

論文の内容の要旨

Effects of imposed bending on the regulation of oscillatory movement in sea urchin sperm flagella

(ウニ精子鞭毛における振動運動の制御に対する屈曲の効果)

氏名 伊澤 寧秀

序論

真核生物の鞭毛運動の特徴は振動運動である。ウニ精子では、屈曲は鞭毛の根元で周期的につくられ先端へと伝わる。振動の原動力であるダブルレット微小管間の滑り運動は、ダブルレット上のダイニンが、ATP加水分解時のエネルギーを用いて引き起こすことが知られている (Brokaw, 1991; Shingyoji, et al., 1977; Summers & Gibbons, 1971)。一方、鞭毛の振動運動は、外部から与えられる様々な刺激に反応して変化すると同時に、屈曲そのものに反応する自律制御特性を示す。このような振動の制御機構を明らかにするには、「ATP濃度に依存した制御」と「屈曲という機械的制御」とを区別して解析することが必要である。しかし、両者を独立に解析することは容易ではない。この難しさを克服することを目指した実験が、2007年に Ishikawa & Shingyoji により試みられた。除膜したウニ精子を用いて、自発的振動に必要な ATP の閾値濃度より、わずかに高い濃度下で運動を停止している鞭毛に対し、機械的変形が及ぼす効果を解析した結果、誘導された屈曲は伝播を示し、さらに伝播方向の切り替えが起こることが示された。しかし振動運動（屈曲の成長と伝播、新たな屈曲の逆方向への形成と成長・伝播）を誘導するには至っていなかった。そこで本研究では、自発的運動を示さない非常に低い ATP 濃度条件下 ($1.0\text{-}2.0\ \mu\text{mol l}^{-1}$) で、振動運動を誘導することに挑戦し、振動の条件を明らかにすることによって振動機構の解明を目指した。

材料と方法

材料には *Hemicentrotus pulcherrimus* (バフンウニ) の精子を用いた。ウニ精子は人工海水 (pH8.0) で希釈して運動を開始させた後に、Triton X-100 を含む除膜液を用いて除膜し、 $1.5\text{-}2.0\ \mu\text{mol l}^{-1}$ ATP を含む再活性化溶液で再活性化した。

機械的変形の誘導と記録・解析

倒立位相差顕微鏡のステージ上のカバーガラスに精子を含む溶液を置き、精子を観察した。次に先端を 0.1% のポリリジンでコートしたガラス微小針をステージの左右から挿入し、それぞれの針で精子の頭部と鞭毛先端部を捉え、頭部の針を先端部の針に近づけることにより、鞭毛に機械的変形を与えた。この 2 本のガラス微小針は、いずれも水圧式のマイクロマニピュレータを用いて操作した。鞭毛運動は、高感度 CCD カメラで撮影して DVD に記録した。解析は、繊毛・鞭毛運動波形解析用ソフトウェア Bohboh を用いて行った。

結果と考察

1. 一对の屈曲形成から振動に至る鞭毛反応

〔振動誘導条件〕低濃度 ATP 存在下で鞭毛反応を導くためには、一对の屈曲を誘導することが必要であった。鞭毛の片側に一つだけの屈曲を誘導した場合、以後の鞭毛反応は得られなかった。そこで、頭部側を保持したガラス針を鞭毛先端部側の針に近づけ、鞭毛の根元に一对の屈曲を誘導するように針を動かした。その後は針を移動させずに静置した。また、鞭毛波形の平面性を維持する目的で、表面張力を利用してガラス面から約 $10\text{-}15\ \mu\text{m}$ の位置で操作した。これらの条件下で機械的変形により反応が誘導された。図 1 に主な反応の分類を示す。図の最上段 (ピンク枠) は、ガラス針による一对の屈曲の誘導を示す。誘導された屈曲反応は四種類で、それぞれが自発的に特徴的な変化を示した。

〔鞭毛反応の種類〕 屈曲形成の後に屈曲の

成長と伝播が続き、周期的に屈曲の向きを替え、3 サイクルを超える振動を示す Beating (BEAT)、BEAT に似ているがサイクル数が 3 未満である Switching (SW)、屈曲の成長と伝播を示したが屈曲方向の切り替えが起こらない Growth and propagation (GP)、そして、誘導された一对の屈曲がアクティブな成長を見せず、緩和的な伝播のみを示す Bend relaxation (BR) である。実験例数 560 のうち 63 例が BEAT、18 例が SW であった。GP は 560 例のうち 11 例で、おそらく SW と BEAT の反応に至るまでの第一段階の反応と考えられる。

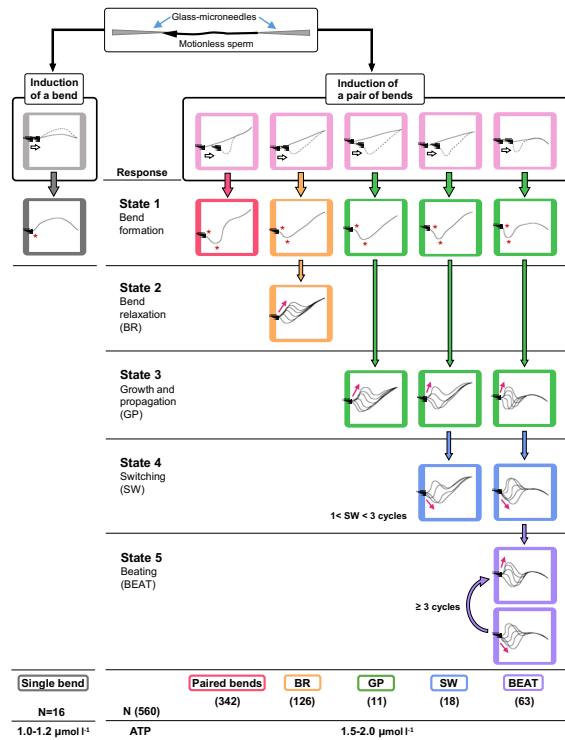


図 1. 閾値以下の ATP 濃度 ($1.5\text{-}2.0\ \mu\text{mol l}^{-1}$) において、外部からの変形により誘導された一对の屈曲が示す鞭毛反応。鞭毛波形は記録画像から再構成したもの。

2. 鞭毛波形における微小管のすべり量の変化

鞭毛波形の変化は、ダイニンによるダブルレット微小管同士の shear (ずり) に対応している。Shear の量は shear angle から求めることができ (図 2 左)、shear angle の変化を連続的に解析した shear curve における変化量から滑り速度 (rad/s) の変化を推測できる。(Gibbons, 1981; Satir, 1968; Warner and Satir, 1974)。BEAT, SW および GP の屈曲の伝播は shear curve の振幅に特徴的な変化が見られ、各サイクルの初期段階で shear angle が増大しアクティブな変化を示している。一方 BR の shear curve は鞭毛先端に向かって伝播する間、安定した変化にとどまり、この波の伝播がパッシブな滑りによって起きていることがわかる。これらの結果から BEAT, SW, GP における波形の制御機構は、BR とは異なることがわかった (図 2 右)。

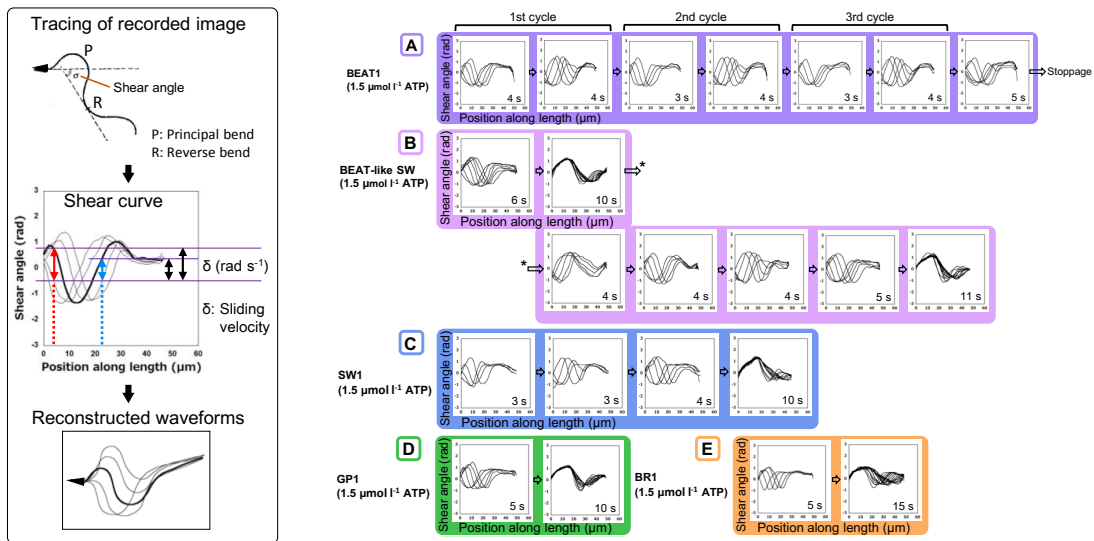


図 2. Shear angle, shear curve と滑り速度の関係 (左図) . 今回の実験で得られた反応から求めた shear curve の例 (右図) .

3. 振動の必須要素：伝播速度の保持と曲率の減少

BEAT, SW, GP は、いわゆる振動の基本的な素過程を反映している可能性が高い。そこで、この 3 種類の反応において、振動が継続している場合と、起こっていた振動が停止する、または振動が起らない場合を比較した。図 3.A は、振動が継続している場合の、鞭毛基部での屈曲の成長、成長した屈曲の大きさを維持したままの伝播、大きさがわずかに減衰してゆく伝播、屈曲方向の切り替え、からなる周期の繰り返しと、振動が停止した場合の、屈曲の成長、伝播、弛緩しながらの伝播を、それぞれ波形の変化で示したものである。図 3.B は、振動が継続している場合、振動が停止した場合の反応時の伝播速度の平均を示す。振動が続く場合では、屈曲成長後の伝播速度が、周期前半、後半ともに、高いレベルに保たれているのに対し、振動が停止した場合では、周期前半に、伝播する屈曲の急激な速度低下が見られる。このことから、十分な伝播速度を維持し、屈曲成長後の伝播速度を低下させないことが、振動の維持に重要であると思われる。また、振動が起らない GP の速度の低下と BR の低い速度が、振動停止時の低下に近い値を示していることは興味深い。さらに、伝播する屈曲の曲率の変化を図 3 の条件で比較すると、振動を継続する場合、一對の屈曲の曲率が同期して減少してゆくのに対し、振動が停止した場合、同期した曲率の減少は見られなかった。

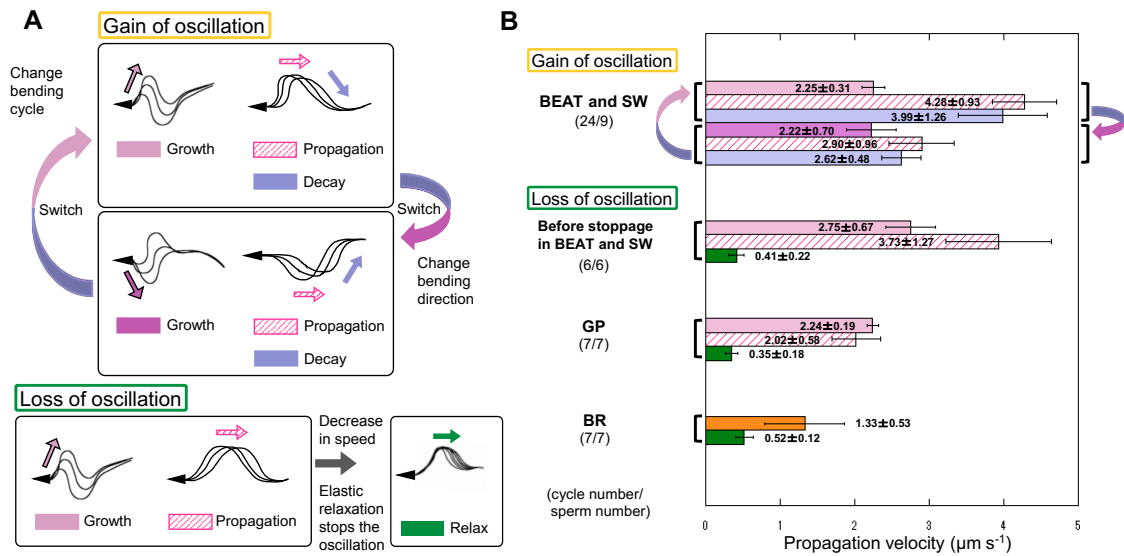


図3. 振動が継続する場合 (Gain of oscillation) と、起こっていた振動が停止する、または振動が起らない場合 (Loss of oscillation) の、波形の変化(A)と伝播速度(B).

4. 振動の開始と停止を決定する条件

誘導される一対の屈曲は、わずかに非対称で、精子頭部寄りの Principal bend (P-bend) と、その後方の P-bend とは逆向きの Reverse bend (R-bend) の P-R から成る。P-R 順で誘導される特性は BEAT, SW, GP

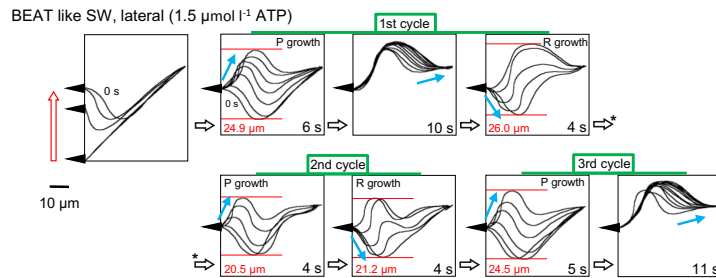


図4. BEAT-like SW の波形変化

のいずれの誘導の際にも見られ、R-P 順となることはなかった。さらに鞭毛基部で新しい屈曲が作られるときは必ず P-bend の成長から始まり、振動が途中で止まる反応 (Loss of oscillation) では、停止は例外なく P-bend の成長過程で起きた。本研究で 1 例だけが、P-bend の成長停止後にやや遅れて R-bend の成長が始まるという R-P 順かと思わせる鞭毛反応を示した (図4)。この例では P-bend の成長が途中で止まるが、数秒後に P-bend の伝播により R-bend の成長が始まる。しかしその後は P-R が順に 1.5 サイクル分振動し、再び P-bend の成長の途中で停止した。R-P 順の再現性は確認できなかった。

結論

振動運動の基本は、鞭毛基部における一対の屈曲形成とその成長及び伝播、さらに鞭毛先端近くで起こるわずかな速度減衰である。この反応は、先行する屈曲変形により秩序だった調節をおこなう。具体的には、R-bend の成長が、振動の継続、停止を制御する重要な要素となっており、R-bend の成長と新しく形成される P-bend の成長が、ある一定の伝播速度をもって、互いにバランスを保ちながら進行することが振動誘導には必須と考えられる。本研究により、振動の基本となる制御機構は、対をなす屈曲の形成と伝播の、先行する屈曲 (R-bend) 変形に依存した時空間制御であることが明らかとなった。