



# 岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

## ウズラの輸卵管における精子貯蔵に関する生理学的研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2018-08-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松崎, 芽衣 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/56214">http://hdl.handle.net/20.500.12099/56214</a>

ウズラの輸卵管における  
精子貯蔵に関する生理学的研究

2016年

岐阜大学大学院連合農学研究科  
生物生産科学  
(静岡大学)

松崎 芽衣

ウズラの輸卵管における  
精子貯蔵に関する生理学的研究

松崎 芽衣

## 目次

略語表	1
第一章 序論	3
第二章 精子貯蔵管由来精子運動抑制因子の同定および精子貯蔵管における 乳酸産生機構	
第一節 緒論	9
第二節 材料及び方法	10
(1) 実験動物	
(2) 試薬	
(3) UVJ 抽出物の調整	
(4) 精子の採取および運動アッセイ	
(5) ゲル濾過クロマトグラフィー	
(6) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)	
(7) 分取クロマトグラフィー (PLC) および薄層クロマトグラフィー (TLC)	
(8) NMR	
(9) SST の乳酸定量	
(10) SST の単離	
(11) SST の乳酸産生能測定	
(12) RT-PCR	
(13) <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	
(14) RNA-Seq 用 cDNA ライブラリの構築	
(15) RNA-Seq、 <i>de novo</i> アセンブリおよびディファレンシャル解析	
(16) 組織低酸素の検出	
(17) ミトコンドリア活性測定	
(18) 統計解析	
第三節 結果	20
(1) ゲル濾過クロマトグラフィーによる UVJ 抽出物の分離	
(2) HPLC による UVJ 抽出物の分離	
(3) PLC による UVJ 抽出物の分離	

(4) NMR による精子運動抑制因子の構造決定	
(5) SST における乳酸の定量	
(6) 単離した SST の乳酸産生能	
(7) SST における MCT 遺伝子の発現および局在	
(8) RNA-Seq を用いた SST 上皮と UVJ 粘膜上皮の遺伝子発現差解析	
(9) UVJ における酸素供給	
(10) SST 上皮細胞のミトコンドリア活性	
第四節 考察	25
第五節 小括	28
第三章 乳酸による精子の運動抑制機構	
第一節 緒論	29
第二節 材料及び方法	31
(1) 実験動物	
(2) 試薬	
(3) 精子の採取および運動アッセイ	
(4) 精子の細胞外 pH および細胞内 pH	
(5) SST 貯蔵精子の細胞内 pH 測定	
(6) 精子ダイニンの ATPase 活性測定	
(7) ATP 定量	
(8) 統計解析	
第三節 結果	35
(1) 乳酸が精子の運動に及ぼす影響	
(2) 有機酸の添加による細胞外 pH の酸性化が精子の運動に及ぼす影響	
(3) SST 貯蔵精子の細胞内 pH	
(4) ウズラ精子ダイニンの ATPase 活性	
(5) オリゴマイシンおよびバナジン酸イオンが精子ダイニン ATPase 活性に及ぼす影響	
(6) 乳酸の添加が精子の ATP 量に及ぼす影響	
第四節 考察	37
第五節 小括	40

第四章	ウズラ精子の運動を制御する細胞内シグナル伝達経路	
第一節	緒論	41
第二節	材料及び方法	43
(1)	実験動物	
(2)	試薬および抗体	
(3)	精子の採取および運動アッセイ	
(4)	精子の細胞内 pH 測定	
(5)	精子の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度測定	
(6)	精子のミトコンドリア活性測定	
(7)	cAMP 定量	
(8)	ATP 定量	
(9)	精子ダイニンの抽出およびダイニン ATPase 活性測定	
(10)	精子可溶化物の調製	
(11)	タンパク定量	
(12)	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)	
(13)	ウェスタンブロッティング	
(14)	統計解析	
第三節	結果	51
(1)	BisII および BisV が精子の運動に与える影響	
(2)	BisII が精子の細胞生理に与える影響	
(3)	PKC による精子タンパクのリン酸化	
(4)	精子に存在する PKC アイソフォームの同定	
第四節	考察	53
第五節	小括	57
第五章	総括	58
	謝辞	64
	引用文献	65

## 略語表

AM:	acetoxymethyl
ATP:	adenosine 5'-triphosphate
ATPase:	adenosine triphosphatase
BCA:	bicinchoninic acid
BCECF:	2', 7'-bis (carboxyethyl)-4 or 5- carboxyfluorescein
BPB:	bromophenol blue
BW:	body weight
CoA:	coenzyme A
DAPI:	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA:	deoxyribonucleic acid
DNase I:	deoxyribonuclease I
DTT:	dithiothreitol
EIA:	enzyme immunoassay
FI:	fluorescent intensity
HEPES:	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMBC:	hetero-nuclear multiple-bond coherence
HMQC:	hetero-nuclear multiple-quantum coherence
HRP:	horseradish peroxidase
IC <sub>50</sub> :	half maximal inhibitory concentration
IgG:	immunoglobulin G
MCT:	monocarboxylate transporter
NADH:	reduced nicotinamide adenine dinucleotide

NMR: nuclear magnetic resonance

OCT: optimal cutting temperature

PCR: polymerase chain reaction

PVDF: polyvinylidene difluoride

QV: quality value

RNA-Seq: RNA sequencing

RNA: ribonucleic acid

RT-PCR: reverse transcription PCR

SDS: sodium dodecyl sulfate

TCA: tricarboxylic acid

Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane

cAMP: cyclic adenosine 3',5'-monophosphate

cDNA: complementary DNA

dATP: deoxyadenosine triphosphate

mRNA: messenger RNA

rRNA: ribosomal RNA



## 第一章 序論

動物の受精において、精子と卵の邂逅を時間空間的に制御することを目的として多様な生殖戦略が進化してきた。ウニやホヤのような体外受精動物では、放卵、放精のタイミングは一致するのが一般的で、精子は卵由来の化学走化性物質の濃度勾配を感知し、卵に対する走化性運動を行うことが知られている。同時に放出される配偶子と精子の走化性は体外受精動物の受精をより成功させやすくすることに一役買っている (Nishigaki *et al.*, 2004; Shiba *et al.*, 2008)。哺乳類を含む体内受精動物においても、精子と卵を同時に受精の場に到着させることが受精を成功させやすくする。このために、オスは排卵に先立ち、あるいは排卵中に交尾を行い、メスの卵管に精子を輸送する。ウサギやネコのような一部の種では、交尾自体が排卵を誘発するトリガーとなるが (Dal Bosco *et al.*, 2011; Brown, 2011)、多くの哺乳類では、交尾は排卵のタイミングに影響を与えない。これらの種においては、メスは卵が受精可能な状態になるまでの間、卵管に精子を貯蔵することができる。この現象は一般的に貯精と呼ばれ、昆虫や魚類、両生類、爬虫類、鳥類など、哺乳類以外の動物でも広く見られる現象である (Birkhead, 1993; Birkhead and Møller, 1993; Orr and Zuk, 2012; Suarez, 2008)。したがって、雌性生殖道内での貯精は、体内受精動物においては精子と卵の相互作用が適切な時間と場所で行われることを保証するための一般的な戦略であるといえる (Holt and Lloyd, 2010; Holt, 2011)。

貯精の最も重要な意義は、精子を適切な時間まで貯蔵することにより受精のタイミングを最適化することである。例えば社会性のハチ目 (e.g. アリ科、ミツバチ科、スズメバチ科) では、成熟した処女女王は繁殖期に数匹のオスと交尾を行うが、その後は一度も交尾することなく巣の中で十年以上にもわたり受精卵を産み続ける。このような昆虫の雌性生殖器には受精嚢 (spermatheca) と呼ばれる器官が存在しており、受精嚢に貯められた一生分の精子を少しずつ放出することによって受精を成立させる (den Boer *et al.*,

2009)。すなわち、社会性のハチ目においては、貯精がコロニーの形成に重要な役割を果たしていると考えられる。また、コウモリ目の一部の種は、秋に交尾を行うがすぐには受精せず、冬眠を経て受精することが知られている。交尾後は子宮卵管移行部 (utero-tubal junction) に精子が貯蔵され、種によっては 198 日もの間貯精を維持することができる (Racey, 1979)。*Scotophilus heathi* (英名: Greater Asiatic yellow bat) では、貯精期間中は血中テストステロン濃度が低く排卵前になると濃度が上昇すること、および子宮卵管移行部にアンドロゲン受容体が発現していることが明らかになっており、この種における貯精はテストステロンの支配を受けている可能性が示唆されている (Roy and Krishna, 2010)。貯精期間中はグルコース濃度およびグルコーストランスポーター (GLUT) の発現が低く、カルニチンおよびカルニチントランスポーター OCTN2 の発現が高いが、排卵前になるとグルコース濃度および GLUT 発現が上昇することが報告されており、貯蔵精子にグルコースを供給することにより、受精に先立ち精子の運動を活性化すると考えられている (Roy and Krishna, 2013)。カメ目およびヘビ亜目においては、数年間 (e.g. *Acrochordus javanicus*; 英名 Javan wart snake では 7 年間) にわたり貯精を行うことが知られている (Birkhead and Møller, 1993)。これらの爬虫類では、交尾をしていない年でも前年に貯蔵した精子を使って受精卵を産むことができ、貯精は受精のタイミングを調節するだけでなく、受精を保証する役割も担っていると考えられる。

鳥類では、精子貯蔵管 (sperm-storage tubules; SST) と呼ばれる管状の構造において貯精が行われる (Bobr *et al.*, 1964; Brillard, 1993)。ニワトリやウズラのような家禽では約 25 時間に 1 個の卵子を排卵するが、卵子が受精可能な時間は、卵子が卵管漏斗部に存在している排卵後約 15 分間のみである (Warren and Scott, 1935)。また、卵子が輸卵管を通過する過程で卵管膨大部からは大量の卵白が分泌されるため、卵白が分泌されている間は、精子は輸卵管を通過できないと予想される。したがって、受精を成功させるには、適切な時間に輸卵管を通過し受精の場にたどり着くことが鳥類においては特に重要

であると考えられる。SST は免疫反応 (Das *et al.*, 2006)、膣からの排出 (Bakst, 2011)、卵管分泌物の流れ等、精子にとって有害な環境から精子を防護し、排卵のタイミングに合わせて精子を放出する役割を担っており (Ito *et al.*, 2011)、貯精は、鳥類の受精においては必須の過程である。家禽においては、SST において貯蔵された精子のみが受精できると考えられている。

鳥類の SST は、ニワトリ卵管の漏斗部 (van Drimmelen, 1949) および子宮膣移行部 (utero-vaginal junction; UVJ) に局在する (Bohr *et al.*, 1964)。発見後まもなくは sperm-nests (e.g. van Drimmelen, 1949) や sperm-host glands (e.g. Gilbert *et al.*, 1968)、sperm-storage glands (e.g. Burke *et al.*, 1972) と呼ばれていたが、近年では、sperm-storage tubules という呼称にほぼ統一されている。SST はかつて sperm-host glands や sperm-storage glands と呼ばれていた通り、哺乳類の子宮腺に似た単一管状腺様の構造を持つ。SST は微絨毛を有する単層の上皮で形成されており、SST の内径は約 10~20  $\mu\text{m}$ 、管長は約 400~600  $\mu\text{m}$  で、分枝または不分枝の管である (Bohr *et al.*, 1964)。一度の交尾で侵入した精子が貯蔵される期間は種によって異なっている。シチメンチョウ (*Meleagris gallopavo*) では、8~15 週間、ニワトリ (*Gallus gallus*) では 3~4 週間、ウズラ (*Coturnix japonica*) で 11~12 日、アヒル (*Anas platyrhynchos*) では 10~15 日程度とされている (Bréque *et al.*, 2003)。卵管あたりに存在する SST の数も種によって異なり、シチメンチョウで約 20,000 個、ニワトリで約 15,000 個、ウズラで約 3,500 個とされ (Birkhead and Møller, 1992)、この数が多い程、貯精期間も長いとされている。SST へ侵入した精子は頭部を盲端部側に整列し、束状になって貯蔵される (Bakst, 1992, Ito *et al.*, 2011)。SST 上皮細胞内には脂肪滴およびグリコーゲン顆粒が観察され、その近傍にはミトコンドリアやゴルジ体が存在しており、活発に代謝を行っていることが示唆されている (Burke *et al.*, 1972)。また、SST 上皮の開口部側では分泌顆粒、盲端部側ではアポクリン突起が観察され、アポクリン分泌により、グリコーゲン顆粒や脂肪滴を含む小

胞が管腔内へ分泌されていると考えられている (Schuppin *et al.*, 1984; Bakst and Bauchan, 2015)。このように、光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いた観察結果は 50 年以上前から報告されている。

射精後の精子は SST に侵入し、長期間体温付近で受精能を維持したまま貯蔵され、排卵前に SST から放出される (Sasanami *et al.*, 2013)。すなわち、鳥類における貯精は、SST への侵入、SST 内での貯蔵、SST からの放出という 3 つの段階から成り立っていると考えられる。SST への精子侵入を制御する直接的な要因は明らかになっていないが、ウズラにおいては、総排泄口腺の分泌物に含まれるプロスタグランジン F<sub>2α</sub> が SST の開口部を拡張することにより精子の侵入を促していることが報告されている (Sasanami *et al.*, 2015)。また、SST からの精子放出については、Ito *et al.* (2011) によってメカニズムの一端が報告されている。鳥類では約 25 時間周期で排卵が起こり、それに伴って血中プロゲステロン濃度が上昇する。SST 上皮細胞には membrane progesterone receptor  $\alpha$  (mPR $\alpha$ ) が発現しており、プロゲステロンの刺激により SST が収縮することにより物理的に貯蔵精子を排出することが報告されている (Ito *et al.*, 2011)。また、プロゲステロンの投与により、UVJ の上皮細胞からクチクラが放出されることも観察されており (Ito *et al.*, 2011)、クチクラは子宮部に存在する卵殻の付いた卵の回転を促す潤滑油のような役割を果たし、卵と子宮部の内壁との間を精子が通過するのを補助していると考えられる。プロゲステロンが SST からの“精子放出因子”として働くことは、排卵と精子放出、および精子の通過を補助するクチクラ分泌のタイミングを同調させるという点で理に適っており、高等動物の生殖戦略としては非常に興味深い。しかしながら、解明されていない点も残されている。例えば、プロゲステロンに反応する SST は全体の一部であり、貯精期間を通じて少しずつ精子が放出されることが観察されているが (Ito *et al.*, 2011)、そのメカニズムは明らかとなっていない。加えて、なぜ SST に貯蔵された精子は長期間受精能を維持できるのかという問いには、未だ答えが出ていない。

精子はタンパク合成を行わないにもかかわらず、SST 内でどのようにして生存し、受精能を維持しているかは、長年にわたり研究者の興味の対象であり続けている。精子貯蔵管に神経投射が観察され (Freedman *et al.*, 2001)、また、アビジン (Foye-Jackson *et al.*, 2011)、アクアポリン (Zaniboni and Bakst, 2004) 等が局在しており、貯精への影響を考察する報告はあるが、貯精との直接的な関連性は証明されていないのが現状である。また、ニワトリにおいて、精子が侵入した SST では形質転換成長因子 $\beta$  (TGF $\beta$ ) の発現が上昇することが報告されている (Das *et al.*, 2006)。卵管は、解剖学的には体外に相当するため、卵管内に侵入した細菌などの異物を排除するための免疫が発達しており、卵管内に侵入した精子も異物として免疫細胞に攻撃されてしまう。TGF $\beta$ 1は T 細胞や B 細胞の増殖を抑制することが鳥類で知られており (Quere and Thorbeck, 1990)、SST に貯蔵された精子に対する免疫反応を抑える働きをされると考えられている。マウスの受精においても、Kawano *et al.* (2014) によって、同様の仕組みが発見された。すなわち、膈内に射精された精子は子宮内の補体に攻撃されるが、精漿に含まれる seminal vesicle protein 2 (SVS2) により精子表面を保護され、この補体から攻撃を回避する仕組みが見出されている。実際に、SVS2 のノックアウトマウスは受精の場である卵管膨大部に到達出来ないため雄性不妊となるが、顕微受精では産仔が得られる。しかし、これらの雌性生殖道の攻撃から精子を保護するメカニズムは、積極的に精子の受精能を長期間維持する仕組みとは考え難い。

SST に貯蔵されている精子は運動を停止しているとされており (Bakst, 1987)、精子は運動を停止して代謝を抑制することにより、活性酸素による細胞膜の傷害を減少させて長期間の貯蔵に耐えているのではないかと考えられている (Bréque *et al.*, 2003)。特に興味深いのは、鳥類の精子は、輸卵管の中で静止状態から運動状態への切り替えを 2 回 (射精後および SST からの放出後) 行うことである。これらの運動の停止・開始を制御する分子スイッチの作動機序は、特に体内受精を行う動物ではほとんど明らかにな

っていない。アカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) において精子の運動を誘起する SMIS (sperm motility-initiating substance) が同定されており (Watanabe *et al.*, 2010)、これが体内受精動物において初めて報告された精子運動開始因子である。アカハライモリでは、オスが精包を放出し、メスが精包を取り込み輸卵管の受精囊に貯蔵する。排卵された卵子により受精囊から押し出された精子は、卵子表面のゼリー層に接触すると運動を開始する。ゼリー層表面の顆粒内には SMIS が局在しており、精子がゼリー層に到達すると先体反応が誘起され、先体内の酵素により顆粒から放出された SMIS が精子の運動を開始させることが示唆されている (Watanabe *et al.*, 2010)。アカハライモリのように、精子が運動を開始する前に先体反応が誘導される例は他に類を見ないもので、一般的な体内受精動物では、精子は運動能を得たのち卵管を遡上し、卵子に接近し先体反応を起こす。

これまでの研究で、UVJ の抽出物を添加した培養液で精子をインキュベートすると、精子の運動が抑制され、精子の運動継続時間が延長することが明らかとなっている (Matsuzaki *et al.*, 2014)。これは、UVJ の抽出物に精子の運動を低下させる未知の生理活性物質が含まれることを示唆するものである。そこで本研究では、SST は精子の運動を不活性化する物質が含まれているという仮説を立て、この物質を同定し、その作用機序を解明することを目的とした。



## 第二章 精子貯蔵管由来精子運動抑制因子の同定および精子貯蔵管における

### 乳酸産生機構

#### 第一節 緒論

鳥類を含む多くの体内受精動物では、交尾と受精のタイミングは必ずしも一致せず、精子と卵を適切な時期と場所に共存させるための調節機構が存在する。この時間調整の役割を担っているのが貯精であり、貯精を行う動物では射精後の精子は卵管内で一定期間貯蔵され、排卵までの間、体温付近でも受精能を保ったまま維持される。貯精の期間は種によって様々で、例えば家禽においては、ウズラで 11 日 (Sittman and Abplanalp, 1965)、ニワトリで 35 日 (Nalbandov and Card, 1943)、シチメンチョウで 117 日 (Christensen and Bagley, 1989) と報告されている。鳥類における貯精の場は、卵管の子宮腔移行部 (utero-vaginal junction; UVJ) および漏斗部に局在する精子貯蔵管 (sperm-storage tubules; SST) である (Bohr *et al.*, 1964)。射精後の精子は SST に侵入したのち運動を停止し、受精能を保ったまま体温付近で長期間維持される (Bakst, 1987)。特筆すべきは、精子は輸卵管の中で静止状態から運動状態への切り替えを 2 回 (射精後および SST からの放出後) 行うことである。ウズラでは、SST から放出された精子は UVJ の粘膜上皮細胞から放出される heat shock protein 70 により運動を再活性化する可能性が示唆されているが (Hiyama *et al.*, 2013)、その他の過程において精子の運動を制御する要因は不明である。

これまでに、SST における精子の運動停止の生理学的役割が考察されているが (Froman, 2003; Froman and Feltmann, 2005; Froman and Feltmann, 2010)、SST 貯蔵精子における運動停止の分子メカニズムについては明らかになっていない。本研究では、SST は精子の運動を不活性化する物質が含まれているという仮説を立て、この物質を同定し、その産生機序を解明することを目的とした。

## 第二節 材料及び方法

### (1) 実験動物

モトキ（所沢市）から購入した7週齢のウズラ (*C. japonica*)を、人工照明により14時間明期-10時間暗期の光周期、室温25°Cの条件下で飼育した。餌は、モトキから購入した成鶏用飼料を不断給餌で与え、水は水道水を不断給水で与えた。産卵時刻を個体別に記録することにより各個体の排卵予定時刻を推定し、実験に用いた。

### (2) 試薬

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS: 137mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4, 282 mOsm/L)、は、全て和光純薬工業（大阪市）から購入した試薬を用いて調製した。ハンクス平衡塩類溶液 (HBSS: 137 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 1.26 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.81 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.56 mM glucose, 0.01% phenol red, pH 7.4, 306 mOsm/L) は、ライフテクノロジーズ（港区）から購入した HBSS 10 倍液（カルシウム、マグネシウム、炭酸水素ナトリウム、フェノールレッド不含）に、前述の濃度になるよう Milli-Q 水で希釈し、CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub> およびフェノールレッドを添加して使用した。

### (3) UVJ 抽出物の調製

連産メスウズラを断頭屠殺により安楽死させたのち、輸卵管を摘出した。輸卵管を子宮部から膣部にかけて切開し、子宮部と膣部との境界に位置する UVJ を採取した。UVJ を生理食塩水 (0.9% NaCl) 中に取り、SST を含まない部位を実体顕微鏡下で除去した。トリミングした UVJ をエッペンドルフチューブに入れ、500 mg 組織/ml になるよう氷冷 PBS を加えた後、解剖バサミで細切し、適宜ボルテックスミキサーで攪拌しながら氷上で2時間抽出した。20,400 × g、4 °C で10分間遠心分離し、上清を UVJ 抽出物と



した。

#### (4) 精子の採取および運動アッセイ

射出精子は、Kuroki and Mori (1997) の方法に従って採取した。採取した精子は 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、濃度が  $2.0 \times 10^7$  sperm/ml になるよう HBSS で希釈してアッセイに用いた。

精子の運動性を評価するために精子運動アッセイを行った。UVJ 抽出物を 10%容量含む HBSS のドロップをプラスチックシャーレ上に作成し、流動パラフィンで封入した。作成したドロップは、アッセイに用いる前に  $39^\circ\text{C}$  で予温した。上述の方法で採取した精子懸濁液をドロップの 20%容量加え（最終精子濃度  $4.0 \times 10^6$  sperm/ml）、ホットプレート上で  $39^\circ\text{C}$  に保ちながら実体顕微鏡（M165FC；ライカマイクロシステムズ、新宿区）下で観察した。精子の運動性は、4（激しい前進運動）、3（活発な前進運動）、2（やや弱い前進運動）、1（微弱な前進運動）、0（運動停止）の五段階で評価した（Wheeler and Andrews, 1943）。コントロール群として 10% PBS を含む HBSS を用い、同様に精子の運動性を評価した。

#### (5) ゲル濾過クロマトグラフィー

ゲル濾過クロマトグラフィーに供する UVJ 抽出物は、ギ酸アンモニウムバッファー（20 mM ギ酸アンモニウム、pH 7.4）を用い上述の方法で調製した。UVJ 抽出物は Superdex 200pg（GE ヘルスケア、日野市）カラム（ $\varnothing 1.6 \times 75$  cm）を用いて分離した。脱気したギ酸アンモニウムバッファー240 ml（2カラム容積分）でカラムを平衡化したのち、UVJ 抽出物 1 ml をカラムにアプライし、さらにギ酸アンモニウムバッファー140 ml を流速 1.0 ml/min で溶出させた。溶出液を 7.5 ml ずつ分取し、各分画について精子運動アッセイによるスクリーニングを行った。すなわち、得られた分画を凍結乾燥した

のち Milli-Q 水に再溶解することで濃縮し、HBSS に 1% 容量添加して運動アッセイによるスクリーニングを行い、24 時間後の運動性が高かった分画を集め合一した。Superdex 200pg のボイド容量 ( $V_0$ ) および分子量を算出するための標準曲線は、Ferritin (440 kDa)、Aldolase (158 kDa)、Conalbumin (75 kDa) および Ovalbumin (43 kDa) の溶出体積により作成した。

#### (6) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

UVJ 抽出物の Superdex 200pg 低分子分画 (溶出体積 100~110ml) を凍結乾燥したのち Milli-Q 水に再溶解することで濃縮し、C-22 カラム (Navi C22-5 ; 4.0 × 150 mm, 和光純薬) を用いた HPLC (島津製作所、京都市) により分離した。移動相 A を 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) を含む 80% アセトニトリル、移動相 B を 0.1% TFA を含む H<sub>2</sub>O とし、A : B = 0 : 100 で 20 分間溶出した後、A : B = 0 : 100 → A : B = 80 : 20 (20 分間) のリニアグラジエントで溶出し、最後に A : B = 100 : 0 で 5 分間溶出した。220 nm における吸光を検出し、レコーダーで記録するとともに、ピークが観察された溶液を分取した。得られた分画は凍結乾燥することにより TFA を除去し、Milli-Q 水に再溶解したのち、HBSS に 1% 容量添加し、運動アッセイによるスクリーニングを行った。

#### (7) 分取クロマトグラフィー (PLC) および薄層クロマトグラフィー (TLC)

PLC は、PLC ガラスプレート シリカゲル 60 F<sub>254</sub> (固定層厚 1 mm ; メルク、目黒区) を用いて行った。キャピラリーを用いてプレートにサンプルをスポットし、酢酸エチル : メタノール : H<sub>2</sub>O = 6 : 4 : 1 の溶媒で展開したのち、プレートをデシケーター中で乾燥させた。サンプルをスポットした位置から 1cm ごとの区画に分け、プレートからシリカゲルを掻き取りガラス試験管に分取した。シリカゲルに展開溶媒を加え、激しく攪拌しながら 30 分間抽出した後、溶媒を濾過し、窒素ガスを吹き付けることにより溶媒を留

去した。結晶またはオイル状の液体を 10  $\mu$ l の Milli-Q に溶解したのち、HBSS に 1% 容量添加し、運動アッセイによるスクリーニングを行った。

PLC により得られた分画に対し、TLC 分析を行った。キャピラリーを用いて TLC アルミシート シリカゲル 60 F<sub>254</sub> (メルク、目黒区) にサンプルをスポットし、酢酸エチル : メタノール : H<sub>2</sub>O = 6 : 4 : 1 の溶媒で展開した。展開後、プレートを風乾し、リンモリブデン酸発色試薬 (5% 12MoO<sub>3</sub> · H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 100% エタノール溶液) にプレートを浸漬したのち、ホットプレート上で加熱することにより発色させスポットを観察した。

#### (8) NMR

<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、および二次元 NMR スペクトル (HMQC および HMBC) は、JEOL GSX-500 核磁気共鳴装置 (500 MHz ; 日本電子、昭島市) を用い、重水 (D<sub>2</sub>O) に溶解した試料を測定した。得られたスペクトルデータを解析したのち、L-乳酸 (シグマアルドリッチ) のスペクトルデータと照合して一致することを確認し、化合物を同定した。

#### (9) SST の乳酸定量

連産メスを断頭屠殺により安楽死させ、輸卵管を摘出し UVJ を採取した。採取した UVJ 粘膜を OCT コンパウンド (サクラファインテックジャパン、中央区) に包埋し、-80°C で凍結したのち、クリオスタットを用いて厚さ 30  $\mu$ m の凍結切片を作成した。レーザーマイクロダイセクション (PALM CombiSystem ; カールツァイス、新宿区) を用いて UVJ 凍結切片から SST または UVJ 上皮細胞を切り出すとともに、レーザーを照射した面積と凍結切片の厚さから、切り出した細胞塊の体積を算出した。回収した細胞塊に 100  $\mu$ l の Milli-Q 水を添加して、ポリトロンホモジナイザーを用いてホモジナイズしたのち、ホモジナイズした溶液を 20,400  $\times$  g、4°C で 10 分間遠心分離し、エバポレータを用いて上清を乾固した。Milli-Q 水を加えて再溶解した後、L-Lactate Assay Kit (Cayman、

ミシガン州) を用い、説明書に従って乳酸定量を行った。すなわち、酵素溶液、補酵素溶液、蛍光基質を含むアッセイバッファーにサンプル溶液を添加し、20 分間室温で反応させた。ドラモンドキャピラリで反応液 4  $\mu\text{l}$  を計りとり、蛍光顕微鏡 (BX51) および Image J (アメリカ国立衛生研究所、メリーランド州) を用いてドラモンドキャピラリ内の反応液が発する蛍光を定量した。レーザーマイクロダイセクションにより切り出した細胞塊の体積から、SST または UVJ 上皮細胞における L-乳酸濃度を算出した。

#### (10) SST の単離

SST の単離は、コラゲナーゼ処理を用いた方法 (King *et al.*, 1999) により行った。連産メスを断頭屠殺により安楽死させ、輸卵管を摘出し UVJ を採取した。実体顕微鏡 (M165FC) 下で SST が存在する部位をトリミングしたのち、SST を含む UVJ 粘膜をチューブに採取した。コラゲナーゼ溶液 (10 mg/ml コラゲナーゼ (和光純薬工業) を含む HBSS) を 1 mg 組織/ $\mu\text{l}$  添加し解剖バサミで細切したのち、コラゲナーゼ溶液をさらに 500  $\mu\text{l}$  加え、攪拌しながら 37°C で 20 分間インキュベートした。コラゲナーゼ処理後、氷冷した反応停止液 (10 mg/ml 牛血清アルブミンを含む  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  不含 HBSS) を 5 ml 添加して酵素反応を停止させた。反応物をシャーレに移し、マイクロピペットを用い実体顕微鏡下で単離された SST を回収するとともに、SST を含まない UVJ 上皮細胞も同様に回収した。

#### (11) SST の乳酸産生能測定

SST の乳酸産生経路を調べるため、解糖系を阻害した場合における SST の乳酸産生能を測定した。すなわち、単離した SST を 1 ml の HBSS (グルコース含量 5.56 mM)、2-DOG 液 (1 mM 2-デオキシグルコースを含むグルコース不含 HBSS) または 2-DOGal 液 (1 mM 2-デオキシガラクトースを含むグルコース不含 HBSS) 中において 39°C で培

養した後、静置して SST を沈澱させ、培養上清を回収した。培養上清を  $20,400 \times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  で 10 分間遠心分離し、上清に含まれる L-乳酸濃度を、L-Lactate Assay Kit (Cayman、ミシガン州) を用いて上述の方法で定量した。

## (12) RT-PCR

RNAiso (タカラバイオ、草津市) を用い、コラゲナーゼ処理により単離した SST から全 RNA を抽出した。混入した DNA を DNase I (タカラバイオ) により分解した後、ReverTra Ase (東洋紡、大阪市) を用いて逆転写反応を行った。cDNA を鋳型とし、*MCT1* (センス:  $5' - \text{GAACCCTGCCTTAACCATGA} - 3'$ 、アンチセンス:  $5' - \text{GGCACA CCCCATTGTAAATC} - 3'$ )、*MCT2* (センス:  $5' - \text{TGTGGCTGGGTCACCTTATGA} - 3'$ 、アンチセンス:  $5' - \text{CTGGCCACAATCACAATCAC} - 3'$ )、*MCT3* ( $5' - \text{CTGGGTA TGGCGTTGAACTT} - 3'$ 、アンチセンス:  $5' - \text{TAAGTAGGACCAGCCCGATG} - 3'$ ) または *MCT4* (センス:  $5' - \text{AGCACCAAGCCAATAGCACT} - 3'$ 、アンチセンス:  $5' - \text{GGGTCTGGCACTCAACTTTC} - 3'$ ) の特異的プライマーを用いて PCR を行った。内部標準として、ウズラ S17 リボソームタンパク遺伝子のプライマー (センス:  $5' - \text{GAC GAAGACGGTGAAGAAGG} - 3'$ 、アンチセンス:  $5' - \text{CTTGGTGTCTGGGTCCACTT} - 3'$ ) を用いて同様に PCR を行った。ネガティブコントロール群として、逆転写酵素を Milli-Q 水に置換して逆転写反応を行った後、*MCT1*、*MCT2*、*MCT3* または *MCT4* の特異的プライマーを用いて同様に PCR を行った群を設けた。PCR 産物を、臭化エチジウムを含む 1%アガロースゲル中で電気泳動し、可視化されたバンドを LAS 500 (GE ヘルスケア) により記録した後、Image J を用いてバンドの定量を行った。

## (13) *in situ* ハイブリダイゼーション

*in situ* ハイブリダイゼーションに用いる UVJ 凍結切片は、Yoshimura *et al.* (2000) の方法により作成した。MCT4 のアンチセンスプローブ (5' - CGCAAAGGAACACTGG GCTCCCAGCAGCAGACAACCCGTTGGCCA -3' , 5' - ATTGCTTCTGCCAGGAGCA CCAAGCCGATAGCACTG -3' , 5' - AAACGCCGTGCGGGTTTTGTGCCGTGCTCAC ACACA -3' , 5' - TGTGACCAGCTGAGGGCAGTGCCTGCGATGTGCCTTTC -3' ) は、ターミナルデオキシリボヌクレオチジルトランスフェラーゼ (サーモフィッシャーサイエンティフィック) により [<sup>33</sup>P] dATP (NEN ライフサイエンスプロダクツ、マサチューセッツ州) 標識したものを使用した。42°C で一晩ハイブリダイゼーションし、室温で 30 分間の洗浄を 2 回行ったのち、55°C で 40 分間反応させた。スライドガラスを洗浄したのち、X 線フィルム (富士フィルム、港区) に感光させ、実体顕微鏡 (M165FC) で観察した。

#### (14) RNA-Seq 用 cDNA ライブラリの構築

RNA-Seq 解析に用いるストランド特異的ライブラリの構築は、SureSelect strand-specific RNA library prep kit (アジレント・テクノロジー、カリフォルニア州) を使い、説明書に従って行った。全 RNA (400 ng) からポリ (A) 配列を含む mRNA を回収および断片化し、アクチノマイシン D (シグマアルドリッチ、目黒区) の存在化で断片化した mRNA を逆転写したのち二本鎖 cDNA を合成した。cDNA の末端修復およびアデニン付加を行ったのち、SureSelect Oligo Adaptor をライゲーションし cDNA にアダプター配列を付加した。インデックスプライマーを含む 3 つのプライマーを用いてアダプター付加 cDNA を PCR により増幅し、RNA-Seq 解析に使用する cDNA ライブラリとした。MiSeq (イルミナ、港区) を用いて SST および UVJ 粘膜上皮由来 cDNA ライブラリのシーケンシング (76 bp、ペアエンド) を行った。

(15) RNA-Seq、*de novo* アセンブリおよびディファレンシャル解析

cutadapt (Martin, 2011) を用い、全リード配列からアダプター配列、低クオリティ (QV < 30) の末端および 76 番目の末端を除去し、50 bp 以下の短いリードを破棄することにより、リードをクリーンアップした。近年、次世代シーケンサーを用いてウズラのドラフトゲノムが解読されている (GenBank 登録番号 : DRA000595) (Kawahara-Miki *et al.*, 2013)。そこで、初めにウズラドラフトゲノムをリファレンスとしてアセンブリを行い、Tophat および Cfflinks を用いてトランスクリプトームデータのディファレンシャル解析を行った (Trapnell *et al.*, 2012)。しかしながら、リファレンスゲノムとして用いたウズラドラフトゲノムでは発現差を検出するためのリードが十分にマッピングできなかった。ウズラにおいては、次世代シーケンサーの技術と比較して、Trinity で生成した高クオリティのトランスクリプトームからアセンブルしたリードが RNA-Seq 解析に適していることが明らかになっている (Finseth and Harrison, 2014)。したがって、Trinity でトランスクリプトームの *de novo* アセンブリを行い、アセンブルした配列をリファレンスとして発現差解析を行った。すなわち、Trinity (version: trinityrnaseq-r20140717) (Grabherr *et al.*, 2011) を用いてクリーンアップしたリードの *de novo* アセンブリを行い、megablast により SILVA rRNA データベース (Quast *et al.*, 2103) と照合し、rRNA 由来の配列を除外した。Trinity のプラグインを用いて rRNA 配列を除去したリードを、Bowtie (Langmead *et al.*, 2009) を用いてマッピングしたのち、RSEM (Li and Dewey, 2011) を用いて転写物の存在比を推定した。SST と UVJ 粘膜上皮の遺伝子発現の差は edgeR パッケージ (Robinson *et al.*, 2010) を用いて決定した。また、解糖系および低酸素に関連する遺伝子セットの SST と UVJ 粘膜上皮における発現差を確認するため、PAGE 解析 (parametric analysis of gene set enrichment) (Kim and Volsky, 2005) を行った。トランスクリプトームの GO (gene ontology) アノテーションは、InterproScan (<http://www.geneontology.org/external2go/interpro2go>) を用いて行った。

#### (16) 組織低酸素の検出

連産ウズラに 180 mg/kg BW の Hypoxiprobe<sup>TM</sup>-1 (化合物名 : pimonidazole HCl、ナチュラル・ファルマシア・インターナショナル、マサチューセッツ州) を静脈注射し、2 時間後に断頭屠殺して UVJ を採取した。コントロール群として、生理食塩水を同量静脈注射した群を設けた。採取した UVJ を OCT コンパウンドに包埋し、-80°C で凍結させた後、クリオスタットを用いて厚さ 10  $\mu$ m の凍結切片を作成した。凍結切片を氷冷アセトンで固定したのち、添付の説明書に従い、抗 pimonidazole 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。1  $\mu$ g/ml の DAPI で核染色した後、蛍光顕微鏡 (BX51、オリンパス、新宿区) を用いて観察した。

#### (17) ミトコンドリア活性測定

SST のミトコンドリア活性測定は、JC-1 (化合物名 : 5,5' ,6,6' -tetrachloro-1,1' ,3,3' -tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide、サーモフィッシャーサイエンティフィック、マサチューセッツ州) を用いて行った。すなわち、連産メスを断頭屠殺したのち UVJ を採取してチューブに取り、50  $\mu$ l の HBSS を加え解剖バサミを用いて細切した。JC-1 を含む HBSS を 500  $\mu$ l 加え (最終濃度 125 nM)、37°C で 20 分間インキュベートして色素をローディングしたのち、800  $\times$  g、室温で 2 分間遠心分離して UVJ 組織片を沈澱させ 1 ml HBSS で洗浄した。コントロール群として、洗浄時にミトコンドリア内膜の脱共役剤である carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP ; シグマアルドリッチ) を 10  $\mu$ M 添加した群を設けた。800  $\times$  g、室温で 2 分間遠心分離したのち、沈澱した UVJ 組織片をスライドガラスにマウントし、蛍光顕微鏡 (BX51) を用いて観察した。画像を顕微鏡用デジタルカメラ (DP70、オリンパス) により記録した後、Image J を用いて



蛍光強度を定量化し、590nm および 530nm における蛍光強度の比（FI 比： $F_{590}/F_{530}$ ）を算出した。FI 比の算出は、SST および UVJ 上皮細胞について行った。

#### (18) 統計解析

実験群間の有意差は、分散分析法および Tukey の多重検定法により判定した。精子の運動アッセイを行った実験については、Mann-Whitney の  $U$  検定法により統計的な有意差を判定した。

### 第三節 結果

#### (1) ゲル濾過クロマトグラフィーによる UVJ 抽出物の分離

UVJ 抽出物から運動抑制因子を分離するため、まずゲル濾過クロマトグラフィーによる分画を行った。UVJ 抽出物を Superdex 200pg カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーに供すると、溶出体積 45 ml (ピーク 1 ; 分子量 1,000 kDa)、70 ml (ピーク 2 および 3 ; 50 kDa)、100-120 ml (ピーク 4 および 5 ; 10 kDa 以下) 付近に主要なピークが検出された (Fig. 2-1)。得られた各分画について精子運動アッセイを行い、24 時間後の精子の運動性を観察したところ、ピーク 4 を含む溶出体積 100-115 ml の分画を添加した精子は、運動が抑制された (データは示していない)。この分画を、HPLC によりさらに分離した。

#### (2) HPLC による UVJ 抽出物の分離

UVJ 抽出物の Superdex 200pg ピーク 4 を、C-22 カラムを用いた HPLC により分離した。溶出体積 0.7 ml から 2.0 ml に素通りのピークが検出されたため、図に示した 11 分画を分取した (Fig. 2-2, A)。これらの分画を凍結乾燥-再融解により濃縮した後、運動アッセイに供すると、分画 2 に精子の運動抑制活性が認められた (Fig. 2-2, B)。C-22 カラムに殆ど保持されない素通り分画には極性が高い物質が含まれると予想されたため、順相系の PLC による分離を試みた。

#### (3) PLC による UVJ 抽出物の分離

C-22 の運動抑制活性分画を PLC に供し、シリカを分取して抽出した後、TLC によって分離を確認した。TLC 分析ではリンモリブデン酸による発色がみられ、分画 7 および 8 において矢印で示した単一のスポットが検出された (Fig. 2-3)。各分画について精子の運動アッセイを行ったところ、分画 7 および 8 に運動抑制活性が認められた (Fig.

2-3)。分画 7 および 8 を合一して凍結乾燥したところ、オイル状の液体となった。この分画に含まれる物質を、NMR スペクトルにより解析した。

#### (4) NMR による精子運動抑制因子の構造決定

分離した精子運動抑制分画について、各種 NMR スペクトルの測定を行った。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルおよび <sup>13</sup>C-NMR スペクトルのケミカルシフト値をスペクトルデータベースで検索したところ、ギ酸、乳酸および D-グルコースのケミカルシフト値がそれぞれ一致した（データは示していない）。すなわち、精子運動抑制分画にはギ酸、乳酸および D-グルコースが含まれていた。

#### (5) SST における乳酸の定量

SST における乳酸の存在量を調べるため、レーザーマイクロダイセクションを用いて切り出した SST 上皮に含まれる乳酸量を測定した。UVJ 凍結切片を顕微鏡下で観察すると SST および UVJ 粘膜上皮が観察されたため（Fig. 2-4, B）、SST の周囲にレーザーを照射し光ピンセットを用いて SST を回収した（Fig. 2-4, C）。同様にして UVJ 粘膜上皮も回収し、これらの抽出物に含まれる乳酸濃度を測定したところ、SST 上皮抽出物の乳酸濃度は約 13 mM であり、UVJ 粘膜上皮抽出物の乳酸濃度（約 3 mM）と比較して有意に高い値を示した（Fig. 2-4, A）。

#### (6) 単離した SST の乳酸産生能

採取した UVJ をコラゲナーゼ処理し実体顕微鏡下で観察したところ、単離された SST が観察された（Fig. 2-5, A）。単離した SST を HBSS に回収し、39°C でインキュベートしながら乳酸濃度を測定すると、培養液中の乳酸量が経時的に増加した（Fig. 2-5, B）。2-DOG 液中で SST をインキュベートし解糖系の酵素を阻害すると、乳酸濃度の上昇は

抑制された (Fig. 2-5, B)。HBSS 中で 1 時間培養した群の乳酸濃度を 100%とすると、2-DOG 液中で培養した群の乳酸濃度は有意に低い値を示した (約 20%)。また、2-デオキシグルコースと類似の構造であり解糖系の酵素を阻害しない 2-デオキシガラクトースを含む 2-DOGal 液中で培養した群の乳酸濃度は 2-DOG 群より有意に高く、HBSS 群との間に有意差はみられなかった (Fig. 2-5, C)。

#### (7) SST における MCT 遺伝子の発現および局在

コラゲナーゼ処理により単離した SST から RNA を抽出し、RT-PCR により MCT1, MCT2, MCT3 および MCT4 遺伝子の発現解析を行ったところ、MCT2 および MCT4 のレーンに両者とも約 900 bp のバンドが観察された (Fig. 2-6)。逆転写を行っていない群 (レーン: -) ではいずれもバンドはみられなかった。

*in situ* ハイブリダイゼーションにより MCT4 mRNA の局在を確認したところ、アンチセンスプローブを用いた群においてシグナルが検出されたが (Fig. 2-7, A)、センスプローブを用いた群ではシグナルは検出されなかった (Fig. 2-7, B)。実体顕微鏡下で X 線フィルムおよびスライドを観察すると、SST 上皮および UVJ 粘膜上皮にシグナルがみられた (Fig. 2-7, C および D)。

#### (8) RNA-Seq を用いた SST 上皮と UVJ 粘膜上皮の遺伝子発現差解析

SST が多量の乳酸を産生するメカニズムを予測するため、RNA-Seq を用いた遺伝子発現の網羅的解析を行った。今回の実験で得られたデータセットは、DDBJ Sequence Read Archive (<http://trace.ddbj.nig.ac.jp/dra/index.html>) に登録した (登録番号: DRA003919)。ヘキソキナーゼやホスホフルクトキナーゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ (PDK)、乳酸脱水素酵素 (LDH) といった解糖系の酵素の発現量は、SST と UVJ 粘膜上皮との間で有意差はみられず、グルコーストランスポーター (GLUT) についても有

意差は検出されなかった (Fig. 2-8)。SST トランスクリプトームのデータセットを用いて KEGG PATHWAY マッピング解析 (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)、および SST と UVJ 粘膜上皮の GO セットを用いた遺伝子発現差解析を行ったが、解糖系の亢進を示す結果は得られなかった (Table 1)。一方、SST において、がん原遺伝子である *c-Fos* および *c-Jun* の発現が UVJ 粘膜上皮と比較して著しく上昇していることがわかった (Fig. 2-8)。

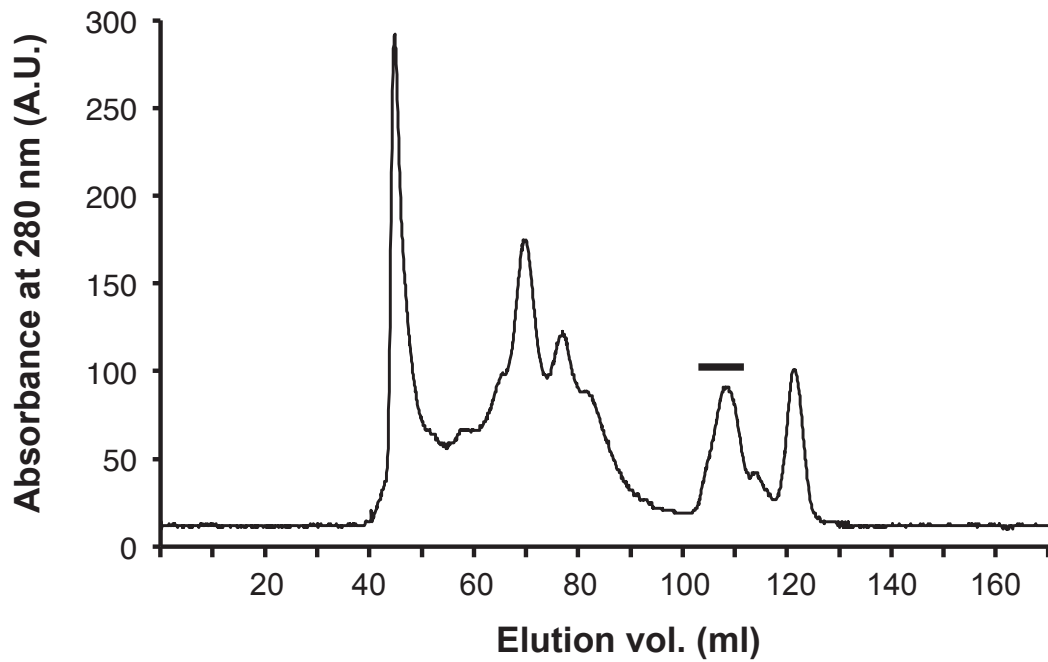
#### (9) UVJ における酸素供給

RNA-Seq 解析により SST が低酸素状態におかれている可能性が示唆されたため、低酸素の組織に蓄積する Hypoxiprobe<sup>TM</sup>-1 を用いて SST の酸素供給を調べた。Hypoxiprobe<sup>TM</sup>-1 を静脈注射した群では、SST 上皮に Hypoxiprobe<sup>TM</sup>-1 のシグナルが観察されたが、UVJ 粘膜上皮においてはシグナルが観察されなかった (Fig. 2-9, A)。また、溶媒のみを注射したコントロール群では、SST 上皮、UVJ 粘膜上皮のいずれもシグナルはみられなかった (Fig. 2-9, B)。すなわち、SST 上皮は低酸素状態におかれていることがわかった。

#### (10) SST 上皮細胞のミトコンドリア活性

SST 上皮のミトコンドリア活性を調べるため、JC-1 を用いて UVJ を染色した。SST 上皮は緑色蛍光が強く、赤色蛍光はほとんどみられなかったが、UVJ 粘膜上皮は赤色蛍光が強く観察された (Fig. 2-10, A)。CCCP を添加すると、SST 上皮、UVJ 粘膜上皮ともに赤色蛍光がほとんどみられなくなった (Fig. 2-10, B)。Image J を用いて 530 nm (緑色) および 590 nm (赤色) における蛍光強度を定量化し、FI 比を算出したところ、SST 上皮の FI 比は UVJ 粘膜上皮と比較して有意に低く、すなわちミトコンドリア活性が低

いことが示された (Fig. 2-10, C)。CCCP を加えたときの SST 上皮および UVJ 粘膜上皮の FI 比は CCCP を添加していない SST 上皮の FI 比と比較して有意差はみられなかった。



**Fig.2-1 Superdex 200pgを用いたゲルろ過クロマトグラフィーによるUVJ抽出物の分離**

UVJ抽出物1 mlを、Superdex 200pgカラム(φ1.6 x 75cm)を用いたゲル濾過により分画した。溶出液を分取し乾固したのち、生理食塩水(pH 7.4)に溶解し、精子運動アッセイに供した。生理活性を有する分画をバーで示した。

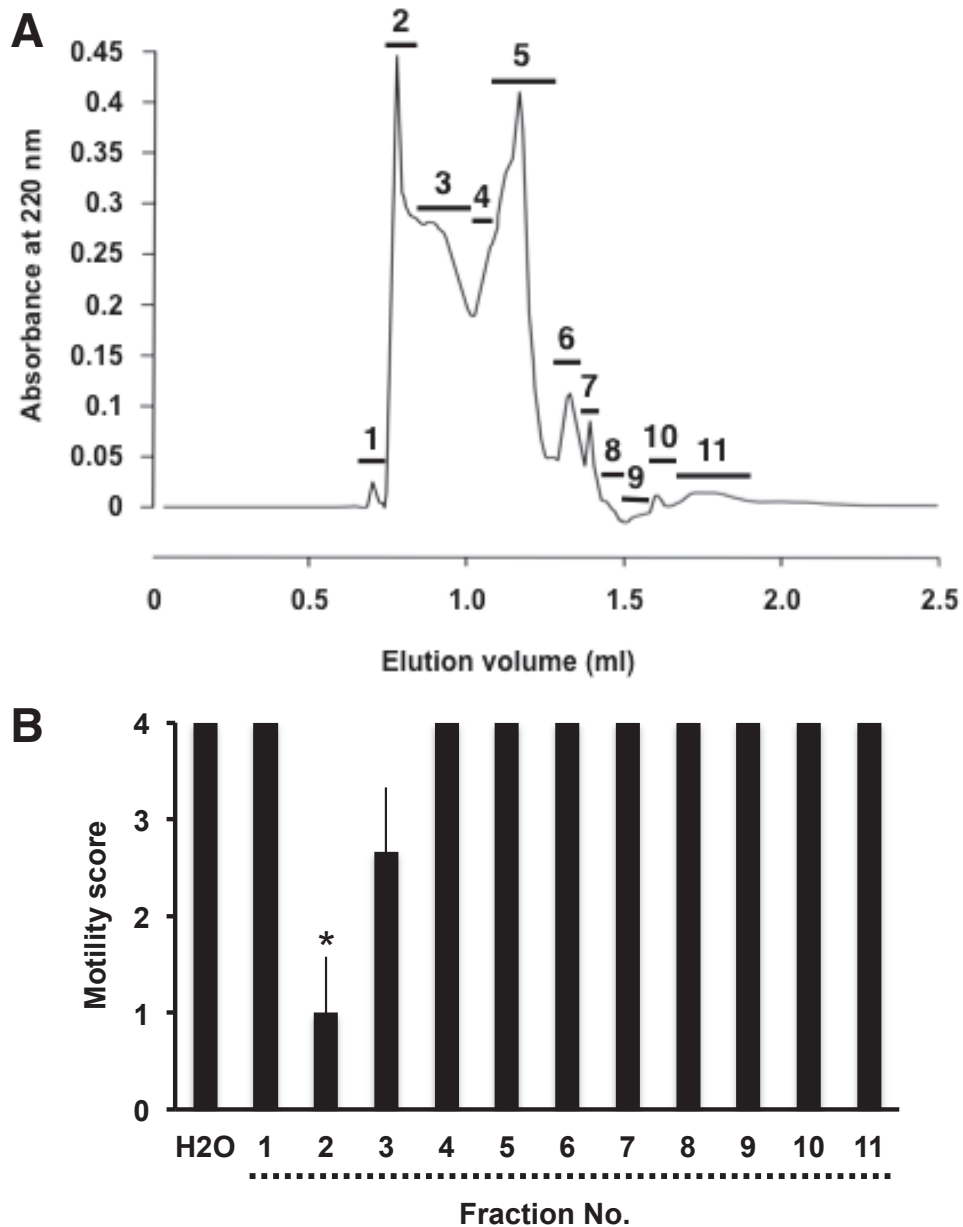
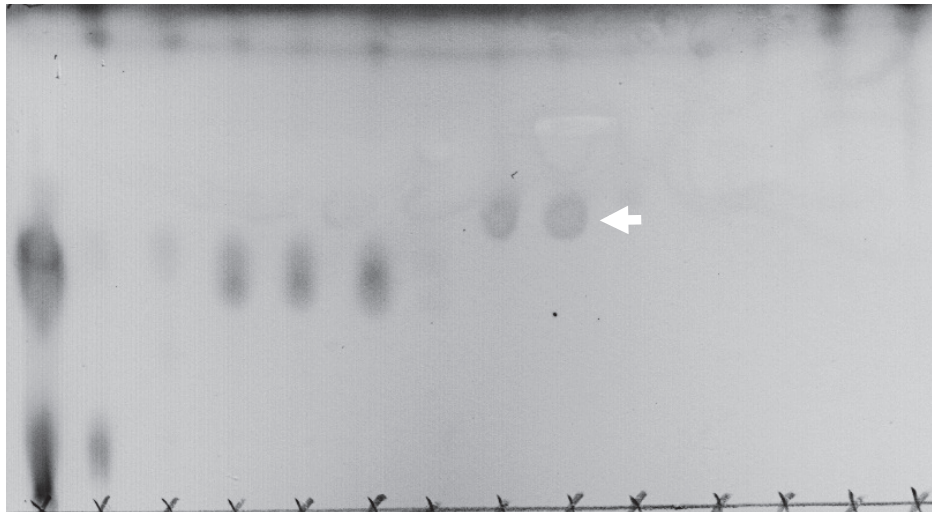


Fig.2-2 C-22逆相カラムを用いたHPLCによるUVJ抽出物の分離

A: 生理活性分画分画をC-22逆相カラムで分離した。分取した分画をバーおよび数字で示した。

B: HPLC分画が精子の運動に与える影響を調べた。各分画を1% (v/v)含むHBSSに射出精子を $4.0 \times 10^6$  sperm/mlとなるよう添加し、精子の運動性を0~4の5段階で評価した。分画2および3に生理活性が認められた。\*: H2O群に対して有意差あり(P < 0.05)。

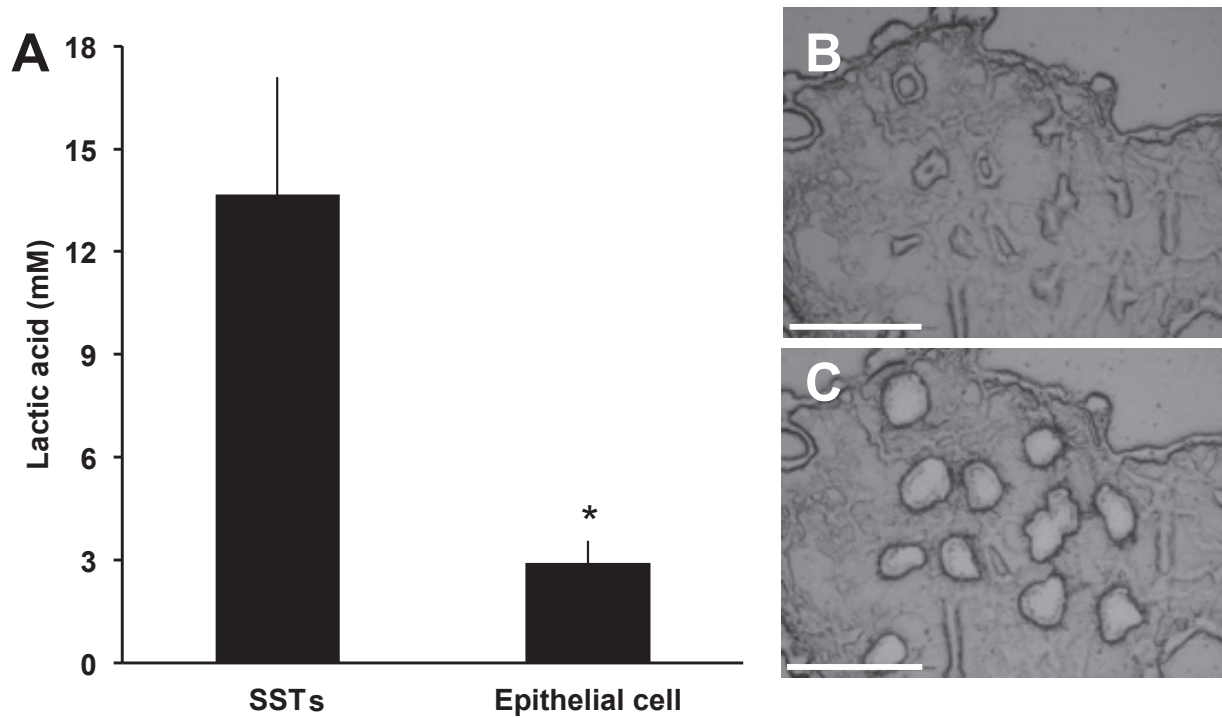




S	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Fr. #
1	4	4	4	4	4	4	1	1	4	4	4	4	4	motility score

**Fig.2-3 PLCによるUVJ抽出物の分離**

生理活性分画のTLC分析を行った。PLCの各分画をTLCに供し、リンモリブデン酸により呈色した。矢印で示した分画に、精子に対する強い運動抑制効果が観察された。HPLCの分画2および3 (Fig2-2, A)を合一し、PLCにより分離した。各分画を添加した時の精子の運動性を下段に示した。矢印は生理活性物質のスポットを示している。S, HPLC分画2および3の混合物。



**Fig.2-4 SSTにおける乳酸の定量**

UVJの凍結切片を作成し、レーザーマイクロダイセクションを用いてSST上皮またはUVJ上皮（非SST上皮）を切り出してL-乳酸を定量した。**A**: SST上皮および非SST上皮の抽出物に含まれるL-乳酸を定量した。実験を4回行い、平均値 ± SEMで示した。SST上皮の乳酸量は非SST上皮の乳酸量と比較して有意に高かった ( $P < 0.05$ )。 **B**, **C**: レーザーマイクロダイセクションによりSSTを切り出す前 (**B**) と後 (**C**) のUVJ上皮凍結切片を示した (Bar = 150  $\mu\text{m}$ )。

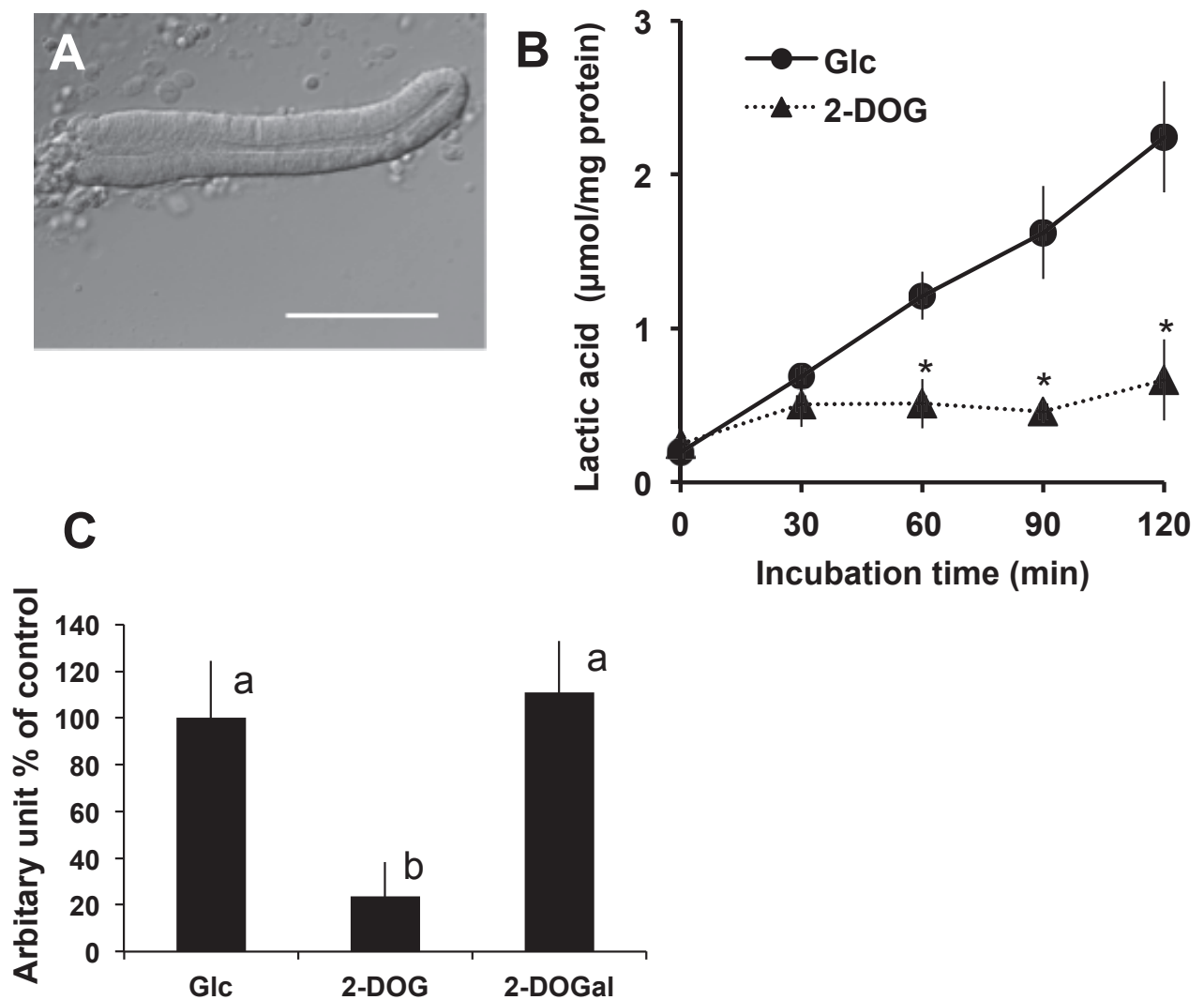


Fig.2-5 SSTの単離および乳酸産生能測定

SSTをコラゲナーゼ処理により単離し、39°Cでインキュベートしながら経時的にL-乳酸量を測定した。

**A:** 20分間のコラゲナーゼ処理によりSSTが単離された (Bar = 150 μm)。**B:** 単離したSSTを5 mM グルコース (Glc) または1 mM デオキシグルコース (2-DOG) を含むHBSS中で培養し、培養上清の乳酸濃度を経時的に定量した。実験を3回行い、乳酸濃度を平均値 ± SEMで表した。\*: 同時間のGlc群に対して有意差あり (P < 0.05)。**C:** 単離したSSTを5 mM グルコース (Glc)、1 mM デオキシグルコース (2-DOG) または2-デオキシガラクトース (2-DOGal) を含むHBSS中で培養し、1時間後の乳酸濃度を測定した。実験を3回行い、乳酸濃度を平均値 ± SEMで表した (異符号間で有意差あり (P < 0.01))。

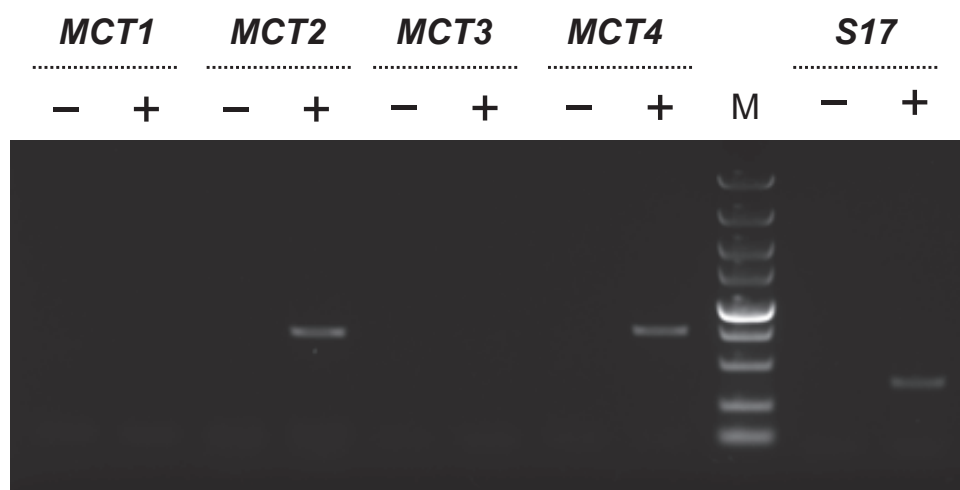
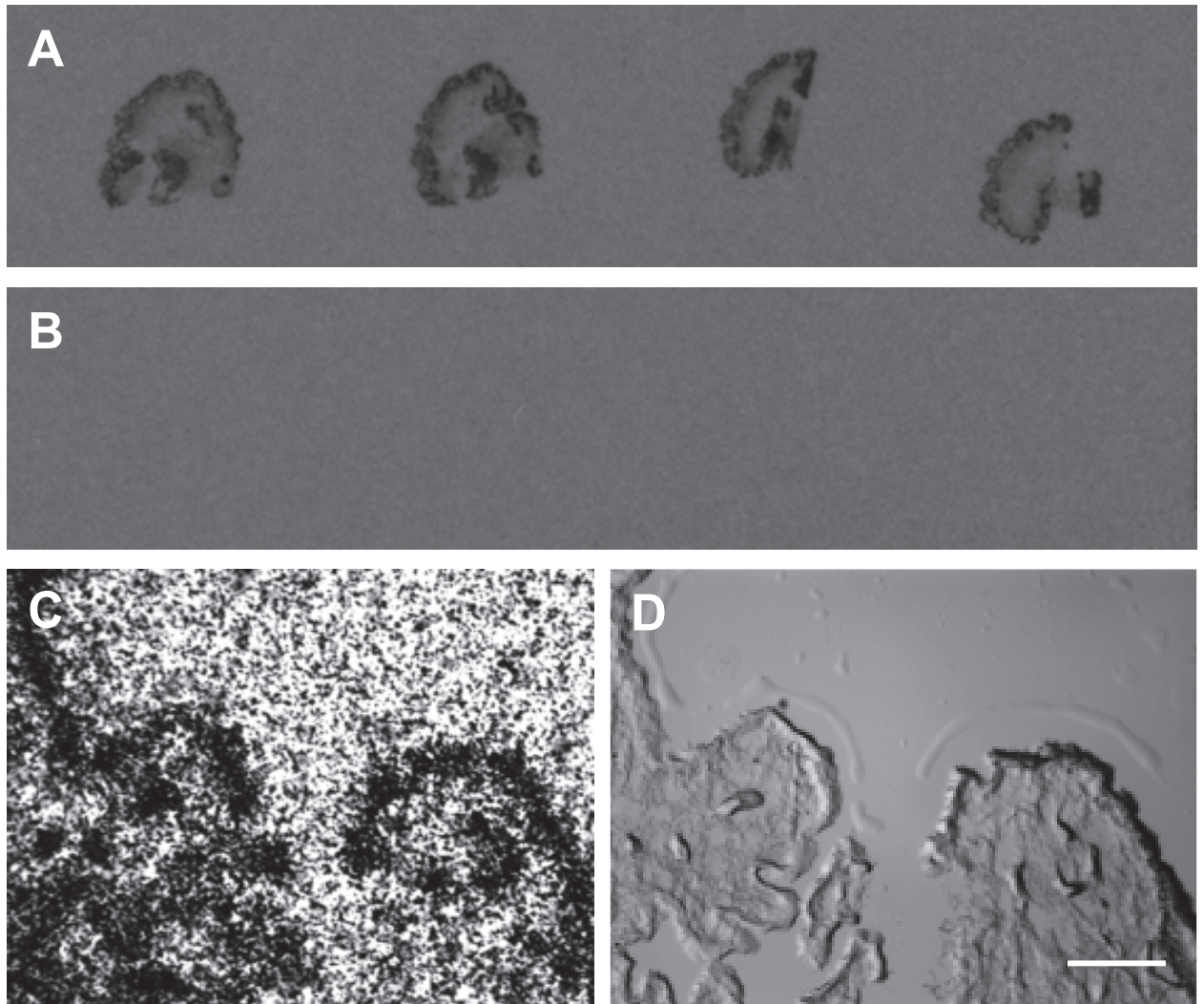


Fig.2-6 *MCT*遺伝子の発現解析

UVJからmRNAを抽出し、RT-PCRを行ったのち、*MCT1*、*MCT2*、*MCT3*、*MCT4*および*S17*の特異的プライマーを用いてcDNAを増幅した。non-RT群(レーン:-)は、UVJからmRNAを抽出したのちRT-PCRを行わず、同様にPCRを行った。3回の実験を行い、代表的な結果を示した。M: 分子量マーカ。

*MCT2*および*MCT4*のレーンに約900 bpのバンドが確認された。



**Fig.2-7 UVJにおけるMCT4 mRNAの発現**

UVJの凍結切片を作成し、<sup>33</sup>P標識プローブを用いたin situハイブリダイゼーションによりMCT4 mRNAの局在を確認した。2回の実験を行い、代表的な結果を示した。A: アンチセンスプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。B: センスプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。C: スライドをX線フィルムに露光し、実体顕微鏡で観察した。D: スライドを実体顕微鏡で観察した (Bar = 200 μm)。

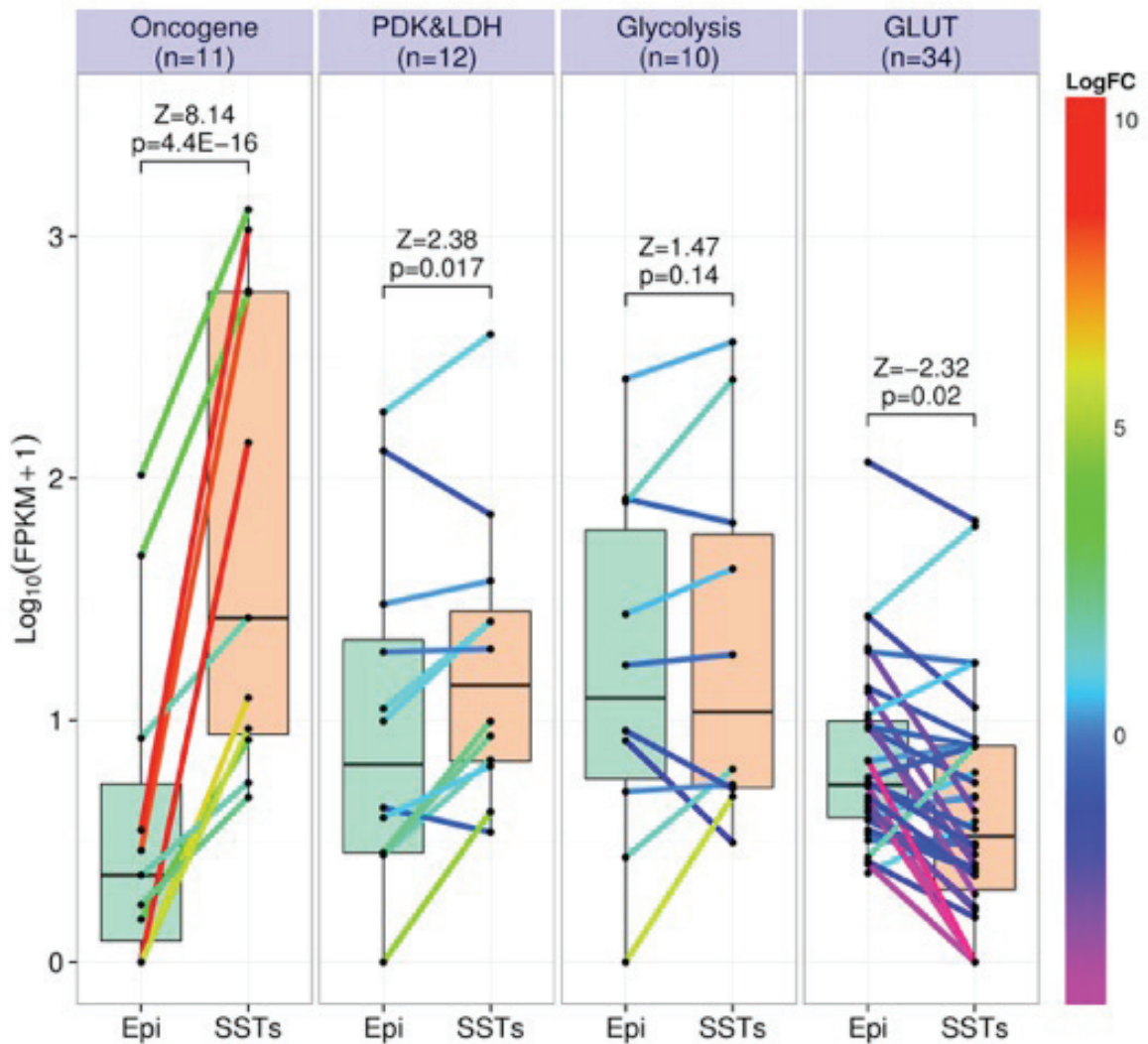


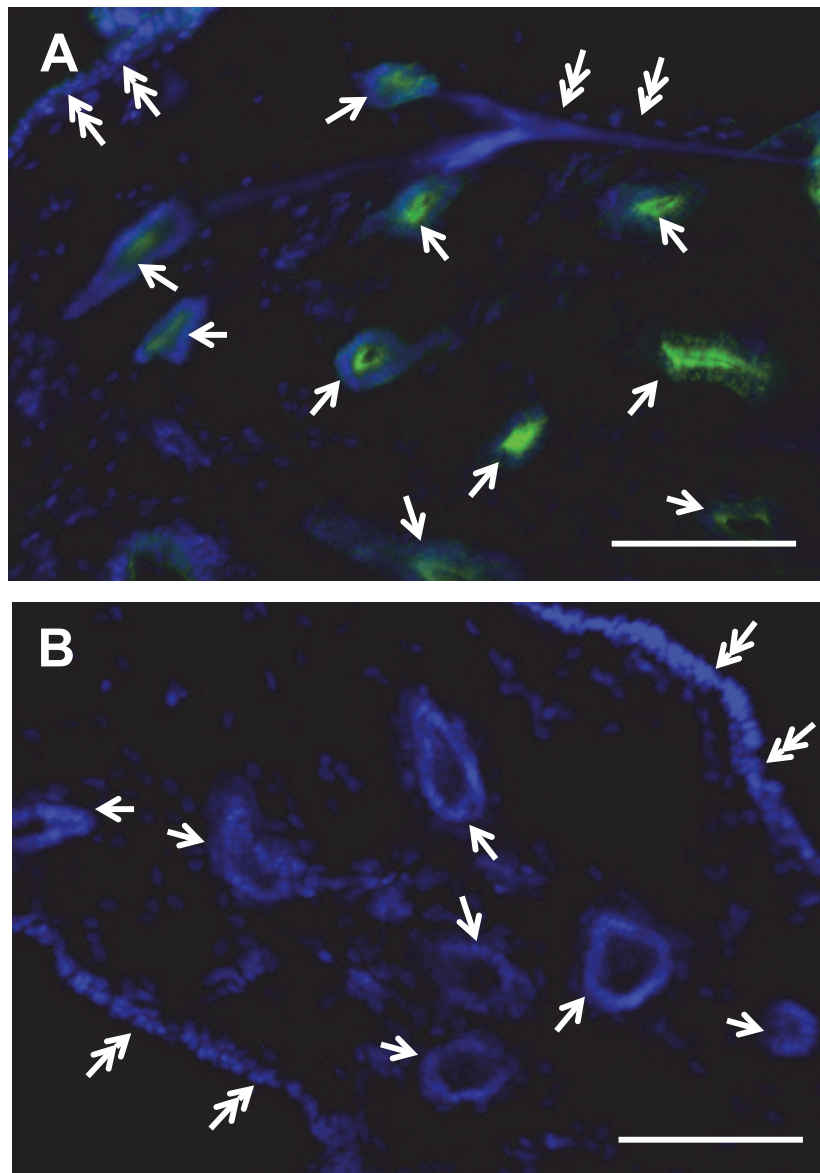
Fig.2-8 SSTと非SST上皮における遺伝子の発現差解析

SSTと非SST上皮における遺伝子発現差解析を行った。ボックスプロットは、がん、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼおよび乳酸脱水素酵素 (PDK&LDH)、解糖系、およびグルコーストランスポーター (GLUT) に関する遺伝子の発現量 (Log<sub>10</sub>(FPKM+1)) を表している。直線は、非SST上皮 (Epi) とSSTにおける遺伝子の発現差を対数変換して示している (LogFC)。

parametric analysis of gene set enrichment (PAGE) によりSSTと非SST上皮のLogFCを比較した。

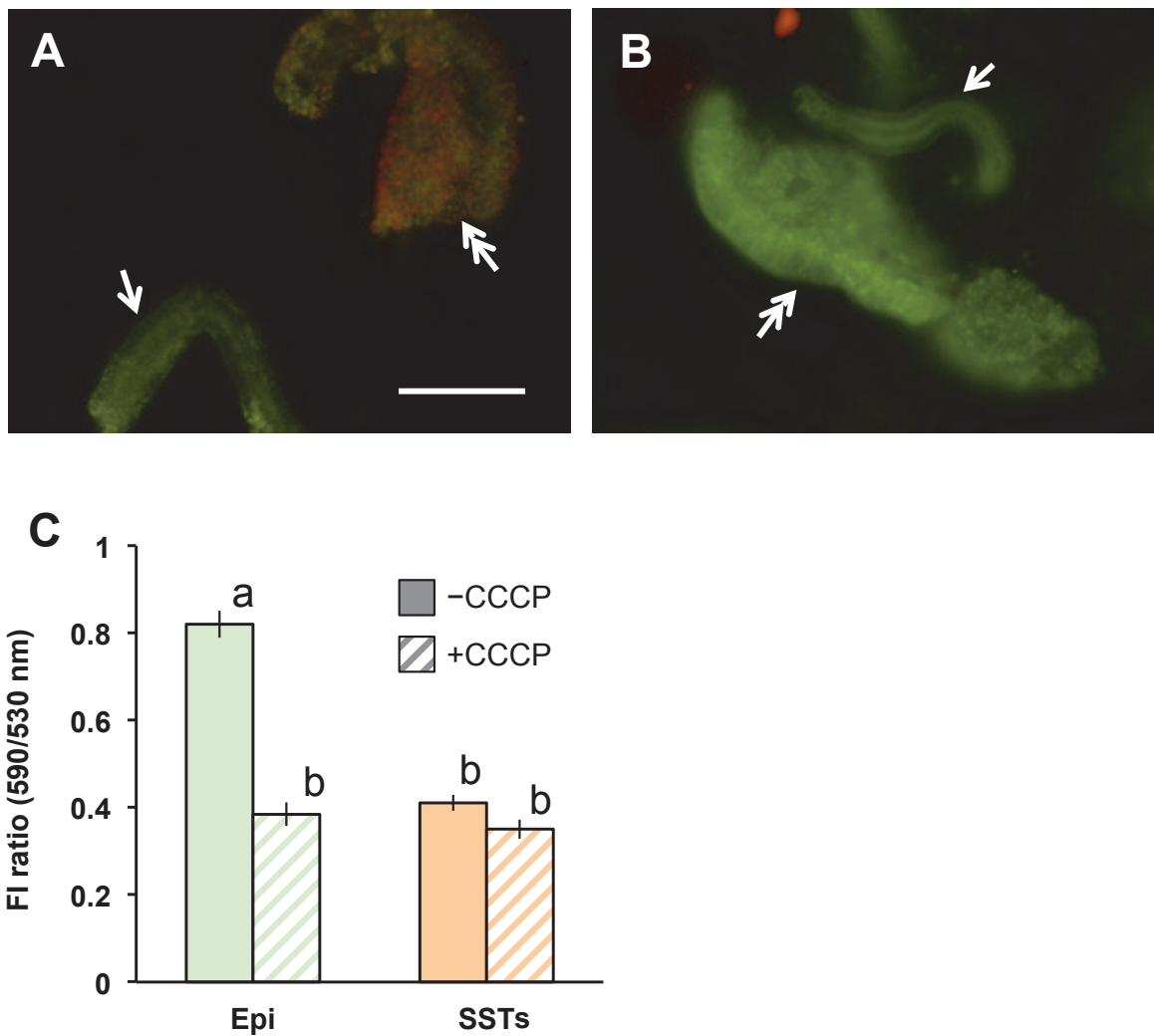
n: 遺伝子数、Z: Zスコア、p: p値。SSTにおいて、原がん遺伝子の発現が著しく増加していた。





**Fig.2-9 UVJにおける酸素供給**

免疫組織化学染色により、低酸素状態の細胞を検出した。A: Hypoxiprobe™-1を静脈注射したメスのUVJ。B: 生理食塩水を静脈注射したメスのUVJ。抗pimonidazole抗体のシグナルを緑色で、核をDAPI染色により青色で示した。SSTを矢印で、非SST上皮を二重矢印で示した(Bar = 100 μm)。Hypoxiprobe™-1投与群において、SSTへのpimonidazole蓄積が観察された。



**Fig.2-10 SSTおよび非SST上皮のミトコンドリア活性**

JC-1染色により、脱共役剤CCCpの存在下(B)または非存在下(A)における、SSTおよび非SST上皮のミトコンドリア膜電位を調べた。SSTを矢印で、非SST上皮を二重矢印で示した(Bar = 100 nm)。

C: SST(橙色)および非SST上皮(Epi: 緑色)におけるJC-1のFI比(590 nm/530 nm)を測定した。

3回の実験を行い、平均値 ± SEMで示した(異符号間に有意差あり(P < 0.0004))。

CCCp非存在下(-CCCp)では非SST上皮と比較してSSTのミトコンドリア活性は有意に低く、CCCpを添加すると(+CCCp)非SST上皮のミトコンドリア活性はSSTと同程度まで低下した。



**Table 1**  
SSTとUVI粘膜炎における遺伝子の発現差解析

GO_id	GO_name	Number of sequences	Z score	P-value	False discovery rate
GO:0005515	MF protein binding	2354	-7.794049752	6.43929E-15	1.71E-12
GO:0005840	CC ribosome	98	6.548828012	5.79903E-11	5.93E-09
GO:0003735	MF structural constituent of ribosome	99	6.527433457	6.69063E-11	5.93E-09
GO:0006412	BP translation	99	6.373236731	1.8508E-10	1.23E-08
GO:0005576	CC extracellular region	110	6.049948334	1.44892E-09	7.71E-08
GO:0006820	BP anion transport	20	-5.426567452	5.74481E-08	2.55E-06
GO:0005524	MF ATP binding	929	-5.361703161	8.24409E-08	3.13E-06
GO:0008289	MF lipid binding	21	5.334001178	9.60719E-08	3.19E-06
GO:0003777	MF microtubule motor activity	38	-4.870426596	1.11358E-06	3.29E-05
GO:0007018	BP microtubule-based movement	39	-4.827499659	1.38258E-06	3.44E-05
GO:0003774	MF motor activity	58	-4.804414293	1.55205E-06	3.44E-05
GO:0016459	CC myosin complex	58	-4.804414293	1.55205E-06	3.44E-05
GO:0006468	BP protein phosphorylation	423	-4.718625472	2.37444E-06	4.86E-05
GO:0017048	MF Rho GTPase binding	12	-4.468511328	7.87658E-06	0.000149655
GO:0005622	CC intracellular	367	4.357143873	1.31771E-05	0.000233674
GO:0004672	MF protein kinase activity	415	-4.332896983	1.4716E-05	0.000244654
GO:0005262	MF calcium channel activity	10	-4.269214999	1.96162E-05	0.000306936

GO:0007156	BP homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion	53	-4.232014107	2.31608E-05	0.000342265
GO:0005882	CC intermediate filament	31	4.116758099	3.84239E-05	0.000537935
GO:0070588	BP calcium ion transmembrane transport	10	-4.036394977	5.42788E-05	0.000721908
GO:0005856	CC cytoskeleton	42	-3.603256105	0.000314256	0.003980576
GO:0016311	BP dephosphorylation	20	-3.210644436	0.001324377	0.016012922
GO:0004198	MF calcium-dependent cysteine-type endopeptidase activity	13	-3.162832965	0.00156242	0.017429501
GO:0030036	BP actin cytoskeleton organization	18	-3.152004905	0.001621535	0.017429501
GO:0005737	CC cytoplasm	221	3.149034063	0.001638111	0.017429501
GO:0008017	MF microtubule binding	36	-3.130481343	0.001745201	0.017854749
GO:0015074	BP DNA integration	13	-3.091820668	0.00198933	0.019598584
GO:0004867	MF serine-type endopeptidase inhibitor activity	18	3.072754654	0.002120928	0.019921593
GO:0004871	MF signal transducer activity	46	-3.065659791	0.002171903	0.019921593
GO:0005179	MF hormone activity	13	3.000344938	0.00269674	0.023911095
GO:0008236	MF serine-type peptidase activity	21	2.976241845	0.002918046	0.025038717
GO:0008146	MF sulfotransferase activity	34	2.892907378	0.003816938	0.031728297
GO:0005509	MF calcium ion binding	269	-2.864577588	0.004175658	0.032881818
GO:0019001	MF guanyl nucleotide binding	15	-2.853316217	0.004326555	0.032881818
GO:0031683	MF G-protein beta/gamma-subunit complex binding	15	-2.853316217	0.004326555	0.032881818
GO:0016791	MF phosphatase activity	25	-2.831161577	0.004637929	0.034269142
GO:0005198	MF structural molecule activity	60	2.801202112	0.005091262	0.035857906

GO:0006810	BP transport	127	-2.799224055	0.005122558	0.035857906
GO:0008237	MF metalloproteinase activity	18	-2.79045819	0.00526335	0.035898746
GO:0008168	MF methyltransferase activity	63	2.775133315	0.005517908	0.036694088
GO:0030286	CC dynein complex	12	-2.752165169	0.005920265	0.038409524
GO:0005215	MF transporter activity	54	-2.736886144	0.006202376	0.039281715
GO:0008233	MF peptidase activity	17	2.727139113	0.00638861	0.039520239
GO:0016491	MF oxidoreductase activity	200	2.706477648	0.006800116	0.041109792
GO:0016020	CC membrane	689	-2.668275556	0.00762417	0.045067316
GO:0036459	MF ubiquitinyl hydrolase activity	51	-2.616318016	0.008888373	0.051397983
GO:0006457	BP protein folding	51	2.565771027	0.010294676	0.058263485
GO:0004129	MF cytochrome-c oxidase activity	15	2.515646606	0.011881425	0.065842897
GO:0004553	MF hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	39	-2.383112906	0.017166928	0.093191895
GO:0006629	BP lipid metabolic process	37	2.279286886	0.022650017	0.12049809
GO:0045454	BP cell redox homeostasis	43	2.243244467	0.024881054	0.129771772
GO:0004866	MF endopeptidase inhibitor activity	10	-2.23035619	0.025723806	0.131587161
GO:0006814	BP sodium ion transport	25	2.215630772	0.0267168	0.134088091
GO:0006281	BP DNA repair	65	2.142772777	0.032131348	0.15827664
GO:0005085	MF guanyl-nucleotide exchange factor activity	25	-2.106623274	0.035150248	0.167675308
GO:0005507	MF copper ion binding	18	2.097576928	0.035942535	0.167675308
GO:0030001	BP metal ion transport	19	-2.079932185	0.037531753	0.167675308

GO:0003723	MF RNA binding	128	2.079504008	0.03757105	0.167675308
GO:0005525	MF GTP binding	280	2.078047394	0.037704994	0.167675308
GO:0016887	MF ATPase activity	87	-2.076784014	0.037821498	0.167675308
GO:0042626	MF ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances	28	-2.039379711	0.041412146	0.176095407
GO:0008083	MF growth factor activity	31	2.037561024	0.041593853	0.176095407
GO:0003779	MF actin binding	63	-2.036433876	0.041706807	0.176095407
GO:0006418	BP rRNA aminoacylation for protein translation	37	1.999249884	0.045581324	0.189447378
GO:0006470	BP protein dephosphorylation	85	-1.988998362	0.046701384	0.190822657
GO:0009058	BP biosynthetic process	52	1.98318315	0.047346975	0.190822657
GO:0006955	BP immune response	31	1.967460774	0.049130114	0.193423393

GO, gene ontology; PAGE, parametric analysis of gene set enrichment; BP, biological process; MF, molecular function; CC, cellular component.

SSTとUVI粘膜上皮の発現比をlog2の対数変換し、それぞれのGOについてZスコアおよびP値を算出した。

#### 第四節 考察

貯精時の精子は SST 上皮細胞と結合しておらず (Ito *et al.*, 2011)、精子と SST との相互作用を成立させるには、精子に何らかの影響を与える因子が SST 上皮から放出されていると予想された。本章では、UVJ 抽出物由来の精子運動抑制因子として、乳酸を同定した。

一般に、哺乳類の卵管内は酸性に保たれている。ヒトでは、多種の乳酸菌 (*Lactbacillus* 属など) を含む腔内細菌叢が存在しており、これらの細菌が乳酸を産生することにより腔内を pH 3.5 前後に保っている (O'Hanlon *et al.*, 2013)。哺乳類の腔上皮は重層扁平上皮であり、エストロゲン刺激により基底細胞が分化して角化細胞となり上層へ移動する (Miyagawa and Iguchi, 2015)。角化細胞はケラチン化して剥落するが、腔内の乳酸菌は剥落したケラチン化細胞に含まれるグリコーゲンを分解して乳酸を産生する (Gregoire *et al.*, 1971)。このように、哺乳類においては、腔の細胞は乳酸の基質を供給するのみで、実際の乳酸産生は腔内の乳酸菌が行っている。一方、本研究の結果から、鳥類では SST の細胞そのものが乳酸を産生している可能性が示唆された。鳥類の輸卵管内細菌叢に関する報告は今までにないものの、家禽の SST 上皮は単層上皮であることが知られている (Bobr *et al.*, 1964; Holm and Ridderstråle, 2002; Bakst, 1994)。したがって、鳥類と哺乳類とでは、卵管における乳酸産生メカニズムが大きく異なっていることが推察された。

免疫組織化学染色および電子顕微鏡による観察から、UVJ 粘膜上皮細胞と比較して SST 上皮細胞には多量のグリコーゲン顆粒が存在することが明らかになっており (Gilbert *et al.*, 1968; Tingari and Lake, 1973)、乳酸産生の基質は SST 上皮細胞に十分量存在していると考えられる。好気的環境下にある細胞では、グルコースからピルビン酸が作られたのちアセチル CoA へと変換され TCA 回路へ入り、産生された NADH のエネルギーを使用して電子伝達系で ATP 合成を行う。嫌気的環境におかれると細胞の代謝は切り替わり、グルコースから生成したピルビン酸は TCA 回路に入らず、LDH によ

り乳酸に変換される。運動時の筋細胞やがん細胞など酸素供給が不足する細胞では、解糖系が亢進していることが知られている (Goda and Kanai, 2012)。SST 上皮は低酸素状態になっており、低酸素状態で発現が上昇する原がん遺伝子の *c-Fos* (Müller *et al.*, 1997) や *c-Jun* (Shaulian and Karin, 2001) などの発現量が上昇していた (Fig 2-8 および 2-9)。単離した SST の乳酸生産量は、グルコース存在下で経時的増大し、2-デオキシグルコースを添加すると抑制された (Fig. 2-5)。2-デオキシグルコースは解糖系を阻害することが知られており (Wick *et al.*, 1957)、SST においては解糖系を介して乳酸を産生していると考えられる。しかしながら、本研究においては SST における低酸素状態が生じるメカニズムを明らかにすることができなかった。

乳酸は極性低分子で細胞膜を通過できないため、細胞内から細胞外へは輸送タンパクを介して放出されると考えられる。MCT は 12 のタイプが存在する輸送タンパクで、主として輸送する基質が異なっており、本章において発現解析を行った MCT1、MCT2、MCT3 および MCT4 は、乳酸またはピルビン酸の輸送に関わっている (Halestrap and Price, 1999; Halestrap, 2013)。発現が確認された MCT2 および MCT4 のうち、MCT2 は主に精巣に発現し、ピルビン酸を  $H^+$  と細胞内へ共輸送することが報告されている (Lin *et al.*, 1998)。一方、MCT4 は基質親和性の低いトランスポーターで、骨格筋において嫌気呼吸により蓄積した乳酸と  $H^+$  を共輸送により排出することが知られている (Dimmer *et al.*, 2000)。 *in situ* ハイブリダイゼーションにより、MCT4 mRNA が SST および UVJ 粘膜上皮いずれにも局在することがわかった (Fig. 2-7)。UVJ 粘膜上皮においても約 3 mM の乳酸が検出されたことから (Fig. 2-4)、SST ほどでないにしろ、UVJ 粘膜上皮においても乳酸が産生されていると考えられる。しかしながら、SST は UVJ 粘膜上皮と異なり低酸素環境下に置かれていることから (Fig. 2-9)、より乳酸産生が活発であると予想され、実際に SST 上皮抽出物の乳酸は高濃度であった (Fig. 2-4)。

上述のように、哺乳類における乳酸の主な役割は、腔内の酸性化による細菌感染の防

止であると考えられる。しかし、精子の運動抑制因子として乳酸が同定され、SSTに乳酸が多量に存在していたことから、鳥類においては、乳酸は SST 貯蔵精子の運動を抑制する役割を有している可能性が示唆された。

## 第五節 小括

体内受精動物の多くは、射出後の精子を卵管内に貯蔵することで、受精のタイミングを適切に制御している。鳥類では、SSTに侵入した精子は運動を停止し長期間貯蔵されることが知られていたが、運動を不活性化する因子は見つかっていなかった。本章では、精子の運動抑制因子としてUVJ抽出物から乳酸を同定し、SSTにおける乳酸産生メカニズムを明らかにした。UVJ抽出物をゲルろ過クロマトグラフィー、HPLCおよびPLCを用いて分離し、精子の運動抑制活性を指標としてスクリーニングを行ったところ、精子運動抑制因子として乳酸が同定された。SSTにはUVJ粘膜上皮と比較して高濃度の乳酸が存在しており、SSTにおける乳酸産生はグルコース依存的であった。SSTはUVJ粘膜上皮と異なり低酸素状態になっており、ミトコンドリア活性が低下していることがわかった。また、解糖系を阻害すると乳酸産生量が低下したことから、SSTでは解糖系を介して乳酸を産生していることが示された。SSTにはMCT4が発現しており、産生された乳酸はMCT4を介してSST内腔へ輸送されることが示唆された。このように、鳥類の輸卵管における乳酸産生メカニズムは、哺乳類のそれとは異なっていることが推察された。



### 第三章 乳酸による精子の運動抑制機構

#### 第一節 緒論

精子はその運動を、周囲の環境に応じて巧みに変化させる。体外受精動物の場合、精巣内の精子は運動能を持たないが、輸精管を通過する過程で成熟し運動を誘起する能力を得る。放精されたのち、周囲の様々な環境の変化がトリガーとなって運動を開始する。体内受精の場合でも、精巣内精子は運動を停止しており、精巣上体を通過する過程で成熟して運動能を得る。

多くの動物の精子は輸精管内で運動を停止しているが、射出後の希釈、あるいは浸透圧やイオン強度の変化が引き金となり運動を開始する。精子の運動活性化は体外受精動物、特に硬骨魚類でよく調べられている。精子の運動開始を司る因子としては、(1) 精液の希釈による細胞外  $K^+$ 濃度の減少（サケ科 (Morisawa *et al.*, 1983a))、(2) 浸透圧の上昇または低下（多くの海水魚類および淡水魚類 (Morisawa and Suzuki, 1980 ; Morisawa *et al.*, 1983b))、(3) 卵由来の精子運動活性化物質（ニシン (Oda *et al.*, 1998; Cherr *et al.*, 2008)、カタユウレイボヤ (Yoshida *et al.*, 2002; Shiba *et al.*, 2008) 等)、(4) 精漿に含まれる精子運動抑制因子の希釈（ティラピア (Mochida *et al.*, 1999)）等が挙げられる。また、カタユウレイボヤの精子では、卵由来の精子運動活性化物質が精子の運動開始因子としてだけでなく、精子誘引因子としてもはたらくことが知られている。

鳥類の精子は、輸精管内で運動を停止している。ウズラの精子においても、輸精管から採取した精子は運動を停止しているが、*in vitro* で生理的塩類溶液中に希釈すると速やかに運動を開始する。鳥類の輸卵管は平滑筋で覆われており厚みがあるため、輸卵管内での精子の運動や移動を直接観察することは、現時点では不可能である。しかし、運動能の低い精子や運動を停止した精子は、人工授精を行ってもその後 SST には侵入出来ないことから、精子は射出後に運動を開始し、SST に侵入した後に運動を再び停止さ

せると考えられる。どのような刺激で精子が運動を開始し、SSTに侵入した精子が、どのようなメカニズムで乳酸により運動を停止するのかは不明であり、輸精管内での精子の運動停止とSST内での精子の運動停止のメカニズムに共通性があるかどうかもまったく明らかとなっていない。

前章では、UVJ粘膜上皮の抽出物から精子運動抑制因子として乳酸を同定し、SSTにおいて乳酸が産生されるメカニズムを明らかにした。本章では、乳酸が精子の運動を停止させるメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 第二節 材料及び方法

### (1) 実験動物

モトキ（所沢市）から購入した 7 週齢のウズラ (*C. japonica*) を、人工照明により 14 時間明期-10 時間暗期の光周期、室温 25°C の条件下で飼育した。餌は、モトキから購入した成鶏用飼料を不断給餌で与え、水は水道水を不断給水で与えた。産卵時刻を個体別に記録することにより各個体の排卵予定時刻を推定し、実験に用いた。

### (2) 試薬

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS: 137mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•12H<sub>2</sub>O, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4, 282 mOsm/L)、は、全て和光純薬工業(株) (大阪市) から購入した試薬を用いて調製した。ハンクス平衡塩類溶液 (HBSS: 137 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 1.26 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.81 mM MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.56 mM glucose, 0.01% phenol red, pH 7.4, 306 mOsm/L) は、ライフテクノロジーズ (港区) から購入した HBSS 10 倍液 (カルシウム、マグネシウム、炭酸水素ナトリウム、フェノールレッド不含) に、前述の濃度になるよう Milli-Q 水で希釈し、CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub> およびフェノールレッドを添加して使用した。

### (3) 精子の採取および運動アッセイ

成熟雄ウズラとメスウズラを交尾させ、交尾完了前に雄から射出精子を採取した。採取した精子は、HBSS に懸濁した後トーマ血球計算盤を用いて精子濃度を算出し、濃度が  $2.0 \times 10^7$  sperm/ml になるよう HBSS で希釈してアッセイに用いた。

精子の運動性を評価するために精子運動アッセイを行った。L-または D-乳酸 (2.5, 5.0, 7.5, 10 mM) を含む HBSS のドロップをプラスチックシャーレ上に作成し、流動パラフィンで封入した。作成したドロップは、アッセイに用いる前に 39°C で予温した。上述

の方法で採取した精子懸濁液をドロップの 20%容量加え（最終精子濃度  $4.0 \times 10^6$  sperm/ml）、ホットプレート上で  $39^\circ\text{C}$  に保ちながら実体顕微鏡下で経時観察した。精子の運動性は、4（激しい前進運動）、3（活発な前進運動）、2（やや弱い前進運動）、1（微弱な前進運動）、0（運動停止）の五段階で評価した（Wheeler and Andrews, 2013）。コントロール群として HBSS を用い、同様に精子の運動性を評価した。

#### (4) 精子の細胞外 pH および細胞内 pH

精子の  $\text{pH}_i$  の測定は、pH 蛍光指示薬である BCECF-AM（同仁化学研究所、益城郡）を用いて行った。射出精子を  $2.0 \times 10^7$  sperm/ml に希釈し、BCECF-AM を含む HBSS（最終濃度  $1 \mu\text{M}$ ）中で  $39^\circ\text{C}$ 、10 分間インキュベートし色素を細胞内に取り込ませた。L-乳酸または D-乳酸（0~10 mM）を含む HBSS に BCECF-AM をロードした精子懸濁液を 20%容量加え、蛍光分光光度計（RF-5300PC；島津製作所、京都市）を用い、430nm または 490nm の励起光を照射した際の 550 nm の蛍光強度を測定した。検量線を作成するために、BCECF-AM を含む HBSS に HCl または NaOH で pH を調整して標準溶液を調整し、バリノマイシン（最終濃度  $10 \mu\text{M}$ ）およびナイジェリシン（最終濃度  $10 \mu\text{M}$ ）を添加したのち、BCECF-AM をロードした精子懸濁液を 20%容量加えて同様に蛍光強度を測定した。蛍光強度の比（FI 比： $500\text{nm}/439\text{nm}$ ）と標準溶液の pH から標準曲線を作成し、精子の細胞内 pH を算出した。精子の  $\text{pH}_e$  は pH メーター（LAQUAtwin、堀場製作所、京都市）を用いて測定した。

#### (5) SST 貯蔵精子の細胞内 pH 測定

SST 貯蔵精子の細胞内 pH 測定は、pHrodo Red AM（サーモフィッシャー・サイエンティフィック、マサチューセッツ州）を用いて行った。射出精子を HBSS で  $2.0 \times 10^7$  sperm/ml に希釈し、pHrodo Red AM を含む HBSS（最終濃度  $1 \mu\text{M}$ ）に 20%容量の精子

懸濁液を加えて 39°C、10 分間インキュベートし色素を細胞内に取り込ませた。800 × g、室温で 3 分間遠心分離し、上清を捨て沈澱を PBS で洗浄する操作を 2 回繰り返したのち、マイクロピペットを用いて沈澱を連産メスの腔内に注入し人工授精した。1 時間後に断頭屠殺し UVJ を採取したのち、PBS で洗浄し 3.7%ホルムアルデヒドを含む PBS で UVJ を固定した。固定した UVJ を解剖バサミで細切し、グリセリンでマウントしたのち蛍光顕微鏡 (BX 51; オリンパス) で観察した。画像を顕微鏡用デジタルカメラ (DP70; オリンパス) により記録した後、Image J (アメリカ国立衛生研究所) を用いて蛍光強度を定量化した。標準曲線は Intracellular pH Calibration Buffer Kit (サーモフィッシャー・サイエンティフィック) を用い添付の説明書に従って作成した。標準曲線を用いて蛍光強度から SST 貯蔵精子の細胞内 pH を算出した。

#### (6) 精子ダイニンの ATPase 活性測定

射出精子を HBSS で  $2.0 \times 10^7$  sperm/ml に希釈し、800 × g で 3 分間遠心分離したのち、沈澱を等量のアッセイバッファー (120 mM KCl, 10 mM disodium β-glycerophosphate, 1 mM DTT, 1.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 μM CCCP, 10 mM HEPES, pH7.0) で洗浄した。800 × g で 3 分間遠心分離し、沈澱を等量の除膜バッファー (0.1% Triton X-100 を含むアッセイバッファー) に懸濁し、ピペッティングにより 2 分間緩やかに攪拌して精子の細胞膜を除去した。10,000 × g で 2 分間遠心分離し、上清を捨て沈澱をアッセイバッファーで洗浄したのち、10,000 × g で 2 分間遠心分離した沈澱を L-乳酸を含むアッセイバッファーに懸濁した。また、10 μM オリゴマイシンまたは 20 μM バナジン酸ナトリウムを含むアッセイバッファーで処理した群を設けた。ATP を最終濃度 1 mM になるよう添加し、39°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、氷冷したトリクロロ酢酸を添加して反応を停止させ、モリブデンブルー法により遊離のリン酸を定量した (Tausky and Shorr, 1953)。すなわち、反応液を 96 穴プレートに移し、モリブデン酸アンモニウムお

よび硫酸鉄 (II) を添加してモリブデンブルーを形成させ、650 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (テカン、川崎市) を用いて測定した。標準曲線を作成するため、 $K_2HPO_4$  標準液を調整し、モリブデンブルー法により同様に吸光度を測定した。 $K_2HPO_4$  標準液の吸光度から標準曲線を作成し、標準曲線を用いて精子ダイニンの ATPase 活性を算出した。

#### (7) ATP 定量

射出精子を HBSS に採取し、 $2.0 \times 10^7$  sperm/ml に希釈したのち、L-乳酸を含む HBSS 中に  $2.0 \times 10^7$  sperm/ml 精子を 20% 容量加えて 39°C で 10 分間インキュベートした (L-乳酸最終濃度 10 mM)。インキュベート後、精子懸濁液 100  $\mu$ l を 96 穴マイクロプレートに入れ、『細胞の』ATP 測定試薬 (東洋ビーネット、大阪市) を等量加え、遮光して 1 分間攪拌したのち 10 分間静置した。標準曲線を作成するため、1 mM ATP (pH 7.35) を HBSS で希釈して ATP 標準液を作成し、同様に『細胞の』ATP 測定試薬を加えて化学発光を検出した。LAS 500 (GE ヘルスケア) を用いて化学発光を検出したのち、Image J を用いて発光強度を定量化した。ATP 標準液の発光強度から標準曲線を作成し、標準曲線を用いて精子の ATP 量を算出した。

#### (8) 統計解析

実験群間の有意差は、分散分析法および Tukey の多重検定法により判定した。精子の運動アッセイを行った実験については、Mann-Whitney の U 検定法により有意差を判定した。

### 第三節 結果

#### (1) 乳酸が精子の運動に及ぼす影響

HBSS に D-乳酸または L-乳酸を添加して精子の運動性を評価した。L-乳酸、D-乳酸のいずれも濃度依存的に精子の運動を抑制した (Fig3-1, A)。L-乳酸は 5 mM 以上、D-乳酸は 7.5 mM 以上の濃度において、乳酸を添加していない群と比較して有意に運動性が減少した。すなわち、L-乳酸および D-乳酸は精子の運動を抑制したが、L-乳酸がより強い運動抑制活性を有していた。

また、精子の細胞外 pH および細胞内 pH を測定したところ、L-乳酸を添加すると濃度依存的に細胞外 pH が低下した (Fig3-1, B)。また、細胞外 pH の低下に伴い精子の細胞内 pH も低下し、いずれの乳酸濃度においても精子の細胞外 pH と細胞内 pH はほぼ同値を示した。D-乳酸を添加した際も、同様に細胞外 pH と細胞内 pH が連動し、乳酸濃度依存的に低下した (データは示していない)。

#### (2) 有機酸の添加による細胞外 pH の酸性化が精子の運動に及ぼす影響

HBSS に DL-乳酸、酢酸、リンゴ酸、オキサロ酢酸またはクエン酸を 10m M 添加して精子の運動性を評価したところ、各種有機酸を添加していない群と比較して有意に運動性が低下した (Fig3-2, A)。また、HBSS に HCl を添加して pH を下げた場合においても有意な運動性の低下がみられた。各種有機酸を添加した際のメディウムの pH と精子の運動性をプロットしたところ、強い相関が認められた (Fig3-2, B;  $R^2 = 0.94619$ )。

#### (3) SST 貯蔵精子の細胞内 pH

細胞内 pH の蛍光指示薬である pHrodo Red-AM を精子にロードし、人工授精によって精子を SST に侵入させた。人工授精 1 時間後の UVJ を採取し蛍光顕微鏡下で観察すると、SST に侵入した精子が赤色蛍光により確認された (Fig3-3, B)。一方、染色後 HBSS

に懸濁した精子においては、SST 貯蔵精子よりも微弱な赤色蛍光が観察された (Fig3-3, A)。精子の蛍光強度を Image J により定量化し、検量線から精子の細胞内 pH を算出したところ、HBSS に懸濁した精子の細胞内 pH は約 7.2、SST 貯蔵精子は約 6.2 であり、SST 貯蔵精子は HBSS に懸濁した精子と比較して有意に細胞内 pH が低下していた (Fig3-3, C および D)。

#### (4) ウズラ精子ダイニンの ATPase 活性

Triton X-100 処理により除膜した精子を用いて、精子ダイニン ATPase 活性を測定した。ウズラ精子のダイニン ATPase は、pH5~9 の範囲においては pH が高いほど高活性を示し、pH の低下に伴って活性が低下した (Fig3-4, A)。除膜精子にトリプシン処理を行い鞭毛軸糸の架橋タンパクを消化した後 ATP を灌流すると軸糸の滑り運動が観察され、pH 5.7 以下において pH 7.4 と比較して有意に滑り運動が起こる割合が低下した (Fig3-4, B)。

#### (5) オリゴマイシンおよびバナジン酸イオンが精子ダイニン ATPase 活性に及ぼす影響

除膜精子をオリゴマイシンまたはバナジン酸 (V) ナトリウムとインキュベートした時の精子ダイニン ATPase 活性を測定した。10  $\mu$ M オリゴマイシンを添加してもダイニン ATPase 活性に差はみられなかったが、20  $\mu$ M バナジン酸イオンの存在下ではダイニン ATPase 活性が有意に低下した (Fig. 3-5)。

#### (6) 乳酸の添加が精子の ATP 量に及ぼす影響

L-乳酸を添加した際の精子 ATP 量を測定した。L-乳酸を添加していない群の ATP 量は  $4 \times 10^5$  細胞あたり約 12 pmole であり、いずれの L-乳酸濃度においても乳酸を添加していない群との有意差はみられなかった (Fig4-3)。



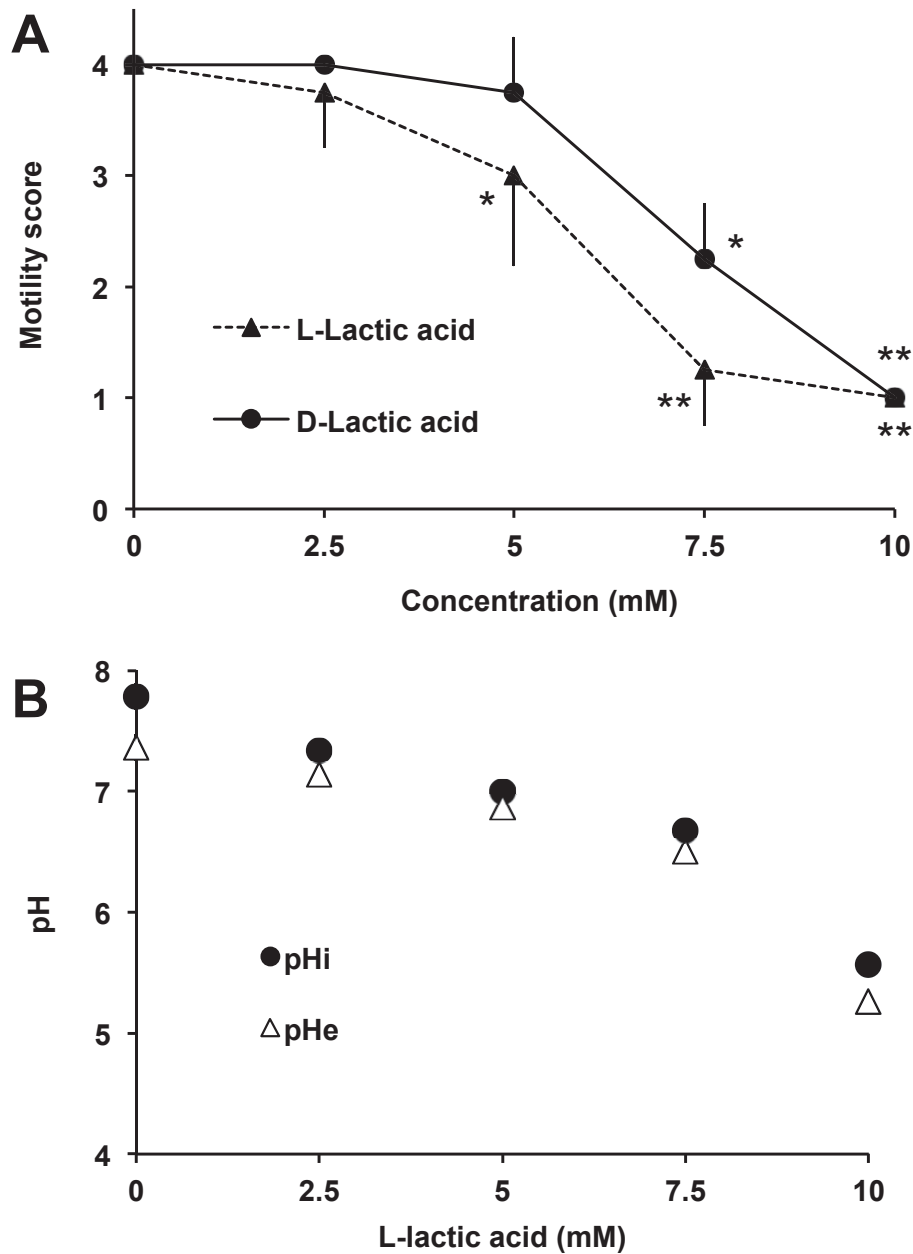


Fig.3-1 乳酸が精子の運動および細胞内pHに及ぼす影響

A: L-乳酸またはD-乳酸をHBSSIに0~10 mM添加し、射出精子を最終濃度 $4.0 \times 10^6$  sperm/mlとなるよう加え、39°Cでインキュベートした。10分後、実体顕微鏡下で精子の運動性を0~4の5段階で評価した。実験を3回行い、平均値  $\pm$  SEMで示した。\*: 0 mM群に対して有意差あり( $P < 0.05$ )。\*\*: 0 mM 群に対して有意差あり( $P > 0.01$ )。B: L-乳酸を添加し、メディウムのpH( $pH_e$ )と精子の細胞内pH( $pH_i$ )を測定した。実験を5回行い、代表的な結果を示した。

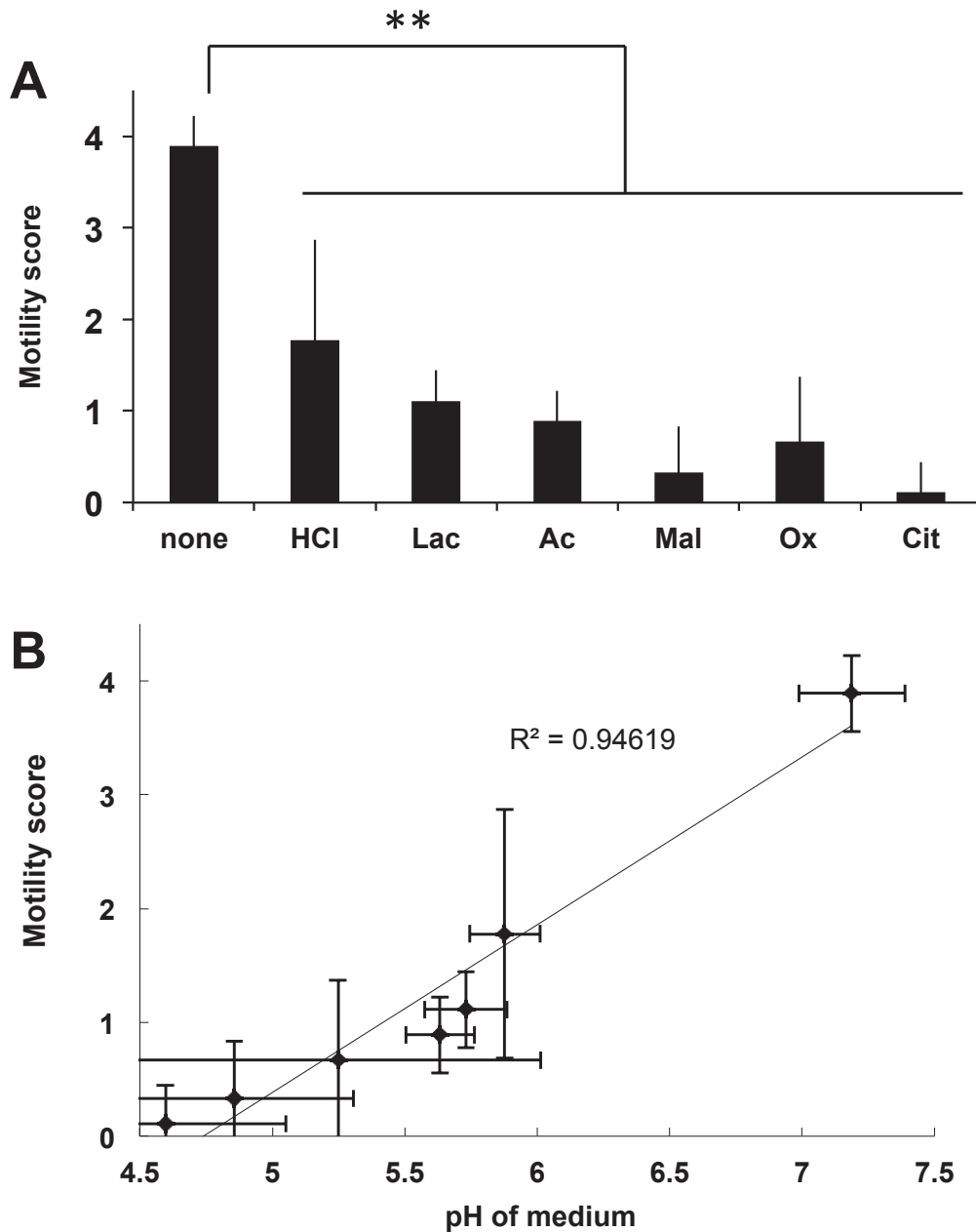


Fig.3-2 各種有機酸が精子の運動に及ぼす影響

A: 乳酸(Lac)、酢酸(Ac)、リンゴ酸(Mal)、オキサロ酢酸(Ox)、およびクエン酸(Cit)をHBSSに10 mM添加し、射出精子を最終濃度 $4.0 \times 10^6$  sperm/mlとなるよう加え、39°Cでインキュベートした。また、HBSS(none)および酸性HBSS(HCl)群を設けた。10分後、実体顕微鏡下で精子の運動性を0~4の5段階で評価した。実験を3回行い、平均値  $\pm$  SEMで示した。\*\*: コントロール群に対して有意差あり(P > 0.01)。B: 各群のメディウムのpHと精子の運動性をプロットした。精子の細胞外pHと運動性との間に強い相関がみられた( $R^2 = 0.94619$ )。

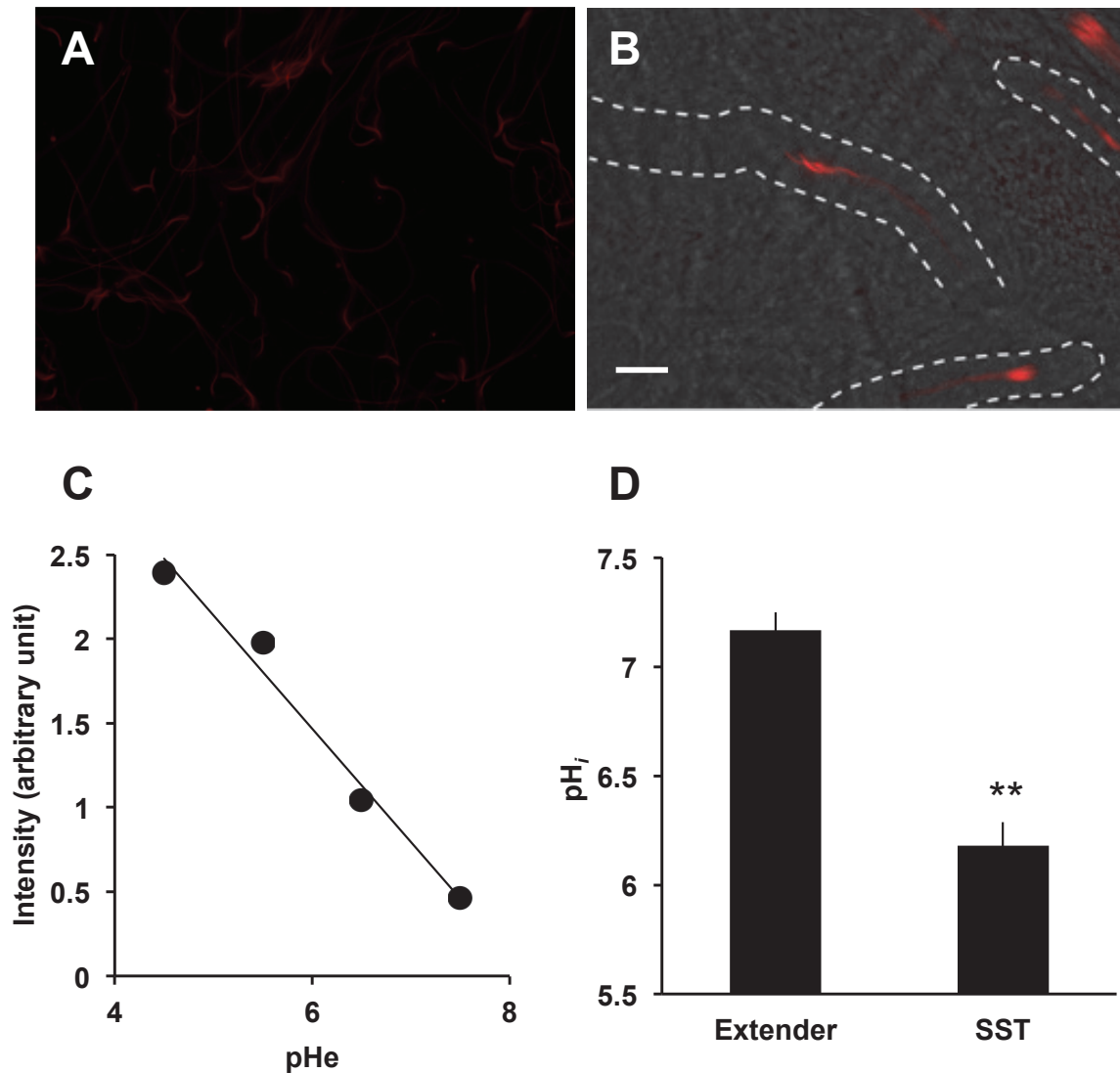
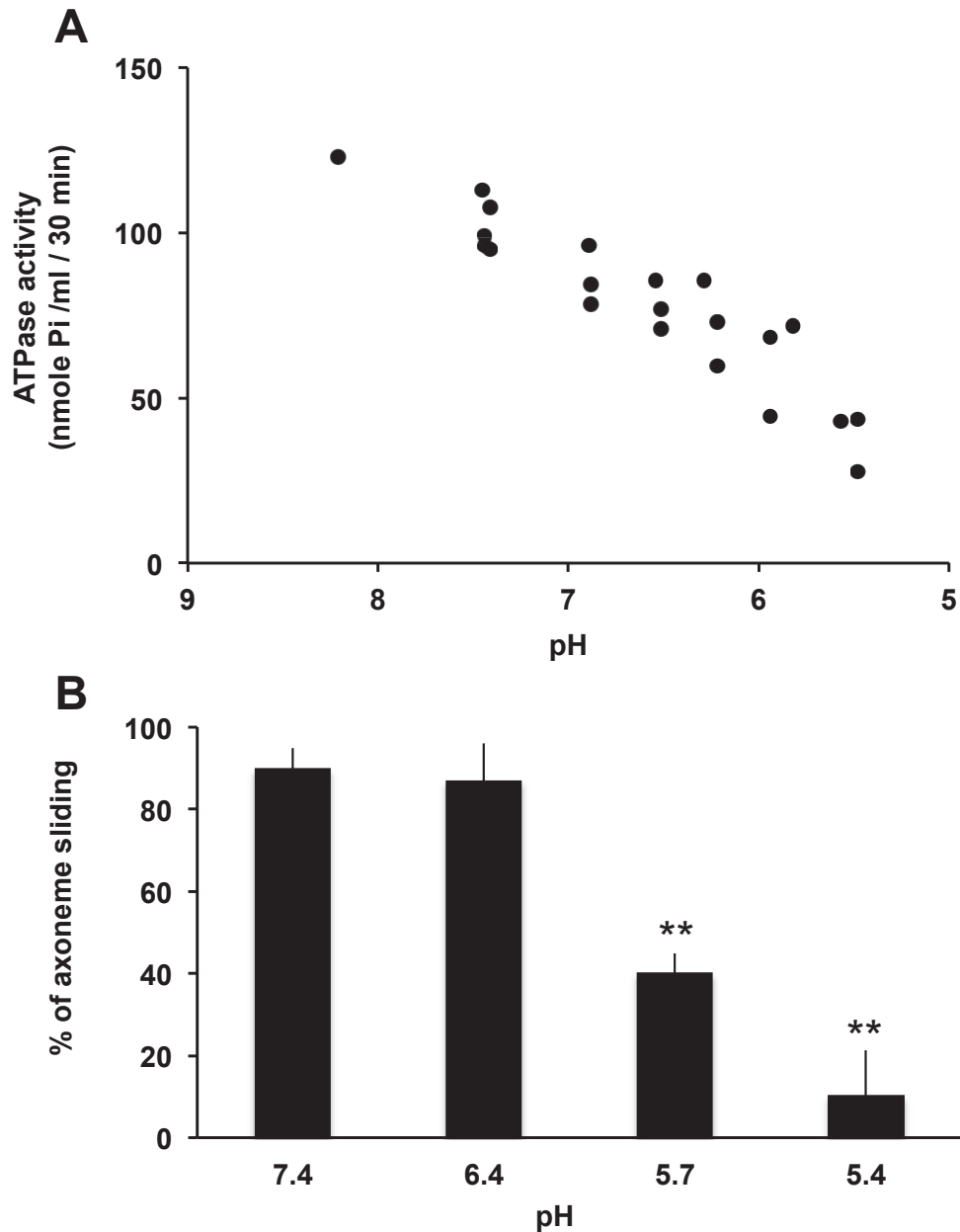


Fig.3-3 SST貯蔵精子の細胞内pH

pHrodo Red-AMを用いて、射出精子(A)およびSST貯蔵精子(B)の細胞内pHを測定した。

A: 射出精子をHBSSに懸濁し、蛍光顕微鏡下で観察した。B: 精子を人工授精し、UVJを採取して蛍光顕微鏡下で観察した。破線はSSTの輪郭を表す(Bar = 50 μm)。C: バリノマイシンおよびナイジェリシン存在下で精子をインキュベートし、蛍光強度とメディウムのpH(pH<sub>e</sub>)をプロットして検量線を作成した。D: 精子の蛍光強度から細胞内pH(pH<sub>i</sub>)を算出した。実験を3回行い、平均値 ± SEMで示した。\*\*: 射出精子群に対して有意差あり(P > 0.00001)。



**Fig.3-4 pHがウズラ精子のダイニンATPase活性に及ぼす影響**

**A:** Triton X-100により除膜した精子と 1 mM ATPを30分間インキュベートし、ATPの加水分解により生じた遊離のリン酸量を測定した。**B:** 除膜精子をスライドガラスに貼付し、トリプシン溶液を灌流して軸系の架橋タンパクを分解した。ATPを含むpH 7.4、6.4、5.7または5.4のバッファーを灌流し、軸系の滑り運動が起こった割合をパーセンテージで表した。実験を3回行い、平均値を±SEMで示した。\*\*: pH7.4群に対して有意差あり(P > 0.0000001)。ウズラ精子のダイニンATPase活性は、酸性で抑制された。

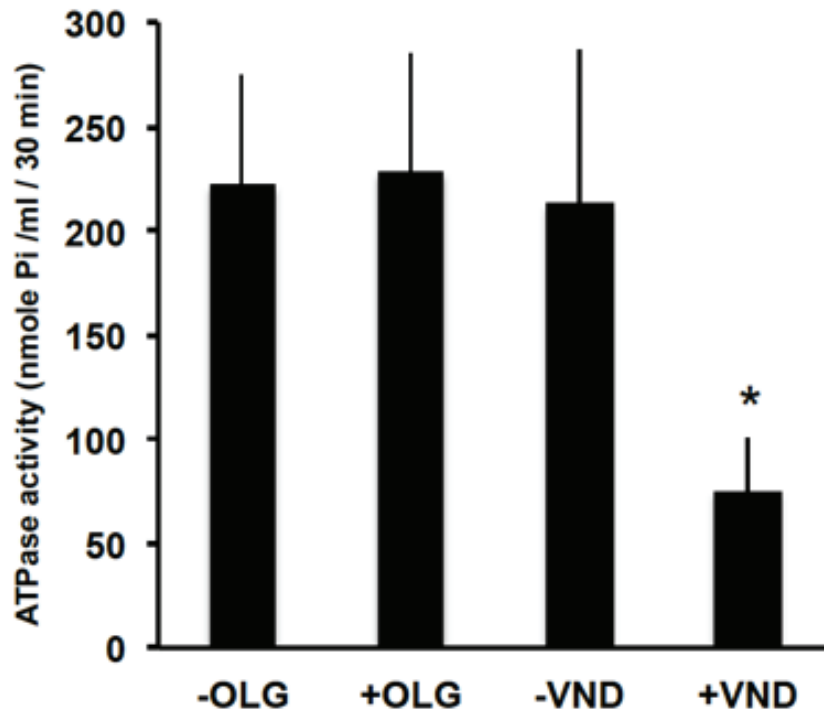
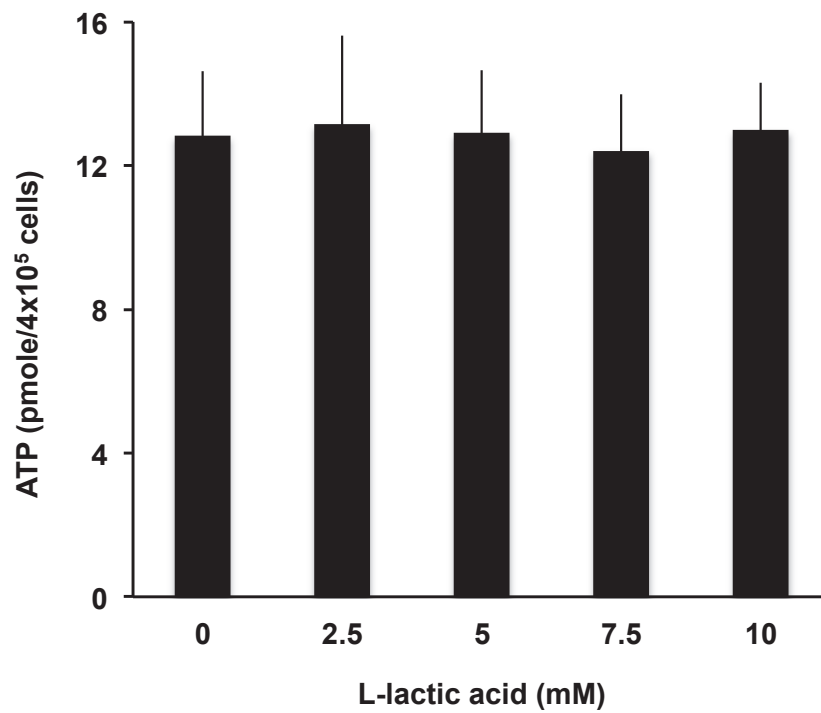


Fig.3-5 オリゴマイシンおよびバナジン酸イオンが精子ダイニンATPase活性に及ぼす影響

除膜精子と1 mM ATPを、10  $\mu$ Mオリゴマイシン(OLG)または20  $\mu$ Mバナジン酸(V)ナトリウム(VND)存在下でインキュベートし、ATPの加水分解により生じた遊離のリン酸量を測定した。実験を3回行い、平均値  $\pm$  SEMで示した。\*: コントロール群に対して有意差あり( $P > 0.05$ )。バナジン酸イオンの存在下でダイニンATPase活性が低下した。



**Fig.3-6 乳酸が精子の細胞内ATP量に及ぼす影響**

L-乳酸をHBSSに0~10 mM添加し、射出精子を最終濃度 $4.0 \times 10^6$  sperm/mlとなるよう加え、10分間インキュベートしたのち精子のATP量を測定した。実験を3回行い、平均値  $\pm$  SEMで示した。すべての群において、0 mM群に対する有意差はみられなかった。

#### 第四節 考察

鳥類では、SST に貯蔵されている精子は運動を停止しており、代謝を抑制することで ATP 消費を防いでいると予想される。これは、精子の呼吸により産生される活性酸素を減少させることから、精子の受精能維持に有利にはたらくと考えられる (Bréque *et al.*, 2003)。しかしながら、SST 内で精子の運動を不活性化するメカニズムは明らかになっていなかった。本章では、SST における精子運動抑制因子として同定された乳酸が、精子の運動性を不活性化するメカニズムを調査した。

ウズラ精子は、乳酸の添加により運動性が低下したが (Fig. 3-1, B)、乳酸以外の有機酸によっても運動が抑制されることがわかった (Fig. 3-2, A)。有機酸を添加した際の  $pH_e$  と  $pH_i$  を測定すると、 $pH_e$  と  $pH_i$  は連動して低下し (Fig. 3-1, B)、さらに、 $pH_e$  と精子の運動性には正の相関があることが明らかになった (Fig. 3-2, B)。このことから、 $pH_e$  の低下に伴う  $pH_i$  の低下が、精子の運動性に影響を及ぼしていることが示唆された。精子の運動性は酸性条件下で低く、pH 依存的に運動性が増加することが知られている (Goldstein, 1979)。 $pH_e$  の酸性化による精子の運動抑制は、哺乳類の精巣上体でも報告されている。精巣上体には特殊な上皮細胞が存在し、管腔側に局在する液胞プロトンポンプにより管腔を酸性化することで、精巣上体に貯蔵されている精子の運動を抑えている (Breton *et al.*, 1996)。ウシでは、精巣上体尾部の内腔液に pH 依存性の精子運動抑制因子が存在し、精巣上体の pH 範囲において精子の運動を抑制することが示唆されている (Carr and Acott, 1984, Acott and Carr, 1984) また、精子の運動性と  $pH_i$  は密接に関係しており、ウニの精子は  $pH_i$  の上昇により代謝が活性化し運動を開始することが報告されている (Christein *et al.*, 1982)。ウニ精子には  $Na^+/H^+$  交換体が存在し、 $Na^+$  の流入に伴う  $H^+$  の流出が  $pH_i$  の上昇を引き起こすことが明らかになっている (Lee *et al.*, 1983; Lee, 1984)。ヒトにおいては精子特異的なカルシウムチャネルである CatSper が運動に必須であるが、CatSper は  $pH_i$  のアルカリ化により活性化されることが明らかになっており

(Kirichok et al., 2006)、電位依存性プロトンチャネル Hv1 を介したプロトンの流出により  $\text{pH}_i$  のアルカリ化が誘導される (Lishko et al., 2010)。ウシでは、精子の  $\text{pH}_i$  を低下させることにより運動が抑制され、運動時間が延長することが報告されている (Jones and Bavister, 2000)。このように、 $\text{pH}_i$  は精子の運動制御において普遍的な役割を担っていると考えられ、ウズラにおいては、乳酸により酸性化した SST 内腔の pH が貯蔵精子の  $\text{pH}_i$  を低下させることにより運動抑制を引き起こすことが示唆された。

本研究の結果から、 $\text{pH}_i$  の低下が精子の運動を抑制するメカニズムは、鞭毛のモータータンパクであるダイニン ATPase の活性低下にあることが示された。精子の運動は鞭毛軸糸を構成するダイニンとチューブリンとの滑り運動によって生じる (Summers and Gibbons, 1971; Gibbons, 1988)。精子のダイニン ATPase の活性は pH による影響を強く受けることが知られており、その至適 pH は弱塩基性の比較的狭い範囲にあることが知られている。ウズラのダイニン ATPase 活性も同様に比較的狭い範囲の至適 pH を有しており、この ATPase 活性は  $F_0$ ATPase の阻害剤であるオリゴマイシンでは阻害されず、ダイニン ATPase を阻害することで知られるバナジン酸 (V) ナトリウムで阻害された。また、この  $\text{pH}_i$  の低下に伴うダイニン ATPase 活性の低下は、除膜精子の軸糸の滑り運動とも直接関係していることが示された。このことは、 $\text{pH}_i$  の低下がダイニン ATPase 活性の活性を低下させ、精子の鞭毛運動の停止に直接関連することを示す直接的な証拠と言える。実際に SST の中で貯蔵中の精子の  $\text{pH}_i$  は 6 程度に低下していることが分かったため、この精子の  $\text{pH}_i$  の低下は、生理的にも精子の運動停止と貯蔵過程に重要であることが示された。

乳酸を添加した際のウズラ精子における  $\text{pH}_e$  の低下と連動した  $\text{pH}_i$  の低下は、未知のプロトンチャネルやトランスポーターを介した  $\text{H}^+$  の流入により引き起こされると予想されるが、本研究では、 $\text{pH}_i$  を制御する輸送タンパクの同定には至らなかった。Sasanami et al. (2011) は、射出精子のキャビテーションと超遠心分離によって回収した膜分画に



対するモノクローナル抗体ライブラリー (mAb ライブラリー) を作出した。この mAb ライブラリーを用いて、受精の際に精子と卵黄膜との結合を阻害する因子として膜結合型アクロシンを同定した。同様の方法で、Hiyama *et al.* (2013) は、精子の運動を活性化する heat shock protein 70 の結合因子として、電位依存アニオンチャンネル2を同定した。この mAb ライブラリーは、原理的にはウズラ精子の膜タンパクに対する抗原を網羅的に認識する mAb ライブラリーであるため、今後、この mAb ライブラリーを利用すれば、 $\text{pH}_i$  を制御する輸送タンパクを同定できる可能性がある。

Munro (1938) は、ニワトリの射出精子の運動が温度依存的に変化する現象を発見した。興味深いことに、ニワトリの精子は体温付近では運動に  $\text{Ca}^{2+}$  を必要とするが、 $30^\circ\text{C}$  付近まで培養温度を低下させると、 $\text{Ca}^{2+}$  不含の培養液中でも活発に運動を行うことが報告されている (Ashizawa *et al.*, 1994a)。本研究では、このような温度依存的な運動の変化がウズラ精子でも起こるかどうかを観察していないが、このような温度依存的な運動の変化が  $\text{pH}_i$ 、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度、ミトコンドリア活性等の変化と連動しているか否かを調べることは、精子の運動の開始や停止のメカニズムを調べる上で恰好の材料になると考えられる。

本章では、SST 管腔における乳酸蓄積による  $\text{pH}_i$  の酸性化が、SST における精子の運動抑制に重要な役割を果たしていることを示した。有鞭毛精子の運動が、ダイニンとチューブリンの滑り運動によって駆動されているという共通性を鑑みると、このような  $\text{pH}_i$  の変化に伴う運動制御の仕組みは、種を超えて受精の成功に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

## 第五節 小括

鳥類の精子は、輸精管内で運動を停止している。前章では、UVJ 粘膜上皮の抽出物から精子運動抑制因子として乳酸を同定し、SST において乳酸が産生されるメカニズムを明らかにしたが、SST に侵入した精子が、乳酸により運動を停止するメカニズムは不明であった。本章では、乳酸が精子の運動を停止させるメカニズムを明らかにした。

ウズラ精子は、乳酸の添加により運動性が低下したが、乳酸以外の有機酸によっても運動が抑制されることがわかった。有機酸を添加した際の  $pH_e$  と  $pH_i$  を測定すると、 $pH_e$  と  $pH_i$  は連動して低下し、さらに、 $pH_e$  と精子の運動性には正の相関があることが明らかになった。このことから、乳酸により酸性化した SST 内腔の pH が貯蔵精子の  $pH_i$  を低下させることにより運動抑制を引き起こすことが示唆された。ウズラのダイニン ATPase 活性は pH の低下に伴って低下した。また、この  $pH_i$  の低下に伴うダイニン ATPase 活性の低下は、除膜精子の軸糸の滑り運動とも直接関係していることが示された。すなわち、 $pH_i$  の低下がダイニン ATPase 活性の活性を低下させ、精子の鞭毛運動の停止に関与することが明らかになった。実際に SST 内に貯蔵された精子の  $pH_i$  は 6 程度に低下していることが分かったため、精子の  $pH_i$  の低下は、生理的にも精子の運動停止と貯蔵過程に重要であることが示された。有鞭毛精子の運動が、ダイニンとチューブリンの滑り運動によって駆動されているという共通性を鑑みると、このような  $pH_i$  の変化に伴う運動制御の仕組みは、種を超えて受精の成功に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

## 第四章 ウズラ精子の運動を制御する細胞内シグナル伝達

### 第一節 緒論

動物において、精子の運動は受精を成功させるために必要である。射精（放精）前の精子は輸精管内で運動を停止しているが、射精（放精）後、浸透圧の変化（Morisawa and Suzuki, 1980）細胞外  $K^+$ 濃度の低下（Morisawa *et al.*, 1983）、精子運動活性化物質への曝露（Yoshida *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2010）または精漿に含まれる運動抑制物質の希釈（Mochida *et al.*, 1999）等の様々な要因によって運動を開始することが報告されている。鳥類では、輸精管に貯蔵されている精子は鞭毛運動を停止しているが、精子を希釈すると運動を開始する。射精後の精子は子宮-膣移行部（*utero-vaginal junction*; UVJ）に局在する精子貯蔵管（*sperm-storage tubules*; SST）に侵入する（Bobr *et al.*, 1964）。精子は SST 内で運動を停止し（Bakst, 1987）、通常の体温である  $41^{\circ}\text{C}$  付近でも長期間受精能を失わずに SST 中で貯蔵されたのち（Birkhead, 1993）、排卵のタイミングに合わせて SST から放出され運動を再開する（Ito *et al.*, 2011; Hiyama *et al.*, 2013）。このように、鳥類精子は受精過程において運動のオン/オフを切り替えていると考えられる。精子鞭毛の運動はダイニンとチューブリンの滑り運動により生じることが知られている（Summers and Gibbons, 1971）。前章では、乳酸がウズラ精子において  $\text{pH}_i$  を低下させることによりダイニン ATPase 活性を抑制し、運動を停止させることを明らかにした。しかしながら、ウズラ精子の鞭毛運動を制御する細胞内シグナル伝達経路についてはほとんど明らかになっていない。

本章では、プロテインキナーゼ C (PKC) の阻害剤である Bisindolylmaleimide II (BisII) (Mahata *et al.*, 2002)、BisII の不活性アナログである Bisindolylmaleimide V (BisV) (Mahata *et al.*, 2002)、プロテインキナーゼ A (PKA) の阻害剤である H-89 (Chijiwa *et al.*, 1990) およびホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) の阻害剤である

LY294002 (Vlahos *et al.*, 1994) を用いて、精子の運動を制御するシグナル伝達経路におけるキナーゼの役割について考察することとした。

## 第二節 材料及び方法

### (1) 実験動物

モトキ（所沢市）から購入した 7 週齢のウズラ (*C. japonica*) を、人工照明により 14 時間明期-10 時間暗期の光周期、室温 25°C の条件下で飼育した。餌は、モトキから購入した成鶏用飼料を不断給餌で与え、水は水道水を不断給水で与えた。

### (2) 試薬および抗体

ハンクス平衡塩類溶液 (HBSS: 137 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 1.26 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.81 mM MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.56 mM glucose, 0.01% phenol red, pH 7.4, 306 mOsm/L) は、ライフテクノロジーズ (港区) から購入した HBSS 10 倍液 (カルシウム、マグネシウム、炭酸水素ナトリウム、フェノールレッド不含) に、前述の濃度になるよう Milli-Q 水で希釈し、CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub> およびフェノールレッドを添加して使用した。BisII および BisV はメルク (目黒区) から、H89 および LY294002 はシグマアルドリッチ (目黒区) から購入した。ウサギモノクローナル抗ヒト PKC リン酸化 Ser/Thr 抗体および PKC アイソフォームサンブラーキットはセル・シグナリング・テクノロジー (千代田区) から、ヤギ抗ウサギ IgG 抗体はコスモ・バイオ (江東区) から購入した。

### (3) 精子の採取および運動アッセイ

射出精子は、Kuroki and Mori (1997) の方法に従って採取した。採取した精子は、HBSS に懸濁した後トーマ血球計算盤を用いて精子濃度を算出し、濃度が  $2.0 \times 10^7$  sperm/ml になるよう HBSS で希釈してアッセイに用いた。

精子の運動性を評価するために精子運動アッセイを行った。BisII (0 ~ 10 μM)、BisV (0 ~ 10 μM)、H89 (0 ~ 1 μM) または LY294002 (0 ~ 10 μM) を含む HBSS のドロップ

をプラスチックシャーレ上に作成し、流動パラフィンで封入した。作成したドロップは、アッセイに用いる前に 39°C で予温した。上述の方法で採取した精子懸濁液をドロップの 20%容量加え（最終精子濃度  $4.0 \times 10^6$  sperm/ml）、ホットプレート上で 39°C に保ちながら実体顕微鏡下で経時観察した。精子の運動性は、4（激しい前進運動）、3（活発な前進運動）、2（やや弱い前進運動）、1（微弱な前進運動）、0（運動停止）の 5 段階で評価した（Wheeler and Andrews, 1943）。コントロール群として HBSS を用い、同様に精子の運動性を評価した。

#### (4) 精子の細胞内 pH 測定

精子の細胞内 pH ( $\text{pH}_i$ ) の測定は、pH 蛍光指示薬である BCECF-AM（同仁化学研究所、益城郡）を用いて行った。BCECF-AM および BisII を含む HBSS に  $2.0 \times 10^7$  sperm/ml の精子懸濁液を 20%容量加え（BCECF-AM 最終濃度  $1 \mu\text{M}$ 、BisII 最終濃度  $1 \mu\text{M}$ 、最終精子濃度  $4.0 \times 10^6$  sperm/ml）、10 分間インキュベートしたのち蛍光分光光度計

（RF-5300PC；島津製作所、京都市）を用い、430nm または 490nm の励起光を照射した際の 550 nm の蛍光強度を測定した。検量線を作成するために、BCECF-AM を含む HBSS に HCl または NaOH で pH を調整して標準溶液を調整し、バリノマイシン（最終濃度  $10 \mu\text{M}$ ）およびナイジェリシン（最終濃度  $10 \mu\text{M}$ ）を添加して、精子とインキュベートしたのち同様に蛍光強度を測定した。蛍光強度の比（FI 比：490 nm/430 nm）と標準溶液の pH から標準曲線を作成し、精子の  $\text{pH}_i$  を算出した。標準溶液の pH は pH メーター（LAQUAtwin；堀場製作所、京都市）を用いて測定した。

#### (5) 精子の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度測定

精子の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の測定は、カルシウム蛍光指示薬である Fluo-8H AM（ナカライテスク、京都市）を用いて行った。Fluo-8H AM を含む HBSS に  $4.0 \times 10^7$

sperm/ml の精子懸濁液を等量加えたのち、39°C で 10 分間インキュベートし、Fluo-8H AM を細胞内にローディングした (Fluo-8H AM 最終濃度 1  $\mu$ M)。BisII を含む HBSS に Fluo-8H AM をローディングした精子を 20%容量加え (BisII 最終濃度 1  $\mu$ M、最終精子濃度  $4.0 \times 10^6$  sperm/ml)、蛍光分光光度計を用いて 490 nm の励起光を照射した際の 515 nm における蛍光強度を測定した。ポジティブコントロール群としてカルシウムイオンフォアである A23187 (10  $\mu$ M) 添加群を設け、同様に蛍光強度を測定した。

#### (6) 精子のミトコンドリア活性測定

ミトコンドリア膜電位蛍光指示薬である JC-1 (ライフテクノロジーズ) および BisII を含む HBSS に、 $2.0 \times 10^7$  sperm/ml の精子懸濁液を 20%容量加えたのち、39°C で 10 分間インキュベートした (JC-1 最終濃度 125 nM、BisII 最終濃度 1  $\mu$ M、最終精子濃度  $4.0 \times 10^6$  sperm/ml)。蛍光分光光度計を用いて 490 nm の励起光を照射した際の 530 nm および 590 nm における蛍光強度を測定した。530 nm および 590 nm における蛍光強度の比を算出し、ミトコンドリア活性とした。ポジティブコントロールとして、ミトコンドリア脱共役剤である CCCP (10  $\mu$ M) 添加群を設け、同様にミトコンドリア活性を算出した。

#### (7) cAMP 定量

精子の cAMP 定量は、cAMP EIA システム (GE ヘルスケア、日野市) を用い、添付の説明書に従って行った。すなわち、BisII を含む HBSS に、 $2.0 \times 10^7$  sperm/ml の精子懸濁液を 20%容量加えたのち、39°C で 10 分間インキュベートした (BisII 最終濃度 1  $\mu$ M、最終精子濃度  $4.0 \times 10^6$  sperm/ml)。800  $\times$  g で 3 分間遠心分離したのち、沈澱に付属の可溶化試薬を添加し、4°C で 10 分間激しく攪拌して精子を可溶化した。20,400  $\times$  g、4°C で 5 分間遠心分離したのち、上清を抗ウサギ IgG 抗体固相化プレートに供し、ウサギ抗

cAMP 抗体を添加して 4°C で 2 時間インキュベートした。標準曲線を作成するため、6400 pM cAMP を可溶化試薬で希釈して cAMP 標準液を調製し、同様にプレートに供したのちインキュベートした。cAMP-HRP を加えてさらに 1 時間インキュベートしたのち、溶液を捨て洗浄バッファーで洗浄 4 回洗浄した。洗浄後、テトラメチルベンジジン溶液を加え、攪拌しながら室温で 30 分間インキュベートし発色させた。1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて反応を停止させたのち、マイクロプレートリーダー（テカン、川崎市）を用いて 492nm における吸光度を測定した。cAMP 標準液の吸光度から標準曲線を作成し、標準曲線を用いて精子の cAMP 量を算出した。

#### (8) ATP 定量

射出精子を HBSS に採取し、 $2.0 \times 10^7$  sperm/ml に希釈したのち、BisII を含む HBSS 中に 20%容量加えて 39°C で 10 分間インキュベートした（BisII 最終濃度 1 μM、最終精子濃度  $4.0 \times 10^6$  sperm/ml）。インキュベート後、精子懸濁液 100 μl を 96 穴マイクロプレートに入れ、『細胞の』ATP 測定試薬（東洋ビーネット、大阪市）を等量加え、遮光して 1 分間攪拌したのち 10 分間静置した。標準曲線を作成するため、1 mM ATP (pH 7.35) を HBSS で希釈して ATP 標準液を調製し、同様に『細胞の』ATP 測定試薬を加えてインキュベートした。LAS 500 (GE ヘルスケア) を用いて化学発光を検出したのち、Image J を用いて発光強度を定量化した。ATP 標準液の発光強度から標準曲線を作成し、標準曲線を用いて精子の ATP 量を算出した。

#### (9) 精子ダイニンの抽出およびダイニン ATPase 活性測定

射出精子を HBSS で  $2.0 \times 10^7$  sperm/ml に希釈し、 $800 \times g$  で 3 分間遠心分離したのち、沈澱を等量のアッセイバッファー（120 mM KCl, 10 mM disodium β-glycerophosphate, 1 mM DTT, 1.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 μM CCCP, 10 mM HEPES, pH7.0）で洗浄した。 $800 \times g$  で 3



分間遠心分離し、沈澱を等量の除膜バッファー（0.1% Triton X-100 を含むアッセイバッファー）に懸濁し、ピペッティングにより 2 分間緩やかに攪拌して精子の細胞膜を除去した。10,000 × g で 2 分間遠心分離し、上清を捨て沈澱をアッセイバッファーで洗浄したのち、10,000 × g で 2 分間遠心分離した沈澱を L-乳酸を含むアッセイバッファーに懸濁した。ATP を最終濃度 1 mM になるよう添加し、39°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、氷冷したトリクロロ酢酸を添加して反応を停止させ、モリブデンブルー法により遊離のリン酸を定量した（Tausky and Shorr, 1953）。すなわち、反応液を 96 穴プレートに移し、モリブデン酸アンモニウムおよび硫酸鉄（II）を添加してモリブデンブルーを形成させ、マイクロプレートリーダー（テカン）を用いて 650 nm における吸光度を測定した。標準曲線を作成するため、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 標準液を調整し、モリブデンブルー法により同様に吸光度を測定した。KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 標準液の吸光度から標準曲線を作成し、標準曲線を用いて精子ダイニンの ATPase 活性を算出した。

#### (10) 精子可溶化物の調製

リン酸化 PKC 基質タンパク検出用のサンプルは、トリクロロ酢酸-アセトン沈澱により調製した。すなわち、HBSS に採取した射出精子を  $2.0 \times 10^7$  sperm/ml に希釈し、予温しておいた BisII 溶液 800  $\mu$ l に精子懸濁液を 200  $\mu$ l 加え 39 °C で 10 分間インキュベートした（BisII 最終濃度 1 $\mu$ M、最終精子濃度  $4.0 \times 10^6$  sperm/ml）。インキュベート後、100% トリクロロ酢酸を 100  $\mu$ l 加えて転倒混和し、氷上に 30 分間放置してタンパクを変性させた。20,400 × g、4 °C で 10 分間遠心し、上清を除いて沈澱を氷冷アセトン 500  $\mu$ l で 5 分間洗浄する操作を 2 回繰り返した。洗浄後、20,400 × g、4 °C で 10 分間遠心し、上清を除去した後、遠心エバポレーターでアセトンを完全に留去し沈澱を乾固した。沈澱に 1% SDS を含む 70 mM Tris-HCl (pH 6.8) 50  $\mu$ l を加え、ソニケーターで沈澱を溶解した。可溶化物の一部をタンパク定量に用い、残りの溶液に BPB-glycerol 溶液（0.017% BPB,

29.4% グリセロール)、2-メルカプトエタノールをそれぞれ 1/18 量加え、10 分間ボイルしてジスルフィド結合を切断し、リン酸化 PKC 基質タンパク検出用のサンプルとした。

PKC アイソフォーム検出用のサンプルは、whole-sperm を溶解して調製した。すなわち、1 ml の HBSS に 1 羽分の射出精子を採取し、800 × g で 3 分間遠心分離した。沈澱に 1% SDS を含む 70 mM Tris-HCl (pH 6.8) 200 μl を加えたのち、ソニケーターで沈澱を溶解した。可溶化物の一部をタンパク定量に用い、残りの溶液に BPB-glycerol 溶液を 1/19 量加えて混合し、PKC アイソフォーム検出用のサンプルとした。

#### (11) タンパク定量

タンパク定量は、Micro BCA kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック、マサチューセッツ州) を用いた BCA 法により行った。標準曲線は牛血清アルブミン (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いて作成した。

#### (12) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

5%濃縮ゲルを重層した 12%分離ゲル (8 cm × 9 cm) を作成したのち、ミニスラブ電気泳動装置(アトー、台東区)を用い、Laemmli(1970)の方法に従って 10 μg protein/lane 、20 mA (定電流) で電気泳動を行った。

#### (13) ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは、セミドライブロッティングの装置を用いて行った。7cm × 9cm の PVDF 膜を 100%メタノールにより親水化した後、25 mM Tris、40 mM アミノカプロン酸を含む 20%メタノール(ブロッティング C 液)に浸し 15 分間振盪した。また、同じ大きさのろ紙を、0.3 mM Tris を含む 10%メタノール、(ブロッティング A 液) および 25 mM Tris を含む 10%メタノール (ブロッティング B 液) に浸した。SDS-PAGE

を行ったゲルをブロットニング C 液に浸し、15 分間振盪した後、ブロットニング装置に、陰極側から C 液に浸した 2 枚のろ紙、C 液に浸したゲル、C 液に浸した PVDF 膜、B 液に浸した 2 枚のろ紙、A 液に浸した 2 枚のろ紙の順で重ね、 $0.95 \text{ mA/cm}^2$  で 1 時間通電することによって、ゲル中のタンパクを PVDF 膜に転写した。通電後の PVDF 膜は、0.1% Tween 20 を含む 25 mM Tris-生理食塩水 (TBS-T) で調製した 5% スキムミルク溶液に浸し、室温で 30 分間振盪してブロッキングを行った。

リン酸化 PKC 基質タンパクの検出には、ウサギ抗 PKC リン酸化基質抗体 (セル・シグナリング・テクノロジー) を一次抗体として用いた。5% スキムミルクを含む TBS-T で 1,000 倍に希釈したウサギ抗 PKC リン酸化基質抗体に浸し、室温で 1 時間一次抗体反応を行った。TBS-T で 15 分間振盪する操作を 3 回繰り返すことによって PVDF 膜を洗浄した後、5% スキムミルクを含む TBS-T で 10,000 倍に希釈した HRP-ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (コスモ・バイオ) に浸し、室温で 30 分間二次抗体反応を行った。TBS-T で 5 分間振盪する操作を 3 回繰り返すことによって PVDF 膜を洗浄した後、Luminata Forte Western HRP substrate (メルクミリポア、目黒区) とインキュベートした。化学発光シグナルは LAS500 (GE ヘルスケア) を用いて検出・撮影した。

PKC アイソフォームの検出には、PKC アイソフォームサンプラーキット (セル・シグナリング・テクノロジー) を一次抗体として用いた。5% スキムミルクを含む TBS-T で希釈した抗 PKC アイソフォーム抗体 ( $\alpha$ : 5,000 倍、 $\beta$ : 2,500 倍、 $\gamma$ : 5,000 倍、 $\delta$ : 1,000 倍、 $\epsilon$ : 500 倍、 $\lambda$ : 2,500 倍、 $\theta$ : 250 倍、 $\iota$ : 2,500 倍、 $\mu$ : 1,000 倍、 $\zeta$ : 250 倍) に浸し、室温で 1 時間一次抗体反応を行ったのち、上述の方法と同様にシグナルを検出した。

#### (14) 統計解析

実験群間の統計的な有意差は、分散分析法および Tukey の多重検定法により判定した。精子の運動アッセイを行った実験については、Mann-Whitney の U 検定法により統計的

な有意差を判定した。

### 第三節 結果

#### (1) BisII および BisV が精子の運動に与える影響

PKC の阻害剤である BisII を添加すると濃度依存的に精子の運動性が低下し、1  $\mu\text{M}$  以上で有意に運動が抑制されたが、BisII の不活性アナログである BisV を添加しても、精子の運動性に有意差はみられなかった (Fig. 4-1)。PKA の阻害剤である H89 および PI3K の阻害剤である LY294002 を添加しても、精子の運動性に有意差は認められなかった (Fig. 4-2 および Fig. 4-3)。

#### (2) BisII が精子の細胞生理に与える影響

BisII を 1  $\mu\text{M}$  添加した際の精子の  $\text{pH}_i$ 、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、ミトコンドリア活性、cAMP 量、ATP 量、およびダイニン ATPase 活性を測定したところ、すべての測定項目においてコントロール群との有意な差は検出されなかった (Fig. 4-4)。

#### (3) PKC による精子タンパクのリン酸化

PKC によりリン酸化された精子タンパクを、抗 PKC リン酸化基質抗体により検出した。BisII を添加していない群では約 25 kDa から 85 kDa の位置にスメア上のバンドが検出された (Fig. 4-5)。BisII を添加すると濃度依存的にバンド強度が低下し、27 kDa、28kDa、50 kDa および 85kDa のバンドにおいて、BisII 添加による精子の運動低下と一致するバンド強度の低下がみられた (Fig. 4-1 および Fig. 4-5)。

#### (4) 精子に存在する PKC アイソフォームの同定

10 種の抗 PKC アイソフォーム抗体を用いて精子に含まれる PKC アイソフォームを検出したところ、PKC $\iota$  のレーンに約 30 kDa、PKC $\mu$  のレーンに約 42 kDa のバンドが検出された (Fig. 4-6)。PKC $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\lambda$ 、 $\theta$  および  $\zeta$  のレーンには特異的なバンド

は観察されなかった。

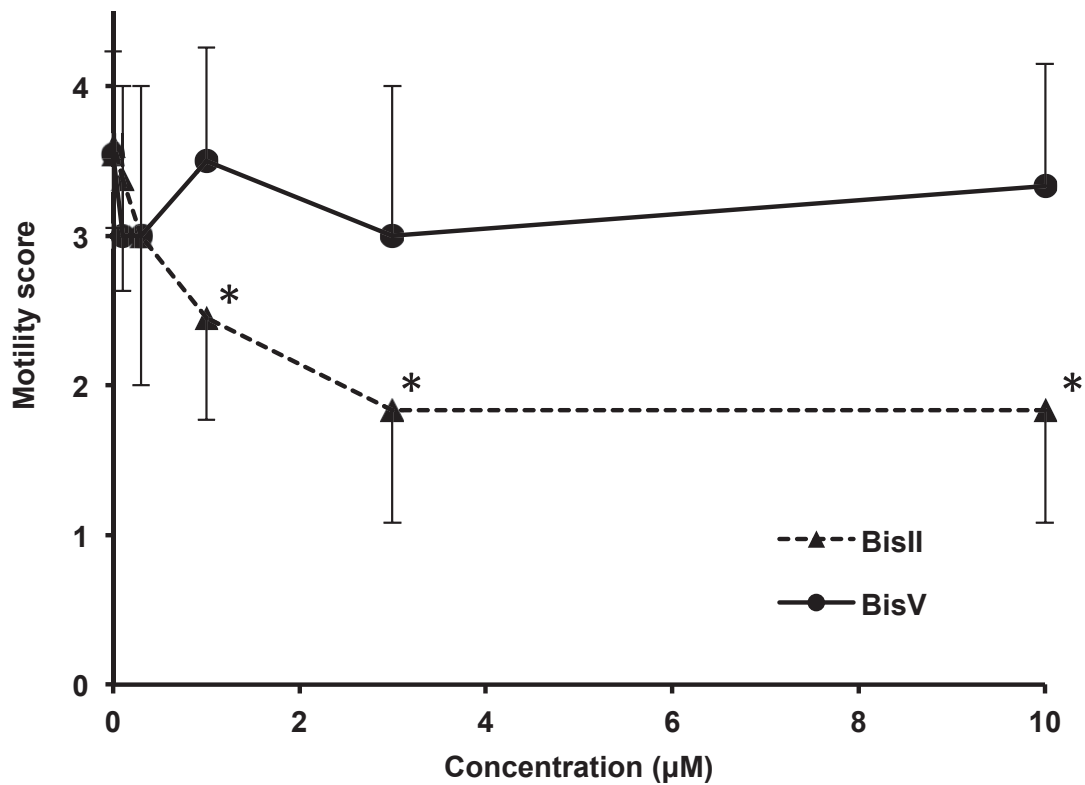


Fig.4-1 BisIIおよびBisVが精子の運動に及ぼす影響

Bisindolylmaleimide II (BisII:  $IC_{50} = 60-90$  nM) または Bisindolylmaleimide V (BisV:  $IC_{50} > 1$  μM) を HBSS に 0, 0.1, 0.3, 1, 3 または 10 μM 添加し、射出精子を最終濃度  $4 \times 10^6$  sperm/ml となるよう加え、39°C でインキュベートした。10分後、実体顕微鏡下で精子の運動性を0~4の5段階で評価した。実験を3回行い、平均値±S.D.で示した。\*: 0 μM群に対して有意差あり(P < 0.05)。

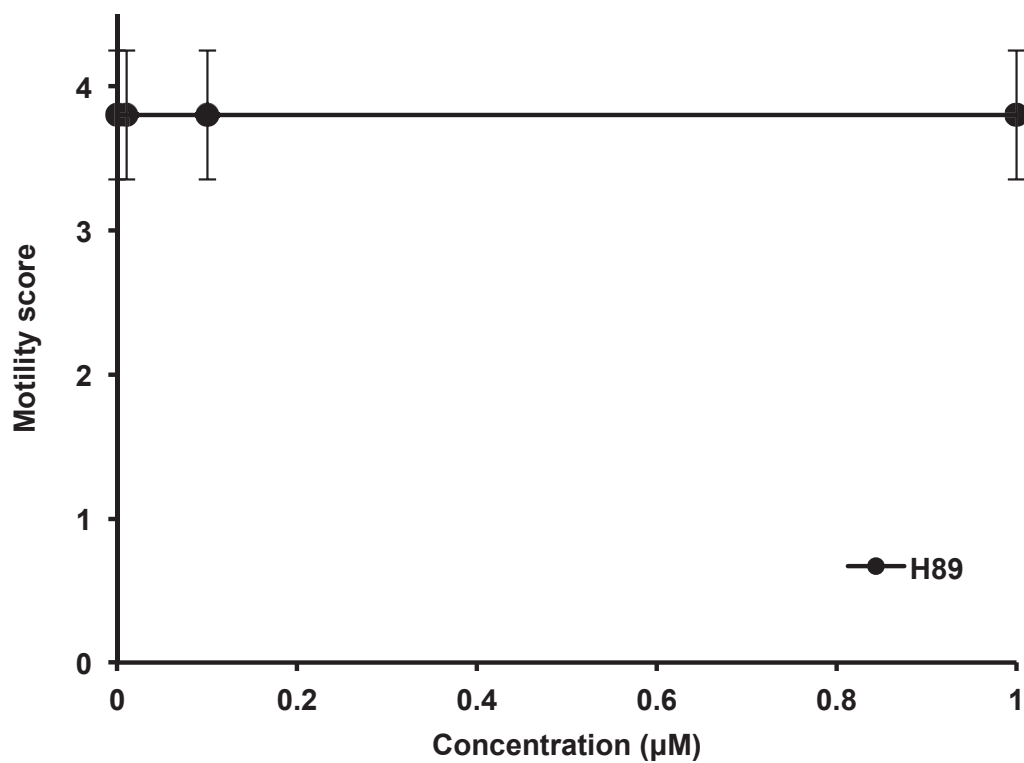


Fig.4-2 H89が精子の運動に及ぼす影響

H-89 ( $IC_{50} = 50 \text{ nM}$ )をHBSSに0, 0.1, 0.3または  $1 \mu\text{M}$ 添加し、射出精子を最終濃度  $4 \times 10^6 \text{ sperm/ml}$  となるよう加え、 $39^\circ\text{C}$ でインキュベートした。10分後、実体顕微鏡下で精子の運動性を0~4の5段階で評価した。実験を3回行い、平均値 $\pm$ S.D.で示した。すべての濃度において、 $0 \mu\text{M}$ 群に対する有意差は検出されなかった。



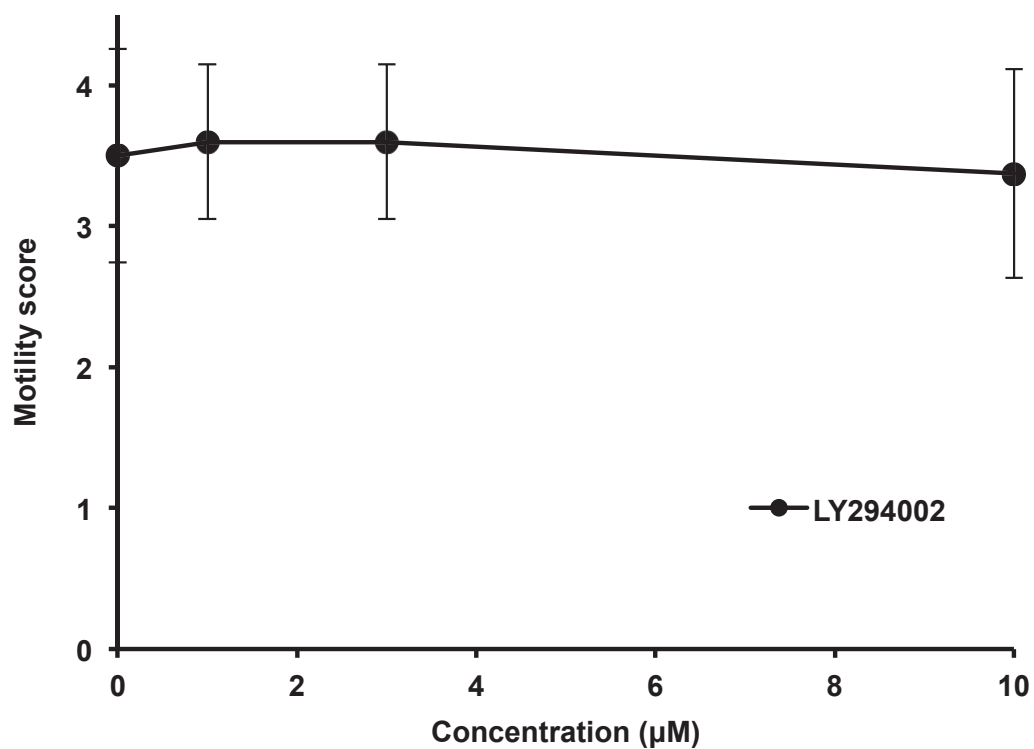


Fig.4-3 LY294002が精子の運動に及ぼす影響

LY294002 ( $IC_{50} = 1.4 \mu\text{M}$ )をHBSSに0, 1, 3または 10  $\mu\text{M}$ 添加し、射出精子を最終濃度 $4 \times 10^6$  sperm/mlとなるよう加え、 $39^\circ\text{C}$ でインキュベートした。10分後、実体顕微鏡下で精子の運動性を0~4の5段階で評価した。実験を3回行い、平均値 $\pm$ S.D.で示した。すべての濃度において、0  $\mu\text{M}$ 群に対する有意差は検出されなかった。

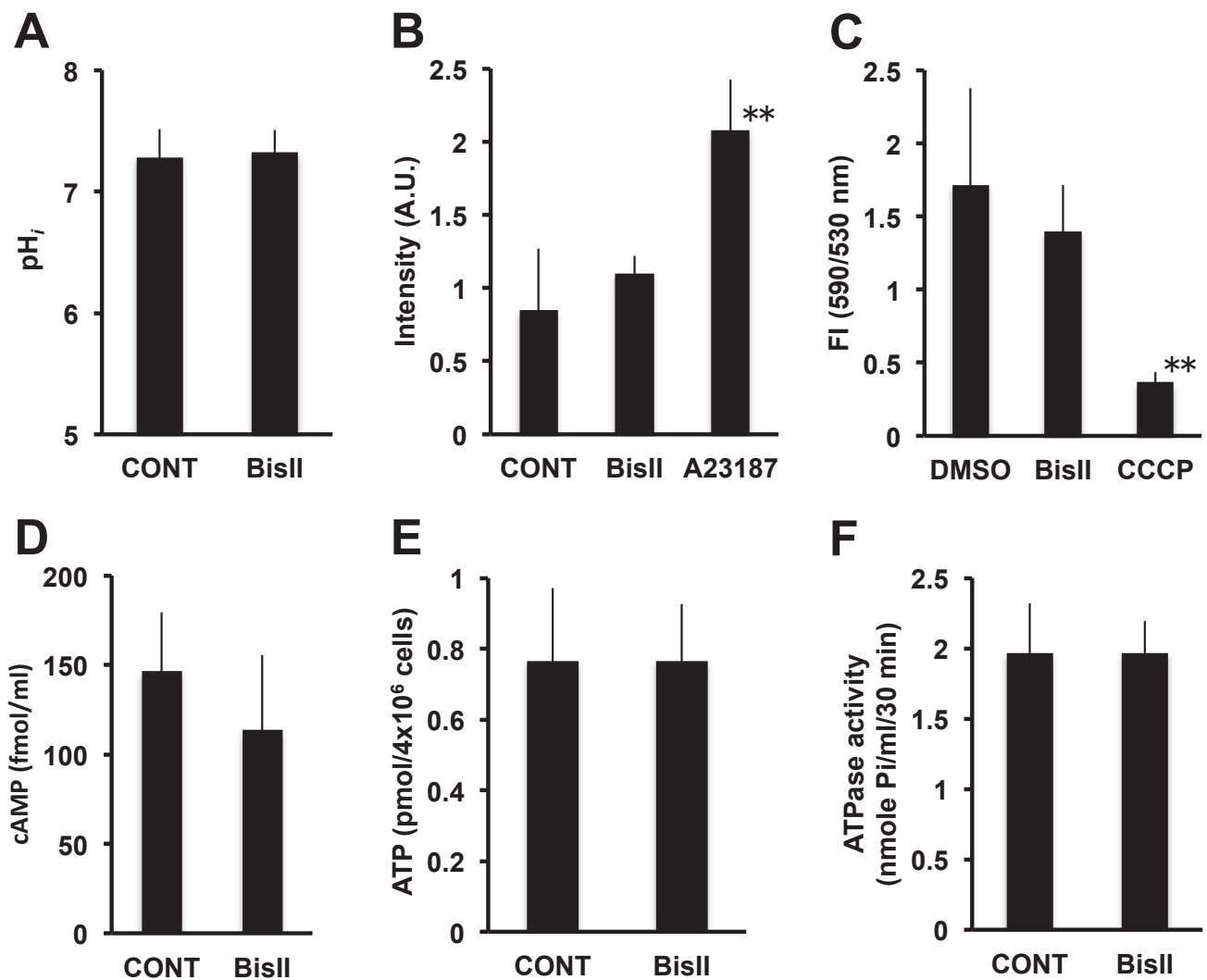
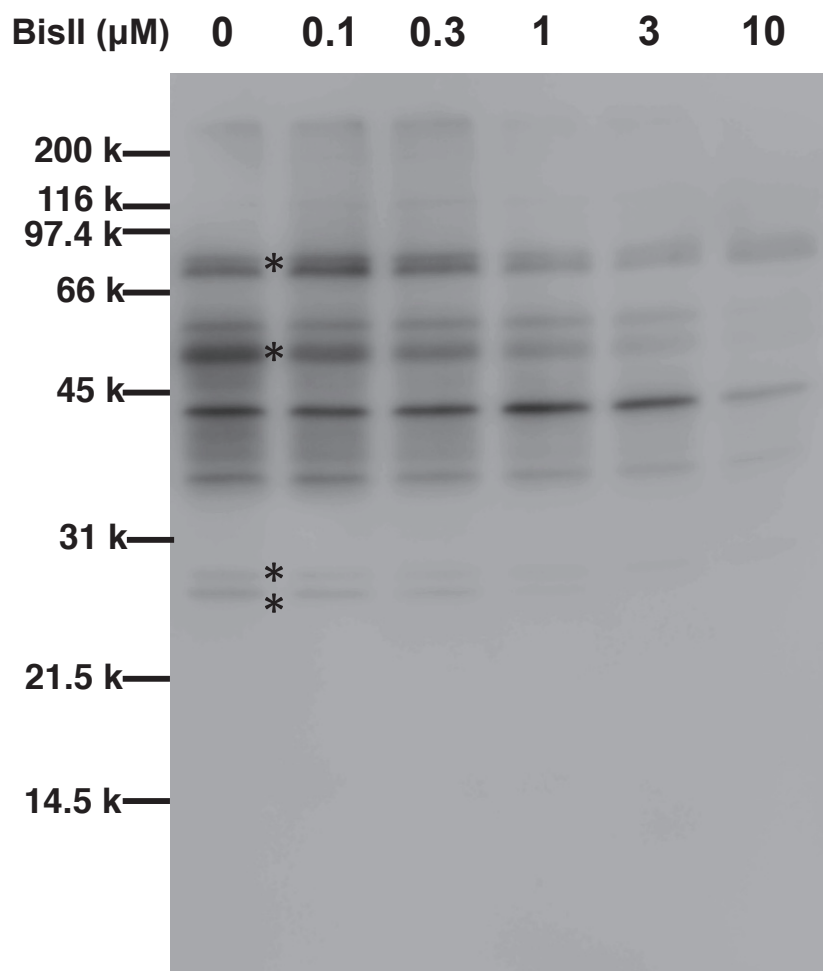


Fig.4-4 BisIIが精子の細胞生理に及ぼす影響

BisIIを含むHBSSに射出精子を最終濃度 $4 \times 10^6$  sperm/mlとなるよう加え (BisII最終濃度 1  $\mu$ M)、39°Cで10分間インキュベートした後、各項目について測定した。実験を3回行い、平均値 $\pm$ S.D.で示した。A: 精子の細胞内pH(pH<sub>i</sub>)を測定した。B: 細胞内カルシウム濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)を測定した。C: 精子のミトコンドリア活性を測定した。D: 精子のcAMP量を測定した。E: 精子のATP量を測定した。F: 精子のダイニンATPase活性を測定した。\*: コントロール群に対して有意差あり(P < 0.01)。すべての測定項目について、BisII添加群とコントロール群の間に有意差は検出されなかった。



**Fig.4-5 PKCによりリン酸化される精子タンパクの検出**

BisIIをHBSSに0, 0.1, 0.3, 1, 3または 10 μM添加し、射出精子を最終濃度 $4 \times 10^6$  sperm/mlとなるよう加え、39°Cで10分間インキュベートしたのち、抗リン酸化PKC基質抗体を用いたウエスタンブロッティングによりPKCを介した精子タンパクのリン酸化を調べた。0 μM 群では約25 kDaから85 kDaの位置にスメア状のバンドが検出された。\*: BisII 1 μM以上でリン酸化が抑制されたタンパクを示した。27 kDa、28kDa、50 kDaおよび85kDaのバンドにおいて、BisII添加による精子の運動低下と一致するバンド強度の低下がみられた。

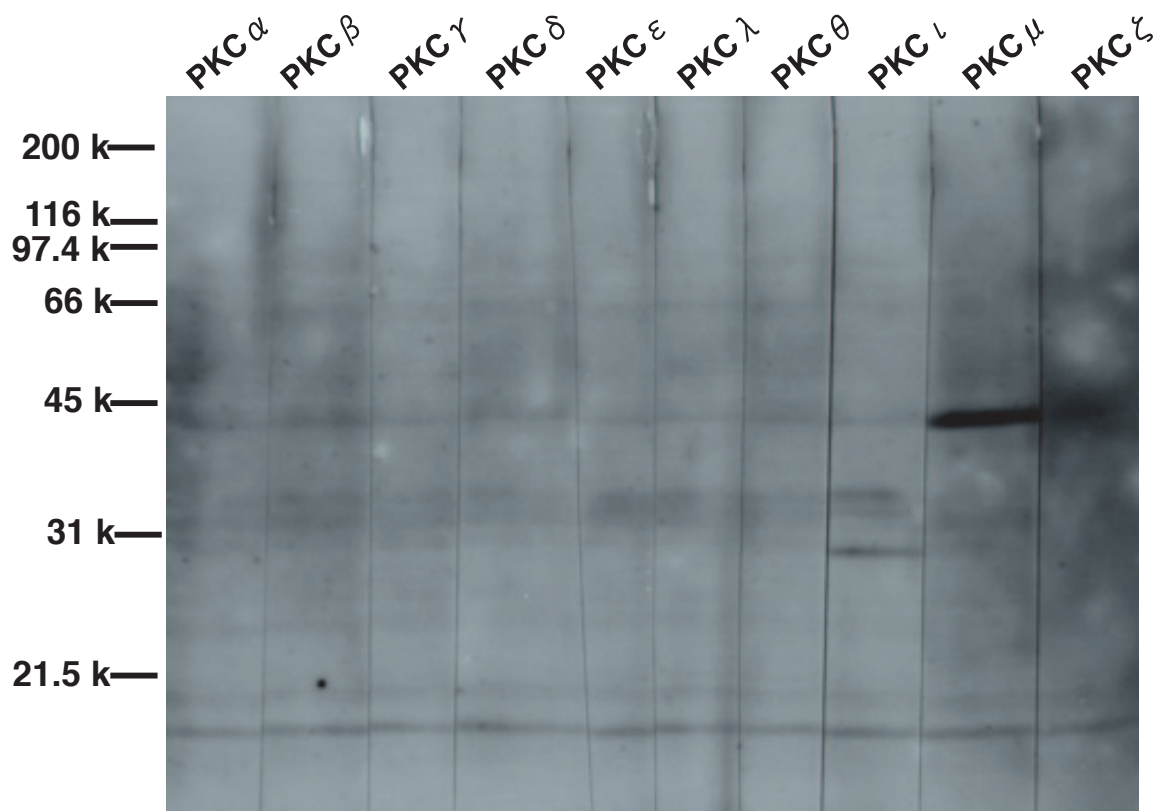


Fig.4-6 ウズラ精子に存在するPKCアイソフォーム

射出精子を可溶化し、抗PKCアイソフォーム抗体を用いたウエスタンブロットティングによりウズラ精子に存在するPKCアイソフォームを調べた。一次抗体は、 $\alpha$ : 5,000倍、 $\beta$ : 2,500倍、 $\gamma$ : 5,000倍、 $\delta$ : 1,000倍、 $\epsilon$ : 500倍、 $\lambda$ : 2,500倍、 $\theta$ : 250倍、 $\iota$ : 2,500倍、 $\mu$ : 1,000倍、 $\zeta$ : 250倍、二次抗体は10,000倍の希釈倍率で抗体反応を行った。PKC $\iota$ のレーンに約30 kDa、PKC $\mu$ のレーンに約42 kDaのバンドが検出された。

#### 第四節 考察

本研究において、PKC の選択的阻害剤である BisII がウズラ精子の運動を抑制することが明らかになった。多くの哺乳類精子や海産動物精子においては、cAMP 依存性 PKA が精子鞭毛の運動制御に関わっていることが報告されている (Si and Okuno, 1995; Nomura *et al.*, 2000)。しかしながら、PKA の阻害剤である H-89 はウズラ精子の運動に影響を与えなかった (Fig. 4-2)。また、cAMP のアナログであり PKA を活性化するジブチリル cAMP を添加した場合にも精子の運動に変化はみられなかった(データは示していない)。加えて、BisII の添加により精子の運動が抑制されているときの cAMP 量は変化しなかった (Fig. 4-4, D)。精子の運動開始や運動調節には多様なプロテインキナーゼおよびホスファターゼが関与していることが知られており、例えばウニの一種では、運動を開始した精子では PKC 基質タンパクを含む複数のタンパクがリン酸化されるが、このタンパクリン酸化には cAMP 依存性キナーゼおよび cAMP 非依存性キナーゼの双方が関わっているとされている (Brokaw, 1987; White *et al.*, 2007)。したがって、ウズラ精子においては、PKA 経路は精子の運動調節に関わる主要な経路ではないと考えられる。Ashizawa *et al.* (2009) は、PI3K の特異的阻害剤である LY294002 がニワトリ精子の運動を阻害することを報告しているが、本研究において、IC<sub>50</sub> 値 (Vlahos *et al.*, 1994) を超える濃度の LY294002 を添加してもウズラ精子の運動は阻害されなかった (Fig. 4-3)。ニワトリ精子では温度依存性の可逆的な運動変化が観察されており (Munro, 1937)、NaCl と緩衝剤から成る単純な組成の塩類溶液中では 40°C で運動を停止するが、30°C では運動が回復すること、Ca<sup>2+</sup>を添加すると 40°C でも運動を再開することが報告されている (Ashizawa *et al.*, 1994a)。一方、ウズラ精子ではこのような温度依存性の不動化現象はみられない (Wishart and Wilson, 1999)。これらのことから、精子の運動制御に関わるシグナル伝達経路はニワトリとウズラで大きく異なることが明らかになった。

第二章および第三章において、SST 内腔の乳酸が貯蔵精子の細胞内を酸性化すること

によりダイニン ATPase 活性を低下させ運動を抑制していることを示した。一方、BisII による精子の運動抑制には  $pH_i$  やダイニン ATPase 活性は関与していなかった (Fig. 4-4, A および F)。すなわち、BisII と乳酸とでは、運動抑制が生じるシグナル伝達が異なっていることが明らかになった。精子への BisII 処理が引き起こす細胞生理の変化を調べたが、 $[Ca^{2+}]_i$ 、cAMP 量、ATP 量およびミトコンドリア活性にはいずれも影響がみられず (Fig. 4-4)、これらの測定項目は BisII による運動抑制に関連していないことが示唆された。一般に、今回測定を行った項目は精子の運動性に関与することが知られている。例えばカタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) においては、sperm-activating and -attracting factor (SAAF) が精子の細胞内へ  $Ca^{2+}$  を流入させ膜の過分極を引き起こし、これがアデニル酸シクラーゼを活性化することにより cAMP 濃度が上昇する (Nomura *et al.*, 2004)。また、SAAF の添加により一過性の細胞内 cAMP 濃度上昇が生じ、続いてダイニンサブユニットが cAMP 依存的にリン酸化される (Shiba and Inaba, 2014; Nomura *et al.*, 2000)。したがって、カタユウレイボヤの精子においては cAMP が SAAF による運動の活性化に重要である。ウニにおいては、ミトコンドリアにおける好気呼吸量は運動性と相関することが報告されている (Tombes and Shapiro, 1985)。また、heat shock protein 70 はウズラ精子の運動を活性化するとともに、 $[Ca^{2+}]_i$  および ATP 量を増加させることが報告されている (Hiyama *et al.*, 2013)。これらの細胞生理に関わる項目が BisII 存在下で変化しないにもかかわらず、PKC 基質タンパクのリン酸化が阻害されたことは特筆すべき点である (Fig. 4-5)。ウニにおいては、PKC を介した 200 kDa、100 kDa、65 kDa および 28 kDa タンパクのリン酸化が精子の運動活性化に関わっている可能性が示唆されている (White *et al.*, 2007)。また、PKC の基質となるタンパクが、ニワトリ精子においては先体反応を誘起すること、ウシ精子においてはハイパーアクチベーションを誘導することがそれぞれ報告されている (Ashizawa *et al.*, 2006; Harayama and Miyake, 2006)。本研究では、BisII による精子の運動抑制と一致するタンパクリン酸化パターンの変化が認

められ (Fig. 4-1 および Fig. 4-5)、これらのリン酸化タンパクがウズラ精子において運動を制御する可能性が示唆されたが、運動制御に関わるタンパクを解明するには至らなかった。ウズラ精子における運動制御の全貌を理解するためには、これらのタンパクの同定および機能解明が待たれる。

ウエスタンブロッティングの結果から、ウズラ精子には PKC $\iota$ および PKC $\mu$ が存在することが明らかになり (Fig. 4-6)、PKC $\iota$ または PKC $\mu$  (もしくは双方) がウズラ精子の運動を制御していることが示唆された。PKC には 10 種以上のアイソフォームが存在し、その構造および性質の違いから、典型 (conventional PKC; cPKC)、新型 (novel PKC; nPKC) および非典型 (atypical PKC; aPKC) の 3 種に分類される (Mellor and Parker, 1998)。cPKC には  $\alpha$ 、 $\beta$ I、 $\beta$ II および  $\gamma$  が属し、Ca<sup>2+</sup>、ジアシルグリセロールおよびホスファチジルセリン依存性；nPKC には  $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\eta$  および  $\theta$  が属し、ジアシルグリセロールおよびホスファチジルセリン依存性且つ Ca<sup>2+</sup>非依存性；aPKC には  $\iota$  および  $\zeta$  が属し、ホスファチジルセリン依存性且つ Ca<sup>2+</sup>およびジアシルグリセロール非依存性である (Corbalán-García and Gómez-Fernández, 2006)。また、PKC $\mu$ はヒトの細胞から同定されたプロテインキナーゼで、その特徴的な構造から近年においてはプロテインキナーゼ D (PKD) とも呼称されている (Wang, 2006)。直接的な証拠は得られなかったが、予備的な実験において、PKC のジアシルグリセロール結合部位に結合し活性化する作用を有するホルボールエステルを BisII 存在下で精子に作用させても運動を回復しなかったことから、ウズラ精子の運動には aPKC が関与している可能性が示唆された (データは示していない)。加えて、BisII による精子の運動抑制と [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の変化が一致しなかったことも、aPKC である PKC $\iota$  が関わっているという仮説を支持している (Fig. 4-4, B)。しかしながら、PKC $\mu$ はジアシルグリセロールおよび nPKC により活性化されることが知られているため (Wang, 2006)、PKC $\mu$ は精子の運動制御に関与していない、もしくはウズラ精子の PKC $\mu$ は哺乳類のそれとは異なる制御機構を有していることが推察された。

本研究により、PKC 経路がウズラ精子の運動制御に関与していることが示唆され、PKCによる精子タンパクのリン酸化が鞭毛運動の調節に必要である可能性が示された。BisIIによる精子の運動抑制はSST貯蔵精子の乳酸による運動抑制とは異っており、ウズラ精子におけるPKCを介した運動制御の生理的意義については、解明のためにさらなる調査が必要であると考えられる。



## 第五節 小括

動物において、精子の運動は受精を成立させるために必須である。鳥類では、受精に先立って射出精子が SST に侵入し、運動を低下させることが知られている。前章では、SST における精子の運動抑制は、乳酸による細胞内の酸性化がダイニン ATPase 活性の低下を引き起こすことに起因することを明らかにした。しかしながら、ウズラ精子の運動抑制を誘導する細胞内シグナル伝達経路は明らかになっていなかった。本章では、*in vitro* で精子の運動を制御するシグナル伝達におけるプロテインキナーゼの役割について考察した。PKC 阻害剤である BisII を添加すると、精子の運動性が濃度依存的に低下したが、BisII の不活性アナログである BisV、PKA 阻害剤の H-89 および PI3K 阻害剤の LY294002 を添加しても精子の運動抑制はみられなかった。BisII の添加は精子の  $\text{pH}_i$ 、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、ミトコンドリア活性、cAMP 濃度、ATP 濃度およびダイニン ATPase 活性には影響を及ぼさなかった。ウエスタンブロッティングにより精子可溶化物からリン酸化 PKC 基質タンパクが検出され、BisII の添加によりこれらのタンパクのリン酸化は阻害された。さらに、精子可溶化物からは PKC $\iota$  および PKC $\mu$  が検出された。これらの結果から、PKC 経路がウズラ精子の運動制御に関わっており、PKC によるタンパクリン酸化が鞭毛運動の調節に必要であることが示唆された。

## 第五章 総括

鳥類では、精子貯蔵管と呼ばれる管状の構造において貯精が行われる。受精を成功させるには、適切な時間に輸卵管を通過し受精の場にたどり着くことが鳥類においては特に重要であると考えられ、鳥類の受精においては、貯精は必須の過程であるとされる。鳥類における貯精は、SST への侵入、SST 内での貯蔵、SST からの放出という 3 つの段階から成り立っている。本研究では、ウズラを用いて、SST で貯蔵されている精子が運動を停止するメカニズムを解明し、精子の運動制御を司るしくみを考察した。

精子は膣部に射精されたのち運動を開始し、交尾 1 時間後にごく少数の精子のみが SST へ侵入する (Bakst *et al.*, 1994)。SST へ侵入した精子は運動を停止し、受精までの間貯蔵されることが知られていたが、本研究において、SST 管腔における乳酸蓄積による細胞内 pH の酸性化が、SST における精子の運動抑制に重要な役割を果たしていることが明らかになった。一般に、乳酸は哺乳類の膣に多量に存在し、膣内の pH を酸性に保っている。例えばヒトでは、膣内細菌叢が乳酸を産生することにより膣内が pH 3.5 前後に維持されており、膣内を酸性に保つことで病原菌の感染を防いでいるとされている (O'Hanlon *et al.*, 2013)。一方、本研究により、乳酸は鳥類においては精子の運動を調節するはたらきを有していることが示された。これは、動物の生殖における調節因子という、新たな乳酸の生理機能を示唆するものである。乳酸以外の有機酸や HCl の添加によっても精子の運動抑制が誘導されたことから、SST 内腔の pH が低くなっていることが精子の運動抑制に重要であることがわかった。SST 上皮細胞では低酸素条件下で多量の乳酸が放出されるため、精子の運動抑制には必然的に乳酸が利用されると考えられる。本研究の結果からは、 $\text{pH}_e$  の低下に伴い、おそらくは細胞外のプロトンが未知のプロトントランスポーターやチャネルを介して細胞膜を通過することで、 $\text{pH}_i$  の酸性化が引き起こされることが示唆された。ヤリイカ (*Loligo bleekeri*) の精子においては、細胞

外  $H^+$ 濃度が低下するとともに $[pH]_i$ が低下し、 $[pH]_i$ が  $Ca^{2+}$ チャネルの開閉を調節することにより運動が変化することが示唆されている (Hirohashi *et al.*, 2013)。直接的な証拠は得られなかったが、リンゴ酸やクエン酸等の多価カルボン酸イオンも精子の運動を抑制したことから、MCT は  $pH_i$ の酸性化には関与していないことが推測された。プロトンの輸送に関わるトランスポーターやイオンチャネルの同定は、今後の研究が待たれる。

SST 内腔では、精子は運動を停止しており (Bakst, 1987; Bakst and Richards, 1985)、代謝を抑制することで ATP 消費を防いでいる。これは、精子の呼吸により産生される活性酸素を減少させることから、精子の生存に有利にはたらく。精子の運動を抑制する類似のメカニズムが、哺乳類の精巣上体で見られる。精巣上体に特殊な上皮細胞が存在し、管腔側に局在する液胞プロトンポンプにより管腔を酸性化することで、精巣上体に貯蔵されている精子の運動を抑えている (Breton *et al.*, 1996)。すなわち、 $pH_e$ の低下は精子の運動抑制に対して普遍的な役割を担っていると考えられる。しかしながら、ニワトリにおいては、外側への SST 分泌液の流れが生じており、精子はその流れに逆らって内向き鞭毛運動を行うことにより SST 内腔にとどまっているというモデルが提案されている (Froman, 2003)。このモデルにおいては、SST からの精子の放出は、ミトコンドリアのエネルギー供給が不足することにより精子の運動速度が低下した結果であると考えられている。一方で、プロゲステロン注射後 1 時間で SST が収縮様の構造変化を起こし大部分の貯蔵精子が放出されることから、ウズラにおいてはプロゲステロンの刺激により SST に貯蔵された精子が放出されることが明らかになっている (Ito *et al.*, 2011)。このように、ニワトリとウズラにおける SST 貯蔵メカニズムは必ずしも一致しない。卵管中の精子を観察した Bobr *et al.* (1964) は、貯蔵精子は SST 排卵および放卵時間の付近で SST から排出されることを報告している。これらのことから、SST からの精子の放出は、ニワトリにおいてはホルモンによって制御されていると推測される。第四章において、ウズラ精子には PKC が存在し、PKC による精子タンパクのリン酸化

が精子の運動を活性化することが明らかになった。しかしながら、ニワトリ精子においては、PKCによるタンパクリン酸化は運動を抑制することが報告されている (Ashizawa *et al.*, 1994, Ashizawa *et al.*, 2006)。また、PI3Kを阻害することによりニワトリ精子の運動が抑制されることが報告されているが (Ashizawa *et al.*, 2009)、ウズラ精子ではPI3Kは精子の運動に関与していなかった。ニワトリ精子では温度依存性の可逆的な運動変化が観察されているが (Munro, 1937)、同条件のウズラ精子ではこのような温度依存性の不動化現象はみられず、5 mM以上のCa<sup>2+</sup>により運動が阻害されるなど、ニワトリ精子とは異なる点がみられる (Wishart and Wilson, 1999)。これらのことから、精子の運動制御に関わるシグナル伝達経路はニワトリとウズラで大きく異なっていることが示された。ニワトリとウズラは同じキジ目キジ科 (Galliformes, Phasianidae) に属しているが、このように異なる繁殖制御の分子メカニズムを有する原因としては、種内における精子競争の違いが挙げられる。精子競争とは、メスの卵管内において別個体由来の精子間で生じる競争である。1羽のメスに対して交尾するオスが多いほど、オスは自分の遺伝子を残せる確率が減少するため、他の個体の精子よりも受精成功率を上げるために進化すると考えられる。一般には、精子競争が激しいほど体重に対する精巢の比率が上がる、射出精子数が多くなる、精子が大きくなる、精子のミトコンドリア数が多くなる等の方向性に進化するとされている。SST内での貯蔵メカニズムが一致しないのは、精子競争により独自に進化した精子の運動制御機構の違いに起因すると考えられる。

第三章において、SST内腔の乳酸が貯蔵精子の細胞内を酸性化することによりダイニンATPase活性を低下させ運動を抑制していることを示した。一方、PKCの阻害による精子の運動抑制には、ダイニンATPase活性は関与していなかった。すなわち、BisIIと乳酸とでは、運動抑制が生じるシグナル伝達が異なっていることが示唆された。PKCにより精子の運動が制御されるステップとしては、輸精管における運動抑制や、射出後の運動活性化、SSTから放出された後の運動活性化などが考えられる。ウズラ精子にお

ける PKC を介した運動制御の生理的意義については、解明のためさらなる調査が必要であると考えられる。

本研究では、SST で貯蔵されている精子が運動を停止するメカニズムを明らかにしたが、SST に貯蔵されている精子がなぜ受精能を維持できるのかという謎は解明できなかった。SST は低酸素になっており多量の乳酸が蓄積していることから、乳酸を含むメディアウムに精子を懸濁し、41.5°C、低酸素条件下で 5 日間インキュベートする実験を行った。その結果、乳酸不含、41.5°C、通常酸素分圧下でインキュベートした精子と比較して形態が保たれていたものの、精子は運動性を失っており、人工授精を行っても受精卵は得られなかった（データは示していない）。すなわち、低酸素かつ酸性のメディアウム中では精子の運動が抑制されるが、体温付近における精子の受精能維持には不十分であることが予想された。Ashizawa *et al.* (1976) は、卵管漏斗部由来の細胞と 4 日間共培養したニワトリ精子は受精能を有するが、SST が存在しない子宮部由来の細胞と共培養しても同様の結果が得られることを報告している。共培養する細胞が腎臓や骨格筋由来であっても、4 日間は精子の受精能を保持することができる (Ashizawa and Nishiyama, 1977)。しかしながら、トリプシン処理による細胞の解離を行わない場合、漏斗部または UVJ の組織片と共培養した精子は、SST が存在しない部位と共培養した精子よりも、はるかに長い期間 (11 日から 12 日間) 受精能を維持できることが明らかになっている (Ashizawa and Nishiyama, 1983)。したがって、精子の受精能を維持するしくみとしては、SST の構造依存的に精子維持活性因子が分泌される、あるいは SST の構造そのものが精子の維持に必要であるといった仮説が考えられる。Bréque *et al.* (2003) は、SST 内の環境はおよそ 3 つの条件を満たすとしている；(1) 精子が生存するのに十分な代謝基質を供給できる、(2) 精子の代謝により生じた毒性の生成物を無毒化できる、(3) 脂質の過酸化反応を抑制し、精子の細胞膜を過酸化化物から防護できる。(1) に関しては、SST 上皮細胞にはグリコーゲン顆粒および脂肪滴が存在することが知られており

(Gilbert *et al.*, 1968; Tingari and Lake, 1973)、基質は SST 上皮細胞に十分量存在していると考えられる。卵管各部位の抽出物と精子をインキュベートすると、膨大部および峡部の抽出物はグルコース取り込みを抑制するが、漏斗部の抽出物とインキュベートした精子はグルコースの取り込みが促進されることが報告されている (Howarth and Huston, 1974)。このことは、鳥類精子は周囲の環境に応じて代謝を切り替え、基質を選択していることを示唆している。SST 上皮細胞にはグリコーゲンが多量に存在することから、SST 内の精子はグルコースを基質として利用する可能性が高いが、直接的な証拠は得られていない。また、近年、ニワトリ SST にはミリスチン酸 (C14)、パルミチン酸 (C16)、ステアリン酸 (C18)、オレイン酸 (C18:1n9) およびリノレン酸 (C18:2n6) の 5 種が主要な脂肪酸として存在し、オレイン酸およびリノレン酸を添加した培地中では精子の生存率が増加することが報告されている (Huang *et al.*, 2016)。脂肪酸は細胞膜の材料となり、代謝基質としても用いられることから、長期間にわたる精子の維持には特に重要であると考えられる。しかしながら、(2) および (3) のような、精子にとって有害な物質から精子を防護するしくみを考察できる知見は限られているが、シチメンチョウ SST の電子顕微鏡観察により、SST 管腔の細胞膜が断片化して小胞を形成し、貯蔵精子の細胞膜と融合する様子が観察されている (Bakst and Bauchan, 2015)。SST 上皮からの分泌物が精子の基質供給、解毒、酸化ストレスの除去などに寄与する可能性は十分に考えられ、SST における貯蔵精子の維持にはたらいっていると推察される。

SST の構造の物理的な特性が精子の貯蔵に関与している可能性も推察される。ニワトリでは、SST に貯蔵されている精子は頭部同士で凝集していることが報告されている (Van Krey, 1981; Froman and Engel, 1989)。ウズラにおいても、SST 貯蔵精子の大部分が向きを揃えて束状に凝集しており、凝集していない精子はほとんどみられない (Ito *et al.*, 2011)。精子が SST へ侵入することにより精子密度が高まり、且つ精子の向きが一致することが、このような精子の凝集構造を形成する一因になっていると考えられる。

このようにして精子が貯蔵されている様子は他の家禽においてもみられるため (Bakst, 1987; Bakst and Richards, 1985; Bakst *et al.*, 1994; Ito *et al.*, 2011)、この特徴的な精子の凝集が生体内における精子の長期貯蔵の主要因であると予想される。アリの一種 *Cataglyphis savignyi* では、精子の頭部同士が凝集し、頭部先端にキャップ状の構造を有する集合体を形成する。この精子集合体は、単独の精子と比較して約 50%速く運動することができるという (Pearcy *et al.*, 2014)。家禽においても、集合体を形成することが精子にとって有利にはたらく可能性が推察される。

現段階では、貯精のプロセスに関する知見は限られている。例えば、主な未解決の問題としては、「射出された精子はどのようにして SST へと侵入するのか」、「どんな分子が精子同士の凝集に関わっているのか」、「精子の凝集を解除する刺激は何か」などが挙げられる。鳥類の精子貯蔵システムにおける分子メカニズムの理解は、室温や体温付近での新たな精子貯蔵法の開発に対する知見を与えることができ、これは人工授精や体外受精などの生殖医療の発展を支える有益な証拠となる可能性がある。鳥類の貯精メカニズムにおける未解決問題の解明については、今後の研究が待たれる。



## 謝辞

本研究の遂行および本論文の取りまとめに際し、静岡大学准教授 笹浪知宏先生には終始熱心なご指導を賜りました。心より感謝いたします。また、種々のご指導を賜りました静岡大学教授 高坂哲也先生、ならびに岐阜大学教授 岩澤淳先生に謹んで感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、NMR 測定および解析にご協力いただきました静岡大学准教授 大西利幸先生、同技術職員 八木昭仁さん、ミトコンドリア活性測定、細胞内 pH 測定および細胞内カルシウム測定にご協力いただきました筑波大学教授 稲葉一男先生、同助教 柴小菊先生、乳酸定量にご協力いただきました島根大学教授 広橋教貴先生、レーザーマイクロダイセクションにご協力いただきました名古屋大学特任講師 佐藤良勝先生、*in situ* ハイブリダイゼーションにご協力いただきました名古屋大学教授 吉村崇先生、ネッパジーン株式会社 渥美優介博士、RNA-Seq 解析にご協力いただきました静岡大学准教授 道羅英夫先生、宇都宮大学准教授 鈴木智大先生、種々のご助言を賜りました富山大学特任助教 水島秀成先生、福島県立医科大学助教 檜山源先生、静岡大学技術職員 市川佳伸さんに深く感謝いたします。また、本研究に多大なご協力をいただいた本研究室の皆様に感謝いたします。

最後に、いつも支えてくれた父、母、姉に心から感謝します。



## 引用文献

- Acott, T. S. and Carr, D. W. (1984). Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. *Biol. Reprod.* 30(4): 926-935.
- Ashizawa, K., Nishiyama, H. and Nagae, T. (1976). Effects of oviducal cells on the survival and fertilizing ability of fowl spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 47: 305-311.
- Ashizawa, K. and Nishiyama, H. (1977). Effects of various cultured cells on the survival and fertilizing ability of fowl spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 49: 405-407.
- Ashizawa, K. and Nishiyama, H. (1983). Prolonged survival of fowl spermatozoa in the oviducal tissues in organ culture. *Br. Poult. Sci.* 24(1): 27-32.
- Ashizawa, K., Tomonaga, H. and Tsuzuki Y. (1994a). Regulation of flagellar motility of fowl spermatozoa: evidence for the involvement of intracellular free  $Ca^{2+}$  and calmodulin. *J. Reprod. Fertil.* 101(2): 265-272.
- Ashizawa, K., Katayama, S., Kobayashi, T. and Tsuzuki, Y. (1994b). Possible role of protein kinase C in regulation of flagellar motility and intracellular free  $Ca^{2+}$  concentration of fowl spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 101(3): 511-517.
- Ashizawa, K., Wishart, G. J., Katayama, S., Takano, D., Ranasinghe, A. R., Narumi, K. and Tsuzuki, Y. (2006). Regulation of acrosome reaction of fowl spermatozoa: evidence for the involvement of protein kinase C and protein phosphatase-type 1 and/or -type 2A. *Reproduction* 131(6): 1017-1024.
- Ashizawa, K., Omura, Y., Katayama, S., Tatemoto, H., Narumi, K. and Tsuzuki, Y. (2009). Intracellular signal transduction pathways in the regulation of fowl sperm motility: evidence for the involvement of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) cascade. *Mol. Reprod. Dev.* 76(7): 603-610.

- Bakst, M. R. and Richards, M. P. (1985). Concentrations of selected cations in turkey serum and oviductal mucosae. *Poult. Sci.* 64: 555-563.
- Bakst, M. R. (1987). Anatomical basis of sperm-storage in the avian oviduct. *Scanning Microsc.* 1: 1257-1266
- Bakst, M. R. (1992). Observations on the turkey oviductal sperm-storage tubule using differential interference contrast microscopy. *J. Reprod. Fertil.* 95(3): 877-883.
- Bakst, M. R. (1994). Fate of fluorescent stained sperm following insemination: new light on oviductal sperm transport and storage in the turkey. *Biol. Reprod.* 50(5): 987-992.
- Bakst, M. R., Wishart, G. and Brullard, J. P. (1994) Oviductal sperm selection, transport, and storage in poultry. *Poult. Sci. Rev.* 5: 117-143.
- Bakst, M. R. (2011). Role of the oviduct in maintaining sustained fertility in hens. *J. Anim. Sci.* 89: 1323-1329.
- Bakst, M. and Bauchan, G. Apical blebs on sperm storage tubules epithelial cell microvilli: Their release and interaction with resident sperm in the turkey hen oviduct. *Theriogenology* 83, 1438–1444 (2015).
- Birkhead, T. R. (1993). Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds and mammals. *Biol. J. of Linnean Soc.* 50: 295-311.
- Birkhead, T. R. and Møller, A. P. (1992). Numbers and size of sperm storage tubules and the duration of sperm storage in birds: a comparative study. *Biol. J. Linnean Soc.* 45(4): 363-372
- Birkhead, T. R. and Møller, A. P. (1993). Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds and mammals. *Biol. J. Linnean Soc.* 50: 295-311.
- Bobr, L. W., Lorenz, F. W. and Ogasawara, F. X. (1964). Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic birds. I. Residence sites of spermatozoa in fowl oviducts. *J.*

*Reprod. Fertil.* 8: 39-47.

den Boer, S. P., Baer, B., Dreier, S., Aron, S., Nash, D. R. and Boomsma, J. J. (2009). Prudent sperm use by leaf-cutter ant queens. *Proc. Biol. Sci.* 276(1675): 3945-3953.

Breton, S., Smith, P. J., Lui, B. and Brown, D. (1996). Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H<sup>+</sup>)-ATPase. *Nat. Med.* 2: 470-472.

Brillard, J. P. (1993). Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination. *Poult. Sci.* 72: 923-928 .

Brokaw, C. J. (1987). Regulation of sperm flagellar motility by calcium and cAMP-dependent phosphorylation. *J. Cell. Biochem.* 35(3): 175-184.

Brown, J. L. (2011). Female reproductive cycles of wild female felids. *Anim. Reprod. Sci.* 124: 155-162.

Bréque, C., Surai, P. and Brillard, J. P. (2003). Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 66(3): 314-323.

Burke, W. H., Ogasawara, F. X. and Fuqua, C. L. (1972). A study of the ultrastructure of the uterovaginal sperm-storage glands of the hen, *Gallus domesticus*, in relation to a mechanism for the release of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 29(1): 29-36.

Carr, D. W. and Acott, T. S. (1984). Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: I. Studies of a sperm motility quiescence factor. *Biol. Reprod.* 30(4): 913-925.

Cherr, G. N., Morisawa, M., Vines, C. A., Yoshida, K., Smith, E. H., Matsubara, T., Pillai, M. C., Griffin, F. J. and Yanagimachi, R. (2008). Two egg-derived molecules in sperm motility initiation and fertilization in the Pacific herring (*Clupea pallasii*). *Int. J. Dev. Biol.* 52(5-6): 743-752.

Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito, K., Toshioka, T. and Hidaka, H. (1990). Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein

phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* 265(9): 5267-5272.

Christen, R., Schackmann, R. W. and Shapiro, B. M. (1982). Elevation of the intracellular pH activates respiration and motility of sperm of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *J. Biol. Chem.* 257(24): 14881-14890.

Christensen, V. L. and Bagley, L. G. (1989). Efficacy of fertilization in artificially inseminated turkey hens. *Poult. Sci.* 68: 724-729.

Corbalán-García, S. and Gómez-Fernández, J. C. (2006). Protein kinase C regulatory domains: the art of decoding many different signals in membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1761(7): 633-654.

Dal Bosco, A., Rebollar, P. G., Boiti, C., Zerani, M. and Castellini, C. (2011). Ovulation induction in rabbit does: current knowledge and perspectives. *Anim. Reprod. Sci.* 129: 106-117.

Das, S. C., Isobe, N., Nishibori, M. and Yoshimura, Y. (2006). Expression of TGF $\beta$  -isoforms and their receptors in utero-vaginal junction of hen oviduct in presence or absence of resident sperm with reference to sperm storage. *Reproduction.* 132(5): 781-790.

Dimmer, K. S., Friedrich, B., Lang, F., Deitmer, J. W. and Bröer, S. (2000). The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem. J.* 350: 19-27.

van Drimmelen, G. C. (1949). Structure of the sperm-nests in the oviduct of the domestic hen. *Nature.* 163(4155): 950.

Finseth, F. R. and Harrison, R. G. (2014). A comparison of next generation sequencing technologies for transcriptome assembly and utility for RNA-Seq in a non-model bird. *PLoS One* 9: e108550.

- Foye-Jackson, O. T., Long, J. A., Bakst, M. R., Blomberg, L. A., Akuffo, V. G., Silva, M.V., Guthrie, H. D. and McMurtry, J. P. (2011). Oviductal expression of avidin, avidin-related protein-2, and progesterone receptor in turkey hens in relation to sperm storage: effects of oviduct tissue type, sperm presence, and turkey line. *Poult. Sci.* 90(7): 1539-1547.
- Freedman, S. L., Akuffo, V. G. and Bakst, M. R. (2001). Evidence for the innervation of sperm storage tubules in the oviduct of the turkey (*Meleagris gallopavo*). *Reproduction.* 121(5): 809-814.
- Froman, D. P. and Engel, H. N. (1989). Alteration of the spermatozonal glycocalyx and its effect on duration of fertility in the fowl (*Gallus domesticus*). *Biol. Reprod.* 40: 615-621.
- Froman, D. P. (2003). Deduction of a model for sperm storage in the oviduct of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biol. Reprod.* 69: 248-253.
- Froman, D. P. and Feltmann, A. J. (2005). Fowl (*Gallus domesticus*) sperm motility depends upon mitochondrial calcium cycling driven by extracellular sodium. *Biol. Reprod.* 72: 97-101.
- Froman, D. P. and Feltmann, A. J. (2010). A new approach to sperm preservation based bioenergetics theory. *J. Anim. Sci.* 88: 314-320.
- Gibbons, I. R. (1988). Dynein ATPases as microtubule motors. *J. Biol. Chem.* 263: 15837-15840.
- Gilbert, A. B., Reynolds, M. E. and Lorenz, F. W. (1968). Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic birds. V. Histochemistry of the uterovaginal sperm-host glands of the domestic hen. *J. Reprod. Fertil.* 16(3): 433-444.
- Goda, N and Kanai, M. (2012). Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism. *Int. J. Hematol.* 95(5): 457-463.
- Goldstein, S. F. (1979). Starting transients in sea urchin sperm flagella. *J. Cell. Biol.* 80(1): 61-68.

Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N. and Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* 29: 644-652.

Gregoire, A. T., Kandil, O. and Ledger, W. J. (1971). The glycogen content of human vaginal epithelial tissue. *Fertil. Steril.* 22: 64-68.

Halestrap, A. P. and Price, N. T. (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem. J.* 343 Pt 2: 281-299.

Halestrap, A. P. (2013). Monocarboxylic acid transport. *Compr. Physiol.* 3(4): 1611-1643.

Harayama, H. and Miyake, M. A. (2006). cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase C activation is involved in the hyperactivation of boar spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 73(9): 1169-1178.

Hirohashi, N., Alvarez, L., Shiba, K., Fujiwara, E., Iwata, Y., Mohri, T., Inaba, K., Chiba, K., Ochi, H., Supuran, C. T., Kotzur, N., Kakiuchi, Y., Kaupp, U. B. and Baba, S. A. (2013). Sperm from sneaker male squids exhibit chemotactic swarming to CO<sub>2</sub>. *Curr. Biol.* 23(9): 775-781.

Hiyama, G., Matsuzaki, M., Mizushima, S., Dohra, H., Ikegami, K., Yoshimura, T., Shiba, K., Inaba, K., and Sasanami, T. (2013). Sperm activation by heat shock protein 70 supports the migration of sperm released from sperm storage tubules in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Reproduction* 147(2): 167-178.

Holm, L., and Ridderstråle, Y. (2002). Development of sperm storage tubules in the quail during sexual maturation. *J Exp Zool.* 292(2): 200-205 .

Holt, W. (2011). Mechanisms of sperm storage in the female reproductive tract: an interspecies comparison. *Reprod. Domest. Anim.* 46: 68-74.

Holt, W. V. and Lloyd, R. E. (2010). Sperm storage in the vertebrate female reproductive tract: how does it work so well? *Theriogenology*. 73: 713-722.

Howarth, B. Jr. and Huston, T. M. (1974). Glucose utilization by spermatozoa of the domestic cock as influenced by oviducal extracts from hens maintained under different environmental temperatures. *J. Reprod. Fertil.* 39(2): 285-290.

Huang, A., Isobe, N., Obitsu, T. and Yoshimura, Y. (2016). Expression of lipases and lipid receptors in sperm storage tubules and possible role of fatty acids in sperm survival in the hen oviduct. *Theriogenology*. 85(7): 1334-1342.

Ito, T., Yoshizaki, N., Tokumoto, T., Ono, H., Yoshimura, T., Tsukada, A., Kansaku, N., and Sasanami T. (2011). Progesterone is a sperm-releasing factor from the sperm-storage tubules in birds. *Endocrinology*. 152(10): 3952-3962

Jones, J. M. and Bavister, B. D. (2000). Acidification of intracellular pH in bovine spermatozoa suppresses motility and extends viable life. *J. Androl.* 21(5): 616-624.

Kawahara-Miki, R., Sano, S., Nunome, M., Shimmura, T., Kuwayama, T., Takahashi, S., Kawashima, T., Matsuda, Y., Yoshimura, T. and Kono, T. (2013). Next-generation sequencing reveals genomic features in the Japanese quail. *Genomics*. 101: 345-353.

Kawano, N., Araki, N., Yoshida, K., Hibino, T., Ohnami, N., Makino, M., Kanai, S., Hasuwa, H., Yoshida, M., Miyado, K. and Umezawa, A. (2014). Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111(11): 4145-4150.

Kim, S. Y. and Volsky, D. J. (2005). PAGE: parametric analysis of gene set enrichment. *BMC Bioinformatics*. 6: 144.

King, L. M., Brillard, J. P., Bakst, M. R. and Donoghue, A. M. (1999). Isolation of sperm storage tubules from the uterovaginal junction mucosa of the turkey. *Poult Sci.* 78(7): 1044-1047.

- Kirichok, Y., Navarro, B., and Clapham, D.E. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *Nature*. 439, 737-740.
- Kuroki, M. and Mori, M. (1997). Binding of spermatozoa to the perivitelline layer in the presence of a protease inhibitor. *Poult. Sci.* 76: 748-752.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259): 680-685.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. and Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 10: R25.
- Lee, H. C. (1984). Sodium and proton transport in flagella isolated from sea urchin spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 259(8): 4957-4963.
- Lee, H. C., Johnson, C. and Epel, D. (1983). Changes in internal pH associated with initiation of motility and acrosome reaction of sea urchin sperm. *Dev. Biol.* 95(1): 31-45.
- Li, B. and Dewey, C. N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12: 323.
- Lin, R. Y., Vera, J. C., Chaganti, R. S. and Golde, D. W. (1998) Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter. *J. Biol. Chem.* 273: 28959-28965.
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L., Fedorenko, A. and Kirichok, Y. (2010). Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell*. 140(3): 327-337.
- Mahata, M., Mahapatra, N. R., O'Connor, D. T. and Mahata, S. K. (2002). Chromaffin cell catecholamine secretion: bisindolylmaleimide compounds exhibit novel and potent antagonist effects at the nicotinic cholinergic receptor in pheochromocytoma cells. *Mol. pharmacol.* 61(6): 1340-1347.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads.



*EMBnet.journal* 17: 10-12.

Matsuzaki, M., Hiyama, G., Mizushima, S., Shiba, K., Inaba, K., and Sasanami, T. (2014). Specific mechanism of sperm storage in avian oviducts. *In: Sawada, H., Inoue, N. and Iwano, M. [eds.] Sexual reproduction in animals and plants, 1st ed. pp. 23-29. Springer, Tokyo.*

Mellor, H. and Parker, P. J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 32(Pt 2): 281-292.

Miyagawa, S. and Iguchi, T. (2015). Epithelial estrogen receptor 1 intrinsically mediates squamous differentiation in the mouse vagina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112(42): 12986-12991.

Mochida, K., Kondo, T., Matsubara, T., Adachi, S. and Yamauchi, K. (1999). A high molecular weight glycoprotein in seminal plasma is a sperm immobilizing factor in the teleost Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Dev. Growth. Differ.* 41(5): 619-627.

Morisawa, M. and Suzuki, K. (1980). Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science.* 210(4474): 1145-1147.

Morisawa, M., Suzuki, K. and Morisawa, S. (1983a). Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes. *J. Exp. Biol.* 107: 105-113.

Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S. and Yasuda, K. (1983b). Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *J. Exp. Biol.* 107: 95-103.

Munro, S. S. (1938). Fowl sperm immobilization by a temperature-media interaction and its biological significance. *Exp. Physiol.* 27: 281-291.

Müller, J. M., Krauss, B., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P. A. and Rupec, R. A. (1997). Hypoxia induces c-fos transcription via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 272: 23435-23439.

- Nalbandov, A. and Card, L. E. (1943). Effect of stale sperm on fertility and hatchability of chicken eggs.. *Poult. Sci.* 22: 218-226.
- Nishigaki, T., Wood, C. D., Tatsu, Y., Yumoto, N., Furuta, T., Elias, D., Shiba, K., Baba, S. A. and Darszon, A. (2004). A sea urchin egg jelly peptide induces a cGMP-mediated decrease in sperm intracellular  $Ca^{2+}$  before its increase. *Dev. Biol.* 272: 376-388.
- Nomura, M., Inaba, K. and Morisawa, M. (2000). Cyclic AMP- and calmodulin-dependent phosphorylation of 21 and 26 kda proteins in axoneme is a prerequisite for SAAF-induced motile activation in ascidian spermatozoa. *Dev. Growth Differ.* 42(2): 129-138.
- Nomura, M., Yoshida, M. and Morisawa, M. (2004). Calmodulin/calmodulin-dependent protein kinase II mediates SAAF-induced motility activation of ascidian sperm. *Cell Motil. Cytoskel.* 59(1): 28-37.
- O'Hanlon, D. E., Moench, T. R., and Cone, R. A.. (2013). Vaginal pH and microbicidal lactic acid when lactobacilli dominate the microbiota. *PLoS One* 8: e80074.
- Oda, S., Igarashi, Y., Manaka, K., Koibuchi, N., Sakai-Sawada, M., Sakai, K., Morisawa, M., Ohtake, H. and Shimizu, N. (1998). Sperm-activating proteins obtained from the herring eggs are homologous to trypsin inhibitors and synthesized in follicle cells. *Dev. Biol.* 204(1): 55-63.
- Orr, T. J. and Zuk, M. (2012). Sperm storage. *Curr. Biol.* 22: R8-R10.
- Pearcy, M., Delescaille, N., Lybaert, P. and Aron, S. (2014). Team swimming in ant spermatozoa. *Biol. Lett.* 10(6). pii: 20140308.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. and Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.* 41: D590-D596.
- Quere, P. and Thorbecke, G. J. (1990). Multiple suppressive effects oft ransforming growth factor  $\beta 1$  on the immune response in chickens. *Cell. Immunol.* 129: 468-477.

- Racey, A. P. (1976). The prolonged storage and survival of spermatozoa in Chiroptera. *J. Reprod. Fertil.* 56: 391-402.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J. and Smyth, G. K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 26: 139-140.
- Roy, V. K. and Krishna, A. (2010). Evidence of androgen-dependent sperm storage in female reproductive tract of *Scotophilus heathi*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165(1): 120-126.
- Roy, V. K. and Krishna, A. (2013). Changes in glucose and carnitine levels and their transporters in utero-tubal junction in relation to sperm storage in the vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.* 319(9): 517-526.
- 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(2): 267-276.
- Sasanami, T., Matsuzaki, M., Mizushima, S. and Hiyama, G. (2013). Sperm storage in the female reproductive tract in birds. *J. Reprod. Dev.* 59: 334-338.
- Sasanami, T., Izumi, S., Sakurai, N., Hirata, T., Mizushima, S., Matsuzaki, M., Hiyama, G., Yorinaga, E., Yoshimura, T., Ukena, K. and Tsutsui, K. (2015). A unique mechanism of successful fertilization in a domestic bird. *Sci Rep.* 5: 7700.
- Shaulian, E. and Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene.* 20: 2390-2400 (2001).
- Shiba, K. and Inaba, K. (2014). Distinct roles of soluble and transmembrane adenylyl cyclases in the regulation of flagellar motility in *Ciona* sperm. *Int. J. Mol. Sci.* 15(8): 13192-13208 .
- Shiba, K., Baba, S. A., Inoue, T. and Yoshida, M. (2008). Ca<sup>2+</sup> bursts occur around a local minimal concentration of attractant and trigger sperm chemotactic response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105(49): 19312-19317.

- Schuppin, G. T., Van Krey, H. P., Denbow, D. M., Bakst, M. R. and Meyer, G. B. (1984). Ultrastructural analyses of uterovaginal sperm storage glands in fertile and infertile turkey breeder hens. *Poult. Sci.* 63(9):1872-1882.
- Si, Y. and Okuno, M. (1995). Activation of mammalian sperm motility by regulation of microtubule sliding via cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent phosphorylation. *Biol. Rep.* 53(5): 1081-1087.
- Sittmann, K. and Abplanalp, H. (1965). Duration and recovery of fertility in Japanese quail *Coturnix coturnix japonica*. *Br. Poult.Sci.* 6: 245-250.
- Suarez, S. S. (2008). Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int. J. Dev. Biol.* 52: 455-462.
- Summers, K. E. and Gibbons, I. R. (1971). Adenosine triphosphate-induced sliding of tubules in trypsin-treated flagella of sea-urchin sperm. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 68(12): 3092-3096.
- Taussky, H. H. and Shorr, E. (1953). A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.* 202(2): 675-685.
- Tingari, M. D. and Lake, P. E. (1973). Ultrastructural studies on the uterovaginal sperm-host glands of the domestic hen, *Gallus domesticus*. *J. Reprod. Fertil.* 34(3): 423-431.
- Tombes, R. M. and Shapiro, B. M. (1985). Metabolite channeling: a phosphorylcreatine shuttle to mediate high energy phosphate transport between sperm mitochondrion and tail. *Cell.* 41(1): 325-334.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., Pimentel, H., Salzberg, S. L., Rinn, J. L. and Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* 7: 562-578.
- Van Krey, H. P., Balander, R. J. and Compton, M. P. (1981). Storage and evacuation of spermatozoa from the uterovaginal sperm host glands of the domestic fowl. *Poult. Sci.* 60:

871-877.

Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y. and Brown, R. F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 269(7): 5241-5248.

Wang, Q. J. (2006). PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol. Sci.* 27(6): 317-323.

Warren, D. C. and Scott, H. M. (1935). The time factor in egg formation. *Poult. Sci.* 14: 195.

Watanabe, T., Kubo, H., Takeshima, S., Nakagawa, M., Ohta, M., Kamimura, S., Takayama-Watanabe, E., Watanabe, A. and Onitake, K. (2010). Identification of the sperm motility-initiating substance in the newt, *Cynops pyrrhogaster*, and its possible relationship with the acrosome reaction during internal fertilization. *Int. J. Dev. Biol.* 54(4): 591-597.

Wheeler, N. C. and Andrews, F. N. (1943). The influence of season on semen production in the domestic fowl. *Poult. Sci.* 22: 361-367.

White, D., de Lamirande, E. and Gagnon, C. (2007). Protein kinase C is an important signaling mediator associated with motility of intact sea urchin spermatozoa. *J. Exp. Biol.* 210(Pt 22): 4053-4064.

Wick, A. N., Drury, D. R., Nakada, H. I. and Wolfe, J. B. (1957). Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. *J. Biol. Chem.* 224: 963-969.

Wishart, G. J. and Wilson, Y. I. (1999). Temperature-dependent inhibition of motility in spermatozoa from different avian species. *Anim. Reprod. Sci.* 57(3-4): 229-235.

Yoshida, M., Murata, M., Inaba, K. and Morisawa, M. (2002). A chemoattractant for ascidian spermatozoa is a sulfated steroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(23): 14831-14836.

Yoshimura, T., Suzuki, Y., Makino, E., Suzuki, T., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Namikawa, T. and Ebihara, S. (2000). Molecular analysis of avian circadian clock genes. *Mol. Brain Res.*

78(1-2): 207–215.

Zaniboni, L. and Bakst, M. R. (2004). Localization of aquaporins in the sperm storage tubules in the turkey oviduct. *Poult. Sci.* 83(7): 1209-1212.