

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月1日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22370023

研究課題名（和文）生物の体制進化に伴う繊毛構造の多様化とその分子機構

研究課題名（英文）Diversification of ciliary structure and its mechanism during evolution of body plan

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

研究成果の概要（和文）：

本研究では、生物の体制進化に伴って変化した繊毛構造の比較解析とその生物学的意義を解明することを目的として、以下の研究成果が得られた。①比較プロテオミクス解析により、グルタチオントランスフェラーゼータがウニ胚頂毛の機械刺激受容と調節に関与することがわかった。②海産巻貝異型精子の軸糸配向構造が明らかになった。③ホヤ精子カラクシンが走化性に関与することがわかった。④ツボカビ類等との比較解析により、カラクシンがオピストコンタ特異的に獲得されたものであることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

This research was carried out to analyze the diversification of ciliary structure during evolution and showed following new aspects; (1) Roles of glutathion transferase theta in the mechanical reception and signal transduction of apical tuft in sea urchin embryos. (2) Array structure of axonemes in the parasperm of a sea snail. (3) Driving of chemotaxis by a novel calcium sensor calaxin in ascidian sperm. (4) Evolutional acquisition of calaxin in the group of opisthokont.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2012年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：微細構造

1. 研究開始当初の背景

真核生物の繊毛は、細胞の運動やシグナルの受容に関わる重要な細胞構造であり、進化を通して高度に保存されている。これまで、その微細構造や運動機構、シグナル伝達に関して、研究が進められてきた。一方、原生生物から多細胞生物、さらに脊椎動物への進化

に伴い、繊毛の構造と機能が多様化した。古くから蓄積された繊毛に関する研究成果は、この構造が生物体制の進化と密接に関わっていることを強く示唆している。しかしながら、繊毛構造の多様化と生物体制進化に関する分子的な解析がこれまでなく、多くが仮説のまま現在に至っている。

2. 研究の目的

本研究では、生物の体制進化に伴って変化した繊毛構造の比較解析とその生物学的意義を解明することを目的として、主に海産生物を用いて、繊毛構造の電子顕微鏡解析、繊毛タンパク質の比較解析、および機能解析を行った。

3. 研究の方法

研究材料としては、種々の海産動物、主には棘皮動物バフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*) の原腸胚およびプリズム幼生、軟体動物 (巻貝) マガキガイ (*Strombus luhuanus*) の正型、異型精子、脊索動物カタユレイボヤ (*Ciona intestinalis*) 精子および菌類フタナシツボカビ (*Gorgonomycetes* sp.) の遊走子を用いた。繊毛、鞭毛の解析には、ハイスピードカメラと運動解析ソフト Bohboh を用いた。繊毛のタンパク質については、MALDI-TOF/MS による解析と Mascot による同定を行った。その他、適宜、免疫学的解析、電子顕微鏡学的解析を行った。

4. 研究成果

①ウニ胚頂毛グルタチオントランスフェラーゼータの同定とその機能：

バフンウニの遊泳繊毛と頂毛を単離し、二次元電気泳動と MALDI-TOF/MS による解析を行った結果、頂毛にグルタチオントランスフェラーゼータ (GSTT) が特異的に含まれることがわかった。阻害剤を用いた結果から、GSTT は幼生の負の重力走性の調節には関与しないが、障害物に衝突した際の方向転換を調節していることがわかった。またこの際、軸系の滑り運動が起こることが示唆された (図 1)。

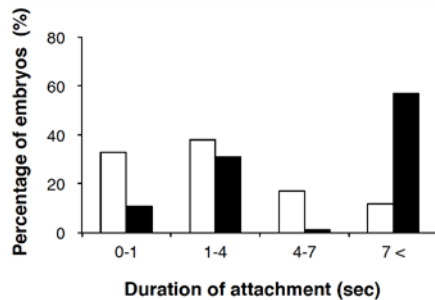


図 1. ウニ胚がシリコン壁に衝突した際にトラップされる時間。白バーは対照、黒バーは GST 阻害剤存在下。

②海産巻貝マガキガイの異型精子の軸糸配向構造：

マガキガイの軸糸について、免疫染色を用いて解析した結果、異型精子が完成する過程で基底体と rootlet が消失すること、波動膜の後端では中心対が存在しないことが明らかとなった。

また、波動膜内の軸糸はおおむね配向が揃っているが、軸糸間に特別な連結構造はないことがわかった。

③ホヤカラクシンの精子走化性への関与：

阻害剤と抗体を用いた実験から、カラクシンが非対称波の伝播に関与することがわかった。カラクシンの阻害剤存在下では精子はその場で回転遊泳を示すのみで、誘因源への走化性は著しく阻害されたことから、カラクシンは走化性を司る重要なタンパク質であることがわかった。カラクシン存在下、カルシウム存在下で、ダイニンによる微小管の滑り運動が抑制されることから、非対称波の伝播には、カラクシンによる微小管滑り運動の抑制が必要なこともわかった。

④ツボカビ類等との比較解析によるカラクシンの分子系統解析：

分子系統学的解析から、カラクシンが後生動物以外に菌類にも存在することが明らかになった (図 2)。一方、その他の生物にはカラクシンが存在せず、外腕ダイニンを調節しているカルシウム結合タンパク質として軽鎖 4 が利用されている。解析の結果、軽鎖 4 はクラミドモナスの他、クリプト藻、繊毛虫、珪藻、褐藻類などにも存在することがわかった。このことから、系統特異的に外腕ダイニンのカルシウムセンサーの獲得が起こったことが示唆された。

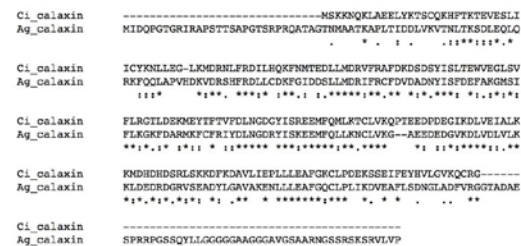


図 2. ホヤカラクシンとツボカビカラクシンのアミノ酸配列アラインメント。

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 13 件)

(1) Kikuchi A, Shiba K, Ozawa T, Nakano K, Inaba K, Numata O. Black Tea High-Molecular-Weight Polyphenol Increases the Motility of Sea Urchin Sperm by Activating Mitochondrial Respiration. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012 Dec 23; 76(12):2321-4. 査読有

(2) Mizuno K, Shiba K, Okai M, Takahashi Y, Shitaka Y, Oiwa K, Tanokura M, Inaba K. Calaxin drives sperm chemotaxis by Ca²⁺-mediated direct modulation of a dynein motor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Dec 11; 109(50):20497-502. 査読有

(3) Saito T, Shiba K, Inaba K, Yamada L, Sawada H. Self-incompatibility response induced by calcium increase in sperm of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Mar 13;109(11):4158-62. 査読有

(4) Mohri H, Inaba K, Ishijima S, Baba SA. Tubulin-dynein system in flagellar and ciliary movement. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2012 Oct 11; 88(8):397-415. 査読有

(5) Yuan Y, Tanabe T, Maekawa F, Inaba K, Maeda Y, Itoh N, Takahashi KG, Osada M. 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*. 2012 Dec 1; 179(3):350-7. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.09.006. 査読有

(6) Yaguchi J, Angerer LM, Inaba K, Yaguchi S. Zinc finger homeobox is required for the differentiation of serotonergic neurons in the sea urchin embryo. *Dev Biol*. 2012 Mar 1;363(1):74-83. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.12.024. 査読有

(7) Yaguchi S, Yaguchi J, Wei Z, Jin Y, Angerer LM, Inaba K. Fez function is required to maintain the size of the animal plate in the sea urchin embryo. *Development*. 2011 Oct; 138(19):4233-43. doi: 10.1242/dev.069856. 査読有

(8) Inaba K. Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Mol Hum Reprod*. 2011 Aug;17(8):524-38. doi: 10.1093/molehr/gar034. 査読有

(9) Nakachi M, Nakajima A, Nomura M, Yonezawa K, Ueno K, Endo T, Inaba K. Proteomic profiling reveals compartment-specific, novel functions of ascidian sperm proteins. *Mol Reprod Dev*. 2011 Jul;78(7):529-49.

(10) 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 AC, Imanishi T, Taniguchi H, Inaba K. 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 functionality. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jan; 39(Database issue):D807-14.

(11) Zhu L, Inaba K. Lipid rafts function in Ca²⁺ signaling responsible for activation of sperm motility and chemotaxis in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mol Reprod Dev*. 2011 Aug 16. doi:

10.1002/mrd.21382. 査読有

(12) Yaguchi S, Yaguchi J, Wei Z, Shiba K, Angerer LM, Inaba K. ankAT-1 is a novel gene mediating the apical tuft formation in the sea urchin embryo. *Dev Biol*. 2010 Dec 1;348(1):67-75. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.09.011. 査読有

(13) Terakubo HQ, Nakajima Y, Sasakura Y, Horie T, Konno A, Takahashi H, Inaba K, Hotta K, Oka K. Network structure of projections extending from peripheral neurons in the tunic of ascidian larva. *Dev Dyn*. 2010 Aug; 239(8):2278-87. doi: 10.1002/dvdy.22361. 査読有

〔学会発表〕(計 74 件)

(1) Kogiku Shiba, Kazuo Inaba. Adenylyl cyclases and Ca²⁺ signaling involved in sperm flagellar motility activation in *C.intestinalis*, The International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants, 2012.11.12-16, Hotel Nagoya Garden Palace, Nagoya, Japan

(2) Kazuo Inaba. 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

(3) 金銀華, 谷口順子, 柴小菊, 谷口俊介, 稲葉一男. ウニ胚頂毛におけるグルタチオン S-トランスフェラーゼ theta の機能, 日本動物学会第 83 回大会, 2012.9.13-15、大阪大学, 大阪

(4) 柴田大輔, 稲葉一男. マガキガイ *Strombus luhuanus* の異型精子形成メカニズム, 日本動物学会第 83 回大会, 2012.9.13-15、大阪大学, 大阪

(5) 柴小菊, 柴田大輔, 稲葉一男. マガキガイ正型精子のカルシウム依存的な後方遊泳, 日本動物学会第 83 回大会, 2012.9.13-15、大阪大学, 大阪

(6) K. Mizuno, J. Yaguchi, K. Shiba, S. Yaguchi, K. Inaba. A Neuronal Calcium Sensor Protein, Calaxin, is Essential for Modulation of Ciliary Beat Direction in Sea Urchin Embryos. 2011 The American Society for Cell Biology annual meeting, Denver, USA, Dec. 3-7, 2011

(7) 稲葉一男. LC-MS/MS によるウニ胚頂毛特異的タンパク質の解析, 日本動物学会第 82 回大会, 2011.9.21-23、旭川

(8) 柴田大輔, 稲葉一男. マガキガイ *Strombus luhuanus* の異型精子形成, 日本動物学会第 82 回大会, 2011.9.21-23、旭川

(9) 水野克俊, 谷口順子, 柴小菊, 谷口俊介, 稲葉一男. ウニ胚頂毛運動における Ca²⁺ 結合タンパク質カラクシンの機能, 日本動物学会第 82 回大会, 2011.9.21-23、旭川

- (10) Inaba K. Proteomic approach to study the functional diversity of cilia and flagella in marine invertebrates, 1st World Congress on Marine Biotechnology, Apr, 2011, Dalian, China
- (11) Inaba K. Tunicate databases: Toward a comprehensive informative basis at molecular and cellular level for tunicate community, The 6th International Tunicate Meeting, Montreal, Canada. Jul. 3-7, 2011.
- (12) Lihong Zhu, Akiko Hozumi, Lixy Yamada, Hitoshi Sawada, Kazuo Inaba. Lipid rafts function in Ca²⁺/calpain-dependent degradation of Ci-Sp17 in the signaling for activation of sperm motility in the ascidian *Ciona intestinalis*, The 6th International Tunicate Meeting, Montreal, Canada. Jul. 3-7, 2011.
- (13) Takako Saito, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba, Lixy Yamada, Hitoshi Sawada. Self-incompatibility response induces intracellular Ca²⁺ influx into sperm in *Ciona intestinalis*, The 6th International Tunicate Meeting, Montreal, Canada. Jul. 3-7, 2011.
- (14) Toshinori Endo, Keisuke Ueno, Kouki Yonezawa, Katsuhiko Mineta, Kohji Hotta, Yutaka Satou, Lixy Yamada, Michio Ogasawara, Hiroki Takahashi, Ayako Nakajima, Mia Nakachi, Mamoru Nomura, Junko Yaguchi, Yasunori Sasakura, Chisato Yamazaki, Miho Sera, Akiyasu C Yoshizawa, Tadashi Imanishi, Hisaaki Taniguchi, Kazuo Inaba. 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 functionality., The 6th International Tunicate Meeting, Montreal, Canada. Jul. 3-7, 2011.
- (15) 水野克俊, 柴小菊, 稲葉一男. Ca²⁺結合タンパク質カラクシンは外腕ダイニンを調節し精子走化性に必須である. 第 63 回日本細胞生物学会大会, 札幌, 2011.6.27-29.
- (16) Inaba K. The function of Ca²⁺ in the regulation of sperm flagellar motility. The 17th International Symposium on Ca²⁺-Binding Proteins and Ca²⁺ Function in Health and Disease, Jul, 2011, Beijing, China
- (17) Jin Y, Yaguchi S, Nakajima Y, Konno A, Inaba K. Analysis of the molecular architecture and the microstructure of the apical tuft in the sea urchin embryos, The Developmental Biology of the Sea Urchin XX, 2011.4, Woods Hole
- (18) L. Zhu, A. Hozumi, K. Inaba. Lipid Rafts Is Involved in Ca²⁺/Calpain-Dependent Degradation of Ci-Sp17 for Activation of Sperm Motility in the Ascidian *Ciona Intestinalis*. 2010 The American Society for Cell Biology annual meeting, Philadelphia, USA, Dec. 11-15, 2010
- (19) D. Shibata, K. Inaba. Formation and motility of parasperm in the gastropod *Strombus luhuanus*, 6th Asian-Pacific Organization for Cell Biology Congress, EDSA Shangri-la, Manila, Philippines, February 2011
- (20) Inaba K. Proteomics, cell biology and physiology of sperm flagella. 6th Asian-Pacific Organization for Cell Biology Congress, Manila, Philippines, Feb. 2011
- (21) Kazuo Inaba. Recent topics in the architecture and function of sperm flagella. 11th International Symposium on Spermatology. Okinawa, Japan. Jun. 24-29, 2010.
- (22) Miyoko Kubo-Irie, Masaru Irie, Kazuo Inaba, Hideo Mohri. In situ assembly of heavy chains of the outer arm dynein in sea urchin sperm axoneme. 11th International Symposium on Spermatology. Okinawa, Japan. Jun. 24-29, 2010.
- (23) Kogiku Shiba, Akiko Hozumi, Kazuo Inaba. Characterization of adenyllyl cyclase involved in sperm motility activation in *Ciona intestinalis*. 11th International Symposium on Spermatology. Okinawa, Japan. Jun. 24-29, 2010.
- (24) Katsutoshi Mizuno, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba. Function of NCS family protein calaxin in the regulation of sperm flagellar waveform. 11th International Symposium on Spermatology. Okinawa, Japan. Jun. 24-29, 2010.
- (25) Mia Nakachi, Ayako Nakajima, Mamoru Nomura, Akiko Hozumi, Kouki Yonezawa, Keisuke Ueno, Toshinori Endo, Kazuo Inaba. Sperm Proteomics in an Ascidian *Ciona intestinalis* with Spatial and Functional Information. 11th International Symposium on Spermatology. Okinawa, Japan. Jun. 24-29, 2010.
- (26) Lihong Zhu, Akiko Hozumi, Kazuo Inaba. Sperm Lipid Membrane Domain Is Essential for the Calpain-Dependent Degradation of a Cancer-Testis Antigen Sp17 during Ascidian Sperm Activation. 11th International Symposium on Spermatology. Okinawa, Japan. Jun. 24-29, 2010.
- (27) Yuhkoh Satouh, Kazuo Inaba. Proteomic characterization of sperm radial spokes identifies a novel spoke protein with an ubiquitin domain. 11th International Symposium on Spermatology. Okinawa, Japan. Jun. 24-29, 2010.
- (28) Katsutoshi Mizuno, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba. NCS family protein calaxin is a calcium dependent dynein modulator responsible for sperm chemotaxis. FASEB Summer Research Conferences: The Biology of Cilia and Flagella. Vermont, USA. Jul. 5-10, 2010.
- (29) Kogiku Shiba, Akiko Hozumi, Kazuo Inaba. Characterization of adenyllyl cyclase involved in flagellar motility activation in *Ciona* sperm. FASEB Summer Research Conferences: The

Biology of Cilia and Flagella. Vermont, USA. Jul. 5-10, 2010.

(30) Alu Konno, Kazuo Inaba. Comparative proteomics of cilia and flagella reveals distinctive regulation of sperm outer dynein. FASEB Summer Research Conferences: The Biology of Cilia and Flagella. Vermont, USA. Jul. 5-10, 2010.

(31) 毛利秀雄, 久保・入江美代子, 入江克, 稲葉一男. ウニ精子軸糸への外腕ダイニン重鎖の再結合, 日本動物学会第 81 回大会, 2010.9.23-25、東京

(32) 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

(33) 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

[図書] (計 2 件)

(1) Inaba K. Regulatory subunits of axonemal dynein. Handbook of Dynein (eds. Hirose, Amos). PanStanford Publishing, 2012 Feb; pp. 303-324.

(2) Shiba K, Mizuno K and Inaba K. Molecular comparison of the axonemal components between sperm flagella and Chlamydomonas flagella. Spermatology: new horizons in the 21 century (ed. M. Moriwasa). Adthree Publishing Co. Ltd. 2012 Aug; pp.30-40.

[その他]

ホームページ:

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

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) 連携研究者

谷口 俊介 (YAGUCHI SHUNSUKE)
筑波大学・生命環境系・准教授
研究者番号: 00505331
柴 小菊 (SHIBA KOGIKU)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号: 70533561
出川 洋介 (DEGAWA YOSUKE)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号: 00311431