

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2010

課題番号：19580327

研究課題名(和文) 鞭毛運動の細胞内情報伝達機構-鶏精子の可逆的不動化をモデルとして

研究課題名(英文) Temperature-dependent regulation of fowl sperm motility - as a model for signal transduction mechanisms of flagellar movement.

研究代表者

芦沢 幸二 (ASHIZAWA KOJI)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：60128353

研究成果の概要(和文): 鶏精子の温度による可逆的な不動化現象の機構を明らかにするために、細胞膜の存在する正常精子と細胞膜を取り除いた除膜精子を用いて研究を行った。40℃で不動化を起こしている正常精子に  $Ca^{2+}$  を添加すると運動は再開した。その後、細胞内情報伝達物質の一つである PI3 キナーゼの阻害剤を加えると、運動性が低下した。これに対して除膜精子では、運動抑制効果は認められなかった。このことから、鶏精子の運動調節に PI3 キナーゼの関与が示唆された。また、この酵素は細胞膜あるいは細胞質に存在するものと推察された。

研究成果の概要(英文): The possible role of PI3-K in the reversible temperature-dependent immobilization of fowl sperm motility was investigated by using PI3 kinase inhibitor. Intact fowl sperm motility in TES/NaCl buffer remained negligible at the avian body temperature of 40°C but was activated immediately after the addition of  $Ca^{2+}$ . The subsequent addition of inhibitor inhibited the motility again. In contrast, these inhibition was not observed in the demembrated spermatozoa at 40°C. These results suggest that PI3 kinase which is not retained in the axoneme and/or accessory cytoskeletal components, but in the cell membrane or cytoplasm, may be involved in the maintenance of flagellar movement of fowl spermatozoa at 40°C.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：動物生殖生理学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：精子、鞭毛運動、運動調節、情報伝達、リン酸化

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類と鳥類の繁殖現象の大きな違いの一つに、雌性生殖道内における精子の受精能

保力持期間が挙げられる。哺乳類は、コウモリなど一部の動物種を除けば短く、24-48時間程度である。ところが、鳥類の精子は卵管

の精子貯留腺内で長期間生存できるが、この機構については不明な点が数多く残されている。ところで、精子の運動はダイニン (ATPase) と称される酵素が ATP を分解することで得られるエネルギーにより、微小管を滑らせることによって引き起こされる。「滑り運動」は、「外的環境」の変化を感知して巧みに調節されている。例えば、鳥類の精子は体温に近い 40 で運動を停止し、温度を下げると再び動き出す。これを温度による可逆的不動化現象と称している。このような現象は、哺乳類精子では見られない。むしろ、最活発な運動を行っている。この現象が、上述の長期生存機構に深く係わっているが、このメカニズムについては全く明らかにされていない。

もし、鳥類精子の不動化現象が受精時にも起こるとすれば、卵細胞との受精は不可能である。なぜなら、精子が卵黄膜を通過する際、哺乳類精子と同様に、精子自らの運動が必須だからである。ところが、鳥類は排卵時に多量の腹腔液を分泌し、この液は受精部位である卵管漏斗部にも流入する。排卵時以外には、このような現象は認められない。したがって、腹腔液中に精子の運動を賦活化させ、受精を助ける因子の存在が示唆された。我々はこの点に着目して、鶏の排卵時の腹腔液を分析した。その結果、運動促進因子の一つとして  $Ca^{2+}$  の存在が明らかになった。卵管内で不動化を起こしていた精子は、受精時になると、これが加わるため一斉に運動を開始するものと推測される。しかし、その詳細は全く説明されていない。

## 2. 研究の目的

先に述べたように、鳥類の精子は体温に近い 40 で運動を停止し、温度を下げると再び動き出す。これを温度による可逆的不動化現象と称している。鳥類精子は、「温度」という外的環境に影響を受けながら、最終的には細胞内で巧みな運動調節を行っている。本研究では、鶏精子を用いて、運動調節機構の多様性を分子レベルで明らかにする目的のために行った。

## 3. 研究の方法

供試精子は、白レグ成鶏から採取・混合し、TES/NaCl 緩衝液 (pH 7.4) で洗浄したものである。精子の運動性の観察は、ビデオカメラと加温装置を取り付けた位相差顕微鏡を用いて行った。細胞膜の存在する正常精子と Triton X-100 で細胞膜を取り除いた除膜精子に、 $Ca^{2+}$  や脱リン酸化酵素の阻害剤であるカ

リクリン A を加え、その前後に阻害剤を添加して、経時的な運動性の変化を観察した。精子細胞膜の流動性は蛍光色素である 1,6-dyphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) を用い、蛍光分光光度計で蛍光の異方性比を算出することによって計測した。ホスファチジル・イノシトール・3 キナーゼ (PI3K) 阻害剤として LY294002 を、対照試薬として LY303511 を用いた。さらに、Western blotting 法により、鶏精子に PI3K 抗体に反応する抗原が検出されるか否かについても検討した。また、一酸化窒素合成酵素 (NOS) の阻害剤として L-NMMA、L-NAME、L-NNA 及び L-NIL を用いた。また、アンドロゲン・レセプターのアンタゴニストとして flutamide を、アゴニストとして 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT) を使用した。さらに、プロテアソームの阻害剤として AM114 を、26S 複合体によってユビキチン化されたタンパク質の分解を抑制する MG132 を使用した。なお、ミオシンホスファターゼの阻害剤にはスベルミンを用いた。

## 4. 研究成果

PI3K 阻害剤 (0~100  $\mu$ M) を単独に添加しても、正常精子あるいは除膜精子の運動性は、30 及び 40 とともに濃度の差異による影響は認められず、30 では活発な運動性を示し、40 では不動化を起こしていた。これに対して、40 で不動化を起こしている精子に  $Ca^{2+}$  を添加すると運動は再開し、約 60% の値を示した。ところがその後、阻害剤を加えると、運動性は 10~20% まで低下した。添加順序を逆にしても抑制効果が認められた。一方、除膜精子に阻害剤を加えると、運動抑制効果は認められず、対照区と同様の値を示した。また Western blotting 法により、鶏精子内に PI3K 抗体を認識するバンドが検出された。以上の結果から、40 における鶏精子の運動調節に PI3K の関与が示唆された。また、この酵素やその基質は軸系あるいはそれに付随する細胞骨格系ではなく、除膜によって溶出する細胞膜あるいは細胞質に存在するものと推察された。

次に、NOS 阻害剤を添加しても、0~100  $\mu$ M の濃度域では正常精子と除膜精子の運動性に影響を及ぼさなかった。この現象は 2 mM  $CaCl_2$  や 100 nM カリクリン A の存在下でも同様であった。一方、30 で活発に運動している正常精子にアンドロゲン・レセプター・アンタゴニストである flutamide を加えると、運動性は濃度依存的に低下した。これに対して、アゴニストである DHT を先に加えて、あ

とから flutamide を添加すると、flutamide の運動抑制効果は認められず、60%前後の値を維持していた。また 40 °C では、flutamide の有無にかかわらず、正常精子は不動化を起こしたままだった。これらの精子に運動促進物質である  $Ca^{2+}$  やカリクリン A を加えることで運動が再開した。しかし、その後 flutamide を添加すると運動性は再び低下した。添加順序を逆にしても、flutamide の抑制作用を止めることはできなかった。Flutamide の代わりに hydroxyflutamide を加えても同様の結果が得られた。以上の結果から、鶏精子の運動調節に NOS は関係しないものの、アンドロゲン・レセプター活性が深く関与していると推察された。また、このレセプターは、細胞膜あるいは細胞質内に存在すると示唆された。

さらに、0~10  $\mu$ M の AM114 あるいは MG132 を添加して 10 分後の正常精子の運動性は、30 °C では全ての濃度域で 40%前後の運動性を示した。40 °C では、全ての濃度域において精子は不動化現象を起こし、運動は抑制されたままであった。除膜精子の場合、30 °C では AM114 及び MG132 添加区ではいずれの濃度域とも 50~60%前後の運動性を示した。30 °C において、AM114 あるいは MG132 の存在下での  $Ca^{2+}$  添加後の精子の運動性は、AM114 添加区のみ  $Ca^{2+}$  添加後に有意に抑制された。40 °C では、両阻害剤添加区において、 $Ca^{2+}$  添加後に運動性は回復したが有意に抑制されていた。反対に  $Ca^{2+}$  存在下での阻害剤添加では、30 °C において有意な運動抑制効果は見られなかったが、40 °C では阻害された。カリクリン A を用いた同様の実験では、両区間に差異は認められなかった。同様に、カリクリン A 存在下での両阻害剤の添加により運動性は抑制されたが有意差は観察されなかった。一方、除膜精子において、EGTA 添加により精子の運動性は低下したが、阻害剤添加の有無にかかわらず  $Ca^{2+}$  添加後に運動性は回復した。以上の結果から、プロテアソーム阻害剤である AM114 と MG132 が鶏精子の代謝に関係なく運動性に何らかの影響を及ぼしているものと推察された。

一方、0~0.5 mM のスペルミンを添加して 10 分後の正常精子の運動性は、30 °C では全ての濃度域で 40%前後の運動性を示した。40 °C では、全ての濃度域で 10%前後の運動性を示した。除膜精子の場合においては、30 °C では添加濃度が高くなるにしたがって運動性は有意に低下した。40 °C ではいずれの濃度域とも不動化現象を起こしていた。正常

精子が活発な運動を行っている 30 °C において、スペルミン存在下での  $Ca^{2+}$  添加後の精子の運動性に変化は見られなかった。精子が不動化を起こす 40 °C では、スペルミン添加区において、 $Ca^{2+}$  添加後に急激に運動性が回復した。反対に  $Ca^{2+}$  存在下でのスペルミン添加区では、30 °C、40 °C の両温度区において有意差は見られなかった。一方、除膜精子において、EGTA 添加により精子の運動性は低下したが、スペルミン添加の有無にかかわらず  $Ca^{2+}$  添加後に運動性は回復した。カリクリン A 存在下でのスペルミン添加後の精子は、30 °C、40 °C の両温度区において、有意な運動抑制効果が見られた。精子の細胞膜流動性は、30 °C、40 °C とともにスペルミン添加の有無に関係なく、ほぼ一定の値を示した。以上の結果から、スペルミンが鶏精子の軸系に直接作用して運動調節に何らかの影響を及ぼしているものと推察された。

## 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 13 件)

Lay, K.M., Ashizawa, K., Nakada, T. and Tatemoto, H.

N-glycosylation of zona glycoproteins during meiotic maturation is involved in sperm-zona pellucida interactions of porcine oocytes. *Theriogenology*, 75, 1146-1152, 2011, 査読あり.

Ashizawa, K., Kawaji, N., Nakamura, S., Nagase, D., Tatemoto, H., Katayama, S., Narumi, K. and Tsuzuki, Y.  
Temperature-dependent regulation of sperm motility of Ijima's copper pheasants (*Syrnaticus soemmerringii ijimae*), one of 'near threatened' species. *Anim. Reprod. Sci.*, 121, 181-187, 2010, 査読あり.

Endo, R., Ishii, A., Nakanishi, A., Nabenishi, H., Ashizawa, K. and Tsuzuki, Y.

Effect of the addition of beta-hydroxybutyrate to chemically defined maturation medium on the nuclear maturation, sperm penetration and embryonic development of porcine oocytes in vitro. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 23, 1421-1426, 2010, 査読あり.

Tsuzuki, Y., Toyama, H., Nabenishi, H., Morita, T. and Ashizawa, K.  
The effect of various concentrations of taurine during in vitro fertilization on the development of bovine embryos fertilized with spermatozoa from three different bulls. Asian-Aust. J. Anim. Sci., 23, 873-879, 2010, 査読あり.

Tsuzuki, Y., Matsubara, M. and Ashizawa, K.  
Effect of cysteamine added to maturation medium on nuclear maturation, glutathione and ATP contents of pig oocytes. J. Mamm. Ova Res., 26, 139-144. 2009, 査読あり.

Ashizawa, K., Omura, Y., Katayama, S., Tatemoto, H., Narumi, K. and Tsuzuki, Y.  
Intracellular signal transduction pathways in the regulation of fowl sperm motility: Evidence for the involvement of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) cascade. Mol. Reprod. Develop., 76, 603-610, 2009, 査読あり.

Tsuzuki, Y., Ikeuchi, K., Nabenishi, H. and Ashizawa, K.  
Effect of beta-hydroxybutyrate added to maturation medium on nuclear maturation of pig oocytes. J. Mamm. Ova Res., 26, 153-158, 2009, 査読あり.

Yamauchi, S., Nakamura, S., Lay, K.M., Azuma, T., Yakabi, T., Muto, N., Nakada, T., Ashizawa, K. and Tatemoto, H.  
Characteristics of Okinawan native agu pig spermatozoa after addition of low-density lipoprotein to freezing extender. J. Reprod. Dev., 55, 558-565, 2009, 査読あり.

Yamauchi, S., Nakamura, S., Yoshimoto, T., Hakada, T., Ashizawa, K. and Tatemoto, H.  
Prediction of the estrous cycle and optimal insemination time by monitoring vaginal electrical resistance (VER) in order to improve the reproductive efficiency of the Okinawan native Agu pig. Anim. Reprod. Sci., 113, 311-316, 2009, 査読あり.

Tsuzuki, Y., Nozawa, K. and Ashizawa, K.  
The effect of addition and removal of various cryoprotectants on the nuclear maturation and ATP content of immature porcine oocytes. Asian-Aust. J. Anim. Sci., 22, 328-335, 2009, 査読あり.

Tsuzuki, Y., Ugajin, M. and Ashizawa, K.  
Effect of adding glucose to maturation medium on the nuclear maturation and ATP content of porcine oocytes. J. Mamm. Ova Res., 25, 172-176, 2008, 査読あり.

Yoshimoto, T., Nakamura, S., Yamauchi, S., Muto, N., Nakada, T., Ashizawa, K. and Tatemoto, H.  
Improvement of the post-thaw qualities of Okinawan native pig spermatozoa frozen in an extender supplemented with ascorbic acid 2-O-alpha-glucoside. Cryobiology, 57, 30-36, 2008, 査読あり.

Tokeshi, I., Yoshimoto, T., Muto, N., Nakamura, S., Ashizawa, K., Nakada, T. and Tatemoto, H.  
Antihyaluronidase action of ellagic acid effectively prevents polyspermy as a result of suppression of the acrosome reaction induced by sperm-zona interaction during in vitro fertilization of porcine oocytes. J. Reprod. Dev., 53, 755-764, 2007, 査読あり.

〔学会発表〕(計 17 件)

大山奈央・芦沢幸二・續木靖浩  
鶏精子の細胞膜流動性と運動制御との関係, 第3回日本暖地畜産学会, 2010年10月16日, 別府

下川一輝・屋嘉比達郎・仲田 正・芦沢幸二・太田成男・建本秀樹  
琉球在来豚アグー精子の凍結処理時における新規細胞死抑制タンパク質 (PTD-FNK protein) 処理による融解後の性状性改善効果, 第3回日本暖地畜産学会, 2010年10月16日, 別府

Koji Ashizawa, Noritomo Kawaji, Daigo Nagaseら  
Sperm motility modulation of Ijima's copper pheasants (Syrmaticus

soemmerringii ijimae), one of 'near threatened' species, 11th International Symposium on Spermatology, 2010年6月24-29日 Okinawa, Japan

Hideki Tatemoto, Satoshi Nakamura, Koji Ashizawaら  
Improvement of the post-thaw qualities of Okinawan native pig Agu spermatozoa after addition of AA-2G and LDL to freezing extender, 2010年6月24-29日 11th International Symposium on Spermatology, Okinawa, Japan

片山誠一・芦沢幸二ら  
幼若ラット子宮のWnt7aおよびインディアンヘッジホッグ遺伝子の発現に及ぼすメトキシクロールおよびエチニルエストラジオールの影響, 第36回日本トキシコロジー学会学術年会, 2009年7月6日, 盛岡

片山誠一・芦沢幸二ら  
幼若ラット子宮のWnt7aおよびインディアンヘッジホッグ遺伝子の発現に及ぼすエストロゲンレセプター選択的アゴニストおよびアンタゴニストの影響, 第35回日本トキシコロジー学会学術年会, 2008年6月26日, 東京

〔図書〕(計0件)

〔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〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芦沢 幸二 (ASHIZAWA KOJI)  
宮崎大学・農学部・教授  
研究者番号: 60128353

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: