

氏名	高橋 ひとみ
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第2966号
学位授与の日付	平成17年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科エネルギー転換科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	LARGE-SCALE PRODUCTION AND PURIFICATION OF BIOLOGICAL ACTIVE BOVINE INTERFERON $\tau$ : POSSIBLE APPLICATION TO INCREASE EMBRYONIC DEVELOPMENT (妊娠認識物質ウシインターフェロン(bIFN) $\tau$ の大量生産・精製: 胚発 育促進への適用)
論文審査委員	教授 奥田 潔 教授 丹羽 皓二 教授 近藤 康博

#### 学位論文内容の要旨

本論文は、ウシの妊娠認識物質であるウシインターフェロン (bIFN) $\tau$  を大量生産ならびに精製し、胚発育促進へ適用するために実施された一連の実験から得られた以下の成果をまとめたものである。

- 1) bIFN $\tau$  を、体外受精由来ウシ栄養膜細胞より得た遺伝子をもとに バキュロウイルス/細胞系 (Ac) により作出した。Ac-recombinant (r) bIFN $\tau$  は高い抗ウイルス活性を示した。培養ウシ子宮内膜上皮細胞に Ac-rbIFN $\tau$  あるいはプロスタグランジン (PG) F $_{2\alpha}$  刺激物質として知られているオキシトシン (OT) を単独または組合わせて添加し、PG F $_{2\alpha}$  合成が抑制されていることから生理活性を確認した。
- 2) バキュロウイルス/カイコ系 (Bm) を利用して bIFN $\tau$  を大量精製する手法を開発した。前処理に酸中和処理、続いてQ-セファロースカラムとキレートセファロースカラムで精製する方法が大量精製に適することを確認した。PGF $_{2\alpha}$  合成量の検討で、Bm-rbIFN $\tau$  は OT 誘導性の PGF $_{2\alpha}$  産生を抑制し、生理活性を確認した。
- 3) ウシ胚の初期発生に及ぼす IFN $\tau$  の作用機構について検討した。桑実期胚を Ac-rbIFN $\tau$  添加培地で培養することによって、胚盤胞への発生が有意に促進した。この時期の胚で IFNR サブユニット発現が確認され、局所調節因子として発生促進作用を示した。
- 4) bIFN $\tau$  特異的放射免疫測定法 (RIA) について検討した。Ac-rbIFN $\tau$  を用いて抗体を調整し、 $^{125}\text{I}$  で標識したAc-rbIFN $\tau$  と、Bm-rbIFN $\tau$  を標品とした二抗体法により RIA を行ったところ、7.8-1,000 ng/mL の範囲で良好な標準曲線が得られ、類縁物質との交差反応は認められなかった。ウシ子宮灌流サンプルへの適用結果により、本測定が有効であることが示された。

## 論文審査結果の要旨

本論文は、ウシの妊娠認識物質であるウシインターフェロン (bIFN) $\tau$  を大量生産ならびに精製し、胚発育促進へ適用するために実施された一連の実験から得られた以下のような成果をまとめたものである。

- 1) *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus 発現系 (Ac: バキュロウイルス/細胞系) を用いた bIFN $\tau$  の発現と活性の有無を検討した。bIFN $\tau$  を、体外受精由来ウシ栄養膜細胞より得た遺伝子をもとにバキュロウイルス/細胞系により作出した。得られた Ac-recombinant (r) bIFN $\tau$  は分子量 23 kDa で高い抗ウイルス活性を示した。培養ウシ子宮内膜上皮細胞に Ac-rbIFN $\tau$  あるいはプロスタグランディン (PG) F $_2\alpha$  刺激物質として知られているオキシトシン (OT, 100 nM) を単独または組合わせて添加し、24 時間の PGF $_2\alpha$  合成量の変化を検討した。Ac-rbIFN $\tau$  は PGF $_2\alpha$  の基礎分泌および OT に誘導される PGF $_2\alpha$  産生を抑制し、Ac-rbIFN $\tau$  は生物活性を有していることが示された。
- 2) *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus 発現系 (Bm: バキュロウイルス/カイコ系) を利用して bIFN $\tau$  を大量精製する手法を開発した。bIFN $\tau$  組換えバキュロウイルスをカイコに感染させることにより Bm-rbIFN $\tau$  が効率良く生産された。Q-セファロースカラムとキレートセファロースカラムを組み合わせた精製の前処理として 3 種類の粗精製法、酸中和処理、シリカゲルカラム処理、Blue セファロースカラム処理について検討したところ、酸中和処理が最も有効であった。100 頭のカイコより、純度約 91% の Bm-rbIFN $\tau$  を約 4.55 mg 精製でき、大量精製に利用できることが確認された。培養ウシ子宮内膜上皮細胞を用いた PGF $_2\alpha$  合成量の検討で、Bm-rbIFN $\tau$  は PGF $_2\alpha$  の OT に誘導される PGF $_2\alpha$  産生を抑制し、生物活性を有していることが示された。
- 3) ウシ胚の初期発生に及ぼす IFN $\tau$  の作用機構について検討した。体外受精後 5 日目の桑実胚を Ac-rbIFN $\tau$  添加培地で培養すると、無添加培地と比較して胚盤胞への発生が有意に促進された。大腸菌発現系由来の rbIFN $\tau$  も同様に発生促進作用を示した。桑実胚と胚盤胞において RT-PCR により IFN $\tau$  サブユニット発現が確認され、IFN $\tau$  はレセプターを介してオートクライン的な作用形態をもつホルモンとして発生促進作用を有することが示唆された。
- 4) bIFN $\tau$  特異的放射免疫測定法 (RIA) について検討した。Ac-rbIFN $\tau$  を用い bIFN $\tau$  のポリクロナール抗体を調整し、クロラミン T 法により Ac-rbIFN $\tau$  を  $^{125}\text{I}$  で標識し、Bm-rbIFN $\tau$  を標品とした二抗体法により RIA を行ったところ 7.8–1,000 ng/mL の範囲で良好な標準曲線が得られ、bIFN $\tau$  の類縁物質との交差反応は認められなかった。また、栄養膜細胞培養上清の段階希釈液と標準曲線が平行し、添加回収率は良好であった。発情周期ならびに妊娠 16 日のウシからの子宮灌流サンプルへの適用結果により、本測定が有効であることが示された。

これらの知見は、受胎率向上をめざした bIFN $\tau$  の利用を加速するのみならず、bIFN $\tau$  が関与する胚発育の一端を明らかにするものであり、妊娠認識期間における bIFN $\tau$  の分泌動態を解明しうる極めて興味深いものである。本学位審査会は、これらの成果をまとめた本論文の内容および参考文献を総合的に審査し、本論文が博士 (農学) の学位に値するものと判断した。