

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570236

研究課題名（和文）体内受精環境に対応する精子運動調節タンパク質の適応的進化に関する研究

研究課題名（英文）A sperm motility-controlling protein adapted to the urodele mode of internal fertilization and its diversity among amphibian species.

研究代表者

渡邊 明彦 (WATANABE AKIHIKO)

山形大学・理学部・教授

研究者番号：30250913

研究成果の概要（和文）：体外受精から体内受精へ受精様式の改変に対応した受精機構の適応を理解するために、イモリの体内受精の成立に必須の役割を担う精子運動開始因子（SMIS）遺伝子の探索を行い、151 アミノ酸をコードする新規遺伝子を同定した。SMIS 遺伝子は、輸卵管特異的に発現し、アミノ酸配列中のシステインノットドメインの親水性領域に活性部位が存在した。また、イロワケガエル、トウホクサンショウウオ、モリアオガエルにおいて、SMIS 相同分子が存在し、その等電点が種間で大きく異なることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Sperm motility-initiating substance is a nonglycosylated protein that acts specifically in the mode of internal fertilization of the urodele amphibian, *Cynops pyrrhogaster*. In the present study, a cDNA encoding SMIS protein was identified. It coded a sequence of 151 amino acids that contained a cysteine knot domain. The expression of the SMIS gene was oviduct-specific and independent of the stimuli of ovulation. The active site of the SMIS was detected in a hydrophilic loop of the cysteine knot domain using synthetic peptides having partial amino acid sequences of the SMIS. Immunoblotting and southern blotting revealed that proteins homologous to SMIS were widely conserved among anuran and urodele amphibians but those homologues showed different isoelectric points ranging from 4 to 7. These results suggest that the molecular feature of the SMIS may be changed in adaptation to the diversified fertilization modes among amphibian species.

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 2,100,000 | 630,000   | 2,730,000 |
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2011 年度 | 500,000   | 150,000   | 650,000   |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：体内受精、精子運動、機能進化、両生類、輸卵管

1. 研究開始当初の背景

ミューラー管由来の卵管に依存した体内受精

様式は、現存する爬虫類以上の脊椎動物種に共通して見られる。受精への卵管の関与

は、精子競争や生殖時期の選択等、多様な生殖戦略を可能にし、陸上の多様な環境下での種の維持に大きく貢献している。同様の特徴は両生類の体内受精においても見られ、その様式は高等脊椎動物の始原的なものであると考えられる。両生類において、体内受精様式は体外受精様式から進化的に確立されたが、この進化に必要な適応的変化の詳細は不明である。私達が発見した新規の Sperm Motility-Initiating Substance (SMIS) はアカハライモリの卵管分泌タンパク質で、これによって引き起こされる精子運動開始が体内受精環境に適応した性質を持つことから、SMIS による精子運動開始機構は受精様式の機能進化に寄与しているものと考えられる。

## 2. 研究の目的

受精様式が異なる両生類種間で SMIS の特徴を比較して、SMIS の構造的、機能的変化を調べ、体内受精様式への受精様式の機能進化における受精機構の適応的改変の有無を分子レベルで明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) SMIS 遺伝子の単離・同定

① SMIS の部分アミノ酸配列をエドマン分解法により解読し、degenerate プライマーを設計して RT-PCR を行って、候補遺伝子を単離した。

② RT-PCR 法により候補遺伝子の発現部位と発現調節のホルモン依存性を調べた。

③ 候補遺伝子配列をもとにリコンビナントタンパク質を作製し、抗 SMIS 抗体との反応性を調べた。

④ 候補遺伝子がコードするアミノ酸配列の一部をもとに合成ペプチドを作製し、精子運動開始活性の有無を調べた。

### (2) SMIS 相同分子の解析

① イロワケガエルとツメガエルを用いてサザンブロット解析を行った。

② トウホクサンショウウオ、ツメガエル、モリアオガエルを用いてイムノブロット解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) SMIS 遺伝子の同定

SMIS タンパク質の部分アミノ酸配列に基づいた RT-PCR により、システインノットドメインを含む 151 アミノ酸をコードする新規遺伝子が SMIS 候補遺伝子として単離された (図)。この遺伝子は、輸卵管特異的に発現

し、排卵誘発ホルモンの作用はその発現に影響しなかった。リコンビナントタンパク質は抗 SMIS 抗体に特異的に結合した。システインノットドメイン中の親水性領域のアミノ酸配列をもつ合成ペプチドは、アカハライモリ精子に対して、配列特異的な運動開始活性を示した。以上の結果から、単離された SMIS 候補遺伝子が SMIS 遺伝子であることが結論された。

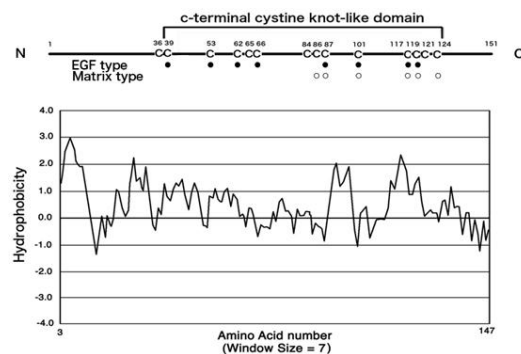


図 SMIS 遺伝子がコードするアミノ酸配列の K-D プロット

### (2) SMIS 相同分子の解析

サザンブロット解析の結果、SMIS 相同遺伝子はイロワケガエルのゲノム中に存在するが、ツメガエルのゲノム中には存在しないことが示唆された。一方、イムノブロット解析の結果、SMIS 相同タンパク質は、ツメガエルのゼリー層中には検出されなかったが、イロワケガエル及びトウホクサンショウウオのゼリー層中に検出された。さらに、モリアオガエルの卵外被にその存在が示唆された。これらの SMIS 相同タンパク質の等電点は種によって異なり、その範囲はおおよそ 4 ~ 7 であった。これらの結果、SMIS は、受精様式によらず広く両生類種に保存されていることが明らかになり、分子的な性質の違いが異なる受精様式に対応している可能性が示された。

## 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)

- ① E. Takayama-Watanabe, C. Campanella, H. Kubo, A. Watanabe. Sperm motility of the Anuran *Discoglossus pictus* is triggered by Homologous Proteins of the Sperm Motility-Initiating

Substance of the Newt *Cynops pyrrhogaster*. Zygote 印刷中 査読有

- ② A. Watanabe, E. Takayama-Watanabe, C.A. Vines, G.N. Cherr. Sperm motility-initiating substance in newt egg-jelly induces differential initiation of sperm motility based on sperm intracellular calcium levels. *Develop. Growth Differ.* 53: 9-17. (2011) 査読有
- ③ M. Ohta, H. Kubo, Y. Nakauchi, A. Watanabe. Sperm motility-initiating activity in the egg jelly of the externally-fertilizing urodele amphibian, *Hynobius lichenatus*. *Zool. Sci.* 27: 875-879. (2010) 査読有
- ④ T. Watanabe, H. Kubo, S. Takeshima, M. Nakagawa, M. Ohta, S. Kamimura, E. Takayama-Watanabe, A. Watanabe, K. Onitake. Identification of the sperm motility-initiating substance in the newt, *Cynops pyrrhogaster*, and its possible relation with the acrosome reaction during internal fertilization. *Int. J. Dev. Biol.* 54: 591-597. (2010) 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 横江美里、柴田大輔、稲葉一男、渡邊明彦 イモリ精子におけるセリンプロテアーゼ活性の局在 日本動物学会第 82 回大会 2011 年 9 月 22 日 旭川市大雪クリスタルホール (旭川市)
- ② 高橋智恵、渡邊明彦 イモリ精子の超活性化した運動における細胞内  $Ca^{2+}$  と

cAMP の役割 日本動物学会第 82 回大会 2011 年 9 月 21 日 旭川市大雪クリスタルホール (旭川市)

- ③ 渡辺絵理子、豊田将、久保英夫、キアラ・カンパネラ、渡邊明彦 *Discoglossus* 卵ジェリー層に含まれるイモリ SMIS 相同タンパク質 日本動物学会第 82 回大会 2011 年 9 月 21 日 旭川市大雪クリスタルホール (旭川市)
- ④ 渡邊明彦、沓澤恵、荒木俊幸、佐野寛 アカハライモリ精子運動開始因子の活性化はセリンプロテアーゼを介して起こる 日本動物学会第 81 回大会 2010 年 9 月 25 日 東京大学
- ⑤ 渡邊明彦 イモリ研究のキーテクノロジー 人工授精のトラブルシューティング 日本動物学会第 81 回大会関連集会 2010 年 9 月 23 日 東京大学
- ⑥ A. Watanabe, M. Kutsuzawa, and E. Takayama-Watanabe. A new mechanism for sperm motility initiation in the mode of internal fertilization of the urodele amphibian, *Cynops pyrrhogaster*. 11th International Symposium on Spermatology. 2010 年 6 月 27 日 沖縄コンベンションセンター (宜野湾市)
- ⑦ 渡邊明彦、谷野俊平 2009. イモリ精子貯蔵における輸精管液の役割に関する研究 日本動物学会第 80 回大会 2009 年 9 月 18 日 静岡県コンベンションセンターグランシップ (静岡市)

⑧ 渡邊明彦、谷野俊平 2009. イモリ精子貯蔵における輸精管液の役割に関する研究 日本動物学会第80回大会 2009年9月18日 静岡県コンベンションセンターグランシップ (静岡市)

⑨ M. Ohta, A. Watanabe. Characterization of carbohydrate moieties that contribute to the activity of acrosome reaction-inducing substance in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. 日本発生生物学学会第42回大会 2009年5月29日 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター (新潟市)

[その他]

ホームページ等

[http://www-sbiol.kj.yamagata-u.ac.jp/~oni\\_lab0/gaiyou\\_J1.html](http://www-sbiol.kj.yamagata-u.ac.jp/~oni_lab0/gaiyou_J1.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡邊 明彦 (WATANABE AKIHIKO)

山形大学・理学部・教授

研究者番号：30250913

### (2) 研究分担者

中内 祐二 (NAKAUCHI YUNI)

山形大学・理学部・助教

研究者番号：60250908