

琉球大学学術リポジトリ

ブタ体外成熟卵子の体外受精時における多精子受精抑制に関わる因子の解明

メタデータ	<p>言語:</p> <p>出版者: 建本秀樹</p> <p>公開日: 2009-12-11</p> <p>キーワード (Ja): ブタ卵子, 透明帯, レクチン, 糖鎖末端, 多精子侵入, 糖タンパク質, 硬化, 多精子受精, 体外受精, 没食子酸, タンニン酸, タンニン関連化合物, ヒアルロニダーゼ活性, ブタ精子, エラグ酸</p> <p>キーワード (En):</p> <p>作成者: 建本, 秀樹, 仲田, 正, Tatemoto, Hideki, Nakada, Tadashi</p> <p>メールアドレス:</p> <p>所属:</p>
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/13867

ブタ体外成熟卵子の体外受精時における 多精子受精抑制に関わる因子の解明

(研究課題番号：17580247)

平成17年度～平成19年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成20年 3 月

研究代表者：建 本 秀 樹
(琉球大学農学部 准教授)

< は し が き >

ブタ卵子の体外受精時には、ブタにおける繁殖技術の発展に対して大きな障害となっている多精子受精(異常受精)が高頻度(50%以上)に起こる。そこで、これまで多くの研究者によって多精子受精を抑制すべく、受精培地の組成や媒精時の精子濃度等の検討が行われてきたが、その原因の解明にまで未だ至っておらず、適切な体外受精環境の構築が強く望まれている。我々は、これまでの研究で、glycosaminoglycans (GAGs)の一つであるコンドロイチン硫酸 A の徹底水解から得られた四糖からなる短鎖のオリゴ糖が、体外受精時の多精子受精を透明帯周囲の卵丘細胞の有無に関係なく効果的に抑制することを初めて明らかにした。この我々が新規に見出したオリゴ糖は、精子頭部の先体に特異的に局在するヒアルロニダーゼ活性を著しく阻害すると共に、透明帯への結合精子数を減少させた。一般に、精子ヒアルロニダーゼは成熟卵の周囲を覆う拡張卵丘細胞層を精子が通過する際に必要とされており、精子の透明帯への侵入に対するヒアルロニダーゼの関与については全く検討されていなかった。また、新規オリゴ糖は D-glucuronic acid と N-acetyl-galactosamine (GalNAc)で構成されており、受精時における精子-透明帯間の一次糖鎖結合へのオリゴ糖の関与も考慮する必要があった。したがって、我々が発見した抗ヒアルロニダーゼ作用を有するオリゴ糖の多精子受精抑制効果は、ヒアルロニダーゼ阻害作用に起因するものか、もしくは精子-卵透明帯間の糖鎖修飾に起因するものかと云った解明すべき次なる研究課題が発生した。

そこで本研究では、糖鎖を有さないポリフェノール類から新たな抗ヒアルロニダーゼ作用物質としてタンニン酸をスクリーニングした。他のポリフェノール類(アピゲニンやクエルセチン等)とは異なり、タンニン酸は精子から粗抽出したヒアルロニダーゼの活性を濃度依存的に阻害し、受精培地への 5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の添加で多精子受精率を 25%にまで有意に抑制した(対照区 58%; $p<0.05$)。一方、抗ヒアルロニダーゼ活性を示さない他のポリフェノール類には多精子受精抑制効果は検出されず、しかも、透明帯への精子結合や精子先体由来タンパク質分解酵素活性を阻害する作用がタンニン酸には認められなかった。ただし、タンニン酸は抗ヒアルロニダーゼ作用以外に強い抗酸化作用を有しており、この点の影響に関してタンニン関連化合物(タンニン酸、エラグ酸ならびに没食子酸)を用いて更なる追究を行った。その結果、多精子受精抑制効果は、タンニン酸と同様に強い抗ヒアルロニダーゼ作用を保持しながら抗酸化作用を示さないエラグ酸においても確認された。そして、エラグ酸もしくはタンニン酸による処理は、透明帯により誘起される精子先体反応を顕著に抑制することが証明された。すなわち、精子-透明帯間の一次結合で惹起される先体反応に精子ヒアルロニダーゼ活性が関与していると云った新たな知見が得られ、この生理学的作用を抗ヒアルロニダーゼ剤は阻害する機序を介して多精子受精を抑制していると結論された。

一方、ブタにおける精子-透明帯間の糖鎖結合には GalNAc よりも

N-acetyl-glucosamine (GlcNAc)の方が強く関わっており、GlcNAc糖鎖末端へ特異的に結合するレクチン(WGAとS-WGA)処理は透明帯への結合精子数ならびに多精子受精率を有意に減少させた($p < 0.05$)。しかし、活性化卵の表層顆粒の開裂に伴う透明帯構成糖タンパク質の硬化や透明帯への結合精子数の減少は活性化処理後4~12時間にかけて起こり、透明帯との相互作用で先体反応を誘起した精子の割合が低下するには活性化処理後12時間を要した。そして、この時期にはGalNAc糖鎖末端の変化は観察されたが、GlcNAcの糖鎖末端の変化が検出されたのは活性化処理後24時間であった。すなわち、透明帯構成糖タンパク質の各糖鎖末端の変化の遅延がブタ体外受精時の高率な多精子受精に影響を及ぼしていると考えられた。

以上述べてきたように、ブタ体外受精時に特異的に観察される高頻度の多精子受精には精子-透明帯間の糖鎖結合が深く関係しており、抗ヒアルロニダーゼ剤による多精子受精抑制効果は、透明帯との糖鎖結合によって引き起こされる精子先体反応の抑制作用に起因していることが明らかとなった。しかし、ブタにおける体外受精環境を完全に確立するには数多くの問題点が残っており、今後の発展が期待される。

研究課題

ブタ体外成熟卵子の体外受精時における多精子受精抑制に関わる因子の解明
(No. 17580247)

研究組織

研究代表者 建本 秀樹 (琉球大学農学部 准教授)
研究分担者 仲田 正 (琉球大学農学部 教授)

交付金決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	1,400,000	0	1,400,000
平成18年度	1,000,000	0	1,000,000
平成19年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	300,000	3,700,000

研 究 発 表

(1) 雑 誌 論 文

- 1) Tatemoto H, Muto N, Yim S-D, Nakada T. Anti-hyaluronidase oligosaccharide derived from chondroitin sulfate A effectively reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Biology of Reproduction*, 査読有り, 72, 2005, 127-134.
- 2) Win MM, Miyagi Y, Ashizawa K, Tatemoto H, Nakada T. In vitro formation of holes on the inner perivitelline layer of quail ovum by chicken spermatozoa. *Animal Science Journal*, 査読有り, 76, 2005, 133-138.
- 3) Win MM, Tatemoto H, Ashizawa K, Nakada T. Effects of diethylstilbestrol administration on sperm penetration into the inner perivitelline layer of Japanese quail, *coturnix japonica*. *The Journal of Poultry Science*, 査読有り, 43, 2006, 67-74.
- 4) Katayama S, Ashizawa K, Fukuhara T, Hiroyasu M, Tsuzuki Y, Tatemoto H, Nakada T, Nagai K. Differential expression patterns of Wnt and β -Catenin/TCF target genes in the uterus of immature female rats exposed to 17 α -ethynyl estradiol. *Toxicological Science*, 査読有り, 91, 2006, 419-430.
- 5) Win MM, Tatemoto H, Ashizawa K, Kawamoto Y, Nakada T. Determination of acrosomal proteolytic activity in spermatozoa collected from quail treated with diethylstilbestrol, using gelatin-substrate slide technique. *The Journal of Poultry Science*, 査読有り, 43, 2006, 307-311.
- 6) Tatemoto H, Tokeshi I, Nakamura S, Muto N, Nakada T. Inhibition of boar sperm hyaluronidase activity by tannic acid reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Zygote*, 査読有り, 14, 2006, 275-285.
- 7) Katayama S, Ashizawa K, Gohma H, Fukuhara T, Narumi K, Tsuzuki Y, Tatemoto H, Nakada T, Nagai K. The expression of Hedgehog genes (*Ihh*, *Dhh*) and Hedgehog target genes (*Ptc1*, *Gli1*, *Coup-TfII*) is affected by estrogenic stimuli in the uterus of immature female rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 査読有り, 217, 2006, 375-383.
- 8) 吉元哲兵, 仲村敏, 渡慶次功, 仲田正, 建本秀樹. 琉球在来豚アグー精子における冷却処理前の室温放置が凍結融解後の精子性状に及ぼす影響. *西日本畜産学会報*, 査読有り, 50, 35-42, 2007.
- 9) Tokeshi I, Yoshimoto T, Muto N, Nakamura S, Ashizawa K, Nakada T, Tatemoto H. Antihyaluronidase action of ellagic acid effectively prevents polyspermy as a result

of suppression of the acrosome reaction induced by sperm-zona interaction during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, 査読有り, 53, 2007, 755-764.

- 10) Yoshimoto T, Nakamura S, Yamauchi S, Muto N, Nakada T, Ashizawa K, Tatemoto H. Improvement of the post-thaw qualities of Okinawan native pig spermatozoa frozen in an extender supplemented with ascorbic acid 2-O- α -glucoside. *Cryobiology*, 査読有り, submitted.

(2) 学会発表

- 1) 渡慶次功, 建本秀樹, 仲村敏, 武藤徳男, 仲田正. ブタ体外受精時におけるタンニン関連化合物の抗酸化ならびに抗ヒアルロニダーゼ作用の精子侵入に及ぼす影響. 西日本畜産学会 2005 年度(第 56 回)大会, 2005 年 10 月 27 日～30 日, 鹿児島大学.
- 2) 渡慶次功, 建本秀樹, 仲村敏, 武藤徳男, 仲田正. ブタ体外受精時における抗ヒアルロニダーゼ作用を有するタンニン関連化合物類の精子侵入と初期発生への影響. 日本畜産学会第 106 回大会, 2006 年 3 月 29 日～31 日, 九州大学.
- 3) 吉元哲兵, 仲村敏, 渡慶次功, 建本秀樹, 芦沢幸二, 仲田正. 琉球在来豚アグー精子の凍結保存:凍結処理前の精子懸濁液ならびに室温放置時間の検討. 日本畜産学会第 106 回大会, 2006 年 3 月 29 日～31 日, 九州大学.
- 4) 渡慶次功, 建本秀樹, 上原美奈, 吉元哲兵, 仲村敏, 仲田正. レクチンによるブタ卵の受精時における精子-透明帯間の糖鎖結合の検討. 第 99 回日本繁殖生物学会大会, 2006 年 9 月 7 日～9 日, 名古屋大学.
- 5) 吉元哲兵, 仲村敏, 山内昌吾, 渡慶次功, 上原美奈, 仲田正, 芦沢幸二, 武藤徳男, 建本秀樹. 琉球在来豚アグー精子の凍結時における凍結用希釈液へのアスコルビン酸-2-O- α -グルコシド添加が凍結融解後の精子性状に及ぼす影響. 西日本畜産学会 2006 年度(第 57 回)大会, 2006 年 10 月 14 日～15 日, 九州東海大学.
- 6) Tokeshi I, Tatemoto H, Muto N, Yoshimoto T, Nakamura S, Nakada T. Anti-hyaluronidase action of ellagic acid effectively prevents polyspermy through suppression of acrosome reaction induced by the sperm-zona interaction during porcine IVF. The Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 2007 年 1 月 6 日～10 日, 京都.
- 7) 渡慶次功, 上原美奈, 仲村敏, 仲田正, 建本秀樹. ブタ卵の活性化に伴う透明帯構成糖タンパク質の硬化ならびに糖鎖末端の変化. 日本畜産学会第 107 回大会, 2007 年 3 月 27 日～29 日, 麻布大学.

- 8) 吉元哲兵, 仲村敏, 山内昌吾, 仲田正, 武藤徳男, 建本秀樹. 琉球在来豚アグー精子の凍結保存: 凍結用希釈液への新規アスコルビン酸誘導体添加が融解後の精子性状に及ぼす影響. 日本畜産学会第 107 回大会, 2007 年 3 月 27 日~29 日, 麻布大学.
- 9) 片山誠一, 芦沢幸二, 成見香瑞範, 續木靖浩, 建本秀樹, 仲田正, 山下保志. 幼若ラット子宮のヘッジホッグ関連遺伝子の発現に及ぼすエストロゲンレセプター選択的アゴニストの影響. 日本畜産学会第 107 回大会, 2007 年 3 月 27 日~29 日, 麻布大学.
- 10) Ahammad MU, Bulbul SM, Howlider MAR, Tareque AMM, Tatemoto H, Kawamoto Y, Nakada T. Modified choice feeding with whole wheat (with or without enzyme) and crushed corn in broiler. 21th Pacific Science Congress, 2007 年 6 月 12 日~18 日, 沖縄.
- 11) 吉元哲兵, 仲村敏, 山内昌吾, 仲田正, 建本秀樹. 夏期に耐凍能が著しく低下する琉球在来豚アグー精子の凍結時におけるグリセリン添加濃度の融解後の精子性状に及ぼす影響. 第 100 回日本繁殖生物学会大会, 2007 年 10 月 18 日~22 日, 東京大学農学部.
- 12) 山内昌吾, 仲村敏, 吉元哲兵, 仲田正, 建本秀樹. 琉球在来豚アグーにおける性周期に伴った VER 値の変動を指標とした交配適期判定法の検討. 西日本畜産学会 2007 年度(第 58 回)大会, 2007 年 10 月 27 日~28 日, 山口大学.
- 13) Mar Lay K, Tokeshi I, Uehara M, Nakada T, Tatemoto H. The concurrent zona modification during maturation is required for sperm penetration in porcine oocytes. 日本畜産学会第 109 回大会, 2008 年 3 月 27 日~29 日, 常磐大学.
- 14) 山内昌吾, 仲村敏, 吉元哲兵, 仲田正, 武藤徳男, 建本秀樹. 沖縄在来豚アグー精子の凍結時におけるシクロデキストリン処理が融解後の精子性状に及ぼす影響. 日本畜産学会第 109 回大会, 2008 年 3 月 27 日~29 日, 常磐大学.

研究成果による産業財産権の出願・取得状況

該当無し。