



Title	低温処理により誘起した家蚕倍数体の遺伝学的および形態学的性状に関する研究
Author(s)	佐原, 健
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 21(1), 55-99
Issue Date	1998-01-22
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/12178
Type	bulletin (article)
File Information	21(1)_p55-99.pdf



[Instructions for use](#)

低温処理により誘起した家蚕倍数体の 遺伝学および形態学的性状に関する研究*

佐原 健

(北海道大学農学部応用分子昆虫学講座)

(平成9年6月26日受理)

Genetic and Morphological Features in the Polyploid Silkworms Induced by Low-temperature Treatment

Ken SAHARA

(Laboratory of Applied Molecular Entomology, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

目 次

- I. 緒 言
- II. 研 究 史
- III. 家蚕4倍体雌における性染色体対合の選択性
 - A. 次世代3倍体蚕を用いた配偶子形成の解析
 - B. 次世代3倍体蚕を用いた性染色体対合の解析
 - C. ほまれ系統を用いた品種内および異品種間の性染色体対合の解析
 - D. 限性系統の卵母細胞染色体における非相称な染色体対の観察
 - E. 限性黄繭系統(Sy)を用いた品種内および異品種間の性染色体対合の細胞学的解析
- IV. 3倍体蚕における卵サイズの決定機構ならびに大卵(Ge)系統における卵サイズと卵数の関係解析
 - A. 2種類の3倍体雌における卵サイズの比較
 - B. 卵巣移植による卵サイズ決定遺伝子の発現機構の解析
- V. 卵殻紋様の大きさを決定する遺伝子
 - A. 様々な倍数体雌が産生する卵における卵殻紋様サイズの比較
 - B. 卵サイズ決定遺伝子(*Esd*)と卵殻網目サイズ決定遺伝子(*Pgd*)の関係
- VI. 4倍体雄蚕における人為的処理による妊性獲得
 - A. アラタ体摘出, 高温-多湿処理および絶食処理による4倍体雄蚕の受精率の向上
 - B. 絶食処理時間と受精率の関係
 - C. 4倍体相互交配により得られたF₁4倍体蚕の性状

VII. 総合考察

摘 要

謝 辞

引用文献

Summary

I. 緒 言

家蚕は絹を生産するための家畜昆虫としてわが国の近代以後の経済発展を支えてきた。この間、生産の安定と向上をもたらすこととなった雑種強勢を利用した一代雑種導入の検討⁸⁶⁾を他の農作物に先駆けて行うなど、育種を目的とした研究が数多く行われた。さらに、家蚕では黄血遺伝子によるメンデル遺伝の再発見⁸⁵⁾を行うといった遺伝的研究が進み、多数の遺伝子突然変異系統が育成され、実験動物としての地位も確立された。また、個体サイズは適当な大きさであり昆虫ホルモンの解析¹⁰⁾など生理化学的研究や、染色体の同定²⁶⁾など細胞遺伝学的研究も進展した。絹の構成タンパク質であるフィブロインの遺伝子同定・構造解析⁷¹⁾など、近年のバイオテクノロジーの発展にも寄与してきた。

植物の倍数体は細胞サイズが大型化することにより、果実や種子ならびに個体全体の大型化を引き起こすことから、多くの作物における育種方法の一つに挙げられている。また、誘起法も簡単なことから染色体の倍増と形態学的ならびに生理学的な変化についての研究が広く行われてきた。一方、動物にお

* 北海道大学博士論文(1997)の一部

いては人為的な誘起法の開発はカエル⁵¹⁾、サンショウウオ⁷⁾、イモリ⁸⁾およびコイ⁵⁴⁾などと少なく、大量の倍数体誘起は非常に困難であった。これらの動物倍数体では、染色体の分離異常などのために継代飼育も困難であることから、ごく限られた研究しか行われていない。

しかしながら家蚕は様々な物理的、化学的刺激^{3,11,16,25,44,57,73,84)}により3倍体、4倍体、6倍体ならびに8倍体が誘起可能で、倍数体研究に最も適した昆虫であり、最も研究された動物種である。特に、滝沢・玉沢⁷³⁾による低温処理法は産下卵への1回の処理によって約1:1の雌雄4倍体を大量に誘起できることから倍数体の性状を調査するのに最も適した方法である。

家蚕卵に対する低温処理においては、倍数体だけでなくモザイク個体が同時に誘起可能である⁷⁴⁾。卵色突然変異を用いてモザイクの由来細胞が雄核、雌核ならびに受精核のいずれであるかを判別するとともに、それぞれの倍数性を細胞遺伝学的に調査した一連の研究からKAWAMURA^{42,45)}は、混数体において細胞の倍数性と性染色体の不均衡が与える個体への悪影響を指摘している。また、ASTAUROV⁴⁾は単為発生により誘起した倍数体や非還元型単為発生2倍体個体の性状調査から、倍数性の研究は発展性に富んでおり正常な発生のみならずガン化した細胞に見られる異常発生の調査にも有効となることを言及している。

本研究においては、家蚕倍数体について性染色体構成の違いにより引き起こされる形態的ならびに細胞遺伝的变化を調査した。第三章では次世代の性染色体の分離からみた配偶子形成と性染色体の対合を調査するとともに限性品種を用いた細胞学的観察により性染色体対合における選択性を検討した。第四章では性染色体構成の異なる2種類の3倍体を用いてW染色体上に卵サイズを決定する遺伝子の存在を明らかにするとともに、その遺伝子発現機構の一端を示した。第五章においては、卵サイズ決定遺伝子に続いて第2の数量因子をZ染色体上に発見し、両者の関係について調査した。第VI章では4倍体の継代飼育を妨げる最大要因である4倍体雄の不妊性に関する検討を行い、妊性の獲得に成功した。この4倍体雄と4倍体雌の交配によって得たF₁4倍体の性状を性染色体構成ごとに調査し、数量遺伝子の発現に関する確証を得た。これらの実験結果をもとに

第VII章において、家蚕倍数体を用いた性染色体構成と倍数体蚕の諸性状について総合的な考察を行った。

II. 研究史

家蚕の性決定様式は雄がZZ、雌がZWの雌ヘテロ型であることは、d油遺伝子(od)を用いた交配実験より明らかにされた⁷⁶⁾。さらに田中⁷⁷⁾は、雄の頻度が雌に比べて非常に低い系統において、性染色体の不分離が起こることにより次代にZO型雄が出現する可能性を予測し、W染色体が存在しない場合にも雄が生ずることを指摘した。以来、性決定を支配している遺伝子の遺伝学的解析には性染色体の突然変異系統が着目され、自然突然変異として発見されたW染色体への染色体転座系統(限性系統)⁷⁹⁾の利用により、W染色体上に雌を決定する遺伝子(Fem)の存在が明らかにされた。その後、放射線を利用した人為的限性系統作出と染色体切断によりFemはW染色体の前端部に位置することが明らかにされた^{81,82)}が、雌遺伝子の発現に関する詳細な研究はなされていない。ごく最近発見された間性蚕¹⁸⁾を用いた遺伝的ならびに雌決定遺伝子解析が期待される。

家蚕倍数体は田中・川口⁷⁸⁾の遠心処理法によって最初に誘起された後、次々に誘起方法が提案された。橋本¹¹⁾により高温処理法が確立された他、コルヒチン処理¹⁶⁾、低温接触^{15,57)}、温湯処理³⁾ならびに炭酸ガス処理⁸⁴⁾等の方法が開発された。これらの方法で誘起された倍数体はいずれも非還元型雌であったが、4倍体雌と2倍体雄の次代3倍体の性比より、W染色体はその数によるものではなく、W染色体の存在そのものが雌を決定することが推測され¹¹⁾、田島⁸⁰⁾によって誘起された限性系統の倍数体が全て雌であることで実証された。また、4倍体雌の配偶子形成における性染色体対合については2つの説が提唱され^{11,25)}、激しい議論が交わされた^{12-14,20,27,31,69,80)}ものの適当なマーカー遺伝子が用いられなかったこと、誘起した倍数体の性染色体構成を確実に判別する方法が確立されていなかったことから未解決のまま残された。しかし近年、KAWAMURA⁴⁶⁾により、この議論の解決に必須である倍数体の性染色体構成判別法が開発され、解決への糸口が見出された。

遠心処理、高温処理、コルヒチン処理、低温接触、温湯処理ならびに炭酸ガス処理などによる方法で得

られた家蚕倍数体は、3倍体のなかに一部4倍体が存在するが、この4倍体は雌個体のみであり、4倍体雄は6倍体雌の誘起により2倍体雄との次代蚕として初めて獲得された²⁸⁻³⁰。その後、ASTAUROV³¹は温湯処理した個体の中に6倍体と3倍体の混数体雌を発見し、2倍体雄との交配で4倍体雄を得た。こうして、得られた4倍体雄を含めた家蚕倍数体の特徴について形態学的、遺伝学および細胞学的研究が進められ、倍数体細胞が大型であるにも関わらず1個体の大きさは2倍体と相違のないことが示された。その他の特徴としては3倍体雄の不妊性と雌の不整形卵産生が認められ、3倍性の判定と確認にこれらの特徴が用いられてきた。4倍体の特徴として雌は正常な妊性を有する大型卵を産下することと、雄のみが極度に妊性が低いことが明らかにされた⁸³。しかし、4倍体の効果的な誘起法が開発されていなかったことに加え、繭質の飛躍的な向上が認められないこと²⁹から経済的価値が失われたため、家蚕倍数体研究は衰退の兆しが見られるようになった。

家蚕4倍体が効率的に誘起可能である方法として、低温処理法⁷³が、広く知られるようになったのは、誘起法の詳細を記載したKAWAMURA⁴³の研究以降であった。低温処理では、6倍体と8倍体の作出も可能であり、この方法を利用して細胞遺伝学的な研究が進化した⁴⁴。特に、4倍体雌雄染色体の対合行動は電子顕微鏡により詳細に観察された^{66,67}。また、4倍体と6倍体精母細胞第一分裂の観察からは、染色体の特異的異常分裂が認められている⁴⁸。形態学的見地からは、4倍体成虫の複眼や卵殻網目状構造の大型化が確認されている²³。

家蚕の性はW染色体が1本以上存在することにより雌が決定されることから、性染色体構成を考慮した細胞遺伝学的研究が必要である。しかしながら、これまでに行なわれたのは、KAWAMURA⁴⁶の研究のみに限られていることから、倍数体雌の形態的特徴についての再検討が必要である。また、不妊である4倍体雄の妊性獲得方法の確立と不妊性の要因追索は、動物倍数体の幅広い研究に欠かせないものであると思われる。さらに、昆虫の精子形成の解析にとっても重要である倍数体蚕の精子形成の研究は、形態的異常に関するKATSUNO and TAMAZAWA²²の研究と3倍体雄にごくわずかに妊性のあるケースを認めた廣川¹⁷の報告があるだけで依然不明の点が多く残されている。

III. 家蚕4倍体雌における性染色体対合の選択性

A. 次世代3倍体蚕を用いた配偶子形成の解析

a. 序 論

家蚕の性はW染色体上に座する雌決定遺伝子(Fem)により決定され、W染色体が1本でも存在する個体は雌となる^{80,82}。人為的に誘起した家蚕4倍体には性染色体構成がZWWW, ZZWWおよびZZZWという3種類の雌の存在が考えられるが、現在までに作出されているのはZZWWとZZZWの性染色体を有する個体である。ZZWW雌4倍体蚕に2倍体の雄を交配して3倍体蚕を作出し、雌雄の分離比から配偶子に関する検討がなされた。その結果、4倍体雌の配偶子はZZ, ZWならびにWWが形成されるとする²⁵とする説と、Z, ZWおよびZWWが形成されるとする^{11,80}2つの説が提出された。

本実験では、低温処理によって誘起した4倍体雌に様々な伴性劣性遺伝子を有する2倍体雄を交配して得られた3倍体の表現形質と性の分離より、4倍体雌において形成される配偶子の性染色体構成を明らかにすることを目的とした。

b. 材料と方法

1) 4倍体の誘起: re9(黒縞, 赤卵: $p^s/p^s, re/re$)の雌にTw1(姫蚕, 第2白卵: $p/p, w-2/w-2$)の雄を26°C下にて4~6時間交配し、暗所で産卵台紙上に産卵させた。産卵台紙は30分間毎に交換して、1枚の産卵台紙への産卵時間を30分以内に制限した。産卵の終了から2時間後(卵齢120分から150分)のF₁卵を-10°Cの低温で24時間処理した^{75,76}。その後、-10°Cの冷凍庫から取り出し、26°C下で20時間催青させた後、即時浸酸処理を施し休眠を打破した。再び26°Cにて約2日間催青を続け、漿液膜細胞が着色した時点で卵色が黒で漿液膜細胞核が大型の卵を4倍体(rw4n)として選抜した⁴³。

2) 3倍体の誘起: 低温処理によって誘起したrw4n雌にいずれも伴性劣性遺伝子を持つsd(伴性赤蟻・d油, 姫蚕: $sch\ od/sch\ od, p/p$), o06(d油, 姫蚕: $od/od, p/p$), No(伴性油, 姫蚕・黄血: $os/os, pY/pY$)およびEq(長節, 姫蚕, 赤卵, かすり: $e/e, p/p, re/re, q/q$)の4系統の雄を交配して得られた3倍体を各々RWs3n, RWod3n, RWNo3nならびにRWeq3nとした。

3) 倍数性の確認: rw4n雌に伴性劣性遺伝子を持つ4系統の2倍体雄を交配して得た個体の3倍性

は、第一精母細胞の染色体数 ($3n=84$) で確認した。すなわち、RWs3n, RWod3n, RWNo3n ならびに RWeq3n の各 6 蛾区の総てについて、無作為に抽出した 5 齢 48~72 時間の精巢をカルノア液 (MA; メタノール 3: 酢酸 1) で固定し、TAKAGI⁷²⁾ の方法に従って染色体標本を作製した。

4) 伴性劣性形質個体の判別と雌雄鑑別: RWs3n では KAWAMURA⁴⁶⁾ に従って伴性赤蟻形質を孵化直前に区別し、RWod3n では孵化後 3 日目に d 油形質個体を判別した。RWNo3n ならびに RWeq3n では、5 齢 24 時間に伴性油ならびに長節個体を判別した。また、雌雄鑑別はいずれの蛾区についても 5 齢起蚕で行った。

c. 結 果

4 倍体と 2 倍体の交配によって得られた個体の第一精母細胞の染色体には 1 価染色体 (univalent), 2 価染色体 (bivalent) ならびに 3 価染色体 (trivalent) の混在が観察された (図 1)。これらの対合染色体をそれぞれ 1 本, 2 本, および 3 本として換算した 1 細胞あたりの染色体数は 84 であった。家蚕の染色体数は $n=28$ であることから、これら供試個体の倍数性が 3 倍性であると確認された。

4 種類の 3 倍体について、その表現形質の分離を調査した。RWs3n には伴性赤蟻個体と黒蟻 (正常) 個体が存在し、前者は全て雌であったのに対し、後

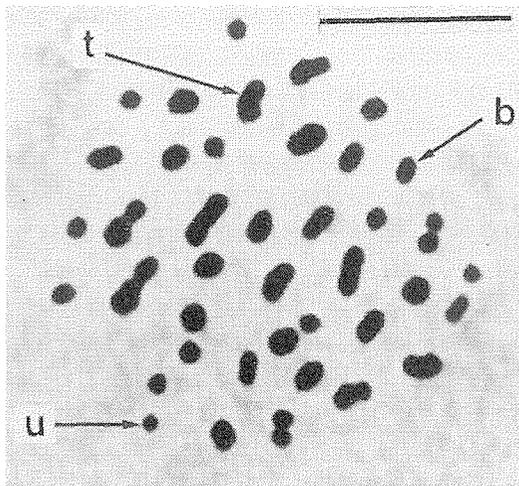


図 1 3 倍体雌の第 1 精母細胞の染色体
Fig. 1 Chromosomes of the primary spermatocyte of a triploid male
u: univalent, b: bivalent, t: trivalent, Bar: 10 μ m

者には雌と雄が混在した。RWod3n には d 油個体と正常個体が、RWNo3n には伴性油個体と正常個体が、そして RWeq3n には長節個体と正常個体がそれぞれ分離し、いずれの正常個体にも雌雄が存在したのに対して、伴性劣性形質個体は全て雌であった。これらの結果より、伴性劣性形質個体の性染色体構成は ZWW, 正常個体雌が ZZW および雄が ZZZ であると考えられる (図 2)。

4 種類の 3 倍体それぞれ 6 蛾区について 5 齢における性染色体別の個体数を調査した結果を表 1 に示した。自然孵化できなかった個体については、卵殻を剥くことにより人為的に孵化させ飼育した。人為孵化区の 5 齢到達率は非常に低く、RWod3n, RWNo3n ならびに RWeq3n の ZWW 個体は存在しなかったが、RWs3n の ZWW 個体はいずれも人為孵化区に現れた。また、いずれの区においても ZWW の割合は非常に低く 1.31% (RWs3n), 1.58% (RWod3n), 1.64% (RWNo3n) ならびに 1.32% (RWeq3n) であった。

d. 考 察

家蚕 4 倍体雌は様々な物理的、化学的な処理によって誘起することができ、遠心法ならびに高温処理法によって誘起した 4 倍体雌 (ZZWW) の配偶子形成についての検討は過去に行われている。即ち、川口²⁵⁾ は遠心法によって誘起した 4 倍体雌 (ZZWW) に 2 倍体雄を交配して得られた 3 倍体の雌雄分離比が 5:1 になるとして、4 倍体雌の配偶子は ZZ, ZW および WW の 3 種類が形成されると推測した。一方、高温処理によって橋本¹²⁾ は d 油遺伝

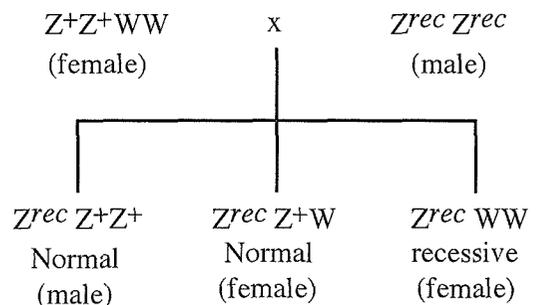


図 2 形質と性によって判定した 3 倍体の性染色体構成
Fig. 2 Sex chromosome constitution revealed by morphological character and their sex of F_1 triploids
rec: sex-linked recessive gene, +: allelic dominant gene

表1 性染色体構成によって判別された3倍体子孫の個体数

Table 1. The number of triploid offspring discriminated by sex chromosome constitution

Batch name	N	Number of hatched larvae	Number of 5th instar larvae			Percentage of fertilized eggs	Percentage of hatched eggs
			ZZZ	ZZW	ZWW		
RWs3n(sp*)	6	1907	277	1224	0	96.65	94.26
RWs3n(peel**)		65	29	3	20		
RWod3n(sp)	6	1691	261	1174	23	95.53	93.34
RWod3n(peel)		46	0	7	0		
RWNo3n(sp)	6	2109	321	1399	29	97.60	95.46
RWNo3n(peel)		36	4	2	0		
RWeq3n(sp)	6	2060	328	1363	22	97.80	95.97
RWeq3n(peel)		36	17	14	0		

*: spontaneously hatched

**: hatched by peeling chorion

子 (*od*) をヘテロに持つ4倍体雌 ($Z^{od}Z+WW$) を誘起し、この雌に2倍体のd油蚕雄を交配することによって3倍体を得た。この3倍体蚕の性比は雌:雄=5:1となったものの表現形質の分離比は、雄についても雌についてもd油蚕:正常蚕=1:1を示した。この結果より橋本¹²⁾は、4倍体雌の配偶子はZ, ZW および ZWW の3種類が形成されると推測した。さらに、田島⁸⁰⁾は限性セープル・形蚕で伴性油遺伝子 (*os*) と *od* 遺伝子を持つ4倍体雌 ($Z^{os}Z^{od}W^{psa+P}W^{psa+P}$) を誘発し、この雌に伴性油蚕雄 ($Z^{os}Z^{os}$) もしくはd油蚕雄 ($Z^{od}Z^{od}$) を交配して得た3倍体の形質分離より、4倍体雌にはZもしくはZWW といったW染色体の不分離によって形成される配偶子が存在すると結論し、橋本¹²⁾の仮説を支持した。

本実験で試みた、低温処理により誘起した家蚕4倍体雌 (Z^+Z^+WW) に伴性赤蟻 (*sch*), d油 (*od*), 伴性油 (*os*) および長節 (*e*) 遺伝子を持つ2倍体雄を交配して3倍体を作成したところ、いずれの3倍体子孫にも伴性劣性個体と正常個体が出現し、正常個体には、雄と雌が混在した。さらに精母細胞において染色体数が84であると確認されたことは、これら3倍体雄が両親から染色体構成に過不足のない配偶子を受け取ったことを意味する。父親由来の配偶子の性染色体はZであるから、3倍体子孫にZZZ, ZZW ならびにZWW 個体が存在したこと (図2) は、4倍体雌の形成した配偶子がZZ, ZW およびWW であったと結論出来る。この結果は、川口²⁵⁾を支持するもので、橋本¹²⁾ならびに田島⁸⁰⁾とは異なっていた。4倍体雌において形成される配偶子の性染色体構成についての考え方の相違は、これら4倍体

の誘起法の相違が原因となっている可能性がある。この相違については、卵母細胞性染色体の対合についての検討を進めて行くことでその原因の解明がなされると考えられる。

伴性劣性遺伝子をマーカーとしてその性染色体構成が判定されたZWW 雌の割合は4種類のいずれの区においても1.5%前後であり (表1), 他の2種類の3倍体 (ZZZ と ZZW) に比較して非常に少なかった。RWs3n 区のZWW 個体は孵化直前に伴性赤蟻として判定されるために、孵化時に個体の割合が調査できる。その結果、孵化時における割合が1.60%, 5齢期における割合が1.31%とほとんど変わりなかった。RWs3n 区の受精率と孵化率が非常に高いこと (表1) から、ZWW 雌は本来少ないと考えられる。この原因については性染色体の非ランダムな対合の可能性が考えられ、この点についての検討が必要である。

また、伴性赤蟻形質を有するZWW 個体のみが自然孵化できなかった。しかし、人為的に卵殻を剥くことにより正常な生育が可能であった (表1)。この結果より、伴性赤蟻遺伝子の発現が家蚕の孵化抑制に関係することが示唆され、伴性赤蟻形質と倍数体個体の孵化に関してさらに検討が必要であると考えられた。

B. 次世代3倍体蚕を用いた性染色体対合の解析

a. 序 論

家蚕染色体の動原体は染色体全体に散在した分散型である。このため、相同染色体が4対存在する4倍体雄の減数分裂では、2価染色体のみならず4価染色体が形成される^{48,66)}。しかし、4倍体雌の染色体対合では、2価染色体のみが56対形成される^{50,65)} こと

から、性染色体対は1つの第1卵母細胞あたりZ-ZとW-WもしくはZ-WとZ-Wのいずれかの2種類が存在する。これら性染色体対は両極へと移動し、引き続いて行われる減数第2分裂の結果、ZZ, ZWおよびWW型のいずれかの配偶子が形成されると考えられる。すなわち、配偶子の分離比より4倍体雌の減数分裂における性染色体の対合割合が算出可能である。

本実験においては本章A-bと同様の方法で3倍体を得て、その性染色体構成ごとの個体数から、4倍体雌の形成した配偶子の数を求め、その分離比により性染色体対合の解析を行い、その結果より、性染色体の対合がランダムに行われているか否かを明らかにすることを目的とした。

b. 材料と方法

1) 供試家蚕系統：4倍体誘起用の母体には、re9(黒縞, 赤卵： p^s/p^s , re/re), Eq(姫蚕, 赤卵, かすり： p/p , re/re , q/q)および大造(形蚕： $+^p/+^p$), 限性蚕品種のZWII(限性非d油・形蚕： $T(Z:W:2)+^{oa}W+^p$, od/od , p/p), Cre(限性セーブル・形蚕, 赤卵： $T(W:2)p^{sa+p}$, p/p , re/re), Ze(限性虎蚕： $T(W:3)Ze$, p/p)およびSy(限性黄繭： $T(W:2)Y$, $p+^r/p+^r$)を、雄蚕にはTw1(姫蚕, 第2白卵： p/p , $w-2/w-2$)を用いた。また、3倍体を得るために誘起された4倍体雌との交配には伴性赤蟻系統のsd(伴性赤蟻・d油, 姫蚕： $sch\ od/sch\ od$, p/p)を用いた。

2) 倍数体の誘起：上記の供試蚕を用いて本章A-bと同様、低温処理によって4倍体を誘起した。誘起した4倍体はそれぞれrw4n($re9 \times Tw1$), Et4n($Eq \times Tw1$), Dt4n(大造 $\times Tw1$), ZWt4n($ZWII \times Tw1$), Ct4n($Cre \times Tw1$), Zt4n($Ze \times Tw1$)およびSyt4n($Sy \times Tw1$)とした。正常3系統ならびに限性4系統の4倍体雌にsd雄を交配して得た3倍体はrws3n, Ets3n, Dts3n, ZWts3n, Cts3n, Zts3nならびにSyts3nとした。

3) 次代3倍体個体の性染色体判別：3種類の正常系統の判別は、KAWAMURA⁴⁶⁾に従い、ZWWを伴性赤蟻形質により判定し、5齢起蚕で正常形質の雌をZZW, 雄をZZZと判定した(cf. 図2)。限性系統4種類においてZWW個体は、同様にして判別した後、3齢2日目にそれぞれの限性形質である非油蚕・形蚕(ZWts3n), セーブル斑紋(Cts3n), 虎蚕(Zts3n), 黄血(Syts3n)形質個体をZZW, 正常形質をZZZ雄とした。3種類の性染色体構成を持つ3倍体個体の雄性配偶子はZであるから、4倍体雌由来の配偶子はWW, ZWそしてZZである。

c. 結果

7種類の4倍体雌にsd雄を交配して得た3倍体の性染色体ごとの個体数を表2に示した。3種類の正常系統(rws3n, Ets3n, Dts3n)においてZWW個体はそれぞれ2.26%, 1.81%, 1.59%と非常に少なかったものの、限性系統ではさらに少なくZWts3nで0.32%, Cts3nで0.97%, Zts3nで0.16%, Syts3n

表2 性染色体構成により判別された3倍体の個体数

Table 2. Number of triploid individuals discriminated by sex chromosome constitution

Group (N)	Number of individuals			fertility (%)	survival rate (%)	sex ratio ♀/♂
	ZZZ	ZZW	ZWW			
rws3n (6)	261	1197	33	95.61	83.22	4.71
Ets3n (3)	83	470	10	96.98	56.47	5.78
Dts3n (6)	327	1565	30	96.41	83.42	4.88
ZWts3n (9)	92	3602	9	90.69	93.13	39.25
Cts3n (5)	13	1539	15	97.10	91.64	119.54
Zts3n (5)	144	1136	2	93.52	93.44	7.90
Syts3n (14)	157	4431	0	98.08	94.68	28.22

表3 4倍体卵母細胞における性染色体対合の推計値と配偶子の分離比

Table 3. The ratio of gametes and calculated pairing ratio of sex chromosomes in tetraploid oocytes

Group	Ratio of gametes (ZW : (ZZ+WW))		Calculated pairing type (ZW+ZW) : (ZZ+WW)
	Theoretical	Observed	
random*	2 : 1		2 : 1
rws3n		4.01 : 1	1 : 1.52
Ets3n		5.05 : 1	1 : 2.03
Dts3n		4.38 : 1	1 : 1.69
ZWts3n		35.66 : 1	1 : 17.33
Cts3n		54.96 : 1	1 : 26.98
Zts3n		7.78 : 1	1 : 3.39
Syts3n		28.22 : 1	1 : 13.64

* The values of random pairing

については全く存在しないなど、両者に違いが認められた。また、雌雄の割合(♀/♂)は正常系統3種類においては4.71~5.78とほぼ同様であるのに対して、限性4系統では7.90 (Zts3n), 28.22 (Syts3n), 39.25 (ZWts3n) さらに119.54 (Cts3n) とばらつきが非常に大きかった(表3)。

4倍体雌の減数分裂時における性染色体対合はZ-ZとW-WもしくはZ-WとZ-Wの組み合わせで1つの第1卵母細胞中に存在すると考えられる。前者から形成される配偶子は全てZWであり、後者から形成されるそれはZZ:ZW:WW=1:2:1と考えられることから(ZW+ZW):(ZZ+WW)=1:[ZZW/(ZZZ+ZWW)-1]/2の数式を用いて性染色体対合の割合を算出した。その結果、いずれの4倍体においてもランダムな対合が行われた場合の値((ZW+ZW):(ZZ+WW)=2:1)よりもZ染色体同士ならびにW染色体同士の間での対合割合が高くなった。その傾向は、限性系統の4倍体でさらに顕著であったが、限性品種間でのばらつきも非常に大きかった。

d. 考 察

本章Aの実験により低温処理で誘起した4倍体雌蚕の配偶子はZZ, ZWならびにWWであることが明らかとなっている。次代3倍体個体における父親由来の配偶子の数は必ずZであるから性染色体構成からZを除いたものが母親4倍体由来の配偶子である。本実験において7品種の雌にTw1雄を交配して得られた4倍体雌の形成したWW配偶子の数は品種間差が認められたものの非常に少なかった(表2)。ZWW個体は孵化直前に伴性赤蟻形質によって判別されるものであり、受精率がいずれの区

においても95%前後と非常に高かったことから、WW配偶子が特異的に不受精卵や発育異常卵となるのではなく本質的に、形成されにくいと考えられる。また、限性品種であるCts3n, ZWts3n, Syts3n区では雄の割合がそれぞれ0.84%, 2.26%ならびに3.54%と非常に小さかった(表2)。この3区の生存率は91.10%, 93.13%ならびに94.68%と高いことから、雄だけが特異的に死亡すると仮定してもまだ性染色体対合がランダムに行われた場合の雄の割合(16.67%)よりも明らかに低くなっていた。

これらの事実から、4倍体雌の減数分裂において性染色体対合が非ランダムである可能性が考えられたため、配偶子の分離比から、Z-WとZ-Wの対合形式を持つ卵母細胞とZ-ZとW-Wを持つ卵母細胞の割合を算出した。表3に示したように性染色体がランダムに対合した場合には(Z-W+Z-W)と(Z-Z+W-W)の卵母細胞の割合は2:1となるが、本実験の7区全てが明らかに異なった値を示した。すなわち、Z染色体はZ染色体、W染色体はW染色体と選択的に対合することが明らかになった。家蚕雌における減数分裂はザイゴテン期に核エンベロープに付着した染色体の両端が対合を開始する⁶⁵⁾。限性系統の4倍体雌において正常系統よりもZとZ, WとWの染色体対合の選択性が高まったのは、W染色体の末端部位に常染色体の転座部分を有するために2つのW染色体同士の対合認識がそれを持たないものよりも高くなるためであると考えられる。

本実験において性染色体対合の選択性が限性系統では最も低いZt4nで約6.5倍、最も選択的なCt4nでは53倍と大きな差異が認められた。第2染色体の断

片が転座した3系統の転座染色体の長さはZWII, CreそしてSyの順であると考えられる^{58,80,83)}。ZWII系統のW染色体は後端の一部が相互転座によってZ染色体断片に置き換わっている⁸³⁾ためにZ染色体とのアフィニティーもあると考えられる。その結果, 対合に関する選択性の高さはCre, ZWIIそしてSyの順になった(表3)と推測できる。転座染色体断片の由来が同じである場合には性染色体対合の選択性の強さは基本的には転座染色体断片の長さに依存すると考えられるものの, Z染色体とW染色体の対合に関するアフィニティーについてZ染色体の由来を変化させて検討する必要がある。また, 正常系統において性染色体対合がランダムに起こらない要因についてもさらに検討が必要であると考えられた。

C. ほまれ系統を用いた品種内および異品種間の性染色体対合の解析

a. 序 論

本章Bの実験において雌雄で異なる品種を用い, 低温処理により誘起した倍化型4倍体雌(ZZW)の性染色体対合は, ZとZ, WとW同士の間で選択的に行われ, その選択性は限性系統においてより顕著であった。本実験においては誘起した4倍体の両親が異なる品種である場合と同じ品種である場合について雌の性染色体対合の選択性の相違を検討した。

b. 材料と方法

1) 供試家蚕: 限性蚕品種のほまれ(限性形蚕: T(W:2)+p, p/p), Tw1(姫蚕, 第2白卵: p/p, w-2/w-2)ならびに伴性赤蟻系統のsd(伴性赤蟻・d油, 姫蚕: sch od/sch od, p/p)を用いた。

2) 倍数体の誘起: 4倍体の誘起には, ほまれ x ほまれ(Homotype)ならびにほまれ x Tw1(Heterotype)を用いて低温処理を行った(本章A-b)。誘起した2種類の4倍体はそれぞれsd雄と交配しHHs3nならびにHws3nの3倍体を得た。

3) 次代3倍体個体の性染色体判別: 性染色体構成の判定は本章B-bの限性系統において行われたのと同様にZWWは伴性赤蟻形質により, 4齢1日目に限性形質である形蚕斑紋を持つ個体をZZW, 姫蚕をZZZ雄と判定した。

4) 性染色体対合比の算出: 性染色体の対合割合である(ZW+ZW):(ZZ+WW)は, 本章B-cに従い性染色体構成の異なる個体の分離比から1:

$[ZZW/(ZZZ+ZWW)-1]/2$ として算出した。

c. 結 果

誘起した2種類の4倍体の受精率, 孵化率はいずれも平均95%以上であったが, 産卵数はHomotype(HHs3n)で平均231.4個に対してHeterotype(Hws3n)で374.4個と大きく異なった。表4ならびに表5にみられるように, いずれのタイプにおいても雄の割合はランダムな分離によって得られる割合(16.6%)よりも低く, 特に, Heterotypeでは極端に低い値となった。また, ZWW雌は双方のタイプともに0から数個体しか出現せずWW配偶子が卵前核となりにくいことが明らかであった。

性染色体の対合((ZW+ZW):(ZZ+WW))比はHomotypeで1:2.60となりランダムな対合(2:1)の約5倍の選択性を示した。Heterotypeでは1:7.82であり, Homotypeのさらに約3倍もZ染色体同士ならびにW染色体同士での対合が高い割合で選択的に行われた。

4. 考 察

限性系統を用い誘起した倍化型4倍体雌の性染色体対合がZ染色体の違いによりどの様に変化するのかわかりやすくするため, 様々な限性系統を用いて同品種内ならびに異品種間における4倍体の誘起を試みたところ限性形蚕の「ほまれ」系統においてのみ次世代3倍体を得ることが出来た。Homotypeにおいては死亡率がやや高かったため対合割合にばら

表4 性染色体構成によって判別したホモタイプほまれ4倍体雌とsch2倍体雄の交配由来の3倍体個体数

Table 4. The number of triploid individuals from the cross between homotype HOMARE4n females and sch2n males discriminated by sex chromosome constitution

No.	ZZZ	ZZW	ZWW	Male (%) ±SE
1	19	131	3	12.42
2	22	157	1	12.22
3	12	89	1	11.76
4	12	85	2	12.12
5	13	98	0	11.71
6	13	147	3	7.98
7	27	166	0	13.99
8	26	166	0	13.54
9	24	133	1	15.19
10	19	130	1	12.67
11	24	90	2	20.69
Total	211	1392	14	13.12±0.89

表5 性染色体構成によって判別したヘテロタイプ (ほまれ x Tw1) 4 倍体雌と *sch* 2 倍体雄の交配由来の 3 倍体個体数

Table 5. The number of triploid individuals from the cross between heterotype (HOMARE x Tw1)4n females and *sch*2n males discriminated by sex chromosome constitution

No.	ZZZ	ZZW	ZWW	Male (%) ±SE
1	30	403	3	6.88
2	19	412	1	4.40
3	17	417	6	3.86
4	16	329	1	4.62
5	15	298	1	4.78
6	18	290	0	5.84
7	8	141	0	5.37
8	10	151	3	6.10
9	11	205	3	5.02
10	15	315	1	4.53
Total	159	2961	19	5.07±0.27

つきが認められたものの、平均対合比は (ZW+ZW):(ZZ+WW)=1:2.60 となり、ランダムな対合が行われた場合の理論値 (2:1) に近い値となるのに対し、Heterotype では 1:7.82 と大きく異なつた。

これらの結果より、ほまれの Z 染色体と Tw1 の Z 染色体には、ほまれの W 染色体との対合認識について違いがあると考えられる。しかしながら、2 倍体雌については同一品種内ならびに、異品種間いずれの交配においても雌雄は 1:1 に分離することから、Z と W 間で対合しうることが明らかである。系統維持の過程で同一品種内の Z と W 染色体の対合は幾度となく行われ、双方の染色体認識に関する部位の相同性が増加した結果、同一品種内交配によって誘起された 4 倍体雌の性染色体対合がランダムな値に近づいたと考えられる。

D. 限性系統の卵母細胞染色体における非相称な染色体対の観察

a. 序 論

鱗翅目昆虫の染色体はそのサイズが小さいことと、狭窄等の形態的特徴が少ないこと、さらに、分染法が確立していないことなどから染色体の同定がなされていない。家蚕の染色体数は $n=28$ と確定しているものの、各々の染色体は未同定であることから性染色体対を観察することは非常に困難である。

家蚕には人為的もしくは自然突然変異として W 染色体上に他の染色体の一部が転座した限性系統が

数種類存在する。KAWAMURA and NINO⁴⁹⁾ は限性黄繭系統を用いて卵母細胞の染色体を観察したところ、28 対の 2 価染色体中に正常系統には認められない非相称な染色体対を発見し、これが常染色体の転座により W 染色体が長くなったために生じた性染色体対であることを示した。

限性系統の転座染色体部位は各系統により長さが違うと考えられている。本実験では、様々な限性系統の性染色体対を判別できるかどうかを調査するとともに非相称な性染色体対の形態と本章 B において明らかになった限性系統 4 倍体雌の対合選択性との関係について考察した。

b. 材料と方法

1) 供試家蚕：本実験の 4 倍体誘起用の雌には ZWII (限性非 d 油性・形蚕：T(Z:W:2)+^{od}W+^p, *od/od*, *p/p*)、Cre (限性セープル・形蚕、赤卵：T(W:2)*p^{Sa+p}*, *p/p*, *re/re*)、ほまれ (限性形蚕：T(W:2)+^p, *p/p*) および Sy (限性黄繭：T(W:2)Y, *p+^Y/p+^Y*) を、雄には Tw1 (姫蚕、第 2 白卵：*p/p*, *w-2/w-2*) を用いた。また、対照区として正常系統の re9 (黒縞、赤卵：*p^S/p^S*, *re/re*) 雌と Tw1 雄の交雑個体を用いた。

2) 卵母細胞染色体標本の作製：それぞれの雌個体を通常の飼育を行い、5 齢 72 時間もしくは 96 時間に卵巣を MA 液 (メタノール：酢酸=3:1) で固定し、-20°C に保存した。染色体標本は TAKAGI⁷²⁾ の方法に従って作成した。

c. 結 果

正常系統として用いた rw(re9 x Tw1) 雌個体の卵母細胞染色体 28 対は全て相称であったのに対し、限性系統には非相称の染色体対が 1 つ存在した (図 3)。また、4 つの限性品種に見られる非相称の染色体対の形態は、1. 染色体の末端部近くにループ構造をとる場合、2. 染色体の末端にループ構造をとる場合、3. 染色体の中央部付近にループ構造をとる場合の 3 タイプに大別された (図 4)。

d. 考 察

正常系統に認められない非相称の染色体対が 4 種類の限性系統雌個体に観察された (図 3) ことから、この染色体対の短い部分が Z 染色体、ループ構造を形成する長い染色体が W 染色体であると考えられ、限性系統の卵母細胞では性染色体対が同定できることが明らかとなった。

本研究で用いた限性系統はいずれも第 2 染色体の

一部がW染色体へ転座しことにより生じたもので、ZWII系統のみさらにZ染色体の一部がW染色体へ転座している。ほまれとSyにおける転座部位は、W染色体の末端部^{58,80)}であり、CreではW染色体の末端部に転座が起こった後、さらにその末端に引き続き転座が起こっており⁸³⁾、ZWIIでは第2とZ染色体がそれぞれの末端に転座した⁸³⁾ことが遺伝的な調査により明らかにされている(図4)。本研究で明らかになったZW染色体対のループ構造はほとんどタイプ1、もしくはタイプ2、であるが、ZWII系統のみが他のものと非常に異なったタイプ3.の形態をとった。このことは転座部位の違いによると考えられる。

本章BならびにCの結果より、4種類の限性系統4倍体雌蚕におけるTw1由来のZ染色体に対するW染色体の対合割合はCre<ZWII<Sy<ほまれの順である。用いた4倍体雌は倍化型4倍体であるから2本のW染色体は同一である。ZWIIを除く3種のZW対はいずれも形態的に近いにも関わらずCreの選択的対合割合は非常に高いことから、性染

色体対の構造と性染色体のアフィニティーとの関係は薄いと考えられる。しかし、第2染色体の転座が2回続けて起こったために2種類の第2染色体がWに付加しているCre⁸⁰⁾と第2とZ染色体の2種類の染色体がW染色体に転座しているZWII系統において対合選択性が高いことは、転座染色体断片の長さや種類がアフィニティーに影響を及ぼしている可能性を現している。

E. 限性黄繭系統(Sy)を用いた品種内および異品種間の性染色体対合の細胞学的解析

a. 序 論

本章BならびにCにおいて配偶子の分離から推定された4倍体雌の性染色体対合の選択性を細胞学的に明らかにすることを目的として実験を進めた。

本章Dにおいて限性系統の卵母細胞染色体でZW染色体対が同定できることが明らかとなったが、4倍体雌の性染色体対はZW+ZWの他にZZ+WWが存在する。本実験では4種類の限性系統の中でその形態が安定し、十分な標本がとれたSy系統を用い、低温処理によって誘起した同品種内交配型

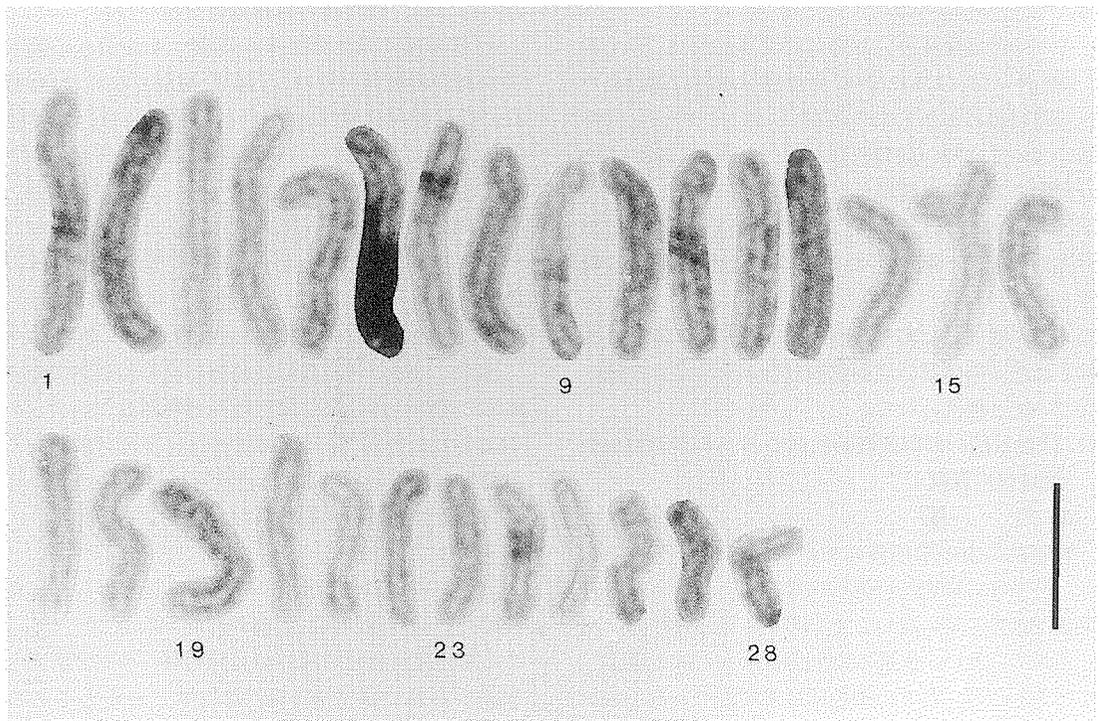


図3 限性系統における長さの順に並べたパキテン期の28染色体対

Fig. 3 28 pachytene bivalents of an oocyte in sex-limited strain arranged in order of length

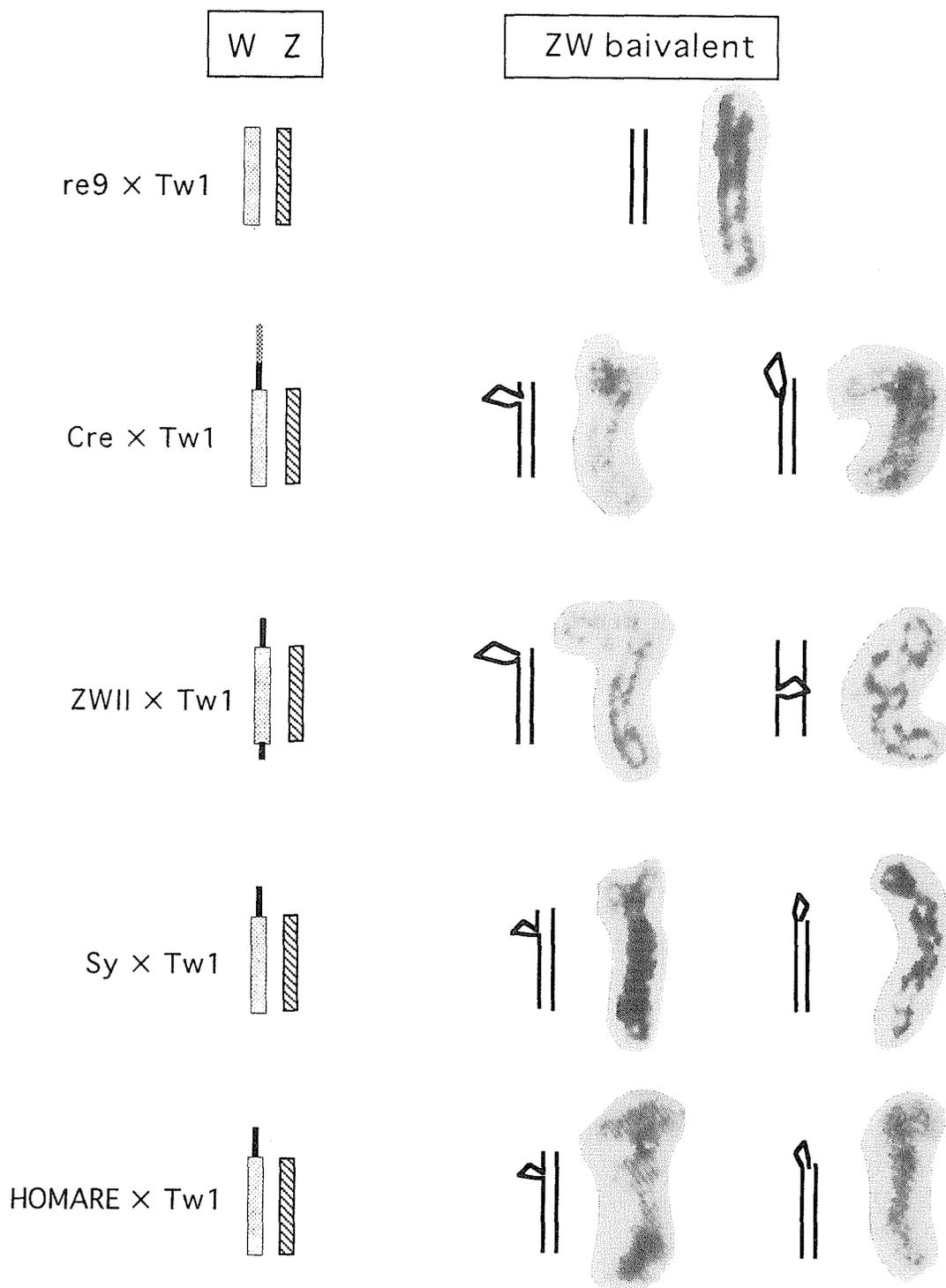


図4 正常系統と限性系統におけるZ-W染色体の対合パターン

Fig. 4 Patterns of synapsis of Z-W bivalents in control and four kinds of sex-limited strains

ならびに異品種間交配型から得た倍化型4倍体にみられる性染色体の対合割合を調査した。

b. 材料と方法

1) 供試家蚕ならびに倍数体の誘起：同品種内交配型は Sy (限性黄繭：T(W:2)Y, p^{+Y}/p^{+Y}) 相互を、異品種間交配型には Sy 雌に re9 (黒縞, 赤卵： p^S/p^S , re/re) 雄をそれぞれ交配し、常法^{41,73)}に従って倍化型4倍体 (Sy4n ならびに Syr4n) を誘起した。

2) 卵母細胞染色体標本の作製：5 齢 96 時間に達した雌個体の卵巣を用いて、TAKAGI⁷²⁾の方法に従って標本作製を行った。

c. 結 果

Sy4n ならびに Syr4n 双方の4倍体卵母細胞には56染色体対の中に非相称な染色体対を2対含むもの(図5)と全てが相称な染色体対であるもの(図6)が観察された。染色体対をその長さや形態により2対ずつ並べたところ、前者においてはZW対と考えられる非相称な染色体対は17, 18番目から21, 22番目の範囲に入った(図5)。一方、後者の全てが相称な細胞では1本だけ非常に長い染色体対が存在し、20番前後に他の染色体対とは形状の異なった染色体対が1対認められた。これらは、前者がWW対合子で、後者がZZ対合子であると考えられた。

56染色体対全てを判別できた卵母細胞において2組のZW対が認められたものとZZならびにWW対が観察されたものの割合をみると(表6), ZW+ZW に対する ZZ+WW 対合型の卵母細胞は Sy4n において約1.62倍, Syr4n において8倍であり、いずれも相同染色体であるZ同士, W同士の対合が選択的に高い値となっていた。

d. 考 察

低温処理によって誘起した倍化型4倍体雌の細胞には父親由来のZ染色体と母親由来のW染色体がそれぞれ2本ずつ含まれている。Sy系統のW染色体は第2染色体由来の起点(2-0.0)から少なくとも*i-lem*(黄体色抑制：2-29.5)座までを含む長い断片が転座しており⁵⁸⁾, ZW染色体対が同定されている⁴⁹⁾。本実験ではSy系統の4倍体ならびにSy雌とre9雄の交雑型の4倍体を誘起し、ZとZ, WとWといった性染色体の選択的な対合が行われているのかどうかを細胞学的に証明することを目指した。

倍化型4倍体にはZW対を2対有する卵母細胞

表6 4倍体(ZZWW)卵母細胞における性染色体対合の割合

Table 6. Pairing ratio of sex chromosomes (ZZWW) in tetraploid oocytes

	Pairing type ((ZW+ZW):(ZZ+WW))	
	Theoretical	Observed
Random	2:1	
Sy4n		21:34
Syr4n		2:16

と, ZZ ならびに WW 対を有する細胞が観察された。その割合は Sy4n において (ZW+ZW):(ZZ+WW)=2.1:3.4 であったのに対して, Syr4n では 1:8 と ZZ と WW 対が約 4.9 倍も選択的に形成されていた(表6)。この結果は、ほまれ系統を用いた配偶子形成割合から推定された結果と一致しており, Z 染色体の由来が異品種であった場合に W 染色体との対合に関するアフィニティーは低下することが細胞学的にも証明された。

WEITH and TRAUT⁸⁸⁾は *Ephestia kuehniella* (スジコナマグラメイガ) の W 染色体突然変異系統の電子顕微鏡観察を行い, W 染色体同士もしくは転座 W 染色体断片と W 染色体が決して対合しないことを明らかにした。このことから, この種の性染色体対合アフィニティーは W 同士に比べ Z と W で非常に強力であると結論した。一方, HULTEN and PEARSON¹⁹⁾は, ヒトの XYY 患者の精母細胞においてダイアキネシスが YY のみで起こり X 染色体は必ず1個染色体として存在することを観察した。両者の相違点は前者の W 染色体は異質染色質である⁸⁷⁾のに対して, ヒト Y 染色体には SRY 遺伝子が座乗している⁵⁶⁾ことである。家蚕においては, W 染色体上に雌決定遺伝子 (*Fem*)⁸³⁾ と卵サイズ決定遺伝子 (*Esd*)⁴⁶⁾ の存在が明らかにされている。家蚕の性染色体対合は相同染色体同士で高いアフィニティーをもつことから性染色体上のアクティブな遺伝子と性染色体対合のアフィニティーとの間にはなんらかの関連があると思われる。

家蚕における Z と W 染色体対合に関するアフィニティーが系統維持による両者の対合の結果, 増加することが推測されるものの, 対合といった両性生殖生物の基本的なメカニズムを理解するためにはさらに, 性染色体上の遺伝子解析などを通じてアフィニティーを決定する要因を明らかにする必要がある。そのためには, 家蚕倍数体が一つの有効な材料

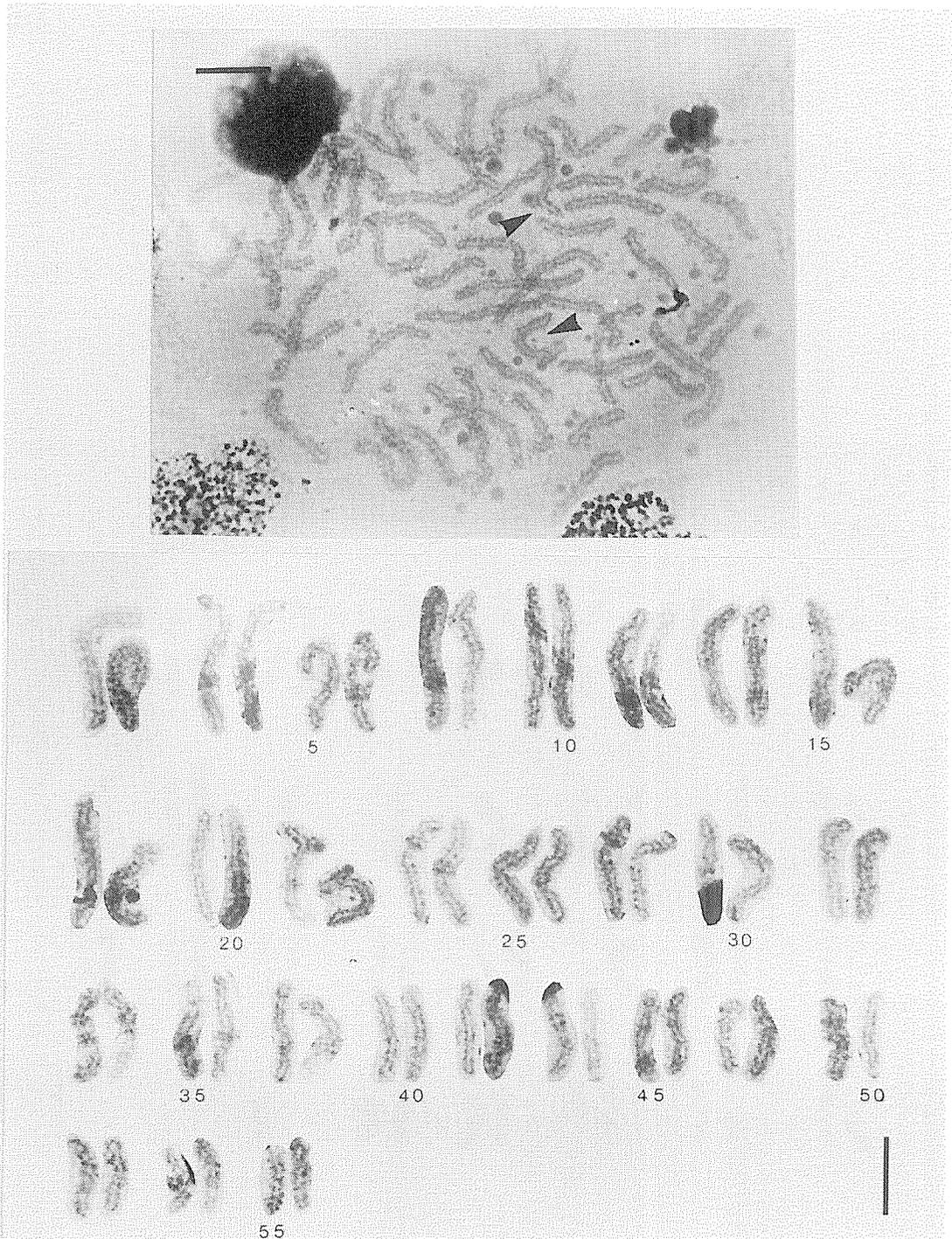


図5 Syr4nにおけるパキテン期の卵母細胞染色体

Fig. 5 Pachytene chromosomes in an oocyte of Syr 4n.

Arrows in the oocyte show the asymmetric Z-W bivalents, which are number 21 and 22 in the 56 bivalents. This oocyte is ZW + ZW type. Bars: 10 μ m

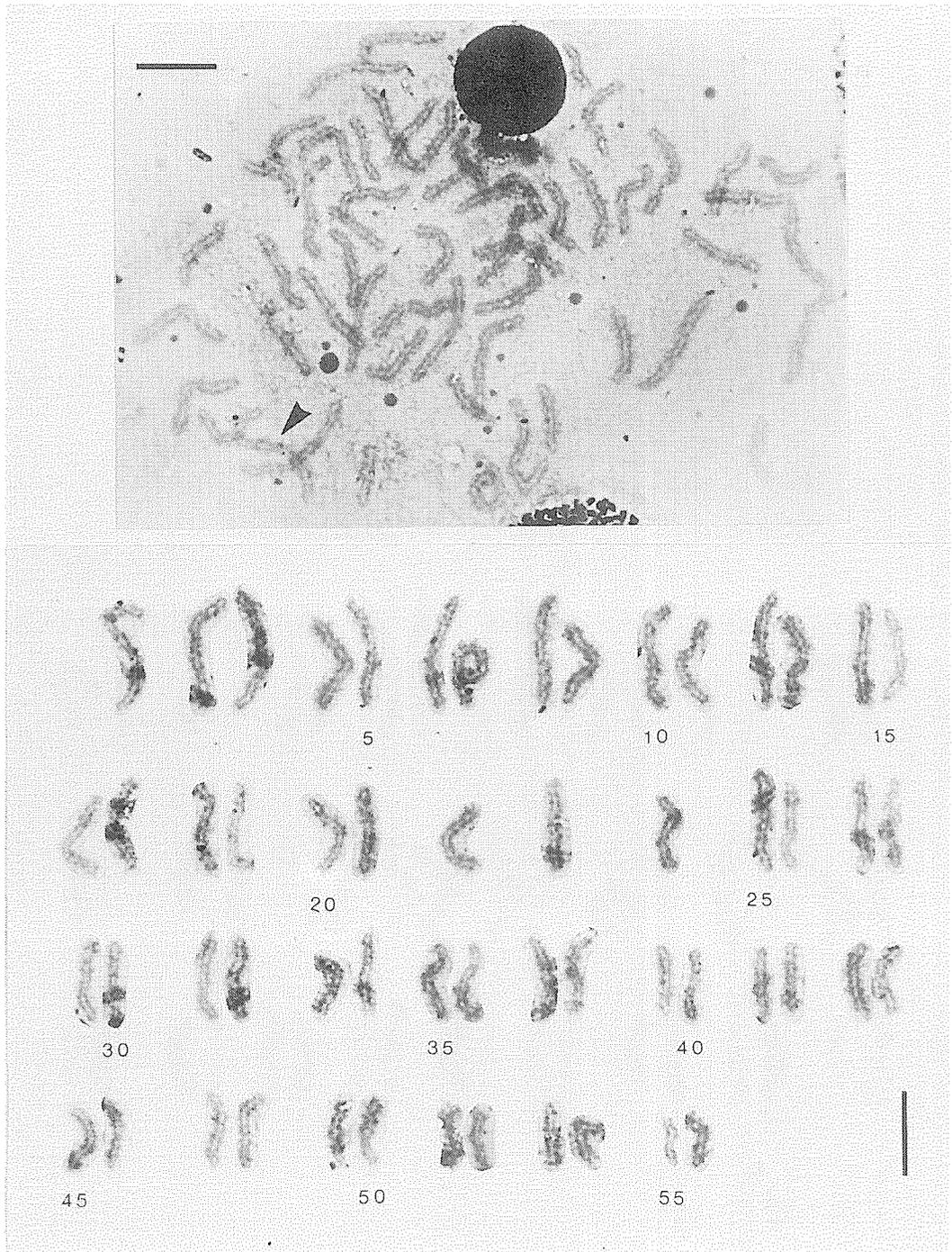


図6 Sy4nにおけるパキテン期の卵母細胞染色体

Fig. 6 Pachytene chromosomes in an oocyte of Sy 4n.

An arrow in the oocyte shows the unusually long W-W bivalent (number 1). Z-Z bivalent may be one of the chromosomes ranging 21 to 23. This oocyte is ZZ + WW type. Bars: 10 μ m

になり得ると考えられる。

IV. 3 倍体蚕における卵サイズの決定機構ならびに大卵 (Ge) 系統における卵サイズと卵数の関係解析

A. 2 種類の 3 倍体雌における卵サイズの比較

a. 序 論

家蚕の倍数体は様々な物理的, 化学的刺激によって誘起される^{3,11,16,25,73,84}。これらの刺激により誘起された 4 倍体雌は大型卵を産下することと, その次世代 3 倍体雌は異常形卵を産下することが知られており, これらの特徴はそれぞれ 4 倍性, 3 倍性の確認に用いられてきた。KAWAMURA⁴⁶⁾ は 4 倍体雌と伴性赤蟻 (*sch*) 系統の雄との交配によって得られた 3 倍体で黒蟻と赤蟻という 2 つの表現形質により 2 種類の雌の性染色体構成 ($Z^{sch}Z+W$ と $Z^{sch}WW$) が判別できることを利用して, ZWW 雌は大型卵を産下することを明らかにした。この結果より, W 染色体上には数量因子の卵サイズ決定遺伝子 (*Esd*) が存在し, 卵の大きさを制御していると推測した。

本研究では, *sch* 系統の他に伴性劣性遺伝子をもつ 3 種類の系統を用いて, 2 種類の 3 倍体雌 (ZZW と ZWW) の卵サイズの違いは Z 染色体上の特定の遺伝子発現の影響によるものかあるいは性染色体構成の違いによるものかを調査した。

b. 材料と方法

供試家蚕ならびに倍数体の誘起: 第 III 章 A-b と同様に re9 (黒縞, 赤卵: p^s/p^s , *re/re*) の雌と Tw1 (姫蚕, 第 2 白卵: p/p , $w-2/w-2$) の雄との F₁ 個体を用いて 4 倍体雌を誘起し, この 4 倍体雌に sd (伴性赤蟻・d 油, 姫蚕: *sch od/sch od*, p/p), o06 (d 油, 姫蚕: *od/od*, p/p), No (伴性油, 姫蚕・黄血: *os/os*, pY/pY) および Eq (長節, 姫蚕, 赤卵, かすり: *e/e*, p/p , *re/re*, q/q) の 4 系統の 2 倍体雄を交配して 3 倍体 (RWs3n, RWod3n, RWNo3n ならびに RWeq3n) を得た。また, それぞれの 3 倍体の性染色体構成も第 III 章 A-c と同様に識別した。

c. 結 果

4 種類の 3 倍体にはそれぞれの優性形質を発現した ZZW 雌と伴性劣性形質の ZWW 雌が出現した。これらの雌に re9 雄を交配し, 産卵させたところ ZZW 雌は異常形卵や未成熟小型卵を混在するもの 2 倍体雌の産下卵とほぼ同等の大きさの卵を産下

した。これに対して ZWW では異常な形態の卵はほとんど認められず, 大きさは ZZW の卵より大型であった (図 7)。

d. 考 察

家蚕の性決定様式は W 染色体上の強力な雌決定遺伝子 (*Fem*) に支配されている⁸³⁾ ために, 倍数体では W 染色体が 1 本でも存在する個体は全て雌である。3 倍体の雌には 2 種類の性染色体構成が存在し, 倍化型 4 倍体雌 (ZZWW) に伴性赤蟻系統雄を交配することで簡単に識別される⁴⁶⁾。

本実験において d 油, 伴性油ならびに長節形質として判別された ZWW 雌の産下卵は ZZW の産下卵よりいずれも大型であり, 伴性赤蟻形質を発現した ZWW 雌の卵と同様の大きさであった (図 7)。また, 4 種類の伴性劣性系統はいずれもその由来が異なることから, 伴性赤蟻形質を有する個体が大型卵を産下するのではなく, ZWW という性染色体構成を持つ 3 倍体雌が大型の卵を産下することが確認された。様々な刺激によって誘起された家蚕 4 倍体雌の卵が大型化する要因は FANKHAUSER⁷⁾ の説に基づく核-細胞質比によって説明されてきたが, 同じ 3 倍性の個体で卵サイズが大きく異なることから, 家蚕における卵サイズ決定は KAWAMURA⁴⁶⁾ によって提唱された W 染色体上の数量因子 (*Esd*) に制御されると考えられる。

B. 卵巣移植による卵サイズ決定遺伝子の発現機構の解析

a. 序 論

家蚕の卵サイズは W 染色体上の数量因子である卵サイズ決定遺伝子 (*Esd*) によって決定されるため, 同じ 3 倍体でも 2 本の W 染色体を持つ ZWW 雌の卵は 1 本の W を持つ ZZW 雌が産生する卵よりも大型である⁴⁶⁾。本実験では, この遺伝子の働きが卵巣外の環境要因に影響されるのかどうかを明らかにするために, ZWW 性染色体構成をもつ卵巣を ZZW 個体へ移植を行い, 造成された卵のサイズを解析した。

また, 家蚕には 3 倍体 ZWW 雌と同様の大型卵を産下する大卵系統があり, Z 染色体上に座位する大卵遺伝子 (*Ge*) により発現されていることが知られている²⁾。この遺伝子は *Esd* を含む W 染色体の一部が Z に転座して現れた自然突然変異であると考えられている⁴⁷⁾ ことから, *Ge* 系統と正常卵系統間で相互卵巣移植を行い, *Esd* の遺伝子発現が Z 染色体

への転座により変化するのかどうかを調査した。

b. 材料と方法

1) 供試家蚕：本実験には re9(黒縞, 赤卵： p^s/p^s , re/re), Tw1(姫蚕, 第2白卵： p/p , $w-2/w-2$), sd(伴性赤蟻・d油, 姫蚕： $sch\ od/sch\ od$, p/p) ならびに Ge(大卵, 形蚕, かすり, こぶ： Ge/Ge , $+^p/+^p$, q/q , K/K) を用いた。

2) 3倍体の誘起：第III章 A-b と同様に re9 雌と Tw1 雄の F₁ 卵を低温処理によって誘起した 4 倍体雌に sd 雄を交配して 3 倍体(RWs3n)を得た。また、それぞれの 3 倍体の性染色体構成も第III章 A-c と同様に伴性赤蟻個体を ZWW, 正常形質雌を ZZW として識別した。

3) 卵巣移植の手順：5 齢 72 時間にジェチルエー

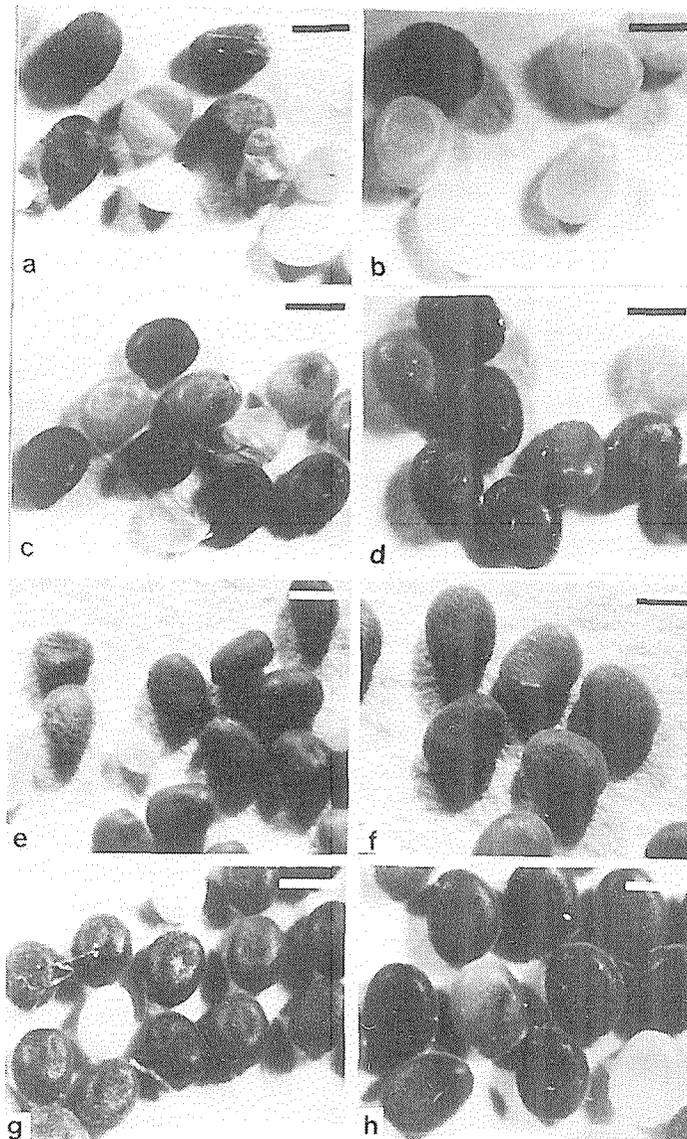


図7 3倍体雌が産下した卵

Fig. 7 The eggs deposited by triploid females

a: RWs3n (ZZW), b: RWs3n (ZWW), c: RWN03n (ZZW), d: RWN03n (ZWW), e: RWeq3n (ZZW), f: RWeq (ZWW), g: RWod (ZZW), h: RWod (ZWW), Bars: 1mm

テルで麻酔を施した幼虫から卵巣を片側摘出し、70%エタノールで傷口を消毒・止血してから給桑した。その後、飼育を続け、化蛹1日目に吐糸期にある別の個体の卵巣を移植した。

4) 卵重の測定：成虫の各卵巣ごとに全ての卵を摘出し余分な水分を十分取り去った後、Digibalance 1003 (SHIMADZU) および Digiprinter DP60D (SHIMADZU) を用いて卵重を測定した。

5) 卵面積の測定：切り取った卵の最大平面断面写真をGanriki画像解析システム (TEKMATE Inc) を用いて測定した。実際値への変換は同様に測定した1 mm 方眼の面積から算出した。

c. 結 果

1) 3倍体雌間における卵巣移植

無処理区の3倍体雌卵は本章Aで述べたのと同様、ZZW雌では異常形卵を混在する普通サイズであったのに対し、ZWW雌では大型卵であった(図8a, 図8b)。ZWW卵巣をZZWの蛹に移植したところ宿主の卵巣には正常サイズの卵が形成され、移植卵巣には大型卵が形成された(図8c, 図8d)。

対照区ならびに移植実験区の1卵巣に形成された

卵数、卵の水平最大断面積ならびに1卵の平均卵重を表7に示した。対照区においてZWW卵は面積、卵重ともにZZW卵よりも有意に大型であったが、形成卵数は明らかに少なかった。また、計測した形質に関して同じグループ間の左右卵巣に有意な差は認められなかった。移植実験区では宿主卵巣、移植卵巣ともに形成された卵数はそれぞれの無処理区よりも減少したが、宿主のZZW卵巣には正常サイズ、移植卵巣のZWWには大型卵が形成され、それぞれのコントロールと面積、卵重ともに有意差は認められなかった。

2) 大卵突然変異系統と正常系統間での卵巣移植

正常系統個体 (rw; re9 x Tw1) に大卵突然変異個体 (TG; Tw1 x Ge) の卵巣を移植したところ同一個体内の宿主卵巣には正常卵、移植卵巣には大卵が形成された(図9a, 図9b, 図9c)。宿主個体をTGとしrw卵巣を移植した場合には、TG個体内の宿主卵巣には大型卵が形成され、移植卵巣に正常卵が形成された(図9d, 図9e, 図9f)。

無処理区の卵数、卵面積ならびに卵重を表8に示した。rwとTG双方の宿主卵巣に形成された卵の

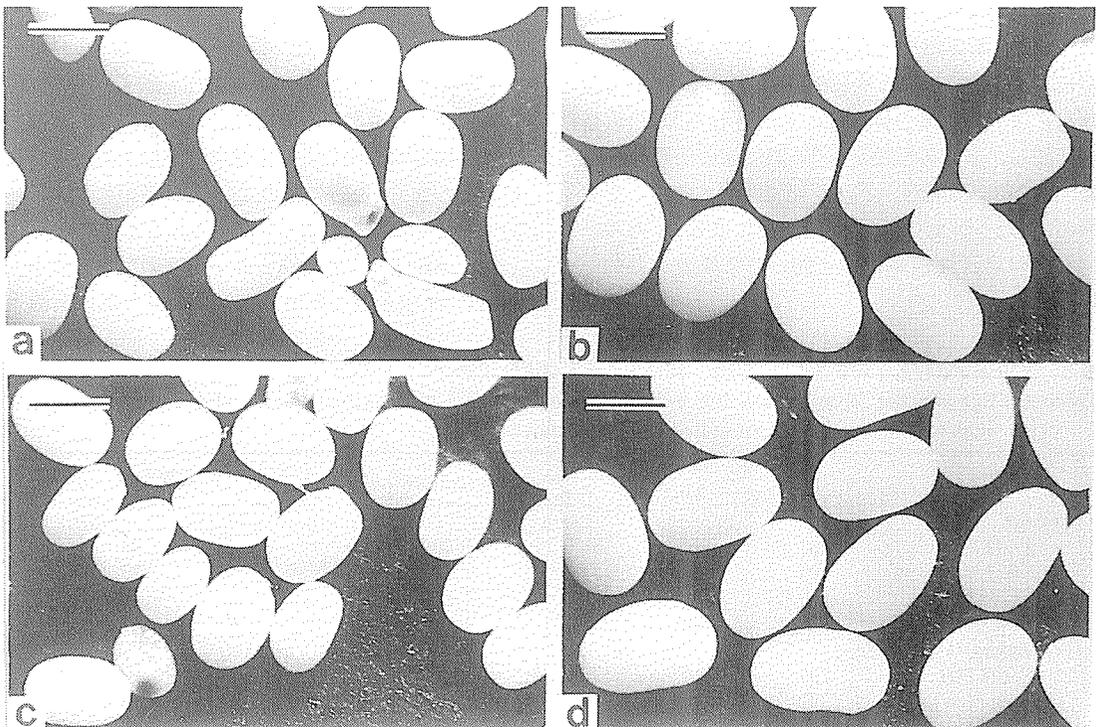


図8 3倍体卵巣に形成された卵

Fig. 8 The eggs produced in the triploid ovaries

a: Control ZZW, b: Control ZWW, c: Host ZZW, d: Donor ZWW

表7 3倍体における1卵巣あたりの卵数、卵の平均水平最大断面積ならびに卵重

Table 7. Egg number in an ovary, the mean value of the area of maximum horizontal optical section of eggs and the weight of an individual egg in the triploids

RWs 3n	Egg number			Size(mm ²) ± SE	Weight(mg/egg)	
	Average	Max.	Min.			
Control						
ZZW(R*)	136.3	136.3	152	104	1.020±0.011	0.55
ZZW(L**)	124.7	124.7	170	99	1.027±0.010	0.53
ZWW(R)	74.5	74.5	90	59	1.508±0.010	0.95
ZWW(L)	68	68	80	56	1.482±0.010	0.97
Transplant						
Host(ZZW)	68.5	68.5	120	9	0.996±0.017	0.56
Donor(ZWW)	16.5	16.5	32	7	1.554±0.019	1.03

*: right ovary at dorsal view

**: left ovary at dorsal view

数、面積および卵重は無処理区のそれと有意な差は認められなかった。移植卵巣には本来形成されるべき卵面積、卵重よりもやや下回る卵が形成されたが、宿主卵とは有意に差が認められた。また、移植卵巣に形成された卵数は無処理区よりも明らかに減少した。

d. 考 察

倍数体蚕を用いた遺伝的研究により家蚕の性決定はW染色体を持った個体が雌となりW染色体が存在しない個体が雄となる^{11,25)}。TAZIMA⁸²⁾はX線照射により転座染色体断片の付加されたW染色体を切断し、家蚕の性決定はW染色体の前端部に位置する雌決定遺伝子(Fem)に支配されることを明らかにした。つまり、家蚕3倍体雌にはZZWならびにZWWの性染色体構成を持った2種類が存在する。

本章Aで明らかになったように3倍体雌では、Z染色体や常染色体の由来に関わらず、ZWW個体はZZW個体よりも有意にサイズの大きい卵を形成し、これはW染色体に存在する数量因子の卵サイズ決定遺伝子(Esd)の数によるものであると考えられる⁴⁶⁾。本来大型卵を形成しない個体内においてEsd遺伝子が、数量因子として発現するのかどうかを明らかにするためにZWW卵巣のZZW個体への移植実験を行った。ZZW個体に移植されたZWW卵巣には大型卵が形成され、宿主卵巣卵に変化がなかったことから、家蚕における卵サイズ決定は卵巣以外で発現している様々な遺伝子の影響を受けることなく、卵母細胞のEsd遺伝子が数量因子として発現することによって決定されると考えられる。

黄血遺伝子(Y)を含む長い第2染色体断片を人為的にW染色体へ転座させて造られた限性黄繭系

表8 2倍体における1卵巣あたりの卵数、卵の平均水平最大断面積ならびに卵重

Table 8. Egg number in an ovary, the mean value of the area of maximum horizontal optical section of eggs and the weight of an individual egg in the diploids

RWs 3n	Egg number			Size(mm ²) ± SE	Weight(mg/egg)	
	Average	Max.	Min.			
Control						
TG(R*)	152.8	162	136		1.503±0.007	0.93
TG(L**)	172	192	130		1.488±0.006	0.93
rw(R)	280.6	296	271		1.072±0.003	0.55
rw(L)	269.4	306	253		1.064±0.003	0.55
Transplant						
Host(TG)	186	254	131		1.519±0.007	0.98
Donor(rw)	97.8	194	17		0.970±0.006	0.49
Host(rw)	283.3	294	277		1.114±0.004	0.49
Donor(TG)	74.3	82	65		1.444±0.009	0.89

*: right ovary at dorsal view

**: left ovary at dorsal view

統⁵²⁾のZW対は、卵母細胞において他の染色体と区別できる⁴⁹⁾。大卵系統のZ染色体が正常系統より長いことからKAWAMURA⁴⁷⁾は、*Ge*突然変異²⁾が*Esd*を含むW染色体断片のZへの転座によって起こったことを明らかにした。ZWW個体は非常に形成されにくく、個体数が少ない⁶⁸⁾ことから、本研究において3倍体の卵巣移植はZWWに限られた。そ

こで*Ge*系統と正常系統を用いて相互に卵巣移植を行い、*Esd*遺伝子を2つ持つ個体内における正常卵巣の卵形成を調査するとともに、Z染色体へ転座した*Esd*がW染色体上の遺伝子と同様に働くかどうかを調査した。

TGを宿主としてrw卵巣を移植すると宿主卵巣には大型卵、移植卵巣には正常卵が形成され、宿主

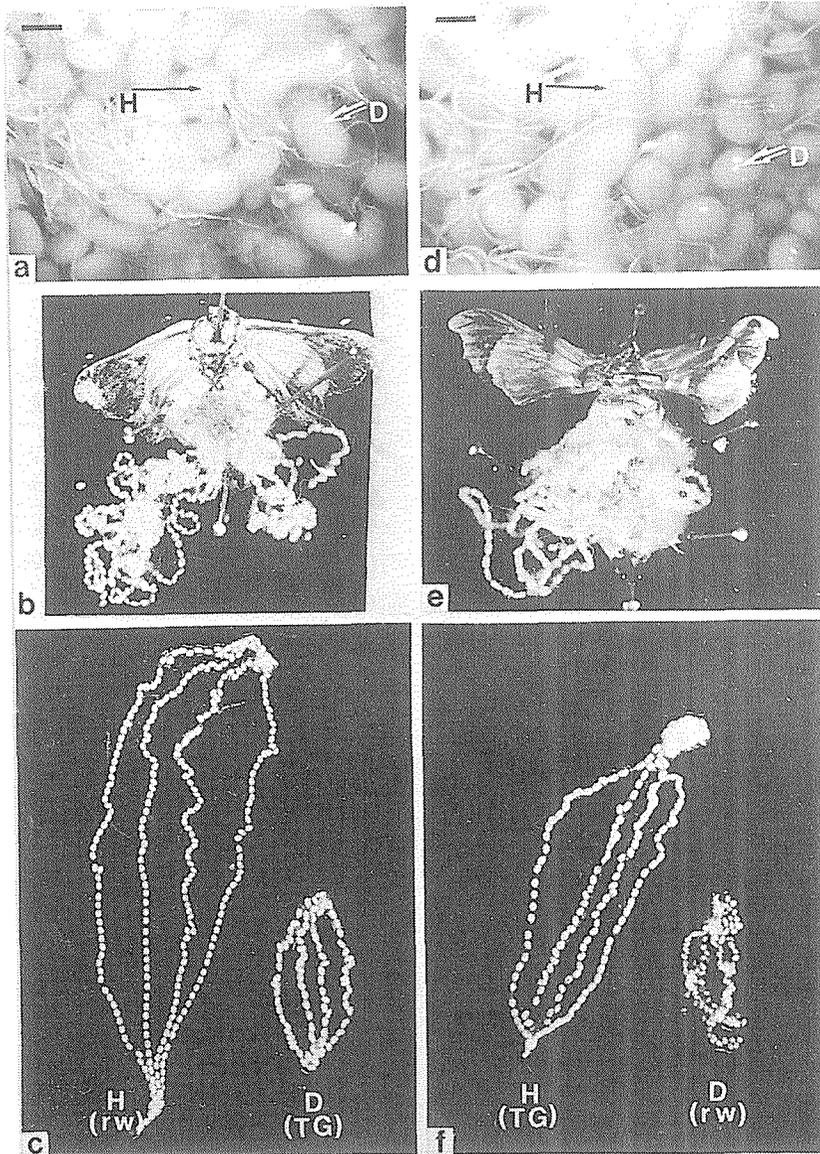


図9 TG2n 卵巣を移植された *rw2n* 由来の 2 種類の卵巣 (a-c)
rw2n 卵巣を移植された *TG2n* 由来の 2 種類の卵巣 (a-c)

Fig. 9 Two kinds of ovaries from an *rw2n* female received a *TG2n* ovary (a-c)
 Two kinds of ovaries from a *TG2n* female received an *rw2n* ovary (d-f)
 H: Host, D: Donor, Bars: 1mm

と移植系統を逆にした場合には宿主卵巣に正常卵、移植卵巣に大型卵が形成された(図9)。最小有意差検定を行ったところ移植卵巣卵の面積はそれぞれのコントロールと差が認められなかった。この結果から、*Esd* の数量因子としての働きは卵巣以外の体内の遺伝背景から影響を受けないこと、ならびにZ染色体に転座した *Esd* はW染色体上の遺伝子と同様に発現していることが明らかにされた。また、卵が小型化する第2小形卵系統 (*sm-2*)⁶⁾ と正常卵系統を用いた交互卵巣移植実験³⁷⁾ でも、移植卵巣に形成される卵も宿主卵も本来の卵サイズであったことから、卵サイズに関連する遺伝子は *Esd* に限らず卵巣以外の遺伝的背景に影響されないと考えられる。

W染色体上に存在すると考えられる *Esd* 遺伝子は性決定以外のW染色体の役割を解明する上で重要なマーカーとなりうる。ZWW雌は *Esd* 遺伝子を解析する上で適した材料であるが、多くの個体を一度に得ることが困難である。そのため、この遺伝子の働きを調査するには同一遺伝子を持つと考えられる *Ge* 系統を用いるべきである。蛹に対する20-Hydroxyecdysoneの50 μ g以上の投与が正常卵系統を大卵系統と同様の大型卵にすること、ならびにその投与時期により大型化する卵の部位が異なることが明らかにされている³²⁾。また、20-Hydroxyecdysoneの大量投与は *Ge* 系統にも同様の効果をあらわし、卵をさらに大型化した³⁴⁾。これらの結果は、卵巣内に存在するエクダステロイドホルモンと *Esd* 遺伝子が何らかの関係を持つ可能性を示唆しており、*Esd* の発現を調査する上で重要な知見である。これらの事柄をさらに明らかにするためにも、*Esd* のDNAレベルでの同定が必要である。第III章Dで明らかにされたように、ZW対は限性系統を用いることにより同定できることから、今後、DNAレベルでの *Esd* 遺伝子の発現機構を明らかにする必要があると考えられる。

V. 卵殻紋様の大きさを決定する遺伝子

A. 様々な倍数体雌が産生する卵における卵殻紋様サイズの比較

a. 序 論

家蚕の卵形質突然変異には卵サイズが変化する大卵 (*Ge*)、小形卵 (*sm*)、第2小形卵 (*sm-2*)、矮小卵 (*emi*) ならびに白妙卵 (*vit*)、卵形態に変異が生じた腎臓形卵 (*ki*)、紡錘形卵 (*sp*) ならびに長形卵

(*elp*)が発見されている^{2,5,9,39,40)}。また、卵殻の表面は部位によって異なる特異的な構造を持つことが走査型電子顕微鏡観察等から明らかにされた^{1,21,61)}。それらの特異構造はクワコ (*Bombyx mandarina*) にも認められ、各部位間における家蚕との比較が行われている^{36,59)}。特異構造の比較は様々な突然変異品種間でも行われ、特に卵側面部の網目状構造域網目1つの面積(以下単に網目面積)やその網目の中の小瘤の数などの変化が指摘されている^{35,39)}。

家蚕倍数体は様々な誘起方法が開発されており、低温処理では雌雄両性の倍化型倍数体を簡単に誘起できる⁷⁵⁾。低温処理によって誘起された4倍体ならびにその次代3倍体卵殻表面構造は部位特異性を保持しており形態の特徴は2倍体と変化しないが、前極中央部の精孔を中心とした花卉状紋構造のサイズ、卵側面部の網目構造域の網目面積と小瘤数は、倍数体において増大する^{23,24)}。しかしながら、これらの研究では倍数体の性染色体構成は全く考慮されていなかった。

第III章で明らかにしたように低温処理によって誘起された4倍体雌に伴性劣性形質を持つ2倍体雄を交配して得られた次代3倍体の2種類の雌の性染色体構成は伴性劣性形質個体ではZWW、正常形質個体ではZZWと判別できる。本実験においてはこれら2種類の3倍体雌の卵殻側面部の網目面積とその中の小瘤数について2倍体と比較した。さらに低温処理によって誘起した4倍体(ZZWW)とその次代4倍体(ZZWWとZZZW)についても網目面積と小瘤数の調査を行った。

b. 材料と方法

1) 供試家蚕：本実験にはre9(黒縞, 赤卵: $p^s/p^s, re/re$)、Tw1(姫蚕, 第2白卵: $p/p, w-2/w-2$) ならびにsd(伴性赤蟻・d油, 姫蚕: $sch od/sch od, p/p$)を用いた。

2) 倍数体の誘起：re9雌とTw1雄のF₁卵(rw)から第III章A-bと同様に低温処理によって4倍体を誘起した(rw4n)。rw4n雌にsd雄を交配して得た3倍体(rws3n)の性染色体構成は伴性赤蟻形質をZWW、正常形質雌をZZWと識別した。4倍体雄は本来不妊であるが、偶然に妊性のある雄が出現したことから4倍体雌雄の交配(ZZWW x ZZZZ)による次代4倍体(RW4n)を作出した。RW4n雌の2種類の雌の性染色体構成(ZZZWとZZWW, 図10a)はそれぞれの個体にsd雄を交配し次代3倍体の形

質と性比によって確認した。つまり、ZZZW 雌の孵化時体色は全て黒となり性比は 1:1 であるのに対して ZZWW 雌は伴性赤蟻が混在するとともに性比は雌:雄=5:1 となる(図 10 b, 図 10 c)。また, 対

照として 2 倍体には rw2n を用いた。

3) 卵殻側面部網目状構造域の網目面積の測定: 各グループから 5 個体の雌について 5 卵ずつ網目面積を測定した。卵殻側面部を走査型電子顕微鏡 (JEOL, JSM-SM ならびに HITACHI, S-2100 A) で写真撮影し, 1 つの網目部分を 1 卵につき 10 ピースずつ Ganriki 画像解析システム (TEK-MATE Inc) を用いて測定した。同様に測定された 1 mm 方眼紙をスタンダードとして卵と網目面積の実際値を算出した。それらの値と小瘤数も合わせ SAS (SAS Institute Inc) によって統計処理して有意差の検定を行った。

c. 結果

それぞれ異なる性染色体構成を持つ 2 倍体, 3 倍体および 4 倍体雌が産生した卵の卵殻側面部の走査型電子顕微鏡写真を図 11 に示した。いずれのグループにも内部が凹状になった網目構造が観察されたが, 網目面積は rws3n (ZWW) を除いて 2 倍体よりも倍数体の方が大きかった。rws3n (ZWW) の網目面積は 2 倍体と同様であった (図 11 a, 図 11 b)。2 種類の 3 倍体雌 (ZZW と ZWW) において網目面積は異なる大きさであった (図 11 c, 図 11 d)。また, 2 種類の 4 倍体雌 (ZZZW と ZZWW) においても面積は異なっていた (図 11 e, 図 11 f)。

性染色体構成と網目面積および小瘤数の関係を調査するためにそれぞれの平均数とその分散を Z 染色体の数に応じて 3 つのタイプに分類してあらわした (表 9)。タイプ 1 は Z 染色体を 1 本持つ rw2n (ZW) と rws3n (ZWW), タイプ 2 は Z 染色体 2 本の rws3n (ZZW), rw4n (ZZWW) および RW4n (ZZWW), さらにタイプ 3 は Z 染色体 3 本の RW4n (ZZZW) である。面積と小瘤数の平均値はタイプ内で有意な差がなくタイプ間で差が認めら

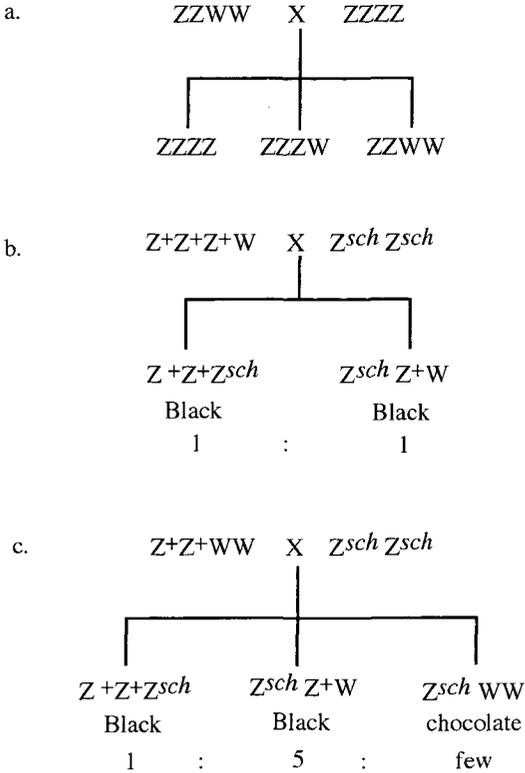


図 10 両親とその子孫の性染色体構成
 Fig. 10 Sex chromosome constitution of parents and offspring
 The body color of the newly hatched larvae and the segregation ratio are given underneath.
 a. rw4n x rw4n, b. RW4n (ZZZW) x sd, c. RW4n (ZZWW) x sd

表 9 卵殻網目の平均面積と平均小瘤数

Table 9. The mean value of the area and the number of knobs in polygonal patterns

	Area (μm^2)	\pm SD	Number of knobs	\pm SD
Type 1				
rw2n(ZW)	1921	342	5.47	1.75
rws3n(ZWW)	2134	277	3.98	1.54
Type 2				
rws3n(ZZW)	2999	458	16.52	4.46
rw4n(ZZWW)	3272	576	16.44	4.41
RW4n(ZZWW)	3468	563	14.46	4.24
Type 3				
RW4n(ZZZW)	4241	890	21.35	8.17

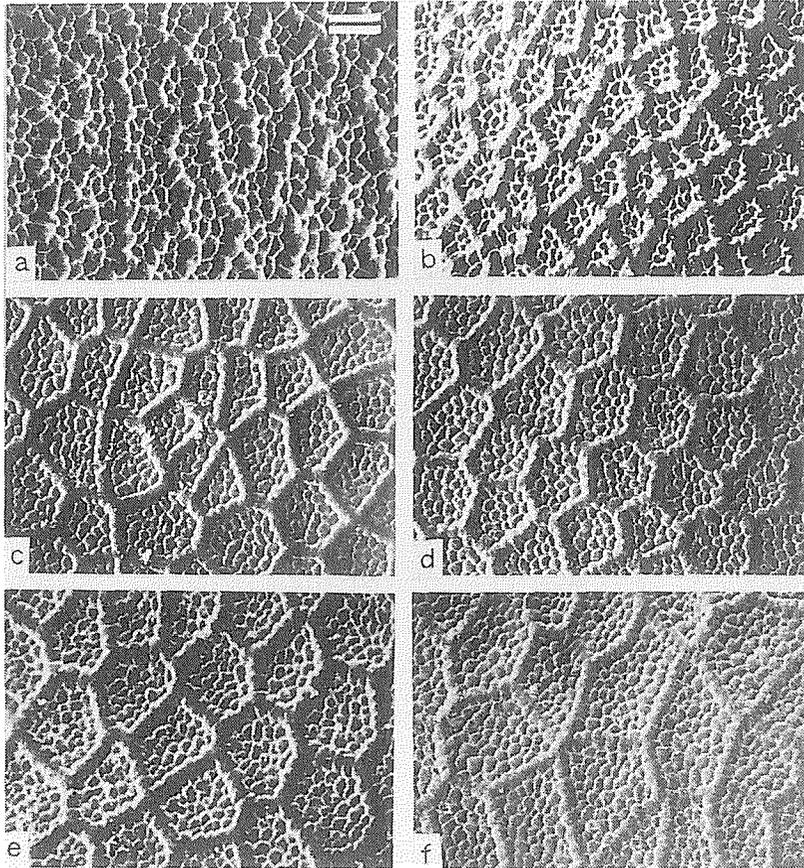
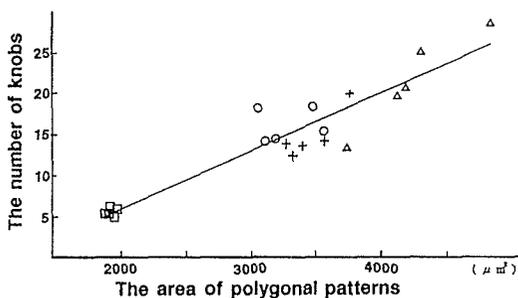


図11 卵殻に認められた網目構造部位

Fig. 11 The polygonal patterns of chorion

a: rw2n (ZW), b: rws3n (ZWW), c: rws3n (ZZW), d: rw4n (ZZWW),
e: RW4n (ZZZW), f: RW4n (ZZZW), Bar: 30 μ m



れている^{60,62}。家蚕とクワコならびにその F_1 個体において行われた構造の比較により卵側面部の網目状構造域の網目面積はクワコと F_1 個体で家蚕より有意に小さかった³⁶。また、家蚕突然変異系統の大卵系 (*Ge*) や第2小卵系 (*sm-2*) と正常卵系統との網目面積の比較においても突然変異系統で面積の減少が認められている^{35,39}。

家蚕は低温処理、温湯処理等によって非常に簡単に倍数体が誘起される。卵殻特異構造の家蚕倍数体における比較は大村・片岡⁵⁹によって初めて行われ、側面部網目状構造域の網目面積が2倍体よりも3倍体および4倍体で増大することを報告している。また、2倍体ならびに4倍体濾胞細胞の大きさとそれぞれの網目の形と大きさが一致したことから家蚕卵殻表面の網目面積は濾胞細胞の大きさに応じた刻印であると結論した。しかしながらこれらの倍数体雌は性染色体構成に関する配慮と解析が全くなされていなかった。

本実験においては低温処理で倍化型4倍体 (*rw4n*; *ZZWW*) を誘起し、その次代3倍体の性染色体構成を伴性赤蟻遺伝子による標識によって判別した (*rws3n*; *ZZW* と *ZWW*)。また、偶然に受精能力を獲得した4倍体雄と4倍体雌との交配による次代4倍体 (*RW4n*) を得て、その性染色体構成 (*ZZZW* と *ZZWW*) を子孫の性比と形質分離によって判定した (図10)。これらの倍数体と2倍体 (*rw2n*; *ZW*) の合計6種類の倍数性と性染色体構成の異なる雌が産生した卵の卵殻側面部の網目構造域の網目面積と小瘤数を比較した。図11にみられるように、大部分の倍数体蚕の卵殻の網目面積は2倍体よりも大型であったが、3倍体の *rws3n* (*ZWW*) の網目面積は2倍体 *rw2n* (*ZW*) と類似した大きさであった。この事実は3倍性が必ずしも網目面積を増大するものではないことを意味している。F検定による有意差検定を行ったところ、2種類の3倍体間 (*ZZW* と *ZWW*) ならびに次代4倍体間 (*ZZZW* と *ZZWW*) には有意差が認められた (表9) ことから倍数性の増加による細胞の大型化が網目面積の増大を引き起こすものではないことが明らかになった。

Z染色体数に応じてタイプを1~3に分類して網目面積と小瘤数を比較し、それぞれのタイプ内のF検定を行ったところ有意差は認められなかった。遺伝的背景と倍数性の異なる個体の卵の網目面積がZ染色体数の増加に従って増大した (図13) ことから、

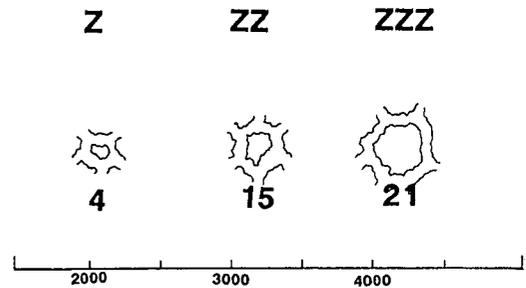


図13 Z染色体数と卵殻網目サイズ (μm^2) の関係

Fig. 13 The relation of the number of Z with the size of polygonal patterns (μm^2)

The number of the figure gives the average number of the knobs.

網目面積はZ染色体上に存在する数量因子によって支配されていると考えられる。この遺伝子はW染色体に存在する卵サイズ決定遺伝子⁴⁹に続いて発見された家蚕における第2の数量遺伝子であり、卵殻網目サイズ決定遺伝子 (Polygonal pattern size determining gene; *Pgd*) と命名する。

網目面積と小瘤数との間には比例関係が存在するものの、網目が大型化することによってその内部の小瘤数が増加したのか、小瘤数が増加することが網目面積を増加させるのか明らかではない。濾胞細胞形状の異常や濾胞皮膜組織のコリオン分泌異常が卵殻側面部の構造を変化させる^{38,60} ことから *Pgd* 遺伝子の発現と濾胞細胞内でのコリオン分泌に関わる遺伝子の関係を明らかにする必要がある。

第2染色体の長い断片がW染色体に転座した限性黄繭系統を用いて、KAWAMURA and NIINO⁴⁹は卵母細胞染色体の中でZ-W対を同定したが、Z染色体単独での同定には至っていない。本実験により明らかにされた卵殻側面部の網目構造域の網目面積測定は、倍数体雌蚕においてZ染色体の数を知る現在唯一の方法である。

B. 卵サイズ決定遺伝子 (*Esd*) と卵殻網目サイズ決定遺伝子 (*Pgd*) の関係

a. 序 論

家蚕倍数体における細胞の大きさは2倍体よりも大きくなる一方、組織全体の細胞数が減少する²⁶。4倍体雌において卵サイズが2倍体よりも大型化するのは、FANKHAUSER and GRIFFITHS⁸により提唱された核-細胞質比に従い、染色体の倍化が卵母細胞の大型化に起因すると考えられてきた。また、卵殻表面の網目状構造域の網目面積が2倍体よりも4

倍体で大型化することも、コリオンタンパク質を分泌する濾胞細胞のサイズ増加に伴うものであると推測されてきた⁵⁹⁾。

家蚕3倍体の雌には性染色体構成の異なる2種類が存在し、ZZW雌は2倍体と同サイズの卵を産下するのに対してZWW雌は大型卵を形成することが第IV章Aの実験より明らかにされ、W染色体上にはKAWAMURA⁴⁶⁾によって提唱された数量因子である卵サイズ決定遺伝子 (*Esd*; Egg size determining gene)の存在が確認された。さらに、本章Aの実験から卵殻側面部の網目面積を決定する第二の数量遺伝子 (*Pgd*) がZ染色体上に発見された。これらの遺伝子の存在は、家蚕における数量形質が核一細胞質比に起因して増加するとした従来の説を否定するものである。

家蚕卵を大型化する遺伝子として最初に発見されたのは、Z染色体に座する *Ge* 遺伝子であり³⁾、この系統は4倍体と同様の大型卵を産下する。KAWAMURA⁴⁷⁾は *Ge* 系統のZ染色体が正常系統よりも長いことから、*Ge* 突然変異は *Esd* 遺伝子を含むW染色体断片のZ染色体への転座であり、本来は同一遺伝子である万能性を示唆した。第IV章Bの結果より、*Esd* 遺伝子はその座乗染色体が変化しても本来の占座染色体であるW染色体にある時と同様に卵巢外の体内環境に影響されずに発現すると考えられた。

本実験においては家蚕卵形質に関わる2つの数量因子であるW染色体上に存在する *Esd* 遺伝子とZ染色体上に座位する *Pgd* 遺伝子の発現における相互の関係を知るために正常系統ならびに *Ge* 系統の倍数体を用いて卵サイズと卵殻の網目サイズの調査を行った。

b. 材料と方法

1) 供試家蚕: 本実験には re9 (黒縞, 赤卵: p^s/p^s , re/re), Tw1 (姫蚕, 第2白卵: p/p , $w-2/w-2$) ならびに *Ge* (大卵, 形蚕, かすり, こぶ: Ge/Ge , $+p/+p$, q/q , K/K) を用いた。

2) 4倍体の誘起: re9雌 x Tw1雄および Tw1雌 x *Ge*雄の産下卵を第III章A-bと同様に低温処理して4倍体を誘起した (rw4nおよびTG4n)。

3) 卵サイズならびに卵殻側面部網目サイズの測定: 卵サイズは水平最大断面積を第IV章B-bと同様に Ganriki 画像解析システム (TEKMATE Inc) を用いて測定した。網目構造部分のサイズは隔離帯

を含まない内部の小瘤部分面積を Ganriki 画像解析システム (TEKMATE Inc) により測定した。それぞれの実値は1mm方眼紙を同様に計測したスタンダードをもとに算出した。

c. 結果

re9 ♀ x Tw1 ♂ (rw) および Tw1 ♀ x *Ge* ♂ (TG) の2倍体と4倍体の合計4種類の産下卵を図14に示した。卵サイズは同一品種内では4倍体が2倍体より大きく、倍数性が同じであればTG系統がrw系統を上回った (表10)。卵サイズの順序は $TG4n > TG2n \geq rw4n > rw2n$ となり rw4n と TG2n の間には有意差は認められなかった。

4種類の卵の網目状構造域の網目サイズには差があったものの形状は同様の多角形を示した (図15)。網目面積は卵サイズに関わりなく双方の系統ともに4倍体が2倍体よりも約2.8倍大型であった (表10)。同一倍数性個体間においては、TG系統でrw系統よりもやや小型であったものの双方の網目面積に有意差は認められなかった。

d. 考察

Ge 遺伝子は *Esd* 遺伝子を含むW染色体断片のZ染色体への転座によって生じたことから同一遺伝子であると考えられる⁴⁷⁾。正常卵系統 (rw) ならびに大卵系統 (TG) の2倍体と4倍体について卵サイズを調査したところ $TG4n > TG2n \geq rw4n > rw2n$ であった (図14) ことから、*Esd* 遺伝子数の増加が卵サイズの大型化を引き起こすことは明白である (表10)。

卵殻表面の網目状構造域の1つの網目面積は系統間での比較において有意差はなかったもののTGはrwよりも小型であった。網目の構造は家蚕品種により多様性が認められる⁷⁰⁾ ことや、網目面積には品種間差が認められた⁵⁹⁾ ことから本実験の差は、使用した品種の差に起因するものであると考えられる。品種内の倍数性による比較では、網目面積はZ染色体上の *Pgd* 遺伝子数が2倍になることにより、双方の4倍体ともに2倍体の約2.8倍大型化した (表10)。

2つの *Esd* 遺伝子を持つグループに属した rw4n と TG4n の卵サイズは 1.5 mm^2 前後で統計的有意差は認められなかった。しかしながら *Pgd* 遺伝子に支配される卵殻表面の網目面積は rw4n において TG2n よりも有意に大型であった。つまり、卵サイズと網目サイズは無関係であり、卵形質を支配する数

量因子である *Esd* 遺伝子と *Pgd* 遺伝子は互いに独立して発現していると考えられる。

KAWAGUCHI *et al.*³³⁾ は家蚕蛹に 20-hydroxyecdysone を 50 μg 以上投与することによって卵管内の位置特異的に卵サイズが大型化し、卵殻網目面積とその中の小瘤数も増加すること、さらに、*Ge* 系統に同様の投与を行っても卵サイズ、網目面積および小瘤数の増加が認められることをみいだした³⁴⁾。卵サイズを決定する *Esd* と卵殻網目面積を決定する *Pgd* の 2 つの数量遺伝子が独立に発現することを考慮すると 20-hydroxyecdysone はこれらの遺伝子発現を強める働きを持ち、大量投与が卵面積と網目面積両方の増大を導いたと考えられる。

家蚕において明らかにされた 2 つの数量因子は卵形質に関する遺伝子であり、性染色体上に座乗する。

第三章 D で明らかにしたように家蚕限性系統の卵母細胞染色体において性染色体対は非相称な形態を示し、他の染色体対と区別することが可能である。数量因子の働きを理解するためにはその遺伝子の同定が必須であるが、家蚕の性染色体を直接マイクロマニピレーターによってかきとり、PCR 法で増幅することにより *Esd* ならびに *Pgd* の単離ができると考えられる。本実験で明らかとなったように、2 つの数量因子は独立して発現することから、今後、それぞれの遺伝子発現についても追求が可能であると考えられる。

生物には様々な数量因子が存在し、正常な形質発現のみならず癌化や異常発生などに関与すると推測される。家蚕は多数の突然変異が系統維持されていることと倍数体が非常に簡単に誘起できることから

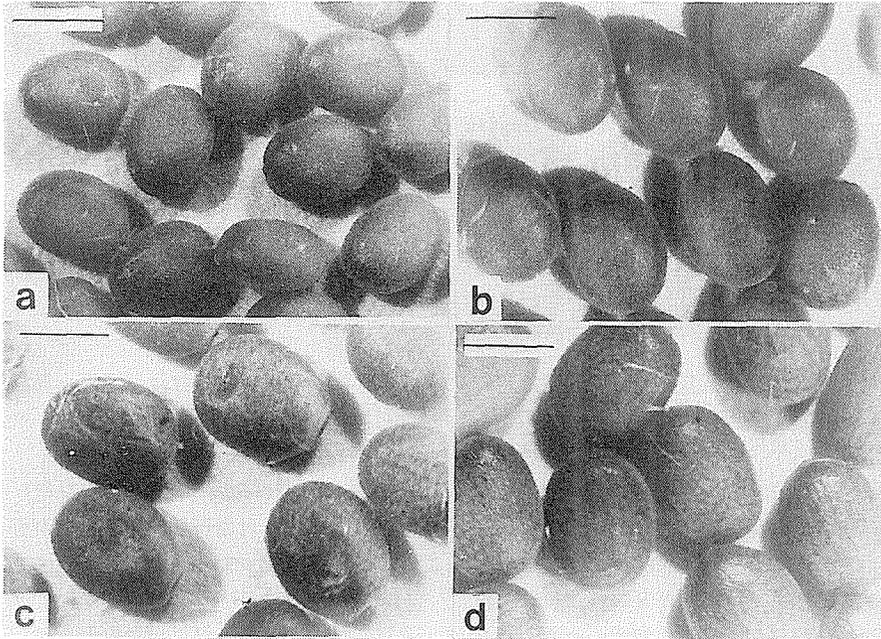


図 14 TG および rw 系統の 2 倍体と 4 倍体の産下卵

Fig. 14 Eggs laid by diploid and tetraploid females of TG and rw

a: rw2n, b: rw4n, c: TG2n, d: TG4n, Bars: 1mm

表 10 正常系統と *Ge* 系統の卵サイズおよび卵殻網目サイズ

Table 10. Egg size and polygonal pattern size in normal and *Ge* strains

	Number of <i>Esd</i> genes	Number of <i>Pgd</i> genes	Average size of eggs(mm ²)	±SD	Average size of polygonal patterns(μm ²)	±SD
rw2n(ZW)	1	1	1.01	0.05	326.1	87
rw4n(ZZWW)	2	2	1.41	0.07	933.3	236
TG2n(ZW)	2	1	1.58	0.08	256.3	75
TG4n(ZZWW)	4	2	1.75	0.09	734.1	144

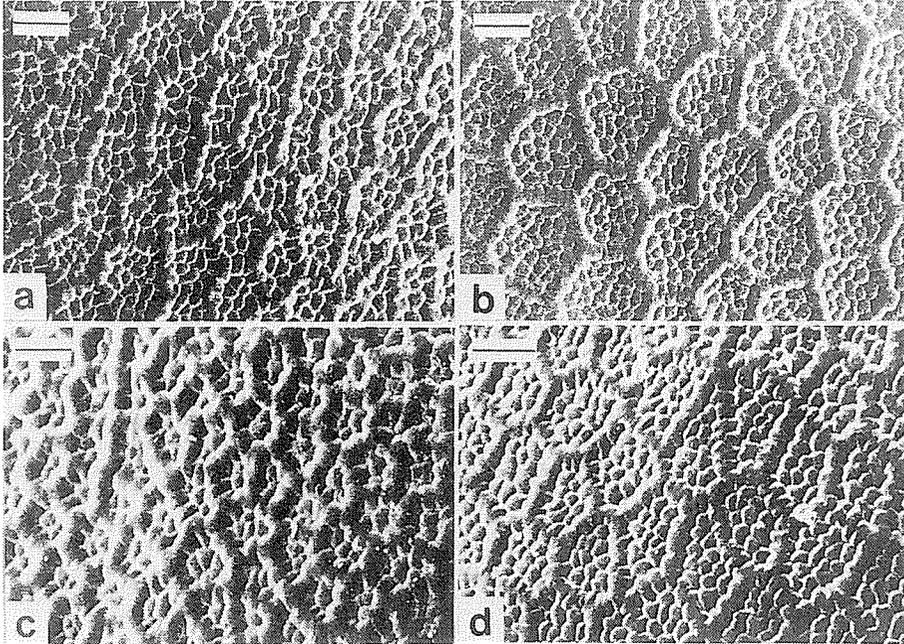


図 15 卵殻の網目構造部位

Fig. 15 Polygonal patterns of chorion

a: rw2n (ZW), b: rw4n (ZZWW), c: TG2n (ZW), d: TG4n (ZZWW),
Bars: 1mm

動物の数量因子の検索に有用な実験材料であると考えられる。

VI. 4倍体雄蚕における人為的処理による妊性獲得

A. アラタ体摘出, 高温-多湿処理および絶食処理による4倍体雄蚕の受精率の向上

a. 序 論

動物の4倍体は植物に比べて非常に稀であるが, その原因をMULLER⁵⁵⁾は性染色体の分化が進んでいるためであると指摘している。動物倍数性の研究は, 誘起が非常に困難であることと両性倍数性が非常に少ないために植物における倍数性の研究よりもはるかに遅れ, 限られたものになっている。その中で, 家蚕は1930年頃から倍数体誘起実験が行われ, 高温, 遠心, コルヒチンならびにCO₂ガス処理など様々な誘起法が試みられてきたが^{11,16,25,84)}, これらの方法で誘起できたのは非還元型の雌のみであった。

家蚕4倍体雄が得られたのは遠心処理によって誘起された6倍体雌もしくは温湯処理によって作成された6倍体と3倍体の混数体に2倍体雄を交配した子孫においてであった^{30,31)}が, いずれも個体数はごく

限られていた。こうして得た4倍体雄を用いてASTAUROV⁴⁾は4倍体相互交配によるF₁4倍体の作成を試みたが, 孵化率が非常に低かった。低温処理法は最も効率よく雌雄両方の4倍体を誘起できる⁷³⁾ものの, 低温処理によって得られる4倍体では雌に正常な受精能が認められる一方, 雄は極度に妊性が低い。

動物の倍数体種の出現(倍数性進化)を妨げる一因として挙げられる不妊性の機構を家蚕4倍体雄を用いて明らかにする研究の一環として, 4倍体雄5齢期の様々なステージにおいて片側アラタ体除去, 高温-多湿処理ならびに絶食処理を施し受精率の向上を試みた。

b. 材料と方法

1) 供試家蚕: 本実験にはre9(黒繭, 赤卵: p^s/p^s , re/re), Tw1(姫蚕, 第2白卵: p/p , $w-2/w-2$)ならびにCre(限性セープル・形蚕, 赤卵: T(W: p^{sa+p} , p/p , re/re))を用いた。

2) 4倍体の誘起: re9雌 x Tw1雄の産下卵を第III章A-bと同様に低温処理して4倍体を誘起した(rw4n)。

3) アラタ体除去手術: 低温処理によって誘起し

た rw4n 雄の 5 齢 6, 24, 48, 72 および 96 時間に黄色⁶³⁾の方法に従って片側アラタ体を除去した。手術個体は 15°C に 24 時間保護した後、再び桑を与え飼育を続けた。

4) 高温一多湿処理：5 齢 6, 24, 48 および 72 時間の各ステージの rw4n 雄個体に桑を与えた状態で、湿度を十分に保ったプラスチック箱に入れて密閉状態にして 38°C で 24 時間処理した⁶⁴⁾。その後は、通常通り飼育を続けた。

5) 絶食処理：5 齢の様々なステージ (0, 24, 48, 54, 60, 72 および 96 時間) の 4 倍体雄個体をそれぞれ 48 時間絶食させた。絶食時は桑を与えなかった以外、通常の飼育環境となんら変化を加えなかった。

6) 処理した個体の倍数性の確認と受精率：片側アラタ体摘出、高温一多湿処理あるいは絶食処理が施された個体を赤卵系統の Cre もしくは re9 雌と交配し、卵色が黒卵：赤卵=1:1 に分離した個体は 2 倍体として排除し、危険率 1% の χ^2 検定で 5:1 として採択された個体を 4 倍体と判定するとともに受精率を調査した。

c. 結 果

χ^2 検定の結果、次代 3 倍体の卵色分離比は黒卵：赤卵=5:1 であり、いずれの個体も 4 倍体であることが証明されたアラタ体片側除去もしくは高温一多湿処理を施された 4 倍体雄個体と無処理区の受精率をみると (表 11)、アラタ体除去手術において 5 齢 24 時間を除いた全ての区で受精率の向上が認められた。また、高温一多湿処理においては 5 齢 72 時間の処理区を除き受精率が向上した。無処理区に対して

有意な向上が認められたのは 5 齢 48 時間ならびに 96 時間におけるアラタ体片側除去区に限られた (表 11)。

5 齢期に絶食刺激を与えた雄個体の 4 倍性の確認と受精率調査のために Cre 雌と交配を行った結果、2 倍体雄は黒卵：赤卵=1:1 の分離比が、4 倍体雄は絶食開始時期により様々な受精率が認められた (図 16)。絶食開始が 72 時間グループの一部と 96 時間グループの大部分の個体は絶食期間中に吐糸を開始したが、その他の実験区では 48 時間の絶食期間中に上簇した個体は認められなかった。 χ^2 検定により 4 倍性が認定された雄の受精率を 3 シーズンにわたり行った実験区ごとに表 12 に示した。いずれの絶食区においても無処理に対して受精率の向上が認められた。処理開始が遅くなるに従って受精率は増加し、1993 年夏世代では 48 時間、秋世代では 72 時間さらに 1994 年夏世代では 54 時間がピークとなったが、さらに遅い時間からの絶食ではその効果が減少した。

d. 考 察

低温処理によって誘起した 4 倍体の雌は正常な妊性を有するのに対して雄では極度に妊性が低い。しかしながら偶然妊性を有する個体が出現するケースがあり、それらを用いて 4 倍体雄の受精に関する研究が行われてきた²²⁾。本実験においては家蚕 4 倍体雄の不妊機構の解明の第一歩として 5 齢幼虫の様々な時期に片側アラタ体除去、高温一多湿処理および絶食処理を行って受精率の向上を試みた。

片側アラタ体除去ならびに高温一多湿処理ではほ

表11 片側アラタ体摘出および高温一多湿処理を施された誘起 4 倍体雄の受精率

Table 11. Fertility of induced tetraploid males applied allatectomy or temperature-moisture treatment

Treatment	Hours after 4th ecdysis	No. of male moths	No. of eggs			Fertility (%)	±SE	B/r ratio***	χ^2
			black	red	unfertilized				
Control		77	980	166	16777	6.39	1.31	5.90	3.93
-1 CA*	6h	3	79	13	1034	8.17	2.68	6.08	0.43
TM**		3	53	10	894	6.58	2.07	5.30	0.03
-1 CA	24h	6	66	17	1630	4.85	4.99	3.88	0.87
TM		7	332	64	2244	15.00	4.47	5.19	0.07
-1 CA	48h	20	1052	223	5221	19.63	1.38	4.72	0.62
TM		9	208	46	2163	10.51	3.86	4.52	0.38
-1 CA	72h	5	154	36	1594	10.65	4.54	4.28	0.72
TM		3	23	5	1234	2.22	0.62	4.60	0.03
-1 CA	96h	10	743	147	2225	28.57	9.49	5.05	0.01

*: excision of one corpus allatum

** : temperature-moisture treatment

*** : the ratio of black eggs to red eggs

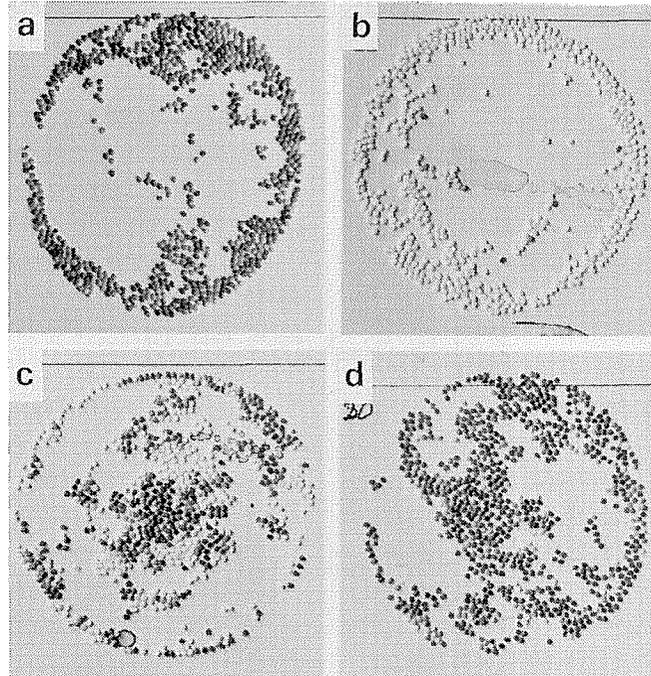


図16 赤卵系統 (Cre) と戻し交配で示された2倍体ならびに4倍体雄の受精率

Fig. 16 Fertility shown by the eggs of red strain (Cre) back-crossed with diploid and tetraploid males.

a: The eggs of a Cre mother crossed with a diploid male. Fertility is 99.3% and the ratio of black to red (b: r) is 329: 333=1: 1.01. b: The eggs of a Cre mother crossed with a tetraploid male. White eggs are unfertilized. Fertility is 1.3% and b: r is 6: 1. c and d: The eggs of Cre females crossed with tetraploid males which received a starvation stimulus. Fertility is 49.5% and 90.9%, respectively. b: r is 292: 54=5.4: 1 for c, and 558: 119=4.7: 1 for d.

表12 絶食処理における Cre ♀ × rw4n ♂ の平均受精率と卵色分離比

Table 12. Average fertility and egg color segregation ratio in starve-shock experiments, Cre ♀ × rw4n ♂

Season	Group*	No. of males	No. of eggs	Fertility(%) ± SE	b/r**	χ^2
1993 Summer	Control	36	13,833	5.19 ± 1.90	5.71	1.16
	0h	23	7,757	6.18 ± 3.78	5.47	0.51
	24h	18	7,317	12.85 ± 4.42	4.91	0.04
	48h	16	5,501	24.63 ± 5.98	5.02	0.00
	72h	20	8,714	18.27 ± 3.41	4.77	0.51
1993 Fall	Control	21	10,055	1.18 ± 0.81	4.17	0.61
	0h	19	9,948	1.71 ± 0.59	5.30	0.08
	24h	10	4,320	9.33 ± 2.92	5.72	0.92
	48h	15	6,964	19.73 ± 6.99	4.70	0.75
	72h	20	10,926	30.48 ± 5.78	5.00	0.00
	96h	18	9,324	6.63 ± 2.33	5.37	0.42
	Diploid	10	6,834	97.67 ± 0.56	1.01	0.13
1994 Summer	Control	30	12,088	5.68 ± 1.48	5.48	0.76
	0h	16	5,320	13.91 ± 3.16	4.78	0.21
	48h	20	8,116	28.91 ± 4.75	4.87	0.25
	54h	48	20,289	39.42 ± 3.41	5.08	0.26
	60h	56	23,038	25.12 ± 2.81	4.85	0.80

*: Start of starvation

** : Egg color segregation ratio of black eggs to red eggs

とんどの実験区において受精率の向上が認められたものの、無処理区に対して有意な増加が認められたのはアラタ体摘出を5齢48時間ならびに96時間で行ったグループであった(表11)。一方、5齢72時間における高温一多湿処理では受精率の有意な減少が認められた。また、無処理区にも6.34%の受精率が認められたことを考慮すると、5齢期における片側アラタ体摘出と高温一多湿処理は4倍体雄の妊性を獲得するための二次的な要因にすぎないと考えられた。

アラタ体摘出実験においては止血のために手術後、15°Cに24時間静置した後、桑を与えたのに対して高温一多湿処理においてはこのような絶食の期間がなかった。このことが、受精率の差として現れた可能性が考えられたので、4倍体雄蚕5齢期の様々なステージにおいて絶食処理を施した。3シーズンにわたる実験の結果、5齢0時間および1993年夏の24時間からの絶食では、無処理と比較した場合に受精率の向上が認められたものの有意差はなかった。それ以降からの絶食開始区においては有意に受精率が増加した(表12)。この結果より、5齢期における絶食処理は、4倍体雄の人為的妊性獲得に有効な方法であることが明らかになった。

絶食刺激による4倍体雄の受精率の向上がピークを迎える処理開始時間は、実験シーズンにより異なったものの放物線をたどって推移する傾向は一致した(表12)。それぞれのピークは1993年夏において5齢48時間、1993年秋では72時間および1994年夏では54時間であった。このような相違は、各シーズンにおける5齢期の長さの違いに原因があると考えられた。つまり、1993年は夏の異常低温が桑質の低下を招いたため、この年の秋の5齢期は正常

よりも1日長い6日間であり、1994年は夏の異常高温が5齢期を半日短縮した。その結果、表13に示すように無処理区における5齢起蚕から羽化までの期間は、1993年秋ではその年の夏よりも約2日長く、これに反して1994年夏には約2日短縮した。これらの結果より、絶食刺激は5齢期の限られた時期に特に効果があると考えられる。3シーズンにわたる実験での5齢期間のばらつきを通常期間である5日間に修正して絶食開始時間ごとの受精率をプロットしたところ、図17にあらわされるように5齢60時間からの絶食刺激が最も効果的であることが明らかになった。

家蚕の減数分裂においては交叉とキアズマ形成は雄にのみ起こる。家蚕4倍体雌の減数分裂において分裂前期の初期には、多価染色体対の形成が観察されるが、徐々に2価染色体に変化し、第一分裂中期には全ての染色体が2価染色体となり、正常な分離を行う⁶⁷⁾。一方、4倍体雄では4価染色体が2価染色体へと完全に分離しないため第一分裂中期に多くの4価染色体が観察される⁶⁶⁾。RASMUSSEN⁶⁶⁾は、この4価染色体の分離異常が精母細胞の染色体の不均衡を生み、4倍体雄の不妊の原因になると推測した。

KING and AKAI⁵³⁾の電子顕微鏡観察により家蚕2倍体の減数分裂は5齢脱皮直後に開始されることが明らかにされている。中垣・川村(私信)は、家蚕雄の減数分裂をフローサイトメーターを用いて調査し、2倍体において5齢6時間に精細胞(n)が観察され始めるのに対して、4倍体雄では5齢60時間に精細胞(2n)が形成され始めることを認めている。4倍体蚕精母細胞における分裂の生体観察では、第一分裂中期から終期までの分裂時間が2倍体の約2倍である⁴⁸⁾ことから、精細胞形成の遅れは分裂速度

表13 5齢起蚕から羽化までの平均日数

Table 13. Average days from 4th molting to adult emergence

Start of starvation	1993 Summer		1993 Fall		1994 Summer	
	No. of individuals	Average (days)	No. of individuals	Average (days)	No. of individuals	Average (days)
0h	23	19.65	19	21.00	16	18.19
24h	18	19.61	10	21.90		
48h	16	19.13	15	20.93	20	16.65
54h					48	15.94
60h					56	16.25
72h	20	17.60	20	20.30		
96h			18	19.56		
Control	36	18.06	21	19.86	30	16.13

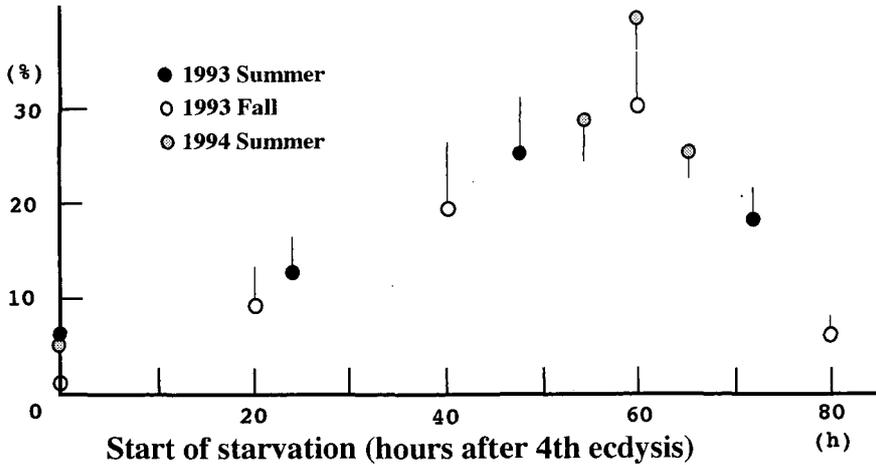


図17 絶食開始ごとに示された平均受精率の推移

Fig. 17 Average fertility plotted for the start of starvation

The fertility curve obtained in the three seasons were put together by adjusting the length of the 5th instar to 5 days (120h), which is the normal for weather.

の違いによって引き起こされると推測される。4倍体において正常な精子形成が何故、妨げられるのかは依然として明らかではないが、本実験において5齢60時間から始まる48時間絶食が最も効果的に受精能力を回復させたことと、精細胞の形成が5齢60時間から観察され始めることとの時間的な一致は非常に興味深い。

家蚕においては4齢から5齢への脱皮のために約48時間の準備期間(4眠)が必要であり、この間は絶食状態にある。家蚕雄における正常な減数分裂および精子形成には絶食が必要な刺激である可能性がある。正常な精子形成を理解するの一助として家蚕4倍体を用いた生物検定系として、本実験で確立した絶食処理は今後、有効な方法と考えられる。

B. 絶食処理時間と受精率の関係

a. 序 論

4倍体雄に対するアラタ体摘出、高温一多湿処理および絶食処理実験の結果より妊性獲得に最も有効なのは絶食処理であることが明らかになった。家蚕は動物において非常に稀な4倍体を簡単に誘起できる種であることから、動物では何故、倍数性進化がおこりにくいのかといった問題に取り組むには好適な実験材料であると考えられる。4倍体雌雄の相互交配による子孫を得てそれらの性状を調査するためには4倍体雄の妊性獲得法の効率化が必要である。また、本章Aにおいて指摘された、家蚕精子形成と4眠における絶食状態との関係を調査する必要がある。

る。これらを明らかにすることを目的として絶食開始時期を5齢60時間に固定して絶食期間と受精率向上との関連について調査を行った。

b. 材料と方法

1) 供試家蚕: 本実験にはre9(黒縞, 赤卵: p^S/p^S , re/re), Tw1(姫蚕, 第2白卵: p/p , $w-2/w-2$)ならびにCre(限性セープル・形蚕, 赤卵: T(W: $p^{S^{a+p}}$, p/p , re/re))を用いた。

2) 4倍体の誘起: re9雌 x Tw1雄の産下卵を第III章A-bと同様に低温処理して4倍体を誘起した(rw4n)。

3) 絶食処理: 5齢60時間の4倍体雄個体に対し様々な長さ(0=Control, 1, 3, 6, 12, 24, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 60, 72時間)の絶食処理を行った。

4) 処理した個体の倍数性の確認と受精率: 絶食処理された4倍体雄を赤卵系統のCre雌と交配し、卵色が黒卵: 赤卵=1:1に分離した個体は2倍体として排除し、危険率1%の χ^2 検定で5:1として採択された個体を4倍体と判定するとともに受精率を調査した。また、処理区ごとの生存率と5齢期間ならびに吐糸から羽化までの期間の調査も行った。

c. 結 果

家蚕4倍体に対して5齢60時間を開始点とし、1時間から72時間までの絶食処理を4シーズンにわたって行った。検定交雑と χ^2 検定によって4倍体の確認された絶食個体の受精率を表14に示した。絶

表14 様々な長さの絶食刺激を与えた4倍体雄の受精率

Table 14. Fertility of tetraploid male silkworms subjected to various lengths of starve shock

Group*	No. of males	No. of eggs	B/r**	Fertility (%)	±SE
Control	83	32,789	4.84	7.22	1.18
1h	39	20,747	4.78	4.63	1.40
3h	18	10,336	4.94	3.73	1.87
6h	37	20,297	4.50	5.34	2.52
12h	41	21,570	5.14	11.27	2.37
24h	43	22,246	4.91	14.96	2.47
30h	24	5,571	5.11	28.94	4.48
33h	10	1,457	5.20	19.56	3.92
36h	41	18,947	4.74	13.70	2.91
39h	34	12,758	4.66	13.61	2.99
42h	37	13,649	4.61	13.56	2.34
45h	16	7,775	5.07	10.15	2.92
48h	66	28,867	4.88	30.39	3.43
51h	25	8,302	4.79	36.85	5.03
54h	24	6,113	4.95	25.31	4.25
60h	10	6,142	4.94	28.23	7.31
72h	37	20,485	4.79	25.52	4.57

*: groups classified by length of starvation

**: ratio of black eggs to red eggs

食期間が6時間以下の処理区では無処理区よりも受精率が低下したものの、12時間以上の処理区ではいずれも受精率の向上が認められた。最も受精率の向上した処理区は51時間処理で、受精率はこの処理区と30時間処理区を2つのピークとし、45時間処理区を極小とする放物線状に推移した。

処理個体の生存率は処理時間の短い区(24時間以

内)において高かったものの、処理時間の長さに必ずしも影響されず、33時間処理区で25%、60時間処理区で43.48%と非常に低い値となった(表15)。また、処理時間と5齢期間および羽化までの期間との関係については(表16)、処理期間と成育期間の延長

表16 4倍体雄における絶食処理区と対照区の成長に要した時間の比較
Table 16. The comparison of time difference between control and starved males in the tetraploid males

表15 絶食処理した4倍体雄の生存率

Table 15. Survival rate of starved tetraploid males

Experimental groups	Number of individuals for starvation	Number of survivor	Survival rate (%)
Control	102	83	81.37
1h	52	39	75.00
3h	20	18	90.00
6h	49	37	75.51
12h	48	37	77.08
24h	52	43	82.69
30h	33	24	72.73
33h	40	10	25.00
36h	81	41	50.62
39h	58	34	58.62
42h	55	37	67.27
45h	17	16	94.12
48h	108	65	60.19
51h	40	25	62.50
54h	40	24	60.00
60h	23	10	43.48
72h	51	37	72.55

Experimental group	5th instar (h)	Spinning to adult (h)	0h of 5th instar to adult (h)
Control	—	—	—
1h	0.00	1.41	1.41
3h	0.00	4.08	4.08
6h	0.00	-9.25	-9.25
12h	12.69	-6.21	6.48
24h	14.00	-0.59	13.41
30h	8.04	-0.55	7.49
33h	8.04	6.52	14.56
36h	1.87	3.87	5.74
39h	0.45	-7.88	-7.43
42h	1.00	-19.93	-18.93
45h	0.20	-19.74	-19.54
48h	3.11	10.17	13.28
51h	3.24	32.92	36.16
54h	8.04	18.79	26.83
60h	13.92	-3.44	10.48
72h	14.63	-11.05	3.58

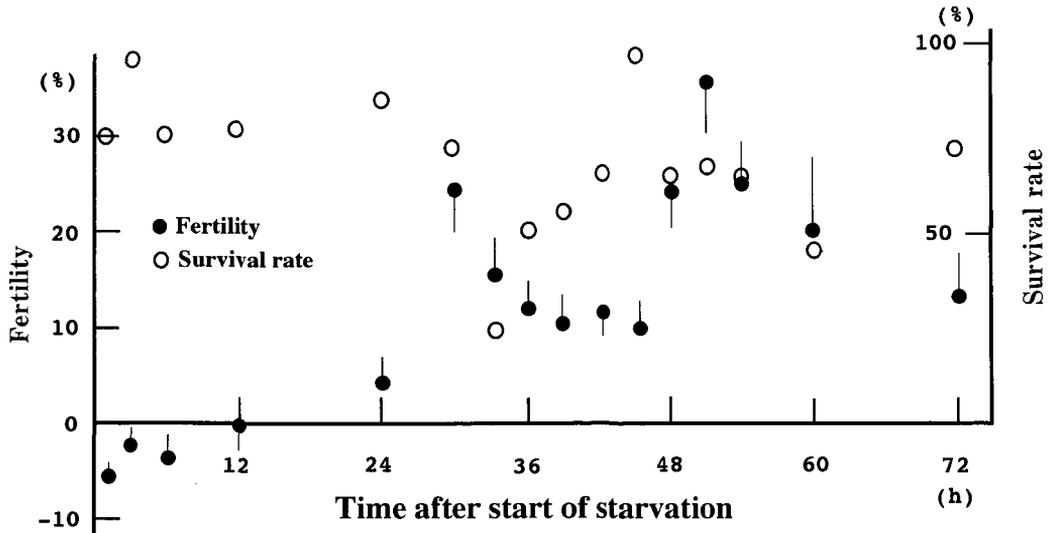


図18 絶食処理された4倍体雄の受精率と生存率の推移

Fig. 18 Fertility and survival rate of starved tetraploid males

が一致したのは1時間処理区の吐糸から羽化までの期間と12時間処理区の5齢期間のみであり、絶食処理は必ずしも成育期間の延長を引き起こすものではなかった。逆に、吐糸期から羽化までの期間は、無処理区に比べて短縮する傾向が認められた。

d. 考 察

家蚕は倍数体誘起が最も容易な昆虫であり、動物の倍数体研究に適した材料と言える。本章Aで明らかになったように絶食処理が4倍体雄の妊性獲得に対する有効性が認められ、動物倍数体研究の材料として注目される。倍数性進化が動物においてはほとんどみられない理由を解明するための材料として利用するには本実験材料の家蚕4倍体雄は好適である。本実験では絶食開始時間を5齢60時間に固定し、絶食時間の長さとの関係を調査した。

本実験は4シーズンにわたり行われた絶食処理の結果をまとめたもの(表14)であることから、各蚕期における無処理区の受精率を差し引いた値が受精率向上に与える絶食処理の効果であると考えられる。図18に絶食期間の受精率に及ぼす効果とそれぞれの実験区における生存率をあらわした。受精率が最も高かったのは51時間処理区であり、その前後の処理区でも20%以上の受精率向上が認められた。48~54時間処理区の生存率は60%以上であったことから、4倍体雄の妊性獲得のためには5齢60時間から51時間前後の絶食処理が最も効果的であるこ

とが明らかになった。また、30時間処理区にも20%以上の受精率の向上が認められ生存率は72.73%と高い値であったことから、絶食時間の短縮と生存率の観点から30時間の絶食処理も妊性向上のための有効な方法であると結論できる。

先に述べたように4倍体雄では精細胞形成が2倍体よりも54時間遅れること(中垣・川村, 私信)ならびに1回の分裂に要する時間が長い⁴⁸⁾ことが判明している。絶食により5齢期間が延長し、このことが時間的制約を緩めて減数分裂を終了する精母細胞の数を増加させ、その結果妊性向上をもたらす可能性が考えられる。このため、絶食時間と5齢および羽化までの期間延長について調査したところ、妊性の向上に成長期間の延長が反映されていなかった(表16)。2倍体における家蚕の精子形成は4眠期の直後に集中して短期間に行われること⁸³⁾ならびに絶食による受精率の向上には時間の長さに応じて2つのピーク(30および51時間)が存在していたこと(図18)を考慮すると、家蚕における正常な精子形成には絶食により消長が制御される物質の関与が示唆される。

この仮説を検証するために、妊性のほとんどない4倍体雄を用いた生物検定系の確立と体液ならびに精巢中の低分子から高分子までの幅広い物質についての分離と同定を現在進めている。

C. 4倍体相互交配により得られたF₁4倍体蚕の性

状

a. 序 論

本章 A の実験により低温処理誘起した 4 倍体雄の妊性獲得には片側アラタ体除去、高温一多湿処理ならびに絶食処理が有効であったことから、4 倍体相互交配による F₁ 4 倍体個体を得て、その性状について調査を行った。片側アラタ体除去および高温一多湿処理によって得られた妊性のある 4 倍体雄と 4 倍体雌由来の次代 4 倍体では孵化率、5 齢起蚕における性比および生存率を雌の性染色体構成に着目して調査した。F₁ 4 倍体個体の性染色体構成を判別して詳細な性状調査を行うために、低温処理によって誘起した伴性赤蟻系統の 4 倍体雄に絶食刺激を施して妊性を獲得させた。こうして得られた伴性赤蟻系統 4 倍体雄と 4 倍体雌を交配することで伴性赤蟻個体を ZZWW 雌、黒蟻個体のうち雌個体を ZZZW、雄個体を ZZZZ と、それぞれの性染色体構成を識別することができる。これら F₁ 4 倍体の性染色体構成別の生存率を様々な成長段階において調査するとともに、2 種類の雌については、第 IV 章ならびに第 V 章で明らかにした家蚕に存在する 2 種類の数量遺伝子 (*Esd* と *Pgd*) の支配する表現形質である卵サイズと卵殻表面の網目面積について調査を行った。

b. 材料と方法

1) 供試家蚕：本実験には re9 (黒縞, 赤卵: p^s/p^s , re/re), Tw1 (姫蚕, 第 2 白卵: p/p , $w-2/w-2$), sd (伴性赤蟻・d 油, 姫蚕: $sch\ od/sch\ od$, p/p), rs (伴性赤蟻, 形蚕, 赤卵: sch/sch , $+p/+p$, re/re) ならびに Cre (限性セープル・形蚕, 赤卵: T(W:2) p^{sa+p} , p/p , re/re) を用いた。

2) 4 倍体の誘起: re9 雌 x Tw1 雄および rs 雌 x

sd 雄の産下卵を第 III 章 A-b と同様に低温処理して 4 倍体を誘起した (rw4n および rssid4n)。

3) 4 倍体雄の妊性獲得と F₁ 4 倍体の作成: 本章 A と同様に rw4n 雄に片側アラタ体除去もしくは高温一多湿処理を施し、4 倍性の確認を Cre 雌との検定交雑によって行った。rw4n 雌と 4 倍性が確認された rw4n 雄との交配によって F₁ 4 倍体を得た (RW4n)。また、絶食処理を施した rssid4n 雄も同様に倍数性を確認した後、rw4n 雌と交配して F₁ 4 倍体を得た (RWRS4n)。

4) 卵サイズならびに網目面積の測定: 卵サイズは水平最大断面積を第 IV 章 B-b と同様に走査電子顕微鏡 (HITACHI, S-2100 A) で写真撮影した後、ATTO 画像解析システム (AE-6910 および Denstograph) を用いて測定した。網目構造域の網目サイズは隔離帯の中心線で分断された面積³⁶⁾を ATTO 画像解析システムにより測定した。それぞれの実際値は同様に計測した 1 mm 方眼紙をスタンダードとして算出した。

c. 結 果

1) RW4n の性状

アラタ体片側摘出ならびに高温一多湿処理によって誘導した妊性を有する 4 倍体雄 39 頭を少なくとも 2 回以上、別々の rw4n 雌と交配し 88 交配区を得て、F₁ 4 倍体雌の性状を調査した。表 17 に示したように、8,115 の受精卵から 3,796 個体が孵化したが、孵化率は最大 79.1% から最小 24.6% までの幅があり、平均 46.78% であった。5 齢起蚕における雌雄の比は平均値で雌:雄=1.32:1 であったが、孵化率ごとに分離飼育した 13 区については孵化率の高い区ほど雌の割合が高く、理論分離比(雌:雄=5:1)

表17 2 倍体、3 倍体ならびに F₁ 4 倍体の孵化率、生存率および性比

Table 17. Hatchability, survival rate and sex ratio in diploids, triploids and F₁ tetraploids

Group (Hatchability)	Number of batch	Number of fertilized eggs	Number of hatched larvae	Average hatchability	Number of larvae after 4th moulting		Survival rate till 4th moulting (%)	Sex ratio (♀/♂)
					females	males		
F ₁ Tetraploid 1 (60%<)	3	303	188	62.05	98	23	64.36	4.26
F ₁ Tetraploid 2 (35%-60%)	7	892	361	40.47	144	67	58.45	2.15
F ₁ Tetraploid 3 (35%>)	3	513	133	25.93	35	47	61.65	0.74
F ₁ Tetraploid (total)	88	8,115	3,796	46.78	1,319	996	60.99	1.32
Diploid(2n x 2n)	1	335	303	90.45	133	125	85.15	1.06
Triploid(4n x 2n)	26	1214	980	80.72	791	142	95.20	5.57

表18 F₁ 4倍体雌の生存個体数Table 18. Number of survivors in the F₁ tetraploid females

Group (Hatchability)	Number of batch	Number of 5th instar females	Number of spinning larvae	Number of pupae	Number of adults
F ₁ Tetraploid 1 (60%<)	3	98	78	52	19
F ₁ Tetraploid 2 (35%-60%)	7	144	69	58	18
F ₁ Tetraploid 3 (35%>)	3	35	29	15	7
F ₁ Tetraploid (total)	88	1,213	892	429	160

表19 F₁ 4倍体雌と re9 雄との次代3倍体の性比Table 19. Sex ratio of triploid progeny from the cross between F₁ tetraploid females and diploid re9 males

Batch No.	Number of individuals		♀/♂	Theoretical sex ratio	χ ²	Batch No.	Number of individuals		♀/♂	Theoretical sex ratio	χ ²
	Females	Males					Females	Males			
1	93	98	0.95	1:1	0.131	22	198	30	6.60	5:1	2.021
2	161	153	1.05	1:1	0.204	23	172	185	0.93	1:1	0.473
3	238	60	3.97	5:1	2.580	24	252	38	6.63	5:1	2.651
4	237	40	5.93	5:1	0.988	25	172	23	7.48	5:1	3.332
5	176	196	0.90	1:1	1.075	26	162	163	0.99	1:1	0.003
6	219	29	7.55	5:1	4.416	27	257	41	6.27	5:1	1.815
7	243	43	5.65	5:1	0.548	28	224	46	4.87	5:1	0.027
8	192	24	8.00	5:1	4.800	29	197	46	4.28	5:1	0.896
9	172	38	4.53	5:1	0.309	30	164	37	4.43	5:1	0.439
10	159	19	8.37	5:1	4.602	31	143	44	3.25	5:1	6.341
11	22	4	5.50	5:1	0.031	32	127	14	9.07	5:1	4.609
12	256	47	5.45	5:1	0.291	33	168	38	4.42	5:1	0.470
13	154	161	0.96	1:1	0.156	34	150	30	5.00	5:1	0.000
14	202	28	7.21	5:1	3.343	35	146	31	4.71	5:1	0.092
15	77	27	2.85	5:1	6.469	36	37	5	7.40	5:1	0.686
16	4	6	0.67	1:1	0.400	37	81	15	5.40	5:1	0.075
17	238	56	4.25	5:1	1.200	38	120	19	6.32	5:1	0.899
18	248	43	5.77	5:1	0.748	39	264	41	6.44	5:1	2.283
19	220	57	3.86	5:1	3.051	40	79	71	1.11	1:1	0.427
20	146	152	0.96	1:1	0.121	41	19	3	6.33	5:1	0.145
21	101	75	1.35	1:1	3.841						

に近づいた。また、孵化個体の5齢到達率は孵化率に関係なく平均値(60.99%)に近似していた。5齢に到達した1,213の雌の吐糸期到達個体は892(73.54%)、化蛹個体は429(35.37%)ならびに羽化個体は160(13.19%)であった(表18)。

低温処理によって誘起された4倍体雌(ZZWW)と雄(ZZZZ)の交配から得られたF₁ 4倍体雌の性染色体構成はZZZWもしくはZZWWである。4倍体雌に2倍体雄を交配して得られる次代3倍体の性比が雌:雄=5:1ならばZZWWであり、1:1ならばZZZWと母親4倍体の性染色体構成が判定できるので、羽化したF₁ 4倍体雌個体にre9雄を交配して

得られた次代3倍体の性比を調査した。160個体の雌成虫のうち正常な産卵を行ったのは41個体にすぎず、残りの雌個体は卵が全くないか、もしくは数卵しか形成しなかった。性比を5:1と1:1に分類してχ²検定により確認した結果は、ZZZW個体が10に対しZZWW個体が31であった(表19)。

2) RWRS4nの性状

RW4nでは3,796の孵化個体を得たものの、F₁ 4倍体雌に存在する2種類の性染色体構成の判別は41個体に限られたため、伴性赤蟻(sch)系統4倍体(rssd4n)を誘起し、絶食処理法で妊性を獲得させた。rw4n雌にrssd4n雄を交配して得られたF₁ 4倍

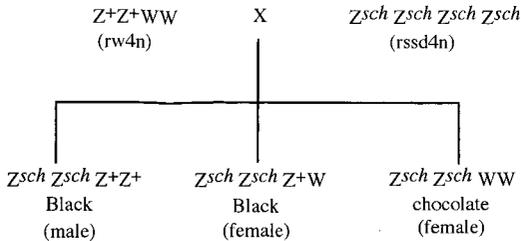


図 19 F₁ 4 倍体の性染色体と孵化直後の幼虫体色
Fig. 19 Sex chromosome constitution and color of newly hatched larvae of F₁ tetraploid

体 (RWRS4n) において伴性赤蟻個体は ZZWW 雌、黒蟻個体雌は ZZZW ならびに雄は ZZZZ と判別された (図 19)。

RWRS4n の孵化率は 92.69% と高く、孵化個体の 5 齢到達率は 88.55%，吐糸個体の割合は 33.59%，化蛹率は 15.27% および羽化率は 12.72% であった (表 20)。5 齢起蚕から成虫にいたるまでの生存率を性染色体構成ごとに調査したところ、吐糸期までの 5 齢期間中ならびに化蛹直前に死亡した ZZZW 雌の割合が非常に高かった。高死亡率が認められた 5 齢期から吐糸までは約 7 日間を要するため、どの時期での死亡率が高いかを詳細に調査したところ、ZZZW 雌の死亡は吐糸前日から吐糸日にかけて極めて高くなっていった (図 20)。ZZZZ 雄の羽化率は 45.21% で特に死亡率の高い時期はなかったが、化蛹直前に死亡する個体が目立った (表 20)。ZZWW は 5 齢起蚕から吐糸までに死亡した個体はなく、羽化率は 57.14% であった (表 20)。

F₁ 4 倍体に存在する 2 種類の雌 (ZZZW と ZZWW) および対照区として 2 倍体 (rwrs2n: ZW) 雌が産生した卵と卵殻表面の網目状構造域 (図 21) について、それぞれの卵サイズと網目面積を計測し

表 20 RWRS4n の F₁ 4 倍体個体における生存率
Table 20. Survival rate in F₁ tetraploids of RWRS4n

	Black		Chocolate		Survival rate(%)
	Dead	Survived	Dead	Survived	
Hatched	384		9	31	92.69
	ZZZZ		ZZZW		
5th-0day	73 (100%)	268 (100%)	7 (100%)		82.08
Spinning	62 (84.93%)	63 (23.51%)	7 (100%)		37.93
Pupae	39 (53.42%)	15 (5.60%)	6 (85.71%)		17.24
Adults	33 (45.21%)	13 (4.85%)	4 (57.14%)		14.37

Percentage in parentheses indicates survival rate.

た (表 21)。卵サイズは ZW=ZZZZ<ZZWW の順となり W 染色体の数が多いほど卵サイズが大型化した。網目面積は ZW<ZZWW<ZZZW であり Z 染色体の数に応じて面積の増加が認められた。

d. 考 察

家蚕 4 倍体雄は本来受精能力が非常に低い。このため、4 倍体雄と 4 倍体雌の交配による F₁ 4 倍体の作出は非常に困難であり、孵化率や精子形成などのごく限られた範囲での性状調査が行われているにすぎなかった^{4,22)}。本実験においては、本章 A で確立したアラタ体摘出、高温-多湿処理および絶食処理により誘起した妊性を有する 4 倍体雄と 4 倍体雌を交配して F₁ 4 倍体を得て、孵化率、生存率、羽化率および 2 種類の性染色体構成の異なる雌 (ZZZW と ZZWW) が産生した卵の形質について調査を行った。

RW4n の孵化率は対照区の 2 倍体 (2n x 2n) や 3 倍体 (4n 雌 x 2n 雄) と比較して非常に低く、5 齢起蚕における雌雄の比も理論値 (雌:雄=5:1) と大

表 21 RWRS4n と rwrs2n における卵サイズと卵殻表面網目サイズ
Table 21. Size of eggs and polygonal patterns in RWRS4n and rwrs2n

Moth No. (Tetraploids)	Sex chromosome	Number of <i>Esd</i> genes	Number of <i>Pgd</i> genes	Egg size (mm ²)	±SE	Polygonal pattern size (μm ²)	±SE
1	ZZWW	2	2	1.53	0.036	1728.68	22.739
2				1.43	0.017	1651.97	22.636
3				1.36	0.072	1822.63	26.383
4				1.55	0.027	1828.40	28.260
5	ZZZW	1	3	0.99	0.019	2969.45	103.114
6				1.08	0.015	2834.61	88.866
7				1.18	0.014	2803.91	88.049
8				1.03	0.017	2313.03	27.345
Diploid	ZW	1	1	1.04	0.011	1049.20	9.692

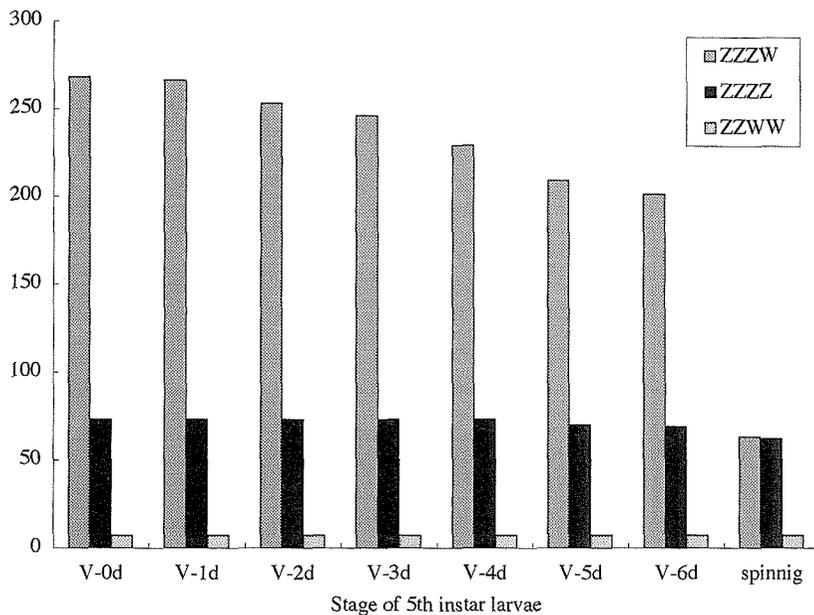


図20 F₁ 倍体における5 齡期間中の生存個体数
 Fig. 20 Survivors of F₁ tetraploids during the 5th instar

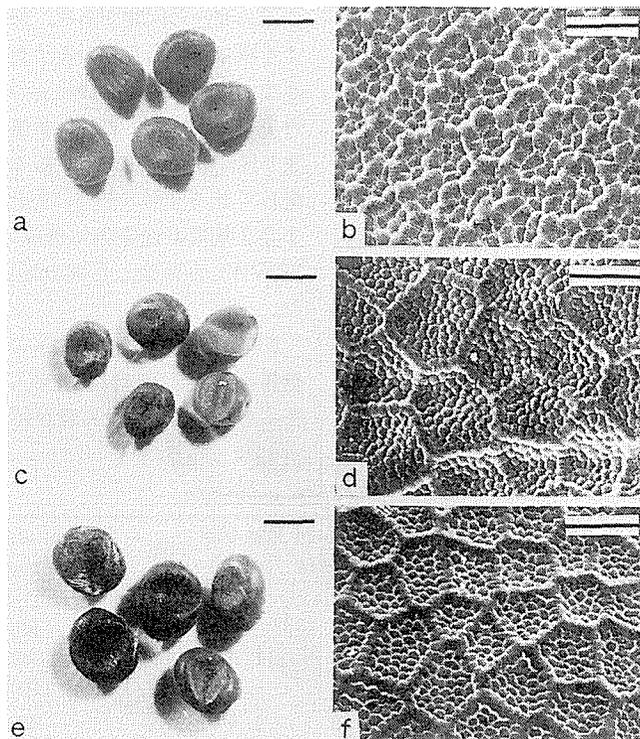


図21 rwrs2n (a と b), RWRS4n (ZZZW) (c と d) および RWRS4n (ZZWW) (e と f) の卵と卵殻の網目部位
 Fig. 21 Eggs and polygonal patterns of rwrs2n (a and b), RWRS4n (ZZZW) (c and d) and RWRS4n (ZZWW) (e and f)
 Bars of a, c and e are 1mm, b, d and f are 50µm

大きく異なる値 (1.32:1) であった (表 17)。孵化率に応じて 3 つのグループ (1; 60%以上, 2; 35-60%, 3; 35%未満) に区分して飼育したところ, 5 齢到達率はいずれのグループとも 60%前後であったのに対して, 孵化率の割合が高いグループほど雌の割合が高くなり理論値に近づいた。これらのことから, 孵化率の低下は雌の低孵化率に起因することが明らかとなった。また, 5 齢以降の雌の生存率を調査した結果, 羽化率は 13.19%, 正常な産卵を行ったのは 41 個体 (3.38%) と非常に少なく (表 18, 表 19), F_1 4 倍体雌は生存が困難であると考えられた。

次代 3 倍体の性比より, RW4n 雌の性染色体構成別の生存個体の比は ZZZW:ZZWW=10:31 と ZZZW 雌の死亡率が高いことが示唆された。しかしながら, RW4n の生存率が極端に低かったことから, より正確な性染色体構成ごとの生存率の確認を行うために, 絶食処理により妊性を獲得した伴性赤蟻系統 4 倍体雄と, rw4n 雌とを交配させて F_1 4 倍体 (RWRS4n) を得た。RWRS4n の孵化個体は ZZWW 雌が伴性赤蟻として判別され, 黒蟻のうち雌は ZZZW, 雄は ZZZZ であった (図 19)。RWRS4n の孵化率は 92.69%, 孵化個体の 5 齢到達率も 88.55% (表 20) と 2 倍体個体の場合 (表 17) と変わりなかったが, 5 齢起蚕以降には死亡率が急速に高くなり, 羽化率は 12.72% と RW4n と同様の値になった。3 種類の F_1 4 倍体の中で ZZZW 雌は特に死亡率が高かったこと, ならびに RW4n において産卵個体に ZZZW 雌が少なかったことから, F_1 4 倍体では ZZZW 雌の死亡率が特に高いことが判明した。

表 20 に示したように RWRS4n における受精卵全体に占める ZZWW 雌の割合は孵化時で 2.14% であり, 5 齢雌での占有率も 2.54% と 4 倍体雌に 2 倍体雄を交配して得られた ZWW 雌の割合^{46,68)} に極めて近い値であった。RW4n においてこの値から算出される ZZWW 雌の個体数は, 5 齢起蚕時に 30.88 であり, ほぼ全ての個体が羽化し, 産卵したと考えられる。このことから, RW4n での低孵化率は ZZZW 雌の孵化率が低いことに原因があることが示唆された。

RWRS4n における ZZZZ 雄と ZZWW 雌は 50% 前後の羽化率であること, ZZZW 雌の死亡率の極めて高い時期は吐糸開始時期と化蛹直前 (図 20, 表 20) であること, RW4n においては孵化ならびに羽化直

前であったことを合わせて考えると, F_1 4 倍体では ZZZW 雌が特異的に死亡率が高く, その死亡時期は孵化, 吐糸, 化蛹および羽化期といった形態的ならびに体内環境の生理的変化が極めて大きい時期と一致する。

家蚕の精母細胞の第一分裂終期において 2 倍体では観察されない染色体ブリッジが 6 倍体で 3 本, 4 倍体で 2 本観察されることから, 特定の染色体にブリッジが形成されると考えられる⁴⁸⁾。4 倍体雄に形成される特定染色体のブリッジが常染色体由来であれば, 遺伝的背景が均一である本実験の F_1 4n の死亡率は性染色体構成ごとに変化するとは考えられないことから, この染色体ブリッジは Z 染色体である可能性が非常に大きい。

KAWAMURA⁴⁵⁾ は低温処理によって誘起した混数体モザイク蚕において 3 倍性の細胞との混数体では胚子の形態異常が非常に高かった原因を性染色体の不均衡にあると推測している。染色体ブリッジが Z 染色体であると仮定すると, いずれの個体にも異常な Z 染色体が存在しているにも関わらず, ZZZW 雌の死亡率が突出して高いことは, 性染色体構成の不均衡に由来すると考えられる。性染色体の均衡性は孵化, 吐糸, 化蛹および羽化といった大きな生理変化に重要な役割を果たす遺伝子の発現に関与することも考えられる。

第 IV 章ならびに第 V 章で明らかにしたように, 家蚕には卵サイズを決定する *Esd* と卵殻網目構造域の 1 つの網目面積を決定する *Pgd*, 2 つの数量遺伝子が存在し, それぞれの遺伝子は独立して発現している。第 V 章では 4 倍体についての検討が行われなかったため, 本章において得られた RWRS4n の F_1 4 倍体を用いて 2 つの数量因子の存在の確認と発現の独立性を検証した。

卵サイズは ZZZW では ZW とほぼ同じサイズであったのに対して ZZWW では 1.4 から 1.5 倍大型卵であった。卵殻網目面積は Z 染色体の数に応じて大型化した。これらのことから, W 染色体上に *Esd* が, Z 染色体上に *Pgd* が存在し, それぞれ数量遺伝子として独立に発現することが確かめられた。また, ZZZW 雌の網目面積にはグループ内で有意に小さい値を示す個体が存在したことから (表 24), Z 染色体の一部欠失の可能性が考えられる。これは父親 4 倍体の染色体ブリッジが Z 染色体であり, 精母細胞の Z 染色体が一部失われた可能性が考えられる。

動物における倍数性の少なきの要因は高度に分化した性染色体にあると MULLER⁵⁵⁾ は指摘している。家蚕4倍体は動物の倍数性進化の起こらない要因を探るモデルとして最適であるのみならず、性染色体の役割がZ染色体とW染色体の構成や両者のバランスにより変化するのかどうかの研究を含めて、正常な発生と癌化などの異常な発生の機構を解明するためのモデルとしての役割を担うことも可能であると考えられる。

VII. 総 合 考 察

低温処理によって誘起された家蚕4倍体は、他の動物倍数体と同様、幼虫ならびに成虫ともに外見の特徴からは2倍体と区別することが不可能である。本実験においては、4倍体の特徴である雄の不妊性と性染色体構成を異にする雌の産下卵サイズの大型化の解析、ならびに配偶子への性染色体の分配およびそれぞれから生ずる倍数体の諸形質について解明することを目的とした。

家蚕4倍体雌(ZZWW)の配偶子形成には、均等な分配が行われてZZ, ZWおよびWW配偶子が形成されるとした説²⁵⁾と不均一な分配の結果Z, ZWならびにZWW配偶子が形成される¹¹⁾という2つの説があった。本研究において、低温処理によって誘起した4倍体雌に4種類の伴性劣性遺伝子(*os*, *sch*, *e*, *od*)をそれぞれ持った2倍体雄を交配して得られた3倍体(次代3倍体)には、正常形質の雌雄の他に伴性劣性形質を持つ雌がごく少数存在することから、ZZWW雌からはZZ, ZWおよびWW配偶子が形成されるもののWW配偶子は選択的に少なくなることが明らかになった。さらに、この要因を調査するために、正常系統3品種と限性系統4品種の合計7品種の4倍体雌を誘起して、形成された配偶子割合を調査したところ、双方の系統ともに性染色体対合において、Z同士, W同士での対合がZとWで対合するよりも選択的に多いという結果が得られた。その選択性は限性系統で特に著しく、転座染色体の長さ依存することが推測された。家蚕雌における減数分裂は、サイゴテン期に核エンベロープに付着した染色体の両端が対合を開始する⁶⁵⁾ことを考慮すると、対合の選択性は染色体両末端のアフィニティーに依存する可能性が考えられる。

限性系統での配偶子形成から予想される性染色体対合が、品種の違いによって変化があるのか否かに

ついて、限性形蚕系統の「ほまれ」を用いて同品種内交配由来の4倍体雌(Homotype)と「ほまれ」雌とTw1雄との品種間交配由来の4倍体雌(Heterotype)の配偶子の形成割合を調査した結果、どちらのタイプにも性染色体対合の選択性は認められたものの、Heterotypeにおいて顕著であった。2倍体の性比は必ず、雌:雄=1:1であることから「ほまれ」が系統維持されている間はZとWの間で対合が行われていると考えられる。これらのことから、ZとW染色体対合の認識に関わる部位の相同性は、対合が行われることによって増加して行く可能性が考えられた。

4倍体雌の配偶子形成から予想される性染色体対合の選択性を実証するために、限性系統4品種について性染色体の同定を試みたところ、いずれの卵母細胞染色体にも1対の不相称な染色体対が観察された。このうち、遺伝解析が進んでおり⁵⁸⁾不相称な染色体対がZW対であると証明されている⁴⁹⁾限性黄鹵系統(Sy)を用いて、HomotypeとHeterotype4倍体雌の性染色体対合を観察した。Homotypeにおける性染色体対合は(ZW+ZW):(ZZ+WW)=2.1:3.4であった。一方、Heterotypeでは1:8であり、「ほまれ」を用いた配偶子形成割合から算出された結果と同様であり、Heterotypeで性染色体対合の選択性増加が起こることが細胞学的にも証明された。

WEITH and TRAUT⁸⁸⁾はW染色体転座系統の*Ephestia kuehniella*(スジコナマダラメイガ)を用いて性染色体の対合を調査し、W染色体同士での対合が認められなかったことから、この種の性染色体対合においては、ZとWの間に強力なアフィニティーが存在すると結論した。これに対して、HULTEN and PEARSON¹⁹⁾はヒトのXYY患者精母細胞における対合はYYのみに限られ、Xは必ず1価染色体として存在することを明らかにした。両者の相違点は、前者のW染色体が異質染色質である⁸⁷⁾のに対して、ヒトY染色体にはSR_Y遺伝子が座位している⁵⁹⁾ことである。家蚕W染色体にも雌決定遺伝子(*Fem*)と卵サイズ決定遺伝子(*Esd*)が存在することを考えると、性染色体上にアクティブな遺伝子が存在することと性染色体対合におけるアフィニティーには何らかの関係があることが示唆される。

家蚕4倍体が大型卵を産下することは以前から良く知られており、倍数体の識別にも利用されてきた

が、その要因については、FANKHAUSER and GRIFFITHS⁸⁾により示された、核一細胞質比により説明されていた。ところが、KAWAMURA⁴⁶⁾は、家蚕卵サイズの大型化はW染色体上の数量因子である卵サイズ決定遺伝子(*Esd*)に支配されると提唱した。*Esd* 遺伝子の存在を確認するために、2種類の3倍体雌(ZZWとZWW)の卵サイズを4系統について調査した結果、いずれもZWWは大型卵を産下したことから*Esd*の存在が明らかとなった。次に、この遺伝子の発現を卵巣移植によって調査するために、3倍体においてZWW卵巣をZZW個体へ移植する実験を行った。また、2倍体を用いて*Esd* 遺伝子のZ染色体への転座突然変異である*Ge*系統⁴⁷⁾と正常卵系統との相互卵巣移植を行った。その結果、すべての移植卵巣に、本来の卵サイズと同じ大きさの卵が形成されたことから、*Esd* 遺伝子は卵巣以外の体内環境に影響されることなく発現するとともに、Z染色体に転座した*Esd* 遺伝子においてもW染色体上に座位するときと同様に働くと考えられた。20-Hydroxyecdysoneの大量投与は、時期特異的に卵サイズを大型化させることが明らかにされている³²⁾。また、*Ge* 系統に対する投与も同様の効果をあらわすことから、*Esd*の発現をさらに追求するためにはエクジステロイドホルモンとの関連を*in vitro*で調査する必要がある。ZW対は唯一、他の染色体対と区別できることから、マイクロマニピレーターやレーザーピンセットを用いた染色体かきとり等による*Esd* 遺伝子のクローニングが緊急の課題である。

家蚕卵殻表面に存在する様々な紋様の中で、側面部に認められる網目状構造域の1つの網目面積を性染色体構成の異なる倍数体間で比較した。網目面積にはその倍数性に関わらず、 $ZW(2n) = ZWW(3n) < ZZW(3n) = ZZWW(4n) < ZZZW(4n)$ の関係が存在したことからZ染色体上に網目サイズを決定する数量遺伝子の存在が明らかになり、この遺伝子を卵殻網目サイズ決定遺伝子(*Pgd*; Polygonal pattern size determining gene)と命名した。この遺伝子は、*Esd*に引き続いて発見された2番目の数量遺伝子であることから、大卵系統(TG)と正常系統(rw)の4倍体ならびに2倍体の卵サイズと網目面積を調査し両者の関係について検討を行った。卵サイズについては $rw2n < rw4n = TG2n < TG4n$ の関係が認められ、*Esd* 遺伝子の増加に伴って卵サイズ

も増加した。また、卵殻網目面積は $rw2n = TG2n < rw4n = TG4n$ のようにZ染色体の数と網目面積との間に正の比例関係が認められた。また、4倍体雌と4倍体雄との交配によって得られたF₁4倍体のZZWWとZZZWの卵サイズと網目面積の比較では、 $ZW = ZZZW < ZZWW$ (卵サイズ)、 $ZW < ZZWW < ZZZW$ (網目面積)の関係が認められた。これらのことから、*Esd*と*Pgd*はそれぞれ独立して働くことが明らかとなった。前述の20-Hydroxyecdysoneの大量投与は、卵サイズとともに網目面積の増大も誘導する³⁴⁾。2つの数量遺伝子が独立して発現することを考慮すると、20-Hydroxyecdysoneは数量因子の発現を促進している可能性が考えられる。

倍数体の性染色体のみに着目した研究においてですら、2種類の異なる数量遺伝子が発見されたことから、生物には様々な未知の数量遺伝子が存在することも考えられる。これらの遺伝子は正常な発生過程や形質発現のみならず癌化や異常発生に関与することが推測される。家蚕は、多数の突然変異が系統維持されているとともに倍数体が簡単に誘起できることから、数量因子解明に適した材料であり、異常分裂などのメカニズム解明にも寄与できる実験用動物であると考えられる。

家蚕4倍体雄の最大の特徴である不妊性の機構解明の一端として、アラタ体片側除去、高温一多湿処理および絶食処理による受精能力獲得を目指した。5齢期の様々な時期における3種類の処理を行った結果、それぞれ時期特異的に4倍体雄の妊性獲得に有効であることが明らかとなった。特に、絶食処理は5齢60時間の幼虫に対する30時間もしくは51時間前後の処理で最も効果的に受精能力を獲得させることができた。

家蚕2倍体雄の減数分裂は5齢脱皮直後から開始されることが知られている⁵³⁾。中垣・川村(私信)は、家蚕の減数分裂をフローサイトメーターにより調査し、2倍体において5齢6時間に観察される精細胞(n)は、4倍体雄で5齢6時間には全く観察されず、54時間後の5齢60時間になって初めて精細胞(2n)ができることをみいだした。

家蚕においては4齢から5齢への脱皮のために約2日間の準備期間(4眠)が必要であり、この間は絶食状態にある。家蚕4倍体雄に対して最も効率的に妊性を獲得させることができた絶食処理開始が5齢

60時間であったことと、精細胞(2n)が形成され始める時期が一致することは非常に興味深い。また、絶食時間を変化させた実験から30時間と51時間に2つのピークが認められたことは、絶食により消長が制御される生体成分の存在を予想させる。

人為的に妊性を獲得させた4倍体雄と4倍体雌とを交配して、F₁4倍体を得た。性染色体構成別に行われた生存率の調査より、ZZZW雌はZZZZ雄やZZWW雌と比較して、極めて死亡率が高いことが明らかとなった。死亡時期は、孵化、吐糸、化蛹および羽化といった形態的ならびに体内環境の生理的変化が大きい時期と一致することから、性染色体構成とこれらの時期に行われる遺伝子発現には関係があることが推測される。

家蚕精母細胞の第一分裂終期において2倍体では観察されない染色体ブリッジが6倍体で3本、4倍体で2本形成される⁴⁸⁾。これらは特定染色体であると考えられているが、遺伝的背景が同質であるF₁4倍体においてZZZW雌のみの死亡率が高いのは、4倍体に形成される染色体ブリッジがZである可能性を強く示唆するものである。KAWAMURA⁴⁹⁾は低温処理によって誘起した混数倍数体モザイクにおいて3倍体細胞との混数体では胚子の形態異常が多かった原因を性染色体の不均衡に求めている。染色体ブリッジがZであると仮定すると、性染色体構成の不均衡は傷ついたZ染色体の働きを回復させることができないのかも知れない。

家蚕においては、350以上の様々な突然変異系統が存在する。正常な遺伝子の作用機構を知るための手段の1つとして突然変異の利用が挙げられる。倍数体の作成は2倍体を知るための比較材料として極めて有効である。例えば、2倍体では当然のこととして受けとめられている正常な精子形成は、4倍体の異常の要因を調査することで、そのキーとなる現象的一致が見い出せた。今後は、これらの現象をいかにして分子レベルにおいて捉えることができるかといった点が大きな課題となる。家蚕倍数体の解析で明らかにされた染色体ならびに細胞遺伝学的現象を分子レベルで証明することが生命現象を解き明かす上で最も重要な点の一つであろう。

摘 要

低温処理によって誘起した4倍体雌(ZZWW)に伴性劣性遺伝子を持つ4種類の2倍体雄を交配して

得た3倍体にはZZZ雄ならびにZZWとZWWの2種類の性染色体構成を持った雌が存在した。伴性劣性形質により判別が可能であったZWWについては1蛾区内の個体数が非常に少なく1.5%前後にとどまった。

3種類の性染色体構成の3倍体は2倍体雄から必ずZ配偶子を受け取っているため、4倍体雌の配偶子はZZ、ZWおよびWWが形成されたと考えられる。3種類の正常系統および4種類の限性系統4倍体雌に伴性赤蟻を交配して得られた、3倍体の性染色体構成の分離比から、4倍体雌における性染色体の対合割合を算出した。その結果、いずれの場合にもZとZおよびWとWの間での対合割合がZとW間での割合よりも多く、ランダムな対合は行われていなかった。性染色体の対合選択性は正常系統よりも限性系統において著しく、転座染色体の長さとの関係が示唆された。

限性系統の「ほまれ」を用いた実験において、低温処理によって誘起された4倍体雌(ZZWW)の性染色体対合選択性は、同品種内交配由来の4倍体(Homotype)よりも異品種間交配由来の4倍体(Heterotype)において顕著であった。この事実を細胞学的に確認するために、限性黄繭系統(Sy)における卵母細胞中で観察される性染色体対の割合((ZZ+WW):(ZW+ZW))を調査したところ、Homotypeで2.1:3.4であったのに対して、Heterotypeでは1:8と約4.9倍もの選択性の増加が認められた。

低温処理によって誘起された4倍体雌に2倍体雄を交配して得られた次代3倍体子孫の卵サイズを調査したところ、ZZW雌では異常形卵を混在する正常サイズ卵を産下したのに対してZWW雌では大型卵が形成されたことから、W染色体上に卵サイズを決定する遺伝子(*Esd*: Egg size determining gene)が存在することを確認した。*Esd*遺伝子の発現を調査するためにZWW卵巣をZZW個体に移植すると同時に*Esd*遺伝子と同一の遺伝子を持つと考えられるGe系統と正常系統間における相互の卵巣移植を行った。その結果、移植卵巣には本来と同じサイズの卵が形成され、*Esd*遺伝子は体内環境に影響されることなく発現することが明らかとなった。

家蚕の卵殻表面に認められる網目状構造域の1つの網目面積を様々な性染色体構成を有する4倍体、

3倍体について2倍体との比較を行った。網目面積は倍数性に関わらず $ZW(2n) = ZWW(3n) < ZZW(3n) = ZZWW(4n) < ZZZW(4n)$ の順であったことから、Z染色体上に *Esd* に続く2番目の数量因子の存在を提唱し、卵殻網目サイズ決定遺伝子 (*Pgd*: Polygonal pattern size determining gene) と命名した。この遺伝子と *Esd* との発現に関する関係を調査するために *Ge* 系統 (TG) と正常系統 (rw) の倍数体を誘起し、卵サイズと網目面積を比較したところ、前者には $rw2n < rw4n = TG2n < TG4n$ の関係が、後者には $rw2n = TG2n < rw4n = TG4n$ の関係が存在したことから、*Esd* 遺伝子と *Pgd* 遺伝子はそれぞれ独立して発現していることが明らかになった。さらに、2種類の性染色体構成を持つ4倍体雌 (ZZZW と ZZWW) における同様の調査においても、卵サイズには $ZW = ZZZW < ZZWW$ 、網目サイズには $ZW < ZZWW < ZZZW$ の関係が存在したことから、両者の独立性が確認された。

家蚕4倍体雄 (ZZZZ) の不妊性の要因を調査する目的で、4倍体雄の妊性獲得法を検討した結果、5齢期におけるアラタ体片側除去、高温一多湿処理および絶食処理が有効であることが示された。特に、5齢期の絶食処理が効果的であったことから、4倍体雄の妊性獲得に関する絶食処理の最適条件を調査して、5齢60時間からの30時間ならびに51時間前後の絶食処理が適当であることが明らかとなった。家蚕4倍体雄の不妊は有核精子の形成異常に起因するが、4眠と精母細胞の減数分裂時期がずれることがその原因となることが示唆された。

5齢期におけるアラタ体片側除去、高温一多湿処理および絶食処理を施して、妊性を獲得させた4倍体雄と低温処理によって誘起した4倍体雌との交配によって、 F_1 4倍体が得られた。 F_1 4倍体の生存率を性染色体構成ごとに調査したところ、ZZZZ雄とZZWW雌に比べてZZZW雌が著しく高い死亡率を示した。ZZZW雌の死亡率は、孵化、吐糸、化蛹および羽化時期に著しく上昇することから、体内環境の変化に関与する遺伝子の発現は性染色体構成のバランスと何らかの関連があることが示唆された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、御指導ならびに御助言を頂き、さらに本論文の御校閲を賜った北海道大学農学部応用分子昆虫学講座教授飯塚敏彦博士に厚く御

礼申し上げます。

また、本研究をとりまとめるについて御助言と本論文の御校閲を賜りました北海道大学農学部昆虫体系学講座教授諏訪正明博士、同遺伝子制御学講座教授三上哲夫博士、同応用分子昆虫学講座助教授伴戸久徳博士に深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり公私にわたって御指導、御鞭撻および適切な御助言を頂きました北海道大学農学部農林統計処理学研究室教授中田徹博士、同応用分子昆虫学講座助手浅野真一郎博士、酪農学園大学生物学研究室川村直子博士、本研究に供試した家蚕突然変異系統の一部を分与下さいました九州大学名誉教授土井良宏博士に心より感謝申し上げます。

本研究における実験遂行上数々のご協力を頂いた、北海道大学農学部附属農場養蚕部技官斎藤寛氏、同技官山田恭裕氏、同元技官菊池邦夫氏、同大学院農業生物学専攻を修了した山村智通・晶子夫妻、同応用分子昆虫学講座卒業生田中陽子君、同講座大学院生、学生各位に心より御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 赤井 弘：家蚕卵殻の微細構造について (I)，日蚕雑，26：335-340，1957
- 2) 有賀久雄：家蚕における伴性遺伝をなす一突然変異。蚕試報，11：499-207，1943
- 3) ASTAUROV, B. L.: Experimental alternation of the developmental cytogenetic mechanisms in mulberry silkworm: Artificial parthenogenesis, polyploidy, gynogenesis and androgenesis. Adv. in Morphogenesis, 6: 199-275, 1967
- 4) ASTAUROV, B. L.: Polyploidy in animals. Ann. Rev. Genet., 3: 99-125, 1969
- 5) DOIRA, H.: Linkage maps of *Bombyx mori*-Status quo in 1983. Sericologia, 23: 245-269, 1983
- 6) 土井良宏・木原 始・筑紫春生：第2小形卵の遺伝的研究，日蚕雑，43：369-372，1974
- 7) FANKHAUSER, G.: Polyploid in salamander, *Eurycea bislineata*. J. Hered., 30: 379-388, 1939
- 8) FANKHAUSER, G. and GRIFFITHS, R. B.: Induction of triploidy and haploidy in the newt, *Triturus viridescens*, by cold treatment of unsegmented eggs. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 25: 233-238, 1939
- 9) 藤川和博・河口 豊・伴野 豊・赤木俊介・古賀克己：カイコにおける白妙卵の卵形質，日蚕雑，62：286-

- 291, 1993
- 10) FUKUDA, S.: The hormonal mechanism of larval moulting and metamorphosis in the silkworm. J. Fac. Sci. Tokyo Imp. Univ. Sec. IV., **6**: 477-532, 1944
 - 11) 橋本春雄: 蚕のテトラプロイド雌の遺伝的研究, 蚕試報, **8**: 359-381, 1933
 - 12) 橋本春雄: 蚕のテトラプロイド雌の遺伝的研究, III, テトラプロイド雌に於けるZ染色体の行動, 蚕試報, **8**: 515-523, 1934
 - 13) 橋本春雄: 蚕のテトラプロイド雌における性染色体の分かれ方, 植物及動物, **3**: 1121-1127, 1935
 - 14) 橋本春雄: 蚕の四倍性雌の遺伝的研究, IV. 四倍性雌と二倍性雄とのF₁の胚子致死並に性比, 蚕試報, **10**: 365-371, 1941
 - 15) 橋本春雄: 産下直後のカイコ卵の温度処理と性比, 蚕糸研究, **20**: 11-13, 1957
 - 16) 広部達道: 蚕卵のコルヒチン処理に因る倍数蚕の出現, 遺種, **15**: 69-74, 1939
 - 17) 廣川昌彦: 家蚕3倍体雄の妊性, 東北蚕糸研報, **17**: 6, 1992
 - 18) 廣川昌彦: 家蚕における性の制御に関する研究, 福島蚕試研報, **28**: 1-104, 1995
 - 19) HULTEN, M. and PEARSON, P. L.: Fluorescent evidence for spermatocytes with two Y chromosomes in an XYY male. Ann. Hum. Genet., **34**: 273-277, 1971
 - 20) ITO, S.: Cytogenetical studies on the chromosomes of silk gland cells of the silkworm with special reference to the structure and behavior of the sex chromosomes. Jpn. J. Genet. **52**: 327-340, 1977
 - 21) 神田俊男・松村初太郎・大槻良樹: 家蚕の卵殻の表面構造, I. 精孔部の微細構造, 日蚕雑, **43**: 379-383, 1974
 - 22) KATSUNO, S. and TAMAZAWA, S.: Studies on apylene and eupylene spermatozoa in the male reproductive organ of the tetraploid male of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). Appl. Ent. Zool., **14**: 438-444, 1979
 - 23) KATSUNO, S.: Size of polygonal patterns of the egg-shell and facets of the compound eye in the tetraploid silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn., **53**: 1-6, 1984
 - 24) KATSUNO, S.: Surface structure of the egg-shell in polyploid silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn., **53**: 97-107, 1984
 - 25) 川口栄作: 蚕のテトラプロイド雌蛾に於ける染色体の行動, 日蚕雑, **5**: 73-79, 1934
 - 26) KAWAGUCHI, E.: Der Einfluß der Eiererbehandlung mit Zentrifugierung auf die Vererbung bei dem Seidenspinner. I. Über experimentelle Auslösung der polyploiden Mutation. J. Facul. Hokkaido Imp. Univ. Sapporo, **38**: 111-133, 1936
 - 27) 川口栄作: テトラプロイド蚕F₁とその両性比(予報), 日蚕雑, **7**: 93-94, 1936
 - 28) 川口栄作: ヘキサプロイドの蚕(予報), 日蚕雑, **7**: 95, 1936
 - 29) 川口栄作: 倍数性の経済的特質, 日蚕雑, **8**: 121-126, 1937
 - 30) KAWAGUCHI, E.: Der Einfluß der Eiererbehandlung mit Zentrifugierung auf die Vererbung bei dem Seidenspinner. III. Beweise für die Beziehung der Geschlechts-chromosomen zu den Nukleolen. Cytologia, **9**: 88-96, 1938
 - 31) 川口栄作: テトラプロイド蚕雌に於ける染色体の分かれ方に対する異論と細胞学的証明, 日蚕雑, **9**: 197-200, 1938
 - 32) 河口 豊・伴野 豊・土井良宏・藤井 博: カイコの大卵突然変異遺伝子による形質発現 2. 20-ハイドロキシエクダイソンの大量投与による大型卵の人為誘発, 応動昆, **33**: 63-68, 1989
 - 33) KAWAGUCHI, Y., BANNO, Y., KOGA, K., DOIRA, H. and FUJII, H.: Polygonal patterns on egg-shell of giant egg mutant and large eggs induced by 20-hydroxyecdysone in *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., **39**: 437-443, 1993
 - 34) KAWAGUCHI, Y., BANNO, Y., KOGA, K., DOIRA, H. and FUJII, H.: Induction of larger egg by 20-hydroxyecdysone in giant egg mutant phenotype in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn., **63**: 443-448, 1994
 - 35) 河口 豊・伴野 豊・古賀克己・藤井 博: カイコの大卵突然変異遺伝子による形質発現 4. 大卵の卵殻表面構造, 応動昆, **37**: 91-95, 1993
 - 36) KAWAGUCHI, Y., BANNO, Y., KOGA, K., KAWARABATA, T. and DOIRA, H.: Comparison of chorion structure of eggs from *Bombyx mori*, *Bombyx mandarina* (Lepidoptera: Bombycidae) and their first filial generation. Appl. Entomol. Zool., **31**: 407-415, 1996
 - 37) KAWAGUCHI, Y., DOIRA, H., BANNO, Y. and FUJII, H.: Ovary-dependent genetic determination of the egg shape and the yolk protein in the small-egg 2 mutant of *Bombyx mori*. Sericologia, **30**: 489-498, 1990
 - 38) 河口 豊・末永 博・藤井 博・坂口文吾: 腎臓形卵

- の卵形成過程における包卵細胞の組織学的変化, 日蚕雑, **54**: 122-127, 1985
- 39) 河口 豊・廬時甲・宮路由香利・藤井 博: カイコにおける第2小形卵の特徴, 日蚕雑, **57**: 157-167, 1988
- 40) 河口 豊・恒成直美・伴野 豊・古賀克己・土井良宏・藤井 博: カイコ矮小卵遺伝子の形質発現, 卵形質の特徴, 日蚕雑, **62**: 485-488, 1993
- 41) KAWAMURA, N.: The early embryonic mitosis in normal and cooled eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Morph., **158**: 57-72, 1978
- 42) KAWAMURA, N.: Cytological studies on the mosaic silkworms induced by low temperature treatment. Chromosoma, **74**: 179-188, 1979
- 43) KAWAMURA, N.: Polyploidy and size of serosa nuclei and cells in eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn., **48**: 77-85, 1979
- 44) KAWAMURA, N.: Induction of hexaploid and octaploid specimens in the silkworm (*Bombyx mori*) by exposing to low temperature. Proc. Jpn. Acad., **57**: 77-82, 1981
- 45) KAWAMURA, N.: Cytological studies on mixoploidy and embryonic development in mosaic silkworms induced by low temperature treatment. Genetica, **60**: 181-190, 1983
- 46) KAWAMURA, N.: The egg size determining gene, *Esd*, is a unique morphological marker on the W chromosome of *Bombyx mori*. Genetica, **76**: 195-201, 1988
- 47) KAWAMURA, N.: Is the egg size determining gene, *Esd*, on the W chromosome identical with the sex-linked giant gene, *Ge*, in the silkworm? Genetica, **81**: 205-210, 1990
- 48) KAWAMURA, N.: Male meiosis in polyploid silkworm, *Bombyx mori*. L. (Lepidoptera: Bombycidae). Int. J. Insect Morphol. & Embryol., **23**: 311-317, 1994
- 49) KAWAMURA, N. and NIINO, T.: Identification of the Z-W bivalent in the silkworm, *Bombyx mori*. Genetica, **83**: 121-123, 1991
- 50) KAWAMURA, N., SAHARA, K. and IIZUKA, T.: Preferential pairing of the sex chromosomes in the tetraploid silkworms (*Bombyx mori*). Hereditas, **121**: 73-78, 1994
- 51) KAWAMURA, T.: The occurrence of triploid in the frog. Zool. Mag., **51**: 629-632, 1939
- 52) 木村敬助・原田忠次・青木秀夫: 家蚕の黄血遺伝子のW転座に関する研究, **21**: 日蚕雑, 199-203, 1971
- 53) KING, R. C. and AKAI, H.: Spermatogenesis in *Bombyx mori* L. I. The canal system joining sister spermatocytes. J. Morph., **134**: 47-56, 1971
- 54) MAKINO, S. and OJIMA, Y.: Formation of the diploid egg nucleus due to suppression of the second maturation division, induced by refrigeration of fertilized eggs of the carp, *Cyprinus carpio*. Cytologia, **13**: 55-60, 1943
- 55) MULLER, H. J.: Why polyploidy is rarer in animals than in plants? Am. Nat., **59**: 346-353, 1925
- 56) MÜLLER, U.: The human Y chromosome. Molecular Genetics of Sex Determination (ed. S. S. Wachtel), Academic Press, New York, p206-224, 1994
- 57) 室賀兵左衛門: 産下直後の蚕卵の低温接触により生ずる異常蚕の研究. I 低温接触時期並に接触時間と異常蚕発現率との関係, 日蚕雑, **16**: 20-25, 1947
- 58) 新野孝男・神田俊男・江口良橋・島崎 旭・渋川明郎: 限性黄繭における転座傷害と染色体の大きさ, 日蚕雑, **56**: 240-246, 1987
- 59) 大村清之助・片岡 平: 家蚕と野蚕の卵紋の形・大きさ及びその成因, 日蚕雑, **18**: 263-275, 1943
- 60) 大槻良樹・神田俊男: カイコの潰れ卵系統の卵殻の特異的構造, 日蚕雑, **47**: 215-220, 1978
- 61) 大槻良樹・神田俊男・松村初太郎: 家蚕の卵殻の表面構造, II. 卵の部位による特異性, 日蚕雑, **46**: 45-50, 1977
- 62) 大槻良樹・北沢敏男・神田俊男: 体外培養したカイコの卵管における卵殻形成, 動雑, **86**: 168-237, 1977
- 63) 黄色俊一: カイコのアラタ体摘出幼虫における脳の神経分泌について. 日蚕雑, **45**: 415-420, 1976
- 64) OSHIKI, S. and MOROHOSHI, S.: The control of growth and development in *Bombyx mori*. X X. Neurosecretion of the brain-corpora allata system in the trimolters derived from tetramolting silkworms by temperature and moisture shocks. Proc. Jpn. Acad., **49**: 353-357, 1973
- 65) RASMUSSEN, S. W.: The meiotic prophase in *Bombyx mori* females analyzed by three-dimensional reconstructions of synaptonemal complexes. Chromosoma, **54**: 245-293, 1976
- 66) RASMUSSEN, S. W.: Chromosome pairing in autotetraploid *Bombyx* males.-Inhibition of multivalent correction by crossing over- Carlsberg Res. Commun., **52**: 211-242, 1987
- 67) RASMUSSEN, S. W. and HOLM, P. B.: Chromosome pairing in autotetraploid *Bombyx* females.-Mechanism for exclusive bivalent formation. Carlsberg Res. Commun., **44**: 101-125,

- 1979
- 68) 佐原 健・川村直子・飯塚敏彦：伴性劣性遺伝子を利用した4倍体雌蚕における性染色体対合の解析，日蚕雑，**59**：196-201, 1990
- 69) 佐藤春太郎：テトラプロイド雌蚕の性染色体の行動に関する橋本及び川口両氏の生殖細胞式に就ての考察，日蚕雑，**8**：186-193, 1937
- 70) 佐藤市兵衛・杉浦勇次郎：蚕卵殻の斑紋に就いて，日蚕雑，**5**：288-231, 1934
- 71) SUZUKI, Y. and BROWN, D. D.: Isolation and identification of the messenger RNA for silk fibroin from *Bombyx mori*. J. Mol. Biol., **63**: 409-429, 1972
- 72) TAKAGI, N.: A simple technique to demonstrate the centromeric 'heterochromatin' in the mouse and other animals. Jpn. J. Genet., **46**: 361-363, 1971
- 73) 滝沢義郎・玉沢 享：ポリプロイドとserosa細胞の大きさの関係，日蚕雑，**37**：248, 1968
- 74) 玉沢 享：蚕卵におよぼす過冷却の影響，II 低温処理(2.5°C~-15°C)によるandrogenesisおよびモザイクの誘発，北大農場研報，**20**：145-152, 1977
- 75) 玉沢 享・滝沢義郎：蚕卵の過冷却処理による倍数体の出現，一漿液膜細胞の大型化と倍数性との関係について—北大農学部紀要，**10**：272-283, 1977
- 76) TANAKA, Y.: Genetic study on the silkworm. J. Coll. Agric. Tohoku. Imp. Univ., **7**: 129-255, 1916
- 77) 田中義麿：蚕の性染色体不分離，遺雑，**15**：359-361, 1939
- 78) 田中義麿・川口栄作：人為的に獲たる triploid の蚕，遺雑，**7**：186-187, 1932
- 79) 田島弥太郎：蚕児の斑紋利用による簡易なる雌雄鑑別法，日蚕雑，**12**：184-188, 1941
- 80) 田島弥太郎：蚕の染色体突然変異に関する研究 II. W 染色体を含む転座に関する研究，蚕試報，**12**：109-181, 1944
- 81) 田島弥太郎：X線による蚕の突然変異の研究，蚕研彙報，**2**：26-29, 1948
- 82) TAZIMA, Y.: Mechanisms of the sex determination in the silkworm, *Bombyx mori*. Proc. 9th Internat. Cong. Genet. Caryogia **6** Suppl., 958-960, 1954
- 83) TAZIMA, Y.: "The Genetics of the silkworm." Logos press, London, 1964
- 84) TAZIMA, Y. and Onuma, A.: Experimental induction of androgenesis, gynogenesis and polyploidy in *Bombyx mori* by treatment of CO₂ gas. J. Seric. Sci. Jpn., **36**: 286-292, 1967
- 85) TOYAMA, K.: Studies on the hybridology of insects. I. On some silkworm crosses with special reference to Mendel's law of heredity. Bull. Coll. Agri. Tokyo Univ., **7**: 259-393, 1906
- 86) 外山亀太郎：蚕種類の改良，蚕業新報，**158**：4-8, 1906
- 87) WEITH, A. and TRAUT, W.: Synaptonemal complexes with associated chromatin in a moth, *Ephestia kuehniella* Z. Chromosoma, **78**: 275-291, 1980
- 88) WEITH, A. and TRAUT, W.: Synaptonemal adjustment, non-homologous pairing and non-pairing of homologous segment in sex chromosome mutation of *Ephestia kuehniella* (Insecta, Lepidoptera). Chromosoma, **94**: 125-131, 1986

Summary

In the silkworm, the triploid progeny from crosses of tetraploid females induced by low-temperature treatment and diploid males carrying the sex-linked recessive genes consisted of 3 types, ZZZ, ZZW and ZWW. The percentage of the ZWW females discriminated by sex-linked recessive phenotypes was only 1.5 in a batch. Three kinds of gametes, ZZ, ZW and WW, were considered to be produced in tetraploid females as a Z gamete was always transmitted from diploid males. The ratio of 3 types of triploids revealed that the sex chromosome pairing of Z with Z and W with W (ZZ+WW) was more preferential than that of Z with W (ZW+ZW). The pairing preference that occurred in the tetraploids from 4 strains harboring sex-limited marker genes was much higher than that in the tetraploids from 3 normal strains. Furthermore, within the tetraploids from sex-limited strains, the length of the translocated autosomes appeared to be factors causing the pairing preference.

By using the sex-limited "Homare" strain, the ratio of pairing patterns ZZ+WW or ZW+ZW, was calculated both in Homotype (intra-strain mating) and Heterotype (inter-strain mating). In the tetraploid oocytes of sex-limited yellow cocoon strain (Sy), the pairing patterns were cytologically observed in Sy4n (Homotype) and Syr4n (Heterotype) and the ratios of 2 pairing patterns were calculated. These 2 experiments revealed that the sex chromosomes in Heterotype tetraploids paired in preference between the same kinds at 5 times those in

Homotypes.

Deposition of large eggs by ZWW triploid females was confirmed in 4 strains. The results showed the presence of a quantitative gene (Egg size determining gene; *Esd*) on the W chromosome. Ovary transplantation between ZWW3n and ZZW3n females, as well as between diploids with or without a giant egg gene (*Ge*), which is identical with the *Esd* gene, was carried out in order to analyze the effects of environmental factors on egg production. Both donor and host ovaries produced eggs of original size. This indicated that environmental factors had no effect on gene expression.

The order in size of polygonal patterns was as follows, $ZW(2n) = ZWW(3n) < ZZW(3n) = ZZWW(4n) < ZZZW(4n)$. Size increase did not depend on ploidy but on the number of Z chromosomes. This fact lead to the conclusion that the polygonal pattern size determining gene (*Pgd*) was present on the Z chromosome. The *Pgd* gene on the Z was the second quantitative gene discovered in the silkworm. The measurement of egg size and polygonal pattern size in *Ge* strain (TG) and normal strain (rw) were summarized as follows: $rw2n < rw4n = TG2n < TG4n$ for egg size and $rw2n = TG2n < rw4n =$

$TG4n$ for polygonal pattern size. The expression of the *Esd* and that of the *Pgd* appeared to be independent of each other. This was confirmed in 2 kinds of F₁ tetraploid females (ZZZW and ZZWW).

In the silkworm, tetraploid males are by nature sterile. Experiments such as excision of a corpus allatum, high temperature-moisture treatment and starvation were conducted in tetraploid males during the 5th larval instar. These stimuli were effective in producing fertile tetraploid males. Starvation for 30 or 51 h of tetraploid males at 60 h of the 5th larval instar was found to be most effective. Start of meiosis in the 5th instar larvae was delayed 60 h in tetraploid males. It is noteworthy that onset time of meiosis coincided with the most effective stage to induce fertile tetraploid males.

The F₁ tetraploids were produced by crossing tetraploid females and artificially induced fertile tetraploid males. As to sex chromosome constitution in the F₁ tetraploids, ZZZZ males and 2 types of females, ZZZW and ZZWW, were expected. The ZZZW females showed quite high mortality at hatching, spinning, pupation and adult emergence. An even sex chromosome balance may be necessary for successful morphogenesis.