

自己評価報告書

平成23年 5月 3日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20580305

研究課題名（和文）凍結乾燥ウシ精子の同種および異種顕微授精系による評価

研究課題名（英文）Evaluation of freeze-dried bull spermatozoa by intra- or inter-species microinsemination

研究代表者 保地 眞一 (HOCHI SHINICHI)

信州大学・繊維学部・教授

研究者番号：10283243

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 応用動物科学

キーワード：ウシ精子、顕微授精、凍結乾燥、カルシウムオシレーション、DNA脱メチル化、ガラス化保存、

1. 研究計画の概要

本研究の目的はウシ精子の凍結乾燥する際の最適条件を決定し、長期間冷蔵保存した後にでも正常な受精シグナルを発する能力をもつことを同種および異種顕微授精系によって証明することである。大きく分けて、排卵マウス卵子を用いた異種顕微授精系と体外成熟ウシ卵子を用いた同種顕微授精系を使い、これらを同時に走らせる。前者ではカルシウムオシレーション動態追跡による精子由来卵活性化因子 (SOAF) の活性を調べ、後者では雄性ゲノムの脱メチル化動態、精子中心体の微小管形成中心 (MTOC) 機能解析、ならびに胚盤胞作製とその質的評価、を行う。またウシ卵細胞質内精子注入法 (ICSI) 系による胚盤胞作製を本格化させるまでには、ICSI 胚に補填する活性化処理の最適化を図っておく必要がある。さらに胚盤胞の受卵牛子宮への移植の実施を想定すると、ICSI 由来ウシ胚の凍結保存技術の確立も望まれる。

2. 研究の進捗状況

(1) 0.37 hPa、14時間と 0.001 hPa、3時間の凍結乾燥処理後に1年間、+25、+4または-196℃で保存したウシ精子が卵子活性化誘起活性を保持しているかを確かめるため、排卵マウス卵子への異種顕微授精を行ってカルシウムオシレーションの発現パターンを共焦点レーザー顕微鏡下で調べたところ、反復性の細胞内カルシウムイオン濃度の増加は凍結乾燥後の保存温度に関わらず 54～58%の割合でマウス卵子に起こったが、凍結乾燥していない精子を注入したときの 79%

よりは低かった。体外成熟ウシ卵子への同種顕微授精を行って核相の変化を追跡したところ、減数分裂再開ウシ卵子の割合 (48～57% vs 70%) や前核形成卵子の割合 (27～34% vs 64%) にも同様の傾向、すなわち致命的ではないものの凍結乾燥区では対照区よりも受精初期のシグナル伝搬が遅れるあるいは劣る傾向が認められた。

(2) 凍結乾燥ウシ精子の ICSI によって作製された前核期卵におけるエピジェネティクス、とくに雄ゲノムの能動的脱メチル化動態を調べた。凍結乾燥後1年間、+4℃で保存したウシ精子で顕微授精させた前核期卵の雄ゲノムにおける脱メチル化レベルを体外受精卵のそれと比較したところ、雄ゲノムの能動的脱メチル化現象は体外受精からは10時間以内、顕微授精 (新鮮対照精子使用) からは6時間以内に開始しており、雌ゲノムのメチル化レベルを1とした雄ゲノムの相対的メチル化レベルは0.4から0.6程度の値を示した。少なくとも凍結乾燥行程が精子に加わることによって雄ゲノムに能動的脱メチル化が誘起される時期や脱メチル化のレベルに特筆すべき問題は生じなかった。

(3) ICSI 由来胚盤胞作製に取り組むに先立ち、卵子活性化誘起の方法を見直した。ICSI 直後に5 μM イオノマイシンで5分間処理し、4時間後に7%エタノールで5分間処理することにより、約30%の胚盤胞発生率が得られるようになった。また、ICSI 由来ウシ胚盤胞の凍結保存技術を高度化するため、ヒト ES 細胞においてアポトーシス抑制に有効なことが報告されていた ROCK 阻害剤、Y-27632 を10 μM の濃度で蘇生培地に添加すること

によって、IVF 由来ウシ胚盤胞のガラス化保存後に 95%もの高生存率を得ることに成功した。また、外径が 200 μm を超える拡張胚盤胞期まで培養を継続してからガラス化保存の方が加温胚の蘇生にとって望ましいことも明らかにした。

3. 現在までの達成度

本研究課題の当初研究目的の達成度について「おおむね順調に進展している」と評価している。異種顕微授精系による SOAF 活性測定、ならびに同種顕微授精系による雄性ゲノム脱メチル化動態については論文発表まで完了し、胚盤胞作製を本格化させるための準備（活性化補填法の見直し、ならびに高蘇生率が得られる凍結保存技術の導入）も論文発表も含め滞りなく済んでいる。

4. 今後の研究の推進方策

同種顕微授精系を利用した凍結乾燥精子の MTOC 機能解析に向け、論文としてまとめるに必要なデータ取りはほぼ完了している。あとは凍結乾燥精子の ICSI によって胚盤胞作製を本格化させ、染色体異常の有無を調べるのが最終年度のタスクとなる。効率的な DNA 傷害検出システムを構築し、凍結乾燥バッファ組成、予備凍結温度、細胞懸濁液の小粒子化、真空度/乾燥時間など、凍結乾燥条件の最適化の可能性も探っておきたい。なお過年度、Nova Science Publishers 出版の「In Vitro Fertilization」という本にウシの顕微授精について 29 ページ分を執筆しており（今秋出版予定）、J Reprod Dev 誌からは凍結乾燥ウシ精子の研究現状を紹介する総説を依頼されている（近日中に投稿）。

5. 代表的な研究成果

（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 5 件）

- (1) H. Abdalla, M. Shimoda, H. Hara, H. Morita, M. Kuwayama, M. Hirabayashi, S. Hochi. Vitrification of ICSI- and IVF-derived bovine blastocysts by minimum volume cooling procedure: effect of developmental stage and age. Theriogenology 誌, 査読有, 74 巻, 2010 年, 1028-1035 頁.
- (2) S. Hochi, H. Abdalla, H. Hara, M. Shimoda, H. Morita, M. Kuwayama, M. Hirabayashi. Stimulatory effect of Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) inhibitor on revivability of in vitro-produced bovine blastocysts after vitrification. Theriogenology 誌, 査読有, 73 巻,

2010 年, 1139-1145 頁.

- (3) H. Abdalla, M. Shimoda, M. Hirabayashi, S. Hochi. A combined treatment of ionomycin with ethanol improves blastocyst development of bovine oocytes harvested from stored ovaries and microinjected with spermatozoa. Theriogenology 誌, 査読有, 72 巻, 2009 年, 453-460 頁.
- (4) H. Abdalla, M. Hirabayashi, S. Hochi. Demethylation dynamics of the paternal genome in pronuclear-stage bovine zygotes produced by in vitro fertilization and ooplasmic injection of freeze-thawed or freeze-dried spermatozoa. J Reprod Dev 誌, 査読有, 55 巻, 2009 年, 433-439 頁.
- (5) H. Abdalla, M. Hirabayashi, S. Hochi. The ability of freeze-dried bull spermatozoa to induce calcium oscillations and resumption of meiosis. Theriogenology 誌, 査読有, 71 巻, 2009 年, 543-552 頁.

〔学会発表〕（計 9 件）

- (1) 原 弘真, IVF または ICSI に由来するウシ前核期卵における DNA メチル化量と H3 ヒストンアセチル化量との関係, 第 103 回日本繁殖生物学会, 平成 22 年 9 月 2~4 日, 十和田.
- (2) 下田 美怜, ICSI と IVF に由来するウシ胚盤胞の超急速ガラス化保存: 発生速度と発育ステージの影響, 第 51 回日本哺乳動物卵子学会, 平成 22 年 5 月 29~30 日, 新潟.
- (3) 原 弘真, ROCK の活性阻害はガラス化保存した体外受精由来ウシ胚盤胞の蘇生率を改善する, 第 112 回日本畜産学会, 平成 22 年 3 月 28~30 日, 東京.
- (4) Abdalla H, Demethylation dynamics of paternal genomes in pronuclear bovine zygotes produced by IVF and ICSI with non-dried or freeze-dried spermatozoa, 第 35 回国際胚移植学会, 平成 21 年 1 月 4~6 日, カリフォルニア州.
- (5) Abdalla H, Ability of freeze-dried bull spermatozoa to induce calcium oscillations and meiosis resumption, 第 1 回世界生殖生物工学会議, 平成 20 年 5 月 24~25 日, ハワイ州.