

機関番号：12102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770075

研究課題名 (和文) カルシウムシグナルを介した鞭毛・繊毛運動制御機構の解明

研究課題名 (英文) Regulatory mechanism of flagellar and ciliary movement via calcium signaling

研究代表者

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

研究成果の概要 (和文)：繊毛・鞭毛が細胞外の環境に応じて瞬時に反応し運動を変化させるメカニズムを明らかにするために、海産動物カタユレイボヤ精子の走化性遊泳や運動活性化、ウニ幼生繊毛逆転反応におけるカルシウムを介した鞭毛・繊毛運動制御機構の解析を行った。研究成果として、精子の誘引物質感知機構、カルシウム非依存的な鞭毛波形制御機構、精子運動活性化におけるシグナル伝達機構、繊毛逆転反応におけるカルシウム流入機構において新たな知見が得られた。

研究成果の概要 (英文)：To understand how flagella and cilia respond to external stimuli and instantaneously modify their movement, regulatory mechanisms of flagellar and ciliary movement via calcium signaling during sperm chemotactic behavior and motility activation in *Ciona intestinalis* and ciliary reversal movement in sea urchin larvae were analyzed. Sensory mechanism of sperm chemoattractant, calcium-independent regulatory mechanism of flagellar asymmetry, cAMP signaling in sperm motility activation and calcium influx during ciliary reversal movement were revealed by these studies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
平成 22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：動物生理科学、細胞・組織、生理学、動物、鞭毛・繊毛、生殖

1. 研究開始当初の背景

繊毛は真核生物において生体内の様々な現象を仲介する水流を作り出し、鞭毛は受精における精子の遊泳をつかさどるなど、鞭毛・繊毛運動は幅広い生命現象に必須な役割を果たしている。繊毛・鞭毛は細胞外の環境

に応じて瞬時に反応し運動を変化させる。例えば受精において精子鞭毛運動は様々な段階に応じて調節を受けることが知られている。多くの生物の精子は精巣中では運動能を持たないが放精の際に運動を開始し、卵由来の物質によって活性化され、卵に対して走化

性を示す。このような外部環境因子による精子運動制御機構の解明は、受精のメカニズムを知る上で非常に重要である。また多様な組織に存在する繊毛に関して外的シグナル受容を介した運動制御が重要な機能を果たしている。

2. 研究の目的

本研究ではカルシウムによる鞭毛・繊毛運動制御機構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、主にカタユウレイボヤ精子鞭毛およびウニ幼生繊毛が外部因子によって運動を変化させる時のカルシウムによる調節機構に着目して、蛍光イメージングを用いた細胞内シグナルの可視化と詳細な運動解析を中心に鞭毛・繊毛運動制御の分子機構の解明にあたった。

3. 研究の方法

鞭毛・繊毛が環境に応じたシグナルを感知しカルシウムによって運動を制御するメカニズムを解明することを目的とし、カタユウレイボヤ精子走化性における鞭毛運動制御機構及びウニ幼生繊毛逆転反応における繊毛運動制御機構の2点の現象に着目し、蛍光イメージングを用いた細胞内シグナルの可視化と詳細な運動解析を中心に研究を推進した。また、これまでに構築してきた精子の鞭毛波形と蛍光像を正確に捉えることのできる顕微鏡用 LED ストロボ照明装置の改良を行うことにより、さらなる手法の発展と向上を目指した。

4. 研究成果

本研究では、鞭毛・繊毛が細胞外の環境に応じて瞬時に反応し運動を変化させるメカニズムを明らかにするために海産動物精子および幼生を材料に鞭毛・繊毛が精子誘引物質や神経伝達物質によって運動を変化させる時のカルシウムによる調節機構に着目し、「カルシウムシグナルを介した鞭毛・繊毛運動制御機構の解明」に取り組んだ。

カタユウレイボヤ精子走化性における鞭毛運動制御機構の解明については $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger などの Ca^{2+} 流出入に関わる分子の阻害剤や外液カルシウム濃度変化によって Ca^{2+} 動態を変化させたときの鞭毛内 Ca^{2+} および鞭毛波形との関係を明らかにした。また、走化性運動時のカルシウム流入のタイミングを元に精子がいつどこで誘引物質を感知し遊泳を変化させるのかについてシミュレーション解析を行った。これらの結果について The 5th International Tunicate Meeting、Gordon Research Conference: Fertilization and the Activation of Development において報告し、現在投稿論文準備中である。また、ウニ幼生

繊毛逆転反応における繊毛運動制御機構の解明については、鞭毛逆転反応に関わると考えられる L 型膜電位依存性カルシウムチャンネルに着目し、パフンウニでのクローニングを行い、モルフォリノ解析を進めている。顕微鏡用 LED ストロボ照明装置の改良についても新型 LED を導入し装置の改良を行った。

また、カタユウレイボヤ精子において走化性と同様にカルシウムシグナルが重要な引き金となる卵由来物質による鞭毛運動活性化についても、カルシウムシグナルによって活性化されると考えられるアデニル酸シクラーゼに着目し分子の同定およびシグナル伝達経路の解明を行い、日本動物学会第 80 回大会、The International Workshop Dynein 2009、生体運動研究合同班会議において成果報告を行った。

さらに顕微鏡用 LED ストロボ照明装置の改良により精子運動活性化時のカルシウムシグナルを捉えることに成功した。卵由来物質によって精子鞭毛内カルシウム濃度が振動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 11th International Symposium on Spermatology、FASEB Summer Research Conferences: The Biology of Cilia and Flagella において成果報告を行った。

本研究で構築した技術および知見を活かし、筑波大谷口研究室との共同研究でウニ幼生頂毛特異的な因子の解析を行い、運動性のない頂毛形成に関わる ankAT という因子を同定した。この成果は *Developmental Biology* 誌において発表した。同じく東京大学真行寺千佳子准教授らとの共同研究により、ウニ精子の機械刺激受容反応を詳細に解析することで精子遊泳方向の制御が精子細胞内カルシウム濃度変化とどのように関わるのか、またそのカルシウム濃度の変化はどのような膜タンパク質により調節されているのかを解明した。この成果は *Cell Structure and Function* 誌において発表した。

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 2 件)

- (1) Kambara, Y., Shiba, K., Yoshida, M., Sato, C., Kitajima, K., Shingyoji, C., Mechanism regulating Ca^{2+} -dependent mechanosensory behaviour in sea urchin spermatozoa, *Cell Structure and Function*, 査読有, 36(1), 2011, 69-82
- (2) Yaguchi, S., Yaguchi, J., Wei, Z., Shiba, K., Angerer, L.M., Inaba, K., ankAT-1 is a novel gene mediating the apical tuft formation in the sea urchin embryo, *Developmental Biology*, 査

〔学会発表〕(計 23 件)

- (1) 齋藤貴子, 柴小菊, 稲葉一男, 原田淑人, 山田力志, 澤田均, カタユウレイボヤにおける自己非自己識別分子とそれを介するカルシウムシグナルの解析, **BMB2010** (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 2010.12.7-10, 神戸ポートアイランド
- (2) 水野克俊, 柴小菊, 稲葉一男, NCS ファミリータンパク質カラクシンのホヤ精子走化性における機能, 日本動物学会第 81 回大会, 2010.9.23-25, 東京大学教養学部駒場キャンパス.
- (3) 金銀華, 柴小菊, 谷口俊介, 稲葉一男, ウニ胚頂毛に存在するグルタチオンS-トランスフェラーゼの胚繊毛運動における役割, 日本動物学会第 81 回大会, 2010.9.23-25, 東京大学教養学部駒場キャンパス.
- (4) 谷口順子, 紺野在, 金銀華, 柴小菊, 谷口俊介, 稲葉一男, カタユウレイボヤ初期胚における繊毛形成とその時空間的パターン解析, 日本動物学会第 81 回大会, 2010.9.23-25, 東京大学教養学部駒場キャンパス.
- (5) Shiba, K., Hozumi, A. and Inaba, K., Characterization of adenylyl cyclase involved in flagellar motility activation in *Ciona* sperm. **FASEB Summer Research Conferences: The Biology of Cilia and Flagella**. 2010.7.5-10, Saxtons River, VT, USA.
- (6) Mizuno, K., Shiba, K., and Inaba, K., NCS family protein calaxin is a calcium dependent dynein modulator responsible for sperm chemotaxis. **FASEB Summer Research Conferences: The Biology of Cilia and Flagella**. 2010.7.5-10, Saxtons River, VT, USA.
- (7) Shiba, K., Hozumi, A. and Inaba, K., Characterization of adenylyl cyclase involved in sperm motility activation in *Ciona intestinalis*. **11th International Symposium on Spermatology** 2010.6.24-29, Okinawa ConventionCenter.
- (8) Mizuno, K., Shiba, K., and Inaba, K., Function of NCS family protein calaxin in the regulation of sperm flagellar waveform. **11th International Symposium on Spermatology** 2010.6.24-29, Okinawa ConventionCenter.
- (9) Kambara, Y., Shiba, K., Yoshida, M., Sato, C.,

Kitajima, K. and Shingyoji, C., Ca²⁺-dependent Regulation of Sea Urchin Sperm Swimming Before and After Mechanical Stimulation. **11th International Symposium on Spermatology** 2010.6.24-29, Okinawa ConventionCenter.

- (10) 金銀華, 谷口俊介, 柴小菊, 稲葉一男, ウニ幼生頂毛の構造とタンパク質組成について, 第 5 回鞭毛・ダイニン研究会, 2010.3.23, 東京大学本郷キャンパス
- (11) 蒲原祐花, 柴小菊, 北島健, 真行寺千佳子, 遊泳中のウニ精子における鞭毛運動のカルシウム制御, 第 5 回鞭毛・ダイニン研究会, 2010.3.23, 東京大学本郷キャンパス
- (12) 宮代大輔, 柴小菊, 上村慎治, 馬場昭次, 吉田学, 新しい精子遊泳運動動態の判別法による走化性反応の検出, 生体運動研究合同班会議, 2010.1.9-11, 中央大学理工学部
- (13) 柴小菊, 保住暁子, 稲葉一男, ホヤ精子運動活性化に関与するアデニル酸シクラーゼの同定, 生体運動研究合同班会議, 2010.1.9-11, 中央大学理工学部
- (14) Shiba, K., Hozumi, A. and Inaba, K., Characterization of adenylyl cyclase involved in Flagellar motility activation in *Ciona* sperm. **International Workshop Dynein 2009**. Nov. 1-5, 2009. Kobe Fashion Museum.
- (15) Mizuno, K., Shiba, K., and Inaba, K., Roles of an axonemal Ca²⁺ binding protein, calaxin, in the regulation of sperm flagellar waveforms. **International Workshop Dynein 2009**. Nov. 1-5, 2009. Kobe Fashion Museum.
- (16) Miyashiro, D., Shiba, K., Kamimura, S., Baba, S.A. and Yoshida, M., ホヤ精子走化性実測データに基づく精子誘引物質感知機構のシミュレーション解析 Chemoattractant Sensing Mechanisms in Sperm: Experimental and Simulation Study, 日本生物物理学会第 47 回年会, 2009.10.30-11.1, 徳島文理大学/アステイトくしま.
- (17) Mizuno, K., Shiba, K., and Inaba, K., 精子鞭毛波形調節における NCS ファミリータンパク質カラクシンの機能 Function of NCS family protein calaxin in the regulation of sperm flagellar waveform, 日本生物物理学会第 47 回年会, 2009.10.30-11.1, 徳島文理大学/アステイトくしま.
- (18) Yaguchi, J., Wei, Z., Shiba, K., Inaba, K. and Yaguchi, S., A novel gene mediating formation of

apical tuft formation in the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. Sea urchin meeting, Oct 1-3, 2009, Woods Hole, MA, USA.

(19) 水野克俊, 柴小菊, 稲葉一男, ホヤ精子鞭毛カラクシンの鞭毛運動における機能, 日本動物学会第 80 回大会, 2009.9.17-20, 静岡グランシップ.

(20) 柴小菊, 保住暁子, 稲葉一男, ホヤ精子運動活性化に関与するアデニル酸シクラーゼの同定, 日本動物学会第 80 回大会, 2009.9.17-20, 静岡グランシップ.

(21) Maruyama, K., Shiba, K., Baba, S.A. and Yoshida, M., Real-time imaging of intracellular Ca^{2+} and flagellar waveforms during sperm chemotaxis in the ascidian, *Ciona intestinalis*. **Gordon Research Conference: Fertilization and the Activation of Development**, Plymouth, USA, Jul. 12-17, 2009.

(22) Shiba, K., Miyashiro, D., Kamimura, S., Baba, S.A. and Yoshida, M., Experimental and simulation study on sperm chemotaxis in the ascidian, *Ciona intestinalis*. **Gordon Research Conference: Fertilization and the Activation of Development**, Plymouth, USA, Jul. 12-17, 2009.

(23) Shiba, K., Baba, S.A. and Yoshida, M., Sperm chemotactic behavior and Ca^{2+} dynamics of the ascidian, *Ciona intestinalis*. **The 5th International Tunicate Meeting**. Jun. 21-25, 2009. Okinawa Industry Support Center.

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴 小菊 (Shiba Kogiku)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・

助教

研究者番号 : 70533561