

氏 名 (本籍)	いし ぐろ すすむ 石 黒 進 (秋 田 県)
学 位 の 種 類	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 乙 第 2478 号
学位授与年月日	平成 22 年 2 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科
学 位 論 文 題 目	体細胞核移植技術を用いた絶滅危惧鳥類の増殖に関する基礎的研究
主 査	筑波大学教授 Ph. D. (家畜生理学) 田 島 淳 史
副 査	筑波大学教授 農学博士 金 井 幸 雄
副 査	筑波大学教授 工学博士 王 碧 昭
副 査	(独) 国立環境研究所環境研究基盤技術ラボラトリー NIES フェロー 理学博士 橋 本 光一郎

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

現在、絶滅危惧鳥類の遺伝的多様性を保存することを目的に、様々な組織から採集された体細胞の凍結保存プログラムが推進されている。将来、凍結保存された体細胞から個体を復元し、増殖するための方法として、体細胞核移植技術の利用が考えられるが、哺乳類において開発された体細胞核移植技術を直接鳥類に応用することは技術的に困難であると考えられる。これまでに、体細胞核移植技術を鳥類に応用する手段として胚期生殖細胞 (Embryonic Germ Cells、以下 EGCs) に体細胞の核を移植することにより、体細胞核移植 EGCs (somatic nuclear transferred EGCs、以下 snt-EGCs) を作製する方法が考案されているが、現時点で鳥類における体細胞核移植個体の誕生は報告されていない。そこで、本研究は体細胞核移植技術を絶滅危惧鳥類の増殖に応用するために必要な基礎的知見を得ることを目的に行われた。

### 1. 異属間体細胞核移植 EGCs の作製

体細胞核移植技術を幅広く絶滅危惧鳥類を増殖するために利用するためには、まず異種間さらには異属間における snt-EGCs を作製するとともに生殖巣原基への移住能を検討する必要がある。ところが、これまで鳥類における snt-EGCs の作製は、生殖細胞と体細胞とがいずれもニワトリ由来の場合に限られている。さらに、鳥類初期胚内における EGCs の生殖巣原基への移住メカニズムも十分に解明されていない。そこで、まず鳥類異属間における体細胞核移植個体作製のモデル動物としてニワトリ (*Gallus gallus domesticus*、以下 c) およびウズラ (*Coturnix japonica*、以下 q) を用い、異属間 snt-EGCs の作製を試みた。体細胞核ドナーとしてニワトリおよびウズラ 4 日胚由来の胚期血球細胞 (Embryonic blood cells; 以下 E) を、また体細胞核のレシピエントとしてニワトリ 7 日胚およびウズラ 6 日胚の生殖巣由来の EGCs である Gonadal Germ Cells (以下 GGCs または G) をそれぞれ用い、電気融合法により snt-GGCs の作製を試みた。その結果、E(q)-G(c) および E(c)-G(q) の組み合わせにおいて、それぞれ 1.0% (5/500) および 1.0% (5/500) の融合率で異属間 snt-GGCs が作製された。

### 2. 鳥類異属間における EGCs の生殖巣原基への移住能の検討

鳥類異属間における EGCs の生殖巣原基への移住能を検討することを目的に、ウズラ 2.5 日胚の血管内に

ニワトリ 2 日胚の血液由来の EGCs である始原生殖細胞 (Primordial Germ Cells: 以下 PGCs) を、1、10、20、50 または 100 個移植し、移植後 1 日目に全胚を固定し、頭頂部から尾部までの連続切片を作製した。組織標本を PAS 反応により染色したのち、顕微鏡下でウズラ生殖上皮、生殖領域、頭部および胚体部に移住した早ワトリ PGCs の比率を計測したところ、それぞれ 12.0%、50.7%、6.2% および 2.5% であった。さらに、ウズラ胚の胚体内および生殖巣領域において観察されたニワトリ PGCs の比率は移植された PGCs の数にかかわらず、それぞれ約 70% および約 63% であることが示された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究により、鳥類異属間において snt-GGCs の作製が可能であること、ならびに鳥類異属間で PGCs を移植した場合、生殖上皮、生殖領域、頭部および胚体部に移住した PGCs の比率は移植された PGCs の数にかかわらず一定であることが証明された。特に 1 個の PGCs をレシピエント胚の血管内に移植した場合においても、その移住能が組織化学的手法を用いて観察可能であることが示されたことは高く評価される。本研究の成果は、絶滅危惧鳥類の遺伝資源保存に資するのみでなく、鳥類における発生工学に新たな手法を提示したこと、生殖系列細胞の移住メカニズムの解明に関する重要な基礎的知見を得たこと等、基礎から応用までにわたる広い分野での展開が期待される。

よって、著者は博士 (学術) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。