

最終試験結果の要旨	
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
実施年月日	令和 2年 1月 24日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・ <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、令和2年1月24日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	Khatun Hafiza
-------------	---------------

【質問1】抗酸化能を有する物質はそのほかにもたくさん知られているが、本研究ではなぜセリシンを使用したのか？

【回答1】体外生産胚の品質/生存率を改善するには、培養中の酸化還元バランスが重要です。セリシンにはヒドロキシル、カルボキシル、アミノ基などの強い極性側基があり、特にヒドロキシル基の含有量が高く、セリシンに抗酸化作用をもたらします。以前の報告においても、セリシンは酸化ストレス下での体外胚の発生能を向上させることが示されています。以上の理由から今回の研究では、セリシンを使用しました。

【質問2】今回の研究では、胚盤胞期胚を熱ストレスに曝露しているが、セリシンのどのような効果を期待してこのような実験を行ったのか？

【回答2】セリシンは、酸化ストレス下での胚の損耗を緩和する可能性が過去の論文で示唆されています。酸化ストレスは熱ストレスによっても誘導されるため、この実験では、セリシン添加培養で得られる胚は熱ストレスに対する耐性が向上しているのではないかと考え、熱ストレスを加えた後の胚の生存率と品質を評価しました。

【質問3】今回の実験では、なぜ小胞体ストレスの阻害剤としてTUDCAを用いていたのですか？また、それ以外に小胞体ストレスの阻害剤はありますか？

【回答3】TUDCAは、主にクマから得られる胆汁酸であるウルソデオキシコール酸のタウリン抱合体です。タウリンは、ER内腔のタンパク質の折り畳みを手助けする有機硫黄基で構成されています。さらに、UPRシグナルを制御することで抗アポトーシス剤としても機能します。これらの特性から、関連研究の多くでTUDCAが使用されているため、今回の研究でも用いました。TUDCA以外の阻害剤としてメラトニン、レスベラトロールなどが挙げられますが、ERストレスに対する効果はTUDCAの方が高いとされています。さらに、TUDCAは、ROSから細胞を保護するマンガンスーパーオキシドジスムターゼの発現を活性化できる強力な抗酸化剤としても知られています。

【質問4】オートファジーの誘導材としてRapamycinを使用した理由を教えてください。

【回答4】Rapamycinは調節因子 Ser / ThrプロテインキナーゼmTORの阻害剤です。このmTORは、栄養源、成長因子、ホルモン、ストレスといった細胞環境に応じて細胞の増殖、

代謝、生存における調節因子として働くとともに、オートファジーを抑制する因子としても知られています。したがって、多くの研究でmTORの阻害剤であるRapamycinがオートファジーの誘導剤として使用されており、本研究でも使用しました。

【質問5】 Rapamycin添加により、胚発生に対する負の影響はありますか？

【回答5】 前述の通り、RapamycinはmTORの阻害剤であるため、高濃度で使用した場合は細胞成長や増殖に必要なシグナル伝達をブロックすることで胚発生に悪影響を与えることが本研究の予備実験で明らかになっています。

【質問6】 本研究でオートファジー阻害剤として使用しているWortmanninはどのようにオートファジーを抑制しているのですか？

【回答6】 Wortmanninは、オートファジーにおいて隔離膜形成に関与するPI3Kの選択的かつ不可逆的な阻害剤として機能し、オートファジーの誘導を阻害します。

【質問7】 セリシンは胚の酸化ストレスを効果的に抑制しますか？また、その他に酸化ストレスを抑制する物質はありますか？

【回答7】 前述したようにセリシンはその化学特性から強力な抗酸化物質として働きます。私たちの以前の研究において、セリシンは酸化ストレスおよび熱ストレス下で培養されたウシ胚におけるROS生成を減少させ、胚発生能を改善することが分かっています。また、その他としては、グルタチオン、アデノシン、ビタミンC、ビタミンE、メラトニンなどが体外培養中の胚の酸化ストレスを緩和することが知られています。

【質問8】 セリシン添加により胚の *IFNT2* の発現が上昇しましたが、なぜですか？

【回答8】 品質の高いウシ胚盤胞期胚では、高い *IFNT2* の発現を示すことが報告されています。発現が上昇する理由についての詳細はわかりませんが、セリシンの強力な抗酸化特性がミトコンドリアの過剰なROS生成や脂質過酸化を防ぐことで、結果的に品質の高い胚が生産されているためだと考えています。

【質問9】 今回の研究で確立した培養系で生産した胚の胚移植は行っていますか？

【回答9】 胚移植は行っていません。しかしながら、確立された培養系の評価として胚移植を行うことの重要性を認識しており、今後、実施したいと考えています。