

論文審査結果の要旨

論文提出者氏名 藤村美樹

真核生物の鞭毛・繊毛の多くは微小管を骨格とした、いわゆる“9+2”の軸系構造を共通して持っている。この構造は中央に一对のシングレット微小管を、そして周辺に9組のダレット微小管を配し、ダブレット微小管に周期的に結合している運動タンパク質のダイニンが働くことにより、微小管が能動的な滑り運動を起こす。この滑り運動が何らかの調節を受けることで周期的屈曲運動が形成されると考えられている。ダイニンが滑り運動を起こす分子機構の解明については最近長足の進歩があったが、滑りを屈曲に変換し、自励振動を引き起こし、周期的な屈曲波を形成する機構についてはほとんど分っていない。その解明に当たって、屈曲が自発的に形成されるためにはどのような条件が必要であるかという問題は尤も基本的な問題であるといえる。藤村氏の研究はこの問題にメスを入れたものである。

藤村氏はこの研究のために、まず新しい実験手法を開拓した。屈曲波の形成と伝播が鞭毛で生じるための条件を明らかにするためには、鞭毛を局部的に阻害することによって屈曲波がどのような変異を受けるかを知ることは大変重要なインフォメーションを得ることになる。しかし鞭毛の局部的阻害は従来非常に困難であった。すなわち、阻害剤などを局部に与える場合には、拡散による作用領域の広域化の問題を避けては通れない。しかも鞭毛は非常に早い振動運動を行っているため、阻害剤の作用領域の絞込みも同様に困難となる。そこで、藤村氏は新しい方法として、自身では阻害効果を持たない蛍光試薬を結合させ、局部的に紫外線(UV)を当て、その部分でエネルギー遷移によるタンパク質の変異を起こさせることによって阻害を引き起こすことを試みた。そして PRODAN という試薬が大変適していることを発見した。局所的に UV を照射する方法としては、落射型蛍光顕微鏡の UV 光路の絞り部分にピンホールを置くことで行った。それにより、UV 光の照射面積を直径 2.5 μm まで絞り込むことができる。またこの方法は光強度を一定のまま照射面積を変えられるという利点ももつ。藤村氏はこの方法を PRODAN-UV 方と名付けた。

この PRODAN-UV 法により、ニジマスやウニの生きている精子は数秒以内に運動を停止する。また細胞膜を除去し、再活性化したものでも同様に運動が阻害されて停止することが分った。また、細胞膜を除去した鞭毛をトリプシン処理し、そこに ATP を加えると、ネクシンなどによる拘束を失った微小管がばらばらに滑り出してくるが、PRODAN-UV 処理をしたものではこの現象が起こ

らなくなることから、この処理によってネクシンなどではないものによって微小管の間に強い架橋が生じていることが示唆された。藤村氏はこの架橋をダイニンによるものと推測している。また大変興味深いことに、この処理では ATPase 活性はほとんど阻害されない。これはダイニンと微小管の相互作用に関して、非常に重要な示唆を与えるものと考えられる。

細胞膜を除去し、再活性化された鞭毛を用いた PRODABN-UV 実験により、以下のような発見がなされた。低 ATP 濃度で再活性化した精子鞭毛において、基部を含む鞭毛前半部を PRODAN-UV 処理した場合でも、処理を施されていない鞭毛後半部では自発的な屈曲運動を行った。また、鞭毛後半部を阻害した場合も、処理を施されていない鞭毛前半部では自発的な屈曲運動を行った。鞭毛の両端を阻害するとそれに挟まれた間で運動が持続され、さらに鞭毛中央部の微小部分を阻害するとその両側で屈曲運動が継続した。一方、ATP 濃度の高い条件では、基部を含む鞭毛前半部を PRODAN-UV 処理した場合、処理を施されていない鞭毛後半部の運動が見られなくなったが、cAMP を加えることで回復した。以上のような実験結果から、鞭毛はどの部分でも自発的な屈曲運動を生じさせる能力を持つことが明らかになった。また、鞭毛の長さを同じ一本の鞭毛を用いて阻害部分を徐々に広げるといった実験の結果から、鞭毛長が短くなると振動数が上昇するが、屈曲角は減少するため、微小管の滑り速度は一定に保たれることも見いだした。

次に、鞭毛基部が屈曲波形成に重要な意味を持つかを確かめるため、PRODAN-UV 処理を鞭毛前部で行い、その部分のほぼ中央をガラス微小針で切断するという実験を行っている。すると、処理しない場合は切断された鞭毛後半部は新たな屈曲を形成することはできないが、処理した鞭毛では自発的な屈曲運動を継続した。この結果は、鞭毛の基部側を固定すると鞭毛基底部の有無に関わらず自発的な屈曲運動が生じることを示している。すなわち、鞭毛の自発的な振動運動が生じるためには、鞭毛基部（もしくは精子頭部）は不要であり、微小管が根本側で固定され、ずれなくなっていることが必要であることが明らかになった。この結果は、従来から議論されていた二つの説、すなわち中心小体を含む鞭毛軸系基底部に屈曲波開始シグナルを規則的に発生させる仕組みが存在するという、いわば“ペースメーカー説”とコンピューターシミュレーション実験で提唱されている、固定端があれば自励振動が起こるといふ“固定端説”において、後者が有力であることを初めて実験的に明らかにしたもので、その意義は非常に高い。

以上のように、本論文はこの分野の研究に極めて大きな一石を投じた重要なものである。本論文を審査委員会で厳正に審査した結果、審査委員全員一致して、申請者が博士（学術）を授与されるにふさわしいと認定した。