表層シート上の繊毛の再活性化を行った。その結果、cAMP の

濃度上昇に伴い、繊毛打頻度の上昇と、繊毛の波形は有効打一回復打のサイクルから、回復打がやや省略される波形、そして回復打がほとんど見られない振幅の狭い運動へと変化した。以上のノックダウンをしていないヒメゾウリムシの場合における解析結果をもとに、外腕・内腕ダイニンのサブユニットをそれぞれノックダウンした場合の繊毛運動について調べた。

外腕ダイニン軽鎖をノックダウンしたヒメゾウリムシ (ODA LC1-kd) は、遊泳速度と繊毛打頻度の低下、さらに繊毛運動における cAMP の感受性の低下を示す²⁾。cGMP および cAMP の濃度上昇に伴う繊毛の波形の変化は、コントロールとほとんど同じであった。また ODA LC1-kd の遊泳の軌跡も、コントロールの場合と同様であった。これらの結果は、ODA LC1-kd が示す遊泳速度の低下は、繊毛打頻度の低下に起因するものであり、ODA LC1、ひいては外腕ダイニンそのものは、繊毛の波形の制御機構に関与していないことを示唆している。

一方、内腕ダイニン中間鎖をノックダウンしたヒメゾウリムシ (IDA IC1-kd) の繊毛の波形は、コントロールや ODA LC1-kd の場合とは大きく異なっていた。cGMP 非存在下で再活性化された細胞表層シート上の繊毛は、有効打が不明瞭な回転運動 (gyration) を示し、cGMP 濃度が上昇しても、この繊毛の波形はほとんど変化しなかった。このことは、IDA IC1 は cGMP による繊毛の波形の制御機構に関与していることを示唆している。cAMP 非存在下でも gyration が見られ、cAMP 濃度が上昇すると、シート上の繊毛は gyration から有効打がやや明瞭になる波形へと変化した。また、IDA IC1-kd の生細胞における遊泳行動を調べたところ、遊泳速度の低下に加え、大きく蛇行する前進遊泳が見られた。これらの結果は、IDA IC1-kd の生細胞が示す前進遊泳の異常や遊泳速度の低下は、繊毛の波形の異常に起因していることと、IDA IC1-kd は有効打の不明瞭を引き起こすことを示している。さらに、IDA IC1-kd は Ca^{2+} による繊毛逆転を示さず後退遊泳をしない²⁾。これに関して今回の結果は、IDA IC1-kd は繊毛運動における Ca^{2+} の感受性の低下を引き起こすというより、有効打が不明瞭になるため、 Ca^{2+} による繊毛逆転を示すことができないという考えを支持している。

以上の結果は、ゾウリムシ繊毛の波形、特に有効打の制御機構には、IDA IC1 が直接関与していることを示している。

【文献】

- 1) Sugino and Naitoh (1982) Nature, 295, 609-611.
- 2) 久富他 (2010) 原生动植物学雑誌, 43, 63-64.
- 3) Galvani and Sperling (2002) Trends Genet., 18, 11-12.
- 4) Noguchi et al. (2001) J. Exp. Biol., 204, 1063-1071.
- 5) Noguchi et al. (2004) Zool. Sci., 21, 1167-1175.