

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850186

研究課題名(和文)ウシ体外生産胚の高品質化を目的とした新規発生阻害機構の解明

研究課題名(英文) Study on improvement of bovine embryonic development under heat stress by regulation of lysosomal enzyme activities

研究代表者

山中 賢一 (YAMANAKA, Kenichi)

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、受精から胚発生初期におけるカテプシンB、リソソームおよびオートファゴソームの動態を明らかにし、受精家畜受精卵における細胞内消化に関する基礎的知見を得ることができた。また、体外生産胚の生産過程における外的ストレスは過剰なカテプシンB活性を誘起し、胚の発生能や品質低下を引き起こすことが明らかとなった。さらに、これらの活性を人為的に抑制することで、胚の発生能低下を回避できることも同時に示され、カテプシン活性が関与する発生停止機構の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to obtain the fundamental information for elucidating the relationship of intracellular digestion and preimplantation embryo development in cattle, we clarified dynamics of cathepsin B activity and its expression, localization of lysosomes and autophagosomes. And also, our data show that the excess cathepsin B activity is induced under conditions of the environmental stress of culture. On the other hand, developmental competence of embryos exposed to culture stress can be improved by inhibition of cathepsin B activity. In conclusion, these findings implicate that cathepsin B activity as one of the possible pathways that are responsible for developmental arrest caused by culture stress. Moreover, regulating cathepsin B would be contributed for the improvement of in vitro embryo production system.

研究分野：動物生殖学

キーワード：体外受精 暑熱ストレス リソソーム ウシ受精卵

1. 研究開始当初の背景

現在、国内における子牛生産のほぼ 100% が人工授精技術を用いて行われており、肉および乳牛の育種改良を飛躍的に促進させるとともに、生産性の高い子牛の増産による栄養的に優れたタンパク質源の安定的な供給に多大な貢献をしている。しかしながら、近年、気候変動に起因すると考えられる夏季の猛暑日、高夜温日数の増加を伴った暑熱環境が家畜の繁殖性を大きく低下させることが生産現場で大きな問題となっている。実際に国内でも温暖な地域である九州地方では、夏季高温期で人工授精後の受胎率が約 10% も下がることが知られており、それに伴う空胎期間の延長や非効率的な子牛生産は畜産農家の経営を圧迫している。

夏季の受胎率の低下の対策として、体外で卵母細胞を成熟後、精子と受精させ、暑熱ストレスに強い発生ステージまで発育させた胚を母体へ戻すという体外生産胚の利用が挙げられる。つまり、雌雄両方の優良形質を受け継いだ子畜の効率的な生産ができるという元々のメリットに加えて、人工授精の弱点である母体環境の変動に対応するための対策としても体外生産胚の利用の重要性が高まってきている。しかしながら、体外生産胚の移植による受胎率は 40% 程度と人工授精と比較して低いことに加えて、凍結保存後の生存性も生体回収（体内生産）胚と比べて低いことが夏季の低受胎率対策としての胚移植の実用性を妨げている。すなわち、夏季の低受胎率対策として体外生産胚の胚移植を効率的に利用するためには、体外生産胚の高品質化が重要な課題となっている。

2. 研究の目的

我々は、これまで体外生産胚の高品質化を目的とした研究を行ってきており、近年では卵母細胞および胚の新たな品質マーカーとなる候補として、システインプロテアーゼに属するカテプシン B の活性に着目した研究を行ってきた。その結果、低品質の卵母細胞および胚ではカテプシン B の酵素活性および遺伝子発現量が有意に高いことを明らかにした。また、このカテプシン B の活性を阻害剤である E 64 により抑制することで、低品質胚において顕著に起こるアポトーシスを抑制できること、さらには胚の発生率を向上できることを明らかにした。これらの結果は、カテプシン B を含むカテプシン群の活性が卵母細胞および胚の品質と負の相関があること、さらに、それらの活性を抑制することで体外生産胚の品質を向上させられる可能性を示している。現時点ではカテプシン B の活性が外的ストレスによって誘導されるのかは明らかとなっていないが、暑熱ストレス下にある精子、卵母細胞および胚と同様に、カテプシン B の活性が高いレベルにあるとアポトーシスが誘導されるという過去の我々の知見から、外的ストレスによってカテプシ

ン B の活性が誘起されることが強く予想される。すなわち、外的ストレスによってカテプシン B の活性が過剰に誘起されることが体外生産胚の発生阻害の原因の一つであるという仮説を立て、これらを抑制することで外的ストレスを受けやすい体外生産系で生産された胚の高品質化が可能となるのではないかと考えた。そこで、本研究では、まずウシ胚発生過程におけるカテプシン B 活性およびその発現動態、リソソームおよびオートファゴソームの局在を明らかにし、カテプシン B やそれらが関与する細胞内消化やオートファジーに関する基礎的知見の集積を行い、さらに、外的ストレスが細胞質内のカテプシン B 動態に与える影響を調べることで、それらと発生阻害との関係の解明およびそれらの人為的制御による体外生産胚の高品質化を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 体外受精胚の作製

と場由来卵巣より、吸引採取法により卵丘卵母細胞複合体(COCs)を採取し、TCM199 に 5% FBS、FSH(0.02 AU/ml)およびゲンタマイシン(10 µg/ml)を加えた培地中で 38.5 °C、5% CO₂、加湿条件下で 22 時間体外成熟培養を行った。体外成熟後、COCs は IVF100 (機能性ペプチド研究所)で 3 回洗浄後、媒精まで 38.5 °C、5% CO₂、加湿条件下で静置した。一方、精液は人工授精用凍結精液を融解後、IVF100 が入った遠心チューブに精液を滴下し懸濁した。懸濁液は 35.0 °C、2000 rpm で 5 分間遠心を行った。遠心後、上清を捨て、IVF100 を加えて懸濁し、同条件でもう一度遠心を行い、再度上清を捨て、1 ml の IVF100 を加えて懸濁した。精子濃度が 5×10^6 個/ml になるように IVF100 で調製し、38.5 °C、5% CO₂、加湿条件下で 6 時間媒精を行った。媒精後、ピペティングにより卵丘細胞および精子を完全に取り除くことで裸化を行った。裸化後、受精胚を SOF-BE1 培地で洗浄し、38.5 °C、5% CO₂、5% O₂、加湿条件下で体外発生培養を行った。暑熱(HS)区では、体外受精時に 6 時間または体外発生培養開始後 20 時間 40.5 °C の高温条件下で培養を行った。発生培養後、2 日で分割率、8 日で胚盤胞形成率を評価した。

(2) カテプシン B 活性の検出

生細胞において活性型カテプシン B を検出できる Magic Red Cathepsin Detection Kit (Cathepsin B MR-(RR)2; Immunochemistry Technologies)を用いた。製造元の説明書に従い反応液を調整し、反応液で作成したドロップに胚を移し、38.5 °C で 20 分間インキュベートした。0.1% PVP-PBS で洗浄した後、スライドガラスにマウントし、蛍光顕微鏡により観察を行った。得られた各画像の蛍光強度を Image J により数値化し、活性の強度を測定した。

(3) カテプシン B の発現解析

サンプルは 20-30 個の胚を使用し、LDS Sample Buffer (Life technologies) により溶解、70 °C で 10 分間処理を行った。各サンプルは Bolt® 4-12% Bis-Tris Plus gels (Life technologies) を用いて電気泳動を行った。泳動後、iBlot 2 Gel Transfer Device (Life technologies) を用いて PVDF 膜へ転写を行った。その後、PVDF 膜を 2% ECL Prime Blocking Agent (GE Healthcare) を含む TBS-T 中でシェーカーを用いて 1 時間振とうすることでブロッキングを行った。TBS-T で 3 回洗浄後、抗カテプシン B 抗体 (abcam, 500 倍希釈) または抗 α -アクチン抗体 (Wako, 5000 倍希釈) をイムノエンハンサー Reagent A (TOYOBO) で希釈した液中で振とうさせながら 4 °C で 1 晩反応を行った。一次抗体反応を行った PVDF 膜を TBS-T で 5 回洗浄し、イムノエンハンサー Reagent B (TOYOBO) で希釈した HRP 標識 Anti-Mouse IgG 抗体 (GE Healthcare, 30000 倍希釈) 液中で 1 時間反応させた。二次抗体反応後、PVDF 膜を TBS-T で 5 回洗浄し、ECL Prime Western Blotting Detection System (GE Healthcare) を用いて検出を行った。発現量は内部標準である α -アクチンの発現量で補正後、1 細胞期の平均値を 1 としてその相対値で示した。

(4) リソソームの検出

リソソームの検出は LysoTracker Red DND-99 (Life technologies) を用いて行った。100 nM LysoTracker RED を含む SOF-BE1 にサンプルを移し、37 °C で 1 時間インキュベートした後、SOF-BE1 で 3 回洗浄した。洗浄後、200 μ l の SOF-BE1 のドロップを作っておいたガラスボトムディッシュにサンプルを移し、カバーガラスをかけ共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。

(5) オートファゴソームの検出

サンプルはまず 0.1% PVP-PBS (PVP-PBS) で 3 回洗浄後、4% PFA-PBS 中で 40 分間、室温で固定した。固定後、PVP-PBS で 3 回洗浄し、0.5% Triton X-100 を含む PVP-PBS 中で 30 分、室温で浸透化を行った。次に、10% FBS-PBS 中で 1 時間、37 °C でブロッキングを行った。その後、1% BSA で 500 倍に希釈した一次抗体 Anti-LC3 (医学生物学研究所) 液中で 4 時間、一晩静置した。翌日、PVP-PBS で 3 回洗浄後、1% BSA を含む PVP-PBS で 200 倍に希釈した二次抗体 Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Life technologies) 液中で 60 分間静置した。その後、PVP-PBS で 3 回洗浄し、スライドガラスに Vectashield mounting medium (Vector Laboratories) でマウントし、カバーガラスをかけ、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。

(6) 胚盤胞期胚のガラス化

発生培養 7 日後の胚盤胞期を 20% FBS+DPBS で洗浄後、VS15 (7.5% エチレングリコール、7.5% DMSO、20% FBS を含む DPBS) に移し、3

分間平衡した。その後、VS33 (16.5% エチレングリコール、16.5% DMSO、0.5M スクロース、20% FBS を含む DPBS) に移し、クライオトップの先端に最小限の液とともに胚を載せ、VS33 に胚を移してからちょうど 1 分後に液体窒素へ投入した。ガラス化保存胚の加温は、まず液体窒素中でクライオトップカバーを外し、その先端を加温液 (0.3M スクロース、20% FBS を含む DPBS) にすばやく浸漬した。その後、顕微鏡下でクライオトップから胚を外し、加温液中で 5 分間平衡し、培養液 20% FBS、0.1mM β -メルカプトエタノールを含む TCM199 に移して洗浄・回復培養を行った。培養の 24 および 48 時間後に生存・孵化の観察を行った。

4. 研究成果

(1) 各発生過程におけるカテプシン B 活性およびタンパク質発現動態

まず、カテプシン B の活性について胚発生過程における動態を調べた。その結果、図 1 に示すように発生ステージが進むにつれてカテプシン B 活性を示す蛍光シグナルが非常に強く検出され、高い活性にあることが明らかとなった。一方、胚盤胞期胚ではカテプシン B 活性が減少していく傾向が認められた。

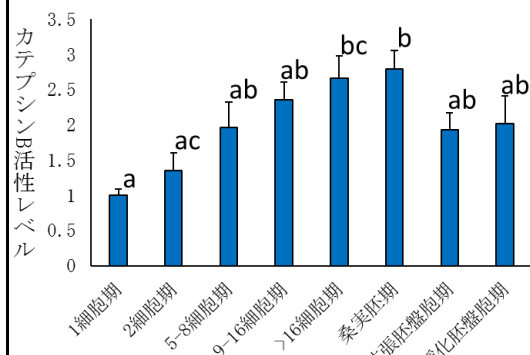


図1 発生過程におけるカテプシン B 活性動態
異符号間に有意差あり ($p < 0.05$)

次に、カテプシン B の胚発生過程における発現動態について解析を行った。その結果、図 2 に示すように、1 および 2 細胞期に比較すると 4-8 細胞期以降の胚で発現量が減少する傾向が見られ、桑実期および胚盤胞期では有意な減少が見られた。

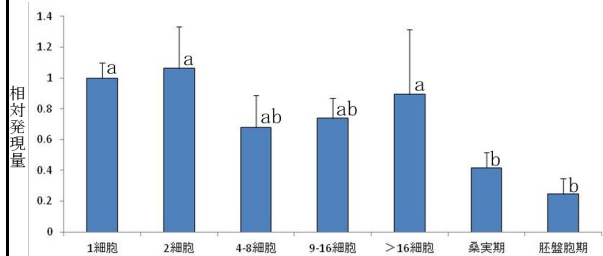


図2 胚発生過程におけるカテプシン B タンパク質発現の変化
異符号間に有意差あり ($p < 0.05$)

この結果はカテプシン B 活性レベルの動態とほぼ同じであった。カテプシン B は未成熟型の前駆体として合成され、その後プロセッシングを経てリソソーム内で成熟型へ変化する

る。今回我々が検出したカテプシン B は成熟型であるため、活性レベルと同様に受精から初期の発生ステージにおいて発現量が高いという結果は、胚発生の初期で活発な物質の分解が行われているということを示している。実際に受精後の胚は細胞質に蓄えられた母性因子を分解することで胚発生に必要な物質の合成に必要なアミノ酸を供給しているため、これら結果は合理的といえる。一方で、活性レベルは胚盤胞期で、発現レベルは桑実期以降で有意に低下していた。この原因についての詳細は不明だが、この時期の胚はその代謝様式が変化することが知られており、それらに伴いカテプシン B の発現も影響を受けてたのかもしれない。

これまでの結果をまとめると、リソソームに含まれる主要な酵素のひとつであるカテプシン B の活性と発現量を指標としてリソソームによる消化機能の胚発生過程における特徴を検討した結果、受精直後の初期の発生ステージにある胚においてその機能が活発に働いていることが示された。このことは、この時期に物質の分解を活発に行うことが胚発生にとって重要な意味を持っていることを示唆していると考えられる。

(2) 各発生過程におけるリソソームおよびオートファゴソームの局在

発生過程における各発生ステージにおけるリソソームおよびオートファゴソームの局在観察を蛍光染色により行った。まず、リソソームの局在を受精前である GV 期および MII 期卵母細胞、受精後である 1 細胞期、2 細胞期、4 細胞期、5-8 細胞期、9-16 細胞期、>16 細胞期、桑実期および胚盤胞期胚において調べた結果、いずれの発生ステージにおいても細胞質にリソソームを示す蛍光シグナルが観察された。各発生ステージのリソソームの局在を比較してみると、受精前の GV 期および MII 期に比較すると受精後の胚でリソソームの数またはサイズが増加する傾向が観察された。特に、5-8 細胞期および 9-16 細胞期胚では、リソソームを示す蛍光シグナルが顕著に観察された。一方で、桑実胚や胚盤胞期といった初期胚発生後期の胚ではカテプシン B の活性や発現と同様にこれらの蛍光シグナルが低下する傾向が見られた。これらの結果は、リソソームの数や大きさが胚発生過程の間で大きく変動するということを示している。また、マウスにおいても同様の報告がなされており、胚発生過程におけるリソソームの局在の変化は哺乳動物種間で同一の特徴を有することが示唆された。

次に、細胞内消化に関わるオートファジーについてオートファジーが起こる際に形成されるオートファゴソーム膜の結合タンパク質である LC3 をマーカーとして、抗 LC3 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。その結果、GV 期でオートファゴソームが多数の蛍光シグナルとして検出され、MII 期では数が減少

した。その後、受精によってオートファゴソームは増加したが、2 および 4 細胞期では再び減少し蛍光シグナルがほとんど見られなかった。一方、4 細胞期から 5-8 細胞期にかけてオートファゴソームの数が再び増加した。そして、9-16 細胞期から桑実期においてはオートファゴソームが細胞膜直下にみられ、胚盤胞期では減少した。まず、GV 期で多数の蛍光が観察され、MII 期ではその蛍光シグナルが著しく減少したことから、少なくとも卵成熟過程においてウシ卵母細胞ではオートファジーが活発に起こっているということが示された。この結果はブタにおける同様の研究において報告されている結果と一致する。また、マウスにおいても、受精前の MII 期卵母細胞ではほとんどオートファジーは起こらないということが報告されており、これは今回見られた MII 期における蛍光シグナルの減少とも一致する。これらの結果は卵成熟過程においてオートファジー機構が重要な役割を果たしている可能性を示している。次に、受精後、再び強い蛍光シグナルが観察されたことから、ウシにおいてもマウスと同様に受精を引き金としてオートファジーが活発に誘起されることが示された。一方で、続く 2 および 4 細胞期においてオートファジーの減少が観察されたが、この結果はマウスの報告とは一致しない。これについて詳細は不明であるが、受精卵を含めた様々な細胞において、細胞分裂の間一時的なオートファジーの抑制が起こることが報告されている。本実験では、各発生ステージの胚を受精後一定の時間でサンプリングしており、今回はそれらがオートファジーの一時的な抑制時期と重なってしまった可能性が考えられる。今後、サンプリング時間をより細分化してこれらの原因について検討する必要がある。また、それ以降の発生ステージに関しては特に 5-8 細胞期においてオートファゴソームが顕著に観察された。これについては、ウシは 8 細胞期に胚ゲノム活性化が起こることが知られており、タンパク質を作り出すために多くのアミノ酸が必要になるため、オートファジーが活発に行われたと考えられる。

これらの結果から、ウシにおいても胚発生過程においてオートファジーがマウスと同様に重要な役割を果たしていることが示唆された。特に、受精をきっかけとして初期の発生ステージでリソソームのサイズやオートファゴソームの数が増大する現象がみられことから、この時期にオートファジーが活発に行われることが胚発生には重要であるのではないかと推察される。

(3) 外的 (暑熱) ストレスがカテプシン B 活性レベルおよび胚発生に及ぼす影響

まず、体外受精時の暑熱ストレスがカテプシン B 活性および体外発生能に及ぼす影響について調べた。カテプシン B 活性に関しては、図 3 に示すように、暑熱区では対照区と比較

して暑熱ストレスからあまり時間の経過していない1細胞期と2細胞期においてその活性が高く、2細胞期では有意に高い活性レベルであった。

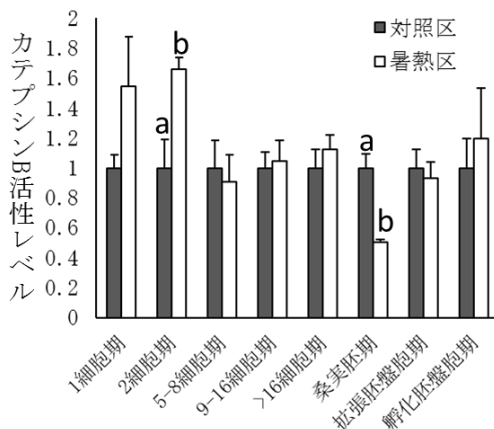


図3 体外受精時の暑熱ストレスがカテプシンB活性レベルに及ぼす影響
同発生ステージ内の異符号間に有意差あり ($p < 0.01$)

次に、発生率に関しては、暑熱ストレスを受けた暑熱区では対照区と比較して分割率 (44.2% vs. 67.6%) および胚盤胞の形成率 (16.7% vs. 5.9%) が有意に低下することが明らかとなった ($p < 0.05$)。一方、カテプシンの活性阻害剤であるE-64を添加した場合、暑熱ストレスを受けた胚でも分割率 (60.7%)、胚盤胞形成率 (18.3%) および胚盤胞期胚の総細胞数が暑熱区と比較して有意に高く ($p < 0.05$)、対象区と同等の成績であった。これらの結果は、体外受精時の暑熱ストレスによりカテプシンBの活性が増加すること、その阻害は暑熱ストレスを受けた胚の体外発生能を改善するのに有効であるということを示している。また、E-64を添加した区においても対照区と同等の前核形成率が得られたこと、さらに顕微鏡下での観察でも精子の運動性や生存性に対するE-64の悪影響は観察されなかったため、将来的には夏季の受胎率向上のためにE-64を人工授精へ利用することで暑熱ストレス下での受精をサポートできる可能性も示された。

また、体外発生培養中の暑熱ストレスが体外発生能およびカテプシンBに及ぼす影響について調べた。まず体外発生培養のどの時期に暑熱ストレスを負荷することが有効であるのかについて予備実験を行った。実験区として体外培養後1、2、4および6日目まで40.5で、その後は通常の38.5で培養する区、また、これらとは逆に、培養開始時は38.5で培養し、体外培養後1、2、4および6日目から40.5で培養する区を設け、発生率を比較した。その結果、発生培養開始後1および2日目の発生ステージにある胚は他の発生ステージの胚と比較して暑熱耐性が有意に低いという結果が得られたため ($p < 0.05$)、次の実験では、発生培養開始後20時間、40.5で培養する条件を暑熱区とするこ

ととした。

まず、体外発生時に暑熱ストレスを受けた胚におけるカテプシンBの活性を調べたところ、体外受精と同様に対照区と比較すると有意に高い活性が確認された (図4)。一方で、カテプシンの活性阻害剤を添加した場合 (E-64+暑熱区) 暑熱ストレスを受けてもカテプシンBの活性レベルを対照区と同等のレベルに維持できることが明らかとなった。

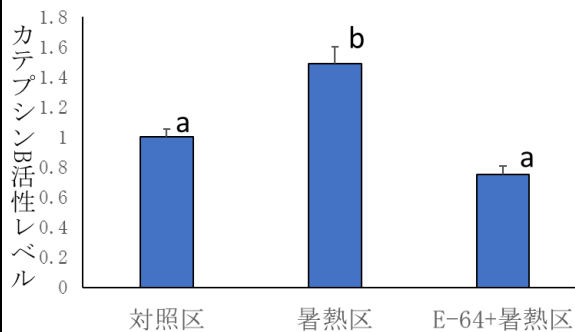


図4 E-64添加が暑熱ストレスを受けた胚のカテプシンB活性レベルに及ぼす影響
異符号間に有意差あり ($p < 0.05$)

次に、発生率を調べた結果、暑熱区では胚盤胞の形成率が対象区と比較して有意に低かった (2.5% vs. 22.0%, $p < 0.05$)。一方、E-64を添加した区 (E-64+暑熱区; 11.7%) では対照区と比較すると低い傾向であったが統計的な有意差は認められなかった。さらに、E-64+暑熱区は暑熱区と比較した場合、胚盤胞の形成率が有意に高い結果であった ($p < 0.05$)。カテプシンBはリソソームの細胞内組織タンパク質の分解に関与し、活発な細胞分裂を行っている胚に必要な材料を供給するためにその役割は重要と考えられる。一方で、過剰な活性レベルの増加は不必要な分解などが誘起され、細胞小器官の障害などを通じて発生に悪影響を及ぼした可能性が考えられる。

ここでの結果から、暑熱ストレスがカテプシンBの活性を増加させること、さらには、それらを抑制することによってストレスを受けた体外生産胚の発生停止を回避できることが示された。

(4) カテプシンB活性抑制によるガラス化保存胚の高品質化

ガラス化保存後の回復培養培地へのE-64添加によるカテプシンBの阻害の効果を調べた。まず、カテプシンBの活性レベルを調べた結果、E-64添加区では対照区と比較して有意に低い活性であった ($p < 0.05$)。回復培養後の生存率は対照区 (83.3%) と比較してE-64区 (90.6%) で高い傾向であった。同様に、回復培養後の孵化率も対照区 (65.7%) と比較してE-64区 (78.9%) で高い傾向であった。さらに、回復培養後の胚を形態的分類によりランク分けしたところ、高品質の胚 (AおよびA'ランク) の割合が対照区 (65.7%) と比較してE-64区 (78.9%) で高い傾向であった。

これらの結果から、ガラス化保存過程においてもカテプシン B 活性レベルを抑制することで胚の発生能および品質を改善できる可能性が示された。

以上、本研究では、受精から胚発生初期におけるカテプシン B、リソソームおよびオートファゴソームの動態を明らかにし、受精家畜受精卵における細胞内消化に関する基礎的知見を得ることができた。また、体外生産胚の生産過程における外的ストレスは過剰なカテプシン B 活性を誘起し、胚の発生能や品質低下を引き起こすことが明らかとなった。さらに、これらの活性を人為的に抑制することで、胚の発生能低下を回避できることも同時に示され、カテプシン活性が関与する発生停止機構の存在が示唆された。

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 7 件)

Hiroaki Nagatomo, Hiroki Akizawa, Ayari Sada, Yasunori Kishi, Ken-ichi Yamanaka, Tetsuya Takuma, Keisuke Sasaki, Nobuhiko Yamauchi, Yojiro Yanagawa, Masashi Nagano, Tomohiro Kono, Masashi Takahashi, Manabu Kawahara, Comparing spatial expression dynamics of bovine blastocyst under three different procedures: in-vivo, in-vitro derived, and somatic cell nuclear transfer embryos, *The Japanese Journal of Veterinary Research*, 査読有、63 巻、2015、159-171

DOI: 10.14943/jjvr.63.4.159

Saiko Sugawara, Toshihiko Ito, Shiori Sato, Yuki Sato, Akira Sasaki, Tomokazu Fukuda, Ken-ichi Yamanaka, Miki Sakatani, Masashi Takahashi, Masayuki Kobayashi, Generation of aminotermally truncated, stable types of bioactive bovine and porcine fibroblast growth factor 4 in *Escherichia coli*, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 査読有、62 巻、2015、164-172

DOI: 10.1002/bab.1251

Miki Sakatani, Ken-ichi Yamanaka, Ahmed Zaky Balboula, Naoki Takenouchi, Masashi Takahashi, Heat stress during in vitro fertilization decreases fertilization success by disrupting anti-polyspermy systems of the oocytes, *Molecular Reproduction and Development*, 査読有、82 巻、2015、36-47

DOI: 10.1002/mrd.22441
Kazuki Yamagami, Nobuhiko Yamauchi, Kaiyu Kubota, Sho Nishimura,

Vishwajit Sur Chowdhury, Ken-ichi Yamanaka, Masashi Takahashi, Shoji Tabata, Masa-aki Hattori, Expression and Regulation of Foxa2 in the Rat Uterus during Early Pregnancy, *Journal of Reproduction and Development*, 査読有、60 巻、2014、468-475

DOI: 10.1262/jrd.2014-086

Daisuke Sugiyama, Yuki Teshima, Ken-ichi Yamanaka, Maria Portia Briones-Nagata, Masatoshi Maeki, Kenichi Yamashita, Masashi Takahashi, Masaya Miyazaki, Simple density-based particle separation in a microfluidic chip, *Anatical Methods*, 査読有、6 巻、2013、308-311

DOI: 10.1039/c3ay40971f

Hiroaki Nagatomo, Shinjiro Kagawa, Yasunori Kishi, Tetsuya Takuma, Ayari Sada, Ken-ichi Yamanaka, Yasuyuki Abe, Yasuhiko Wada, Masashi Takahashi, Tomohiro Kono, Manabu Kawahara, Transcriptional wiring for establishing cell lineage specification at the blastocyst stage in cattle, *Biology of Reproduction*, 査読有、88 巻、2013、1-10

DOI: 10.1095/biolreprod.113.108993

Ahmed Zaky Balboula, Ken-ichi Yamanaka, Miki Sakatani, Manabu Kawahara, Abd Elraouf Hegab, Samy Zaabel, Masashi Takahashi, Cathepsin B activity has a crucial role in the developmental competence of bovine COCs exposed to heat-shock during in vitro maturation, *Reproduction*, 査読有、146 巻、2013、407-417

DOI: 10.1530/REP-13-0179

[学会発表](計 3 件)

山中賢一、体外生産胚の高品質化に向けた取り組み、新たな肉用牛生産シンポジウム、2014 年 12 月 12 日、アバンセ(佐賀県・佐賀市)

山中賢一、水落絢子、阪谷美樹、竹之内直樹、高橋昌志、和田康彦、体外発生時の暑熱ストレスがウシ胚のカテプシン B 活性に及ぼす影響、日本繁殖生物学会、2014 年 8 月 21 日、帯広畜産大学(北海道・帯広市)

山中賢一、櫻澤彩、和田康彦、阪谷美樹、竹之内直樹、高橋昌志、日本繁殖生物学会、2013 年 9 月 12 日、東京農工大学(東京都・府中市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山中 賢一 (YAMANAKA, Kenichi)
佐賀大学・農学部・准教授
研究者番号: 40572920