

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06378

研究課題名(和文) タンパク質代謝機構制御によるウシ体外受精胚の発生能向上

研究課題名(英文) Improvement of developmental competence by regulation of protein metabolic systems in bovine embryos fertilized in vitro

研究代表者

山中 賢一 (YAMANAKA, Ken-ichi)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：40572920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質修飾過程で引き起こされる小胞体ストレスを制御することによりウシ体外受精胚の発生能を向上させる生産系の確立を目指した。小胞体ストレス関連遺伝子の発現解析により体外成熟および初期の胚発生ステージにおいて小胞体ストレスが顕著に誘導されていることが明らかとなった。この結果をもとに小胞体ストレス抑制条件を最適化することにより体外発生率だけでなく、凍結融解後の生存性も向上させることに成功した。加えて、生体由来の卵母細胞においても本法により発生能の向上が確認され、現場レベルでの応用も可能であることが示された。これらの結果は、ウシ体外受精胚を用いた子牛生産の効率化に寄与することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胚発生過程といった特殊な時期における小胞体ストレスによる影響は不明な点が多く、その一端を明らかにした本研究の成果は学術的意義があるといえる。また、体外受精胚からの子牛生産の需要が国内外を問わず増加している。しかしながら、体外受精胚は体内胚と比較すると耐凍性も低く、移植した場合の受胎率も10%程度低いことが問題となっている。このような状況において、生産現場での適応が可能な今回の成果は、実社会での課題解決のための一助となり、その社会的意義もあるといえる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish the in vitro embryo production system to improve the developmental competence of bovine in vitro fertilized embryos by controlling endoplasmic reticulum (ER) stress induced during the protein modifications. Expression analysis of ER stress-related genes revealed that ER stress is significantly induced during in vitro maturation and early embryogenesis stages. Based on these results, optimization of ER stress suppression conditions successfully improved not only the in vitro development rate of embryos but also their viability after freezing and thawing. In addition, the application of this method to oocytes derived from OPU was confirmed to improve their developmental competence, indicating that this method can be applied at the field level. These results could contribute to the efficiency of calf production using in vitro fertilized embryos.

研究分野：動物繁殖学

キーワード：体外受精 小胞体ストレス ウシ 胚発生 OPU

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、超音波画像診断装置を用いて生体内卵巣から卵母細胞を採取する経腔採卵 (OPU) 法を用いて任意の雌牛から繰り返し卵母細胞を採取することが可能となっている。OPU で採取した卵母細胞から体外受精 (IVF) 胚を生産することは、任意の雌雄個体から優良形質を受け継いだ子牛のより効率的な増産、牛群の遺伝的改良に大きく貢献できる。加えて、OPU-IVF 胚は、現在、現場レベルでの活用が広まりつつあるゲノム育種価の利用促進にも大いに貢献する。つまり、移植前に OPU-IVF 胚においてゲノミック評価を実施することで、選抜圧を高めることや世代間隔の短縮につながり、育種改良の迅速化を図ることができる。加えて、OPU-IVF 胚を用いた子牛生産では、暑熱ストレスに強い発生ステージまで体外で発育させた胚を母体へ戻すため、人工授精における夏季受胎率の低下に対する対策としても有効であると考えられている。

しかしながら、過去数十年にわたってウシ IVF 胚の品質向上に関する研究がなされてきたにもかかわらず、移植後の受胎率は体内受精胚のそれと比較して未だに低い。したがって、高い発生能を有する IVF 胚の生産系を確立することが求められている。

2. 研究の目的

これまでタンパク質修飾過程において不良タンパク質が小胞体に蓄積することにより誘導される小胞体ストレスに着目し、IVF 胚の発生能との関係について研究を行ってきた。その結果、IVF 胚の発生過程においても小胞体ストレスが顕著に生じており、その小胞体ストレスが IVF 胚における不適切なレドックス状態を生み出し、結果的にアポトーシスを誘導し、発生能低下の原因の一つとなっていることを明らかにした。そこで、本研究では、IVF 胚の発生能との関係が明らかとなった小胞体ストレスの制御を通じて高い発生能を有する IVF 胚の生産系を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 小胞体ストレス動態の解析

IVF 胚生産過程において小胞体ストレスが高いレベルで誘導される時期を特定することを目的として、胚の各発生ステージでの小胞体関連遺伝子発現をリアルタイム PCR 法により調査した。また、発生能を向上させることが報告されている小胞体ストレス阻害剤であるタウロウルソデオキシコール酸 (TUDCA) の体外成熟培地への添加がそれら遺伝子発現に及ぼす影響について調査を行った。

(2) 小胞体ストレス抑制条件の最適化による発生能の向上

小胞体ストレス抑制条件を最適化することを目的として、遺伝子発現解析の結果に基づいて体外成熟時に加えて、IVF 胚の発生培養後の初期発生ステージまで TUDCA 添加を継続し、体外発生率を比較した。また、得られた胚盤胞期胚を生産現場で主流である緩慢凍結法により保存した後、融解後の生存率、孵化率、アポトーシス率の評価を行った。

(3) OPU-IVF 胚の生産系への応用

畜産現場で実用化するためには、屠場由来卵子のみならず、OPU 卵子においてもその有効性を確認することが重要であるため、黒毛和種繁殖雌牛から OPU 法により採取した卵丘-卵母細胞複合体を用いて作成した OPU-IVF 胚に本法を適応した場合の発生能を調査した。

4. 研究成果

(1) 小胞体ストレス動態の解析

小胞体ストレス関連遺伝子の発現動態を調査するために、まず初めに対照区の各ステージの胚を用いて、1細胞期胚を基準としてそれぞれの遺伝子の変化を調査した。PERK 経路では、胚盤胞期胚で PERK 発現が有意に減少し、ATF4 においてもその発現の減少傾向が見られた。アポトーシスに関連する CHOP でも同様に胚盤胞期胚で発現の有意な低下が見られた。また、ATF6 経路では、ATF6 の胚盤胞期胚で発現の有意な減少が見られた一方で、GRP78 は全ての発生ステージで一定の発現を保っていた。最後に、IRE1 経路では、IRE1 は胚盤胞期胚で BAX は 8細胞期胚と胚盤胞期胚で発現の有意な減少が見られた。

次に TUDCA 添加による小胞体ストレス関連遺伝子の発現への影響を発生ステージごとに対照区と比較を行った。その結果、ATF4 および IRE1 の 2細胞期胚と 4細胞期胚で発現の有意な低下が見られた。また、CHOP および ATF6 に関して有意差は見られなかったが、2細胞期胚において発現の減少傾向が見られた。

これまでの研究において、体外成熟時の TUDCA 添加は卵丘-卵母細胞複合体における小胞体ストレス関連遺伝子の発現を低下させることにより胚盤胞期への発生率が向上することを報告している。一方で、今回の結果において、体外成熟時のみの TUDCA 添加では初期発生ステージにおいていくつかの小胞体ストレス関連遺伝子の発現が対照区と同等レベルに回復しており、その

効果は限定的であることが明らかとなった。したがって、TUDCA 添加を初期発生ステージまで延長することでより発生能を向上させられる可能性が示された。

(2) 小胞体ストレス抑制条件の最適化による発生能の向上

遺伝子発現解析に基づいて、小胞体ストレス抑制の条件を検討した結果、体外成熟から初期発生ステージまで TUDCA を添加した区 (IVM+IVC 添加区)において胚盤胞期への発生率が対照区と比較して有意に高かった (図1)。また、得られた胚盤胞期胚を緩慢凍結法により凍結保存し、融解後の生存性を評価した。その結果、孵化率は有意な差は見られなかったが、生存率が IVM+IVC 添加区で対照区と比較して有意に高かった。同様に、アポトーシス発生率についても、同区で対照区と比較して低かった。これらの結果から、条件の最適化によってより高い発生能を有する胚の生産系が確立された。

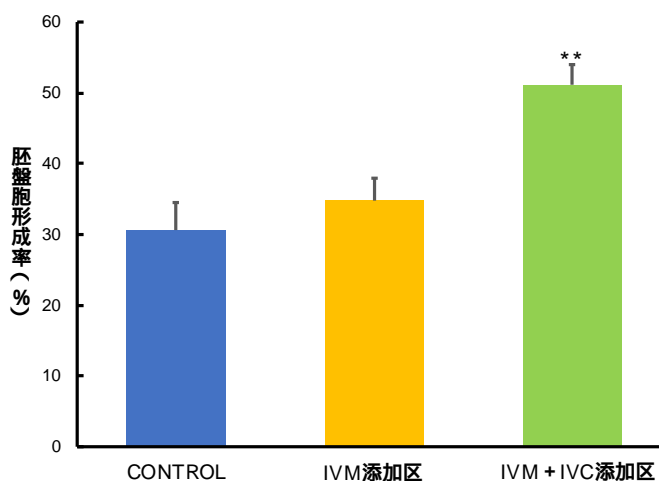


図1：各区における胚盤胞形成率 ** $p < 0.05$

(3) OPU-IVF 胚の生産系への応用

本法により生産した OPU-IVF 胚の胚盤胞期への発生率は対照区と比較して有意に高い結果であった。また、タイムラプスインキュベーターを用いて発生動態を観察した結果、第一分割において正常な卵割パターンを示した胚からの胚盤胞期胚の割合が対照区と比較して高い傾向が見られた ($p = 0.056$)。これらの結果から、本生産系は OPU-IVF 胚にも適応可能であり、その生産効率の向上に寄与することが期待される。

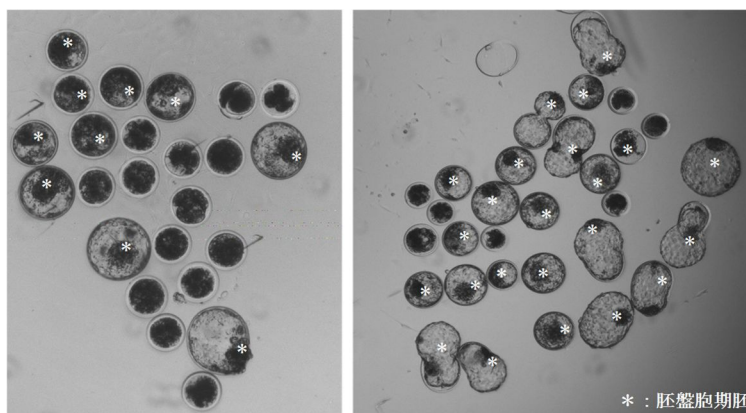


図2：小胞体ストレス抑制により作出された胚盤胞期胚

本研究において確立された IVF 胚の生産系は、移植胚の生産効率の向上に加えて、胚の耐凍性の向上にも寄与することが示された。飼育頭数が限られた我が国の畜産現場では新鮮胚と比べて扱いが容易な凍結胚の移植が一般であるため、本法を用いることで OPU-IVF 胚による子牛生産の効率化に寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Balboula Ahmed Z., Aboelenain Mansour, Sakatani Miki, Yamanaka Ken-Ichi, Bai Hanako, Shirozu Takahiro, Kawahara Manabu, Hegab Abd Elraouf O., Zaabel Samy M., Takahashi Masashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Effect of E-64 Supplementation during In Vitro Maturation on the Developmental Competence of Bovine OPU-Derived Oocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes13020324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------