

—総説—

特集：生殖補助医療における精子処理の基礎と実際

精子の運動メカニズムから考える精液輸送, 精子処理法

Semen transport and sperm handling methods based on the mechanisms of sperm motility

梅原 崇・島田 昌之*

Takeshi Umehara and Masayuki Shimada*

広島大学大学院統合生命科学研究科 〒739-8528 東広島市

Hiroshima University - Laboratory of Animal Reproduction, Graduate School of Biosphere Science, 1-4-4, Kagamiyama Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8528, Japan

要旨：精子は、非常に高い運動能を持ち、受精するという役割に特化されたユニークな細胞である。したがって、他の細胞で報告されている知見がそのまま当てはまらないことが多いこと、動物種間でも大きさや形態が大きく異なることから、精子の運動メカニズムといった生物・生命科学的な観点だけでなく、精子を利用する生殖工学や高度生殖補助医療において、精子に関して何が正しい情報であるかを判断することが難しい。このことが、精子の凍結保存、人工授精や体外受精法の技術発展を遅らせている要因と考えられる。本稿では、精子運動の基本的なメカニズムについて、エネルギー生産に焦点を当てて解説し、そこから考えられる最適な精子処理法について、家畜や実験動物での実験・実施例を含めて紹介する。

キーワード：精子, ミトコンドリア, ATP, 人工授精, 体外受精

はじめに

精子は、特徴的な形態をしている。頭部は、DNAの結合タンパク質がヒストンからプロタミンへと置換された凝縮核を中心として、細胞質部位は分泌顆粒が占有している^{1,2)}。この分泌顆粒に富んだ細胞質部位を一般的には先体と呼んでおり、受精時に分泌顆粒の開裂により分泌顆粒内に蓄えられた酵素が放出される現象が、先体反応である³⁾。分泌顆粒の開裂は、カルシウムイオン (Ca^{2+}) 依存的であると報告されている。精子では、種々のストレス（温度変化や酸化ストレスなど）が受精時ではなくても自発的な先体反応（あるいは先体損傷）を引き起こすことが知られており、そのような精子は少なくとも体内では受精できない⁴⁾。しかし、受精時の生理的な先体反応と上記のストレス性の先体損傷の違いの詳細は不明である。

頭部と尾部の接合部位の細胞質には、受精時のカルシウ

ムオシレーションを引き起こすPLC ζ や卵割に必要な中心体などが存在している。尾部の付け根部分は、中片部やミトコンドリア鞘とも呼ばれているが、この部位は中心部分が尾部構造の特徴である微小管の9+2構造となっており⁵⁾、その周囲の細胞質部位にミトコンドリアがある。すなわち、中片部においては、ミトコンドリアでATPが産生されるため、この効率的なATP産生により中片部のATP濃度が尾部よりも高いと考えられるが、このATP濃度差が、精子の運動パターンに及ぼす影響はよくわかっていなかった。

尾部は先端に至るまで、微小管の9+2構造が中心を貫いており、その周囲の細胞質には小胞体などの細胞内小器官も見られるが、ミトコンドリアは存在していない。微小管は、チューブリンという細胞骨格で構成されているが、そこにはダイニンというATP分解酵素 (ATPase) が結合しており、ダイニンの作用でリン酸基 (PO_3^{2-}) が放出され、それと Ca^{2+} によりチューブリンの滑り込み運動が生じて、尾部の振幅運動が誘起されていると考えられている⁶⁾。 Ca^{2+} は、おそらく尾部にも存在している滑面小胞体から放出されていると考えられるが、細胞外から取り込まれた Ca^{2+} もまた振幅運動に関与している可能性もある。また、尾部にはミトコンドリアが局在しないため、ATPは嫌氣的解糖系で合成されるが、産生される乳酸（嫌氣的解糖系でグルコースから

(受付 2021年7月26日／受理 2021年8月26日)
別刷請求先：〒739-8528 広島県東広島市鏡山1-4-4
広島大学大学院統合生命科学研究科

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: mashimad@hiroshima-u.ac.jp

返還されるピルビン酸は、ミトコンドリアに移行し、アセチルCoAに変換されるとTCAサイクル→電子伝達系に利用されるが、ミトコンドリアが存在しない尾部では、ピルビン酸は乳酸に変換される)がどのように排出されるのかについてはわかっていない。

このように精子について、特に受精に関わる先体反応や運動メカニズムには不明な点が多いのが現状であり、そのために人工授精や体外受精にどのような処理をした精子を用いればよいのかという技術革新が進んでいない(図1)。そこで、我々は、精子の代謝機構や処理過程における変化に着眼した研究を行ってきたので、その成果の一部を紹介する。

精子の運動パターンと栄養基質

上述のとおり、精子は中片部にはミトコンドリアが局在し、尾部には局在していないことから、グルコース存在下では尾部と中片部でエネルギー産生を行い、グルコース非存在下ではピルビン酸や乳酸などを添加することで中片部でのみエネルギーを生産できると考えられる。そこで、グルコース濃度の異なる培養液でブタ精子を培養した結果、高グルコース環境では曲線性の運動パターンを示すが、グルコース濃度を減少させることで精子の直進速度が高まることを明らかにした(図2)。そして、いずれの培養液においても精子中のATP量に差はないが、グルコース濃度の減少に伴ってミトコンドリアの膜電位活性(電子伝達系が活性化

し、ATPを合成していることを示す指標)が上昇したことから、中片部のエネルギー生産が精子の直進運動を引き起こすことが明らかとなった⁷⁾。

しかし、完全にグルコースを除去した時には乳酸を添加しているにもかかわらず、精子の直進速度が培養時間に伴って減退し、ミトコンドリアの膜電位活性も低下した。そこで、グルコースがエネルギー生産以外にも使われていると仮定し、ATPを産生しない解糖系であるペントースリン酸化回路に着眼して実験を行った。その結果、ペントースリン酸化回路により産生されるNADPH量が、グルコース添加により増加すること、ペントースリン酸化回路の抑制剤を添加するとミトコンドリアの膜電位活性が低下すること、その時、活性酸素種(ROS)が増加していることを突き止めた⁸⁾。すなわち、グルコースは好氣的解糖系(ペントースリン酸化回路)により分解され、NADPHを産生すること、NADPHが酸化ストレスを低下させていると考えられた(図2)。NADPHは酸化されたグルタチオンを還元することで酸化ストレスを低下させる因子であることから、精子が直線運動する時、酸化ストレスによりミトコンドリアの機能障害が誘導され、運動可能時間が短縮していると推定される。実際、ミトコンドリアで働く様々なタンパク質は、精子の直進運動時に酸化・分解されていること、これらのタンパク質の中で核ゲノムにコードされるものはターンオーバーされない(精子では遺伝子発現は起こらないので、核ゲノムにコードされるタンパク質は分解されると、消失する)、それが制限要因となり、精子の運動可能時間が決定することが示された。

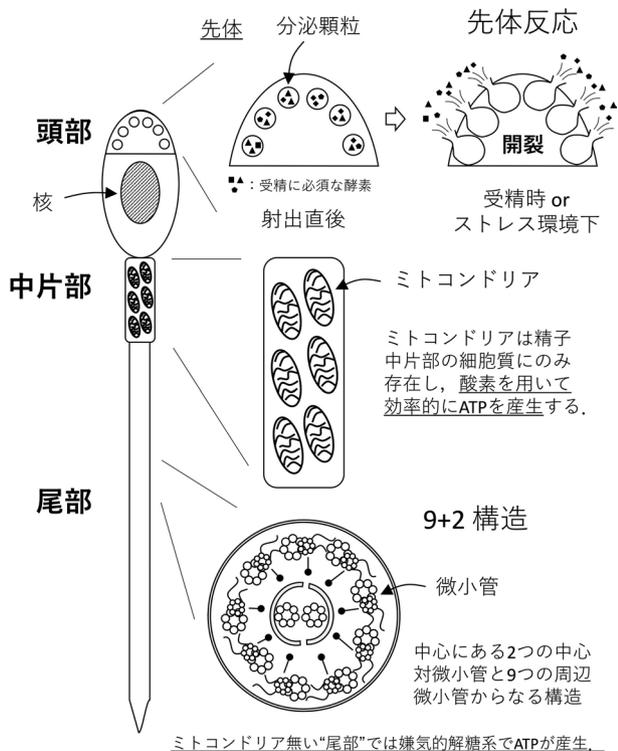


図1 哺乳類精子の構造と形態

酸化ストレスを上昇させない条件

ミトコンドリア内の酸化ストレスは、ターンオーバーできない核ゲノムにコードされるタンパク質を分解する⁹⁾。そ

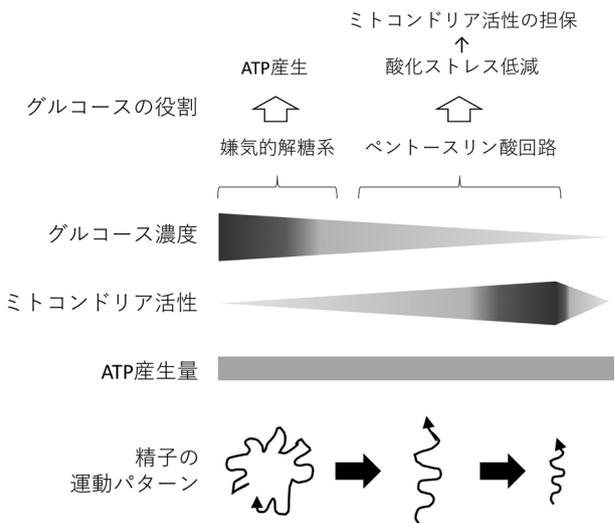


図2 精子運動を制御するエネルギー産生経路

の中には、ミトコンドリア内特異的な転写因子やRNA合成酵素も含まれている。さらに、ミトコンドリア内の酸化ストレスは、環状のミトコンドリアDNAを断片化することも明らかとなった⁹⁾。すなわち、酸化ストレスに曝された精子ミトコンドリアは、不可逆的に機能が低下する。精子のミトコンドリアにおけるATP産生は、精子が子宮内を通過するのに必要な直進運動を引き起こすことから、精子のミトコンドリア機能を保持することが、精子処理、特に人工授精において重要である。

精液中には、フルクトースや種々のアミノ酸類、さらには飽和脂肪酸が高濃度含有されている。フルクトースはグルコースの異性体であり、嫌気的および好氣的解糖系両者に利用されるが、細胞内に取り込まれる取り込み口が異なる。グルコースは、GLUT1～4により細胞内に取り込まれ、それらの中でGLUT1、GLUT2、GLUT3が精子尾部に存在している¹⁰⁾。GLUT4のみがインスリン刺激により細胞質から細胞膜に輸送される特徴を持つが、それ以外は恒常的に細胞膜上に局在するため、グルコースがあれば自動的に精子尾部内に取り込まれる仕組みになっている。一方、フルクトースは、GLUT1～4ではなく、GLUT5により細胞質内に取り込まれる¹¹⁾。そして、GLUT5は中片部に局在している。アミノ酸類は抗酸化因子であるグルタチオン合成に利用され、飽和脂肪酸はβ酸化で分解されることでATP産生の基質になることから、精液中では精子は直進運動を行う¹²⁾。しかし、37℃下で活発にエネルギー合成を行うと内在性の抗酸化因子(グルタチオンとその還元サイクル)ではROSを消去しきれなくなり、酸化ストレスが増大する。ミトコンドリアのエネルギー生産は温度感受性が高いことから(温度を低下させると活性が低下する)、精液は37℃の体温では経時的に機能低下するため、長時間の保管や輸送を行うときは、20℃程度の室温が精子へのダメージは少なくなると期待できる。実際、ブタ精子においては、保存用の希釈液を用いることで、15℃前後で1週間以上保管後に人工授精に用いられ、良好な繁殖成績(高い妊娠率)が得られている。

精子を直進運動させる条件

人工授精において、長時間(子宮内を通過するのにかかる時間)、直進運動を持続し、その後、卵管内で受精能獲得する必要がある。そのため、洗浄した精子(精液の成分である精漿を除去した精子)は、精漿中の精子を直進運動させるのに必要であった成分を含有する溶液で懸濁し、人工授精に用いる必要がある。そのために必要な因子として、イタコン酸を同定した。これは、ミトコンドリアのTCAサイクルから作られる物質で、嫌气的解糖系に関わる酵素を修飾し、酵素活性を低下させる働きを持っている。つまり、精子はミトコンドリアでエネルギー産生を行い、直進運動しているとき、イタコン酸を合成して嫌气的解糖系を止めることで、曲線運動を行わないように自己制御していることになる⁸⁾。しかし、この理論は「ニワトリが先か卵が先かという」因果性のジレンマを抱えている。すなわち、最初にどのようにして

嫌气的解糖系を抑制してミトコンドリアでエネルギー産生を行わせるかという点である。最近、私達は、精漿中に高濃度のイタコン酸が含まれていることを明らかにした。そして、この生理的濃度のイタコン酸を添加することで、精漿上体精子(精漿に曝されていない精子)でも直進運動を誘導することに成功した。

直進運動を持続する条件は、酸化ストレスを上昇させないことである。精子は内因性のグルタチオンを合成する能力を有するが、外因性の細胞膜を通過し、かつミトコンドリア内にまで到達する小分子の抗酸化因子であるピロロキノリンキノン(Pyroloquinoline quinone : PQQ)やエルゴチオネイン、コエンザイムQ10(CoQ10)を添加することで、精子の直進運動時間を6時間まで延長させることができる。そして、酸化ストレスを低下させ、直進運動をする精子は、長時間培養後においても先体を保持し、少ない精子の注入数であっても良好な人工授精成績が得られることをブタやマウスで確認していることから、「直進運動の誘導+持続」を達成できる人工授精用の溶液を用いることで、人工授精成績の改善が期待できる。

体外受精のための精液処理

人工授精は、精子が子宮内を自走して卵管に到達する必要があるため、精子を直進運動させる必要がある。上述のとおり、直進運動を持続させるために尾部の振幅を抑制する=嫌气的解糖系を抑制する条件が推奨される(図3)。体内では、子宮から卵管に移行する時、精子のみが卵管に侵入すること、そして精子は卵管上皮細胞に結合して一時休止すること、排卵後に卵管粘液中のグルコース濃度が上昇することなどにより、直進運動するというプログラムが解除され、精子尾部全域で嫌气的解糖系が活性化されて、激しい尾部の振幅によるzig-zag運動=ハイパーアクティベーション状態となる。このような時間、空間、環境条件の変化により精

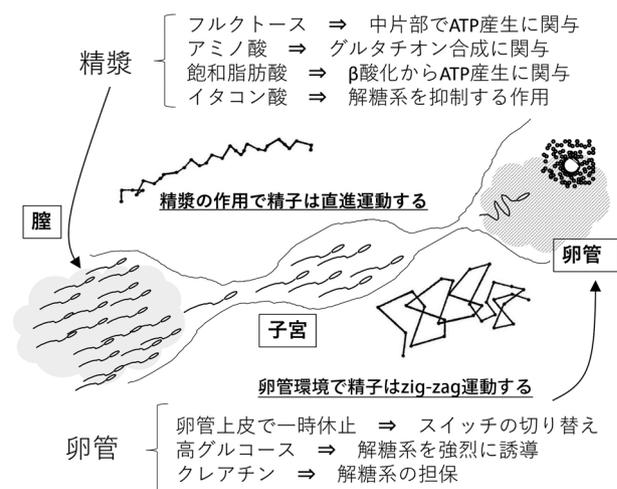


図3 雌の副生殖器官内における精子の挙動

子は受精能を獲得するわけである¹³⁾。この過程を体外で再現しなければ、効率良い体外受精を実施することはできないと考えられる(図3)。

まず、射出精子においては、精漿中に精子を直進運動させる因子が含まれているので、できるだけ早く精子と精漿を分離する必要がある。このことは、マウスやブタなどの体外受精研究において、精巢上体精子では少数精子で体外受精が成立することからも明らかである。また、輸送後の精液では、精子が運動しているときの方が精漿による影響が大きいので、輸送時は精子の代謝が活発化しない20℃前後が望ましいと考えられる。しかし、10℃以下に温度が下がると精子の機能に著しい障害が起こるので、適温に維持して輸送する必要がある。

精漿を除去した精子は、37℃に加温した受精用培地で懸濁すると直ちに嫌氣的解糖系が活性化される。しかし、この嫌氣的解糖系の活性化は、乳酸の蓄積に伴う精子尾部の細胞質内pH低下により、長時間持続することができない。精子尾部のpHが低下すると、尾部は硬直した状態となり、精子の運動軌跡は直線となる。このような動きをする精子は受精できないので、嫌氣的解糖系を活性化させるのは、卵の入ったドロップに入れる瞬間であることが好ましいと考えられる。したがって、精漿を除去した精子は培養液に浮遊させ、20℃前後で保管する。そして、体外受精直前に37℃に加温してswim upを行い、運動良好な精子を体外受精に用いるのが最適である。

Swim up時、そして体外受精時に尾部の激しい振幅を維持してzig-zag運動を一定時間持続させるには、ATPの効率的利用も重要である。我々は、この効率的利用に重要な因子としてクレアチンを同定した。クレアチンは、卵巣の顆粒膜細胞でFSH依存的に合成され、卵胞液中に蓄積している。そして、排卵時に成熟卵とともに卵管へと排出され、卵管粘液中のクレアチン濃度が上昇する。クレアチンは、クレアチントランスポーターを介して精子に取り込まれ、ATPが多い時にはクレアチンキナーゼによりクレアチンリン酸へと変換される。一方、ATPが少ない時、クレアチンリン酸からリン酸基(pO_3^{2-})が放出され、それが微小管の滑り込み運動に利用される。まさにクレアチンは、ハイブリットカーのバッテリーの役割を果たしており、クレアチン存在下では精子のzig-zag運動が持続するので、マウスでは1つの卵当たり5個の精子という微少数の精子で高効率な体外受精が可能となっている^{14, 15)}。

まとめ

精子は、直進運動とzig-zag運動を使い分けて、子宮を通過し、卵管で受精する。この使い分けは、代謝機構の切り替えにより制御されていることから、精子の代謝機構を理解し、代謝に用いられる基質、代謝が活性化する温度、気相条件などを最適化する必要がある。本稿では射出精子について解析したが、精巢上体精子は精漿に曝された経験がないので、zig-zag運動を誘導するのは容易であるが直進運動さ

せることは難しい。また、射出精子であっても凍結精子では、凍結融解過程でミトコンドリアが損傷しているため、融解後は激しいzig-zag運動をおこない、それが短時間で終了することが多く観察される。このような精子の条件の違いも考慮することで、最適な精子処理が可能になる。

文 献

- 1) Balhorn, R. (2007): The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.*, 8, 1–8.
- 2) Abou-Haila, A. and Daulat, R.T. (2000): Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch. Biochem. Biophys.*, 379, 173–182.
- 3) Yanagimachi, R. (2011): Mammalian sperm acrosome reaction: where does it begin before fertilization? *Biol. Reprod.*, 85, 4–5.
- 4) Tesarik, J. (1989): Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoon. *Hum. Reprod.*, 4, 957–961.
- 5) Fawcett, D.W. (1970): A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol. Reprod.*, 2, 90–127.
- 6) Porter, M.E. and Winfield, S.S. (2000): The 9+ 2 axoneme anchors multiple inner arm dyneins and a network of kinases and phosphatases that control motility. *J. Cell Biol.*, 151, 37–42.
- 7) Zhu, Z., Umehara, T., Okazaki, T., Goto, M., Fujita, Y., Hoque, S. A., Kawai, T., Zeng, W. and Shimada, M. (2019): Gene expression and protein synthesis in mitochondria enhance the duration of high-speed linear motility in boar sperm. *Front. Physiol.*, 10, 252.
- 8) Zhu, Z., Umehara, T., Tsujita, N., Kawai, T., Goto, M., Cheng, B., Zeng, W. and Shimada, M. (2020): Itaconate regulates the glycolysis/pentose phosphate pathway transition to maintain boar sperm linear motility by regulating redox homeostasis. *Free Radic. Biol. Med.*, 159, 44–53.
- 9) Zhu, Z., Kawai, T., Umehara, T., Hoque, S.M., Zeng, W. and Shimada, M. (2019). Negative effects of ROS generated during linear sperm motility on gene expression and ATP generation in boar sperm mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.*, 141, 159–171.
- 10) Bucci, D., Rodriguez-Gil, J.E., Vallorani, C., Spinaci, M., Galeati, G. and Tamanini, C. (2011). GLUTs and mammalian sperm metabolism. *J. Androl.*, 32, 348–355.
- 11) Burant, C.F., Takeda, J., Brot-Laroche, E., Bell, G.I. and Davidson, N.O. (1992): Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *J. Biol. Chem.*, 267, 14523–14526.
- 12) Islam, M.M., Umehara, T., Tsujita, N. and Shimada, M. (2021). Saturated fatty acids accelerate linear motility through mitochondrial ATP production in bull sperm. *Reprod. Med. Biol.*, 20, 289–298.
- 13) Ikawa, M., Inoue, N., Benham, A.M. and Okabe, M. (2010). Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J. Clin. Investig.*, 120, 984–994.
- 14) Umehara, T., Tsujita, N., Goto, M., Tonai, S., Nakanishi, T., Yamashita, Y. and Shimada, M. (2020).

Methyl-beta cyclodextrin and creatine work synergistically under hypoxic conditions to improve the fertilization ability of boar ejaculated sperm. *Anim. Sci. J.*, 91, e13493.

15) Umehara, T., Kawai, T., Goto, M., Richards, J.S. and

Shimada, M. (2018). Creatine enhances the duration of sperm capacitation: a novel factor for improving in vitro fertilization with small numbers of sperm. *Hum. Reprod.*, 33, 1117–1129.