

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 先 第 320 号	氏 名	西尾 克俊
審査委員	主査 辻 明彦 副査 長宗秀明 副査 音井威重		
学位論文題目 Studies of efficient conditions for generation of genetically modified pigs (遺伝子組換えブタの効率的作製条件に関する研究)			
審査結果の要旨 <p>ブタは解剖学的、生理学的にヒトと類似しているとの理由から、異種移植などの医用動物としても注目をされるようになった。さらに近年、CRISPR/Cas9 を中心としたゲノム編集技術が開発され、遺伝子編集された子豚の誕生が多く報告されるようになってきた。特に、体外受精過程でエレクトロポレーション法を用いたゲノム編集技術は受精卵の段階で遺伝子導入・編集が行われ、特殊な技術を必要としない方法として有用であることが示された。一方、ゲノム編集体外受精卵を作出するには卵母細胞が必要であるが、ブタは暑熱に弱く、特に受精前の卵母細胞の成熟過程での感受性が大きいとされている。そこで本研究では、安定的に且つ効率的にゲノム編集受精卵を作出するために、1) 豚受精卵へのCRISPR/Cas9 の効率的な導入条件を検討し、2) 卵母細胞の成熟過程での高温への感受性の高い時期を特定することを試みた。</p> <p>最初に、エレクトロポレーション法におけるパルス波形および電圧が胚発生に及ぼす影響を検討した。その結果、両極性パルスは単極性パルスに比較して胚発生率を低下させることが判明した。一方、電圧においては40V/mmで処理された胚の発生率は低下し、さらに、30V/mm以上の電圧は発生した胚のDNA損傷率を増加させた。FGF10を標的としたゲノム編集を2種類の電圧(25V/mm および30V/mm)で行った場合、発生した胚の編集割合は、それぞれ7.7% (2/26) および3.6% (1/28)であったことから、25V/mmでの単極性パルスによるエレクトロポレーションが胚生存率を維持でき且つゲノム編集が可能な条件であることを明らかにした。</p> <p>次に、ブタ卵母細胞の熱ストレス(41℃)感受性の高い核成熟時期を検討した。培養開始からそれぞれ12時間高温下で培養を行い、合計48時間成熟培養した。その結果、成熟培養開始12時間目から高温下に置いた群で成熟率が有意に低下し、DNA損傷率も有意に高くなった。次に、この感受性の高い核相を確認した結果、培養時間12時間~16時間では卵核胞期、20時間目では卵核胞崩壊期、24時間目では第一減数分裂中期の卵母細胞の割合が最も多く占め、熱ストレスの影響を最も受けるのは卵核胞期から第一減数分裂中期の移行時期であることを示した。</p> <p>以上本研究は、安定的に且つ効率的にゲノム編集体外受精卵を作出するための条件を明らかにしたものであり、本論文は博士(工学)の学位授与に値するものと判定する。</p>			