

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名                      阪谷 美樹

地球温暖化に伴う夏季の高温環境は家畜における生産性を著しく低下させ、安定的な畜産物生産を妨げる要因になっている。特に受精後の早期胚死滅は発情間隔の延長による空胎期間の延長を引き起こすなど、経済的に与える影響も大きいため、高温条件下の初期胚発生が受ける影響とそのメカニズムを解明することは極めて有意義である。本研究は、夏季における乳用牛の受胎率低下原因を明らかにし、さらにその対策技術を開発していく上での基礎的な知見を得るために受精後の胚に着目し、体外受精胚を用いて高温培養条件が胚の死滅並びに発生停止の機構に及ぼす影響を解明する目的として行われたものである。

### 1. 高温条件が体外受精胚の発生に及ぼす影響

高温環境に曝された胚が発生のどの段階で影響を受けるかを、体外培養胚を用いて検討した。38.5℃で発生培養を行った胚を対照区として高温処理区との比較を行った。その結果、1) 発生培養開始 0, 2, 4, 6 日目 (Day0, 2, 4, 6) のいずれの段階においても 42℃の条件は胚に致死的事であることが明らかとなった。2) 発生培養 (8 日間) を通じて体内条件に近い 40℃で培養した胚の発生率は 11.0%であり、対照区の 37.5%と比較し有意に低く、40℃で培養した胚の多くは 8 細胞期以下で発生が停止していることが明らかとなった。3) 胚発生のステージと高温培養条件の関係を明らかにするために、発生培養開始 0, 2, 4, 6 日目 (Day0, 2, 4, 6) に 41℃ 6 時間の高温処理を行い、その後は 38.5℃にて培養を行った。細胞数測定を行ったところ、Day0, 2 区では胚盤胞発生率が 18.8%、23.6%と対照区 (37.5%) と比較して有意に低く、胚盤胞細胞数 (107.5、118.1) も対照区 (143.2) と比較し有意に低かった。Day4, 6 区の発生率はそれぞれ 40%、38.1%であり、対照区との間に細胞数も含めて差は認められなかった。以上より、高温に対する感受性が高い胚ステージは 8 細胞期胚までであり、それ以降の発生の進んだ胚では生理的な温度範囲であれば、耐暑性を獲得しているこ

とが示唆された。

## 2. 高温培養条件と細胞内酸化還元状態の関係

次に胚発生の各段階における高温処理と酸化ストレスの関係について検討した。発生培養開始0, 2, 4, 6日目 (Day0, 2, 4, 6)に41℃ 6時間の高温処理直後の還元型グルタチオンの測定と酵素リサイクリング法による総グルタチオン量の評価を行った。高温に対する感受性の高いDay0, 2胚は、胚内活性酸素も対照区と比較し有意に高いことが示された。以上のことから、胚の発生障害が生じるステージと活性酸素が増加するステージが一致したことから、初期胚における高温処理による発生阻害は、活性酸素類に由来する酸化ストレスによるものである可能性が示唆された。

## 3. 還元物質の添加による高温処理下での酸化ストレス、胚発生能の改善効果

高温条件下の初期胚発生阻害が酸化ストレスに起因することを明らかにするために、抗酸化物質(アントシアニンおよびβ-メルカプトエタノール)を培養液に添加し胚の高温処理後の胚発生を検討した。その結果、これらの抗酸化物質の投与により細胞内活性酸素発現が抑制され、高温処理後の胚盤胞発生率が改善したことから、高温処理に伴う胚の障害は活性酸素類の増加に起因する酸化ストレスが原因であることが明らかとなった。

## 4. 高温処理が体外培養胚の抗酸化遺伝子およびタンパク質発現に与える影響

高温負荷により胚での活性酸素が増加する要因を検討するために、ストレスタンパク質(HSP70)並びに抗酸化遺伝子発現とタンパク質発現を調べた。HSP70は、遺伝子発現並びに高温処理終了後18時間でのタンパク質発現が対照区と比較し有意に増加した。しかしながら、高温処理終了後3時間のタンパク質発現は増加していないことから、高温に対する胚のタンパク質発現応答に一定の時間を要することが明らかとなった。一方、抗酸化関連酵素であるCuZn-SOD並びにCatalaseに関しては高温処理後の遺伝子発現に増加傾向が認められたものの、タンパク質の発現量には3, 18時間後どちらにおいても対照区との差は認められなかった。これらの結果は、高温処理を受けた胚では抗酸化関連酵素の絶対量が少ない可能性を示唆している。すなわち、高温により障害を受けたタンパク質を修復する機能は有しているものの、不十分な抗酸化機能によって、活性酸素の除去が正常に行われず、残存した活性酸素がDNA損傷をもたらし、胚発生が阻害される可能性が示唆された。

以上を要するに、本研究は、乳牛の体外受精胚の高温ストレスによる発生障害の機序を解明したものであり、地球温暖化に伴う家畜の受胎性低下を予防し、引いては家畜生産性向上と食料資源確保に向けた技術の向上を高める上できわめて有益な知見を提供するものであり、学術上、応用上寄与する面が少なくない。よって審査委員一同は本論文が学位(獣医学)を授与するにふさわしいものと認めた。