

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 —統合的オーム解析—

広橋 教貴

Regulatory basis of alternative adaptive traits in cephalopod reproductive systems-an integrative omics approach.

Noritaka HIROHASHI

**Abstract** 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.

**Keywords:** alternative reproductive tactics, male dimorphism, proteome, RNA-seq, sperm evolution

はじめに

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、我々は代替生殖戦略に注目してきた。代替生殖戦略とは、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略は興味深い(図1)。成熟雄には大型のもの(以下ペア雄)と小型のものが存在し、大型雄(以下ペア雄)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(以下スニーカー雄)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。

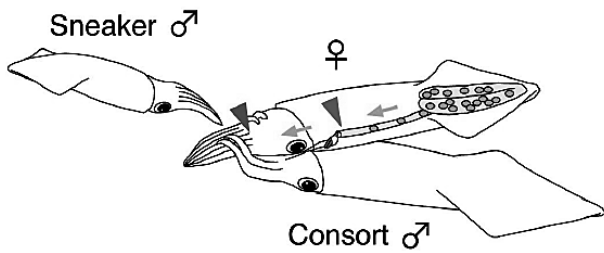


図1 Alternative reproductive tactic in *Loligo bleekeri* ヤリイカの生殖様式 大型雄 (consort) が雌体内へ精莢を挿入する際に小型雄 (sneaker) が精莢を雌体外口周辺部に付着させる。雌はその後産卵するが, consort雄とsneaker雄のどちらの精子も受精に使われる。

代替生殖戦術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、雌の体内と体外の環境には大きな違いがあるため、各精子がそれぞれの環境に適応しているだろうと想像できる。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 (Iwata et al., 2011)。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「CO<sub>2</sub>走化性」のためであることを突き止めていた (Hirohashi et al., 2013a, 2013b)。

本研究の目的は、1) 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)、そこからこれまで発見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。

## 材料と方法

材料は主に相模湾産のヤリイカを用いた。三浦市松輪漁港において活イカを仕入れ、現地にてスニーカー雄、ペア雄それぞれの成熟個体の精巣を摘出、直ぐにTRIzol (Invitrogen)を用いてtotalRNAを抽出し、冷蔵保存して研究室へ持ち帰った。その後速やかにRNeasy kit (QIAGEN)を用いてtotalRNAを精製し、超低温保存した。UV分光光度計 (Agilent NanodropとAgi-

lent 2100 bioanalyzer) を用いて良質な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 (illumina HiSeq2000) を用いて定量的トランスクリプトーム (RNA-seq) 解析を行った。各スニーカー、ペア雄から得られたシーケンスを1つのdatasetにプールし、Trinityをつかってアッセンブルした。発現量 (fragments per kilobase per million reads; FPKM) を求めるため、bowtieを用いてスニーカー・ペア雄から得たリードをTrinity上にマップし、RSEMとedgeRを用いて解析した。putative alternative splicing variantsは別のcontigとしたが、それらをまとめて1つのsub-componentとして扱った。

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莢を取り出し、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%SDS) に可溶化されるもの (膜タンパク質、構造タンパク質など) を分けて解析した。可溶化試料をポリアクリルアミド電気泳動で分離し、トリプシンによるゲル内消化を行った後、LC-MS/MSを用いて解析した。MSスペクトルデータは前に得られたRNA-seqデータベース上でSEQUESTとMascotを用いて解析した。

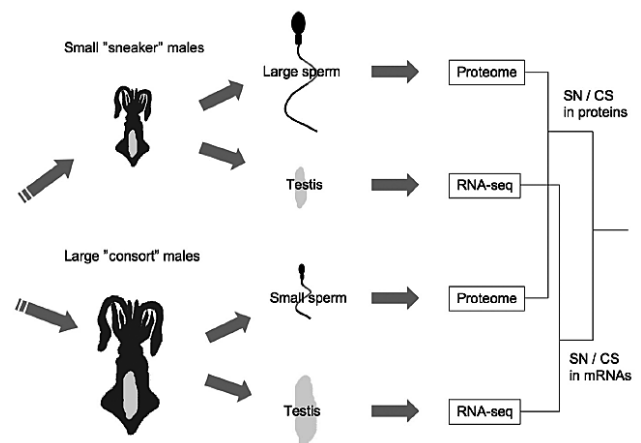


図2 Integrative omics approach to identify genes involved in male dimorphism. 成熟したスニーカー雄とペア雄の精巣に発現するRNAを比較し、さらにそれぞれの精子のタンパク質を比較した。

## 結果と考察

定量的トランスクリプトーム (RNA-seq) 解析

を行った結果、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。次にプロテオーム解析によって、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）。

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。

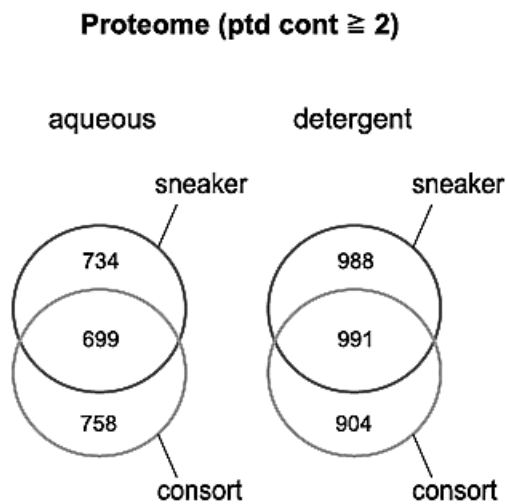


図3 Summary of sperm proteome analysis 可溶性画分 (aqueous) と界面活性剤可溶画分 (detergent) に分け、スニーカー・ペア精子間で比較した。数字は遺伝子数を示す。

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って発現していることが分かった。

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

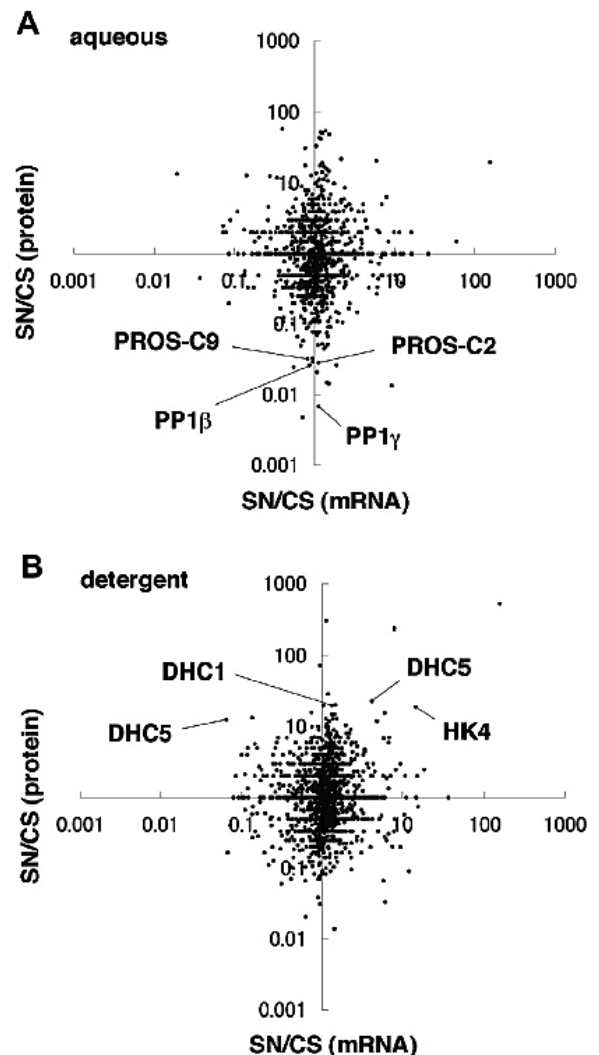


図4 スニーカー雄とペア雄間での精巣転写産物と精子タンパク質の発現量比較。プロテオーム解析で同定された遺伝子の精巣RNA量を横軸に、精子タンパク質量を縦軸にして各遺伝子についてスニーカー/ペア比をプロットした。水溶性の精子抽出液 (A) と界面活性剤 (1%SDS) 添加で可溶化される抽出液 (B) に分けて解析した。

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こみ、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。原因として精子膜タンパク質の相対量が挙げられる。一般にイオンチャンネルや受容体などの膜タンパク質は精子細胞に稀かにあってもその機能を十分発揮するため、どの動物においてもプロテオーム解析によって見つからないことが多い。今後、Triton-114や免疫沈降などの処理によって膜タンパク質を濃縮する必要がある。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（図5）。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益な情報源となるであろう（Yoshida et. al., 2014）。

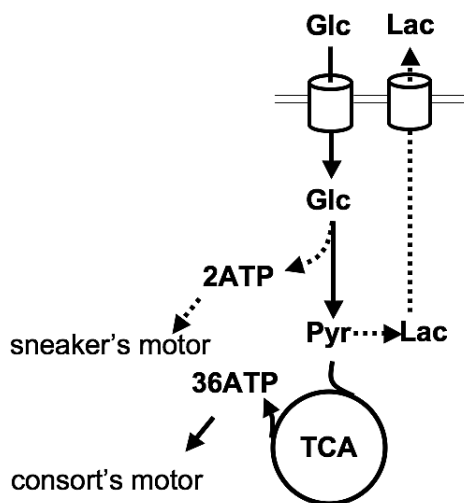


図5 スニーカー精子（破線）およびペア精子（実線）の鞭毛運動を持続させるための主要なATP産生の推定経路

## 結 論

ヤリイカの雄2型に特徴的な遺伝子発現を網羅的トランスクリプトーム（精巣）解析およびプロテオーム（精子）解析で探った。トランスクリプトーム解析で236,455 contigs, 57,298 sub-component（スプライシングバリエーションを纏めたもの）が得られ、そのうちおよそ50%はスニーカー・ペア雄のどちらかにのみで発現していた。精子タンパク質では、5.7~7.8%がどちらか一方に発現していた。その中で解糖系やミトコンドリア呼吸に関わる酵素群がペア雄で偏って発現していることが分かった。実際の精子を調べてみると精子寿命、鞭毛運動のためのエネルギー生産で顕著な違いが見られた。

## 謝 辞

トランスクリプトーム解析では小倉淳氏（長浜バイオ大）、吉田真明氏（遺伝研）、プロテオーム解析では山田力志氏（名古屋大）の協力を仰いだ。この研究は、山田科学振興財団、NRF、科研費の支援により行った。今回の結果の一部は文献（Yoshida et.al., 2014）にまとめた。

## 引用文献

- Hirohashi, N., and Iwata, Y. (2013a) 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.*, **6**: e26729.
- Hirohashi, N. et al. (2013b) Sperm from Sneaker Male Squids Exhibit Chemotactic Swarming to CO<sub>2</sub>. *Current Biology*, **23**: 775-781.
- 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 Evolutionary Biology*, **11**: 236.
- Yoshida, M.A., Yamada, L., Ochi, H., Iwata, Y., Tamura-Nakano M., Sawada, H., Sauer H.W., Ogura, A. and Hirohashi, N. (2014) Integrative omics analysis reveals differentially loaded proteins in dimorphic euspermatozoa of the squid, *Loligo bleekeri*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Apr 24 PMID: 24768636, in press.