

論文の内容の要旨

Studies on the roles of external strain in the regulatory mechanism of dynein activity underlying flagellar oscillation in sea urchin sperm

(ウニ精子鞭毛の振動運動を誘起するダイニンの外力に依存した活性制御)

氏名 餘家 博

序論

真核生物鞭毛の振動運動は、鞭毛を構成する 9 本のダブルレット微小管同士の間、モータータンパク質ダイニンが ATP 加水分解のエネルギーを利用して引き起こす滑り運動を原動力としている。鞭毛内の ATP 濃度は常に高く保たれているにも関わらず、ダイニンによる滑りの量や速度は鞭毛内の位置によって、また屈曲波の位相の変化に伴って、ダイナミックかつ協調的に制御されていると考えられる。

ダイニンの活性はどのような機構で制御されているのだろうか。ダイニンが鞭毛の 9+2 構造の中に組み込まれた状態では、その活性は鞭毛に与えられる屈曲や外力によって変調されることが明らかにされており [Okuno and Hiramoto, 1976; Hayashi and Shingyoji, 2008], ダイニンの活性は滑り運動によって生じた屈曲によってフィードバック制御を受けていると考えられる。

中心小管などの鞭毛内の構造がダイニン活性の制御に関わっていることは多くの研究から示唆されている [Smith, 2002; Nakano et al., 2003]. しかし、ダイニン分子そのものが自律的に、外力に応じて活性を制御している可能性も示唆されている。近年、鞭毛から取り出した一分子のダイニンを用いた実験から、ダイニンの力発生の方向が外力依存的に逆転することが発見された [Shingyoji et al., 2015]. これはダイニン自体が外力に応答して運動モードを変化させる能力を持つことを示唆する。しかし、実際の鞭毛内のように複数のダイニン分子が集まって働くとき、ダイニン分子の集合による微小管滑り運動が外力に応じて協調的に制御されるのか、また制御されるとしてどのような運動モードがあるのかは、わかっていない。もしダイニンが外力に応じて活性を変えることができるなら、*in vitro* でとらえること

もできるであろう。

本研究では、複数集まったダイニン分子が力学シグナルに応答して活性を変化させる能力を持っているかどうかを明らかにするため、ダイニンによる微小管滑り運動に対する外力の効果を調べた。第一章では、ウニ精子鞭毛から抽出した外腕ダイニンである 21S ダイニンをガラス面上に吸着させ、21S ダイニンによって滑り運動を起こしている微小管にガラス微小針で機械操作を与える実験系を開発した。その結果、滑り運動の停止、逆方向の滑り、微小管の解離という、これまで報告されていない 3 つの運動モードが外力によって誘導されることが示された。また、滑り速度が微小管の屈曲に伴って変化した。これらの結果は、複数集まったダイニン分子が、外力に応答して柔軟に滑り活性を変化させる能力を持つことを示す。さらに第二章では、ウニ精子鞭毛から滑り出させたダブルレット微小管上についたままのダイニンによる微小管滑り運動に対する外力の効果を調べる実験系を開発した。その結果、微小管の異なる部位への屈曲がダイニンの滑り活性に影響を与える可能性が示唆され、鞭毛内の状況により近いこの実験系においても、ダイニンが外力に応答する能力を持つ可能性が示唆された。このようなダイニンの自律応答の制御機構は、鞭毛の振動運動の制御において重要な役割を担っている可能性がある。

第一章 ガラス面上に吸着させた外腕ダイニンによる微小管滑り運動の制御に対する外力の効果

(本章の内容は Journal of Experimental Biology 誌第 220 巻 1124–1134 頁に 2017 年 3 月に掲載された。)

<材料と方法>

・21S ダイニンと微小管

21S ダイニンは、アカウニ (*Pseudocentrotus depressus*)、バフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*)、キタムラサキウニ (*Strongylocentrotus nudus*) の精子を界面活性剤で除膜し、頭部の除去を行った後に 0.6 mol l⁻¹ NaCl 処理した鞭毛から抽出し、ショ糖濃度勾配遠心によって精製した。微小管はブタの脳から精製したチューブリンを、蛍光色素ローダミンで標識したのちに重合した。

・滑りの観察、機械刺激、記録と解析

従来の“*in vitro* motility assay”系 [Paschal et al., 1987] を微小操作の手法 [Morita and Shingyoji, 2004] にもとづいて改変した。100–350 μg ml⁻¹ の 21S ダイニンを容量 1.4 μl のガラスチャンバー内に灌流・静置したのち、微小管を加えた assay buffer (50 mmol l⁻¹ KAc, 1 mmol l⁻¹ ATP を含む) を灌流し、微小管の滑り運動を誘導した。灌流後にチャンバー上面のカバーガラスの上および周辺に assay buffer 150 μl を置き、ピンセットでカバーガラスを側方へずらし (図 1, 白抜き矢印)、灌流部にガラス微小針を導入できるような open surface とした (図 1)。ガラス微小針は水圧式マイクロマニピュレータによって操作し、微小管の蛍光像とガラス微小針の位相差像を蛍光顕微鏡 Olympus IX-70 で同時に観察し、CCD カメラで記録した。

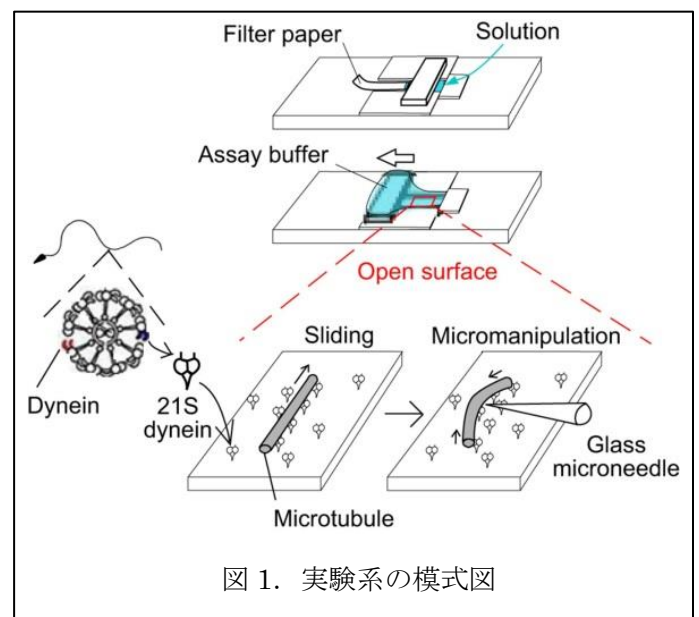


図 1. 実験系の模式図

<結果と考察>

・ Open surface チャンバーでの微小管の滑り運動

Open surface を導入した本実験系でも従来の系と同様、ガラス面上のダイニンによる微小管の一方向性の滑り運動が観察され、一部の微小管 (22%; 367 本中 79 本) では自発的に滑り運動が停止してその場に留まったり、再び滑り運動が開始したりする様子が観察された。

・ 滑り運動中の微小管に対する水平面内での屈曲は、滑りの継続や停止を誘導した

滑り運動をしている 260 本の微小管に、ガラス微小針を用いて、ガラス面に平行な平面内で屈曲操作 (574 例) を行ったところ、434 例 (76%) では屈曲操作後も微小管は一方向性の滑り運動を継続した。一方 136 例 (23%) では微小管は屈曲後に滑りを停止し、ガラス微小針を離れた後もしばらくはガラス面上に留まって静止した (図 2)。残りの 4 例では、もとは逆方向の滑りが誘導された (後述)。

・ 速度の低下

滑りの継続が観察された 434 例の屈曲操作のうち、37 例では明らかな速度の低下が誘導された。これはダイニンが外力に応答して速度を微調整する能力を持つことを示唆する。

・ 停止の誘導の条件

屈曲操作を部位によって分類すると、微小管の後方部分を曲げた時よりも、中央付近を曲げた時の方が停止の頻度が有意に高く ($P < 0.03$, chi-square test), 中央付近を曲げた場合の中では、前方部分が後

ろ方向へ引かれて動いた場合の方が、引かれて動かなかった場合よりも停止の頻度が高かった ($P < 0.01$, chi-square test)。また、微小管の前方部分だけが停止を示し、後方部分は滑りを継続した 10 例のうち 10 例全てにおいて、前方部分の停止直前に前方部分がガラス微小針の動きによって後ろ方向へ引かれて動いていた。これらの結果は、後ろ方向への外力によって、複数分子のダイニンが微小管との相互作用を保ったまま、滑りのモードから停止のモードへ同時に遷移しうることを示唆する。

・ 逆方向の滑り

逆方向の滑りが誘導された 4 例のうち 3 例では、微小管の後方部分を曲げて鋭角 (40° 以下) の屈曲をつくり、ガラス微小針でその屈曲を保ち続けることによって微小管の前方部分で逆方向の滑りが誘導された (図 3)。これは、微小管の弾性による継続的な後ろ方向への力に応答して、複数分子のダイニンが協調して通常と逆方向の滑りに寄与でき

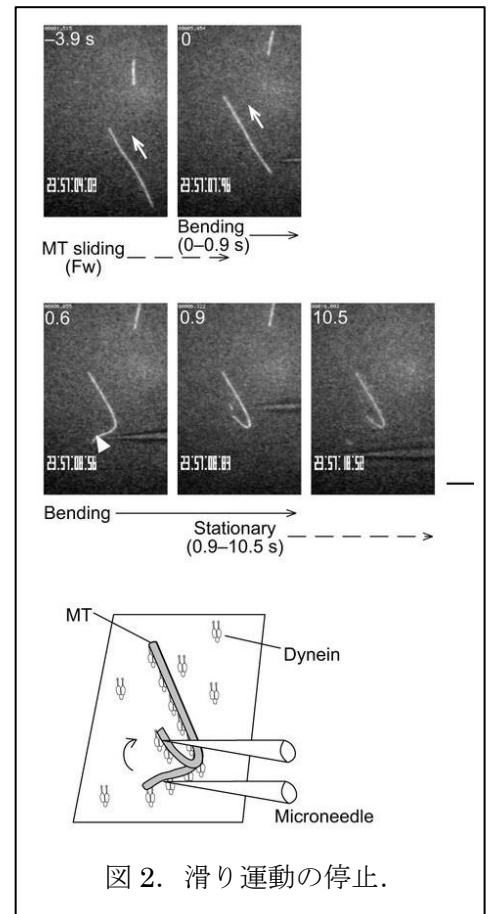


図 2. 滑り運動の停止.

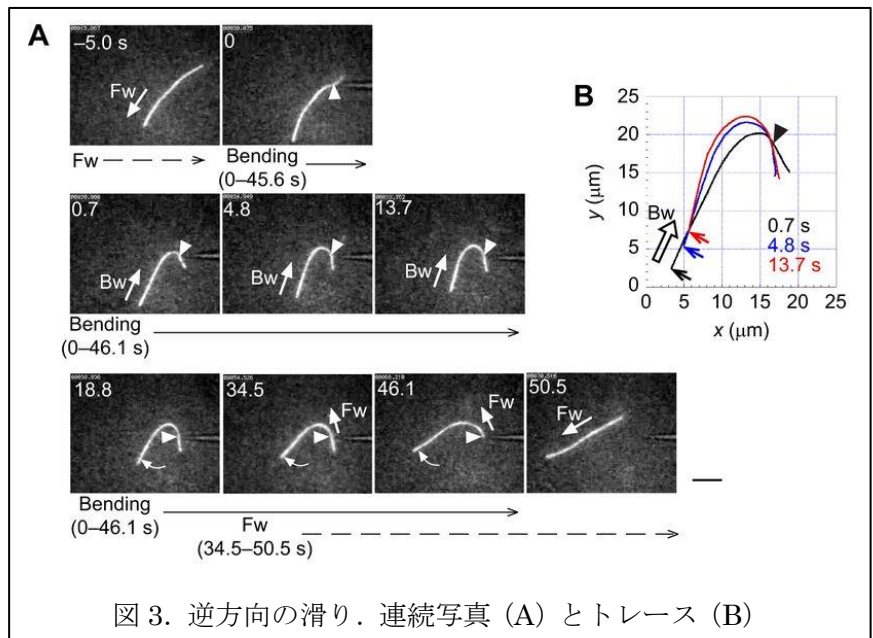


図 3. 逆方向の滑り. 連続写真 (A) とトレース (B)

ることを示唆する.

・微小管の解離

主に比較的低い濃度の 21S ダイニン ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) を用いた条件下での 10 例の機械操作では, 微小管に三次元的な屈曲が与えられ, ガラス面上のダイニンからの微小管の解離が誘導された. これは, ガラス面に垂直な外力が解離を誘導しうることを示している.

第二章 方法の探索: ダブレット微小管上のダイニンによる微小管滑り運動に対する屈曲の効果を調べる試み

<材料と方法>

ダブレット上のダイニンによる微小管滑り運動アッセイ[Yoshimura and Shingyoji, 1999]を, 微小操作の方法にもとづいて改変した. 除膜して頭部を除去したアカウニ (*Pseudocentrotus depressus*) 精子鞭毛を, ガラスチャンバー内で $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ elastase で処理し, 0.02 mmol l^{-1} ATP を与えることで sliding disintegration を誘導し, ダブレット上のダイニンを露出させた. そこへ, 重合微小管を加えた assay buffer (70 mmol l^{-1} K-Ac, 1 mmol l^{-1} caged ATP, 20 units per ml hexokinase を含む)を灌流した. 灌流後に第一章と同様に上面のカバーガラスをずらし, 機械刺激を与えることのできる open surface の系を実現した. ダイニンによる重合微小管の滑り運動は UV 照射による caged ATP の光分解によって誘導し, ダブレット微小管と重合微小管の蛍光像およびガラス微小針の位相差像を蛍光顕微鏡 Olympus IX-70 で観察し, CCD カメラで記録した.

<結果と考察>

1 mmol l^{-1} caged ATP 存在下で重合微小管はダブレット上のダイニンに結合し, UV 照射によって一過的に ATP を与えるとダブレットに沿って一方向的な滑り運動を数秒間示した.

1 回目の UV 照射によって滑り運動を示した 15 本の微小管に, ガラス微小針で屈曲を与えて 2 回目の UV 照射を行ったところ, 6 例は再び同じ方向への滑り運動を示し, 残りの 9 例は滑り運動を示さず静止したままだった. 2 回目の UV 照射後に動かなかった微小管の割合は屈曲を与えた場合でも与えなかった場合 (19 例中 12 例) でも有意な差はなかった ($P=0.85$, chi-squared test).

しかし, 微小管の前方部分に屈曲を与えた場合, 中央付近に与えた場合よりも, 屈曲後の 2 回目の UV 照射後に滑り運動を示さない微小管の割合が有意に高かった ($P<0.05$, Fisher's exact test). この結果は, 鞭毛内のようにダイニンがダブレット上に並んだ状態でも, 複数分子のダイニンによる滑り運動の活性状態が何らかの力学シグナルに応答して変化する可能性を示唆している.

結論

本研究の結果は, 複数のダイニン分子の活性状態が, 外力を介して柔軟に, そして協調的に制御されることを示している. この制御機構は, 鞭毛の振動運動の実現に必要な鞭毛内のコミュニケーションの重要な一側面であるかもしれない. nucleotide binding や Ca^{2+} などを介したその他の制御機構との関連性の解明は今後の課題である.