

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660211

研究課題名(和文)鳥類の受精と発生に必須なスパイラルオシレーションの作動機序と多精受精における役割

研究課題名(英文)Roles of spiral-like Ca²⁺ oscillations in avian fertilization

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：鳥類では受精時に多数の精子が卵子内に侵入する多精受精を行うため、顕微受精による個体作出は困難であった。本研究では、精子に含まれるホスホリパーゼCzeta、クエン酸合成酵素およびアコニット酸ヒドラーターゼを用いれば多精受精を体外で再現可能であることを示した。鳥類の卵子は受精時に特徴的なカルシウム波が観察される。精子侵入直後に起こる一過性の上昇反応とその後1時間以上継続するスパイラルカルシウムオシレーションである。前者は減数分裂の再開に必要であり、後者は初期発生の進行に重要であることを突き止めた。以上、本研究により、鳥類の受精メカニズムの理解が大きく進んだ。

研究成果の概要(英文)：Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) has not been successful in birds because of the difficulty in mimicking the physiological polyspermy that takes place during normal fertilization. Here, we report that injection of a single spermatozoon with sperm extract (SE) or its components led to the development and birth of healthy quail chicks. SE contains three factors phospholipase C (PLCZ), aconitate hydratase (AH), and citrate synthase (CS) all of which are essential for full egg activation and subsequent embryonic development. PLCZ induces a transient Ca²⁺ rise required for the resumption of meiosis. AH and CS are required for long-lasting, spiral-like Ca²⁺ oscillations, which are essential for cell cycle progression in early embryos. We also found that coinjection of cRNAs encoding 3 factors supported full development of ICSI-generated zygotes without the use of SE. These findings will help assist our understanding of the mechanism of avian fertilization and embryo development.

研究分野：繁殖生物学

キーワード：受精 多精受精 スパイラルカルシウムオシレーション 精子ファクター クエン酸合成酵素 アコニット酸ヒドラーターゼ ウズラ

1. 研究開始当初の背景

哺乳類をはじめとした多くの動物種における受精では、一個の卵子に一個の精子が侵入する単精受精が行われる。一方で、一部の両生類、爬虫類および鳥類等では、一個の卵子に複数の精子が侵入する多精受精が行われる。受精時に卵子は減数分裂の再開等の卵子活性化反応を起こすが、この過程には卵細胞質内カルシウムイオン濃度の上昇を伴うことが知られており、研究の進んでいる哺乳類では、精子に含まれるホスホリパーゼ Czeta と呼ばれるタンパク質がカルシウム濃度の上昇反応を引き起こす精子ファクターであることが明らかにされている。これまでの研究で、鳥類では、一過性の Ca^{2+} 濃度の上昇の数分後に起こるスパイラル様の Ca^{2+} 上昇反応 (スパイラルオシレーションと命名) が起こること、スパイラルオシレーションが、その後の発生に必須であること、スパイラルオシレーションを惹起する新規卵子活性化因子が精子抽出物中に存在することを世界に先駆けて発見している。しかし、スパイラルオシレーションを誘起する精子ファクターおよびその作動機序は不明であった。

鳥類では、ウイルスを用いないで確実に外来遺伝子を導入する方法は現在もお確立されていない。我々の研究グループでは、トランスジェニックマウスの作出に有効なツールである卵細胞質内精子注入-精子媒介法 (ICSI-SMGT 法) をウズラで確立し、Triton X-100 処理を施した精子を用いることで、GFP 発現ウズラ胚の作出に成功した。一方、 IP_3 と精子抽出物を投与したウズラ顕微授精胚では、孵化まで発生が進行するのに対して、Triton X-100 処理を施した精子の ICSI-SMGT 胚は卵割ステージ V で停止することが大きな問題として残されている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、本研究代表者が発見した「鳥類の新規卵子活性化因子」の実体を解明し、如何にしてスパイラルオシレーションを惹起するのか、そして如何にしてその後の発生を開始させるのか、その作動機序を解明することを目的とした。加えて、本研究では、ICSI-SMGT ウズラ卵の作出に最適な精子処理法を検討した。

3. 研究の方法

精子抽出物からスパイラルオシレーションを惹起する新規精子ファクターを単離同定するために、抽出物をゲルろ過クロマトグラフィーに供した。抽出物を卵子に投与し、スパイラルオシレーションを惹起するか否かで活性を追跡した。活性を有する画分を SDS-PAGE で分離し、分離されたバンドを in-gel digestion および LC-MS/MS 解析に供し、de novo sequencing により実態解明を行った。得られた新規精子ファクターの cRNA を作成し、精子抽出物を用いないで、cRNA のみで

も顕微受精胚が孵化するかを検証した。

さらに、新規精子ファクターおよび精子抽出物を用いた遺伝子組み換えウズラ胚の作出にも着手した。すなわち、TritonX-100、ジメチルスルフォキシド、リゾレシチンまたは凍結融解により細胞膜にダメージを与えた精子と GFP 発現ベクターとインキュベートし、顕微受精に供した。

4. 研究成果

(1) ウズラの胚発生に必須な卵細胞質内 Ca^{2+} 波の動態解析

2 ng の精子抽出物を投与した場合、注入部位から同心円状に広がる Ca^{2+} 波が観察され、投与後約 5 分で胚盤全体に到達した。その後注入部位からスパイラル様の Ca^{2+} 波が約 1 分間隔で誘発され、それが少なくとも 1 時間以上計測された (図 1)。一方、1 ng の精子抽出物を投与した場合、同心円状に広がる Ca^{2+} 波が観察されたが、胚盤全体に伝搬すること無く、次のスパイラル様の Ca^{2+} 波が誘発された。しかし、スパイラル Ca^{2+} 波の間隔に差は無かった。また 10 pg の精子抽出物を投与した場合、投与後 50 分に胚盤の一部のみ Ca^{2+} 波が発生したが、スパイラル様の Ca^{2+} 波は観察されなかった。以上の結果から、胚盤全体へ同心円状に伝搬する Ca^{2+} 波と、周期性をもつスパイラル様の Ca^{2+} 波を併せ持つことが、正常な胚発生に必須であると考えられた。

鳥類の受精時における卵細胞質内のカルシウム動態を明らかにしたのは、本研究が初めてであり、きわめて学術的価値の高い成果と考えられる。

(2) 新規精子ファクターの同定

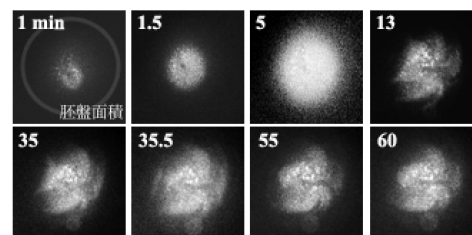


図1.一過性の Ca^{2+} 上昇後に観察されるスパイラルオシレーション

カラムクロマトグラフィーにより分子量 30-90 kDa 付近にスパイラル様 Ca^{2+} オシレーションを誘起する成分が含まれていることが分かった。またその画分における Ca^{2+} オシレーションの誘起能力は、LCA レクチンに吸着されることが分かった。LCA 処理と未処理画分に含まれるタンパクのディファレンシャル解析および LC-MS/MS 解析から、7 個の候補タンパクが同定され、その内のクエン酸合成酵素、およびアコニット酸ヒドラターゼが Ca^{2+} オシレーションを誘起することが分かった。さらにホスホリパーゼ Czeta と 2 つのタンパクをコードする新規遺伝子の cRNA を単一精子とともに投与したウズラ卵

が孵化したことから(図2) これらの3つの精子ファクターは、ウズラ卵の活性化とその後の胚発生の誘起に必要十分であると考えられた。クエン酸合成酵素は、鳥類と同じく多精受精を行う有尾両生類のイモリでも精子ファクターとして同定されており興味深い。またアコニット酸ヒドラーゼは鳥類の特異的な精子ファクターであり、超大型の鳥類卵子の活性化に必須な精子ファクターと考えられる。



図2. 3種類の精子ファクターを用いた顕微授精により孵化したウズラヒナ

(3) 顕微授精により作出した GFP 発現ウズラの発生率と遺伝子導入効率

TritonX-100、DMSO およびリゾレシチン処理を施した精子の顕微注入では、卵細胞質内の Ca^{2+} オシレーションが誘起されなかったが、凍結融解処理精子を顕微注入した場合、それが誘起された。また凍結融解処理群の発生率は 85% であり、そのうち 52.9% の胚が卵割ステージ V を超え、最も発生が進行した胚ではステージ 27 まで進行した。また GFP シグナルが検出された胚の割合は 82.3% であった(表 1)。またサザンブロット解析から、27% の割合で胚ゲノムへの GFP 遺伝子の挿入が確認された。以上の結果、精子凍結融解処理は、TX-100 等の他の処理と比較して、卵への悪影響が少なく、GFP 発現ウズラ胚の発生能を大幅に改善することが分かった。

本方法により、近い将来、顕微受精法により遺伝子組み換えウズラが孵化する可能性はきわめて高い。本方法と CRISPR-Cas9 システムを併用すれば、遺伝子ノックアウトウズラの作出も可能となり、鳥類の基礎研究に対する貢献は非常に高いと考えられる。

表 1. 精子処理法が GFP の発現と胚発生に及ぼす影響

Sperm treatment	No. of oocytes		Expressing GFP (%)	No. of embryos:										
	injected	Developed (%)		III	IV	V	VI	VII	VIII	XI	4	6	25	27
Control	17	15 (88.2)	2 (14.4)		3	5	1			1	2	2	1	
TX-100	15	11 (73.3)	6 (72.8)		1	2	7		1					
FT	20	17 (85.0)	14 (82.3)		1	4	3	5	1	1		1	1	

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 -チュープ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す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.*
Speific 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 1 件)

名称: 鳥類の体外受精方法及びクローン細胞又はクローン個体の作製方法、並びにキット

発明者: 笹浪知宏、水島秀成

権利者: 静岡大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-191576

出願年月日: 平成 26 年 9 月 19 日

国内外の別: 国内

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・大学院農学領域・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: