

# TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

Application of dead end-knockout zebrafish to recipients of germ cell transplantation

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2018-01-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 李, 倩 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1476">https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1476</a>

## 【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：李 倩 (リ セン)

博士論文題目： Application of *dead end*-knockout zebrafish to recipients of germ cell transplantation (*dead end*ノックアウトゼブラフィッシュの生殖細胞移植用宿主への利用)

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しなされ、誤記の訂正や表現の修正等が施された。生殖細胞移植に用いる宿主は移植細胞(ドナー)由来の配偶子に加え、宿主自身の配偶子を同時に生産する。そこで、不妊三倍体を宿主として利用し、ドナー由来の配偶子のみを生産する宿主の成功が可能になっている。しかし、魚種によっては、倍数化処理個体の生残率が著しく低い場合や、三倍体個体が異数性ながら配偶子を生産しうる例も散見される。そこで、本研究では、新たな不妊魚の作出法として、ゲノム編集技術に着目した。*dead end* (*dnd*) 遺伝子は、ゼブラフィッシュで初めて単離された始原生殖細胞の生殖腺原基への移動に必須の遺伝子である。本研究では、*dnd* 遺伝子をノックアウトするため、Zinc Finger Nuclease (ZFN) を用いた。まず、ゼブラフィッシュを用いて *dnd* 遺伝子の第 1 エキソンに設計した ZFN の RNA (10ng/ $\mu$ l) を受精卵に 2n1 ずつ顕微注入した。その結果、1 個体の親世代から変異を持つ次世代が得られ、その変異遺伝効率は 56.4%であった。さらに、これらの F1 個体の雌雄を交配することで、この変異をホモに持つ F2 の作出も可能であった。これらのホモ個体は生殖細胞を完全に欠損し、生殖細胞マーカーである *vasa* 遺伝子の発現も全く欠如していた。一方、これらの個体では支持細胞マーカーである *gsdf* は正常に発現していた。そこで、これらのホモ変異個体に *vasa*-*gfp* 遺伝子で生殖細胞を蛍光標識した細胞を移植した。その結果、移植細胞は宿主の生殖腺へと移動し、そこに取り込まれて増殖、分化を繰り返し、最終的には配偶子を生産しうることを明らかにした。得られたオス宿主を用いて交配実験を行った結果、これら宿主からはドナー由来のハプロタイプを持つ次世代のみが生産された。以上の結果から、*dnd* 遺伝子をノックアウトした生殖細胞欠損個体は生殖細胞移植の宿主として極めて適した性質を保持していることが明らかになった。本法は多くの水産上有用にも応用することが可能であるため、幅広い応用が期待される。

以上のように、学生から提出された博士論文は、国内外の研究の水準に照らし、各研究分野における学術的意義、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 29 年 8 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 4 回、国際学会で 1 回行っていることを確認した。大学院海洋科学技術研究科が指定した研究者倫理教育を修了し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、国際会議での発表の際も、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発表会(8 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。また、平成 29 年 8 月 16 日には、学術論文一編が第一著者として公表済みであることを確認した (Application of *dead end*-knockout zebrafish as recipients of germ cell transplantation. Li Q, Fujii W, Naito K, Yoshizaki G. Mol Reprod Dev. Jul 21. 2017)。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。