

氏 名 井 上 広 滋
 学位(専攻分野) 博 士 (農 学)
 学位記番号 論 農 博 第 1942 号
 学位授与の日付 平 成 6 年 9 月 24 日
 学位授与の要件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
 学位論文題目 Studies on Foreign Gene Transfer into Fish
 (魚類への外来遺伝子導入に関する研究)

論文調査委員 (主 査)
 教 授 坂 口 守 彦 教 授 石 田 祐 三 郎 教 授 内 海 恭 三

論 文 内 容 の 要 旨

動物個体への外来遺伝子導入技術は遺伝子の機能や調節機構を生体内で研究する為の有効な手段であり、また、有用種の育種の新技法となり得ることも期待されている。本研究は魚類における外来遺伝子導入法を確立し、その有用性を検討したものである。その結果は以下のように要約される。

1. メダカをモデル動物として用い、外来遺伝子導入法を検討した。卵母細胞へのマイクロインジェクションは卵母細胞の培養や人工受精などの技術を必要とするが、高い導入率(正常胚の55%)が得られた。受精卵へのマイクロインジェクションは卵母細胞を用いる方法よりも簡便で、しかもほぼ同等の導入率(正常胚の52%)が得られた。さらに、熟練を要せず、多数の卵を同時に処理できる方法としてエレクトロポレーションによる導入も試み、導入率は低いながらも導入が可能であることが明らかになった。特徴の異なるこれら3種の導入方法の確立により、卵の性質や、研究の目的に応じて最も適した導入法を選択することが可能になった。
2. 導入した外来遺伝子を発現させるために、魚類において機能するプロモーターを検索した。種々のプロモーターをレポーター遺伝子の upstream に挿入してニジマス肝臓由来の培養細胞に導入し、各々の活性を調べたところ、SV2、ニワトリキメラプロモーター miw などが構成的に、また、マウスメタロチオネイン I プロモーター (mMT-I) 及びニジマスメタロチオネイン A プロモーター (rtMT-A) などは金属による誘導に応じて発現することが明らかになった。さらに、メダカ胚を用いてこれらプロモーターの個体における活性を調べたところ、SV2 及び miw は構成的に、mMT-I 及び rtMT-A は飼育水への金属投与に応じて誘導的に発現することが明らかとなった。
3. 外来遺伝子導入技術による遺伝子発現に関する研究の有用性を検討するために、ニワトリ δ -クリスタリン遺伝子を卵母細胞へのマイクロインジェクションによりメダカ胚に導入し、発生における発現時期及び発現部位を解析した。水晶体における発現は水晶体形成期に限定的に認められた。一方、水晶体以外の組織では、発生初期では中胚葉性の組織でのみわずかに発現し、発生の進行に伴って内胚

葉性、外胚葉性の組織においても発現が観察されるようになり、いずれにおいても発生段階によって特異的な発現パターンを示すことが明確となった。

4. 本技術を用いた有用魚類育種の可能性を検討するために、成長ホルモン遺伝子の導入によるニジマスの成長促進を試みた。ニジマスへの外来遺伝子導入は、グルタチオン処理により卵膜の硬化を抑制した受精卵に外来遺伝子をマイクロインジェクションすることにより行なうことができた。また、メダカにおいて活性が認められた miw がニジマス個体においても活性を有することを確認した後、本プロモーターに連結したニジマス成長ホルモン cDNA をニジマス胚に導入し、孵化仔魚において発現を確認した。孵化後 149 日後まで仔稚魚の体重を測定したところ、導入群の体重は対照群のその 112-126% であり、成長が有意に促進されることが明らかになった。

以上のように、本論文は魚類において外来遺伝子導入技術を確立するとともに、本技術の遺伝子研究における有用性及び育種の新技法としての応用の可能性を示したものと見える。

論文審査の結果の要旨

動物個体への外来遺伝子導入技術はマウスを中心に発展し、これまでに多くの成果をあげているが、魚類においてはその技術は完成されたものとはなっていなかった。本研究において、著者は魚類への外来遺伝子導入技術を確立し、さらに分子生物学及び魚類育種学の分野における本技術の有用性を示した。評価すべき主要な点は次の通りである。

1. メダカ卵において 3 種の方法で外来遺伝子導入を試み、各々の特徴を明らかにした。これにより多様に分化した魚類において、魚種や卵の性質に応じて適当な導入方法を選択することが可能となった。また、高い導入率が必要とされる遺伝子の機能に関する研究から、多数の個体を扱う育種に関する研究まで幅広い分野への対応が可能となった。
2. 魚類における各種プロモーターの活性を検討し、活性の高いプロモーターを選定することにより、これまで困難であった外来遺伝子の発現を可能にした。SV 2 や miw が、構成型の活性を持つことを示したことに加えて、誘導型プロモーターであるメタロチオネインプロモーターが、飼育水に金属を投与するだけで発現を調節できることを示し、魚類における癌遺伝子や病原性遺伝子等に関する研究への応用の可能性を示した。
3. メダカを用いて δ -クリスタリン遺伝子の発生における発現様式を調べ、その発現が組織及び発生段階で特異性があることを明らかにした。このことは発生過程における遺伝子発現の研究が、外来遺伝子導入魚を用いることにより効率良く進め得ることを示している。また、このようなメダカを用いる実験系は、他の魚類における同様な研究に今後活用できるものと考えられる。
4. 有用魚種であるニジマスの受精卵へ miw プロモーターに連結した成長ホルモン遺伝子を導入することによって仔稚魚期の成長が促進されることを見いだした。このことは外来遺伝子導入によって、減耗率の大きい仔稚魚期を速やかに通過させることが可能であること、適正なプロモーターに連結した外来遺伝子を導入することにより有用魚種の形質を改変できることなどを示唆しており、本技術が将来養殖に適した形質を持つ品種を短期間に作出するための新技法となる可能性があることを示して

いる。

以上のように、本論文は魚類への外来遺伝子導入技術を確立し、遺伝子研究におけるその有用性を明示するとともに、魚類育種への応用の道を拓いたものであり、水産化学、水産増殖学、水産育種学などの発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成6年7月28日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。