

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14775

研究課題名(和文)プロトンダイナミクスが制御する鞭毛運動メカニズム

研究課題名(英文)Flagellar movements regulated by environmental proton dynamics

研究代表者

広橋 教貴(Hirohashi, Noritaka)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：90376997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：精子が環境のプロトン濃度の変化を感じて正確に鞭毛運動を変換するメカニズム(如何にインプットシグナルを時間微分して、細胞内で情報処理を行うか)を解明することを目指した。環境のプロトン勾配を蛍光プローブを用いて可視化した状態で精子がターン遊泳する地点とそれまでの勾配変化を計算したところ、ターンを引き起こすのに、 $>-0.0025\text{pH/sec}$ の変化と $\text{pH}5.5$ の閾値を超える事が必要であった。ターン時の鞭毛運動を時間分解すると、3つの異なる波形運動が連続的に繰り返し観察された。この運動は、これまで海産無脊椎動物の精子で研究されてきた走化性(卵への遊走性)とは全く異なる仕組みである事が今回明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Here, we show that initiation of the turn motion requires a swim down a steep proton gradient (a theoretical estimation of more than 0.025pH/s), crossing a threshold pH value of ~ 5.5 . Time-resolved kinematic analysis revealed that the turn sequence results from the rhythmic exercise of two flagellar motions: a stereotypical flagellar 'bent-cane' shape followed by asymmetric wave propagation, which enables a sharp turn in the realm of low Reynolds numbers. This turning episode is terminated by an 'overshoot' trajectory that differs from either straight-line motility or turning. As with bidirectional pH-taxis in some bacteria, squid spermatozoa also showed repulsion from strong acid conditions with similar flagellar kinematics as in positive pH-taxis. These findings indicate that squid spermatozoa might have a unique reorientation mechanism, which could be dissimilar to that of classical egg-guided sperm chemotaxis in other marine invertebrates.

研究分野：細胞生物学

キーワード：精子 プロトン勾配 センシング 鞭毛 走化性 pHイメージング

1. 研究開始当初の背景

ヤリイカにおいて、繁殖競争に有利な大型個体群はメス体内へ精子を受け渡し（おそらく体内受精）、不利な小型群は競争を回避して、メス体表部へ精子を付着させる（おそらく体外受精）。圧倒的に劣勢を強いられた小型群の精子は、大型群の精子にはない能力を発揮し、あるいは特殊な形質を利用して受精競争に参入する。我々がこれまで発見した特殊能力・特異的形質とはつぎの3つである。

- (1) 顕著に長い鞭毛：小型オスが生産する精子鞭毛長は大型オスのそれに比べ50%ほど長い（これは受精能をもつ種内二型精子として世界初の報告）
- (2) 集団を形成・維持する能力：小型オスの精子は、好気呼吸で排出する二酸化炭素に対して走性をもつことで自己集合体をつくる。
- (3) 寿命を長く維持する能力：小型オス精子の射出後の寿命は大型オス精子に比べ長い。

このうち、(2)についてさらに研究を進めた。

2. 研究の目的

水素イオン (H^+) は、生命現象にあまねく存在し、個体・細胞・分子がその機能を恒常的に維持するために、生体膜内外で H^+ 濃度 (pH) を感受し、応答する。通常、細胞や分子の応答を決めるのは pH の絶対値である。しかし、果たして細胞は pH の時間変化を感受して応答することは無いだろうか？この問題提起の背景には、細胞が受ける pH 変化が、細胞の内と外での劇的に違うことにある。即ち、細胞内では pH ホメオスタシス機構により H^+ 濃度は一定に保たれ、且つ H^+ の拡散速度は極めて速いため、オルガネラ膜で隔離されない限り、細胞内 pH 環境は均一である。ところが細胞外環境は、生体内でも H^+ 濃度が $0.1nM$ (pH 10) から

$0.1M$ (pH 1) と劇的な変化に暴露される。またわずかな環境の pH 変化が生物にとって重要なシグナルとなることも最近徐々に分かってきている。その1例がゴンズイの神経繊維 (ヒゲ) である。この硬骨魚類は 0.1 ユニットの pH 変化を感じて餌となるゴカイなどを探し出す受容器を発達させている。この受容器の実態は不明だが、末梢神経に pH 感受性分子 (例えばイオン透過型や受容体型) が発現していると考えられる。しかし時間変化の処理は、中枢神経を含めた高次機能に委ねられ、その仕組みを解明するのは容易でない。同様に、昆虫やほ乳類の嗅覚における CO_2 (酸) 感受においても、匂い源を探り当てる、いわゆる時間微分の情報処理機構の解明は困難を極める。この問題解決に最良のモデルがイカ類の精子走化性である。イカ精子は微小空間に形成されるプロトン勾配に対して正と負の (二方向性) 走行性を示すことが我々の最近の研究で分かった。つまり、正の走行性では、精子が H^+ 濃度の低い方から高い方へ移動する現象で、これは所謂、卵へ接近する精子走化性と類似する。一方、負走化性では精子が H^+ 濃度の高い方から低い方へ移動する現象で、化学忌避物質に対する細胞の

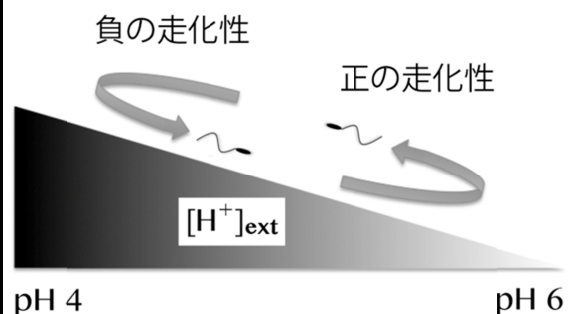


図3 正と負のプロトン走化性
ヤリイカ精子は二方向性の化学走性を示し、pH 4~6 のプロトン勾配中にトラップされる (右)。

逃避行動とよく似る。このように、イカ類の精子は環境の pH 変化を感受し、遊泳運動の strait turn strait 変換 (turn の開

始と終止)を正確な位置とタイミングで行うことができる。本研究では、 H^+ 濃度勾配において、正と負の精子走行性が如何なる分子と情報処理によって実行されているか明らかにすることを目指した。

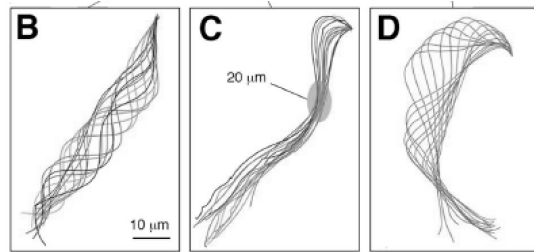
3. 研究の方法

広範囲の環境 pH の測定と精子遊泳軌跡の追跡 イカ類の精子は、正の走化性 (pH5~6)、負の走化性 (pH4~5) がそれぞれ弱酸性域で観察されることから(図3)、pH イメージングには、2つ蛍光指示薬 (PHrodo と BCECF) を同時に用いることで、環境の僅かな pH 変化をより高い感度で検出することを可能にした。イメージングには、共焦点顕微鏡を用いた。遊泳軌跡と環境 pH イメージングから精子が turn 遊泳を開始する前に経験したプロトン勾配とその時間微分を計算し、これにより、a)鞭毛運動の転換開始 (strait turn) を引き起こすための条件を導いた。さらに b) 遊泳方向の修正 (turn strait) と turn 開始前の遊泳方向との相関を明らかにした。これらの解析を、負の走化性、正の走化性それぞれについて行い、両者を比較して、なぜ正反対の応答を示すのか、そのメカニズムを探った。

4. 研究成果

精子が環境のプロトン濃度の変化を感じて正確に鞭毛運動を変換するメカニズム(如何にインプットシグナルを時間微分して、細胞内で情報処理を行うか)を解明することを目指した。環境のプロトン勾配を、蛍光プローブを用いて可視化した状態で精子がターン遊泳する地点とそれまでの勾配変化を計算したところ、ターンを引き起こすのに、 $>-0.0025\text{pH}/\text{sec}$ の変化と pH5.5 の閾値を超える事が必要であった。ターン時の鞭毛運動を時間分解すると、3つの異なる波形運動が連

続的に繰り返し観察された(下図)。この運動は、これまで海産無脊椎動物の精子で研究されてきた走化性(卵への遊走性)とは全く異なる仕組みである事が今回明らかになった。



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) Starfish Apaf-1 activates effector caspase-3/9 upon apoptosis of aged eggs. Tamura R, Takada M, Sakaue M, Yoshida A, Ohi S, Hirano K, Hayakawa T, Hirohashi N, Yura K, Chiba K. **Sci Rep.** 2018 Jan 25;8(1):1611.

2) A coordinated sequence of distinct flagellar waveforms enables a sharp flagellar turn mediated by squid sperm pH-taxis. Iida T, Iwata Y, Mohri T, Baba SA, *Hirohashi N. **Sci Rep.** 2017 Oct 11;7(1):12938.

[学会発表](計 4 件)

1. 飯田智宏、広橋教貴 ヤリイカスニーカー精子における pH 勾配に対する方向転換 日本動物学会年会、2015年9月19日朱鷺メッセ(新潟市)

2. Noritaka Hirohashi. Are the sperm smarter than their donors?? Cephalopod International Advisory Council (CIAC)

2015, 2015年11月11日函館国際ホテル(函館市)

3. Yoko Iwata, Noritaka Hirohashi, Yoshiro Watanabe, Paul Shaw and Warwick H.H. Sauer. Strategic sperm release from spermatophores in loliginid squids responding to sperm competition risk. Cephalopod International Advisory Council (CIAC) 2015, 2015年11月11日函館国際ホテル(函館市)

4. Tomohiro Iida and Noritaka Hirohashi. How squid sperm determine directional changes in a pH gradient. Cephalopod International Advisory Council (CIAC) 2015, 2015年11月12日函館国際ホテル(函館市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ipc.shimane-u.ac.jp/ercbr/ji/kenjo/mbss.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

広橋 教貴 (Hirohashi, Noritaka)
島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：90376997

(2) 研究分担者

岩田 容子 (Iwata, Yoko)
東京大学・大気海洋研究所・講師

研究者番号：60431342

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()