

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15022

研究課題名(和文) 精子のin vivoイメージングを用いた受精メカニズムの解明

研究課題名(英文) Studied on the in vitro imaging of spermatozoa during fertilization

研究代表者

笹浪 知宏 (Sasanami, Tomohiro)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：80322139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：生殖戦略の一つとして、動物では貯精と呼ばれるメカニズムを採用している。鳥類でも、輸卵管で精子を貯蔵するが、41℃という高い体温下で数週間から数ヶ月もの間、受精能力を維持したまま精子が貯蔵される現象は驚異的である。本研究では、鳥類の貯精嚢を主な研究対象とし、輸卵管内の精子のイメージングによる可視化に挑戦し、加えて、貯精嚢での長期間の精子貯蔵メカニズムの解明を目指した。蛍光試薬で精子を標識し、高感度カメラで検出した所、輸卵管外からの精子の可視化に成功した。また貯精嚢に存在する抗酸化タンパク質を同定し、このタンパク質が精子の生存性を向上させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In avian species, simple tubular invaginations referred to as sperm storage tubules (SSTs) are located between the vagina and uterus as sperm storage sites. Spermatozoa, once ejaculated, migrate to and are thereafter stored in the lumen of the SSTs without loss of fertilizing capacity for up to 15 weeks at a body temperature of 41°C, however, the actual mechanism has been an enigma for more than half a century. In this study, we first investigated in vivo sperm imaging using IVIS system, and next, we identified redox protein in the SST. Using IVIS system with fluorescent probe I had successfully detected sperm signal from outside of the oviduct. In addition, I had identified redox protein in the SST and found that in vitro sperm incubation with this anti-oxidant protein prolong the sperm longevity.

研究分野：繁殖生物学

キーワード：精子貯蔵管 受精 精子 イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

体内受精を行う高等動物では、受精を効率良く達成する為に重要な事象として、精子と卵子とがタイミングよく受精の場に共存する必要性が挙げられる。そのための生殖戦略として、雌性生殖器内に一定期間精子を貯蔵し、排卵のタイミングに合わせて精子を放出するための「貯精嚢」と呼ばれる器官を備える動物種が多く存在する。貯精嚢の内部で精子は長期間受精能を維持したまま貯蔵されることが知られ、本研究代表者が研究対象としている鳥類では、数週間から数ヶ月の間、体温付近(約41℃)で精子が受精能を維持したまま貯蔵されることが知られている。

一方、雌性生殖器内へは卵子に対して圧倒的多数の精子(例えばヒトでは数億個)が射出されるのに対し、受精の場に辿り着く精子は数百個であり、実際に受精出来るのはたった数個の精子である。つまり、雌性生殖器内では、精子間競争が起こるとともに、雌性生殖器による精子選抜・淘汰が行われていると考えられる。この仕組みは謎に包まれているが、雌性生殖器にはダメージを受け、受精能が低下した精子や、遺伝的に近親な精子を受精から排除するとともに、自身に最適な精子を自ら積極的に選択するシステムが存在すると考えられる。一方、体外授精や顕微授精等の人為的な不妊治療では受精が起こり、精子および卵子自体の受精能には問題が無いことが確認されている原因不明の不妊症例が報告されている。また、ウシやブタ等の家畜においても、精子の活力や形態は正常であるが、受胎成績の極めて悪い精液の事例も少なくない。

これまでの半世紀以上にも及ぶ研究により、精子と卵子との結合・融合に関する知見は蓄積しつつある。しかし、どのようなタイミングおよびメカニズムで精子が輸卵管を登り、受精の場にたどり着くのか、どのようにして輸卵管内に大量に射出された精子が淘汰され、受精の場に到達する精子が選抜されるのか、その淘汰や選抜機構には個体差や雌雄の組み合わせが重要なのか、等の重要な問題は未解決のまま残されている。その最大の理由は、動物の輸卵管が不透明であり、射精された精子が輸卵管内を移動し受精するまでの過程を直接可視化し追跡することが困難な点にあった。近年のイメージング技術の進歩により、輸卵管内での精子の挙動を外部から検出することも不可能な時代ではなくなった。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究では、鳥類を実験モデルとして、輸卵管における精子選抜および精子輸送過程をイメージングにより可視化するとともに、その分子メカニズムの解明に挑戦する。さらに、41℃という高温下で精子が長期間貯蔵されるという驚異的なメカニズムを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

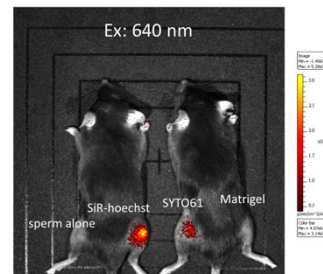
グルコースの2位の水酸基にヨウ素を酵素的に導入し、精子とインキュベート後、computed tomography (CT) で検出した。また蛍光色素である pHrodo-Red-AM, Syto61 または SiR-hoechst で精子を染色し、近赤外光を検出する装置である IVSI で検出した。これらの精子をウズラの腔内に注入し、検出を行った。また体外に取り出した輸卵管を検出した。

一方、精子の運動制御に関わる因子の同定に関する実験では、貯精嚢抽出物を陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーに供し、精子の運動に影響を与える分画を回収した、得られた分画を LC-MS/MS 分析することにより、活性分子を同定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 精子のインビトロイメージング

体外から精子を可視化する技術を開発するために、グリカールを基質として、クロロペルオキシダーゼにより、グルコースの2位の水酸基にヨウ素または臭素の導入を試みた。その結果、合成、単離・精製および NMR 分析による構造決定には成功したが、合成産物の細胞毒性が強く、実験に使用できないことがわかった。そこで市販の蛍光試薬である SiR-hoechst および SYTO-61 を用いて精子を標識し、IVIS imaging system を用いた可視化を試みた。その結果、マウスを用いた実験では、体外からの精子蛍光の観察に成功した(右図)。



ウズラ精子を用いた IVIS イメージングでは、蛍光色素である SiR-hoechst および SYTO-61 で染色したウズラ精子をメスの腔内に人工授精する方法を検討した。結果、体外からのイメージングは蛍光試薬の蛍光強度とカメラの感度が不足し、現時点では不可能であった。しかし、人工授精後のウズラから輸卵管を取り出してイメージングを行った場合、精子のシグナルが検出可能であることが判明した(下図)。しかしながら、輸卵管自体の自家蛍光が予想外に強いこと、体外での輸卵管培養手法がないことなど、今後さらに改良が必要と考えられた。



#### (2) ウズラ精子の運動制御に関する因子の

## 同定

一方、精子の運動制御に関わる因子の同定に関しては、子宮腔移行部に存在する抗酸化タンパク質として、アルブミン(ALB)とトランスフェリン(TRF)を同定し、機能解析を行った。イオン交換クロマトグラフィーでALBとTRFを精製し、精子の生存性に及ぼす効果を調べた。ALBとTRFは共にインビトロで精子の生存性を改善し、その効果はTRFの方が高かった。そこでTRFをジゴキシゲニンでラベルし、精子表面への結合を確認したところ、TRFは精子の頭部に結合することが判明した。興味深いことに、市販のウシTRFや大腸菌に発現させた組み換えウズラTRFには効果がないことから、ウズラの天然TRFには精子の生存性を改善するための特殊な構造がある可能性が示唆された。今後、さらなる解析が必要と考えられる。加えて、ゲルろ過クロマトグラフィーの低分子分画には、アクチン結合タンパク質のC末端ペプチドが検出された。合成ペプチドを作成し、精子に及ぼす影響を観察したところ、ミトコンドリア活性、細胞内カルシウム濃度の上昇反応が観察された。これらのことから、貯精嚢内における精子の維持には、運動の停止、酸化ストレスの除去に加え、さらなるメカニズムが存在する可能性が考えられた。

## 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) Matsuzaki M, Mizushima S, Ichikawa Y, Shiba K, Inaba K, Sasanami T, Effects of a protein kinase inhibitor on sperm motility in the Japanese quail. *Journal of Poultry Science* 54 (1): 73-79 (2017)、査読あり
- (2) Ichikawa Y, Matsuzaki M, Mizushima S, Sasanami T, Egg envelope glycoprotein ZP1 and ZP3 mediates sperm-egg interaction in the Japanese quail. *Journal of Poultry Science* 54 (1): 80-86 (2017)、査読あり
- (3) Ichikawa Y, Matsuzaki M, Hiyama G, Mizushima S, Sasanami T, Sperm-egg interaction during fertilization in birds. *Journal of Poultry Science* 53 (3): 173-180 (2016)、査読あり
- (4) Hiyama G, Mizushima S, Matsuzaki M, Ichikawa Y, Kansaku N, Sasanami T, Expression of Prolactin receptor on the surface of quail spermatozoa. *Journal of Poultry Science* 53 (2): 157-164 (2016)、査読あり

[学会発表](計 22 件)

- (1) 水島秀成、黒岩麻里、須田千晶、小野珠乙、笹浪知宏、ウズラ初期胚におけ

るゲノム活性化のタイミングと細胞周期関連遺伝子の発現解析、日本家禽学会 2018 年度春季大会、2017 年

- (2) 笹浪知宏、松崎芽衣、水島秀成、ウズラ精子貯蔵管で貯精に重要な役割を果たすタンパク質の同定、日本畜産学会第 124 回大会、2017 年
- (3) 笹浪知宏、鳥類のつがい選択と受精戦略(招待講演) 生殖トーク、2018 年
- (4) 檜山源・政森楓・戸張靖子・松崎芽衣・笹浪知宏、雌ウズラの配偶者選択に関する研究 第 41 回鳥類内分泌研究会、2017 年
- (5) 笹浪知宏、ウズラの受精における精子-卵子相互作用に関する因子の探索 第 11 回菅島受精発生の会、2017 年
- (6) 松崎芽衣、市川佳伸、水島秀成、広橋教貴、笹浪知宏、ウズラ精子貯蔵管への精子侵入を誘導する要因 日本動物学会第 88 回大会、2017 年
- (7) 松崎芽衣、道羅英夫、佐々木達也、切岩祥和、Prodip Kumar Sarkar、水島秀成、笹浪知宏、輸精管におけるウズラ精子の運動停止機構 家禽学会 2017 年度秋季大会、2017 年
- (8) Tomohiro Sasanami, Mei Matsuzaki, Shusei Mizushima (招待講演) Mechanism of sperm storage in birds Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Symposium 12 : Fertilization, 2017 年
- (9) 笹浪知宏、松崎芽衣、崔宰熏、吉村崇、水島秀成 ウズラのつがい選択を制御する要因 家禽学会 2017 年度春季大会、2017 年
- (10) 市川佳伸、松崎芽衣、水島秀成、笹浪知宏 ウズラの卵胞成熟過程における卵細胞膜の免疫組織化学的解析 家禽学会 2017 年度春季大会、2017 年
- (11) 松崎芽衣、水島秀成、道羅英夫、笹浪知宏 ウズラ精子貯蔵管に含まれる精子運動調節タンパク 家禽学会 2017 年度春季大会、2017 年
- (12) Prodip Kumar Sarkar、松崎芽衣、笹浪知宏 ウズラ精子のインビトロにおける生存性に関する研究 家禽学会 2017 年度春季大会、2017 年
- (13) 笹浪知宏 鳥類の輸卵管における精子貯蔵(招待講演) 性と生殖の懇談会、2017 年
- (14) 笹浪知宏、市川佳伸、松崎芽衣、水島秀成 ウズラの受精における精子-卵子相互作用の解析 第 40 回鳥類内分泌研究会、2016 年
- (15) 松崎芽衣、水島秀成、市川佳伸、笹浪知宏 乳酸はウズラ精子貯蔵管において精子の運動を抑制する 第 40 回鳥類内分泌研究会、2016 年

- (16) 水島秀成、小野珠乙、笹浪知宏 ウズラ体細胞核移植胚の発生能 家禽学会 2016 年度秋季大会、2016 年
- (17) 市川佳伸、松崎芽衣、水島秀成、笹浪知宏 ウズラにおける精子-卵融合の形態学的解析 家禽学会 2016 年度秋季大会、2016 年
- (18) 松崎芽衣、市川佳伸、水島秀成、柴小菊、稲葉一男、笹浪知宏 プロテインキナーゼ C 阻害剤はウズラ精子の運動を抑制する 家禽学会 2016 年度秋季大会、2016 年
- (19) 宮崎奨、市川佳伸、水島秀成、笹浪知宏 ウズラの精子脱凝縮反応に必要な卵子由来因子 家禽学会 2016 年度秋季大会、2016 年
- (20) 笹浪知宏 鳥類における配偶者選択に関する研究 (招待講演) 受精発生の会、2016 年
- (21) Mizushima, S., Ono, T. and Sasanami, T. Attempt on the establishment of somatic cell nuclear transfer method in Japanese quail. Proceedings of the 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress (2016).
- (22) Sasanami, T., Matsuzaki, M., and Mizushima, S. Factor affecting sperm uptake into the sperm storage tubules in Japanese quail (*Coturnix japonica*). Proceedings of the 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress (2016).

〔図書〕(計 2 件)

- (1) Matsuzaki M and Sasanami T. (Sasanami T Eds) Sperm storage in the female reproductive tract - A conserved reproductive strategy for better fertilization success. *In: Avian reproduction - From behavior to molecules*, Springer, 2017、総ページ数 14
- (2) Mizushima S, Matsuzaki M, Sasanami T (Sheng G Eds.) Handling of gametes for in vitro insemination in birds. *In: Avian and reptilian development biology methods and protocols*, Humana Press, 2017、総ページ数 15

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
笹浪 知宏 (SASANAMI, Tomohiro)  
静岡大学・農学部・准教授  
研究者番号：80322139

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：