

氏名(本籍) 小原 有 策 (岡山県)  
 学位の種類 博士(農学)  
 学位記番号 博甲第4696号  
 学位授与年月日 平成20年3月25日  
 学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
 審査研究科 生命環境科学研究科  
 学位論文題目 鳥類における体細胞核移植個体の作出に関する基礎的研究  
 - 体細胞核移植 GGCs 作製の試み -

主査	筑波大学教授	農学博士	金井 幸雄
副査	筑波大学教授	農学博士	本田 洋
副査	筑波大学准教授	Ph. D. (家畜生理学)	田島 淳史
副査	筑波大学教授	工学博士	王 碧 昭
副査	(独) 農業生物資源研究所 遺伝子組換え家畜研究 センター上級研究員	農学博士	内藤 充

## 論文の内容の要旨

体細胞核移植技術は、発生学及び発生工学の研究手法として重要なばかりでなく、家畜遺伝資源の保存、家畜育種、トランスジェニック動物の作製などの要素技術として極めて応用価値が高い。Wilmot *et al.* (1997) がヒツジで体細胞核移植個体の作製に成功して以来、哺乳類での成功例が相次いで報告され、体細胞核移植技術はすでに発生工学に関する基礎研究及び応用研究を行う上での基盤技術の一つになっている。これに対し、鳥類における体細胞核移植個体の成功例は現時点では報告されていない。これは鳥類における卵細胞の形成過程や卵の構造が哺乳類と大きく異なるため、体細胞核移植個体を作製するためには哺乳類とは異なった戦略が必要なためである。そこで本研究では、生殖系列キメラの作製技術を応用することにより鳥類における体細胞核移植個体の作出が可能であると考え、1) ガラス化保存法を用いて凍結保存した生殖巣生殖細胞 (GGCs) を用いた体細胞核移植 GGCs の作製、2) 核体を用いた体細胞核移植 GGCs の作製について検討を行った。

### 1) ガラス化保存法を用いて凍結保存した生殖巣生殖細胞 (GGCs) を用いた体細胞核移植 GGCs の作製

ガラス化保存法を用いて凍結保存された GGCs と、未凍結の胚性血球細胞 (EBCs) を用いて体細胞核移植 GGCs の作製を試みた結果、融合率 2～5.6% の割合で体細胞核移植 GGCs が作製された。同様に、ガラス化保存法を用いて凍結保存した GGCs と EBCs を用いて体細胞核移植 GGCs の作製を試みた結果、GGCs の融合率は未凍結細胞を用いた場合と比べて低い値を示したものの、全ての処理区において体細胞核移植 GGCs が作製された。

### 2) 核体を用いた体細胞核移植 GGCs の作製

体外での培養及び増殖が可能な線維芽細胞を凍結保存した後に核体を作製し、これを核ドナーとして体細胞核移植 GGCs を作製する方法について検討した。その結果、凍結保存後に血清飢餓状態で培養することに

より G<sub>0</sub> 期に誘導した線維芽細胞を用いて作製した核体を核ドナーとして用いて体細胞核移植 GGCs を作製した場合、その融合率は 0.5 ~ 0.9% であった。さらに、3 ~ 6 日間培養を行った GGCs を核レシピエントとし、核体を核ドナーとして体細胞核移植 GGCs の作製を試みた結果、同様に体細胞核移植 GGCs が作製されることが確認され、その融合率は 0.5 ~ 2% であった。

これらの結果から、凍結保存した GGCs は、未凍結の体細胞及び凍結保存後の体細胞のいずれを核ドナーとした場合にも、体細胞核移植 GGCs の作製に使用できること、また凍結及び培養操作を加えた線維芽細胞から核体を作製し、これを核ドナーとした場合にも、体細胞核移植 GGCs の作製が可能であることが実証され、さらに後者については体外培養後の GGCs を用いた場合にも体細胞核移植 GGCs の作製が可能であることが明らかになった。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、生殖系列キメラの作製技術を応用して鳥類における体細胞核移植技術の開発を目指す研究の一環として実施された。遺伝資源保存を目的として体細胞核移植技術を応用するにあたり、体細胞ならびに生殖細胞を凍結保存することは極めて重要な課題である。本研究では、従来法に比べて操作時間が短いガラス化保存法を用いて生殖細胞ならびに体細胞を凍結保存した後に GGCs と融合することにより体細胞核移植 GGCs を作製することに成功している。また、凍結保存後に血清飢餓状態で体外培養した線維芽細胞から作製した核体を核ドナーとした場合にも体細胞核移植 GGCs の作製が可能であることを実証した。

これらの知見は、鳥類における体細胞核移植技術の開発に向けて大きく貢献するものであり、その成果の畜産学的な応用が期待できる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。