

Chemotactic response with a constant delay-time
mechanism in *Ciona* spermatozoa revealed by a high time
resolution analysis of flagellar motility

(鞭毛運動の高時間分解能解析により明らかになったホヤ精子
の一定時間の遅れ機構を持った走化性応答)

宮代 大輔

総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系

目次

使用した略語・変数リスト-----	4
General introduction-----	5
第一部 ホヤ精子走化性反応の解析と一定遅延モデル	
要約-----	9
導入-----	10
結果と考察	
化学誘引物質源に対する精子の相対位置の定義-----	13
Fig.1-----	15
Fig.2-----	16
精子の頭部遊泳軌跡の解析による応答時間 T_R の決定-----	17
Fig.3-----	19
Fig.4-----	20
新規の波形解析による応答時間 T_R の決定-----	21
Fig.5-----	24
Fig.6-----	25
Fig.7-----	27
SAAF の刺激に対する精子の応答-----	28
Table1-----	32
Fig.8-----	33
Fig.9-----	34
Fig.10-----	35
Fig.11-----	36
Constant delay model による走化性応答のシミュレーション-----	37
Fig.12-----	39
Fig.13-----	40

材料と手法-----	42
Fig.14-----	44
第2部 泳いでいるウニ精子の周りの流れ	
要約-----	45
導入-----	46
材料と手法-----	48
Fig.15-----	50
Fig.16-----	51
結果と考察	
精子遊泳軌跡、および、流動の平面性-----	52
精子とマイクロビーズの距離とマイクロビーズの移動速度-----	52
Fig.17-----	54
流れの計算-----	55
Fig.18-----	56
マイクロビーズの移動速度と流れの計算値の比較-----	57
Fig.19-----	58
結論-----	60
General conclusion-----	61
謝辞-----	62
References-----	63

使用した略語・変数リスト

$[Ca^{2+}]_i$ -----細胞内 Ca^{2+} 濃度

D-----Wave-shape-distance

GC-----Guanylylcyclase

p-bend-----principal bend

r-bend-----reverse bend

SAAF-----Sperm-activating and -attracting factor

SAPs-----Sperm-activating peptides

θ_s -----感知点

θ_R -----機械的応答点

θ_C ----- Ca^{2+} 応答点

General introduction

体外受精を行う海産無脊椎動物では、放精される精子は、同じように海水中へ放卵される卵まで、できるだけ短時間に、正確にアクセスできるように最適化されていると考えられる。その化学誘引物質の探査機構と遊泳制御のしくみは、精子にとっては無限に近いほどの非常に広大な空間で、誤りなく卵を探索でき、高い効率で到達し授精できる独特の進化を遂げて来たと推測される。探知機構、探知後の信号伝達機構、鞭毛モータータンパク質の活性制御による鞭毛打波形の制御、遊泳方向の舵取りなど、精子走化性反応過程で見られる機構の中には、生物学的にも興味深い現象が多く含まれている。その他にも、高等な動物の行動パターン制御に比較すると、非常に単純な運動システムのように思える往復運動する鞭毛波形だけで走化性が達成できている点、低レイノルズ数の制約下で遊泳行動を効率化している点など、我々が似た機構を模倣する上でも、精子走化性は興味のある現象である。バイオミメティックスの観点からも、制御のソフトウェアを学び取る意義は大きいと考えられる。

現在、このような無脊椎動物精子の走化性は、次のような一連の応答過程として観察されることがわかっている。まず、卵由来の化学誘引物質の濃度勾配を種特異的な受容体で感知し、その刺激によって、鞭毛打運動の非対称性の増減などの遊泳パターンの変化が起こり、あるタイミングで精子の遊泳方向が切り替わり、その結果、化学誘引物質の放出源である卵により接近するような位置に遊泳運動軌跡を修正するというものである。この一連の走化性反応過程は、多くの動物種で、ほぼ同じような過程として観察できるため、海水中で精子と卵が効率よく出会うしくみとして、共通する基本的で重要な機構があると考えられる。

精子の走化性は、これまで広く研究されて来っており、海洋無脊椎動物では種特異的な化学物質によって誘導されることがわかっている。たとえば、ホヤ (Yoshida et al., 2002)、サンゴ (Coll et al., 1994)、ウニ (Ward et al., 1985; Guerrero et al., 2010)、ヒトデ (Böhmer et al., 2005)、イカ (Zatlyn et al., 2002)、アワビ (Riffell et al., 2002)、両生類 (Olson et al., 2001) などの例が知られており、この種特異性は、様々な種由来の化学誘引物質が混在し得る海水中の場合、精子が同

種の卵を見つける為に重要であると考えられている。

精子誘引物質の受容体と信号伝達系の例も、いくつかの種で報告されてきた。ウニでは、精子誘引物質として種々の”sperm-activating peptides”（以下、SAPs と略す）が同定されていて（Suzuki & Yoshino, 1992）、それらの中で”resact”と”speract”というオリゴペプチドが精子の化学誘引物質として同定されている（Ward et al., 1985; Guerrero et al., 2010）。Resact に対する精子細胞上の受容体は同定されており、膜貫通型の guanylylcyclase（以下、GC と略す）であることが明らかになっている（Singh et al., 1988）。受容体 GC によって合成された cyclic GMP（cGMP）は、cGMP 活性化型 K^+ チャネルを介した K^+ の流入によって膜電位の過分極を引き起こし（Galindo et al., 2000; Darszon et al., 2001）、この膜電位の変化は、次に細胞内の pH と Ca^{2+} と cAMP の濃度を上昇させるという（Darszon et al., 2001; Kaupp et al., 2003; Böhmer et al., 2005; Strunker et al., 2006）。もう一つの SAP である speract の受容体自身は GC 活性はないが（Dangott et al., 1989）、別の GC 酵素と複合体を形成していることがわかっている（Bentley et al., 1988）。キヒトデ（*Asteria samurensis*）の SAP である”asterosap”も精子の化学誘引物質としてはたらき（Böhmer et al., 2005）、その受容体も GC 活性を持つ（Nishigaki et al., 2000）。Asterosap に誘発された cGMP の上昇は、細胞内 Ca^{2+} 濃度（ $[Ca^{2+}]_i$ ）の上昇をもたらす（Matsumoto et al., 2003; Böhmer et al., 2005）。

海産無脊椎動物の精子における $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、一般に、細胞膜上の Ca^{2+} チャネルを介して起こる。*Arbacia punctulata*（アスナロウニ）では、resact が cGMP と cAMP を介して $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を誘発し（Cook et al., 1994）、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は cAMP-依存性- K^+ チャネル（ K^+ -selective cyclic nucleotide-gated cation channels）によって制御されている（Strunker et al., 2006; Galindo et al., 2007; Bonigk et al., 2009）。ホヤでは、 Ca^{2+} チャネルが精子の非対称的な鞭毛波形の形成を仲介し、その結果、走化性を示す遊泳パターンが生じる（Yoshida et al., 2003）。

精子鞭毛波形は一般に $[Ca^{2+}]_i$ と密接に関係していると考えられている。鞭毛の運動波形は、ほぼ左右対称の往復運動をするものの、屈曲方向によって、わずかな振幅、屈曲率、屈曲速度の違いがあることが知られている。大きな屈曲が形成される側を P-bend（principal bend）側、反対側を R-bend（reverse bend side）側と呼ぶ。これまで、精子の除膜モデルにおける鞭毛軸糸の対称性が、溶媒中の Ca^{2+} 濃度と密接に関係していることが実験的に示されている。たとえば、ウニ

(Brokaw et al., 1974; Brokaw, 1979; Bannai et al., 2000) とホヤ (Brokaw, 1997) では、再活性化溶液中の Ca^{2+} 濃度が再活性化モデルの鞭毛波形の非対称性と関係しており、 Ca^{2+} 濃度が上昇すると、P-bend と R-bend 間の屈曲の差がさらに大きくなり、非対称性が増すことが分かっている。しかし、不思議なことに、ホヤの精子鞭毛では急旋回と直進遊泳を伴う典型的な走化性応答が、常に Ca^{2+} -bursts ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ の一過性の急激な上昇) と一緒に観察されるのにもかかわらず、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は鞭毛波形の非対称性とは、単純に一对一で対応するような関係にはないという報告がある (Shiba et al., 2008)。他にも $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と鞭毛波形の非対称性の間に、直接の関係のないケースが、ウニ精子でも報告されている (Böhmer et al., 2005; Wood et al., 2005)。これらの事実を考えると、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が単独で精子の鞭毛打の非対称性を決定しているのではなく、 Ca^{2+} によって活性化される何らかの未知の機構、あるいは、他の複合的な要素によって精子鞭毛打の非対称性は動的に制御されている可能性が高い。

理論的なシミュレーション研究も試みられており、Friedrich と Julicher (2007) は、ウニ精子が卵に近づくための戦略を 2次元と 3次元の遊泳モデルでシミュレーションしている。彼らは、化学誘引物質に精子が応答するための緩和時間を仮定することで、精子が卵にうまく接近できるという走化性モデルができることを示している。また、Guerrero et al. (2010) と Böhmer et al.

(2005) は、彼らの Stopped-flow 法による実験結果に基づいて走化性物質を受容してから 0.1 - 0.2 s の応答の遅れ時間があることを示し、モデル計算の妥当性を主張している。しかし、その遅延時間の直接的な根拠については明確な説明はない。また、stopped-flow 装置を用いて走化性物質を精子に急速に与えた時に見られる反応遅延と、精子の遊泳中に起こる緩やかな濃度変動時の走化性反応経過とをどのように関連づけて考えるべきかの明確な答えはまだない。

本研究では、上のようなモデルを再検証する目的で、特に、その中でも信号伝達を含む走化性応答を最初に引き起こすきっかけとなる事象は何かという点に着目して解析を実施した。そのきっかけとなる事象は、今のところ、まだ不明であるが、化学誘引物質の受容後に発生する 2つの観察可能な指標があると考えた。1つは鞭毛波形の微細な変化と、もう1つは精子内の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇である。これらの指標を統計的に取り扱うことで、走化性応答の最初のきっかけとなる真の事象、あるいは、その事象が起こるべき点を予測できると考えた。

本文中では、まず本研究で初めて導入した遊泳軌跡と鞭毛波形の解析方法について説明する。ここで考案した新しい波形解析手法が、非常に鋭敏に、波形の微細な変化を検出できる点が明らかにできた。第2に、この波形変化の前に起こるはずの走化性応答の最初のきっかけとなる事象がいつになるかを、実験データに基づいた統計的方法によって求めた。第3に、きっかけとなる事象を感知するための簡単なキネティクスのモデルを考案して示す。第4に、本研究で提案した一定の遅れ時間のモデルに基づいて走化性の効率をシミュレーションにより、走化性の効率を評価した。最後に、第2部として遊泳中の精子の周りの海水の流れを解析し、走化性物質の濃度勾配が、精子の遊泳行動自身でひずんだり、かき混ぜられたりする可能性について、検討した。

第1部

ホヤ精子走化性反応の解析と

一定遅延モデル

要約

精子の卵への走化性遊泳中、ホヤ精子は種特異的な化学誘引物質を受容し、未知の機構によって、その濃度勾配を感知すると考えられる。化学誘引物質を感知した後、精子は、異なる鞭毛打運動パターンからなる一連の遊泳応答を示し、徐々に化学誘引物質の放出源である卵に遊泳軌道を近づけていく。Shiba et al. はホヤ精子において、化学誘引物質の感知後、細胞内 Ca^{2+} 濃度の急激な上昇が起こることを観察した。しかし、その前後で起こる精子細胞内の生化学的な機構は不明のままである。本研究ではホヤにおいて化学的信号を受容するタイミングと、その感知機構に着目した。解決すべきもっとも重要な課題のひとつとして、走化性応答の最初の段階が、いつ、どこで起こるかを判別することが上げられる。そのために精子の鞭毛打運動を詳細に解析できるように、高速ビデオ記録(600Hz)と、鞭毛打と精子頭部の遊泳軌跡の微細な変化を検出するための新規の手法を導入した。これらの解析から、運動の応答が起こる前にあると想定される化学誘引物質の真の感知点がどこにあるかを推定し、その感知時点から運動応答開始までの遅れ時間がほとんど一定であることを発見した。この一定時間の遅れを持つモデルの走化性効率を評価するために、ホヤ精子の走化性挙動のコンピュータシミュレーションを行った。

導 入

効率のよい走化性応答と卵へ向かう方向転換機構は、授精に向けて行うべき精子の重要なタスクと言える。多くの海洋無脊椎動物では、精子は種特異的の化学誘引物質を受容し、その濃度勾配を感知することで、新たな遊泳軌道が卵に近づくように鞭毛打を制御する。たとえば、ウニ精子の走化性の場合、その機構の詳細は調べられていて (Cook et al., 1994; Ward et al., 1985; Eisenbach, 1999; Kaupp et al., 2006) 、流体力学をつかった遊泳動態の理論的な研究も行われている (Alvarez et al., 2014) 。走化性中の遊泳パターンの変化は、いくつかの動物種で似かよったもので、外部の信号の受容から細胞内の信号の変換、そして最終的な鞭毛打パターンの制御による応答まで、共通する一連の反応機構、および、運動制御機構が存在しているのではないかと考えられる。例えば、海洋無脊椎動物では、化学誘引物質の刺激がないときには精子は一定の螺旋または円軌道を泳ぐが、化学誘引物質の濃度勾配を感知すると、鞭毛打のパターンとそれによる遊泳軌道を変化させる一連の応答を示す。その応答は短い急旋回と直進遊泳期を経て、もとの円軌道の遊泳パターンに戻るといったものである。この一連の遊泳行動変化が、直接精子を卵へと向かわせるのではなく、結果的に卵へより近い場所での螺旋遊泳パターンをとるように変化させる。この反応が繰り返すことで、精子は徐々に化学誘引物質の放出源である卵へと近づく。

Shiba et al. (2008) の報告によると、化学誘引物質の濃度勾配の感知後に細胞内 Ca^{2+} 濃度の素早い上昇と非対称性の高い鞭毛打パターンへの変化が観察される。よって、ホヤ精子における細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化はさらに下流の精子細胞内の信号伝達の引き金となる決定的な出来事の1つであると考えられた。

本研究で、もっとも重要で基本的な疑問点は Ca^{2+} 応答の前の過程に関連するものである。どのようにして細胞外の化学誘引物質が精子細胞表面にある化学受容体に受容されるのか、もしくは、どのようにして細胞内の信号伝達の機構が鞭毛打パターンの変化を開始させるのかという点である。この機構の中で特に注目したのは、いつどのようにして精子が化学誘引物質の濃度勾配の信号を感知するかであり、これは走化性応答を開始させる過程を理解する上で、もっとも重要

な課題であると考えた。

ホヤ精子の走化性応答の先行研究から、観察された細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、精子がホヤに特異的な化学誘引物質である sperm-activating and -attracting factor (SAAF) の濃度変化を感知した後に起こる一連の細胞内反応の1つであると考えられる (Oishi et al., 2003, 2004)。Shiba et al.

(2008) の研究によると、 Ca^{2+} 応答が見られるタイミングは、精子の遊泳軌跡の中で SAAF 濃度が極小になる地点を精子が泳いでいる時点に対応していた。しかし、どのようにしてこの特定の地点で Ca^{2+} 応答が引き起こされるのかについての明確な説明は今のところない。もし、Shiba et al. の観察で使用した Ca^{2+} インディケータで検出される閾値以下の濃度での Ca^{2+} 応答があると仮定するならば、精子の実際の細胞内信号伝達応答は、精子が化学誘引物質の極小濃度地点を通過する前に、すでに引き起こされていると考えることも可能である。

走化性応答機構の簡単なモデルは、ウニ精子の speract (卵由来のオリゴアミノ酸の化学誘引物質) に対する応答に関する実験から提唱されている (Guerrero et al., 2010)。彼らは、精子細胞内の cGMP 依存の Ca^{2+} 信号を注意深く解析することで、精子が細胞表面の受容体によって化学誘引物質の濃度勾配の信号を感知してから、細胞内の下流の化学反応機構までに、一定の遅れ時間を発生させる機構を持っていることが示唆された。そのような制御された遅延タイマーは、ウニでの走化性実験から、約 0.1–0.2 s と推定され、走化性応答のちょうどいいタイミングで、下流の Ca^{2+} 応答が引き起こされると考えられる (Guerrero et al., 2010; Böhmer et al., 2005)。このような遅延時間のモデルによって、2次元の円軌道や3次元の螺旋軌道を泳いでいるウニ精子の走化性応答について説明されている (Friedrich & Julicher, 2007)。

本研究では、同様の遅れ時間のモデルを用いて Ca^{2+} 応答の前にホヤ精子の鞭毛打運動に起こる何らかの変化が検出できるか否かについて詳細に調べた。蛍光色素の Ca^{2+} 指示薬と Ca^{2+} 応答を検出するための画像取得系の応答に閾値があると仮定し、 Ca^{2+} 応答の前の鞭毛打において、任意の位相での微細な波形変化が起こると期待される。さらに低レイノルズ数条件下では鞭毛の波形の変化があれば精子頭部の遊泳軌跡に必ず何らかの変化が起こることも期待される。そこで高速ビデオ記録 (600Hz、時間分解能 1.7ms) を用いて、精子の動きの詳細な解析を行った。このときホヤ精子の鞭毛打頻度は 60Hz 以下で、その周期は 17 ms 以上であった。さらに新規に導入した精密

な解析を鞭毛波形と遊泳軌跡に対して行い、SAAF に対する Ca^{2+} 応答が閾値以下の間におこる微細な運動の変化を検出した。このような実験から SAAF 濃度勾配の正確な感知点がどこにあるかと推測した。

結果と考察

化学誘引物質源に対する精子の相対位置の定義

光学顕微鏡下のチェンバーでの観察では、ホヤ精子はほぼ一定の半径と遊泳速度で、遊泳することが多い。本研究では、遊泳精子の頭部の位置を表わす方法として、XY座標の代わりに、Fig.1に示すように角度(θ)を用いた。まずはじめに、遊泳軌道の上で化学誘引物質であるSAAFの放出源に最も近い位置を定義する。この位置、および精子がその地点を通過する時間を、それぞれ $\theta=\theta_0$ ($\theta_0=0$)、 $t=T_0$ とする。次に、精子は、 $\theta=\theta_0$ の点を通過した後、以下の3種類の過程を順番に経験するものと仮定する。最初に起こるイベントは、化学走化性物質の受容で、濃度勾配を $\theta=\theta_s$ の位置、 $t=T_s$ の時間に感知するものと仮定する。この段階は、精子は化学的な信号を受容したばかりであって次の応答は何も始まっていないので、鞭毛打波形も特に何も変化しないと考えられる。二番目は、 T_s のあとの一定時間後に、SAAFの受容により引き起こされる最初の機械的応答が鞭毛波形と頭部軌跡に現れるものと考え、その地点を $\theta=\theta_R$ 、時間を $t=T_R$ とする。上での述べたように、 T_s と T_R の間では、精子内部では走化性応答の信号伝達反応がすでに開始されていると考えられるが、鞭毛波形上は、全く変化の見られない期間、反応潜時である。第三番目のイベントとしての Ca^{2+} 応答が観察される時点 $\theta=\theta_C$ 、 $t=T_C$ とした。

次に、以下のような作業仮説を導入する。これは後述する精子遊泳の角速度と位置(θ_R 、または θ_C)との間の線形関係を解釈するためのものである。顕微鏡観察から、ホヤ精子の遊泳速度は、機械的応答が開始される前($T_0 < t < T_R$)は、ほぼ一定であることが確認でき、時間 t と θ の間には、線形の相関関係があり、その実験データの回帰直線を得ることができる(Fig.2)。この解析から、遊泳速度に相当する遊泳角速度(ω [rad/s])は、回帰直線の傾きから個々の精子について直接計算できる。遊泳速度、軌道半径、角速度は、精子ごとに個体差による統計的バラツキがあると考えられる。そこで、このバラツキを利用してから、次のような作業仮説に基づき、正確な θ_s の値を統計的に求めることができると期待した。

<作業仮説>

- i) 感知点、 θ_s 、は SAAF 源に対して相対的に固定されている
- ii) 機械的応答の遅れ時間 T_R-T_S はすべての精子で一定である
- iii) Ca^{2+} 応答の遅れ時間、 T_C-T_S 、はすべての精子で一定である

この仮説は、また θ_R 、 θ_C 、 T_0 のようなパラメータにも統計的バラツキが存在することを示唆する (Fig.2) が、これは個々の精子の遊泳速度のバラツキに由来する。

T_R-T_S と θ_s を求めるためにも、精子遊泳速度の統計的バラツキを利用した。機械的な反応の起こる T_R の時点では、より速い遊泳速度の精子は一定の遅れ時間 (T_R-T_S) の間に、より遠い地点まで到達するであろう。遅いものは、その逆である。よって、その関係は次の式で表現できる。

$$\theta_R = (T_R - T_S) \cdot \omega + \theta_s. \quad (1)$$

この ω と θ_R の関係をあらわす回帰直線の傾きと y 切片を計算することで、 T_R-T_S と θ_s を求めることができる。同様にして、次の式から θ_s と T_C-T_S を求めることができるであろう。

$$T_C - T_0 = \theta_s / \omega + T_C - T_S \quad (2)$$

この $1/\omega$ と T_C-T_0 の関係をあらわす回帰直線の傾きと y 切片を計算することで T_C-T_S と θ_s を求めることができる。

以上の遊泳速度のバラツキを統計的に解析するとき、 θ_R をいかに正確に求めるかが非常に重要である。そこで、2つの独立な新方法で θ_R を求めることにした。1つは精子の頭部の移動軌跡のずれからの抽出方法、もう一つは、遊泳鞭毛波形の差異検出方法である。

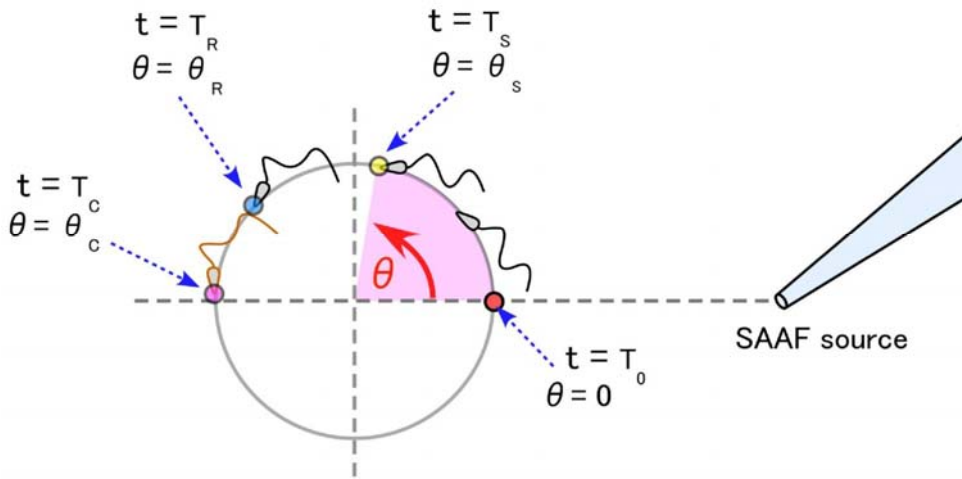
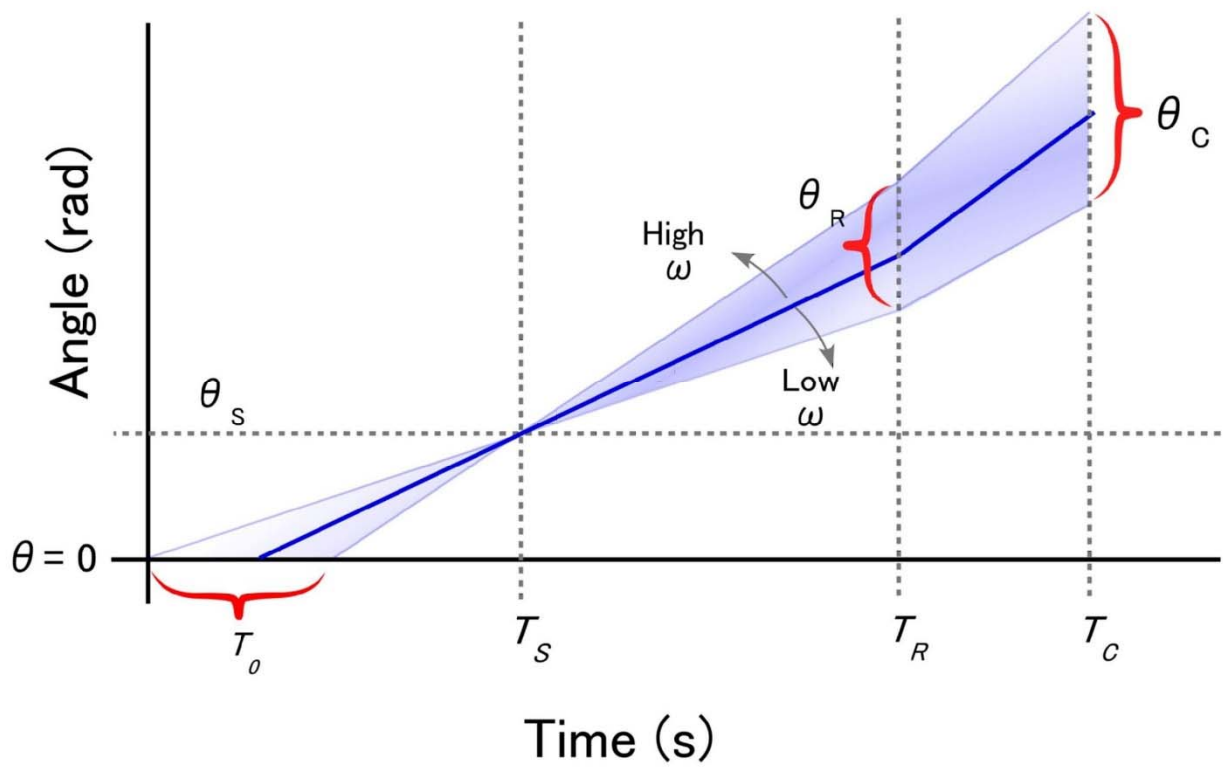


Fig. 1

角度 (θ) と時間 (T) の定義を示した図。

T_0 、 $\theta=0$ は SAAF 源から最も近い位置を表す。 T_s 、 θ_s は精子が SAAF 濃度勾配を感知して、走化性信号伝達の一連の反応が開始する位置を表す。 T_R 、 θ_R は鞭毛打に初めて機械的応答が現れる位置を表す。 T_c 、 θ_c は Ca^{2+} 応答が観察される位置を表す。



Fig, 2

作業仮説を表す図。記号の定義は Fig.1 と同じ。

精子の頭部遊泳軌跡の解析による応答時間 T_R の決定

はじめに、走化性物質である SAAF の濃度勾配がないときの定常状態 (“resting state”と呼ぶ) の精子頭部遊泳軌跡を解析した。Resting 状態ではホヤ精子は一定の円軌道を泳ぎ、ほぼ同じ軌跡で旋回する。Fig.3 に示すように 600 fps で撮影した画像から、精子頭部の移動軌跡は、大きい円軌道と小さい楕円軌道を重ね合わせた経験式で近似できることがわかった。この小さい楕円軌道は、鞭毛打 (<60 Hz) と同期した微小振幅の回転運動と見なすことができたので、その頭部遊泳軌跡を次の経験式で近似した。

$$P(t) = c + r_1 \exp(\omega t \cdot j) + F_p(\omega_0 t, r_x, r_y) \times \exp(\omega t \cdot j + q) \quad (3)$$

ここで、 $P(t)$ は複素数座標で表した頭部の座標、 j は虚数単位 ($j^2 = -1$)、 ω は大きな旋回円軌道の角速度、 ω_0 は小さい頭部の振動楕円軌道の角速度 ($2\pi\omega_0$ 鞭毛打頻度と同じ)、 F_p は $r_x \cos(\omega_0 t) + j \cdot r_y \sin(\omega_0 t)$ で定義される周期関数、 c と q は定数、 r_x と r_y は楕円の長軸と短軸半径をそれぞれあらわす。

式(3)の近似式と、実測した頭部遊泳軌跡の最終的な残差を二次元平面上にプロットすると、Fig.3f に示すようにほぼランダムなガウス分布となった。このことは測定された頭部遊泳軌跡が、系統的な偏りなく経験式(3)で近似できることを示している。

この最終的な残差ノイズは、標準偏差で $0.50 \mu\text{m}$ の大きさであった。このノイズは、後述する議論より、ホヤ精子頭部のブラウン運動に由来するゆらぎではなく、解析ソフト (Bohboh Soft, Tokyo, Japan) による精子頭部の輝度重心の計算精度に由来するものであることが推測された。この精度は、もとの画像の画素の大きさ ($0.73 \mu\text{m}/\text{pixel}$) とほぼ同程度である。本研究ではホヤ精子の頭部の位置は画素の大きさの精度で決まると考えられる。

この精度は、次のようにブラウン運動の大きさを見積もることで合理的に説明できると考えられる。まず、精子の頭部の大きさと鞭毛の長さをそれぞれ約 $3 \mu\text{m}$ と $50 \mu\text{m}$ 、拡散係数を $0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ として、ブラウン運動の大きさを見積もると、撮影のフレーム間隔の $1/600 \text{ s}$ で $0.05 \mu\text{m}$ 程度の小さなものとなる。乱流や対流、他の精子との衝突など、外力が加わらない限りは、ホヤ精子は、

この距離以上の距離を変位する可能性は非常に少ない。さらに重要なことは、理想的な画像記録条件が達成できれば、理論的には、 $0.05\ \mu\text{m}$ もの高い精度で、頭部遊泳軌跡の resting 状態からのずれを、 $1/600\ \text{s}$ の時間分解能で検出できることを意味している。

上記の経験式(3)を用いて、精子の遊泳パターンに最初に変化が現れる点 (θ_R 、および T_R) を決定した。そのために以下のように、測定された頭部の位置と、経験式(3)から予測される頭部の位置を比較した。位置比較を行う場合、まず、経験式で遊泳履歴から予測される位置と、実測される頭部位置の残差を計算した (Fig. 4a, b)。続いて、これらの残差の平方和が、定常的な遊泳軌跡から得られる測定誤差から定義されるノイズ幅を求めた。その後、前者の残差が、後者のノイズ幅 (臨界値) を最初に越える点を抽出し (Fig. 4c、Material & Methods 参照)、この点を、頭部遊泳軌跡が resting 状態から逸脱し始めた時点、すなわち、鞭毛打に最初に検出可能な何らかの変化が出現した時点 (T_R) であると定義した。

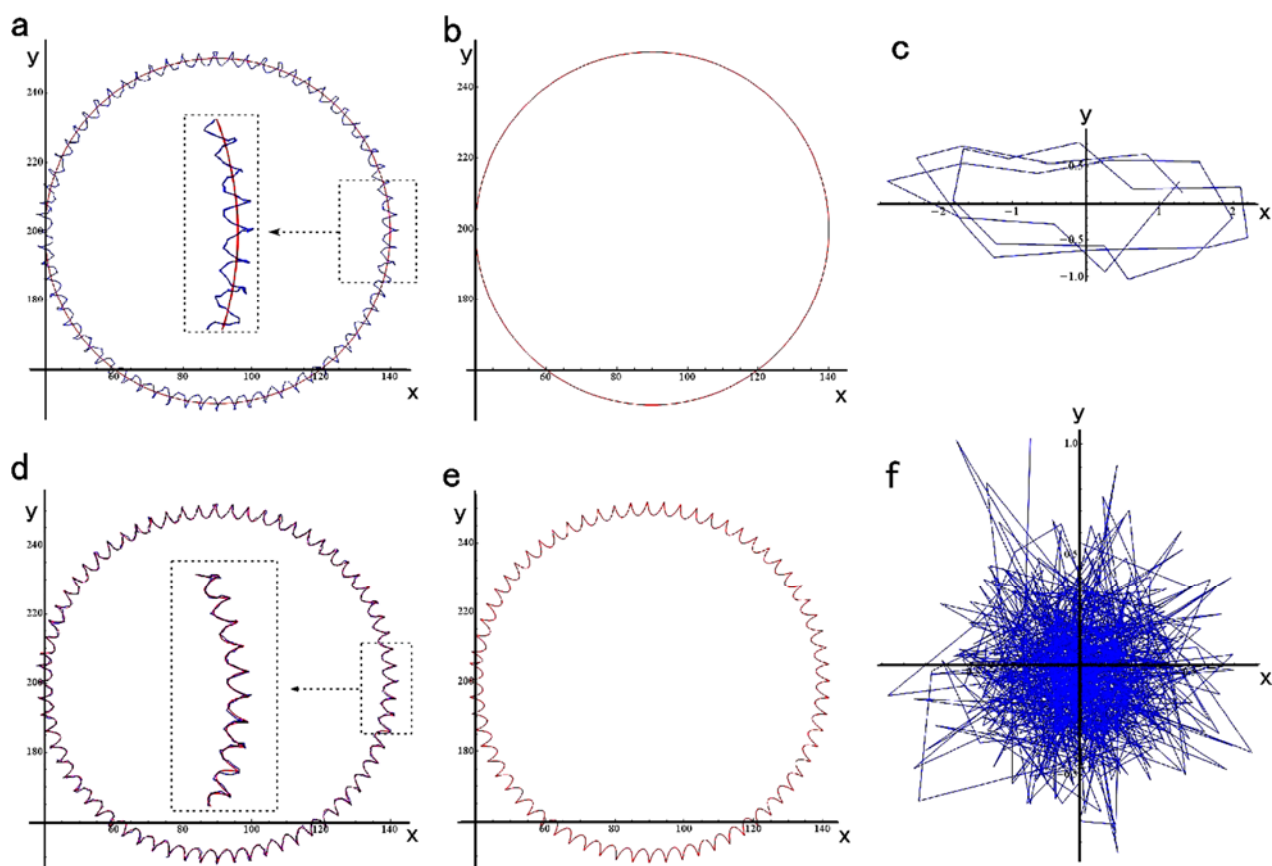


Fig. 3

頭部遊泳軌跡の経験式による近似。a, b: 測定された精子頭部遊泳軌跡（青い曲線）を円軌道（赤い曲線、 $c + r_1 \exp(\omega t \cdot j)$ ）で近似したときの例。c: 近似曲線間の残差、すなわち、測定値と推定値の差（鞭毛打3周期分）を二次元座標上で表示したもの。楕円軌道成分が残っている。d, e: 測定された精子頭部遊泳軌跡（青い曲線）を、円軌道と楕円軌道を重ね合わせた経験式（赤い曲線、 $c + r_1 \exp(\omega t \cdot j) + F_p(\omega_0 t, r_x, r_y) \times \exp(\omega t \cdot j + q)$ ）で近似したときの例。f: 最終的な残差。系統的偏りを持たないガウス分布になっている。軸の単位は μm 。

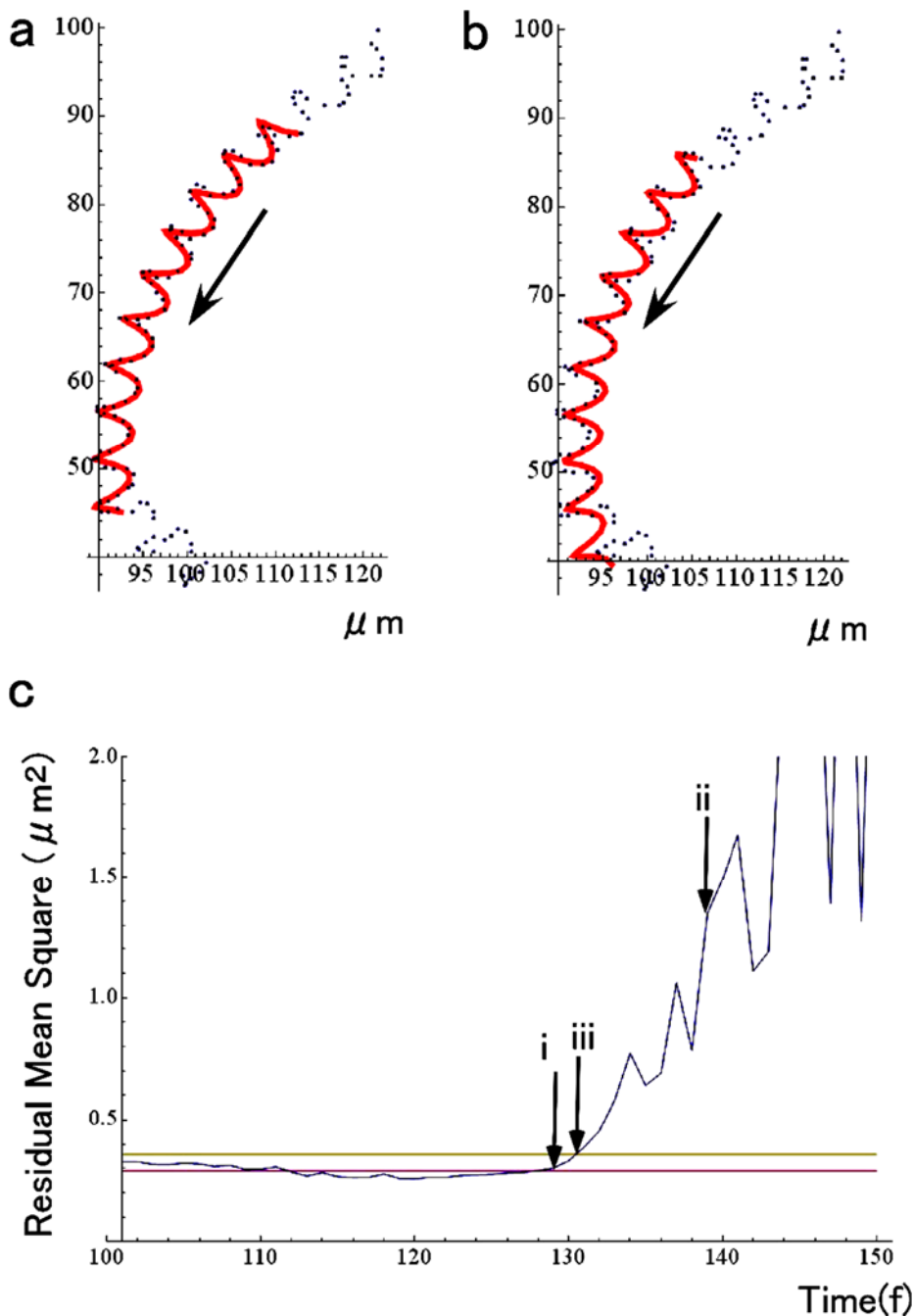


Fig. 4

頭部遊泳軌跡の解析による T_R の決定。a, b: 観察された精子頭部の遊泳軌跡（青い点）とそれを経験式 (3) で近似した曲線（赤い線）。c: 残差平方和のプロット。矢印 i が示した時間は、Fig. 4a のデータに対応している。このとき経験式 (3) と観察データの残差は、臨界値（黄色の線）以下である（材料と手法の項を参照）。矢印 ii が示した時間は、Fig. 4b のデータに対応している。このとき残差は臨界値を大きく超えている。Fig. 4c の矢印 iii は残差が初めて臨界値を超えた点をあらわす。このとき精子頭部は、経験式 (3) から予測される軌道を初めて逸脱する。この点を T_R すなわち機械的な走化性応答が現れる点であると判断した。赤い線は、最初の 120 フレームの残差平方和の平均値を表している。

新規の波形解析による応答時間 T_R の決定

本研究では、もう一つの別の手法も考案し比較することで、resting 状態からの逸脱点をより客観的に、高い精度で抽出する工夫を行った。ここでは、まず、鞭毛波形解析用のソフト (Bohboh Soft, Tokyo, Japan) を用いて、記録画像ごとに、ホヤ精子の鞭毛の各セグメントの位置座標 (絶対座標) を取得した。次に、それらの座標を鞭毛の付け根の部分が原点上に来るように移動後、鞭毛の先端が x 軸上に来るように回転させ、相対座標上に全鞭毛波形を配置させた。例を Fig. 5 に示す。

ホヤ精子が、周期的に規則的な波形を繰り返している場合、すべての波形は、一周期前の波形と酷似した波形になっている (Fig. 5 の青線)。しかし、波形に微細な変化が現れると、一周期前とは異なった波形が観察されるであろう (Fig. 5 の赤線)。この赤い線が現れる時点を T_R であると定義することにした。

波形の差異を定量的に扱うために、以下の式で定義される新規のパラメータ (wave-shape distance と呼ぶ) を導入した。

$$D(\tau_1, \tau_2) = \sum_s [P(s, \tau_1) - P(s, \tau_2)]^2. \quad (4)$$

ここで、 τ_1 と τ_2 は 2 つの画像を記録したそれぞれの時刻、 s は鞭毛に沿った基部から、各セグメントまでの距離、 P は Fig. 5 で示した各セグメントの相対座標位置である。ここで、計算される $D(\tau_1, \tau_2)$ は、2 つの時刻 τ_1 と τ_2 における、それぞれの波形の差異をあらわす量となる。

ホヤ精子鞭毛が、鞭毛打周期 bp で、一定の波形を繰り返す定常状態にある場合、すべての波形は、同じ鞭毛打位相にある他の波形と一致する。この場合 $D(\tau_1, \tau_1 + n \times bp)$ はゼロになるであろう (n は整数)。また、 $D(\tau_1, \tau_2)$ は、鞭毛打位相の差に同期して変化するであろう (Fig. 6a)。30–60 Hz (鞭毛打周期、17–33 ms) のホヤ精子の鞭毛打頻度の場合、600 fps (時間分解能、1.67 ms) で考えると $D(\tau_1, \tau_2)$ の時系列データは、鞭毛打位相で 0.31–0.42 rad 程度の分解能で、一致点を見つけることができる。

Fig. 6 に波形解析の例を示す。Fig. 6a に示すように、 $D(\tau_1, \tau_2)$ は $\tau_1 - \tau_2$ に依存して変化する。また、Fig. 6b で示すように、 τ_1 と $\tau_1 - \tau_2$ の二次元座標上で表現すると、 $D(\tau_1, \tau_2)$ が周期的に変化している様子がわかる。このようなプロットから、2つの鞭毛波形を比較すると、1.67ms という高い時間分解能で、波形変化点、 T_R を検出することができる。

本研究では、上に示した波形の相対座標の代わりに、他のパラメータも使って、鞭毛波形変化点を抽出できるか、検討も行った。座標軸ではなく、shear-angle（鞭毛の各セグメントと頭部軸間の角度で、鞭毛軸系内の微小管の相対的な滑り量に対応）、鞭毛の曲率（鞭毛軸に沿った shear-angle の変化量に相当）を使った解析を試みた結果（data not shown）、これら、二次的に得られた解析結果では計算上のノイズが発生するため、再現性や、検出能力上問題が多いことがわかった。そのため、記録画像上の座標を直接用いる上の方法を採用することに決めた。

低レイノルズ数（ホヤ精子の泳ぎの場合は、約 10^{-6} ）の流体力学的条件では、遊泳中の慣性力は無視できて、精子が能動的に発生させる力と外部の粘性抵抗力が常につき合っている。これは鞭毛波形が、わずかでも変化すると、即座に頭部遊泳軌跡も変化するということを意味する。Fig. 7 に示すように2つのまったく独立した解析方法、すなわち頭部遊泳軌跡の解析（Fig. 3, 4）と鞭毛波形の解析（Fig. 5, 6）による $T_R - T_0$ の値（遊泳軌道中の θ_0 の位置から機械的応答が起こるまでの時間）が、よく一致していることが分かった。いずれの方法を用いても、ホヤ精子鞭毛波形の変化を、記録画像の時間分解能で、客観的に抽出することに成功したが、よりバラツキが小さく時間分解能の高い wave distance 解析の結果を、今後の解析には用いることにした。

鞭毛打の振幅は対称ではなく、多くの場合、片方が他方に比べて大きい。前述したように、振幅が大きいほうの屈曲はふつう円遊泳軌跡の外側になり、これを principal-bend (p-bend)、反対側の屈曲は reverse-bend (r-bend) と呼ぶ。詳細な波形解析から、最初に機械的応答が起こるタイミングは、常に鞭毛基部での屈曲が p-もしくは r-bend 側で最大になるときに対応していることが新しく発見された。この特徴は、鞭毛内にある未解明の波形切り替え機構、つまり、新しい屈曲パターンを最初に生み出す機構がはたらくのは、常に鞭毛基部で新しい次の屈曲波が生まれるときに発生する事実を反映していると考えられる。言い換えると、ホヤ精子は、いつでも自由に鞭

毛波形を変化させることはできず、変化可能な点は、鞭毛打位相に大きく依存することになる。この点では、ホヤ精子の鞭毛波形制御機構は、化学誘引物質の濃度勾配に即座には応答できない、あるいは、0 から最大半周期分の遅れの範囲で応答する不完全さがあって、走化性という点では、完全には最適化されていないことを示唆するかもしれない。このことのもう1つの結論として、本研究で得られた T_R の値は、鞭毛打周期の半周期分（約 10 ms）のバラツキを回避できないともいえる。この誤差は精子の走化性挙動の不確定性の主な要因になるかもしれないが、その生物学的意義は不明である。少なくとも、この fuzzy 機構でも鞭毛打波形を制御しても、卵へとたどり着ける融通性があるのは事実であろう。

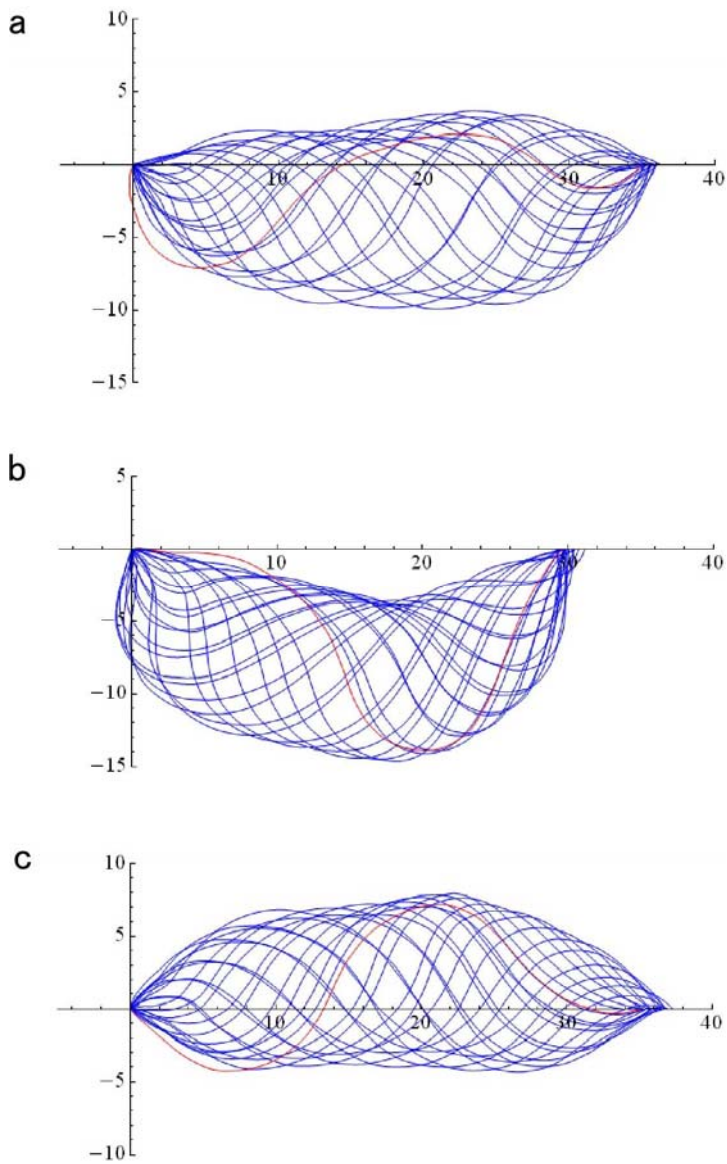


Fig. 5

波形解析の例。鞭毛の付け根の部分が、二次元座標軸上の原点に来るように平行移動し、鞭毛の先端が x 軸上に来るように回転させたところ。青い線は、定常状態で鞭毛打運動しているホヤ精子の鞭毛打 2 周期分の波形を重ねて表示したものである。赤い線は定常状態から逸脱したときの波形を示す。a, b, c は、それぞれ、resting、turnig、straight-swimming と呼ぶ 3 種類の定常状態を示す（本文参照）。軸の単位は μm 。

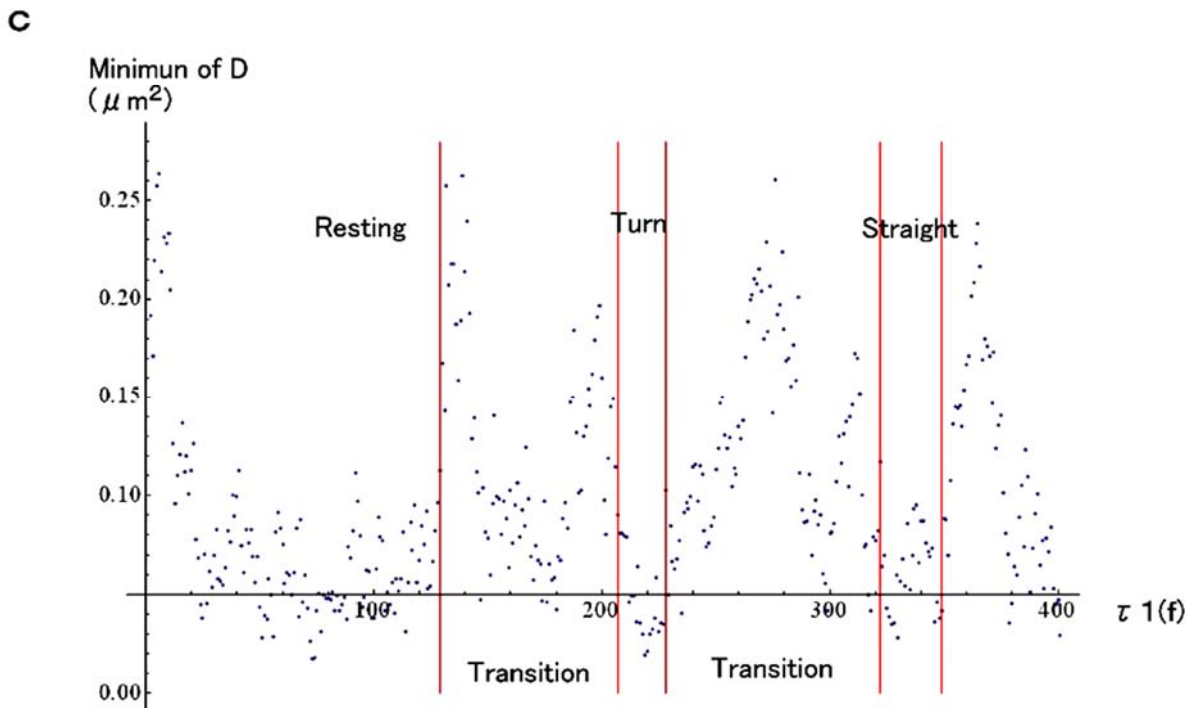
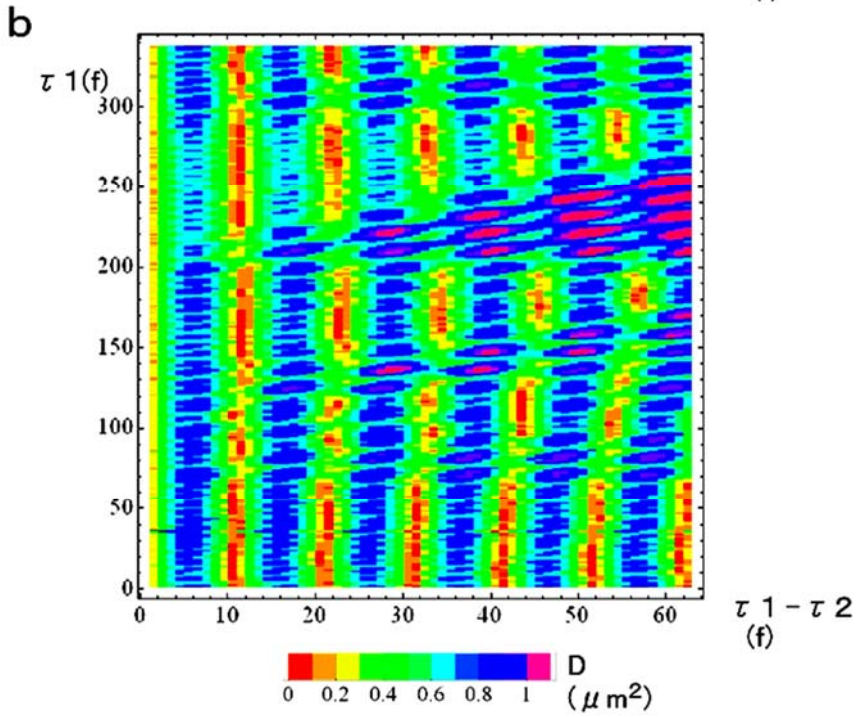
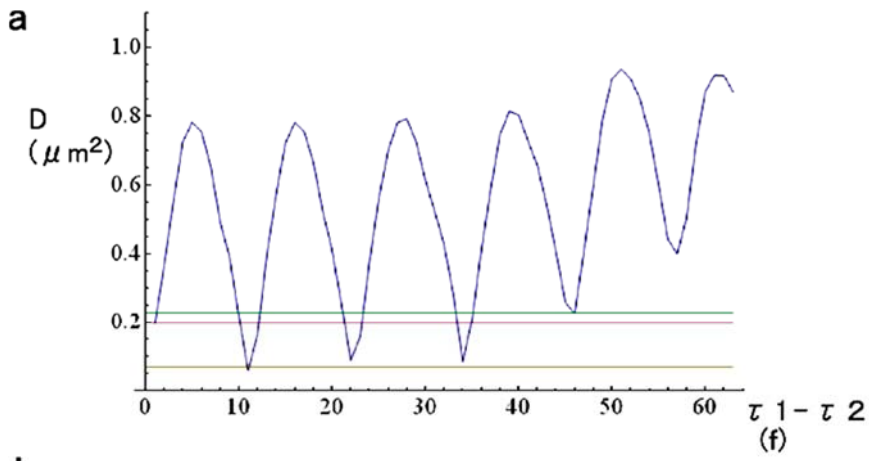


Fig. 6

波形解析による T_R の検出。a: τ_1 を固定し τ_2 を変化させた $D(\tau_1, \tau_2)$ の時系列。赤と黄色の線はそれぞれ $\tau_1 - \tau_2 = 1/600$ s のときの $D(\tau_1, \tau_2)$ と $1/600$ s の時間分解能で得られる最も近い位相の波形間の $D(\tau_1, \tau_2)$ をあらわす。緑の線は鞭毛打パターンが変化したときの $D(\tau_1, \tau_2)$ をあらわす。b: $(\tau_1, \tau_1 - \tau_2)$ 平面上で $D(\tau_1, \tau_2)$ の値を示した擬似カラー表示。c: τ_1 を固定し $\tau_1 - \tau_2$ を変化させた時の $D(\tau_1, \tau_2)$ の最小値を τ_1 に対してプロットした図。

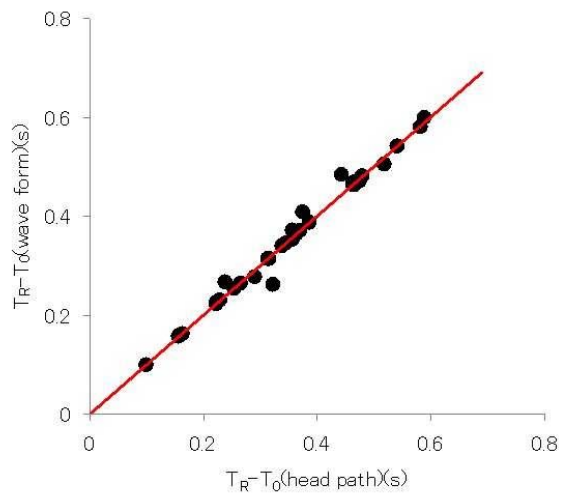


Fig. 7

2つの異なる方法で得られた $T_R - T_0$ の比較。横軸は頭部遊泳軌跡によるもの、縦軸は鞭毛波形によるものをそれぞれ表している。両者はよく一致している。(n = 33, 相関係数 = 0.992).

SAAF の刺激に対する精子の応答

SAAF 濃度勾配存在下での遊泳パターンの変化は、以前に報告されたもの (Shiba et al., 2008) とほとんど同じであることを観察できた。走化性応答を起こす過程で、ホヤ精子遊泳軌跡は、3つの異なる定常状態 (resting, turning, straight-swimming) と、それぞれの過渡期に分別できる。Resting 状態は SAAF 濃度勾配がないときに見られる遊泳パターンと同じもので、その後、他の2つの定常状態が現れる。上述の波形解析を用いることで、高い時間分解能で各定常状態の開始点と終了点を定義することができた (Fig. 6c)。また、以下に記述するようにそれらの定常状態の間に不安定な過渡期が存在することも明らかになった。

定常期と他の定常期間の過渡期では不規則な波形が混在し、定常期と比べて大きな $D(\tau_1, \tau_2)$ が観察される。この過渡期は、1つの鞭毛に2種類の屈曲パターンが混在するときに対応し、新しく鞭毛基部で生成された屈曲波が鞭毛基部から先端へと伝播し、古い屈曲波形が先端部分で徐々に消失してゆく過程に相当する。そのような不安定な過渡期は、50–80 ms から、数回の鞭毛打周期 (<4.5 beat cycles) まで続くケースがあった。過渡期の最短時間は、古い屈曲が新しい屈曲に置き換わるのに必要な時間に相当し、上の波形制御機構の考察で述べたように、鞭毛波の新しい波形が生成するのは、基部で、しかも、p-bend、r-bend の開始点でのみであり、同時に、鞭毛尾部中途にある古い波形は、途中でスイッチを切り換えるようには、変化できないことを強く示唆している。観察された過渡期を Table 1 にまとめた。以下の解析では、SAAF 濃度勾配を感知する時間 (T_S) と機械的応答が起こる時間 (T_R) を決めるために、精子の走化性遊泳の画像を注意深く解析した。

SAAF 濃度勾配があるときの典型的な精子の挙動は resting → turning → straight swimming → resting → という繰り返しであった。しかし Table 1 に示すように過渡期の長さのバラツキはけっして小さくなかった。また resting 状態が短く、頭部遊泳軌跡を経験式(3)を使ってうまく近似できない場合もあった。このようなばらつきの原因の1つは、走化性応答経路の複雑さを反映している可能性は考えられる。後で議論するように、走化性物質を感知するしくみとして、私は濃度の二

次微分値をピークに持つ時に、極大応答を示すようなキネティックモデルを例にとって考察するように、化学反応経路だけで $\pi/2$ の遅延を生み出すようなモデルを実現するには、微妙なバランスの化学反応速度定数を設定する必要がある。巡回遊泳軌跡の半周期、あるいは、それ以前から周期的に濃度変動する走化性物質によって支配されるような応用特性の場合、相当時間の長い前歴によって、その時々に応答が支配されることになる。そのため、不規則な濃度勾配の攪乱、あるいは、他の精子との物理的な衝突などの複数の事象が、折り重なって、精子鞭毛波形に影響するものと考えられる。ここでは、 T_R を決めるために、resting 状態が最短でも鞭毛打四周期以上安定して続いたデータのみを採用し、続く解析に用いることにした。

本研究では、ホヤ精子の走化性遊泳中の挙動は3つの異なる定常状態に分割することができたが、ウニ精子の走化性遊泳では、鞭毛打の非対称性が連続的に変化する現象が観察され、Friedrich と Julicher (2007) の理論的な研究では、そのような連続応答モデルが採用されている。このような遊泳挙動の差は Ca^{2+} 応答の特性からも類推されるように (Shiba et al., 2008)、ホヤ精子が化学誘引物質の感知と、その応答反応において、ウニ精子比べると、よりすばやい反応が可能になるような信号伝達経路もっていることを示唆するかもしれない。

Fig.1 に示した時間と位置の定義と Fig.2 に示した作業仮説に基づいて、まず T_R すなわち resting 状態から、はじめて機械的応答が出現するまでの時間を求め、その後、その時間に対応する位置 θ_R を計算した。 θ_R は Fig. 9a に示すように $0.5-3$ rad (1.89 ± 0.76 rad) の範囲に分布していた。Shiba et al. (2008) の研究と比較すると Ca^{2+} 応答が起こる時間 (T_C) は、 T_R より後であった。この順序の説明は次の二通り可能であろう。一つは、 Ca^{2+} 応答が検出不可能な濃度で、機械的応答よりも先に起こっているという可能性である。もう一つの可能性は、 Ca^{2+} 応答が機械的応答の下流で起こる現象である可能性である。Böhmer et al. (2008) と Guerrero et al. (2010) の精子走化性のモデルで示されるように、精子の鞭毛波形は、その時々 Ca^{2+} 濃度では直接決まらず、それ以前の濃度変化の履歴が大きく影響するのもかも知れない。Shiba et al. (2008) の研究でも、鞭毛打の非対称性は Ca^{2+} 濃度とは直接関連していないことが示されている。この問題に対する正しい答えを得るためには、さらなる研究が必要であろう。

次に、SAAF 濃度勾配を感知する点 θ_S (この点は直接観察できないが) と、そこから機械的

応答が起こるまでの遅れ時間の関係を解析した。Fig. 9a と Fig. 8a に示すように、 θ_R は統計的なバラツキを持っている。式(1)と Fig.2 の作業仮説から、Fig. 9a のように直線回帰することで、 T_R-T_S と θ_S について、それぞれ 0.18s と 0.85 rad という推定値を得た。また式(2)から、Fig. 9b のように直線回帰することで、 T_C-T_S と θ_S について、それぞれ 0.19 s と 1.3 rad という推定値を得た。Fig. 9a と Fig. 9b を比べると前者のほうのバラツキが大きいいため、後者による推定値を θ_S の真の値に近いものとして採用した。よって、精子は 1.3 rad の地点の SAAF 濃度勾配を感知して、それがきっかけとなり、約 0.18-0.19s 遅れて Ca^{2+} 応答と機械的応答を起こす、という結論を出した。

上述の解析から、 $\theta_S=1.3$ rad、 $T_R-T_S=0.18$ s、 $T_C-T_S=0.19$ s という値を得た。精子遊泳軌跡上の $\theta_S=1.3$ rad の地点は、ちょうど精子がもっとも大きな負の SAAF 濃度勾配を経験する点に相当していた。この SAAF 濃度変化を検出するための信号伝達の機構については、さらなる生化学的研究が必要であるが、現象を説明できる簡単なキネティクスのモデルを一例、Fig.10 に示す。このモデルでは最も重要な点は SAAF 濃度の変化速度を感知できる点である。これを支持する証拠、あるいは、似たケースとして、ウニ精子の鞭毛打パターンは Ca^{2+} 濃度には直接依存せず、その変化速度に依存する (Alvarez et al., 2012) という報告がある。

ウニ精子の走化性の場合 (Kashikar et al., 2012)、走化性の機構が応答するために 100-200 ms の平均化時間が必要と考えられ、その間に、精子は化学誘引物質の濃度を平均化していると想定している。しかし、これは同時に精子による勾配のサンプリングの時間分解能を制限することを意味する。このような平均化時間は、ホヤ精子でも存在している可能性がある。なぜなら、Fig. 3 に見られるように、鞭毛打による頭部位置の揺らぎに由来した化学誘引物質濃度の小さな揺らぎを経験しつつも、同時に、精子は大まかな濃度勾配を感知しなければならないためである。本研究の解析結果では、ホヤ精子が SAAF 濃度勾配を感知する点 θ_S はもっとも大きな負の濃度勾配を経験する地点であった。仮にサンプリングの平均化時間が 100 ms 程度なら、本研究の解析ではその平均化時間は、遅れ時間 (T_R-T_S や T_C-T_S) の中に含まれると解釈できるであろう。その意味で、本研究のデータは平均化時間があるという考え方とは、大きくは矛盾しない。

もうひとつの問題は SAAF 濃度勾配を感知する機構についてである。もし、精子が頭部と鞭毛中の異なる 2 点で濃度の差を感知するようにデザインされていれば、いつでも、精子の向きが

ちょうど濃度勾配と方向と一致すれば、効率よく濃度勾配に応答することができるであろう。そこで、測定された T_s (SAAF を感知する時間) と、その時の精子の向きがどのような相関を持つか調べた (Fig. 11)。しかし、それらの間には特に相関は見られず、精子は鞭毛波形や細胞の向きに関係なく SAAF 濃度勾配を感知できると結論した。すなわち、精子上の異なる 2 点間で濃度勾配を検出するようなセンサーモデルは成り立ちそうにない。代わりに、ウニ精子では、二重パルス実験の結果 (Kashikar et al., 2012) から、化学誘引物質濃度勾配を、時間的に感知するモデルが提唱されている。なお、ウニでは化学誘引物質の受容体は鞭毛に局在していることがわかっているが (Cardullo et al., 1994)、ホヤの場合、SAAF の受容体の局在は、まだ明らかになっていない。

Table 1 走化性応答時の過渡期の長さ

観察された過渡期 の種類	過渡期の長さ		
	周期範囲	平均周期	平均時間 [ms]
Resting → Turning	0.5 - 4.5	2.0 ± 1.6	33 ± 27 (n=30)
Turning → Straight (Turning 期を含む)	3 - 14	5.8 ± 2.6	97 ± 43 (n=21)
From straight to resting (Straight 期を含む)	7 - 19	11.3 ± 3.1	188 ± 52 (n=20)

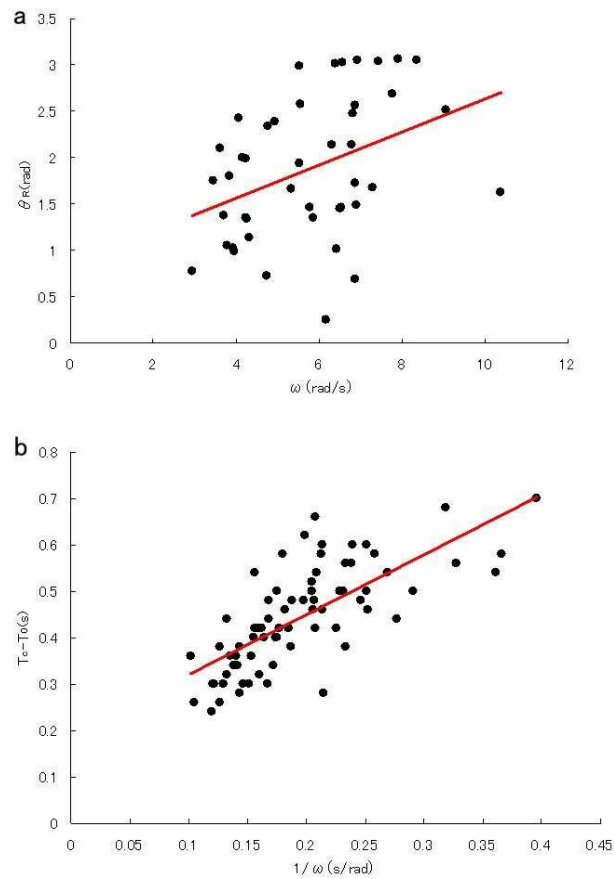


Fig. 8

走化性応答の作業仮説に基づいた θ_s の解析。a: θ_R と ω (精子遊泳の角速度) の相関を示す図。式(1)に基づいて遅れ時間 ($T_R - T_S = 0.18$ s) , と感知点 ($\theta_s = 0.85$) が、回帰直線の傾きと y 切片から、それぞれ求められた (n=44、相関係数=0.388) 。 b: $T_C - T_0$ と $1/\omega$ の相関を示す図。式(2)に基づいて感知点 ($\theta_s = 1.3$ rad) と遅れ時間 ($T_C - T_S = 0.19$ s) が、回帰直線の傾きと y 切片からそれぞれ求められた (n=72、相関係数=0.727) 。

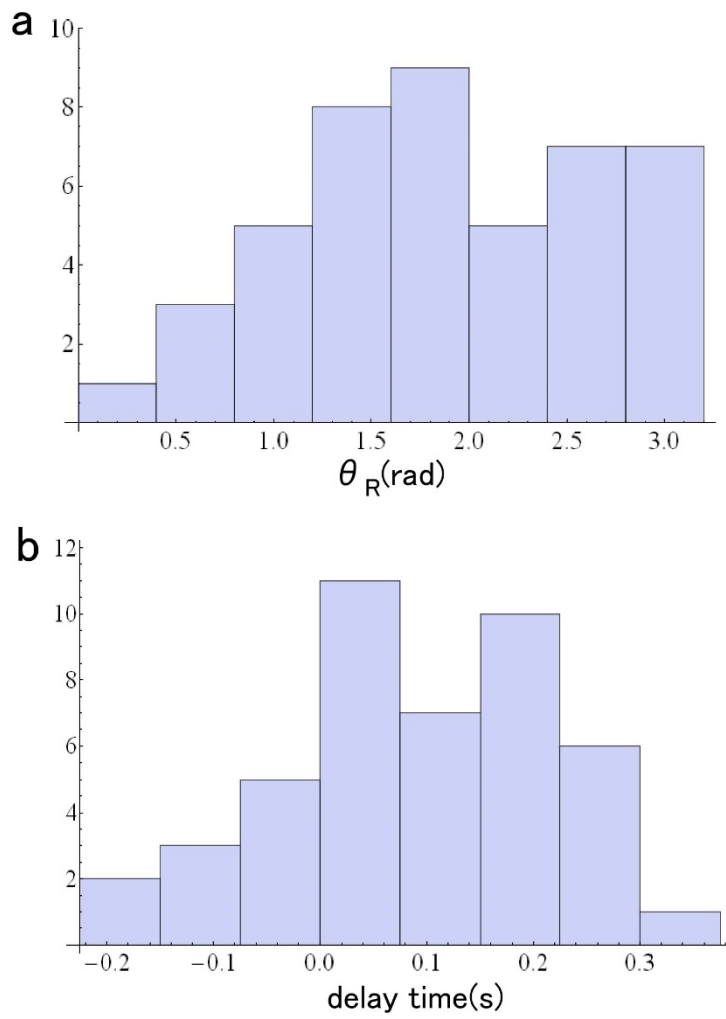


Fig. 9

応答点 (θ_R) と遅れ時間 (T_R-T_S) の分布を示すヒストグラム。a: θ_R のヒストグラム。 1.89 ± 0.76 rad。 b: 推定された T_R-T_S のヒストグラム (平均遅延時間、 0.093 ± 0.127 s) 。

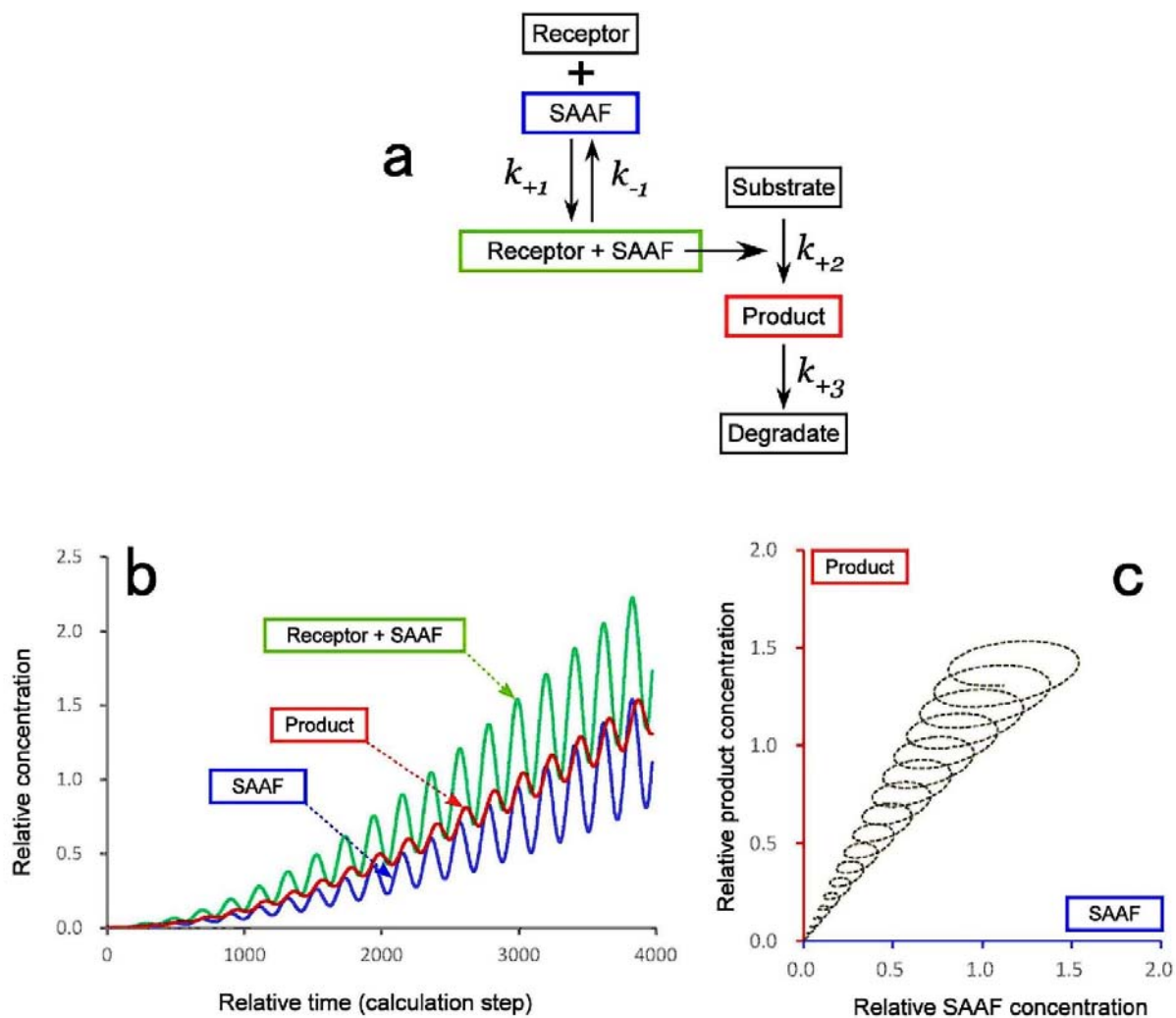


Fig. 10

走化性応答を説明する信号伝達系の反応速度論的モデル。a: 簡略化されたキネティクスモデル。受容体は SAAF によって活性化され、下流の化学反応 (k_{+2}) を促進する。そしてその反応がセカンドメッセンジャー (Product) を生成する。b: SAAF 濃度をサイン波で変化させたときの product の時系列をシミュレートしたもの。計算に用いたパラメータは k_{+1}/k_{-1} , k_{+2}/k_{+3} , substrate 濃度, receptor 濃度でそれぞれ 0.25, 10, 1, 16 とした。このモデルは、最小の仮のパラメータセットからなるが、 $\pi/2$ (1.6 rad) の遅れを持つ走化性応答をよく再現できている。c: SAAF と product の濃度の相関を示す図。遅れ時間が広い範囲の SAAF 濃度で一定に保たれている。

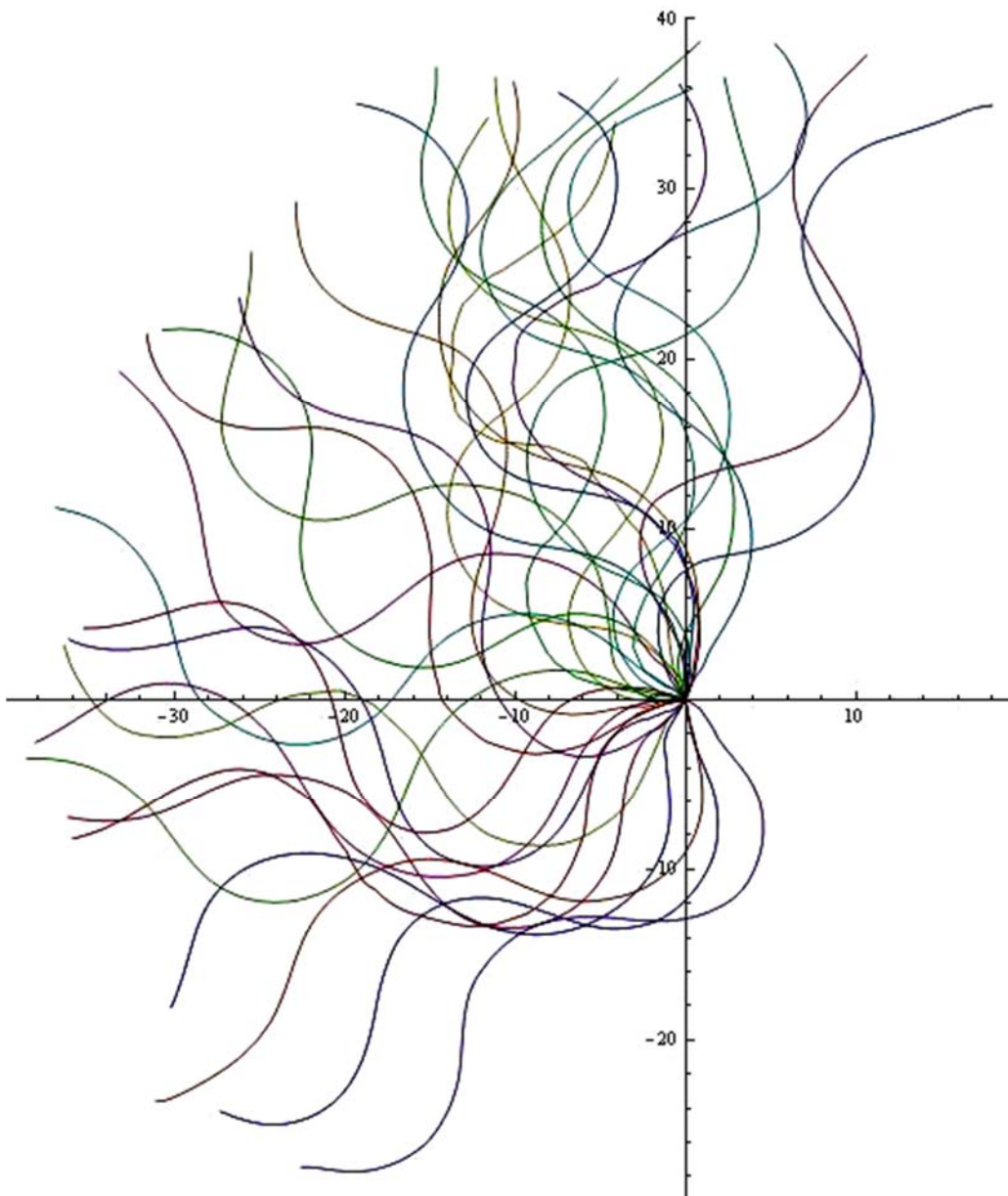


Fig.11

感知点 θ_s における精子の向きを示す図。得られた波形データをすべて重ねて表示した。X 軸-の向き（左側）に SAAF の放出源がある。

Constant delay model による走化性応答のシミュレーション

上記解析で分かったことは、SAAF の濃度勾配の中を泳ぐホヤ精子は resting 状態にあるとき $\theta_s = 1.3$ rad の位置で濃度勾配を感知し、そこから 0.18 s 後に機械的応答を示し、さらにその後 Ca^{2+} 応答を示し、その後ほぼ一定の長さの turning 状態と straight-swimming 状態を経て、もとの resting 状態に戻るということである。この繰り返しによって精子の遊泳軌道は卵に近づいていく。この”constant delay model”の効率を定量的に評価するため、Mathematica (ver.8, Wolfram Research)を用いて精子の遊泳軌跡のモデル計算を行った。

遊泳軌跡の計算では Fig.13 に示すように3つ定常状態 (resting, turning, straight-swimming) のみを記述し、その間の過渡期は省略した。機械的応答を起こす時間(T_R)のゆらぎの影響を評価するために Fig.13a では実測したゆらぎの大きさ(Fig.9b)に相当するランダムノイズを乱数を使って計算に組み込んだ。Fig.13b は比較のため、ノイズのない条件の計算結果を示している。走化性応答の結果を示すために、まず走化性効率を示すベクトル a を定義した (Fig.12a)。このベクトルは 2 つの独立なパラメータ ($|a|$ と Φ_a) からなり、 θ_s 、 $T_R - T_S$ 、および定常状態 (turning, straight-swimming) と過渡期の期間に依存して変化する。

もともと走化性効率がよいのはベクトル a が卵の中心を向いている場合である。ベクトル a に基づいて精子の大域的挙動を4つ場合に分類できる (Fig.12b)。Case 1 は $\cos\Phi_a < 0$ の条件に対応し、 $T_R - T_S > 0.35$ s や resting 状態の遊泳速度が速すぎる条件で実現される。この場合精子は卵から遠ざかっていく (Fig. 12d)。Case 2 は $|a|/\cos\Phi_a > 2R$ の条件に対応し、精子は卵に近づくものの最終的には卵から一定の距離の円軌道上にとどまる (Fig.12e)。Case 3 と 4 は $|a|/\cos\Phi_a < 2R$ の条件に対応し、精子は卵に到達できる (Fig.12f,g)。

Fig. 12c に実測のベクトル a を示す。ホヤ精子はバラツキはあるもののほとんどすべてのベクトル a が Case 3 の領域に収まった。走化性遊泳の過程で、ベクトル a が Case 3 に常に収まっていたとしてもゆらぎがあればその大域的挙動は複雑なものになるため、その挙動を計算して確かめる必要がある。Fig.13 に示すようにゆらぎの影響は少なく卵に到達できていることが分かった。Fig.13a と同様の計算を 100 回ほど

試みたが、いずれも 20 s 以内に卵に到達できた。

Fig.12b の Case 3 と 4 の中でもっとも効率がよいのはベクトル a が $\Phi_a = 0$ の条件を満たすときである。しかし、理由は不明であるが実際に観察されるものは Φ_a が $\pi/4$ ほどずれた Case 3 のほうを向いている。 $\Phi_a = 0$ の条件は遅れ時間 ($T_R - T_S$) を 0 としたときに実現される。このことから環境の遥動 (低温による遊泳速度の低下、海水の粘度の増加、海水の流れなど) に対するロバストネスを確保するように設計されていると考えることもできる。またこの問題の答えを出すには Corkidi et al. (2008) で示されたような 3 次元での精子の挙動を考慮する必要があるかもしれない。

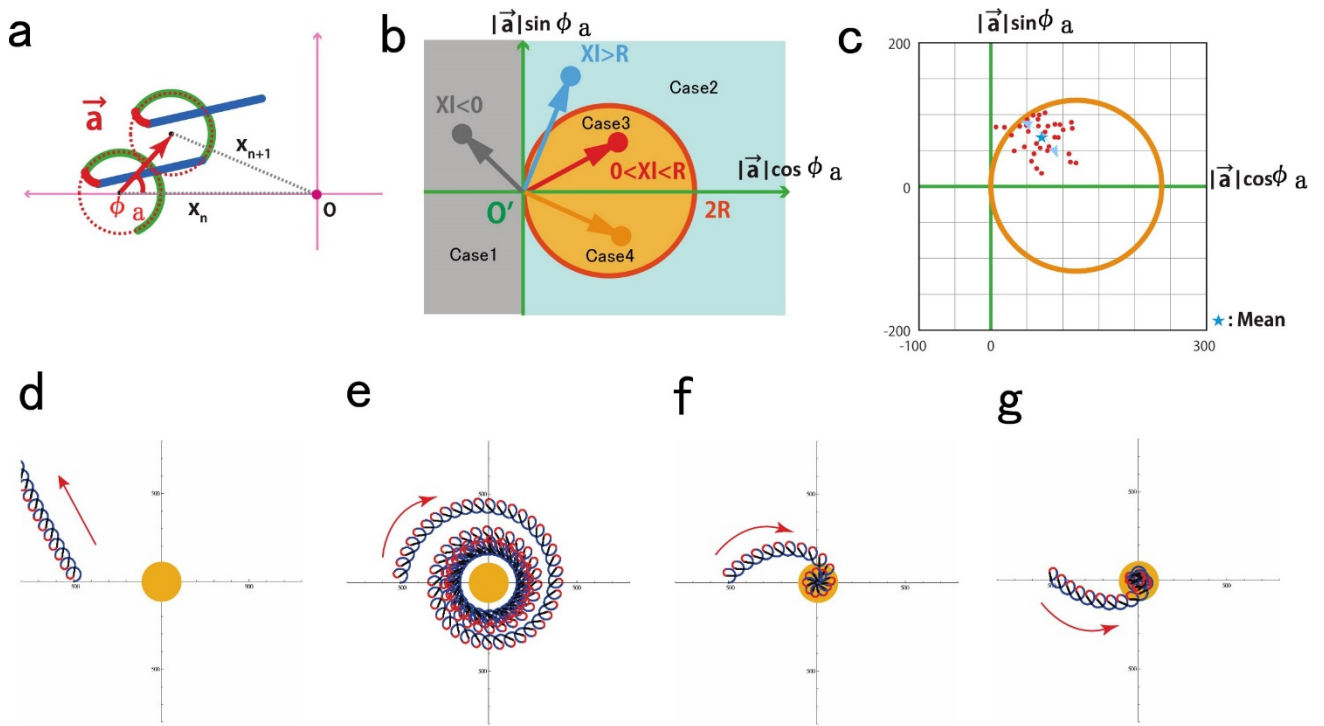


Fig.12

走化性効率の計算。 a: 走化性ベクトル(a , 赤矢印)の定義。N番目の resting 状態の円軌道の中心(X_n)から $n+1$ 番目のそれ(X_{n+1})へ向かうベクトルとして定義される。座標の原点は卵の中心を表す。 Φ_n は a と x 軸のなす角を表す。 b: ベクトル a に基づいて走化性効率を分類する図。 c: 実際に測定したベクトル a を示す図。軸の単位は μm 。 d-g: Cases 1-4 について精子の大域的挙動を示した図。中心の黄色い円は直径 $120\text{-}\mu\text{m}$ の卵を表す。

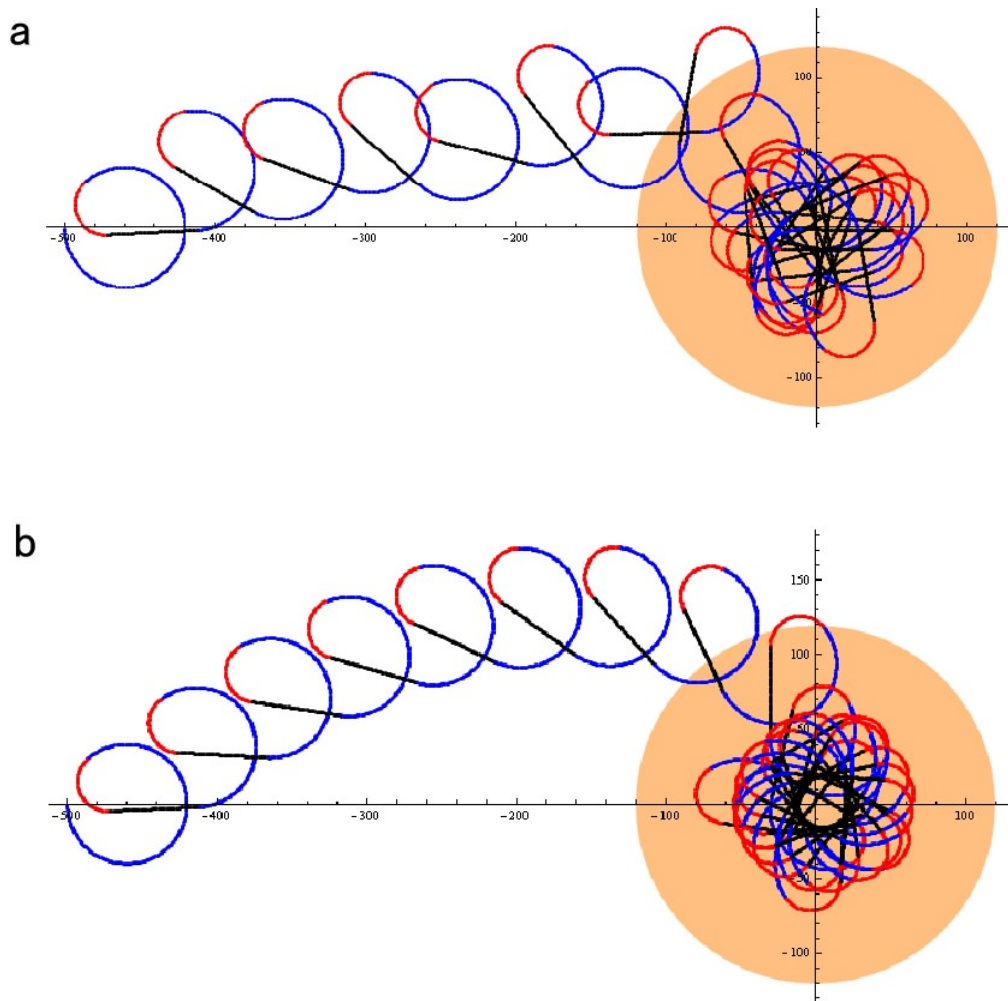


Fig. 13

走化性条件下でのホヤ精子の遊泳軌跡のシミュレーション。青線、赤線、黒線はそれぞれ resting, turning, straight swimming の状態の遊泳軌跡を表す。オレンジの円は卵を表す。a: $\theta_s = \pi/2$ かつ $T_R - T_S = 0.093 \text{ s} \pm 0.127 \text{ s}$ の条件でのシミュレーション。b: $\theta_s = \pi/2$ かつ $T_R - T_S = 0.093 \text{ s}$ の条件でのシミュレーション。軸の単位は μm 。

結論

本研究では、ホヤ精子の遊泳の 600 fps での撮影と鞭毛打パターンの変化を精密に検出する方法によって、機械的応答が初めて起こる時間 (T_R) を決定した。この T_R をさらに統計的に解析することで SAAF 濃度勾配の感知点 (θ_s) と一定の遅れ時間 ($T_R - T_S$) をそれぞれ 1.3rad, 0.18s と推定した。これによって、精子が誘引物質濃度の時間的変化を微分値で感知しその後一定時間の遅れがあつて鞭毛打パターンを変化させるという結論を出した。遅れ時間のモデルはすでに Bohmer et al. (2005) と Guerrero et al. (2010) によって提唱されているが、高い時間分解能で実際の遊泳パターンの測定から感知点と遅れ時間を求めたのは初めてである。さらにシミュレーションによって精子の走化性の効率を評価できた。

材料と手法

材料

ホヤ(*C. intestinalis*)は油壺港(Kanagawa, Japan)で収集し、使用するまで一定の光条件で飼育した。精子は”sperm ducts”から取り出し氷の上で使用まで保存した。精子の運動性は人工海水中(462 mM NaCl, 9 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 48 mM MgCl₂, and 10 mM HEPES–NaOH (pH 8.2).)で観察した。SAAFは合成したものを使った(Oishi et al., 2003, 2004)。

遊泳軌跡と鞭毛波形の解析

集めた精子は 1 mM theophylline (Sigma)を含んだ人工海水で 100000 倍に希釈した。theophylline は細胞内 cAMP を増加させることで精子の運動を活性化する(Yoshida et al., 1994)。観察用のチェンバーは 0.5mm の厚さのシリコンゴムとカバーガラスからなり片側が開いている。精子のガラスへの非特異的接着を防ぐためにあらかじめ 1%BSA でコートし、そこに活性化した精子を加えた。誘引物質の濃度勾配を作るために、1 μM SAAF を含んだ 1% agar 溶液をガラスマイクロピペットの先端(直径, 50–100 μm)に入れた。マイクロピペットをチェンバーに入れてから 0.5 から 3 分後、マイクロピペットの先端付近を泳いでいる精子を撮影した。静止の画像は 20 倍対物レンズ(Olympus UPlan FINH)の位相差顕微鏡(Olympus BX51)で観察した。また光源は LED のストロボ照明系を用いて 100μs の照明時間で高速 CCD カメラ(HAS-220; Ditect, Tokyo, Japan)と同期させて撮影した。精子の運動解析用ソフト(BohbohSoft, Tokyo, Japan)を用いて、精子の頭部と鞭毛の各セグメントの位置をフレームごとに追跡し、その座標を取得した。

精子頭部遊泳軌跡の経験式での近似

得られた高速ビデオ画像から Bohboh をつかって精子頭部の輝度重心の位置座標を得た。ブライトコントラストの位相差対物レンズを使ったので、得られた座標は頭部の重心に対応している。

Fig.3,4 に示すように、観察された頭部遊泳軌跡は大きな円軌道と小さなジグザグ軌道の重ね合わせたものになっている。まず遊泳軌跡を円軌道(Fig. 3b)で近似しその差を得た。次にその差のデータを軸が

回転する楕円軌道(Fig. 3c)で近似した。近似した(Fig. 3e)後に残った残差はガウス分布になっていた(Fig. 3f)。近似には基本的に最小2乗法を使ったが、大域的な最小値を自動で見つけることは難しいため、まず画像を見ながら手作業である程度近似し、そのパラメータを初期値として Mathematica (Wolfram Research)の関数 FindMinimum を用いて局所最小値を求めることで最終的な近似をした。

Wave-shape-distanceの解析

もし鞭毛打が正確に同じ波形を繰り返しているなら、式(4)で定義される wave-shape-distance(D)は同じ鞭毛打位相のところで最小値をとる。特に今回の実験における時間分解能では D について次の式が成り立つ。

$$D(\tau, \tau + \frac{1}{600}) > D(\tau, \tau + \frac{1}{1200}) > D(\tau, \tau + T_p)$$

ここで τ は波形を観察した時間、 T_p は正確な鞭毛打周期を表す。すべての τ_1, τ_2 について $D(\tau_1, \tau_2)$ を計算し、上の式が成り立つ区間を定常期と判断した。

またウニ精子の波形について 6000fps で撮影したデータを用いて D の感度が鞭毛打位相に依存して変わるかを確認した (Fig.14) ところ、そのような依存性は見られなかった。

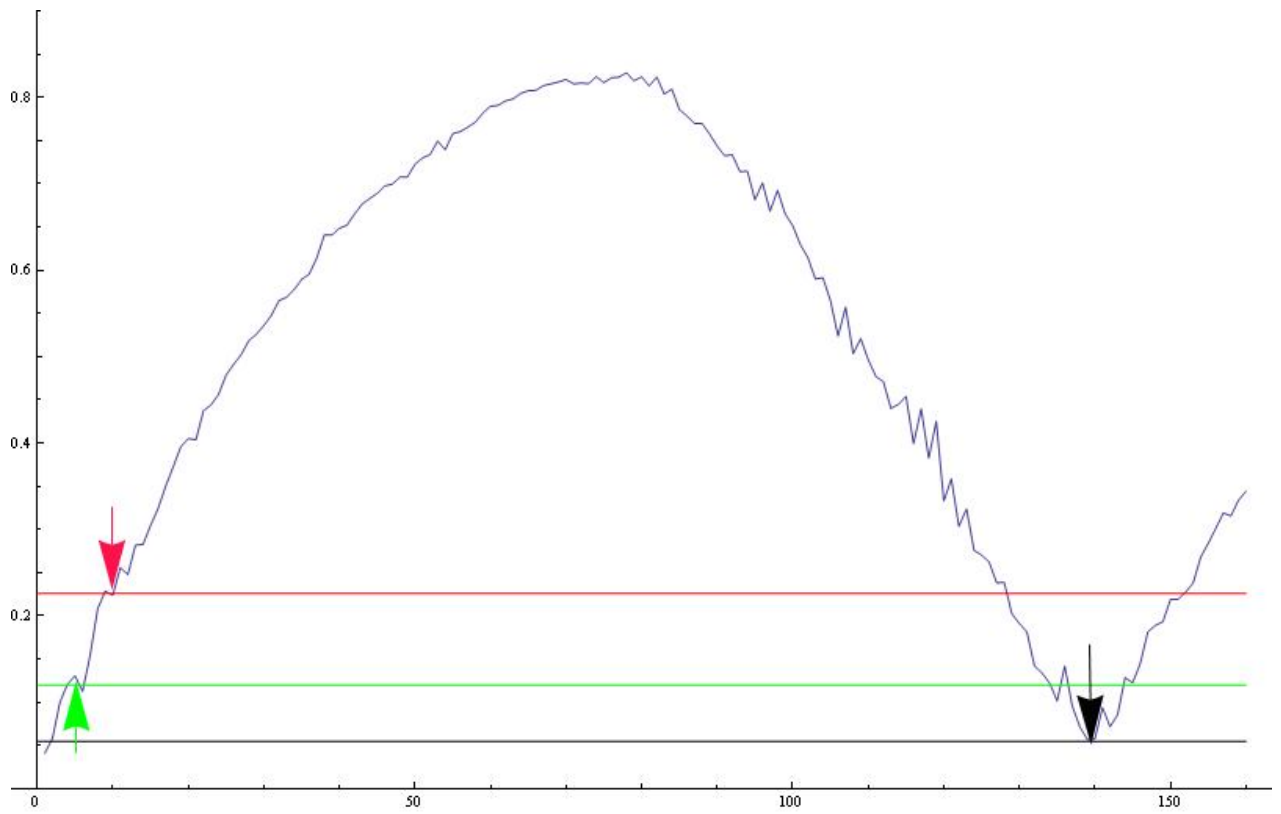


Fig.14

6000fps で観察した wave-shape-distance, D 。縦軸 $D(\tau_1, \tau_2)$ 。横軸 $\tau_1 - \tau_2$ (frame)。緑の線と矢印は $1/1200s$ の時間差分の D の値。赤の線と矢印は $1/600s$ の時間差分の D の値。黒の線と矢印は同位相の D の値。

第2部

泳いでいるウニ精子の周りの流れ

要約

多くの海洋無脊椎動物の受精では、精子が卵から放出された化学誘引物質を受容し、その濃度勾配、あるいは、動的な変化を感知することで、鞭毛打の運動パターンを変え、そこで生じた遊泳軌跡の変化によって、結果的に精子が卵に効率よく接近できるようにデザインされている。もし、精子が感知すべき化学誘引物質の濃度勾配が、精子周囲に起こっている海水の流れによって乱されると、精子はうまく走化性応答をすることができなくなると考えられる。精子の遊泳運動自体も流れを起こす原因になるので、その影響が濃度勾配を乱すほど大きいかな否か、攪乱しないように特殊な遊泳パターン制御機構を持つのか、あるいは、攪乱されても良い調節機構を持つのかは確認すべき重要な課題である。本研究では、遊泳中のウニ精子と、その周りに入れやラツテクスビーズ（半径 $0.1 \mu\text{m}$ ）を微分干渉顕微鏡で観察し、6000fps で撮影することで流れを可視化した。さらに slender body theory に基づいて、精子の遊泳軌跡から流れを計算した。その結果、流れが精子のごく近傍でしか発生しない点、つまり、みずからの遊泳行動によって周囲の化学誘引物質の濃度分布に大きな影響を与えるような擾乱^{じょうらん}はほとんど起こらないことを確認できた。

導 入

卵の分泌する走化性物質に対する効率のよい走化性応答と、卵へ向かった方向転換機構は、精子にとっては授精を成功させる上の、おそらく唯一の重要なタスクであると言えるかも知れない。多くの海洋無脊椎動物では、精子は種特異的な化学誘引物質を受容し、その濃度勾配を感知することで、鞭毛打運動パターンを変化させ、新たな遊泳軌道が卵により接近できるようにしている。たとえば、ウニ精子の走化性遊泳の場合は、その機構の詳細は調べられており (Cook et al., 1994; Ward et al., 1985; Eisenbach, 1999; Kaupp et al., 2006)、流体力学的な手法を使った遊泳動態の理論的な研究も行われている (Alvarez et al., 2014)。しかし、精子遊泳行動にとっての1つの大きなジレンマは、効率よく遊泳する、あるいは、より速く遊泳することは、反作用としての流れを生じ、周囲溶媒の大きな変位を引き起こし、それが、精子が感知すべき周囲の化学誘引物質の濃度勾配をかき乱してしまう可能性である。ウニ精子の場合、周りに起こる海水の流れによっても走化性応答は妨害される可能性もあり、その影響が、濃度勾配を乱すほど大きいかな否かは、精子走化性反応を議論する上で、確認すべき重要な課題であると考えられる。

精子のように小さな微生物の周囲で起こる流れはストークス流れと呼ばれる流れである。一般に、流れにおける慣性の影響と粘性の影響の大きさの比を表す無次元数としてレイノルズ数が使われるが、精子遊泳はそのスケールから粘性が支配的な低レイノルズ数 ($10^{-9} \sim 10^{-12}$ 程度) の現象であると言える。Navier-Stokes 流体の構成式に、低レイノルズ数条件を加味すると線形な微分方程式が得られ、これに支配されるのがストークス流れである。泳いでいる精子の周りのストークス流れを計算するための理論として slender body theory がある (Hancock, 1953; Keller & Rubinow, 1976)。その理論は鞭毛が細長いということを利用したものである。

本研究では泳いでいるウニ精子とその周りに浮かんだマイクロビーズ (半径 $0.1 \mu\text{m}$) を微分干涉顕微鏡で観察し、6,000 fps の超高速ビデオカメラを使用して撮影することで、鞭毛周囲の流れを正確に可視化できた。さらに slender body theory 基づいて、精子の遊泳軌跡から流れを計算した。その結果、流れが精子のごく近傍でしか起こらないことが確認できた。わずかな擾乱が起こ

っている系であるが、走化性応答における流れ場の攪乱効果は少なく、ウニ精子は、あらかじめ存在する化学誘引物質の濃度分布をそのまま残したまま、溶媒中を遊泳できることが強く示唆された。これは、純粹に流体力学的な議論から推論できた結論であるが、精子遊泳機構が、そのような擾乱作用を少なくするように最適化された系であるのかどうかは、詳細の運動制御機構の解明を待たなければならない。

材料と手法

ウニとマイクロビーズ

ウニは、日本近海で採取したバフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*) 使用し、オス個体の体腔内に 0.55 M KCl を注入し、放精されたものを回収して使用した。精子は、マイクロチューブ内で、冷蔵保存し、使用時に、20 mg/mL BSA (ウシ血清アルブミン) を含む自然海水に、約 1000 倍に希積分散させたものを観察試料としてもちいた。この海水中には、あらかじめ、ラテックスビーズ (半径 0.1 μm 、TransFluoSpheres Carboxylate-Modified Microspheres、T8878, Molecular Probe、以下、マイクロビーズとよぶ) を 0.002% 混入させ、鞭毛周囲の流れを可視化できるようにした。

撮影装置

観察は微分干渉顕微鏡 (Olympus BX-61, UplanSApo 60x/1.20W) で行い、キセノン照明下で 6,000 fps で撮影した。この撮影装置は、理研・脳研に設置してある顕微鏡に組み込まれたもので、CCD カメラのデータ転送を高速化する回路の組み込みによって、光学的な条件さえ整えば、100,000 fps の高速まで撮影可能な装置である (Etoh et al., 2003)。実験は、3,000 fps と 6,000 fps の両方で行い、本研究の解析には、主に 6,000 fps で記録された画像を用いた。

画像処理と解析

微分干渉顕微鏡の像は、原理的には、屈折率の差をコントラストに変えたもので、定量的な取り扱いには使えない。特に、鞭毛の中心軸座標を画像から直接抽出できないために、微分像からもとのコントラスト像 (屈折率像) を作成する必要がある。そこで、微分方向を考慮した干渉像 (Fig.15) の積分処理することで通常のコントラストの像 (明視野照明観察像に似た屈折率像) を得た (Fig.16)。次に、鞭毛波形追跡ソフト (Bohboh Soft, Tokyo, Japan) を用いて、ウニ精子の頭部と鞭毛軸、および、浮遊するマイクロビーズの座標を取得した。この画像積分処理、および、

座標値決定後の演算には Mathematica (Wolfram Research) を用いた。

流れの計算

流れの計算は Smith & Blake (2009) の方法を参考に実施した。粘度は $0.00089 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ (0.89 cPs) とし、スライドガラスの表面と精子の距離は $3\mu\text{m}$ とした。頭部は 8 面体の形状を持つ物体に近似して粘性抗力の計算を行った。

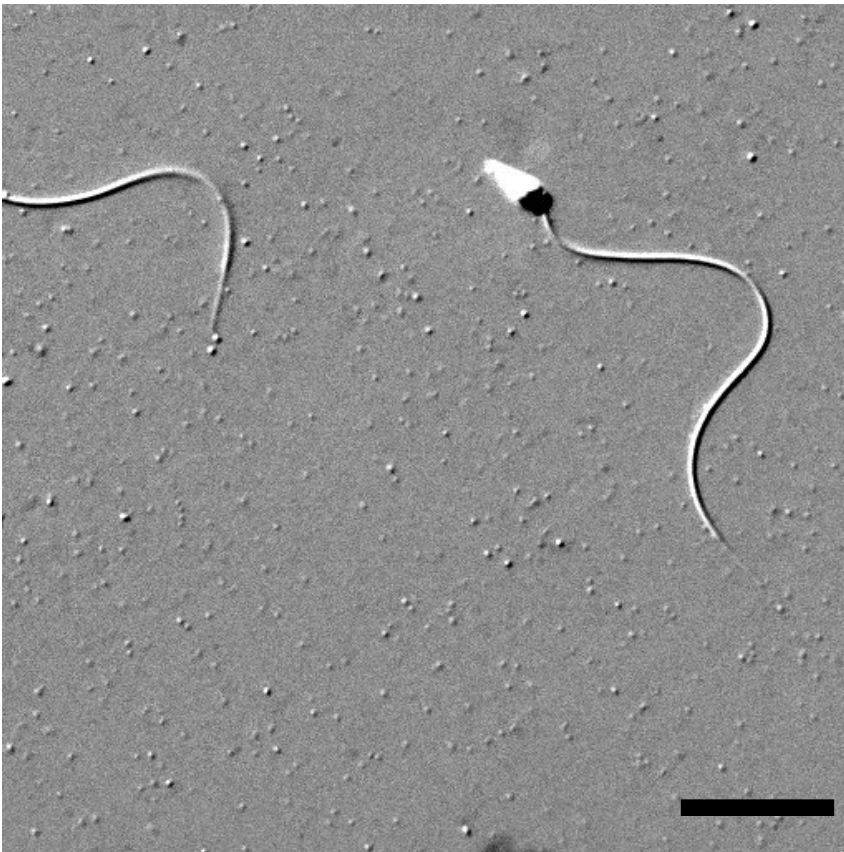


Fig.15

泳いでいる精子とその周りに漂うマイクロビーズを撮影した微分干渉像。微分干渉像の微分方向は左上から右に向かう方向である。その方向へと、陰影がついて観察されるために、画像の輝度分布から、正確な物体の位置を求めることはできない。スケールは、10 μm

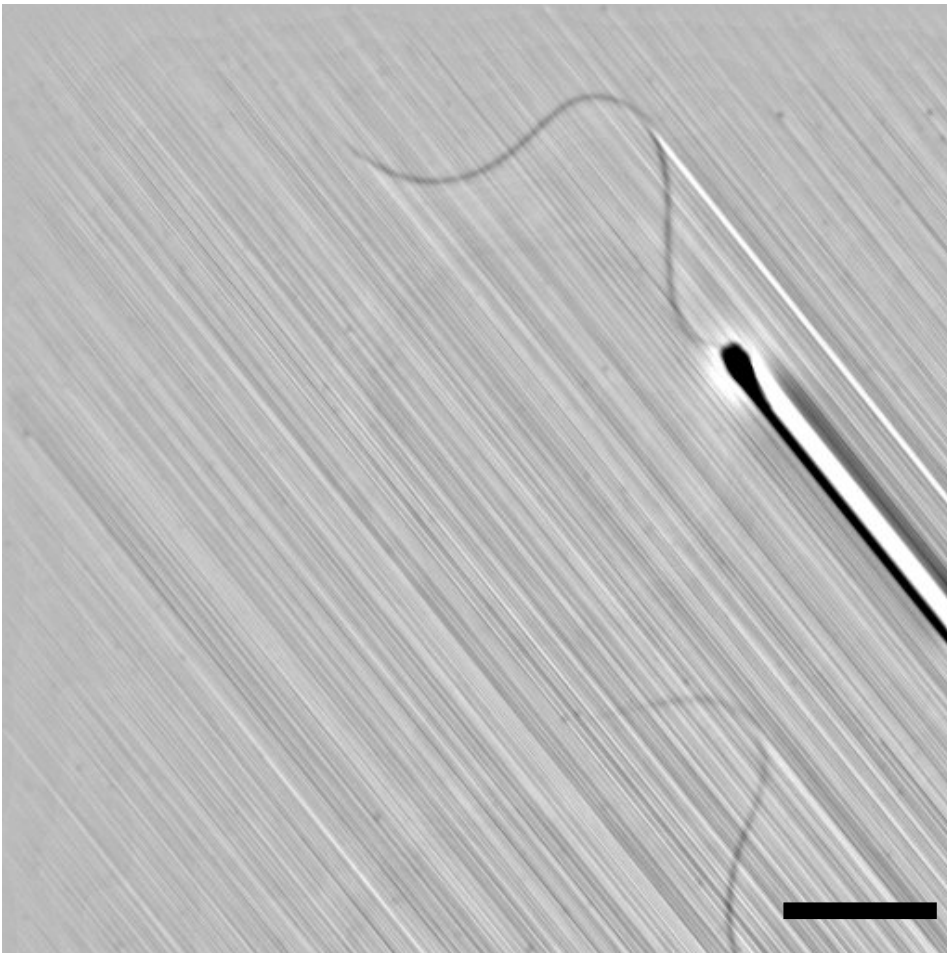


Fig.16

積分処理した画像。鞭毛位置は、暗いコントラストが付いて表示されている。この画像をもとに座標を正確に求めた。精子頭部の右下に向かう黒い影は、積分計算のエラーを示す。微分干渉顕微鏡像（8ビット画像）のコントラストが、精子頭部で飽和していることが原因で発生する計算エラーである。本研究では、この計算エラー発生箇所が、鞭毛尾部と重ならないものを選んで処理を行った。

結果と考察

精子遊泳軌跡、および、流動の平面性

遊泳中の泳いでいる精子とその周りに漂うマイクロビーズ（半径 $0.1 \mu\text{m}$ ）を撮影した微分干渉像を Fig.15 に示す。精子はスライドガラスの表面の近く、ほぼ一定の距離の平面内を遊泳し、鞭毛全長が、その物体深度内に収まる傾向が強い。今回の観察から、マイクロビーズも数秒程度の観察時間内であれば、ブラウン運動で焦点面以外へ移動することなく、同じ平面内にとどまることが確認できた。同条件下で実施した巡回遊泳中のウニ精子鞭毛と、近傍のカバーガラス面との間の距離の実測結果は、約 $3 \mu\text{m}$ でほど一定となっていることがわかった。この距離が一定に保たれる理由は、ウニ精子鞭毛打運動のわずかな 3 次元性、つまり、つぶれたラセン状の鞭毛波形のために、カバーガラス面に対して顕微鏡光軸方向へのわずかな作用力（粘性抗力や壁効果など）が発生し、この力と、精子が 3 次元ラセンを描きながらカバーガラス面に接近する力のバランスが存在するためであると推測される。この正しい結論は、本研究で進めるような正確な流体力学的な解析アプローチを進めることで、始めて導かれる可能性があるが、時間分解能を上げる顕微鏡像記録法の他に、3 次元波形の精密な記述が必要になるであろう。

今回の観察から、精子とその周りのマイクロビーズの 2 次元座標の時系列をもとに、単純化して流速を議論することで問題はないと判断した (Fig.17a)

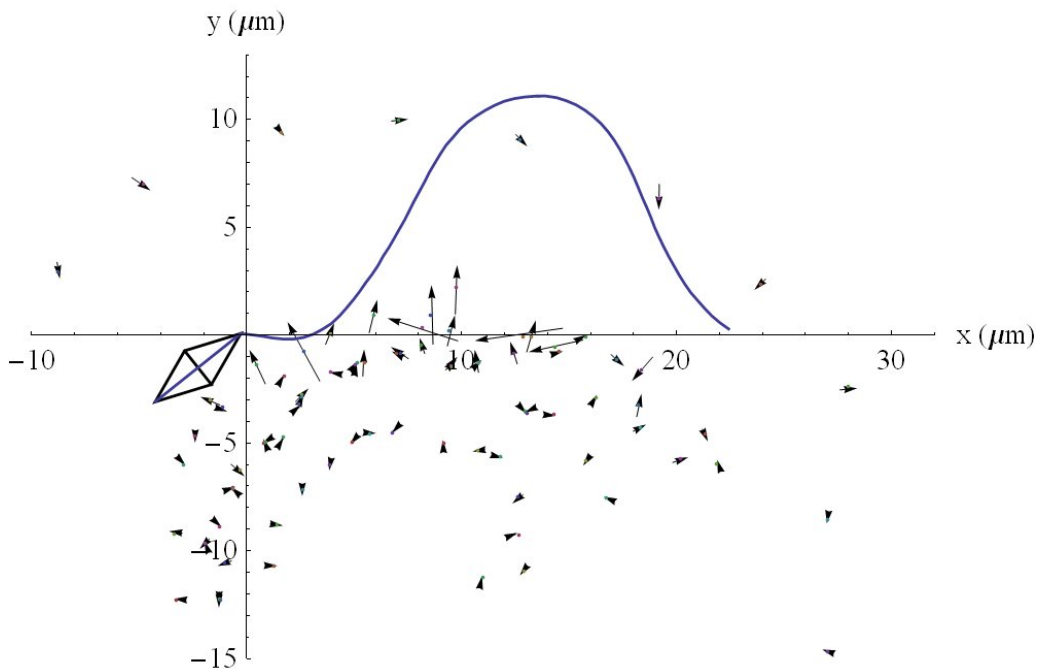
精子とマイクロビーズの距離とマイクロビーズの移動速度

流体内での物体と流れとの関係、粘性抗力を議論する上で、流れ場と物体との距離は、非常に重要なパラメータとなる。粘性抗力が、速度勾配である剪断流速（shear rate）に比例する値として定義されており、その比例定数が粘性係数である点、また、ストークス流れは、この粘性抗力によって一義的に決定されると考えられるためである。

精子とマイクロビーズとの間の距離、マイクロビーズの移動速度の大きさとの関係を Fig.17b に

示す。距離の精子のごく近傍 ($<7\mu\text{m}$) でのみ流れが起こっていることがわかった。精子の近傍のマイクロビーズでもあまり動かず、像上で鞭毛と重なっても衝突せず、すり抜ける場合もあった。これは顕微鏡の光軸方向に、わずかにずれた位置にマイクロビーズがあるためと考えられる。このことは、鞭毛の半径 (約 $0.1\mu\text{m}$)、マイクロビーズの半径 ($0.05\mu\text{m}$)、と焦点深度 ($0.1\mu\text{m}$) を考慮すると十分に起こりうる。つまり、運動中の鞭毛周辺で、焦点深度程度に離れた箇所であっても、流れを生じない場が存在することを強く示唆している。

a



b

velocity of bead ($\mu\text{m}/\text{ms}$)

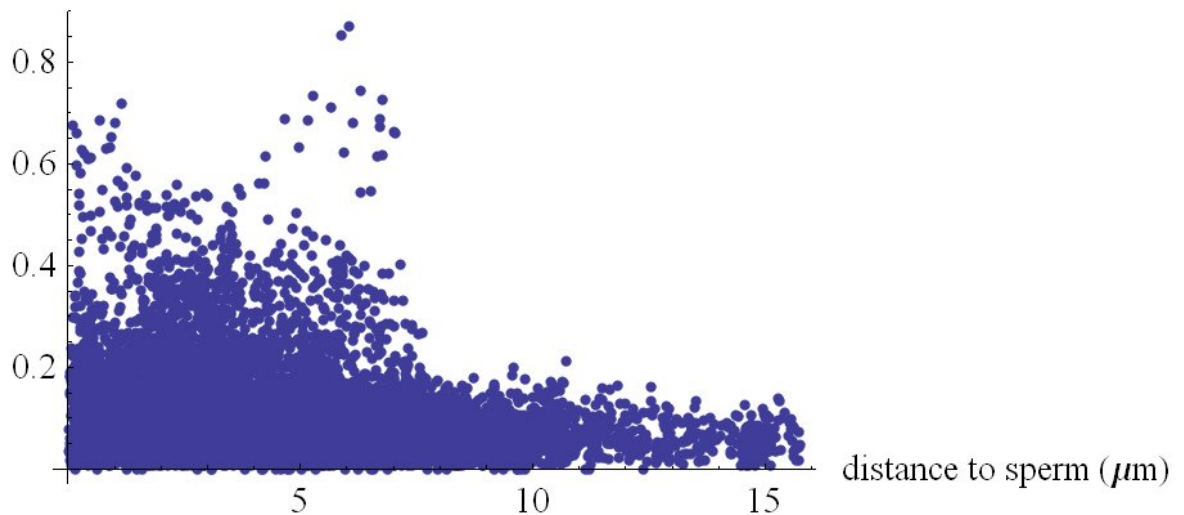


Fig.17

精子鞭毛と、その周りのマイクロビーズの座標データの可視化。a, 精子の位置とマイクロビーズの移動速度。ひし形、曲線、矢印がそれぞれ精子の頭部、鞭毛、マイクロビーズの位置と速度を示す。矢印は、長さ $1 \mu\text{m}$ が、速度 $0.15 \mu\text{m}/\text{ms}$ に相当する。精子と接する近傍でのみ、マイクロビーズの移動（流れ）が生じていることがわかる。b, 精子鞭毛とマイクロビーズ間の距離と、マイクロビーズの移動速度との関係 ($n=11,424$)。鞭毛のごく近傍 ($<7 \mu\text{m}$) でしか、実質的な流れが生じないことがわかる。

流れの計算

実際の流れの観察と対応するための理論的なアプローチを次に実施した。今回、6,000 fps で記録した鞭毛波形から、正確な座標軸をもとめることができ、その移動より、ストークス流れ場におけるミクロな流れを *Slender body theory* に基づいて計算することができるからである。

計算結果を Fig.18a に示す。この計算では、カバーガラス近傍での遊泳軌跡であることを考慮して、約 3 μm 離れた位置にある壁効果も考慮した (Blake,1971)。顕微鏡光軸 (Z 軸) 方向への流れの成分が、ほかの XY 軸方向成分に比べて小さいので ($<1/10$)、光軸方向の成分を省略し、2次元空間で流れ場を表示した。図 17a とよく対応することがわかる。

精子から Z 軸方向に焦点深度程度だけずれた位置での流れは、速度の大きさが数 10%程度減少するものの、ベクトルの向きはほとんど変わらなかった。図 17b に対応する精子からの距離と、流れの速度の大きさとの関係を Fig.18b に示す。ここの理論的なアプローチでも、精子のごく近傍 ($<5 \mu\text{m}$) でしか、流れが起こっていないことがわかった。流れの大きさの上限値は、距離にほぼ反比例するが、距離が近くても流れが起きない場合もあることがわかる。

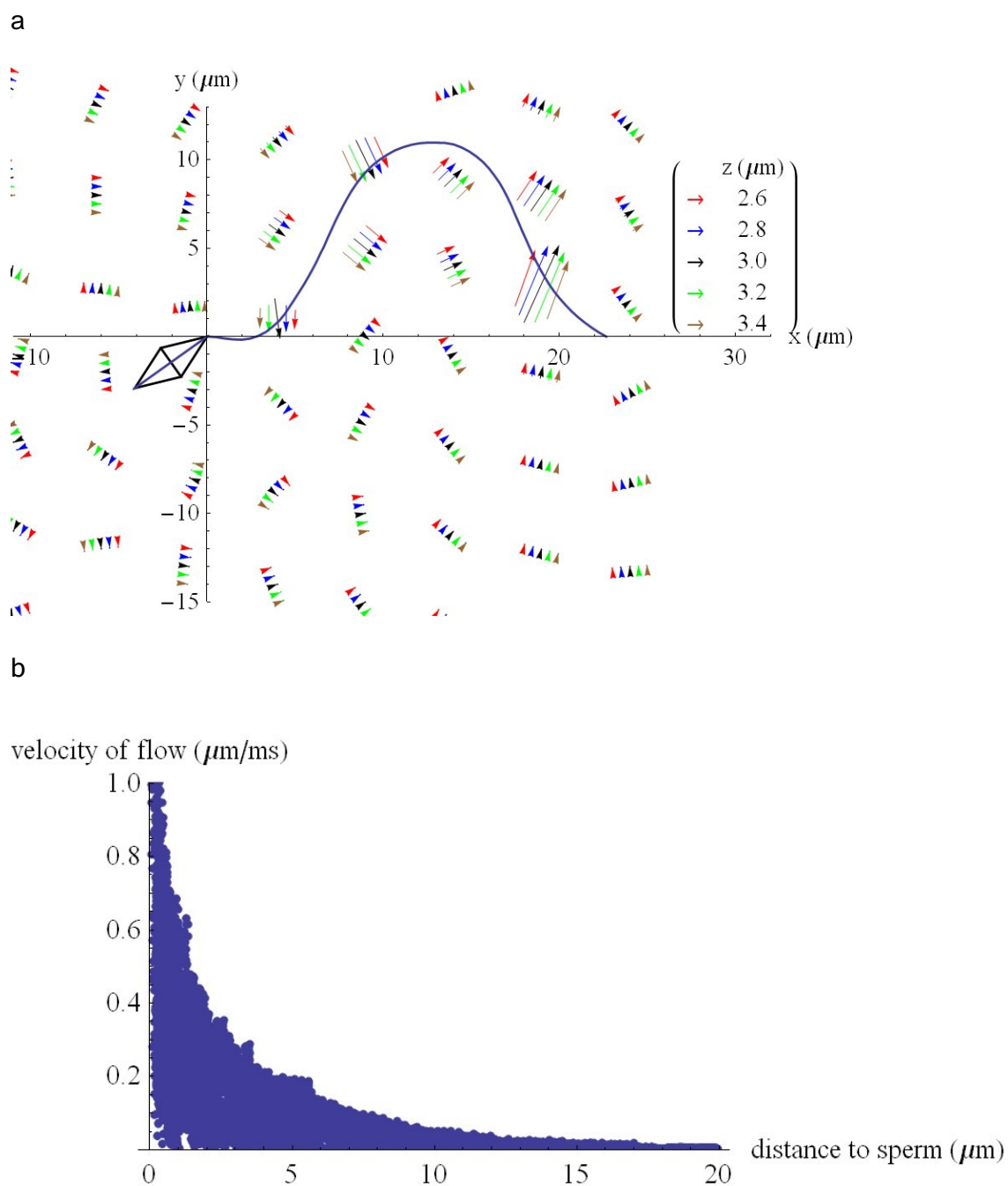


Fig.18

精子の遊泳軌跡から流れを計算した結果。a, 精子の位置と流れの速度。ひし形、曲線、矢印がそれぞれ精子の頭部、鞭毛、流れの速度を示す。矢印は長さ $1 \mu\text{m}$ で速度 $0.15 \mu\text{m}/\text{ms}$ を示す。z はスライドガラス表面からの距離を表す。精子は、カバーガラスから距離約 $3 \mu\text{m}$ 離れた位置を泳いでいることが実験的に確かめられている。b, 精子からの距離と流速との関係 ($n=34,800$)。

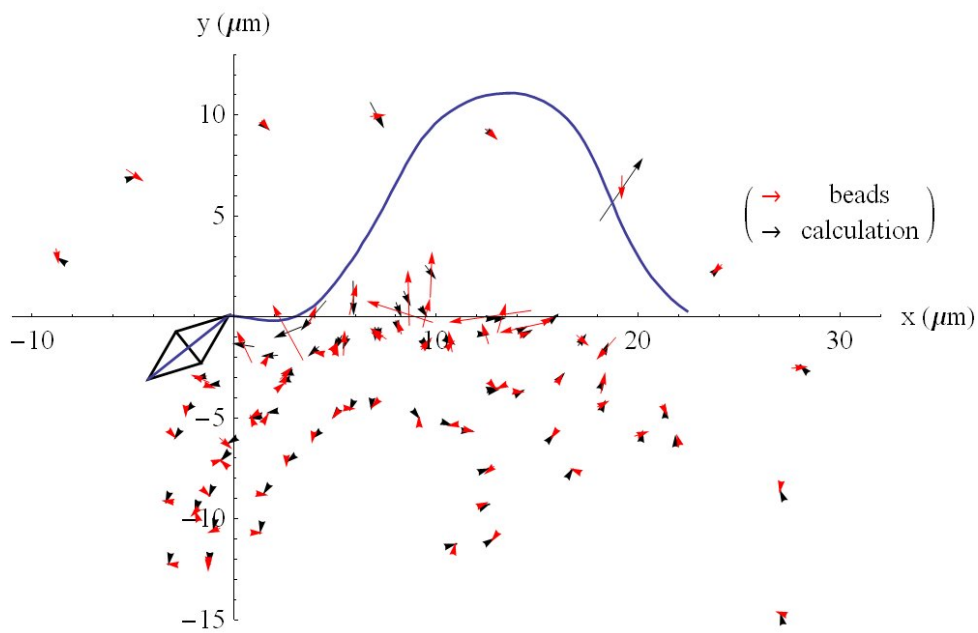
マイクロビーズの移動速度と流れの計算値の比較

マイクロビーズの移動速度と流れの計算値の比較した。(Fig.19) 速度の大きさも (Fig.19b) 向きも (Fig.19c) 相関はほとんどなかった。精子近傍の流れを説明するには、さらに今回考慮しなかった効果を考える必要がある。

精子近傍の流れは壁効果を含めた slender body theory によってのみでは説明できないことがわかった。鞭毛打運動にともなって観察されたマイクロビーズの移動は、流動ではなく、鞭毛と物理的なコンタクト（摩擦）によって引き起こされた移動である可能性が高く、これを流動と解釈するならば、図 19c で見られた理論と観察結果との矛盾点が多い点は明らかと考えられる。逆に、マイクロビーズの運動を、物理的な接触の結果であると考えれば、図 17b と図 18b で示された、速度・距離関係は、7 μm 近傍までの左下がりの傾向（距離に反比例する流速）は、理論的な考察と観察がうまく一致していると考えることができる。

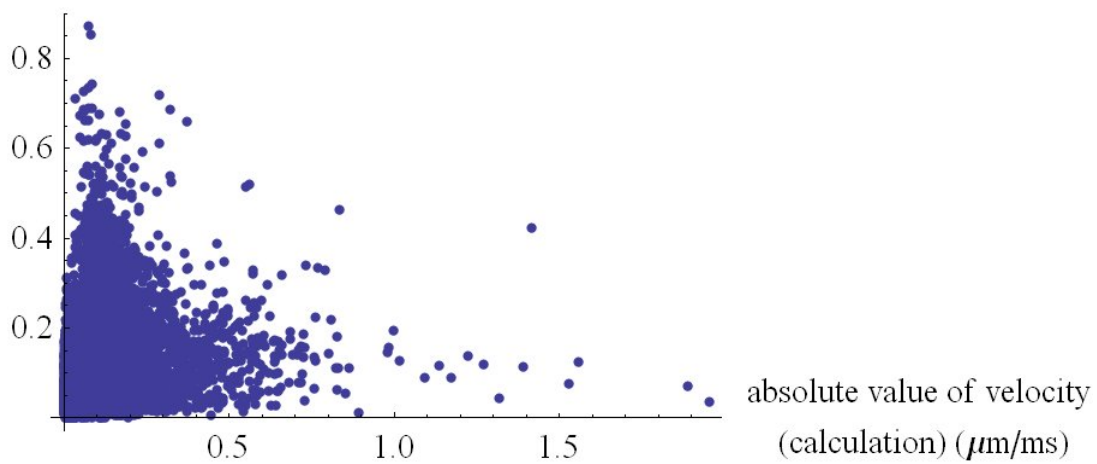
物理的な接触が、主なマイクロビーズ変位の原因と考えられる場合、遊泳運動中のウニ精子が引き起こす擾乱発生範囲は、鞭毛のスweepする、ごく狭い空間に限られると予測できるであろう。平面的な鞭毛打波形は、そのような擾乱空間をできるだけ狭く収めるための理にかなった運動形態であるとも考えることができるかも知れないが、本研究で対象としている走化性物質の拡散に関して考察すると、鞭毛径近傍 (<1 μm) での走化性化学物質の拡散時間は、1 ms ときわめて速く、たとえ、物理的な接触で、化学物質の濃度勾配が攪乱された場合でも、次の鞭毛打周期 (15-20 ms) 後には、攪乱前の濃度勾配が復元される環境にあると考えられる。このような視点で考えると、鞭毛打の頻度 (40 - 70Hz) も、理にかなった速度と言えるのかも知れない。

a



b

absolute value of velocity
(beads) ($\mu\text{m}/\text{ms}$)



C

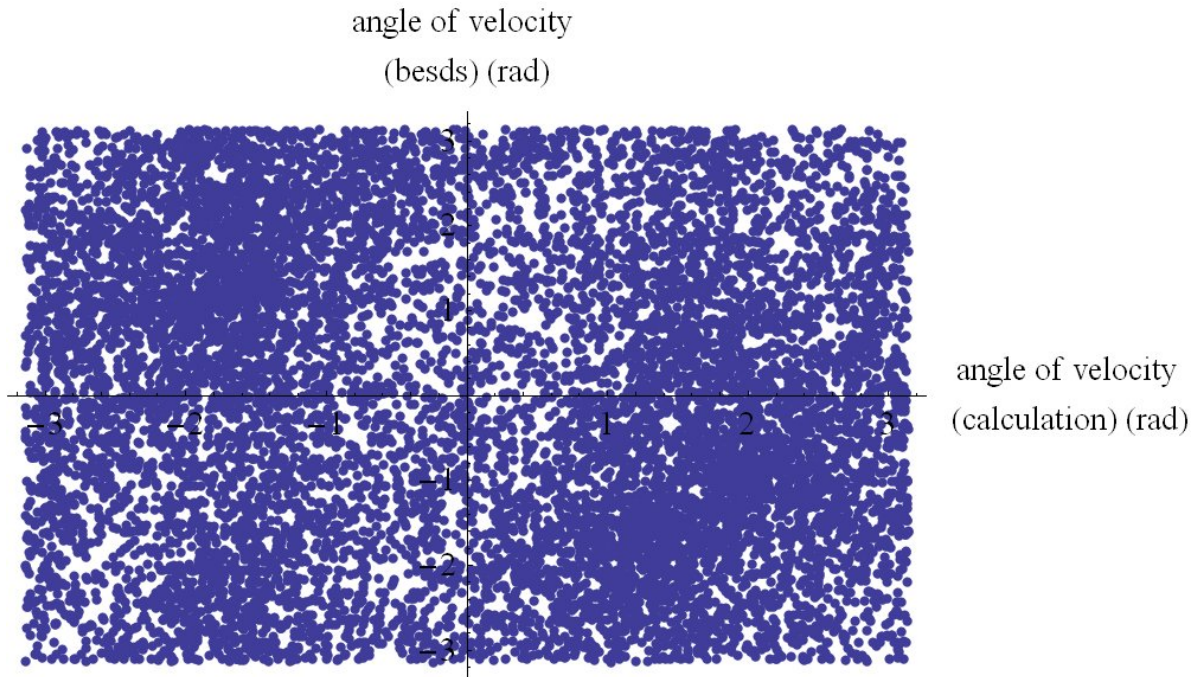


Fig.19

マイクロビーズの移動速度と流れの速度の計算値の比較。a, 精子の位置と流れの速度とマイクロビーズの移動速度。ひし形、曲線、矢印がそれぞれ精子の頭部、鞭毛、流れの速度（もしくはマイクロビーズの移動速度）を示す。矢印は長さ $1 \mu\text{m}$ で速度 $0.15 \mu\text{m}/\text{ms}$ を表す。b, 流れの速度の大きさとマイクロビーズの移動速度の大きさの関係。n=11,340. c, 実際に観察されたマイクロビーズの速度の向き（角度）と、理論的に計算された流れの向き（角度）との関係。速度の大きさが $1 \mu\text{m}/\mu\text{s}$ 以上のもののみを表示した (n = 11,340)。2つには、相関がほとんどないことがわかる。

結 論

ここでは、6,000 fps の超高速ビデオ撮影技術を使い、遊泳中のウニ精子鞭毛のまわりの流動を 0.1 μm のマイクロビーズを使って観測し、さらに、理論的な流れ場の計算も平行して行った。観察結果から、ウニ精子の鞭毛のごく近傍 (<7 μm) でしか流れが起きないことがわかった。

このことから、遊泳中の精子は化学誘引物質の濃度勾配を乱さないと推測される。精子細胞のどの位置に、走化性物質の受容体が分布するかで、流れ場の影響は変わって来ると考えられるが、頭部近辺の場合、流れの影響は非常に小さいと考えられる。また、鞭毛長 (40~50 μm)) に比較して、流れの起こる範囲 (<7 μm) は小さく、実質的な擾乱効果はきわめて小さいと考えられる。

General conclusion

第1部では、ホヤ精子の遊泳の 600 fps での撮影と鞭毛打パターンの変化を精密に検出する方法によって、機械的応答が初めて起こる時間 (T_R) を決定した。この方法は走化性に限らず鞭毛の屈曲パターンが変化するさまざまな現象に応用可能である。またこの T_R をさらに統計的に解析することで SAAF 濃度勾配の感知点 (θ_s) と一定の遅れ時間 ($T_R - T_s$) をそれぞれ 1.3rad, 0.18s と推定した。これによって、精子が誘引物質濃度の時間的変化を微分値で感知しその後一定時間の遅れがあって鞭毛打パターンを変化させるという結論を出した。濃度勾配の感知点を明確に定めたのは本研究がはじめてである。さらにシミュレーションによって精子の走化性の効率を評価できた。

第2部では、6,000 fps の超高速ビデオ撮影技術を使い、遊泳中のウニ精子鞭毛のまわりの流動を 0.1 μm のマイクロビーズを使って観測し、さらに、理論的な流れ場の計算も平行して行った。このようなスケールと時間分解能で流れを可視化したのは、本研究がはじめてである。観察結果から、ウニ精子の鞭毛のごく近傍 (<7 μm) でしか流れが起きないことがわかった。このことから精子の遊泳は周りの濃度勾配を乱さないと結論した。

謝辞

以下の人々に感謝します。 T. Oishi (Tohoku University)、 M. Murata (Tohoku University) 、 Kamimura Shinji (Chuo University)、 Okuno Makoto (Chuo University)、 Toyoshima Youko (The University of Tokyo)、 Shiba Kogiku (University of Tsukuba)、 Miyashita Takahiro (Chuo University)、 Yoshida Manabu (The University of Tokyo)、 Baba A Shoji (Ochanomizu University) 、 Wada Yuuko (Chuo University).

References

- Alvarez L, Dai L, Friedrich BM, Kashikar ND, Gregor I, Pascal R, Kaupp UB** . The rate of change in Ca^{2+} concentration controls sperm chemotaxis. *J. Cell Biol.*2012; **196**(5):653-663.
- Bannai H, Yoshimura M, Takahashi K, Shingyoji C**. Calcium regulation of microtubule sliding in reactivated sea urchin sperm flagella. *J Cell Sci* 2000;113:831–839.
- Bentley JK, Khatra AS, Garbers DL**. Receptor-mediated activation of detergent-solubilized guanylate cyclase. *Biol Reprod* 1988;39:639–647.
- Blake JR**. A note on the image system for a stokeslet in a no-slip boundary. *Proc. Gamb. Phil. Soc.* (1971), 70, 303-310
- Bonigk W, Loogen A, Seifert R, Kashikar N, Klemm C, Krause E, Hagen V, Kremmer E, Stru' nker T, Kaupp UB**. An atypical CNG channel activated by a single cGMP molecule controls sperm chemotaxis. *Sci Signal* 2009;2:ra68.
- Bohmer M, Van Q, Weyand I, Hagen V, Beyermann M, Matsumoto M, Hoshi M, Hildebrand E, Kaupp UB** . Ca^{2+} spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm. *The EMBO Journal* 2005;**24**:2741-2752.
- Brokaw CJ**. Calcium-induced asymmetrical beating of triton-demembrated sea urchin sperm flagella. *J Cell Biol* 1979;82: 401–411.
- Brokaw CJ**. Transient disruptions of axonemal structure and microtubule sliding during bend propagation by Ciona sperm flagella. *Cell Motil Cytoskeleton* 1997;37:346–362.
- Brokaw CJ, Josslin R, Bobrow L**. Calcium ion regulation of flagellar beat symmetry in reactivated sea urchin spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1974;58:795–800.
- Cardullo RA, Herrick SB, Peterson MJ, and Dangott LJ** . Sperm receptors are localised on sea urchin sperm flagella using a fluorescent peptide analog. *DEV BIOL* 1994;162:600-607
- Coll JC, Bowden BF, Meehan GV, Konig GM, Carroll AR, Tapiolas DM, Alino PM, Heaton A, De Nys R, Leone PA et al**. Chemical aspects of mass spawning in corals. I. Sperm-attractant molecules in the eggs of the scleractinian coral *Montipora digitata*. *Mar Biol* 1994;118:177–182.
- Cook SP, Brokaw CJ, Muller CH, Babcock DF**. Sperm chemotaxis: egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses. *Dev Biol* 1994;165:10–19.
- Corkidi G, Taboada B, Wood CD, Guerrero A, Darszon A**. Tracking sperm in three-dimensions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;**373**:125-129.

- Dangott LJ, Jordan JE, Bellet RA, Garbers DL.** Cloning of the mRNA for the protein that crosslinks to the egg peptide speract. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2128–2132.
- Darszon A, Beltrán C, Ricardo F, Nishigaki T, Treviño CL.** Ion transport in sperm signaling. *Dev Biol* 2001;240:1–14.
- Eisenbach M** Sperm Chemotaxis. *Rev Reprod* 1999;4:56-66
- Etoh, T. et al.** An image sensor which captures 100 consecutive frames at 1000000 frames/s *IEEE Transactions on Electron Devices* 2003, 50:144–151
- Friedrich BM, Frank Julicher.** Chemotaxis of sperm cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*2007; **104**:13256-13261.
- Galindo BE, Beltran C, Cragoe EJ Jr, Darszon A.** Participation of a K⁺ channel modulated directly by cGMP in the speract-induced signaling cascade of *Strongylocentrotus purpuratus* sea urchin sperm. *Dev Biol* 2000;221:285–294.
- Galindo BE, de la Vega-Beltran JL, Labarca P, Vacquier VD, Darszon A.** Sp-tetraKCNG: a novel cyclic nucleotide gated K⁺ channel. *Biochem Biophys Res Comm* 2007;354:668–675.
- Gibbons BH, Gibbons IR** Flagellar movement and adenosine triphosphatase activity in sea urchin sperm extracted with triton X-100. *J. Cell Biol.* 1972 **54**:75-97.
- Guerrero AD, Wood CD, Nishigaki T, Carneiro J, Darszon A.** Tuning sperm chemotaxis. *Biochem. Soc. Trans.* 2010;**38**:1270-1274.
- Hancock GJ.** The Self-Propulsion of Microscopic Organisms through Liquids *Proc. Roy.Soc. lond.A.* 1953 217, 96-122.
- Kashikar ND, Alvarez L, Seifert R, Gregor I, Jäckle O, Beyermann M, Krause E, and Kaupp UB.** Temporal sampling, resetting, and adaptation orchestrate gradient sensing in sperm. *J. Cell Biol.* 2012;198:6:1075-1091
- Kaupp UB, HILDEBRAND E, WEYAND I** Sperm Chemotaxis in Marine Invertebrates—Molecules and Mechanisms. *J. Cell Physiol.* 2006;208:487–494
- Kaupp UB, Solzin J, Hildebrand E, Brown JE, Helbig A, Hagen V, Beyermann M, Pampaloni F, Weyand I.** The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm. *Nat Cell Biol* 2003;5:109–117.

- Keller JB and Rubinow SI.** Slender-body theory for slow viscous flow. *J. Fluid Mech.* (1976), vol. 75, part 4, pp. 705-714
- Matsumoto M, Solzin J, Helbig A, Hagen V, Ueno S, Kawase O, Maruyama Y, Ogiso M, Godde M, Minakata H et al.** A sperm-activating peptide controls a cGMP-signaling pathway in starfish sperm. *Dev Biol* 2003;260:314–324.
- Nishigaki T, Chiba K, Hoshi M.** A 130-kDa membrane protein of sperm flagella is the receptor for asterosaps, sperm-activating peptides of starfish *Asterias amurensis*. *Dev Biol* 2000;219:154–162.
- Oishi T, Tsuchikawa H, Murata M, Yoshida M, Morisawa M.** Synthesis of endogenous sperm-activating and attracting factor isolated from ascidian *Ciona intestinalis*. *Tetrahedron Lett.* 2003;44:6387-6389.
- Oishi T, Tsuchikawa H, Murata M, Yoshida M, Morisawa M.** Synthesis and identification of an endogenous sperm activating and attracting factor isolated from eggs of the ascidian *Ciona intestinalis*; an example of nanomolar-level structure elucidation of novel natural compound. *Tetrahedron* 2004;60:6971-6980.
- Olson JH, Xiang X, Ziegert T, Kittelson A, Rawls A, Bieber AL, Chandler DE.** Allurin, a 21-kDa sperm chemoattractant from *Xenopus* egg jelly, is related to mammalian sperm-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11205–11210.
- Riffell JA, Krug PJ, Zimmer RK.** Fertilization in the sea: the chemical identity of an abalone sperm attractant. *J Exp Biol* 2002;205:1439–1450.
- Shiba K, Baba SA, Inoue T, Yoshida M.** Ca²⁺ bursts occur around a local minimal concentration of attractant and trigger sperm chemotactic response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008;105:19312-19317.
- Singh S, Lowe DG, Thorpe DS, Rodriguez H, Kuang W-J, Dangott LJ, Chinkers M, Goeddel DV, Garbers DL.** Membrane guanylate cyclase is a cell-surface receptor with homology to protein kinases. *Nature* 1988;334:708–712.
- Smith DJ and Blake JR** SURFACE ACCUMULATION OF SPERMATOZOA:A FLUID DYNAMIC PHENOMENON *Math. Scientist* 2009 34, 74-87
- Strunker T, Weyand I, Bonigk W, Van Q, Loogen A, Brown JE, Kashikar N, Hagen V, Krause E, Kaupp UB.** A K⁺-selective cGMP-gated ion channel controls chemosensation of sperm. *Nat Cell Biol* 2006;8:1149–1154.
- Suzuki N, Yoshino K.** The relationship between amino acid sequences of sperm-activating peptides and the

taxonomy of echinoids. *Comp Biochem Physiol B* 1992;102:679–690.

Ward GE, Brokaw CJ, Garbers DL, Vacquier VD. Chemotaxis of *Arbacia punctulata* spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer. *J Cell Biol* 1985;101:2324–2329.

Wood CD, Nishigaki T, Furuta T, Baba SA, Darszon A. Real-time analysis of the role of Ca²⁺ in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm. *J Cell Biol* 2005;169:725–731.

Yoshida M, Inaba K, Ishida K, Morisawa M. Calcium and cyclic AMP mediate sperm activation, but Ca²⁺ alone contributes sperm chemotaxis in the ascidian, *Ciona savignyi*. *Dev. Growth Differ.* 1994;**36**:589-595.

Yoshida M, Murata M, Inaba K, Morisawa M. A chemoattractant for ascidian spermatozoa is a sulfated steroid. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:14831–14836.

Zatylny C, Marvin L, Gagnon J, Henry J. Fertilization in *Sepia officinalis*: the first mollusk sperm-attracting peptide. *Biochem Biophys Res Comm* 2002; 296:1186–1193.