

	フジイ タシ
<b>氏 名</b>	<b>藤井 貴志</b>
本籍（国籍）	北海道
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 718 号
学位授与年月日	平成 30 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学
<b>学位論文題目</b>	<b>ウシ精子および初期胚におけるアクアポリン 3 および 7 の発現と耐凍性との関連性に関する研究 (Studies on relevance of aquaporins 3 and 7 to cryotolerance in bovine spermatozoa and preimplantation embryos)</b>
学位審査委員	主査 澤井 健(岩手) 副査 手塚 雅文(帯広 教授), 平田 統一(岩手 助教), 木村 直子(山形 教授)

### 論文の内容の要旨

凍結保存精液および凍結保存胚を用いた牛の人工授精および胚移植技術は、効率的な優良種畜生産による育種改良や高能力の素牛生産において不可欠な技術となっている。しかしながら、凍結融解後のウシ精子はその約 30–50%が死滅し、また、凍結融解したウシ初期胚の受胎率は、新鮮胚の受胎率と比較して低い。凍結融解後のウシ精子および初期胚の生存性や受胎能力を高めることができれば、より効率的な育種改良と優良牛生産が可能となる。そのためには、ウシ精子および初期胚の凍結傷害に関わる低温生物学的特性に関して、分子レベルでの理解とそれらの知見に基づく技術改良を行う必要がある。水や耐凍剤の細胞膜透過性は、細胞内氷晶の形成、耐凍剤のもつ細胞毒性および浸透圧変化による細胞の収縮および膨張など様々な凍結傷害と密接に関わる重要な細胞機能である。アクアポリン (AQP) は、細胞膜上に発現し、水の選択的かつ効率的透過に関わるチャネルタンパク質であり、細胞の凍結保存過程において重要な役割を担っていると考えられる。しかし、ウシ精子および初期胚における AQP の発現や凍結保存過程における役割については不明な点が多い。本研究では、水と耐凍剤の両方の透過に関与する AQP3 および AQP7 に着目し、ウシ精子および初期胚における AQP3 および AQP7 発現と精子および初期胚の耐凍性との関連性について検討した。

ウシ精子における AQP3 および AQP7 の発現、凍結保存過程（新鮮射出精子、希釈冷却精子および凍結融解精子）を通じた AQP3 および AQP7 の局在とそれら発現量の変化を調べるとともに、ウシ凍結融解精子における AQP3 および AQP7 タンパク質量と凍結融解後の運動性および細胞膜・先体膜性状との関係を解析した。ウシ凍結融解精子を用いたウェスタンブロッティング (WB) による解析では、AQP3 および AQP7 に対応する明瞭なバンドがそれぞれ約 42 kDa および約 53 kDa に検出され、ウシ精子に AQP3 および AQP7 が発現していることが明らかとなった。蛍光免疫染色による解析では、AQP3 は、ウシ新鮮射出精子、希釈冷却

精子および凍結融解精子の尾部の主部に局在していることが示された。一方、AQP7については、ウシ新鮮射出精子、希釈冷却精子および凍結融解精子全てにおいて、頭部および尾部全体に局在する精子と頭部および中片部に局在する精子の 2 パターンが存在することが明らかとなった。また、希釈冷却および凍結融解操作によってウシ精子における AQP3 および AQP7 の局在および WB により評価したタンパク質量は変化せず、凍結保存過程を通して AQP3 および AQP7 は主に精子の尾部に局在することが示された。さらに、ウシ凍結融解精子における AQP3 および AQP7 タンパク質量と凍結融解後の運動性、特に運動速度に関するパラメータとの間に正の相関関係が認められた。これらの結果から、AQP3 および AQP7 はウシ精子の主に尾部に局在し、特に運動性に関わる精子尾部の耐凍性に重要な役割を持つ可能性が示された。

ウシ卵子および初期胚における AQP3 および AQP7 mRNA およびタンパク質発現動態を解析した。また、AQP3 および AQP7 の人為的な発現抑制または発現促進により、ウシ胚における AQP3 および AQP7 発現と初期胚の耐凍性との関連性について検討した。AQP3 および AQP7 mRNA およびタンパク質は、卵子から拡張胚盤胞期胚までの全てのステージで発現していた。AQP3 および AQP7 mRNA 発現量は、8-16細胞期胚では低い値を示したものの、後期桑実期および初期胚盤胞期胚への発生にともない増加し、その後、胚盤胞期胚への発生にともない減少した。また、体外受精由来の胚盤胞期胚における AQP3 mRNA 量は、体内受精胚と比較し低い値であったが、AQP7 mRNA 量については、両者に差はなかった。RNA 干渉法による AQP3 発現抑制は、ウシ体外受精胚の初期発生およびガラス化保存後の生存性に影響を及ぼさなかった。一方、ウシ体外受精由来の拡張胚盤胞期胚を高浸透圧培地 (351 mOsm) で一定時間培養することで、AQP3 および AQP7 mRNA 発現量が増加し、緩慢凍結-融解およびガラス化-加温後 24 時間培養後の割球細胞の生存性が向上した。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ともに、高浸透圧処理により AQP3 および AQP7 発現を促進することで、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。

今後、ウシ精子および初期胚における AQP の生理的および低温生物学的機能をより詳細に解明するために、ゲノム編集技術や AQP の特異的機能阻害剤等を用いたさらなる解析が必要であるが、本研究で得られた知見は、ウシ精子および初期胚の耐凍性に AQP3 および AQP7 が重要な役割を担う可能性を示すものであり、ウシ精子および初期胚の凍結保存技術の向上に寄与するものである。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、細胞膜上において、水やグリセリン等の耐凍剤の効率的透過に関与するアクアポリン (AQP) 3 および AQP7 に着目し、ウシ精子および初期胚における AQP3 および AQP7 発現と精子および初期胚の耐凍性との関連性について明らかにすることを目的とした。

本研究により、ウシ精子に AQP3 および AQP7 が発現していることが明らかとなった。さらに、AQP3 は、ウシ新鮮射出精子、希釈冷却精子および凍結融解精子の尾部の主部に局在し

ていることが示された。一方、AQP7については、ウシ新鮮射出精子、希釈冷却精子および凍結融解精子全てにおいて、頭部および尾部全体に局在する精子と頭部および中片部に局在する精子の2パターンが存在することが明らかとなった。また、希釈冷却および凍結融解操作によってウシ精子におけるAQP3およびAQP7の局在およびWBにより評価したタンパク質量は変化せず、凍結保存過程を通してAQP3およびAQP7は主に精子の尾部に局在することが示された。さらに、ウシ凍結融解精子におけるAQP3およびAQP7タンパク質量と凍結融解後の運動性、特に運動速度に関するパラメータとの間に正の相関が認められた。以上より、AQP3およびAQP7はウシ精子の主に尾部に局在し、特に運動性に関わる精子尾部の耐凍性に重要な役割を持つ可能性が示された。

AQP3およびAQP7 mRNAおよびタンパク質は、成熟卵子から拡張胚盤胞期胚までの全てのステージで発現していた。体外受精由来の胚盤胞期胚におけるAQP3 mRNA量は、体内受精胚と比較し低い値であったが、AQP7 mRNA量については、両者の間に差はなかった。ウシ体外受精由来の拡張胚盤胞期胚を高浸透圧培地（351 mOsm）で一定時間培養することで、AQP3およびAQP7 mRNA発現量が増加し、緩慢凍結-融解およびガラス化-加温後24時間培養後の割球細胞の生存性が向上した。以上より、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、AQP3およびAQP7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られることが示唆された。

本研究の結果は、ウシ精子および初期胚の耐凍性にAQP3およびAQP7が重要な役割を担う可能性を示すものであり、これらの知見は、ウシ精子および初期胚の凍結保存技術のさらなる発展に寄与することが期待される。

以上、本審査委員会は「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値あるものと認めた。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

##### 主論文

1. Fujii, T., Hirayama, H., Fukuda, S., Kageyama, S., Naito, A., Yoshino, H., Moriyasu, S., Yamazaki, T., Sakamoto, K., Hayakawa, H., Takahashi, K., Takahashi, Y. and Sawai, K. (2018) Expression and localization of aquaporins 3 and 7 in bull spermatozoa and their relevance to sperm motility after cryopreservation. *Journal of Reproduction and Development*. (掲載証明書)

##### 参考論文

1. Fujii, T., Hirayama, H., Naito, A., Kashima, M., Sakai, H., Fukuda, S., Yoshino, H., Moriyasu, S., Kageyama, S., Sugimoto, Y., Matsuyama, S., Hayakawa, H. and Kimura, K. (2017) Production of calves by the transfer of cryopreserved bovine elongating conceptuses and possible application for preimplantation genomic selection. *Journal of Reproduction and Development*, 63(5): 497-504.