

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658238

研究課題名(和文) 暑熱・寒冷による卵子・胚の傷害メカニズム：分子機構から産業応用へ

研究課題名(英文) The mechanism by which oocytes/embryos are injured at low/high temperatures

研究代表者

枝重 圭祐 (EDASHIGE, KEISUKE)

高知大学・教育研究部総合科学系・教授

研究者番号：30175228

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)：ブタの卵子/胚の温度傷害に、温度センサーチャンネルが関与しているかどうかをしらべた。成熟卵子と胚では低温を感知するTRPA1とTRPM8のいずれのmRNAも発現していたが、未成熟卵子ではTRPA1のmRNAのみが発現していた。また、高温を感受するTRPV1のmRNAは未成熟卵子でのみ発現していた。ブタ卵子を低温処理すると、各ステージで発現しているTRPチャンネルの作動温度に依存して傷害を受けた。それらのチャンネルの発現を抑制すると、傷害が大きく軽減された。したがって、ブタ卵子の低温傷害に低温感受性チャンネルが関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We examined whether temperature-sensitive transient receptor potential (TRP) channels were involved in the injury of pig oocytes/embryos at low/high temperatures. Pig immature oocytes and maturing oocytes expressed mRNA of TRPA1, a cold-sensitive TRP channel, whereas mature oocytes and embryos expressed not only mRNA of TRPA1 but also that of TRPM8, another cold-sensitive TRP channel. TRPV1, a hot-sensitive channel, was expressed only in immature oocytes. The viability of pig oocytes decreased after cold treatment, depending on the activation temperature of the TRP channels expressed in oocytes at each stage. When oocytes were suppressed with the expression of the cold-sensitive TRP channels, the viability was improved markedly. These results strongly suggest that cold-sensitive TRP channels are involved in the chilling injury of pig oocytes.

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：低温傷害 ブタ卵子 TRPチャンネル

### 1. 研究開始当初の背景

ブタの卵子/胚の凍結保存は難しい。その理由は、低温感受性が極めて高く、低温で容易に傷害を受けるからである。しかしながら、そのメカニズムは明らかではない。ブタの卵子と胚は、15 以下の温度に 10 分程度さらされただけで成熟/発生が停止し、数時間後に死滅する。リン脂質の相分離による細胞膜傷害のようなごく短時間で死滅させるものや、紡錘体形成異常のような細胞分裂異常による細胞分裂の傷害等の従来から唱えられている低温傷害のメカニズムとは考えにくい。また、暑熱環境下での母体の体温上昇によるウシ胚の傷害も、ごく初期のステージに限られているので、熱ショックタンパク質のような高温で非選択的に発現されるタンパク質が関与しているとは考えにくく、発生段階によって特異的に発現するタンパク質に依存していると考えられる。

温度センサーチャンネル(温度感受性 Transient Receptor Potential Channel、以下 TRP チャンネル)は皮膚の神経等に存在し、外界の温度変化を即座に感知して、Ca<sup>2+</sup>等の陽イオンを神経細胞内に流入させ、「熱い」「冷たい」と感じさせる。もしこのようなチャンネルが卵子や胚において発現しているならば、このチャンネルが温度感受の引き金となり、細胞内情報伝達を経て低温/高温傷害等を引き起こすと考えられる。そうならば、情報伝達の上流部をブロックすることによって、傷害を回避できるだろう。近年、ブタ卵子を 14 に冷却すると、数秒で細胞内 Ca<sup>2+</sup>が上昇することが報告された。この結果は上述の仮説を支持していると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、(1)ブタの卵子/胚においても低温/高温を感受する温度感受性 TRP チャンネルが発現しているかどうか、(2)このチャンネルの活性化がブタの成熟途上卵子の低温傷害に関与し、このチャンネルの発現を抑制することによって低温傷害を軽減できるかどうか、(3)このチャンネルの活性化がブタの成熟卵子の低温傷害に関与し、このチャンネルの発現を抑制することによって低温傷害を軽減できるかどうかについて明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1)ブタの卵子と胚における温度感受性 TRP チャンネルの発現

屠場由来のブタ卵巣から回収した未成熟卵子、これらを 10%ウシ胎子血清とヒト閉経性腺刺激ホルモン添加 TCM-199 液で 12 時間培養して作製した成熟途上卵子、および 48 時間培養して作製した成熟卵子を卵子として用いた。また、成熟卵子を電気刺激法で単為発生させて作製した桑実胚および胚盤胞を胚として用いた。これらの卵子/胚の cDNA をテンプレートとし、17 以下を感受する

TRPA1、26 以下の温度を感受する TRPM8、40 以上を感受する TRPV1 の cDNA 配列を元に作製したプライマーを用いて、リアルタイム PCR を行った。そして、各温度感受性 TRP チャンネルの mRNA の相対的発現量の、卵子の成熟段階と胚の発育段階による違いをしらべた。

#### (2)低温感受性 TRP チャンネルの発現を抑制したブタ成熟途上卵子の低温感受性

成熟途上卵子で mRNA が検出された TRPA1 の double stranded (ds)RNA をブタ未成熟卵子に注入して 12 時間培養し、TRPA1 の発現を抑制した成熟途上卵子を作製した。そして、低温処理(15 あるいは 24 で 10 分間)した後さらに 36 時間培養し、成熟率と生存率が改善するかどうかをしらべた。

#### (3)低温感受性 TRP チャンネルの発現を抑制したブタ成熟卵子の低温感受性

成熟卵子で mRNA が検出された TRPA1 と TRPM8 の dsRNA をブタ未成熟卵子に注入して 48 時間培養し、これらのチャンネルの発現を抑制した成熟卵子を作製した。そして、低温処理(15 あるいは 24 で 10 分間)した後さらに 24 時間培養し、生存率が改善するかどうかをしらべた。

### 4. 研究成果

#### (1)ブタの卵子と胚における温度感受性 TRP チャンネルの発現

ブタの未成熟卵子、成熟途上卵子、および成熟卵子のいずれにおいても、TRPA1 の mRNA が同程度発現していた(図 1)。一方、TRPM8 は成熟卵子のみで発現していた。

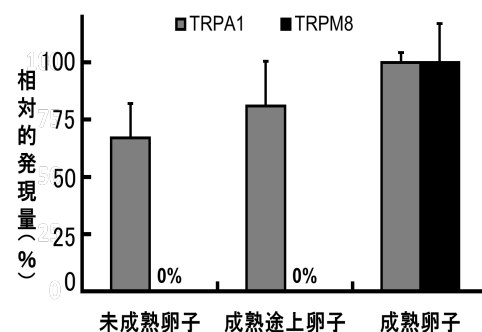


図1 ブタ卵子における低温感受性TRP チャンネルのmRNAの相対的発現量

ブタ胚では、桑実胚と胚盤胞のいずれにおいても TRPA1 と TRPM8 の mRNA が成熟卵子とほぼ同程度発現し、発生段階による違いはほとんどないことがわかった。(図 2)

高温を感受する TRPV1 の mRNA は、未成熟卵子では発現していたが、成熟途上卵子や成熟卵子および胚ではほとんど発現していなかった(図には示さず)

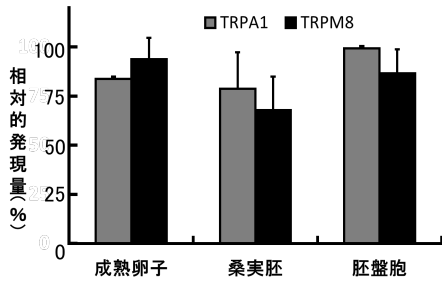


図2 ブタ胚における低温感受性TRPチャンネルのmRNAの相対的発現量

したがって、ブタの未成熟卵子と成熟卵子では17以下をTRPA1が、成熟卵子ではTRPA1だけでなく、26以下を感知するTRPM8が低温を感受していると考えられた。ブタ胚においても、TRPA1とTRPM8が低温感受に関与していると考えられた。一方、高温を感受するTRPV1が未成熟卵子を除いて発現していないことから、基本的にブタの卵子や胚は高温傷害を受けにくいのではないかと考えられた。

(2) 低温感受性TRPチャンネルの発現を抑制したブタ成熟途上卵の低温感受性  
 発育途上卵では、24で処理しても成熟率も生存率もほとんど低下しなかったが、15で処理するといずれも大きく低下した(図3)。

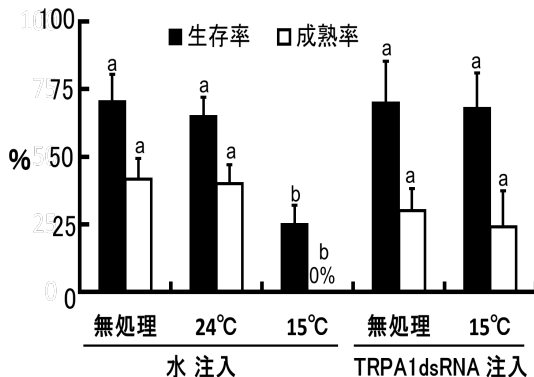


図3 TRPA1 dsRNAを注入した成熟途上卵の低温感受性

これは、未成熟卵子や発育途上卵では26以下を感知するTRPM8が発現していないが、17以下を感知するTRPA1が発現しているためであると考えられた。TRPA1の発現を抑制した成熟途上卵を15で処理した場合、成熟率と生存率が大きく改善し、低温処理しなかった成熟途上卵と有意な差はなかった。これらの結果から、成熟途上卵における低温傷害にはTRPA1が大きく関与していることが強く示唆された。

(3) 低温感受性TRPチャンネルの発現を抑制したブタ成熟卵の低温感受性  
 成熟卵を15で低温処理して24時間培養すると生存率は大きく低下した(図4)。

これは成熟卵では成熟途上卵と同様にTRPA1が発現しているためであると考えられた。TRPA1の発現を抑制した成熟卵を15で低温処理した場合、生存率は大きく改善し、低温処理しなかった成熟卵と有意な差は見られなかった。この結果は、成熟卵における15での低温傷害にTRPA1が関与していることを強く示唆している。

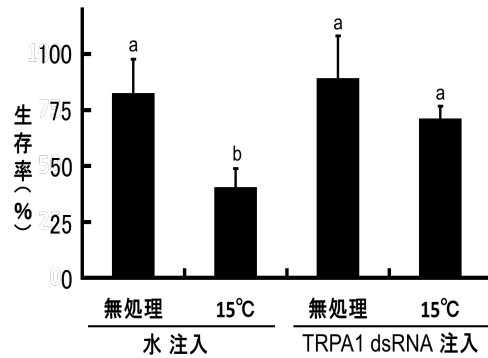


図4 TRPA1 dsRNAを注入した成熟卵の低温感受性

成熟卵は、24で低温処理して24時間培養すると、成熟途上卵とは異なり、生存率は大きく低下した(図5)。成熟卵では、成熟途上卵とは異なり、26以下を感知するTRPM8が発現しているためであると考えられた。TRPM8の発現を抑制した成熟卵を24で低温処理した場合、生存率は大きく改善し、低温処理しなかった成熟卵と有意な差は見られなかった。この結果は、成熟卵における24での低温傷害にTRPM8が関与していることを強く示唆している。

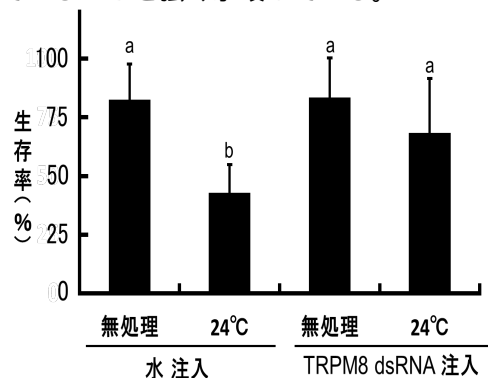


図5 TRPM8 dsRNAを注入した成熟卵の低温感受性

(4) 結論

ブタの成熟途上卵および成熟卵における低温傷害には低温感受性TRPチャンネルが大きな役割を果たしていることがわかった。成熟段階にかかわらず、15での卵の低温傷害にはTRPA1が、成熟卵における24での低温傷害にはTRPM8が関与していると考えられた。

今後は、低温感受性TRPチャンネルが感受した温度情報がどのような細胞内情報伝達

を経て傷害をもたらしているかを明らかにする必要がある。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計5件)

- Delgado M. Valdez Jr., Bo Jin, Ryoma Tsuchiya, Shinsuke Seki, Naoya Saida, Chihiro Koshimoto, Kazutsugu Matsukawa, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. A trial to cryopreserve immature medaka (*Oryzias latipes*) oocytes after enhancing their permeability by exogenous expression of aquaporin 3. *Journal of Reproduction and Development*, 59, 205-213, 2013.  
doi: 10.1262/jrd.2012-179
- Bo Jin, Ryu-ichi Higashiyama, Yu-ichi Nakata, Jun-ichi Yonezawa, Shangdan Xu, Masashi Miyake, Sei-ichi Takahashi, Kazuhiro Kikuch, Ken-ichi Yazawa, Shuhei Mizobuchi, Saori Niimi, Mizuho Kitayama, Chihiro Koshimoto, Kazutsugu Matsukawa, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Rapid movement of water and cryoprotectants in pig expanded blastocysts via channel processes: its relevance to their higher tolerance to cryopreservation. *Biology of Reproduction*, 89, 1-12, 2013.  
doi: 10.1095/biolreprod.112.107250
- Bo Jin, Keiji Mochida, Atsuo Ogura, Chihiro Koshimoto, Kazutsugu Matsukawa, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Equilibrium vitrification of mouse embryos at various developmental stages. *Molecular Reproduction and Development*, 79, 785-794, 2012. doi: 10.1002/mrd.22113
- Bo Jin, Yasunori Kawai, Takao Hara, Shoko Takeda, Shinsuke Seki, Yu-ichi Nakata, Kazutsugu Matsukawa, Chihiro Koshimoto, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Pathway for the movement of water and cryoprotectants in bovine oocytes and embryos. *Biology of Reproduction*, 85, 834-847, 2011.  
doi: 10.1095/biolreprod.110.088641
- Shinsuke Seki, Keisuke Edashige, Sakiko Wada, Peter Mazur. Effect of the expression of aquaporins 1 and 3 in mouse oocytes and compacted 8-cell embryos on the nucleation temperature for intracellular ice formation. *Reproduction*, 142, 505-515, 2011.  
doi: 10.1530/REP-10-0538

### 〔学会発表〕(計23件)

新見沙織, 北山みずほ, 竹下純隆, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. プタ卵子の低温傷害に温度感受性 TRP チャンネルは関与しているか. 第 106 回日本繁殖生物学会大会, 2013 年 9 月 12~17 日, 東京農工大学農学部府中キャンパス, 府中

市.  
北山みずほ, 中田裕一, 新見沙織, 平川猛, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. Mitochondrial permeability transition pore の開口によるマウス卵子の耐凍性向上の試み. 第 106 回日本繁殖生物学会大会, 2013 年 9 月 12~17 日, 東京農工大学農学部府中キャンパス, 府中市.  
平川猛, 佐々木智世, 北山みずほ, 竹下純隆, 新見沙織, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. ラット胚における水および耐凍剤に対する透過性と透過経路. 第 106 回日本繁殖生物学会大会, 2013 年 9 月 12~17 日, 東京農工大学農学部府中キャンパス, 府中市.  
住友弘明, 竹下純隆, 新見沙織, 北山みずほ, 平川猛, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. 水・耐凍剤チャンネルおよび不凍タンパクの発現によるゼブラフィッシュ Stage III 卵子の耐凍性向上の試み. 第 106 回日本繁殖生物学会大会, 2013 年 9 月 12~17 日, 東京農工大学農学部府中キャンパス, 府中市.  
竹下純隆, 住友弘明, 山内健嗣, 新見沙織, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. 水・耐凍剤チャンネルと不凍タンパクの発現によるゼブラフィッシュ Stage I 卵子の耐凍性向上の試み. 第 106 回日本繁殖生物学会大会, 2013 年 9 月 12~17 日, 東京農工大学農学部府中キャンパス, 府中市.  
郡七海, 枝重圭祐, 葛西孫三郎, 赤木悟史, 保地眞一, 松川和嗣. ウン線維芽細胞の培養時期が細胞周期および凍結乾燥後の DNA 損傷に与える影響. 第 117 回日本畜産学会大会, 2013 年 9 月 9~10 日, 新潟大学五十嵐キャンパス, 新潟市.  
Keisuke Edashige, Shinsuke Seki, Hayato Arimura, Mizuho Kitayama, Saori Niimi, Chihiro Koshimoto, Kazutsugu Matsukawa, Magosaburo Kasai. Aquaporin 9 plays a significant role in the channel-dependent movement of Me<sub>2</sub>SO and acetamide in mouse morulae. \* The 50th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 28-31, 2013. North Bethesda Marriott and Conference Center, Bethesda, Maryland.  
佐々木智世, 平川猛, 北山みずほ, 越本知大, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. 平衡ガラス化法によるラット胚の凍結保存. 第 60 回日本実験動物学会総会, 2013 年 5 月 15~17 日, つくば国際会議場, つくば市.  
竹中由布, 枝重圭祐, 葛西孫三郎, 松川和嗣. アスコルビン酸 2 リン酸の発生培地への添加がウン体外受精胚の発生に及ぼす影響. 第 116 回日本畜産学会大会. 2013 年 3 月 27 日~30 日, 安田女子大学 7, 9 号館, 広島市.  
枝重圭祐. 動物生殖細胞の凍結保存技術

の開発研究。第6回ラットリソースリサーチ研究会/第1回実験動物科学シンポジウム(招待講演)2013年2月1日京都大学百周年時計台記念館,京都市。西本あずさ,枝重圭祐,葛西孫三郎,保地眞一,松川和嗣。予備凍結および保存温度が凍結乾燥ウシ体細胞のDNA損傷および核移植後の発生に及ぼす影響。第105回日本繁殖生物学会大会。2012年9月5日~8日,筑波大学大学会館,つくば市。

山内健嗣,住友弘明,有村隼,新見沙織,佐々木智世,松川和嗣,葛西孫三郎,枝重圭祐。水・耐凍剤チャンネルを発現させた未熟なゼブラフィッシュ卵子の耐凍性。第105回日本繁殖生物学会大会。2012年9月5日~8日,筑波大学大学会館,つくば市。

新見沙織,杉岡篤,佐々木智世,松川和嗣,葛西孫三郎,枝重圭祐。ガラス化凍結したマウス卵巣内の胞状卵胞内卵子の受精能と発生能。第105回日本繁殖生物学会大会。2012年9月5日~8日,筑波大学大学会館,つくば市。

有村隼,北山みずほ,関信輔,佐々木智世,新見沙織,松川和嗣,葛西孫三郎,枝重圭祐。マウス桑実胚でのDMSOとAcetamideの透過におけるAquaporin9の役割。第105回日本繁殖生物学会大会。2012年9月5日~8日,筑波大学大学会館,つくば市。

Keisuke Edashige, Shinsuke Seki, Hayato Arimura, Kan Matsuo, Yu-ichi Nakata, Bo Jin, Kazutsugu Matsukawa, Chihiro Koshimoto, Magosaburo Kasai. The role of aquaporin 9 in the movement of DMSO and acetamide in mouse morulae. SSR's 45th Annual Meeting of Society of the Study of Reproduction. August 12-15, 2012. The Alumni Hall at the Hetzel Union Building, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania.

田仲梨絵,有村隼,松川和嗣,葛西孫三郎,枝重圭祐。未熟なゼブラフィッシュ卵子の低温生物学的特性。第104回日本繁殖生物学会大会,2011年9月15日~17日,いわて県民情報交流センター・アイーナ,盛岡市。

長谷川由貴,濱本圭祐,保地眞一,長尾さや子,枝重圭祐,葛西孫三郎,松川和嗣。凍結乾燥したウシ顆粒膜細胞の核移植に由来する胚盤胞の作出。第104回日本繁殖生物学会大会,2011年9月15日~17日,いわて県民情報交流センター・アイーナ,盛岡市。

長尾さや子,濱本圭祐,枝重圭祐,葛西孫三郎,保地眞一,松川和嗣。ウシ体細胞の凍結乾燥後の保存法がDNA損傷度および核移植後の発生に及ぼす影響。第114回日本畜産学会,2011年8月26日~

27日,北里大学十和田キャンパス,十和田市。

- ②1 Keisuke Edashige, Yohei Yamaji, Shinsuke Seki, Kazutsugu Matsukawa, Chihiro Koshimoto, Magosaburo Kasai. Developmental ability of vitrified mouse oocytes expressing water channels. The 48th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 24-27, 2011, The LaSells Stewart Center on the campus of Oregon State University, Corvallis, Oregon.
- ②2 枝重圭祐。EFSを用いた胚の凍結保存。LASセミナー2「胚・精子の凍結保存」。第58回日本実験動物学会総会,2011年5月25~27日,タワーホール船堀,江戸川区。
- ②3 持田慶司,長谷川歩未,枝重圭祐,葛西孫三郎,小倉淳郎。緩慢融解が可能な新規マウス胚ガラス化保存法の開発。第58回日本実験動物学会総会,2011年5月25~27日,タワーホール船堀,江戸川区。

〔図書〕(計3件)

葛西孫三郎。メディカルレビュー社, HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY Vol. 20 No. 2, 吉村泰典編,生殖系列細胞の凍結の歴史と意義,2013,11-14頁。  
枝重圭祐。日本冷凍空調学会,冷凍空調便覧IV巻,食品・生物編,第8章動物細胞および動物組織8・2精液8・2・2水産動物,2013,332-333頁。  
枝重圭祐。日本冷凍空調学会,冷凍空調便覧IV巻,食品・生物編,第8章動物細胞および動物組織8・3動物胚と卵子8・3・2水産動物,2013,338-339頁。

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

枝重 圭祐 (EDASHIGE Keisuke)  
高知大学・教育研究部総合科学系・教授  
研究者番号: 30175228

(2)研究分担者

葛西 孫三郎 (KASAI Magosaburo)  
高知大学・教育研究部総合科学系・教授  
研究者番号: 60152617

松川 和嗣 (MATSUKAWA Kazutsugu)  
高知大学・教育研究部総合科学系・准教授  
研究者番号: 00532160

(3)連携研究者

なし