

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658236

研究課題名(和文)ブタ精液中に存在する膠様物の機能解析と応用

研究課題名(英文)Characteristic analyses of boar seminal gel and the application

研究代表者

舟橋 弘晃(FUNAHASHI, Hiroaki)

岡山大学・その他の研究科・教授

研究者番号：50284089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：ブタ精液中の膠様物の諸特性を解析評価した。膠様物は、強酸性および強アルカリ性で溶解できたが、中性周辺では比較的安定していた。また、子宮内に多く存在する多核白血球の膠様物への走化性はなく、また、極めて高い保水性が認められた。粉末膠様物を精液と混和することで、精子カプセルを作成することが出来、そのカプセル中で一定時間精子が生存でき、また徐々に精子が放出されることを確認できた。化学的な解析により、膠様物は α -グリカンを多く含むことが明らかとなり、糖鎖解析とペプチド解析から特異的な糖鎖とタンパク質を含むことが明らかとなった。これらの知見は、医療分野を含む広い領域で有効活用できる可能性を含む。

研究成果の概要(英文)：Characteristic analyses of seminal gel in ejaculated boar semen were analysed. The gel could be dissolved in both conditions of severe acidic and alkaline conditions, whereas it is stable around neutral conditions. Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes for seminal gel was not observed. Preparation of sperm capsule by mixing frozen-dried seminal gel with boar semen or washed sperm allowed survival and release of sperm from the capsule. Chemical analyses of seminal gel demonstrated that the gel is α -glycan-rich. Analyses of sugar chains and peptides showed that seminal gel contains specific sugar chains and protein. These information may have possibilities to contribute in wide fields including biomedical area.

研究分野：農学

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：膠様物 ブタ 精液 人工授精

1. 研究開始当初の背景

ブタ精液の精液採取時に得られる膠様物は、尿道球腺由来のムコタンパク質と精囊腺由来の塩基性タンパク質が反応して生成されることが知られ、精液中の水分を吸収する性質が知られているが、詳細な学術的知見は明らかにされていない。げっ歯類では同様の副生殖腺から得られるタンパク質が膣栓を形成し、交尾後に精液が子宮から逆流漏出することを防いでいる。さらに、雌ブタを雄と交配した際には、人工授精で見られるほどの精液の逆流漏出は見られないことから、ブタでも膠様物が膣栓を形成し精液の逆流漏出を防いでいる可能性がある。

一方、人工授精技術は、雌の頸管内または子宮内に希釈した精液を人工的に注入する技術であり、約半世紀前にウシで普及した古い生殖工学技術である。しかし、多胎動物のブタでは、子宮が長いなどの形態的理由から多量の精液を注入する必要があるにもかかわらず、注入した約半分の精液は雌性生殖道から逆流漏出する。現在の人工授精技術では、ブタの膠様物は不要物として採取時に廃棄されているのが現状である。

2. 研究の目的

副生殖腺由来物質の性質を明らかにすることでブタにおける精子競争に関わる戦略を明らかにし、合わせてその知見を利用した新たな人工授精技術を開発するなど、ブタの生殖における副生殖腺分泌物の意義の認識と利用を試みる。

3. 研究の方法

まずブタ膠様物の組成、構造、機能など化学的・生物学的性質を解明するための研究を行った。

雄ブタ精液中の膠様物の採取は、岡山県農林水産総合センター畜産研究所の協力を得て、受精能力の高いことが証明されているパークシャー種の雄ブタの新鮮精液を採取する際に、ガーゼで濾過して、分離した膠様物を4で保持して研究室に持ち帰った後、使用するまで -30 の冷凍庫内で冷凍保存した。

その膠様物の凍結乾燥粉末の作成は、凍結膠様物をぬるま湯にて融解し、純水でもみ洗いすることで不純物を除去し、液体窒素内で凍結させた後に、凍結乾燥機にて72時間程度凍結乾燥させた。その後、葉さじで細かくすりつぶし、粉末状態で室温にて使用まで保存した。

多核白血球の膠様物への走化性解析に際して、多核白血球は、雌ブタの静脈から採取した血液から定法に従ってHistopaque-1077液を使用して遠心分離し、PBSにて洗浄した後に濃度調整(1.0×10^8 細胞/ml)を行い、使用まで4で保持した。多核白血球の走化性は、Blind Well Chamberを使用し、ポアサイズ $8 \mu\text{m}$ のフィルターで仕切った上層の部分に多核白血球懸濁液を、下層に膠様物懸濁液を入れ、90分間培養後に90%メタノールにて固定後、ギムザ染色を行い、ポアを通り抜けている多核白血球の数を顕微鏡下で数えることで評価した。

膠様物の吸水性評価については、0.05gの凍結乾燥膠様物を2ml供試液(純水、培養液、精漿)と混和し、一晚培養後、膠様物を取り出し、その質量変化から吸水量を算出し、比重(純水 1.00、培養液 1.01、精漿 1.02g/ml)をもとに吸水性を評価した。

精子の運動性は、精液性状検査板を用い、生物顕微鏡下で社団法人日本人工授精師協会の精子活力検査法に従って評価した。

凍結乾燥膠様物を利用した精子カプセルは、50mgの凍結乾燥膠様物を10ml遠心管に入れ、 1.0×10^8 細胞/mlに濃度調整したブタ新鮮射出精液と混和後、室温にて1時間静置す

ることで作成した。この精子カプセルは、培養液で3回洗浄後に39で1,3,6時間培養し、上澄み液中の精子数およびその活力を観察することで評価した。

膠様物の化学的特性解析は、協力研究者である本学環境生命科学研究科生物機能科学講座の木村吉伸教授の生理活性化学研究室の協力を得て実施し、得た膠様物を酵素処理後、ペプチドを抽出し、アミノ酸配列の同定および糖鎖の解析を行う。

膠様物の糖鎖・ペプチド解析は、膠様物を種々の酵素によって分解した後に、逆相および順相カラムにて分画後、フェノール硫酸法によりPA化した。吸光度や蛍光強度で得られたピークをカラムによって再分画した。

膠様物のペプチド解析は、膠様物をトリプシンなどで処理(37、一晚)後、逆相HPLCカラムを用いて分離後、吸光度の高い試験管群をPVDFトランスファー膜に吸着させ、シーケンサーを用いてアミノ酸配列を推定した。

4. 研究成果

ブタ精液膠様物は、強酸(pH=1)および強塩基(pH=12, 13)条件化で完全に溶解し、中性から弱酸性(pH=4, 5, 7)で大きく白濁凝固を起こした。

膠様物の吸水性を調べたところ、培養後の質量で、精漿(1519±44)と水(1335±26)、変化量で、精漿(1468±44)と水(1284±26)のそれぞれの区間に有意な差が存在した(p<0.05)。

膠様物への多核白血球の走化性の有無について検討したところ、Blind Well Chamberのフィルターのパアサイズ8μmを通過している多核白血球数(cells/mm²)で、実験区(172.3±20.4)、対照区(102.9±23.8)間に有意な差は存在しなかった(p=0.069)。

精子カプセル中に取り込まれた後に遊離した精子の運動性は、すべての実験区間で有意

な差が見られなかった(p>0.05)。しかし、精子数(1.0×10⁶)は、mM199の培養時間1時間区(0.51±0.37)と3時間区(2.03±1.67)の間で有意な差が見られた(p<0.05)。培養後のpHは、mM199と比較して、TL-HEPES-PVAでは、すべての時間区で低い値を示し、有意な差が存在していた(p<0.05)。

膠様物の化学分析により、o-グリカンを含む物質であることが明らかとなった。また、糖鎖解析およびペプチド解析の結果から、非常に大きくまた多くの種類の糖鎖やタンパク質を含むこと、さらにそれらは特異的な糖鎖やタンパク質である可能性が極めて高い。

以上の結果から、雄ブタ膠様物は、雌ブタ生殖道内で免疫細胞の受ける影響が少なく、精液を遊離することから精液カプセルとして人工授精への利用が期待される。また、さらなる糖鎖およびペプチド解析によって医療分野での応用可能な機能を有する糖鎖およびタンパク質の発見につながる可能性が期待できる。

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)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

高橋 弦・舟橋弘晃 ブタ精液中膠様物の特性解析と精子カプセル化の可能性 関西畜産学会第63回大会(平成25年9月5日~6日、滋賀県立大学)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
舟橋弘晃（ 52 ）

研究者番号：50284089

(2) 研究分担者
（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者
（ ）

研究者番号：