

ブタ精子由来の卵子活性化因子の検討

細井美彦、草ノ瀬基一、佐伯和弘、
松本和也、入谷明

要 約

哺乳動物の精子が卵子と融合すると20時間以上も続く連続的なカルシウム波が起こり、卵子が活性化することが知られている。精子の細胞質因子が卵子の活性化に関与していると考えられているが、本実験でも精子抽出液が、卵子を活性化させることを傍証した。本実験においてはブタ精子抽出液が、異種のハムスター卵子を活性化させることが示された。また、その活性化能力は、精子を抽出する際に濃度依存的傾向にあった。また、経時的には、活性化されて前核を持つ卵子の率が最高に達するのは、注入後5時間より遅くなる。これは正常の受精に比して、遅いと考えられ、この活性化因子は単独で受精における活性化を担うかどうかは検討の余地がある。しかし、今後この精子抽出液を用いて、自然な活性化卵を胚操作に供給できる可能性があると考えられる。

緒 言

正常な受精は、精子と卵子の融合によって起こる膜融合により卵子の活性化が起こり、発生が開始する。しかし最初のカルシウムの上昇と引き続く活性化に、精子の持ち込む因子が関与するかどうかは証明されていない。ヒトの不妊治療で広く用いられている顕微授精技術で、特定の精子による注入では卵子の活性化が起きない例が報告され、精子による卵子を活性化する因子の存在を検討する必要が出てきた。卵子を活性化させると想定される精子ファクターの研究は、古くからなされている。しかし、本実験が想定している哺乳動物の精子抽出液による卵子活性化の可能性に関する研究は、1990年 K. Swann、1990年 S.L. Stice & J.M. Roble の報告が最初である。彼らの報告では、受精卵の核に特異的に卵子活性化作用が認めれ、この活性化は、卵子内のカルシウム放出により引き起こされたことが示された。この現象は精子から抽出されたタンパク分画のマイクロインジェクションにより活性化した胚でも同様に認められた。さらにこの因子は、受精後卵子内で合成されたものではなく、さらに2細胞期まで認められるが4細胞期胚の核では失活している事が示された。これらの結果は、精子がカルシウム放出を調節する物質を卵細胞質内に直接持ち込むか、あるいは、精子が持ち込んだ物質がカルシウム放出にかかわるキナーゼの活性化に関与していることを強く示唆している。

また、これらの現象が受精卵に特異的に認められることから、初期発生への関与が強く考えられる。これまでハムスター、ブタ、ウサギ、マウス、ヒトの精子でその活性が知られているが、現在までのところ精子ファクターを単離・精製したとする報告はない。精子ファクターは、顕微授精後の初期分割がうまく行かない場合に、卵の発生を改善すると言った不妊治療や繁殖技術への利用が期待されるほか、核移植など卵の活性化が組み込まれた胚操作技術への応用が考えられる。また、体外受精では、これまで利用された精子で、受精率が高いにもかかわらず、その精子由来の受精卵の発生率が低く使用できなかったものの中には、精子ファクターに原因があるものが含まれている可能性も考えられる。この精子ファクターの検討のためには、多量の精子を必要とするため、本実験は、多量の精子を回収できるブタ精子を用いて抽出液を回収し、ここで精子ファクターの存在を確認するために卵子へ顕微注入後、活性化を誘起できるかどうかを検討した。この精子ファクター活性を検出するためのバイオアッセイに用いる卵子には、受精能獲得ブタ精子が侵入して活性化を起こすことが確認されているハムスター卵子を用いた。

材料と方法

卵子の回収：精子抽出液の顕微注入によって検討するバイオアッセイに用いるハムスター卵子は、過剰排卵処理をして回収した。8-10週齢のハムスター雌の膣栓を午前中に確認した後、妊馬血清性腺刺激ホルモン（PMSG）を午後8時に30iu投与し、さらにその48時間後に、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）を30iu投与して過剰排卵を誘起した。卵回収用として60mmプラスチックシャーレ内に、TCM199培養液200 μ lからなる滴を3個つくり、パラフィンオイルで覆い、培養スポットとした。卵丘細胞除去用には、同様にして60mmシャーレ内に、150iu/mlヒアルロニダーゼスポットを2個を用意した。hCG投与後14-15hで、頸骨脱臼でハムスターを屠殺し、すみやかに卵管膨大部をろ紙上に取り出した。余分な組織をとり除いた後、卵管膨大部は卵丘細胞除去用シャーレのスポット周囲のパラフィン内に移した。

その後、柄付き針とピンセットを使い、実体顕微鏡下にて卵管膨大部を見ながら卵子（卵丘細胞塊）を取り出し、ヒアルロニダーゼ・スポット内に移動する。その後、卵丘細胞が透明帯より分離し始めた時に、卵子をパスツールピペット内で2-3回ゆっくり上下させ卵丘細胞を取り除き、培養スポット内に移動した。

ブタ精子抽出液の処理：ブタ射出精液を4000rpm、4 $^{\circ}$ C、30分間、遠心後に上澄みを除去し、精子を細胞内組成液（ICM）にて1億精子/mlに希釈、懸濁した。ブタ精子懸濁液を15ml取り、超音波分散機にて破碎（出力3-5W、60秒 \times 2）し、破碎液を4000rpm、4 $^{\circ}$ C、1hにて遠心後、上澄を0.22 μ mの膜フィルターで滅菌し、ブタ精子抽出液とした。

マイクロマニピレーターの設定：150mmのシャーレの上に10 μ lずつ培養液と精子抽出液のスポットを交互に作り、パラフィン・オイルにて全てのスポットを覆う。このシャーレを顕微鏡の視野にあわせてステージにのせ、ホールディングニードルとインジェクションニードルをジョイスティック二次元油圧マニピレーターに接続して調節する。ホールディングニードルは外径80 μ m、内径20 μ mでニードル内を先端から、TCM199、流動パラフィン、フロリナートの順になるようセットする。またインジェクションニードルは、ガラス管を引き切った後、フッ化水素中で空気を通し穴をあける。そしてインジェクションニードルに、ICMあるいは、精子抽出液を少量注入し、注入液の後部に少量の空気を残したまま耐圧ホルダーにニードルを付ける。注入液前部の空気をフロリナートを充満することにより放出させ、先端から注入液が出ていることを確認した後、シャーレ内に浸す。水平面、垂直面の両方でニードルが平行になるようにセットした。

ブタ精子抽出液の卵子への注入：卵をインジェクションスポットに移動し、ホールディングニードルで透明体を静かに吸引し、極体が12時の位置にくるように保定し、インジェクションニードルを吸引保定した卵の寸前まで動かし止めるインジェクションニードルの挿入部位の透明体表面と、インジェクションニードルの先端の焦点をよく合わせ、透明帯と細胞質膜を突き抜く。対照区ではICM、実験区では精子抽出液をできる限りゆっくり1/4目盛り注入する。これは、計算上ほぼ28nlに相当する。注入が終わったらピペットを抜き卵子を培養スポットに移動後、炭酸ガス培養器（37.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、95%空気）で培養した。

活性化の検討：ブタ精子抽出液の卵子への注入後、1、2、3、4、5、24時間に卵子を固定して、前核の有無を調べ、活性化の程度を検討した。まず卵子を培養スポットから取り出し、パラフィンが付着しないよう培養液でよく洗浄した後、少量のワセリン・パラフィンを四隅につけたカバーガラスとスライドガラスの間につぶさない程度に固定した。その後少量のカコジル酸で希釈したグルタルアルデヒドをカバーガラスとスライドガラスの隙間に流し込んだ後、中性ホルマリンに12時間以上浸して完全に固定した。プレパラートの裏側から、蒸留水をかけ洗浄の後、少量の100%エタノールで30秒程度、洗浄脱

水し、1-2分間0.25%ラクモイドで染色する。その後アセトグリセロールで卵子を脱色し、カバーガラスの四辺にマニキュアを塗り、卵の乾燥防止して、簡易標本を作製し、前核の有無を観察記録した。

結 果

実験1では、結果を表1に示すように、ブタ精子抽出液はハムスター卵子を活性化した。また、抽出用の精子液の濃度が、 10×10^6 精子/ml以上あれば、ハムスター卵子を活性化させることが示され、本条件下では、ブタ精子を 10×10^7 /mlで抽出するともっとも高い活性化能力が得られた。活性化に必要な最低濃度は示せなかったが、抽出濃度を下げると低くなることが示された。また、この濃度が 10×10^8 精子/mlを越えると前核の形成率が減少する事も示された。これは、抽出により精子頭部に含まれる蛋白質分解酵素が、高濃度に液中に存在するためではないかと考えられる。

Table 1. Effect of SF extracted by various concentration of porcine sperm on hamster oocyte activation.

表1. ブタ精子抽出液回収精子濃度がハムスター卵子の活性化に及ぼす影響

Treatment ^a 処理方法	N ^b of eggs 処理卵数	N of eggs with pronucleus (%) at 24h ^c 処理24時間後の前核形成数(率)
緩衝液	45	1 (2.2)
精子抽出液 (10×10^6 精子/ml)	33	11 (33.3)
精子抽出液 (10×10^7 精子/ml)	35	19 (54.2)
精子抽出液 (10×10^8 精子/ml)	20	6 (30.0)

a 材料と方法で示した精子抽出液を、抽出精子濃度別に注入し、前核率を見ている。すべての実験は、3回ずつ反復して行われた。

b Nは卵子の数を表している。

c hは時間を示し、抽出液が注入されてからの経過時間を表す。

実験2では、精子抽出液によって誘起される前核の形成が、正常な受精経過と時間経過が異なるかどうかを調べた。表2に示されるように、前核の形成率は、注入後5時間より24時間が高いので、注入5時間以後にピークがあると考えられた。対照区の緩衝液注入区でも、24時間では、低率ではあるが活性化が見られた。なお、本実験で表に示された活性化は、前核形成でのみ確認されており、染色体の変化を含んでいないが、変化の見られる染色体を持つ卵子は、精子抽出液の注入区で頻度が高い傾向にあった。

Table 2. Development of pronuclear formation in hamster oocytes injected by porcine SF (sperm extract fluid)

表2. ブタ精子抽出液注入が起こすハムスター卵子前核形成の経時的変化

Treatment ^a 処理方法	N ^b of eggs 処理卵数	N of eggs with pronucleus (%) at : 処理後の前核形成数 (率)			
		1 h ^c	3 h ^c	5 h ^c	24h ^c
緩衝液	23	1 (4.3)			
	22		0 (0)		
	25			0 (0)	
	22				4 (18.1)
精子抽出液	33	1 (3.0)			
	25		3 (12.0)		
	31			10 (32.3)	
	29				14 (48.3)

a 材料と方法で示した精子抽出液 (10×10^7 精子/ml) を注入した。すべての実験は、3回ずつ反復して行われた。

b N は 注入された卵子の数を表している。

c h は時間を示し、抽出液が注入されてからの経過時間を表す。

これらの結果では、本実験においてはブタ精子抽出液が、異種のハムスター卵子を活性化させることが示された。また、活性化は精子を抽出する際に濃度依存的傾向にあり、経時的には、活性化されて形成される前核を持つ卵子の率が最高に達するのは、注入後5時間より遅いと考えられた。

考 察

哺乳動物の精子が卵子と融合すると20時間以上も続く連続的なカルシウム波が起こり、卵子が活性化することが知られている。この受精に際して起こる膜融合が引き起こすカルシウムの上昇は、細胞において成長因子が増殖効果を引き起こすメカニズムと相似したところがある。そこで、受精における活性化は、リガンドとレセプターの関係で論じられる事が多かった。しかし、精子の抽出液を卵子へ単に注入することにより、ハムスター、マウス、ヒトでこのカルシウム波が引き起こされることが報告され、ウサギにおいては同種精子の抽出液が卵子を活性化させることが確認された。これは、膜上のレセプターとリガンドが結合することのみで、卵子が活性化されるのではなく、それ以外の細胞質因子が卵子の活性化に関与していると考えられる。それは、本実験でも精子抽出液が、ハムスターの卵子を活性化させたことから推測される。

この精子の細胞質因子は、精子の成熟後期に生産されることがマウスで示されている。Kimuraらは、マウス円形精子細胞を細胞質内へ注入したが、卵子を活性化することが出来なかった。そこで、この注入卵子に電気刺激による活性化を行い、発育を確認した。この結果は精子がもつ活性化因子が精子形成の間に付与されることを示唆しているといえよう。この付与された活性化因子は、射出精子中に存在し

ていると考えられるが、実験的検討の為に多量に精液を回収できる種は少ない。そこで、本実験では精液の回収が容易で、生化学的な分析にも向くと考えられるブタの精液が持つ細胞質因子の普遍性について検討した結果、ハムスター卵子に対しては活性を持つことが証明された。また同様の結果はウシでも証明されている。この種で越えて普遍性があるという結果は、卵子を活性化する蛋白質は、生命の発生に根元的であることから遺伝的に保存されている可能性もあり、多様な種間でその生理活性が保存的に維持されているかどうか注目される場所である。

また、細胞質内への精子注入する顕微授精では、精子と卵子の膜融合を起こさず受精卵と産子が得られている。しかし、精子と卵子の膜融合に関与する時間が省略されているにもかかわらず、前核の形成時間は、正常な受精に比べて遅い傾向にある。また本実験でも通常のハムスターテストによる前核形成時間は5時間で精子抽出液に反応しておこる前核形成は本実験では、5時間以降になっており遅い傾向にあると考えられる。これは、卵子の活性化には数系統の経路があり、正常な活性化では同時に進行する可能性があり、通常一系統だけでは不十分であるが補償的に働いて追いつくこともあると考えられる。

Fissoreらは、卵子の中の多くの分子が受精に関連したカルシウム波の生産に関係しているが、精子が、これらの機構をどのようにして、カルシウム波の開始と継続を制御しているのかが判明していないと論評している。特に哺乳動物の長く続くカルシウム波は以後の発生にとって重要な要素となっている事は確実である。膜の融合が一時的なカルシウム波の発生を、そして精子細胞質因子がそれに引き続く連続したカルシウム波の生産に関与している可能性があり、精子の卵子活性化の機構解明は生物学的な疑問に答えるばかりでなく、胚操作技術にとって重要な単為発生卵の作出や細胞内カルシウム波についての研究に大きく役立つと考えられる。今後、この精子抽出液中のどの分子が活性化に関与しているかを同定することが必要であり、そのメカニズムを解明する予定である。

引用文献

1. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature* 1993 ; 361 : 315-325.
2. Cuthbertson KSR, Whittingham DG, Cobbold PH. Free Ca^{2+} increases in exponential phases during mouse oocyte activation. *Nature* 1981 ; 294 : 754-757.
3. Fissore RA, Dobrinsky JR, Balise JJ, DUBY R, Robl JM. Patterns of intracellular Ca^{2+} concentrations in fertilized bovine eggs. *Biol Reprod* 1992 ; 47 : 960-969.
4. Fissore RA, Robl JM. Mechanism of calcium oscillations in fertilized rabbit eggs. *Dev Biol* 1994 ; 166 : 634-642.
5. Fissore RA, Gordo AC, Wu H. Activation of development in mammals: Is there a role a sperm cytosolic factor? *Theriogenology* 1998 ; 49 : 43-52
6. Jones KT, Carroll J, Whittingham DG. Ionomycin, thapsigargin, ryanodine, and sperm induced Ca^{2+} release increase during meiotic maturation of mouse oocytes. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 6671-6677.
7. Kimura Y, Yanagimachi R. Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development* 1995 ; 121 : 2397-2405.
8. Kline D, Kline JT. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol* 1992 ; 149 : 80-89.
9. Kono T, Carroll J, Swann K, Whittingham DG. Nuclei from fertilized mouse embryos have calcium releasing activity. *Development* 1995 ; 121 : 1123-I 128.
10. Lawrence Y, Whitaker M, Swann K. Sperm-egg fusion is the prelude to the initial Ca^{2+} increase at fertilization in the mouse. *Development* 1997 ; 124 : 233-241.
11. Miyazaki, S, Igusa, Y. Fertilization potential in golden hamster eggs consists of recurrent hyperpolarizations. *Nature* 1981 ; 290 : 702-704.

12. Miyazaki S. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate-induced calcium release and guanine nucleotide-binding protein-mediated periodic calcium rises in golden hamster eggs. *J Cell Biol* 1988 ; 106 : 345-353.
13. Moore GD, Kopf GS, Schultz RM. Complete mouse egg activation in the absence of sperm by stimulation of exogenous G-protein coupled receptors. *Dev Biol* 1993 ; 159 : 669-678.
14. Nakada K, Mizuno J, Shiraishi K, Endo K, Miyazaki S. Initiation, persistence and cessation of the series of intracellular Ca^{2+} responses during fertilization in bovine eggs. *J Reprod Dev* 1995 ; 41 : 77-84
15. Palermo G, Joris H, Dewoey P, van Sterteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992 ; 340 : 17-18.
16. Palrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, Lai FA. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 1996 ; 379 : 364-368.
17. Schultz RM, Kopf GS. Molecular basis of mammalian egg activation. *Current Topics in Dev Biol* 1995 ; 30 : 21-62.
18. Sette C, Bevilacqua A, Bianchini A, Mangia F, Geremia R, Rossi P. Parthenogenetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. *Development* 1997 ; 124 : 2267-2274.
19. Snell WJ, White JM. The molecules of fertilization. *Cell* 1996 ; 85 : 629-637.
20. Stice SL, Robl JM. Activation of mammalian oocytes by a factor obtained from rabbit sperm. *Mol Reprod Dev* 1990 ; 25 : 272-280.
21. Sun FZ, Hoyland J, Maxson X, Moor RM. A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation. *Development* 1992 ; 115 : 947-956.
22. Swann K. A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development* 1990 ; 110 : 1295-1302.
23. Swann K. Ca^{2+} oscillations and sensitization of Ca^{2+} release in unfertilized mouse eggs injected with a sperm factor. *Cell Calcium* 1994 15 : 331-339.
24. Swann K, Lai FA. A novel signaling mechanisms for generation Ca^{2+} oscillations at fertilization in mammals, bioassays 1997 ; 19 : 371-378.
25. Tesarik J, Souza M, Testart J. Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 1994 ; 9 : 511-518.
26. Whitaker MJ, Patel R. Calcium and cell cycle control. *Development* 1990 ; 108 : 525-542.
27. Wu H, He CL, Fissore, RA. Injection of a porcine sperm factor triggers calcium oscillations in mouse oocytes and bovine eggs. *Mol Reprod & Dev* 1997 ; 46 : 176-189.
28. Wu H, He CL, Fissore, RA. Injection of a porcine sperm factor induces activation in mouse eggs. *Mol Reprod & Dev*. 1997. In Press.
29. Yanagimachi R (1993) : Mammalian fertilization. In E Knobil, JD Neill (eds) : "The Physiology of Reproduction". Raven Press, pp 189-317.