

氏名	林 武 司
学位（専攻分野の名称）	博 士（畜産学）
学 位 記 番 号	乙 第 946 号
学位授与の日付	令和 2 年 2 月 20 日
学位論文題目	凍結保存によるウシ受精胚のミトコンドリア機能低下と品質管理機構を介した回復
論文審査委員	主査 教 授・博士（農学） 岩 田 尚 孝 教 授・博士（畜産学） 桑 山 岳 人 准 教 授・博士（農学） 白 砂 孔 明 博士（農学） 木 村 康 二* 博士（農学） 橋 本 周**

論文内容の要旨

胚移植は和牛，乳牛共に子牛の生産に不可欠な技術になっている。胚移植を効率的に利用するには胚の凍結保存は不可欠な技術であり，大部分の胚移植が凍結融解胚にて行われている。受精胚の凍結保存は，胚の活用の幅を時間空間的に増大させる利点があるが，凍結により受精胚の品質や受胎率の低下が起こることが技術的に解決しなければならない課題である。胚を凍結すると細胞内 DNA やミトコンドリアに損傷が起きることが報告されている。受精胚のエネルギー生産のうち多くを賄うミトコンドリアの損傷は凍結融解後の受精胚の回復や生存性を低下させる。これらの損傷を受けたミトコンドリアは，胚が正常に発育する上では回復する必要がある。ミトコンドリアの品質は合成と分解のバランスの元，維持されているが，この機構を制御している因子に SIRT1 がある。この SIRT1 の活性化はミトコンドリアの合成と分解を誘起する効果がある。そこで人為的に凍結融解胚においてこの SIRT1 を活性化させると，凍結によって損傷を受けたミトコンドリアの回復が促され，胚質が改善するのではないかと仮説を立てた。本研究ではウシ胚のミトコンドリア機能，DNA の完全性，および発達能力に対する緩慢凍結保存の影響を評価し，凍結融解後培地へのレスベラトロール添加が凍結融解胚盤胞の生存性を改善するかどうかを調べた。さらに凍結保存前のレスベラトロール処理が凍結融解後の受精胚に及ぼす影響を調べるとともに，移植後の受胎率について調査し，現場における活用の可能性について検討した。

受精胚に対して凍結保存が及ぼす影響を調べるために，短鎖および長鎖ミトコンドリアシーケンスをターゲットとするリアルタイム PCR によってミトコンドリアのコピー数を測定しその比率でミトコンドリア DNA 完全性 (mtDNA) を調べた。また凍結融解後の ATP 含有量を測定したところ，新鮮胚と比較して，凍結融解後 24 時間培養した受精胚ではミトコンドリアゲノムの完全性や ATP 含量が有意に減少した。加えて二本鎖 DNA に対する免

*岡山大学大学院 環境生命科学科 教授

**大阪市立大学大学院 医学研究科 特任准教授

疫染色により，凍結融解胚の DNA がフラグメント状に細胞質に局在し DNA 損傷の存在が明らかになった。凍結融解胚を 0.5 μ M レスベラトロールを含む培地で培養すると，胚の SIRT1 発現と生存率は，溶媒処理胚（対照区）と比較して著しく改善した。さらに，融解後の培養中培地に含まれた mtDNA 含有量は，溶媒処理胚よりもレスベラトロール処理胚の方が高く，胚中で活発なミトコンドリアの分解が起こっていると推測された。

これらの結果から融解後培養液添加へのレスベラトロールが受精胚の生存性向上に働くことが示唆されたが，ウシ，ヒト等の受精胚移植は凍結融解後から速やかに移植することが一般的であり，融解後の長時間培養は現場での利用に即さない。よって現場での利用を考慮し，凍結保存前にレスベラトロール処理を行い融解後は速やかに移植することを想定し試験を設計した。次の試験として凍結保存前にウシ受精胚をレスベラトロール処理し，胚の性状や受胎率について検証した。採胚にも活用できるように受精後 6 日目または 7 日目の体外受精胚を用い，レスベラトロール 1 μ M で 6 時間または 24 時間処理した。このレスベラトロール処理（6 時間または 24 時間）は，胚盤胞発生率や胚盤胞のグレードには影響しなかったが，処理胚では SIRT1 の発現レベルが大幅に増加した。レスベラトロールで前処理した受精胚を凍結融解した後，48 時間培養後の透明帯脱出率は，レスベラトロール処理した受精胚の方が有意に高かった。さらに，レスベラトロールの前処理により，処理時間に関係なく，受精胚のミトコンドリア DNA のコピー数が大幅に増加した。試験場の近辺に受卵牛を 100 頭前後用意しこれに対して移植試験を行った。現場での応用を視野に体外受精胚は 6 日齢から 24 時間，生体から回収する体内受精胚では 6.5 日齢から 6 時間レスベラトロール処理を行った。レスベラトロール前処理（6 または 24 時間）は，体内および体外生産胚の両方で，対照区に比べ受胎牛への移植後の受胎率を改善した。これらのことから，ウシ受精胚の緩慢凍結は，胚盤胞のミトコンドリアに損傷を与え，胚質を低下させるが，融解前もしくは後にレスベラトロールで処理することにより SIRT1 発現が上昇し，これはミトコンドリアの生合成を活性化し受精胚内ミトコンドリアの質を向上させること，胚の生存率が向上することが明らかになった。またウシ受精胚のレスベラトロール処理は高受胎率を得るために有効な手法であることが明らかになった。

審査報告概要

繁殖雌牛頭数の減少による黒毛子牛価格の高騰が近年続いており，乳牛をレシピエントとした受精卵移植による黒毛和種の増頭が図られているが，利便性に優れる凍結保存胚は新鮮胚と比較すると受胎率が低く，凍結保存胚の改善が必要である。本研究では凍結保存がウシ受精卵に与える影響について胚内ミトコンドリア機能を中心に検証するとともに，ミトコン

ドリアの生合成を促進するレスベラトロールを用いて、凍結融解胚の品質の改善について検討を行った。結果、凍結保存により MtDNA の断片化していることを明らかにした。また凍結融解後受精卵に対して、レスベラトロールで 24 時間処理したところ、MtDNA の外部への放出が促進され、生存性が向上した。さらに凍結処理前にレスベラトロールで 6 時間または 24 時間処理を行ったところ、融解後の透明帯脱出率が増加した。また凍結前に体内胚 6 時間、体外受精胚 24 時間でレスベラトロール処理を行い、凍結融解後移植試験を行ったところ、処理胚の受胎率が向上した。本研究ではウシ受精卵における凍結処理のミトコンドリアへの影響と品質管理機構の促進による凍結胚および受胎性の改善方法について新規性のある知見が得られたことから、審査員一同は博士(畜産学)の学位を授与する価値があると判断した。