

論文内容の要旨

論文題目 Roles of mechanical bending in the switching mechanism of microtubule sliding underlying the flagellar oscillation in sea urchin sperm

ウニ精子鞭毛の振動運動の基礎となる微小管滑り運動切り替え機構における屈曲の役割

氏名 林 周一

[序論]

真核生物の鞭毛運動の最大の特徴は周期的屈曲形成という「振動」にある。これは、鞭毛軸糸を構成する9本のダブルット微小管上に並ぶダイニンが ATP の加水分解エネルギーを使って起こす滑り運動が制御される結果起こるが、その制御の全容は解明されていない (図 1A)。ウニ精子鞭毛では、principal (P-) bend と reverse (R-) bend が、2本の中心小管を含む面に垂直な平面内に形成される。中心小管は滑りの制御に重要であり、主に中心小管

の両側の、7番のダブルット上と3番のダブルット上のダイニンによる滑りによって P-bend と R-bend とがそれぞれ形成されるらしい。ダイニンはマイナス端モーターであるので、この時、滑りの相対的な向きが切り替わると予想されるが、その切り換えの機構がこれまで謎であった (図 1B)。ところで、鞭毛に機械的変形等を外部から与えた場合、鞭毛の振動運動は大きく変化する。このことから、力学的情報が滑りの制御に関わると考えられる。滑りの切り換えに屈曲そのものが重要であることが、エラスターゼ処理軸糸で得られる 2本のダブルット束を用いた実験で示された (Morita and Shingyoji, 2004)。エラスターゼ処理軸糸は、屈曲の特性をある程度維持していることから、この滑りの切り換えは中心小管の両側で起こっている可能性が高い。

本研究では、振動運動の機構解明の基本となる、滑りの切り換えが屈曲により誘導されるという仮説を証明し、さらにその切り換えを誘導する屈曲条件、およびダイニンの活性化条件について知見を得ることを目指した。屈曲によってダイニン活性部位が中心小管の両側で実際に切り替わることを証明するためには、1) 滑りの切り換えを確実に誘導できる屈曲条件を決定し、かつ 2) 軸糸内のダイニン活性部位を推測することができる実験系が必要である。そこで私は、高濃度 Ca^{2+} (10^{-4} M) 存在下

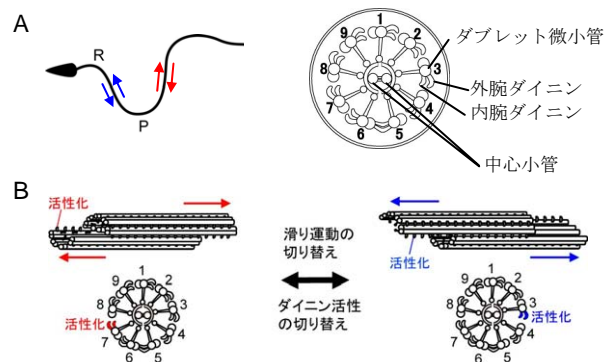


図 1. ウニ精子の鞭毛運動と微小管間の滑り運動の切り替え

でウニ精子鞭毛が示す、基部に大きな P-bend のみを残した運動停止状態 (quiescence) に着目した。この状態では 3 番のダブルレット上のダイニンの活性は抑制されている。この quiescence を示す鞭毛を用いることにより、与える屈曲方向を決定できただけでなく、2) の問題も解決できた。さらに、実験の過程でこの P-bend の存在により、滑りの切り換え反応が変わることに気づいた。そこで、この屈曲を切り離れた状態 (type-1)、屈曲存在状態 (type-2)、屈曲のまま滑りを誘導後に切り離れた状態 (type-3) の 3 種類を用いた。また、最近の研究からダイニンの非加水分解ヌクレオチド結合部位への ADP 結合がダイニンの活性化に関与することが示されていることから (Ishikawa and Shingyoji, 2007)、屈曲による滑りの切り換えの制御に ADP が関与している可能性についても検討を行った。本論文では、これらの結果について報告する。

[材料と方法]

アカウニ (*Pseudocentrotus depressus*) とムラサキウニ (*Anthocidaris crassispina*) の精子を用いた。精子を Triton X-100 を含む溶液で除膜した後に、鞭毛をローダミンで染色した。ただし、重合微小管の滑りの解析 (結果 2) では、鞭毛を cy5、重合微小管をローダミンで染色した。10⁻⁴ M Ca²⁺, 1 mM ATP 存在下で quiescence を示す鞭毛をチャンバーに灌流してガラス面に付着させた。鞭毛をエラストナーゼで処理した後にチャンバーの上部を開放し、マイクロマニピュレータに取り付けたガラス微小針を挿入し、鞭毛に屈曲を与えた。UV 照射による 1 mM caged ATP の光分解によって軸糸の滑りを誘導した。放出された ATP は、溶液中の hexokinase によって ADP に、または apyrase (結果 3 のみ) によって AMP に分解されるため、軸糸は 3-4 秒 (hexokinase) または 5-6 秒 (apyrase) 滑って停止し、再度 UV 照射することによって繰り返し滑りが誘導された。鞭毛の蛍光像はイメージ・インテンシファイアを付けた CCD カメラを用いてビデオテープまたは DVD に記録し、画像の解析には NIH image と ImageJ を用いた。

[結果と考察]

1. 滑りの切り替え制御に対する屈曲方向の効果

Quiescence を示す鞭毛の P-bend の後方部分で軸糸を切断し、断片化した軸糸 (type-1) を屈曲面内で両方向に曲げた時に、滑りの切り替えが起こるかどうかを検討した。1 mM caged ATP の光分解によって、軸糸は 1 組の細い束と太い束に分かれるような滑りを示し、中心小管を含まない細い束が切断部位から頭部方向へと滑り出した。屈曲を与えない場合には、UV 照射ごとに細い束が同じ方向へと滑った。次に、細い束と太い束の重なりの後方部分を基部の P-bend と同じ方向 (P-bend 方向) または逆方向 (R-bend 方向) に曲がりができるように変形させた時の滑りを観察したところ、P-bend 方向の屈曲によって 56% の軸糸で滑り方向の逆転が誘導されたのに対し (図

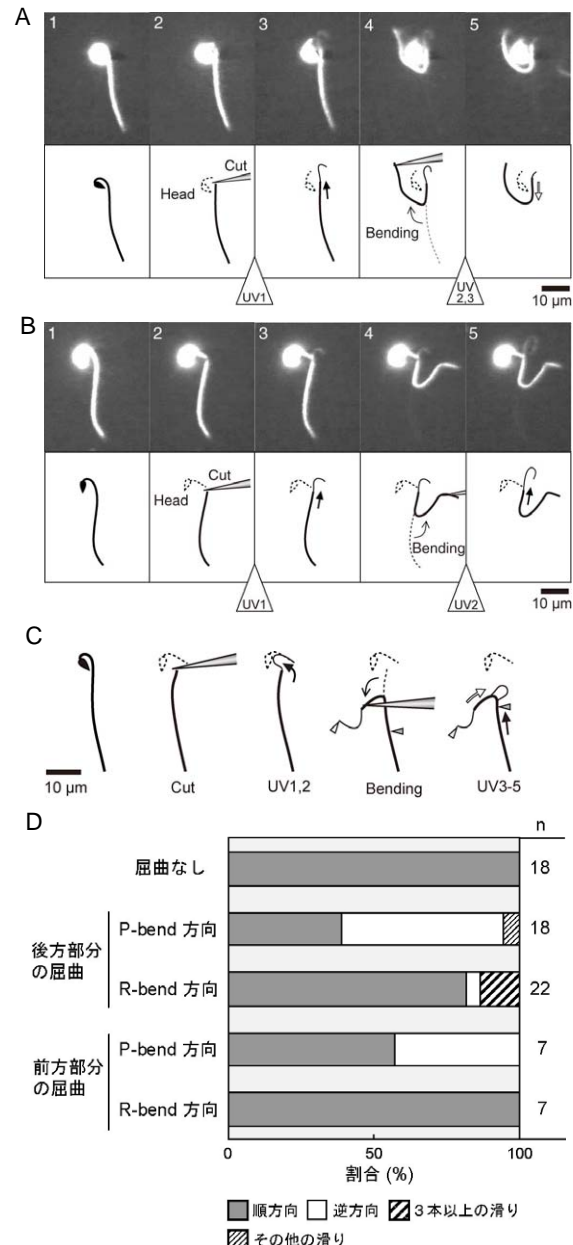


図 2. 基部で切断した鞭毛の滑りに対する屈曲の効果

2A, D), R-bend 方向の屈曲では 5% でしか逆転しなかった (図 2B, D). 重なりの方前部分を P-bend 方向に曲げても 43% の軸糸で滑り方向の逆転が誘導され, その 3 例中 2 例では屈曲部位の方前のみで逆方向の滑りが観察された (図 2C, D). これらの結果は, 滑りの切り替えには屈曲方向が重要であることを示す.

基部で切断した鞭毛では屈曲による滑りの逆転の割合が約 50% と低いことから, 滑りの切り替えに必要な要素が欠けている可能性がある. その要素の一つとして, ダイニンと微小管の相互作用の状態が考えられる. そこで次に, 基部の屈曲を残した鞭毛で滑りの切り替えを起こす条件を調べた. Quiescence を示す鞭毛 (type-2) に滑りを誘導すると, 軸糸の根元付近からループをつくるように細い束が滑り出し, 屈曲を与えなければその滑り方向は変化しなかった. このような滑りを起こした鞭毛の後方を P-bend 方向に曲げた場合には, 同一方向の滑りが起こったのに対し (図 3A, C), R-bend 方向の屈曲を与えて一対の逆向きの屈曲をつくるように曲げた場合には, 71% の軸糸で滑り方向の逆転が誘導され, ループが小さくなった (図 3B, C).

したがって, 基部に P-bend がある鞭毛では, 後方の R-bend 方向の屈曲によって滑りの切り替えが高頻度で誘導されることが分かった. また, 細い束が滑り出した後に基部を切断した軸糸 (type-3) において重なりの方前部分を R-bend 方向に曲げた場合にも滑り方向の逆転が誘導された (図 3D). これらの結果は, 最初の滑りを起こす時の基部の P-bend の屈曲情報が重要であることを示唆する.

以上の結果から, 7 番側ダイニンによる滑り (Ps) は P-bend の屈曲情報がない時には P-bend 方向の屈曲によって (図 4-1), 一方 P-bend 存在下では後方の R-bend との一対の屈曲によって (図 4-2, 3), 逆方向の滑り (Rs) が誘導されることが明らかになった.

2. 屈曲によるダイニン活性部位の切り替えの証明

高濃度 Ca^{2+} 存在下で太い束上の 3 番のダイニンの活性は中心小管を介した制御によって抑制され, 微小管の滑り速度は減少する (Nakano *et al.*, 2003). したがって, もし屈曲による滑り方向の逆転が, ダイニン活性が太い束上から太い束上へと切り替わることによって起こるならば, 屈曲後の逆方向の滑り速度は減少することが予想される. そこで, まず quiescence を示す鞭毛において細い束と太い束に重合微小管を作用させ, その滑り速度を調べた. その結果, 太い束上

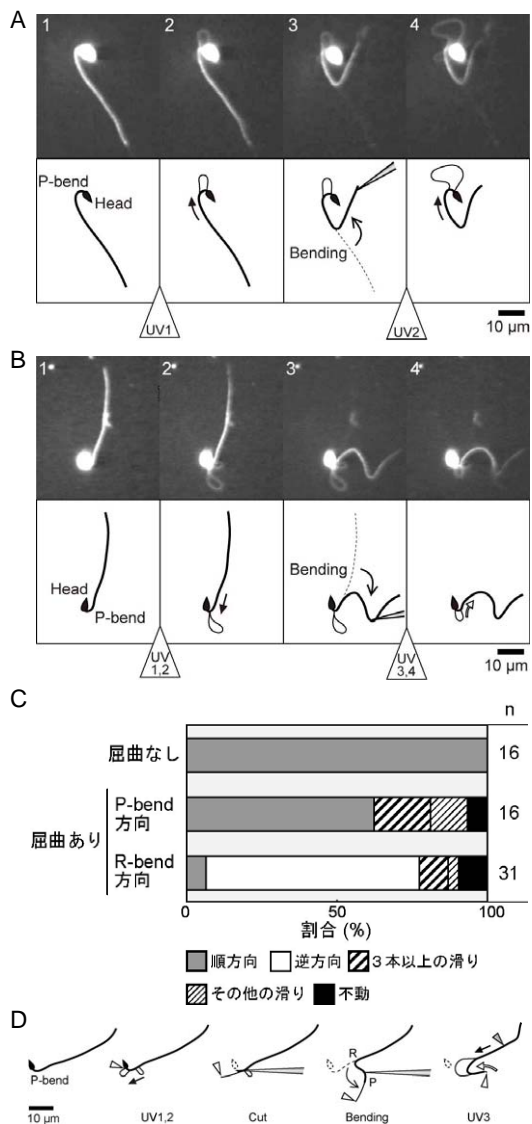


図 3. 基部の屈曲を残した鞭毛の滑りに対する屈曲の効果

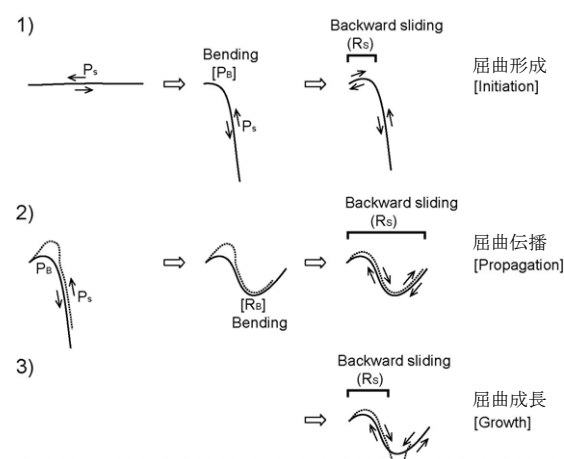


図 4. Quiescence を示す鞭毛における滑り方向に対する屈曲の効果のまとめ

の滑り速度 (平均 $4.2 \mu\text{m/s}$, $n=59$) は, 細い束上の滑り速度 (平均 $5.2 \mu\text{m/s}$, $n=44$) よりも有意に小さいことが確認された. 次に, 結果 1 の鞭毛の後方を曲げた時にみられる滑りの速度を調べると, 基部で切断した鞭毛でも基部の屈曲を残した鞭毛においても, 逆方向の滑り速度 (それぞれ平均 $3.7 \mu\text{m/s}$ と $3.3 \mu\text{m/s}$) は順方向の速度 (それぞれ平均 $6.1 \mu\text{m/s}$ と $6.7 \mu\text{m/s}$) の 1/2 程度であり, 有意に減少していた (図 5A). これらの結果は, 滑りの逆転は太い束上のダイニンによって起こされた滑りであることを示しており, 屈曲によって中心小管の両側でダイニン活性が切り替わることが証明された. また, 屈曲後の逆方向の滑りの開始時にのみ約 39% で遅延が観察されることから (図 5B), このような遅延現象は屈曲によるダイニン活性の切り替え過程を反映していると考えられる.

3. 滑りの切り替え制御における ADP の関与の検討

屈曲による滑りの切り替え制御における ADP の関与を検討するために, 溶液中の ADP 量を変化させた時に屈曲によって誘導される滑りの逆転の割合変化を調べた. 高濃度 Ca^{2+} , apyrase 存在下で軸糸の安定した滑りを誘導することが難しいため, 1) 低濃度 Ca^{2+} , apyrase 存在下と 2) 高濃度 Ca^{2+} , hexokinase 存在下で軸糸断片を用いて実験を行った. どちらの条件下でも屈曲を与えない場合は全ての軸糸で滑り方向は順方向のみであった. しかし, 屈曲を与えた場合は逆方向が出現し, 1) の条件では, 滑りの逆転の割合は 15% であったが, 0.4 mM caged ADP 存在下では 50% に増加した (図 6A). 2) の条件では, 逆転の割合は 26% であったが, 0.01 mM ADP 存在下では 42% に, 0.02 mM caged ADP 存在下では 35% に増加した (図 6B). これらの結果は, 屈曲による滑りの切り替えがダイニンへの ADP 結合を介して起こることを示唆する.

まとめ

ウニ精子鞭毛の振動運動における滑りの切り替えには, 鞭毛の屈曲方向とダイニンと微小管の相互作用の情報が重要であることが示された. また, 屈曲による滑りの切り替えは, 中心小管の両側でダイニン活性部位が切り替わることによって引き起こされることが証明された. さらに, 屈曲によるダイニン活性の切り替えはダイニンへの ADP 結合を介して制御されることが示唆された. これらの結果から, 鞭毛の振動運動の基本は, 屈曲という力学シグナルによる協調的なダイニン活性制御にあることが明らかになった.

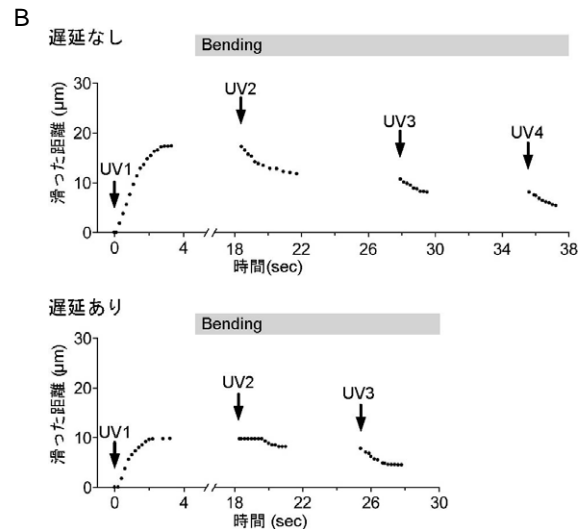
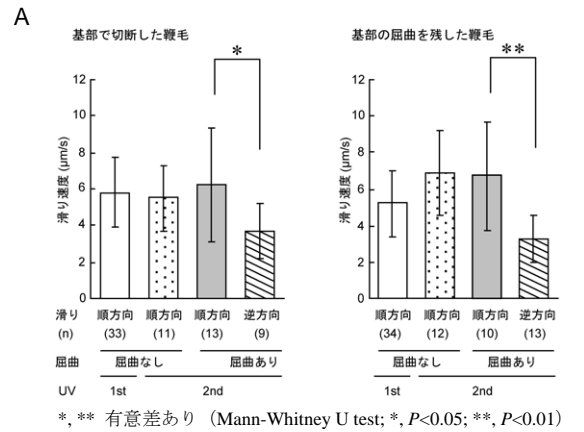


図 5. 滑り速度に対する屈曲の効果 (A) と屈曲により滑り方向が逆転した時の滑り距離の時間変化 (B)

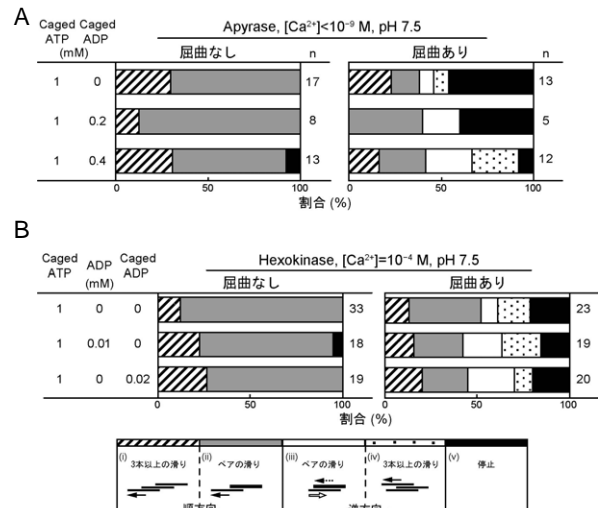


図 6. 屈曲による滑りの切り替えに対する ADP の効果