

論文審査の結果の要旨

論文提出者 高尾大輔

真核生物の鞭毛・繊毛は共通して 9+2 の軸糸構造を持ち、主要構成成分である微小管とダイニンの相互作用によって屈曲運動が引き起こされる。この時、ダイニンは、ATP の加水分解反応と共役することで屈曲運動に必要な滑り力を発生できることがわかっている。つまり、鞭毛の全長に渡って消費量を補う十分量の ATP が供給され続けなければ破綻してしまう運動系である。ウニ精子の場合、ATP は鞭毛基部付近に局在するミトコンドリアのみ生産され、拡散によって鞭毛先端まで供給される。また、この ATP 供給を補う形でクレアチンシャトル機構が働いていることも報告されている。また、クレアチンシャトル存在下では、拡散による ATP 供給のみで鞭毛の運動活性は充分維持できるというシミュレーション結果も報告されている。しかし、このような研究の中で最も重要なパラメータである物質の拡散係数、特に鞭毛内での拡散係数については、実際の測定値はなく、他の条件下で得られた推定値がそのまま借用されて来た。この博士論文の研究では、まず鞭毛内の物質の拡散係数を FRAP 法で実測し、その結果をもとに過去のシミュレーションを詳しく再検証している。

ウニ精子を使って FRAP 解析をする上で大きな問題点がある。それは、精子の細胞内に取り込ませることのできる蛍光物質の種類が非常に限られている点である。精子は一般的な細胞に比べて小さいため、微小ガラス針で細胞膜の一部を物理的に透過させるマイクロインジェクション法のような従来手法の応用がきわめて難しい。現在、精子の細胞で唯一確立されて用いられている方法としては、蛍光物質のエステル化合物を用いる方法がある。しかし、この方法で使用できる蛍光物質はごく一部の低分子量のものに限られる。この論文では、より多くの分子種で鞭毛内における拡散の性質を調べるために、近年確立された単一細胞エレクトロポレーションの技術をウニ精子でも応用し見事に成功させている。種々の蛍光物質を取り込ませ、その FRAP 解析を行っている。

本論文は3つの部分に分かれている。第1章では、ウニ精子における単一細胞エレクトロポレーションの開発について述べている。単一細胞エレクトロポレーションとは、細胞内に導入する物質をガラス微小針内に充填し、単一細胞レベルで局所的にエレクトロポレーションを行う新手法で、神経細胞を使った研究で確立されている。ウニ精子では細胞の大きさや溶液の条件などが神経細胞とは全く異なるため、いくつかの困難な点があったが、この博士論文で紹介された研究が、海産動物種を使い、しかも精子のような小さな細胞では、最初の成果である。低分子量の蛍光色素（分子量約 500）や蛍光デキストランなど（分子量 3,000）の精子内取り込みに成功している。第2章では、この手法を使って、詳しい拡

散速度の解析を紹介している。また、その結果をもとに、鞭毛内におけるATPエネルギー供給のシミュレーションについても記述している。得られた拡散係数は、ATP (MW 507) や低分子量蛍光色素(MW 376-623)ではおよそ $60\mu\text{m}^2/\text{s}$ と見積もられ、以前の推定値 (筋細胞内での予想値、 $>150\mu\text{m}^2/\text{s}$) に比べて 2~3 倍低い値となることが示されている。このように拡散が制限された条件で Tombes et al. (1987) の示したモデルが成り立つのかも再検証している。一般的なウニ精子鞭毛と同程度の長さ $40\mu\text{m}$ の鞭毛ではクレアチンシャトル系が共存すればATPの拡散係数が $60\mu\text{m}^2/\text{s}$ であっても屈曲運動に必要なATPは供給可能であると本研究は結論している。同様の計算から、 $100\mu\text{m}$ を超えるような長い鞭毛では他のエネルギー供給機構 (哺乳類精子で見られる様な解糖系の寄与) を考えなければならないとも推測している。

最後の第3章では精子の頭部と鞭毛の境界であるネックの部分における物質の拡散特性について詳しい考察を行っている。この部分での拡散特性を調べるため、初めに、蛍光色素を取り込ませた精子の頭部での FRAP 解析を行った。この観察から頭部と鞭毛の間で物質は少なくとも拡散移動できることはわかった。さらに詳しくネック部分の拡散性を調べるため、鞭毛に沿ったいろいろな場所で FRAP 解析を行い、場所と見かけ上の拡散速度 (蛍光強度の回復時定数) の関係を調べた。その結果、鞭毛中心部分に比べ、先端部分では見かけ上の拡散速度が遅く、基部付近 (ネック付近) では逆に速度が速いという現象を発見している。さらに、本研究は、計算シミュレーションを行った結果、場所による見かけ上の拡散速度の違いは、細胞構造の違いが主たる要因であることが強く示唆された。すなわち、鞭毛の先端部分では片側からの物質の交換が起こらず、見かけ上拡散の速度が減少する点、ネック部分では3次元的な広がりを持つ頭部と直結している影響から見かけ上の速度が増加するという説明をきわめて明瞭に行っている。さらに、ネック部分での拡散障壁は全く存在しないか、存在しても影響は小さいと結果づけている。見かけ上の物質拡散速度 (物質がある箇所での枯渇した場合、どの程度の時間で再供給がなされるかというパラメータ) は、細胞の構造や境界条件が大きく影響することを実験と理論の両方ではじめて示した点で意義は大きい。

この研究で開発された手法は、精子細胞内での一分子蛍光観察などの実験にも発展・応用できるものと考えられる。精子は細胞体 (頭部) が比較的小さく細胞全体が1次元的な細長い構造体であり、上のような定量的な議論を行うのに格好の材料である。この事実も明確に示されている。この様な新しいアプローチを提供できた点、さらに、鞭毛・繊毛の内部構造と他の物質との相互作用を拡散速度というパラメータを使って調べる研究も可能となり、学問上の展開も期待される。高尾大輔氏が提出した本論文は、以上述べたように、詳細な定量解析と理論的な計算を平行して行った点、新しい実験系へと展開できた点で、本審査委員会は博士 (学術) の学位を授与するにふさわしいものと認定した。