

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450462

研究課題名(和文) ブタ凍結乾燥精子のDNA断片化低減と修復機構の解明による産子作製

研究課題名(英文) Reduction of DNA fragmentation of freeze-dried boar sperm and elucidation of the repair mechanism for piglet production

研究代表者

菊地 和弘 (KIKUCHI, Kazuhiro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門 動物機能利用研究領域・主席研究員

研究者番号：20360456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ブタ精子の凍結乾燥を行うとDNAの断片化が起きる。この断片化はトレハロースにて軽減できるが、処理の有無で受精・胚発生に影響を及ぼさない。DNAの断片化の修復を引き起こす遺伝子が発現する可能性がある。そこで、成熟卵への注入後に6種のDNA修復遺伝子発現を確認したが、断片化されたDNAによって遺伝子発現が誘導されないことが示唆された。一方、卵の成熟が進むにつれ、いくつかの遺伝子でその発現が進展した。卵の成熟中にDNA修復遺伝子の発現量が増加することで、顕微授精卵において凍結乾燥精子のDNAの断片化が修復される可能性が示された。また、顕微授精卵を移植したが妊娠には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Freeze-drying causes DNA fragmentation in boar spermatozoa. Reduction of the fragmentation can be possible by the treatment with trehalose, however, this reduction does not affect fertilization and embryonic development. When we checked the expression of 6 kinds of DNA repair genes after the injection into matured oocyte, no clear evidence was detected. However, the expression of some kinds of the genes were expressed as the maturational stages progressed. These results suggest that the expression of these repair genes during maturation may contribute for the DNA repair of the freeze-dried sperm after the injection to matured oocytes.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：ブタ 精子 凍結乾燥 DNA断片化 修復

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 家畜や実験動物の遺伝資源の保全には、生体保存のほか配偶子や初期胚の長期超低温保存が行われている。特に精子保存は比較的容易で、液体窒素中で保存される。しかしながら、液体窒素のランニングコストが多額であることから、それを使わない常温~5度の低温保存技術の確立が望まれている。その1つとして精子の凍結乾燥保存が期待される。凍結乾燥後は運動性が喪失するため、人為的な生殖補助技術すなわち精子の顕微授精(卵細胞質内精子注入、以下ICSI)を行わなければならないというデメリットが存在するが、近年ICSIの技術も発展してきており、その恩恵を受け実験動物では凍結乾燥精子のICSIによる産子作製の報告がなされてきている。しかしながら、大型家畜では、ICSIそのものが、マウスやヒトに比べて難しいということもあり、これまでに成功例がない。私たちの研究室ではこれまでに、ブタの凍結乾燥精子による産子作製にチャレンジしてきており、現在のところ39日齢胎子までの発生を確認している(文献1)が、その後の妊娠維持や出産に至っていない。ブタでは単為発生胚は妊娠29日までは発生が進むがその後発生を停止し流産することから(文献2)、私たちの結果は、ブタにおいて凍結乾燥精子を顕微注入して発生した胚は、単為発生刺激によって発生をしたものではなく受精を経て発生をしたものと考えられ、きわめて初期ではあるが胎生発育能を有することを証明している。

(2) 発生の停止の原因は明らかではないが、未凍結の精子あるいは通常行われる凍結融解精子に比べて、凍結乾燥精子ではDNAの断片化が顕著であることが知られている。これらの傷害により、通常の初期発生や胎生発育能に影響を及ぼす可能性が示唆されている。しかしながら、これらに関して確固たる報告は見当たらない。

(3) 凍結乾燥精子のDNA断片化を低減させる試みもなされている。DNA断片化の主な原因は、もともと精子細胞質に存在するエンドヌクレアーゼが活性化されるため、その活性化にはCaイオンやMgイオンが必要である。凍結乾燥用液にこれら二価陽イオンをキレートするEGTAやEDTAを加えることでエンドヌクレアーゼの不活性化が期待できる。実際にマウスにおいてはその効果が報告されている(文献3)。当研究室でもブタで両キレート剤について確認したところ、EGTAにその効果が認められている(文献1)。

### 2. 研究の目的

本研究では、超低温保存が不必要な遺伝資源の保全法の可能性として、家畜(ブタ)における精子の凍結乾燥保存に関する以下の3項目の研究を行う。

(1) 凍結乾燥の際に生じる精子DNA断片化の軽減を目的に、適切な凍結乾燥用の溶液の添加物を選択しその効率化を図る。

(2) 精子注入卵における断片化DNAの修復機構、とくに修復機構に關与する遺伝性発現について調べる。

(3) 世界初となる家畜の凍結乾燥精子からの産子作製を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 精子の凍結乾燥

凍結乾燥液として、10 mM トリス HCl 緩衝液に 50 mM EGTA を加えたものにトレハロースを加えた。これまでの成果として、トレハロースのDNA断片抑制効果に関する実験を行った(文献4)。7.5ないし15 mM 添加で有意な抑制効果が得られている(図1)。ただし、顕微授精後の正常受精(前核)率ならびに胚盤胞発生率に差がなかった。本研究では、トレハロースを15 mM 加えた凍結乾燥液にて凍結乾燥精子をDNA断片化抑制精子、0 mM ものを対照区精子とした。

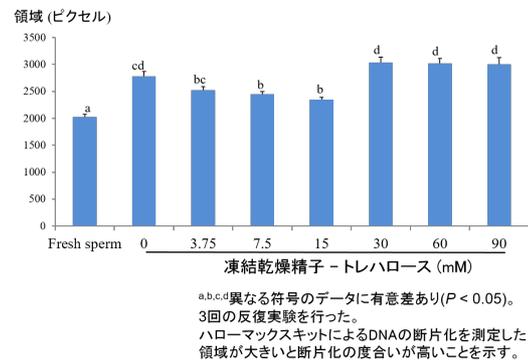


図1. 凍結乾燥精子のDNAに及ぼすトレハロースの影響

ランドレース種雄豚1頭から射出精子を採取し、精子性状を確認したのち、30、900×gで10分遠心処理した。上記の凍結乾燥液に精子を再懸濁し、最終濃度を4×10<sup>8</sup>精子/mLとした。精子懸濁液1 mLを15 mLの凍結乾燥用ガラスバイアルに分注し、アルミ箔でカバーし、-80にて4時間以上予備凍結した。アルミ箔をとり凍結乾燥用ゴムキャップに交換した(蓋には溝が掘られており、中途状態で被せることにより空気の流れが可能となっている)、凍結乾燥機(FTS systems DuraDry μP, SP Scientific, Warminster, PA, USA)に装填した。凍結乾燥のプログラムは、一次乾燥として、0.13 hPaで19時間、凍結乾燥機の庫内温度を-30から30まで、0.75°C/分で加温した。最後の80分間を30で処理した。二次乾燥して、0.13 hPaで3時間処理した。庫内ならびにバイアル内に窒素ガスを充填して、ゴムキャップを押し下げることで気体の流通を遮断し、バイアルを取り出し専用のアルミキャップで密閉した。精子

のはいったバイアルは使用時まで暗所に 4 で保管した。

## (2) 卵の体外成熟

食肉処理場より卵巣を 35 で輸送し、10%ウシ胎子血清、抗生剤(100 IU/mL ペニシリン G ならびに 0.1mg/mL ストレプトマイシン)、20 mM HEPES を加えた 199 培養液中で卵丘細胞-卵複合体(以下、卵)を採取した。既報(文献 5)に従い、5%酸素下で、0.6 mM システイン、50 mM β-メルカプトエタノール、1 mM ジブチリック cAMP (dbcAMP)、ならびホルモン(10 IU/mL eCG ならびに 10 IU/mL hCG)ならびに抗生剤を加えた North Carolina State University (NCSU)-37 液で 20-22 時間、引き続き dbcAMP ならびにホルモンを除いた NCSU-37 で 24 時間体外成熟培養を行った。卵丘細胞をヒアルロニダーゼ処理ならびにピペティング操作により除去し、実体顕微鏡下で第一極体を有する卵を成熟卵として実験に供与した。また、成熟途中の卵については、培養開始後の一定時間に卵丘細胞を除去した卵を使用した。

## (3) 顕微授精ならびに精子注入卵の体外培養

凍結乾燥精子に等量の水を加え、600×g で 2 分間遠心し、5 mg/mL BSA を含むリン酸緩衝食塩水で洗浄した。5-10 秒の超音波処理で頭部と尾部を切断して室温に静置させた。

既報(文献 4, 6)に従い顕微授精を行った。精子頭部を、20 mM HEPES と 4%ポリビニルピロリドン(分子量= 360,000)を添加した受精卵培養液(IVC-PyrLac, 文献 5)とともにマイクロピペットに吸引した。マイクロマニプレータを用い、199 培養液中にて、ピエゾマイクロインジェクタで成熟卵に精子頭部を注入した。注入後 1 時間で、卵子活性化液(0.05 mM CaCl<sub>2</sub>、0.1 mM MgSO<sub>4</sub>、0.1 mg/mL ウシ血清アルブミンを添加した 0.28 M D-マンニトール液)がはいった活性化用チャンバーに顕微授精卵を移し、1.5 kV/cm の電圧で 20 μ 秒の直流パルスを印加した。既報(文献 5)に従い、IVC-PyrLac にて受精卵の培養を行った。

## (4) RNA 抽出・精製、cDNA 合成ならびに量的 RT-PCR (qRT-PCR)

成熟過程の卵、成熟卵ならびに顕微授精卵をプールして、RNeasy Micro Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)にてマニュアル通りに総 RNA を抽出した。Primescript II first strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)を用い cDNA を合成した。LightCycler® 480 SYBR Green I (Roche, Indianapolis, IN, USA)を用い qRT-PCR を行った。それぞれの遺伝子発現量については、チュブリン 1 を標準とした。

## (5) DNA 修復遺伝子の定量

本実験では、ヒトで卵ならびに胚で報告(文献 7, 8)を基に、6 つの遺伝子についてその発現量を検出した(図 2)。

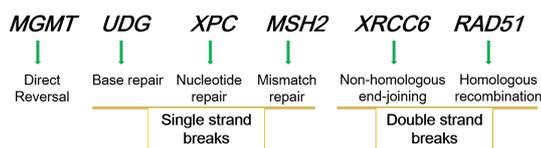


図2. 本研究に用いたDNA修復遺伝子とその特性

## (6) 胚移植

春期発動前の借り腹雌豚に 1,000 IU の eCG を投与し、72 時間後に 500 IU の hCG を投与して発情を同期化させた。この手法により、40-45 時間に排卵が期待される。この排卵の時間帯に顕微授精を行い、約 4 時間後に麻酔下で外科的に借り腹雌豚の卵管に顕微授精卵ならびに単為発生卵を供移植した。なお、単為発生卵も供移植した。成熟卵に 2.2 kV/cm の電圧で 20 μ 秒 DC パルスを印可し、約 4 時間 10 mg/ml サイトカラシン B を処理し極体放出を抑制し二倍体化した。移植後 40 日以降において聴音波診断装置で妊娠の有無を確認した。

## 4. 研究成果

### (1) 凍結乾燥用の溶液の添加物の選択

正常受精の向上を目的に界面活性剤である Triton-X (TX)の効果を確認した。基本液(0 mM もしくは 15 mM のトレハロースを含む)に TX を 0.5% もしくは 1% を加えて(対照区として 0%)凍結乾燥精子を作製し顕微授精を行った。正常受精ならびに異常受精ともにその割合に差がなかった(表 1)。TX は強制的な精子細胞膜を除去するもので、注入後に精子クロマチンの脱凝縮が亢進することでエンドヌクレアーゼに作用を押さるものと期待されたが、受精におよぼす効果は認められなかった。以降の実験では、トレハロースのみを添加することとした。

表1. Triton X-100 (TX) 処理の受精に及ぼす影響

処理区	総卵数	正常受精卵 <sup>a</sup> (%)	異常受精卵 <sup>b</sup> (%)
0 mM Tre + 1% TX	114	77 (67.5 ± 2.3)	23 (20.2 ± 3.0)
0 mM Tre + 0.5% TX	122	77 (63.1 ± 4.4)	26 (21.3 ± 4.2)
0 mM Tre + 0% TX	94	64 (68.1 ± 5.0)	20 (21.3 ± 5.6)
15 mM Tre + 1% TX	93	66 (71.0 ± 7.7)	17 (18.3 ± 6.7)
15 mM Tre + 0.5% TX	129	100 (77.5 ± 4.6)	19 (14.7 ± 2.7)
15 mM Tre + 0% TX	68	51 (75.0 ± 9.7)	10 (14.7 ± 4.1)

<sup>a</sup>極体2個を有し、前核2個を形成した卵。

<sup>b</sup>極体3個を有するもの、前核0個のものあるいは3個異常の卵。

それぞれの区で5回以上の反復を行った。

Tre: trehalose

### (2) 断片化 DNA の修復機構、とくに修復機構に關与する遺伝子発現の解明

顕微授精卵における DNA 修復遺伝子の発現 15 mM トレハロースを加えて凍結乾燥精子を作製した。下垂後に顕微授精を行い 3 時間後に回収した。direct reversal of damage に關与する MGMT 遺伝子、single-strand damage に關与する UDG, XPC ならびに MSH2 遺伝子、

さらに double-strand breaks に関する *XRCC6* ならびに *RDA51* 遺伝子の発現に関して RT-PCR にて検索を行ったが、発現量には差は認められなかった(図3)。

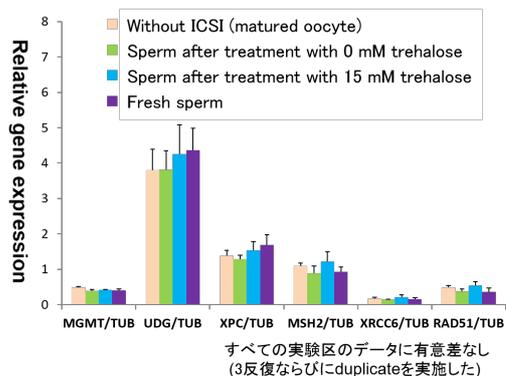


図3. 顕微授精後4時間における、DNA修復遺伝子の相対的遺伝子発現

卵成熟過程における DNA 修復遺伝子の発現成熟段階以前の卵、すなわち卵胞より採卵直後の卵核前期の卵(GV卵, 培養開始後0時間)、やや減数分裂の進行した卵核胞後期の卵(GV-L卵, 20時間)、卵核胞崩壊後で成熟が進行段階にある第一減数分裂中期の成熟卵(M-I卵, 33時間)と、第二減数分裂中期の成熟卵(M-II卵, 44時間)で、これらの6遺伝子を調べたところ、*UDG*の発現がM-I卵ならびにM-II卵で、*XPC*の発現がM-II卵でそれぞれ他の成熟段階の卵(GV卵~GV-L卵ならびにGV卵~M-I卵)に比べ有意にアップレギュレートしていた。さらに、*MSH2*および*RAD21*遺伝子においても成熟が進行するにつれて発現量が増加する傾向が認められた。これらの結果から、卵の成熟中にDNA修復遺伝子の発現量が増加することで、顕微授精された凍結乾燥精子のDNAの断片化が修復されている可能性が示された(図4)。

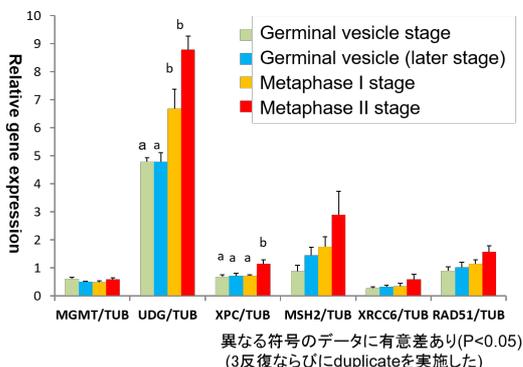


図4. 異なる卵成熟段階におけるDNA修復遺伝子の相対的遺伝子発現

### (3) DNA断片化抑制精子を顕微授精した受精精卵の移植実験

15 mM トレハロース処理の凍結乾燥精子ならびに対照区の精子を顕微注入し、8-12時間後に借り腹雌豚それぞれ、5ならびに6頭ずつ

(計11頭)に移植を行った。いずれも妊娠の継続は認められなかった(表2)。

表2. 凍結乾燥精子の顕微授精卵の移植

実験番号	Trehalose (mM)	移植した卵数 (顕微授精卵 + 単為発生卵*)	妊娠
1	15	106 (77 + 29)	-
2	0	103 (78 + 25)	-
3	15	105 (80 + 25)	-
4	15	100 (84 + 16)	-
5	15	96 (72 + 24)	-
6	0	108 (80 + 28)	-
7	0	120 (96 + 24)	-
8	15	110 (90 + 20)	-
9	0	124 (94 + 30)	-
10	15	114 (88 + 26)	-
11	0	120 (94 + 26)	-

\*単為発生卵は胚の着床・妊娠維持のために供移植した

### < 引用文献 >

Nakai et al. Effects of chelating agents during freeze-drying of boar spermatozoa on DNA fragmentation and on developmental ability in vitro and in vivo after intracytoplasmic sperm head injection. *Zygote* 2007; 15:15-24.

Kure-bayashi et al. Successful implantation of in vitro-matured, electro-activated oocytes in the pig. *Theriogenology* 2000; 53: 1105-1119.

Kusakabe et al. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 13501-13506

Men et al. Effect of trehalose on DNA integrity of freeze-dried boar sperm, fertilization, and embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 2013; 80: 1033-1044.

Kikuchi et al. Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified in vitro system. *Biol Reprod* 2002; 66: 1033-1041.

Nakai et al. Morphologic changes in boar sperm nuclei with reduced disulfide bonds in electrostimulated porcine oocytes. *Reproduction* 2006; 131: 603-611.

Wood et al. Human DNA repair genes. *Science* 2001; 291:1284-1289.

Jaroudi et al. Expression profiling of DNA repair genes in human oocytes and blastocysts using microarrays. *Hum Reprod* 2009; 24: 2649-2655.

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Men NT, Kikuchi K, Furusawa T, Dang-Nguyen TQ, Nakai M, Fukuda A, Noguchi J, Kaneko H, Viet Linh N, Xuan Nguyen B, Tajima A. Expression of DNA repair genes in porcine oocytes before and after fertilization by ICSI using freeze-dried sperm. Anim Sci J. 2016; 87: 1325-1333. (査読有) doi: 10.1111/asj.12554.

Kikuchi K, Kaneko H, Nakai M, Somfai T, Kashiwazaki N, Nagai T. Contribution of in vitro systems to preservation and utilization of porcine genetic resources. Theriogenology. 2016; 86 :170-175. (査読有) doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.029.

〔学会発表〕(計4件)

菊地 和弘, Tamas Somfai ,Nguyen Thi Men. プタにおける配偶子保存研究の取り組み . Cryopreservation Conference 2016 . 2016.11.10 基礎生物学研究所 (愛知県・岡崎市)

Kikuchi K, Men NT, Nakai M, Noguchi J, Hiroyuki K. Contribution of in vitro system for preservation and utilization of porcine genetic resources. 18th International Congress of Animal Reproduction. 2016.6.26 Tours(France).

Kikuchi K, Men NT, Nakai M, Noguchi J, Hiroyuki K. Current status of intracytoplasmic freeze-dried sperm injection into porcine oocytes. 3rd Fatty Pig Conference. 2015.11.18 Budapest (Hungary).

Kikuchi K, Otoi T, Nguyen MD. International collaboration for conservation and utilization of porcine genetic resources. 2014 Animal Production Prediction in Taiwan Inter national Conference. 2014.6.5 Tainan(Taiwan).

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

菊地 和弘 (KIKUCHI, Kazuhiro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門 動物機能利用研究領域・主席研究員

研究者番号：20360456