

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 22 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450394

研究課題名(和文) 受精能力制御因子で派生する欠陥分子をマーカーとする家畜精子の分子性状検査法の開発

研究課題名(英文) Development of methods to evaluate molecular characteristics of livestock spermatozoa by the detection of aberrant fertility-regulating factors

研究代表者

原山 洋 (HARAYAMA, HIROSHI)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30281140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、家畜の人工授精で雌を受胎させにくい精子を産生する雄個体(低繁殖症雄個体)を正確に選り出すための新しい精子分子性状検査法の開発であった。本研究での取り組みにより、ウシ(黒毛和種)の凍結保存精子および新鮮射出精子における先体チロシンリン酸化タンパク質の分布状態を指標とする検査法の開発に成功した。またこの検査法により人工授精および体外受精での成績を予測できることを示した。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to develop a new method to evaluate sperm molecular characteristics for identifying AI-subfertile males of livestock. In this study, we succeeded in the development of the method to evaluate molecular characteristics of bull (Japanese Black bull) cryopreserved and freshly ejaculated spermatozoa by the observation of acrosomal tyrosine-phosphorylated proteins. Moreover, we also showed that outcomes of AI and in vitro fertilization can be predicted by this evaluation for the spermatozoa.

研究分野：生殖生物学

キーワード：応用動物 畜産学 雄性繁殖能力 精子 人工授精 ウシ ブタ

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ウシの繁殖成績は長期間にわたり低下し続け、人工授精での受胎率が肉用牛では60%、乳用牛では50%を下回るような統計結果が報告された。また地球温暖化に伴う夏季の酷暑化で、ブタの夏季不妊症は長期化を示した。このような家畜の低受胎症はわが国の畜産経営の最大のリスクであるとともに、畜産乳製品の安定供給を脅かす要因で、国民生活にも畜産乳製品の価格上昇という形でその悪影響が及んでいた。

(2) 家畜における低受胎症の原因究明には、雌雄両個体での繁殖能力の精密精査が必要である。雄性繁殖能力の評価では数十年前に確立された精子の活力、濃度、形態を指標とする伝統的な細胞生物学的検査法が主体的に利用されていたが、これらの検査に合格した精子を雌に人工授精しても受胎しない症例が多く認められた。このため、人工授精で雌を受胎させにくい精子を産生する雄個体(低繁殖症雄個体)を正確に選び出すための新しい精子検査法の開発が畜産現場から強く求められた。

(3) 私たちは長年にわたり哺乳類の精子における受精能力制御因子の探索と機能解析を実施し、これらの因子のうち先体チロシンリン酸化タンパク質(Ac-pY)およびアデニル酸シクラーゼ10(ADCY10)については機能的に劣る欠陥分子が精子で派生することを報告した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、低繁殖症の原因となりうる受精能力制御因子の欠陥分子を精子に高率に派生させる哺乳動物の雄個体を検出するための新しい精子の分子性状検査法を開発することであった。本研究では以下の点について検討した。

(1) Ac-pYの分布状態をマーカーとする精子の分子性状検査法における人工授精成績および体外受精成績の予測精度を検討した。

(2) ADCY10のスプライシングエラーに起因する欠陥分子の検出法の開発を試みた。

(3) Ac-pYとADCY10以外の受精能力制御因子の分子特性および機能解析を行い、ついで精子分子性状検査法のマーカー分子となりうる「機能的に劣る欠陥分子」を探索した。

### 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または神戸大学農学部で飼育中のウシ(黒毛和種)およびブタ(梅山豚とラージホワイト種)からそれぞれ人工陰法および手圧法により採取した。ウシ凍結保存精子、ウシ精巣上体尾精子、ウシ精巣およびブタ精巣は兵庫県立農林水産技術総合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、詳細な手順は引用文献に記載のとおりである。

- 精子の運動性の測定(雑誌論文 )
- RT-PCRおよびPCR産物の塩基配列解析(雑誌論文 )
- ウェスタンブロッティング法(雑誌論文 )
- 間接蛍光抗体法(雑誌論文 )
- FITC-PNA/PI染色法による精子先体の形態観察(雑誌論文 )
- キャパシテーション・ハイパーアクチベーション・先体反応の誘起処理(雑誌論文 )
- 人工授精法(雑誌論文 )
- 過排卵処理および人工授精された雌ウシからの非外科的な胚の回収(雑誌論文 )
- 体外受精法(雑誌論文 )

### 4. 研究成果

#### (1) Ac-pY

ウシ凍結保存精子におけるAc-pY正常分布率(1頭につき3~6回の間接蛍光抗体法による観察を実施)は14~95%(検査頭数:34頭)とかなり大きな個体差を示した。またこれらの値には、凍結保存精子を用いた人工授精での受胎率(1頭につき30~129回の人工授精を実施、検査頭数:16頭、 $P<0.01$ ,  $r=0.702$ )および過排卵処理と人工授精を施した雌ウシでの移植可能胚の回収率(1頭につき13~39個の回収胚を検査、検査頭数:16頭、 $P<0.05$ ,  $r=0.721$ )との間に有意な相関関係が認められた。また体外受精においてもAc-pY正常分布率の高い凍結保存精子(平均正常分布率:74%, 1頭につき3~4回の検査を実施、検査頭数:3頭)を使用した場合、低い凍結保存精子(平均正常分布率:13%, 1頭につき3~4回の検査を実施、検査頭数:2頭)と比べて有意に高い受精率(平均受精率はそれぞれ69%と36%  $P<0.01$ )が得られた。以上の結果から、ウシ凍結保存精子におけるAc-pY正常分布率は人工授精での受胎率および体外受精での受精率を予測するための有用なマーカーであり、これを用いた精子の分子性状検査法により低繁殖症の雄ウシ個体を人工授精プログラムから排除できると考えられる(雑誌論文 )。

正常分布

異常分布

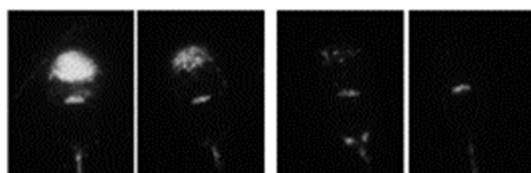


図.ウシ精子先体におけるAc-pYの分布状態

ウシの新鮮射出精子(1頭につき3~17回の観察を実施、検査頭数:20頭)および精巣

上体尾精子(1頭につき1回の検査を実施, 検査頭数32頭)におけるAc-pY正常分布率はそれぞれ4~99%および18~99%とかなり大きな個体差を示した。また新鮮射出精子および精巣上体尾精子のこれらの値には,凍結保存精子を用いた人工授精での受胎率[それぞれ1頭につき45~88回の人工授精を実施, 検査頭数:8頭,  $P<0.05$ ,  $r=0.830$ )および(1頭につき39~485回の人工授精を実施, 検査頭数:14頭,  $P<0.05$ ,  $r=0.715$ )]との間に有意な相関関係が認められた(雑誌論文)。

## (2) ADCY10

既報(Noda *et al.*, PLoS One. 2013, 8(2): e57296)に示したウシADCY10の機能的に劣る欠陥分子を特異的に認識するウサギポリクロナール抗体の作製を専門業者に委託したが,納入された抗体の反応特異性は低く,実験条件を多様に変更したが,反応特異性の低さは改善されなかった。そのため,ウシ新鮮射出精子におけるADCY10の機能を評価するための手法を別途に開発した。その結果,ADCY10活性化剤を洗浄後のウシ射出精子に添加した際の前進運動性の状態を解析することで,ADCY10の機能を間接的に評価できることを示した(未発表)。

## (3) その他の受精能力制御因子

### IZUMO1

ウシ新鮮射出精子においてIZUMO1は先体の主部と赤道節の境界部で45 kDaおよび17 kDaの分子質量を持つタンパク質として検出された。先体反応とともにIZUMO1は赤道節全体へと拡散した。凍結保存時の操作により先体の損傷・離脱が生じた精子では同様の変化が観察され,さらにIZUMO1の先体全体への拡散あるいは消失も認められた(学会発表)。なお,17 kDaのIZUMO1が欠陥型であるか否かについては検討を継続中である。

### カルパイン2

$Ca^{2+}$ 依存性プロテアーゼのカルパイン2がブタ新鮮射出精子の鞭毛の中片部および主部に分布し,Full-type hyperactivationの発生制御に関与することを示唆した。またキャパシテーション精子が受精能力を発現する際に引き起こす細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の急速な上昇に呼応する分子のひとつがカルパイン2であると推察した(雑誌論文)。なお,カルパイン2の欠陥分子は見出せなかった(未発表)。

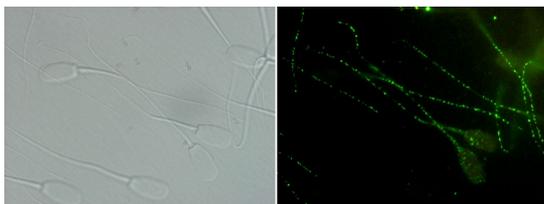


図. 間接蛍光抗体法によるブタ新鮮射出精子でのカルパイン2の検出(左:可視光,右:蛍光)

セリン・スレオニンプロテインホスファターゼ Calyculin Aに感受性を示すセリン・スレオニンプロテインホスファターゼ(PP1/PP2A)がウシ新鮮射出精子の頸部,主部および後先体部に分布し,基質タンパク質のセリン・スレオニンリン酸化状態を調節することで,精子における受精能力の発現を制御することを明らかにした。とりわけ頸部での脱リン酸化反応はFull-type hyperactivationの発生抑制に,および後先体部での脱リン酸化反応は先体反応の発生抑制の解除に関与することを示した(雑誌論文)。またブタ新鮮射出精子の後先体部に分布するPP1/PP2Aもウシと同様の機能を有するが,この分子の調節に新規性の高い細胞内cAMPシグナル伝達機構が関与する可能性を示唆した(雑誌論文)。またこれらのPP1/PP2Aには少なくともPP1 $\gamma$ 2が含まれることを明らかにした(未発表)。

### cAMP 作動性グアニンヌクレオチド交換タンパク質(EPAC)

ウシおよびブタの新鮮射出精子において,複数の種類の市販の抗体を用いてEPAC1およびEPAC2の検出を試みたが,いずれの実験においてもEPACとしての機能に重要なC末端領域を欠損する断片型分子しか検出できず,正常型のEPACを見いだせなかった(未発表)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

Miyuki M. Arai, Kenta Minami, Yukari Ogura, Nagisa Otsuka, Shohei Hama, Hiroshi Harayama, Mitsuhiro Sakase and Moriyuki Fukushima. Variation among individual bulls in the distribution of acrosomal tyrosine-phosphorylated proteins in epididymal and ejaculated spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 査読有, 2016, in press.

DOI: 10.1071/RD15483

Kazumi Kishida, Hiroshi Harayama, Fuminori Kimura and Takashi Murakami. Individual differences in the distribution of sperm acrosome-associated 1 proteins among male patients of infertile couples; their possible impact on outcomes of conventional *in vitro* fertilization. *Zygote*, 査読有, 2016, in press.

DOI: 10.1017/S0967199415000623

Ayane Isono, Shunsuke Tate, Kazumi Nakamura-Mori, Taichi Noda, Sho Ishikawa and Hiroshi Harayama. Involvement of cAMP-dependent unique signaling cascades in the decrease of serine/threonine-phosphorylated proteins in boar sperm head. *Theriogenology*, 査読有, 2016, Vol. 85, No. 6, pp.1152-1160.

DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.11.031

Kazumi Kishida, Mitsuhiro Sakase, Kenta

Minami, Miyuki M. Arai, Reiko Syoji, Namiko Kohama, Takayuki Akiyama, Akio Oka, Hiroshi Harayama and Moriyuki Fukushima. Effects of acrosomal conditions of frozen-thawed spermatozoa on the results of artificial insemination in Japanese Black cattle. *Journal of Reproduction and Development*, 査読有, 2015, Vol. 61, No. 6, pp. 519-524.

DOI: 10.1262/jrd.2015-073.

Yohei Mizuno, Ayane Isono, Aya Kojima, Miyuki M. Arai, Taichi Noda, Mitsuhiko Sakase, Moriyuki Fukushima and Hiroshi Harayama. Distinct segment-specific functions of calyculin A-sensitive protein phosphatases in the regulation of cAMP-triggered events in ejaculated bull spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 査読有, 2015, Vol. 82, No. 3, pp. 232-250.

DOI: 10.1002/mrd.22465

Aya Kojima, Yuki Matsushita, Yukari Ogura, Sho Ishikawa, Taichi Noda, Tetsuma Murase and Hiroshi Harayama. Roles of extracellular  $Ca^{2+}$  in the occurrence of full-type hyperactivation in boar ejaculated spermatozoa pre-incubated to induce the cAMP-triggered events. *Andrology*, 査読有, 2015, Vol. 3, No. 2, pp. 321-331.

DOI: 10.1111/andr.12005

Taichi Noda, Kenta Minami, Aya Kojima, Yohei Mizuno, Ayane Isono, Mitsuhiko Sakase, Moriyuki Fukushima and Hiroshi Harayama. Expression patterns of the activator type of cAMP-responsive element modulator in testicular germ cells of Japanese Black bulls. *Theriogenology*, 査読有, 2014, Vol. 81, No. 8, pp. 1012-1020.

DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.01.014.

Hiroshi Harayama. Roles of intracellular cyclic AMP signal transduction in the capacitation and subsequent hyperactivation of mouse and boar spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*, 査読有, 2013, Vol. 59, No. 5, pp. 421-430.

DOI: 10.1262/jrd.2013-056

[学会発表](計 20 件)

小倉 有香里, 原山 洋, ブタ精子での先体反応誘起に伴う頭部タンパク質 SPACA1 の変化, 日本畜産学会第 121 回大会, 2016 年 3 月 29 日, 日本獣医生命大学(東京都)

荒井 美由紀, 原山 洋, ウシ新鮮射出精子における先体チロシンリン酸化タンパク質の分布状態, 第 4 回関西生殖医学集談会・第 48 回関西アンドロロジカンファレンス合同研究会, 2016 年 3 月 5 日, ハービス PLAZA (大阪府)

荒井 美由紀, 坂瀬 充洋, 福島 護之, 原山 洋, ウシ新鮮射出精子の分子性状における個体差 - 先体チロシンリン酸化タンパク質と人工授精成績との関係, 第 108 回日本繁殖生物学会大会, 2015 年 9

月 18 日, 宮崎大学農学部(宮崎県)

原山 洋, 人工授精成績・体外受精成績に影響を与える哺乳類精子の先体タンパク質, 第 60 回日本生殖医学会学術講演会シンポジウム 3「受精に関する最近の話題(招待講演)», 2015 年 4 月 27 日, パシフィコ横浜(神奈川県)

原山 洋, 哺乳類の精子学 - 運動の開始から受精まで -, 第 35 回関西生殖発生毒性フォーラム基礎教育講演(招待講演), 2015 年 4 月 11 日, 弁天町 ORC200 生涯学習センター(大阪府)

福田 匡起, 坂瀬 充洋, 福島 護之, 原山 洋, ウシ凍結精子での先体損傷・離脱に伴う IZUMO1 の変化, 日本畜産学会第 119 回大会, 2015 年 3 月 28 日, 宇都宮大学(栃木県)

原山 洋, 低繁殖症雄ウシの精子における欠陥型タンパク質の検出および特性解析, 受胎率向上 SIG 第 1 回会合, 2014 年 12 月 20 日, 東京大学(東京都)

Kazumi Kishida, Hiroshi Harayama, Fuminori Kimura and Takashi Murakami, The association between spatial distribution patterns of SPACA1 in human ejaculated sperms and outcomes of conventional IVF, World Congress of Reproductive Biology 2014, September 3, 2014, Edinburgh (UK)

荒井 美由紀, 南 健太, 小倉 有香里, 坂瀬 充洋, 福島 護之, 原山 洋, 黒毛和種精子でのチロシンリン酸化タンパク質の分布状態が先体の安定性に及ぼす影響, 第 107 回日本繁殖生物学会大会, 2014 年 8 月 21 日, 帯広畜産大学(北海道)

小倉 有香里, 高岸 祐樹, 小島 彩, 石川 翔, 原山 洋, ブタ精子での先体反応に伴う頭部タンパク質「SPACA1」の分布および分子マスの変化, 第 107 回日本繁殖生物学会大会, 2014 年 8 月 21 日, 帯広畜産大学(北海道)

福田 匡起, 坂瀬 充洋, 福島 護之, 原山 洋, ウシ凍結保存精子における先体の損傷・離脱が頭部での IZUMO1 の分布に及ぼす影響, 第 107 回日本繁殖生物学会大会, 2014 年 8 月 21 日, 帯広畜産大学(北海道)

野田 大地, 南 健太, 坂瀬 充洋, 福島 護之, 原山 洋, ウシ精巣における cAMP 依存性転写因子 CREM の発現パターンの解析, 第 107 回日本繁殖生物学会大会, 2014 年 8 月 21 日, 帯広畜産大学(北海道)

原山 洋, 家畜精子のハイパーアクチベーションに先立つ部位特異的なキャパシテーション, 日本アンドロロジー学会第 33 回学術大会シンポジウム 1「Capacitation の最前線を極める」(招待講演), 2014 年 6 月 12 日, 軽井沢プリンスホテルウエスト(長野県)

原山 洋, 水野 洋平, 小島 彩, Full-type hyperactivation の誘起に伴う家畜精子の頸部および中片部の変化, 日本畜産学会第 118 回大会, 2014 年 3 月 28 日, つくば国際会場(茨城県)

岸田 和美,原山 洋,木村 文則,村上 節,  
ヒト射出精子の頭部における SPACA1 の分布状態の個体差 - 先体主部での分布状態と体外受精成績との関係 -, 第 2 回関西生殖医療集談会, 2014 年 3 月 1 日, ハービス PLAZA (大阪府)

小島 彩,原山 洋,ブタ精子の鞭毛に分布するカルパイン 2 の役割, 第 2 回関西生殖医療集談会, 2014 年 3 月 1 日, ハービス PLAZA (大阪府)

小島 彩,石川 翔,設楽 修,原山 洋,ブタ精子におけるカルパインの検出および機能解析, 第 106 回日本繁殖生物学会大会, 2013 年 9 月 12 日, 東京農工大学 (東京都)

岸田 和美,原山 洋,木村 文則,村上 節,ヒト射出精子における SPACA1 の検出 - 先体での検出パターンと体外受精成績との相関性 -, 第 106 回日本繁殖生物学会大会, 2013 年 9 月 12 日, 東京農工大学 (東京都)

坂瀬 充洋,小路 玲子,小浜 菜美子,秋山 敬孝,岡 章生,原山 洋,福島 護之,人工授精で雌を受胎させにくい精子を産生する黒毛和種雄個体の検出法 - 凍結保存後の精子先体の正常性と体内受精由来の移植可能胚率の関係 -, 第 106 回日本繁殖生物学会大会, 2013 年 9 月 14 日, 東京農工大学 (東京都)

水野 洋平,坂瀬 充洋,福島 護之,原山 洋,ウシ精子の鞭毛におけるタンパク質チロシンリン酸化および超活性化運動の誘起, 関西畜産学会第 63 回大会, 2013 年 9 月 5 日, 滋賀県立大学 (滋賀県)

〔図書〕(計 0 件)

## 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: 3 0 2 8 1 1 4 0

### (2) 研究分担者

村瀬 哲磨 (MURASE, Tetsuma)  
岐阜大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号: 3 0 3 0 3 5 1 4

福島 護之 (FUKUSHIMA, Moriyuki)  
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・主任研究員  
研究者番号: 6 0 4 6 3 3 9 5