

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

2018

岩手大学大学院 連合農学研究科  
生物生産科学専攻（岩手大学配属）

藤井 貴志

## 目次

|                                     | 頁  |
|-------------------------------------|----|
| 第1章 緒論                              | 1  |
| 第2章 ウシ精子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係  |    |
| 1. 緒言                               | 6  |
| 2. 材料および方法                          | 9  |
| 3. 結果                               | 17 |
| 4. 考察                               | 30 |
| 5. 要約                               | 37 |
| 第3章 ウシ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係 |    |
| 1. 緒言                               | 40 |
| 2. 材料および方法                          | 43 |
| 3. 結果                               | 53 |
| 4. 考察                               | 72 |
| 5. 要約                               | 80 |
| 第4章 総括                              | 81 |
| 謝辞                                  | 84 |
| 引用文献                                | 85 |

## 第 1 章

### 緒論

牛における人工授精および胚移植技術は、効率的かつ計画的な優良種畜の造成による育種改良や高能力な繁殖素牛の増産において必須の技術である。このような中、ウシ精子および初期胚の凍結保存技術は、人工授精や胚移植における時間的かつ地理的な制限を排除することができ、人工授精および胚移植技術を活用する上で極めて重要な役割を担っている。ウシ精子の凍結保存法については、1952年に Polge が、グリセリンを耐凍剤としたウシ精液の凍結保存法の開発に成功している (Polge 1952)。また、ウシ初期胚の凍結保存法については、1973年に Wilmut らにより、緩慢凍結法による凍結胚由来の子牛が生産されている (Wilmut ら 1973)。その後、ウシ精子および初期胚の凍結保存法は、人工授精および胚移植技術の実用化と並行して、凍結保存液の種類、耐凍剤の種類や濃度、耐凍剤の平衡時間の検討や新たな凍結器具の開発等がなされ、様々な改良が加えられてきた。現在では、ウシ精子の凍結保存法として、グリセリンを耐凍剤とした「急速凍結法」が、またウシ初期胚の凍結保存法として、グリセリンやエチレングリコール (EG) を耐凍剤とした「緩慢凍結法」および高濃度の EG およびジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた「ガラス化保存法」が一般に普及している。一方で、様々な改良が加えられた現在の凍結保存法を用いても、凍結融解後のウシ精子はその約 30-50%が死滅する。また、凍結融解後のウシ初期胚の移植後の受胎率は、新鮮胚移植の受胎率と比較して低いことが知られている (農林水産省 2016)。凍結融解後のウシ精子および初期胚の生存性および受胎能力をさらに高めることができれば、より効率的かつ計画的な育種改良と優良牛の増産が可能となる。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ついて、分子レベルでの理解とそれらの知見に基づくウシ精子および初期胚の凍結保存法の技術改良が必要である。

凍結保存および融解過程が細胞に与える主な傷害としては、細胞内氷晶形成に

よる傷害、耐凍剤の細胞毒性による傷害および急激な浸透圧変化による細胞の過度な膨張および収縮による傷害が挙げられる (Edashige 2016a, Edashige 2016b, Kasai ら 2002, Pedro ら 1997)。これらの傷害を回避するためには、凍結保存および融解過程において、細胞膜で適切かつ効率的に水や耐凍剤の透過が行われることが重要となる。そのため、精子および初期胚における水や耐凍剤の細胞膜透過性は、上記の傷害と密接に関わる重要な低温生物学的特性であり、凍結保存の成否を左右する極めて重要な要因と考えられる。細胞膜における水や耐凍剤の透過は、主に、脂質二重膜を介した非選択的な単純拡散と脂質二重膜内に存在する輸送タンパク質を介した促進拡散により行われる (Verkman ら 1996)。アクアポリン (AQP) は、1992 年に Agre らにより、水を選択的かつ効率的に透過させる機能を持つ細胞膜の内在性のチャネル分子として発見され、細胞膜における促進拡散に関与する最も重要なタンパク質の一つとして知られている (Preston ら 1992)。AQP は、アスパラギン (N)、プロリン (P) およびアラニン (A) の 3 つのアミノ酸で構成される NPA モチーフという短い疎水領域を持ち、その領域が水の通り道となる小孔を形成し、水分子の選択的透過性を規定している (Murata ら 2000)。これにより、AQP は、細胞膜を介した非選択的な単純拡散と比較し、約 10~100 倍の効率で水を透過させることができる (Agre ら 2002)。哺乳動物では、AQP0 から AQP12 までの 13 種類の AQP が同定されており、それらは一次構造や機能の違いにより、水を選択的に透過させる classical AQP (AQP0、AQP1、AQP2、AQP4、AQP5、AQP6 および AQP8)、水に加えて耐凍剤として使用されるグリセリン等の小分子も透過させる aquaglyceroporins (AQP3、AQP7、AQP9 および AQP10)、そして他の AQP と一次構造が大きく異なり、細胞質内に局在する superaquaporins (AQP11 および AQP12) の 3 つのグループに分類される (Agre ら 2002, Ishibashi ら 2009, Verkman 2002)。

AQP は、様々な動物種において、精子および初期胚を含め、腎臓、肺、消化管、皮膚、子宮、卵巣、精巣など生体の種々の組織および細胞に広く発現しており (Ishibashi ら 1997a、Ishibashi ら 1997b、Hara-Chikuma ら 2005、Huang ら 2006、Takata ら 2004)、生体内外における組織や細胞の恒常性を維持するという極めて重要な生理的役割を担っている。一方、近年、細胞や組織の凍結保存過程における AQP の重要性についても注目が高まっており (Sales ら 2013、Yeste ら 2017)、特にマウスやブタの精子、卵子および初期胚を中心に、AQP 発現と耐凍性との関連性について研究が進められている (Bedford-Guaus ら 2016、Edashige ら 2003、Jin ら 2013、Morató ら 2014、Tan ら 2015)。しかし、ウシ精子および初期胚においては、AQP の発現とその機能について知見の集積が十分でなく、AQP 発現と耐凍性との関係について不明な点が多い。ウシ精子および初期胚における AQP の発現や機能の理解は、ウシ精子および初期胚の凍結保存技術の改善に寄与すると考えられる。

そこで本研究では、水および耐凍剤の両方を透過させる機能を持つ AQP3 および AQP7 に着目し、ウシ精子および初期胚における AQP 発現と耐凍性との関連性について検討した。第 2 章では、ウシ精子における AQP3 および AQP7 の発現と、それらの凍結保存過程を通じた局在性および発現量の変化を調べるとともに、ウシ精子における 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。第 3 章では、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、AQP3 および AQP7 の人為的な発現抑制あるいは発現促進実験により、ウシ初期胚における AQP3 および AQP7 と耐凍性との関連性について検討した。

## 第 2 章

ウシ精子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係

## 1. 緒言

凍結保存精液を用いた牛の人工授精技術は、優良な種雄牛ときわめて多数の雌牛を時間的かつ地理的な制限なく交配させることができ、牛の育種改良および優良牛の増産において必須の技術となっている。ウシ精子の凍結保存法については、EG や DMSO 等と比較して毒性の少ないグリセリンを耐凍剤とした急速凍結法が一般に普及しており、各所に適した手法によりウシ精子の凍結保存が行われている。その一方で、現在の凍結保存技術をもってしても、凍結融解後のウシ精子は、その約 30-50%が死滅する。また、種雄牛の中には、採精直後の精液性状に問題はないものの、凍結融解後に生存性や運動性が著しく低下する個体が存在し、凍結精液生産効率の低下を招く要因の一つとなっている (Curry 2000)。ウシ精子の凍結保存技術のさらなる高度化および効率化のためには、ウシ精子の耐凍性に関わる低温生物学的特性について、分子レベルでの理解とそれらの知見に基づく凍結技術の改良を行う必要がある。

精子は、その凍結保存過程において、凍結保存液での希釈や冷却および凍結融解操作による浸透圧の変化に起因する過度な収縮および膨張、耐凍剤のもつ細胞毒性および細胞内氷晶形成などの様々な凍結傷害のリスクにさらされる。水や耐凍剤の細胞膜透過性は、上記の凍結傷害と密接に関わる重要な低温生物学的特性である (Edashige 2016a, Edashige 2016b, Sales ら 2013, Woods ら 2004)。AQP は、細胞膜における内在性のチャネルタンパク質であり、促進拡散により単純拡散と比較して 10~100 倍の効率で水を透過させる機能を有する (Agre ら 2002, Preston ら 1992)。哺乳動物では、13 種類の AQP が同定されており、その中でも AQP3、AQP7、AQP9 および AQP10 は水に加えて、精子の耐凍剤として広く利用されているグリセリン等の小分子の透過にも関与することから (Agre ら



2002、Ishibashi ら 2009)、精子の凍結保存過程に重要な役割を担うことが予想される。そのため、ウシ精子における AQP の発現や機能を理解することは、ウシ精子の凍結保存技術のさらなる改良に向けた重要な基礎的知見になる。

哺乳動物精子における AQP、特に水と耐凍剤の両方の透過に関与する AQP3 および AQP7 の発現動態、生理的機能および耐凍性との関係については、マウス、ヒトおよびブタにおいて最も研究が進んでいる (Chen ら 2011a、Chen ら 2011b、Laforenza ら 2016、Moretti ら 2012、Prieto-Martinez ら 2016、Prieto-Martinez ら 2017b、Prieto-Martinez ら 2017c、Saito ら 2004、Vicente-Carrillo ら 2016、Yeung ら 2009、Yeung ら 2010b)。マウス精子では、AQP3 は尾部の主部に局在し、AQP3 ノックアウトマウスの精子は、射出後の子宮内侵入にともなう浸透圧の低下に適応できずに尾部が湾曲し、その結果、受精率、雌マウスの妊娠率および一腹産子数が低下する (Chen ら 2011b)。ヒト精子では、AQP7 が尾部全体に局在し、精子運動性の低い不妊男性の精子は、正常な運動性および妊孕性を持つ男性の精子と比較して、フローサイトメーターで測定した AQP7 の蛍光強度が低く、AQP7 が精子の運動性の維持に関連する可能性が報告されている (Saito ら 2004)。さらに、ブタ精子では、AQP3 および AQP7 がそれぞれ頭部と尾部全体および頸部に局在し、凍結融解後の精子運動性および精子の細胞膜・先体膜性状、すなわち耐凍性に関連することが示されている (Prieto-Martínez ら 2017c)。一方、ウシ精子における AQP に関する研究は非常に少なく、マウス、ヒトおよびブタ精子と比較しその役割に関して不明な点が多い。

ウシ精子における AQP 発現と耐凍性との関係については、これまでに 2 報の研究報告がなされている。Prieto-Martínez ら (2017a) は、AQP3 および AQP7 がウシ希釈冷却精子および凍結融解精子の中片部あるいは先体後核帽に発現し、希釈冷却精子における AQP7 量が耐凍性に関連する可能性を報告している。また、

Morató ら (2018) は、aquaglyceroporins には分類されていないもののグリセリン代謝に関わる可能性が報告されている AQP11 (Madeira ら 2015) が、ウシ希釈冷却精子および凍結融解精子の頭部および尾部全体に発現し、希釈冷却精子における AQP11 量が耐凍性、体外受精後の受精率および人工授精後の受胎率と関連する可能性を報告している。一方、近年、ブタ精子では、凍結融解操作により AQP7 の局在が変化することが報告されている (Prieto-Martínez ら 2017c、Vicente-Carrillo ら 2016)。そのため、ウシ精子における AQP3 および AQP7 と耐凍性との関係を明らかにするためには、ウシ精子の凍結保存過程 (新鮮射出精子、希釈冷却精子および凍結融解精子) を通した AQP3 および AQP7 の局在性や発現量の変化について検討する必要がある。しかしながら、ウシ精子の凍結保存過程を通した AQP3 および AQP7 の局在性や発現量の変化を詳細に調べた研究報告はなく、さらに、それらの発現と凍結融解後の精子の運動性や細胞膜・先体膜性状との関係についても不明な点が多い。

本研究では、まず、ウシ精子における AQP3 および AQP7 の発現を確認するため、ウシ凍結融解精子における *AQP3* および *AQP7* の mRNA およびタンパク質発現解析を行った (実験 1)。次に、ウシ精子における AQP3 および AQP7 タンパク質の局在性および凍結保存過程を通したそれらの局在性と発現量の変化について検討した (実験 2)。さらに、ウシ精子における AQP3 および AQP7 発現と耐凍性との関係を明らかにすることを目的に、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 (実験 3)。

## 2. 材料および方法

### (1) 供試精液

実験に供試したウシ精液は、一般社団法人ジェネティクス北海道十勝清水種雄牛センター（十勝清水、北海道、日本）において飼養されていた 13 から 15 ヶ月齢のホルスタイン種若雄牛 9 頭（牛 No. A-I）より採取した。若雄牛を擬牝台に乗駕させ、人工膣法により、1 回の採精につき 1 または 2 射出精子を採取した。精液量および精子濃度を測定した後、一部を新鮮射出精子としてサンプリングした。その後、新鮮射出精液を卵黄クエン酸ソーダ液で等倍希釈し、正立型顕微鏡下で、前進運動精子+++の割合を算出した（家畜人工授精講習会テキスト 2015）。前進運動精子+++の割合が 65–75%の検体のみ以後の凍結保存に供試した。検査後の精液は、約 2 時間かけ 4℃まで冷却し、一部を希釈冷却精子としてサンプリングした。その後、グリセリンを含む卵黄クエン酸ソーダ液により最終液量まで希釈し、2 時間グリセリン平衡処理を行った。グリセリン平衡処理後の精液は、0.5 ml のストローに封入し、プログラムフリーザー（Digitcool 5300; IMV technologies, France）を用いて凍結した後、実験に使用するまで液体窒素中で保存した。凍結保存精子の融解は、ストローを 37℃の温水中に 1 分間浸漬することにより行った（Nebel 2007）。

### (2) RNA 抽出

ウシ凍結融解精子（約 3 億 5,000 万精子）を、5 ml の 0.02% PVA (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) を含む DPBS (Nissui Pharmaceutical Co, Tokyo, Japan) (0.02% PVA-PBS) を用いて、600 g、5 分で 3 回遠心洗浄した。精子ペレットに 2 ml の TRIzol 試薬 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を添加し、60℃

で 30 分間インキュベート（10 分毎に攪拌）した後、室温で 5 分間静置した。200  $\mu$ l のクロロホルム（nacalai tesque, Kyoto, Japan）を添加し、15 秒間攪拌後、室温で 3 分間静置し、12,000  $g$ 、4°C の条件下で 15 分間遠心分離した。上部の水相を新たな 1.5ml チューブに移し、500  $\mu$ l のイソプロパノール（Wako Pure Chemical Industry, ltd, Osaka, Japan）を添加した後、室温で 10 分間静置し、12,000  $g$ 、4°C の条件下で 15 分間遠心分離した。上清を除去後、RNA のペレットを 1 ml の 75% エタノール（Wako）を用いて 7,500  $g$ 、4°C の条件下で 5 分間遠心洗浄した。その後、RNA ペレットを 5 分間真空乾燥させ、100  $\mu$ l の RNase Free Water（Sigma）を添加し、55°C で 10 分間インキュベートした。得られた RNA サンプルは、RNeasy Mini Kit（Qiagen, Tokyo, Japan）のクリーンアッププロトコルに従い精製し、最終液量が 25  $\mu$ l になるよう調製した。RNA サンプルは逆転写（RT）反応まで -80°C のフリーザー内において保存した。

### （3）RT-PCR およびアガロースゲル電気泳動

ウシ凍結融解精子から抽出した RNA サンプルの RT 反応は、QuantiTect Reverse Transcription Kit（Qiagen）を用いて行った。RNA サンプル 12  $\mu$ l に、gDNA wipeout buffer を 2  $\mu$ l 添加し、42°C で 2 分間インキュベートした。その後、RT 酵素および RT buffer をそれぞれ 1  $\mu$ l および 5  $\mu$ l 添加し、42°C で 30 分間処理することで cDNA を合成した。コントロールとして、RT 酵素を添加しないサンプル（RT-）も作製した。RT 反応後、95°C で 3 分間処理することで RT 酵素を失活させ、PCR 反応まで -30°C のフリーザー内で保存した。PCR 反応は、HotStarTaq Master Mix Kit（Qiagen）を用いて行った。10  $\mu$ l の 2 $\times$ Master Mix、1  $\mu$ l の Forward および Reverse Primer（最終濃度 0.5  $\mu$ M、Table 1）、6  $\mu$ l の RNase Free Water および 2  $\mu$ l の cDNA サンプルを混和し、95°C で 15 分間処理

することで HotStarTaq DNA ポリメラーゼを活性化した。その後、94°C-30 秒、59°C-1 分、72°C-1 分の反応を 45 サイクル行うことで cDNA を増幅した。その後、1% エチジウムブロマイド (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) を含む 1.5 %アガロースゲル (Lonza, Tokyo, Japan) により電気泳動を行い、増幅産物の有無およびサイズを確認した。

#### (4) タンパク質抽出およびウエスタンブロッティング (WB)

ウシ新鮮射出精子、希釈冷却精子および凍結融解精子 (約 5,000 万精子) を、0.02% PVA-PBS を用いて、600 g、5 分で 3 回遠心洗浄した。ウシ精子、腎臓および赤血球からのタンパク質抽出は、ISOGEN (Nippon Gene, Toyama, Japan) を用いてメーカーの説明書に従い実施した。抽出したタンパク質は、100  $\mu$ l の 2% SDS および 100 mM DTT を含むサンプルバッファー (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 中で 6 分間煮沸し、WB 用のサンプルとした。ウシ精子における  $\alpha$ -tubulin 検出用のサンプルは、サンプルバッファーでさらに 10 倍希釈することで作製した。各サンプル 10  $\mu$ l を用いて、60 mA、90 分の条件下で 12% ポリアクリルアミドゲル (Invitrogen) により電気泳動を行い、Trans-Blot システム (AE-7500; ATTO Corporation) により PVDF メンブレン (Millipore Corporation) に転写した。その後、1% ウシ血清アルブミン (BSA; essentially fatty acid-free, Sigma) および 5% 正常ヤギ血清 (NGS; Wako) を含む DPBS 中において、室温で 30 分間ブロッキング処理を行った。1 次抗体反応は、anti-human AQP3 rabbit polyclonal IgG (sc-20811; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA, 1:200)、anti-human AQP7 rabbit polyclonal IgG (orb13253; biorbyt, san Francisco, CA, USA, 1:500)、anti- $\alpha$  tubulin mouse monoclonal IgG (MABT205; Millipore Corporation, 1:500) または正常ウサギ血清 (NRS; Invitrogen, 1:5000) を含む

抗体希釈液（0.05% Tween-20、0.1% BSA、1% NGS を含む DPBS）中において、4℃で一晩行った。DPBS を用いて 5 分間の洗浄処理を 5 回行った後、2 次抗体反応を行った。2 次抗体反応は、horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit（sc-2004; Santa Cruz Biotechnology, 1:5000）または goat anti-mouse（sc-2005; Santa Cruz Biotechnology, 1:5000）immunoglobulin secondary antibody を含む抗体希釈液中において、室温で 2 時間行った。その後、DPBS を用いて 5 分間の洗浄処理を 5 回行い、HRP 発光基質（Millipore Corporation）と室温で 2 分間反応させた。反応後のメンブレンは、ChemiDoc CCD カメラ（Bio-rad laboratories, Hercules, CA, USA）で撮影し、Image J ソフトにより各バンドの面積を数値化し、各タンパク質量として半定量した。AQP3 および AQP7 タンパク質量は、 $\alpha$ -tubulin タンパク質量で補正した。各バンドの分子量は、分子量マーカー（LC5925; Invitrogen）を用いて作成した検量線により推定した。

#### （5）蛍光免疫染色

ウシ新鮮射出精子、希釈冷却精子および凍結融解精子を、5 ml の 0.02% PVA-PBS を用いて、600 g、5 分で 3 回遠心洗浄した。精子ペレットに 3ml の 4% PFA-PBS（Wako）を添加し、室温で 30 分間固定処理を行った。その後、5 ml の 0.02% PVA-PBS を用いて、600 g、5 分で 3 回遠心洗浄し、0.02% PVA-PBS で再懸濁後、APS コートスライドガラス（Matsunami Glass, Osaka, Japan）に塗抹し、1 時間風乾した。0.25% Triton X-100（Sigma）および 1% BSA を含む DPBS 中において、室温で 10 分間透過処理を行った。DPBS を用いて 5 分間の洗浄処理を 3 回行った後、1% BSA および 5% NGS を含む DPBS 中において、室温で 30 分間ブロッキング処理を行った。1 次抗体反応は、anti-human AQP3 rabbit

polyclonal IgG (sc-20811; Santa Cruz Biotechnology, 1:50)、anti-human AQP7 rabbit polyclonal IgG (orb13253; biorbyt, 1:100) または NRS (Invitrogen, 1:5000) を含む抗体希釈液中において、4°Cで一晩行った。DPBS を用いて 5 分間の洗浄処理を 5 回行った後、2 次抗体反応を行った。2 次抗体反応は、goat anti-rabbit FITC-conjugated antibody (sc-2012; Santa Cruz Biotechnology, 1:500) を用いて室温で 2 時間行った。その後、DPBS を用いて 5 分間の洗浄処理を 5 回行い、DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を含む封入液で封入し、蛍光顕微鏡 (Nikon E800; Nikon, Tokyo, Japan) を用いて観察および写真撮影を行った。

#### (6) ウシ凍結融解精子の運動性検査

ウシ凍結融解精子の運動性検査は、精子運動解析装置 (IVOS II; HTCasa version 1.7.1, Hamilton Thorne Inc., Beverly, MA, USA) を用いて実施した。5  $\mu$ l の凍結融解精子を検査に適切な濃度になるようグリセリンを含む卵黄クエン酸ソーダ液と混和し、37°Cで 5 分間インキュベートした。その後、3  $\mu$ l の混和液を 37°Cに温めた専用のカウンティングチャンバー (Leja, Nieuw Venneep, Netherlands) に添加し、運動精子率 (motile: 頭部の長さ以上の距離を動いた精子、%)、前進運動精子率 (progressive: 精子進行方向性速度平均および直線係数平均が、それぞれ 50  $\mu$ m/s および 80%以上の精子、%)、精子進行方向性速度平均 (VAP、 $\mu$ m/s)、精子直線地点移動平均 (VSL、 $\mu$ m/s)、精子曲線地点移動平均 (VCL、 $\mu$ m/s)、直線係数平均 (STR: VSL/VAP、%)、直進性の平均 (LIN: VSL/VCL、%)、精子頭部の平均振幅 (ALH、 $\mu$ m) および精子頭部の秒間振幅回数 (BCF、Hz) の 9 つのパラメータについて検査を実施した。運動性の各パラメータは、カウンティングチャンバーの任意の 6 ヶ所について、60 フレーム/秒

の条件でデジタル画像として記録し、その平均値を計測値とした。1 検体につき 3 回反復して検査を実施し（最低 900 精子を検査）、その平均値を統計解析に使用した。

#### （7）蛍光染色によるウシ凍結融解精子の細胞膜・先体膜性状の解析

ウシ凍結融解精子における細胞膜・先体膜性状の検査は、Celeghini ら（2007）の方法を参考に、Hoechst 33342 (Sigma)、PI (Sigma) および PNA-FITC (Vector Laboratories) を用いて実施した。200  $\mu$ l のウシ凍結融解精子に Hoechst 33342（最終濃度 18  $\mu$ M）を添加し、遮光下において、37°C で 10 分間インキュベートした。その後、PI（最終濃度 30  $\mu$ M）および PNA-FITC（最終濃度 25  $\mu$ g/ml）を添加し、遮光下において、37°C で 8 分間インキュベートした。染色精子は、0.1%ホルムアルデヒド（Wako）で固定した後、スライドガラス（Matsunami Glass）にのせ、カバーガラス（Matsunami Glass）で覆い、即座に蛍光顕微鏡を用いて観察および写真撮影を行った。Hoechst 33342 に染色されるものを精子とし、PI および PNA-FITC に染色される精子をそれぞれ細胞膜損傷精子および先体膜損傷精子と判定し、次の 4 群に分類した：①細胞膜・先体膜ともに正常な精子（PI-PNA-）、②先体膜のみ損傷した精子（PI-PNA+）、③細胞膜のみ損傷した精子（PI+PNA-）、④細胞膜・先体膜ともに損傷した精子（PI+PNA+）。染色精子の計測は、Image J ソフト (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) の細胞カウントツールを用い、1 検体につき 3 回反復して検査を実施し（最低 251 精子を検査）、その平均値を統計解析に使用した。

#### （8）実験計画

実験 1: ウシ精子における *AQP3* および *AQP7* mRNA およびタンパク質発現解析



ウシ精子における AQP3 および AQP7 の発現を確認するため、雄牛 1 頭（牛 No. A）の凍結融解精子を用いて、AQP3 と AQP7 の mRNA およびタンパク質発現をそれぞれ RT-PCR および WB により解析した。WB によるタンパク質発現解析では、ポジティブコントロールとして腎臓（Rojen ら 2011）を、ネガティブコントロールとして赤血球（Campos ら 2011）を供試した。

実験 2：ウシ新鮮射出精子、希釈冷却精子および凍結融解精子における AQP3 および AQP7 タンパク質の局在性と発現量解析

ウシ精子における AQP3 および AQP7 タンパク質の局在性および凍結保存過程を通したそれらの局在性と発現量の変化を明らかにするため、雄牛 2 頭（牛 No. B および C）、各 4 ロット（計 8 検体）の新鮮射出精子、希釈冷却精子および凍結融解精子における AQP3 と AQP7 タンパク質の局在性およびタンパク質発現量をそれぞれ蛍光免疫染色および WB により解析した。AQP7 の局在性については、2 つの局在パターンの精子が観察されたため（局在パターン 1 および 2）、各検体について最低 200 精子を観察し、局在パターン 1 の精子の割合を算出した。

実験 3：ウシ精子における AQP3 および AQP7 タンパク質発現と耐凍性との関係の解析

ウシ精子における AQP3 および AQP7 発現と耐凍性との関係を明らかにするため、雄牛 6 頭（牛 No. D-I）、各 3 ロット（計 18 検体）の凍結融解精子における AQP3 および AQP7 タンパク質量と運動性および細胞膜・先体膜性状の関係を重回帰分析により解析した。

（9）統計解析

統計解析は、統計解析ソフト R (R version 3.3.2) を用いて行った。実験 2 における、雄牛および凍結保存操作（希釈冷却および凍結融解操作）が、ウシ精子における AQP7 の局在パターンおよび AQP3 と AQP7 タンパク質量に及ぼす影響については、2 元配置の分散分析により解析を行った。AQP7 の局在パターン 1 の割合については、その値をアークサイン変換した後に検定を行った。実験 3 におけるウシ凍結融解精子の AQP3 および AQP7 タンパク質量と運動性および細胞膜・先体膜性状の関係については、重回帰分析を行った。VAP、VSL、VCL、ALH および BCF については、正規分布を仮定し、一般線形モデルに当てはめて解析を実施した。motile、progressive、STR、LIN、PI-PNA<sup>-</sup>、PI-PNA<sup>+</sup>、PI+PNA<sup>-</sup>、PI+PNA<sup>+</sup>については、ベータ分布を仮定し、一般化線形モデルに当てはめて解析を実施した。9 つの運動性のパラメータおよび 4 つの細胞膜・先体膜性状のパラメータをそれぞれ個々の従属変数とし、AQP3 および AQP7 タンパク質量を独立変数とした。全ての解析において、P 値が 0.05 未満の場合、統計的に有意とみなした。

### 3. 結果

実験 1: ウシ精子における *AQP3* および *AQP7* mRNA およびタンパク質発現解析

*AQP3* および *AQP7* について、ウシ凍結融解精子由来の cDNA を用いて PCR を行い、アガロースゲル電気泳動を行った結果を Fig. 1 に示した。RT 酵素を添加したサンプルでは、*AQP3* および *AQP7* ともに目的のサイズ (*AQP3*: 209 bp、*AQP7*: 152 bp) にバンドが検出された。RT 酵素を添加しなかったサンプルでは、*AQP3* および *AQP7* ともにバンドは検出されず、ウシ凍結融解精子に *AQP3* および *AQP7* mRNA が存在することが明らかとなった。次に、ウシ凍結融解精子、腎臓および赤血球における *AQP3* および *AQP7* 抗体を用いた WB の結果を Fig. 2 に示した。*AQP3* について、凍結融解精子では、約 42 kDa に単一の明瞭なバンドが検出された。一方、腎臓では、約 41–42 kDa および約 52 kDa の 2 つのバンドが検出された。*AQP7* については、凍結融解精子において約 53 kDa に明瞭なバンドが検出された。腎臓では、約 40 kDa および約 53 kDa に 2 つの明瞭なバンドが検出された。赤血球では、*AQP3* および *AQP7* ともに明瞭なバンドは検出されなかった。*AQP3* および *AQP7* 抗体の代わりに、NRS を使用した場合、凍結融解精子において約 49 kDa、腎臓において約 40 kDa に非特異的なバンドが検出された。

実験 2-1: ウシ新鮮射出精子、希釈冷却精子および凍結融解精子における *AQP3* および *AQP7* タンパク質の局在性解析

蛍光免疫染色による、ウシ新鮮射出精子、希釈冷却精子および凍結融解精子における *AQP3* および *AQP7* 局在解析の結果をそれぞれ Fig.3 および Fig.4 に示した。*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全てにおい

て尾部の主部に局在しており、凍結保存操作による局在性の変化や個体間での局在性の差異はなかった (Fig. 3)。一方、AQP7 については、頭部および尾部全体に局在するパターン (局在パターン 1) と頭部および中片部に局在するパターン (局在パターン 2) の 2 つの局在パターンの精子が存在した (Fig. 4)。AQP3 および AQP7 抗体に代わりに、NRS を使用した場合、蛍光シグナルは検出されなかった (Fig. 3 および Fig. 4)。AQP7 局在パターン 1 の精子の割合について、2 元配置の分散分析を行ったところ、雄牛および凍結保存操作間に交互作用はなく、凍結保存操作によって影響を受けなかったが、雄牛 (牛 No. B および C) 間で差異が認められた (交互作用 :  $P = 0.172$ 、雄牛  $P = 0.016$ 、凍結保存操作  $P = 0.092$ ) (Fig. 5)。

実験 2-2 : ウシ新鮮射出精子、希釈冷却精子および凍結融解精子における AQP3 および AQP7 タンパク質の発現量解析

WB による AQP3 および AQP7 のバンドパターンは、新鮮射出精子、希釈冷却精子および凍結融解精子において差異はなかった (Fig. 6)。また、AQP3 および AQP7 タンパク質量について、2 元配置の分散分析を行ったところ、雄牛および凍結保存操作間に交互作用はなく、雄牛 (牛 No. B および C) および凍結保存操作によって影響を受けなかった (AQP3 : 交互作用  $P = 0.772$ 、雄牛  $P = 0.504$ 、凍結保存操作  $P = 0.889$ 、AQP7 : 交互作用  $P = 0.895$ 、雄牛  $P = 0.166$ 、凍結保存操作  $P = 0.726$ ) (Fig. 6)。

実験 3 : ウシ精子における AQP3 および AQP7 発現と耐凍性との関係の解析

実験 3 に供試した雄牛 6 頭 (牛 No. D-I)、各 3 ロット (計 18 検体) の凍結融解精子における運動性、細胞膜・先体膜性状および AQP3 と AQP7 タンパク質量

の結果をそれぞれ Table 2 および Fig. 7 に示した。また、重回帰分析の結果を Table 3 に示した。重回帰分析の結果、全てのモデルにおいて、交互作用は認められなかった。AQP3 タンパク質量と VAP、VSL、VCL および STR の間に正の相関関係が認められた (Table 3、VAP :  $P = 0.029$ 、VSL :  $P = 0.015$ 、VCL :  $P = 0.019$ 、STR :  $P = 0.008$ )。また、AQP7 については、progressive、VAP、VSL、VCL および ALH との間に正の相関関係が認められた (Table 3、progressive :  $P = 0.027$ 、VAP :  $P < 0.001$ 、VSL :  $P < 0.001$ 、VCL :  $P < 0.001$ 、ALH :  $P < 0.001$ )。一方、AQP7 タンパク質量と BCF の間には、負の相関関係が認められた ( $P = 0.009$ )。細胞膜・先体膜性状については、4 つのパラメータ全てにおいて AQP3 および AQP7 タンパク質量との間に関連性は認められなかった (Table 3)。

Table 1. Primer sequences for RT-PCR

| Genes       | Nucleotide sequences (5'-3') | Annealing temperature (°C) | Fragment size (bp) | GenBank Accession no. |
|-------------|------------------------------|----------------------------|--------------------|-----------------------|
| <i>AQP3</i> | F-GCACAAGGAGCAGATGTGAA       | 59                         | 209                | NM_001079794          |
|             | R-TACAGGCTGAAGGICCTGCT       |                            |                    |                       |
| <i>AQP7</i> | F-CATTGTGACTGGCATCCTTG       | 59                         | 152                | NM_001076378          |
|             | R-ACCACCAGTCCTTGTTCTG        |                            |                    |                       |

F: forward, R: reverse

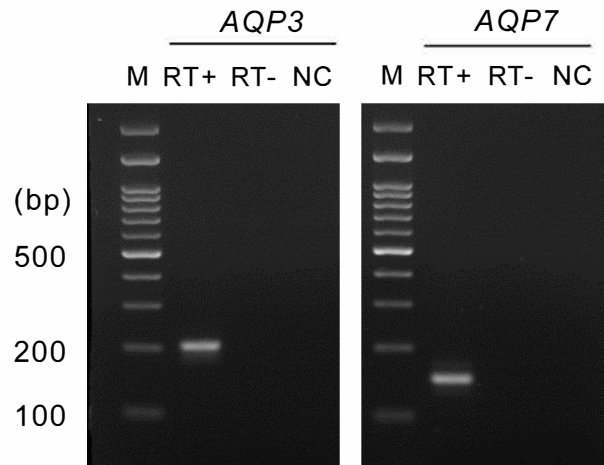


Fig. 1. Detection of *AQP3* and *AQP7* mRNA in frozen–thawed bull (Bull A) spermatozoa. Expected PCR products for bovine *AQP3* (209bp) and *AQP7* (152bp) were obtained from sperm RNA (RT+). No band was detected in RNA samples omitted reverse transcriptase (RT-). M: molecular marker. NC: negative control.

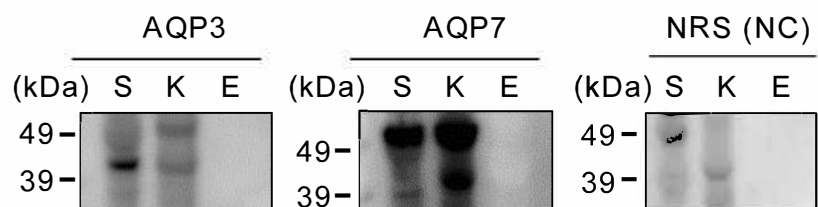


Fig. 2. Representative photographs of Western blotting for AQP3 and AQP7 in frozen-thawed bull (Bull A) spermatozoa, kidney, and erythrocytes. S: spermatozoa. K: kidney. E: erythrocytes. NRS: normal rabbit serum. NC: negative control.



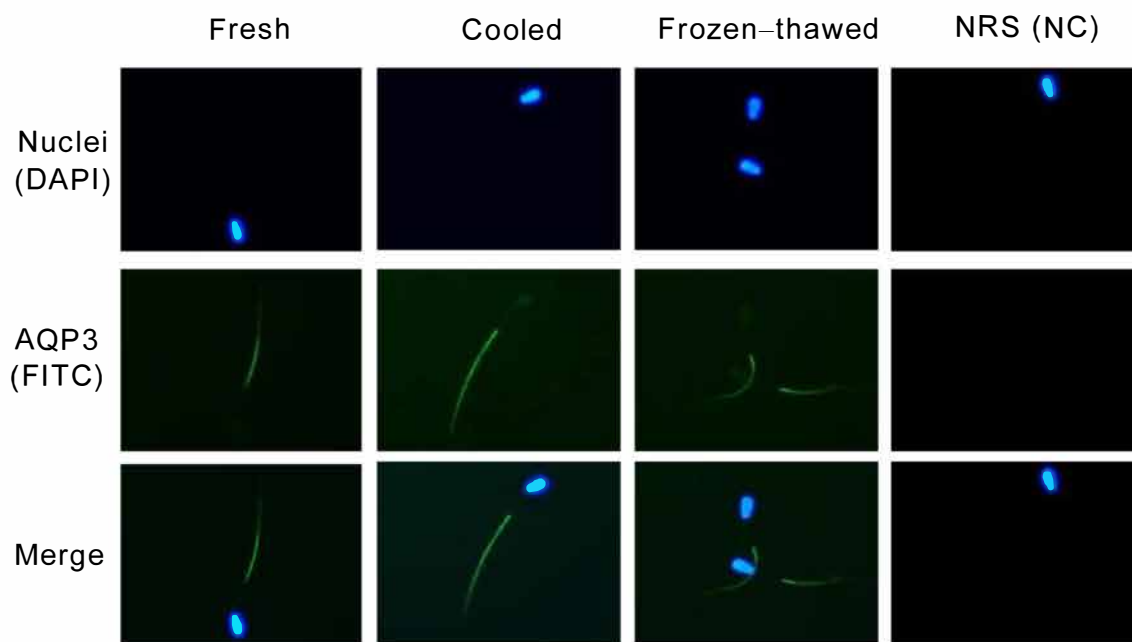


Fig. 3. Representative photographs of immunostaining for AQP3 in fresh, cooled, and frozen-thawed bull (Bull B or C) spermatozoa. NRS: normal rabbit serum. NC: negative control.

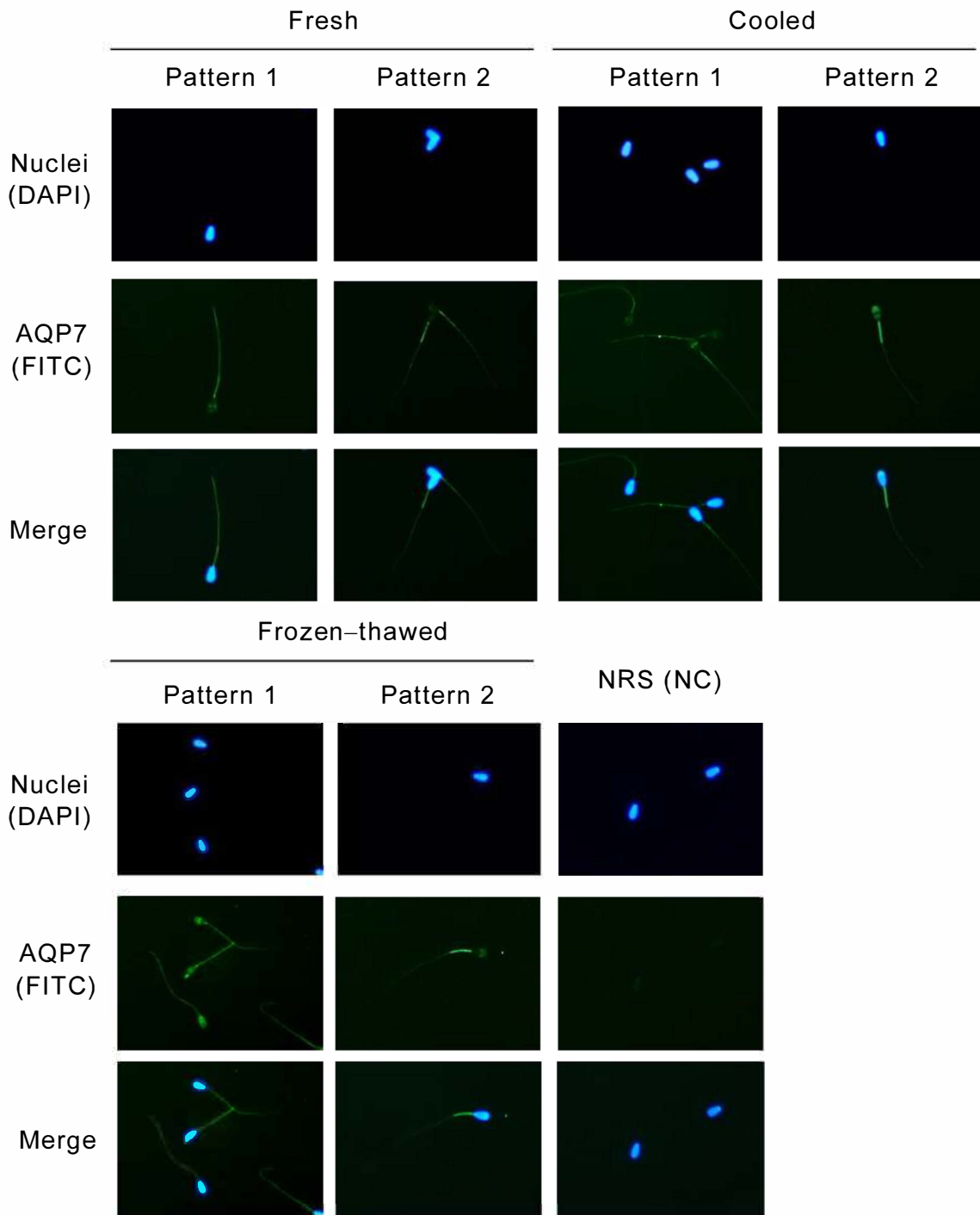


Fig. 4. Representative photographs of immunostaining for AQP7 in fresh, cooled, and frozen-thawed bull (Bull B or C) spermatozoa. Pattern 1: diffused staining in head and entire tail. Pattern 2: diffused staining in head and clear staining in mid-piece. NRS: normal rabbit serum. NC: negative control.

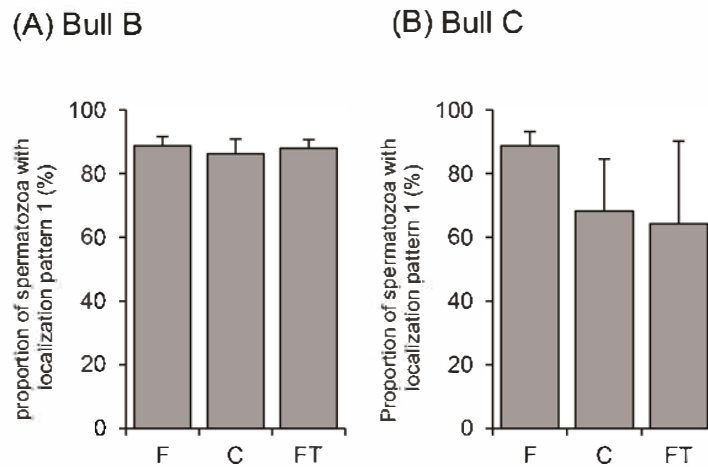


Fig. 5. The proportion of spermatozoa with localization pattern 1 of AQP7 in fresh, cooled, and, frozen–thawed steps evaluated by immunocytochemistry analysis (A: Bull B, B: Bull C). Columns and bars indicate mean value and the standard deviation (SD), respectively. In a two-way ANOVA, no interaction was detected between bull and cryopreservation step. Proportion of spermatozoa with localization pattern 1 did not differ among fresh, cooled, and frozen–thawed spermatozoa (the mean value  $\pm$  SD in fresh, cooled, and frozen–thawed spermatozoa were  $88.7 \pm 3.5$ ,  $77.2 \pm 14.7$ , and  $76.1 \pm 21.3$ , respectively,  $P = 0.092$ ), whereas differed between Bull B and C (the mean value  $\pm$  SD in Bull B and C were  $87.6 \pm 3.5$  and  $73.8 \pm 19.7$ , respectively,  $P = 0.016$ ). F: fresh spermatozoa, C: cooled spermatozoa, FT: frozen–thawed spermatozoa.

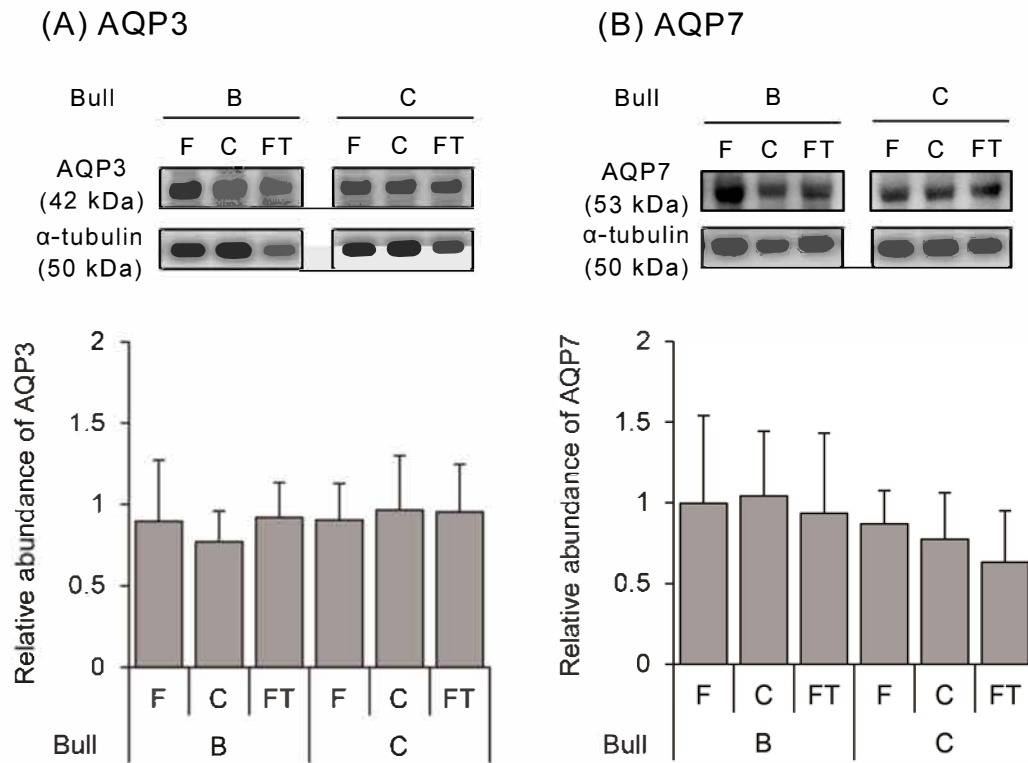


Fig. 6. The relative abundances of (A) AQP3 and (B) AQP7 in fresh, cooled, and, frozen–thawed bull spermatozoa evaluated by image analysis of the bands detected in Western blotting. Columns and bars indicate mean value and the SD, respectively. In a two-way ANOVA, no interaction was detected between bull and cryopreservation step. No significant difference was observed in relative abundances of AQP3 and AQP7 evaluated by Western blotting among fresh, cooled, and frozen–thawed bull spermatozoa (AQP3:  $P = 0.889$ , AQP7:  $P = 0.726$ ) or between Bull B and C (AQP3:  $P = 0.504$ , AQP7:  $P = 0.166$ ). F: fresh spermatozoa, C: cooled spermatozoa, FT: frozen–thawed spermatozoa.

Table 2. Motility and integrity of plasma and acrosomal membranes in frozen–thawed bull spermatozoa.

| Bull | Lot | Motility   |                 |            |            |            |         |         |          |          | Plasma and acrosomal membrane integrity |             |             |             |
|------|-----|------------|-----------------|------------|------------|------------|---------|---------|----------|----------|---|-------------|-------------|-------------|
|      |     | motile (%) | progressive (%) | VAP (µm/s) | VSL (µm/s) | VCL (µm/s) | STR (%) | LIN (%) | ALH (µm) | BCF (Hz) | PI–PNA– (%)                             | PI–PNA+ (%) | PI+PNA– (%) | PI+PNA+ (%) |
| D    | a   | 46.5       | 35.3            | 96.1       | 86.4       | 158.9      | 89.5    | 56.4    | 6.2      | 33.3     | 64.1                                    | 0.6         | 17.7        | 17.5        |
|      | b   | 47.8       | 34.1            | 91.9       | 82.4       | 148.8      | 88.3    | 56.4    | 5.7      | 35.2     | 62.4                                    | 0.7         | 19.9        | 17.0        |
|      | c   | 55.6       | 42.3            | 95.7       | 86.5       | 153.5      | 89.4    | 58.0    | 5.9      | 35.0     | 62.9                                    | 0.4         | 20.7        | 15.9        |
| E    | a   | 53.3       | 42.2            | 98.7       | 91.0       | 161.1      | 90.8    | 57.9    | 6.0      | 36.7     | 71.3                                    | 0.0         | 15.3        | 13.4        |
|      | b   | 51.5       | 41.1            | 101.0      | 92.8       | 162.4      | 90.6    | 57.9    | 6.0      | 37.1     | 65.3                                    | 0.2         | 21.6        | 12.9        |
|      | c   | 53.8       | 42.6            | 102.2      | 93.3       | 163.4      | 90.2    | 58.2    | 6.0      | 36.8     | 64.6                                    | 0.3         | 18.9        | 16.2        |
| F    | a   | 59.0       | 46.8            | 103.3      | 93.1       | 174.1      | 89.9    | 55.7    | 6.7      | 35.1     | 77.9                                    | 0.0         | 9.8         | 12.2        |
|      | b   | 54.4       | 43.8            | 108.1      | 97.2       | 187.1      | 88.8    | 53.6    | 7.5      | 32.3     | 66.3                                    | 0.5         | 15.1        | 18.1        |
|      | c   | 58.9       | 49.4            | 113.1      | 102.7      | 193.1      | 90.4    | 54.7    | 7.6      | 32.8     | 67.4                                    | 0.5         | 16.0        | 16.2        |
| G    | a   | 38.3       | 23.3            | 76.8       | 70.2       | 120.7      | 90.3    | 61.2    | 4.2      | 37.7     | 69.5                                    | 0.2         | 15.1        | 15.1        |
|      | b   | 43.4       | 27.8            | 81.0       | 73.8       | 127.3      | 90.2    | 60.6    | 4.3      | 39.1     | 62.6                                    | 0.2         | 19.3        | 17.9        |
|      | c   | 42.1       | 27.0            | 79.5       | 71.2       | 126.1      | 88.8    | 58.9    | 4.6      | 36.1     | 44.4                                    | 0.6         | 28.1        | 26.9        |
| H    | a   | 45.0       | 26.4            | 75.9       | 66.3       | 124.7      | 84.9    | 53.9    | 5.1      | 33.9     | 70.3                                    | 0.2         | 11.6        | 17.8        |
|      | b   | 56.5       | 36.3            | 84.2       | 73.0       | 135.3      | 83.8    | 54.1    | 5.3      | 36.0     | 68.4                                    | 0.5         | 16.2        | 14.9        |
|      | c   | 66.0       | 42.9            | 81.1       | 71.1       | 129.7      | 86.5    | 56.1    | 5.0      | 36.4     | 74.2                                    | 0.3         | 13.9        | 11.7        |
| I    | a   | 46.0       | 34.6            | 91.7       | 83.6       | 141.3      | 89.8    | 61.4    | 5.3      | 33.8     | 63.8                                    | 0.0         | 20.6        | 15.6        |
|      | b   | 28.0       | 20.8            | 94.6       | 86.1       | 146.3      | 88.3    | 59.8    | 5.4      | 33.3     | 47.3                                    | 0.2         | 26.0        | 26.5        |
|      | c   | 41.8       | 31.9            | 96.0       | 85.7       | 149.2      | 88.3    | 59.6    | 5.8      | 33.3     | 53.5                                    | 0.2         | 20.6        | 25.7        |

motile: percentage of motile spermatozoa. progressive: percentage of progressively motile spermatozoa. VAP: average path velocity.

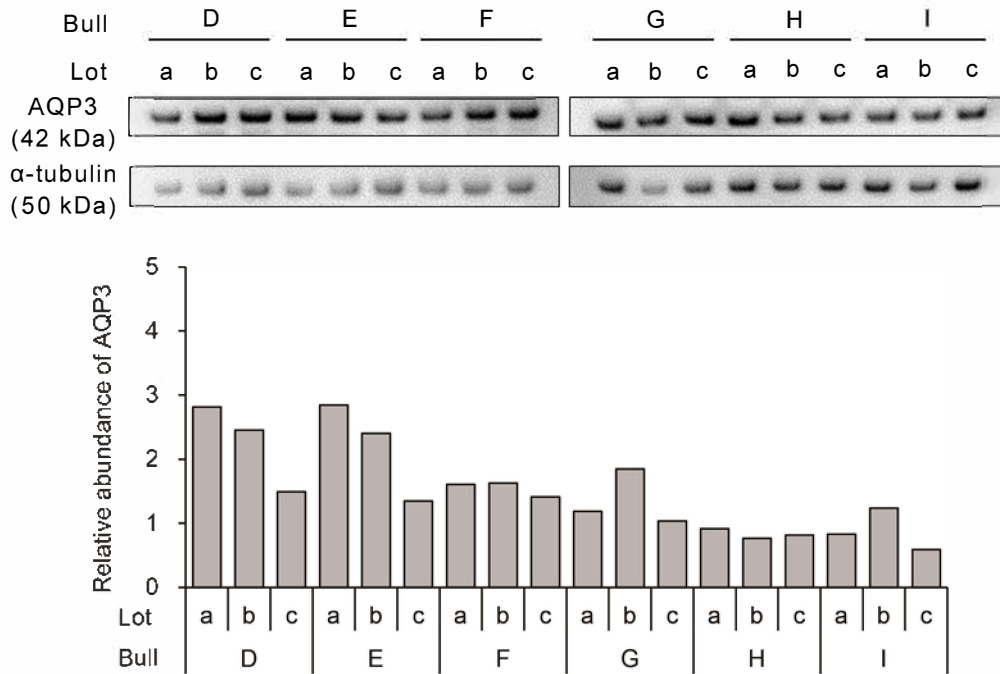
VSL: straight-line velocity. VCL: curvilinear velocity. STR: percentage of straightness (VSL/VAP). LIN: percentage of linearity (VSL/VCL).

ALH: amplitude of lateral head displacement. BCF: beat frequency.

PI–PNA–: PI unstained and PNA–FITC unstained. PI–PNA+: PI unstained and PNA–FITC stained.

PI+PNA–: PI stained and PNA–FITC unstained. PI+PNA+: PI stained and PNA–FITC stained.

(A) AQP3



(B) AQP7

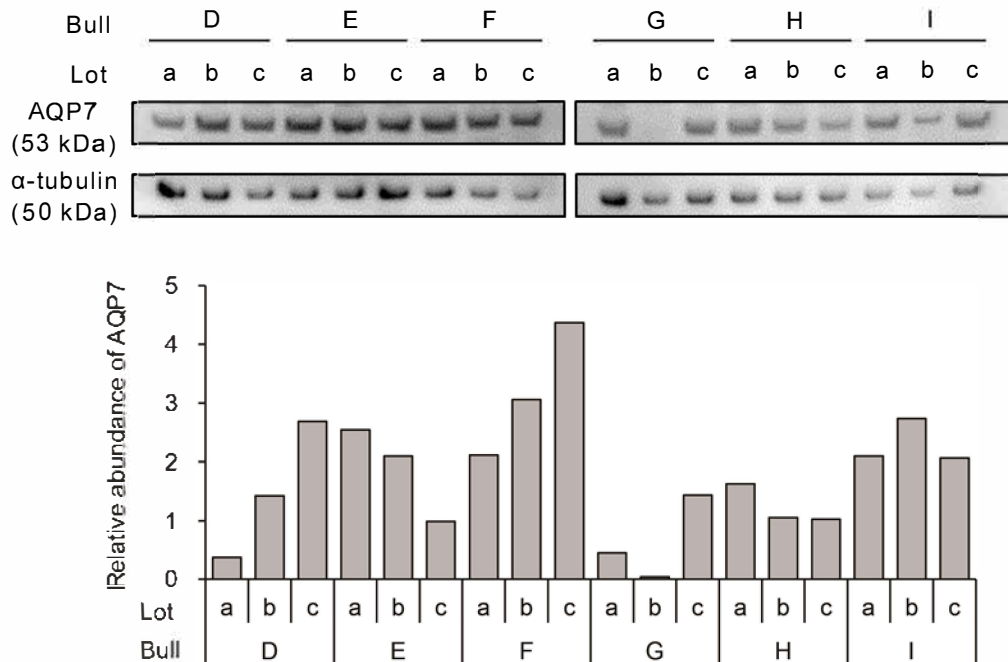


Fig. 7. The relative abundances of (A) AQP3 and (B) AQP7 evaluated by image analysis of the bands detected in Western blotting in frozen-thawed bull (Bulls D to I) spermatozoa.

Table 3. Effect of the relative abundances of AQP3 and AQP7 on motility and membranes integrity parameters in frozen–thawed bull spermatozoa.

| Dependent variables | Independent variables |        |         |          |        |         |            |
|---------------------|-----------------------|--------|---------|----------|--------|---------|------------|
|                     | AQP3                  |        |         | AQP7     |        |         |            |
|                     | Estimate              | SEM    | P value | Estimate | SEM    | P value |            |
| Motility            | motile                | 0.039  | 0.119   | 0.741    | 0.060  | 0.078   | 0.436      |
|                     | progressive           | 0.144  | 0.106   | 0.177    | 0.152  | 0.069   | 0.027*     |
|                     | VAP                   | 5.968  | 2.471   | 0.029*   | 7.182  | 1.607   | < 0.001*** |
|                     | VSL                   | 6.375  | 2.330   | 0.015*   | 6.782  | 1.515   | < 0.001*** |
|                     | VCL                   | 12.271 | 4.659   | 0.019*   | 13.852 | 3.031   | < 0.001*** |
|                     | STR                   | 0.140  | 0.053   | 0.008**  | 0.033  | 0.034   | 0.332      |
|                     | LIN                   | −0.014 | 0.033   | 0.666    | −0.027 | 0.021   | 0.199      |
|                     | ALH                   | 0.420  | 0.212   | 0.067    | 0.636  | 0.138   | < 0.001*** |
|                     | BCF                   | 0.375  | 0.542   | 0.499    | −1.061 | 0.353   | 0.009**    |
| Membrane integrity  | PI−PNA−               | 0.083  | 0.120   | 0.489    | −0.015 | 0.078   | 0.850      |
|                     | PI−PNA+               | −0.034 | 0.254   | 0.893    | −0.221 | 0.172   | 0.199      |
|                     | PI+PNA−               | −0.003 | 0.103   | 0.979    | 0.001  | 0.067   | 0.983      |
|                     | PI+PNA+               | −0.120 | 0.099   | 0.226    | 0.022  | 0.063   | 0.730      |

Asterisk indicates statistically significant (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, and \*\*\*P < 0.001).

motile: percentage of motile spermatozoa. progressive: percentage of progressively

motile spermatozoa. VAP: average path velocity. VSL: straight-line velocity.

VCL: curvilinear velocity. STR: percentage of straightness (VSL/VAP).

LIN: percentage of linearity (VSL/VCL).

ALH: amplitude of lateral head displacement. BCF: beat frequency.

PI−PNA−: PI unstained and PNA−FITC unstained.

PI−PNA+: PI unstained and PNA−FITC stained.

PI+PNA−: PI stained and PNA−FITC unstained.

PI+PNA+: PI stained and PNA−FITC stained.

#### 4. 考察

実験 1 では、ウシ凍結融解精子に *AQP3* および *AQP7* mRNA が存在することを明らかにした。また、WB によるタンパク質発現解析では、*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 に検出された。一方、本研究で示した *AQP3* および *AQP7* の WB におけるバンドサイズは、Prieto-Martínez ら (2017a) のウシ精子における *AQP3* および *AQP7* に関する先行研究の結果と異なっていた。Prieto-Martínez ら (2017a) は、WB における解析において、*AQP3* および *AQP7* のバンドがそれぞれ 30 kDa と 60 kDa および 25 kDa に検出されると報告している。本研究と Prieto-Martínez ら (2017a) との結果の相違の要因は明らかではないが、使用した抗体の違いやタンパク質抽出法の違いが原因の一つと考えられる。実際に、ブタ精子を用いた研究では、使用した抗体やタンパク質抽出法の違いが、WB における AQP のバンドパターンに影響することが報告されており (Prieto-Martínez ら 2016、Prieto-Martínez ら 2017c、Vicente-Carrillo ら 2016)、この点については、今後、ブロッキングペプチドを用いた抗原吸収実験やアミノ酸配列分析などの検証実験が必要と考えられる。しかしながら、本研究では、ポジティブコントロールとして使用した腎臓 (Rojen ら 2011) において精子と同一サイズにバンドが検出され、ネガティブコントロールとして使用した赤血球 (Campos ら 2011) ではバンドは検出されなかった。さらに、本研究で用いた抗ヒト *AQP3* 抗体および抗ヒト *AQP7* 抗体作製時の抗原ペプチド配列のウシとの相同性は、それぞれ 99% および 100% であった。以上のことから、本研究においてウシ凍結融解精子で検出された約 42 kDa および約 53 kDa のバンドはそれぞれウシ *AQP3* および *AQP7* と考えられる。

実験 2 では、ウシ精子における *AQP3* および *AQP7* タンパク質の局在性およ



び凍結保存過程を通したそれらの局在性と発現量の変化について検討した。蛍光免疫染色による局在解析において、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、希釈冷却および凍結融解操作によりその局在は変化しなかった。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（局在パターン 1）と頭部および中片部に局在する精子（局在パターン 2）の 2 パターンの精子が存在することが明らかとなった。加えて、AQP7 についても、希釈冷却や凍結融解操作によって局在パターンが変化することはない、すなわち局在パターン 1 および 2 の精子の割合が変化することはない。一方、AQP7 局在パターン 1 および 2 の精子の割合は、牛 No. B および C 間で差異が認められた。本研究では、AQP7 の局在パターン 1 および 2 の精子の特性、局在パターン 1 および 2 の精子の割合の個体・ロット間差や運動性および耐凍性との関係を解明するまでには至らなかったが、今後の研究課題として大変興味深い点であり、これらの点に関して今後より詳細に検討していく必要がある。

凍結融解前のブタ精子では、AQP7 は頭部あるいは尾部に局在するが、凍結融解操作によって頭部にも局在するようになることが報告されている（Prieto-Martínez ら 2017c、Vicente-Carrillo ら 2016）。本研究においては、少なくとも本研究での希釈冷却および凍結融解操作では、ウシ精子における AQP3 や AQP7 の局在性が変化することはない、AQP3 および AQP7 は凍結保存過程を通してウシ精子の主に尾部に局在することが示された。一方、WB の結果と同様に、本研究で示した AQP3 および AQP7 の蛍光免疫染色における局在性の結果は、Prieto-Martínez ら（2017a）のウシ精子における AQP3 および AQP7 に関する先行研究の結果と異なっていた。Prieto-Martínez ら（2017a）は、AQP3 はウシ精子の中片部に、AQP7 はウシ精子の先体後核帽および中片部に局在することを

示している。本研究と Prieto-Martínez ら (2017a) との結果の相違の要因は明らかではないが、使用した抗体の違いが大きな要因の一つと推察される。実際に、ブタ精子では、相同性の高い抗体であっても、使用する抗体によって AQP7 の蛍光免疫染色による局在解析の結果が異なることが報告されている (Vicente-Carrillo ら 2016)。一方、ウシやブタ等と比較して抗体の充実しているマウスやヒト精子の研究においては、免疫組織化学あるいは金コロイド標識抗体を用いた電子顕微鏡検査により、AQP3 は尾部の主部に局在することが明示されており、さらに AQP3 ノックアウトマウスの精子は、射出後の子宮内侵入にともなう浸透圧の低下に適応できずに尾部が湾曲し、受精能が低下することが報告されている (Chen ら 2011b、Laforenza ら 2016)。また、AQP7 はヒト精子の尾部全体に局在し、運動性の維持に関与する可能性が示されている (Saito ら 2004)。動物種間で精子における AQP の局在性や機能に違いがあることは十分に考えられるが、上記のマウスやヒト精子で明らかにされている局在部位および生理的役割を考慮すると、本研究の結果 (AQP3 および AQP7 はウシ精子の主に尾部に局在する) は合理的であり、蛍光免疫染色により検出された蛍光シグナルはウシ AQP3 および AQP7 に特異的なものであると考えられる。しかしながら、種々の動物種における先行研究においてすでに議論されているとおり (Vicente-Carrillo ら 2016、Yeung ら 2010a)、抗体の特異性の問題については、哺乳動物精子の AQP に関する研究全体の課題と考えられ、この点に関してはウシにおいても今後慎重に検討していく必要がある。

実験 3 では、ウシ精子における AQP3 および AQP7 発現と耐凍性との関係を明らかにするため、WB により評価した 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。本研究では、試験を効率的に進めるため、凍結融解精子を用いて AQP3 および AQP7 タンパク質

量の評価を行った。しかし、熱ショックタンパク質 90 (HSP90) など複数のタンパク質について、凍結融解操作によりタンパク質が壊れてしまい、WB による検出量が低下する可能性があることが報告されており (Chen ら 2014、Yeste ら 2016、Zhang ら 2015)、AQP3 および AQP7 タンパク質量の評価を、先行研究 (Morató ら 2018、Prieto-Martínez ら 2017a、Prieto-Martínez ら 2017c) のように凍結融解前の精子を用いて行った場合、異なる結果となる可能性がある。そこで、実験 2 では、ウシ精子の凍結保存過程を通した WB による AQP3 および AQP7 タンパク質検出量の変化について検討した。その結果、希釈冷却および凍結融解操作によってウシ精子の AQP3 および AQP7 タンパク質量は変化しないことが示された。以上のことから、実験 3 では、凍結融解精子を用いて AQP3 および AQP7 タンパク質量を評価できると判断した。

実験 3 では、計 18 検体について AQP タンパク質量の検査を行ったが、興味深いことに、各検体における AQP3 および AQP7 タンパク質量に大きなばらつきが認められた。精子形成過程において、減数分裂開始以降は新たな RNA の転写は起こらず (Miller ら 2006)、また、一般に成熟精子では新たな翻訳も起こらないと考えられている。そのため、各検体における AQP3 および AQP7 タンパク質量の違いは、精子形成過程における減数分裂前の転写および翻訳レベルに起因すると考えられる。精巣機能に影響を及ぼす何らかの雄牛の状態が精子形成過程における AQP3 および AQP7 の RNA やタンパク質の転写および翻訳レベルに関与していることが考えられるが、このメカニズムについては今後さらなる研究が必要である。

本研究の実験 3 において、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重回帰分析により解析したところ、AQP3 および AQP7 タンパク質量と凍結融解後の

progressive、VAP、VSL、VCL、STR あるいは ALH との間に正の関連性が認められた。実験 3 で用いた 18 検体は、目視での検査ではあるものの、新鮮射出時における前進運動精子の割合や奇形精子の割合に大きな差はなかった。そのため、各検体における凍結融解後の精子の運動性や膜性状の結果は、各検体の耐凍性として評価できると考えられ、progressive、VAP、VSL、VCL、STR あるいは ALH は、それぞれ、前進運動精子率、平均速度、直線速度、曲線速度、直線性および頭部振幅を表していることから、AQP3 および AQP7 タンパク質量が多い凍結精液は、凍結融解後に活発に運動する精子が多く、耐凍性が高いと解釈できる。最近、Prieto-Martínez ら (2017c) は、ブタ新鮮希釈精子において、AQP3 が先体および尾部全体に、AQP7 が頸部に局在し、AQP3 および AQP7 タンパク質量と凍結融解後 30 分後の運動性 (運動率および前進運動精子率) との間に正の相関関係があることを報告している。また、Prieto-Martínez ら (2017a) は、AQP7 がウシ精子の中片部および先体後核帽に局在し、凍結融解後の運動性の高い精子は、凍結融解後の運動性の低い精子と比べ、AQP7 タンパク質量が多いことを報告しており、本研究の結果はこうした先行研究の結果を裏付けるものである。一方、Prieto-Martínez ら (2017a および 2017c) は、ブタ精子およびウシ精子において、凍結融解後の運動性と同様に、AQP3 あるいは AQP7 タンパク質量と凍結融解後の細胞膜・先体膜が正常な精子の割合との間に正の関連性があることを報告している。しかし、本研究においては、AQP3 および AQP7 タンパク質量と細胞膜・先体膜が正常な精子の割合との間に関連性は認められず、この点については、Prieto-Martínez ら (2017a および 2017c) の先行研究の結果と矛盾する。AQP3 および AQP7 タンパク質量と細胞膜・先体膜性状との関係について、本研究と先行研究の結果の相違の原因は明らかではないが、解析手法の違いが要因の一つかもしれない。本研究では、蛍光顕微鏡を用いて目視で細胞膜・先体膜性状

の検査を行ったため、検査精子数が Prieto-Martínez ら (2017a) と比較して少ない。今後、より多くの精子の検査が可能なフローサイトメーター等を用いた精度の高い手法により細胞膜・先体膜性状の解析を行い、AQP3 および AQP7 タンパク質量と細胞膜・先体膜性状との関係について再検討する必要があると考えられる。一方、Prieto-Martínez ら (2017a) は、AQP3 がウシ精子の中片部に発現することを示しているが、AQP3 タンパク質量については、耐凍性の高いウシ精子と耐凍性の低いウシ精子間で差がないことを報告している。しかしながら、本研究では、AQP7 のみではなく、AQP3 においてもその発現量がウシ精子の耐凍性と関連する可能性が示された。ウシ精子では、AQP3 および AQP7 が凍結保存過程を通して主に尾部に局在することを考慮すると、AQP3 および AQP7 タンパク質量の多い精子は、より効率的に水や耐凍剤を透過することで、凍結保存過程における浸透圧の変化に適応し、特に尾部における凍結傷害が軽減され、その結果、凍結融解後の運動性が高くなったと推察される。

本研究では、上述のとおり、AQP3 および AQP7 がウシ精子の耐凍性と関連する可能性がある結論づけたが、AQP3 および AQP7 が耐凍性のみではなく、生理的な運動性に直接関与している可能性も考えられる。Prieto-Martínez ら (2017b) および Prieto-Martínez ら (2016) は、ブタ新鮮希釈精子における AQP3 および AQP7 タンパク質量と運動性および膜性状との間に関連性がないことを報告している。また、AQP3 および AQP7 ノックアウトマウスの精子の運動性は、野生型マウスと比較して差は無いことが報告されている (Chen ら 2011b、Sohara ら 2007)。一方、ヒト精子では、運動性および妊孕性の低い男性の精子を用いた実験から、AQP7 が精子の運動性の維持に関連する可能性が報告されている (Saito ら 2004)。しかし、ウシ精子における AQP と生理的な運動性との関係に関する研究報告はこれまでに無い。今後、AQP3 や AQP7 がウシ精子における生

理的な運動性と関連するのかを明らかにするためには、ウシ新鮮射出精子における運動性と AQP タンパク質量および局在性との関係や、AQP の特異的機能阻害がウシ精子の運動性に及ぼす影響を調べる必要がある。

卵子や初期胚における研究では、特定の AQP の発現抑制あるいは欠損実験や、発現促進実験により、マウスおよびブタを中心に AQP の生理的および低温生物学的機能の解明が進められている (Bedford-Guaus ら 2016、Edashige ら 2003、Jin ら 2013、Morató ら 2014、Tan ら 2015、Xiong ら 2013)。先述したとおり、一般的に射出精子においては、転写および翻訳機構は停止していると考えられるため、AQP の発現抑制や発現促進実験による機能解析は難しいと考えられる。一方、近年、海産硬骨魚類精子において、抗体を用いた特定の AQP の特異的機能阻害実験により、AQP1 や AQP7 が運動性の制御に重要な役割を持つことが明らかにされている (Boj ら 2015)。ウシ精子においてもこのような実験系を構築することができれば、ウシ精子における AQP の生理的および低温生物学的な役割をより詳細に解明することができると考えられ、今後の検討課題である。

本研究では、AQP3 および AQP7 が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。ウシ精子における 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は、今後、特定の AQP の特異的機能阻害実験や、精子形成過程における AQP 発現制御メカニズムに関する研究を行う必要があるものの、本研究は、ウシ精子の AQP に関する研究を発展させるものであり、ウシ精子の凍結保存技術のさらなる高度化に向けた重要な基礎的知見になると考えられる。

## 5. 要約

凍結保存精液を用いた牛の人工授精技術は、育種改良や子畜の生産において必須の技術である。一方、現在の凍結保存技術をもってしても、凍結融解後のウシ精子は、その約 30-50%が死滅する。ウシ精子の凍結保存技術のさらなる改善のためには、ウシ精子の耐凍性に関与する低温生物学的特性について、分子レベルでの理解が求められる。本研究では、細胞膜で水や耐凍剤であるグリセリンを効率的に透過させる機能を持つ AQP3 および AQP7 について、ウシ精子における発現および局在性を明らかにするとともに、凍結保存過程を通じたそれらの局在性および発現量の変化について検討した。さらに、ウシ精子における 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 WB による解析では、AQP3 および AQP7 に対応する明瞭な単一のバンドがそれぞれ約 42 kDa および約 53 kDa に検出された。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 パターンの精子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 タンパク質量と細胞膜・先体膜性状との間に関連性は認められなかったものの、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。

本研究の結果から、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。



### 第 3 章

ウシ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係

## 1. 緒言

ウシ初期胚の凍結保存技術は、胚移植における時間的かつ地理的な制限を排除することができ、胚の効率的利用や計画的な優良種畜の生産において欠かせない技術となっている。現在では、グリセリンや EG を耐凍剤とした緩慢凍結法および高濃度の EG や DMSO を耐凍剤としたガラス化保存法が世界的に普及している。国際胚技術学会の調査によると、2015 年には世界中で 520,535 個のウシ体内受精胚が移植され、そのうち凍結保存胚の移植数は全体の半数を超える 61% (317,386 個) を占めている (Perry 2016)。その一方で、現在の凍結保存技術をもってしても、ウシ胚は少なからず凍結保存に関わる傷害を受け、その受胎率は新鮮胚移植と比較して低い (農林水産省 2016)。特に、経膈採卵技術や性選別精液の普及にともない近年需要が増加している体外受精胚 (Blondin 2016) は、体内受精胚と比較して耐凍性が低く、移植後の受胎率が低下することが問題となっている (Massip 2001)。ウシ初期胚の凍結保存技術のさらなる高度化のためには、ウシ初期胚の耐凍性に関わる低温生物学的特性について、分子レベルでの理解とそれらの知見に基づく技術改良が求められる。

初期胚は、その凍結保存過程において、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過度な収縮および膨張などの様々な凍結保存に関わる傷害のリスクにさらされる。水や耐凍剤の細胞膜透過性は、上記の凍結傷害と密接に関わる重要な低温生物学的特性であり、初期胚の凍結保存の成否を左右する極めて重要な要因である (Edashige 2016a, Edashige 2016b, Sales ら 2013, Woods ら 2004)。第 1 章でも述べたように、AQP は、細胞膜における促進拡散に関与する内在性のチャネルタンパク質であり、哺乳動物では、13 種類の AQP が同定されている (Agre ら 2002, Ishibashi ら 2009, Preston ら 1992)。特に、

AQP3、AQP7、AQP9 および AQP10 は水に加えて、耐凍剤として利用されるグリセリンや EG の透過にも関与することから (Agre ら 2002、Ishibashi ら 2009)、初期胚の凍結保存過程に重要な役割を担うことが予想される。ウシ初期胚における AQP の発現やその機能の理解は、ウシ初期胚の凍結保存技術のさらなる改善に寄与することが期待される。

卵子や初期胚における AQP、特に AQP3 および AQP7 の発現、生理的および低温生物学的機能については、マウスにおいて最も研究が進んでいる。マウスでは、成熟卵子から胚盤胞期胚の全てのステージにおいて *AQP3* および *AQP7* mRNA およびタンパク質が発現している (Barcroft ら 2003、Edashige ら 2000、Offenberg ら 2000、Xiong ら 2013)。また、マウス 2-細胞期胚に AQP3 あるいは AQP7 siRNA を導入し、AQP3 または AQP7 発現を人為的に抑制すると、4-細胞期以降の発生が停止することから、AQP3 および AQP7 がマウス胚の初期発生に何らかの重要な役割を持つ可能性が示されている (Xiong ら 2013)。一方、水や耐凍剤であるグリセリンおよび EG の細胞膜透過は、マウス卵子では脂質二重膜を介した単純拡散によって行われるのに対し、桑実期胚では AQP3 を介した促進拡散によって行われることが報告されている (Edashige ら 2006、Edashige ら 2007)。また、Edashige ら (2003) および Yamaji ら (2011) は、グリセリンを耐凍剤としたマウス卵子のガラス化保存において、*AQP3* cRNA を卵子に導入し、AQP3 発現を人為的に増加させることで、ガラス化保存後の卵子の生存性、体外受精後の発生率および移植後の個体作出効率が向上することを報告している。さらに、Tan ら (2015) は、RNA 干渉法によりマウス卵子の *AQP7* mRNA 発現を抑制すると、ガラス化保存後の卵子の全てが死滅したことを報告している。以上のことは、AQP3 および AQP7 がマウス初期胚の発生あるいは卵子や初期胚の耐凍性において重要な役割を担うことを示している。

一方、ウシ卵子および初期胚においても、AQP3に関するいくつかの研究報告がなされている（Camargo ら 2011、Jin ら 2011、Kuzmany ら 2011、Lopera-Vasquez ら 2017）。Jin ら（2011）は、ウシ桑実期胚に AQP3 が発現し、桑実期胚における水、グリセリンおよび EG の細胞膜透過は、AQP3 を介した促進拡散によって行われていることを報告しており、ウシ胚においても AQP3 が耐凍性に重要な役割を持つ可能性を示している。しかし、ウシ卵子および初期胚の発生過程における AQP3 および AQP7 の mRNA およびタンパク質発現動態を詳細に調べた報告はなく、また、AQP3 および AQP7 がウシ胚の初期発生および耐凍性に果たす役割については不明な点が多い。

本研究では、まず、AQP3 および AQP7 について、ウシ卵子および初期胚における mRNA およびタンパク質発現動態を解析し、次いで体外受精および体内受精由来胚盤胞期胚における AQP3 および AQP7 mRNA 量を比較した（実験 1）。次に、AQP3 および AQP7 がウシ胚の初期発生および耐凍性に果たす役割を明らかにすることを目的に、RNA 干渉法による AQP3 および AQP7 の発現抑制が、ウシ体外受精胚の初期発生およびガラス化-加温後の生存性に及ぼす影響について検討した（実験 2）。さらに、AQP3 および AQP7 の人為的な発現促進が、ウシ体外受精胚の凍結-融解またはガラス化-加温後の生存性に及ぼす影響について検討した（実験 3）。

## 2. 材料および方法

### (1) ウシ卵巣の採取および卵子の吸引採取

実験に供試したウシ卵巣は、北海道畜産公社（帯広市、北海道、日本）に搬入屠殺されたホルスタイン種、ジャージー種または黒毛和種雌牛より採取した。卵巣を採取した個体の月齢は考慮せず、卵巣疾患が疑われるものは実験から除外した。採取した卵巣は、抗生物質[100 IU/ml ペニシリン G カリウム (Meiji Seika, Tokyo, Japan)、0.1 mg/ml 硫酸ストレプトマイシン (Meiji Seika) ]を含む室温の 0.9%生理食塩水中に浸漬して実験室に持ち帰った。卵巣表面の生理食塩水および血液を拭き取り、注射針およびシリンジを用いて、直径 2-8 mm の小卵胞から卵胞液とともに卵丘細胞-卵子複合体 (COCs) を吸引採取した。その後、実体顕微鏡下において、3 層以上の卵丘細胞が透明帯周囲に均一に付着し、かつ卵細胞質が変性していない COCs を選抜し、以後の実験に供試した。

### (2) 体外成熟培養

選抜後の COCs の成熟培養には、IVMD-101 培地 (Research Institution for the Functional Peptides, Yamagata, Japan) を用いた。ミネラルオイル (nacalaitesque) で覆った 100  $\mu$ l の IVMD-101 培地のドロップに COCs を移し (1 ドロップあたり 5-10 個)、39°C、5% CO<sub>2</sub>、in air 条件下の CO<sub>2</sub> インキュベーター内において 20-22 時間の成熟培養を行った。

### (3) 体外受精 (IVF)

体外受精は、IVF-100 培地 (Research Institution for the Functional Peptides) を用いて行った。黒毛和種雄牛 1 頭の凍結保存精子を 37°C の温湯に 1 分間浸漬

することで融解し、5 ml の IVF-100 培地を用いて、600 g、5 分で 2 回遠心洗浄した。その後、最終精子濃度が  $5 \times 10^6$  精子/ml になるよう IVF-100 培地を添加して再懸濁した。ミネラルオイル (nacalai tesque) で覆った 100  $\mu$ l の懸濁液のドロップに COCs を移し (1 ドロップあたり 10–15 個)、39°C、5% CO<sub>2</sub>、in air 条件下の CO<sub>2</sub> インキュベーター内において 5–6 時間の媒精を行った。培精終了後、ピペッティングにより卵子周囲の卵丘細胞を完全に除去し、卵細胞質が変性していない卵子のみをその後の実験に供試した。

#### (4) 体外発生培養

IVF 処理後の胚は、0.1% BSA を含む修正 TALP 培地 (Bavister ら 1983) [0.1 M NaCl (Sigma)、4.02 mM KCL (Sigma)、0.38 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma)、2.04 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (Sigma)、0.49 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (Sigma)、25 mM NaHCO<sub>3</sub> (Sigma)、0.55 mM Na-Pyruvate (Sigma)、1.11 mM Glucose (Sigma)、2.14 mM Na-Lactate (Sigma)、2% (v/v) BME amino acids (Sigma)、1% (v/v) MEM non-essential amino acids (Sigma)、100 IU/ml ペニシリン G カリウム、0.1 mg/ml 硫酸ストレプトマイシン] に移し、39°C、5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>、90% N<sub>2</sub> 条件下のマルチガスインキュベーター内において、2 日間の発生培養を行った。その後、3% (v/v) New born calf serum (NBCS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を含む修正 TALP 培地 (260 mOsm) に胚を移し、さらに 6 日間の発生培養を行った。なお、IVF を行った日を培養 0 日目 (Day 0) とし、Day 2、Day 4、Day 5、Day 6、Day 7 および Day 8 において胚の発生状態を実体顕微鏡下で観察した。

#### (5) ウシ体外受精胚の高浸透圧処理

ウシ体外受精胚の高浸透圧処理は、拡張胚盤胞期胚（Day 7）を 3% NBCS およびスクロース（Wako）を含む 351 mOsm の修正 TALP 培地で 6 時間培養することで行った。

#### （6）ウシ体内受精胚の作出

ウシ体内受精胚は、過剰排卵処理後、人工授精を行った黒毛和種またはアングス種ドナー牛より採取した。発情周期の任意の時期（発情期を除く）に、膈内留置型プロジェステロン製剤（CIDR; CIDR®1900, Pfizer Japan Inc., Tokyo, Japan）をドナー牛の膈内に挿入し、その約 48 時間後に 1 mg のエストロジェン製剤（EB; Kyoritsu seiyaku, Co., Ltd, Tokyo, Japan）を筋肉内投与した。EB 投与後 4 日目から計 20 IU の卵胞刺激ホルモン（FSH; Antrin®R-10, Kyoritsu Seiyaku）を 1 日 2 回、3 日間にわたり漸減投与方法によりドナー牛に筋肉内投与した。FSH 投与開始の約 48 時間後に CIDR を抜去するとともに、PGF<sub>2α</sub>（cloprostenol 0.5 mg/cow, Resipron®-C, ASKA Animal Health Co., Ltd., Tokyo, Japan）を筋肉内投与することで黄体退行を誘起した。人工授精は、ドナー牛の発情発見後約 12-24 時間後に行い、ドナー牛からの胚回収は、授精後 7-8 日目にバルーンカテーテルを用いた子宮灌流法により行った。採取された胚は、国際胚技術学会のマニュアル（Robertson ら 2010）に従って形態学的評価を行い、IETS コード 1 および 2 の胚盤胞期胚のみを実験に供試した。

#### （7）short interfering RNA (siRNA) の設計および体外受精胚への siRNA の注入

ウシ AQP3 および AQP7 遺伝子の配列を基に、AQP3 および AQP7 に対する siRNA を設計（BLOCK-iT™ RNAi Designer; Thermo Fisher Scientific）およ

び作製した (Table. 4)。また、いずれの遺伝子の発現抑制効果を持たない Control siRNA (AllStar Negative Control siRNA; Qiagen) を使用した。siRNA の注入にはマイクロマニピュレーター (NARISHIGE, Tokyo, Japan)、マイクロインジェクター (FemtoJet; Eppendorf, Hamburg, Germany) およびインジェクションピペット (Femtotips; Eppendorf) を用い、50  $\mu$ M の AQP3 および AQP7 siRNA または 20  $\mu$ M の Control siRNA 約 10  $\mu$ l を媒精後に卵丘細胞を除去した 1-細胞期胚の細胞質内に注入した。

#### (8) ウシ卵子および初期胚からの RNA 抽出

成熟卵子 (Day 0)、2-細胞期胚 (Day 1)、4-細胞期胚 (Day 1)、8-細胞期胚 (Day 2)、16-細胞期胚 (Day 2)、後期桑実期胚 (Day 5)、初期胚盤胞期胚 (Day 6)、胚盤胞期胚 (Day 6.5) および拡張胚盤胞期胚 (Day 7) を 0.02% PVA-PBS で 3 回洗浄後、1% (w/v) Polyvinylpyrrolidone (PVP; Sigma) および 0.5% (w/v) Protease (Sigma) を含む DPBS に移し、透明帯を溶解除去した。その後、透明帯を除去した卵子および胚を 0.02% PVA-PBS で 3 回洗浄し、5  $\mu$ l の溶解液 [0.8% (v/v) IGEPAL (MP Biomedicals, LCC, Santa Ana, CA, USA)、5 mM Dithiothreitol (Thermo Fisher Scientific)、1 U/ $\mu$ l RNasin (Promega Corp., Madison, WI, USA)、RNase free water (Invitrogen)] が入ったチューブに移し、液体窒素による凍結、融解および攪拌を 3 回繰り返すことで細胞を粉砕し、RNA を抽出した。RNA サンプルは逆転写 (RT) 反応まで  $-80^{\circ}\text{C}$  のフリーザー内で保存した。

#### (9) RT-PCR およびアガロースゲル電気泳動

ウシ卵子および初期胚から抽出した RNA サンプル 5  $\mu$ l に、gDNA wipeout



buffer を 2  $\mu$ l および RNase Free Water を 8  $\mu$ l 添加し、42°C で 2 分間インキュベートした。その後の RT 反応、PCR およびアガロースゲル電気泳動は、第 2 章に記述した方法に準じて行った。使用したプライマー情報は Table 4 に示した。

#### (10) リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は、CFX96 Touch™ Real Time System (BioRad) を用いて行い、PCR 産物の検出は、SYBR Green PCR master Mix Kit (Qiagen) により行った。18  $\mu$ l の反応液[10  $\mu$ l 2×Master mix、1  $\mu$ l の Forward および Reverse Primer (最終濃度 0.5  $\mu$ M、Table 4)、6  $\mu$ l の RNase Free Water]に各 cDNA サンプル 2  $\mu$ l を添加し、95°C で 15 分間処理することにより HotStarTaq DNA ポリメラーゼを活性化した。その後、94°C-15 秒、59°C-30 秒、72°C-30 秒の反応を 45 サイクル行うことで cDNA を増幅および蛍光度の測定を行った。その後、増幅した PCR 産物の融解曲線から得られた PCR 産物の特異性を確認した。mRNA 発現量は、標準曲線との比較により定量した。各遺伝子の PCR 産物を Qiaquick PCR purification Kit (Qiagen) を用いて精製し、Nano Drop (ND-1000; Thermo Fisher Scientific) を用いて各精製物の濃度を測定した。その後、各精製物の濃度が 10 ng/ml になるように TE バッファー (Invitrogen) で希釈した。各精製物を TE バッファーで 10 倍ずつ段階希釈することで標準サンプル (10<sup>-4</sup> – 10<sup>-14</sup> ng/ml) を作製した。標準サンプルは、毎回のリアルタイム PCR 反応毎に作製し、cDNA サンプルと共に増幅した。SYBR Green の蛍光度の測定は全ての増幅サイクルで行った。mRNA 発現量の定量化は、CFX Manager™ software を用いて行い、各サンプルにおける mRNA 発現量は、同一サンプルにおける *Histone H2A* mRNA 発現量で補正した。

### (11) 蛍光免疫染色

ウシ卵子および初期胚を 0.02% PVA-PBS で 3 回洗浄し、 $-20^{\circ}\text{C}$  のメタノールに 20 分間浸漬することで固定処理を行った。その後、0.02% PVA-PBS を用いて 5 分間の洗浄処理を 3 回行い、0.01% Triton X-100 および 5% NGS を含む DPBS 中において、室温で 30 分間透過処理を行った。0.02% PVA-PBS を用いて 5 分間の洗浄処理を 3 回行い、1% BSA および 5% NGS を含む DPBS 中において、室温で 30 分間ブロッキング処理を行った。1 次抗体反応は、anti-human AQP3 rabbit polyclonal IgG (sc-20811; Santa Cruz Biotechnology, 1:50)、anti-human AQP7 rabbit polyclonal IgG (orb13253; biorbyt, 1:100) または NRS (Invitrogen, 1:5000) を含む抗体希釈液 (0.1% BSA、1% NGS を含む DPBS) 中において、 $4^{\circ}\text{C}$  で一晩行った。0.02% PVA-PBS を用いて 5 分間の洗浄処理を 5 回行った後、2 次抗体反応を行った。2 次抗体反応は、goat anti-rabbit FITC-conjugated antibody (sc-2012; Santa Cruz Biotechnology, 1:500) を用いて室温で 2 時間行った。その後、0.02% PVA-PBS を用いて 5 分間の洗浄処理を 5 回行い、スライドガラス上に作製した VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI の微小滴内に卵子または胚を移し、カバーガラスで覆った。カバーガラスの周囲をマニキュアで封入し、共焦点レーザー顕微鏡 [Leica TCS SP5-S; Leica Microsystems, Tokyo, Japan、(実験 1)] または蛍光顕微鏡 (実験 2 および 3) を用いて観察および写真撮影を行った。

### (12) ウシ体外受精胚の緩慢凍結およびガラス化保存

#### 緩慢凍結保存

ウシ体外受精胚の緩慢凍結保存は、Dochi ら (1998) の方法に若干の修正を加えた方法により行った。IETS コード 1 の体外受精由来拡張胚盤胞期胚 (Day 7)

を、室温の凍結保存液[1.5 M EG (Wako)、0.1 M トレハロース (Wako) および 18% NBCS を含む DPBS]に約 10 分間浸漬して平衡処理を行った後、0.25 ml のストロー (Fujihira Industries, Co., ltd, Tokyo, Japan) に封入した (1-5 個/ストロー)。凍結保存はプログラムフリーザー (ET3; Fujihira Industries) を用いて行った。胚を封入したストローを、-7.0°C に予備冷却したメタノール内に浸漬し、5 分間静置後、植氷することで細胞外の氷晶形成を誘起した。その後、-0.3°C /分の速度で-35°C まで冷却し、-35°C で 5 分間静置後、液体窒素中に投入した。凍結胚の融解は、風のない場所でストローを液体窒素中から取り出し、空気中で 10 秒間保持した後、30°C の温水に 30 秒間浸漬することで行った。

#### ガラス化保存

ウシ体外受精胚のガラス化保存は、Inaba ら (2011) の方法に若干の修正を加えた方法により行った。IETS コード 1 の体外受精由来拡張胚盤胞期胚 (Day 7) を、室温の平衡液[7.5% EG、7.5% DMSO (Wako) および 20% NBCS を含む TCM199 (Thermo Fisher Scientific) ]に 3 分間浸漬することで平衡処理を行った。その後、室温のガラス化液 (15% EG、15% DMSO、0.5 M スクロースおよび 20% NBCS を含む TCM199) に 1 分間浸漬し、微量のガラス化液とともにクライオトップ (Kitazato BioPharma, Fujinomiya, Japan) 上に乗せ (1-5 個)、直接液体窒素中に投入することでガラス化した。ガラス化保存胚の加温は、37°C の融解液 (0.2 M スクロースおよび 20% NBCS を含む DPBS) に 3 分間浸漬することで行った。

#### (13) 緩慢凍結およびガラス化保存後のウシ体外受精胚の生存性評価

緩慢凍結-融解およびガラス化-加温後のウシ体外受精胚は、IVD-101 培地

(Research Institution for the Functional Peptides) に移し、39°C、5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>、90% N<sub>2</sub> 条件下のマルチガスインキュベーター内において、24 時間培養後、再拡張率および透明帯からの脱出率を実体顕微鏡下で評価した。また、総細胞数および死細胞率を評価した。死細胞核の染色は、LIVE/DEAD Cell Imaging Kit (488/570) (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。総細胞核の染色は、死細胞核の染色後、5 µg/ml の Hoechst 33342 を含むエタノール中に浸漬し、4°C で一晩静置することで行った。蛍光顕微鏡を用いて写真撮影を行い、Image J ソフトの細胞カウントツールを用いて総細胞および死細胞数を計測し、各胚における死細胞率 (死細胞数/総細胞数×100) を算出した。

#### (14) 実験計画

実験 1 : ウシ卵子および初期胚における *AQP3* および *AQP7* の mRNA およびタンパク質発現解析

まず、ウシ体外成熟卵子、体外受精由来の 2-4 細胞期胚、8-16 細胞期胚、後期桑実期胚、初期胚盤胞期胚、胚盤胞期胚および拡張胚盤胞期胚における *AQP3* および *AQP7* の mRNA 発現を RT-PCR 法により確認した。次に、ウシ胚における胚性遺伝子活性化時期である 8 細胞期から拡張胚盤胞期胚への発生にともなう *AQP3* および *AQP7* の mRNA 発現動態をリアルタイム RT-PCR により解析した。また、ウシ体外成熟卵子、体外受精由来の 2 細胞期胚、8 細胞期胚、後期桑実期胚、初期胚盤胞期胚、胚盤胞期胚および拡張胚盤胞期胚における *AQP3* および *AQP7* のタンパク質発現動態を蛍光免疫染色法により解析した。さらに、ウシ体内受精および体外受精由来の胚盤胞期胚 (Day 7) における *AQP3* および *AQP7* mRNA 発現量を比較解析した。

## 実験 2 : RNA 干渉法による AQP 発現抑制がウシ胚の初期発生および耐凍性に及ぼす影響の解析

ウシ胚における AQP3 および AQP7 発現と初期発生および耐凍性との関係を明らかにすることを目的に、RNA 干渉法による AQP3 および AQP7 発現抑制がウシ体外受精胚の初期発生および耐凍性に及ぼす影響について検討した。なお、AQP3 発現抑制が初期発生に及ぼす影響として、Day 2 における 2-細胞期以上への分割率、Day 4、Day 5、Day 6、Day 7 および Day 8 におけるそれぞれ 8-細胞期胚、桑実期胚、初期胚盤胞期胚、胚盤胞期胚および拡張胚盤胞期胚以上への発生率を評価した。また、耐凍性に及ぼす影響として、Day 7 の拡張胚盤胞期胚におけるガラス化-加温後 24 時間培養後の生存性を評価した。

## 実験 3 : AQP の発現促進がウシ胚の耐凍性に及ぼす影響の解析

ウシ初期胚における AQP3 および AQP7 発現と耐凍性との関係の解明を目的に、高浸透圧処理 (3% NBCS およびスクロースを含む 351 mOsm の修正 TALP 培地で 6 時間培養) による AQP3 および AQP7 発現促進がウシ体外受精胚の耐凍性に及ぼす影響について検討した。対照区は、3% NBCS を含む 260 mOsm の修正 TALP 培地で 6 時間培養した。なお、AQP3 および AQP7 発現促進が耐凍性に及ぼす影響として、Day 7 の拡張胚盤胞期胚における緩慢凍結-融解およびガラス化-加温後 24 時間培養後の生存性を評価した。

### (15) 統計解析

統計解析は、統計解析ソフト R または StatView を用いて行った。実験 1 における各発生ステージにおける AQP3 および AQP7 mRNA 発現量については、Kruskal-Wallis の検定を行い、その後 Scheffe 法を用いて多群間の検定を行った。

また、体内受精および体外受精胚における *AQP3* および *AQP7* mRNA 発現量については、対応のない t 検定により検定を行った。実験 2 における *AQP3* および *AQP7* mRNA 発現量、発生率および緩慢凍結-融解あるいはガラス化-加温後 24 時間培養後の再拡張率、透明帯からの脱出率および死細胞率については、一元配置の分散分析または Kruskal-Wallis の検定を行い、その後 Turkey-Kramer 法または Scheffe 法を用いて多群間の検定を行った。発生率および緩慢凍結-融解あるいはガラス化-加温後 24 時間培養後の再拡張率、透明帯からの脱出率および死細胞率は、アークサイン変換した値を統計解析に用いた。実験 3 における *AQP3* および *AQP7* mRNA 発現量、緩慢凍結-融解あるいはガラス化-加温後 24 時間培養後の死細胞率については、対応のない t 検定により検定を行った。緩慢凍結-融解あるいはガラス化-加温後 24 時間培養後の死細胞率は、アークサイン変換した値を統計解析に用いた。また、緩慢凍結-融解およびガラス化-加温後 24 時間培養後の再拡張率および透明帯からの脱出率は、カイ二乗検定により検定を行った。全ての解析において、P 値が 0.05 未満の場合、統計的に有意とみなした。

### 3. 結果

実験 1 : ウシ卵子および初期胚における *AQP3* および *AQP7* の mRNA およびタンパク質発現解析

*AQP3* および *AQP7* mRNA は、ウシ体外成熟卵子、体外受精由来のウシ 2-4-細胞期胚、8-16-細胞期胚、後期桑実期胚、初期胚盤胞期胚、胚盤胞期胚および拡張胚盤胞期胚の全ての発生ステージで検出された (Fig. 8)。 *AQP3* および *AQP7* ともに、その mRNA 発現量は、8-16-細胞期と比較して後期桑実期および初期胚盤胞期において有意 ( $P < 0.05$ ) に増加し、その後胚盤胞期および拡張胚盤胞期への発生にともない初期胚盤胞期と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に減少した (Fig. 9)。 *AQP3* および *AQP7* 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検出された。 *AQP3* および *AQP7* タンパク質ともに、成熟卵子から初期胚盤胞までは、細胞核および細胞質に蛍光シグナルが観察されたが、胚盤胞期胚および拡張胚盤胞期胚では、細胞核における蛍光シグナルが減弱し、細胞質に加え細胞膜上にも明瞭な蛍光シグナルが観察された (Fig. 10 および Fig. 11)。ウシ体外受精由来の胚盤胞期胚における *AQP3* mRNA 発現量は、体内受精由来の胚盤胞期胚と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に低かった (Fig. 12)。一方、ウシ体外受精由来の胚盤胞期胚における *AQP7* mRNA 発現量は、体内受精由来の胚盤胞期胚と比較して差はなかった (Fig. 12)。

実験 2 : RNA 干渉法による AQP 発現抑制がウシ胚の初期発生および耐凍性に及ぼす影響の解析

Uninjected 区 (siRNA の注入を行わない区)、Control siRNA 区 (Control siRNA を注入する区)、*AQP3* siRNA 区 (*AQP3* siRNA を注入する区) および

AQP7 siRNA 区(AQP7 siRNA を注入する区)のウシ後期桑実期胚における *AQP3* または *AQP7* mRNA 発現解析の結果を Fig. 13 に示した。*AQP3* mRNA 発現量は、Uninjected 区および Control siRNA 区と比較し、AQP3 siRNA 区で有意 ( $P < 0.001$ ) に低い値を示した (Fig. 13)。一方、*AQP7* mRNA 発現量については、各試験区間に差は認められなかった (Fig. 13)。また、ウシ後期桑実期胚および胚盤胞期胚において、蛍光免疫染色により AQP3 タンパク質の発現を解析したところ、後期桑実期胚では、各試験区間において明瞭な差は認められなかったが、胚盤胞期胚においては、Uninjected 区および Control siRNA 区と比較し、AQP3 siRNA 区で、蛍光シグナルが減弱する像が観察された (Fig. 14)。以上より、本実験で用いた *AQP3* siRNA は、ウシ初期胚における AQP3 発現抑制効果を有することが確認されたが、AQP7 siRNA については、その発現抑制効果を確認できなかった。

AQP3 発現抑制が、ウシ体外受精胚の Day 2 における 2-細胞期胚以上への分割率、Day 4、Day 5、Day 6、Day 7 および Day 8 におけるそれぞれ 8-細胞期胚、桑実期胚、初期胚盤胞期胚、胚盤胞期胚および拡張胚盤胞期胚以上への発生率に及ぼす影響について検討した結果を Table 5 に示した。Day 2 における 2-細胞期胚以上への分割率 (90.5–90.8%)、Day 4 における 8-細胞期胚以上への発生率 (61.4–65.8%)、Day 5 における桑実期胚以上への発生率 (42.0–43.9%)、Day 6 における初期胚盤胞期胚以上への発生率 (26.1–33.1%)、Day 7 における胚盤胞期胚以上への発生率 (24.4–35.6%) および Day 8 における胚盤胞期胚以上 (31.8–39.6%) および拡張胚盤胞期胚以上への発生率 (24.0–32.7%) 全てにおいて、Uninjected 区、Control siRNA 区および AQP3 siRNA 区間に差は認められなかった。

さらに、AQP3 発現抑制が、Day 7 の体外受精由来の拡張胚盤胞期胚における



ガラス化保存後の生存性（再拡張率、透明帯からの脱出率および死細胞率）に及ぼす影響について検討した結果を Table 6 および Fig. 15 に示した。ガラス化保存-加温後 24 時間培養後の再拡張率および透明帯からの脱出率は、Uninjected 区（88.9%および 63.0%）および Control siRNA 区（86.2%および 65.5%）と比較して、AQP3 siRNA 区（79.3%および 44.8%）で低い値を示したものの、各試験区間に有意な差は認められなかった（Table 6）。また、ガラス化保存-加温後 24 時間培養後の死細胞率についても、Uninjected 区（ $5.8 \pm 1.0\%$ ）、Control siRNA 区（ $4.7 \pm 1.0\%$ ）および AQP3 siRNA 区（ $5.8 \pm 0.7\%$ ）間に差は認められなかった（Fig. 15）。

### 実験 3：AQP の発現促進がウシ胚の耐凍性に及ぼす影響の解析

高浸透圧処理（3% NBCS およびスクロースを含む 351 mOsm の修正 TALP 培地で 6 時間培養）が、体外受精由来のウシ拡張胚盤胞期胚（Day 7）における AQP3 および AQP7 の mRNA 発現に及ぼす影響について検討した結果を Fig. 16 に示した。AQP3 および AQP7 とともに、その mRNA 発現量は、対照区と比較して、高浸透圧処理区で有意（AQP3:  $P < 0.01$ 、AQP7:  $P < 0.05$ ）に高い値を示した（Fig. 16）。しかし、対照区および高浸透圧区における蛍光免疫染色の AQP3 および AQP7 の蛍光強度を解析したところ、両者に差は認められず、本研究では、高浸透圧処理による AQP3 および AQP7 タンパク質の発現増加は確認できなかった（Fig. 17）。

また、高浸透圧処理が、体外受精由来ウシ拡張胚盤胞期胚（Day 7）の緩慢凍結およびガラス化保存後の生存性（再拡張率、透明帯からの脱出率および死細胞率）に及ぼす影響について検討した結果を Table 7 および Fig. 18 に示した。緩慢凍結保存において、融解後 24 時間培養後の再拡張率は、対照区（84.4%）およ

び高浸透圧区（88.9%）間で差は認められなかったものの、透明帯からの脱出率は対照区（35.6%）と比較し高浸透圧区（64.4%）で有意（ $P < 0.01$ ）に高く、死細胞率は対照区（ $9.7 \pm 1.5\%$ ）と比較し高浸透圧区（ $6.3 \pm 0.5\%$ ）において有意（ $P < 0.05$ ）に低い値を示した（Table 7 および Fig. 18）。一方、ガラス化保存においては、加温後 24 時間培養後の再拡張率（86.0–92.0%）、透明帯から脱出率（46.0–48.0%）について、対照区および高浸透圧処理区間で差は認められなかったが（Table 7）、死細胞率は対照区（ $6.8 \pm 0.9\%$ ）と比較し高浸透圧区（ $4.7 \pm 0.6\%$ ）において有意（ $P < 0.05$ ）に低い値を示した（Fig. 18）。

Table 4. Primer sequences for RT-PCR

| Genes              | Nucleotide sequences (5'-3') | Annealing temperature (°C) | Fragment size (bp) | GenBank Accession no. |
|--------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------|-----------------------|
| <i>AQP3</i>        | F-GCACAAGGAGCAGATGTGAA       | 59                         | 209                | NM_001079794          |
|                    | R-TACAGGCTGAAGGTCCTGCT       |                            |                    |                       |
| <i>AQP7</i>        | F-CATTGTGACTGGCATCCTTG       | 59                         | 152                | NM_001076378          |
|                    | R-ACCACCAGTCCTTGGTTCTG       |                            |                    |                       |
| <i>Histone H2A</i> | F-AGGACGACTAGCCATGGACGTGTG   | 59                         | 209                | NM_174809.2           |
|                    | R-CCACCACCAGCAATTGTAGCCTTG   |                            |                    |                       |
| AQP3 siRNA         | S-CCUCAUCCUCGUGAUGUUUTT      | N/A                        | N/A                | N/A                   |
|                    | AS-AAACAUCACGAGGAUGAGGTT     | N/A                        | N/A                | N/A                   |
| AQP7 siRNA         | S-GGAGUUCAUCAGCACGUAUTT      | N/A                        | N/A                | N/A                   |
|                    | AS-AUACGUGCUGAUGAACUCCTT     | N/A                        | N/A                | N/A                   |

F: forward, R: reverse, S: sense strand, AS: antisense strand

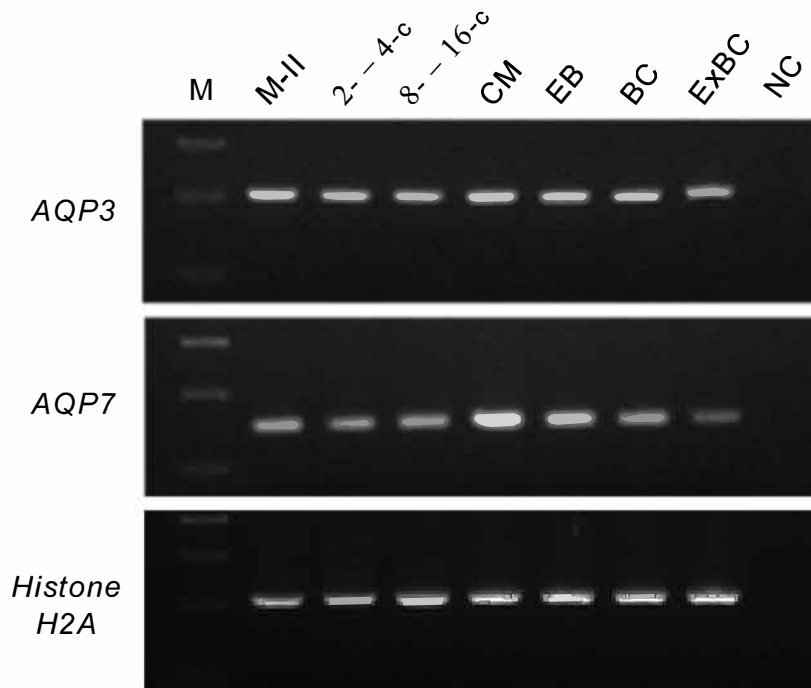


Fig. 8. Detections of *AQP3*, *AQP7*, and *Histone H2A* mRNA in bovine oocytes and preimplantation embryos.

M: marker, M-II: metaphase II oocyte, 2- – 4-c: 2- to 4-cell embryos, 8- – 16-c: 8- to 16-cell embryos, CM: compacted morula, EB: early blastocyst, BC: blastocyst, ExBC: expanded blastocyst, NC: negative control

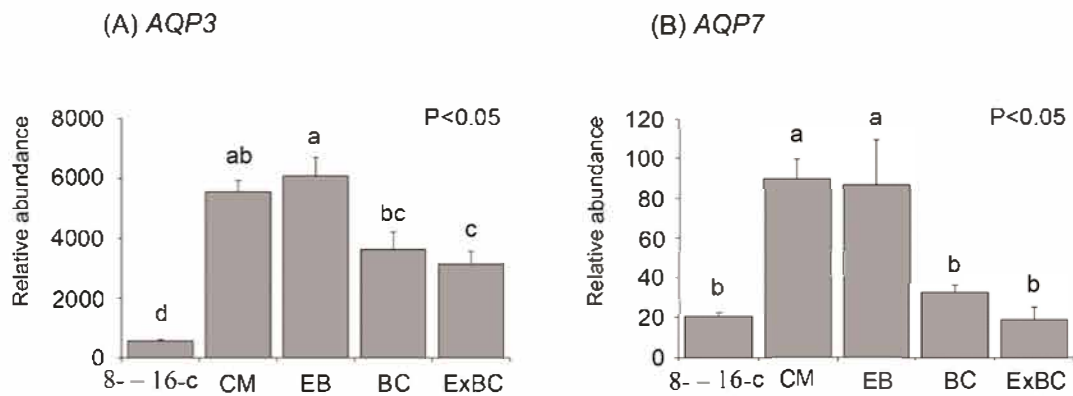


Fig. 9. Change in the *AQP3* (A) and *AQP7* (B) mRNA transcripts levels (mean  $\pm$  SEM) from 8- to 16-cell embryos to expanded blastocyst (n=5). 8- to 16-c: 8- to 16-cell embryos, CM: compacted morula, EB: early blastocyst, BC: blastocyst, ExBC: expanded blastocyst. The relative abundance of *AQP3* and *AQP7* were normalized to that of *Histone H2A*.<sup>a,b,c,d</sup> Different superscripts indicate the significant difference ( $P < 0.05$ ).

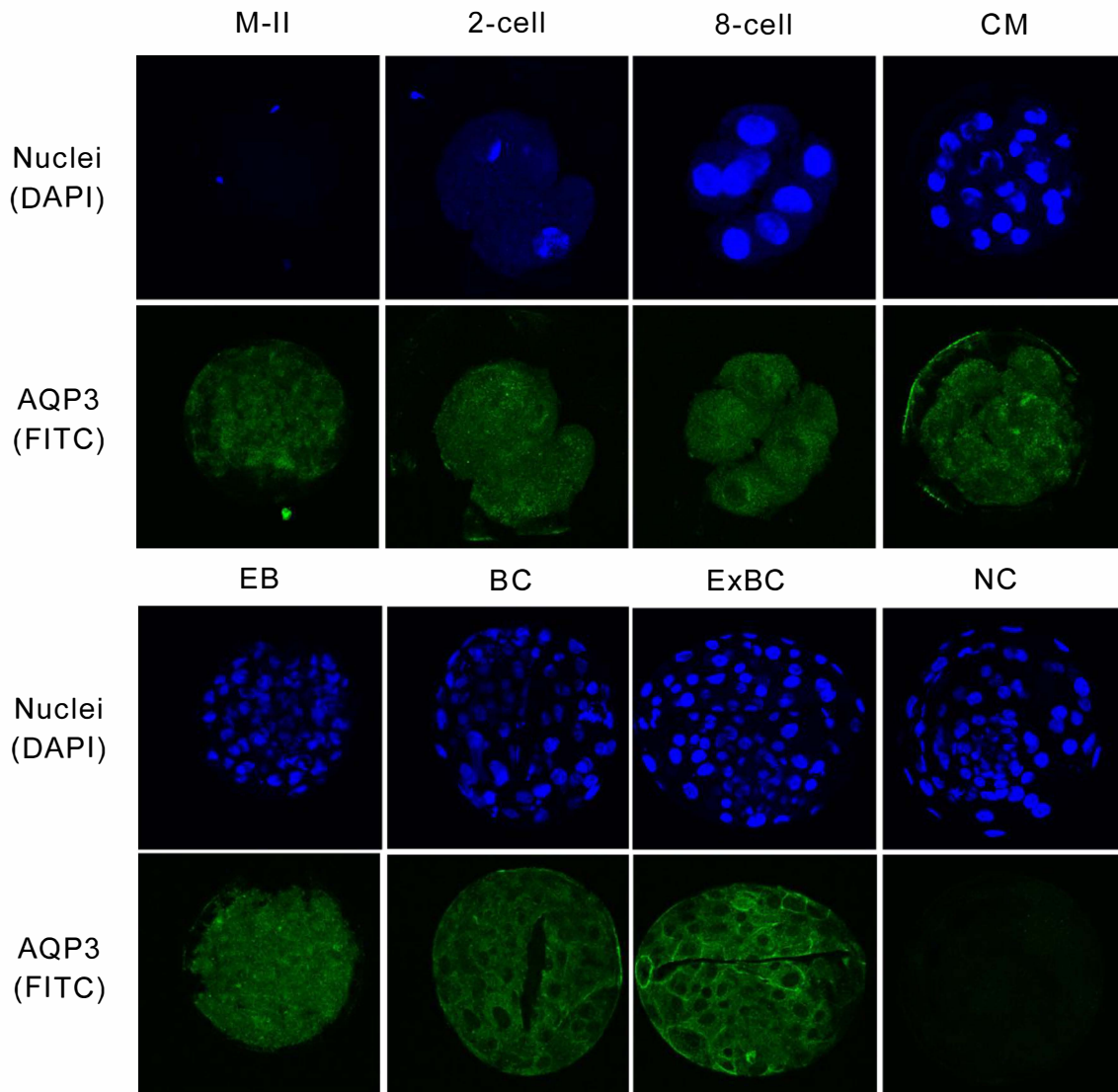


Fig. 10. Representative photographs of immunostaining of AQP3 in bovine oocyte and preimplantation embryos. AQP3 protein and nuclei in oocyte and embryos were labeled with anti AQP3 antibody (sc-20811) and DAPI, respectively. M-II: metaphase II oocyte, CM: compacted morula, EB: early blastocyst, BC: blastocyst, ExBC: expanded blastocyst, NC: negative control.

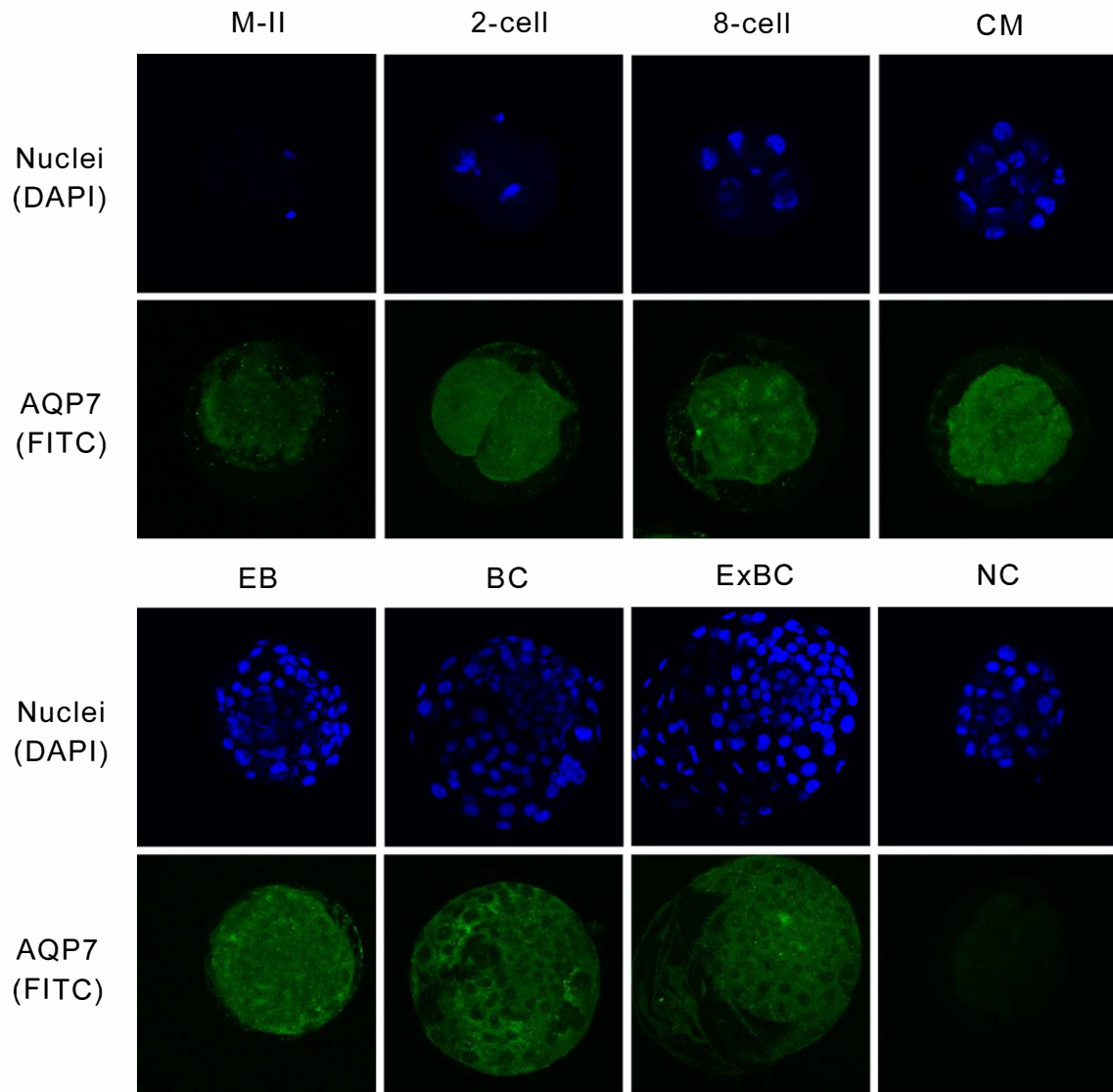


Fig. 11. Representative photographs of immunostaining of AQP7 in bovine oocyte and preimplantation embryos. AQP7 protein and nuclei in oocyte and embryos were labeled with anti AQP7 antibody (orb13253) and DAPI, respectively. M-II: metaphase II oocyte, CM: compacted morula, EB: early blastocyst, BC: blastocyst, ExBC: expanded blastocyst, NC: negative control.

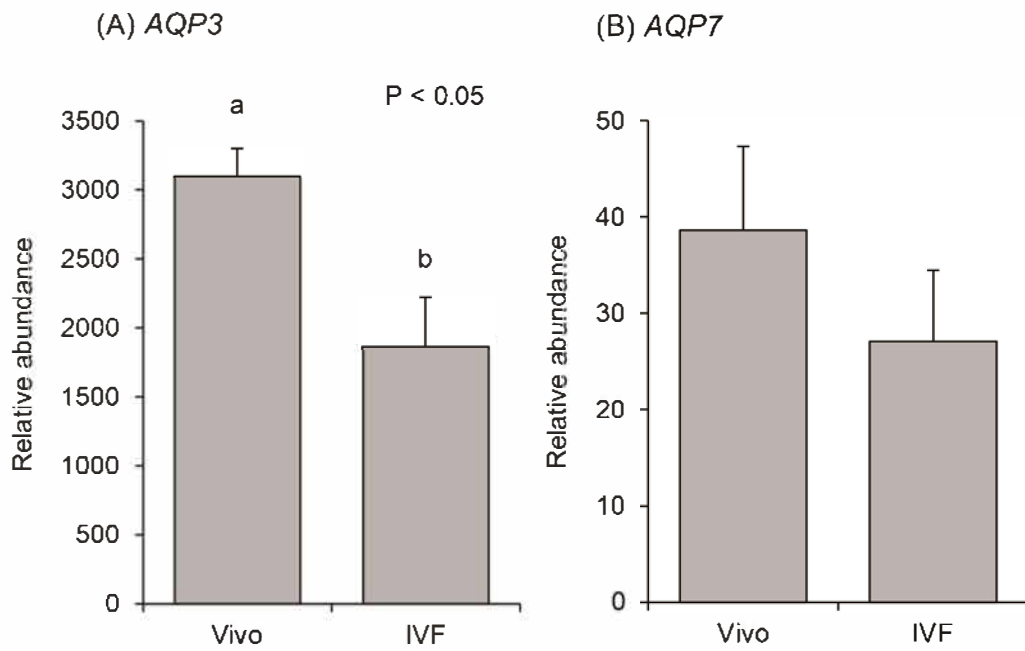


Fig. 12. Relative abundance (mean  $\pm$  SEM) of *AQP3* (A) and *AQP7* (B) mRNA in bovine blastocyst (Day 7) derived from Vivo and IVF (*AQP3*: n = 10, *AQP7*: n = 5). <sup>a, b</sup> Different superscripts indicate the significant difference ( $P < 0.05$ ).



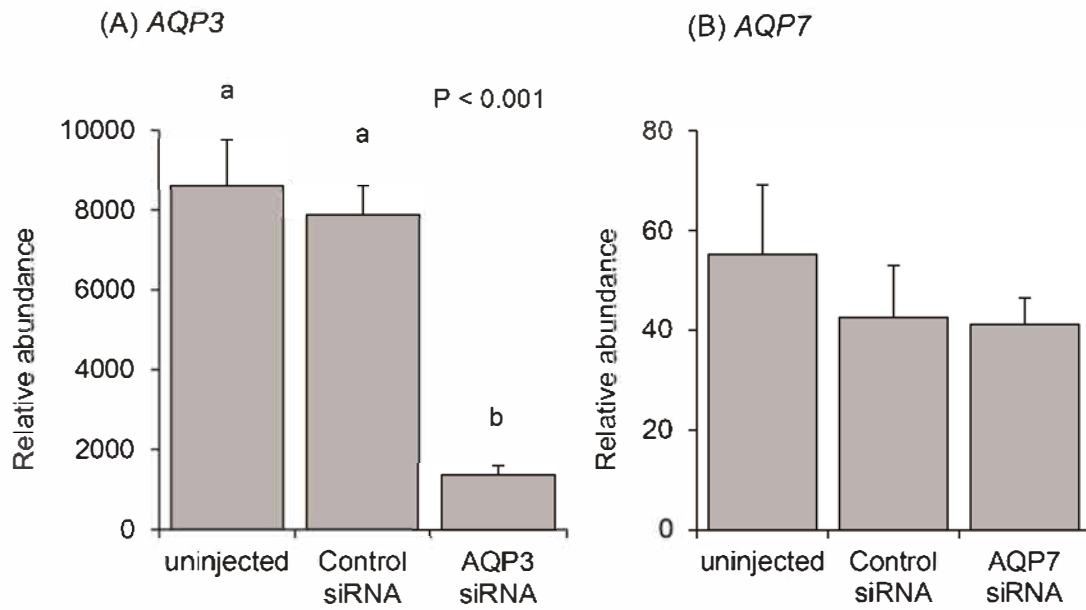


Fig. 13. Relative abundance (mean  $\pm$  SEM) of *AQP3* (A) and *AQP7* (B) mRNA in bovine compacted morula (Day 5) obtained from uninjected, control siRNA injection, *AQP3* siRNA injection, and *AQP7* siRNA injection (n = 5).<sup>a, b</sup> Different superscripts indicate the significant difference ( $P < 0.001$ ).

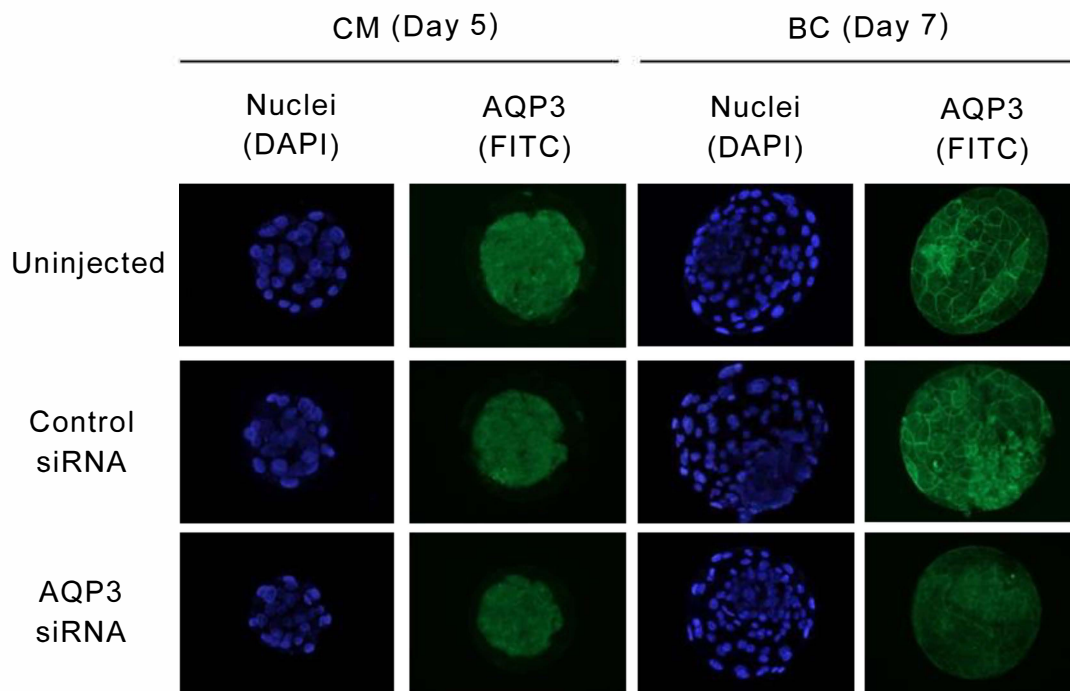


Fig. 14. Representative photographs of immunostaining of AQP3 in bovine morula (Day 5) and blastocyst (Day 7) obtained from uninjected, control siRNA injection, and AQP3 siRNA injection.

Table 5. Effect of AQP3 siRNA injection on *in vitro* development of bovine embryos.

| Treatment     | No. of embryos cultured | No. (%)* of embryos developed to |               |               |           |           |            |             |
|---------------|-------------------------|----------------------------------|---------------|---------------|-----------|-----------|------------|-------------|
|               |                         | Day 2                            | Day 4         | Day 5         | Day 6     | Day 7     | Day 8      |             |
|               |                         | 2-cell $\leq$                    | 8-cell $\leq$ | Morula $\leq$ | EB $\leq$ | BC $\leq$ | BC $\leq$  | ExBC $\leq$ |
| Uninjected    | 278                     | 252 (90.7)                       | 183 (65.8)    | 122 (43.9)    | 92 (33.1) | 99 (35.6) | 110 (39.6) | 91 (32.7)   |
| Control siRNA | 264                     | 239 (90.5)                       | 162 (61.4)    | 111 (42.0)    | 78 (29.6) | 69 (26.1) | 84 (31.8)  | 66 (25.0)   |
| AQP3 siRNA    | 238                     | 216 (90.8)                       | 151 (63.5)    | 104 (43.7)    | 62 (26.1) | 58 (24.4) | 77 (32.4)  | 57 (24.0)   |

Experiments were replicated 9 times.

\*Percentages of the number of embryos cultured.

EB: early blastocyst, BC: blastocyst, ExBC: expanded blastocyst,

Table 6. Effect of AQP3 siRNA injection on *in vitro* development of bovine embryos after vitrification-warming.

| <i>Treatment</i> | <i>No. of embryos</i> | <i>No. of viable embryos (%)<sup>a)</sup></i> | <i>No. of hatching or hatched embryos (%)<sup>b)</sup></i> |
|------------------|-----------------------|---|--|
| Uninjected       | 27                    | 24 (88.9)                                     | 17 (63.0)  |
| Control siRNA    | 29                    | 25 (86.2)                                     | 19 (65.5)  |
| AQP3 siRNA       | 29                    | 23 (79.3)                                     | 13 (44.8)  |

Experiments were replicated for 5 times.

<sup>a)</sup> No. of re-expanded embryos after culture for 24 h post vitrification-warming.

<sup>b)</sup> No. of hatching and hatched embryos after culture for 48 h post vitrification-warming.

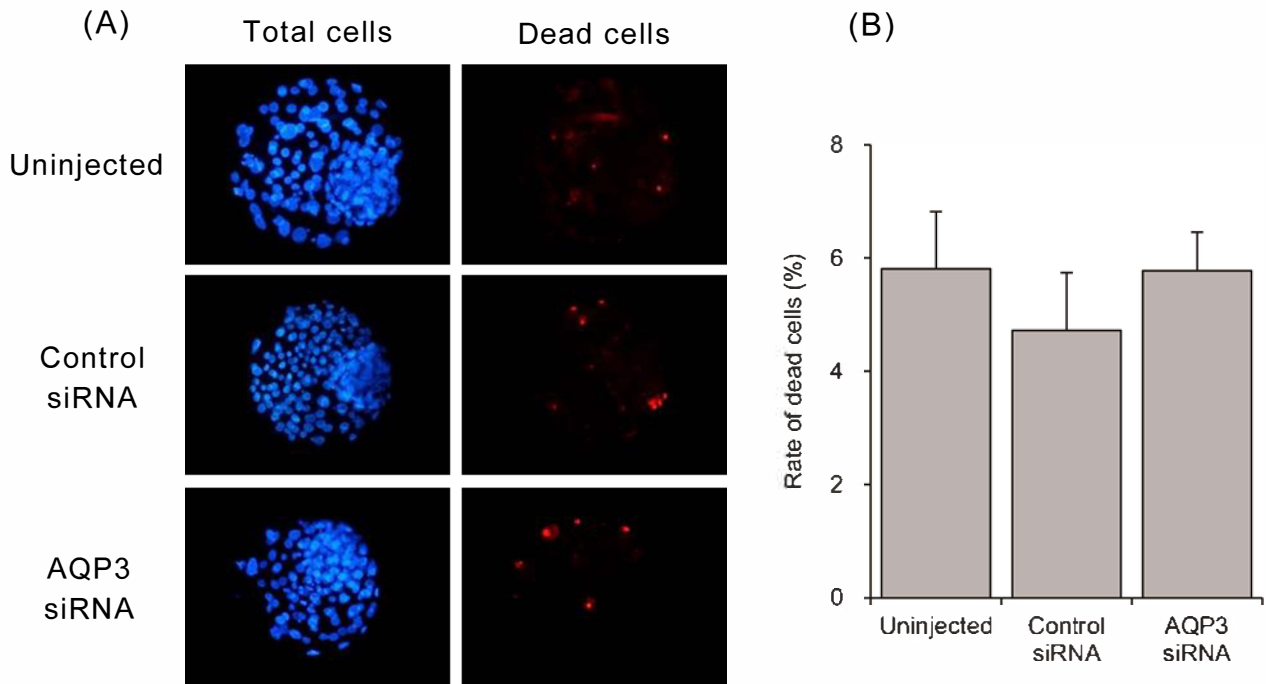


Fig. 15. Detection of dead cells in bovine embryos obtained from uninjected, control siRNA injection, and AQP3 siRNA injection after 24 h culture post vitrification–warming. (A) Representative photographs of dead cells staining in bovine embryos obtained from uninjected, control siRNA injection, and AQP3 siRNA injection after 24 h culture post vitrification–warming. (B) Rate of dead cells in bovine embryos obtained from uninjected (n = 12), control siRNA injection (n = 13), and AQP3 siRNA injection (n = 12) after 24 h culture post vitrification–warming. There is no significant difference among uninjected, Control siRNA, and AQP3 siRNA.

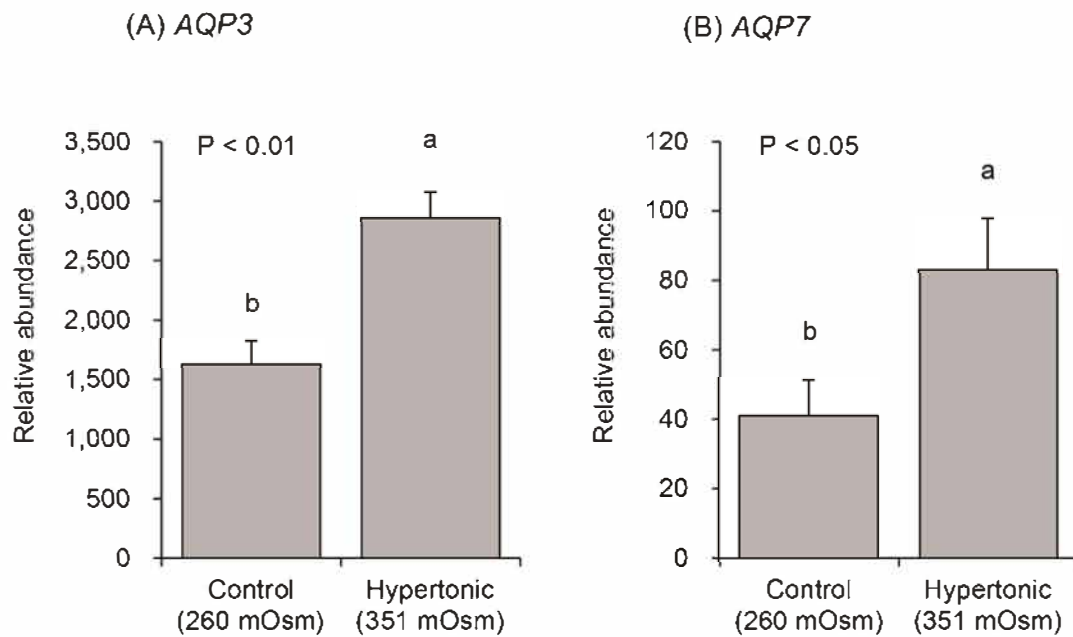


Fig. 16. *AQP3* (A) and *AQP7* (B) mRNA transcripts levels (mean  $\pm$  SEM) in bovine expanded blastocyst (Day 7) cultured in isotonic (260 mOsm, Control) or hypertonic medium (351 mOsm, Hypertonic) for 6 h (n=5). The relative abundance of *AQP3* and *AQP7* were normalized to that of *Histone H2A*. <sup>a, b</sup> Different superscripts indicate the significant difference (*AQP3*: P < 0.01, *AQP7*: P < 0.05).

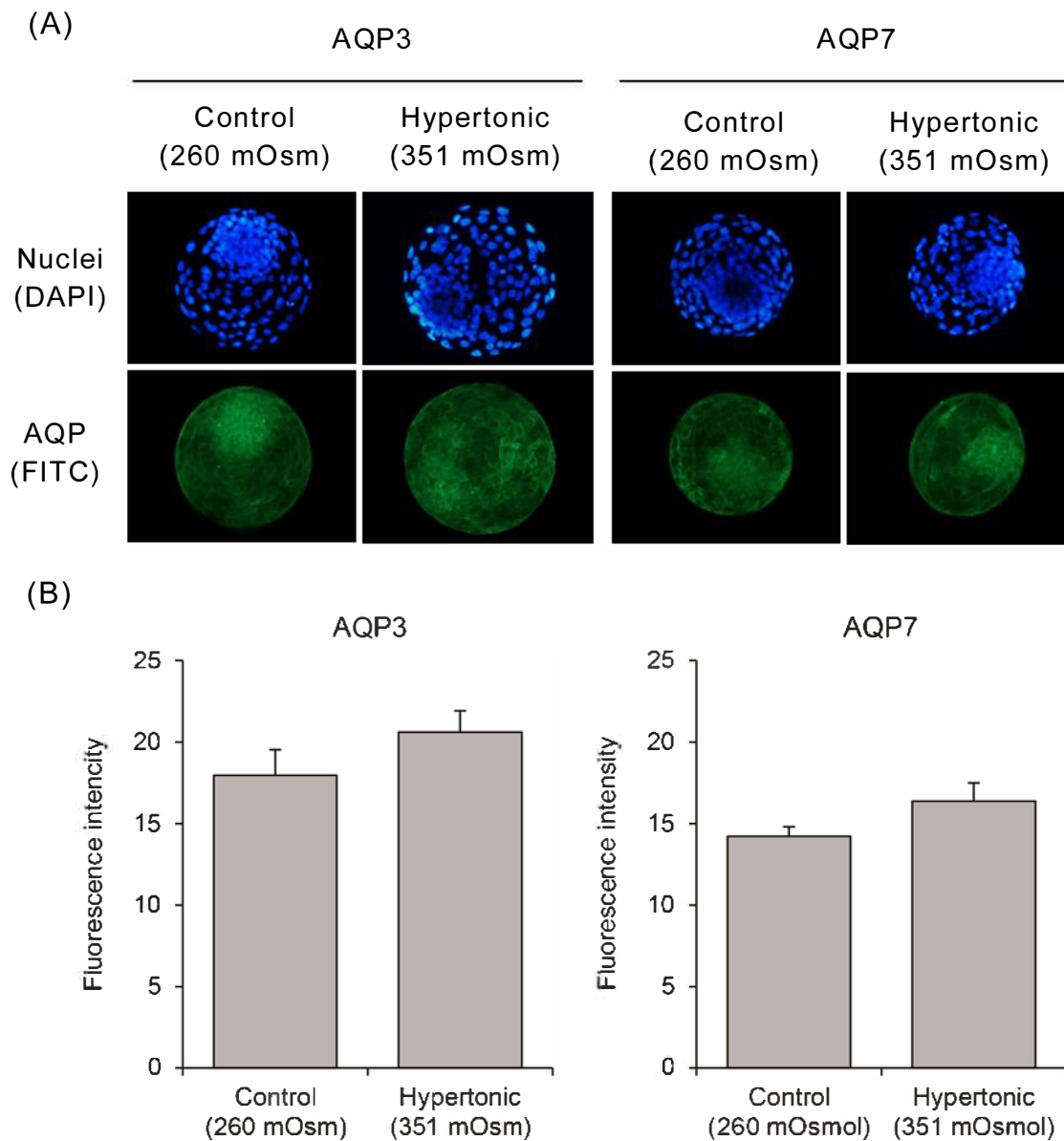


Fig. 17. (A) Representative photographs of immunostaining of *AQP3* and *AQP7* in bovine expanded blastocyst (Day 7) cultured in isotonic (260 mOsm, Control) or hypertonic medium (351 mOsm, Hypertonic) for 6 h. (B) Fluorescence intensity of immunostaining of *AQP3* and *AQP7* in bovine expanded blastocyst (Day 7) cultured in isotonic (260 mOsm, Control) or Hypertonic (351 mOsm, Hypertonic) medium for 6 h (n = 10). No significant differences in fluorescence intensity of immunostaining of *AQP3* and *AQP7* were observed between Control and Hypertonic groups.

Table 7. Effect of hypertonic treatment on *in vitro* development of bovine embryos after freeze-thawing or vitrification-warming.

| <i>Cryopreservation procedure</i> | <i>Treatment</i> | <i>No. of embryos</i> | <i>No. of viable embryos (%)<sup>a)</sup></i> | <i>No. of hatching or hatched embryos (%)<sup>b)</sup></i> |
|-----------------------------------|------------------|-----------------------|---|--|
| Slow-freezing                     | Control          | 45                    | 38(84.4)                                      | 16(35.6) <sup>d</sup>                                      |
|                                   | Hypertonic       | 45                    | 40(88.9)                                      | 29(64.4) <sup>c</sup>                                      |
| Vitrification                     | Control          | 50                    | 46(92.0)                                      | 23(46.0)   |
|                                   | Hypertonic       | 50                    | 43(86.0)                                      | 24(48.0)   |

Experiments were replicated for 5 times.

<sup>a)</sup> No. of re-expanded embryos after culture for 24 h post vitrification-warming.

<sup>b)</sup> No. of hatching and hatched embryos after culture for 48 h post vitrification-warming.

<sup>c, d</sup> Different superscripts indicate the significant difference ( $P < 0.01$ ).



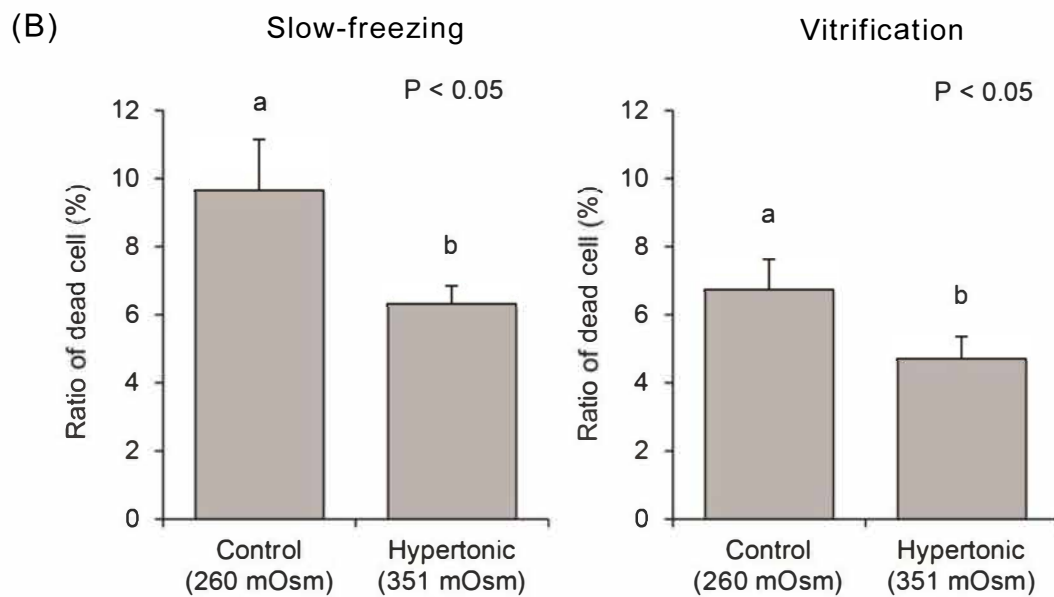
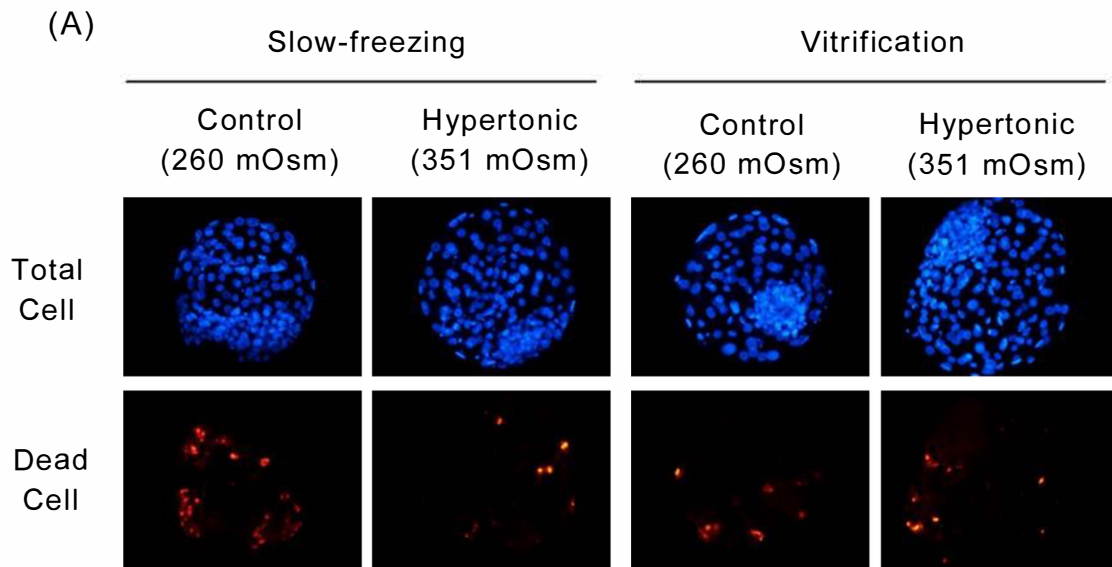


Fig. 18. Detection of dead cells in control (260 mOsm) and hypertonic treated (351 mOsm) embryos after 24 h culture post freeze–thawing or vitrification–warming. (A) Representative photographs of dead cells in control and hypertonic treated embryos after 24 h culture post freeze–thawing or vitrification–warming. (B) Rate of dead cells in control and hypertonic treated embryos after 24 h culture post freeze–thawing or vitrification–warming (n = 20). <sup>a, b</sup> Different superscripts indicate the significant difference (P < 0.05).

#### 4. 考察

本研究の実験 1 では、ウシ卵子および初期胚の各ステージにおける *AQP3* および *AQP7* mRNA およびタンパク質発現を解析した。*AQP3* および *AQP7* mRNA は、卵子および全てのステージの胚で発現しており、それらの発現量は、8-16-細胞期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への発生にともない増加し、その後胚盤胞期および拡張胚盤胞期への発生にともない減少した。マウス胚において、*AQP3* および *AQP7* mRNA は、成熟卵子、2-細胞期胚、8-細胞期胚、桑実期胚および胚盤胞期胚の全てのステージで発現し (Barcroft ら 2003、Edashige ら 2000、Offenberg ら 2000、Xiong ら 2013)、さらに、*AQP3* および *AQP7* mRNA 発現量は、卵子から 8 細胞期までの胚と比較し、桑実期および胚盤胞期胚において増加する可能性が報告されており (Offenberg ら 2000)、ウシ卵子および初期胚を用いた本研究結果と類似していた。また、*AQP3* および *AQP7* タンパク質についても、ウシ卵子および全てのステージのウシ初期胚で発現が確認された。マウス胚における *AQP3* または *AQP7* タンパク質の局在性についてはいくつかの異なる報告がなされている。Xiong ら (2013) は、マウス胚において、*AQP3* および *AQP7* タンパク質は、卵子から 2-細胞期胚までは細胞質に局在するが、8-細胞期以降は主に細胞膜上に局在するようになると報告している。一方、Barcroft ら (2003) および Nong ら (2013) は、マウス胚において、*AQP3* タンパク質は、8-細胞期胚では主に細胞質に局在しているが、桑実期胚以降に細胞膜上に局在するようになることを報告している。本研究において、ウシ成熟卵子から初期胚盤胞期胚までは、*AQP3* および *AQP7* タンパク質は細胞核および細胞質内に局在していたが、胚盤胞期および拡張胚盤胞期への発生にともない、*AQP3* および *AQP7* とともに細胞核における蛍光シグナルが減弱し、細胞膜上にも明瞭な

蛍光シグナルが観察されるようになった。以上のことから、ウシ胚とマウス胚では初期発生過程における AQP3 および AQP7 タンパク質の局在性が変化する時期が異なる可能性が示された。さらに、ウシ胚では、AQP3 および AQP7 は、胚盤胞期以降に細胞膜に局在するようになることから、胚盤胞期および拡張胚盤胞期への発生にともなう胞胚腔形成、すなわち胚の外側から内側への液体成分の流入に AQP3 および AQP7 が関与している可能性が示された。ウシ卵子および初期胚における AQP3 および AQP7 について、初期発生を通して mRNA やタンパク質発現を詳細に解析した報告はこれまでに無く、本研究により、ウシ胚の初期発生過程における AQP3 および AQP7 の発現動態に関して新たな知見が得られた。さらに、本研究において、体外受精由来ウシ胚盤胞期胚における *AQP3* mRNA 発現量は、体内受精胚と比較して有意に低かった。Offenberg ら (2005) は、体外受精由来マウス胚盤胞期胚における *AQP8*、*AQP9* および *AQP11* mRNA 発現量は、体内受精由来胚盤胞期胚と比較して低いことを報告しており、発生環境の違いが AQP 発現に影響する可能性を示している。しかし、Kazmany ら (2011) は、ウシ体内受精および体外受精由来胚盤胞期胚における *AQP3* mRNA 発現量に差は無いことを報告しており、この結果は本研究結果と矛盾する。Kazmany ら (2011) の先行研究と本研究の結果の違いの理由は明らかではないが、Lopera-Vasquez ら (2017) は、ウシ体外受精卵の発生培地へ卵管液を添加すると、胚盤胞期胚における *AQP3* mRNA 発現量が増加することを報告しており、本研究の結果と合わせて、ウシ胚においても初期発生過程における発生環境が AQP3 発現に影響を及ぼす可能性が示された。

マウス 2-細胞期胚に AQP3 あるいは AQP7 siRNA を導入し、AQP3 あるいは AQP7 発現を抑制すると、4-細胞期以降の発生が阻害される (Xiong ら 2013)。また、Bell ら (2013) は、AQP3 発現制御に関与する p38 MAPK signaling を阻

害すると、マウス胚の AQP3 発現が減少し、胚盤胞期胚の拡張および透明帯からの脱出が阻害されることを報告している。加えて、本研究の実験 1 において、AQP3 および AQP7 mRNA 発現量は、8- - 16-細胞期から桑実期および初期胚盤胞期にかけて増加し、それらのタンパク質は胚盤胞期以降に細胞膜上に局在するようになることが示された。これらのことから、ウシ胚においても AQP3 および AQP7 が初期発生、特に桑実期から胚盤胞期への発生に重要な役割を持つことが推察される。そこで、実験 2 では、まず、RNA 干渉法による AQP3 および AQP7 発現抑制がウシ胚の初期発生に及ぼす影響について検討した。AQP3 siRNA 区については、後期桑実期胚における AQP3 mRNA 発現が抑制され、胚盤胞期胚における AQP3 タンパク質発現が抑制されていることを確認できたものの、体外受精後の分割率やその後の発生率について対照区および Control siRNA 区と差はなく、AQP3 はウシ胚の初期発生に必須の因子ではない可能性が示された。ただし、ウシにおいて AQP3 は卵子の時点で発現していること、また、RNA 干渉法では、標的遺伝子の発現を完全に抑制できないことを考えると、残存した AQP3 が正常に機能した可能性を排除できない。さらに、本研究の結果には示さなかったが、ウシ卵子および初期胚には、AQP3 以外にも、AQP0、AQP4、AQP5、AQP6、AQP8、AQP9、AQP11 mRNA が発現していることを確認しており、他の AQP が AQP3 の機能を補完した可能性もある。そのため、本研究の結果のみでは、AQP3 がウシ胚の初期発生に果たす役割について結論づけることはできないと考えられる。また、本研究で用いた AQP7 siRNA では、ウシ初期胚の AQP7 mRNA 発現は抑制されず、AQP7 発現抑制がウシ胚の初期発生に及ぼす影響を検討することは出来なかった。

ウシ桑実期胚において、水や耐凍剤であるグリセリンおよび EG は、AQP3 を介した促進拡散によって細胞内外に輸送される (Jin ら 2011)。このことから、

AQP3 は、ウシ初期胚の凍結保存過程において重要な役割を担うことが予想される。そこで、実験 2 では、ウシ初期胚における AQP3 発現と耐凍性との関係の解明を目的に、RNA 干渉法による AQP3 発現抑制がウシ初期胚のガラス化-加温後の生存性に及ぼす影響について検討した。ガラス化保存では、緩慢凍結保存法と比較して高濃度の耐凍剤を使用するため、ガラス化-加温前後において、促進拡散による速やかな細胞内外への水および耐凍剤の流入および流出が種々の凍結傷害を回避する上で重要となる。そのため、本研究では、AQP3 の発現抑制による耐凍性への影響は、緩慢凍結保存と比較しガラス化保存においてより顕著に出ると想定し、ガラス化-加温後の生存性を評価した。しかし、AQP3 発現抑制胚のガラス化-加温後 24 時間培養後の再拡張率、透明帯からの脱出率は、対照区および Control siRNA 区と比較して低いものの、有意な差は認められなかった。この要因としては、上述した RNA 干渉法による AQP 発現抑制がウシ胚の初期発生に及ぼす影響の検討と同様に、残存した AQP3 が水や耐凍剤の流出および流入に寄与した可能性や他の種類の AQP により AQP3 の機能が補完された可能性がある。

実験 3 では、AQP3 および AQP7 発現促進が、体外受精由来ウシ拡張胚盤胞期胚 (Day 7) における耐凍性に及ぼす影響について検討することで、ウシ胚における AQP3 および AQP7 と耐凍性との関係を明らかにすることを試みた。Bell ら (2009) は、スクロースを添加した高浸透圧培地 (350 mOsm) でマウス桑実期胚を 6 時間または 24 時間培養すると、MAPK signaling の活性化を介して AQP3 mRNA およびタンパク質発現が増加することを報告している。また、Tan ら (2015) は、マウス卵子を EG、DMSO またはスクロースを含む高浸透圧培地に浸漬することで、細胞膜に発現する AQP7 タンパク質量が増加することを報告している。本研究においても、体外受精由来ウシ拡張胚盤胞期胚 (Day 7) を、スクロースを含む 351 mOsm の高浸透圧培地で 6 時間培養すると、AQP3 および

*AQP7* mRNA 発現量が有意に増加した。さらに、高浸透圧処理したウシ初期胚の緩慢凍結-融解およびガラス化-加温後 24 時間培養後の死細胞率は、対照区と比較して有意に低く、さらに緩慢凍結-融解においては、融解後 24 時間培養後の透明帯からの脱出率が対照区と比較して有意に高かった。これらの結果から、*AQP3* および *AQP7* 発現量の増加がウシ初期胚の耐凍性の向上と関連している可能性が示唆された。すなわち、本研究では、緩慢凍結およびガラス化保存における耐凍剤の一つとして EG を使用したが、高浸透圧処理によりウシ初期胚の *AQP3* および *AQP7* 発現量が増加したことで、凍結保存過程における細胞膜を介した水や EG の透過がより効率的に行われるようになり、浸透圧変化による過度な膨張および収縮、耐凍剤による細胞毒性または細胞内氷晶形成による凍結傷害が軽減された結果、凍結-融解またはガラス化-加温後の割球細胞の生存性が向上した可能性が考えられる。一方、実験 2 において、ウシ体外受精由来胚盤胞期胚の *AQP3* 発現を抑制しても、耐凍性への影響は全く認められなかったにも関わらず、実験 3 における高浸透圧処理では、*AQP3* mRNA 発現が増加することで、耐凍性が向上した。実験 3 の高浸透圧処理では、*AQP3* mRNA に加え、*AQP7* mRNA の発現も高まっており、胚の耐凍性には、複数の AQP の相互作用が重要な役割を担っている可能性がある。今後、*AQP3* および *AQP7* の特異的阻害剤の使用等により、*AQP3* および *AQP7* とウシ初期胚における耐凍性との関連性についてさらに検証する必要がある。

一方、本研究では、高浸透圧処理による *AQP3* および *AQP7* タンパク質の増加は確認できなかった。マウス卵子は、高浸透圧ストレスを受けると、卵子細胞質内に存在するオーロラキナーゼ A のリン酸化、次いでタンパク質の翻訳に関与する Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein (CPEB) のリン酸化が促進され、それにより、*AQP7* タンパク質が増加する (Tan ら 2015)。さらに、

高浸透圧ストレスにより増加した AQP7 は、膜タンパク質の細胞膜への動員に関わる F-Actin (Kierszenbaum ら 2011) と結合し、速やかに細胞膜での発現が増加するモデルが提唱されている (Tan ら 2015)。また、本研究の実験 1 において、ウシ胚における AQP3 および AQP7 タンパク質は、胚盤胞期以降に細胞膜に明瞭に局在することが示された。本研究では、高浸透圧処理が AQP3 および AQP7 タンパク質発現量に及ぼす影響を調べるため、蛍光免疫染色での AQP3 および AQP7 の蛍光強度を解析したが、上記のことを踏まえると、蛍光免疫染色による蛍光強度から算出した AQP タンパク質量に及ぼす影響を調べるだけでなく、AQP の細胞膜への動員メカニズムに関わる分子群やその局在性 (細胞膜での発現) に及ぼす影響についてより詳細に調べるべきであり、この点については今後慎重に検討する必要がある。

一方、実験 3 の結果は、AQP3 および AQP7 がウシ初期胚の耐凍性と関連する可能性を示すばかりでなく、高浸透圧処理により AQP 発現を人為的に促進することで、ウシ体外受精胚の耐凍性を向上させられる可能性を示すものである。体内受精胚と体外受精胚の耐凍性の違いの要因の一つとして、脂肪滴の多寡との関係がよく研究されている。ウシやブタの体外受精胚は、体内受精胚と比較して脂肪滴含量が多く、脂肪滴を減少させると凍結融解後の生存性が向上する (Takahashi ら 2013)。一方、ウシ体外受精胚と体内受精胚では、水や耐凍剤の細胞膜透過性が異なることが示唆されている (Hochi ら 2003)。実験 1 において示した通り、体外受精由来の胚盤胞期胚における AQP3 mRNA 発現量は、体内受精由来の胚盤胞期胚と比較して有意に低く、また AQP7 mRNA 発現量については両者に差はないものの、体外受精由来胚盤胞期胚は体内受精由来胚盤胞期胚と比較してその値が低かった。高浸透圧処理により体外受精胚の AQP3 および AQP7 発現量が増加したことで、細胞膜における水や耐凍剤の細胞膜透過性が体内受精

胚に近づき、凍結-融解またはガラス化-加温後の割球細胞の生存性が向上した可能性が考えられる。

マウス、ブタ、ヒツジまたはウシ等の哺乳動物卵子および初期胚は、適度な静水圧、浸透圧または酸化ストレスを与えられることで、ストレス耐性を獲得し、体外培養における発生能や凍結保存における耐凍性が向上することが報告されている(Bockら2010、Boglioloら2011、Duら2008、Pribenszkyら2005、Pribenszkyら2008、Pribenszkyら2010、Trigalら2013)。このような適度なストレス負荷により、哺乳動物卵子や初期胚の発生能や耐凍性が向上するメカニズムの詳細はこれまで不明であったが、近年、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により、遺伝子の転写および翻訳機構の変化が発生能や耐凍性向上のメカニズムに關与する可能性が示されている(Bockら2010、Bockら2016、Jiangら2016)。実際に、Jiangら(2016)は、高静水圧処理を施した受精後7日目のウシ体外受精由来拡張胚盤胞期胚は、無処置区と比較して、ガラス化-加温後の再拡張率が向上するとともに、アポトーシス関連遺伝子の発現が減少し、RNAプロセッシングや細胞増殖関連遺伝子の発現が増加することを報告している。高浸透圧処理により、ウシ胚の*AQP3*および*AQP7*発現が増加し、緩慢凍結-融解およびガラス化-加温後の割球細胞の生存性が向上したという本研究の結果は、上記のようなストレス負荷による耐凍性向上メカニズムの一端を成すのかもしれない。

本研究では、*AQP3* および *AQP7* がウシ初期胚の耐凍性に重要な役割を持つ可能性が示された。また、高浸透圧処理により、人為的に *AQP3* および *AQP7* の発現を増加させることで、ウシ体外受精胚の耐凍性を向上できる可能性が示唆された。ただし、ウシ初期胚における *AQP3* および *AQP7* と耐凍性との関係を直接証明するためには、ウシ初期胚において *AQP3* および *AQP7* がどのような種類の耐凍剤の促進拡散に関わるのかを明らかにするとともに、凍結あるいはガラス化保



存に用いる耐凍剤の種類や濃度および平衡時間等について複数の条件を設定し、AQP の多寡と凍結-融解あるいはガラス化-加温後の生存性との関連性を検討する必要がある。また、AQP3 および AQP7 遺伝子欠損ウシ胚や AQP3 および AQP7 の特異的阻害剤を用いたさらなる検証実験が必要と考えられる。さらに、ウシ体外受精胚の耐凍性向上技術として応用するためには、高浸透圧処理を施したウシ体外受精胚の凍結保存-移植後の受胎率や産子の正常性の調査を行う必要がある。

## 5. 要約

ウシ初期胚の凍結保存技術は、胚移植技術を活用する上で必須の技術である。一方、現在の凍結保存技術をもってしても、ウシ初期胚は少なからず凍結傷害を受け、移植後の受胎率は低下する。特に近年需要が増加している体外受精胚は、耐凍性が低く、移植後の受胎率が低いことが問題となっている。ウシ初期胚の凍結保存技術のさらなる向上のためには、ウシ初期胚の耐凍性に関わる低温生物学的特性について、分子レベルでの理解が求められる。本研究では、細胞膜で水や耐凍剤であるグリセリンやEG等を効率的に透過させる機能を持つ*AQP3*および*AQP7*について、ウシ卵子および初期胚における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、ウシ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おり、*AQP3*および*AQP7*mRNA発現量は、8-16-細胞期では低い値を示したものの、後期桑実期胚および初期胚盤胞への発生にともない増加し、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発現量は、体内受精胚と比較し有意に低かった。*AQP3*発現抑制は、ウシ胚の初期発生およびガラス化保存後の胚の生存性に影響を及ぼさなかった。一方、ウシ体外受精由来拡張胚盤胞期胚に対して高浸透圧処理を施すことで、*AQP3*および*AQP7*mRNA発現量が増加し、緩慢凍結およびガラス化保存後の割球細胞の生存性が向上することが明らかとなった。

本研究の結果から、*AQP3*および*AQP7*がウシ初期胚の耐凍性に重要な役割を持つ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。

## 第 4 章

### 総括

AQP は、細胞膜において水を選択的かつ効率的に透過させるチャネルタンパク質として 1992 年に発見され (Preston ら 1992)、それ以降、主にノックアウトマウスを用いた解析から、様々な器官、組織および細胞における生理的役割が明らかにされてきた (Takata ら 2004)。一方、AQP は、細胞膜を介した速やかな水や耐凍剤の透過が不可欠な細胞の凍結保存過程においても重要な役割を担うと推測されるにもかかわらず、凍結保存過程における AQP の機能に関する研究は十分になされていない (Sales ら 2013)。特に、ウシ精子および初期胚における AQP に関する研究報告は少なく、その発現動態や生理的機能、また凍結保存過程における役割について未だ不明な点が多い。本研究では、水および耐凍剤 (グリセリンや EG 等) の両方を透過させる機能を持つ 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 発現と耐凍性との関係について検討した。

第 2 章では、AQP3 および AQP7 が、凍結保存過程を通してウシ精子の主に尾部に局在することを明らかにするとともに、AQP3 および AQP7 量が、凍結融解後の運動性、特に運動速度と関連することを示した。最近、耐凍性の高いウシ精子は、耐凍性の低い精子と比較して、AQP7 および AQP11 タンパク質量が多く、AQP7 および AQP11 がウシ精子の耐凍性の指標になることが報告されている (Morato ら 2018、Prieto-Martínez ら 2017a)。本研究の結果は、AQP7 および AQP11 に加えて AQP3 もウシ精子の耐凍性と関連するという新たな知見を提示する。さらに本研究は、AQP3 および AQP7 が、特にウシ精子の尾部の耐凍性に重要な役割を担う可能性を示すものである。今後は、特異的阻害剤を用いた AQP3 および AQP7 のチャネル機能阻害実験等を行うことで、ウシ精子の凍結保存過程における AQP3 および AQP7 の役割がより詳細に解明されることが期待される。

第 3 章では、AQP3 および AQP7 mRNA およびタンパク質がウシ卵子から拡

張胚盤胞期胚までの全てのステージで発現していることを明らかにした。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。さらに、高浸透圧培地を用いた *AQP3* および *AQP7* の発現促進実験により、*AQP3* および *AQP7* がウシ初期胚の耐凍性と関連する可能性を示すと同時に、高浸透圧処理により人為的に *AQP3* および *AQP7* 発現を促進することでウシ体外受精胚の凍結融解後の生存性を向上させられる可能性を示した。ウシ桑実期胚では、細胞膜におけるグリセリンや EG の透過は、*AQP3* を介した促進拡散により行われることが報告されている (Jin ら 2011)。*AQP7* がウシ初期胚における水や耐凍剤の透過に果たす役割についてさらなる研究が必要であるが、Jin ら (2011) の先行研究を踏まえると、高浸透圧処理により *AQP3* および *AQP7* の発現が上昇した結果、凍結保存過程における水や耐凍剤の輸送がよりスムーズに行われ、細胞内氷晶の形成、耐凍剤による毒性、浸透圧変化による過度な膨張および収縮といった凍結傷害が軽減されたと推察される。今後、ゲノム編集技術や特異的阻害剤を用いたさらなる検証実験により、ウシ初期胚における *AQP3* および *AQP7* 発現と耐凍性との関係がより詳細に解明されることが期待される。また、本研究により、*AQP* の人為的発現制御によるウシ体外受精胚の耐凍性向上技術の開発の可能性が示され、今後同技術の開発が進むことが期待される。

本研究により、*AQP3* および *AQP7* がウシ精子および初期胚の耐凍性に重要な役割を持つ可能性が示された。これまで、ウシ精子、卵子および初期胚の凍結保存技術の改良は、主に、凍結保存液の種類、耐凍剤の種類、濃度、平衡時間および添加剤の利用等の検討を行い、その中から最適な条件を見つけるといった経験的手法により行われてきた。今後は、*AQP* を指標にして研究を進めることで、ウシ精子および初期胚の凍結保存技術をさらに改良できると考えられ、牛の人工授精および胚移植技術のさらなる発展に貢献することが期待される。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導と御高閲を賜った主指導教員の岩手大学農学部 澤井 健 教授に深く感謝いたします。また御校閲および御助言を賜った副指導教員の岩手大学農学部 橋爪 力 名誉教授、帯広畜産大学畜産学部 手塚 雅文 教授、岩手大学農学部 平田 統一 助教並びに審査委員として貴重な御助言をいただきました山形大学農学部 木村 直子 教授に深く感謝いたします。本研究の第2章を遂行するにあたり絶えず有意義な御指導と適切な御助言を賜った一般社団法人ジェネティクス北海道顧問 高橋 芳幸 博士、東京農業大学生物産業学部 平山 博樹 教授ならびに一般社団法人ジェネティクス北海道十勝清水種雄牛センターの皆様に深く感謝いたします。さらに、本研究を遂行するにあたり多大なる御協力を頂いた北海道立総合研究機構畜産試験場生物工学グループの皆様に深く感謝いたします。

本研究は、一般社団法人ジェネティクス北海道および日本学術振興会科学研究費助成事業（平成27-29年度若手研究B）の支援を受けて遂行いたしました。

## 引用文献

- Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S. (2002). Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* 542, 3-16.
- Bavister BD, Leibfried ML, Lieberman G. (1983). Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol Reprod* 28, 235-247.
- Barcroft LC, Offenberg H, Thomsen P, Watson AJ. (2003). Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate transepithelial water movements during cavitation. *Dev Biol* 256, 342-354.
- Bedford-Guaus SJ, Chauvigné F, Mejía-Ramírez E, Martí M, Ventura-Rubio A, Raya Á, Cerdà J, Veiga A. (2016). Expression of the T85A mutant of zebrafish aquaporin 3b improves post-thaw survival of cryopreserved early mammalian embryos. *Zygote* 24, 839-847.
- Bell CE, Larivière NM, Watson PH, Watson AJ. (2009). Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways mediate embryonic responses to culture medium osmolarity by regulating Aquaporin 3 and 9 expression and localization, as well as embryonic apoptosis. *Hum Reprod* 24, 1373-1386.
- Bell CE, Watson AJ. (2013). p38 MAPK regulates cavitation and tight junction function in the mouse blastocyst. *PLoS One* 8, e 59528.
- Blondin P. (2016). Logistics of large scale commercial IVF embryo production. *Reprod Fertil Dev* 29, 32-36.
- Bock I, Losonczy E, Mamo S, Polgar Z, Harnos A, Dinnyes A, Pribenszky C. (2010).

- Stress tolerance and transcriptional response in mouse embryos treated with high hydrostatic pressure to enhance cryotolerance. *Cryo Letters* 31, 401-412.
- Bock I, Raveh-Amit H, Losonczi E, Carstea AC, Feher A, Mashayekhi K, Matyas S, Dinnyes A, Pribenszky C. (2016). Controlled hydrostatic pressure stress downregulates the expression of ribosomal genes in preimplantation embryos: a possible protection mechanism? *Reprod Fertil Dev* 28, 776-784.
- Bogliolo L, Ariu F, Leoni G, Uccheddu S, Bebbere D. (2011). High hydrostatic pressure treatment improves the quality of in vitro-produced ovine blastocysts. *Reprod Fertil Dev* 23, 809-817.
- Boj M, Chauvigné F, Cerdà J. (2015). Coordinated Action of Aquaporins Regulates Sperm Motility in a Marine Teleost. *Biol Reprod* 93, 1-11.
- Camargo LS, Boite MC, Wohlres-Viana S, Mota GB, Serapiao RV, Sa WF, Viana JH, Nogueira LA. (2011). Osmotic challenge and expression of aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced in vitro. *Cryobiology* 63, 256-262.
- Campos E, Moura TF, Oliva A, Leandro P, Soveral G. (2011). Lack of Aquaporin 3 in bovine erythrocyte membranes correlates with low glycerol permeation. *Biochem Biophys Res Commun* 408, 477-481.
- Celeghini EC, de Arruda RP, de Andrade AF, Nascimento J, Raphael CF. (2007). Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod Domest Anim* 42, 479-488.
- Chen Q, Duan EK. (2011a). Aquaporins in sperm osmoadaptation: an emerging role for volume regulation. *Acta Pharmacol Sin* 32, 721-724.



- Chen Q, Peng H, Lei L, Zhang Y, Kuang H, Cao Y, Shi QX, Ma T, Duan E. (2011b). Aquaporin3 is a sperm water channel essential for postcopulatory sperm osmoadaptation and migration. *Cell Res* 21, 922-933.
- Chen X, Zhu H, Hu C, Hao H, Zhang J, Li K, Zhao X, Qin T, Zhao K, Zhu H, Wang D. (2014). Identification of differentially expressed proteins in fresh and frozen-thawed boar spermatozoa by iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. *Reproduction* 147, 321-330.
- Curry MR. (2000). Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod* 5, 46-52.
- Dochi O, Yamamoto Y, Saga H, Yoshiba N, Kano N, Maeda J, Miyata K, Yamauchi A, Tominaga K, Oda Y, Nakashima T, Inohae S. (1998). Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology* 49, 1051-1058.
- Du Y, preLin L, Schmidt M, Bøgh IB, Kragh PM, Sørensen CB, Li J, Purup S, Pribenszky C, Molnár M, Kuwayama M, Zhang X, Yang H, Bolund L, Vajta G. (2008). High hydrostatic pressure treatment of porcine oocytes before handmade cloning improves developmental competence and cryosurvival. *Cloning Stem Cells* 10, 325-330.
- Edashige K. (2016a). Permeability of the plasma membrane to water and cryoprotectants in mammalian oocytes and embryos: Its relevance to vitrification. *Reprod Med Biol* 16, 36-39.
- Edashige K. (2016b). The movement of water and cryoprotectants across the plasma membrane of mammalian oocytes and embryos and its relevance to

vitrification. *J Reprod Dev* 62, 317-321.

Edashige K, Ohta S, Tanaka M, Kuwano T, Valdez DM Jr, Hara T, Jin B, Takahashi S, Seki S, Koshimoto C, Kasai M. (2007). The role of aquaporin 3 in the movement of water and cryoprotectants in mouse morulae. *Biol Reprod* 77, 365-375.

Edashige K, Sakamoto M, Kasai M. (2000). Expression of mRNAs of the aquaporin family in mouse oocytes and embryos. *Cryobiology* 40, 171-175.

Edashige K, Tanaka M, Ichimaru N, Ota S, Yazawa K, Higashino Y, Sakamoto M, Yamaji Y, Kuwano T, Valdez DM Jr, Kleinhans FW, Kasai M. (2006). Channel-dependent permeation of water and glycerol in mouse morulae. *Biol Reprod* 74, 625-632.

Edashige K, Yamaji Y, Kleinhans FW, Kasai M. (2003). Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation. *Biol Reprod* 68, 87-94.

Hara-Chikuma M, Verkman AS. (2005). Aquaporin-3 functions as a glycerol transporter in mammalian skin. *Biol Cell* 97, 479-486.

Hochi S. (2003). Cryopreservation of follicular oocytes and preimplantation embryos in cattle and horses. *J Reprod Dev* 49, 13-21.

Huang HF, He RH, Sun CC, Zhang Y, Meng QX, Ma YY. (2006). Function of aquaporins in female and male reproductive systems. *Hum Reprod Update* 12, 785-795.

Inaba Y, Aikawa Y, Hirai T, Hashiyada Y, Yamanouchi T, Misumi K, Ohtake M, Somfai T, Kobayashi S, Saito N, Matoba S, Konishi K, Imai K. (2011). In-straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using Cryotop. *J*

Reprod Dev 57, 437-443.

Ishibashi K, Hara S, Kondo S. (2009). Aquaporin water channels in mammals. Clin Exp Nephrol 13, 107-117.

Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Kageyama Y, Tohsaka A, Suzuki F, Marumo F, Sasaki S. (1997a). Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea. J Biol Chem 272, 20782-20786.

Ishibashi K, Kuwahara M, Kageyama Y, Tohsaka A, Marumo F, Sasaki S. (1997b). Cloning and functional expression of a second new aquaporin abundantly expressed in testis. Biochem Biophys Res Commun 237, 714-718.

Jiang Z, Harrington P, Zhang M, Marjani SL, Park J, Kuo L, Pribenszky C, Tian XC. (2016). Effects of High Hydrostatic Pressure on Expression Profiles of In Vitro Produced Vitrified Bovine Blastocysts. Sci Rep 6, 21215.

Jin B, Kawai Y, Hara T, Takeda S, Seki S, Nakata Y, Matsukawa K, Koshimoto C, Kasai M, Edashige K. (2011). Pathway for the movement of water and cryoprotectants in bovine oocytes and embryos. Biol Reprod 85, 834-847.

Jin B, Higashiyama R, Nakata Y, Yonezawa J, Xu S, Miyake M, Takahashi S, Kikuchi K, Yazawa K, Mizobuchi S, Niimi S, Kitayama M, Koshimoto C, Matsukawa K, Kasai M, Edashige K. (2013). Rapid movement of water and cryoprotectants in pig expanded blastocysts via channel processes: its relevance to their higher tolerance to cryopreservation. Biol Reprod 89: 1-12.

Kasai M, Ito K, Edashige K. (2002). Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. Hum Reprod 17, 1863-1874.

- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. (2011). Cytoskeletal track selection during cargo transport in spermatids is relevant to male fertility. *Spermatogenesis* 1, 221-230.
- Kuzmany A, Havlicek V, Wrenzycki C, Wilkening S, Brem G, Besenfelder U. (2011). Expression of mRNA, before and after freezing, in bovine blastocysts cultured under different conditions. *Theriogenology* 75, 482-494.
- Laforenza U, Pellavio G, Marchetti AL, Omes C, Todaro F, Gastaldi G. (2016). Aquaporin-mediated water and hydrogen peroxide transport is involved in normal human spermatozoa functioning. *Int J Mol Sci* 18, E66.
- Lopera-Vasquez R, Hamdi M, Maillo V, Lloreda V, Coy P, Gutierrez-Adan A, Bermejo-Alvarez P, Rizos D. (2017). Effect of bovine oviductal fluid on development and quality of bovine embryos produced in vitro. *Reprod Fertil Dev* 29, 621-629.
- Madeira A, Moura TF, Soveral G. (2006). Aquaglyceroporins: implications in adipose biology and obesity. *Cell Mol Life Sci* 72, 759-771.
- Massip A. (2001). Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Domest Anim* 36, 49-55.
- Miller D, Ostermeier GC. (2006). Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum Reprod Update* 12, 757-767.
- Morató R, Chauvigné F, Novo S, Bonet S, Cerdà J. (2014). Enhanced water and cryoprotectant permeability of porcine oocytes after artificial expression of human and zebrafish aquaporin-3 channels. *Mol Reprod Dev* 81, 450-461.
- Morató R, Prieto-Martínez N, Muiño R, Hidalgo CO, Rodríguez-Gil JE, Bonet S, Yeste M. (2018). Aquaporin 11 is related to cryotolerance and fertilising

ability of frozen–thawed bull spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* [Epub ahead of print].

Moretti E, Terzuoli G, Mazzi L, Iacoponi F, Collodel G. (2012). Immunolocalization of aquaporin 7 in human sperm and its relationship with semen parameters. *Syst Biol Reprod Med* 58: 129-135.

Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y. (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407, 599-605.

Nebel RL. (2007). Techniques for artificial insemination of cattle with frozen-thawed semen. *In: Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Yonugquist RS & Threlfall WR EDs, 253-258.

Nong YQ, Liu FH, Chen Y, Wang F. (2013). The expression and distribution of aquaporin 3 in mouse embryos before and after vitrification. *J Assist Reprod Genet* 30, 601-606.

Offenberg H, Barcroft LC, Caveney A, Viuff D, Thomsen PD, Watson AJ. (2000). mRNAs encoding aquaporins are present during murine preimplantation development. *Mol Reprod Dev* 57, 323-330.

Offenberg H, Thomsen PD. (2005). Functional challenge affects aquaporin mRNA abundance in mouse blastocysts. *Mol Reprod Dev* 71, 422-430.

Pedro PB, Zhu SE, Makino N, Sakurai T, Edashige K, Kasai M. (1997). Effects of hypotonic stress on the survival of mouse oocytes and embryos at various stages. *Cryobiology* 35, 150-158.

Perry G. (2016). 2015 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newslett*, 34, 10-25.

- Polge C. (1952). Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at 79 degrees C. *Nature* 169, 626-627.
- Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. (1992). Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256, 385-387.
- Pribenszky C, Du Y, Molnár M, Harnos A, Vajta G. (2008). Increased stress tolerance of matured pig oocytes after high hydrostatic pressure treatment. *Anim Reprod Sci* 106, 200-207.
- Pribenszky C, Molnár M, Cseh S, Solti L. (2005). Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. *Anim Reprod Sci* 87, 143-150.
- Pribenszky C, Vajta G, Molnar M, Du Y, Lin L, Bolund L, Yovich J. (2010). Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. *Biol Reprod* 83, 690-697.
- Prieto-Martínez N, Morató R, Muiño R, Hidalgo CO, Rodríguez-Gil JE, Bonet S, Yeste M. (2017a). Aquaglyceroporins 3 and 7 in bull spermatozoa: identification, localisation and their relationship with sperm cryotolerance. *Reprod Fertil Dev* 29, 1249-1259.
- Prieto-Martínez N, Morató R, Vilagran I, Rodríguez-Gil JE, Bonet S, Yeste M. (2017b). Aquaporins in boar spermatozoa. Part II: detection and localisation of aquaglyceroporin 3. *Reprod Fertil Dev* 29, 703-711.
- Prieto-Martínez N, Vilagran I, Morató R, Rivera Del Álamo MM, Rodríguez-Gil JE, Bonet S, Yeste M. (2017c). Relationship of aquaporins 3 (AQP3), 7 (AQP7), and 11 (AQP11) with boar sperm resilience to withstand freeze-thawing

procedures. *Andrology* 5, 1153-1164.

Prieto-Martínez N, Vilagran I, Morató R, Rodríguez-Gil JE, Yeste M, Bonet S. (2016). Aquaporins 7 and 11 in boar spermatozoa: detection, localisation and relationship with sperm quality. *Reprod Fertil Dev* 28, 663-672.

Robertson I, Nelson RE. (2010). Certification and identification of embryo. In: Stringfellow DA, Givens MD (eds.), *Manual of The International Embryo Transfer Society*. 4th ed, Champaign. International Embryo Transfer Society, 86-105.

Røjen BA, Poulsen SB, Theil PK, Fenton RA, Kristensen NB. (2011). Short communication: Effects of dietary nitrogen concentration on messenger RNA expression and protein abundance of urea transporter-B and aquaporins in ruminal papillae from lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 94, 2587-2591.

Saito K, Kageyama Y, Okada Y, Kawakami S, Kihara K, Ishibashi K, Sasaki S. (2004). Localization of aquaporin-7 in human testis and ejaculated sperm: possible involvement in maintenance of sperm quality. *J Urol* 172, 2073-2076.

Sales AD, Lobo CH, Carvalho AA, Moura AA, Rodrigues AP. (2013). Structure, function, and localization of aquaporins: their possible implications on gamete cryopreservation. *Genet Mol Res* 12, 6718-6732.

Sohara E, Ueda O, Tachibe T, Hani T, Jishage K, Rai T, Sasaki S, Uchida S. (2007). Morphologic and functional analysis of sperm and testes in Aquaporin 7 knockout mice. *Fertil Steril* 87, 671-676.

Takahashi T, Inaba Y, Somfai T, Kaneda M, Geshi M, Nagai T, Manabe N. (2013). Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Reprod Fertil Dev* 25,

589-599.

- Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y. (2004). Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. *Prog Histochem Cytochem* 39, 1-83.
- Tan YJ, Zhang XY, Ding GL, Li R, Wang L, Jin L, Lin XH, Gao L, Sheng JZ, Huang HF. (2015). Aquaporin7 plays a crucial role in tolerance to hyperosmotic stress and in the survival of oocytes during cryopreservation. *Sci Rep* 5, 17741.
- Trigal B, Muñoz M, Gómez E, Caamaño JN, Martín D, Carrocera S, Casais R, Díez C. (2013). Cell counts and survival to vitrification of bovine in vitro produced blastocysts subjected to sublethal high hydrostatic pressure. *Reprod Domest Anim* 48, 200-206.
- Verkman AS. (2002). Aquaporin water channels and endothelial cell function. *J Anat* 200, 617-627.
- Verkman AS, van Hoek AN, Ma T, Frigeri A, Skach WR, Mitra A, Tamarappoo BK, Farinas J. (1996). Water transport across mammalian cell membranes. *Am J Physiol* 270, C12-30.
- Vicente-Carrillo A, Ekwall H, Álvarez-Rodríguez M, Rodríguez-Martínez H. (2016). Membrane stress during thawing elicits redistribution of aquaporin 7 but not of aquaporin 9 in boar spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 51, 665-679.
- Wilmot I, Rowson LE. (1973). The successful low-temperature preservation of mouse and cow embryos. *J Reprod Fertil* 33, 352-353.
- Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 48, 148-156.
- Xiong Y, Tan YJ, Xiong YM, Huang YT, Hu XL, Lu YC, Ye YH, Wang TT, Zhang D, Jin F, Huang HF, Sheng JZ. (2013). Expression of aquaporins in human



embryos and potential role of AQP3 and AQP7 in preimplantation mouse embryo development. *Cell Physiol Biochem* 31, 649-658.

Yamaji Y, Seki S, Matsukawa K, Koshimoto C, Kasai M, Edashige K. (2011). Developmental ability of vitrified mouse oocytes expressing water channels. *J Reprod Dev* 57, 403-408.

Yeste M. (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology* 85, 47-64.

Yeste M, Morató R, Rodríguez-Gil JE, Bonet S, Prieto-Martínez N. (2017). Aquaporins in the male reproductive tract and sperm: Functional implications and cryobiology. *Reprod Domest Anim* 52 Suppl 4, 12-27.

Yeung CH. (2010a). Aquaporins in spermatozoa and testicular germ cells: identification and potential role. *Asian J Androl* 12, 490-499.

Yeung CH, Callies C, Rojek A, Nielsen S, Cooper TG. (2009). Aquaporin isoforms involved in physiological volume regulation of murine spermatozoa. *Biol Reprod* 80, 350-357.

Yeung CH, Callies C, Tüttelmann F, Kliesch S, Cooper TG. (2010b). Aquaporins in the human testis and spermatozoa - identification, involvement in sperm volume regulation and clinical relevance. *Int J Androl* 33, 629-641.

Zhang XG, Hu S, Han C, Zhu QC, Yan GJ, Hu JH. (2015). Association of heat shock protein 90 with motility of post-thawed sperm in bulls. *Cryobiology* 70, 164-169.

牛受精卵移植実施状況. (2016). 農林水産省.

家畜人工授精講習会テキスト. (2015). 一般社団法人日本家畜人工授精師協会. 281-291.