

論文内容の要旨

本研究では、ドジョウの胞胚細胞並びに培養体細胞を用いて非除核未受精卵への核移植を行い、個体の作出を試みるとともに、作出された個体について詳細な分析を行った。以下に本研究内容の要約を記した。

I. 非除核未受精卵への胞胚細胞の核移植

本実験では魚類における核移植技術の基礎的知見、および核移植技術の向上を目指して、ドジョウを実験材料魚として、非除核未受精卵への胞胚細胞の核移植を行い、個体の作出および作出個体の分析を試みた。その結果、レシピエント未受精卵の提供親およびドナー受精卵の採卵親と採精親をそれぞれ異なる組み合わせから得られた総数793個の核移植卵のうち、308(38.8%)が付活(卵割の有無を確認)、177(22.3%)が胞胚、17(2.1%)が孵化期に達し、13(1.6%)が仔魚となりその一部は成魚期の段階へ成長した。作出された発生胚および仔稚魚の細胞核の相対DNA量測定の結果、半数体、2倍体、4倍体、2倍体3倍体および2倍体4倍体モザイクが確認された。このうち2倍体の出現率は全体の58.8%を占めた。これらの個体から抽出されたDNAのRAPD分析およびマイクロサテライト多型解析の結果では、2倍体でドナー核のみに由来する個体および、レシピエント核のみに由来する個体がそれぞれ見られた。また4倍体にはドナー核のみを有するものと、ドナーとレシピエントの両核を有するものが認められた。これらの結果から、非除核未受精卵への胞胚細胞の核移植によって成魚期まで生存する個体が作出される事が明らかとなった。

II. 非除核未受精卵への同一の胞胚から得られた細胞を用いた核移植

ドジョウ非除核未受精卵への胞胚細胞の核移植では、ドナー由来の2倍体個体が得られる事が確認された。これは、ドナー細胞を同一の胞胚期卵から得られたもののみを用いることで同じ遺伝子組成の個体が作出される可能性がある。そこで本実験では、同一の胚から得られた細胞を個々のレシピエント卵に移植し作出個体の倍数性および核の由来を分析し、クローン生成の可能性について検討した。その結果、総数1599個の核移植卵のうち、619(38.7%)が卵割、366(22.9%)が胞胚、35(2.2%)が孵化期に到達し、25(1.6%)が仔魚となり、その一部は成魚期へと成育した。倍数性判定では2倍体、3倍体、4倍体、2倍体3倍体モザイク、2倍体4倍体モザイクの個体が確認された。更に、倍数性が半別された個体の核の由来についてマイクロサテライト分析をおこなった結果、様々な倍数性と核の由来の組み合わせが確認されたが、そのうち複数のドナー由来の2倍体を含んだグループが確認された。この結果、非除核未受精卵を用いた核移植においてもクローンに近い個体の集団が作出されることが明らかとなった。

氏名	田中 大介		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	農第133号		
学位授与の日付	平成21年3月21日		
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当		
学位論文題目	ドジョウの非除核未受精卵への胞胚細胞並びに体細胞の核移植に関する研究		
論文審査委員(主査)	教授	太田博巳	
(副主査)	教授	角田幸雄	
(副主査)	教授	細谷和海	

III. 胞胚細胞の核移植によって作出された個体の形態的分析と生殖能力

本実験では胚細胞核移植によって作出され、成魚期へと生育した核移植魚 15 個体について生物学的特徴を調べ、その健全性について調べた。その結果、核型分析においてドナー由来の 2 倍体核移植個体は、 $2n=50$ であり正倍数体であることが確認された。また他の倍数体も同様に正倍数体であった。形態的分析は、核移植魚 2 倍体 12 個体と対照魚 (養殖魚雌 30 個体、雄 30 個体) の固定標本について、体長 (BL)、頭長 (HL)、体高 (BH)、尾柄高 (CP)、頭幅 (HW)、体幅 (BW)、尾柄幅 (CPW)、吻端から背鰭、胸鰭、腹鰭、臀鰭の各鰭の全端基部までの長さ (それぞれ DF、PF、VF、AF とする) および体重 (W) を測定し、体長と諸形質との回帰直線の傾きと切片の差について検定を行った。また脊椎骨数、鰓耙数、および胸鰭、背鰭、腹鰭、臀鰭、尾鰭の鰭条数を測定し、通常魚との比較も行った。その結果経皮的分析および計数的形質においても通常魚との有意な差は確認されなかった。しかし、体重においてのみ有意差が見られた。生殖能力については雌雄それぞれから、卵および精子が得られ、精子には運動活性が、卵には胚盤の隆起が確認された。さらに、通常魚との掛け合わせにおいてそれぞれの組み合わせで卵割の開始が確認され、孵化期、摂餌仔魚期へと成育した。また生残率においても対照と変わらなかった。これらの結果より、非除核未受精卵への胞胚移植によって得られた核移植魚の健全性が示された。

IV. 非除核未受精卵への培養体細胞の核移植

ドジョウ成魚の鱗から培養された体細胞をドナーとして非除核未受精卵への核移植を行い、個体の作出を試みた。ドナー細胞には親魚の鱗組織を FBS 濃度 15% とした DULBECCO'S MODIFICATION OF EAGLE'S MEDIUM (DMEM) 中でコンフルエントまで培養し用いた。核移植実験の結果、総核移植卵数 434 個のうち、90 (20.7%) が卵割し、68 (15.7%) が胞胚期、11 (2.5%) が囊胚期に至った。しかし、体節期以降への発生個体は確認されなかった。囊胚期および、その近くの段階まで発生した胚の一部は固定しマイクロサテライト分析を行った。その結果、43 の胚のうち 4 個体はドナー核のみを、5 個体はレシピエント核のみを、34 個体はドナーおよびレシピエントの両核を有することが判明した。これらの結果より、通常体細胞移植によって卵は付活化され発生を開始するが、本手法において体節期以降へ発生を進めた個体は得られなかった。

V. 非除核未受精卵への血清飢餓培養法によって培養された体細胞の核移植

非除核未受精卵への血清飢餓培養法によって培養された成魚の鱗細胞の核移植によって個体へ発生するか否かを検討した。ドナー細胞は FBS 濃度 15% の DMEM 中でコンフルエントまで培養後、FBS 濃度 0.5% の培養液に置換し 3 日間血清飢餓処理を行い

用いた。その結果、総核移植卵 1038 個のうち、176 (17.0%) が卵割し、72 (6.9%) が胞胚期、39 (3.8%) が囊胚期へと至った。しかし、体節期以降への発生個体は確認されなかった。また囊胚期および、その近くの段階へと発生した胚の一部については固定し、マイクロサテライト分析をおこなった。その結果、48 個体のうち 26 個体ドナーに由来、15 個体がレシピエントに由来、7 個体がドナーおよびレシピエントの両方に由来していた。これらの結果からドジョウにおける血清飢餓処理を行った培養体細胞移植の核移植で、体節期以降への個体は得られない事が明らかとなった。

VI. 低温処理を行った非除核未受精卵への培養体細胞の核移植

本研究ではドジョウを用いて低温処理を施した非除核未受精卵への核移植を行いそれらの生残率、また発生した卵や個体について核の由来を調べた。ドナー細胞には親魚の鱗組織を FBS 濃度 10% とした DMEM 中でコンフルエントまで培養し用いた。レシピエント卵は搾出した未受精卵を接水 5 分後から 40 分間約 0 度で低温処理を行い、その後卵脚除去を行い用いた。その結果、総核移植卵 837 個のうち 201 (24.0%) が卵割し、97 (11.6%) が胞胚、43 (5.1%) が囊胚、6 (0.7%) が体節期、3 (0.4%) が孵化期へと到達した。そのうち 1 個体 (0.1%) が孵化後 5 日齢へと達した。また、倍数性の判別が可能であった 3 個体のうち、4 倍体が 2 個体、2 倍体が 1 個体であった。更にマイクロサテライト分析は 17 個体について行い、そのうち 5 個体がドナーのみに由来していた。また 11 個体でドナーおよびレシピエントの両方の核に由来し、また 1 個体がレシピエント核のみに由来していた。そして核の由来と、倍数性の判別を照らし合わせた結果、4 倍体 2 個体はドナーおよびレシピエントの両方に由来し、2 倍体の個体はドナー核のみに由来していた。これらの結果から、低温処理卵への核移植によって孵化期以降も生存する個体が作出される事が確認された。

本研究では、ドジョウの非除核未受精卵への胞胚細胞移植において個体が作出され、それらの中にはドナー由来の 2 倍体および他の倍数体が確認された。更に、核移植個体の一部は成魚期まで生存し、それらから次世代が得られた。また、培養体細胞を用いた同様の実験の一部においても孵化期へと生存した個体が得られた。これらの結果は、魚類の核移植の研究の技術向上に有用であると同時に、育種や絶滅危惧種の保護や保存に結びつくものと思われる。

論文審査結果の要旨

水産のバイオテクノロジーに関する研究は、1980年前後から染色体操作を中心に進められ、倍数体、雌性発生、並びに雄性発生2倍体、およびクローンの作出技術とそれら作出した魚の利用性について究明されてきた。これらの作出過程で、染色体はゲノム単位で人為的に倍加または削減され、染色体倍加は受精卵の第二減数分裂あるいは第一卵割を阻止することによって達成されてきた。しかしながら第一卵割阻止は第二減数分裂阻止に比べて細胞学的に困難であり、これによるクローン作出の成功率は極めて低く、4倍体はほとんど得られていないのが現状である。本研究論文が取り組んだ細胞核移植技術は4倍体、およびさらに高次の倍数体作出に活用できる技術として期待されている。さらに最近では絶滅危惧魚種の保存対策として核移植技術の活用が提案されている。このように本技術は種々の有用性を持つが、魚類における核移植実験の報告は哺乳類、両性類に比べて少なく、未だ基礎的知見の収集が必要な分野である。

本研究ではドジョウを実験材料として、核移植による倍数体作出に関わる諸問題を解明するため、4倍体、複2倍体、クローン作成の可能性とその育種への応用について詳細に検討している。初めに、非除核卵へ初期胚細胞を移植し、核移植魚の作出頻度、倍数性、ドナー・レシピエント核の所有状態について明らかにし、次に同一胚の細胞核を個々のレシピエント卵に移植してクローン生成の可能性について検討した。また、実験によって得られた未成魚期～成魚期へと成育した個体については外部形態および核型分析、生殖能力の分析、通常魚との比較によって健全性を詳細に調べた。更に、培養体細胞の核移植実験も行い、個体作出の可否や、培養体細胞からのクローン作出についても検討を行った。

まず、ドジョウ非除核未受精卵への胞胚細胞の核移植をおこない、卵は発生を開始し孵化期へと至った。更に作出個体の一部は成魚期へと成長した。核移植魚の相対DNA量の分析では、半数体、2倍体、3倍体、4倍体が確認された。また、これに加えて2倍体-4倍体モザイクの存在を示唆した。更に核移植魚の核の由来の分析では、様々な核の由来と倍数性の組み合わせが見られたが、2倍体個体の多くがドナー核のみを所持していることを明らかにした。

次に核移植によりクローン作成を目的として、同一胞胚からの胚細胞の核移植による個体の作出を試み、一つの胞胚から複数の個体を作成した。更にそれらの個体にはドナー由来の2倍体の組み合わせが確認され、それらは遺伝的均一性の高いクローン

と考えられた。この胞胚細胞の核移植によって作出し、成魚期まで成長した個体の核型、形態的特徴、生殖能力について調べ、それぞれの個体が正倍数性であること、異数体などの染色体異常は確認されないことを明らかにした。また、核移植魚の外部形態的特徴は、体長に対する各部分の比率は対照魚の範囲内であった。鰓耙数、鱗条数および脊椎骨数の各計数比較においても、同様に核移植魚と通常魚との間に差異がないことを明らかにした。核移植によって作出された個体の生殖能力について、核移植雌魚と通常魚雄の交配、および通常魚雌と核移植雄魚の交配によって、得られた受精卵が高い頻度で発生を続け、摂餌仔魚に到達することも確かめている。これらの結果から、胞胚細胞の核移植によって作出した個体が健全であることを明瞭に証明した。

次に培養細胞の核移植では、核移植卵は卵割を開始したが、胚の生残率は発生が進むにつれて低下し、囊胚期で全ての卵が発生を停止し、その結果からドナー核の不十分な初期化に原因すると考察した。そこで、核移植卵の発生能の向上を目指し、血清飢餓培養法により培養した体細胞の核移植を行った結果、孵化期へと至る個体は得られなかったものの、囊胚期における生残率は通常条件と比較すると高い傾向が見られたことから細胞が初期化にはある程度成功したものと考えられた。最後に低温処理を行った非除核未受精卵への体細胞核移植を行い、個体数は少ないものの、体節期、孵化期、孵化5日齢までの個体を得ることに成功した。

以上のように、申請者はドジョウの非除核未受精卵への胞胚細胞の核移植によって新たな個体を作成し、それらが成魚期へと至り生殖能力を有することを本研究によって証明した。また作出個体の健全性についても明らかにし、これらの成果は魚類の核移植技術の向上に著しく貢献し、魚類育種のみならず、絶滅危惧種の保護や保存にも有用な技術を開発したと考えられる。

よって本論文は博士（農学）論文として価値あるものと認める。

なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経た上、平成21年2月9日の農学研究科教授会において論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が充分であると認められた。