リソソームシステインプロテアーゼ制御による
牛卵巣の長期保存技術の開発

北海道大学大学院農学研究院畜産科学部門・教授 高橋 昌志

■ 目的

牛の生産効率向上のため使用されている卵巣の広域流通を可能とするために、申請者らによって解明された胚品質低下に関与するリソソームプロテアーゼであるカテプシン(CTS)制御の観点から、1)と畜後の卵巣組織でのタンパク質分解による傷害と卵子発生能とを評価すると共に、2)保存液にCTS阻害剤を添加し、卵巣および卵胞組織への障害軽減化の評価を実施し、3)実際に輸送試験を実施し、長時間保存・輸送後の卵胞卵子の発生能向上を目的とした。

■ 方法

①と場にて採取した牛卵巣を6時間および一晩一般保存条件(20°C)で保存を行い、その後の体外授精に供するサイズの卵胞、卵丘細胞卵子複合体(COCs)および卵巣組織を採取し、カテプシンの酵素活性の評価、固定組織での発現、局在および遺伝子発現動態を検出・評価した。併せて卵胞液を採取し、CTSB, Kの蛍光標識特異基質ペプチドの反応後、消化によって得られる蛍光による酵素活性を蛍光顕微鏡、あるいは蛍光プレートリーダーにて検出、評価した。遺伝子発現については、採取卵子のCTSBに加えて、卵巣組織、卵胞内環境悪化の指標として、アポトーシス関連遺伝子、二本鎖DNA損傷をTUNEL法による評価を行った。②卵巣の保存液にCTSB阻害剤であるE-64を添加し、保存経過後の保存卵巣から採取した卵子を体外成熟、体外受精および体外培養させた際の成熟率、授精後2日目の分割率ならびに培養7日目の胚盤胞形成率と構成総細胞数の計測による発生効果を解析した。さらに、実際に採取卵巣を恒温輸送機を使って宅配輸送を行い、輸送後の発生能に及ぼす効果を検証した。最後に、保存卵子へのオートファジー促進剤と組み合わせたE-64の効果を検討した。

■ 結果および考察

まず、保存卵巣の卵胞液の生化学、組織化学解析を行った結果、保存開始後、8時間でグルコースは90%減少し、24時間後にはほぼ枯渇していた。卵胞組織構造も内壁の顆粒子総細胞層の剥離、浮遊がみられ、そこではDNAの断片化がみられた。卵胞液内のCTSBの活性の増加様の挙動がみられた。これに対するE-64添加による卵巣保存への効果は見られず、逆に変性卵数の増加と胚盤胞発生率の低下が見られた。また、卵胞内の卵丘・顆粒総細胞あるいは、卵子におけるCTSやアポトーシス関連遺伝子発現への改善効果等として、E-64の効果は見られなかった。次に、定温輸送器に入れた卵巣を輸送し、その評価を行った。輸送保存卵巣から採取後の卵子発生能は非常に低く、静置保存と比べても顕著に発生能が低下した。これに対してもE-64の添加保存の改善効果は認められなかった。

これらのことから、輸送により時間の経った卵巣内環境の悪化によるCOCsの品質低下が想定されたが、近年細胞内の不要タンパク質分解、再利用に大きくかわり、発生への関与も知られてきたオートファジーの誘導剤並びにカテプシン活性の阻害剤の混合添加によって保存卵巣内COCsの有意な発生向上が観察された。今後の品質低下卵子等の救済手法としての有効性が期待される。

■ 結語

本研究では、仮説として設定した保存卵巣内のプロテアーゼ阻害による卵子発生能向上を進めてきたが、結果として、保存卵巣中卵胞内環境の悪化への対応としては十分ではなかった。しかし、保存中の卵巣内の詳細な情報が得られたことから、今後の研究の切り口としての深化が期待される。

以上のことから、卵巣組織全体を対象とした保存性向上の方向よりも、採取卵子の成熟、発生能向上としての細胞内プロテアーゼ制御としての活用がより実用的であると考えられた。