

ニワトリ精子における休眠機構の解明：精液保存技術への応用

筑波大学生命環境系・助教 浅野 敦之

■ 目的

家禽精液の冷蔵液状保存は重要技術だが、精子の細胞膜やミトコンドリア代謝に障害を生じ、短時間で受精能力が劣化する。最近私はニワトリ精子の保存に、細胞内および外 Ca^{2+} 除去(EGTA-AM および EGTA)を用い活動休止を誘導することで冷蔵保存性を向上することを報告した。またそのメカニズムにエネルギー代謝ダイナミクスが関わることも明らかにした。本研究では、 Ca^{2+} 動態とメタボロームの点から液状保存性の原理を調べ、体外保存強化に向けた新技術の構築を目的とした。

■ 方 法

ロードアイランドレッド種(RIR)精液を、遠心洗浄後 Beltsville Poultry Semen Extender(BPSE)に懸濁した。

【実験 1：ニワトリ保存精子の Ca^{2+} 動態】

Ca^{2+} 除去の作用経路を調べるため、EGTA-AM、EGTA および EDTA を使って 48 時間保存した精子における細胞内カルシウム動態を、 Ca^{2+} 蛍光プローブ Fluo4-AM を使って調べた。

【実験 2： Ca^{2+} 除去ニワトリ保存精子のメタボローム解析】

Ca^{2+} 反応性エネルギー代謝の休止が生理的休眠を誘導する代謝経路を明らかにするため、EGTA および EGTA-AM 存在下で 48 時間保存した精子を HM700 メタボロミクス解析に供し、代謝産物の定量とバイオインフォマティック解析を行った。

【実験 3：休眠メカニズムと精子選別技術を合わせた保存技術の開発】

MIGLIS®(メニコン)はヒト生殖医療で通用される良好精子選別器である。そこで、精子選別法で回収した良好(G)精子に Ca^{2+} キレーターによる生理的休眠を誘導し、精子の体外保存性向上を試みた。なお精子機能と受精能をミトコンドリア膜電位と内卵黄膜(IPVL)通過試験で評価した。

■ 結果および考察

【実験 1：ニワトリ保存精子の Ca^{2+} 動態】

ニワトリ精子の Ca^{2+} は 48 時間保存により有意に増加した(0.14 mM vs 0.28 mM)。これに対して、EDTA、EGTA-AM および EGTA 処理区のそれは有意に低下した(0.08 mM、0.06 mM および 0.09 mM)。一方、それらに差は認められなかった。

【実験 2： Ca^{2+} 除去したニワトリ保存精子のメタボローム解析】

メタボロミクス解析の結果、計 348 種の代謝物を定量的に検出した。主成分分析、代謝物の変量解析比較、発現量、クラスタリング、および相関性解析、パスウェイ解析、オーバーラップ解析、ヒートマップ解析を行った。対 BPSE コントロールで EGTA-AM および EGTA はそれぞれ 6 および 9 の代謝物の調節を行うことで代謝関連経路に特徴的な変化を生むことが分かった。

【実験 3：休眠メカニズムと精子選別技術を合わせた保存技術の開発】

ミトコンドリア膜電位測定の結果、G および P 精子間に差は認められなかったことから、ミトコンドリア活性は G と P 形質との関係性が低いと考えられた。IPVL 通過試験の結果、EGTA 処理に MIGLIS® 前処理を組み合わせることで、48 時間保存精子の受精能力が改善されたことが分かった。

■ 結 語

EGTA と EGTA-AM は液状保存中の精子において共に Ca^{2+} 低下を誘導するが、代謝経路に明らかな差異が存在することが分かった。また Ca^{2+} 除去と MIGLIS® 前処理の組み合わせは、相乗的にニワトリ精液の保存性を改善できる。本研究の成果は、家禽精液の保存性強化に向けた新技術のみならず開発に有用な技術原理の一つを提供する。