

マウス精子の凍結保存感受性に関する量的形質
遺伝子座 (QTL) 解析

2018 年 1 月

刘 金莎

マウス精子の凍結保存感受性に関する量的形質
遺伝子座 (QTL) 解析

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生物機能科学専攻

博士(農学)学位論文

刘 金莎

目次

第 1 章 緒言	3
第 2 章 新鮮・凍結精子の体外受精率の評価及び受精率に関する QTL 解析	7
2.1 緒言	7
2.2.材料及び方法	9
2.3 結果	15
2.4 考察	20
第 3 章 凍結精子の状態の検討	29
3.1 緒言	29
3.2 材料及び方法	32
3.3 結果	37
3.4 考察	42
第 4 章 総論	54
第 5 章 謝辞	57
第 6 章 参考文献	59

第1章

緒言

マウスでは、1970年代から胚や配偶子の保存及び次世代を作製するために生殖工学技術 (assisted reproductive technologies ; ARTs) が広く使用されている (Whittingham *et al.*, 1972; Whittingham *et al.*, 1974; Mochida *et al.*, 2017)。生殖工学技術は過排卵、体外受精、胚・精子凍結から、より高度な顕微操作技術を必要とする遺伝子改変技術、顕微授精や核移植クローンなどを含む (Yokoyama *et al.*, 1990; Byers *et al.*, 2006)。生殖工学技術の発展は、マウス系統の作製・保存・輸送・大規模生産という研究資源の活用に大きく貢献している。近年、遺伝子改変マウスの急速な作製に伴い、これらの生物資源を長期保存する方法として胚凍結と精子凍結が利用されているが、多くの研究室およびマウス施設において簡単かつ経済的な方法として精子凍結保存が主に使用されている (Thornton *et al.*, 1999; Ostermeier *et al.*, 2008; Yoshiki *et al.*, 2009)。一方で、凍結および融解操作 (Tao *et al.*, 1995)、長期保存、または浸透圧変化および酸化ストレスなどの環境変化は、精子の運動性、生存率、先体完全性および膜完全性に有害な変化をもたらし (Walters *et al.*, 2005)、精子の受精能力の低下を引き起こすという問題点が挙げられる。

注目すべきことは、精子凍結後に、異なる系統のマウスにおいて精子の生存率及び運動性が異なるという点である。これは、凍結精子を用いて胚を生産する際に、効率に系統間のばらつきを生じさせてしまう (Tada *et al.*, 1990; Sztein *et al.*, 2000)。この系統間の多様性には、複数の遺伝子による複雑形質である可能性が高い。すなわち、これらの量的形質の原因となる遺伝子は、いわゆる量的形質遺伝子座 (quantitative trait loci ; QTL) であり、精子膜の正常性および精子運動性など生理学的な複雑なメカニズムに関与することが考えられる。

例えば、C57BL/6 (B6) 近交系マウスは、精子を凍結融解してから、IVF を行って得られる受精率が低いことが示されている (Hasegawa *et al.*, 2014)。B6 マウス系統は、最も知られた標準的な近交系であり、多くのトランスジェニックおよびノックアウトマウス系統の遺伝背景として広く利用されている (Songsasen *et al.*, 1997)。しかし、一方では、古典的近交系として長い歴史を持つ DBA/2 (D2) 系統マウスは、凍結融解の操作に対してより耐性があり、高い受精能力を維持する (Nishizono *et al.*, 2004)。特に、この系統は、現在最も信頼性が高い精子凍結液の一つである 18%ラフィノース+3%スキムミルク水溶液 (18% raffinose と 3% skim milk ; R18S3) に対する感受性が低いことが明らかになっている。精子生理学的見地からは、細胞膜からコレステロールが脱離することが、正常な受精能獲得への重要な過程であることが知られている (Davis *et al.*, 1980)。Choi and Toyoda (1998) の研究によると、細胞膜からコレステロールの脱離を促進するメチル- β -シクロデキ

ストリン (methyl- β -cyclodextrin ; MBCD) を精子の前培養培地中に添加することで、受精能獲得が効率的に誘起され、受精率を高める (Choi *et al.*, 1998)。最近、B6 近交系マウスにおいて、L-グルタミンを添加した R18S3 で精子を凍結し、MBCD を添加した培養液中で融解した精子を前培養すると、受精能力を大幅に改善することが報告されている (Takeo *et al.*, 2008, 2010, 2011)。なお、卵子側への処理では、C57BL / 6J (B6J)マウスの IVF において、還元型グルタチオン (glutathione ; GSH) の処理により、卵子透明帯の精子通過が促進されることが示されている (Bath *et al.*, 2010; Hasegawa *et al.*, 2012)。

以上の技術改善により、現在では、B6 系統及びその遺伝子改変マウスにおける精子は安定的に凍結保存することができ、実用的な受精率が得られる。このため、精子の凍結に対する感受性に関わる遺伝的解析は、特に実用上の必要性は高くないかも知れない。しかし、精子の凍結融解に対する感受性の系統差に関与する遺伝子または分子メカニズムに関する情報はほとんどない。こちらの情報は、卵子を効果的に受精させるために必要な精子の生理学的特徴の理解に役立つはずである。そこで本研究では、精子凍結感受性が対照的な 2 つの近交系 B6J と D2J を親系統とするリコンビナント近交系 (recombinant inbred ; RI) マウスを用いて、凍結保存感受性に関する QTL 解析を行った。こちらの RI 系統は、両方の親系統の略語を用いて、BXD RI 系統という (Taylor *et al.*, 1999; Peirce *et al.*, 2004)。一般に、RI 系統マウスは、2 つの近交系マウスを交雑から生じた F2 から兄妹交配を繰り返した系統からな

る RI 系統である。それらの染色体は、ゲノムブロックのモザイクを形成し、親の一方のみからそれぞれの遺伝子をホモで継承している。よって、RI 系統を用いて興味ある QTL を統計学的に同定することが可能である。

本研究では、第 2 章において、近交系マウス B6J、D2J 及び BXD RI 系統の新鮮および凍結融解精子を用いて、受精率の相違を明らかにした。続いて、8 系統の RI マウスにおける新鮮・凍結精子の受精率を用いて QTL を同定した。第 3 章では、凍結精子の受精率に関わる精子側の指標となる精子運動性測定、細胞膜の正常性や先体の状態及び受精能獲得（capacitation）を、BXD RI 系統およびその親系統を用いて解析した。

第2章

新鮮・凍結精子の体外受精率の評価及び受精率に 関する QTL 解析

2.1 緒言

マウス系統を長期保存する方法として Nakagata N. & Takeshima T.の報告した 18%ラフィノース+3%スキムミルク水溶液による精子凍結方法は幅広く利用されている (Nakagata *et al.*, 1993)。理化学研究所バイオリソースセンターでもこの方法を採用し、一部変更を加えることにより実用的な精子凍結法として安定した成績で行われている。精子は、精巣上体を通過することによって成熟し、凍結保存に対して耐性がある。一般的 12 週齢以上雄マウスにおける精巣上体尾部から成熟した精子を採取して凍結する。そして、凍結精子を融解してから体外受精や人工授精に使用して胚や産仔を得ることが可能となる。しかし、遺伝的背景によってマウスにおける凍結精子を用いて体外で受精率は大きく異なることが知られている (Sztein *et al.*, 2000)。このような形質は、複数の遺伝子座によって支配され、実験操作の影響を

受けるため、その遺伝解析はほとんどしていない。最近、QTL (Quantitative trait loci : 量的形質遺伝子座) 解析が盛んに用いられている (Alberts *et al.*, 2010)。QTL 解析は、数量化可能な形質を支配する遺伝子を同定するための統計的相関関連を解析する方法である。また、RI 系統は、2つの近交系統間の表現型に關与する因子の染色体マッピングを行なう目的で開発された (Taylor *et al.*, 1999; Peirce *et al.*, 2004)。更に、マイクロサテライト遺伝多型マーカーに関する全ゲノム情報を利用でき、QTL ソフトウェアを用いて遺伝子領域を特定することが出来る。表現型の評価方法では、環境の影響による変異を小さくするために最適な条件下で精度の高い検定ができる方法を開発する必要があります。本章は、厳密に制御された条件下で近交系マウス B6J、D2J 及び BXD RI 系統における新鮮・凍結精子の体外受精の受精率が異なることを実証した。更に、B6J、D2J 及び BXD RI の受精率を用いて、凍結保存感受性に関する遺伝要因のゲノムを明らかにすることを目的として行った。

2.2.材料及び方法

マウス

B6J 系統の 12 週齢以上雄マウスは日本チャールスリバー (Charles River Japan) から購入した。D2J 系統及び BXD RI マウスは理化学研究所・筑波事業所・バイオリソースセンターに保存している凍結胚を融解して胚移植後して個体を得た。また、6 週齢以上になると、同じ系統の雌と雄を交配し、増やした雄マウスは 12 週齢以上で使用した。全ての系統における少なくとも 6 匹の雄マウスを IVF 実験に使用した。IVF の受精率に關与する卵子の影響を除外するために、すべての IVF 実験に使った雌マウスは日本チャールスリバーから購入した 9 週齢～12 週齢の雌 B6J であった。すべてのマウスは、温度 ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$)、湿度 ($55\pm 2\%$) および照明条件 (07:00～21:00) 及び特定病原体不在条件下で飼育され、全ての実験は理化学研究所・筑波事業所の実験動物審査委員会の承認を受け実施した。

IVF

一部変更を加えることにより実験を行った (Hasegawa *et al.*, 2016)。初めに、新鮮精子の培養液は、450 μl の 0.3% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin ; BSA) を含む HTF (human tubal fluid ; HTF) (Quinn *et al.*, 1985) をミネラルオイルで覆い、

30分以上5%CO₂、37°Cインキュベータ内に静置し、ガス平衡させた。一方で、凍結精子の培養液は200μlの0.3%BSAを含むHTFであった。採精は、成熟雄マウス(3ヶ月～11ヶ月齢)を用い、頸椎脱臼で安楽死させ、ハサミとピンセットを用いて速やかに精巣上部尾部のみを摘出し、濾紙上で血液と脂肪組織を除去した。ピンセットで精巣上部尾部をつまみ、26G注射針を膨大部分に尖刺して露出した精子塊を針先ですくい取り、左右の尾部からそれぞれ精子を前培養液中のドロップに導入し、インキュベータ内へ戻して(37°C、5%CO₂下、加湿空气中)60分間前培養し、受精能獲得を誘起させた。また、採精後に左右の精巣上部尾部をすぐに凍結を行った。

未受精卵の採取は、妊馬血清性性腺刺激ホルモン(eCG; Peamex, Sankyo Co., Tokyo, Japan)とヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG; Puberogen; Sankyo Co.)各7.5単位を48～50時間後で雌マウスの腹腔内へ投与し過排卵を誘起した。通常B6Jでは、9～12週齢の個体を1匹から20～30個の卵子を採取できるが、本研究において、1匹雄マウスに対する30～40個の卵子が必要し、3～4匹の雌B6Jを用いた。採卵の前に、採卵とも媒精用の体外受精用培養液(HTF)は、80μlを2～4ドロップを載せたディッシュをミネラルオイルで覆い、30分以上5%CO₂、37°Cインキュベータ内に静置し、ガス平衡させた。頸椎脱臼で安楽死させ、ハサミとピンセットを用いて5分以内に雌の個体から卵管だけを摘出し、滅菌したろ紙上で血液を除去してから採卵用ディッシュのミネラルオイル中に沈めた。ピンセットで卵管をディッシュの

底に押しつけることにより固定し、1ml シリンジに取り付けた 26G の針先で卵管膨大部を引き裂き、放出した卵子-卵丘細胞塊を針先で移動させて培養液中に導入した。採卵後は速やかにディッシュをインキュベータへ戻した。本研究では 1 匹あたり雄マウスの精子の受精能力を評価するために、30~40 個の卵子を 2 つドロップに分けて媒精した。

精子と卵子の共培養（媒精）の前に、精子の運動性の確認（実体顕微鏡下）と濃度の測定（通常、精子液 5 μ l を水で 10 倍希釈し、血球計算盤で濃度を求める：1/5mm の厚さの血球計算盤の場合、最小マス（1/4mm 四方）内の精子数 $\times 8 \times 10^5$ /ml が精子濃度）を行った。媒精は精子前培養ドロップの縁をチップの先で広げた部分からピペッターで活発に運動している精子を静かに（縁に沿ってピペッターの先を動かすようにして）吸引し、採卵した培養液中に導入した。直後に同じドロップ内の精子の運動性を解析した。本実験では、新鮮精子における導入する精子量は 200 cells/ μ l（最終精子濃度）になるようにした。凍結精子における導入する精子量は、500 cells/ μ l（最終精子濃度）になるようにした。第 3 章に述べた方法で運動性を測定した。

確実な受精判定のためには媒精後 5 時間後に、胚操作用キャピラリーでピックアップし、新鮮な改変 CZB 培養液（Chatot *et al.*, 1989）に 2 回移しかえて卵丘細胞などを取り除いた。卵子を改変 CZB 培養液で洗浄後、ワセリンパラフィンで 4 箇所滴したスライドガラス（2 枚）上に少量の改変 CZB 培養液と共に 15~20 個（1 枚あ

たり)の卵子を乗せ、カバーガラスをかぶせてグルタルアルデヒドを濾紙で吸い取りながら流し込み、10～20分間固定した。固定後、同様に水、エタノール、酢酸オルセインを順番に流し込んだ。酢酸オルセインで染色したらすぐに観察した。受精判定は、雄の前核及び精子尾部より受精を判定した (Ogura *et al.*, 1997)。

精子の凍結保存法

精巣上体尾部は体外受精のディッシュの蓋に置いて 100 μ l の R18S3 を入れ、その液中で前述の左右の精巣上体尾部を先の細いハサミで切れ目を 10–15 箇所ほど中心から放射状に入れ、そのまま 1 分間、ゆっくりディッシュを揺らしながら拡散させた。次に、精子液を 10 μ l ずつ小滴状に分け、予めラベルを貼っておいた保存用プラスチックストロー (0.25ml) に、PB1 液を半分、空気を 2cm ほど吸ってから、精子液 (10 μ l) を吸い取り、更に空気を約 2cm、PB1 を 1cm 吸って最後にストローパウダーで栓をした。最後に液体窒素上に浮かせたプラスチック容器にストローを入れ、10～60 分間静置した後に、プラスチック容器内に液体窒素を徐々に入れてから、保存用のケーンもしくはカセットにストローを移して保存した。本実験に使った精子凍結液は、以前に 18%ラフィノースおよび 3%スキムミルク (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) で調整し、遺伝工学基盤技術室に凍結保存された R18S3 を完全に溶けてから室温まで自然冷却させ、20,000G (15,000rpm)

で 15 分間遠心分離して沈殿物を取り除き、精子を凍結しました。一週間以上に保存された凍結精子のストローを取り出し、10 秒数えてから 37°C の温水に漬け、そのまま 15 分間温めたら、温めておいたディッシュの蓋に、精子液だけを取り出して、広げて平衡させた 2 つドロップの 200 μ l の HTF へ 5 μ l ずつ精子液を移し、インキュベータ内に 60 分間前培養し、前述の IVF 手順の通りに、1 つドロップの 200 μ l の HTF で培養した精子で実験を行った。同時に別の 1 つドロップの 200 μ l の HTF で培養した精子を第 3 章に述べた方法で運動性を測定した。

QTL 解析

表現型に関する全ての QTL マッピングは、GeneNetwork の WebQTL ソフトウェア (www.genenetwork.org) を用いて行った (Chesler *et al.*, 2004)。潜在的な QTL を評価するために、間隔マッピングは、形質の違い及び特定の遺伝子型マーカーの違いとの間の関連性の測定値として尤度比統計 (likelihood ratio statistics ; LRS) から計算した。また、Haley-Knott 回帰による統計学的に有意な Suggestive 及び significant LRS スコア (初期設定) は WebQTL ソフトウェアを用いて 1,000 回の並び替え検定によって決定した。一般的、表現型と染色体座における遺伝的差異 (対立遺伝子) との間の関連性は対数尤度比の値 (LOD Score) が計算されます。LOD 値は、4.61 を掛けることによって、LRS スコア (尤度比統計) に変換することがで

きます。suggestive 閾値を超える QTL のピークおよびショルダーにある遺伝子は、GeneNetwork パッケージ (<http://genenetwork.helmholtz-hzi.de>) で実施された QTL miner を使用して、支配する遺伝子の同定を行った (Alberts *et al.*, 2010; Nedelko *et al.*, 2012)。我々は、解析された QTL 内にマッピングされた遺伝子を精査するために、国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) Entrez Gene ウェブサイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>) および Jackson Laboratory's Mouse のゲノムデータベース (MGI) (www.informatics.jax.org) プロジェクトを使って責任遺伝子を同定した。

統計解析

エクセルを使って、サンプル数 6 より受精率の平均値±標準誤差を算出した。また、新鮮及び凍結精子における受精率の数値を逆正弦変換し、算出された。その値の正規性を確認して、それぞれ繰り返しのある二元配置の分散分析(two-way ANOVA)を行い、系統間(B6J vs. D2J)及び凍結処理(新鮮精子 vs.凍結精子)の両因子間の交互作用の有無を検討した。そして、交互作用が認められた場合は、多重比較検定の Tukey-Kramer によって解析した。 $P < 0.05$ を統計的有意とした。

2.3 結果

初めに、系統により凍結精子を用いた IVF の受精率が大きく異なるという既報に従って、近交系マウス B6J 及び D2J における新鮮・凍結精子の体外受精能力を評価した(Sztejn et al., 2000)。受精率に関与する卵子側の因子を除外するために、すべての IVF 実験には、9~12 週齢の雌 B6J から採取した卵子を用いた。または、受精率の判定について検討した。通常、媒精 4~6 時間後に、胚操作キャピラリーでピックアップし、新鮮な改変 CZB 培養液に 2 回移しかえて卵丘細胞などを取り除き、正常な卵子のみを新鮮な CZB 培養液へ移して培養する。翌日、2 細胞期胚は受精卵として判定し、記録する。本実験では、受精(侵入)能力を調べるために、卵子を染色することによる雌雄両前核の形成および精子尾部の卵細胞質内へ残ることを受精判定の基準とした(図 2.1 A)。得られた結果は、B6J 及び D2J の新鮮精子を用い、それぞれの受精率は、 $79.3 \pm 4.5\%$ と $94.6 \pm 2.8\%$ であった(図 2.1 B 及び表 2.2)。B6J 及び D2J の凍結精子を用い、それぞれの受精率は、 $9.4 \pm 3.8\%$ と $85.2 \pm 7.9\%$ であった(図 2.1 B 及び表 2.2)。つきまして、B6J vs. D2J 系統及び新鮮 vs. 凍結精子に関する両因子の効果について two-way ANOVA を行ったところ、両因子(系統・凍結処理)共に、受精率に有意な影響を与えていることが明らかとなった($P < 0.0001$) (表 2.1)。また、系統および凍結保存方法に関して 2 つの因子間には相互作用があった($P < 0.0006$) (表 2.1)。これは、受精率がこれらの 2 つの因子を組み合わせて決定された

ことを示している。2つの因子間には相互作用があったため、多重比較検定によって解析した (図 2.3)。B6J 及び D2J における両方とも精子を凍結したら、受精率が減少した。さらに、凍結精子における B6J の受精率は D2J より有意的に低いことを見られた ($P < 0.001$)。さらに、D2J より B6J の凍結精子における受精率が有意的に低いことを見られた ($P < 0.001$)。この結果は、凍結保存感受性が系統により大きく異なることを実証した。続いて、厳密に制御された条件下で、B6J、D2J 及び BXD RI の 8 系統を用い、新鮮及び凍結精子における体外に受精率を評価した。その結果は (表 2.2) に示している。凍結精子の受精率について、7 系統の BXD リコンビナント近交系マウスは B6J と B2J の間に連続的変異がみられた (図 2.2)。続いて、B6J、D2J 及び BXD RI マウスの凍結精子における受精率により WebQTL ソフトウェアを用い、凍結保存感受性に関する QTL を検出した (図 2.4)。遺伝子マーカーと表現型の相関を算出する区間マッピング法により、染色体 1 上において LRS スコア 8.52 の suggestive QTL が観察された。11 番染色体上に別のピークがあったが、閾値 LRS スコア 8.52 の suggestive level 以下であった。または、全ゲノムにわたって多くの閾値付近のピークが存在しました。染色体 11 上の最も高い QTL 領域は、70 個の遺伝子を含み、染色体 1 上の QTL は、43 個の遺伝子を含んでいた。これらの遺伝子のうち、少なくとも 15 の遺伝子については、精巣に発現しており、受精能または精子の運動性に関与する機能を有している可能性がある。前述の Two-way ANOVA の結果を見ると、我々は、系統における内在受精能力と同様に凍結を用いた受精率

が凍結に対する系統特異感受性によって決定される可能性を仮定した。したがって、凍結融解精子の受精率による QTL 解析の結果は、これら 2 つの要因の累積効果を反映している可能性があることを考えた。遺伝的背景の影響を最小限にするために、各雄個体における凍結精子と新鮮精子の受精率の比率を相対受精率として算出したところ(相対受精率として指定された)、8 系統の BXD RI マウスは B6J と D2J の間で連続的な量的形質がみられた (図 2.3)。そして、相対受精率による QTL 解析がより明確に全ゲノムの間隔マッピングをされた。染色体 1 および 11 上の受精に関連する 2 つの示唆的な形質遺伝子座 (QTL) を同定した (図 2.5)。

最後に、相対受精率を制御する可能の責任遺伝子について検討した。系統特異相対受精率を制御する可能の責任遺伝子を特定するために、領域を設定すれば、その範囲にある遺伝子を取り出せる GeneNetwork の QTL miner tool を使って、染色体 1 に 153.969506–158.217850 Mb の領域にある 43 個遺伝子及び染色体 1 に 59.237260–61.324742 Mb の領域にある 70 個遺伝子を取り出した。次に、我々は、以下の 2 つの基準によって、これらの領域上の責任遺伝子を選択した：(1) NCBI マウス ENCODE トランスクリプトームデータを用いて精巣で発現された遺伝子；(2) Jackson Laboratory からの MGI マウスゲノムデータベースの表現型注釈における生殖器系で発現される遺伝子。さらに、我々は、MGI データベースによる capacitation が起きる時に内因性 Ca^{2+} -ATPase 活性の本質的役割がキーワードとして追加して責任遺伝子を選択した(Fraser *et al.*, 1992)。これは、前進運動から hyperactivated 運

動に変化する時に精子のミトコンドリアでエネルギー産生(Millman *et al.*, 1980)及び **capacitation** が起きる時に精子の細胞膜からコレステロールを脱離することを反映する(Davis *et al.*, 1980)。選択された多くの遺伝子の中に、以下の情報から更に選択された。(1) MGI の情報から遺伝子オントロジー(Gene Ontology ; GO)期間にカルシウムチャンネル活性、(2) MGI のタンパク質情報から ATP 結合部位及び(3) GO におけるコレステロール代謝過程。最後に、15 個責任遺伝子を選択され、(表 2.3)に記載されている。

2.4 考察

本研究の主な目的は、マウス精子における凍結融解に対する感受性の系統差に関与する遺伝子座を同定する。凍結融解精子を用いた受精率は、B6J および D2J 系統における明白な表現型を示すことが知られているので(Sztein *et al.*, 2000)、2つの近交系マウスを交雑から生じた RI 系統におけるこのような表現型に関する責任遺伝子座の QTL 分析するために最良のモデルを提供する。しかしながら、この研究では、理化学研究所バイオリソースセンターにおける利用可能な系統数が限られているため、RI マウスを 8 系統しか使用できなかった。これは、類似の BXD RI 系統を用いた他の研究と比べて少なかった(Zidek *et al.*, 1998; Nedelko *et al.*, 2012)。しかし、少数の BXD RI 系統にもかかわらず、染色体 1 および 11 上の 2 つの責任ある QTL を成功に同定した。これは、凍結融解に対する感受性については親系統間に系統差が大きいことを考えた。一般的に、系統間における量的形質は広い範囲の値を示すと、RI 系統を用いた QTL 分析の効率性を増加させることが知られている(Cheng *et al.*, 2015)。これは、相対受精率は、パラメータとして使用することも責任ある QTL を同定する可能性があることを見出した。そして、我々は、凍結精子を用いた受精率と比べて、相対受精率のゲノムワイド関連マッピングより明らかなプロファイルに示された。染色体 1 および 11 上の suggestive QTL に同定された 15 個の責任遺伝子は、凍結融解精子の受精能力に関する系統差を引き起こす可能性が

あった。我々は、MGIのデータベースによる Chr 1 の候補遺伝子の4つ(*Tdrd5*、*Soat1*、*Abl2* 及び *Cacna1e*)全てに B6J と D2J 間に多型が見られ、そのうち1つ(*Abl2*) にアミノ酸置換が見られた。Chr 11 の候補遺伝子では、3つの遺伝子のみが多型があり、そのうち1つ(*Nlrp3*) にアミノ酸置換があった(表. 2.3)。本研究は、D2J 系統の精子に特異的な低温耐性を引き起こす可能性を考えて、染色体 11 を注目して、責任遺伝子を標的とした凍結精子を使う体外受精の受精率改善を目指すことが期待できる。更に、将来にコンジェニック系統または遺伝子変異マウスを使う研究には、これらの遺伝子の支配による変異の疑問に対する明確な答えを提供することになった。

表 2.1. Two-way ANOVA 分散分析による C57BL/6J(B6J)及び DBA/2J(D2J)マウスにおける受精率に關与する主効果の確率 (*P* 値)

	主効果		相互作用 (系統×凍結処理)	多重比較検定
	系統(B6J・D2J)	凍結(新鮮・凍結処理)		
受精率	<0.0001	<0.0001	0.0006	Tukey–Kramer
単精受精率	<0.0001	<0.0001	<0.0001	Tukey–Kramer

$P < 0.05$ を統計的有意とした

受精率は卵細胞質内に雌前核、1 以上雄前核の形成および精子尾部を残る卵子が受精卵である。単精受精率は卵細胞質内に雌前核、1 つ雄前核の形成および精子尾部を残る卵子が受精卵である。

表 2.2. B6J、D2J 及び BXD RI マウスの新鮮・凍結精子における受精率

系統	雄匹数	精子	卵子数	受精率 (%)	単精受精率 (%)
C57BL/6J	6	新鮮	183	79.3 ± 4.5 ^a	73.8 ± 2.7 ^a
	6	凍結	205	9.4 ± 3.8 ^{bc}	9.4 ± 3.8 ^{bc}
	6	相対率		13.3 ± 6.0	
DBA/2J	6	新鮮	212	94.6 ± 2.8	80.6 ± 4.1
	6	凍結	207	85.2 ± 7.9 ^d	70.3 ± 7.9 ^d
	6	相対率		90.6 ± 9.2	
BXD-8	6	新鮮	186	97.5 ± 1.3	85.3 ± 3.9
	6	凍結	198	63.0 ± 6.8	62.0 ± 6.5
	6	相対率		64.9 ± 7.8	
BXD-11	6	新鮮	176	89.4 ± 5.0	84.2 ± 6.0
	6	凍結	204	31.4 ± 9.8	31.0 ± 9.8
	6	相対率		34.8 ± 9.8	
BXD-12	6	新鮮	206	95.7 ± 1.4	85.9 ± 1.3
	6	凍結	188	80.5 ± 7.3	80.5 ± 7.3
	6	相対率		84.2 ± 7.66	
BXD-15	6	新鮮	221	73.3 ± 6.4	71.0 ± 5.8
	6	凍結	212	60.6 ± 6.6	59.7 ± 6.5
	6	相対率		82.0 ± 5.4	
BXD-19	6	新鮮	198	93.1 ± 3.5	90.2 ± 2.5
	6	凍結	184	68.9 ± 12.0	67.9 ± 11.3
	6	相対率		75.8 ± 14.0	
BXD-27	6	新鮮	212	96.8 ± 1.5	87.5 ± 3.2
	6	凍結	186	49.2 ± 3.4	49.2 ± 3.4
	6	相対率		51.0 ± 3.8	
BXD-31	6	新鮮	203	96.4 ± 2.0	93.2 ± 2.3
	6	凍結	187	64.6 ± 6.5	64.1 ± 6.3
	6	相対率		67.6 ± 7.9	
BXD-32	6	新鮮	192	98.5 ± 0.70	82.1 ± 4.1
	6	凍結	206	87.4 ± 2.70	76.1 ± 3.0
	6	相対率		88.8 ± 3.08	

(平均値±標準誤差)

同じ列の異なる上付き文字は、有意差を示している(^{a,b; c,d} $P < 0.01$)

表 2.3. 相対受精率に関する QTLs における遺伝子リスト

Symbol	染色体	キーワード	精巣/RPKM	SNP on Exon	A. A. Substitution B6J/D2J (Position)
<i>Tdrd5</i>	1	male infertility, spermatogenesis, spermatid development	8.70	Y	-
<i>Soat1</i>	1	cholesterol me	7.27	Y	-
		tabolic process			
<i>Abl2</i>	1	reduced fertility, reproductive process, ATP binding	1.80	Y	V/A (28) A/P (32) M/V (1030)
<i>Cacna1e</i>	1	calcium channel	0.08	Y	-
<i>Pld6</i>	11	male infertility, reproductive system	33.96	-	-
<i>Slc47a2</i>	11	ductus deferens, epididymis	31.60	-	-
<i>Map2k3</i>	11	male reproductive system	13.64	Y	-
<i>Flii</i>	11	ductus deferens, epididymis, penis	7.28	-	-
<i>Alkbh5</i>	11	reduced male fertility	6.85	-	-
<i>Usp22</i>	11	epididymis	6.08	-	-
<i>Rasd1</i>	11	ductus deferens, epididymis	3.52	-	-
<i>Wnt3a</i>	11	reduced female fertility, ejaculatory epididymis, seminal vesicle	1.93	Y	-
<i>Wnt9a</i>	11	ejaculatory duct	0.23	-	-
<i>Kcnj12</i>	11	epididymis	0.04	-	-
<i>Nlrp3</i>	11	reduced fertility	0.04	Y	L/V (717)

RPKM, reads per kilobase of exon per million mapped sequence reads

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>). Mouse Genomics Informatics の gene expression database 遺伝子発

現によって得られた遺伝子情報 (www.informatics.jax.org)。Y : MGI データベースによる B6J と D2J の間に一塩

基多型が存在します。 - : 存在しません。A. A. Substitution : アミノ酸置換。Position : アミノ酸の位置。

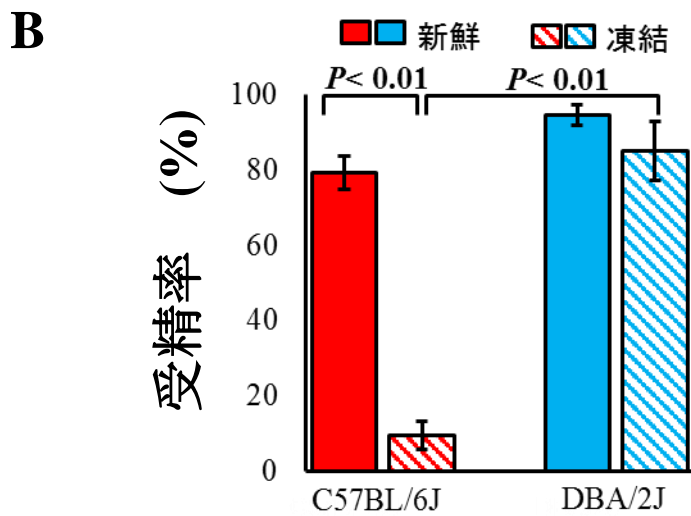
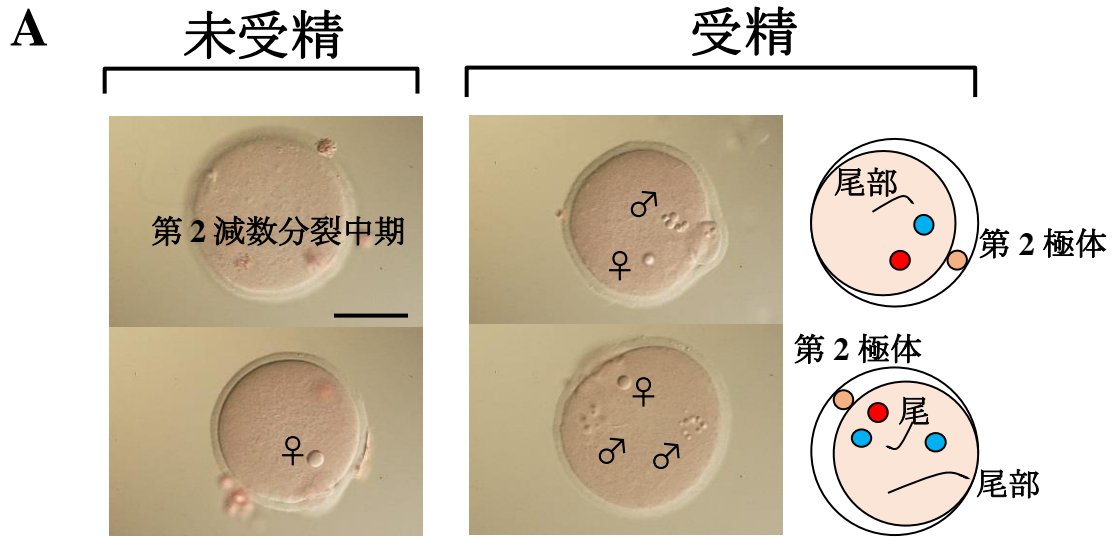


図 2.1. B6J、D2J マウスの新鮮・凍結精子における受精率

(A) 媒精 5 時間後に、酢酸オルセインで染色された卵子である。卵細胞質内に雌前核、1 以上雄前核の形成および精子尾部を残る卵子が受精卵である。bar= 50 μ m.

(B) B6J、D2J マウスの新鮮・凍結精子における受精率である (平均値 \pm 標準誤差;Tukey-Kramer 検定による $P < 0.01$)

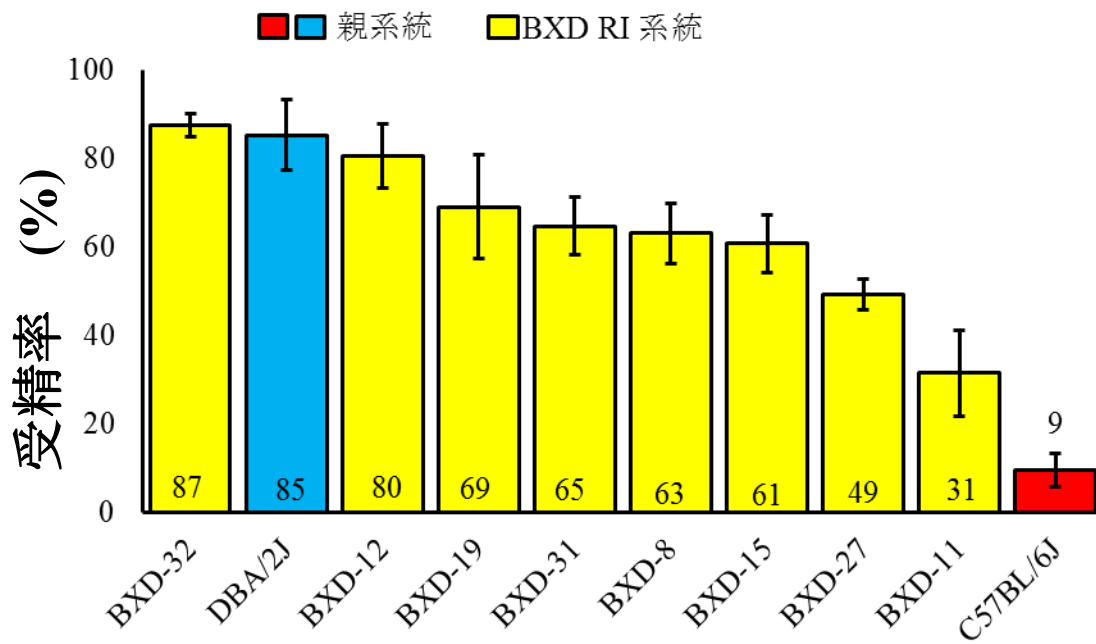


図 2.2. B6J、D2J 及び BXD RI マウスの凍結精子における受精率の分布

(平均値±標準誤差)

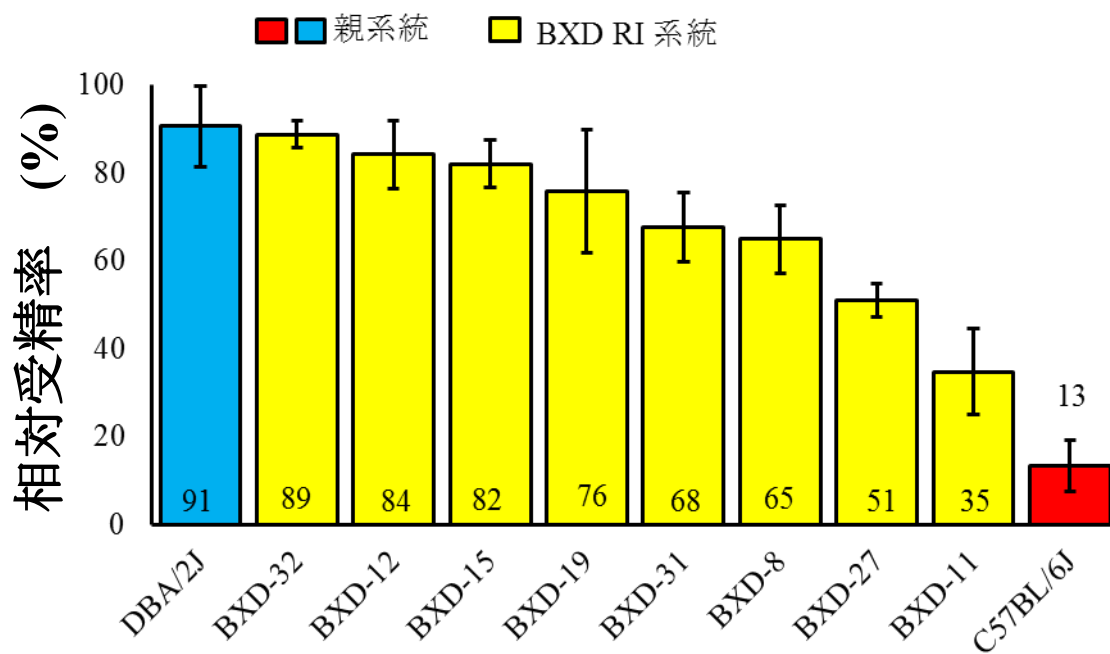


図 2.3. B6J、D2J 及び BXD RI マウスの凍結精子における相対受精率の分布

(平均値±標準誤差)

各雄個体における凍結精子と新鮮精子の受精率の比率を相対受精率として算出し

た。相対受精率= (凍結受精率/新鮮受精率) ×100%

受精率(凍結精子)

Significant LRS = 10.43
Suggestive LRS = 8.52

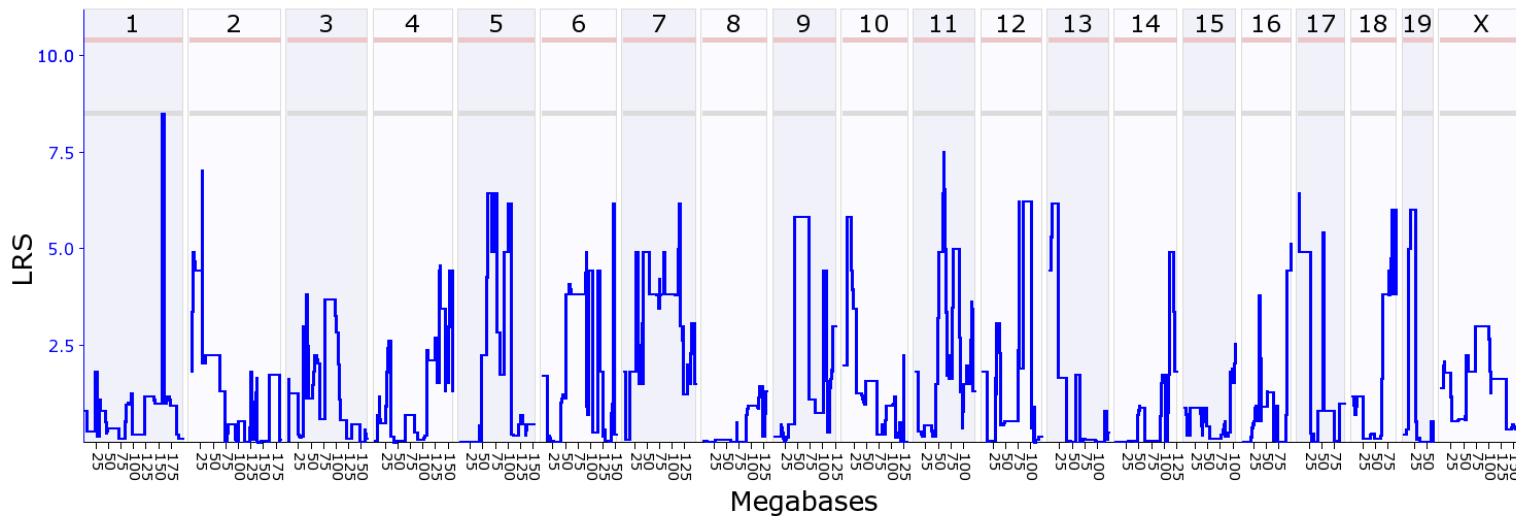


図 2.4. ゲノムワイド関連の区間マッピングによる凍結融解精子を用いた受精率に関する QTL

ピークおよびブートストラップ合図に基づいて重大な区間が選択された。青色の線として LRS スコアを示しているのは全ゲノムにわたって区間マッピングであった。x 軸は、各染色体における物理マップのメガ塩基対 (megabases) である。y 軸は、LRS スコアを表す。グラフの上の数字は、各染色体の番号を示している。水平線は、 $P < 0.05$ (赤線) および $P < 0.37$ (灰色線) で、それぞれ全ゲノム内に significant 閾値及び suggestive 閾値を示す。

相対受精率(凍結精子/新鮮精子)

Significant LRS = 13.92
Suggestive LRS = 11.15

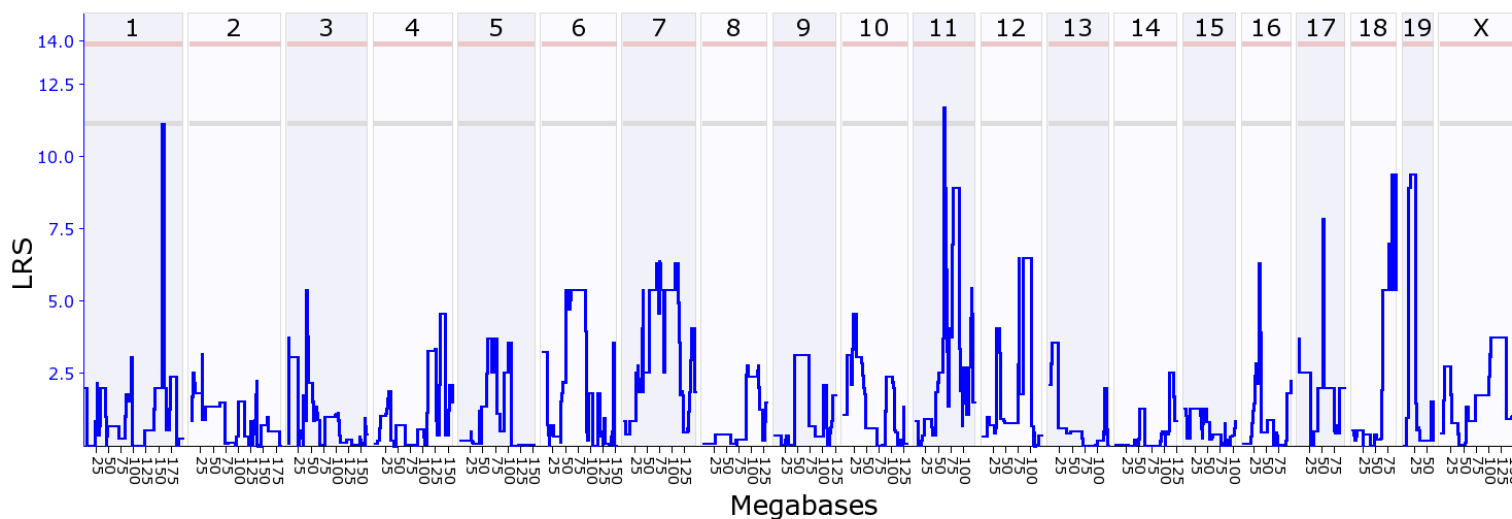


図 2.5. ゲノムワイド関連の区間マッピングによる相対受精率に関する QTL

ピークおよびブートストラップ合図に基づいて重大な区間が選択された。青色の線として LRS スコアを示しているのは全ゲノムにわたって区間マッピングであった。x 軸は、各染色体における物理マップのメガ塩基対 (megabases) である。y 軸は、LRS スコアを表す。グラフの上の数字は、各染色体の番号を示している。水平線は、 $P < 0.05$ (赤線) および $P < 0.37$ (灰色線) で、それぞれ全ゲノム内に significant 閾値及び suggestive 閾値を示す

第3章

凍結精子の状態の検討

3.1 緒言

体外受精について、単に体外へ取り出した未受精卵と精子を用いて、体外で受精させるだけでなく、受精能獲得 (capacitation) 体外で再現の必要があります。また、精巣上体における精子成熟 (maturation) と呼んでいる精子はほとんど運動性を持ちませんが、射出精子は卵子と受精する能力をもたず、capacitation を起こす前に運動開始をされて、雌生殖道内で複雑な生理学的、機能的な変化を起して受精することが可能となります。これは、capacitation を起こす過程であり、精子の生理学的変化について、特に細胞膜のコレステロール含量が低いこと及び HCO_3^- と Ca_2^+ の細胞内流入は、capacitation の重要な要因であります。また、高い Ca^{2+} 濃度により、精子は直進性の運動から尾部を大きく激しく振幅させる超活性化運動

(hyperactivation) に変化させます。これは、精子が卵子と出合いやすくしていると考えられています。したがって、capacitation を起こした精子のみが卵子に対して先体反応を起こし、受精することが可能となります。精子頭部の先端には、酵素を含

む先体 (acrosome) が存在しますが、細胞膜と先体外膜が融合して、先体内に酵素を放出します。これは、先体反応であり、受精に必須の過程であります。

第 2 章で系統における新鮮・凍結精子の体外受精の受精率が異なることを実証した。特に、B6J の凍結精子を用いた IVF を行って得られた受精率が低いことを示している。マウス凍結精子において受精能が低下する原因は、低温傷害及び浸透圧変化によるストレスは有害な変化を与えることが知られている (Walters *et al.*, 2005)。凍結融解後にマウス精子の受精率が低いことは、運動性、生存率、先体完全性および膜完全性に有害な変化をもたらし、精子の受精能力の低下を引き起こすことが明らかにした (Nishizono *et al.*, 2004)。近年、精子の運動性評価に精子運動解析装置 (CASA) が使用されている (Goodson *et al.*, 2011)。しかし、精子の運動性の評価結果と受精の関係は不明な点が多い。今回、運動性及び生存率の評価に CASA (computer-aided spermatozoa analysis) を実施した。先体完全性および膜完全性について、PI 染色は、細胞が損傷を受けた時に透過できるようになり、核を赤色に蛍光染色する特性を持っている。この特性を利用し死細胞染色液として用いた (Cheng *et al.*, 1996)。精子先体の評価は、PNA によって評価した (Cheng *et al.*, 1996)。精子先端部には PNA で識別できる成分が存在し、細胞膜および先体外膜が正常な精子は PNA に染色されない。しかし、先体外膜が損傷すると、先体内の物質が PNA で染色される。また、CTC 染色 (chlortetracycline ; CTC) においては、CTC がカルシウムに依存して精子細胞膜表層に結合すること (Ward, 1984; Fraser *et al.*, 1992; Fuller

et al., 1997)、また **capacitation** に伴って精子細胞膜のコレステロールの脱離やカルシウムイオンの細胞内流入が起こることが知られている(Davis et al., 1980)。

本章は、受精能における重要な情報近として、近交系マウス B6J、D2J 及び BXD RI 系統における凍結精子の受精率に関わるその他の指標として、運動性、生存率、先体完全性および膜完全性、**capacitation** をさらに検討した。

3.2 材料及び方法

マウス

C57BL/6J (B6J)系統の12週齢以上雄マウスは日本チャールスリバー (Charles River Japan)から購入した。DBA/2J(D2J) 系統及びBXD RI マウスは理化学研究所・筑波事業所・バイオリソースセンターに保存している凍結胚を融解して胚移植後して個体を得た。または、6週齢以上になると、同じ系統の雌と雄を交配し、増やした雄マウスは12週齢以上で使用した。全ての系統における少なくとも6匹の雄マウスを各実験に使用した。IVF 及び精子運動性を測定する雄マウスは同じ個体であった。染色実験に用いた精子は、IVF 及び精子運動性を測定する雄マウスとは別の6匹の雄マウスを用いました。すべてのマウスは、温度 ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$)、湿度 ($55\pm 2\%$) および照明条件 (07:00~21:00) 及び特定病原体不在条件下で飼育され、全ての実験は理化学研究所・筑波事業所の実験動物審査委員会の承認を受け実施した。

精子の運動性解析

媒精後に、CASAによって精子の移動軌跡に係わる各種パラメーターを、 37°C で、精子運動性解析装置(Hamilton Thorne Integrated Visual Optical System ; Hamilton Thorne Research, Beverley, MA, USA)を利用して解析した。新鮮精子及び凍結精子を観察す

る直前に、ピペットでやさしく培養液と精子を混合してから解析した。解析パラメータの設定は図 3.1 のようにした。測定した項目は、運動率（頭部を動いた精子の割合；Motile）、前進運動率（激烈に運動している精子割合；Progressively motile）（VAP >50 $\mu\text{m/s}$ ）、平均速度 VAP（average path velocity; $\mu\text{m/s}$ ）、直線速度 VSL（straight-line velocity; $\mu\text{m/s}$ ）、曲線速度 VCL（curvilinear velocity; $\mu\text{m/s}$ ）、頭部振幅 ALH（amplitude of lateral head displacement ; μm ）、頭部振動数 BCF（beatcross frequency ; Hz）、直進性 LIN（linearity: $\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL}$ ）、直線性 STR（straightness: $\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP}$ ）である。1つのサンプル（雄1匹）あたり、少なくとも3ヶ所をカウントしました。カウントされた精子は1つのサンプルあたり、300から440精子であった。

精子膜及び精子先体の蛍光染色

精子膜及び精子先体の評価する前に、新鮮精子の培養液は、450 μl の 0.3%BSA を含む HTF をミネラルオイルで覆い、30分以上 5%CO₂、37°Cインキュベータ内に静置し、ガス平衡させた。凍結精子の培養液は 200 μl の 0.3%BSA を含む HTF であった。次に、新鮮精子は成熟雄マウス（3ヶ月～11ヶ月齢）を用い、頸椎脱臼で安楽死させ、ハサミとピンセットを用いて速やかに精巣上体尾部のみを摘出し、濾紙上で血液と脂肪組織を除去した。ピンセットで精巣上体尾部をつまみ、26G注射針を膨大部分に尖刺して露出した精子塊を針先ですくい取り、左右の尾部からそれぞれ

れ精子を前培養液中のドロップに導入し、インキュベータ内へ戻して（37°C、5% CO₂ 下、加湿空気中）60 分間前培養し、受精能獲得を誘起させた。または、採精後に左右の精巣上体尾部をすぐに凍結を行った。一週間以上に保存された凍結精子を精子膜及び精子先体の蛍光染色を行った。本実験に使った雄マウスは IVF 及び運動性解析と異なった。

前培養した精子は PNA 及び PI を用いた二重染色法によって行った。精子前培養ドロップの縁をチップの先で広げた部分からピペッターで活発に運動している精子を静かに（縁に沿ってピペッターの先を動かすようにして）20 μ L の精子懸濁液を吸引し、チューブに入れ、1 μ L の Alexa Fluor 488 を接合したピーナッツのレクチン PNA(1 mg/ml, Invitrogen, Paisley, UK)および 0.5 μ L の PI (2.4 mM, LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)を添加して、37°C・暗所下で 15 分間静置した。新鮮精子及び凍結精子を観察する直前に、50 μ L の 0.3%BSA を含む HTF で希釈し、ピペットでやさしく混合して、蛍光標識した精子培養液 8 μ L をスライドガラスに滴下し、カバーガラスを乗せて、素早く観察した。なお、PNA+PI によって染色した精子を Fig. 3-1 に示した。1 のサンプル（雄 1 匹）あたり、少なくとも 100 精子をカウントした。同時に、Capacitation の判定も行った。

クロルテトラサイクリン（chlortetracycline ; CTC）蛍光染色

Capacitation を判定するために、CTC 染色方法による行った。染色する前に、750 μ M CTC, 5 mM cysteine, 130 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.8 の CTC solution を調整し、0.45 μ m フィルターでろ過してから、20 μ L つづを mL チューブに分注して冷凍庫に保存した。精子を染色する当日に融解し、使う前に 4 $^{\circ}$ C・遮光下で保管した。または、1% glutaraldehyde 固定液は、25% glutaraldehyde を 1M Tris HCl (pH 8.0)で希釈して、4 $^{\circ}$ C冷蔵庫に保存した(Choi *et al.*, 1998)。精子は 60 分間前培養して、精子前培養ドロップの縁をチップの先で広げた部分からピペッターで活発に運動している精子を静かに 20 μ L の精子懸濁液を吸引し、20 μ L CTC solution を入れたチューブに入れ、37 $^{\circ}$ C・暗所下で 15 分間静置後に、5 μ L1% glutaraldehyde で固定した。蛍光標識した精子培養液 8 μ L をスライドガラスに滴下し、カバーガラスを乗せて、観察する前に 4 $^{\circ}$ C・遮光下で 2 時間に保管した。1 のサンプル (雄 1 匹) あたり、少なくとも 100 精子をカウントした。精子を蛍光顕微鏡下で観察し、Ward and Storey (1984) に従って 3 つのパターンに分類した：F パターンは、頭部の均一な蛍光を示す (uncapaciated)。B パターンは、頭部の前側部分の蛍光および後側頭部領域の暗い帯である (先体反応が起きない capacitated)。AR パターンは、頭部の全表面にわたって蛍光がほとんどまたは全くないことを示す (uncapaciated、先体反応した)。B パターンと AR パターン精子の両方が capacitation である。B パターンは、前培養後に正常な精子を表すことを考えられた。

統計解析

エクセルを使って、サンプル数6より各パラメータの平均値±標準誤差を算出した。また、新鮮及び凍結精子における百分率のパラメータの数値を逆正弦変換し、算出された。非正規分布のパラメータを除いて、繰り返しのある二元配置の分散分析 (two-way ANOVA) を行った。次に、Tukey-Kramer 検定は、分析された精子関連パラメータの多重比較に使用された。非正規分布（運動速度、ALH、LIN、および PI (-) /PNA (+)）について、Kruskal-Wallis 検定を多重比較に適用した。B6J、D2J および BXD RI マウスの平均パラメータ値間の相関は、統計的コンピューティングおよびグラフィックス (<http://www.R-project.org>) のためのフリーソフトウェア環境である R を適用することによってピアソンの相関係数を用いて分析した。 $P < 0.05$ を統計的有意とした。

3.3 結果

B6J、D2J 及び BXD RI 系統における新鮮・凍結精子の運動性

本実験では、マウス精子における凍結保存に対する運動性変化を明らかにするために、IVF 実験と同じサンプルで、新鮮精子及び凍結精子における 9 つの精子運動性パラメータが CASA 装置を用いて調べた。親系統の B6J 及び D2J における得られた結果について、B6J vs. D2J 系統及び新鮮 vs. 凍結精子に関する両因子の効果について two-way ANOVA を行った。得られた結果について、2 因子の分散分析を行ったところ、両因子（系統、凍結融解操作）共に、前進運動率、VAP、VSL 及び VCL における有意な影響を与えていることが明らかとなった。また、VSL における系統および凍結保存方法に関して 2 つの因子間には相互作用があった ($P < 0.001$) (表 3.1)。これは、受精率がこれらの 2 つの因子の組み合わせにより決定されていることを示している。しかし、9 つの精子運動性パラメータにおいて、motility、ALH 及び LIN が正規分布になっていないので、ノンパラメトリック検定の Kruskal-Wallis 検定による B6J vs. D2J 系統及び新鮮 vs. 凍結精子は 4 つのグループにして有意差を解析した (表 3.3)。凍結融解操作に対する progressively motile、VAP、VSL、および VCL を多重比較検定による有意差を示した。(図 3.3 及び表 3.3)。これら 4 つの精子運動性パラメータを相対受精率との相関分析に供した。したがって、または、

厳密に制御された条件下で、B6J×D2J の交雑から生じた遺伝子の染色体マッピングを行なう目的で開発されたリコンビナント近交系マウスで、BXD RI の 8 系統を用い、新鮮及び凍結精子における体外に運動性を評価した。その結果は表 3.3 に示している。

B6J、D2J 及び BXD RI 系統における新鮮・凍結精子の細胞膜の完全性及び先体状態

マウス精子における凍結保存に対する細胞膜の完全性及び先体状態の変化を明らかにするために、PI および PNA により染色が細胞膜核および先体に局在することで、それぞれ細胞膜および先体の完全性を調べた。精子は PI 染色により細胞膜損傷(PI(+))または細胞膜完全性(PI(-))を分類された (図 3.3 A)。更に、PI(-)/PNA(+) パターンは先体反応を起さる準備ができた live 精子を示した (図 3.3)。親系統の B6J 及び D2J における得られた結果について、B6J vs.D2J 系統及び新鮮 vs.凍結精子に関する両因子の効果について two-way ANOVA を行った。得られた結果について、2 因子の分散分析を行ったところ、両因子 (系統、凍結融解操作) 共に、細胞膜の完全性及び損傷における有意な影響を与えていることが明らかとなった(表 3.2 及び 図 3.3 B)。しかし、PI(-)/PNA(+)のデータが正規分布になっていないので、ノンパラメトリック検定の Kruskal-Wallis 検定による B6J vs.D2J 系統及び新鮮 vs.凍結精子は 4 つのグループにして有意差を解析した (図 3.3 及び表 3.4)。したがって、または、

厳密に制御された IVF と同じ精子培養条件下で、B6J×D2J の交雑から生じた遺伝子の染色体マッピングを行なう目的で開発されたリコンビナント近交系マウスで、BXD RI の 8 系統を用い、新鮮及び凍結精子における細胞膜の完全性及び先体状態を評価した (表 3.4)。

B6J、D2J 及び BXD RI 系統における新鮮・凍結精子の Capacitation 状態

マウス精子における凍結保存に対する capacitation 状態の変化を明らかにするために、精子は CTC による染色された。F、B および AR パターンは、それぞれ uncapaciated 状態、先体反応が起きない capacitated および先体反応した capacitated 精子を示した。capacitation 率は、B パターンおよび AR パターンを含む capacitated 精子の割合であった (図 3.4 A)。親系統の B6J 及び D2J における得られた結果について、B6J vs.D2J 系統及び新鮮 vs.凍結精子に関する両因子の効果について two-way ANOVA を行った。得られた結果について、2 因子の分散分析を行ったところ、両因子 (系統、凍結融解操作) 共に、F 率、B 率および capacitation 率における有意な影響を与えていることが明らかとなった (表 3.2)。また、系統および凍結保存方法に関して 2 つの因子間には相互作用があった (表 3.2)。こちらのパターンは、2 つの因子の組み合わせにより決定されていることを示している。2 つの因子間には相互作用があったため、多重比較検定によって解析し、凍結精子における B6J の

capacitation 率は D2J より有意的に低いことを見られた ($P < 0.001$) (図 3.4 及び図 3.4)。この結果は、凍結保存感受性が系統により大きく異なることを実証した。または、厳密に制御された IVF と同じ精子培養条件下で、B6J×D2J の交雑から生じた遺伝子の染色体マッピングを行なう目的で開発されたリコンビナント近交系マウスで、BXD RI の 8 系統を用い、新鮮及び凍結精子における Capacitation 状態を評価した (表 3.4)。

受精率と精子状態に関与するパラメータとの相関

精子について間の関係を理解するために、BXD RI および親系統における凍結融解精子の表現型間の相関解析を行い、受精率と運動性や、細胞膜や、先体及び capacitation の関係を検討した。B6J 及び D2J マウスにおいて、こちらのパラメータは有意差があった。正確な相関分析のために、こちらの精子に関連するパラメータは、受精率と同様に各雄個体における凍結精子と新鮮精子の率の比率を相対受精率に変換され、ピアソンの相関(Pearson's Correlation Coefficient)によって相関係数を算出した。全体的に、相対的受精率は、CTC 染色による B パターン (先体反応していない capacitated)、PI (-) /PNA (+) 染色 (先体反応を起さる準備ができた live 精子) と最も相関があった。相対受精率と相対 B パターン率の相関係数は、 $r = 0.64$ 、 $P = 0.027$ であった。相対受精率と相対 PI (-) /PNA (+) 率の相関係数は、 $r = 0.69$ 、

$P = 0.039$ であった。それらの相関は統計学的に有意であった（図 3.5）。他のパラメータは、相対受精率と有意な相関がなかった。特に、精子運動性のパラメータは相対受精率との相関係数が低かった。しかし、VAP、VSL 及び VCL において、互いに相関が高かった（図 3.5）。

3.4 考察

本研究では、CTC 染色によって明らかにされ、凍結融解後に B6J 精子の **capacitation** は起きる能力が著しく低下になり、一方で、D2J 精子は凍結保存の影響を受けなかったことを分かった。これは、MBCD を添加した前培養培地によって凍結融解した B6J 精子を用いた IVF の効率的に改善され、細胞膜のコレステロールの脱離を促すことによって **capacitation** を高めることで一致した (Takeo *et al.* 2008)。CTC 染色によって明らかにされた B パターンおよび AR パターンを含む精子は、**capacitated**、先体反応が起きない B パターン及び **capacitated**、先体反応が起きた AR パターン両方とも **capacitated** 精子であったことが知られている。相関分析により、AR パターンまたは **capacitation** と比べて、B パターンの方が相対受精率とより望ましい相関があることが明らかになった (図 3.5)。特に、本研究では、AR パターンと相対受精率の 0.22 の相関係数 (r) は 0.22 を示すことは、前培養後の先体反応が起きた精子は受精に効率的に関与しない可能性があることを示唆している。しかし、新鮮精子を用いた IVF 実験では、先体反応が起きた精子は卵丘細胞を通過して非常に迅速に透明帯に到達することが報告された (Hino *et al.*, 2016)。これは、凍結融解操作は最小の損傷でも精子生理を変化させる可能性があるため、新鮮精子と凍結融解精子が異なる行動する可能性を考えられた。我々の結果は、精子を前培養後に B パターンへの変化は、異なるマウスの凍結融解精子を用いた IVF

プロトコールに最適化して信頼できる指標であることを示唆している。これは、PI (-) /PNA (+) 染色による先体反応が起きる準備ができている live 精子の場合とことで一致した。この PI (-) /PNA (+) 率は、受精率と高い相関があり、卵子を受精する可能性が最も高いと共に凍結融解精子の個体群を示す可能性があった。

我々の分析では、精子運動性に関連するパラメータは、相対受精率との間に有意な相関を示さなかった。媒精は精子前培養ドロップの縁の活発に運動している精子を吸引し、IVF を行った。しかし、精子運動性を測定した精子は、培養液と精子を混合してより均質である精子を用いて解析した。この違いに起因すると考えられた。実際、新鮮精子を IVF に使用した場合、受精率と精子の運動性パラメータとの間には有意な相関があり、これはおそらく、前培養液のドロップの全体の精子が高い生存率であると考えられた。

表 3.1. Two-way ANOVA 分散分析による C57BL/6J(B6J)及び DBA/2J(D2J)マウスにおける運動性に関する主効果の確率 (P 値)

	主効果		相互作用 (系統×凍結処理)	多重比較検定
	系統(B6J・D2J)	凍結(新鮮・凍結処理)		
Motile	NA	NA	NA	Kruskal-Wallis
Progressively motile	0.0120 (D2J > B6J)	<0.0001 (新鮮 > 凍結)	0.1607	
VAP	<0.0001 (D2J > B6J)	<0.0001 (新鮮 > 凍結)	0.1577	
VSL	<0.0001	0.0002	0.0307	Tukey-Kramer
VCL	<0.0001 (D2J > B6J)	<0.0001 (新鮮 > 凍結)	0.2448	
ALH	NA	NA	NA	Kruskal-Wallis
BCF	0.0072 (D2J < B6J)	0.5105	0.0916	
LIN	NA	NA	NA	Kruskal-Wallis
STR	0.1165	0.7366	0.0258	

$P < 0.05$ を統計的有意とした (ボールド体)

Motile : 測定した項目は、運動率 (頭部を動いた精子の割合)、Progressively motile : 前進運動率 (激烈に運動している精子割合 ; $VAP > 50 \mu\text{m/s}$)、平均速度 VAP (average path velocity; $\mu\text{m/s}$)、直線速度 VSL (straight-line velocity; $\mu\text{m/s}$)、曲線速度 VCL (curvilinear velocity; $\mu\text{m/s}$)、頭部振幅 ALH (amplitude of lateral head displacement ; μm)、頭部振動数 BCF (beatcross frequency ; Hz)、直進性 LIN (linearity: $LIN = VSL/VCL$)、直線性 STR (straightness: $STR = VSL/VAP$) である。

NA は、非正規分布のために利用できない (Kruskal-Wallis 検定による多重比較検定の結果を表 3.3 に示す)。

表 3.2. Two-way ANOVA 分散分析による C57BL/6J(B6J)及び DBA/2J(D2J)マウスにおける染色パラメーターに關与する主効果の確率 (*P* 値)

	主効果		相互作用 (系統×凍結処理)	多重比較検定
	系統(B6J・D2J)	凍結(新鮮・凍結処理)		
PI (-)	0.0097 (D2J > B6J)	<0.0001 (新鮮 > 凍結)	0.0979	
PI(-)/PNA(+)	NA	NA	NA	Kruskal-Wallis
F pattern	0.0337	0.0067	0.0044	Tukey-Kramer
B pattern	0.0493	0.0023	0.0175	Tukey-Kramer
AR pattern	0.7615	0.2299	0.5822	
Capacitation	0.0337	0.0067	0.0044	Tukey-Kramer

$P < 0.05$ を統計的有意とした(ボールド体)

PI は完全な細胞膜を有する精子を示す。PI (-) /PNA (+) は、先体反応の準備ができた live 精子を示す。

F パターンは、頭部の均一な蛍光を示す (uncapaciated)。B パターンは、頭部の前側部分の蛍光および後側頭部領域の暗い帯である (先体反応が起きない capacitated)。

AR パターンは、頭部の全表面にわたって蛍光がほとんどまたは全くないことを示す (uncapaciated、先体反応した)。B パターンと AR パターン精子の両方が capacitation である。

NA は、非正規分布のために利用できない。(Kruskal-Wallis 検定による多重比較検定の結果を表 3.4 または図 3.3 B に示す)

表 3.3. B6J、D2J 及び BXD RI マウスの新鮮・凍結精子における運動性

系統	雄匹数	精子	Motile (%)	Progressively motile (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)
C57BL/6J	6	新鮮	72.8 \pm 3.4 ^a	40.7 \pm 1.5	167.0 \pm 3.4	94.5 \pm 2.7 ^{ac}	361.2 \pm 5.5
	6	凍結	25.8 \pm 1.9 ^b	12.2 \pm 1.1	143.1 \pm 4.1	82.2 \pm 2.5 ^{bc}	317.9 \pm 4.7
DBA/2J	6	新鮮	74.5 \pm 2.0 ^a	48.7 \pm 1.3	254.8 \pm 2.8	164.1 \pm 2.3 ^{ad}	551.5 \pm 5.7
	6	凍結	26.5 \pm 2.5 ^b	14.0 \pm 1.7	213.7 \pm 2.6	126.3 \pm 4.5 ^{db}	482.8 \pm 5.5
BXD-8	6	新鮮	74.3 \pm 2.9	42.8 \pm 3.1	204.2 \pm 7.3	126.0 \pm 7.4	423.5 \pm 13.7
	6	凍結	29.8 \pm 1.4	14.3 \pm 0.9	172.4 \pm 5.0	97.1 \pm 4.0	368.9 \pm 13.9
BXD-11	6	新鮮	66.7 \pm 3.7	40.8 \pm 2.3	211.6 \pm 4.0	137.9 \pm 2.9	460.8 \pm 7.6
	6	凍結	22.0 \pm 2.0	11.8 \pm 0.7	184.1 \pm 5.0	105.9 \pm 4.0	401.3 \pm 6.1
BXD-12	6	新鮮	66.8 \pm 3.7	39.3 \pm 3.3	199.8 \pm 8.4	127.1 \pm 5.7	432.9 \pm 15.1
	6	凍結	24.0 \pm 1.3	14.0 \pm 1.0	205.3 \pm 6.0	126.8 \pm 5.3	439.7 \pm 12.8
BXD-15	6	新鮮	71.0 \pm 2.7	45.2 \pm 2.5	205.9 \pm 4.2	131.7 \pm 4.2	416.5 \pm 6.8
	6	凍結	22.7 \pm 2.9	11.2 \pm 1.9	155.3 \pm 9.3	86.1 \pm 6.6	329.2 \pm 14.7
BXD-19	6	新鮮	64.0 \pm 4.5	37.7 \pm 3.8	192.4 \pm 7.2	121.7 \pm 4.9	396.7 \pm 12.3
	6	凍結	19.5 \pm 4.3	11.0 \pm 2.6	167.5 \pm 3.9	93.9 \pm 4.7	361.1 \pm 14.2
BXD-27	6	新鮮	65.0 \pm 3.2	40.3 \pm 2.8	229.2 \pm 4.3	148.6 \pm 2.9	473.4 \pm 9.6
	6	凍結	27.7 \pm 2.0	15.0 \pm 0.6	202.1 \pm 2.9	119.8 \pm 3.8	428.4 \pm 6.0
BXD-31	6	新鮮	70.7 \pm 1.9	45.5 \pm 2.1	191.0 \pm 8.1	122.9 \pm 5.3	395.1 \pm 17.8
	6	凍結	20.2 \pm 1.4	11.2 \pm 1.0	155.3 \pm 3.9	94.5 \pm 4.0	331.8 \pm 8.2
BXD-32	6	新鮮	75.8 \pm 2.4	49.3 \pm 3.2	226.7 \pm 14.9	157.9 \pm 12.1	465.3 \pm 27.2
	6	凍結	28.7 \pm 2.0	14.8 \pm 0.8	204.2 \pm 4.3	119.1 \pm 3.3	438.0 \pm 7.8

平均値 \pm 標準誤差、同じ列の異なる上付き文字は、有意差を示している (a,b; c,d $P < 0.01$, Motile および VSL については、Kruskal-Wallis 検定および Two-way ANOVA に続いて Tukey-Kramer 検定をそれぞれ解析した)。

表 3.3. (続きの)B6J、D2J 及び BXD RI マウスの新鮮・凍結精子における運動性.

系統	雄匹数	精子	ALH (μm)	BCF (Hz)	LIN (%)	STR (%)
C57BL/6J	6	新鮮	21.8 \pm 0.3 ^a	37.5 \pm 0.6	26.7 \pm 1.0	56.7 \pm 1.3
	6	凍結	22.2 \pm 0.6 ^a	38.9 \pm 0.7	27.5 \pm 0.5	58.8 \pm 1.5
DBA/2J	6	新鮮	30.1 \pm 0.3 ^b	36.8 \pm 2.3	29.2 \pm 0.2	61.8 \pm 0.3
	6	凍結	30.0 \pm 0.7 ^b	36.2 \pm 0.5	26.7 \pm 0.7	53.5 \pm 6.5
BXD-8	6	新鮮	26.0 \pm 0.5	34.1 \pm 1.9	28.3 \pm 0.9	58.5 \pm 1.4
	6	凍結	26.6 \pm 0.6	37.7 \pm 0.6	27.2 \pm 0.7	56.3 \pm 1.8
BXD-11	6	新鮮	27.5 \pm 0.3	37.4 \pm 0.5	29.2 \pm 0.5	62.2 \pm 0.9
	6	凍結	26.4 \pm 1.3	37.2 \pm 0.5	27.2 \pm 0.5	57.3 \pm 1.1
BXD-12	6	新鮮	27.0 \pm 0.4	35.7 \pm 0.6	30.0 \pm 0.3	62.7 \pm 0.7
	6	凍結	25.4 \pm 0.6	35.7 \pm 0.4	29.7 \pm 0.5	61.0 \pm 1.1
BXD-15	6	新鮮	25.0 \pm 0.2	34.8 \pm 0.6	31.7 \pm 0.8	61.5 \pm 1.0
	6	凍結	22.4 \pm 0.9	37.5 \pm 0.7	27.2 \pm 1.0	57.7 \pm 0.9
BXD-19	6	新鮮	25.6 \pm 0.4	36.5 \pm 0.6	30.2 \pm 0.5	61.5 \pm 0.8
	6	凍結	21.8 \pm 1.7	38.6 \pm 0.7	27.8 \pm 0.9	58.3 \pm 1.5
BXD-27	6	新鮮	28.3 \pm 0.4	35.6 \pm 0.6	30.8 \pm 0.3	61.7 \pm 0.2
	6	凍結	27.7 \pm 0.8	34.2 \pm 1.1	29.0 \pm 0.7	59.3 \pm 0.7
BXD-31	6	新鮮	23.4 \pm 0.8	36.4 \pm 0.5	31.2 \pm 0.4	63.0 \pm 0.4
	6	凍結	22.2 \pm 1.2	37.9 \pm 0.9	30.2 \pm 0.4	61.2 \pm 1.2
BXD-32	6	新鮮	25.6 \pm 0.6	38.2 \pm 0.4	31.5 \pm 0.9	64.7 \pm 1.2
	6	凍結	26.8 \pm 0.6	36.2 \pm 0.5	28.0 \pm 0.6	58.3 \pm 0.7

平均値 \pm 標準誤差、同じ列の異なる上付き文字は、有意差を示している。(^{a,b} $P < 0.01$, ALH と LIN については、Kruskal-Wallis 検定を適用した。BCF については、因子間の相互作用が有意でなかったため、多重比較検定を適用しなかった)。

表 3.4. B6J、D2J 及び BXD RI マウスの新鮮・凍結精子における精子膜、精子先体及び capacitation.

系統	雄匹数	精子	PI(-) (%)	PI(-)/PNA(+) (%)	F pattern (%)	B pattern (%)	AR pattern (%)	Capacitation (%)
C57BL/6J	6	新鮮	57.5 ± 3.75	22.1 ± 3.0 ^a	34.0 ± 3.2 ^a	52.2 ± 3.3 ^a	13.7 ± 2.1	66.0 ± 3.2 ^a
	6	凍結	29.8 ± 7.11	5.8 ± 2.1 ^{bA}	59.7 ± 1.7 ^{bc}	24.6 ± 1.5 ^{bA}	15.6 ± 1.5	40.3 ± 1.7 ^{bc}
DBA/2J	6	新鮮	61.7 ± 7.97	23.5 ± 6.4	37.9 ± 6.5	50.1 ± 7.8	12.0 ± 4.2	62.1 ± 6.5
	6	凍結	48.8 ± 7.35	25.6 ± 4.9 ^B	36.9 ± 3.0 ^d	45.6 ± 3.3 ^B	17.4 ± 4.2	63.1 ± 3.0 ^d
BXD-8	6	新鮮	52.0 ± 9.74	15.6 ± 4.5	36.2 ± 6.4	53.5 ± 5.4	10.3 ± 2.9	63.8 ± 6.4
	6	凍結	31.8 ± 3.18	6.9 ± 1.1	46.1 ± 2.9	33.5 ± 3.6	20.4 ± 2.5	53.9 ± 2.9
BXD-11	6	新鮮	41.5 ± 4.85	17.0 ± 2.4	34.6 ± 4.7	56.6 ± 3.5	8.7 ± 1.4	65.4 ± 4.7
	6	凍結	31.2 ± 4.47	12.0 ± 3.8	48.8 ± 3.6	35.5 ± 2.9	15.7 ± 2.4	51.2 ± 3.6
BXD-12	5	新鮮	51.9 ± 6.28	18.1 ± 3.7	37.8 ± 5.0	53.2 ± 4.0	9.0 ± 2.0	62.2 ± 5.0
	5	凍結	34.1 ± 5.86	12.8 ± 1.3	45.4 ± 6.1	37.5 ± 6.7	17.2 ± 3.9	54.6 ± 6.1
BXD-15	6	新鮮	62.7 ± 2.36	27.5 ± 1.6	33.4 ± 2.6	55.0 ± 4.2	11.6 ± 2.7	66.6 ± 2.6
	6	凍結	30.3 ± 5.50	12.7 ± 2.8	29.8 ± 4.5	46.3 ± 5.8	23.8 ± 3.1	70.2 ± 4.5
BXD-19	6	新鮮	49.9 ± 5.64	13.6 ± 2.6	43.1 ± 5.6	45.7 ± 5.8	11.2 ± 1.2	56.9 ± 5.6
	6	凍結	32.0 ± 3.04	11.9 ± 1.5	36.7 ± 2.5	45.7 ± 3.0	17.7 ± 3.6	63.3 ± 2.5
BXD-27	6	新鮮	54.5 ± 4.21	17.0 ± 2.4	51.4 ± 5.5	35.5 ± 4.3	13.1 ± 2.2	48.6 ± 5.5
	6	凍結	36.0 ± 3.32	8.3 ± 2.2	48.8 ± 4.4	23.0 ± 5.3	28.2 ± 5.3	51.2 ± 4.4
BXD-31	6	新鮮	63.0 ± 5.86	13.3 ± 4.0	36.9 ± 2.7	50.6 ± 3.7	12.4 ± 1.2	63.1 ± 2.7
	6	凍結	30.8 ± 4.57	11.5 ± 1.9	36.6 ± 4.7	44.0 ± 4.3	19.4 ± 1.7	63.4 ± 4.7
BXD-32	6	新鮮	43.8 ± 6.23	9.1 ± 2.7	27.8 ± 3.5	60.9 ± 4.1	11.3 ± 1.7	72.2 ± 3.5
	6	凍結	26.1 ± 2.86	13.8 ± 2.6	35.5 ± 4.5	43.0 ± 4.8	21.5 ± 0.6	64.5 ± 4.5

平均値±標準誤差、同じ列の異なる上付き文字は、有意差を示している。(a,b,c,d) $P<0.01$; A,B $P<0.05$, F パターンと B

パターンについては、Tukey-Kramer 検定を適用した。PI (-) と PNA (+) 及び AR パターンは因子間の有意な

相互作用がないために、多重比較を適用しなかったため、Kruskal-Wallis 検定を適用しました)。

図 3.1 解析パラメータの設定

ANALYSIS SETUP #5: RIKEN 1

Frames Acquired: 30

Frame Rate: 60 Hz

Minimum Contrast: 30

Minimum Cell Size: 3 Pixels

Minimum Static Contrast: 15

Straightness (STR), Threshold: 50.0 %

Vap Cutoff: 30.0 $\mu\text{m/s}$

Prog. Min VAP: 50.0 $\mu\text{m/s}$

VSL Cutoff: 20.0 $\mu\text{m/s}$

Cell Size: 10 Pixels

Cell Intensity: 75

Static Head Size: 0.70 to 4.00

Static Head Intensity: 0.18 to 1.84

Static Elongation: 0 to 80

Computer-aided sperm analysis (IVOS TOX Sperm Analyzer)



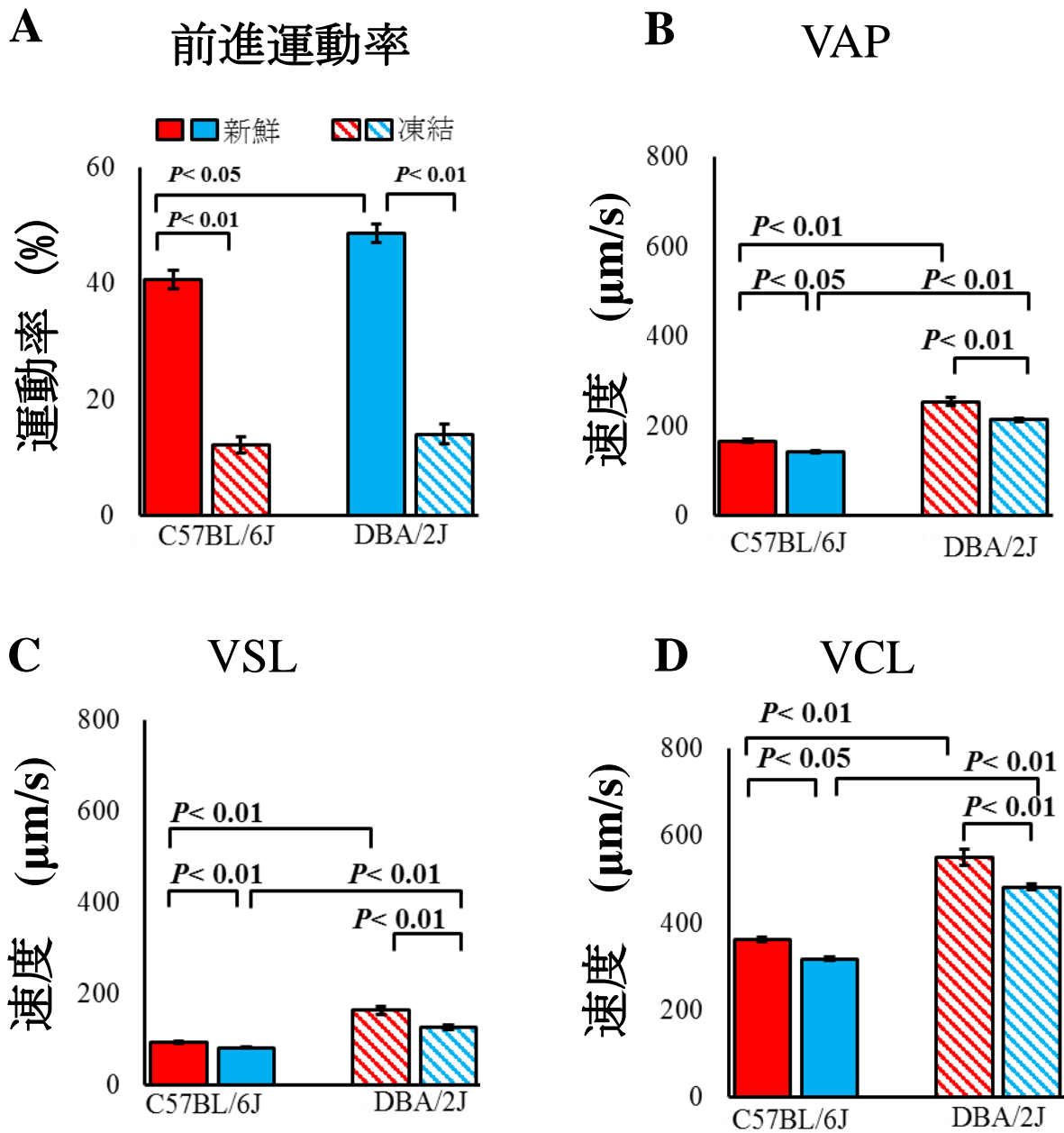


図 3.2. B6J、D2J マウスの新鮮・凍結精子における運動性

(A) 前進運動率; (B) 平均速度 VAP(average path velocity; $\mu\text{m/s}$); (C) 直線速度 VSL(straight-line velocity; $\mu\text{m/s}$); (D) 曲線速度 VCL(curvilinear velocity; $\mu\text{m/s}$).

(平均値 \pm 標準誤差)

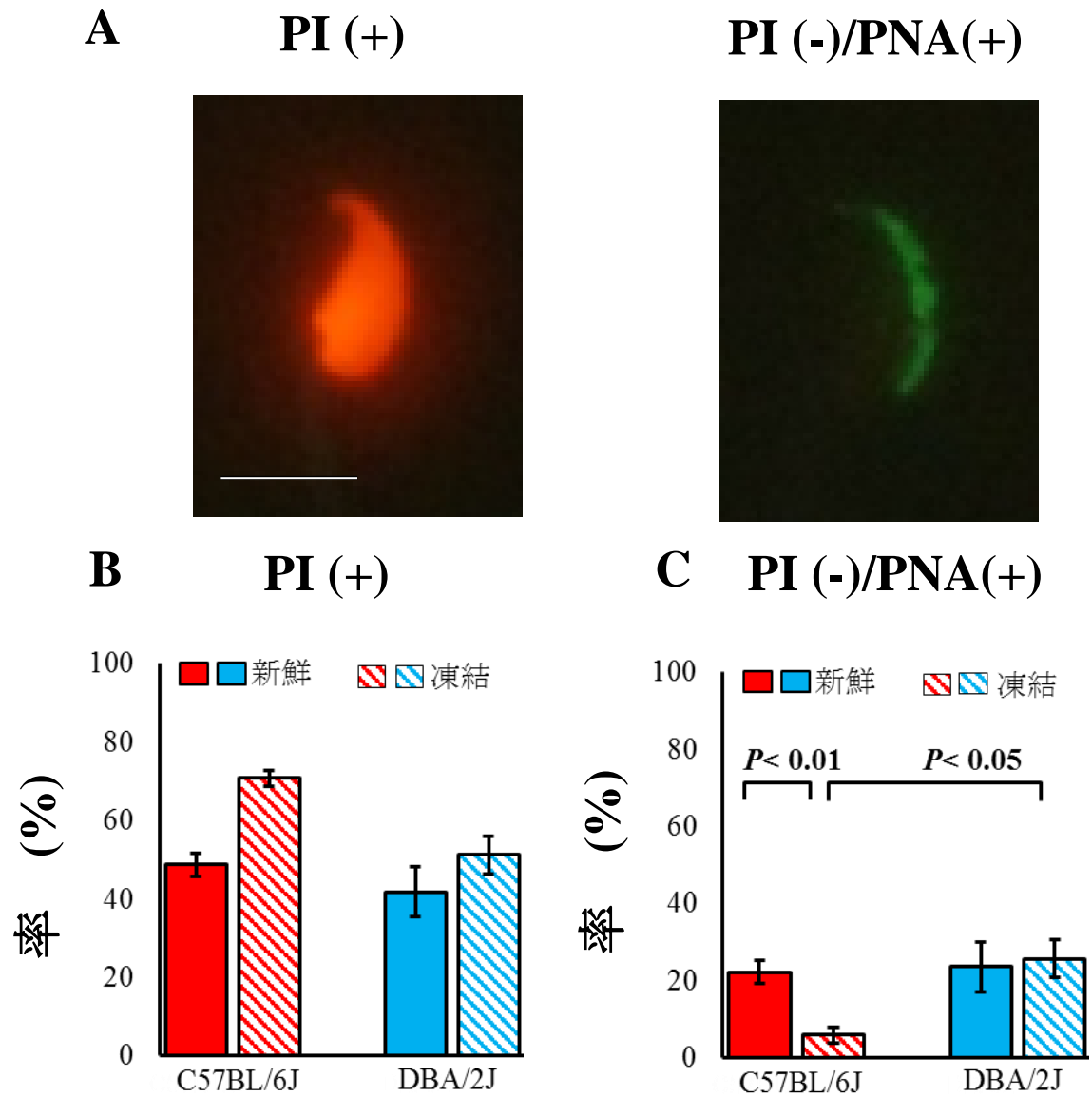


図 3.3. B6J、D2J マウスの新鮮・凍結精子における先体状態

(A) 精子 PI 及び PNA で染色し、PI (+) パターンは細胞膜が損傷した精子を示している。PI (-) /PNA (+) は、先体反応の準備ができた live 精子を示す。bar= 10 μ m。

(B) B6J、D2J マウスの新鮮・凍結精子における PI (+) 及び (C) PI (-) /PNA (+) 率である(平均値 \pm 標準誤差)

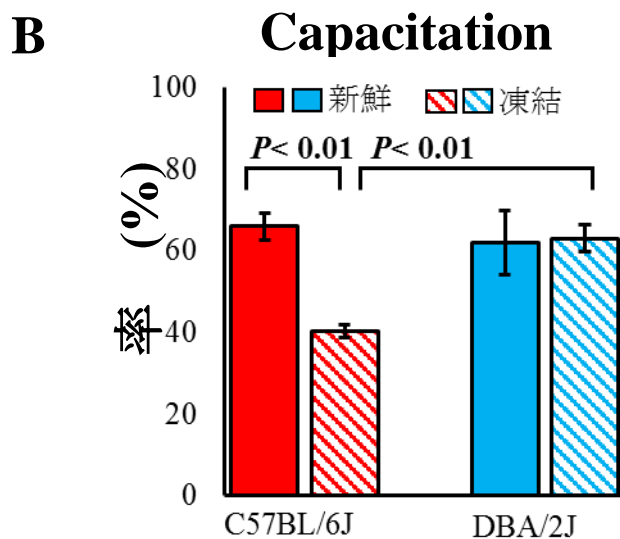
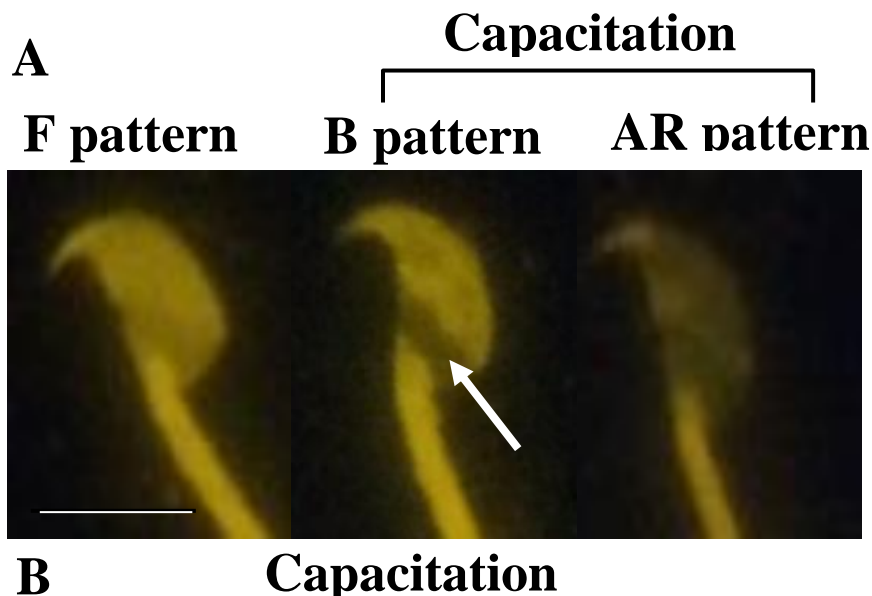


図 3.4. B6J 、 D2J マウスの新鮮・凍結精子における capacitation 率

(A) 精子は CTC で染色された。F パターンは、頭部の均一な蛍光を示す

(uncapaciated)。B パターンは、頭部の前側部分の蛍光および後側頭部領域の暗い帯である (先体反応が起きない capacitated)。AR パターンは、頭部の全表面にわたって蛍光がほとんどまたは全くないことを示す (uncapaciated、先体反応した)。B パターンと AR パターン精子の両方が capacitation である

(B) B6J 、 D2J マウスの新鮮・凍結精子における capacitation 率。(平均値±標準誤差)

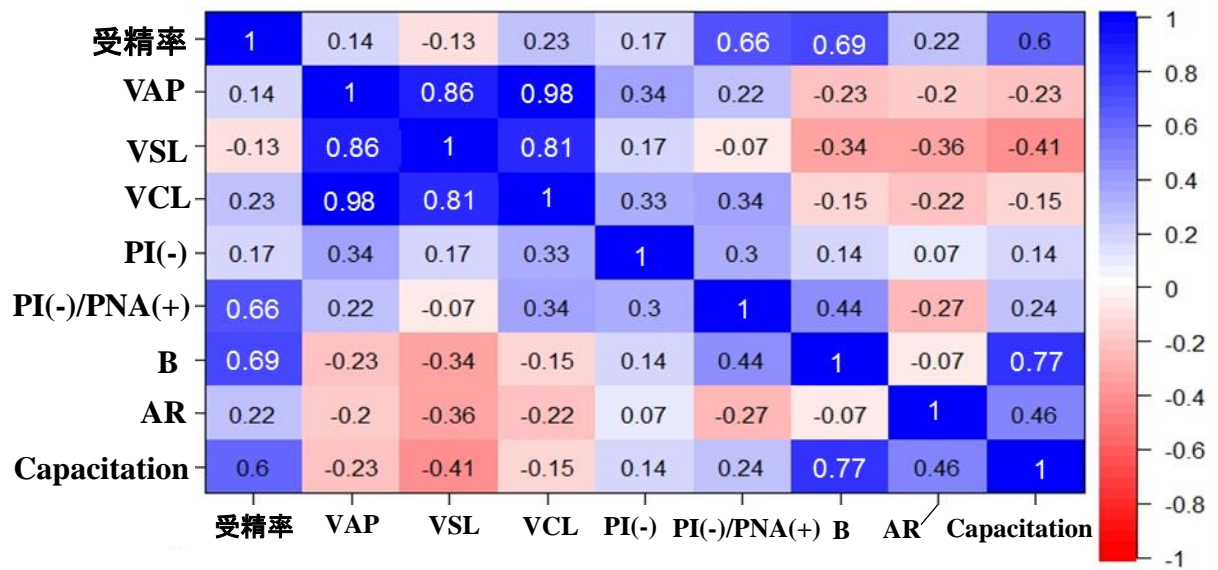


図 3.5. B6J、D2J 及び BXD RI マウスにおける受精率と精子関連パラメータとの間の相関

白い数字は有意差の存在を示す（ピアソンの相関係数 r について $P < 0.05$ ）。

第4章

総論

精子の凍結保存に対する感受性はマウスの遺伝的背景によって大きく異なることが知られているが、その根底にあるメカニズムは解明されていない。本研究は、量的形質遺伝子座(QTL)解析を用いて、マウス精子の凍結保存感受性に関わるゲノム領域を明らかにすることを目的として行った。特に、受精率に関する責任遺伝子を同定することで、これらの遺伝子を標的とした凍結精子を使った体外受精の受精率改善を目指すことが期待できる。得られた結果は、B6 及び D2 における受精率が系統および凍結保存方法に関して2つの因子の組み合わせにより決定されていることを示している。これは、凍結保存感受性が系統により大きく異なることを実証した。そして、B6J と D2J 両系統間の表現型に關与する因子の染色体マッピングを行なう目的で開発された BXD RI の 8 系統における評価した受精率は B6 と D2 の間で連続的な量的形質を示した。凍結精子と新鮮精子の受精率の比率を算出した相対受精率は、マイクロサテライト遺伝多型マーカーに関する全ゲノム情報を利用して、GeneNetwork (www.genenetwork.org)の WebQTL ソフトウェアを用い QTL を検出した。遺伝子マーカーと表現型の相関を算出する区間マッピング法により、第 1 染色体及

び第 11 染色体上において likelihood ratio statistics (LRS) スコア 11.5 の suggestive level 以上のピークが観察された。第 1 染色体上の QTL 領域は 43 個の遺伝子を含み、第 11 染色体上の QTL 領域は 70 個の遺伝子を含んでいた。これらの遺伝子のうち、少なくとも 15 の遺伝子については、精巣に発現し、かつ受精能または精子の運動性に関与する機能を有している可能性があった。また、我々は、MGI のデータベースによる Chr 1 の候補遺伝子の 4 つ (*Tdrd5*, *Soat1*, *Abl2* 及び *Cacna1e*) 全てに B6J と D2J 間に多型が見られ、そのうち 1 つ (*Abl2*) にアミノ酸置換が見られた。Chr 11 の候補遺伝子では、3 つの遺伝子のみが多型があり、そのうち 1 つ (*Nlrp3*) にアミノ酸置換があった。

凍結精子の受精率に関わる精子側の指標として、前培養後の運動性、生存率、膜正常性、先体の状態および受精能獲得 (capacitation) を統計学的に検討した。B6 と D2 の分散分析により、系統と凍結保存操作の 2 因子が、9 種のうち 4 種の運動性指標、膜正常性、capacitation に影響を与えることが示された。また、受精率と有意に相関する精子の状態として、capacitation が進行し、かつ先体反応は生じていない状態であることが示唆された。また、凍結融解 B6 精子は capacitation 率が有意に低下することが示されたが、これは MBCD による capacitation 誘起によって凍結融解 B6 精子の受精率が改善する報告と一致した。

本研究により、マウス精子の凍結保存感受性に関わるゲノム領域が示され、また受精率に相関する前培養精子の状態も確認できた。これらの情報は、今後の精子凍結の技術改善および精子の生理学的な特性解析に役立つものと期待される。

第5章

謝辞

本研究の遂行ならびに学位論文の取りまとめにあたり、多くのご支援とご指導を賜りました、指導教授である小倉淳郎先生(筑波大学大学院生命環境科学研究科生物機能科学専攻、理化学研究所バイオリソースセンター遺伝工学基盤技術室長)に厚く御礼申し上げます。時に応じて、厳しくご指導いただいたこと、励ましてくださったことを通じて、私自身の至らなさを実感することが多くありました。また、筑波大学大学院生命環境科学研究科生物機能科学専攻准教授(理化学研究所バイオリソースセンター遺伝工学基盤技術室専任研究員)井上貴美子博士にも、論文の執筆にあたり常に的確なアドバイスをいただきましたことを深謝いたします。

学位論文審査において、貴重なご指導とご助言を頂いた、馬場忠先生(筑波大学大学院生命環境科学研究科生物機能科学専攻教授)、柏原真一先生(筑波大学大学院生命環境科学研究科生物機能科学専攻准教授)に心より感謝申し上げます。

本研究で使用した研究材料におきまして、文部科学省（ナショナルバイオリソースプロジェクト）の資金的支援を受け、理化学研究所筑波研究所バイオリソースセ

ンターより 8 系統 BXD RI マウスと DBA/2J マウスをいただきましたことに感謝いたします。

研究を進めるに当たり、最初の胚操作技術の実験指導から研究の進め方と計画全般の指導をいただきました、理化学研究所バイオリソースセンター遺伝工学基盤技術室の持田慶司さんと長谷川歩未さんには深く感謝いたします。また、多方面にわたるご支援と技術指導をいただきました、越後貫成美さん、廣瀬美智子さん、畑中勇輝さん、井上弘貴さん、的場章悟さん、上村悟氏さん、富島俊子さん、百々由希子さん、事務担当アシスタント塚原文乃さんを始め遺伝工学基盤技術室のみなさまにも深く感謝いたします。

最後に、本研究をサポートして下さいました理化学研究所の大学院生国際プログラム・アソシエイト（IPA）により感謝申し上げ、以上をもって謝辞とさせていただきます。

第 6 章

参考文献

Alberts R, Schughart K. QTLminer: identifying genes regulating quantitative traits. *BMC Bioinformatics* 2010; 11:516.

Bath M. L. Inhibition of in vitro fertilizing capacity of cryopreserved mouse sperm by factors released by damaged sperm, and stimulation by glutathione. *PLoS One* 24 2010; 5:e9387.

Byers SL, Payson SJ, Taft RA. Performance of ten inbred mouse strains following assisted reproductive technologies (ARTs). *Theriogenology* 2006; 65:1716-1726.

Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil* 1989; 86: 679-688.

Cheng F-P, Fazeli A, Voorhout WF, Marks A, Bevers MM, Colenbrander B. Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *J Androl* 1996; 17:674-682.

Cheng Q, Seltzer Z, Sima C, Lakschevitz FS, Glogauer M. Quantitative trait loci and candidate genes for neutrophil recruitment in sterile inflammation mapped in AXB-BXA recombinant inbred mice 2015; *PLoS One* 10:e0124117.

Chesler EJ, Lu L, Wang J, Williams RW, Manly KF. WebQTL: rapid exploratory analysis of gene expression and genetic networks for brain and behavior. *Nat Neurosci* 2004; 7:485-486.

Choi YH, Toyoda Y. Cyclodextrin removes cholesterol from mouse sperm and induces capacitation in a protein-free medium. *Biol Reprod* 1998; 59:1328-1333.

Davis BK, Byrne R, Bedigian K. Studies on the mechanism of capacitation: albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during in vitro incubation of rat sperm cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 1546-1550.

Fraser LR, McDermott CA. Ca (2+)-related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for Ca (2+)-ATPase. *J Reprod Fertil* 1992; 96:363-377.

Fuller SJ and Whittingham DG. Capacitation-like changes occur in mouse spermatozoa cooled to low temperatures. *Mol Reprod Dev* 1997; 46, 318-324.

Goodson SG, Zhang Z, Tsuruta JK, Wang W, O'Brien DA. Classification of mouse sperm motility patterns using an automated multiclass support vector machines model. *Biol Reprod* 2011; 84(6):1207-1215.

Hasegawa A, Yonezawa K, Ohta A, Mochida K, Ogura A. Optimization of a protocol for cryopreservation of mouse spermatozoa using cryotubes. *J Reprod Dev* 2012; 58:156-161.

Hasegawa A, Mochida K, Tomishima T, Inoue K, Ogura A. Microdroplet in vitro fertilization can reduce the number of spermatozoa necessary for fertilizing oocytes. *J Reprod* 2014; 187-193.

Hasegawa A, Mochida K, Inoue H, Noda Y, Endo T, Watanabe G, Ogura A. High-yield superovulation in adult mice by anti-inhibin serum treatment combined with estrous cycle synchronization. *Biol Reprod* 2016; 94:21.

Hino T, Muro Y, Tamura-Nakano M, Okabe M, Tateno H, Yanagimachi R. The Behavior and Acrosomal Status of Mouse Spermatozoa In Vitro, and Within the Oviduct During Fertilization after Natural Mating. *Biol Reprod* 2016; 95(3):50.

Millman MS, Caswell AH, Haynes DH. Kinetics of chlorotetracycline permeation in fragmented, ATPase-rich sarcoplasmic reticulum. *Membr Biochem* 1980; 3:291-315.

Mochida K, Hasegawa A, Ogura A. Recent technical breakthroughs for ARTs in mice. *J Mam Ova Res* 2017; 34: 13-21.

Nakagata N, Takeshima T. Cryopreservation of mouse spermatozoa from inbred and F1 hybrid strains. *Exp Anim* 1993; 42:317-320.

Nedelko T, Kollmus H, Klawonn F, Spijker S, Lu L, Hessman M. Distinct gene loci control the host response to influenza H1N1 virus infection in a time-dependent manner. *BMC Genomics* 2012; 13:411.

Nishizono H, Shioda M, Takeo T, Irie T, Nakagata N. Decrease of fertilizing ability of mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury. *Biol Reprod* 2004; 71:973-978.

Ogura A, Wakayama T, Suzuki O, Shin T.Y, Matsuda J, and Kobayashi Y. Chromosomes of mouse primary spermatocytes undergo meiotic divisions after incorporation into homologous immature oocytes. *Zygote* 1997; 5: 177-182

Ostermeier GC, Wiles MV, Farley JS, Taft RA. Conserving, distributing and managing genetically modified mouse lines by sperm cryopreservation. *PLoS One* 2008; 3:e2792.

Peirce JL, Lu L, Gu J. A new set of BXD recombinant inbred lines from advanced intercross populations in mice. *BMC Genet* 2004; 5: 7.

Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 1985; 44: 493-498.

Songsasen N, Leibo SP. Cryopreservation of mouse spermatozoa. I. Effect of seeding on fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa. *Cryobiology* 1997; 35:240-254.

Sztejn JM, Farley JS, Mobraaten LE. In Vitro Fertilization with Cryopreserved Inbred Mouse Sperm. *Biol Reprod* 2000; 63:1774-1780.

Tada N, Sato M, Yamanoi J, Mizorogi T, Kasai K, Ogawa S. Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *J Reprod Fertil* 1990; 89:511-516.

Takeo T, Hoshii T, Kondo Y. Methyl-beta-cyclodextrin improves fertilizing ability of C57BL/6 mouse spermatozoa after freezing and thawing by facilitating cholesterol efflux from the cells. *Biol Reprod* 2008; 78:546-551

Takeo, T, Nakagata, N. Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl- β -cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. *Lab Anim* 2010; 44:132-137.

Takeo T, Nakagata N. Reduced glutathione enhances fertility of frozen/ thawed C57BL/6 mouse sperm after exposure to methyl- beta-cy-clodextrin. *Biol Reprod* 2011; 85:1066-1072.

Tao J, Du J, Kleinhans FW, Critser ES, Mazur P, Critser JK. The effect of collection temperature, cooling rate and warming rate on chilling injury and cryopreservation of mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1995; 104: 231-236.

Taylor BA, Wnek C, Kotlus BS, Roeme RN, MacTaggart T, Phillips SJ. Genotyping new BXD recombinant inbred mouse strains and comparison of BXD and consensus maps. *Mamm Genome* 1999; 10:335-348.

Thornton CE, Brown SD, Glenister PH. Large numbers of mice established by in vitro fertilization with cryopreserved spermatozoa: implications and applications for genetic resource banks, mutagenesis screens, and mouse backcrosses. *Mamm Genome* 1999; 10:987-992.

Walters EM, Men H, Agca Y, Mullen SF, Critser ES, Critser JK. Osmotic tolerance of mouse spermatozoa from various genetic backgrounds: acrosome integrity, membrane integrity, and maintenance of motility. *Cryobiology* 2005; 50: 193-205.

Ward CR, Storey BT. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol* 1984; 104:287-296.

Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. *Science* 1972; 178: 411-414.

Whittingham DG. Embryo Banks in the Future of Developmental Genetics. *Genetics* 1974; 78: 395-402.

Yokoyama M, Akiba H, Katsuki M, Nomura T. Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by in vitro fertilization using cryopreserved spermatozoa. *Jikken Dobutsu* 1990; 39:125-128.

Yoshiki A, Ike F, Mekada K, Kitauro Y, Nakata H, Hiraiwa N, Mochida K, Ijuin M, Kadota M, Murakami A, Ogura A, Abe K, Moriwaki K, Obata Y. The mouse resources at the RIKEN BioResource center. *Exp Anim* 2009; 58: 85-96.

Zidek, V., A. Musilova, J. Pintir, M. Simakova, and M. Pravenec. Genetic dissection of testicular weight in the mouse with BXD recombinant inbred strains. *Mamm. Genome* 1998; 9:503-505.