

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570074
 研究課題名（和文） 先体反応誘起に必須な2つのシグナルによる精子内 Ca^{2+} 上昇の
 連携調節機構
 研究課題名（英文） Cross-talk of Ca^{2+} signal on acrosome reaction in starfish
 研究代表者
 松本 緑 (MATSUMOTO MIDORI)
 慶應義塾大学・理工学部・准教授
 研究者番号：00211574

研究成果の概要：

ヒトデの先体反応について、精子内の Ca^{2+} の上昇を促す2種類の機構（ARIS と asterosap のシグナル伝達機構）が起こす単独作用の時とは全く異なる協調的な Ca^{2+} の上昇機構に焦点をあててこれを解明することにある。未だ同定できていない ARIS 受容体を ARIS 活性糖鎖である Fr. 1 に対するアフィニティークロマトグラフを用いて、精子膜画分より Fr. 1 特異的に結合性を持つ 41kD の受容体候補タンパク質が見出した。さらに、その受容体候補タンパク質の精子膜ラフトへの局在を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：ヒトデ、受精、先体反応

1. 研究開始当初の背景

先体反応は、その受精に至る一連の精子・卵相互作用のうちでも、中核をなす重要なものである。

ヒトデ先体反応は、卵ゼリー中の3成分（ARIS、Co-ARIS、asterosap）がそれぞれ協調的に精子に対して作用することが必須である。申請者は今まで ARIS・asterosap のシグナル間の協調作用に着目して、これには cGMP 由来の細胞内 pH の上昇を伴う一時的な Ca^{2+} の上昇と SOC 由来の持続的な Ca^{2+} の上昇、cAMP の上昇と PKA によるリン酸化が関与す

ることを明らかにしてきたが、この2つの Ca^{2+} の上昇がどのようにリンクし、先体反応突起形成を誘導するかは未だ不明である。

2. 研究の目的

ヒトデの先体反応について、精子内の Ca^{2+} の上昇を促す2種類の機構（ARIS と asterosap のシグナル伝達機構）が起こす単独作用の時とは全く異なる協調的な Ca^{2+} の上昇機構に焦点をあててこれを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) ARIS 受容体の単離-ARIS アフィニティ レジンを作成し、ARIS 結合タンパク質を精製する。
- (2) 精子内 PKA 標的分子の同定-精子抽出物を用いて PKA リン酸化特異抗体により探索する。
- (3) ARIS タンパク質領域の構造決定-アミノ酸配列をエドマン分解により決定する。
- (4) ARIS 遺伝子のクローン化-(3)の結果を元にヒトデ卵巣 mRNA より単離する。
- (5) 新口動物における ARIS 様タンパク質の比較-棘皮動物、原索動物より ARIS 様タンパク質遺伝子を検索し、比較する。
- (6) ARIS 生合成過程-*in situ* hybridization、抗体染色により ARIS の合成ステージを決定する。
- (7) ヒトデ精子のプロテオーム解析-SDS-PAGE により分画したサンプルを質量分析機により解析する。
- (8) ARIS ナノ構造を観察-原子間力顕微鏡、走査型電子顕微鏡により、観察する。
- (9) 補因子 Co-ARIS の作用-マイクロドメイン上のコレステロールとの作用を調べた。

4. 研究成果

- (1) ARIS 受容体の単離-未だ同定できていない ARIS 受容体を ARIS 活性糖鎖である Fr. 1 に対するアフィニティークロマトグラフを用いて、精子膜画分より Fr. 1 特異的に結合性を持つ 41kD の受容体候補タンパク質を見出した。この分子は過ヨウ素酸酸化により不活化した ARIS には結合せず、過剰の Fr. 1 により結合は阻害された。さらに、その受容体候補タンパク質の精子膜ラフトへの局在を明らかにした。
- (2) 精子内 PKA 標的分子の同定-ARIS と asterosap の協同的な刺激により、精子内 cAMP の上昇と cAMP 依存蛋白質リン酸化酵素 (PKA) によるタンパク質のリン酸化がおこることが示されているので、PKA のターゲットとなるタンパク質を同定し、このシグナル経路を試みたが、同定にはいたらなかった。
- (3) ARIS タンパク質領域の構造決定-また、ARIS 分子の構造を決定するために、ARIS 蛋白質領域の構造を解析したところ、3 種類の蛋白質分子 (ARIS1, 2, 3) が存在することがわかった。
- (4) ARIS 遺伝子のクローン化-エドマン分解に部分配列を決定し、それを元に

した RT-PCR により、キヒトデ

ARIS1, 2, 3 の全塩基配列を決定した。

- (5) 新口動物における ARIS 様タンパク質の比較-キヒトデ ARIS1, 2, 3 配列を元に棘皮動物においてヒトデ綱、ナマコ綱、ウミユリ綱について卵外被より ARIS 様分子を単離し、その構造を決定した。それぞれ、ARIS 特有のドメインが存在し、保存された構造であった。また、BLAST サーチにより、ナメクジウオ、クシクラゲにも同様な遺伝子が存在した。
- (6) ARIS 生合成過程-青森県浅虫より定期的にヒトデをサンプリングし、各生殖段階の生殖巣のサンプルを得て、ヒトデ生殖巣発達のステージ表を作成した。ARIS1, 3 の *in situ* hybridization の結果、ARIS mRNA は生殖巣発達の初期の時期から継続的に発現していた。卵巣基底膜付近にある初期の卵母細胞に強く発現が観察された。
- (7) ヒトデ精子のプロテオーム解析-*Asterias amurensis*, *A. forbesi*, and *Asterina pectinifera* の精子膜蛋白質を 1 次元電気泳動-LC/MS/MS によりプロテオミクス解析を行い、種間の蛋白質を比較検討した。シグナル伝達に関わる分子が多数同定された。
- (8) ARIS ナノ構造を観察-走査型電子顕微鏡により卵表面にネット構造が観察された。原子間力顕微鏡により、直径約 1.0 nm の繊維状構造、直径約 2.0 ~ 5.0 nm の紐状構造が観察された。この大きさは以前 X 線回折により予想したものとほぼ一致した。高濃度になると糖鎖を介した形でタンパク質同士が連結し、ネットワーク様構造を形成した。この構造変化を起こす濃度は先体反応誘起濃度と一致した。タンパク質領域を分解すると糖鎖は凝集した構造になった。
- (9) 補因子 Co-ARIS の作用-先体反応誘起のための補因子 Co-ARIS の機能を未知であったが、標的をラフト画分と予測し、過剰のコレステロールの添加により、Co-ARIS の先体反応誘起補因子としての活性が特異的に阻害されること、Co-ARIS が精子膜上におけるコレステロール状態に影響を与えていることを見いだした。また、培養細胞カベオラ強制発現下でも Co-ARIS はカベオラに変化を与え、モデル膜を用いた AFM 観察により、ラフト上の GM1 に影響を与えることが示された。

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 7 件)

- ①. Mia Nakachi, Motonori Hoshi, Midori Matsumoto, Hideaki Moriyama
Conserved sequences of sperm-activating peptide and its receptor throughout evolution despite speciation in the sea star *Asterias amurensis* and closely related species *Zygote* 16 1-10 査読有 2008
- ②. Mia Nakachi, Motonori Hoshi, Midori Matsumoto, Hideaki Moriyama
Identification of guanylate cyclases and related signaling proteins in sperm tail from sea stars by mass spectrometry *Marine Biotechnology*, 10, 564-571 査読有 2008
- ③. Midori Matsumoto, Osamu Kawase, M. Sadiqul Islam, Masahiro Naruse, Shin-nosuke Watanabe, Motonori Hoshi
The concerted regulation of acrosome reaction in starfish by intracellular cGMP, pH, cAMP, and Ca^{2+} levels *International Journal of Developmental Biology* 52, 523-526 査読有 2008
- ④. Noritaka Hirohashi, Noriko Kamei, Hideo Kubo, Hitoshi Sawada, Midori Matsumoto and Motonori Hoshi
Egg and sperm recognition systems during fertilization *Development, Growth and Differentiation* 50 S221-238 査読有 2008

〔学会発表〕(計 13 件)

- ①. 松鹿弥生 成瀬正啓 松本緑 キヒトデ先体反応誘起物質 ARIS の高次構造解析 日本動物学会関東支部第 6 1 回大会 2009 年 3 月 20 日埼玉
- ②. 岡田泰三、宮川一志、久保英夫、松本緑 マボヤ体腔細胞のアロ認識機構解明を目指して—フェノールオキシダーゼ放出誘導抗体 日本動物学会関東支部第 6 1 回大会 2009 年 3 月 20 日埼玉
- ③. Midori Matsumoto, Osamu Kawase, Sadiqul MD Islam, Masahiro Naruse and Motonori Hoshi
The concerted regulation of acrosome reaction in starfish by intracellular pH, cAMP and Ca^{2+} level 13th International Echinoderm Conference, 6 Jan., 2009 Tasmania, Australia
- ④. Masahiro Naruse, Hiroshi Sakaya, Motonori Hoshi, Midori Matsumoto
Conserved role of ARIS: Acrosome Reaction-Inducing Substance in the

echinodermata 13th International Echinoderm Conference, 6 Jan., 2009 Tasmania, Australia

- ⑤. 成瀬正啓、石川里歩、昌谷洋、星元紀、松本緑 キヒトデ先体反応誘起物質 ARIS タンパク質領域の同定 日本動物学会第 7 9 回大会 2008 年 9 月 6 日福岡
- ⑥. 高橋未来、神林祐輔、江間正起、松本緑 マボヤ体腔細胞の同種異個体認識反応における自己マーカー分子の探索 日本動物学会第 7 9 回大会 2008 年 9 月 5 日福岡
- ⑦. 昌谷洋、成瀬正啓、松本緑 ヒトデ類における卵外被プロテオグリカン ARIS の共通性 FCCA 若手フォーラム 2008 2008 年 8 月 21 日 つくば
- ⑧. 松本緑 体を守る防衛ライン—異物センシングシステム—次世代センシングシステム技術分科会 2008 年 7 月 25 日東京
- ⑨. 宮川一志、竹田典代、星元紀、松本緑 マボヤ体腔細胞 Contact Reaction における液胞放出とフェノールオキシダーゼ活性の関係 日本動物学会第 7 8 回大会 2007 年 9 月 22 日 弘前
- ⑩. 竹田典代、出口竜作、藤澤敏孝、小泉修、松本緑、中島陽子 タマクラゲのヒドラ神経ペプチドによる放卵誘起機構 日本動物学会第 7 8 回大会 2007 年 9 月 20 日 松江
- ⑪. 成瀬正啓 松本緑 星元紀 キヒトデ精子先体反応誘起物質 (ARIS) 受容体の精子膜上での動態 日本動物学会第 7 8 回大会 2007 年 9 月 20 日 弘前
- ⑫. 濱中玄、松本緑、金子洋之 イトマキヒトデ胚の形態形成における間充織細胞の動態 日本動物学会第 7 8 回大会 2007 年 9 月 20 日 弘前
- ⑬. Masahiro Naruse, Motonori Hoshi, Midori Matsumoto
Analysis of the acrosome reaction-inducing substance receptor on the sperm surface membrane in *Asterias amurensis* Gordon Conference Fertilization and Activation of Development, 17. July 2007 Holderness, USA

〔図書〕(計 2 件)

- ①. Midori Matsumoto Recognition mechanism of egg and sperm by sugar chains *Experimental Glycoscience Glycobiology* 谷口直之編 シュプリンガー・ジャパン社 278-284 2008
- ②. 松本緑 天然物化学—海洋生物編— 山村庄亮ら編 アイピーシー 2.6 海洋生物の精子活性化、走化性と先体反応 63-70 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 緑 (MATSUMOTO MIDORI)
慶應義塾大学・理工学部・准教授
研究者番号：00211574

(2) 研究分担者

小林 一也 (KOBAYASHI KAZUYA)
慶應義塾大学・理工学部・助教
研究者番号：50360110

(3) 連携研究者

該当なし