

ニワトリ精子のエネルギー代謝を休眠させ、長期冷蔵保存する技術を開発

ニワトリ精子の細胞内外からカルシウムを除去してエネルギー代謝と細胞機能を休止させ、今までより長期間、受精能力を維持できる冷蔵保存技術の開発に成功しました。このような技術は、家禽の効率的な品種改良や希少遺伝資源の保存および増殖に貢献すると期待されます。

精子の体外保存技術は、卵が大きすぎて凍結保存できない鳥類において特に重要です。冷蔵保存は簡便かつ低コストで、産業への応用性の面から注目されてきました。しかし、鳥類の精子は一般的に低温耐性が低く、ニワトリの場合、冷蔵保存すると精子の細胞膜やミトコンドリアに重篤な障害を生じ、6～24時間以内に受精能力が失われます。このように短時間で受精能力を喪失してしまう一方で、ニワトリ精子は、受精のため雌の生殖器道に入ると3週間もの間、受精能力を維持する生命力も有しています。

本研究では、何がニワトリ精子の受精能力の維持と破綻を制御しているのかを調べました。

その結果、冷蔵保存したニワトリ精子の受精能力障害は、カルシウムイオンの細胞内への流入が起因となることが分かりました。そこで細胞内外からカルシウムイオンを除去すると、精子の受精関連機能の休止が誘導され、今までよりも長期間（3日間以上）、冷蔵保存できることが分かりました。

さらにそのメカニズムを調べると、細胞内外からのカルシウム除去は、さまざまな経路で精子のエネルギー代謝ダイナミクスに働きかけて、細胞の低酸素化、低 pH および運動性の一時休止など生理的休眠のような状態に誘導することが分かりました。

本研究成果は、カルシウムが受精機能の休止と再起動に関わる分子スイッチの一つであることを示しており、受精に際し、雌生殖器道で排卵を待たなければならない精子の生殖戦略に関わっている可能性があります。また、簡便な手法で今までより長い期間精子の冷蔵保存を可能にする技術は、養鶏のような多羽飼育産業や低コストで効率的な希少遺伝資源増殖法への応用に貢献すると期待されます。

研究代表者

筑波大学 生命環境系/つくば機能植物イノベーション研究センター

浅野 敦之 助教

Department of Animal Science, CALS, Cornell University, USA

Vimal Selvaraj (Professor of Integrative Physiology)



研究の背景

精子の体外保存は、特に卵が大きすぎて凍結保存できない鳥類において不可欠な技術です。一般的に、動物精子の保存には目的に応じて凍結か冷蔵法が用いられます。しかし低温耐性が低い家禽精子は、どちらの方法でも高い受精能力を維持するのが難しく、哺乳類家畜に比べ保存技術の整備が遅れています。冷蔵保存は低コストで且つ短時間で大量に保存できる手軽さから、畜産などの多頭羽飼育産業への応用性に優れていますが、ニワトリと七面鳥では精子の細胞膜やミトコンドリアに重篤な障害を生じ、6～24時間以内に受精能力が著しく劣化します。一方、家禽精子は受精のため雌の生殖器道に入るとニワトリで3週間、七面鳥で16週間もの間、受精能力を持続できます。何が精子の受精能力の維持と破綻をコントロールしているのでしょうか？ 遺伝子の運送に特化した精子は、効率的に推進力を生むため、ミトコンドリアを中心としたエネルギー代謝経路を鞭毛に集約し、複雑なネットワークを介して受精関連機能群を制御しています。

本研究では、エネルギー代謝の点から、冷蔵保存したニワトリ精子の機能障害メカニズムの解明と新規保存法の開発に取り組みました。

研究内容と成果

本研究では、ニワトリ精子を使った実験で、冷蔵保存期間が長くなると細胞膜のカルシウム透過性が上昇し受精機能の異常が発生することを見出しました。

そこで、さまざまな金属イオン除去剤と共に精子を冷蔵保存した結果、特に細胞外および細胞内カルシウムの特異的除去剤（EGTA および EGTA-AM）は、精子の生存性と運動能の保存を促進することが分かりました（参考図）。さらに人工授精^{注1}による体内受精試験の結果、これらの保存精子は長期（3日間以上）にわたり高受精能力を示すことから、冷蔵による細胞ダメージが少ないことが分かりました。

そこでエネルギー代謝経路群に着目し、このメカニズムを調べました。その結果、これら二つのカルシウム特異的除去剤は精子内の酸素利用性と pH を低下させ、細胞を生理的休眠のような状態に誘導することが分かりました。しかし、ミトコンドリア^{注2}の代謝機能を示す細胞内活性酸素量、ミトコンドリア膜電位および ATP 蓄積量について、EGTA と EGTA-AM との間で明確な違いが認められました。さらに、これらの差異は、ATP 異化反応^{注3}の主経路の一つで、鞭毛運動のモータータンパク質であるダイニン ATPase の活性動態と連動している可能性が示されました。

以上の結果を踏まえ、冷蔵保存したニワトリ精子から細胞外と細胞内カルシウムを除去すると、今までより長い期間、受精能力を高維持できることが分かりました。また、そのメカニズムには、ミトコンドリア機能と ATP 異化反応を統括するエネルギー代謝ダイナミクスの制御、さらには結果的に生じた細胞の低酸素化、低 pH および運動性の一時休止など生理的休眠に近い状態への誘導が関与していることが明らかになりました。

今回の成果は、カルシウムが受精機能の維持と破綻の決定に関わる分子スイッチの一つである可能性を示し、新たな精子保存技術の開発に向けた技術基盤となり得ます。また、簡便な手法で今までより長い期間精子の冷蔵保存を可能にする技術は、養鶏産業の効率化や低コストな希少遺伝資源増殖法への応用に貢献すると期待されます。

今後の展開

家禽精子の冷蔵保存性の向上について、古くから保存環境（温度、冷却速度、培養液組成、添加物）の点から技術的研究がなされてきました。本研究はニワトリ精子が本来有する受精能力の維持と破綻に関わる分子スイッチの作用メカニズムを明らかにし、長期冷蔵保存技術の新たな技術原理をもたらしまし

た。今後さらに、ニワトリ精子の未知の生理機能を解明し、長期細胞保存技術への応用を進めていきます。空を飛ぶ鳥は交配の機会が少なく、一回の交配で長期間受精卵を産み続けることで種の存続を図ってきた面があります。このような精子の長期受精能力維持のメカニズムを知ることは、受精にあたり雌生殖器官で待機し、排卵を待たなければならない精子の生殖戦略に迫るものと考えられ、空に活路を見出すことが出来た鳥類の特殊な生殖メカニズムの解明に貢献することが期待されます。

参考図

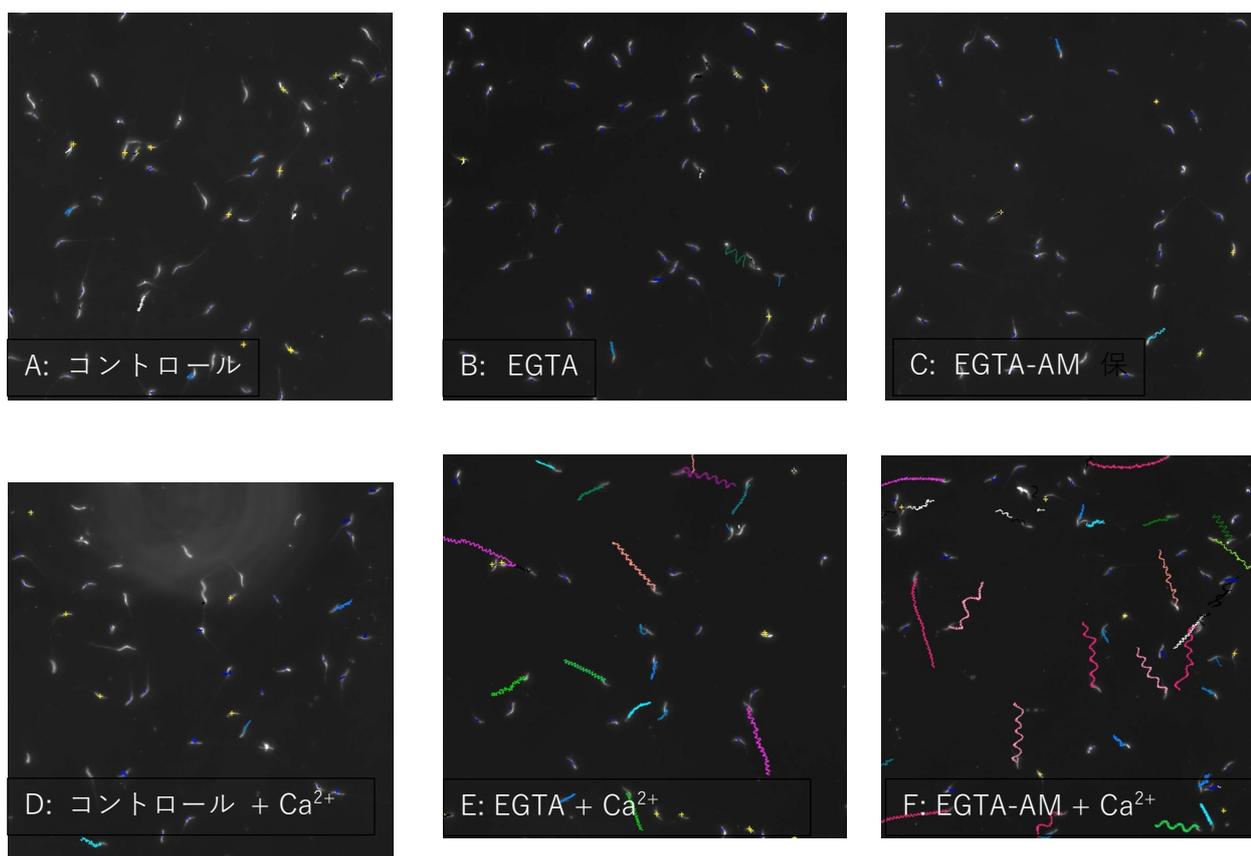


図 ニワトリ精子運動性の休止と再起動

さまざまな条件でニワトリ精子を72時間4°Cで冷蔵保存後、39°Cに温めて1秒間の運動軌跡を特殊な装置で追跡した。コントロール (A)、EGTA 添加 (B)、EGTA-AM 添加 (C) では、ほとんど運動性の回復がみられなかった。しかし、温める時にカルシウム (Ca²⁺) を添加すると、コントロール (D) に比べてEGTA 添加 (E) とEGTA-AM 添加 (F) では急速かつ劇的に運動性の回復がみられた。このことは、細胞内外からのカルシウム除去で、ニワトリ精子における受精能力の保存性を強化できることを示している。

用語解説

注1) 人工授精

精子を雌生殖器官内へ人工的に送り込む手技。これにより精子は、ニワトリで約3週間、七面鳥で約16週間もの間、排卵に合わせて受精を継続する。哺乳類家畜の精子は24時間程度しか受精能力を維持できない。

注2) ミトコンドリア

細胞のエネルギー源となるアデノシン三リン酸 (ATP) をつくる主要な小器官。通常、ATP の大量合成には細胞質に存在する解糖系と、ミトコンドリアに存在するトリカルボン酸回路と電子伝達系が連動する必要がある。精子はミトコンドリアを鞭毛の中片部に規則正しく旋状に集約し、さらに隣接する鞭毛主部に解糖系に関わる全ての酵素を配置している。これにより、効率的にエネルギーを代謝できる特徴がある。

注3) ATP 異化反応

ATP をより単純な物質に分解してエネルギーを取り出す反応のこと。鞭毛に存在するミトコンドリア ATPase とダイニン ATPase は精子における主な ATP 異化反応として知られる。ミトコンドリア ATPase は主に ATP 合成、ダイニン ATPase は鞭毛運動の駆動を担う点で違いがあるが、共に精子の鞭毛運動の駆動と維持に深く関与している。

研究資金

本研究は、科研費による研究プロジェクト (17KK0150、21H02377) の一環として実施されました。

掲載論文

【題名】 Arresting calcium-regulated sperm metabolic dynamics enables prolonged fertility in poultry liquid semen storage.

(カルシウム反応性エネルギー代謝の休止によるニワトリ精子の冷蔵保存性の向上)

【著者名】 PS. Sushadi, M. Kuwabara, EEW. Maung, MS. Mohamad Mohtar, K. Sakamoto, V. Selvaraj, and A. Asano

【掲載誌】 *Scientific Reports*

【掲載日】 2023年12月8日

【DOI】 <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48550-2>

問い合わせ先

【研究に関すること】

浅野 敦之 (あさの あつし)

筑波大学 生命環境系/つくば機能植物イノベーション研究センター (T-PIRC) 助教

URL: <https://trios.tsukuba.ac.jp/researcher/0000003190>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報局

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp