

ジスルフィド結合還元剤処理牛精子の顕微注入後の膨化および雄性前核形成

錢 晓喬・稻垣 宏・佐々田比呂志・菅原 七郎

東北大学農学部動物生殖科学講座 宮城県仙台市 〒981

要旨：本実験は、ジスルフィド結合還元剤処理による牛精子核の膨化を検討した。実験1：in vitro下で影響を調べた。その結果、Tris-HCl中の50 mM以上の高濃度ジチオトレイトル処理で、30分後、80%以上の精子核膨化が認められた。5 mMのジチオトレイトルと1%のドデシル硫酸ナトリウム界面活性剤の併用処理すべての精子核が速やかに膨化した。一方、50 mM以下のグルタチオン還元型の単独処理あるいは界面活性剤との併用処理では精子核の膨化がみられなかった。実験2では、ジチオトレイトルの単独処理による精子核の膨化状態は溶液中の塩濃度に影響されることがわかった。実験3：Tris-HCl中の5 mMのジチオトレイトルあるいは5 mM濃度のグルタチオン還元型で前処理した牛精子を体外成熟牛卵子へ顕微注入し精子核の変化を調べた。注入6時間後で雄性前核形成率はそれぞれ49.0と7.4%であった。対照区へパリン処理精子(5.3%)と比べ、前者は有意に高かった($P < 0.01$)。以上の結果、牛における顕微受精の場合、注入精子の雄性前核形成にプロタミンのジスルフィド結合の還元を誘起する前処理を行うことが有効である可能性が示唆された。

キーワード：ジスルフィド結合、ジスルフィド結合還元剤、膨化、雄性前核形成、顕微注入。

牛の顕微受精卵は体外培養下で胚盤胞へ発生し、移植後胎子へ発育することが報告されているが、発生速度が遅いことや発生率がきわめて低いことが知られている[4, 5]。その原因として、顕微注入後の精子核の膨化と雄性前核形成の遅延が挙げられている[11]。一般に、精子核は濃縮クロマチンで構成され、DNAは精子核内でプロタミンと抱合して安定化している。プロタミンはジスルフィド結合をしているが、雄性前核形成にいたる精子核の変化は最初にプロタミン間のジスルフィド結合が還元することに始まると考えられている[7]。これまで同種および異種卵子への精子の顕微注入の実験で、種によって、その精子核の膨化および雄性前核形成率に差があることが報告されている[17]。牛精子の場合、プロタミン1型のみ存在し他種の精子に比べより安定した結合をしていることが指摘されている[1, 2]。そこで、本実験では、ジスルフィド結合還元剤であるジチオトレイトル、グルタチオン還元型および界面活性剤であ

るドデシル硫酸ナトリウムで牛精子を処理し in vitroでの変化を検討し、次にこれらの還元剤で前処理した牛精子を体外成熟牛卵子へ顕微注入し、その後の精子核の膨化および雄性前核形成を調べた。

材料および方法

供試精液と体外成熟卵子の準備：本研究ではすべて凍結保存黒毛和種牛精液を供試した。

顕微注入に供試した卵子はと場由来の卵巢内卵胞から採取し、10%FCS 加のTCM199液で、39°C, 5%CO₂, 95%空気の条件下で、22時間体外成熟させたものであった。

実験1：還元剤処理による in vitroでの精子核の変化について調べた。凍結精液を37°Cの温水中で急速融解し、50 mMのTris-HCl緩衝液、pH7.4を10 ml加え洗浄遠心(×200 g, 5分間)を2回行った。得られた洗浄精子を以下の溶液に1×10⁷ cells/mlの精子濃度で懸濁させ、37°Cの温水中で2時間インキュベートした：①5～50 mM濃度のジチオトレイトル(Dithiothreitol, DTT, 和光純薬)含Tris-HCl緩衝液、②1～5%のドデシル硫酸ナトリウム(Sodium Dodecyl Sulfate, SDS, 和光純薬)溶液、③5～50 mMグルタチオン還元型(Glutathione Reduced Form, GSH, 和光純薬)含Tris-HCl緩衝液、④5% SDS+50 mM GSH含Tris-HCl緩衝液、⑤5 mM DTT+1% SDS含Tris-HCl緩衝液および⑥100～500 mM DTT含生理食塩水溶液。

各処理後、10分間隔で精子を採取し、スライドガラス上に塗抹し標本を作製した。塗抹標本を4%ホルムアルデヒド液で10分間固定し、ギムザ染色後、精子核の変化を400倍下で検鏡した。精子核の膨化率は各処理区200個以上の精子を観察し、Fig. 1により膨化精子核と無変化精子核に分類し、その割合を算出した。

実験2：精子核の膨化に及ぼすジスルフィド結合還元剤の影響が溶媒のNaClの濃度に左右されることが指摘されている[12]。そこで、DTTの濃度とNaClの濃度との関係が精子核の膨化にどのように影響するかを調べた。洗浄精子を1×10⁷ cells/mlの精子濃度で、DTTが100～500 mMの濃度になるように0.1～0.5%の各NaClの濃度で調整し、続けて、37°Cの温水中で10分間インキュベートした。処理後、実験1と同様に塗抹標本を作製し、固定、染色後、検鏡した。

実験3：実験1および実験2で得られた成績に基づいて、精子をDTTとGSHで処理し顕微注入をし、注入精子核の膨

(受付 1996年1月16日／受理 1996年4月8日)

別刷請求先：〒981 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1

東北大学農学部動物生殖科学講座

化および雄性前核形成を調べた。

A. 精子処理：精子の処理は、洗浄精子を 1×10^7 cells/ml の精子濃度で 5 mM DTT 含 Tris-HCl 緩衝液あるいは 5 mM GSH 含 Tris-HCl 緩衝液に懸濁し、37°C で、30 分間インキュベートした。対照区として、通常の体外受精の前処理として用いられるヘパリン処理を行った。インキュベート後、生理食塩水で洗浄遠心を 2 回行った。

B. 顕微注入操作：体外成熟培養した卵子を 1 mg/ml のヒアルロニダーゼ含 TCM199 液中で、卵子透明帯外径よりわずかに太いピペットで吸引・排出を繰り返し、一部の卵丘細胞を除去し透明帯の一部を露出させた。卵子を顕微注入用シャーレ内にある 10 μ l の培養液ドロップに 5 個ずつ移し、第 1 極体の位置が 12 時あるいは 6 時の方向になるように保定した。培養液ドロップに近接して作出した精子浮遊液ド

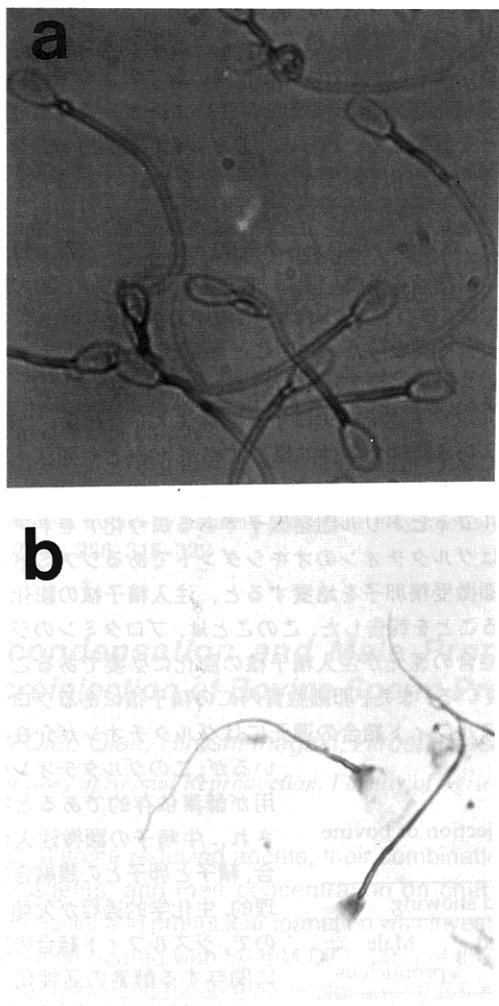


Fig. 1. Photomicrographs of bovine sperm after treatment with several disulfide reducing agents. a. intact sperm heads. b. decondensed sperm heads ($\times 600$).

ロップから、内径 5 μ l のインジェクションピペットで精子を吸引し、卵細胞質内に小量の液とともに一個の精子をいれて顕微注入を行った。続いて、顕微注入後の卵子を Zimmerman 液で満たしたセルチャンバー（理工化学）に入れ、電気パルス発生装置（ECF-2001、理工化学）で電気刺激をした。電気刺激条件として、アライメント電流（AC）を 500 KHz, 40 V および直流パルス電流（DC）を 1 KV/cm, 30 μ s に設定し、1 回通電した。顕微注入後、卵子を TCM199 液で成熟培養と同様の条件で 6 時間培養した。培養後、卵子を酢酸・エタノール (1:3) で固定、1% 酢酸オルセインで染色し、精子核の状態を判定した。統計処理は χ^2 検定法を行い有意差を判定した。

結果

実験 1：還元剤処理による *in vitro* での精子核の変化

in vitro での精子核の変化は Fig. 1 により無変化と膨化に分類された。試験した濃度 1 から 5%までの SDS 含 Tris-HCl 緩衝液あるいは 5 から 50 mM までの GSH の単独処理の場合、2 時間のインキュベーションでいずれも精子核に変化は全くみられなかった。また、50 mM GSH と 5% SDS の併用処理でも変化は生じなかった。Tris-HCl 緩衝液を用いた場合、40 mM 濃度以下の DTT で 2 時間処理すると、精子核に全く変化はみられなかったものの、50 mM 濃度の DTT で精子を処理することにより 40 分間のインキュベーションで 100% の精子核に膨化が観察された。また、生理食塩水で DTT 濃度を 500 mM に調整した場合、精子核に全く変化は認められなかった。さらに、5 mM DTT と 1% SDS を Tris-HCl 緩衝液で調整し併用処理した場合、インキュベーション 5 分で 83% の精子核に、10 分で 100% の精子核に膨化がみられた (Fig. 2)。

実験 2：DTT 処理効果に及ぼす溶媒中の NaCl の影響

実験 1 で 0.9% の生理食塩水に DTT 500 mM を溶解した液で処理した場合、精子核に全く変化がみられなかった。そこ

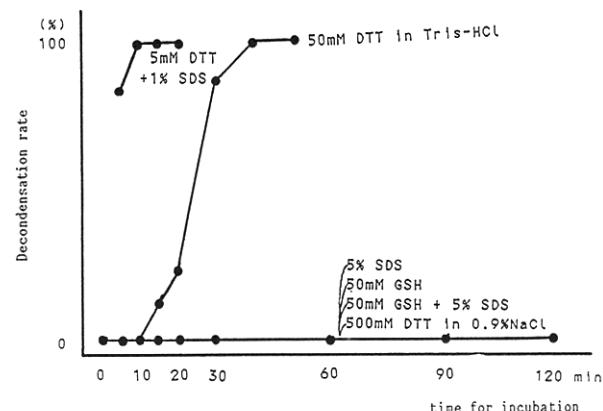


Fig. 2. Decondensation rate of bovine sperm head after treatment with several disulfide reducing agents.

で、NaCl濃度を下げて検討した結果、NaClの濃度が0.4%までは500 mMまでのDTT処理で精子核の変化がほとんど観察されなかつたが、濃度を0.3%以下に下げるときDTTの濃度に依存して精子核の変化が認められた(Fig. 3)。

実験3：還元剤処理精子核の顕微注入後の雄性前核形成

実験1の結果、DTTをTris-HCl緩衝液で調整し単独処理した場合、50 mMの濃度で精子核の膨化が誘起された。さらに、5 mMのDTTでは1%のSDS溶液と併用処理で、インキュベーションが10分間の短時間ですべての精子核が膨化した。それで、精子核のジスルフィド結合還元処理に5 mMのDTT濃度が十分に作用していると推察された。そこで、5 mMのDTTあるいはGSHで精子を処理して顕微注入を行った。その結果(Table 1)、DTT処理では51個の検査卵子中25個(49.0%)で雄性前核形成が認められ、対照区と有意差があった($P < 0.01$)。一方、GSH処理では雄性前核形成率が低かったものの、一部を含めた膨化精子核の割合(48.1%)は対照区と比べ有意に高かった($P < 0.01$)。

考 察

本研究では、牛精子にジスルフィド還元剤処理を行い、*in*

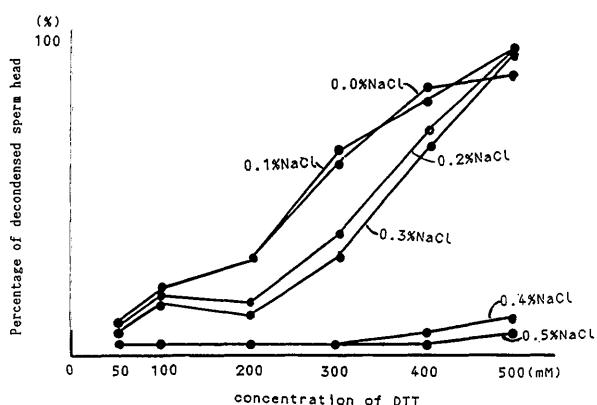


Fig. 3. Effects of DTT in NaCl solution at various concentrations on decondensation of bovine sperm head. The bovine sperm head was treated with DTT for 10 min.

Table 1. Decondensation and male pronucleus formation after microinjection of bovine sperm head treated with some disulfide reducing agents

Disulfide reducing agent used	No. of oocytes examined	No. (%) of microinjected sperm head showing			
		Intact	Partly decondensed	Decondensed	Male pronucleus
Dithiothreitol	51	19 (37.3)*	5 (9.8)	2 (3.9)	25 (49.0)*
Glutathione	27	12 (44.5)*	10 (37.0)*	3 (11.1)	2 (7.4)
Control #1	113	90 (79.7)	13 (11.5)	4 (3.5)	6 (5.3)

* Significantly different from the control ($P < 0.01$). #1 In the control, the sperm was treated with heparin.

*vitro*および顕微注入後の精子核の変化について検討した。その結果、*in vitro*でDTT、SDSあるいはGSHの単独処理で精子核はほとんど変化しなかつた。Delgadoら[3]はヒト精子がSDSの単独処理で膨化するが、牛、豚、ラットおよびウサギ精子は変化しなかつたことを報告した。Jagerら[6]は、*in vitro*で牛精子の膨化を誘起するためにはヒト精子と比べて10倍以上の濃度である500 mMのDTT処理が必要であると指摘している。牛精子の場合、DNAはプロタミンI型と結合していることが知られている。したがって、種によってプロタミン同士およびDNAとプロタミンの結合状態が異なり、精子核の安定性が異なるものと考えられる。

一方、Perreaultら[12]は5 mM DTTとTritonX 100の併用処理でハムスター精子核の膨化が起きることを報告した。本実験では、5 mM DTTと1% SDSとの併用処理で膨化が起きたものの、GSHとSDSの併用処理ではほとんどみられなかつた。Lassalleら[10]はGSHが精子核に作用するためにはGSHが精子膜を通過することが必要であることを指摘している。また、Yoshida[15]は、豚での正常受精において雄性前核形成が卵細胞質内のグルタチオン濃度に左右されることを報告した。さらに、彼らの測定結果では、体外成熟豚卵子ではGSH濃度が4.6～17.2 mMの範囲であった[16]。また、牛細胞質内のGSH濃度については報告されていないが、本実験で用いた5から50 mMまでの濃度が低かったことより種による違いを示していると考えられる。また、本実験では、DTT処理の場合、溶液中の塩濃度によってその効果が大きく異なる。このことはZirkinら[17]が報告したハムスターの精子核での結果と同様であった。

ジスルフィド還元処理精子を顕微注入した結果、DTT処理で注入後6時間で雄性前核形成率が49%と対照区へパリン処理精子のものより有意に高かつた。Perreaultら[13]は、スルフィヒドリル阻害因子であるヨウ化アセトアシドあるいはグルタチオンのオキシダントであるジアミドの添加液で顕微受精卵子を培養すると、注入精子核の膨化が抑制させることを報告した。このことは、プロタミンのジスルフィド結合の還元が注入精子核の膨化に必要であることを示唆している。また、卵細胞質内に精子核にあるプロタミンのジスルフィド結合の還元にはグルタチオンが介在しているが、このグルタチオンの作用が酵素依存的であると推察され、牛精子の顕微注入の場合、精子と卵子との膜融合等生理的、生化学的過程が欠如するので、ジスルフィド結合の還元に関与する酵素の活性化しないことが考えられる。それが顕微注入精子核の膨化および雄性前核形成遅延の一因であろう。Keeferら[8]は、5 mM DTT処理を行った牛精子核を

ハムスター卵子へ顕微注入した結果、6時間後に100%の雄性前核形成率が得られたことを報告した。本研究での成績と異なるが、これは、種によって卵細胞質内の雄性前核形成に関与する因子の違いによることが考えられる。あるいは、Keeferらの用いた卵子は体内成熟卵子であったことから、体外と体内での卵子成熟の質的違いによることが考えられる。この点について今後牛生体内成熟卵子での検討が必要である。

本研究は一部文部省科学研究費（一般研究B 06454122）によって実施された。

文 献

- 1) Balhorn, R.S., Weston, C.T. and Wyrobek, A. (1984): DNA packaging in mouse spermatids; synthesis of protamine variants and four transition proteins. *Exp. Cell Res.*, 150, 298–308.
- 2) Calvin, H.I. (1976): Comparative analysis of the nuclear basic proteins in rat, human, guinea pig, mouse and rabbit spermatozoa. *Biochem. Biophys. Acta.*, 434, 377–389.
- 3) Delgado, N.M., Huacuja, H., Merchant, R.R. and Rosado, A. (1980): Species specific decondensation of human sperm nuclei by heparin. *Arch. Androl.*, 4, 305–313.
- 4) Goto, K., Kinoshita, A., Takuma, Y. and Ogawa, K. (1990): Fertilization in sperm injection in cattle. *Theriogenology*, 33, 238 (abst).
- 5) Goto, K., Kinoshita, A., Kuroda, A., Nakanishi, Y. and Ogawa, K. (1990): Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. *Vet. Rec.*, 127, 517–520.
- 6) Jager, S., Wijchman, J. and Kremer, J. (1990): Studies on the decondensation of human, mouse, and bull sperm nuclei by heparin and other polyanions. *J. Exp. Zool.*, 256, 315–322
- 7) 片桐千明・高宗和史 (1992) : 精子核の凝縮と膨潤. 精子学 : 68–79. 東京大学出版会.
- 8) Keefer, C.L., Brackett, B.G. and Perreault, S.D. (1986): Behavior of bull sperm nuclei following microinjection into hamster oocytes. *Biol. Reprod.*, 34 (S1), 54.
- 9) Keefer, C.L. (1989): Fertilization by sperm injection in the rabbit. *Gamete Res.*, 22, 59–69.
- 10) Lassalle, B. and Testart, J. (1992): Relationship between fertilizing ability of frozen human spermatozoa and capacity for heparin binding and nuclear decondensation. *J. Reprod. Fert.*, 95, 313–324.
- 11) 李 喜和・岩崎説雄・中原達夫 (1993) : ウシ卵子の顕微授精条件の検討ならびに授精後の核及び胚発生の経時的变化. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 39, 49–55.
- 12) Perreault, S.D. and Zirkin, B.R. (1982): Sperm nuclear decondensation in mammals: Role of sperm-associated proteinase *in vivo*. *J. Exp. Zool.*, 224, 253–257.
- 13) Perreault, S.D., Wolff, R.A. and Zirkin, B.R. (1984): The role of disulfide reduction during mammalian sperm nuclear decondensation *in vivo*. *Dev Biol.*, 101, 160–167.
- 14) Perreault, S.D., Barbee, R.R., Elstein, K.H., Zucker, R.M. and Keefer, C.L. (1988): Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed *in vivo* by sperm injection and *in vitro* by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 39, 1557–167.
- 15) Yoshida, M. (1993): Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 35, 76–81.
- 16) Yoshida, M., Ishigaki, K., Nagai, T., Chikyu, M. and Purcell, V.G. (1993): Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol. Reprod.*, 49: 89–94.
- 17) Zirkin, B.R., Soucek, D.A., Chang, T.S.K. and Perreault, S.D. (1985): *In vitro* and *in vivo* studies of mammalian sperm nuclear decondensation. *Gamete Res.*, 11, 349–365.

Decondensation and Male Pronuclear Formation in Bovine Oocytes after Microinjection of Bovine Sperm Pretreated with Disulfide Bond Reducing Agents

Xiao Qiao Qian, Hiroshi Inagaki, Hiroshi Sasada and Shichiro Sugawara

Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai 981, Japan

Effect of some reducing agents, their combination with other agents, and their concentration on changes in sperm nuclei and pronuclear formation was investigated. First, while treated with 50 mM DTT, 80% of the sperm had partly decondensed their nuclei after 0.5 h of treatment, and complete decondensation was observed in all the sperm after 10 min incubation in 5 mM DTT and 1% SDS. None of the sperm was seen dispersed 2 h after treatment with 50 mM GSH and 5% SDS. Second, the decondensation rate was dependent on the NaCl con-

centration when DTT was used as a reducing agent. Finally microinjection of sperm pretreated with 5 mM DTT resulted in a significantly higher male pronuclear formation rate 6 h postinjection (49%) than that (5.3%) of the heparin pretreated control. These results suggest that pretreatment of bovine sperm with DTT may affect the fertilization rate after microinjection.

Key words: Disulfide bond, Disulfide bond reducing agent, Decondensation, Male pronuclear formation, Microinjection.