

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19233

研究課題名（和文）熱非依存的HSP70誘導因子の活用によるシャペロン機能強化牛胚の作製

研究課題名（英文）Production of molecular chaperone-enhanced bovine embryos by utilizing heat-independent HSP70 inducer

研究代表者

高橋 昌志（Takahashi, Masashi）

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：10343964

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、アスパラガス茎抽出物（EAS）による卵子を含む生殖細胞機構の解明を目的とした。EAS添加により(1)成熟、卵割、胚盤胞形成、総細胞数に負の影響を与えず、HSP70遺伝子、タンパク質発現が増加した。(2)暑熱負荷による胚盤胞発生率低下の回復、活性酸素産生の減少、グルタチオンの増加が見られた。(3)ミトコンドリア活性とATP産生、脂肪小滴のサイズを増加させた。(4)12時間処理で体外受精・培養後の胚盤胞IFNT遺伝子発現増加傾向がみられたが、暑熱負荷単体によるHSP誘導効果促進効果は明確でなかった。(5)EAS構成成分のアスパラプロリン3種はHSP70単体による誘導効果が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未利用資源であるアスパラガス茎抽出物（EAS）が生殖細胞へのストレス耐性を強化する新たな知見提供として、HSP70の誘導を通じて生殖細胞の保護を実証し、ミトコンドリア活性やATP産生の増加など細胞内代謝の改善も示した。また、EAS構成成分であるアスパラプロリンがHSP70の発現促進の可能性を示唆し、これらの物質の新規機能を理解する手がかりを提供した。EASの利用により、環境ストレス下でも高品質な卵子や胚を確保する技術が発展し、農業や畜産業における生産性向上に貢献できる。また、EASの成分が持つ潜在的な医療応用も期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to elucidate germ cell mechanisms including oocytes by asparagus stem extract (EAS). The addition of EAS increased (1) HSP70 gene and protein expression without negative effects on maturation, egg division, blastocyst formation, and total cell number. (2) EAS restored the reduction of blastocyst development rate caused by heat stress, decreased ROS production, and increased glutathione. (3) Increased mitochondrial activity ATP production and fat droplet size. (4) 12-hour treatment showed a trend toward increased blastocyst IFNT gene expression after in vitro fertilization and culture, but the effect of heat load alone in promoting HSP-induction effect was not clear. (5) Three types of asparaprolin, a component of EAS, showed an induction effect by HSP70 alone.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：ウシ胚 卵子 アスパラガス茎抽出物 IFNT 胚発生

1. 研究開始当初の背景

熱ショック(HS)は生殖細胞、卵子成熟、受精、胚発生を含めた生殖機能阻害すると共に細胞内酸化ストレス増加との関連が知られる。一方、大腸菌や培養細胞への軽度なHSは分子シャペロン機構により誘導された熱ショックタンパク質(HSP)による細胞防除が強化される。申請者らはアスパラガスの廃棄根部から抽出・精製された機能性成分である Standardized extract of *Asparagus officinalis* stem(EAS)が牛顆粒層細胞へのHS非依存的なHSP70誘導や、HS処理との併用で相乗的なHSP70の誘導と酸化ストレス軽減を報告した(Sci Rep 2021, doi: 10.1038/s41598-021-97632-6)。またEAS処理細胞の凍結保存後生存性の向上も確認し(129回日本畜産学会大会2021.9)、EASによるシャペロン機能強化効果が検証された。他方、牛胚盤胞への軽度なHS負荷によりHSP70と反芻動物胚固有の妊娠シグナルであるIFN(インターフェロントウ)の発現増加や透明帯脱出の割合増加も予備的に確認しており、HSによるIFN誘導制御も含めた胚の機能強化の可能性が示唆された。加えて、卵子の成熟時におけるしかし、HS負荷は酸化ストレスも同時に誘起するため、卵子・胚への負の影響も懸念される。そのため、酸化ストレスを惹起しない細胞内シャペロン因子誘導因子の活用による新たな細胞強化へのニーズが求められている。

2. 研究の目的

これまでに熱ショックによるシャペロン機能の高まりと熱ショックからの細胞内環境保護機構は多岐にわたって研究されてきているが、暑熱による酸化ストレスの傷害の軽減化には課題が残されていた。一方で、HSPによるI型インターフェロンであるIFN発現が関わるウイルス感染や免疫応答に関しての報告も少ないながらあるが(Mol Reprod Dev, 8:549-554, 1996, J Virol, 87:998-1009, 2013, Brit J Derm, 177:1367-1375, 2017)、熱ショックに依存せずにHSPを誘導し、かつIFN、特にIFNの発現調節、制御にかかわる研究は国内外で皆無である。これまでは熱ショック誘導による細胞の自己防衛力としてのHSPを主とする分子シャペロンが主体となって細胞や組織の生存性維持に大きく関わってきた。一方で、熱ショックにより生じた活性酸素の過剰産生、除去酵素活性の低下による還元環境維持能の低下などから、細胞内への酸化ストレスが蓄積し、DNA損傷、細胞膜資質の過酸化などの機能不全を引き起こすことが広く知られている。特に、少ない細胞構成にもかかわらず、個体発生を完遂できる全能性を持った卵子や初期胚では、ストレスによる障害は致命的にもなりうる。加えて、海外成熟、培養によって作製した受精卵移植によって子宮内に移植される凍結融解後の胚盤胞の損傷を含めた品質や受胎シグナルであるIFN産生能等も、その後の受胎性を大きく影響することは広く知られている。これまで、高品質な胚を体外で作製や凍結保存後の生存性を低下させないために、抗酸化物質、成長因子などの培養環境などの改善による胚の品質や耐凍性向上研究が広く実施されてきた。しかし、胚の生産自体がゴールではなく、「凍結後の高い生存性と子宮内での受胎のしやすさ、を踏まえた胚作製も考慮する必要があると考えられる。非熱ショックによるシャペロン機構誘導と細胞内環境の強化ならびに胚のストレス発現促進にかかわる未知の機構を明らかにすることで、胚における基礎的、実用的な研究成果を構築するのみならず、一般的なI型IFNが関わる免疫増強機構や細胞、組織強化など、繁殖のみならず、健康、機能向上にかかわる新たな知見が得られる可能性も大いにありうる。本研究では、体細胞にて報告されたアスパラガス茎抽出物(EAS)を卵子を含む生殖細胞への活用で、熱非依存的HSP70誘導によるシャペロン機能強化によるストレス耐性の付与が卵子を含む生殖細胞での効果と作用機構を解明する。

3. 研究の方法

食肉処理場より採取したウシ卵巣より、卵丘細胞を採取、播種しコンフルエントとなった単層を試験に供した。(1)EASを既報の効果添加量をもとに1, 5, 10mg/mlの濃度で添加後、誘導時間によるHSP70の遺伝子発現誘導を解析し、添加量および誘導時間を確定する。併せてHSP90, 25の遺伝子の発現も併せて実施し、EAS特異的発現の可否を解析した。HSP70タンパク質発現についても実施し、遺伝子、タンパク質発現への影響を解析した。(2)EASによるHSP70誘導細胞に熱ショック処理(40.5℃)をし、蛍光指示薬の反応により細胞内活性酸素および細胞内還元因子であるグルタチオン(GSH)を蛍光顕微鏡により検出、画像解析による蛍光の定量化を行い、EAS処理による熱ショック誘導の酸化ストレス低減効果を評価した。(3)卵子成熟培養時にEASを添加し、成熟後の卵子について、蛍光指示薬によるミトコンドリア活性、ATP量並びに脂肪小滴の解析、(4)体外受精、体外培養によって得られた胚盤胞にEASを添加し、HSP70, IFNTの遺伝子発現ならびにIFNTのタンパク質発現を解析した。(5)EAS機能の主要成分として分離、精製されたアスパラプロリン3種((L-Leu-L-Pro, L-Phe-L-Pro, L-Tyr-L-Pro))について、単独並びに混合での効果の検証を培養顆粒層細胞を用いて実施した。

4. 研究成果

(1) 0.1 および 0.5 mg/ml EAS 添加区では、成熟、卵割、胚盤胞ならびに総細胞数において負の影響は見られなかった。また、HSP70 の相対遺伝子発現量は 0.1 および 0.5 mg/ml EAS 添加区で有意に増加した。さらに、HSP70 タンパク質発現についても免疫染色により検出・定量比較したところ、無添加対照区と比較して 0.5 mg/ml EAS 添加区で増加する傾向があった(図 1)。

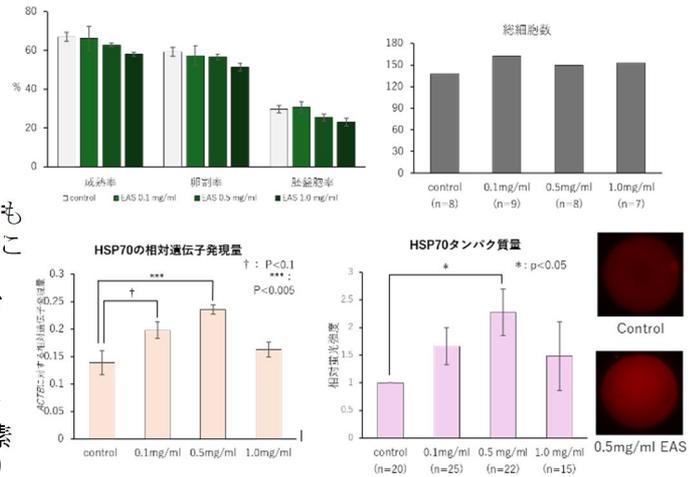


図 1 ウシ卵子成熟、発生及び HSP70 誘導に及ぼす EAS の作用

(2) 41 の熱ショック(HS)条件下で実験 1 と同様の指標に加えて活性酸素(ROS)の検出を行った結果、HS によりみられた胚盤胞発生率の低下、活性酸素の増加は 0.1mg/ml の EAS 添加によって発生回復、ROS 産生の低下並びに GSH の増加がみられた(図 2)。

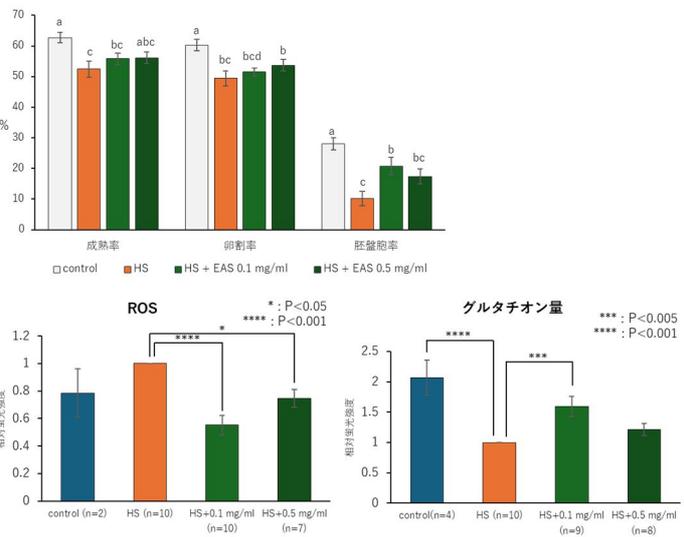


図 2 暑熱ストレス負荷卵子の成熟、発生、酸化ストレス防除に及ぼす EAS の作用

(3) EAS 添加によって、ミトコンドリア活性増加に伴う ATP 産生の増加並びに、脂肪小滴サイズの増加も新たにみられ、胚内における細胞内の代謝調節への可能性も示唆された(図 3)。

(4) 体外受精、体外培養によって得られた胚盤胞に 0.1 および 0.5mg/ml EAS を添加後、IFNT の遺伝子発現を解析したところ、0.1mg/ml 添加 12 時間後の増加がみられた。また、40.5 6 時間の熱ショック処理実施後では、EAS 添加による影響は見られず、熱ショック単体による IFNT の増加様の発現パターンが確認されたが明瞭な効果としては見されなかった。一方、HSP70 の発現は熱ショック処理 6 時間で増加したが、胚胚盤胞の形態への影響は確認されなかった(図 4)。

(5) EAS による HSP70 誘導効果をこれまでに確認してきたが、これまでの研究によって、EAS 構成成分中の有効物質として明らかになったアスパラプロリン 3 種((L-Leu-L-Pro, L-Phe-L-Pro, L-Tyr-L-Pro)について、顆粒層培養モデルを用いてその個別並びに混合による HSP 誘導効果を検出した。ところ、既報の 1uM 添加によって HSP70 発現が EAS と同程度に誘導促進された。加えて、脂肪小滴の誘導もアスパラプロリンの個別並びに、混合でも観察されたとともに、ステロイド合成経路にかかる遺伝子発現の増加がみられた。このことから、EAS 構成成分である 3 種のアスパラプロリンは、個別に 1uM として培養に添加する場合、HSP70 の誘導効果には差は見られないことから単独での効果も推察された(図 5)。

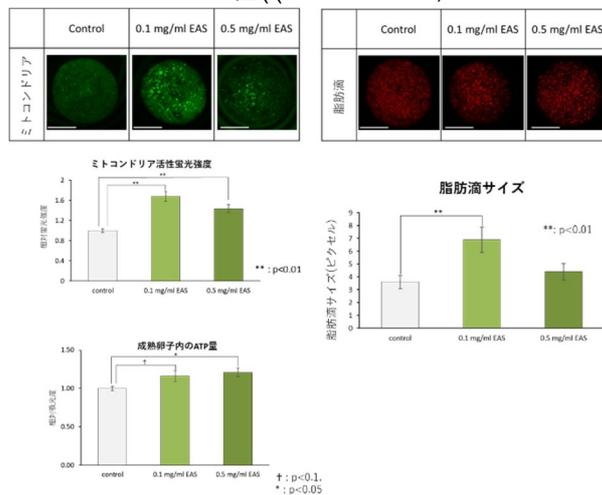


図 3 ウシ卵子内のミトコンドリア活性、ATP 合成並びに脂肪小滴合成に及ぼす EAS の効果

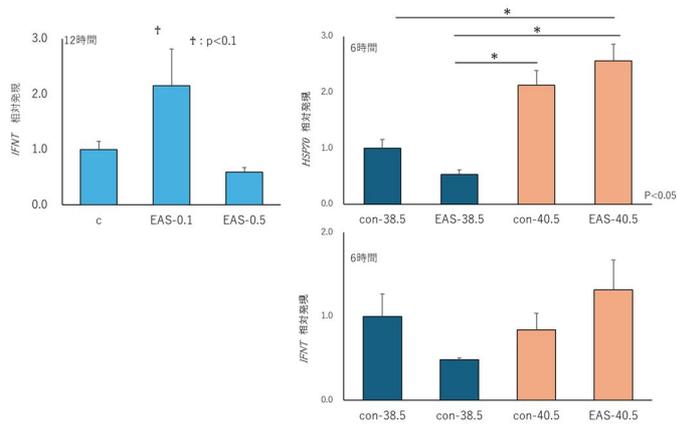


図4 ウシ胚盤胞の HSP70 並びに IFNT 誘導に及ぼす EAS の効果

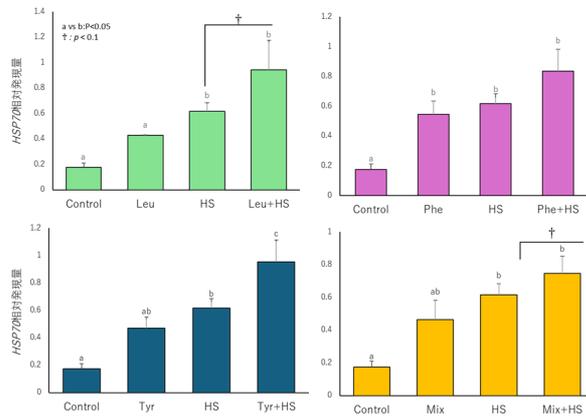


図5 ウシ顆粒層細胞の HSP70 導に及ぼすアスパラプロリンの効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Ho Khoi Thieu, Balboula Ahmed Zaky, Homma Kohei, Takanari Jun, Bai Hanako, Kawahara Manabu, Thi Kim Nguyen Khang, Takahashi Masashi | 4. 巻 225 |
| 2. 論文標題 Synergistic effect of standardized extract of <i>Asparagus officinalis</i> stem and heat shock on progesterone synthesis with lipid droplets and mitochondrial function in bovine granulosa cells | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology | 6. 最初と最後の頁 106181 ~ 106181 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jsbmb.2022.106181 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Rinako Kusuno, Ho Theu Khoi, Kohei Homma, Jun Takanari, Hanako Bai, Manabu Kawahara, and Masashi Takahashi | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Effect of a standardized extract of <i>Asparagus officinalis</i> stem on developmental competence and oxidative stress in heat shock treated bovine oocytes | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of International Food Animal Conference | 6. 最初と最後の頁 16-23 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 楠野莉奈子、Ho Theu Khoi、本間 康平、高成 準、唄 花子、川原 学、高橋昌志 |
| 2. 発表標題 ウシ卵子成熟および発生における熱ショック非依存的なHSP70発現誘導と酸化ストレスに及ぼすEASの影響 |
| 3. 学会等名 日本畜産学会第130回大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Rinako Kusuno, Ho Theu Khoi, Kohei Homma, Jun Takanari, Hanako Bai, Manabu Kawahara, and Masashi Takahashi |
| 2. 発表標題 Effect of a standardized extract of <i>Asparagus officinalis</i> stem on developmental competence and oxidative stress in heat shock treated bovine oocytes |
| 3. 学会等名 International Food Animal Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|