

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840061

研究課題名(和文)精子機能を調節する時空間的な細胞内カルシウムシグナルの可視化

研究課題名(英文)Spatiotemporal visualization of intracellular calcium signal for regulation of sperm function

研究代表者

柴 小菊 (SHIBA, Kogiku)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：70533561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では受精のキーシグナルであるカルシウムに着目し、イメージングや鞭毛波形解析を行うことにより受精の様々な段階に応じた精子機能の解明に取り組み、以下の成果が得られた。(1)ケージド化合物を用いて精子細胞内シグナルを人為的に制御することで精子機能調節を時空間的に可視化する系を構築した。(2)構築したケージドATPによる精子刺激系を用いることにより鞭毛カルシウム結合タンパク質カラグシンが非対称波の屈曲伝播と屈曲方向の切換に関与していることがわかった。(3)精子運動活性化・走化性において可溶性アデニル酸シクラーゼのカルシウムを介した役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This research was carried out to elucidate sperm function in the various stages of fertilization. Especially intracellular calcium signaling was focused. The following results were obtained. (1) To visualize sperm function spatiotemporally the system for sperm stimulation by using caged compounds were constructed. (2) Experiments using caged ATP revealed that calaxin is involved in propagation and switching of flagellar waveforms. (3) Soluble adenylyl cyclase critically plays a role in the regulation of flagellar motility and Ca²⁺-dependent regulation of flagellar waveform during chemotactic movement.

研究分野：細胞生物学

キーワード：鞭毛運動 精子 カルシウム

1. 研究開始当初の背景

受精において精子は精巣内から卵に到達し融合するまで、卵側からのシグナルを含め外的環境因子により様々な調節を受ける。このとき「正しい場所と正しいタイミング」で機能調節を行うことは同種の卵にたどり着くために必要不可欠である。一般的に精子は精巣の中では運動をしていないが、体外に放出されると運動を開始し活性化が起こる。次に精子は同種の卵へと確実にたどりつくために卵に対して走化性を示し、最終的に卵に到達した精子は、雌雄同体の生物の場合には自己非自己認識を経た後、先体反応を介して卵と融合する。運動開始から先体反応までこれら全ての段階において Ca^{2+} は重要なシグナル因子として働く。精子頭部および鞭毛には多くの Ca^{2+} シグナリングに関わる因子が発現しており、ほ乳類、ウニ類で個々の現象における細胞内のシグナル伝達経路の研究が活発になされている。しかし精子が受精に向けた様々な段階に応じてどのように Ca^{2+} シグナルを使い分けているのかはよくわかっていない。 Ca^{2+} シグナルが「いつ」「どこで」「どのように」働いているのかを知ることは細胞内シグナル伝達機構を知る上で非常に重要な情報である。

2. 研究の目的

本研究では精子の受精におけるシグナル受容・応答の全容を明らかにすることを最終目標とした。本申請課題の研究期間においては、主に「時空間的な精子機能調節におけるカルシウムシグナルの役割」に焦点を当てて研究を進めた。カルシウムシグナルが精子の機能をどのように調節するのかを可視化するため、精子運動活性化、精子走化性など多様な精子機能におけるカルシウム制御機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究では受精のキーシグナルであるカルシウムに着目し、イメージングや鞭毛波形解析を行うことにより受精の様々な段階に応じた精子機能の解明に取り組んだ。ケージド化合物を用いて精子細胞内シグナルを人為的に制御することで時空間的に精子機能調節を可視化する系を構築した。ケージド化合物とは生理活性を持つ分子を光分解性保護基で保護することにより一時的にその活性を失わせた分子のことで、UV など一定波長の光を照射することで任意の場所とタイミングで活性を瞬時に回復させることができる。

4. 研究成果

(1) ケージド ATP による精子刺激系の確立
ケージド ATP を用いて精子機能を時空間的に制御する系を確立した。除膜したカタユレイボヤ精子にケージド ATP を添加し、UV 照射により運動開始直後の鞭毛波形形成

を捉えることのできるシステムを構築した。ケージド解除のための UV 光源として UVLED を使用し、鞭毛波形の観察には赤色 LED のパルス光を用い、高速カメラにより記録を行った (図1)。ピンホールスライダを用いることにより径 $20 \mu\text{m}$ の範囲で局所的に UV 光を照射し、精子頭部、鞭毛基部、鞭毛先端など部位に応じた刺激が可能となった。さらにケージド化合物による刺激下の精子鞭毛内シグナル変化を可視化するため、二光源落射蛍光投光管を用いてカルシウム蛍光シグナルを捉えるための青緑色 LED、ケージド解除のための UVLED を組み込んだ系を構築した。現在赤色 LED の透過光を加え、青緑色、赤色の LED を同時に光らせ、イメージスプリッターを用いてカメラの直前で像を二つに分けることで、ケージド解除前後の蛍光像による細胞内カルシウム変化と位相差像による精子鞭毛運動変化を同時に記録することが可能な系を構築中である。

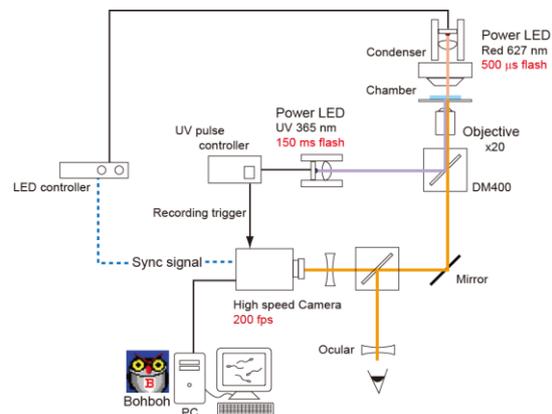


図1：ケージド解除のための UVLED、波形観察のための赤色 LED を組み込んだ精子解析システム

(2) 鞭毛非対称波の伝播におけるカラクシンの役割

構築したケージド ATP による精子刺激系を用いてカルシウム依存的な非対称波の形成と伝播のメカニズムを解明するための実験を行った (図2)。その結果低濃度カルシウムで誘導される対称波と高濃度カルシウムで誘導される非対称波では、はじめに形成される屈曲方向に違いがあることが明らかとなった。鞭毛非対称波調節に関与する鞭毛軸系カルシウム結合タンパク質カラクシンを阻害したところ、高濃度カルシウム条件下でのみ鞭毛波伝播が顕著に抑制された。このことからカラクシンは高濃度カルシウムによって誘導される非対称波の屈曲伝播と屈曲方向の切替に関与していることが明らかとなった。これらの成果については生体運動研究合同班会議 2016 において報告した。

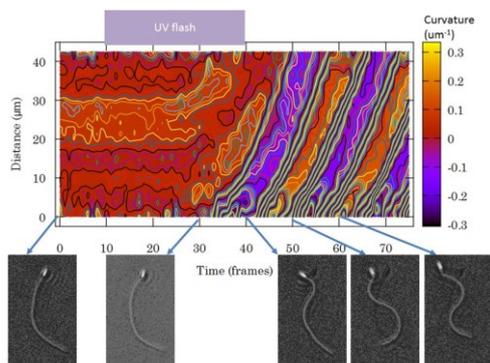


図2 低濃度カルシウム条件下における対称波形成の様子。横軸に時間、縦軸に鞭毛根元からの距離、疑似カラーで鞭毛曲率を示している。

(3) ホヤ精子における可溶性アデニル酸シクラーゼの役割

カルシウムイメージングと詳細な鞭毛運動解析を行うことにより、カタユレイボヤ精子運動活性化、走化性における可溶性アデニル酸シクラーゼの役割を明らかにした。精子鞭毛運動の活性化および調節には、カルシウムやcAMPなどが重要な役割を果たしている。cAMP合成酵素であるアデニル酸シクラーゼには可溶性型(sAC)と膜貫通型(tmAC)二種類が存在する。カタユレイボヤ精子においてsAC阻害剤は、精子運動率には影響しないが運動速度が約半分になること、遊泳軌跡曲率が上昇すること、精子走化性が有意に阻害されることを明らかにした。またカルシウム欠如海水ではsAC阻害剤により運動が完全に阻害された。カルシウムイメージングの結果、sACが阻害されると精子走化性に必要なターン時に過剰なカルシウム流入が生じていることがわかった(図3)。これらの結果よりsACはカルシウムを介した鞭毛振動数の上昇と、カルシウム排出またはカルシウム依存的な鞭毛打非対称性の変換を介して精子走化性に関与している可能性が示唆された。これらの成果については *The 8th International Tunicate Meeting, The 12th International Symposium on Spermatology*, 日本動物学会第85回大会において報告し、*Int J Mol Sci* 誌において発表した。

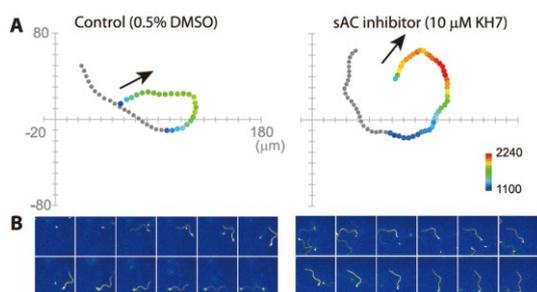


図3: 精子走化性ターン時の鞭毛内カルシウムイメージング。sACを阻害すると過剰なカルシウム流入が生じる(右)。

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8件)

① Kinoshita N, Shiba K, Inaba K, Fu G, Nagasato C, Motomura T. Flagellar waveforms of gametes in the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Eur J Phycol*, 査読有, 2016: 51(2): 139-148. doi: 10.1080/09670262.2015.1109144. doi: 10.1371/journal.pone.0126005.

② Matsuzaki M, Mizushima S, Hiyama G, Hirohashi N, Shiba K, Inaba K, Suzuki T, Dohra H, Ohnishi T, Sato Y, Kohsaka T, Ichikawa Y, Atsumi Y, Yoshimura T, Sasanami T. Lactic acid is a sperm motility inactivation factor in the sperm storage tubules. *Sci Rep*. 査読有, 2015; 5:17643. doi: 10.1038/srep17643.

③ Miyata H, Satouh Y, Mashiko D, Muto M, Nozawa K, Shiba K, Fujihara Y, Isotani A, Inaba K, Ikawa M. Sperm calcineurin inhibition prevents mouse fertility with implications for male contraceptive. *Science*. 査読有, 2015; 350(6259):442-5. doi: 10.1126/science.aad0836.

④ Konno A, Shiba K, Cai C, Inaba K. Branchial cilia and sperm flagella recruit distinct axonemal components. *PLoS One*. 査読有, 2015; 10(5):e0126005.

⑤ Mizushima S, Hiyama G, Shiba K, Inaba K, Dohra H, Ono T, Shimada K, Sasanami T. The birth of quail chicks after intracytoplasmic sperm injection. *Development*. 査読有, 2014 Oct; 141(19):3799-806. doi: 10.1242/dev.111765.

⑥ Sung CG, Kim TW, Park YG, Kang SG, Inaba K, Shiba K, Choi TS, Moon SD, Litvin S, Lee KT, Lee JS. Species and gamete-specific fertilization success of two sea urchins under near future levels of pCO₂. *Journal of Marine Systems*. 査読有, 2014 Sep; 137: 67-73. doi:10.1016/j.jmarsys.2014.04.013

⑦ Shiba K, Inaba K. Distinct roles of soluble and transmembrane adenylyl cyclases in the regulation of flagellar motility in *Ciona* sperm. *Int J Mol Sci*. 査読有, 2014 Jul 28; 15(8):13192-208. doi: 10.3390/ijms150813192.

⑧ Miyashiro D, Shiba K, Miyashita T, Baba SA, Yoshida M, Kamimura S. Chemotactic response with a constant delay-time mechanism in *Ciona* spermatozoa revealed by a high time resolution analysis of flagellar motility. *Biol Open*. 査読有, 2015 Jan 8; 4(2):109-18. doi: 10.1242/bio.20137351.

[学会発表] (計21件)

① Haruhiko Miyata, Yuhkoh Satouh, Daisuke Mashiko, Masanaga Muto, Kaori Nozawa, Kogiku Shiba, Yoshitaka Fujihara, Ayako Isotani, Kazuo Inaba, Masahito Ikawa. Sperm calcineurin is necessary for midpiece flexibility and male fertility, *Biophysical Society 60th Annual*

Meeting, 2016.2.27-3.2, Los Angeles Convention Center, Los Angeles, CA, USA.

② Haruhiko Miyata, Yuhkoh Satouh, Daisuke Mashiko, Masanaga Muto, Kaori Nozawa, Kogiku Shiba, Yoshitaka Fujihara, Ayako Isotani, Kazuo Inaba, Masahito Ikawa. Sperm-specific calcineurin is necessary for midpiece flexibility and male fertility, 国際シンポジウム "生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御", 2016.2.17-19, 京都大学百周年時計台記念館, 京都府、京都市.

③ 柴小菊, 馬場昭次, 藤原英史, 稲葉一男. 鞭毛非対称波の伝播におけるカラクシンの役割, 生体運動研究合同班会議, 2016.1.8-10, キャンパスプラザ京都, 京都府、京都市.

④ 佐野 マリコ, 柴小菊, 稲葉一男. 炭酸脱水酵素/CO₂ を介したカレイ類系統特異的な精子運動阻害, 日本動物学会第 86 回大会, 2015.9.17-19, 新潟コンベンションセンター 朱鷺メッセ, 新潟県、新潟市.

⑤ 稲葉一男, 柴小菊, 柴田大輔, Wenjie Zuo, 城倉圭, 牧野由美子, 山口勝司, 重信秀治. RNAseq データを用いたプロテオミクスによる海産無脊椎動物繊毛の多様性機構に関する研究, 日本動物学会第 86 回大会, 2015.9.17-19, 新潟コンベンションセンター 朱鷺メッセ, 新潟県、新潟市.

⑥ 菊池 絢子, 柴小菊, 中野賢太郎, 小澤哲夫, 稲葉一男, 沼田治. 紅茶高分子ポリフェノール MAF によるムラサキウニ精子の運動活性化, 日本動物学会第 86 回大会, 2015.9.17-19, 新潟コンベンションセンター 朱鷺メッセ, 新潟県、新潟市.

⑦ 松崎 芽衣, 柴小菊, 稲葉一男, 道羅英夫, 笹浪知宏. 低酸素状態は乳酸産生および精子の運動停止に関与する, 日本動物学会第 86 回大会, 2015.9.17-19, 新潟コンベンションセンター 朱鷺メッセ, 新潟県、新潟市.

⑧ Osamu Kutomi, Katsutoshi Mizuno, Keiko Hirose, Lixy Yamada, Hitoshi Sawada, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba. カタユウレイボヤ精子鞭毛における内腕ダイニンのキャラクターゼーション Characterization of inner arm dyneins from sperm flagella in *Ciona intestinalis*, 第 53 回日本生物物理学会年会, 2015.9.13-15, 金沢大学角間キャンパス, 石川県、金沢市.

⑨ Haruhiko Miyata, Yuhkoh Satouh, Daisuke Mashiko, Masanaga Muto, Kaori Nozawa, Kogiku Shiba, Yoshitaka Fujihara, Ayako Isotani, Kazuo Inaba, Masahito Ikawa. Inhibition of sperm-specific calcineurin for male contraception, **Gordon Research Conference: Fertilization and the Activation of Development**, 2015.7.19-24, Holderness, NH, USA

⑩ Kogiku Shiba, Kazuo Inaba. The role of soluble adenylyl cyclase in the regulation of flagellar motility in *Ciona* sperm, **The 8th International Tunicate Meeting**, 2015.7.13-17, Aomori City Cultural Hall, Aomori, Japan.

⑪ Kazuo Inaba, Osamu Kutomi, Katsutoshi

Mizuno, Kogiku Shiba, Keiko Hirose. Two novel subunits of axonemal dyneins from *Ciona intestinalis*, as potentially key regulators for ciliary motility, **The 8th International Tunicate Meeting**, 2015.7.13-17, Aomori City Cultural Hall, Aomori, Japan.

⑫ 阿閉耕平, 柴小菊, 中山剛, 石田健一郎, 稲葉一男. 多機能運動装置ハプトネマが示す新規微小管系運動のメカニズム, 生体運動研究合同班会議, 2015.1.7-9, 学習院大学, 東京

⑬ 久富理, 広瀬恵子, 柴小菊, 稲葉一男. ホヤ精子鞭毛の新規タンパク質 DYBLUP と f11 ダイニンとの相互作用, 生体運動研究合同班会議, 2015.1.7-9, 学習院大学, 東京都、豊島区.

⑭ 柴小菊, 稲葉一男. ホヤ精子における可溶性アデニル酸シクラーゼの役割, 日本動物学会第 85 回大会, 2014.9.11-13, 東北大学川内キャンパス, 宮城県、仙台市.

⑮ 久富理, 水野克俊, 広瀬恵子, 柴田大輔, 山田力志, 澤田均, 柴小菊, 稲葉一男. カタユウレイボヤ精子鞭毛における内腕ダイニン f の単離・解析, 日本動物学会第 85 回大会, 2014.9.11-13, 東北大学川内キャンパス, 宮城県、仙台市.

⑯ 紺野在, 柴小菊, 池上浩司, 稲葉一男, 瀬藤光利. チューブリンポリグルタミン酸化酵素 Ttl19 欠損マウス精子に見られる特異な構造異常と運動異常の解析, 日本動物学会第 85 回大会, 2014.9.11-13, 東北大学川内キャンパス, 宮城県、仙台市.

⑰ 松崎芽衣, 水島秀成, 柴小菊, 稲葉一男, 笹浪知宏. 乳酸はウズラ精子貯蔵管における精子の運動停止に関与する, 日本動物学会第 85 回大会, 2014.9.11-13, 東北大学川内キャンパス, 宮城県、仙台市.

⑱ Kogiku Shiba, Kazuo Inaba. The role of soluble adenylyl cyclase in the regulation of flagellar motility in *Ciona* sperm. **The 12th International Symposium on Spermatology**, 2014.8.8-10, Newcastle City Hall, Newcastle, Australia.

⑲ Kazuo Inaba, Osamu Kutomi, Katsutoshi Mizuno, Keiko Hirose, Kogiku Shiba, Lixy Yamada, Hitoshi Sawada. Molecular characterization of axonemal dyneins of sperm flagella in the Ascidian *Ciona intestinalis*. **The 12th International Symposium on Spermatology**, 2014.8.8-10, Newcastle City Hall, Newcastle, Australia.

⑳ Kaoru Yoshida, Kogiku Shiba, Akira Nakashima, Ayako Sakamoto, Shigeru Matsunaga, Kazuo Inaba, Manabu Yoshida. Sperm chemotaxis is mediated by calcium extrusion via plasma membrane Ca²⁺-ATPase and Na⁺/Ca²⁺ exchanger. **The 12th International Symposium on Spermatology**, 2014.8.8-10, Newcastle City Hall, Newcastle, Australia.

㉑ Hideo Mohri, Miyoko Kubo-Irie, Masaru Irie, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba. Phylogenetic

aspects of flagellar outer arm dynein. *The 12th International Symposium on Spermatology*, 2014.8.8-10, Newcastle City Hall, Newcastle, Australia.

〔図書〕 (計 2 件)

① Inaba K, Kutomi O, Shiba K, Cosson J. Sperm guidance: comparison with motility regulation in bikont species. *In: Flagellar Mechanics and Sperm Guidance (Cosson J, Ed)*, Bentham Science Publishers, 2015 Nov; pp.349-389.

doi: 10.2174/97816810812811150101

② 稲葉一男、柴小菊、吉田学：「精子運動の活性化と走化性」 動植物の受精学-共通機構と多様性 (澤田均編) 化学同人 (Apr 2014) pp.286-300.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shimoda.tsukuba.ac.jp/ronbun.html>

<http://www.shimoda.tsukuba.ac.jp/~inaba/publish.html>

<http://www.shimoda.tsukuba.ac.jp/~jambio/kenkyu.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

柴 小菊 (SHIBA, Kogiku)

筑波大学大学院生命環境系・助教

研究者番号：70533561