



# 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>

氏 名 (本 国 籍)	松崎 芽衣 (長野県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第666号
学 位 授 与 年 月 日	平成29年3月13日
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学 位 論 文 題 目	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
審 査 委 員 会	主査 静岡大学 教授 高坂 哲也 副査 静岡大学 准教授 笹浪 知宏 副査 岐阜大学 教授 岩澤 淳

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

動物は受精戦略に工夫を凝らし、生存競争を勝ち抜く事で今日における進化を遂げてきた。鳥類は季節繁殖を行う動物であり、その受精戦略は非常に巧みである。繁殖期には短期間に複数の卵子を排卵し産卵するが、それらの卵子すべてを効率良く受精させるために、鳥類は卵管の子宮腔移行部 (UVJ; utero-vaginal junction) に精子貯蔵管 (SST; sperm storage tubules) と呼ばれる特殊な構造を持っている。SST に貯蔵された精子は約数週間から数ヶ月間受精能を維持するため、雌は一度の交尾で長期間受精卵を産み続けることが可能である。このように雌性生殖道内で交尾後の精子が貯蔵される現象は貯精と呼ばれ、体内受精を行う動物では広く観察される現象である。家禽では、SST での貯精は 50 年以上前から報告されているが、どのようにして精子が長期間貯蔵されるのか、その分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。本研究では、SST に含まれる精子の運動を不活性化する物質を同定し、その作用機序を解明することを目的とした。

第2章では、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。

第3章では、乳酸が精子の運動を停止させ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、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細胞外 pH ( $pH_e$ ) と細胞内 pH ( $pH_i$ ) 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。

第 4 章では、*in vitro* で精子の運動を制御するシグナル伝達経路を調査した。プロテインキナーゼ C (PKC) 阻害剤である Bisindolylmaleimide II (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 Bisindolylmaleimide V (BisV)、プロテインキナーゼ A (PKA) 阻害剤の H-89 およびホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (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  $pH_i$ 、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度、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 $\alpha$  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。

以上、本研究では、SST 管腔における乳酸蓄積による  $pH_i$  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明らかにした。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。加えて、本研究では、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、精子の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。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本学位論文は、鳥類の輸卵管で作動する精子貯蔵の仕組みに焦点を当て、精子貯蔵に関与する器官である精子貯蔵管で精子の運動を停止させる仕組み、精子の運動を制御する細胞内シグナル伝達機構についての調査を行ったものである。

第 2 章では、精子貯蔵管由来精子運動抑制因子を単離・同定し、その活性本体が乳酸であることを明らかにした。乳酸は生体内に豊富に存在する、ありふれた物質であるが、実際に精子貯蔵管に高濃度の乳酸が含まれていること、精子貯蔵管には乳酸の輸送体が発現していること、さらに、精子貯蔵管は生体内で低酸素状態にあり、これ

により亢進した解糖系により大量の乳酸を合成できることを明らかにした。鳥類の受精過程で重要な役割を果たすという乳酸の新しい機能を発見した点は特筆すべき成果であると評価される。

第3章では、乳酸がいかにして精子の運動を停止させるかの仕組みを明らかにする研究が展開されている。乳酸はインビトロで精子の運動を低下させる活性を持ち、乳酸によって運動を抑制されている精子は細胞内 pH が低下していることが明らかとなった。この細胞内 pH の低下が、鞭毛運動を駆動する分子モーターであるダイニンを不活性することが明らかとなった。インビトロでの研究だけでなく、実際に精子貯蔵管内で貯蔵されている精子の細胞内 pH が大きく低下していることをインビボの研究でも実証し、生理的に重要であることを示した点は高く評価出来る。

第4章では、精子の運動が抑制される際の細胞内シグナル伝達についての考察を進めた。タンパクキナーゼ C の特異的な阻害剤であるビスインドリルマレイミド II が精子の運動を抑制することを見出し、タンパクキナーゼ A およびフォスファチジルイノシトール 3 キナーゼの阻害剤では運動が抑制されないことを示した。この知見はニワトリ精子の知見と相反するものであるが、ウズラの精子に含まれるタンパクキナーゼ C を免疫学的な手法により同定し、さらに実際にタンパクキナーゼ C でリン酸化されるタンパク質のバンドも同定していることから、信頼性の高いデータと評価される。ニワトリとウズラでは精子生理が大きく異なっている可能性を指摘しており、学術的にも価値ある研究であると評価出来る。

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

## 基礎となる学術論文

1) 題目 : Lactic acid is a sperm motility inactivation factor in the sperm storage tubules

著者名 : Mei Matsuzaki, Shusei Mizushima, Gen Hiyama, Noritaka Hirohashi, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba, Tomohiro Suzuki, Hideo Dohra, Toshiyuki Ohnishi, Yoshikatsu Sato, Tetsuya Kohsaka, Yoshinobu Ichikawa and Tomohiro Sasanami

雑誌名 : Scientific Reports,

巻・頁・発行年 : 5, 17643, 2016

2) 題目 : Effects of a protein kinase inhibitor on sperm motility in the Japanese quail

著者名 : Mei Matsuzaki, Shusei Mizushima, Yoshinobu Ichikawa, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba and Tomohiro Sasanami

雑誌名 : Journal of Poultry Science

巻・号・頁・発行年 : 2016年7月11日受理(受理証明添付)

既 発 表 学 術 論 文

1) 題 目 : Sperm storage in the female reproductive tract in birds

著 者 名 : SASANAMI, Tomohiro, MATSUZAKI, Mei, MIZUSHIMA, Shusei,  
HIYAMA, Gen

雑誌名 : Journal of Reproduction and Development

巻・頁・発行年 : 59, 4, 334-338, 2013

2) 題 目 : Sperm activation by heat shock protein 70 supports the migration of sperm released from sperm storage tubules in Japanese quail (*Coturnix japonica*)

著 者 名 : HIYAMA, Gen, MATSUZAKI, Mei, MIZUSHIMA, Shusei, DOHRA, Hideo,  
IKEGAMI, Keisuke, YOSHIMURA, Takashi, SHIBA, Kogiku, INABA, Kazuo, SASANAMI,  
Tomohiro

雑誌名 : Reproduction

巻・号・頁・発行年 : 147, 2, 167-178, 2013

3) 題 目 : A unique mechanism of successful fertilization in a domestic bird

著 者 名 : SASANAMI, Tomohiro, IZUMI, Shunsuke, SAKURAI, Naoki, HIRATA,  
Toshifumi, MIZUSHIMA, Shusei, MATSUZAKI, Mei, HIYAMA, Gen, YORINAGA, Eriko,  
YOSHIMURA, Takashi, UKENA, Kazuyoshi, TSUTSUI, Kazuyoshi

雑誌名 : Scientific Reports

巻・号・頁・発行年 : 5, 7700, 2015