

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20780198

研究課題名（和文） ブタ卵成熟過程における卵子ミトコンドリア機能の解析

研究課題名（英文） Investigation of the function of mitochondria in the oocytes during oocyte maturation in pigs.

研究代表者

横尾 正樹（YOKOO MASAKI）

秋田県立大学 生物資源科学部 准教授

研究者番号：10396541

研究成果の概要（和文）：

本研究は、ブタ卵丘細胞-卵子複合体や卵子の呼吸量、さらにはブタ卵成熟過程におけるミトコンドリア機能について調査した。その結果、呼吸量や ATP 含量の高いブタ卵子は、成熟能力が高いことが示された。さらに、卵成熟過程におけるミトコンドリアの再構成（分布や移動）がブタ卵子の呼吸量や成熟卵子の品質に関わっていることが示された。

研究成果の概要（英文）：

I investigated that the oxygen consumption of single porcine COCs and oocytes and the function of mitochondria in the oocytes during oocyte maturation. From this study, it is demonstrated that the oocytes with high oxygen consumption and ATP levels showed higher competence of oocyte maturation. Furthermore, these findings suggest that mitochondrial reorganization may be partly related to the oxygen consumption and consequently the quality of porcine oocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：繁殖 ミトコンドリア機能

## 1. 研究開始当初の背景

近年、未成熟卵子の体外培養技術は、成熟卵子を安価に、かつ大量に確保することができるため、優良家畜の増産、家畜改良、さらには体細胞クローン動物の研究に必要不可

欠な技術となっている。しかしながら、実際に体外成熟培養で得られた成熟卵は高い成熟率は示すものの、体内（卵巣内）で成熟した卵子と比較して受精率・発生率が極めて低く、満足な成績が得られていないのが現状で

ある。現在、この問題に対して、体外培養で得られる成熟卵子の『品質』に問題があると考えられている。しかし、家畜のみならず哺乳動物の卵成熟機構の詳細は未だ解決されていないため、成熟卵子の品質を向上させる根本的な改良は行われていない。すなわち、哺乳動物の卵成熟機構の詳細を明らかにすれば、卵成熟を人為的に制御することが可能となり、より高品質な成熟卵を安定して作出するための体外培養系を構築できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、ブタ卵成熟過程における卵子ミトコンドリア機能に着目し、卵成熟におけるミトコンドリアの役割を解析することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ブタ COCs の採取と培養

屠殺場由来のブタ卵巣の中卵胞（直径 2-5mm）から 18G の注射針を付けたニードルで、卵丘細胞-卵子複合体（COCs）を吸引採取し、TCM-199 を基礎培地とする培養液に回収した。回収した COCs は、形態的に 4 つのグレードに分けた。（A：コンパクトな複数層の卵丘細胞，B：3-5 層のコンパクトな卵丘細胞層，C：3 層以下の卵丘細胞層で透明帯が一部見えるもの，D：完全に、もしくは大部分が裸化されているもの）COCs は、TCM199 に 10%ブタ卵胞液，10IU/mL eCG を添加した培養液で，37℃，5%CO<sub>2</sub>，95%空気の条件下で 48 時間培養した。培養後，COC は 0.1%ヒアルロニダーゼ溶液で卵子から卵丘細胞を除去した。卵成熟率は，第一極体の放出で評価した。また，いくつかの卵子は，呼吸量，ATP 含量，ミトコンドリア染色の実験に使用した。

### (2) ATP 含量の測定

完全に裸化した卵子の ATP 含量は，ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応に基づく市販の kit（プロメガ）を使用して測定した。卵子を PBS で 3 回洗浄し，PBS（50uL）を入れたチューブ内に 1 つずつ入れた。反応液（50uL）を加え，室温で 5 分間反応させた後，ルミノメータ（Luminometer 20/20n，プロメガ）によって ATP 含量を測定した。0-10 pmol/tube の範囲で，5 点の標準液を作製し，サンプルの ATP 含量は標準曲線から求めた。

### (3) ミトコンドリアの染色

卵子を MitoTracker Orange（Molecular Probs）で染色した。この染色液は活性型ミトコンドリアを染色するものである。MitoTracker Orange（200nM）を添加した培養液中で 37℃，30 分染色し，共焦点レーザー顕微鏡（FV-300，オリンパス）で観察した。

### (4) 呼吸量の測定

ブタ COCs または卵子の呼吸量は，走査型電気化学顕微鏡（HV-403）を用いて測定した。単一の COCs または卵子を，測定液（5mL）で満たした測定プレート内の逆円錐形ウェル内に静置した。ガラスでコーティングされた白金微小電極を用いて，呼吸量を測定した。-0.6V vs Ag/AgCl の条件下で，電極を鉛直方向に 3 回走査し，溶液中の溶存酸素濃度をモニターした。スキャンスピードは 31.1um/s で行った。呼吸量は，球面拡散理論に基づいて計算した。

## 4. 研究成果

COCs のグレードが高いほど，呼吸量や卵成熟率が高いことが明らかとなった。第一極体を放出した成熟卵子の呼吸量（ $F \times 10^{-14} \text{ mol s}^{-1}$ ）は，卵成熟過程において高く維持されていた（GV oocytes:  $0.60 \pm 0.03$ ; matured oocytes:  $0.57 \pm 0.01$ ）。成熟卵子の ATP 含量（pmol/oocyte）は卵成熟過程で有意に増加した（GV oocytes;  $1.16 \pm 0.11$ , matured oocytes;  $2.06 \pm 0.06$ ）。一方で，第一極体を放出できなかった卵子では，呼吸量（ $0.31 \pm 0.04$ ）や ATP 含量（ $1.51 \pm 0.21$ ）は，成熟卵子と比較して有意に低い値であった。卵成熟過程の卵子内ミトコンドリア分布は，タイプ 1（ミトコンドリアが卵細胞膜下に均一に存在），タイプ 2（ミトコンドリアのクラスターが観察され，その一部は細胞質内部へと移動），タイプ 3（ミトコンドリアクラスターが大きくなり，内部への移動も顕著に見られる）に分けられ，成熟するにつれて，タイプ 1 からタイプ 3 へと変化することが観察された。しかしながら，極体を放出できなかった卵子では，タイプ 2 でとどまる傾向がみられた。以上の結果から，呼吸量や ATP 含量の高いブタ卵子は，成熟能力が高いことが示された。さらに，卵成熟過程におけるミトコンドリアの再構成（分布や移動）がブタ卵子の呼吸量や成熟卵子の品質に関わっていることが示された。

## 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）

〔雑誌論文〕（計 5 件）

1. Masaki Yokoo, Naoko Kimura, Hiroyuki Abe and Eimei Sato. Influence of hyaluronan accumulation during cumulus expansion on porcine oocyte maturation *in vitro*. *Zygote*, 16, 309-314, 2008.
2. Masaki Yokoo, Takahiro Ito-Sasaki, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue and Hiroyuki Abe. Multiple analysis of

respiratory activity in the identical oocytes by applying scanning electrochemical microscopy. Transactions of the Materials Research Society of Japan, 33, 759-762, 2008.

3. Masaki Yokoo, Naoko Kimura and Eimei Sato. Induction of oocyte maturation by hyaluronan-CD44 interaction in pigs. Journal of Reproduction and Development, 56, 15-19, 2010.
4. Satoshi Sugimura, Ken-ichi Yamanaka, Manabu Kawahara, Takuya Wakai, Masaki Yokoo and Eimei Sato. Early metaphase II oocytes treated with dibutyl cyclic adenosine monophosphate provide suitable recipient cytoplasm for the production of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos. Animal Science Journal, 81, 48-57, 2010.
5. Haruo Murakawa, Nobuya Aono, Takayuki Tanaka, Hiroyuki Kikuchi, Hidemune Yoshida, Hiroaki Yoshida, Masaki Yokoo and Hiroyuki Abe. Morphological evaluation and measurement of the respiration activity of cumulus-oocyte complexes to assess oocyte quality. Journal of Mammalian Ova Research, 26, 32-41, 2010.

〔学会発表〕(計1件)

1. Takayuki Tanaka, Nobuya Aono, Yuki Iwasa, Tomoko Kamono, Hiroyuki Kikuchi, Asami Suzuki, Haruo Murakawa, Hidemune Yoshida, Masaki Yokoo, Hiroyuki Abe and Hiroaki Yoshida. Embryo development after vitrification-thawing can be predicted by assessment of oxygen consumption. The international ovarian conference 2009, Tokyo.

〔図書〕(計1件)

1. 佐藤 英明, 星野 由美, 横尾 正樹. カラーアトラス 不妊診療のための卵子学. 医歯薬出版, 2010.208.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横尾 正樹 (YOKOO MASAKI)

秋田県立大学, 生物資源科学部, 准教授

研究者番号: 10396541

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし