

|   |                                     |          |                    |
|---|-------------------------------------|----------|--------------------|
| 氏名  | 小野 千由貴                              |          |                    |
| 授与した学位  | 博士                                  |          |                    |
| 専攻分野の名称   | 農学                                  |          |                    |
| 学位授与番号  | 博甲第                                 | 6211     | 号                  |
| 学位授与の日付   | 2020年 3月25日                         |          |                    |
| 学位授与の要件   | 環境生命科学研究科 農生命科学専攻<br>(学位規則第4条第1項該当) |          |                    |
| 学位論文の題目   | 小卵胞由来ブタ卵母細胞の成熟能及び初期発生能に関する研究        |          |                    |
| 論文審査委員  | 教授 西野 直樹                            | 教授 舟橋 弘晃 | 教授 木村 康二 准教授 若井 拓哉 |
| <b>学位論文内容の要旨</b>  |                                     |          |                    |
| <p>本研究は、ブタ卵巣由来小卵胞(SF；直径1～2 mm)および中卵胞(MF；直径3～6 mm)由来卵母細胞の体外成熟(IVM)能や体外受精(IVF)能、初期発生能の違いと、それらを生み出す原因を検討することを目的とした。先行研究において、SFおよびMF由来卵丘細胞-卵母細胞塊をIVM培養に供し、それらの卵母細胞のIVM能を比較するとともに、第一極体を確認できた成熟卵母細胞のみを用いて、それらのIVF能および初期発生能を調べた。その結果、SF由来卵母細胞のIVM能および初期発生能は既報と同様にMF由来卵のそれらと比較して低いことが確認されたが、IVF率や前核形成率で評価されるIVF能および卵割率で評価される母系効果能はSFおよびMF由来卵母細胞間に有意な差がないことを明らかにした。また、SFおよびMF由来卵母細胞のAURKA、AURKB、MOS、ZP3、ZP4、NALP9、HSF1、BCL2遺伝子由来mRNA量をIVM培養の前後で比較した結果、全てのmRNA量はIVM培養の間に有意に低下したが、c-MOS遺伝子を除く他の遺伝子のmRNA量にMFおよびSF由来卵母細胞間で差はなかった。一方、IVM培養前のSF由来卵母細胞のc-MOS遺伝子転写産物量は、MF由来卵より有意に低く、SF由来卵母細胞のIVM能や初期発生能に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで本研究において、IVM培養中でのmRNA量の低下や卵母細胞のオートファジー能の重要性に関する報告の存在から、mTORシグナル経路依存性オートファジー誘導剤のラパマイシンと同阻害剤の3-MAがMFおよびSF由来卵母細胞のIVM率能および初期発生能におよぼす影響を調べた。その結果、IVM培養時のラパマイシンまたは3-MA存在は、MF由来卵母細胞のIVM能および初期発生能をそれぞれ改善または阻害したが、SF由来卵母細胞で同様の効果が全く観察されなかった。これらの結果から、mTORシグナル経路を介してオートファジー能を調整する能力は、MFおよびSF由来卵母細胞間で異なることを見出し、その違いがそれらの卵母細胞のIVM能や初期発生能での違いに影響している可能性を示唆した。さらに、mTOR非依存的なオートファジー誘導剤でもある二糖類のトレハロースがMFおよびSF由来卵母細胞のオートファジー能およびIVM能や初期発生能におよぼす影響を調べた。その結果、トレハロースはLC3-IIおよびp62のタンパク質レベルで評価したSF由来卵母細胞のオートファジー能に影響を及ぼさなかったが、卵丘細胞塊の生存性維持をサポートし、SF由来卵母細胞のIVM能および初期発生能を有意に改善した。以上の研究から、MF由来卵母細胞のIVM能および初期発生能は、オートファジー能調節によりさらに改善できるが、SF由来卵母細胞のそれらは、トレハロースなどの存在下で卵丘細胞の死滅を防ぎ、卵母細胞と卵丘細胞との十分なコミュニケーションを確保することで改善される可能性を明らかにした。これらの知見は、雌性生殖細胞資源の有効活用を促進し、家畜生産や生殖補助医療での受精卵の体外生産効率の改善に大いに資すると考えられる。</p> |                                     |          |                    |

## 論文審査結果の要旨

本提出論文は、哺乳動物の卵巣中に多数存在するものの、これまで胚の体外生産のために利用されてこなかった直径 3mm 以下の小卵胞由来卵母細胞の体外成熟能及び体外発生能の改善を目的として、卵母細胞の成熟能に影響することが知られているオートファジー能に着目し、それに影響する各種因子の影響他に関する研究成果をまとめたものである。

まず、mTOR シグナル経路を介するオートファジー能の調節能は、SF および MF 由来卵母細胞間で明らかに異なることを見出した。またさらに、LC3-II および p62 のタンパク質レベルで評価したオートファジー能についても IVM 培養の進行とともに低下することや、mTOR 非依存的なオートファジー誘導剤であるトレハロースを用いても SF 由来卵母細胞のオートファジー能を制御することは出来ないが、トレハロースの存在が SF 由来 COCs の卵丘細胞の生存性を少なくとも IVM 培養前半 20 時間維持するとともに IVM 能および胚盤胞期までの初期発生能を向上させることを明らかにした。これらの結果から、MF 由来卵母細胞の IVM 能および初期発生能は、オートファジー能調節によりさらに改善できるが、SF 由来卵母細胞のそれらは、トレハロースなどの存在下で卵丘細胞の死滅を防ぎ、卵母細胞と卵丘細胞との十分なコミュニケーションを確保することで改善される可能性を明らかにした。

これらの成果は、卵巣内生殖細胞資源をさらに有効に活用することを可能にし、家畜生産や生殖補助医療での受精卵の体外生産効率を改善し、ゲノム編集などによる動物生産での生殖細胞供給をより容易にし、生殖バイオテクノロジーの更なる発展に大いに資すると考えられ、高く評価できる。また、本提出論文が明らかにした知見は、人類にとって重要な肉資源の一つであるブタの改良増殖効率の改善に役立ち、産業上も極めて意義深い。

以上のことから、本学位審査委員会は、これらの成果をまとめた本論文の内容および参考文献を総合的に審査し、本論文は、博士（農学）の学位に値すると判断した。