

学 位 論 文 題 名

Immunochemical and molecular biological studies of pregnancy-associated proteins in small odontocetes

（小型ハクジラ類の妊娠関連タンパクに関する
免疫生化学的および分子生物学的研究）

学位論文内容の要旨

鯨類は海洋生態系における高次捕食者であり、海洋環境や他の水産資源に大きな影響を及ぼす生態的地位にある。また水産資源としての価値も高く、その資源を適切に管理する必要がある。一方、小型の鯨類は世界中の多くの施設で飼育され、各施設は教育・レクリエーションの他、調査研究や種の保存を目的として飼育技術及び繁殖技術の確立を目指している。鯨類の繁殖生理・生態を明らかにすることは、飼育下の繁殖技術の向上のみならずその生活史の理解や資源動態の調査において重要な意義を持つ。

この様な背景から、鯨類の妊娠成立・維持並びにその制御機構を把握することは重要であるが、いまだ十分な理解を得るには至っていない。これまで小型ハクジラ類においては飼育下での繁殖プログラムが進められ、人工授精などの新しい繁殖技術の確立などによりその実績は高まっている。しかしながら繁殖管理上の問題点として胎児および新生児の死亡などが報告されており、さらなる改善点として早期に妊娠を把握し、継続的なモニタリングを行う妊娠管理システムを構築することが急務である。

他の陸生哺乳類では、内分泌因子以外にも妊娠に伴い血中もしくは胎盤等に出現する特異タンパクが発見されている。母体の健康維持や繁殖管理を目的とした場合、この様な妊娠特異タンパクは妊娠関連指標として注目され、その検出や血中動態に基づく妊娠のモニタリングが確実に行われている。

本研究は鯨類における妊娠関連タンパクの検索、同定および性状解析を行い、妊娠維持機構の解明に寄与することを目標とした。さらに、開発した検出・測定系を用いて、それらタンパク質の早期妊娠診断および妊娠経過のモニタリング指標としての適用検討を行っ

た。具体的には胎児由来の alpha-fetoprotein (AFP) および胎盤由来の pregnancy-associated glycoprotein (PAG) に着目し、小型ハクジラ類であるスジイルカ、バンドウイルカ、ハナゴンドウを対象種としてこれらのタンパク質及びこれをコードする遺伝子を検索・同定すると共に、様々な性状解析を行い基礎知見を集積した。

AFP は胎児の肝臓および卵黄嚢において高レベルで発現し、ヒトの妊娠経過の指標として利用される胎児性のタンパク質である。初めにスジイルカ胎児血清を抗ヒト AFP 血清および抗スジイルカ雄血清を結合したアフィニティーカラム並びに Superdex 200 ゲル濾過カラムに供して AFP の精製を行った。精製品の分子量はゲル濾過で 78,000、SDS-PAGE で 68,000 であり、これら精製品の分子量や N 末端アミノ酸配列は他動物のそれらと高い相同性を示した。得られたスジイルカ *afp* cDNA 塩基配列は 610 個のアミノ酸翻訳領域から構成され、同配列は他の陸上哺乳類 *afp* と 80% 以上の相同性を示した。次に精製 AFP より作製した特異抗体を用いて、一元放射免疫拡散法および化学発光免疫測定法を確立し、スジイルカ、バンドウイルカおよびハナゴンドウの胎児および妊娠雌血清中の AFP 量を測定した。胎児血清中の AFP 濃度は胎児の発育に伴い濃度が減少する傾向が見られ、妊娠雌血清については妊娠中期に高値を示す傾向がみられた。さらに *afp* mRNA の各種臓器における発現性状を明らかにするために、リアルタイム定量 RT-PCR (qRT-PCR) を用いて胎児および妊娠雌の各器官における同発現量を測定した結果、胎児肝臓において高レベルの発現が認められた。また胎児肝臓および胎児胎盤における同 mRNA の妊娠進行に伴う変化を調べた。肝臓においては妊娠前期に高い発現を示し、その後減少する傾向がみられたが、胎盤では全期間においてほとんど発現がみられなかった。以上により妊娠期間中のイルカ類において、AFP の由来は主に胎児肝臓であることが明らかとなった。また妊娠雌における AFP の血中レベルとその変動が明らかとなり、妊娠成立・維持の指標とする際に必要な基礎的知見が得られた。さらに、胎児における AFP の血中動態は他哺乳類のそれと類似していたことから、鯨類の妊娠成立・維持機構における同タンパク質の関与が強く示唆された。

次に PAG の解析を行った。PAG は家畜の妊娠診断や妊娠経過指標として利用される胎盤由来の糖タンパク質である。スジイルカ胎盤組織より PAG のクローニングを行った結果、6 種類の cDNA (*pag* 1~6) が確認された。各翻訳領域 (397-404 アミノ酸) の演繹アミノ酸配列は陸上哺乳類 *pag* 配列と高い相同性を示し、本種の PAG をコードしていると考えら

れた。スジイルカ *pag* 配列はアスパラギン酸プロテアーゼファミリーに特徴的なドメインを含み、またアスパラギン酸プロテアーゼ活性に必要な catalytic モチーフを含んでいたことより、構造的には同活性を持ち得る可能性が示唆された。さらに本種 *pag* 配列は同モチーフを有するウマおよびブタ *pag* 配列に最も近いクレードを形成した。

各種臓器における *pag* mRNA の発現性状を明らかにするため、*pag* 3～6 のコンセンサス配列を標的とする qRT-PCR を用いて、胎児および妊娠雌の各器官における発現量の測定を行った。その結果、胎児胎盤において高レベルの発現が認められた。胎児胎盤における同 mRNA の妊娠進行に伴う変化を調べたところ、各妊娠段階による発現レベルはほぼ一定であった。したがってイルカ類 PAG は主に胎盤より分泌され、妊娠期間を通じて常に一定量発現していることが明らかとなった。このことから PAG は妊娠期間を通してなんらかの生理活性を持ち、妊娠維持に関与する可能性が示唆された。

以上、本研究では、免疫生化学的および分子生物学的手法を用いてスジイルカの AFP および PAG をタンパク質ならびに遺伝子レベルで同定した。AFP については精製法の確立ならびに特異抗体の作製に成功した。また AFP および PAG の一次構造解析を行い、海棲哺乳類で初めて両妊娠関連タンパクの詳細な性状を明らかにした。また AFP および PAG のタンパク質・遺伝子発現の特異的な定量法を新たに開発し、妊娠期間中における発現性状に関する基礎的な知見を得たことにより、両者が陸生哺乳類のそれらと同様な機能を持ち妊娠維持に関与する可能性が示された。一方、AFP の血中における出現は妊娠雌において必ずしも高値を示さないことから、他の内分泌因子等による妊娠成立・経過診断を補完する指標として利用できる可能性が示された。PAG についてはその遺伝子発現が妊娠初期の胎盤組織で確認されたため、今後血中に分泌された同タンパク質を利用した妊娠診断に応用できる可能性が示唆された。これらの知見は、今後 PAG タンパクの同定・精製法の確立、並びに血中におけるその検出・測定技術の開発へ役立つことが期待される。

本研究で得られた知見は鯨類の妊娠成立・維持機構に関する重要な基礎的知見を提供すると共に、妊娠診断およびモニタリングの正確性と実用性の向上の一助となる成果であり、今後の鯨類の生殖生理学の発展に大きく寄与するものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	原	彰 彦
副 査	教 授	足 立	伸 次
副 査	准教授	東 藤	孝
副 査	講 師	清 水	宗 敬
副 査	助 教	平 松	尚 志

学 位 論 文 題 名

Immunochemical and molecular biological studies of pregnancy-associated proteins in small odontocetes

(小型ハクジラ類の妊娠関連タンパクに関する
免疫生化学的および分子生物学的研究)

鯨類の繁殖生理・生態を明らかにすることは、飼育下の繁殖技術の向上のみならずその生活史の理解や資源動態の調査において重要な意義を持つ。特に妊娠成立・維持並びにその制御機構を把握する必要があるが、いまだ十分な理解を得るには至っていない。またこれまで小型ハクジラ類においては飼育下での繁殖プログラムが進められ、人工授精などの新しい繁殖技術の確立などによりその実績は高まっている。しかしながら早期に妊娠を把握し、継続的なモニタリングを行う妊娠管理システムを構築することが強く望まれている。

本研究は鯨類における妊娠関連タンパクの検索、同定および性状解析を行い、妊娠機構の解明に寄与することを目標とした。さらに、開発した検出・測定系を用いて、それらタンパク質の早期妊娠診断および妊娠経過のモニタリング指標としての検討を行った。具体的には胎児由来の alpha-fetoprotein (AFP) および胎盤由来の pregnancy-associated glycoprotein (PAG) に着目し、小型ハクジラ類であるスジイルカ、バンドウイルカおよびハナゴンドウにおいてこれらのタンパク質及びこれをコードする遺伝子を検索・同定すると共に、性状解析を行い基礎知見を集積した。

スジイルカ胎児血清を抗ヒト AFP および抗スジイルカ雄血清タンパクを結合した2種のアフィニティーカラム並びにゲル濾過カラムに供して AFP の精製を行った。また胎児肝

臓より完全長 AFP cDNA 断片を単離した。精製品の分子量（ゲル濾過で 78,000、SDS-PAGE で 68,000）、N 末端アミノ酸配列および *afp* cDNA 塩基配列（610 アミノ酸）は他動物のそれらと高い相同性を示した。これらのことから鯨類で初めて AFP を精製・同定した。

次に精製 AFP より作製した特異抗体を用いた一元放射免疫拡散法、化学発光免疫測定法および特異プライマーを用いたリアルタイム定量 RT-PCR 法を確立した。胎児血清中の AFP 濃度は胎児の発育に伴い減少する傾向が観察され、妊娠雌血清については妊娠中期に高値を示す傾向が見られた。各種臓器における *afp* mRNA の発現量は、胎児肝臓において高レベルの発現が認められた。妊娠進行に伴う変化を調べたところ、妊娠前期に高い発現を示し、その後減少する傾向がみられた。以上により妊娠期間中のイルカ類において、AFP の由来は主に胎児肝臓であることが明らかとなった。また妊娠雌における AFP の血中レベルとその変動が明らかとなり、妊娠成立・維持の指標とする際に必要な基礎的知見が得られた。さらに、胎児における AFP の血中動態は他の哺乳類のそれと類似していたことから、鯨類の妊娠成立・維持機構における同タンパク質の関与が強く示唆された。

次にスジイルカ胎盤組織より 6 種類の PAG cDNA (*pag* 1~6) をクローニングした。各翻訳領域（397 および 404 アミノ酸残基）の演繹アミノ酸配列は陸上哺乳類 PAG 配列と高い相同性を示し、PAG をコードしていると考えられた。スジイルカ PAG 配列はアスパラギン酸プロテアーゼファミリーに特徴的なドメインを含み、構造的には同活性を持ち得る可能性が示唆された。各種臓器における *pag* mRNA の発現性状を明らかにするため、*pag* 3~6 のコンセンサス配列を標的とする qRT-PCR を用いて、胎児および妊娠雌の各器官における発現量の測定を行った。その結果、イルカ類 PAG は主に胎盤より分泌され、妊娠期間を通じて常に一定量発現していることが明らかとなった。このことから PAG は妊娠期間を通してなんらかの生理活性を持ち、妊娠維持に関与する可能性が示唆された。

以上、本研究では、免疫生化学的および分子生物学的手法を用いてスジイルカの AFP および PAG をタンパク質ならびに遺伝子レベルで同定し、海棲哺乳類で初めて両妊娠関連タンパクの詳細な性状を明らかにした。また AFP および PAG のタンパク質・遺伝子発現の特異的な定量法を新たに開発し、妊娠期間中における発現性状に関する基礎的な知見を得たことにより、両者が陸生哺乳類のそれらと同様な機能を持ち妊娠維持に関与する可能性が示された。また AFP は他の内分泌因子等による妊娠成立・経過診断を補完する指標として、PAG については、今後血中に分泌される同タンパク質を利用した妊娠診断に応

用できる可能性が示唆された。

これらの結果は鯨類の妊娠成立・維持機構に関する重要な基礎的知見を提供すると共に、妊娠診断およびモニタリングの正確性と実用性の向上の一助となる成果であり、今後の鯨類の生殖生理学の発展に大きく寄与するものと思われる。よって審査員一同は申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。