

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	ZENG YIREN
論文題目	Diagnostic histone modification analysis of preimplantation embryos for animal production (動物生産のための着床前胚の診断的ヒストン修飾解析)		
(論文内容の要旨)			
環境要因によって資源動物の着床前胚（受精卵）の受胎能力が影響を受けることが知られており、資源動物生産においては、受精卵の受胎能力はその品質評価の対象となり、高い受胎能力を持つ受精卵の生産や受精卵の品質の評価方法の確立が望まれている。本研究では、子牛生産に応用可能な形で、ウシ受精卵の品質評価にエピジェネティック修飾、特にヒストンのメチル化修飾情報を用いることを念頭に、個別の受精卵さらにはその一部を採取した細胞塊（バイオブシー）に対して適用可能なヒストン修飾解析法を開発することを目的とした。 Chapter I では、本研究の学術的背景および目的を提示している。まず、本研究でも用いた高速シーケンスによって可能になった、クロマチン修飾の解析を含むゲノムワイド研究の現状と、生殖補助技術を含む環境要因による受精卵のエピジェネティック修飾の変容の包括的な解析が、受精卵の品質に及ぼす影響の解明やそれに基づく受精卵の品質評価に有用である可能性を述べている。次いで、受精卵の形態的特徴に頼ってきた従来の品質評価方法の限界にも触れ、生殖補助技術を進歩させる上での受精卵のエピゲノム解析の潜在的意義を強調している。また、本研究で着目したヒストン修飾の解析法について、受精卵という少数の細胞からなる組織の解析に関連して、解析に多数の細胞を必要とするChIP-seq法の限界、より少数の細胞での解析を可能にしたCUT&RUN法、CUT&Tag法の登場の過程を述べている。章の最後に、固相支持体に細胞の保持を依存する従来のCUT&Tag法から、固相支持体を必要としないNON-TiE-UP CUT&Tag (NTU-CAT法) への改良について述べ、本研究では、同一ウェル内での細胞塊の個別操作を可能にするWell-of-the-Well (WOW) システムをNTU-CAT法と組み合わせることによって、解析操作の簡易化、系統的誤操作の軽減、用いる試薬の節約、細胞の損失防止を同時に実現し、単一の受精卵のみならずそのバイオブシーに対しても解析を可能にすることを目的としたことを述べている。 Chapter II では、まず、WOWシステムとNTU-CAT法を組み合わせたWOW-CAT法のプロトコルを記述し、同法によってウシ胚盤胞のH3K4me3修飾のゲノムワイド解析を行い、従来のChIP-seq法およびNTU-CAT法の結果と比較した。その結果、WOW-CAT法を用いることによって、抗体や反応液の使用量および煩雑な反応液交換の回数を大幅に削減しながら、NTU-CAT法と同等の結果が得られるだけでなく、平均プロファイルの形状の比較やChIP-seq法との比較における偽陽性率の評価から、WOW-CAT法で得られる結果はNTU-CAT法のそれに比べて、一般的なスタンダードとしてのChIP-seq法のものに、より近いことが分かった。次に、実験操作の簡易化は、単一の受精卵のみならず、一部の細胞塊に対する操作を可能にしたため、同一の受精卵を半分ずつに切断し、それぞれについて異なるヒストン修飾（H3K4me3修飾に加えH3K27ac修飾）を解析することを試みた。その結果、同一の単一受精卵に対する異なるヒストン修飾の同時解析が可能であり、それぞれの修飾の特異性を抽出することができた。さらに、将来の胎子本体には寄与しない栄養膜細胞のバイオブシーへのWOW-CAT法（H3K4me3修飾を対象としたもの）の適用を試み、栄養膜細胞特異的修飾の検出によってその妥当性が評価された上で、受精卵本体の修飾との比較から、栄養膜細胞バイオブシーの修飾評価によって、受精卵の本体の修飾を診断できることが示唆された。			

Chapter IIIでは、WOW-CAT法によるヒストン修飾診断の子牛生産への応用性を探るため、まず、高速シーケンスを用いずに栄養膜細胞バイオプシーのヒストン修飾をWOW-CAT法後の定量PCR (WOW-CAT-qPCR) で検出することによって、受精卵本体の特徴づけができるかを検討した。それぞれ雌および雄と推定される受精卵で特異的にみられるXIST遺伝子およびDDX3Y遺伝子のH3K4me3修飾を対象にして、これらの修飾の検出による性判別を試みたところ、従来のY染色体上の反復配列の検出による性判別方法と比較して、XIST修飾に関しては100%、DDX3Y修飾に関しては94.4%の一致を見た。次に、各種生産方法で生産したウシ胚盤胞のH3K4me3修飾のゲノムワイド比較解析 (NTU-CAT法による) の結果から同定した数種の受胎率関連修飾候補および上記の性判別関連修飾の評価を、栄養膜細胞バイオプシーを用いてWOW-CAT-qPCRによって行い、残った受精卵本体2個を代理母牛に移植したところ (1個は解析した受精卵の全兄弟卵の移植)、2頭とも妊娠を得た。

最終章はGeneral summaryとして、Chapter IIIまでに述べた一連の研究によって、単一受精卵の一部の細胞塊にも適用可能であり、かつより簡易化したヒストン修飾解析法を実現したこと、それにより、同一受精卵内の複数の異なるヒストン修飾の同時解析や栄養膜細胞バイオプシーを用いた受精卵の診断的解析という拡張的な応用性を示したこと、実際に診断後の受精卵から妊娠に成功したことを総括し、WOW-CAT法のような受精卵の診断ツールの継続的な探求と改良は、動物生産の持続的な改善に貢献し、より健康な後代の確保につながり、生殖生物学の分野を発展させ得ると結んでいる。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

乳肉生産の高度化、気候変動や異常気象、生殖補助技術の適用等により、資源動物の着床前胚（受精卵）を取り巻く環境は多様化、複雑化している。家畜ウシの受精卵移植は畜産先進国を中心に普及しているが、受精卵によって受胎能力に差があることが問題となっており、高い受胎能力を持つ受精卵の生産や受精卵の品質の評価方法の確立は子畜の効率的生産上重要な課題である。本研究では、環境によって変容を受け、受精卵の品質に影響を与えうる因子としてエピジェネティック修飾、特にヒストン修飾に着目し、子牛生産に応用可能な形で、個別の受精卵さらにはその一部を採取した細胞塊（バイオブシー）に対して適用可能なヒストン修飾解析法を開発することを目的としている。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. 一度に最大13個の受精卵あるいはそのバイオブシーに対して、解析操作の簡易化、系統的誤操作の軽減、用いる試薬の節約、細胞の損失防止を同時に実現しながら実施可能なヒストン修飾解析法を開発した。

2. 本法は、これまで困難だった同一受精卵内の複数の異なるヒストン修飾の同時解析や、栄養膜細胞バイオブシーを用いた受精卵の診断的解析という拡張的な応用性を実現した。

3. 本法において、特定のヒストン修飾を対象にして定量的PCRによる検出を行うことによって、高速シーケンスを使用することなく受精卵の特徴づけを可能にすることが示唆された。

4. 栄養膜細胞バイオブシーに対するヒストン修飾の診断的解析後の受精卵本体の移植から2頭の妊娠に成功している。

以上のように、本論文は、動物生産へ応用可能な着床前胚の診断的ヒストン修飾解析法を開発したものであり、畜産学、発生工学、応用動物科学、生殖生物学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和6年6月7日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）