



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on the effect of <i>Asparagus officinalis</i> stem extract on the induction of molecular chaperone and cellular function of bovine granulosa cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	HO, Khoi Thieu
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14819号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/85525">https://hdl.handle.net/2115/85525</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Ho_Khoi_Thieu_review.pdf, 審査の要旨



## 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (農学)	氏名	Ho Khoi Thieu
審査担当者	主査	教授	小林泰男
	副査	教授	西邑隆徳
	副査	教授	高橋昌志(国際食資源学院)
	副査	准教授	川原 学
	副査	助教	唄 花子

### 学位論文題名

Study on the effect of *Asparagus officinalis* stem extract on the induction of molecular chaperone and cellular function of bovine granulosa cells (牛顆粒膜細胞への分子シャペロン誘導と細胞機能発現に及ぼすアスパラガス茎抽出物の作用)

本論文は英文 135 頁, 図 30, 表 1, 6 章からなり, 参考論文 1 編が付されている。

近年の気温上昇は、夏季の高温を引き起こし、卵子成長阻害、ホルモン分泌低下など、家畜の繁殖性低下要因として深刻な問題であり、その対策が求められている。暑熱ストレス(Heat Stress: HS)に起因する影響の一つとして、細胞内の活性酸素の増加による障害が注目されている。HS により誘導される熱ショックタンパク質(HSP)は分子シャペロンとして、変性を受けた機能不全タンパクの構造、機能への防御作用が知られるが、他方で HS による活性酸素産(ROS)生増加による悪影響も起こる。そのため、酸化ストレスを増加させずに HS 非依存的な HSP 誘導-ストレス応答性付加による細胞機能強化が有効であり、因子の探索と生殖機能への評価の必要がある。近年、アスパラガスの不可食部である茎からの酵素分解抽出物(EAS)が HS 非依存的な HSP70 誘導作用がすることが明らかになり、シャペロン機能強化によるヒトの健康向上への有効性の検証が進められている。しかし、家畜生産、特に繁殖機能にかかわる生殖細胞への EAS の効果ならびに機能発現への影響に関する研究は国内外において皆無である。

そこで、本研究では、EAS による HSP 誘導の可否ならびに、ストレス耐性の付与が卵子発育や卵巣機能に深く関わるウシ顆粒層細胞(granulosa cell: GC)に及ぼす作用を明らかにするとともに、ストレス耐性獲得による細胞機能強化を図ることを目的とした。

### 1)ウシ顆粒膜細胞の HSP70 誘導、細胞内酸化還元バランスおよび細胞機能に対する EAS の影響

まず、最初の研究として、非 HS および HS 条件下における HSP70 の特異的誘導および細胞内酸化還元状態に対する EAS の影響を検討した。EAS 添加により、非 HS 条件下で HSP70 遺伝子発現が増加した。一方、HSP27 と HSP90 は影響を受けなかった。HSP70 タンパク質も同様に EAS 添加によって非 HS および HS 条件下共に増加した。さらに、EAS 添加により、非 HS および HS 条件下でグルタチオン (GSH) 合成が増加し、ROS 発生および DNA 損傷が減少した。HS 条件下でも HSP70 と熱ショック因子 (HSF) 1、nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2)、Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) ならびに抗酸化酵素関連遺伝子群の発

現相が相乗的に増加した。一方、HSP70 活性の阻害により EAS 存在下でも HSF1 の減少、ROS の増加と GSH が減少した。本結果から、EAS はウシ GC に対して、HS 非依存的な HSP70 の特異的誘導効果を持つとともに HSP70 を介した酸化還元バランスの改善作用を有することが明らかになった。加えて、HS による相乗的な発現促進と酸化還元環境改善作用が初めて明らかになった。

### 2) ウシ顆粒膜細胞におけるステロイド生成に及ぼす EAS の影響

プロゲステロン (P4) は、哺乳動物の生殖において卵巣機能に重要な役割を担うステロイドホルモンであるが、夏季の HS は、排卵後に卵巣に形成される黄体 (CL) での P4 合成を低下させる。そこで、GC における非 HS および HS 条件下での P4 合成に及ぼす EAS の効果を検証した。HS によって P4 合成、steroidogenic acute regulatory protein (STAR)、 $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase ( $3\beta$ -HSD) およびミトコンドリア膜活性の発現が低下した。一方、EAS 添加により、非 HS、HS 条件下共に STAR、 $3\beta$ -HSD、ミトコンドリア膜活性ならびに脂肪小滴の発現が増加し、P4 産生が増加した。EAS と HS の併用により、非 HS 条件下での EAS 処理と比べて P4 産生が劇的に増加した。HSP70 活性の阻害により、EAS による P4 合成、ミトコンドリア活性、脂肪小滴が減少した。これらの結果から、EAS による P4 合成の増加は、STAR および  $3\beta$ -HSD 経路の活性化、および HSP70 による酸化還元バランスとシャペロン機能によるミトコンドリアと脂質の代謝改善を介することが示唆された。

### 3) ウシ顆粒膜細胞の凍結保存後の生存率に及ぼす EAS の影響

細胞の長期保存手法としての凍結は安定的な機能解析や様々な機能解析に有効な手段であるが、凍結前の細胞へのストレスによる凍結保存後の生存性低下が知られ、それに係る要因と生存性向上は重要である。そこで、培養ウシ GC の解凍後生存率に及ぼす EAS の影響を HS 処理との酸化還元バランスとの関連で解析した。凍結前の HS 処理により、保存解凍後の生存率ならびに細胞膜損傷の低下と細胞内 ROS の増加がみられたが、EAS 前処理後に凍結保存した HS 処理 CG では、融解後の生存率が向上したと共に ROS の低下と GSH の増加がみられた。また、HS 処理 CG においてみられた HSP70 の核内局在は、EAS の存在によって核、細胞質ともに HSP70 タンパク質が増加した。これらの結果から、HS にさらされた GC は、EAS 前処理によって分子シャペロンと酸化還元状態が向上し、凍結保存期間ならびに融解後の細胞内環境の維持向上が継続することで、解凍後の生存率が向上したことが示唆された。

全体として、EAS は細胞内の酸化還元状態を調節することにより、ウシ GC の細胞機能に有益な影響を及ぼすことが示唆された。さらに、HSP70 産生に対する EAS と HS の相乗効果は、P4 合成および細胞生存能力の向上に寄与することが示唆された。

よって審査員一同は、Ho Khoi Thieu 氏が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。