

令和 5 年 11 月 2 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21420

研究課題名（和文）緑藻クラミドモナスの2本の鞭毛の違いの解明

研究課題名（英文）Differences between two flagella of the green alga Chlamydomonas

研究代表者

若林 憲一（Wakabayashi, Ken-ichi）

東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授

研究者番号：80420248

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は緑藻クラミドモナスの2本の鞭毛の性質の違いを分子レベルで明らかにすることを旨としたものである。

研究材料の片方の鞭毛しか打たない変異株は、外腕重鎖、内腕分子種a, c, dを欠損している。我々はこれらのダイニン間にある構造が2本の鞭毛で非対称に存在する可能性を考え、内腕分子種を1つずつ欠いた外腕重鎖欠損株を作成したが、これらはすべて2本の鞭毛を動かした。そのため、複数の内腕ダイニン間にまたがる構造が原因である可能性がある。クライオ電子顕微鏡によって変異株の鞭毛内部構造を観察したところ、片方の鞭毛でだけ失われている構造を見出した。現在この構造の要因となるタンパク質の同定を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：まだ片方の鞭毛にしか存在しない構造のタンパク質実体を明らかにできていないが、それができた暁には、進化の過程の大きな謎である「なぜバイコンタ生物が植物に、ユニコンタ生物が動物になったのか」という問いに対する回答に近づくことになる。また、鞭毛運動の調節機構の理解を深化させると期待できる。

社会的意義：ヒト不動繊毛症候群の発症メカニズムの理解を深化させると期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to clarify the differences between the two flagella of the green alga Chlamydomonas.

The mutant strain of interest beats only one flagellum and is deficient in the outer arm heavy chain and inner arm subspecies a, c, and d. We considered that the structure between these dyneins might exist asymmetrically in the two flagella. To test this hypothesis, we generated strains deficient in outer arm heavy chain and one of inner arm a, c, and d. However, all of these beat both of two flagella. Therefore, it is possible that a structure spanning between multiple inner arm dyneins is responsible. Cryo-electron microscopy of the mutant flagella revealed a structure that was lost in only one of the flagella. The protein responsible for this structure is currently being identified.

研究分野：細胞生物学

キーワード：鞭毛・繊毛 ダイニン クラミドモナス 緑藻

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物は「ユニコンタ」と「バイコンタ」に大別することができる(図1; Cavalier-Smith, 2004)。コンタ *konta* とは「足」の意味で、鞭毛(繊毛とも呼ぶ)を指す。鞭毛を1本もつ単細胞生物を祖先として進化した生物をユニコンタ、2本もつ単細胞生物を祖先として進化した生物をバイコンタと呼ぶ。前者の例が動物、後者の例が植物であり、たとえばヒト精子は1本の鞭毛をもち、コケ精子や緑藻細胞は2本の鞭毛をもつ。細胞に生えた鞭毛の本数が進化の重要な道筋を決めたのは大変不思議である。

真核生物の鞭毛は、よく保存された「9+2構造」をもつ(図2右)。しかし、多くのバイコンタ生物の2本の鞭毛は機能的な違いをもつ。応募者は、バイコンタに属すモデル単細胞緑藻クラミドモナス(図2左)を用いて鞭毛運動の研究を行ってきた。クラミドモナス細胞から生える2本の鞭毛は、人間の平泳ぎのように一見同じ様に運動するが、光刺激によって細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度が上昇したときの応答が異なり、それによって走光性を示す(Kamiya and Witman, 1984)。しかし、クラミドモナスを含むどのバイコンタ生物においても、2本の性質の違いの原因は謎である。

研究開始当時、我々は、あるクラミドモナス2重突然変異株が、鞭毛を片方しか打たないことを見出した。このような表現型はこれまで報告がなく、2本の鞭毛の違いに迫る大きな手がかりになる。この表現型の原因として、応募者は「それぞれの単独変異株で欠損する構造を架橋する構造があり、その構造は2本の鞭毛のうち一方にだけ存在する。2重変異株でその構造が失われ、もともとその構造をもつほうの鞭毛が止まる」という仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究計画では、クラミドモナスの当該変異株を材料として、2本の鞭毛のうち片方だけが非運動性になる原因を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) 変異株の詳細観察

当該変異株は外腕ダイニン $\alpha$ 重鎖を欠損した *oda11* 株と、内腕ダイニン分子種 a, c, d に共通して含まれるサブユニット p28 を欠損したためにこれらの3つのダイニンを欠損した *ida4* 株

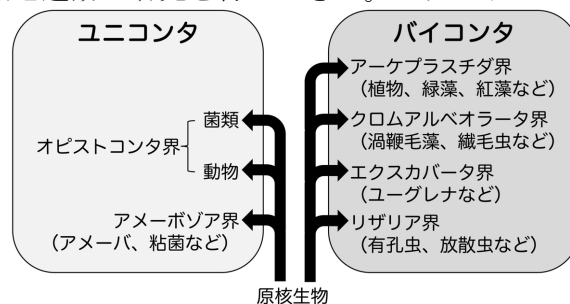


図1 真核生物の進化と分類  
(神谷, 2012 より改変)

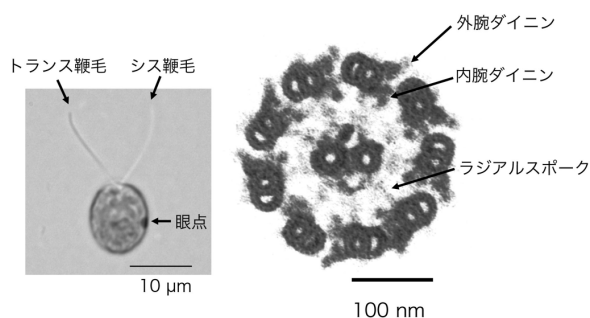


図2 左: クラミドモナス細胞。眼点に近いシス鞭毛と遠いトランス鞭毛の性質は異なる。右: 鞭毛横断面の電顕像。9組の2連微小管が2本の中心微小管を囲む9+2構造をもつ。2連微小管上にはモータータンパク質ダイニンの外腕・内腕と、中心微小管に向かって生えるラジアルスポークが存在する。

の二重変異株である。この株を詳細に観察し、シス・トランスのどちらの鞭毛が停止しているかを明らかにする。

#### 2) 鞭毛タンパク質の比較プロテオーム

二重変異株は合成表現型を示すため、単独変異で失われるタンパク質に加えて、二重変異にしてはじめて失われるタンパク質があると考えた。そこで、二重変異株と *oda11* 株の鞭毛タンパク質サンプルを調製し、比較プロテオームを行う。

#### 3) 新規変異株の樹立

外腕ダイニン $\alpha$ 重鎖と、内腕ダイニン a, c, d のどれかとの間の架橋構造が 2) にあたるタンパク質であると考え、「片方が止まる」という表現型を得るための最小ダイニン欠損セットを明らかにするため、*oda11* 株を親株として、a, c, d のどれか 1 つのダイニンを欠損した株を作成し、表現型を探る。

#### 4) クライオ電子顕微鏡法

*oda11* x *ida4* 二重欠損株から調製した鞭毛-核複合体をクライオ電子顕微鏡によって観察し、片方の鞭毛でのみ失われている構造がないかを検証する。

### 4. 研究成果

#### 1) 詳細観察

*oda11* x *ida4* 二重変異株の 70% はトランス鞭毛だけで運動していることがわかった。しかし、残りのうち 20% はシス鞭毛のみで運動し、10% は野生株と同様 2 本の鞭毛で遊泳していた。このことから、二重変異株で現れる形質は、3-2) で想定したような架橋構造の欠損が原因であり、この構造は確率的に失われる可能性を見出した。

#### 2) プロテオーム

プロテオーム解析の結果、25 種のタンパク質が *oda11* 株と比較して顕著に減少していることを見出した。これらが、想定していた、外腕-内腕の未知の架橋構造を構成している可能性がある。これらのうち 6 種は中心対微小管に局在することがわかっていたため、残り 19 種を候補と考えた。うち 17 種の欠損株が米国クラミドモナスセンターに存在していたため取り寄せて観察したところ、すべて運動性の表現型は見られなかった。残り 2 種が原因である可能性、また、これらのタンパク質単独の欠損では表現型が得られない可能性の両方を考えて、現在残りの実験を進めている。

#### 3) 新規変異株の樹立

*oda11* 株を親として、*ida9* 株(内腕 c を欠損)との掛け合わせ、CRISPR/Cas9 による a, d 重鎖のノックアウトという方法で二重変異株を作成したが、全て 2 本の鞭毛がともに運動していた。片方しか打たないという表現型には、複数の内腕ダイニンが欠損することが必要である可能性があるため、現在 3 重変異株の作成に取り組んでいる。

#### 4) クライオ電子顕微鏡法

*oda11* x *ida4* 二重変異株の繊毛-核複合体を精製してクライオ電子線トモグラフィーを行った結果、片方の鞭毛にのみになんらかの構造欠損が見られた。現在、それがシス鞭毛なのかトランス鞭毛なのかをさぐるべく、トランス鞭毛のみをもつ変異株との3重変異株を作成して同様の実験を行っているところである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wakabayashi Ken-ichi, Isu Atsuko, Ueki Noriko	4. 巻 1293
2. 論文標題 Channelrhodopsin-Dependent Photo-Behavioral Responses in the Unicellular Green Alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Optogenetics (Advances in Experimental Medicine and Biology), 2nd ed.	6. 最初と最後の頁 21 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-15-8763-4_2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Morishita Jun, Tokutsu Ryutarō, Minagawa Jun, Hisabori Toru, Wakabayashi Ken-ichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Characterization of <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Mutants That Exhibit Strong Positive Phototaxis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 1483 ~ 1483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants10071483	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Deschoenmaeker Frédéric, Mihara Shoko, Niwa Tatsuya, Taguchi Hideki, Wakabayashi Ken-ichi, Toyoshima Masakazu, Shimizu Hiroshi, Hisabori Toru	4. 巻 169
2. 論文標題 Thioredoxin pathway in <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120: activity of NADPH-thioredoxin reductase C	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 709 ~ 719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab014	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fu Nae, Sugiura Kazunori, Kondo Kumiko, Nakamura Shungo, Wakabayashi Ken-ichi, Hisabori Toru	4. 巻 297
2. 論文標題 Monitoring cellular redox dynamics using newly developed BRET-based redox sensor proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101186 ~ 101186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101186	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Osamu Kutomi et al.	4. 巻 7
2. 論文標題 A dynein-associated photoreceptor protein prevents ciliary acclimation to blue light	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabf3621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abf3621	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokochi Yuichi, Yoshida Keisuke, Hahn Florian, Miyagi Atsuko, Wakabayashi Ken-ichi, Kawai-Yamada Maki, Weber Andreas P. M., Hisabori Toru	4. 巻 118
2. 論文標題 Redox regulation of NADP-malate dehydrogenase is vital for land plants under fluctuating light environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2016903118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2016903118	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokochi Yuichi, Fukushi Yuka, Wakabayashi Ken-ichi, Yoshida Keisuke, Hisabori Toru	4. 巻 118
2. 論文標題 Oxidative regulation of chloroplast enzymes by thioredoxin and thioredoxin-like proteins in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2114952118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2114952118	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanno Asuka, Tokutsu Ryutaro, Arakaki Yoko, Ueki Noriko, Minagawa Jun, Yoshimura Kenjiro, Hisabori Toru, Nozaki Hisayoshi, Wakabayashi Ken-ichi	4. 巻 16
2. 論文標題 The four-celled Volvocales green alga <i>Tetrabaena socialis</i> exhibits weak photobehavior and high-photoprotection ability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0259138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0259138	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asahina Yuma, Sakamoto Kazuma, Hisabori Toru, Wakabayashi Ken-ichi	4. 巻 596
2. 論文標題 The mammalian-type thioredoxin reductase 1 confers a high-light tolerance to the green alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 97 ~ 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.01.088	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takano, W., Hisabori, T., *Wakabayashi, K.	4. 巻 296
2. 論文標題 Rapid estimation of cytosolic ATP concentration from the ciliary beating frequency in the green alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.015263	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kutomi O. et al. (total 32 authors)	4. 巻 7
2. 論文標題 A dynein-associated photoreceptor protein prevents ciliary acclimation to blue light	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabf3621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abf3621	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 関口敬俊、吉田啓亮、若林憲一、久堀徹
2. 発表標題 チオレドキシン様タンパク質による葉緑体ATP合成酵素の酸化制御
3. 学会等名 日本光合成学会2021年年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 若林 憲一
2. 発表標題 Significance of phototaxis in the unicellular green alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> revealed by “perverse” cells
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関口敬俊、吉田啓亮、若林憲一、久堀徹
2. 発表標題 Trx様タンパク質による葉緑体ATP合成酵素の不活性化制御
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第47回討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 町田亮人、近藤久益子、若林憲一、久堀徹
2. 発表標題 シアノバクテリアATP合成酵素 サブユニットのY252C変異
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第47回討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宋 叡陽、植木 紀子、中島 昌子、坂本 一馬、山口 勝司、久堀 徹、廣野 雅文、若林 憲一
2. 発表標題 強い負の走光性を示す緑藻クラミドモナス新規変異株の単離と解析
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 朝比奈 佑磨, 久堀 徹, 若林 憲一
2. 発表標題 長時間露光によるクラミドモナスの走光性符号変動
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 若林憲一
2. 発表標題 Photobehavior and its significance studied using the Volvocales green algae with different cell numbers: Chlamydomonas, Tetrabaena, and Volvox
3. 学会等名 German-Japanese Meeting 2022 "Green Aquatic Biology: Ecology meets Synthetic Biology" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宋 叡陽, 植木 紀子, 中島 昌子, 坂本 一馬, 山口 勝司, 久堀 徹, 廣野 雅文, 若林 憲一
2. 発表標題 強い負の走光性を示す緑藻クラミドモナス新規変異株の単離と解析
3. 学会等名 第15回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 朝比奈 佑磨, 久堀 徹, 若林 憲一
2. 発表標題 長時間露光によるクラミドモナスの走光性符号変動
3. 学会等名 第15回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笛木 俊太, 亀田 重賢, 吉田 愛美, 井須 敦子, 若林 憲一, 吉村 建二郎
2. 発表標題 クラミドモナスの走熱性をつかさどるTRPチャネル
3. 学会等名 第15回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋山 健太郎, 小澤 真一郎, 高橋 裕一郎, 若林 憲一, 久堀 徹
2. 発表標題 葉緑体ATP合成酵素研究: クラミドモナスでできること
3. 学会等名 第15回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植木 紀子, 若林 憲一
2. 発表標題 緑藻ボルボックス目における個体サイズと鞭毛光反応の協調的進化
3. 学会等名 第15回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上村 柚紀子, 吉田 啓亮, Chris White-Gloria, Greg B. Moorhead, 若林 憲一, 久堀 徹
2. 発表標題 色素体セリン合成系酵素3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼのリン酸化
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Minh Chau Tran, Shoko Mihara, Ken-ichi Wakabayashi, Keisuke Yoshida, Toru Hisabori
2. 発表標題 Functional interaction between Cystathionine-beta-synthase X proteins and NADPH-thioredoxin reductase C in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 ,第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福土結香、横地佑一、若林憲一、吉田啓亮、久堀徹
2. 発表標題 シロイヌナズナ葉緑体内におけるTrxおよびTrx様タンパク質による酸化制御
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関口敬俊、吉田啓亮、若林憲一、久堀徹
2. 発表標題 Trx様タンパク質による葉緑体ATP合成酵素の不活性化制御
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丹野明日翔, 得津隆太郎, 新垣陽子, 植木紀子, 皆川純, 吉村建二郎, 久堀徹, 野崎久義, 若林憲一
2. 発表標題 緑藻テトラバエナ(シアワセモ)の光行動と光防御能
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本一馬、久堀徹、若林憲一
2. 発表標題 クラミドモナス纖毛交互打ち変異株の単離と解析
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 若林憲一
2. 発表標題 緑藻クラミドモナス走光性のレドックス制御
3. 学会等名 岡山大学次世代研究育成グループ事業「電場・電子誘起による細胞機能化デバイスの開発」第1回セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Wakabayashi K., Isu A., Ueki N. (eds. Yawo, Kandori, Koizumi, Kageyama)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 13
3. 書名 Optogenetics (Advances in Experimental Medicine and Biology), 2nd ed.	

1. 著者名 若林憲一、植木紀子（白木賢太郎・編）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 4
3. 書名 相分離生物学の全貌	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------