

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06237

研究課題名（和文）基部陸上植物の精子走化性におけるカルシウム輸送体の役割

研究課題名（英文）Contribution of Ca²⁺-transporters to sperm chemotaxis in basal land plants

研究代表者

大和 勝幸 (Yamato, Katsuyuki)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：50293915

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではゼニゴケの電位依存性カルシウムイオンチャネルのホモログMpVICSPER1、カルシウムイオンポンプのホモログMpPMCAおよびEF-Handを有するMpCAPS（構造上の特徴からMpCAFAと改称）について解析した。MpVICSPER1については発現コンストラクトの作成が大幅に遅れ、現在も解析中である。MpPMCAおよびMpCAFAについては、いずれも精子の正常な遊泳に必要とされるものの、精子走化性および受精には必須ではないことが明らかとなった。なお、蛍光タンパク質で可視化すると、MpCAFAは2本の鞭毛両方に検出されたが、MpPMCAは1本のみ局在していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シダにおける精子走化性が報告されて以来、動物を中心とする生物種を用いて精子誘引物質、精子誘引物質受容体を含むシグナル伝達因子などが同定されてきた。ここに、ゼニゴケがモデルとして加わることで、これまでの実験系では到達できなかった、精子走化性のしくみ一般の理解に貢献すると期待される。なお、被子植物では、運動能をもたない精細胞は花粉管によって卵近傍に運ばれる。この時、卵に隣接する助細胞が花粉管を誘引する。この花粉管ガイダンスは被子植物が独自に進化させたしくみであるが、ゼニゴケにおける精子走化性システムを明らかにすることで、その進化を理解するための手がかりが得られる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study focused on homologs of voltage-dependent calcium-ion channel, MpVICSPER1, calcium-ion pump, MpPMCA, and EF-Hand protein MpCAPS (renamed to MpCAFA due to its structural features) in the liverwort *Marchantia polymorpha*. Due to delay in vector construction, functional analysis of MpVICSPER1 is still on-going. MpPMCA and MpCAFA were shown to be required for normal spermatozoid swimming but not for sperm chemotaxis and fertility. MpPMCA was found to be localized in one of the two flagella, while MpCAFA was detected both flagella.

研究分野：植物ゲノム科学

キーワード：精子走化性 ゼニゴケ カルシウム イオンチャネル 輸送体

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

受精は有性生殖の根幹をなすプロセスであり、多くの生物種で卵および精子という異型配偶子が用いられる。このプロセスに先立ち、卵は精子誘引物質によって精子を誘引し、受精によって両者が融合することで新たな個体あるいは生命の出発点となる。なお、現象としての精子誘引（精子走化性）は、植物であるシダの精子のリンゴ酸に対する誘引として最初に報告された (Pfeffer, Unters. aus dem bot. Inst. in Tübingen, 1:363-482, 1884)。

精子が卵に到達するには、精子誘引物質の濃度変化をリアルタイムに検知し、その情報に基づいて鞭毛運動を制御する必要がある。これまでに、前述のシダ (Brokaw, J. Exp. Biol. 35:192-196, 1958 他)、ホヤやマウスなどの動物 (Yoshida & Yoshida, Mol. Hum. Reprod. 17:457-465, 2011)、褐藻類 (Rui & Boland, J. Org. Chem. 75:3958-3964, 2010) などの生物種で精子走化性の研究が行われてきた。しかし、精子誘引物質やその受容体、シグナル伝達因子、鞭毛運動の制御因子などが報告されているものの、精子走化性における一連のプロセス全体は完全には解明されていない。さらには、精子走化性に関する研究そのものが一部の生物種に限られ、かつ未解明の部分もあるため、精子走化性メカニズムの生物種間における共通性・多様性の理解は限定的である。

研究代表者は、陸上植物における精子走化性に興味をもち、ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* L. をモデルとして研究を行ってきた。ゼニゴケでは雌雄が個体として分かれており、雄株は造精器をもつ雄器托を、雌株は造卵器をもつ雌器托を形成する。雄器托に雨水などがかかると造精器より精子が放出される。雄株から雌株へ水中を遊泳して雌器托近傍に達した後、精子は造卵器が放出する精子誘引物質に導かれて卵に到達して受精に至る。シダの精子走化性が報告された後、ゼニゴケでも同様の研究が行われ、精子が K^+ などに誘引されることが報告された (Åkerman, Zeitschrift für Botanik 2:94-103, 1910; Lidforss, Jahrb. f. wiss. Botanik., 41:65-87, 1904)。

動物では、精子細胞質内 Ca^{2+} 濃度が鞭毛運動の制御、すなわち精子誘引物質の濃度勾配に応じた運動方向の制御に重要な役割をもつことが知られており (Yoshida & Yoshida, Mol. Hum. Reprod. 17:457-465, 2011)、さらに精子細胞質内で Ca^{2+} に結合して鞭毛運動を制御するタンパク質も同定されている (Mizuno et al., PNAS 109:20497-20502, 2012)。陸上植物においては、ヒメツリガネゴケにおいて Ca^{2+} 透過性チャネルであるグルタミン酸受容体様タンパク質 GLR が精子走化性に必要であることが報告された (Ortiz-Ramírez et al., Nature 549:91-95, 2017)。すなわち、GLR 遺伝子が破壊された変異体の精子は、遊泳できるにも関わらず造卵器に到達することができない。これはコケ植物においても細胞内 Ca^{2+} 動態が精子走化性を制御する可能性を示唆している。一方、研究代表者らはゼニゴケ精子に存在する電位依存性 Ca^{2+} チャネルホモログ遺伝子である MpVICSPER1 (voltage-dependent ion channel, spermatozoid-specific) を見だし、その機能欠失変異体が精子走化性を喪失することを見いだしている

2. 研究の目的

精子走化性の分子基盤の基本原理や多様性に対する理解を深めることを目的とし、ゼニゴケ精子がもつ Ca^{2+} チャネルホモログ MpVICSPER1、 Ca^{2+} トランスポーターホモログ MpPMCA (plasma membrane Ca^{2+} ATPase) およびカルシウム結合タンパク質ホモログ MpCAFA (calcyphosin-FAP115-like) に着目してゼニゴケにおける精子走化性メカニズムの一端を明らかにする。

3. 研究の方法

【MpVICSPER1 の機能解析】

そのアミノ酸配列から、単体でイオンチャネルを形成し、電位依存的に Ca^{2+} を透過させると推測される。これを検証するため、アフリカツメガエル卵母細胞に MpVICSPER1 mRNA を注入し、

Fluo 色素あるいは GCaMP タンパク質などの Ca^{2+} インジケータで細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を観察する予定であったが、発現コンストラクトの作成が難航し、実施には至らなかった。

【MpPMCA の機能解析】

細胞膜 Ca^{2+} ポンプ様膜タンパク質をコードする MpPMCA 遺伝子の機能欠損株を作出し、精子走化性への影響を解析した。また、蛍光タンパク質との融合により、細胞内局在を評価した。

【MpCAFA の機能解析】

Ca^{2+} 結合ドメインである EF ハンドを有する MpCAFA の機能欠損株を作出し、精子走化性への関与を検証した。また、蛍光タンパク質との融合により、細胞内局在を評価した。

4. 研究成果

【MpVICSPER】

コンストラクトの作成が遅れたため、動物細胞を用いた Ca^{2+} チャンネル活性評価の実施には至らなかった。また、N 末端および C 末端に蛍光タンパク質 mCitrine を結合して細胞内局在を調べたが、蛍光を検出できなかった。蛍光タンパク質遺伝子の挿入部位を変更するか、抗体による検出を検討している。

【MpPMCA の機能解析】

CRISPR/Cas9 により、MpPMCA 遺伝子機能欠損株 *Mppmca*^{sg} 株を作出し、精子走化性への影響を解析した。また、蛍光タンパク質との融合により、細胞内局在を評価した。

まず、アミノ酸配列に基づく系統解析を行った結果、MpPMCA は P-type IIB ATPase に分類され、かつコケ植物、シダ植物、藻類などの鞭毛をもつ生物種のみで構成されたクレードに属していた。しかし、典型的な P-type IIB ATPase とは異なり、N 末端領域には活性を制御するカルモジュリン結合ドメインは保存されていなかった。機能解析のために作出した *Mppmca*^{sg} 株精子の形態等に異常は見られなかったが、運動能が顕著に低下した精子の割合が増加していた。なお、鞭毛軸系の断面を透過型電子顕微鏡で観察したところ、基本構造である 9+2 構造に異常は見られなかった。*Mppmca*^{sg} 株精子の造卵器および KCl への誘引は明確には見られなかったが、野生株雌株と掛け合わせたところ、数は減少していたものの胞子のうが形成された。MpPMCA の細胞内局在を調べるため、蛍光タンパク質 *mCitrine* 遺伝子を MpPMCA 遺伝子 cDNA の 5'側に連結したコンストラクトを *Mppmca*^{sg} 株これらの *mCitrine*-MpPMCA 相補株では、*mCitrine* 蛍光は 2 本の鞭毛のうち 1 本のみ局在していた。このような局在を示すタンパク質は、少なくとも車軸藻類および陸上植物の精子では知られていない。以上の結果から、MpPMCA は精子走化性に必須ではないものの、片方の鞭毛運動を制御することで精子走化性に寄与している可能性が示唆された。

【MpCAFA の機能解析】

Ca^{2+} 結合ドメインである EF ハンドを有する MpCAFA の機能欠損株 *Mpcafa*^{sg} を作出し、影響を解析した。また、蛍光タンパク質との融合により、細胞内局在を評価した。

MpCAFA は、N 末端領域が哺乳類の Ca^{2+} 結合タンパク質 calyphosin、C 末端領域が緑藻の軸系タンパク質 FAP115 に類似しており、MpCAFA のオーソログは一部の藻類、コケ植物、シダ植物にのみ存在していた。*Mpcafa*^{sg} 株精子は形態的には正常であったが、その遊泳速度は低下していた。しかし、*Mpcafa*^{sg} 株精子は造卵器に誘引され、稔性も示した。従って、MpCAFA は精子の正常な遊泳には必要であるものの、精子走化性には必須ではないことが判明した。*Mpcafa*^{sg} 株に MpCAFA-*mCitrine* コンストラクトを導入すると、精子の遊泳速度が回復し、MpCAFA-*mCitrine* が 2 本の精子鞭毛全体に局在することが示された。また、MpCAFA の calyphosin 様領域および FAP115 様領域の両方が機能および局在に必須であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森田 瑞生, 大和 勝幸
2. 発表標題 ゼニゴケ (<i>Marchantia polymorpha</i>) の精子走化性におけるEF-hand タンパク質遺伝子MpCAPS の機能解析
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青木 元汰, 大和 勝幸
2. 発表標題 ゼニゴケの精子走化性におけるK+チャネルホモログ遺伝子MpBK1, MpBK2a, MpBK2bの機能解析
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 武部 夏実, 諏訪 宏紀, 山崎 由美子, 森田 瑞生, 松川 哲也, 竹村 美保, 荒木 崇, 大和 勝幸, 梶山 慎一郎
2. 発表標題 ゼニゴケ精子に対するapigenin の作用
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mizuki MORITA, Katsuyuki T. YAMATO
2. 発表標題 Functional analysis of a gene encoding EF-hand protein, MpCAPS, in the sperm chemotaxis in <i>Marchantia polymorpha</i>
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mizuki Morita, Katsuyuki T. Yamato
2. 発表標題 Functional analysis of a gene encoding EF-hand protein, MpCAPS, in the sperm chemotaxis in <i>Marchantia polymorpha</i>
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Genta Aoki, Katsuyuki T. Yamato
2. 発表標題 Functional analysis of K ⁺ channel homolog genes, MpBK1, MpBK2a, and MpBK2b, in the sperm chemotaxis in the liverwort <i>Marchantia polymorpha</i>
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 森田 瑞生, 大和 勝幸
2. 発表標題 ゼニゴケ (<i>Marchantia polymorpha</i>) の精子走化性におけるEF-hand タンパク質遺伝子MpCAPS の機能解析
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮崎まどか, 南野尚紀, 平尾聖, 十川太輔, 上田貴志, 大和勝幸
2. 発表標題 ゼニゴケPlasma Membrane Ca ²⁺ -ATPaseは精子の鞭毛運動に必要である
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 ゼニゴケ (Marchantia polymorpha) の精子走化性におけるEF-handタンパク質遺伝子MpCAPSの機能解析
2. 発表標題 森田 瑞生, 大和 勝幸
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎 まどか, 平尾 聖, 十川 太輔, 大和 勝幸
2. 発表標題 ゼニゴケの精子誘引機構におけるPlasma Membrane Ca ²⁺ -ATPaseの機能解析
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎まどか, 平尾聖, 十川太輔, 大和勝幸
2. 発表標題 ゼニゴケの精子誘引機構におけるPlasma Membrane Ca ²⁺ -ATPase の機能
3. 学会等名 日本植物学会 第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎まどか, 平尾聖, 十川太輔, 大和勝幸
2. 発表標題 ゼニゴケの精子誘引における Plasma Membrane Ca ²⁺ -ATPase の機能
3. 学会等名 第63回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田瑞生, 大和勝幸
2. 発表標題 ゼニゴケ (Marchantia polymorpha) の精子走化性における EF-hand タンパク質遺伝子 MpCAPS の機能解析
3. 学会等名 第63回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------