

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658233

研究課題名(和文) 乳化脂質を用いたウシ体外受精胚の発生促進

研究課題名(英文) Promotion of development of in vitro produced bovine embryos by using emulsified lipophilic nutrients

研究代表者

池田 俊太郎 (Ikeda, Shuntaro)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50447893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：家畜が摂取する飼料に含まれる生理活性脂質について、ウシ受精卵の体外培養液への添加を意図した簡易で安定な乳化方法を開発した。乳化VEBC(α-トコフェロールとβ-カロテンの混合物)には胚発生(特に胚盤胞の孵化率)を促進する効果が見られ、一方、乳化オレイン酸は胚盤胞発生率を低下させた。乳化VEBCによる胚発生促進メカニズムの解明を目指し、マイクロアレイを用いた網羅的解析により、乳化VEBCの添加によって胚において発現が変化する遺伝子をリスト化した。

研究成果の概要(英文)：We developed a simple and stable method for emulsification of bioactive lipophilic nutrients intended to add them into culture media of in vitro produced bovine embryos. Emulsified mixture of alpha-tocopherol and beta-carotene (emVEBC) enhanced hatching rate of blastocysts, whereas emulsified oleic acid decreased blastocyst development. To elucidate mechanisms of the favorable effects of emVEBC on embryonic development, a microarray-based transcriptomic analysis of blastocysts was implemented and candidates of responsible genes were listed.

研究分野：畜産学・獣医学

科研費の分科・細目：応用動物科学

キーワード：ウシ 受精卵 初期胚 体外受精 脂質 乳化

1. 研究開始当初の背景

卵子と精子の融合によって受精卵ができる。受精卵は細胞分裂を繰り返し、ウシの場合、受精後 6~8 日目に、百個程度の細胞からなる胚盤胞と呼ばれる発生段階に達する。ヒト、家畜いずれにおいても、この胚盤胞までの体外培養方法が確立されており、生殖医療や家畜の効率的生産に応用されている。家畜の受精卵が胚盤胞まで発生できるかどうかは、卵子の段階でも大きく決まっているが、受精卵がストレスを受けたり、体外培養条件に不備があると、本来胚盤胞に発生できるはずの受精卵もそれができなくなる。また、胚盤胞の質も培養条件によって大きく変化する。

ウシ受精卵の培養液は、通常水に溶ける物質のみで作られ、油のような水に溶けにくい物質(脂質)は一般的には用いられない。しかし、生体内には、種々の生理活性を有する脂質が存在し、それらを培養液に添加した場合、受精卵の発生能力に影響を及ぼすことが考えられる。

また、実験的に脂肪酸や脂溶性ビタミンなどの脂質を培養液に添加する場合でも、エタノールやジメチルスルホキシド等の両親媒性の溶媒が用いられることが多い。しかし、生体の組織液中の脂質の主要な存在形態は、リポタンパク質というエマルジョンである(遊離脂肪酸、ビタミン A、ビタミン D のように特定のタンパク質と結合している場合もある)。

生理活性を有する脂質の受精卵培養液への利用を図る上で、水を主成分とする培養液への簡易な溶解と培養細胞へのより生理的条件に近い形での脂質のデリバリーを可能にする、乳化脂質の利用を着想した。

2. 研究の目的

本研究は、家畜が摂取する飼料に含まれる生理活性脂質について、受精卵の培養液への添加を意図した簡易な乳化方法を開発するとともに、乳化脂質の利用によって、ウシ体外受精卵の胚発生を改善することを目的とした。さらに、発生促進作用のメカニズムを解明するために、遺伝子発現の網羅的解析を行った。

3. 研究の方法

(1)生理活性脂質の簡易な乳化方法

生理活性脂質として、代表的な抗酸化ビタミンである α -トコフェロール(α -Toc)を用いた。乳化に用いる界面活性剤として、Tween-20(T20, HLB 値 16.7), Tween-40(T40, 同 15.6), Tween-80(T80, 同 15.0), Polyglyceryl-10 Laurate(P10, 同 15.5)を用いた。スターラーバーを入れた容量 20ml の

ガラスバイアル(日電理化硝子, SV-20)に 5.05%(w/w)の各界面活性剤水溶液を 5~8 ml 調製し、そこに 1%(w/w)になるように α -Toc を入れ(界面活性剤の最終濃度は 5% w/w)、室温で 5 分間攪拌した。攪拌後の溶液の状態を肉眼で観察した。P10 を界面活性剤として用いた方法で、 α -Toc と α -carotene の混合物(α -Toc: α -carotene=1000:1 w:w)およびウシ血清中の主要な遊離脂肪酸であるオレイン酸(OA)を乳化した製剤を調製し、それぞれ乳化 VEBC および乳化 OA とした。調製した乳化製剤は 4℃ で保存した。

P10 を界面活性剤として用いた方法で調製した乳化 α -Toc (2 点)について、含まれる α -Toc 濃度を、高速液体クロマトグラフィーを用いて、調製時、調製 1,2,3,4 週間後および 2 か月後に経時的に測定し、 α -Toc の経時安定性を評価した。

(2)ウシ体外受精卵の発生に及ぼす乳化脂質の影響

食肉市場由来のウシ卵巣より採取した卵子を用いて、常法(Ikeda S et al., J.Reprod.Dev. 58:91-97, 2012)によりウシ体外受精卵を得た。体外受精日を Day0 とし、Day3 に 8 細胞期以上に発生している胚を、0.05% (v/v)の乳化 VEBC あるいは乳化 OA (1)で調製したものを含む培養液(修正合成卵管液)に移し、引き続き培養した。乳化に用いた界面活性剤(P10)水溶液を 0.05% (v/v)濃度で含む培養液を対照区とした。

Day8 に胚盤胞発生率を評価した。また、対照区と乳化 VEBC 区との比較においては、Day10 に透明帯からの孵化率も合わせて評価した。発生率および孵化率の実験区間における有意差を分散分析を用いて検討した。

(3)乳化 VEBC がウシ体外受精卵の遺伝子発現に及ぼす影響

乳化 VEBC がウシ体外受精卵の遺伝子発現に及ぼす影響を検討するために、マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行った。(2)における対照区と乳化 VEBC 区を用いた培養を 3 回(2 区同時での培養を 3 回)独立に行い、それぞれの培養につき、Day8 の胚盤胞を各区 10 個を 1 群として採取した。採取した胚盤胞は SuperAmp Lysis Buffer(ミルテニーバイオテク)に入れ、45℃ で 10 分間インキュベートした後、以下の解析まで -20℃ で保存した。

mRNA を抽出後、SuperAmp RNA 増幅により、cDNA に変換・増幅した。増幅後の cDNA 250 ng を Cy3 で標識し、アジレント社の Whole Bovine Genome Oligo マイクロアレイ 4x44K V2 に対しハイブリダイズした。洗浄後のマイクロアレイの Cy3 イメージを取得した。Feature Extraction Software によるデータの標準化及び Rosetta Resolver による遺伝

子発現の差異の解析を行った。まず対照区 3 群、乳化 VEBC 区 3 群の平均値の比較において、2 倍以上の発現量の差異かつ $P < 0.01$ を示した遺伝子をピックアップした。それらの遺伝子の中から、上述した 3 回の培養を通じて、対照区と乳化 VEBC 区で同様の発現の差異を示した遺伝子をリストした。

4. 研究成果

(1) 生理活性脂質の簡易な乳化方法

界面活性剤として P10 を用いて α -Toc を乳化した場合、溶液は攪拌直後に白濁した後、乳白透明に変化したため、十分な可溶化が行われたと考えられた (図 1)。一方 T20 を用いた場合は、透明度は低く溶液は攪拌後すぐに不均一化した。また、T40 および T80 を用いた場合は攪拌後白濁したままであり、溶液は不均一なままであった。この結果から、比較した界面活性剤の中で、 α -Toc の乳化には P10 が適していると考えられた。同様の方法を用いて乳化 VEBC および乳化 OA も調製した (図 1)。

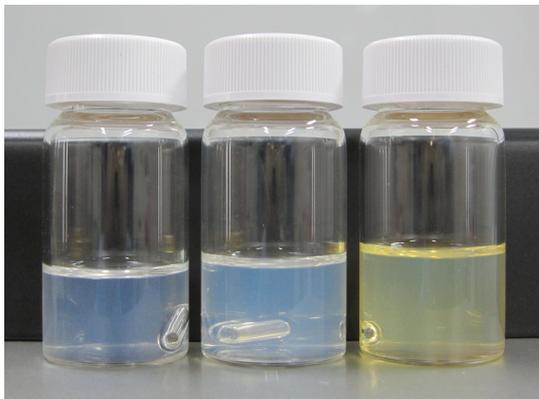


図 1. P10 を用いて調製した乳化脂質製剤
左より乳化 OA、乳化 α -Toc、乳化 VEBC。

P10 を用いて調製した乳化 α -Toc (2 点) における α -Toc 濃度の経時変化を、調製時の濃度 ($6.6 \pm 0.32 \mu\text{g/ml}$) を 100% として図 2 に示した。少なくとも 2 か月間にわたり、濃度や純度の減少は無かった。以上の結果から、 α -Toc の簡易で安定な乳化方法を開発することが出来た。

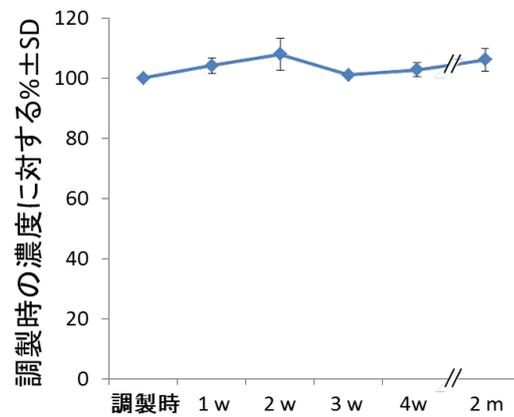


図 2. 乳化 α -Toc 中の α -Toc の安定性
w, m はそれぞれ調製時からの週および月を表す。

(2) ウシ体外受精卵の発生に及ぼす乳化脂質の影響

対照区と乳化 VEBC 区の Day8 における胚盤胞発生率および Day10 における孵化率を表 1 に示した。胚盤胞発生率に実験区間の有意差は無かった。一方、孵化率については、対照区に比べ乳化 VEBC 区で有意に高くなった。このことから、乳化 VEBC の利用により、胚盤胞の生存性を高めることが出来ると考えられた。

表 1. ウシ体外受精卵の発生に及ぼす乳化 VEBC の影響

実験区	胚数 (培養回数)	胚盤胞発生率	孵化率
		% ± 標準誤差	
対照	111(5)	52.1 ± 3.7	10.7 ± 3.1a
乳化 VEBC	107(5)	52.5 ± 4.0	23.6 ± 1.5b

a, b 異符号間に有意差あり ($P < 0.01$)

対照区と乳化 OA 区の Day8 における胚盤胞発生率を表 2 に示した。対照区に比べ乳化 OA 区で有意に低い胚盤胞発生率となった。この結果から、乳化 OA は胚盤胞発生を阻害することがわかった。

表 2. ウシ体外受精卵の発生に及ぼす乳化 OA の影響

実験区	胚数 (培養回数)	胚盤胞発生率
		% ± 標準誤差
対照	61(3)	59.1 ± 2.0a
乳化 OA	57(3)	42.5 ± 3.9b

a, b 異符号間に有意差あり ($P < 0.05$)

(3)乳化 VEBC がウシ体外受精卵の遺伝子発現に及ぼす影響

(2)の試験において、乳化 VEBC に胚盤胞の孵化率を促進する効果が得られたため、その効果のメカニズム解明を目指し、マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行った。対照区 3 群、乳化 VEBC 区 3 群の平均値の比較において、2 倍以上の発現量の差異かつ $P < 0.01$ を示した遺伝子は 897 個あり、その内、3 回の培養を通じ、対照区と乳化 VEBC 区で同様の発現の差異を示した遺伝子は 99 個あった(図 3)。

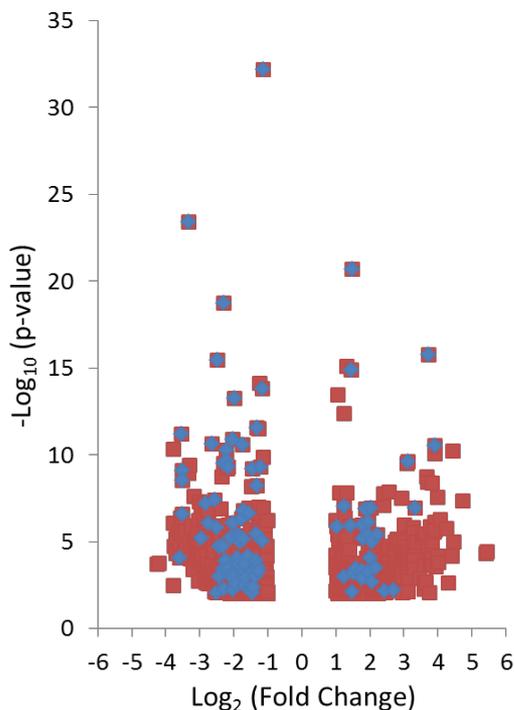


図 3 . 対照区と乳化 VEBC 区における遺伝子発現の差異 Day8 の胚盤胞について解析した。赤色のプロットは平均値の比較で発現の差異 (2 Fold Change $>$, $P < 0.01$) を示した 897 遺伝子を表し、青色のプロットは 3 回の培養を通じて発現の差異を示した 99 遺伝子を表す。

現在、これらの遺伝子を対象として、より定量性を上げた方法で発現の差異を検討するとともに、各遺伝子の胚発生における機能解析を進めている。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Ikeda S

Simple method for emulsification of lipophilic nutrients that affect preimplantation development of bovine embryos in vitro.

Reprod. Fertil. Dev. 査読有 26:157, 2014

DOI: 10.1071/RDv26n1Ab86

Kuroki T, Ikeda S, Okada T, Maoka T, Kitamura A, Sugimoto M, Kume S
Astaxanthin ameliorates heat stress-induced impairment of blastocyst development in vitro: -Astaxanthin colocalization with and action on mitochondria-

J. Assist. Reprod. Genet. 査読有 30:623-631, 2013

DOI: 10.1007/s10815-013-9987-z

[学会発表](計 1 件)

Ikeda S

Simple method for emulsification of lipophilic nutrients that affect preimplantation development of bovine embryos in vitro.

40th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society

2014.1.11 ~ 14

Reno, NV, USA

6 . 研究組織

(1)研究代表者

池田 俊太郎 (IKEDA, Shuntaro)

京都大学大学院・農学研究科・助教

研究者番号 : 5 0 4 4 7 8 9 3