

ウシ子宮内膜上皮細胞における暑熱-酸化ストレス応答経路の解析

北海道大学大学院農学研究院・助教 唄 花子

■ 目的

暑熱ストレスは家畜の繁殖性を低下させる。乳牛でも、夏季には受胎率の低下が引き起こされる。今後も温暖化による環境温度の上昇が懸念されており、暑熱ストレス対策は重要課題である。現在までに、母体子宮組織への影響に関する報告は少ない。私たちは現在までに、冷涼な気候である北海道でも夏季にはウシ子宮組織が暑熱ストレスを受けていることを示唆する結果を報告した。また、暑熱ストレスに伴う酸化ストレス増加を示唆するデータも得ている。本研究では、暑熱ストレス負荷が母体子宮に及ぼす影響を調べるため、暑熱負荷により誘導される酸化ストレスに着目し、酸化ストレス関連遺伝子の発現変化および細胞内ストレス応答経路を検証した。

■ 方法

北海道内の食肉加工場より、非妊娠ウシ子宮組織を採取し、子宮内膜上皮細胞を単離・培養した。ウシ子宮内膜上皮細胞を用いて、通常条件(平常時の牛の体温と同じ 38.5°C)および暑熱条件(日最高気温時の牛の体温と同じは 40.5°C)で 12 時間培養した。細胞の形態および増殖性に異常がないことを確認した後、暑熱ストレスおよび酸化ストレス関連遺伝子発現解析を行った。

暑熱負荷培養時の熱応答配列(HSE)および酸化ストレス応答配列(ARE)への影響をレポーターアッセイにより調べた。また、その上流因子である NRF2 の安定化を調べた。

ストレス応答に役割を担う KEAP1 および NRF2 の発現および局在変化を調べるために、遺伝子発現解析および免疫染色を行った。

統計解析には、解析ソフト StatView (Version 5.0, SAS Institute Inc.) を用いて行い危険率が 5% 以下の場合を統計学的に有意であるとみなした。

■ 結果および考察

1. 熱ショック性タンパク質および抗酸化酵素の遺伝子発現変化

子宮内膜上皮細胞において、熱ショック性タンパク質および抗酸化酵素の遺伝子は暑熱負荷 12 時間で発現上昇がみとめられ、暑熱負荷に伴う酸化ストレスの増加が示唆された。

2. 細胞内ストレス応答経路の検証

12 時間の暑熱負荷により、HSE, ARE ともに対照区と比較して暑熱区での活性が有意に高かった。このとき、NRF2 の安定性も、対照区と比較して暑熱区で有意に高かった。

3. 細胞内ストレス応答経路因子の遺伝子発現および局在変化の検証

KEAP1 と NRF2 の遺伝子発現は、暑熱負荷による影響はみとめられなかった。KEAP1 タンパク質の局在は、対照区と暑熱区で同様に細胞質に局在していた。NRF2 は、対照区と比較して暑熱区では核への局在が多くみられた。

これらの結果から、暑熱負荷時には細胞質における KEAP1 と NRF2 の結合が解かれ、NRF2 が核内に移行したと考えられる。暑熱負荷時にみられた抗酸化酵素遺伝子の発現上昇については、核内に移行した NRF2 が ARE を介して作用した結果と考えられる。

■ 結語

本研究により、暑熱ストレス負荷時には、子宮細胞において KEAP1-NRF2 経路によるストレス応答機構が働くことが示唆された。今後は、抗酸化酵素以外の因子についても検証を続け、ストレス応答機構への理解を深めたい。