

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03902

研究課題名(和文) 鳥類の受精過程で作動する雌雄の認証機構の解明

研究課題名(英文) Sperm competition during the passage through the female reproductive tract in birds

研究代表者

笹浪 知宏 (Sasanami, Tomohiro)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：80322139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、鳥類の輸卵管における精子貯蔵、精子-卵子相互作用に着目し、受精メカニズムの解明を目的とした。雄の受精能力と精子の遊泳との関係を調査し、受精能力の高い精子は鞭毛が長いことが判明した。ウズラ9系統のオスから精子を採取し、鞭毛長を測定した結果、系統間で鞭毛長に有意な違いが認められた。また、蛍光二重染色を射出精子に施すことにより、精子貯蔵管内で人工授精後の精子を別々に可視化することにも成功した。加えて、ウズラの精漿には、抗酸化作用を有するタンパク質としてアルブミンおよびトランスフェリンの存在が判明し、これらの抗酸化タンパクの添加で、インビトロでの精子の生存性が向上させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、受精能力の高い精子の特徴として、鞭毛の長さが重要であることを発見した。また、この精子の形質が精子貯蔵管(SSTs)への侵入に大きな影響を与え、これが父性に大きく影響することも明らかにした。加えて、SSTsに存在する抗酸化物質の発見は、これまで凍結保存が困難であったニワトリ・ウズラ等の家禽精子の液状保存に応用することが可能となり、その波及効果は非常に大きいと考えられる。これらの知見は、人工授精、体外受精等の人工的な授精技術の改良だけでなく、不妊治療および避妊薬の新しい視点からの開発に直接応用可能であることは言うまでもない。

研究成果の概要(英文)：During passage through the female reproductive tract, the spermatozoa massively decrease in number, and only a small number of sperm are able to reach the site of fertilization. However, the exact mechanism of sperm selection is poorly understood. Here, we investigated sperm entry into the sperm storage tubules (SSTs) and subsequent fertilization success under a competitive situation created by artificial insemination of a sperm mixture obtained from two males. We found paternity of embryos was biased towards males with longer flagellum when a sperm from the two males strains was artificially inseminated into females. Our novel sperm staining method with two different fluorescent dyes showed that the biased fertilization was due to the better ability of the sperm to enter the SSTs. Our results indicated that sperm competition occurs to win a place in the SSTs, and that filling the SSTs with their own spermatozoa is a critical step to achieve better fertilization success.

研究分野：繁殖生物学

キーワード：受精 輸卵管 精子貯蔵管 精子 鞭毛 ウズラ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物の行う有性生殖は、遺伝形質の多様性を維持するために重要であり、進化の過程で多くの生物が選択してきた生殖様式である。生物にとって受精の成功は自身の子孫を次世代に残すための最重要課題であるため、生存競争の過程で、生殖に不利な形質は排除され、より生殖に有利な形質を獲得することによって、生物は今日における進化を遂げてきたと考えられている。動植物には、遺伝的多様性を維持するために、自家受精を避ける仕組みが存在し、動物においては、雌雄同体の生物であるホヤで、その分子機構が明らかになりつつある。しかしながら、高等動物においてはヒト、マウスおよびニワトリなどで、交配時に主要組織適合遺伝子複合体クラスの違いを嗅ぎ分けて近親交配をさけるようなペアリングをするらしい(cryptic male preference または cryptic female choice)という報告はあるものの、その分子機構は未だ生物分野の大きな謎として残されている。一方、生体内、すなわち、輸卵管などの雌性生殖器官で精子の選抜が行われているか、あるいは、受精の際に卵と精子との認証において選抜が行われているかについては、まったく明らかになっておらず、議論が進んでいない。適切なモデルがなかったからである。

これまでのウズラを用いた観察結果から、精子貯蔵管(SST)内への精子の侵入の頻度には個体差があり、用いる雄個体や雌個体を変えることで大きなバラツキが生じることが分かっている。また、これとの関連性は不明であるが、個々の雄の受精率にも個体差があることが知られている。これは、精子のSSTへの侵入、SST内における精子の維持あるいは卵子-精子の認証機構には、科学的には証明されていない“相性”があり、卵管や卵子が精子を積極的に選択する可能性を示唆するものである。しかし、この“相性”を説明可能な分子メカニズムは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、本研究代表者の注目した“鳥類の卵管における貯精現象”および“卵子-精子相互作用”を実験モデルとして、鳥類における cryptic female choice の存在と分子機構を明らかにすることを目標とした。SSTへの精子の侵入に影響を与える要因、SST内で精子の生存性を向上させる精子貯蔵因子等の同定を第一の目標とする。加えて、精子-卵子認証機構を制御する因子の同定を試みる。さらに、これらの要因を系統別に調査するとともに、受精率、精子のSSTへの侵入率等に違いが生じるのかを調査することとした。

3. 研究の方法

(1) 精子鞭毛長の調査と鞭毛長が受精に及ぼす影響の観察：

Wild type, dominant black, yellow, albino, silver, panda, fawn2, DVD および rb の9系統の雄ウズラから交尾中断法によって射出精子を採取し、ハンクス平衡塩類溶液に懸濁して実験に使用した。ホルマリンで固定後、スメア標本を作成し、顕微鏡下で鞭毛長を測定した。Wild type および dominant black から射出精子を採取し、等量ずつ混合した精液を人工授精した。7日間受精卵を回収し、15日間孵卵後、割卵して羽装色から父性を判定した。Wild type および dominant black 精子の運動を computer assisted sperm motility analysis system (CASA)で分析した。また、両者の精子をヘキスト 33342 または pHrodo-red で別々に染色し人工授精を行い、SST内の精子の分布を調べた。

(2) SST内で精子の生存性に影響を与える因子の同定：

UVJの抽出物を Superdex200pg によるゲルろ過クロマトグラフィーに供し、採取した分画が精子の運動継続時間に及ぼす影響を観察した。運動延長活性のある分画を電気泳動で分離し、検出されたバンドを LC-MS/MS 分析により同定した。さらに、C8 逆相カラムを用いた HPLC によりタンパクを単離し、精子の運動延長活性を調べた。活性が認められたタンパクに対する特異的抗体を作成し、ウェスタンブロットおよび免疫組織化学染色によって解析した。

(3) 精子-卵子間相互作用に関与する因子の探索

ウズラの射出精子の先体反応をカルシウムイオノフォアで誘起した。先体反応誘起後の精子をビオチン標識試薬で処理し、精子膜表面のタンパクを標識した。ビオチン標識処理を行った精子の細胞膜分画を 0.2% Triton X-100 を用いて可溶化した。また最大卵胞から卵子を採取し、胚盤部分とそれ以外の部分から 0.2% Triton X-100 を用いて細胞膜タンパクを別々に可溶化した。可溶化した卵細胞膜タンパクを SDS-PAGE にて分離し、PVDF 膜に転写後、ビオチン標識した精子細胞膜タンパクを用いたリガンドブロットで検出した。

4. 研究成果

(1) 精子鞭毛長の調査と鞭毛長が受精に及ぼす影響の観察：

Wild type, dominant black, yellow, albino, silver, panda, fawn2, DVD および rb の鞭毛長を測定した。その結果、Wild type は 141 μm 、dominant black は 144 μm 、yellow は 153 μm 、albino は 142 μm 、Silver は 132 μm 、panda は 144 μm 、fawn2 は 129 μm 、DVD は 129 μm 、rb は 138 μm であった。今回調べた系統で、もっとも鞭毛が長いのは yellow であり、逆にもっと

も鞭毛が短いのは DVD および fawn2 であったが、yellow 系統はホモ個体で致死となる変異を有し、ヘテロ個体として維持されているため、交配実験には使用できないと判断した。また、dominant black と wild type の組み合わせを用いると、F1 の父性を羽装で簡便に判別できるため、人工授精実験に使用した。

人工授精後 1 日から 7 日目まで卵を回収し、父性を調べたところ、dominant black 由来の胚が高い割合を占めた。SST 貯蔵精子は dominant black 精子の割合が有意に高かった。培養液の粘性を変化させて精子の曲線速度を調べたところ、粘性が増加するにつれ低下した。回帰直線を求め、傾きを比較したところ、Wild type と比較して、dominant black が有意に小さかった。精子の各部位長は、dominant black 精子は全長および中片部長が有意に長く、尾部では有意差は見られなかった。以上の結果から dominant black 精子は Wild type 精子よりも鞭毛が長いこと、粘性の高い輸卵管内においても運動性を維持しやすく、SST への侵入に有利であるため受精に有利になると予想された。

(2) SST 内で精子の生存性に影響を与える因子の同定:

ゲルろ過の溶出体積 65-85ml に精子の運動継続時間を延長する活性が確認された為、LC-MS/MS 解析によりタンパクを同定した。その結果、複数のタンパクが同定された。HPLC により、さらにタンパクを分画し、精子の運動継続時間を延長する活性を調べたところ、アルブミンおよびトランスフェリンに精子の運動継続時間を延長する活性があることがわかった。ウェスタンブロット解析の結果から、アルブミンおよびトランスフェリンは UVJ 抽出物中に検出され、免疫組織化学染色の結果から、両タンパクは SST に存在することが確認された。過去の研究で、アルブミンおよびトランスフェリンは抗酸化作用を有することが報告されており、ウズラの SST では、乳酸による運動停止作用に加え、アルブミンおよびトランスフェリンによる抗酸化作用により生存性が延長している可能性が示唆された。

(3) 精子-卵子間相互作用に関与する因子の探索

卵子の細胞膜分画をリガンドブロット解析し、胚盤部分およびそれ以外の部分の細胞膜に検出されるバンドを比較した。その結果、両方のサンプルに共通して検出されるバンドに加え、胚盤部分にのみ見られるいくつかのバンドを検出した。これらのバンドの LC-MS/MS 分析の結果から、いくつかの膜貫通タンパクを同定した。以上の結果から、卵子細胞膜に存在する膜貫通タンパクは精子の膜タンパクと結合し、胚盤部分とそれ以外の部分で局在が異なる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hiyama Gen, Mizushima Shusei, Matsuzaki Mei, Tobarai Yasuko, Choi Jae-Hoon, Ono Takashi, Tsudzuki Masaaki, Makino Satoshi, Tamiya Gen, Tsukahara Naoki, Sugita Shoei, Sasanami Tomohiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Female Japanese quail visually differentiate testosterone-dependent male attractiveness for mating preferences	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-28368-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishii Ayane, Kawai Masahito, Noda Haruka, Kato Hiroyuki, Takeda Kohei, Asakawa Kotomi, Ichikawa Yoshinobu, Sasanami Tomohiro, Tanaka Keiji, Kimura Yoko	4. 巻 8
2. 論文標題 Accelerated invagination of vacuoles as a stress response in chronically heat-stressed yeasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-20781-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuzaki Mei, Mizushima Shusei, Dohra Hideo, Sasanami Tomohiro	4. 巻 57
2. 論文標題 Expression of Transferrin and Albumin in the Sperm-Storage Tubules of Japanese Quail and their Possible Involvement in Long-Term Sperm Storage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 88 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2141/jpsa.0190049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kohsaka Tetsuya, Minagawa Itaru, Morimoto Masashi, Yoshida Takuya, Sasanami Tomohiro, Yoneda Yoshitaka, Ikegaya Naoki, Sasada Hiroshi	4. 巻 30
2. 論文標題 Efficacy of relaxin for cisplatin-induced testicular dysfunction and epididymal spermatotoxicity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Basic and Clinical Andrology	6. 最初と最後の頁 3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12610-020-0101-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuzaki Mei, Sasanami Tomohiro	4. 巻 1
2. 論文標題 Sperm Storage in the Female Reproductive Tract: A Conserved Reproductive Strategy for Better Fertilization Success	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Avian Reproduction	6. 最初と最後の頁 173 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-10-3975-1_11	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 Mizushima Shusei, Matsuzaki Mei, Sasanami Tomohiro	4. 巻 1
2. 論文標題 Handling of Gametes for In Vitro Insemination in Birds	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Avian and Reptilian Developmental Biology: Methods and Protocols	6. 最初と最後の頁 243 ~ 257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-7216-6_16	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24件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 笹浪知宏・松崎芽衣・水島秀成
2. 発表標題 ウズラ精子のダイニンATPase活性
3. 学会等名 日本家禽学会 2019年度秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹浪知宏、広橋教貴、松崎芽衣
2. 発表標題 ウズラの精子鞭毛長が受精に及ぼす影響
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹浪知宏
2. 発表標題 鳥類の受精戦略 その生理的意義とメカニズムー
3. 学会等名 山口大学時間学特別セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiro Sasanami
2. 発表標題 Female mating preference in bird: more masculine guys are popular for females after all!
3. 学会等名 福建農林大学セミナー（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹浪知宏・松崎芽衣
2. 発表標題 ウズラの精子鞭毛長と受精との関係
3. 学会等名 第 43 回 鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiro Sasanami
2. 発表標題 Mechanisms of successful fertilization in Japanese quail
3. 学会等名 Seminar in Sesoko Station, Tropical Biosphere Research Center University of the Ryukyus（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水島秀成・塚田光・笹浪知宏・小野珠乙・黒岩麻里
2. 発表標題 雄ウズラの生殖腺におけるDAZLの発現解析
3. 学会等名 日本家禽学会 2020年度春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笹浪知宏・平川泰成・大久保武・松崎芽衣・水島秀成
2. 発表標題 ウズラmembrane progesterin receptor の転写調節領域の解析
3. 学会等名 日本家禽学会 2020年度春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohiro Sasanami
2. 発表標題 Female mating preference in Japanese quail
3. 学会等名 Seminar in Seoul National University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松崎芽衣、水島秀成、広橋教貴、笹浪知宏
2. 発表標題 精子貯蔵管上皮細胞表面の糖鎖が精子侵入に及ぼす影響
3. 学会等名 日本家禽学会2018年度秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松崎芽衣、笹浪知宏
2. 発表標題 ニワトリ精子貯蔵管における貯蔵精子の更新に精漿が及ぼす影響
3. 学会等名 日本動物学会第89回札幌大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mei Matsuzaki, Tomohiro Sasanami
2. 発表標題 Mechanism of sperm-storage in the avian oviduct
3. 学会等名 International Symposium on Animal Production and Conservation for Sustainable Development 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木麻衣子、笹浪知宏
2. 発表標題 ウズラの受精における精子核の脱凝縮反応に関する研究
3. 学会等名 第42回鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市川佳伸、笹浪知宏
2. 発表標題 ウズラの受精における精子-卵子相互作用に関わる卵子側因子の探索
3. 学会等名 第42回鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松崎芽衣、広橋教貴、都築政起、前田照夫、水島秀成、笹浪知宏
2. 発表標題 ウズラ精子貯蔵管への精子侵入と精子競争との関係
3. 学会等名 日本家禽学会2019年度春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水島秀成、笹浪知宏、小野珠乙、黒岩麻里
2. 発表標題 ウズラの配偶子に発現するDNase Iの受精における機能
3. 学会等名 日本家禽学会2019年度春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市川佳伸、松崎芽衣、道羅英夫、水島秀成、笹浪知宏
2. 発表標題 ウズラの受精における精子-卵子相互作用に関わる因子の解析
3. 学会等名 家禽学会2017年度秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水島秀成、小野珠乙、黒岩麻里、笹浪知宏
2. 発表標題 ウズラ体細胞移植胚の作出効率に及ぼす卵紫外線照射の影響
3. 学会等名 家禽学会2017年度秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 笹浪知宏
2. 発表標題 ウズラの受精における精子-卵子相互作用の解析
3. 学会等名 日本動物学会第88回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomohiro Sasanami
2. 発表標題 Mechanism of oviductal sperm storage in birds
3. 学会等名 International Forum on Avian Germplasm and Genome Editing 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 笹浪知宏
2. 発表標題 鳥類の配偶者選択と受精戦略
3. 学会等名 信州大学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 笹浪知宏
2. 発表標題 鳥類の輸卵管における精子貯蔵機構とその応用
3. 学会等名 日本農芸化学会シンポジウム「鳥類の農芸化学-基礎研究から産業利用まで」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神作宜男, 戸張靖子, 笹浪知宏
2. 発表標題 ニワトリ発生胚下垂体におけるプロラクチン分子検出
3. 学会等名 日本家禽学会2018年度春季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松崎芽衣, イエンブイ, 中村有希, 前田照夫, 都築政起, 笹浪知宏
2. 発表標題 ニワトリ精子貯蔵管における貯蔵精子の更新に関する研究
3. 学会等名 日本家禽学会2018年度春季大会
4. 発表年 2018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