

ホヤ精子鞭毛における微小管滑り運動の制御

山口 さやか (筑波大学 生物学類) 指導教員: 稲葉 一男 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

卵と受精するために、精子は鞭毛運動を適切に制御して遊泳しなければならない。鞭毛の内部構造は軸糸とよばれ、9本のダブルレット微小管と2本の中心対微小管からなる9+2構造をとっている。ダブルレット微小管上には、運動の力を発生させる分子モーターであるダイニンが周期的に結合している。ダイニンは、ATPを分解することで得られたエネルギーを用いて、隣り合うダブルレット微小管を滑らせる。ダイニンによる微小管の滑りが鞭毛の屈曲を生みだし、それが根元から先端へと伝播することで鞭毛運動が作り出される。

鞭毛運動は細胞内外の環境変化に応じて巧みに調節されている。鞭毛運動の調節において、カルシウムとcAMPは重要な役割を果たしている。前者は非対称波の形成と伝播に、後者は運動の開始、活性化に深く関わっていることが知られている。しかしながら、カルシウムとcAMPがどのように相互に関連して鞭毛運動の調節に働いているのかは明らかになっていない。これら2つの因子の鞭毛軸糸への効果は、鞭毛の細胞膜と細胞質を取り除いた除膜モデルの手法を用いることで調べることができる。そこで本研究では、除膜モデル精子の運動、および鞭毛運動のもととなっている微小管の滑り運動に対するカルシウムとcAMPの効果を実験的に解析することで、鞭毛運動の調節機構を解明することを目的とした。

材料・方法

(1) 精子除膜モデル

本研究では、カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) の精子を実験に用いた。テオフィリンで運動を活性化させた精子を界面活性剤 (0.04% Triton X-100) で除膜した後、ATPの入った溶液で運動を再活性化させた。この時、再活性化溶液に添加するカルシウム濃度 (10^{-10} M, 10^{-5} M) とcAMP濃度 (0, 20 μ M) の組み合わせを変えて精子の運動を調べた。

(2) 微小管滑り運動

テオフィリンで運動を活性化させたカタユウレイボヤの精子をホモジェナイズし、頭部と鞭毛を分離した。単離した鞭毛を除膜し、軸糸を得た。スライドガラス上に両面テープとカバーガラスで作ったチャンバーに単離軸糸を注入した。その後、微小管の滑りを誘導するために、軸糸の連結構造を消化するためのタンパク質分解酵素トリプシンを含む再活性化溶液を灌流した。この際、再活性化溶液に含まれるカルシウム濃度とcAMP濃度の組み合わせを変えた。同様の実験は、ホモジェナイズしない精子除膜モデルでも行った。顕微鏡下で微小管の滑りを観察、録画し、ソフトウェアを使って滑り速度を計測した。

結果

(1) 精子除膜モデル

cAMPを加えなかった場合、低カルシウム濃度 (10^{-10} M) では対称な鞭毛波形が、高カルシウム濃度 (10^{-5} M) では非対称な鞭毛波形が観察された。cAMPを加えた場合にも同様の波形が観察され、波形に対するcAMPの効果は見受けられなかった。しかしながら、低カルシウム濃度ではcAMPの添加により鞭毛打頻度の有意な上昇が見られた。また、cAMP存在下では、低カルシウム濃度と比べ高カルシウム濃度で鞭毛打頻度が有意に低下することがわかった。

(2) 微小管滑り運動

単離軸糸の微小管の滑り速度を計測したところ、精子除膜モデルと同様の効果が観察された。すなわち、低カルシウム濃度におけるcAMPによる滑り速度の上昇、および、cAMP存在下における高カルシウム濃度による滑り速度の抑制が起こることがわかった。一方、ホモジェナイズしない精子除膜モデルを用いて微小管の滑り運動を調べたところ、高濃度および低濃度カルシウム条件下とも、単離軸糸と比べ滑り速度の上昇が認められた。特に、高カルシウム濃度において、その上昇は顕著であった。

考察

精子除膜モデルの実験では、低カルシウム条件下でcAMPによる鞭毛打頻度の上昇が見られたが、高カルシウム条件下ではその効果はなかった。このことから、cAMPによる鞭毛打頻度の上昇はカルシウムが低濃度の場合に効果が表れると考えられる。鞭毛打頻度は、屈曲が同じである場合には微小管の滑り速度に比例する。実際、単離した軸糸の微小管の滑り速度を計測したところ、除膜モデルで得られた結果を裏付けるように、低カルシウム濃度cAMP存在下で速度の上昇が見られた。一方、cAMP存在下では高カルシウム濃度において除膜モデルの鞭毛打頻度、単離軸糸の微小管滑り運動が低下することがわかった。高濃度カルシウム存在下では、カルシウム結合タンパク質であるカラクシンが外腕ダイニンに結合し、微小管の滑り運動を抑制することが知られている。また、cAMPはダイニンなどの軸糸タンパク質のリン酸化を介して微小管の滑り運動を調節していると考えられている。本研究から、高濃度カルシウム存在下ではカラクシンが、低濃度カルシウム下ではcAMP依存的リン酸化が運動調節に優先的に働いていることが示唆される。

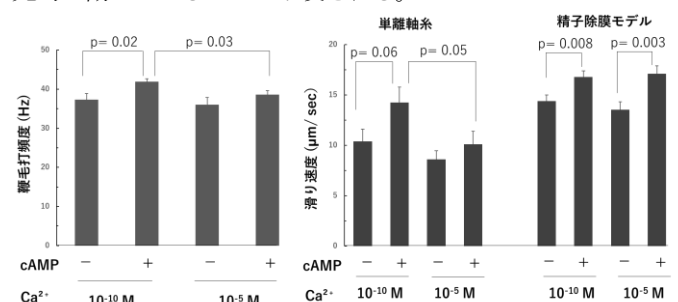


図. 除膜精子鞭毛打頻度 (左) および微小管滑り運動 (右) に対するカルシウムおよびcAMPの効果