

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2016.3) 16:48-49.

平成25・26年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題 27) カルシウムイオノフォア処理によるマウス未熟精子の生理的機能獲得

日野 敏昭

## 27) カルシウムイオノフォア処理によるマウス未熟精子の生理的機能獲得

研究代表者 日野 敏昭

### 【目的】

カルシウムイオノフォア（イオノフォア）はマウス成熟精子に対して受精能力の獲得を促進することが知られている（文献）。一方、イオノフォアが、精巣や精巣上体に存在する受精能力に乏しい未熟精子に対しても同様の効果をもたらすかどうかは不明である。本研究では、イオノフォアで未熟精子を処理し、受精能力の獲得に必要とされる、精子内カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 濃度の上昇や、精子先体内部の膜構造の崩壊（先体反応）、非対称性に尾部を激しく動かす超活性化運動（ハイパーアクチベーション）の出現といった一連の変化に及ぼすイオノフォアの効果を調査した。

### 【方法】

8-16 週齢の B6D2F1 雄マウスの精巣（図 1 A）、精巣上体頭部（図 1 B）、精巣上体体部（図 1 C）から未熟精子を採取してイオノフォア（20  $\mu\text{M}$ 、10 分）で処理し以下の検討を行った。

#### 1. 精子内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化

膜透過型カルシウム蛍光プローブ（Fluo4-AM）を未熟精子の細胞内に取り込ませて、イオノフォア処理前後における蛍光強度の変化を観察した。また、蛍光画像を ImageJ で解析して、イオノフォア処理前後における精子内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化を測定した。

#### 2. 精子先体反応の有無

精子の先体内構造物に特異的に反応する FITC 標識 Soybean for trypsin inhibitor を含む培養液で精子を 10 分間培養し、遠心・洗浄後、蛍光顕微鏡下にて先体反応の有無を判定した。

#### 3. ハイパーアクチベーションの有無

培養液中の精子の運動をスローモーション撮影し、ハイパーアクチベーションを起こした精子の割合を算出した。

#### 4. 体外受精による受精能力の判定

過排卵誘起した B6D2F1 雌マウスの卵管から卵子-

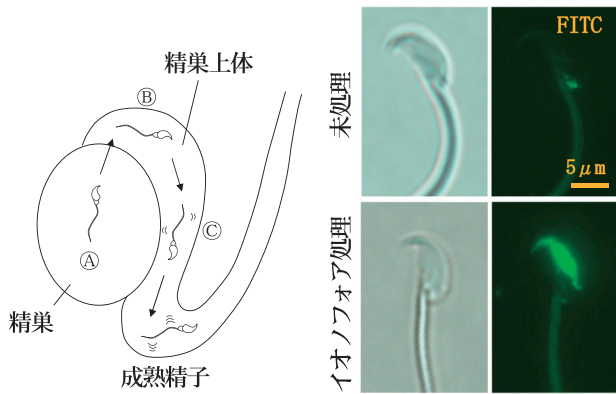


図1 精子成熟までの流れ  
(精子成熟は矢印の流れに沿って進む)

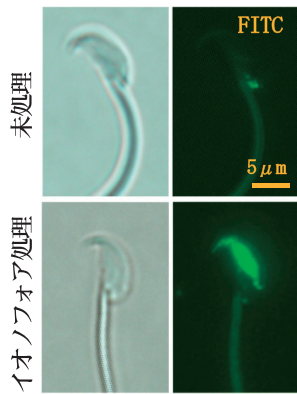


図2 精巣上体体部の未熟精子

卵丘細胞複合体 (COC) を採取して体外受精に供した。また、COC をヒアルロニダーゼで処理して卵丘細胞を除去した卵子 (卵丘除去卵子) や、卵丘除去卵子を酸性タイロードで処理して透明帯を除去した卵子 (透明帯除去卵子) を作製して体外受精に供した。

## 【結果】

### 1. 精子内 $Ca^{2+}$ 濃度の変化

精巣と精巣上体体部の未熟精子をイオノフォア処理すると、精子内  $Ca^{2+}$  濃度が処理前の 3.5 ~ 4.2 倍まで上昇し、精巣上体頭部の未熟精子を処理した場合は 34 倍にまで上昇した。また、各部の未熟精子間でイオノフォア処理前の蛍光強度を比較したところ、精巣上体頭部の未熟精子における蛍光強度は精巣や精巣上体体部の未熟精子に比べて極端に低かった (約 1/17)。このことから、精巣上体頭部の未熟精子の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度はもともと他の部位の未熟精子よりも低く抑えられていることがわかった。

### 2. 精子先体反応の有無

精巣上体体部の未熟精子では、イオノフォア処理により 83% の精子が先体反応を起こしていた (図 2)。精巣と精巣上体頭部の未熟精子では、イオノフォア処理の有無に関わらず先体反応を起こした精子は観察されなかった。

### 3. ハイパーアクチベーションの有無

精巣上体体部の未熟精子では、培養液に導入された直後から、尾部の振幅の浅い直進性の運動パターンを示す精子が多数観察された。これらの運動精子を回収

してイオノフォアで処理し、遠心、洗浄後 30 分間培養したところ、88% がハイパーアクチベーションを起こしていた。イオノフォア未処理の場合には 90% が直進性のままだった。精巣や精巣上体頭部の未熟精子は、イオノフォア処理の有無に関わらず運動性を示さなかった。

## 4. 体外受精による受精能力の判定

イオノフォア処理した精巣上体体部の未熟精子の受精率は、COC、卵丘除去卵子を用いた場合には 0% であったが、透明帯除去卵子を用いた場合は 100% であった。イオノフォア未処理の未熟精子では、いずれの種類の卵子を用いた場合でも受精率は 0% であった。なお、精巣と精巣上体頭部の未熟精子は、イオノフォア処理の有無に関わらず運動性を示さなかったため体外受精は行わなかった。

## 【考察】

イオノフォアはどの部位の未熟精子においても強制的に精子内に  $Ca^{2+}$  を流入させる効果をもつことが明らかとなった。精巣上体体部の未熟精子では  $Ca^{2+}$  濃度の上昇によって先体反応やハイパーアクチベーションが誘起され、卵丘細胞や透明帯の通過はできないものの、卵子細胞膜への融合能を獲得することが明らかになった。しかしながら、精巣や精巣上体頭部の未熟精子では、精子内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇しても先体反応やハイパーアクチベーションが起こらなかったことから、これらの部位の未熟精子では生理的機能獲得のための機構が未完成であることが示唆された。今後は、イオノフォア処理によって卵子細胞膜への融合能を獲得した精巣上体体部の未熟精子におけるリン酸化の有無を調査する予定である。

## 【文献】

Tateno H, Krampf D, Hino T, Sánchez-Cárdenas C, Darszon A, Yanagimachi R, Visconti PE,  $Ca^{2+}$  ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing in vitro without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110, 18543-18548, (2013)