

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月24日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658225

研究課題名（和文） ブタおよびマウスの精子の育て直し処理による体外保存耐性の強化

研究課題名（英文） Enhancement of the tolerance to the storage in boar and mouse spermatozoa by the re-maturation in vitro

研究代表者

原山 洋 (HARAYAMA HIROSHI)

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：30281140

研究成果の概要（和文）：

哺乳類精子の耐凍性には大きな動物種間差が存在する。ウシでは精子の高い耐凍性により、産子生産のための人工授精プログラムに凍結精液を利用できる。本研究では、ウシ精子に高い耐凍性をもたらす精巣上体成熟に伴う精子細胞膜の安定化の分子メカニズムを示唆した。また、この分子メカニズムに基づき精子の耐凍性を向上させるための体外培養系の開発を試みた。

研究成果の概要（英文）：

There are great differences in the freezability of mammalian spermatozoa among species. In cattle, high freezability of the spermatozoa enables us to use frozen semen in the AI program. In this study, we indicated the molecular mechanism for epididymal maturation-related stabilization of the plasma membrane which brings high freezability to bull spermatozoa. In addition, we attempted to develop *in vitro* incubation system to enhance sperm freezability on the basis of the above-mentioned molecular mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生殖生物学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：応用動物，畜産学，雄性繁殖能力，精子，人工授精，凍結保存

## 1. 研究開始当初の背景

ウシ精子より低温耐性の低いブタおよびマウスの精子を凍結保存または液状低温保存すると、そのかなり多数が細胞傷害を生じて先体崩壊を引き起こす。このような細胞傷害を起こした精子では受精能力が低下していることから、体外保存精子の人工授精（ブタ）および体外受精（マウス）での利用は一般的ではない。すなわち、この点がブタおよびマウスの繁殖技術に共通する問題点である。哺乳類精子は潜在的な受精能力を精巣上体での成熟変化により獲得するが、精巣上体の通過中に精子は細胞膜における安定化作用を受ける。申請者は自身の研究経験から、

精巣上体による精子膜の安定化作用はブタやマウスよりもウシで強いとの仮説を立てている。

## 2. 研究の目的

本研究では、体外保存技術が十分に実用化していない動物種の精子における低温耐性（耐凍能）の強化を目的として、ウシ精子において凍結保存を可能とする精巣上体での精子細胞膜の安定化作用について分子レベルで検討した。ついで得られた情報をもとに、ウシ精巣上体による精子の細胞膜の安定化作用を体外で再現するための体外培養系の開発を試みた。なお、本報告書では解析を詳

細に進めることができたチロシンリン酸化型 Sperm acrosome-associated 1 (SPACA1) に関する研究成果を中心に報告する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験試料および人工授精での受胎成績

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黒毛和種の種雄牛および種雄牛候補から精巣および精巣上体を採取した。mRNA 抽出用の組織片については、採取後直ちにリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄し、その場で細切した後に速やかに液体窒素中で凍結した。精巣上体尾精子は、精巣上体尾を切開した後に、精管から精巣上体管に 0.1% ポリビニルアルコール添加 PBS (PVA-PBS) を緩やかに注入して灌流させることで回収した。また、精液は同センターで育成中の黒毛和種種雄牛候補から人工腔法に従って採取した。これらの精液の一部に PVA-PBS を加えて遠心洗浄を 3 回行うことで洗浄精子を得た。また、一部の精巣および精巣上体の各部から精子を採取した。ブタ新鮮濃厚部精液は兵庫県立農林水産技術総合センター畜産技術センターおよび神戸大学大学院農学研究科で育成中のラージホワイト種および梅山豚から手圧法により採取した。なお、人工授精の受胎成績については兵庫県立農林水産技術総合センターで取りまとめたデータをご提供いただいた。

#### (2) RT-PCR

SPACA1 の発現状態を調べる目的で、精巣および精巣上体の RNA から合成した cDNA を用いて PCR を行った。プライマーは、ウシ *SPACA1* の塩基配列 (Accession No. NM\_001046545.1) に基づき Web Primer を用いて設計した。

#### (3) 間接蛍光抗体法 (IIF)

パラホルムアルデヒド固定した精子を Triton-X 100 添加 PBS を用いて細胞膜透過処理した後、抗 EPAA 抗体と 4°C で一晩反応させた。ついで精子浮遊液を FITC 標識二次抗体と反応させた後、少量の減光防止剤とともにスライドガラスにのせ、カバーガラスで封入し、蛍光顕微鏡下で観察した。

メタノール固定した精子塗抹標本を抗リン酸化チロシン抗体、抗 SPACA1 抗体または抗リン酸化セリン・スレオニン抗体と 4°C で一晩反応させた。反応後の精子塗抹標本を FITC または Rhodamine 標識二次抗体と反応させ、少量の減光防止剤とともにカバーガラスで封入し、蛍光顕微鏡下で観察した。

#### (4) ウェスタンブロッティング法 (WB)

SDS-PAGE により分離した精巣、精巣上体または精子由来のタンパク質を転写した PVDF 膜をウシ胎仔血清 (FCS) 添加 PBS-Tween でブロッキングした。一次抗体 (抗リン酸化チロシン抗体または抗 SPACA1 抗体) を FCS 添加 PBS-Tween で希釈し、PVDF 膜に反応させた。

ついで PVDF 膜を西洋ワサビパーオキシダーゼ (HRP) 標識二次抗体と反応させた後、ECL キットおよび Hyper film-ECL を用いて抗体と反応する精子タンパク質を検出した。

#### (5) 免疫沈降法

洗浄した射出精子を 2 倍濃度の RIPA バッファーに浮遊させ、超音波処理を行った。破砕された試料を混和した後、遠心分離して不溶性精子断片物と精子抽出液に分離した。Protein A アガロースビーズ懸濁液を予め氷冷された PBS を用いて洗浄した後に抗リン酸化チロシン抗体を加えて混和した。抗体と反応させた Protein A アガロースビーズを遠心して沈降させ、氷冷した PBS で洗浄した。回収したアガロースビーズに精子抽出液を加えて、混和して反応させた。さらに Protein A アガロースビーズを遠心して回収した。上清を非免疫沈降物とした。沈降した Protein A アガロースビーズをサンプルバッファーに再浮遊させ、5 分間煮沸して上清を免疫沈降物として回収し、SDS-PAGE および WB に供した。

#### (6) FITC-PNA/PI 染色法による精子先体の形態観察

パラホルムアルデヒド固定した精子を TritonX-100 添加 PBS で処理した後、FITC 標識 PNA 添加 PBS で染色した。ついで PI 添加 PBS で核染色し、減光防止剤とともにスライドガラスに封入して蛍光顕微鏡下で観察した。

#### (7) キャパシテーション誘起処理

洗浄直後を精子を細胞膜透過性 cAMP アナログ (cBiMPS) 添加培養液 (PVA 添加 mKRH 液) に再浮遊させて 38.5°C ウォーターバスの中でインキュベートした。

### 4. 研究成果

#### (1) ウシ精巣上体での精子細胞膜の安定化・チロシンリン酸化型 SPACA1

報告者は既報 (Mol Reprod Dev 77: 910-921, 2010) において、頭部での耐凍性の高いウシ精子の先体前部にはチロシンリン酸化型 SPACA1 の分布量が多い可能性を示唆した。そこで本研究ではこの可能性を実証するため、まずは入手が比較的容易で、人工授精に使用する凍結精子について、先体前部でのチロシンリン酸化型 SPACA1 の分布状態と先体の正常性または人工授精での受胎率との相関関係を調べた。その結果、先体前部でのチロシンリン酸化型 SPACA1 の分布が明瞭な精子の割合は、正常先体を有する精子率および受胎率とそれぞれ有意な正の相関関係にあった ( $r=0.7751$ ,  $P<0.0001$ ,  $n=27$  および  $r=0.7507$ ,  $P=0.0124$ ,  $n=10$ )。また同様の検討を精巣上体尾の新鮮精子および新鮮射出精子を対象に行った。先体前部でのチロシンリン酸化型 SPACA1 の分布が明瞭な精巣上体尾精子の割

合と同一個体の凍結保存精子の正常先体率および受胎率の相関関係を調べた結果、それぞれ有意な正の相関関係にあった ( $r=0.8817$ ,  $P=0.0202$ ,  $n=6$  および  $r=0.9841$ ,  $P=0.0199$ ,  $n=4$ )。また、新鮮射出精子については前者には有意な正の相関関係が見られたものの、後者には検査例数が少ないため相関関係に有意性を認めるまでには至られなかった ( $r=0.8626$ ,  $P=0.0270$ ,  $n=6$  および  $r=0.8435$ ,  $P=0.3609$ ,  $n=3$ )。しかし、後者も正の相関関係を示す傾向にあり、今後検査個体数を増やせばより明確な結論を得られると考えている。これらの結果より、凍結前の段階で先体前部でのチロシンリン酸化型 SPACA1 の分布が明瞭な精子の割合が高い雄個体では、凍結保存後に正常な先体を持つ精子の割合が高く、さらに人工授精の成績も良好な傾向にあると言える。従って、チロシンリン酸化型 SPACA1 が精子の耐凍性を向上させる先体細胞膜の安定化作用に関与し、人工授精における精子の受精能力の保持に機能すると考えられる。

SPACA1 mRNA の発現解析を行うため、ウシ SPACA1 のコーディング領域が増幅されるように設計したプライマーセットを用いて RT-PCR を行った。コントロールとした *G3PDH* については、精巣および精巣上体頭から採取したサンプルにおいて PCR 産物が効率的に増幅されたが、精巣上体の体および尾由来のサンプルでは *G3PDH* は十分に増幅されなかった。このことは精巣および精巣上体頭の組織片から分量の正常な RNA を回収できたことを示している。そこでこれらのサンプルを用いた RT-PCR の結果を比較したところ、SPACA1 の増幅産物である 950 bp のバンドは精巣でのみ得られた。この結果は、ウシにおいて SPACA1 mRNA は少なくとも精巣で発現し、精巣上体頭では発現していないことを示している。

精巣上体の様々な部位から採取した精子における SPACA1 のチロシンリン酸化状態を調べた。精巣上体尾精子を抗リン酸化チロシン抗体および抗 SPACA1 抗体を用いた IIF (二重染色法) に供したところ、チロシンリン酸化タンパク質は精子の先体前部と赤道節サブセグメントに分布し、特に先体前部における分布は SPACA1 とほぼ一致した。さらに射出精子のタンパク質抽出液から抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降された 42 kDa タンパク質は抗 SPACA1 抗体と反応した。以上の結果より、ウシ成熟精子において 42 kDa SPACA1 の一部はチロシンリン酸化型で、少なくとも先体前部に分布すると考えられる。次に精巣上体での精子成熟に伴う SPACA1 の変化を調べるため、精巣と精巣上体の各部から作製した組織抽出液、および精巣上体尾精子の抽出液を用いて WB を行った。なお、精巣

上体体から高いタンパク質濃度の組織抽出液を調整することは困難であったため、実験から除外した。精巣の組織抽出液において、SPACA1 は 43 kDa および 41 kDa の二本のバンドとして検出された。しかし、各精巣上体の組織抽出液では異なる検出パターンが観察された。精巣上体頭の組織抽出液では 42 kDa および 38 kDa のバンドが検出され、部位が精巣上体の遠位部になるにつれて 36 kDa および 34 kDa のバンドが増加する傾向を示し、尾の組織抽出液では成熟精子と同様の検出パターンを示した。一方、チロシンリン酸化タンパク質は各部位の組織抽出液において複数のバンドとして検出され、特に精巣上体尾精子の抽出液には認められない 37 kDa のバンドが強く検出された。また、免疫沈降法によってチロシンリン酸化型 SPACA1 であることが示された 42 kDa のバンドは、精巣上体の頭から尾の組織抽出液では明確に検出されたが、精巣の抽出液では検出されなかった。また、精巣上体の各部位から採取した精巣上体精子を IIF に供し、精巣上体での精子成熟に伴う SPACA1 およびチロシンリン酸化タンパク質の分布の変化を調べた。精巣上体精子では、SPACA1 およびチロシンリン酸化タンパク質はともに尾の成熟精子とほぼ同じ分布を示した。しかし頭の精子では、チロシンリン酸化タンパク質は頭部全体に散在し、SPACA1 は赤道節に分布していた。

複数の個体 (32 頭) から回収した精巣上体尾精子の先体前部におけるチロシンリン酸化タンパク質および SPACA1 の分布状態には大きな個体差が認められた。具体的には、チロシンリン酸化タンパク質の分布が明瞭な精子の割合が低い (0~34%) 個体が 5 頭、中間 (35~79%) の個体が 15 頭、および高い (80~100%) 個体が 12 頭であった。また SPACA1 においては、割合の低い個体が 5 頭、中間の個体が 15 頭、および高い個体が 11 頭であった (1 頭は未検査)。またそれぞれのタンパク質の分布が明瞭な精子の割合の間には有意な正の相関関係が認められた ( $r=0.9360$ ,  $P<0.0001$ )。このデータは、二重免疫染色法および免疫沈降・WB 法での結果から示唆した考察、すなわち先体前部でのチロシンリン酸化型 SPACA1 の存在を裏付けている。次に、16 頭の個体から採取した精巣上体尾精子の抽出液を WB に供し、チロシンリン酸化タンパク質を検出した。その結果、先体前部にチロシンリン酸化タンパク質が明瞭に分布する精子の割合が 35%未満の 4 頭のうち 3 頭において、チロシンリン酸化型 SPACA1 と考えられる 42 kDa のバンドの検出強度は低かった。一方、SPACA1 の WB による検出パターンに大きな個体差は認められなかった。さらに同一個体の精巣における SPACA1 mRNA の発現状態を RT-PCR により解析したが、PCR 産物の

電気泳動像に大きな個体差は認められなかった。

以上の結果から、精巣で産生される SPACA1 の精子先体への配置は、精巣上体の頭および体の通過に伴うチロシンリン酸化に依存すると考えられる。また耐凍性の異なる精子の間で SPACA1 の含量自体には差がないことから、耐凍性向上のための精子の処理にはリコンビナントタンパク質を付加して精子先体での SPACA1 の含量を高めるよりも、精子にもともと備わる SPACA1 を薬剤処理により人為的にチロシンリン酸化するほうが有効であると考えられた。

・後帽部セリン・スレオニンリン酸化タンパク質  
キャパシテーション誘起処理したウシおよびブタの射出精子の後帽部では処理時間に伴いセリン・スレオニンリン酸化タンパク質のホスファターゼ 1 $\gamma$ 2 による脱リン酸化が認められた。またこの脱リン酸化反応は細胞内 cAMP シグナル伝達機構の活性化により促進された。さらに、精巣上体の各部位から採取したウシ精巣上体精子を IIF に供し、精巣上体での精子成熟に伴う後帽部セリン・スレオニンリン酸化タンパク質の出現状態を調べた。精巣上体精子では、後帽部リン酸化タンパク質とともに尾の成熟精子とほぼ同じ分布を示した。頭の精子では、その一部のみが成熟精子と類似した分布を示した。他方、精巣上体漿液セリン・スレオニンリン酸化タンパク質である EPAA はウシでは主に後帽部に分布したこと（図 1）から、上述の後帽部セリン・スレオニンリン酸化タンパク質の少なくとも一部は EPAA であると考えられる。

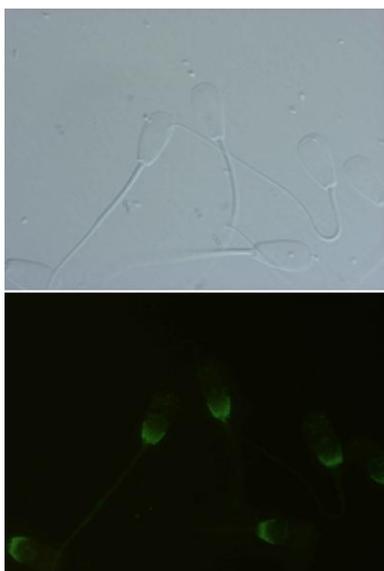


図 1. 間接蛍光抗体法によるウシ精子での EPAA の分布観察（上段は位相差顕微鏡像，下段は FITC 蛍光像を示す。）

## (2) 薬剤処理による SPACA1 のチロシンリン酸化の試み

先体前部に分布する SPACA1 のチロシン残基でのリン酸化状態を上昇させる目的で、ウシ射出精子をチロシンホスファターゼ阻害剤バナジン酸で 180 分間または 360 分間処理したところ、鞭毛においてタンパク質のチロシンリン酸化状態の上昇が誘起された。しかし先体前部におけるタンパク質のチロシンリン酸化状態にほとんど変化は見られなかった。また先体前部におけるチロシンリン酸化 SPACA1 の分布が明瞭な精子の割合にも有意な変化は認められなかった。なお、ブタ射出精子においても同様の結果であった。これらの結果から、精子での SPACA1 のチロシンリン酸化による先体細胞膜の安定化および耐凍性の向上には精巣上体で生産されるタンパク質リン酸化調節因子による特異的な作用が必要であると推定される。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔学会発表〕（計 6 件）

- ①磯野彩音，小島 彩，高岸佑樹，石川 翔，設楽 修，原山 洋，ブタ精子での後帽部タンパク質の脱リン酸化および先体反応における cAMP-EPAC シグナリングの役割，日本畜産学会第 116 回大会，2013 年 3 月 30 日，広島
- ②水野洋平，坂瀬充洋，福島護之，原山 洋，ウシのハイパーアクチベーション精子における鞭毛タンパク質のリン酸化状態，日本畜産学会第 116 回大会，2013 年 3 月 30 日，広島
- ③南 健太，野田大地，磯野彩音，小島 彩，水野洋平，坂瀬充洋，福島護之，原山 洋，黒毛和種精子における先体の耐凍性マーカーの特性解析，第 62 回関西畜産学会大会，2012 年 9 月 14 日，和歌山
- ④原山 洋，哺乳類精子の細胞内 cAMP シグナル伝達機構に関する研究，第 105 回日本繁殖生物学会大会 2012 年度日本繁殖生物学会賞学術賞受賞者講演（招待講演），2012 年 9 月 6 日，つくば
- ⑤南 健太，野田大地，磯野彩音，小島 彩，水野洋平，坂瀬充洋，福島護之，原山 洋，黒毛和種精子先体前部におけるチロシンリン酸化型 SPACA1 の解析—サンプル間差および精子成熟に伴う変化について—，第 105 回日本繁殖生物学会大会，2012 年 9 月 5 日，つくば
- ⑥南 健太，野田大地，磯野彩音，小島 彩，水野洋平，坂瀬充洋，福島護之，原山 洋，黒毛和種精子における耐凍能マーカーの検出パターン，日本畜産学会第 115 回大会，2012 年 3 月 29 日，名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原山 洋 (HARAYAMA HIROSHI)

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：30281140