

論文の内容の要旨

論文題目

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)

氏名 宮代 大輔

要旨

多くの動物の精子は、種ごとに異なった特異的な走化性物質にのみ反応し、その濃度変化を感知し、遊泳パターンを切り換えることで、卵に向かって接近するしぐみを持っている。この走化性応答の過程で見られる精子の遊泳パターン変化は多くの動物種で類似し、共通した化学シグナル受容経路と精子の運動制御機構があると考えられる。たとえば、誘因物質の刺激のない条件下では、精子は一定のラセン軌道、あるいは円軌道上を遊泳するが、化学誘因物質の濃度変化を感知すると、鞭毛打運動を非対称型に変化させることで、短時間の急な旋回遊泳をおこない、その後、直進遊泳から、はじめの定常的な遊泳パターンへと戻ることが知られている。この一連の走化性応答の結果、はじめの遊泳の円軌道が少しずつずれて、卵により接近できるようになる。このしぐみの詳細について、特に受容体での化学物質の感知から、細胞内でのシグナル伝達、運動機構のスイッチングの経路に関しては、不明な点が多い。この走化性反応機構を解明する上では、最初の段階、精子が化学物質の濃度変化をどのようなタイミングで感知するかを明らかにすることがもっとも

重要な課題の1つであると考えられる。

これまで、Shiba らの研究 (2008) で、ホヤ精子は走化性誘因物質の濃度変化を感知し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の急激な上昇を引き起こすこと、また、それとほぼ同時に鞭毛運動波形を変えながら、遊泳軌跡を変化させ、卵に接近することが明らかになった。精子内の Ca^{2+} 濃度変化が、誘因物質を感知したことを示すよい指標となることをこの研究は示している。彼らの研究によれば、細胞内の Ca^{2+} 濃度変化の起こるタイミングは、遊泳軌跡の上で誘因物質（この場合、ホヤ精子特異的な SAAF (Yoshida ら, 2002)）の濃度が一番低くなる箇所であることが示されている。なぜ、誘因物質の濃度が極小となる点で Ca^{2+} の反応が起こる必要があるのか、そのメカニズムも含めて、また明確な説明はできていない点である。一番考えやすいモデルは、それ以前に、すでに何らかの濃度変化を精子頭部にある受容体が感知していて、その後、シグナル伝達の化学カスケード反応による一定の遅延時間を経過した後で、Shiba らの観察した遊泳軌跡変化や Ca^{2+} の濃度変化が起こるとするものであろう。 Ca^{2+} 反応前後の細胞内で起こっているシグナル伝達反応に関しては、まだ、詳細はわかっていないが、このような遅延モデルは、ウニ精子の走化性を議論するときにも、うまく現象を説明できることが示唆されている。

化学走性の機構を解明する上では、非常に些細な遊泳軌跡や鞭毛打運動の変化を、いかに高い時間精度で検出するかが重要である。 Ca^{2+} 濃度の変化が見られる時点は、シグナル伝達に関わる一連のカスケード化学反応が完了した後で観察されるステップであり、その開始タイミングを解析しても、明確なシグナル受容機構の経路に関する議論は難しいと我々は考えているからである。もし、 Ca^{2+} の変化以前に起こる何らかの反応が、小さな鞭毛波形変化をとともなうならば、精子運動が非常に低いレイノルズ数の条件下の運動であることを生かして、それを検出できることができると私は期待した。よって、鞭毛波形や頭部位置を高速度ビデオ画像記録し、わずかな変化を高い時間分解能で解析すれば、信号伝達の前兆を検出できると考え、本研究を開始したのである。そのような解析から、遊泳軌跡、鞭毛波形変化より一定時間遡った所にある、真の SAAF センシング時点が特定できると期待した。

本研究では、まず、遊泳軌跡および波形の変化を精密に検出できる新しい解析方法を考案した。遊泳軌跡による解析方法では、まず精子が一定の遊泳パターンをとる時の遊泳軌跡を近似する経験式を立てた。この経験式は半径数十から数千 μm 程度の大きな円軌道と半径数 μm 程度の小さな楕円軌道の重ねあわせであらわされた。そしてこの経験式から実測の遊泳軌跡が測定誤差の範囲を超えて逸脱した時点を精子の遊泳パターンが変化した時点であると判断した。一方、鞭毛波形による解析方法では、まず、異なる波形の差異を定量化し、その値が、精子が一定の遊泳パターンをとる時には鞭毛打の位相が等しいときに、ごく小さい値をとることを利用し、鞭毛波形に時間的周期性があるか否かを判断した。この周期性が維持される区間を判定しその境目を精子の遊泳パターンが変化した時点である

と判断した。両解析方法による結果はよく一致していた。このことは鞭毛波形の変化が即座に遊泳軌跡に反映されるという低レイノルズ数条件から期待されるものである。

解析結果から、 Ca^{2+} 濃度変化が起こるべき時間の前（または、ほぼ同時）に、わずかな変化ではあるが、一定の鞭毛波形変化が起こることを発見した。この反応はシグナル伝達経路の下流にあるとすれば、さらにその反応の上流、一定時間前に真の誘因物質センシング時点が存在すると考えられる。実際に精子の遊泳速度と遊泳パターンが変化が起こる地点は相関を示したので、それに基づいて真の誘因物質センシング時点がどこにあるかを、観察例数を増やすことで統計的な手法で外挿し求めた。その結果、実際に鞭毛の波形変化が起こる時点より、一定時間遡った所で、SAAF 濃度勾配上の決まった位置を通過する時点で感知することを示す証拠を得た。それはちょうど SAAF 濃度勾配に背を向けた状態、つまり精子頭部がもっとも急峻な SAAF 濃度減少を経験する時（頭部で感知する SAAF 濃度変化の2次微分がゼロとなる時点）が、走化性シグナル伝達カスケード反応の開始する時期（センシング時点）という結論に達した。そのセンシング時点を通過後、約 0.18 秒後に最初の小さな波形変化が起こり、ほぼ同時に Shiba らの示した Ca^{2+} 濃度変化、その後、遊泳軌跡変化が順次起こることが、ホヤ精子の走化性機構の全容である。

このことより現実的なシグナル伝達機構に基づいて、実際に細胞内で起こっていると考えられる走化性モデルのシミュレーションもおこなった。走化性をうまく説明可能な数式モデルを立て、走性反応の結果起こる卵への接近効率、および、その反応の robustness に関する議論も加えた。

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のか否か、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、遊泳中のユニ精子と、その周りに入れやラテックスビーズ（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。