

論文内容の要旨

論文題目 Roles of ATP and ADP in the regulation of the movement of reactivated sea urchin sperm flagella

(再活性化したウニ精子鞭毛の運動制御における ATP と ADP の役割)

氏名 吉村 安寿 弥

[序論]

真核生物の鞭毛の周期的屈曲運動の原動力は、鞭毛軸糸を構成する 9 本のダブルレット微小管上に並んだダイニン (図 1a) によって駆動される微小管滑り運動である。ダイニンは一方向に微小管を滑らせるため、全てのダイニンが一様に滑りを起こしては管状構造をとる軸糸は屈曲できない。そのため屈曲運動の際にはダイニンの滑り活性は空間的、時間的に調節されていると考えられている。これまでの研究から、生理的条件において滑りは主に中心小管の両側で起こり、その他の部分では抑制されていること、中心小管/ラディアルスポーク系が軸糸タンパク質のリン酸化・脱リン酸化を介してダイニンの運動活性を制御する可能性が報告されている。しかし屈曲運動に伴って軸糸内で協調的にダイニンの活性を変化させる機構は解明されていない。

これまでに、エネルギー源である ATP と加水分解産物である ADP がダイニン活性制御に関わる可能性が考えられている。例えば、テトラヒメナ繊毛やウニ精子鞭毛の酵素処理軸糸の滑り頻度の解析から繊毛、鞭毛内に存在する高濃度 ATP が滑り運動を抑制する効果を持つこと、ADP が滑り運動を誘導する効果を持つことが示唆されている。同様に、クラミドモナスの中心小管やラディアルスポークを欠損した突然変異体で、高濃度 ATP 条件下では動けない鞭毛が、高濃度 ATP 条件でも ADP を加えることによって、または低濃度 ATP 条件下にすると動くことが報告されている。また、最近の研究から、ATP・ADP が鞭毛から抽出されたダイニンの活性に影響を与えることが分かった。このことから、ATP・ADP

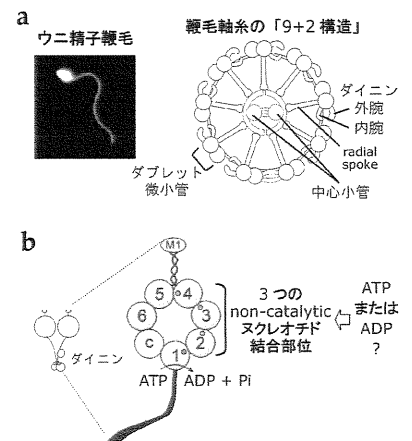


図 1 (a) 鞭毛運動と軸糸の構成要素 ; (b) ダイニン重鎖への ATP・ADP の結合

がダイニン重鎖の3つの非触媒ヌクレオチド結合部位に作用してダイニンの活性を調節する可能性が推測されている (図 1b). しかし実際の鞭毛運動において, ATP・ADP によるダイニン活性の調節がどのような役割を果たしているのかについては調べられていない.

本研究は, 正常な鞭毛の屈曲運動制御における ATP・ADP の役割を解明することを目指した. そこでまず, (1) 除膜したウニ精子の鞭毛運動に対して ATP・ADP がどのような効果を持つのか, (2) ATP・ADP による鞭毛運動の調節にリン酸化・脱リン酸化による制御が関与するのか, の2点に注目した. 鞭毛運動に対する ATP・ADP の効果を検討するためには正常な屈曲運動が可能な鞭毛を用いる必要があるが, 鞭毛が正常に運動する実験条件では高濃度の ATP と一定濃度の ADP が常に存在するので ATP・ADP の効果を調べるのは困難である. そこで, 除膜したウニ精子鞭毛の運動を可逆的に停止させるが, ATPase 活性はほとんど抑制しない低い pH 条件を利用し, (1) 低い pH において運動を停止した除膜鞭毛に対する ATP・ADP の効果を検討した. また, (2) いくつかのリン酸化・脱リン酸化酵素阻害剤や脱リン酸化酵素を用い, 鞭毛運動に対する効果を低い pH 条件で検討した. 更に, ATP が持つ抑制効果が鞭毛の振動運動に必要かどうかを調べるために, (3) 除膜した鞭毛をエラストアーゼ存在下で再活性化したときの振動運動の持続時間に対する ATP 濃度の影響を通常の pH 条件で検討した. 本論文はこれらの結果を報告する.

[結果]

1-1. 低 pH における高濃度 ATP による鞭毛運動の抑制

除膜したウニ精子 (バフンウニ, ハスノハカシパン) 鞭毛は pH 8.0 において高濃度 ATP (1 mM) によって再活性化すると, 生きた精子と同様の周期的屈曲運動を示す. ところが pH 7.2 以下では 1 mM ATP 存在下で鞭毛の運動が完全に停止した (図 2a). 運動を停止した鞭毛の約 90% は頭部付近に 1 つの安定した屈曲を残していた (図 2c). それに対し, 低濃度 ATP (0.02 mM) で再活性化すると, 完全な抑制は見られず 50% 以上の鞭毛が運動を示した (図 2a). 一方, pH 7.2, 1 mM ATP においても, エラストアーゼ処理軸糸は滑りを起こしたが, pH 8.0 に比べて滑り回数は減少した (図 2b). 高濃度 ATP による鞭毛運動の抑制と滑り頻度の低下が, 外腕と内腕のどちらのダイニンの運動活性が抑制された結果起こるのかを調べるために, 高塩濃度処理によって外腕ダイニンを除去した鞭毛を pH 7.0, 1 mM ATP において再活性化した. その結果, 外腕除去鞭毛は高濃度 ATP 存在下でも高い運動性を示した (図 2d). 更に, 外腕除去鞭毛に精製した外腕ダイニン (キタムラサキウニ) を再構成したところ, 高濃度 ATP 存在下での運動は完全に抑制された (図 2d). 以上の結果は低い pH において高濃度

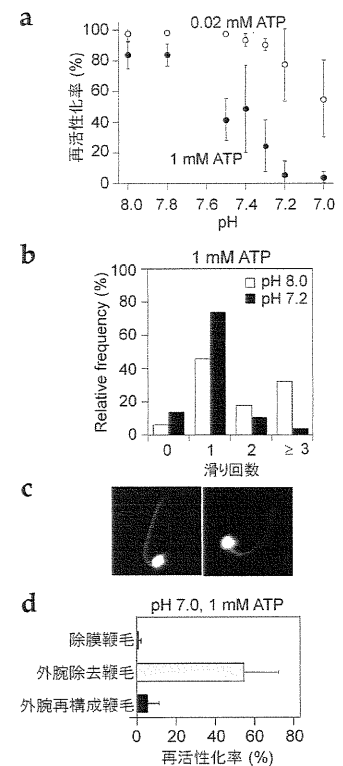


図 2. 低 pH における鞭毛運動 (a) とエラストアーゼ処理軸糸滑り回数 (b); (c) 低 pH, 高濃度 ATP において運動停止した鞭毛; (d) 低 pH, 高濃度 ATP における鞭毛運動に対する外腕ダイニンの影響

ATP が外腕ダイニンの運動活性を抑制することで鞭毛内の滑り頻度を低下させ、屈曲運動を抑制することを示唆する。

1-2. 低 pH, 高濃度 ATP による鞭毛運動の抑制の ADP による解除

pH 7.0-7.2, 1 mM ATP における運動停止と滑り頻度の抑制に ADP が与える影響を検討した。その結果, pH 7.2 において鞭毛の再活性化率と軸糸の滑り頻度の両方が ADP により上昇した (図 3a, b)。更に 0.05 mM ADP でプレインキュベーションした鞭毛を, pH 7.0, 1 mM ATP で再活性化したところ, 屈曲運動が誘導され, 約 50%の再活性化率を示した (図 3c)。以上の結果はダイニンへの ADP の結合が低 pH, 高濃度 ATP による抑制を解除し, 滑り運動, 鞭毛運動を誘導することを示唆する。

2. ATP・ADP による鞭毛の運動調節への脱リン酸化の関与

低 pH 条件における鞭毛運動に対してリン酸化酵素阻害剤 (cAMP dependent protein kinase inhibitor) や脱リン酸化酵素阻害剤 (microcystin LR) が及ぼす効果を検討したが, 鞭毛運動に変化は見られなかった。そこで protein phosphatase 1 (PP1) を用いた実験を行った。鞭毛を PP1 処理した後, pH 7.0 において 0.02 mM ATP で再活性化したところ, 低濃度 ATP 存在下にも関わらず鞭毛運動は完全に停止した (図 4a)。運動を停止した鞭毛の波形は (図 4b), pH 7.0 において高濃度 ATP 存在下で運動を停止した鞭毛の波形 (図 2c) によく似ていたが, 0.02 mM ATP で運動を抑制された PP1 処理鞭毛では ADP プレインキュベーションによる屈曲運動の誘導が見られなかった (図 4a)。更に, 蛍光 ADP (BODIPY®TR-ADP) の鞭毛への結合を全反射顕微鏡で観察し, 鞭毛の蛍光強度を測定したところ, PP1 処理鞭毛では未処理鞭毛に比べて ADP の結合が低下していた (図 4c)。以上の結果は, PP1 による軸糸タンパク質の脱リン酸化がダイニンへの ADP の結合を低下させ, ATP による運動抑制への感受性を高める可能性を示唆する。

3. ATP による抑制の鞭毛運動制御における役割

エラスターゼはダブルレット間をつなぎとめているタンパク質を消化するため, エラスターゼと ATP を同時に与えて再活性化した除膜

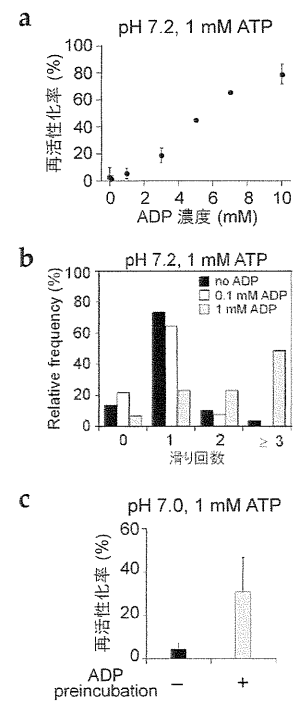


図 3. 低 pH・高濃度 ATP における鞭毛運動 (a) とエラスターゼ処理軸糸滑り回数 (b) に対する ADP の効果; (c) 低 pH・高濃度 ATP における鞭毛運動に対する ADP プレインキュベーションの効果

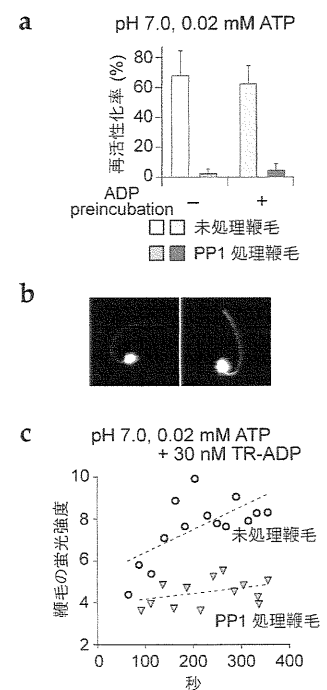


図 4. (a) 低 pH・低濃度 ATP における鞭毛運動に対する PP1 処理の効果; (b) 低 pH, 低濃度 ATP 存在下における蛍光 ADP の軸糸への結合

鞭毛は、しばらく振動運動をした後、ダブルレット間に起こる滑り運動によって分解する (図 5a)。振動運動の持続時間に対する ATP 濃度の影響を調べたところ、1 mM ATP 存在下では振動は 100 秒間持続したのに対し、0.02 mM ATP では持続時間が 45 秒と短くなった (図 5b)。また、1 mM ATP が存在しても、外腕除去鞭毛では振動運動の持続時間は短くなった (図 5c)。これらの結果は、高濃度 ATP 存在下では ATP による抑制を受けた外腕ダイニンがダブルレット間をつなぎとめる働きを持つことを示唆する。また、ATP によるダイニンの運動活性の抑制が鞭毛の振動運動の制御に必要である可能性を示唆する。

[考察]

本研究の結果はウニ精子鞭毛の運動制御において、ダイニンへの ATP の結合が滑りを抑制し、ADP の結合が滑りを誘導する役割を持つことを示唆する。このことから、高濃度 ATP という生理的条件においてダイニンの運動活性は ATP によって抑制されており、その抑制をダイニンへの ADP 結合が解除して加水分解エネルギーの力発生への変換を誘導し、滑りを起こさせることが鞭毛運動の制御の基本である可能性が示唆された。屈曲運動の際、高濃度 ATP はダイニンの運動活性を抑制することで滑りを特定の部位に限定する役割を持ち、ADP は滑りを誘導する役割を持つと推測される。

また今回の結果は、ダイニンへの ADP の結合が脱リン酸化経路によって調節されている可能性を示唆する。このことからタンパク質のリン酸化・脱リン酸化による鞭毛運動の制御が、ダイニンの 3 つの非触媒ヌクレオチド結合部位への ATP・ADP の結合と解離を介して行われている可能性が初めて提示された。タンパク質リン酸化が ATP・ADP の結合を調節し得るかどうかは今後検討する必要がある。

ATP・ADP による滑りの抑制と誘導の効果が、ある瞬間には軸糸内の特定のダイニンにのみ作用する仕組みは分かっていない。しかし、主要な滑りが主に中心小管の両側で起こること、PP1 が、サケ精子において外腕ダイニンを脱リン酸化し、クラミドモナス鞭毛において中心小管に局在することが報告されていることから、ATP・ADP の結合・解離を調節するリン酸化・脱リン酸化を中心小管/ラディアルスポーク系が担い、軸糸内において特定のダイニンを活性化している可能性が推測される。また、ダイニンの運動活性は、力学シグナルに反応して調節されるが、この調節にも ATP, ADP の結合、解離が関係する可能性が高い。今後は力学シグナルと、中心小管/ラディアルスポーク系の関与を明らかにすることが是非とも必要であるが、このためには新たな実験系の開発が必要であろう。

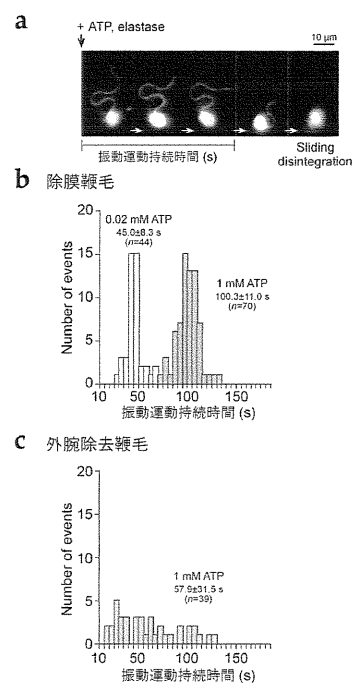


図 5. (a) ATP, エラスターゼ存在下における除膜鞭毛の運動; (b) 除膜鞭毛の振動運動持続時間に対する ATP 濃度の効果; (c) 外腕除去鞭毛の振動運動持続時間