
Review

ゾウリムシを用いた研究から明らかになった 繊毛のエネルギー供給と運動調節機構

久富 理^{1*}・堀 学²

¹筑波大学下田臨海実験センター 〒415-0025 静岡県下田市 5-10-1

²山口大学大学院理工学研究科 〒753-8512 山口県山口市吉田 1677-1

The molecular mechanisms of intraciliary energy-supply system and ciliary movements revealed by the studies on *Paramecium* cilia

Osamu KUTOMI^{1*} and Manabu HORI²

¹Shimoda Marine Research Center, University of Tsukuba, Shizuoka 415-0025, Japan

²Division of Environmental Science and Engineering, Graduate School of Science and Engineering, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8512, Japan

SUMMARY

Most eukaryotes have motile cilia/flagella as cell organelles for swimming, locomotion, or generating extracellular fluid flow. Recent studies have revealed that dysfunctions in ciliary/flagellar motility engender human disease. Most motile cilia/flagella possess the inner structure called the axoneme with “9 + 2” pattern, in which the nine doublet microtubules surround two central singlet microtubules. This structural pattern is evolutionally conserved. The axoneme comprises many structural components aligned on the microtubules, including axonemal dyneins, radial spokes, and projections on the central pair microtubules. Ciliary/flagellar movements are generated by dynein-driven microtubule sliding, and are controlled by second messengers such as Ca^{2+} and cAMP. However, molecular mechanisms of ciliary/flagellar movements in response to Ca^{2+} and cAMP, and the individual roles of the axonemal components in the mechanisms remain unclear. Furthermore, mechanisms by which the energy is supplied for ciliary/flagellar movement are not well defined. *Paramecium* has long been used as a model organism for studying ciliary motility, because of its valuable experimental systems. For example,

*Corresponding author
Tel: +81-558-22-6809/Fax: +81-558-22-0346
E-mail: kutomi036@gmail.com

Received: 04 March 2014; Accepted: 28 May 2014.

cell excitement can be analyzed electrophysiologically, and cilia on demembrated cell models and cortical sheets can be reactivated in vitro. Furthermore, protocols for RNAi depletion of specific genes, as well as the genome and the ciliary proteome databases, became available recently. This review describes recent studies on molecular mechanisms of ciliary movements in *Paramecium*, highlighting intraciliary energy-supply systems and regulatory systems by Ca^{2+} and cAMP.

Key words: Phosphagen shuttle system, Ciliary response, Ciliary reversal, Ca^{2+} , cAMP, Axonemal dynein, Cortical sheet, RNA interference

はじめに

真核生物の繊毛 (cilia) および鞭毛 (flagella) は、毛の形をした細胞小器官であり、原生生物から我々人間をはじめとする後生動物に至るまで、高度に保存されている。繊毛と鞭毛は、ともに直径がおよそ $0.2\ \mu\text{m}$ で、構造はほとんど同じだが、ひとつの細胞に生えている本数や長さによって呼び分けられている。ゾウリムシやテトラヒメナなどの繊毛虫で見られるようにひとつの細胞に数百～数千本生えていて、長さが数 μm 程度と比較的短いものを繊毛と呼び、緑藻類クラミドモナスや精子などに見られるように 1 または 2 本程度生えていて、長さが数十 μm ～数百 μm と比較的長いものを鞭毛と呼ぶ。繊毛・鞭毛は運動器官として様々な重要な役割を担っている。たとえば、原生生物のゾウリムシやクラミドモナスの繊毛・鞭毛は細胞自身が移動する動力器官として働いている。後生動物の場合、精子の鞭毛は、精子が卵のもとへ移動する役割を果たし、受精の成立に必須である。気管の繊毛は、外界からの埃やウイルスなどを掃き出し、体内への侵入を防ぐ働きをしている。また、ノードと呼ばれる胚のくぼんだ部分にある繊毛は、回転運動をして左方向の水流を発生させ、その水流が心臓などの臓器の左右の非対称性を決定するのに重要である (Nonaka et al., 1998, 2002; Hirokawa et al., 2006)。

近年、繊毛・鞭毛の機能不全が、呼吸器不全、内臓逆位、水頭症、不妊症など様々な重篤な疾患を引き起こす遺伝病の原因となることが明らかとなり、これらは「繊毛病」と総称されている (Afzelius, 2004; Ibanez-Tallon et al., 2004; Zariwala et al., 2007; Marshall, 2008)。このため、繊毛・鞭毛は生命維持に必要な不可欠な存在として注目され、繊毛・鞭毛研究はより重要性を増している。

本総説では、筆者らがこれまで行ったゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) やヨツヒメゾウリムシ (*P. tetraurelia*) の繊毛運動に関する研究を中心に、繊

毛・鞭毛運動のメカニズムにおける最新の知見を概説したい (ゾウリムシとヨツヒメゾウリムシは実験に応じて使い分けられているが、これら 2 種における運動メカニズムはほとんど同じである)。

繊毛・鞭毛の構造

繊毛・鞭毛の内部には軸糸と呼ばれる骨格構造があり、その周りを細胞膜 (繊毛膜) が覆っている。軸糸の横断面を電子顕微鏡で観察すると、9 対の 2 連微小管 (周辺微小管) と、中心に 2 本の微小管 (中心小管) からなる「9 + 2」と呼ばれる特徴的な構造が見られる (Fig. 1)。哺乳類胚のノード繊毛のような 2 本の中心小管がない「9 + 0」や (Bellomo et al., 1996)、キイロシヨウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の精子鞭毛で見られるような周辺微小管の外側にさらに 9 本の微小管がある「9 + 9 + 2」など (Kiefer, 1970)、いくつか例外が存在するが、ほとんどの生物において「9 + 2」の構造が保存されている。

詳細な軸糸の内部構造については、古くから電子顕微鏡による知見が蓄積しているが、最近ではクライオ電子線トモグラフィ法によって 3 次元の微細構造がクラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*; 以降、クラミドモナスは本種を指す)、ウニ類 (*Anthocidaris crassispina*, *Pseudocentrotus depressus*, *Arbacia lixula*, *Sphaerechinus purpuratus*) の精子、テトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*; 以降、特に記述しない場合、テトラヒメナは本種を指す) において明らかになっている (Nicastro et al., 2005, 2006; Ishikawa et al., 2007; Bui et al., 2012; Pigino et al., 2012)。周辺微小管にはモータータンパク質のダイニンが結合しており、繊毛・鞭毛運動は、ダイニンが ATP 加水分解エネルギーを利用して、隣り合う周辺微小管との間で発生させるすべり運動によって起こることが知られている。しかし、このすべり運動が繊毛の屈曲運動に変換される機構はまだ全貌が明

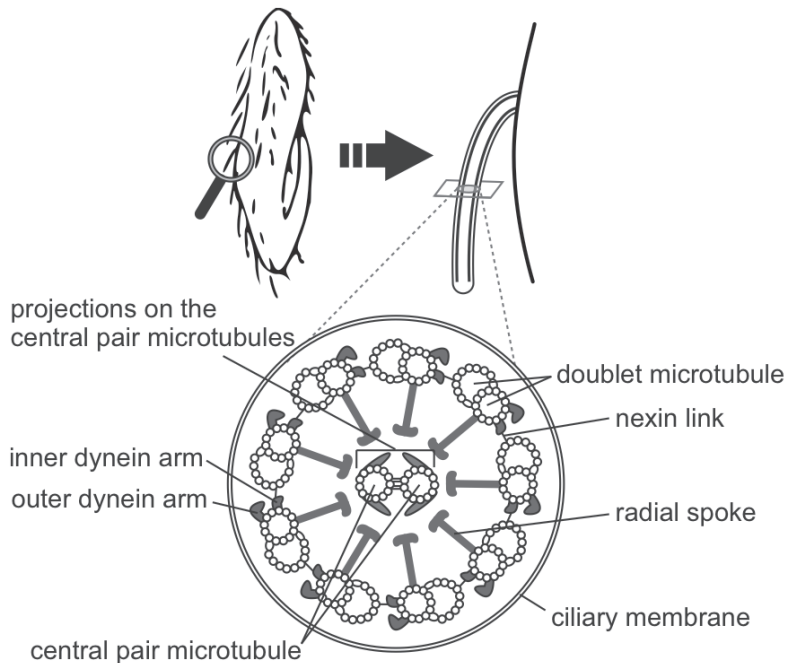


Fig. 1. An illustration of the cross-sectional view of eukaryotic cilia/flagella.

らかになっていない。屈曲への変換には、一部のダイニンだけが活性化されるような調節機構が必要だが、その一端を周辺微小管から中心に向かって伸びているラジアルスポークや、中心小管の周りにある中心装置が担うと考えられている (Smith and Sale, 1992; Nakano et al., 2003; Smith and Yang, 2004)。さらに、周辺微小管上に位置するダイニン調節複合体もまた、屈曲への変換を担っていると考えられている (Gardner et al., 1994; Piperno et al., 1994)。最近クライオ電子線トモグラフィ解析によって、このダイニン調節複合体が、周辺微小管の間を架橋しているネキシンリンクであることが明らかにされた (Heuser et al., 2009)。

繊毛・鞭毛は、このような緻密で複雑な軸系構造が巧妙に働くことによって運動するが、その構成タンパク質はおよそ 250 種類存在することがクラミドモナス鞭毛のプロテオーム解析により明らかになっている (Pazour et al., 2005)。

繊毛・鞭毛研究の材料としてのゾウリムシ

繊毛・鞭毛についての研究材料として、原生生物ではゾウリムシ、テトラヒメナ、クラミドモナスなどが、後生動物では、ウニ、ホヤ (特にユウレイボヤ属 *Ciona*)、魚類などの精子が主に使用されてき

た。クラミドモナスは変異体を容易に確立できるため、繊毛・鞭毛の構成成分についての研究が先行しており、多くの軸系タンパク質が同定されている (Pazour et al., 2005)。カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) の精子鞭毛タンパク質においてもプロテオーム解析が行われており、クラミドモナスに次いで、多くの軸系タンパク質が同定されている (Inaba, 2007)。

ゾウリムシも繊毛運動の解析に古くから利用されている研究材料である。これまでに、繊毛運動研究の歴史において極めて重要な発見がなされてきた。たとえば、電気生理学的手法を用いた、膜電位変化と繊毛運動変化の関係についての研究 (Naitoh, 1966; Naitoh and Eckert, 1969) である。また、細胞を界面活性剤で処理した細胞モデル (トリトンモデル) を用いて、 Ca^{2+} や cAMP 濃度の繊毛運動に対する影響も明らかにされた (Naitoh and Kaneko, 1972, 1973; Bonini and Nelson, 1988; Nakaoka and Ooi, 1985)。トリトンモデルは、ATP を添加することによって生きた細胞とほとんど変わらない繊毛運動を再現できる優れた実験系である。

しかし、ゾウリムシ細胞はかなり厚みがあるため、顕微鏡で生細胞やトリトンモデルを観察しても、細胞表面の繊毛と細胞質の像が重なってしまい、繊毛のみにピントを合わせることができない。

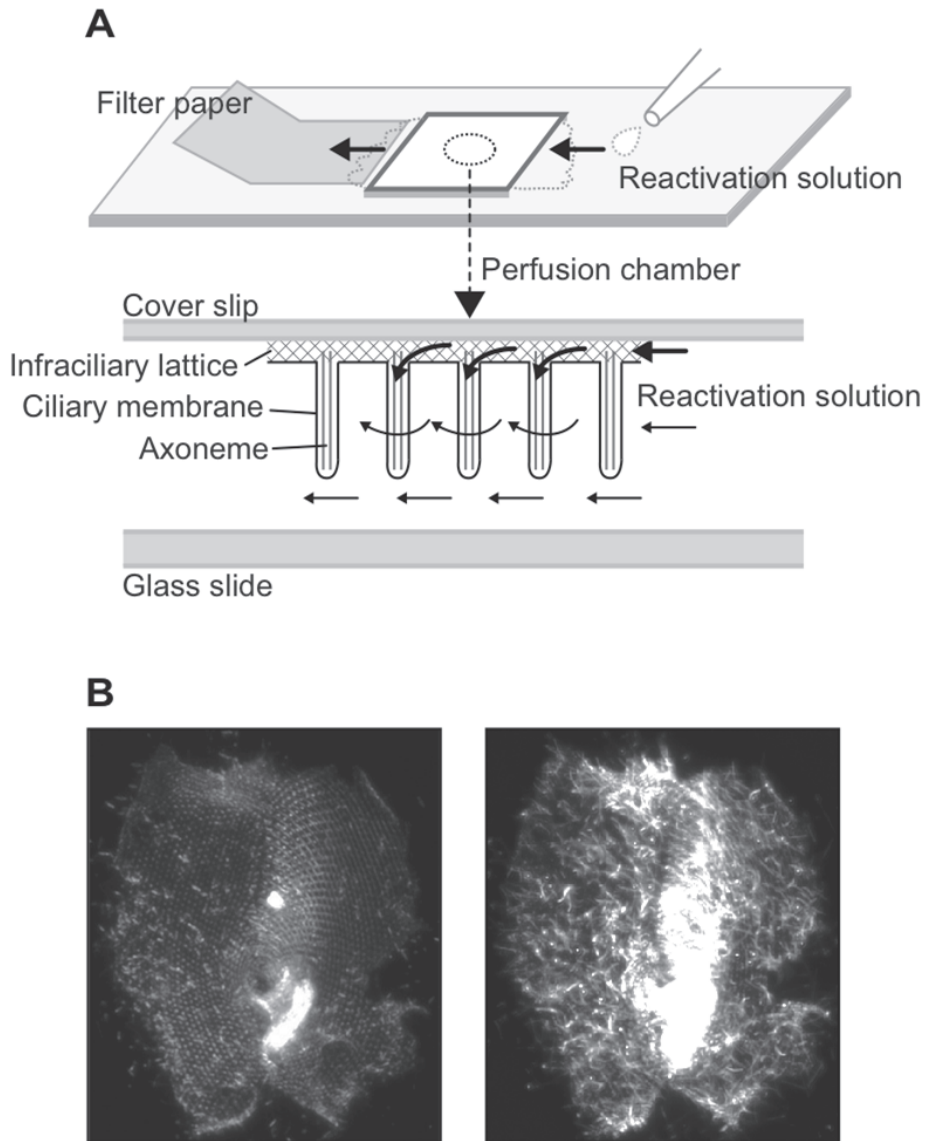


Fig. 2. Observation of cilia on the ciliated cortical sheet from *Paramecium*. (A) Flat cortical sheets adhered to the surface of the coverslip are reactivated by perfusion of a reactivation solution. The solution is diffused into cilia through the infraciliary lattice and the ciliary base (indicated by thick arrows). This illustration is modified from Noguchi et al. (2001). (B) Images of ciliated cortical sheet under dark-field microscopy. The tops of the panels represent the anterior direction of the cell. Left: an image focused on the cell cortex. Right: an image focused on cilia.

そのため、繊毛運動（特に繊毛打波形）の観察は困難であった。この問題を解決するため、野口らは細胞表層シートと呼ばれる新たな実験系を開発した（Noguchi et al., 1991, 2001; Fig. 2）。これは先端にキャピラリー（内径 0.2 mm 以下）を装着した駒込ピペットでゾウリムシを吸引・吐出する事により細

胞を破き、細胞質を除去することで繊毛と細胞表層だけにしたものである。おそらくは細胞がキャピラリーを通過するときのせん断力によって破断され、その表層だけが、スライドガラスとカバーガラスで作った灌流室を流れる際に細胞膜下繊維系を介してガラス面に付着するものと考えられる。細胞表層

シートでは、繊毛運動を見るのに邪魔となる細胞質がないため、顕微鏡で見たときに繊毛のみにピントを合わせることができ、繊毛運動の様子を直接観察することが可能となる (Fig. 2B)。

ヨツヒメゾウリムシでは、ゲノム解析やプロテオーム解析が行われたことで遺伝情報を利用できるようになり (Aury et al., 2006; Arnaiz et al., 2007, 2009, 2011), RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) による遺伝子ノックダウンも可能となった (Galvani and Sperling, 2002)。そのため、目的の繊毛タンパク質のノックダウンによって引き起こされる繊毛運動の異常と、繊毛タンパク質組成の異常とを関連づける研究を行うことが可能となった。ヨツヒメゾウリムシにおける RNAi による遺伝子ノックダウンは、目的遺伝子を含む組換えプラスミドを導入した大腸菌をヨツヒメゾウリムシに食べさせることで、特定の遺伝子の発現を抑制する方法である。この方法は食餌法と呼ばれ、操作が簡便である点と、給餌してから数日で表現型が現れる点から、目的タンパク質の機能解析法として非常に有効な方法である。

ゾウリムシ繊毛運動のエネルギー供給機構

繊毛が絶えず運動するためには、繊毛内にエネルギー源の ATP が安定して供給されなくてはならない。ATP は細胞質のミトコンドリアで合成され、拡散によって繊毛基部から繊毛内へと均一に行き渡っていく。しかし、繊毛のダイニンによる ATP の消費は大きいので、拡散による供給だけではすぐにエネルギー切れとなるおそれがある。こうした問題を回避するため、クレアチンリン酸やアルギニンリン酸が高エネルギーリン酸の輸送体として繊毛内で機能すると考えられてきた。これらは ATP を利用して作られる高エネルギーリン酸化合物で、ATP が消費されると、キナーゼを介してこれらのリン酸が ADP に転移され、直ちに ATP が再生する。この場合 ATP の拡散移動は必要なく、代わりにクレアチンリン酸やアルギニンリン酸が拡散移動することによって高エネルギーリン酸が輸送される。このようなエネルギー供給機構をシャトル機構と呼ぶ。筋肉にはクレアチンリン酸シャトル機構が備わっていると考えられている (Wallimann et al., 1992)。繊毛・鞭毛においては、これまでにアメリカムラサキウニ (*Strongylocentrotus purpuratus*) の精子鞭毛内にクレアチンキナーゼが存在することや (Tombes and Shapiro, 1985, 1987; Tombes et al., 1987), テトラヒメナ (*T. pyriformis*) の繊毛内でアルギニンキナーゼ活性が検出されたことから (Watts and Bannister, 1970), 繊毛・鞭毛内のシャトル機構の存在が支持されている。

野口らはゾウリムシの繊毛運動のエネルギー供給機構としてアルギニンリン酸シャトル機構が機能していることを証明した (Noguchi et al., 2001; 野口と沢田, 2001)。そこで働くアルギニンリン酸の実際の濃度は不明だが、ゾウリムシ細胞質内のアルギニンリン酸濃度が 0.4 mM と推定されていることから、およそこの程度がシャトル機構にも有効な濃度だと推定される (Noguchi et al., 2001)。実際に、細胞表層シートを低濃度の ATP (0.1 mM 程度) によって再活性化させたとき、この濃度のアルギニンリン酸を添加すると繊毛打頻度が顕著に上昇する。一方、内在のアルギニンキナーゼの有効濃度は、ゾウリムシ繊毛に本来は存在しないクレアチンリン酸シャトル機構の繊毛運動への影響を調べることにより、以下のように推定された (Kutomi et al., 2012b)。まず、細胞表層シートに外来のクレアチンリン酸とクレアチンキナーゼを含む再活性化液を加え、人工のクレアチンリン酸シャトル機構が機能して繊毛打頻度が上昇することを確認した。次に、推定されたアルギニンリン酸濃度と同じ 0.4 mM のクレアチンリン酸存在下 (ATP は 0.1 mM) において、クレアチンキナーゼ濃度を変化させて繊毛の運動活性 (打頻度) の変化を調べたところ、クレアチンキナーゼ濃度が 0.6 mg/ml のとき、アルギニンリン酸を付加した場合と同程度の繊毛打頻度の上昇が見られた (Kutomi et al., 2012b; Fig. 3)。使用したクレアチンキナーゼは二量体で、分子量はおよそ 81 kDa であることから、外来のクレアチンキナーゼの有効濃度は 7.4 μ M であると計算された。これによって、内在のアルギニンキナーゼの有効濃度はおよそ 7.4 μ M であると推定された (Kutomi et al., 2012b)。

なお、外来のクレアチンリン酸シャトル機構を細胞表層シートに導入して繊毛打頻度を上昇させるには、クレアチンリン酸とクレアチンキナーゼを含む再活性化液を何度も補充する必要があった。クレアチンキナーゼの分子量は ATP (分子量 507.2) と比べて 100 倍以上大きいので、外来のクレアチンキナーゼが繊毛基部から繊毛全長に渡り拡散する際にかなりの抵抗が生じると考えられる。

ゾウリムシ繊毛運動の調節機構

ゾウリムシは普段は水中を自由に泳ぎまわっているが、前方の障害物にぶつくとバックし、後方からの刺激に対しては普段の倍以上の速さで泳いで逃げる。こうした行動反応は、繊毛の打つ頻度や方向が変化することによって生じ、細胞が刺激を受けた際に生じる膜電位変化と、それによって生じる繊毛内のセカンドメッセンジャーの濃度変化により調節されている。たとえば、細胞前端部が刺激を受ける

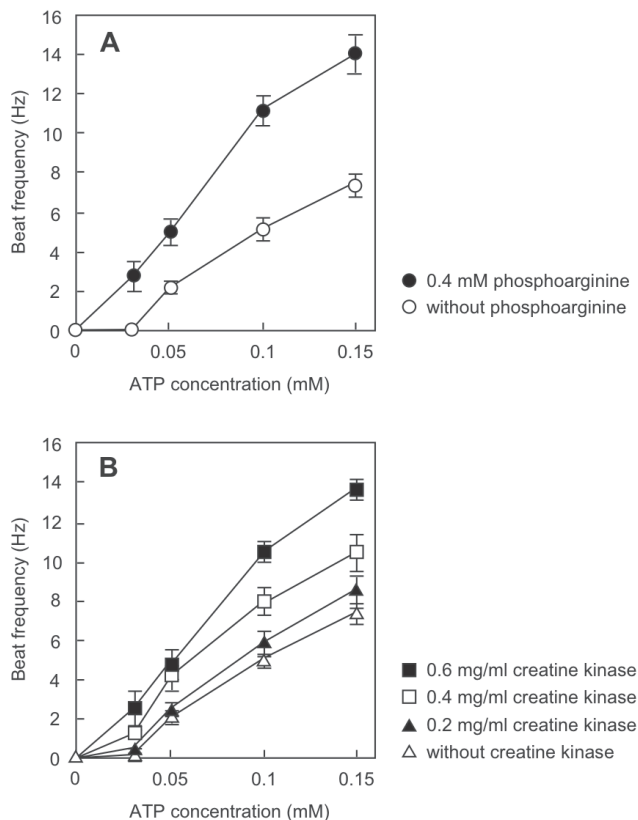


Fig. 3. Effects of phosphoarginine and phosphocreatine on ciliary beat frequency. The beat frequency of cilia on intact cortical sheets of *P. caudatum* was determined in the presence of low concentrations of ATP. Ciliated cortical sheets were perfused continuously with reactivation solutions containing 1 mM EGTA, 50 mM potassium acetate, 1 mM MgCl_2 , 10 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0), and 0.4 mM phosphoarginine (A) or 0.4 mM phosphocreatine and various concentrations of creatine kinase (B). Values represent means $\pm$ SD ($n = 10$). These graphs are reproduced from Kutomi et al. (2012b) with permission.

と脱分極が起こり、膜電位依存性の Ca^{2+} チャンネルが開き、細胞外から Ca^{2+} が繊毛内に流入して繊毛内 Ca^{2+} 濃度が上昇する (Naitoh and Eckert, 1969; Kung and Eckert, 1972; Kung and Saimi, 1982; Gonda et al., 2007). そして、繊毛内 Ca^{2+} 濃度が 10^{-6} M 程度上昇すると、繊毛打方向が逆転し、後退遊泳を示す。一方、細胞後端部が刺激を受けると過分極が起こり、 K^+ チャンネルを介したカチオンの流出に伴ってアデニル酸シンクラーゼが活性化され、繊毛内の cAMP 濃度が上昇する (Schultz et al., 1992). これによって繊毛打頻度が上昇し、ゾウリムシは通常の倍以上の速さで泳ぐ。また、ゾウリムシの繊毛は有効打と回復打のサイクルからなる三次元的な運動を示すが (Sugino and Naitoh, 1982), この繊毛打の波形調節

に cGMP が必須であることが明らかとなっている (Noguchi et al., 2004).

他の生物においてもゾウリムシの場合と同様に、これらのセカンドメッセンジャーの濃度変化によって運動が変化することが知られている。たとえば、テトラヒメナにおいても細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇によって繊毛逆転が引き起こされる (Goodenough, 1983). また、クラミドモナスは、強い光に対して鞭毛打の波形を変化させて後退遊泳するが、これもやはり Ca^{2+} の濃度上昇を伴う (Schmidt and Eckert, 1976; Harz and Hegemann, 1991). ウニ類やユウレイボヤ属などの精子においては、 Ca^{2+} 濃度変化が鞭毛打の波形変化に重要な役割を果たすことが知られている (Brokaw et al., 1974; Gibbons and Gibbons, 1980; Shiba et al., 2008).

一方、cAMP は、クラミドモナスではゾウリムシの場合とは異なり、鞭毛運動を阻害する効果があるが (Hasegawa et al., 1987), ユウレイボヤ (*C. savignyi*), ニジマス (*Salmo gairdneri*), マウスなどの精子においては、運動の活性化に重要であることが知られている (Morisawa and Okuno, 1982; Yoshida et al., 1994; Visconti et al., 1995). したがって、生物によって作用は違うものの、ほとんどの場合において、繊毛・鞭毛運動は Ca^{2+} や cAMP などのセカンドメッセンジャーによって調節されると考えられる。

Ca^{2+} による繊毛・鞭毛運動の調節機構については、まだ明らかになっていないが、繊毛・鞭毛のモデル生物の軸糸から Ca^{2+} 結合タンパク質がいくつか同定されており、

これらの機能解析が行われている (後述). 一方 cAMP による繊毛・鞭毛運動の調節機構については、ほとんどの生物において、cAMP 濃度上昇によって cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) が活性化され、それによっていくつかの軸糸タンパク質がリン酸化されることが重要であると考えられている。ゾウリムシでは、cAMP 依存的にリン酸化される軸糸タンパク質のうち、分子量 29 kDa の外腕ダイニン軽鎖 (p29) のリン酸化が cAMP による繊毛運動の調節に重要であることが明らかにされている (Hamasaki et al., 1991; Barkalow et al., 1994; Noguchi et al., 2000; Kutomi et al., 2012a: 後述). また、p29 のリン酸化が脱リン酸化酵素の PP2C によって脱リン酸化されることも明らかになっている (Noguchi et al., 2003). クラミドモナスで

は、PKA をアンカーするタンパク質がラジアルスポークに存在しており (Gaillard et al., 2001; Yang et al., 2006) , このタンパク質に変異を起こしたクラミドモナスは、鞭毛打の異常を示したこと (Gaillard et al., 2006) , クラミドモナス軸系タンパク質の cAMP 依存的リン酸化の調節に、ラジアルスポークが機能している可能性が示唆されている。

繊毛運動の調節機構におけるダイニンの役割

ダイニンは繊毛運動変化を直接引き起こす最も重要な構成成分であることから、繊毛運動の調節機構を研究する上で、ダイニンの役割を理解することは非常に重要である。繊毛のダイニンは、繊毛の中心に対して外側にある外腕ダイニンと、内側にある内腕ダイニンの 2 つに大きく分けられる。それぞれのダイニンは数種類のサブユニットから構成される巨大な複合体である。外腕ダイニンは 1 種類の複合体だが、内腕ダイニンは複数種類存在する。各複合体を構成するサブユニットは、分子量の大きさごとに重鎖、中間鎖、軽鎖に分類される。重鎖は ATP 加水分解サイクルを行うモータードメインを持つ。中間鎖や軽鎖は重鎖に結合して、ダイニンの活性調節や、ダイニンを周辺微小管に結合させる役割を担うと考えられている。

外腕ダイニン

外腕ダイニンは他の軸系成分と比べて容易に単離できることもあって、これまでにいくつかの生物の外腕ダイニンの分子構成が明らかになっている。最も解析が進んでいるクラミドモナスの外腕ダイニンは、重鎖が 3 つ (α HC, β HC, γ HC) , 中間鎖が 2 つ (IC1, IC2) で、軽鎖は 10 種類 (LC1~LC10) から構成されている (King and Kamiya, 2008) 。外腕ダイニンが欠損している変異体は、鞭毛打頻度が低下して遊泳速度が遅くなることから、外腕ダイニンは繊毛が高頻度で運動するのに必要であることが示されている (Brokaw and Kamiya, 1987) 。

外腕ダイニンの軽鎖の 1 つである LC1 は、繊毛・鞭毛運動に重要なサブユニットであることが報告されている。クラミドモナスの場合、LC1 は γ HC のモータードメインとチューブリン (周辺微小管) と結合しており (Benashski et al., 1999; Wu et al., 2000; Patel-King and King, 2009) , LC1 のドミナントネガティブ変異株では、鞭毛打頻度と遊泳速度の減少と鞭毛打波形の乱れが生じる (Patel-King and King, 2009) 。眠り病の病原体として知られる寄生性原虫のトリパノソーマ (*Trypanosoma brucei*) では、LC1 の RNAi ノックダウンによって、外腕ダイニンが部分的に消失し、鞭毛打頻度が減少すると同時に、鞭

毛打が逆転して後退遊泳を示すようになる (Baron et al., 2007) 。扁形動物のプラナリア (*Schmidtea mediterranea*) の場合、LC1 を RNAi によってノックダウンすると、繊毛打頻度が通常の半分ほどに低下し、それに伴い他の繊毛との協調性が失われることで、メタクロナル波と呼ばれる同調的な繊毛運動に乱れが生じる (Rompolas et al., 2010) 。

我々は、ヨツヒメゾウリムシの LC1 が cAMP による繊毛運動の調節に必須であることを明らかにした (Kutomi et al., 2012a) 。この論文において、ヨツヒメゾウリムシの LC1 を「*ODALI* (Outer Dynein Arm Light chain 1)」と表記しているため、本稿でも以後このように表記する。*ODALI* を RNAi によってノックダウンしたヨツヒメゾウリムシ (*ODALI*-RNAi) は、遊泳速度が半分以下に低下するだけでなく、何も刺激を受けなくても自発的に回避反応 (1 秒程度の短い後退遊泳) を頻繁に示したり、人為的な脱分極の誘導で通常の倍以上の後退遊泳を示したりした (Kutomi et al., 2012a) 。細胞表層シートを用いて *ODALI*-RNAi の繊毛打頻度を解析したところ、ノックダウンをしていないヨツヒメゾウリムシ (コントロール) に比べて繊毛打頻度が減少していたことがわかった。また、通常、繊毛打頻度は ATP 濃度上昇に伴って上昇するが (Noguchi et al., 2001; 野口と沢田, 2001) , *ODALI*-RNAi の場合、1 mM ATP で繊毛打頻度が頭打ちになることがわかった。しかし、繊毛打の波形には異常が見られなかったことから、*ODALI*-RNAi が示した遊泳速度の減少は、繊毛打頻度の減少に起因することが判明した。また、*ODALI*-RNAi は頻繁に自発的な回避反応を示すことから、 Ca^{2+} に対する感受性が上昇し、コントロールより低い Ca^{2+} 濃度で繊毛逆転を示すのではないかと予想された。しかし、繊毛逆転を引き起こすのに必要な Ca^{2+} 濃度は、コントロールの場合とほとんど変わらなかった。つまり、この結果は、*ODALI* をノックダウンしても Ca^{2+} による繊毛逆転の調節にはほとんど影響を与えないことを意味している。そこで、もう 1 つのセカンドメッセンジャー、cAMP に注目した。繊毛打の方向は cAMP によっても調節されており、cAMP は濃度依存的に繊毛打をより後方へとシフトさせる (Noguchi et al., 2000, 2004, 2005) 。繊毛打方向の調節において、cAMP は Ca^{2+} と拮抗的に作用し、 Ca^{2+} による繊毛逆転を抑制する効果があることが知られている (Bonini and Nelson, 1988; Nakaoka and Ooi, 1985; Noguchi et al., 1991, 2000, 2004, 2005) 。細胞表層シート上の繊毛を Ca^{2+} 存在下で再活性化させ、繊毛逆転状態にしておき、そこから徐々に cAMP 濃度を上げていくと、コントロールでは cAMP 濃度上昇に伴って繊毛逆転が抑制されたのに対して、*ODALI*-RNAi の場合は、cAMP による繊

毛逆転の抑制がほとんど見られなかった (Kutomi et al., 2012a) . したがって, *ODAL1* をノックダウンすると, cAMP による調節系が阻害され, cAMP の Ca^{2+} による繊毛逆転を抑制する効果がほとんど失われていることを示している. このため *ODAL1*-RNAi では自発的に後退遊泳をしたり, 脱分極刺激によって通常の倍以上の時間後退遊泳を示したりしたのではないかと考えられる.

このように, *ODAL1* ノックダウンが及ぼす最も顕著な影響は, 繊毛逆転を抑制する cAMP の効果が消失することである. この現象が cAMP 依存的リン酸化による繊毛運動調節機構の消失によるものかどうかを検証するため, *ODAL1*-RNAi から単離した繊毛軸糸に, γ - ^{32}P ATP を加え, cAMP 依存的にリン酸化される軸糸タンパク質を探索した. その結果, *ODAL1*-RNAi では, コントロール軸糸では検出される 29 kDa のリン酸化タンパク質のバンドが検出されなかった (Kutomi et al., 2012a) . 以前の研究により, 分子量 29 kDa の外腕ダイニン軽鎖 p29 が cAMP 依存的にリン酸化され, それによって外腕ダイニンと微小管とのすべり速度が上昇することが知られている (Hamasaki et al., 1991; Barkalow et al., 1994) . 従って, *ODAL1* ノックダウンによって p29 の cAMP 依存的リン酸化が消失し, それによって繊毛運動の調節機構が阻害されたことが *ODAL1*-RNAi の運動異常の原因であると考えられる (Fig. 4) .

p29 はコードする遺伝子が未だにクローニングされていないために実体は不明だが, おそらく *ODAL1* そのもので, ノックダウンによって p29 自体が消失したものと推察される. その理由は, *ODAL1* の推定分子量は 22 kDa で, 外腕ダイニンの軽鎖の中では最も 29 kDa に近いこと, *ODAL1* のアミノ酸配列の 55 番目のセリンが cAMP 依存的にリン酸化されると予想されることである (Kutomi et al., 2012a) . p29 のアミノ酸配列の解読によって両者が同一かどうかがいずれ明らかになるであろう. また, *ODAL1* とクラミドモナスの LC1 のアミノ酸配列を比較すると, γ HC のモータードメインやチューブリンとの相互作用部位が保存されている (Kutomi et al., 2012a) . しかし, *ODAL1* が γ HC, およびチューブリンと相互作用しているかどうかはまだわかっていない.

テトラヒメナでは p29 と機能的に相同だと考えられているタンパク質は, 分子量 34 kDa の外腕ダイニン軽鎖 (p34) である. p34 も cAMP 依存的にリン酸化されることがわかっている (Christensen et al., 2001) . また, テトラヒメナでも cAMP 存在下で外腕ダイニンと微小管とのすべり速度が上昇することから, テトラヒメナにもゾウリムシと同様の cAMP による繊毛運動の調節機構が存在する可能性がある.

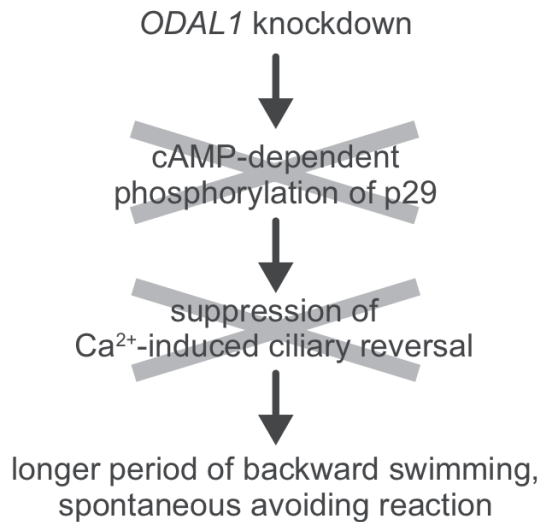


Fig. 4. Effects of *ODAL1* knockdown on ciliary movements in *P. tetraurelia*. In the control cells, the outer dynein arm light chain, p29, is phosphorylated in cAMP-dependent manner, causing suppression of Ca^{2+} -induced ciliary reversal. The *ODAL1* knockdown impairs the cAMP-dependent phosphorylation of p29, causing defects in ciliary response to cAMP. Therefore, phenotypes of *ODAL1*-RNAi cells, such as a longer period of backward swimming and a spontaneous avoiding reaction in the absence of any stimulation, are probably due to the apparent hypersensitivity to Ca^{2+} that is a consequence of the defects in the ciliary response to cAMP.

また, *ODAL1*-RNAi 軸糸の電子顕微鏡観察によって, 外腕ダイニンが部分的に欠失していることが判明した. このことは, *ODAL1* ノックダウンは外腕ダイニンの不安定化を引き起こすことを示している. トリパノソーマ (*T. brucei*) でも, LC1 ノックダウンによってヨツヒメゾウリムシと同様に外腕ダイニンが減少することが報告されているが (Baron et al., 2007) , プラナリアやクラミドモナスでは, LC1 をノックアウトまたはノックダウンしても外腕ダイニンは減少しない (Patel-King and King, 2009; Rompolas et al., 2010) . このことから, 外腕ダイニンの安定化に LC1 が関係しているかどうかは, 生物種によって異なると考えられる.

LC1 以外に, 外腕ダイニンの主要な構成成分である β HC, および IC1 も繊毛病のひとつであるカルタゲナー症候群 (内臓逆位, 気管支拡張症, 不妊症などの症状を示す遺伝病) の原因遺伝子 (Bartoloni et al., 2002) として知られており, これらのタンパク質の繊毛運動における機能について, 現在ヨツヒメゾウリムシを用いた研究が進められている (堀ほか, 2008, 2009) .

内腕ダイニン

前述のように、内腕ダイニン複合体は複数種あって、モータードメインを1つだけ持つ単頭型と2つ持つ二頭型の2種類に分類される。クラミドモナスでは7種類の主要な内腕ダイニンが同定され（これらはa~gと呼ばれている）、このうち、二頭型はfの1種類のみであり、単頭型はf以外の6種類あることが明らかになっている（Kagami and Kamiya, 1992; King and Kamiya, 2008）。内腕ダイニンを欠失するクラミドモナス変異株では、鞭毛打の振幅が減少することから、内腕ダイニンは鞭毛打の波形の調節に重要であると考えられている（Brokaw and Kamiya, 1987）。二頭型の内腕ダイニンを欠失したクラミドモナス変異株では、鞭毛打の振幅が減少するだけでなく、走光性を示さなくなることが知られている（King and Dutcher, 1997）。テトラヒメナでは、二頭型の内腕ダイニンの重鎖をノックアウトすると後退遊泳を全く示さなくなったり（Hennessey et al., 2002）、繊毛打の波形に乱れが生じ、遊泳に影響を及ぼしたりする（Wood et al., 2007）。

二頭型の内腕ダイニンの活性を調節する因子として、クラミドモナスでは分子量 138 kDa の中間鎖（IC138）が Ca^{2+} 存在下において脱リン酸化されることが重要であると考えられている（Habermacher and Sale, 1997）。テトラヒメナにおいても、繊毛逆転には分子量 112 kDa の中間鎖が脱リン酸化されるのが重要であると考えられている（Deckman and Pennock, 2004）。ヨツヒメゾウリムシの二頭型の内腕ダイニン中間鎖のひとつは IC138 の相同分子種であるが、リン酸化による内腕ダイニンの活性調節に関わっているのかどうかについてはまだ明らかになっていない。ヨツヒメゾウリムシの繊毛運動における二頭型の内腕ダイニンの重鎖や中間鎖の機能についても現在研究が進められている（過能ほか, 2009; 井上ほか, 2011; 久富ほか, 2010, 2011）。

繊毛打逆転機構に働く因子

我々は膜を除去したゾウリムシの細胞表層シートを高濃度（0.5 M 程度）の KCl に 1 分間ほど曝すと、 Ca^{2+} 依存的な繊毛逆転が起こらなくなること

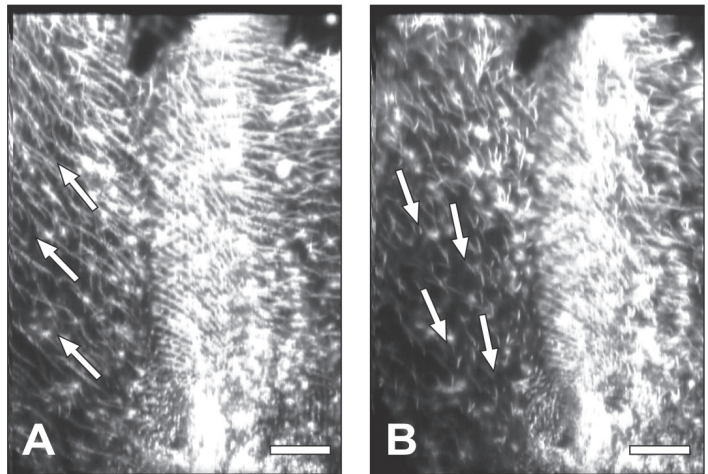


Fig. 5. Inactivation of Ca^{2+} -induced ciliary reversal by high-salt extraction in *Paramecium*. (A) Ciliary orientation on the cortical sheet before extraction with 0.5 M KCl. The cilia were reactivated in the presence of $2 \mu\text{M Ca}^{2+}$. The cilia beat toward the anterior of cortical sheet, showing the Ca^{2+} -induced ciliary reversal. (B) Ciliary orientation on the cortical sheet after extraction with 0.5 M KCl. The cortical sheets were perfused with a high-salt solution (0.5 M KCl). After perfusion for 1 min, the cortical sheets were washed with a low-salt solution. The cilia were reactivated by ATP in the presence of $2 \mu\text{M Ca}^{2+}$. The cilia beat in the normal direction despite the presence of $2 \mu\text{M Ca}^{2+}$. The tops of the panels represent the anterior direction of the cell. Arrows indicate directions of ciliary beats. Bars, 20 μm . These images are reproduced from Kutomi et al. (2013) with permission. Movies are presented at <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00709-013-0504-0>.

発見した（以後この現象を「繊毛逆転不活性化」と呼ぶ）（Kutomi et al., 2013; Fig. 5）。高塩濃度処理は、本来は繊毛のダイニン（特に外腕ダイニン）を抽出するために使用されるが、抽出には 30–60 分ほど要する（Howard and Sale, 1995）。短時間の高塩濃度処理による繊毛の抽出物を SDS-PAGE で分析したところ、外腕ダイニンはほとんど抽出されていなかった（Kutomi et al., 2013）。従って、繊毛逆転不活性化は、外腕ダイニンとは別の繊毛タンパク質が繊毛から外れたことに起因していると考えられる。

繊毛逆転不活性化は、KCl のほかに高濃度の KNO_3 処理でも起こる。これは、 Cl^- と NO_3^- はカオトロピック効果（水分子間の相互作用を減少させる効果で、これによりタンパク質の構造の不安定化が起こる）の強さが同程度であるからだと考えられる。そのため、 Cl^- よりもカオトロピック効果が弱い SO_4^{2-} や CH_3CHOO^- では、繊毛逆転が正常に起こり、反対にカオトロピック効果が強い Γ^- では繊毛運動自体が止まってしまう。これらの様々なカリウム塩で処理した繊毛の抽出物を SDS-PAGE で分析したところ、繊毛運動への影響がほとんどなかった K_2SO_4 や CH_3COOK で処理した場合、繊毛タンパク

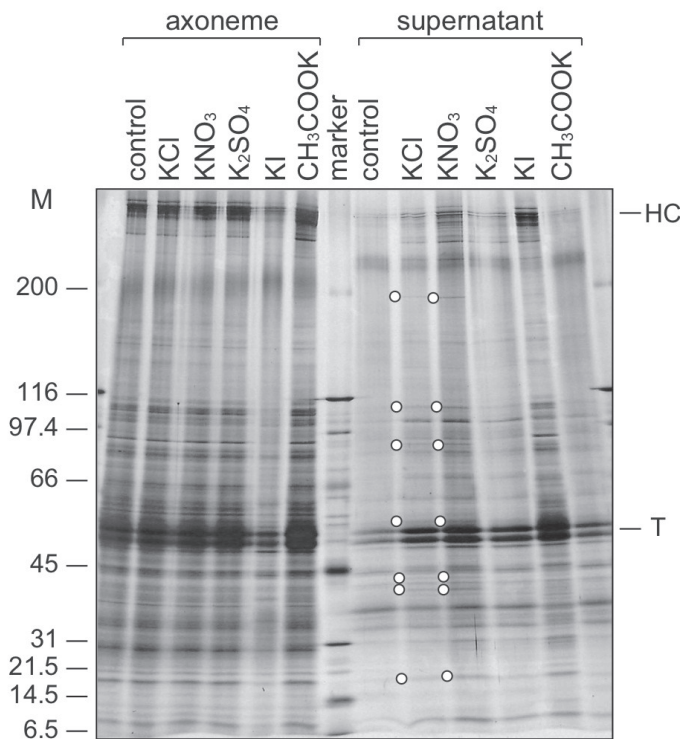


Fig. 6. Effects of extraction with various high-potassium salts in the absence of ATP on the composition of axonemal proteins. Isolated ciliary axonemes were extracted with the various high-potassium salts indicated in the figure for 1 min. The concentrations of the potassium salt are 0.5 M. Proteins in the extraction remnants (axoneme) and supernatants are analyzed by SDS-PAGE. Open circles indicate common bands between the supernatants with 0.5 M KCl and KNO₃. HC, outer arm dynein heavy chains; T, tubulins; M, Markers for molecular weights ($\times 10^3$). This image is reproduced from Kutomi et al. (2013) with permission.

質はほとんど抽出されないが、繊毛逆転不活性化が起こる KCl や KNO₃ 処理をした場合においては、K₂SO₄ や CH₃COOK で処理した場合では見られなかったバンドや、濃くなったバンドがいくつか検出された (Kutomi et al., 2013; Fig. 6) . これらのバンドは Ca²⁺ による繊毛逆転の調節機構に働く重要な因子である可能性が高い. このことを検証するため、質量分析によって目的の繊毛タンパク質を同定し、さらには RNAi によるノックダウンを行って目的遺伝子の機能解析を行うことが、解決への近道になると期待できる. なお、繊毛の運動性が完全に消失した KI 処理をした場合は、繊毛逆転不活性化が起こる場合において検出される特徴的なバンドだけでなく、多くの繊毛タンパク質が抽出されていた (Kutomi et al., 2013; Fig. 6) . このため KI 処理では、ほとんどの繊毛タンパク質が無作為に抽出されてしまうと考えられる.

Ca²⁺ による繊毛運動の調節機構に関わる Ca²⁺ 結合タンパク質

Ca²⁺ による繊毛運動の調節機構にはどこかで Ca²⁺ と結合するタンパク質が関わっているはずである. これまでの研究によって同定されたいくつかの Ca²⁺

結合タンパク質のうち、クラミドモナスの外腕ダイニン軽鎖, LC4 は, Ca²⁺ 依存的な鞭毛運動の調節に働く重要な候補因子のひとつであると考えられている (King and Patel-King, 1995; Sakato et al., 2007) . テトラヒメナでは, Ca²⁺ の有無によって *in vitro* における内腕ダイニンと微小管とのすべり速度が変化することから, 内腕ダイニンに Ca²⁺ 感受性があり, そこに存在するセントリンと呼ばれるカルモジュリンファミリーに属する Ca²⁺ 結合タンパク質が繊毛逆転に関わると考えられている (Guerra et al., 2003; Satir, 2003) . カタユレイボヤの精子鞭毛には, カラクシンと呼ばれる Ca²⁺ 結合タンパク質が存在する (Mizuno et al., 2009) . カラクシンは外腕ダイニンに直接結合し, Ca²⁺ 存在下において外腕ダイニンと微小管とのすべり運動を抑制することから, Ca²⁺ による鞭毛運動の調節に重要な役割を果たしていると考えられている (Mizuno et al., 2012) .

ゾウリムシでは, 繊毛逆転がカルモジュリン阻害剤によって部分的に影響を受けることから, Ca²⁺ による繊毛逆転には, カルモジュリンが関係している可能性が指摘されている (Otter et al., 1984; Izumi and Nakaoka, 1987) . さらに, 前述の高濃度 KCl 抽出によって検出された繊毛逆転に関与する候補タンパク質の中にもカルモジュリンが含まれている (野口,

未発表)。したがって、ゾウリムシの繊毛逆転の調節機構にカルモジュリンが関わっている可能性は高いと考えられる。そこで、筆者は、ゾウリムシ繊毛を抗カルモジュリン抗体を用いて免疫染色を行い、高塩濃度処理前後における繊毛内のカルモジュリンの蛍光シグナルの変化を調べた。その結果、意外なことに、高塩濃度処理を行うと、未処理の繊毛軸系よりも蛍光シグナルが増大した (Kutomi et al., 2013)。これは、高塩濃度処理によって、軸系内のカルモジュリンの一部が解離するものの、カルモジュリンを覆っている (おそらくカルモジュリンと相互作用している) 他の軸系タンパク質も解離したか、あるいは構造が変化したために、抗カルモジュリン抗体が軸系に残ったカルモジュリンと結合しやすくなったためかもしれない。また、このことは、カルモジュリンやカルモジュリンと相互作用するタンパク質が繊毛打逆転の調節に関与している可能性を示唆している。カルモジュリンがゾウリムシ繊毛軸系のどこに存在するのかは明らかにされていないが、クラミドモナスではカルモジュリンは中心小管やラジアルスポークに局在することから (Wargo et al., 2005; Yang et al., 2006)、ゾウリムシの場合も同様の場所に局在するのかもしれない。

しかしながら、ヨツヒメゾウリムシの繊毛にはカルモジュリン以外のいくつかの Ca^{2+} 結合タンパク質が存在していることが報告されていることから (Kim et al., 2002)、 Ca^{2+} による繊毛逆転の調節機構には、これらの複数の Ca^{2+} 結合タンパク質が協同して働いているのかもしれない。

今後の展望

本総説では繊毛運動のメカニズムに関する膨大な知見の一部を紹介した。繊毛の運動メカニズムは古くから多くの研究がなされているが、未だにその全貌は明らかになっていない。外腕ダイニンの各サブユニットの役割、内腕ダイニンの役割、ラジアルスポークや中心装置などが果たす役割など、解明すべき点はまだ多く残されている。本総説では示さなかったが、ゾウリムシの繊毛打においては、 Ca^{2+} や cAMP の他に cGMP による調節機構も存在しており (Bonini and Nelson, 1988; Noguchi et al., 2004)、これも非常に興味深い問題である。前述したように、ゾウリムシでは電気生理、トリトンモデル、細胞表層シートなど繊毛運動を解析する上で有効な手法が利用できるだけでなく、RNAi によるノックダウンのような遺伝的手法も利用できる。繊毛運動のメカニズムの全容を理解するうえで、これらの手法を用いた繊毛運動機構の解析に加え、生化学的手法を中心とした繊毛の構成成分の解析を行うことが必要となる

だろう。

また、本総説で述べた繊毛運動に関する知見や研究手法は、冒頭で述べたヒトの繊毛病に関する研究にも有効である。繊毛の構造や構成タンパク質は、種を超えて共通性が高く、ヒト繊毛病の原因遺伝子に相同な遺伝子がヨツヒメゾウリムシにおいても多く見つかっている (Arnaiz et al., 2009)。したがって、ゾウリムシ (特にヨツヒメゾウリムシ) はヒトの繊毛病研究の有効なモデル生物であり、将来、繊毛病の発症機構の解明や有効な治療法の開発に大きく貢献することが期待される。

謝辞

本総説を執筆する機会を与えてくださった、情報通信研究機構未来 ICT 研究所の岩本政明編集長に深く感謝申し上げます。筆者の元指導教員である富山大学野口宗憲博士には、本総説の執筆に当たってご助言頂いたことを深く感謝申し上げます。また、筆者の研究の遂行にあたって非常に多くのご協力を頂いた、奈良教育大学の石田正樹博士、徳島文理大学の富永貴志博士、フランス国立研究センターの Jean Cohen 博士と France Koll 博士、富山大学の中村省吾博士と蒲池浩之博士、富山大学元野口研究室の野口宗憲博士とメンバーの皆様、山口大学堀学研究室の皆様には深く感謝申し上げます。本総説で取り上げた筆者の研究の一部は、科学研究費補助金基盤研究 (C) 「繊毛病に関する繊毛打制御の分子機構の解析 (No. 21590358)」; 代表者: 堀学 (平成 21~23 年度)」からの支援で行われました。

引用文献

- Afzelius, B. A. (2004) Cilia-related diseases. *J. Pathol.*, 204, 470–477.
- Arnaiz, O. and Sperling, L. (2011) ParameciumDB in 2011: new tools and new data for functional and comparative genomics of the model ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Nucleic Acids Res.*, 39, D632–D636.
- Arnaiz, O., Cain, S., Cohen, J. and Sperling, L. (2007) ParameciumDB: a community resource that integrates the *Paramecium tetraurelia* genome sequence with genetic data. *Nucleic Acids Res.*, 35, D439–D444.
- Arnaiz, O., Malinowska, A., Klotz, C., Sperling, L., Dadlez, M., Koll, F. and Cohen, J. (2009) Cildb: a knowledgebase for centrosomes and cilia. *Database*, doi:10.1093/database/bap022.
- Aury, J. M., Jaillon, O., Duret, L., Noel, B., Jubin, C.,

- Porcel, B. M., Ségurens, B., Daubin, V., Anthouard, V., Aiach, N. et al. (2006) Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Nature*, 444, 171–178.
- Barkalow, K., Hamasaki, T. and Satir, P. (1994) Regulation of 22S dynein by a 29-kD light chain. *J. Cell Biol.*, 126, 727–735.
- Baron, D. M., Kabututu, Z. P. and Hill, K. L. (2007) Stuck in reverse: loss of LC1 in *Trypanosoma brucei* disrupts outer dynein arms and leads to reverse flagellar beat and backward movement. *J. Cell Sci.*, 120, 1513–1520.
- Bartoloni, L., Blouin, J. L., Pan, Y., Gehrig, C., Maiti, A. K., Scamuffa, N., Rossier, C., Jorissen, M., Armengot, M., Meeks, M. et al. (2002) Mutations in the DNAH11 (axonemal heavy chain dynein type 11) gene cause one form of situs inversus totalis and most likely primary ciliary dyskinesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 99, 10282–10286.
- Bellomo, D., Lander, A., Harragan, I. and Brown, N. A. (1996) Cell proliferation in mammalian gastrulation: the ventral node and notochord are relatively quiescent. *Dev. Dyn.*, 205, 471–485.
- Benashski, S. E., Patel-King, R. S. and King, S. M. (1999) Light chain 1 from the *Chlamydomonas* outer dynein arm is a leucine-rich repeat protein associated with the motor domain of the γ heavy chain. *Biochemistry*, 38, 7253–7264.
- Bonini, N. M. and Nelson, D. L. (1988) Differential regulation of *Paramecium* ciliary motility by cAMP and cGMP. *J. Cell Biol.*, 106, 1615–1623.
- Brokaw, C. J., Josslin, R. and Bobrow, L. (1974) Calcium ion regulation of flagellar beat symmetry in reactivated sea urchin spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 58, 795–800.
- 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.
- Bui, K. H., Yagi, T., Yamamoto, R., Kamiya, R. and Ishikawa, T. (2012) Polarity and asymmetry in the arrangement of dynein and related structures in the *Chlamydomonas* axoneme. *J. Cell Biol.*, 198, 913–925.
- Christensen, S. T., Guerra, C., Wada, Y., Valentin, T., Angeletti, R. H., Satir, P. and Hamasaki, T. (2001) A regulatory light chain of ciliary outer arm dynein in *Tetrahymena thermophila*. *J. Biol. Chem.*, 276, 20048–20054.
- Deckman, C. M. and Pennock, D. G. (2004) Dephosphorylation of inner arm 1 is associated with ciliary reversals in *Tetrahymena thermophila*. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 57, 73–83.
- Gaillard, A. R., Diener, D. R., Rosenbaum, J. L. and Sale, W. S. (2001) Flagellar radial spoke protein 3 is an A-kinase anchoring protein (AKAP). *J. Cell Biol.*, 153, 443–448.
- Gaillard, A. R., Fox, L. A., Rhea, J. M., Craigie, B. and Sale, W. S. (2006) Disruption of the A-kinase anchoring domain in flagellar radial spoke protein 3 results in unregulated axonemal cAMP-dependent protein kinase activity and abnormal flagellar motility. *Mol. Biol. Cell*, 17, 2626–2635.
- Galvani, A. and Sperling, L. (2002) RNA interference by feeding in *Paramecium*. *Trends Genet.*, 18, 11–12.
- Gardner, L. C., O'Toole, E., Perrone, C. A., Giddings, T. and Porter, M. E. (1994) Components of a "dynein regulatory complex" are located at the junction between the radial spokes and the dynein arms in *Chlamydomonas* flagella. *J. Cell Biol.*, 127, 1311–1325.
- Gibbons, B. H. and Gibbons, I. R. (1980) Calcium-induced quiescence in reactivated sea urchin sperm. *J. Cell Biol.*, 84, 13–27.
- Goodenough, U. W. (1983) Motile detergent-extracted cells of *Tetrahymena* and *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.*, 96, 1610–1621.
- Gonda, K., Oami, K. and Takahashi, M. (2007) Centrin controls the activity of the ciliary reversal-coupled voltage-gated Ca^{2+} channels Ca^{2+} -dependently. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 362, 170–176.
- Guerra, C., Wada, Y., Leick, V., Bell, A. and Satir, P. (2003) Cloning, localization, and axonemal function of *Tetrahymena* centrin. *Mol. Biol. Cell*, 14, 251–261.
- Habermacher, G. and Sale, W. S. (1997) Regulation of flagellar dynein by phosphorylation of a 138-kD inner arm dynein intermediate chain. *J. Cell Biol.*, 136, 167–176.
- Hamasaki, T., Barkalow, K., Richmond, J. and Satir, P. (1991) cAMP stimulated phosphorylation of an axonemal polypeptide that copurifies with the 22S dynein arm regulates microtubule translocation velocity and swimming speed in *Paramecium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 88, 7918–7922.
- Hasegawa, E., Hayashi, H., Asakura, S. and Kamiya, R. (1987) Stimulation of in vitro motility of *Chlamydomonas* axonemes by inhibition of cAMP-dependent phosphorylation. *Cell Motil. Cytoskele-*

- ton, 8, 302–311.
- Harz, H. and Hegemann, P. (1991) Rhodopsin-regulated calcium currents in *Chlamydomonas*. *Nature*, 351, 489–491.
- Hennessey, T. M., Kim, D. Y., Oberski, D. J., Hard, R., Rankin, S. A. and Pennock, D. G. (2002) Inner arm dynein 1 is essential for Ca^{++} -dependent ciliary reversals in *Tetrahymena thermophila*. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 53, 281–288.
- Heuser, T., Raytchev, M., Krell, J., Porter, M. E. and 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.
- Hirokawa, N., Tanaka, Y., Okada, Y. and Takeda, S. (2006) Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell*, 125, 33–45.
- 堀学, Cohen, J. and Koll, F. (2009) ゾウリムシ絨毛ダイニンの研究. *原生動物学雑誌*, 42, 65–66.
- 堀学, Laligné, C., Klotz, C., Malinowska, A., Dadlez, M., Arnaiz, O., Sperling, L., Cohen, J. and Koll, F. (2008) 絨毛研究のモデルとしてのゾウリムシ. *原生動物学雑誌*, 41, 69–70.
- Howard, D. R. and Sale, W. S. (1995) Isolation of inner- and outer-arm dyneins. *Methods Cell Biol.*, 47, 481–486.
- Ibanez-Tallon, I., Pagenstecher, A., Fliegauf, M., Olbrich, H., Kispert, A., U-Ketelsen, P., North, A., Heintz, N. and Omran, H. (2004) Dysfunction of axonemal dynein heavy chain Mdnah5 inhibits ependymal flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation. *Hum. Mol. Genet.*, 13, 2133–2141.
- Inaba, K. (2007) Molecular basis of sperm flagellar axonemes: structural and evolutionary aspects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1101, 506–526.
- 井上桂那子, 石田正樹, 富永貴志, Cohen, J., 堀学 (2011) ゾウリムシの絨毛打逆転機構の研究. *原生動物学雑誌*, 44, 38–39.
- Ishikawa, T., Sakakibara, H. and Oiwa, K. (2007) The architecture of outer dynein arms in situ. *J. Mol. Biol.* 368, 1249–1258.
- Izumi, A. and Nakaoka, Y. (1987) cAMP-mediated inhibitory effect of calmodulin antagonists on ciliary reversal of *Paramecium*. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 7, 154–159.
- 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.
- 過能由佳, 井上桂那子, Cohen, J., Koll, F., 堀学 (2009) ゾウリムシ絨毛打制御の分子機構の解析. *原生動物学雑誌*, 42, 25–26.
- Kiefer, B. I. (1970) Development, organization, and degeneration of the *Drosophila* sperm flagellum. *J. Cell Sci.*, 6, 177–194.
- Kim, K., Son, M., Peterson, J. B. and Nelson, D. L. (2002) Ca^{2+} -binding proteins of cilia and infraciliary lattice of *Paramecium tetraurelia*: their phosphorylation by purified endogenous Ca^{2+} -dependent protein kinases. *J. Cell Sci.*, 115, 1973–1984.
- King, S. J. and Dutcher, S. K. (1997) Phosphoregulation of an inner dynein arm complex in *Chlamydomonas reinhardtii* is altered in phototactic mutant strains. *J. Cell Biol.*, 136, 177–191.
- King, S. M. and Kamiya, R. (2008) Axonemal dyneins: assembly, structure and force generation. *In: The Chlamydomonas Sourcebook: Cell Motility and Behavior*, Vol. 3. Witman, G. B. (ed.). Academic Press, San Diego, pp. 131–208.
- King, S. M. and Patel-King, R. S. (1995) Identification of a Ca^{2+} -binding light chain within *Chlamydomonas* outer arm dynein. *J. Cell Sci.*, 108, 3757–3764.
- Kung, C. and Eckert, R. (1972) Genetic modification of electric properties in an excitable membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 69, 93–97.
- Kung, C. and Saimi, Y. (1982) The physiological basis of taxes in *Paramecium*. *Annu. Rev. Physiol.*, 44, 519–534.
- 久富理, 堀学, 井上桂那子, 野口宗憲 (2010) ヒメゾウリムシの絨毛運動における軸糸ダイニン軽鎖・中間鎖の機能的な研究. *原生動物学雑誌*, 43, 63–64.
- Kutomi, O., Hori, M., Ishida, M., Tominaga, T., Kamachi, H., Koll, F., Cohen, J., Yamada, N. and Noguchi, M. (2012a) Outer dynein arm light chain 1 is essential for controlling the ciliary response to cyclic AMP in *Paramecium tetraurelia*. *Eukaryot. Cell*, 11, 645–653.
- 久富理, 井上桂那子, 堀学, 野口宗憲 (2011) ヒメゾウリムシの絨毛の波形の調節における外腕・内腕ダイニンの役割. *原生動物学雑誌*, 44, 39–40.
- Kutomi, O., Seki, M., Nakamura, S., Kamachi, H. and Noguchi, M. (2013) Inactivation of Ca^{2+} -induced ciliary reversal by high-salt extraction in the cilia of *Paramecium*. *Protoplasma*, 250, 1219–1227.
- Kutomi, O., Takemura, M., Kamachi, H. and Noguchi, M. (2012b) Estimation of effective concentrations of ATP-regenerating enzymes in cilia of *Paramecium caudatum*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 59, 49–53.
- Marshall, W. F. (2008) The cell biological basis of ciliary

- disease. *J. Cell Biol.*, 180, 17–21.
- Mizuno, K., Padma, P., Konno, A., Satouh, Y., Ogawa, K. and Inaba, K. (2009) A novel neuronal calcium sensor family protein, calaxin, is a potential Ca^{2+} -dependent regulator for the outer arm dynein of metazoan cilia and flagella. *Biol. Cell*, 101, 91–103.
- Mizuno, K., Shiba, K., Okai, M., Takahashi, Y., Shitaka, Y., Oiwa, K., Tanokura, M. and Inaba, K. (2012) Calaxin drives sperm chemotaxis by Ca^{2+} -mediated direct modulation of a dynein motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 109, 20497–20502.
- Morisawa, M. and Okuno, M. (1982) Cyclic AMP induces maturation of trout sperm axoneme to initiate motility. *Nature*, 295, 703–704.
- Naitoh, Y. (1966) Reversal response elicited in nonbeating cilia of *Paramecium* by membrane depolarizatin. *Science*, 154, 660–662.
- Naitoh, Y. and Eckert, R. (1969) Ionic mechanisms controlling behavioral responses of *Paramecium* to mechanical stimulation. *Science*, 164, 963–965.
- Naitoh, Y. and Kaneko, H. (1972) Reactivated Triton-extracted models of *Paramecium*: modification of ciliary movement by calcium ions. *Science*, 176, 523–524.
- Naitoh, Y. and Kaneko, H. (1973) Control of ciliary activities by adenosinetriphosphate and divalent cations in Triton-extracted models of *Paramecium caudatum*. *J. Exp. Biol.*, 58, 657–676.
- Nakano, I., Kobayashi, T., Yoshimura, M. and Shingyoji, C. (2003) Central-pair-linked regulation of microtubule sliding by calcium in flagellar axonemes. *J. Cell Sci.*, 116, 1627–1636.
- Nakaoka, Y. and Ooi, H. (1985) Regulation of ciliary reversal in Triton-extracted *Paramecium* by calcium and cyclic adenosine monophosphate. *J. Cell Sci.*, 77, 185–195.
- Nicastro, D., McIntosh, J. R. and Baumeister, W. (2005) 3D structure of eukaryotic flagella in a quiescent state revealed by cryo-electron tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 102, 15889–15894.
- 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*, 313, 944–948.
- Noguchi, M., Kitani, T., Ogawa, T., Inoue, H. and Kamachi, H. (2005) Augmented ciliary reorientation response and cAMP-dependent protein phosphorylation induced by glycerol in Triton-extracted *Paramecium*. *Zool. Sci.*, 22, 41–48.
- Noguchi, M., Kurahashi, S., Kamachi, H. and Inoue, H. (2004) Control of the ciliary beat by cyclic nucleotides in the intact cortical sheets from *Paramecium*. *Zool. Sci.*, 21, 1167–1175.
- Noguchi, M., Nakamura, Y. and Okamoto, K.-I. (1991) Control of ciliary orientation in ciliated sheets from *Paramecium* - differential distribution of sensitivity to cyclic nucleotides. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 20, 38–46.
- Noguchi, M., Ogawa, T. and Taneyama, T. (2000) Control of ciliary orientation through cAMP-dependent phosphorylation of axonemal proteins in *Paramecium caudatum*. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 45, 263–271.
- Noguchi, M., Sasaki, J. Y., Kamachi, H. and Inoue, H. (2003) Protein phosphatase 2C is involved in the cAMP-dependent ciliary control in *Paramecium caudatum*. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 54, 95–104.
- 野口宗憲, 沢田毅稔 (2001) ゾウリムシ繊毛運動のエネルギー供給機構. 比較生理生化学, 18, 102–107.
- Noguchi, M., Sawada, T. and Akazawa, T. (2001) ATP-regenerating system in the cilia of *Paramecium caudatum*. *J. Exp. Biol.*, 204, 1063–1072.
- Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M. and Hirokawa, N. (1998) Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell*, 95, 829–837.
- Nonaka, S., Shiratori, H., Saijoh, Y. and Hamada, H. (2002) Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature*, 418, 96–99.
- Otter, T., Satir, B. H. and Satir, P. (1984) Trifluoperazine-induced changes in swimming behavior of *Paramecium*: evidence for two sites of drug action. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 4, 249–267.
- Patel-King, R. S. and King, S. M. (2009) An outer arm dynein light chain acts in a conformational switch for flagellar motility. *J. Cell Biol.*, 186, 283–295.
- Pazour, G. J., Agrin, N., Leszyk, J. and Witman, G. B. (2005) Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *J. Cell Biol.* 170, 103–113.
- Pigino, G., Maheshwari, A., Bui, K. H., Shingyoji, C., Kamimura, S. and Ishikawa, T. (2012) Comparative structural analysis of eukaryotic flagella and cilia from *Chlamydomonas*, *Tetrahymena*, and sea urchins. *J. Struct. Biol.*, 178, 199–206.
- Piperno, G., Mead, K., LeDizet, M. and Moscatelli, A. (1994) Mutations in the “dynein regulatory com-

- plex" alter the ATP-insensitive binding sites for inner arm dyneins in *Chlamydomonas* axonemes. *J. Cell Biol.*, 125, 1109–1117.
- Rompolas, P., Patel-King, R. S. and King, S. M. (2010) An outer arm dynein conformational switch is required for metachronal synchrony of motile cilia in planaria. *Mol. Biol. Cell*, 21, 3669–3679.
- Sakato, M., Sakakibara, H. and King, S. M., (2007) *Chlamydomonas* outer arm dynein alters conformation in response to Ca^{2+} . *Mol. Biol. Cell*, 18, 3620–3634.
- Satir, P. (2003) Control molecules in protozoan ciliary motility. *Jpn. J. protozool.* 36, 87–96.
- Schmidt, J. A. and Eckert, R. (1976) Calcium couples flagellar reversal to photo-stimulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature*, 262, 713–715.
- Schultz, J. E., Klumpp, S., Benz, R., Schürhoff-Goeters, W. J. and Schmid, A. (1992) Regulation of adenylyl cyclase from *Paramecium* by an intrinsic potassium conductance. *Science*, 255, 600–603.
- Shiba, K., Baba, S. A., Inoue, T. and Yoshida, M. (2008) Ca^{2+} bursts occur around a local minimal concentration of attractant and trigger sperm chemotactic response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 105, 19312–19317.
- Smith, E. F. and Sale, W. S. (1992) Regulation of dynein-driven microtubule sliding by the radial spokes in flagella. *Science*, 257, 1557–1559.
- Smith, E. F. and Yang, P. (2004) The radial spokes and central apparatus: Mechano-chemical transducers that regulate flagellar motility. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 57, 8–17.
- Sugino, K. and Naitoh, Y. (1982) Simulated cross-bridge patterns corresponding to ciliary beating in *Paramecium*. *Nature*, 295, 609–611.
- Tombes, R. M., Brokaw, C. J. and Shapiro, B. M. (1987) Creatine kinase-dependent energy transport in sea urchin spermatozoa: Flagellar wave attenuation and theoretical analysis of high energy phosphate diffusion. *J. Biophys.*, 52, 75–86.
- Tombes, R. M. and Shapiro, B. M. (1985) Metabolite channeling: A phosphocreatine shuttle to mediate high energy phosphate transport between sperm mitochondrion and tail. *Cell*, 41, 325–334.
- Tombes, R. M. and Shapiro, B. M. (1987) Enzyme termini of a phosphocreatine shuttle: Purification and characterization of two creatine kinase isoenzymes from sea urchin sperm. *J. Biol. Chem.*, 262, 16011–16019.
- Visconti, P. E., Moore, G. D., Bailey, J. L., Leclerc, P., Connors, S. A., Pan, D., Olds-Clarke, P. and Kopf, G. S. (1995) Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*, 121, 1139–1150.
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K. and Eppenberger, H. M. (1992) Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.*, 281, 21–40.
- Wargo, M. J., Dymek, E. E. and Smith, E. F. (2005) Calmodulin and PF6 are components of a complex that localizes to the C1 microtubule of the flagellar central apparatus. *J. Cell Sci.*, 118, 4655–4665.
- Watts, D. C. and Bannister, L. H. (1970) Localization of arginine kinase in the cilia of *Tetrahymena pyriformis*. *Nature*, 226, 450–451.
- Wood, C. R., Hard, R. and Hennessey, T. M. (2007) Targeted gene disruption of dynein heavy chain 7 of *Tetrahymena thermophila* results in altered ciliary waveform and reduced swim speed. *J. Cell Sci.*, 120, 3075–3085.
- Wu, H., Maciejewski, M. W., Marintchev, A., Benashski, S. E., Mullen, G. P. and King, S. M. (2000) Solution structure of a dynein motor domain associated light chain. *Nat. Struct. Biol.*, 7, 575–579.
- Yang, P., Diener, D. R., Yang, C., Kohno, T., Pazour, G. J., Dienes, J. M., Agrin, N. S., King, S. M., Sale, W. S., Kamiya, R. et al. (2006) Radial spoke proteins of *Chlamydomonas* flagella. *J. Cell Sci.*, 119, 1165–1174.
- Yoshida, M., Inaba, K., Ishida, K. and Morisawa, M. (1994) Calcium and cyclic AMP mediate sperm activation, but Ca^{2+} alone contributes sperm chemotaxis in the ascidian, *Ciona savignyi*. *Dev. Growth Differ.*, 36, 589–595.
- Zariwala, M. A., Knowles, M. R. and Omran, H. (2007) Genetic defects in ciliary structure and function. *Annu. Rev. Physiol.*, 69, 423–450.