

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440169

研究課題名(和文)精子CO2センシングの分子基盤

研究課題名(英文)Molecular bases for CO2 sensing in spermatozoa

## 研究代表者

広橋 教貴 (HIROHASHI, Noritaka)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：90376997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヤリイカにおいて小型(スニーカー)雄の精子の持つ受精能持続時間と鞭毛運動持続時間が大型(コンソート)雄の精子に比べ顕著に長いことを見つけた。内的要因は、グリコーゲン蓄積量の違いであり、さらに細胞内へのグルコース取込みと乳酸排出がスニーカー精子でより効率的であった。乳酸排出による酸性化は二酸化炭素で誘導される自己集合体を安定化させる。精子集合は局所的な低酸素状態を引き起こし、これが代謝経路の変化と精子生存(長寿命)を確立する。これらの結果と比較オーム解析から、交尾後生殖環境が精子寿命を規定し、寿命は生得的なエネルギー量と代謝経路の調節によって決定されることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：In squids, two types of male mating behavior are causally associated with adult body size. Males inseminate promiscuously with the same females; large “consort” males internally, and small “sneaker” males externally. Previously we found that in *Heterololigo bleekeri*, only sneaker spermatozoa are able to swarm, suggesting that a swarming trait might have arisen in sneakers as a “sperm cooperation” strategy among sibling sperm to compete with consorts, or as a consequence of adaptation to external fertilization. Notably, only sneaker spermatozoa inseminated long before egg spawning can be stored in the seminal receptacle. We found that they exhibited greater persistence in fertilization competence and flagellar motility than consort ones owing to larger amount of flagellar glycogen. These results, together with comparative omics analyses, suggest that postcopulatory reproductive contexts define sperm longevity by modulating the inherent energy levels and metabolic pathways.

研究分野：生殖生物学

キーワード：mating behavior promiscuity sneaker males reproduction spermatozoa glycogen

## 1. 研究開始当初の背景

種内異型雄の出現は分断選択による進化的プロセスの結果と一般に考えられる。イカ類において、雄が示す2つの異なる交接様式(代替繁殖戦略)は成体サイズに深く関連する(文献1)。つまり、大型の雄は雌の体内へ、小型雄は雌の体外(体表部)へ精莢(精子カプセル)を付着させる。これまで我々は、ヤリイカにおいて小型(スニーカー)雄の精子は、精子自ら排出する二酸化炭素に反応して、自己集合体を形成する形質が備わることを見いだしてきた(文献2, 3)。これが生じる進化メカニズムとして、1)大型(コンソート)雄の精子と受精を争うためにスニーカー精子があみだした「精子同盟」戦略によるものか、あるいは2)雌体外部への精子受け渡しによって生じる外部環境への適応によって進化した可能性が考えられる(文献3)。2型雄による媒精位置の違いは、その後の精子の受精過程の違いを生じさせる結果に繋がる。すなわち、スニーカー精子は雌周口部から雌貯精嚢へ移動し、そこで長期間(最長何ヶ月も)受精を待つ。一方、コンソート精子は産卵直前に雌体内の輸卵管側に受け渡され、すぐに受精する。大小雄の交接行動に見られる違いは、その受け渡し位置もさることながら、媒精から受精までにかかる時間の差も注目すべき点である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、同種内でありながら雄が2つの異なる繁殖様式をもち、その結果精子の形質において顕著な分断的な進化を遂げたヤリイカをモデルに、獲得した形質の適応意義を見つけることである。とくに生殖に不利な弱小雄が優れた精子を生産することによって、受精過程のどの局面でその形質が発揮されているか、を明らかにする。またその形質を作動させる生理メカニズム、分子メカニズムについて解明することである。

## 3. 研究の方法

これまでの研究方法では、まずスニーカー精子とコンソート精子の形態、遊泳行動、構成タンパク質(プロテオーム)、発現遺伝子(精巢 RNA-seq)の比較解析により、両者の違いを見いだしてきた。しかし本研究では、まずヤリイカにおける2種類の雄の生殖様式から、顕著な違いを抽出した。スニーカー雄の精子は雌精子貯蔵器官に蓄えられること。貯蔵期間は1ヶ月にも及ぶことから、寿命がコンソート精子と比較して格段に長いこと。以上の2つより、スニーカー精子には、長期保

存に適した形質が備わっているという仮説を立て、実験を計画した。

## 4. 研究成果

### (1)受精能の持続時間の測定

精莢を刺激して放出した精子を海水中に希釈保存し、一定時間後に雌卵管より採取した成熟卵に媒精し、受精率を計数したところ、スニーカー精子の受精能は希釈後30分を経過してもほとんど低下しなかったのに対し、コンソート精子では受精率が激減した。雌の貯精嚢に蓄えられた精子についても調べたところ、新鮮なコンソート精子より有意に長く受精能を維持した。これらのことから、精子細胞自体に異なる寿命(受精能)が賦与されていることが分かった。

### (2)遊泳運動持続時間の比較

受精能の違いが精子運動性に原因するか調べるため、前の実験と同様に、希釈後の各種運動パラメーターを精子解析装置(SMAS)で調べた。予想通り、スニーカー精子の運動性は30分以上高いままであったが、コンソート精子は30分以内に劇的に低下した。

### (3)精子細胞内に蓄えられたエネルギー源の同定と定量

我々は以前に精子プロテオーム解析を行い、両者の違いとして解糖系関連酵素を見いだしていた(文献4)。また、先行研究では頭足類精子において、解糖系を使って運動することが報告されていた(文献5)。そこでグリコーゲンの定量を行ったところ、スニーカー精子の方が顕著に多くのグリコーゲンをもちことが分かった。さらに、40分間遊泳させると、スニーカー精子もコンソート精子も蓄積グリコーゲン量が減少し、その差がほとんど無くなった。精莢の組織切片をもちいたPAS染色(糖などを染色)により、スニーカー精子がより強く呈色した。

つぎに精莢内精子の横断面切片を作成し、透過型電子顕微鏡で観察すると、鞭毛内に電子密度の高い微少顆粒が観察され、粒子径からグリコーゲン顆粒と思われた。遊泳後の精子ではほとんど見られなかったことからグリコーゲン顆粒であることが示唆される。新鮮な2タイプの精子で切片を作成し顆粒密度を比較すると、やはりスニーカー精子の方が圧倒的に多かった。細胞内の分布は、鞭毛基部に少なく、中央付近から尾部にかけて密度が高い。

### (4)長期保存を可能にする環境要因の同定

グリコーゲンの蓄積量の違いは希釈後の遊泳時間に現れたが、違いはわずか1時間以内である。しかしスニーカー精子は1ヶ月以上も保存されることから、他の要因が必要である。タコの精子において、細胞外グルコースを取り込んで遊泳することが報告されていたので(文献5)、海水に1mM glucoseを加えると、スニーカー、コンソートともに遊泳持続時間が時間単位から数日単位に変化した。グルコース取り込み能力はスニーカーがコンソートより高く、解糖系の最終産物である乳酸の排出量は、同様にスニーカー>コンソートであった。

#### (5)嫌氣的条件下における寿命延命効果

雌の精子保存器官(貯精囊)がどのような化学的・物理的組成なのか未だ分からないが、鳥類において貯精囊内は嫌氣的であることが報告されている(文献6)。そこで精子を嫌氣的な海水中へ置くと、スニーカー精子は寿命が長くなるのに対し、コンソート精子は変化がなかった。さらに、スニーカー精子だけが示す自己集合形質について寿命との関連を調べた。集合を形成した場合、集合を阻害された精子より寿命が長くなった。

以上の結果より、スニーカー精子には内的要因(保存グルコース量)と外的要因(嫌氣環境における延命)と内外を結ぶ要因(効率的な細胞外グルコース利用)が協同的に作用し、受精環境に適応している。さらに以前発見したスニーカー精子の自己集合反応も寿命に関係していることを新たに見つけた。

#### <引用文献>

1) Iwata, Y., Shaw, P., Fujiwara, E., Shiba, K., Kakiuchi, Y., and Hirohashi, N. (2011) Why small males have big sperm: dimorphic squid sperm linked to alternative mating behaviours. *BMC Evol Biol* **11**, 236

2) Hirohashi, N., Alvarez, L., Shiba, K., Fujiwara, E., Iwata, Y., Mohri, T., Inaba, K., Chiba, K., Ochi, H., Supuran, C. T., Kotzur, N., Kakiuchi, Y., Kaupp, U. B., and Baba, S. A. (2013) Sperm from sneaker male squids exhibit chemotactic swarming to CO<sub>2</sub>. *Curr Biol* **23**, 775-781

3) Hirohashi, N., and Iwata, Y. (2013) The different types of sperm morphology and behavior within a single species: Why do sperm of squid sneaker males form a cluster? *Commun Integr Biol* **6**, e26729

4) Yoshida, M. A., Yamada, L., Ochi, H., Iwata, Y., Tamura-Nakano, M., Sawada, H., Sauer, W. H., Ogura, A., and Hirohashi, N. (2014) Integrative omics analysis reveals differentially distributed proteins in dimorphic euspermatozoa of the squid, *Loligo bleekeri*. *Biochem Biophys Res Commun* **450**, 1218-1224

5) Mann, T., Martin, A. W., Thiersch, J. B., Lutwak-Mann, C., Brooks, D. E., and Jones, R. (1974) D(-)-Lactic Acid and D(-)-Lactate Dehydrogenase in Octopus Spermatozoa. *Science* **185** 453-454

Sasanami, T., Matsuzaki, M., Mizushima, S., and Hiyama, G. (2013) Sperm storage in the female reproductive tract in birds. *J Reprod Dev* **59**, 334-338

#### 5. 主な発表論文

[雑誌論文] (計9件)

1. Noritaka Hirohashi, Tomohiro Iida, Noriyosi Sato, Sauer H.H. Warwick, Yoko Iwata. Complex adaptive traits between mating behaviour and post-copulatory sperm behaviour in squids. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 2016 *In press*

2. Toshiaki Yamamoto, Noritaka Hirohashi, Eiji Fujiwara, Tatsuya Suzuki, Hatsuna Maruta, Hirotake Omiya, Shigeru Kitanishi, Relationships between body size and secondary sexual characters, and sperm characters in male Dolly Varden char (*Salvelinus malma*). *Ecology of Freshwater Fish 2016 on line* DOI: 10.1111/eff.12283

3. Hirohashi N., Site of Mammalian Sperm Acrosome Reaction. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2016;220:145-58. doi: 10.1007/978-3-319-30567-7\_8.

4. La Spina FA, Puga Molina LC, Romarowski A, Vitale AM, Falzone TL, Krapf D, Hirohashi N, Buffone MG. Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct., *Dev Biol.* 2016 Mar 15;411(2):172-82. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.02.006.

5. Matsuzaki M, Mizushima S, Hiyama G,

- Hirohashi N, Shiba K, Inaba K, Suzuki T, Dohra H, Ohnishi T, Sato Y, Kohsaka T, Ichikawa Y, Atsumi Y, Yoshimura T, Sasanami T. Lactic acid is a sperm motility inactivation factor in the sperm storage tubules. *Sci Rep*. 2015 Dec 1;5:17643. doi: 10.1038/srep17643
6. Nakamachi T, Ishida H, Hirohashi N., Sound production in the aquatic isopod *Cymodoce japonica* (Crustacea: Peracarida)., *Biol Bull*. 2015 Oct;229(2):167-72., PMID: 26504157.
  7. Hirohashi N, Spina FA, Romarowski A, Buffone MG., Redistribution of the intra-acrosomal EGFP before acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *Reproduction*. 2015 Jun;149(6):657-63. doi: 10.1530/REP-15-0017.
  8. Yoshida MA, Yamada L, Ochi H, Iwata Y, Tamura-Nakano M, Sawada H, Sauer WH, Ogura A, Hirohashi N., Integrative omics analysis reveals differentially distributed proteins in dimorphic euspermatozoa of the squid, *Loligo bleekeri*., *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Aug 1;450(3):1218-24. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.076.
  9. Buffone MG, Hirohashi N, Gerton GL., Unresolved questions concerning mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Biol Reprod*. 2014 May;90(5):112. doi: 10.1095/biolreprod.114.117911.
- [学会発表] (計 13 件)
1. Noritaka Hirohashi. “The molecules supporting fertilization and their surrounding molecular environment” 日本分子生物学会年会ワークショップ: 2015年12月4日 神戸国際会議場(神戸市)
  2. Tomohiro Iida and Noritaka Hirohashi. How squid sperm determine directional changes in a pH gradient. *Cephalopod International Advisory Council (CIAC) 2015*, 2015年11月12日函館国際ホテル(函館市)
  3. Noritaka Hirohashi. Are the sperm smarter than their donors?? *Cephalopod International Advisory Council (CIAC) 2015*, 2015年11月11日函館国際ホテル(函館市)
  4. Yoko Iwata, Noritaka Hirohashi, Yoshiro Watanabe, Paul Shaw and Warwick H.H. Sauer. “Strategic sperm release from spermatophores in loliginid squids responding to sperm competition risk.” *Cephalopod International Advisory Council (CIAC) 2015*, :2015年11月11日函館国際ホテル(函館市)
  5. Noritaka Hirohashi. “Complex adaptive ejaculate traits in relation to alternative reproductive tactics in *Heterololigo bleekeri*.” *CIAC2015 workshop* :2015年11月9日 函館市国際水産・海洋総合研究センター(函館市)
  6. 飯田智宏、広橋教貴 日本動物学会年会「ヤリカスニーカー精子におけるpH勾配に対する方向転換」: 2015年9月19日 朱鷺メッセ(新潟市)
  7. 広橋教貴 日本動物学会シンポジウム「受精から生殖システムの進化を考える」: 2015年9月18日 朱鷺メッセ(新潟市)
  8. 広橋教貴 日本生理学会シンポジウム「Regulatory mechanisms of sperm properties toward fertilization success」: 2015年3月21日 神戸国際会議場(神戸市)
  9. 広橋教貴 第16回隠岐地域水産振興シンポジウム「隠岐近海のシロイカ資源の将来」: 2015年3月19日 マリンポートホテル海士(海士町)
  10. 広橋教貴 山田科学成果発表会「**頭足類**生殖システムにおける代替的適応形質の制御基盤」: 平成26年5月31日 東京コンファレンスセンター有明(東京都)
  11. 広橋教貴 8大学合同公開臨海実習「弱者の子孫繁栄術-イカの場合-」: 2014年9月24日 広島大学向島臨海(尾道市)
  12. 広橋教貴 理化学研究所ケミカルバイオロジー勉強会「**頭足類**の代替生殖戦術」:

2014年10月1日 理化学研究所(和光市)

13. 広橋教貴 日本動物学会シンポジウム  
「性的対立～対立の構図：行動から分子へ」:2014年9月11日 東北大学(仙台市)

[図書] (計1件)

1. Noritaka Hirohashi, Carbohydrate-based gamete recognition during the sperm acrosome reaction in sea urchins. in

Glycoscience: Biology and Medicine, Eds.N. Taniguchi 2015; Springer Japan

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.ipc.shimane-u.ac.jp/ercbr/jikkenjo/mbss.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

広橋 教貴 (HIROHASHI Noritaka)  
島根大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号: **90376997**