

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：24405

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20676

研究課題名（和文）同属に異なる受精様式を持つ海産カジカをモデルとした精子進化の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular basis of sperm evolution in marine sculpin with different fertilization mode in the same genus.

研究代表者

伊藤 岳 (Takeshi, Ito)

大阪公立大学・大学院理学研究科・特任助教

研究者番号：10908429

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究により、海産カジカ科魚類において系統の異なる北米の種群と日本の種群の両方で、体内受精の進化に伴い精子の頭部が伸長することを明らかにした。また、伸長した頭部の適応的な役割を明らかにするため、粘度の異なる溶液で精子を遊泳させ解析したところ、粘度に適応して頭部が伸長した可能性は低かった。一方で、精子の運動様式は近縁種にも関わらず体外受精種と体内受精種で大きく異なり、体外受精種では振幅運動、体内受精種では回転運動していた。また、同属で体外受精種・体内受精種が見られるArteidius属の精子のRNA sequenceにより、受精様式により発現量が異なる遺伝子の候補を選出することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、精子の構成成分や受精そのものに関する研究は多くなされてきた。しかしながら、受精に至るまでの過程での精子の適応進化については見過ごされてきた。本研究は、進化生態学の観点から精子の適応進化を明らかにしただけでなく、精子形態の違いを機能面からも検証した研究である。そのため、複合的な視点から精子の適応機構を捉えることができた点で、学術的意義がある。加えて、RNA sequenceにより体外受精から体内受精種へ進化する際に発現量が変化した遺伝子の候補を選出することができた。これらの遺伝子を調べ体内受精に必要な要素を明らかにすることで、将来的に薬学への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study revealed that sperm heads elongate during the evolution of internal fertilization in marine sculpin of both North American and Japanese species groups, which differ in phylogeny. To clarify the adaptive role of the elongated head, we analyzed sperm motility in solutions with different viscosities and found no evidence of head elongation in response to viscosity. On the other hand, in closely related species, sperm motility differed greatly between external fertilization and internal fertilization, with amplitude motility in externally fertilizing species and rotational motility in internally fertilizing species. In addition, the RNA sequences of sperm of *Arteidius*, a genus which contain both externally and internally fertilizing species, allowed us to select candidate genes whose expression levels differed depending on the type of fertilization mode.

研究分野：進化生態学

キーワード：精子 受精様式 精子競争 RNA sequence カジカ科魚類 体内受精 体外受精

### 1. 研究開始当初の背景

精子は全ての動物が有する細胞であるにも関わらず、形態や大きさは様々である。これは、体外・体内受精といった「受精様式」の違いや、異なるオス同士の精子が受精を巡って競う「精子競争の度合い」の違いによって生じると考えられている。例えば、魚類ではカワスズメ科魚類で、精子競争レベルの高い種はより精子が長く、速くなることが報告されている (Fitzpatrick et al 2009)。一方で、受精様式の違いは、無脊椎動物から哺乳類まで幅広い分類群の精子の比較から、体内受精種は体外受精種よりも長い精子をもつと言われてきた (Stockley et al., 1996; Lüpold & Pitnick, 2018)。しかしながら、例えば、無尾類のほぼ全ては体外受精、哺乳類は全て体内受精であるというように受精様式は系統的な制約が強く、系統の異なる遠縁種同士の比較では、受精様式以外の様々な要因が精子の形質の進化に影響を及ぼすため、受精様式の違いがどのように精子の進化に影響するか、を検証することは困難である。

硬骨魚類には、少数であるが哺乳類のように体内受精を行なう種が知られており、とりわけ本研究の対象である海産カジカ科魚類は、近縁種に体内受精種と、体外受精種が混在するだけでなく、繁殖様式が多様化し、種間で多様な精子競争レベルをもつ非常に珍しい種群である。申請者はこれまで、海産カジカ科魚類 47 種の精子の形態、運動性を計測し、系統樹に照らし合わせた系種間比較解析を行ってきた。

※47種の種間比較から一部抜粋		受精様式	精子競争	精子全長
ヒメフタスジカジカ	39µm	体外	丸型	低い 短い
ニジカジカ	39µm	体内	細長型	低い 短い
アナハゼ	65µm	体内	細長型	高い 長い

図：海産カジカ科魚類の体内受精・精子競争と精子形態

その結果、今までの予測と異なり、体内受精の進化は精子の頭部長を伸長させるが鞭毛長には影響を与えないこと、運動性を変化させること、精子競争レベルの違いは精子の鞭毛長と遊泳速度に関与することを明らかにした (図; Ito, 2021 博論)。また、この精子の進化は、カジカに限らず他の魚類でも同様の進化をしている可能性がある (Ito et al., 2021 J. Zool.)。さらに、予備的なプロテオーム分析から、体内受精種では、免疫に関わるタンパク質の発現量が増加することがわかった (Ito, 2021)。しかし、なぜ精子の頭部が伸長するのかといった機能的側面、またどの遺伝子が関与するのか、その配列の特異性や発現量などの分子的要因は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、精子のマクロな形態、運動性、機能と、ミクロな分子基盤の相互の進化を紐付け、魚類における「体外受精から体内受精への進化機構を明らかにするため、以下の3つの研究を行った。

- (1) 海産カジカ科魚類を用いて体内受精の進化、精子競争レベルの激化によって精子が分子レベルでどのように進化したかを、系統関係を考慮して解明する。
- (2) 海産カジカ科魚類で得られた結果が、他の魚類分類群でも普遍的であるかを確かめる。
- (3) 体内受精の進化により生じた精子形態の変化の機能的意義を明らかにする。

### 3. 研究の方法

- (1) 海産カジカ科魚類を用いて体内受精の進化、精子競争レベルの激化によって精子が分子レベルでどのように進化したかを、系統関係を考慮して解明する。

本研究のかなめであった同属で異なる受精様式を有するカジカ (*Artedius* 属と *Enophris* 属) の北米での採集は、COVID-19 の流行により、最終年度での採集となった。また、北米には系統的に重要な種が生息するため、これらの種も併せて採集した。採集場所はカナダ・バンクーバーで行い、SCUBA 潜水により採集した。運動性、遊泳速度を測定し、RNA sequence 用に精巣および卵巣を保存した。精子は Ito & Awata(2019)に従い固定し、形態を観察した。精巣から RNA を抽出し、次世代シーケンサーにより RNA sequence を行った。得られたデータは、国立遺伝学研究所のスーパーコンピュータのソフトウェア (TRINITY 等) を用い、de novo アセンブリやアノテーションを行った。

- (2) 海産カジカ科魚類で得られた結果が、他の魚類分類群でも普遍的であるかを確かめる。

比較的近縁種に体外受精種と体内受精種を有する分類群の魚を選定し、潜水調査により採集した (トゲウオ目、体外受精種：シワイカナゴ・チューブスナウト、体内受精種：クダヤガラ。スズキ目、体外受精種：スズメダイ・ナガサキスズメダイ・クマノミ、体内受精種：ウミタナゴ。スズキ目カサゴ亜目、体外受精種：キリンミノ・ハオコゼ、体内受精種：カサゴ・シロメバル)。採集場所は、北海道臼尻、新潟県佐渡、愛媛県愛南町で行った。COVID-19 の流行により採集に行くことができなかった年は、輸送や鮮魚の購入によりサンプルを入手した。チューブスナウトの一部の個体は、葛西臨海水族園の提供により入手した。(1) と

同様に、精子形質を測定し、RNA sequence を行った。

- (3) 体内受精の進化により生じた精子形態の変化の機能的意義を明らかにする。受精様式の違いに着目すると、体内環境は、体外環境に比べて粘度が高い。そのため、体内受精種の伸長した精子頭部は、粘性環境でスムーズに遊泳するための適応だと仮説を立てた。そこで、頭部が丸いヒメフタスジカジカ（体外受精種）と頭部が細長いキマダラヤセカジカ（体外受精種）を用い、低粘度から高粘度まで粘度を変えたニュートン流体（メチルセルローズ）および非ニュートン流体（フィコール）中での運動性をハイスピードカメラにより撮影し解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 海産カジカ科魚類における精子形質の進化

北米と日本のカジカ 52 種について、系統種間比較解析を行ったところ、過去の研究と異なり、体内受精の進化は精子全長に影響を与えないこと、頭部を伸長させること、体内環境の浸透圧に適応して言うことが明らかとなった。また、系統の異なる北米と日本の両種群で精子形質が平行進化していたことを明らかにした。これら新規の結果が得られた理由として、これまでの研究は精子競争レベルが異なる種同士で体外受精種と体内受精種を比較しており、本研究では精子競争レベルを考慮したことが挙げられる。一方で、精子競争レベルの増加は、精子の全長と遊泳速度を増加させることが明らかとなった。加えて、北米の潮間帯に生息するカジカ Fluffy sculpin と Rosy sculpin の GSI を比較し、両種の基礎的な生態情報を提供した。

##### (2) 海産カジカ科魚類における精子の分子基盤の進化

本研究のかなめである、同属に異なる受精様式をもつ *Artedius* 属と *Enophrys* 属の北米での採集は、COVID 流行による渡航制限のため最終年度となったため現在 RNA sequence は解析中である。しかしながら、*Artedius* 属の精巣発現遺伝子に関して、レファレンスゲノム (*Artedius* 属の体内受精種 *scalyhead sculpin* を使用) に対するリードのマッピングをカウントすることで発現量を比較したところ、同一遺伝子間でも発現量に大きく差があり、体外受精種では発現量が少なく、体内受精種では発現量が増加している遺伝子の候補を割り出せた (図 1)。今後は、これらの遺伝子に着目し、体内受精の進化によってどのような遺伝子基盤の変化が必要であったかを明らかにする。

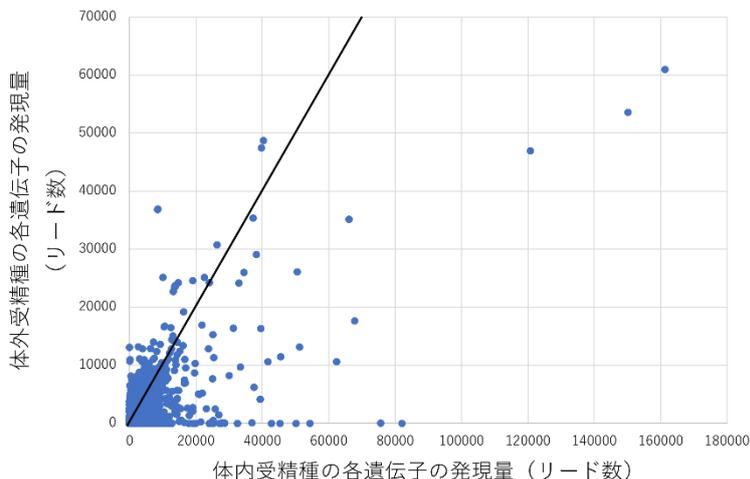


図 1 *Artedius* 属における遺伝子発現量の違い。黒線は体外受精種と体内受精種で発現量の比が 1 であることを示す。黒線より下部は、体内受精種でより発現量が多い遺伝子、上部は体外受精種で発現量が多い遺伝子を示す。

##### (3) 海産カジカ科魚類での結果と他魚種との共通性および一般則

比較的近縁種で異なる受精様式をもつ 3 分類群に関して精子形質の比較を行ったところ、海産カジカ科魚類と同様に、体内受精の進化は精子頭部の伸長に関わり、精子競争レベルの増加は精子全長と遊泳速度の増加に関与していた (Ito et al., *Ecol Evol.*)。過去の研究から、多くの種で、相対的な精巣重量 (relative testes mass, RTM) は精子競争

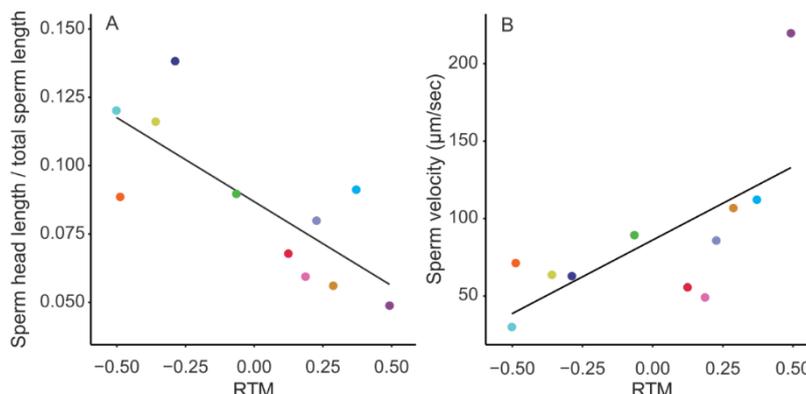


図 2 相対性総重量(RTM)と精子形質の関係。A. 相対精子頭部長。B. 精子遊泳速度。

レベルが強い種で増加する (e.g., Fitzpatrick 2009)。そこで、RTM と精子形質の相関を調べたところ、単純な精子全長と RTM は相関せず、RTM が大きい種ほど精子全長に対して頭部長が短かった。また、RTM の増加に伴い精子速度が増加していた (図 2)。この結果は、単純な頭部長と鞭毛長の増加は遊泳速度の減少を招くため、相対的な比が遊泳速度の指標になるというという理論モデル (Humphries et al. 2008) の実証例となった。RNA sequence に関しては現在解析中であるが、カジカと同様の結果が得られれば、分子基盤の平行進化によってよりマクロな形質の進化が起きていることを実証できる。

#### (4) 体内受精の進化により生じた精子形態の変化の機能的意義

ハイスピードカメラで撮影した動画の解析の結果、近縁種の体外受精種のヒメフタスジカジカと体内受精種のキマダラヤセカジカにおいても、鞭毛の動かし方は大きく異なっていることがわかった。ヒメフタスジカジカでは、鞭毛を振幅運動させ前進していたのに対し、キマダラヤセカジカでは、回転運動により前進しており、体内受精の進化は、運動様式までも進化させることが判明した。また、伸長した頭部が粘性への適応という仮説を検証するために、粘度の異なる溶液での精子の運動性を解析したところ、「頭部の長い体内受精種は頭部の丸い体外受精種よりも高粘度で遊泳速度が減少しにくい」という予測とは異なり、遊泳速度の減少率は粘度を上げて両種で変わらなかった (図 3)。

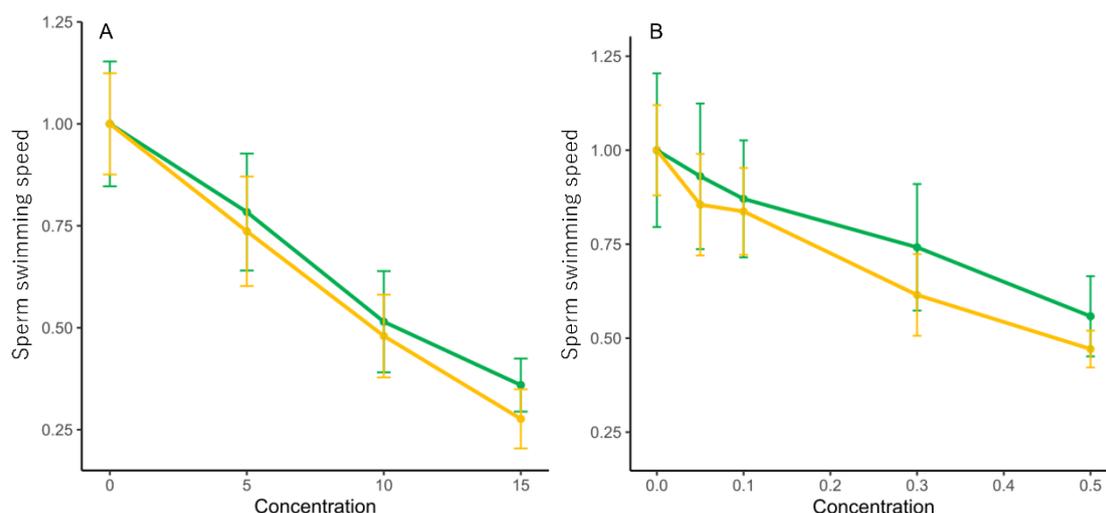


図 3 粘度と遊泳速度の関係。X 軸は各溶液の粘度、Y 軸は濃度 0% を 1 とした精子遊泳速度の比。A. フィコール。B. メチルセルロース。緑線は体外受精種ヒメフタスジカジカを、黄線は体内受精種キマダラヤセカジカを示す。

一方、精子の遊泳様式にも違いがあったため、両種の精子運動の直進性を調べたところ、頭部の丸いヒメフタスジカジカの精子に比べて、頭部の細長いキマダラヤセカジカの精子は直進性が高かった。この結果は他のカジカにおいても同様で、体内受精種では直進性が高かった。これは、卵に直接放出される体外受精種の精子と異なり、体内受精種の精子は卵巣内を移動し卵にたどり着く必要があるためだと考えられた。以上より、頭部形態は粘性への適応という仮説は否定されたが、精子の直進性に関与している可能性を示した。

本研究で得られた一連の成果は国内外の学会で発表し、魚類における体内受精の進化に伴う精子進化の一般則に関しては国際ジャーナルで発表した。

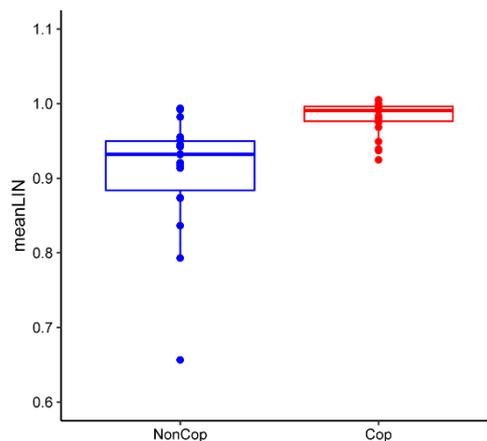


図 4 カジカ科魚類における精子運動の直進率。青色の boxplot は体外受精種、赤色は体内受精種を示す。

<引用文献>

Fitzpatrick, J.L., Montgomerie, R., Desjardins, J.K., Stiver, K.A., Kolm, N. & Balshine, S. (2009). Female promiscuity promotes the evolution of faster sperm in cichlid

- fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 1128–1132.
- Humphries, S., Evans, J.P. & Simmons, L.W. (2008). Sperm competition: linking form to function. *BMC Evol. Biol.* **8**, 1–11.
- Ito, T. & Awata, S. (2019). Optimal methods to fix fish sperm for optical microscopic observation: comparisons among different fixative solutions using sperms of copulatory and non-copulatory marine fishes. *Ichthyol. Res.* **66**, 307–315.
- Ito, T., Kinoshita, I., Tahara, D., Goto, A., Tojima, S., Sideleva, V.G., Kupchinsky, A.B. & Awata, S. (2021). Fertilization modes drive the evolution of sperm traits in Baikal sculpins. *J. Zool.* 1–11.
- Ito, T., Morita, M., Okuno, S., Inaba, K., Shiba, K., Munehara, H., ... & Awata, S. (2022). Fertilization modes and the evolution of sperm characteristics in marine fishes: Paired comparisons of externally and internally fertilizing species. *Ecology and Evolution*, 12(12), e9562.
- Lüpold, S. & Pitnick, S. (2018). Sperm form and function: what do we know about the role of sexual selection? *Reproduction* **155**, R229–R243.
- Stockley, P., Gage, M.J.G., Parker, G.A. & Moller, A.P. (1996). Female reproductive biology and the coevolution of ejaculate characteristics in fish. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **263**, 451–458.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Ito Takeshi, Morita Masaya, Okuno Seiya, Inaba Kazuo, Shiba Kogiku, Munehara Hiroyuki, Koya Yasunori, Homma Mitsuo, Awata Satoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Fertilization modes and the evolution of sperm characteristics in marine fishes: Paired comparisons of externally and internally fertilizing species	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ece3.9562	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊藤岳・守田昌哉・柴小菊・稲葉一男・宗原弘幸・山崎彩・古屋康則・本間光雄・安房田智司
2. 発表標題 体外受精vs体内受精：異なる系統の海産魚類における精子進化の一般性の検証
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ito T, Morita M, Okuno S., Inaba K, Shiba K., Munehara H., Koya Y., Homma M., & Awata S.
2. 発表標題 Paired comparisons of eleven species with different fertilization modes reveal the evolution of sperm in marine fishes.
3. 学会等名 International Behavioral Ecology Congress (ISBE) 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤岳・Breana Goldman・安房田智司・Karen D. Crow
2. 発表標題 北米西岸に固有の交尾型海産カジカ Fluffy sculpin と姉妹種 Rosy sculpin の受精様式と雌雄の繁殖戦略
3. 学会等名 2022年度日本魚類学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

動物社会学研究室 | 大阪公立大学  
<https://www.omu.ac.jp/sci/biol-asoci/publication/index.html>

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