

学 位 論 文 要 旨

氏名 谷原史倫

題 目 : Study of Zona Pellucida Function During In Vitro Fertilization in Pigs
(ブタ体外受精における透明帯の機能に関する研究)

論文要旨 :

Efficient generation of viable porcine embryos will contribute to research in reproductive physiology, agriculture and biotechnology, including cloning and transgenesis in pigs, and the establishment of pigs as laboratory animals for human disease models. However, polyspermy still occurs with high frequency during in vitro fertilization (IVF) in pigs and polyspermy is considered to be a very troublesome obstacle to efficient production of normal porcine embryos. The zona pellucida (ZP) is considered to be important for prevention of polyspermy in mammalian oocytes. After sperm penetration into ooplasm, contents of the cortical granules were released to the perivitelline space (PVS), they act on the ZP, and cause biochemical and structural changes of ZP that make ZP lost sperm ability to bind ZP and penetration ability of sperm previously bound to the ZP (zona reaction). However, the function(s) with regard to sperm penetration or prevention of polyspermy is not well understood in pigs.

In the present study, the first series of experiments was conducted to investigate the effects of the ZP on sperm penetration during IVF. I collected in vitro matured oocytes with a first polar body (ZP+ oocytes). Some of them were freed from the ZP (ZP- oocytes) by two treatments (pronase and mechanical pipetting), and the effects of these treatments on sperm penetration parameters (sperm penetration rate and numbers of penetrated sperm per oocyte) were evaluated. There was no significant difference in the parameters between the two groups. Secondly, I compared the sperm penetration parameters of ZP+ and ZP- oocytes using frozen-thawed epididymal spermatozoa from four boars. Sperm penetration into ZP+ oocytes was found to be accelerated relative to ZP- oocytes. Thirdly, I evaluated the sperm penetration of ZP+ and ZP- oocytes at 1-10 h after IVF (co-incubation of gametes for 3 h). The proportions of oocytes penetrated by sperm increased significantly with time in both groups; however, the number of penetrated sperm per oocyte did not increase in ZP- oocytes. Finally, I performed IVF using ZP- oocytes divided into control (3 h) and prolonged gamete co-incubation (5 h) groups. Significantly greater numbers of sperm penetrated in the 5 h group than in the control group. These results suggest that the ZP and oolemma are not competent factors for prevention of polyspermy in the porcine IVF system using in our laboratory. Furthermore, the presence of the ZP accelerates sperm

penetration into the ooplasm.

The second series of experiments was conducted to evaluate the detail functions of the ZP for sperm penetration. Firstly, I investigated the effects of the ZP on sperm binding and acrosomal status. I evaluated the numbers of sperm bound to the ZP in ZP+ oocytes and oolemma in ZP- oocytes. Acrosomal statuses of these binding sperm were also evaluated. Furthermore, I evaluated the numbers and acrosomal statuses of sperm presenting in the ZP and perivitelline space (PVS) using ZP+ and ZP- oocytes. More sperm bound to the ZP than to the oolemma. The average number of sperm present in the PVS was 0.44–0.51 per oocyte, and all sperm had lost their acrosomes. I found that the sperm in the PVS, in other words, the sperm passing through the ZP can fuse with oolemma with high efficiency. It may be considered that the sperm are induced some kind of factors involved in sperm-oolemma fusion by passing through the ZP. So in the second experiment, I focused on IZUMO, a critical factor involved in sperm-oolemma fusion, and investigated the effects of the ZP on immunological detection of IZUMO. The proportion of sperm that were immunopositive for anti-IZUMO antibody was significantly higher after they were passing or had passed through the ZP. Furthermore, I performed IVF in the medium supplemented anti-IZUMO antibody to investigate the importance of IZUMO to sperm penetration in pigs. Addition of anti-IZUMO antibody to the fertilization medium significantly inhibited the penetration of sperm into ZP- oocytes. Finally, I investigated whether the ZP induces the synthesis of IZUMO in sperm using two kinds of protein synthesis inhibitors, chloramphenicol (CP) and cycloheximide (CH). It has been reported that eukaryotic cells including spermatozoa have two kinds of ribosomes, mitochondrial 55S and cytoplasmic 80S ribosomes. I hypothesized that CP and CH inhibits 55S and 80S ribosomes, respectively, resulting in inhibition of mRNA translation in sperm. Addition of CP and CH to fertilization medium had no effect on immunological detection of IZUMO during IVF. These results indicate that the ZP induces the acrosome reaction, which is associated with the functional exposure of IZUMO, resulting in completion of fertilization in pigs. It is suggested that IZUMO may not be synthesized during IVF and undergoes some modifications resulting in exposure of IZUMO during passing through the ZP.

In the present study, I elucidated the ZP, accelerates functional exposure of IZUMO resulting successful fertilization. The ZP supports success of normal fertilization not only by being barrier to extra sperm penetration, but also by preparing the condition of sperm for fusing with oolemma. Research of mechanisms controlling fertilization in pigs, such as preventing polyspermy and sperm-oolemma fusion, are expected to contribute improving IVP system in pigs and also to the research of biotechnology in other species.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	谷原 史倫
審 査 委 員	主 査：農業生物資源研究所 上級研究員 菊地 和弘
	副 査：山口大学 教授 山本 芳実
	副 査：山口大学 教授 音井 威重
	副 査：山口大学 教授 佐藤 宏
	副 査：鹿児島大学 准教授 高木光博
題 目	Study of Zona Pellucida Function During In Vitro Fertilization in Pigs ブタ体外受精における透明帯の機能に関する研究
審査結果の要旨： 申請者は、ブタ体外受精(IVF)卵において多精子侵入が頻発するという特性を活用し、一般に知られているが多精子防御機構に関与する透明帯反応がブタ卵では機能するのかを解析する事により、透明帯の機能を明らかにすることを目的とした。 第 1 章では、透明帯の存在が IVF 時の精子侵入に与える影響を検討した。体外成熟培養後、卵丘細胞を除去した透明帯を有する成熟卵(ZP+卵)と、ZP+卵から透明帯を除去した卵(ZP-卵)を用いた。ZP+卵と ZP-卵に 4 頭の種雄豚からの凍結精巣上体精子にて IVF を行い、精子侵入状況を調べたところ、ZP+卵と比較し ZP-卵で精子侵入は有意に低かった。次に、IVF 開始時から経時的に精子侵入を観察したところ、ZP+卵、ZP-卵共に時間経過に伴い精子侵入率が増加し、ZP+卵では侵入精子数も増加したが、ZP-卵では侵入精子数は低いまま推移した。卵細胞膜による多精子拒否について調べるため、ZP-卵を用い、媒精時間を延長して IVF を行ったところ、延長区(5 時間)では対照区(3 時間)と比較し精子侵入が有意に増加した。ブタでは透明帯および卵細胞膜は多精子侵入を防ぐことができず、透明帯が存在すると精子侵入が促進されることが示された。 第 2 章では、卵表面の精子および囲卵腔内に存在する精子を観察し、透明帯の機能について更なる検討を行った。先体を失った精子のみが卵細胞膜と融合できることが知られており、透明帯が精子侵入を促進した要因として、透明帯による先体反応の誘起が考えられた。はじめに ZP+卵と ZP-卵に IVF を行い、卵表面に存在する精子数を測定し(Binding Assay)、時間経過に伴うその推移を調査した。ZP+卵では囲卵腔に存在する精子数も調べ	

た。また、各々FITC-PNA 染色を行い先体の有無を観察した。卵表面の精子数は ZP+卵において有意に多く、また囲卵腔内の精子数は各経過時間において 0.44 から 0.51 個/卵で推移し、すべて先体を失っていた。ZP-卵表面に存在する先体を失った精子は 6.2 から 11.3 個/卵で推移していた。透明帯を通過した精子は先体反応が誘起され、効率よく卵細胞膜と融合していることが示された。透明帯を通過することで、膜融合を促進する何らかの因子が誘起されている可能性がある。IZUMO はマウス、ヒトおよびブタ精子において精子と卵子の膜融合因子として報告された膜タンパクであり、その候補となりうる。次にブタの IVF 時における透明帯の存在が IZUMO の機能的発現に及ぼす影響を検討した。ZP+卵と ZP-卵を用いて IVF 後、FITC-PNA 染色、Hoechst 染色および市販の抗 IZUMO 抗体を用いた IZUMO の免疫蛍光染色を行い、ZP+卵においては ZP 内部もしくは囲卵腔に存在しかつ先体を失った精子について、ZP-卵においては表面に付着しかつ先体を失った精子について IZUMO の機能的発現状況を調べたところ、透明帯を通過することで IZUMO の機能的発現が有意に促進されていた。同抗体を添加した体外受精培地を用いて ZP-卵に IVF を行い、精子侵入状況を調べたところ、抗体濃度を高くすると精子侵入は有意に低下した。卵表面に付着した精子数に差は無かった。ブタにおいても IZUMO は精子侵入に重要な存在であるが、卵への付着には影響しないことが示された。最後に、タンパク合成阻害剤であるクロラムフェニコールとシクロヘキシミドを体外受精培地に添加し、成熟したブタ精子において IZUMO が IVF 中に新合成されているのかどうかを調べたところ、新合成されてはならず、もともと存在した IZUMO が透明帯を通過することで何らかの変化を起こし、免疫蛍光染色で検出されるようになったということが推察された。

本研究により、ブタ卵の IVF において、透明帯は精子における IZUMO の機能的発現を促進し、精子と卵の膜融合を促し、その結果として卵への精子侵入を高めるという働きをもつことが示された。これらの成果は、ブタに限らずヒトも含めた医療、繁殖学、そして生殖工学の発展に大きく貢献すると期待される。学術的にも論文発表等で国際的に十分に評価されている。以上により、本論文は博士（獣医学）の学位を授与するにふさわしいと判断された。