

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20580052

研究課題名(和文) 鱗翅目昆虫精子が受精可能な状態に成熟する過程で関与する因子のカタログ化

研究課題名(英文) Molecular identification and characterization of sperm maturation factors in lepidopteran insect.

研究代表者

長岡 純治 (NAGAOKA SUMIHARU)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・助教

研究者番号：00303933

研究成果の概要(和文)：

カイコガ (*Bombyx mori*) 精子成熟因子である trypsin 様セリンプロテアーゼ, initiatorin の一次構造および性質を決定した。また, オオスカシバ (*Cephonodes hylas*) にも initiatorin に類似した精子成熟因子が存在する可能性を見出した。生殖腺分泌物にはアルギナーゼ, 一酸化窒素合成酵素, アンジオテンシン転換酵素が含まれ, 精子成熟に深く関係していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

Molecular activation mechanisms of sperm maturation in insects have been studied mainly in the Lepidoptera. In the male silkworm, *Bombyx mori*, secretions of the prostatic gland which contain trypsin like a serine-type endopeptidase called initiatorin, trigger a cascade reaction that leads to induction of sperm maturation. Here, we identified initiatorin and showed that it efficiently cleaves fluorogenic peptides with a dibasic sequence. Similar processes of endopeptidase-triggered initiation of motility were found in *Cephonodes hylas*. Moreover, we provide evidence that the action of arginase (AG), nitric oxide synthase (NOS) and di-peptidylpeptidase (angiotensin converting enzyme, ACE) mediates a step for *Bombyx* sperm maturation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：分子昆虫学

科研費の分科・細目：農学 ・ 応用昆虫学

キーワード：昆虫、酵素、生理活性、発生・分化、プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

すべての動物の精巣で作られた完成精子は、数多くの生化学的反応過程を経て、(運動能の獲得・維持→卵子に進入→受精)といった一連の受精可能な「成熟」状態へと変化する。鱗翅目昆虫の一種であるカイコガの精子は、核を持ち受精に参画する有核精子と核

を持たない無核精子の2型が存在し、成虫では、貯精囊に貯えられた状態になっている。この時点での有核精子は256個が一つの束になって存在するのに対して、無核精子はすでに分離して存在している。そして、無核・有核精子ともに運動能を持たない。また、貯精囊内の両精子をいったん *in vitro* に取り出し、

これを未交尾メスに注入しても、受精卵を産ませることはできない。交尾・射精時、生殖輸管の分泌物により構築される精包は、メス交尾嚢内に作られ、両型の精子は射精に伴ってこの精包へと移行する。この中で、無核精子は前進性のない活発な運動能を獲得し、その運動により精包の内容物がかき混ぜられることで有核精子束は解離して、緩慢な運動能を獲得するようになる。このように変化した精子を未交尾メスの交尾嚢に注入すると、受精卵を産ませることが出来る。さらに、貯精嚢中の精子を分泌物とともに *in vitro* に取り出し、これに前立腺の磨砕物、もしくはカイコガには存在しない *trypsin* を適当な濃度で混合することで、無核精子は活発な運動能を獲得し、有核精子束は解離し、さらにこれを未交尾のメス交尾嚢に注入すると、受精卵を産ませることが出来る。すなわち、貯精嚢に貯蔵された未成熟な精子を受精可能な状態に成熟活性化する因子は、前立腺にのみ存在する *trypsin* 様の *serine* 型 *endopeptidase* であると予想され、精子活性化イニシエーターという意味から「*initiatorin*」と名付けられてきた。

2. 研究の目的

鱗翅目昆虫精子が受精可能な状態に成熟する過程で関与する因子のカタログ化を明らかにする目的から、カイコガを材料にして、

- (1) *in vitro* における精子活性化活性を指標に、前立腺からの *initiatorin* を精製し、その一次構造と *endopeptidase* としての性質を決定する。
- (2) *Initiatorin* により誘起される様々な精子成熟への反応カスケード分子を明らかにする目的から、精子成熟時にアルギニンおよび尿素が蓄積することに特に注目し、これに係わることが予想される、アルギナーゼ (AG), 一酸化窒素合成酵素 (NOS), アンジオテンシン転換酵素 (ACE) を取り上げ、射精時のオス生殖腺および精包内での動態を明らかにし、精子成熟への関与を検討する。
- (3) カイコガとそれ以外の昆虫での精子成熟機構の類似性を明らかにする目的からまず、鱗翅目スズメガ科に属するオオスカシバ未成熟精子に対する *trypsin* の反応性と *initiatorin* 相同遺伝子の単離を行う。

3. 研究の方法

トリプシン様エンドペプチダーゼ (*initiatorin*), AG, NOS, ACE を取り上げる。すべての対象分子については、以下の流れに従い、一次構造、性質、精子成熟への影響 (機能) を順次、検討した。

(1) カイコガゲノムや EST 配列情報と、他の生物で知られている遺伝情報などを参考

にして、酵素活性がみられる生殖腺部位より、対象酵素に対する cDNA 候補を単離し、その一次構造を明らかにする。

(2) 単離された遺伝子は、対象酵素の遺伝子であるか不明であるので、単離された遺伝子を大腸菌の高発現系をもちいて発現させる。発現タンパク質の酵素学的性質を、生殖腺から調整した粗酵素液と比較することにより遺伝子の同定を行い、さらに詳細な酵素学的性質・機能を調査することにより、その特徴を明らかにする。

(3) 対象酵素の生殖腺各部位における合成部位を明らかにする目的から、遺伝子配列情報をもとにした RT-PCR により遺伝子発現を調査し、同時に発現タンパク質を抗原として抗体を作成し、これを用いて、交尾前後におけるオス生殖腺における存在状態、さらには、精包内での動態を検討する。

(4) 発現タンパク質やそれに対する抗体や阻害剤を *in vitro* 精子成熟検討系に単独もしくは、複数組み合わせて添加し、精子成熟に対する機能作用点を決定する。

4. 研究成果

(1) *initiatorin*

in vitro 精子成熟検討系における精子活性化活性を指標に *benzamidine* をリガンドとした *affinity chromatography* を用いて *initiatorin* タンパク質の精製を前立腺磨砕液から行った。活性画分からは分子量が 29 kDa と 26 kDa のタンパク質が含まれ、アミノ酸配列解析により決定された N 末端配列 (IVGGRRAVPHSFP) は両タンパク質とも同じであった。次に、得られたアミノ酸配列をもとに縮合プライマーを作成し、RT-PCR により遺伝子の単離をおこなった (GenBank: AB485779)。この遺伝子を大腸菌高発現系で発現・精製した組み換えタンパク質でも精子活性化活性が確認できた。*Initiatorin* の予想アミノ酸配列中には *serine protease* の特徴である pre (分泌シグナル), pro, mature 領域からなる 3 つのドメイン構造と触媒必須残基 H⁸⁵, D¹³⁴, S²²⁶ が見出された。この遺伝子は、生殖輸管の前立腺部分にのみ特異的に発現しており、大腸菌発現系に導入して得た組み換えタンパク質を抗原として作製した抗体は、遺伝子発現同様、前立腺でのみ分子量 32, 29, 26 kDa のタンパク質を認識した。そして、精包では、分子量 32 kDa は消失しており、分子量 29, 26 kDa, および新たに 24 kDa のタンパク質を認識した。以上の結果を総合すると、32 kDa タンパク質は、pro-mature 領域からなる不活性化型であり、射精に伴い精包へと移行する間に、他のプロテアーゼまたは自己触媒活性により R-IVGG で切断されて、前立腺から精製された精子活性化活性を持つ mature 型の 29, 26 kDa へと変化したものと考えられた。

以上により、GenBank: AB485779 にコードされるタンパク質は精子活性化因子である *initiatorin* であり、これによりその一次構造を明らかにできたものと判断した。次に、前立腺精製タンパク質および組み換えタンパク質の酵素学的性質を検討したところ、至適 pH は pH 9.0 付近で、Ca²⁺ 非依存性であり、*antipain* や *leupeptin* によって活性が阻害される傾向が見出された。さらに、蛍光人工基質を用いて基質特異性について検討したところ、*trypsin* 同様 ペプチドの Arg-C 末端を切断するが、特に Boc-Gly-Arg-Arg-MCA のように C 末端側に連続する 2 つのアルギニンを有する基質に対して特異的に反応するという性質が明らかとなり、*initiatorin* の基質タンパク質探索と精子成熟との関係を解明する上で重要な手がかりが得られた。

(2) アルギナーゼ (AG)

オス生殖輸管における AG 活性は、貯精囊のみに局在すると報告されてきたが、器官からの粗酵素液の調整法を再検討し、測定したところ、貯精囊の他に乳白腺にも極めて強い活性が見出され、その多くは射精に伴い、精包へと移行することが確認された。2 種類の遺伝子 (R 型と F 型) がクローニングされ、それぞれを発現させた大腸菌の破碎可溶性画分に含まれる活性について K_m 値、反応至適温度、反応至適 pH を比較したところ、大きな違いは認められなかった。しかし、R 型遺伝子は、乳白腺と貯精囊に、F 型遺伝子は、脂肪体、筋肉、精巢で特異的に発現していた。R 型と F 型遺伝子は *alternative splicing* により生じる 5' 端構造のみが異なる遺伝子であり、そこから作られるタンパク質は、R 型が F 型に比べて N 末端 10 残基のみ短くなると予想される。R、F 型遺伝子の違いは、AG の反応性性質に影響させるのではなく、R 型は、細胞外放出により生殖腺分泌物中に、一方、F 型は、細胞質内に留まるのに関与しているものと判断される。R 型には既知の細胞外放出メカニズムに係わるシグナル配列が見出されないから、新奇な生殖腺特異的細胞外放出に深く関係しているものと予想される。

(3) 一酸化窒素合成酵素 (NOS)

In vitro 精子成熟再現系では、通常、無核精子が運動能を獲得 (AAF 活性) には約 5 分を要したが、L-NAME や D-NAME のような NO 合成阻害剤添加した場合には、濃度依存的に AAF 活性は弱まり、10.4 mM 以上の濃度以上で前立腺磨砕液の AAF 活性は完全に阻害された。また、NO 消去剤である *carboxy-PTIO* を添加すると、30 mM 以上加えたとき前立腺磨砕液に含まれる AAF 活性は完全に阻害されたが、添加後 5 分以降の変化を継続的に検討すると、完全な AAF 活性が検出されるも

の、添加する *Carboxy-PTIO* の濃度が上昇するに伴い、検出されるまでに要する時間は延長された。*Trypsin* のもつ AAF 活性に対しても、NO 合成阻害剤、NO 消去剤ともに同様な傾向が見出されたが、前立腺分泌物に含まれるそれと比較して、高濃度を必要とした。オス生殖腺の一部、乳白腺からは、NOS 遺伝子と NOS 様遺伝子の 2 種類が単離でき、これらがコードするタンパク質は、射精時に生殖腺分泌物として、メスへと送り込まれていることが見出された。加えて、交尾完了後の精包内では NO が盛んに合成されている可能性を明らかにした。以上の結果ら、生殖腺分泌物に含まれる NOS の作用により合成される NO は、精包内での精子運動能獲得に深く係わっており、精子運動能獲得の分子メカニズムを解明する上で手がかりが得られた。

(4) アンジオテンシン転換酵素 (ACE)

Captopril により阻害されるヒト ACE に類似した ACE 活性が、カイコガオス貯精囊と精包で見出された。オス生殖腺からは 2 種類の ACE 様遺伝子 (*ACEr 1*, *ACEr 2*) が単離されたが、*ACEr 2* は貯精のうのみで発現していた。大腸菌の発現系で合成させた *ACEr 2* は、ヒト ACE に類似した ACE 活性が確認された。さらに、*ACEr 2* に対する特異抗体は貯精のうのみ、遺伝子から予想される 74.1 kDa タンパク質と反応し、射精時に精包に移行することを見出した。貯精囊に含まれる運動能をもたない精子は、精包内に移動すると運動能をもつようになり、その際、特異的なアルギニン生成が生じるが、この反応系に *Captopril* を添加したが、これらの精子運動能獲得やアルギニン特異的生成反応影響は認められず、この変化への ACE の関与を明らかに出来なかった。昆虫 ACE の存在は様々な報告がなされているが、生殖との関係について初めてその手がかりが得られた。

(5) オオスカシバ (*Cephaloscyba hylas*) の *initiatorin* 同定

オオスカシバの生殖腺は、カイコガのそれとは異なった構造をしていたが、貯蔵されていた精子は、カイコガと同じく、一本ずつに分かれた無核精子と束になった有核精子の 2 型が存在していた。両者ともに運動能を欠いていたが、*trypsin* を添加すると、無核精子は盛んな回転運動を獲得し、その後、有核精子束は解離した。附属腺の一部には *initiatorin* と 71% の相同性が認められる遺伝子が特異的に発現しており、この部位の磨砕物は無核精子に緩やかな運動能の獲得をもたらした。生殖様式・生殖腺の形態が異なるカイコガ以外の鱗翅目昆虫でも、カイコガ同様に *initiatorin* 様精子活性化イニシエーターが存在していることが予想

できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 22 件)

- ① Nagaoka S., Takata Y., Kato K.; Identification of two arginases generated by alternative splicing in the silkworm, *Bombyx mori.*, *Arch. Insect Biochem.*, 査読有, 76, 2011, 97-113.
- ② Nagaoka S., Katayama H., Fujibayashi Y., Sugimura Y.; Calcium oxalate crystals in mulberry leaves: No negative effect on feeding the silkworm, *Bombyx mori.* *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, 査読有, 79, 2010, 71-74.
- ③ Yamamoto K., Nagaoka S., Banno Y., Aso Y.; Biochemical properties of an omega-class glutathione S-transferase of the silkworm, *Bombyx mori.* *Comp. Biochem. Phys.*, 査読有, 149C, 2009, 461-467.

[学会発表] (計 30 件)

- ① 長岡純治・河崎紗織; カイコガ生殖腺分泌物に含まれる Angiotensin-converting enzyme の存在とその機能. 日本蚕糸学会第 80 回大会. 2010 年 4 月 3 日. 上田市
- ② Nagaoka S., Kato K., Takata Y.; The identification of the sperm activating factor, initiatorin, which is a prostatic endopeptidase of the silkworm, *Bombyx mori.* 11th International symposium on spermatology. 2010 年 6 月 26 日. 宜野湾市
- ③ 長岡純治・藤田菜津子・大槻正嗣; 昆虫精子の活性化におけるトリプシン様セリンプロテアーゼの存在. 日本蚕糸学会合同支部大会. 2010 年 11 月 15 日. 浦添市

[図書] (計 4 件)

- ① 長岡純治; 精子が動き出す仕組み, 「虫たちが語る生物学の未来」, 衣笠会, 2009, pp114-117.

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 無細胞系タンパク質合成用抽出液の調整方法、およびカイコ組織用抽出キット
発明者: 長岡純治・東出将賢・伊東昌章
権利者: 国立大学法人京都工芸繊維大学,
株式会社島津製作所
種類: 特許

番号: 第 4243762 号

取得年月日: 21 年 1 月 20 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

長岡 純治 (NAGAOKA SUMIHARU)
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・助教
研究者番号: 00303933

(2)研究分担者

白井 孝治 (SHIRAI KOHJI)
信州大学・繊維学部・准教授
研究者番号: 00293499

山本 幸治 (YAMAMOTO KOHJI)
九州大学・農学研究科・助教
研究者番号: 00346834

(3)連携研究者

