

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21112004

研究課題名(和文)アロ認証研究のための次世代技術の開発と活用

研究課題名(英文)Development and application of future technology for allrecognition research

研究代表者

稲葉 一男(INABA, Kazuo)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：80221779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 97,300,000円、(間接経費) 29,190,000円

研究成果の概要(和文)：(1)ホヤ精子の新規カルシウム結合タンパク質「カラクシン」は鞭毛外腕ダイニンにカルシウム依存的に結合しモーター活性を抑制することにより精子鞭毛の非対称波を伝播させ、最終的に卵への精子走化性を引き起こしていることが明らかとなった。(2)巻貝であるマガキガイにおいて2種の後進運動を発見した。精子束からの遊離と雌の受精嚢壁からの遊離に後進運動が用いられ、これらの運動にはカルシウムが必要なことがわかった。(3)アロ認証研究に必要なプロテオミクス解析、高速運動解析、遺伝子改変技術について開発を行い、ホヤ精子-卵のアロ認証、ウズラ精子の貯蔵、褐藻類遊走子の運動調節等に関する領域内共同研究を進めた。

研究成果の概要(英文)：First, a novel calcium-binding protein calaxin has been shown to bind to the outer arm dynein in a calcium-dependent manner, resulting in suppression of the asymmetric flagellar waveform and in the chemotactic movement of sperm in the ascidian *Ciona intestinalis*. Second, the eusperm in the gastropod *Strombus luhuanus* has been shown to exhibit two types of backward swimming. One is to detach from sperm bundle and the other is to be released from the epithelium of female sperm receptacle. In both cases, extracellular calcium ion plays a critical role for switching to backward swimming. Third, by developing analytical systems for high-speed imaging and transgenic techniques, we have conducted many collaborating works in the research group, including allrecognition in the sperm-egg interaction in *Ciona*, sperm storage mechanism in quail, and regulation of flagellar movement of the zoospore in brown algae.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：受精 精子走化性 カラクシン 海産生物 トランスジェニック技術 ホヤ 鞭毛繊維

1. 研究開始当初の背景

海産生物の受精研究の歴史は古く、受精現象、先体反応の発見から始まり、精子運動性の変化、精子-卵認識、膜融合、卵応答など、受精分野の基礎となっている多くの知見は海産生物を用いた研究により得られたものである。マウスやヒトなどの脊椎動物の受精研究が発展した状況であっても、依然として海産動物から多くの新しい知見が輩出されている。これは、海産動物に多様な受精様式が存在し、受精現象の極端な一面が得られること、および他の細胞の混入のない多量の配偶子が容易に得られるといった利点があるからである。一方、ゲノミクス、プロテオミクス、ノックアウト技術など、モデル生物を用いた手法により、受精における重要分子の発見やそれらの機能解析が進んでいる。これらの新技術を海産動物に適用し、それらを駆使することにより新知見を得る方向の研究は、まだ緒についたばかりである。

本研究では、代表者と分担者が確立してきた海産生物の新技术、機能プロテオミクス、高速イメージング、トランスジェニック技術を駆使し、受精時の分子認証に関わる新規分子の同定と機能解析を進めることを目的として研究を進めた。研究開始当初は、ホヤを中心として海産生物のゲノム情報が得られたばかりであり、代表者のグループ以外、プロテオミクスを駆使した研究はほとんど行われていなかった。また、プロテオミクスで同定した分子に関する機能解析に関する報告もほとんどなかった。高速イメージングに関しては、ホヤやウニを用いた研究が行われていたが、プロテオミクス等で同定された分子との関連についての研究が欠落していた。海産動物におけるトランスジェニック技術については、分担者が確立したMinosを用いたホヤトランスジェニック技術が確立しており、この方法を用いた種々の系統が作製されていた。しかしながら特定の遺伝子を破壊するノックアウト技術の開発がないために、プロテオミクス等で同定された分子の機能を遺伝子破壊により解析することが不可能であった。これらの技術のコンビネーションによる新たな分子認証研究のエポックを確立し、精子活性化走化性、精子先体反応、ミトコンドリア膜輸送、精子-卵膜認識、精子-卵細胞膜認識の受精の素過程に関与する分子解析を行うことがアロ認証メカニズムを理解する上で必要である。

研究開始前の状況としては、一部の機器を除き、本研究を進める上で必要な設備的・組織的な準備は整っていた。また、研究代表者は、ホヤデータベース開発に関する研究代表、およびホヤ系統保存に関するナショナルバイオリソースプロジェクトの拠点代表を務めており、これらのリソースを十分に活用した研究を行うことができる状況であった。これらのリソースを領域内研究者にも提供することで本領域研究がスムーズに進むと期待された。

2. 研究の目的

本研究では、機能プロテオミクス、高速イメージング、トランスジェニック技術を駆使し、受精時の分子認証に関わる新規分子の同定と機能解析を進めることを目的とする。これらの技術を提供することによりアロ分子認証研究を海産生物において押し進めるとともに、領域内の共同研究により、さまざまな生物研究に応用する。具体的には、ホヤなどの海産動物を研究材料にし、精子活性化走化性、精子先体反応、ミトコンドリア膜輸送、精子-卵膜認識、精子-卵細胞膜認識の受精の素過程に関与する分子を機能プロテオミクスにより同定する。さらにトランスジェニック技術を用いて、分子認証に関わる分子の視覚化および機能解析を行なう。本計画研究で用いた方法論は、様々な生物を用いる領域内の他の計画班の進める研究にも応用し、領域内の活性化を図る。さらに、本研究で同定された重要分子については、計画班との共同研究により、他の動物あるいは植物において検索し、動植物に共通のアロ認証機構を明らかにする。

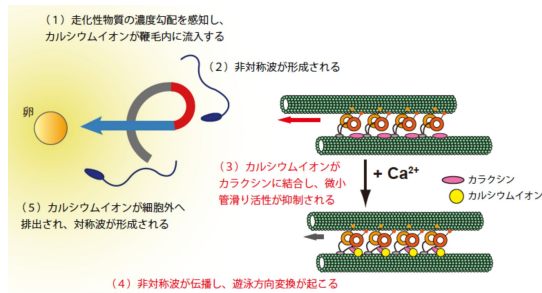
3. 研究の方法

本研究では、海産生物の受精における分子認証に関わる分子や、それらの分子と相互作用する分子の機能プロテオミクスとイメージングによる解析、およびトランスジェニックラインを用いた分子の機能解析、さらに本分野に有用なエンハンサートラップラインの開発に主眼をおいて研究を進めた。前者は代表者が、後者は分担者がこれまで確立してきたシステムを用いて解析し、それらの融合により本計画研究の目的であるこれらの技術の当該分野への応用と、システムの確立を目指した。具体的な研究項目は、(1)精子活性化のシグナル伝達機構、(2)ミトコンドリア移動の分子メカニズム、(3)先体反応の機能プロテオミクス、(4)精子膜画分のシグナル因子の検索、(5)解析系・技術の応用である。プロテオミクス技術とトランスジェニック技術が確立されているホヤを主な研究材料に用いるとともに、アロ認証機構の多様性を理解するために種々の海産生物も用いた。領域内共同研究では、海産動物以外に、ウズラ、イモリ、褐藻類、ゼニゴケ等も研究対象とした。

4. 研究成果

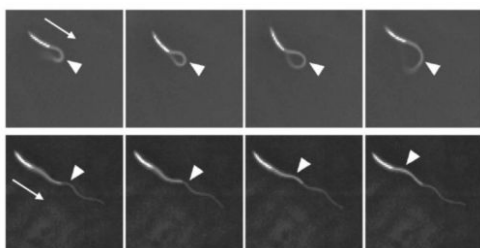
(1)プロテオミクスによる精子構成タンパク質の同定：ホヤ精子の様々な画分の二次元電気泳動による解析、ならびに質量分析計によるタンパク質同定を行った。その結果、精子の各コンパートメント(頭部可溶性画分、頭部不溶性画分、尾部可溶性画分、尾部不溶性画分)に特異的に局在するタンパク質を明らかにした。また、尾部特異的なアクチンフォームが存在することや、可溶性画分における軸系タンパク質の新たな機能が示唆された。

(2) 精子走化性のメカニズム：ホヤ精子鞭毛に存在する新規の神経カルシウムセンサーを同定し、「カラクシン」と命名した。さらに、鞭毛軸系のカラクシンがカルシウム依存的に外腕ダイニン重鎖に結合すること、カラクシンの結合によりダイニンの微小管滑り運動活性が抑制されること、ダイニンの部分的抑制により鞭毛の非対称波の伝播が維持されること、それにより結果的に非対称波によるターン運動が可能となり、卵に向かう精子走化性が可能となることを明らかにした(下図)。



(3) 精子運動活性化に至る分子メカニズム：哺乳類精子で報告されているSp17のホヤオルソログについて解析したところ、Sp17が精子の頭部ミトコンドリア近傍と鞭毛全体に存在すること、精子活性化走化性物質であるSAAFの作用により分解されること、分解がカルシウム依存的であり、カルパイン阻害剤により阻害されること、この分解が精子活性化の際のcAMP上昇に関与していることを明らかとなり、受精時の運動調節とミトコンドリア移動(精子反応)への関与が示唆された。

(4) 体内受精における精子後方運動の意義とメカニズム：体内受精を行う生物種における精子の接近や貯蔵機構を解明するために、海産のマガキガイを用いて研究を進めた。精子は頭部どうしを結合させた数十の精子の束である「精子束」の状態では放出されるが、精子束から精子がばらける際に精子が後進運動を示すことがわかった(上図)。この運動では、極端な非対称の波により精子自体を後進させる。一方、雌の受精嚢に入った後、上皮から脱離する際にも後進運動を示すことがわかった。この際、鞭毛波は鞭毛の先端から頭部に向けて伝わることを観察された(下図)。以上の一連の運動方向の変化には細胞外からのカルシウムの取り込みが必要であることも明らかとなった。



(5) カタユレイボヤにおけるトランスジェニック技術の改良：アロ認証機構の解明に有用な系統の作製を目指して、カタユレイボヤにおいて従来のトランスポゾンベクターよりも変異誘導率が上昇した新しいベクターをUAS-Gal4システムを応用して構築した。このベクターを利用して受精に関わる精子側因子の変異体をスクリーニングした結果、p21-activated kinaseが受精に関与していることを示唆するデータを得た。また、カタユレイボヤの卵で発現を示す母性因子をロックダウンする逆遺伝学的手法を構築し、その発動に関する条件検討を進めた。本手法はGFP遺伝子がホヤの卵母細胞でエピジェネティックな抑制を受けることを利用して内在の遺伝子の発現を抑制するものである。さらに、カタユレイボヤにおいて新しい蛍光プローブの導入を目指し、光変換型蛍光タンパク質Kaedeを利用した細胞ラベルが可能であることを示した。

(6) ホヤにおける遺伝子ロックアウト法の開発：カタユレイボヤにおいてTALEN nuclease (TALEN)法による遺伝子破壊を検討した。TALENのカタユレイボヤへの発現系を確立し、TALENにより標的遺伝子に高い効率で変異が導入されることを明らかにした。その他エンハンサートラップシステムを用いた遺伝子の方向特異的発現の仕組みやHox1遺伝子の機能を解明した。

(7) 以上の成果のほか、領域内共同研究により、ホヤ、ヤリイカ、イモリ、イカ、ウズラ、ゼニゴケ、褐藻類の精子あるいは遊走子に関するイメージングや波形解析で一定の成果が得られた。

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25件)

1. 稲葉一男. カルシウムシグナルによる哺乳類精子超活性化の制御 (2014) 細胞工学, Vol. 33(4), 366-371. (査読無)
2. Shiba, K., Shibata, D., Inaba, K. (2014) Autonomous changes in the swimming direction of sperm in the gastropod *Strombus luhuanus*. *J Exp Biol.* 217:986-996. doi: 10.1242/jeb.095398 (査読有)
3. Treen, N., Yoshida, K., Sakuma, T., Sasaki, H., Kawai, N., Yamamoto, T., Sasakura, Y. (2014) Tissue-specific and ubiquitous gene knockouts in *Ciona* by electroporating TALENs provide new approaches to investigate gene functions. *Development* 141, 481-487. doi: 10.1242/dev.099572 (査読有)
4. Alavi, S.M., Matsumura, N., Shiba, K., Itoh, N., Takahashi, K.G., Inaba, K., Osada, M. (2013).

- Roles of extracellular ions and pH in 5-HT-induced sperm motility in marine bivalve. *Reproduction*. 147:331-345. doi: 10.1530/REP-13-0418 (査読有)
5. Hiyama, G., Matsuzaki, M., Mizushima, S., Dohra, H., Ikegami, K., Yoshimura, T., Shiba, K., Inaba, K., *Sasanami, T. (2013). (査読有) Sperm activation by heat shock protein 70 supports the migration of sperm released from sperm storage tubules in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Reproduction*. 47:167-178. doi: 10.1530/REP-13-0439 (査読有)
 6. 水野克俊, 柴小菊, 稲葉一男. 精子が卵を目指すしくみ 運動の方向転換を司るタンパク質「カラクシン」(2013) 遺伝, Vol. 67(5), 610-617. (査読無)
 7. Hirohashi, N., Alvarez, L., Shiba, K., Fujiwara, E., Iwata, Y., Mohri, T., Inaba, K., Chiba, K., Ochi, H., Supuran, C.T., Kotzur, N., Kakiuchi, Y., Kaupp, U.B., Baba, S.A. (2013). Sperm from sneaker male squids exhibit chemotactic swarming to CO₂. *Curr Biol*. 23:775-781. doi: 10.1016/j.cub.2013.03.040 (査読有)
 8. Sakuma, T., Hosoi, S., Woltjen, K., Suzuki, K., Kashiwagi, K., Wada, H., Ochiai, H., Miyamoto, T., Kawai, N., Sasakura, Y., Matsuura, S., Okada, Y., Kawahara, A., Hayashi, S., and Yamamoto, T. (2013). Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes to Cells*, 18:315-326. doi: 10.1111/gtc.12037 (査読有)
 9. Hozumi, A., Yoshida, R., Horie, T., Sakuma, T., Yamamoto, T., and Sasakura, Y. (2013). Enhancer activity sensitive to the orientation of the gene it regulates in the chordate genome. *Dev Biol*. 375:79-91. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.12.012 (査読有)
 10. Ogura, Y., Sasakura, Y. (2013). Ascidiaceae as excellent models for studying cellular events in the chordate body plan. *Biol. Bull.* 224(3), 227-236. URL: <http://www.biolbull.org/content/224/3/227.long> (査読有)
 11. Mizuno K, Shiba K, Okai M, Takahashi Y, Shitaka Y, Oiwa K, Tanokura M, Inaba K. (2012) Calaxin drives sperm chemotaxis by Ca²⁺-mediated direct modulation of a dynein motor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109:20497-20502. doi: 10.1073/pnas.1217018109 (査読あり)
 12. Mohri, H., Inaba, K., Ishijima, S., Baba, S.A. (2012). Tubulin-dynein system in flagellar and ciliary movement. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 88:397-415. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23060230> (査読有)
 13. Yuan, Y., Tanabe, T., Maekawa, F., Inaba, K., Maeda, Y., Itoh, N., Takahashi, K.G., *Osada, M. (2012). Isolation and functional characterization for oocyte maturation and sperm motility of the oocyte maturation arresting factor from the Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Gen Comp Endocrinol*. 179:350-357. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.09.006 (査読有)
 14. Saito, T., Shiba, K., Inaba, K., Yamada, L., Sawada, H. (2012). Self-incompatibility response induced by calcium increase in sperm of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(11):4158-4162. doi: 10.1073/pnas.1115086109 (査読有)
 15. Sasakura, Y., Kanda, M., Ikeda, T., Horie, T., Kawai, N., Ogura, Y., Yoshida, R., Hozumi, A., Satoh, N., and Fujiwara, S. (2012). Retinoic acid-driven Hox1 is required in the epidermis for forming the otic/atrial placodes during ascidian metamorphosis. *Development* 139, 2156-2160. doi: 10.1242/dev.080234 (査読有)
 16. Kawai, N., Ochiai, H., Sakuma, T., Yamada, L., Sawada, H., Yamamoto, T., and Sasakura, Y. (2012). Efficient targeted mutagenesis of the chordate *Ciona intestinalis* genome with zinc-finger nucleases. *Dev Growth Differ*. 54: 535-545. doi: 10.1111/j.1440-169X.2012.01355.x (査読有)
 17. Inaba, K. (2011). Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. (2011) *Mol Hum Reprod* 17: 524-538. doi: 10.1093/molehr/gar034 (査読有)
 18. Nakachi, M., Nakajima, A., Nomura, M., Yonezawa, K., Ueno, K., Endo, T., Inaba, K. (2011). Proteomic profiling reveals compartment-specific, novel functions of ascidian sperm proteins. *Mol Reprod Dev*. 78:529-549. doi: 10.1002/mrd.21341. (査読有)
 19. Zhu, L., Inaba, K. (2011). Lipid rafts function in Ca²⁺ signaling responsible for activation of sperm motility and chemotaxis in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mol Reprod Dev* 78: 920-929. doi: 10.1002/mrd.21382 (査読有)
 20. Ogura, Y., Sakaue-Sawano, A., Nakagawa, M., Satoh, N., Miyawaki, A., and Sasakura, Y. (2011). Coordination of mitosis and morphogenesis: role of a prolonged G2 phase during chordate neurulation. *Development* 138: 577-587. doi: 10.1242/dev.053132 (査読有)
 21. Horie, T., Shinki, R., Ogura, Y., Kusakabe, T.G., Satoh, N., and Sasakura, Y. (2011). Ependymal cells of chordate larvae are stem-like cells from the adult nervous system. *Nature* 469, 525-528. doi: 10.1038/nature09631 (査読有)
 22. Endo, T., Ueno, K., Yonezawa, K., Mineta, K., Hotta, K., Satou, Y., Yamada, L., Ogasawara, M., Takahashi, H., Nakajima, A., Nakachi, M., Nomura, M., Yaguchi, J., Sasakura, Y., Yamasaki, C., Sera, M., Yoshizawa, A.C., Imanishi, T., Taniguchi, H., and Inaba, K. (2011). CIPRO 2.5: *Ciona intestinalis* protein database, a unique integrated repository of

large-scale omics data, bioinformatic analyses and curated annotation, with user rating and reviewing functionalit. Nucleic Acids Res. 39 (Suppl. 1), 807-814. doi: 10.1093/nar/gkq1144 (査読有)

23. Hozumi, A., Kawai, N., Yoshida, R., Ogura, Y., Ohta, N., Satake, H., Satoh, N., and Sasakura, Y. (2010). Efficient transposition of a single transposon copy in the genome of the ascidian *Ciona intestinalis* with a transgenic line expressing transposase in eggs. *Dev. Dyn.* 239: 1076-1088. doi: 10.1002/dvdy.22254. (査読有)
24. Sasakura, Y., Suzuki, M. M., Hozumi, A., Inaba, K., and Satoh, N. (2010). Maternal factor-mediated epigenetic gene silencing in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mol. Genet. Genomics* 283 (1), 99-110. doi: 10.1007/s00438-009-0500-4 (査読有)
25. Inaba, K. and Mizuno, K. (2009). Purification of dyneins from sperm flagella. *Methods Cell Biol.* 92: 49-63. doi: 10.1016/S0091-679X(08)92004-5 (査読有)

[学会発表](計10件)

1. N.Treen, K.Yoshida, H.Sasaki, T.Sakuma, N.Kawai, T.Yamamoto, Y.Sasakura. Genome editing with TALENs and Crispr/Cas9 in the ascidian *Ciona intestinalis*. International symposium on RNAi and genome editing method. 2014年3月15日. 徳島大学(徳島)、招待講演.
2. Inaba K. Regulation of ciliary and flagellar movement by a novel calcium sensor calaxin, TLL Seminar, 2013.12.9, TEMASEK Lifesciences Laboratory, Singapore、招待講演.
3. 稲葉一男. 精子運動の方向転換を司るカルシウム結合タンパク質「カラクシン」: 軸系ダイニン調節の分子系統学的考察, 第36回日本分子生物学会年会ワークショップ「アロ認証から生殖タクティクスへ: 動植物域を超えた生殖戦略」, 2013.12.3, 神戸ポートピアホテル, 神戸、招待講演.
4. 稲葉一男. 精子運動の方向を制御するメカニズム, 日本アンドロロジー学会第32回学術大会特別講演, 2013.7.26, グランキューブ大阪, 大阪、招待講演.
5. 稲葉一男. 受精時の精子運動性のイメージング, 第58回日本生殖医学会学術講演会, 2013.11.15, 神戸国際会議場, 神戸、招待講演.
6. 笹倉靖徳. 脊索動物ホヤにおける遺伝学的技術を用いた発生メカニズムの解明, 日本動物学会第84回大会, 2013年9月26日, 岡山大学(岡山)、招待講演.
7. Inaba K. Mechanism of Ca²⁺-mediated signaling for sperm motility, The International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants, 2012.11.12-16, Hotel Nagoya Garden Palace, Nagoya, Japan. 招待講演.

8. Y.Sasakura, N.Treen, H.Sasaki, N.Kawai, T.Sakuma, T.Yamamoto, K.Yoshida. Knockout of genes with TALE nucleases in the chordate *Ciona intestinalis*. The 46th annual meeting for the Japanese society of developmental biologists. 2013年5月31日. くにびきメッセ(松江)、招待講演.
9. Inaba K. Calaxin is a Ca²⁺-dependent dynein modulator in opisthokonts: A phylogenetic consideration on the evolution of cilia and flagella, International Workshop Dynein 2013, 2013.10.31-11.3, Orbis Hall, Kobe, Japan. 招待講演.
10. Inaba K. Proteomics, Cell Biology and Physiology for Sperm Flagellar Motility. 6th Asian-Pacific Organization for Cell Biology Congress, 2011.2.26, Manila, Phillipines、招待講演.

[図書](計6件)

1. Inaba, K., Mizuno, K., Shiba, K. Structure, function and phylogenetic consideration of calaxin. (2014). In: "Sexual Reproduction in Animals and Plants" (Ed. by H Sawada), Springer Japan. Pp. 49-57.
2. Sasakura, Y. (2014) Germline transformation in the ascidian *Ciona intestinalis* In: "Sexual Reproduction in Animals and Plants" (Ed. by H Sawada), Springer, Japan. Pp. 465-473.
3. Inaba, K. (2012). Regulatory subunits of axonemal dynein. *Handbook of Dynein* (eds. Hirose, Amos). PanStanford Publishing, pp.303-324.
4. Shiba, K., Mizuno, K., Inaba, K. (2012). Molecular comparison of the axonemal components between sperm flagella and *Chlamydomonas* flagella. *Spermatology: new horizons in the 21 century* (ed. M. Moriwsawa). Adthree Publishing Co. Ltd, pp.30-40.
5. Sasakura Y., Sierro N, Nakai, K Inaba K., Kusakabe TG. (2012) Genome structure, functional genomics, and proteomics in ascidians. In, *Genome Mapping and Genomics in Laboratory Animals* (eds, P. Denny and C. Kole, Springer) p87-132.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲葉 一男 (INABA, Kazuo)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号: 80221779

(2) 研究分担者

笹倉 靖徳 (SASAKURA, Yasunori)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号: 10400649