

氏名(本国籍)	MD. SHAROARE HOSSAIN (バングラデシュ人民共和国)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第494号
学位授与年月日	平成20年9月10日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	信州大学
学位論文題目	Effect of Fatty Acids on Acrosome Reaction of Boar Spermatozoa (ブタ精子の先体反応における脂肪酸の影響)
審査委員会	主査 信州大学 教授 辻井 弘 忠 副査 信州大学 教授 濱野 光 市 副査 静岡大学 教授 高坂 哲 也 副査 岐阜大学 教授 土井 守

### 論文の内容の要旨

精子と卵子が受精する過程で、精子の表面に付着した受精能抑制因子が除去され、精子は受精能を獲得する。受精能獲得した精子の頭帽(先体)が胞状化し、先体の内容物(種々の酵素)が放出される現象を精子の先体反応という。牛血清アルブミン(BSA)は、この先体反応および精子の運動性・生存性を促進する作用があることが知られている。本実験は、この脂肪酸に着目して脂肪酸が精子の先体反応に関与しているかを検討した。

ウシ血清アルブミン-V (BSA-V)、脂肪酸フリーBSA (BSA-FAF)およびポリビニルアルコール(PVA)を比較した結果、BSA-Vに結合した脂肪酸は精子運動性・生存性・先体反応を促進し、グルコースの利用も増加させることを見出した。

各脂肪酸がブタ精子の運動性・生存性を促進し、先体反応率を増加させるかどうかを調べた結果、不飽和脂肪酸、特にアラキドン酸とオレイン酸がブタ精子の運動性や先体反応を促進することを見出した。

$^{14}\text{C}$ -オレイン酸及び $^3\text{H}$ -リノール酸を個々に添加(単一標識)もしくは同時添加(二重標識)した時の各脂肪酸の代謝活性を比較した結果、脂肪酸は同時添加の方が単一添加より取込み及び酸化が高かった。また、オレイン酸の方がリノール酸より脂肪酸の取込みおよび酸化が有意に高かった。脂肪酸がブタ精子のコレステロールの流出を検討した結果、アラキドン酸、リノール酸およびオレイン酸は、精子内のコレステロール流出を促進した。

脂肪酸によるブタ精子の先体反応誘起のメカニズムをPKAとPKCの2つの経路のインヒビターを用いて調べた。その結果、アラキドン酸によって誘導された先体反応はPKAおよ

び PKC インヒビターの単一または複合添加のいずれにおいても阻害がみられた。

これらの結果から、不飽和脂肪酸のアラキドン酸、リノール酸およびオレイン酸がブタ精子の膜変化および精子中のコレステロールの流出や PKA および PKC を介し、タンパク質がリン酸化され、先体反応を誘起することを明らかにした。

現在 BSA を主体とする培養液が大半を占めている。しかし BSA は、製造番号による違いや、BSE(牛海綿状脳症)問題などからも既知培養液への転換が求められている。本研究の結果は、BSA の脂肪酸を不飽和脂肪酸のアラキドン酸、リノール酸およびオレイン酸に転換出来る可能性を見出した。このことから、種々の培養液を既知培養液に置き換えられる可能性を見出した。

## 審 査 結 果 の 要 旨

精子と卵子が受精する過程で、精子の表面に付着した受精能抑制因子が除去され、精子は受精能を獲得する。受精能獲得した精子の頭帽(先体)が胞状化し、先体の内容物(種々の酵素)が放出される現象を精子の先体反応という。牛血清アルブミン(BSA)は、この先体反応および精子の運動性・生存性を促進する作用があることが知られている。精子培養液の BSA 添加量は 4 mg/ml 以上で、60  $\mu$ g/ml 以上の脂肪酸を含んでいる。本実験は、この脂肪酸に着目して脂肪酸が精子の先体反応に関与しているかを 4 つの実験で検討した。

1. ウシ血清アルブミン-V に結合した脂肪酸がブタ精子の先体反応に及ぼす影響  
BSA フラクション V (BSA-V)、脂肪酸フリーBSA (BSA-FAF) およびポリビニルアルコール(PVA)がブタ精子の運動性・生存性・先体反応・グルコースの利用に及ぼす影響を比較検討した。その結果、BSA-V に結合した脂肪酸は精子運動性・生存性・先体反応を促進した。このことから BSA-V に結合した脂肪酸はブタ精子の先体反応を誘導するだけでなく、運動性およびグルコースの利用も増加させることを見出した。

2. 脂肪酸がブタ精子の運動性・生存性・先体反応に及ぼす影響

各脂肪酸がブタ精子の運動性・生存性を促進し、先体反応率を増加させるかどうかを調べた。その結果、不飽和脂肪酸、特にアラキドン酸とオレイン酸がブタ精子の運動性や先体反応を促進することを見出した。

3. 脂肪酸がブタ精子のコレステロール流出に及ぼす影響

$^{14}\text{C}$ -オレイン酸及び  $^3\text{H}$ -リノール酸を個々に添加(単一標識)もしくは同時添加(二重標識)した時の各脂肪酸の代謝活性を比較した。その結果、脂肪酸は同時添加の方が単一添加より取込み及び酸化が高かった。また、オレイン酸の方がリノール酸より脂肪酸の取込みおよび酸化が有意に高かった。脂肪酸がブタ精子のコレステロールの流出とタンパク質のチロシンリン酸化に及ぼす影響を検討した結果、アラキドン酸、リノール酸およびオレイン酸は、精子内のコレステロール流出を促進した。

4. 脂肪酸によるブタ精子の先体反応誘起のメカニズム

脂肪酸によるブタ精子の先体反応誘起のメカニズムを PKA と PKC の 2 つの経路のインヒビターを用いて調べた。その結果、アラキドン酸によって誘導された先体反応は PKA および PKC インヒビターの単一または複合添加のいずれにおいても阻害がみられた。

これらの結果から、不飽和脂肪酸のアラキドン酸、リノール酸およびオレイン酸がブタ精子の膜変化および精子中のコレステロールの流出やPKAおよびPKCを介し、タンパク質がリン酸化され、先体反応を誘起することを明らかにした。

以上の結果から、BSA 結合脂肪酸、特に不飽和脂肪酸のアラキドン酸、リノール酸およびオレイン酸、特にアラキドン酸がブタ精子の運動性・生存性・先体反応を促進することが判明した。

現在一般的に使われている体外受精の培養液のほとんどが BSA を含む培養液である。BSA は狂牛病問題などのため代替が急務とされている。以上の研究結果は、BSA を含まない既知培養液の開発などに発展するものと期待される。また、脂肪酸がブタ精子の先体反応を促進することを明らかにしたことは新しい知見である。よっ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

Hossain MS, Hyeong LJ, Miah AG and Tsujii H. Effect of fatty acids bound to bovine serum albumin-V on acrosome reaction and utilization of glucose in boar spermatozoa. *Reproductive Medicine and Biology* 2007; 6: 109-115.

Hossain MS, Tareq KMA, Hamano K and Tsujii H. Effect of the fatty acids on boar sperm motility, viability and acrosome reaction. *Reproductive Medicine and Biology* 2007; 6: 235-239.