

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15361

研究課題名(和文)オートファジー制御による高品質なウシ体外胚生産系の開発

研究課題名(英文)Improvement of in vitro embryo production by autophagy regulation in cattle

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)：ウシ卵母細胞および胚で起こるオートファジーに着目し、初期胚発生過程におけるオートファジー動態と発生能との関係を明らかにすることでウシ体外生産胚の発生能向上を目的とした。オートファジー活性動態を観察した結果、初期分割期でその活性が高まることが示された。また、マウスとは異なる動態であることも示され、種間で異なることが示唆された。次に、時期特異的にオートファジーを阻害または誘導する実験を行い、発生初期の胚でのオートファジーを誘導した場合、発生率が向上する一方で、阻害した場合、発生率が低下することが示された。以上の結果から、オートファジー制御により体外生産胚の発生能が向上することが明らかとなった。

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オートファジー機構には不明な点が数多く残されており、本研究の成果は学術的意義が高いといえる。また、近年の人工授精による受胎率の低下により、体外生産胚の胚移植の実施件数が世界的に急増しており、それに伴う体外生産胚の高品質化に対する畜産業界からの期待は非常に高い。すなわち、オートファジー動態の詳細を明らかにし、それらの制御を通じて体外生産胚の高品質化を示した本研究の成果は、胚移植による子牛生産の基盤技術として期待されている体外胚生産系の高度化に重要な知見であり、学術的のみならず、実社会での課題解決に貢献できるという点で社会的意義が高いといえる。

研究成果の概要(英文)：To improve the developmental competence of bovine embryos produced in vitro, this study focused on autophagy occurring in bovine oocytes and embryos, and investigated the relationship between autophagy dynamics and developmental competence in early embryogenesis. As a result of observing the dynamics of autophagy activity, the activity was increased during early embryonic stages. Moreover, our data indicated that the dynamics were different from those in mice, suggesting that it would differ between species. Next, we conducted experiments to inhibit or induce autophagy in a time-specific manner. Induction of autophagy during early embryonic stages improved the developmental rate to blastocyst stage, whereas this rate drastically decreased by inhibition of autophagy. In conclusion, this study indicated that autophagy regulation during in vitro development could improve the developmental competence of in vitro produced embryos.

研究分野：動物繁殖学

キーワード：体外受精 胚発生 オートファジー ウシ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### 研究の学術的背景

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高温環境が家畜の繁殖性を大きく低下させ、夏季では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。一方、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胚移植を利用した暑熱対策の積極的な利用を妨げている。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

近年、マウスにおいて細胞内の物質分解機構であるオートファジーが受精後に活性化され、8細胞期までの初期発生に必須であること、さらに、このオートファジー活性が胚発生能と正の相関があることが報告されている。したがって、ウシにおいてもこのオートファジーが胚発生能に関与することが強く予想される。しかしながら、これまで家畜の胚発生過程におけるオートファジーの役割に関して詳細に調べた研究は少ない。

そこで、ウシ卵母細胞および胚で起こるオートファジーに着目し、初期胚発生過程におけるオートファジー動態と発生能との関係を明らかにするとともに体外生産胚の発生能向上を目的とした。

### 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およびゲンタマイシンを加えた培地中で 38.5℃、5% CO<sub>2</sub>、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 で洗浄後、媒精まで 38.5℃、5% CO<sub>2</sub>、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、遠心洗浄後、精子濃度が 5×10<sup>6</sup> 個 / ml になるように IVF100 で調製し、38.5℃、5% CO<sub>2</sub>、加湿条件下で 6 時間媒精を行った。媒精後、ピペッ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 CR1aa 培地で洗浄し、38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>、加湿条件下で体外発生培養を行った。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) オートファジー活性動態の解析

ウシ初期胚発生におけるオートファジーに関する基礎的知見の集積を目的として、卵核胞期卵(GV)から胚盤胞期胚までのステージにおけるオートファジー活性の解析を行った。オートファジー活性の検出は、Cyto-ID Autophagy Detection Kit を用いて行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、得られた画像(図1)におけるオートファジー活性は、Image J ソフトウェアを使用して、ドット状のシグナル数をカウントすることで評価した。

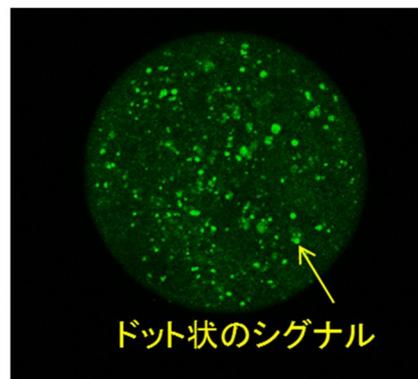


図1 卵母細胞におけるオートファジー検出画像

#### (3) オートファジー阻害および誘導処理

体外発生培養中のオートファジー制御が胚発生に及ぼす影響を調べた。オートファジーを阻害するために Wortmannin を使用し、発生培地における濃度が 2.5μM、5μM、10μM になるように調整した。一方、オートファジーを誘導するために Rapamycin を発生培地における濃度が 10nM、50nM、100nM になるように添加した。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。さらに、胚盤胞期へ達した胚におけるアポトーシス発生率を(*in situ* cell death detection kit)を用いて解析を行った。

#### (4) Real-time PCR による遺伝子発現解析

オートファジー誘導処理が体外生産胚の遺伝子発現に及ぼす影響を調べるために、胚盤胞期

胚における胚発生関連遺伝子の発現解析を行った。10個の胚盤胞期胚から RNA 抽出は RNAeasy Plus Micro Kit、cDNA 合成は SuperScript™ VILO™ Master Mix cDNA Synthesis Kit、発現解析は SsoAdvanced™ universal SYBER® green supermix を用いて行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ウシ胚発生過程におけるオートファジー活性動態の解析

ウシ卵母細胞の成熟および胚発生過程におけるオートファジー動態について、蛍光染色法により解析を行った(図2)。卵核胞期、第二減数分裂中(MII)期、1細胞期~胚盤胞期までの卵母細胞または胚のすべてのステージにおいてオートファジー小胞が観察されたが、特に、MII期卵子、9-16細胞期胚、胚盤胞期胚においてオートファジー活性が顕著に高かった。これらの結果のうち、受精後からオートファジー活性が上昇し、初期分割胚でその活性が高まるといった点においてはマウスでの報告と一致するものであった。また、発生が遅延している初期分割胚でオートファジー活性の低下が確認されたことから、ウシ胚においてもマウス胚と同様にこの時期のオートファジーの活性化がその後の発生に関与している可能性が示された。一方で、マウスを使った報告では、MII期でオートファジーが検出されないことから、体外成熟培養の影響や種間での違いを示唆した結果といえる。さらに、ウシでは胚盤胞期胚においても高いオートファジー活性が見られたこともマウスでの報告とは異なる結果であった。ウシでは、透明体脱出後、反芻動物特有の現象である胚の伸張が起こるが、そのような発生過程やその後の着床様式の違いがこのオートファジー動態の違いを生み出している可能性が考えられる。

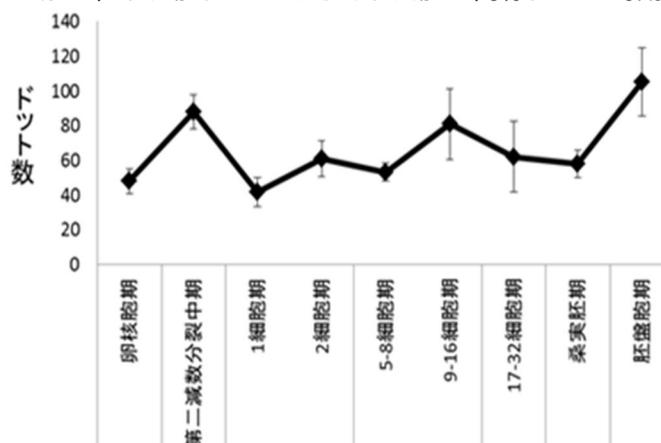


図2 各発生ステージにおけるオートファジー活性

##### (2) オートファジー制御による体外生産胚の発生能向上

Rapamycin 添加によりオートファジーを誘導した場合、胚盤胞期までの発生率が上昇し、胚盤胞期胚の構成細胞におけるアポトーシス発生率の低下がみられた。一方で、Wortmannin 添加によりオートファジー阻害を行った場合、濃度依存的に分割率および胚盤胞期までの発生率が低下した。次に、オートファジー阻害処理の時期および期間が胚発生能に及ぼす影響について検討を行った結果、発生培養開始から 72 時間までのオートファジー阻害が発生能を低下させることが明らかとなった。オートファジー活性動態の解析結果では、この時期の発生ステージにあるウシ胚で、オートファジーの活性が高くなることが明らかとなっており、この時期のオートファジーの胚発生における重要性が示唆された。さらに、この時期のウシ胚は胚ゲノムの活性化が起こる時期ということが知られており、それに新規のタンパク質合成の材料の供給等のため、この時期のオートファジーが重要な役割を担っている可能性が示された。

##### (3) オートファジー制御が遺伝子発現に及ぼす影響

オートファジー制御とウシ胚発生能との関係について、その詳細をより明らかにするために、オートファジー関連遺伝子および胚発生関連遺伝子の発現解析を行った。オートファジー誘導により、4細胞胚におけるオートファジー関連遺伝子である LC3、ATG5、ATG7 の mRNA および活性型である LC3-タンパク質発現が大幅に増加した。また、オートファジー経路の活性化は、4細胞期胚における母性因子である BMP15、GDF9 および FST の有意な減少を引き起こすことが確認された。さらに、オートファジーを誘導された胚は、胚盤胞期胚において胚発生関連遺伝子 (BCL2、MnSOD、SOX2、POU5F1、NANOG、PLAC8、IFN- および GLUT5) の発現

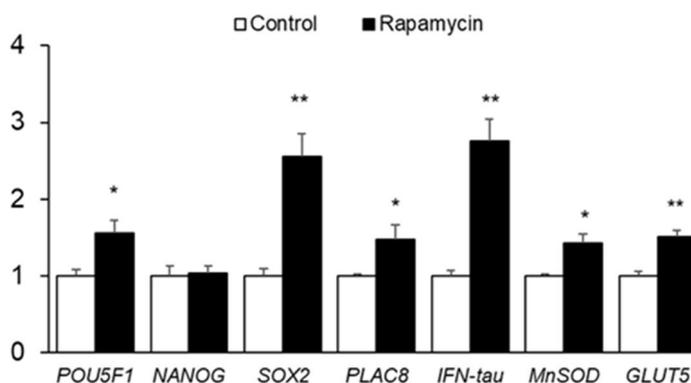


図3 胚盤胞期胚における遺伝子発現解析

\*,\*\* 処理区間に有意差あり (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ )

が有意に上昇しており、品質が高いことが示唆された（図 3）。以上の結果、オートファジー誘導処理を体外受精後 3 日間行うことで、ウシ体外生産胚の発生能を向上させることが示された。

また、オートファジーと同様にタンパク質代謝に関わる小胞体にも着目し、小胞体ストレスが胚発生能に及ぼす影響について調べた。その結果、体外発生培養中に小胞体ストレスを低減することが、体外発生率の向上に加えて、胚の耐凍性を向上することに重要であることが明らかとなった。同様に、ウシ卵丘-卵母細胞複合体の体外成熟培養における小胞体ストレスと発生能との関係を調べた結果、小胞体ストレスにより、卵母細胞を取り囲む卵丘細胞でのアポトーシスが誘導されるとともに、卵母細胞内の酸化ストレスレベルも上昇することが明らかとなった。一方、小胞体ストレスの阻害によって卵成熟率および受精後の胚発生率が向上した。これらの結果から、小胞体ストレスが体外生産胚の発生能低下に深く関与しており、それを制御することで、高品質な胚を生産することが可能であることが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 江頭潤将・建本秀樹・和田康彦・山中賢一	4. 巻 62
2. 論文標題 暑熱ストレスが経腔採卵により採取されたウシ卵丘 - 卵母細胞複合体の品質に及ぼす影響	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本暖地畜産学会報	6. 最初と最後の頁 111-119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11461/jwaras.61.111	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 -
1. 著者名 Ken-ichi Yamanaka, Kyoko Yamashita, Hafiza Khatun, Yasuhiko Wada, Hideki Tatamoto, Miki Sakatani, Naoki Takenouchi, Masashi Takahashi, Shinya Watanabe	4. 巻 89
2. 論文標題 Normal DNA methylation status in sperm from a somatic cell cloned bull and their fertilized embryo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 1406-1414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13086	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 Hafiza Khatun, Junki Egashira, Miki Sakatani, Naoki Takenouchi, Hideki Tatamoto, Yasuhiko Wada, Ken-ichi Yamanaka	4. 巻 85
2. 論文標題 Sericin enhances the developmental competence of heat-stressed bovine embryos	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 696-708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mrd.23038	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 Wataru Iwasaki, Kenichi Yamanaka, Daisuke Sugiyama, Yuki Teshima, Maria Portia Briones-Nagata, Masatoshi Maeki, Kenichi Yamashita, Masashi Takahashi, Masaya Miyazaki	4. 巻 8
2. 論文標題 Simple separation of good quality bovine oocytes by using a microfluidic device	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-32687-6	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 -

1. 著者名 Junki Egashira, Yusuke Ihara, Hafiza Khatun, Yasuhiko Wada, Toshihiro Konno, Hideki Tatemoto, Ken-ichi Yamanak	4. 巻 65
2. 論文標題 Efficient in vitro embryo production using in vivo-matured oocytes from superstimulated Japanese Black cows	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 183-190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2018-155	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 -

1. 著者名 Ken-ichi Yamanaka, Hafiza Khatun, Junki Egashira, AhmedZ Balboula, Hideki Tatemoto, Miki Sakatani, Naoki Takenouchi, Yasuhiko Wada, Masashi Takahashi	4. 巻 114
2. 論文標題 Heat-shock-induced cathepsin B activity during IVF and culture compromises the developmental competence of bovine embryos	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 293-300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.theriogenology.2018.04.005	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 Maria Portia B. Nagata, Kenji Endo, Kazuko Ogata, Kenichi Yamanaka, Junki Egashira, Naoto Katafuchi, Tadayuki Yamanouchi, Hideo Matsuda, Yuki Goto, Miki Sakatani, Takuo Hojo, Hirofumi Nishizono, Kenji Yotsushima, Naoki Takenouchi, Yutaka Hashiyada, Kenichi Yamashita	4. 巻 115
2. 論文標題 Live births from artificial insemination of microfluidic-sorted bovine spermatozoa characterized by trajectories correlated with fertility	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 3087-3096
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1717974115	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 -

1. 著者名 建本秀樹・曳美和・佐渡山祐希・上原みなみ・金野俊洋・山中賢一	4. 巻 60
2. 論文標題 沖縄在来ブタアゲの精液輸送時ならびに精子凍結時におけるトコフェロールとアスコルビン酸の同時処理による凍結融解精子性状の改善効果	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本暖地畜産学会報	6. 最初と最後の頁 111-120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11461/jwaras.60.111	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 -

1. 著者名 Miki Sakatani, Kenichi Yamanaka, Ahmed Zaky Balboula, Masashi Takahishi	4. 巻 88
2. 論文標題 Different thermotolerance in in-vitro-produced embryos derived from different maternal and paternal genetic backgrounds	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 1934-1942
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.12875	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 Masahiro Kaneda, Masashi Takahishi, Ken-ichi Yamanaka, Koji Saito, Masanori Taniguchi, Satoshi Akagi, Shinya Watanabe, Takashi Nagai	4. 巻 63
2. 論文標題 Epigenetic analysis of bovine parthenogenetic embryonic fibroblasts	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 359-363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2017-040	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 -

1. 著者名 Hafiza Khatun, Yasuhiko Wada, Toshihiro Konno, Hideki Tatemoto, Ken-ichi Yamanaka	4. 巻 159
2. 論文標題 Endoplasmic reticulum stress attenuation promotes bovine oocyte maturation in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 361-370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/REP-19-0492	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 -

1. 著者名 Hafiza Khatun, Yusuke Ihara, Kota Takakura, Junki Egashira, Yasuhiko Wada, Toshihiro Konno, Hideki Tatemoto, Ken-ichi Yamanaka	4. 巻 142
2. 論文標題 Role of endoplasmic reticulum stress on developmental competency and cryo-tolerance in bovine embryos	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 131-137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.theriogenology.2019.09.042	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Khatun Hafiza, Yasuhiko Wada, Kenichi Yamanaka
2. 発表標題 Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress Improves Developmental Competency and Cryotolerance of Bovine Blastocysts Produced In Vitro
3. 学会等名 the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies (AAAP (国際学会))
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Junki Egashira, Hideki Tatemoto, Yasuhiko Wada, Ken-ichi Yamanaka
2. 発表標題 Efficient in vitro embryo production system using in vivo-matured oocytes from superstimulated Japanese black cow
3. 学会等名 International Embryo Technology Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井護、山中賢一、江頭潤将
2. 発表標題 ウシ初期胚発生過程におけるオートファジー制御が発生能に及ぼす影響
3. 学会等名 日本畜産学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江頭潤将、曾我康史、和田康彦、山中賢一
2. 発表標題 体内成熟卵母細胞を用いた体外受精胚の発生動態解析
3. 学会等名 日本畜産学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江頭潤将、曾我康史、山口博之、和田康彦、山中賢一
2. 発表標題 黒毛和種におけるOPU由来体内成熟卵子を用いた効率的な体外胚生産系の検討
3. 学会等名 日本暖地畜産学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Khatun Hafiza, Yusuke Ihara, Kota Takakura, Yasuhiko Wada, Kenichi Yamanaka
2. 発表標題 Inhibition of endoplasmic reticulum stress during in vitro maturation improves the developmental competence of bovine COCs
3. 学会等名 International Embryo Technology Society (国際学会)
4. 発表年 2020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