

令和元年5月29日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07990

研究課題名(和文) ウシ凍結前精子の耐凍能判定法の確立を目的としたSPACA1タンパク質の解析と利用

研究課題名(英文) Characterization and utilization of SPACA1 proteins for the purpose of establishment of a new method to predict freezability of bull sperm before cryopreservation

研究代表者

原山 洋 (HARAYAMA, HIROSHI)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：30281140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ウシ凍結前精子の先体耐凍能判定法を確立すること、およびこの判定法を普及させるための基盤づくり(技術的信頼性の構築)であった。本研究での取り組みにより、SPACA1タンパク質の分布状態を指標とするウシ(黒毛和種)新鮮射出精子の耐凍能判定法を開発した。またSPACA1タンパク質の分布異常は精巣上体の通過時における精子の成熟変化の不全と関連すること、およびSPACA1タンパク質の正常分布率の低い凍結保存精子を人工授精に使用した際の雌ウシの低受胎は精子の受精能力の低さに起因することを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

雌ウシを受胎させにくい精子を生産する種雄候補牛を、精子の分子マーカー(SPACA1タンパク質)を指標として利用することで客観的に特定できるようになった。またウシの雄性低繁殖症の原因分子のひとつを特定できた。これらの成果により、人工授精法によるウシの生産効率を向上でき、産肉能力または泌乳能力の高い優良個体をさらに増産できるようになる。本研究の成果は、食肉や牛乳などの畜産製品を社会に安定的に供給するための家畜の生産体制の改善に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：The aims of the present study were to develop a new method to predict freezability of bull sperm before cryopreservation and to increase its reliability by disclosing molecular methodology. In this study, we succeeded in the development of the method to predict freezability of bull (Japanese Black bull) sperm before cryopreservation according to the criterion of the distribution of SPACA1 proteins. We also suggested that aberrant distribution of SPACA1 proteins is related to abnormal maturation of the sperm in the epididymis, and that low fertilizing ability of cryopreserved sperm with aberrant distribution of SPACA1 proteins is linked to poor results in the artificial insemination using them.

研究分野：生殖生物学

キーワード：応用動物 畜産学 雄性繁殖学 精子 人工授精 ウシ

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

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ウシの人工授精での受胎率は長期間にわたり低下し続けている。このようなウシの低受胎はわが国の畜産経営の最大のリスクであり、生産基盤の脆弱化の要因になる。また低受胎による乳用牛の泌乳成績の悪化は乳製品の安定供給を脅かす要因で、国民生活にも乳製品の価格上昇という形でその悪影響が及んでいる。このような低受胎の原因究明にはウシの繁殖能力の精密精査が必要である。私たちは雄性繁殖能力の精密検査法の開発に取り組み、人工授精で雌を受胎させにくい精子では、頭部の先体チロシンリン酸化タンパク質の分布に異常が見られ、凍結保存時に受精に重要な先体が重度に損傷すること、先体チロシンリン酸化タンパク質の分布異常の程度と人工授精成績との間に相関関係が存在すること、および先体チロシンリン酸化タンパク質の分布異常は凍結保存前の精子にすでに認められることを明らかにした。またこれらの知見をもとに「先体チロシンリン酸化タンパク質を指標とする凍結前精子の先体耐凍能判定法」を開発し、種雄候補牛の繁殖能力の検査法の一部として兵庫県において既に使用している。

(2) しかしながら先体チロシンリン酸化タンパク質には複数の種類が存在するため、先体耐凍能を制御する責任タンパク質は不明で、また先体耐凍能判定法の原理も未解明である。判定の精度および信頼性を向上させて先体耐凍能判定法を広く普及させるためには、上述の責任タンパク質を特定し、その具体的な機能を究明することで先体耐凍能判定法の原理を解明することが不可欠である。私たち (Harayama et al., Mol Reprod Dev. 2010; 77: 910-921) は先体チロシンリン酸化タンパク質の少なくとも一部は Sperm-associated 1 (SPACA1) タンパク質であり、少数のウシに由来する凍結精子において先体チロシンリン酸化タンパク質量と SPACA1 タンパク質量との間に相関関係を見出したが、この知見は SPACA1 タンパク質が上述の責任タンパク質である可能性を強く示唆している。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ウシ凍結前精子の先体耐凍能判定法を確立すること、およびこの判定法を普及させるための基盤づくり(技術的信頼性の構築)であり、これらを達成するために以下の取り組みを実施した。

- (1) 先体耐凍能判定法の精度向上に関する取り組み：鞭毛運動機能に欠陥(欠陥型 ADCY10)を持つ試料をウシ凍結前精子の先体耐凍能検査の対象から除外するための手法の開発、および検査用指標としての SPACA1 タンパク質の有効性の検討
- (2) 先体耐凍能判定法の原理解明に関する取り組み：SPACA1 タンパク質の細胞内分布特性の観察および体外受精能力に及ぼす影響の検討

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験試料

新鮮射出精子は、兵庫県立農林水産技術総合センター・北部農業技術センターで育成中の種雄候補牛(黒毛和種, 1歳以上)から人工膈法により採取された。凍結保存精子は同センターから提供された。精巢および精巢上体は同センターで廃用となった種雄牛または種雄候補牛より採取された。

#### (2) 実験手法

以下の手法を用いて本研究を実施した。なお、手順の詳細については引用文献に記載されたとおりである。

精子の性状(前進率, 奇形率および正常先体率)検査(雑誌論文, Arai et al., Reprod Fertil Dev. 2017; 29: 1297-1305)

精子の鞭毛運動様式の観察(雑誌論文 ~ )

RT-PCR, 遺伝子操作, ウェスタンブロッティング法および間接蛍光抗体法(雑誌論文)

人工授精法(雑誌論文, Arai et al., Reprod Fertil Dev. 2017; 29: 1297-1305)

体外受精法(Kishida and Sakase et al., J Reprod Dev. 2015; 61: 519-524)

細胞の可溶性成分と膜成分の分離法およびシヨ糖密度勾配超遠心法(Asano et al., J Cell Physiol. 218: 537-548)

### 4. 研究成果

#### (1) 精子の性状検査

43頭の種雄候補牛から新鮮射出精子(156サンプル)を採取した。精子の一般性状(前進率, 奇形率および正常先体率)を調べ、サンプル毎に成績を記録した。また一部のサンプルを用いて体内受精試験または体外受精試験に使用する精子を凍結保存した。また67頭の廃用牛から精巢および精巢上体を採取し、以下の実験に使用した。

#### (2) 先体耐凍能判定法の精度向上に関する取り組み

鞭毛運動機能に欠陥(欠陥型 ADCY10)を持つ試料をウシ凍結前精子の先体耐凍能検査の対象から除外するための手法の開発

ADCY10の活性化剤「炭酸水素ナトリウム(5~20 mM)」または阻害剤「KH-7(10または50 μM)」含む培養液に正常な運動能力を備えるウシ新鮮射出精子を洗浄処理後に浮遊させて、ADCY10の高活性型(炭酸水素ナトリウム添加区)、中活性型(炭酸水素ナトリウム・KH-7無添加区)および低活性型(KH-7添加区)の精子を準備した。これらの運動精子の顕微鏡像動画をハイスピードカメラ記録システムで録画し、得られた動画をコマ送り再生して運動様式、運動速度および鞭毛屈曲の対称性を解析した。また、一部の試料については精子頭部の核を細胞膜透過性DNA染色剤のSYBR14で染色し、蛍光顕微鏡下で1秒間の写真を撮影することで、精子頭部の移動の軌跡を記録した。その結果、ADCY10の高活性型または中活性型の精子は頭部の回転(ローテーション)を伴わない平面の前進運動または円運動を示すこと、および低活性型の精子はローテーションを伴う前進運動を示すことが明らかになった。以上の結果から、洗浄処理後にADCY10阻害剤(KH-7)を含まない培養液に浮遊させた際にローテーションの発生が高率に認められる精子試料は、鞭毛運動機能に欠陥(欠陥型ADCY10)を持つとみなし、ウシ凍結前精子の先体耐凍能検査から除外できると考えられる。

#### ウシ凍結前精子での先体耐凍能の検査用指標としてSPACA1タンパク質の有効性の検討

ウシ精子においてSPACA1タンパク質は先体の主部前部および赤道節に分布しており、この分布様式を正常型とした。またほぼすべての精子の赤道節にはSPACA1タンパク質が均一に分布していたが、主部前部での分布状態は試料によって変動し、この部位でSPACA1タンパク質が減少、消失または拡散した状態を異常型とした。ウシの新鮮射出精子(n=66)および精巣上体尾精子(n=67)を対象とした検査では、SPACA1タンパク質の正常分布率は大きな試料間差(7~95%)を示し、先体チロシンリン酸化タンパク質の正常分布率との間に有意な正の相関関係を示した。またSPACA1タンパク質と先体チロシンリン酸化タンパク質の分布状態を蛍光免疫二重染色法により観察したところ、先体の主部前部におけるこれらのタンパク質の分泌状態は各精子において一致していた。精巣上体尾精子のSPACA1タンパク質の正常分布率は、同一個体由来の凍結保存精子の正常先体率ならびに凍結保存精子を人工授精に使用した際の受胎率との間に有意な正の相関関係を示した。以上の結果から、先体の主部前部におけるSPACA1タンパク質の分布状態は、ウシ凍結前精子の先体耐凍能の検査用指標として有効であると示唆された。

#### (3) 先体耐凍能判定法の原理解明に関する取り組み

##### SPACA1タンパク質の細胞内分布特性の観察

mRNAの発現解析および蛍光免疫組織化学法での観察により、SPACA1タンパク質は精巣で産生され、減数分裂後の精子細胞では精子頭部となる領域に分布することを示した。精子の精巣上体頭の通過に伴う成熟中にSPACA1タンパク質の一部が先体の赤道節から主部前部に移動することが明らかになった。以上の結果から、ウシ精子におけるSPACA1タンパク質の分布異常は精巣上体における成熟変化の不全に起因すると考えられる。

ウシ精巣由来するmRNAからRT-PCR法により増幅したcDNAを用いて培養体細胞にGFP標識SPACA1タンパク質を発現させた。その結果、SPACA1タンパク質は培養体細胞の細胞質内では顆粒状に存在したが、その一部は細胞膜に分布する傾向を示した。これらの培養細胞を冷却処理に供したところ、強い細胞凝集が発生し、これが色素(トリパンブルー)細胞膜透過試験による客観的な細胞の生存性(survivability)の判定を困難にした。他方、外来SPACA1タンパク質の発現には体細胞間で量的な不均一が認められ、これが冷却処理時の体細胞の応答および挙動に大きなばらつきを生じさせた。

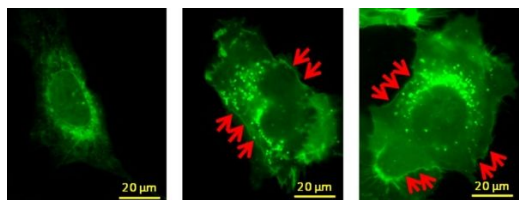


図. 遺伝子導入により外因性ウシ SPACA1 タンパク質(EGFP 標識)を発現させた培養体細胞(U2OS 細胞)。矢印は培養細胞の辺縁部(細胞膜)を示す。外因性ウシ SPACA1 タンパク質の多くは細胞質内の緑色の顆粒として存在するが、一部は辺縁部(細胞膜)に分布していた。

ウシ凍結保存精子を可溶性成分と膜成分に分離したのち、各成分をウェスタンブロッティングに供したところ、SPACA1タンパク質は膜成分でのみ検出された。また膜成分をショ糖密度勾配超遠心法で分画すると、SPACA1タンパク質はbuoyant membrane componentの分画で検出された。以上の結果から、ウシ精子のSPACA1タンパク質は脂質ラフトの成分である可能性が示唆された。

#### SPACA1タンパク質の体外受精能力に及ぼす影響の検討

SPACA1タンパク質の正常分布率が50%以上の凍結保存精子(n=10)と10%以下の凍結保存精子(n=7)の体外受精成績を比較したところ、平均受精率はそれぞれ69%および36%であり、両者の数値の間には有意差が認められた。以上の結果から、SPACA1タンパク質の正常分布率の低い凍結保存精子を人工授精に使用した際の低受胎は精子の受精能力の低さに起因すると示

唆された。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 10 件)

Yuka Arai, Mitsuhiro Sakase, Moriyuki Fukushima and Hiroshi Harayama. Identification of isoforms of calyculin A-sensitive protein phosphatases which suppress full-type hyperactivation in bull ejaculated spermatozoa. *Theriogenology*, 査読有, Vol. 129, 2019, pp. 46-53. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.02.010

Hiroshi Harayama. Flagellar hyperactivation of bull and boar spermatozoa (Invited review). *Reproductive Medicine and Biology*, 査読有, Vol. 17, 2018, pp. 442-448. DOI: 10.1002/rmb2.12227

Ayano Yamada, Mitsuhiro Sakase, Moriyuki Fukushima and Hiroshi Harayama. Reconsideration of the evaluation criteria for bull ejaculated sperm motility in the context of rotation. *Journal of Reproduction and Development*, 査読有, Vol. 64, 2018, pp. 377-384. DOI: 10.1262/jrd.2018-036

Hiroshi Harayama, Kenta Minami, Kazumi Kishida and Taichi Noda. Protein biomarkers for male artificial insemination subfertility in bovine spermatozoa (Invited review). *Reproductive Medicine and Biology*, 査読有, Vol. 16, 2017, pp. 89-98. DOI: 10.1002/rmb2.12021

原山 洋、水野 洋平、家畜精子鞭毛の超活性化運動に関する研究の現状(招待総説論文)、*日本胚移植学雑誌*、査読有、39 巻、2017、159-167 ページ。

坂瀬 充洋、福島 護之、兵庫県における黒毛和種種雄候補牛精液の受胎性評価の取り組み(招待総説論文)、*日本胚移植学雑誌*、査読有、39 巻、2017、177-182 ページ。

Masaki Fukuda, Mitsuhiro Sakase, Moriyuki Fukushima and Hiroshi Harayama. Changes of IZUMO1 in bull spermatozoa during the maturation, acrosome reaction, and cryopreservation. *Theriogenology*, 査読有, Vol. 86, 2016, pp. 2179-2188. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.07.010

### 〔学会発表〕(計 10 件)

山田 綾乃、活力検査法の改良を目的としたウシ射出精子の運動様式の観察、第 111 回日本繁殖生物学会大会、2018

山田 綾乃、cAMP-PKA シグナル伝達活性の違いがウシ精子の運動様式に及ぼす影響 - 精子の活力検査における評価基準の見直し -、日本アンドロロジー学会第 37 回学術大会、2018

荒井 佑香、ウシ精子での細胞外 Ca<sup>2+</sup>依存的な Full-type ハイパーアクチベーションの抑制に機能するカリクリン A 感受性プロテインホスファターゼアイソフォームの特定、第 6 回関西生殖医学集談会、2018

Yuka Arai, Calyculin A-sensitive protein phosphatases which are involved in the suppression for full-type hyperactivation of bovine sperm, Fourth World Congress of Reproductive Biology (WCRB2017), 2017

Hiroshi Harayama, Advanced techniques for the reproduction in the cattle, UGSVS lecture, 2017

荒井 佑香、ウシ精子のハイパーアクチベーションを抑制するカリクリン A 感受性プロテインホスファターゼの特定、第 109 回日本繁殖生物学会、2016

原山 洋、先体タンパク質をマーカーとする哺乳類精子の分子性状検査法、日本アンドロロジー学会 35 回学術大会 シンポジウム 1 男性不妊症の分子メカニズム、2016

### 〔図書〕(計 1 件)

原山 洋、培風館、発生生物学 基礎から応用への展開、2019、44-47 ページ

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：中嶋 昭雄

ローマ字氏名：NAKASHIMA, Akio

所属研究機関名：神戸大学

部局名：バイオシグナル総合研究センター

職名：准教授

研究者番号(8桁): 70397818

研究分担者氏名：坂瀬 充洋

ローマ字氏名：SAKASE, Mitsuhiro

所属研究機関名：兵庫県立農林水産技術総合センター

部局名：北部農業技術センター

職名：課長

研究者番号(8桁): 70463396

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。