

氏 名	志 賀 一 穂
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2496 号
学位授与の日付	平 成 15 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	クローン牛の実用的生産技術の開発に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 今 井 裕 教 授 佐 々 木 義 之 教 授 宮 本 元

論 文 内 容 の 要 旨

胚の分割により、また初期胚の割球や体細胞をドナー細胞とした核移植によって、クローン牛を人為的に生産できるようになった。これらのクローン牛は、それらが有している遺伝子が全く相似であると予想されることから、産肉・産乳能力を正確に判定する実験用試験牛として、限られた供試頭数で精度の高い試験結果を得ることが期待できる。また、体細胞を用いたクローン技術では、既に能力の判明したウシと同等レベルの経済価値をもつウシを生産することもでき、今後、質の高い乳・肉生産や牛群の改良に畜産現場での応用が期待される。しかし、胚の分割や核移植などの胚操作技術は開発されてもない技術であり、多くの点で技術的改良を必要としている。本研究では、これらの技術を畜産現場で実用的に利用するための技術改良や実証を試みたものであり、その内容は以下のように要約できる。

第1章では、肉用牛生産農家が、生産性が高く、低コストな子牛生産を行うには、双子生産が効果的であることを述べ、これを達成するために開発された初期胚分割技術とクローン技術の歴史的背景と技術的改良点などについて述べている。

第2章では、牛胚の分割による遺伝的に相似な双子牛の生産とその関連技術について検討している。まず、牛分割胚を実用的に利用するため、分割胚の凍結保存技術について検討し、グリセロールとシュクロースによるストロー内ワンステップ法を使うことにより、生存性の高い凍結保存が可能であることを示した。分割胚の性を予知し、希望される性を持つウシを生産するための性別判別技術の検討では、数個の胚細胞を用いて、Y染色体特異的遺伝子に対するPCRによって、90%以上の精度で性別判別が可能になった。また、分割胚によって生産した一卵性双子の片方を肥育して産肉性を調査することにより、産肉性に優れた種雄牛候補牛が選抜でき、双子の肥育検定により息牛の間接検定成績が推定可能であることを示した。

第3章では、初期胚に由来する胚細胞をドナーとした核移植を実用化するために、第2成熟分裂中期にある卵母細胞をレシピエントとして、核移植後の胚を効率的に活性化し、胚盤胞期まで発生させる条件を見出した。さらに、核移植胚の培養条件について検討し、マウス胎子線維芽細胞との共培養による培養系を確立した。また、レシピエント卵子の凍結保存技術について検討し、エチレングリコールを用いた凍結保存法を開発した。

第4章では、体細胞をドナーとしたクローン技術について検討した。体細胞のリプログラミングに及ぼす血清飢餓処理の影響について検討し、従来考えられていたような血清飢餓処理の有効性は認めることができなかった。筋肉組織由来培養細胞をドナー細胞とし、レシピエント卵子への核移植に続き活性化誘起処理を行うことにより、体細胞クローン胚が高率に発生し、正常なクローン牛が生産できることを明らかにした。また、体細胞クローン胚の発生に適切な培養条件を検討し、5%酸素の低酸素下では無血清培地で胚発生が可能であることを示し、クローン胚の胚発生に必要な培養条件を検討するための実験系を確立することができた。

以上のことから、クローン技術にはいまだ解明すべき点、改良すべき問題点も多いが、畜産における実用技術として有効に活用しうる大きな潜在価値をもっていると考えられた。

論文審査の結果の要旨

胚の分割技術や体細胞核移植などのクローン技術の開発によって、遺伝的に全く相似な個体、すなわちクローン家畜を作出することが可能になった。これらの技術の家畜改良に応用することによって、短期間で、効率的に家畜群の経済形質を高めることが可能になると期待される。しかし、これらの技術を実用的に利用してゆく上で、改良すべき点が多く残されていた。本研究は、クローン技術をウシに応用し、実用化するための技術的改良を目的として行われた。得られた成果は、以下のように要約される。

1. 胚の分割による遺伝的に相似な双子牛生産技術を確立するため、分割胚の凍結保存技術について検討し、耐凍保護剤としてグリセロールとシュークロースを用いた実用性の高い、簡便な胚の凍結保存法を開発した。
2. 数個の胚細胞からPCR法によるY染色体関連遺伝子の特異的増幅によって、分割胚の性を90%以上の精度で予知し、性の分かった子牛を生産する手法を開発した。
3. クローン技術の種雄牛選抜への応用の可能性を、分割胚から生産した一卵性双子牛を用いて検討した。双子牛の片方を肥育して得られた産肉成績は、もう一方の子牛が子孫に伝達した産肉能力をよく反映しており、クローン技術が種雄牛造成に有効な技術となりうることを示唆している。
4. 受精後の胚細胞を用いたクローン技術の改善を行い、レシピエント卵子の人為的活性化手法や胚の体外培養条件を改善することにより、クローン胚を効率的に胚盤胞期まで発生させる技術を開発した。
5. クローン技術の簡易化を図るために、核移植の際にレシピエントとして用いられている未受精卵の凍結保存技術を開発した。
6. 体細胞のリプログラミングに及ぼすドナー細胞（筋肉組織由来の培養細胞）の血清飢餓処理について検討した。体細胞クローン牛の生産には、ドナー細胞の血清飢餓処理は不可欠ではないことを明らかにしている。さらに、クローン胚の体外培養条件について検討し、低率ではあるものの、安定してクローン牛を生産するための基盤技術を確立している。

以上のように、本論文は、遺伝的に全く相似のクローン牛の生産技術を実用化する上で、重要と考えられるいくつかの技術に関して新知見を得たものであり、家畜繁殖学並びに家畜遺伝育種学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成15年7月24日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。