

論文内容の要旨

論文題目 **Studies on the mechanism of initiation of flagellar oscillation
in sea urchin sperm**
(ウニ精子における鞭毛の振動開始機構に関する研究)

氏名 石川 里奈

序論

真核生物の鞭毛運動の特徴は、振動運動である。ウニ精子鞭毛では、鞭毛基部で両方向に屈曲が周期的に形成され、先端へと伝播する。この振動運動は、軸糸内のダブルレット微小管上に並ぶダイニンが、ATP加水分解のエネルギーにより、ダブルレット微小管間に起こす滑り運動を原動力としている。屈曲は、滑り量の差がある部分に形成されること、また、鞭毛のどの部分でも、屈曲形成の能力をもつことが実験的に示されている。しかし、屈曲形成がどのような機構により振動運動となるのかについては、まだ明らかにされていない。鞭毛運動においては、屈曲の形成、成長、伝播、逆方向への屈曲形成が、連続的に起こるため、屈曲形成が連続的な振動となる条件、すなわち振動開始の要因を特定することは容易ではない。従って、振動の誘導の開始過程を解析するには、特別な実験系が必要である。

これまでに、機械的に鞭毛を変形することにより、鞭毛運動の変化やダイニンの活性化が起こることが報告されており、力学シグナルがダイニンの活性化の調節に関与すると考えられている。また、ADPの存在が、鞭毛運動やダイニンの活性制御に関わっていることも知られている。しかし、力学シグナルやADPが、振動運動の制御において、具体的にどのような役割を果たすのかは、まだわかっていない。

本論文では、鞭毛における振動開始機構の解明を目指した。具体的には、低濃度ATP存在下で運動を停止している除膜鞭毛に、力学シグナルを与えることにより振動運動を誘導するという独

自の手法を開発し、これを用いて振動開始における ATP と ADP の役割、および鞭毛に沿った反応性の違いの役割を検討したので、その結果を報告する。

材料と方法

アカウニ *Pseudocentrotus depressus* の精子を用いた。海水に希釈した精子を除膜後、ATP を含む再活性化溶液で再活性化した。鞭毛に力学シグナル（“機械的変形”または“機械的揺動”）を与えるには、精子の頭部を 0.1%ポリリジンであらかじめコートしたガラス微小針で保持した。機械的変形では、鞭毛先端に付着させたもう 1 本のガラス微小針により、鞭毛を曲げた。機械的揺動では、頭部を保持した針を取り付けたマニピュレーターに軽く触れた。暗視野顕微鏡下で image intensifier をつけた CCD カメラにより画像をビデオに記録後、モニター画面上で OHP シートにトレースし、解析した。

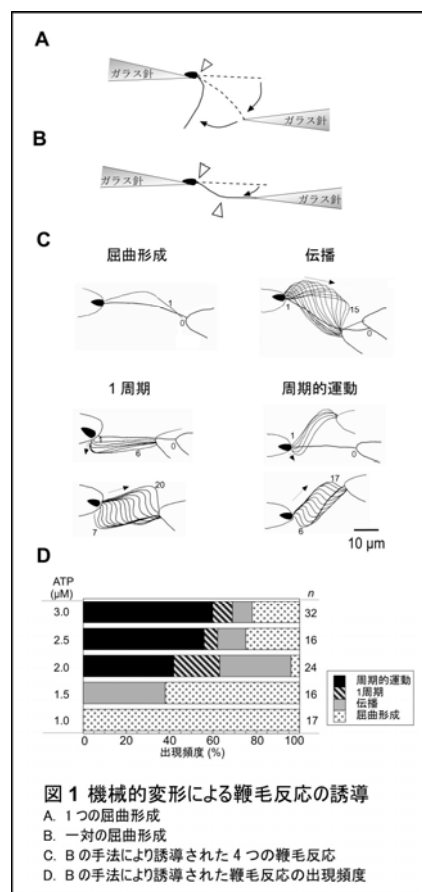
結果と考察

低濃度 ATP 下における鞭毛の再活性化

再活性化率は、10 μM ATP では 95%以上を示したが、5.0 μM 以下では徐々に減少し、2.0 μM ATP で 5.8%となり、1.5 μM ATP では運動はみられなくなった。運動をしていない鞭毛は、まっすぐ、またはゆるやかな屈曲を示し、“rigor wave”ではなかった。自発的振動運動に必要な ATP 閾値濃度（約 2.0 μM ）の存在は、振動運動には、ある割合のダイニンが協調的に運動することが必要であることを示しているものと考えられる。

外部からの屈曲（機械的変形）による鞭毛反応の誘導

1.0 - 4.0 μM ATP 存在下で運動を停止しているウニ精子の鞭毛が屈曲するように変形を与えた。鞭毛前方に 1 つの屈曲が形成されるように鞭毛を変形した場合は（図 1A）、鞭毛反応は誘導されなかった。一方、一対の屈曲が形成されるように変形した場合は（図 1B）、「屈曲形成」（“bend formation”）に続いて、「伝播」（“propagation”）、「1 周期」の運動（“full cycle”）、「周期的運動」（“beating”）の反応のいずれかが起こった（図 1C）。これらの鞭毛反応の出現頻度は、ATP 濃度に依存していた。「周期的運動」は 2.0 μM ATP 以上で誘導され（図 1D）、「周期的運動」に必要な最少の ATP 濃度は、自発的振動運動と同じであった。また、誘導された「周期的運動」の鞭毛打頻度は、ATP 濃度により変化した。このことから、誘導された「周期的運動」は、通常の振動運動におけるダイニンの活性制御を反映していると考えられる。しかし、鞭毛先端に付着させたガラス微小針を取り除くと、誘導されてい



た鞭毛反応は停止し、振動を持続させることはできなかった。このことは、この一連の鞭毛反応が受動的な反応の要素を含む可能性を示す。そこで機械的揺動による反応の誘導を試みた。

機械的揺動による鞭毛反応の誘導

精子頭部を保持した針に機械的揺動を与えた結果、鞭毛の前方部分に一对の屈曲が誘導され、それに続いて、変形により誘導された鞭毛反応とほぼ同様の反応が誘導された。「周期的運動」は 2.0 μM 以上の ATP で誘導された。

誘導された屈曲の特徴

2 つの手法により形成された一对の屈曲の特性と、その屈曲がその後どの段階の鞭毛反応へと発達するかを検討した。その結果、一对の屈曲のうち後方の屈曲と鞭毛反応との関連が見られたので、詳しい解析を行った (表

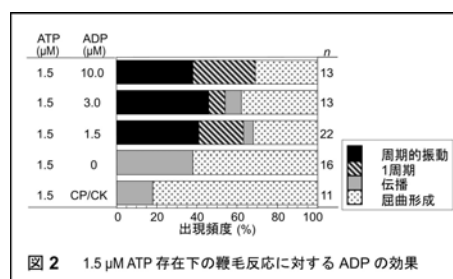
手法	反応	後方の屈曲の基部からの距離 [μm]	後方の屈曲の屈曲角度 [rad]	成長した後方の屈曲最大屈曲角度 [rad]
機械的変形	周期的運動	2.9±1.9 (17) ^{*1}	1.2±0.4 (17)	2.0±0.3 (8) ^{**}
	1 周期	4.4±2.1 (13) ^{*2}	1.1±0.3 (13) §1	1.7±0.4 (10) ^{**}
	伝播	6.5±4.5 (14) ^{*3}	1.3±0.3 (14)	1.4±0.4 (14) ^{**}
	屈曲形成 ^{b)}	17.6±7.7 (15) ^{*4}	1.0±0.3 (15) §1	1.0±0.3 (15) ^{**}
機械的揺動	周期的運動	3.1±1.9 (7)	1.2±0.4 (7)	1.8±0.3 (7)
	1 周期	4.9±1.7 (6)	1.1±0.4 (6) §2	1.8±0.2 (6)
	伝播	5.4±2.8 (7)	1.3±0.1 (4)	1.6±0.2 (4)
	不完全伝播	5.5±1.4 (14)	1.0±0.5 (10)	1.0±0.5 (10)
	屈曲形成	5.1±1.4 (3)	0.9±0.2 (3) §2	0.9±0.2 (3)

a) 1.0-3.0 μM ATP 存在下で形成された対の屈曲のうち後方の屈曲の特徴。Mean±s.d. (n).
b) 機械的変形をはずした後に、形成された屈曲が残っていたものを解析した。
^{**}, ^{*1-4}, §1, §2, 有意差あり。 ^{*2-3}間には有意差なし。(Mann-Whitney U test, P<0.05).

1). 鞭毛のより前方に屈曲が形成された場合 (表 1, ^{*1-4}), またさらにその屈曲が成長し角度が大きくなった場合に (表 1, ^{**}), より発達した鞭毛反応が誘導された。また、最初の屈曲角度の大きさにより、伝播するかどうかが決まるらしい (表 1, §1 と §2)。後方の屈曲の曲率と鞭毛反応との関連は見られなかった。これらの特性は、ATP 濃度には依存しなかった。機械的変形と機械的揺動のどちらの力学シグナルも、振動運動の誘導に有効であり、ダイニンの協調的な運動を引き起こすことがわかった。今回「一对の屈曲」の形成が振動の誘導に重要であることが明らかになったが、これは、一对の屈曲のうち後方の屈曲における滑り運動によって、前方の屈曲のダイニンの活性が制御されるという機構が存在することによると考えられる。

ADP の効果

次に、振動運動の誘導における ADP の効果を外部から屈曲を与える機械的変形により調べた。1.5 μM ATP 存在下では「周期的運動」は誘導されなかったが、1.5 - 10 μM ADP を加えると「周期的運動」の誘導に成功した (図 2)。ADP 量が増えても、「周期的運動」の出現頻度や鞭毛打頻度 (約 0.04 Hz) は変わらなかったことから、ADP が ATP に変換された結果、「周期的運動」が誘導されたのではないと考えられる。振動運動の誘導は、ATP 濃度のみで決定されるわけではなく、ATP と ADP の両方の存在が重要であると考えられる。また、2.5 μM ATP 中で誘導された「周



期的運動」は、鞭毛先端のガラス微小針をとり除くと停止した。しかし、 $2.5 \mu\text{M}$ ATP とともに $2.5 \mu\text{M}$ ADP が存在すると、ガラス微小針を外しても、振動が 1-5 周期持続した。この結果は、ADP がダイニンの活性状態を高めることを示している。ADP がどのようにダイニンの働きを調節しているのかは不明である。ADP の結合によりダイニンの構造または機能が変化すると、力学シグナルに反応して、ATP 加水分解エネルギーの化学-力学変換が高まるのかもしれない。

振動運動における鞭毛前方の役割

一対の屈曲の後方の屈曲が、鞭毛のより前方（基部から $3 \mu\text{m}$ 付近）に形成されると、「周期的運動」が誘導された（表 1）。従って、鞭毛の前方と後方とで反応が異なる可能性がある。そこで、後方部分に屈曲を形成することを試みた。上記の手法では、屈曲を形成する位置をコントロールできない。そこで頭部を保持するガラス微小針を利用して、全長約 $40 \mu\text{m}$ の鞭毛の前方部分を頭部と共に保持し、制約されない鞭毛の長さ（L）を短くし、L の部分に外部からの変形により屈曲を誘導した（図 3A）。実験は $2.0 \mu\text{M}$ ATP で行った。その結果、鞭毛の前方約半分を制約して後方に屈曲を形成した場合、「周期的運動」が誘導された（図 3B）。しかし、鞭毛の半分以上を制約した場合、鞭毛の後方に一対の屈曲が形成されても「周期的運動」は誘導されず、また高次の鞭毛反応の出現頻度も減少した。一方、 $1.5 \mu\text{M}$ ATP と $1.5 \mu\text{M}$ ADP が存在する場合には、鞭毛前方部分が少しでも制約されると「周期的運動」は誘導されなかった（図 3C）。このように鞭毛の前方と後方とで、運動活性制御に違いがあることがわかった。鞭毛の長軸にそった反応性の違いは、屈曲の形成と、後方の屈曲からより前方への制御を介した振動運動の開始に重要であると考えられる。鞭毛の位置による反応の違いは、ダイニンの種類の違いによるのかもしれない。また、ダイニン以外の構造的な違い、例えば、ダイニンの制御に重要な役割をもつ、中心小管やラジアルスポークなどの違いも考えられる。生理的な高濃度 ATP 存在下でも、鞭毛の前方と後方とでダイニンの運動活性制御が異なるのかどうかはわからない。しかし、鞭毛にそって存在する反応性の違いは、振動運動中のダイニンの運動制御の要因として重要であると考えられる。

本研究では、振動運動を誘導する新しい手法を用いて、振動運動開始の要因のいくつかを初めて明らかにした。振動開始に特に重要なのは、ATP と ADP の存在、及び鞭毛の前方と後方の運動活性制御の違い、であることがわかった。本研究は、鞭毛の屈曲という力学シグナルがダイニンの運動活性を制御していることを強く支持する。この力学シグナルが鞭毛にそってどのようにダイニンの運動活性を制御するのか、その分子機構の解明が、今後の重要な課題の一つである。

