

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15648

研究課題名（和文）鳥類の精子貯蔵管をモデルとした精子選択メカニズムの解明

研究課題名（英文）Sperm selection mechanism in a model of avian sperm-storage tubules.

研究代表者

松崎 芽衣（Matsuzaki, Mei）

広島大学・統合生命科学研究科（生）・助教

研究者番号：70848085

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、最後に交尾した雄の精子が受精に有利となるlast male sperm precedence (LMSP)の分子メカニズムを、ウズラを用いた研究により明らかにすることを目的とした。本研究により構築したマルチプレックスPCRを用いたウズラの個体識別・父性鑑別システムに加え、精子貯蔵管における貯蔵精子の消費速度および精子貯蔵管内の貯蔵精子量を推定する試験系の組み合わせにより、LMSPが交尾後から受精に至るまでのどの段階で、どの様に生じるかを明らかにするための実験基盤を整備した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、精子中片部の長さが産仔の父性に影響を与える可能性という想定外の成果を得られた。また、雌が複数の雄と交尾した際に最後の雄の精子が受精に有利となるLMSP減少の詳細なメカニズムの解明には至らなかったものの、系統間の差異や精漿の有無といった精子の状態がLMSPに影響を与える可能性が実験的に示された。これらの成果は、今後のLMSPメカニズムの解明のための重要な手がかりとなりうる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to clarify the molecular mechanism of the last male sperm precedence (LMSP), in which the sperm of the last mated male favor fertilization. We developed a microsatellite marker-assisted system by multiplex PCR for identifying individuals and paternities in Japanese quail. We estimated the consumption rate and the amount of stored sperm in the sperm-storage tubules. Our results establish an experimental basis for clarifying how and when LMSP occurs from post-copulation to fertilization.

研究分野：動物生産科学

キーワード：精子貯蔵 精子競争 鳥類 父性の偏り

## 1. 研究開始当初の背景

鳥類の90%以上は繁殖期に一夫一妻のつがいを作ると言われているが、つがいとの交尾だけでなく婚外関係間の交尾も一般的に行われている。すなわち、社会的には一対一の婚姻関係しか持たない単婚であるが、生理的には複数対複数の婚姻関係を持つ乱婚である。乱婚の動物では、交尾後の雌性生殖道内で交尾後性選択が起きているとされる。性選択とは異性をめぐる競争であり、同性間競争および異性による選択によって生じると考えられている。乱婚の動物においては交尾後性選択によって父性の偏りが生じると推測されているが、交尾後性選択が生じるメカニズムはいかなる動物でも明らかになっていない。

交尾後性選択の一種として last male sperm precedence (LMSP) と呼ばれる現象が知られている。LMSP とは、複数の雄が雌と交尾を行った場合、最後に交尾した雄の精子が受精に有利となる現象である。LMSP は昆虫において多く報告されている。例えば、ショウジョウバエは雌性生殖道内に管状受精嚢を有し、交尾後の精子が貯蔵されることが知られているが、複数の雄と交尾した雌の管状受精嚢に貯蔵された精子の大部分は最後に交尾した雄由来であることが明らかになっている (Latturey et al., *Evol. Lett.* 2018)。鳥類においては、異なる3系統のニワトリ精子を順番に人工授精すると最後に人工授精した雄由来の胚が多く得られ、その効果は人工授精の間隔を空けるほど大きくなることがわかっている (Bui et al., *J. Poult. Sci.* 2018)。雄の組み合わせが同じであっても人工授精の順番を変えると最後の雄由来の胚が多く得られることから、鳥類においても LMSP が起きることが示唆されているが、そのメカニズムは不明である。

鳥類の雌は輸卵管内に精子貯蔵管と呼ばれる器官を有し、精子貯蔵管内で精子を長期間貯蔵することができる。交尾後の射出精子は精子貯蔵管へ侵入し、受精能を維持したまま貯蔵された後、排卵に合わせて少しずつ放出されることにより一定期間連続して(例えばシチメンチョウでは3ヶ月以上)受精を達成することが可能である。雌の体内で精子が貯蔵される現象は貯精と呼ばれ、鳥類以外でも体内受精を行う動物で広くみられる現象である。鳥類では一度の交尾で数億の精子が射精されるにも関わらず、精子貯蔵管に貯蔵される精子はそのうちの1%以下と言われている。応募者は以前の研究で、複数のニワトリ雄由来の精子を順番に人工授精した後に精子貯蔵管を観察し、貯蔵精子の大部分は後から人工授精した精子であることを見出した(松崎ら、家禽学会2018年春季大会)。以上のことから、鳥類では貯精の段階で LMSP が起きていると予想され、異性による選択のメカニズムを考察する上で恰好のモデルとなると考えられる。

LMSP が生じるメカニズムは、いかなる動物においても明らかになっていない。したがって、受精に至るまでの過程で精子がどのように選抜されるのかということは、鳥類に限らず体内受精を行う動物に共通する疑問である。本研究は、「雌は精子をどのようなしくみで選んでいるか?」という素朴な疑問に端を発している。

## 2. 研究の目的

本研究では、LMSP の効果を定量化するための実験系を構築し、この実験系を用いて LMSP に関与する要因を明らかにすることで LMSP の鍵となる因子を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、ウズラをモデルとして用い、鳥類における LMSP の効果を解析するための実験系を構築した。当初の予定では、ゲノム編集を利用して蛍光タンパクを精子に発現させ、異なる個体由来の精子を識別できるシステムを構築することを計画していたが、後述の通り蛍光タンパク遺伝子のノックインが困難であったため、蛍光色素を用いて異なる個体由来の精子を識別するシステムを採用した。また、複数の雄と交尾した雌の産仔の父性の比率および精子貯蔵管へ侵入した精子の比率を調査するための実験系を構築した。研究の過程において、異なるウズラ系統由来の精子を混合して人工授精した競争的条件下で父性の偏りが観察されたため、このような競争的条件下で父性の偏りが生じるメカニズムも調査した。

### (1) 蛍光タンパク発現精子を産生するゲノム編集ウズラの作出検討

受精卵へのゲノム編集を利用して精子特異的タンパクの遺伝子へ蛍光タンパク遺伝子を挿入することにより、蛍光タンパク発現精子を産生する個体の作出を試みた。ゲノム編集ウズラ作出法としては、一細胞期受精卵へのインジェクションによる CRISPR ベクター導入 (Mizushima et al., ) および放卵受精卵(約60,000細胞の初期胚)へのウイルスベクター感染による CRISPR ベクター導入 (Lee et al., 2019) が報告されている。しかしながら、一細胞期受精卵採取には成熟個体の安楽死が必要であり、かつ1羽から採取できる受精卵は1個のみであるという採卵効率の問題のため、また、ウイルスベクターを用いる場合は P1 レベルの施設で使用可能で取扱いが容易なアデノ随伴ウイルス (AAV) が鳥類へ感染しないためクラス2のウイルスベクターを使用する必要があり、組換え DNA 実験における封じ込めレベルの観点から、作出されるゲノム編集ウズラの飼育が非常に困難 (P2A レベルの家禽舎が必要) という問題のため、本研究では始原

生殖細胞 (Primordial germ cells; PGC) の培養および CRISPR ベクター導入を検討した。ニワトリでの既報 (Ezaki et al., 2019) を参考に、ニワトリ血清、B-27 サプリメント、ヒト線維芽細胞増殖因子 2 (hFGF2)、H-1152 (ROCK 阻害剤)、Blebbistatin (myosin II 阻害剤) 等を含むニワトリ PGC 用培地 (PGCM) で孵卵 50 時間胚 (HH stage 13~14) から採取した血液を培養し、PGC の増殖を観察した。加えて、培養器材の表面コーティング、各種サイトカインおよびシグナル伝達阻害剤の添加の検討を行った。

#### (2) 異なる系統間における父性の偏りが生じるメカニズムの調査

(1) でゲノム編集ウズラが作出できた場合、ゲノム編集雄由来の精子を順番に雌へ人工授精し、ゲノム上の外来蛍光タンパク遺伝子を利用して生まれてくる雛の父性の鑑別を行う予定であった。しかしながら、後述の通りゲノム編集ウズラを研究期間内に作出できる見込みがなかったため、蛍光タンパク遺伝子を利用した父性鑑別は断念し、顕性黒色羽装形質を有する Dominant Black (DB) 系統のウズラを利用した羽毛色鑑別を検討した。DB 系統はメラノコルチン受容体 1 の変異により顕性の黒色羽装の表現型を示す。したがって、産仔の羽毛色を調べることによりどちらの雄の精子が受精したかを鑑別することができる。

LMSP に影響を与える要因を調べるための実験に先立ち、DB 雄由来の精子と野生型雄由来の精子を混合して野生型雌へ人工授精した場合の父性の偏りを解析した。この予備検討において父性の偏りが確認されたため (後述)、当初の計画を変更し、このような競争的条件において父性の偏りが生じる理由を調査した。

#### (3) LMSP メカニズム解析のための統一の実験基盤の構築

LMSP メカニズムを統一的理解するための実験基盤として、ウズラ MS マーカーを用いた父性鑑別法を検討するとともに、既存の方法を利用した精子貯蔵時および受精時における LMSP 効果を評価するための方法を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 蛍光タンパク発現精子を産生するゲノム編集ウズラの作出検討

ニワトリと同様の条件でウズラ PGC の培養を試みたが、培養開始 7 日間程度で PGC の形態が球形の半接着細胞から線維芽細胞様の接着細胞へ変化した。このような PGC の線維芽様細胞への形態変化はニワトリ PGC でも観察されており、生殖細胞マーカーである Vasa の遺伝子発現量が著しく減少する (未発表データ) ことから、培養過程で PGC が生殖細胞としての性質を喪失したものとされた。細胞の分化には細胞-細胞間接着や細胞-細胞外基質間接着が重要な役割を果たすことが知られているため、培養面の表面加工が異なる接着細胞用プレートと浮遊細胞用プレートでウズラ PGC を培養したところ、浮遊細胞用プレートでは PGC の線維芽様細胞への形態変化が抑制された。しかしながら、培養初期は分裂が見られるものの培養開始 10~15 日以降は増殖速度が低下し、約  $10^2 \sim 10^3$  程度の細胞数に達するとその後徐々に細胞数が減少していき培養を維持できなかった。続いて、上皮成長因子 (EGF)、Activin、骨形成因子 4 (BMP4)、シグナル伝達阻害剤 (PKA, PKC, JNK, Wnt 阻害剤) 等を添加しウズラ PGC の培養を試みたが、いずれの添加物においてもウズラ PGC の増殖能の向上は観察されなかった。PGC へのゲノム編集および胚への移植には  $10^6 \sim$  程度の細胞数を長期間維持できる培養系が必要となるため、本研究期間中では PGC を利用したゲノム編集ウズラの作出には至らなかったが、培養プレートへの PGC の接着を低減することにより PGC の線維芽様細胞への形態変化を抑制することを示唆する結果が得られた。

#### (2) 異なる系統間における父性の偏りが生じるメカニズムの調査

野生型と DB 系統各 1 個体から採取した精子を 1:1 の比率で混合し人工授精して雛の父性を調査した。生まれてくる雛の父性は 1:1 になるとされたが、予想に反して雛の父性は DB への偏りがみられた (野生型由来 33.6%、DB 由来 66.4%)。野生型の精子と DB の精子を異なる蛍光色素で染色して精子貯蔵比率を調べると、DB の精子は野生型精子よりも貯蔵比率が高かった。DB 精子と野生型精子の形態を比較したところ、DB 精子は野生型と比較して中片部が長いことが明らかになった。また、DB 精子は低粘性の溶液中では野生型精子よりも運動速度が遅いが、溶液の粘性を高めても運動速度が低下しづらいたことが判明し、中片部が長い精子は輸卵管内のような高粘性条件下において、より精子貯蔵管へ侵入しやすいことが推察された (Matsuzaki et al., 2021)。

ウズラ中片部長を決定する要因を明らかにするため、9 系統のウズラ精子中片部長を調査したところ、精子中片部長が長い系統 (DB、Yellow 等) と短い系統 (Fawn-2、DVD 等) 見られた。このことから、ウズラ精子の中片部長は遺伝的な影響を受けると予想され、中片部の長さは連続的な値を示すため量的形質遺伝子座 (QTL) の影響を受ける可能性が示唆された。そこで、長い中片部の表現型を示す DB 系統と短い中片部の表現型を示す Fawn-2 系統のウズラを交配し、作出した F1 を親とする F2 集団について QTL-Seq 解析を行い、DB 系統特異的な塩基多型が検出される 102 遺伝子上を QTL 候補として同定した。これらの候補遺伝子にはマウスの精子形成関連遺伝子として知られる ring finger protein 17、intraflagellar transport 81 等の遺伝子も含まれていた。

### (3) LMSP メカニズム解析のための統一の実験基盤の構築

ウズラの Z 染色体上に 10 座位の MS マーカー増幅用プライマーを設計し、これらのうち 3 座位の MS プライマーを異なる蛍光色素でそれぞれ標識することで、マルチプレックス PCR で調整したサンプルのフラグメント解析による個体識別・父性鑑別が可能であった。また、人工授精後に受精卵を回収して卵黄膜を採取・染色して卵黄膜内層へ形成された精子の結合痕をカウントすることにより、ウズラの貯蔵精子の消費速度（精子損失係数）を 0.0132 /h と推定した。人工授精時に精子を異なる色素で蛍光標識することによって卵黄膜上にトラップされた精子を識別することも可能であり、精子貯蔵管内の貯蔵精子を蛍光色素によって識別する試験系との組み合わせにより、LMSP をより多面的に評価することができると期待された。

また、LMSP の評価法の検討に関連して、異なる蛍光色素で標識した精子を人工授精した後、精子貯蔵管内の精子の蛍光面積を画像解析により数値化することで、ニワトリで精子貯蔵管における LMSP の強度を定量することに成功した (Matsuzaki et al., 2024)。この実験では 2 番目に人工授精する雄の系統や精漿の除去がニワトリの LMSP 強度に影響を与えることが明らかになった。同様の手法はウズラにも適用可能であるため、精子貯蔵管における LMSP 強度を数値化することにより LMSP に影響を与える要因の特定へ寄与することが予想された。

本研究では、当初とは異なる計画で研究を進行したが、精子の中片部長が精子貯蔵管への侵入率、ひいては産仔の父性に影響を与える可能性という想定外の成果を得た。また、LMSP の詳細なメカニズムの解明には至らなかったものの、ニワトリにおいて系統や精子の状態が LMSP に影響を与えることが示唆され、今後の LMSP メカニズムの解明のための手がかりとなる成果を得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuzaki Mei, Hirohashi Noritaka, Tsudzuki Masaoki, Haqani Mohammad Ibrahim, Maeda Teruo, Mizushima Shusei, Sasanami Tomohiro	4. 巻 100
2. 論文標題 Longer and faster sperm exhibit better fertilization success in Japanese quail	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Poultry Science	6. 最初と最後の頁 100980 ~ 100980
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.psj.2021.01.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuzaki Mei, Mizushima Shusei, Tsudzuki Masaoki, Maeda Teruo, Sasanami Tomohiro	4. 巻 65
2. 論文標題 Sperm replacement in sperm-storage tubules causes last-male sperm precedence in chickens	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 British Poultry Science	6. 最初と最後の頁 97 ~ 104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00071668.2023.2287732	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林聡史, Mohammad I. Haqani, 都築政起, 道羅英夫, 堀内浩幸, 笹浪知宏, 松崎芽衣
2. 発表標題 ウズラの精子中片部長に關与する量的形質遺伝子座の探索
3. 学会等名 日本動物学会2022年度早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松崎芽衣, 笹浪知宏
2. 発表標題 鳥類の貯精と交尾後性選択
3. 学会等名 日本動物学会2022年度早稲田大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林 聡史, Mohammad I. Haqani, 都築政起, 道羅英夫, 堀内浩幸, 笹浪知宏, 松崎芽衣
2. 発表標題 ウズラ精子中片部長を制御する遺伝子群の探索
3. 学会等名 日本家禽学会2023年度春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松崎 芽衣
2. 発表標題 家禽の精子貯蔵管における交尾後性選択に関する研究
3. 学会等名 第24回日本畜産学会若手企画シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mei Matsuzaki, Tomohiro Sasanami
2. 発表標題 Last-male sperm precedence during sperm-storage in chicken
3. 学会等名 Poultry Science Association 2023 PSA Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------