

令和元年6月25日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07690

研究課題名(和文)ウシ精子の走温性を調節する細胞内情報伝達機構

研究課題名(英文) Intracellular signal transduction mechanism of regulating bovine sperm thermotaxis

研究代表者

濱野 光市 (Hamano, Koh-ichi)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：70303443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は走温性による精子の評価法を畜産現場に応用するための基礎的研究である。ウシ精子の走温性発現温度、最適温度勾配を確認した。SKF、ルテニウムレッド、RN-1734によるカルシウム(Ca)チャネル阻害、カラクシン、カルモジュリンの阻害は走温性を阻害し、速度、尾部打頻度が低下した。TRPチャネル促進剤GSK1016790Aは走温性を促進した。走温性発現精子のCa濃度の増大、温度による可逆的变化を確認した。tmAC、sAC阻害剤のddA、2CE、オプシン阻害剤ヒドロキシルアミンは精子の走温性を阻害した。受精能獲得前後における走温性の発現を確認した。粘性培地は受精能獲得精子の走温性を阻害した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではウシ精子の走温性における発現機構とカルシウムの動態、作用機構を調べた。走温性発現精子のカルシウムチャネル、カルシウム結合タンパクの解析から、温度勾配における走温性の発現、走温性の調節における特定のカルシウムチャネル、複数のカルシウム結合タンパクの関与が明らかになり、温度勾配における精子の移動、温度変化による精子の頭部および尾部の運動調節機構の一部が解明され、受精における精子の運動機能が解明される。走温性を指標にした客観的で正確な精子の受精能の解析、雄ウシの繁殖能力の評価が可能になり、繁殖性の高い雄ウシが選抜され、人工授精後の雌ウシの受胎率が改善し、効率的にウシを増産できる。

研究成果の概要(英文)：This study was basic study to apply the new evaluating system of the sperm using thermotaxis in the livestock raising settings and obtained the following results. We confirmed the initiating temperature of thermotaxis expression of the bull sperm and optimal temperature gradient for thermotaxis. Both of calcium channel inhibition by Verapamil, SKF, Ruthenium red, RN-1734 and inhibition of Calaxin, calmodulin inhibited thermotaxis, and curvilinear velocity and flagellar amplitude decreased as compared with thermotaxis. GSK1016790A of the TRP channel agonist promoted thermotaxis. We confirmed increase of the calcium concentration of the thermotaxis expressed sperm, reversible change by temperature lifting and lowering. ddA, 2CE of the tmAC, sAC inhibitor and the hydroxylamine of the opsin inhibitor inhibited the thermotaxis of the bull sperm. We confirmed thermotaxis expression before and after sperm capacitation. The viscous medium inhibited the thermotaxis of capacitated sperm.

研究分野：家畜繁殖

キーワード：ウシ精子 走温性 温度勾配 制御因子 発現機構 運動解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は雌生殖道内における精子の運動機能の変化である走温性を確認し、これが受精に関与する重要な運動生理機能であることを示すとともに、精子細胞膜に存在する分子に制御されている可能性を示した(河西、濱野ら、北信越畜会報、2007)。走温性は雌生殖道内で生じる温度勾配を認識して精子の運動を調節することで高温域に移動すると考えられ、精子細胞内の情報伝達機構と密接な関係がある。ウサギとブタで卵管狭部と膨大部における温度勾配での精子の走温性が報告され、受精能獲得したウサギ精子が高温域の卵管膨大部へ移動する正の走温性が確認されている。ヒト精子でも同様の結果が得られ、排卵時は卵管膨大部までの温度勾配への走温性が、排卵後は卵胞液、卵子への走化性が、精子の移動に関与すると推察されているが、明確な結論は得られていない。一方、精子の受精能獲得の前後における走温性、走化性の関与が調べられており、受精能獲得前の走温性と獲得後の走化性が、精子の移動と効率的な受精過程を可能にすると考察されている。しかしながら、走温性を発現する精子の運動調節機構に関する研究は極めて少なく、得られた情報はほとんどない。最近、人工授精後の雌ウシの受胎率低下が重大な問題となっており、精子の核・DNA、超活性化運動、先体反応等が調べられているが、明確な結論は得られていない。走温性の基礎研究には未解明のことが残されており、応用への展開に関して検討することが多い。本研究計画は走温性の未解明な基礎研究を完成し、走温性を利用した雄ウシの繁殖性診断や評価法に応用する研究を進める。

### 2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究は走温性の未解明な基礎的研究を完成し、走温性を利用した精子の新しい診断方法や評価法を畜産現場に応用・展開するための基礎となる研究を行う。研究期間内に以下のことを明らかにする。

- (1) 走温性制御因子の同定、発現調節機構の解明
- (2) 走温性発現経路、情報伝達機構の解明
- (3) 走温性発現精子の受精機能の解明

### 3. 研究の方法

#### (1) 走温性制御因子の同定、発現調節機構の解明

精子の走温性の発現開始から温度勾配を認識し運動を調節する機構を明らかにするために、走温性発現因子を探索し、走温性発現精子の移動性、方向の変化を調べた。

走温性発現因子の探索：走温性発現制御因子として、研究代表者はウシの体温付近の温度域で精子が高い移動能を示すことを見出した(未発表)。顕微鏡に装着して25～45の温度域から任意の温度勾配を設定し、移動中の精子の運動を詳細に計測できる装置を作製した(馬場、濱野ら、未発表)。本計画ではこの装置を利用して異なる温度勾配を設定し、精子を検査チャンパーに導入し検査した。高温域に移動した精子数を計測し、走温性の発現開始温度、走温性維持の最適温度勾配、維持時間を調べた。

走温性発現機構の解析：研究代表者は上述の温度勾配装置による走温性の計測において、スライドガラスとカバーガラスの間隔が100 $\mu$ m、精子の移動経路が22 $\times$ 40mmのチャンパーに精子を導入することで運動性を詳細に、正確に解析できる方法を確立した(木下、濱野ら、北信越畜会報、2013)。解析用ソフトウェア(Bohboh)の利用により、精子の移動方向の変化と尾部運動の詳細で正確な解析が可能になり、チャンパー内の温度勾配分岐部における精子の変化を計測した。10秒間、1000画像を記録後、ソフトウェアを操作し、指定した精子の頭部の解析から振幅、直線・曲線速度、直線性を、尾部の波長、屈曲、振幅、打頻度の変化から、走温性に伴う移動性、方向の変化を調べた。温度勾配における除膜精子の尾部変化を調べ、細胞膜における走温性発現調節部位を同定した。

#### (2) 走温性発現経路、情報伝達機構の解明

走温性制御因子の受容体、発現経路を探索し、情報伝達機構を解明するために、走温性発現精子の細胞膜流動性、カルシウム動態、カルシウム濃度の変化、および分子薬理的調節機構を調べた。

走温性発現精子の細胞内カルシウム動態の解析：38.5で遮光インキュベートすることで細胞内にFluo-3/AMを導入後、温度勾配装置を利用し精子に走温性を発現させ、蛍光顕微鏡により走温性発現前後におけるFluo-3/AMを計測することで精子の細胞内カルシウム動態を調べてきた(未発表)。走温性発現精子の移動方向の変化に影響する、頭部から尾部におけるカルシウムの変動を解析した。温度勾配、時間経過によるカルシウム濃度の変化、高濃度カルシウムの分布変化を計測することで、因子の受容部分、受容体、および発現経路を調べた。

走温性発現精子におけるカルシウム作用機構の解明：研究代表者は精子の運動性におけるカルシウムの作用を調べ、複数のカルシウムチャンネル特異的阻害剤を利用して探索し、電位依存性チャンネルの関与を明らかにした(未発表)。本計画ではカルシウム作用に関与する電位依存性チャンネル、のほかにTRPCチャンネル、細胞内放出チャンネル、Cation channel of sperm (CatSper)関連チャンネル、カルシウムポンプのそれぞれの阻害剤である、ベラパミル、SKF、ライアノジン、ミベフラジル、タプシガルギンを添加し、それぞれの阻害作用に応じて精子の移動、方向を変化する走温性を調べることで、因子を直接、あるいは、間接的に受容するチャンネル部分、およ

びカルシウムシグナル伝達機構を解明した。

走温性発現精子の分子薬理的調節機構の解明：cAMP/PKAの経路が精子のタンパク質チロシンリン酸化を調節していることが知られており、研究代表者は脱リン酸化、およびリン酸化に關する酵素阻害剤による精子運動性の抑制、低下を解析してきた（川名、濱野ら、北信越畜会報、2001、Hossain, Hamanoら、Reprod Med Biol、2010）。本研究では、アデニル酸シクラーゼ（AC）とcAMPの關与の解明を目的に、tmACの阻害剤であるddAとsACの阻害剤である2CEを利用して走温性を調べた。また、ヒト精子における走温性への關与が報告されたオプシンのウシ精子における關与を解明することを目的に、走温性を調べた。オプシン阻害剤であるヒドロキシルアミン（HA）添加区における両温域に移動した精子数を調べた。

### （3）走温性発現精子の受精機能の解明

受精能獲得前後における走温性と走化性の発現順序を解明し、走温性発現精子の受精能獲得、超活性化運動、先体反応を調べ、走温性との相關の解明を試みた。

走温性発現精子の運動性の解析：研究代表者はプロカイン、ヘパリン処理によりウシ精子の超活性化運動を高率に誘起し解析してきた（木下、濱野ら、北信越畜会報、2013）。超活性化運動誘起前後の精子を温度勾配に導入し、CASAにより走温性と超活性化運動の発現を調べる。超活性化運動は頭部の遊泳軌跡（星型と円型）の違いから解析し、走温性の発現はチャンパー内の経路を移動する精子の数と方向の変化から解析した。

走温性発現精子の受精能の解析：研究代表者はクロルテトラサイクリン：Chlortetracycline（CTC）染色によりウシ精子の受精能獲得、先体反応を検査してきた（赤沼、濱野ら、北信越畜会報、2013）。温度勾配で走温性を発現した精子頭部の染色性の違いにより受精能獲得と先体反応を評価した。

## 4．研究成果

本研究は、走温性の未解明な基礎的研究を完成し、走温性を利用した精子の新しい診断方法や評価法を畜産現場に応用・展開するための基礎となる研究を行った。

### （1）走温性制御因子の同定、発現調節機構の解明

#### 走温性発現因子の探索

顕微鏡に装着して25～45の温度域から任意の温度勾配を設定し、移動中の精子の運動を詳細に計測できる装置を利用して異なる温度勾配を設定し、精子を検査チャンパーに導入し検査した。高温域に移動した精子数を計測し、走温性の発現開始温度、走温性維持の最適温度勾配を明らかにした。TritonX-100による除膜精子の運動、特に超活性化運動誘起条件を調べ、カルシウム、ATPの關与を確認した。

走温性発現精子のカルシウムイオン、カルシウム結合タンパクの關与を調べ、カルシウム欠培地内での負の走温性を確認するとともに、カルシウム結合タンパクである、カラクシン、カルモジュリンの阻害が走温性に影響し、移動精子が減少することを明らかにした。

#### 走温性発現機構の解析

温度勾配装置による走温性の計測において、スライドガラスとカバーガラスの間隙が100μm、精子の移動経路が22×40mmのチャンパーに精子を導入することで運動性を詳細に、正確に解析できる方法を確立した。解析用ソフトウェア（Bohboh）の利用により、精子の移動方向の変化と尾部運動の詳細で正確な解析が可能になり、チャンパー内の温度勾配分岐部における精子の変化を調べた。10秒間、1000画像を記録後、ソフトウェアを操作し、指定した精子の頭部の解析から走温性に伴う移動性、方向の変化を調べた。

走温性発現精子の移動性、方向の変化を調べ、速度、直線性、尾部屈曲の変化を確認した。

走温性発現ウシ精子の温度勾配条件下における移動性、運動方向の変化を調べ、精子頭部における速度、直線性、尾部の屈曲の変化を再確認した。

### （2）走温性発現経路、情報伝達機構の解明

#### 走温性発現精子の細胞内カルシウム動態の解析

走温性発現精子のカルシウムの変化、動態を解析した。温度勾配、時間経過によるカルシウム濃度の変化を調べ、高温域における精子のカルシウム濃度の増大を確認した。

さらに、走温性発現精子のカルシウムの変化、動態を解析し、温度の上昇・下降に応じた精子のカルシウム濃度の可逆的变化を確認した。

走温性発現ウシ精子の細胞内カルシウム動態、特に、時間経過に伴う温度勾配条件下におけるカルシウム濃度の変化を調べ、高温域における精子のカルシウム濃度の増大、温度の上昇・下降に応じた精子のカルシウム濃度の変化を再確認した。

走温性発現ウシ精子におけるカルシウムチャンネルの關与の解明を目的に、カルシウムチャンネル阻害時のウシ精子の運動性、移動性および温度変化時のカルシウム変化を調べた。温度勾配条件下においてウシ精子は走温性を発現したが、ベラパミル、ミベフラジルによるカルシウムチャンネル阻害区ではいずれも走温性が阻害された。カルシウムチャンネル阻害区の直線速度、曲線速度および尾部打頻度は、走温性発現区に比べ低下した。走温性発現精子のカルシウム濃度

は、温度の上昇・下降にともない、それぞれ変化した。カルシウムチャンネル阻害区のカルシウム濃度の変化は緩慢であった。

走温性発現精子におけるカルシウム作用機構の解明

・カルシウム作用に關与する TRPC チャンネル、細胞内放出チャンネル、Cat ion channel of sperm (CatSper) 関連チャンネルのそれぞれの阻害剤である、SKF、ライアノジン、ミベフラジルを添加し、それぞれの阻害作用に応じて精子の移動、方向を変化する走温性を調べ、TRPC チャンネル、細胞内放出チャンネルの關与を確認した。

・電位依存性 L 型、T 型カルシウムチャンネル阻害剤であるベラパミルと SOC チャンネル促進剤であるタブシガルギンを添加後、精子の走温性を調べ、ベラパミルによる阻害、尾部打頻度の低下、タブシガルギンによる精子走温性の発現を確認した。

・カルモジュリン阻害剤の W-7、カラクシン阻害剤のレパグリニド、および TRP カルシウムチャンネル阻害剤の SKF、TRPV カルシウムチャンネル阻害剤のルテニウムレッド、RN-1734 の添加による走温性の阻害、TRP カルシウムチャンネル促進剤の GSK1016790A の添加による走温性の促進を確認した。

走温性発現精子の分子薬理的調節機構の解明

・ウシ精子の走温性におけるアデニル酸シクラーゼ (AC) と cAMP の關与の解明を目的に、tmAC の阻害剤である ddA と sAC の阻害剤である 2 CE を利用して走温性を調べた。ddA および 2 CE 添加区では、高温域、低温域に移動した精子数に有意な差はみられず、走温性が阻害された。sAC および tmAC のいずれのアデニル酸シクラーゼも、ウシ精子の走温性の発現に關与することが示唆された。

・ヒト精子における走温性への關与が報告されたオプシンのウシ精子における關与を解明することを目的に、走温性を調べた。温度勾配条件下では、対照区において高温域と低温域に移動した精子数に有意な差がみられたが、オプシン阻害剤であるヒドロキシルアミン (HA) 添加区では両温域に移動した精子数に有意差はなく、ウシ精子の走温性におけるオプシンの關与が示唆された。

### (3) 走温性発現精子の受精機能の解明

走温性発現精子の運動性の解析

・走温性発現ウシ精子の運動性におけるオプシンの關与を調べる目的から、頭部、尾部の運動性を調べた。温度勾配条件下では、対照区、ヒドロキシルアミン (HA) 区における移動精子の直線速度、曲線速度、軌跡速度、尾部打頻度および尾部振幅のいずれにおいても有意差はなかった。また、走温性発現ウシ精子の運動性におけるカルシウム結合タンパク質であるカルモジュリンの關与を調べる目的から、カルモジュリン阻害剤である W7 を添加し、頭部、尾部の運動性を調べた。温度勾配条件下で高温域に有意に多数の精子が移動した対照区、移動精子数に有意な差が認められなかった W7 区において、移動精子の直線速度、曲線速度、軌跡速度、尾部打頻度および尾部振幅のいずれにおいても有意差はなかった。ウシ精子が高温域に移動する走温性発現機構の解明には、直線速度、曲線速度、軌跡速度、尾部打頻度および尾部振幅以外の運動機能が關与していることが推察され、さらに異なる運動解析パラメータによる解析が必要であると考えられた。

走温性発現精子の受精能の解析

・受精能獲得前後における走温性の発現を調べ、受精能獲得との關係を確認した。36~38 の温度勾配内の移動精子数を調べ、粘性培地 (1%メチルセルロース添加 B0 液) および非粘性培地 (B0 液) 内のいずれにおいても、高温域に移動する走温性を確認した。非粘性培地と比べ、粘性培地における走温性発現精子数は低下したが、高率に精子の超活性化運動を誘起するプロカイン処理精子および受精能獲得を誘起するヘパリン・カフェイン処理精子の発現の低下率は小さいことを確認した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

A G Miah, R Bathgate, K Hamano, U Salma

Effects of pre-freeze *Nigella sativa* oil supplementation on cryosurvival of ovine Spermatozoa

Reprod Domestic Animal 査読：有，2018，

DOI:10.1111/rda.13275

M Anisuzzaman MD, Takagi Y, Baba S A., Hamano K

Possible ability of bovine follicular fluid to attract migrating bull spermatozoa

Reprod Med Biol 査読：有 巻：16 発行年：2017 133-138

DOI: 10.1002/rmb2.12025

M Anisuzzaman MD, Takagi Y, Baba S A., Hamano K

Involvement of calcium channels and intracellular calcium in bull sperm thermotaxis

J Reprod Dev 査読：有 巻：63 発行年：2017 頁：143-148

URL：http://reproduction.jp/

〔学会発表〕(計 8件)

増田 英晃，広瀬 海里，富岡 郁夫，高島 誠司，保科 和夫，濱野 光市，高木 優二

トリプシン振盪培養法による成熟ブタ精巣からの精原細胞の単離

第 111 回日本繁殖生物学会、2018

石倉夏樹，諸白加奈子，富岡郁夫，高木優二，濱野光市

走温性発現ウシ精子におけるカルシウムチャンネルの関与

第 67 回北信越畜産学会大会，2018

広瀬海里，富岡郁夫，高島誠司，保科和夫，濱野光市，高木優二

幼若ブタ前精原細胞と成熟ブタ精原細胞の分化マーカー遺伝子を用いた比較

第 124 回日本畜産学会大会、2018

Shinya Watanabe, Mayuko Okabe, Mikio Sekinuma, Ko Hatakeyama, Koh-ichi Hamano

Science communication attached with hands-on field experience program in university farm:

Concerns of students about somatic cell cloning technology

W C R B 2017

渡邊伸也，岡部繭子，関沼幹夫，畠中洸，濱野光市

体細胞クローン技術に関するサイエンスカフェに参加した学生の意識変化

第 123 回日本畜産学会大会、2017

広瀬海里，関口健司，富岡郁夫，高島誠司，濱野光市，高木優二

FG-beads による成熟精巣からの精原細胞の単離

第 123 回日本畜産学会大会、2017

石倉夏樹，市岡 樹，林 知洋、富岡郁夫，高木優二，馬場昭次，濱野光市

走温性発現ウシ精子の運動性とカルシウムの変化

第 66 回北信越畜産学会大会，2017

安田瞳美，佐藤健太，富岡郁夫，高木優二，濱野光市

ウシ精子の走温性におけるカルシウムの関与

第 66 回北信越畜産学会大会，2017

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。