



Title	精子受精能獲得現象に影響を及ぼす生理活性物質
Author(s)	鈴木, 宏治
Citation	大阪大学, 1974, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31052
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【4】

氏名・(本籍)	鈴 ^{すず} 木 ^き 宏 ^{こう} 治 ^じ
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 3066 号
学位授与の日付	昭和49年3月25日
学位授与の要件	薬学研究科応用薬学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	精子受精能獲得現象に影響を及ぼす生理活性物質
論文審査委員	(主査) 教授 青沼 繁 (副査) 教授 近藤 雅臣 教授 岩田平太郎 教授 上原喜八郎

論文内容の要旨

緒 論

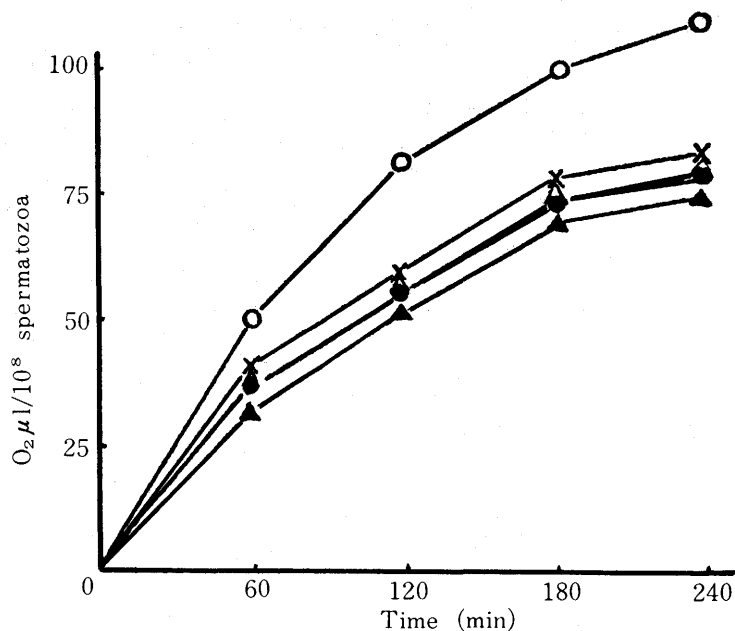
一般に哺乳動物の精子は射精されたままの状態では受精できず、発情期の雌性生殖路内で一定時間過ごすことにより、ある種の生物学的変化をおこし、はじめて受精できる。この現象は精子の受精能獲得 (capacitation) と呼ばれており雌性生殖路内には capacitation factor (CF) の存在が示唆されている。また、capacitation 精子は精漿あるいは副睾丸分泌液と接触することにより受精能を消失し (decapacitation)、精漿、副睾丸分泌液中には decapacitation factor (DF) の存在が示唆されている。精子は発情期の雌性生殖路内に移すことにより、再び受精能を獲得することができる (recapacitation)。精子にみられるこの可逆的現象である capacitation, decapacitation の本質は、いまだ明らかではない。演者は、この現象を解明すべく capacitation, decapacitation に伴う機能的変化、更にはこれらの現象に影響を及ぼす生理活性物質について、まず雌性動物側から capacitation に影響を及ぼす物質について、次に精子側から精子自身に存在し、精子の受精能をコントロールしている物質について検討を行った。

本 論

第一章 精子機能に影響を及ぼす子宮内の生理活性物質

精子の capacitation は雌性動物の内分泌環境によって支配されており、progesterone 処理子宮内でなく estrogen 処理子宮内においてはじめて成立する。精子の代表的代謝である呼吸および嫌氣的解糖能について検討し、両者共に estrogen 処理子宮内で著しく促進されることが認められた。また呼吸機能にみられた促進は DF を含む精漿で処理することにより著明な減退を示した。このような結果をもとに、モルモット子宮から呼吸活性促進物質の抽出を行い [(Fr. Es-100 : estrogen 処理子宮の硫安 50~100%沈澱)、(Fr. Pro-50 : progesterone 処理子宮の硫安50%沈澱)] estrogen 処

Fig. 1. Effect of guinea-pig uterine extract on guinea-pig sperm respiration



Respiration was determined with Warburg apparatus in Ca-free KRP buffer at 37°C.

—×— Control (bovine serum γ -globulin, 2.5 mg + bovine serum albumin, 2.5 mg)

—○— Fr. Es-100 (5 mg)

—●— Fr. Es-50 (5 mg)

—△— Fr. Pro-100 (5 mg)

—▲— Fr. Pro-50 (5 mg)

理子宮内からは精子の呼吸活性を促進する生理活性物質の存在が明らかになった (Fig. 1)。この物質は精漿処理によって減退した呼吸活性をも回復することが認められた。しかし、この呼吸促進物質には副睾丸精子を capacitation させる CF 活性は認められなかった。

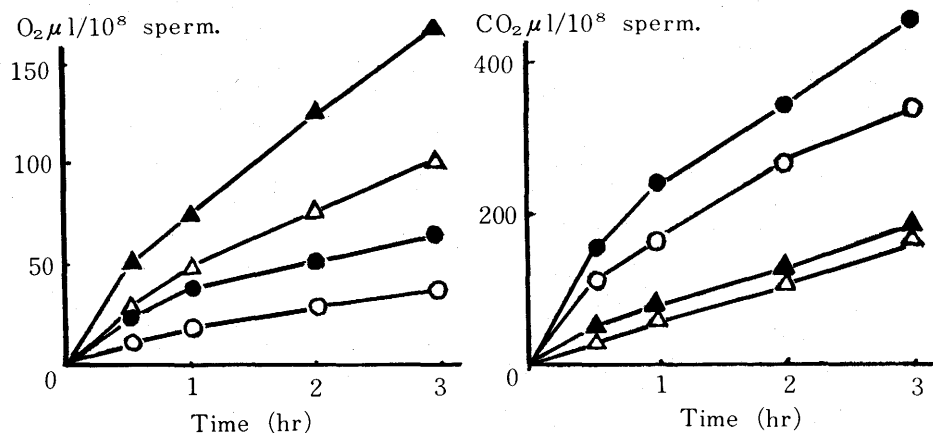
第二章 精子成熟に伴う受精能の変動

前述の如く capacitation 精子は精子の成熟の場である副睾丸内の DF によって decapacitation させることから、capacitation は単に雌性生殖路内における生理的变化ではなく、精子成熟過程と密接な関連性を有する現象として、とらえることができる。従って capacitation の生理化学的本質は精子の成熟過程に伴う機能的変化と相通ずるとの観点から検討を行った。呼吸、嫌氣的解糖能ともに精子の成熟過程に伴ない変動することが認められ (Fig. 2)、また雌性生殖路からの抽出物に対する精子の運動性は、成熟精子において特異的に促進がみられた。Acrosome reaction を指標とした、capacitation に対する反応性も精子成熟過程に伴ない増すことが判明した (Table. 1)。これらの結果から、精子は成熟過程に伴なって機能的変化を生じ、外部環境に対する反応性を増すとともにその受精能を増大化することが示された。

Fig. 2. Respiration and anaerobic fructolysis of guinea-pig spermatozoa

a) Respiration

b) Anaerobic fructolysis



Respiration (Ca-free KRP buffer, gas phase : air) and anaerobic fructolysis, (Ca-free KRB buffer, gas phase : N₂) were determined with Warburg apparatus at 37 °C.

Substrate : Fructose, 2.5 mg/vessel

- ▲— unripe spermatozoa (unwashed)
- △— unripe spermatozoa (washed)
- ripe spermatozoa (unwashed)
- ripe spermatozoa (washed)

Table 1. Motility and acrosome reaction % of guinea-pig spermatozoa after incubation in utero for 9 hours

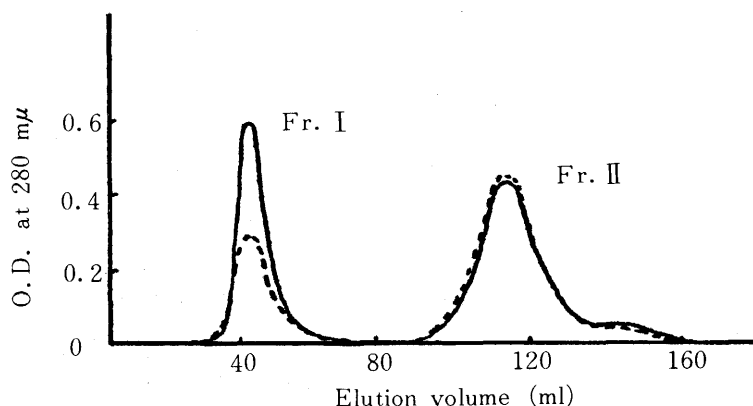
Experimental No.	Spermatozoa	Motility (%)	Acrosome reaction (%)
1	ripe	29.3	16.0
	unripe	10.0	2.0
2	ripe	20.5	5.7
	unripe	12.0	0.8
3	ripe	15.2	6.8
	unripe	4.5	1.3

Guinea-pig epididymal spermatozoa was inseminated in the estrogen dominated uterus for 9 hours.

第三章 精子からの遊離物質と受精能阻害活性

精子の成熟過程に伴う機能的変化を物質レベルから明らかにする目的で medium 中に精子より遊離してくる物質について検討した。その結果、成熟過程に伴ない精子からの遊離物質の量が増すことが認められ、この遊離物質の Sephadex G-200 column で最初に溶出される分画 (Fr. I) に明らかな量的変動が示された (Fig. 3)。次いで Fr. I の精子細胞自身に対する生理的機能の検討として精子呼吸、運動性に及ぼす影響をみたところ、Fr. I は精子生存性には何ら影響を与えないにもかかわらず、呼吸、運動性ともに著しく抑制されることが明らかとなった。そこで DF は種に非特異的作用を有すると報告されていることから、Fr. I の DF 活性の有無をウサギ精子を用いて検討したとこ

Fig. 3. Gel filtration of the substance released from incubated guinea-pig spermatozoa on Sephadex G-200



Column size : 2×70 cm

Eluate : distilled water (pH 7.4)

— ripe spermatozoa, ---- unripe spermatozoa

ろ、Fr. I 処理により capacitation 精子の受精能は著明に抑制されること、また Fr. I により脱受精能された精子は発情期の雌性生殖路内で recapacitation されることを認め、Fr. I に可逆的な DF 活性のあることが判明した (Table. 2)。また Fr. I の DF 活性はマウスの体外受精においても認められ、Fr. I を添加することによりマウス体外受精は著明に抑制された。一方 Fr. I を、予め Fr. I に対する抗体で処理することにより、その DF 活性は完全に消失することから DF は免疫原性をもつことが示された (Table. 3)。そこで、この精子からの DF の遊離が子宮内ではそのホルモン状態によりどのような影響を受けるか ^{131}I でラベル化した抗体の種々処理した精子への結合能をみることにより検討したところ、Fr. I は estrogen 処理子宮内で特異的に精子より遊離され、また capacitation 精子の精漿処理により、Fr. I は精子に結合することが明らかになった (Table. 4)。このことは精子から DF が遊離することにより capacitation が生じ、capacitation 精子に精漿中の DF が結合することにより decapacitation が生ずることを示唆するものである。また子宮内で精子から遊離した Fr. I は、estrogen 処理子宮内で特異的に消失することが認められ、生殖機能の合目的的

Table 2. Effect of Fr. I on fertilization of rabbit spermatozoa

Treatment	<u>Ova fertilized</u> Ova recovered	% Fertile
Capacitated spermatozoa	16/19	84
Capacitated spermatozoa + Fr. I	3/26	11
Capacitated spermatozoa + Fr. I + recapacitation	20/36	56
Epididymal spermatozoa	1/13	8

Rabbit spermatozoa was capacitated in an estrous rabbit uterus for 6 hours.

Fr. I (1 mg/10⁷ spermatozoa) was incubated with capacitated spermatozoa for 30 min at 37 °C.

Capacitated spermatozoa treated with Fr. I was recapacitated in an estrous uterus.

Table 3. Effect of Fr. I and anti-Fr. I-immunoglobulin (anti-Fr. I-Ig.) on mouse fertilization in vitro

Treatment	No. of ova examined	No. of ova fertilized*	% Fertile
Control	64	30	47
Fr. I **	67	0	0
Fr. I + anti-Fr. I-Ig. (50 µg)	58	2	3
Fr. I + anti-Fr. I-Ig. (100 µg)	54	21	39
Fr. I + anti-Fr. I-Ig. (200 µg)	46	19	41
Fr. I + normal serum *** γ-globulin (200 µg)	36	0	0

Mouse spermatozoa (2.2 × 10⁵) and ova were incubated in modified KRB buffer (pH 7.4) under mineral oil in 5 % CO₂-air for 4 hours at 37 °C.

* Ova with male and female pronuclei

** Fr. I ; 10 µg/tube

*** fractionated from normal rabbit serum

Table 4. Binding activity of ^{131}I -anti-Fr. I -immunoglobulin to guinea-pig spermatozoa

Treatment	Radioactivity ^{c)} (cpm/ 10^7 spermatozoa) (Mean $\pm$ S. E.)	Specific activity (%)
Uterine sperm. ^{a)} ...Capacitated sperm.	2,400 $\pm$ 69 ^{***}	69
Uterine sperm. ^{a)} treated with seminal plasma...Decapacitated sperm.	3,127 $\pm$ 13	90
Uterine sperm. ^{b)} ...Non-capacitated sperm.	2,811 $\pm$ 39 [*]	81
Epididymal sperm. (incubated sperm. in vitro)	2,973 $\pm$ 31	86
Epididymal sperm. (fresh)	3,467 $\pm$ 157	100

a) incubated in an estrogen dominated uterus for 6 hours

b) incubated in a progesterone dominated uterus for 6 hours

c) after the reaction with ^{131}I -anti-Fr. I -immunoglobulin, the radioactivity of the spermatozoa washed by the buffer

*** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; significantly different as compared to the group of epididymal sperm. (fresh)

な結果として興味深いものと考えられる。

第四章 in vitro capacitation 誘発に関する検討

capacitation は精子から DF を遊離することにより生ずるならば、精子機能に何ら damage を与えることなく精子から特異的に DF を遊離させるような適当な medium を用いて in vitro においても capacitation の誘発は可能であると考え、chemically defined medium である modified KRB buffer 中で incubation をすることにより capacitation 誘発の検討を行った。その結果、モルモット精子において incubation time の経過に伴ない acrosome reaction の出現を認め、更に capacitation 精子ならば異種動物の精子とでも受精可能なハムスターの卵を用いることにより、preincubation 精子が特異的に受精することを認めた (Table. 5)。また、ウサギ精子においても同様の結果が得られた。以上の結果、capacitation は精子からの DF の遊離によるものであるとの演者の考えをより明らかなものとした。

第五章 受精能阻止物質の精製および性質

マウス体外受精阻止に対する DF 活性を指標として DF の安定性を検討したところ、DF は 80°C の熱処理によって失活するが、酸 (pH 2.0)、アルカリ (pH 10.0) 処理には安定であることを認めた。また pronase 処理でその活性は約 $\frac{1}{2}$ に、 β -amylase 処理では完全に失活することから、DF 活性発現に糖および蛋白質の関与が示された (Table. 6)。DF の精製は等電点分画法、DEAE cellulose column chromatography および Sephadex G-50 によるゲルろ過法により行った。この DF はゲルろ過法、また Ampholine column の等電点的電気泳動法で pH 2.6 付近に等電点をもつ低分子酸性糖蛋白質であることを認めた (Fig. 4)。更に、精製 DF の受精能阻害機序を検討したところ、DF は

Table 5. Penetration of guinea-pig spermatozoa into hamster ova * in vitro

Treatment	Epididymal spermatozoa		Preincubated spermatozoa **	
	Ova fertilized Ova examined	% Fertile	Ova fertilized Ova examined	% Fertile
Wash ***	0/17	0	15/20	75
Unwash	0/15	0	6/23	26

※ Hamster ova were treated with 0.2 % hyaluronidase and 0.1 % trypsin to disperse cumulus cells and dissolve zona pellucida.

※※ Guinea-pig spermatozoa was preincubated in modified KRB buffer under mineral oil in 5 % CO₂-air for 12 hours at 37 °C.

※※※ Preincubated spermatozoa was washed with modified KRB buffer before insemination with hamster ova.

Table 6. Effect of pronase-P, trypsin and β -amylase on DF activity of Fr. I in mouse fertilization in vitro

Pretreatment of Fr. I *	Ova fertilized Ova examined	% Fertile
Control (-Fr. I)	30/45	67
Pronase-P	21/67	31
Trypsin	6/73	9
β -amylase	39/64	61
Nontreated Fr. I	2/72	3

Mouse spermatozoa and ova were incubated in modified KRB buffer under mineral oil in 5 % CO₂-air for 4 hours at 37 °C.

Fr. I was pretreated with each enzyme (Fr. I : enzyme = 20 : 1) for 6 hours at 37 °C.

※ Treated Fr. I (10 μ g) was assayed in mouse fertilization.

精子の acrosome 中に含まれ卵周囲に層として存在する corona radiata を溶解する酵素である corona radiata penetrating enzyme (CPE) の阻害活性を有することを認め、DF が CPE の inhibitor であることが示された (Table 7)。

Fig 4. Determination of isoelectric point of DF by Ampholine column electrophoresis

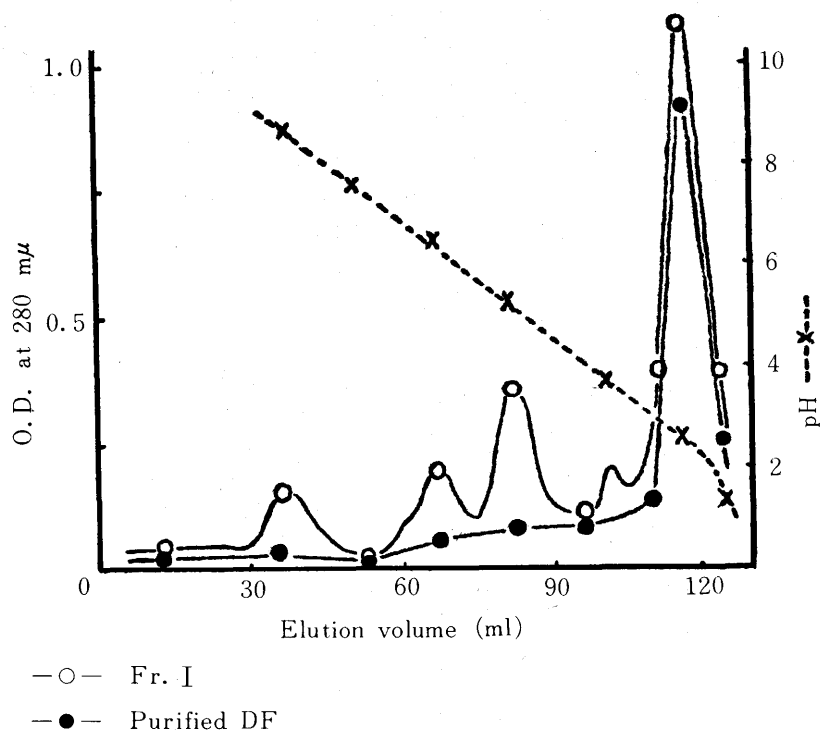


Table 7. Effect of DF on activity

Treatment of ova	Denudation index			No. of ova
	+	±	—	
None	2	2	6	10
CPE (50 μ g)	10	1	0	11
CPE (50 μ g) + DF (500 μ g)	1	1	11	13

Denudation index ;

+ the corona cells were completely dispersed

± some corona cells were removed

— only the cumulus cells were removed

CPE ; corona radiata penetrating enzyme from rabbit spermatozoa.

CPE was incubated with or without DF for 2 hours at 37 °C before treatment with ova.

結 論

- 1) estrogen 処理子宮は精子の呼吸、嫌氣的解糖能を特異的に促進し、その本体は子宮内に存在するアルブミン様蛋白質であることが判明した。

- 2) 精子は成熟過程に伴って、外部環境に対する反応性を増すと共に、その受精能を増大化することが示された。
- 3) 精子からの遊離物質には、精子の運動性、呼吸機能の抑制作用、受精能阻害活性 (DF 活性) が認められた。また capacitation は精子から DF の遊離により生じ、decapacitation は capacitation 精子に DF が結合することにより生ずることが示唆された。
- 4) 精子機能に damage を与えない適当な medium を用いることにより in vitro capacitation 誘発が可能なことを示した。
- 5) DF は精製により低分子の酸性糖蛋白質であり、その作用機序は CPE 活性の阻害作用にあることが判明した。

論文の審査結果の要旨

モルモット睾丸中より精子受精能獲得因子を抽出精製し、その因子が酸性糖蛋白であることを認め併せてその作用機作の一つとして精子の acrosome に存在する corona radiata penetrating enzyme を抑制する作用があることを認めた。

この観点より本論文が薬学博士の学位記を授与する価値あるものと認めた。