

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22370028

研究課題名(和文) 精子の遊泳制御におけるカルシウム調節機構の解明

研究課題名(英文) Calcium dynamics in the regulation of flagellar movement of swimming spermatozoa

研究代表者

真行寺 千佳子 (Shingyoji, Chikako)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80125997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：ウニなどの走化性を示す精子の遊泳方向は、カルシウム濃度に依存した鞭毛運動によって制御されている。我々は、カルシウム反応を頭部機械刺激により誘導し、遊泳方向変化とそれに対応するカルシウム動態を定量化することに成功した。この「機械刺激反応実験系」による解析の結果、カルシウム流入による遊泳停止が起こり、カルシウム排出初期(膜のPMCAとフラジェラシアリンの協調的働き)の段階で鞭毛波が対称となり直進遊泳を示し、NCKXによる排出で細胞内カルシウム濃度が下がると通常の非対称波へ移行することが明らかとなった。また、細胞内カルシウムストアによる細胞内の濃度調節が、運動の開始に関与することも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Flagellar movement of the sea urchin sperm is regulated by intracellular Ca^{2+} . To study the mechanism of Ca^{2+} dynamics underlying flagellar movement, we analyzed the mechanosensory behavioral responses. In the presence of 10 mM Ca^{2+} , the sperm swim in circular paths (C). When a mechanical stimulus was applied to the head, the sperm showed a series of flagellar responses, consisting of a stoppage of beating (Q) and a recovery of swimming in a straight path (S), followed by swimming in a circular path again; as the result the sperm avoided the obstacle. Ca^{2+} -imaging showed that the intracellular Ca^{2+} was high in the Q and the early stage of S, and gradually decreased after that. The Ca^{2+} influx was induced by Ca^{2+} channels and the Ca^{2+} efflux was induced by a flagellin-related Ca^{2+} -efflux system, PMCA and the NCKX. Separate experiments revealed that the initiation of flagellar movement of the sperm was regulated by the intracellular Ca^{2+} through the Ca^{2+} stores.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：カルシウム 生体分子 生理学 細胞・組織 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

原生物や精子などの鞭毛や繊毛は、細胞内カルシウム濃度が高まると、特徴的な運動変化を示すことが知られており、このカルシウム反応が細胞機能の制御に必須である。ゾウリムシでは、繊毛の有効打の方向が逆転し、細胞は後退遊泳により逃避反応を示す。一方、ウニ精子は、細胞内カルシウム濃度が 10^{-4} M 以上に高まると鞭毛は基部でステッキ状に曲がり、運動を停止する。これよりわずかに低い濃度 10^{-5} – 10^{-7} M では、鞭毛の波形は非対称となるが運動は続く。細胞内カルシウム濃度の上昇は通常一過的で、上昇後すぐに 10^{-8} M 以下の低濃度にもどる。例えば、精子が卵に対して走化性を示すときには、細胞内カルシウム濃度の一過的増大が周期的に起こり、直進とターンが、卵に到達するまで交互に繰り返される (Shiba と Yoshida ら、2008; Darszon らのグループ 2004 他; Kaup らのグループ 2003 他)。

細胞内カルシウムの急激な上昇には、電位依存性のカルシウムチャンネルが、またカルシウムの排出には、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger などが関与することが示唆されていた。しかし、カルシウムの動態とこれら膜タンパク質の機能との関係はまだ一部しかわかっていなかった。

遊泳軌跡の変化 (波形の対称性の変化) とカルシウム動態の周期的調節の関係については、カルシウム濃度が高い状態では鞭毛の非対称性が増し遊泳方向が変わる (ターンする) という説 (説 1) と、高い濃度下でも直進とターンの両者が見られ、単にカルシウムの濃度レベルが波形の対称性を決めるのではなく、カルシウムの動的変化が重要とする説 (説 2) が出されており、決着がついていない。それぞれの実験には主にウニ精子とホヤ精子が用いられている。このカルシウム調節機構の解明は、走化性の基礎となるカルシウムによる鞭毛運動制御を理解する上でも意義深い。誘因物質などによる外界からの刺激に対する、膜を介した反応制御の基本機構についての理解を深めるという観点からも重要な意味を持つ。

2. 研究の目的

カルシウムの反応性のより詳細な解析には、反応を正確に繰り返し誘導し解析できる実験系の開発が望まれる。走化性の場合には刺激量の時

空間制御が難しい。そこで、我々は、ウニとホヤ精子の持つ「機械刺激反応性」に注目し、これを新しい実験系として確立して、カルシウム反応を定量化し、この反応制御に関わる膜タンパク質および鞭毛の制御を解明することを目指した。

ウニやホヤの精子に見られる「機械刺激反応性」は、研究代表者らが数年前に発見しその機能解析を進めてきた興味深い現象で、ゾウリムシに見られる逃避反応時のカルシウム反応と共通した機構によると推測される。遊泳中のウニ精子の頭部先端に微小ガラス針をぶつけると、精子は一時的に運動停止を示し、その後直進遊泳 (対称な波形) を示して遊泳方向を変え、その数秒後、通常非対称波を示す緩やかなターンを示す遊泳軌跡へと戻る。この一連の反応は、細胞外にカルシウムがなければ起こらない。この反応中の細胞内カルシウム濃度の変化は大変興味深い。鞭毛停止は、急激な濃度上昇により誘導されるが、カルシウムが (まだ高めの状態のまま少しずつ) 減少するように見える状態に対称波となる。この変化は連携研究者柴らの発見した走化性時のカルシウム動態 (説 2) とよく似ている。機械刺激反応は、繰り返し誘導できるので、さまざまな膜タンパク質の阻害剤などの効果を検討する道が開ける。

もう 1 つの視点は、分担者北島らによりウニ精子の膜にのみ発見されているポリシアル酸含有糖タンパク質「フラジェラシアリン」の役割に注目することである。ポリシアル酸の機能はほとんどが未知であるが、近いタイプで神経細胞接着分子上のものは脊椎動物脳の発生や分化に関わることが示されている。フラジェラシアリンは、精子の運動に関わることは示唆されている (Kitajima ら 2006) が、その機能の詳細を調べる有効な手段がこれまでなかった。本計画の機械刺激によるカルシウム反応性の解析実験が新たな道を開く。予備実験の結果から、これがカルシウム濃度の急激な減少に関わる可能性が高い。そこで、フラジェラシアリン依存性膜タンパク質がカルシウム濃度の減少調節に関わるという考えを組み込んだ、カルシウム流入と排出の機構に関する新しいモデルを提案し (Fig. 4) これを生理機能と生化学特性の両面から検証する。

3. 研究の方法

アカウニ (*Pseudocentrotus depressus*) とバフンウニ (*Hemacentrotus pulcherrimus*) の精子を用いた。

(1) 機械刺激受容反応

機械受容反応の誘導と記録・解析

スライドガラスとカバーガラス, およびスペーサーとして厚さ 1 mm のシリコンシートを用いてチャンパーを作り, チャンパー内はフォルムバール処理を行った。このチャンパー内に海水に希釈した精子を入れ, 水圧式マイクロマニピュレーターに取付けたガラス微小針を操作して, 精子頭部に微小針を当てた。精子の運動は, ストロボ照明を組み込んだ位相差顕微鏡で観察し, 高速度カメラでデジタル画像としてコンピューターに記録し (200 fps), 繊毛・鞭毛運動波形解析用ソフトウェア Bohboh を用いて解析した。カルシウムイメージング

上記の位相差顕微鏡で用いた LED ストロボ照明装置を蛍光顕微鏡に応用し, カルシウムインジケーターである fluo-4 AM 体を精子に取り込ませ, 機械刺激に反応した精子のカルシウム濃度変化を波形変化と対応させて解析した。

阻害剤・抗体実験

暗視野顕微鏡下で実験を行った。機械受容チャネルの阻害剤であるガドリニウム (Gd^{3+}), 電位依存性カルシウムチャネルの阻害剤として verapamil とコバルト (Co^{2+}), カルシウム排出に関わるとされる PMCA の阻害剤の 5-(-6-)-carboxyeosin (CE), および NCKX の阻害剤の KB-R7943 を用いた。さらに, flagellalin のモノクローナル抗体である 3G9 と 4F7 を用いた。

(2) 細胞内 Ca^{2+} ストアの役割

Ca^{2+} キレート, 細胞内 Ca^{2+} ストアの機能阻害

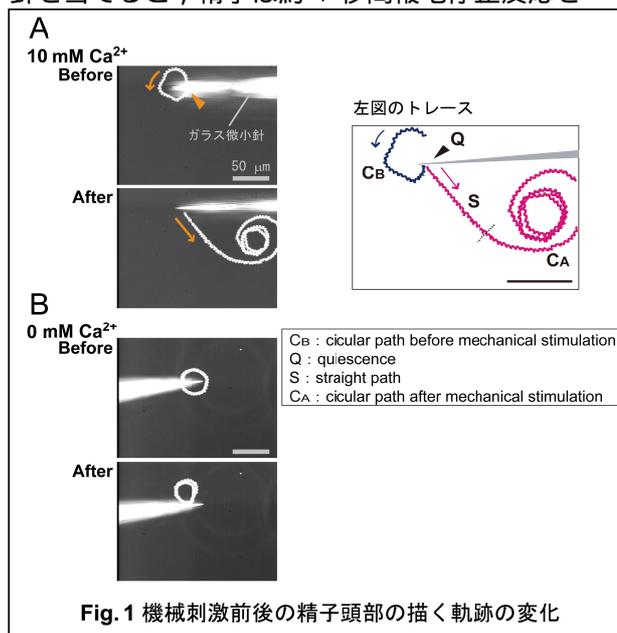
精子は 0-10 mM Ca^{2+} を含む人工海水 (ASW, pH 8.0) に 2 段階で希釈し, ASW の Ca^{2+} は 10 mM (1 段階目), 0.1 mM (2 段階目) の BAPTA (*O,O'*-bis(2-amino-phenyl)ethyleneglycol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, tetrapotassium salt, hydrate) により, それぞれ 1.5×10^{-9} M, 2.9×10^{-10} M 以下にキレートした。細胞内 Ca^{2+} は, 25 μ M の膜透過型 BAPTA (BAPTA-AM) によりキレートした。実験では, 第 1 段階で Ca^{2+} を含まない ASW (pH 7.0) 中で遊泳開始前の精子を 20-30 分間 (23-25) キレート剤で処

理し, その後, pH 8.0 の ASW に希釈して遊泳を誘導した。 Ca^{2+} ATPase 阻害剤として用いられている thapsigargin (Tg) で阻害が起きる高い感受性の SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase) がウニ精子には存在しない。そこで Tg-resistant SPCA (secretory pathway Ca^{2+} ATPase; ミトコンドリア膜に局在) に阻害効果の高い bisphenol (2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol)) を 0.1-5.0 μ M で使用した。これらの調製に用いる dimethyl sulfoxide (DMSO) は 3% とした。阻害剤は精子の第 2 段階希釈時の ASW に加え, 精子への作用は運動の開始または変化を指標とした。精子の運動性は, 遊泳率として計測し, 遊泳している精子については鞭毛打頻度と鞭毛波形の変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 機械刺激に対する反応

10 mM カルシウムを含む人工海水に希釈したウニ精子は, ガラス面近くでは直径約 50 μ m の円を描くように遊泳する (C_B)。ガラス微小針を遊泳軌跡中に差し入れ, 精子頭部先端に垂直に針を当てると, 精子は約 1 秒間鞭毛停止反応を



示した (Q)。その後, 直線的な軌跡で遊泳 (S) を再開し, その後再び円を描くような遊泳 (C_A) に戻った。このようにして精子は, 障害物を避けるという逃避反応を示した (Fig. 1A)。この一連の反応はカルシウム依存性で, カルシウム濃度が 10 mM では 100%, 1 mM では 5.4% の精子

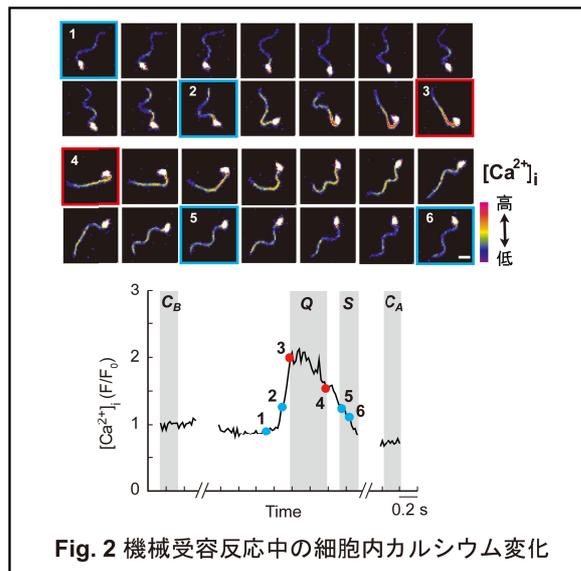
が逃避反応を示した .0 mM では、機械刺激による遊泳方向の変化は起こらなかった (Fig. 1B). 以下では、10 mM カルシウム存在下で機械刺激により誘導される一連の反応 (C_B -Q-S- C_A と表す) に着目して実験を行った .

(2) 波形変化

機械刺激を与える前のウニ精子の屈曲波形は、屈曲がより大きい Principal bend (P-bend) とより小さい Reverse bend (R-bend) からなる . 機械刺激による鞭毛停止反応後の直進遊泳時には、R-bend の屈曲が P-bend の大きさに近づく結果、鞭毛波形はより対称性を増し、遊泳軌跡が直線的になることが明らかとなった .

(3) 細胞内カルシウムの可視化

機械受容反応中の細胞内カルシウム濃度の変化を解析した結果 (Fig. 2: カルシウム濃度の変化を青から赤までの疑似カラーで表す), 円を描いて遊泳している 1 の状態ではカルシウム濃度は低く、2 で頭部が針にぶつくとカルシウム濃度は急激に上昇し、鞭毛停止反応を示す 3 の状態では最大になった . その後徐々に低くなるが、直進遊泳をしている 5 の状態ではまだ定常状態より高い .



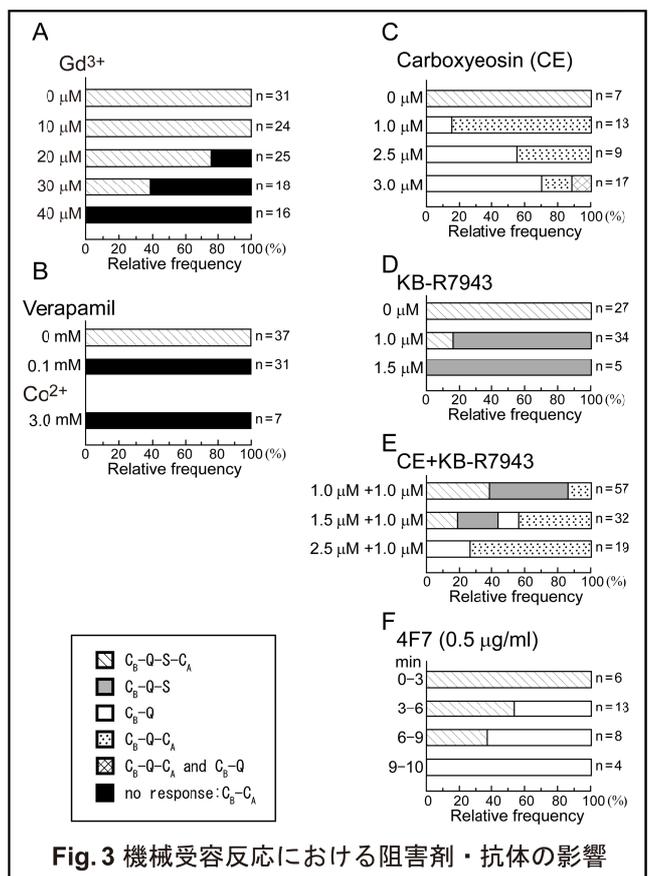
(4) カルシウム流入制御

機械受容チャネルの阻害剤であるガドリニウム (Gd^{3+}) 20-30 μ M 存在下では、通常機械刺激により誘導される鞭毛停止反応が一部の精子では起こらず、40 μ M ではすべての精子で停止反応は阻害され、精子は遊泳を続けた (Fig. 3A). また、L 型の電位依存性カルシウムチャネルの

阻害剤である verapamil (0.1 mM) やコバルト (3 mM Co^{2+}) 存在下でも、機械刺激による停止反応は誘導されなかった (Fig. 3B). これらの結果から、機械刺激による鞭毛停止反応には、機械受容チャネルと L 型電位依存性カルシウムチャネルが連動して関与すると推測される .

(5) Ca^{2+} -ATPase (PMCA) と K^+ -依存性 Na^+/Ca^{2+} exchanger (NCKX) の役割

カルシウム排出に関わると予想される PMCA の阻害剤 5-(-6)-carboxyeosin (CE) と NCKX の阻害剤である KB-R7943 の効果を調べた . 1 μ M CE 存在下では、機械刺激により鞭毛停止反応が誘導された後、円軌跡を描く遊泳となり (C_B -Q- C_A), 通常停止反応後に見られる直進遊泳は起こらなかった . CE 濃度を上げると機械刺激による鞭毛停止反応を示したままで運動を再開しないもの (C_B -Q) の割合が増加した (Fig. 3C). 一方、1-1.5 μ M KB-R7943 存在下では、機械刺激による鞭毛停止反応後の直進遊泳が長くなり、再び円軌跡



に戻ることなく鞭毛がまっすぐになって運動を停止した (C_B -Q-S) (Fig. 3D). 以上の結果から、機械刺激による鞭毛停止からの運動再開には PMCA が、直進遊泳から円軌跡を描く遊泳に戻

る過程には NCKX がそれぞれ関わる結果、細胞内カルシウム濃度が減少することが示唆された。さらに、CE と KB-R7943 共存下では各阻害剤単独で見られる反応のタイプがすべて現れた (Fig. 3E) ことから、PMCA と NCKX の活性は細胞内カルシウムの絶対濃度により切り替わるように制御されているのではないと推測される。

(6) Flagelliasialin の役割

ウニ精子の細胞膜に特異的に存在する α -2,9 結合ポリシアル酸糖タンパク質 flagelliasialin は、細胞内カルシウム濃度調節に関与すると考えられている。Flagelliasialin 糖鎖部分のモノクローナル抗体である 4F7 (0.5 $\mu\text{g/ml}$) を海水中に加えて約 3 分後から精子の鞭毛打は不規則となり、遊泳軌跡が乱れた。運動を完全に停止するまでの 10 分間に機械刺激を与えると、鞭毛停止反応を示したまま運動を停止する ($C_{B,Q}$) という CE 存在下と似た反応が見られた (Fig. 3F)。この結果は、鞭毛停止反応後の運動開始には、flagelliasialin の関与する Ca^{2+} 排出機構が関与することを示唆する。

遊泳中の精子は、4F7 や CE 存在下では quiescence を示して運動を停止 ($C_{B,Q}$) し、KB-R7943 では直線状で停止 ($C_{B,Q-S}$ の後に起こると予想される停止) したが、興味深いことに、verapamil の共存下では停止せずに通常の鞭毛運動が持続した。このことは、定常状態の遊泳中においても細胞内カルシウム濃度調節が行われており、その調節機構には、電位依存性カルシウムチャンネルを介したカルシウムの流入と PMCA, NCKX, flagelliasialin の関与するシステムによるカルシウム排出が関わりと推測される。

(7) 精子遊泳に対する細胞内外の Ca^{2+} キレート、細胞内 Ca^{2+} ストアへの Ca^{2+} 取り込み阻害の効果

BAPTA, BAPTA-AM により細胞内外の Ca^{2+} をキレートした条件下で、精子を bisphenol (BP) で処理した。その結果、精子の遊泳率は阻害剤の濃度依存的に低下し、細胞内 Ca^{2+} をキレートするとキレートしない条件より高くなった。BP による SPCA の阻害では Ca^{2+} ストアへの Ca^{2+} の取り込みは阻害されるが、ストア内から細胞内への Ca^{2+} 放出は阻害されない。放出された Ca^{2+} はキレート剤存在下ではキレートされる。上記の結果は、 Ca^{2+} 放出と BAPTA-AM によるキレートの結果起こる細胞内 Ca^{2+} 濃度の増大と減少が、精子の遊泳率と関係することを示唆する。2-4

μM BP 処理では、どの Ca^{2+} キレート条件下でも遊泳率は外部からの Ca^{2+} 投与の直後に大きく上昇し、これを裏付ける。

本研究では、ウニ精子におけるカルシウム依存性機械受容反応に着目し、この反応の特性、およびカルシウム流入に関わる膜タンパク質等を明らかにすることにより、カルシウム動態制御のメカニズムを解明することを目指した。その結果、精子頭部の機械刺激により、鞭毛運動の一時停止とそれに続く対称性の増大による直進遊泳、それに続く円軌跡を描く遊泳の回復という一連の特徴ある反応が誘導されることを見出した。この反応中の細胞内のカルシウム動態と阻害剤等の効果の解析から、鞭毛停止反応時には細胞内カルシウムの一時的な上昇が起こ

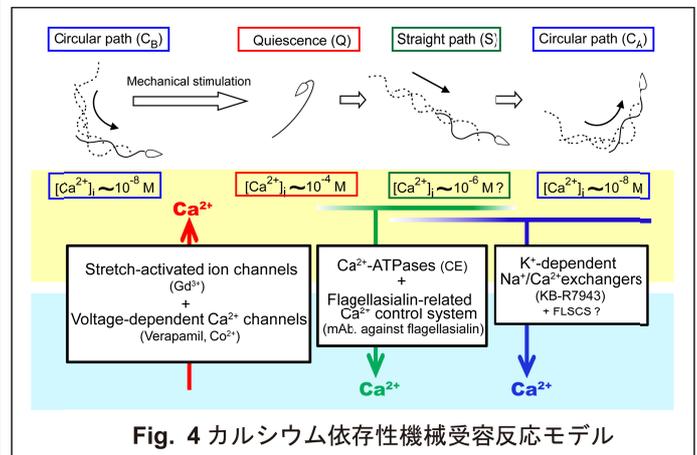


Fig. 4 カルシウム依存性機械受容反応モデル

り、直進遊泳時には徐々に下がるが定常状態より高いままであること、鞭毛停止反応後のカルシウム排出は、PMCA, NCKX, および flagelliasialin の関わる新たな系が相互に関与しながらカルシウム濃度を制御していることが明らかとなった (Fig. 4)。また、遊泳開始には、細胞内のカルシウムレベルが重要であり、遊泳開始後は、内外のカルシウムレベルが低くてもすぐに遊泳が停止することはないことがわかった。カルシウム排出において PMCA, NCKX, flagelliasialin の関わる新たな系がどのように機能するのは今後の課題である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Pigino, G., Maheshwari, A., Bui, K. H., Shingyoji, C., Kamimura, S. and Ishikawa, T. (2012) Comparative structural analysis of eukaryotic flagella and cilia from

Chlamydomonas, Tetrahymena, and sea urchins. *J. Struct. Biol.*, 178: 199-206. 査読有. DOI: 10.1016/j.jsb.2012.02.012

Kambara, Y., Shiba, K., Yoshida, M., Sato, C., Kitajima, K. and Shingyoji, C. (2011). Mechanism regulating Ca^{2+} -dependent mechanosensory behaviour in sea urchin spermatozoa. *Cell Structure and Function*, 36: 69-82. 2011.4.1. on line. <http://dx.doi.org/10.1247/csf.10020> 査読有.

Nakano, I., Fujiwara, R., Wada, M. and Shingyoji, C. (2011). Effects of iodide on the coupling between ATP hydrolysis and motile activity in axonemal dynein. *Cytoskeleton*, 68: 279-289. 査読有. DOI: 10.1002/cm.20511

[学会発表](計12件)

Shingyoji, C. Mechanical activity of dynein and its regulation underlying oscillatory movement of sperm flagella. International Workshop Dynein 2013, Kobe (Orbis Hall), October 31-November 3, 2013. (invited).

Nakano, I., Nishide, I. and Shingyoji, C. The role of intracellular calcium in the regulation of flagellar response to mechanical stimulation in sea urchin spermatozoa. International Workshop Dynein 2013, Kobe, October 31-November 3, 2013.

Izawa, Y. and Shingyoji, C. Effects of mechanical deformation on the initiation of beating in sea urchin sperm flagella. International Workshop Dynein 2013, Kobe, October 31-November 3, 2013.

中野泉、西出功、真行寺千佳子、ウニ精子の機械刺激反応における細胞内カルシウムの役割. 日本動物学会第84回大会、岡山市(岡山大学) 2013年9月26-28日.

西出功・中野泉・真行寺千佳子 “ウニ精子遊泳制御における細胞内カルシウムの役割” 第7回鞭毛・ダイニン機能研究会、東京(2013年3月23日)

中野泉・蒲原祐花・金澤尊・佐藤ちひろ・北島健・真行寺千佳子 “ウニ精子の機械刺激時の Ca^{2+} 依存性鞭毛運動制御に対する脂質ラフト形成阻害剤等の効果” 日本動物学会第83回大会、大阪(2012年9月15日).

Shingyoji, C. Ca^{2+} signaling and the mechanosensory response in sea urchin spermatozoa. 1st International caesar Conference “Sperm Signaling and Motility”, Bonn, October 5-7, 2011.

中野泉・蒲原祐花・金澤尊・佐藤ちひろ・北島健・真行寺千佳子 “ウニ精子の機械受容反応に關与するカルシウム依存性膜タンパク

質の活性制御” 日本動物学会第82回大会、旭川(2011年9月21-23日).

中野泉・藤原輪・真行寺千佳子 “ウニ精子鞭毛ダイニンのATPase活性と運動活性の連関に対するKIの効果” 日本動物学会第81回大会、東京(2010年9月23日~25日)

Kambara, Y., Shiba, K., Sato, C., Kitajima, K. and Shingyoji, C. “ Ca^{2+} -dependent regulation of sea urchin sperm swimming before and after mechanical stimulation.” The 11th International Symposium on Spermatology, Okinawa, 2010. 6. 24 - 6. 29.

[図書](計2件)

Shingyoji, C. (2013). Measuring the regulation of dynein activity during flagellar motility. In *Methods in Enzymology*, vol. 524, Cilia Part A (edited by Wallace F. Marshall), Academic Press, UK. pp. 397 (Chapter 9, p. 147-170).

Shingyoji, C. (2011). Regulation of dynein in ciliary and flagellar Movement. In *Dynein: Structure, Biology and Disease*, edited by S. M. King, Elsevier, Chapter 13, pp. 367-393.

[その他](計3件)

プレスリリース(東京大学): 2011年3月30日 14時発表 4月1日0時解禁 「精子の機械受容反応の発見とカルシウム依存性鞭毛反応の制御機構の解明-ウニ精子が障害物を回避して遊泳を続けるメカニズム-」.

上記内容は、2011年4月1日、日経 biotech, 日経速報ニュースで報道された.

上記内容は、東大HPと理学系HPに掲載された.

<http://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2011/07.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真行寺 千佳子 (Shingyoji, Chikako)
東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号: 80125997

(2) 研究分担者

北島 健 (Kitajima, Ken)
名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授
研究者番号: 80192558

(3) 連携研究表者

柴 小菊 (Shiba, Kogiku)
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・助教
研究者番号: 70533561