



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_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（獣医学）

氏名：谷 田 孝 志

審査委員	主査 教授	坪 田 敏 男
	副査 教授	岡 松 優 子
	副査 准教授	柳 川 洋 二 郎
	副査 教授	片 桐 成 二

学位論文題名

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）

乳用牛では、子宮内膜における上皮成長因子（EGF）濃度の周期的変化の消失が低受胎の原因になることが知られている。このリピートブリーダー牛の腔内に精漿あるいは精漿タンパク質の1つであるオステオポンチン（OPN）を投与すると、子宮内膜のEGF濃度が正常化して受胎性も回復することから、OPNの作用機序解明とOPNによる治療の実用化が望まれている。しかし、生体材料由来OPNによる治療用製剤開発に関しては、供給量不足や感染症伝播リスク等の問題点が指摘されている。一方、OPNは、翻訳後修飾や多様な受容体（インテグリンおよびCD44）を介してさまざまな作用を発現するが、子宮内膜のEGF濃度調節作用については、翻訳後修飾の意義や同作用に関与する一次構造の最小単位は不明であった。そこで本研究では、第1章で同作用における翻訳後修飾の意義を調べ、第2章で一次構造の最小単位を決定した。

第1章では、翻訳後修飾が付与されない大腸菌由来組換え牛OPN（rOPN）を用いてOPNの同作用発現における翻訳後修飾の必要性を検討した。まず、EGF濃度異常を示すリピートブリーダー牛に発情（0日目）を誘起し、その腔内にPBS（74頭）、精漿（37頭）またはrOPN（0.3 mg, 105頭）を投与して、3日目に子宮内膜EGF濃度を測定した。一部の牛（PBS, 精漿およびrOPN：それぞれ58頭, 20頭および83頭）には試料投与直前に人工授精を行い、受胎性を評価した。その結果、rOPN群はEGF濃度正常化率および受胎率（58.1%および47.0%）のいずれに

においても、精漿群（62.2%および45.0%）と同等の高い効果を示した。次に、発情を誘起したリピートブリーダー牛に rOPN（17 頭）あるいは PBS（18 頭）を投与し、3 日目に子宮内膜 EGF 濃度を調べた。発情後 7 日目に 2 個または 3 個の胚を移植し、同 14 日目に回収した。正常な EGF 濃度を示す泌乳牛（18 頭）に PBS を投与して対照群とした。その結果、rOPN 群と正常牛群では胚回収率（58.7%および 58.3%）は PBS 群（32.0%）より高く、いずれも PBS 群に比べ大型の胚が回収された。また、試料投与後に EGF 濃度が正常になった牛の胚回収率（64.4%）は、異常が持続した牛（16.7%）に比べて高かった。以上より、OPN の子宮内膜 EGF 濃度正常化作用には翻訳後修飾を必要としないことが示された。また、OPN による受胎性回復には、子宮内膜 EGF 濃度の正常化による胚の生存性と発育能の改善が関わると思われた。

第 2 章では、子宮内膜 EGF 濃度と受胎性を回復させる作用における OPN の一次構造の最小単位を決定した。まずトロンビンで切断（推定切断箇所：Arg163–Ser164）した rOPN の断片およびその混合物をリピートブリーダー牛に投与して子宮内膜 EGF 濃度の正常化に及ぼす効果を調べ、rOPN の N 末端側に活性部位の存在することを示した。次いで、N 末端側断片のトロンビン切断部位近傍に位置する 2 つのインテグリン結合モチーフの両方を含むペプチド 1（GRGDSVAYGLK, 32, 320 および 1600 nmol, 各 20～25 頭）と、それぞれ片方を含むペプチド 2 および 3（GRGDS および SVAYGLK, いずれも 320 および 1600 nmol, 各 20～25 頭）を化学合成により調製し、PBS（47 頭）および rOPN（0.3 mg, 83 頭）とともにリピートブリーダー牛に投与して効果を調べた。その結果、ペプチド 1 群（320 および 1600 nmol）およびペプチド 3 群（1600 nmol）の EGF 濃度正常化率（44.0%～56.3%）は rOPN 群（63.9%）と同等であり、追加で実施した受胎性評価試験（各 50～55 頭）でも PBS 群（75 頭, 21.6%）に比べ高い受胎率（41.8%～50.0%）が得られた。さらに、RGD モチーフの役割を調べるためにペプチド 1 のアスパラギン酸（D）をグルタミン酸（E）に置換したペプチドの効果を調べたところ、EGF 濃度正常化率は PBS 群と同程度にまで低下した。以上の結果より、乳用種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 の構造的最小単位は SVAYGLK モチーフであり、RGD モチーフは本効果の活性増強に関与する可能性が示された。

本研究により申請者は、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 の作用には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を明らかにして OPN ペプチドによる治療用製剤の開発につなげた。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者谷田孝志氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学院規程第 10 条の規定による本学院の行う学位論文の審査等に合格と認めた。