

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：80122

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18805

研究課題名(和文) アクアポリン発現制御による牛体外受精胚の耐凍性向上に関する研究

研究課題名(英文) Study on improvement of cryotolerance in bovine in vitro fertilized embryos by the regulation of aquaporin expression

研究代表者

藤井 貴志 (FUJII, TAKASHI)

地方独立行政法人北海道立総合研究機構・農業研究本部畜産試験場・研究職員

研究者番号：60609105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウシ卵子から拡張胚盤胞期胚までの初期発生過程におけるアクアポリン(AQP)3およびAQP7mRNAおよびタンパク質発現動態を明らかにした。また、スクロースを添加した高浸透圧培地でウシ体外受精胚を一定時間培養することで、AQP3およびAQP7mRNA発現量が増加し、緩慢凍結-融解およびガラス化-加温後の生存性が向上することが明らかとなった。以上の結果から、AQP3およびAQP7発現がウシ初期胚の耐凍性と関連する可能性が示されると同時に、AQPの人為的な発現制御によりウシ体外受精胚の耐凍性を向上させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we clarified the expression status of AQP3 and AQP7 mRNA and protein during bovine preimplantation development. Furthermore, we demonstrated that hypertonic treatment induces the up-regulation of AQP3 and AQP7 expression in bovine in vitro fertilized (IVF) embryos, and improves the viability of bovine IVF embryos after freeze-thawing and vitrification-warming. These findings suggest that AQP3 and AQP7 may be involved in the cryotolerance of bovine embryos, and artificial regulation of AQP3 and AQP7 expression may contribute the improvement of cryotolerance of bovine IVF embryos.

研究分野：動物生殖工学

キーワード：ウシ 体外受精胚 凍結保存 アクアポリン 耐凍性

1. 研究開始当初の背景

ウシの体外受精技術は、効率的な産子生産法として重要な技術である。国際胚技術学会の調査によると、2015年には、世界で生産された全ウシ胚の約48%に相当する60万個以上の体外受精胚が生産されており、体外受精胚の需要は年々増加している。その一方で、ウシ体外受精胚は、体内受精胚と比較して耐凍性が低く、このことが体外受精胚の利用促進にとって阻害要因となっている。これまで、体外受精胚の耐凍性向上について様々な研究がなされてきたが、体外受精胚の凍結融解-移植後の受胎率は依然として低い。ウシ体外受精胚の耐凍性向上のためには、ウシ体外受精胚の低耐凍性に関わるメカニズムについて、分子レベルでの理解とそれらの知見に基づく技術改良が求められる。

細胞膜における水や耐凍剤の透過性は、細胞内氷晶の形成、耐凍剤による細胞毒性および浸透圧変化による過度な収縮および膨張といった主要な細胞の凍結傷害と密接に関わる低温生物学特性である。体内受精胚と体外受精胚では、水や耐凍剤の細胞膜透過性が異なることが示唆されており、細胞膜透過性の差異が体外受精胚の低耐凍性と関連する可能性がある。細胞膜における水や耐凍剤の透過は、主に、脂質二重膜を介した非選択的な単純拡散と脂質二重膜内に存在する輸送タンパク質を介した促進拡散により行われる。アクアポリン(AQP)は、細胞膜における促進拡散に関与する内在性のチャネルタンパク質であり、哺乳動物では、13種類のAQPが同定されている。中でも、AQP3やAQP7は水に加えて、耐凍剤として利用されるグリセリン等の効率的な透過にも関与することから、細胞の凍結保存過程に重要な役割を担っていると考えられ、AQP3やAQP7の発現動態の差異が、体内受精胚と体外受精胚の耐凍性の違いの要因の一つであることが予想される。

2. 研究の目的

本研究では、ウシ胚の初期発生過程におけるAQP3およびAQP7 mRNAおよびタンパク質発現動態を明らかにするとともに、体内および体外受精胚におけるAQP3およびAQP7発現を比較した。また、AQP3およびAQP7の人為的な発現抑制あるいは発現促進実験により、AQP3およびAQP7とウシ胚の耐凍性との関連性について検討し、AQP3お

よびAQP7の人為的な発現制御によるウシ体外受精胚の耐凍性向上を試みた。

3. 研究の方法

(1) ウシ卵子および初期胚におけるAQP3およびAQP7のmRNAおよびタンパク質発現解析

ウシ胚の初期発生過程におけるAQP3およびAQP7のmRNAおよびタンパク質発現動態を明らかにするため、ウシ体外成熟卵子、体外受精由来の2-4細胞期胚[Day 1、(体外受精日 = Day 0)]、8-16細胞期胚(Day 2)、後期桑実期胚(Day 5)、初期胚盤胞期胚(Day 6)、胚盤胞期胚(Day 6.5)および拡張胚盤胞期胚(Day 7)におけるAQP3およびAQP7のmRNA発現をRT-PCRにより解析した。次に、ウシ胚における胚性遺伝子活性化時期である8細胞期から拡張胚盤胞期胚への発生にともなうAQP3およびAQP7のmRNA発現動態をリアルタイムRT-PCRにより解析した。また、ウシ体外成熟卵子、体外受精由来の2細胞期胚、8細胞期胚、後期桑実期胚、初期胚盤胞期胚、胚盤胞期胚および拡張胚盤胞期胚におけるAQP3およびAQP7のタンパク質発現動態を蛍光免疫染色法により解析した。さらに、ウシ体内受精および体外受精由来の胚盤胞期胚(Day 7)におけるAQP3およびAQP7 mRNA発現量をリアルタイムRT-PCRにより比較解析した。

(2) AQP3およびAQP7の人為的な発現抑制または発現促進がウシ体外受精胚の耐凍性に及ぼす影響の解析

ウシ胚におけるAQP3およびAQP7発現と耐凍性との関係を明らかにすることを目的に、RNA干渉法によるAQP3およびAQP7の人為的な発現抑制または高浸透圧処理によるAQP3およびAQP7の人為的な発現促進がウシ体外受精由来拡張胚盤胞期胚の耐凍性に及ぼす影響について検討した。RNA干渉法については、AQP3およびAQP7に対するsiRNAまたはいずれの遺伝子の発現抑制効果を持たないControl siRNAを体外受精後の1細胞期胚の細胞質内に注入し、Day 5の後期桑実胚またはDay 7の胚盤胞期におけるAQP3およびAQP7 mRNAおよびタンパク質発現抑制効果をそれぞれリアルタイムRT-PCRおよび蛍光免疫染色により確認した。高浸透圧処理については、Day 7の拡張胚盤胞期胚を、スクロースを添加した 351

mOsm の発生培地で 6 時間培養し、AQP3 および AQP7 mRNA およびタンパク質発現促進効果をそれぞれリアルタイム RT-PCR および蛍光免疫染色により対照区 (260 mOsm の発生培地で 6 時間培養) と比較した。なお、耐凍性に及ぼす影響として、エチレングリコールおよびトレハロースを用いた緩慢凍結保存およびエチレングリコールおよびジメチルスルホキシドを耐凍剤とし、クライオトップを用いたガラス化保存後 24 時間培養後の生存性 (再拡張率、透明帯からの脱出率および死細胞率) を評価した。

4. 研究成果

(1) ウシ卵子および初期胚における AQP3 および AQP7 の mRNA およびタンパク質発現解析

AQP3 および AQP7 mRNA は、ウシ体外成熟卵子、体外受精由来のウシ 2-4 細胞期胚、8-16 細胞期胚、後期桑実期胚、初期胚盤胞期胚、胚盤胞期胚および拡張胚盤胞期胚の全ての発生ステージで検出された。AQP3 および AQP7 とともに、その mRNA 発現量は、8-16 細胞期と比較して後期桑実期および初期胚盤胞期において有意 ($P < 0.05$) に増加し、その後胚盤胞期および拡張胚盤胞期への発生にともない初期胚盤胞期と比較して有意 ($P < 0.05$) に減少した。AQP3 および AQP7 タンパク質は、成熟卵子から拡張胚盤胞期胚までの全てのステージで検出された。AQP3 および AQP7 タンパク質とともに、成熟卵子から初期胚盤胞までは、細胞核および細胞質に蛍光シグナルが観察されたが、胚盤胞期胚および拡張胚盤胞期胚では、細胞核における蛍光シグナルが減弱し、細胞質に加え細胞膜上にも明瞭な蛍光シグナルが観察された。ウシ体外受精由来の胚盤胞期胚における AQP3 mRNA 発現量は、体内受精由来の胚盤胞期胚と比較して有意 ($P < 0.05$) に低かった。一方、AQP7 mRNA 発現量は、体内および体外受精由来の胚盤胞期胚間で差はなかった。

(2) AQP3 および AQP7 の人為的な発現抑制または発現促進がウシ体外受精胚の耐凍性に及ぼす影響の解析

(2) - AQP3 および AQP7 の人為的な発現抑制がウシ体外受精胚の耐凍性に及ぼす影響の解析

ウシ後期桑実期胚における AQP3 mRNA

発現量は、Uninjected 区 (siRNA の注入を行わない区) および Control siRNA 区 (Control siRNA を注入する区) と比較し、AQP3 siRNA 区 (AQP3 siRNA を注入する区) で有意 ($P < 0.001$) に低い値を示した。一方、AQP7 mRNA 発現量については、各試験区間に差は認められなかった。また、ウシ後期桑実期胚および胚盤胞期胚において、蛍光免疫染色により AQP3 タンパク質の発現を解析したところ、後期桑実期胚では、各試験区間において明瞭な差は認められなかったが、胚盤胞期胚においては、Uninjected 区および Control siRNA 区と比較し、AQP3 siRNA 区で、蛍光シグナルが減弱する像が観察された。以上より、本実験で用いた AQP3 siRNA は、ウシ初期胚における AQP3 発現抑制効果を有することが確認されたが、AQP7 siRNA については、その発現抑制効果を確認できなかった。

AQP3 発現抑制が、ウシ拡張胚盤胞期胚におけるガラス化保存後の生存性 (再拡張率、透明帯からの脱出率および死細胞率) に及ぼす影響について検討したところ、ガラス化保存-加温後 24 時間培養後の再拡張率および透明帯からの脱出率の平均値は、Uninjected 区 (88.9% および 63.0%) および Control siRNA 区 (86.2% および 65.5%) と比較して、AQP3 siRNA 区 (79.3% および 44.8%) で低い値を示したものの、各試験区間に有意な差は認められなかった。また、ガラス化保存-加温後 24 時間培養後の死細胞率についても、Uninjected 区 ($5.8 \pm 1.0\%$)、Control siRNA 区 ($4.7 \pm 1.0\%$) および AQP3 siRNA 区 ($5.8 \pm 0.7\%$) 間に差は認められなかった。

(2) - AQP3 および AQP7 の人為的な発現促進がウシ体外受精胚の耐凍性に及ぼす影響の解析

AQP3 および AQP7 とともに、その mRNA 発現量は、対照区と比較して、高浸透圧処理区で有意 (AQP3: $P < 0.01$, AQP7: $P < 0.05$) に高い値を示した。しかし、対照区および高浸透圧区における蛍光免疫染色の AQP3 および AQP7 の蛍光強度を解析したところ、両者に差は認められず、本研究手法では、高浸透圧処理による AQP3 および AQP7 タンパク質の発現促進効果は確認できなかった。高浸透圧処理による AQP3 および AQP7 発現促進が、Day 7 におけるウシ拡張胚盤胞期胚の緩慢凍結およびガラス化保存後の生存性 (再拡

張率、透明帯からの脱出率および死細胞率)に及ぼす影響について検討した。緩慢凍結保存において、融解後 24 時間培養後の再拡張率は、対照区 (84.4%) および高浸透圧区 (88.9%) 間で差は認められなかったものの、透明帯からの脱出率は対照区 (35.6%) と比較し高浸透圧区 (64.4%) で有意 ($P < 0.01$) に高く、死細胞率は対照区 ($9.7 \pm 1.5\%$) と比較し高浸透圧区 ($6.3 \pm 0.5\%$) において有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。一方、ガラス化保存においては、加温後 24 時間培養後の再拡張率 (86.0–92.0%)、透明帯から脱出率 (46.0–48.0%) について、対照区および高浸透圧処理区間で差は認められなかったが、死細胞率は対照区 ($6.8 \pm 0.9\%$) と比較し高浸透圧区 ($4.7 \pm 0.6\%$) において有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。これらの結果から、AQP3 および AQP7 がウシ初期胚の耐凍性と関連する可能性が示されると同時に、高浸透圧処理により AQP3 および AQP7 発現を人為的に促進することで、ウシ体外受精胚の耐凍性を向上させられる可能性が示された。

以上、本研究では、ウシ卵子から拡張胚盤胞期胚までの初期発生過程における AQP3 および AQP7 発現動態に関して新たな基礎的知見が得られた。また、発生環境がウシ胚の AQP3 発現に影響する可能性が示された。さらに、AQP3 および AQP7 がウシ胚の耐凍性に重要な役割を果たす可能性を示すと同時に、AQP3 および AQP7 の人為的発現制御によりウシ体外受精胚の耐凍性を向上させられる可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

{学会発表}(計 2 件)

(1) T Fujii, H Hirayama, A Naito, H Yoshino, S Moriyasu, and K Sawai. Effects of downregulation of AQP3 transcripts by RNA interference on early development and cryotolerance of bovine embryos. 4th World Congress of Reproductive Biology、2017 年 9 月 29 日、沖縄コンベンションセンター

(2) T Fujii, H Hirayama, S Kageyama, A Naito, S Fukuda, S Moriyasu, and K Sawai. Expression status of aquaporin 3, 7, and 9

in bovine preimplantation embryos. 42th International Embryo Transfer Society meeting、2016 年 1 月 24 日、アメリカ合衆国ケンタッキー州ルイビル

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤井 貴志 (FUJII Takashi)

研究者番号 : 60609105