

= ミニレビュー =

精漿機能に着目した合成融解液の開発とそれを用いたブタ凍結精液の人工授精 Development of chemical defined thawing solution focused on the role of seminal plasma, and its application to artificial insemination of cryopreserved boar semen

岡崎 哲司^{1,†}, 秋好 禎一¹, 森 学¹, 手島 久智¹, 島田 昌之²

Tetsuji OKAZAKI^{1,†}, Teiichi AKIYOSHI¹, Manabu MORI¹, Hisanori TESHIMA¹
and Masayuki SHIMADA²

¹大分県農林水産研究指導センター 畜産研究部, 〒879-7111 大分県豊後大野市

²広島大学大学院 生物圏科学研究科 生殖内分泌学, 〒739-8528 広島県東広島市

[†]責任著者: okazaki-tetsuji@pref.oita.lg.jp

要旨

ブタ凍結精液による人工授精技術は、貴重な雄個体の遺伝資源保存や発情適期に人工授精が可能になるなど現場ニーズがあるにもかかわらず、実用化されていないのが現状である。我々はこれまでに、融解直後の精子に生じるクライオキャパシテーションが人工授精後の低受胎の原因であること、精漿はそれを抑制し、精漿含有融解液を用いることで高い繁殖成績が得られることを明らかとしてきた。しかし、精漿には伝染性ウイルス疾病を招く危険性があることから、精漿の機能を補完した合成融解液の開発が求められている。融解後のクライオキャパシテーションは細胞外の Ca^{2+} を取り込むことで助長され、精漿はそれを抑制していたことから、これらの現象に Ca^{2+} が関与していると考えられる。細胞外 Ca^{2+} キレーターである EGTA の融解液への添加は精子細胞内 Ca^{2+} 上昇と、それに起因するクライオキャパシテーションを抑制した。また、融解後の精子の運動率、体外および体内受精率も改善したことから、EGTA の有効性が確認された。しかし、EGTA 融解液による人工授精では、卵管内受精率は高いにもかかわらず、胎子の着床率は 51% と非常に低く、さらに、着床胎子においても、その死亡率が高かった。この結果から、精漿には免疫抑制因子が存在し、これらが、精子が抗原となり遊走された白血球による胚の貪食を防ぐと仮説を立てた。精漿中から強い免疫抑制作用を有する cortisol を同定し、融解液への cortisol 添加は、凍結精液を人工授精後 24 および 48 時間の子宮腔内白血球数を有意に抑制し、正常妊娠モデルとなる「液状精液による人工授精」の子宮内白血球数と類似した動態を示した。この EGTA および cortisol を添加した合成融解液で人工授精した場合の着床率は飛躍的に向上し、繁殖成績も受胎率が 84%、一腹産子数 10.1 頭と実用化レベルに達した。本ミニレビューでは、ブタ精漿は精子機能性のみでなく、子宮内の免疫系を制御するという新しい知見について解説すると共に、それを基に開発した凍結精液における合成融解液について紹介する。

キーワード: ブタ, 精漿, 凍結精液, 人工授精, 免疫

序論

ブタにおける凍結精液を用いた人工授精は、優秀な遺伝形質を有する雄ブタの後代を獲得するため一部の研究機関で行われているのみで、生産現場ではほとんど利用されていない。ブタにおける凍結精液技術は、優

秀な雄個体の遺伝資源保存や発情適期に人工授精ができるなど経済的な価値は高いことからその開発研究は進められている[4,7,20,28,31]。しかし、人工授精による受胎率は 50%、一腹平均産子数は 5 頭程度と液状精液(受胎率 80%、一腹平均産子数 10 頭程度)と比較す

投稿日: 2012年6月10日

掲載決定日: 2012年8月6日

ウェブサイト事前公開日: 2012年8月8日

るとその差は歴然である[12,13]。この低繁殖性の主因は、精子凍結融解後の低い生存性および運動性であり、これには凍結時のダメージのみでなく、凍結融解時の温度ストレスによって生じる自発的なキャパシテーション(クライオキャパシテーション)が密接に関わっていることが報告されている[3,35]。近年、我々は、キャパシテーション抑制作用を有する精漿を融解液へ添加することでクライオキャパシテーションの指標となる精子タンパク質のチロシン残基のリン酸化と、その後誘起される先体反応を抑制でき、人工授精後の繁殖成績が向上したことを報告している[21,22]。この精漿含有融解液による人工授精は、液状精液と同等の繁殖成績を示すことが可能だが、精漿には豚繁殖・呼吸障害症候群(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、サーコウイルス II 型 (porcine circovirus type 2, PCV2)、パルボウイルス(porcine parvovirus, PPV)およびオーエスキーウイルス(Aujeszký's disease, ADV) など現在経済損失を増大させているウイルスが排出される[10,14,16]。したがって、このようなウイルスが存在しない SPF (specific pathogen-free)農場や非感染農場では疾病を蔓延させると懸念される。また、精漿成分は季節毎、個体毎によって大きく変動すること[19]から精漿含有融解液の性質を安定化させることが困難である。そのため、全ての農場で安定的かつ安全に使用可能にするためには精漿の正の作用を探究し、融解液に精漿を添加せずとも、同等の機能を有する合成融解液の開発が求められる。これまでに、凍結融解精子における精漿の役割はほとんど明らかとされていない。本ミニレビューでは、精漿の機能解析を経て得られた知見を基に合成融解液を開発した我々の研究を紹介すると共に、それを用いた人工授精試験についても報告する。

クライオキャパシテーションの抑制 -Ca²⁺キレート剤 EGTA の効果-

射出精子におけるキャパシテーションは精子細胞内の Ca²⁺ の急激な増加によって誘起される[1,2]。この細胞内 Ca²⁺ の上昇は、細胞外からの Ca²⁺ 流入が初期のトリガーとなり、細胞内の Ca²⁺ ストアからイオンが放出されるためと考えられている[34,36]。一方、凍結融解後の精子においては、凍結融解刺激による原形質膜の物理的損傷により、Ca²⁺ チャンネルを介さずに直接細胞内へ流入すると考えられる。そこで、まず、ブタ凍結融解精子においても細胞内 Ca²⁺ が増加しているか否かを細胞内 Ca²⁺ 指示薬である Fluo-3/AM を用いて観察した。その結果、融解直後から精子頭部および中片部で強い Ca²⁺ シグナルが検出され、培養時間に依存してシグナル強度は増加した[23]。これらの精子ではタンパク質の

チロシン残基のリン酸化が検出され、クライオキャパシテーションが誘起されており、さらに、培養液へ Ca²⁺ を添加することでそれらは増大した。一方、培養液に 10% (v/v) 精漿を添加すると、Ca²⁺ 依存性のクライオキャパシテーションは完全に抑制されていた。つまり、融解時の精子に起こるクライオキャパシテーションは細胞外 Ca²⁺ により制御され、かつ精漿の作用により Ca²⁺ の流入を抑制していると示唆された。そこで、このような精漿の機能を模倣するため、細胞外 Ca²⁺ に高い親和性を示す 2 価イオンキレート剤であるグリコールエーテルジエチレンジアミン四酢酸 (EGTA; *O,O'*-Bis (2-aminoethyl) ethyleneglycol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid)) が細胞内 Ca²⁺ 上昇とクライオキャパシテーションにどのような影響を及ぼすか検討した。融解液への 6 mM EGTA 添加は、精漿添加時と同様にクライオキャパシテーションを抑制し、さらには、融解後に持続的に観察される細胞内 Ca²⁺ 上昇は認められず、その効果は長時間の培養でも保持されていた。これらの結果から、精漿の有するクライオキャパシテーション抑制作用は EGTA の融解液への添加で模倣できることが示された。

通常、融解液として用いられる Modena 液には 2 価イオンをキレートする EDTA が 6 mM 含まれている[8]。しかし、EDTA は Ca²⁺ に対する親和性が EGTA と比べて低く、溶液中の Ca²⁺ を完全にキレートするためには、これ以上の高濃度を添加する必要がある。この高濃度 (12 mM) の EDTA 添加は、融解後の運動率を低下させた[23]。この結果は、EDTA は Ca²⁺ をキレートすると共に、精子の運動能に関与していると報告されている Zn²⁺、Mg²⁺ などの他の二価イオン[15,17,32]も同時にキレートしたためと推察される。一方で、EDTA には 2 価イオンをキレートすることで、抗酸化作用を示すという正の効果も存在する。実際、精子運動率および細胞膜正常率を指標にすると EGTA の効果は 6 mM EDTA の存在下で増強された。また、これら条件で培養した精子は、非常に高い運動率が長時間持続したことから、融解液へ EDTA と EGTA を併用することが重要であると結論づけた。このようにして開発した EDTA および EGTA を添加した融解液にて作出した凍結融解精子を体外受精および人工授精に供試したところ、通常使用される Modena 液で作出したものと比較して、いずれも有意に高い受精率を示したことから(図 1)、EGTA により抑制状態にあったキャパシテーションは受精時に可逆的に誘起され、これら精子は高い受精能を保持していることが明らかとなった。以上の結果から EDTA および EGTA 添加融解液は融解時に誘起されるクライオキャパシテーションを抑制し、高い運動率を維持させることで人工授精に有効なツールであることが示された。

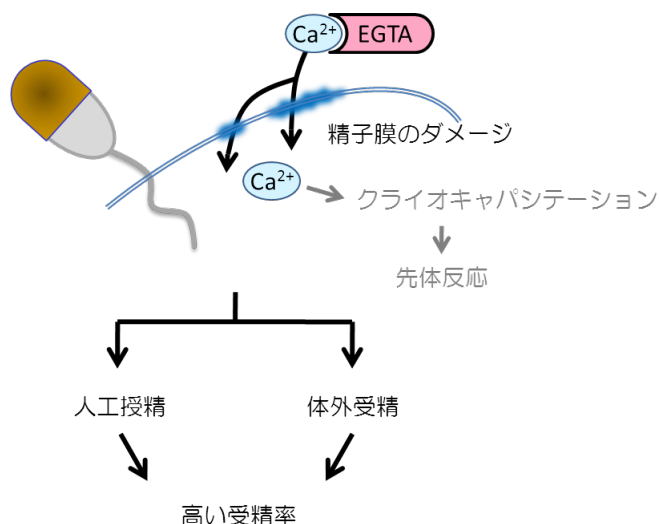
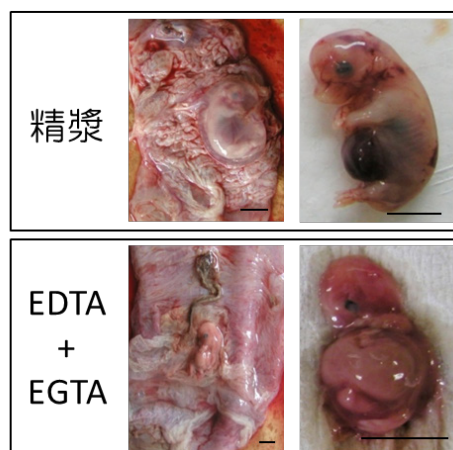
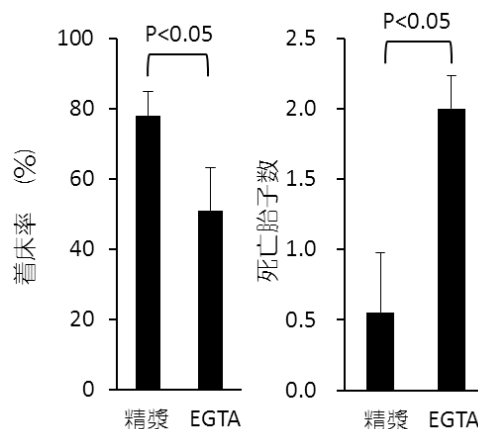


図 1. 融解液へ添加する EGTA の効果

融解液へ添加された EGTA は、細胞外 Ca²⁺ をキレートすることで、クライオキャパシテーションおよびその後誘起される先体反応を抑制する。これら EGTA の作用により、体外および人工授精後の受精率は改善される。

図 2. 精漿含有および EDTA と EGTA を含有した融解液により人工授精した着床率と胎子の様子
精漿を包含していない合成融解液では着床率が低く、さらには、着床胎子の死亡率が増加する。(スケールバー = 10 mm)



着床を促進する精漿中因子 -cortisol の免疫抑制作用-

上述した EDTA および EGTA 添加融解液を用いた人工授精で十分な数の着床胎子が得られるかを確認するため、PMSG-hCG により過排卵処理を施した雌ブタに 1 回 (50×10^8 sperm/ml) 人工授精後、30 日後の子宮を回収し、着床率 (胎子数/黄体数) を算出した。その結果、EDTA と EGTA 添加融解液を用いた場合、着床率は 51% と低く、対照とした精漿 10% (v/v) 含有した融解液を用いた場合では 78% と有意な差が認められた (図 2) [Okazaki and Shimada, unpublished data]。さらに、精漿を全く包含していない EDTA および EGTA 添加融解液では、着床胎子が免疫細胞による食作用を受け、死滅しているものが多く観察された。これらの結果から、精漿中に子宮内の免疫系を制御し、胚の着床を促進 (あるいは正常化) させる因子が存在しているのではないかと推察した。

人工授精後に子宮内に遊走される白血球は、子宮腔内に残留した死滅精子を貪食し、子宮環境を整える役割がある [18]。一方、Rozeboom *et al.* [29,30] は、これらの白血球が精漿存在下では人工授精後 24 時間以内に消失することを報告している。また、マウスおよびヒト精漿には、種々のサイトカイン・ケモカインや抗炎症性ステ

ロイドホルモンなどが含まれていることが示されている [9,24,33]。したがって、精漿中の免疫抑制因子が、人工授精後の精子が抗原となって起こる細胞性免疫能を抑制し、胚が子宮へ到達した時にはその免疫力は低下し、白血球による胚への侵襲を抑制していると考えた。しかし、ブタ精漿中の免疫抑制因子と人工授精後の子宮内環境、さらには、それらが繁殖成績にどのように関与しているかについては全く明らかとされていない。そこで、ステロイドホルモンを中心に精漿中免疫抑制因子の同定を試みた。その結果、精漿中には免疫抑制作用を有する cortisol が 0.92 ng/ml 濃度で存在することが EIA により明らかとなった。cortisol は prostagrandin (PG)、leukotriene などの炎症性物質を阻害する [6] 他、細胞質に局在する glucocorticoid receptor (GR) に結合し、核内へ移行後、NF- κ B responsive element を負に制御することで炎症性サイトカイン (*Il-1*、*Il-2*、*Il-5*、*Il-6* など) 遺伝子の転写を抑制する。さらには、抗炎症性サイトカイン遺伝子 (*Lipocortin*、*Il-1R antagonist*、*I κ - β*) を転写させることで、初期自然免疫の際に遊走される好中球などの白血球遊走を阻害する [5]。この cortisol の子宮内免疫抑制作用を、人工授精後の子宮腔内白血球数を指標に検討した。人工授精後 6 時間で子宮内に多核白血球 (polymorphonuclear leukocyte, PMN) が遊走され、その

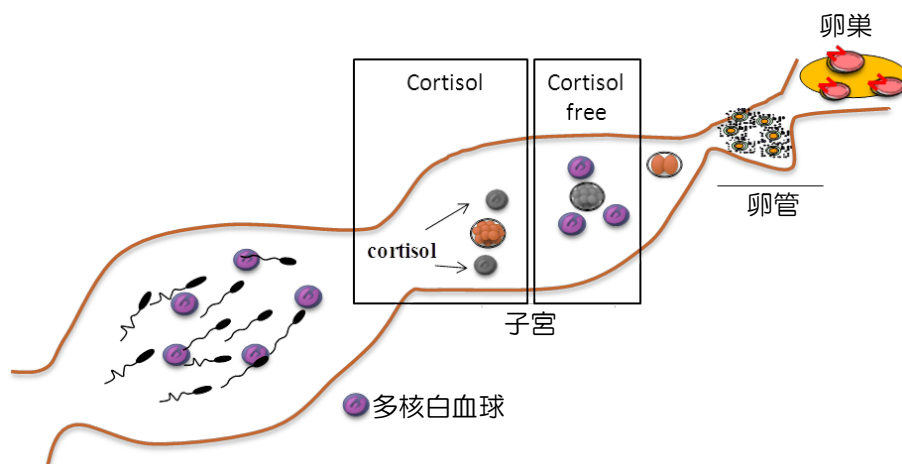


図 3. 注入する cortisol と子宮内免疫系および胚の生存について
人工授精後、精子を異物認識し、子宮内は多核白血球で充満される。人工授精時に子宮内へ注入される cortisol は、細胞性免疫を抑制し、胚の生存を担保する。

数は、液状精液、cortisol 無添加および添加凍結融解精液いずれを注入した処理区間でも有意な差は認められなかったが、人工授精後 24 および 48 時間後において、cortisol 無添加凍結融解精液を注入したそれは有意に高い値を示し、子宮内へ cortisol を注入することでこれらは精漿を含有する液状精液と同水準にまで低下した。これらの結果から、精漿中に含まれる cortisol は子宮内で精子など異物に対して遊走される好中球を人工授精後 24 時間以内で減少させる免疫抑制作用をもつことが明らかとなった(図 3)。

精漿中の生理活性物質が子宮内膜細胞に作用し、着床サイトでのリンパ球誘引および分化を促すことで着床を成立させることもマウスやヒトで報告されている。着床期の子宮粘膜中のリンパ球は、父性抗原をもつ半同種移植片(semi-allograft) である胎子を侵襲しないため、着床サイトのリンパ球が細胞障害作用の低下した子宮内特異的な uterine NK-cell (uNK)と CD4⁺ helper T-cell (Th2) へと分化している。近年、Robertson *et al.* [25,26,27]および Gutsche *et al.* [11]は、精漿中の TGF-β と IL-8 が子宮粘膜細胞に作用することが着床サイトでのリンパ球集積と分化に重要であると報告している。我々はブタにおいて、精漿中に炎症性サイトカインであるマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) や IL (interleukin)-17 を、抗炎症性サイトカインとして IL-13 を検出していること、着床期の子宮粘膜細胞に T-cell マーカーである CD3⁺ cell が散在していることを見いだしている[Okazaki, unpublished data]ことから、ブタにおいても着床に重要な子宮粘膜中の T-cell が存在し、精漿がそれらに何らかの役割を果たしているかもしれない。今後、このような視点で精漿が胚の着床に果たす役割を研究していく必要がある。

2 価イオンキレート剤(EDTA+EGTA)および cortisol 含有融解液による人工授精テスト

私これまでの研究で、cortisol が子宮腔内の白血球数を減少させ、細胞性免疫能を抑制させることが明らかとなったことから、自然発情中の雌ブタへ EDTA、EGTA および cortisol 含有合成融解液を用いて凍結融解精液の人工授精を行い、その繁殖成績を算出した。その結果、人工授精後 30 日齢における子宮内の胎子着床率は 83%へと向上し、その値は、精漿を 10% (v/v) 包含した融解液を用いた場合(78%)と遜色ないものであった。さらに、現場実証試験として、81 頭の自然発情中の雌ブタに、3 回の人工授精 (5×10^9 sperm/回) を実施した。受胎率は 80%で、一腹平均産子数は 10.1 頭という好成績を示した。対照区として、これまでに開発してきた精漿含有融解液を用いて人工授精した成績、受胎率 81%、一腹平均産子数 10.3 頭と比較しても有意な差は認められなかったことから、本研究で開発された合成融解液は産業上においても十分利用可能なものであると示された。

ステロイドホルモンである cortisol の注入は、胎子と母体へ副作用を及ぼす懸念があるが、子宮へ注入する cortisol 量は、ブタの炎症の治療時に投与する量に比較して 1/10,000 程度であり、精漿に含有する量と注入量が同程度であること、かつ、cortisol は代謝分解が早いこと、産子の一週齢平均体重、その後の発達も正常であることから、本融解液を用いた人工授精は安全面においても影響はないと考えられる。

謝辞

今回の試験遂行にあたり、豚の飼養管理および人工授精に御協力頂いた工藤 一男、伊東 昭司、藤原 弘

樹 氏に感謝申し上げます。なお、本成果は、生物系特定産業技術研究支援センターにおけるイノベーション創出基礎的研究推進事業により行われたものである。

参考文献

1. **Bae Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M, Florman HM.** Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1999; 96: 6757–6762.
2. **Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G.** Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front. Biosci.* 2000; 5: E110–123.
3. **Barbas JP, Mascarenhas RD.** Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 2009; 10: 49–62.
4. **Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S.** Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology* 2009; 72: 930–948.
5. **De Bosscher K, Haegeman G.** Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* 2009; 23: 281–291.
6. **Durham SR.** The inflammatory nature of allergic disease. *Clin. Exp. Allergy.* 1998; 28 Suppl 6: 20–24.
7. **Flores E, Cifuentes D, Fernández-Novell JM, Medrano A, Bonet S, Briz MD, Pinart E, Peña A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE.** Freeze-thawing induces alterations in the protamine-1/DNA overall structure in boar sperm. *Theriogenology* 2008; 69: 1083–1094.
8. **Funahashi H, Sano T.** Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. *Theriogenology* 2005; 63: 1605–1616.
9. **Gopichandran N, Ekbote UV, Walker JJ, Brooke D, Orsi NM.** Multiplex determination of murine seminal fluid cytokine profiles. *Reproduction* 2006; 131: 613–621.
10. **Guérin B, Pozzi N.** Viruses in boar semen: detection and clinical as well as epidemiological consequences regarding disease transmission by artificial insemination. *Theriogenology* 2005; 63: 556–572.
11. **Gutsche S, von Wolff M, Strowitzki T, Thaler CJ.** Seminal plasma induces mRNA expression of IL-1beta, IL-6 and LIF in endometrial epithelial cells *in vitro*. *Mol. Hum. Reprod.* 2003; 9: 785–791.
12. **Johnson LA, Aalbers JG, Willems CMT, Sybesma W.** Use of boar spermatozoa for artificial insemination. 1. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sow on 36 farms. *J. Anim. Sci.* 1981; 52: 1130–1136.
13. **Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC.** Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 62: 143–172.
14. **Kim J, Han DU, Choi C, Chae C.** Simultaneous detection and differentiation between porcine circovirus and porcine parvovirus in boar semen by multiplex seminested polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Sci.* 2003; 65: 741–744.
15. **Lapointe S, Ahmad I, Buhr MM, Sirard MA.** Modulation of postthaw motility, survival, calcium uptake, and fertility of bovine sperm by magnesium and manganese. *J. Dairy Sci.* 1996; 79: 2163–2169.
16. **Maes D, Nauwynck H, Rijsselaere T, Mateusen B, Vyt P, de Kruif A, Van Soom A.** Diseases in swine transmitted by artificial insemination: an overview. *Theriogenology* 2008; 70: 1337–1345.
17. **Magnus O, Brekke I, Abyholm T, Purvis K.** Effects of manganese and other divalent cations on progressive motility of human sperm. *Arch. Androl.* 1990; 24: 159–166.
18. **Matthijs A, Harkema W, Engel B, Woelders H.** *In vitro* phagocytosis of boar spermatozoa by neutrophils from peripheral blood of sows. *J. Reprod. Fertil.* 2000; 120: 265–273.
19. **Murase T, Imaeda N, Yamada H, Miyazawa K.** Seasonal changes in semen characteristics, composition of seminal plasma and frequency of acrosome reaction induced by calcium and calcium ionophore A23187 in Large White boars. *J. Reprod. Dev.* 2007; 53: 853–865.
20. **Okazaki T, Abe S, Shimada M.** Improved conception rates in sows inseminated with cryopreserved boar spermatozoa prepared with a more optimal combination of osmolality and glycerol in the freezing extender. *Anim. Sci. J.* 2009; 80: 121–129.
21. **Okazaki T, Abe S, Yoshida S, Shimada M.** Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. *Theriogenology* 2009; 71: 491–498.
22. **Okazaki T, Akiyoshi T, Kan M, Teshima H, Shimada M.** Artificial insemination trial of Frozen-thawed boar spermatozoa with thawing solution containing seminal plasma (abstract). *Jpn. J. Swine Sci.* 2011; 48: 164–168.
23. **Okazaki T, Yoshida S, Teshima H, Shimada M.** The addition of calcium ion chelator, EGTA to thawing solution improves fertilizing ability in frozen-thawed boar sperm. *Anim. Sci. J.* 2011; 82: 412–419.
24. **Politch JA, Tucker L, Bowman FP, Anderson DJ.** Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Hum. Reprod.* 2007; 22: 2928–2935.
25. **Robertson SA.** Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue. Res.* 2005; 322: 43–52.
26. **Robertson SA.** Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. *J. Anim. Sci.* 2007; 85: E36–44.
27. **Robertson SA, Ingman WV, O'Leary S, Sharkey DJ, Tremellen KP.** Transforming growth factor beta--a mediator of immune deviation in seminal plasma. *J. Reprod. Immunol.* 2002; 57: 109–128.
28. **Roca J, Carvajal G, Lucas X, Vazquez JM, Martinez EA.** Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 2003; 60: 77–87.
29. **Rozeboom KJ, Troedsson MH, Crabo BG.** Characterization of uterine leukocyte infiltration in gilts after artificial insemination. *J. Reprod. Fertil.* 1998; 114: 195–199.
30. **Rozeboom KJ, Troedsson MH, Rocha GR, Crabo BG.** The chemotactic properties of porcine seminal components toward neutrophils *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 2001; 79: 996–1002.
31. **Sancho S, Casas I, Ekwall H, Saravia F, Rodriguez-Martinez H, Rodriguez-Gil JE, Flores E, Pinart E, Briz**

- M, Garcia-Gil N, Bassols J, Pruneda A, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S.** Effects of cryopreservation on semen quality and the expression of sperm membrane hexose transporters in the spermatozoa of Iberian pigs. *Reproduction* 2007; 134: 111–121.
32. **Stock CE, Fraser LR.** Divalent cations, capacitation and the acrosome reaction in human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1989; 87: 463–478.
33. **Tarter TH, Cunningham-Rundles S, Koide SS.** Suppression of natural killer cell activity by human seminal plasma in vitro: identification of 19-OH-PGE as the suppressor factor. *J. Immunol.* 1986; 136: 2862–2867.
34. **Treviño CL, Felix R, Castellano LE, Gutiérrez C, Rodríguez D, Pacheco J, López-González I, Gomora JC, Tsutsumi V, Hernández-Cruz A, Fiordeliso T, Scaling AL, Darszon A.** Expression and differential cell distribution of low-threshold Ca^{2+} channels in mammalian male germ cells and sperm. *FEBS. Lett.* 2004; 563: 87–92.
35. **Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 60-61: 481–492.
36. **Wennemuth G, Westenbroek RE, Xu T, Hille B, Babcock DF.** $\text{CaV}2.2$ and $\text{CaV}2.3$ (N- and R-type) Ca^{2+} channels in depolarization-evoked entry of Ca^{2+} into mouse sperm. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 21210–21217.



Japan Society for Reproduction Engineering