

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291069

研究課題名(和文)カラクシンによる繊毛機能の調節機構の解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of ciliary functions by calaxin

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ダイニンのカルシウムセンサーであるカラクシンの構造と機能を解明することを目的とした。まず、カラクシンの4つのEF-handのうちEF2とEF4が構造的EF-hand、EF3が調節的EF-handであることがわかった。また、カルシウムイオンが結合すると開構造へシフト、dyneinが結合すると閉構造から開構造へ構造変化することが示唆された。機能面では、カラクシンが繊毛屈曲を調節し、基底体の配向を制御する結果、繊毛の協調的運動に寄与ことがわかった。さらにカラクシンを欠損したマウスでは、軸糸構造は見かけ上正常だが、水頭症や内臓逆位といった繊毛病の症状が表現型として現れることがわかった。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we aimed to clarify the structure and function of the dynein calcium sensor calaxin. First, X-ray crystallography revealed that EF2/EF4 are structural and EF3 is a regulatory EF-hand. Overall calaxin structure was suggested to change by a Ca<sup>2+</sup> from closed to open state, of which state change was largely accelerated by binding of dynein. By using sea urchin embryos, we concluded that calaxin determines basal body orientation by regulating ciliary bending. Calaxin-deficient mice possess apparently normal axonemal structures. However, they represent typical ciliopathy phenotypes, in particular hydrocephalus and situs inversus.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：カラクシン 鞭毛 繊毛 精子 ダイニン 微小管 生殖 繊毛病

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物の鞭毛と繊毛の運動調節を司るカルシウムセンサーとして、我々はカルシウム依存的にダイニンと結合する性質をもつ新規の神経カルシウムセンサーファイミリータンパク質を発見し、「カラクシン」と命名した (Mizuno ら, 2009)。最近、カラクシンの特異的阻害剤、カラクシン変異体、および特異的な抗体を用いて、カラクシンが直接ダイニンによる微小管滑り運動を抑制すること、非対称波の生成は阻害しないがその伝播を阻害することにより非対称波による精子のターン運動を阻害すること、その結果、精子の走化性を阻害することを明らかにした。このことは、カラクシンがカルシウム依存的な鞭毛繊毛運動の調節の鍵を握っていることを示している。精子の運動のみならず、多くの生物の鞭毛繊毛の機能調節においてカルシウムは極めて重要な役割を果たしている。一方、疾患と結びつくことから注目されている一次繊毛の機能調節にもカルシウムが重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。しかし、その分子基盤、特に、分子モーターの機能と関連付けた研究は極めて少なく、多くはわかっていない。

### 2. 研究の目的

カラクシンは研究代表者らがホヤ精子鞭毛から発見・命名した新規のカルシウム結合タンパク質である。鞭毛繊毛の外腕ダイニンと直接結合して分子モーター活性を制御し、精子鞭毛の非対称波の発生、ひいては精子走化性を司っている。最近、カラクシンが繊毛の配向を制御することにより、ウニ胚幼生の行動を制御することが示唆された。本研究では、カラクシンがこうした多彩な機能を生み出す分子基盤を知ることを目的とし、カラクシン分子の基本情報、すなわち結晶構造、ダイニン・微小管との結合様式、他のカルシウム結合タンパク質との機能比較の研究を行った。また、カラクシンの繊毛協調運動における機能や細胞の平面極性、形態形成に果たす役割を調べた。

### 3. 研究の方法

以下の計画・方法に従って研究を進めた。

#### (1) ダイニンの構造解析

生化学的手法により、ダイニン・微小管との結合部位を決定した。また、他のカルシウム結合タンパク質、特にクラミドモナス外腕ダイニン軽鎖との構造比較、分子系統学的解析を行った。一方、X線構造解析は大腸菌で発現させたホヤカラクシンを精製したのち、カルシウムで結晶したものをを用いて、R-Axis で、 $2.0 \text{ \AA}$  の X 線回折データを取得した。

#### (2) カラクシン発現を抑制したウニ胚の作製と解析

ウニ卵へモルフォリノオリゴを注入して発生させることにより、カラクシンをノックダ

ウンした胚を作製し、その繊毛運動を記録、波形解析を行った。

#### (3) カラクシンを欠損したノックアウトマウスの作製と解析

ノックアウトマウスの外観、組織における表現型、精子運動、気管繊毛運動を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) ダイニンの構造解析

ダイニンのカルシウムセンサーであるカラクシンの構造と機能解明することを目的として、ホヤカラクシンを大腸菌で発現させ、その X 線結晶解析を行った。まず、カラクシンの 4 つの EF-hand (EF1, EF2, EF3, EF4) のうち EF2 と EF4 が構造的 EF-hand、EF3 が調節的 EF-hand であることがわかった。また、FRET を用いた解析の結果、カルシウムイオンが結合すると開構造へシフト、dynein が結合すると閉構造から開構造へ構造変化することが示唆された。

#### (2) カラクシンを欠損したウニ胚の作製と解析

ウニ卵にカラクシンのモルフォリノオリゴを注入し、カラクシンをノックダウンしたところ、受精後約 12 時間後に起こる繊毛の配向が異常になった。その結果、胚はその場で回転して、効率の良い前進運動はできなかった。この場合、繊毛運動の振動数は変わらないが、屈曲が弱くなり繊毛の振動範囲の角度は浅くなった (図 1)。一方、正常胚では

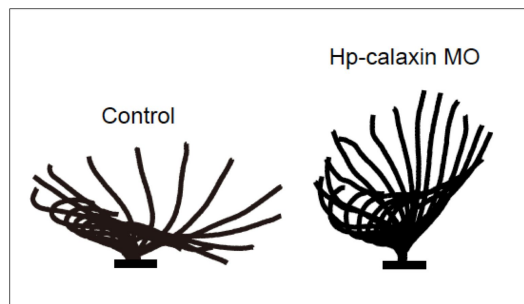


図 1. カラクシンをノックダウンしたウニ胚の繊毛運動。正常胚 (左) と比べ、ノックダウン胚 (右) は屈曲が浅くなり繊毛打範囲が狭くなる。

基底体の方向が揃っているために、繊毛打方向が一定で、効率の良い流れを起こすことができるが、モルファントでは、基底体の方向がバラバラとなっていた (図 2)。カラクシンによる屈曲波制御により、効率の良い流れが起こり、その流体力学的フィードバックにより、基底体が配向していくと考えられる。

#### (3) カラクシンを欠損したノックアウトマウスの作製と解析

カラクシンを欠損したノックアウトマウスを作製し、マウスの組織、器官、個体レベルでのカラクシンの機能を解析した。ノック

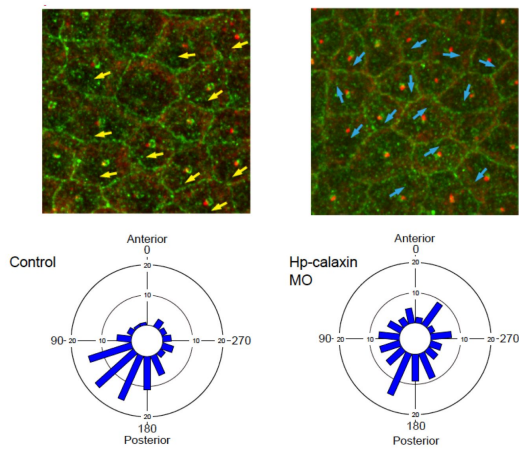


図2 . カラクシンをノックダウンした時の基底体の配向。正常胚（左）では基底体が一定方向に配向し、繊毛打方向が規定されるために同じ方向に流れが生じて胚は直進運動が可能になる。一方、カラクシンをノックダウンした胚（右）では、基底体の配向がランダムになるため、繊毛打の振動数は同じでも胚は直進することができず、その場で回転した運動を示す。カラクシンが働くことにより、正常な屈曲運動による流体フィードバックが働き、初期胚の基底体の配向が決定されると考えられる。

アウトマウスでは、軸系構造は見かけ上正常だが、水頭症や内臓逆位といった繊毛病の症状が表現型として現れることがわかった。今後の繊毛構造の解析、ならびに繊毛運動の詳細な解析により、組織、器官、個体におけるカラクシンの高次機能が明らかになると期待される。

## 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9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.

(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) Inaba K, Mizuno K. Sperm dysfunction and ciliopathy. *Reprod Med Biol*, 査読有, 2015; Oct

14; online. doi: 10.1007/s12522-015-0225-5

(5) Inaba K. Calcium sensors of ciliary outer arm dynein: functions and phylogenetic considerations for eukaryotic evolution. *Cilia*. 2015; 4:6. doi:10.1186/s13630-015-0015-z.

(6) 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.

(7) 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.

(8) 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 pCO<sub>2</sub>. *Journal of Marine Systems*. 査読有, 2014 Sep; 137: 67-73. doi:10.1016/j.jmarsys.2014.04.013

(9) 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.

〔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/CO<sub>2</sub> 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リゼーション 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-city, Aomori prefecture, 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-city, Aomori prefecture, 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, 東京都豊島区

(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 f/I1 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. チュープリンポリグルタミン酸化酵素 Ttl9 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  $Ca^{2+}$ -ATPase and  $Na^+/Ca^{2+}$  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 5 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.

(2) Cosson J, Prokopchuk G, Inaba K. The flagellar mechanics of spermatozoa and its regulation. *In: Flagellar Mechanics and Sperm Guidance (Cosson J, Ed)*, Bentham Science Publishers, 2015 Nov; pp.3-134.

(3) Yoshida M, Inaba K. Sperm chemotaxis in urochordates. *In: Flagellar Mechanics and Sperm Guidance (Cosson J, Ed)*, Bentham Science Publishers, 2015 Nov; pp.183-207.

(4) 稲葉一男: 「カルシウムシグナルによる哺乳類精子超活性化の制御」細胞工学 Vol. 33(4), 366-371. 秀潤社 (2014)

(5) 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）

〔その他〕

ホームページ URL:

<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

柴 小菊 (SHIBA, Kogiku)  
筑波大学・生命環境系・助教  
研究者番号：70533561

谷口 俊介 (YAGUCHI, Shunsuke)  
筑波大学・生命環境系・准教授  
研究者番号：00505331

田之倉 優 (TANOKURA, Masaru)  
東京大学・農学生命科学研究科・教授  
研究者番号：60136786