

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651240

研究課題名(和文) ホヤ精子誘引物質の合成・分泌経路からみた誘引物質の種特異的分化機構の解明

研究課題名(英文) Study on biosynthesis and secretion mechanisms of the sperm attracting factor in ascidians

研究代表者

吉田 学 (Yoshida, Manabu)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60301785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：多くの動物では、受精に先立ち卵から放出される物質によって精子が誘引される。この精子誘引作用は多くの場合種特異的であると考えられている。しかしこの誘引物質の卵での合成・分泌経路は全くの未知であるため、シグナル伝達系の普遍性と種特異性については全く解っていなかった。本研究では、カタユウレイボヤ精子誘引物質SAAFの合成・分泌経路のメカニズムの解明を進め、近縁他種の機構と比較することで、受精における精子誘引の種多様性のメカニズムについて考察することを目標とした。

研究成果の概要(英文)：Sperm attraction of the egg found in many animals is believed to be a species-specific phenomenon in many cases. However, biosynthesis and secretion pathway of the sperm attractant in eggs is almost unknown. In this study, we tried to understand the universality and biodiversity of the sperm attraction system. First, in order to elucidate biosynthesis pathway and secretion of the sperm attractant SAAF, we have tried to comprehensive analysis of gene expression during oogenesis by RNA-seq analysis. Second, we have tried to identify sperm attractant from the ascidians related to *Ciona intestinalis*, and finally we identified the sperm attractant from the ascidian *Ascidia sydneiensis*.

研究分野：生殖生物学

キーワード：受精 生体分子 生理活性物質 シグナル伝達 生体生命情報学 RNA-Seq

1. 研究開始当初の背景

「受精」という生命にとって重要なイベントを、効率的、かつ正常に行うための戦略として、卵の精子誘引作用(精子走化性)が知られている。この現象は、体外受精をする多くの動物門において種特異的な反応であり、同種の精子と卵子を確実に出会わせ、受精の確率を高めるシステムとして、非常に興味深い戦略システムである。しかし、精子活性化・誘引物質に関しては植物におけるシダや褐藻類、動物におけるサンゴ、ウニ、ホヤ等の一部の種で同定されているのみで、研究開始時点で分子機構はほとんど何も分かっていなかった。さらに、卵側からの精子誘引物質放出機構に関する研究も皆無であった。申請者等は、研究開始時点までに尾索動物カタコウレイボヤの卵から放出される精子誘引物質 SAAF がポリヒドロキシステロール硫酸抱合体 (25S)-3 α ,4 β ,7 α ,26-tetrahydroxy-5 α -cholestane-3,26-disulfate であることを明らかにし、さらにこの分子のコレスタン骨格の 3 位と 26 位に配位する硫酸基が精子活性化・誘引活性に必須である事を示していた。また、これまで顧みられていなかった精子誘引物質の分泌系にも着目し、カタコウレイボヤでは SAAF の放出に VCP/p97 が関わっていることを明らかとしていた。しかし SAAF の卵内での合成経路は全くもって不明なままであった。ホヤでも精子誘引作用が種特異的であることが知られているが、ポリヒドロキシステロールのような低分子有機化合物がなぜ種特異的に多様性をもち、精子走化性という普遍的な反応を種特異的に起こしうるのか、全く不明であった。一方、カタコウレイボヤでは、ゲノム及び EST 解析により性ステロイドの受容体及び合成酵素の多くが欠損していることが知られており、SAAF を含むステロイド代謝経路は全く独自のもので、この誘引物質合成経路の種特異性が誘引物質の多様性につながり、種特異性に至っていると予想された。

2. 研究の目的

多くの動物では、受精に先立ち、卵から放出される化学物質によって精子が誘引される。この卵による精子誘引作用は種特異的で、尾索動物ホヤでは種毎に異なったポリヒドロキシステロール硫酸抱合体が種特異的な精子誘引物質として働いていると考えられる。しかしこの誘引物質の卵での合成・分泌経路は全く未知であるため、どの部分が種を超えて普遍的なメカニズムであるか、どのようにそこから種特異的な誘引物質が形成するのに至ったか、全く不明である。

そこで本研究では、本質的に種特異的で

ある受精システムの普遍性と種特異的分化のメカニズムの理解を進める目的で、種特異性をもつ卵の精子誘引作用を題材に種の特異性と普遍性の比較解析を行うことを目的とした。

まず、精子誘引物質の構造が明らかとなっていないカタコウレイボヤを題材に、基準となる分子機構の解明のため、カタコウレイボヤ精子誘引物質 SAAF の合成・分泌経路の解明を進めることを目標とした。具体的には、カタコウレイボヤ精子誘引物質 SAAF 合成に関わる酵素群、及び cholesterol から SAAF に至るまでの中間生成産物を網羅的に調べ、さらにその合成経路が働くステージも調べることで、SAAF がいつ、どのように卵内で合成されているのかの大まかな骨格を解明することを達成目標とした。

次に近縁他種の精子誘引物質を同定して比較することで、卵での精子誘引物質合成・分泌のメカニズムを解明すると同時に、種の多様性が生じるメカニズムについても迫ることを目標とした。期間内には、カタコウレイボヤ近縁他種の精子誘引物質の構造を完全決定することを達成目標とした。

さらに、主に魚類等を中心にした、ホヤ以外の受精における卵と精子の相互作用についても調べ、将来的により普遍的な受精システムの理解につながる基礎を得ることも目指した。

3. 研究の方法

(1) カタコウレイボヤ卵における SAAF の合成経路の解明:

精子誘引物質 SAAF は成熟した未受精卵から放出されるが、SAAF の合成経路は全く不明である。そこで SAAF 合成経路の解明を目指した。

まず SAAF 合成の最終過程と考えられる硫酸抱合反応について、その反応を司るスルフォトランスフェラーゼの同定を行い、qPCR 法や *in situ* hybridization 法により発現の分布と時期を調べた。研究当初に計画していた、ラジオアイソトープを用いたトレーサー実験による SAAF 合成における中間生成産物の同定は、実験を予定していた東京大学臨海実験所の RI 施設が廃止されたため、実施することができなかった。

また、SAAF 合成系を司る酵素群の同定も試みた。SAAF を合成している時期の卵(初期卵母細胞、成熟卵母細胞、および未受精卵)を一個体より約 100 細胞ずつ、計 3 個体より mRNA を抽出し、次世代 DNA シーケンサ HiSeq (Illumina) を用いた RNAseq 解析を行い、SAAF 合成経路に関わりそうなステロイド代謝酵素の存在を網羅的に探索した。

(2) カタコウレイボヤ卵における SAAF の分泌調節機構の解明：

これまでの研究により、SAAF は卵成熟の過程で卵核胞崩壊後から卵内に存在し、受精後に分泌されなくなることがわかっている。また卵よりの SAAF の分泌については、これまでの申請者らの研究により VCP/p97 と未同定の ABC トランスポーターが関与していることが示唆されている。そこで分泌に関わる分子機構について検討した。

まず、SAAF 合成・分泌に関わると思われる既知の分子について、qPCR 法および *in situ* hybridization 法で発現を解析した。また、分泌に関わるトランスポーターを、卵母細胞の RNAseq 解析で網羅的に探索することを試みた。

(3) 精子走化性の分子機構における種特異性と普遍性の理解：

種特異性のある精子走化性の普遍的な分子機構を理解するため、カタコウレイボヤでの知見をベースにして検討することを目指した。まず、カタコウレイボヤと同族別種である *Ciona savignyi*、および近縁かつ別属のボヤである 2 属 4 種 (*Phallusia mammilata*, *P. nigra*, *Ascidia ahodori* (ナツメボヤ), *A. sydneyensis* (スジキレボヤ)) における精子活性化並びに走化性の特異性について、詳細に解析を行った。また、カタコウレイボヤと同様の手法を用い、これらの種の精子誘引物質の精製を行った。精製が成功した *A. sydneyensis* の精子誘引物質については、連携研究者により、NMR を用いた構造決定を行った。

また、魚類を用いて受精時における精子の運動・受精能の調節機構についての基礎的データの取得を行った。

4. 研究成果

(1) カタコウレイボヤ卵における SAAF の合成系路の解明：

SAAF 合成の最終過程である硫酸転移酵素 (Sulfotransferase, SULT) の発現の網羅的な同定を試みた。その結果、24 個ある SULT 農地、14 個の遺伝子が卵巣で発現していることが PCR で確認された。こららの全ての遺伝子のクローニングを行い、*in situ* hybridization を行ったところ、これまでに初期卵母細胞で高発現している 6 つの SULT を同定した。また、さらに qPCR 法による解析を行い、初期卵母細胞で発現量が多い 4 つの遺伝子を同定した (学会発表 3)。

また、卵母細胞の RNA-seq データ解析を行い、網羅的な解析を試みた。その結果、いくつかの SAAF 合成に関わる酵素と思われる遺伝子の発現が確認された (未発表)。現在、ステージで発現の差異のある遺伝子の網羅的な解析を進めている途上である。(未発表)

(2) カタコウレイボヤ卵における SAAF の分泌調節機構の解明：

まず、SAAF と結合することがわかっており、SAAF 分泌に関わるとされる VCP/p97 について、PCR および *in situ* hybridization 法により解析を行ったところ、卵形成に従って卵細胞内で発現していることが明らかとなった (学会発表 7)。

また、卵母細胞の RNA-seq データ解析により、VCP/p97 が初期卵母細胞で高発現し、それが未受精卵まで維持されていることが確認された (未発表)。

(3) 精子走化性の分子機構における種特異性と普遍性の理解：

カタコウレイボヤとその近縁種における精子活性化および走化性の特異性に関する詳細な解析を行った。その結果、過去にも言われていたように、おおむね種の特異性が見られたが、詳細に見ると同属間や、異種間での精子誘引が見られる組み合わせがあった。おもしろいことに、ある特定の種間 (*C. savignyi* と *A. sydneyensis*) では片方向性の種間誘引があった (論文 4)。

またカタコウレイボヤ以外の精子誘引物質の同定を行い、スジキレボヤ *A. sydneyensis* のみ最終的な構造決定に成功した (論文 3)。

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 5 件)

1. Miyashiro, D. Shiba, K., Miyashita, T., Baba, S., Yoshida, M., and Kamimura, S. Chemotactic response with a constant delay-time mechanism in *Ciona* spermatozoa revealed by a high time resolution analysis of flagellar motility. ***Biology Open* 4**:109-118 (2015). doi: 10.1242/bio.20137351 査読有

2. Gallego, V., Pérez, L., Asturiano, J. F., and Yoshida, M. Sperm motility parameters and spermatozoa morphometric characterization in marine species: a study of swimmer and sessile species. ***Theriogenology* 82**(5):668-676 (2014). doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.05.026. 査読有

3. Matsumori, N., Hiradate, Y., Shibata, H., Oishi, T., Simma, S., Toyoda, M., Hayashi, F., Yoshida, M., Murata, M., and Morisawa, M. A Novel Sperm-Activating and Attracting Factor (SAAF) from the Ascidian *Ascidia sydneyensis*. ***Organic Letters*, 15**(2):294-297 (2013). doi: 10.1021/ol303172n 査読有

4. Yoshida, M., Hiradate, Y., Sensui, N., Cosson, J., and Morisawa, M.

Species-specificity of sperm motility activation and chemotaxis: a study on ascidian species. *Biological Bulletin*, 224(3):156-165 (2013). <http://www.biobull.org/content/224/3/156.abstr> 査読有

5. Sensui, N., Yoshida, M. and Tachibana, K. Role of Mos/MEK/ERK cascade and Cdk1 in Ca^{2+} oscillations in fertilized ascidian eggs. *Developmental Biology* 367, 208-215 (2012). doi: 10.1016/j.ydbio.2012.05.011 査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 有馬大貴、筒井秀和、吉田 学、岡村康司 発現系を用いた CatSper チャネルの機能解析 日本動物学会第 85 回大会 東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市) 2014 年 9 月 11-13 日

2. 吉田 薫、坂本恵香、稲葉一男、吉田 学 精子走化性における膜型カルシウム ATPアーゼの役割 日本動物学会第 85 回大会 東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市) 2014 年 9 月 11-13 日

3. 小野千紘、坂本恵香、吉田 薫、吉田 学 カタユレイボヤ精子誘引物質 SAAF 合成にかかわる硫酸転位酵素の探索 日本動物学会第 85 回大会 東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市) 2014 年 9 月 11-13 日

4. 山本拓也、小坂浩司、鳥飼浩平、吉田 薫、大石 徹、吉田 学 SAAF 誘導体の活性比較による SAAF の作用メカニズムの考察 日本動物学会第 85 回大会 東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市) 2014 年 9 月 11-13 日

5. 渡部友博、海老根真琴、柴田 一、土川博史、松森信明、村田道雄、吉田 学、森沢正昭、大石 徹 スジキレボヤから単離された精子活性化誘引物質の構造決定と化学合成 第 56 回天然有機化合物討論会 高知県立県民文化ホール他(高知県高知市) 2014 年 10 月 15-17 日

6. Yoshida, K., Shiba, K., Nakashima, A., Sakamoto, A., Matsunaga, S., Inaba, K., and Yoshida, M. Sperm chemotaxis is mediated by calcium extrusion via plasma membrane Ca^{2+} -ATPase and Na^+/Ca^{2+} exchanger. *The 12th International Symposium on Spermatology*, Newcastle City Hall, Newcastle, NSW, Australia, 8th - 14th August 2014

7. 坂本恵香、吉田 薫、吉田 学 カタユレイボヤ精子誘引物質 SAAF の卵からの放出にかかわる分子の解析 日本動物学会第 65

回関東支部会 東京 2013 年 3 月 16 日

8. 吉田 薫、坂本恵香、稲葉一男、吉田 学 Plasma membrane Ca^{2+} /ATPase concerning sperm chemotaxis in the ascidian *Ciona intestinalis* 第 36 回日本分子生物学会年会 神戸 2013 年 12 月 3-6 日

9. Yoshida M., Matsumori N, Hiradate Y, Sensui N, Cosson J, Shibata H, Oishi T, Murata M and Morisawa M. Species-specificity of sperm motility activation and chemotaxis: a study on ascidian species. *Gordon Research Conference: Fertilization and the Activation of Development*, Plymouth, NH, USA, July. 14-19, 2013.

10. Ono C, Maruyama K, Sakamoto A, and Yoshida M. CatSper mediates sperm penetration into the vitelline membrane in the Ascidian *Ciona intestinalis*. *Gordon Research Conference: Fertilization and the Activation of Development*, Plymouth, NH, USA, July. 14-19, 2013.

11. 小野千紘、丸山虎轍、吉田 学 カタユレイボヤの受精における精子特異的チャネル CatSper の働き 日本動物学会第 83 回大会 大阪 2012 年 9 月 13-15 日

12. 泉水 奏、柴 小菊、馬場昭次、稲葉一男、吉田 学 pH によるホヤ卵からの精子誘引物質放出の制御 日本動物学会第 83 回大会 大阪 2012 年 9 月 13-15 日

13. 大倉信彦、吉田 学、泉水 奏 海水中に取り出されたホヤ卵の形態変化 日本動物学会第 83 回大会 大阪 2012 年 9 月 13-15 日

14. Yoshida, M. Sperm chemotaxis in the ascidians. *The International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants*, Nagoya, Japan. November 12-16, 2012.

15. Ono, C., Maruyama, K., Sakamoto, A., and Yoshida, M. Role for CatSper, Sperm-Specific Ca^{2+} Channel in Fertilization of the Ascidian *Ciona intestinalis*. *The International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants*, Nagoya, Japan. November 12-16, 2012.

〔図書〕(計 2 件)

1. Yoshida, M. Sperm chemotaxis: the first authentication events between conspecific gametes before fertilization. *in "Sexual Reproduction in Animals and Plants."* (Ed. by H. Sawada, N. Inoue, & M. Iwano), Springer, Tokyo

Japan. (2014) pp3-11. ISBN 978-4-431-54588-0

2. 稲葉一男、柴 小菊、吉田 学 第 17 章
精子運動の活性化と走化性 **動物の受精学**
澤田 均 編 化学同人 (2014)
pp286-300. ISBN: 978-4-759815-12-2

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 学 (YOSHIDA, Manabu)
東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号: 60301785

(2) 研究分担者

吉田 薫 (YOSHIDA, Kaoru)
桐蔭横浜大学・先端医用工学センター・講師
研究者番号: 70398973

(3) 連携研究者

村田 道雄 (MURATA, Michio)
大阪大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 40183652