



# 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: jpn 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	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/00101279">http://hdl.handle.net/20.500.12099/00101279</a>

氏 名 (本 国 籍)	市川 佳伸 (長野県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博乙第164号
学 位 授 与 年 月 日	令和5年3月13日
学 位 論 文 題 目	ウズラの受精における配偶子間相互作用に関する研究
審 査 委 員 会	主査 静岡大学 教授 笹 浪 知 宏 副査 静岡大学 准教授 与 語 圭一郎 副査 岐阜大学 教 授 岩 澤 淳

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

受精は次世代の個体を生み出すための重要な過程であり、雌雄の配偶子間での種特異的な相互作用により正確に成し遂げられている。配偶子間相互作用に関する研究は長年行われてはいるものの、鳥類では遺伝子操作が難しく簡便な体外受精法も技術的に確立されていないなどの課題があり、関連する分子や機構のごく一部しか明らかとなっていない。そこで本研究ではウズラの受精における配偶子間相互作用に関与する因子を明らかにし、またウズラにおいて確立されている顕微授精 (ICSI) 法よりも簡便かつ自然に近い状況で配偶子間相互作用を解析するための技術として媒精による体外授精法の効率化を目的とした。

第2章においては卵を覆う卵黄膜内層 (PVM) を単離し射出精子とインキュベートし結合を評価することで精子との結合に関与する因子を調べた。その結果、PVMを構成する5種類の糖タンパク質 (ZP タンパク質) のうち、精製した ZP1 または ZP3 を添加した場合に精子の PVM への結合を阻害した。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。このことから、PVM を構成する要素のうち ZP1 および ZP3 が精子との結合に機能していることが明らかとなった。第3章では精子の卵内への侵入に関与する卵側因子について明らかにすることを目的とし、まず受精卵の免疫組織化学染色を行なった。その結果、胚盤部分においては卵子内に侵入した精子頭部が観察されたが、他の部分では侵入した精子は確認されなかった。また哺乳類の卵管において精子との結合に関与すると報告のあるアネキシンに注目し、卵子から抽出した卵細胞膜画分のウェスタンブロットおよび卵胞の免疫組織化学染色を行った。その結果、アネキシン A6 (ANXA6) が胚盤部分の細胞膜上に局在していることが明らかとなった。さらに ANXA6 を培養細胞に発現させたところ有意に精子結合数が増加した。これらのことから ANXA6 が卵の胚盤部分における精子の侵入に関与している可能性が示された。第4章では体外授精の効率化について検討するため排卵卵に様々な精子濃度での媒精を行い侵入した精子数および発生の進行程度を評価し、さらに卵活性化に関与する因子について解析を行った。その結果  $2 \times 10^4$  個の精子を用いた場合、受精率および 24 時間培養後の発生進行度はこれまでの報告より改善が見られたが、ICSI の場合と比べると発生の進行は大幅に遅れており M 期促進因子の分解も十分ではなかったことが明らかとなった。これらのことから体外授精を行う場合、2

×10<sup>4</sup>個より多くの精子が必要であるということが示された。

本研究では精子との相互作用に関わる卵側因子として、PVMの要素である ZP1 および ZP3、卵細胞膜上の ANXA6 が明らかとなったが、これらと結合する精子側因子の解明が今後の課題である。また体外授精の実用化についてはまだ多くの検討が必要である。鳥類の受精メカニズム解明だけでなく家禽産業や生物多様性保護の進展のため、基礎研究および技術開発をさらに続けていく必要がある。

## 審査結果の要旨

本学位論文は、鳥類の精子-卵子間の相互作用およびその後の細胞内シグナル伝達に焦点を当て、精子と卵黄膜との結合およびその後の相互作用の仕組み、受精成立させるために必要なシグナル伝達について調査を行ったものである。

第2章では、精子と卵子の外側を覆う卵黄膜内層との結合に関与する卵黄膜内層の成分が ZP1 と ZP3 であることを明らかにした。精子と卵黄膜内層との結合を ZP1 および ZP3 に対する特異的抗体が阻害すること、卵黄膜内層の可溶化物から精製した ZP1 と ZP3 が精子と特異的に結合することなどの結果から、受精の最初の段階で機能する分子を同定した点は高く評価できる。

第3章では、鳥類の受精に関する長年の謎であった胚盤への精子の侵入機構に関する調査を進めた。鳥類の卵子は巨大であるが、精子は胚盤と呼ばれるわずか数ミリの領域に侵入する必要があり、その分子メカニズムは長年の謎であった。胚盤を覆う胞膜上には、ANXA5 が局在しており、ANXA5 が重要な分子であることを組換えタンパクを発現させた培養細胞を用いて証明した。また、本タンパク質は精子が卵内に侵入する前段階で精子を卵子表面に繋ぎ止める役割を果たしていることを提案し、ANXA タンパクファミリーの新しい機能を発見したとして学術的に価値ある研究であると評価できる。

第4章では、鳥類では難しいとされてきた体外受精方法(IVF)の確立を目指した。IVFによって、受精を成功させることはできたが、その後の発生が遅延することが判明した。鳥類では、一個の卵に複数の精子が侵入する多精子受精を行うが、IVF では、卵内に侵入する精子数が少なく、卵子活性化が不十分であることを生化学的方法で証明した。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

### 基礎となる学術論文

1) 題目 : Egg Envelope Glycoproteins ZP1 and ZP3 Mediate Sperm-Egg Interaction in the Japanese Quail

著者名 : Yoshinobu Ichikawa, Mei Matsuzaki, Shusei Mizushima, Tomohiro Sasanami

雑誌名 : The Journal of Poultry Science

巻・頁・発行年 : 54, 80-86, 2017

- 2) 題目 : Possible involvement of annexin A6 in preferential sperm penetration in the germinal disk region  
著者名 : Yoshinobu Ichikawa, Mei Matsuzaki, Shusei Mizushima, Tomohiro Sasanami  
雑誌名 : Reproduction and Fertility  
巻・頁・発行年 : 3, 152-161, 2022
- 3) 題目 : Egg development after *in vitro* insemination in Japanese quail (*Coturnix japonica*)  
著者名 : Yoshinobu Ichikawa, Shusei Mizushima, Noritaka Hirohashi, Tomohiro Sasanami  
雑誌名 : The Journal of Poultry Science  
巻・頁・発行年 : 受理・印刷中

#### 既発表学術論文

- 1) 題目 : Lactic acid is a sperm motility inactivation factor in the sperm storage tubules  
著者名 : Mei Matsuzaki, Shusei Mizushima, Gen Hiyama, Noritaka Hirohashi, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba, Tomohiro Suzuki, Hideo Dohra, Toshiyuki Ohnishi, Yoshikatsu Sato, Tetsuya Kohsaka, Yoshinobu Ichikawa, Yusuke Atsumi, Takashi Yoshimura, and Tomohiro Sasanami  
雑誌名 : Scientific Reports  
巻・頁・発行年 : 5, 17643, 2015
- 2) 題目 : Expression of Prolactin Receptor on the Surface of Quail Spermatozoa  
著者名 : Gen Hiyama, Shusei Mizushima, Mei Matsuzaki, Yoshinobu Ichikawa, Norio Kansaku, Tomohiro Sasanami  
雑誌名 : The Journal of Poultry Science  
巻・頁・発行年 : 53, 157-164, 2016
- 3) 題目 : Effects of a Protein Kinase Inhibitor on Sperm Motility in the Japanese Quail  
著者名 : Mei Matsuzaki, Shusei Mizushima, Yoshinobu Ichikawa, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba, Tomohiro Sasanami  
雑誌名 : The Journal of Poultry Science  
巻・頁・発行年 : 54, 73-79, 2017