

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 9 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・教授

研究者番号：70227114

研究成果の概要（和文）： 希少豚品種である琉球在来豚アグー精子における凍結保存技術の改良を行った。その結果、凍結処理時の酸化ストレスからの保護と低比重リポタンパク質(LDL)による精子細胞膜の流動性の維持が凍結融解後の精子性状を有意に改善させた。さらに、新規細胞死抑制タンパク質(PTD-FNK protein)で処理した精子では、融解後のミトコンドリア正常性が向上しミトコンドリア依存型カスパーゼ活性が低下した。以上の結果から、良好なアグー凍結精子を作製する有用な方法が確立できたと結論された。

研究成果の概要（英文）： The technical establishment of boar sperm cryopreservation is indispensable for effective breeding of the scarce Okinawan native Agu pig. In this study, the addition of ascorbic acid 2-O- α -glucoside (AA-2G) and low-density lipoprotein (LDL) to the freezing extender reduced the plasma membrane damage in post-thaw Agu sperm as a consequence of the protection of sperm against extracellular oxidative stress and cold shock damage, respectively, during cryopreservation. Moreover, treatment with an artificial anti-cell death protein (PTD-FNK protein) prevented the mitochondrial dysfunction leading to the apoptotic-cell death during cryopreservation. Therefore, these results indicate that the post-thaw qualities of fragile Agu sperm is effectively improved through the established techniques in this study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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、酸化ストレス、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

一般に、ブタ精子は他の家畜精子に比べて耐凍能が劣り、凍結・融解後の運動性、生存性、細胞膜正常性、ミトコンドリア正常性、DNA 正常性、さらには受精能力の著しい低下が観察される。そして、凍結精子を人工授

精に使用した場合、受胎率や出産率は顕著に低下し、生産性が減少する結果となる。一方、国内唯一の希少豚品種である琉球在来豚アグーにおいて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我が国のブタ品種

の多様性を維持するという観点からも、アグー精子の凍結保存技術を確立することが必要であった。しかし、世界的に見ても未だ実用化に耐え得るだけのブタ凍結精子は作成できていなかった。そこで、凍結処理過程で引き起こされるブタ精子に特有の様々な細胞障害を抑制すべく、これまでとは違った観点からの研究を遂行することが、ブタ凍結精子の作成技術を確立する上で不可欠であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、以下の3点に関する研究を通して、アグー精子における凍結保存技術の確立を目指した。

- (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後の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、アグー精子に適した LDL 添加凍結用希釈液を作成した。
- (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-x_L のアミノ酸配列を改変した新規細胞死抑制タンパク質(PTD-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追究した。

3. 研究の方法

- (1) 凍結処理を行う精子を酸化ストレスから保護するためには、取り扱いが容易で安定した抗酸化能を有し、しかも、毒性を有さない抗酸化剤を用いる必要がある。その点を考慮し、以前、ブタ卵子の酸化ストレスからの保護に対して非常に有効であった安定型アスコルビン酸誘導体(アスコルビン酸 2-O- α -グルコシド; AA-2G)をブタ精子の抗酸化剤として使用した。射出精液を成熟雄アグーから擬雌台を用い手圧法で採取し、これまでの我々の研究により明らかとなったアグー精子に適した凍結処理行程に則って凍結処理を行った。その際、凍結用希釈液(BF-5)に 0-400 μ M の AA-2G を加えた AA-2G 処理試験区を設け、融解精子の性状を以下の試験により判定し、AA-2G の抗酸化作用によるアグー凍結精子への効果を検証した。
- (2) 手圧法で採取したアグー射出精液を凍結処理する際、従来の 20%鶏卵黄を添加

した希釈液(対照区)の卵黄の代わりに 2-10%の LDL を添加した希釈液(処理区)を用い、凍結・融解後の精子性状を判定することで、LDL の至適添加濃度を明らかにすると共に、LDL によるアグー凍結精子への効果を検討した。なお、凍結用希釈液に添加する LDL の鶏卵黄からの抽出は、Moussa et al. (2002, *Theriogenology*, 57, 1695-1706)の方法に準じて行った。

- (3) アグー射出精子に凍結処理を行う際、日本医科大学大学院 医学研究科の太田教授より提供された PTD-FNK protein を凍結用希釈液に 0-400 nM の濃度で添加し、凍結・融解後の精子性状を判定することで、PTD-FNK protein の至適添加濃度を明らかにすると共に、PTD-FNK protein によるアグー凍結精子への効果を検証した。さらに、凍結障害によるミトコンドリア依存型カスパーゼ活性化機序の発現を明らかにし、ミトコンドリア障害を PTD-FNK protein で、細胞膜障害をヒアルロン酸(HA)でそれぞれ抑制することで、凍結処理により引き起こされる細胞内外からの細胞障害に起因したカスパーゼの活性化を抑制しアポトーシス誘導から精子を保護することを試みた。

また、凍結・融解後の各精子性状は以下の試験により判定した。

- 精子細胞膜正常： CFDA/PI による蛍光二重染色を行い、膜に障害を受けた精子を蛍光顕微鏡下で観察した。
- 精子運動パラメータ： 精子運動解析装置を用い、融解精子の運動パラメータ(運動精子率と活性型前進運動精子率)を計測した。
- 精子細胞内カスパーゼ活性： 蛍光染色法で精子細胞内の活性化型カスパーゼを検証した。
- 精子 DNA 障害： コメットアッセイ法で細胞障害ならびにアポトーシスに伴った断片化 DNA を計測した。
- 精子先体の正常性： ゼラチンスライド法で先体由来タンパク質分解酵素活性を測定し、先体の正常性を評価した。
- 精子ミトコンドリアの正常性： MitoTracker による蛍光染色を行い、ミトコンドリア障害を受けた精子を蛍光顕微鏡下で観察した。
- 細胞内 ATP 量の指標とした精子生存性： ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応による細胞内 ATP 量をルミノメーターで測定し、精子生存性を評価した。
- 精子受精能力： 体外成熟卵との体外受精で凍結精子の受精能力を評価した。

4. 研究成果

(1) アグー精子凍結時における凍結用希釈液(BF-5)への AA-2G 添加が融解後の精子性状に及ぼす影響について検討した。

実験 1 では、アグー3頭の射出精子を 0-800 μM の AA-2G を添加した BF-5 で冷却・凍結し、融解後の精子運動性を観察したところ、200 μM AA-2G 処理区では融解後の精子運動性が他の区に比べて有意に向上した($P<0.05$)。このことから、BF-5 へ添加する AA-2G の至適添加濃度は 200 μM AA-2G であることが明らかとなった。次に、実験 2 では、アグー4頭の射出精子を 0 もしくは 200 μM の AA-2G を含む BF-5 で凍結し、融解後の細胞内アスコルビン酸(AsA)量と ATP 量、脂質過酸化、ならびに細胞膜と DNA の障害性を調べ、さらに体外受精で精子受精能力を評価した。その結果、精子細胞内 AsA 量は AA-2G 処理で変化しなかったが、脂質過酸化は抑制され(図 1)、凍結処理に伴う細胞膜と DNA の障害は共に有意に減少した($P<0.05$)。また、AA-2G 処理区の精子では、細胞内 ATP 量と体外受精率が無処理区に比べて有意に増加した($P<0.05$)。さらに、200 μM AA-2G 処理区の凍結精子を人工授精に使用した際、新鮮精子と同レベルの出産率(38%)と平均一腹正常産子数(3.7頭)を得ることに成功した(表 1)。

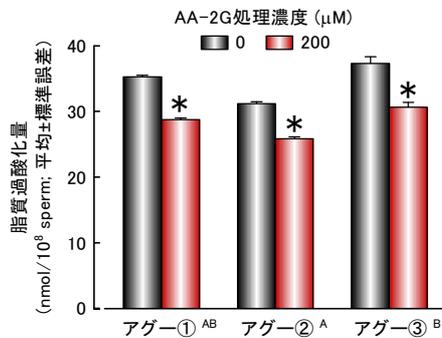


図 1. AA-2G 処理が凍結融解後のアグー精子の脂質過酸化量に及ぼす影響。

* 同一個体間で有意差を認める($P<0.05$).

^{A,B} 個体間に有意差を認める($P<0.05$).

表 1. 凍結精子による AI 後の成績。

AI に用いた精子	供試雌頭数	出産率(%)	平均一腹産子数
新鮮精子(未凍結精子)	17	41.2	4.0
AA-2G 処理凍結精子	8	37.5	3.7
無処理の凍結精子	7	0.0*	0.0*

* 5%の危険率で有意差を認める。

以上の結果から、細胞外のラジカルを消去する AA-2G の作用により、アグー精子の凍結障害は抑制され、融解後の精子性状が効果的に改善されることが明らかとなった。

(2) 細胞膜流動性の劣るブタ精子は凍結融解処理過程で障害を受けやすく、その現象は一般豚精子に比べてアグー精子においてより顕著である。通常の凍結用希釈液には 20%の鶏卵黄が含まれており、その有効作用因子は LDL であるとされている。そこで本研究では、アグー精子の凍結時における凍結用希釈液に含まれる鶏卵黄の LDL への置換が融解後の精子性状に及ぼす影響について検討した。

その結果、20%鶏卵黄を含む通常の凍結用希釈液(対照区)に比べ、鶏卵黄の代わりに LDL を添加した修正凍結用希釈液を使用(処理区)した場合、個体間で量に差は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た($P<0.05$)。そして、LDL を含む凍結用希釈液で処理した処理区精子の細胞膜正常性は、対照区に比較して有意に高いレベルで維持された($P<0.05$, 図 2)。また、融解後 1 時間の運動精子率においても、処理区では対照区に比べて 10~20%の高い値を示し、LDL 処理区の精子においては DNA、ミトコンドリアさらには先体への障害も軽減された。これらパラメータを指標とした LDL 至適濃度は個体間で差があるものの 4 または 6%であった。さらに、アグー精子の融解後の細胞内 ATP 量は、対照区に比べて 4-6%の LDL 処理区で著しく多く($P<0.05$), 高い生存性の維持が確認された。

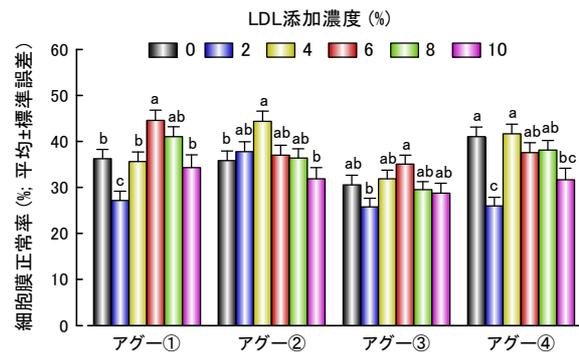


図 2. LDL 処理が凍結融解後のアグー精子の細胞膜正常性に及ぼす影響。

0% LDL 区は、20%卵黄添加(対照区)。

** 同一個体間で有意差を認める($P<0.05$).

以上の本研究結果から、雄アグーの精子を凍結する際には、凍結時のコールドショックに伴う細胞障害を効果的に抑

制する作用を有する LDL 処理が、良好な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) 近年、ヒト精子において凍結障害がアポトーシス様細胞死を誘導し、カスパーゼの活性化を起こした精子では融解後の受精能力が著しく低下するとの報告がなされた。しかし、アポトーシス誘導機序に関わる細胞内因子と凍結融解後の精子性状との関連を詳細に追究した報告はない。そこで本研究では、アグー精子の凍結処理過程におけるアポトーシス様細胞死の誘導機序を検証すると共に、ミトコンドリアに依存したカスパーゼの活性化を抑制する Bcl-xL から遺伝子組み換え技術で作製した PTD-FNK protein による処理が融解後の精子性状に及ぼす影響について検討した。

その結果、無処理区の凍結精子では、高頻度(40-55%)にカスパーゼの活性化が確認された。しかし、PTD-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(P<0.05, 図 3), 300 nM の PTD-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が有意に増加(53-59%)すると共に、高い細胞内 ATP 量も観察された(P<0.05)。そして、凍結時の PTD-FNK protein 処理により、融解後に DNA 障害性を示す精子の割合は有意に低下し(P<0.05), 精子運動性は顕著に改善された。さらに、体外受精試験の結果、PTD-FNK protein 処理区の精子侵入率は、無処理区の値から 14-33% も有意に増加した(P<0.05)。しかしながら、細胞膜障害への FNK protein 処理の効果は認められなかった。

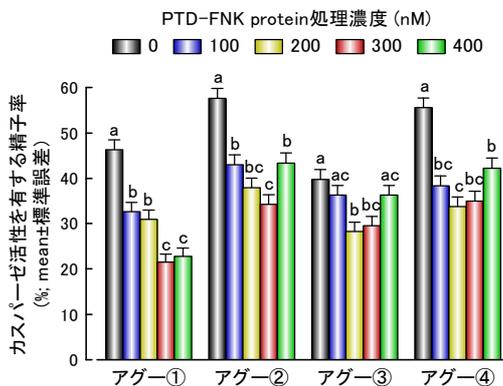


図 3. PTD-FNK protein 処理が凍結融解後のアグー精子のカスパーゼ活性に及ぼす影響。
*° 同一個体間では有意差を認める(P<0.05).

次に、凍結処理後のアグー精子では活性型カスパーゼ-3 および-9 を有する精子が確認され、アグー精子の凍結・融解処理過程でミトコンドリア依存型カスパーゼ機序が活性化されていることが明らかとなった。そして、300 nM の PTD-FNK protein で凍結前の精子を処理した場合、融解後の精子におけるカスパーゼ-3 と-9 の活性は低下した(P<0.05)。しかし、PTD-FNK protein 処理による融解後のカスパーゼ-8 活性の抑制や精子細胞膜正常性への効果は認められなかった。そこで、細胞膜正常性等の改善作用が期待される 500 µg/ml ヒアルロン酸(HA)を PTD-FNK protein を含む凍結用希釈液に添加したところ、HA は融解後の細胞膜障害を抑制したが(P<0.05), カスパーゼ-8 活性に対する影響は見られなかった。一方、PTD-FNK protein+HA の処理は凍結・融解後の各種精子性状を改善し、凍結精子における受精能力の維持に対して顕著に有効であった(P<0.05, 図 4)。

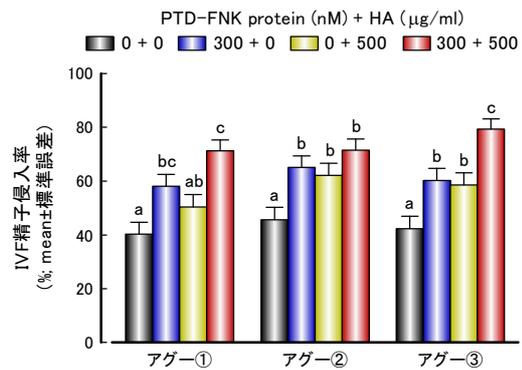


図 4. PTD-FNK protein とヒアルロン酸(HA)の処理が凍結融解後のアグー精子の受精能力に及ぼす影響。
*° 同一個体間では有意差を認める(P<0.05).

以上の結果から、精子凍結用希釈液への PTD-FNK protein と HA の添加は、凍結障害で引き起こされるミトコンドリア依存型アポトーシス様細胞死と細胞膜障害の抑制、さらには融解後の精子受精能力の維持に非常に効果的であり、良好なアグー凍結精子を作製する点において有用な方法であると結論された。

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 10 件)

- ① Lay KM, Nakada T, Tatemoto H. The involvement of N-glycosylation of zona glycoproteins during meiotic maturation in sperm-zona pellucida interactions of porcine

- denuded oocytes. *Animal Science Journal*, in press, 2012, 査読有り.
- ② Lay KM, Oshiro R, Arasaki C, Ashizawa K, Tatemoto H. Role of acidification elicited by sialylation and sulfation of zona glycoproteins during oocyte maturation in porcine sperm-zona pellucida interactions. *Journal of Reproduction and Development*, 57, 744-751, 2011, 査読有り.
- ③ Ahammad MU, Nishino C, Tatemoto H, Okura N, Kawamoto Y, Okamoto S, Nakada T. Maturation changes in the survivability and fertility of fowl sperm during their passage through the male reproductive tract. *Animal Reproduction Science*, 128, 129-136, 2011, 査読有り.
- ④ Ahammad MU, Nishino C, Tatemoto H, Okura N, Kawamoto Y, Okamoto S, Nakada T. Maturation changes in motility, acrosomal proteolytic activity, and penetrability of the inner perivitelline layer of fowl sperm, during their passage through the male genital tract. *Theriogenology*, 76, 1100-1109, 2011, 査読有り.
- ⑤ 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.
- ⑥ Ashizawa K, Kawaji N, Nakamura S, Nagase D, Tatemoto H, Katayama S, Narumi K, Tsuzuki Y. Temperature-dependent regulation of sperm motility of Ijima's copper pheasants (*Syrmaticus soemmerringii ijimae*), one of 'near threatened' species. *Animal Reproduction Science*, 121, 181-187, 2010, 査読有り.
- ⑦ 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.
- ⑧ Ashizawa K, Omura Y, Katayama S, Tatemoto H, Narumi K, Tsuzuki Y. Intracellular signal transduction pathways in the regulation of fowl sperm motility: evidence for the involvement of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) cascade. *Molecular Reproduction and Development*, 76, 603-610, 2009, 査読有り.
- ⑨ 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.
- ⑩ 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 9 件)
- ① 大城柳子, 下川一輝, 建本秀樹. 琉球在来豚アグーにおける精液輸送用懸濁液へのスキムミルク添加が凍結融解後の精子性状に及ぼす影響. 日本畜産学会第 115 回大会講演要旨, 2012 年 3 月 28 日~30 日, 名古屋大学東山キャンパス.
- ② 大城柳子, Khin Mar Lay, 新崎千江美, 建本秀樹. ブタ卵の体外成熟時における透明帯構成糖タンパク質のシアル化と硫酸化が精子-透明帯間の相互作用に及ぼす影響. 第 4 回日本暖地畜産学会沖縄大会, 2011 年 10 月 29~30 日, 沖縄産業支援センター.
- ③ 下川一輝, 大城柳子, 伊野波彰, 太田成男, 建本秀樹. 琉球在来豚アグー精子における凍結障害によって引き起こされるアポトーシス様細胞死の解明. 第 104 回日本繁殖生物学会大会, 2011 年 9 月 13 日~17 日, いわて県民情報交流センター・アイーナ.
- ④ 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性改善効果. 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.
- ⑤ 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.
- ⑥ Ashizawa K, Kawaji N, Nagase D, Tatemoto H, Tsuzuki Y. Sperm motility modulation of Ijima's copper pheasants (*Syrmaticus soemmerringii ijimae*), one of "near threatened" species in Japan. 11th International Symposium on Spermatology, 94, 2010, Okinawa 7/24-29.
- ⑦ 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.

- ⑧ 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.
- ⑨ 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.

[その他]

- ① いのちドラマチック 第1集, 福岡伸一監修, NHK「いのちドラマチック」制作班編, 「アグー豚」, p103-112, 木楽舎, 2011年.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

建本 秀樹 (TATEMOTO HIDEKI)

琉球大学・農学部・教授

研究者番号: 70227114