

寒冷衝撃山羊精子の呼吸依存性カルシウム輸送

沖増英治・内海恭三・湯原正高

(家畜繁殖研究室)

Received November 1, 1977

Respiration-dependent Calcium Transport in the Cold-shocked Goat Spermatozoa

Eiji OKIMASU, Kyozo UTSUMI and Masataka YUHARA

(Laboratory of Animal Reproduction)

When spermatozoa are exposed directly to the cold temperature at about 0°C without protective agent, they suffer irreversible and deleterious changes which lead to a cell loss known as the cold shock. The study reported here was undertaken to determine effectiveness of exogeneous calcium on the respiration of cold-shocked goat spermatozoa and to estimate the degree of the sperm membrane defect caused by the cold shock.

The cold shock to goat sperm was given by the direct immersion of sperm suspension into the ice-water bath followed by incubation for 10 min. at 0°C. The respiratory activity of the sperm was determined by Galvani oxygen electrode. The protective action of egg-yolk against the cold shock was also investigated.

Exogeneous calcium did not stimulate the respiration both of the intact motile sperm and of the 0.1M NaF-inhibited immotile sperm in calcium-free medium. From these results, exogeneous calcium seems not to be permeable to the sperm plasma membrane enough to stimulate the respiration, when the membrane is intact or not disintegrated.

A gradual stoichiometric increase was observed in the respiration rate of cold-shocked spermatozoa by addition of calcium below 1mM. This respiratory activity was slightly inhibited by 2, 4-dinitrophenol. However, the activity was inhibited by calcium above 1mM. As shown by these results, exogeneous calcium might pass into the sperm cell through the sperm membrane due to the loss of the selective permeability of the cell membrane caused by the cold shock. It seems that these results show a possibility of the respiration-dependent calcium transport in the mitochondria of the cold-shocked spermatozoa.

The cold-shocked sperm with egg yolk did not increase respiratory activity by the calcium. This suggests that the respiration-dependent calcium transport was not induced by the protected cell surface by egg yolk.

結 言

常温から 0°C 付近への急激な低温感作は、精子の運動性を低下させ、ついには不可逆的に不動化させることは古くから認められている。この運動性の低下は、精子内の c-AMP の漏出¹⁵⁾と関係づけられている。また、この寒冷衝撃によって精子頭部のアクロゾームの膨

化が引き起こされていることも、電子顕微鏡観察によって報告されている³⁾。この場合、頭部のアクロゾームに限らず原形質膜も少なからず、構造上、損傷を受けているものと思われる。

精液の寒冷衝撃によって原形質膜のイオン選択透過性が低下し、精子細胞内外の陽イオンは細胞内外へ出入りしていることが報告されている⁴⁾。さらに、そのような原形質膜機能の損傷は、細胞内の ATP やチトクローム c や補酵素の漏出をも引き起こしていることが指摘されている^{1), 7)}。

近年、STOREY¹³⁾ は家兎精巣上体精子の呼吸に及ぼす Ca^{2+} の効果を報告している。すなわち、正常な家兎精巣上体精子は添加 Ca^{2+} による酸素消費能の増加は示されないが、 Ca^{2+} に特異的な ionophore (A23187) を細胞膜に作用させることによって、ミトコンドリアでの Ca^{2+} 依存性酸素消費が認められていることを指摘している。また、同氏¹⁴⁾ は家兎精巣上体精子のミトコンドリアにおける Ca^{2+} 依存性酸素消費の特徴は、他の細胞のミトコンドリアに見られるものと同じであることを報告している。

これまで、このような寒冷衝撃に対して保護効果を持つ精液稀釈液が開発されてきたが、その稀釈液中の有効な物質の検索がなされ、卵黄中のレシチンや牛乳中のカゼインが細胞膜の機能を保護しているといわれている。また、高濃度 (20mM) の EDTA や CTAB, SDS, Triton X-100 といった界面活性剤の寒冷衝撃保護効果も報告されている⁴⁾。

そこで本研究は、山羊精子細胞に及ぼす寒冷衝撃の影響を明らかにするために、寒冷衝撃によって不可逆的に不動化した精子細胞において、 Ca^{2+} 依存性酸素消費が生じるか否かを検討すると共に、その結果から原形質膜の Ca^{2+} イオン選択透過性の低下の程度を推定しようとした。また、卵黄物質の寒冷衝撃に対する保護作用も、その酸素消費能から合わせて検索した。

材 料 と 方 法

当研究室繫養のザーネン種並びに在米種の雄より人工膈法によって精液を採取した。採取後ただちに精液は、113mM KCl, 15mM KPi, 3mM MgCl_2 , 1.6mM EDTA, 20mM Tris; pH 7.4 の溶液 (以下、KCl, KPi, MgCl_2 , Tris+EDTA と略す) で1回洗浄し、細胞外の Ca^{2+} 並びに精漿が除去された。

実験Ⅰでは不動化精子は、洗浄精子をフッ化ナトリウム (NaF) (0.1M) の含んだ KCl, KPi, Tris+EDTA 溶液で約1時間半、37°C で培養し、その運動性を完全に止めることで得られた。その後、KCl, Tris 溶液で2回洗浄して、懸濁液中の NaF 並びに EDTA を取り除いた。反応液は、KCl, Tris; pH 7.4 の溶液に、基質としてピルビン酸並びにコハク酸を各々10mM ずつ加えたものを用いた。

実験Ⅱでは寒冷衝撃不動化精子は、細水中 (0°C) に20cc の試験管の冷却槽を設置し、その壁面に沿って洗浄精子懸濁液を流し、37°C から0°C へ急激な温度感作を精子に与え、15分間保温することで得られた。その後、KCl, Tris 溶液による37°C での30分間培養を経て実験Ⅰと同じ反応液で酸素消費量を測定した。

実験Ⅲの精子は、まず最初に洗浄精子を実験Ⅱと同様な方法で緩慢に冷却する弱い寒冷衝撃を与えて運動性を低下させた。その後、対照として KCl, KPi, Tris+EDTA 溶液で、また試験区として20%卵黄クエン酸ソーダ液 (ECD)+EDTA 溶液で2回目の寒冷衝撃を施し完全に不動化させた。

なお、酸素消費量の測定のために用いた酸素電極は、隔膜型ガルバニ電極¹⁶⁾を用いた給水化学研究所製生化学用 DO 測定装置を使用し、測定方法は前報⁹⁾によった。

結果と考察

1. 正常精子並びに NaF 不動化精子の酸素消費に及ぼす Ca^{2+} の影響

NaF 不動化精子並びに正常精子の酸素消費量 (12.52 並びに $26.50 \text{ nMO}_2/\text{min} \cdot 3 \times 10^8 \text{ cells/ml}$) に及ぼす添加 Ca^{2+} の影響は認められなかった (Fig. 1). 従って添加 Ca^{2+} は、NaF 不動化精子並びに正常精子の原形質膜を透過しなかったものと推察された。この結果は、正常家兎精巣上体精子の酸素消費量に及ぼす Ca^{2+} の効果を検索した STOREY らの報告¹³⁾ とほぼ一致した。

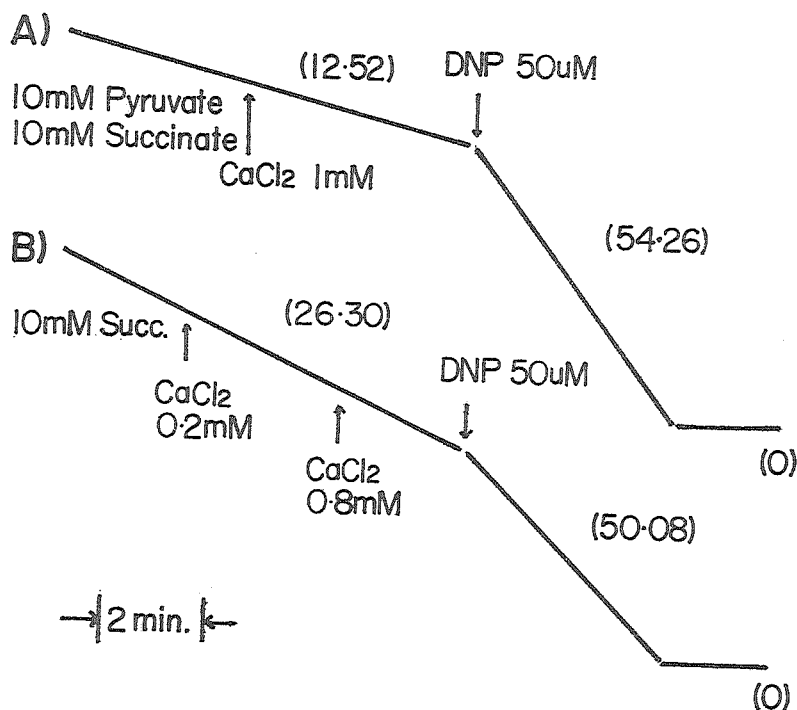


Fig. 1 Respiration rate of goat sperm with succinate and/or pyruvate as substrate measured by oxygen electrode. A) Effect of Ca^{2+} addition on the respiration of immobilized sperm, which was incubated in the medium containing 0.1 M sodium fluoride and rinsed. B) Effect of Ca^{2+} addition on the respiration of intact sperm, and motility of the sperm was 30 percent. The medium was 113mM KCl, 15mM KPi, 20mM Tris, pH 7.4 (A)., 150mM NaCl, 20mM Tris, pH 7.4 (B). Figures in parentheses give respiration rates as $\text{nMO}_2/\text{min} \cdot 3 \times 10^8 \text{ cells/ml}$. Uncoupler DNP was added at the end of the experiment to give the maximal rate. The point marked (0) indicates that the suspension has become anaerobic.

一般に、運動性のある精子の酸素消費量はその運動性の程度（活力）と相関関係があると いわれる⁸⁾。そこで本実験では、正常精子の運動性を鞭毛 ATP ase の阻害剤である NaF で

不動化することにより、運動性から生じる酸素消費量をなくし、その後の添加 Ca^{2+} の効果を探った。なお、TASH¹⁵⁾らは、0.04MのNaFによって不動化させた牛精子は、NaFの除去により運動性が回復したと報告している。しかし、本実験では、0.1MのNaFによって不動化させたが、洗浄後の運動性の回復は観察されなかった。

その後、Fig. 1に示す如く脱共役剤2,4-dinitrophenol (DNP) 添加によって、NaF不動化精子の酸素消費量(12.52)は54.26 ($\text{nMO}_2/\text{min} \cdot 3 \times 10^8 \text{ cells/ml}$)へ、正常精子の酸素消費量(26.30)は50.08 ($\text{nMO}_2/\text{min} \cdot 3 \times 10^8 \text{ cells/ml}$)へと亢進した。すなわち、DNP添加によりピルビン酸並びにコハク酸の基質酸化による電子伝達系とエネルギー転移系との共役状態が脱共役され、その結果、基質酸化に伴う最大酸素消費を示したものと推察された。このことより、NaF不動化精子並びに正常精子の酸化的リン酸化反応は、電子伝達系とエネルギー転移系においてその2つの反応系はある程度、共役状態であることが認められ、正常な呼吸代謝系を有しているものと思われた。

2. 寒冷衝撃不動化精子の酸素消費に及ぼす Ca^{2+} の影響

本実験で得られた寒冷衝撃不動化精子の初期酸素消費量 ($10.44 \text{ nMO}_2/\text{min} \cdot 3 \times 10^8 \text{ cells/ml}$) は、実験IでのNaF不動化精子の酸素消費量 ($12.52 \text{ nMO}_2/\text{min} \cdot 3 \times 10^8 \text{ cells/ml}$) と、ほぼ同じ数値を示した (Fig. 1, 2)。従って、これらの値は、運動を伴わない精子による呼吸の基礎代謝量と思われた。

寒冷衝撃不動化精子の酸素消費量に及ぼす Ca^{2+} の効果は、Fig. 2の如く、2度目の0.2 mMの Ca^{2+} 添加によって10.44から13.77 ($\text{nMO}_2/\text{min} \cdot 3 \times 10^8 \text{ cells/ml}$) に亢進(1.32倍)し、その後、さらに0.6mMの Ca^{2+} 添加により15.65 ($\text{nMO}_2/\text{min} \cdot 3 \times 10^8 \text{ cells/ml}$)に亢進(1.14倍)した。しかし、DNP添加によってごくわずか(15.65→15.01)阻害された。

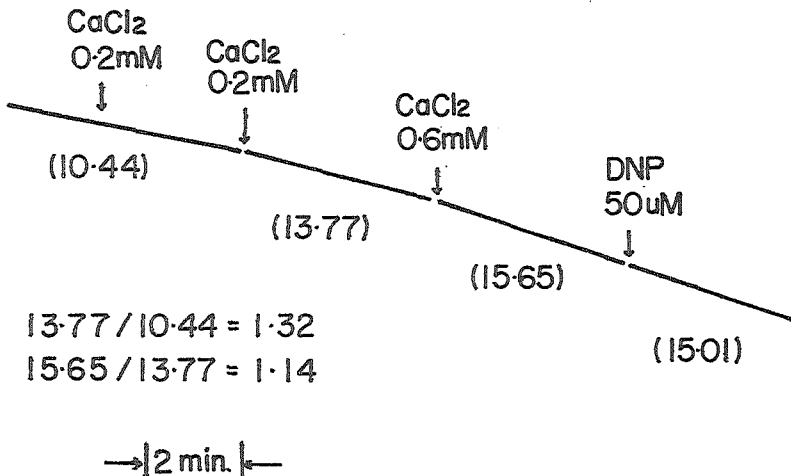


Fig. 2 Stoichiometric effect of Ca^{2+} addition on the respiration of sperm after cold shock. The medium was 113mM KCl, 35mM Tris, pH7.4 with 10mM pyruvate and 10mM succinate as substrate. Figures in parentheses give respiration rates as $\text{nMO}_2/\text{min} \cdot 3 \times 10^8 \text{ cells/ml}$.

一般に精液の寒冷衝撃によって、精子細胞の原形質膜は構造や機能においてかなり損傷を受けているものと思われている。例えば、精子細胞内外の陽イオンはその選択透過性の低

下により、細胞内外へ移送される⁴⁾。すなわち、 Ca^{2+} 、 Na^{+} は細胞内へ取り込まれ、 Mg^{2+} 、 K^{+} は細胞外へ漏出していることが認められている。また、そのような Ca^{2+} の細胞内透過性の変化によって、精子の代謝は大きく影響される⁵⁾。

STOREY¹³⁾ は、正常家兎精巢上体精子に Ca^{2+} に特異的な ionophore (A23187) を作用させ、 Ca^{2+} 添加によって Ca^{2+} 依存性酸素消費の発現を報告している。また、このような Ca^{2+} 依存性酸素消費現象は、精子のミトコンドリア¹⁴⁾に限らず、古くは Chance²⁾らによってラットの肝臓のミトコンドリアを用いて報告されており、Lehninger⁶⁾によっても詳しく述べられている。すなわち、ミトコンドリアの機能である酸化的リン酸化反応における電子伝達系とエネルギー転移系との3つの共役部位に Ca^{2+} が作用し、電子伝達系での基質からの電子の流れを促進し、結果として酸素消費が亢進されるというものである。また、 Ca^{2+} のミトコンドリア膜の透過性は、DNP によって阻害されることも知られている¹⁰⁾。また、予備的ではあるが、著者らは既に寒冷衝撃山羊精子内へ Ca^{2+} が実際に取り込まれることを Murexide¹⁷⁾法によって観察している。

これらのことにより、寒冷衝撃不動化精子の原形質膜の Ca^{2+} の選択透過性は低下し、添加 Ca^{2+} は細胞内へ取り込まれ、中片部のミトコンドリアにおいて Ca^{2+} 依存性酸素消費を刺激したものと推察された。また、その取り込みは添加 Ca^{2+} 量に応じた段階的な亢進を示した。

しかし、高濃度の Ca^{2+} 添加は阻害的に作用した。このことは、一つにはミトコンドリア膜を透過した Ca^{2+} がリン酸イオンと反応して、ハイドロキシアパタイト ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) というリン酸カルシウムの複合体としてミトコンドリア内部に沈着し、石灰化^{9),10)}してミトコンドリアの正常機能が損失した可能性も考えられる。

3. 卵黄による寒冷衝撃保護効果

卵黄物質が寒冷衝撃に対して精子の運動性を保持させる事実は古くから認められており、この保持作用は卵黄中のある物質、特にレシチン様物質であることが報告されている^{11),12)}。また KARAGIANNIDIS⁴⁾は、EDTA (20mM) や CTAB, SDS, Triton X-100 といった界面活性剤を使って、寒冷衝撃時における Ca^{2+} の原形質膜間の移動を防げることを報告している。そこで本実験は、寒冷衝撃時における卵黄物質の存在が山羊精子の Ca^{2+} 依存性酸素消費量に及ぼす影響から Ca^{2+} の動態を知ろうとした。

卵黄物質を含まない山羊精子に対する2度の寒冷衝撃は、山羊精子の初期酸素消費量 ($5.01 \text{ nMO}_2/\text{min} \cdot 3 \times 10^8 \text{ cells/ml}$) を、実験IIでの1回寒冷衝撃を与えた精子の初期酸素消費量 ($10.44 \text{ nMO}_2/\text{min} \cdot 3 \times 10^8 \text{ cells/ml}$) の約半分以下に低下させた (Fig. 2, 3)。これは寒冷衝撃の程度の差によるものと思われた。その後、 0.1 mM の Ca^{2+} 添加により 5.01 から 6.89 ($\text{nMO}_2/\text{min} \cdot 3 \times 10^8 \text{ cells/ml}$) に亢進 (1.38倍) し、さらに2度目の 0.2 mM の Ca^{2+} 添加によって 8.35 ($\text{nMO}_2/\text{min} \cdot 3 \times 10^8 \text{ cells/ml}$) に亢進 (1.21倍) した。しかし、第1回目の軽い寒冷衝撃に続いて2度目の寒冷衝撃時に卵黄物質が存在していると、初期酸素消費量は前述のものよりも1.25倍と高い値 ($6.26 \text{ nMO}_2/\text{min} \cdot 3 \times 10^8 \text{ cells/ml}$) を示した。また、その後の Ca^{2+} 添加によってその酸素消費量は影響されなかった。

従って、酸素消費能の動態から寒冷衝撃時における卵黄物質の存在は、精子細胞膜を保護することによって、原形質膜での Ca^{2+} の選択透過性の低下を防いでいるものと思われた。

以上、3つの実験結果より、酸素消費量に影響を及ぼす Ca^{2+} が、寒冷衝撃不動化精子の原形質膜を透過し、中片部のミトコンドリアでの酸化的リン酸化反応のエネルギー転移系と

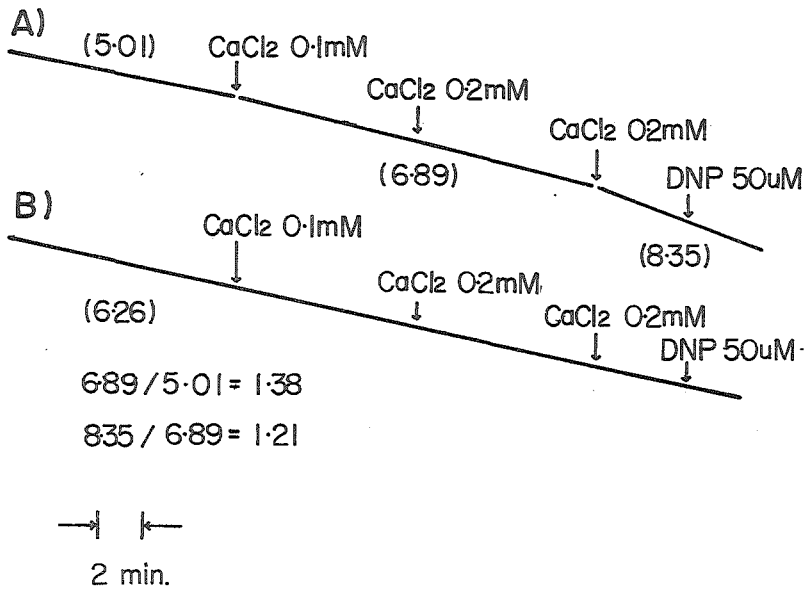


Fig. 3 Effect of egg-yolk-citrate diluent (ECD) on the respiration of cold-shocked sperm. A) Effect of Ca²⁺ addition on the sperm, which had been cold-shocked in the presence of egg-yolk. B) Effect of Ca²⁺ addition on the sperm, which had been cold-shocked in the absence of egg-yolk.

の共役なしに、添加量に応じて電子伝達系を働かせて、酸素消費量を亢進しているものと推察された。また、このような Ca²⁺ 依存性酸素消費量の違いから、寒冷衝撃による原形質膜のイオンの選択透過性の変化、即ち原形質膜の損傷程度を推測できることが示唆された。寒冷衝撃による原形質膜のイオンの選択透過性の低下は、卵黄物質の膜保護作用によって、防がれることが認められた。

摘 要

寒冷衝撃による山羊精子の原形質膜の損傷は、ひいては原形質膜のイオン選択透過性の低下をもたらしているものと考えられる。そこで、本研究は寒冷衝撃不動化山羊精子の原形質膜の損傷を、Ca²⁺ 依存性酸素消費の亢進を測ることによって明らかにしようとした。

1. NaF 不動化精子と正常精子の酸素消費量は、添加 Ca²⁺ によって影響されなかった。また、DNP 添加によって脱共役効果が認められた。
2. 寒冷衝撃を施した不動化精子の酸素消費量は、添加 Ca²⁺ の添加量 (1 mM 以下) に応じて段階的に亢進された。また、その酸素消費量の亢進、すなわち、Ca²⁺ の取り込みは DNP によってわずかに阻害された。高濃度 (1 mM 以上) の添加 Ca²⁺ は阻害的に作用した。
3. 寒冷衝撃時に卵黄物質が存在することにより、その酸素消費量は Ca²⁺ 添加によって影響されなかった。

寒冷衝撃は、山羊精子における添加 Ca²⁺ 依存性酸素消費量の亢進を示し、このことは原形質膜での Ca²⁺ の選択透過性の低下をもたらしているものと思われた。また、寒冷衝撃時の卵黄物質の存在によって、原形質膜の機能低下が防がれることが推察された。

文 献

- 1) BROOKS, D. E. and T. MANN : *Biochem. J.* **129**, 1023—1034 (1972)
- 2) CHANCE, B. : *J. Biol. Chem.* **240**, 2729—2748 (1965)
- 3) JONES, R. C. and I. C. A. MARTIN : *J. Reprod. Fert.* **35**, 311—318 (1973)
- 4) KARAGIANNIDIS, A. : *J. Reprod. Fert.* **46**, 83—90 (1976)
- 5) KEYHANI, E. and B. T. STOREY : *Biochimica. et. Biophysica Acta.* **305**, 557—569 (1973)
- 6) LEHNINGER, A. L. : *Biochem. J.* **119**, 129—138 (1970)
- 7) MANN, T. : *Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract.* Methuen & Co Ltd, London (1964)
- 8) NEVO, A. C. : *J. Reprod. Fert.* **9**, 103—107 (1965)
- 9) 沖増英治・内海恭三・湯原正高 : 凍結精液研究会会報, **52**, 8—10 (1977)
- 10) 小沢高将 : ミトコンドリアーその分子構築と生理化学 南江堂・東京 (1970)
- 11) QUINN, P. J. and I. G. WHITE : *Exp. Cell. Res.* **49**, 31—39 (1968)
- 12) QUINN, P. J. and I. G. WHITE : *J. Reprod. Fert.* **12**, 263—270 (1966)
- 13) STOREY, B. T. : *Biol. Reprod.* **13**, 1—9 (1975)
- 14) STOREY, B. T. and E. KEYHANI : *Ferti. Steri.* **25**(11), 976—984 (1974)
- 15) TASH, J. S. and T. MANN : *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* **184**, 109—114 (1974)
- 16) 内海耕鎚 : 蛋白質・核酸・酵素, **14**, 621—624 (1969)
- 17) 内海恭三・守永太賀彦・沖増英治・湯原正高 : 凍結精液研究会会報 (1978) 投稿中

正 誤 表 (Errata)

頁 (Page)	行 (Line)	誤 (Erratum)	正 (Correct)
2	2	1967	1967年
3	3	組職学	組織学
3	24	資料	資料
8	11	分析し易し	分析し直し
14	8	ミカンユミバエ	ミカンコミバエ
31	24. 26	egg yolk	egg-yolk
40	15	研者	研究者
42	16	fragmen-tation	fragmentation
55	14	259—262 (1972)	259-262, 岩波書店・東京(1972)