

平成22年 4月30日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20700380

研究課題名（和文） 精子のメカノバイオロジー

研究課題名（英文） Mechanobiology of mammalian sperms

研究代表者

松浦 宏治（MATSUURA KOJI）

岡山大学・異分野融合先端研究コア・助教

研究者番号：70443223

研究成果の概要（和文）：

流体環境下における精子運動性と機能分子との相関を知り、卵管内の力学的環境を反映させることが受精プロセスにとって重要であるか否かを分子生物学的に検証する。運動精子速度と頭部の蛍光強度の間には正の相関が見られ、流速が上昇すると運動精子の頭部が上流側に向くことが示唆された。精子固定時の流速上昇時に頭部および頸部の細胞内カルシウム濃度上昇が観察された。頭部と頸部で精子運動に関わるシグナル伝達が働いており、卵管内等の流体中を運動し受精するために必要な分子機能を備えていると推察される。

研究成果の概要（英文）：

To find the role of mechanical stimuli for fertilization in microfluidic environment that can mimic that of the oviduct, we investigated the relationship between intercellular Ca concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) and shear-stress (SS) in motile sperms and discussed the molecular mechanism of the mechano-sensing. We found that the  $[Ca^{2+}]_i$  in the head of a motile sperm is higher than that in the head of a non-motile sperm in flow. The directions of the heads of motile sperms that can handle  $Ca^{2+}$  were against the fluid flow direction significantly, while the distribution of the angles between non-motile sperms and flow direction is bimodal. When the fluid velocity increased, an increase in the fluorescent intensity was observed for a second. Slight fluorescent change was observed in the fluid velocity and SS change. Our proposal based on this study is that intracellular calcium concentration changes in the head might be responses of SS, but the intracellular calcium concentration changes by altering flow velocity would be slight and second-scale events.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2009年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野：生体医工学、生殖生理学、MEMS

科研費の分科・細目：人間医工学

キーワード：精子、メカノバイオロジー、ソフトリソグラフィー、運動性、カルシウムイオン、

## 1. 研究開始当初の背景

卵管内で卵巣から子宮への流れが生じている中で精子が運動性を維持しかつ卵管内を遡上し卵子にたどり着くためには、精子が流れの向きを感知して運動していると推察される。一般的に細胞運動を制御する因子の一つとして $\text{Ca}^{2+}$ が知られているため、そのイオン動態を把握することは精子の運動性と受精メカニズムの解明に貢献する。本研究では、流れ等の物理的的刺激が存在する環境下における精子の運動とそのイオン動態について情報を得、受精プロセスに必要な精子運動と卵管の力学的環境に関する理解を深めることを目的とする。

## 2. 研究の目的

培地の流れが存在している状態、精子への圧力等、動的環境下における精子運動性および機能分子との相関を知り、卵管内の力学的環境を反映させることが受精能獲得に重要であるか否か検証を試みる。具体的には、卵管内の液流れ等を再現できるマイクロ流路およびデバイスを作製し、運動性とイオン動態を同時に観測することにより、機能分子および運動性の相関について情報を得ることを試みる。

卵管内の力学的環境を再現するマイクロ流路を有するデバイスをガラス、シリコン樹脂、PMMA等を組み合わせて構成し、高速度CCDカメラによる精子の運動軌跡解析と精子内のイオン濃度評価の二面から行う。後者については、各イオン選択性を有する蛍光色素で標識し、その濃度分布を蛍光顕微鏡によって追跡する。上記の結果によって、受精能獲得に至るプロセスの解明に貢献する。

## 3. 研究の方法

①流体刺激を負荷させるために、マイクロチャンネル内の精子運動軌跡と細胞内カルシウム濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の同時計測系を構築した。2-10

( $\mu\text{M}$ ) のFluo-3 or 4 AMで染色した健常者の運動精子を高さ50  $\mu\text{m}$ , 幅500  $\mu\text{m}$ のPDMS (Poly(dimethylsiloxane)) 製マイクロチャンネル内 (図1) に入れて、共焦点蛍光顕微鏡観察は488 nm励起光を共焦点スキャナCSU-10に通過させて観察を行った。

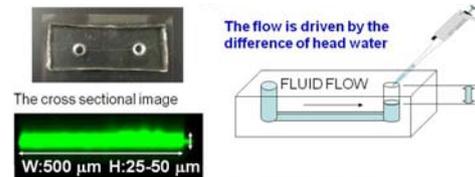


図1 本研究で使用した PDMS マイクロチャンネルと水頭差によって水流を作る方法。

水頭圧で流速を変化させた際 (図2) のヒト精子の運動性および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を評価した。その運動性と細胞内カルシウム濃度の ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 測定を行った。得られた画像を図3に示す。

②イオンチャンネル活性を阻害する薬剤 (RuRed,  $\text{GdCl}_3$ , verpamil) を添加して、その $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化と運動性の変化を観測した。

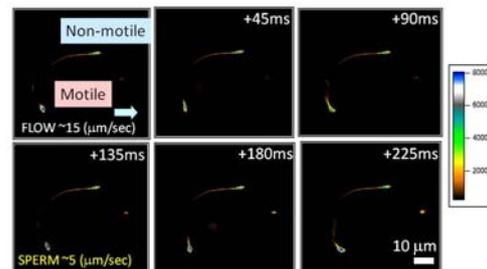


図2 マイクロチャンネル内におけるヒト運動精子と不運動精子の時分割共焦点蛍光顕微鏡カルシウムイメージング像。時間分解能は45 msである。

③上記の研究を進めている際に、ブタ精子が疎水性の高いPDMSに吸着しにくいことを発見した。そのことを利用して、ブタ精子の運動性を定量的に測定できるチャンバーを作製した。精子の運動軌跡記録・解析は、10倍のBMレンズ (ニコン) を装着した顕微鏡像をSperm Motility Analysis System (SMAS) (ディテクト) を使用してプレパラート作製直後と15分後に行った。

## 4. 研究成果

①運動精子と不動精子の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を比較したと

ころ、高速運動精子の頭部蛍光強度が高く観察された。また、運動精子速度と頭部の蛍光強度の間には正の相関が見られた(図3)。静止流体あるいはPTV(Particle Tracking Velocimetry)で観測された速度が15  $\mu\text{m}/\text{sec}$ の系について、流体中では、頭部の蛍光強度が精子運動速度とほぼ相関していることを見いだしている。

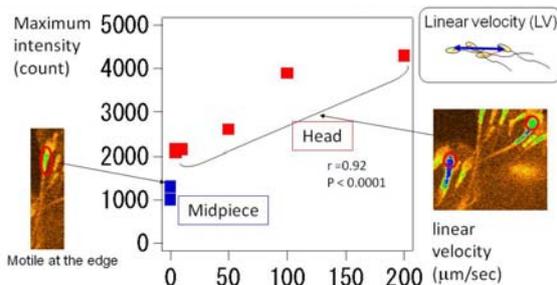


図3 Fluo-3AM 蛍光強度とヒト精子運動速度の相関。

PTVで観測された速度が0.1-0.3 mm/secの流体における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 由来の蛍光を示す運動精子の向き(尾部→頭部)と流体のなす角の分布は150度で最大であったのに対し(n=96)、不動精子では0度と180度で最大であった(n=54)。これらの現象から、流速が大きくなるにつれて運動精子の頭部が上流側に向くことが示唆された。

頭部を固定し精子内イオン動態を計測する系においては、ヒト精子についてはPoly-L-lysineをガラスにコートして精子頭部を吸着させる方法が良いことを確認した。一方、ブタ精子がガラスに吸着し易いことを利用して、ブタ精子頭部をガラスに吸着させ、

水頭差変化によって流速を変化させた際の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を計測した。流速が変化していない場合と比較して、流速上昇時に頭部および頸部の最大蛍光強度の増加が見られた(図4)。現在のところ、流速に対する定量性は見出していないが、流速が上昇する際に頭部および頸部の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が観察されたと考えている。ガラスに吸着させたヒト精子についても同様の傾向が見られた。

## ②機械受容イオンチャネルの阻害剤

(Ruthenium Red(RuR)と $\text{GdCl}_3$ )添加時の蛍光強度変化観測を試みたが、ヒト精子運動速度は著しく低下しなかったものの、観察された蛍光強度が著しく低下したため、この観察系では精子運動性とチャネル活性に関わる議論が困難であった。特にRuRはミトコンドリアに蓄積することが知られているために、この薬剤を添加した際の変化がイオンチャネル活性の変化に由来するか否か判別がつきにくい問題点がある。

一方、膜電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの代表的阻害剤であるVerpamilを添加した際には、同様に運動性は低下せず、流速が0.1mm/secの時、精子頭部は上流に向かっていった。

これらの結果をまとめると、精子は流体の向きを感知する機構が細胞内に備わっており、その機能が頭部に備わっていると考えられる。

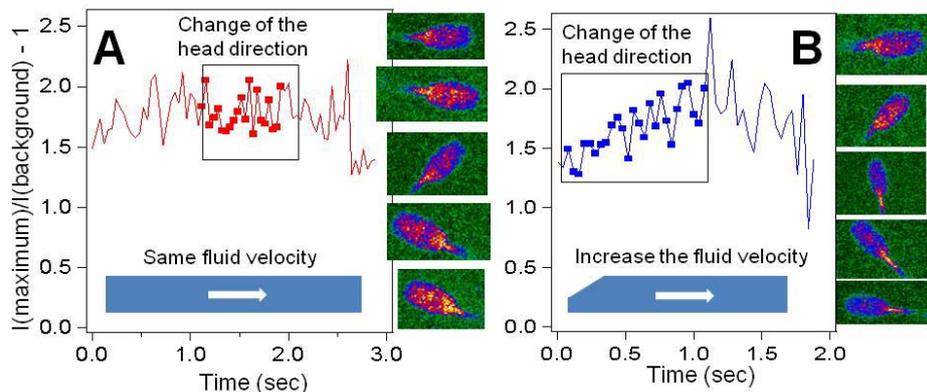


図4 ブタ精子頭部を固定した際の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 由来蛍光強度変化観測。強度最大値と時間の関係をグラフにした。時間分解能は40 msecである。A: 流速が変化しなかった際、B: 流速が増加した際の変化。

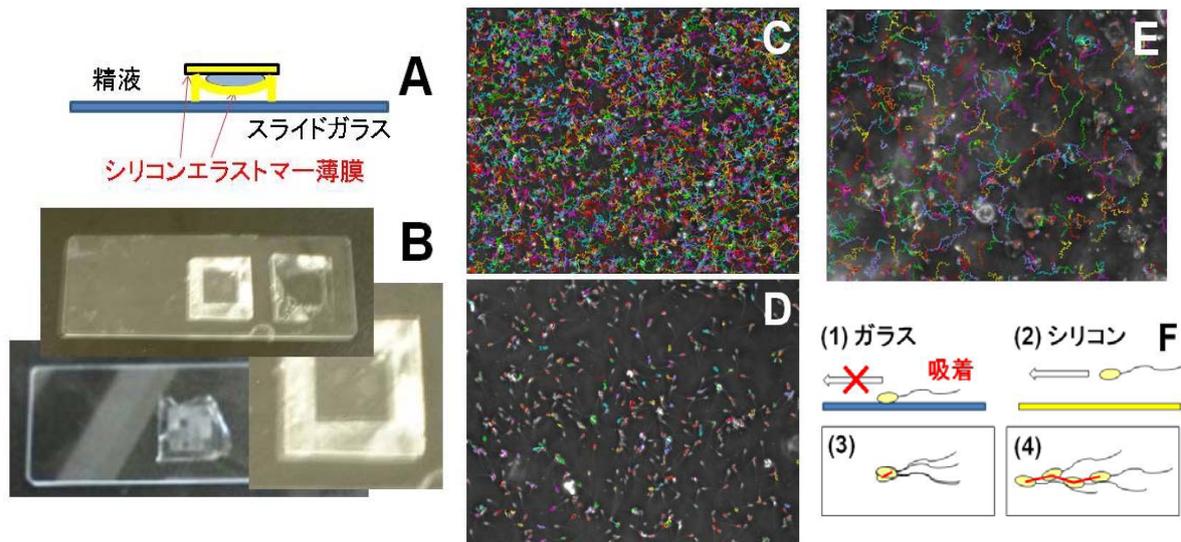


図5 A: 観察方法原理。下側のエラストマーは精液の重みでたわむ。上側のエラストマーではさむことにより、観察に適した焦点深度を得る。 B: チャンバー試作品。 C: 顕微鏡で観察した際のブタ精液内精子の運動軌跡。白色は精子であり、頭部が大きく見える。色付きの線は精子頭部の運動軌跡を示す。 D: ガラスに吸着した精子の運動軌跡。赤印は不動粒子として認識されている。運動軌跡も直線でないことから、吸着していると判断される (F(3)参照)。 E: 当チャンバーを使用した際の運動軌跡。速度はCとの間に有意差なし。 F: (1)(2)ガラスおよびエラストマー製チャンバー底面と精子頭部との相互作用および(3)(4)その運動軌跡の模式図。(3)と(4)はそれぞれ顕微鏡像DとEに対応する。

これらの精子では頭部と頸部で精子運動に関わる $Ca^{2+}$ シグナル伝達が働いており、卵管内等の流体中を運動し受精するために必要な機能を備えていると推察される。①のガラス吸着時の実験結果からは、シェアストレスがその役割を担うが、②の実験結果でその可能性を十分に証明できない状況である。この点を正当に検証するためには、流速変化と $[Ca^{2+}]_i$ 由来の蛍光変化を詳細に検討する必要があると考えている。また、今後は候補となる機械受容イオンチャネルの選択的阻害剤(例えば、TrpV2: cannabiol, TrpC3: pyrazole-2)添加時の挙動を評価する。

③ガラス製とPDMS製の二種類のプレパラートを比較したところ、ガラスの場合15分後にはほとんどの精子が吸着したが、PDMSの場合は一部のみの吸着が見られた(図5)。多数の精子運動性を同時に記録・解析するためには、観察時における精子像が重ならないように焦点深度を小さくする必要がある。簡単に当目的を達成するため、縦横 $1 \times 0.5$  (mm<sup>2</sup>)程度面積

を持つ2枚のPDMSチャンバーに精液を挟み込む方法を提案しており、当方法で恒常的にブタ精子運動軌跡解析を行っている。本観察技術は将来的には畜産業における精液・精子管理システムへの貢献につながる。今後はその運動軌跡と細胞内分子挙動について精査する計画である。

##### 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2件)

- ① 松浦宏治、Development and performances of plastic microfluidic sperm sorter、Fertility and Sterility、査読有、90巻、2008、S241
- ② 松浦宏治、Direct observation of  $[Ca^{2+}]_i$  changes in motile sperms with 50 msec time resolution、Biophysical Journal、査読有、96巻、2009、630a

[学会発表] (計9件)

- ① 松浦宏治、生殖細胞のメカノバイオロジーとデバイス応用、日本機械学会第22回

- バイオエンジニアリング講演会、2010年1月10日、岡山理科大学
- ② 松浦宏治、PDMSの物性を利用した生殖細胞操作デバイスの作製・傾斜培養によるマウス胚の培養成績とそのマイクロ空間の制御、第20回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、2009年11月8日、金沢エクセルホテル東急・石川四高記念文化交流館
- ③ 松浦宏治、マイクロ流体中の運動精子における細胞内カルシウムイオンが果たす一役割、日本生物物理学会第47回年会、2009年10月30日、アスティとくしま
- ④ 松浦宏治、シリコンエラストマー製チャンバーによるガラス吸着性精子の運動軌跡測定、第102回日本繁殖生物学会大会、2009年9月11日、近畿大学
- ⑤ 松浦宏治、Motility and  $[Ca^{2+}]_i$  distribution of sperms in flow condition、XXXVI International Congress of Physiological Sciences、2009年7月30日、京都国際会議場
- ⑥ 松浦宏治、Microfluidic sperm sorter 内流体中における精子運動の共焦点蛍光顕微観察、第48回日本生体医工学会大会、2009年4月24日、タワーホール船堀
- ⑦ 松浦宏治、Characterization of Motile Sperms Selected by Microfluidic SpermSorter、第18回化学とマイクロ・ナノシステム研究会・ISMM2008、2008年12月7、8日、京都大学 桂キャンパス 船井哲良記念講堂
- ⑧ 松浦宏治、Microfluidic sperm sorter を用いた運動良好精子分離の粘度による影響、第53回日本生殖医学会総会・学術講演会、2008年10月23日、神戸国際会議場
- ⑨ 松浦宏治、Microfluidic sperm sorter

で回収された精子の特性、第45回日本生殖医学会中国四国支部学術講演会、2008年8月30日、ホテルクレメント徳島

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：光学的観察用チャンバー及び試料の光学的観察方法

発明者：松浦宏治、舟橋弘晃

権利者：岡山大学

種類：特許

番号：特願

出願年月日：21年7月21日

国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://rcis.vbl.okayama-u.ac.jp/RCIS/index.php?option=com\\_content&view=article&id=55:matsuura&catid=29:the-cms&Itemid=60](http://rcis.vbl.okayama-u.ac.jp/RCIS/index.php?option=com_content&view=article&id=55:matsuura&catid=29:the-cms&Itemid=60)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 宏治 (MATSUURA KOJI)

岡山大学・異分野融合先端研究コア・助教

研究者番号：70443223