

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06362

研究課題名（和文）ウシ精子の走温性におけるカルシウムシグナル伝達機構の解明と受胎率向上への応用

研究課題名（英文）Elucidation of calcium signaling mechanism in thermotaxis of bovine sperm and its application to improvement of conception rate

研究代表者

濱野 光市（Hamano, Koh-ichi）

信州大学・農学部・特任教授

研究者番号：70303443

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は走温性を利用した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。温度勾配低温域における走温性発現精子は軌跡速度を低下し、鞭毛角度を増大しながら高温域に移動した。ヤギ精子の走温性の発現を確認した。温度勾配区と一定区の精子カルシウムイオンレベルが異なり、温度勾配区の精子は5秒後にカルシウム濃度を上昇し30秒後まで維持した。走温性発現精子の運動性の変化におけるTRPV3、4チャンネル、カリウムチャンネルの関与を確認した。粘性培地における精子の走温性の発現を確認し、高温域の走温性発現精子は受精能獲得率が高い傾向にあった。超活性化運動精子は粘性培地に適応し運動性を変化させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は精子の走温性における運動調節とカルシウム作用機構を調べた。走温性発現精子の運動性の変化、ヤギ精子の走温性が明らかになり、走温性発現、運動調節機構の一部が解明され、カルシウム作用機構の解析から、温度勾配における精子のカルシウムイオンレベル、走温性発現精子の運動性におけるTRPV、カリウムチャンネルの関与が明らかになり、走温性発現経路、伝達機構の一部が解明される。走温性発現精子の受精能の解析から、粘性培地における走温性の発現、CTC染色精子の受精能が解明される。走温性を指標にした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、効率的なウシの増産が可能になり、畜産分野に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：This study is basic research for applying a sperm evaluation method using thermotaxis to livestock production sites. Thermotactic sperm in the low temperature area of the temperature gradient decreased their curvilinear velocity and increased shear angle as they moved to the high temperature area. We confirmed thermotaxis in goat sperm. Sperm calcium ion levels in the temperature gradient area and constant temperature area were different; sperm in the temperature gradient area increased their calcium concentration after 5 seconds and maintained it until 30 seconds later. We confirmed the involvement of TRPV3, 4 channels, and potassium channels in changes in the motility of thermotactic sperm. We confirmed the expression of thermotaxis in spermatozoa in a viscous medium, and found that sperm expressing thermotaxis at high temperatures tended to have a high capacitation rate. It was suggested that hyperactivated motile sperm may adapt to the viscous medium and change their motility.

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 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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。申請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)。申請者は、ウシ精子の走温性発現温度、最適温度勾配を確認し、カルシウムチャンネルの阻害は走温性を阻害し、TRPチャンネル促進は走温性を促進することを確認した。また、走温性発現精子のカルシウム濃度の増大、温度の上昇・下降による可逆的变化を確認した(JSPS KAKENHIJP15K07690)。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、精子の運動性や機能等が調べられているが、明確な結論は得られていない。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えられているが、走温性発現精子の運動調節機構に関する研究は極めて少ない。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・展開するため、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、走温性を利用した精子の検査法や雄ウシの繁殖能力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検査法や雄ウシの繁殖能力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) 走温性の発現および運動調節機構の解明
- (2) 走温性発現経路、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) 走温性の発現および運動調節機構の解明

精子の走温性の発現開始から温度勾配を認識し、運動調節機構を明らかにするため、走温性発現因子を探索し、発現精子の移動性、方向の変化を調べた。また、反芻動物のヤギ精子における走温性の発現を調べた。

走温性発現機構の解析：申請者は特製の温度勾配作成装置による走温性検査において、特製の検査チャンバーに精子を導入することで運動性を詳細に解析した。10秒間、1000画像を記録後、精子の移動方向の変化と尾部運動の正確な解析が可能になり、設定した温度勾配における精子の変化を検査した。新鮮射出、液状保存、凍結保存後のヤギ精子は、チャンバーに導入し、ヤギの体温である40℃を基準に、40℃の温度一定区と39~41℃の温度勾配区を設定して移動能を調べた。

走温性発現部位の解析：精子の走温性発現調節部位を同定するため、TritonX-100により除膜した精子の運動性、温度勾配における運動性の解析を試みた。0.2、0.03、0.01、0.001% Triton-X100 (TX) 添加除膜 (E) 液でウシ精子の原形質膜を除膜し、CaCl₂無添加、0.1、1、5、10mM ATP 添加再活性化 (R) 液、5mM ATP 添加、1、5、10、15 μL CaCl₂ 添加 R 液に浮遊し、運動性と超活性化運動 (HA) を調べた。

(2) 走温性発現経路、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、走温性発現精子のカルシウムの分布、カルシウム濃度の変化を調べた。

走温性発現精子のカルシウム動態の解析：申請者は Fluo-4/AM を利用することで精子のカルシウム動態を調べてきた(北信越畜会報、115、28、2017)。走温性発現精子の温度勾配、時間

経過によるカルシウムの分布と濃度の変化を計測することで、走温性発現因子の受容体、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：申請者はカルシウムチャネル阻害剤を利用し、電位依存性チャネルの関与を明らかにした (J Reprod Dev, 62, 415-422, 2017)。カルシウムシグナル伝達機構を明らかにするため、TRPV3 チャネル(ch)促進、および阻害剤、TRPV4ch 促進、および阻害剤、プロトン ch 阻害剤、カリウム ch 阻害剤を添加し、精子の走温性を調べた。

(3) 走温性発現精子の受精機能の解明

走温性発現精子の受精能獲得、超活性化運動調節機構の解明を試みた。

走温性発現精子の超活性化運動の解析：申請者はウシ精子の超活性化運動を高率に誘起し、解析してきた。超活性化運動誘起精子を粘性培地内の温度勾配に導入し、頭部の遊泳軌跡、チャンパー内を移動する精子の数と方向の変化の解析から、運動調節機構の解明を試みた。

走温性発現精子の受精能の解析：申請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を検査してきた。走温性発現精子頭部の CTC 染色性の違いから受精能獲得を調べた。走温性発現精子のウシ卵子との体外受精を試みた。人工授精後の雌牛の受胎率が異なる種雄牛の精子の走温性を調べた。

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検査法や雄ウシの繁殖能力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) 走温性の発現および運動調節機構の解明

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

走温性発現機構の解析

・特製の解析用チャンパーに精子を導入することで精子の移動能、運動性を詳細に解析できた。顕微鏡に装着した精子運動解析装置を利用し、10 秒間、1000 画像を記録後、精子の移動方向の変化と尾部運動の正確な解析が可能になった。

・温度勾配装置を利用して、38~39、39~40 に設定した温度勾配における精子の変化を調べ、低温域から高温域に移動する精子を確認し、ウシ精子における走温性の発現を再確認した。39~40 の温度勾配では高温域への精子の移動が抑制された。

・温度勾配の低温域、高温域、中間域の精子の頭部の運動性を解析し、移動速度、方向転換、移動方向を調べ、低温域の精子が軌跡速度を低下しながら、高温域方向に移動することを確認した。また、尾部打頻度、鞭毛角度、尾部屈曲率を調べ、低温域における鞭毛角度の増大を明らかにした。

・新鮮射出、液状保存、凍結保存後のヤギ精子は、39~41 の温度勾配区では高温域に有意に多数移動し、走温性の発現を確認した。38~40、40~42 の温度勾配区では凍結保存ヤギ精子は高温域に有意に多数移動した。ヤギ精子では、1 の温度勾配を認識する走温性の発現が確認された。

走温性発現部位の解析

・TritonX-100 (TX) により除膜した精子の運動性、超活性化運動 (HA) 温度勾配における尾部の変化を解析し、精子の走温性発現調節部位の解析を試みた。

・0.03~0.001%TX 添加除膜 (E) 液で除膜した精子は再活性化 (R) 液で 40% 以上の精子が HA

を誘起した。0.01% TX 添加 E 液で除膜した精子は ATP 濃度、Ca²⁺濃度にかかわらず、30~40% が HA を誘起した。0.2% TX 添加 E 液で除膜した精子は Ca²⁺濃度に依存して HA を誘起した。
・除膜精子は温度一定区、温度勾配区において、検査用チャンバーに導入後接着割合が高く、運動性検査が困難なことから、走温性発現部位を解析できなかった。

(2) 走温性発現経路、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、走温性発現精子のカルシウムの分布、カルシウム濃度の変化を調べた。

走温性発現精子のカルシウム動態の解析

・走温性発現精子の温度勾配、時間経過によるカルシウムの分布と濃度の変化を解明するため、共焦点レーザー顕微鏡により温度勾配各部を移動する精子のカルシウムイオン濃度を調べ、温度一定区と温度勾配区における精子内カルシウムイオンレベルが異なることを確認した。

・異なる温度勾配において時間経過による精子のカルシウムの分布と濃度の変化を計測することで、発現経路を調べた。36 の温度一定区と 36~38 の温度勾配区における精子のカルシウムイオン濃度を比較した。温度一定区ではカルシウムイオン濃度は変化しなかった。温度勾配区では 5 秒後にカルシウムイオン濃度が上昇し、10、20、30 秒後のいずれにおいても、温度一定区と比べ、有意に高い濃度であった。5、10、20、30 秒後において温度勾配区の精子のカルシウムイオン濃度は 0 秒と比べ、有意に高い濃度であった。

・37 の温度一定区と 37~38 の温度勾配区における精子のカルシウムイオン濃度を比較した。温度勾配区では 5 秒後、精子のカルシウムイオン濃度が上昇し、温度一定区と比べ、5、10 秒後では有意に高い濃度であり、0 秒と比べ、有意に高い濃度であった。

・温度勾配による集団および個別精子のカルシウムの分布と濃度の変化を計測することで、走温性発現因子の発現経路を調べた。温度一定区の分岐部と温度勾配区の分岐部、温度一定区の右側と温度勾配区の高温域間を移動する精子の、精子内カルシウムイオンの相対輝度は差が認められた。

走温性発現精子におけるカルシウム作用機構の解明

・精子は FPP (TRPV3 チャンネル (ch) 促進)、17R (TRPV3ch 阻害)、GSK (TRPV4ch 促進)、RN (TRPV4ch 阻害)、ZC (プロトン ch 阻害)、Q (カリウム ch 阻害) で処理し、38.5 の温度一定区、37.5~39.5 の温度勾配区で、高温域と低温域に移動した精子の移動能と運動性を解析した。温度勾配区の対照区、FPP 区、GSK 区の高温域への移動能は低温域より有意に高かった。温度勾配区の対照区、FPP 区、GSK 区の VAP、尾部屈曲率は高温域で有意に高かった。FPP 区、VCL、尾部打頻度は高温域で有意に高く、LIN は有意に低かった。走温性発現精子の運動性の変化における TRPV チャンネル、カリウムチャンネルの関与が示唆された。

(3) 走温性発現精子の受精機能の解明

走温性発現精子の受精機能を解明するため、受精能獲得、超活性化運動調節機構を調べた。

走温性発現精子の超活性化運動の解析

・精子はプロカイン (Pr)、カフェイン - ヘパリン (CH)、イオノフォア (I) で処理し、温度一定区と温度勾配区で、非粘性培地と粘性培地における精子の移動能と運動性を解析した。温度勾配区では全区において高温域への移動能が高く、粘性培地における移動能は非粘性培地より低下したが、Pr 区、CH 区、I 区では対照区と比べ低下率が小さかった。

・0h と 4h の非粘性、粘性培地での精子の特異運動の割合を調べた。インキュベーション 0h の

粘性培地の Pr 区は頭部を激振し遊泳 (HP) ; 100%、 CH 区は HP ; 42%、頭部を激振し非移動 (NP) ; 10% を示した。4h の粘性培地の Pr 区は HP ; 70%、 CH 区は NP ; 47% を示した。

・粘性培地における精子の走温性の発現が確認され、超活性化運動精子は粘性培地に適応し運動性を変化する可能性が示唆された。

走温性発現精子の受精能の解析

・温度勾配区の走温性発現精子の CTC 染色により検査した受精能獲得率は、高温域において高い傾向にあった。温度勾配区から回収後の精子は、運動性が低く体外受精に供試できなかった。

・温度勾配区における高温域への精子の移動能は種雄牛により異なり、人工授精後の雌ウシの受胎率が高い種雄牛の精子の移動能が高い傾向にあった。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Pitia A.M., Minagawa I., Abe Y., Kizaki K., Hamano K., Sasada H., Hashizume K., Kohsaka T.	4. 巻 385
2. 論文標題 Evidence for existence of insulin-like factor 3 (INSL3) hormone-receptor system in the ovarian corpus luteum and extra-ovarian reproductive organs during pregnancy in goats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res	6. 最初と最後の頁 173-189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅原千愛, 高月 颯, 田野井優太郎, 濱野光市, 高木優二
2. 発表標題 OptiPrep密度勾配遠心によるブタ精子保存液からの卵黄顆粒の除去
3. 学会等名 第131回日本畜産学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 保坂 謙, 濱野光市, 高木優二
2. 発表標題 幼若ブタ精巢細胞の短期冷蔵保存
3. 学会等名 第117回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 保坂謙, 諸白家奈子, 濱野光市, 高木優二
2. 発表標題 トリプシン処理したブタ精巢細胞のタイムラプス観察
3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高月颯、小林吉倫、濱野光市、古屋元宏、藤田智之、高木優二
2. 発表標題 ブタ精子への100MPs加圧における卵黄の保護効果
3. 学会等名 第130回日本畜産学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田 英晃、保坂 謙、富岡郁夫、濱野光市、高木優二
2. 発表標題 トリブシン振盪培養法により単離されたブタ精原細胞でのITIH遺伝子の発現
3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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	高木 優二 (Takagi Yuji) (20226757)	信州大学・学術研究院農学系・准教授 (13601)	

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
---------	---------