

論文の内容の要旨

論文題目 Studies on factors affecting the velocity of microtubule sliding in flagella
(鞭毛微小管の滑り速度に影響を与える要因の解析)

氏名 今井 洋

序論

真核生物の鞭毛・繊毛運動は、ダブルレット微小管間の滑り運動を原動力としている。微小管滑り運動は、ダブルレット上に2列に並ぶ外腕ダイニンと内腕ダイニンがATPを加水分解しこの時生じる化学エネルギーが力学的エネルギーに変換されることによって起される。これまでの研究から、鞭毛運動の制御において、内腕は屈曲形成に必須であるのに対し、外腕は滑り速度調節に重要であるといわれている。例えば、膜除去後のウニ精子やクラミドモナスの鞭毛を再活性化した場合、その鞭毛打頻度は外腕抽出により低下する。また、トリプシン処理によりダブルレット間の滑りを誘導すると、その速度は、外腕抽出により低下する。しかし、単離した外腕と内腕が起す微小管滑り運動の速度は必ずしも異ならないことが報告されている。従って、外腕と内腕が存在する場合に内腕のみの場合より滑り速度が高いことは、外腕と内腕の特性の違いとして単純に説明することはできない。

ところで、ウニ精子鞭毛の外腕ダイニンである21 Sダイニンは、トリプシン処理により、モータードメインを含むC末の340 kDa断片とそれ以外のN末の110 kDa断片に分れる。340 kDa断片には、ダイニンが微小管とATP依存的に結合する部位(B-link)が含まれるが、ATPに非依存的に結合する部位(A-link)は110 kDa断片に含まれる。また、

21 S ダイニンの ATPase 活性はトリプシン処理により上昇することが知られている。これらのことから、トリプシン処理により ATPase 活性の上昇した断片が微小管滑り速度を高めている可能性も考えられる。しかし、トリプシン処理断片は隣り合う微小管間を架橋できないのでこの断片のみで高い速度の滑り運動は起せないと思われる。

本研究では、外腕存在下でトリプシン処理軸系の滑り速度が高いのは、どのような仕組みによるのかという疑問を解くことを手がかりとして、鞭毛運動の基本である滑り活性の調節機構における外腕と内腕の役割を解明することを目指した。滑り速度を解析するには、軸系構造の一部を酵素処理によりこわす必要がある。本研究では、滑りの制御系を残したまま滑りを誘導できるエラスターゼ処理と一部のダイニンのトリプシン処理とを組み合わせるといふ新しい手法の導入により大きな成果を得た。

材料と方法

実験にはキタムラサキウニ、バフンウニ、ムラサキウニの精子を用いた。精子を除膜後断片化し (intact 軸系と呼ぶ)、0.6 M KCl 処理とこの処理の後 0.75 M KCl 処理により外腕を抽出した軸系を用いた。また、外腕を抽出した軸系に、外腕や外腕のトリプシン処理断片を再構成した軸系も用いた。これらの軸系を約 5 μ l の chamber に灌流後、1 mM ATP 存在下でエラスターゼ、またはトリプシンを灌流して、微小管の滑りを誘導し、滑り速度を解析した。滑り運動は暗視野顕微鏡で観察し、イメージインテンシファイアー付きの高感度 CCD カメラでビデオに記録後、モニター画面上で微小管の動きをトレースし、速度を解析した。軸系のダイニンについては電気泳動、immunoblot を用いて解析した。その結果、0.6 M KCl 処理軸系には約 5%の外腕とほぼすべての内腕が残っていること、0.6 M KCl 処理後 0.75 M KCl 処理をした軸系には約 70%の内腕のみが残っていることがわかった。

結果と考察

<エラスターゼ処理軸系とトリプシン処理軸系の滑り運動>

5 μ g/mlエラスターゼ処理軸系では、約 60%がエラスターゼ処理に典型的な 1 回だけの滑りを示し、2 本のダブレットの束に分かれた。一方、1 μ g/mlトリプシン処理軸系においても約 40%が、同様の滑りを示した。この割合は、外腕を抽出しても変化しなかった。滑り速度を正確に測定するために、この 1 回だけの滑りに着目し、速度を解析した。

5 μ g/mlエラスターゼにより誘導した滑り速度は平均約 8 μ m/secで、外腕の有無によって有意な変化を示さなかった(Mann-Whitney U-testにより検定)。一方、1 μ g/mlトリプシンにより誘導した滑り速度は、intact軸系、0.6 M KCl処理軸系では 11-15 μ m/secとエラ

スターゼ処理による滑りより有意に速いが、0.75 M KCl処理軸糸では、エラスターゼ処理の場合と有意な差はみられなかった。

ほとんどの軸糸が滑りを起すエラスターゼ3分間処理とトリプシン1分間処理後の軸糸についてSDS-PAGEでダイニンの状態を調べたところ、ダイニン重鎖はエラスターゼ処理では影響を受けている様子はなかった。しかし、トリプシン処理ではダイニンは切断されてより小さなバンドが生じていた。このことから、エラスターゼ処理による滑りの方がトリプシン処理よりも生体内に近い状態を反映していると考えられる。

<酵素処理から滑り開始までに要する時間>

以上の結果から、外腕と内腕が共に存在する軸糸と内腕のみが存在する軸糸の滑り速度はほぼ等しいと予想される。しかし、これ以外にもこの結果を説明する仮説は考えられる。その1つは、エラスターゼ処理軸糸では、外腕が滑りに貢献していないため外腕の有無が速度に影響しなかったという仮説である。そこで、エラスターゼ処理開始から滑り開始までの時間 (time lag) を検討した。軸糸の滑り運動は、生体内で滑りを抑制している構造が消化されて抑制が弱くなり、ダイニンの滑りの力の方が大きくなったときに起るとすると、time lagは、滑りを起すダイニンの数を反映することになる。Intact軸糸から外腕を抽出するとエラスターゼでもトリプシンでもlagが長くなった。従って、エラスターゼ処理により誘導される滑りには外腕も貢献していたと考えられる。

もう1つは、エラスターゼが、自由な滑りを抑制している構造を十分消化しない結果、トリプシンより速度が遅くなったという仮説である。そこで消化の状態を変えるために、0.1 µg/mlトリプシンと20 µg/mlエラスターゼを用いて測定を行った。その結果、プロテアーゼ濃度の増減によりlagや滑りのパターンは変化した。滑り速度は影響を受けなかった。従って、一部の軸糸構造の消化が不十分なために滑り速度が低いわけではないことが示された。

以上の結果から、外腕と内腕の揃った軸糸と内腕のみの軸糸で微小管滑り速度はほぼ等しく、外腕がトリプシン処理による滑り速度上昇に関与していることが示唆された。そこで、トリプシン処理をした外腕を外腕のない軸糸に再構成し、エラスターゼにより誘導される滑り速度に対する効果を検討した。

<トリプシン処理外腕再構成軸糸の滑り速度>

Crudeの外腕を1 mM ATP存在下でトリプシン処理し、外腕抽出軸糸とインキュベート後、エラスターゼと1 mM ATPにより滑りを誘導した。0.75 M KCl処理軸糸に再構成した場合滑り速度は変化しなかったが、5%の外腕が存在する0.6 M KCl処理軸糸では滑り速度が有

意に高くなった。ところが、外腕をATP非存在下でトリプシン処理した場合にはこのような速度上昇はみられなかった。SDS-PAGEで調べたところ、ATP存在下でトリプシン処理した外腕は主に350 kDa断片となり、1 mM ATP存在下で軸糸に結合することがわかった。従って、速度の上昇には、軸糸に一部の外腕が存在すること、ATP存在下で外腕をトリプシン処理することが重要であることがわかった。

<トリプシン処理 21 Sダイニン再構成軸糸の滑り速度>

軸糸に滑りを誘導するときのトリプシン処理はdigestion index (DI: トリプシン濃度×処理時間/タンパク濃度)で約300である。精製した外腕である21 Sダイニンを、DI300と3000でトリプシン処理後0.6 M KCl処理軸糸に再構成して滑りをみた。その結果速度の有意な上昇がみられた。DI300では、ダイニンの α 重鎖の約半分が切断され、 β 重鎖はほとんど影響を受けていなかった。従って、滑り速度上昇には α 重鎖の断片が重要である可能性が高い。また、ATPase活性は、トリプシン処理によって有意に上昇し、微小管存在下ではさらに上昇した。

<トリプシン処理軸糸から得られた滑り速度に関わる要因>

トリプシン処理により軸糸に滑りを誘導したとき、速度上昇にかかわる外腕の断片が作られていると予想される。それは滑りの間ダブレット上にあるのかもしれないが、遊離する可能性も考えられる。そこで、トリプシン処理 (DI=300) で滑りを誘導後、ダブレット上に残った外腕断片とダブレット以外の外液成分について調べた。その結果、ダブレットに残った外腕断片には滑り速度上昇の効果はみられなかったが、外液成分には滑り速度上昇の効果がみられた。

最後に、外液成分を分画し、ダイニン重鎖、350 kDaの断片、140 kDaの断片を含む主に3種の画分を得た。これらの画分の効果を検討したところ、350 kDaの断片を含む画分のみが滑り速度上昇の効果を示した。この結果から、ATPase活性の高まった350 kDaの断片が、軸糸内でまだ断片化していない外腕に作用してその活性を高める結果、滑り速度が上昇するのではないかと考えられる。

以上のように、本研究では、ウニ精子鞭毛において外腕と内腕の存在する軸糸の微小管滑り速度はトリプシン処理外腕断片の働きにより上昇することを明らかにした。滑り速度をパラメーターとして、ダイニン相互の活性の協調的制御を捉えることに成功したという点でこの成果は重要な意味を持つ。