

論文の内容の要旨

論文題目 新しい局所阻害法を用いた鞭毛運動屈曲波の形成機構に関する研究

Studies on a generation and propagation of bending wave in flagella by means of a new local inhibition technique.

氏名 藤村美樹

(背景と目的)

鞭毛運動は分子モーターであるダイニンの働きにより鞭毛軸糸を構成する微小管同士に滑りが生じ、その滑りが屈曲に変換されるものと考えられている。しかし、何故屈曲が鞭毛全体に伝播する“波”として何らかの制御を受けて形成され、それが一定のリズムで“繰返されるのか”については結論が出ていない。すなわち、細胞膜を除去された鞭毛はそのどの部位でも ATP の存在下で屈曲を形成することは広く知られているが、果たして鞭毛のどの部位でも定常的な屈曲波を形成できるのかは現在のところ明らかではない。

また、鞭毛基部が鞭毛運動に果たす役割についても明らかではない。これまで鞭毛運動における鞭毛基部の役割については2つの仮説が提唱されてきた。一つ目の仮説は鞭毛基部にはペースメーカーのようなものが存在し、鞭毛の周期的な屈曲リズムを与えているとの説である。これは鞭毛基部を切断した精子は頭部を含む側では新たな屈曲を形成できるが、含まない側では新たな屈曲が形成されないことなどが理由として挙げられる。一方、2つ目の仮説であるが鞭毛基部は最初の屈曲が生じる際の抵抗発生源としてのみ必要とするとの説である。つまり、純粋に基部抵抗を与える“固定された端”としてのみの機能を持つとの考え方である。この説は各種コンピューターシミュレーションによって説明されている。しかし、現在のところこれら両説は実験的に確立されてはいない。

本研究ではこれらの問題を解明するために鞭毛運動を局所的に阻害する手法を開発することを試みた。このような試みはこれまでにもなされてきたが、阻害剤自身の拡散の問題などがあり、正確な実験をすることは困難であった。本研究では、鞭毛運動を局所的に阻害する方法として励起した場合に限り鞭毛運動を阻害する効果を持つ蛍光色素と、局所的な励起光照射システムを組み合わせる方法の可能性について検討した。蛍光色素 PRODAN (6-propionyl-2-dimethylamino-naphthalene) は本研究の目的に合う阻害効果をもつ蛍光色素であり、局所的な紫外線照射機構と共に使用することにより当初の目的を達成することができた。

(結果と考察)

鞭毛運動を局所的に阻害する新しい方法

鞭毛運動を局所的に阻害する方法である PRODAN-UV 法(以下、鞭毛を PRODAN 処理して紫外線を照射することを PRODAN UV 処理、PRODAN-UV 処理で鞭毛運動を阻害する方法を PRODAN-UV 法とする。)を開発し、鞭毛運動を局所的に阻害することに成功した。本研究では“励起された場合に限り鞭毛運動を阻害する蛍光色素”である PRODAN と落射型蛍光顕微鏡の光学系を利用した局所的紫外線照射装置を用いることにより、鞭毛上の任意の部位の運動を阻害することに成功した。

PRODAN-UV 処理を鞭毛全体に施すと鞭毛運動の振動数および屈曲角が経時的に減少し、やがて鞭毛運動が停止した。また、阻害効果は紫外線強度および PRODAN 濃度に依存的であり、ATP の有無に依存せずに阻害が生じることがわかった。さらに、PRODAN-UV 処理後に紫外線照射を停止しても、鞭毛運動が回復することはなかった。以上の結果から PRODAN-UV 処理によって軸系構成タンパク質が不可逆的に変性、もしくは何らかの架橋が軸系構成タンパク質の間に形成された可能性が示唆された。

次に、PRODAN-UV 処理を施すことにより軸系構成タンパク質にどのような変化が生じるかについて検討した。電気泳動法によって、PRODAN-UV 処理特異的に変性するタンパク質の検出を試みたがはっきりした変化は見られなかった。一方、細胞生物学的な手法を用いた実験では以下のような結果が得られた。局所的に PRODAN-UV 処理した細胞膜除去精子に対してトリプシンを作用させると未処理部分からは微小管の滑り出しが観察される一方、処理部分からは微小管の滑り出しは観察されなかった。rigor な状態の鞭毛に PRODAN-UV 処理を施し、そこにイオントフォレシス法で ATP を与えても rigor bend が崩れない。以上の結果より、PRODAN-UV 処理を行った部位は微小管同士の滑りが生じないこと、そして、タンパク質同士が架橋を作っている“固定”された状態になっていることが推測される。

鞭毛運動の局所阻害実験

細胞膜除去鞭毛、およびインタクトな鞭毛の後半部分を阻害した場合、阻害していない鞭毛前半部分においては常に運動が維持された。一方、鞭毛基部を含む鞭毛前半部分を阻害した場合、それとは大きく異なった。まず、インタクト精子の鞭毛の場合、鞭毛基部の運動を阻害するとほとんどの場合阻害していない鞭毛尾部においても運動が停止する事がわかった。一方、細胞膜除去鞭毛の場合 ATP 濃度によって実験結果が異なった。まず、低 ATP 濃度(50 μ M 未満)の場合、阻害していない鞭毛後半部分では運動が維持された。これに対して高 ATP 濃度(50 μ M 以上)の場合、鞭毛基部の運動を阻害すると、鞭毛尾部は阻害していないにも拘らず運動停止した。しかし、細胞膜除去鞭毛における基部阻害時の尾部運動停止は cAMP を再活性化溶液中に添加することで大幅に回復することがわかった。さらに、トリプシン処理した際に運動停止して見える鞭毛尾部から微小管の滑り出しが観察されることより、運動停止しているように見える鞭毛尾部では微小管同士の滑りを起こ

させる能力は保持しているものの、それを制御する機構が機能していないと考えられる。

以上の結果より、鞭毛はそのどの部位でも本質的に定常的な屈曲波を形成、維持する能力を持つことが示された。

鞭毛基部は純粋な固定端として機能する

これまでの結果から、鞭毛基部の役割についてペースメーカーか、固定端か明確に結論づけることはできない。何故なら、鞭毛基部に存在するペースメーカーから、“止まっているように見える”部分を通じて何らかのシグナルが鞭毛尾部に向けて送られている可能性は否定できないからである。そこで鞭毛基部に PRODAN-UV 法を用いて人工的な固定領域を導入し、その固定領域を切断して鞭毛の端に人工的な固定端を導入する実験を行った。一般的に運動している鞭毛を切断すると、鞭毛基部を含む側では運動を維持し、含まない側では運動が停止することが知られている。そこで、鞭毛基部を機械的に除去し、その代わりに PRODAN-UV 法を用いて人工固定端を導入した際に、鞭毛は屈曲波を維持できるかを確かめた。もし、鞭毛基部に存在するペースメーカーから何らかのシグナルが運動停止している領域を伝って尾部に伝達されているのならば、鞭毛基部を切断すると鞭毛運動は停止するはずである。一方、鞭毛基部が物理的に固定された“端”としての機能のみを持つのであれば鞭毛基部を切断しても、導入した“人工固定端”が中心体のような働きをして鞭毛運動は維持されるはずである。切断実験の結果、人工固定端の下流の鞭毛は定常的な屈曲波を維持した。このことは鞭毛基部の果たす役割が基部抵抗の発生源としての固定端であることを示している。

鞭毛運動の振動数は鞭毛の可動長によっても制御される

鞭毛運動の局所障害実験を行った際、興味深い結果が得られた。鞭毛運動を徐々に障害した場合、鞭毛の運動している長さが減少するとそれに伴い鞭毛全体に渡り屈曲角が減少する。一方、鞭毛運動の振動数は上昇した。この際、鞭毛全体における微小管同士の平均すべり速度は屈曲角が減少し、振動数が上昇することからほぼ一定に保たれた。これは、一定の ATP 濃度条件において決定されることは微小管の平均滑り速度であり、屈曲角などの鞭毛の波形や、振動数などは外部溶液の粘性抵抗などによって副次的に決定されることを示している。

(まとめ)

本研究の成果

これまで技術的に難しいとされてきた鞭毛運動の局所障害に成功した。

鞭毛はどの部位においても定常的な屈曲波を形成、維持する能力を持つことを示した。

物理的に固定された“端”が鞭毛運動形成に必要であることを示した。

鞭毛運動の振動数は鞭毛の可動長に依存する。