



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

ウズラの受精における配偶子間相互作用に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2023-06-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 市川, 佳伸 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/00101279

ウズラの受精における
配偶子間相互作用に関する研究

2022 年

岐阜大学大学院連合農学研究科

市川 佳伸

ウズラの受精における
配偶子間相互作用に関する研究

市川 佳伸

目次

略語表	1
第一章 序論	3
第二章 精子との結合に関与する卵黄膜内層 (PVM) 構成因子の同定	
第一節 緒論	10
第二節 材料および方法	12
(1) 実験動物	
(2) 組織の調製	
(3) ZP1 および ZP3 タンパク質の精製	
(4) 精子懸濁液の調製	
(5) 媒精試験	
(6) 免疫染色	
(7) PVM と精子結合の観察	
第三節 結果	16
(1) <i>in vitro</i> における精子-PVM 相互作用に対する抗 ZP 抗体の影響	
(2) ZP1 および ZP3 タンパク質の精子-PVM 結合への影響	
(3) ZP1 および ZP3 タンパク質と精子との結合	
第四節 考察	18
第五節 小括	22
第三章 精子の胚盤への侵入に関与する因子の同定と免疫組織化学的解析	
第一節 緒論	23
第二節 材料および方法	25

(1) 実験動物	
(2) 組織の調製	
(3) 抗 ANXAs 血清の調製	
(4) 電気泳動とウエスタンブロット	
(5) 免疫組織化学染色	
(6) 培養細胞での ANXA6 の発現	
(7) 培養細胞への媒精試験	
第三節 結果	31
(1) 胚盤部分における精子の PVM 通過	
(2) 卵細胞膜画分のウエスタンブロット解析	
(3) ANXA6 の胚盤部分への局在	
(4) ANXA6 発現細胞と精子の結合	
第四節 考察	34
第五節 小括	37
第四章 体外授精後の発生段階とカルシウムイオンシグナル経路の解析	
第一節 緒論	38
第二節 材料および方法	40
(1) 実験動物	
(2) 体外授精および ICSI	
(3) 初期発生段階の判定および核染色	
(4) 精子侵入によって PVM に形成された孔の観察	
(5) ウエスタンブロット	
(6) 統計解析	
第三節 結果	44

(1) 体外授精後に精子により胚盤部分の PVM に形成された孔と胚発生	
(2) ICSI 後の MPF と CSF の分解	
(3) 体外授精後の MPF と CSF の分解	
第四節 考察	46
第五節 小括	50
第五章 総括	51
謝辞	57
引用文献	58

略語表

AR:	acrosome reaction
BCA:	bicinchoninic acid
BSA:	bovine serum albumin
CBB:	coomassie brilliant blue
DIG:	digoxigenin
D-MEM:	dulbecco's modified eagle's medium
DNA:	deoxyribonucleic acid
FITC:	fluorescein isothiocyanate
GC:	granulosa cell
GD:	germinal disk
GFP:	green fluorescent protein
HBSS:	hanks' balanced salt solution
HRP:	horseradish peroxidase
ICSI:	intracytoplasmic sperm injection
IgG:	immunoglobulin G
IVF:	<i>in vitro</i> fertilization
MAPK:	mitogen-activated protein kinase
NRS:	normal rabbit serum
ORF:	open reading frame

PBS:	phosphate-buffered saline
PCR:	polymerase chain reaction
PTX:	pertussis toxin
PVDF:	polyvinylidene difluoride
SDS-PAGE:	sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
Tris:	tris(hydroxymethyl)aminomethane
cRNA:	complementary ribonucleic acid

注：本論文中における「受精」および「授精」の表記について

本論文（主に第4章）においては、「*in vitro*」での媒精による受精をあえて「体外授精」と表記した。これは第4章での目的の一つは「ICSI」と「*in vitro* 媒精」を比較検討することであり、どちらも一般では「体外受精」に含まれることから、両者を明確に区別するためにそれぞれ「ICSI」と「体外授精」と表記することとした。

第一章 序論

有性生殖を行う多くの生物では、次の世代を生み出すために受精が不可欠である。鳥類を含めた多くの動物における受精とは大小の大きさの異なる配偶子、つまり大型で数が少なく運動性のない雌性配偶子（卵）と小型で多数かつ運動性のある雄性配偶子（精子）の合体、さらにはそれぞれの核が合体し1つ核を形成することであり、生じた受精卵がやがて新しい個体となる。この重要なイベントは、種特異的な精子と卵の結合、精子の卵細胞への侵入、卵活性化などからなる連続的なステップである。各過程において様々な分子が関与し複雑に制御された機構により正確な受精が成し遂げられている。これまでに哺乳類を中心に受精のメカニズムや相互作用に関わる分子について様々な研究が行われ解明が進んでいる。この成果は生物学における学術的重要性は当然ながら、畜産業における繁殖や育種技術の発展、医療および医薬業における不妊治療や避妊薬開発への応用といった我々の身近な生活から生命にまで広く影響を与えている。

動物の卵は細胞膜の外側を卵膜と呼ばれる細胞外マトリックスにより覆われた状態で排卵され受精の時を迎える。この卵膜は哺乳類では透明帯（zona pellucida, ZP）、両生類では卵黄膜（vitelline envelope）、魚類ではコリオン（chorion）、そして鳥類では卵黄膜内層（perivitelline membrane, PVM）と呼ばれている。卵膜は卵細胞を物理的に保護するだけでなく、精子との種特異的な結合や先体反応の誘起など受精における精子との相互作用において重要な機能を持っていることが分かっている。また ZP タンパク質とよばれる数種類の糖タンパク質で構成されており、これらはよく保存された ZP ドメインと呼ばれる配列を持つことが分かっている（Wassarman *et al.*, 2001）。

Wassarman のグループはマウスの透明帯を構成する主要な ZP タンパク質として ZP1、ZP2、ZP3 の 3 つを同定し、さらに ZP3 は受精の際に精子と卵の結合に種特異的に関与していることを明らかにした (Bleil and Wassarman, 1980; Florman and Wassarman, 1985)。その後、多くの動物種において精子との結合に必要な ZP タンパク質が同定されている (Lee *et al.*, 1993; Sacco *et al.*, 1989; Katagiri *et al.*, 1999; Vo and Hedrick, 2000)。ZP タンパク質の構造と機能は進化的に保存されているが (Harris *et al.*, 1994)、ZP タンパク質の供給源が種によって異なることは興味深い。例えば、マウスにおいては 3 つの ZP タンパク質は発育中の卵母細胞で合成される (Shimizu *et al.*, 1983) が、ウサギの ZP3 は顆粒層細胞で産生される (Lee and Dunbar, 1993)。魚類や鳥類などの卵生動物においては、一部の ZP タンパク質は肝臓から分泌され血液循環を介して卵巣まで運ばれる (Hamazaki *et al.*, 1989; Murata *et al.*, 1995; Bausek *et al.*, 2000; Sasanami *et al.*, 2003)。しかし、アフリカツメガエルでは卵母細胞が ZP タンパク質の唯一の供給源である (Kubo *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 1999)。

鳥類においても受精の際に精子と出会う卵子は複数の ZP タンパク質で構築された卵黄膜内層 (PVM) に包まれている。Sasanami らのグループはこれまでに、ウズラの PVM が少なくとも 5 種類の糖タンパク質 (ZP1、ZP2、ZP3、ZP4、ZPD) から構成されることを報告した (Pan *et al.*, 2001; Sasanami *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2009; Kinoshita *et al.*, 2010; Serizawa *et al.*, 2011)。

哺乳類に比べ鳥類の卵は非常に大きく、また有色であるため精子と卵の相互作用を直接観察することが非常に困難であり、体外授精の手法も確立されていない。また、排卵された卵子は卵管漏斗部より分泌されるカラザ層に覆われるためすぐに受精能を失う。精子はその後、卵母細胞との相互作用がなくなり、カラザ層に埋め込まれる (Wishart, 1997)。このような技術的に困難な状況の中で、研究者は体外授精の代替

モデルとして、卵胞から単離された PVM を射出精子とインキュベートしている

(Birkhead *et al.*, 1994; Robertson *et al.*, 1997; Robertson *et al.*, 1998; Kuroki and Mori, 1997)。その結果、鳥類の受精における卵-精子相互作用について、様々なことが解明されてきた。

Bausek ら (2004) は、精製した ZP1 または ZP3 タンパク質の精子への結合をテストし、どちらも精子の先端部に特異的に結合することを示した。しかし、ZP3 だけが 180kDa の精子タンパク質と相互作用して結合することがわかった。これらの結果から ZP3 がニワトリにおいて精子結合タンパク質であることが示された。マウスでは、ZP2 も精子との相互作用に関与していることが報告されており (Bleil *et al.*, 1988)、精子の通過後にプロテアーゼによる ZP2 の構造変化により、多精子受精を防いでいることが報告されている (Burkart *et al.*, 2012)。鳥類では、ZP2 は未熟な卵胞の段階で卵母細胞において発現し PVM のマイナーな成分として存在する (Kinoshita *et al.*, 2010)。

精子表面で ZP タンパク質と相互作用する成分など、鳥類の精子-卵間相互作用を担う補完的な分子についても一部が明らかとなっている。笹浪らはウズラの精子膜成分に対するモノクローナル抗体 (mAb) ライブラリーを作製し、*in vitro* で精子による PVM の孔の形成を抑制する効果を検証した (Sasanami *et al.*, 2011)。その結果、もっとも抑制効果のある mAb の認識する抗原は精子アクロシンであることが分かり、実際この mAb は精子と PVM との結合を強く阻害した。またこのアクロシンは、アクロソームマトリックスに加え、精子の細胞膜にも局在していることが明らかになった。これらの結果はウズラの受精において、射精した精子の細胞膜に存在する 45kDa の精子アクロシンが、精子と PVM の結合をサポートしていることが示された

(Sasanami *et al.*, 2011)。しかしながら、PVM の構成要素のなかでアクロシンと結合する因子はまだはっきりとはしていない。

精子は卵膜に結合したのち、これを通過する必要がある。哺乳類や鳥類などでは精子が持つプロテアーゼが ZP タンパク質を加水分解することで生じた孔が精子の侵入経路になると考えられている (Florman and Ducibella, 2006)。哺乳類では精子先体に局在する ATP 非依存性のセリンプロテアーゼである精子アクロシンが透明帯の加水分解と精子通過に不可欠であると考えられてきた (McRorie and Williams, 1974)。しかし、Baba ら (1994) は、アクロシンノックアウト雄マウスが運動性の正常な精子を産生し、受胎可能であることを示した。従って、アクロシンは少なくともマウスにおいては受精に必須でない。一方で Hirose ら (2020) はアクロシンノックアウトのハムスターにおいて精子が透明帯を通過できず完全に不妊になることを示した。また最近 Fujihara ら (2021) はマウスにおいて精子先体に局在する SPACA4 が透明帯通過に必要であることを報告している。これらのことは哺乳類においても透明帯通過に機能するプロテアーゼは種によって異なり、複数の因子の存在を示唆している。Sawada らは、ホヤやウニなどの海産無脊椎動物において、精子の先体内のライシンと呼ばれているプロテアーゼが卵黄膜に結合後に放出され、ライシンの作用が精子の卵黄膜の通過に不可欠であるとしている (Sawada *et al.*, 2002; Sakai *et al.*, 2003; Yokota and Sawada, 2007)。同様の結論は、マウス、ブタ、ヒトを含む哺乳類の受精からも導き出された (Pasten *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2009; Zimmerman *et al.*, 2011)。ウズラの受精では、ユビキチン・プロテアソーム系が精子による PVM の孔形成に重要な役割を果たすことが示されたものの、一方ではアクロソームのセリンプロテアーゼであるアクロシンが、受精の際の PVM の孔形成に関与していると考えられている (Richardson *et al.*, 1992; Slowinska *et al.*, 2010; Sasanami *et al.*, 2012)。

鳥類では、受精卵の PVM を剥がして観察すると精子が通過するために形成された多数の孔が観察される。ニワトリでは受精卵の PVM には胚盤領域に集中して孔が空

けられるという現象が報告されているが、ウズラにおいてはそのような現象は報告されていない (Birkhead *et al.*, 1994; Wishart, 1997)。精子は雌性前核のある胚盤にたどり着けなければ受精に至らない。しかし、巨大な卵細胞において精子を胚盤へと導く仕組みがあるのではないかという仮説は未だに証明されていない。Nishio らはニワトリの ZP2 が未熟卵母細胞の PVM に蓄積し、そのまま成熟卵の胚盤領域に留まることを明らかにした (Nishio *et al.*, 2014)。ZP2 の精子への結合特性はまだ検証されていないが、精子を胚盤領域へ優先的に侵入させる仕組みに関与しているのかどうかを調べることは非常に興味深い。一方でウズラにおいては胚盤領域の PVM の構成成分について、生化学的に特異性があることは報告されていない。ウズラにおいても精子を胚盤への効率的な侵入に導くための何らかの仕組みがあることが予想されるが、侵入のメカニズムや関与する因子についてもまったく分かっていない。

動物の受精メカニズムを研究する上で重要な技術の 1 つが体外受精法 (IVF) である。IVF は今では世界でもっとも標準的な繁殖技術のひとつとなっている。IVF 技術の発達は哺乳類の受精研究の発展にも大きく寄与し、特に精子-卵融合過程の研究進展には著しい成果を上げている (Miyado *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2011; Ohoto *et al.*, 2016)。IVF のひとつである細胞質内精子注入法 (顕微授精・ICSI) もヒトの不妊治療に用いられているだけでなく (Palermo *et al.*, 1992)、基礎生物学分野においても応用され、例えば遺伝子組み換えマウスの作出なども行われてきた (Perry *et al.*, 1999)。

IVF は鳥類の受精研究にも応用されている。Mizushima ら (2014) は ICSI および卵殻培養法によりウズラにおいて正常な雛を得ることに成功している。この ICSI の技術開発によりウズラの受精について多くのことが明らかとされている。特に卵活性化に必須の精子由来因子として Phospholipase Czeta1 (PLCZ1)、Citrate synthase (CS)、Aconitase2 (ACO2) の 3 つを鳥類で初めて同定し、ICSI においてこれらの

cRNA をひとつの精子と同時に注入したところ通常の多精子受精と同じ発生をたどることを実証している(Mizushima *et al.*, 2014)。

このように ICSI により大きな進展を成したことはできたが、この手法は通常の受精における重要なステップである精子の卵への侵入・融合の過程を省略していることを考慮しなくてはならない。またこの手法は高額なさまざまな機器が必要となることに加え熟練の操作技術が必要となるなど、容易に誰でもが行えるものではない。体外受精は高額な機器は必要ではないので、ICSI よりずっと以前から鳥類にも応用されてきた。しかし媒精に適した卵を得るためには卵管から排卵直後の卵を採取する必要があるが実験に供する卵の数を十分に得ることは簡単ではなく、研究成果に関する情報は限られたものとなっている。Howarth (1970) と Nakanishi ら(1990) はニワトリで体外受精 2-3 時間後の卵の胚盤において複数の精子の存在とその後の雄性前核の形成について報告している。Tanaka ら (1994) は体外受精後に卵を外科的に雌鶏の卵管内に戻すことにより雛を得たと報告している。また Olszanska らは排卵直前の最大卵胞を取り出し *in vitro* で排卵させたのち、媒精することでウズラおよびニワトリにおいて受精卵を得ることに成功している (Olszanska *et al.*, 2002; Batellier *et al.*, 2003)。このように体外受精もいくつかの方法で試みられ報告されているが、それぞれ受精や発生の効率を上げるために工夫された方法である一方、手間がかかる方法であるとも言える。体外受精の難しさの要因はいくつか考えられるが、やはり鳥類の生理的多精子受精の再現性や卵のサイズが大きく取り扱う上で物理的な安定性（壊れやすい）が避けられない問題である。鳥類の受精においては前述のように精子の卵内への侵入のメカニズムは全くわかっておらず、受精後の卵活性化に関わる因子についても ICSI により一部明らかになっているものに限られている。体外受精法の簡易化、効率化は研究の進展に必須の重要なテーマであると考えられる。

このように、鳥類の受精を制御するいくつかの重要な分子や機構が発見されたが、哺乳類などに比べまだ多くの不明な点が残されている。また体外授精についても技術面で困難が多く、検討事例も少ない。そこで本研究ではウズラにおいてはまだ明確とされていない精子と PVM の結合に関与する因子、さらに卵細胞内への侵入に関与する因子を明らかにすることを目的とした。また精子-卵相互作用の観察や卵活性化メカニズムの解析をより生理的条件に近い状態で詳しく行うために必要な技術として媒精による体外授精の効率化を目指し、条件の検討や発生の進行程度について調べるとともに卵活性化に至るカルシウムイオンシグナル経路に関わる因子についても解析を行った。

第二章 精子との結合に関与する卵黄膜内層 (PVM) 構成因子の同定

第一節 緒論

受精の最初のステップにおいて精子はまず卵子と特異的な結合をする必要がある。鳥類では卵黄膜内層 (perivitelline membrane, PVM) と呼ばれる細胞外マトリックスが卵子の細胞膜の外側を取り囲んでおり、卵子を物理的な衝撃から守っているだけではなく、種特異的な受精を成功させるために重要な役割を持っていることが分かっている。

鳥類において PVM は少なくともウズラでは 5 種類 (ZP1, ZP2, ZP3, ZP4, ZPD)、ニワトリでは 6 種類 (ZP1, ZP2, ZP3, ZP4, ZPD, ZPAX) の糖タンパク質で構成されており、ZP1 と ZP3 がこのどちらの種においても主要な要素であることが知られている。

しかしながら、鳥類では体外授精を容易に行う方法が確立されてないということもあり、精子-卵相互作用の機序や因子の解明は進んでいない。この体外授精を難しくしている要因は、卵細胞のサイズがとても大きく、精子との相互作用の様子を直接観察するには難しいということに加え、排卵の直後から卵管の漏斗部において分泌される卵黄膜外層が PVM の外側を覆い精子の到達を妨げてしまうことによる (Wishart, 1997)。

この問題を回避するために開発された方法が、PVM を卵胞から単離し射出精子とインキュベートする方法である。この方法を使うことにより精子と卵子の結合メカニズムの一部が明らかにされている (Birkhead *et al.*, 1994; Robertson *et al.*, 1997; Robertson *et al.*, 1998; Kuroki and Mori, 1997; Sasanami *et al.*, 2012)。ウズラでは精子の細胞膜や先体内腔に存在するアクロシンが卵子との結合に関わっていることが報告されている (Sasanami *et al.*, 2011)。しかしアクロシンと結合する卵子側の因子は分かっていない。

本研究ではウズラ卵から単離した PVM と射出精子を *in vitro* でインキュベートして相互作用を評価する手法により、ウズラにおける精子-卵相互作用の最初のステップである精子と PVM の結合に PVM の構成因子である ZP1 および ZP3 が関与することを明らかにした。

第二節 材料および方法

(1)実験動物

ウズラ(*Coturnix japonica*)はモトキ(所沢市)から購入し、14時間明期-10時間暗期の人工照明下、室温25°Cで飼育。成鶏用飼料(モトキ、所沢市)および水道水を不断で与えた。産卵時刻を個体ごとに記録することにより排卵時刻を予測し、実験に用いた。

(2)組織の調製

雌のウズラは断頭屠殺後に最大卵胞を採取した。PVMの単離については既に報告されている方法を用いた(Gilbert *et al.*, 1977; Sasanami *et al.*, 2002)。最大卵胞から卵胞膜を剥がし去り、卵黄部分を洗い流すことにより、基底膜とPVMに挟まれた状態の顆粒層を得た。この一枚のシート状のものを一時的に純水に浸すことにより浸透圧で顆粒層細胞を破壊し、PVMのシートを単離した。このPVMは射出精子および精製したZP1、ZP3とのインキュベート試験にそれぞれ使用した。

(3) ZP1 および ZP3 タンパク質の精製

単離したPVMは1%SDSを含むTris-HCl緩衝液(70 mM Tris, pH6.8)に室温で一晩浸すことで溶解させ、遠心分離(10 000 g, 10 min)した上清をPVM溶解画分とした。このPVM溶解画分をSDS-PAGEで分離した。SDS-PAGEは非還元条件下、12%(w/v)アクリルアミド分離ゲルおよび5%濃縮ゲルを使用し他はLaemmli(1970)の方法に従った。泳動後のゲルを銅染色キット(Bio-Rad Laboratories)を用いて染色し97 kDaのZP1と35 kDaのZP3のバンドを切り出した。このゲルを0.1% (w/v) SDSを含む100 mM Tris-HCl緩衝液(pH 9.0)に入れ4°Cで一晩攪拌しタンパク質を溶出させた。これを純水

で透析、凍結乾燥後に PBS(-)に溶解した。タンパク質の濃度測定には BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)を使用し、ZP1 と ZP3 の純度の確認は SDS-PAGE による分離と銀染色により確認した。

(4) 精子懸濁液の調製

射出精子は Kuroki and Mori (1997)の方法に従って交尾直前の雄から採取した。採取した精子は 1.25 mM CaCl₂ および 1.8 mM MgSO₄ を含むハックス平衡塩類溶液 (HBSS)に懸濁したのちトーマ血球計算盤を用いて精子濃度を算出した。精子懸濁液は 39°Cに保温した。

(5) 媒精試験

PVM は 5 mm 四方に切り出し、 1×10^7 sperm/ml HBSS となるように希釈した 0.5 ml の精子懸濁液に入れ、39°Cで 30 分間インキュベートした。氷温にすることで反応を停止させ、氷温の PBS で3回洗い流した。PVM はスライドガラス上に広げ、3.7% (v/v)ホルムアルデヒドを含む PBS で固定してからシッフ試薬(和光純薬工業、大阪市)で染色した。光学顕微鏡 (BX 51, オリンパス, 東京都)で観察して精子との反応によって PVM に形成された孔を確認、ランダムに選択した5つの範囲について写真撮影して Image J (NIH)で孔の数を計測した。

各種の ZP タンパク質に対する抗体の影響を評価するため、抗 ZP1 抗体(Ohtsuki *et al.*, 2004)、抗 ZP2 抗体(Kinoshita *et al.*, 2010)、抗 ZP3 抗体(Sasanami *et al.*, 2002)、抗 ZP4 抗体(Serizawa *et al.*, 2011)、抗 ZPD 抗体(Sato *et al.*, 2009)、正常ウサギ血清を 1:200 に HBSS で希釈し媒精試験の際にそれぞれ添加した。精子と PVM の結合についての評価法として百日咳毒素 (PTX, Calbiochem, USA) で精子先体反応 (AR) を

阻害する方法が報告されており (Sasanami *et al.*, 2011)、本研究においても媒精試験の際に 2 $\mu\text{g/ml}$ の PTX を反応液中に添加し、影響を調べた。

精製した ZP1 および ZP3 タンパク質の精子-PVM 結合への影響を評価するため射出精子をあらかじめ Hoechst33342 (1 $\mu\text{g/ml}$) で染色し、精製した ZP1 または ZP3 タンパク質、PTX (2 $\mu\text{g/ml}$) を加えて媒精試験をした。BSA を対照として用いた。媒精後の PVM を PBS で穏やかに 3 回洗い、スライドガラス上に広げた後、3.7%ホルムアルデヒドを含む PBS で固定した。PVM 上の精子数は蛍光顕微鏡(BX 51)および微分干渉観察にて計測した。

(6) 免疫染色

Digoxigenin(DIG)標識 ZP1 および ZP2 は DIG Protein Labeling Kit(Roche)を使用して作製した。射出精子は $1 \times 10^7/\text{ml}$ となるよう希釈したのち 3.7% (v/v)ホルムアルデヒドを含む PBS で室温 10 分間固定した。固定した精子は Poly-L-lysine コートしたスライドガラス上に塗り広げ風乾し、PBS で 5 分間洗浄後、2%正常ヤギ血清および 1%BSA を含む PBS で 1 時間ブロッキング処理した。次に DIG 標識した ZP1 または ZP3(50 $\mu\text{g/ml}$)および 1%BSA を含む PBS で 2 時間 4°Cにて処理した。PBS で 5 分間、3 回洗浄したのち FITC 標識-抗 DIG-ヤギ IgG(1: 200, Roche)で 1 時間、4°Cでインキュベートした。PBS で洗浄したのちグリセロールで包埋し蛍光顕微鏡(BX 51)観察および微分干渉観察にて精子を確認した。

(7) PVM と精子結合の観察

PVM をおよそ 5 mm 四方に切り出し、 1×10^7 sperm/ml となる様に精子を懸濁した HBSS に入れ 39°Cでインキュベートした。精子が PVM に結合する様子を実体顕微鏡

で観察した。

第三節 結果

(1) *in vitro* における精子-PVM 相互作用に対する抗 ZP 抗体の影響

PVM の構成タンパク質のうち精子との相互作用に関与するものを調べるため、媒精試験において抗 ZP 抗体の添加が精子による PVM への孔形成にどのように影響するかを調べた。その結果、Fig. 2-1 に示す様に ZP1 と ZP3 に対する抗体はそれぞれ孔形成を顕著に阻害した、一方で ZP2、ZP4、ZPD に対する抗体および正常ウサギ血清を添加した場合はその様な影響はなかった。この結果はウズラにおいては PVM の構成要素のうち、ZP1 と ZP3 が精子との相互作用に関与していることを示している。

(2) ZP1 および ZP3 タンパク質の精子-PVM 結合への影響

ZP1 と ZP3 が精子と PVM の結合に関与しているのかどうか調べるため、PTX を添加した媒精試験を行った。Fig. 2-2 A に示した様に PTX を $1\mu\text{g/ml}$ 添加すると精子による PVM の孔形成が阻害された。加えて ZP1 タンパク質によって誘導される精子先体反応も PTX の添加によって阻害されていた (Fig. 2-2 B)。

単離した PVM から精製した ZP1 および ZP3 タンパク質の純度については SDS-PAGE および銀染色によって確認した (Fig. 2-3 A)。単量体 ZP1 (97kDa、レーン 4) と ZP3 (35kDa、レーン 2) が単一のバンドとして得られたので、これらを以後の試験に用いた。

Fig. 2-3 A に示したように精子の PVM への結合は ZP1 の添加により量依存的に阻害された。ZP3 も ZP1 に比較してより高い濃度を必要としたが同様に精子-PVM の結合を阻害した。これらの結果から ZP1 と ZP3 はウズラにおいて精子の PVM への結合のステップにおいて役割を果たしていることが示された。

(3) ZP1 および ZP3 タンパク質と精子との結合

ZP1 および ZP3 が精子表面に結合するのかどうかを確認するため DIG 標識した ZP1 と ZP3 を用意し射出精子とインキュベートした。免疫組織化学染色により ZP1 (Fig. 2-4 B)、ZP3 (Fig. 2-4 A) のどちらも精子頭部にシグナルが検出された。ZP1、ZP3 を添加しない場合にはこの様なシグナルは検出されなかった (Fig. 2-4 C)。また射出精子とインキュベートした PVM を実体顕微鏡で観察したところ精子の頭部と PVM が結合している様子が観察された (Fig. 2-5)。

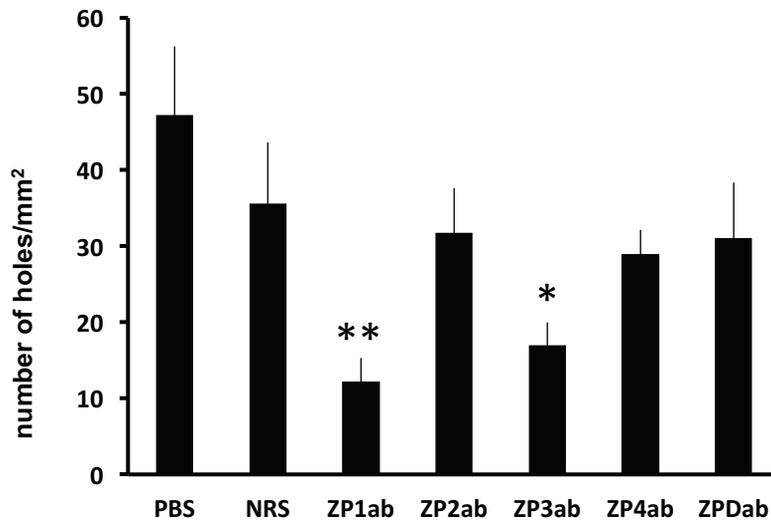


Fig. 2-1 *in vitro*における精子のPVMへの孔形成に対する抗ZP抗体の影響

最大卵胞から単離したPVMを射出精子とともに各ZPタンパク質に対する抗体をそれぞれ添加してインキュベートした。精子によってPVMに形成された孔の数は顕微鏡観察によってカウントした。各区で3回の平均値と標準偏差を示した。有意差あり* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

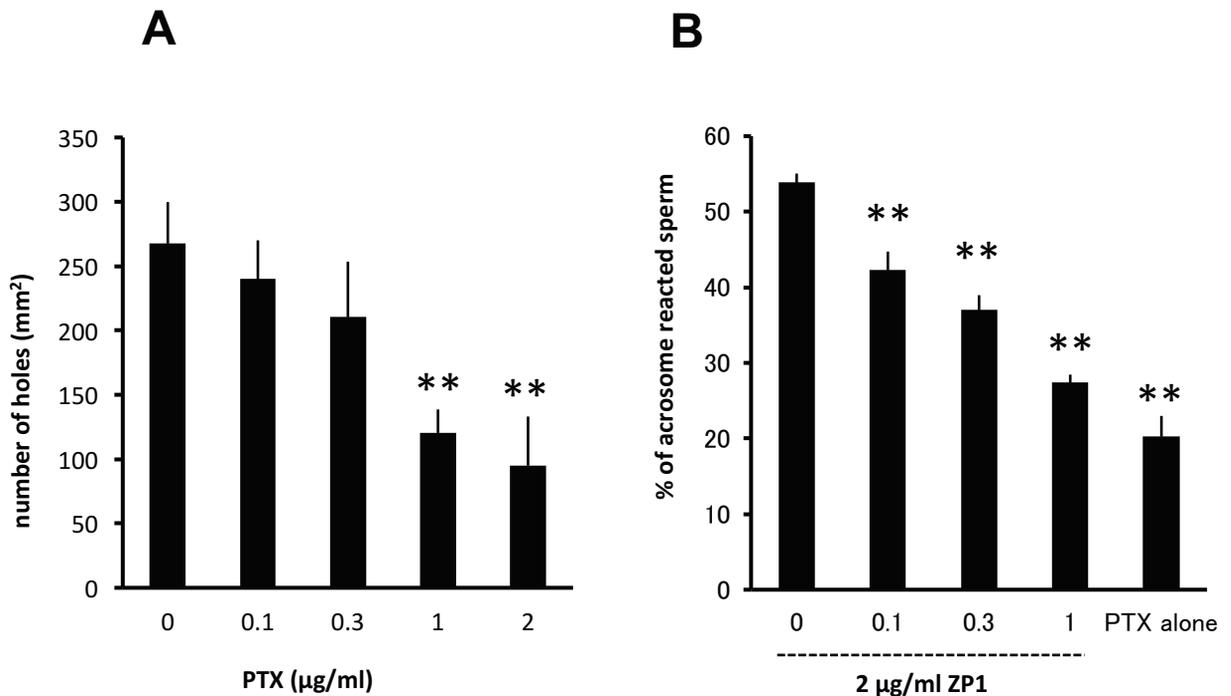


Fig. 2-2 精子のPVMへの孔形成に対するPTX添加の影響

(A) 最大卵胞から単離したPVMを各濃度のPTX (0, 0.1, 0.3, 1.0, 2.0 µg/ml)を添加し射出精子とインキュベートした。精子によってPVMに形成された孔の数は顕微鏡観察によってカウントした。各区で3回の平均値と標準偏差を示した。(**)有意差あり P<0.01) (B)ZP1による射出精子の先体反応誘起に対するPTX添加の影響を調べた。射出精子をZP1(2 µg/mlまたは 0 µg/ml)と様々な濃度の PTX (0, 0.1, 0.3, 1 µg/ml)とともに10分間インキュベートした。先体反応の有無を顕微鏡観察により調べた。各区で3回の平均値と標準偏差を示した。(**)有意差あり P<0.01)

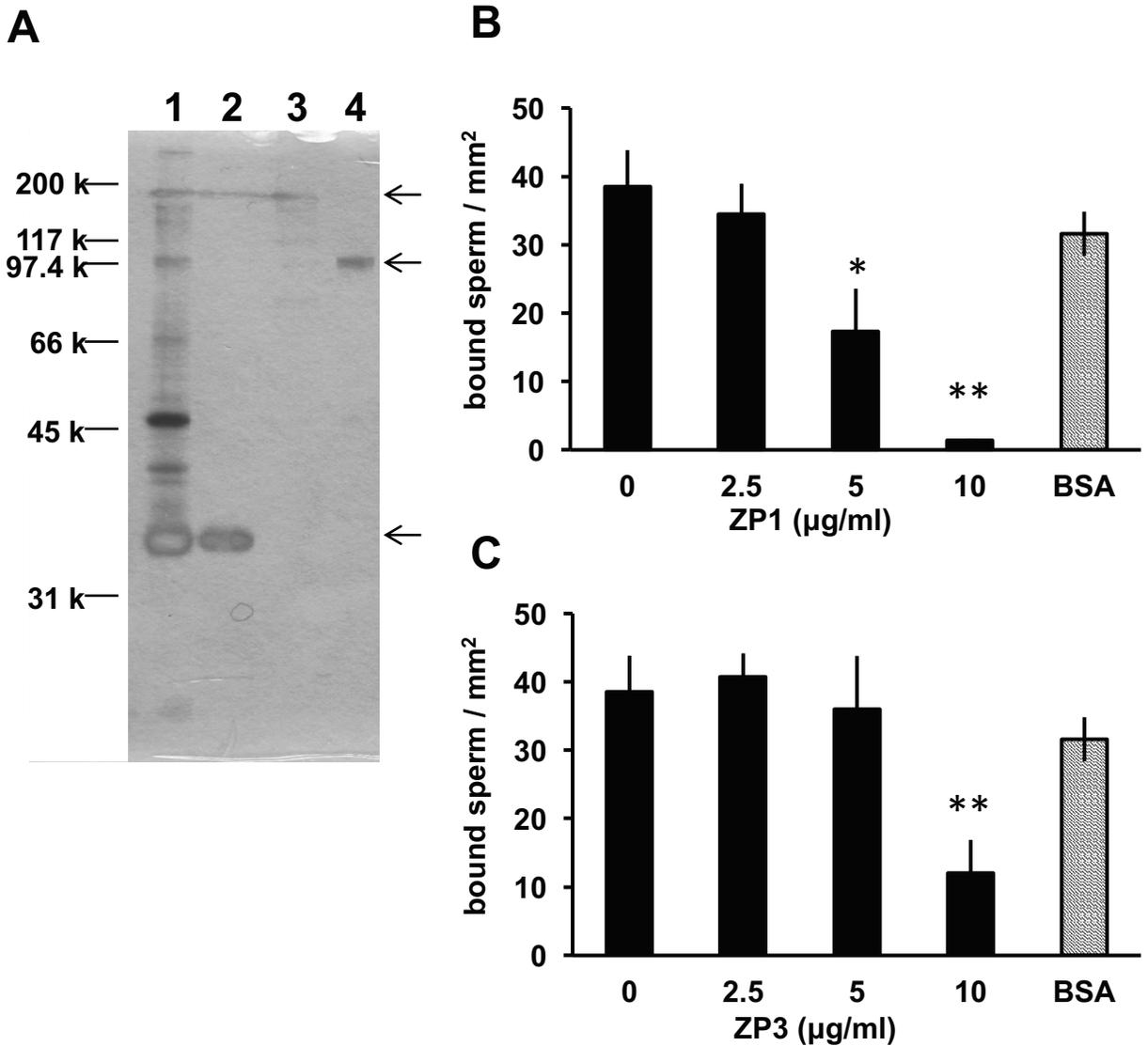


Fig. 2-3 精子のPVMへの結合に対するZP1とZP3の影響

(A) 精製したZP3 (レーン2, 0.1 μg/lane)、精製した2量体 ZP1 (レーン3, 0.1 μg/lane)、精製したZP1 (レーン4, 0.1 μg/lane) を SDS-PAGEで分離した(サンプルは非還元、銀染色)。PVMの溶解物(レーン1, 1 μg/lane)を比較対象とした。(BとC) 精製したZP1 (0, 2.5, 5.0, 10 μg/ml, panel B) または精製したZP3 (0, 2.5, 5.0, 10 μg/ml, panel C)を添加して射出精子とPVMをインキュベートした。BSA(10 μg/ml)添加区をネガティブコントロールとした。PVMに結合している精子数を顕微鏡観察によりカウントした。各区で3回の平均値と標準偏差を示した。有意差あり* P<0.05, ** P<0.01.

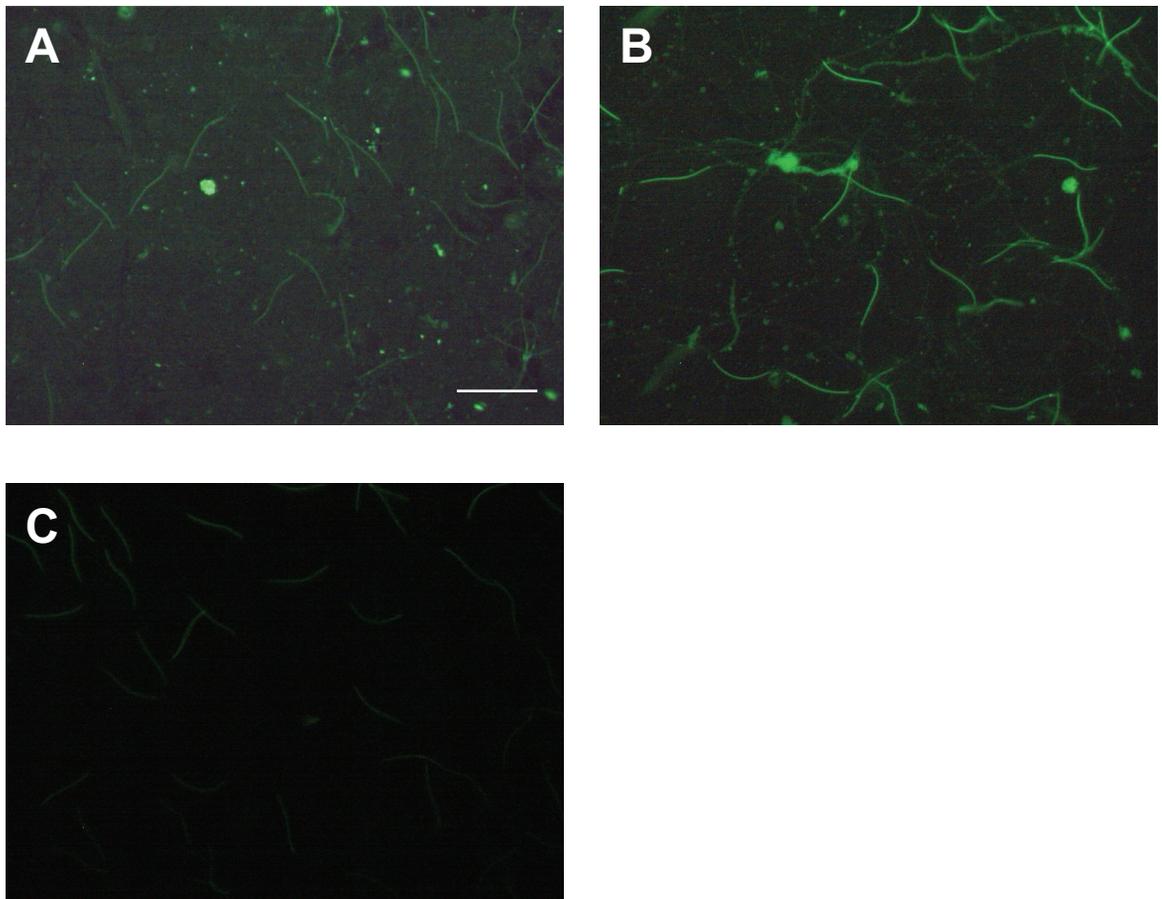


Fig. 2-4 ZP1およびZP3の精子との結合

射出精子を3.7% (v/v)ホルマリンで固定後にスライドガラスに塗布した。DIG標識したZP3 (panel A)またはZP1 (panel B)、PBS (panel C)でインキュベートしたのち、FITC標識抗DIG抗体で処理した。精子は蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは25 μ m。

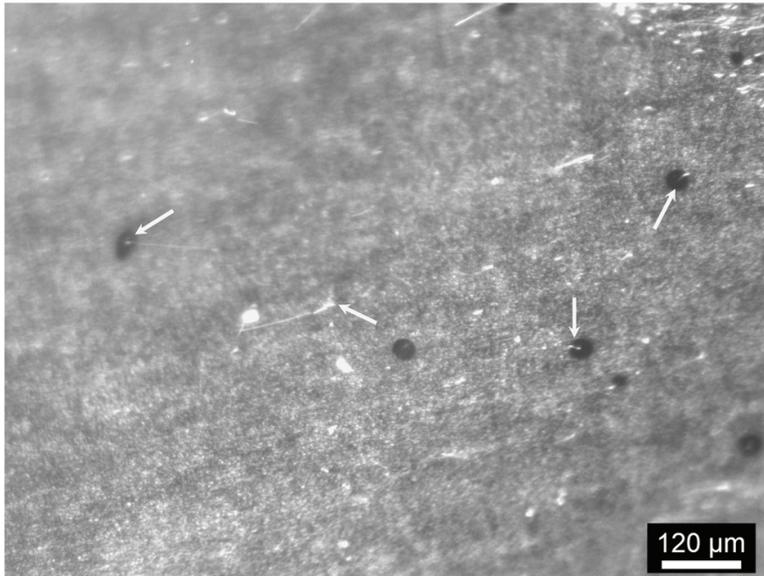


Fig. 2-5 PVMに結合した精子

最大卵胞から単離した精子を射出精子とインキュベートした。インキュベート中に精子がPVMに結合する様子を実体顕微鏡で観察した。矢印はPVMに結合した精子を示す。スケールバーは120 μm 。

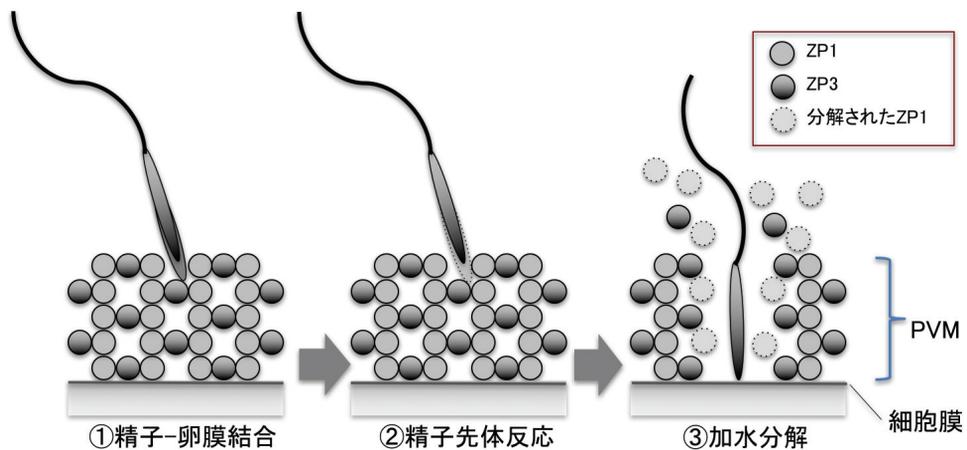


Fig. 2-6 精子-PVM相互作用の模式図

精子とPVMの相互作用を模式的に表した。(1)精子はPVMのZP1およびZP3を認識して結合する。(2)ZP1により精子の先体反応が誘起される。(3)先体内のプロテアーゼによってZP1が加水分解され孔が形成される。

第四節 考察

本研究において、まず PVM を構成する 5 つの ZP タンパク質に対する抗体をそれぞれ添加した状態での精子-PVM 相互作用への影響を検討した。その結果、ZP1 と ZP3 に対する抗体それぞれが精子による PVM への孔形成を阻害した (Fig. 2-1)。このことは ZP1 と ZP3 が精子との相互作用に関与していることを示している。しかしながら、このことだけでは精子と PVM の結合、先体反応の誘起、PVM への孔形成という段階からなる精子-PVM の相互作用にどのように影響したか理解するには不十分である。つまり抗 ZP タンパク質抗体による阻害効果は次の 3 つの説明が考えられるからである。1 つ、抗体が ZP1、ZP3 を覆い精子が接合する部位にアクセスできない様にした、2 つ、抗体により精子の先体反応が阻害された、3 つ、抗体により PVM を分解する酵素の作用が阻害された。

そこで、ウズラにおいて精子先体反応を阻害する作用が報告されている百日咳毒素 (PTX) を媒精試験に添加し、精子-PVM 結合のステップだけを切り離して調べることとした (Sasanami *et al.*, 2011)。その結果、PVM の主要な構成要素である ZP1 および ZP3 は明らかな精子-PVM 結合の阻害効果を示し、これらが精子との結合に関わっていることが明らかとなった。またここで示された阻害効果の強さから ZP1 の方が精子とのより強い親和性を持っていることが考えられた。ZP1 と ZP3 の結合する精子側の因子は分かっていないが、ZP タンパク質側の要素としては、Han ら (2010) によるとニワトリでは ZP3 の O-glycan が精子との結合に重要であるとしている。Sasanami ら (2007) も精製した ZP1 から N-glycanase で N-glycan を除くと先体反応の誘起能が低下することを報告している。鳥類における精子-卵相互作用のメカニズムを解明していくには、精子表面に存在する ZP タンパク質の結合相手を特定することは必須とな

っている。またこの ZP1 と ZP3 の結合相手はそれぞれ違うのか、同じなのかも分かっていない。この精子-卵相互作用のメカニズム解明に向けて、特に生化学的なアプローチについて、鳥類は卵のサイズが大きく ZP タンパク質の精製も容易でありモデルとして優れていると考えている。

ニワトリにおいて精子の卵内への侵入は胚盤部分で起きていると報告されている (Birkhead *et al.*, 1994、Wishart 1997)。この現象の要因は分かっていないが、ZP タンパク質の関与も可能性がある。木下らはウズラにおいて ZP2 が未熟卵胞の卵母細胞において発現しており PVM のマイナーな要素として存在していることを報告している (Kinoshita *et al.*, 2010)。ニワトリにおいては ZP2 が未熟な卵母細胞においてだけではなく、最大卵胞まで発達した段階においても胚盤付近の領域に留まっていると報告されている (Nishio *et al.*, 2014)。この報告では ZP2 の局在は精子の侵入が胚盤周辺で起きているという現象に関連している可能性に言及している。ZP2 が精子と直に結合するかどうかは鳥類ではこれまで調べられていないが、確かにニワトリにおいて ZP2 の特徴的な局在が精子の結合や侵入に影響していると考えるのは合理的な考えである。しかし、今回の実験では媒精試験において抗 ZP2 抗体の添加は精子の孔形成に影響を与えることは無かった (Fig. 2-1)。またウズラでは ZP2 遺伝子は白色卵胞で発現していて、ZP2 タンパク質も黄色卵胞の PVM からは検出できていない (Kinoshita *et al.*, 2010)。これは、PVM に機能しうるだけの ZP2 が存在していなかったから媒精試験において抗体の影響が出なかったという可能性を示している。同じような状況が ZP4 タンパク質においても言える (Serizawa *et al.*, 2011)。このように今のところ ZP2 と ZP4 の精子-PVM 相互作用における未知の役割について議論ができるほど十分な実験的な証拠が得られていないのが現状である。今回の実験の進め方においては PVM をサンプリングする際に胚盤部分を特に考慮して切り出したわけではない。しかしここで注意しておくべきことはウズラでは受精卵を調べたところ、精子によって形成された孔の密度は胚盤

周辺で特に多いわけではなく赤道部分や植物極周辺を含めて全体的に大きな違いはないということである (Rabbani *et al.*, 2006)。つまりウズラの精子-卵結合のメカニズムはニワトリと同じわけではないということである。

マウスにおいては受精後、表層顆粒から放出されるプロテアーゼであるオバスタチンによる ZP2 の切断が多精子受精の抑制に必要であることが知られている (Burkart *et al.*, 2012)。しかしながら哺乳類の様な ZP2 の機能は鳥類では考えられない。なぜなら鳥類では多数の精子が卵内に侵入するからである (Hemmings and Birkhead, 2015; Mizushima *et al.*, 2014)。このようにウズラでは受精における ZP2 の役割は分かっていないが、組み換え ZP2 と ZP3 の相互作用や細胞表面においてアモルファス構造の形成することについて報告されており (Kinoshita *et al.*, 2010)、このことは未熟な卵母細胞において発現した ZP2 は ZP3 と結合して卵胞における PVM の形成を進めるといふ役割を持っている可能性を示している。

ZPD についてはタンパク質の発現レベルは卵胞の発達に従い増加し、抗 ZPD 血清を使った免疫組織化学染色によって最大卵胞の PVM に存在することが分かっている (Sato *et al.*, 2009)。今回の媒精試験においては抗 ZPD 血清の添加が精子の PVM への孔形成に影響しなかったことから、ウズラの受精においては精子-卵結合に重要な役割は果たしていないのではないかと考えられる。

蛍光免疫組織化学染色において DIG 標識した ZP1 と ZP3 を精子とインキュベートしたところ精子頭部の表面にシグナルが検出された。この結果は単離した PVM と精子をインキュベートした際に精子の頭部が PVM に結合している様子が実体顕微鏡観察において確認されたことと合致している (Fig. 2-5)。Bausek らはニワトリを用いて、精製した ZP1 および ZP3 と精子との結合を調べ、精子先端に特異的に結合することを報告している (Bausek *et al.*, 2004)。興味深いことは ZP3 だけが精子の 180kDa タンパ

ク質との結合を示したということである。笹浪らはウズラで精子細胞膜に存在する 45kDa のアクロシンが精子-PVM 結合に関与していることを報告しているが、このアクロシンと ZP タンパク質との結合については調べられていない。また ZP タンパク質と結合する複数の精子側因子が存在し精子-PVM 結合に関与していることも鳥類では考えられる。

本研究において精子と ZP1 および ZP3 が結合することが明らかとなったことから、これまでの報告と合わせて精子と PVM の相互作用の各ステップは、(1) 精子は PVM の ZP1 および ZP3 を認識して結合する、(2) ZP1 により精子の先体反応が誘起される、(3) 先体内のプロテアーゼによって ZP1 が加水分解され孔が形成される、以上のように考えられ。またこれらを模式的に示した (Fig 2-6)。今後は ZP タンパク質と結合する因子を含め PVM と相互作用する精子側因子の解明が必要となる。

第五節 小括

本章においては精子と PVM の結合について調べ、PVM の主要な構成要素である ZP1 と ZP3 が精子との結合に関与していること、ZP1 と ZP3 が精子の頭部に結合することを明らかにした。ウズラでは PVM は 5 種類の ZP タンパク質で構成されており、まずこれら ZP タンパク質に対する抗体や抗血清を媒精試験に添加して影響を調べた。媒精試験は単離した PVM と精子をインキュベートし、精子の結合や孔形成を観察、評価することで相互作用のメカニズムや関与する因子を調査するものである。鳥類の卵は哺乳類に比べサイズが非常に大きく媒精による精子-PVM 相互作用の直接の観察は難しいが、逆に PVM の単離や ZP タンパク質の抽出や精製は容易であるという利点があり、卵胞から単離した PVM を用いた媒精試験もこの研究において重要な手法となっている。最初の抗体を添加した媒精試験の結果では ZP1 と ZP3 に対する抗体がそれぞれ精子による孔形成を阻害した。しかしこの結果からは抗体の添加が精子の結合を阻害したのか、先体反応の誘起を阻害したのか、孔形成を阻害したのかは分からない。そこで精子先体反応を阻害する PTX を添加して媒精試験を行った。これにより精子-PVM 結合の過程だけを切り離して評価することができる。その結果、精製した ZP1 と ZP3 を添加により精子の結合を濃度依存的に阻害した。また DIG 標識した ZP1 と ZP3 が精子頭部に結合することが観察された。媒精試験では多量の ZP1、ZP3 タンパク質が精子に結合し、PVM への結合を競合的に阻害したことを示している。このことから、PVM に存在する ZP1 および ZP3 が精子との結合に役割を果たしていることが示された。一方でこれら ZP タンパク質と直接結合する精子側因子については分かっておらず、鳥類の受精メカニズム解明には今後の研究が待たれる。

第三章 精子の胚盤への侵入に関与する因子の同定と免疫組織化学的解析

第一節 緒論

鳥類の受精において精子はまず PVM に結合し通過するための孔を形成すること、関連する分子もいくつか明らかとなっていることは前章で述べた通りである。精子は PVM を通過した後に卵細胞内へ侵入することとなるが、どのようなメカニズムで侵入するのか、また関連する因子についても全くわかっていない。これは鳥類の卵のサイズがあまりにも大きいことにより精子の侵入過程を直接観察することが難しいなど技術面的問題が大きい。卵の取扱いが比較的容易で遺伝子操作技術も確立されている哺乳類では、マウスをモデル動物として精子-卵相互作用を解析するためのイメージング技術も開発され (Jin *et al.*, 2011)、遺伝子ノックアウトマウスの作出と解析により精子-卵融合に必須の因子として精子側因子 IZUMO や卵側因子 JUNO が発見されている (Inoue *et al.*, 2005; Bianchi *et al.*, 2014)。受精に必須のこれらの因子が解明されることにより、医療や畜産の現場での応用研究が進められ社会への貢献度は非常に大きい。

本研究では、ウズラにおける精子の卵内への侵入に関与する卵側因子を明らかにすることを目的とした。因子の探索において、鳥類に限らず様々な種での報告から可能性のある因子について検討したが、本研究においてはアネキシン (Annexin, ANX) に注目した。アネキシンはカルシウム依存的にリン脂質結合に結合するタンパク質のファミリーであり、哺乳類では 12 種類のメンバー (Annexin A1~A12, ANXAs) が見出されている。そして細胞の内外に局在し脂質膜やタンパク質と相互作用これらはがん細胞の転移、創傷治癒、血管新生、プラスミン生成といった様々なイベントに関与することが知られている (Schloer *et al.*, 2018)。受精においても関与することが示唆されており、ウシの卵管表皮細胞で発現しているアネキシンが精子との結合に関与しているとの報

告もある (Ignotz *et al.*, 2007)。ウズラにおいてもわれわれのグループではアネキシンは卵管腔移行部の精子貯蔵管にも存在していることを確認している(未公開)。そこで、アネキシンの局在や精子との相互作用について、ウズラでは精子侵入の様子を生きたまの卵細胞を用いて観察することは難しいので、受精卵および排卵卵子を用いて免疫組織化学的な解析や培養細胞を用いた実験を行なった。

また鳥類の受精において精子は卵の雌性前核が形成される胚盤部分に侵入しなければ受精は成立しない。とても大きな卵に対し小さな胚盤部分に精子を効率的に侵入させる仕組みがあると考えるのは合理的である。この仕組みについてこれまでにいくつかの仮説があり、例えば PVM の構成成分が胚盤を覆う部分では他の部分とは異なっており精子を誘引しているのではないかと考えられたが実証はされていない。ニワトリでは胚盤を覆う部分の PVM に集中的に精子が孔を形成することが知られているが、この原因は分かっていない (Bramwell and Howarth, 1992)。そこで、本研究では胚盤部分にはそれ以外の部分との違いに注目し、精子との相互作用に関与する因子が胚盤部分にあるのではないかと仮定して実験を行なった。

第二節 材料および方法

(1) 実験動物

実験に使用した 8 から 20 週令の雌および雄のウズラ (*C. japonica*) はクエルコスモス (愛知県田原市) から購入した。個別のケージに入れ 14 時間明期-10 時間暗期 (午前 5 時に点灯) の照明下、自由飲水、成鶏用飼料 (モトキ、所沢市) の不断給餌で飼育した。放卵の時間を個体ごとに毎日記録し、放卵の 30 分後を基準 (Etches and Schoch, 1984) に排卵時間を推定した。実験には規則的に産卵している個体を選択した。

(2) 組織の調製

排卵卵子を得るため放卵後にウズラを断頭屠殺し卵管膨大部から採取した。また排卵推定時刻の 8-10 時間前に断頭屠殺し最大卵胞を切り出した。受精卵はケージに雌雄のウズラを飼育することで得た。

(3) 抗 ANXAs 血清の調製

ウサギ抗 ANXAs 血清は大腸菌に発現させた His-ANXAs を用いて作出した。

ウズラ *ANXA1* cDNA は N-末端と C-末端にそれぞれ制限酵素 XhoI と XbaI 切断部位を付加し PCR で増幅した。反応条件および用いたプライマーは以下の通り。

反応条件: 94 °C 1 分、62 °C 1 分、72 °C 2 分、30 サイクル

センス鎖 5'- GGCTCGAGACTAAAAGAACAAATGCTCA-3'

アンチセンス鎖 5'- GGTCTAGATAAAGCGACCAGGATGGTTT-3'

*ANXA2*cDNA は N-末端と C-末端にそれぞれ制限酵素 XhoI と SalI 切断部位を付加

し PCR で増幅した。反応条件および用いたプライマーは以下の通り。

反応条件: 94 °C 1 分、62 °C 1 分、72 °C 2 分、30 サイクル。

センス鎖 5'- GGCTCGAGACAGTTAAGGCTTACTCAAA-3'

アンチセンス鎖 5'- GGGTCGACTTCAGTCCTCTCCACCACAC-3'

*ANXA5*cDNA は N-末端と C-末端にそれぞれ制限酵素 XhoI と SalI 切断部位を付加し PCR で増幅した。反応条件および用いたプライマーは以下の通り。

反応条件: 94 °C 1 分、62 °C 1 分、72 °C 2 分、30 サイクル

センス鎖 5'- GGCTCGAGATGGCGAAGTATACAAGAGG-3'

アンチセンス鎖 5'- GGGTCGACTCTTTCTGAATCATCTGATA-3'

*ANXA6*cDNA は N-末端と C-末端にそれぞれ制限酵素 XhoI と SalI 切断部位を付加し PCR で増幅した。反応条件および用いたプライマーは以下の通り。

反応条件: 94 °C 1 分、62 °C 1 分、72 °C 2 分、30 サイクル

センス鎖 5'- GGCTCGAGCGGCTGATTGTAAGCTTGAT-3'

アンチセンス鎖 5'- GGGTCGACTTGTAGAGCTTGTCAGCAAA-3'

ANXA1 を含む PCR 産物は XhoI と XbaI で切断処理した後、pCold TF DNA vector (Takara Bio, Kusatsu, Japan) に挿入した。 *ANXA2*、*ANXA5* および *ANXA6* を含むそれぞれの PCR 産物は XhoI と SalI で消化処理した後 pCold TF DNA vector に挿入した。得られたコンストラクトは大腸菌 *BL21* 株 (Takara Bio) に形質転換し、アンピシリン耐性のクローンからコロニー PCR および DNA 配列解析の上、目的の株を選抜した。すべての組み換え ANXAs の発現は 1 mM isopropyl- β -thiogalactopyranoside を添加し 15°C、24 時間で行い、タンパク質の精製は細胞溶解物から Nickel レジン

(Novagen, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) を用いて添付の説明書の通りにおこなった。精製度の確認は SDS-PAGE および CBB 染色により行った。組み換えタンパク質を用いたウサギ (New Zealand White rabbit, SLC, 浜松市) の免疫は Kuroki and Mori (1997) の方法に従った。ウサギ背面の皮下に組み換えタンパク質 (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と等量の Freund's complete adjuvant (Sigma-Aldrich) を混ぜたエマルジョンを 1 mL 注射した。追加の免疫は 初回と同量の抗原を 6 および 8 週後に行った。最後の注射から 2 週間後に血液を採取し血清は 4°C で保管し実験に使用した。

(4) 電気泳動とウエスタンブロット

卵管から採取した卵は生理食塩水に浸し、PVM をハサミとピンセットを用いて剥がしとり付着している卵黄はパスツールピペットで穏やかに水流を当てて洗い流した。洗った PVM は 0.1% Triton X-100 を含む PBS に浸して 10 分間激しく攪拌したのち、10 分間遠心 (20,000 $\times g$ 、4°C) して残渣を取り除いた。この上清を卵細胞膜抽出物とした。サンプルのタンパク質濃度は BCA Protein Assay kit (Pierce, ThermoFisher Scientific, MA, USA) を用いて測定した。SDS-PAGE は Laemmli (1970) の方法に従い還元条件で 5% (w/v) および 12% (w/v) ポリアクリルアミドのゲルをそれぞれ濃縮ゲルと分離ゲルとして作成し行った。ウエスタンブロッティングのため SDS-PAGE で分離したタンパク質を PVDF 膜 (Immobilon-P; Millipore, Merck, Darmstadt, Germany) に転写した (Matsudaira, 1987)。5% (w/v) BSA、0.1% (w/v) Tween 20 を含む PBS で 30 分間ブロッキング処理を行った後、ブロッキングバッファーで希釈した ANXA1、ANXA2、ANXA5、ANXA6 に対する抗血清 (1:1,000) もしくはそれらの血清をそれぞれの抗原タンパク質を加え吸収処理しておいた抗血清 (1:1,000) (Sasanami *et al.*, 2002) で 1 次抗体処理した。マウス抗 E-cadherin 抗体 (BD Biosciences, NJ, USA) は細胞膜

の検出に使用した。2次抗体として ANXAs には HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Cappel™, MP Biomedicals, CA, USA)、E-cadherin には HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Cappel™, MP Biomedicals) を使用し、シグナル検出には化学発光法を用いた (Amersham™, GE Healthcare, IL, USA)。化学発光の検出には ImageQuant™ LAS 500 (GE Healthcare)を使用した。

(5) 免疫組織化学染色

卵胞での ANXAs タンパク質を検出するため最大卵胞をブアン氏液で固定し Paraplast (Oxford Labware, St. Louis, MO, USA)に包埋した。厚さ 4 μm に薄切した切片はキシレンで脱パラフィン処理したのち PBS で洗浄してから 1% BSA および 10% ヤギ正常血清を含む PBS でブロッキング処理を 1 時間行った。1次抗体処理はブロッキング液で希釈 (1:100) した抗 ANXA1、ANXA2、ANXA5、ANXA6 血清で 2 時間行った。血清の特異性はあらかじめ抗原タンパク質で吸収処理した血清を用いることで確認した。PBS で洗浄したあとブロッキング液で希釈 (1:300) した Alexa Fluor 546 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体(Molecular probes, ThermoFisher Scientific)で 1 時間処理した。サンプルの観察は 1 μM の Hoechst 33342 (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) で染色したあと蛍光顕微鏡 (BX 51, Olympus Optics, Tokyo, Japan)で行った。

ANXA6タンパク質の卵胞においての詳しい局在を確認するため切片のブロッキング処理した後、1次抗体に抗 ANXA6 血清 (1:100)、ラット抗 ZP1 血清 (1:100) (Ohtsuki *et al.*, 2004)、マウス抗 E-cadherin 抗体 (1:100) を用いた。PBS で洗浄後、2次抗体として Alexa Fluor 546 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:300) および FITC 標識ヤギ抗ラット IgG (1:300) または Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (1:300) で処

理した。サンプルは蛍光顕微鏡で観察した。

(6) 培養細胞での ANXA6 の発現

ウズラ ANXA6 の ORF を上流および下流にそれぞれ Hind III と Xba I 切断部位を付加するよう PCR で増幅 (94 °C 30 秒、51.3 °C 30 秒、72 °C 2 分、35 サイクル) した。センス鎖およびアンチセンス鎖プライマーはそれぞれ 5'-AAAAAAGCTTGCAGCTCTGGCACTTTGAGGA -3' および 5'-GCTCTAGATTAATGTACCACATTTACC -3' を使用した。PCR 産物は HindIII および XbaI で処理し、同様の制限酵素で処理した哺乳類発現用プラスミドベクター pcDNA3.1(+) (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) にライゲーションした。ウズラ ANXA6 を挿入したコンストラクトはコンピテント大腸菌 *DH5α* 株 (Takara Bio) に形質転換した。コンストラクトの塩基配列は DNA シーケンシング解析によって確認した。

HEK293 細胞株 (静岡大学高坂哲也博士から分譲) は 10% 牛胎児血清およびペニシリン (100 units/mL)、ストレプトマイシン (100 μg/mL) を含む D-MEM 培地 (Sigma-Aldrich) で 37 °C、5% CO₂ 添加の条件で培養した。トランスフェクションの前に細胞は 6 穴培養シャーレ (Falcon, Corning, NY, USA) に入れたカバーガラス (22 mm × 22 mm) 上に継代し、およそ 75% コンフルエントになるまで約 48 時間培養した。DNA (2.5 μg) は Lipofectamine Plus (Gibco, ThermoFisher Scientific) を用いて 添付の手順書に従って HEK293 細胞に導入した。

(7) 培養細胞への媒精試験

HEK293 培養細胞は 0.8 mmol/L MgSO₄、1.26 mmol/L CaCl₂、4.2 mmol/L NaHCO₃ を添加したハンクス平衡塩類溶液 (pH 7.4, 270-305 mOsm/kg) (HBSS, GE Healthcare)

で2回洗浄した。射出精子は黒木と森の方法に従い、雌ウズラとの交尾行動中の雄ウズラから射出直前に採取し、HBSSに懸濁した（Kuroki and Mori, 1997）。精子懸濁液はHEK293細胞の培養液に 1×10^6 cells/mLの濃度となるように添加し、37°Cで0、10、30分間インキュベートした。PBSで穏やかに洗ったのち1 μ M Hoechst 33342で染色、グリセロールで包埋して蛍光顕微鏡で観察した。視野内に観察されるHEK293細胞に結合している精子数を計測し、無作為に選択した5つ以上の視野について計測をした。

第三節 結果

(1) 胚盤部分における精子の PVM 通過

受精卵を卵管の膨大部から採取し薄切片を作製、精子頭部と PVM を染色して観察することで精子がどこから卵内に侵入しているのかを観察した。Fig. 3-1 に示したように胚盤部分では PVM の内側に精子の頭部が確認されたが (パネル A 矢印)、胚盤以外の部分では PVM の内側には観察されなかった (パネル B)。胚盤以外の部分では精子のプロテアーゼによる加水分解で PVM に孔を形成してはいるが精子はそこにトラップされているように観察された (パネル B 矢印)。そこで 5 つの受精卵の切片を観察し、観察された精子の数を卵内に侵入した精子 (penetrated) と PVM に留まっている精子 (trapped) に分けてそれぞれ数え、胚盤部分およびそれ以外の部分においてそれぞれ観察された精子数に対する割合を通過率 (penetration rate) として算出した (Table 3-1)。その結果、胚盤部分では侵入した精子数の割合が 34%であり胚盤以外の部分に比べて有意に多いことが分かった。このことは精子は胚盤部分を覆おう部分では PVM を通過することができるが、胚盤以外の部分では PVM を通過することができないということを示している。

(2) 卵細胞膜画分のウエスタンブロット解析

次に放卵卵子から PVM を剥がし取り TritonX-100 で溶解抽出した卵細胞膜抽出画分についてウエスタンブロット解析を行った (Fig. 3-2)。パネル A に示すように抗 E-cadherin 抗体でバンドが検出されることから、この画分には確かに卵の細胞膜溶解物が含まれることが確認された。この画分に対し ANXA1、ANXA2、ANXA5、ANXA6 に対するそれぞれの抗血清を用いて同様に解析した。その結果、ANXA1 に対する抗血清は還元条件において 40 kDa のバンドに対して強く反応した (パネル B)、70 kDa のバ

ンドも確認された。抗 ANXA6 血清で検出した場合は 66 kDa のバンドだけが確認された。逆に ANXA2 と ANXA5 で検出されたのは微かなバンドだけであった。それぞれの抗血清を各抗原であらかじめ吸収処理したものではこのようなシグナルは検出されなかった (パネル B)。

(3) ANXA6 の胚盤部分への局在

ANXAs タンパク質の卵における局在を調べるため最大卵胞の切片について抗 ANXAs 血清を用いて免疫組織化学染色をした (Fig. 3-3)。ANXA6 タンパク質は胚盤部分を覆う顆粒層細胞 (GC) の下に検出されたが (パネル A および B、矢じり)、そのシグナルは中央から離れると無くなっていき胚盤でない部分では消えた (パネル A および B、二重矢じり)。胚盤以外の部分ではそのようなシグナルは検出されなかった (パネル C)。ANXA1、ANXA2、ANXA5 について同様に免疫組織化学染色を行なった場合はそのような特徴的なパターンは見られず (パネル D-F)、シグナルが見られたのは血球細胞だけであった (パネル D-F、矢印)。正常ウサギ血清で同様の染色を行なった場合、シグナルは検出されなかった (パネル G)。

ANXA6 の局在をさらに詳しく調べるため、PVM の主要な構成要素である ZP1 に対する抗血清および細胞膜のマーカータンパク質である E-cadherin に対する抗体を用いてそれぞれ抗 ANXA6 抗体との二重染色を行なった (Fig. 3-4)。抗 ANXA6 血清のシグナルは抗 ZP1 抗体のシグナルとは共在していないように見えた (パネル A-C)。また抗 E-cadherin 抗体とも共在していないことが分かった (パネル D-F)。これらの結果から ANXA6 は PVM と細胞膜との間に局在していることが示された。

(4) ANXA6 発現細胞と精子の結合

ANXA6 が精子と結合するのかどうかを確認するため ANXA6 を発現させた HEK 細胞を作製し、射出精子と培養して結合を観察した (Fig. 3-5)。細胞に結合している精子数を計測したところ培養時間の経過とともに増加していることが分かった。また培養 30 分後にはベクタープラスミドだけをトランスフェクションした細胞を用いた場合に比べ明らかに多くなっていることが分かる (パネル A-C)。この精子の結合は抗 ANXA6 抗血清を添加することで阻害され、抗原タンパク質で吸収処理された抗血清では影響がなかったことから特異的なものであることが確認された (パネル D)。

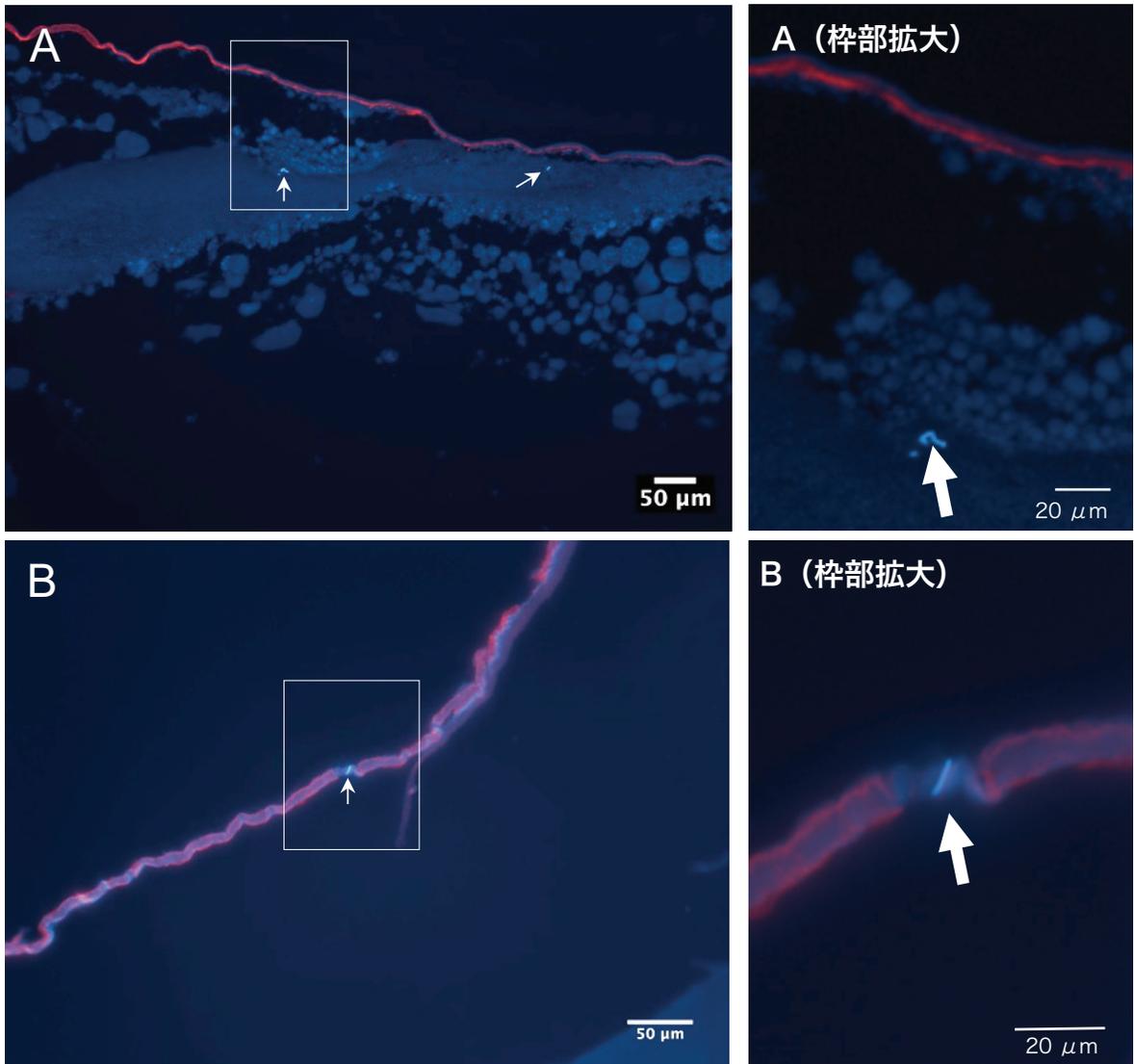


Fig. 3-1 受精卵でPVMを通過した精子

(AおよびB)受精卵の免疫組織化学染色。受精卵は放卵2時間後に卵管膨大部から得た。パラフィン切片を抗ZP1抗血清で染色してPVM(赤)を示した。精子核はヘキスト 33342 (青)で染色した。精子核は胚盤領域の卵細胞内に見られたが(Aの矢印)、そのような精子核は胚盤以外の部分では観察されず、PVMに閉じ込められた精子核が観察された(Bの矢印)。スケールバーは50 μ m。

Table 3-1 受精卵の胚盤および胚盤以外の部分における精子の観察

Number of fertilized eggs	Area observed	Number of sperm		Penetration rate (%)
		Penetrated	Trapped	
5	Germinal disk	16	31	34**
5	Non germinal disk	0	131	0

** indicates significantly different from non germinal disk ($p < 0.01$).

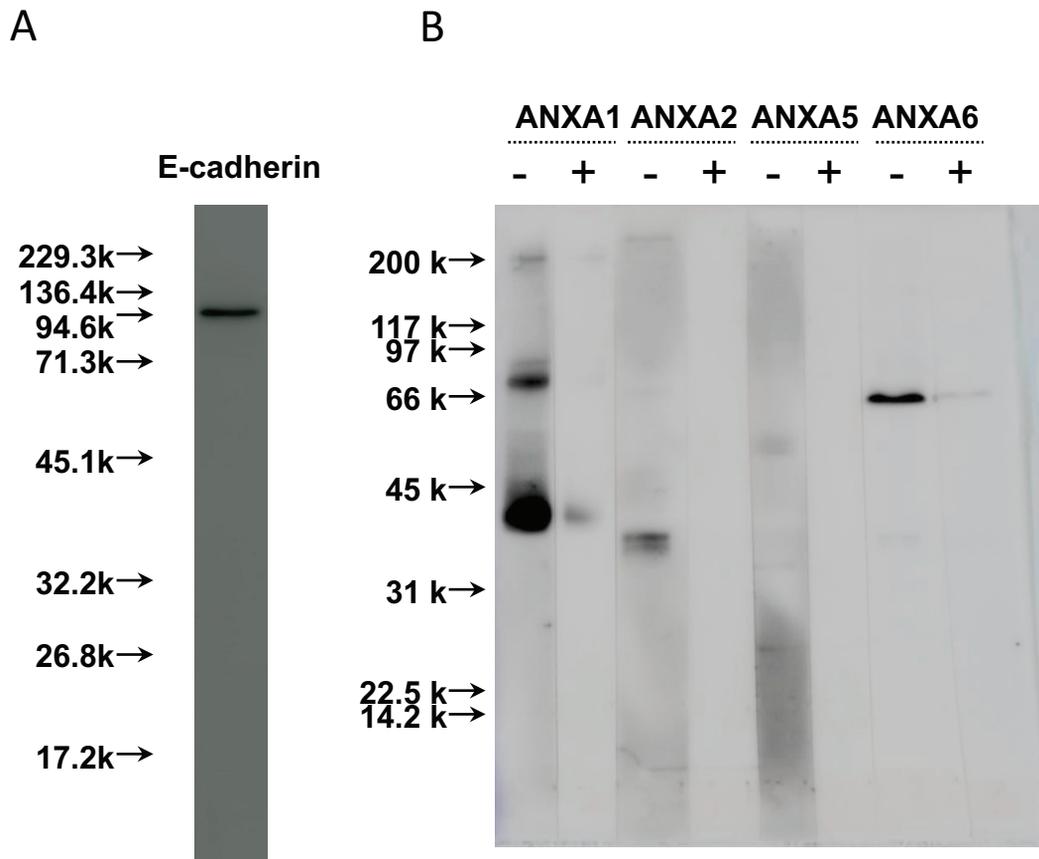


Fig. 3-2 卵細胞膜画分のウエスタンブロット解析

排卵後の卵母細胞のTriton-X100可溶化画分をSDS-PAGEで分離し (A) 抗E-cadherin抗体 (B) 抗ANXA1、ANXA2、ANXA5、ANXA6抗血清で処理した。それぞれの抗血清に各抗原タンパク質をあらかじめ添加(+)または添加なし(-)。

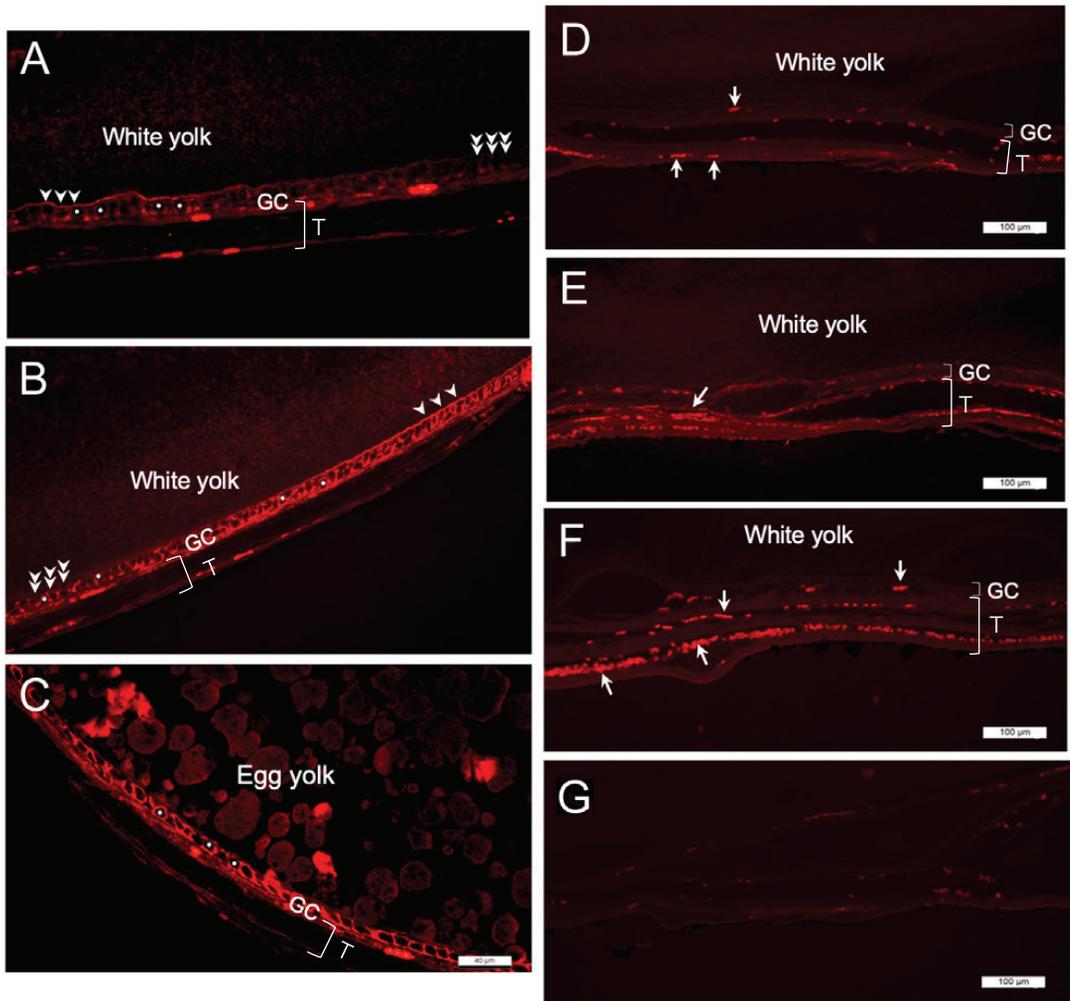


Fig. 3-3 免疫組織化学染色による最大卵胞におけるANXAsタンパク質の局在解析

最大卵胞を採取し固定後、胚盤部分とそれ以外の部分に分けパラフィン包埋し、切片を染色、蛍光顕微鏡観察した。胚盤部分（A、B）および胚盤以外の部分（C）を抗ANXA6血清で染色した。胚盤部分については抗ANXA1血清（D）、抗ANXA2血清（E）、抗ANXA5血清（F）、正常ウサギ血清（G）でも染色した。ANXA6のシグナルは胚盤部分に見られる（AおよびBの矢じり）、しかし胚盤の端から外側に向かって消えていく（AおよびBの2重矢じり）。胚盤以外の部分ではそのように染色されるものは観察されなかった（C）。アスタリスクで示したのは顆粒層細胞（GC）。GCの外側には卵胞膜細胞層（T）がある。（D）、（E）、（F）の矢印で示された細胞は血球と思われる。スケールバーは100 μ mもしくは40 μ m。

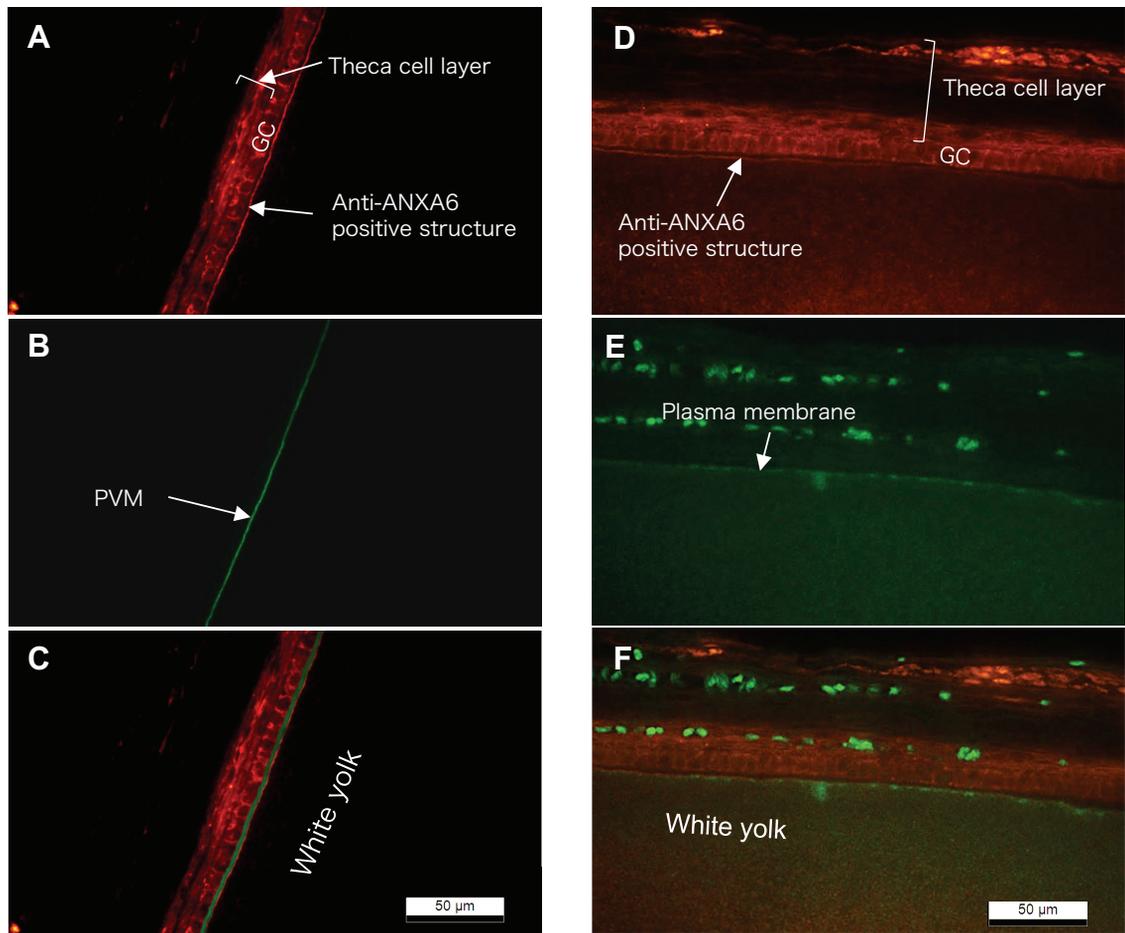


Fig. 3-4 卵胞におけるANXA6の局在

(Aから C) 最大卵胞を抗ANXA6抗血清およびPVMの構成要素であるZP1に対する血清で免疫染色した。抗ANXA6抗血清(A)、抗ZP1抗血清 (B) および重ね合わせ(C)。 (DからF) 同じサンプルを抗ANXA6抗血清 (D)、細胞膜結合タンパク質であるE-cadherinに対する抗体 (E) で染色した。重ね合わせが(F)。スケールバーは50 μm。

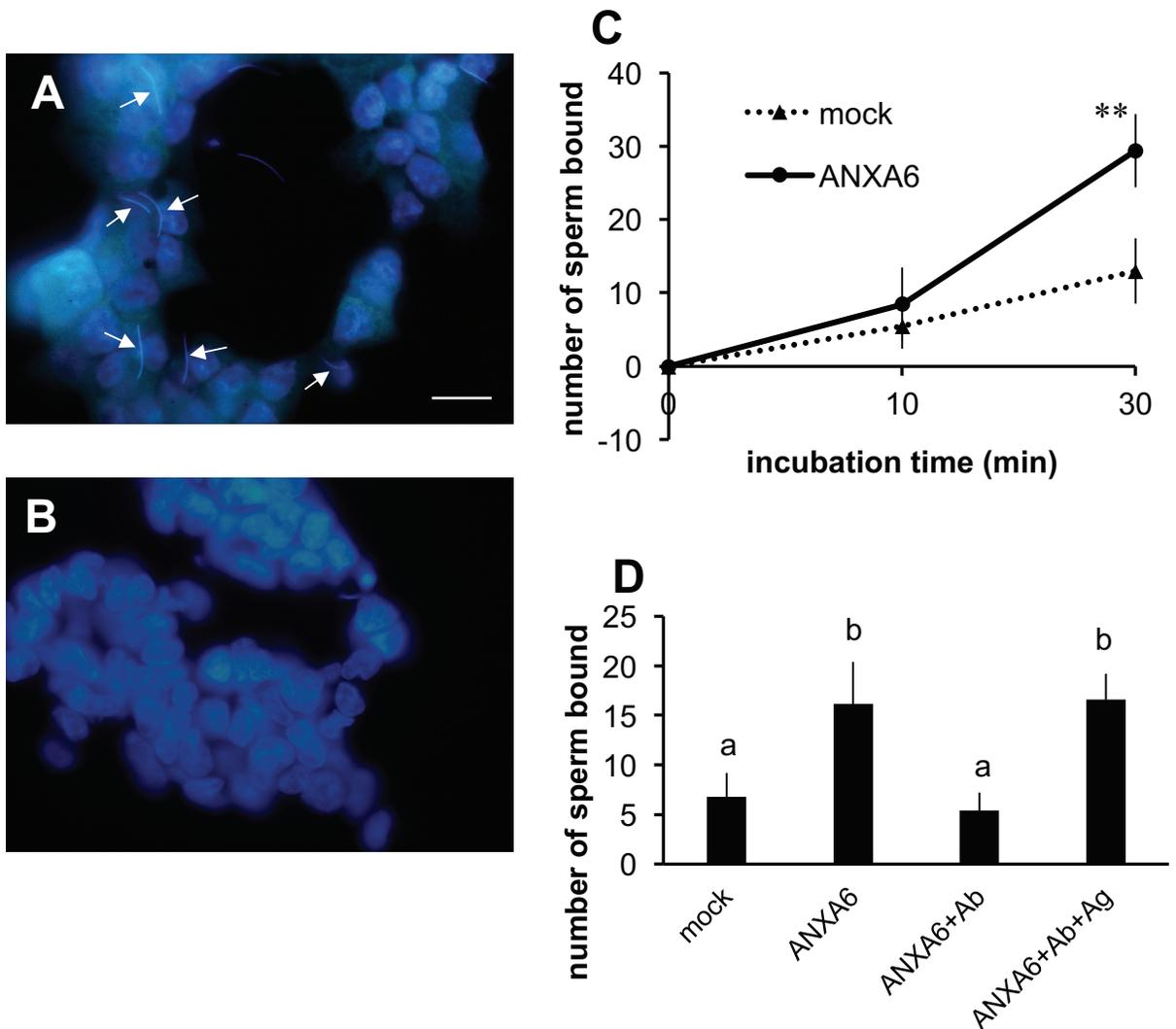


Fig. 3-5 ANXA6を発現させたHEK293細胞に結合する精子

HEK293細胞にANXA6発現コンストラクション (A)、ベクターのみ (B)を形質転換し射出精子とインキュベートした。矢印は細胞に結合した精子を示した。スケールバーは20 μ m。(C) ANXA6発現コンストラクトおよびベクターのみ(mock)をトランスフェクションしたHEK293細胞と射出精子をそれぞれインキュベートし、0、10、30分後に結合している精子を顕微鏡で観察し視野あたりの精子数をカウントした。** mockに対し有意差あり ($P < 0.01$)。(D) ANXA6発現コンストラクトおよびベクターのみをトランスフェクションしたHEK293細胞と射出精子をそれぞれ30分間インキュベートし、さらに抗ANXA6抗体 (ANXA6+Ab) および予め抗原で吸収処理した抗ANXA6抗体(ANXA6+Ab+Ag)を添加しておいた試験区と比較した。3回の試験の平均値および標準偏差を示した。(異符号間で有意差あり $P < 0.01$)

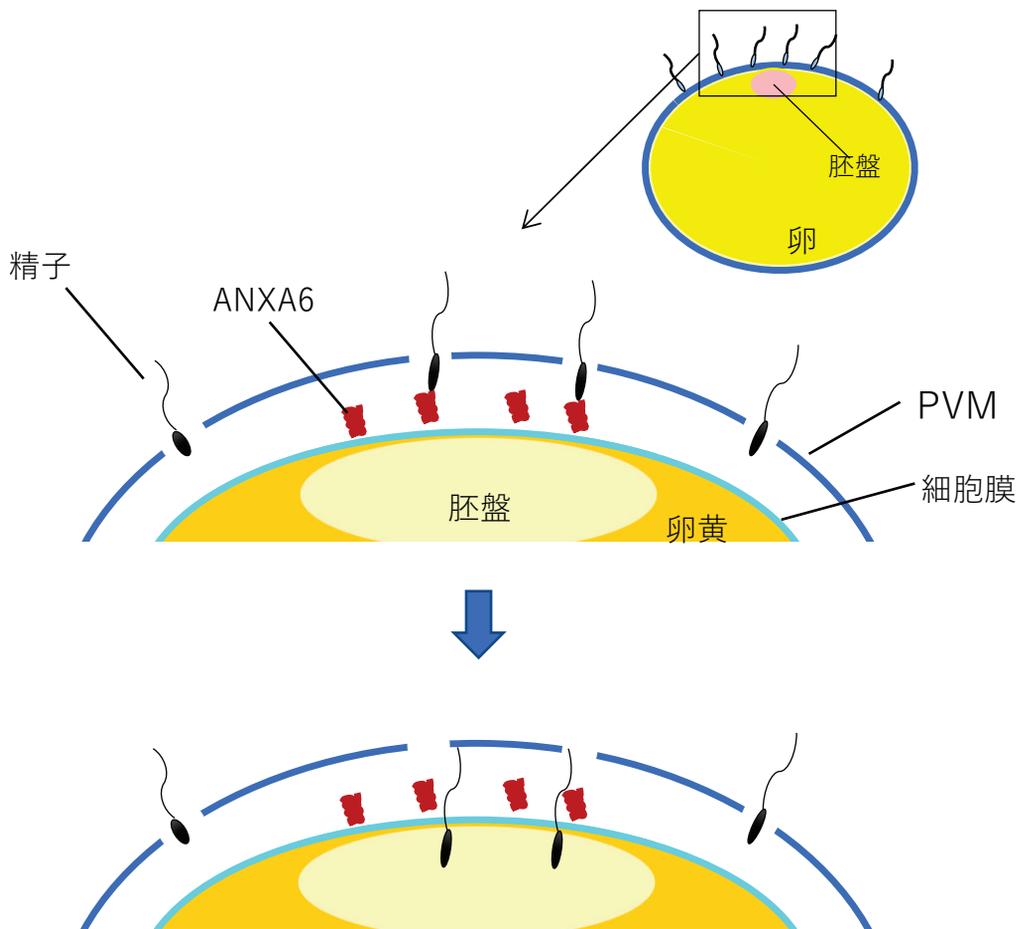


Fig. 3-6 ウズラの卵でのANXA6の局在と役割を示した模式図

ウズラの卵およびその胚盤部分の拡大図とANXA6の局在、精子との相互作用について模式的に示した。ANXA6は細胞膜とPVMの間(囲卵腔)に細胞膜上に結合した状態で局在し、胚盤を覆う部分以外の場所にはない。精子はPVMに孔を形成したのち胚盤部分ではANXA6と結合することができる(拡大図上)。胚盤部分の精子は、その後卵細胞内へ侵入する。それ以外の精子はPVMに孔を形成するがそのまま留まり、卵細胞内へ侵入することはない(拡大図下)。ANXA6は精子のPVM通過から卵内への侵入過程において補助的な役割を果たしていると予想される。

第四節 考察

本研究においてウズラの卵で発現している ANXA6 が精子と特異的に相互作用していることを明らかにした。鳥類において卵の細胞膜表面に精子との結合に参与するタンパク質の存在を確認したのは初めてのことである。特に興味深いのはその局在であり、ANXA6 は胚盤部分を覆う領域の PVM と細胞膜の間に多く存在していた (Fig. 3-4)。ANXAs はカルシウム依存的にリン脂質結合に結合するタンパク質のファミリーであり好中球の漏出やプラスミン生成といった細胞外で起こる様々なイベントに参与することが知られている (Schloer *et al.*, 2018)。一方で疎水性の細胞膜貫通ドメインを持たないことも知られている (Rescher and Gerke, 2004)。また、どのようにして細胞外に輸送されるのかについて詳しいメカニズムは分かっていないが、ANXA2 ではリン酸化されることにより活性型となって細胞外に輸送されていることが報告されている (Deora *et al.*, 2004)。ANXA6 ではマウスにおいて授乳開始のタイミングで乳管上皮細胞の細胞内から細胞外へ輸送されていることが報告されている (Rocha *et al.*, 1990)。

本研究において免疫組織化学染色の結果で ANXA6 は PVM と卵細胞膜の間に局在していることが示されており、このことから ANXA6 は何らかの手段で細胞外へ輸送され卵卵腔に集積していると考えられる。しかし ANXA6 がどこから分泌されてくるのかは分かっていない。免疫組織化学染色で示された ANXA6 のシグナルは E-cadherin とは共有していないことが分かったが PVM を採取した際に洗浄したのちも残っていたことから卵細胞膜とは結合していることも明らかである。ウエスタンブロットの結果においても Triton X-100 可溶画分に E-cadherin とともに ANXA6 が含まれていた (Fig 3-2)。これらのことから ANXA6 は何らかの分子の介在により細胞膜に結合していると考えられる。ANXA6 の細胞表面への輸送や局在のメカニズムについては今後の研究課題で

ある。

本研究の組み換え ANXA6 タンパク質を使った媒精試験においては精子の結合が観察されたが HEK293 細胞との膜融合のような現象は観察されなかった。マウスでの最近の研究では、GPI アンカー型葉酸受容体ファミリーのタンパク質であるが葉酸を運ぶ能力は無い JUNO が、精子と卵子の細胞膜融合を促進する本物の融合因子であることが報告された (Bianchi *et al.*, 2014)。鳥類においては精子-卵融合に関与する分子については未だに見つかっていない (Nishio and Matsuda, 2017)。鳥類の受精において精子-卵の細胞膜融合が実際に起きているのかどうかについても分からないが、本研究の結果は ANXA6 は精子と卵子の融合過程では役割を持たないが、卵内に侵入する前に卵細胞膜の表面に精子を保持するように機能する可能性があることを示している。本研究では精子の表面に存在するであろう ANXA6 の結合相手を同定する実験までには至っていない。ウシでは BSP1 と呼ばれるタンパク質が精嚢で分泌され精子表面に結合することが報告されている (Ignotz *et al.*, 2001)。BSP1 は精子の卵管上皮への結合を促進することが示されており、また卵管で発現している ANXAs と相互作用するため、BSP1 が精子の卵管結合タンパク質の候補であることが示唆されている (Ignotz *et al.*, 2007)。ウズラの精子において BSP1 と類似の因子が存在するかどうかは分からないが、これまでの研究において ANXAs は卵管腔移行部の精子貯蔵管にも存在していることが分かっている (未公開)。精子において ANXA6 との結合に関与するタンパク質の同定が今後の課題である。

鳥類では多くの種で精子が卵内に侵入する部位は胚盤部分に集中していることが報告されている (Bramwell and Howarth, 1992; Birkhead *et al.*, 1994)。精子は優先的に胚盤部分の PVM を通過できるようになっており、これにより雌性前核のある胚盤への侵入を確かなものに行っていると考えられている。しかし、Yoshizaki らのグループはウズラにおいて受精卵の卵膜に精子によって形成された孔は胚盤以外の部分も含めて

卵全体に広く存在していることを報告している (Rabbani *et al.*, 2006)。本研究の過程でもウズラの受精卵に形成された PVM の孔は卵全体に遍在していることを確認している (データ未公開)。この孔の分布の違いは種の違いによるものなのかはわからないが、おそらくウズラの受精が特徴的なのであろうと考える。

Nishio らのグループはニワトリで ZP2 が未熟な卵細胞に発現していて成熟卵の胚盤部分にそのまま残っていることを報告している (Nishio *et al.*, 2014)。彼らはこのような ZP2 の胚盤部分への局在は精子が胚盤部分に集中して孔を開けるという現象と関連づけているが、それを証明する結果はまだ報告されてない。Kinoshita らのウズラにおける実験によれば ZP2 は未熟な卵胞において発現しているが、成熟卵胞の PVM では ZP2 タンパク質は検出限界以下であった (Kinoshita *et al.*, 2010)。本研究においては ANXA6 が胚盤部分に特徴的に蓄積していることを明らかにしたが、しかしこのことが精子の胚盤への集中的な侵入と関係があるのかは不明である。

第五節 小括

本章ではウズラの受精において精子は胚盤部分においてのみ PVM を通過していること、また ANXA6 が胚盤部分の卵細胞膜上に局在していることを明らかにした。しかしながらそれら二つの関係はまだ不明である。ただ、胚盤以外の部分では精子は PVM に孔をあけるものの卵細胞内に侵入できていないことが観察されており、この現象から胚盤部分の PVM の内側には精子の侵入や細胞膜上への固定に関与するような何らかの因子が存在することが予想される。今回の免疫組織化学染色の結果から ANXA6 は胚盤部分の PVM と卵細胞膜の間に領域に局在しており、胚盤以外の部分では検出されなかった。また細胞実験の結果からは ANXA6 と精子の特異的な結合が示された。これらのことから ANXA6 は精子が卵膜に孔を形成したあと、卵細胞内に侵入する前の段階において精子を固定するような役割を果たしているのではないかと考えられる。鳥類における精子-卵相互作用と関係する分子の解明にはまださらなる研究が必要である。

第四章 体外授精後の発生段階とカルシウムイオンシグナル経路の解析

第一節 緒論

これまでに研究されたすべての脊椎動物の受精において、卵-精子融合の直後に侵入した精子由来の因子により卵細胞質内のカルシウムイオン濃度の一過的な上昇や周期的な上昇（オシレーション）が引き起こされることが知られている。このカルシウムイオン濃度の上昇に続き減数分裂の再開、雌性前核の形成など一連の卵活性化反応を引き起こす（Stricker, 1999; Runft *et al.*, 2002）。精子由来卵活性化因子および卵活性化の仕組みは哺乳類ではマウスをモデルとしてよく研究され、医療への応用が期待されている。

鳥類における卵活性化の仕組みについてはウズラをモデルとしてこれまで研究が行われており、特に ICSI によりウズラの正常な雛を得ることに成功したことをきっかけに様々なことが分かってきた(Mizushima *et al.*, 2014)。精子由来卵活性化因子としてホスホリパーゼ C ζ 1 (PLCZ1)、クエン酸シンターゼ (CS)、アコニターゼ 2 (ACO2) の3つが必須であること、PLCZ1 が最初のカルシウムイオンの一過的な増加を引き起こし、そして CS と ACO2 は長時間にわたり継続するスパイラルカルシウムオシレーションに必要であることを明らかにしている(Mizushima *et al.*, 2014)。また、この初期の一過的なカルシウムイオンの増加とその後のスパイラルオシレーションはそれぞれ inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-1 (ITPR1) および -3 (ITPR3) そして、ryanodine receptor-3 (RYR3) を介していることが明らかとなった (Mizushima *et al.*, 2022)。またこれらの因子は卵活性化と胚発生開始タイミングにおいて分解されていることが報告されている (Mizushima *et al.*, 2022)。

このように鳥類の受精研究に大きな進展をもたらし、非常に有用な手法である ICSI は多精子受精を模したものであるが、考慮すべき点もある。それは、ICSI は胚盤部

分に一つの精子と多数の精子抽出物を直接注入するので、精子が卵へ侵入する過程をスキップしていることである。また、さまざまな高額な機器や熟練の技術が必要となり、誰でもが気軽に実験に用いることができるわけでは無いということもある。もちろん ICSI が試みられる以前より、*in vitro* での媒精によって受精卵を得る実験はウズラやニワトリで行われてきた (Olszanska *et al.*, 2002; Batellier *et al.*, 2003)。Olszanska らは排卵予想時刻直前に卵胞を取り出し、*in vitro* で排卵させた卵に媒精させる方法を用いている。これは卵管で付着する卵白が精子の結合を妨げることを考慮した方法であり、手間はかかるものの 15%程度の卵で胚発生が見られた。

本研究では *in vitro* 媒精によるウズラの受精（本論文では体外授精と表記）の方法確立を目指し、自然に排卵された卵を用いて精子量の違いによる受精率や発生の進行程度を調べた。またその時の発生の進行程度とカルシウムイオンシグナル経路および減数分裂再開に関与する因子の下方制御について ICSI を用いた場合を通常の発生の進行として比較した。

第二節 材料および方法

(1) 実験動物

ウズラ(*C. japonica*)はクエルコスモス(田原市)から購入し、14時間明期-10時間暗期の人工照明下、室温 25°Cで飼育。市販の成鶏用飼料および水道水を不断で与えた。産卵時刻を個体ごとに記録することにより排卵時刻を予測し、実験に用いた。

(2) 体外授精および ICSI

射出精子は Kuroki and Mori (1997)の方法に従って交尾直前の雄から採取した。採取した精子は 1.25 mM CaCl₂ および 1.8 mM MgSO₄ を含むハックス平衡塩類溶液(HBSS)に懸濁したのちトーマ血球計算盤を用いて精子濃度を算出した。精子懸濁液は 39°Cに保温した。精子懸濁液を HBSS で 2×10^3 , 2×10^4 , 2×10^5 sperm/mL に調製し、卵子の媒精に使用した。未受精卵は放卵の 0.5 から 2 時間後の間に雌ウズラを断頭屠殺により安楽死させ、卵管膨大部から回収した(Mizushima *et al.*, 2014)。排卵卵に付着した卵白は 41°Cのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中でスパーテル及びピンセットを使って取り除いたのち、約 45 mL の PBS で満たした 50 mL チューブの中に卵を移し、41.5°Cで穏やかに振とうしながら表面に付着した卵白の除去を行った。振とう開始から 30 分後に PBS を入れ替え、再び 30 分間振とうした。20 mL のプラスチックカップに HBSS を 10 mL を入れ、スパーテルを使って卵を胚盤部が上を向くように沈めた。胚盤上部の液面から調製した精子懸濁液を 100 μ L (2×10^2 , 2×10^3 , 2×10^4 sperm) 添加し、41.5°Cで 30 分間培養した。培養後、PBS を入れたガラスシャーレ内でスパーテルを使って表面を洗浄した卵を体外授精卵とした。

媒精後の体外培養は Ono ら (1994) および Mizushima ら (2014) の方法に従って行った。20 mL のプラスチックカップに抗生物質を添加した Dulbecco's Modified

Eagle's Medium (DMEM, シグマアルドリッチジャパン合同会社, 品川区) を約 20 mL 注ぎ、胚盤が水面を向くように体外授精卵を沈めた。別のプラスチックカップを空気が入らないように重ね体外培養 (41.5°C, 5% CO₂) を行った。

対照実験として ICSI により受精させた卵を用いて比較を行なった。精子の顕微注入および精子由来の卵活性化因子 (*PLCZ1*, *CS*, *ACO2* の cRNA) の調製は Mizusima ら (2014, 2022) の方法に従った。

(3) 初期発生段階の判定および核染色

24 時間体外培養した体外授精卵および ICSI 卵の胚盤部を実体顕微鏡下で観察し、Eyal-Giladi and Kochav (1976) の方法にならって初期発生段階の判定を行った。Mizushima ら (2009) の方法に従い胚盤を回収、固定および染色をした。すなわち、卵をシャーレに取り出し、直径 5 mm の孔を開けたろ紙を用いて穴が胚盤を囲うように被せた。ハサミを使ってろ紙の外枠に沿って切り出すことで胚盤部をろ紙に付着させ、ろ紙に付着した余分な卵黄はキムワイプでふき取ることで卵子から胚盤部を採集した。ろ紙がついたままの胚盤部を氷酢酸:エタノール (1:3) 溶液 2 mL に沈めて固定した。3 時間後、胚盤を 100 %エタノール溶液 2 mL 中に移し、30 分後に新たな 100 %エタノール溶液中に沈める操作を合計 2 回繰り返すことで胚盤の脱水を行った。PBS 2 mL 中で 15 分間沈める操作を 2 回繰り返した後、スライドグラス上で胚盤をろ紙からハサミで切り離した。胚盤の上からグリセリンと 100 µg/mL 4', 6-diamidino-2-pH enylindole (DAPI, シグマアルドリッチジャパン) を 9:1 で混合したものを 20 µL かけ、上からスライドグラスを押し付けて 2 時間浸透させた。蛍光顕微鏡 (BX-51, オリパス株式会社, 新宿区) 下で DAPI による染色を行った胚盤を観察し、発生段階の判別を行なった(Olszańska *et al.*, 2002; Mizushima *et al.*, 2009)。

(4) 精子侵入によって PVM に形成された孔の観察

媒精 30 分後に卵を PBS を満たしたシャーレに移してよく洗い、ピンセットを使用して PVM を卵黄から引きはがし、付着した卵黄塊を取り除いた。胚盤周辺部から 5 mm 四方程度の大きさに切り出した PVM をスライドガラスに移し広げた。室温で 10 分間乾燥させた後、3.7%ホルムアルデヒド水溶液を PVM 上に 500 μ L マウントし、5 分間静置した。3.7%ホルムアルデヒド水溶液を Milli-Q 水で洗い流し、シッフ試薬（富士フィルム和光純薬、大阪市）を 500 μ L マウントして 5 分間静置した。シッフ試薬を Milli-Q 水で洗い流し室温で完全に乾燥させた後、光学顕微鏡（E800、Nikon、東京）下で PVM に形成された孔を観察し、視野（3mm²）における孔の数をカウントした。

(5) ウェスタンブロット

受精卵の減数分裂再開のためのシグナル伝達に関わる因子の解析のため培養 3 時間後の胚盤を回収し、Mizushima ら（2022）の方法に従い、120 mM KCl, 0.1 mM EGTA, 10 mM Na- β -glycerophosphate, 0.2 mM PMSF, 1 mM DTT を含む 20 mM HEPES 緩衝液（pH 7.5）にホモジナイズした。10,000 g で 10 分間遠心し、上清を卵抽出物とした。タンパク質定量は BCA Protein Assay Reagent Kit（Pierce, Rockford, IL, USA）を用いた BCA 法により行った。

SDS-PAGE は Laemmli (1970)の方法に従い、8%または 12% ポリアクリルアミド分離ゲルおよび 5% ポリアクリルアミド濃縮ゲルを用いて各レーン 10 μ g のタンパク質を泳動した。泳動後に PVDF 膜（Millipore, Bedford, MA, USA）に転写した。ブロッキングバッファー（Detector Block, SeraCare Life Sciences, Milford, MA, USA）でインキュベーション後、ウサギ抗ヒト Cyclin B1 抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc.,

Santa Cruz, California, USA)またはウサギ抗c-MOS抗体 (Bioss, Inc., Tokyo, Japan)、ウサギ 抗ラット ITPR1 抗体 (Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel)、マウス抗ニワトリ RYR 抗体(GeneTex, Inc., Irvine, CA) を添加して 4°C で一晩反応させた。抗ニワトリ γ -tubulin (TUBG)モノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)はコントロールとして検出に使用した。 2次抗体には HRP 結合したヤギ抗ウサギ IgG 抗体またはロバ抗マウス IgG 抗体を用いた。検出には化学発光法にて行い、HRP 基質 (Immobilon、Millipore) および LAS 3000 (GE Healthcare, Madison, WI, USA)を用いた。画像解析は ImageJ 1.48v ソフトウェア (NIH, Bethesda, MD, USA)を使用した。

(6) 統計解析

タンパク質の発現量は TUBG タンパク質量を内部標準として定量化した。データは平均 \pm S.D として表し ANOVA によって有意差分析を行なった。実験群間の統計的な有意差は Tukey の多重検定法により判定し $P < 0.05$ の場合に有意差があると判断した。

第三節 結果

(1) 体外授精後に精子により胚盤部分の PVM に形成された孔と胚発生

媒精後 30 分の卵から PVM を単離し、胚盤部分に精子によって形成された孔の数を調べた。様々な精子濃度で体外授精を行ったとき精子数の増加に従い PVM に形成された孔の数も増加していた (Fig. 4-1)。この結果と一致して、精子数の増加に従い胚発生もステージの進行に改善が見られた (Table 4-1)。表に示したように、 2×10^2 個の精子濃度で媒精し 24 時間培養したときはどの卵も発生は進まなかった。一方で、 2×10^3 個の精子数で媒精した場合は 24 時間後に 10 の内 2 つの卵がステージ III-V まで発生が進行し、 2×10^4 個の時は 14 のうち 6 の卵 (43%) がステージ V から VIII の胚盤葉発生まで進行した。

(2) ICSI 後の MPF と CSF の分解

ウズラにおいて第 2 減数分裂中期の卵で M 期促成因子 (MPF) と細胞分裂抑制因子 (CSF) の活性を調べるため、MPF のサブユニットである CCNB1 と CSF の 1 つであり MAPK シグナル経路の因子である c-MOS のタンパク質発現量をそれぞれ調べた。

未受精の排卵卵子におけるウエスタンブロットの結果では抗 CCNB1 抗体および抗 c-MOS 抗体は約 50kDa および約 43kDa のタンパク質と強く結合した (Fig.4-2A)。これらのサイズは他の脊椎動物のものとほぼ同じであった (Castro *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2020)。このことからまたシグナルは正常血清では検出されなかったことから、特異的な反応であることが示された。

次に、細胞質内の一過的なカルシウムイオンの増加とスパイラルオシレーションの誘起にそれぞれ関与する ITPR1 と RYR3 について調べた。その結果、約 270 および 500kDa のバンドが抗 ITPR 抗体および抗 RYR3 抗体に対してそれぞれ検出された

(Fig.4-2A)。さらにこれらのバンドは通常ウサギ IgG および通常マウス IgG では反応がなかった。

次に、卵活性化の過程における CCNB1 と c-MOS の不活性化について調べるため、精子由来卵活性化因子とともに ICSI を行った 3 時間後にこれらのタンパク質量を調べた。その結果、Fig. 4-2B および 4-2D に示したように対照とした PBS と ICSI した場合に比べ、CCNB1 と c-MOS のタンパク質量は大幅に減少した。この減少の様子は ITPR1 と RYR3 でもみられた。これは Mizushima ら (2022) の報告と一致している。さらに、この CCNB1 と c-MOS の減少は *PLCZ1* の cRNA のみの場合でも確認できたが、一方で *CS* と *ACO2* の場合はこの減少は起きなかった。この結果は PLCZ-1 に誘起されたカルシウムイオンの増加が CSF、そして MPF 不活性化の要因となっていることを示している。RYR3 の減少は *CS* と *ACO2* の cRNA 両方を注入したときに見られており、このことも Mizushima ら(2022)の報告と一致している。

(3) 体外授精後の MPF と CSF の分解

異なる精子濃度で体外受精を行い 3 時間後の卵内の ITPR1、RYR3、CCNB1 および c-MOS のタンパク質発現レベルの変化を Fig.4-3 A-C に示した。すべてのタンパク質において TUBG との相対的なバンドの強度で変化が見られた。ITPR1 および RYR3 の減少量は授精に用いた精子数に依存していた (A-D)。しかしながら、この減少の程度は ICSI の場合と比較してみると小さいものである。さらに CCNB1 と c-MOS タンパク質の減少は 2×10^4 個の精子を用いて授精したときに確認されたが、しかし、やはり ICSI の場合と比較してみると減少量は少なかった (C-D)。

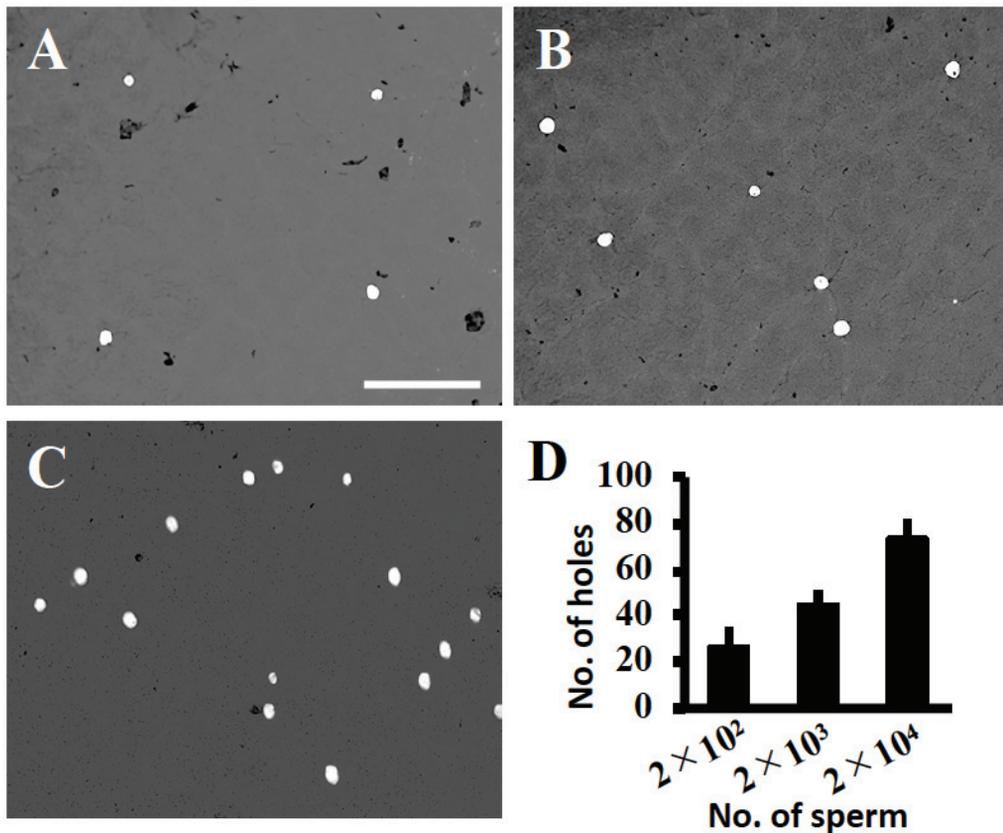


Fig. 4-1 体外授精時に胚盤部分のPVMに精子によって形成された孔と精子濃度を変化させた場合の孔の数の違い

(A-C) 媒精後30分のウズラの卵からPVMを単離し精子によって形成された孔を観察した。精子濃度はそれぞれ 2×10^2 (A)、 2×10^3 (B)、 2×10^4 (C)、PVMを洗浄後にシッフ試薬で染色し顕微鏡観察した。(D) PVMの 3 mm^2 あたりの孔の数を3回の実験の平均値と標準偏差で示した。スケールバーは $200 \mu\text{m}$ 。

Table 4-1 体外授精 24時間後の胚発生

No. of sperm inseminated	No. of eggs		No. of embryos									
	Treated	Developed (%)	Developed to the stage* of									
			II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
ICSI	6	5 (83)							2	1	2	
2×10^2	7	0 (0)										
2×10^3	10	2 (20)		1		1						
2×10^4	14	6 (43)				2	1	2	1			

*Developmental stages were determined according to the classification system of Eyal-Giladi and Kochav (1976)

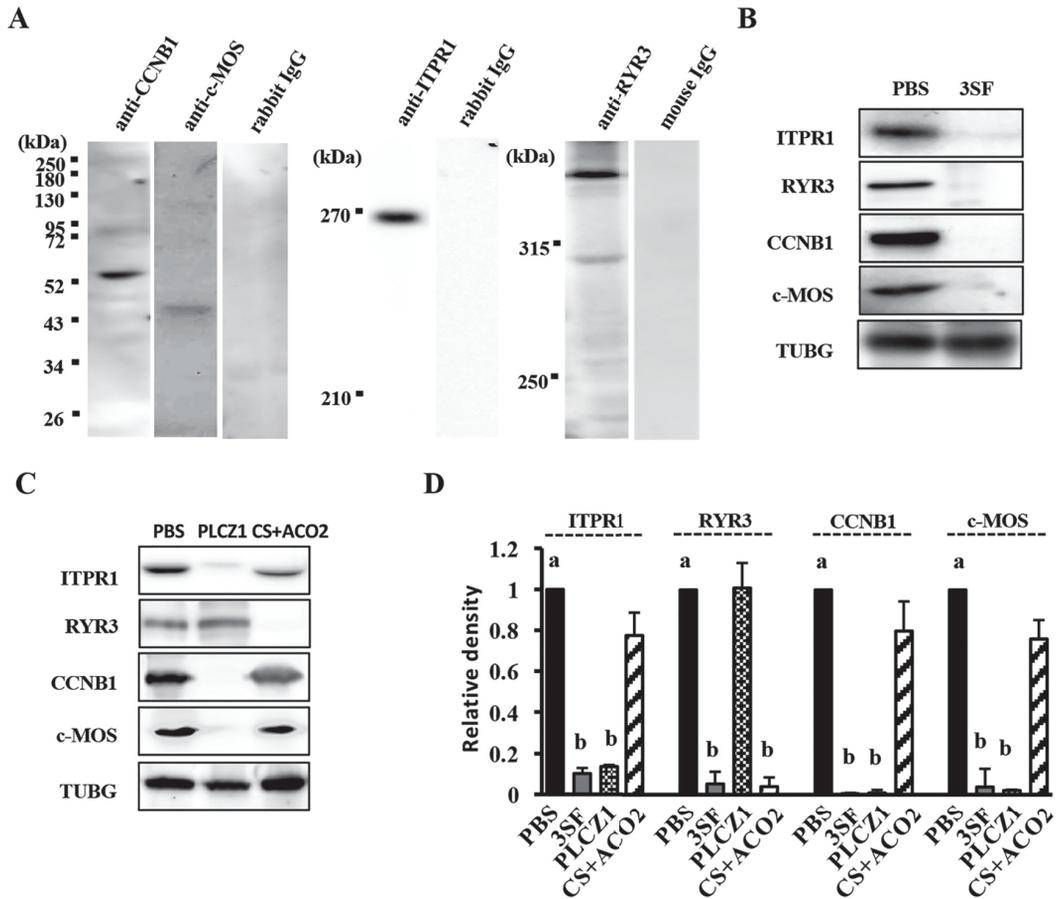


Fig. 4-2 ICSI後のウズラ卵におけるCCNB1、c-MOS、ITPR1、RYR3タンパク質発現量

(A) ウズラの排卵卵子においてCCNB1、c-MOS、ITPR1、RYR3の各タンパク質を検出した。(B)3つの精子因子(3SF:PLCZ1、CS、ACO2)のcRNAまたはPBSを同時にインジェクションしたICSI後3時間のウエスタンブロットによる解析。(C) PLCZ1のcRNAのみ、CSとACO2のcRNAsまたはPBSを同時にインジェクションしたICSI後3時間のウエスタンブロットによる解析 (D) ICSI後の各タンパク質発現量の定量解析を行なった。ウエスタンブロットのバンド強度を定量化し3回の実験の平均値と標準偏差で示した。異符号間で有意差あり ($P < 0.01$)。

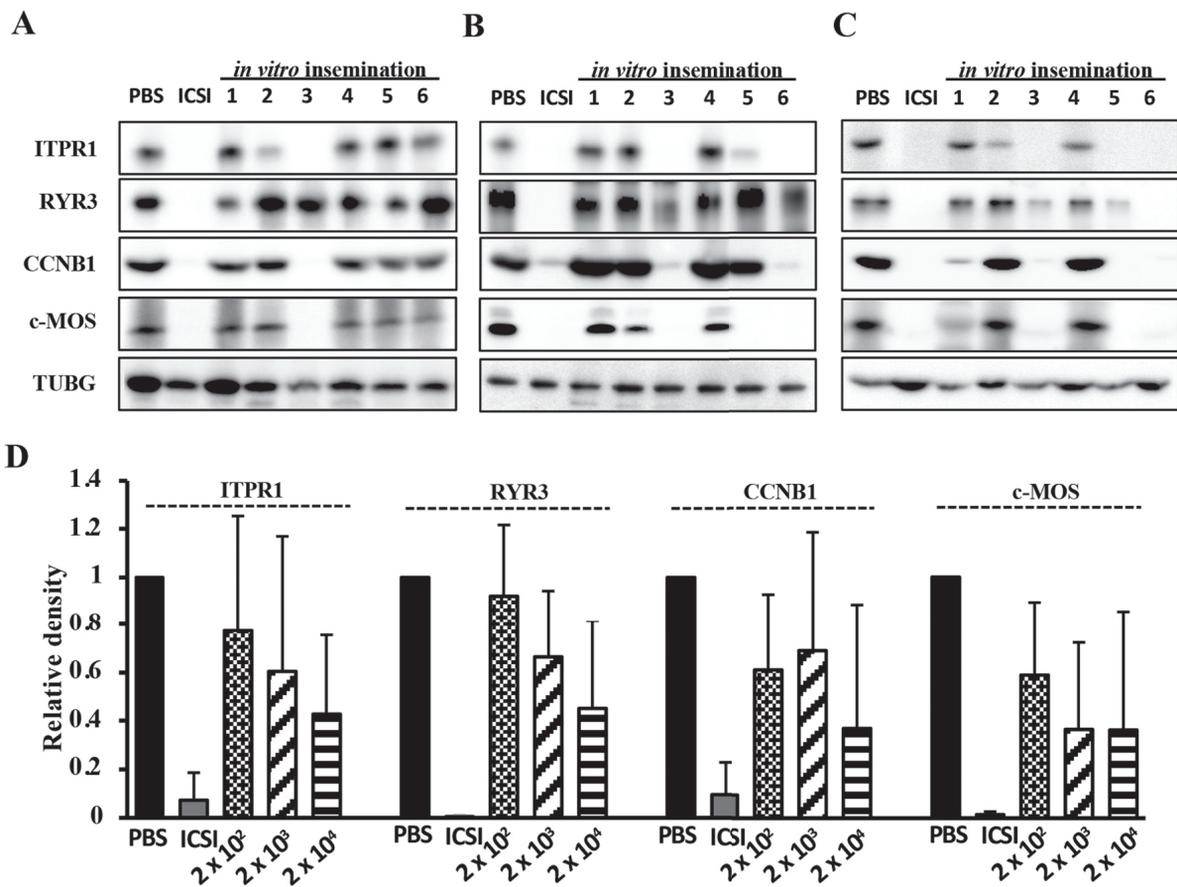


Fig. 4-3 異なる精子濃度による体外授精後のウズラ卵における ITPR1、RYR3、CCNB1、c-MOSタンパク質の発現レベルの変化

(A-C) 体外授精3時間後のタンパク質発現量についてウエスタンブロット解析をおこなった。用いた精子濃度はそれぞれ 2×10^2 (A)、 2×10^3 (B)、 2×10^4 (C)。1-6はそれぞれ異なる卵での結果を示している。対照としてICSIおよびPBS処理をした卵での結果を示した。(D) 体外授精後の各タンパク質発現量の定量解析を行なった。実験は3回行い、それぞれウエスタンブロットのバンド強度を定量化し3回の平均値と標準偏差で示した。

第四節 考察

この研究ではウズラ卵での *in vitro* 媒精による体外授精の効率化に向けた検討を行ない、精子濃度による胚発生の進行程度の違いや卵活性化に關与する因子の分解程度について調べた。まず媒精後 30 分の卵から PVM を剥がし取り胚盤部分に形成された孔の数を調べたところ、精子数の増加に伴って孔の数も増えたが 2×10^4 でも 70 個程度の孔であった。つまり多くとも 70 程の精子が胚盤に入ったと考えられる。

胚発生に至った割合は 20-43%であったが、これはウズラでの Olszańska ら (2002) や ニワトリでの Batellier ら (2003) の 15%程度という結果と比べて同等かそれ以上の数値であった。さらに、ステージ VIII までの発生はこれまで報告された段階より改善されている (ステージ VI; Olszańska *et al.*, 2002; Batellier *et al.*, 2003)。Olszanska らは *in vitro* で排卵された卵を使っていることが大きな違いであるが、これらの結果は、鳥類においては自然に排卵され卵管から回収した卵を IVF に用いることが適切である可能性を示している。

なぜ卵管から回収した卵の方が発生の進行に有利なのか、その理由について明確な答えは得られていないが、卵管において卵の初期胚発生を助ける何らかの因子が分泌されている可能性が考えられる。Tanaka ら (1994) はニワトリにおいて体外授精後の卵を外科的に卵管に戻して正常な雛を得ている。また近年では哺乳類においても卵管分泌物の働きについてその重要性が見出されている。母体内で受精し発生した場合と体外授精し培養した場合で比較すると体内発生胚の方が発生および着床に有利であることが報告されている (Garcia *et al.*, 2018; Nishizono, 2021)。今回の実験に用いた未受精卵は放卵 30 分から 2 時間後に採卵したものであり、排卵直後から 1 時間以内の間であると予測される。短時間のあいだではあるが、卵管漏斗部や膨大部において分泌された卵白成分が付着した状態であり、この間に何らかの因子が作用している可能性が考えられる。

また卵白の付着は精子の PVM への結合、通過を妨げるため、媒精前に除去、洗浄してから使用している。実験で使用した卵は排卵後の経過時間に最大 1 時間の差があるが、体外受精の結果で見られた精子の侵入数や受精率のばらつきに対し、この排卵後の卵管内での経過時間がどのように影響しているのか、卵管分泌物の発生促進に与える影響および卵白の付着による精子通過阻害への影響の両面について、今後の検討課題と思われる。

哺乳類や鳥類の卵は排卵の時点で細胞周期は第 2 減数分裂中期で停止している (MetII 停止)。これは哺乳類では細胞分裂抑制因子 CSF (cytostatic factor) が分裂終期促進因子 APC/C (anaphase promoting complex) の活性を抑制し、M 期促進因子 MPF (Metaphase promoting factor) のサブユニットである cyclin B (CCNB) の分解を防いでいることにより維持されている。精子由来卵活性化因子により細胞内カルシウムイオンの上昇が起こることで、CSF および MPF が不活性化され、細胞周期の再開、前核形成に至ることが知られている (Jones, 2005)。PLCZ1 は Saunders ら (2002) によってカルシウムオシレーションを引き起こす精子特異的な因子としてマウスから単離された。PLCZ1 によって生じたカルシウムイオンの上昇は CSF の一つである Erp1 を直接リン酸化するカルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CamKII) を介する経路で伝達され、それにより CCNB の分解が引き起こされる (Tatone *et al.*, 2002; Tung *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2005; Madgwick *et al.*, 2006; Shoji *et al.*, 2006; Inoue *et al.*, 2007)。さらに CamKII は c-MOS の分解を活性化させる。がん原遺伝子産物である c-MOS は CSF 活性の制御において重要な役割を果たしているとされている (Sagata *et al.*, 1988)。多くの研究において、c-MOS の下流の因子として MAPK キナーゼ (MEK)、MAPK を介する経路について示唆している (Tunquist and Maller, 2003; Yamamoto *et al.*, 2008)。

このように減数分裂の再開には CSF および MPF の分解が重要となっていることが哺乳類では知られている。本研究において、体外培養 24 時間後にそれぞれの卵からタンパク質を抽出してカルシウムシグナル経路および減数分裂再開に関与する因子の分解を調べた結果、ICSI では ITPR1 および RYR3 に加え c-MOS および CCNB1 がほぼ分解されていたが、体外授精の場合は卵による違いが大きく、コントロール群と有意差は無かった (Fig 4-3)。タンパク質の抽出に用いた卵と発生を観察した卵は同一でないため明確な因果関係は分からないが、媒精に用いた精子量の増加に伴い、胚発生に至った卵、c-MOS および CCNB1 の分解が見られた卵の割合がそれぞれ類似して推移していることから (精子量 2×10^2 でそれぞれ 0%、16%、 2×10^3 で 20%、30%、 2×10^4 で 43%、50%)、受精しなかった卵は十分な精子が侵入せずに c-MOS および CCNB1 の分解ができなかったことで減数分裂の再開に至らなかったことが原因ではないかと考えられる。つまり今回の精子量 2×10^4 では卵の活性化に必要なだけの精子因子に不足していたと考えられる。減数分裂の再開にはより多くの精子を侵入させることが必要であることが分かった。

また Fig4-2 に示した ICSI の結果から *PLCZ1* の cRNA のみのインジェクションにより ITPR1、c-MOS および CCNB1 分解が誘導されることが確認された (Fig. 4-2 C-D)。つまり *PLCZ1* による ITPR1 を介した一過的なカルシウムイオン上昇は MPF を活性化するために必要であるということが示された。Mizushima ら (2009, 2014, 2022) の報告によれば *CS* と *ACO2* の cRNA インジェクションでは雌性前核の形成は見られなかった一方で、*PLCZ1*cRNA のみのインジェクションではより高い割合での雌性前核の形成が確認されたとある。マウスでは緑色蛍光タンパク質 (GFP) と融合させた *CCNB1*cRNA をインジェクションした時、受精後最初のカルシウムイオン濃度上昇の約 10 分後にこの GFP 融合 *CCNB1* が分解されると報告されている (Nixon *et al.*, 2002)。ウズラでは *PLCZ1*cRNA のインジェクション後、一過的なカルシウムイオン上

昇の 30 分後に ITPR1 の分解が見られ、これは CCNB1 の速やかな分解により減数分裂の完了を確かなものにするということを示している(Mizushima *et al.*, 2022)。鳥類において、CCNB1 の分解過程についてはまだ不明な部分があるが c-MOS の分解は明らかに PLCZ1 により促進されており、これは ITPR1 の分解と一致しており、APC/C によるユビキチン化の介在を示唆するものである。

一方で、CS と ACO2 により誘導される RYR3 を介したカルシウムオシレーションの役割について、本研究の結果からは明らかにすることはできなかった。Fig4-3 の結果を見ると RYR3 の分解はより多くの精子を必要としていることが分かる。この RYR3 の分解は ICSI の実験において CS と ACO2 の cRNA 注入により誘導されていることから (Fig 4-2, C-D)、RYR3 を介したカルシウムオシレーションに関与するものであることが考えられる。体外授精での発生の進行をみると、ICSI に比べかなりの遅れが見られた (Table 4-1)。前述の通り PLCZ1 に誘導される一過的なカルシウム増加により減数分裂の再開が引き起こされるとすると、RYR3 を介したカルシウムオシレーションはその後の卵割に関係しているのでは無いかと想像するが、今回の実験からは根拠となるものは得られず、今後の研究が待たれる。

第五節 小括

現代では IVF という技術はヒトを含めて哺乳類において子孫を得るための方法として生殖医療や畜産の現場、また基礎研究などにおいて広く使われている。水島らは鳥類で初めて細胞質内精子注入法 (ICSI) によってウズラの雛を得ることに成功したが、体外授精では成功例がない。これは *in vitro* で卵-精子結合から生理的多精子受精までのプロセスを再現することの難しさに原因がある。

この研究ではウズラの排卵直後の卵を用いて体外授精 (IVF) を行い、精子の侵入数やその後の卵発生の進行程度およびカルシウムシグナル経路の下流にあたる MPF と CSF の分解について調べた。

様々な精子濃度での体外授精後に発生の進行について観察したところ、受精率は 20-43% であり胚発生のステージは VIII まで進行した。この結果はこれまでの報告例より改善していた。これは自然排卵の未受精卵を卵管から回収して媒精に用いたことが大きく影響していると考えられ、卵管からの何らかの因子の影響に興味を持たれる。しかしながら、いずれにおいても 24 時間培養後のステージは ICSI の場合にくらべ遅れていた。この時の MPF と CSF の分解も精子量の増加に応じて、分解の程度も進むように見られたが、いずれも十分ではないことが分かった。このことから、より多くの精子を卵に侵入させる必要があると考えられる。

今回の結果からウズラにおける体外授精における重要な知見が得られたとともに、カルシウムシグナル経路から減数分裂再開に至る経路について新しい知見を得ることができた。しかし、本研究の目的である受精メカニズム、特に精子-卵融合研究のための体外授精法確立にはまだまだ検討と工夫が必要であると思われる。

第五章 総括

鳥類の受精における配偶子間相互作用に関わる因子やメカニズムについては他の動物と同様に多くの研究がなされてきたが、哺乳類などと比べて技術的な課題が多く、未解明の部分が多いように思われる。本研究では、「精子-PVM 結合」「精子の卵への侵入」に関与する因子の解明、そして精子-卵相互作用解析のための技術として「体外授精」の確立に向けた検討を行なった。

鳥類の受精研究の難しさについて、その理由はいくつかあるが卵のサイズが大きいことと多精子受精であることそして遺伝子操作が難しいことが大きな要因であると考えられる。卵-精子相互作用を直接観察することができれば、精子の卵内への侵入に関するメカニズムも解明に近くと思われるが、鳥類のモデル動物として扱われるウズラやニワトリの卵もサイズの大きさと不透明の卵黄で満たされていることから、生きたまま自然の受精を観察することは現在までできていない。また鳥類の卵は排卵後に卵管漏斗部より分泌される卵白に覆われるため精子が結合できず受精能を失い、PVM に結合できなくなってしまった精子は卵白に埋め込まれる (Wishart, 1997)。このため排卵後の卵は精子との相互作用の評価に用いることは困難である。また体外授精も困難である。これは多精子受精であることが大きな要因である。卵管から取り出した未受精卵にたくさんの精子を用いて媒精すれば良いかと言えば、そうではない。卵細胞は周囲を覆う PVM により物理的に保護されており、受精後はさらに卵管から分泌される卵白により覆われるが、*in vitro* では培養液中で自身の重量と精子によって孔を形成されることにより崩壊してしまうことがある。一方でその大きさを生かして工夫もされてきた。毎日、一羽のトリから 1 つ得られる成熟した卵胞から PVM を単離し、*in vitro* で精子とインキュベートすることで代替モデルとして相互作用を観察、評価することができる (Birkhead *et*

al., 1994; Robertson *et al.*, 1997; Robertson *et al.*, 1998; Kuroki and Mori, 1997)。また材料の PVM や ZP タンパク質は大量に手に入るという利点から生化学的な研究には有利である。本研究においても、第 2 章においてこの手法により精子-PVM 結合について実験を行ない精子との結合に関与する PVM 構成因子を明らかにした。

鳥類では排卵直後の卵は PVM に覆われており、精子は受精の最初の段階としてまずこの PVM と結合することとなる。ニワトリでは精子との結合に関与する因子として PVM の主要な構成要素である ZP3 が明らかとなっており、さらに ZP3 は精子タンパク質と結合することが報告されている (Bausek *et al.*, 2004)。ウズラにおいては、PVM との結合に関与する精子側因子としてアクロシンが報告されている (Sasanami *et al.*, 2011)。しかし、このアクロシンと結合する PVM の構成要素は分かっていない。そこでまず第 2 章においては精子と PVM の結合に関与する因子について調べた。

実験ではまず PVM を構成する 5 種類の ZP タンパク質に対する抗体を媒精試験に添加して影響を調べた。この結果 ZP1 と ZP3 に対する抗体がそれぞれ精子による孔形成を阻害した。しかしこの結果からは抗体の添加が精子の結合を阻害したのか、先体反応の誘起を阻害したのか、孔形成を阻害したのかは分からない。そこで精子先体反応を阻害する PTX を媒精試験に添加し、精子-PVM 結合の過程だけを切り離して評価することとした。その結果、精製した ZP1 と ZP3 は精子の PVM への結合を濃度依存的に阻害した。また DIG 標識した ZP1 と ZP3 が精子頭部に結合することが観察された。媒精試験では多量の ZP1、ZP3 タンパク質が精子に結合し、PVM への結合を競合的に阻害したことを示している。このことから、PVM に存在する ZP1 および ZP3 が精子との結合に役割を果たしていることが示された。一方でこれら ZP タンパク質と直接結合する精子側因子については分かっておらず、今後の研究が待たれる。

精子は PVM を通過したのち卵内に侵入することとなるが、鳥類においてはどのよう

に精子が侵入するのか、どんな分子が関与するのか、まったく分かっていない。そこで第3章ではウズラにおいて精子の侵入に関与する因子の探索を行ない、精子は胚盤部分においてのみ PVM を通過していること、また ANXA6 が胚盤部分の卵細胞膜上に局在し精子との結合に関与している可能性があることを明らかにした。

まずウズラの受精卵を卵管から回収して免疫組織化学染色を行なった。卵内に侵入した精子の頭部が多数確認されたが、それはどれも胚盤部分だけであった。それ以外の黄色卵黄の部分にはひとつも精子は確認されず、PVM にトラップされた精子だけが観察された。これは胚盤以外の部分では精子は PVM に孔をあけるものの卵細胞内に侵入できていないことが考えられる。もちろん受精卵のすべての部分をくまなく観察したわけではないので胚盤以外の部分で精子が全く PVM を通過できないことは証明されないが、卵内に侵入した精子の割合は胚盤部分で圧倒的に高いことが分かった。この現象から胚盤部分の PVM の内側には精子の侵入や細胞膜上への固定に関与するような何らかの因子が存在することが予想された。今回の実験結果から ANXA6 は胚盤部分の PVM と卵細胞膜の間に領域に局在しており、胚盤以外の部分では検出されなかった。また細胞実験の結果からは ANXA6 と精子頭部の特異的な結合が示された。これらのことから ANXA6 は精子が PVM に孔を形成したあと、卵細胞内に侵入する前の段階において精子を固定し、侵入への補助的な役割を果たしているのではないかと考えられる。

アネキシンファミリーのタンパク質 (ANXAs) はおよそ 30~40 kDa (ANXA6 は 66 kDa) で、カルシウム依存的にリン脂質に結合する。様々な組織、細胞で発現しており、細胞の移動、小胞輸送など細胞膜に関連した機能も様々報告されている (Raynal P and Pollard HB, 1994; Swairjo MA and Seaton BA, 1994)。ANXA6 についても細胞接着や細胞膜修復など細胞膜に関する様々な役割が報告されている (Grewal *et al.*, 2017)。本研究において精子との結合に関与する因子の探索にあたり、アネキシンがウシの卵管において精子の卵管上皮への結合に関与することが示されており (Ignotz *et al.*, 2007)、

またウズラの卵管においても発現していることからアネキシンについて検討を行なった。免疫染色の結果、ANXA6はPVMと卵細胞膜の間に局在していることが分かった。ANXA6は膜貫通ドメインを持たないことから他の因子と結合して、胚盤部分にのみ存在していると考えられる。またどこからどのように輸送されてくるのかについても今後の研究が必要である。

鳥類卵では雌性前核は胚盤部分に形成されるので、精子は胚盤部分に侵入しなければ受精は成立しない。ウズラでは直径20 mm以上になる卵の胚盤部分はわずか直径約2 mmの白い円盤状の構造である。精子は圧倒的に多数の状況とはいえ、確実な受精のためには胚盤へ精子を誘導したり、胚盤部分のPVMへの結合や孔形成を容易にしたりするような仕組みがあるに違いないと考えられてきた。実際ニワトリなど多くの種では胚盤を覆う部分のPVMに集中して精子が孔を形成することが報告されている(Bramwell and Howarth, 1992; Birkhead *et al.*, 1994)。この現象の原因は明確にはなっていないが、PVMの構成成分が異なっていることが関係している可能性もある(Nishio *et al.*, 2014)。しかしながら、ウズラにおいては卵全体に孔が形成されていることが示されており(Rabbani *et al.*, 2006)、胚盤部分でPVMの構成が異なることも確認されていない。今回の研究においても受精卵で精子によってPVMに形成された孔を観察すると確かに胚盤に限らず、その反対側まで全体に孔があった(データ未公開)。これらのことから、ウズラではニワトリなどと違う仕組みが存在していることが考えられる。ANXA6の局在や役割がウズラの受精においてどのような意味を持つのか、卵内への侵入に必須であるのか、それとも胚盤への侵入を他の部分より有利にしているような働きをしているのか、今後のさらなる研究が期待される。

現代ではIVFという技術はヒトを含めて哺乳類において子孫を得るための方法として生殖医療や畜産の現場、また基礎研究などにおいて広く使われている。水島らは鳥類で初めて細胞質内精子注入法(ICSI)によってウズラの雛を得ることに成功したが、体

体外授精では成功例がない。前述の通り、鳥類の受精メカニズム研究の大きな障壁となっているのが、*in vitro* で精子-卵結合から受精完了までを観察できるシステムが確立されていないことである。ウズラでの ICSI の成功により卵子活性化や胚発生にいたる様々なことが解明され、遺伝子操作への応用も期待されている (Mizushima *et al.*, 2014)。しかし ICSI は多くの高額な機器や熟練の技術を必要とし、実験手段として簡易に行えるものではない。そこで第 4 章ではウズラの受精メカニズム研究のための今後のツールとして *in vitro* 媒精による体外授精法確立を目指して検討を行なった。

様々な精子濃度での媒精後に発生の進行について観察したところ、いずれにおいても 24 時間培養後の発生ステージは ICSI の場合と比べ大幅に遅延していたものの、受精率や発生の進行度においてこれまでの体外授精の成績を改善することができた。改善の要因として、これまでは体外で排卵させて媒精していたが、今回は自然に排卵された卵を卵管から回収して用いたことが考えられる。これは排卵後に卵を覆う卵白が精子の結合を阻害するため、排卵直後の卵を積極的に得ることが重要視されてきたが、今回の方法のように付着した卵白を PBS でよく洗い流すことで精子の侵入を可能にできることが分かった。排卵後の時間経過による卵の老化などは影響しないことは ICSI に用いた場合に影響しないことやカルシウムシグナル経路に関わるタンパク質の分解が起きていないことなどから確認されている。むしろ、自然排卵された卵の方が胚発生に有利であったことから、卵管内で胚発生を助けるような物質が分泌されている可能性を示唆している。今後はこのような発生を助ける因子の解明と積極的な利用に向けた研究が期待される。

また今回行なった ICSI の結果から、*PLCZ* の cRNA 注入により MPF と CSF の不活性化が進むことが分かった。Mizushima ら (2011) の報告から *PLCZ* は精子侵入直後に起こる *ITPR* を介したカルシウムイオン濃度上昇に必要であることが分かっている。体外授精の結果からも、*ITPR* の分解が十分であれば *CCNB* の分解に至ることが

示された。今回の媒精に用いた精子数 2×10^4 でも CCNB の分解がすべての卵では起きていないことから、精子数が十分ではなく卵活性化に必要な量の PLCZ が卵内へもたらされなかったことから MPF が不活性化されずに減数分裂の再開が起きなかったと考えられる。一方で精子数 2×10^4 で一部の卵で CCNB の分解までされていても、すべての卵で発生の進行が遅れていた。この理由について、RYR の分解が培養 3 時間後の時点でもほとんど起きていないことから、なんらかの関与が考えられる。RYR を介したカルシウムオシレーションは精子由来の CS と ACO2 により誘起されることが分かっているが、このこれらの役割についてはいまだに不明である。

本研究においてはウズラの受精において、これまでに分かっていた配偶子間相互作用に関わる因子を見いだすことができた。しかし、これらの因子が実際の受精において必須なのか、どんな役割を果たしているのかについては、まだこれら解明すべき課題である。ウズラでの ICSI の技術確立により遺伝子操作ができるようになったことで受精研究にも大きな貢献が期待されるが、哺乳類での研究のように遺伝子操作とライブイメージングの両方が必ず必要となってくる。ウズラとニワトリの間では受精メカニズムの違いも見られるが、ICSI と体外授精を応用することによりウズラを鳥類のモデルとして今後の研究が期待される。

謝辞

本研究の遂行および論文の執筆にあたり、静岡大学教授 笹浪知宏先生には終始丁寧なご指導を賜りました。心より感謝いたします。

また実験計画の立案からディスカッションにいたるまで、いつもサポートをしていただきました北海道大学助教 水島秀成先生、広島大学助教 松崎芽衣先生に感謝いたします。また実験に協力していただいた静岡大学 笹浪研究室の皆様にも感謝いたします。

最後に、いつも支えてくれた家族に心から感謝いたします。

引用文献

Baba T, Azuma S, Kashiwabara S and Toyoda Y. (1994). Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 31845-31849.

Batellier F, Couty I, Olszańska B, Stepińska U and Brillard JP. (2003). *In vitro* fertilisation of chicken oocytes after *in vitro* ovulation. *British Poultry Science*, 44: 819–820.

Bausek N, Waclawek M, Schneider WJ and Wohlrab F. (2000). The major chicken egg envelope protein ZP1 is different from ZPB and is synthesized in the liver. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 28866-28872.

Bausek N, Ruckenbauer HH, Pfeifer S, Schneider WJ and Wohlrab F. (2004). Interaction of sperm with purified native chicken ZP1 and ZPC proteins. *Biology of Reproduction*, 71: 684-690.

Bianchi E, Doe B, Goulding D & Wright GJ. (2014) Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature*, 508 483–487.

Birkhead TR, Sheldon BC and Fletcher F. (1994). A comparative study of sperm-egg interactions in birds. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101: 353-361.

Bleil JD and Wassarman PM. (1980). Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 77: 1029-1033.

Bleil JD, Greve JM and Wassarman PM. (1988). Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Developmental Biology*, 128: 376-385.

Bramwell RK & Howarth B. (1992). Preferential attachment of cock spermatozoa to the perivitelline layer directly over the germinal disc of the hen's ovum. *Biology of Reproduction* 47 1113–1117.

Burkart AD, Xiong B, Baibakov B, Jiménez-Movilla M and Dean J. (2012). Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *Journal of Cell Biology*, 197: 37-44.

Cao LR, Jiang JC and Fan HY. (2020). Positive feedback stimulation of *ccnb1* and *mos* mRNA translation by MAPK cascade during mouse oocyte maturation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8: 609430.

Castro A, Peter M, Magnaghi-Jaulin L, Vigneron S, Galas S, Lorca T and Labbé JC. (2001). Cyclin B/*cdc2* induces *c-Mos* stability by direct phosphorylation in *Xenopus* oocytes. *Molecular Biology of the Cell*, 12: 2660–2671.

Deora AB, Kreitzer G, Jacovina AT & Hajjar KA. (2004) An annexin2 phosphorylation switch mediates p11-dependent translocation of annexin2 to the cell surface. *Journal of Biological Chemistry*, 279 43411–43418.

Etches RJ & Schoch JP. (1984). A mathematical representation of the ovulatory cycle of the domestic hen. *British Poultry Science*, 25 65–76.

Eyal-Giladi H and Kochav S. (1976). From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. *Developmental Biology*, 49: 321–337.

Florman HM and Ducibella T. (2006). In *Physiology of Reproduction*, 3edn, Vol 1, pp 55–112. Ed. JD Neill. Elsevier Academic Press. St Louis, MO, USA.

Florman HM and Wassarman PM. (1985). O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell*, 41: 313-324.

Fujihara Y, Herberg S, Blaha A, Panser K, Kobayashi K, Larasati T, Novatchkova M, Theussl HC, Olszanska O, Ikawa M, Pauli A. (2021). The conserved fertility factor SPACA4/Bouncer has divergent modes of action in vertebrate fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 28;118(39): e2108777118.

Ganguly A, Sharma RK and Gupta SK. (2008). Bonnet monkey (*Macaca radiata*) ovaries, like human oocytes, express four zona pellucida glycoproteins. *Molecular Reproduction and Development*, 75: 156-166.

García EV, Oliva ME, LeBlanc JG and Barrera AD. (2018) Epi-nutrients in the oviductal environment: Folate levels and differential gene expression of its receptors and transporters in the bovine oviduct. *Theriogenology*, 119, 189–197.

Gilbert AB, Evans AJ, Perry MM and Davidson MH. (1977). 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.

Grewal T, Hoque M, Conway JRW, Reverter M, Wahba M, Beevi SS, Timpson P, Enrich C, Rentero C. (2017). Annexin A6-A multifunctional scaffold in cell motility. *Cell Adh. Migr.*, 11, 288–304.

Hamazaki TS, Nagahama Y, Iuchi I and Yamagami K. (1989). A glycoprotein from the liver constitutes the inner layer of the egg envelope (zona pellucida interna) of the fish, *Oryzias latipes*. *Developmental Biology*, 133: 101-110.

Han L, Monné M, Okumura H, Schwend T, Cherry AL, Flot D, Matsuda T and Jovine L. (2010). Insights into egg coat assembly and egg-sperm interaction from the X-ray structure of full-length ZP3. *Cell*, 143: 404-415.

Hirose M, Honda A, Fulka H, Tamura-Nakano M, Matoba S, Tomishima T, Mochida K, Hasegawa A, Nagashima K, Inoue K, Ohtsuka M, Baba T, Yanagimachi R, Ogura A. Acrosin is essential for sperm penetration through the zona pellucida in hamsters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2020) Feb 4;117(5):2513-2518.

Howarth B, Jr. (1970). An examination for sperm capacitation in the fowl. *Biology of Reproduction*, 3: 338–341.

Hemmings N and Birkhead TR. (2015). Polyspermy in birds: sperm numbers and embryo survival. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282: 20151682.

Hrabia A, Takagi S, Ono T and Shimada K. (2003). Fertilization and development of quail oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Biology of Reproduction*, 69: 1651–1657.

Ichikawa Y, Matsuzaki M, Hiyama G, Mizushima S and Sasanami T. Sperm-Egg Interaction during Fertilization in Birds. (2016). *Journal of Poultry Science*, 53: 173-180.

Ichikawa Y, Matsuzaki M, Mizushima S and Sasanami T. Egg envelope glycoproteins ZP1 and ZP3 mediate sperm-egg interaction in the Japanese quail. *Journal of Poultry Science*, 54: 80–86. 2017.

Ignotz GG, Lo MC, Perez CL, Gwathmey TM & Suarez SS. (2001) Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. *Biology of Reproduction* 64:1806–1811.

Ignotz GG, Cho MY & Suarez SS. (2007) Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. *Biology of Reproduction* 77: 906–913.

Inoue N, Ikawa M, Isotani A and Okabe M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*, 434: 234–238.

Inoue D, Ohe M, Kanemori Y, Nobui T and Sagata N. (2007). A direct link of the Mos–MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of *Xenopus laevis* eggs. *Nature*, 446: 1100–1104.

Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Chiba K and Hirohashi N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during *in vitro* fertilization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 108: 4892–4896.

Jones KT. (2005). Mammalian egg activation: from Ca²⁺ spiking to cell cycle progression. *Reproduction*, 130: 813–823.

Katagiri C, Yoshizaki N, Kotani M and Kubo H. (1999). Analyses of oviductal pars recta-induced fertilizability of coelomic eggs in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, 210: 269-276.

Kinoshita M, Mizui K, Ishiguro T, Ohtsuki M, Kansaku N, Ogawa H, Tsukada A, Sato T and Sasanami T. (2008). Incorporation of ZP1 into perivitelline membrane after *in vivo* treatment with exogenous ZP1 in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *FEBS Journal*, 275: 3580-3589.

Kinoshita M, Rodler D, Sugiura K, Matsushima K, Kansaku N, Tahara K, Tsukada A, Ono H, Yoshimura T, Yoshizaki N, Tanaka R, Kohsaka T and Sasanami T. (2010.) Zona pellucida protein ZP2 is expressed in the oocyte of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Reproduction*, 139: 359-371.

Kong M, Diaz ES and Morales P. (2009). Participation of the human sperm proteasome in the capacitation process and its regulation by protein kinase A and tyrosine kinase. *Biology of Reproduction*, 80: 1026-1035.

Kubo H, Kawano T, Tsubuki S, Kawashima S, Katagiri C and Suzuki A. (1997). A major glycoprotein of *Xenopus* egg vitelline envelope, gp41 is a frog homolog of mammalian ZP3. *Development, Growth and Differentiation*, 39: 405-417.

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

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Lee VH and Dunbar BS. (1993). Developmental expression of the rabbit 55 kDa zona pellucida protein and messenger RNA in ovarian follicles. *Developmental Biology*, 55: 371-382.

Lee VH, Schwoebel E, Prasad S, Cheung P, Timmons TM, Cook R and Dunbar BS. (1993). Identification and structural characterization of the 75-kDa rabbit zona pellucida protein. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 12412-12417.

Madgwick S, Hansen DV, Levasseur M, Jackson PK and Jones KT. (2006). Mouse Emi2 is required to enter meiosis II by reestablishing cyclin B1 during interkinesis. *Journal of Cell Biology*, 174: 791–801.

Matsudaira P. (1987). Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *Journal of Biological Chemistry* 262 10035–10038.

McRorie RA and Williams WL. (1974). Biochemistry of mammalian fertilization. Annual Review of Biochemistry, 43: 777-803.

Miyado K, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A, Okabe M and Mekada E. (2000). Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. Science, 287: 321–324.

Mizushima S, Takagi S, Ono T, Atsumi Y, Tsukada A, Saito N and Shimada K. (2009). Phospholipase C ζ mRNA expression and its potency during spermatogenesis for activation of quail oocyte as a sperm factor. Molecular Reproduction and Development, 76: 1200–1207.

Mizushima S, Hiyama G, Shiba K, Inaba K, Dohra H, Ono T, Shimada K and Sasanami T. (2014.) The birth of quail chick after intracytoplasmic sperm injection. Development, 141: 3799-3806.

Mizushima S. (2017). Fertilization 2: Polyspermic fertilization. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1001: 105-123.

Mizushima S, Sasanami T, Ono T, Kansaku N and Kuroiwa A. (2022). Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor-1 and -3 and ryanodine receptor-3 may increase ooplasmic Ca²⁺ during quail egg activation. Journal of Poultry Science, 59: 175–181.

Murata K, Sasaki T, Yasumasu S, Iuchi I, Enami J, Yasumasu I and Yamagami K. (1995). Cloning of cDNAs for the precursor protein of a low-molecular-weight subunit of the inner layer of the egg envelope (chorion) of the fish *Oryzias latipes*. Developmental Biology, 167: 9-17.

Nakanishi A, Utsumi K and Iritani A. (1990). Early nuclear events of *in vitro* fertilization in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Molecular Reproduction and Development*, 26: 217–221.

Nishio S, Kohno Y, Iwata Y, Arai M, Okumura H, Oshima K, Nadano D and Matsuda T. (2014). Glycosylated chicken ZP2 accumulates in the egg coat of immature oocytes and remains localized to the germinal disc region of mature eggs. *Biology of Reproduction*, 91: 1-10.

Nishio S and Matsuda T. (2017). Fertilization 1: sperm-egg interaction. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1001 91–103.

Nishizono H. (2021). Biochemistry of oviductal fluid: Crosstalk between maternal oviduct and embryos. *Journal of Japanese Biochemical Society* 93(6): 840-844

Nixon VL, Levasseur M, McDougall A and Jones KT. Ca²⁺ oscillations promote APC/C-dependent cyclin B1 degradation during metaphase arrest and completion of meiosis in fertilizing mouse eggs. (2002). *Current Biology*, 12: 746–750.

Ohto U, Ishida H, Krayukhina E, Uchiyama S, Inoue N and Shimizu T. (2016). Structure of IZUMO1–JUNO reveals sperm–oocyte recognition during mammalian fertilization. *Nature*, 534: 566–569.

Ohtsuki M, Hanafy AM, Mori M and Sasanami T. (2004). Involvement of interaction of ZP1 and ZPC in the formation of quail perivitelline membrane. *Cell and Tissue Research*, 318: 565-570.

Olszańska B, Stepińska U and Perry MM. (2002). Development of embryos from *in vitro* ovulated and fertilized oocytes of the quail (*Coturnix japonica*). The Journal of Experimental Zoology, 292: 580–586.

Ono T, Murakami T, Mochii M, Agata K, Kino K, Otsuka K, Ohta M, Mizutani M, Yoshida M and Eguchi G. (1994). A complete culture system for avian transgenesis, supporting quail embryos from the single-cell stage to hatching. Developmental Biology, 161: 126–130.

Palermo G, Joris H, Devroey P and Van Steirteghem AC. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet, 340: 17–18.

Pan J, Sasanami T, Kono Y, Matsuda T and Mori M. (2001). Effects of testosterone on production of perivitelline membrane glycoprotein ZPC by granulosa cells of Japanese quail (*Coturnix japonica*). Biology of Reproduction, 64: 310-316.

Pasten C, Morales P and Kong M. (2005). Role of the sperm proteasome during fertilization and gamete interaction in the mouse. Molecular Reproduction and Development, 71: 209-219.

Perry ACF, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y and Yanagimachi R. (1999). Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. Science, 284: 1180–1183.

Rabbani MG, Sasanami T, Mori M and Yoshizaki N. (2006). Sperm-egg interaction is mediated by a sperm-associated body in quail. Development Growth and Differentiation, 48: 33-40.

Raynal P, Pollard HB. (1994). Annexins: a novel family of calcium-and membrane-binding proteins in search of a function. *Biochim Biophys Acta* 1197, 63–93

Rescher U & Gerke V. (2004) Annexins – unique membrane binding proteins with diverse functions. *Journal of Cell Science*, 117:2631–2639.

Richardson ME, Korn N, Bodine AB and Thurston RJ. (1992). Research note: kinetic and inhibition studies with turkey acrosin. *Poultry Science*, 71: 1789-1793.

Robertson L, Brown HL, Staines HJ and Wishart GJ. (1997). Characterization and application of an avian *in vitro* spermatozoa-egg interaction assay using the inner perivitelline layer from laid chicken eggs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 110: 205-211.

Robertson L, Wilson YI, Lindsay C and Wishart GJ. (1998). Evaluation of semen from individual male domestic fowl by assessment of sperm: perivitelline interaction *in vitro* and *in vivo*. *British Poultry Science*, 39: 278-281.

Rocha V, Lozano JJ & Haindl AH. (1990) Evidence for differential localization of annexin VI during mammary secretory differentiation. *Biochemical Society Transactions*, 18 1110–1113.

Sacco A, Yurewicz EC, Subramanian MG and Matzat PD. (1989). Porcine zona pellucida: Association of sperm receptor activity with the α -glycoprotein component of the Mr = 55,000 family. *Biology of Reproduction*, 41: 523-532.

Sagata N, Oskarsson M, Copeland T, Brumbaugh J and Woude GFV. (1988). Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Nature*, 335: 519–525.

Sakai N, Sawada H and Yokosawa H. (2003). Extracellular ubiquitin system implicated in fertilization of the ascidian, *Halocynthia roretzi*: isolation and characterization. *Developmental Biology*, 264: 299-307.

Sasanami T, Pan J, Doi Y, Hisada M, Kohsaka T and Toriyama M. (2002). Secretion of egg envelope protein ZPC after C-terminal proteolytic processing in quail granulosa cells. *European Journal of Biochemistry*, 269: 2223-2231.

Sasanami T, Pan J and Mori M. (2003). Expression of perivitelline membrane glycoprotein ZP1 in the liver of Japanese quail (*Coturnix japonica*) after *in vivo* treatment with diethylstilbestrol. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 84: 109-116.

Sasanami T, Murata T, Ohtsuki M, Matsushima K, Hiyama G, Kansaku N and Mori M. (2007). Induction of sperm acrosome reaction by perivitelline membrane glycoprotein ZP1 in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Reproduction*, 133: 41-49.

Sasanami T, Yoshizaki N, Dohra H and Kubo H. (2011). Sperm acrosin is responsible for the sperm binding to the egg envelope during fertilization in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Reproduction*, 142: 267-276.

Sasanami T, Sugiura K, Tokumoto T, Yoshizaki N, Dohra H, Nishio S, Mizushima S, Hiyama G and Matsuda T. (2012). Sperm proteasome degrades egg envelope glycoprotein ZP1 during fertilization of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Reproduction*, 144: 423-431.

Sato T, Kinoshita M, Kansaku N, Tahara T, Tsukada A, Ono H, Yoshimura T and Dohra H and Sasanami T. (2009). Molecular characterization of egg envelope glycoprotein ZPD in the ovary of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Reproduction*, 1370: 333-343.

Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K and Lai FA. (2002). PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development*, 129: 3533–3544.

Sawada H, Sakai N, Abe Y, Tanaka E, Takahashi Y, Fujino J, Kodama E, Takizawa S and Yokosawa H. (2002). Extracellular ubiquitination and proteasome-mediated degradation of the ascidian sperm receptor. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 99: 1223-1228.

Schloer S, Pajonczyk D & Rescher U. (2018). Annexins in translational research: Hidden Treasures to be found. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 1781.

Schmidt A, Duncan PI, Rauh NR, Sauer G, Fry AM, Nigg EA and Mayer TU. (2005). *Xenopus* polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity. *Genes & Development*, 19: 502–513.

Serizawa M, Kinoshita M, Rodler D, Tsukada A, Ono H, Yoshimura T, Kansaku N and Sasanami T. (2011). Oocytic expression of zona pellucida protein ZP4 in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Animal Science Journal*, 82: 227-235.

Shimizu S, Tsuji M and Dean J. (1983). *In vitro* biosynthesis of three sulfated glycoproteins of murine zonae pellucidae by oocytes grown in follicle culture. *Journal of Biological Chemistry*, 258: 5858-5863.

Shoji S, Yoshida N, Amanai M, Ohgishi M, Fukui T, Fujimoto S, Nakano Y, Kajikawa E and Perry ACF. (2006). Mammalian Emi2 mediates cytostatic arrest and transduces the signal for meiotic exit via Cdc20. *The EMBO Journal*, 25: 834–845.

Słowińska M, Olczak M, Liszewska E, Watorek W and Ciereszko A. (2010). Isolation, characterization and cDNA sequencing of acrosin from turkey spermatozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 157: 127-136.

Stricker SA. (1999). Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Developmental Biology*, 211: 157-176.

Swairjo MA, Seaton BA. (1994). Annexin structure and membrane interactions: a molecular perspective. *Annu Rev Biophys Biomolec Struct* 23, 193–213

Tanaka K, Wada T, Koga O, Nishio Y and Hertelendy F. (1994). Chick production by *in vitro* fertilization of the fowl ovum. *Reproduction*, 100: 447–449.

Tatone C, Delle Monache S, Iorio R, Caserta D, Di Cola M and Colonna R. (2002). Possible role for Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase II as an effector of the fertilization Ca²⁺ signal in mouse oocyte activation. *Molecular Human Reproduction*, 8: 750–757.

Tian J, Gong H and Lennarz WJ. (1999). *Xenopus laevis* sperm receptor gp69/64 glycoprotein is a homolog of the mammalian sperm receptor ZP2. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 96: 829-834.

Tung JJ, Hansen DV, Ban KH, Loktev AV, Summers MK, Adler JR III and Jackson PK. (2005). A role for the anaphase-promoting complex inhibitor Emi2/XErp1, a homolog of early mitotic inhibitor1, in cytostatic factor arrest of *Xenopus* eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 4318–4323.

Tunquist BJ and Maller JL. (2003). Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes & Development*, 17: 683–710.

Vo LH and Hedrick JL. (2000). Independent and hetero-oligomericdependent sperm binding to egg envelope glycoprotein ZPC in *Xenopus laevis*. *Biology of Reproduction*, 62: 766-774.

Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. (2001). A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biology*, 3: E59-64.

Wishart GJ. (1997). Quantitative aspects of sperm: egg interaction in chickens and turkeys. *Animal Reproduction Science*, 48: 81-92.

Yamamoto DS, Tachibana K, Sumitani M, Lee JM and Hatakeyama M. (2008). Involvement of Mos–MEK–MAPK pathway in cytostatic factor (CSF) arrest in eggs of the parthenogenetic insect, *Athalia rosae*. *Mechanisms of Development*, 125: 996–1008.

Yokota N and Sawada H. (2007). Sperm proteasomes are responsible for the acrosome reaction and sperm penetration of the vitelline envelope during fertilization of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *Developmental Biology*, 308: 222-231.

Zimmerman SW, Manandhar G, Yi YJ, Gupta SK, Sutovsky M, Odhiambo JF, Powell MD, Miller DJ and Sutovsky P. (2011). Sperm proteasomes degrade sperm receptor on the egg zona pellucida during mammalian fertilization. *PLoS One*, 6: e17256.