

論文内容要旨

論文題目

Impaired fertilizing ability of *Sod1*-deficient mouse sperm during In vitro fertilization

(体外受精における *Sod1* 欠損マウス精子の受精能低下機構の解析)

所属部門： 分子疫学 部門

所属講座： 生化学・分子生物学 講座

氏名： 角田智志

【内容要旨】(1,200 字以内)

本邦では約 6 組に 1 組の夫婦が不妊に悩まされている。不妊を解決する手段として生殖補助医療が近年目覚ましい発展を遂げている。とりわけその要となる体外受精技術は不妊治療に限らず、基礎医学研究における遺伝子改変動物の作出、畜産における優良品種の開発、希少動物保護、など広い分野で利用されている。しかしながら体内に比べ酸素濃度の高い体外にて配偶子および着床前胚を操作することによる酸化的傷害が、受精率、胚発生率あるいは着床率を低下させると考えられている。

哺乳動物の妊孕性に与える酸化ストレスの影響についてはこれまで多くの報告がなされている。中でも抗酸化酵素スーパーオキシドジスムターゼ 1(SOD1)の遺伝子 *Sod1* を欠損した雌マウスの妊孕性は極めて低い。SOD1 は酸素分子から最初に生じる活性酸素種であるスーパーオキシドを消去する酵素で、欠損した場合はスーパーオキシドが種々のラジカル連鎖反応を引き起こし、酸化ストレスが亢進して細胞毒性を示す。*Sod1* 欠損卵と野生型精子を体外受精させ、通常酸素(20%)下で培養すると 2 細胞期で卵割が停止する。このように *Sod1* 欠損雌マウスが著しい生殖能低下を示すのに対し、*Sod1* 欠損雄マウスの妊孕性に異常は認められない。本研究は体外受精過程における *Sod1* 欠損精子の生殖能を評価することを目的とし、野生型卵を用いた体外受精試験を行った。

性成熟した 12-16 週齢の *Sod1* 欠損雄マウスあるいは野生型雄マウス由来の精子を野生型卵と体外受精させ、受精率を評価した。精子の機能評価として運動能、ATP 含量、脂質過酸化物量およびチロシンリン酸化の経時的变化を解析した。

Sod1 欠損精子の体外受精率は野生型と比べて著しく低下し、還元剤の 2-メルカプトエタノールを添加することで一部回復が認められた。卵表面を覆う糖タンパク質の層である透明帯を除去した卵を用いた場合は、*Sod1* 欠損精子と野生型精子との間に受精率の違いは認められなかった。*Sod1* 欠損精子の運動性、ATP 含量は培養時間に依存して減少し、脂質過酸化物量は増加した。精子の受精能獲得の指標の一つであるチロシンリン酸化については、野生型に比べて *Sod1* 欠損精子では抑制された。

以上の結果から、*Sod1* 欠損雄マウス由来の精子は、体外受精過程において酸化的傷害が蓄積し受精率低下を示すことが明らかとなった。卵の透明帯を除去した *Sod1* 欠損精子は正常に受精したことから、精子の酸化的傷害の蓄積はチロシンリン酸化抑制を伴う受精能獲得障害を引き起こし、透明帯貫通を阻害すると考えられる。体外受精過程では、精子は体内に比べて高濃度の酸素に長時間曝されることから、還元剤添加等により精子の酸化的傷害を効果的に緩和することで受精率の向上が期待される。

平成 25年 1 月 24日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名：角田 智志

論文題目：Impaired fertilizing ability of *Sod1*-deficient mouse sperm during in vitro fertilization
(体外受精における *Sod1* 欠損マウス精子の受精能低下機構の解析)

審査委員：主審査委員

藤井 順逸 (印)

副審査委員

宮田 喜寿 (印)

副審査委員

中島 修 (印)

審査終了日：平成 25年 1 月 22日

【論文審査結果要旨】

晩婚化や出産年齢の高齢化が進んだことにより、望んでも子供に恵まれない夫婦が増え、それが少子化をもたらす要因の一つになっている。そのため不妊治療の重要性が増している。しかし、生殖補助医療の進歩によりその成績は大きく改善したものの、老化個体からの配偶子は体外受精効率が低いなど、解決すべき問題は未だ多く残されている。活性酸素は老化促進要因として知られ、その生成を抑えることが老化の防止や様々な疾患の改善に有効と考えられる。生体は、各種抗酸化酵素を有しており、活性酸素を効率よく除去することで酸化障害を防いでいる。なかでも酸素分子から最初に生じる活性酸素種のスーパーオキシドを消去する *Sod1* は、酸化障害からの防御において中心的な役割を果たすと考えられている。*Sod1* を欠損する雌マウスは不妊となることから、その原因究明のための検討がなされているが、雄マウスの妊孕性に異常は認められておらず、雄性生殖機能における *Sod1* の生理的な役割は不明であった。

申請者は、*Sod1* 欠損精子の機能について体外受精系で検討を行い、次のような結果を得た。①野生型マウスの卵を用いて、野生型精子と *Sod1* 欠損精子の受精能を比較したところ、*Sod1* 欠損精子の受精効率は野生型精子の半分以下であった。②その受精効率は培養時の酸素濃度を下げても変わらず、還元剤の投与で一部改善が認められた。③野生型精子に比べて多くの *Sod1* 欠損精子が卵の透明帯に付着しており、そうした卵では受精が起こっていなかった。そこで卵の透明帯を除去したところ、*Sod1* 欠損精子の受精効率は野生型とほぼ同等になった。④培養時間を変えて経時的に測定したところ、野生型精子に比べて *Sod1* 欠損精子の運動能は早期に低下し、エネルギー源である ATP 量も減少した。脂質過酸化物の量については、*Sod1* 欠損精子の方が著しく増加した。⑤精子の受精能獲得に必要なリン酸化チロシンの量は、*Sod1* 欠損精子では少なかった。以上の結果は、*Sod1* 欠損により増加した活性酸素が精子の酸化を促進し、受精能獲得障害・エネルギーの早期枯渇・運動能低下などをもたらし、受精能を低下させたことを示唆している。母胎内の受精過程には多数の精子が関与し、その一部が正常に機能することで妊孕性が保たれるため異常は認められなくとも、体外受精での検討結果が示すように個々の精子については酸化ストレスによる機能障害が起こる可能性がある。

本研究は、体外受精系で *Sod1* 欠損マウスの精子の機能を調べることで、活性酸素が精子の受精能に与える影響を明らかにし、体外受精の過程で生じる酸化ストレスの作用を理解する上で重要な知見であることから、博士(医科学)の学位論文にふさわしいと判断した。

(1, 200字以内)