

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

Regulatory basis of alternative adaptive traits in cephalopod reproductive systems.

(個人推薦)

代表研究者 島根大学 広橋 教貴 Shimane University Noritaka HIROHASHI
協同研究者 東京大学 岩田 容子 The University of Tokyo Yoko IWATA
長浜バイオ大学 小倉 淳 Nagahama Institute of Bio-Science and Technology Astushi OGURA

In the coastal squid *Loligo bleekeri*, each male produces one of two types of fertilization-competent spermatozoa (eusperm) that exhibit morphological and behavioral differences. Large “consort” males produce short-tailed spermatozoa that display free-swimming behavior when ejaculated into seawater. Small “sneaker” males, on the other hand, produce long-tailed spermatozoa that exhibit a self-swarming trait after ejaculation. To understand the molecular basis for adaptive traits employed by alternative male mating tactics, we performed the transcriptome deep sequencing (RNA-seq) and proteome analyses to search for differences in testicular mRNAs and sperm proteins, respectively. From mature male testes we identified a total of 236,455 contigs (FPKM =1) where 3789 and 2789 were preferentially (=10-fold) expressed in consort and sneaker testes, respectively. A proteomic analysis detected 4302 proteins in the mature sperm as post-translational products. A strongly biased (=10-fold) distribution occurred in 55 consort proteins and 61 sneaker proteins. A family encoding dynein heavy chain gene, however, was found to be biased towards sneakers, whereas many enzymes involving energy metabolism were heavily biased towards consort spermatozoa. From these results we hypothesize that discrete differential traits in dimorphic eusperm arose from a series of innovative alterations in the intracellular components of spermatozoa.

研究目的

有性生殖システムは集団内および雌雄間の対立と調和によって進化・多様化してきたと考えられる。どの種を例に挙げても、生殖システムは複雑で巧妙であり、その全容が明らかにされている種はほとんど存在しない。ダーウィン以来、性淘汰に関する多くの進化モデル・進化理論が提唱されてきたが、それらは有性生殖システム全体の一側面に光を照らすものであり、種が有する各生殖形質の適応意義やそれらの繋がりについて、そのほとんどは依然として謎である。

生殖システムの統合的理解を目指して、我々は代替生殖戦術に注目してきた。代替生殖戦術とは、一集団中の雄または雌の生殖行動様式に見られる「一貫した多様性」を指す言葉で、昆虫からほ乳類に至る

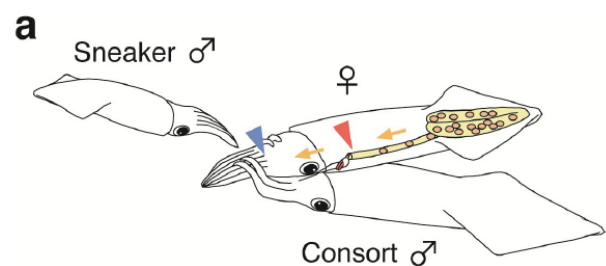


図1 Alternative reproductive tactic in *Loligo bleekeri* ヤリイカの生殖様式 大型雄 (consort) が雌体内へ精莢を挿入する際に小型雄 (sneaker) が精莢を雌体外口周辺部に付着させる。雌はその後産卵するが、consort雄とsneaker雄のどちらの精子も受精に使われる。

ほとんどの動物門に存在する。そのなかで、頭足類ヤリイカの代替生殖戦術は興味深い(図1)。成熟雄には大型と小型のものが存在し、大型雄(ペア雄)

は雌体内に精子を受け渡す「体内受精」型であるのに対し、小型雄（スニーカー雄）は雌体表に精子を付着させ、卵が雌体外へ出されるときに受精する「体外受精」型である。代替生殖戦略をとる種の中なかでも、生殖行動においてこれほど劇的な違いを示す例は珍しい。精子にとっても、雌体内と体外の環境には大きな違いがあると容易に想像つくので、それぞれの精子がそれぞれの環境に適応しているかも知れない。精子の形質は受精前の貯精を巡る精子間競争や受精時にいち早く卵へ接近するための争いなどによって適応的な変化を遂げていると一般に考えられる。そこで精子サイズを調べたところ、スニーカー雄の精子はペア雄より1.5倍も大きかった。さらにスニーカー雄の精子にのみ自己集合能があり、この集合は、精子自身の呼吸によって生じる二酸化炭素を感知する「CO₂走化性」のためであることを突き止めていた。

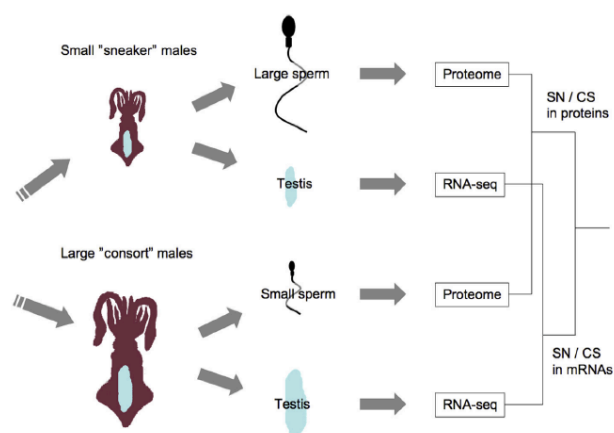
本研究の目的は、1) まずはじめにペア雄とスニーカー雄の産生する精子の違いを網羅的に解析した後（図2）、そこから上述したペア精子とスニーカー精子の形質の違い（精子サイズと二酸化炭素走化性の有無）を生じさせている分子を明らかにすること、2) 反対に網羅的解析によって得られる差次的発現の大きいものの中から、まだ見つかっていない隠れた機能の違いを見出すことである。

研究経過と考察

スニーカー雄、ペア雄それぞれの成熟した個体の精巣から totalRNA を抽出し、ナノドロップを用いた A260/A280 測定、および電気泳動による分解の程度を確認した後、良質な RNA だけを選び、スニーカー、ペアそれぞれ 3 個体の RNA 試料を同量混合し、次世代シーケンサーを用いた定量的トランスクリプトーム（RNA-seq）解析を行った。その結果、合わせて 236,455 の contigs (FPKM =1) を得ることができた。そのうちスニーカー雄の精巣だけに強く（10倍以上）発現する遺伝子の数は 3789 個（7.8%）であり、反対にペア雄精巣だけに強く発現する遺伝子数は 2789 個（5.7%）であった。

次にスニーカー雄、ペア雄それぞれの成熟した個体から精莖を取り出し、その中に蓄えられている精子を集め、タンパク質を可溶化し、LCMS を用いたプロテオーム解析を行った。タンパク質の可溶化には、水溶性（主に細胞質画分）と界面活性剤（1%

Triton-100）に可溶化されるもの（膜タンパク質な



ど）を分けて解析した。

図2 Integrative omics approach to identify genes involved in male dimorphism. 成熟したスニーカー雄とペア雄の精巣に発現する RNA を比較し、さらにそれぞれの精子のタンパク質を比較した。

水溶性画分には、スニーカー精子から 1433、ペア精子から 1457 個のタンパク質が同定された。特異的に発現するタンパク質はスニーカー精子が全体の 51.2%、ペア精子が 52.0% と意外と多かった。界面活性剤の画分も傾向は同じであった（図3）。

Proteome (ptd cont \geq 2)

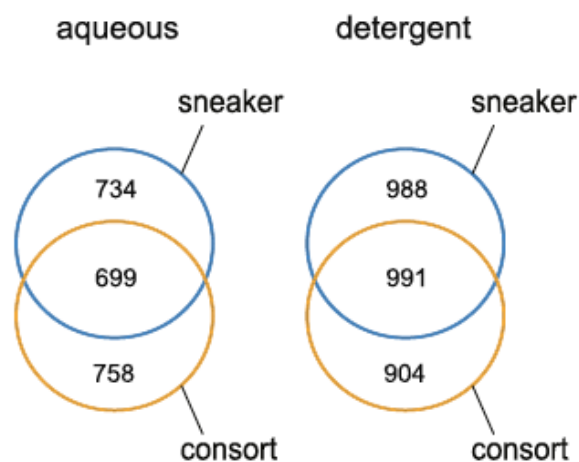


図3 Summary of sperm proteome analysis 可溶性画分 (aqueous) と界面活性剤可溶画分 (detergent) に分け、スニーカー・ペア精子間で比較した。数字は遺伝子数を示す。

特異的に発現するタンパク質はスニーカー精子、ペア精子とも多かったが、peptide count が 2~4 の発

現量が小さいものほど特異的発現を示す割合が高く、peptide count が 10 以上の高発現のタンパク質は約 75% が共通に存在した。

つぎに個々のタンパク質を見ると、水溶性画分には proteasome や phosphoprotein phosphatase1 などがペア精子に偏って発現する特徴的なタンパク質であることが分かった。界面活性剤可溶画分には、ダイニン重鎖や hexokinase などがスニーカー精子に偏向発現していることが分かる。

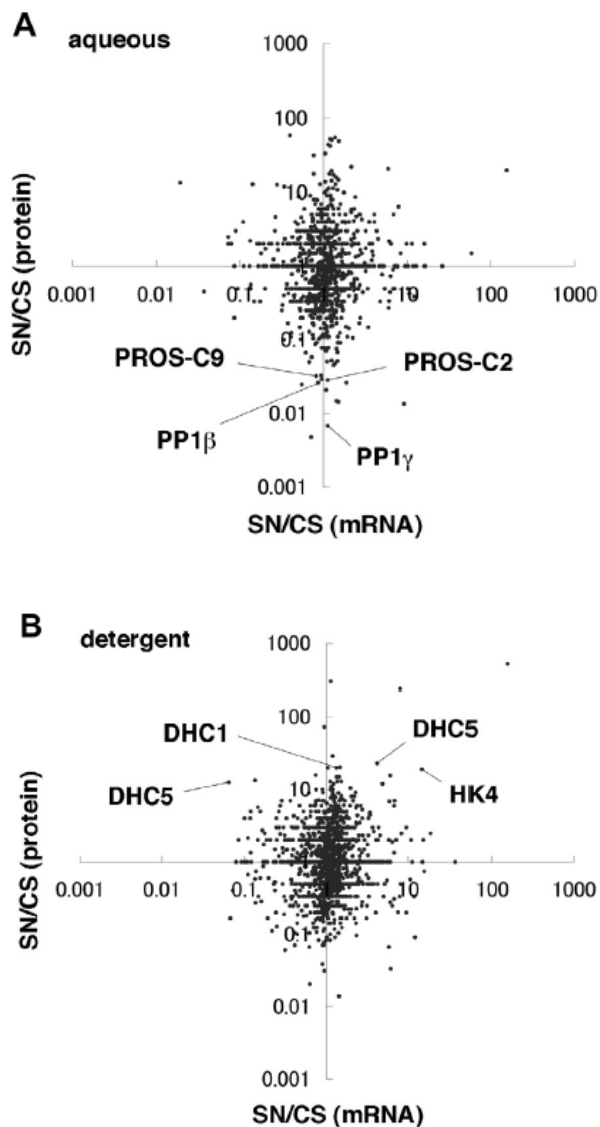


図4 スニーカー雄とペア雄間での精巣転写産物と精子タンパク質の発現量比較 プロテオーム解析で同定された遺伝子の精巣 RNA 量を横軸に、精子タンパク質量を縦軸にして各遺伝子についてスニーカー/ペア比をプロットした。

phosphoprotein phosphatase1(PP1)は生体内でグリコーゲン代謝に重要な働きがあることが知られてい

る。そこで、プロテオーム解析から解糖系や糖新生に関わる酵素群の発現量を比較したところ、それらの多くはペア精子に偏向発現していることが示唆された。さらに興味深いことにミトコンドリアにおけるエネルギー産生に関わる (TCA 回路) の酵素群にも同じ傾向が見られた。即ち、スニーカー精子とペア精子はエネルギー産生の経路や効率に違いがあることが予想された。それを確かめるため、次の項目について比較した。

- ① 精子運動性の持続時間
- ② グルコースの取り込みとその代謝
- ③ ミトコンドリア呼吸の必要性

① について調べると、ペア精子の運動持続時間は 25~30 分程度であったのに対し、スニーカー精子 12 時間程度は高い運動性を維持した。② 海水中に 10mM グルコースを添加すると、運動性持続時間はどちらの精子も 3~4 日程度になった。また一旦停止した精子にグルコースを加えると再び遊泳したことから、運動持続時間は精子内在的なエネルギー源が枯渇したためと判断できる。グルコースを添加した条件で細胞外に排出される乳酸量を測ったところ、スニーカー精子がペア精子に比べて約 10 倍乳酸量が高かった。つまり、スニーカー精子はグルコースを取り込み、解糖系を使って ATP を産生した後、ピルビン酸を乳酸に変換させて細胞外へ排出する。③ グルコース存在下で脱共役剤 CCCP を添加したところ、スニーカー精子は運動性の高い状態を維持したが、ペア精子は 10 分程度で運動を停止した。即ち、ペア精子は TCA 回路による ATP 産生が運動性維持に必須であるのに対し、スニーカー精子は解糖系のみで運動を維持できることが分かった。

今回のプロテオーム解析によって、これまで観察されていた精子 2 型 (精子鞭毛長の違いと精子集合に関わるシグナル経路関連分子) の候補は見つからなかった。その代わりに、いままで知られていなかった運動性の持続性や遊泳に必要なエネルギー産生経路において 2 型間で顕著な違いが見つかった。今後、2 型精子に見られる代替的な形質の生理的意義を探る上で、今回の網羅的解析は有効な情報源となるであろう。

この研究の遂行にあたり、山田科学振興財団の援助に心より感謝を申し上げます。

研究の発表
口頭発表

1. 広橋教貴 CO₂に応答する精子鞭毛について, 第3回 絨毛研究会 (東大・本郷) 2012年6月8日
 2. 精子ナビゲーション戦略の分子機構の解明 科研費新学術領域動植物アロ認証 第5回領域会議(静岡県下田東急ホテル) 2012年6月12-14日
 3. CO₂- taxis in Loliginidae spermatozoa. Noritaka Hirohashi International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants (Joint Meeting of the 2nd Allo-authentication Meeting and the 5th Egg-coat Meeting (MCBEEC)) Hotel Nagoya Garden Palace, Nagoya, Japan, Nov12-16, 2012.
 4. A smart cell: spermatozoon of the squids. Noritaka Hirohashi 1st. International Workshop of Cephalopods and Other Marine Organisms. Organizers, Noritaka Hirohashi and Yoko Iwata. (JAMSTEC Tokyo office, Tokyo) Oct 17, 2012.
 5. 広橋教貴 文科省科研費新学術領域研究「動植物に共通するアロ認証の解明」第7回領域会議:平成25年6月1~3日 島根県松江市 くにびきメッセ
 6. 広橋教貴 日本動物学会年会シンポジウム「受精機能と生殖戦略の進化~藻類から脊椎動物まで」平成25年9月26日 岡山大学
 7. 広橋教貴 日本動物学会北海道支部 第549回支部講演会「精子におけるCO₂感受性の分子機構とその進化的意義」:平成25年11月29日 北海道旭川市 旭川医大
 8. 広橋教貴 第36回日本分子生物学会年会ワークショップ「アロ認証から生殖タクティクスへ:動植物域を超えた生殖戦略」平成25年12月4日神戸国際会議場
 9. Hirohashi N WE-Heraeus Seminar on "Physics and Biology of Directed Movements of Cells and Organisms" (Physikzentrum Bad Honnef, Germany Dec. 9, 2013)
 10. 広橋教貴 文科省科研費新学術領域研究「動植物に共通するアロ認証の解明」第8回領域会議:平成26年1月8~10日名古屋大学
 11. Hirohashi N Seminar at Institute of Biotechnology-UNAM (Cuernavaca, Mexico Jan 27, 2014)
- 誌上発表
1. Jin M, Fujiwara E, Hirohashi N. Real-time observations of the mouse sperm acrosome reaction during in vitro fertilization. In Sperm cell Research in the 21st Century: Historical Discoveries to New Horizons. Ed. Morisawa M. Adthree Publishing Co., Ltd. 2012.
 2. Noritaka Hirohashi, Yoko Iwata, Warwick H. H. Sauer, Yasutaka Kakiuchi Respiratory CO₂ mediates sperm chemotaxis in squids. In Sexual Reproduction in Animals and Plants (Proceedings). (Eds, H Sawada, N Inoue, M Iwano) Springer Japan 2013.
 3. Noritaka Hirohashi, Luis Alvarez, Kogiku Shiba, Eiji Fujiwara, Yoko Iwata, Tatsuma Mohri, Kazuo Inaba, Kazuyoshi Chiba, Hiroe Ochi, Claudiu T. Supuran, Nico Kotzur, Yasutaka Kakiuchi, U. Benjamin Kaupp, Shoji A. Baba Sperm from Sneaker Male Squids Exhibit Chemotactic Swarming to CO₂. **Current Biology**, 23, 775-781, 2013.
 4. Kakiuchi Y, Hirohashi N, Murakami-Murofushi K. The macroscopic structure of RADA16 peptide hydrogel stimulates monocyte/macrophage differentiation in HL60 cells via cholesterol synthesis. **Biochem Biophys Res Commun**. 2013; 433, 298-304.
 5. Kei Moriwaki, Takako Nakagawa, Fumio Nakaya, Noritaka Hirohashi, and Kazuyoshi Chiba, Arrest at metaphase of meiosis I in starfish oocytes in the ovary is maintained by high CO₂ and low O₂ concentrations in extracellular fluid. **Zool. Sci** 2013; Nov30(11):975-984.
 6. Noritaka Hirohashi* and Yoko Iwata, The different types of sperm morphology and behaviour within a single species- why do sperm of squid sneaker males

form a cluster? **Commun Integr Biol.** Nov 1, 2013; 6(6): e26729.

7. 哺乳類受精のライブイメージング 佐藤裕公・広橋教貴 特集・受精のバイオロジー～混沌から生まれる新世界～ 細胞工学 2014; vol133 No. 4 p393-399.
8. Noritaka Hirohashi*, Glycan-dependent activation of sperm in sea urchin fertilization. in Glycoscience: Biology and Medicine, Eds. 2014; Springer **in press**
9. Masa-aki Yoshida, Lixy Yamada, Hiroe Ochi, Yoko Iwata, Miwa Tamura-Nakano, Hitoshi Sawada,

Warwick H. Sauer, Atsushi Ogura, Noritaka Hirohashi* Integrative omics analysis reveals differentially loaded proteins in dimorphic euspermatozoa of the squid, *Loligo bleekeri*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 2014; Apr 24 PMID: 24768636

10. Mariano G. Buffone, Noritaka Hirohashi, George L. Gerton, Unresolved questions concerning mammalian sperm acrosomal exocytosis, **Biol. Reprod.** 2014; 90(5):112, 1-8.