

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07165

研究課題名(和文) 体内受精様式の成立に関わる輸卵管の機能進化の実証的研究

研究課題名(英文) Studies on molecular mechanisms for functional evolution of oviduct to establish internal fertilization

研究代表者

渡辺 絵理子 (WATANABE, ERIKO)

山形大学・学士課程基盤教育機構・准教授

研究者番号：20337405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集技術により、体内受精の鍵となる精子運動開始因子(SMIS)の、システインノット(CK)構造に関わる領域を欠損した遺伝子改変アカハライモリを作成し、SMISが合成される輸卵管の分泌物のウェスタンブロット解析により、活性に関わるSMISの重合状態等にCK構造が重要であることが示唆された。また、RNAseqによりシリケンイモリとトウホクサンショウウオのSMIS遺伝子の全塩基配列と部分配列をそれぞれ同定し、CK構造が保存されていることが示唆された。さらに、ウェスタンブロット解析により、樹上受精種の一部でSMISに分子量変化を伴う差異が認められ、異なる受精環境への適応との関連性が推察された。

研究成果の概要(英文)：Sperm motility-initiating substance (SMIS) is a key protein for the internal fertilization of *Cynops pyrrhogaster*. The deduced amino acid sequence of SMIS cDNA included 14 cysteine residues, and 6 of them construct the cysteine knot (CK) motif. CK motif is thought to mediate protein polymerization and stabilize protein conformation. 1) We performed genome editing using CRISPR/Cas9 system for targeting to 4th cysteine residues of the CK motif. Western blotting using the anti-SMIS antibodies revealed that the lack of the 4th cysteine resulted in the change of polymerization and/or conformation status of SMIS in correlation with the physiological activity. 2) SMIS genes of *Cynops ensicauda* and *Hynobius lichenatus* were identified by RNAseq and found the presence of the CK motif in the deduced amino acid sequences. 3) By the Western blotting, differences in the molecular sizes and the possible polymerization status were suggested among species that undergo distinct mode of reproduction.

研究分野：発生生物学

キーワード：体内受精 ゲノム編集 機能進化 輸卵管 精子運動 両生類

1. 研究開始当初の背景

両生類には、水中や陸上の様々な環境に適応した生殖様式の多様化が見られ、その結果確立された体内受精様式は両生類の陸上環境への適応に大きく貢献した。精子運動開始因子 (Sperm motility initiating substance: SMIS) は異なる様式で生殖を行う両生類の種間で保存されており、生殖環境に適応した特有の構造を持つ卵外被を通過するための特異的な精子運動を引き起こす。アカハライモリの体内受精では、SMIS は、卵外皮であるゼリー層の最外層の顆粒構造に局在し、メスの貯精嚢に貯蔵された精子がゼリー層表面に直接媒精されると、精子に作用して受精のための運動を開始させる。アカハライモリでは、SMIS が体内受精成立の鍵タンパク質となっている。SMIS はゼリー層内側の構成成分を分泌する輸卵管曲部、及び外側の構成成分を分泌する子宮の上皮細胞で合成され、輸卵管内腔に分泌される。ゼリー層の顆粒構造中では重合して不活性な状態で存在しており、顆粒構造を覆って外部から隔離しているシート構造中のリガンドが誘起する精子先体反応により活性化されることが予測されている。顆粒構造への SMIS の局在が、先体反応と連携した独特の精子運動開始機構を成立させ、アカハライモリの体内受精様式の成立に大きな役割を果たしたのと考えられる。

2. 研究の目的

1) SMIS 遺伝子改変アカハライモリを作成し、これを用いて、SMIS の精子運動開始因子活性の発現に関連する顆粒構造への局在形成、及び受精時の SMIS 活性化の分子機構を明らかにする。

2) 異なる受精様式を持つ両生類の SMIS 相同遺伝子を同定、比較解析することにより体内受精様式成立に必要な SMIS 遺伝子構造の特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

1) CRISPER/CAS9 システムにより、SMIS 遺伝子改変アカハライモリを作成した。SMIS は 6 シス테인残基によりシステインノット構造を形成し、第 2 ループの C-末側に 7 アミノ酸残基からなる活性部位が存在する。活性部位の C-末側に存在する 4 番目のシス테인残基をターゲットとしたガイド RNA を合成し、CAS9 タンパク質とともに受精卵に注入した。発生した個体は性成熟まで飼育した。遺伝子改変の確認のために、ガイド RNA / CAS9 注入個体の尾から抽出したゲノム DNA をテンプレートとして、PCR によりターゲットを含む配列を増幅し、シーケンス解析を行った。目的とした遺伝子改変が確認された個体の輸卵管曲部及び子宮より分泌物を採取し、SMIS を特異的に認識する抗体を用いてウェスタンブロッティング

を行い、分泌物中に含まれる SMIS の状態を解析した。

2) アカハライモリ輸卵管曲部、シリケンイモリ輸卵管、トウホクサンショウウオ輸卵管及びモリアオガエル輸卵管より抽出したそれぞれの total RNA を用い、RNAseq を行った。得られた結果を Trinity を用いて de novo アセンブリし、NCBI の遺伝子データベースを用いてアノテーションした。これらの情報をデータベースとしてアカハライモリ SMIS に高い相同性をもつ配列を BLAST 検索した。

3) モリアオガエル、シュレーゲルアオガエル、リュウキュウカジガエル、シリケンイモリ、メキシコサンショウウオの輸卵管より分泌物を採取し、SMIS を特異的に認識する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、分泌物中に含まれる SMIS の状態を解析した。

4. 研究成果

1) 4 番目のシス테인残基をターゲットとした SMIS 遺伝子改変アカハライモリ作成により得られた KO1、KO2 の 2 個体を用いて輸卵管曲部及び子宮内の SMIS の存在状態を調べた。

KO1 では、SMIS のアミノ酸配列中の 4 番目のシス테인残基に隣接する C 末側の 2 アミノ酸残基の欠損が予想された (図 1: KO1b)。また、これに加えて、2 アミノ酸残基の置換と 1 アミノ酸残基の欠損した SMIS が混在することが予想された (図 1: KO1a)。KO2 では、4 番目のシス테인残基の欠損が予想された (図 1: KO2)。これらの 2 個体では、SMIS は野生型と変異型が混在して発現していることが予想された。

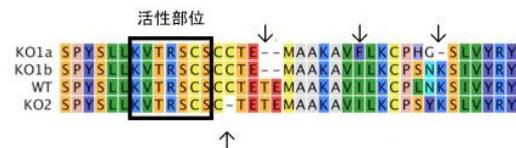


図 1 矢印で配列の変異を示す。矢印で示していない箇所のアミノ酸の違いは新規 SMIS ヴァリアント (研究結果 4) のものと考えられる。WT: 野生型

輸卵管曲部及び子宮から分泌物を採取し、SMIS の精子運動開始活性に対して中和作用を持つ抗 SMIS 抗体を用いて、ウェスタンブロッティングを行った。野生型では輸卵管曲部分泌物及び子宮分泌物中に約 28 kDa のバンドが検出されたが、子宮分泌物においてより多く検出された。KO1、及び KO2 においても同様のバンドは検出されたが、検出量が減少した。特に KO2 では顕著に減少し、子宮分泌物中と輸卵管分泌物中における検出量の差が野生型に比べて小さかった。

次に SMIS の活性部位に結合する抗 P2 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。野生型では輸卵管曲部及び子宮分泌物中に 96.5kDa、及び 17 kDa のバンドが検出され、子宮分泌物中にはこれらのバンドに加えて 22 kDa のバンドが検出された。KO1、及び KO2 では、96.5 kDa、及び 22 kDa のバンドの検出量が野生型と比べて減少した。さらに、KO2 では 17 kDa のバンドが子宮分泌物に検出されなかった。

アミノ酸配列から予想される SMIS の分子量は約 16kDa であり、検出された複数のバンドは SMIS の異なる重合状態及びコンフォメーションを反映すると考えられる。SMIS が精子運動開始を適切に行うためには、不活性な状態での顆粒構造への局在及び受精時の活性化に対応した適切な重合状態及びコンフォメーションを取る必要がある。ウエスタンブロッティング解析の結果は、システインノット構造を形成する 4 番目のシステイン残基と第 3 ループが、SMIS の重合及びコンフォメーションの形成に必要な領域であるとともに、活性の発現にも重要な役割を果たす領域であることを示唆する。

2) 異なる受精様式を持つ両生類の SMIS 相同遺伝子の同定

アカハライモリと同じ *Cynops* 属であり、体内受精を行うシリケンイモリの SMIS 相同遺伝子を、輸卵管の RNAseq により同定した。塩基配列より推定されたシリケンイモリ SMIS は、アカハライモリ SMIS と 91% の相同性を持つ C 末端側の 150 アミノ酸残基からなる配列の N 末側にさらに 25 残基からなるアミノ酸の配列が結合した構造を持ち、システインノット構造を形成する 6 システイン残基と活性部位は保存されていた。

一方、体外受精を行う有尾両生類であるトウホクサンショウウオの輸卵管の RNAseq により、アカハライモリ SMIS 遺伝子に高い相同性を持つコンティグ配列が得られた。このコンティグ配列から推定されるアミノ酸配列には活性部位のアミノ酸配列と、システインノット構造に關与するシステイン残基が保存されていた。体外受精種の SMIS 相同遺伝子が同定されたのは本研究が初めてである。体外受精を行うトウホクサンショウウオでは、淡水の低浸透圧により精子運動開始が引き起こされると考えられる一方、SMIS の精子運動開始への関与が示唆されている。今後、トウホクサンショウウオ SMIS 相同遺伝子の全塩基配列を決定し、アカハライモリ SMIS 遺伝子と比較することにより、SMIS の構造変化が体内受精成立に果たした役割がより一層明らかになると期待される。

また、輸卵管分泌物に由来する泡巣を用いて樹上受精を行うモリアオガエルから輸卵管を採取して RNAseq を行った。RNA を抽出する輸卵管の部位と抽出条件を検討し、HCG 投与による排卵誘発、繁殖期における野外採

集個体の使用など、様々な条件で繰り返し RNAseq を行ったが、アカハライモリ SMIS 遺伝子に相同性を持つコンティグ配列は得られなかった。そのために、遺伝子改変モリアオガエルの作成することができなかった。モリアオガエルの泡巣における SMIS の存在はウエスタンブロッティングにより示されており、モリアオガエルでは SMIS 相同遺伝子が発現する領域及びタイミングが極めて限定的であるものと考えられる。

3) 異なる受精様式を持つ両生類の SMIS のウエスタンブロッティングによる解析

ともに泡巣を用いた樹上受精を行うモリアオガエルとシュレーゲルアオガエルの輸卵管分泌物を採取し、SMIS の活性部位に結合する抗 P2 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。モリアオガエル輸卵管分泌物中には 83kDa、及び 17 kDa のバンドが検出された。それぞれ重合体及び単量体を認識すると考えられ、モリアオガエル SMIS はアカハライモリ SMIS と同様に重合体を形成することが示唆された。また、シュレーゲルアオガエルの輸卵管分泌物中には 83kDa のバンドは検出されたが、17kDa のバンドは検出されず、11kDa のバンドが検出された。同様の受精様式を持つこれらの 2 種の間においても SMIS の分子構造が変化していることが示唆された。モリアオガエル、シュレーゲルアオガエルと同じアオガエル科に属し、淡水中で体外受精を行うリュウキュウカジカガエルの輸卵管分泌物中には抗 P2 抗体が認識するバンドが検出されなかった。

アカハライモリと同様に体内受精を行うシリケンイモリでは、抗 P2 抗体により、輸卵管分泌物中に 88kDa、及び 17kDa のバンドが検出され、SMIS はアカハライモリ SMIS と同様の重合体を形成することが示唆された。一方、メキシコサンショウウオでは、抗 P2 抗体により輸卵管分泌物中に 15kDa のバンドのみが検出された。メキシコサンショウウオも体内受精を行うが、SMIS の構造変化により重合体形成の様式が異なることが示唆された。

以上の結果から、受精様式が異なる種の間だけでなく、体内受精、または樹上受精を行う種の間でも、SMIS の構造変化が起こっていることが示唆された。

4) アカハライモリ輸卵管曲部の RNAseq を行い、既知の SMIS 遺伝子とは異なる配列を持つ新規 SMIS ヴァリアントを発見した。システインノット構造を形成するシステイン残基、及び活性部位をコードする領域の塩基配列は保存されていた。SMIS と新規 SMIS ヴァリアントの遺伝子は、排卵誘発個体ではそれぞれ子宮と輸卵管局部で特異的に発現していた。この発現様式から、2 種類の SMIS が相互作用して、SMIS の特異的な局在や活性化機構を構築していることが示唆される。

今後、新規 SMIS ヴァリエントと、SMIS の生理活性との関係について解析を進める予定である。

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3件)

S. Kon, T. Sato, D. Endo, T. Takahashi, A. Takaku, Y. Nakauchi, F. Toyama, V. B. Meyer - Rochow, E. Takayama-Watanabe, A. Watanabe. Sperm storage influences the potential for spontaneous acrosome reaction of the sperm in the newt *Cynops pyrrhogaster*. Mol. Reprod. Dev. 査読有 84:1314-1322 2017 年

DOI: 10.1002/mrd.22932

T. Sato, M. Yokoe, D. Endo, M. Morita, F. Toyama, Y. Kawamura, Y. Nakauchi, E. Takayama-Watanabe, A. Watanabe. Sperm motility initiating substance may be insufficient to induce forward motility of *Cynops ensicauda* sperm. Mol. Reprod. Dev. 査読有 84:686-692 2017 年

DOI: 10.1002/mrd.22849

M. Yokoe, E. Takayama-Watanabe, Y. Saito, M. Kutsuzawa, K. Fujita, H. Ochi, Y. Nakauchi, A. Watanabe. 2016. A novel cysteine knot protein for enhancing sperm motility that might facilitate the evolution of internal fertilization in amphibians. PLOS ONE 査読有 11: e0160445. 2016 年

DOI: 10.1371/journal.pone.0160445

[学会発表](計16件)

高山—渡辺絵理子、佐藤多恵、中内祐二、渡邊明彦 ゲノム編集技術を用いた、アカハライモリ精子運動開始因子 SMIS の解析 日本動物学会第 8 9 回大会 2018 年

水戸慎也、西尾潤、高山—渡辺絵理子、外山史、渡邊明彦 アカハライモリ輸卵管で発現する新規 SMIS 遺伝子の同定 日本動物学会第 8 9 回大会 2018 年

渡邊明彦、渡辺絵理子、野口立彦 陸生動物の体内受精に関わる精子運動の適応的進化の分子基盤 第 3 回次世代両生類研究会 基礎生物学研究所(招待講演) 2017 年

高山 渡辺 絵理子, 水戸 慎也, 川村 勇樹, 渡邊 明彦 アカハライモリ卵ジェリー層における精子運動開始因子 SMIS の局在形成 日本動物学会第 8 8 回大会 2017 年

遠藤 大介, 近 紳之介, 渡辺 絵理子, 渡邊 明彦 NMDA チャネルはアカハラ

イモリ精子の先体反応と運動に關与する 日本動物学会第 8 8 回大会 2017 年
近 紳之介, 佐藤 多恵, 中内 祐二, 高山 渡辺 絵理子, 渡邊 明彦 イモリ精子の自発的先体反応能は精子貯蔵に關連して高まる 日本動物学会第 8 8 回大会 2017 年

Akihiko Watanabe, Shinnosuke Kon and Eriko Takayama-Watanabe Differences of intracellular signaling for autonomous acrosome reaction from that for the acrosome reaction at fertilization. WCRB2017 (国際学会) 2017 年

Daisuke Endo, Tae Sato, Misato Yokoe, Masaya Morita, Fubito Toyama, Yuuki Kawamura, Yuni Nakauchi, Eriko Takayama-Watanabe, Akihiko Watanabe Sperm motility substance may be insufficient no induce forward motility of *Cynops ensicauda* sperm. WCRB2017 (国際学会) 2017 年

Akihiko Watanabe, Eriko Takayama-Watanabe, Yuni Nakauchi Significance of Cav3.2 and TRPV4 in the adaptation of intracellular signaling for motility regulation to various reproductive environments in amphibian sperm 50th JSDB meeting (国際学会) 2017 年

遠藤大介、近紳之介、Viktor B Meyer-Rochow、渡辺絵理子、渡邊明彦 オスによる貯精がアカハライモリ精子の自発的先体反応能に及ぼす影響 日本動物学会平成 2 9 年度東北支部会 2017 年

佐藤多恵、渡邊絵理子、渡邊明彦 精子卵相互作用に関わる Ca²⁺透過性チャネルの選択的な利用 日本動物学会平成 2 9 年度東北支部会 2017 年

Eriko Takayama-Watanabe, Misato Yokoe, Masaya Morita, Akihiko Watanabe. Structure, localization, and function of the sperm motility-initiating substance of the sword-tailed newt, *Cynops ensicauda*. 87th meeting of the Zoological Society of Japan (国際学会) 2016 年

Tae Stoh, Tomoe Takahashi, Eriko Takayama-Watanabe, Akihiko Watanabe Multiple calcium-permeable channels differently mediate the regulation of sperm motility triggered by SMIS in the red-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*. 87th meeting of the Zoological Society of Japan (国際学会) 2016 年

Akihiko Watanabe, Eriko Takayama-Watanabe, Yuni nakauchi Sperm motility-initiating substance

that might facilitate the evolution of internal fertilization in amphibians.
87th meeting of the Zoological Society of Japan (国際学会) 2016 年
佐藤多恵、渡辺絵理子、中内裕二、渡邊明彦 精子運動調節機構は外部環境に適応して選択的に改変される 第47回精子研究会(招待講演)2016年
佐藤多恵、渡邊明彦、渡辺絵理子 アカハライモリ精子の運動調節におけるT型Ca²⁺チャンネルとTRPチャンネルの役割 日本動物学会平成28年度東北支部大会)2016年

〔その他〕

山形大学プレス発表

<https://www.yamagata-u.ac.jp/jp/files/6114/7676/5796/press20161018.pdf>

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 絵理子 (WATANABE Eriko)
山形大学・学士課程基盤教育機構・准教授
研究者番号：20337405

(2)研究分担者

渡邊 明彦 (WATANABE Akihiko)
山形大学・理学部・教授
研究者番号：30250913

越智 陽城 (Ochi Haruki)
山形大学・医学部・准教授
研究者番号：00505787