

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380153

研究課題名(和文) 家禽の輸卵管で精子の運動を制御する分子スイッチの探索と動物精子の液状保存への応用

研究課題名(英文) Mechanism of sperm storage in the female reproductive tract in birds

研究代表者

笹浪 知宏 (Sasanami, Tomohiro)

静岡大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80322139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：家禽の輸卵管には精子貯蔵管(SST)と呼ばれる管状の構造が存在し、射精された精子を長期貯蔵する。本研究では、SST内で精子の運動を低下させる仕組みを調べた。SSTが分布する子宮腔移行部の抽出物から精子の運動性を低下させる運動抑制物質として乳酸を同定した。射出精子を乳酸とインキュベートすると、精子の細胞内pHが低下し、これが精子の鞭毛運動を抑制することがわかった。SSTは生体内で低酸素状態になっており、SSTが大量の乳酸を産生する原因になっていると考えられた。乳酸を添加し低酸素条件にした培養液で精子を5日間貯蔵したところ、無処理の培養液と比較して5日後の精子の形態維持効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：In several vertebrate groups, post-copulatory sperm viability is prolonged by their storage in specialized organs within the female reproductive tract. In birds, ejaculated sperm can be stored in a quiescent stage within oviductal sperm storage tubules (SSTs), thereby preventing the loss of fertility for up to 15 weeks; however, the mechanism by which once-activated spermatozoa are rendered quiescent within SSTs remains a mystery. Here, we show that quail SSTs maintain a hypoxic niche and secrete lactic acid. Sperm immobility is induced by lactic acid through cytoplasmic acidification and flagellar dynein ATPase inactivation. The assertion that hypoxia played a role in the process of sperm storage was further supported by improved morphological preservation of ejaculated spermatozoa under hypoxic conditions at body temperature. Our results open up new opportunity for technological improvement in prolonging sperm longevity at ambient or body temperature.

研究分野：繁殖生物学

キーワード：精子貯蔵管 輸卵管 精子貯蔵 乳酸 ウズラ

1. 研究開始当初の背景

動物は、受精の戦略を特殊化させることによって、生存競争に打ち勝ち、今日に至る進化を遂げてきた。これまでの半世紀にも及ぶ研究により、配偶子間の種特異的な結合、すなわち精子と卵子との結合・融合に関するプロセスは詳細に調べられてきた。しかしながら、射出された精子がいかにかして雌性生殖器官内を移動し、卵子と出会うかについての分子機構はほとんど理解されていない。

鳥類の雌性生殖器官である卵管には、交尾後、精子を長期間貯蔵し、生存させるための精子貯蔵管(Sperm Storage Tubules; SST)が存在する。特筆すべきは、鳥類では、一度交尾を行えば、精子が SST 内で長期間生存したまま貯蔵される為、その後交尾を繰り返さなくても、一定期間受精卵を産み続ける点である(例えば、七面鳥で約 8~15 週間、ニワトリで約 2 週間、ウズラで約 10 日間)。SST 内では、精子は運動を停止し、あたかも休眠状態のように振る舞っていることが観察されているが、①雌性生殖器官内に射精された精子が如何にして SST 内へ侵入し、②如何にして SST 内で精子が長期間維持され、③一旦 SST 内に貯蔵された精子が如何にして再び SST から放出され、卵子まで到達するのかについての分子機構はまったく理解されていない。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究をさらに発展させ、鳥類特有の精子貯蔵の分子機構を解明するとともに、精子貯蔵に関与する生理活性物質の同定を目的とした。また、この生理活性物質は種を超えて効果を有すると考えられることから、動物の精子に共通した運動制御機構の原理を発見・解明することを目標とした。そして、この仕組みを応用し、次のステップでは、射出精子をインビトロで長期間液状保存し、これまでにない視点からの精子保存方法の開発を目指すことを目標としている。

3. 研究の方法

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。400 万精子/ml になるよう精子懸濁液を希釈し、39°C でインキュベートしながらハイスピードカメラを用いて精子の運動を記録した。産卵を繰り返しているウズラから UVJ を摘出し、湿重量 50 mg/ml となるように PBS 中で細切し抽出を行った。細胞片を低速遠心で落とした後、上清を 20,000 x g、4 °C で 10 分間遠心し、UVJ 抽出物を得た。UVJ 抽出物を凍結乾燥させ、少量の PBS に溶解した後、Superdex 200pg によるゲル濾過クロマトグラフィーの供した。精子の運動抑制活性を有する画分を C22 逆相カラムを用いた HPLC および

preparative TLC により分画し、活性を追跡した。活性画分を <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY および HMQC 解析に供し、構造決定を行った。

UVJ からコラゲナーゼ消化により SST を単離し、ハンクス平衡塩類溶液中で培養した。経時的に培養液を回収し、培養上清に含まれる乳酸を測定した。単離した SST または UVJ の粘膜上皮細胞から total RNA を抽出し、RNAseq 解析に供した。またレーザーマイクロダイセクションによって SST 部分を切り取り解析に用いた。

ウズラの射出精子を採取し、様々な濃度の生理活性物質とインキュベートした。精子の細胞内 pH, カルシウム濃度およびミトコンドリア活性をそれぞれ pHrodo, Fluo8H および JC-1 を用いて測定した。また、精子の ATP 量、ATPase 活性および鞭毛の滑り運動に対する効果を調べた。

4. 研究成果

(1) ウズラ SST に含まれる精子の運動抑制因子の同定

射出精子をゲル濾過分画とインキュベートすると、分子量 10 kDa 以下の画分に精子の運動が不活発にし、鞭毛を伸ばす活性があることがわかった。分子量 10 kDa 以下のゲル濾過分画を C22 逆相カラム及び preparative TLC で分離し、活性を追跡したところ、精子の運動抑制物質は親水性低分子であることが予測された。構造解析の結果、この活性成分は乳酸と同定された(図 1)。

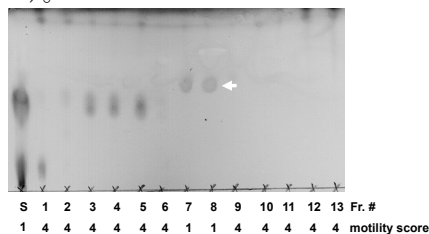


図1. UVJから単離した精子運動抑制因子のTLC分析  
フラクション7および8に強い運動抑制活性が見出された。

(2) SST における乳酸の産生機構の解明

レーザーマイクロダイセクションにより凍結切片より SST および SST 近傍に存在する上皮細胞を単離し、これらの組織抽出物中の乳酸濃度を測定した。その結果、SST 抽出物には 13 mM という極めて高濃度の乳酸が含まれ、近隣の上皮細胞より 5 倍以上も高い値を示した。コラゲナーゼによって単離した SST をグルコース添加培養液で培養したところ、SST は培養

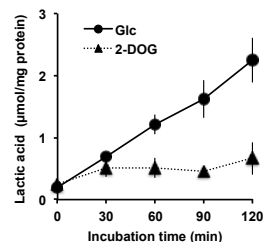


図2. 培養SSTからの乳酸の放出  
単離したSSTをグルコース添加培地(Glc)とデオキシグルコース(2-DOG)添加培地で培養し、経時的に培養液中の乳酸を測定した。

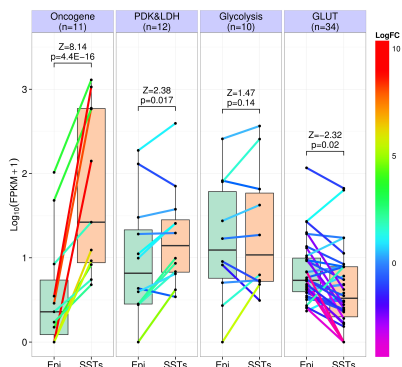


図3. SSTとSST近傍の上皮細胞におけるRNAseq解析  
解糖系に関する酵素やトランスポーターの発現量は  
増強していないが、癌原遺伝子の発現が顕著に増大した。

時間とともに培養液中に乳酸を放出することがわかった。この乳酸の放出は培養液にデオキシグルコースを添加することで阻害されたことから(図2)、SSTは解糖系を介して乳酸を放出すると考えられた。しかしRNAseq解析の結果から、SSTでは、解糖系の代謝酵素、グルコース輸送体の発現量の亢進は認められなかった。c-Fos、c-Junなどの低酸素状態で発現が上昇する遺伝子の発現量が高いことが判明した(図3.)。

### (3) 乳酸による精子の運動抑制機構の解明

射出精子を乳酸とインキュベートすると、精子は乳酸の濃度に依存して運動を低下させた。精子の細胞内pH、カルシウム濃度およびミトコンドリア活性は乳酸の添加により低下することが分かった。細胞内ATP量は乳酸の添加で変化しなかったが、ATPase活性および鞭毛の滑り運動は乳酸の添加によって低下することがわかった。以上のことから、SSTから放出された乳酸により、SST内腔が酸性化され、このことにより、精子の細胞内pHが低下し、これが精子の運動を強力に抑制する仕組みが明らかとなった。

### (4) 精子のインビトロでの長期保存

1~3.までの研究成果により、SST内腔は低酸素状態であり、高濃度の乳酸が含まれることが判明した。よって、この条件をインビトロで再現すれば精子を体温付近で長期保存可能であると予想された。そこで、窒素処理により酸素濃度を低下させた培養液に乳酸を添加した保存液を作成し、射出精子を41.5℃で5日間貯蔵した。形態観察の結果、無処理群と比較して、処理群では、

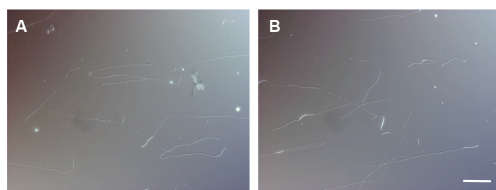


図4. 精子のインビトロでの長期保存の試み  
A: 無処理の培養液で貯蔵した精子とB: 10 mM乳酸を含む  
低酸素状態の培養液で貯蔵した精子。Scale bar=50 μm

5日後においても、精子の構造が維持されており、本条件の有用性が示唆された(図4)。しかし、5日間貯蔵した精子を人工授精しても、受精卵を得ることが出来なかった。このことは、高濃度の乳酸および低酸素状態という本研究で明らかになった条件に加え、さらなるメカニズムが存在することを示唆している。

今後、SST内で精子が長期間維持される仕組みの理解がさらに進めば、室温での精子の長期液状保存技術が開発可能であると考えている。

## 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 3 件)

(1) Nagai, H., Sezaki, M., Kakiguchi, K., Nakaya, Y., Lee, H. C., Ladher, R., Sasanami, T., Han, J. Y., Yonemura, S. and Sheng, G.

Cellular analysis of cleavage-stage chick embryos reveals hidden conservation in vertebrate early development.

*Development*, 142 (7): 1279-1286 (2015).

(2) Sasanami, T., Izumi, S., Sakurai, N., Hirata, T., Mizushima, S., Matsuzaki, M., Hiyama, G., Yorinaga, E., Yoshimura, T., Ukena, K. and Tsutsui, K.

A unique mechanism of successful fertilization in a domestic bird. *Scientific Reports*, 5, Article number: 7700 (2015)

(3) Mizushima, S., Hiyama, G., Shiba, K., Inaba, K., Dohra, H., Ono, T., Shimada, K. and Sasanami, T.

The birth of quail chicks after intracytoplasmic sperm injection.

*Development*, 141(19): 3799-3806 (2014)

[学会発表] (計 16 件)

(1) 笹浪知宏、青谷龍郎、檜山源、水島秀成、松崎芽衣、小野貴史、都築政起、雌ウズラの配偶者選択を制御する雄側の要因、日本家禽学会 2015 年度春季大会、2015 年 3 月 30 日、宇都宮大学 (宇都宮市)

(2) 松崎芽衣、柴小菊、稲葉一男、鈴木智大、道羅英夫、檜山源、水島秀成、笹浪知宏、ウズラ精子貯蔵管から放出される乳酸による精子運動抑制機構、日本家禽学会 2015 年度春季大会、2015 年 3 月 30 日、宇都宮大学 (宇都宮市)

(3) 市川佳伸、笹浪知宏、ウズラの受精過程のライブイメージング、日本家禽学会 2015 年度春季大会、2015 年 3 月 30 日、宇都宮大学 (宇都宮市)

(4) 笹浪知宏、久枝雅広、水島秀成、ウズラ胚盤抽出物による精子頭部の膨化反応、日本畜産学会第119回大会、2015年3月28日、宇都宮大学(宇都宮市)

(5) 笹浪知宏、鳥類の生殖戦略と受精：その生理的意義と分子機構、第10回広島大学JAB特別セミナー、2014年12月18日、広島大学(東広島市)

(6) 笹浪知宏、松崎芽衣、水島秀成、ウズラの精子貯蔵管における精子貯蔵と活性化のメカニズム、第46回精子研究会、2014年12月13日、東京医科大学病院(新宿区)

(7) Tomohiro Sasanami, Mei Matsuzaki, Shusei Mizushima, Unique mechanisms of successful fertilization in birds, CDB seminar, 2014. 12. 2, RIKEN CDB, Kobe, Japan

(8) 笹浪知宏、鳥類の輸卵管における受精戦略、日本動物行動学会ラウンドテーブル、2014年11月1日、長崎大学(長崎市)

(9) Tomohiro Sasanami, Mei Matsuzaki, Shusei Mizushima, Effects of cloacal gland secretion on the fertilization in Japanese quail (*Coturnix japonica*), 10th Asia Pacific Poultry Conference, 2014. 10. 19-23, ICC Jeju, Jeju, Korea

(10) Shusei Mizushima, Gen Hiyama, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba, Hideo Dohra, Tamao Ono, Kiyoshi Shimada, Tomohiro Sasanami, Full-term development of quail egg by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and use of ICSI for avian transgenesis. 10th Asia Pacific Poultry Conference, 2014. 10. 19-23, ICC Jeju, Jeju, Korea

(11) 久枝雅広、笹浪知宏、水島秀成、ウズラの受精におけるγ-チューブリンの動態に関する研究、日本家禽学会2014年度秋季大会、2014年9月28日、鹿児島大学(鹿児島市)

(12) 笹浪知宏、檜山源、水島秀成、松崎芽衣、ウズラの配偶者選択に関する研究、日本家禽学会2014年度秋季大会、2014年9月28日、鹿児島大学(鹿児島市)

(13) 水島秀成、檜山源、柴小菊、稲葉一男、道羅英夫、小野珠乙、島田清司、笹浪知宏、ウズラの受精時に卵を活性化させる新規精子ファクターの探索、日本家禽学会2014年度秋季大会、2014年9月28日、鹿児島大学(鹿児島市)

(14) 笹浪知宏、松崎芽衣、水島秀成、筒井

和義、ウズラ精子貯蔵管への精子の侵入に及ぼす精漿成分の効果、日本動物学会第85回仙台大会、2014年9月11-13日、東北大学(仙台市)

(15) 松崎芽衣、水島秀成、柴小菊、稲葉一男、笹浪知宏、乳酸はウズラ精子貯蔵管における精子の運動停止に関与する、日本動物学会第85回仙台大会、2014年9月11-13日、東北大学(仙台市)

(16) 笹浪知宏、松崎芽衣、水島秀成、鳥類の輸卵管における受精の補償機構、日本動物学会第85回仙台大会シンポジウム、性的対立～対立の構図：行動から分子へ、2014年9月12日、東北大学(仙台市)

[図書] (計 3件)

(1) Matsuzaki, M., Hiyama, G., Mizushima, S., Shiba, K., Inaba, K. and Sasanami, T.\*  
Specific mechanism of sperm storage in avian oviducts.  
*In Sexual Reproduction in Animals and Plants*, H. Sawada, N. Inoue, and M. Iwano Eds., Springer, pp23-30 (2014)

(2) 笹浪知宏、松田幹、鳥類(ニワトリ、ウズラ)の受精  
DOJIN BIOSCIENCE SERIES 動植物の受精学、澤田均編、化学同人、(2014)

(3) 大久保武、神作宜男、笹浪知宏、ニワトリの繁殖  
シリーズ<家畜の科学>ニワトリの科学、古瀬充弘編、朝倉書店(2014)

[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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹浪 知宏 (SASANAMI, Tomohiro)

静岡大学・学術院農学領域・准教授

研究者番号：80322139

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：