

論文審査結果の要旨

本論文は、インド・スリランカにおける伝統医学（アーユル・ヴェーダ）において、糖尿病の治療に用いられている天然薬物 *Salacia Reticulata* 由来の抗糖尿病作用成分 kotalanol (1)、neokotalanol (2) に代表される新規スルホニウム塩に、新たな抗糖尿病薬のリード化合物の創製を求め、昨年新たに発見された関連化合物 neoponkoranol (3)、neosalaprinol (4) の構造研究も含め、これらスルホニウム塩の構造と活性の相関関係について検討を加えたものである。

1998 年の発見以来、側鎖の絶対構造が不明であった 2 について、天然品をアルカリ分解に付して得た化合物の別途合成によりその絶対構造を確定するとともに、本分解反応の過程で、極めて特異な脱保護を伴う閉環反応を見出している。また、2008 年、サラシア属植物から α -グルコシダーゼ阻害作用への主たる寄与活性成分として、新たに単離・同定されたスルホニウム塩 (5) と 13 員環環状スルフォキシド (6) が、それぞれ neosalacinol (7) および 2 であることを明らかにし、あわせて両者の簡便な合成法も確立している。さらに、2010 年に新たに単離された 2 種の関連スルホニウム塩型活性成分 (3 および 4) の同定にも成功している。このように極めて強い抗糖尿病作用を示す新規スルホニウム塩に関して、提唱構造の誤りを改訂したことは高く評価できる。

一方、構造活性相関研究では、2 の数種の側鎖置換基の立体異性体の合成を検討し、これらの合成とその過程で遭遇したヘプチトール類の特異な反応性を見出している。さらに、関連スルホニウム塩 neoponkoranol (8) の側鎖部の立体化学異性体 (3'-*epi*-7 および 5'-*epi*-7) の簡便合成法を独自のアイデアで立案し、3'-*epi*-7 に 7 を凌ぐ強い化合物の創製に至ったことは評価できる。また、全ての天然スルホニウム塩に共通の 5 員環チオ糖部の 6 員環への変換についても検討し、6 員環チオ糖 (8) の合成過程において、ビスエポキシド (9) の特異な閉環反応を見出し、文献記載の反応経路の誤りを訂正できたことも、大いに評価できる。

以上、本研究の手法および実験の展開方法ともに論理的かつ合理的で、得られた結果は天然物化学の分野のみならず、スルホニウム塩を先導化合物とする新規抗糖尿病の創製研究に資するところ大である。よって本論文は、博士論文として相応しいものと認める。

氏 名	なごや ひろゆき 名古屋 博之
学位の種類	博 士 (農学)
学位記番号	農 第 147 号
学位授与の日付	平成 22 年 9 月 15 日
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	細胞工学的手法を用いたアマゴの育種とその応用に関する研究
論文審査委員 (主 査)	教 授 太 田 博 巳
(副主査)	教 授 滝 井 健 二
(副主査)	教 授 細 谷 和 海

論文内容の要旨

育種作業は、野生集団の飼育、人工環境下における再生産技術の確立、各飼育集団の比較による遺伝的多型の解析、目的形質を定めた選抜、といった手順を踏んで新集団を作出するのが一般的な方法と考えられる。この選抜作業により品種として遺伝的に固定するには 20 世代以上の交配が必要とされる。産業重要種が多く含まれるサケ科魚類のように、成熟年齢に達するまでに長い年月を要するグループでは、従来の育種手法で形質を固定するには長期にわたる努力が必要となる。また、交雑育種では対象となる生物が交配可能な組み合わせに限定されるといった問題もある。しかし、近年著しい発達をみせる細胞工学や遺伝子工学的手法等を応用することにより、水産生物においても育種期間の短縮化や、交配不可能な種間でも細胞融合や外来遺伝子導入技術を応用することにより、遺伝的機能の改良を加えることがより効率的に行えるものと考えられる。

アマゴ *Oncorhynchus masou ishikawae* はサケ科サケ属の一種で、神奈川県以西の太平洋側、四国全域、九州瀬戸内海側の河川に分布する日本固有種である。通常は成熟に 2 年を要するが、(独)水産総合研究センター養殖研究所には雌雄ともに 1 年で成熟する系統が存在し、発生学や遺伝学に関する研究を展開するのに適したモデル魚として、その利用価値は高い。本研究ではこのアマゴを実験材料として、これまでの選抜や交雑といった長い年月を必要とした育種方法に対して、細胞工学的手法等を取り入れることにより短期間で育種が行える手法の開発を目的とした。第 1 章では、遺伝的固定化の短縮手法の開発を行った。わずか 2 世代で全ての遺伝子が相同なクローン集団を作出することが可能な雄性発生技術に着目し、その誘起条件の検討を行った。次に作出したクローンの生物特性についても明らかにした。また通常の交配によりそのクローンを維持することを目的として、雄性発生によって作出した YY 雄をホルモン処理により雌に性転換する条件を検討した。さらに、この雄性発生手法を改良するため、従来法である卵割阻止によって染色体を倍数化する方法に対し、予め精子を融合した後に人工授精を行うことにより、倍数化処理無しに 2 倍体を得る方法を検討した。第 2 章では、遺伝子工学的な手法を用いて短期間に目的の形質を導入する育種手法の開発を行った。ベニザケ *O. nerka* 由来の成長ホルモン遺伝子の上流にメタロチオネインプロモーターをつなげ、アマゴに遺伝子導入して高成長形質を添加した遺伝子組換え魚を作出し、その生物学的特性について検討した。また、遺伝子組換え魚が自然環境に散逸することに対するリスク低減策として、X 線照射による不妊化方法についても検討を行った。第 3 章では以上の結果を総合的に考察し、魚類の育種を効率的に推進する方法について検討した。

第 1 章 雄性発生による育種

1. 雄性発生アマゴの作出

両性生殖を行う種では母親由来の配偶子(n)と父親由来の配偶子(n)が受精によって融合(2n)することによって正常な発生が進む。卵あるいは精子のどちらかの配偶子を放射線などで核を遺伝的に破壊して人工授精を行うと、正常な配偶子の遺伝子のみで発生が進むが、この個体はいわゆる半数体となってふ化前後で全て死亡してしまう。ところが、受精後の卵割時に水圧や温度刺激によって卵割を抑えると、卵割に先立ち複製された染色体が分割されずに 2n となったまま発生が進み、次の卵割時にこの 2n が複製されて分裂が進むことで生

性が回復される。卵由来の核を遺伝的に破壊して正常な精子と受精させた場合が雄性発生、その逆に精子由来の核を破壊して正常卵と受精させた場合が雌性発生である。雌性発生の場合、卵割阻止を行って染色体を倍数化する手法以外にも、受精直後に起こる第 2 極体の放出を阻止することにより倍数化が起こる。この第 2 極体の放出阻止は自然界でも起こる場合があり、卵割阻止処理を施した個体の中に第 2 極体の放出が阻止された個体が混じるため、後の解析が複雑となる。これらを考慮に入れ、本研究では染色体の倍数化が卵割阻止のみで起こる雄性発生手法の開発を行った。

アマゴの未受精卵にコバルト 60 を線源とした γ 線照射を行い、種々の線量で卵由来の核を遺伝的に破壊し、正常精子と受精させて雄性発生を誘起した結果、最適線量は 450 Gy であった。また、卵に X 線を照射して雄性発生を誘起した場合も最適照射量は同じであった。染色体を倍加するための卵割阻止条件は、受精卵を 10℃ の水槽に収容して 7.5 時間後に 650 Kgf/cm²、6 分間処理した時が最適であった。雄性発生を 2 回繰り返した子供の DNA フィンガープリント像を調べた結果、全ての子供は像が一致し、クローンとなっていた。このことから、雄性発生によって作出された個体が完全ホモ個体であることが証明された。また、アマゴの性決定様式は XY 型であるが、精子から雄性発生で作出された個体の雌雄比はほぼ 1 : 1 であった。さらに雄性発生によって生じた雄と正常雌を交配すると、次世代は全て雄となり、雄性発生によって作出された雄の性染色体が YY 型(超雄)であることが確認された。これらの YY 雄は 17 α -ethynylestradiol の投与によって雌に性転換され、この YY 雌と YY 雄を交配することにより容易に YY 雄を維持できることも明らかとなった。

2. 精子融合条件の検討

卵割阻止法による雄性発生個体は精子由来の染色体が n と n に分かれることを阻止して倍数化するため、全ての遺伝子座で完全ホモ個体となる。本手法は 1 世代で遺伝的固定化が起こり、育種作業を行う上では有用である。一方、雄性発生の応用として、長期間凍結保存が可能な精子を用いた希少種の保護や系統の保存方法としての利用を考えた場合には、その遺伝的近交度が問題となる。受精する前に予め 2 つの精子を融合し、この融合精子(2n)と核を遺伝的に破壊した卵を受精させて雄性発生を起こせば、精子の組み合わせにより遺伝的近交が回避できると考えられる。そこで、精子融合と雄性発生を組み合わせる 2 倍体個体を作成する方法について検討した。

精子を融合する方法として、本研究では高濃度のポリエチレングリコール(PEG)溶液で精子を処理する方法を検討した。精子を処理する PEG の種類、濃度、及び処理時間を変えて精子の融合率と処理後の精子活性を調べたところ、分子量 7500 の 50%PEG で 150 秒間処理するのが最適であることが明らかとなった。この手法を用い、劣性遺伝を示す先天的メラニン色素異常のアルビノを利用し、そのアルビノアマゴ精子を用いた雄性発生 2 倍体の作出を試みた。作出した個体はアルビノの表現系を示すとともに、マイクロサテライトがヘテロ性を示したことから、遺伝的多様性を維持した雄性発生個体であることが証明された。この手法は卵割阻止型の雄性発生の弱点である遺伝的多様性の喪失を補完する手法として有用と考えられた。

論文審査結果の要旨

3. 雄性発生を利用した希少種の保存

雄性発生の利用方法として絶滅危惧種の精子を凍結保存し、種が絶滅した後に精子を解凍して近縁種の卵を借り腹とした雄性発生を行うことにより、個体を復活させることが考えられる。これを実証するため、希少種でアマゴの亜種に当たるビワマス *O. masou subsp.* の精子とアマゴ卵を用いて雄性発生2倍体個体を作成することを試みた。その結果、低い割合(0.01~0.05%)ながらもビワマスの雄性発生個体を得ることができた。雄性発生により生じた雄のDNAを調べたところ、ビワマス雄に特異的なマーカーの存在を確認した。このことから作出された雄個体はビワマス由来の遺伝子を持つ個体であることが確認された。

第2章 遺伝子導入手法による育種

雄性発生を行うことにより、2世代で遺伝的固定が可能となるが、この方法では作出された個体の中から目的とする形質遺伝子をホモに持つ個体を選抜する作業が残される。目的の形質が見つからなければ、雄性発生を繰り返す必要がある。そこで、目的の形質を直接導入する手法として、遺伝子組換え技術に着目した。形質として魚類養殖上のメリットが大きい高成長に着目し、下垂体系ホルモンである成長ホルモンの遺伝子導入を試みた。また、作出された遺伝子組換え魚類の生物特性についても調査を行った。ベニザケ由来のメタロチオネインBプロモーターの下流にベニザケの成長ホルモン遺伝子をつなげたプラスミドをアマゴに遺伝子導入した結果、遺伝子組換えアマゴを作成することに成功した。ふ化後13ヶ月間に渡り成長速度を調査した結果、対照群との間に約5倍の体重差が確認された。また、血中の成長ホルモン濃度を測定したところ、対照群に比べ最大10倍の濃度差が認められた。F1以降も成長速度を調査したところ、これらの形質が維持されることを確認された。次に、遺伝子組換え魚が自然界に散逸するリスク対策のため、魚の不妊化技術についても検討した。方法として、受精卵にX線を照射することによる不妊化を試みた。受精後24日後の発眼卵に1Grayから3Grayを照射し、1年後に生殖腺の発達を調べたところ、成熟期でも生殖腺が未熟な状態で維持される割合は5.9、17.1および35.0%となり、照射線量の増加とともに不妊化率が高まり、受精卵への放射線照射が魚類の不妊化手法として有望であることが示唆された。

以上述べてきたように、本研究では産業重要種であるアマゴを実験材料として、細胞工学的手法を用いた魚類の育種方法についていくつかの技術開発を行った。雄性発生を行うことにより、2世代で遺伝的固定化が可能となることを確認した。また、融合精子を人工授精することにより、遺伝的多様性を維持した雄性発生2倍体を作成することに成功し、この手法が希少種の保存や系統の保存にも有効であることを提示した。また、成長ホルモン遺伝子の組換えにより高成長を示すアマゴを作成し、その生物学的特性を明らかにした。さらに、遺伝子組換え魚の自然環境への散逸リスクを低減するため、受精卵にX線を照射を行うことにより不妊化する手法を考案した。これらの知見が成熟に多年月を要する魚類の育種作業の短縮化、目的とする形質の効率的導入、系統保存等に利用されていくことを期待したい。

水産重要種であるアマゴは日本固有の魚であるが、通常は成熟に2年を要する。申請者の名古屋博之は、(独)水産総合研究センター養殖研究所に雌雄ともに1年で成熟する系統が存在し、長年月を要する育種に関する研究を展開するのに適したモデル魚となり得ることに着目し、その利点を利用した魚類の育種技術の開発に取り組んだ。育種作業は選抜作業により品種として遺伝的に固定するには20世代以上の交配が必要とされる。産業重要種が多く含まれるサケ科魚類のように、成熟年齢に達するまでに長い年月を要するグループでは、従来の育種手法で形質を固定するには長期にわたる努力が必要となる。申請者は、近年著しい発達をみせる細胞工学や遺伝子工学的手法等を応用することにより、水産生物においても育種期間の短縮化や、交配不可能な種間でも細胞融合や外来遺伝子導入技術を応用して、遺伝的機能の改良を加えることがより効率的に行えると考えた。

両性生殖を行う種では、母親由来の配偶子と父親由来の配偶子が受精によって融合して正常な発生が進むが、卵あるいは精子のどちらかの配偶子を放射線などで核を遺伝的に破壊して人工授精を行うと、半数体となってふ化前後で全て死亡してしまう。申請者は、アマゴの未受精卵にコバルト60を線源としたγ線照射を行い、種々の線量で卵由来の核を遺伝的に破壊し、正常精子と受精させて雄性発生を誘起した結果、最適線量は450Gyであることを明らかにした。また、卵にX線を照射して雄性発生を誘起した場合でも最適照射量は同じであることも明らかにした。次に、染色体を倍加するための卵割阻止条件として水圧処理を試み、受精卵を10℃の水槽に収容して7.5時間後に650Kgf/cm²、6分間処理した時が最適であることを明らかにした。このような手法で雄性発生を2回繰り返した子供のDNAフィンガープリント像を調べたところ全ての子供は像が一致してクローンとなっていることを示し、このことから、雄性発生によって作出された個体が完全ホモ個体であることを証明した。また、雄性発生によって生じた雄と正常雌を交配すると次世代は全て雄となることから、雄性発生によって作出された雄の性染色体がYY型(超雄)であることを確認した。これらのYY雄に雌性ホルモンを投与することによりYY雌を作成し、これとYY雄を交配することによりYY雄を安定的に量産できる手法も開発した。

上述の卵割阻止法による雄性発生個体は全ての遺伝子座で完全ホモ個体となるが、雄性発生の応用として、長期間凍結保存が可能な精子を用いた希少種の保護や系統の保存方法としての利用を考えた場合には、その遺伝的近交度が問題となる。そこで申請者は、受精する前に予め2つの精子を融合して核を遺伝的に破壊した卵と受精させることにより雄性発生個体の作出を試みた。精子を融合する方法として、申請者は高濃度のポリエチレングリコール(PEG)溶液で精子を処理する方法を検討し、精子を処理するPEGの種類、濃度、及び処理時間を変えて精子の融合率と処理後の精子活性を調べ、分子量7500の50%PEGで150秒間処理するのが最適であることを明らかにした。この手法を用い、

劣勢遺伝を示すメラニン色素異常のアルビノを利用して雄性発生 2 倍体の作出を試みたところ、作出した個体はアルビノの表現系を示すとともに、マイクロサテライトがヘテロ性を示したことから、遺伝的多様性を維持した雄性発生個体であることを照明した。この手法は卵割阻止型の雄性発生の弱点である遺伝的多様性の喪失を補完する手法として有用であり、将来の系統保存や個体復元技術として、画期的な成果と言える。

次に申請者は、種が絶滅した後精子を解凍して近縁種の卵を借り腹とした雄性発生を行うことにより、個体を復活させる手法の開発に取り組んでいる。実際の希少種でアマゴの亜種に当たるビワマスの精子とアマゴ卵を用いた雄性発生 2 倍体個体作出を試み、低い割合ながらもビワマスの雄性発生個体を得ることに成功している。雄性発生により生じた雄の DNA を調べ、ビワマス雄に特異的なマーカーが存在することを確認し、作出された雄個体はビワマス由来の遺伝子を持つ個体であることが確認している。

雄性発生を育種技術として利用する場合、作出した個体の中から目的とする形質遺伝子をホモに持つ個体を選抜する作業が残される。そこで、申請者は目的の形質を直接導入する手法として、遺伝子組換え技術に着目した。組み換える遺伝子として養殖上のメリットが大きい成長ホルモン遺伝子に着目し、ベニザケ由来のメタロチオネイン B プロモーターの下流にベニザケの成長ホルモン遺伝子をつなげたプラスミドをアマゴに遺伝子導入することを試みた。その結果、遺伝子組換えアマゴを作出することに成功し、対照群との間に約 5 倍の体重差が生じることを明らかにした。また、組換えアマゴの血中の成長ホルモン濃度を測定し、対照群に比べ最大 10 倍の濃度差があることを明らかにした。さらに F1 以降も成長速度を調査し、これらの形質が維持されることを確認している。

また、申請者は、このようにして作出した遺伝子組換え魚が自然界に散逸するリスク対策についても検討し、魚の不妊化手法の開発についても研究を進めている。受精後 24 日後のアマゴの発眼卵に 1 Gray から 3Gray の X 線を照射し、1 年後に生殖腺の発達を調べ、成熟期でも生殖腺が未熟な状態で維持される個体が多く出現すること、照射線量の増加とともに不妊化率が高まり、受精卵への放射線照射が魚類の不妊化手法として有望であることを指摘した。

以上のように、申請者は細胞工学的な手法を駆使し、サケ科魚類のアマゴの育種作業の短縮化、効率化について新たな手法を開発し、今後の魚類の育種技術の進展に資する多くの知見を得ており、高い評価を与える業績と考えられる。

よって本論文は博士（農学）論文として価値あるものと認める。

なお、審査に当たっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経た上、平成 22 年 7 月 13 日の農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。

氏 名	わた なべ ひろし 渡 部 宏
学 位 の 種 類	博 士（農学）
学 位 記 番 号	農 第 1 4 9 号
学位授与の日付	平 成 23 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	Adaptive behavioral strategies of mantids
論文審査委員（主 査）	教 授 矢 野 栄 二
（副主査）	教 授 豊 田 秀 吉
（副主査）	教 授 櫻 谷 保 之