

人工授精成績の回復を目的としたウシ凍結保存精子の鞭毛機能の精密検査法の実用化

神戸大学大学院農学研究科・教授 原山 洋

■ 目的

牛肉生産に必要な仔牛の大部分は、種雄牛の凍結保存精子を使用した人工授精により生産されている。しかし人工授精による近年の仔牛生産効率(受胎率)の低下は直近 25 年間で 15%以上に達している。我々は低迷する人工授精成績を回復させるため、精子頭部の新規分子性状検査法を開発した。精子は父性ゲノムを格納する頭部と、卵子への移動と侵入に必要な推進力を発生させる鞭毛で構成される。このため精子機能は頭部と鞭毛で別々に検査される。鞭毛機能検査では運動率と運動様式が顕微鏡下で判定されるが、その結果が人工授精成績に反することは多く、これが成績不振の一因であると考えられている。本研究では、ウシの人工授精成績の回復を目的とし、人工授精に使用する凍結保存精子の鞭毛機能評価のための精密検査法の開発・実用化に資する実験を実施した。

■ 方法

実験試料

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で育成中の黒毛和種種雄牛候補を使用した。実験 1, 2 および 3 で使用した種雄牛候補の頭数はそれぞれ 10 頭, 9 頭および 3 頭で、実験 1 および 2 では凍結保存精子を、実験 3 では新鮮射出精子を使用した。

実験 1. 凍結保存精子の前進運動能力の観察

融解された凍結保存精子を希釈後に、加温した精液性状検査板にのせ、顕微鏡動画を撮影した。動画をコマ送り再生して精子の運動様式(ローテーション有の前進運動, ローテーション有の円運動, ローテーション無の前進運動, ローテーション無の円運動, 振動運動および不動)を観察した。

実験 2. 凍結保存精子の鞭毛超活性化運動能力の観察

融解された凍結保存精子を遠心洗浄後に cAMP アナログおよびプロテインホスファターゼ阻害剤含有 mKRH 液中でインキュベートした。インキュベーションの前後に試料を、加温した精液性状検査板にのせ、顕微鏡動画を撮影し、動画をコマ送り再生して精子の鞭毛運動様式を観察し、Full-type 鞭毛超活性化運動率を調べた。

実験 3. 新鮮射出精子における TRPC3 チャンネルの検出

遠心洗浄後の新鮮射出精子における TRPC3 チャンネルの検出をウェスタンブロットティングによりを試みた。なお、一次抗体には Santa Cruz Biotechnology 製抗 TRPC3 チャンネル抗体を使用した。

■ 結果および考察

実験 1. 凍結保存精子の前進運動能力の観察

各運動様式を示す精子の割合と人工授精の成績との相関をケンドールの順位相関係数により評価したところ、人工授精成績と有意な相関関係にあったのはローテーション有の前進運動を示す精子の割合のみであった。

実験 2. 凍結保存精子の鞭毛超活性化運動能力の観察

Full-type 鞭毛超活性化運動を示す精子の割合には大きな個体差が認められた。インキュベーション 1 および 2 時間後に Full-type 鞭毛超活性化運動率がピークを迎える雄個体はそれぞれ 3 頭ずつであったが、明確なピークを示さない個体も 3 頭認められた。

実験 3. 新鮮射出精子における TRPC3 チャンネルの検出

ウシ TRPC3 チャンネルに含まれるアミノ酸配列を認識する市販抗体を一次抗体として使用してウェスタンブロットティングを様々な条件で実施したが、ウシ精子での TRPC3 チャンネルの検出には至らなかった。

■ 結語

本研究の結果から、人工授精での受胎成績をより正確に予想するためには、前進運動を示す精子のローテーションの有無を観察することが有効であると考えられる。また卵との体内受精に必須の Full-type 鞭毛超活性化運動を示すための精子の能力には多様な個体差が存在すると考えられる。