

ガラス化保存ウシ胚盤胞における

カテプシン B の動態とその阻害が胚生存性に与える影響

生物資源科学専攻 家畜生産生物学講座 遺伝繁殖学 丹羽悠斗

1. はじめに

ガラス化保存は家畜の胚などの遺伝資源を超低温で長期間保存する技術であり、胚の有効利用により家畜の生産効率を向上させることが期待されている。しかし、ガラス化保存による細胞損傷が胚生存性を低下させることが問題になっており、細胞損傷の評価および胚生存性を向上させる方法の開発が求められている。本研究では、ストレスによる誘導、細胞内消化や細胞死に関与することが知られているリソソームプロテアーゼであるカテプシン B (CTSB) に注目し、ウシ胚盤胞におけるガラス化保存後の CTSB の動態と胚生存性の関係性について明らかにすることを目的とした。

2. 方法

食肉処理場由来の牛卵巣から採取した卵丘細胞産子複合体を定法に従って体外成熟、体外受精および体外培養を行い、胚移植に用いられるステージである受精後 7 日の胚盤胞を実験に供試した。

【実験 1】ウシ胚盤胞をガラス化保存し、加温、回復培養 24 時間後の生存胚を回収した。対照区としては、受精後培養時間が同じである新鮮（非ガラス化保存）胚盤胞を用いた。胚盤胞は内側の内部細胞塊 (ICM) と外側の栄養外胚葉 (TE) の異なる細胞系列に分化しているため、ブレードを用いた顕微操作により胚を ICM と TE に切断分離した後に以下の解析に供試した。切断した ICM と TE に対して、蛍光基質を用いた CTSB 活性の検出および定量 PCR による *CTSB* 遺伝子の発現解析を行った。また、培養細胞において CTSB によるアポトーシスの誘導が報告されていることから、アポトーシス関連遺伝子も同時に発現解析を行った。【実験 2】CTSB と胚生存性および胚品質との関係を探るため、CTSB の機能阻害剤 (E-64) がガラス化保存胚盤胞に与える影響を調べた。ガラス化保存後、回復培養培地に E-64 を 0, 0.5, 1.0 μM 添加し、回復培養 24 時間後の胚生存率と 48 時間後の孵化率を計測した。その後、生存胚を回収して総細胞数、ICM 数および TE 数を計測した。

3. 結果と考察

【結果 1】新鮮胚盤胞と比較して、ガラス化保存胚盤胞の TE において、CTSB 活性の有意な上昇と *CTSB* 遺伝子発現の上昇傾向が観察された。同様に、アポトーシス関連遺伝子 (*BAX*, *CASPASE-9*, *CASPASE-3*) の発現もガラス化保存胚盤胞の TE において、有意な上昇あるいは上昇傾向がみられた。これらの結果から、CTSB はウシ胚盤胞の TE 細胞においてガラス化保存による損傷の指標になることが示唆された。また、ガラス化保存による CTSB 発現-アポトーシス誘導経路の発動が示唆された。【結果 2】生存率、孵化率、総細胞数ならびに ICM 数および TE 数ともに E-64 添加による効果はみられなかった。

4. 結論

ウシ胚盤胞において、ガラス化保存による CTSB の活性化とアポトーシス遺伝子の発現誘導は細胞損傷の指標になりうるが、回復培養時の CTSB の機能阻害はガラス化保存胚盤胞の生存性向上への寄与は低いことが明らかになった。今後は阻害剤の特異性や処理開始時の胚発生ステージなどの条件検討が必要である。