

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15651

研究課題名（和文）ウシ高走流性精子のエピゲノム変化に着目した低受胎要因の解明

研究課題名（英文）Investigation of low fertility factors based on epigenetic changes in bovine highly motile spermatozoa.

研究代表者

緒方 和子 (Ogata, Kazuko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・主任研究員

研究者番号：40761614

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ウシ凍結精液の受胎性を判定する新たな精液評価技術が求められている。本研究では、運動性に問題はないが受胎性の低い精液の特徴の検出を目指した。マイクロ流体技術を用いることで、高走流性精子を評価対象に絞った精液評価を実現した。また、精液中の個々の精子の運動計測値を解析することで、高走流性精子の中でも運動の特徴の異なる精子群を分類することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウシの人工授精受胎率の低下が問題となる中、通常精液検査では発見できない受胎性の低い凍結精液の存在が知られてきており、精液の受胎性を評価する新たな評価技術の開発が求められている。本研究では、精液中に存在する高走流性精子を対象にした精液評価を実施し、個々の精子の運動計測値の解析による新たな運動性評価手法を開発した。これにより、従来の運動計測値では表現できなかった運動の特徴の数値化が可能となった。今後、精液の受胎性や品質に関わる運動の特徴を解明することで、凍結精液の評価技術の改良に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to develop a technique to assess the fertility of bovine frozen semen by identifying the sperm differences between bull semen with normal motility but different fertility. The use of microfluidic technology enabled semen evaluation to focus on the highly motile sperm mixedly extent in the semen. Analysis of the measured motility values of individual sperm contained in semen has made it possible to classify groups of highly motile sperm with different motility characteristics. This quantified motility characteristics could not be expressed by conventional motility assessment. It would help to improve evaluation techniques for frozen semen in the future.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：精子 ウシ 運動性 マイクロ流体デバイス エピゲノム 受胎性 DNAメチル化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

凍結精液の普及と共に、精液の評価手法の開発が進んできた。中でも精子の運動性は、受精の際に卵子へ到達するために不可欠であると共に、評価が簡便で生産現場で実施できる普遍的なものであるため、最も一般的な精液の質の指標とされている。一方で近年、ウシの人工授精による受胎率の低下の要因が探られる中、運動性が良好であるにもかかわらず、受精または受胎ができない精液の存在が明るみになってきた。これは、精子の受精および受胎能を *in vitro* でより精度高く予測する上での新たな指標が必要であることを示している。

これまでに研究代表者らは、新たな精子選別手法であるマイクロ流体技術により液流に逆らって泳ぐ走流性の高い精子(高走流性精子)を選別して捕集できることをウシ精液で確認した。マイクロ流路の構造と流速は、卵管を模倣して設計されている(Miki and Clapham., *Curr Biol*, 2013)。そのため、選別された高走流性精子は受精部位まで到達できる能力を持つ精子と考えられた。しかし、それらの精子を人工授精に用いたところ、走流性の高さが受胎性に直結するとは一概に言えなかった。一方で、高走流性精子の運動様式には少なくとも2つのパターンがあり、受胎結果に影響しうることを明らかにし、精液中におけるそれらの割合を反映する指標値を設定した(SMI, Nagata et al., *PNAS*, 2018)。

精子が受精できない、あるいは受精できても発生に至らない要因として、DNAの配列変化を伴わず、ヒストンやDNAの修飾状態により遺伝子発現が制御されるエピジェネティクス変化の関与が知られている。精子の運動性が卵子への到達、すなわち受精までに影響するのに対して、精子核で生じるエピゲノム変化は受精後の胚発生に影響しうる。ウシ精子のエピジェネティクスと受胎性に関する先行研究として、ヒストン修飾やDNAメチル化と受胎性との関連が示されてきている(Kropp et al., *BMC Genomics*, 2017; Kutchy et al., *Andrologia*, 2018)。また、従来の精子選別法であるSwim-up法(Parrish et al., *Theriogenology*, 1995)により選別されたヒト精子では、運動性の高いものと低いものとでクロマチン構造、ならびにDNAおよびヒストンの修飾状態が異なることが報告されている(Kim et al., *Fertil Steril*, 2015)。

### 2. 研究の目的

精液性状が良好でも受胎性の低い精液を生産する雄牛を早期に発見する手法の確立が求められる。本研究では、運動性に問題はないが受胎性の異なる精液を対象として、マイクロ流体技術による精子の選別処理を行う。これにより、受精に関わると考えられる高走流性精子を評価対象に絞り込み、各精液における運動性やエピゲノム修飾等の相違を解析する。以上より、受精および受胎能の異なる精液に含まれる精子の特徴をより明確にすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

人工授精後の受胎率の異なる市販の黒毛和種種雄牛6頭の凍結精液を解析に使用した。供試精液は融解後の精子運動率が80%を超えており、運動性に問題がないことを確認した。種雄牛受胎率50%を基準に高受胎群(n=3)および低受胎群(n=3)に区分した。各精液について、マイクロ流体デバイス(DMSS, 特許第6202501号)による選別処理を行った。精液の希釈、選別および遠心濃縮には0.6%BSAおよび5mM EGTA添加SP-TALP液を用いた。選別処理により得られる、液流に逆らって泳いで捕集された高走流性精子の分画を選別区、液流に押し戻されて捕集されずに残った精子分画を残余区とした。また、選別処理を行わずインキュベートのみを行った精子を対照区とした。受胎性の異なる精液から選別捕集した高走流性精子の違いを明らかにするために、運動特性、先体正常性、細胞膜正常性、クロマチン正常性およびDNAメチル化状態を比較した。

#### 1) 運動特性の評価

精子動解析装置(CASA)で計測される運動パラメーターのうち、直線速度(VSL)、曲線速度(VCL)、平均速度(VAP)、頭部振幅(ALH)および頭部振動数(BCF)の値を解析に用いた。はじめに、受胎性の異なる精液から選別した高走流性精子における、運動性の指標値( $SMI = VSL(\mu\text{m}/\text{sec}) \times BCF(\text{Hz}) / VCL(\mu\text{m}/\text{sec})$ ; Nagata et al., *PNAS*, 2018)を比較した。次に、高走流精子に特徴的な運動を検出して比較するために、全精子の個々の運動計測値を用いてクラスター分析および主成分分析を行った。主成分分析の結果を受けて設定した評価基準をもとに受胎性のグループ(高受胎群、低受胎群)間および試験区(選別区、残余区、対照区)間における精子の運動性の特徴を評価した。

#### 2) 先体、細胞膜およびクロマチン正常性の評価

受胎性の異なるグループおよび試験区に含まれる精子について、卵子への侵入および細胞膜との融合といった受精の初期段階に重要となる精子先体膜および細胞膜の正常性をFITC-PNA/PI染色(Nagy et al., *Biol Reprod*, 2003)で評価した。また、卵細胞質内への侵入後の受精段階に影響するクロマチン構造をトルイジンブルー染色(Beletti et al., *Braz. j. morphol. Sci*, 2005)で評価した。

### 3) DNA メチル化状態の評価

ウシ精子で受胎性と精子 DNA メチル化率に相関のある DNA メチル化可変領域 (DMR) が選定されている (Takeda et al., J Reprod Dev, 2021)。本検討ではそのうち一箇所のメチル化部位 (CpGF) のメチル化率について、受胎性の異なるグループ間および試験区間での比較を行った。DNA メチル化率の評価は、武田ら (Takeda et al., J Reprod Dev, 2021) の手法に従い、パイサルファイト処理後の精子 DNA を鋳型とした PCR および制限酵素処理による検出法である COBRA 法で評価した。

## 4. 研究成果

### 1) 運動特性の評価

高走流性精子の SMI について、高受胎群 ( $8.8 \pm 0.5$ ) および低受胎群 ( $8.4 \pm 0.9$ ) での差は見られなかった。SMI は、精子集団としての評価値であり、CASA による個々の精子運動計測値の平均値から算出される。そのため、個々の精子間で見られた動き方の違い (2つのパターン) が検出されにくいと考えられた。そこで、個々の精子の運動性の違いをより区別するため、供試精液中に含まれる全精子の運動計測値のクラスター分析および主成分分析を実施した。主成分分析の結果、主成分散布図は図 1 となり、主成分負荷量について、PC1 では VSL、VCL および VAP が負の方向に、PC2 では ALH が正の方向、BCF が負の方向に関連することが示された。これらはクラスター分析で分類される運動性の特徴を反映していた。主成分分析の結果に基づき、各区の個々の精子の運動性の特徴を分類したところ、対照区および残余区の精子群では運動速度を反映する PC1 における分布に二極化が見られ、微動精子がより多く含まれた。これに対して、選別区の精子群では、VAP 100  $\mu\text{m}/\text{秒}$  および BCF 16 Hz を超える精子が多く見られた。また、選別区では運動性の高い精子が異なる 2 群 (A, B) に分かれ、A 群では平均 VSL が 111.2  $\mu\text{m}/\text{秒}$ 、平均 VCL が 201.9  $\mu\text{m}/\text{秒}$ 、平均 ALH が 3.6  $\mu\text{m}$  であり、B 群では平均 VSL が 64.8  $\mu\text{m}/\text{秒}$ 、平均 VCL が 123.6  $\mu\text{m}/\text{秒}$ 、ALH が 1.4  $\mu\text{m}$  であった (図 2)。A 群、B 群に含まれる精子の割合を、受胎性の異なる精液グループ間で比較したところ、高受胎群 (A 群:  $64.4 \pm 18.6\%$ 、B 群:  $5.2 \pm 2.9\%$ ) および低受胎群 (A 群:  $71.6 \pm 5.8\%$ 、B 群:  $11.4 \pm 4.1\%$ ) で有意な差は見られなかった。以上より、主成分分析による個別精子の運動性解析により、高走流精子の運動性の特徴を明らかにできることが示された。一方で、受胎性の異なるグループ間における違いは検出されなかった。

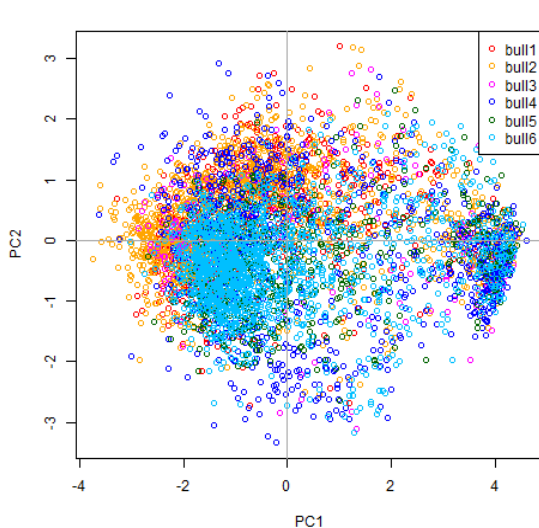


図 1. 全精子の主成分分析から得られた主成分得点 (PC1, PC2) の散布図

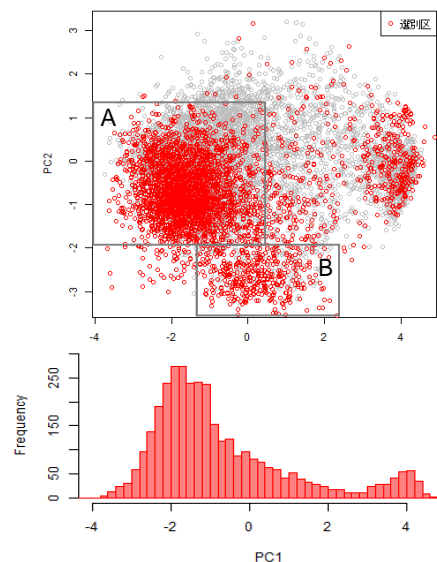


図 2. 高走流性精子における運動性の特徴

### 2) 先体、細胞膜、およびクロマチン正常性の評価

先体正常率および細胞膜正常率は、選別区で残余区と比較して高かった。一方で、選別区での比較では、高受胎群および低受胎群で先体正常率および細胞膜正常率に差が見られなかった。また、クロマチン正常性は、全ての精液で高い値であり、選別区における比較では、高受胎群および低受胎群のグループ間で差が見られなかった。以上より、本検討で供試した凍結精液における受胎性の差と、FITC-PNA/PI 染色で検出される先体損傷と細胞膜損傷、およびトルイジンブルー染色で検出されるクロマチン異常には関連性は見られなかった。

### 3) DNA メチル化状態の評価

ターゲットとしたメチル化部位 (CpGF) における高走流性精子の DNA メチル化率は、高受胎群で  $38.0 \pm 8.7\%$ 、低受胎群で  $44.3 \pm 6.0\%$  となり、有意な差は見られなかった (図 3)。また、試験

区間の DNA メチル化率にも有意な差はなく、選別処理の有無は解析したメチル化部位の DNA メチル化率に影響しないことが示唆された (図 3)。一方で、本検討で評価した CpG だけでなく、より網羅的な検討が必要であることが考えられた。

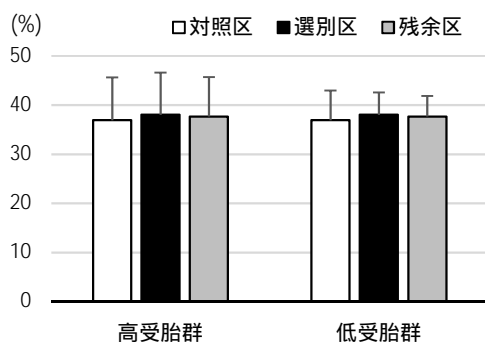


図 3. 走流性によって選別したウシ精子 CpG 部位における DNA メチル化率

#### まとめ

本研究では、マイクロ流体技術を用いて選別捕集した高走流性精子を対象とした精液評価を実施した。個々の精子に着目した運動解析により精子の運動の特徴を評価することが可能となった。今後、精液の受胎性や質に関わる運動の特徴を明らかにすることで、精液の評価項目として応用できる可能性が示された。本研究の成果について、現在論文投稿の準備を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ogata Kazuko, Nagata Maria Portia B., Nishizono Hirofumi, Yamanouchi Tadayuki, Matsuda Hideo, Ogata Yuki, Takeda Kumiko, Hashiyada Yutaka, Yamashita Kenichi	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 In vitro survival kinetics of microfluidic sorted bovine spermatozoa	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/andr.12958	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 緒方和子	4. 巻 43(3)
2. 論文標題 ウシ精子の受胎能にかかわる基礎的研究	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本胚移植学雑誌	6. 最初と最後の頁 153-156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 緒方和子, 小林栄治, 武田久美子.
2. 発表標題 ウシ精液の運動性評価への精子個別解析データの活用
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 緒方 和子
2. 発表標題 運動性の高い精子の選別捕集技術の活用に向けて
3. 学会等名 日本胚移植技術研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 緒方和子、小林栄治、山下健一、武田久美子
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスで捕集した高走流性ウシ精子の個別運動特性の解析
3. 学会等名 第6回日本胚移植技術研究会大会・第39回北海道牛受精卵移植研究会
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------