

外腕ダイニン中間鎖 2 の点変異
によってもたらされる繊毛運動の変調

県立広島大学 大学院

総合学術研究科

生命システム科学専攻

博士論文

令和 5 年 9 月

(2023 年)

近藤 裕祐

目次

第1章 緒論	1
1-1 はじめに	2
1-2 繊毛運動研究の背景	2
1-3 繊毛運動研究における課題	4
1-4 本研究の目的	5
1-5 各章の概要	6
第2章 新規外腕ダイニン中間鎖点変異株	10
2-1 はじめに	11
2-2 材料と方法	12
2-3 結果	29
2-4 考察	35
第3章 変異型ダイニンのモーター活性	39
3-1 はじめに	40
3-2 材料と方法	41
3-3 結果	44
3-4 考察	51

第4章 IC2 と相互作用するダイニンサブユニットの探索	52
4-1 はじめに	53
4-2 材料と方法	53
4-3 結果	54
4-4 考察	56
第5章 総合考察	58
謝辞	61
参考文献	62

第 1 章 緒論

緒論

1-1 はじめに

鞭毛・繊毛は真核生物に幅広く見られる運動性の細胞小器官である。その波動運動は微小管とモータータンパク質・ダイニンの滑り運動を基本とするが、運動機構の詳細は明らかになっていない。本研究では緑藻クラミドモナスの新規運動性変異株を用いて、鞭毛・繊毛の構造と機能の研究を行い、その運動メカニズム解明を目指した。本章では、研究の背景と本研究の具体的な目的を記し、最後に各章の概要を提示する。

1-2 繊毛運動研究の背景

真核生物の鞭毛・繊毛

波動運動を行う鞭毛は、精子や原生生物が遊泳する際の推進力を生み出し、一方、繊毛は細胞の遊泳にだけでなく、動物の気管、脳室、輸卵管の上皮において、細胞外にある物質の輸送も行っている（神谷，2012）。これら2つの見た目は異なるが、後述するように、基本的には同じものである。長くて細胞から1-2本生えているものを鞭毛、短くて多数生えているものを繊毛と呼ぶ。近年では細菌の運動器官である「べん毛」と区別するために、繊毛の表記に統一する流れが見られる。本論文では鞭毛・繊毛のことを繊毛と統一して表記する。ヒトには、繊毛の機能に異常がある先天性疾患が知られている。これを原発性繊毛運動不全症（Primary Ciliary Dyskinesia, PCD）と呼ぶ。PCDの患者は内臓逆位、気管支拡張症、不妊症などのさまざまな症状を示すが、それぞれの組織の上皮細胞における繊毛の機能不全によるものである（Afzelius, 1994）。繊毛の膜の内側の構造は軸糸と呼ばれるが、その軸糸は9本の微小管（周辺微小管）が中心の2本の微小管（中心対微小管）を円形に囲んだ「9+2」と呼ばれる進化の上でよく保存された構造をとっている。周辺微小管は、完全な円筒形のA小管と不完全な円筒形のB小管からなり、それらはネキシンリンクと呼ばれる構造によってたがいに結びつけら

れている。周辺微小管からは、中心対微小管へ向かってスポークと呼ばれる構造が放射状に伸びている (Gibbons, 1981 ; 図 1-1B)。繊毛の研究には、次に示すような理由から緑藻クラミドモナスが伝統的によく用いられてきた。

緑藻クラミドモナス

クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*, 和名 : コナミドリムシ) は葉緑体を持ち、光合成を行う単細胞の緑藻である。約 10 μm の細胞の前方に 2 本の繊毛があり (図 1-1A), それをヒトが平泳ぎするように動かし水中を縦横無尽に泳ぐ。細胞は光に向かって泳ぐ正の走光性, あるいは, 光から遠ざかる負の走光性を示す。細胞は, 眼点と呼ばれる光受容器官により光を検知し, それを電気信号に変換する。その信号に応じて, 2 本の繊毛の打ち方を変えることで, 正負の走光性が発揮される (Witman, 1993)。

クラミドモナスは通常の培養条件では 1 倍体であり, 紫外線の照射や外来遺伝子の挿入により遺伝子が傷つくと簡単に突然変異株を得ることができる。一方, 栄養条件が悪くなるとプラス株とマイナス株に分化し, 両者が接合して 2 倍体となる。栄養条件がよくなると, 減数分裂して発芽し, 4 分子が得られる。この 4 分子の表現型の解析から, 2 つの変異の遺伝的距離の解析が可能である。これらのことから, クラミドモナスは繊毛研究の標準的なモデル生物としてよく用いられており, これまでに, 多数の繊毛構成タンパク質が同定されている (福澤, 久保, 2009)。

繊毛の駆動力を生み出すダイニン

繊毛の波動運動は, モータータンパク質であるダイニンが微小管間に滑り運動を生じさせることが基礎となっている。このことは, ダイニン腕に ATP 加水分解酵素であるダイニンが含まれること (Gibbons and Rowe, 1965), プロテアーゼで軽く処理したウニ精子軸糸に ATP を与えると軸糸から微小管が滑り出すこと (Summers and Gibbons,

1971), から見事に示された。

周辺微小管の間には 2 種類の突起構造が観察される。内側のものをダイニン内腕, 外側をダイニン外腕と呼んでいる。花束状の形をなす外腕ダイニンは A 小管上に 24 nm の周期で一列に並んでいる (King, 2012)。一方, 内腕ダイニンの配置はもっと複雑で, 少なくとも 7 種類の分子種 (a-g) が A 小管上に 96 nm の周期で複雑に並んでいる (Heuser et al., 2009; 図 1-2A)。本研究で用いる緑藻クラミドモナスでは, これら 2 種類のダイニンをそれぞれ欠失した変異株が得られている。外腕ダイニンと内腕ダイニンの欠失株ではどちらも遊泳速度が低下するが, 速度の低下の仕方は両者で異なる。外腕ダイニンの欠失株では繊毛打頻度の減少, 内腕ダイニン欠失株では繊毛の屈曲角度の減少によって速度の低下がもたらされる (Brokaw and Kamiya, 1987)。また, 外腕ダイニンと内腕ダイニンを同時に欠失した二重変異株は繊毛の運動性がなくなり, 細胞は遊泳できなくなる (Kamiya et al., 1991)。これらの結果は, 内腕ダイニンと外腕ダイニンが繊毛運動においてそれぞれ異なる機能をもつことを示唆している。ヒトでも, ダイニンを失って典型的な繊毛病の病態を呈する PCD 患者が見ついている。興味深いことに, このうち外腕ダイニンの構造に欠損がある場合が全体の 55%にも上ることが知られている (Knowles et al., 2013)。この結果は, ヒトの繊毛運動において, 外腕ダイニンの変異のほうが内腕ダイニンよりもより強い機能不全を誘導する可能性を示唆している。このような観点から, 外腕ダイニンの構造と機能の解明は, 繊毛運動のメカニズム解明に必要であるだけでなく, 医学的にも重要であると考えられる。

1-3 繊毛運動研究における課題

クラミドモナスの外腕ダイニンは 3 本の重鎖 α , β , γ , 2 本の間鎖 IC1, IC2, 10 本以上の軽鎖 (LC1-10 とその他のホモログ) と 3 本の足場タンパク質 DC1, DC2, DC3 など計 19 種類のサブユニットから構成され, 分子量 2 MDa にも及ぶ巨大な複合体で

ある (King et al., 2023; 図 1-2B)。重鎖は C 末の 2/3 から構成される頭部と N 末の 1/3 から構成される尾部に区分される。頭部は ATP 加水分解活性を持ちモーターとして働く、また微小管結合部位も有しており ATP 依存的に微小管に結合、解離する。一方、重鎖尾部は ATP 非依存的に微小管と結合する。この尾部には 2 つの中間鎖といくつかの軽鎖が作る複合体 (中間鎖・軽鎖複合体) が結合している。中間鎖あるいは軽鎖が欠損すると外腕ダイニン自体が微小管上に構築されなくなることが多いことから、中間鎖・軽鎖複合体は重鎖尾部と一緒に、軸糸内で外腕ダイニンが構築されるための核となっていると考えられている。近年、この中間鎖・軽鎖複合体は、軸糸上で密に並び外腕ダイニン分子間を機能的に保持している可能性が示唆されており、繊毛運動において多数のダイニンが協調して働くために重要な機能を持つと考えられるようになってきた (Nicastro et al., 2006; Ishikawa et al., 2007; Oda et al., 2013; Rao et al., 2021; Walton et al., 2021; Kubo et al., 2021; Walton et al., 2023)。しかし、前述のとおり、中間鎖と軽鎖の変異株の多くでは外腕ダイニン自体が構築できなくなることから、既存の変異株を用いた機能解析はこれまで難しかった。外腕ダイニン構造を保持したまま、中間鎖や軽鎖の機能に異常があるような変異株が単離できれば、それぞれの機能を調べる上で有力な研究材料となる。

1-4 本研究の目的

本研究の出発点は、共同研究者の菅野が単離した新規変異株 214 株 (*oda6E279K* 株) である。この変異株は遊泳速度・繊毛打頻度ともに低下していた。この性質は、外腕ダイニンの変異株の特徴と似ていたが、軸糸の電子顕微鏡観察から外腕ダイニンの存在が確認されるなど、既存の外腕ダイニン変異株とは異なる特徴ももっていた。原因遺伝子を調べたところ、外腕ダイニンの中間鎖 IC2 に点変異が挿入されていることがわかった。本研究ではこの変異株を詳細に解析することで、IC2 の機能を明らかにすることを

目的とした。

1-5 各章の概要

第 2 章では、新たに単離した外腕ダイニン変異株の性質について述べる。遊泳速度は野生株の 60%だった。速度低下の原因を遺伝子レベルで調べたところ、外腕ダイニンを構成するサブユニットの 1 つ、中間鎖 IC2、に点変異 (E279K) があることがわかった。変異株に野生型の IC2 遺伝子を形質転換したところ、運動性が野生株並みに回復した。この結果は、運動性の低下がこの点変異により生じたことを示すものである。この株では外腕ダイニンが正しく構築されることから、この点変異は外腕ダイニンの構築には影響を与えずにその機能を低下させたと言える。このような変異株が得られたのは初めてである。

第 3 章では、IC2 の点変異により外腕ダイニンの機能が低下する原因を追究した。IC2 は、ダイニン分子の尾部に結合しており、頭部モータードメインとは約 15 nm も離れている。遠くにある頭部モーター活性を IC2 が制御するメカニズムはこれまでわかっていなかった。最近になって、クライオ電子顕微鏡による構造解析から、IC2 は隣接する外腕ダイニン分子の頭部と接触していることが明らかにされ、そのことから、私は、IC2 は隣接するダイニンのモーター活性を制御し、E279K 変異はその制御を乱して軸系の運動性を低下させたのではないかと考えるようになった。この仮説を検証するために、ダイニンの並べ方の違いによりダイニンのモーター活性に対し点変異の影響に差がないか調べた。その結果、ダイニン分子をばらばらに孤立させた場合と規則正しく密に並べた場合で、確かに、変異型ダイニンの微小管滑り速度、ATP 加水分解活性に対する変異型ダイニンの影響が大きく異なることがわかった。これらのことから、IC2 の E279K 変異はダイニン分子内というよりも隣接するダイニン重鎖のモーター活性に強く影響を与えることが示唆された。外腕ダイニンには、 $\alpha \beta \gamma$ の 3

種類の重鎖が存在する。次の問題は、IC2がどの重鎖に影響を与えるか調べることである。

第4章では、E279K変異が影響を与える重鎖を特定するために、この変異株と外腕ダイニン重鎖 α 、 β 、 γ それぞれの単独欠失株との二重変異株を作製し、その遊泳速度を評価した。その結果、*oda11*株 (α 重鎖欠失) と *oda2-t*株 (γ 重鎖のモータードメイン欠失) では、単独株に比べて2重株の遊泳速度が低下し、対照的に、*oda4S7*株 (β 重鎖モータードメインの欠損) では、単独変異株と二重変異株に速度の差は見られなかった。このことから、IC2変異が β 重鎖に影響を与えることが示唆された。

第5章では、本研究の総括を行う。本研究から、外腕ダイニン分子の中間鎖は隣接する外腕ダイニンの β 重鎖の機能を制御している可能性が示唆された。外腕ダイニンは隣り合う分子同士で密に接触していることが古くから指摘されていたが (Goodenough et al., 1989), その機能的な意義はわかっていなかった。本研究から、外腕ダイニン同士の物理的接触により互いのモーター活性が制御される可能性が強く示唆される。この制御機構の詳細を調べ、中間鎖IC2の繊毛運動における役割を明らかにすることが今後の課題である。

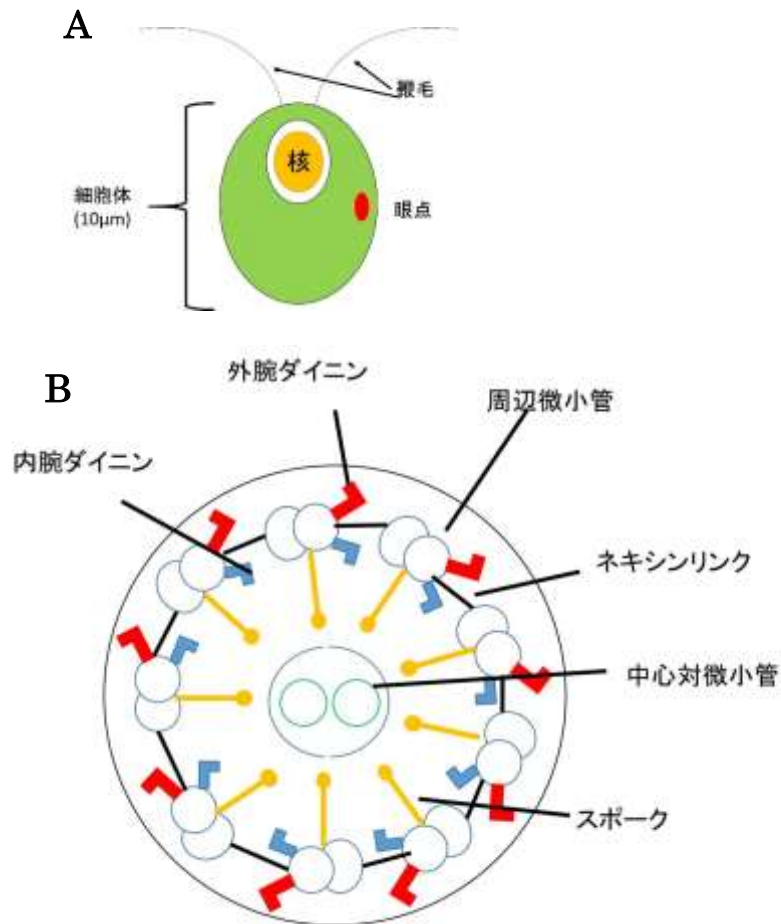


図 1-1. 緑藻クラミドモナスと繊毛・繊毛横断面の模式図

(A) 緑藻クラミドモナスには 2 本の繊毛が生えており，それらを平泳ぎするように動かすことで水中を泳ぐ。眼点で光を感じ取り，光に向かって泳ぐ正の走光性，あるいは，光から遠ざかる負の走光性を示す。(B) 繊毛の膜の内側にある構造を軸糸と呼ぶ。軸糸は 9 本の微小管（周辺微小管）が中心の 2 本の微小管（中心対微小管）を円形に囲んだ 9+2 と呼ばれる構造をとっている。周辺微小管は 8 の字型をしており，完全な円筒形の A 小管と不完全な円筒形の B 小管からなる。周辺微小管はネキシンリンクと呼ばれる構造によってたがいに結びつけられている。また，周辺微小管から中心対微小管へ向かって，スポークと呼ばれる構造が放射状に伸びている。

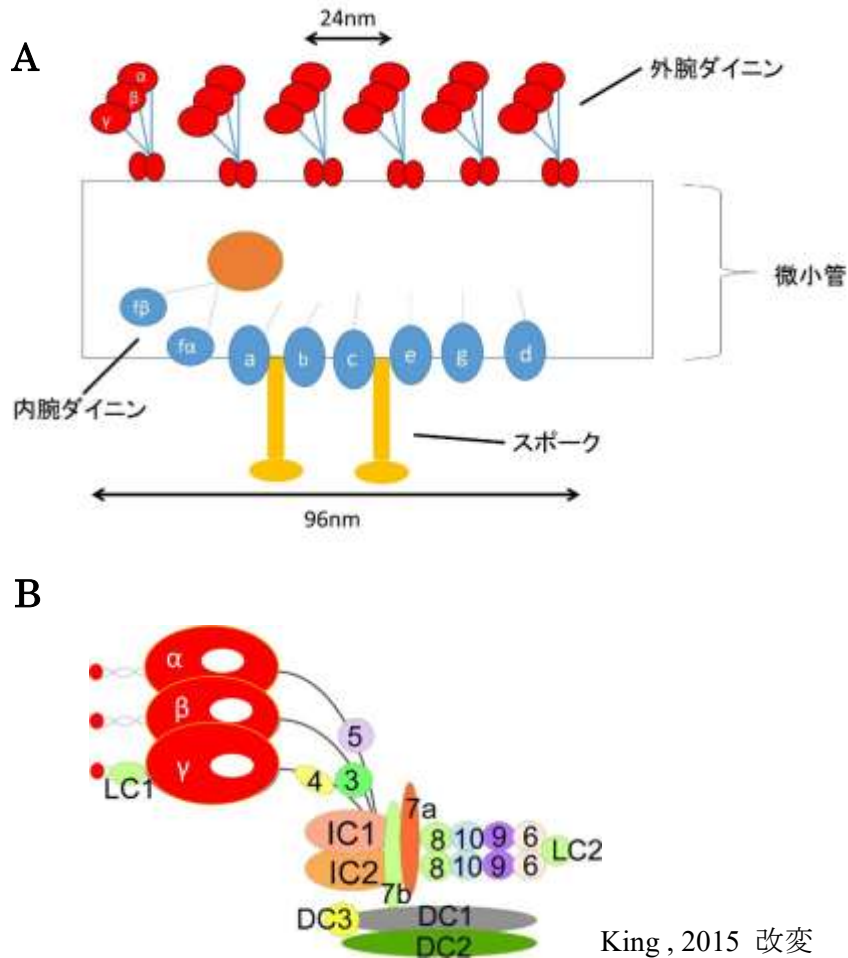


図 1-2. 軸糸側面図と外腕ダイニンの詳細図

(A) 周辺微小管には2種類の突起構造がある。内側のものをダイニン内腕，外側をダイニン外腕と呼んでいる。花束状の形をなす外腕ダイニンは A 小管上に 24 nm の周期で一列に並んでいる (King, 2012)。一方，内腕ダイニンの軸糸内構造はもっと複雑で，少なくとも 7 種類の分子種 (a-g) が A 小管上の 96 nm の基本周期内に複雑に配置されている。(B) クラミドモナスの外腕ダイニンは 3 本の重鎖 $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ と 2 本の中間鎖 IC1・IC2 と 10 本以上の軽鎖 (LC1-10 など) と 3 本のドッキングコンプレックス (DC1-3) から構成され，分子量 2 MDa にも及ぶ巨大な複合体である。重鎖は ATP 加水分解能を持ちモーターとしての役割を担っている。中間鎖軽鎖は，重鎖を微小管にアンカーすると考えられるが，詳しいことは分かっていない。

第 2 章 新規外腕ダイニン中間鎖点変異株

第2章 新規外腕ダイニン中間鎖点変異株

2-1 はじめに

繊毛は 500 種類を越える部品タンパク質からなる非常に複雑な構造を持つ (Pazour et al., 2005)。各タンパク質はその波動運動を発生させる上でそれぞれ固有の機能をもつと考えられている。繊毛運動における各タンパク質の機能を調べる上で、特定タンパク質を欠失したクラミドモナスの変異株の解析は有力な研究手段となっており、実際、繊毛ダイニンの多様性とそれぞれのダイニンがもつ機能の違いが明らかになってきたのはクラミドモナスの変異株の研究からである (Kamiya, 2002)。例えば、ダイニンの変異株が初めて単離されたのも (Huang et al., 1979)、運動性が異なる各種ダイニン変異株が単離されたのも (Kamiya, 1988; Kamiya et al., 1991)、クラミドモナスが初めてである。ダイニン分子を構成する中間鎖・軽鎖はモーター活性をもつ重鎖の尾部に結合しており、ダイニン分子を安定的に軸糸内の微小管にアンカーするうえで重要であると考えられている (King and Witman, 1990)。近年、軸糸の構造解析の結果から、中間鎖・軽鎖にはダイニン分子のアンカー機能だけでなく、ダイニン分子間を機能的に保持してその活性を制御する可能性も示唆されている (Rao et al., 2021; Walton et al., 2021; Kubo et al., 2021)。しかし、既存の中間鎖や軽鎖の変異株は外腕ダイニン自体が構築できなくなることが多い。それら変異株では、中間鎖・軽鎖が持つかもしれないダイニンの活性制御機構の解析は当然ながら不可能である。つまり、中間鎖と軽鎖がもつ機能の詳細を明らかにするには変異株の種類が足りないと考えられる。そこで、本研究では、中間鎖や軽鎖の新規変異株の単離からスタートすることとした。本章では新規の外腕ダイニン中間鎖または軽鎖の新規変異株を単離し、その基本的な性質を明らかにすることを目的とする。

これまで得られていたダイニン欠失株は、野生株に紫外線照射や化学的変異原によりゲノム遺伝子に変異を導入して作成されたライブラリーから探索していた。ここで

は新たな変異株を作出する試みとして、遊泳速度が遅い内腕ダイニン変異株 *ida5* (内腕ダイニン重鎖 **a,c,d,e** を欠失) を出発点として、それにさらに紫外線変異を導入した。内腕ダイニンを欠失した株にさらに外腕ダイニンの欠損が生じると、運動性が著しく低下する (Kamiya et al., 1991)。そのような2重変異株の中に、これまで得られなかったような新規のダイニン変異株が含まれる可能性を期待した。変異導入実験を行ったところ、運動性が著しく低下した株が 5 種類得られた。それらを野生型と戻し交配し、*ida5* の変異を取り除いたところ、5 株の中に、野生株の 60% の速度で遊泳する株が新たに見つかった。PCR をベースとした AFLP 法により変異遺伝子の位置を絞り込み、さらに、原因遺伝子の候補を探索したところ、この変異株には外腕ダイニンの中間鎖 IC2 に点変異 (E279K) があることがわかった。この変異株に野生型ゲノム IC2 遺伝子を形質転換したところ、運動性が野生株並みに回復した。このことから、運動性の低下がこの変異により生じたことが確定した。この株では、外腕ダイニンが軸糸微小管上に正しく構築されていることから、この変異はダイニンの構築を妨げることなくダイニンのモーター活性を低下させ、繊毛の運動、ひいては細胞の遊泳を低下させたことが示唆された。中間鎖の点変異により、ダイニン分子の機能が低下する変異株が得られたのはこれが初めてである。

2-2 材料と方法

クラミドモナスの培養

使用した株は、野生株 (*Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, CC-125)、各種ダイニン欠失株 (表 2-1)、そして中間鎖遺伝子の点変異株 214 株 (*oda6E279K* 株) である。クラミドモナスは TAP (Tris, Acetate, Phosphate) 液体培地で空気を送り込みながら 25°C で 12 時間 / 12 時間の明暗周期をつけて培養した (Gorman and Levine, 1965)。培養時間は実験によって異なり、細胞モデルを作成する時は培養 2-3 日の若い細胞を用

い、絨毛を単離する時は大量の細胞を得るために培養 4-5 日の細胞を用いた。

突然変異の導入と変異株の単離

4 日間 TAP 液体培地で培養した *ida5* 株（表 2-1）をシャーレに入れて 40 cm の位置に置いた 15W の UV ランプを用いて紫外線を照射し、変異を導入した。紫外線照射後の細胞はその後 3 日間培養してその中から運動性を失った変異株を単離した。この変異株を野生株と戻し交配を行うことで *ida5* の変異を取り除いたものを解析した。

表 2-1 : 使用したクラミドモナス変異株

変異株	欠失部位	運動性	変異遺伝子	参考文献
外腕ダイニン				
<i>oda6-E279K</i> (214)	無し	遅い	IC2 中間鎖	本研究
<i>oda1</i>	外腕全体	非常に遅い	外腕結合構造	Kamiya, 1988
<i>oda6</i>	外腕全体	非常に遅い	IC2 中間鎖	Kamiya, 1988
<i>oda6R88</i>	LC2, 6, 9	非常に遅い	IC2 中間鎖	Mitchell and Kang, 1993
<i>oda11</i>	α 重鎖	遅い	α 重鎖	Sakakibara et al., 1991
<i>oda4-s7</i>	β 重鎖の頭部	非常に遅い	β 重鎖	Sakakibara et al., 1993
<i>oda2-t</i>	γ 重鎖の頭部	遅い	γ 重鎖	Liu et al., 2008
内腕ダイニン				
<i>ida1</i>	f	非常に遅い	ダイニン f α 重鎖	Kamiya et al., 1991
<i>ida4</i>	a,c,d	遅い	内腕ダイニン軽鎖	Kamiya et al., 1991
<i>ida5</i>	a,c,d,e	遅い	内腕結合構造	Kato et al., 1993
<i>ida9</i>	c	遅い	ダイニン c 重鎖	Yagi et al., 2005
作成した二重変異株				
<i>oda6-E279K; oda1</i>		非常に遅い		本研究
<i>oda6-E279K; oda11</i>		非常に遅い		本研究
<i>oda6-E279K; oda4-s7</i>		非常に遅い		本研究
<i>oda6-E279K; oda2-t</i>		非常に遅い		本研究
<i>oda6-E279K; ida1</i>		非常に遅い		本研究
<i>oda6-E279K; ida4</i>		止まる		本研究
<i>oda6-E279K; ida5</i>		止まる		本研究
<i>oda6-E279K; ida9</i>		遅い		本研究
<i>oda6; ida4</i>		止まる		Kamiya et al., 1991
形質転換株				
<i>oda6-E279K ida4::IC2</i>		非常に遅い		本研究
<i>oda6 ida4::IC2</i>		遅い		本研究

クラミドモナスの接合

クラミドモナスでは異なる変異株の掛け合わせにより容易に二重変異株や三重変異株を得ることができる。また、野生株を戻し交配することで複数の変異が挿入された変異株からそれぞれ単独の変異株を入手することも可能である。ここでは、改変した **Sears** の方法によりクラミドモナスの接合を行った (**Sears et al., 1980**)。

白金耳を用いてクラミドモナスの+株と-株を寒天培地からとりだし、それぞれを 2 ml の GAM 培地 (1.2 mM MgSO₄ · 7H₂O, 0.27 mM 7H₂O, 0.57 mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.57 mM K₂HPO₄, 0.73 mM KH₂PO₄, 1.7 mM HOC(COONa)(CH₂COONa)₂ · 2H₂O, 2.5 mM HEPES-NaOH pH7.2, 1.6 μM H₃BO₃, 0.34 μM ZnSO₄ · 7H₂O, 0.26 μM MnSO₄ · 4H₂O, 84 nM CoCl₂ · 6H₂O, 82 nm Na₂MoO₄ · 2H₂O, 16 nM CuSO₄ · 5H₂O) に懸濁した。懸濁液を蛍光灯下で 4 時間シェイクして配偶子へと誘導をかけた。+株と-株の配偶子をそれぞれ 0.5 ml ずつ混ぜ合わせて 1 時間待ち、それを顕微鏡で観察して多くが 4 つの鞭毛をもつ接合細胞になっていることを確認した。作られた接合子を 2.5% 寒天培地に撒き、一晩光の下で放置した。翌朝、シャーレにパラフィルムを巻いて密封した後、暗闇に 3 日程度放置し、接合子を成熟させた。接合子は暗闇に放置している間に寒天の中に潜り込む。寒天表面には接合していない栄養細胞も多く残っているがそれらは、よく焼いて無菌化した剃刀を用いて寒天の表面をなぞることでかきとり、この操作でははがれない接合子を寒天の表面に露出させた。接合子を実体顕微鏡 (OLYMPUS, SZ61) で観察しながら、アルコールで滅菌したガラス針を用いてそれら多数を一か所に集めた。集めた接合子は寒天ごと滅菌したメスで切り出し、新しい 1.5% 寒天培地に移した。移した接合子をガラス針で寒天上に等間隔に並べた。それらを光の下で一晩おくと、16 時間から 20 時間後に、接合子から減数分裂後の娘細胞が 4 から 8 つハッチしてくる。これらをガラス針で元とは別の場所に縦方向に等間隔に並べた。これら娘細胞は一週間程度で目視できる程度のコロニーを形成する、それらを滅菌したつまようじを用いてそれ

それにつき 96 穴プレートに移した。細胞の運動を 2-3 日にわたって観察することで目的の変異株を単離した。

遊泳速度の測定

クラミドモナスの細胞の大きさは、午前中に小さく夕方に向けて大きくなる。つまり、その大きさには強い日周期がある。遊泳速度は細胞の大きさや形に強く依存するため、遊泳速度は、同じ株でも計測するタイミングで差が生じる。計測ごとの見かけの速度差を抑えるために、遊泳速度の計測はいつも同じ時間帯に設定した。具体的には、培養開始後 2-3 日目の午前中に計測した。また、クラミドモナスは温度によっても、運動性が大きく異なる。測定温度は 25 °C に固定した。

実際の測定は以下の通りである。細胞を取る前の培養液は、フラスコを回転させながらよく混ぜクラミドモナスを均一にした。そののち、ピペットを用いて 20 μ l の細胞をとり、それをスライドグラスに載せた。このサンプルにカバーグラスをかぶせる際には、カバーグラスの相対する辺の両縁にワセリンを均一に塗り、スライドグラスとカバーグラスの間に 0.3 mm 程度の高さのスペーサーを作った。クラミドモナスはわずかな環境変化により運動性が変わりやすいが、この様にすると、クラミドモナスは比較的安定した運動性を示した。また、クラミドモナスは光に依存して運動性を変化させる (Witman, 1993)。この影響を最小限にするために光源には赤色フィルターを被せてクラミドモナスにとっては暗闇の環境で観察した。細胞は、暗視野顕微鏡 (OLYMPUS, BX50) の \times 10 対物レンズを用いて観察した。視野にクラミドモナスが 30 個体程度泳いでいる場所を探して CCD カメラ (OLYMPUS, CS230) で細胞の遊泳を撮影し、PC にその動画を取り込んだ。細胞の遊泳軌跡を ImageJ のマクロ MTrack2 (<https://valelab4.ucsf.edu/~nsturman/ijplugins/MTrack2.html>) により計測し、その位置情報から細胞速度を測定した。同一株に対して異なる 3 回の培養を行い、遊泳速度を測

ることで、遊泳速度の平均と標準偏差を求めた。

繊毛打頻度の測定

神谷の方法を用いて繊毛打頻度を測定した。すなわち、顕微鏡に取り付けた光学センサーにより細胞の揺れを電気信号に変換し、その信号を周波数解析することで、繊毛打頻度を計測した (Kamiya, 2000)。生細胞の繊毛打頻度を測定する際には、培養 3-4 日目の少し濃い培養液を用いた。薄い培養では、きれいな繊毛打頻度の分布が得られなかったことが理由である。培養液をよく混ぜてから 30 μ l の培養液をとり、それをスライドガラスの上に置き、前述のようにワセリンのスペーサーから作られたチャンバー内にクラミドモナスを入れた。クラミドモナスがよく集まっている箇所を探し、繊毛打頻度の測定を行った。

繊毛軸糸の調整

繊毛の単離精製には、局所麻酔薬・Dibucaine HCl を用いた (Witman, 1986)。まず、遠心して細胞を集めた (3,000 rpm 5 min, 室温, Beckman, Avanti, HP-30I)。上澄みを捨て、沈殿した細胞に 200 ml の蒸留水を加えて、懸濁後、再び遠心して細胞を洗った (3,000 rpm 5 min, 室温, Beckman)。上澄みを捨て、沈殿に室温の 10 ml HMDS (10 mM HEPES-NaOH (pH7.4), 5 mM MgSO₄, 1 mM DTT, 4% Sucrose) を入れて懸濁した。そこに、100 mM Dibucaine-HCl を 0.62 ml 加えて 30 秒間パスツールピペットで懸濁し、繊毛の脱離反応を誘発した。顕微鏡で繊毛の脱離を確認した後に、冷 10 ml HMDS + 0.2 ml の 0.1M EGTA を加えて反応を止め、それを 50 ml コニカルチューブに移し氷冷した。遠心処理により (2,500 rpm 4 分 日立 Swing type rotor), 細胞体のみ沈殿させ、脱離した繊毛は上澄みに回収した。上澄みをよく冷やしておいた新しい 50 ml コニカルチューブに移し、再度同じ遠心処理をして、僅かに残る細胞体を除去した。上澄

みをさらに別のチューブに移したのち、鞭毛を沈殿させる遠心を行った（Tomy MX-301; 14,600 rpm 10 分）。上澄みを捨てた後、沈殿の上に少量残る残渣をピペットマンを用いて丁寧に捨て、そこに 0.1 - 0.5 ml（繊毛の量に応じて調節）の HMDEK（30 mM HEPES-NaOH (pH7.4), 5 mM MgSO₄, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 50 mM CH₃COOK）を加え沈殿を懸濁した。繊毛懸濁液をサンプルチューブに移し、そこに界面活性剤 Nonident P-40（終濃度 0.5 - 1.0%）を加えて、氷上で 10 分間脱膜した。遠心により、繊毛軸糸を集めた（Tomy MX-301 15,000rpm 6 分）。電気泳動をする場合、あるいは、ダイニンを抽出する場合には、1ml HMDEK に懸濁した軸糸サンプルを再び遠心して（Tomy MX-301 15,000 rpm 6 分） Nonidet P-40 に溶けた膜タンパク質を取り除いた。

電子顕微鏡による繊毛軸糸の微細構造の観察

単離した繊毛軸糸を 2% グルタルアルデヒドと 2% タンニン酸を含む固定液で処理したのちに 1% オスミウムで後固定した。その後、固定済みの軸糸をアルコールによって脱水させ、その後、Epon 樹脂に包埋した。ダイヤモンドナイフを用いて厚さ約 50 nm の超薄切片を作成し(Leica EM UC7 Leica Microsystems), それらを 7% 酢酸ウランと 0.2% クエン酸鉛による 2 重染色を行った。観察には JEM1400EX-II (Joel Co., Tokyo)を使用した。

遺伝子多型解析を用いた新規変異株の遺伝子座特定

クラミドモナス S1D2 株は、本研究で用いた株 (*Chlamydomonas reinhardtii*) と近縁関係にあり、遺伝的多型を示す。この S1D2 株と新規変異株を掛け合わせて 4 分子を作成し、PCR レベルの遺伝子多型解析 (Amplified Fragment Length Polymorphism AFLP 法) を行った (Kathir et al., 2003)。この方法では、各染色体上に多型によって異なる PCR 産物が生じるプライマーセットを多数用意し、それを用いてゲノム遺伝子

の PCR を行うものである。4 分子の表現型と PCR 産物の長さの違いから、変異の遺伝子座を大まかに決定することができる。

Total RNA の精製と逆転写による cDNA library の作成

脱繊毛後に繊毛再生中のクラミドモナス細胞内では多くの繊毛構成タンパク質をコードする mRNA 量が数倍に増加することが知られている (Harris, 2009)。pH ショックにより培養開始 2-3 日目の若い細胞から繊毛を脱離させ、その後、繊毛再生中のクラミドモナス細胞から RNA を調整した (Yagi et al., 2009)。100 ml のクラミドモナス培養液に 1 M 酢酸を 2 ml 入れ、pH を中性から 4.5 に下げた。顕微鏡で脱繊毛されたことを確認した後、1 分後に、1 M KOH を 2 ml 加え pH を中性に戻した。脱繊毛 30 分後に、繊毛がちょうど半分程度の長さまで伸長した細胞、約 30 ml をコニカルチューブに取り、遠心操作により細胞を集めた (2,500 rpm 3 分)。集めた細胞にセパゾール (Nakalitesque, Kyoto) を加え、懸濁して細胞を破壊した。メーカーのマニュアルに従い、この細胞抽出液から total RNA を得た。この total RNA に、poly T を表面に固定した磁気ビーズ (Dynabeads Olig-dT, Invitrogen) を加え、mRNA をビーズにトラップして精製した。得られた RNA を逆転写酵素 (Superscript III, Invitrogen) を用いて逆転写して cDNA Library を調整した。

PCR による IC2 遺伝子の増幅と DNA 配列解析

新規変異株の IC2 遺伝子を増幅させるために、この株の cDNA library をテンプレートにした PCR 反応を行った。本研究で使用したプライマーは表 2-2 にまとめている。DNA ポリメラーゼは KOD FX (TOYOBO KFX-101) を用いた。PCR 反応の溶液組成と反応プロトコルは以下の通りである。

・ PCR 溶液

Template DNA	1 μ l
KOD FX buffer	12.5 μ l
2mM dNTP	5 μ l
Forward primer (表 2-2)	0.75 μ l
Reverse primer (表 2-2)	0.75 μ l
KOD FX	0.4 μ l
MQ	5 μ l
<hr/>	
Total	25

・ PCR cycle

96°C	2 min		
98°C	15 sec	}	30 cycles
68°C	2 min		
68°C	5 min		

PCR 産物はアガロースゲル電気泳動によって分離し、ゲル抽出キット (FastGene Gel/PCR Extraction Kit FG-91302) を用いて精製した。精製した PCR 産物を鋳型に BigDye Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンスを行った。

・ サイクルシーケンス溶液

Template DNA	2-5 ng
BigDye premix	2 μ l
×5BigDye solution	1 μ l
MQ	mess up 10 μ l

・ program

96°C	1.5 min		
96°C	35 sec	}	25cycles
57°C	40 sec		
60°C	1 min		

エタノール沈殿によりシーケンスサンプルを精製し，それを HiDi-formamide (Applied Biosystems, 4311320) 13 μ l に溶解し，95 °Cで2分加熱することでDNAを一本鎖に変性させた。変性させたサンプルは氷上に5分間静置することで冷まし，シーケンス用の96穴プレートに移し替えた。これをシーケンサーABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) にセットしてシーケンスを実行した。ここで取得したデータは，塩基配列解析ソフト BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) を用いて解析した。

表 2 : 実験に使用したプライマー

IC2-cDNAseq-1F	TGATGCACAAATAACGTGGCTTACC
IC2-cDNAseq-1R	GGTTCAAGTTGGAGTTCCTGTTGTT
IC2-cDNAseq-2F	ATGTTCTCCACGCACTCATTTCATCT
IC2-cDNAseq-2R	GCACAAAGTGTCATGTCGTGAGTTC
IC2-genomic-F	GAGATGAACAGGTATTGGTGACGAG
IC2-genomic-R	GACTTGATACCCTTCCTGCAGTTC

使用したプライマーはいずれもプライマー設計ソフト, primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>)を用いて設計した。実際のプライマーの作成はユーロフィンジェノミクス株式会社に依頼した。

ダイニンの粗抽出

榭原と神谷の方法に従い、絨毛軸糸からダイニンを高塩濃度抽出した (Sakakibara and Kamiya, 1989)。絨毛軸糸を 100 μ l の 0.6 M KCl in HMDE (30 mM HEPES, 5 mM MgSO₄, 1 mM DTT, 1 mM EGTA) に懸濁し、10 分間氷冷してダイニンを粗抽出した。抽出液を遠心し (15,000 rpm, 11 分)、上澄みを新しいサンプルチューブに移し氷冷した。残りの沈殿に対して再び同じ操作を行い、2 回の抽出で得られたサンプル (合計 200 μ l) に 800 μ l HMDE を加えて塩濃度を下げた。それを、90,000 rpm, 10 分の強い遠心によりゴミを取り除いた。得られた上澄み (ダイニン粗抽出液) を新しいチューブに入れて氷上で保存した。

外腕ダイニンの精製

外腕ダイニンは、加々美と神谷の方法に従い、陰イオン交換カラム MonoQ を用いて分画精製した (Kagami and Kamiya, 1992)。先述したダイニン粗抽出液を高精度 HPLC システム (Smart system, GE healthcare bioscience) にかけて、KCl 濃度グラジエントにより、カラムにトラップされた各種ダイニンを分画・精製した。

SDS-PAGE

変異株の外腕ダイニン重鎖を調べる際には、軸糸サンプルを 4 M Urea を含む 4 % アクリルアミドゲル (King et al., 1986) で電気泳動をしたのちに CBB 染色を行った。変異株の外腕ダイニンサブユニット組成を調べる際には、精製したダイニンの分画をアクリルアミド濃度 5–15% のグラジエントゲルを用いた SDS-PAGE を行った後に銀染色でタンパク質を確認した (Kagami and Kamiya, 1992)。

ウェスタンブロット

外腕ダイニンサブユニットを定量するために、単離した繊毛軸糸サンプルを使ってウェスタンブロットを行った。まず、1 サンプルの総タンパク質量を 5 μ g として 15%ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行った。分離したタンパク質をセミドライ式泳動槽 (Transblot SD, Biorad) を用いてゲルから PVDF 膜 (Millipore, 1214726) に移した。染色に用いた一次抗体は、ダイニン中間鎖 IC2, 軽鎖 LC2, LC3, LC5, LC6 のポリクローナル抗体、二次抗体は、HRP 標識の抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (GE ヘルスケア NA934-1ML) を使用した。

CTAB 法によるゲノム DNA の精製

Gloeckner の方法を参考に CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide) 法によるクラミドモナスのゲノム DNA 精製を行った(<https://www.chlamycollection.org/methods/minipreps-of-dna-from-chlamydomonas-cultures/>)。濃いクラミドモナスの培養液 (培養 4-5 日目) を 2 ml エッペンドルフチューブにとり、遠心操作により細胞を集めた (3,000 rpm, 4 分, 室温 Eppendorf Centrifuge 5475R)。上澄みを丁寧に除去し沈殿を CTAB buffer (2% W/V Hexadecyltrimethyl ammonium Bromide, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8.0), 2% V/V Beta-mercaptoethanol) 0.5 mL にサスペンドした。この溶液を 65°Cで一時間、熱処理した。そこにフェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール 25:24:1 を 0.5 mL を加えて、30 秒間ボルテックスした後に遠心 (10,000 rpm 10 分, 室温) した。抽出液は上から水層, 変質したタンパク質を含む中間層, フェノール層の三層に分かれた。DNA は水層に溶けているので、中間層を吸わないよう気をつけながらピペットで丁寧に水層を回収し、新しいエッペンドルフチューブに移した。この溶液に体積の 0.7 倍量のイソプロパノールを加えた後、氷上で 15 分インキュベートすることで DNA を不溶化させ、遠心 (15,000 rpm

20分, 4°C) して DNA を沈殿させた。上澄みを取り除き, 沈殿に 70%冷エタノールをそっと載せ, 再び遠心 (15,000 rpm 20分, 4°C) を行った後に, エタノールをピペットマンで丁寧に取り除いた。わずかに残るエタノールを取り除くためにサンプルをエバポレーター (Savant, DNA Speed Vac) に 3分程度かけた。乾燥処理後の DNA は 0.2 mL TE (Tris, EDTA)に溶かし, 分光光度計 (HITACHI U-2001) を用いて濃度を測定した。精製したゲノム DNA は -30°Cで保存した。

IC2 遺伝子のクローニング

ゲノム遺伝子から IC2 遺伝子の全長を PCR で増幅し, いったん pCRBlunt プラスミドにクローニングしたのち, それをパラモマイシン耐性遺伝子をもつクラミドモナス細胞発現用プラスミド pSI103 にサブクローニングした。IC2 の全長は約 5kbp あり, 非常に GC リッチであるため, DNA polymerase は GC リッチな配列にも強く, ミスコピーの少ない PrimeSTAR GXL (TaKaRa)を用いた。鋳型 DNA は前述の CTAB 法によってクラミドモナス野生株から精製した DNA を用いた。

・ PCR 溶液

5×PrimeSTAR GXL Buffer	5µl
dNTP Mixture	2µl
primer IC2 genome F(表 2-2)	0.5µl
primer IC2 genome R(表 2-2)	0.5µl
精製ゲノム DNA 溶液	1µl
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	0.5µl
MQ	16.5µl
<hr/>	
Total	25µl

・ PCR cycle

98°C	10 sec	}	30 cycles
60°C	15 sec		
68°C	6 min		

PCR 産物はアガロースゲル電気泳動によって分離し、ゲル抽出キット (FastGene Gel/PCR Extraction Kit) を用いて精製した。次に PCR 産物を DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (TaKaRa)を用いて、pCR-Blunt vector (Invitrogen) にライゲーションした。その後ライゲーション産物をエレクトロポレーター (ECM630 Electro Cell Manipulator, BTX630) を用いて、大腸菌の DH5 α に形質転換した。

・ エレクトロポレーターの設定

電圧	1,800V
抵抗	125 Ω
コンデンサー	50 μ F

形質転換後のコンピテントセルはカナマイシン入りの寒天 LB 培地に撒いて、一晩 37°C でインキュベートした。翌朝、出てきたコロニーを滅菌した竹串で突き、2 mL のカナマイシン入り液体 LB 培地に移して振とう培養 (37°C, 12hr) した。培養液が白濁していることを確認したのちに、Plasmid Mini prep. Kit (FastGene) を用いて、プラスミドをミニプレップした。次にプラスミドが IC2 遺伝子を含んでいるか確認するために制限酵素 EcoR I (TaKaRa) で処理したのちに、アガロースゲル電気泳動をすることで DNA のサイズを確認した。このゲルから IC2 遺伝子を含むゲルのみくり抜き、ゲル

抽出キットを用いて精製した。

次に、IC2 ゲノム遺伝子をプラスミド pSI103 にクローニングした。pSI103 を EcoR I で切断後、アルカリフォスファターゼ (TaKaRa) を用いて末端脱リン酸化処理を行い、pSI103 の自己閉環を防いだ。EcoRI で切断した IC2 ゲノム遺伝子と pSI103 を混合し、DNA Ligation Kit (Takara) によってライゲーションさせ、それを先ほどと同様の手法を用いて DH5 α に形質転換した。それをアンピシリンが含まれる寒天培地にまき、翌朝出てきたコロニーからプラスミドを精製した。EcoR I で処理したプラスミドをアガロースゲル電気泳動にかけ、遺伝子が正しくクローニングされたか確認した。

クラミドモナスの形質転換

山野の方法に従って IC2 遺伝子をクラミドモナスに形質転換した (Yamano et al., 2013)。培養 2-3 日目の対数増殖期にある若いクラミドモナス細胞、(細胞密度 1-2 $\times 10^6$ /ml, OD 0.3-0.4 at 730 nm) 約 300 ml を 500 ml 遠心管 (滅菌処理済み) に入れ、遠心操作により細胞を集めた (3,000 rpm 5 分)。その際、希薄な細胞は遠心の際に管壁面に付着しやすいため、培養液に 1/1,000 量の 10% tween 20 を加えた。遠心後、上澄み液を丁寧に取り除き、沈殿を TAP+40 mM sucrose 10ml で懸濁した。懸濁液を新しい 15 ml コニカルチューブに移し、遠心により細胞を集めた (2,500 rpm 3 分)。上澄みを取り除いた後、沈殿を TAP + 40 mM sucrose 1-2 ml で懸濁した (細胞密度 1 $\times 10^8$ /ml)。この時の細胞密度によって形質転換効率が大きく左右されることから、細胞密度の計測は必ず行った。IC2 遺伝子をクローニングした pSI103 を Dra I (TaKaRa) で切断し (IC2 ゲノム遺伝子は切断されない)、プラスミドを直線化した。環状化 DNA ではクラミドモナスの形質転換効率が大幅に減少するからである。細胞懸濁液と直線化した野生型 IC2 遺伝子 (総 DNA 量は ~400 ng) をエッペンドルフチューブ内で混ぜ合わせて 40 μ l とした。DNA 溶液は細胞密度が変わらないように 5 μ l 以下に抑えた。40 μ l

DNA 混合液を 2 mm gap キュベット (NEPAGENE, EC-002S) に移し, キュベットをエレクトロポレーター (スーパーエレクトロポレーター NEPA21, NEPAGENE) にセットした。エレクトロポレーションをする前に必ず細胞液の抵抗値が 0.5-0.6 k Ω の範囲にあることを確認した。抵抗値がこの範囲から外れると, 形質転換効率が低下するからである。細胞懸濁液の抵抗値が低いときは細胞液を遠心して濃縮し, 逆に高いときは TAP sucrose を加えることで細胞液を薄めた。電気穿孔条件は以下の通りである。

・エレクトロポレーターの設定

	Poring pulse	Transfer pulse
電圧	300V	20V
パルス幅	8ms	50ms
パルス間隔	50ms	50ms
回数	1	± 5
減衰率	40%	40%
極性	+	\pm

電気穿孔後は, 直ちに, キュベット内の細胞液すべてを TAP + 40 mM sucrose 5 ml が入った 15 ml チューブに移し, それを光の下で一晩振とう培養し, エレクトロポレーションによって生じた細胞のダメージを回復させた。翌日, 細胞液を遠心して (2,500 rpm 3 分), 沈殿を 1 ml TAP 培養液に懸濁し, それを 2 枚のパラモマイシン入り TAP アガロース培地 (1.5% アガロース 10 μ g/ml パラモマイシン) に 500 μ l ずつ撒いた。一週間程度で現れたコロニーを滅菌した爪楊枝でつつき, それを 96 穴プレートの TAP 培地に移し培養した。数日間観察し, 運動性が回復している細胞を探した。

2-3 結果

外腕ダイニンの機能を欠損した新規変異株

外腕ダイニンの制御機構を明らかにするために、その機能が低下している新規変異株の単離を試みた。この目的のために、内腕ダイニン重鎖を欠失する *ida5* 株 (Kato et al., 1993) に紫外線を照射し非運動性細胞をあつめた。内腕ダイニン欠失株を出発材料に選んだ理由は、*ida5* 株のような内腕ダイニン変異株と外腕ダイニン変異株との二重変異株は非運動性になることが知られており (Kamiya et al., 1992)、2重株には外腕ダイニン変異株が多く含まれると期待されたからである。単離された非運動性の細胞を野生株と戻し交配をして *ida5* 変異を取り除き、遊泳速度の低下した株を単離した (214 株)。その遊泳速度 $95 \mu\text{m}/\text{sec}$ 、繊毛打頻度 40Hz は、どちらも野生株のその 60% 程度だった (図 2-1A)。既存のダイニン変異株と運動性を比較した。214 株の遊泳速度、繊毛打頻度はともに、外腕ダイニン欠失株 *oda1* と野生株の中間程度となっていた (Kamiya, 1988; 図 2-1A)。一方、既存の内腕ダイニン変異株と比較すると、遊泳速度は各種内腕ダイニン変異株と同程度だったが、214 株の繊毛打頻度は内腕ダイニン株よりも低かった。外腕ダイニン変異株では遊泳速度の低下が繊毛打頻度の低下により生じる (Kamiya, 1988)。この点で、214 株の運動性は外腕ダイニン変異株の特徴に近いと考えられる。次に、既存のダイニン欠失株との二重変異株を作成してその運動性を調べた。*ida4* 株 (内腕ダイニン重鎖 a,c,d の欠失) または *ida5* 株 (内腕ダイニン重鎖 a,c,d,e の欠失) と掛け合わせると非運動性になったが、*ida1* 株 (ダイニン重鎖 f の欠失) または *ida9* 株 (ダイニン重鎖 c の欠失) との掛け合わせでは、単独株よりも遊泳が遅くなったものの停止はしなかった (図 2-1B)。一方、*oda1* 株との二重変異株では、遊泳速度と繊毛打頻度ともに *oda1* 株と変わりがなかった (図 2-1B)。これらの結果から、214 株の運動性低下は内腕ダイニンではなく外腕ダイニンの異常により生じた可能性があると考えられた。

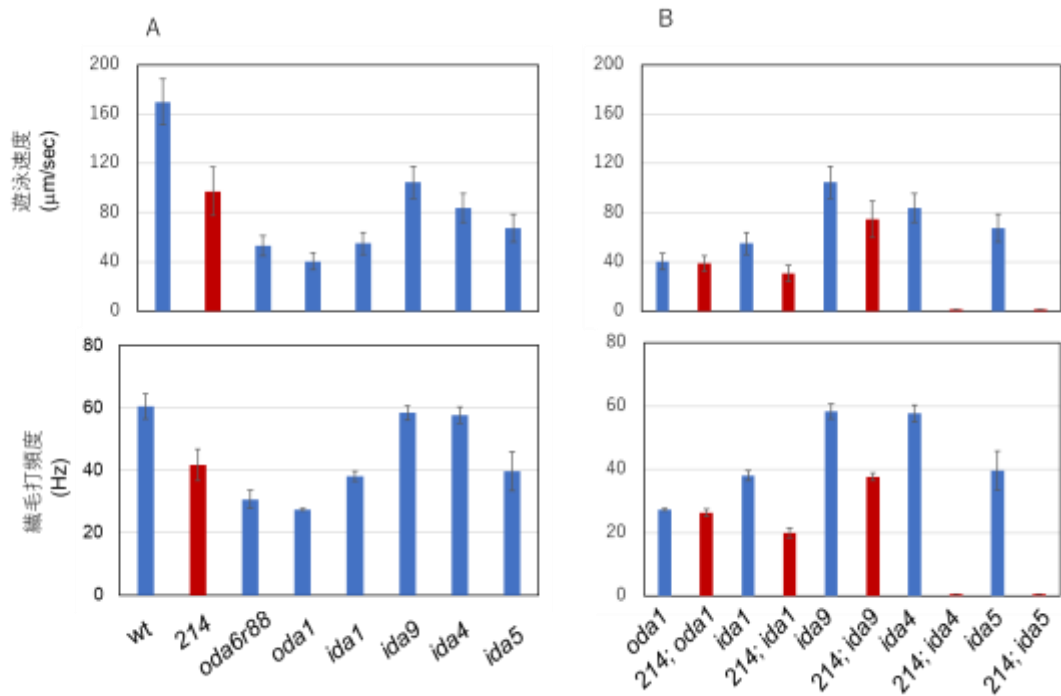


図 2-1. 新規変異株 214 と既存変異株との運動性比較

(A) 214 株と様々なダイニン変異株の遊泳速度（上図）と繊毛打頻度（下図）を比較した。(B) 様々なダイニン変異株と 214 変異株とそれらの二重変異株の遊泳速度（上図）と繊毛打頻度（下図）を比較した。214 変異体と内腕ダイニン変異株の二重変異株 (*ida4, ida5*) は非運動性であった。一方, 214 変異体と外腕ダイニン欠失株 *oda1* との二重変異体は, *oda1* とほぼ同じ速度で泳いだ。遊泳速度の平均と標準偏差は, 各株について 30 個以上の細胞で測定した。繊毛打頻度の平均と標準偏差は細胞体振動の高速フーリエ変換解析から得られた打頻度周波数分布から推定した

新規変異株における外腕ダイニンの構造

新規変異株 **214** は運動性検定から外腕ダイニンの機能が低下していることが示唆された。この結果は、**214** 株の外腕ダイニンの構造に異常がある可能性を疑わせる。そこで、まず軸糸構造の切片を電子顕微鏡で解析し、外腕ダイニンの構造に異常がないかを調べた。その結果、**214** の軸糸断面における外腕ダイニンは一見正常に見えることが分かった (図 2-2A)。次に、SDS-PAGE によって外腕ダイニン重鎖の定量を試みた。その結果、外腕ダイニン重鎖 (α , β , γ HC) のバンド強度について、**214** 株と野生株の間に差は見られなかった (図 2-2B)。さらに、微小管と粗抽出ダイニンの混合物を用いた共沈実験により、変異型外腕ダイニンと野生型外腕ダイニンの微小管結合性の違いも調べた。しかし、変異型外腕ダイニンの微小管への結合量は野生型外腕ダイニンのそれとほぼ同じであることがわかった (図 2-2C)。以上のことから、**214** 変異は外腕ダイニンの微小管への結合性に大きな影響を与えないことがわかった。次に、中間鎖と軽鎖が **214** 株で減少するかを調査した。これは、中間鎖 IC2 の N 末端領域に 23 個のアミノ酸置換を持つ変異株 *oda6r88* (Mitchell and Kang, 1993) が、軽鎖の LC2, LC6, LC9 がなくなるために外腕の構造があっても *oda* 株のような遅い運動性を示すと報告されているからである (Dibella et al., 2005)。ここでも SDS-PAGE とイムノブロット解析により、**214** では IC1, IC2, LC1-LC6 の減少は検出されなかった (図 2-3)。したがって、**214** 変異は、これらのサブユニットに顕著な変化を与えることなく、外腕ダイニンの機能に影響を与えられなかったと考えられた。

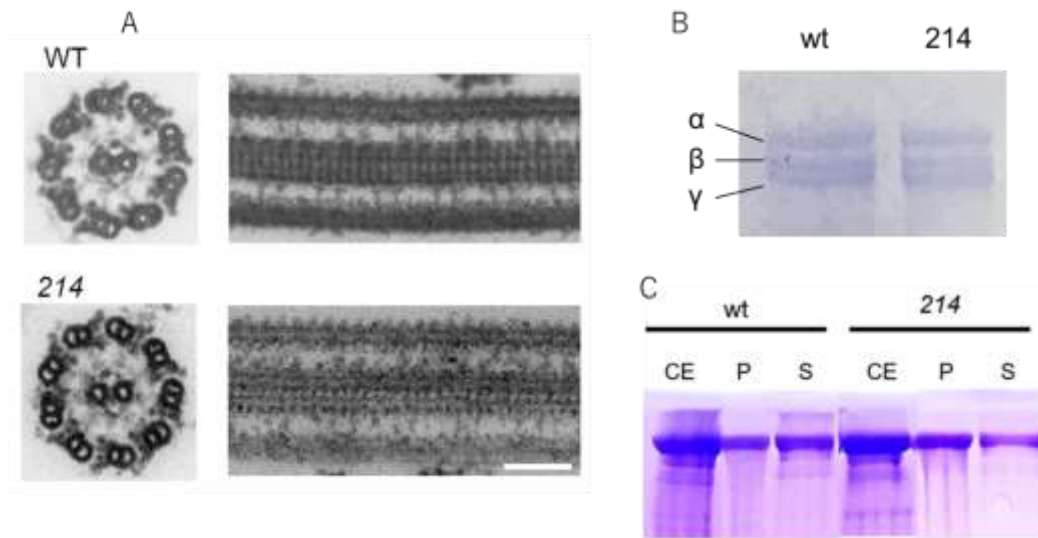


図 2-2. 214 株の外腕ダイニン構造と重鎖の定量

(A) 野生株と 214 株の軸糸構造を横断面と縦断面で電子顕微鏡による観察をした。両者の構造上の違いは見られなかった。(B) 野生株と 214 株の軸糸サンプルを SDS-PAGE で外腕ダイニン重鎖の量を SDS-PAGE 解析により比較した。214 株は外腕ダイニン重鎖 α β γ を野生株並みに保持していた。ゲルは CBB で染色した。(C) 外腕ダイニン粗抽出液と微小管を混ぜて共沈実験を行った。CE は粗抽出液、P は沈殿物、S はその上澄みを示している。214 株の微小管結合性は野生株と遜色なかった。

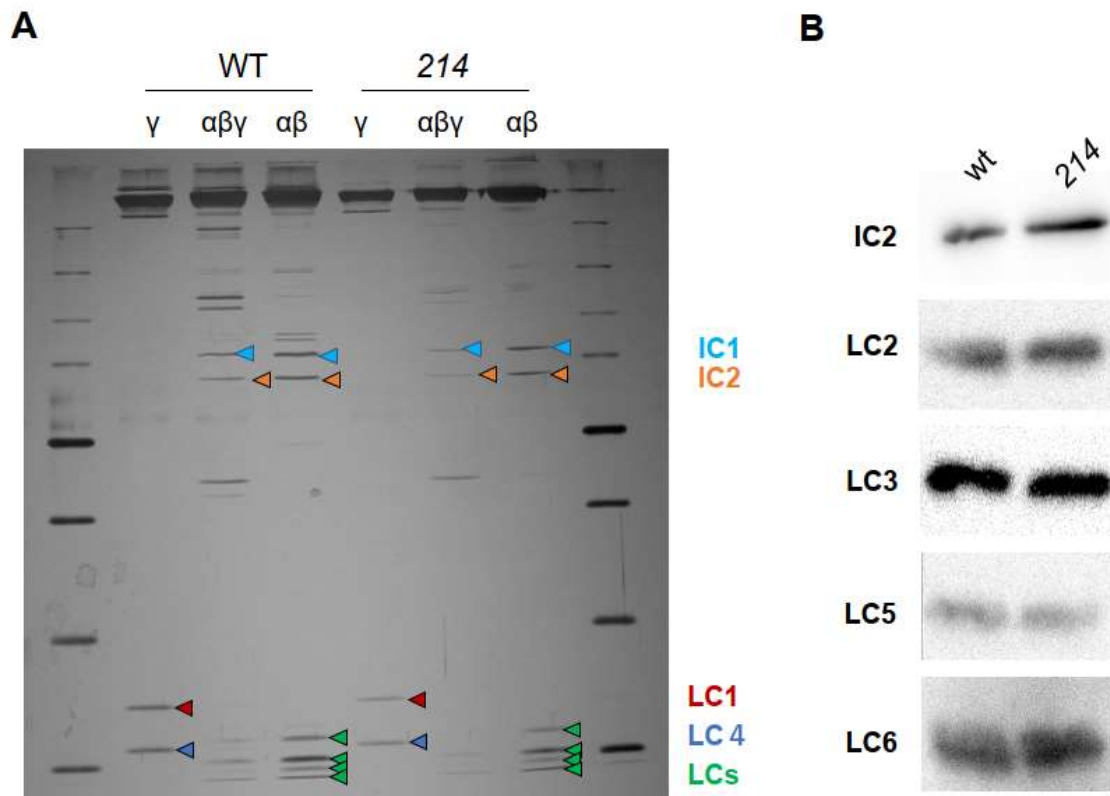


図 2-3. 野生株および 214 軸糸における中間鎖と軽鎖の含量

(A) 外腕ダイニンサブコンプレックス (γ , $\alpha\beta\gamma$, $\alpha\beta$) をイオン交換クロマトグラフィーを用いてダイニン抽出液から精製し, 外腕ダイニンサブユニットを 5-15%グラジエントゲル上で SDS-PAGE により分析した。214 の中間鎖と軽鎖のバンドパターンは, 野生株とほぼ同じであった。IC1 (シアン), IC2 (オレンジ), LC1 (赤), LC4 (青), およびその他の LC のバンド (緑) は, 異なる色の矢印で示した。(B) 野生株と 214 の軸糸における IC2 と LC2, LC3, LC5, LC6 のウェスタンブロットを行った。これらの実験から 214 株は野生株と同程度の中間鎖 IC1, IC2 と軽鎖 LC1-6 までを保持していることが分かった。

IC2 遺伝子における変異の同定

遺伝子多型解析 (Amplified-fragment-length polymorphism analysis; Kathir et al., 2003) により, **214** の変異はゲノム遺伝子リンケージグループ 12 の 2.0 - 2.5 Mbp の領域にマッピングされた (図 2-4A)。この領域には, **ODA6** 遺伝子座に位置する IC2 の遺伝子を含む (Mitchell and Kang, 1991) 繊毛構成成分をコードする 6 つの遺伝子が含まれていた (図 2-4A)。IC2 遺伝子の塩基配列解析の結果, 変異株では開始コドン ATG から数えて 1237 番目のグアニンがアデニンに変異していることが分かった。この変異では 279 番目のアミノ酸残基がグルタミン酸からリジンに変化しており (図 2-4B), それは β プロペラ構造を形成する 7 つの WD 反復ドメインのうちその 3 番目のドメイン上に位置していた (図 2-4C)。279 番目のグルタミン酸は多くの生物間で保存されているが, 例外的にゼブラフィッシュにおいてこれがアスパラギン酸になっていた (図 2-5)。興味深いことに, WD ドメインの 2 番目と 3 番目の境界にある 247 番目のアルギニン残基の変異がヒト PCD 患者に見つかっている (図 2-5)。その患者の気管上皮細胞の繊毛では, 外腕ダイニン数が著しく減少していた (Al-Mutairi et al., 2022)。IC2 のこの変異は外腕ダイニンの安定性と微小管上への構築に重要な残基であると考えられる。

E279K 変異が **214** の運動性低下の原因であるかどうかを調べるため, **214** 株に野生型 IC2 遺伝子を形質転換した。実験には, 内腕ダイニン変異株である *ida4* と **214** 株との二重変異株を用いた。この二重変異株は非運動性であり, 形質転換により外腕ダイニンの機能が回復すると細胞が再び遊泳することが期待された。非運動性の二重変異株 *ida4; 214* とポジティブコントロールとして *ida4; oda6* に IC2 遺伝子を形質転換したところ, どちらも運動性が回復した (図 2-6)。このことから **214** の運動性の低下は IC2 遺伝子の変異によって生じたことが確定した。そこで, この変異株を *oda6E279K* と命名することにした。*oda6E279K* 形質転換体 (*oda6E279K::IC2*) の遊泳速度は *oda6* 形

質転換体 (*oda6::IC2*) よりも遅かった。これは、前者の形質転換体が、変異型と野生型 *IC2* を持つ 2 種類の外腕ダイニンを発現し (図 2-6)、変異型ダイニンが正常型ダイニンの滑りを阻害しているために生じた可能性が考えられた。

2-4 考察

新規運動性変異株 *oda6E279K* (214) の外腕ダイニン運動活性

中間鎖または軽鎖を欠くいくつかの外腕ダイニン変異株がこれまでに単離されている (Kamiya, 1988; King et al., 2023)。ほとんどの変異株は外腕ダイニン全体を欠失しているか、外腕分子の数が大幅に減少しており、遊泳速度も遅く、繊毛打頻度も野生株の 30-40% に減少していた (図 1A)。この結果から、中間鎖・軽鎖複合体は外腕ダイニンを周辺微小管に結合させるために重要であることが示唆されていた。この考えは、最近のクライオ電子顕微鏡を用いた繊毛軸糸の研究から、中間鎖・軽鎖複合体が外腕ダイニン分子の基部に結合する解析結果からも支持されている (King and Witman, 1990; Walton et al., 2021; Rao et al., 2021; Kubo et al., 2021)。対照的に、*oda6E279K* (214) 株は、野生株に比べて遊泳速度が低いにもかかわらず、外腕ダイニンサブユニットを保持していた。このことから、この変異は外腕ダイニンの構築にはほとんど影響を及ぼさないが、その活性に影響を及ぼすことが示唆された。第 3 章では *IC2* の *E279K* 変異が外腕ダイニンにどのような影響を与えているのか調べるために *in vitro* の実験を行った。

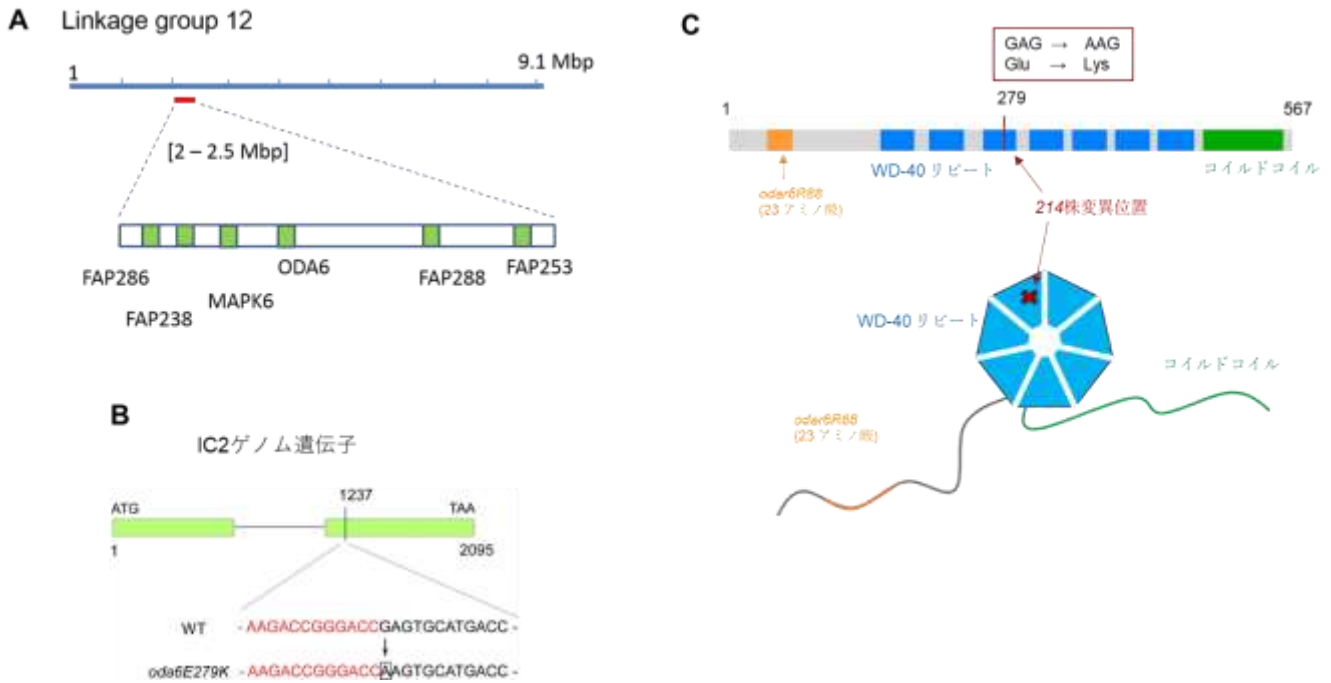


図 2-4. 214 株は外腕ダイニン中間鎖 IC2 に点変異を持つ

(A) 214 株変異位置を遺伝子多型解析によりマッピングした。214 変異はリンケージグループ 12 の 2-2.5 Mbp の領域にマップされた。この領域には繊毛関連タンパク質 (FAPs) の遺伝子がいくつか含まれており (Pazour et al., 2005), その一つが外腕ダイニン中間鎖 2(IC2)をコードする ODA6 遺伝子である。(B) ODA6 遺伝子で見つかった 214 株における G から A の点突然変異。(C) IC2 の機能ドメインと構造モデル。この変異は第 3WD ドメインに位置する 279 番目のグルタミン酸からリジンに変化を引き起こす。既存の IC2 変異株 *oda6R88* 株における 23 アミノ酸の置換変異をオレンジ, WD-リピートドメインを青, 214 変異位置を赤, コイルドコイルドメインを緑で示す。

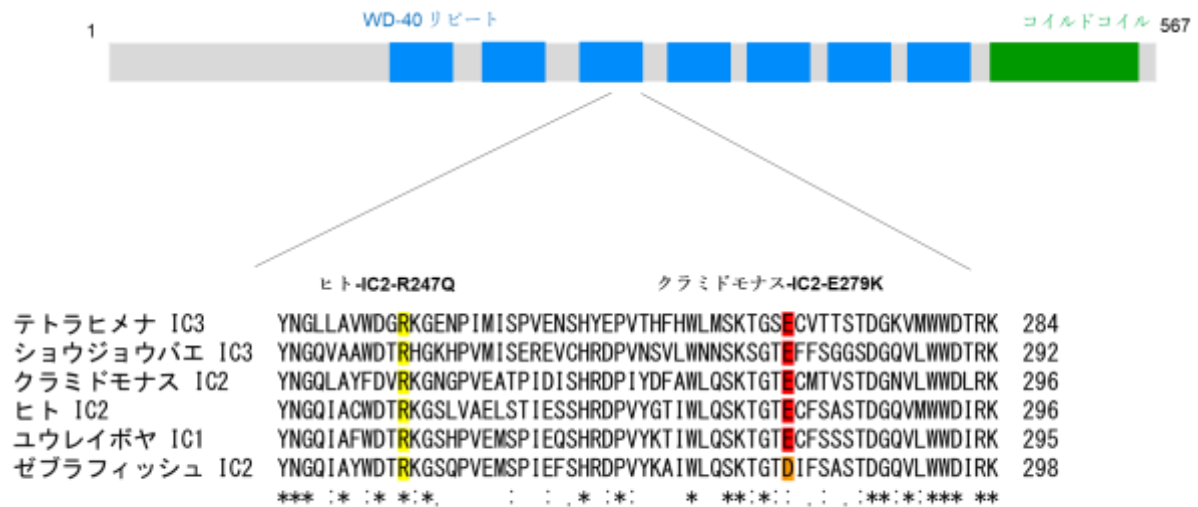


図 2-5. さまざまな生物間での外腕ダイニン IC2 のアミノ酸配列の比較

279 番目のグルタミン酸は、多くの生物間で保存されている（赤でマーク）が、ゼブラフィッシュではその位置がアスパラギン酸となっている（オレンジでマーク）。ヒトの PCD 患者には IC2 の第 2WD ドメインと第 3WD ドメインの境界領域にある 247 番目のアルギニン（黄でマーク）がグルタミンに置換される変異が見つかっている。興味深いことにこの変異は、気管繊毛における外腕ダイニンの数が減少することが分かっている (Al-Mutairi et al., 2022)。

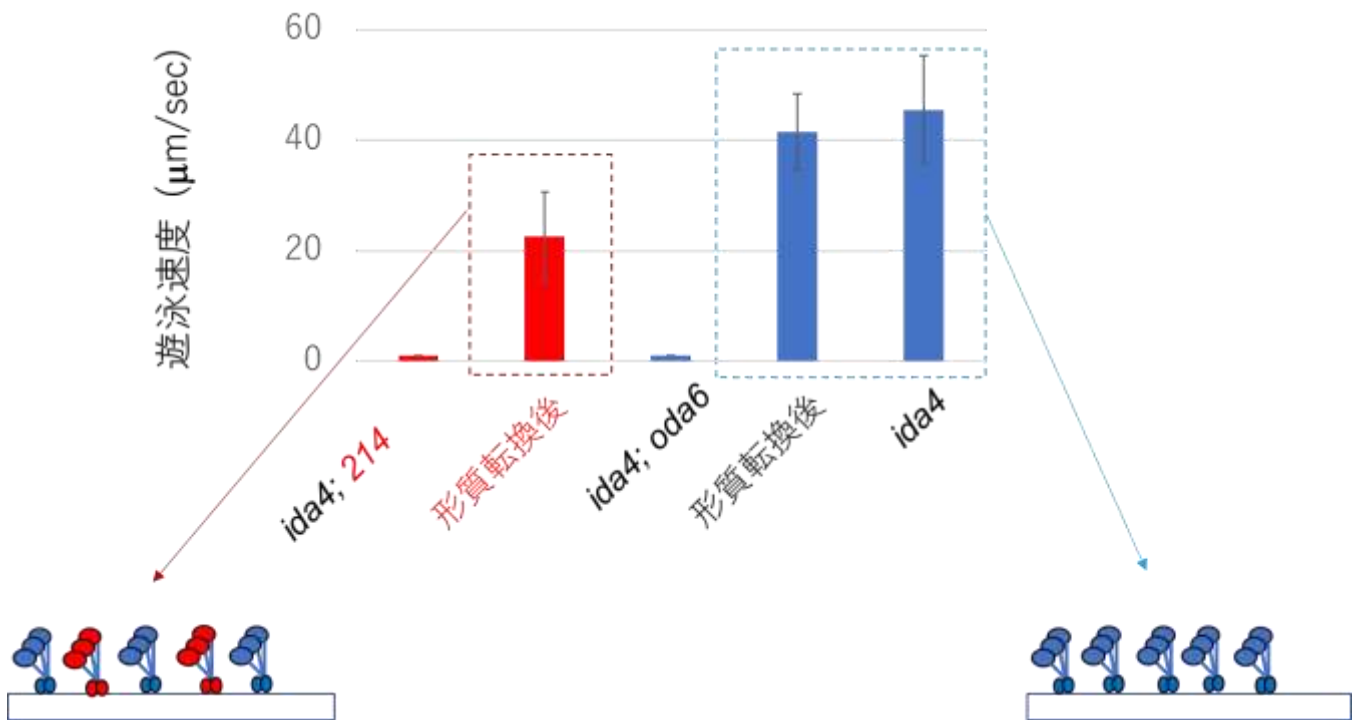


図 2-6. 形質転換による運動性の回復

214 株に野生型 IC2 遺伝子を形質転換により、変異株の運動性が回復するか調べた。運動性を持たない 2 重変異株 *ida4; 214* 株に野生型 IC2 遺伝子を形質転換したところ、形質転換体に運動性が回復することがわかった。このことから、214 株の遊泳速度低下の原因が IC2 遺伝子の点変異 (E297K) であることが確定した。そこで、変異株の名前を *oda6E279K* 株と新たに命名した。同様の実験を、*ida4; oda6* に対しても行った。この株は運動性を持たないが、野生型 IC2 遺伝子の形質転換により、*ida4* 株並みの遊泳を示すようになった。*ida4; 214* 株、*ida4; oda6* 株、それぞれの形質転換体の運動を比べると、*ida4; 214* の形質転換体は *ida4; oda6* 株のそれよりも遅いことが分かった。すなわち、214 株の運動性は IC2 遺伝子の形質転換では完全には回復していないことが示唆された。速度が低下している原因は模式図で示しているように *ida4; 214* 株の形質転換体は野生型のダイニンと変異型のダイニンが混ざり合っていることだと考えられる。

第 3 章 変異型ダイニンのモーター活性

第3章 変異型ダイニンのモーター活性

3-1 はじめに

第3章では、中間鎖 **IC2** の点変異により外腕ダイニンの機能が低下するのはなぜか、その原因を追究した。ダイニンはヌクレオチド条件を変化させる、またはダイニン分子の並べ方によってその活性が変化することが知られている (Omoto et al., 1996; Yagi and Kamiya, 1995; Aoyama and Kaimiya, 2010)。そこで本章では多様な条件で野生型ダイニンと変異型ダイニンのモーター活性を比較することで、変異型ダイニンのモーター活性低下の要因とその特徴を追求することを目的とする。

ダイニンを活性化する *in vitro* の特殊な条件では、この変異株の運動性が野生株と同程度になっていた。このことから、この **IC2** の変異はダイニンのモーター活性を抑制状態に固定している可能性が考えられた。興味深いことに、微小管に対するダイニンの配置の仕方により、変異型ダイニンのモーター活性に違いが見られた。すなわち、個々の分子を単独でガラス上に配置させた場合、変異型ダイニンの微小管滑り速度は野生型ダイニンの **70%** に低下していたが、分子を微小管上で密に並べた場合には、その速度は野生型ダイニンの **10%** にまで低下していた。また、**ATP** 加水分解活性もダイニンの存在状態の違いにより差があることがわかった。ダイニンを軸糸から単離した場合、変異型と野生型ダイニンの **ATP** 加水分解活性に差が見られなかったが、軸糸の **ATP** 加水分解活性は、変異型では野生型の **70%** に減少していた。これらの結果は、**IC2** の **E279K** 変異は軸糸内のようにダイニンが密に並ぶときに、モーター活性と **ATPase** 活性のどちらにも強い影響を与えることが分かった。繊毛軸糸内では外腕ダイニンは密に並び分子同士が互いに接触していることを考慮すると、**IC2** の **E279K** 点変異は、隣接する外腕ダイニンのモーター活性に影響を与える可能性が考えられた。

3-2 材料と方法

微小管を観察するための暗視野顕微鏡

微小管の直径は 25nm と細く，その観察には特殊な顕微鏡が必要である。光源の輝度を上げると，微小管 1 本 1 本の観察が可能になることが知られており，ここでは，光源に 100W 水銀ランプ(U-RFL-T; Olympus)を用意し，それを暗視野顕微鏡(BX-51; Olympus)に組み込んだ。微小管の滑り運動を測定する際には 50 倍の油浸対物レンズを使用した。

軸糸微小管の滑り運動の観察

岡垣と神谷の方法に従い，ATP の存在下にプロテアーゼ処理軸糸から微小管を滑り出させた (Okagaki and Kamiya, 1986)。単離した繊毛を HMDEKP (HMDEK に 1 % polyethylene glycol 分子量 20,000 を加えたもの) に懸濁して 1 ml とした。微小管の滑り速度を計測する実験ではこの繊毛サンプルを約一秒間，3 回の超音波処理を施し，繊毛を断片化した。遠心処理により沈殿させた繊毛を HMDEK 100 μ l に懸濁し，等量の 0.2% Nonidet P-40 (in HMDEKP) を加えて繊毛を脱膜した。得られた繊毛軸糸をフローセル(スライドガラスとカバーガラスの間に両面テープを貼って隙間を作ったもの)に流し込み，軸糸がガラスに張り付いていることを暗視野顕微鏡で確認した。0.5 mM ATP を含む HMDEKP を用いて，ガラスにつかなかった軸糸を洗い流した。このとき，溶液を加えた側とは反対側にろ紙を差し込むことで，溶液交換を行った。その後，同様の方法で，フローセル内の溶液をヌクレオチド(ATP 1mM または ATP 0.1mM + ADP 0.5mM) とタンパク質分解酵素 (0.5 μ g/ml Trypsin) を含む溶液に交換し，軸糸の解体と微小管の滑りを誘導した。ATP を含む液を灌流する作業から動画記録を開始し，常に顕微鏡の焦点を合わせながら，5 分程度にわたって微小管が滑り出す様子を記録した。微小管滑り速度の解析には ImageJ を使用した。

細胞モデルの繊毛打頻度測定

神谷の方法に従い、界面活性剤 Nonidet P-40 によって細胞から細胞膜を除去し、運動機構を残した細胞モデルを作製した (Kamiya, 2000)。実験の初めに必ず、クラミドモナス生細胞を顕微鏡観察して、繊毛の生え具合と細胞の運動性を確かめた。繊毛が無い細胞が多い時は、細胞を遠心して沈殿させ、それを純水に懸濁し、30分ほどエアレーションした。この操作により、繊毛が再生して運動性が改善する。細胞を 15 ml のコニカルチューブに 10 ml とり、遠心 (2,500 rpm, 3 min, 日立 Swing type rotor) した。上澄みをパストゥールピペットを用いて丁寧に取り除き、10 ml の純水に懸濁した。再び遠心 (2,500 rpm, 3 min, 日立 Swing type rotor) し、上澄みを丁寧に取り除いた後、10 ml の HES (10 mM HEPES (pH7.4), 1 mM EGTA, 4% sucrose) 溶液に懸濁した。もう一度遠心 (2,500 rpm, 3 min, 日立 Swing type rotor) をかけて上澄みを丁寧に取り除いた。この作業は細胞モデルの質を左右することが多く、試料作成ごとに必ず行った。得られた沈殿に NP40 液 (0.5% Nonidet P40 in HMDEK) 0.2 ml を加え、静かに懸濁した。この作業は氷上で行い、懸濁の作業はマイルドに行った。この作業により、細胞は除膜されて死ぬ。除膜された細胞は室温では活性がすぐに落ちるので、サンプルを常に氷で冷やした。動いている細胞がないことを確かめるために、サンプル 5 μ l を 100 μ l の HMDEKP に懸濁し、一部をとり顕微鏡で観察した。この時、洗いの作業が上手くいっていないと、カルシウムイオンが液中に残ることで、クラミドモナスの繊毛が抜けてしまう。クラミドモナスが動いていないこと、繊毛が抜けていないことを確認したら、試料 10 μ l と HMDEKP 80 μ l を混ぜ、次に 10 mM ATP を 10 μ l 加えすぐに顕微鏡で観察した。細胞モデルの濃度によっては、ATP が即座になくなってしまいうので、ATP 添加後はサンプルを放置しないようにした。再活性化後、ほとんどの細胞が生細胞のように動くことを確認後、異なる ATP 濃度で繊毛打頻度の変化を測定した。

繊毛打頻度の測定方法は第 2 章の材料と方法で解説したものと同様である。新しいチューブの中に、HMDEKP 80 μ l, ATP 再生系としてクレアチンリン酸キナーゼ (3,500 units/ml) を 2 μ l, 0.5 M クレアチンリン酸 1 μ l, そこに、異なる濃度の ATP 溶液 (10 mM, 5 mM, 1 mM, 0.5 mM) を 10 μ l 入れ、最後に、細胞モデルのサンプル 10 μ l を混ぜ、すぐさま繊毛打頻度を測定した。

精製ダイニンを使った微小管の滑り運動

この実験でも軸糸微小管の滑り運動で説明したフローセルを使用して溶液を灌流しながら実験環境を整えた。精製した外腕ダイニンの α β サブコンプレックスの分画 (方法は、2 章の材料と方法を参照) をフローセルに 10 μ l 流してガラス上に外腕ダイニンを吸着させた。次に 4mg/ml の BSA 溶液を 10 μ l 流すことでガラス表面をブロッキングした。ブタの脳チューブリンを 37°C において重合させ、それを微小管重合阻害剤であるタキソールを用いて安定化させたのち、希釈した微小管をフローセルに灌流した。微小管がダイニンを介してガラスに吸着する様子が顕微鏡下に観察された。HMDEK で余計な微小管を除去したのち、1mM ATP と 1mM ADP を含んだ HMDEK を 20 μ l 流して微小管の滑り運動を開始させた。微小管の運動の様子を撮影し、その速度を ImageJ で解析した。

束化微小管の作成とそこからの微小管滑り運動

変異型、野生型ダイニン間でのモーター活性の違いを、ダイニンが微小管上に並んだ状態でも比較した。外腕ダイニンは微小管と混合すると、自発的に微小管上に密になりび微小管の束ができる (Haimo and Fenton, 1984)。そのようにして作成した束化微小管から滑り出す微小管のすべり速度を測定した。外腕ダイニンが高密度に接着した微小管の束は、青山と神谷の方法で作製した (2010)。まず、重合した微小管をガラス表面

に吸着させ、そこに ATP とともに外腕ダイニンの粗抽出液を流し込んだ。この処理により、外腕ダイニンは微小管上に ATP 非感受性の結合部位で並ぶことが期待された。その後、ATP を洗い流し、次に、ATP 非存在下にもう一度微小管を導入した。すると、微小管 2 本が結合した微小管束が観察されたが、2 本目の微小管はすべて ATP 感受性微小管結合部位で微小管と相互作用していると考えられた。最後に、1mM の ATP 溶液を灌流して、微小管束の滑り運動を誘発し動画撮影したのち、その速度を ImageJ で解析した。

電子顕微鏡による束化微小管に並ぶ外腕ダイニンの観察

Guido らの方法を参考に束化微小管の間に並ぶ野生型外腕ダイニンと変異型外腕ダイニンを電子顕微鏡によって観察した(Guido et al., 2022)。束化微小管を形成するために重合した微小管と外腕ダイニンの粗抽出液を 1 : 1 の濃度 (終濃度 0.5 mg / ml 程度) で混ぜて 10 分室温で放置した。微小管が束になっていることを暗視野顕微鏡で確認した後に、夾雑物を除くために遠心処理 (Tomy, MX-301; 15,000 rpm 10 min) し、その上澄みを丁寧に取り除いた。沈殿物に HMDE (30 mM HEPES-NaOH (pH7.4), 5 mM MgSO₄, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 50 mM CH₃COOK) を加えて懸濁し、束化微小管の濃度が 40 µg / ml になるように調整した。束化微小管は 1 %グルタルアルデヒド液で固定し、1%の酢酸ウランで染色したのちに電子顕微鏡 (JEM-1200EX-II; Joel Cp., Tokyo)で観察した。

3-3 結果

繊毛軸系微小管の滑り運動活性

外腕ダイニンの運動活性を *oda6E279K* (214) 株と野生株の間で比較するために、プロテアーゼ処理により解体されていく軸系において、微小管の滑り運動を調べた。変異

株の滑り速度は 1 mM ATP で野生株とほぼ同じであったが (図 3-1A), 軸糸から滑り出す微小管の本数は変異株では有意に少なかった (図 3-1B)。一方, そこに 1 mM ADP を加えたところ, 変異株から滑り出す微小管の本数が上昇して, その値は野生株のそれに近づくことがわかった。また, 界面活性剤で除膜した細胞モデルの運動を再活性化する実験を行ったところ, *oda6E279K* (214) 株の繊毛打頻度は, 1 mM ATP (生理学的な濃度) では野生株の細胞モデルより有意に低かったが, 低 ATP 濃度では繊毛打頻度の差が無くなることもわかった (図 3-2)。ADP 添加や ATP 濃度の低下がダイニンの活性を上昇させる効果があることが知られている (Omoto et al., 1996; Yagi and Kamiya, 1995)。これらの結果は, 変異型外腕ダイニンのモーター活性は野生型外腕ダイニンよりも低く抑えられているものの, ADP や低濃度 ATP 条件においては, 野生型外腕ダイニン並みに上昇することが示唆する。ADP や低濃度 ATP の効果は外腕ダイニン全体を欠損した *oda1* の軸糸では観察されないことから (図 3-1B と 3-2)。ADP または低濃度 ATP は外腕ダイニンに直接働きかけてそのモーター活性に影響を与えられとされる。AAA タンパク質ファミリーに属するダイニンの重鎖には ATP 加水分解部位 (AAA1) の他に, 3 つのヌクレオチド結合部位が存在することが知られている (AAA2 - AAA4)。そこに結合するヌクレオチドの違いによりダイニンの活性が制御される可能性が指摘されている (Yagi, 2000; Shiroguchi and Toyoshima, 2001; Inoue and Shingyoji, 2007)。今回得られた IC2 点変異は外腕ダイニンのこれらの制御的なヌクレオチド結合部位に影響を与え, その結果としてダイニンの機能を変調させる可能性も考えられる。

外腕ダイニンの *in vitro* 運動活性

oda6E279K (214) 株と野生株の外腕ダイニン活性をより直接的に比較するために, 外腕ダイニンを単離精製して, ダイニンと相互作用しながら滑る微小管の運動を顕微鏡下で調べた (Kagami and Kamiya, 1992; Sakakibara and Nakayama, 1998)。イオン交

換カラムクロマトグラフィーを用いて精製した外腕ダイニンの $\alpha\beta$ 複合体をスライドガラスに吸着させ、1 mM ATP, 1 mM ADP の条件下で滑り運動を行う微小管を暗視野顕微鏡下でビデオ記録した。変異型外腕ダイニンの微小管滑り速度 ($1.8 \pm 0.7 \mu\text{m}/\text{sec}$) は、野生型外腕ダイニン ($3.6 \pm 1.2 \mu\text{m}/\text{sec}$) よりも 50%遅かった (図 3-3A)。このことから、IC2 点変異によって外腕ダイニンモーター活性が低下していることが示唆された。

外腕ダイニンにより束化された微小管における微小管の滑り運動

外腕ダイニンの存在状態が軸糸内に近い状態で、野生型及び変異型外腕ダイニンのモーター活性を比較した。外腕ダイニン分子は軸糸内の微小管上に並ぶと互いに接触しながら密に並んで結合する。このような密状態においてダイニンのモーター活性が上昇する可能性が考えられる (Aoyama and Kaimiya, 2010; Rao et al, 2021; Walton et al, 2021; Kubo et al, 2021)。IC2 の点変異は外腕ダイニン間の相互作用に影響を与えているかもしれない。そこで、IC2 変異型および野生型のダイニンで形成された微小管の束において、微小管滑り速度を比較する実験をおこなった。ATP 存在下に、ガラス表面に吸着させた微小管に外腕ダイニン粗抽出液を添加した。この状態では、外腕ダイニンの尾部 (ATP 非感受性) のみ微小管と結合し、微小管上に外腕ダイニンが向きを揃えて並んでいる (Aoyama and Kamiya, 2010)。ATP を除去し、さらに微小管を加えると、微小管束が形成された。2 本目の微小管は 外腕ダイニン頭部にある ATP 感受性微小管結合部位を介して微小管と結合していると考えられる。このような束では、外腕ダイニンが微小管間に周期的に配列していることが確認された (図 3-3D ; Aoyama and Kamiya, 2010)。この束に 1mM の ATP を加えると、束内の微小管の滑り運動が観察された。その滑り速度は、野生型外腕ダイニンではガラス表面上に吸着したダイニンで観察された場合よりもかなり速く、 $33 \pm 12.1 \mu\text{m}/\text{sec}$ となり過去の文献と同程度であった (図 3-

3B ; Aoyama and Kamiya, 2010)。一方、変異型外腕ダイニンで形成された微小管束では、微小管滑り速度は $4.3 \pm 2.2 \mu\text{m}/\text{sec}$ で、野生型外腕ダイニンで形成された微小管束の滑り速度よりも約 8 倍遅かった (図 3-3B と 3-3C)。

変異型ダイニンの微小管の滑り速度が野生型ダイニンに比べて著しく低下する原因を探った。微小管束中の外腕ダイニン分子の配置を電子顕微鏡で観察したところ、野生型、変異型の外腕ダイニンともに微小管上に周期的な配列を示した (図 3-3D)。しかし、変異型ダイニンでは、微小管間で連続的に整列するダイニン分子の数が、野生型よりも少なかった。外腕ダイニン間の配列の定量的比較は今後の課題であるが、この結果は、変異型外腕ダイニンでは、その分子間、あるいは、ダイニンと微小管間の相互作用が野生型ダイニンよりも弱い可能性を示唆する。以上のことから、E279K 変異は外腕ダイニン間もしくはダイニン・微小管間の相互作用を弱め、外腕ダイニンの運動活性を著しく低下させたと考えられる。

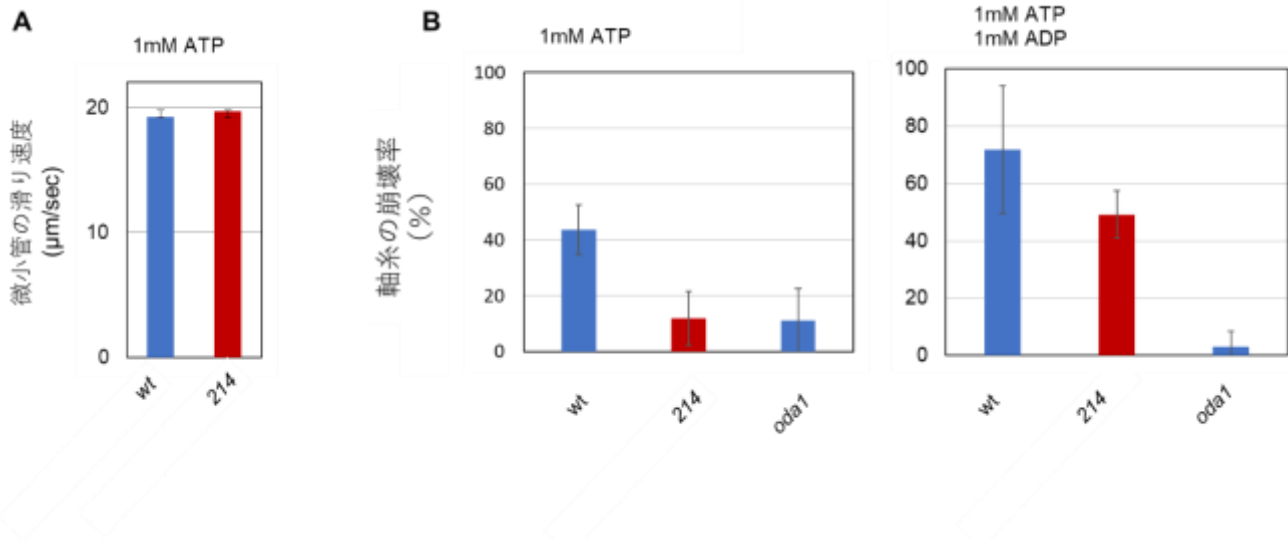


図 3-1. プロテアーゼ処理した軸糸から滑り出す微小管の比較

野生株, *oda6E279K* (214) 株および *oda1* において, プロテアーゼ処理した軸糸における ATP による微小管の滑り速度と軸糸の崩壊率を測定した。(A) *oda6E279K* (214) 株の軸糸における微小管の滑り速度は, 野生株の軸糸とほぼ同じであった。(B) 1mM ATP (左) と 1mM ATP+1mM ADP (右) 存在下でプロテアーゼ処理した軸糸における軸糸崩壊率の比較。214 軸糸の微小管滑り活性は, ADP 存在下で上昇した。

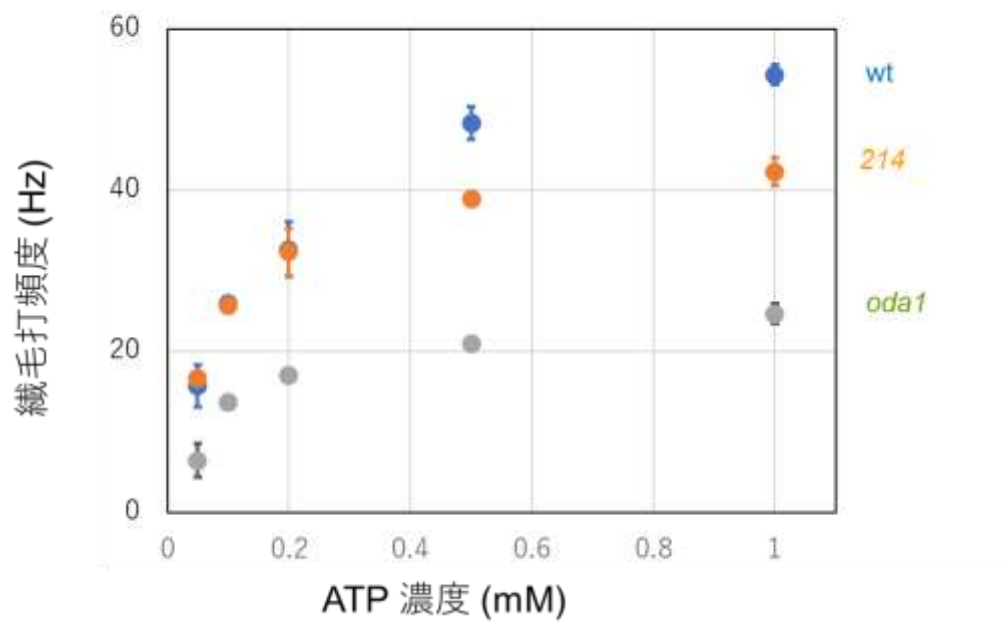


図 3-2. 214 株細胞モデルの運動

様々な濃度の ATP 条件において、野生株、*oda6E279K* (214) 株、*oda1* 株細胞モデルの繊毛打頻度を比較した。高 ATP 濃度 (1 mM ATP) では野生株と 214 株には 10 Hz 程の差があったが、低 ATP 濃度 (0.2 mM 以下) では、差がほとんどなくなることがわかった。

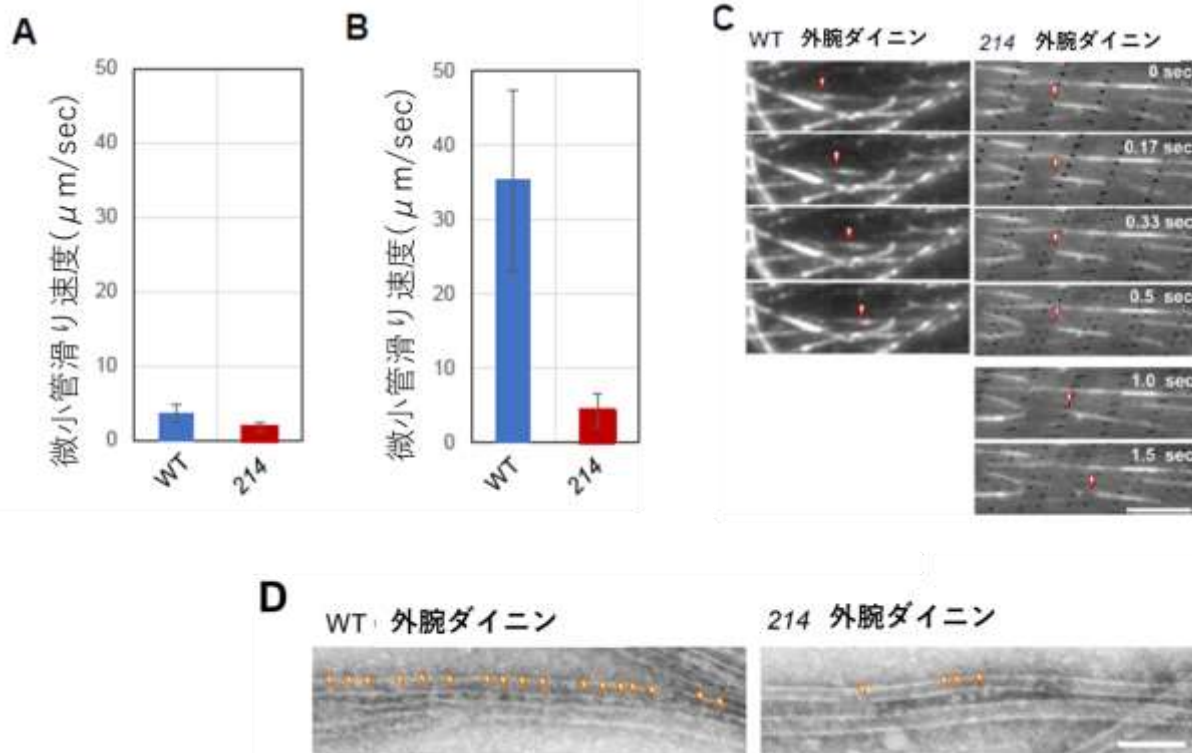


図 3-3. ガラス表面と微小管束内での微小管の動き

(A) 野生型および変異型外腕ダイニンによって生じる微小管滑り速度の比較。Mono-Q カラムで精製した外腕ダイニン $\alpha\beta$ サブコンプレックスをガラス表面にランダムに付着させ、1 mM ATP と 1 mM ADP を加えて微小管の滑り運動を誘導した。変異型外腕ダイニンを用いた場合の滑り速度 ($1.8 \pm 0.7 \mu\text{m}/\text{sec}$) は、野生型外腕ダイニンを用いた場合 ($3.6 \pm 1.2 \mu\text{m}/\text{sec}$) よりも約 50%遅かった。(B) 野生型および変異型外腕ダイニン ($\alpha\beta\gamma$ 複合体) で形成された微小管束の ATP 誘導解離時の微小管滑り速度。(C) 束化微小管の滑りを経時的に示した暗視野顕微鏡像。矢印は動いている微小管の端を示す。スケールバー：10 μm 。(D) 野生型と変異型ダイニンで形成された微小管束の電子顕微鏡像。外腕ダイニン分子は微小管間に周期的に密に配列している。しかし、変異型外腕ダイニンの整列は、野生型外腕ダイニンの整列よりも規則性がなく、より疎である。矢印は整列する外腕ダイニンを示している。スケールバー：100 nm。

3-4 考察

軸糸の微小管滑り実験と精製ダイニンの微小管滑り運動の実験から、変異株では外腕ダイニンのモーター活性が低下していることが明らかになった。一方、ADP 添加や低 ATP 濃度条件などのダイニンの高活性化条件においては、*oda6E279K* (214) 株の軸糸微小管が滑る割合と、細胞モデルにおける運動性は野生株並みに上昇した。このことから、*oda6E279K* (214) 株のダイニンのモーター活性は ATP 濃度が高い *in vivo* に近い条件では抑制されているが、ダイニンを活性化した条件では抑制が外れて野生株とほぼ同じモーター活性まで回復することが明らかになった。これはモータードメイン自体の機能が低下しているのではなく、*oda6E279K* (214) 株のダイニンのモーター活性が抑制状態に固定されていることを示す重要な結果である。

束化された微小管の滑り運動実験では、野生型ダイニンと比較して変異型ダイニンの微小管滑り速度が 8 倍も低下するという興味深い結果が得られた。それぞれの外腕ダイニンによって束化された微小管を電子顕微鏡で観察したところ、変異型ダイニンでは微小管上の並びが疎になる傾向にあった。一方、繊毛内においては、微小管に対する変異型ダイニンの結合性は野生型のそれと変わらないことが分かっている (図 2-2C)。これらの結果から、変異型ダイニンでは隣り合う外腕ダイニン分子間の結合性が低下し、それによってモーター活性が低下する可能性が示唆された。第 4 章では、ダイニンの変異株を用いて、変異した IC2 が隣接する外腕ダイニン分子のどのサブユニットに影響を及ぼすのかを検証する実験をおこなった。

第4章 変異型 IC2 と相互作用する サブユニットの探索

第4章 IC2と相互作用するダイニンサブユニットの探索

4-1 はじめに

前章の実験から *oda6E279K* 変異は隣接する外腕ダイニンの活性に影響を与える可能性があることが示唆された。外腕ダイニン分子は微小管上に構築される際に、分子が密に結合すること (Haimo et al., 1979; Haimo and Fenton, 1984), また軸糸の微小管上では IC2 が位置する外腕ダイニンの尾部は隣接する外腕ダイニンの重鎖モータードメインと複数個所で接触することが確認されている (Rao et al., 2021; Walton et al., 2021; Kubo et al., 2021; Zimmermann et al., 2023)。これらのことから、IC2 の E279K 変異は外腕ダイニン重鎖 α , β , γ のどれかに影響を与えている可能性が高いと考えられた。本章では、外腕ダイニン重鎖単独欠失株と *oda6E279K* (214) 株との二重変異株を作製し、その運動性を解析することで変異型 IC2 が影響を与えるサブユニットが何かを探索した。

4-2 材料と方法

二重変異株の作製

oda6E279K(214) 株と外腕ダイニン重鎖単独欠失株(それぞれ表 2-1 を参照), *oda11* 株(α 重鎖欠失), *oda4S7* 株(β 重鎖モータードメインの欠損), *oda2-t* 株(γ 重鎖モータードメインの欠損)を掛け合わせて、それぞれの二重変異株を作製した。掛け合わせは、2-2 節の材料と方法と同じである。

二重変異株の遊泳速度測定

作製した二重変異株の遊泳速度を測定した。2-2 節の材料と方法に記載した方法で遊泳速度を測定した。

外腕ダイニン分子の *in silico* 構造解析

PDB(Protein Data Bank)に掲載されているクラミドモナス外腕ダイニンの分子モデルを用いて、中間鎖 IC2 と各ダイニン重鎖の相互作用を調べた。用いた構造データは、7KZM (Walton et al., 2021)と 8GLV (Walton et al., 2023)である。まず、繊毛微小管に並ぶの繊毛蛋白質の構造情報 (8GLV) から、外腕ダイニン重鎖と IC2 のデータを抽出した。中間鎖 IC2 の座標を基準として、この外腕ダイニン重鎖と、先に明らかにされていた微小管に結合する外腕ダイニン分子のより詳細な構造情報 (7KZM) とを重ね合わせ、2つのダイニン分子の座標データを一致させた。その後、チューブリン以外のデータを削除することで 2本の微小管プロトフィラメント上に並ぶ外腕ダイニンの重鎖と中間鎖 IC2 というシンプルなモデルを構築した。モデルの構築には UCSF chimera(Pettersen et al, 2004)を使用した。

4-3 結果

各種外腕ダイニン重鎖欠失株と 214 株の二重変異株の運動性解析

変異型 IC2 は外腕ダイニン重鎖の α , β , γ のうちどれに強い影響を与えているのだろうか? この疑問を解決するために *oda6E279K* (214) 株と各外腕ダイニン重鎖単独欠失株との二重変異株を作製し、その運動性を評価した (図 4-1)。その結果、*oda11* 株 (α 重鎖欠失) と *oda2-t* 株 (γ 重鎖モータードメインの欠失) において、二重変異株は単独株に比べて遊泳速度が低下していることがわかった。対照的に、*oda4S7* 株 (β 重鎖モータードメインの欠損) においては、単独変異株と二重変異株の両者に遊泳速度の差は見られなかった。この結果は IC2 の E279K 変異が外腕ダイニン β 重鎖に強い影響を与えていることを示唆する。

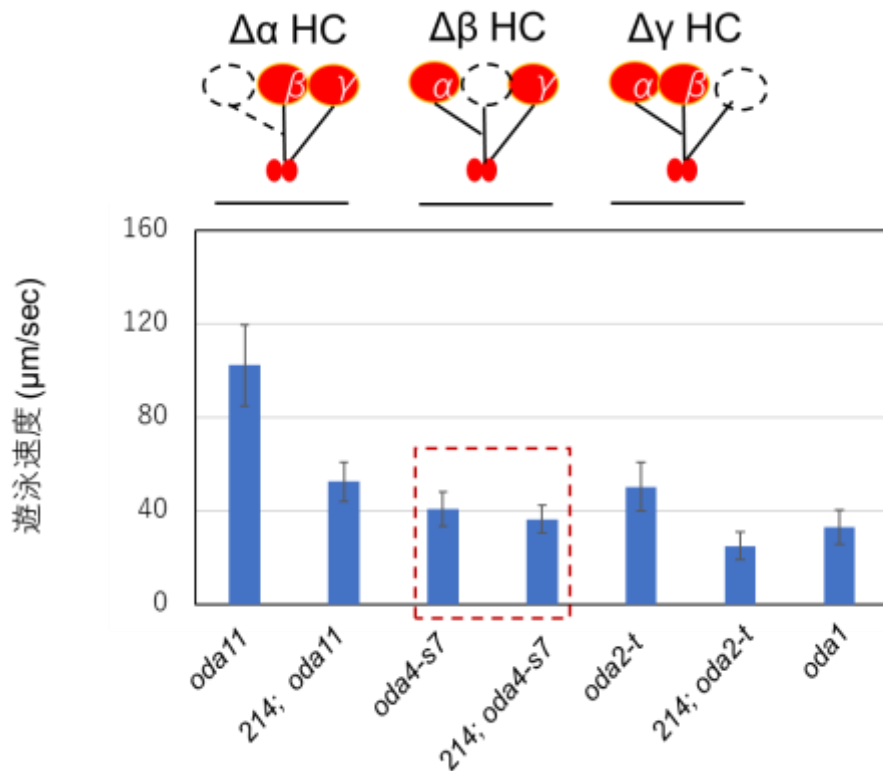


図 4-1. 外腕ダイニン重鎖の欠失株と 214 株との二重変異株の運動性

214 株とそれぞれの外腕ダイニン重鎖単独欠失株との二重変異株の遊泳速度を比較した。*oda11* 株 (α 重鎖欠失) と *oda2-t* 株 (γ 重鎖モータードメイン欠失) は二重変異株になると遊泳速度が低下した。*oda4S7* (β 重鎖モータードメイン欠失) 株については二重変異株と遊泳速度の差はなかった (赤枠)。

4-4 考察

IC2 は β 重鎖を介して外腕ダイニンを制御する

束化された微小管の滑り実験 (図 3-4B,C,D) では, ダイニン分子間に相互作用があること, その相互作用は中間鎖 IC2 の E279K 変異により低下することが示唆された (第 3 章)。本章では, *oda6E279K* (214) 株と各種外腕ダイニン重鎖単独欠失株との二重変異株の運動性を解析した結果 (図 4-1), IC2 の E279K 変異は隣接する外腕ダイニンの β 重鎖に影響を与えている可能性が示唆された。近年, クライオ電子顕微鏡を用いた構造学的研究から, 外腕ダイニン分子の根元に位置する IC2 の WD-リピートドメインは隣接する外腕ダイニン分子の β 重鎖の AAA6 ドメインと接触していることがあきらかとなっており (Rao et al., 2021; Walton et al., 2021; Kubo et al., 2021; Zimmermann et al., 2023; Walton et al., 2023), IC2 は β 鎖の AAA6 を通じて隣接ダイニンに影響を与える可能性が考えられる。興味深いことに, 変異位置の 279 番目のグルタミン酸は WD リピートが形成する β プロペラドメインの内側に位置しており, β 重鎖と直接結合していない (図 4-2)。おそらく *oda6E279K* 変異は IC2 の β プロペラにアロステリックな構造の変化を生じさせて, β 重鎖との相互作用に影響を与えているのではないかと考えられる。それでは, 変異型 IC2 は β 重鎖との相互作用に具体的にはどのような影響を与えているのだろうか? 微小管に結合する変異型ダイニンを電子顕微鏡により観察したところ, 変異型ダイニンの分子間相互作用は低下している可能性が示唆された (図 3-4D)。*oda6E279K* (214) 株では, その遊泳速度と繊毛打頻度はどちらも 60%程度まで低下することを考慮すると (図 2-1A), 中間鎖 IC2 と隣接するダイニン分子の β 重鎖の間には相互作用があつて, その相互作用はダイニンのモーター活性を調節しているが, 今回得られた IC2 点変異はその相互作用を変化させて繊毛運動を低下させた可能性が考えられる。

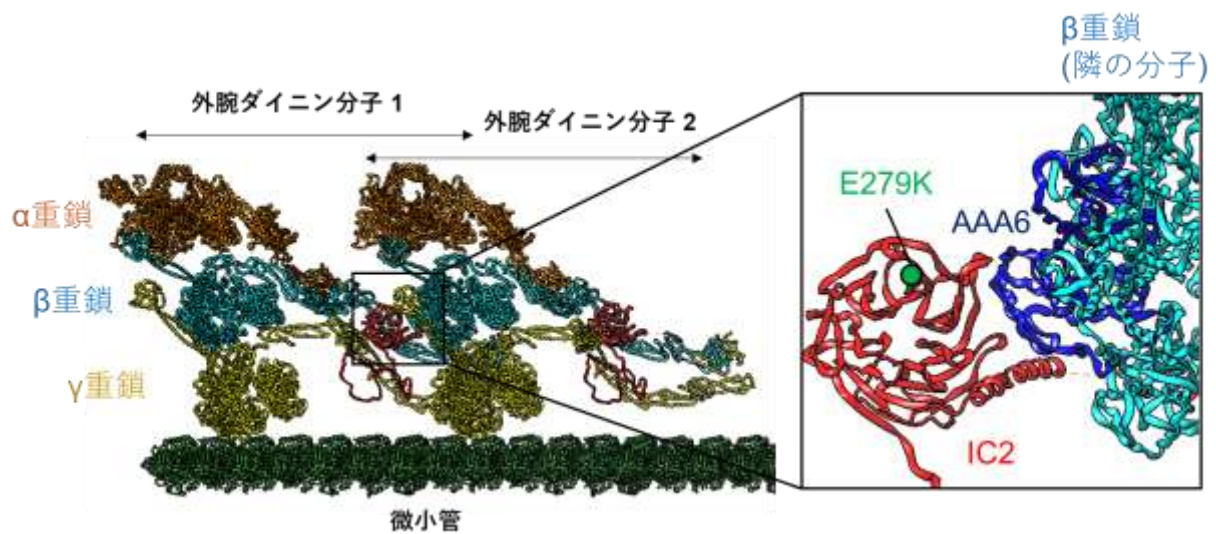


図 4-2 微小管に並ぶ外腕ダイニン分子モデル

7KZM (Walton et al., 2021) のデータと 8GLV (Walton et al., 2023) の PDB データを基に分子モデルを構築した。左図は 2 分子の外腕ダイニンが軸糸内の微小管上に並んでいる分子モデルである。全ての外腕ダイニンサブユニットを表示すると構図が複雑になるため、重鎖と IC2 のみのシンプルなモデルを構築した。α 重鎖はオレンジ、β 重鎖はシアン、γ 重鎖は黄、IC2 は赤で示している。右図は IC2 と β 重鎖の接触部分を拡大したものである。IC2 は赤でその E279K 変異位置を緑で表示している。隣の分子の β 重鎖はシアンでその AAA6 ドメインを青で表している。

第5章 総合考察

5 総合考察

本研究ではこれまでに困難であった中間鎖・軽鎖複合体の機能を解析するべく、外腕ダイニン中間鎖や軽鎖の機能に異常があるものの、外腕ダイニン構造を保持している新規変異株を探索した。新たに単離された変異株では、外腕ダイニンの中間鎖 IC2 に点変異が挿入されており、279 番目のグルタミン酸がリジンに変化していた (図 2-4)。その結果、遊泳速度、鞭毛打頻度ともに野生株の 60%程度になっていた(図 2-1A)。これまでに単離されてきた外腕ダイニン変異株の多くは外腕ダイニン分子そのものが微小管上に構築できなくなっている (Kamiya, 1988) が、この変異株では外腕ダイニンサブユニットを保持していた(図 2-2)。最近のクライオ電子顕微鏡による軸糸の構造解析から、中間鎖 IC2 は外腕ダイニン分子間の結合部に位置することが示されている (Rao et al., 2021; Walton et al., 2021; Kubo et al., 2021; Zimmermann et al., 2023; Walton et al., 2023)。この変異株の外腕ダイニンを詳細に調べることで、これまでほとんどわかっていなかったダイニン分子間の相互作用による繊毛運動制御のメカニズムを明らかにできるのではないかと考え、本研究ではこの新規株のダイニンの性質を詳しく調べた。

変異型外腕ダイニンのモーター活性は低下していたが、ダイニン活性化条件においてそのモーター活性は野生株並みに回復した (図 3-1B, 3-2)。これは変異型外腕ダイニンのモーター活性が抑制状態で固定されていることを示唆している。変異型ダイニンの微小管モーター活性を調べたところ、その滑り速度は変異型の外腕ダイニンでは、分子が密に並んだ状態において顕著に減少していることが分かった。この結果は、ダイニン分子間にそれぞれのモーター活性を制御する機構があり、そこに IC2 が関わることを示唆する (図 3-2A,B,C)。微小管上に並ぶ外腕ダイニンを電子顕微鏡により観察したところ、変異型ダイニンは連続して並びにくくなる傾向が見られた (図 3-3D)。これは、変異型外腕ダイニンでは、ダイニン分子間の相互作用が低下しているか、ダイニンと微小管の相互作用が低下しているかのどちらかを示唆する。IC2 の点変異によるモーター活性の

低下はこの IC2 によるダイニン分子間,あるいは微小管との相互作用が変調することに起因すると考えられた。

これまでの繊毛軸糸の構造解析から,外腕ダイニンの IC2 は隣接する外腕ダイニン分子の重鎖モータードメインと相互作用することが示されている (Zimmermann et al., 2023; Walton et al., 2023)。これは,変異型 IC2 が隣接する外腕ダイニンの重鎖に影響を与えて繊毛の運動性を低下させた可能性を考えさせる。その重鎖を特定するために,二重変異株による運動性の解析を行ったところ,変異型 IC2 は隣接するダイニンの β 重鎖に強い影響を与えることが強く示唆された (図 4-1)。

本研究では,ダイニン外腕中間鎖 IC2 が隣接する外腕ダイニンの β 重鎖を制御する可能性をはじめて示した。外腕ダイニンが隣接するダイニン分子と接触していることは古くから指摘されていたが (Goodenough et al., 1989), その機能的意義は長らくわかっていなかった。本研究により,外腕ダイニン分子間にある物理的な接触が中間鎖 IC2 を介して行われ,その変異によりダイニン間の相互作用が変調されるという新たな作業仮説をたてることができた。今後は,このモデルが正しいかどうかを確かめる必要がある。本研究はそのような実験を進める上での基礎となると考える。

謝辞

本論文は多くの方々にご協力頂くことで完成させることが出来ました。

指導教員の八木俊樹教授には私が学部生の頃から7年間にわたり丁寧なご指導を賜りました。研究をするために必要な知識はもちろんのことですが、何よりも研究の面白さを教えて頂きました。言葉にならないほど素晴らしいこの研究の世界に私を引き込んでくださったことに深謝の意を表します。

副査の伊原伸治教授，齋藤靖和教授，菅裕教授，山下泰尚准教授，には本論文の作製にあたり的確なご助言を賜りましたことお礼申し上げます。

東京大学 理学部の神谷律名誉教授には電子顕微鏡を用いた軸糸の微細構造観察にご協力頂きましたこと心より感謝いたします。

中央大学 理工学部 生命科学科の箕浦高子教授，菅野英美里氏には本研究の核となる変異株を単離し，お譲り頂きましたこと感謝いたします。

法政大学 生命科学部 生命機能学科の廣野雅文 教授には変異株の遺伝子座を特定することにご協力頂きました。感謝申し上げます。

コネチカット大学の **Stephen M. King** 教授と京都産業大学 生命科学部 産業生命科学科の若林憲一教授にはダイニン軽鎖のポリクローナル抗体をお譲り頂きました。厚くお礼申し上げます。

八木研究室の皆様には，本研究を遂行するための環境を共に整えて頂きましたこと，お礼申し上げます。特に小川倫加氏とは共に変異株の基本的な性質を解析する実験を行いました。また，福永晃氏には研究室に所属して右も左もわからない私に実験手技を教えて頂きました。また，西村勇斗氏と鈴木志緒里氏には一部のデータ解析にご協力頂きましたこと，重ねて深くお礼申し上げます。

最後に適切なお助言を頂きました研究者の方々と，切磋琢磨して高めあってきた友人達，そしてどんな時にも私を肯定して，応援してくれた家族に心より感謝申し上げます。私はこれからもこの素晴らしき研究の世界を楽しみながら，自分なりに精一杯励んでいきます。今後とも，どうぞよろしくお願い致します。

参考文献

神谷, "太古からの 9+2 構造 -繊毛の不思議-" 岩波書店 2012

福澤, 久保, 「クラミドモナス」 低温科学, 67,17-21,2009.

Afzelius, B.A. 2004. Cilia-related diseases. *J Pathol.* 204: 470-477.

Al-Mutairi, D. A., Alsabab, B. H., Alkhaledi, B. A., Pennekamp, P., Omran, H. 2022. Identification of a novel founder variant in DNAI2 cause primary ciliary dyskinesia in five consanguineous families derived from a single tribe descendant of Arabian Peninsula. *Front Genet.* 13:1017280.

Aoyama, S., Kamiya, R. 2010. Strikingly fast microtubule sliding in bundles formed by *Chlamydomonas* axonemal dynein. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67:365-372.

Brokaw, C.J., and Kamiya, R. 1987. Bending patterns of *Chlamydomonas* flagella: IV. Mutants with defects in inner and outer dynein arms indicate differences in dynein arm function. *Cell Motil Cytoskeleton* 8: 68–75.

Dibella, L.M., Gorbatyuk, O., Sakato, M., Wakabayashi, K., Patel-King, R.S., Pazour, G.J., Witman, G.B., and King, S.M. 2005. Differential light chain assembly influences outer arm dynein motor function. *Mol. Biol.Cell*, 16: 5661–5674.

Gorman, D.S, and Levine, R.P. 1965. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in

the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 54: 1665–1669.

Furuta, A., Yagi, T., Yanagisawa, H. A., Higuchi, H., and Kamiya, R. 2008. Systematic comparison of in vitro motile properties between *Chlamydomonas* wild-type and mutant outer arm dyneins each lacking one of the three heavy chains. *J Biol Chem* 284: 5927-5935.

Gibbons, IR., Rowe AJ., 1965. Dynein: A Protein with Adenosine Triphosphatase Activity from Cilia. *Science*. 3682: 424-430

Gibbons, IR., 1981. Cilia and flagella of eukaryotes. *J Cell Biol.* 91: 107-124.

Guido, I., Vilfan, A., Ishibashi, K., Sakakibara, H., Shiraga, M., Bodenschatz, E., Golestanian, R., Oiwa, K., 2022. *Small*. 32; e2107854.

Haimo, LT., Telzer, B.R., and Rosenbaum, J.L. 1979. Dynein binds to and crossbridges cytoplasmic microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76: 5759-5763.

Haimo, L.T., and Fenton, R.D. 1984. Microtubule crossbridging by *chlamydomonas* dynein. *Cell Motil.* 4: 371-385.

Harris, E. 2009. *The Chlamydomonas Sourcebook*, Vol. 1, 2nd ed., Amsterdam: Academic Press.

Heuser, T., Raytchev, M., Krell, J., Porter, M, E., Nicastro, D. 2009. The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella. *J Cell Biol.* 187: 921-933.

Huang, B., Piperno, G., Luck, D, J. 1979. Paralyzed flagella mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. Defective for axonemal doublet microtubule arms. *J Biol Chem.* 254: 3091-4000.

Inoue, Y., and Shingyoji, C. 2007. The roles of noncatalytic ATP binding and ADP binding in the regulation of dynein motile activity in flagella. *Cell Motil Cytoskeleton.* 64: 690-704.

Ishikawa, T., Sakakibara, H., and Oiwa, K. 2007. The architecture of outer dynein arms in situ *J. Mol. Biol.* 368: 1249 –1258.

Kagami, O., and Kamiya, R. 1992. Translocation and rotation of microtubules caused by multiple species of *Chlamydomonas* inner-arm dynein. *J. Cell Sci.* 103: 653– 664.

Kamiya, R., and Witman, G.B. 1984. Submicromolar levels of calcium control the balance of beating between the two flagella in demembrated models of *Chlamydomonas*. *J Cell Biol.* 98: 97-107.

Kamiya, R, and Okamoto, M. 1985. A mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* that lacks the flagellar outer dynein arm but can swim. *J Cell Sci.* 74: 181-91.

Kamiya, R. 1988. Mutations at twelve independent loci result in absence of outer dynein arms in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 107: 2253–2258.

Kamiya, R., Kurimoto, E., and Muto, E. 1991. Two types of *Chlamydomonas* flagellar mutants missing different components of inner-arm dynein. *J. Cell Biol.* 112: 441–447.

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

Kamiya, R., and Yagi, T. 2014. Functional diversity of axonemal dyneins as assessed by in vitro and in vivo motility assays of *Chlamydomonas* mutants. *Zool. Sci.* 31: 633-644.

Kato, T., Kagami, O., Yagi, T., and Kamiya, R. 1993. Isolation of two species of *Chlamydomonas reinhardtii* flagellar mutants, *ida5* and *ida6*, that lack a newly identified heavy chain of the inner dynein arm. *Cell Struct Funct* 18: 371–377.

Kato-Minoura, T., Hirono, M. and Kamiya, R. 1997. *Chlamydomonas* inner-arm dynein mutant, *ida5*, has a mutation in an actin-encoding gene. *J. Cell Biol.* 137: 649-656.

Kathir, P., LaVoie, M., Brazelton, W.J., Haas, N.A., Lefebvre, P.A., and Silflow, C.D. 2003. Molecular map of the *Chlamydomonas reinhardtii* nuclear genome. *Eukaryot Cell* 2: 362–379.

Kikushima, K., Yagi, T., Kamiya, R. 2004. Slow ADP-dependent acceleration of microtubule translocation produced by an axonemal dynein. FEBS Lett. 563: 119-122.

King, S.M., Otter, T., and Witman, G.B. 1986. Purification and characterization of Chlamydomonas flagellar dyneins. Methods Enzymol. 134: 291–306.

King, S.M., and Witman, G.B. 1990. Localization of an intermediate chain of outer arm dynein by immunoelectron microscopy. J. Biol.Chem. 265: 19807-19811.

King, S.M. 2012. Integrated control of axonemal dynein AAA(+) motors. J Struct Biol 179: 222–228.

King, S M., Yagi, T., and Kamiya, R. 2023. The Chlamydomonas Sourcebook, Vol. 3, 3rd ed. Chapt. 6, Amsterdam: Academic Press.

Knowles, M, R., Daniels, L, A., Davis, S, D., Zariwala, M, A., Leigh, M, W. 2013. Primary ciliary dyskinesia. Recent advances in diagnostics, genetics, and characterization of clinical disease. Am J Respir Crit Care Med. 188: 913-935.

.

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

Liu, Z., Takazaki, H., Nakazawa, Y., Sakato, M., Yagi, T., Yasunaga, T., King, S.M., and

Kamiya, R. 2008. Partially functional outer-arm dynein in a novel *Chlamydomonas* mutant expressing a truncated gamma heavy chain. *Eukaryot. Cell* 7: 1136 –1145.

Mitchell, D.R., and Rosenbaum, J.L. 1986. Protein-protein interactions in the 18 S ATPase of *Chlamydomonas* outer dynein arms. *Cell Motil. Cytoskeleton* 6: 510 –520.

Mitchell, D.R., and Kang, Y. 1991. Identification of *oda6* as a *Chlamydomonas* dynein mutant by rescue with the wild-type gene. *J. Cell Biol.* 113: 835– 842.

Mitchell, D.R., and Kang, Y. 1993. Reversion analysis of dynein intermediate chain function. *J. Cell Sci.* 105: 1069 –1078.

Nicastro, D., Schwartz, C., Pierson, J., Gaudette, R., Porter, M.E. and McIntosh, J.R. 2006. The molecular architecture of axonemes revealed by cryoelectron tomography. *Science* 5789, 944-948.

Oda, T., T. Yagi, H. Yanagisawa, and M. Kikkawa. 2013. Identification of the outer-inner dynein linker as a hub controller for axonemal dynein activities. *Curr. Biol.* 23:656–664.

Oda, T., Hirokawa, N., and Kikkawa, M. 2007. *J. Cell Biol.* 177: 243–252

Okagaki T, and Kamiya R. 1986. Microtubule sliding in mutant *Chlamydomonas* axonemes devoid of outer or inner dynein arms. *J Cell Biol.* 103: 1895-902.

Omoto, C. K., Yagi, T., Kurimoto, E., Kamiya, R. 1996. Ability of paralyzed flagella mutants of *Chlamydomonas* to move. *Cell Motil Cytoskeleton*. 33: 88-94.

Ori-McKenney, K. M., Xu, J., Gross, S. P., Vallee, R. B. 2010. A cytoplasmic dynein tail mutation impairs motor processivity. *Nat Cell Biol*. 12: 1228-1234.

Pazour G. J., Agrin N., Leszyk J., and Witman G. B. 2005. Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *J Cell Biol* 170: 103–113.

Rao, Q., 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. *Nat Struct Mol Biol* 28: 799–810.

Reiter, J.F., and Leroux, M.R. 2017. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18: 533–547

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E. 2004. UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612.

Sakakibara, H., and Nakayama, H. 1998. Translocation of microtubules caused by the α , β and γ outer arm dynein subparticles of *Chlamydomonas*. *J Cell Sci*. 111: 1155-1164.

Sakakibara, H., Mitchell, D.R., and Kamiya, R. 1991. A Chlamydomonas outer arm dynein mutant missing the alpha heavy chain J. Cell Biol. 113: 615– 622.

Sakakibara, H., Takada, S., King, S.M., Witman, G.B., and Kamiya, R. 1993. A Chlamydomonas outer arm dynein mutant with a truncated beta heavy chain J. Cell Biol. 122: 653– 661.

Sakakibara, H., and Kamiya, R. 1989. Functional recombination of outer dynein arms with outer arm-missing flagellar axonemes of a Chlamydomonas mutant. J. Cell Sci. 92: 77-83.

Shiroguchi, K., Toyoshima, Y. Y. 2001. Regulation of monomeric dynein activity by ATP and ADP concentrations. Cell Motil Cytoskeleton. 49: 189-199.

Summers, K.E., Gibbons, I.R., 1971. Adenosine triphosphate-induced sliding of tubules in trypsin-treated flagella of sea-urchin sperm. Proc Natl Acad Sci U S A 68: 3092-3098.

Yagi T. 2000. ADP-dependent microtubule translocation by flagellar inner-arm dyneins. Cell Struct Funct. 25: 263-267.

Yagi T, Kamiya R. 1995. Novel mode of hyper-oscillation in the paralyzed axoneme of a Chlamydomonas mutant lacking the central-pair microtubules. Cell Motil Cytoskeleton. 31: 207-214.

Yagi, T., Minoura, I., Fujiwara, A., Saito, R., Yasunaga, T., Hirono, M. and Kamiya, R. 2005. An axonemal dynein particularly important for flagellar movement at high viscosity: implication from a new *Chlamydomonas* mutant deficient in the dynein heavy chain gene DHC9. *J. Biol. Chem.* 280: 41412-41420.

Yamano, T., Iguchi, H., Fukuzawa, H. 2013. Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal. *J Biosci Bioeng.* 115: 691-694.

Walton, T., Wu, H., Brown, A. 2021. Structure of a microtubule-bound axonemal dynein. *Nat Commun* 12: 477

Walton, T., Gui, M., Velkova, S., Fassad, M. R., Hirst, R. A., Haarman, E., O'Callaghan, C., Bottier, M., Burgoyne, T., Mitchison, H. M., Brown, A. 2023. Axonemal structures reveal mechanoregulatory and disease mechanisms. *Nature*. doi: 10.1038/s41586-023-06140-2. Online ahead of print.

Witman, G. B. 1986. Isolation of *Chlamydomonas* flagella and flagellar axonemes. *Methods Enzymol.* 134: 280 –290.

Witman, G. B. 1993. *Chlamydomonas* phototaxis. *Trends Cell Biol.* 1993 11:403-8

Zimmermann, N., Noga, A., Obbineni, J.M., Ishikawa, T. 2023. ATP-induced conformational change of axonemal outer dynein arms revealed by cryo-electron tomography. *EMBO J.* 13: e112466.