



Title	マウス体外受精系における亜鉛イオンの精子受精能獲得に及ぼす影響
Author(s)	川口, 誠
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32786
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 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

氏名・(本籍)	川 口 誠
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 5 2 5 3 号
学位授与の日付	昭和 56 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	マウス体外受精系における亜鉛イオンの精子受精能獲得に及ぼす影響
論文審査委員	(主査) 教授 青沼 繁 (副査) 教授 近藤 雅臣 教授 鎌田 皎 教授 岩田平太郎

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する能力を有しておらず、雌性生殖路内において一定期間滞留する間に何らかの生理的機能変化を遂げ、初めて受精可能となる。この現象は、capacitationと呼ばれ、capacitationした精子は精漿等とincubationすることによりその受精能を消失すること(decapacitation)も知られている。これは精漿中に存在するdecapacitation factor (DF)の影響と考えられる。最近著者等はDFが精子自身に含まれることを示し、精子capacitationという現象は、このDFが精子より遊離することによりおこることを示唆した。

capacitationに伴い精子の構造上に何らかの変化がおこっているものとの考えから、光学および電子顕微鏡的に多くの研究が成されてきた。精子が卵の透明帯(zona pellucida)に侵入するまでには先体酵素の放出が必要であり、事実先体反応(acrosome reaction)のおこることがハムスター・モルモット・ウサギ等において確かめられている。しかし種により観察に難易があり、マウスではacrosome reactionを含めcapacitationに伴う形態変化に関しほとんど検討が成されていない。著者はマウス精子を経時的に観察する間に、精子の運動形態に変化のおこることを見出した。そこでこの点に着目し、capacitationとの関連性について検討した。

一方、1921年Bertrand & Vladescoにより、哺乳動物の精子・精漿中に多量の亜鉛が含まれることから、受精との関連性が指摘された。しかし受精における亜鉛の役割、capacitation, decapacitation現象における亜鉛の関与に留意した報告はない。そこでマウス体外受精系を用い、亜鉛イオン(Zn^{2+})の受精現象における働きについて検討を加えた。

本 論

第一章 精子受精能獲得に伴う精子運動形態変化

マウス体外受精系において経時的に精子の運動形態の観察を行った結果、副睪丸尾部より調製直後の精子は直進運動をしているがその後ねじり前進が現われ始め、最後には特徴的な旋回運動を示す（精子の“activation”）ことを認めた(Fig. 1, Fig. 2)。activation 精子の出現は capacitation と parallel な関係を示した(Fig. 3)。

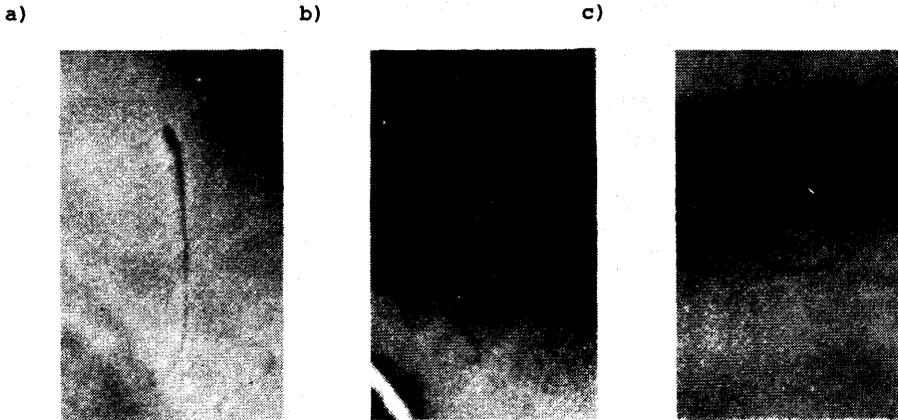


Fig. 1. Changes of Swimming Pattern of Mouse Spermatozoa during Incubation

A suspension(0.5ml) of epididymal spermatozoa (about 1.0×10^6 spermatozoa/ml of m-KRB solution) was incubated at 37°.

- a) examined within 5 min of being suspended in m-KRB solution
- b) examined after 20 min in m-KRB solution
- c) examined after 60 min in m-KRB solution (an activated spermatozoon)

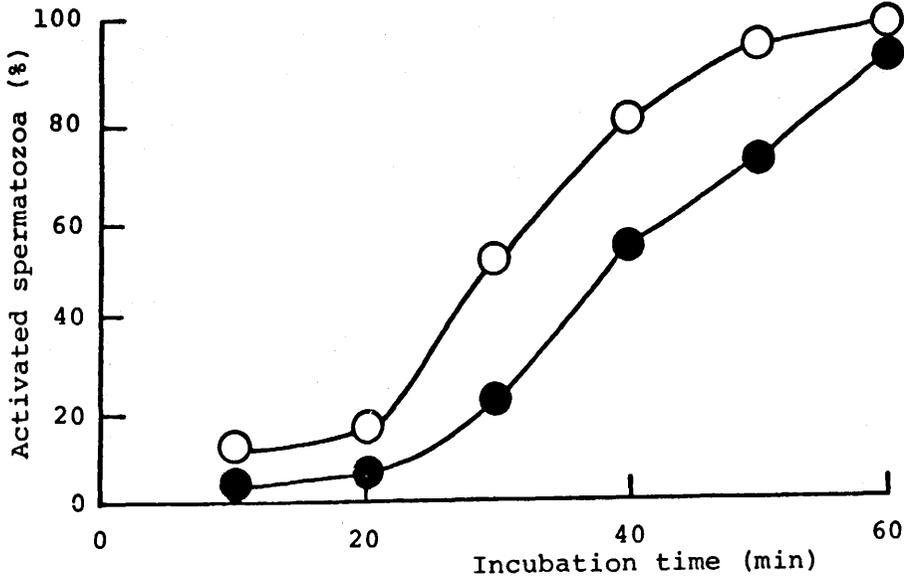


Fig. 2. Increase of Activated Spermatozoa during Incubation

- , incubated in m-KRB solution of pH 8.0 at 37°
- , incubated in m-KRB solution of pH 7.0 at 37°

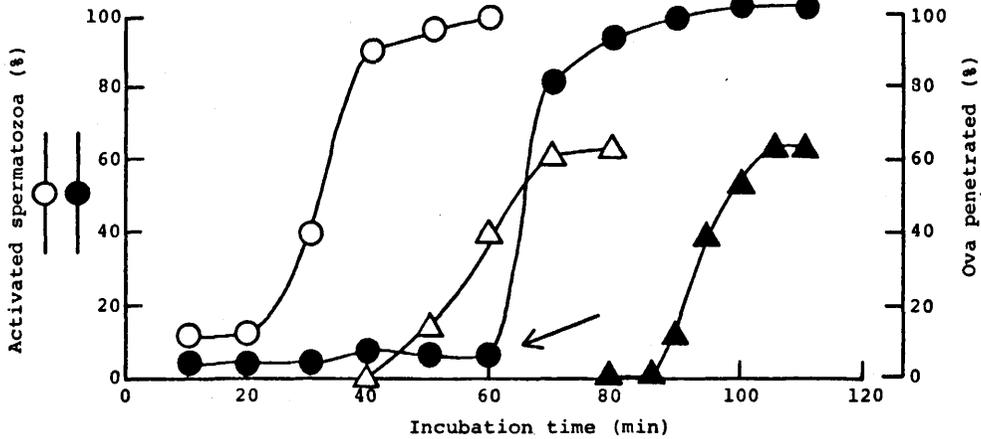


Fig. 3. Relationship between Appearance of Activated Movement and Fertilizing Ability of Spermatozoa

- (○—○), incubated at 37°
 (△—△), incubated at 37°
 (●—●), incubated for 60 min at 20°, and immediately transferred to 37°
 (▲—▲), incubated for 60 min at 20°, and immediately transferred to 37°
 (indicated by arrow)

activation 精子の出現は capacitation に影響しない pH 範囲ではほとんど変化がなかったが、低温にすることにより、またモルモット精子より得た decapacitation 活性を有する物質 Fr. I の存在下に抑制された。さらに Ca^{2+} の非存在下、 Zn^{2+} の添加によっても activation 精子の出現は抑制され、これらのイオンの capacitation への関与が示唆された。しかし、一旦 activation した精子はそれぞれの条件下においても、最早この運動を抑制されなかった。これらのことより精子の activation は capacitation 精子に特徴的な運動形態であることが示された。

精子の直進運動は、雌性生殖路を卵に早く到達するためには必要であるが、そのままでは卵の存在部位を素通りになることになる。マウス精子が卵管上部に達するのに約30分要することを考慮すると、卵に到達するのと時期を同じくして capacitation を完了し activation 精子に変化することになり、卵周囲の精子濃度の上昇に役立つものと思われる。また広角度な鞭毛運動は精子の最大の推進力となることから、卵外層を形成する cumulus oophorus, zona pellucida を通過し卵内へ侵入する際の推進力となり得る合目的な性質をもっているものと考えられる。

第二章 亜鉛イオンのマウス体外受精に及ぼす影響

マウス体外受精系において、 $250 \mu M$ の Zn^{2+} 存在下に受精は完全に阻害された (Table I)。

しかし、他の二価金属イオン (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+}) は $250 \mu M$ の濃度において影響を与えなかった (Table II)。

Zn^{2+} による阻害効果は精子あるいは卵をあらかじめ Zn^{2+} 存在下に培養するか、あるいはあらかじめ capacitation させた精子を用いた場合には認められなかった (Table III)。

以上のことより、 Zn^{2+} は精子の capacitation を抑制する性質を有することを認めた。

Table I. Effect of Various Concentrations of Zn^{2+} on Fertilization of Mouse Ova *in Vitro*

	Zn^{2+} conc. (μM)							
	0	7.8	15.6	31.3	62.5	125	250	500
No. of experiments	6	3	3	3	6	6	6	3
Total no. of ova examined	104	59	66	66	108	113	95	53
Ova penetrated ^{a)} (%)	54 ± 6	56 ± 5	56 ± 2	35 ± 8	14 ± 3	7 ± 3	0	0

Epididymal spermatozoa were added to m-KRB solution containing ova and various concentrations of Zn^{2+} .

a) mean ± s.e.m. of values in 3-6 independent tests

Table II. Effect of Various Divalent Cations on Fertilization of Mouse Ova *in Vitro*

Cation ^{a)}	Total no. of ova examined	Ova penetrated (%) ^{b)}
—	52	60 ± 9
Zn^{2+}	45	0
Mg^{2+}	53	67 ± 4
Ca^{2+}	48	59 ± 9
Mn^{2+}	56	52 ± 10
Fe^{2+}	57	67 ± 8
Cu^{2+}	46	32 ± 13
Hg^{2+}	20	0

a) Each at 250 μM in m-KRB solution containing 1.19 mM Mg^{2+} and 1.71 mM Ca^{2+} , except when these ions were increased as shown.

b) mean ± s.e.m. of values in 3 independent tests

Table III. Effect of Zn^{2+} on Fertilization of Mouse Ova *in Vitro* under Various Conditions

Treatment ^{a)}	Spermatozoa	Ova	Zn^{2+} in final culture medium	No. of experiments	Total no. of ova examined	Ova penetrated ^{b)} (%)
None	Epididymal	Normal	—	4	88	68 ± 7
Zn^{2+}						
Exp. I	Epididymal	Normal	+	4	81	0
Exp. II	Capacitated	Normal	+	5	109	59 ± 8
Exp. III	Epididymal	Treated	—	4	77	54 ± 9
Exp. IV	Treated ^{c)} epididymal	Normal	—	3	52	52 ± 10
Exp. V	Treated ^{c)} capacitated	Normal	+	3	51	38 ± 11

a) dose : 250 μM

b) mean ± s.e.m. of values in 3-5 independent tests

c) preincubated with 250 μM Zn^{2+}

また Zn^{2+} 存在下に培養した精子は Zn^{2+} 濃度を低下させることにより capacitation したが、この様な精子の zona pellucida の通過は副睾丸精子の場合と同様の時間であり、同程度の侵入率であった (Table IV)。

Table IV. Relationship between Mouse Sperm Capacitation and Zn^{2+}

	Ova penetrated (%) ^{a)}	
	Incubation time (min)	
	30	90
Epididymal spermatozoa	0	64 ± 10
Capacitated spermatozoa	56 ± 10	75 ± 8
Treated spermatozoa ^{b)}	2 ± 2	52 ± 10

a) mean ± s.e.m. of values in 3 independent tests

b) preincubated with 250 μM Zn^{2+} for 40 min

このことより、250 μM の Zn^{2+} 存在下には副睾丸精子の受精能は維持されているが潜在していることを認めた。

第三章 亜鉛イオンの精子-卵融合に及ぼす影響

Zn^{2+} の capacitation 抑制作用を zona pellucida の通過よりさらに後期の段階、即ち perivitelline space に侵入した精子が卵黄と融合し pronuclei 形成から二卵割に到る間において検討した。

前章において認められた Zn^{2+} の capacitation 抑制作用は、媒精後 1.5 時間目における受精能の判定結果である。その後 pronuclei 形成に充分な 5 時間の培養を行っても、 Zn^{2+} 存在下には受精能が抑制されたままであった (Table V)。

Table V. Fertilizing Ability after Prolonged Incubation of Spermatozoa in the Presence of Zn^{2+}

	Zn^{2+} in culture ^{a)} medium	Ova penetrated (%) ^{b)}	
		1.5 hr	5.0 hr
Epididymal spermatozoa	—	62 ± 8	55 ± 10
Epididymal spermatozoa	+	0	7 ± 1**
Capacitated spermatozoa ^{c)}	+	55 ± 9	55 ± 4

a) dose : 250 μM

b) Ova were examined 1.5 hr and 5.0 hr after insemination (mean ± s.e.m. of values in 3 independent tests).

c) preincubated for 40 min in m-KRB solution

Significantly different from epididymal spermatozoa in m-KRB solution : **p < 0.01

このことは Zn^{2+} の作用が単に capacitation を遅延させるのではなく、完全に阻害することを示す。一方、zona pellucida を酵素処理により取り除いた zona-free 卵を用いた体外受精系においても

capacitation 精子のみしか受精できないことがマウスを含め種々の哺乳動物精子で確かめられている。この様な系を用いた場合も Zn^{2+} は capacitation 抑制作用を示した (Table VI)。

Table VI. Effect of Zn^{2+} on Fertilization of Zona-free Mouse Ova *in Vitro*

Spermatozoa	Zn^{2+} in culture ^{a)} medium	Total no. of ova examined	Ova penetrated ^{b)} (%)
Epididymal	—	97	66 ± 7
Epididymal	+	87	5 ± 3**
Capacitated ^{c)}	+	104	50 ± 12

a) dose : 250 μ M

b) Ova were denuded by means of proteolytic enzyme (α -chymotrypsin).
Ova were examined 5 hr after insemination (mean \pm s.e.m. of values
in 5 independent tests).

c) preincubated for 40 min in m-KRB solution

Significantly different from epididymal spermatozoa in m-KRB solution : ** $p < 0.01$

卵子との融合には精子の postnuclear cap region が関与することが報告されており, Zn^{2+} は精子 postnuclear cap region の膜を安定化しているものと考えられる。また zona-free 卵を用いた系に対しても Zn^{2+} が同様の作用を示すことは, 雌性生殖器由来成分の存在如何にかかわらず作用を発現することを示している。

第四章 capacitation および acrosome reaction に関与する因子と亜鉛イオンとの関連性

精子の受精能調節因子として DF の存在が報告されている。また *in vitro* における capacitation の誘発は卵胞液あるいは血清 albumin の存在下でのみ高率でおこることが報告され, albumin を含めた二, 三の蛋白質分画が capacitation factor (CF) として働くことが示唆されている。ヒト卵胞液中には histidine, cysteine といった Zn^{2+} との結合能を有するアミノ酸含量が高い。histidine 存在下には Zn^{2+} の受精阻害活性が減少し, また histidine 処理した精子は Zn^{2+} 存在下でも受精した (Table VI)。

Table VI. Effect of Zn^{2+} on Fertilizing Ability of Histidine Treated Spermatozoa

Spermatozoa	Zn^{2+} in culture ^{a)} medium	Total no. of ova examined	Ova penetrated ^{b)} (%)
Epididymal	—	123	50 ± 3
Epididymal	+	117	3 ± 1***
Treated epididymal ^{c)}	+	139	38 ± 8

a) dose : 250 μ M

b) mean \pm s.e.m. of values in 6 independent tests

c) preincubated in m-KRB solution containing 8 mM of histidine for 10 min

Significantly different from treated epididymal spermatozoa : *** $p < 0.001$

一方マウス体外受精系より牛血清 albumin (BSA) を除くと受精がおこらず, また capacitation 精

子は影響を受けないことから、マウス精子の capacitation に BSA が必須であり、BSA の非存在下には capacitation がほぼ完全に抑制され副睾丸精子の状態に保たれていることを認めた (Fig. 4)。

medium 中へ BSA を追加投与 (Table VIII), あるいは精子を高濃度 BSA にてあらかじめ処理を行うことにより (Table IX), 250 μM の Zn^{2+} 存在下にもかかわらず受精可能となった。

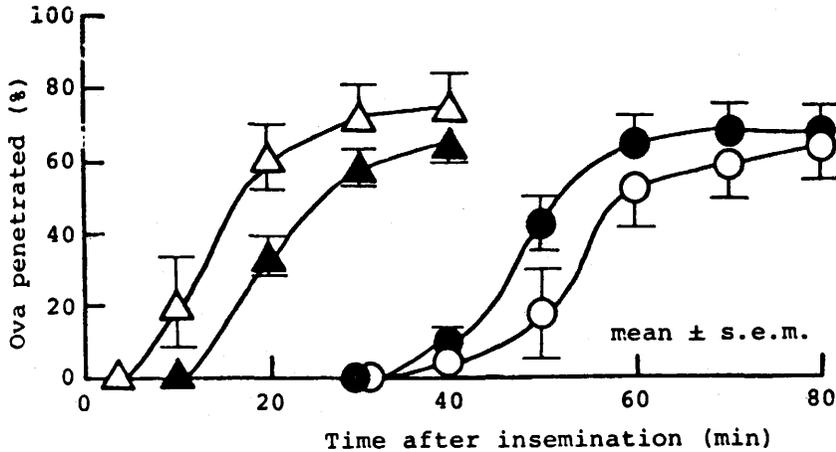


Fig. 4. Effect of Sperm Preincubation in BSA-free m-KRB Solution on the Time Course of Fertilization of Mouse Ova *in Vitro*

- , epididymal spermatozoa
- △, capacitated spermatozoa
- , preincubated spermatozoa in BSA-free m-KRB solution
- ▲, preincubated spermatozoa in Ca^{2+} -free m-KRB solution

Table VIII. Effect of BSA on Capacitation Inhibitory Activity of Zn^{2+}

BSA in culture medium (mg/ml)	Zn^{2+} in culture medium ^{a)}	Total no. of ova examined	Ova penetrated ^{b)} (%)
4	—	62	58 ± 6
4	+	48	0
8	+	78	64 ± 8

Epididymal spermatozoa were added to m-KRB or Zn-KRB solution containing ova.

a) dose : 250 μM

b) mean ± s.e.m. of values in 3 independent tests

哺乳動物精子の acrosome reaction には、一般に Ca^{2+} が必須である。著者はマウス副睾丸精子を Ca^{2+} -free な medium 中で capacitation 誘発に十分な時間培養することにより、acrosome reaction を除き capacitation のほぼ完了した精子を得ることができることを認めた。この様な前培養精子に対しても Zn^{2+} は受精阻害作用を示し、acrosome 膜の安定化作用を有することが示唆された。(Fig. 5)。

Table IX. Effect of Zn^{2+} on Fertilizing Ability of BSA Treated Mouse Spermatozoa

Spermatozoa	Zn^{2+} in culture ^{a)} medium	Total no. of ova examined	Ova penetrated ^{b)} (%)
Epididymal	—	54	53 ± 5
Epididymal	+	59	6 ± 3
Treated epididymal ^{c)}	+	59	42 ± 8*

a) dose : 250 μ M

b) mean \pm s.e.m. of values in 3 independent tests

c) preincubated in m-KRB solution containing 8 mg/ml of BSA for 10 min

Significantly different from epididymal spermatozoa in Zn-KRB : * $p < 0.05$

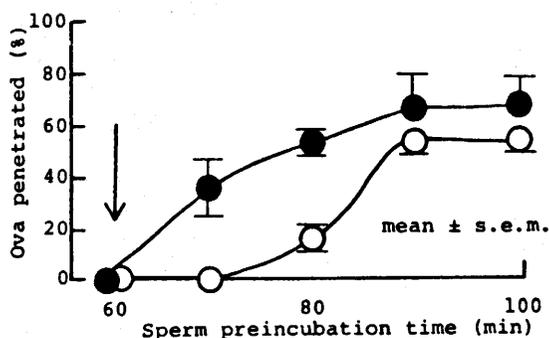


Fig. 5. Effect of Zn^{2+} on Fertilization of Mouse Ova *in Vitro* with Spermatozoa Preincubated in Ca^{2+} -free Medium

Epididymal spermatozoa were preincubated in Ca^{2+} -free m-KRB solution for 60 min, then Ca^{2+} (1.71 mM) and ova added (indicated by arrow).

- , Ova were examined at various times after insemination.
- , Zn^{2+} (250 μ M) was added to the ova at various times after insemination. Ova were examined at 90min after Zn^{2+} addition.

結 論

1) マウス精子は capacitation に伴い特徴的な旋回運動 (精子の "activation") を示すことを認めた。精子の activation は低温, Ca^{2+} の非存在下, Zn^{2+} の添加, さらにモルモット精子より得た decapacitation 活性を有する物質 Fr. I の存在下のそれぞれの条件下において抑制された。しかし一旦 activation した精子は, それぞれの条件下においても最早この運動を抑制されなかった。精子の activation は capacitation の過程を抑制した場合にのみ抑制されることが明らかとなり, capacitation 精子に特徴的な運動であることを示した。

2) マウス体外受精系を用い精子・精漿中に多量に含まれる Zn^{2+} に関し検討を行ったところ, 250 μ M

の濃度において受精は完全に阻害された。 Zn^{2+} による受精阻害はcapacitation精子あるいは卵には認められず、精子のcapacitation抑制作用によることを明らかにした。これまでDFがcapacitationの調節に関与することが示唆されてきたが、 Zn^{2+} もまたそのような因子として重要な役割を果たし得ることを示した。

- 3) Zn^{2+} のcapacitation抑制作用は、長時間の培養後も認められた。 Zn^{2+} はzona-free卵を用いた体外受精系においてもcapacitation抑制作用を示し、 Zn^{2+} は副睾丸精子膜に対し卵黄との融合をも阻害するという形で働いていることを明らかにした。
- 4) マウス精子のcapacitationにBSAが、またacrosome reactionに Ca^{2+} が必須な因子であることが明らかとなり、 Zn^{2+} の作用機作の一つとしてBSAのCF作用の抑制があることを示した。さらに Zn^{2+} はacrosomeの安定化作用を有していることを認めた。

論文の審査結果の要旨

マウス精子はcapacitationに伴い旋回運動を行い、 Zn^{2+} はこれを抑制することを認めた。従って、 Zn^{2+} はcapacitationを抑制することにより受精を阻害し、この阻害は牛血清アルブミンの機能を抑制することにより惹起され、同時にacrosome reactionも抑制することを認めた。

以上の新しい知見を得たので博士論文としての価値あるものと認める。