

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	Khatun Hafiza
審査委員	主査 佐賀大学 准教授 山中賢一
	副査 佐賀大学 教授 和田康彦
	副査 琉球大学 教授 建本秀樹
	副査 鹿児島大学 教授 三好和睦
	副査 琉球大学 准教授 金野俊洋
審査協力者	印
題 目	<p>Improvement of <u>in vitro</u> embryo production by controlling endoplasmic reticulum stress and autophagy in cattle</p> <p>(小胞体ストレスおよびオートファジー制御によるウシ体外胚生産系の改良に関する研究)</p>
<p>現在、国内における子ウシ生産のほぼ100%が人工授精技術を用いて行われている。しかしながら、近年、気候変動に起因すると考えられる夏季の猛暑日、高夜温日数の増加を伴った高温環境が人工授精における受胎率を大きく低下させており、これに伴う非効率な子牛生産は空胎期間の延長や子牛価格の高騰を招き、畜産農家全体の経営を圧迫している。</p> <p>一方、胚はその発育ステージによって高温に対する感受性が異なることが知られており、受精後7日目の胚盤胞期胚はそれ以前の発生初期の胚よりも高温環境に強いことが報告されている。したがって、体外の一定環境下で暑熱ストレスに強い発生ステージまで発育させた胚を母体へ戻すという体外生産胚の利用は、雌雄両方の優良形質を受け継いだ子畜の効率的な生産というメリットに加えて、夏季の受胎率低下対策としても有効であると考えられている。しかしながら、体外生産胚の品質は体内生産胚と比較して低く、移植後の受胎率や凍結保存後の生存率が低いことが知られており、体外生産胚の高品質化が当該分野における重要な課題となっている。</p> <p>そこで、本研究では体外生産胚の発生能に大きく影響を及ぼすレドックス状態に着目するとともに、タンパク質代謝機構の制御によりウシ体外生産胚の発生能向上を図ることを目的とした。</p>	

まず、抗酸化作用を持つ蚕由来タンパク質であるセリシンの添加が、胚の発生能に及ぼす影響を調べるために、得られた胚盤胞期胚に対して酸化ストレスを誘導した。その結果、セリシン非添加区ではアポトーシス陽性細胞が有意に増加したが、セリシン添加区ではその増加は認められなかった。また、遺伝子発現解析の結果、セリシン添加区では妊娠認識に関与する *IFNT2* が有意に高い発現を示した。したがって、セリシン添加により環境ストレス耐性の高い体外生産胚を生産できることが間接的に示された。

次に、タンパク質修飾過程で生じる小胞体ストレスに着目し、その阻害剤および誘導剤を用いた実験を通じて、それらが胚発生能に及ぼす影響について調べた。その結果、体外発生培養中に小胞体ストレスを低減することにより、体外生産胚の発生率向上に加えて、胚の耐凍性を向上させることが明らかとなった。同様に、ウシ卵丘-卵母細胞複合体の体外成熟培養における小胞体ストレスと体外受精後の胚発生能との関係を調べた結果、現行の体外成熟培養では、卵母細胞を取り囲む卵丘細胞において小胞体ストレスが誘起されていること、卵丘細胞でのアポトーシスが顕著に誘導されていること、さらに、卵母細胞内の酸化ストレスレベルも上昇していることが明らかとなった。一方、小胞体ストレスの阻害によって卵母細胞内の酸化ストレスレベルが低下し、卵成熟率および受精後の胚発生率が向上した。これらの結果から、小胞体ストレスが酸化ストレスとも密接に関係しながら、体外生産胚の発生能および品質低下に深く関与しており、それらを制御することで、高品質な胚を生産することが可能であることが示された。

さらに、タンパク質分解や細胞質の品質維持に関わり、近年、哺乳類胚の発生能との関係が報告されているオートファジーに着目し、その制御による胚発生能の向上を試みた。その結果、ウシ初期胚のオートファジー活性が体外発生率と正の相関があること、特に4細胞期にオートファジーを誘導することで高い発生率が得られることが明らかとなった。また、遺伝子発現解析による胚の品質評価を行った結果、オートファジーを誘導した胚において胚発生に重要であることが報告されている遺伝子群が高発現しており、初期胚発生過程におけるオートファジー誘導により体外生産胚の品質向上が可能であることが示唆された。

以上のように、本研究は、ウシ体外生産胚のレドックス状態、タンパク質代謝機構および発生能との相互関係についての新たな知見を提供しており、それらは高い受胎率が望める胚の体外生産系の確立に寄与すると期待される。また、近年の人工授精による受胎率低下によりその代替としての利用が期待されているウシ体外生産胚の高品質化という成果は、実社会からの期待に応えるという点で評価できる。

したがって、審査員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値を有しているものと判定した。