

鞭毛の屈曲波が両方向にくりかえしつくられる仕組み – ダイニン切り替え説の証明 –

林 周一 (生物科学専攻修了*), 真行寺 千佳子 (生物科学専攻 准教授)

鞭毛・繊毛は、細胞の動きや生体内の物質の移動などを担う重要な運動装置である。原生生物や多くの動物の精子は、鞭毛を波打たせて遊泳するが、この時鞭毛の根元で両方向に周期的につくられる屈曲(図1のPとR)は、ほとんど減衰せずに先端へと伝えられる。鞭毛の根元に特別の仕掛けは存在しない。鞭毛を構成する「9+2」構造とよばれる特徴的な構造に周期的振動を起こす仕掛けが潜んでいる。では、それはどのような仕組みなのか。われわれは、鞭毛の振動機構を解き明かす重要な仮説の証明に成功した。

屈曲形成に重要なのは、「9+2」構造を構成する9本のダブルット(複合)微小管(以下、ダブルット)とダブルット上に並ぶダイニンである(図1中段)。生体分子モーターの一種であるダイニンは、ATPを使って、隣のダブルットと結合・解離をくりかえしながら一方向に動く。ダイニンの動きについて、われわれのグループは最近新しい運動モデルを提唱した(2008年12月2日プレスリリース；

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 12月8日電子版に掲載)。屈曲は、鞭毛の中心の2本の微小管(中心小管)を通る面に垂直な面に形成される(図1上段)。「9+2」構造を鞭毛の根元からみあげたとすると、隣のダブルットに向かって突き出したダイニンは時計回りに配置されており、ダイニンは隣のダブルットを鞭毛の先端方向へと押し上げるように滑らせる。振動運動の時、すべてのダイニンが同じように滑りを起こすのではない。エラストラーゼという酵素を用いてダブルット間をつなぐタンパク質繊維を壊し、ATPにより滑りを誘導すると、鞭毛はあたかも2本の束からなるかのように分かれた(図1下段)。この結果からわれわれのグループは、屈曲PとRはそれぞれ中心小管の両側の7番と3番のダブルット上のダイニン(図1)の滑りにより形成されるという仮説を提示した(2003年発表)。

もし、両方向への屈曲形成が、7番と3番のダイニンの滑りが切り替わることに起こるのだとすると、切り替えは鞭毛が曲がることにより自動的に誘導されると推測される(2004年発表)。

そこで、エラストラーゼ処理した頭部付き精子を用いて鞭毛の根元方向を見分けながら、まず7番の滑り(P滑り)を誘導後、微小針で鞭毛を屈曲させてATPを与えたところ、滑り方向が逆転した(図2)。高濃度カルシウム条件では3番のダイニンは7番より有意に滑り速度が遅いという特性が、この滑り方向の逆転時に明確にみられたことから、ダイニンの切り替え仮説は証明された。さらに、P屈曲存在下ではR屈曲により滑りが切り替わった(図2)が、屈曲していない鞭毛ではP屈曲により滑りが切り替わった。鞭毛は、屈曲によるひずみを感じ、ダイニンと微小管との結合状態に応じて、ダイニンの切り替えを起こすらしい。この研究により、鞭毛の振動の基本機構が明らかとなった。

本研究は、文部科学省(科学研究費補助金)の支援によって行われ、S. Hayashi and C. Shingyoji, *Journal of Cell Science*, **121**, 2833-2843, 2008に掲載された。同誌121巻17号のIn this issue欄にも取り上げられた。

* 現在、独立行政法人理化学研究所発生・再生科学総合研究センター研究員。

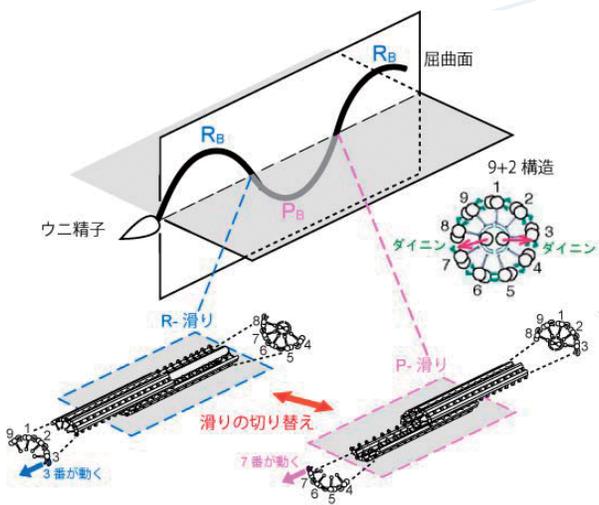


図1: 運動中の鞭毛におけるダブルット微小管間の滑りを示す模式図。P屈曲, R屈曲(P_b, R_b)を作る滑り(P滑り, R滑り)を起こすのは、9+2構造の主にダブルット7番(ピンク)と3番(青)上のダイニンである。

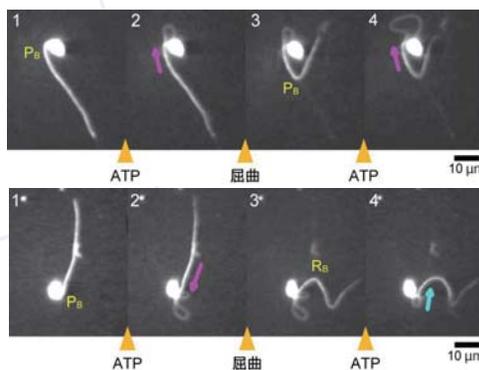


図2: 除膜後エラストラーゼ処理をした鞭毛にATPを与えP滑りを誘導する(1→2)。鞭毛をP屈曲方向に曲げても滑り方向は変化しないが(上段3, 4), R屈曲方向に曲げると逆転する(下段3, 4)。

ペプチドホルモンを介した木部と師部とのクロストーク

福田 裕穂 (生物科学専攻 教授)

植物には、木部と師部の2つの養分輸送組織がある。ちょうど人に動脈と静脈があるように。これらの組織はともに、その間にある維管束幹細胞からつくられる。木部は根から水分、塩類、シグナル分子を運び、師部は葉でつくられたショ糖やシグナル分子を運ぶ。この2つの装置がうまく連動してはじめて、植物内の栄養や情報のスムーズな伝達が可能になる。この2つの輸送経路は近接して存在するものお互いに交わらない。したがって、この2つの組織は、その密な連携のためお互いに情報のやりとりをしているのではないかと予想されていたが、情報伝達の実体は不明であった。

2006年に私たちは、細胞培養系を用いて、木部の形成を抑制する新規ペプチドホルモン、TDIFを発見した (Ito *et al.*, *Science*, **313**, 842-845, 2006)。TDIFは2つのプロリンに水酸基の修飾をもつ、12個のアミノ酸からなるペプチドであった。今回、私たちは、TDIFの植物体内での機能とその受容体の探索を行った。まず、

モデル植物であるシロイヌナズナのゲノム情報と私たちが行ってきた網羅的な遺伝子発現解析のデータをもとに、TDIFの受容体候補を60種類ほどに絞り込んだ。これらの候補のそれぞれの遺伝子破壊シロイヌナズナを入手して解析した結果、*TDR (putative TDIF receptor)* 遺伝子の欠損がTDIF感受性を失わせること、TDRタンパク質がTDIFと特異的に結合することから、TDRがTDIFの受容体であると証明された。発現解析からTDR遺伝子は維管束幹細胞に、TDIF遺伝子は師部周辺に、その発現が局在した。また、TDIFが師部細胞から分泌されることも明らかとなった (図1)。個体を用いた解析から、TDIFは木部分化阻害作用に加え、維管束幹細胞の分裂促進作用をもつことも明らかとなった。

これらの結果から、TDIFを介した木部と師部間のクロストークが次のように明らかにされた (図2)。

- 1) TDIFは師部組織によりつくられ、細胞外に分泌される。
- 2) 分泌されたTDIFは、維管束幹細胞に局在する受容体TDRに結合し、シグナルを細胞内に伝える。
- 3) その結果、維管束幹細胞から木部への分化が阻害される一方で、維管束幹細胞の分裂は促進され、未分化な状態の幹細胞が増える。

このようにして、師部からのシグナルが、木部細胞への分化を抑制し、過剰の木部をつくらせないという、師部から木部へ向けての制御機構が明らかになった。それでは、木部から師部に向けてのシグナルはないのか。当然あると考えていて、現在、それを解析する方法を模索中である。本研究は、Y. Hirakawa *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **105**, 15208-15213, 2008に掲載された。

(2008年9月18日プレスリリース)

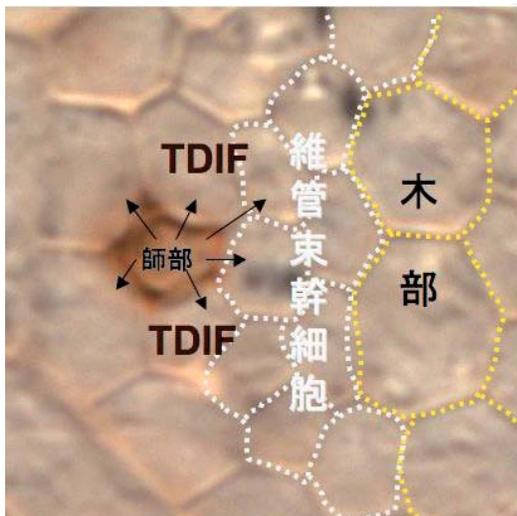


図1: TDIFペプチドの根における局在。TDIFは師部前駆細胞から特異的に分泌される。

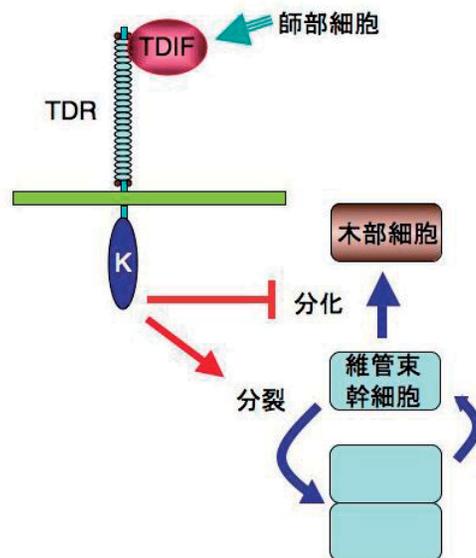


図2: TDIF/TDRシステムによる維管束幹細胞の発生運命の制御。師部細胞から分泌されたTDIFはTDRに受容され、維管束幹細胞からの木部分化を阻害し、幹細胞の分裂を促進する。

超原子価ジスルフィド結合の開発と特性解明

川島 隆幸 (化学専攻 教授), 狩野 直和 (化学専攻 准教授)

硫黄の特徴のひとつとして2価2配位の硫黄同士で結合を形成する性質が知られている。その結合(S-S)はジスルフィド結合とよばれ、アミノ酸であるシステイン同士の結合などタンパク質の構造を保持するのに役立っている。ジスルフィド結合は還元によってチオール(-SH)に変換され、酸化すると再びジスルフィドに戻るという可逆的な性質をもっており、毛髪のパーマにもその性質が利用されている。硫黄のもうひとつの特徴として、最外殻電子の個数が形式的に8以上の数の価電子を有する「超原子価状態」をとることが挙げられる。しかし、ジスルフィド結合と超原子価状態という二つの硫黄の特徴が一つの結合に組み込まれた4価4配位硫黄と2価2配位の硫黄との超原子価結合は、きわめて不安定であるとされ、その結合に関して構造的知見や性質はわかっていなかった。

われわれはこれまでに電子求引性の二座配位子を用いて種々の超原子価化合物の安定化に成功してきたが、この配位子は硫黄原子同士の超原子価結合の安定化

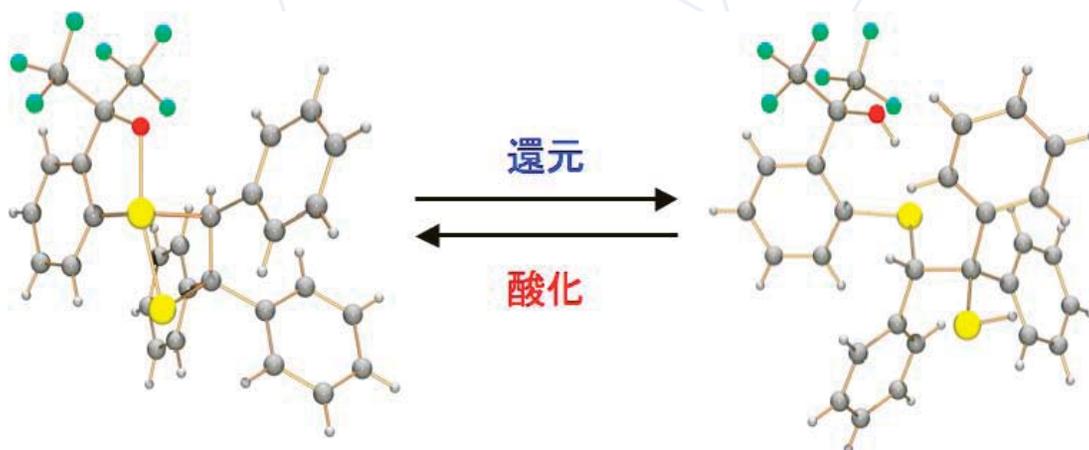
にも有効であると考えた。チオール(-SH)部位とスルフィド(-S-)部位を分子内にもつ化合物を合成し、その酸化反応により4価4配位の硫黄と2価2配位の硫黄との超原子価結合(以後、便宜的にS(IV)-S(II)結合とする)をもつ化合物の合成に成功した。S-S結合の長さは2.2138 Åであり、一般的なジスルフィド結合のS-S間の長さ(1.97-2.08 Å)よりかなり長く、一方の硫黄原子が超原子価状態にあることを反映していた。4価硫黄原子は形式的に10個の価電子をもつことになるために負電荷を帯びるように思えるが、分極の度合いを調べたところ、逆に4価硫黄原子は正に、そして2価の硫黄原子はやや負に分極していることがわかった。

この化合物は空气中、室温で扱えるほど安定だったが、溶液中で加熱すると分解し、硫黄原子と二つの炭素原子からなる三員環化合物が容易に生成された。このことは4価4配位硫黄をもつことに由来すると考えられ、4価4配位硫黄上での結合の組み替えが起こることを意味し、生体内

反応での反応様式を考察する上で興味深い知見である。S(IV)-S(II)結合を還元するとS-S結合がS-O結合とともに切断されて、チオールとスルフィド部位をあわせもつスルフィド化合物へと変換され、このスルフィド化合物を酸化するとS-S結合が再生した。つまり、S(IV)-S(II)結合もジスルフィドと同様に酸化還元によって可逆的に結合の形成・切断が行えることを意味している。ジスルフィド結合を構成する硫黄の片方を4価4配位にしても、可逆的な結合の形成・切断というS-S結合の性質が保持されることがわかった。今回の結果を契機にして、従来は想定されていなかった超原子価S(IV)-S(II)結合をもつ物質の生体内現象への関与が発見されることを期待している。

本研究成果は、N. Kano *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 9430-9433, 2008に掲載された。さらに、*Nature Chem.* の Research Highlights 欄でも取り上げられた。

(2008年10月27日プレスリリース)



硫黄-硫黄超原子価結合を有する化合物の分子構造と反応式。超原子価S(IV)-S(II)結合をもつ化合物を還元すると、結合の切断を伴って2価2配位の硫黄原子のスルフィド部位とチオール部位をもつ化合物が生成し、生成物の酸化反応によってS(IV)-S(II)結合が再生して元に戻る。(黄色：硫黄、灰色：炭素、白：水素、黄緑：フッ素、赤：酸素)

卵への精子走化性運動におけるカルシウムの役割

吉田 学 (臨海実験所 講師), 柴 小菊 (臨海実験所 特任研究員)

受精のさい、精子が卵を探して遊泳する過程において、卵または雌性器官が精子を誘引する現象（精子走化性）が、多くの動物で見られ、とくに海水中に放卵・放精を行い体外受精する海産動物では顕著に見られる。精子は走化性運動時、誘引源から遠ざかると遊泳方向が急激に変化し、引き続いて誘引源方向へと直進するという特徴的な方向転換（ターン）を行うが（図1）、このターンは精子鞭毛の波形が一過的に変化することで引き起こされる。この精子の遊泳方向を決定する鞭毛波形は、これまでの細胞膜を除去した精子での実験などから、細胞内カルシウム濃度によって一律に決まっていると考えられていた。しかし、精子誘引物質が同定されている動物がきわめて少ないこと、精子は小さい上に高速で運動をするため顕微鏡下での運動解析等が困難であったことなどの理由で、精子が走化性を示すときの鞭毛波形制御のメカニズムは長い間謎であった。

私たちはこれまでに尾索動物カタユウ

レイボヤの精子誘引物質が新奇の硫酸化ステロイド SAAF であることを同定し、この誘引物質 SAAF による精子運動制御のメカニズムの解明にあたってきた。今回、私たちは高速運動している精子の鞭毛波形を正確にとらえるため、発光ダイオード（LED）を用いたストロボ照明装置を蛍光顕微鏡に組み込んだ高速度イメージングシステムを開発し、走化性運動時の微小な精子鞭毛内カルシウム変化をとらえることに世界で初めて成功した（図2）。その結果、走化性運動時の精子では、鞭毛波形の変化が見られる直前に細胞内カルシウムの一過的な上昇（カルシウムバースト）が開始することが明らかとなった。また、精子走化性の最大の謎である精子がどのように誘引物質を感知しているのかを明らかにするため、誘引物質濃度勾配中においてカルシウムバーストがどこで起こるかを調べた。すると精子は誘引源に向かって泳いでいるときではなく、常に誘引源からもっとも離れたときに反応していることが明

らかとなった。以上のことから、精子は誘引物質濃度が減少から上昇に変わる点（濃度変化の極小値）を検出し、カルシウムバーストを生じることで鞭毛波形を瞬時に変化させ、遊泳方向の転換を行っているのではないと思われる（図1）。

本研究により、精子走化性におけるカルシウムの役割の一端が明らかとなった。また、精子が誘引物質の極小値という負の濃度変化を感知しているという興味深い結果を得ている。今後は誘引物質の感知機構やカルシウムによる鞭毛波形の制御機構を明らかにすることで、長年の謎であった精子運動の制御システムが解明されることが期待される。

以上の成果は、K. Shiba *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 19311-19316, 2008 に掲載された。

(2008年11月11日プレスリリース)

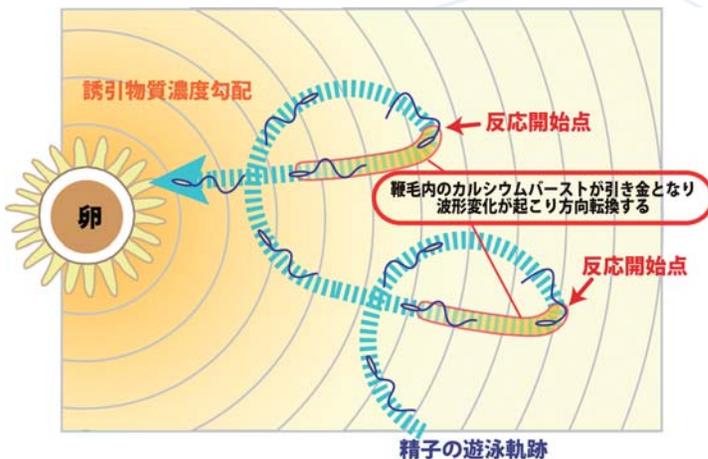


図1：精子走化性モデル。卵に対して走化性を示す精子は、卵から遠ざかるときに遊泳方向が大きく変化する。精子は誘引物質濃度が極小になる点（矢印）を検出し、鞭毛内カルシウムの上昇（カルシウムバースト）が生じ方向転換のための鞭毛波形変化が連続的に誘導される。

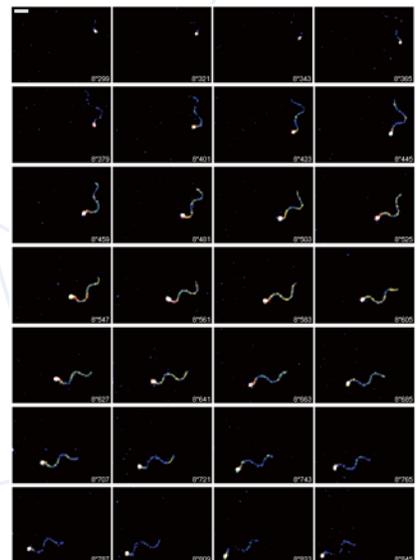


図2：走化性運動時の精子鞭毛内カルシウムの挙動。カルシウム蛍光プローブ fluo-4 を導入した精子鞭毛内のカルシウム変化を、LED ストロボ照明装置を組み込んだ高速度イメージングシステムにより測定したものの。

メダカ左右軸突然変異体からヒト繊毛病へ

武田 洋幸 (生物科学専攻 教授)

脊椎動物の外形は基本的には左右対称である。しかし、心臓の位置、消化管のねじれ方などは明らかに左右非対称となっている。重要なことはこれらの非対称性が遺伝的に決まっており個体差がほとんどないということである。私たち人間で、内臓の配置が乱れるのは、約一万人に一人。メダカ *ktu* 変異体は、内臓配置が完全にランダムになる典型的な左右軸喪失の変異体として単離された (図 A)。内臓逆位は直接個体の生命に関わるわけではないので、この魚は成魚まで成長・成熟する。しかし興味深いことに、この変異体は成長の過程で必ず腎臓肥大を発症し、下腹部がふくれ背筋が曲がる。この成魚の姿が、孫悟空が空を飛ぶために乗る筋斗雲 (きんとうん) に似ていることから、学生の一人がこの変異体を *kintoun (ktu)* と名付けた。

左右軸異常と腎臓病、一見関係ない現象に思えるが、実は最近の研究から細胞表面に生えている細胞小器官の繊毛が共通の犯

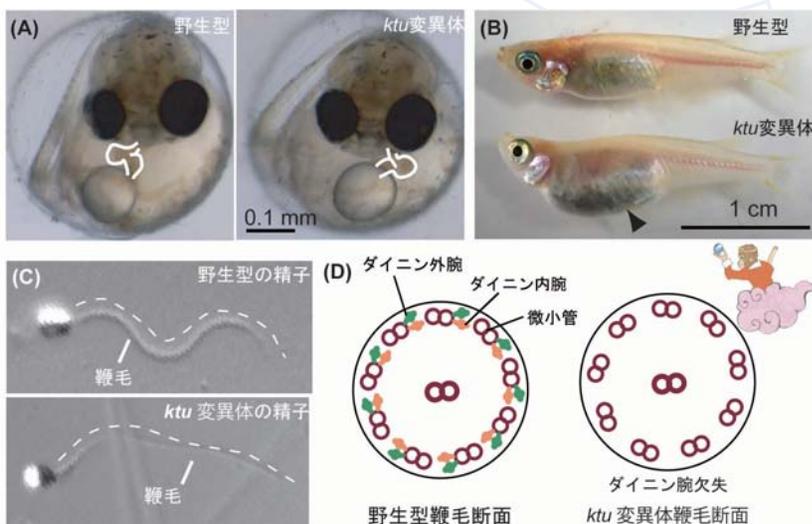
人であることが予想された。繊毛は発生のごく初期に左右非対称の遺伝子発現に関与すること、そして腎臓では原尿の流れを作り出したり、その流れのセンサーとして機能していることが知られている。運動性の繊毛は、9+2 構造 (周辺と中心の微小管) とよばれる微小管構造と周辺微小管間にある分子モーターのダイニン外腕・内腕をもつ (図 D)。実際、*ktu* 変異体の雄では、大きな繊毛とも言える精子鞭毛の運動性が低下していた (図 C)。さらなる解析により、*ktu* 変異体では繊毛・鞭毛の運動性に必須なダイニン腕が欠損することで運動性を失っていることが判明した (図 D)。メダカのゲノムは、昨年われわれを含む日本チームにより解読された (M. Kasahara *et al.*, *Nature*, **447**, 714-719, 2007)。われわれはそのゲノム情報を駆使して、*ktu* 変異体の原因遺伝子の同定に成功した。変異を起こしていた遺伝子は、ヒトを含めた脊椎動物、ミツバチ、ハエを含めた昆虫、一部の単細胞生物 (クラミドモナス) など運動性の繊毛・鞭毛を有する生物に広く存在する新しい遺伝子であった。これが順遺伝学 (突然変異体から出発する遺伝学) の醍醐味である。内臓逆位からはじまり、生物界に広く存在する重要な新規遺伝子にたどり着いた。

研究はさらに進んだ。生物種間で保存されている遺伝子は、往々にしてヒトの遺伝病の原因遺伝子でもある場合が多い。運動性の繊毛が原因で起こる病気は有名なカルタゲナー症候群を含む繊毛病 (気管支の拡張、男性不妊、内臓逆位などの症状を示す) がある。この遺伝病を専門とするオムラン (H. Omran) 教授 (フライブルグ大学) と共同で、繊毛病を発症した患者のゲノム DNA を調べた。その結果、この症候群を発生する 2 家系で、*ktu* 遺伝子の変異が見つかった。また単細胞生物であるクラミドモナスの変異体 *pf13* (鞭毛の運動性喪失) の原因遺伝子が *ktu* と相同であることも、ミッチェル (D. R. Mitchell) 教授 (ニューヨーク州立大学)、神谷律教授 (生物科学専攻) との共同研究により判明した。渡邊嘉典博士 (分子細胞学研究所) などの協力も得て行われた機能解析の結果、Ktu タンパク質は細胞質中でのダイニン腕の形成に必須なものであることがわかった。ダイニン腕形成過程はそのメカニズムがこれまでほとんどわかっておらず、今回の研究がきっかけとなり理解が進むものと期待される。

このように魚の変異体を用いた研究は、基礎的な発生学の研究にとどまらず、生命科学の広い分野に貢献している。この研究成果は H. Omran *et al.*, *Nature*, **456**, 611-616, 2008 に掲載された。

このように魚の変異体を用いた研究は、基礎的な発生学の研究にとどまらず、生命科学の広い分野に貢献している。この研究成果は H. Omran *et al.*, *Nature*, **456**, 611-616, 2008 に掲載された。

(2008 年 12 月 2 日プレスリリース)



メダカ *ktu* 変異体の表現型。
 (A) 受精後 3 日目の胚。白線は心臓。変異体は左側へループしている。
 (B) メダカ成体 (3 ヶ月)。変異体の腹部が膨らみ (矢尻) 背骨が湾曲している。
 (C) 運動中の精子。変異体の精子鞭毛の運動は異常。
 (D) 鞭毛、繊毛の軸糸断面図。変異体はダイニン外腕と内腕を欠失する。