

サケ科魚類の生殖系列における遺伝子操作技術の開発

著者	片山 直人
学位名	博士(海洋科学)
学位授与機関	東京海洋大学
学位授与年度	2015
学位授与番号	12614博甲第386号
URL	http://id.nii.ac.jp/1342/00001274/

[課程博士] (博士論文審査及び最終試験の結果要旨)

学生氏名：片山 直人

博士論文題目：サケ科魚類の生殖系列における遺伝子操作技術の開発

博士論文審査：申請者から提出された論文について、審査委員と申請者の間で質疑応答が繰り返され、誤記の訂正や表現の修正等が施された。

第一章では、*Cre/loxP* 系を用いたパルス標識法を構築するにあたり、*Cre/loxP* 系がニジマスの生殖細胞特異的に稼働しうるかを検討した。その結果、*Cre* 酵素による *DsRed* 遺伝子の切り出しが生殖細胞特異的に起こり、抑制されていた *Egfp* 遺伝子の発現をユビキタスプロモーターの制御により誘起できることを証明した。また、雄性生殖系列では、*vasa* 遺伝子は、精母細胞以降に発現が著しく減少するため、*vasa* 遺伝子の発現制御領域により制御される *cre* 遺伝子は、精原細胞のみで強発現していたと考えられる。したがって、*DsRed* 遺伝子は、精原細胞のみで *Cre* 酵素により切り出され、緑色蛍光を発していた精母細胞ならびに精子細胞は、*DsRed* 遺伝子が切り出された精原細胞が分化したことにより生じた細胞であったことが示唆された。このことは、未分化な *vasa* 遺伝子発現細胞である精原細胞の発生を、最も分化した精子細胞まで緑色蛍光により追跡できたことを示している。以上のように、ニジマス生殖細胞においても *Cre/loxP* 系が機能し、これを用いたパルス標識法の利用が可能であることが示唆された。

第二章では、遺伝子ノックアウト法により、生殖系列で特異的に発現している遺伝子の機能解析をサケ科魚類で行うことを目指し、その第一歩として CRISPR/Cas 系を用いたゲノム編集がヤマメ、ニジマス、ヒメマスにおいて可能であるかを検討した。稚魚各 8 尾の変異解析の結果、ヤマメでは 6 尾、ニジマスでは 7 尾、ヒメマスでは 6 尾で *dnd* 遺伝子に変異が認められた。さらに、成熟したヤマメおよびニジマス Founder 雄それぞれ 2 個体と 4 個体を野生型雌個体と交配し、F1 世代を得た。F1 世代のうち、*dnd* 遺伝子ヘテロ変異体を探索した結果、ヤマメではそれぞれ 6.8% と 13.3%、ニジマスではそれぞれ 0.8%、0.9%、1.9%、3.7% の F1 個体が *dnd* 遺伝子ヘテロ変異体であった。したがって、CRISPR/Cas 系を用い、サケ科魚類の *dnd* 遺伝子の編集に成功した。また、*dnd* 遺伝子の変異は生殖細胞系列でも認められ、次世代に *dnd* 遺伝子ヘテロ変異体を得られた。今後、*dnd* 遺伝子ヘテロ変異体同士を交配することで、*dnd* 遺伝子ノックアウト個体を得られると期待される。以上のように、CRISPR/Cas 系を用いて生殖細胞関連遺伝子をノックアウトすることが可能であることが示唆され、各遺伝子の機能解明に役立つことが期待される。

以上、本研究ではサケ科魚類において生殖系列での遺伝子の改変、あるいはノックアウト技術を開発した極めて貴重な基礎研究である。本研究は、サケ科魚類の育種学の将来に大きく貢献した内容であり、国内外の研究の水準と照らしてみても十分に高い学術的意義、新規性、独創性及び応用的価値を有しており、博士の学位に値することを審査委員一同確認した。

最終試験の結果要旨：

最終試験は平成 28 年 2 月 12 日に行われた。審査委員一同出席の下、講演発表は国内学会にて 6 回、国際学会で 2 回行っていることを確認した。さらに合同セミナーへの出席時間も 60 時間を越えていることを確認した。学術論文は 1 編が第一著者として公表済み(Naoto Katayama, Sachi Kume, Shoko Hattori-Ihara, Sakiko Sadaie, Makoto Hayashi and Goro Yoshizaki: Germ Cell-Specific Excision of loxP-flanked Transgenes in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Biology of Reproduction* (in press))であることを確認した。本論文は英語で書かれているうえ、国際会議でも口頭発表を行い、英語での質疑応答も無難にこなしていることから、語学についても問題ないと判断した。また、申請者に対して論文内容についての最終確認のための質疑応答を行い、その内容は十分であった。一方、専門知識については公開發表会(2月12日)当日の質疑や予備審査時でのディスカッションを含め十分であると確認した。以上から、申請者について博士論文審査、最終試験とも合格と判定した。