

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570246

研究課題名(和文) 体内受精の成立に関わる精子運動開始機構の適応的進化に関する研究

研究課題名(英文) Mechanism for sperm motility initiation involving in the adaptive evolution to establish internal fertilization

## 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、精子運動開始因子(SMIS)の作用様式の適応的変化を解明するために、1)電子顕微鏡観察、2)免疫学的解析、3)遺伝子構造解析を行った。アカハライモリ体内受精に重要な、SMISを含む顆粒は、シリケンイモリ(体内受精種)とモリアオガエル(樹上受精種)の卵外被に見られ、後者ではその局在が著しく異なっていた。顆粒は、イペリアトゲイモリ(体内受精種)とアズマヒキガエル(体外受精種)には見られず、受精様式に加え、更なる要因に適応した作用様式の多様化が示唆された。一方、アカハライモリSMIS遺伝子の構造と発現制御を解明し、種間比較のために、RNAseqによるSMIS遺伝子の新同定法の確立に成功した。

研究成果の概要(英文)：SMIS, a key protein for internal fertilization of the newt, *C. pyrrhogaster*, localizes granules in the surface of egg jelly and induces sperm motility in female body. It acts in a different manner among amphibians and is hypothesized to contribute to the diversification of reproductive modes to evolve internal fertilization. To address this hypothesis, we examined ultrastructure of egg jelly and SMIS localization in *C. ensicauda* and *P. waltl* that undergo internal fertilization, *R. arboreus* that do arboreal fertilization, and *B. japonicus* that do external fertilization. Distributions of SMIS-localizing granules suggested changes in machinery of SMIS action adaptively to various factors including reproductive modes. We also found that *C. pyrrhogaster* SMIS gene was constructed by 3 exons and succeeded to establish a new method to identify SMIS homologous genes using RNAseq, which will be available to analyze the correlation of SMIS structure with its different action in future study.

研究分野：生殖生物学

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

脊椎動物の進化において、両生類に生じた体外受精からの受精様式の多様化と体内受精の確立は、陸上環境への適応に大きく貢献したことが示唆されている。私たちがアカハライモリの卵外被であるジェリー層から単離・同定した sperm motility-initiating substance (SMIS)は、体内受精様式に高度に適応した作用機序を有する一方で、体内受精を行う両生類種のジェリー層及びその派生物中に同様の活性が見られることから、精子運動の調節を介して体内受精の確立に大きく寄与したことが示唆される。SMIS は分子的特徴の変化を伴いながら両生類種間で保存されており、SMIS の作用機構が受精様式の多様化と体内受精の進化に関連して適応的に変化したことが示唆される。

#### 2. 研究の目的

SMIS の作用機構の変化の実体を明らかにし、受精様式の多様化と体内受精の進化に関連した分子機構の適応的な変化を理解する。

#### 3. 研究の方法

研究は以下の3つの手法によって得られた結果を総合的に考察することによって実施した。1) ジェリー層、及びその派生物に由来する卵外被の走査型電子顕微鏡観察による超微細構造の観察、2) 抗 SMIS 抗体を用いたジェリー層、及びその派生物に由来する卵外被の凍結切片等の免疫染色、3) 各種遺伝子操作技術を用いた SMIS 遺伝子の構造解析

#### 4. 研究成果

##### (1) SMIS が局在する顆粒の構造的な保存性

SMIS は、アカハライモリの卵ジェリー層表層に局在する顆粒に含まれ、精子先体反応と連携して精子運動を誘導する。このユニークな作用機序がアカハライモリの体内受精成立の鍵となる。本研究では、体内受精種3種と体外受精種2種について、卵ジェリー層、及びその派生物に由来する卵外被に同様な顆粒の有無とその局在を検討した。SMIS が局在する顆粒は体内受精種であるシリケンイモリと樹上受精種であるモリアオガエルにおいて観察された。シリケンイモリでは、卵ジェリー層の表層への明確な局在が示され、その体内受精においてアカハライモリと同様な精子運動開始機構が機能することが示唆された。一方、モリアオガエルでは、ジェリー層派生物である泡巣の構成成分中にランダムな分布が観察された。モリアオガエルの樹上受精では、放卵・放精と同時にメスが泡巣構成成分を攪拌するため、このような特異的な特徴に適応して SMIS の分布様式が変化したものと考えられる。一方、体内受精種であるイベリアトゲイモリと水中受精種であるアズマヒキガエルの卵ジェリー層には

顆粒が観察されなかった。イベリアトゲイモリの結果は予想外であり、アズマヒキガエルの結果とともに、SMIS の作用様式が体内及び体外といった受精様式のみならず、多様な要因によって改変されている可能性を示唆するもので、大変興味深い。しかし、人為的な排卵誘発による影響も考慮する必要があり、今後それぞれの可能性について注意深く検証する必要がある。

##### (2) SMIS 遺伝子の構造的な特徴

SMIS は、免疫学的な比較解析により、分子量と pI が種間で異なることから、分子構造の変化が受精様式への適応に関連するものと考えられる。本研究では、SMIS の分子構造の相違の実体を解明するために、ゲノムウォーキング法により、アカハライモリ SMIS 遺伝子の 1172 bp の転写領域を含む 4794 bp の SMIS 遺伝子塩基配列を決定した。SMIS cDNA 配列中の 145 番目と 146 番目、及び 270 番目と 271 番目の塩基の間にイントロン配列の挿入が見られ、SMIS 遺伝子が3つのエキソンから成ることが明らかになった。転写領域の上流には TATA ボックス、CAT ボックス等が見られたが、特徴的な転写調節配列は見られなかった。しかし、輸卵管の RT-PCR によって、SMIS の転写がエストラジオールによって調節されることが示された。今後、この性ステロイドによる転写調節機構をさらに検証し、SMIS 遺伝子発現に関わる構造的な特徴を特定することが期待される。

SMIS 遺伝子の比較解析のために、4種の両生類の輸卵管から mRNA を抽出し、SMIS の機能領域周辺のアミノ酸配列をコードする degenerate プライマーを用いて RT-PCR を行ったが、SMIS cDNA 断片を得ることができなかった。そこで、近年進歩が著しい次世代型 DNA シークエンシング技術を用い、RNAseq による SMIS cDNA の塩基配列の取得を試みた。アカハライモリの輸卵管から抽出した mRNA を試料として得たショートリードを de novo アッセンブリーしたところ、得られた 113084 リードから、SMIS cDNA と 98% の相同性をもつシングルリードの塩基配列の取得に成功した。このことから、ゲノム情報のリファレンス配列をもたない、アカハライモリを始めとするほとんどの両生類種において、分子構造の変異に影響されずに SMIS 遺伝子を同定することができることが明らかになった。今後、本法により、種特異的な SMIS 遺伝子構造を解明する予定である。

#### 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 5件)

A. Watanabe, E. Takayama-Watanabe. 2015. *In silico* identification of the genes for sperm-egg interaction in the internal fertilization of the newt *Cynops pyrrhogaster*. Int. J. Dev. Biol. in press.

E. Takayama-Watanabe, H. Ochiai, S. Tanino, A. Watanabe. 2015. Contribution of different Ca<sup>2+</sup> channels to the acrosome reaction-mediated initiation of sperm motility in the newt *Cynops pyrrhogaster*. Zygote 23: 342-351.

M. Yokoe, M. Sano, H. Shibata, D. Shibata, E. Takayama-Watanabe, K. Inaba, A. Watanabe. 2014. Sperm proteases that may be involved in the initiation of sperm motility in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. Int. J. Mol. Sci. 15: 15210-15224.

T. Takahashi, M. Kutsuzawa, K. Shiba, E. Takayama-Watanabe, K. Inaba, A. Watanabe. 2013. Distinct Ca<sup>2+</sup> channels maintain a high motility state of the sperm that may be needed for penetration of egg jelly of the newt, *Cynops pyrrhogaster*. Develop. Growth Differ. 55: 657-667.

E. Takayama-Watanabe, C. Campanella, H. Kubo, A. Watanabe. 2012. Sperm motility initiation by egg jelly of the anuran, *Discoglossus pictus* may be mediated by sperm motility-initiating substance of the internally-fertilizing newt, *Cynops pyrrhogaster*. Zygote 20: 417-422.

[学会発表](計 25 件)

Yokoe M, Shibata H, Shibata D, Takayama-Watanabe E, Inaba K, Watanabe A. AEBSF-sensitive acrosomal protease is involved in egg-jelly -induced sperm motility initiation in the fire berry newt, *Cynops pyrrhogaster*. International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants, Nov 12th-16th, Nagoya

Takahashi T, Shiba K, Takayama-Watanabe E, Inaba K, Watanabe A. A hyperactivated state of sperm motility is coordinated by local actions of T-type and L-type voltage dependent Ca<sup>2+</sup>-channels in internal fertilization of the newt, *Cynops pyrrhogaster*. International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants, Nov 12th-16th, Nagoya

Watanabe A, Nakauchi Y, Takayama-Watanabe E. Identification and characterization of

the gene encoding sperm motility-initiating substance, an oviduct secreting protein significant for internal fertilization of the newt, *Cynops pyrrhogaster*. The 45th annual meeting of the Japanese society of Developmental Biologists. May 28th-31th Kobe international conference center.

渡辺明彦、中内祐二、高山-渡辺絵理子 アカハライモリの精子運動調節 - 両生類の体内受精様式はほ乳類の受精様式の原型か - 両生類はワンダーランド(日本動物学会第 83 回大会シンポジウム) 9 月 13-15 日 大阪大学

渡辺明彦 アカハライモリの体内受精特異的な精子運動調節機構 第 5 回生殖研究若手の会 7 月 27 日 東京大学三崎臨海実験所

渡辺明彦 アカハライモリの体内受精特異的な精子運動調節機構 平成 24 年精子研究会 11 月 10 日 東北大学

有村健志、佐藤千菜美、角田智志、藤井順逸、渡辺明彦 アルデヒド還元酵素 KO マウス精子の大きな屈曲を伴う運動 日本動物学会第 83 回大会 9 月 13-15 日 大阪大学

横江美里、高山-渡辺絵理子、渡辺明彦 アカハライモリ精子運動開始因子の活性部位の同定 日本動物学会第 83 回大会 9 月 13-15 日 大阪大学

高橋智恵、柴小菊、稲葉一男、渡辺明彦 アカハライモリでは、中片前側と後側で独立した運動調節機構が働く 日本動物学会第 83 回大会 9 月 13-15 日 大阪大学

高久彰朗、高橋智恵、渡辺明彦 4-アミノピリジンによるアカハライモリ精子の運動開始 日本動物学会第 83 回大会 9 月 13-15 日 大阪大学

有村健志、佐藤千菜美、藤井順逸、渡辺明彦 Aldehyde reductase (ALR)-KO マウス精子の運動状態の解析 日本動物学会平成 24 年度東北支部会 7 月 21 日 山形大学

高久彰朗、高橋智恵、渡辺明彦 イモリ精子の運動に、ほ乳類精子の超活性化を担う CatSper チャネルは関わるか 日本動物学会平成 24 年度東北支部会 7 月 21 日 山形大学

横江美里、有村健志、村田健二、高山-渡辺絵理子、渡辺明彦 チョウザメの精子運動解析と SMIS 相同分子の探索 日本動物学会平成 25 年度東北支部大会 7 月 20 日 秋田大学

高橋智恵、柴小菊、稲葉一男、Gary N Cherr、渡辺明彦 アカハライモリの精子運動の部域

特異的な調節におけるアデニル酸シクラーゼの役割に関する研究 日本動物学会平成25年度東北支部大会 7月20日 秋田大学

横江美里、齊藤瑤子、高山-渡辺絵理子、渡辺明彦 無尾両生類二種の生死運動に対するSMISの作用 日本動物学会第84回大会 9月28日 岡山大学

高橋智恵、柴小菊、高山-渡辺絵理子、Gary N Cherr、稲葉一男、渡邊明彦 リアノジンは精子中片後側の細胞内 Ca<sup>2+</sup>を増加させる日本動物学会第84回大会 9月28日 岡山大学

高山-渡邊絵理子、落合広人、高橋智恵、横江美里、渡邊明彦 イモリ卵-精子相互作用における電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネルの役割 日本動物学会第84回大会 9月28日 岡山大学

渡辺明彦、渡辺絵理子、中内祐二 ハイパーアクチベーションは卵管マトリクスと共進化する？ 日本アンドロロジー学会第33回学術大会及び第20回精子形成・精巣毒性研究会シンポジウム1. Capacitationの最前線を極める 6月12日 軽井沢プリンスホテル

渡辺明彦、近紳之介、渡辺絵理子 SMISによるモリアオガエル精子運動活発化の細胞内信号伝達に関する研究 日本動物学会平成26年度東北支部大会 7月13日 岩手大学

A. Watanabe, E. Watanabe A novel signal for penetration of oviduct-secreted matrix that might contribute diversification of reproductive mode in amphibians. 12<sup>th</sup> International symposium on spermatology Aug 10-14 Newcastle, NSW

渡邊明彦、渡辺絵理子 アカハライモリ受精関連遺伝子の同定 日本動物学会第85回大会 9月11日 東北大学

渡辺絵理子、近紳之助、渡邊明彦 両生類卵ジェリー層表面の微細構造の観察 日本動物学会第85回大会 9月11日 東北大学

A. Watanabe, E. Takayama-Watanabe. Global survey of the genes involving in the mechanism of newt fertilization using de novo assembled RNAseq. International Workshop on Developmental and Regenerative Biology in Yamagata. Sep 10th Yamagata University

K. Hirano, H. Ochi, K. Hoshijima, K. Takeshima, E. Takayama-Watanabe, A. Watanabe. Tyrosinase gene knockout by

TALEN technology in the red-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*. International Workshop on Developmental and Regenerative Biology in Yamagata. Sep 10th Yamagata University.

平野 高大、越智陽城、星島一幸、竹島一仁、星島一幸、渡辺-高山絵理子、渡辺明彦 ゲノム編集技術 TALEN を用いたアカハライモリのチロシナーゼ遺伝子の破壊 第22回山形分子生物学セミナー 山形大学

〔図書〕(計1件)

E. Takayama-Watanabe, T. Takahashi, M. Yokoe, A. Watanabe. 2014. Acrosome reaction-mediated motility initiation that is critical for the internal fertilization of urodele amphibians. In Sexual reproduction in animals and plants. H. Sawada, N. Inoue, M. Iwano (eds) Springer, Tokyo, Japan, pp. 97-103.

〔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  
<http://sci.kj.yamagata-u.ac.jp/~watan/>

## 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

渡辺絵理子 (WATANABE, Eriko)  
山形大学・基盤教育院・准教授  
研究者番号：20337405

中内祐二 (NAKAUCHI, Yuni)

山形大学・理学部・助教  
研究者番号：60250908