



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Identification of the structural element of osteopontin for the restoration of the normal endometrial epidermal growth factor profile and fertility in repeat breeder dairy cows [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	谷田, 孝志
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第16468号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95482
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takashi_Tanida_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：谷 田 孝 志

Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Identification of the structural element of osteopontin for the restoration of the normal endometrial epidermal growth factor profile and fertility in repeat breeder dairy cows
(乳用リピートブリーダー牛の子宮内膜上皮成長因子発現と受胎性を回復させる
オステオポンチンの構造的最小単位の同定)

多くの乳用リピートブリーダー経産牛では、発情周期中における子宮内膜上皮成長因子（EGF）濃度の二峰性の上昇が消失または低下しており、この異常は低受胎と関連する。精漿（SP）中のオステオポンチン（OPN）を牛の射精部位である腔内に投与すると、子宮内膜 EGF 濃度が正常化し、受胎性も回復することから、OPN の作用を活用した本処置の実用化が望まれている。しかし、供給量や感染症伝播リスクの観点から、治療用製剤開発において生体由来 OPN は適切ではなく、本処置の治療機序も明らかではない。

OPN は多様な機能を有するタンパク質であり、翻訳後修飾の有無や一次構造に含まれる複数の結合部位を介して多様な受容体（インテグリンおよび CD44）に結合することによりその機能を変化させる。しかし、子宮内膜 EGF 濃度を正常化する機能においては、翻訳後修飾の必要性や本機能の発現に関与する一次構造の部位（最小単位）は不明である。これらを明らかにすることで、OPN の作用機序の解明や OPN を活用した治療法の開発が期待できる。そこで本研究では、乳用リピートブリーダー牛の子宮内膜 EGF 濃度と受胎性を回復させる OPN の構造的最小単位を同定することを目的とし、第 1 章では本機能における翻訳後修飾の必要性を調べ、第 2 章では一次構造の最小単位を決定した。

第 1 章では、翻訳後修飾が無い大腸菌由来組換え OPN（rOPN）が乳用リピートブリーダー牛の子宮内膜 EGF 濃度と受胎性の回復に及ぼす効果を調べ、翻訳後修飾の必要性を調べた。まず、EGF 濃度異常を示すリピートブリーダー牛に対し、発情日に PBS（74 頭）、SP（0.5 ml、37 頭）または rOPN（0.3 mg、105 頭）を腔内に投与し、その 3 日後に子宮内膜 EGF 濃度を測定した（実験 1-1）。一部の牛 [PBS 群（58 頭）、SP 群（20 頭）および rOPN 群（83 頭）] については、試料投与直前に人工授精を行い、その 30～35 日後に妊娠鑑定を行った。その結果、rOPN 群の EGF 濃度正常化率および受胎率（58.1%および 47.0%）は SP 群（62.2%および 45.0%）と同程度であり、PBS 群と比べて高かった（29.7%および 28.1%）。次に、EGF 濃度異常を示すリピートブリーダー牛に対し、発情時に PBS（PBS 群、18 頭）または rOPN（rOPN 群、17 頭）を腔内に投与した（実験 1-2）。また、

正常な EGF 濃度と受胎性を示す牛（正常群、18 頭）に対し、PBS を同様に投与した。発情後 3 日目に子宮内膜 EGF 濃度を測定した後、同 7 日目に 2 個または 3 個の胚を移植し、発情後 14 日目に回収した。その結果、rOPN 群の胚回収率（58.7%）は正常群と同程度（58.3%）であったが、PBS 群（32.0%）と比べて高かった。また、試料投与後の EGF 濃度が正常になった牛の胚回収率（64.4%）は異常のままであった牛（16.7%）と比べて高かった。一方、rOPN 群と正常群から回収された胚の大きさは同程度であり、PBS 群と比べて大きかったが、胚の大きさと子宮内膜 EGF 濃度との間に相関は認められなかった。以上より、子宮内膜 EGF 濃度と受胎性を回復させる機能において、OPN は翻訳後修飾を必要としないことが示された。また、OPN による子宮内膜 EGF 濃度の回復が受胎性の向上につながる理由として、胚の生存性が向上することが考えられた。

第 2 章では、子宮内膜 EGF 濃度と受胎性を回復させる機能における、OPN の一次構造の最小単位を決定することを目的とした。まず、トロンビンで切断した rOPN の断片が乳用リピートブリーダー牛の子宮内膜 EGF 濃度の正常化に及ぼす効果を調べた（実験 2-1）。EGF 濃度異常を示すリピートブリーダー牛に対し、授精直後に 16 nmol（0.3 mg 相当）の rOPN、トロンビンで切断（推定切断箇所：Arg163-Ser164）した rOPN の N 末端（N-rOPN）および C 末端断片（C-rOPN）またはこれら切断断片の混合物（Th-rOPN）を腔内に投与した（各群 13～20 頭）。その 3 日後に子宮内膜 EGF 濃度を測定し、30～35 日後に妊娠鑑定を実施した。その結果、N-rOPN 群の EGF 濃度正常化率（25.0%）は C-rOPN 群（7.7%）と rOPN 群（55.6%）および Th-rOPN 群（64.3%）の中間の値を示した。次に、OPN のインテグリン結合モチーフを含む化学合成ペプチドが子宮内膜 EGF 濃度と受胎性の回復に及ぼす効果を調べた。EGF 濃度異常を示すリピートブリーダー牛に対し、実験 2-1 と同様に試料を投与し、子宮内膜 EGF 濃度測定および妊娠鑑定を行った。実験 2-2 では、PBS（47 頭）、rOPN（0.3 mg、83 頭）または 2 つの隣接したインテグリン結合モチーフを含むペプチド[GRGDSVAYGLK（ペプチド 1:32、320 および 1600 nmol）、GRGDS（ペプチド 2:320 および 1600 nmol）および SVAYGLK（ペプチド 3:320 および 1600 nmol）]を投与した（各群 20～25 頭）。その結果、ペプチド 1 投与群（320 および 1600 nmol）およびペプチド 3 投与群（1600 nmol）の EGF 濃度正常化率（44.0%～56.3%）は rOPN 投与群（63.9%）と同程度であり、PBS 投与群（15.6%）と比べて高かった。その他の投与群の EGF 濃度正常化率は PBS 投与群と同程度であった。受胎性への影響を調べるため、EGF 濃度正常化効果が認められたペプチドについて、投与試験を追加実施したところ、ペプチド 1 投与群（320 および 1600 nmol、各群 50 頭）、ペプチド 3 投与群（1600 nmol、55 頭）および rOPN 投与群（111 頭）の受胎率（41.8%～50.0%）はいずれも同程度であり、PBS 投与群（21.6%、75 頭）と比べて高かった。実験 2-3 では EGF 濃度を正常化する機序における RGD モチーフの役割を調べるために、PBS（24 頭）、ペプチド 1（320 nmol、78 頭）またはペプチド 1 のアスパラギン酸をグルタミン酸に置換した GRGESVAYGLK ペプチド [ペプチド 4:320（50 頭）および 1600 nmol（26 頭）] を投与した。その結果、ペプチド 4 投与群の EGF 濃度正常化率は PBS 投与群と同程度であり（16.0%～19.2%）、ペプチド 1 投与群（44.9%）と比べて低かった。以上より、SVAYGLK モチーフが乳用リピートブリーダー牛の子宮内膜 EGF 濃度と受胎性を回復させる OPN の構造的最小単位であり、RGD モチーフが本効果の活性増強に関与する可能性が示された。

本研究から、乳用リピートブリーダー牛の子宮内膜 EGF 濃度と受胎性を回復させる機能において、OPN はその機能の発現に翻訳後修飾を必要とせず、インテグリン結合モチーフ

がその構造的最小単位であることが示された。そのため、本モチーフを含む部分タンパク質やペプチドがリピートブリーダー牛の受胎性を向上させる治療用製剤になる可能性がある。また、リピートブリーダー牛に対する治療法を改良するために、OPN がインテグリンを介して子宮内膜 EGF 濃度を正常化する機序の解明が求められる。