

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06763

研究課題名(和文)精子貯蔵に関する輸精管の機能進化におけるCRISP2の役割

研究課題名(英文)Role of CRISP2 in the functional evolution of the sperm storage in vas deferens

研究代表者

渡辺 絵理子(WATANABE, Eriko)

山形大学・学士課程基盤教育機構・准教授

研究者番号：20337405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アカハライモリ精巢で発現するCRISP2vとCRISP2vsを同定した。CRISP2vsはion channel regulatoryドメインを欠く、CRISP2vのスプライシングバリエーションであり、両者は標的細胞に競合して結合、Ca²⁺透過性チャネルの開閉を制御すると考えられる。Crisp2vs mRNAのCrisp2v mRNAに対する相対発現量が多い輸精管の精子では、クオリティーの指標となるCa²⁺の精子中片への局在が維持されていた。また、精包構成分子を分泌する骨盤腺と腹側腺でのCrisp2vとCrisp2vsの合成、分泌が示唆され、精包中でも精子クオリティー維持に働く可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異なる受精様式を持つ動物種においては貯精部位、期間がそれぞれ異なり、独自の貯精機構を持つと考えられる。本研究により、体内受精を行う有尾両生類では、輸精管を含む雄性生殖管におけるCRISP2vとCRISP2vsを用いた独自の精子のクオリティー維持機構を獲得したことにより、その受精様式を成立させるために必要な長期の貯精が可能となったことが示された。CRISP2vとCRISP2vsは細胞外タンパク質であることから、生殖補助医療や家畜生産における精子のクオリティー維持技術の開発に貢献することも期待できる。

研究成果の概要(英文)：We identified Crisp2v and Crisp2vs as newly CRISP proteins which suppress the gating of Ca²⁺ channels. Crisp2v and Crisp2vs were suggested to be expressed in the vas deferens of newt. Crisp2vs is a splicing variant lacking ICR domain that suppress the gating of Ca²⁺ channels. In sperm of the newt, intracellular Ca²⁺ is localized to the midpiece to keep fertilizability. We showed that as for the individual which was higher in the relative expression of Crisp2vs to Crisp2v in the vas deferens, higher was the rate of sperm in which intracellular Ca²⁺ is localized to the midpiece, in the reproductive season. We also found that Crisp2v and Crisp2vs gene was included in the RNAseq data of tissues containing pelvic or ventral glands which synthesized component proteins of the spermatophore. It was suggested that Crisp2v and Crisp2vs maintain the sperm quality in the vas deferens and spermatophore of newt.

研究分野：発生

キーワード：Crisp sperm storage newt

1. 研究開始当初の背景

精巣で形成された精子が生殖管で貯蔵される貯精により、精子形成と受精を異なるタイミングで行うことが可能となる。貯精は多くの動物種で様々な生殖戦略の成立のために重要な役割を果たすものであるが、貯精中の精子の受精においてはクオリティーの維持が必要となる。貯精が行われる領域及び精子のクオリティーの維持機構は動物種により異なり、貯精の機構は独立に進化したものであると考えられる。

受性能獲得を必要とする状態で貯蔵される哺乳類の精子とは異なり、アカハライモリ等の有尾両生類の精子は、先体反応や運動、受精が可能な状態で、長ければ数ヶ月に渡り輸精管内で貯蔵される。同じ両生類でも無尾両生類には明確な貯精部位が確認されていない。輸精管は有尾両生類に特有の精子貯蔵部位であり、有尾両生類は輸精管における独自の貯精機構を獲得したものと考えられる。

さらに、体内受精種であるアカハライモリの精子は輸精管における貯精後に生殖管の付属腺由来の分泌物で包まれた精包として体外に排出されてメスに受け渡され、メスの体内においても排卵時まで貯蔵される。輸精管における貯精終了後も精子のクオリティーが維持される環境をオスの生殖腺が用意する必要がある。精包の構成タンパク質は骨盤腺と腹側腺で合成・分泌されることが示唆されているが、その実体は明らかになっていない。

我々はこれまでにアカハライモリの精子においては、 Ca^{2+} 透過性チャネルの開口制御による細胞内 Ca^{2+} の精子中片への局在により受精におけるクオリティー維持が行われていることを示した。cysteine-rich secretory protein (CRISP) は、複数の動物種でイオンチャネル制御に関わることが示されている分泌タンパク質である。我々はこれまでにマウスの精子運動に抑制的に関与することが知られている CRISP2 である CRISP2L 及び Ca^{2+} 透過性チャネルの開口を抑制する領域を欠く CRISP2S がアカハライモリ輸精管において発現することを示している。

2. 研究の目的

「4. 研究の結果」で詳述する通り、本研究では貯精において有尾両生類特異的な機能を持つと推測される新たな CRISP 遺伝子として *Crisp2v* 及び *Crisp2vs* を同定した。当初は明確な貯精部位を持たない無尾両生類であるネツタイツメガエルとアカハライモリとの比較による有尾両生類貯精機能の獲得機構の解明を計画していたが、*Crisp2v* 及び *Crisp2vs* を用いることで、より直接的な有尾両生類貯精機能の解析を行うことが可能となった。本研究では、有尾両生類における生殖腺付属器官の機能進化の実態の解明につながる知見として、アカハライモリで獲得された *Crisp2v* 及び *Crisp2vs* による貯蔵精子のクオリティー維持機構の詳細を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

アカハライモリ輸精管特異的に発現する *Crisp2* cDNA の解析

アカハライモリ輸卵管 RNAseq データから得られた CRISP2 遺伝子断片の配列からプライマーを作成し、アカハライモリ輸精管から抽出した totalRNA を用いて RT-PCR を行い、輸精管で発現する *CRISP2* 遺伝子断片の塩基配列を決定した。この配列を用いて RACE 法を行い、これまでに知られている *CRISP2* 遺伝子とは異なる配列を持つ新規遺伝子として *CRISP2v* および *CRISP2vs* を同定した。哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類の NCBI 上に存在する *Crisp* タンパク質のアミノ酸配列を用いて、最尤法により系統樹を作製した。

CRISP2v 及び *Crisp2vs* 遺伝子欠損アカハライモリの作成

Crisp2v 遺伝子と *Crisp2vs* 遺伝子の共通な塩基配列中のエキソンの領域に約 41 塩基の欠失を導入するように標的配列を設計した。ガイド RNA を Cas9 タンパク質とともにアカハライモリ受精卵に注入した。幼生のゲノム DNA から標的領域を含む DNA 断片を PCR 増幅し、アガロースゲル電気泳動により変異導入個体を選別した。

精子細胞内輸精管における Ca^{2+} 局在の確認

Fluo8H-AM (AAT Bioquest) を DMSO に 5mM に溶解後、輸精管再構成塩類溶液 (20 mM NaCl, 6 mM Na_2SO_4 , 1 mM KCl, 0.1 mM $Ca(NO_3)_2$, 0.06 mM $MgSO_4$, 10 mM HEPES-NaOH: pH 6.9) で 5 μ M に調整し、雄のアカハライモリから抽出した輸精管中より採取した dry sperm を等量加えて混合し、17 の暗所で 2 時間静置し、精子に Fluo8H を取り込ませた。蛍光顕微鏡 (ECLIPSE Ti2-E/B, NIKON) と共焦点レーザー顕微鏡 (C2, NIKON) を用いて精子を観察し、488 nm のレーザー光により Fluo8H を励起して精子細胞内 Ca^{2+} の分布を示す蛍光の局在を調べた。

骨盤腺を含む組織と腹側腺を含む組織で発現するタンパク質の解析

Eurofins genomics 社の受託解析を利用して RNAseq を行った。骨盤腺、腹側腺それぞれを含む組織から抽出した total RNA を用いて作成したリード、または両方のリードを Trinity ver.2.12.0 を用いて de novo アセンブリし、コンティグを作成した。得られたコンティグは NCBI GenBank を用いてアノテーションした。さらに、骨盤腺、腹側腺それぞれを含む組織から抽出した totalRNA を用いて RT-PCR を行った。

4. 研究成果

アカハライモリ輸精管特異的に発現する *Crisp2* cDNA の塩基配列の解析

新たにアカハライモリ輸精管で発現する新規 CRISP 遺伝子として *CRISP2v* 遺伝子および *CRISP2vs* 遺伝子を同定した。これまでにアカハライモリ輸精管で発現する CRISP 遺伝子として報告した *CRISP2* 遺伝子は、輸精管以外にも輸卵管、脳、眼球、レンズなどを含む複数の組織で発現するのに対して、*CRISP2v* 遺伝子および *CRISP2vs* 遺伝子の発現領域はアカハライモリ雄性生殖管に限定される。*CRISP2vs* 遺伝子は ion channel regulatory (ICR) ドメインを欠く、*CRISP2v* 遺伝子のスプライシングバリエーションである可能性が示唆されている。*CRISP2v* 遺伝子の cDNA 塩基配列は、これまでに同定したアカハライモリ CRISP2 遺伝子である *CRISP2L* 遺伝子の cDNA 塩基配列と 822 塩基中 91 塩基が異なる。また、CRISP タンパク質系統関係の解析から、*CRISP2v*、*CRISP2vs* およびアカハライモリ CRISP2 は、有尾類の Crisp ファミリーのみが属するクレードを形成することから、*CRISP2v*、*CRISP2vs* は有尾両生類に特異的な機能を持つと考えられた。以上の結果より、*Crisp2v* および *Crisp2vs* が有尾両生類特有の精子貯蔵部位である輸精管において貯精に関する役割を持つと考えられた。

輸精管における精子細胞内 Ca^{2+} 局在の確認と *Crisp2v* および *Crisp2vs* mRNA の発現

Crisp2v 及び *Crisp2vs* は細胞への結合に必要な領域を共通して持つことから、同じ標的細胞に競合して結合することにより Ca^{2+} 透過性チャネルの開口を制御すると考えられる。貯蔵精子では細胞内 Ca^{2+} の局在を精子中片に維持することで受精におけるクオリティーが維持されることがこれまでに示されていることから、細胞内 Ca^{2+} の局在を調べることでその精子の受精におけるクオリティー維持の程度を推測することができる。生殖期が始まる春に採集したイモリ輸精管内の精子細胞内 Ca^{2+} の局在、および輸精管における *Crisp2v* 遺伝子と *Crisp2vs* 遺伝子の相対的な発現量を調べたところ、細胞内 Ca^{2+} の局在が維持されている精子を多く含む輸精管ほど *Crisp2vs* 遺伝子の *Crisp2v* 遺伝子に対する相対発現量が多かった。*Crisp2vs* の相対発現量が低い輸精管では Ca^{2+} 透過性チャネルが過度に抑制され、精子細胞内 Ca^{2+} の局在が維持できなくなったと考えられる。*Crisp2v* と *Crisp2vs* は競合的に精子に作用して Ca^{2+} 透過性チャネルの開口を制御することで細胞内 Ca^{2+} の局在維持に関わることが示唆された。

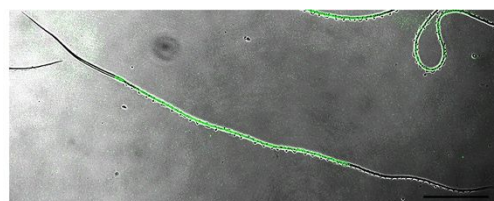


図1 Ca^{2+} の存在を示す蛍光が中片に局在する精子
Bar: 50 μ m

CRISP2v 及び *Crisp2vs* 遺伝子欠損アカハライモリを用いた解析
Crisp2v と *Crisp2vs* の精子細胞内 Ca^{2+} の局在維持における役割を直接検証する目的で、*Crisp2v* 及び *Crisp2vs* 遺伝子ノックアウトイモリの作成を行った。*Crisp2v* と *Crisp2vs* の新たな発見及び新型コロナウイルス感染拡大によりスケジュール進行に変更が生じたため、期間内に性成熟に至る個体を得ることは叶わなかったが、現在飼育中の個体の性成熟を待ち、*Crisp2v* 及び *Crisp2vs* 遺伝子ノックアウトイモリの精子における、受精を待たずに貯精中に自発的に先体反応を起こした精子の割合を調べることににより、*Crisp2v* と *Crisp2vs* の精子の受精におけるクオリティー維持に果たす役割を明らかにする。

骨盤腺と腹側腺の開口部位の同定

アカハライモリの精包は総排出腔に開口する骨盤腺と腹側腺の分泌するタンパク質により形成される。精包がどのような機序で形成されるのかを明らかにするために、総排出腔周辺の組織切片をヘマトキシリン-エオジン染色し、腹側腺と骨盤腺が総排出腔に開口する位置を調べたことにより、骨盤腺は輸精管の開口部に隣接して開口し、腹側腺は総排出腔の前側から後側にかけて腹側にかけて開講することが明らかとなった。精子は総排出腔に排出後すぐに骨盤腺の分泌物に包まれ、その後腹側腺の分泌物に包まることが示唆される。

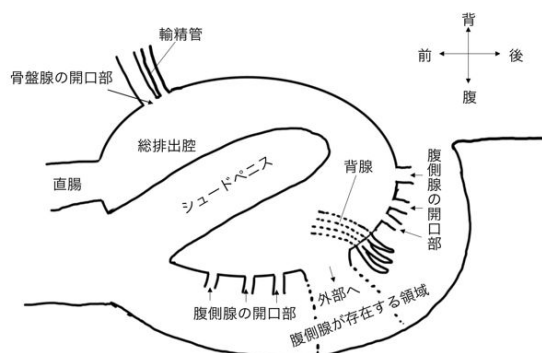


図2 輸精管及び精包を構成するタンパク質を分泌する骨盤腺と腹側腺の開口部位

骨盤腺を含む組織と腹側腺を含む組織で発現するタンパク質の解析

RNA-seq 及び RT-PCR 法による検証の結果、骨盤腺を含む組織においては *Crisp2v* mRNA 及び *Crisp2vs* mRNA の、腹側腺を含む組織では *Crisp2v* mRNA の発現が検出され、骨盤腺では *Crisp2v* と *Crisp2vs* が、腹側腺では *Crisp2v* が合成・分泌されることが示唆された。腹側腺と骨盤腺の分泌物により構成される精包には *Crisp2v*、及び *Crisp2vs* が含まれることにより、精包の受け渡し中及びメスの貯精嚢内においても Ca^{2+} 透過性チャネルの開口制御による細胞内 Ca^{2+} を精子中片への局在により受精におけるクオリティーが維持されると考えられる。

RNA-seq 及び RT-PCR 法による検証の結果、骨盤腺を含む組織においては *Crisp2v* mRNA 及び *Crisp2vs* mRNA の、腹側腺を含む組織では *Crisp2v* mRNA の発現が検出され、骨盤腺では *Crisp2v* と *Crisp2vs* が、腹側腺では *Crisp2v* が合成・分泌されることが示唆された。腹側腺と骨盤腺の分泌物により構成される精包には *Crisp2v*、及び *Crisp2vs* が含まれることにより、精包の受け渡し中及びメスの貯精嚢内においても Ca^{2+} 透過性チャネルの開口制御による細胞内 Ca^{2+} を精子中片への局在により受精におけるクオリティーが維持されると考えられる。

RNA-seq 及び RT-PCR 法による検証の結果、骨盤腺を含む組織においては *Crisp2v* mRNA 及び *Crisp2vs* mRNA の、腹側腺を含む組織では *Crisp2v* mRNA の発現が検出され、骨盤腺では *Crisp2v* と *Crisp2vs* が、腹側腺では *Crisp2v* が合成・分泌されることが示唆された。腹側腺と骨盤腺の分泌物により構成される精包には *Crisp2v*、及び *Crisp2vs* が含まれることにより、精包の受け渡し中及びメスの貯精嚢内においても Ca^{2+} 透過性チャネルの開口制御による細胞内 Ca^{2+} を精子中片への局在により受精におけるクオリティーが維持されると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 T. Sato, T. Arimura, K. Murata, M. Kawamura, W. Obama, M. Suzuki, Y. Nakauchi, A. Tominaga, M. Morita, K. Hiraoka, E. Takayama-Watanabe, A. Watanabe .	4. 巻 38
2. 論文標題 Differences of extracellular cues and Ca ²⁺ permeable channels in the signaling pathways for inducing amphibian sperm motility.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Zool. Sci.	6. 最初と最後の頁 343-351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2108/zs200159	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 H. Furukawa, S. Mito, J. Nishio, N. Sato, Y. Ando, A. Tominaga, F. Toyama, Y. Nakauchi, E. Takayama-Watanabe, A. Watanabe	4. 巻 65
2. 論文標題 Identification and characterization of sperm motility initiating substance-2 gene in the internally fertilizing Cynops species.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Develop. Growth Differ	6. 最初と最後の頁 144-152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12846	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤小百合、高山-渡辺絵理子、渡邊明彦
2. 発表標題 アカハライモリの精子機能調節における細胞内pH の関与に関する研究
3. 学会等名 日本動物学会2021年度東北支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古川春佳、富永篤、高山 - 渡辺絵理子、渡邊明彦
2. 発表標題 SMIS遺伝子の重複はイモリ科において起こった
3. 学会等名 日本動物学会第92大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤小百合、高山-渡辺絵理子、渡邊明彦
2. 発表標題 アカハライモリ卵ジェリー層のpHは精子運動を活性化する
3. 学会等名 日本動物学会第92大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤のぞみ、高山-渡辺絵理子、渡邊明彦
2. 発表標題 アカハライモリ精子の貯蔵機能に関する新たなCrisp2 の発見
3. 学会等名 2020年度動物学会東北支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上拓、渡辺絵理子、渡邊明彦
2. 発表標題 アカハライモリの精包精子における自発的な先体反応の抑制
3. 学会等名 2020年度動物学会東北支部大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	渡邊 明彦 (WATANABE Akihiko) (30250913)	山形大学・理学部・教授 (11501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------