

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291072

研究課題名(和文) 精子の遊泳制御におけるカルシウム調節機構の解明 - アクチンの役割

研究課題名(英文) Mechanism regulating the swimming behavior of sperm by calcium- A role of actin

研究代表者

真行寺 千佳子 (Shingyoji, Chikako)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80125997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ホヤやウニなどの走化性を示す精子に見られる遊泳方向の制御は、カルシウム濃度に依存した鞭毛運動の変化によって引き起こされる。しかし、膜タンパク質を介する細胞内カルシウム濃度の調節、およびカルシウムによる鞭毛運動の制御の機構はほとんど解明されていない。本研究では、カルシウム反応を「機械刺激により誘導」するという技術的ブレイクスルーにより、遊泳する精子の挙動からカルシウム動態の高精度の推定を実現し、これに基づいてカルシウム排出に関わるタンパク質の機能には、ラフトの形成とアクチン繊維の存在が重要であることを示した。さらに、このラフトは、精子の遊泳条件では、鞭毛に沿って移動することを発見した。

研究成果の概要(英文)：A mechanism regulating the sperm swimming has not clearly been understood. In sea urchin sperm, calcium plays an important role for this regulation. At pH6-7, sperm does not show swimming and is immotile. Calcium dynamics of influx and efflux through flagellar membrane is known to be necessary for normal swimming and an inhibition of this dynamics brings about the inhibition of swimming movement. By using this characteristics of sperm at pH7 and 8 we compared the differences such as raft formation and behavior of membrane fluorescent probes. We found that the function of calcium efflux protein in the flagellar membrane, PMCA, requires formation of a so-called lipid raft with cooperative existence of flagellin. Actin was detected in the raft fraction of the sperm membrane obtained at pH8, but the role of actin has not been elucidated. Furthermore, we observed that a fluorescent probe detecting rafts moves along the flagella at pH8, suggesting a certain dynamic factor of the raft.

研究分野：細胞生物学、細胞生理学

キーワード：生体膜 ラフト カルシウム 精子 ウニ 生体分子

## 1. 研究開始当初の背景

ウニ精子は、細胞内カルシウム濃度が  $10^{-4}$  M 以上に高まると鞭毛は基部でステッキ状に曲がり、運動を停止する。これよりわずかに低い濃度  $10^{-5}$  -  $10^{-7}$  M では、鞭毛の波形は非対称となるが運動は続く。細胞内カルシウム濃度の上昇は通常一過的で、上昇後すぐに  $10^{-8}$  M 以下の低濃度にもどる。精子が卵に対して走化性を示すときには、細胞内カルシウム濃度の一過的増大が周期的に起こり、直進とターンが、卵に到達するまで交互に繰り返される (Shiba と Yoshida ら, 2008; Darszon らのグループ 2004 他; Kaup らのグループ 2003 他)。細胞内カルシウムの急激な上昇には、電位依存性のカルシウムチャネルが、またカルシウムの排出には、Plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase と  $Na^{+}/Ca^{2+}$  exchanger (以下、PMCA と NCKX) などが関与することが示唆されていた (Vacquire のグループ)。しかし、カルシウムの動態とこれら膜タンパク質の機能との関係を示すことは困難であった。

ウニやホヤの精子に見られる「機械刺激反応」は、研究代表者らが発見した興味深い現象である (Kambara ら, 2011)。遊泳中のウニ精子の頭部先端に微小ガラス針をぶつくと、精子は一時的に運動停止を示し、その後直進遊泳 (対称な波形) を示して遊泳方向を変え、その数秒後、通常の非対称波を示す緩やかなターンを示す遊泳軌跡へと戻る。これらの一連の反応は、いずれも細胞内カルシウム濃度変化と対応しており、この方法が、本研究におけるカルシウム動態の解析の困難を克服する道を拓くこととなった。

## 2. 研究の目的

タンパク質をはじめとする生体分子が、膜上のある領域に集合して機能する、microdomain (脂質ラフト) の存在が指摘されているがその実体は未だ定かではない。この解析が難しい原因の一つは、ドメインが動的であり、時間的にも空間的にも高い分解能でなければ解析できないことにある。もし精子のカルシウム動態に関わる分子が脂質ラフトを形成して機能するならば、ラフト形成の阻害剤下で機械刺激受容反応に伴う遊泳軌跡に乱れが生じるので、カルシウム制御

のどの過程で脂質ラフト形成に関わるかを明らかにできる。そこで、フラジェラシリンがアクチンおよび PMCA と共局在することを確認した上で、ラフト形成とアクチン繊維の役割に注目し、カルシウム排出の開始過程でアクチン繊維の動態が、1) 脂質ラフトへの PMCA の集積、2) PMCA によるカルシウム排出、3) フラジェラシリンの分布とカルシウム排出、4) PMCA から NCKX への切り替え (カルシウム濃度の微小な変化を感知?)、に關与するという仮説を立て、これを生理機能と生化学特性の両面から検証することを目指した。

## 3. 研究の方法

材料としてバフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*) の精子を用いた。

### (1) 脂質ラフト画分に含まれるタンパク質の分析

個体より切り出した精巢から精子を採取した (dry sperm)。精子の運動性獲得は人工海水 (pH 8.0) への懸濁によりおこない、MBCD は懸濁後 5min で最終濃度 10mM となるように加え 15min 間室温で保持した。精子を 0.1% の界面活性剤 (Triton-X100) を含む可溶化緩衝液に懸濁後遠心し、細胞膜に含まれる成分を回収した後 85%-30%-5% のショ糖溶液を重層した密度勾配遠心 (200,000g, 18h, 4 ) により分画し、各分画に含まれるタンパク質を回収した。得られたサンプルは還元変性処理 (65 , 15min) して電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、PMCA、アクチン、Flagelliasialin の抗体を用いたウエスタンブロット解析によりラフトに存在するタンパク質の同定を行った。

### (2) 生きたウニ精子を用いた脂質ラフトの機能阻害

暗視野顕微鏡下で水圧式マイクロマニピュレーターに取り付けたガラス微小針により精子頭部に機械刺激を与え、ストロボ照明により波形を可視化したウニ精子の遊泳の軌跡を記録した。機械受容反応における反応時間及び反応パターンの解析をラフトの形成を阻害する MBCD (1 - 5 mM)、アクチンの重合阻害剤の LatrunculinB (1 - 5  $\mu$ M) 及びアクチンフィラメント脱重合阻害剤の Jasplakinolide (1 - 5  $\mu$ M) 存在下で行った。

### (3) 蛍光分子を用いた細胞膜の観察

ラウルダンの蛍光2波長同時観察によるラフト形成の定量化

ウニ精子を pH 6.5 の人工海水に希釈し、ラウルダン(10  $\mu$ M)を加えて 40 min 室温で保持し細胞膜に取り込ませた。観察時に pH 6.5 の人工海水又は pH 8.0 の人工海水に再希釈し、MBCD (1 - 5 mM), LatrunculinB (5  $\mu$ M), Jasplakinolide (5  $\mu$ M)の効果を pH 8.0 の人工海水を用いて解析した。カバーガラスを用いて作成したチャンパーに精子を灌流し、354nm レーザーを用いて励起された蛍光をダイクロイックミラーにより 440nm と 490nm の2波長に分け、I.I.CCD カメラを用いて同時に観察した。蛍光強度の測定はレーザーパワーとのリニアリティがある 50 - 200 a.u.の範囲で行った。細胞膜のラフト形成状態を示す GP 値を、精子の蛍光観察像から imageJ を用いて  $GP = I_{440} - I_{490} / I_{440} + I_{490}$  により算出した。

蛍光スフィンゴミエリンの一分子観察

ウニ精子を pH 6.5 の人工海水に希釈し、蛍光ラベルしたスフィンゴミエリン(5 nM)又はホスファチジルコリン(30 nM)を加えて 20 min 室温で保持した。pH 6.5 の人工海水又は pH 8.0 の人工海水に再希釈した精子をカバーガラスで作成したチャンパーに灌流してガラス面に付着させ、精子の細胞膜における蛍光分子の輝点の動きを全反射顕微鏡(TIRF)とエンハンサーを付けた sCMOS カメラを用いて 33ms の時間分解能で記録した。輝点の拡散係数の計算を解析用ソフトウェア WinATR、輝点の速度の解析を Labview による自作ソフトウェアにより行った。

#### 4. 研究成果

##### (1)ウニ精子のラフトに含まれるタンパク質の解析

細胞膜の脂質ラフトに含まれる構成要素は、シヨ糖密度勾配遠心により LD-DIM (Low Density Detergent Insoluble Membrane)分画に集積する。運動開始前後のウニ精子の細胞膜からラフト分画に含まれるタンパク質を回収し Immunoblot 法により解析した結果、運動性を獲得した後の精子のラフト分画には  $Ca^{2+}$ 排出膜タンパク質である PMCA、脂質ラフトに局在する事が知られる GPI-アンカー蛋白質である Flagelliasialin、細胞骨格タンパク質であるアクチンが検出された。PMCA とアクチンは運動

を開始していない dry sperm を用いた同様の解析ではラフト画分に検出されなかったため、ウニ精子において運動の開始が細胞膜の状態変化を引き起こす可能性が示唆された。

Flagelliasialin はウニ精子の細胞膜に特異的に存在する  $\alpha$ -2,9 結合ポリシアル酸糖タンパク質であり、ウニ精子の細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の調節に関わるとの知見が得られている(Kambara et al., 2011)。またアクチンは膜タンパク質ではないため単独でラフト画分に含まれる事は起こりえない。Flagelliasialin やアクチンが細胞内  $Ca^{2+}$ の排出を担う膜タンパク質である PMCA と共にラフト画分に検出された事から、これらのタンパク質が精子の運動開始後にラフトに集合し機能的に相互作用する事によりウニ精子の細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度がコントロールされている可能性が示された。

MBCD 処理によりコレステロールを細胞膜から除去しラフトの形成を阻害した精子の細胞膜を用いて同様の解析を行った結果、PMCA とアクチンはラフト画分に検出されず、MBCD 処理は機能的なラフトの形成を阻害しうる事が明らかとなった。

##### (2)機械刺激反応を用いた運動性の解析

MBCD 処理によるラフト形成阻害の効果  
細胞膜におけるラフト形成が生きたウニ精子の細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度変化に伴う精子の波形制御機構にどのような役割を果たしているのか、機械刺激反応を用いて解析した。ウニ精子の細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度は通常  $\sim 10^{-8}$  M と低く保たれ、カバーガラス上では非対称な波形で円軌跡を描いて遊泳するが、頭部にガラス微小針で刺激を与えると急激な  $Ca^{2+}$ 流入により細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度が上昇し精子は Quiescence と呼ばれる片側のみの屈曲を残した停止反応をおこす。続く細胞内  $Ca^{2+}$ の排出により Quiescence は解除され精子は細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の低下に伴って対称波形を形成して直進遊泳を行い針から遠ざかり、その後元の円軌跡での遊泳を行う(CQSC パターン反応)。

MBCD 処理を行いラフトの形成を阻害した精子の機械刺激反応を解析した結果、正常な精子に比べ停止反応(Quiescence)の持続時間が有意に増加した。さらに、通常停止反応の解除後に細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の低下に伴っておこる直進遊泳が観察される割合が低下し CQSC パ

ターンから CQC パターンへと機械刺激反応が変化した。これらの観察結果は、機能的なラフトの形成が PMCA の働きによるコントロールされた精子の細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度制御機構に重要である事を示している。

#### アクチン阻害剤の効果

阻害剤を用いて機械刺激反応により引き起こされる細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度変化に対するアクチンの関与を検証した結果、アクチンフィラメントの脱重合阻害剤である Jasplakinolide 処理(5  $\mu$ M)を行ったウニ精子では M8CD 処理によるラフト形成の阻害を行った精子を用いた場合と共通して停止反応の持続時間の増加及び 40%の精子において直進遊泳が観察されなくなるという反応パターンの変化が観察された。アクチンの重合阻害剤である LatrunculinB 処理(5  $\mu$ M)を行った精子ではおよそ 20%の精子で直進遊泳が観察されなくなったが、停止反応の持続時間の増加は観察されず、Jasplakinolide 処理よりも効果は限定的だった。これらの結果から、アクチンの脱重合の阻害はラフト形成阻害と同様に細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度を低下させるメカニズムに異常を引き起こす事が示され、アクチンの動態が細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の制御機構に関与する事が明らかとなった。

#### (3)蛍光プローブによる細胞膜ラフトの直接観察

ラウルダンをを用いた細胞膜の状態変化の測定  
ラウルダン (6-Dodecanoyl-2-Dimethylaminonaphthalene)は細胞膜の状態変化(脂質ラフト形成)を反映して発光波長を変化させる環境感受性色素であり、細胞膜内に取り込まれたラウルダンは細胞膜への水分子の浸入が多い状態(Disordered lipid phase)では 490nm の、ラフト形成状態とされる細胞膜への水分子の浸入が少ない状態(Ordered lipid phase)では 440nm の発光波長を示す事が知られている。本研究では 354nm レーザーによる励起光をラウルダンを細胞膜に取り込ませたウニ精子に照射し、観察された発光波長をダイクロイックミラーとフィルターを用いて 440nm と 490nm に分割しそれぞれの蛍光像を同時に観察できる2波長同時観察顕微鏡システムを作成した。観察された精子の蛍光像から解析プログラムを用いて細胞膜でのラフト形成の度合いを数値化できる GP 値を示す画像を得た。GP 値が高い部分は細

胞膜においてラフト形成が多い事を示している。GP 値の M8CD 濃度依存的な低下が観察され、細胞膜のラフト形成状態の変化を直接観察することに成功した。

#### ウニ精子の運動開始に伴う GP 値の変化

ウニ精子の運動開始前後で GP 値の比較を行った結果、運動性をもつ精子の鞭毛は運動性をもたない精子の鞭毛に比べ高い GP 値を示し、精子の運動性の獲得により鞭毛の細胞膜においてラフト形成が促進されることが明らかとなった。GP 値は鞭毛の長軸に沿って値に変動が見られ、細胞膜の状態は常に変化している事が示された。

#### アクチン阻害剤の効果

GP 値に対するアクチン阻害剤の効果を調べた結果、Jasplakinolide 処理(5  $\mu$ M)を行ったウニ精子では GP 値の低下、LatrunculinB 処理(5  $\mu$ M)を行った精子では GP 値の上昇する傾向が観察されたが、測定値はばらつきが大きく有意な差は検出されなかった。

#### (4)鞭毛上のラフト分子の可視化

ラフトはコレステロールとスフィンゴ脂質を含む細胞膜の機能ドメインと考えられている。精子の細胞膜におけるラフトの動態をとらえるため蛍光プローブをつけたスフィンゴミエリンの動きを一分子顕微鏡を用いて観察した。スフィンゴミエリンの輝点は鞭毛の長軸に沿って両方向に動いており、精子の運動開始前後で拡散係数はそれぞれ  $1.1\mu\text{m}^2/\text{s}$  と  $0.6\mu\text{m}^2/\text{s}$  と運動性を持つ精子の鞭毛で高い値を示した。輝点の動きの多くはブラウン運動をしていたが、運動開始後の精子においてのみおよそ 1 秒間一方向へスムーズに動く様子が観察された。これらの結果は、運動性を持つ精子の鞭毛の細胞膜においてラフトがより動的な性質を獲得するメカニズムが存在する事を示唆する。

#### 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 2 件)

Yoke, H. and Shingyoji, C. (2017). Effects of external strain on the regulation of microtubule sliding induced by outer arm

dynein of sea urchin sperm flagella. *Journal of Experimental Biology*, 220: 1122-1134. 査読有. (doi: 10.1242/jeb.147942)

Shingyoji, C., Nakano, I., Inoue, Y. and Higuchi, H. (2015). Dynein arms are strain-dependent direction-switching force generators. *Cytoskeleton*, 72: 388-401. 査読有. (doi: 10.1002/cm.21232)

[学会発表] (計 17 件)

Nakano, I., Inoue, Y., Kanazawa, T., Sato, C., Kitajima, K., Suzuki, K., Kusumi, A. and Shingyoji, C. Roles of plasma membrane modification in the regulation of intracellular calcium in sea urchin spermatozoa. The 5th International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions, Univ. Tokyo (Tokyo), January 21-22, 2017.

Jirakulsomchok, J., Nakano, I. and Shingyoji, C. Light-induced Ca<sup>2+</sup>-dependent flagellar response of sperm in the presence of pyrenebutyrate. The 5th International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions, Univ. Tokyo (Tokyo), January 21-22, 2017.

Shingyoji, C., Yoke, H. and Izawa Y. Mechanical activity of dynein and its dynamical regulation underlying oscillatory movement of sperm flagella. The 5th International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions, Univ. Tokyo (Tokyo), January 21-22, 2017.

Shingyoji, C., Yoke, H., Nakano, I., Inoue, Y. and Higuchi, H. Strain-sensitive regulation of mechanical activities of dyneins underlying oscillatory movement of sperm flagella. The 22nd International Congress of Zoology and The 87th Meeting

of Zoological Society of Japan, Okinawa Convention Center (Okinawa), November. 14-19, 2016.

Jirakulsomchok, J., Nakano, I. and Shingyoji, C. A Novel Method to Induce Light-controlled Calcium-dependent Flagellar Responses in the Presence of Pyrenebutyrate in Sea Urchin Sperm. The 22nd International Congress of Zoology and The 87th Meeting of Zoological Society of Japan, Okinawa Convention Center (Okinawa), November. 14-19, 2016.

Nakano, I., Inoue, Y., Kanazawa, T., Sato, C., Kitajima, K. and Shingyoji, C. Dynamic roles of plasma membrane protein in the regulation of intracellular calcium in sea urchin spermatozoa. The 22nd International Congress of Zoology and The 87th Meeting of Zoological Society of Japan, Okinawa Convention Center (Okinawa), November. 14-19, 2016.

Kitajima, K. Glycan-mediated Interactions on Pig Sperm Lipid Rafts during Fertilization. APMC11 / MST33 / AAT39 Conference; Phuket, Thailand, May 23-27, 2016. (基調講演)

Shingyoji, C., Yoke, H., Nakano, I., Inoue, Y. and Higuchi, H. Mechanical activity of dynein and its dynamical ordering underlying oscillatory movement of sperm flagella. The 4th International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions. Nishijin Hall (Fukuoka), November 22-23. 2015.

中野 泉・井上裕一・鈴木健一・楠見明弘・真行寺千佳子. ウニ精子の運動制御における細胞膜脂質ラフトの役割. 日本動物学会第 86 回大会, 新潟, 2015 年 9 月 17-19 日.

Kitajima, K. Functional significance of glycan-mediated interactions on sperm microdomains during fertilization. 23rd International Symposium on Glycoconjugates (Glyco23); September 15-20, 2015; Hotel Le Méridien Lav, Split,

Croatia (基調講演)

Shingyoji, C. Mechanical activity of dynein and its dynamical ordering underlying oscillatory movement of sperm flagella. The 3rd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions., Nemunosato Hotel & Resort (Shima), January 10-11, 2015.

真行寺千佳子・中野泉・井上裕一・樋口秀男. ウニ精子鞭毛ダイニン分子の出す力の特性と外力の効果. 日本動物学会第85回大会, 仙台, 2014年9月11-13日.

中野泉・井上裕一・金澤尊・北島健・真行寺千佳子. ウニ精子のカルシウム依存性鞭毛運動制御における脂質ラフト形成. 日本動物学会第85回大会, 仙台, 2014年9月11-13日.

Kitajima, K. Microdomain-localized GPI-anchored glycans and calcium regulation in animal sperm. The Royal Golden Jubilee Ph D. Congress XV. May 28-30, 2014; Jomtien Palm Beach Hotel and Resort, Pataya, Thailand. (基調講演)

Shingyoji, C. Mechanical activity of dynein and its regulation underlying oscillatory movement of sperm flagella. International Workshop Dynein 2013, Orbis Hall (Kobe), October 31-November 3, 2013. (invited).

Nakano, I., Nishide, I. and Shingyoji, C. The role of intracellular calcium in the regulation of flagellar response to mechanical stimulation in sea urchin spermatozoa. International Workshop Dynein 2013, Orbis Hall (Kobe,) October 31-November 3, 2013.

中野泉・西出功・真行寺千佳子. ウニ精子の機械刺激反応における細胞内カルシウムの役割. 日本動物学会第84回大会. 岡山(岡山大学), 2013年9月26-28日.

(図書) (計4件)

Higuchi, H. and Shingyoji, C. (2017). Measuring the motile properties of single dynein molecules. In "Handbook of Dynein"

Edited by Keiko Hirose. 350(Chapter 5). (Copyright © 2017 Pan Stanford Publishing Pte. Ltd. )

Shingyoji, C. (2016). Regulation of dynein activity in oscillatory movement of sperm flagella. In "Muscle Contraction and Cell Motility: Fundamentals and Developments" Edited by Haruo Sugi, 474 (pp. 365-380). (Copyright © 2016 Pan Stanford Publishing Pte. Ltd. )

Kanazawa, T., Suzuki, E., Miyata, S., Sato, C. and Kitajima K. (2014). Flagelliasialin: A highly glycosylated GPI-anchored protein involved in intracellular Ca<sup>2+</sup> regulation in sea urchin sperm. Glycoscience: Biology and Medicine (eds., Taniguchi N, Endo T, Hart GW, Seeberger P, Wong CH), 1568(pp.1-6), Springer. DOI: 10.1007/SpringerReference\_396268 URL: <http://www.springerreference.com/index/chafterdbid/396268> (査読有り)

Shingyoji, C. (2013). Measuring the regulation of dynein activity during flagellar motility. In Methods in Enzymology, vol. 524, Cilia Part A (edited by Wallace F. Marshall), Academic Press, UK. Chapter 9, 397(pp. 147-170).

{その他}

ホームページ等

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/hikaku/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

真行寺 千佳子 (SHINGYOJI, Chikako)  
東京大学・大学院理学系研究科・准教授  
研究者番号: 80125997

### (2) 研究分担者

北島 健 (KITAJIMA, Ken)  
名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授  
研究者番号: 80192558