

氏名(本籍)	峰松健夫(長崎県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第3336号
学位授与年月日	平成16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	農学研究科
学位論文題目	始原生殖細胞を用いた体細胞核移植ニワトリの作製に関する基礎的研究

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	河野義明
副査	筑波大学助教授	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

論文の内容の要旨

体細胞核移植技術は、家畜の育種、遺伝資源の保存、トランスジェニック動物の作製などに有効であるとともに、発生学および発生工学の研究手法としても重要である。これまでに、ヒツジをはじめ、ウシ、ヤギ、マウス、ブタ、ラ、ウマにおいて体細胞核移植によるクローン動物が作出されているが、家禽では鳥類に固有な卵細胞の構造的・生理的特性が障壁となり、体細胞核移植によるクローン動物の作出は困難とされている。一方、家禽では胚発生の初期に出現する始原生殖細胞(PGCs)が生殖腺へ移動する際に血管系を循環するという特徴を利用して、PGCsの移植による生殖系列キメラの作製が可能であり、家禽への体細胞核移植技術の応用を考えた場合、PGCsが有効な体細胞核レシピエントとして利用できる可能性がある。そこで、本研究では体細胞核移植ニワトリの作製に関わる基礎研究として、(1)紫外線によるPGCsの機能的除核、(2)PGCsと体細胞の電気融合、および(3)核移植PGCsを用いた生殖系列キメラの作出について、検討を行った。

(1) 紫外線によるPGCsの機能的除核

ニワトリPGCsは、核が極めて大きい細胞であるため、マイクロマニピュレータ等を用いた物理的方法による除核は難しいと考えられる。そこで、本研究では紫外線照射によって核を不活化する機能的除核法について検討した。PGCsに紫外線を10～120秒間照射し、核DNAの損傷度をコメットアッセイ法で定量化すると同時に、ヨウ化プロピジウム(PI)および二酢酸フルオレセイン(FDA)の二重染色法を用いてPGCsの生存性を判定した。その結果、紫外線を10秒から60秒間照射されたPGCsは、照射時間に比例した明らかなDNA損傷を受けるものの、その生存性には変化がないことが明らかになった。また、紫外線照射PGCsを2日胚の血管中に移植した結果、照射時間が30から60秒の場合には、PGCsは増殖が抑制されるものの生殖腺への移住能を保持し、核レシピエントとして利用できる可能性が示された。

(2) PGCsと体細胞の電気融合

次いで、体細胞として胚性血球細胞(EBCs)を用い、電気融合による核移植PGCsの作製を試みた。電

気融合の効率は、細胞を整列させる AC フィールド、および細胞融合を誘導する DC パルスによって影響され、また、融合液の浸透圧も融合効率を決める重要な要因である。そこで、本実験では AC フィールドと DC パルスの電气的条件、および融合液の濃度について検討した。その結果、サッカロース濃度 0.25M の融合液、350V/cm (60 秒間) の AC フィールド、および 4kV/cm (3 回) の DC パルスという条件設定で、約 10% の高い融合効率が得られることが明らかになった。

(3) 核移植 PGCs を用いた生殖系列キメラ胚の作製

最後に、上記の方法で作製された核移植 PGCs を用いて、生殖系列キメラ胚の作製を試みた。60 秒間の紫外線照射および EBCs との電気融合により作製された核移植 PGCs を、2 日胚血液中に注入した。また、EBCs 由来の生殖系列キメラであることを確認するために、あらかじめ EBCs を蛍光色素で標識したところ、注入 5 日後、全繰り返しにおいてレシピエント胚の生殖腺から標識細胞が検出された。また、PGCs およびレシピエント胚にオス (ZZ)、EBCs にメス (ZW) を用いたところ、注入 5 日後のレシピエント胚生殖腺から W 染色体が検出された。これらの結果から、核移植 PGCs は生殖腺に定着し、レシピエント胚は生殖系列キメラ胚になることが示された。

審査の結果の要旨

哺乳動物における体細胞クローンの作出は、1997 年にヒツジで最初の成功例が報告されて以来、多くの動物種で成功し、新しい動物利用を可能にする新技術として期待されている。しかしながら、鳥類では卵細胞が多量の卵黄物質を蓄積する巨大細胞であり、体外培養および細胞操作が難しいことから、体細胞クローン技術の開発は未知の領域に止まっている。一方、鳥類では初期胚中に出現する PGCs の移植により生殖系列キメラが得られ、このキメラ個体同士の交配により移植 PGCs に由来する個体の復元が可能である。本研究は、このような鳥類の PGCs の特色に着目し、PGCs を核移植のレシピエントとして利用する技術、すなわち哺乳動物の体細胞クローンに代わる鳥類での新技術開発を念頭に、その基盤技術としての核移植 PGCs 作製に係わる諸条件について検討したものである。まず、ニワトリ PGCs の紫外線照射による核の機能的不活化および体細胞との電气的細胞融合条件について検討し、次いで体細胞との融合 PGCs の生殖腺への移住能等について解析した。その結果、一定の条件下で紫外線照射による PGCs の機能的除核が可能であり、さらに体細胞との電気融合により核移植 PGCs が作製できること、また、この核移植 PGCs を用いて生殖系列キメラ胚が作製できること等を他に先駆けて明らかにした。

以上のように、本研究は PGCs を用いた体細胞核移植ニワトリの作製に関して、その技術開発に必要な新たな知見を提示するものであり、その成果の畜産学分野での役割は大きいと判断する。

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。