

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23380110

研究課題名(和文) 魚類の効率的な人工授精に向けた「卵-精子相互作用」の分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of egg-sperm interaction during fertilization in teleost and development of application system for artificial fertilization

研究代表者

松原 孝博 (Matsubara, Takahiro)

愛媛大学・南予水産研究センター・教授

研究者番号：60443389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：魚類の卵は厚い卵膜に保護され、精子は一か所だけ存在する卵門とよばれる孔を通して受精することから、卵から何らかの働きかけなしに受精することは困難と推察された。この研究では卵門への精子誘導と卵巣腔液の精子活性化機能に焦点を当て、精子に対する一連の働きかけである卵巣腔液に含まれる因子による精子運動活性化と卵門周辺の因子による精子誘導からなる「卵-精子相互作用」が硬骨魚類に共通して存在することを新たに分子生物学的研究を導入して明らかにし、養殖等の種苗生産の効率化に有用な情報を得た。

研究成果の概要(英文)：Teleost egg is covered with a thick envelope called chorion, and has a micropyle at animal pole through which sperm access to the egg plasma membrane. The present study elucidated the egg-sperm interaction being consisted of activation of sperm motility by an ovarian fluid coupled with sperm guiding into micropyle by a protein factor. Such fertilization system is suggested to be common in many teleost species.

研究分野：水産増養殖

キーワード：硬骨魚類 受精 精子活性化 精子誘導 卵門 卵巣腔液

1. 研究開始当初の背景

現在、2万9千種に及ぶといわれる魚類の多くは卵生であり、受精は体外で行われる。卵には厚くて堅固な卵膜があり、受精が起こるには精子がこの卵膜を通り抜ける必要がある。そのため卵膜には予め卵門と呼ばれる精子の通り穴が1か所用意されている。自然界での魚類の産卵は、流れのある河川や海で行われ、偶然の卵門への進入では、100%に近い受精率は説明できない。

ニシンは沿岸域の藻場で群れをなして産卵し、産卵場では放出された精子により海水が白濁する群来(くき)と呼ばれる光景が見られる(Hay, 1985)。群来の中で精子は運動することなく漂い、卵の近傍に達してはじめて運動を開始し受精する。こうした特殊性からニシン精子の挙動については興味もたれ、卵門周辺で精子が回転(旋回)運動へと変化し卵門に進入する現象が観察されている(Yanagimachi, 1957)。その後の研究から、ニシン精子に回転運動を誘起するのは、卵門周辺に局在するタンパク質であり、精子運動開始因子(SMIF)と名付けられた(Griffin et al., 1996)。さらに、卵周辺の海水中で精子は直進的な運動をしており、卵巣腔液(排卵卵を浸漬している体液)中に含まれる精子活性化ペプチド(HSAP)が運動開始の引き金になることが明らかにされた(Morisawa et al., 1992, Oda et al., 1998)。Charrら(2008)は統合的な観点から、海水中で不動の精子は卵周辺のHSAPにより直進運動を開始し、卵門周辺に接触するとSMIFにより卵門へと誘導され、効率的な受精が引き起こるとしている。

ニシンのように環境水中で精子が不動である魚種は他になく、その運動様式が魚類の中でも極めて異色であるため、SMIFやHSAPによる精子の運動制御はニシンに特異的と捉えられてきた。しかしながら、散発的な状況証拠(Yanagimachi et al., 1992)などから「卵-精子相互作用」による精子の運動制御は他の硬骨魚類に広く共通して存在すると予察された。

2. 研究の目的

①学術的目的

この分野の研究例は極めて少なく、しかもニシンに限定されてきた。そのため「卵-精子相互作用」に関する認知度は極めて低く、卵門への精子の進入は偶発的と信じられている。体外受精を行う魚類にとってこの現象は再生産の根幹をなす受精機構の一部であることから、学術的な観点からこれが魚類全般にわたって用いられている機構であることを明確にする必要がある。そのため、卵門への精子誘導と卵巣腔液の精子活性化機能に焦点を当て、精子に対する一連の働きかけが硬骨魚類に共通して存在する「卵-精子相互作用」であることを明らかにし、加えてそれら因子の作用機構の一端を解明することを目的とする。

②産業的な目的

栽培漁業の種苗生産では遺伝的多様性を保つ観点から、また、養殖では育種の観点から、必要とする雌雄から確実に良質な卵と精子を得て効率的に仔稚魚を得る技術が必要となってきた。人工授精では凍結保存精子や成熟度の不十分な精子が用いられる他、ウイルス疾病予防対策として未受精卵の洗浄「洗卵作業」が行われることがある。こうした場合、しばしば受精率低下をまねくことから改善策が切望されている。そこで、活性化因子に関する生化学的、分子生物学的知見を背景に、凍結精子や未熟精子の受精能を高めることに加え、卵質低下(受精率低下)とそれら因子の関係を明らかにし、種苗生産の効率化へ向けた適用技術を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

精子誘導因子に関して、SMIF遺伝子を世界に先駆けてクローニングし、その発現特性を免疫組織化学や分子生物学的手法により明らかにする。また、SMIF遺伝子産物による精子運動変化(直進から回転)を複数の種で調べ、このシステムが硬骨魚類に広く利用されていることを確認する。併せて遺伝子の発現特性も明らかにする。また、精子運動活性化因子に関しては、卵巣腔液中の精子運動活性化因子の生化学的性状分析と遺伝子クローニングを複数種を使用して行い、ニシンHSAPに相当するか否か、また、硬骨魚類に共通するシステムか否かを検証する。

水産業への適用法を開発するため、精製あるいは合成した精子活性化因子を用いて、凍結精子や未成熟精子の受精能向上技術を開発し、種苗生産に適用する。また、精子運動能や卵-精子相互作用に関わる他の要因を含めて、受精率低下の防除方法を考案する。

4. 研究成果

① 硬骨魚類に見られる卵-精子相互作用の共通性

これまでの魚類精子及び卵の性質に関する研究報告から、魚類の精子は海水中で不動なニシンを除き、概ね30秒程度から5分程度の運動を行い、本研究で調べた海産魚類を含めて、一般的に海産魚類で長く運動する傾向が見られている。さらに、カタクチイワシ、カワハギ、クロマグロ、ニホンウナギ、マツカワなど種々の魚類精子で、雌の卵巣内で排卵卵を浸漬している卵巣腔液を添加して画像解析により比較を行った結果、運動する精子の比率と精子の運動速度を増加させる効果がクロマグロとニホンウナギで顕著に見られたのに対し、マツカワやカタクチイワシでは明瞭な効果は見られなかった。このことから、卵巣腔液による精子活性化作用には魚種による差が認められることが示唆された。

一方、顕微鏡下での受精前の精子の運動軌跡の観察では、上記の魚種以外マダイなども含め、いずれも卵門に対して精子を誘導すると考えられる卵門周辺での運動変化が認められ、卵門への精子の誘導現象が硬骨魚類に広く見られることが明らかになった。これにより、当初想定された精子活性化と精子誘導からなる「卵-精子相互作用」が系統分類学的に離れた種において共通して見られることが示唆された（図1）。

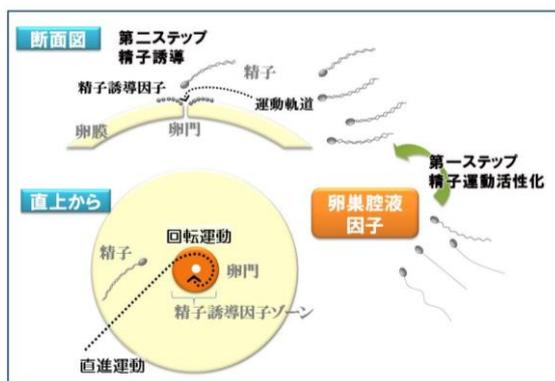


図1 硬骨魚類に広く見られる精子運動活性化と精子誘導からなる卵-精子相互作用の模式図

② 卵門への精子誘導因子

平成23年度までに、ニシン卵巣 cDNA ライブラリーから精子誘導因子 (SMIF) 遺伝子候補を部分クローニングした。ここではさらに解析を進め、2つのサブタイプの解析を完了した。その情報をもとに、ウナギ SMIF 候補の配列解析を完了すると共に、新たにカタクチイワシを用いて SMIF 候補遺伝子の配列解析を実施した。ニシンの主要な SMIF 候補遺伝子 cDNA は ORF 4,425bp であり 1,475 残基のアミノ酸をコードする。カタクチイワシの成熟卵巣から得た配列はニシンの SMIF 候補遺伝子から推定されたアミノ酸配列と高い相同性を示した。先に、ニシン SMIF 遺伝子候補についてバキュロウイルスベクターによりリコンビナントタンパク質を作製し、特異抗血清を得た。本研究では、これを用いて候補遺伝子が SMIF のものであることを確認するため、ニシン卵について免疫組織化学を実施した。ニシン卵は卵膜外側に粘着物質の層をもち、これが極度の非特異反応を引き起こす。抑制する方法として、ブアン固定とオートクレーブによる粘着性物質の破壊が有効であることを確かめ、粘着性卵における SMIF 免疫組織化学の方法を確立した。その結果、SMIF タンパク質が卵門の周辺のみならず局在していることを免疫組織化学的に確認することに成功した（図2）。

これまでの遺伝子解析から系統分類学的に離れた5魚種の硬骨魚類の卵巣に SMIF あるいは SMIF 様遺伝子が発現していることが確認され、SMIF による卵門への精子誘導がニシンに限られた現象ではなく、硬骨魚類に広

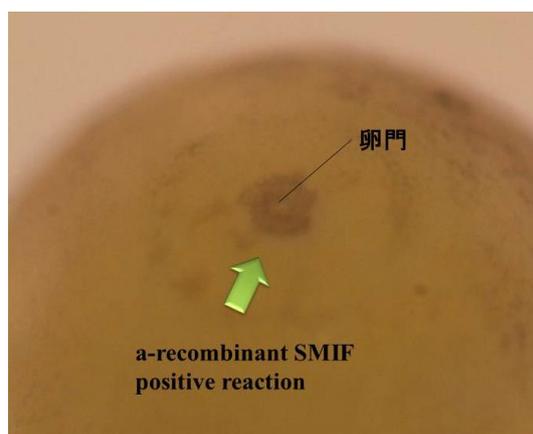


図2 ニシンにおける抗 SMIF リコンビナントタンパク質を用いた卵門周辺の免疫組織化学像（未発表データ）

く共通する現象である可能性が浮き彫りにされてきた。ホモロジー解析から同遺伝子は生体防御に機能する $\alpha 2$ -マクログロブリンファミリーに属する可能性が示されたことから、同遺伝子の機能の確定を進めることに重点を置き、次に記す作業順序に従って実施した。ニシンでは現在までに、1) 卵膜から目的タンパクを大量に精製する方法を開発、2) N-末端及び内分アミノ酸配列を解析し、その情報をもとに上記 SMIFcDNA を解析、3) SMIF 遺伝子よりリコンビナントタンパク質を作製し、特異抗血清を作製、4) 候補遺伝子と SMIF タンパクの同一性を確認するため、SMIF 免疫組織化学の方法を確立した。免疫組織の試験結果は、卵門周辺を特異的に染色するもので、1つの強い間接的証拠を得たと言える。さらに、同配列情報をもとにニシン SMIF 遺伝子候補のリアルタイム PCR 系を作製し、卵巣の発達が開始される11月以降各月サンプリングした卵母細胞を用いて、同遺伝子の発現量を測定した結果、SMIF 遺伝子発現は卵母細胞の発達と共に増加し、2つ目の「間接的証拠」を得た（図3）。

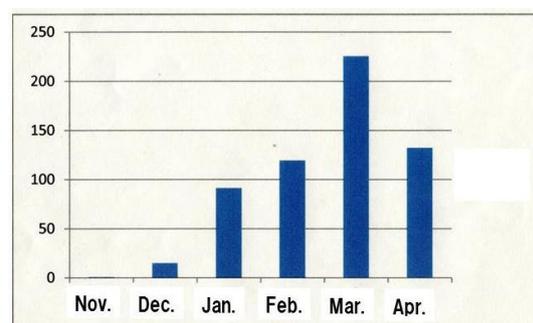


図3 リアルタイムPCRによるニシン SMIF 遺伝子候補の卵濾胞での発現の季節的変化（未発表データ） 縦軸は卵濾胞1個当たりの相対的発現量を示す。

カタクチイワシ精子誘導因子 (SMIF) 遺伝子候補の配列に加え、卵巣、精巣で発現する $\alpha 2$ -マクログロブリンファミリー遺伝子1

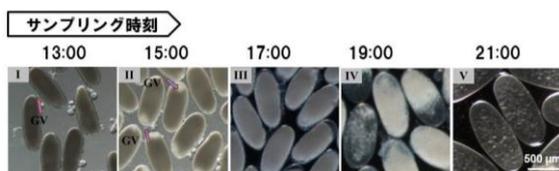
種及び肝臓にて発現する $\alpha 2$ -マクログロブリン遺伝子の解析を実施した。その結果、3種の遺伝子は高い相同性を示し、先の候補がSMIF遺伝子であることを示唆する明瞭な根拠を得るには至らなかった。しかし得られた配列解析をもとに他魚種の成熟卵巣で遺伝子解析を行った結果からは、相同性を持つ配列が得られ、精子誘導因子(SMIF)遺伝子候補の配列が多くの魚種の成熟卵巣で見出されることが分かり、卵門への精子の誘導に関する観察結果と一致した。

③ 精子運動活性の「概日リズム」及び卵巣腔液の精子活性化

ここではカタクチイワシを研究の中心魚種と位置付け、幼魚を海面生簀にて飼育後、適宜陸上水槽に移し一定条件下にて自発的産卵を誘導し高速CCDカメラによる精子運動撮影と画像解析を組み合わせて異なる時刻における精子運動活性を解析した。その結果、精子採取時刻による顕著な精子活性の差異があることを見出した。この現象は雌由来の精子活性化因子に関する結果を不明瞭にする。そのため、雌の排卵時刻(午後8-9時)を特定し、卵巣における卵母細胞の最終成熟の開始時刻及び経時的形態変化を明らかにした(図4)。

図4 カタクチイワシ卵母細胞の最終成熟における経時変化(未発表データ)

I: 卵黄形成終了期の卵母細胞、II~IV: 最終成熟期の卵母細胞、V: 排卵卵



それをもとに、午前8時、午後0時、午後4時、午後8時に精巣をサンプリングし、海水中での精子運動活性を解析した。その結果、運動活性を示す精子の比率は午前9時の5%未満から時間を追って増加し、雌の排卵時刻午後9時には65%以上に達した。このことから、輸精管内の精子は雌の排卵に合わせて運動能を獲得する「概日リズム」を持つことを明らかにした(図5)。

これまで、産卵期に向けて精子が運動能を獲得することは知られてきたものの、周期的産卵を行う種において精子運動能にも日周期性が存在することが、今回初めて明らかになった。これは、輸精管内の精子の「成熟」と受け止められ、画像解析による定量的評価により精子の「成熟」現象が初めて客観的に把握された。当該成果は、学術的な進展であると同時に、魚類の種苗生産に用いる凍結保存精子の質を高めることなどに極めて有益であり、産業に対する貢献も大きい。

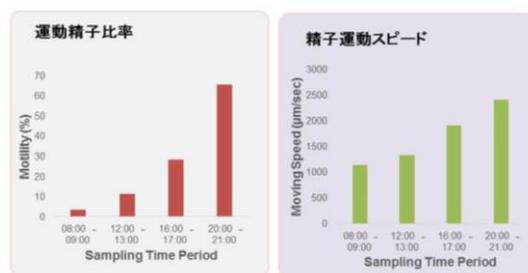


図5 カタクチイワシ精子の採取時刻による運動精子比率及び運動スピードの変化(未発表データ)

精子活性化因子に関し、卵巣腔液による精子活性化が顕著なクロマグロに加え、より扱いやすいマツカワについて、画像解析による精子運動活性評価法を用いて対象種の精子運動に対する卵巣腔液の効果を調べた。クロマグロでは精子運動比率は明確に高まり、運動時間、運動速度はいずれも2倍以上に達した。液体クロマトグラフィーによる活性化因子の分画では、比較的低分子のタンパク画分に精子運動活性化作用が認められ、タンパク質等の機能性因子の存在を強く裏付けた。カタクチイワシなどを用いて卵母細胞の「退行」と「過熟」に起因する卵質低下や卵巣腔液の劣化を分析し、SMIFや精子運動活性化因子の分解を通じた受精能低下予防策と防除策に関する増養殖への適用方法を考案した。

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 4 件)

- Hiramatsu, N., Todo, T., Sullivan, C. V., Schilling, J., Reading, B. J., Matsubara, T., Ryu, Y.-W., Mizuta, H., Luo, W., Nishimiya, O., Wu, M., Mushiobira, Y., Yilmaz, O., Hara, A., Ovarian yolk formation in fishes: Molecular mechanisms underlying formation of lipid droplets and vitellogenin-derived yolk proteins, *Gen. Comp. Endocrinol.* doi: 10.1016/j.yggen. 2015.01.025. 2015 査読有
- Yamane, K., Yagai, T., Nishimiya, O., Sugawara, R., Amano, H., Fujita, T., Hiramatsu, N., Todo, T., Matsubara, T., and Hara, A., Characterization of vitellogenin and its derived yolk proteins in cloudy catshark (*Scyliorhinus torazame*), *Fish Physiol. Biochem.* Vol. 39, 373-390. 2013 査読有
- 蓮平裕次、水田紘子、羅雯姝、盛田祐加、澤口小有美、松原孝博、平松尚志、東藤孝、原彰彦、カッタスロートトラウト *Oncorhynchus clarki* における 2 型ピテ

ロジェニン転写産物および蛋白質の卵発達に伴う発現変化、日本水産学会誌 79(2), 175-189, 2013 査読有

- ④ Yanagimachi R., Cherr G., Matsubara T., Andoh T., Harumi T., Vines C., Pillai M., Griffin F., Matsubara H., Weatherby T., and Kaneshiro K., Sperm Attractant in the Micropyle Region of Fish and Insect Eggs, Biol. Reprod. 88(2) 1-11, 2013 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① Ryu, Y.-W., Todo, T., Hiramatsu, N., Matsubara, T., Sullivan, C.V. and Hara, A., VERY LOW-DENSITY LIPOPROTEIN IS PRIMARY CARRIER OF NEUTRAL LIPIDS TO OOPLASM LIPID DROPLETS IN TELEOSTS, 10th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, 2014 年 5 月 29 日、Olhao、Portugal
- ② Hiramatsu, N., Todo, T., Sullivan, C.V., Reading, B.J., Matsubara, T., Ryu, Y.-W., Mizuta, H., Luo, W., Nishimiya, O., Wu, M., Mushirobira, Y. and Hara, A., OVARIAN YOLK FORMATION IN FISHES: MOLECULAR MECHANISMS UNDERLYING FORMATION OF LIPID DROPLETS AND VITELLOGENIN DERIVED YOLK PROTEINS, 10th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, 2014 年 5 月 29 日、Olhao、Portugal
- ③ Goto, R., Ryu, Y.-W., Kurita, K., Matsubara, T., Yamauchi, K. and Nagahama, Y., VISUALIZATION AND MIGRATION OF PRIMORDIAL GERM CELLS IN A MARINE FISH, THE JAPANESE ANCHOVY, ENGRAULIS JAPONICAS, 10th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, 2014 年 5 月 29 日、Olhao、Portugal
- ④ 後藤理恵・松原孝博・柳 蓉芸・山羽悦郎・山内皓平・長濱嘉孝、海産魚卵顕微注入法の開発と評価。平成 26 年度日本水産学会秋季大会。2014 年 9 月 21 日。九州大学 (箱崎)

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 孝博 (MATSUBARA TAKAHIRO)
愛媛大学南予水産研究センター 教授
研究者番号：60443389

(2) 研究分担者

三浦 猛 (MIURA TAKESHI)
愛媛大学南予水産研究センター 教授
研究者番号：00261339

太田 耕平 (OHTA KOHEI)
愛媛大学南予水産研究センター 准教授
研究者番号：10585764

(3) 連携研究者

持田 和彦 (MOCHIDA KAZUHIKO)
水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所 グループ長
研究者番号：00371964

澤口 小有美 (SAWAGUCHI SAYUMI)
水産総合研究センター西海区水産研究所 研究員
研究者番号：40553087

三浦 智恵美 (MIURA CHIEMI)：
愛媛大学南予水産研究センター 講師
研究者番号：90518002