

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07793

研究課題名(和文) カイコガを利用した体内受精型動物の精子成熟機構の解明

研究課題名(英文) Studies on mapping of seminal proteins and regulation of calcium and protein tyrosine phosphorylation in relation to sperm flagellar waveform and capacitation in 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・助教

研究者番号：00303933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 精子成熟に関与する6つの候補タンパク質を見出した。これらのタンパク質は、共通してArg-Arg延長配列を含んでおり、精子成熟の進行とともに段階的な分解が見出された。これらの知見は、精子成熟誘発因子Initiatorinによって、主にArg-Argモチーフを特異的に切断することで引き起こされているものと考えられる。

(2) カイコガにおいても、精子の鞭毛運動形体変化は、ヒト精子の運動性の開始および調節における調節因子として注目されているCa²⁺、cAMP依存性プロテインキナーゼ(PKA)活性およびチロシンリン酸化が深く関係している可能性が見出された。

研究成果の概要(英文)：(1) The objective of this study was to evaluate the major basic protein profile of *Bombyx* seminal fluid and to determine if any of these proteins was associated with semen fertility. Six candidate proteins included Arg-Arg extended sequences in common. Moreover, they exhibited a step-wise regression with the progress of sperm maturation. These findings suggested that mainly the specific cleavage at Arg-Arg motif is caused by a trypsin-type protease, called initiatorin, which is thought to be involved in the sperm maturation. (2) We indicate that flagellar beating of silkworm sperm was controlled by Ca²⁺ levels, cAMP-dependent protein kinases (PKA) activities and the specific degradation of threonine-phosphorylated protein.

研究分野：昆虫生殖・発生学

キーワード：精子成熟 カイコガ セリンプロテアーゼ チロシンリン酸化

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物精子は、精巣の細精管の中でその形は完成するが、その後、排精されても、弱い運動能しか持たず、受精能力も持たない。しかし、オス生殖輸管とそれに続く輸精管、さらに射精によりメスの生殖輸管である膣、子宮、輸卵管と移動することで次第に運動のパターンは変化し、同時に、激しさは増していき、それにともない受精可能な状態になる。この一連の変化は、今まで、精巣上体の粘性の高い液体によって動きが制限されていた精子が、メスの生殖腺に移り、希釈されることによって生じるものと理解されてきた (Usselman and Cone, *Biol. Reprod.* 29, 1241-1253, 1983)。しかし、最近、この変化に3つの分泌型セリンプロテアーゼインヒビターが関わっていることが報告された (Ou *et al.*, *Int. J. Androl.* 35, 52-62, 2012)。すなわち、交尾により、オスから精子・精漿を送り込み、結果、メスの体内で受精をするような体内受精型動物の精子成熟においては、精漿部分に含まれる物質による精子に対する作用(精子外作用)と、その作用を受け取った精子内の情報伝達(精子内作用)によって、初めて、運動能を獲得し、最終的に受精能も持つようになる(精子成熟化反応)ものと理解できる。本研究で取り上げるチョウ目昆虫カイコガの場合、精子成熟化に係わる全ての反応は、オス生殖輸管の一部、前立腺から特異的に分泌される、トリプシンに類似したセリンプロテアーゼである、精子成熟誘発因子・Initiatorin によって誘発されることが知られている (Nagaoka *et al.*, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2012)。また、カイコガ以外のチョウ目、バタ目、カメムシ目昆虫の未成熟段階にあると予想される運動能を持たない精子は、カイコガ Initiatorin で処理すると、それらは運動能を獲得することが見出され、同時に、各昆虫オス生殖腺分泌物中には Initiatorin 類似因子が存在している。このことから、昆虫界における精子成熟機構は共通性が極めて高いものと考えられる。

2. 研究の目的

カイコガを用いて、精子成熟に伴い引き起こされる精漿・精子内の反応を、セリンタイププロテアーゼ・Initiatorin を糸口に、*in vitro* 精子成熟反応再現系を用いて解明することで、カイコガに限らず広く未だ不明な体内受精型昆虫-動物における精子成熟機構のメカニズムの理解に役立つ、新規な知見を得る。

3. 研究の方法

カイコガの精子成熟は、① Initiatorin そのものや、その作用により生じた変化は、精漿や精子に作用し、②次に、その作用を受け取った精子は、その内部でシグナル伝達を介して変化していき、最終的なものとして精子成熟現象が生じるものと予想される。そこで、大きく前述2つの部分に分けて解析し、得ら

れた両成果を再構成する、と同時に、研究の効率化もはかった。

(1) Initiatorin は精漿に存在するタンパク質であるので、精漿または、精子表面タンパク質に作用する可能性が考えられる。羽化後1日が経過したカイコガオス貯精のうから取り出した未成熟精子を含む精液に trypsin (終濃度 5 µg/ml) 溶液または前立腺磨砕液を加えることで精子成熟反応を *in vitro* に再現した (*in vitro* 精子成熟反応再現系)。反応開始後、経時的に取り出したものに含まれるタンパク質は Toda and Kimura (1997) の方法に従い、等電点 6-11 の範囲で二次元電気泳動を利用して分離した。一方、*in vivo* での変化を捉えるために、羽化後1日が経過したカイコガオスをメスと交尾させることでメス体内にできる精包を用いた。交尾終了後から経時的に集めたものから、水に可溶性タンパク質を調製し、逆相系カラムを接続した HPLC により粗分離を行い、各分画ごとに SDS-PAGE で分離することで検討した。両実験区ともに展開されたタンパク質は PVDF 膜に転写して切り出した後、エドマン法により N 末端の 10-20 残基ほどを決定した。得られたアミノ酸配列はカイコガゲノムデータベースに照合し、この結果を元にプライマーを設計して RT-PCR と RACE 法により遺伝子の単離を行った。遺伝子の発現は *Actin A3* を内部標準遺伝子とした相対的定量 PCR (qPCR) により解析した。また、単離した遺伝子配列は大腸菌発現系を利用し、N 末端に 6×His-tag 配列を付加した組換えタンパク質として合成させた。発現タンパク質はニッケルアガロースカラムにより精製した後、これを抗原としてウサギに免疫することで抗血清を調製し、さらに、Protein G をリガンドとしたクロマトグラフィーにより抗体を作製するのに用いた。得られた抗体はそれぞれの特異性を確認した後、Western blotting 法によるタンパク質の動態について調査を行った。

(2) 哺乳動物の場合、「精子成熟」において、共通して、精子構成タンパク質のチロシンリン酸化に質的・量的変化が見られる。一方、精巣から取り出した緩やかな直進性の運動能を持つマウス精子は、受精能獲得培地中でカルシウムイオン透過担体 (Calcium ionophore A23187) で処理すると、ほぼすべての精子が運動能を失うが、この状態から培地から A23187 を取り除くと、cAMP 依存性タンパク質キナーゼ A (PKA) 活性の上昇が生じ、チロシンリン酸化に関係なく、ハイパーアクチベーションや先体反応が起きる (Tateno *et al.*, 2013)。しかし昆虫精子においてこれらの現象に関する報告は少ない。これらを踏まえ、羽化後1日が経過したカイコガオス貯精のうから取り出した未成熟精子を含む精液に対して、予めカルシウムキレート剤 (EGTA, BAPTA-AM)、A23187 を単独もしくは組み合わせで添加・処理した後、trypsin 溶液 (終濃度 5 µg/ml) 溶液または前立腺磨砕

液を加え、精子成熟における Ca^{2+} の影響を評価した (*in vitro* 精子成熟反応再現系)。全ての操作は、 25°C 下で行い、一定時間おきに反応系の一部分は位相差顕微鏡下へ取り出し、その精子運動の有無および運動形体を、本来の精子成熟の場である精包内の変化と比較しながら、評価した。*In vitro* 精子成熟反応再現系および精包に含まれる精子は Karr and Walters (2015) に従い調製し、PKA 活性は、抗 Phospho-PKA Substrate 抗体を、チロシンリン酸化状態は、抗 Phospho-Tyrosine 抗体を用いた Western blotting に供することで調査した。また、チロシンリン酸化タンパク質の同定は、Toda and Kimura (1997) に従い、等電点 4-6 範囲で二次元電気泳動法により分離した後、展開されたスポットを切り出し、MALDI TOF-MS による Peptide Mass Fingerprinting (PMF) およびエドマン法による N 末端配列決定を行った。

4. 研究成果

(1)-1 メス交尾のう内に形成された直後 (交尾開始後 30 分)、と精子成熟が完了した (交尾開始後 300 分) 精包に含まれるタンパク質をそれぞれに粗分画し、比較した。後者特異的に存在する p19 (19 kDa)、p17 (17 kDa) が見出し、これらをコードする遺伝子が単離した。単離された遺伝子から推定されるアミノ酸配列より、p19、p17 は、同一のタンパク質 (BmSfP38: GenBank Accession No. BAS68531) の切断部位の違いによって生じたものであることが明らかとなった。また、BmSfP38 は、N 末端に分泌シグナルを有し、成熟タンパク質の推定分子質量は 38.3 kDa で、全構成アミノ酸の約 7% arginine を含む等電点 9.53 の塩基性タンパク質であることも予想された。BmSfP38 は、貯精のうで部位特異的に発現しており、抗 BmSfP38 抗体も貯精のうにおいて推定分子質量 38 kDa に相当するタンパク質を部位特異的に認識した。さらに貯精のうから取り出した精液を精子と精漿画分に分けて調査したところ、そのほとんどが精子から見出された。次に、精包における交尾後の時間経過に伴う変化を調べたところ、交尾開始後 30 分では、38 kDa タンパク質は見出されず、代わって 35 kDa タンパク質が精子および精漿画分から見出された。しかし、時間経過とともに 35 kDa タンパク質は徐々に消失していき、交尾開始後 300 分になると、精子からは p19、p17 に相当する分子質量のタンパク質、精漿からは p17 やさらに低分子質量のタンパク質が検出されるようになった。このような抗 BmSfP2 抗体反応タンパク質の変化は、貯精のうから取り出した精液に Initiatorin を含む前立腺磨砕液あるいは trypsin を添加し、*in vitro* で精子成熟を再現した場合でも同様であった。BmSfP38 の推定アミノ酸 315、316 番目には連続した arginine 配列が存在しており、これは連続した arginine 配列の C 末端側を切断しやすい性質をもつ Initiatorin に

としては好適な配列である。また、ここで切断された場合、前述の 38 kDa から 35 kDa への分子質量変化は説明することができる。そこで、分泌シグナルを取り除いた BmSfP38、ならびに連続した arginine 配列を alanine に置換したタンパク質を大腸菌発現系で発現させ、これに精製 Initiatorin を反応させることで生じる分子質量を調査した。結果、前者は Initiatorin により 3 kDa に相当する分子質量の低下が認められたが、後者では観察されなかった。

BmSfP38 は、貯精のうで合成される分泌タンパク質であると予想されているにもかかわらず、精子のみから見出された。このことは、推定等電点が塩基性であるがゆえに精子へ吸着した結果とも考えられる。しかし、これだけでは等電点の変化を伴わない 38 kDa から 35 kDa の分子質量変化によって、存在画分が精子から精漿画分へ変化したことは説明し難い。キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の生殖腺分泌物である sex-peptide は、N 末端側のアミノ酸配列を介して精子に吸着することでメスに移行するが、trypsin 様プロテアーゼによりこの領域が切断されると、精子から遊離し、その生理的機能を発現するようになる (Peng *et al.*, 2005)。このことから、BmSfP38 の場合、C 末端側の配列を介して精子に吸着し、この部分が Initiatorin により切断されることで、精漿画分へと移行した可能性が考えられる。カイコガの精子には無核精子、有核精子束の 2 種類が存在するが、電子顕微鏡観察によれば、貯精のうに存在する運動能を持たない無核精子の鞭毛膜は 5 層の厚い構造であるが、精包内で運動能を獲得するとマイクロスリット状の構造を持つ 2 層の薄い構造となる (Osanai and Kasuga, 1990; Osanai *et al.*, 1991)。この無核精子鞭毛膜の厚さ変化には BmSfP35 が係っているものと考えられる。精包内では、arginine が積極的に供給され、これに arginase が作用することで、多量の urea が蓄積する (Kasuga *et al.*, 1987; Nagaoka *et al.*, 2011)。推定アミノ酸配列を見ると、p19、p17 の N 末端アミノ酸配列の直前には共通して arginine が存在していることから、その低分子化には、Initiatorin やその他の trypsin 様プロテアーゼによる作用が予想され、結果、C 末端に arginine が存在するペプチドが多く生じているものと期待できる。そしてこのペプチドに、Initiatorin により活性化される Carboxypeptidase B (投稿準備中) が作用すれば多量の arginine が供給されるかもしれない。(1) -2 精子成熟反応再現系において、無核精子は反応開始 5 分後から緩やかな前進性を持たない運動能を獲得し始め、その強さは 60 分後まで増強された。一方、有核精子束は反応開始後 15 分の時点で一部解離し始め、反応開始後 60 分の時点では多くが全体的に膨張し解離していた。次に、二次元電気泳動上に展開されたスポットを比較すると、反応開

始後 5-15 分の間に出現し、60 分まで蓄積する傾向にある 7 種類が見出された。

(1)-2-1 このうち、2 種類 (分子質量 22 kDa, pI 7.0; 21 kDa, pI 9.0) に注目し、遺伝子の単離を行ったところ、それぞれ分泌シグナルを有する推定分子質量 52.4 kDa, 61.2 kDa のタンパク質 (BmSfp54, GenBank No. LC042540; BmSfp62, GenBank No. LC042542) に由来することが予想された。また、二次元電気泳動スポットから決定した N 末端配列に相当する配列の直前には、連続した 2 つの arginine (RR 配列) が両者に共通して存在しており、この他に RR 配列は BmSfp54 で 7 個、BmSfp62 で 6 個散在していた。BmSfp54 と BmSfp62 の全体の相同性は約 40% であるものの、BmSfp54 の ³⁵⁹Gly-³⁹⁵His 領域と BmSfp62 の ³⁸⁰Gly-⁴¹⁶His 領域に注目すると約 80% という高い相同性を有していた。そこで、この領域の配列を用いて、カイコゲノムデータベースに対して検索を行ったところ、さらに 2 種の類似遺伝子の存在が予想されたので、貯精の cDNA から遺伝子のクローニングを進めた。結果、単離された遺伝子からは、分泌シグナルを有するそれぞれ分子質量 53.9 kDa (BmSfp53, GenBank No. LC316987), 49.5 kDa (BmSfp49, GenBank No. LC316988) のタンパク質が予想された。また、BmSfp54 及び BmSfp62 と同様に、RR 配列が BmSfp53 で 7 個、BmSfp49 で 4 個含まれていることを見出した。上記 4 遺伝子は同一染色体上に BmSfp62, BmSfp54, BmSfp53, BmSfp49 の順でタンデムに並んでおり、エクソン及びイントロンの数や位置がほぼ一致していた。それぞれの遺伝子は、貯精のうで特異的に発現しており、さらに、それぞれに対する抗体も貯精のう部位特異的に推定分子質量と等しいタンパク質を認識した。さらに、貯精のうから取り出した精液を精子と精漿画分に分けて調査したところ、そのほとんどは精漿画分から見出された。これを抗 BmSfp62 抗体により免疫沈殿させると、その分画からは 4 タンパク質をそれぞれ特異的に認識する抗体に反応するタンパク質が見出された。In vitro 精子成熟反応再現系において、4 タンパク質の変化を時間経過で調べたところ、いずれも推定分子質量と一致するタンパク質が反応開始後 30 分までに消失し、代わって、それよりも低分子質量の特異的なタンパク質を経て、最終的に BmSfp54 では 19 kDa, BmSfp62 では 15 kDa, BmSfp53 では 30 kDa と 19 kDa, BmSfp49 では 18 kDa のタンパク質が出現し、反応開始後 300 分まで蓄積していった。この分子質量変化は精包内でも概ね同様であった。

以上により見出された 4 種類の精液タンパク質はいずれも貯精のうで特異的に発現しており、分泌シグナルを持つことから、貯精のうで合成・分泌され、互いに相互作用を持ちながら精漿に存在するタンパク質であると予想される。ドクチョウ (*Heliconius erato*)

の精液タンパク質には BmSfp54 及び BmSfp62 と約 70%, オオカバマダラ (*Danaus plexippus*) のタンパク質には BmSfp53 及び BmSfp49 と約 60% の相同性を持つものが存在していることから、これらは少なくともチョウ目に共通して存在しているものと考えられる。ここに 4 タンパク質が互いに高い相同性を有する領域を持っていることも加味すると、共通した機能を有しているものと予想される。しかし、現時点で、この共通領域は機能同定が完了したタンパク質と相同性が認められず、どのような機能を持つかは予測できない。精子成熟反応の進行に伴って、特異的な分子質量を経て低分子化していくことや、最終的に蓄積するペプチドに相当する二次元電気泳動スポットから得られた N 末端配列の直前には RR 配列が存在していることから、予測アミノ酸配列中に見出される複数の RR 配列は特異的な切断部位となっているものと考えられる。Initiatorin はペプチド配列に含まれる RR 配列の C 末端側を特異的に切断する性質を持つエンドペプチダーゼであり (Nagaoka *et al.*, 2012), 実際、貯精のう由来の精液 Pro-carboxypeptidase B の Pro-mature 部分に存在する RR 配列を特異的に切断することでその活性調節を行っている。よって、これら 4 つのタンパク質は Initiatorin によって特異的に切断されることで、その生理的機能発現が調節されているものと考えられ、低分子化が進んでいく過程で生じるペプチド及び最終的に蓄積するペプチドの機能解析はカイコガ精子成熟の分子メカニズムを明らかにする上で重要な手がかりになるものと期待される。

(1)-2-2 分子質量 26 kDa, pI 8.5 (p26) のタンパク質スポットに対応する遺伝子の単離を進めたところ、N 末端に分泌シグナルを持ち、推定分子質量 32.2 kDa, pI 8.6 の塩基性タンパク質の一部であることが予想されたが、データベース上からはその機能を予測することはできなかった (BmSfp32, GenBank No. LC042541)。推定アミノ酸配列中に存在する p26 の N 末端配列の直前には連続した 2 つの arginine 配列 (RR 配列) が存在していた。BmSfp32 は貯精のうで部位特異的に発現しており、抗 BmSfp32 抗体も貯精のうにおいて推定分子質量 32 kDa に相当するタンパク質 (p32) を部位特異的に認識した。さらに貯精のうから取り出した精液を精子と精漿に分画して調査したところ、p32 のほとんどは精子から見出された。また、蛍光免疫染色法による観察では、有核精子束表面にまばらに付着していた。次に、精包における交尾後の時間経過に伴う変化を調べたところ、射精が完了して精包が完全に形成される交尾開始後 30 分ではすでに p32 は見出されず、代わりに p26 に相当する分子質量 26.8 kDa タンパク質のみが交尾開始後 300 分まで見出された。このような分子質量の変化は、in vitro 精子成熟反応再現系でも同様であった。また、精包、

in vitro 精子成熟反応再現系ともに、p26 は精漿画分にも存在していた。

BmSfp32 は、*Heliconius erato* の精液タンパク質と 53% の相同性が認められ、シャクガ科、アゲハチョウ科にも同程度の相同性を持つタンパク質が存在することから、チョウ目に共通するタンパク質と考えられる。このタンパク質は、貯精のうで合成・分泌されるものの、多くは精子に付着して存在していた。しかし、射精に伴いメスに移行する過程で N 末端側の 27 アミノ酸が切断されると精子から遊離し、その一部は精漿へと移行する。この切断には、RR 配列の C 末端側切断に強い特異性を持つセリンプロテアーゼである、Initiatorin が関与しているものと考えられる (Nagaoka *et al.*, 2012)。ただし、推定アミノ酸配列中には RR 配列が当該部分の他に 3 か所存在しているものの、精包や *in vitro* 精子成熟反応再現系からは p26 に相当するタンパク質のみが検出されたことから、選択的に切断が行われているものと予想される。また、BmSfp38 同様に、精子に付着した状態でメスへ移行し、プロテアーゼによるプロセッシングを受けることで機能発現可能な状態へ変化するという制御を受けている可能性が考えられる。そこで、BmSfp32 及び BmSfp38 の限定的な分解によって切り離される領域には相同性が認められないものの、精子に対する吸着性を制御しているものと仮定し、大腸菌発現系で合成させたこの領域と蛍光緑色タンパク質 (GFP) の融合タンパク質を、貯精のうから取り出した精子と混合させて、蛍光顕微鏡下で観察したが、今のところ配列依存的な GFP の精子への吸着は観察できなかった。今後、さらなる検討が必要である。

(2)-1 *In vitro* 精子成熟再現系に含まれる精子細胞外 Ca^{2+} を EGTA により除去すると、濃度依存的に精子運動能獲得反応は阻害された。しかし、精子内への強制的な Ca^{2+} の流入を期待した A23187 処理および精子細胞内 Ca^{2+} の除去を期待した BAPTA-AM 処理は、精子の運動形体への影響を及ぼさなかった。そこで、A23187、BAPTA-AM の順番で添加・処理すると、無核精子は、高速で波打ちながら盛んに円状に運動を行うようになり、有核精子束は一部で頭部の完全な解離が観察され、これらは、精包内で観察されるものと類似していた。以上により、無核精子の運動能獲得ならびにその後の運動形体の変化には精子細胞内への Ca^{2+} 流入が深く関わっているものと予想された。A23187、BAPTA-AM の併用による精子細胞内への Ca^{2+} 流入制御はより受精可能な精子状態へと変化させたかについては不明であり、今後、人工授精に供して評価する必要があると考える。

(2)-2 オス貯精のう内の未成熟精子と精包内および *in vitro* 精子成熟反応再現系から精子を調製し、SDS を含むサンプルバッファーで可溶化されたタンパク質に対して抗 Phospho-PKA Substrate 抗体による Western

blotting を行うと、精子成熟に伴い抗体に反応したタンパク質の質的・量的変化が見出されたので、カイコガにおいても精子成熟に伴い PKA 活性が変化するものと考えられた。

(2)-3 抗 Phospho-Tyrosine 抗体陽性タンパク質の状況によりチロシンリン酸化状態の変化を調査すると、未成熟時に強く反応した分子質量 29 kDa バンドは精子成熟の進行に伴い弱まり、それに入れ替わるように分子質量 17 kDa バンドが見出された。これらの精子タンパク質は、EDTA、Triton X-100 では可溶化されず、Deoxycholic acid、SDS/ β -mercaptoethanol、Urea/CHAPS によって効率よく可溶化された。二次元電気泳動により分離すると、29 kDa バンドを構成するタンパク質は異なる 3 つのスポット (pI 5.8, 6.0, 6.3) からなることが明らかとなった。また分子質量 17 kDa バンドのタンパク質は pI 5.3 に展開された。これら 4 つのタンパク質を trypsin 消化によるペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 分析と MASCOT サーバーによる検索を行ったが、該当するタンパク質は見出せなかった。そのため、N 末端の 12 アミノ酸ほどをエドマン法により決定したところ、それぞれ N 末端配列が少し異なるものの、すべて精液タンパク質 BmSfp25 の一部分に一致していた。このタンパク質は、前項(1)-1 において、交尾後 300 分画において特異的に見出された p15 (分子質量 15 kDa) から得られた N 末端配列から単離された、主に貯精のうで発現する遺伝子から推定されたタンパク質 (GenBank Accession No. LC041357) である。そこで、抗 BmSfp25 抗体を使って、成熟過程における精漿および精子に含まれる BmSfp25 タンパク質の動態を調査した。これらの結果をまとめることにより、以下の 2 点が明らかとなった。①オス貯精のうで部位特異的に合成・分泌されるチロシンリン酸化・分子質量 29 kDa タンパク質 (推定分子質量 23,116) は、その多くが精子に強固に吸着した状態で存在し、そのままの状態を維持して、射精時に、メス交尾のうの中に形成される精包へと移動する。②精包内では、精子成熟が進むにつれ、Leu¹¹⁹-Ile¹²⁰ 間で特異的な分解を受ける。結果、生じたリン酸化チロシンをもつ C 末端側の分子質量 17 kDa (推定分子質量 12,624) 部分は依然として精子に吸着したままで存在するが、p15 に相当するリン酸化チロシンを持たない 19 kDa (推定分子質量 10,510) 部分は精子から外れ、精漿へと移動・蓄積する。BmSfp25 に約 30-40% 程度の相同性をもつ精液タンパク質が数種のドクチョウ属昆虫に存在していることから、このタンパク質は少なくともチョウ目昆虫の精液に共通して存在するものと考えられる。しかし、両者に共通している部分を中心に相同検索を行ったが、現時点では、どのような機能を持つタンパク質かは予測できなかった。また、SDS-PAGE から導き出される分子質量と推定分子質量が大きく異なることから、チロシンの

リン酸化以外にも多くの修飾を受けている可能性が考えられた。BmSfp25 の特異的切断には、Initiatorin は、連続した 2 つのアルギニンの C 末端側で特異的に切断するので、関与していないと考えられる。この切断に係わるエンドペプチダーゼの探索は、さらなる精子成熟メカニズムの理解に役立つものと期待される。

(3) 上述の BmSfp38, BmSfp54, 62, 53, 49, BmSfp32, BmSfp25 は今のところ、その機能については不明である。そこで、その機能を明らかにするために、当該遺伝子のノックダウンシステムを TALEN によるゲノム編集により作製することを開始した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Nagaoka, S., Kawasaki, S., Kawasaki, H. Kamei, K.; The angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor, captopril disrupts the motility activation of sperm from the silkworm, *Bombyx mori*. 査読有, *Journal of Insect Physiology*, 103, 2017, 18-28.
DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.09.007>
- ② Yamamoto, K., Nagaoka, S.; Identification and localization of a novel ecdysone oxidase in the silkworm, *Bombyx mori*. 査読有, *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 86, 2017, 49-53.
DOI:https://doi.org/10.11416/jibs.86.2_049
- ③ Nagaoka, S., Asagoshi, M., Kato, K., Takata, Y.; Success in the acquisition of *Bombyx mori* sperm motility is influenced by the extracellular production of nitric oxide (NO) in the presence of seminal fluid nitric oxide synthase (NOS). 査読有, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 84, 2017, 40-47.
DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.04.003>
- ④ Hirowatari, A., Nagaoka, S., Yamada, N., Yamamoto, K.; Identifying a sigma class glutathione S-transferase 2 from the silkworm *Bombyx mori*. 査読有, *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 86, 2017, 1-7.
DOI: https://doi.org/10.11416/jibs.86.1_001

[学会発表] (計 10 件)

- ① 長岡純治・土居 梓・畑山紗智子・近藤由紀子; 精子成熟に伴う精子吸着性チロシンリン酸化タンパク質 BmSfp25 の変化. 日本蚕糸学会第 88 回大会. 2018 年 3 月 19 日. 名古屋市
- ② 柰田紗希・高村智子・白井孝治・長岡純治; 相同性をもった 4 種のカイコガ精漿タンパク質は精子成熟の進行に伴い段階的に分解される. 日本蚕糸学会第 87 回大

会. 2017 年 3 月 21 日. つくば市

- ③ 高村智子・柰田紗希・土居 梓・白井孝治・長岡純治; カイコガ精液タンパク質 (BmSfp32) は特異的分解により精子吸着性が低下する. 日本蚕糸学会第 87 回大会. 2017 年 3 月 21 日. つくば市
- ④ 土居 梓・白井孝治・長岡純治; カイコガ精子成熟に伴い分解される精包タンパク質の同定. 日本蚕糸学会第 85 回大会. 2015 年 9 月 26 日. 札幌市
- ⑤ 土居 梓・柰田紗希・高村智子・白井孝治・長岡純治; カイコガ精子成熟に伴い分解される精液タンパク質の動態. 日本蚕糸学会第 86 回大会. 2016 年 3 月 17 日. つくば市
- ⑥ 長岡純治・木村周世・西村祐香・阪倉美紀; カイコガ Initiatorin と類似したセリンプロテアーゼは、あらゆる昆虫の精子成熟誘発因子となりうるのか? 日本蚕糸学会第 86 回大会. 2016 年 3 月 17 日. つくば市
- ⑦ 長岡純治・阪倉美紀・木村周世; カイコガ精子成熟誘発因子・Initiatorin による carboxypeptidase B の特異的な活性調節. 日本蚕糸学会第 85 回大会. 2015 年 9 月 26 日. 札幌市
- ⑧ 高村智子・柰田紗希・長塚英莉・白井孝治・長岡純治; *In vitro* 精子成熟再現系における塩基性タンパク質の変化. 日本蚕糸学会第 85 回大会. 2015 年 9 月 26 日. 札幌市
- ⑨ 柰田紗希・高村智子・長塚英莉・白井孝治・長岡純治; 精子成熟誘発因子・Initiatorin の基質候補タンパク質. 日本蚕糸学会第 85 回大会. 2015 年 9 月 26 日. 札幌市

[図書] (計 2 件)

- ① 長岡純治; カイコガを利用した受精可能な精子への変化機構 (精子成熟) の解明, 北隆館 (アグリバイオ), 1, 2017, 74-78

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 転写・翻訳共役型無細胞系タンパク質合成

発明者: 長岡純治

権利者: 京都工芸繊維大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-015070 (P2016-015070)

出願年月日: 2016.1.29

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・応用生物学系・助教

研究者番号: 00303999