

学 位 論 文 要 旨

氏名 NGUYEN VAN THANH

題 目 : Study of the effects of chlorogenic acid supplementation during in vitro maturation on the developmental competence of porcine oocytes
(ブタ卵母細胞の発生能力に及ぼす体外成熟中のクロロゲン酸添加の影響に関する研究)

論文要旨 :

Improving the quality of in vitro derived porcine embryos and maintaining their in vivo development after transfer is crucial in both scientific and commercial points of view. Oxidative stress is a certain threat to porcine oocytes and in vitro derived embryos since these cells are removed from their natural habitats, leading to the lack of maternal antioxidant factors. The present studies were conducted to investigate antioxidant effects, anti-heat stress effects of chlorogenic acid (CGA) during in vitro maturation (IVM) on the developmental competence of porcine in vitro derived embryos with/without electro-stimulation treatment.

The first study was aimed to investigate the effects of CGA supplementation during IVM on in vitro development of porcine oocytes in order to improve the porcine in vitro production (IVP) system. Oocytes were matured either without (control) or with CGA (10, 50, 100 and 200 μ M). Subsequently, the matured oocytes were fertilized with capacitated sperm, and the presumptive zygotes were subsequently cultured in vitro for 7 day. The rates of maturation, fertilization and blastocyst formation of oocytes matured with 50 μ M CGA were significantly ($p < 0.05$) higher than those of the control oocytes. Hydrogen peroxide (H_2O_2) is one of the reactive oxygen species, and this chemical induces DNA damage to porcine oocytes. When oocytes were matured in IVM medium added with 1 mM H_2O_2 to assess the protective effect of CGA, 50 μ M CGA supplementation improved the maturation rate and the proportion of DNA-fragmented nuclei in oocytes compared with control oocytes matured without CGA. Moreover, when oocytes were matured with either 50 μ M CGA (control) or caffeic acid (10, 50 and 100 μ M), the rates of maturation, fertilization and the blastocyst formation of oocytes matured with 50 μ M CGA were similar to those of oocytes matured with 10 and 50 μ M caffeic acid. Our results suggest that CGA has comparable effects to caffeic acid, and IVM with 50 μ M CGA is particularly beneficial to IVP of porcine embryos and protects oocytes from DNA damage induced by oxidative stress. Therefore, supplementation of CGA to the maturation medium has a potential to improve porcine IVP system.

In the second study, we investigated the effects of CGA on porcine oocyte

maturation under heat stress and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation. For IVM at 41.0°C (hyperthermic condition), supplementation of the maturation medium with 50 µM CGA significantly improved the percentage of matured oocytes and reduced the rate of apoptosis relative to oocytes matured without CGA ($p < 0.05$). CGA treatment of oocytes during IVM under hyperthermia tended to increase ($p < 0.1$) percentage of blastocyst formation after parthenogenesis and significantly increased ($p < 0.05$) the total cell number per blastocyst relative to oocytes matured without CGA. For IVM at 38.5°C (isothermic condition), CGA significantly improved the rate of blastocyst development compared with oocytes matured without CGA ($p < 0.05$), but did not affect oocyte maturation, apoptosis rate or the number of cells per embryo. Omission of all antioxidants from the IVM medium significantly reduced the rate of oocyte maturation, but the rate was restored upon addition of CGA. These results demonstrate that CGA is a potent antioxidant that protects porcine oocytes from the negative effects of heat stress, thus reducing the frequency of apoptosis and improving the quality of embryos.

Electroporation is a method of choice to introduce an exogenous gene into embryos for transgenic animal production. Although this method is considered practical and effective, embryonic damage caused by electro-stimulation treatment remains a major problem. Thus, another study was conducted to evaluate the optimal culture system for electro-stimulation treated porcine embryos by supplementation of chlorogenic acid (CGA) during IVM. The oocytes were treated with various concentrations of CGA (0, 10, 50, and 100 µM) through the duration of maturation for 44 h. The treated oocytes were then fertilized, electro-stimulated at 30 V/mm with five 1 msec unipolar pulses, and subsequently cultured in vitro until development into the blastocyst stage. Without electro-stimulation, the treatment with 50 µM CGA had useful effects on the maturation rate of oocytes, the total cell number, and the apoptotic nucleus indices of blastocysts. When the oocytes were electro-stimulated after in vitro fertilization, the treatment with 50 µM CGA supplementation significantly improved the rate of oocytes that developed into blastocysts, but reduced the apoptotic nucleus indices (4.7% and 7.6%, respectively) compared with those of the untreated group (1.4% and 13.0%, respectively). These results suggested that supplementation with 50 µM CGA during maturation improves porcine embryonic development and quality of electro-stimulation treated embryos.

Compared with other mammal counterpart, IVP system in pigs is less effective. However, our results indicated that the supplementation of 50 µM CGA during IVM has beneficial effects on embryonic development and quality of porcine embryos with or without electro-stimulation treatment. Moreover, the presence of CGA during oocyte maturation under heat stress effectively protects porcine oocytes from apoptosis and improved its developmental ability after parthenogenesis activation.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Nguyen Van Thanh
審 査 委 員	主 査：農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 ユニット長 菊地 和弘
	副 査：山口大学 教 授 佐藤 晃一
	副 査：山口大学 教 授 西垣 一男
	副 査：鹿児島大学 教 授 窪田 力
	副 査：山口大学 准教授 谷口 雅康
題 目	Study of the effects of chlorogenic acid supplementation during <i>in vitro</i> maturation on the developmental competence of porcine oocytes (ブタ卵母細胞の発生能力に及ぼす体外成熟中のクロロゲン酸添加の影響に関する研究)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>体外 (<i>in vitro</i>) 由来のブタ胚の品質を改善し、移植後も体内 (<i>in vivo</i>) での発生を担保することは、科学的小および産業の観点から重要である。酸化ストレスは、ブタの卵母細胞および体外由来の胚の品質を低下させることが知られている。申請者はこれらの問題解決のために、新規の抗酸化剤であるクロロゲン酸 (CGA) のブタの体外生産に及ぼす効果について検討した。</p> <p>第 1 章では、ブタの体外生産 (IVP) システムを改善するために、ブタ卵母細胞の体外発生に対する IVM 中の CGA 添加の影響について検討した。卵母細胞は、CGA なし (対照区) ならびに CGA あり (10、50、100、200 μM) で成熟培養を行い、その後、成熟した卵母細胞に受精能を獲得した精子を体外受精させ、ひきつづきそれらを <i>in vitro</i> で 7 日間培養した。50 μM CGA で成熟した卵母細胞の成熟、受精および胚盤胞形成の割合は、対照卵母細胞の割合よりも有意に高かった ($p < 0.05$)。過酸化水素 (H_2O_2) は活性酸素種の 1 つであり、この化学物質はブタ卵母細胞に DNA 損傷を誘発することが報告されている。CGA の保護効果を評価するために 1 mM H_2O_2 を添加した体外成熟培地で卵母細胞を成熟させた場合、CGA なしで成熟した対照区の卵母細胞と比較して、50 μM CGA 添加により卵母細胞の成熟率が上昇し核の DNA 断片化の割合が低下しその効果が認められた。さらに、卵母細胞が 50 μM CGA (対照区) または一般的な抗酸化剤の一つであるカフェ酸 (10、50 および 100 μM) のいずれかで成熟した場合、50 μM CGA で成熟した卵母細胞の成熟、受精および胚盤胞への発生状況は、カフェ酸 10 および 50 μM と同様であった。すなわち CGA はカフェ酸と同等の効果があり、50 μM CGA を含む体外成熟はブタ胚の IVP に特に有益であり、</p>	

酸化ストレスによって誘発される DNA 損傷から卵母細胞を保護することが示唆された。

第 2 章では、熱ストレス下でのブタ卵母細胞の成熟と単為発生誘起後の胚発生に対する CGA の影響を検討した。熱ストレス下では酸化ストレスが誘起されることが知られている。41.0°C の体外成熟 (高温条件) の場合、成熟培地に 50 μ M CGA を追加すると、成熟した卵母細胞の割合が有意に向上し、CGA なしで成熟した卵母細胞と比較してアポトーシス率が低下した ($p < 0.05$)。高体温下の IVM 中の卵母細胞の CGA 添加は、単為生殖後の胚盤胞形成の割合を増加 ($p < 0.1$) する傾向があり、CGA なしで成熟した卵母細胞に比べて胚盤胞あたりの総細胞数を大幅に増加 ($p < 0.05$) した。38.5°C (等温条件) の体外成熟の場合、CGA は CGA なしで成熟した卵母細胞 ($p < 0.05$) と比較して胚盤胞の発生率を大幅に改善しましたが、卵母細胞の成熟、アポトーシス率、または胚あたりの細胞数には影響しなかった。体外成熟培地からすべての抗酸化物質を省略すると、卵母細胞の成熟率が大幅に低下したが、CGA の添加により回復した。これらの結果は、CGA がブタ卵母細胞を熱ストレスの悪影響から保護する効果的な抗酸化剤であり、アポトーシスの頻度を減らし、胚の品質を改善することを示唆している。

第 3 章では、CGA を応用技術に適用することを検討した。エレクトロポレーションは、トランスジェニック動物の生産のために外因性遺伝子を胚に導入するための選択方法である。その際に、電気刺激を行う必要があるが、胚への影響があると報告されている。したがって、体外成熟培養中に CGA を補充することにより、電気刺激処理したブタ胚の体外発生について検討を行った。卵母細胞を、44 時間の成熟期間を通して、さまざまな濃度の CGA (0、10、50、および 100 μ M) で処理し、次いで、その卵母細胞を体外受精させ、電気刺激 (1 msec、30 V/mm の DC パルスを 5 回) を加え、続いて胚盤胞期まで体外で培養した。電気刺激なしでは、50 μ M CGA での処理は、卵母細胞の成熟率、総細胞数、および胚盤胞のアポトーシス核指数に効果が認められた。卵母細胞が体外受精後に電気刺激された場合、50 μ M CGA 添加による処理は、胚盤胞に発達した卵母細胞の割合を大幅に改善しましたが、アポトーシス核指数 (それぞれ 4.7% および 7.6%) を減少させました未治療群 (それぞれ 1.4% および 13.0%)。これらの結果より、体外成熟培養中に 50 μ M CGA を補充すると、ブタの胚発生と電気刺激処理胚の品質が向上することが報告された。

本研究により、本研究から CGA がブタの体外胚発生に大きく貢献することが明らかとなった。また、遺伝子改変のみならずゲノム編集豚の作製に貢献すること、さらにベトナムの在来豚の保全にも有益となりうる重要な知見であることが報告された。

以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位を授与するにふさわしいと判断された。