

論文内容の要旨

論文題目 Studies on the regulation of microtubule sliding by Ca^{2+} in flagellar axonemes
(鞭毛軸糸における微小管滑り運動の Ca^{2+} による制御の機構)

氏名 中野 泉

序論

真核生物の鞭毛の基本構造は「9+2」構造と呼ばれ、9本のダブルレット微小管が中心の2本の微小管を囲むように配置されている。鞭毛の周期的屈曲運動は、この9本のダブルレット微小管上に並ぶモータータンパク質ダイニンがATPを加水分解する時に生ずる化学エネルギーによって力を発生し、隣り合う微小管との間に滑りを引き起こすことによって起こる。 Ca^{2+} は鞭毛・繊毛運動の制御に関与することが知られており、ウニ精子の鞭毛では、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇によって波形の非対称性が増大し、 10^{-4} M Ca^{2+} では片側の屈曲のみを残して運動が停止する。このような Ca^{2+} による鞭毛・繊毛の波形変化は、細胞体の遊泳方向の制御に重要であると考えられているが、 Ca^{2+} がどのような機構によってダイニンの活性を変化させ、屈曲波形の変化を起こすのかは未だ解明されていない。

これまでの Ca^{2+} によるダイニンの活性制御機構の研究では、軸糸から微小管が滑り出す際の実験速度や抽出したダイニンによる微小管の滑り速度が調べられてきたが、 Ca^{2+} は滑り速度に影響を与えないと報告されてきた。しかし近年、高濃度ATP存在下では中心小管が Ca^{2+} による滑り速度の制御に重要であると報告されている。しかし低濃度ATP存在下では、中心小管は Ca^{2+} による滑り運動の制御に必須ではないとの報告もあり、ATP濃度によりダイニンの活性の制御機構が異なっている可能性が考えられる。よって、 Ca^{2+} によるダイニン活性制御機構の解明においては、中心小管とATP濃度の関与を考慮することが重要であると考えられる。

本研究は、Ca²⁺による軸系ダイニンの活性の制御機構について解明することを目的とし、滑りの制御機構をある程度残していると考えられている elastase 処理軸系を用いて、in situ に近い条件で実験を行った。本論文は二部から構成され、第一部では、「中心小管を介した Ca²⁺による微小管滑り運動の制御機構」について、第二部では、「Ca²⁺による微小管滑り運動の制御に及ぼす外腕抽出の効果」について、その結果を報告する。

材料と方法

第一部、第二部共に材料にはアカウニとタコノマクラの精子を用いた。除膜した精子は断片化し、頭部を除去して軸系のみを用いた。一部の軸系は、0.6 M KCl で 3 分間室温で処理した後、0.75 M KCl で 1 時間 on ice で処理し、外腕ダイニン全てを抽出した。軸系は rhodamine でラベルして断片化し、5 μ l チェンバー内で elastase 処理を行った。軸系の sliding disintegration の観察においては 0.02 mM または 1 mM ATP を、また重合微小管 (MT) の滑り運動を観察する滑り解析系においては 1 mM ATP を加えてダブルット微小管の滑りを誘導した。観察は蛍光顕微鏡と SIT カメラを用いて行った。第二部における ATPase 活性の測定では、0.75 M KCl 処理軸系を更に低イオン強度の Tris-EDTA 溶液で 2 時間処理し、軸系に残っている全ての内腕ダイニンを抽出し、ATP の加水分解量をマラカイトグリーンの呈色反応によって測定した。

結果と考察

第一部：中心小管を介した Ca²⁺による微小管滑り運動の制御機構

Elastase 処理軸系に 10⁻⁴ M Ca²⁺、1 mM ATP の条件で滑りを誘導すると、軸系内の滑りの制御を反映して 1 回の滑り運動が起こり、その結果軸系は中心小管を含む太いダブルットの bundle と含まない細いダブルットの bundle とに分かれる (Yoshimura and Shingyoji, 1999)。このようにして得られた中心小管の有無が判別できるダブルット bundle 上に MT を灌流し、bundle の端のダブルット上に露出したダイニンと相互作用した MT の動きを、Ca²⁺条件を変化させて解析することにより、中心小管の有無が Ca²⁺によるダイニンの滑り活性の変化に関与するかを検討した。

Ca²⁺濃度を <10⁻⁹ M から 10⁻⁴ M の間で変化させて MT の滑り運動が観察される割合を観察した結果、中心小管を含まない細い bundle 上で観察された滑り運動の起る頻度は 30-40% で Ca²⁺により変化しなかった。しかし、中心小管を含む太い bundle 上で観察された滑り運動の起る頻度は、低濃度 Ca²⁺条件では約 20%と低く、さらに、10⁻⁴ M Ca²⁺では 9%にまで低下した。このことから、ダブルット微小管上に並ぶダイニンによる滑り運動の起る頻度

は、中心小管を介して高濃度 Ca^{2+} により抑制的に制御されていることが示唆された。さらに、滑り速度を調べた結果、 $10^{-7} - 10^{-4} \text{ M Ca}^{2+}$ のいずれの濃度においても、中心小管を含む太い bundle 上の微小管滑り速度が $<10^{-9} \text{ M Ca}^{2+}$ に比べ有意に低下した (Mann-Whitney U-test; $p < 0.05$)。しかし細い bundle 上の滑り速度には変化は見られなかった。これらの結果は、高濃度の Ca^{2+} 存在下で、中心小管がダイニンの活性を抑制的に制御していることを強く示唆する。

第二部： Ca^{2+} による微小管滑り運動の制御に及ぼす外腕抽出の効果

第一部において示された、 Ca^{2+} 存在下での中心小管による軸系内のダイニンの活性制御機構の仕組みをさらに明らかにするため、第二部では、外腕抽出軸系を用いて Ca^{2+} により外腕ダイニン、内腕ダイニンの活性がどのように制御されるのかに注目し実験を行った。

第一部と同様の方法で、MT の滑り運動の解析を、外腕ダイニンを抽出した内腕のみの軸系を用いて行った。その結果、中心小管が存在する太い bundle 上において、滑り運動の起こる頻度は、外腕が存在する軸系と同様に高濃度 Ca^{2+} によって 9%にまで低下した。しかし、 Ca^{2+} による滑り速度の低下は観察されなかった。このことは、 Ca^{2+} によるダイニンの滑り速度の低下には外腕ダイニンが重要であることを示唆する。

上記の実験において、外腕抽出軸系を用いて軸系を 2 本のダブレットの bundle に分かれるように滑りを誘導する際に、注目すべき事実が観察された。外腕を抽出していない軸系 (intact 軸系)では $10^{-4} \text{ M Ca}^{2+}$, 1 mM ATP の条件で 2 本の bundle に分かれるが、この条件では外腕抽出軸系は滑りを示さず、2 本の bundle に分かれるような滑りを誘導するには、 Ca^{2+} 濃度を低下させる必要があった。これは、内腕ダイニンの活性の Ca^{2+} による制御を反映している可能性が高い。そこで、intact 軸系および外腕抽出軸系を用いて Ca^{2+} 及び ATP 条件を変えて滑りパターンを詳しく観察した。その結果、intact 軸系では ATP 濃度に依存した滑りパターンが観察され、特に低濃度 ATP 条件下ではほとんどの軸系が 3 回以上の滑りを起こして多数のダブレットに分かれる様子が観察されたが、 Ca^{2+} による影響は少なかった。一方外腕抽出軸系においては、滑りパターンは Ca^{2+} 濃度に強く依存し、高濃度 Ca^{2+} 条件下では、ATP 濃度によらず 90%以上の軸系で滑り運動は観察されなかった。

外腕ダイニンが存在する場合、ATP 濃度の低下により高濃度 ATP 条件下よりも多くのダブレット間で滑りが誘導された。これは、軸系内において滑りを起こしうるダイニンの活性が ATP 濃度により制御されていることを反映している可能性が高い。そこで、 0.1 mM ADP 存在下で高濃度 ATP を加える事により誘導される滑りを観察した。その結果、intact 軸系においては高濃度 Ca^{2+} , 高濃度 ATP で観察された 1 回のみ滑り、すなわち軸系の大部分

のダブルレット間での滑りの抑制が ADP により解除され、多数のダブルレット間で滑りの起る様子が観察された。一方外腕抽出軸系では、低濃度 Ca^{2+} 条件では、ADP を加えることにより滑り回数の増加が観察されたが、高濃度 Ca^{2+} 条件下の強い滑りの抑制は ADP により解除されなかった。この結果は、内腕ダイニンには Ca^{2+} による強い運動活性の抑制機構が存在していることを示唆する。

そこで最後に、内腕ダイニンそのものに Ca^{2+} による活性制御機構が存在するかどうかを調べるため、外腕抽出軸系から低イオン強度の Tris-EDTA 溶液で内腕ダイニンを抽出し、その ATPase 活性に対する Ca^{2+} の効果を検討した。その結果、 Ca^{2+} 濃度が低い条件で軸系から抽出したダイニンは、測定時の Ca^{2+} 濃度が低い場合も高い場合も ATPase 活性に変化は見られなかった。一方、 10^{-4} M Ca^{2+} 存在下で内腕ダイニンを軸系から抽出し高濃度 Ca^{2+} 条件で ATPase 活性を測定すると、ATPase 活性の有意な低下が観察された。同様の測定を外腕ダイニンについても行ったが、 Ca^{2+} による ATPase 活性の抑制はみられなかった。この結果は、内腕ダイニンの活性は Ca^{2+} により直接抑制され得ることを示唆する。

以上の結果より、内腕ダイニンの活性は Ca^{2+} により抑制的に制御されており、中心小管がこの制御機構に関与している事が示された。一方、外腕ダイニンが存在するときには中心小管を介した Ca^{2+} による制御とは独立に、低濃度 ATP や ADP によるダイニン活性制御機構が存在するらしいことが示唆された。

本研究において、生理的 ATP 濃度である高濃度 ATP 条件においては、中心小管は軸系内において内腕と外腕ダイニンの活性の Ca^{2+} による抑制的な制御機構に必須であることが明らかとなった。このことは、長い間謎とされてきた Ca^{2+} による鞭毛波形の変化の基本がダイニンの滑り活性の抑制にあることを示したという点で重要なばかりでなく、その役割が注目されている中心小管の機能をより深く理解する上で重要な発見であるといえる。