

## 論文内容の要旨

論文題目 Mechanism regulating  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mechanosensory behaviour in sea urchin spermatozoa

(ウニ精子におけるカルシウム依存性機械受容反応の制御機構)

氏名 蒲原 祐花

### [序論]

真核生物において、筋収縮や鞭毛・繊毛運動、神経情報伝達をはじめとするさまざまな細胞機能の制御に、カルシウムが重要な役割を果たしている。しかし、その制御機構については不明な点が多く残されている。繊毛・鞭毛は、細胞の遊泳や物質輸送に必要な推進力を生み出すだけでなく、外部からの刺激を受容し反応する特性を持つ。クラミドモナスの走光性や精子に見られる走化性は細胞体が光や卵からの誘因物質を刺激として受容し、鞭毛運動変化を起こすことによって誘導される。これらはカルシウム依存性反応である。カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) では、精子の運動は誘引物質である SAAF の濃度勾配に依存して変化し、SAAF 濃度が低い領域に精子が侵入すると細胞内カルシウム濃度が一時的に上昇し、遊泳方向が変化することが知られている (Shiba *et al.*, 2008)。遊泳方向の変化は、精子鞭毛の波形の非対称性が変化することによって起こされるが、細胞内カルシウム濃度変化による遊泳方向制御の全容はまだ明らかにされていない。

カルシウム依存性の鞭毛・繊毛反応は、機械刺激によっても引き起こされる。これまでに、ムラサキイガイ (*Mytilus edulis*) のエラの繊毛、ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*)、クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*)、ウニ精子において機械受容反応の報告がある。ゾウリムシは、遊泳中にその細胞前端部が障害物に当たると一時的に繊毛打が逆転し、細胞体の遊泳方向が変わり、いわゆる逃避反応 (avoiding reaction) を示す (Naitoh & Kaneko, 1972)。クラミドモナスでは、細胞体全体に振動を与えると、鞭毛打頻度が上昇し遊泳速度が上がる (Wakabayashi *et al.*, 2009)。ウニ精子では、頭部先端への機械刺激により一時的に鞭毛運動が停止する (Shingyoji & Takahashi, unpublished)。これらの機械刺激により誘導されるカルシウム依存性の鞭毛・繊毛運動の変化についても、細胞内カルシウム動態の制御およびカルシウム依存性の鞭毛・繊毛運動の制御の全容は明らかにされていない。

本研究では、ウニ精子におけるカルシウム依存性機械受容反応に着目し、この反応の特性を明らかにするとともに、カルシウム流出入に関わる膜タンパク質等を明らかにすることにより、カルシウム動態制御のメカニズムを解明することを目指した。

ウニ精子でカルシウム流出入に関わる膜タンパク質としては、カルシウムの流入に関わる T型とL型の2種類の電位依存性カルシウムチャネル (Darszon *et al.*, 2006) が知られている。カルシウム排出については、主に頭部の細胞膜に存在すると報告されている Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) と鞭毛の細胞膜に存在するとされている  $\text{K}^{+}$ -依存性  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  exchanger (NCKX) が関わり、これらの連携により

細胞内のカルシウム濃度は常に低く保たれていると考えられているが、そのメカニズムは不明である (Su & Vaquier, 2002). さらに最近発見されたウニ精子細胞膜に特異的なシアル酸含有糖タンパク質 flagelliasialin もカルシウム流出の制御に関わるとされているが、その機能は明らかではない (Miyata *et al.*, 2004, 2006). 本研究では、これら関連タンパク質等の阻害剤および抗体を用いることにより、ウニ精子の機械受容反応におけるカルシウム動態制御のメカニズムの一端を明らかにした。

## [材料と方法]

アカウニ (*Pseudocentrotus depressus*) とバフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*) の精子を用いた。

### 機械受容反応の誘導と記録・解析

スライドガラスとカバーガラス、およびスペーサーとして厚さ 1 mm のシリコンシートを用いてチャンバーを作り、チャンバー内はフォルムバル処理を行った。このチャンバー内に海水に希釈した精子を入れ、水圧式マイクロマニピュレーターに取付けたガラス微小針を操作して、精子頭部に微小針を当てた。精子の運動は、ストロボ照明を組み込んだ位相差顕微鏡で観察し、高速度カメラでデジタル画像としてコンピューターに記録し (200 fps), 繊毛・鞭毛運動波形解析用ソフトウェア Bohboh を用いて解析した。

### カルシウムイメージング

上記の位相差顕微鏡で用いた LED ストロボ照明装置を蛍光顕微鏡に応用し、カルシウムインジケータである Fluo-4 AM を精子に取り込ませ、機械刺激に反応した精子のカルシウム濃度変化を波形変化と対応させて解析した。

### 阻害剤・抗体実験

暗視野顕微鏡下で実験を行った。機械受容チャネルの阻害剤であるガドリニウム ( $Gd^{3+}$ ), 電位依存性カルシウムチャネルの阻害剤として verapamil とコバルト ( $Co^{2+}$ ), カルシウム排出に関わるとされる PMCA の阻害剤の 5(6)-carboxyeosin (CE), および NCKX の阻害剤の KB-R7943 を用いた。さらに, flagelliasialin のモノクローナル抗体である 3G9 と 4F7 を用いた。

## [結果と考察]

### (1) 機械刺激に対する反応

10 mM カルシウムを含む人工海水に希釈したウニ精子は、ガラス面近くでは直径約 50  $\mu m$  の円を描くように遊泳する ( $C_B$ )。ガラス微小針を遊泳軌跡中に差し入れ、精子頭部先端に垂直に針を当てると、精子は約 1 秒間鞭毛停止反応を示した ( $Q$ )。その後、直線的な軌跡で遊泳 ( $S$ ) を再開し、その後再び円を描くような遊泳 ( $C_A$ ) に戻った。このようにして精子は、障害物を避けるという逃避反応を示した (Fig. 1A)。この一連の反応はカルシウム依存性で、カルシウム濃度が 10 mM では 100%, 1 mM では 5.4% の精子が逃避反応を示した。0 mM では、機械刺激による遊泳方向の変化は起こらなかった (Fig. 1B)。以下では、10 mM カルシウム存在下で機械刺激により誘導される一連の反応 ( $C_B$ - $Q$ - $S$ - $C_A$  と表す) に着目して実験を行った。

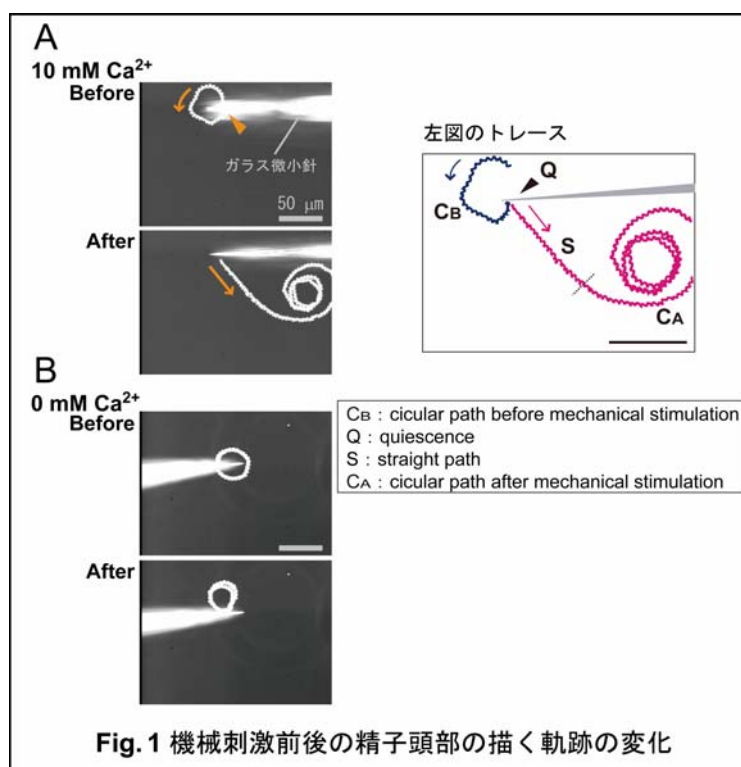


Fig. 1 機械刺激前後の精子頭部の描く軌跡の変化

## (2) 波形変化

機械刺激を与える前のウニ精子の屈曲波形は、屈曲がより大きい Principal bend (P-bend) と、より小さい Reverse bend (R-bend) からなる。機械刺激による鞭毛停止反応後の直進遊泳時には、R-bend の屈曲が P-bend の大きさに近づく結果、鞭毛波形はより対称性を増し、遊泳軌跡が直線的になることが明らかとなった。

## (3) 細胞内カルシウム濃度の可視化

機械受容反応中の細胞内カルシウム濃度の変化を解析した結果 (Fig. 2: カルシウム濃度の変化を青から赤までの疑似カラーで表す), 円を描いて遊泳している 1 の状態ではカルシウム濃度は低く, 2 で頭部が針にぶつかりカルシウム濃度は急激に上昇し, 鞭毛停止反応を示す 3 の状態では最大になった。その後徐々に低くなるが, 直進遊泳をしている 5 の状態ではまだ定常状態より高い。

## (4) カルシウム流入制御

機械受容チャネルの阻害剤であるガドリニウム ( $Gd^{3+}$ ) 20-30  $\mu M$  存在下では, 通常機械刺激により誘導される鞭毛停止反応が一部の精子では起こらず, 40  $\mu M$  ではすべての精子で停止反応は阻害され, 精子は遊泳を続けた (Fig. 3A)。また, L型の電位依存性カルシウムチャネルの阻害剤である verapamil (0.1 mM) やコバルト (3 mM  $Co^{2+}$ ) 存在下でも, 機械刺激による停止反応は誘導されなかった (Fig. 3B)。これらの結果から, 機械刺激による鞭毛停止反応には, 機械受容チャネルとL型電位依存性カルシウムチャネルが連動して関与すると推測される。

## (5) $Ca^{2+}$ -ATPase と $K^{+}$ -依存性 $Na^{+}/Ca^{2+}$ exchanger の役割

カルシウム排出に関わると予想される PMCA の阻害剤 5(6)-carboxyeosin (CE) と NCKX の阻害剤である KB-R7943 の効果を調べた。1  $\mu M$  CE 存在下では, 機械刺激により鞭毛停止反応が誘導された後, 円軌跡を描く遊泳となり ( $C_B$ -Q- $C_A$ ), 通常停止反応後に見られる直進遊泳は起こらなかった。CE濃度を上げると機械刺激による鞭毛停止反応を示したままで運動を再開しないもの ( $C_B$ -Q) の割合が増加した (Fig. 3C)。一方, 1-1.5  $\mu M$  KB-R7943 存在下では, 機械刺激による鞭毛停止反応後の直進遊泳が長くなり, 再び円軌跡に戻るこ

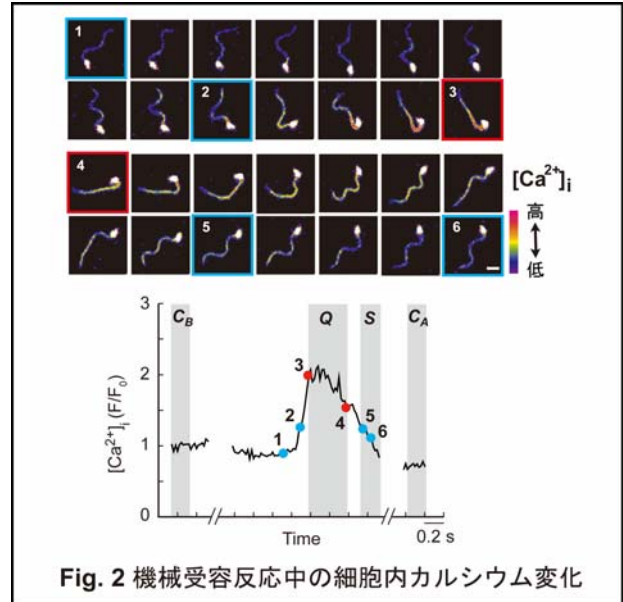


Fig. 2 機械受容反応中の細胞内カルシウム変化

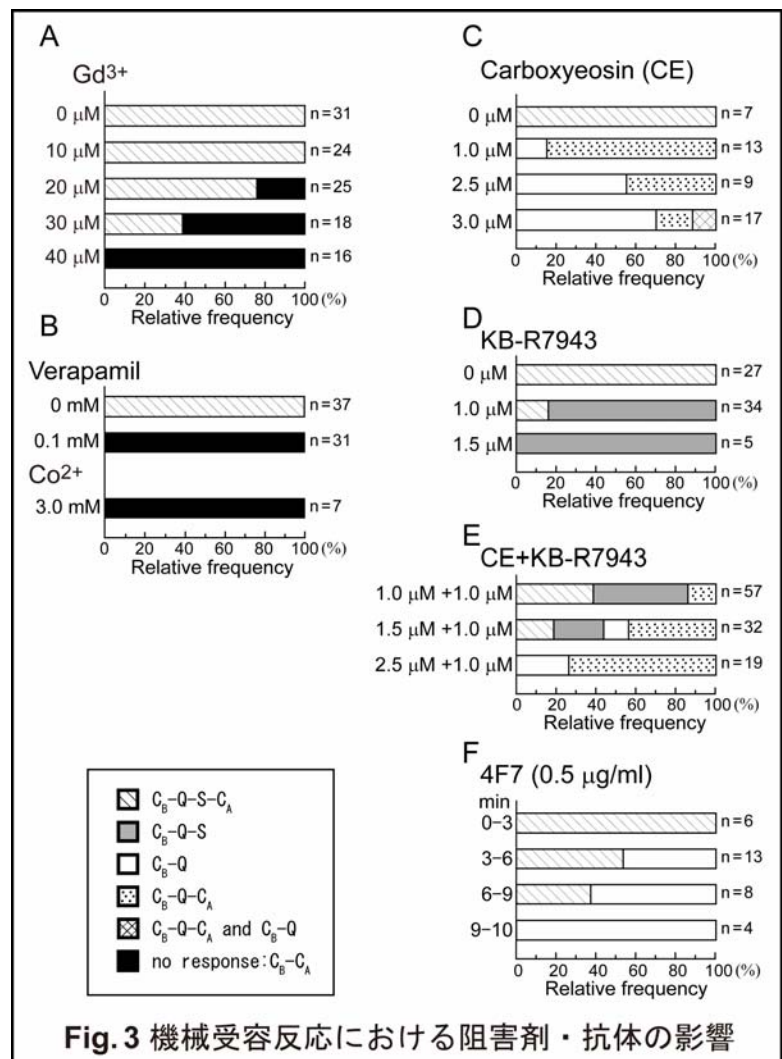


Fig. 3 機械受容反応における阻害剤・抗体の影響

となく鞭毛がまっすぐになって運動を停止した(C<sub>B</sub>-Q-S) (Fig. 3D). 以上の結果から, 機械刺激による鞭毛停止からの運動再開にはPMCAが, 直進遊泳から円軌跡を描く遊泳に戻る過程にはNCKXがそれぞれ関わる結果, 細胞内カルシウム濃度が減少することが示唆された.

さらに, CE と KB-R7943 共存下では各阻害剤単独で見られる反応のタイプがすべて現れた (Fig. 3E) ことから, PMCA と NCKX の活性は細胞内カルシウムの絶対濃度により切り替わるように制御されているのではないと推測される.

## (6) Flagelliasialin の役割

ウニ精子の細胞膜に特異的に存在する $\alpha$ -2,9 結合ポリシアル酸糖タンパク質flagelliasialinは, 細胞内カルシウム濃度調節に関与すると考えられている. Flagelliasialin糖鎖部分のモノクローナル抗体である4F7 (0.5  $\mu$ g/ml) を海水中に加えて約3分後から精子の鞭毛打は不規則となり, 遊泳軌跡が乱れた. 運動を完全に停止するまでの10分間に機械刺激を与えると, 鞭毛停止反応を示したまま運動を停止する(C<sub>B</sub>-Q) というCE存在下と似た反応が見られた (Fig. 3F). この結果は, 鞭毛停止反応後の運動開始には, flagelliasialinの関与するCa<sup>2+</sup> 排出機構が関与することを示唆する.

遊泳中の精子は, 4F7 やCE存在下ではquiescenceを示して運動を停止 (C<sub>B</sub>-Q) し, KB-R7943 では直線状で停止 (C<sub>B</sub>-Q-Sの後に起こると予想される停止) したが, 興味深いことに, verapamilの共存下では停止せずに通常の鞭毛運動が持続した. このことは, 定常状態の遊泳中においても細胞内カルシウム濃度調節が行われており, その調節機構には, 電位依存性カルシウムチャンネルを介したカルシウムの流入と, PMCA, NCKX, flagelliasialinの関与するシステムによるカルシウム排出が関わりと推測される.

## [まとめ]

本研究では, ウニ精子におけるカルシウム依存性機械受容反応に着目し, この反応の特性, およびカルシウム流出入に関わる膜タンパク質等を明らかにすることにより, カルシウム動態制御のメカニズムを解明することを目指した. その結果, 精子頭部の機械刺激により, 鞭毛運動の一時停止とそれに続く対称性の増大による直進遊泳, それに続く円軌跡を描く遊泳の回復という一連の特徴ある反応が誘導されることを見出した. この反応中の細胞内のカルシウム動態と阻害剤等の効果の解析から, 鞭毛停止反応時には細胞内カルシウムの一時的な上昇が起り, 直進遊泳時には徐々に下がるが定常状態より高いままであること, 鞭毛停止反応には機械刺激受容チャンネルとL型の電位依存性のカルシウムチャンネルが連動して関与すること, 鞭毛停止反応後のカルシウム排出は, PMCA, NCKX, および flagelliasialin の関わる新たな系が相互に関与しあいながらカルシウム濃度を制御していることが明らかとなった (Fig. 5).

カルシウム排出に PMCA, NCKX, flagelliasialin の関わる新たな系がどのように関わるのかは今後の課題である. また, 直進遊泳時に対称波を作り出すメカニズムの解明が待たれる.

