

氏 名	木 村 康 二
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2581 号
学位授与の日付	平 成 17 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	ウシ胚における妊娠認識物質の性に依存した分泌動態に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教授 今 井 裕 教授 久 米 新 一 教授 廣 岡 博 之

論 文 内 容 の 要 旨

ウシインターフェロントウ (IFN- τ) は、胚を構成する栄養膜細胞より分泌されるタンパク質で、子宮からの PGF $_{2\alpha}$ の分泌に影響し、黄体を維持させ、母体に妊娠を認識させるシグナルである。IFN- τ は偶蹄目反芻動物に共通して発見されているが、近年アカジカにおいて、このシグナル分泌が胚の性により影響を受ける可能性が示唆されている。本論文は、ウシ雌雄胚における IFN- τ の分泌量を測定することにより、その性による分泌動態を検討し、その発現メカニズムについて論じたものである。その主な内容は、以下の通りである。

第 1 章では、IFN- τ の生体内での役割およびその作用機構について概説し、本研究の目的および意義について述べている。

第 2 章では、体外受精由来ウシ胚盤胞期胚の性が IFN- τ 分泌におよぼす影響について述べている。体外成熟・体外受精・体外培養によって得られた 8 細胞期胚を TCM 199 培地を用いて BRL 細胞と共培養し、胚盤胞期まで発生した個々の胚について、IFN- τ 分泌量と性との関連について検討した。その結果、雌胚は雄胚に比べて有意に多くの IFN- τ を分泌していることが明らかとなった。また、この培養系においては胚盤胞の性比は雄に偏っており、培養系そのものが IFN- τ 分泌に影響を与えている可能性が示唆された。そこで、グルコース代謝量が雌雄胚で異なることに注目し、グルコースの培養液への添加・非添加が胚の性比に及ぼす影響について検討した。桑実期胚までは、グルコースの存在にかかわらず性比は 1 : 1 であったが、胚盤胞期胚においてはグルコース添加区で有意に性比が雄にかたよることを示した。次に、グルコース添加 (雄比が増える)・非添加 (性比は 1 : 1) 条件下で作出した胚盤胞期胚の IFN- τ 分泌の性差について検討した。グルコースの添加・非添加にかかわらず、雌胚は雄胚より有意に多くの IFN- τ を分泌しており、胚の性比のかたよりとは無関係に、体外由来雌胚は雄胚よりも多くの IFN- τ を分泌することが明らかとなった。

第 3 章では、ウシ体内由来胚盤胞期胚の性が IFN- τ 生産に及ぼす影響について述べている。体内由来胚における IFN- τ 分泌が体外胚と同様に性に依存しているか否かを検討するため、体内由来 9 日齢胚および 14 日齢胚を回収し、個々の胚の IFN- τ 分泌量と性について検討した。9 日齢胚では体外由来胚同様、雌胚は雄胚に比べて多くの IFN- τ を分泌しており、体外環境が性に依存した IFN- τ の分泌動態の原因ではないことが示された。さらに、14 日齢胚ではこの性差はみられず、胚の発育にともなってこの現象が消失することが示された。

第 4 章では、ペントース・リン酸代謝系酵素抑制剤および酸化ストレスがウシ胚における IFN- τ 分泌の雌雄差に及ぼす影響について検討している。第 3 章で見られた胚の発育過程における IFN- τ の性に依存した分泌の消長は、雌胚における片側の X 染色体が不活化する時期と一致した。そこで、グルコースのペントース・リン酸代謝系への流入に重要な役割をもち、遺伝子が X 染色体上に存在するグルコース 6 リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD) について、その酵素阻害剤が IFN- τ 分泌に与える影響を検討した。G6PD 阻害剤として知られる、ジヒドロエピアンドロステロン (DHEA) または 6 アミノニコチンアミド (6-AN) を添加した培養液で胚盤胞期胚を作出し、各胚の性と IFN- τ 分泌量を比較した。両阻害剤の添加は IFN- τ 分泌の低下を引き起こし、さらに、その影響は雄胚よりも雌胚で大きく、その結果 IFN- τ 分泌の性による差は消

失した。また、G6PDは細胞内の酸化還元状態を左右するNADPHを生成する。そこで、酸化ストレスがIFN- τ 分泌に与える影響を調べるために、培養液への過酸化水素添加または高酸素分圧（20%）条件下で、胚のIFN- τ 分泌量と性差の関係について検討した。その結果、酸化ストレス存在下では、胚盤胞への発生は有意に抑制されたが、IFN- τ 分泌は影響を受けなかった。また、酸化ストレス存在下においても雌雄における分泌差も消失せず、G6PD阻害剤のIFN- τ 分泌作用におよぼす効果は細胞内酸化還元状態の変化によるものではないことが明らかとなった。

最後に、第5章では、本研究によって明らかとされた点および結果がまとめられている。

論文審査の結果の要旨

ウシ胚盤胞期胚の栄養膜細胞より分泌されるインターフェロントウ（IFN- τ ）は、胚の存在を母体に知らせ、卵巣の黄体機能を維持させ、妊娠を継続する機能をもつとされる。IFN- τ はウシを含めた偶蹄目反芻家畜に共通に見られる妊娠認識物質であるが、近年アカジカにおいてIFN- τ が性に依存した分泌量の差を示すことが報告されている。このことは、反芻家畜における子畜の生産性や性差に影響を及ぼす可能性があり、家畜生産上無視できない現象といえる。そこで、本論文では、ウシ胚のIFN- τ の性に依存した分泌動態について検討するとともに、その発現メカニズムの解明をめざしたものであり、得られた主な成果は以下のようにまとめることができる。

1. 体外受精に由来するウシ胚盤胞期胚の雄および雌胚について、IFN- τ の分泌量を検討したところ、雌胚は雄胚に比べて有意に多量のIFN- τ を分泌していることを明らかにした。
2. 体外受精卵の体外培養系における雌雄胚の性比は雄に偏っていることから、培養系の何らかの要因が胚の性比やIFN- τ 分泌量に影響を及ぼしている可能性について検討した。グルコース代謝量が胚の性によって異なることに注目し、培養系へのグルコースの添加の有無が胚の性比やIFN- τ 分泌量に及ぼす影響について検討した結果、グルコースの有無に関わらず、雌胚は雄胚より多量にIFN- τ を分泌することを明らかにした。
3. 体内で受精したウシ胚（人工授精後9日齢胚および14日齢胚）について、雌雄胚におけるIFN- τ の分泌量を比較した。9日齢胚では、体外受精胚と同様、雌胚でより多くのIFN- τ 分泌が観察されたが、14日齢胚では性に依存した分泌量の差は消失していた。このことから、IFN- τ の分泌の性差は、体外・体内を問わず見られる現象であると同時に、雌雄差が消失する時期がX染色体の不活性化時期と一致することから、IFN- τ 分泌にはX染色体とリンクする遺伝子が関与している可能性が示唆された。
4. X染色体上にあつて、グルコースのペントースリン酸代謝系への流入に重要な役割を果たしているグルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ（G6PD）について、その酵素阻害剤（ジヒドロエピアンドロステロンおよび6アミノニコチンアミド）のIFN- τ 分泌の性差に及ぼす影響について検討した。その結果、培養系への両阻害剤の添加はIFN- τ 分泌の低下をもたらすと同時に、その作用は雄胚より雌胚で大きく、最終的にはIFN- τ 分泌の性差は消失した。このことから、IFN- τ 分泌の性差は、X染色体上に存在する代謝関連遺伝子によってもたらされていることを明らかにした。
5. G6PDはNADPHの生成に関与し、細胞内の酸化還元状態に影響を及ぼす。そこで、胚への酸化ストレスの付与がIFN- τ 分泌に及ぼす影響について検討した。過酸化水素の添加および高酸素分圧（20%）下での胚の培養によって胚発生は抑制されたが、IFN- τ 分泌には影響が認められなかった。このことから、G6PDH阻害剤のIFN- τ 分泌への抑制効果は、細胞内の酸化還元状態の変化によるものではないことを明らかにした。

以上のように、本論文は、家畜生産上極めて重要である妊娠シグナル分子IFN- τ の性に依存した分泌動態の原因解明と、IFN- τ 分泌のメカニズムを解明したものであり、家畜繁殖学、家畜内分泌学、動物生理学および生殖生物学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、平成17年10月20日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。