

高温培養環境が牛培養卵丘細胞の活性酸素産生ならびに
抗酸化関連酵素の発現に及ぼす影響

阪谷美樹・山中賢一・Ahmed Z Balboula・高橋昌志
(九州沖縄農研)

【目的】夏季高温環境下において牛の繁殖性は大きな影響を受けており、卵巣組織も高温環境下では強い高温ストレスに曝されていると考えられている。卵子は熱に対する感受性が高いと考えられているが、生体内で卵子の周りを覆っている卵丘細胞は、抗酸化物質やキレート剤の分泌また胚の発生促進因子を分泌することによって胚の保護及び発生の支持を行っていると考えられる。そこで、本研究では卵丘細胞の高温耐性と活性酸素除去機構を評価することを目的とし、培養卵丘細胞を用いて検討を行った。

【材料および方法】卵子を回収した後のと場由来卵胞液から卵丘細胞を回収した。0.83 % (w/v) 塩化アンモニウム加トリス緩衝液にて赤血球を取り除いた後、DMEM 溶液で洗浄を行い、培養皿に播種した。一度、コンフルエントに達したものを0.05%トリプシン (Gibco) 加 EDTA 溶液にて分散させ、5%胎子血清加 DMEM にて洗浄した後、4 ウェルディッシュに1万個/ウェルで播種した。50%コンフルエントに達した細胞を実験に供した。高温処理区は 41°C 24 時間の培養を行い、一方で 38°C 24 時間培養した細胞を対照区とした。高温処理終了後、総 RNA を抽出し cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法によって抗酸化関連遺伝子 *HSP70*, *SOD*, *Catalase*, *Glutathione Peroxidase (GPx)* の発現を検出し、内部標準 *Histone H2a* に対する発現量として数値化し比較を行った。タンパク質発現は処理終了後にウェスタンブロッティング法にて *HSP70*, *SOD*, *Catalase* のバンドを検出し、内部標準タンパク質 β -Actin に対する発現量として数値化し、対照区との比較を行った。それぞれの結果について共分散分析法を用いて統計処理を行い、 $P < 0.05$ 以下を有意な差であると判定した。

【結果および考察】高温処理により卵丘細胞にお

ける *HSP70*, *SOD*, *Catalase* の遺伝子発現は対照区と比較し有意に増加し、*GPx* は増加傾向を示し、高温処理によって抗酸化関連遺伝子の発現が誘導されることが明らかとなった。一方、タンパク質の発現に関しても *HSP70*, *SOD*, *Catalase* のタンパク質発現は高温処理によって有意に増加した。高温処理によって誘導された遺伝子は速やかにタンパク質の合成を誘導していることが示唆された。以前に報告されているように卵丘細胞では高温処理によって細胞内の活性酸素の有意な増加が認められているが、今回の結果はこれらの増加した活性酸素除去機構が強く誘導されることによって、抗酸化に関与するタンパク質及び酵素が増加したことを示唆している。すなわち、培養卵丘細胞は高温培養環境に曝されても十分な抗酸化酵素を誘導することによって卵子を高温ストレスから保護している可能性が示唆された。

表 高温処理が卵丘細胞の抗酸化関連遺伝子の発現に及ぼす影響

	対照区	高温処理区
HSP70	1.00	5.38 ± 0.68 *
SOD	1.00	1.64 ± 0.22 #
Catalase	1.00	2.20 ± 0.52 #
GPx	1.00	1.81 ± 0.36 †

対照区を 1 とした場合の相対発現度で表示。

対照区と比較し*: $P < 0.001$, #: $P < 0.05$, †: $P < 0.1$ 。