

—原著—

ガラス化前のレスベラトロール処理が ミトコンドリアとウシ胚発生に及ぼす影響

Effect of resveratrol pre-treatment on mitochondrial number and developmental ability of bovine vitrified-warmed embryos

伊藤 洵・久保 穂乃佳・中村 慎佑・岩田 尚孝*

Jun Ito, Honoka Kubo, Shinsuke Nakamura and Hisataka Iwata*

東京農業大学動物科学科 〒243-0034 厚木市

Department of Animal Science, Tokyo University of Agriculture, Funako 1737, Atsugi, Kanagawa 243-0034, Japan

要旨：胚の凍結はミトコンドリアに損傷を与える。レスベラトロール (Res) 処理はミトコンドリア合成を促す働きがある。本研究では、ガラス化前のRes処理が胚のミトコンドリア動態および胚発生に及ぼす影響について検討した。ウシ卵巣卵子を定法により受精させ、受精後24時間から1日間Res (0.5 μ M) 処理したところ、SIRT1の発現量は増加したが発生および胚のミトコンドリア数には差が観察されなかった。次に受精後2日目の胚をガラス化すると、胚の発生率および胚盤胞期胚のミトコンドリア数が減少したが、ガラス化前のRes処理はこれを有意に回復した。また、胚の培地中にミトコンドリアゲノム由来の細胞外DNAが有意に多く放出されていることを確認した。Res前処理はガラス化融解後1日目の胚中dsDNA量やTOMM20量を有意に減少させた。以上から、ガラス化前のRes処理はミトコンドリア動態を変化させ、発生率を改善し、ミトコンドリア数の多い胚盤胞期胚を得るのに有効であることが示された。

キーワード：ガラス化, SIRT1, ミトコンドリア, レスベラトロール

Abstract: Cryopreservation induces mitochondrial dysfunctions and resveratrol induces mitochondrial biogenesis. The present study examined the effect of resveratrol treatment before vitrification on the developmental ability and mitochondrial kinetics of bovine embryos. Treatment of early developmental stage embryos with resveratrol for 24 h increased the levels of SIRT1 expression but did not affect embryo development to the blastocyst stage or the mitochondrial DNA copy number in the blastocyst. Vitrification of embryos (2 days post fertilization) reduced the developmental ability and mitochondrial number of embryos compared with their respective values in fresh embryos, but the pretreatment of embryos with resveratrol restored them. In addition, resveratrol pretreatment increased the amount of extracellular mitochondrial DNA released into the culture medium. Furthermore, resveratrol pretreatment reduced the levels of dsDNA and TOMM20 in embryos 1 day after thawing. In conclusion, resveratrol treatment before vitrification effectively improved embryonic development and increased mitochondrial numbers in the resultant blastocysts.

Key words: Vitrification, SIRT1, Mitochondria, Resveratrol

はじめに

レスベラトロールは植物が作るフィトアレキシンで、ブドウの皮やナッツなど多くの農産物に見られる。レスベラトロールを培地に添加して牛の胚の発育や卵子の体外発育を改善することが報告されている¹⁻³⁾。レスベラトロールはSIRT1の活性化作用があることが知られており、SIRT1はクラス3のヒストン脱アセチル化酵素であり、様々な細胞の

(受付 2019年11月18日/受理 2019年11月25日)
別刷請求先：〒243-0034 神奈川県厚木市船子1737
東京農業大学 動物科学科

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: h1iwata@nodai.ac.jp

機能に重要な働きを持っており、そのなかの一つがミトコンドリアの合成である⁴⁾。ブタ卵子の成熟培地に添加するとSIRT1の活性化を介してミトコンドリアの合成を促す効果があることが報告されている⁵⁾。ミトコンドリアは、細胞にあってはその機能が品質を制御している機構が存在しており、卵子においてもミトコンドリアの脱分極剤であるcarbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) で処理すると、ミトコンドリアの機能の急激な低下後、活発なミトコンドリアの除去と合成が起こることがブタの卵子で報告されている⁶⁾。そのため、SIRT1の活性化はミトコンドリアの品質管理機構を活性化させ、ミトコンドリアや細胞質を改善する働きが予測される。

ガラス化は人や家畜の卵子や胚の保存に広く用いられている技術であるが、ガラス化そのものが胚や卵子の完全性を完璧に維持できるわけではない。例えば、マウスの卵を用いた実験ではミトコンドリアの機能低下や卵子の発育能力の低下が報告されている^{7, 8)}。ブタの卵子を用いた実験でもブタ卵子のガラス化後のATPの低下や発生率の低下が報告されている⁹⁾。このような障害を受けたミトコンドリアが加温後どのような運命をたどるのかについては報告がないが、移植後健全な児が得られることから、障害からの回復が行われると推測される。近年、我々のグループは牛の初期胚を用いて、ガラス化処理がミトコンドリアの機能を低下させること、一方で加温後のレスベラトロール処理がSIRT1の活性化をさせ、ミトコンドリアの質を改善し、胚発生を改善することを報告した¹⁰⁾。同様にウシの胚盤胞期胚を用いた実験でも加温後のレスベラトロール処理がミトコンドリアの分解を促し、その後の生存性を改善することを報告している¹¹⁾。一方で胚移植においてはガラス化された胚は迅速に体内に戻されるため、長期間体外で培養することは少ない。そこで、あらかじめレスベラトロールで前処理しSIRT1を予備的に活性化させることが、同様にミトコンドリアの品質管理機構を介して胚の質改善とその予後の成績改善に有効ではないかと仮説を立てている。この仮説のためにウシの胚盤胞期胚の緩慢凍結胚を用いて前処理の効果を検討したところ、融解後の胚中のミトコンドリアの合成が活性化し、これを移植に用いると有意に受胎率を改善した¹²⁾。そこで、本研究では受精後2日目の初期胚を対象に、レスベラトロールで前処理し、ガラス化加温後の胚の発育能力やミトコンドリアの動態が変化しうのかどうかについて検討を行った。

材料と方法

1. 試薬と培地

特に記述のない限り、試薬はナカライテスク社 (Kyoto, Japan) から購入したものをを用いた。卵子の体外成熟培地には、Medium 199 (Gibco, Grand Island, NY, USA) に10%のウシ胎児血清 (FCS: 5703H; ICN Pharmaceuticals, Costa, Mesa, CA) および5 mMのタウリンをそれぞれ加えて使用し

た。体外受精および体外胚培養培地には合成卵管液 (Synthetic oviductal fluid; SOF) を基礎培地として用いた¹³⁾。体外受精培地は、SOFに5 mg/mLの脂肪酸不含のウシ血清アルブミン (BSA) および10 IU/mLのヘパリン (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) を加えたものを使用した。受精から24時間までの体外胚発生培地は、SOFにアミノ酸 (Sigma-Aldrich) および1.5 mMのグルコース、1%のFCSを加えて用いた。さらに、受精後24時間から7日までの体外胚発生培地は、上記の体外胚発生培地のFCSを5%に変えた。気相条件は体外成熟から受精後24時間までを38.5°C、5% CO₂、飽和水蒸気下にて、受精後24時間以降は38.5°C、5% CO₂、5% O₂、90% N₂、飽和水蒸気下にてそれぞれ培養を行った。エタノールに溶解したレスベラトロール (Wako, Osaka, Japan) は0.5 μMの濃度で体外胚発生培地に添加した。この濃度はウシの初期胚と胚盤胞期胚を用いた以前の研究に基づいて決定した^{10, 12, 14)}。また、エタノールのみを添加した培地で培養した胚を対照群として使用した。

2. 卵子卵丘細胞複合体 (Cumulus cells-oocyte complexes; COCs) の採取と体外成熟

食肉センターより入手したウシ卵巣は、抗生物質を含有したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に保存し、25°Cで4時間以内に実験室に持ち帰った。本研究は、東京農業大学動物実験倫理委員会により承認されている。COCsは卵巣表面上の胞状卵胞から、18 Gの注射針 (TERMO, Tokyo, Japan) を装着した10 mLシリンジ (TERMO) を用いて吸引採取した。密な卵丘細胞を持つCOCsを選出し、体外成熟培地で21時間培養した。

3. 体外受精および体外胚発生

体外受精には黒毛和種凍結融解精液を用いた。凍結精液は密度勾配遠心分離法に基づいて30および60%のPercoll溶液にて、800 gで10分間の遠心分離をして洗浄を行った。遠心後、精子は 2×10^6 /mLの濃度に調整した。体外受精培地で100 μLのドロップを作製し、COCsを1ドロップあたり10–15個ずつ導入し、精子と5時間の共培養し、その後体外胚発生培地で作製した100 μLのドロップに10–15個ずつ導入して培養した。受精処理から24時間後に卵丘細胞を取り除き、推定上の受精胚をレスベラトロール添加非添加の発生培地で24時間前処理し、その後8–12細胞に分割した胚のみをガラス化処理およびその後の発生に供し、体外胚発生培地で作製した5 μLのドロップ内で5日間培養した。1回に10個の胚を5 μLの培地で個別培養し胚盤胞期胚への発生率を記録した。

4. 胚のガラス化-加温処理

8–12細胞の胚のガラス化はウシの初期胚を用いた以前の研究に基づいて行った¹⁰⁾。胚は基礎培地 (BM) 内で洗浄された。BMはTCM-199に25 mMのHEPESおよび20%のFCSを加えて調整した。さらに平衡培地として、それぞれ

表1 初期胚のガラス化がその後の発生に及ぼす影響

Groups	No. of oocyte	No. of trials	Rate (%) of Blastulation	Total cell number
Control	100	10	48.0 ± 3.3 ^a	101.6 ± 6.2 ^a
Vitrified	100	10	27.0 ± 4.2 ^b	75.3 ± 5.8 ^b

胚盤胞期胚の発生率とその総細胞数はガラス化加温後5日目に測定した。値は平均±標準誤差で示す。a-b: $P < 0.05$ 。

7.5%のエチレングリコール (EG) とジメチルスルホキシド (DMSO) をBMに加えて作製した。胚を平衡培地で10分間、室温条件下で浸漬した。次に、BMに0.5 Mのスクロースおよび15%のEGとDMSOを加えた培地中で60秒間浸漬し、クライオトップ (Kitazato BioPharma, Shizuoka, Japan) に乗せて液体窒素に浸漬しガラス化保存した。

加温処理は、38.5°Cに設定したBMに1 Mのスクロースを加えた加温培地にクライオトップの先端を投入し、胚を遊離させて60秒間処理した。その後、38.5°Cの0.5 Mおよび0.25 Mのスクロースを添加したBMで各々3または5分間処理し、38.5°CのBMで5分間処理した。

5. 胚中に含まれるミトコンドリアDNAコピー数の測定

胚盤胞期胚はHoechst33342で染色されたのち、蛍光顕微鏡 (IX71; Olympus, Tokyo, Japan) 下で総細胞数を評価した。評価された胚盤胞期胚を6 μ LのDNA抽出液 (20 mM Tris, 0.4 mg/mL proteinase K, 0.9% Nonident P-40, 0.9% Tween 20) 内で55°Cを30分間、98°Cを5分間の処理を行い、DNAを抽出した。胚中のミトコンドリアDNA数の定量を行うために、PCRはSsofast™EvaGreen Supermix (Bio-Rad) およびプライマー (Forward; 5'-GTAACCGCACACGCATTTGT-3', Reverse; 5'-GGAATGAGGGAGGGAGGAGT-3', 157 bp) を用いた。測定は対象配列を組み込んだベクターを用いて希釈系列を作製し、CFX Connect Real-Time PCR検出システム (Bio-Rad) を用いて測定を行った¹⁰⁾。

6. 培地中に含まれるミトコンドリアDNAコピー数の測定

受精後2日目から5日目培養して得られた胚盤胞期胚の発育培地5 μ LのDNAは、培地とDNA抽出液 (2 \times , 40 mM Tris, 0.8 mg/mL proteinase K, 1.8% Nonident P-40, 1.8% Tween 20) を等量混合し、その後55°Cを30分間、98°Cを5分間の処理を行い抽出した。培養培地中のミトコンドリアDNA数の定量は胚中のミトコンドリアゲノムDNAコピー数の測定法を用いた。

7. 免疫染色

免疫染色はTakeoらの方法に基づいて行った¹⁵⁾。胚は4% paraformaldehydeで固定処理後、一次抗体として抗SIRT1マウスモノクローナル抗体 (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 抗TOMM20ウサギポリクローナル抗体 (1:200; Santa Cruz Biotechnology) および抗DsDNAマ

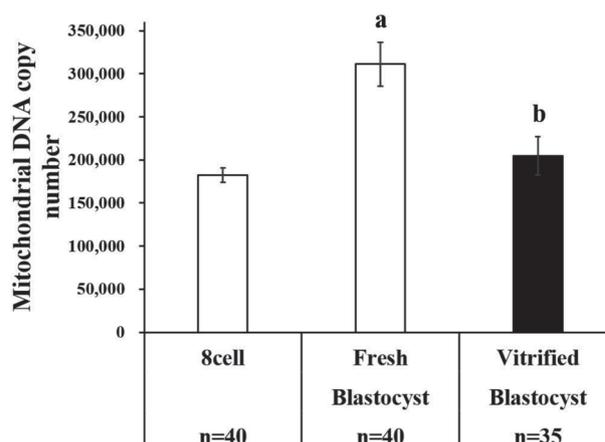


図1 ミトコンドリアのゲノムコピー数

ガラス化前の受精後2日目の胚およびその後5日目のガラス化加温 (Vitrified) および新鮮胚 (Fresh) を測定に供した。縦 (Y) 軸はゲノムのコピー数。

ウスポリクローナル抗体 (1:200; Abcam, Cambridge, UK) でそれぞれ一晩処理した。その後、二次抗体としてSIRT1およびdsDNAにはヤギ-抗マウスIgG Alexa Fluor 488 (1:500; Cell Signaling), TOMM20には抗ウサギIgG Alexa Fluor 555 (1:500; Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA) で一時間処理した。処理後の胚をスライドガラス上のDAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) を含む0.5 μ Lの退光防止剤 (ProLong Gold antifade regant with DAPI; Invitrogen, OR, USA) に移して封入し、蛍光顕微鏡 (DMI6000 B; Leica, Wetzlar, Germany) 下で観察した。SIRT1とTOMM20は胚全体対象に、dsDNAは細胞質部分を対象に蛍光輝度を数値化し (ImageJ) 比較に用いた。

8. 統計処理

2区間のデータの比較にはStudent's t-testを用いた。また、3区間以上のデータの比較にはANOVAの一元配置分散分析による多重比較検定を用いた。胚盤胞期胚率は、統計分析前にアークサイン変換した値を用いた。解析結果、 $P < 0.05$ の値は統計的に有意であると認めた。

結果

1. ガラス化は加温後の胚の質を低下させる

ガラス化により胚盤胞期への発生率および総細胞数は有意に減少した (表1)。

またミトコンドリアの数をDNAコピー数で推測すると、ガラス化後発育した胚の含有するミトコンドリアDNAコピー数は有意に減少した (図1)。

表2 レスベラトロールの短時間処理が胚発生に及ぼす影響

Groups	No. of embryos	No. of trials	Rate (%) of		Total cell number
			Blastulation	Hatched	
Control	105	10	56.3 ± 5.3	4.6 ± 2.0	111.8 ± 6.6 ^a
Resveratrol	109	10	58.1 ± 5.5	6.7 ± 3.2	96.0 ± 4.1 ^b

受精後24時間の胚をレスベラトロール(Res)0または0.5 μMで24時間処理し、得られた分割胚をその後5日間の培養に供した。値は平均±標準誤差で示す。a-b: $P < 0.05$.

表3 レスベラトロール処理がガラス化後の胚発生に及ぼす影響

Groups	No. of embryos	No. of trials	Rate (%) of		Total cell number
			Blastulation	Hatched	
Vit / -	114	10	28.7 ± 2.6	0 ± 0 ^a	119.5 ± 7.9
Vit / Res+	113	10	34.2 ± 2.9	5.8 ± 1.6 ^b	110.0 ± 7.0

受精後24時間の胚をレスベラトロール(Res)0または0.5 μMで24時間処理し、ガラス化加温後5日間培養した。値は平均±標準誤差で示す。a-b: $P < 0.05$.

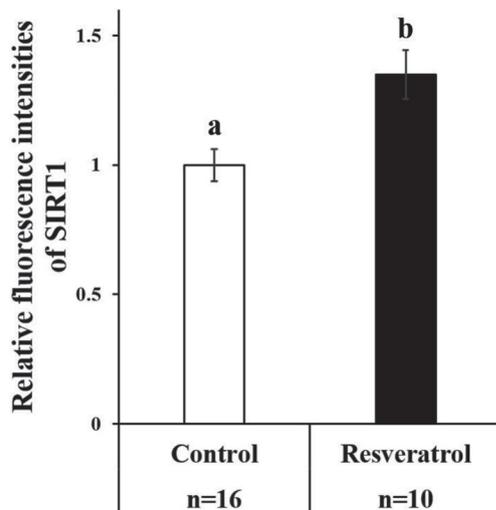


図2 レスベラトロール処理がSIRT1発現に及ぼす影響
免疫染色によるSIRT1の相対的な輝度。a-b: $P < 0.05$.

2. レスベラトロールの前処理は新鮮胚には大きな影響を与えない

レスベラトロール処理はSIRT1の発現を有意に増加させた(図2)。受精後24時間の1細胞の胚をレスベラトロールで24時間処理して得られた分割胚をその後5日間培養した。レスベラトロール処理は分割胚の出現率には影響しなかった(繰り返し10回, 対象区; 52.8 ± 6.0 vs. レスベラトロール区; 58.7 ± 5.8)。これらの胚を5日間培養すると、胚盤胞への発生率には差がなく、胚の総細胞数はレスベラトロール区の方が有意に少ない結果となった(表2)。得られた胚のミトコンドリアDNAコピー数を対象区とレスベラトロール

区で比較したが有意な差は認められなかった(図3-A)。また培地中に放出されるミトコンドリアゲノム由来の細胞外DNA量を測定したが両者には差が見られなかった(図3-B)。

3. レスベラトロールの前処理はガラス化後の胚発育を改善しミトコンドリアを増やす

ガラス化前のレスベラトロール処理は、ガラス化加温後の胚盤胞期胚への発生を改善する傾向にあり、特に脱出胚盤胞は有意に増加した。総細胞数は両区に間に差が認められなかった(表3)。

ミトコンドリアゲノムコピー数は、レスベラトロールで前処理を行った胚において有意に多く、培養液中に見出されるミトコンドリアゲノム由来の細胞外DNAコピー数も有意に多かった(図4)。

4. ガラス化後のミトコンドリアの動態にレスベラトロール処理は影響する

胚の二本鎖DNAを免疫染色すると割球の周囲に二本鎖DNAが観察される。既報では、この量はガラス化によって増えることが示されている¹⁰⁾。我々の実験ではレスベラトロール処理によって断片が減少した(図5)。

胚のミトコンドリアの外膜タンパク質を免疫染色するとTOMM20の輝度が減少した(図6)。

考 察

本研究では、ガラス化は初期胚の胚盤胞期胚への発生能力を低下させ、胚のミトコンドリア数を減少させるが、レスベラトロールで前処理するとガラス化加温後の発育能力が改善し、ミトコンドリア数の多い胚盤胞期胚が得られることが示された。

ガラス化加温後の初期胚の発生能力は無処理に比べ低くなっていた。Haraはガラス化加温処理後の胚の発育能力の

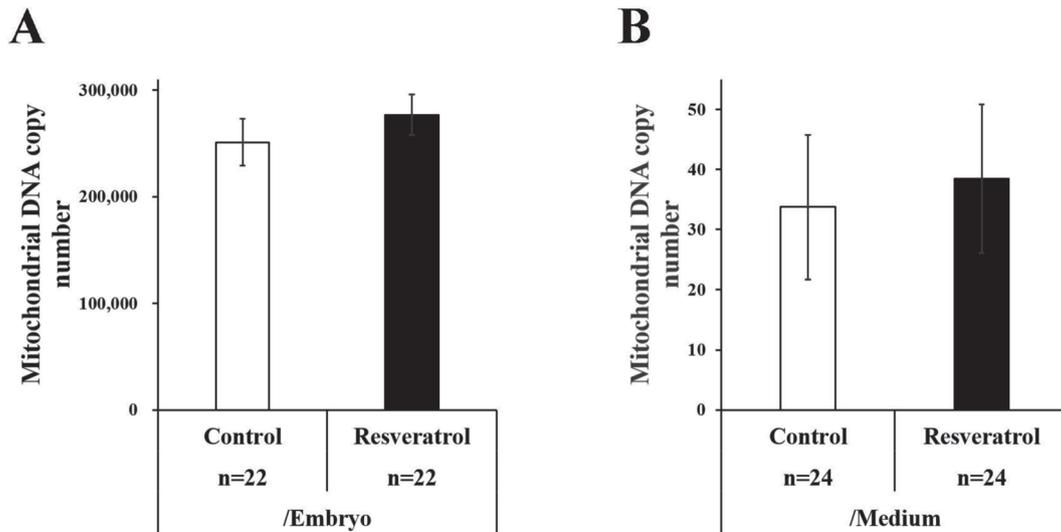


図3 ミトコンドリアのゲノムコピー数

受精後24時間の胚をガラス化前にレスベラトロールで24時間処理し、その後5日培養して得られた胚盤胞期胚のミトコンドリアゲノムコピー数 (A) とその培地中のミトコンドリアゲノム由来細胞外DNAのコピー数 (B)。縦 (Y) 軸はゲノムのコピー数。Aは胚あたり、Bは培地1 μ Lあたり。

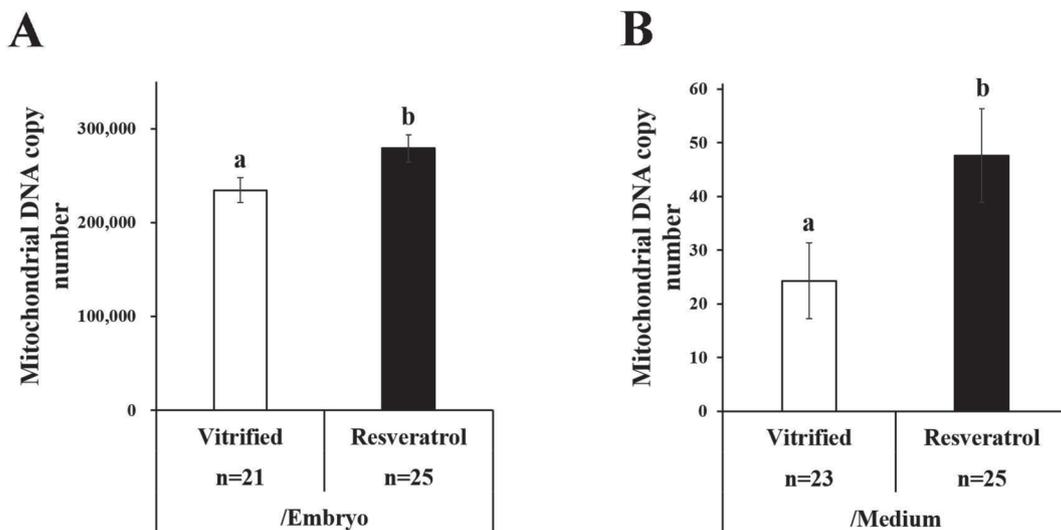


図4 ミトコンドリアのゲノムコピー数

受精後24時間の胚をガラス化前にレスベラトロールで24時間処理し、ガラス化処理を行った。加温後5日培養して得られた胚盤胞期胚のミトコンドリアゲノムコピー数 (A) とその培地中のミトコンドリアゲノム由来細胞外DNAのコピー数 (B)。縦 (Y) 軸はゲノムのコピー数。Aは胚あたり、Bは培地1 μ Lあたり。a-b: $P < 0.05$ 。

低下とATPの低下が起こり、ミトコンドリアゲノムの障害が起こることを報告している¹⁰⁾。また、ガラス化されたヒツジ胚の電子顕微鏡による観察では、細胞質の断片化や伸張したミトコンドリアなどが観察されており¹⁶⁾、ガラス化によってミトコンドリアに何らかの障害が起こると考えられる。レスベラトロールは、従来その強力な抗酸化作用に注目して凍結に由来する活性酸素除去を目的に試験されている。

例えば、ウシやマウスの胚盤胞や卵子のガラス化加温後に活性酸素を除去し、発育を改善するという報告がある^{17, 18)}。一方で、培養液へのレスベラトロール添加が卵子や胚のSIRT1を活性化させることが報告されており^{14, 19)}、Hayashiらはウシの胚盤胞期胚を6時間のレスベラトロール処理でSIRT1を活性化できることを報告している¹²⁾。本研究でも受精後1日目から2日目までの24時間の処理において

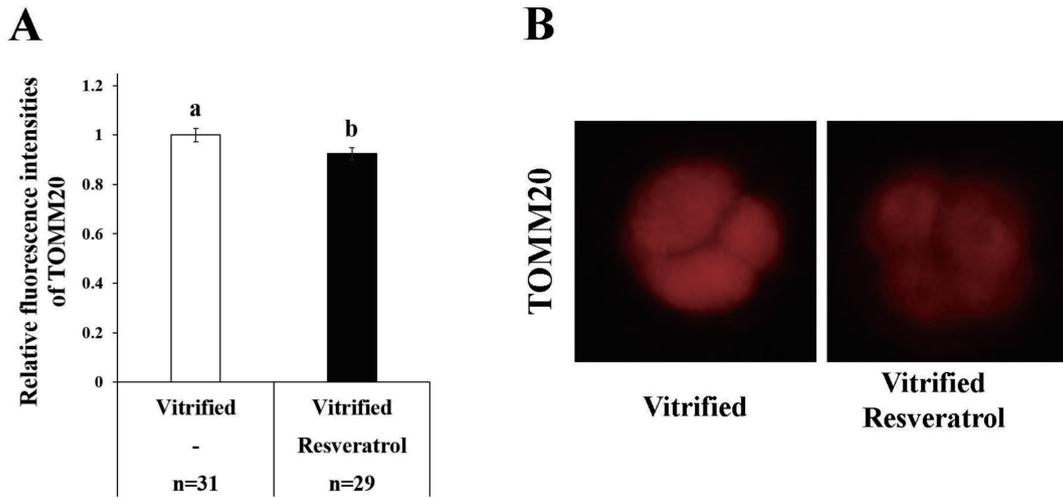


図5 レスベラトロールがガラス化加温処理後の胚中のTOMM20量に及ぼす影響
レスベラトロール処理および未処理のガラス化加温胚のTOMM20を対象に免疫染色した。Aは相対輝度。Bは代表的な写真。a-b: $P < 0.05$.

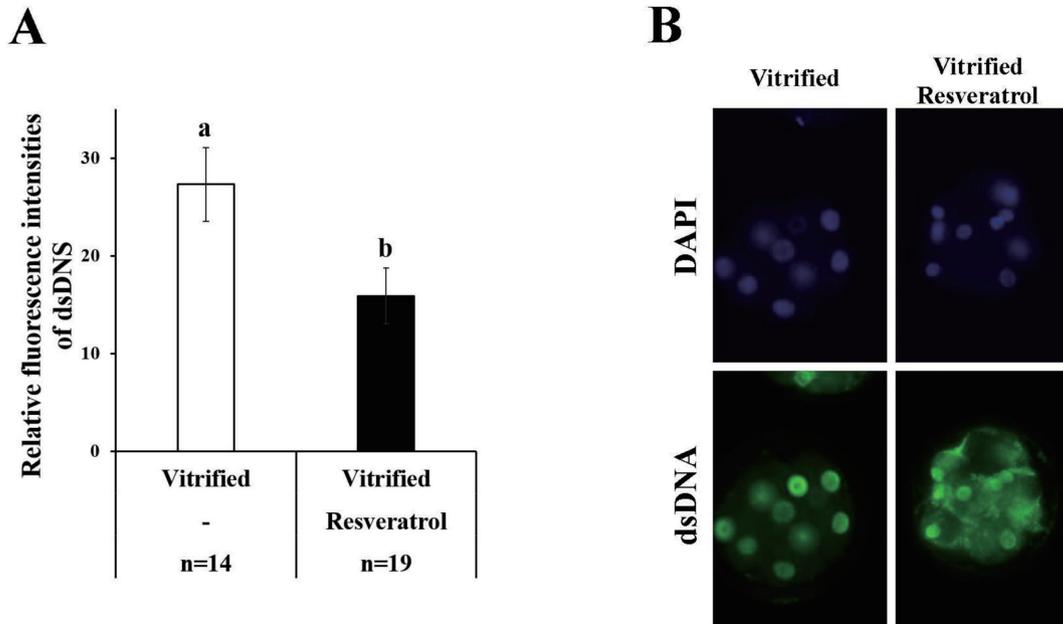


図6 レスベラトロールが胚中のDNAに及ぼす影響
レスベラトロール処理および未処理のガラス化加温胚のdsDNAを対象に免疫染色した。Aは核を除いた細胞質の蛍光輝度。Bは代表的な写真。a-b: $P < 0.05$.

SIRT1の活性化が確認された。

SIRT1はAMPKやPGC1 α と協調してミトコンドリア合成に働きかけることが知られている²⁰⁾。本研究においても、ガラス化加温胚のミトコンドリア数は無処理に比べて減少し、一方でガラス化前のレスベラトロール処理がミトコンドリア数を有意に増加させたことから、レスベラトロールの前処理がガラス化加温後のミトコンドリアの合成を活性化さ

せる効果があると考えられた。面白いことに新鮮胚ではこの効果が確認されず、ミトコンドリアに何らかの障害があるという条件とレスベラトロール処理が相互に関係していると推測される。

合成と分解を介してミトコンドリアは維持されているため、胚の中のミトコンドリアの動態をモニタリングすることは容易ではなく、単一指標では評価できない。本研究では、

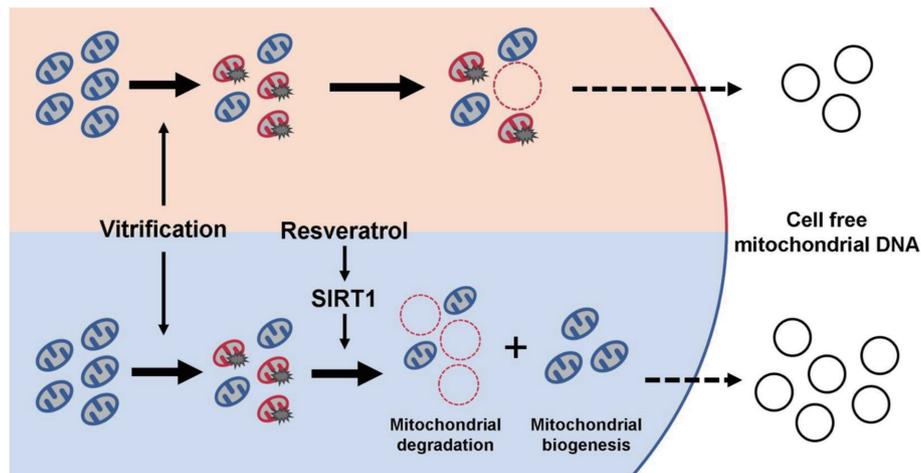


図7 レスベラトロール処理の効果の想定図

ガラス化により胚中のミトコンドリアが障害を受け、これが胚の発生を低下させる。一方でレスベラトロール前処理をガラス化前に施すことで、加温後のミトコンドリアの合成を含めた品質管理機構が活性化し、発生能力が高くミトコンドリアの多い胚盤胞期胚が得られる。

dsDNAを対象に胚の免疫染色を行うと、ガラス化加温胚の細胞質に多く観察されたdsDNA陽性のシグナルがレスベラトロールによって減少することが観察された。このガラス化加温胚におけるdsDNAの減少は、加温後のレスベラトロール処理でも報告されており¹⁰⁾、レスベラトロールが細胞質の何らかのDNAを除去する効果があると考えられる。この推測を裏付けるように、ミトコンドリアの量をミトコンドリア外膜のタンパク質であるTOMM20の量で評価した実験ではガラス化加温後にレスベラトロールがこれを減少させることを確認したため、ガラス化によって傷ついたミトコンドリアが除去されている可能性が考えられる。

機能不全を起こしたミトコンドリアは、オートファジーやプロテアソームによって管理され除去される²¹⁾。細胞をCCCP処理し、ミトコンドリアの機能不全を起こさせると、ミトコンドリアゲノム由来の細胞外DNAが培地に放出される²²⁾。この放出はオートファジーの阻害によって増える²³⁾。機能不全のミトコンドリアゲノムは、細胞内で処理され多いときは細胞外に放出されるのではないかと考えている。本研究においても、細胞外DNAの形でミトコンドリアゲノムDNAが培地中に放出されており、これがレスベラトロール処理によって増えている。同様に、ガラス化加温後のウシ初期胚をレスベラトロール添加培地で培養したときも培地中のミトコンドリアゲノム由来の細胞外DNAが増加するため¹⁰⁾、レスベラトロール処理によって活性化した品質管理機構を反映して培地中に分解されるミトコンドリアのゲノムDNAが放出された可能性がある。

本研究では、ガラス化によってミトコンドリアの質低下が惹起され、胚の質が低下すること、さらにガラス化前に胚をレスベラトロールで処理することがミトコンドリアの合

成を活性化させ、ガラス化に由来する障害から、胚の回復を助けることが明らかになった(図7)。

文 献

- 1) Wang, F., Tian, X., Zhang, L., He, C., Ji, P., Li, Y., Tan, D. and Liu, G. (2014): Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 101, 577–586.
- 2) Itami, N., Shirasuna, K., Kuwayama, T. and Iwata, H. (2015): Resveratrol improves the quality of pig oocytes derived from early antral follicles through sirtuin 1 activation. *Theriogenology*, 83, 1360–1367.
- 3) Sugiyama, M., Kawahara-Miki, R., Kawana, H., Shirasuna, K., Kuwayama, T. and Iwata, H. (2015): Resveratrol-induced mitochondrial synthesis and autophagy in oocytes derived from early antral follicles of aged cows. *J. Reprod. Dev.*, 61, 251–259.
- 4) Gomes, A.P., Price, N.L., Ling, A.J., Moslehi, J.J., Montgomery, M.K., Rajman, L., White, J.P., Teodoro, J.S., Wrann, C.D., Hubbard, B.P., Mercken, E.M., Palmeira, C.M., de Cabo, R., Rolo, A.P., Turner, N., Bell, E.L. and Sinclair, D.A. (2013): Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell*, 155, 1624–1638.
- 5) Sato, D., Itami, N., Tasaki, H., Takeo, S., Kuwayama, T. and Iwata, H. (2014): Relationship between mitochondrial DNA copy number and SIRT1 expression in porcine oocytes. *PLoS One*, 9, 1–8.
- 6) Itami, N., Shiratsuki, S., Shirasuna, K., Kuwayama, T. and Iwata, H. (2015): Mitochondrial biogenesis and degradation are induced by CCCP treatment of

- porcine oocytes. *Reproduction*, 150, 97–104.
- 7) Nagai, S., Mabuchi, T., Hirata, S., Shoda, T., Kasai, T., Yokota, S., Shitara, H., Yonekawa, H. and Hoshi, K. (2006): Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. *Tohoku J. Exp. Med.*, 210, 137–144.
 - 8) Lei, T., Guo, N., Tan, M.H. and Li, Y.F. (2014): Effect of mouse oocyte vitrification on mitochondrial membrane potential and distribution. *J. Huazhong. Univ. Sci. Technol. Med. Sci.*, 34, 99–102.
 - 9) Dai, J., Wu, C., Muneri, C.W., Niu, Y., Zhang, S., Rui, R. and Zhang, D. (2015): Changes in mitochondrial function in porcine vitrified MII-stage oocytes and their impacts on apoptosis and developmental ability. *Cryobiology*, 71, 291–298.
 - 10) Hara, T., Kin, A., Aoki, S., Nakamura, S., Shirasuna, K., Kuwayama, T. and Iwata, H. (2018): Resveratrol enhances the clearance of mitochondrial damage by vitrification and improves the development of vitrified-warmed bovine embryos. *PLoS One*, 13, 1–17.
 - 11) Hayashi, T., Kansaku, K., Abe, T., Ueda, S. and Iwata, H. (2019): Effects of resveratrol treatment on mitochondria and subsequent embryonic development of bovine blastocysts cryopreserved by slow freezing. *Animal Science Journal*, 90, 849–856.
 - 12) Hayashi, T., Ueda, S., Mori, M., Baba, T., Abe, T. and Iwata, H. (2018): Influence of resveratrol pretreatment on thawed bovine embryo quality and mitochondrial DNA copy number. *Theriogenology*, 106, 271–278.
 - 13) Takahashi, Y. and First, N.L. (1992): In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 37, 963–978.
 - 14) Abe, T., Kawahara-Miki, R., Hara, T., Noguchi, T., Hayashi, T., Shirasuna, K., Kuwayama, T. and Iwata, H. (2017): Modification of mitochondrial function, cytoplasmic lipid content and cryosensitivity of bovine embryos by resveratrol. *J. Reprod. Dev.*, 63, 455–461.
 - 15) Takeo, S., Kawahara-Miki, R., Goto, H., Cao, F., Kimura, K., Monji, Y., Kuwayama, T. and Iwata, H. (2013): Age-associated changes in gene expression and developmental competence of bovine oocytes, and a possible countermeasure against age-associated events. *Mol. Reprod. Dev.*, 80, 508–521.
 - 16) Dalcin, L., Silva, R.C., Paulini, F., Silva, B.D., Neves, J.P. and Lucci, C.M. (2013): Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial activity and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos. *Cryobiology*, 67, 137–145.
 - 17) Madrid Gaviria, S., Morado, S.A., López Herrera, A., Restrepo Betancur, G., Urrego Álvarez, R.A., Echeverri Zuluaga, J. and Cética, P.D. (2019): Resveratrol supplementation promotes recovery of lower oxidative metabolism after vitrification and warming of in vitro-produced bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, 31, 521–528.
 - 18) Wang, Y., Zhang, M., Chen, Z.J. and Du, Y. (2018): Resveratrol promotes the embryonic development of vitrified mouse oocytes after in vitro fertilization. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 54, 430–438.
 - 19) Takeo, S., Sato, D., Kimura, K., Monji, Y., Kuwayama, T., Kawahara-Miki, R. and Iwata, H. (2014): Resveratrol improves the mitochondrial function and fertilization outcome of bovine oocytes. *J. Reprod. Dev.*, 60, 92–99.
 - 20) Price, N.L., Gomes, A.P., Ling, A.J., Duarte, F.V., Martin-Montalvo, A., North, B.J., Agarwal, B., Ye, L., Ramadori, G., Teodoro, J.S., Hubbard, B.P., Varela, A.T., Davis, J.G., Varamini, B., Hafner, A., Moaddel, R., Rolo, A.P., Coppari, R., Palmeira, C.M., de Cabo, R., Baur, J.A. and Sinclair, D.A. (2012): SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metabolism*, 15, 675–690.
 - 21) Tanaka, A., Cleland, M.M., Xu, S., Narendra, D.P., Suen, D.F., Karbowski, M. and Youle, R.J. (2010): Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J. Cell Biol.*, 191, 1367–1380.
 - 22) Kansaku, K., Munakata, Y., Itami, N., Shirasuna, K., Kuwayama, T. and Iwata, H. (2018): Mitochondrial dysfunction in cumulus-oocyte complexes increases cell-free mitochondrial DNA. *J. Reprod. Dev.*, 64, 261–266.
 - 23) Kansaku, K., Munakata, Y., Shirasuna, K., Kuwayama, T. and Iwata, H. (2019): Mitochondrial cell-free DNA secreted from porcine granulosa cells. *Zygote*, 27, 272–278.