

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	真核生物繊毛運動調節における外腕ダイニンサブユニットの機能に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	久次史花
Author(English)	Ayaka Kyuji
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12341号, 授与年月日:2023年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:若林 憲一,久堀 徹,田中 寛,柳田 保子,田口 英樹,立花 和則
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12341号, Conferred date:2023/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

2022年度 博士論文
真核生物繊毛運動調節における
外腕ダイニンサブユニットの機能に関する研究

東京工業大学
生命理工学院・生命理工学系
ライフエンジニアリングコース
久次 史花

指導教員 若林 憲一 准教授
副指導教員 久堀 徹 教授

略語一覽

AAA+ : ATPases associated with a variety of cellular activities

AMS : 4-acetamido-4'-maleimidylstilbene2,2'-disulfonate

ADP: adenosine diphosphate

ATP : adenosine triphosphate

AMV-RT : Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase

Cas9 : CRISPR-Associated Proteins 9

CBB : coomassie brilliant blue

cDNA : complementary deoxyribonucleic acid

CLiP : Chlamydomonas Library Project

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats

crRNA : CRISPR RNA

DC : docking complex

DEPC : diethylpyrocarbonate

DMTU : 1,3-dimethylthiourea

DNA : deoxyribonucleic acid

DTT : dithiothreitol

Fw : forward

gRNA : guide RNA

HC : heavy chain

HDR : homology-directed repair

IC : intermediate chain

IPTG : isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

LC : light chain

MTBD: microtubule binding domain

NDK : nucleoside diphosphate kinase

Ox : Oxidized

PAM : proto-spacer adjacent motif

PCD : Primary Ciliary Dyskinesia

PCR : polymerase chain reaction

Red : Reduced

RNP : ribonucleoprotein

ROS : reactive oxygen species

RT-PCR : reverse transcription polymerase chain reaction

Rv : reverse

t-BOOH : tertiary butyl hydroperoxide

TCA : trichloroacetic acid

Trx : thioredoxin

Vi: inorganic vanadate

2-Cys-Prx : 2 cysteine-peroxiredoxin

目次

第1章 序論	1
1.1 はじめに：生物の行動	2
1.2 鞭毛・繊毛	3
1.3 繊毛研究のモデル生物・クラミドモナス	5
1.4 ダイニン	7
1.5 クラミドモナスでわかった外腕ダイニンのサブユニット構成	12
1.6 チオレドキシシン様軽鎖 LC3 と LC5	15
1.7 カルシウムイオン結合軽鎖 LC4	19
1.8 クラミドモナスの光行動	20
1.9 光行動とカルシウムイオン、酸化還元	22
1.10 本研究の目的	24
第2章 扁形動物プラナリアの外腕ダイニンサブユニットの機能解析	25
2.1 序	26
2.1.1 扁形動物プラナリア	26
2.1.2 プラナリアの外腕ダイニン	28
2.2 実験方法	31
2.2.1 プラナリア種と飼育条件	31
2.2.2 RNA 抽出	31
2.2.3 cDNA 調製	31
2.2.4 RNA 干渉によるノックダウン	32
2.2.5 RT-PCR	33
2.2.6 プラナリアの移動様子の観察、移動速度の測定	33
2.2.7 繊毛打観察	33
2.2.8 走査電子顕微鏡観察	33
2.2.9 透過電子顕微鏡観察	33
2.3 実験結果	35
2.3.1 RNA 干渉個体の RT-PCR による判別	35
2.3.2 ノックダウン個体の運動の観察	37
2.3.3 移動速度の測定	38
2.3.4 繊毛打様式と繊毛打頻度	39
2.3.5 繊毛横断面の透過電子顕微鏡観察	41
2.3.6 プラナリア腹部の走査電子顕微鏡観察	42
2.4 考察	43
2.4.1 カルシウムイオン結合タンパク質カラクシンの機能	43

2.4.2	酸化還元タンパク質 TXNDC3 の機能.....	43
2.4.3	外腕ダイニンの微小管への結合に介在するタンパク質 DC2.....	43
2.4.4	繊毛研究の実験生物としてのプラナリアの欠点.....	44
第3章	緑藻クラミドモナスの外腕ダイニンサブユニットの生化学的機能解 析.....	45
3.1	本章の概要.....	46
第4章	緑藻クラミドモナスの外腕ダイニンサブユニットの生理学的機能解 析.....	47
4.1	本章の概要.....	48
第5章	総括.....	49
5.1	まとめ.....	50
	引用文献.....	51
	発表論文.....	60
	謝辞.....	61

第 1 章 序論

1.1 はじめに：生物の行動

運動する生物の多くは、刺激応答行動を示す。たとえば、動物は餌の匂い刺激に対して採餌行動を示し、微生物は捕食者から逃げるために接触刺激に対して逃避行動を示し、光合成微生物は光合成に適した光環境に移動するために光刺激に対して走光性や光驚動反応などの光行動を示す。このような生物の行動は、簡単には以下のように表せる。

環境情報→受容体→生物内情報処理→運動装置調節→行動発現

このうち、太字で示した部分が生体内での反応である。生物の行動の調節機構を理解するためには、この生体内で起きる反応カスケードを分子レベルで明らかにする必要がある。

生物行動を分子レベルで明らかにするためには、まずはシンプルな体制の生物を材料とする必要がある。そのような目的で、古くから大腸菌 *Escherichia coli* の走化性の研究が行われてきた。大腸菌は、アミノ酸の刺激に対してべん毛運動を調節し、走化性を示す(Berg, 1975)。大腸菌の知見を基盤として多様な原核生物を用いた研究が行われてきたが、体制がやや複雑になった真核単細胞生物の行動に関する分子レベルの知見は、アメーバ運動による走化性を除いて限定的であった(Fan et al., 2017)。アメーバ運動以外の真核単細胞生物の運動の代表例が鞭毛・繊毛による運動である。鞭毛・繊毛は、後述するその構造の複雑さから、これを使った行動の理解が遅れていた。

近年、鞭毛・繊毛研究のモデル生物である緑藻クラミドモナスのゲノムデータベースが公開されたこと(Pazour et al., 2005; Merchant et al., 2007)、クラミドモナス繊毛のクライオ電子顕微鏡解析が進んだこと (Bui et al., 2009)、繊毛を動かすモータータンパク質・ダイニンの生化学的な研究が進んだこと (King, 2017) などから、繊毛を使った真核単細胞生物の行動研究を行うための基盤が整ってきた。本研究は、主としてクラミドモナスが光行動を示すための繊毛運動調節機構の分子機構を明らかにすることを目的として行われた。上のカスケードに当てはめれば、クラミドモナスの光行動は

光→眼点・葉緑体→細胞内酸化還元状態・カルシウムイオン濃度変動→繊毛運動調節→光行動発現

と表すことができる。このうち、特に酸化還元状態やカルシウムイオン濃度の変動を感受すると考えられるダイニンのサブユニットが、繊毛運動調節に果たす役割を明らかにすることを目指した。

1.2 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り、運動することで細胞の周りに液体の流れを作る。（なお、鞭毛・繊毛は相同の細胞小器官だが、1細胞から生える本数が1本～4本程度のときに鞭毛、それより多いと繊毛と呼ぶ習慣がある。近年は繊毛に用語統一する傾向があるため、本論文では以後繊毛と呼ぶ。）繊毛は微生物や精子の遊泳に寄与することがよく知られているほか、脊椎動物の脳室上皮、気管上皮、卵管上皮などにも生えており、それぞれ脳脊髄液の循環、異物の排出、卵の輸送などにはたらく。

繊毛はこのような細胞の推進装置や組織周辺の粘液の起流装置として機能するだけでなく、化学シグナルや力学的刺激に対するアンテナとしても機能しており、多様な生命現象に関わっている(Marshall and Nonaka, 2006)。繊毛が機能不全になったことで生じるヒト疾患も数多く知られており、原発性不動繊毛症候群 Primary Ciliary Dyskinesia (PCD)と総称される。1.5万人から4万人に1人の割合で発症し、多発性嚢胞腎、気管支拡張症、内臓逆位、網膜色素変性症、不妊など、多岐にわたる症状を示す(Pazour et al., 2000; Li et al., 2004)。

繊毛の膜を除いた内部構造「軸糸」の横断面は、9組の周辺2連微小管が2本の中心微小管を囲んだ、特徴的な“9+2”構造をもつ(図1.2.1)。この構造は原生生物からヒトまで生物種を越えて広く保存されている。周辺微小管にはモータータンパク質「ダイニン」の外腕と内腕が結合している。このダイニンがATPの加水分解エネルギーによって周辺微小管間に滑りを生じさせることで、繊毛は屈曲運動を行う。

繊毛はただ動くだけでなく、様々な刺激に応じて運動様式を変化させることがその機能の上で重要である。たとえば、哺乳類の気管上皮繊毛は異物からの機械的刺激に応じて繊毛打頻度(1秒間に繊毛打を行う回数)を上昇させることで異物を効率的に体外に排出する(Girard et al., 1986)。また、海産生物の精子は卵の分泌物に反応して運動波形を変化させることで、卵に向かって泳ぐ走化性を示す(図1.2.2)(Inaba, 2015; Shiba et al., 2008)。ダイニンがATPの加水分解に応じてどのように構造変化して繊毛打が生じるかについては近年のクライオ電子顕微鏡解析の進歩によって理解が進んでいる(Walton et al., 2021; Kubo et al., 2021)。しかし、9+2構造を保ったままでどのようにして運動様式を変化させているのか、その分子メカニズムについてはほとんど明らかになっていない。

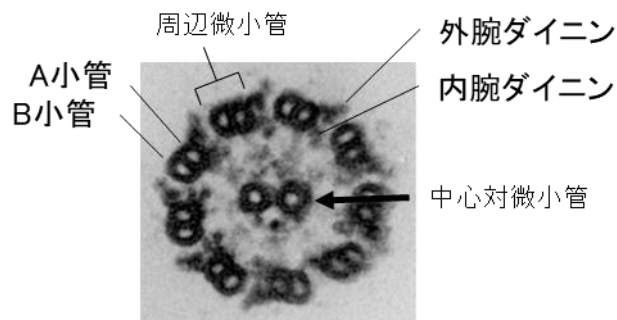


図 1.2.1 クラミドモナス繊毛軸糸横断面の超薄切片法による透過電子顕微鏡像。9本の周辺微小管が2本の中心微小管を囲んだ“9+2”構造がみられる。周辺微小管は断面が円形でダイニンを結合しているA小管と、それに付随したB小管からなる。(若林憲一博士(東工大)提供)。



図 1.2.2 カタユレイボヤ *Ciona intestinalis* 精子が示す卵への走化性。通常は大きな円を描く軌跡で遊泳するが、卵から放出される誘引物質濃度が低下したことを感じると、運動波形を変えて遊泳軌跡の曲率を大きくし、より誘引物質濃度が高い方向へと泳ぐ。この波形変換はカルシウムイオンの急激な流入（バースト）による（東京大学大学院理学系研究科プレスリリース <https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2008/25.html> より引用。Shiba et al., 2008）。

1.3 繊毛研究のモデル生物・クラミドモナス

クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*; 和名 コナミドリムシ) は淡水棲単細胞緑藻の一種である (図 1.3.1)。長さ約 10 μm の 2 本の繊毛を平泳ぎのように動かして遊泳する。細胞体のほとんどは核を取り囲むカップ状の葉緑体で占められており、細胞体の赤道付近に光受容装置である眼点を 1 つもつ。

クラミドモナスは実験生物としての以下のような多くの利点を持つため、繊毛運動、光合成、有性生殖など、広い研究分野で古くからモデル生物として扱われてきた。特に繊毛研究については研究分野をリードする実験生物として知られている。まず、通常は一倍体で無性的に増殖するため、突然変異株の単離が容易であり、順遺伝学的手法を得意とする。その一方で 2 つの接合型をもち、その間での有性生殖を行うため、古典遺伝学的解析 (四分子解析) が適用できる。繊毛に関する初期の分子レベルの知見はそのほとんどがクラミドモナスの運動異常変異株の遺伝学的解析から得られたと言って良い。また、培養が容易であり、培養スケールを数ミリリットルから数十リットル程度まで容易に変えられることから、運動の顕微鏡観察からタンパク質抽出・精製まで多様な研究手法に適用可能である。さらに、外来遺伝子の導入が可能であることなどが挙げられる。2005 年には全生物に先駆けた最初の繊毛プロテオーム、2007 年には全ゲノムのデータベースが公開 (ドラフトゲノムデータは 2003 年に先行公開) されるなど、各種データベースも確立している (Pazour et al., 2005; Merchant et al., 2007)。先述したヒト疾患 PCD の原因遺伝子の多くはクラミドモナスの繊毛運動異常突然変異株の研究から同定されており、研究成果は医療にも貢献している (Pennarun et al., 1999 ; Duquesnoy et al., 2009)。

その一方で、相同組換えが生じる確率が同一配列のランダムな挿入に比して 1/1000 以下と非常に低いため、任意の遺伝子をノックアウトする逆遺伝学的手法を長らく容易ではなかった (Gumpel et al., 1994)。それを補うため、まず、抗生物質耐性遺伝子カセットを野生株核ゲノムにランダムに挿入した上で、挿入された染色体上の位置情報とともに株が公開された (CLiP (Chlamydomonas Library Project) , Li et al., 2016; Li et al., 2019)。これにより、興味のある遺伝子のノックアウト株が米国の Chlamydomonas resource center から入手できるようになった。さらに、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集法が確立されつつあり (Greiner et al., 2017)、逆遺伝学的手法を用いた研究の幅が広がっている。

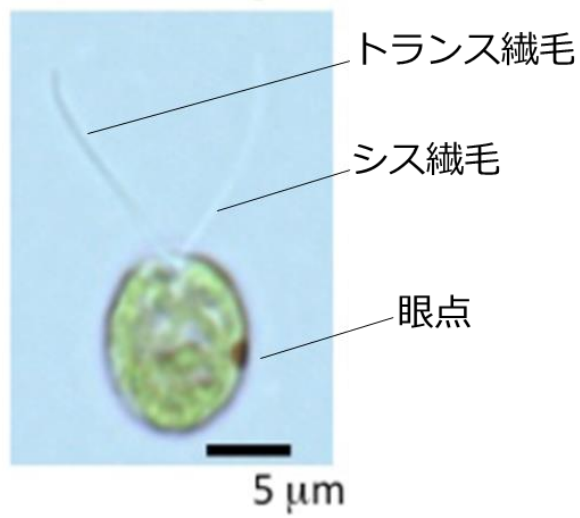


図 1.3.1 クラミドモナスの明視野顕微鏡像。2本の繊毛を平泳ぎのように動かし、繊毛側を前にして泳ぎ、眼点で光を受容する。2本の繊毛は、眼点に近い方をシス繊毛、遠い方をトランス繊毛と呼んで区別する。（若林憲一博士（東工大）提供）

1.4 ダイニン

ダイニン dynein は微小管系モータータンパク質である。繊毛虫テトラヒメナの繊毛運動を生み出すタンパク質として発見され、CGS 単位系(centimeter-gram-second)の力の単位 dyne から名付けられた(Gibbons, 1965)。その後、相同タンパク質が細胞質にも存在することがわかり、細胞内小胞輸送や姉妹染色体分離などの広い生命現象に関わることが見出された(Reck-Peterson et al., 2018)。

ダイニンは ATP 加水分解エネルギーを用いて構造変化し、微小管マイナス端(重合速度の低い α チューブリン露出側)へ向かって動く(Certer et al., 2021)(図 1.4.1E)。後述するようにダイニンは複数のタンパク質から成る複合体であり、重鎖はリング状の六量体を形成することが特徴である AAA+(ATPases associated with a variety of cellular activities)ファミリータンパク質の一種である。ダイニン重鎖は単独ポリペプチド鎖内に 6 つの AAA ドメインを有してリング状構造をつくる、AAA+ファミリーの中でも稀なタンパク質である(図 1.3.1.A-D)(Neuwald et al., 1999)。

ダイニンは繊毛を動かす軸糸ダイニンと細胞質ダイニンの 2 つのファミリーに大きく分けられるが、それぞれの重鎖の構造は相同である。軸糸ダイニン重鎖は、図 1.4.1 で示した tail ドメインで周辺微小管 A 小管に結合し、MTBD で向かい合う B 小管と相互作用する(図 1.4.2A)。ATP 加水分解エネルギーによる構造変化により、周辺微小管間に滑り力を起こし、周辺微小管間の連結構造の存在によって、滑りが屈曲に変換される(図 1.4.2B)。

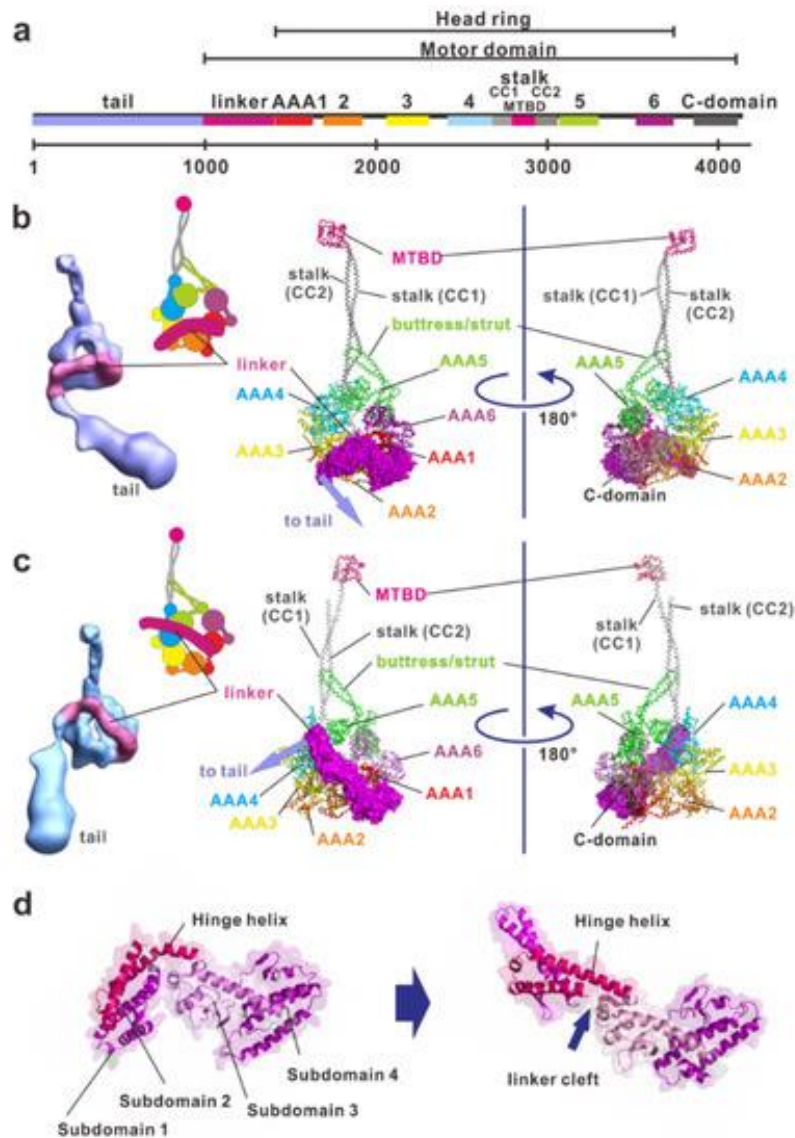
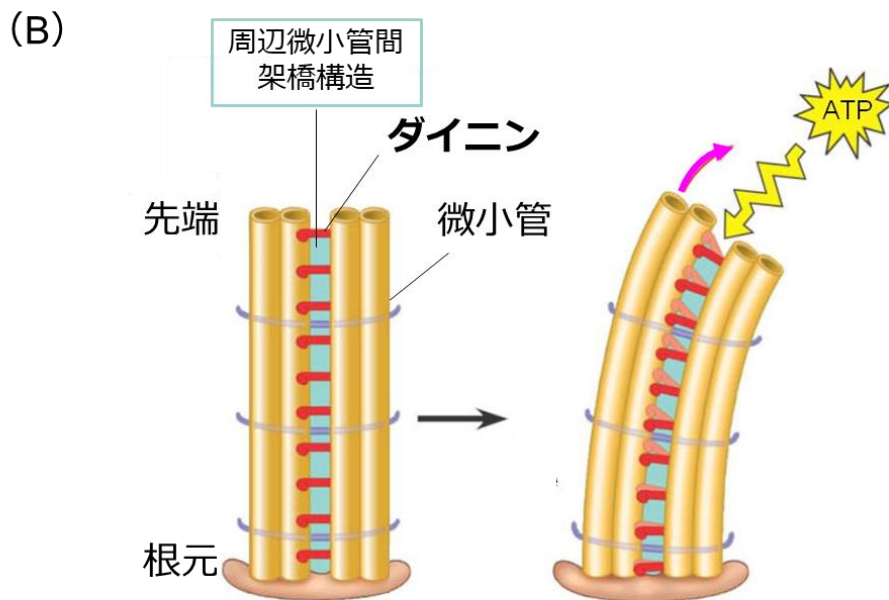
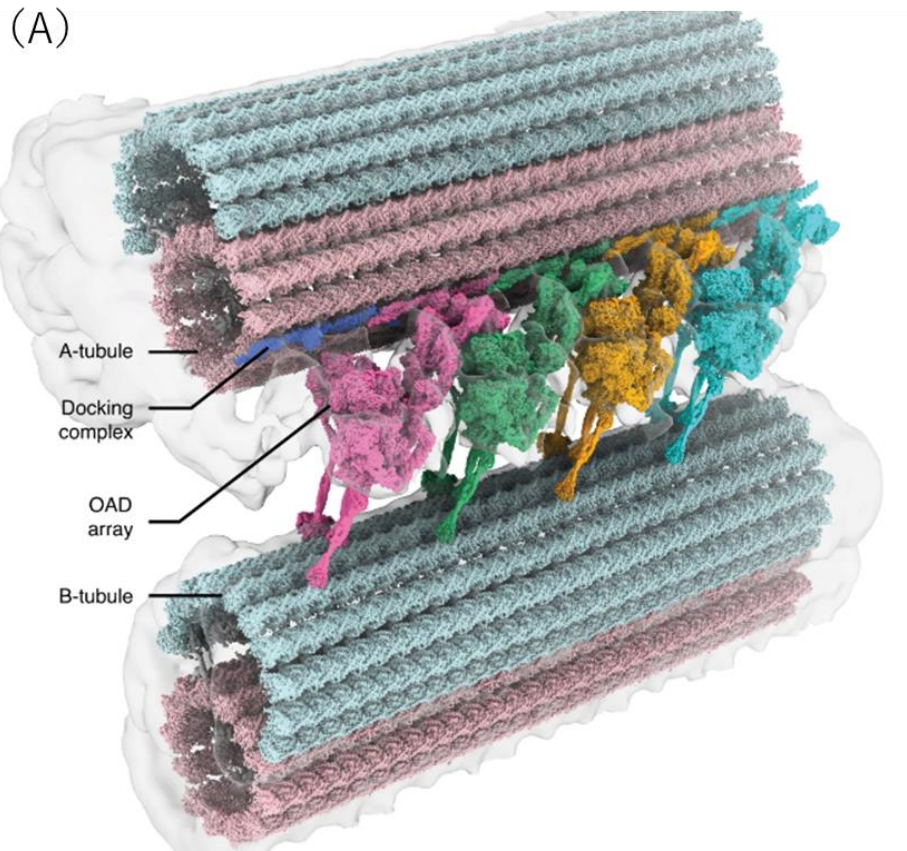


図 1.4.1 ダイニン重鎖の構造と構造変化モデル。(A) クラミドモナス内腕ダイニン c 重鎖のドメイン構造。AAA ドメインを 6 つもつ。主たる ATP 加水分解ドメインは AAA1 に存在する。AAA4 と AAA5 の間の stalk ドメインの先端で微小管（繊毛の場合は B 小管）に結合する(MTBD: microtubule binding domain)。軸糸ダイニンの場合、tail ドメインに A 小管を結合する。AAA ドメインと tail ドメインを linker ドメインがつなぐ。6 つの AAA ドメイン+stalk をヘッドリング、linker から C 末側をモータードメインと呼ぶ。(B) ADP-Vi 結合状態のクラミドモナス内腕ダイニン c 全体のクライオ電顕像から得られた電子密度マップ (左) と、ADP-Vi 結合状態の酵母細胞質ダイニン重鎖の結晶構造 (右)。(C) ヌクレオチド非結合状態のクラミドモナス内腕ダイニン c 全体の電子密度マップ (左) と ADP 結合状態の酵母細胞質ダイニン重鎖の結晶構造 (右)。6 つの AAA ドメインがリング構造(AAA+リング)を形成し、リングか

(図 1.4.1 の続き) ら突出した stalk を AAA5 から突出した buttress (=控え壁) が側面から支えている。stalk はコイルドコイル(CC)ドメインから成る。(B)から(C)への構造変化において、linker ドメインが AAA+リングに対してスイングすることで、モータードメインと tail の成す角度が大きく変わる。また、AAA+リングの構造変化にともなう buttress の位置の変化により CC1 と CC2 にずれが生じる。その stalk の CC のずれにより MTBD の微小管結合親和性が変化する((B)が弱く、(C)が強い)。Ishibashi et al., 2020 より引用。



Bio1151 websiteより一部改変

図 1.4.2 軸糸ダイニンの構造と周辺微小管の屈曲。(A) テトラヒメナ繊毛のクライオ電子顕微鏡解析が得られた、2本の隣接する周辺微小管間の外腕ダイニン

(図 1.4.2 の続き) の模式図。ダイニン重鎖の **tail** ドメイン側は後述する IC/LC などの他のサブユニットを介してピンクの A 小管に結合し、AAA+リングから突出した stalk 先端の MTBD が水色の B 小管に対して滑り運動を行う (Rao et al., 2021 より引用)。(B) 隣り合う 2 本の周辺微小管の屈曲運動の模式図。ダイニンは ATP 加水分解に伴う構造変化により、繊毛の根元側に向かって滑る。弾性をもつ周辺微小管間連結構造により、滑り運動が屈曲運動に変換される (Bio1151 website より一部改変)。

1.5 クラミドモナスでわかった外腕ダイニンのサブユニット構成

軸系ダイニンはさらに外腕ダイニンと内腕ダイニンの2種に分けることができ、それぞれ周辺微小管の外側と内側に結合している(図 1.2.1)。初期はこれら2種のダイニンは同じタンパク質だと考えられてきたが、クラミドモナスにおいて外腕ダイニン単独欠損株が単離されたことから、異なるタンパク質であることがわかった(Kamiya and Okamoto, 1985)。その後、内腕ダイニンの多様性がクラミドモナスのダイニン欠損変異株によって次々に明らかになり、現在では以下に述べるようなクラミドモナスの軸系ダイニンの種類とそれらの微小管上での配置が他の生物のダイニンを議論する際の規範となっている。

クラミドモナスの外腕ダイニンは1種が24 nm、内腕ダイニンは主なもの7種がそれぞれ96 nm周期で結合している(Bui et al., 2009)(図 1.5.1)。内腕ダイニン7種はそれぞれが異なる滑り活性をもち、そのことが繊毛の波の伝播に重要な役割を担っていると考えられている(Kamiya, 1995)。内腕ダイニンは、9組のうち特定の周辺微小管で失われているもの、繊毛基部だけに存在するマイナー内腕ダイニンと呼ばれるものなども存在する(Kamiya and Yagi, 2014)。

本研究では、2つの理由で外腕ダイニンに着目した。1つは、主要なものだけで8種類存在する軸系ダイニンのうち、その欠損が最も重篤な運動低下を促す重要なモーターであるという点。外腕ダイニン欠損株の繊毛打頻度は、野生株の1/3まで低下する(Kamiya, 1988)。もう1つは、後述するようにさまざまな化学シグナルを受容する多くのサブユニットをもつ、多機能モーターであるという点である。これは、内腕ダイニンには見られない特徴である。

クラミドモナスの外腕ダイニンは、3つの重鎖(Heavy Chain, HC)、2つの中間鎖(Intermediate Chain, IC)、11の軽鎖(Light Chain, LC)の計16のサブユニットからなる、合計2 MDaを超える巨大タンパク質複合体である。ATP加水分解活性およびモーター活性を持つ α 、 β 、 γ の3つの重鎖のN末のtailドメインが、中間鎖IC1, IC2といくつかの軽鎖から成るIC/LC複合体によって束ねられた、花束状の複合体を形成する(図 1.5.2)。こうしてできた複合体が、ドッキングコンプレックス(Docking complex, DC)と呼ばれる他のタンパク質複合体によって周辺微小管のA小管に結合する(図 1.4.2A)。IC/LC複合体に含まれない軽鎖がダイニン活性を調節すると考えられている(図 1.5.2)。

IC/LC複合体に含まれない軽鎖にはLC1, LC3, LC4, LC5の4種がある。LC1については機能がわかっており、微小管へ結合親和性を下げて γ HCのモーター活性を低下させるブレーキのような役割をもつ(Ichikawa et al., 2015)。その他の3種が、化学シグナルによる運動調節に関わると考えられており、本研究の対象となる。LC3とLC5は酸化還元調節に関与するタンパク質であるチオレドキシンのファミリータンパク質であり、LC4はカルシウムイオン結合タンパク質

であるカルモジュリンに似たタンパク質である (King and Patel-King, 1995; Patel-King et al., 1996)。

LC3, LC5、および LC4 は、それぞれのタンパク質モチーフの特徴から、細胞内の酸化還元状態やカルシウムイオン濃度の変動に応じてダイニンの活性調節をすることが予想されてきた。実際、組換えタンパク質を使った生化学的解析では、確かに LC3 と LC5 は酸化還元応答をし (Patel-King et al., 1996)、LC4 はカルシウムイオンを結合した (King and Patel-King, 1995)。しかし、これらの生体内における機能は謎であった。その大きな理由は、これらのタンパク質のクラミドモナスにおける単独欠損株が存在しなかったことにある。1970年代から多くの研究室で精力的に行われてきた運動性異常変異株の順遺伝学的なスクリーニングでは、これらの軽鎖の欠損株は単離されなかった。このことは、これらの軽鎖の欠損株は、単純な運動性低下株スクリーニングで選抜されるような顕著な表現型は持たないと考えられる。また、軽鎖は分子量約 1 万 5 千前後と小さいため遺伝子も短く、抗生物質耐性カセットのランダムな挿入による欠損株が得られる確率が低かったのも一因である。本研究開始時において、これら 3 種の軽鎖の欠損株は CLiP にも登録されていなかった。

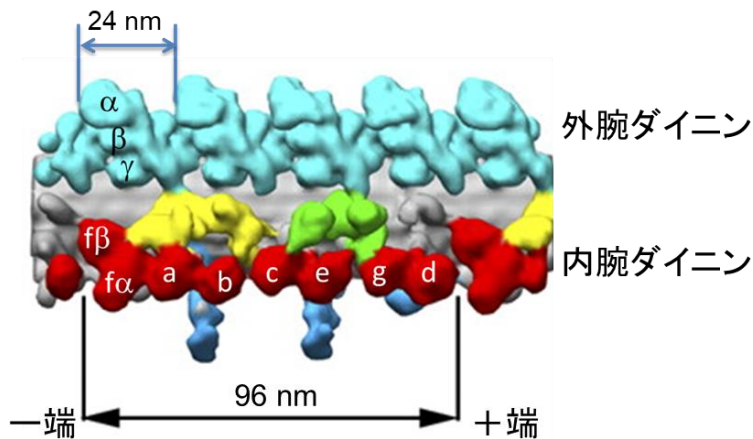


図 1.5.1 クラミドモナス軸系クライオ電子顕微鏡トモグラム。1組の周辺微小管をダイニン側から見ている。左側が微小管のマイナス（-）端（繊毛基部側）、右側がプラス（+）端（同、先端側）にあたる。水色は外腕ダイニンを示し、 α , β , γ の3つの重鎖を含む複合体が24 nm周期で結合している。赤色は内腕ダイニンを示し、a-gの7種類が96 nm周期でそれぞれ特異的な位置に結合している。fのみ重鎖を2つ（ $f\alpha$, $f\beta$ ）含み、その他は重鎖を1つ含む。黄色は内腕fのIC/LC複合体を、緑色は周辺微小管間架橋構造を示す。Bui et al., 2009 より一部改変。

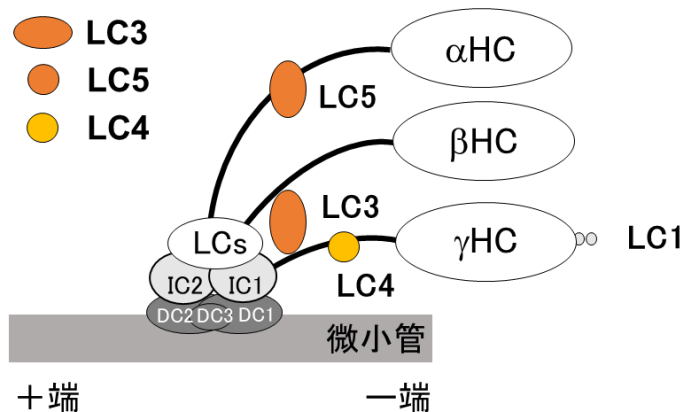


図 1.5.2 クラミドモナスの外腕ダイニン模式図。リング状のAAAドメインをもつ3つのHCが、その根元のIC/LC複合体(IC1, IC2, LC2, LC6, LC7a, LC7b, LC8, LC9, LC10を含む)によって花束のようにまとまっている。LC3は β HCと γ HCの間をまたぐように、LC5は α HCに結合している。LC4は γ HCに結合している。IC/LC複合体は、3つのサブユニット(DC1, DC2, DC3)から成る別の複合体であるドッキング複合体(DC)を介して周辺微小管A小管に結合している。

1.6 チオレドキシン様軽鎖 LC3 と LC5

チオレドキシン *thioredoxin*, Trx は原核生物からヒトまで生物種を問わず保存されている分子量 1 万程度の小タンパク質である。細胞質、ミトコンドリア、葉緑体、繊毛など、さまざまな細胞内区画にアイソフォームが局在している

(図 1.6.1)。活性部位に **WCGPCK/R** というモチーフをもち、2つのシステイン残基が標的タンパク質とジチオールジスルフィド交換反応を行うことで標的タンパク質を還元し、活性を調節する(図 1.6.2)。動物細胞では酸化ストレス防御、植物細胞ではカルビン・ベンソン回路の酵素群の活性調節など、幅広い生命現象において酸化還元シグナルの授受を行う制御因子としてはたらく。細胞質、ミトコンドリア、葉緑体に局在する Trx の機能に関する研究は進んでいるが(Kang et al., 2019; Mohammadi et al., 2019)、LC3, LC5 を含む軸糸ダイニンサブユニット型 Trx の機能はほとんどわかっていない。

LC3, LC5 はともに **WCGPCK** のモチーフを持ち、外腕ダイニン複合体にそれぞれ 1 つずつの割合で含まれることがわかっている。LC3 は分子量約 17,000 で、 β HC と γ HC の tail 部分にまたがって結合している(図 1.5.2)。LC5 は分子量約 14,000 のタンパク質で、 α HC の tail 部分に結合している(図 1.5.2)(Patel-King et al., 1996)。

LC3 と LC5 の生体内での機能はまだ解明されていないが、ヒントとなる実験結果はいくつか得られている。

1 つ目は除膜細胞モデルの運動再活性化実験である。除膜細胞モデルとは、細胞を非イオン性界面活性剤処理して除膜した標品を指す。当然細胞は死ぬが、繊毛内部の軸糸の 9+2 構造は保持されているため、ATP を添加すると軸糸の運動が再活性化され、細胞モデルはまるで生きているかのように動き出す。この実験法の重要なポイントは、細胞モデル外液の条件を任意に変えられることにある。野生株細胞と、 α HC および LC5 を欠損した *oda11* 変異株細胞に対してこの実験を行う際、溶液を酸化的条件(還元型グルタチオンと酸化型グルタチオンを、後者を過剰にして加える)にすると、*oda11* 細胞モデルは野生株細胞モデルよりも重鎖が 1 つ足りないにもかかわらず高い繊毛打頻度を示した(Sakakibara et al., 1991; Wakabayashi and King, 2006)。このことは、LC5 が重鎖の活性を抑制するブレーキのような機能があることを示唆する。

2 つ目は繊毛プロテオームデータベースの解析である。繊毛に NADH/NADPH 依存型リンゴ酸脱水素酵素が 2 種局在していることが明らかになった(Pazour et al., 2005)。光合成生物の葉緑体内は光を受けると還元的に、暗闇では酸化的になると考えられている。葉緑体内の還元力はリンゴ酸として細胞質に放出される(Raghavendra and Padmasree, 2003)。繊毛と細胞の細胞質は、

繊毛基部に拡散障壁が存在するものの、概ね分子量 5 万よりも小さい分子は自由に出入りできると考えられている(Takao et al., 2014)。

以上の 2 つの情報から、光合成活性変化の情報を繊毛内リンゴ酸脱水素酵素がリンゴ酸の量変動として受け取り、繊毛内の LC5 が酸化還元の最初のセンサーとなり、LC3 を介して γ HC を酸化し、ATPase 活性を調節するモデルが提示されている(King, 2017) (図 1.6.3)。しかし、このモデルの実験的な検証はされていない。

後生動物においては、外腕ダイニンのサブユニット構成は異なり、HC は 2 つになり、LC は少なくなっている。マウスでは LC3, LC5 にあたる軽鎖は失われているが、その代わり、中間鎖が Trx 配列も含んで巨大化したタンパク質としてダイニン基部に存在する(Ogawa et al., 1996)。LC3, LC5 のマウスホモログである TXNDC2 (分子量約 60,000)、TXNDC3 (分子量約 70,000) は中間鎖として存在し、成熟した精子の酸化還元状態を調節するのに重要な役割を果たすと考えられている(Smith et al., 2013)。両方を欠損したノックアウトマウスは、精子形成能や生殖能には異常はないが、加齢とともに生体内のスーパーオキシド (O_2^-) の量が増加し、精子の運動性が低下する (Smith et al., 2013)。このことから、TXNDC2, TXNDC3 は、HC の活性調節というよりは、細胞内の活性酸素種の除去に機能している可能性が示唆されている。

上記のことより繊毛内 Trx の役割について、2 つの仮説が考えられる。

1. ダイニン重鎖の活性を直接調節している。
2. 活性酸素種の除去など、繊毛内の酸化還元状態恒常性を維持している。

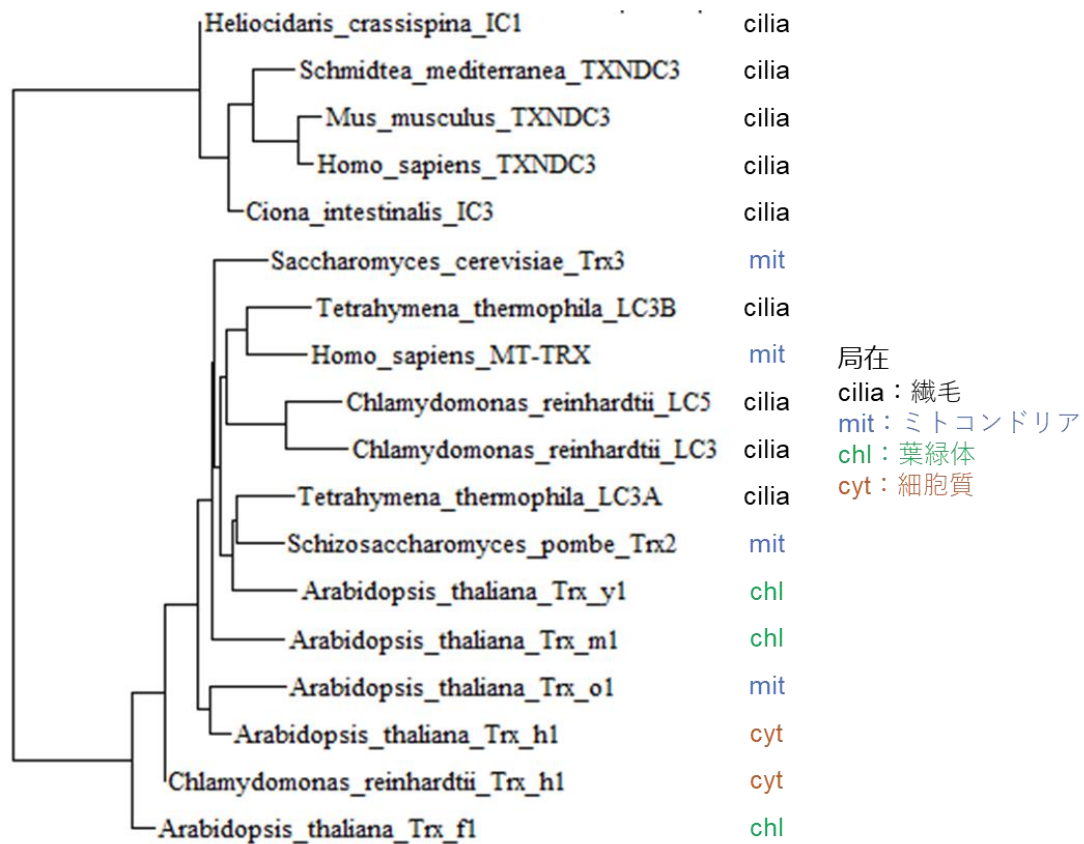


図 1.6.1 Trx ファミリーの系統樹。プラナリア(*Schmidtea mediterranea*)、ムラサキウニ(*Heliocidaris crassispina*)、マウス(*Mus musculus*)、ヒト(*Homo sapiens*)、カタユウレイボヤ(*Ciona intestinalis*)、テトラヒメナ(*Tetrahymena thermophila*)、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、分裂酵母(*Shizosaccharomyces pombe*)、クラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)等多くの生物において保存されている。

使用したデータベースは以下の通りである。プラナリア : SmedGD

(<http://smedgd.stowers.org/>)、ムラサキウニ、テトラヒメナ : NCBI protein

database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>)、マウス、ヒト、カタユウレイボヤ、

出芽酵母、分裂酵母 : KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>)、シロイヌナズナ

ナ : aramemnon (<http://aramemnon.uni-koeln.de/>)

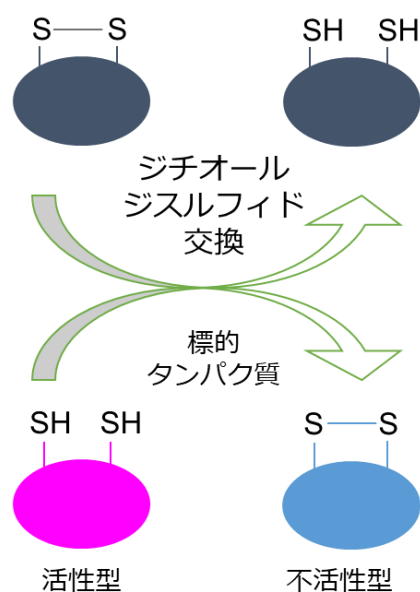


図 1.6.2 Trx の反応。Trx 活性部位の 2つのシステイン残基が不活性型の標的タンパク質のジスルフィド結合と反応すると、ジチオールジスルフィド交換反応によって標的タンパク質が還元され活性型になる。この反応で酸化された Trx はチオレドキシシン還元酵素によって再び還元型になる。

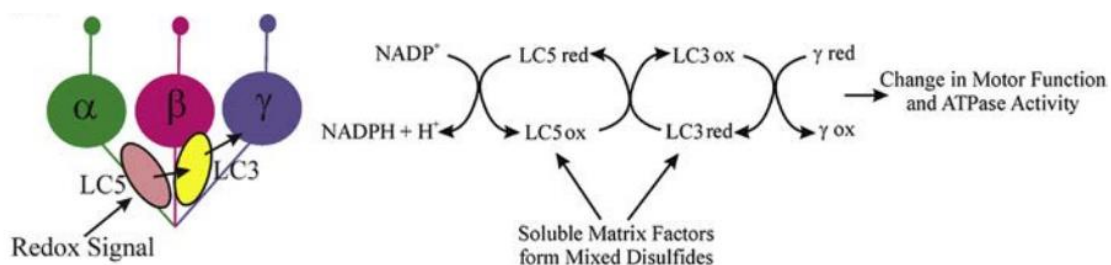


図 1.6.3 現在考えられているクラミドモナスの外腕ダイニン内の酸化還元カスケードモデル。葉緑体から還元力を受けた NADH/NADPH 依存型リンゴ酸脱水素酵素が働き、LC5 が酸化還元の最初のセンサーとなり他のコンポーネントに伝達することで HC のモーターの機能や ATPase 活性を変化させ運動調節を行う。(King, 2017 より引用)

1.7 カルシウムイオン結合軽鎖 LC4

LC4は、分子量約18,000のタンパク質で、 γ HCのtail部分に結合しており(図1.5.2)、外腕ダイニン複合体1つに対してLC4が1つ含まれることが分かっている。カルシウムイオン結合タンパク質カルモジュリンのホモログ(相同性42%)であり、カルシウム結合イオンモチーフであるEFハンドを3つ持つ。

LC3, LC5と同様、LC4もその単独欠損変異株が存在しないため、直接機能の解明はされていない。しかし、後述するクラミドモナスの光行動の際に見られる繊毛運動調節はカルシウムイオン濃度変化によって起こることが知られており、LC4がそれに寄与することが予想されてきた。生化学的な実験から、外腕ダイニン内におけるLC4相互作用のカルシウムイオン依存的な構造変化のモデルが報告されている(Sakato et al., 2007)(図1.7.1)。このモデルのように、LC4はカルシウムイオン依存的に γ HCの稼働範囲を調節すると予測されている。

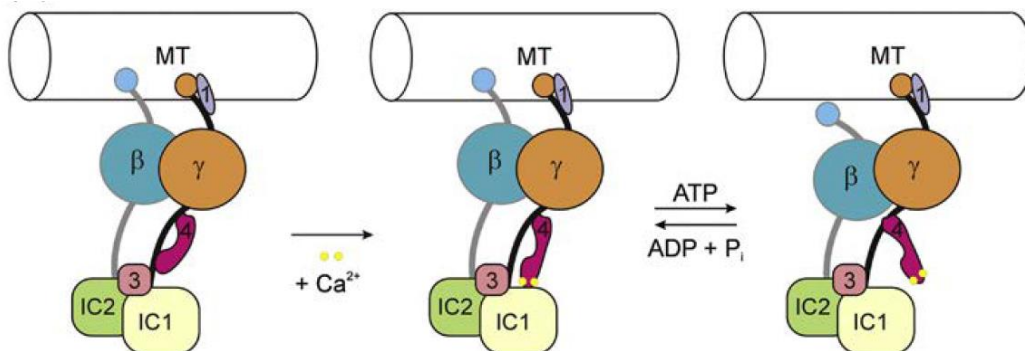


図1.7.1 外腕ダイニン内におけるLC4相互作用のモデル。(左)カルシウムイオンが存在しないときLC4は γ HC tailに存在する2箇所のIQモチーフを介して γ HCに結合している。(中)カルシウムイオン存在下ではLC4のEFハンドモチーフの1つは γ HCのIQモチーフから分離し、中間鎖IC1に接近または結合する。(右)ATP存在下では、LC4がIC1から離れると考えられている。 α HCを含む他の外腕ダイニンサブユニットはこのモデルに関わらないと考えられている MT:微小管(microtubule), 1: LC1, 3: LC3, 4: LC4を示す(King, 2017より引用)。

1.8 クラミドモナスの光行動

繊毛をもつ藻類の多くは、光合成に適した光条件を求めて移動する反応、光反応行動（光行動）を示す。光行動には大きくわけて3つの現象がある。1つ目は光線に平行に運動する走光性（または光走性）で、光源に向かう場合を正の走光性、光源と逆方向に向かう場合を負の走光性と呼ぶ。2つ目は光驚動反応（または光忌避反応）であり、光の照射方向とは無関係に、光の強度変化に応じて一時的に運動を止めたり、運動方向を逆転させたりする。3つ目は定常的な運動速度に及ぼす光の効果、光キネシスであり、多くの場合藻類は明るいときに速く、暗いときに遅く泳ぐ。

クラミドモナスはこの3つを明確に示すため、光行動研究の良いモデル生物としても知られている。まず、クラミドモナスは眼点と呼ばれる光受容体を持つ。眼点が光を感受すると、光受容タンパク質チャンネルロドプシンの陽イオン流入に端を発するシグナル伝達経路により2本の繊毛の打つ強さのバランス、具体的には繊毛打頻度と波形の振幅を変化させることで遊泳方向を変化させ、正または負の走光性を示す。また、フラッシュ光のように急激に強い光を浴びると、細胞は一時的に繊毛の運動波形を変換して細胞側を前にして後退遊泳する（光驚動反応）（図 1.8.1）（若林、植木, 2022）。さらに、クラミドモナスは明るいところで速く、暗いところでは遅く泳ぐ（光キネシス）(Casey et al., 2003; Wakabayashi and King, 2006)。

つまり、クラミドモナスの光行動は[光受容]—[細胞内信号伝達]—[繊毛運動制御]からなる(渡辺、鈴木 2009)。特に走光性と光驚動反応は光照射後1秒以内に起こる迅速なものであり、繊毛運動制御機構に不全があれば光行動にも異常が生じる可能性が高い。光行動は、順遺伝学・逆遺伝学の両手法で繊毛運動制御機構を研究する上で、重要な検査対象になる。

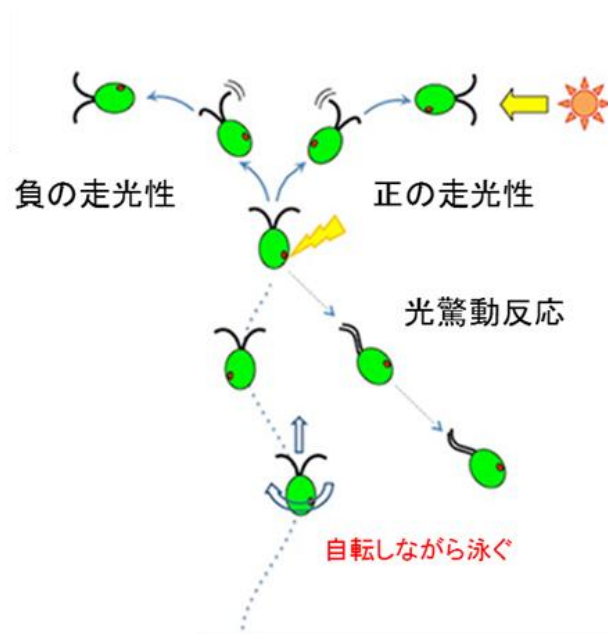


図 1.8.1 クラミドモナスの光行動。眼点で光を受容し、2本の繊毛打のバランスを変化させる（走光性）、または繊毛波形を変換させる（光驚動反応）。
 (若林憲一博士（東工大）提供)

1.9 光行動とカルシウムイオン、酸化還元

クラミドモナスの光行動の発現には、カルシウムイオンと酸化還元という2つの因子が重要な役割を果たす。

主な調節因子はカルシウムイオンである。1.8で述べたようにクラミドモナスには眼点と呼ばれる光受容体があり、細胞膜上に光受容タンパク質チャンネルロドプシン、それを裏打ちするカロテノイドからなる色素顆粒層がある(図1.2.1)(Eichenberger et al., 1986; Niyogi et al., 1997)。眼点が光を感じると、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇すると考えられている。強い光を浴びて大量のカルシウムイオン(10^{-4} M程度)が流入すると光驚動反応が、少量のカルシウムイオン(10^{-7} M)が流入すると走光性が誘導されると考えられている(Hyams and Borisy, 1978; Bessen et al., 1980; Kamiya and Witman, 1984)。外腕ダイニン欠損株は光驚動反応時に停止するだけで後退遊泳を示さないこと、またLC4は高カルシウムイオン濃度($K_{Ca} \sim 3 \times 10^{-5}$ M)下でないとカルシウムイオンを結合しないことなどから、LC4による外腕ダイニン活性制御が後退遊泳のための波形変換に重要であると予想されている(Kamiya, 1985; King and Patel-King, 1995)。

走光性は2本の繊毛のカルシウムイオン応答性の違いによる遊泳方向変化によって生じる。2本の繊毛の分子レベルの違いは、内腕ダイニンが関与しているという説や(King and Dutcher, 1997)、外腕ダイニンが関与しているという説があるが(Takada and Kamiya, 1997)、まだ決着がついていない。

酸化還元も同時に光行動には重要な因子である。光合成生物の葉緑体内は光を受けると還元的に、暗闇では酸化式的になると考えられている。一方で、細胞内ATP濃度は明条件、暗条件で培養しても大きく変化しない(Forti, 2003)。これらのことから、クラミドモナスの光キネシス(明所で速く、暗所で遅く泳ぐ)は細胞内酸化還元状態変化に応じた制御であると考えられている(Wakabayashi and King, 2006)。また、これらの光行動の酸化還元による制御は、外腕ダイニン欠失突然変異株ではみられない。これらのことから、酸化還元による光行動制御には外腕ダイニン、おそらくはLC3とLC5が関与していると予想されている

さらに、走光性の制御にも酸化還元が関与していることが知られている。クラミドモナスは細胞内の活性酸素種が増えると正、減ると負の走光性を示す(Wakabayashi et al., 2011)(図1.9.1)。酸化還元シグナルは、眼点が光を感受してからシス・トランスどちらかの繊毛を強く打って方向転換するまでの時間を制御していると考えられる(Nakajima et al., 2020)。つまり、走光性はカルシウムイオンシグナルと酸化還元シグナルが協調して制御していると考えられている。

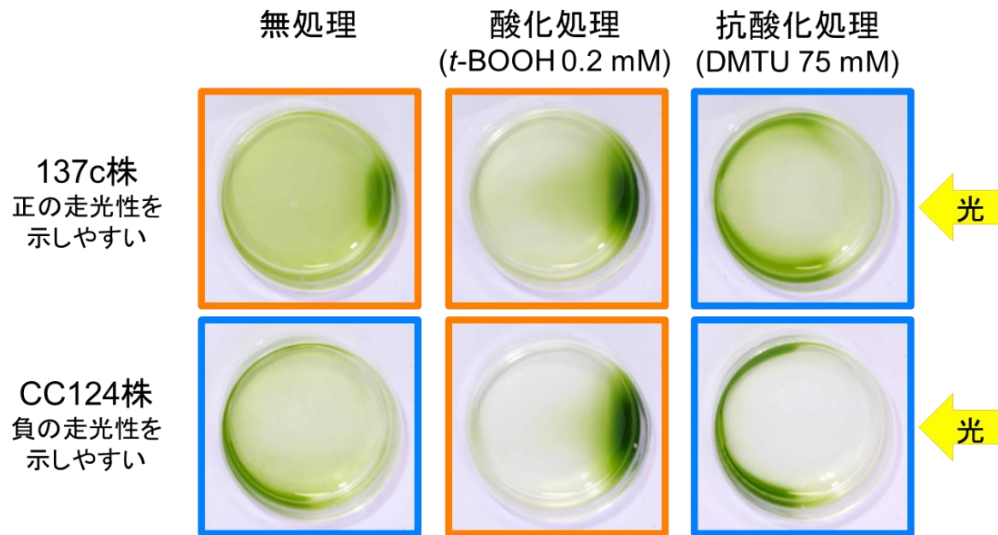


図 1.9.1 走光性のディッシュアッセイ。培養液をペトリディッシュにいれ、右側から $\lambda = 525 \text{ nm}$ の緑色光を 5 分間当てた。野生株の 137c 株と CC124 株は薬剤処理なしだとそれぞれ正の走光性、負の走光性を示すが、*t*-BOOH (*tertiary butyl hydroperoxide*) で酸化処理 (Garcia-Cohen et al., 2000) を行うとどちらも正の走光性を示し、DMTU (*dimethylthiourea*) で抗酸化処理 (Beehler et al., 1994) を行うと負の走光性を示す。(植木紀子博士ご提供の資料より)

1.10 本研究の目的

本研究では、Trx 型およびカルシウムイオン結合型の外腕ダイニンサブユニットの生理機能、特に繊毛運動調節に果たす役割を明らかにすることを目的とする。

研究開始時期にはクラミドモナスの LC3, LC5, LC4 の欠損株を得ることが困難だったため、まずノックダウン実験が容易な扁形動物プラナリアを用いてこれらと相同の外腕サブユニットの発現を抑制し、その運動表現型を解析した（第 2 章）。

続いて、クラミドモナス LC3 と LC5 の組換えタンパク質の Trx としての性質を生化学的に評価し、他のオルガネラ内にあるよく研究されている Trx との比較によって生理機能を予測した（第 3 章）。

クラミドモナスのダイニン軽鎖欠損株の入手と作製ができたことで、これらの株の運動と光行動を解析した（第 4 章）。

最後に、第 2～4 章の内容を総括し、Trx 型およびカルシウムイオン結合型の外腕ダイニンサブユニットの機能について考察した（第 5 章）。

第2章 扁形動物プラナリアの 外腕ダイニンサブユニットの 機能解析

2.1 序

2.1.1 扁形動物プラナリア

第1章で述べたように、クラミドモナス細胞における相同組換え効率は著しく低いため、遺伝子をノックアウトするのが困難であるという、実験生物として大きな欠点がある。(2017年にCRISPR/Cas9システムを用いたクラミドモナスのゲノム編集法が発表されたが(Greiner et al., 2017)、本研究開始時(2016年)には未発表であった。)その欠点を相補する実験生物として注目されてきたのが扁形動物プラナリアである(図2.1.1.1)。

プラナリアは肉食無脊椎動物であり、ウズムシ目(三岐腸目)の総称である。高い再生能力をもつため、再生研究のモデル生物としてよく知られている。プラナリアの1種 *Schmidtea mediterranea* は、食餌法によって容易にRNA干渉によるノックダウン個体を得ることができる(Rompolas et al., 2010)。

(RNA干渉は、二本鎖RNAと相補的な塩基配列を持つ標的遺伝子転写産物の相同部分を切断することにより、遺伝子発現が抑制される現象である。)プラナリアは腹部に繊毛を持ち、繊毛打によって水底を滑走する(図2.1.1.2)。繊毛形成や繊毛運動が阻害されると、プラナリアは尺取り虫のように筋肉を使って動く蠕動(ぜんどう)運動する(Rompolas et al., 2010)。つまり、繊毛に関連することが予想される遺伝子をRNA干渉実験によって発現抑制すれば、繊毛異常の有無を、運動の目視で容易に判定することができる。そのため、逆遺伝学的手法に特化した繊毛研究の新たなモデル生物として注目されている。



図 2.1.1.1 *Schmidtea mediterranea*。再生実験で良く知られる *Dugesia japonica* は矢印型の頭部を持つが、*S. mediterranea* はくびれのない蒲鋒のような体形をしている(Rompolas et al., 2010 より引用)。

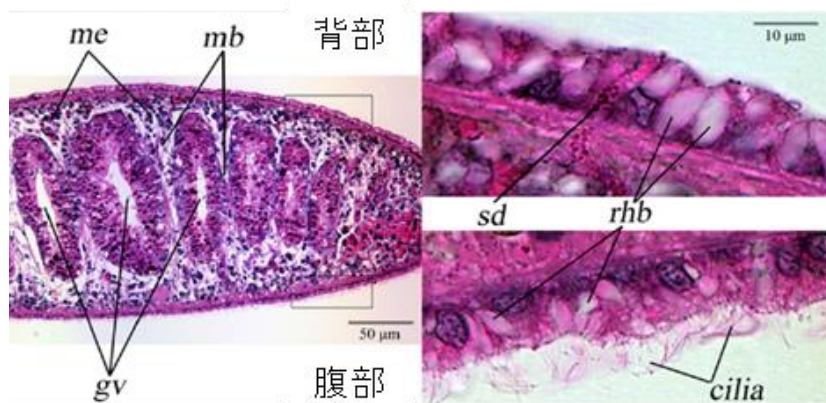


図 2.1.1.2 プラナリアの横断面をヘマトキシリン・エオシン染色した。(ヘマトキシリンは核を青藍色に、エオシンは細胞質・線維類や赤血球をピンク色に染める。) 腹部に繊毛 (cilia) がみられる。図中で示しているのは筋肉 (mb: muscle bands)、間葉 (me: mesenchyme)、胃血管 (gv: gastrovascular)、分泌管 (sd: secretory ducts)、棒状体 (rhb: rhabdites)。(Rompolas et al., 2010 より一部改変して引用。)

2.1.2 プラナリアの外腕ダイニン

プラナリアの軸糸外腕ダイニンの生化学的研究はまだあまり進んでいないが、電子顕微鏡観察による形態学的な研究とゲノム解析により、他の動物と同じく外腕ダイニン重鎖が2つの「2頭型ダイニン」であることがわかっている（図 2.1.2.1.A）。クラミドモナスを含む原生生物では、重鎖 α HC、 β HC、 γ HCの3つを含む「3頭型ダイニン」である。動物の進化の過程で α HCが消失し、残された2つの重鎖のうち、アミノ酸配列からクラミドモナスの β HCが動物型 α HCと相同、同じく γ HCが動物型 β HCと相同であると考えられている（図 2.1.2.1.A）（Inaba, 2011）。

クラミドモナスや、動物のダイニン研究によく用いられるホヤを用いて明らかにされた外腕ダイニンサブユニット遺伝子のうち、プラナリアには多くが保存されている。プラナリアデータベースを用いた相同性解析から、クラミドモナス LC4 と同じくカルシウムイオン結合タンパク質である動物のカラクシン、クラミドモナス LC3 と LC5 の相同遺伝子である TXNDC3 が存在していることがわかっている（図 2.1.2.1.B）。また、外腕ダイニンを微小管に結合させるドッキング複合体も保存されている。ただし、クラミドモナスのドッキング複合体が DC1、DC2、DC3 の3つのタンパク質から成るのに対し、プラナリアのそれは DC2 のみである。他の動物と同様、外腕ダイニン中間鎖の数が増え、ドッキング複合体の機能を代替していると考えられている。

本章では、外腕ダイニンの活性調節を担うと予想されるサブユニットの機能解析を逆遺伝学的に行うことを目的として、プラナリアにおいてカラクシンと TXNDC3 をノックダウンし、その表現型を検証することとした。RNA 干渉実験のコントロールとして、DC2 をノックダウンすることにした。DC2 がクラミドモナスと同様に外腕ダイニン-周辺微小管結合に介在していれば、発現抑制された場合外腕ダイニンは微小管上に構築されず、繊毛打頻度が通常の 1/3 程度に低下するはずである（Kamiya, 1988）。

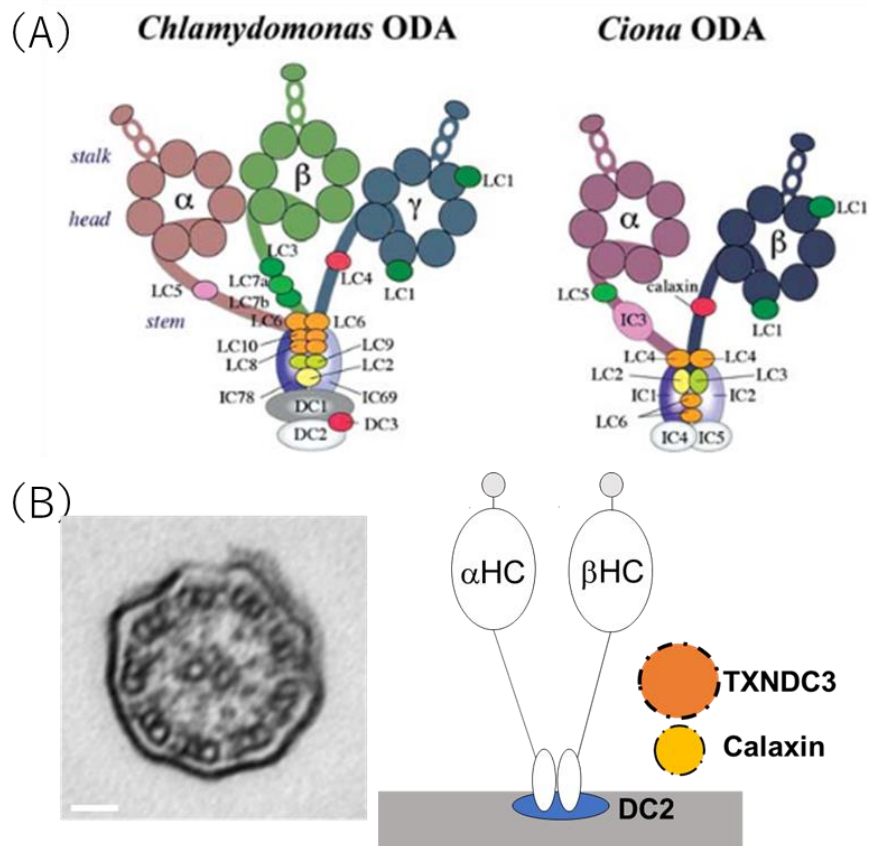


図 2.1.2.1 (A)クラミドモナス(*Chlamydomonas*)とホヤ(*Ciona*)の外腕ダイニンのサブユニット構成の比較。クラミドモナスは3頭型(重鎖3つを含む)であるがホヤは2頭型(同、2つを含む)である。(Inaba, 2011 より引用) (B)プラナリア繊毛の横断面の電子顕微鏡像(図 2.3.5.1)と外腕ダイニン模式図。カラクシンおよび TXNDC3 の結合位置や外腕ダイニン 1 分子あたりの DC2 の数は不明である。Bar=50 nm



図 2.1.2.2 動物外腕ダイニン中間鎖 (IC) のドメイン構造。上はウニの外腕ダイニン中間鎖 IC1、下はヒトの外腕ダイニン中間鎖 TXNDC3 でそれぞれ Trx モチーフ (ピンク) が 1 つ、NDK モチーフが 3 つ (黄緑) 存在する。(King, 2017 を改変して引用)

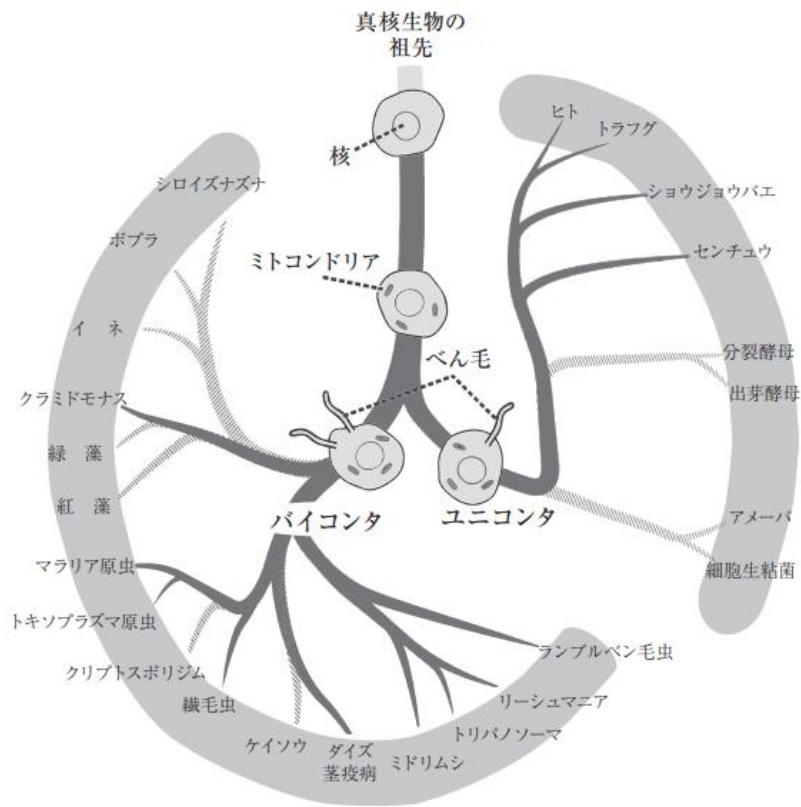


図 2.1.2.3 遺伝子配列のデータから調べた真核生物の系統樹。核を持った祖先型の単細胞生物が、真核生物の祖先と考えられている。初期に繊毛を1本持つユニコンタ（右側）と繊毛を2本持つバイコンタ（左側）に分岐し、前者は動物、後者は植物などに進化した。（上村慎治,2010より引用）

2.2 実験方法

2.2.1 プラナリア種と飼育条件

プラナリア *Schmidtea mediterranea* を用いた。培地は 1×solution of Montjuïc salts (1.6 mM NaCl, 1.0 mM CaCl₂, 1.0 mM MgSO₄, 0.1 mM MgCl₂, 0.1 mM KCl, 1.2 mM NaHCO₃; Cebria and Newmark, 2005) を使用した。フードコンテナに培地とプラナリアを入れ、インキュベーター内 25°C で暗黒下で飼育した。週に 1, 2 回、約 2~3 cm 角に切った牛のレバーを餌として与えた（その後取り除き、キムワイプで洗浄した）。レバーは -80°C で保存し、プラナリアに与える際、室温にて解凍した。

S. mediterranea は有性種だが、以下のように無性的に増殖させた。約 1 週間断食させた後（体内に餌がある状態で切断すると消化液によって死滅するため）、剃刀で 1 個体あたり 3-4 等分に切断し、その後 1 週間は毎日培地を交換して、再生しなかった個体を取り除いた。約 1 週間後、再生したプラナリアに通常時と同じく週に 1, 2 回餌を与えた。

2.2.2 RNA 抽出

プラナリア 2-3 個体を 2 ml チューブに入れ、培地を完全に除去した。1 ml TRIzol (Invitrogen) を入れ、プラナリア個体が完全に溶けるまで何度かピペッティングを行い 5 分間室温で静置した。その後 0.2 ml クロロホルムを添加、15 秒間チューブを転倒混和後 3 分間室温で静置した。11 krpm, 15 分室温で遠心分離した。上層を他のチューブに移し、そこに 0.5 ml イソプロパノールを加えピペッティングしたのち、10 分間室温で静置した。11 krpm, 10 分室温で遠心分離した。上清を除いた後ペレットに 0.5 ml 75% エタノールを添加後、7.5 krpm, 5 分室温で遠心分離した。上清を取り除きペレットを乾燥させたのち、0.05 ml DEPC 処理水に懸濁した。

2.2.3 cDNA 調製

2.2.2 で単離した RNA から、First strand cDNA キット (Invitrogen) を用いて cDNA を調製した。2.2.2 で単離した 2.2 µg RNA、Oligo dT 1 µl、dNTPs 2 µl、滅菌 milliQ 水を合計 12 µl になるよう混合し、65°C 5 分間加熱後氷上で冷やした。事前に準備した 8 µl mixed buffer (5×synthesis buffer 4 µl、0.1 M DTT 1 µl、RNase out 1 µl、DEPC 処理水 1 µl、AMV-RT (Avian Myeloblastosis Virus 由来の逆転写酵素) 1 µl) を加え 25°C 10 分、50°C 1 時間、85°C 5 分で加熱後、-20°C で保存した。PCR の際 3 µl 使用した。

2.2.4 RNA 干渉によるノックダウン

2.2.3 で得た cDNA を鋳型にし、標的タンパク質の cDNA 配列を Takara Ex Taq を用いて PCR 増幅し DNA セグメントを得た。遺伝情報はプラナリアの遺伝子データベース SmedGD (<http://smedgd.stowers.org/>)と PlanMine (<http://planmine.mpi-cbg.de/planmine/begin.do>)を使用した。プライマー情報は下記に示した。

使用した遺伝子番号とプライマー

・カラクシン

・ TXNDC3

・ DC2

dd_Smed_v6_4191_0_1

(reverse BlastP hits *Chlamydomonas* DC2 $7.75 \times e^{-35}$) (PlanMine)

F3 : GCGCTCTAGAGCGGGATCACCTAGAGAACG

R3 : GCGCCTCGAGGTGGCAGCGGATGAGTTTTC

制限酵素 XhoI と XbaI で処理した T7 プロモーターを 2 つ含む L4440 ベクターに PCR によって得られた DNA セグメントをライゲーションによって組み込んだ。大腸菌は HT115(DE3)に上記の DNA コンストラクトをエレクトロポレーション法によって導入し 0.5 ml SOC 培地+20 mM glucose で 1 時間 37°C 回復培養を行った後 LB 培地 (10 g Tryptone, 5 g Yeast Extract, 10 g NaCl and 10 ml of 1 M Tris (pH 7.5) with HCl per L) +0.1 mg/mL Ampicillin プレートにまき 37°C 終夜培養した。翌日得られたコロニーを拾い、2 ml LB 培地+50 mg/mL Ampicillin で前培養をオーバーナイト、37°Cで行った。その翌日、前培養した培養液 0.5 ml を 4.5 ml 2×YT 培地 (16 g tryptone, 10 g yeast extract, and 5 g NaCl per L) +0.1 mg/mL Ampicillin で 1 時間 37°C で培養した。その後 50 µl 100 mM IPTG を添加し、2-3 時間 37°C 培養した。2 ml 培養液を 10 krpm, 5 分室温で遠心分離し上清を除いた。もう一度同じ操作をし、培地を完全に取り除いた大腸菌ペレットを得た。

プラナリアをディッシュに移し、形質転換した大腸菌のペレットと 1 µl 程度の食用紅、50 µl レバーペーストをシリンジで混ぜたものを餌として与え、1-2 時間ほど放置した。赤く変色したプラナリアが餌を食べたものとみなしてフードコンテナーに移し、週 2 回の頻度で餌を与えて 2~3 週間飼育した。1 つの標的タンパク質に対して 20 個体を実験に使用した。

2.2.5 RT-PCR

2.2.4 で得たプラナリア個体に対し 2.2.2、2.2.3 の操作を行い cDNA を得た。これを鋳型として RT-PCR を行った。プライマーは 2.2.4 で使用したものを使い、酵素は Ex Taq を用いた。

2.2.6 プラナリアの移動様子の観察、移動速度の測定

9 cm のシャーレに 8-10 個体のプラナリアを入れ、上からプラナリアの移動様子を観察し、カメラ (USB 2.0 1024 × 768 pixel color camera (DFK31BU03.H, Charlotte)) で 1 分間動画を撮影した。

2.2.7 絨毛打観察

プレパラートに数滴の培地とともにプラナリアをのせ、潰れないようにカバーガラスをかぶせ絨毛打を観察した。絨毛打をカメラで動画撮影したものを ImageJ でキモグラフにし絨毛打頻度を求めた。カメラ X-PRI high speed CMOS camera (AOS Technologies AG) で 250 frames/s で高速度撮影した。

2.2.8 走査電子顕微鏡観察

プラナリアを 2 個体用いた。1 ml Relaxant Solution (1 % HNO₃, 0.85 % formaldehyde, 50 mM MgSO₄) 中で 1 時間室温で静置した後、溶液を交換し終夜処理した。ドラフト内でサンプルを回転させながら 1% glutaraldehyde + PBS で 10 分、15 分処理した。1% glutaraldehyde + 0.1 M Na cacodylate buffer で 50 分室温で処理した。1% osmium tetroxide + cacodylate buffer で 1 時間処理した後 3 回 0.1 M Na cacodylate buffer、3 回蒸留水でリンスした。1% methanolic uranyl acetate で 1 時間ブロック染色後、3-4 回蒸留水でリンスした。50% ethanol 10 分、75% ethanol 10 分、100% ethanol 10 分を 4 回処置することでサンプルを脱水させた。Epon resin で固め 60°C のオーブンで 48 時間包埋した。この試料を用いて走査電子顕微鏡 (JSM5900 (JEOL)) で絨毛の横断面を観察した。

2.2.9 透過電子顕微鏡観察

プラナリアを 2 個体用いた。1 ml Relaxant Solution (1 % HNO₃, 0.85 % formaldehyde, 50 mM MgSO₄) を 1 時間室温で静置した後溶液を交換しオーバーナイトで処理した。2.5 % glutaraldehyde + 0.1 M Na cacodylate buffer (pH 7.4) で 1.5 時間室温で処理した後 0.1 M Na cacodylate buffer でリンスした。1 % osmium tetroxide + cacodylate buffer で 1 時間処理した後 3 回 0.1 M Na cacodylate buffer、3 回蒸留水でリンスした。50% ethanol 10 分、75% ethanol 10 分、100% ethanol 10 分を 4 回処置することでサンプルを脱水させた。この試料を用いて透過電子顕微鏡 (H-7650 (Hitachi)) で腹部を観察した。

※2.2.8 走査電子顕微鏡、2.2.9 透過電子顕微鏡の操作はコネチカット大学ヘルスセンターの Maya Yankova 氏に委託した。

2.3 実験結果

2.3.1 RNA 干渉個体の RT-PCR による判別

本研究で機能解析を行う 3 つのダイニンサブユニットであるカラクシン (calaxin, cal と略す)、TXNDC3、DC2 の RNA 干渉用ベクターを導入した大腸菌を 4-5 回摂食した個体から、RT-PCR によってノックダウン個体を選別した。以後、RNA 干渉(interference)が確認できたプラナリアを *Smed-*(タンパク質名) (RNAi) と表す。Wild Type (wt) は通常のコメであるレバーのみを摂食した個体、Control は空ベクターを導入した大腸菌を摂食した個体をそれぞれ指す。RT-PCR のポジティブコントロール用の遺伝子として、全ての細胞で定常的に発現している actin、繊毛の周辺微小管構成要素で細胞質内の軸糸ダイニン重鎖の安定性に寄与する WDR92 (Patel-King et al., 2019)、繊毛外腕ダイニン中間鎖である IC2 の発現量をそれぞれ確認した。

RT-PCR の結果、*Smed-cal* (RNAi) と *Smed-dc2* (RNAi) において、それぞれカラクシンと DC2 の発現量の顕著な低下が見られた (図 2.3.1.1, 2)。これら 2 つの遺伝子については確かにノックダウンされた個体が得られたことがわかった。しかし、TXNDC3 の発現は Control でほとんど見られず、*Smed-txn3* (RNAi) ではむしろ発現量の増加が見られた (図.2.3.1.1)。これらのことから、予想に反して TXNDC3 は外腕ダイニンに常に存在するサブユニットではない可能性が示唆された。プラナリア個体は自切直後は無性能で、個体サイズが大きくなる数か月後に有性化する (Kobayashi et al., 2012)。RNA 干渉に用いたプラナリアは切って再生した直後のものを使用した。成熟段階に応じて繊毛の構成要素が変わる可能性を検討しなければならない。

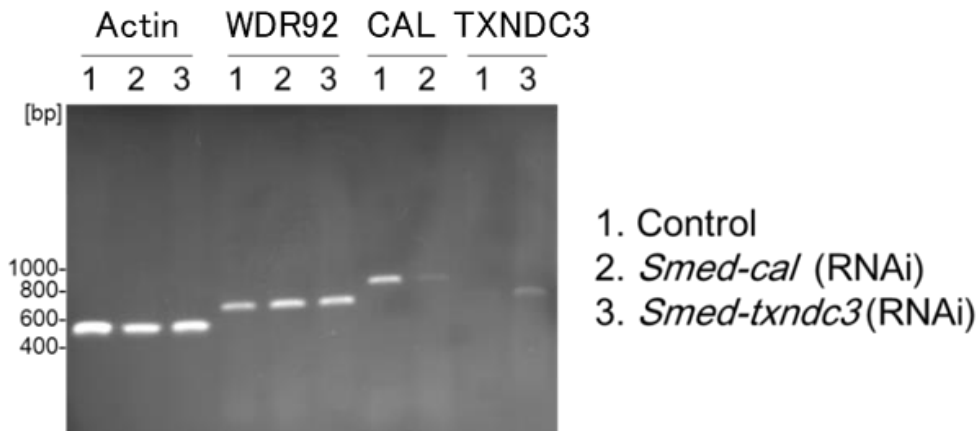


図 2.3.1.1 RT-PCR の結果 (カラクシン、TXNDC3)。Control、*Smed-cal* (RNAi)、*Smed-txnDC3* (RNAi)においてポジティブコントロールである actin、WDR92 の発現量が変わらないことを確認ができた。*Smed-cal* (RNAi)はカラクシンの発現量の顕著な低下が見られた。*Smed-txnDC3* (RNAi)は TXNDC3 の発現量の増加が見られた。

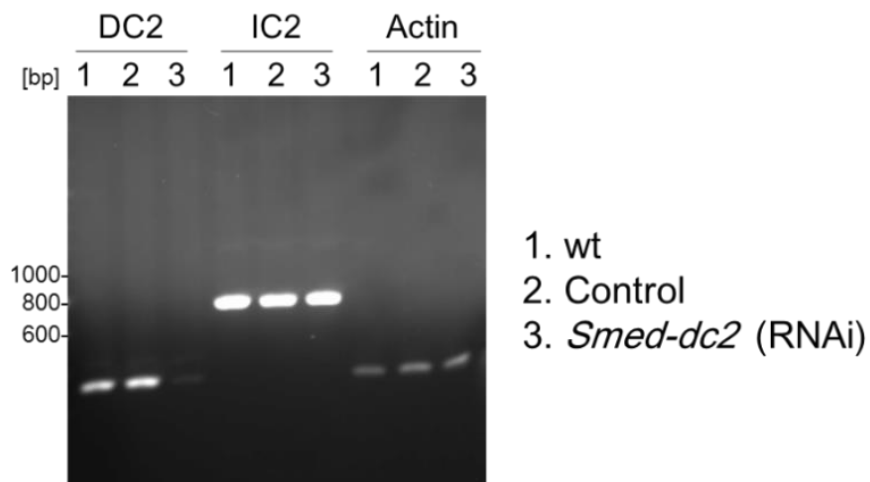


図 2.3.1.2 RT-PCR の結果 (DC2)。 *Smed-dc2* (RNAi)において DC2 の発現量の顕著な低下が見られた。Control、*Smed-dc2* (RNAi)においてポジティブコントロールである IC2、Actin の発現量が変わらないことを確認ができた。

2.3.2 ノックダウン個体の運動の観察

2.1.1 で述べたように、繊毛の機能不全はプラナリアの運動様式を滑走から蠕動運動に変える (Rompolas et al., 2010)。今回選んだ外腕ダイニンサブユニットの RNA 干渉がプラナリアの運動に及ぼす影響を調べるため、ノックダウン個体の運動様式を観察した。

Smed-dc2 (RNAi) は蠕動運動をした(図 2.3.2.1)。DC2 のノックダウンが繊毛の形成もしくは運動を阻害したと考えられる。一方、*Smed-txndc3* (RNAi) と *Smed-cal* (RNAi) は Control と同様の滑走運動を行った。これらの個体の運動をさらに詳しく解析した。

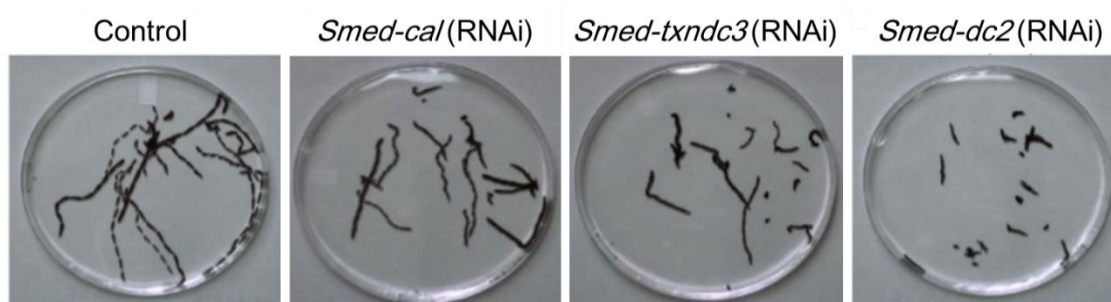


図 2.3.2.1 トラッキング画像。長い距離を滑走する Control と比べ、*Smed-cal* (RNAi) と *Smed-txndc3* (RNAi) はやや短い距離を滑走、*Smed-dc2* (RNAi) はほぼ動いていないことがわかった。15 fps で撮影し、50 フレームごとの画像を 30 秒間分重ね合わせた。

2.3.3 移動速度の測定

図 2.3.2.1 のデータを用いて、移動速度を算出した (図 2.3.3.1)。その結果、Control 個体に比べ、*Smed-cal* (RNAi) は約 40%、*Smed-txndc3* (RNAi) は約 30%、*Smed-dc2* (RNAi) は約 80% 速度低下していることがわかった。

カラクシンのノックダウン個体は運動様式には変化がなかったが、移動速度が低下していた。このことから、カラクシンの欠損は蠕動運動を促すほどの繊毛運動阻害は起こさないが、繊毛の屈曲に何らかの影響を与えていると考えられる。TXNDC3 は前述の通り通常ほとんど発現していない。RNA 干渉により却って発現量が増加した個体において移動速度が低下しているのは意外であった。

ノックダウン実験のポジティブコントロール用に選出した DC2 のノックダウン個体が確かに最も顕著な表現型を呈した。そのため、本来の目的からは離れるが、この個体についてより詳しく解析を行うことにした。

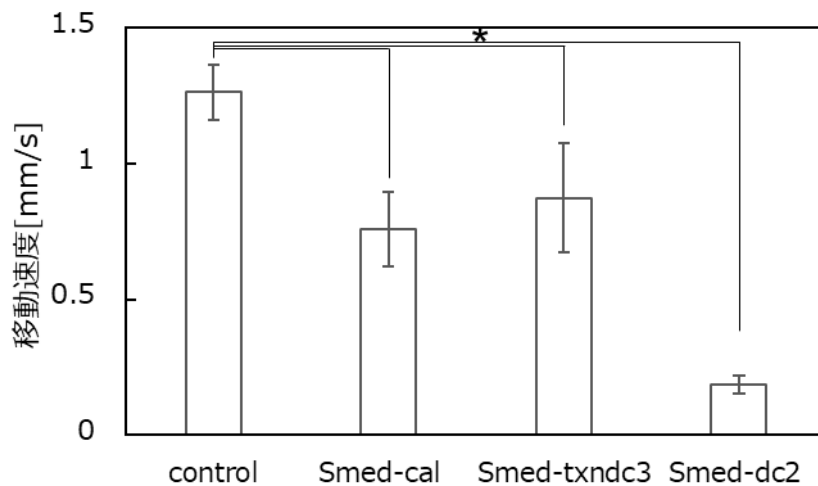


図 2.3.3.1 プラナリアの移動速度 (n=5)。Control 個体に比べ、*Smed-cal* (RNAi) は約 40%、*Smed-txndc3* (RNAi) は約 30%、*Smed-dc2* (RNAi) は約 80% 遅く移動していることがわかった。Student-test *: $p < 0.01$

2.3.4 繊毛打様式と繊毛打頻度

Smed-dc2 (RNAi)で劇的に移動速度が低下した原因を探るため、繊毛打を微分干渉顕微鏡で高速度観察した。Controlの繊毛は大きな屈曲で打ち、かつ隣り合う繊毛が少しずつ位相をずらして波打つことによって作られる、いわゆるメタクロナル波が見られた(図 2.3.4.1)。メタクロナル波の形成は効率的な流れの創出に寄与すると考えられている(Okamoto and Nakaoka, 1994)。一方で、*Smed-dc2* (RNAi)は屈曲が小さく、Controlのようなメタクロナル波は見られなかった。

次に、繊毛打頻度を計測した。同一の繊毛の運動の様子を一定時間ごとに撮影して並べたキモグラフを用いて、同一波形を呈する間の時間を測定することによって繊毛打頻度を測定すると、Controlが19 Hzであるのに対し、*Smed-dc2* (RNAi)は13 Hzと低い値を示した(図 2.3.4.2)。*Smed-dc2* (RNAi)の移動速度が低下した原因は繊毛打頻度の低下と、メタクロナル波の形成不全だと分かった。クラミドモナス外腕ダイニン欠損株では繊毛打頻度が野生株の1/3程度に低下することがわかっている(Kamiya, 1988)。プラナリアにおいても、外腕ダイニンの周辺微小管への結合に介在すると予想されるDC2のノックダウンによって、外腕ダイニンの形成が阻害されたことが示唆された。

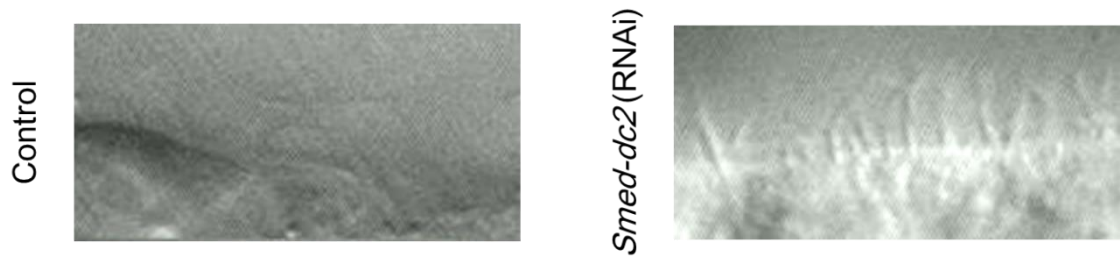


図 2.3.4.1 繊毛の打つ様子。Control の繊毛は大きな屈曲で打ち、メタクロール波が見られた。Smed-dc2 (RNAi) は屈曲が小さく、個々の繊毛が無秩序に打っていた。250 frames/s で撮影。

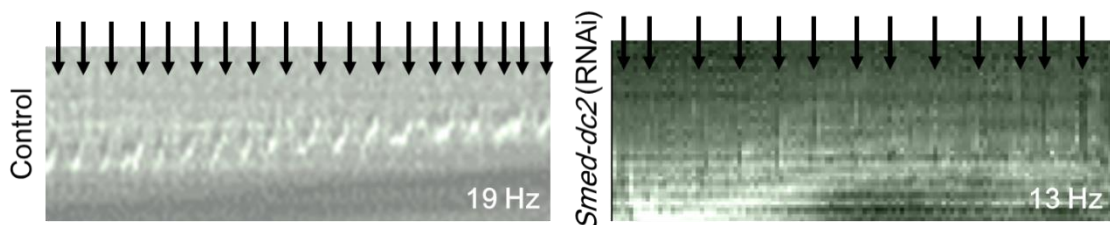


図 2.3.4.2 図 2.3.4.1 のデータから得たキモグラフ。横軸は時間(1 秒)を示す。同一の繊毛の運動の様子を一定時間ごとに並べた。同一波形を呈するまでの時間を測定することによって繊毛打頻度を測定した。上の黒矢印は繊毛が 1 回打ったことを表し、矢印の数を数えることで繊毛打頻度を数値化できる。Control に比べ Smed-dc2 (RNAi) は低い繊毛打頻度を示した。

2.3.5 繊毛横断面の透過電子顕微鏡観察

Smed-dc2 (RNAi)の表現型から、外腕ダイニンの欠損が示唆された。これを確かめるために、繊毛横断面を透過電子顕微鏡で観察した。*Smed-dc2* (RNAi)の繊毛は多くの周辺微小管上に外腕ダイニンの欠損が見られた(図 2.3.5.1)。周辺微小管あたりの外腕ダイニン形成率を算出したところ、Controlが100% (N=37)であったのに対し、*Smed-dc2* (RNAi)は21% (N=38)と低い値を示した。DC2はクラミドモナスにおいてDC1, DC3とともに外腕ダイニンドッキング複合体を形成し、外腕ダイニンが周辺微小管の特定箇所強い結合親和性で結合することに寄与していることが示されている(Takada and Kamiya, 1994; Takada et al., 2002)。この結果から、プラナリアにおいてもDC2の機能は保存されており、DC2の欠損は外腕ダイニンの構築不全を促すことが分かった。

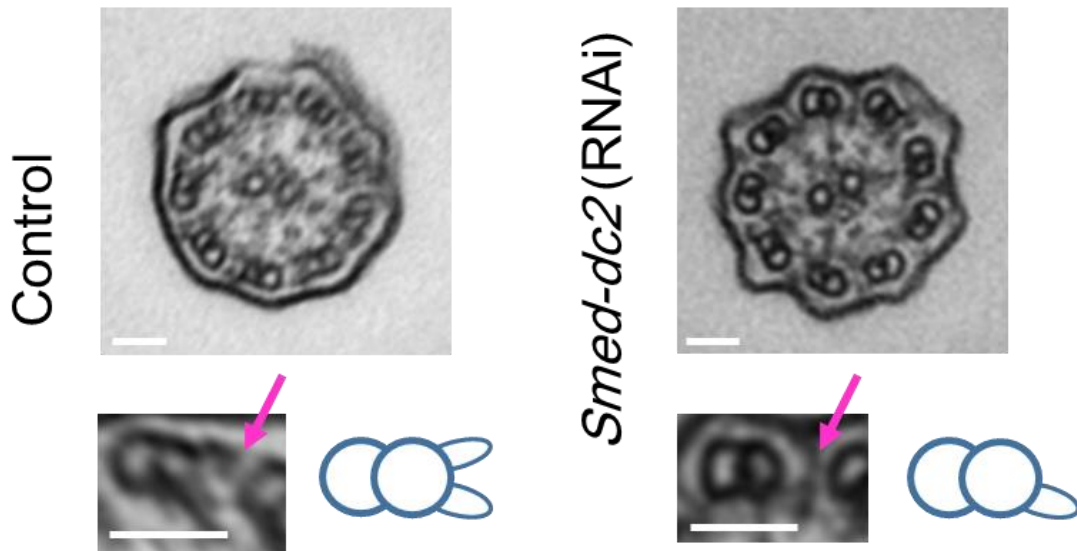


図 2.3.5.1 繊毛横断面の透過電顕像。左下の図は周辺微小管の拡大図、ピンクの矢印は外腕ダイニンの位置を示す。右下の図は左下の図の模式図である。Controlは全ての周辺微小管に外腕ダイニンの存在が確認できたが *Smed-dc2* (RNAi)は9つのうち6つの外腕ダイニンの欠損があった。Bar=50 nm

2.3.6 プラナリア腹部の走査電子顕微鏡観察

最後に、*Smed-dc2* (RNAi)の移動運動速度低下が、繊毛の運動不全だけによるのか、それとも繊毛の形成にも異常があるかを検証するために、走査電子顕微鏡(SEM)観察を行った。*Smed-dc2* (RNAi)はControlと比べて繊毛の量が減少し、短い繊毛が混在していた(図 2.3.6.1)。クラミドモナスのDC2欠損株 *oda1* では繊毛打頻度は低下するが、繊毛の本数や長さには異常を呈さない(Kamiya, 1988; Takada et al., 2002)。この結果は、プラナリアにおけるDC2は、外腕ダイニンの形成以外に、繊毛の形成、繊毛長の維持などにも重要な働きを持つことを示唆している。

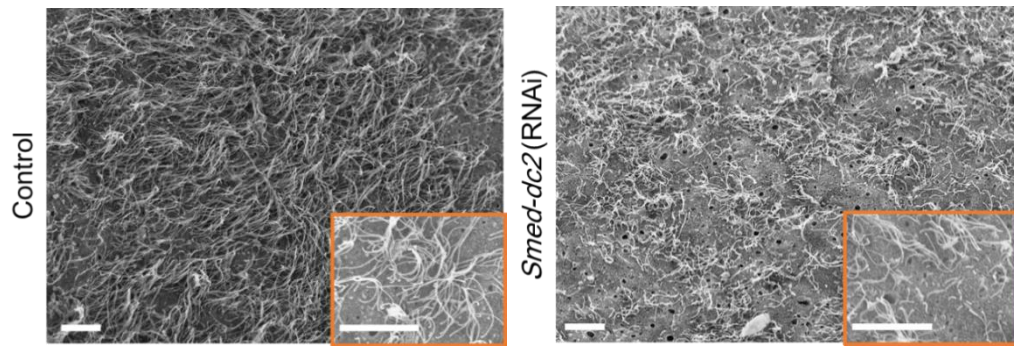


図 2.3.6.1 プラナリア腹部の走査電顕像。左の Control と比べ右の *Smed-dc2* (RNAi)は繊毛の量が減少し、短い繊毛が混在していた。Bar= 10 μ m

2.4 考察

2.4.1 カルシウムイオン結合タンパク質カラクシンの機能

カラクシンは精子の軸糸ダイニンをカルシウムイオン依存的に調節するタンパク質である。ヒトやウニ、ホヤなど動く鞭毛や繊毛を持つ動物において広く保存されている(Mizuno et al., 2012; Inaba, 2015)。 *Smed-cal* (RNAi)は Control と比べて移動速度が約 40%低下していたにもかかわらず、繊毛異常個体に特徴的な蠕動運動を行わなかった。移動速度の低下は繊毛運動異常の 1 つの指標ではあるが、このことが蠕動運動への運動様式変換を必ずしも促すわけではないことがわかった。蠕動運動への変換がおきる滑走運動低下には一定の閾値があり、40%の低下はその閾値以下であると考えられる。

ウニのカラクシンノックダウン胚を用いた研究で、繊毛打頻度は高いものの、繊毛打の屈曲が小さく、かつ繊毛が打つ方向がバラバラで、個体として効率的な前進遊泳が行えないことがわかった(Mizuno et al., 2017)。 *Smed-cal* (RNAi)においても同様のことが起きていた可能性がある。しかし、定常状態の細胞内カルシウムイオン濃度は低く、カラクシンが常に機能していることは考えにくい。カラクシン欠損が繊毛波形の振幅低下と運動方向のランダム化を促すメカニズムは今後の課題である。

2.4.2 酸化還元タンパク質 TXNDC3 の機能

2.3.1 で示したように、TXNDC3 は発現がほぼ見られなかった。クラミドモナスの外腕ダイニン軽鎖 LC3 や LC5、ウニの外腕ダイニン中間鎖 IC1 と異なり、プラナリアの TXNDC3 は外腕ダイニンの化学量論的(stoichiometric)なサブユニットではない可能性がある。そもそも発現していなかったため「ノックダウン」ができず、詳しい解析を行わなかったが、発現量が増加すると移動速度が 30%減少するという結果は興味深い。

クラミドモナスにおいて、細胞内の活性酸素種(ROS)の量に応じて繊毛打頻度の変動することが知られている(Wakabayashi and King, 2006)。基本的には ROS が多いと低く、少ないと高くなるが、ROS 消去剤を大量に添加することによっても繊毛打頻度は低下する。TXNDC3 が細胞内で典型的な Trx のように還元因子として機能するのか、それとも第 3 章で述べる非典型的な Trx のように酸化因子として機能するのかにも依るが、TXNDC3 の発現量上昇が細胞内 ROS 蓄積量の上昇もしくは極端な低下を促し、そのことか繊毛打頻度を低下させている可能性がある。

2.4.3 外腕ダイニンの微小管への結合に介在するタンパク質 DC2

2.3.3~6 の結果から、 *Smed-dc2* (RNAi)は Control と比べて、外腕ダイニン形成率の低下、鞭毛打頻度の低下、繊毛量の減少、短い繊毛の混在という多くの表

現型が得られた。周辺微小管あたりの外腕ダイニン形成率が 0% にならなかったのは、RNA 干渉の効率が 100% ではなかったからだと考えられる（図 2.3.1.2）。

先述したように、外腕ダイニン単独の欠損が繊毛形成や繊毛長に影響を与えるという報告は、クラミドモナスに限らずこれまででない。一方で、外腕ダイニンといくつかの内腕ダイニンを同時に欠損したクラミドモナス株 *pf22* の繊毛は非運動性であると同時に繊毛が短くなる(Mitchison et al., 2012)。ヒト PF22 相同遺伝子を欠損した繊毛病患者にも同様の繊毛表現型が見られる(Mitchison et al., 2012)。このことから、大量のダイニン欠損が繊毛形成能を低下させる可能性はあり、プラナリアにおいては外腕ダイニン欠損だけでも同様の表現型が現れたのかもしれない。ダイニン形成と繊毛形成の連関のメカニズムについては今後の課題である。

2.4.4 繊毛研究の実験生物としてのプラナリアの欠点

プラナリアはノックダウンが容易という大きな利点はあるが、繊毛単離法が確立していないため、繊毛やダイニンの生化学的研究には向かない。そのため、外腕ダイニンのサブユニット構成などの基本的な知識については不明な点が多くある。今回のように遺伝子の相同性だけに依拠したノックダウン実験によって繊毛運動調節機構の理解を目指すのは、TXNDC3 の実験結果からも分かるように限界があるということが判明した。

そこで、クラミドモナスで逆遺伝学的手法を可能にするために始まったミュータントのライブラリー化プロジェクトである米国の *Chlamydomonas Library Project* やそれと同様の京都大学・福澤秀哉研究室で始まったプロジェクトを利用して、クラミドモナスにおいてノックアウト実験を行うこととした（第 4 章）。

第3章 緑藻クラミドモナスの 外腕ダイニンサブユニットの 生化学的機能解析

3.1 本章の概要

第3章では緑藻クラミドモナスの Trx 様外腕ダイニン軽鎖 LC3 と LC5 の機能解析のため、まず生化学的な手法を用いて中点酸化還元電位測定することとした。酸化還元タンパク質の中点酸化還元電位は、還元状態のタンパク質と酸化状態のそれが 1 : 1 の割合で存在するとき、電子の授受に際して生じる電位である。得られた数値から、そのタンパク質の生理的 pH における電子の放出しやすさ・受け取りやすさを判定することができる。LC3 と LC5 について中点酸化還元電位を測定し、研究が進んでいる葉緑体型 Trx やその標的タンパク質の中点酸化還元電位と比較することで、LC3 と LC5 の生体内での機能を予測することができると考えた。

本研究では酸化還元電位の測定を LC3 と LC5 を組換えタンパク質として調製し、既知の酸化還元電位の溶液中におけるそれらの酸化還元状態を判定して中点酸化還元電位を同定した。

第4章 緑藻クラミドモナスの 外腕ダイニンサブユニットの 生理学的機能解析

4.1 本章の概要

本章では、CLiPに準じた方法で単離された緑藻クラミドモナスの Trx 様外腕ダイニンサブユニット LC3、LC5 欠損株、CLiP から得られた LC3 欠損株を用いた運動性、光行動の表現型解析から、LC3 と LC5 の生理機能解明を目指した実験について記す。

さらに、外腕ダイニンの活性調節に寄与すると考えられるもう 1 つの軽鎖、カルシウムイオン結合タンパク質 LC4 について、CRISPR/Cas9 を用いた手法で欠損株を得ることができた。CLiP から得られた LC4 欠損株も同時に用い、これらについて光行動の表現型解析を行った結果を記した。

第 5 章 総括

5.1 まとめ

本研究では、Trx 型外腕ダイニンサブユニットとしてプラナリア TXNDC3, クラミドモナス LC3, LC5、カルシウム結合型外腕ダイニンサブユニットとしてプラナリアのカラクシン、クラミドモナスの LC4 をそれぞれノックダウンまたはノックアウトした株を用い、運動性解析によってそれぞれの生理的機能の解析を目指した。また、プラナリアにおけるノックダウン実験のコントロールとして、ドッキング複合体サブユニット DC2 ノックダウン株の表現型解析を行った。平行して、クラミドモナス LC3, LC5 の中点酸化還元電位測定からその機能を予想した。以下に、それぞれのタイプの外腕ダイニンサブユニットの機能について考察した。

引用文献

- Berg C. H. (1975). Chemotaxis in bacteria. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 4(00):119-36.
- Bessen M., Fay B. R., and Witman B. G. (1980). Calcium Control of Waveform in Isolated Flagellar Axonemes of *Chlamydomonas* 446. *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY*, 86:446-45.
- Beehler J.C., Ely E.M., Rutledge S.M., Simchuk L.M., Reiss K.O., Shanley F.P. and Repine J. E. (1994). Toxic effects of dimethylthiourea in rats. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 123(1), 73-80.
- Boyden S.E., Zhang F., Bamberg E., Nagel G. and Deisseroth K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neuroscience*, 8(9), 1263-8.
- Bui H. K., Sakakibara H., Movassagh T., Oiwa K. and Ishikawa T. (2009). Asymmetry of inner dynein arms and inter-doublet links in *Chlamydomonas* flagella. *Journal of Cell Biology*, 186 (3):437–446.
- Casey M. D., Yagi T., Kamiya R. and Witman B. G. (2003). DC3, the smallest subunit of the *Chlamydomonas* flagellar outer dynein arm-docking complex, is a redox-sensitive calcium-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 24;278(43):42652-9.
- Cebria F., and Newmark A.P. (2005). Planarian homologs of netrin and netrin receptor are required for proper regeneration of the central nervous system and the maintenance of nervous system architecture. *Development*, 132(16):3691–3703.
- Ceter P. A. and Cho C., Jin L. and Vale D. R. (2021). Crystal structure of the dynein motor domain. *Science*, 4;331(6021):1159-65.
- Choudhary K.S., Baskaran A. and Sharma P. (2019). Reentrant Efficiency of Phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii* Cells. *Biophysical Journal*, 117(8):1508-1513.
- Duquesnoy P., Escudier E., Vincensini L., Freshour J., Bridoux A., Coste A., Deschildre A., J.... and Amselem S. (2009). Loss-of-Function Mutations in the Human Ortholog of *Chlamydomonas reinhardtii* ODA7 Disrupt Dynein Arm Assembly and

Cause Primary Ciliary Dyskinesia. *The American Journal of Human Genetics*, 85(6):890–896.

Fan Y., Xie L. and Chung Y. C. (2017). Signaling Pathways Controlling Microglia Chemotaxis. *Molecules and Cells*, 40(3):163-168.

Forti G., Furia A., Bombelli P. and Finazzi G. (2003). In vivo changes of the oxidation-reduction state of NADP and of the ATP/ADP cellular ratio linked to the photosynthetic activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 132(3):1464–1474.

Foster W. K. and Smyth D. R. (1980). Light antennas in phototactic algae. *Microbiological Review*, 44(4): 572-630.

Fujiu K., Nakayama Y., Yanagisawa A., Sokabe M. and Yoshimura, K. (2009). *Chlamydomonas* CAV2 encodes a voltage-dependent calcium channel required for the flagellar waveform conversion. *Current Biology*, 19(2):133-139.

Garcia-Cohen C. E., Marin J., Diez-Picazo D. L., Baena B. A., Salices M. and Rodriguez-Martinez A. M. (2000). Oxidative Stress Induced by tert-Butyl Hydroperoxide Causes Vasoconstriction in the Aorta from Hypertensive and Aged Rats: Role of Cyclooxygenase-2 Isoform. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 293(1):75-81.

Gibbon R. I. (1965). AN EFFECT OF ADENOSINE TRIPHOSPHATE ON THE LIGHT SCATTERED BY SUSPENSIONS OF CILIA. *Journal of Cell Biology*, 26(3):707-12.

Girard R P. and Kennedy R. J. (1986). Calcium regulation of ciliary activity in rabbit tracheal epithelial explants and outgrowth. *European Journal of Cell Biology*, 40(2):203–209.

Greiner A., Kelterborn S., Evers H., Kreimer G., Sizova I. and Hegemann P. (2017). Targeting of Photoreceptor Genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via Zinc-Finger Nucleases and CRISPR/Cas9. *The Plant Cell*, 29(10):2498–2518.

Gumpel J. N. Rochaix D. J. and Purton S. (1994). Studies on homologous recombination in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet*, 26(5-6):438-42.

Hanson T. G., Aggeler R., Oglesbee D., Cannon M., Capaldi A. R., Tsien Y.R. and Remington, S. J. (2004). Investigating Mitochondrial Redox Potential with Redox-

sensitive Green Fluorescent Protein Indicators. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13):13044–13053.

Hirasawa M, Schürmann P, Jacquot J-P, Manieri W, Jacquot P, Keryer E, Hartman C. F. and Knaff B. D. (1999). Oxidation-reduction properties of chloroplast thioredoxins, ferredoxin:thioredoxin reductase, and thioredoxin f-regulated enzymes. *Biochemistry*, 38(16):5200–5205.

Horling F., Lamkemeyer P., König J., Finkemeier I, Kandlbinder A, Baier M, and Dietz K.M. (2003). Divergent Light-, Ascorbate-, and Oxidative Stress-Dependent Regulation of Expression of the Peroxiredoxin Gene Family in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 131(1):317–325.

Hozumi A., Satouh Y., Makino Y., Toda T., Ide H., Ogawa K. King M. S. and Inaba K. (2006). Molecular Characterization of Ciona Sperm Outer Arm Dynein Reveals Multiple Components Related to Outer Arm Docking Complex Protein 2. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 63(10):591–603.

Hutchison S. R. and Ort R. D. (1995). Measurement of equilibrium midpoint potentials of thiol/disulfide regulatory groups on thioredoxin-activated chloroplast enzymes. *Methods in Enzymology*, 252:220-228.

Hyams S.J. and Borisy G. G. (1978). Isolated flagellar apparatus of Chlamydomonas: characterization of forward swimming and alteration of waveform and reversal of motion by calcium ions in vitro. *Journal of Cell Science*, 33(1):235-253.

Ichikawa M., Saito K., Yanagisawa H., Yagi T., Kamiya R., Yamagushi S., Yajima J., Kushida Y., Nakano K., Numata O. and Toshima Y. (2015). Axonemal dynein light chain-1 locates at the microtubule-binding domain of the γ heavy chain. *Molecular Biology of the Cell*, 26(23):4236-4247.

Inaba K. (2011). Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Molecular Human Reproduction*, 17(8):524–538.

Inaba K. (2015). Calcium sensors of ciliary outer arm dynein: functions and phylogenetic considerations for eukaryotic evolution. *Cilia* 4:6.

Ishibashi K., Sakakibara H. and Oiwa K. (2020). Force-generating mechanism of axonemal dynein in solo and ensemble. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8):2843.

Kamiya R. (1988). Mutations at twelve independent loci result in absence of outer dynein arms in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of cell biology* 107(6 Pt 1):2253-8.

Kamiya R. (1995). Exploring the function of inner and outer dynein arms with *Chlamydomonas* mutants. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 32(2):98-102.

Kamiya R. (2000). Analysis of cell vibration for assessing axonemal motility in *Chlamydomonas*. *Methods*, 22(4):383-387.

Kamiya R. and Okamoto M. (1985). A mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* that lacks the flagellar outer dynein arm but can swim. *Journal of Cell Science*, 74 (1):181–191.

Kamiya R. and Witman B. G. (1984). Submicromolar levels of calcium control the balance of beating between the two flagella in demembrated models of *Chlamydomonas*. *Journal of cell biology*, 98: 97–107.

Kamiya R. and Yagi T. (2014). Functional Diversity of Axonemal Dyneins as Assessed by in Vitro and in Vivo Motility Assays of *Chlamydomonas* Mutants. *Zoological Science*, 31(10):633-644.

Kang Z., Qin T. and Zhao Z. (2019). Thioredoxins and thioredoxin reductase in chloroplasts: A review. *Gene*. 706:32-42.

King M. S. and Patel-King S.R. (1995). Identification of a Ca²⁺-binding light chain within *Chlamydomonas* outer arm dynein. *Journal of Cell Science*, 108(12):3757–3764.

King M. S. and Patel-King S. R. (2016). Planaria as a Model System for the Analysis of Ciliary Assembly and Motility. *Methods in Molecular Biology*, 1454:245-54.

King M. S. (2017). *Dyneins* 2nd edition Volume 1.

Kobayashi K., Maezawa T., Nakagawa H., Hoshi M. (2012). Existence of Two Sexual Races in the Planarian Species Switching between Asexual and Sexual Reproduction. *Zoological Science*, 29(4):265-272.

Krimm I, Lemaire S, Ruelland E, Miginiac-Maslow M, Jacquot J., Hirazawa M, Knaff B. D. and Lancelin J. (1998). The single mutation Trp35→Ala in the 35-40 redox site of *Chlamydomonas reinhardtii* thioredoxin h affects its biochemical activity and the pH dependence of C36-C39 1H-13C NMR. *European Journal of Biochemistry*, 255(1):185-195.

Kubo S., Yang K. S., Black S. C., Dai D., Valente-Paterno M., Gaertig J., Ichikawa M. and Bui H. K. (2021). Remodeling and activation mechanisms of outer arm dyneins revealed by cryo-EM. *EMBO Reports*, 22(9):e52911

Li B. J., Gerdes M. J., Haycraft J. C., Fan Y., Teslovich, M. T., May-Simera, H. ... and Dutcher K. S. (2004). Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. *Cell*, 117(4):541-552.

Li X., Zhang R., Patena W., Gang S. S., Blum R. S, Ivanova N., Yue R., Robertson M. J., Lefebvre A. P., Fitz-Gibbon T. S., Grossman R. A. and Jonikas C. M. (2016). An Indexed, Mapped Mutant Library Enables Reverse Genetics Studies of Biological Processes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 28(2):367-387.

Li X., Zhang R., Patena W., Gang S. S., Blum R. S, Ivanova N., Yue R., Robertson M. J., Lefebvre A. P., Fitz-Gibbon T. S., Grossman R. A. and Jonikas C. M. (2019). A genome-wide algal mutant library and functional screen identifies genes required for eukaryotic photosynthesis. *Nature Genetics*, 51:627–635.

Marshall F.W. and Nonaka S. (2006). Cilia: tuning in to the cell's antenna. *Current Biology*. 16(15):R604-14.

Mitchison M. H., Schmidts M., Loges T. N., Freshour J., Dritsoula A., Hirst A. R., O'Callaghan, C., Blau H., Dabbagh A. M., Olbrich H., Beales L. P., Yagi T., Mussaffi H., Chung K.M. E, Omran H., and Mitchell R. D. (2012). Mutations in axonemal dynein assembly factor DNAAF3 cause primary ciliary dyskinesia. *Nature Genetics*, 44:381-389

Mizuno K., Shiba K., Okai M., Takahashi Y., Shitaka Y., Oiwa K., Tanokura M. and Inaba K. (2012). Calaxin drives sperm chemotaxis by Ca²⁺-mediated direct modulation of a dynein motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:20497–20502.

Mizuno K., Shiba K., Yaguchi J., Shibata D., Yaguchi S., Prulière G., Chenevert C. and Inaba K. (2017). Calaxin establishes basal body orientation and coordinates movement of monocilia in sea urchin embryos. *Scientific Reports*, 7:10751.

Mohammadi F., Soltani A., Ghahremanloo A., Javid H. and Hashemy S. (2019). The thioredoxin system and cancer therapy: a review. *Cancer Chemother Pharmacology*, 84(5):925-935.

- Nagel G., Ollig D., Fuhrmann M., Kateriya S., Musti A. M., Bamberg E., and Hegemann P. (2002). Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science*, 296(5577):2395-8.
- Nagel G., Szellas T., Huhn W., Kateriya S., Adeishvili N., Berthold P., ... and Bamberg E. (2003). Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24):13940-13945.
- Neupert J., Gallaher D. S., Lu Y., Strenkert D., Segal N., Barahimipour R., Fitz-Gibbon T. S., Schroda M., Merchant S. S. and Bock R. (2020). An epigenetic gene silencing pathway selectively acting on transgenic DNA in the green alga *Chlamydomonas*. *Nature Communications*, 11(1):6269.
- Neuwald F. A., Aravind, L., Spouge L. J., and Koonin, V. E. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Research*, 9(1):27-43.
- Ogawa K., Takai H., Yokota E., Shimizu T. Inaba K. and Mori H. (1996). Is outer arm dynein intermediate chain 1 multifunctional? *Molecular Biology of the Cell*, 7(12):1895-907.
- Okamoto K. and Nakaoka Y. (1994). Reconstitution of Metachronal Waves in Ciliated Cortical Sheets of Paramecium: II. Asymmetry of the Ciliary Movements. *Journal of Experimental Biology*, 192(1);73-81.
- Patel-King S. R., Benashki E. S., Harrison A. and King M. S. (1996). Two Functional Thioredoxins Containing Redox-sensitive Vicinal Dithiols from the *Chlamydomonas* Outer Dynein Arm. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(11):6283–6291.
- Patel-King S.R., Sakato-Antoku M., Yankova M., King M. S. (2019). WDR92 is required for axonemal dynein heavy chain stability in cytoplasm. *Molecular Biology of the Cell*, 15;30(15):1834-1845.
- Pazour J. G., Dickert L. B., Vucica Y., Seeley S. E., Rosenbaum L.J., Witman B. G. and Cole G. D. (2000). *Chlamydomonas* IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene *tg737*, are required for assembly of cilia and flagella. *The Journal of cell biology*, 151(3):709-718.
- Pazour J. G., Agrin N., Leszyk J. and Witman B. G. (2005). Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *The Journal of cell biology*, 170(1):103–113.

Pennarun G., Escudier E., Chapelin C., Bridoux M. A., Cacheux V., Roger G., Clement A., Goossens M., Amselem S. and Duriez B. (1999). Loss-of-Function Mutations in a Human Gene Related to *Chlamydomonas reinhardtii* Dynein IC78 Result in Primary Ciliary Dyskinesia. *The American Journal of Human Genetics*, 65(6):1508–1519.

Raghavendra S. A. and Padmasree K. (2003). Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends Plant Science* 8(11):546–553.

Rao O., Han L., Wang Y., Chai P., Kuo Y., Yang R., Hu F., Yang Y. Howard J. and Zhang K. (2021). Structures of outer-arm dynein array on microtubule doublet reveal a motor coordination mechanism. *Nature Structural and Molecular Biology*. 28(10):799–810.

Reck-Peterson L. S., Redwine B. William, Vale D. R. and Certer P. A. (2018). The cytoplasmic dynein transport machinery and its many cargoes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(6):382-398.

Rompolas P, Patel-King S. R. and King M. S. (2010). An Outer Arm Dynein Conformational Switch Is Required for Metachronal Synchrony of Motile Cilia in Planaria. *Molecular Biology of the Cell*, 21(21):3669–3679.

Sakakibara H., Mitchell R. D. and Kamiya R. (1991). A *Chlamydomonas* outer arm dynein mutant missing the alpha heavy chain. *Journal of Cell Biology*, 113(3):615-22.

Sakato M., Sakakibara H. and King. M. S. (2007). *Chlamydomonas* outer arm dynein alters conformation in response to Ca²⁺, *Molecular Biology of the Cell*, 18(9):3620–3634.

Schroda M. (2019). Good News for Nuclear Transgene Expression in *Chlamydomonas*. *Cells*, 28;8(12):1534.

Shiba K., Baba A. S., Inoue T., Yoshida M. (2008). Ca²⁺ bursts occur around a local minimal concentration of attractant and trigger sperm chemotactic response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(49):19312–19317.

Sugiura K., Nishimaki Y., Owa M., Hisabori T., Wakabayashi K. (2018) Assessment of the flagellar redox potential in *Chlamydomonas reinhardtii* using a redox-sensitive fluorescent protein, Oba-Qc. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 503(3):2083-2088.

Takada S. and Kamiya R. (1994). Functional reconstitution of Chlamydomonas outer dynein arms from alpha-beta and gamma subunits: requirement of a third factor. *Journal of Cell Biology*, 126(3):737-45.

Takaba H., Matsuda E., Nair N. B. and Nakao S. (2002). Molecular modeling of gas permeation through an amorphous microporous silica membrane. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 35(12).

Takao D., Dishinger F. J., Kee L. H., Pinsky M. J., Allen L. B. and Verhey J. K. (2014). An assay for clogging the ciliary pore complex distinguishes mechanisms of cytosolic and membrane protein entry. *Current Biology*, 24(19): 2288–2294.

Wada Y., Mogami Y. and Baba S. (1997). Modification of ciliary beating in sea urchin larvae induced by neurotransmitters: Beat-plane rotation and control of frequency fluctuation. *Journal of Experimental Biology*, 200(Pt 1):9–18.

Wakabayashi K. and King M. S. (2006). Modulation of Chlamydomonas reinhardtii flagellar motility by redox poise. *The Journal of cell biology*, 173(5): 743–754.

Wakabayashi K., Misawa Y., Mochiji S. and Kamiya R. (2011). Reduction-oxidation poise regulates the sign of phototaxis in Chlamydomonas reinhardtii. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(27):11280–11284.

Whitesides M. G., Lilburn E. J. and Szajewski P. R. (1997). Rates of thiol-disulfide interchange reactions between mono- and dithiols and Ellman's reagent. *The Journal of Organic Chemistry*, 42:332-338.

Witman B. G. (1986). Isolation of Chlamydomonas flagella and flagellar axonemes. *Methods in Enzymology*, 134:280-90.

Yamano T., Iguchi H., and Fukuzawa H. (2013). Rapid transformation of Chlamydomonas reinhardtii without cell-wall removal. *Journal of bioscience and bioengineering*, 115(6):691-694.

Yoshida K., Hara S. and Hisabori T. (2015). Thioredoxin Selectivity for Thiol-based Redox Regulation of Target Proteins in Chloroplasts. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 290(23):14278-14288.

Yoshida K., Hara A., Sugiura K., Fukaya Y., Hisabori T. (2018). Thioredoxin-like2/2-Cys peroxiredoxin redox cascade supports oxidative thiol modulation in chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(35):E8296-E8304

Yoshida K. and Hisabori T. (2016). Two distinct redox cascades cooperatively regulate chloroplast functions and sustain plant viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(27):E3967-E3976.

上村慎治(2010). 微生物のべん毛・繊毛の運動メカニズム
バイオメカニズム学会誌, Vol. 34, No. 3

若林憲一、植木紀子(2022). ボルボックス目緑藻の比較から紐解く光行動の意義
光合成研究 95:121-130

渡辺正勝, 鈴木武士 (2009) 第 1 章 光と感覚 (寺北明久, 蟻川謙太郎 編) 『動物の多様な生き方 1 見える光、見えない光』 共立出版, pp.98-113.

発表論文

学位論文に関わるもの

第 2 章

Kyuji A., Patel-King S. R., Hisabori T., King M. S., Wakabayashi K. (2020).
Cilia loss and dynein assembly defects in planaria lacking an outer dynein arm
docking complex subunit
Zoological Science 37:7-13

参考論文

第 4 章実験方法部分

*Ueki N., *Isu A., *Kyuji A., *Asahina Y., *So S., *Takahashi R., Hisabori T.,
Wakabayashi K. (2022).
Observation of Photobehavior in *Chlamydomonas reinhardtii*.
Journal of Visualized Experiments e63961 (*: equal contribution)

謝辞

本研究において、指導教員である東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所の若林憲一准教授に基礎から丁寧にご指導いただきました。厚く御礼申し上げます。

プラナリアを用いた研究はアメリカコネチカット大学ヘルスセンター Stephen M. King 教授の下で3か月間短期留学し行いました。留学の際、経済的支援をしていただいた東京工業大学情報生命博士教育院プログラム、短期留学を受け入れて頂いた King 教授、プラナリアの実験についてご指導頂きました Ramila Patel-King 博士、電子顕微鏡実験を委託した Maya Yankova 氏にお世話になりました。感謝申し上げます。

また組換えタンパク質を用いた中点酸化還元電位の測定実験を指導していただいた東京工業大学化学生命研究所の吉田啓亮准教授に感謝申し上げます。

前任者の小板橋亮矩氏によって単離された LC3 欠損株、共同研究先である東京大学医学部吉川雅英研究室から単離された LC5 欠損株のおかげでクラミドモナスを用いた研究を行うことができました。クラミドモナス実験について様々な指導を頂きました卒業生の中島昌子氏、朝比奈佑磨氏に感謝いたします。

最後に研究環境を与えていただきました東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所の久堀徹教授、快適な研究環境を整えてくださったスタッフの皆様に厚く御礼申し上げます。

2023年1月5日 久次史花