

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 15 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580389

研究課題名（和文）ブタの夏季不妊症を引き起こす精子の受精機能不全に対する臨床的治療法の開発

研究課題名（英文）Development of clinical therapeutic methods against failure of fertilizing functions causing summer infertility in boars

研究代表者

村瀬 哲磨（MURASE TETSUMA）

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：30303514

研究成果の概要（和文）：

夏季に悪化するブタ精液性状を改善し、年間を通して安定的な精液の供給およびひいては安定的な豚肉生産を確保するための方法を開発することを目的として、ブタにおける希釈液の改良および比較の目的でウシ凍結融解精子の性状を検査する新規方法の開発とその受精能力を上昇させる方法を検討した。その結果、改良したブタ希釈液により受胎率が上昇し、ウシ精子の新規検査法を見だし、また、ウシ精液の凍結に使用する希釈液を改良することにより精子機能の改善が可能であった。

研究成果の概要（英文）：

In an attempt to improving boar sperm quality which decreases in summer and stable provision with semen leading to stable production of pork during the year, this study investigated a new diluent for boar semen storage, a new method to evaluate frozen-thawed bull sperm quality and development of a method to improve fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. Bull spermatozoa were used as a reference to boar spermatozoa. Modified diluents for boar semen improved conception rates. In bulls, new method for sperm evaluation was found out and modification of diluent for freezing bull semen enabled improvement of sperm fertilizing ability.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
平成 22 年度	600,000	180,000	780,000
平成 23 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 臨床獣医学

キーワード：臨床繁殖・産科 精子

1. 研究開始当初の背景

世界的に地球温暖化の影響で動物の生殖機能の低下が世界的に危惧されている。一方、ブタの繁殖において毎年夏季不妊症により受胎成績が低下することは国内外を問わず

古くから知られている。このことは国内では、豚肉の安定供給を脅かす要因となっており、温暖化の進行はブタの夏季不妊症の問題を増強し、抜本的な対策が必要であるとの認識がなされている。また、ブタにおける夏季不

妊娠に関する問題の解決は、一般に哺乳動物の生殖に及ぼす温暖化の影響を解析することにもつながる重要な課題である。国外においては、ブタ精子の受精機能として精子の Heat shock protein 70 含量およびアクロシン活性に季節的な変化が起こることが確かめられている。

2. 研究の目的

本研究では、種雄豚において、夏季不妊症の発症する機序を明らかにする目的で、先体反応を調節する機構の中でセラミドの上流（スフィンゴミエリナーゼ (SMase) の活性化）の経路、および以下の点について一年を通して調べることににより夏季に異常となる精子機能の調節機構を明らかにする。(1) 一般精液性状、(2) 精子頭部の受精能獲得状況（クロールテトラサイクリン (CTC) 染色による受精能獲得した精子の割合）、(3) A23187 による先体反応の誘起率、(4) 精子の PLC 活性 (A23187 により刺激後、精子中の DAG 生成量)、(5) SMase 活性 (A23187 により刺激後、精子中セラミド生成量)、(6) cAMP アナログ (cBiMPS) により誘起される鞭毛の超活性化運動、(7) cBiMPS で刺激した後のタンパク質チロシン残基のリン酸化状況および (8) 体外受精による精子の侵入率及び侵入した精子の数を調べる。

3. 研究の方法

(1) 鞭毛の超活性化運動の誘起

精子を洗浄した後 cAMP アナログ (cBiMPS) の存在下で種々の時間培養し、精子の運動を位相差顕微鏡下で観察した。鞭毛の超活性化運動が誘起された精子の割合を調べた。

(2) 精子の先体反応の誘起

精子を洗浄した後カルシウムイオノホア A23187 の存在下で種々の時間培養し、精子の先体を位相差顕微鏡下で観察した。先体反応が誘起された精子の割合を調べた。また、阻害剤/増強剤が先体反応へ及ぼす影響を調べる場合は、種々の阻害剤の存在下で精子を前培養した後イオノホアにより精子を刺激し、同様に先体反応の誘起を調べた。

(3) タンパク質チロシンリン酸化

上記の培養した精子のタンパク質を SDS-PAGE により分離した。抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロット法によりタンパク質のチロシンリン酸化状況を調べた。

(4) 精子の免疫染色

精子における SPACA1 の局在を調べる目的で、塗抹固定した精子を、1 次抗体としてモルモット抗 SPACA1 抗体および 2 次抗体として TRITC 結合抗モルモット免

疫グロブリンポリクローナル抗体を使用し染色した。蛍光顕微鏡下で観察することにより SPACA1 の局在を調べた。

(5) 精漿の採取と脱塩

ウシ射出精液あるいはブタ希薄部精液を採取し、遠心分離により精漿を回収する。脱塩カラムを用いて脱塩し、溶出した精漿を保存し、分画ごとにタンパク質濃度および脱塩の正否を確認する目的で電解質濃度を測定した。また、ブタ精液を希釈・冷蔵保存する際に希釈液に脱塩した精漿を添加し、あるいはウシ精液を凍結保存する際にその希釈液に脱塩した精漿を添加した。

(6) 精液の保存

ブタ：濃厚部精液を採取し、BTS 希釈液で希釈度、17°C にて保存した。

ウシ：卵黄-トリスクエン酸を基礎とする通常の 1 次希釈液で射出精液を希釈後、冷却し、グリセロールを含む 2 次希釈液で 2 次希釈後液体窒素内に凍結保存した。精漿はブタにおいては BTS 希釈液に、ウシにおいては 2 次希釈液に添加した。

(7) 精子の先体反応観察

実験に応じて以下の方法を使用した。

① グルタルアルデヒド固定標本の観察による先体反応誘起率の測定 種々の処置後の精子をグルタルアルデヒドにより固定した後、位相差顕微鏡下で先体反応の有無を観察した。

② 蛍光色素による先体の染色 精子をパラホルムアルデヒドで固定後 Triton X-100 で透過処理し、あるいはエタノールで固定した後、FITC-PSA あるいは FITC-PNA により先体を染色した。蛍光顕微鏡下で先体を観察し、先体の損傷度を分類した。

(8) 一般精液性状検査

① 精子の運動性 位相差顕微鏡下で観察することにより主観的に判定した。

② 生存率 ヨウ化プロピジウム染色により測定した。

4. 研究成果

(1) 主な成果

① シクロオキシゲナーゼ (Cox) I 阻害剤により、カルシウムイオノホアにより誘起されるブタ精子の先体反応は抑制されたが、Cox II の阻害剤により先体反応はむしろ増強された。また、Cox II の阻害により蓄積するアラキドノイルエタノールアミドを添加するとカルシウムイオノホアにより誘起される先体反応が濃度依存的に増強された。以上のことから、ブタ精子の先体反応の誘起を調節する機構において、Cox I の下流に存在する反応経路が重要であるばかりでなく、Cox II の下流の反応経路はむしろ先体反応には関与が少な

く、その上流の代謝産物が膜融合に役割を果たしていることが示唆された。

② 比較の目的で低繁殖症ウシ精子の先体を調べる方法を検討した結果、精子の SPACA1 タンパク質の含量に個体差はほとんど見られなかったが、精子先体前部に分布するチロシンリン酸化型 SPACA1 タンパク質は低繁殖症の個体で少なく、このタンパク質でのチロシンリン酸化を正しく行えないことが低繁殖症の一因であると推定された。

③ 比較の目的でウシ精子を用い、受胎率低下の原因を検出するため先体の蛍光色素染色法の最適条件を検討し、従来のグルタルアルデヒド固定標本の検査法と比較した結果、固定・透過処理後 FITC-PNA 染色する方法が有効であるが、グルタルアルデヒド固定標本の方法も同様に有効であった。両方法による先体の正常率は受胎率の正常および低下した個体間で差が認められず、また、FITC-PNA 染色パターンの詳細な分類によっても差を検出できなかった。このことが他に低受胎の原因があったのであるか技術的な原因であるかは区別できなかった。また、前述のようなチロシンリン酸化型 SPACA1 のような分子の局在による低繁殖症を検出する検査法の重要性が確認された。

④ 電解質を含まないブタ精漿を得る目的で、脱塩カラムを使用したゲル濾過後のブタ精漿の性状を調べた結果、分画の最後の部分で少量の電解質が溶出することが判明した。ブタ精液の希釈液に添加し、精漿が持つ膜保護作用を利用した精子の保存性を高める可能性を検討したが、使用した精漿の由来する個体による相違が大きいことが判明した。

⑤ 脱塩したブタ精漿を凍結乾燥させた後、あるいはそのまま凍結保存した。保存後、BTS 希釈液に添加し、ブタ精液を希釈した。希釈精液を 17°C にて保存後、精子の先体反応を誘起した。その結果、一部の精漿サンプルの添加では先体反応は遅延した（最終的な先体反応誘起率は無添加と同じであった）。しかし、他のサンプルにおいては、保存後の精子の運動性が低下すること、先体反応の誘起が影響されないこと、が観察された。

比較の目的でウシ精液を用い、脱塩カラムを用いてゲル濾過したウシ精漿を凍結乾燥し、保存後希釈液に添加して精液を凍結保存した。精液を融解後カルシウムとカルシウムイオノホアにより誘起される先体反応（図 1）が遅延されることが示された。このことは、凍結融解によって起こる時期尚早な受精能獲得を精漿の添加により防止できる可能性を示唆する。

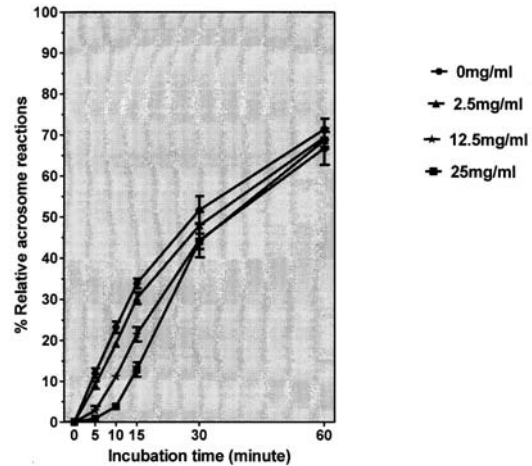


図 1. 脱塩・凍結乾燥した精漿を添加して凍結融解したウシ精子における先体反応誘起

⑥ 鞭毛の超活性化運動の誘起とタンパク質チロシン残基のリン酸化状況:特に夏季に採取したブタ精子を cAMP アナログ cBiMPS の存在下で培養し超活性化運動を誘起した場合、32 kDa のタンパク質のチロシンリン酸化が、特に培養の初期に、強く発現した。このことは、このタンパク質は先体の損傷に伴ってリン酸化を受けることが知られており、夏季に先体保有率が低下したという過去の報告と一致した。

⑦ 既存の希釈液 BTS (BTS-BD)、その重炭酸を HEPES に置換した BTS-HD、EDTA を EGTA に置換した BTS-BG および両者をそれぞれ EGTA と HEPES へ置換した BTS-HG を用いてブタ精液を人工授精した結果、3年間の総計で BTS-HD および BTS-BG の受胎率が他よりも高い傾向にあった。このことから重炭酸と EDTA は一方のみ添加する方が両者とも添加あるいは置換するよりも有効であると考えられた。

⑧ 成分として含まれる重炭酸を HEPES に置換した BTS 希釈液 (BTS-H) を使用して夏季の精子に見られる先体反応の過敏な誘起を緩和することが可能か否かを調べた。ブタ精液を通常の BTS 希釈液 (BTS-B) あるいは BTS-H で 5 倍希釈し、保存後 12 および 60 時間における精子の運動率と生存率を測定した結果両者に有意差は認められなかった (図 2 (A) および (B))。

また、精液を BTH-B あるいは BTS-H で段階的に希釈・保存後、精子の先体反応をカルシウムとカルシウムイオノホア A23187 により誘起したところ、BTS-B の精子は希釈倍率が高くなるに従って（重炭酸濃度はほぼ一定）先体反応誘起率が高まった (図 3(A))。一方 BTS-H で同様に段階希釈した場合は、希釈倍率に応じて先体反応誘起率は低下した (図 3(B))。以上のことから、BTS-H は希釈液として使用可能であり、夏季に受胎性低下を引き起こす先体反応の過敏誘起を緩和する可能性が示唆された。

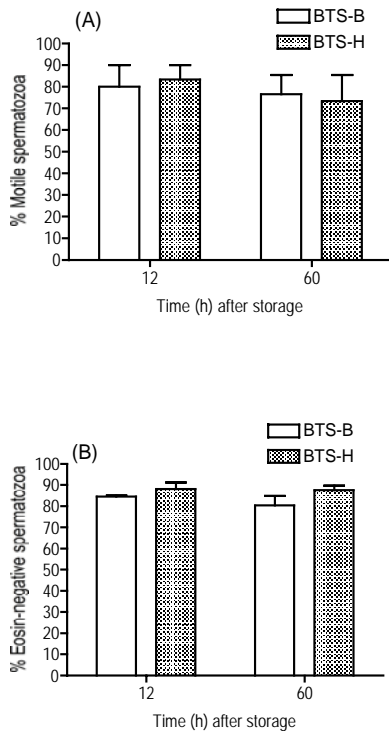


図2. BTS-BあるいはBTS-Hで希釈後におけるブタ精子の運動率(A)および生存率(B).

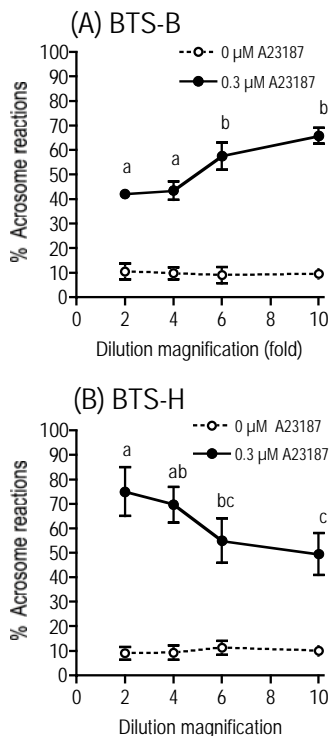


図3. BTS-B (A)あるいはBTS-H (B)で段階的に希釈・保存後において誘起した先体反応の変化.

(2) 国内における位置づけ

精液の安定的な供給という観点からのブタ夏季不妊症に関する研究は他に行われていない。近年受胎能力の低下し

た黒毛和種精子が発見されることが多く、このような精子を確実に検出する新規方法とその病態を解明する研究が行われている。一方、哺乳動物精子の先体反応を調節する機構に関する研究は国内では見当たらない。

(3) 国外における位置づけ

先体反応の分子機構に関する研究は数多く見られ、本研究で得られたブタ精子の先体反応におけるCoxI/IIを介した反応経路の関与はそのような流れの中に位置づけられる。また、国外においてもブタ精液性状が夏季に低下することは知られているので、これを緩和する方法を開発するための研究として位置づけられる。

(4) 国内におけるインパクト

夏季におけるブタ精液の安定的供給は豚肉の生産に必須であり、本研究の成果はこのための大きな貢献をした。また、2次的に得られたウシ精液の凍結保存用希釈液に脱塩した精漿を添加すると鞭毛の超活性化運動と先体反応の誘起が遅延することは、精液の受胎能力低下の原因の一つとして知られる時期尚早な受精能獲得を防止する方法となる可能性があり、国内において受胎能力の低下した種雄牛への応用が大きく期待された。

(5) 国外におけるインパクト

ブタにおける夏季の受胎率低下は国外でも同様であり、本研究の結果はこの対策に大きく貢献する。一方、ウシにおける人工授精後の受胎率は国内外を問わず年々低下の一途をたどっている。ブタで開発を予定していた精漿の利用が、ウシの凍結精液の受胎能力改善にも有効である可能性が示唆されたことは、ウシの受胎率向上に対する貢献が期待される。

(6) 今後の展望

組成を修正した希釈液のうち最も受胎率の高かった修正希釈液に脱塩精漿を添加することにより新たな希釈液を開発し、特に夏季における受胎率低下を防ぐことができる方法の開発を目指す。また、ブタにおいては添加する精漿の作用に個体差が大きかったことと運動性が添加により低下する例のあったことから、精漿の添加のみならずその代替となる添加剤の検討も開始する。一方、シクロオキシゲナーゼの先体反応における関与は、その阻害剤を使用することにより、夏季に起きる過敏な先体反応の誘起を調節できる可能性を秘めているので、このことについても検討が必要である。

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2件)

- ① Murase T., Imaeda N, Yamada H, Takasu M, Taguchi K, Katoh T. Dilution of boar ejaculates with BTS containing HEPES in place of bicarbonate immediately after ejaculation can reduce the increased inducibility of the acrosome reaction by treatment with calcium and calcium ionophore A23187, which is potentially associated with boar subfertility. J. Reprod. Dev. 査読有り, 56: 309-14 (2010).
- ② Harayama, H., Nishijima, K., Murase, T., Sakase, M., Fukushima, M. Relationship of protein tyrosine phosphorylation state with tolerance to frozen storage and the potential to undergo cyclic AMP-dependent hyperactivation in the spermatozoa of Japanese Black bulls. Mol. Reprod. Dev. 査読有り, 77: 910-21 (2010).

[学会発表] (計1件)

- ① Murase, T., Imaeda, N., Yamada, H., Harayama, H., Takasu, M., Taguchi, K., and Katoh, T. Desalting of boar seminal plasma by gel filtration. 11th International Symposium on Spermatology. Okinawa (2010年6月25日).

[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

村瀬 哲磨 (MURASE TETSUMA)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：30303514

(2)研究分担者

原山 洋 (HARAYAMA HIROSHI)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：30281140

三宅 正史 (MIYAKE MASASHI)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環・教授

研究者番号：60093316

(3)連携研究者

()

研究者番号：

