

自己評価報告書

平成 23 年 4 月 4 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2011

課題番号：20580312

研究課題名 (和文) 琉球在来豚アグー精子における凍結保存技術の確立

研究課題名 (英文) Establishment of the technique for sperm cryopreservation in Okinawan native Agu pig

研究代表者

建本 秀樹 (TATEMOTO HIDEKI)

琉球大学・農学部・准教授

研究者番号：70227114

研究分野：家畜繁殖学

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：精子，アグー，ブタ，凍結保存，細胞障害

1. 研究計画の概要

国内唯一の希少豚品種である琉球在来豚アグーには、近交退化に起因する高度な繁殖障害を認める。したがって、希少な雄アグーの遺伝資源を保存し維持すると共に、凍結精子を用いることでアグーの繁殖効率を改善すると云った点から、アグー精子の凍結保存技術の確立は喫緊の課題である。しかしながら、世界的に見てもブタ精子の凍結保存技術は未だ実用化されていない。そこで、従来までとは異なる視点からアグー精子における凍結保存の技術改良を図るため、以下の研究を実施した。

- (1) 凍結処理時の酸化ストレスからの保護作用が凍結融解アグー精子の性状に及ぼす影響を検討した。
- (2) 鶏卵黄から抽出精製した低比重リポタンパク質(LDL)を凍結用希釈液に添加し、精子細胞膜の流動性を維持することによる冷却・凍結処理時の凍結障害からの保護が凍結融解後のアグー精子の性状に及ぼす影響を検討した。
- (3) 精子凍結処理時の膜電位の低下によるミトコンドリア外膜からの細胞質内へのシトクロム *c* の放出を Bcl-xL 変異体である新規細胞死抑制タンパク質(FNK protein)で阻害し、凍結障害に起因した細胞内カスパーゼの活性化ならびにアポトーシス様細胞死を抑制したアグー精子の凍結保存を試みた。

2. 研究の進捗状況

- (1) 毒性を有することなく安定した抗酸化能を示す安定型アスコルビン酸誘導体(AA-2G)を抗酸化剤として使用した。その結果、200 μ M AA-2G の細胞外ラジカ

ル消去作用により、凍結処理に伴うアグー精子の脂質過酸化量は減少し、細胞膜と DNA の障害は共に有意に抑制された。すなわち、AA-2G の抗酸化作用により融解後の精子性状が効果的に改善されることを明らかにした。

- (2) 20%鶏卵黄を含む通常の凍結用希釈液に比べ、鶏卵黄の代わりに4-6%の LDL を添加した修正凍結用希釈液を使用した場合、個体間で差があるものの凍結融解後の精子におけるコレステロール含有量は有意に増加し、精子の細胞膜正常性は高いレベルで維持された。また、LDL 処理区の融解後 1 時間の運動精子率は対照区に比べて 10-20%の高い値を示し、同時に LDL 処理精子では細胞内 ATP 量が増加すると共に、DNA や精子先体への障害も軽減された。以上の結果から、冷却・凍結時の細胞膜流動性低下を抑制する LDL 処理が、良好なアグー凍結精子を作成する上で非常に有用であると結論された。
- (3) 凍結処理に伴って精子のカスパーゼが高頻度(40-55%)に活性化されていたが、FNK protein 処理濃度に依存して活性化型カスパーゼを有する精子の割合は著しく減少した。そして、300 nM の FNK protein 処理区では、無処理区(39-42%)に比較して正常なミトコンドリアを有する精子の割合が有意に増加した(53-59%)。また、FNK protein 処理区では、DNA 障害が抑制され精子運動性が有意に向上した。すなわち、アグー精子の凍結処理時にはカスパーゼ活性化を伴ったアポトーシス様細胞死が誘導されており、ミトコンドリア依存型カス

パーゼ活性化機序を効果的に抑制する FNK protein 処理は融解後の精子性状を著しく改善することが明らかになった。

3. 現在までの達成度

「おおむね順調に進展している」

従来までのブタ精子凍結保存に関する研究概念とは異なる着眼点から研究を遂行し、精子凍結時における AA-2G と LDL 処理による酸化ストレスならびに物理的障害からの保護の重要性を証明した。さらに、精子凍結処理時にはミトコンドリア障害に起因したアポトーシス様細胞死が誘導されていることをブタ精子において初めて明らかにした。

これら研究結果により、凍結融解後のアグー精子の性状は著しく改善され、凍結精子によるアグー産子を得ることに成功した。また、本研究成果はアグーのみならず一般経済豚精子における凍結保存技術の向上に対しても十分に貢献できると思われる。

4. 今後の研究の推進方策

ブタ精子において、凍結障害に伴ってカスパーゼが活性化され、アポトーシス様細胞死が誘導されると云った非常に新しい成果が得られた。この点に着目した精子凍結保存に関する研究報告は見当たらない。そこで、凍結障害とアポトーシス様細胞死との関連を、さらに詳細に追究していく予定である。

また、改良した凍結精子を使用した人工授精によりアグーブランド豚の生産に貢献する。

5. 代表的な研究成果

(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 4 件)

- ① Lay KM, Ashizawa K, Nakada T, Tatemoto H. N-glycosylation of zona glycoproteins during meiotic maturation is involved in sperm-zona pellucida interactions of porcine oocytes. *Theriogenology*, 75, 1146-1152, 2011, 査読有り.
- ② Yamauchi S, Nakamura S, Lay KM, Azuma T, Yakabi T, Muto N, Nakada T, Ashizawa K, Tatemoto H. Characteristics of Okinawan native Agu pig spermatozoa after addition of low-density lipoprotein to freezing extender. *Journal of Reproduction and Development*, 55, 558-565, 2009, 査読有り.
- ③ Yamauchi S, Nakamura S, Yoshimoto T, Nakada T, Ashizawa K, Tatemoto H. Prediction of the estrous cycle and optimal insemination time by monitoring vaginal electrical resistance (VER) in order to

improve the reproductive efficiency of the Okinawan native Agu pig. *Animal Reproduction Science*, 113, 311-316, 2009, 査読有り.

- ④ Yoshimoto T, Nakamura S, Yamauchi S, Muto N, Nakada T, Ashizawa K, Tatemoto H. Improvement of the post-thaw qualities of Okinawan native pig spermatozoa frozen in an extender supplemented with ascorbic acid 2-O- α -glucoside. *Cryobiology*, 57, 30-36, 2008, 査読有り.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 下川一輝, 屋嘉比達郎, 仲田正, 芦沢幸二, 太田成男, 建本秀樹. 琉球在来豚アグー精子の凍結処理時における新規細胞死抑制タンパク質(PTD-FNK protein)処理による融解後の性状改善効果. 第 3 回日本暖地畜産学会大分大会, 2010 年 10 月 16~17 日, 別府亀の井ホテル.
- ② Tatemoto H, Nakamura S, Ashizawa K, Yoshimoto T, Yamauchi S, Muto N, Nakada T. Improvement of the post-thaw qualities of Okinawan native pig Agu spermatozoa after addition of AA-2G and LDL to freezing extender. 11th International Symposium on Spermatology, 94, 2010, Okinawa 7/24-29.
- ③ 建本秀樹. 沖縄在来豚アグーの増殖効率アップを目指した挑戦. International Satellite Symposium 市民公開講座 (11th International Symposium on Spermatology), 2010 年 6 月 26 日, 沖縄県名護市民会館.
- ④ 吾妻俊之, 屋嘉比達郎, 仲村敏, 仲田正, 芦沢幸二, 武藤徳男, 建本秀樹. 凍結用希釈液に添加したヒアルロン酸による琉球在来豚アグー凍結精子の性状改善効果. 第 2 回日本暖地畜産学会長崎大会, 2009 年 10 月 24~25 日, 長崎大学文教キャンパス.
- ⑤ 山内昌吾, 仲村敏, 吉元哲兵, 仲田正, 武藤徳男, 建本秀樹. 凍結用希釈液への鶏卵黄由来低密度リポタンパク質(LDL)添加による沖縄在来豚アグー精子性状の改良効果. 第 101 回日本繁殖生物学会大会, 2008 年 9 月 18 日~20 日, 九州大学.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]