

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580439

研究課題名(和文)牛卵子成熟および胚発生に関わるオートファジー・リソソーム系のストレス応答機構

研究課題名(英文)The role of autophagy-lysosomal pathway on the developmental competence of bovine oocytes and embryo development

研究代表者

高橋 昌志 (TAKAHASHI, MASASHI)

北海道大学・(連合)農学研究科(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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、牛卵子成熟および初期胚発生能に及ぼす細胞質内オートファジー・リソソーム系のストレス応答機構を解明することを目的とした。暑熱負荷によってリソソームとカテプシン(CTS)Bの活性化ならびにアポトーシス経路の活性化がおり、胚発生低下との関連が見られた。これに対して、CTS B阻害剤であるE-64の添加によって、暑熱ストレス下の発生向上効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：This study investigated 1)the relationship between heat shock during in vitro maturation (IVM) of bovine cumulus oocyte complexes (COCs) and cathepsin(CTS) B activity in relation to apoptosis and 2) the effect of supplementation of CTSB inhibitor (E-64) during IVM of heat-shocked COCs on embryonic development were investigated. Heat stress exposure during maturation significantly decreased the cleavage and blastocyst rate as well as increase in lysosome and CTSB activities. Besides, increase of caspase-3 activities in HS-treated oocytes showed significant increase of TUNEL-positive cells in blastocysts. Addition of CTDB inhibitor E-64 to maturation medium significantly increased the developmental rate and total cell number of blastocyst as well as decreasing the activities of lysosome and caspase-3. These results indicate that the regulation of lysosomal CTS by specific inhibitors improve the developmental competence of normal and heat-shocked COCs.

研究分野：家畜繁殖

キーワード：ウシ胚 発生 リソソーム カテプシン

1. 研究開始当初の背景

受精卵移植利用による子畜生産技術は過去 20 数年にわたって人工繁殖技術の中心的な位置を占め、育種改良にも大きく貢献してきた。しかし、依然として新鮮胚移植の受胎率は 50%前後、凍結胚では 40%前後で推移、停滞しており、さらなる受胎率向上に対する技術開発が大いに期待されている。一方、年間 22.5 万頭の雌牛が食肉処理場に出荷され、それらの有する膨大な卵巣内卵子の子畜生産資源としての活用は非常に多い。しかし、体外成熟 - 体外受精 - 体外発生をさせて作成した体外生産胚の移植による受胎率は 40%と低いとともに、凍結保存後の生存性も生体回収胚と比べて低く、これらの要因が体外受精卵移植技術の実用化を妨げている。加えて、夏季の受胎率低下防止対策としての受精卵移植の有効性が期待されていることから、高い凍結保存性や胚移植後の高受胎性が得られる高品質な胚の生産に対する必要性は依然として高い。

近年、マウス初期胚において、細胞内のタンパク質の分解 再利用に関わるオートファジー (自食) 作用機構が解明され、初期胚発生に必須な要因であることが明らかにされた。加えて、牛の低発生卵子の卵丘細胞では細胞質内の蛋白質分解に関わるリソソームが持つシステインプロテアーゼ遺伝子の発現が高いことが報告され、卵子品質とプロテオリシスとの逆相関が提唱された。一方、申請者らは、システインプロテアーゼに属するカテプシン B タンパク質の活性、発現ならびにアポトーシスが高品質胚と比べて低品質卵子で増大することおよび、成熟培養中のカテプシン B 活性阻害によってアポトーシス抑制と胚発生を向上させることを初めて明らかにした。これらの新たな知見から、リソソーム機能と細胞質内タンパク質の分解 再利用に関わる機構が牛胚の発生向上と高品質化に重要である

可能性が提示された。

2. 研究の目的

本研究では、高品質な牛胚生産を目的として、牛卵子成熟および初期胚発生能に及ぼす細胞質内オートファジー・リソソーム系のストレス応答機構を解明することを目的として、以下の実験を実施した。

(1) 酸化、暑熱等のストレス因子が胚リソソームの傷害に及ぼす影響の評価解析と成熟・初期発生への影響

(2) リソソームが関与する蛋白質分解・代謝に関わるオートファジー動態並びに、システイン・アスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシン類のストレス応答とアポトーシス誘導に及ぼす影響

(3) カテプシンおよびオートファゴソーム群の遺伝子発現ならびにタンパク質活性の制御によるストレス負荷下での卵子成熟・胚発生への影響解析

3. 研究の方法

牛卵子及び初期胚の品質 - 発生と細胞内カテプシン B 活性・遺伝子発現との逆相関を明らかにしていることから、卵子成熟、胚発生時の細胞質内リソソーム機能不全によるカテプシン群の不必要時の漏出による細胞内機能への影響という仮説を立て、リソソームへのダメージを可視的に検出する蛍光プローブを用いることで、品質・発生能とリソソーム機能の評価する。加えて、リソソームから漏出する可能性のあるカテプシン B に焦点を当て、卵子・胚の品質とリソソーム損傷ならびに発現動態について解析した。

卵子・初期胚が受けた暑熱によって、酸化ストレスが増大し、胚発生が低下することを既に申請者らは明らかにしているが、これらのストレスを成熟卵子並びに初期胚に負荷させる体外モデルを用いることで、リソソーム損傷への影響についてカテプシ

ンの動態並びにカテプシン群の発現並びにアポトーシスに關与する Caspase-3,-9 の遺伝子発現並びに活性型タンパク質の動態を解析した。

暑熱・酸化ストレスに曝露させた卵子・初期胚の培養液にカテプシン活性阻害剤を添加し、その胚発生、細胞数等の増殖に及ぼす効果ならびにカテプシン・リソソームおよびカスパーゼ活性、に及ぼす影響を解析した。

4. 研究成果

体外成熟培養時の暑熱ストレス負荷によって、体外受精後の分割率ならびに胚盤胞発生率の有意な低下が見られた(図1)。

蛍光活性基質による卵子細胞質内のカテプシンB活性を検出したところ、増加を示す強いスポット出現と有意な増加が見られ、カテプシンBが不活性化状態で収納されているリソソームの活性化と連動した動きが観察された(図2)。加えて、体細胞においてカテプシンシグナル経路によって影響を受けることが報告されているカスパーゼ活性の有意な増加も併せて観察された。卵丘細胞においては、暑熱負荷によってDNA断片化が有意に増加した。

このことから、暑熱ストレスによってリソソームがダメージを受け、それによって漏出したカテプシンの活性化が起こることで、細胞質内の不必要な異化作用につながり、遺伝子発現や発生に影響が出たことが考えられる。加えて、カテプシン-カスパーゼとつながるアポトーシスシグナル経路の活性化も引き起こされていると示唆される。

暑熱ストレスによる発生低下とリソソーム活性の増加は、カテプシン阻害剤であるE-64を成熟培養液に添加することで有意に改善された。その際に、卵子でのカスパーゼ3の発現が抑制されたことに加えて、形成された胚盤胞細胞でのDNA断片化が有意に減少

した。カテプシン阻害剤の添加は、暑熱感作時のカテプシンB蛋白質増加の改善には影響しなかったが、カスパーゼ3発現を低下させた。

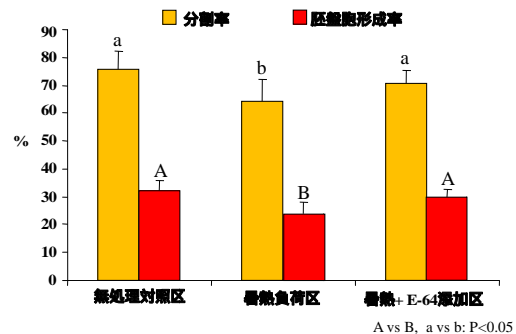


図1 卵子への暑熱負荷による体外受精胚の胚発生への影響

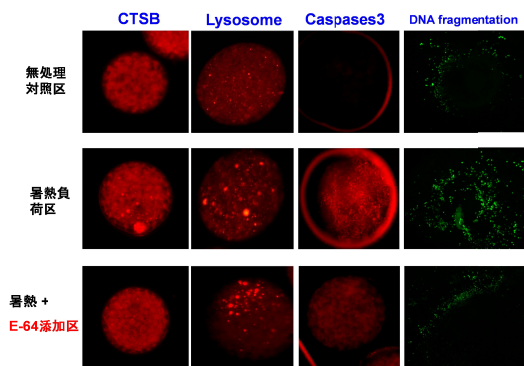


図2 暑熱負荷卵子におけるリソソーム、カテプシン活性およびアポトーシス動態と阻害剤の効果

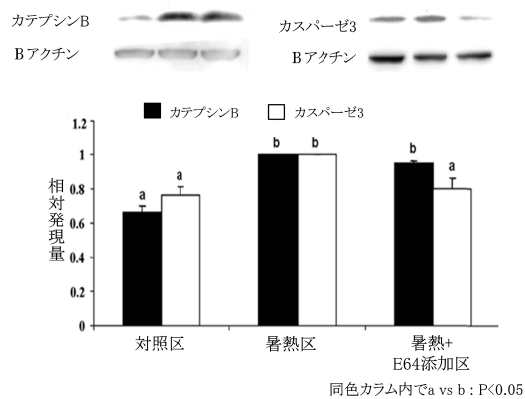


図3 暑熱負荷卵子におけるカテプシン活性およびカスパーゼ3の発現と阻害剤の効果

以上の結果から、暑熱等のストレスを受けた卵子細胞質内では、異化作用に関わるリソソームが生涯を受ける、あるいは膜の透過性が変わるような活性化を受け、その結果漏出したカテプシンによるカスパーゼ依存的アポ

トース誘導が受精後の胚発生を阻害する要因であり、カテプシン B を阻害することで胚発生の回復効果が得られることが明らかとなった。また、天然成分としてのビタミン B6 誘導体の胚発生向上効果が見られたことから、今後、安価かつ効果的な胚の品質向上技術としての活用が期待されるとともに、生体への給与等の手段による生体全体への繁殖ストレス低減技術への展開も期待される。

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 4 件)

Sakatani M, Yamanaka K, Balboula AZ, Takenouchi N, Takahashi M. Heat stress during in vitro fertilization decreases fertilization success by disrupting anti-polyspermy systems of the oocytes. *Mol Reprod Dev*, 82 :36-47, 2015. 査読有

Balboula AZ, Yamanaka K, Sakatani M, Kawahara M, Hegab AO, Zaabel SM, Takahashi M, Cathepsin B activity has a crucial role in the developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes exposed to heat shock during in vitro maturation. *Reproduction*. 146:407-417, 2013. 査読有

Nagatomo H., Kagawa S., Kishi Y., Takuma T., Sada A., Yamanaka KI., Abe Y., Wada Y., Takahashi M, Kono T. and Kawahara M. Transcriptional wiring for establishing cell lineage specification at the blastocyst stage in cattle. *Biology of Reproduction*, DOI 10.1095/biolreprod.113.108993, 2013.

2013 Jun 27;88(6):158.1-10. 査読有

高橋昌志. 家畜の繁殖機能に及ぼす暑熱ストレス. *北畜草会報*. 1:47-54. 2013. 査読無

[学会発表](計 4 件)

Aboelenain M, Kawahara M, Balboula AZ, Montasser AE, Zaabel SM, Okuda K, Takahashi M. The role of autophagy in regression of bovine corpus luteum in relation to lysosomal function, (帯広畜産大学 北海道帯広市、第 107 回日本繁殖生物学会大会、2014.8.21-23).

Takahashi M, The role of autophagy and lysosomal functions on reproductive efficiency in cattle. 4th Hokkaido University-Seoul National University joint meeting(招待講演)、(北海道大学 北海道札幌市、2014.11.28)

佐野 渚、笹山典久、白数昭雄、太田久由、阪谷美樹、長嶋比呂志、川原 学、高橋昌志、中空系によるマウス胚盤胞期胚のガラス化凍結保存、第一回北海道畜産草地学会大会(北海道大学、北海道 札幌市、2012.12.15-16)

高橋昌志、ウシ卵子成熟、初期胚発生、品質にかかわるシステインプロアーゼの作用機構、第 15 回麻布大学 生殖・発生工学セミナー(招待講演)、(麻布大学、神奈川県相模原市、2012.12.17)

[図書](計 1 件)

Masashi Takahashi, *Frontiers of Agricultural Science*, 総ページ 277 Shougakudo, ISBN978-4-87974-685-6(2015)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/anim/breed/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 昌志 (TAKAHASHI, Masashi)
北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：10343964