

鳥類における受精のライブイメージングにむけた技術開発

著者	市川 佳伸
雑誌名	技術報告
巻	22
ページ	11-14
発行年	2017-03-10
出版者	静岡大学技術部
URL	http://doi.org/10.14945/00010243

鳥類における受精のライブイメージングにむけた技術開発

市川 佳伸

技術部 教育研究支援部門

1. はじめに

受精に関する研究は、畜産業や医療を背景に主には哺乳類で活発に進められてきた。近年ではマウス等の実験動物でのゲノム編集技術の進歩により、受精に関連する分子が次々と明らかとなっているとともに、ライブイメージング技術も確立しつつあり、ヒトの不妊治療や避妊薬の開発の基礎となっている。その一方で、受精メカニズムや受精戦略は種により多種多様である。これは、生物によって生育環境が異なり、精子の形態や卵子のサイズも大きく異なることから明らかであるが、一般にはあまり認知されていない。哺乳類以外の受精メカニズムの解明は、基礎研究にとって重要課題であるだけでなく、種の進化や多様性を考え、生命の神秘を感じるための教育題材としても非常に魅力的なものである。

鳥類の受精における卵子と精子の相互作用について模式的に表した(図1)。卵子は卵膜と呼ばれる膜で被われている。この卵膜はZPタンパク質と呼ばれる糖タンパク質で構成されている。精子はまず卵子を被う卵膜と結合し、先体反応を起こす。先体反応とは精子頭部の構造変化で、これにより放出されたプロテアーゼの作用によりZPタンパク質を加水分解することで卵膜に孔状構造を形成し、精子は卵膜を通過する。その後、精子は卵細胞内に侵入し受精が成立する。しかし、卵膜に孔を形成した後、精子がどのようにして卵膜を通過し卵細胞内に侵入するか、その仕組みや関連する因子は全く分かっていない。

受精の仕組みについて、ほ哺乳類のように研究が進んでいない理由の1つとして、体外受精法が確立していない事が挙げられる。体外受精が困難である理由は、鳥類特有の受精生理にある。鳥類卵は排卵後に卵管に取り込まれ、直ちに精子が結合し受精がおけると同時に、卵管から卵白が分泌され卵子を被う。鳥類卵は多精受精であり1つの卵に多数の精子が侵入するが、卵白が付着した卵には精子が結合する事が出来なくなる。つまり、排卵後の卵子はすぐに卵白が付着するので、体外受精に使用可能な卵子を得る事が難しいのである。また卵子のサイズが極端に大きく取り扱いが難しい事も理由に挙げられる。

そこで本研究では、ウズラを実験材料とし、卵胞から卵膜だけを単離し精子と培養する手法を応用し、精子が卵膜を通過する様子を顕微鏡下で観察するためのライブイメージング法の技術開発と受精メカニズムの解析を目的とした。

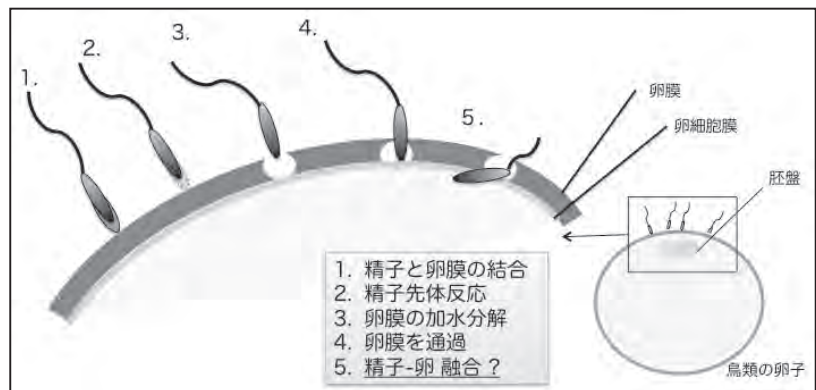


図1 鳥類の受精(模式図)

2. 材料および方法

2.1 実験動物

実験には8から20週齢のウズラ (*Coturnix japonica*) を使用した。飼育は明期14時間、暗期10時間の光線管理を行い、市販の飼料を不断給餌とし、水も不断給水とした。

2.2 卵膜の単離

雌ウズラを断頭屠殺し、最大卵胞を採取した。ピンセットとハサミを用いて卵胞膜細胞層を剥がした後、生理食塩水中で卵黄を洗い流し、基底膜と卵膜に挟まれたシート状の顆粒層細胞を得た。これを純水中に移し、浸透圧ショックにより顆粒膜細胞を破壊することで卵膜を取り出した。単離した卵膜はPBS中に保存した。この方法は Gilbert ら^[1]の方法を参考にした。またこれらの実験動物の取り扱い、静岡大学実験動物管理委員会の指針に従った。

2.3 精子の採取

雌ウズラと交尾中の雄ウズラから射出直前に精子を採取した。精子は37°Cに加温した1.25 mM CaCl₂および1.8 mM MgSO₄を含むハンクス平衡塩類溶液 (HBSS) に懸濁し、血球計算盤を用いて精子濃度を測定した。

2.4 卵膜の媒精実験

Kuroki and Mori^[2]の方法を参考に、試験管内での卵膜の媒精実験を行った。PBSで洗浄した卵膜を約5 mm×5 mmに切り出し、37°Cに加温したHBSSに入れ、 1×10^7 cells/mLとなるように精子懸濁液を加え37°Cで培養した。観察は光学顕微鏡を用い、デジタルカメラで記録した。

2.5 免疫組織化学染色

雄ウズラと交尾し受精卵を毎日産卵している雌ウズラを使用した。排卵予定時刻の30分後に断頭屠殺し、卵管から受精卵を採取した。ブアン氏液に浸漬固定後、胚盤部分とそれ以外の部分に切り分け、パラフィンに包埋して切片を作製した。一次抗体はRabbit anti-ZP3 IgG (1:2000)を使用し、二次抗体には、Alexa Fluor546 Goat anti-Rabbit IgG (1:4000)を用いた。また、DAPIで核染色し、2重染色して蛍光顕微鏡で観察した。

3. 結果

3.1 媒精実験

卵胞から単離した卵膜と精子を培養する媒精実験という手法が過去に報告されており、この方法では、精子により卵膜に孔が形成されることが報告されている^[2]。本研究ではこの方法を応用し、精子が卵膜に孔を形成し、通過する様子を観察することとした。

まず、卵膜を培養しながら顕微鏡で観察できるような小型のチャンバーを試作した (図2A)。2枚のスライドガラスの間に0.5 mm厚のシリコンシートを挟み、中央に15 mm×15 mm程度の空間を作り、そこにHBSSと5 mm×5 mm

程度に切った卵膜を入れ、 1×10^7 cells/mLとなるように精子懸濁液を添加した。このチャンバーを小型ホットプレートで37°Cに加温しながら顕微鏡で観察した。その結果、精子が卵膜に結合している様子が観察され、10分程で孔が形成され始めるこ

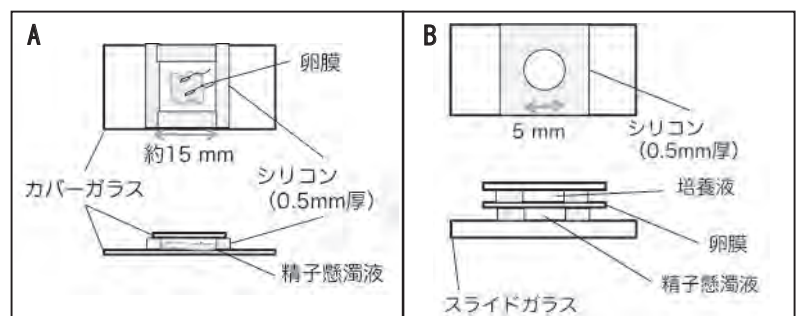


図2 媒精実験用チャンバー

とが確認された (図 3 A)。孔は次第に広がり、15 分程で直径約 $20\ \mu\text{m}$ の孔が形成された (図 3 B, C, D)。しかし、精子は孔を形成した後、卵膜を通過することは無く、そのまま留まっているように見えた。これは、卵膜がスライドガラスに密着するなどして精子が通過するスペースが確保されていないことが原因の 1 つであると考えられた。またこの方法では精子は卵膜の両面に無数に結合するため、精子が通過した場合に確認が難しい事が考えられた。このことから、チャンバーの仕組みを見直した。

図 2B に示すように、 $15\ \text{mm} \times 15\ \text{mm}$ のシリコンシート (0.5 mm 厚) 2 枚で卵膜を挟んだ。シリコンシートには中央に直径 5 mm の穴を開けており、さらに両側からカバーガラスで挟むことにより卵膜の両側に空間を作った。この卵膜の片側には HBSS、もう片側には精子懸濁液を加えた HBSS を満たし、培養しながら顕微鏡で観察した。その結果、精子は卵膜に孔を形成するものの通過する様子はまったく確認されなかった (図 3 E)。

3.2 免疫組織化学染色による受精卵の観察

卵膜の媒精実験では、精子が卵膜を通過する様子を観察する事は出来なかった。そこで、受精卵を使って、卵膜を通過した精子を直接観察する事を試みた。受精の成立のためには、精子が卵膜を通過することが必要であり、受精卵では卵膜を通過する前後の精子が観察されるはずであると考えた。

鳥類では、排卵すると直ちに精子と結合して受精がおこる。本実験では、出来るだけ精子が卵膜を通過した直後の様子を観察するため、排卵予想時刻の 30 分後に卵管から受精卵を採取した。受精卵は直ちに固定し、免疫組織化学染色に用いた。抗体は、卵膜の主要な構成要素である ZP3 に対する抗体を使用し、DAPI による核染色の 2 重染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

その結果、胚盤の部分では卵膜に孔状構造が形成されている事が観察された。さらにその内側の胚盤内に侵入した精子頭部が観察された (図 4 A, B)。一方で胚盤以外の部分では、卵膜に孔状構造が観察されたが、精子はそのまま留まっている様子が観察された。卵細胞内に侵入した精子は観察されなかった (図 4C)。未受精卵では卵膜の孔状構造や精子は観察されなかった (図 4D)。

4. 考察

媒精実験用のチャンバーを作製し、精子と卵膜の相互作用をリアルタイムで観察する事が出来た。精子は卵膜に結合し孔を形成するが、通過する事はなかった。このことから、精子は自身の運動のみでは

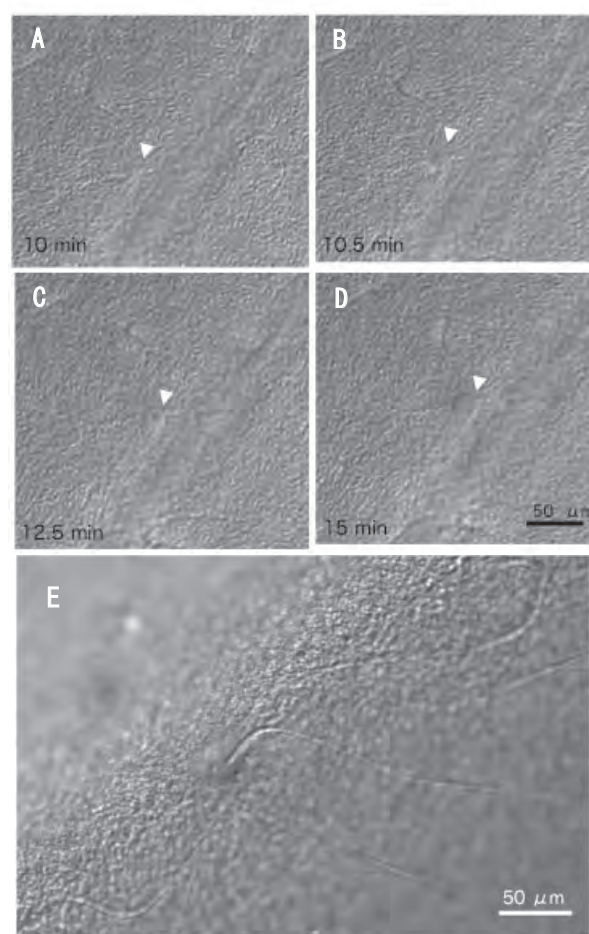


図 3 卵膜に形成された孔と結合した精子

(A) 精子を添加して培養開始 10 分後。精子が結合している (矢じり部分)。(B) 10.5 分後。孔の形成が確認された。(C) 12.5 分後。孔が拡大している。(D) 15 分後。孔の拡大が終了した。精子が結合している。(E) 卵膜の両側にスペースを作ったチャンバーで媒精した。精子は孔を形成するが通過しなかった。

卵膜を通過することは出来ず、別な要素が必要である事が示された。

このようなチャンバーを使用する事により、精子の挙動が詳しく解析できる事から、相互作用に関わる未知の因子の解明に役立つものと期待される。

免疫組織化学染色では、精子は胚盤部分でのみ卵膜を通過し、卵細胞内に侵入している事が示された。卵細胞の核は胚盤部分に存在しており、受精成立を目指す精子が胚盤部分から侵入してくることは、受精の効率化としては理にかなっている。卵膜の内側には、卵細胞膜があり、精子との結合や相互作用に関わる何らかの因子が胚盤部分にのみ存在する可能性がある。

今後は、細胞膜について、免疫組織化学染色法や電子顕微鏡観察などを用いて、胚盤とそれ以外の部分における構成要素や構造の違いを詳細に調べていきたい。また、精子との相互作用に関わる因子の発見につなげたい。

参考文献

[1] Gilbert AB, Evans AJ, Perry MM and Davidson MH. A method for separating the granulosa cells, the basal lamina and the theca of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 50: 179- 181. 1977.

[2] Kuroki M and Mori M. Binding of spermatozoa to the perivitelline layer in the presence of a protease inhibitor. *Poultry Science*, 76: 748-752. 1997.

謝辞

本研究は JSPS 科研費 16H00473 の助成を受けた。

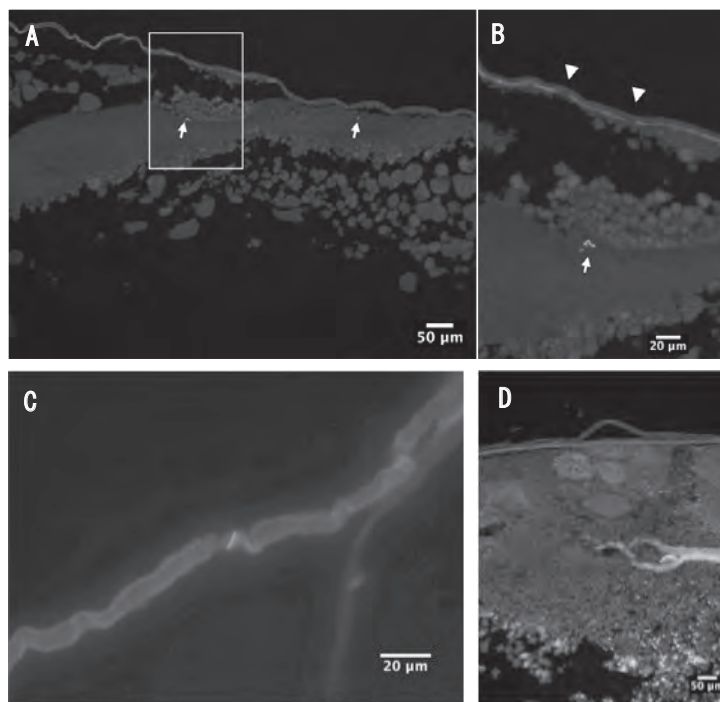


図4 受精卵の免疫組織化学染色

(A) 受精卵の胚盤部分。胚盤内に侵入した精子（矢印）が観察された。(B) Aの白枠部拡大。卵膜に形成された孔（矢じり）が観察された。(C) 受精卵の胚盤以外の部分。卵膜に孔が形成されているが精子は卵膜に留まったままである。(D) 未受精卵