

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06592

研究課題名(和文)精子鞭毛波形制御におけるカルシウムイオンとcAMPの役割の解明

研究課題名(英文)Regulation of sperm flagellar motility by Ca²⁺ and cAMP

研究代表者

柴 小菊 (Shiba, Kogiku)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：70533561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ケージド化合物を用いて、cAMPが引き起こす鞭毛波形変化過程および細胞内カルシウム濃度の挙動を詳細に解析した結果、ホヤ精子においてcAMPがカルシウム依存的、カルシウム非依存的の二つの条件下で異なる波形変化をもたらすことを明らかにした。またCNGチャネル阻害剤の精子走化性に対する効果を調べたところ、cAMP、過分極によって活性化されるCNGチャネルの一種HCNチャネルが精子走化性時のカルシウム排出に作用し、適切な波形変化を制御している可能性が示唆された。精子走化性における遊泳方向変換を正しいタイミングで誘導するためのシグナリング経路および鞭毛波制御の分子機構において新たな知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物の鞭毛・繊毛は、精子運動・体内の水流制御など細胞運動やシグナル受容において非常に重要な器官であり、その構造・機能は進化を通して高度に保存されている。本申請課題では、材料として扱いやすく反応が顕著に観察できる海産生物精子を用いて、「鞭毛波形制御におけるカルシウムイオンとcAMPの役割」に着目し、研究を実施した。その結果精子鞭毛波形を制御するためのシグナル因子とその役割を明らかにした。本研究成果は、不妊治療や繁殖分野への応用へとつながるものである。

研究成果の概要(英文)：Using caged compounds, we analyzed in detail the behavior of cAMP-induced flagellar waveform change process and intracellular calcium concentration, and found that cAMP induces different waveform changes in ascidian spermatozoa under two conditions: calcium-dependent and calcium-independent. The effects of CNG channel inhibitors on sperm chemotaxis were also examined, suggesting that HCN channels, a type of CNG channel activated by cAMP and hyperpolarization, may act on calcium efflux during sperm chemotaxis and regulate the appropriate waveform changes. Our findings provide new insights into the signaling pathways and molecular mechanisms of flagellar wave regulation to induce the correct timing of swimming direction change during sperm chemotaxis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：精子運動 繊毛 イオンチャネル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物の繊毛・鞭毛は細胞外の環境に応じて瞬時に反応し運動を変化させる。受精において多くの生物の精子は精巣中では運動能を持たないが放精の際に運動を開始し、卵由来の物質によって活性化され、卵に対して走化性を示す。このとき精子内では劇的な変化が生じ鞭毛運動が制御されている。本研究課題の研究代表者は、これまで高速遊泳中の精子の鞭毛波形とカルシウム動態を同時に捉えることのできる顕微鏡用照明装置や膨大な画像の解析を可能にするソフトなど他では真似のできない実験システムを構築してきた。構築したカルシウムイメージング装置を用いて、カタユレイボヤ精子が走化性を示しているときの鞭毛内カルシウム変動を捉えることに世界で初めて成功した。また鞭毛・繊毛軸系に存在する新規のカルシウム結合タンパク質カラクシンが精子走化性において非対称波形の伝播に関与することが研究代表者らの研究により明らかとなり、カルシウムシグナルが直接分子モーターを制御する機構の解明に大きく貢献した。

本申請課題では、精子走化性における鞭毛波制御におけるカルシウムイオンと cAMP の役割に着目し、研究を実施した。

2. 研究の目的

鞭毛・繊毛の運動制御機構を解明することを最終目標とし、本申請課題では「ホヤ精子鞭毛波形制御におけるカルシウムイオンと cAMP の役割の解明」を目的とした。実験材料であるカタユレイボヤ精子は、運動活性化・精子誘引因子が既に同定されており精子運動制御における鞭毛波形解析、鞭毛内カルシウムイメージングの実験・解析系が研究代表者らのグループによって確立されていること、ゲノムが明らかになっており精子プロテオミクスの基盤が整っていることから鞭毛運動制御機構の解明において非常に有用である。本研究ではカタユレイボヤ精子の鞭毛波形形成過程の詳細解析、波形変化を引き起こす細胞内シグナルの可視化、キーシグナル因子の同定を行うことにより、精子の遊泳方向制御に重要な鞭毛波の対称化・非対称化におけるカルシウムイオンと cAMP の役割の全容解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 精子鞭毛波形解析

精子走化性遊泳を理解するためには鞭毛波形の解析が必須である。50-60 ヘルツで高速振動するカタユレイボヤ精子鞭毛運動を正確にとらえるために研究代表者らのグループでは高速度カメラと自作のストロボ照明装置を使用している。カメラの露光シグナルと同期した 0.5 ミリ秒以下の短いパルス光で撮像することにより鞭毛波形を明瞭に取得することが可能である。同様のシステムを蛍光顕微鏡の照明系に応用することにより、カルシウムイオン感受性蛍光色素を取り込ませた精子の鞭毛内カルシウムイメージング系も確立した。得られた動画の解析はお茶の水女子大学馬場昭次名誉教授によって開発された細胞運動解析ソフトウェア Bohboh によって行った。このソフトウェアは精子頭部のような細胞体の自動トラッキングや繊毛・鞭毛の波形の自動トレースが可能であり、得られた座標データから遊泳軌跡、軌跡曲率、遊泳速度、波形曲率、輝度値などを算出できる。

(2) ケージド化合物を用いた実験系

膜透過性ケージド cAMP および cGMP を取り込んだカタユレイボヤ精子の細胞内サイクリックヌクレオチド濃度上昇に伴う鞭毛運動変化を高速カメラにより解析した。UV-LED でケージド解除を行いながら高速運動している精子鞭毛波形を赤色 LED ストロボによって可視化するシステムを用いた(図 1)。このシステムにより cAMP および cGMP の一過的な上昇が鞭毛波の非対称性調節にどのような影響を与えるのかを知ることができる。

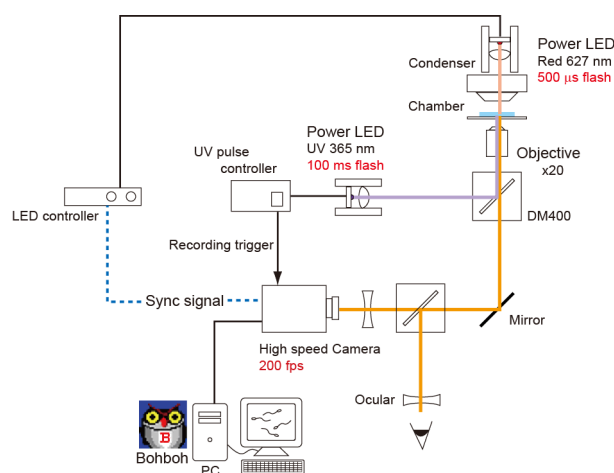


図 1: ケージド化合物を用いた鞭毛波形解析システム。倒立位相差顕微鏡のコンデンサー部分に赤色 LED ホルダーを組み込み、蛍光観察のための光路には UVLED を組み込み、UV 照射のシグナルを録画トリガーとし、高速カメラと同期をとった赤色光で波形を記録した。

4. 研究成果

(1) 対称化・非対称化に伴う精子鞭毛内のカルシウムイオンと cAMP の動態解析

cAMP の一過的な増加によりカルシウム存在下、非存在下両方において波形変化が見られたが、

cGMP では波形変化が見られなかった。

同様の実験で、膜透過性ケージド cAMP を取り込んだ精子の細胞内 cAMP 濃度上昇に伴う鞭毛内カルシウム濃度変化を LED ストロボ光源を組み込んだ蛍光顕微鏡によって解析した。その結果 cAMP 濃度上昇に伴い細胞内カルシウムイオン濃度も上昇することがわかった。この結果は、鞭毛波制御のカルシウム流入にはサイクリックヌクレオチド感受性チャネルが関与していることが示唆された。

(2) 鞭毛波の対称化・非対称化制御に関わる分子の同定

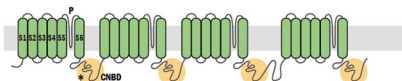
サイクリックヌクレオチド感受性 (CNG: cyclic nucleotide gated) チャネルの関与を調べるため、複数の CNG チャネル阻害剤を用いて精子走化性時の波形変化を調べた結果、精子走化性時の遊泳方向変換に必要な鞭毛波形変化が阻害された。カルシウムイメージングの結果、走化性におけるターン運動の際に示す細胞内カルシウムイオンの排出が CNG チャネル阻害剤存在下で抑制されることがわかった。これらの結果から、カタユレイボヤ精子運動調節において cAMP を介して CNG チャネルが活性化され、カルシウムイオンの排出制御に関与していることが示唆された。

カタユレイボヤ精子における CNG チャネル分子の局在を明らかにするため、ホヤ精巢で高発現している二種類の CNG チャネルの解析を行った(図2)。CNG チャネルは、環状ヌクレオチドによって活性化されるイオンチャネルの一種で、精子走化性のシグナル経路において重要であることがウニ精子で報告されている。しかし、走化性物質の受容から運動の変化に至るシグナル経路におけるこれらの CNG チャネルの機能や役割の詳細は明らかでない。四量体を形成し環状ヌクレオチドによって活性化されるカリウム選択性の CNG チャネルである tetraKCNG (tetrameric, cyclic nucleotide-gated, K⁺-selective)チャネルについては、カタユレイボヤの精巢、精子において多量発現しており鞭毛膜上に局在すること、走化性経路に重要な細胞膜の過分極に関与しうることを既に報告している。本研究では、過分極および環状ヌクレオチドによって活性化される CNG チャネルである HCN (hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated) チャネルの解析を行った。抗カタユレイボヤ HCN2 チャネル抗体を作製し、カタユレイボヤ精子において HCN チャネルが発現していることをタンパク質レベルで確認した。また、間接蛍光抗体法により、精子の鞭毛膜上に局在していることを明らかにした。さらに、精子運動調節における HCN チャネルの役割を明らかにするために、HCN チャネル特異的な阻害剤を用いて精子走化性への影響を調べた結果、遊泳方向変換に必要な鞭毛波形変化が安定しないこと、遊泳方向変換の引金となるカルシウム流入が過剰かつ長時間になることがわかった。これらの結果から、カタユレイボヤ精子 HCN チャネルは KCNG チャネルによって生じた過分極によって活性化され、カルシウムイオン排出を制御することにより、精子の走化性シグナリングに関与していることが示唆された。

以上の成果に関しては国際会議を含めた複数の学会で発表済みである。ホヤ精子走化性制御における CNG チャネルの役割に関する論文は *Int J Mol Sci* 誌に発表した。ホヤ精子において発見された鞭毛・繊毛のカルシウムセンサーであるカラクシンの遺伝子欠損マウスの解析を行い、カラクシンが体軸左右性決定に重要なノード繊毛の形成および運動に関与すること、精子、気管繊毛においても波形制御に関与することを発見し、*Commun. Biol.* 誌に発表した。本申請課題遂行のために改良した鞭毛・繊毛運動解析技術を活かし、複数の共同研究を行い *Current Biol.* 誌、*PLoS Genet.* 誌、*Sci Adv.* 誌、*BMC Zoology* 誌などにおいて成果を報告した。

tetraKCNG (CNGK)

tetrameric, cyclic nucleotide-gated, K⁺-selective channel



HCN

hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channel

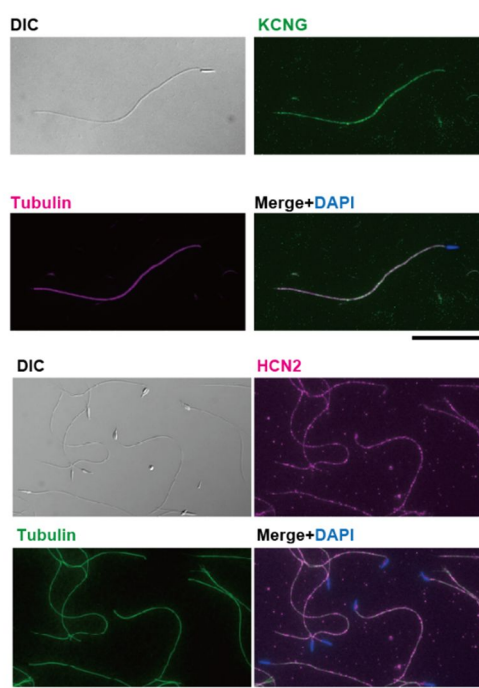
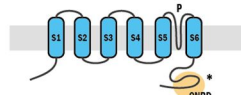


図2: 精子走化性に関与する二種類の CNG チャネル (上)とその局在解析(下)。作製した抗カタユレイボヤ KCNG および HCN2 チャネル抗体による免疫蛍光染色。KCNG および HCN2 共に精子鞭毛への局在が確認される。

1. 著者名 Morohoshi Akane, Miyata Haruhiko, Shimada Keisuke, Nozawa Kaori, Matsumura Takafumi, Yanase Ryuji, Shiba Kogiku, Inaba Kazuo, Ikawa Masahito	4. 巻 16
2. 論文標題 Nexin-Dynein regulatory complex component DRC7 but not FBXL13 is required for sperm flagellum formation and male fertility in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1008585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1008585	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Jokura Kei, Shibata Daisuke, Yamaguchi Katsushi, Shiba Kogiku, Makino Yumiko, Shigenobu Shuji, Inaba Kazuo	4. 巻 29
2. 論文標題 CTEN064 Is Required for Coordinated Paddling of Ciliary Comb Plate in Ctenophores	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 3510 ~ 3516.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2019.08.059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki Keita, Shiba Kogiku, Nakamura Akihiro, Kawano Natsuko, Satouh Yuhkoh, Yamaguchi Hiroshi, Morikawa Motohiro, Shibata Daisuke, Yanase Ryuji, Jokura Kei, Nomura Mami, Miyado Mami, Takada Shuji, Ueno Hironori, Nonaka Shigenori, Baba Tadashi, Ikawa Masahito, Kikkawa Masahide, Miyado Kenji, Inaba Kazuo	4. 巻 2
2. 論文標題 Calaxin is required for cilia-driven determination of vertebrate laterality	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-019-0462-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件(うち招待講演 4件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Kogiku Shiba
2. 発表標題 The role of Ca ²⁺ in the regulation of flagellar movement during sperm chemotaxis
3. 学会等名 RIMS Workshop "Biofluid Mechanics of Reproduction" in Biofluids 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴 小菊, 稲葉 一男
2. 発表標題 ホヤ精子の鞭毛運動調節におけるCNGチャネルの役割
3. 学会等名 第92回日本動物学会オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉浦健太, 柴 小菊, 稲葉 一男, 松本緑
2. 発表標題 緩歩動物クマムシの精子における動態と形態の関係に迫る
3. 学会等名 第92回日本動物学会オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 城倉圭, 佐藤友, 柴 小菊, 稲葉 一男
2. 発表標題 クシクラゲ櫛板の構築とその繊毛運動におけるCTEN0189の役割
3. 学会等名 第92回日本動物学会オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤友, 城倉圭, 柴 小菊, 稲葉 一男
2. 発表標題 クシクラゲ櫛板を構成する新規タンパク質BmBTBD19およびCTEN078により示された繊毛間リンクの2段構造
3. 学会等名 第92回日本動物学会オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kogiku Shiba, Kazuo Inaba
2. 発表標題 The role of CNG channel in the regulation of flagellar motility in the ascidian sperm
3. 学会等名 The virtual Dynein 2021 International Workshop (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kei Jokura, Yu Sato, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba
2. 発表標題 A novel protein CTEN0189 is involved in the maintenance of asymmetric ciliary movements in the comb plates of ctenophores
3. 学会等名 The virtual Dynein 2021 International Workshop (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴 小菊, 稲葉 一男
2. 発表標題 3D 遊泳トラッキングシステムを用いたホヤ精子走化性の解析
3. 学会等名 2022 年生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴 小菊
2. 発表標題 ジオラマ環境下での精子走化性の応答計測に向けて
3. 学会等名 科学研究費助成事業 学術変革領域研究 (A) 「ジオラマ環境で覚醒する原生知能を定式化する細胞行動力学」 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴 小菊
2. 発表標題 精子が卵に近づく運動メカニズム
3. 学会等名 第45回エアロ・アクアバイオメカニズム学会講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴 小菊, 稲葉 一男
2. 発表標題 カタコウレイボヤ精子運動調節におけるKCNGチャネルの役割
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 さやか, 柴 小菊, 稲葉 一男
2. 発表標題 cAMPとカルシウムイオンによる微小管滑り運動の協調的制御
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴 小菊
2. 発表標題 ホヤ精子鞭毛波形制御におけるカルシウムイオンとcAMPの役割
3. 学会等名 内分泌・代謝学共同利用・共同研究拠点ワークショップ「受精・発生最前線 ~受精の仕組みと初期発生を支える代謝メカニズム」（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学下田臨海実験センター稲葉研究室発表論文
<https://inaba-lab-shimoda.jimdofree.com/home/%E7%99%BA%E8%A1%A8%E8%AB%96%E6%96%87-publications/>
筑波大学下田臨海実験センター発表論文
<https://www.shimoda.tsukuba.ac.jp/publications.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------