

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業 ソロタイプ
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation, Solo type

研究開発課題名： (日本語) メカニカルフィードバックによる繊毛の自律的運動制御機構の解明
(英語) Study on the autonomous regulation of ciliary motility through mechanical feedback system

研究開発担当者 (日本語) システム理工学部 機械制御システム学科 教授 吉村 建二郎
所属 役職 氏名： (英語) Department of Machinery and Control Systems
Shibaura Institute of Technology
College of Systems Engineering and Science
Kenjiro Yoshimura

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

生体の運動が緻密に制御されているのは、運動の結果を機械受容により検出し、力発生の制御にフィードバックしているからである。姿勢制御のような個体レベルでのフィードバック制御はよく分かっている。さらに最近では、機械受容によるフィードバック運動制御が、繊毛運動においては単一細胞内で行われていることが明らかになってきている。本研究では、繊毛は、繊毛にかかる力学的負荷を受容して、打つ方向を反転させたり出力を増強させたりする自律的メカニカルフィードバック制御機構を解明する。

(1) 繊毛の機械反応におけるカルシウムイオンの動態の解明

カルシウム感受性蛍光色素により細胞内カルシウムイオン濃度の分布をイメージングにより解明するために、カルシウム感受性蛍光タンパク質をクラミドモナス細胞に発現させる手法の開発を進めた。カルシウム感受性蛍光タンパク質を鞭毛に局在するタンパク質および抗生物質耐性遺伝子と結合したコンストラクトを作成し、クラミドモナスを形質転換した。

(2) 繊毛に発現する機能未知の TRP チャネルの機能

クラミドモナスのゲノムには、8つの TRP チャネル遺伝子があるが、その生理的機能は分かっていない。機械刺激感受性を調べるために重力走性のアッセイをしたところ、発現が抑制されると重力走性が亢進する TRP チャネル、逆に過剰発現させると重力走性が亢進する TRP チャネルを発見した。熱刺激感受性を調べるために温度走性のアッセイをしたところ、複数の TRP で異なる温度範囲で温度走性の低下がみられた。TRP チャネルのアゴニストとして知られている化学物質に対する走化性は観察されなかったが、鞭毛の運動が停止する反応があることが分かった。これらの結果は、TRP チャネルが機械刺激、化学刺激、熱刺激に対する反応に関与していることを示している。

(3) TRP チャネルの活性化機構の解明

TRP チャネルは、機械刺激だけではなく、熱や化学物質によっても活性化されるがその分子機構は明らかになっていない。その解明のために、クラミドモナスの TRP チャネルを人工膜に再構成して電気生理学的解析を行うためのコンストラクトを製作した。

英文

Precise regulation of the motility of living organisms is brought about by the detection of the outcome of the motility by mechanoreception and the feedback control of force production. The feedback regulation at the whole-body level such as posture control has been well documented. A recent report shows that the feedback regulation through mechanoreception is also involved in the control of ciliary motility at single cell level. This study aims at unveiling the autonomous feedback regulatory mechanism through which cilia perceive the mechanical load and modulate the output.

(1) Calcium ion dynamics in the ciliary mechanoresponse

To monitor the distribution of the intracellular calcium ion concentration by calcium imaging, we developed a method to express calcium sensitive fluorescent protein in *Chlamydomonas* cells. A construct enabling combined expression of the calcium sensitive fluorescent protein, flagellar protein, and antibacterial-resistance gene was generated, and transformed into *Chlamydomonas* cells.

(2) Functions of the ciliary TRP channels with unknown function

Chlamydomonas genome contains at least 8 TRP channel genes but the function of the channels is unknown. To explore the function as mechanosensor, we assessed gravitaxis and found that a mutant with decreased expression of one TRP gene has facilitated gravitaxis while a mutant with overexpression of yet another TRP channel gene also presents facilitated gravitaxis. To explore the function as thermosensor, we assessed thermotaxis and found that some TRP channel mutants have defects in thermotaxis in distinct temperature ranges. *Chlamydomonas* cells did not show chemotaxis to chemicals known as TRP channel agonist, but the flagella of *Chlamydomonas* cells stopped beating in response to some chemicals. These results indicate that *Chlamydomonas* TRP channels are involved in the mechanoresponse, chemoresponse, and thermoresponse.

(3) Activation mechanism of TRP channels

TRP channels are known to be activated by mechanical, thermal, and chemical stimuli but the underlying molecular mechanism is not fully understood. We constructed a construct for the electrophysiological analysis by the reconstruction of *Chlamydomonas* TRP channels in lipid bilayer.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 1件）

1. NOMURA T, SOKABE M, YOSHIMURA K. Voltage-dependent inactivation of MscS occurs independently of the positively charged residues in the transmembrane domain. *Biomed Res Int.* 2016, 2016:2401657.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 単細胞生物の機械反応と機械受容、口頭、吉村建二郎、第28回バイオレオロジー・リサーチ・フォーラム、2016/6/17-18、国内.
2. Temperature sensitive mutants of the MscL mechanosensitive channel prevent cell growth at high temperature. Owada, N, Morita, K., Yoshida, M., and Yoshimura, K. Biophysical Society 61st Annual Meeting、2017/2/11-15、国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願