

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22366

研究課題名(和文)ウシ精子の鞭毛機能の評価基準の見直しを目的とした3次元ローテーション運動の解析

研究課題名(英文)Analyses of 3-dimensional rotation for the purpose of reconsidering criteria for the evaluation of flagellar functions in bull sperm

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) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウシ凍結保存射出精子用の鞭毛機能検査法の評価項目(新規候補)「3次元ローテーション」について、発生機構の解明、生物学的な位置づけ、および利用の検討を行い、次の成果を得た。

(1.発生機構)凍結保存に伴う3次元ローテーションの発生に、頸部細胞内Ca²⁺ストアのタプシガルギン感受性Ca²⁺ポンプにおける機能の低下、およびそれに伴う細胞内Ca²⁺濃度の上昇が関与することを示した。(2.位置づけ)3次元ローテーションが受精能獲得途上の精子で観察される運動様式であることを示唆した。(3.利用)鞭毛機能検査法での新規の評価項目として3次元ローテーションが有用である可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウシ凍結保存射出精子のための鞭毛機能検査法における評価精度を向上させるための改良として、新規の評価項目「3次元ローテーション」の導入に道筋をつけることができた。この成果により、人工授精によるウシの生産効率を改善でき、産肉能力や泌乳能力に優れる産子を一層増産できるようになると期待される。さらに本研究成果は畜産乳製品を市場に安定供給するためのウシの生産システムの拡充に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study regarding a new candidate "3-dimensional rotation (3D-R)" of the criterion for the evaluation of flagellar functions in bull cryopreserved sperm, we carried out experiments to elucidate the mechanism for its occurrence, to characterize it biologically and to examine its validity. The obtained results were listed below.

(1) The cryopreservation-related occurrence of 3D-R is regulated by reduction of the activity of thapsigargin-sensitive Ca²⁺ pumps in the sperm neck and the consequent increases of the intracellular Ca²⁺ level. (2) The 3D-R is one of the typical patterns of motility which sperm exhibit during the capacitation process. (3) The 3D-R is a potentially critical parameter for the evaluation of the flagellar functions in bull cryopreserved sperm.

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 牛肉生産に必要な仔牛の大部分は、約半世紀前に実用化された家畜繁殖技術「種雄牛の凍結保存精子を使用した人工授精」(図1)により現在も生産されている。しかし人工授精による近年の仔牛生産効率(受胎率)は右肩下がりであり、直近25年間の受胎率低下は15%以上に達しており、これは国民の食生活および日本産農産物(高級牛肉)の輸出戦略を脅かす深刻な問題となっている。私たちは低迷する人工授精成績を回復させるため、これまでに精子頭部の新規分子性状検査法を開発した(Harayama et al., Reprod Med Biol. 2017, 16:89-98)。

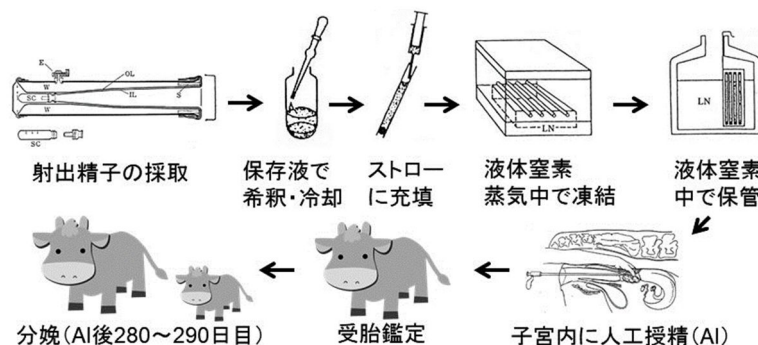


図1. 仔牛生産のための人工授精

(2) 精子は父性ゲノムを格納する頭部と卵子への移動と侵入に必要な推進力を発生させる鞭毛で構成される。このため精子機能は頭部と鞭毛で別々に検査される。鞭毛機能検査では運動率と運動様式が顕微鏡下で判定されるが、その結果が人工授精成績に反することは多く、これが成績不振の一因であると私たちは考えた。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、ウシの人工授精成績を回復させるための鞭毛機能検査法の改良(評価基準の見直し)である。現行の検査法で使用されている評価基準は「前進運動が良好な精子の運動様式で人工授精前に前進運動する精子が雌の体内で卵子と受精する」という学説に基づいている。しかし私たちは、ウシ精子の前進運動には2種類(R+:3次元ローテーション[頭頂部と鞭毛先端を結ぶ長軸を中心とした回転]を伴う運動(図2)とR-:ローテーションしない2次元平面運動)が存在し、鞭毛運動の制御に重要な細胞内環状アデノシン1リン酸(cAMP)依存的なシグナル伝達活性(Harayama, J Reprod Dev, 2013, 59:421-430)の低い精子はR+(3次元ローテーション有)を、活性の高い精子はR-(3次元ローテーション無)を示すという予想外の発見を報告した(Yamada et al., J Reprod Dev, 2018, 64:377-384)。この事実は鞭毛機能検査での評価基準の見直しの必要性を示唆している。しかし現行の検査の評価基準に3次元ローテーションという項目を追加して大幅な変更を行うためには、この現象の詳細な知見が必要である。

(2) 本研究では、ウシの人工授精に使用される凍結保存精子における3次元ローテーションの発生機構の解明および生物学的な位置づけを細胞生物学的・分子生物学的な見地で行い、さらにその現象の利用の可能性を検討した。

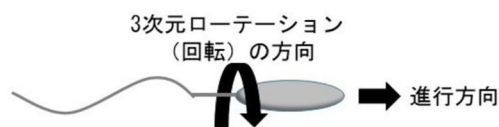


図2. 3次元ローテーションを示す精子

3. 研究の方法

(1) 実験試料および人工授精の成績

凍結保存前の射出精子は、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)から人工膣法により採取された。凍結保存射出精子および人工授精の成績は同センターから提供された。

(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ておりである。

- ✓ 精子の運動様式の観察(Yamada et al., J Reprod Dev, 2018, 64:377-384)

- ✓ 精子の活性化剤，阻害剤などでの処理（Yamada et al., J Reprod Dev, 2018, 64:377-384，雑誌論文，）
- ✓ 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～）
- ✓ 精子の受精能獲得（キャパシテーション）誘起処理（雑誌論文，）

4. 研究成果

(1) 3次元ローテーションの発生機構の解明に関する取り組み

凍結保存精子での3次元ローテーションの発生状態の観察

凍結保存前の射出精子および凍結保存射出精子において，3次元ローテーションの発生状態を比較した。凍結保存前の射出精子（採取後に運搬して約3時間後に観察）の多く（約半数）は2次元平面運動を示し，3次元ローテーションを示す精子の数は全体の約1/4であった。他方，凍結保存後では3次元ローテーション精子の割合が2次元平面運動精子の割合よりも有意に高く，約50%であった。なお，凍結保存精子にcAMP依存的なシグナル伝達経路の活性化剤のNaHCO₃（20 mM）を添加しても3次元ローテーションを示す精子の割合に大きな変化は認められなかった。以上の結果は，凍結保存の過程でウシ精子において3次元ローテーションを発生させるような変化が生じること，およびその変化はcAMP依存的なシグナル伝達活性の低下ではない可能性を示唆している。

3次元ローテーションの発生機構におけるCa²⁺ポンプの役割の検討

既報（Bailey and Buhr, 1995, Cryobiology, 32: 259-269; Cormier et al., 1997, J Androl, 18:461-468）において，凍結保存後のウシ射出精子では細胞内Ca²⁺濃度が上昇していること，およびこのイオン濃度の上昇には細胞内ストアにCa²⁺を格納するCa²⁺ポンプ（Ca²⁺-ATPase）の機能の低下が関与する可能性が示唆されている。そこで細胞内ストアのCa²⁺ポンプの機能を低下させる阻害剤タプシガルギンの添加が凍結保存前の射出精子での3次元ローテーションの発生状態に及ぼす影響について検討した。その結果，45分間のタプシガルギン（10 μM）処理を行うと，凍結保存前の射出精子での3次元ローテーション率に凍結保存時とかなり類似する変化を誘起できた。また，細胞内Ca²⁺ストア（余剰核膜胞）が存在する精子頸部において，タプシガルギンによる活性阻害を受けるCa²⁺ポンプ（SERCA-like Ca²⁺ pump）が存在することをウェスタンブロッティング法および間接蛍光抗体法により観察した。以上の結果から，凍結保存に伴う3次元ローテーションの発生に，頸部のタプシガルギン感受性Ca²⁺ポンプでの活性の低下，およびそれに伴う細胞内Ca²⁺濃度の上昇が関与することが示唆された。

3次元ローテーションの発生機構へのATPの関与について

様々な濃度のグルコースを添加して凍結保存の前および後の射出精子を処理したが，処理後の3次元ローテーション率に大きなばらつきが存在してグルコース添加濃度との関係を見出すことはできなかった。明確な結果を得るためには更なる追加実験が必要である。

(2) 3次元ローテーションの生物学的な位置づけに関する取り組み

高粘性培養液中での3次元ローテーションの維持に関する観察

人工授精により子宮内に注入されたウシ凍結保存射出精子は，卵管峡部を経て卵管膨大部に到達したのちに卵と受精する。また卵管内には粘性の高い内腔液が存在している。本研究では凍結保存射出精子を卵管液の状態を模した高粘性の培養液に浮遊させて精子の運動様式を観察した。凍結保存射出精子を融解し，未洗浄のまま，または1回遠心洗浄後に低粘性あるいは高粘性（2.5% ポリビニルピロリドン添加）の培養液に浮遊させて顕微鏡下で運動様式を観察した。その結果，低粘性培養液中では運動精子の大部分が3次元ローテーションを示したが，高粘性培養液中では運動率は有意に低下し，また精子の多くが2次元の平面運動を示し，運動速度も低下する傾向にあった。

3次元ローテーションと受精能獲得（キャパシテーション）との関係に関する検討

凍結保存前の射出精子に体外で受精能獲得（キャパシテーション）誘起処理を施し，その処理過程で精子に生じる運動様式の変化を顕微鏡下で観察した。処理前には多くの精子が2次元の平面運動を示したが，処理とともに3次元ローテーションを示す精子が増加し，その後に鞭毛超活性化運動（ハイパーアクチベーション）を示す傾向が認められた。以上の結果から，低粘性培養液中での3次元ローテーションが受精能獲得（キャパシテーション）過程にある精子の運動様式であることと考えられる。また既報（Bailey et al., J Androl, 2000, 21:1-7）においてウシ凍結保存射出精子では保存のための作業に由来する受精能獲得様の変化（クライオ・キャパシテーション）を受けることが示されているが，この点を考え合わせると，融解直後の多くの精子で観察される3次元ローテーションはクライオ・キャパシテーションに関連すると推察される。

(3) 3次元ローテーションの利用に関する取り組み

凍結保存射出精子での3次元ローテーションの発生状態のサンプル間差の観察

人工授精での成績（受胎率）が異なる種雄牛候補10頭の凍結保存射出精子を融解したのちに培養液で希釈して運動様式の観察に使用した。人工授精の成績が最高値の雄では最低値の雄と

比べて3次元ローテーションを示す精子の割合が高く、2次元平面運動を示す精子の割合が低い傾向にあった。また種雄牛候補10頭で得たデータをスピアマンの順位相関係数で評価したところ、有意な正の相関関係が3次元ローテーションを示す精子の割合と人工授精の成績(受胎率)との間に認められた。以上の結果から、人工授精での受胎成績をより正確に予想するためのウシ凍結保存射出精子での鞭毛機能検査法の指標として、「3次元ローテーションの発生状態」が有効である可能性が示唆された。この可能性を実証するためには、大規模牛群での検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Minami Kenta, Arai-Aso Miyuki M., Ogura-Kodama Yukari, Yamada Ayano, Kishida Kazumi, Sakase Mitsuhiro, Fukushima Moriyuki, Harayama Hiroshi	4. 巻 218
2. 論文標題 Characteristics of bull sperm acrosome associated 1 proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animal Reproduction Science	6. 最初と最後の頁 106479 ~ 106479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anireprosci.2020.106479	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Arai Yuka, Sakase Mitsuhiro, Fukushima Moriyuki, Harayama Hiroshi	4. 巻 129
2. 論文標題 Identification of isoforms of calyculin A-sensitive protein phosphatases which suppress full-type hyperactivation in bull ejaculated spermatozoa	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 46 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.theriogenology.2019.02.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saha Soma Rani, Sakase Mitsuhiro, Fukushima Moriyuki, Harayama Hiroshi	4. 巻 154
2. 論文標題 Effects of digoxin on full-type hyperactivation in bovine ejaculated spermatozoa with relatively lower survivability for incubation with stimulators of cAMP signaling cascades	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 100 ~ 109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.theriogenology.2020.05.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 SAKASE Mitsuhiro, FUKUSHIMA Moriyuki	4. 巻 66
2. 論文標題 Necessity of exact examination of sperm characteristics to assess artificial insemination-subfertile bulls	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 199 ~ 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2020-029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 南 健太, 麻生 美由紀, 山田 綾乃, 岸田 和美, 坂瀬 充洋, 福島 護之, 原山 洋
2. 発表標題 低繁殖症の雄ウシを検出するための精子分子性状検査法のマーカー「SPACA1タンパク質」の解析
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第38回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南 健太, 麻生 美由紀, 山田 綾乃, 岸田 和美, 坂瀬 充洋, 福島 護之, 原山 洋
2. 発表標題 黒毛和種精子におけるSPACA1タンパク質の特性解析
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 RANI Saha Soma, SAKASE Mitsuhiro, FUKUSHIMA Moriyuki, HARAYAMA Hiroshi
2. 発表標題 Involvement of digoxin-sensitive Na ⁺ /K ⁺ -ATPase in the regulation of bovine sperm motility
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原山 洋
2. 発表標題 家畜精子の受精制御分子の探索と利用
3. 学会等名 第46回山梨大学発牛工学研究センターセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原山 洋
2. 発表標題 ウシ精子における精密性状検査法の開発
3. 学会等名 令和2年度 東海畜産学会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原山 洋, Saha Soma Rani
2. 発表標題 ウシ射出精子の鞭毛運動に及ぼすNa ⁺ /K ⁺ -ATPase阻害剤Digoxinの影響
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第39回学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 原山 洋	4. 発行年 2019年
2. 出版社 株式会社培風館	5. 総ページ数 169
3. 書名 発生生物学 (5.3 哺乳類の受精 pp. 44 ~ 47)	

1. 著者名 原山 洋, 内藤邦彦	4. 発行年 2020年
2. 出版社 インターズー	5. 総ページ数 351
3. 書名 繁殖生物学 改訂版 (第2版) (第5章3 受精 pp. 228 ~ 237)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	中嶋 昭雄 (Nakashima Akio) (70397818)	神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・准教授 (14501)	
研究 分 担 者	坂瀬 充洋 (Sakase Mitsuhiro) (70463396)	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・課長 (84508)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関