

| | |
|---------|---|
| 氏名(本籍) | 鴨下真紀(東京都) |
| 学位の種類 | 博士(学術) |
| 学位記番号 | 甲第71号 |
| 学位授与年月日 | 平成30年3月15日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第3条第2項該当 |
| 学位論文題名 | ゲノム編集のためのブタ前核期胚のガラス化保存法および CRISPR/Cas9 システムの導入条件に関する研究 |
| 論文審査委員 | (主査) 柏崎直巳 (副査) 伊藤潤哉 坂上元栄 |

論文内容の要旨

【序論】ブタは家畜として優れた繁殖能力や発育能力を有し、食料供給源として人類に大きく貢献している。また、その臓器のサイズおよび形態はヒトとの類似性が高く、ヒトへの臓器提供動物あるいは疾患モデル動物としても非常に有用である。人類は優秀な動物を選抜して繁殖させる方法で利用目的に適した家畜を作り出し、そこへ人工授精・胚移植等の技術を適用して、家畜の改良を効率的に行ってきた。しかし、この手法は改良に非常に多大な時間を要する。そこで人類が解決しなければならない食料増産等の解決法の1つとして、ゲノムレベルでの動物の機能や形質を改良する手法が有望視されている。そして、遺伝子組換えや遺伝子ノックアウト(KO)動物の作出が試みられ、多くの生物現象や疾病の解明等、様々な利活用が報告されてきた。このゲノムレベルでの動物の改良は、研究の初期段階では初期胚を含む未分化な生殖系列の細胞に対する遺伝子断片の顕微注入操作等によって行われていたが、目的個体作出には操作胚由来の個体からさらに交配を重ねる必要がある。また、マウス・ラット以外の種では生殖系列に分化する胚性幹(ES)細胞株は確立しておらず、家畜では相同組換えした体細胞を核移植することでゲノムレベルで動物を改良していた。しかし、体細胞の相同組換え率が低率であるばかりでなく、核移植後の胚の発育能が著しく低いことが問題で、家畜における遺伝子改変動物作出の報告は少ない。しかし、近年開発されたゲノム編集技術のCRISPR/Cas9システムを用いることで家畜でもゲノム編集動物作出が従来法より簡便に行える可能性が示唆された。しかし、このCRISPR/Cas9システムは、前核期胚へ直接核酸等を導入してゲノム変異を高率に誘起できるが、ブタでは生体からの胚採取には手術を要すること、また、体外受精による受精率が低いことから、前核期胚を多数準備することは難しい。さらに、CRISPR/Cas9システムの前核期胚への至適導入条件が明らかでないことから、効率的にゲノム編集個体を作成することは難しい。

本研究は、ゲノム編集ブタの効率的な作出システムの構築を最終的な目的に研究を行った。第一章では新規凍害保護物質カルボキシル基導入ポリリジン (COOH-PLL) を利用した前核期胚のガラス化保存の改良を試みた。第二章では CRISPR/Cas9 システムの効率化を目的とし、前核期胚への CRISPR/Cas9 システムの導入条件が体外での発生能および胚盤胞でのゲノム編集率に及ぼす影響を検討した。第三章ではガラス化保存前核期胚への gRNA および Cas9 注入後の発生能について調べた。

第一章 新規凍害保護物質を用いたブタ前核期胚のガラス化保存法の改良

【目的】ブタ前核期胚は細胞サイズが大きいことや、細胞質脂肪滴が存在すること等から低温感受性が高く、超低温保存後の発生能が低下することが知られている。本研究では新規凍害保護物質であるカルボキシル基導入ポリリジン (COOH-PLL) を添加した保存液がブタ前核期胚の体外での発生能に及ぼす影響を検討した。さらに、本保存液によりガラス化保存した前核期胚が産子への発育能を有するかを調べた。

【方法】食肉処理場由来卵巣より回収した未成熟卵を体外成熟培養し、得られた成熟卵を凍結融解精子と体外受精し、前核期胚を得た。前核期胚は、30% (v/v) ethylene glycol (EG) および COOH-PLL を 0、1、10、20、30% (w/v) 添加した保存液 (P0、P1、P10、P20、P30) を用いてガラス化保存し、加温後に体外発生培養を行い生存率および発生率を調べた。また、最も高い胚盤胞率を示した P20 でガラス化保存したブタ前核期胚を発情同期化したブタへ外科的に胚移植し、産子への発生能を調べた。

【結果】P0、P1、P10、P20 および P30 でガラス化保存した胚の生存率は、それぞれ 91.8%、86.7%、85.4%、80.7% および 76.8% で、試験区間に有意な差はなかった ($P > 0.05$)。P0、P1、P10、P20 および P30 でガラス化保存した胚の 2-4 細胞期胚率はそれぞれ 23.1%、27.5%、37.8%、41.7%、39.7% であり、P0 および P1 において対照区 (56.7%) と比較して発生率は低下した ($P < 0.05$)。また、胚盤胞率はそれぞれ 1.3%、3.8%、12.2%、19.4% および 4.8% であり、P20 は P0 よりも有意に高く ($P < 0.05$)、対照区 (28.4%) と有意差のない値を示した ($P > 0.05$)。さらに、P20 でガラス化保存した前核期胚を移植した 8 頭のレシピエント中 2 頭が妊娠、分娩をし、計 15 頭の産子が得られた。以上の結果より、20% (w/v) COOH-PLL 添加保存液によりガラス化保存したブタ前核期胚の胚盤胞への発生能は向上し、産子への発育能を有することが示された。

第二章 ブタ前核期胚への CRISPR/Cas9 システム導入条件の検討

【目的】CRISPR/Cas9 システムは、標的配列を認識する gRNA がヌクレアーゼである Cas9 を呼び込み、標的配列を切断する。前核期胚に導入する際には一般的に gRNA と Cas9 の mRNA やタンパク質を細胞質注入する必要がある。しかし、ブタでは最適な導入条件は明らかになっていない。本研究では、マウスにおいて着床に必須であるとされる Leukemia Inhibitory Factor (LIF) を標的とした gRNA の作製を行い、作製した gRNA および Cas9 mRNA あるいはタンパク質を前核期胚に注入し、その後の体外での発生能および胚盤胞のゲノム編集率を調べた。

【方法】gRNA は CRISPR direct ツールを使用して設計した。複数作製した gRNA のうち、最も切断効率が高い gRNA を選別するため、体細胞に gRNA と Cas9 を共発現するプラスミドを導入し、最も切断効率の高い gRNA を前核期胚の注入に用いた。gRNA および Cas9 発現プラスミドは *in vitro* 転写を行い、Nuclease free water で希釈した。第一章と同様の方法で作製した前核期胚に、5 ng/μL gRNA + Cas9 mRNA (R5)、12.5 ng/μL gRNA + Cas9 mRNA (R12.5)、25 ng/μL gRNA + Cas9 mRNA (R25)あるいは 50 ng/μL gRNA + Cas9 mRNA (R50)を注入し、生存率および胚盤胞への発生率を調べた。対照群として、注入を行わなかった無処理区および gRNA や Cas9 の希釈液を注入した Sham 区についても同様に生存率と発生率を調べた。さらに、10 ng/μL gRNA + Cas9 タンパク質 (Pro10)、25 ng/μL gRNA + Cas9 タンパク質(Pro25)あるいは 50 ng/μL gRNA + Cas9 タンパク質(Pro50)を注入し、同様に生存率および胚盤胞率を調べた。得られた胚盤胞は回収し、PCR 産物のダイレクトシーケンスによりゲノム編異率を調べた。

【結果】gRNA および Cas9 mRNA を注入した前核期胚の生存率は無処理区において 100%、Sham 区において 77.6%、R5 において 61.7%、R12.5 において 64.6%、R25 において 67.6%、R50 において 67.9%であり、Sham 区を含む顕微注入を行ったすべての試験区において生存率は低下した($P < 0.05$)。胚盤胞率は無処理区において 34.2%、Sham 区において 16.5%、R5 において 17.7%、R12.5 において 18.2%、R25 において 17.5%、R50 において 14.4%であり、試験区間に有意な差はみられなかった($P > 0.05$)。gRNA および Cas9 タンパク質を注入した前核期胚の生存率は Pro10 において 72.7%、Pro25 において 75.0%、Pro50 において 64.3%であり、無処理区(100%)および Sham 区(76.0%)と比較して有意に低い生存率を示した($P < 0.05$)。胚盤胞率は、無処理区において 36.7%、Sham 区において 8%、Pro10 において 9.1%、Pro25 において 14.3%、Pro50 において 12.5%であり、試験区間に差はみられなかった($P > 0.05$)。gRNA および Cas9 mRNA を注入した前核期胚由来胚盤胞を回収し遺伝子型解析を行った結果、R5 において 7.7%、R12.5 において 40.0%、R25 において 50.0%、R50 において 12.5%であり、R25 は R5 と比較して高いゲノム編異率を示した($P < 0.05$)。本研究により、gRNA および Cas9 mRNA あるいはタンパク質の前核期胚への注入は、胚の生存性を低下させるものの、胚盤胞への発生能には影響を及ぼさないことを示した。また、本研究の結果より R25 において最も高いゲノム編集率を示したため、効率よくゲノム編集胚を作出するためには適切な濃度の gRNA および Cas9 mRNA を注入する必要があると考えられる。

第三章 ガラス化保存ブタ前核期胚への gRNA および Cas9 注入後における発生能の検討

【目的】ブタ前核期胚は低温感受性が高く、ガラス化保存が難しいことに加え、顕微操作を伴う核酸の注入は胚への物理的なダメージが大きく、これまでにガラス化保存した前核期胚を用いて遺伝子改変動物を作出したという報告はされていない。そこで、第一章により確立した 20% (w/v) COOH-PLL 添加液を用いてガラス化保存したブタ前核期胚に gRNA および Cas9 を注入し、その後の発生能を評価した。

【方法】第一章と同様の方法で作出した前核期胚を 20% (w/v) COOH-PLL 添加液を用いてガラス化保存し、加温後に gRNA および Cas9 mRNA あるいはタンパク質を注入し、体外発生培養後の生存率および発生率を調べた。注入試験区は第二章と同様に設定した。さらに、Pro25 を注入した新鮮およびガラス化前核期胚を胚移植し、28 日後に子宮を採取し胎子の作出を試みた。

【結果】gRNA および Cas9 mRNA を注入したガラス化保存前核期胚の生存率は無処理区において 100%、Sham 区において 8.3%、R5 において 31.8%、R12.5 において 31.6%、R25 において 50%であり、Sham 区では生存率は低下した($P < 0.05$)。胚盤胞率は無処理区において 9.1%、Sham 区において 0%、R5 において 13.6%、R12.5 において 0%、R25 において 9.1%であり、試験区間に有意な差はみられなかった($P > 0.05$)。gRNA および Cas9 タンパク質を注入したガラス化保存前核期胚の生存率は無処理区において 59.5%、Sham 区において 32.4%、Pro10 において 27.0%、Pro25 において 34.2%、Pro50 において 16.2%であり、Pro50 は無処理区と比較して有意に低い生存率を示した($P < 0.01$)。胚盤胞率は無処理区において 2.7%、Sham 区において%、Pro10 において 2.7%、Pro25 において 5.4%、Pro50 において 5.3%であった。Pro25 を注入した新鮮およびガラス化前核期胚を胚移植した結果、胎子は確認できず、また着床痕も観察されなかった。以上の結果より、ガラス化保存したブタ前核期胚に gRNA および Cas9 を注入した結果、胚盤胞に発生することが示された。また、胚移植後に胎子への発育は確認されなかったが、LIF は胚の発生にも関与しているため、ゲノム編集が生じ LIF が欠損し着床がみられなかった可能性もあり、胚における LIF の役割についてさらなる研究が必要であると考えられる。

本研究により、ブタ前核期胚のガラス化保存法の改良に成功し、CRISPR/Cas9 システムの導入条件が胚の生存性とゲノム編集率に影響を及ぼすことを示した。さらに、CRISPR/Cas9 システムを導入したガラス化保存ブタ前核期胚が胚盤胞への発生能を有するをはじめて明らかにした。本研究の成果は、ゲノム編集ブタ作出の効率化に有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

1. 学問的背景

ブタは家畜として優れた発育能力や繁殖能力を有し、食料供給源として人類に大きく貢献している。また、その臓器のサイズおよび形態はヒトとの類似性が高く、ヒトへの臓器提供候補動物あるいは疾患モデル動物としても非常に重要である。人類は優れた動物機能を評価し、選抜して、繁殖させ、利用目的に適した家畜を作り出した。さらに人工授精や胚移植などの技術を活用し、効率的な家畜の改良を行ってきた。しかし、この手法は非常に膨大な時間を要する。また、今後の人類が解決しなけれ

ばならない持続可能な食料増産などの諸課題の解決法の1つとして、人為的なゲノム操作による家畜改良の手法が有望視されている。これまでに遺伝子組換えや遺伝子ノックアウト動物の作出が試みられ、多くの生物現象や疾病の解明など、様々な利活用が報告されてきた。このゲノム改変による動物の改良は、研究の初期段階では初期胚を含む未分化な生殖系列の細胞に対する遺伝子断片の顕微注入などによって行われていたが、目的とする個体作出には操作胚由来の個体（ファウンダー）をさらに交配して選抜する必要がある。また、マウス・ラット以外の種では生殖系列に分化する胚性幹細胞株は確立されておらず、家畜では目的の相同組換えを起こした体細胞を核のドナーとして核移植を介して目的の個体、すなわちゲノム改変動物を作出してきたが、体細胞の相同組換え率が低率で、さらに核移植胚の発育能が著しく低いことから、家畜におけるゲノム改変動物作出の効率は低い。しかし、最近開発されたゲノム編集技術、特に CRISPR/Cas9 システムを用いることで、家畜でもゲノム改変動物の作出が従来法より簡便に作出しうる可能性が示唆された。この CRISPR/Cas9 システムは、前核期胚などの初期胚へ直接核酸などを導入してゲノム変異を効率的に誘起しうるが、ブタでは生体からの胚採取には外科的手法を要すること、また、体外培養系による受精卵作製率が低いことから、前核期胚を多数準備することが難しい。さらに、CRISPR/Cas9 システムの前核期胚への至適導入条件などが明らかでないことから、効率的にゲノム改変ブタを作出することは難しい。

2. 論文の内容

本論文は、ブタにおけるゲノム編集によるゲノム改変個体を効率的に作出することを最終目的に、1) ゲノム編集の導入する標的細胞としての前核期胚を供給するためのブタ前核期胚のガラス化保存法の改良を試みた（第一章）、2) ゲノム編集処置のための核酸もしくはヌクレアーゼとしてのタンパク質の導入標的細胞としてのブタ前核期胚への導入諸条件を検討した（第二章）、そして3) ガラス化保存したブタ前核期胚をゲノム編集対象細胞とし、白血病阻止因子 (Leukemia Inhibitory Factor: LIF) を標的とした guide RNA (gRNA) および Cas9 の mRNA もしくはタンパク質を標的細胞の細胞質へ顕微注入し、その後の胚の発生能を調べた（第三章）。

第一章 カルボキシル基導入ポリリジンを用いたブタ前核期胚のガラス化保存法の改良

ブタ前核期胚は、細胞サイズが大きいことや細胞質脂肪滴が存在することなどから低温感受性が高く、超低温保存後の発生能が低下することが知られている。本研究では新規凍害保護物質であるカルボキシル基導入ポリリジン (COOH-PLL) を添加した保存液がブタ前核期胚の体外での発生能に及ぼす影響を検討した。さらに、本保存液によりガラス化保存した前核期胚が産子への発育能を有するかを調べた。

【方法】食肉処理場由来場ブタ卵巣より回収した未成熟卵を体外成熟培養し、得られた成熟卵を凍結融解精子と体外受精し、前核期胚を得た。胚は、30% (v/v) ethylene glycol (EG) および COOH-PLL を 0、1、10、20、30% (w/v) 添加した保存液 (P0、P1、P10、P20、P30) を用いてガラス化保存し、加温後

に体外培養を行い生存率および発生率を調べた。また、最も高い胚盤胞率を示した P20 でガラス化保存した前核期胚を発情同期化したブタへ外科的に胚移植し、産子への発生能を調べた。

【結果】P0、P1、P10、P20 および P30 でガラス化保存した胚の生存率は、それぞれ 91.8%、86.7%、85.4%、80.7%および 76.8%で試験区間に有意な差はなかった($P > 0.05$)。P0、P1、P10、P20 および P30 でガラス化保存した胚の 2-4 細胞期胚率はそれぞれ 23.1%、27.5%、37.8%、41.7%、39.7%であり、P0 および P1 において対照区 (56.7%) より低下した($P < 0.05$)。また、胚盤胞率はそれぞれ 1.3%、3.8%、12.2%、19.4%および 4.8%であり、P20 は P0 よりも有意に高く($P < 0.05$)、対照区 (28.4%) と有意差のない値を示した($P > 0.05$)。さらに、P20 にてガラス化保存した前核期胚を移植した 8 頭のレシピエントのうち 2 頭が分娩し、計 15 頭の産子が得られた。以上の結果より、20%(w/v) COOH-PLL 添加保存液によりガラス化保存したブタ前核期胚の胚盤胞への発生能は向上し、産子への発育能を有することが示された。

第二章 ブタ前核期胚への CRISPR/Cas9 システム導入条件の検討

CRISPR/Cas9 システムは、標的配列を認識する gRNA がヌクレアーゼである Cas9 を呼び込み、標的配列を切断する。前核期胚に導入する際には一般的に gRNA と Cas9 の mRNA やタンパク質を細胞内へ導入する必要がある。しかし、ブタでは最適な導入条件は明らかになっていない。本章では、マウスにおいて着床に必須であるとされる LIF を標的とした gRNA を作製し、gRNA および Cas9 の mRNA あるいはタンパク質を前核期胚細胞質に顕微注入し、その後の体外での発生能および胚盤胞のゲノム変異率を調べた。

【方法】gRNA は CRISPR direct ツールを使用して設計した。複数作製した gRNA のうち、最も切断効率が高い gRNA を選別するため、体細胞に gRNA と Cas9 を共発現するプラスミドを導入し、最も切断効率の高い gRNA を前核期胚の注入に用いた。gRNA および Cas9 発現プラスミドは *in vitro* 転写を行い、nuclease free water で希釈した。第一章と同様の方法で作製した前核期胚に、5 ng/ μ L gRNA+Cas9 mRNA (R5)、12.5 ng/ μ L gRNA+Cas9 mRNA (R12.5)、25 ng/ μ L gRNA+Cas9 mRNA (R25)あるいは 50 ng/ μ L gRNA+Cas9 mRNA (R50)を顕微注入し、生存率および胚盤胞への発生率を調べた。対照群として、注入を行わなかった無処理区および gRNA や Cas9 の希釈液を注入した Sham 区についても同様に生存率と発生率を調べた。さらに、10 ng/ μ L gRNA+Cas9 タンパク質 (Pro10)、25 ng/ μ L gRNA+Cas9 タンパク質(Pro25)あるいは 50 ng/ μ L gRNA+Cas9 タンパク質(Pro50)を注入し、同様に生存率および胚盤胞率を調べた。得られた胚盤胞は回収し、PCR 産物のダイレクトシーケンシングによりゲノム変異率を調べた。

【結果】gRNA および Cas9 mRNA を注入した前核期胚の生存率は無処理区において 100%、Sham 区において 77.6%、R5 において 61.7%、R12.5 において 64.6%、R25 において 67.6%、R50 において 67.9%であり、Sham 区を含む顕微注入を行ったすべての試験区において生存率は低下した($P < 0.05$)。胚盤胞率は無処理区において 34.2%、Sham 区において 16.5%、R5 において 17.7%、R12.5 において

18.2%、R25において17.5%、R50において14.4%であり、試験区間に有意な差はみられなかった($P > 0.05$)。gRNAおよびCas9タンパク質を注入した前核期胚の生存率はPro10において72.7%、Pro25において75.0%、Pro50において64.3%であり、無処理区(100%)およびSham区(76.0%)と比較して有意に低い生存率を示した($P < 0.05$)。胚盤胞率は、無処理区において36.7%、Sham区において8%、Pro10において9.1%、Pro25において14.3%、Pro50において12.5%であり、試験区間に差は認められなかった($P > 0.05$)。また、gRNAおよびCas9 mRNAを注入した前核期胚由来胚盤胞を回収し遺伝子型解析を行った結果、R5において7.7%、R12.5において40.0%、R25において50.0%、R50において12.5%であり、R25はR5と比較して高いゲノム変異率を示した($P < 0.05$)。本研究により、gRNAおよびCas9 mRNAあるいはタンパク質の前核期胚への注入は、胚の生存性を低下させるものの、胚盤胞への発生能には影響を及ぼさなかった。また本章の結果より、R25において最も高いゲノム変異率を示したため、効率よくゲノム編集胚を作出するには至適濃度のgRNAおよびCas9 mRNAを顕微注入する必要があると考えられる。

第三章 ガラス化保存ブタ前核期胚へのgRNAおよびCas9注入後における発生能の検討

ブタ前核期胚は低温感受性が高く、ガラス化保存の損傷に加え、顕微操作を伴う核酸の注入は胚への物理的なダメージがあり、これまでにガラス化保存した前核期胚を用いた遺伝子改変動物の作出例は報告されていない。そこで、第一章により確立した20% (w/v) COOH-PLL添加液を用いてガラス化保存したブタ前核期胚にLIFを標的としたgRNAおよびCas9を顕微注入し、その後の胚の発生能を評価した。

【方法】第一章と同様の方法で作出した前核期胚を20% (w/v) COOH-PLL添加液を用いてガラス化保存し、加温したブタ前核期胚に対して、LIFを標的としたgRNAおよびCas9 mRNAあるいはタンパク質を細胞質へ顕微注入した。そして、その胚の体外発生培養後の生存率および発生率を調べた。注入試験区は第二章と同様に設定した。さらに、Pro25を注入した新鮮およびガラス化前核期胚を胚移植し、28日後に子宮を採取し胎子の作出を試みた。

【結果】gRNAおよびCas9 mRNAを注入したガラス化保存前核期胚の生存率は無処理区において100%、Sham区において8.3%、R5において31.8%、R12.5において31.6%、R25において50%であり、Sham区では生存率は低下した($P < 0.05$)。胚盤胞率は無処理区において9.1%、Sham区において0%、R5において13.6%、R12.5において0%、R25において9.1%であり、試験区間に有意な差はなかった($P < 0.05$)。gRNAおよびCas9タンパク質を注入したガラス化保存前核期胚の生存率は無処理区において59.5%、Sham区において32.4%、Pro10において27.0%、Pro25において34.2%、Pro50において16.2%であり、Pro50は無処理区と比較して有意に低い生存率を示した($P < 0.01$)。胚盤胞率は無処理区において2.7%、Sham区において%、Pro10において2.7%、Pro25において5.4%、Pro50において5.3%であった。Pro25を注入した新鮮およびガラス化前核期胚を胚移植した結果、胎子は確認できず、また着床痕も観察されなかった。以上の結果より、ガラス化保存したブタ前核期胚にgRNA

および Cas9 を注入した結果、胚盤胞に発生することが示された。また、胚移植後に胎子への発育は確認されなかったが、LIF はブタ胚の発生や着床に関与している可能性があり、ブタ胚における LIF の役割について、さらなる研究の必要性が示唆された。

3. 論文の審査

1) テーマの立て方

家畜としてさらには医学・医療用の動物として非常に重要なブタにおける効率的なゲノム編集ブタの作出システムの構築を最終目的に、生殖系列の前核期胚をゲノムターゲットとして、その材料を効率的に供給する 1 つの手法として前核期胚の超低温保存法の改善、さらには、前核期胚への CRISPR/Cas9 の核酸もしくはタンパク質の導入条件をテーマに設定している。これらのテーマは、今後の人類が解決すべき持続可能な食料生産などの課題などの解決法の 1 つとして有望視されており、適切である。

2) 研究の背景

これまでのブタにおけるゲノム編集によるゲノム改変個体の作出は、体細胞核移植を介した研究が多い。そこで効率的なゲノム改変個体の作出に必要な初期胚への直接導入における様々な至適条件の検討や材料供給法の 1 つとしての初期胚超低温保存法の改善が必要なことを、先行研究を十分に理解したうえで、本論文の展開に役立てている。

3) 研究の方法

本論文での主な材料としてのブタ初期胚の入手は、生体からでは外科的処置が必要なことから、食肉処理場由来の卵巢から採取した卵母細胞を体外で成熟培養 (IVM) ・受精 (IVF) ・培養 (IVC) することにより作製した初期胚を用いることで十分な数の材料を研究に用いた。さらに、研究の方法として胚の発育能力は、IVC を基本に、胎子や産子への発育能は発情同期化した仮親への胚移植を採用しており、適切な評価方法である。

4) 研究の結果

本論文の実験結果は、適切に図表にまとめられており、統計学的な検定法も適切に適用されている。しかし、ゲノム編集の CRISPR/Cas9 システムを導入したブタ胚盤胞の解析数は多いとはいえない。

5) 考察と結論

本研究によって得られた結果から、ブタにおけるゲノム変異個体を効率的に作出するための多くの諸条件が明らかにされ、適切な結論を導き出している。今後のこの分野への貢献が期待できる。特にブタ前核期胚のガラス化保存による超低温保存した胚から産子を作出し、学術論文として公表したことは大いに評価できる。

6) 参考文献

ブタにおけるゲノム編集による効率的なゲノム変異個体作出システムに関連した先行研究が網羅的に引用されている。また、本論文におけるテーマの学問的背景や考察においても適切な文献が適切に

引用されている。

4. 審査結果

本論文の成果は、ブタ前核期胚ガラス化保存法の改良に成功し、ブタ前核期胚への顕微注入による CRISPR/Cas9 システムの導入条件が胚の生存性と誘導するゲノム変異率に影響を及ぼすことが明らかにしたことである。さらに、ガラス化保存ブタ前核期胚へ CRISPR/Cas9 システムを導入し、その処置胚が胚盤胞への発生能を有することを示した。これらの成果は、ゲノム編集によるゲノム改変ブタ作出の効率化に貢献するものと考えられる。以上のことから、本論文は博士（学術）の授与にふさわしい研究業績であると判定した。