

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

Preservation of fish genetic resources by
spermatogonial cryopreservation

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2015-06-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 李, 承起 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1089

〔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：イ スンギ

博士論文題目：Preservation of fish genetic resources by spermatogonial cryopreservation
(精原細胞の凍結保存による魚類遺伝子資源の保存)

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。

近年、乱獲や環境破壊により多くの魚種が絶滅の危機に瀕しており、これら魚種の遺伝子資源の長期保存は喫緊の課題となっている。これまでに、本研究室において始原生殖細胞および精原細胞の凍結保存技術が確立され、凍結細胞由来の配偶子生産に成功している。一方、本技術はサンプリング直後に精巣組織を細胞レベルまで解離する必要があり、設備の整っていないサンプリング場所で本技術を用いることは困難であった。そこで本研究では、精巣組織をそのままの状態に凍結保存し、これから調整した細胞を宿主に移植することで、凍結精巣組織由来の卵と精子の生産を目指したものである。

本研究では生殖細胞が緑色蛍光を発する *pvasa-Gfp* 遺伝子導入ニジマスの精巣を材料に用いた。まず、凍結保存液中の凍結保護剤、タンパク質、糖の種類および濃度の至適条件を検討した。至適化された凍結保存液を用い、精巣の緩慢凍結を行った。凍結した精巣は1日から1年間、液体窒素中で保存した。解凍後、酵素処理により細胞分散を施し、A型精原細胞(ASG)の生残率を調べた。次に、凍結精巣由来の配偶子生産を目的として、優性アルビノ(ヘテロ) *pvasa-Gfp* 遺伝子(ヘミ)導入ニジマスの精巣を解凍後分散し、野生型の三倍体ニジマス宿主に移植した。

精巣凍結保存液の至適条件(1.3M DMSO、1.0M トレハロース、15% BSA)で精巣を1年間凍結保存した結果、ASGの生残率は29.15%であり、この値は保存期間に関わらず、ほぼ一定であった。1ヶ月および2ヶ月間凍結した精巣を宿主に移植した結果、凍結細胞は宿主生殖腺へ生着し、移植後2、3年目には、宿主が成熟した。得られた卵および精子を野生型のニジマスと交配させた結果、次世代個体のほぼ半数がアルビノおよびGFP陽性の表現型を示した。すなわち、三倍体宿主は凍結精巣組織由来の配偶子のみを生産し、これらの配偶子は機能的であることが確認された。以上の結果より、精巣を丸々の状態で凍結した材料から、生殖細胞移植介して機能的な卵、精子を生産可能であることが明らかとなった。

以上、本研究では魚類遺伝子資源を半永久的に保存するための実用的な方法を開発した世界で初めての例であるといえる。本研究で開発された技術は既に実用化されており、国内外で絶滅が危惧されているいくつかのサケ科魚類の保全プロジェクトに利用されている。このように魚類の保全生物学分野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26年2月16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2回、国際学会で1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(Lee, S., Iwasaki, Y., Shikina, S. & Yoshizaki, G. Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 1640-1645, (2013))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16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。