

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06072

研究課題名(和文) カイコガオスの妊よう性を支配する精しょうタンパク質の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of seminal proteins governing male fertility of the silkworm, *Bombyx mori*.

研究代表者

長岡 純治 (Nagaoka, Sumiharu)

京都工芸繊維大学・応用生物学系・准教授

研究者番号：00303933

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)：カイコガオス生殖輸管における発現遺伝子データベースを構築して、多数の未推定遺伝子、機能未知遺伝子、スプライシングバリエーションを見出すと同時に、新規セリンプロテアーゼやインヒビターならびに、イニシャトリンの新規候補基質タンパク質が推定された。二次元電気泳動法により分離された精子成熟に伴い変化するタンパク質は、構築されたデータベースを利用することで全アミノ酸配列が明らかとなり、イニシャトリンの基質であることが予想された。さらに、これら精漿タンパク質遺伝子のノックアウトシステムをゲノム編集により作成したところ1系統がオス完全不妊となり、メス体内での精子移動不全が原因していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カイコガ精漿を構成するタンパク質を網羅的に解析することが可能なデータベースが構築された。精子成熟時に変化するタンパク質を調査して、これらも構築したデータベースを利用して解析することで、有用性を確認すると共に、実際にカイコガ精子成熟誘発因子であるイニシャトリンの基質を見出して、これらはメス体内での精子移動に関与して、これらのタンパク質の不全はオスに起因する不妊をもたらすものが存在することを明らかとした。総じて、体内受精型動物の精液タンパク質機能解析を進める研究基盤が構築でき、同時にその生理的機能の一端が明らかとなり、生殖補助やベストコントロールへの新規応用技術開発へと繋がるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：A database of expressed genes in the male reproductive organs of the silkworm, *Bombyx mori*, was constructed by long-read RNA-seq analysis. Many unidentified genes, genes with unknown functions, and splicing variants were found. Among them, long noncoding RNAs, novel serine proteases and inhibitors, and novel substrate proteins for trypsin-like proteases known to induce sperm maturation were identified. The proteins that change with sperm maturation were identified by separation and analysis using two-dimensional electrophoresis. The complete amino acid sequences were clarified using the constructed database, and the possibility that these proteins are substrates for trypsin-like protease, initiatorin was suggested. Next, knockout lines of the genes corresponding to these sperm proteins were generated by genome editing (TALEN). One of these lines resulted in complete male infertility caused by inadequate sperm movement in the female during sperm maturation.

研究分野：昆虫科学関連

キーワード：蚕糸昆虫利用学 昆虫生理生化学 精子成熟 精漿タンパク質 オス妊性 次世代シークエンス ノックアウト系統 カイコガ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

精子は精漿と共にオスからメスへと交尾行動によって送り込まれ、メス体内でさらに移動することで、最終的に卵子と受精する。このような体内受精型動物におけるオス（精子）側に関連する妊性決定機構の解明は、地球上で生物種が安定に維持されてきた仕組みの理解への一助となる。同時に、その知見が応用利用されると生殖補助（精子バンク、不妊検査・治療）やペストコントロールが可能となる。カイコガのオス妊性形成に関する研究は、①*in vivo*における精子の妊性決定に係わる変化は、人為的に交尾・射精タイミングを調節することでメスの交尾のう内に形成される精包内の変化として把握することができる。②オス体内からは未成熟精子と生殖輸管分泌物（精漿）が容易に回収でき、これを *in vitro* で反応させることで *in vitro* の反応を再現させることも可能である(*in vitro* 精子成熟再現系)。③すべての妊性評価は、人工交配と人工授精によって行える(長岡, 2014)。これらの特徴を利用することで、オス生殖輸管の一部分・前立腺から部位特異的に分泌される精漿タンパク質でありユニークな基質特異性をもつトリプシン様セリンプロテアーゼ・イニシヤトリン (serine protease 2) が、すべてのオス妊性決定反応を誘発・調節していることを明らかにした (Nagaoka et al., 2012)。この成果は、カイコガ以外のチョウ目、バタ目、カメムシ目、ハエ目昆虫、甲殻類においてもトリプシン様プロテアーゼが精子成熟誘発因子として関与している可能性が指摘されている (Xu et al., 2020; Stephens et al., 2018)。マウスの場合、排精直後の運動能が弱く受精能力も持たない「精子」は、精漿を含まない無血清培地中で培養すると、受精能を獲得することから、オス側に起因する妊しょう性は、精子が形成される段階でほぼ方向付け・決定されているものとされてきた(Usselman and Cone, 1983)。しかし、近年、ヒトや家畜のオスに起因する妊ようの悪化現象（精子カクライシス）が報告されるに伴い、「精漿」を分泌する精嚢を除去すると完全な不妊になることから「精漿」の機能は注目されるようになり、哺乳動物や線虫でも、セリンプロテアーゼやそのインヒビターが精子成熟を制御していることが示唆されるようになってきた。本研究は、生命倫理問題が絡まないカイコガの精漿タンパク質の同定・機能解明を進め、昆虫に限らず体内受精型動物には、どのような特徴を持った精漿タンパク質がどのように機能することでオス妊性決定に係わっているのかを明らかにする。

2. 研究の目的

- (1) カイコガ精漿タンパク質を合成・分泌するオス生殖腺で発現する遺伝子配列の精密かつ網羅的なプロファイルデータベースを構築する。チョウ目昆虫ドクチョウの精液タンパク質を網羅的に解析すると、約6割が既知タンパク質との相同性が認められない (Walters and Harrison, 2010)。生物種を問わず精液タンパク質に関する情報は少なく、ゲノム配列が決定されているカイコガにおいては、精液タンパク質のアノテーションデータに間違いや抜け落ちが生じている (未発表データ)。
- (2) 二次元電気泳動法や逆相クロマトグラフィーによりなどによりカイコガ精漿タンパク質の種類と精子成熟過程における変化をカタログ化する。カイコガの特徴である *in vivo*, *in vitro* 精子成熟再現系を利用して、精子成熟反応の進行に伴って回収した精液タンパク質を効率よく分離・解析した上で前述のデータベースを利用して、「精漿タンパク質」の変化を「精子成熟」との関連性において記載したデータを他の動物に先駆け、構築する。
- (3) 昆虫・カイコガで、前述の成果から妊性に関連が予想された精漿タンパク質のノックアウト系統を作成することでオス妊性との関連性を明白にする。同時に、オス妊性に関連し

たユニークな変異系統を利用することで精漿タンパク質に関する詳細な機能解析を行なう。

3. 研究の方法

(1) オス生殖腺で発現する完全長遺伝子配列を明らかにする

未交尾オス生殖輸管から mRNA を調整して、oligo dT を用いた cDNA 合成を行なう。これにより polyA を持つ RNA に由来する cDNA を次世代シーケンシング解析により網羅的に解析する。得られた配列情報は、①リード数により発現頻度を求める。②生殖腺特異的な新規スプライスジャンクションの検出を行なう。③既知の公開カイコガデータベースに登録されている既知遺伝子、予測遺伝子との照合ならびに間違い訂正を行なう。④上記に該当しない新規遺伝子の正確性について検討する。⑤発現リード数が高い遺伝子について生殖腺部位別の発現定量化とクローニングによるカタログ化を行なう。

(2) 精子成熟に係わる精漿タンパク質を分離して同定する

精漿タンパク質は精子に吸着していることを考慮して (Nagaoka and Yamamoto, 2019), 精子成熟の場である精包内タンパク質 (*in vivo*) と *in vitro* 精子成熟再現系から効率よく再現性よくサンプルを調製する方法を検討する。次に、精子成熟の進行 (時間軸) に沿った解像度の高い二次元電気泳動解析とタンパク質分離用 C₁₈ カラムを用いた液体クロマトグラフィーを行う。イニシヤトリンはアルギニンが連続した C 末端側を切断すること (Nagaoka et al., 2012) を考慮した先行実験を参考に、大きな変化が見られた塩基性タンパク質の調査を丁寧に行なう。変化が観察されたタンパク質については、トリブシン処理を経て Peptide Mass Fingerprint (PMF) とさらに MS/MS もしくは、LC-MS/MS に供する。得られたデータは前述で構築したデータベースに対して検索する (Mascot サーチ)。同時に、エドマン分解により N 末端配列解析も行なう。これらの解析のよって得られた情報をもとに精子成熟反応情報が付加された精漿タンパク質のカタログ化を進める。

(3) 精子成熟の進行に伴う精漿タンパク質の詳細な動態を明らかにする

(1), (2) において、見出された精漿タンパク質の詳細な情報を得るために、全配列の確認・決定のために、再度、RT-PCR, RACE 法による cDNA の単離を行い、全アミノ酸配列を明らかにする。得られた cDNA を大腸菌で発現・精製して、これを抗原としてウサギに免疫することで抗体を得る。この全配列に対するポリクローナル抗体は、western blotting などにより、精漿タンパク質としての分泌、移動、分解等の動態を精査する。

(4) 精子成熟に関連した精しょうタンパク質の機能性を明らかにする

前項までで取り上げた精漿タンパク質に対応した遺伝子を、ゲノム編集 (Transcription Activator-Like Effector Nuclease: TALEN) によりノックアウト系統を構築・維持する。作製されたオス系統を用い、(1) 生殖腺の形態の確認、(2) 野生型メスと交尾させ、交尾行動、交尾のう (精包)、受精のう内の精子数・形態・運動性、産卵数・受精率を検討することで、妊性とその原因となっている要素の評価を行う。

4. 研究成果

(1) 成虫オス生殖輸管で発現する完全長遺伝子データベース構築

羽化後 0 日の未交尾 *pnd w-1* 系統オス成虫の生殖輸管から全 RNA を調整して、cDNA 合成に oligo dT を用いてライブラリーを作った。これをロングリードシーケンサー PacBio Sequel II (パシフィックバイオサイエンス社) の ISO-Seq により総リード数

118,528,086 (平均リード長 2,501.3 bp), 総塩基数 296,476,653,170 bp の解読を行なった。この配列情報をカイコゲノム情報 (KAIKObase) を利用してアノテーションならびにスプライシングバリエーションの解析を行なったところ、約 3,500 種類のリードに整理され、既に公共データベースでのアノテーション間違いならびに多数の新規遺伝子を見出すことができた。特に、160 番までの発現量が多い遺伝子は、その約 9 割が機能未知なものであり、貯精のう、前立腺特異的な高い発現が明らかとなった。その中には、長鎖ノンコーディング RNA、新規セリンプロテアーゼやインヒビターならびに、精子成熟誘発因子となっているトリプシン様プロテアーゼの新規候補基質タンパク質を見出すことができた。なお、これらの遺伝子は RT-PCR と RACE 法により完全長クローニングとデータベース配列との照合を行なった。

(2) 精子成熟に伴って変化する精漿タンパク質の探索

in vitro 精子成熟再現系における精漿タンパク質の経時的な変化を精子成熟状況と共に二次元電気泳動法により分析した。当初、一次元目の等電点電気泳動を pH 3-11 レンジのゲルストリップで行なったところ、貯精のう精液から約 400 個、前立腺からは約 520 個のスポットが検出された。しかし、毎回の再現性が低く、以降の解析が困難であった。そこで、イニシャトリンの切断部位が 2 個のアルギニンが連なった C 末端側であることに注目して、塩基性タンパク質のその解析範囲を狭めることにした。条件検討を行ない、pH 6-11 レンジのゲルストリップ、陰極側の電極用紙は DTT で湿らせたものを使用し、電圧プログラムの変更を行なうこととした。この条件下で貯精のうから取り出した精液タンパク質を調査すると約 225 個のスポットが再現性よく観察されるようになり、そのうち、精子成熟に伴い出現してくる 9 個のスポットが見出した。

(3) 精子成熟に伴い変化するタンパク質の同定

2 次元電気泳動により分離されたスポット複数個を PMF により同定を試みたが同定には至らなかった。この原因を検討したところ、スポットのトリプシン処理が十分でないことに起因していることが明らかとなり、その改善法については今後進めていく必要がある。そこで、前項で見出された 9 個のスポット中分離状態の良い 7 個についてエドマン法により N 末端解析を行ない、そのうち 5 個については最終的に遺伝子配列解析まで行ない、全アミノ酸配列を決定するまでに至った。これらのタンパク質は共通して ①貯精のう特異的に分泌される精漿タンパク質であり、②精子成熟に伴い 2 つ連なったアルギニン配列の C 末端側で分解されていることが明らかとなった。すでに、カルボキシペプチダーゼ B がアルギニン配列の C 末端側でイニシャトリンによって切断されることで活性化調節を受けていることが明らかとなっているので (Sakakura et al., 2022), これらはイニシャトリン (serine protease 2) の基質となっているものと予想された。

(4) ノックアウト系統を利用した精漿タンパク質の機能解析

以上の成果を踏まえ、4 種類 (7 遺伝子) のゲノム編集法によりノックアウト (KO) 系統を樹立した。作成した系統のうち、互いに類似した一次構造を持ち、ゲノム上にタンデムに並ぶ 4 つの精漿タンパク質遺伝子をすべてノックアウトさせた KO 系統は、変異アレルホモ接合 (-/-) オスは、貯精のうにおいて 4 種タンパク質を完全に消失していた。野生型オスマたは、KO 型ヘテロ接合オスを交配させた場合、メスの遺伝子型に関係なく平均 300 個の卵が産下され、その 8 割程度が孵化した。ところが、KO 型ホモ接合オスを交配させると、産下卵数は、交尾をしなかったメスが自然に産下する卵数とほぼ等しい平均 60 個と著しく減少し、そのすべてが未受精卵であった。KO 型ホモ接合オスが射精した無核・

有核精子の形態上の異常は認められなかった。また、交尾のうにおける無核精子の激しい運動能を獲得と、有核精子束が解離し、緩慢な運動能を獲得する現象には異常が見出されず、同時に、このときに観察される尿素の蓄積にも変化が認められなかった。だが、交尾後 120 分以降の受精のうからは、通常、無核精子と有核精子が観察されるが、KO 系統では、無核精子のみが観察された。よって、これら 4 つの精漿タンパク質は、オスの妊性決定に深く係わっており、有核精子のメス体内での交尾のうから受精のうへの移動に関係していることが明らかとなった。

<引用文献>

Nagaoka, S., Kato, K., Takata, Y., Kamei, K., 2012. Identification of sperm-activating factor initiatorin, a prostatic endopeptidase of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42, 571–582.

長岡純治, 2014. カイコガ精子成熟誘発因子・イニシヤトリンから見た 昆虫オス生殖分子メカニズムの解明 蚕糸・昆虫バイオテック 83, 11–24.

Nagaoka, S., Yamamoto, K., 2019. Identification and characterization of superoxide dismutase in silkworm seminal fluid. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* 88, 39–47.

Sakakura, M., Takata, Y., Kimura, C., Matsuda, S., Takamura, T., Nagaoka, S., 2022. Limited proteolysis by a prostatic endopeptidase, the sperm-activating factor initiatorin, regulates the activation of procarboxypeptidase B in the seminal fluid of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 148, 103819.

Stephens, K., Cardullo, R. A., Thaler, C. D., 2018. *Culex pipiens* sperm motility is initiated by a trypsin-like protease from male accessory glands. *Mol. Reprod. Dev.* 85, 1–9.

Usselman, M. C., Cone, It. A., 1983. Rat sperm are mechanically immobilized in the caudalepididymis by “immobiin.” a high molecular weight glycoprotein. *Biol. Reprod.* 29, 1241–1253.

Walters, J. R., Harrison, R. G., 2010. Combined EST and proteomic analysis identifies rapidly evolving seminal fluid proteins in *Heliconius* butterflies. *Mol. Biol. Evol.*, 27, 2000–2013.

Xu, X., Wang, Y., Bi, H., Xu, J., Liu, Z., Niu, C., He, L., James, A. A., Li, K., Huang, Y., 2020. Mutation of the seminal protease gene, serine protease 2, result in male sterility in diverse lepidopterans. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 116, 103243.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakakura, M., Takata, Y., Kimura, C., Matsuda, S., Takamura, T., Nagaoka, S.	4. 巻 148
2. 論文標題 Limited proteolysis by a prostatic endopeptidase, the sperm-activating factor initiatorin, regulates the activation of pro-carboxypeptidase B in the seminal fluid of the silkworm, <i>Bombyx mori</i> .	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 103819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibmb.2022.103819	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miki Sakakura, Yuki Takata, Chikayo Kimura, Saki Matsuda, Tomoko Takamura, Sumiharu Nagaoka	4. 巻 148
2. 論文標題 Limited proteolysis by a prostatic endopeptidase, the sperm-activating factor initiatorin, regulates the activation of pro-carboxypeptidase B in the seminal fluid of the silkworm, <i>Bombyx mori</i> .	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 103819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibmb.2022.103819	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagaoka, S., Tani, N., Kimura, C. and Sakakura, M.	4. 巻 90
2. 論文標題 Identification and characterization of fructose-1,6-diphosphate aldolase in seminal fluid of the silkworm, <i>Bombyx mori</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Insect Biotechnology and Sericology	6. 最初と最後の頁 11-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11416/jibs.90.1_011	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 一田（高濱）昌利，長岡純治，倉知桂子，地村千里，齊藤有里加，首藤優子，秋野順治	4. 巻 13
2. 論文標題 イタリアから渡来した養蚕教材について	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 京都工芸繊維大学学術報告書	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takagi, S., Murayama, S., Torii, K., Takemura-Morita, S., Kurganov, E., Nagaoka, S., Wanaka, A. and Miyata, S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Depletion of microglia and macrophages with clodronate liposomes attenuates zymosan-induced Fos expression and hypothermia in the adult mouse.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2020.577244	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター資源昆虫学研究室ホームページ
<https://sites.google.com/view/kitael/>

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
---------	---------