

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 金 民洙

この20年、ウシの繁殖性（妊娠率）は低下し続けている。妊娠率の低下の要因は早期胚死滅によるとされ、妊娠成立期の遺伝子発現などの解明やその有効利用の開発が待たれている。インターフェロン・タウ（IFNT）は反芻動物の胚・栄養膜（トロホブラスト）細胞から分泌され、その黄体退行抑制作用から母親の妊娠認識物質と知られている。しかしながら、この遺伝子の発現制御機構など、まだまだ不明な点が多くその解明が待たれている。そこでもし、この遺伝子の発現制御機構や生物活性を明らかにすることができれば、その人為的な調節が可能になり、ウシの妊娠率の向上に貢献できる。

第1章：初期胚の成長過程において、先ず2種の細胞（内部細胞塊とトロホブラスト「栄養膜」細胞）が現れ、胚盤胞を形成する。この時、内部細胞塊では転写因子 OCT3/4 が、トロホブラスト細胞では転写因子 CDX2 が発現しているが、ウシのトロホブラスト細胞では CDX2 だけではなく OCT3/4 の両者が発現していることが分かっている。そこで先ず、これらの転写因子が IFNT 遺伝子の転写活性にどのように影響するのかを検証した。

いままで IFNT 遺伝子上流域に結合する転写因子として CDX2、ETS2、JUN や CREBBP が明らかになっていた。そこで先ず、OCT3/4 の発現ベクターを作製し、IFNT 遺伝子の転写活性に OCT3/4 がどのように影響するか、OCT3/4 の発現濃度や添加のタイミングをルシフェラーゼ法で検証した。次に、CDX2 との関連性を調べるために CDX2 や OCT4 単一の強制発現における IFNT 遺伝子の転写活性を検証した。OCT3/4 は CDX2 単一の IFNT 遺伝子の発現亢進を抑制したが、CDX2、ETS2 や JUN の組み合わせでは OCT3/4 の抑制能は消失した。また、OCT3/4 の添加を遅らせても、OCT3/4 の抑制能は消失した。さらに、ETS2、JUN や CREBBP が IFNT 上流域上で複合体を形成することが必要であることも証明した。

第2章：当研究室では、ウシ胚の着床期における IFNT 遺伝子転写産物が次世代シーケンサーにより検証されていた。それによると、10 種以上の IFNT 遺伝子が存在するにもかかわらず、たった2種類の IFNT（IFNT1 および IFNTc1）遺伝子のみが妊娠子宮内で発現していることが分かった。

そこで、2つの IFNT 遺伝子の発現制御機構に違いがあるかどうかを第2章で検証した。妊娠17日の胚・トロホブラストでは IFNT1 mRNA がもっとも多く、妊娠が進行する20日、22日では発現が低下していた。一方、IFNTc1 mRNA は妊娠20日に最も発現が高かった。

次に、この発現の違いを遺伝子上流域領域の差異、または転写因子結合の差異と考え、両者の遺伝子上流域の核酸配列と各種転写因子の結合能を強制発現法で検証した。以前より、上流域-637 ベースのルシフェラーゼ・コンストラクトは作製されていた。それに加え、

両遺伝子上流域-1000 ベースを含むコンストラクトを作製した。さらに、上流域の欠損コンストラクト (Deletion constructs: -1000、-637、-389、-262、-222 および-157 ベース) と転写因子結合領域ミューテーション・コンストラクト (Mutation constructs: CDX2 結合サイト、AP-1・JUN 結合サイトおよび ETS2 結合サイト) を作製し、強制発現・ルシフェラーゼ法での検証に使用した。

欠損コンストラクトと転写因子 CDX2、JUN または ETS を EF 細胞内に導入する (強制発現) すると、ETS2 の添加時に IFNT 1 と IFNTc1 遺伝子の転写活性 (ルシフェラーゼ) に変化が見られた。また、ETS2 領域変異コンストラクトでも ETS2 に対する IFNT1 と IFNTc1 遺伝子の反応性に違いが見られた。また、この差異は 4 種の転写因子 (CDX2、JUN、ETS2 および CREBBP) 添加時においても ETS2 の差異として現れたことから、両者の反応性の差異は転写因子 ETS2 によることが判明した。

第 3 章: IFNT 遺伝子同士の転写活性の差異は生体内においてどのような意味を持つのだろうか? その違いは子宮側への IFNT 効力の差異と位置付け、体外培養系を用いて IFNT1 と IFNTc1 のウシ子宮上皮細胞での遺伝子発現を解析した。

まず、IFNT 1、IFNTc1 とコントロールとして IFNA のクローニングを行い、それらの発現コンストラクトを作製した。次に、そのコンストラクトを 293 細胞に導入し、強制発現後のそれぞれの IFN を回収した。

ウシ子宮上皮細胞は岡山大学の奥田潔教授に提供していただいた。また、コントロール細胞として IFNT に反応性をもつウシ MDBK 細胞を同時に検証した。IFNT の誘導物質として知られている interferon stimulated gene (ISG) 12、ISG15、MX1 および MX2 の子宮内膜上皮細胞での反応性を検証した。両 IFNT とも子宮上皮細胞での ISG12、ISG15 や MX1 転写産物に対する反応性に変わりなかった。ところが、MX2 mRNA は IFNT1 ではなく、IFNTc1 添加時の子宮内膜上皮細胞のみに出現した。このことは 2 つの IFNT 遺伝子の発現は、子宮内中の IFNT 産生を上昇させるのだけではなく、子宮内膜上皮細胞の反応性にも違いがあることを示している。

総括: IFNT には 10 種以上の遺伝子が存在する。ところが、実際に子宮内で発現しているのは IFNT1 と IFNTc1 の 2 種のみであった。また、それらの発現動態にも子宮上皮細胞の反応性にも差があったことから、IFNT の遺伝子複製 (duplication) には単純に発現量を増加させるだけではなく、新しい機能を付加していったに違いない。いままで、IFNT の子宮内投与実験は IFNT1 のみで行われていたが、その投与実験では必ずしもポジティブなデータが得られていたわけではなかった。これからの投与実験は少なくとも 2 種の IFNT を投与しなければいけないことと、その発現 (投与時期) も検証しなければ、子宮内への IFNT の効果が測れないことが分かった。

よって審査委員一同は本論文が博士(獣医学)の学位論文として価値あるものと認めた。