

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380036

研究課題名(和文)精子成熟開始因子から見た昆虫オス生殖分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study on the insect male reproduction molecules mechanism from the viewpoint of the sperm-activating factor.

研究代表者

長岡 純治 (NAGAOKA, SUMIHARU)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・助教

研究者番号：00303933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円、(間接経費) 4,530,000円

研究成果の概要(和文)：カイコガ前立腺に存在する精子成熟誘発因子であるエンドペプチダーゼ、イニシャトリン(Initiatorin)は、貯精のうに存在する不活性なCarboxypeptidase Bに存在する2つの連続したArginine配列のC末端を特異的に切断し、活性化する。さらに、この切断部位は、チョウ目昆虫内では、保存されていた。また、カイコガ以外のチョウ目、バッタ目、カメムシ目昆虫のオス生殖腺には、部位特異的に発現するIni類似遺伝子(Inir)が存在し、精子成熟誘発因子として機能している可能性が見出された。

研究成果の概要(英文)：A serine protease called initiatorin (BmIni) is required for sperm activation in the silkworm, *Bombyx mori*. It has been expected that BmIni is responsible for the cleavage of seminal and/or sperm proteins, mainly at Arg-Arg sites, and thus is involved in the sperm activation. However, activation of sperm motility has been little known to other insects. (1) To determine the molecular mechanism of signaling pathways for sperm motility, we examined the evidence that BmIni acts on carboxypeptidase B (BmCPB). (2) We found a crucial role for BmIni-like serine protease activity in initiating conserved signaling pathways for sperm activation in many Lepidoptera, Orthoptera, Hemiptera species.

研究分野：昆虫生理

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫 カイコガ 生殖 精子成熟 プロテアーゼ 酵素 生理活性 プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

カイコガを含むチョウ目昆虫の精子には、核を持たない無核精子と核を持ち受精に参画する有核精子の二型がある。精巣で作られた両型の精子は、貯精のうに移動し、射精時まで貯えられる。このとき無核精子は分離しているのに対し、有核精子は256個が一つの束になって存在しており、ともに運動能を持たず、受精能も持たない。交尾時の射精に伴い、両型の精子はメス交尾のう内に構築される精包へと移行する。精包はオス生殖輸管に由来する分泌物のみから形成され、精子以外の細胞を全く含まない器官である。この中で、無核精子は前進性のない運動性を獲得し、有核精子束は解離して緩慢な運動性を獲得し、最終的に受精能を獲得するようになる。このような精子の変化を「精子成熟」という。1938年に大村は、未成熟な精子に生殖腺の末端部である前立腺の磨砕物を加えることで、*in vitro* で再現することに成功し、精子成熟誘発因子が前立腺に存在する可能性を初めて報告した。次に、1980年代後半に、報告者を含む小山内らによって、これが適当な濃度の trypsin で代替できることを見出し、trypsin 様の serine protease が精子成熟誘発因子であると予想し、イニシヤトリン (Initiatorin; BmIni) と名付けた。近年、我々のグループはさらにこの因子について検討を深め、その一次構造を明らかにした。さらに、酵素学的検討から trypsin 同様、lysine, arginine の C 末端を切断するセリンタイプのエンドペプチダーゼであるが、特に、2つの連続した arginine 配列の C 末端側を切断しやすい性質を持つことを明らかにしてきた。これらの知見は、初めてレーウエンフック以来330年間不明であった昆虫精子の成熟機構を理解する上で、分子レベルでの手がかりが提供されたことになる。

2. 研究の目的

カイコガで明らかになった Initiatorin という精子成熟誘発因子に注目することで、昆虫界に共通するオス生殖面からみた一般性と種分化維持に係わる特殊性を分子レベルで理解を目指す。

(1) 精子成熟誘発因子としての BmIni の同定は完了したものの、BmIni から開始された反応とそれによる生成物がどのように未成熟精子に作用して、成熟精子へと変化させるのかについては未だ不明である。そこで、BmIni の基質タンパク質の同定を目指した。

(2) カイコガ以外の昆虫種の精子成熟誘発因子については不明な点が多い。特に、カイコガと同じチョウ目昆虫である *Antheraea pernyi* (サクサン) の精子成熟誘発因子は熱に安定なペプチドであると報告されており (Shepherd; 1974)、我々のカイコガにおける知見とは異なる。このことを踏まえ、「様々なチョウ目昆虫やチョウ目以外の昆虫の精子成熟誘発因子が BmIni に類似した serine

protease である」という立場から、その仮説の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) Initiatorin 基質タンパク質の探索・同定
in vitro 精子成熟系で未成熟精子を含む貯精のう物質に trypsin もしくは BmIni を作用させ、精子成熟に伴い、変化するタンパク質を二次元電気泳動、逆相クロマトグラフィーを利用し、網羅的に探索した。

貯精のうには不活性型

Carboxypeptidase B (BmCPB) が存在しており、*in vitro* では trypsin によって活性化することができる (Aigaki et al., 1987)。そこで、BmIni が trypsin に似た性質を持つことに注目し、BmIni の基質としての BmCPB の可能性を検討した。BmCPB の単離を RT-PCR, RACE 法によりおこない、BmCPB の推定 Pro-mature 配列、および一部改変した配列を大腸菌発現系で発現させ、精製したのち、これに精製 BmIni を反応させた。

(2) カイコガ以外の昆虫における精子成熟誘発因子の探索・同定

サクサンを含むチョウ目 12 種、バタ目 2 種、カメムシ目 4 種について、オス生殖腺の形態と精子貯蔵部位について調査したうえで、

未成熟精子を *in vitro* に取り出して trypsin や BmIni を含む *B. mori* の前立腺磨砕液に対する反応性を観察した。

生殖腺で部位特異的に発現している BmIni 様 serine protease 遺伝子 (*Inir*) の RT-PCR による単離と発現部位の検討を行った。

大腸菌発現系を利用した組換え *Inir* タンパク質の作成を行い、これを用いて基質特異性の検討を行った。

これらの成果を総合し、各昆虫における精子成熟誘発因子の探索と比較検討を進めた。

4. 研究成果

(1) 貯精のうから調製した未成熟精子を含む精液サンプルと前立腺サンプルからは二次元電気泳動上、それぞれ、約 400 個と 520 個のスポットが検出された。精液に前立腺磨砕液を混合したところ、反応開始後 5 分から無核精子は前進性を持たない運動能を獲得し始め、その運動性は 60 分まで徐々に増強された。これに対応するように、精液由来の 12 個のスポットは消失し、10 個のスポットが出現した。また、反応開始後 60 分になると、有核精子束が解離してくる様子が観察されるが、その時期特異的に、1 個のスポットの出現が見出された。このような精子状態と二次元電気泳動上のスポット変化の関係は、精液に trypsin を混合した場合でも同様であった。消失したスポットに対応するタンパク質は、BmIni の基質であり、出現してくるスポットに対応するタンパク質は、その反応生成物であると予想されるので、引き続き N 末端

解析等をおこなっている。

未交尾オス貯精のうに含まれる不活性型 BmCPB は、射精時に BmIni の作用を受けて活性化され、メスへ移行することを見出した。cDNA の単離により (GenBank Accession No. AB485777), BmCPB は、分泌シグナルをもつ分子質量 49.4 kDa のタンパク質であると予想された。次に、予想分泌シグナル以降に対応した配列を大腸菌発現系で発現させた。これに BmIni を作用させると、初めて CPB 活性が検出され、その酵素学的性質は、貯精のう粗酵素液から調製した活性型 BmCPB と類似していた。さらに、そのときの分子質量の変化を追跡したところ、特異的な 2 つのタンパク質に切断されていることが見出された。この 2 つのタンパク質の分子質量は、すでに報告されている昆虫 CPB が trypsin によって活性化される際に切断される部位から予想される BmCPB の pro-mature 切断領域で切断された場合に生じるタンパク質の分子質量とほぼ一致していた。この予想 pro-mature 切断領域には、4 つの arginine が存在していた。そこで、この arginine 残基を中心に lysine もしくは alanine に改変した発現タンパク質を作成し、活性化への影響を調査したところ、BmIni は不活性型 BmCPB 中に存在する 2 つの連続した arginine 配列の C 末端側を切断することで活性化していると結論した。さらに、(2) で調査したチョウ目昆虫から単離された CPB の pro-mature 切断領域には、2 つの連続した arginine 配列が保存されていた。

	Activation site	
<i>B. mori</i>	↓	: YGRSFESPVERPRR LLRGLNVFEYN SHAA
<i>B. mandarina</i>		: YGRSFESPVERPRR LLRGLNVFEYN SHAA
<i>S. ricini</i>		: YGRTFEPFEREPRR ISHGPNVNGYNSYAT
<i>S. cynthia</i>		: YGRTFEPFEREPRR ISHGPNVNGYNSYAT
<i>S. jonassii</i>		: YGRTFDPIERESRRR ILNGFNVNGYNSYAT
<i>A. aliena</i>		: YGRSFDVPERQPKRR I IHGPNVVEYNSYAT
<i>A. japonica</i>		: YGRTFEPVERAPRRR VFQGFNVYGYNSYAT
<i>A. convolvuli</i>		: YGRLLPEPVERTPRR ILRPFVSVYEYNSFSA
<i>D. plexippus</i>		: YGRSFENWDRTPKRR FMRSFSIFEYHSYNA

図1 チョウ目昆虫CPBとの相同性

(2) 調査したチョウ目昆虫のオス生殖腺の形態は、カイコガとは異なっていたが、共通して生殖輸管の真ん中部分に、一本一本がばらばらになった無核精子と複数本が束になった有核精子束が運動能をもたない状態で貯蔵されていた。これに、*in vitro* でカイコガ前立腺磨砕液や trypsin を作用させると、無核精子は前進性のない活発な運動能を獲得し、有核精子束は束が解離された。さらに、全ての供試昆虫からは Inir が単離され、BmIni とは約 70% の相同性を有していた。しかし、その発現部位は昆虫種によってカイコガと同様、陰茎に近い生殖輸管末端部のものや、精子貯蔵部位や、陰茎とは逆側の生殖輸管先端部に発現しているものなど様々であった。Inir の発現 (存在) 部位が異なることから、Inir の活性制御メカニズムは空間的に

異なり、その結果、サクサンとカイコガで精子成熟誘発因子が異なるものとして報告されてきた可能性が予想される。なお、サクサンの組換え Inir タンパク質は、BmIni 同様、ペプチドの lysine, arginine の C 末端を切断するエンドペプチダーゼ活性を有し、特に C1, C2 に arginine を有するような人工基質に対して高い特異性を有していた。

バッタ目に属する 2 種昆虫の生殖腺の形態は、カイコガとは、全く異なっており、精子の貯蔵部位もはっきり特定することができなかった。しかし、生殖腺からは、1 種類のほとんど運動能を持たない精子を *in vitro* に取り出すことができ、trypsin 添加により、緩やかではあるもののはっきりとした運動能の誘発が観察された。さらに、BmIni とは約 40% の相同性をもつ Inir が単離された。

カメムシ目に属する 2 種類のセミの生殖腺形態もカイコガとは、異なっており、その一部には、運動能を持たない状態の精子が貯えられていた。そして、この精子にカイコガ前立腺磨砕物や trypsin を作用させると、かなり活発な運動能が誘発された。また、同時に、BmIni に対して約 30% の相同性を持つ Inir は、附属腺の一部分で特異的に発現していることが見出された。

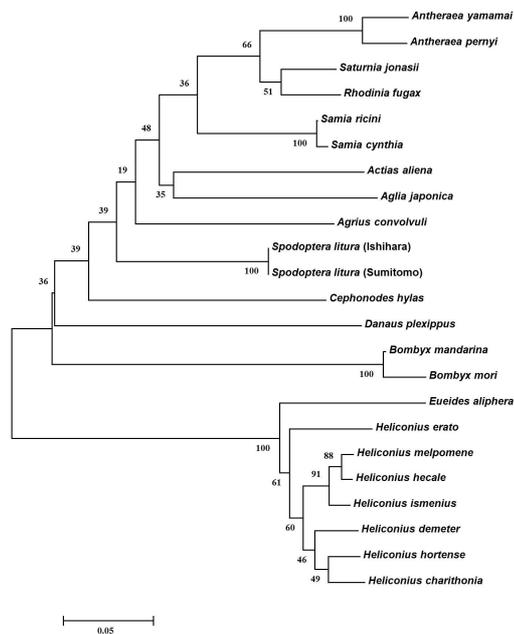


図2 Initiatorin様遺伝子の相同性

(3) 結論

以上の研究成果を整理すると、少なくとも、チョウ目、バッタ目、カメムシ目昆虫では、Initiatorin 様の serine protease が精子成熟誘発因子として機能し、そこから始まる反応カスケードも共通していると予想される。

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 15 件)

長岡純治; カイコガ精子成熟誘発因子・イニシヤトリンから見た昆虫オス生殖分子メカニズムの解明. 蚕糸・昆虫バイオテック. 査読無, 83, 2014, 14-24.

DOI: 10.11416/konchubiotec.83.1_011

Nagaoka, S., Kato, K., Takata, Y., Kamei, K.; Identification of the sperm-activating factor initiatorin, a prostatic endopeptidase of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* 査読有, 42, 2012, 571-582.

DOI: 10.1016/j.ibmb.2012.04.004

Nagaoka, S., Takata, Y., Kato, K.; Identification of two arginases generated by alternative splicing in the silkworm, *Bombyx mori*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 査読有, 76, 2011, 97-113.

DOI: 10.1002/arch.20407

〔学会発表〕(計 23 件)

長岡純治・谷 奈緒; カイコガオス生殖腺分泌物に存在するアルドラーゼアイソザイム. 日本蚕糸学会第 83 回大会. 2014 年 3 月 10 日. 藤沢市

阪倉美紀・長岡純治; オス生殖腺部位特異的に存在する CarboxypeptidaseB の精子活性化因子・Initiatorin による活性化. 日本蚕糸学会合同支部会. 2012 年 11 月 10 日. 上田市

木村周世・長岡純治; カイコガ, ヤママユガ, スズメガ科昆虫における精子活性化因子の探索. 日本蚕糸学会合同支部会. 2012 年 11 月 10 日. 上田市

長岡純治・木村周世・阪倉美紀; カイコガ精子活性化因子・Initiatorin と類似した因子は鱗翅目昆虫以外にも共通するか?. 日本蚕糸学会合同支部会. 2012 年 11 月 10 日. 上田市

長岡純治・加藤久美子・高田祐希; 精子活性化因子である前立腺に局在するセリンプロテアーゼ・イニシヤトリンの酵素学的特徴. 日本蚕糸学会第 82 回大会. 2012 年 3 月 14 日. 福岡市

長岡純治・大槻正嗣; カイコガオス生殖腺分泌物中に含まれるアルギニンキナーゼの存在とその機能. 日本蚕糸学会合同支部会. 2011 年 11 月 5 日. 盛岡市

〔図書〕(計 1 件)

長岡純治; 絹糸腺の抽出液を利用した新しいタンパク質合成系の開発, 「繊維科学フォーカス 2」, 公益財団法人衣笠繊維研究所, 2014, 印刷中

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・工芸科学研究科・助教
研究者番号: 00303999

(2) 研究分担者

白井 孝治 (SHIRAI KOJI)
信州大学・繊維学部・准教授
研究者番号: 00293499

山本 幸治 (YAMAMOTO KOJI)
九州大学・農学研究科・助教
研究者番号: 00346834