

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780278

研究課題名(和文)ウシ凍結卵におけるアポトーシス機構の解明と新規の凍結・培養法の開発

研究課題名(英文)The elucidation of the apoptotic mechanism in cryopreserved bovine oocytes and the establishment of the new method for cryopreservation and in vitro culture

研究代表者

阿部 靖之(Abe, Yasuyuki)

山形大学・理工学研究科・助教

研究者番号：80447086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：ウシ卵子(卵核胞期)における凍結法の改良を目的として、凍結処理の影響を解析した結果、ミトコンドリアおよび微小管に作用して局在を変化させ、ミトコンドリア機能低下やアポトーシス誘導が起こることが示唆された。そこで、細胞骨格安定剤の前処理や、卵丘細胞の一部除去により、凍結卵子の成熟・受精・発生を向上することに成功した。

また、凍結卵子の受精障害を回避することを目的として、精子の受精能を制御する因子を探索し、直線性の運動、移動速度、先体の正常性が受精に大きく影響することを見出した。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of the improvement of the cryopreservation method in bovine oocytes (germinal vesicle stage), we analyzed the effect of the cryopreservation on oocytes. The cryopreservation changed mitochondrial and microtubular localization, as a result, mitochondrial functional decline and induction of the apoptosis occurred. Then, we were successful in increasing the rates of maturation, fertilization and development in the cryopreserved oocytes by the treatment of the cytoskeleton stabilizer and removal of the cumulus cells.

Also, for the purpose of evading a fertilization disorder of the cryopreserved oocytes, we analyzed of the factor which controlled fertility of the sperm. We found that linearity and velocity of moving, and acrosomal normality had influence to fertility of the sperm.

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：発生工学 ウシ 卵子 凍結保存 アポトーシス ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、卵子（未受精卵，胚）の体外培養，凍結保存などの生殖補助技術は目覚ましい発展を遂げ，産業動物の生産に大きく貢献しているばかりでなく，その技術はヒト不妊治療にも応用され，重要性が増している．ウシ卵巣内の未受精卵（GV期卵）は，体外培養によって成熟（MII期卵）し受精能を獲得した後，受精・発生（胚盤胞形成）できるが，発生率は**20～40%**と低い．凍結卵ではその率がさらに低下（20%以下）するため，対応策として凍結保存法の改良が進められているが，明確な改善策は見出されていない．

(2) 凍結卵の解析では，凍結障害の主要原因が細胞質内への氷結晶形成による物理的障害であることから，光学・電子顕微鏡を用いて形態的变化が観察されており，シトクロムc漏出などの知見が得られている．他に，DNA断片化や不飽和脂肪酸の組成変化など，凍結処理の結果として生じる現象について調べられているものの，アポトーシス（細胞死）が誘導されるメカニズムについては未解明である．

(3) 卵子成熟過程において，ミトコンドリアは核成熟の挙動に同調しながら，ATP産生量の変化や移動（核周辺への集積と細胞質全体への分散）が繰り返し起こり，その移動に微小管が関わることを示唆されているが，凍結処理による微小管への影響の詳細は不明である．

2. 研究の目的

ウシ未受精卵において凍結処理によって引き起こされる品質低下やアポトーシスが，卵細胞質内ミトコンドリアと関連性があるという新たな説を提唱し，卵子成熟過程に起こる

ミトコンドリアの挙動（機能的变化，移動）を調べ，アポトーシス機構を解明する．その知見を基に，凍結・融解後の卵子におけるアポトーシスを抑制するため，新たな凍結保存法を開発する．また，凍結卵子が持つ受精能低下という問題を，精子の受精前処理によって解決することを目的として，精子の受精能を制御する因子を同定する．

3. 方法

(1) 体外培養および凍結保存

ウシ卵巣より採取した卵丘細胞-卵子複合体（COCs）を耐凍剤へ段階的に暴露後，液体窒素へ浸漬し凍結保存した．融解後，体外成熟・受精・発生し，成熟率および受精率，胚盤胞への発生率を調べた．

(2) 凍結卵子が持つ特徴の解析

ミトコンドリアおよびアクチン，紡錘体の分布・形態は，免疫染色によって観察した．各卵子は受精卵呼吸測定装置HV-403によって酸素消費量を測定し，ミトコンドリア機能を推定した．卵子からTotal RNAを抽出後に，アポトーシス抑制遺伝子Bcl-2およびアポトーシス誘導遺伝子Bax，ミトコンドリア分裂因子Drp-1，卵子受精関連因子CD9遺伝子の発現を，逆転写ポリメラーゼ反応（RT-PCR）によって調べた．

(3) 新規凍結保存法の開発

採取したCOCsを細胞骨格安定剤（サイトカラシンD，タキソール）で処理後，ピペッティングにより裸化し，凍結保存した．

(4) 精子受精能を制御する因子の同定

8種のウシ精子について，受精能を体外受精，精子運動パラメーター値をComputer Assisted Sperm Analysis，運動性に関わる遺伝子の発現をRT-PCR，精子先体の正常性を免

疫染色によって調べた。

4. 研究成果

(1) 凍結卵子が持つ特徴の解析

凍結卵子のミトコンドリアは分布形態が変化し(図1), 酸素消費量を指標として機能が低下していることを明らかにした(図2). また, 細胞分裂において重要な役割を持つアクチンフィラメント(細胞骨格)および紡錘体に異常が生ずることを発見した. さらに, Bcl-2の発現は, 新鮮卵と凍結卵で同程度であったにもかかわらず, Baxの発現は凍結卵で高かった. これらのことから, 凍結処理の刺激がミトコンドリアおよび微小管に作用して局在を変化させるとともに, アポトーシスが誘導されミトコンドリアの膜透過性亢進および機能低下が起こったと考えられる.

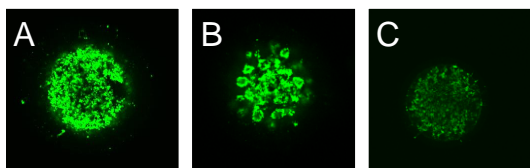


図1. ウシ成熟卵子における活性型ミトコンドリアの分布.
A) 均一型, B) 凝集型, C) 減少型.

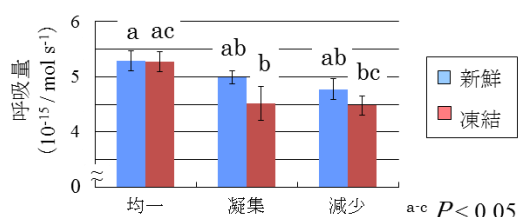


図2. ウシ成熟卵子における酸素消費量.

(2) 新規凍結保存法の開発

裸化により耐凍剤の浸透性を約2倍に向上することに成功した. しかし, 裸化による物理的障害がみられたため, サイトカラシン D 処理により, 裸化による F-アクチンへの影響を軽減したが, サイトカラシン D が過剰に作用し発生率の低下を招いた. それに対し, 裸

化せずにサイトカラシン D 処理した場合は発生率を向上させ, ウシ卵子の凍結保存に有効であることが示された.

(3) 精子受精能を制御する因子の同定

凍結卵の受精能が低い要因を解明するために卵子の CD9 遺伝子発現を調べたが, 新鮮卵と変化が見られなかった. そこで, ウシ精子の性質を個体間で比較し, 精子受精能は従来の指標である運動精子率のほか, 精子における直線性の運動, 移動速度(図3), 先体の正常性(図4)と強い相関が見出され, 効率的なウシ産生に貢献できるのではないかと考えられる

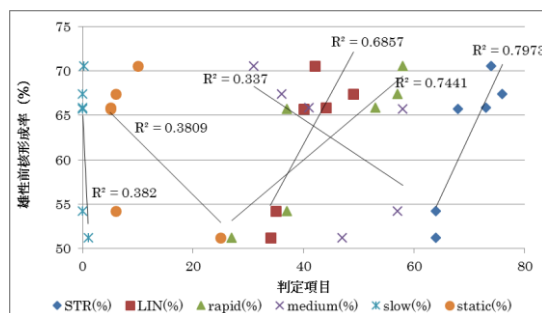


図3. 各精液における運動パラメーターと雄性前核形成率の関係.

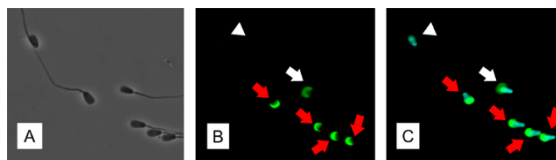


図4. ウシ精子核および先体の染色像.

(A) 位相差像, (B) 先体, (C) 先体+核
赤矢印: 正常, 白矢印: 部分的損傷, 白矢じり: 先体消失.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計14件)

- ① Fukuda, T., Kino, Y., Abe, Y., Yamashiro, H., Kuwahara, Y., Nihei, H., Sano, Y., Irisawa, A., Shimura, T., Fukumoto, M., Shinoda, H., Obata,

- Y., Saigusa, S., Sekine, T., Isogai, E., Fukumoto, M. Distribution of Artificial Radionuclides in the Abandoned Cattle in the Evacuation Zone of the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant. PLoS One. 査読有. (掲載決定)
DOI: 10.1371/journal.pone.0054312. Epub 2013 Jan 23.
- ② Aono, A., Nagatomo, H., Takuma, T., Nonaka, R., Ono, Y., Wada, Y., Abe, Y., Watanabe, T., Kawahara, M. Successful vitrification of bovine immature oocytes retrieved by ovum pick-up. Theriogenology. 査読有. (掲載決定)
DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.02.009. Epub 2013 Mar 25.
- ③ Yamashiro, H., Abe, Y., Fukuda, T., Kino, Y., Kuwahara, Y., Fukumoto, M., Kobayashi, J., Uematsu, E., Tong, B., Sugiyama, T., Yamada, T., Shinoda, H., Sekine, T., Sato, E. Effects of radioactive caesium on bull testes after the Fukushima nuclear plant accident. Sci. Rep. 査読有. (掲載決定) DOI: 10.1038/srep02850.
- ④ Isogai, E., Kino, Y., Abe, Y., Yamashiro, H., Shinoda, H., Fukuda, T., Fukumoto, M., Kuroda, K., Yoneyama, H., Isogai, E., Sekine, T. Distribution of Radioactive Cesium in Ostrich (*Struthio camelus*) after the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident. Radiat. Emerg. Med. 査読有. (掲載決定)
http://www.hs.hirosaki-u.ac.jp/~hibaku-pro/rem/file_pdf/2013_vol2-2/rem_vol2_2_11_tsutomu%20sekine.pdf#search=Distribution+of+Radioactive+Cesium+in+Ostrich+%28Struthio+camelus%29+after+the+Fukushima+Daiichi+Nuclear+Power+Plant+Accident.
- ⑤ Nagatomo, H., Kagawa, S., Kishi, Y., Takuma, T., Sada, A., Yamanaka, K., Abe, Y., Wada, Y., Takahashi, M., Kono, T., Kawahara, M. Transcriptional wiring for establishing cell lineage specification at the blastocyst stage in cattle. Biol. Reprod. 査読有. (掲載決定)
DOI: 10.1095/biolreprod.113.108993. Print 2013 Jun.
- ⑥ Beppu, T., Kawata, S., Aizawa, N., Pu, Y. J., Abe, Y., Ohba, Y., Katagiri, H. 2,6-Bis(arylsulfonyl)anilines as Fluorescent Scaffolds through Intramolecular Hydrogen Bonds: Solid-State Fluorescence Materials and Turn-On-Type Probes Based on Aggregation-Induced Emission. ChemPlusChem. 2014, 79 (4), 536-545. 査読有.
DOI: 10.1002/cplu.201300428.
- ⑦ 磯貝恵美子, 福田智一, 木野康志, 福本学, 篠田壽, 関根 勉, 山城秀昭, 黒田健吾, 米山 裕, 阿部靖之. 東京電力福島第一原子力発電所事故に伴う被災家畜の被ばくと放射性セシウムの体内動態. 宮城県獣医師会会報. 2012, 65(3): 125-128. 査読有.
DOI: なし
- ⑧ Shimizu, T., Magata, F., Abe, Y., Miyamoto, A. Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) and BMP-7 induce vascular endothelial growth factor expression in bovine granulosa cells. Anim. Sci. J. 2012, 83:663-667. 査読有. DOI: 10.1111/j.1740-0929.2012.01032.x. Epub 2012 Jun 27.
- ⑨ 福本 学, 被災動物放射能評価グループ (磯貝恵美子, 福田智一, 木野康志, 関根勉, 篠田壽, 桑原義和, 志村勉, 福本基, 阿部靖之, 山城秀昭, 三枝新, 小幡裕一). 福島第一原子力発電所事故に伴う被災家畜の臓器別放射性セシウム濃度. Isotope News. 2012, 696(4): 10-12. 査読なし.

http://www.jrias.or.jp/member/pdf/201204_TRACER_FUKUMOTO.pdf

- ⑩ 福本 学, 磯貝恵美子, 福田智一, 木野康志, 関根勉, 篠田壽, 千葉美麗, 鈴木敏彦, 清水央, 高橋温, 西村真, 桑原義和, 志村勉, 鈴木正敏, 井上和也, 高橋慎太郎, 福本基, 阿部靖之, 山城秀昭, 小林仁, 森本素子, 三枝新, 小幡裕一. 警戒区域で何が起きているか - 牛における放射性物質の動態. 家畜衛生学雑誌. 2012, 38: 105-106. 査読なし. DOI: なし
- ⑪ Abe, Y., Suwa, Y., Asano, T., Yanagimoto-Ueta, Y., Kobayashi, N., Ohshima, N., Shirasuna, S., Abdel-Ghani, M. A., Oi, M., Kobayashi, Y., Miyoshi, M., Miyahara, K., Suzuki, H. Cryopreservation of canine embryo. Biol. Reprod. 2011, 84(2): 363-368. 査読有. DOI: 10.1095/biolreprod.110.087312. Epub 2010 Oct 6.
- ⑫ Abdel-Ghani, M. A., Abe, Y., Asano, T., Hamano, S., Suzuki, H. Effect of bovine cumulus-oocyte complexes-conditioned medium on in-vitro maturation of canine oocytes. Reprod. Med. Biol. 2011, 10: 43-49. 査読有. DOI: 10.1007/s12522-010-0069-y.
- ⑬ Abdel-Ghani, M. A., Abe, Y., Asano, T., Suzuki, H. Effect of graft site and gonadotrophin treatment on follicular development of canine ovarian grafts transplanted to NOD-SCID mice. Reprod. Med. Biol. 2011, 10: 259-266. 査読有. DOI: 10.1007/s12522-011-0091-8.
- ⑭ 阿部靖之. 動物の胚および卵子の凍結技術. 冷凍. 2011, 86 : 7-12. 査読なし. DOI: なし

[学会発表] (計 9 件)

- ① Yamashiro, H., Abe, Y., Kuwahara, Y., Urushihara, Y., Suzuk, M., Inoue, K., Takahashi, S., Kino, Y., Fukuda, T., Isogai, E., Fukumoto, M. Effects of radiation on abandoned bull associated with Fukushima Nuclear Power Plant accident. CABX Workshop and international Symposium (Jeju, Korea). 7-10 December, 2013.
- ② 阿部靖之, 山城秀昭, 福田智一, 木野康志, 関根勉, 桑原義和, 福本基, 小林仁, 阿部宏之, 磯貝恵美子, 福本学. 福島第一原発20km圏内の雌ウシにおける卵巣の正常性. 第56回日本放射線影響学会 (青森). 2013年10月18-20日 講演要旨集 p37.
- ③ 佐藤隆司, 菊池英里子, 金明奎, 荒木至, 阿部宏之, 阿部靖之 (2013). ウシGV期卵母細胞のガラス化保存における卵丘細胞除去および細胞骨格安定剤Taxolの影響. 第106回日本繁殖生物学会 (東京). 2013年9月12-14日. 講演要旨集 p22.
- ④ 荒木至, 柏渕将輝, 小塚泰輝, 佐藤隆司, 阿部宏之, 阿部靖之. ウシ精子における受精能と運動パラメーターの相関性. 第117回日本畜産学会 (新潟). 2013年9月9, 10日. 講演要旨集 p11.
- ⑤ 阿部靖之, 山城秀昭, 及川俊徳, 福田智一, 木野康志, 関根 勉, 桑原義和, 福本 基, 小林 仁, 阿部宏之, 沼邊孝, 磯貝恵美子, 福本 学. 福島第一原発 20km 圏内に生息する雌ウシの生殖器に対する放射性物質の影響解析. 第 54 回日本哺乳動物卵子学会 (東京). 2013 月 5 月 25, 26 日. 講演要旨集 p13.

- ⑥ 阿部靖之, 山城秀昭, 木野康志, 福田智一, 阿部宏之, 小林 仁, 磯貝恵美子, 福本 学. 福島第一原発由来の放射性物質がウシの雌生殖器に及ぼす影響の解析. 第55回日本放射線影響学会 (仙台). 2012年9月6-8日. 講演要旨集 p47
- ⑦ 阿部靖之. 発生工学技術を用いた動物生産 . 山形化学工学談話会 (米沢). 2012年2月17日. (招請講演)
- ⑧ Abe, Y., Takakura, K., Kaito, K., Ogawa, T., Yokoo, M., Abe, H. Effect of vitrification at GV stage on the mitochondrial and cytoskeletal integrity in bovine oocytes. 38th Annual Conference of the IETS (Phoenix, USA). 7-10 January, 2012.
- ⑨ Abe, Y. Studies on the cryopreservation and in vitro culture of eggs in mammals. International Workshop on Polymer Rheology for East Asian Young Scientists (Yamagata, Japan). 1 September, 2011. (招請講演)

[図書] (計1件)

- ① 阿部 靖之 他, 日本冷凍空調学会, 冷凍空調便覧 第IV巻 食品・生物編 動物胚および卵子 (哺乳類), 2013, pp. 334-338

[その他]

ホームページ

<http://yasuyukiabe.yz.yamagata-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 靖之 (ABE, Yasuyuki)

山形大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号 : 80447086