

# 保地眞一

目的別テーマ：バイオフィバー生合成機構の解明

研究テーマ

17-2-21：微小管繊維の伸張に関わる精子中心体と卵子細胞周期制御因子の役割

## ABSTRACT

Using an interspecies microinsemination assay with bovine or mouse oocytes, it was examined (1) whether centrosomes of Antarctic minke whale spermatozoa function as the microtubule-organizing center (MTOC), and (2) whether the minke whale haploid spermatogenic cells have an enough ability for sperm-borne-oocyte activating factor (SOAF) in terms of induction of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations and oocyte activation. For the MTOC assay, bull and rat spermatozoa were referred as positive and negative controls, respectively. Vitrified-warmed bovine mature oocytes were subjected to immunostaining against  $\alpha$ -tubulin 4-6 h after intracytoplasmic injection (ICSI) of 5 mM dithiothreitol-treated spermatozoa. Aster formation occurred from whale spermatozoa (33%) and bull spermatozoa (33%), but very little from rat spermatozoa (3%). Activation treatment for the microinseminated oocytes with 7% ethanol + 2 mM 6-dimethylaminopurine resulted in the similar proportion of oocytes forming whale sperm aster (35 vs. 27% in non-treated group; 4 h after ICSI) but significantly larger aster (aster diameter ratio to oocyte diameter, 0.57 vs. 0.30 in non-treated group). These results indicate that centrosome brought into bovine oocytes by whale spermatozoa contributes to the MTOC and assembly of the microtubule network is promoted by oocyte activation. In an additional experiment, the ability of centrosomes in minke whale haploid spermiogenic cells (round spermatids, early elongating spermatids, late elongating spermatids, and testicular spermatozoa) to function as MTOC was evaluated by the interspecies microinsemination assay. No aster formation was observed in the bovine oocytes microinseminated with round spermatids (0%). However, some of oocytes microinseminated with early- or late-elongating spermatids as well as testicular spermatozoa exhibited aster formation. These results indicate that centrosomes in whale spermiogenic cells at the elongating stages have a fully competent ability to function as the MTOC. For the SOAF assay, a population of round spermatids, early-stage elongating spermatids, late-stage elongating spermatids, and testicular spermatozoa was cryopreserved in the presence of 7.5% glycerol on board at the Antarctic Ocean and transported to the laboratory. Repetitive increases of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration occurred in 0, 65, 81 and 96% of BDF1 mouse oocytes injected with the post-thaw round spermatids, early-stage elongating spermatids, late-stage elongating spermatids and testicular spermatozoa, respectively. Normal pattern of the  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations was observed in 26-47% of these responding oocytes. Most oocytes exhibiting  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations, regardless of the oscillation pattern, resumed meiosis (83-94%). These results indicate that whale spermatogenic cells acquire the SOAF activity closely relating to their  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation-inducing ability at the relatively early stage of spermiogenesis.

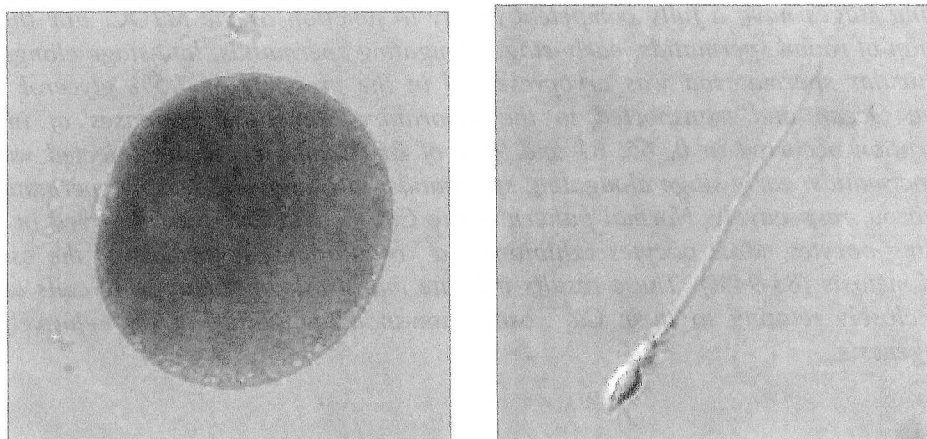
## 研究目的

受精直後の卵子には中心体を起点とした星状体ができ、ここから発達した微小管繊維網が雌雄両前核を卵子の中央に移動させる役割を担い、胚発生のための第一細胞周期へと誘導する。この起点を微小管形成中心 (MTOC) と呼んでおり、多くの哺乳類で精子由来の中心体とその機能を提供するという。また、精子が受精時に卵子内に持ち込み、減数分裂中期で停止していた卵子の細胞周期を再開させるフォスホリパーゼ活性をもつ因子を精子由来卵子活性化因子 (SOAF) と呼んでおり、卵細胞質内のカルシウムイオンの反復性上昇 (カルシウムオシレーション) を引き起こしてその後の卵子活性化へと導く。海棲哺乳類の受精生理に関わる情報は極めて少ないので、

初年度はとくに南極海棲クロミンククジラの精子ならびに精子形成途上の半数体精子細胞を用い、それらが持つ MTOC 活性について調べた。また次年度は、同じクロミンククジラの精子形成途上の半数体精子細胞が、どの時期からカルシウムオシレーションを誘起する能力を持ち、かつ卵子を活性化させる SOAF 活性をもつようになるのかを調べた。

## 2 年間の研究内容と成果

MTOC が精子の中心体由来する場合、ウシ成熟卵子へ顕微授精することで精子星状体が観察される。異種顕微授精から 4 時間後に  $\alpha$ -チューブリンの免疫染色と DAPI による核染色を施したところ、クジラ精子の頸部から星状体ができ、微小管繊維網を卵細胞質全体に拡げてくることがわかった。顕微授精卵子にエタノール / 6-DMAP の併用処理により活性化誘起しても MTOC 形成卵率は変わらなかったが、微小管繊維網の成長は速くなった。さらに各種クジラ半数体精子細胞を顕微授精してそれらの中心体が MTOC として機能できるようになる時期を調べたところ、初期伸張精子細胞以降で星状体形成例が得られてきた。このように、クジラの精子形成過程において、伸張精子細胞以降の半数体生殖細胞は MTOC として機能しうる中心体を持っていることがわかった。次に SOAF 活性として卵子内でカルシウムオシレーションを引き起こし、減数分裂を再開させる能力を有するかどうかは、マウス成熟卵子へ顕微授精することで調べられる。SOAF が精子形成途上のどの時期で獲得されるのかは動物種によって異なっているが、クジラではその時期は伸張精子細胞以降であることがわかった。ウシ精子およびクジラ精子がマウス卵子に誘起するカルシウムオシレーションには、後半になるとパルスの周期が短くなる例が多く認められ、マウス精子が誘起するような正常パターン率はそれぞれ、29%と 40%だった。クジラの円形精子細胞を注入しても細胞内カルシウムの動態もマウス卵子の核相も変化しなかったが、初期伸張精子細胞を注入すると 60%、後期伸張精子細胞では 67%、精巣精子では 92%に反復パルス性のカルシウムオシレーションが観察された（うち正常パターン率は 25~33%）。卵子の活性化は、正常パターン及び短周期パターンのオシレーションを呈した卵子のそれぞれ、100%及び 87%に起こっていた。このようにクジラ SOAF の獲得時期は卵子活性化につながる反復パルス性のオシレーションを示すようになる時期と一致していた。これらの知見は Oxford University Press が出版する *Zygote* 誌に 3 報の原著論文として掲載され、海洋哺乳類の資源保存を目的とした胚盤胞の生産に活用されるものとして期待される。



左：クジラの体外成熟卵子（直径 150  $\mu\text{m}$ ）。右：クジラの精巣内精子（全長 60  $\mu\text{m}$ ）