

氏 名	しま づ よし き 島 津 美 樹
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2494 号
学位授与の日付	平 成 15 年 7 月 23 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	ミニブタの生殖工学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 宮 本 元 教 授 佐 々 木 義 之

論 文 内 容 の 要 旨

ミニブタはボディーサイズが小さい(成熟個体で約30kg)ため飼育・管理が容易であり、また解剖学的・生理学的にもヒトと類似していることから、農学および医学領域におけるモデル動物として期待されている。本研究は、ミニブタを農学・医学領域における遺伝子組換えモデル動物として利用するために、精液の保存、発情および排卵の人為的制御、受精卵の体外操作、受精卵移植、遺伝子組換え技術など、ミニブタにおいて生殖工学に関連する諸技術の確立を目指したものである。本論文の内容は以下のように要約される。

第1章では、ミニブタの育種改良における歴史的背景、繁殖生理の特徴を紹介し、モデル動物としての適性とそれを生かすための生殖工学技術の必要性について述べた。

第2章では、ミニブタ精液の保存法について検討した。採取した精液から精漿を完全に除去することで、15℃における7日間程度の液状保存が可能となった。また、液体窒素下での半永久的な凍結保存も可能であることがわかった。しかし、精液の低温に対する耐性能には大きな個体差が見出された。

第3章では、未成熟なミニブタにおける過剰排卵誘起法について検討した。ウマとヒトに由来する絨毛性性腺刺激ホルモンを投与することにより、未成熟ミニブタに発情と過剰排卵を人為的に誘導することが可能となった。さらに、ホルモン投与後120時間で雌雄両前核を有する受精卵を回収することができた。回収した受精卵を用いて、マイクロインジェクション法による遺伝子導入システムを確立した。

第4章では、成熟ミニブタの発情同期化について検討した。プロゲステロン様作用をもつ合成ステロイド剤であるAltrenogestを18日間投与することで卵巣中の黄体を維持し、投与終了後約6日で発情が回帰することを示した。さらに、Altrenogest処理は雌ミニブタの繁殖能力に全く影響しないことが明らかとなった。このことによって、成熟ミニブタの発情の人為的制御が可能になった。

第5章では、前章までに確立してきた生殖工学的手法を用いて、ハンチントン舞蹈病のモデルとなる遺伝子組換えミニブタの作製について検討した。ミニブタゲノムライブラリーよりクローニングしたハンチンチン遺伝子に、この疾患の主要な発症要因と考えられているCAG塩基の反復配列(75回)を挿入した後、神経細胞特異的に発現するラットエノラーゼ遺伝子プロモーターとの融合遺伝子をマイクロインジェクション法によって受精卵に導入した。合計5頭の遺伝子組換えミニブタが得られ、そのうちの1頭は、目的遺伝子産物を脳で発現するとともに、ハンチントン舞蹈病に類似の表現型を示した。

本研究によって、ミニブタを遺伝子組換えモデルとして利用するために不可欠な生殖工学の基盤技術を確立することができた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

ミニブタは成熟した個体でも30kg程度しかなく、大動物を主たる研究対象としている畜産領域において、有望な実験動

物である。また、解剖学的・生理学的にヒトに類似する点が多く、医学領域を含む多方面でのモデル動物としての利用が期待できる。特に、遺伝子組換え技術はミニブタの利点を生かし、モデル動物として利用する基盤技術となる。しかし、そのために必要な生殖工学技術はこの動物種では未開拓の研究領域である。本研究では、ミニブタにおいて生殖工学技術を開発し、遺伝子組換えへの応用の一例として、ハンチントン舞蹈病の遺伝子疾患モデルを作出することを目的としている。得られた成果は、以下のように要約される。

1. ミニブタの安定的生産、遺伝子組換え個体の維持には、精子の保存技術の開発が不可欠である。精液中に含まれる精漿を除去し、保存液と置換することにより、15℃下における1週間の保存、-196℃における凍結保存が可能になった。

2. 遺伝子組換え個体を作出するため、遺伝子を導入する受精卵を効率よく採取するための技術として、過剰排卵誘起技術について検討した。未成熟な雌ミニブタに対して、性腺刺激ホルモンを投与することにより、発情を強制的に誘導するとともに、多数の卵子の排卵と受精卵の回収が可能になった。

3. 遺伝子導入卵子を適切な時期にレシピエントブタに移植するために、成熟ミニブタの発情周期の制御技術について検討した。合成ステロイドホルモンにより偽妊娠を維持しながら、同ホルモン剤の一過的な投与停止によって発情を人為的に誘導することが可能になった。発情同期化した雌ミニブタは、胚移植後正常な繁殖能力を有していることを明らかにしている。

4. ハンチントン舞蹈病の疾患モデルとなる遺伝子組換えミニブタの作出を試みた。ミニブタゲノムライブラリーより同病の責任遺伝子であるハンチンチン遺伝子をクローニングした。この遺伝子に疾病の原因と考えられているCAG塩基反復配列を挿入し、神経細胞特異的に発現するプロモーターとともに、受精卵に遺伝子導入した。胚移植によって、5頭の遺伝子組換え動物が得られ、このうちの1頭は目的とするモデル動物としての表現型を示した。

以上のように、本論文は、ミニブタにおける生殖工学技術を開発するとともに、遺伝子組換えミニブタの作出に成功し、ミニブタを各種モデル動物として応用するための基盤を確立したもので、実験動物学、家畜繁殖学、生殖工学および家畜生理学の発展に寄与するところが多い。

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6月19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。