HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ドジョウの倍数性とクローン，それらの特殊な生殖様式
Author(s)	荒井，克俊
Description	ミニレビュー
Citation	動物遺伝育種研究，37(1)，59-80
Issue Date	2009-06-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/38854
Type	journal article
File Information	arai.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

〔ミニレビュー〕

ドジョウの倍数性とクローン，それらの特殊な生殖様式

荒井克俊

北海道大学大学院水産科学研究院、〒041-8611 函館市港町 3-1-1

Polyploidy, clone and atypical reproduction in the loach

Katsutoshi ARAI

Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University

1. はじめに

ドジョウはコイ目ドジョウ科の淡水魚であり、「柳川鍋」、「どじょう（どぜう）汁」などの食材として、また童謡に歌われる魚として馴染み深い。ドジョウは基礎研究の材料として利点を持つ一方、内水面の食資源として産業種の側面も持つ。本邦のドジョウは *Misgurnus anguillicaudatus* 一種とされてきたが、遺伝的に大きく分化した複数の集団が含まれている。また、倍数性変異が見られ、この特性と関連して非還元配偶子形成（unreduced gametogenesis）、雌性発生（gynogenesis）、雑種発生（hybridogenesis）といった特殊な生殖様式が生じている。ドジョウに生じる自然倍数体や雌性発生クローンを生殖に関する変異体と見なすと、本種は脊椎動物における無性生殖研究の良いモデルとなり、この様な特殊な生殖の研究から得られる知見は正常な配偶子形成や減数分裂機構、ゲノム重複や倍数性進化をより深く理解する資となる。

ドジョウはメダカやゼブラフィッシュほど小さくなく、底生の魚であるので、水槽を立体的に利用して多数を飼育することは困難である。しかし、人為排卵・排精が可能で繁殖させやすいこと、仔稚魚の飼育が比較的簡単なことは、生殖、発生、遺伝の実験的研究に適している。本稿では、ドジョウならびにその近縁種で開発された生殖・発生工学技術と遺伝・育種研究に必須のマーカーを簡単に紹介し、それらを駆使した自然倍数体、自然クローンの遺伝と生殖に関する問題を解説する。また、集団遺伝学的研究の結果に基づき、外来ドジョウ問題についても触れたい。

なお、本文では、個体の倍数性を二倍体、三倍体、四倍体---- と、配偶子の倍数性を 2n、3n、4n---- と表記した。

2. 生殖・発生工学技術

2-1. 繁殖と飼育

ドジョウはヒト胎盤絨毛性生殖腺刺激ホルモン hCG（human chorionic gonadotropin：商品名ゴナトロピンなど）投与により実験室で簡単に排卵・排精を誘起しうることから、搾出により得た卵と精子の人工受精が可能である。ホルモン処理と排卵までの時間も、飼育水温条件も加えて、よく調べられているので計画的な実験が可能である（鈴木 1976; 鈴木と山口 1975）。仔稚魚の育成もブラインシュリンプとペレット（コイ・キンギョ用）の給餌により比較的簡単である。しかしながら、通例、成熟に達するには雄で 1 年、雌で 2 年を要し、メダカやゼブラフィッシュにおける早い世代交代は望めない。

2-2. 人為交雑

魚類では、一般に異種の精子を受精した場合であっても、精子が卵門を通過することが可能であれば、受精現象が生じる。従って、異種の精子で受精した場合、両親の種のゲノムを受け継ぐ交雑種 hybrid ができることが期待されるが、必ずしも予想通りとならない事例も多い。荒井（1989）は、サケ・マス類を中心に魚類における交雑の結果を整理し、交雑の組み合わせによる雑種の生存能力を総述し、両親種のゲノムを受け継ぐ真の雑種に加えて、自然の雌性発生、三倍体の出現、染色体削減による異数体の出現が生じることを指摘している。

ドジョウ類における人為交雑の古典的研究として、皆森の一連の業績がある（Minamori 1953; 皆森 1956）。

連絡先：　荒井克俊、北海道大学大学院水産科学研究院
〒041-8611 函館市港町 3-1-1
(e-mail: araikt@fish.hokudai.ac.jp)

その後、Kusunokiら（1994）は、ドジョウ科の異属*Cobitis*の魚種とドジョウ*M. anguillicaudatus*の交雑からは生存性の子孫が生じること、染色体観察からこれらの雑種は両親のゲノムを受け継いでいることを報告した。アロザイムの発現パターンも、これらの子孫が雑種であることを支持した（荒井ら1994）。以上の結果は異属間であっても交雑が可能なことを示している。しかしながら、ドジョウとキンギョ*Carassius auratus*あるいはコイ*Cyprinus carpio*などの異科の魚との交雑から生じる胚は細胞遺伝学的には両親のゲノムを受け継ぎ異数体ではないが、発生は致死的であり、孵化後まもなく全滅した（木島ら1996ab）。致死的な雑種であっても、後述の染色体操作の手法により、母親種のゲノムを2セット、父親種のゲノムを1セット有する雑種三倍体（異質三倍体）とすると、劇的に生存率が回復し、正常な形態をもつ雑種が多数孵化することがサケ科魚類で報告されている（Arai 1984, 1986, 1988; 荒井1989）。そこで、ドジョウ雌×キンギョあるいはコイ雄において、母方ドジョウ由来ゲノムを倍加させたところ、発生胚の形態に著しい改善が見られたが、生存性雑種の作出には到らなかった（木島ら1996ab）。

同属異種のドジョウとカラドジョウの間の正逆雑種は生存性で核学的に両親の中間を示す（Kimら1995）。そして、これらドジョウとカラドジョウの雑種雄は組織学的所見では少量の精子を持つことが報告されている（Parkら2006）。Fujimotoら（2008）は、一部のドジョウ×カラドジョウ雑種雄は、減数分裂により受精能力のある1n精子を作ることを報告している。しかしながら、ドジョウ属内種間雑種雌の生殖能力についての知見は目下のところ得られていない。

2-3. 染色体操作と性統御

遺伝的に不活性化した精子による正常成熟卵の受精による人為雌性発生の誘起、また、不活性化卵の正常精子による受精による人為雄性発生（androgenesis）の誘起は、現在、魚類を含む多くの下等脊椎動物で利用されている基本的テクニックである（荒井1997, Arai 2001）。水産分野では、1970年代後半から80年代にかけて、養殖魚種の不妊化による成長改善、短期間での遺伝的固定、性の統御（全雌・全雄生産）のバイオテクノロジーとして「染色体操作」が特に注目されるに到り、ドジョウ*M. anguillicaudatus*においても、正常受精卵の第二極体放出阻止による人為三倍体作出、UV照射精子による受精と第二極体放出阻止による雌性発生二倍体の誘起、これら産物の成長、成熟の特性評価が行われた（Suzukiら1985ab; Chaoら1986; Chenら1986; Kimら1994; AraiとInamori 1999; 稲森ら1999; ZhangとArai 1999a）。さらに、人為雄性発生とその二倍体の作出（Araiら1992; Masaokaら1995; Fujimotoら2007）、卵割阻止による雌性発生二倍体の作出が相次ぎ（Suwaら1994）、韓国のグループは近縁種カラドジョウ*M. mizolepis*において、正常受精卵の卵割阻止による人為四倍体の作出とその特性評価、次世代作成に成功した（Namら2001b; NamとKim 2004）。さらに、彼らは詳細な処理条件検討により異種のコイ*Cyprinus carpio*卵を用いたカラドジョウ雄性発生二倍体作出とクローン系統の樹立にも成功している（Namら2000b, 2004）。最近、中国において近縁種の大鱗副泥鰍（*Paramisgurnus dabryanus*）を用いた雌性発生二倍体の作出が報告されている（Youら2008）。

人為雌性発生二倍体における結果（Suzukiら1985b; Youら2008）から、ドジョウ（*M. anguillicauatus*）の遺伝的性決定機構は雄ヘテロ（雌XX-雄XY）型が、大鱗副泥鰍（*P. dabryanus*）では雌ヘテロ（雌ZW-雄ZZ）型が推定された。一方、生理的性の人為的転換は基本的技術であり、上述の染色体操作と併用することにより、全雌生産、全雄生産、不妊化など、さまざまな性統御が可能となる（荒井1997, Arai 2001）。ドジョウ科では、カラドジョウにおける雌性ホルモン（エストラジオール17 β）浸漬処理による雌への性転換と（Namら1998b）、ドジョウにおける雄性ホルモン（17 αメチルテストステロン）経口投与による雄への性転換が報告されている（Yoshikawaら2007a, 2009）。また、ドジョウでは稚魚を高温下で飼育することにより、性比の雄への偏りが報告されており、水温統御による性転換が示唆されている（Nomuraら1998）。

2-4. 核移植

顕微操作を用いた核移植による体細胞クローン作成も基本的な技術である。KingとBriggsによる両生類における核移植実験の勃興期（DiBerardino 2001; DiBerardinoとMckinnell 2004）に少し遅れて、中国では雌性核除去や胞胚核の移植が、同種ならびに同属異種との間でなされ、特に、核－細胞質雑種の誘起とその水産養殖への研究が盛んに研究された（Yanら1989）。これらの研究のなかで、大鱗副泥鰍*P. dabryanus*とキンギョ*Carassius auratus*の間での科間核移植についても検討された（Yanら1990）。一方、旧ソ連（ロシア）においてもヨーロッパドジョ

ウ *M. fossilis* を用いた核移植が行なわれ、Gasaryan ら (1979) は、胞胚核の移植によるクローン稚魚を得ている。最近、胞胚核の移植による核移植はドジョウ *M. anguillicaudatus* においても成され、これら核移植個体の形態学的特性、生殖特性等も研究されている（Tanaka ら 2009)。また、細胞融合の手法により、大鱗副泥鰍 *P. dabryanus* において核移植が行われている（Fu と Wu 2001)。

核移植と同様のマイクロマニピュレーションによる生殖発生工学技術として顕微授精（ICSI: intracytoplasmic sperm injection）がある。これは、ヒトの生殖補助医療技術として利用されているが、魚類では例が少ない（Poleo ら 2001, 2005)。最近、比較的高い率で顕微授精を行うことがメダカで可能になったことから（Otani ら 2009)、ドジョウを含む他の魚種においてもこの方面の研究が進むことが期待される

2-5. 遺伝子導入

トランスジェニックも現在、様々な領域で、基本的な研究技術となっている。ドジョウ類におけるトランスジェニックの研究は、1980 年代に中国ではじまり（Zhu ら 1986)、その後、韓国のグループが発展させ、カラドジョウを用いた一連の研究を行った（Nam 2006; Nam ら 1998a, 1999, 2000ab, 2001ac, 2002, 2003, 2004)。彼らは同種から得た成長ホルモン遺伝子のコンストラクトの導入、発現、次代への伝達に成功し、巨大なトランスジェニック魚の後代を得た（Nam ら 1999, 2000ab, 2001ac)。彼らはトランスジェニック技術を、前述の異種間雄性発生技術と組み合わせ、トランスジェニッククローンとした（Nam ら 2000b, 2002)。また、この様なトランスジェニック魚の逃亡等による自然界野生集団の遺伝的撹乱を防止するため、第二極体放出阻止に由来する、あるいは人為四倍体と正常二倍体の交配に由来する不妊三倍体を用いた生物学的封じ込め（biological containment）技術開発を行っている (Nam ら 2001a)。

2-6. キメラ

胚操作のうち、応用性の高い技術として生殖系列キメラ（germ-line chimera）がある。これは対象とするドナーの始原生殖細胞（PGC: primordial germ cell）あるいは、それらを含む（と期待される）胚盤の一部、胞胚割球をホストに移植し、ホストにドナー由来の配偶子を作らせようとする技術である。初期のドジョウキメラは胞胚細胞の移植により作られたが、生殖系列キメラの作出率は極めて低かった（Nakagawa ら 2002, 2003)。生殖系列キメラの作出率向上には、PGC を多く含む胚盤下層の移植（Yamaha ら 2001, 2003)、あるいは、単離した PGC を移植することが重要であるが、近年、たった一つのドジョウ PGC を、不妊化したゼブラフィッシュ胚に移植し、数ヵ月後にゼブラフィッシュにドジョウの機能精子を作らせることに成功した (Saito ら 2008)。すなわち、生物の科（family）を超えて、生殖細胞を作らせることが可能になった。これはホストを台木、ドナーを穂木とした、魚類における「接ぎ木技術」とも見做せる。この様な研究の延長上に、種苗生産が困難であるウナギの卵を、繁殖が容易なキンギョ等の養殖魚に産出させたり、成熟までに長期間を要するダウリアチョウザメの高級キャビアを、比較的短期に成熟する別のチョウザメに作らせる、借り腹生産（養殖）への応用がある。この技術の現状と将来展望は、既にいくつかの総説に詳述されている（斉藤と山羽 2004, 2006; 山羽 2002; 山羽ら 1999; Yamaha ら 2007)。

2-7. 発生ステージ

染色体操作、核移植、生殖系列キメラ、あるいは ICSI などの発生工学的な操作を行うには、対象とする種の受精から胚発生の過程がよく理解され、発生ステージが決定されていることが重要である。ドジョウの発生ステージについては、*M. fossilis* における研究（Kostomarova1991）があるが、最近 Fujimoto ら (2004, 2006) は、形態学的ならびに分子生物学的知見（*goosecoid* (*gsc*) , *no tail* (*ntl*) などのマーカー遺伝子の発現）により、*M. anguillicaudatus* の発生ステージを決定するとともに、PGC の移動経路についても明らかにした。

2-8. 精子および生殖細胞の凍結保存

増養殖や水産育種を円滑に進めるためには精子や細胞の凍結保存技術の開発も重要である。精子の凍結保存については、*M. fossilis* について Kopeika ら (2004) の研究があるが、最近、市販の注射筒と粉末ドライアイスを用いた簡便で安価なドジョウ *M. anguillicaudatus* 精子凍結法（Yasui ら 2008）が報告される一方、希釈液、耐凍剤などの好適凍結保存条件についても詳細に検討された（Yasui ら 2009)。胚細胞あるいは PGC の凍結保存技術は本種では確立しておらず、今後、さらなる研究が望まれる。

3. 遺伝マーカーと染色体情報

3-1. 遺伝マーカー

ドジョウの生殖・発生に関する研究ならびに技術開発の現状について上述したが、これらに加えて重要なのが遺伝的解析のためのツールである。ドジョウでは古くから形態（色彩）マーカーとして劣性形質ヒドジョウ（体色は緋色であり眼は黒い）とアルビノ（体色は緋色であり眼も赤い）が知られている（Suzuki ら 1985b）。これらは肉眼的にその遺伝子伝達をトレースできることから、上述の染色体操作やキメラ作成の成否確認の可視的マーカーとして利用されてきた。しかしながら、これらの色彩変異を一般的な遺伝マーカーとして利用するには難がある。1980 年代から利用可能な共優性マーカーとして酵素の生化学的な遺伝多型、すなわちアロザイムがあったが、ドジョウでは 2000 年代に到っても使用可能なのは 9 酵素を支配する 12 座であり（Khan と Arai 2000）、多型性が高くないことのほか、多数の試料を生鮮状態のまま凍結保存しなければならないなどの分析技術上の問題もあった。近年、高多型性でかつ共優性の DNA マーカーとして、マイクロサテライト（MS）マーカーが活発に利用されている。ドジョウにおいても分子遺伝学的な手法により MS マーカーが多数開発され、これらの一部は人為雌性発生二倍体を用いた half-tetrad analysis の手法により動原体からの地図距離推定に用いられたほか（Morishima ら 2001, 2008b; Arias-Rodriguez ら 2007, 2009a）、交配家系の連鎖分析により 164MS マーカーと 1 色彩（ヒドジョウ）マーカーが 27 の連鎖群（染色体数 2n=50 からの理論値は 25 連鎖群）よりなる第一世代の遺伝地図にマップされた（Morishima ら 2008b）。

これらのほか、核ゲノム全体の遺伝的均一性（クローン性）の検討のため、33.6、33.15 などのミニサテライト配列や（GGAT)n などのオリゴヌクレオチドをプローブとしたマルチローカス・DNA フィンガープリント（DNA-FP）法が開発された（Morishima ら 2008a）。また簡便な判定のために、市販のランダムプライマー（Operon、Wako など）による PCR 増幅を用いた RAPD（Random Amplified Polymorphic DNA）-PCR 法が利用されている（Morishima ら 2008a）。以上は核ゲノムに関するマーカーであるが、母性遺伝を行う細胞質の遺伝マーカーとしてミトコンドリア DNA があり、調節領域あるいはチトクローム b 遺伝子領域の RFLP および塩基配列解析による系統解析に利用されている（Morishima ら 2008a; Yang ら 2009；小出水 2009）。

3-2. 染色体

ゲノム全体の構造を知るには染色体情報も重要である。ドジョウ（類）では比較的早くから染色体観察がなされ、本邦産ドジョウ *M. anguillicaudatus* の染色体数は 2n=50 と決定されてきた（Hitotsumachi ら 1969）。ところが、Ojima と Takai（1979）は、本邦の市場から得た標本になかに、染色体数 75 の三倍体、同 100 の四倍体が出現することを報告した。このような倍数性変異（四倍体）の存在は、後に Arai ら（1991a）により確認されるとともに、中国長江（揚子江）流域由来の標本においても観察された（Li ら 1983; 李ら 2008）。また、欧州産の *M. fossilis* においても、二倍体（2n=50）と四倍体（2n=100）の存在が知られている（Raicu と Taisescu1972; Boron 2000; Ene と Suciu2000）。一方、カラドジョウ *M. mizolepis* の染色体数は 2n=48 であり、核型上の相違はロバートソン融合により説明される（Ueno ら 1985）。体細胞分裂像のみならず、分裂中の精母細胞や卵母細胞の卵核胞を用いた減数分裂像の観察も行われてきた（Zhang ら 1998, 2002; Itono ら 2006; Morishima ら 2008c; Yoshikawa ら 2009）。しかしながら、さまざまな蛍光色素を用いた分染や、rDNA などをプローブとした FISH（fluorescence *in situ* hybridization）は近縁のシマドジョウ *Cobitis* 属で検討されているが（Boron 2003; Rabova ら 2001）、*Misgurnus* 属のドジョウでは行われておらず、早急な検討が望まれる。

4. 自然四倍体

4-1. 自然四倍体は進化的な四倍体か、遺伝的な四倍体か

上述のように、自然四倍体ドジョウを Ojima と Takai（1979）が初めて報告した。しかしながら、その標本の産地は明確ではなかった。筆者も広島大学生物生産学部在任中に学生実験の教材として市場より得た産地・起源不明の標本のなかに四倍体個体を見いだした（Arai ら 1991a）。2-3 節のように、受精後に第一卵割を高温、圧力で抑制することにより人為四倍体誘起は理論的には可能であるが、現実には特性評価を行うため四倍体個体を十分な数得ることは、どの魚種においても容易ではない。そこで、筆者が染色体数 100 のドジョウを手にして、最初に考えたことは、人為的に作成が困難な四倍体の代わりに、これらの自然四倍体について特性解析を行うことであった。

最初に、これらの自然四倍体ドジョウが、コイやキンギョのように二倍体（2n）であっても、染色体数を 100 もつ進化的な四倍体であり、既に遺伝的には二倍

体化しているのか、あるいは、現在も染色体セット（ゲノム）を4セットもつ遺伝的な四倍体であるのかを確かめた。ゲノムセットを4組もつか否かは、減数分裂時の染色体像を観察できれば推測可能であり、もし二倍体（2n=100）であれば50の二価染色体が、四倍体（4n=100）であれば25の四価染色体が期待できる。しかしながら、魚類において減数分裂像の観察は簡単ではない。そこで、人為的な雌性発生などの染色体操作の方法を用いて、この問題の解決を試みた。

もし、自然四倍体がすでに二倍体（2n=100）化しているとすると、その卵は半数体（1n=50）であるので、遺伝的に不活性化したUV照射精子で受精し、人為的な雌性発生を誘起した場合、胚は母親の1セットのゲノムのみを持つ半数体（1n=50）となる。したがって、胚は小眼、小頭、体の矮小、歪曲などの一連の半数体症候群といわれる奇形を呈し、致死的である。ところが、自然四倍体より得た成熟卵をUV照射精子で受精し、人為雌性発生を誘起した場合、生じた胚は正常な形態を持つドジョウ仔魚であった（Araiら1991b, 1993）。すなわち、自然四倍体は4セットのゲノムを持つ遺伝的な四倍体（4n=100）であり、減数分裂により2セットの2nゲノムが配偶子(卵･精子)に伝達され、雌性発生を誘起しても二倍体の生存性子孫が誕生したと考えられる。同様に、UV照射により卵を不活性化して、自然四倍体の精子で受精することにより誘起した、雄性発生個体も雄由来の2セットのゲノム（2n）を持つことになり生存性であった（Araiら1995）。以上の染色体操作実験の結果から、起源不明の四倍体ドジョウは進化的な四倍体ではなく、ゲノムを4セットもつ遺伝的な四倍体（4n=100）であることが結論できた。

4-2. 自然四倍体に由来する倍数体の生殖特性

ドジョウ自然四倍体は染色体を4セット持ち、雌雄とも妊性をもつので、それぞれ2nの卵と精子を産むことが期待できる。そこで、四倍体の産む2n卵を、四倍体の2n精子で受精し、四倍体系統（4n雌 ×4n雄; 以下雌×雄）を作成した。また、それらの2n配偶子を用いた人工受精および染色体操作により、種々の倍数体子孫（図1）を作成した（Arai 2001, 2003; Araiら 1991b,1993; Matsubaraら 1995；Zhangと Arai 1996; Yoshikawaら 2008）。例えば、四倍体と二倍体間の人工受精（4n × 2n, 2n × 4n）により三倍体を容易に作出することが可能であり、さらに圧力処理（PS）あるいは高温処理（HS）などにより、これらの受精後にそれぞれ第二極体放出を阻止すると、五倍体（4n × 2n/PS）、四倍体（2n × 4n/PS）が生じる（図1）。四倍体の産む卵を、四倍体の精子で受精した後に、第二極体放出を阻止して（4n × 4n/PS）、相同染色体を6セットもつ六倍体（6n=150）を作成することも可能である（図1）。

六倍体ドジョウを成熟まで飼育したところ、雌は大型3n卵を、雄は3n精子を産生した（Araiら 1999）。これらはいずれも受精能力を持ち、両者の交配（6n×6n）から六倍体系統を再生できた。また、六倍体の産む3n卵を四倍体の2n精子，二倍体の1n精子で受精することにより、それぞれ五倍体（6n × 4n）と四倍体（6n × 2n）を得た（Araiら 1999）。六倍体が妊性を有し、機能性の3n配偶子を産生したことも、自然四倍体が遺伝的四倍体（4n=100）である証拠となる。何故なら、もし2n=100であるのなら、第二極体放出阻止法で得られる子孫は人為三倍体（3n=150）となり、一般的には不妊になることが予想されるのに対し、これら子孫は雌雄ともに妊性を有したからである。二倍

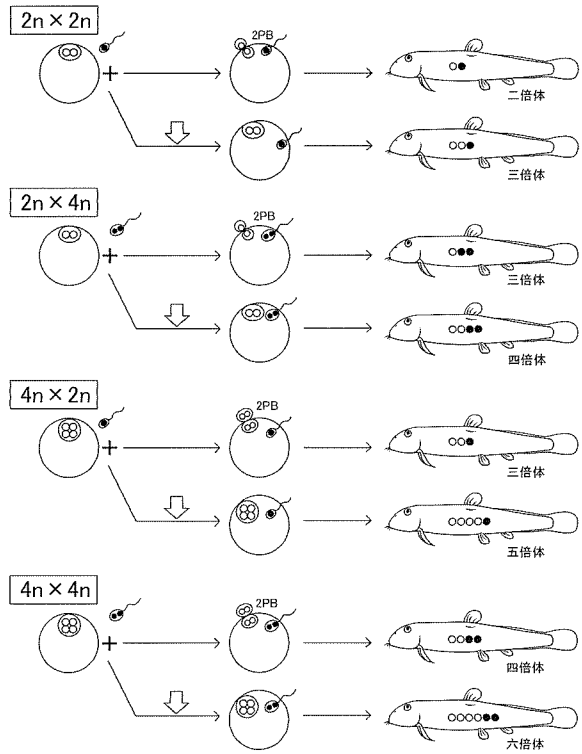

図1．正常二倍体および自然四倍体ドジョウの配偶子(卵、精子）を用いた人工受精とその後の染色体操作（低温・高温あるいは圧力処理による第二極体（2PB）放出阻止：矢印）による三倍体、四倍体、五倍体および六倍体の作出。　○および●は、母親あるいは父親由来の1組のゲノム（染色体セット）をそれぞれ示す。

体（2n=100）から三倍体（3n=150）ではなく、四倍体（4n=100）から六倍体（6n=150）を作出したと考えると、機能的な3n配偶子の形成が良く説明できる。

通常の二倍体ドジョウから、受精後の第二極体放出阻止により作出する人為三倍体は一般に雌で強い不妊性を示し、雄においても少量の異数性精子の産生など生殖能力の低下を示すが（Zhangと Arai 1999a; Araiと Inamori 1999）、四倍体に由来する三倍体の生殖特性はそれと大きく異なった。四倍体に由来する三倍体（4n × 2n, 2n × 4n）は雄の場合、妊性をもつ精子は全くあるいはほとんど得られなかったが、雌では卵巣が良く発達し、これらは成熟卵を産んだ。ところが、産出された卵にはサイズに相違が見られ、大型卵（卵径約1.4 ㎜）を多く産む個体もあれば、多数の小型卵（卵径約1.1 ㎜）と少数の大型卵を産む個体もあった（Matsubaraら 1995）。そこで、これらの卵にUV照射精子あるいは正常精子を媒精し、各々、人為雌性発生と通常の人工受精を行った。そして、それぞれより生じる胚の染色体計数あるいはフローサイトメーターによるDNA量測定の結果から、もともとの卵の倍数性を判定した。その結果、小型卵は1nであったのに対して、大型卵は3nであった（Matsubaraら 1995; Zhangと Arai 1996）。五倍体は中型の卵を産むが、同様のアプローチで卵の倍数性を判定したところ、これらは2nであった（Matsubaraら 1995; Zhangと Arai 1996）。

以上のほか、四倍体由来の二倍体卵から誘起した雌性発生二倍体、同四倍体、および三倍体（2n × 4n）の産する三倍体卵から人為的に誘起した雌性発生三倍体についても、その妊性が調査された（Momotaniら 2002; Zhangら 1998, 2002）。以上を含め、正常二倍体と自然四倍体の配偶子を用いた交配と染色体操作に由来する各種倍数体の妊性と生殖特性を表1にまとめた。

自然四倍体に由来する三倍体では、多くの場合、頻度は異なるが、大型の3n卵と小型の1n卵が同時に産出された（Matsubaraら 1995; Zhangら 1998）。ところで、三倍体が3n卵を産むとすると、これらの卵は母親の体細胞と同一の遺伝子型を持つ可能性がある。そこで、大型3n卵にUV照射精子を媒精することで人為雌性発生を引き起こし、雌性発生三倍体を作出し、DNA-FP法によりその遺伝的均一性を調べた。その結果、雌性発生三倍体のほとんどは母親三倍体と同一のDNA-FPを示した（Araiと Mukaino 1997）。すなわち、三倍体（四倍体と二倍体の交配由来）ドジョウは3nの卵を作り、一部の例外を除き、それらは遺伝的に同一であることが考えられた。すなわち、三倍体は非還元的に遺伝的に同一なクローン3n卵をつくる可能性が高い。なお、この様な特殊な生殖様式の細胞学的機構については第7節で述べる。

一方、三倍体が作る小型の1n卵はどのように形成されるのであろうか、乳酸脱水素酵素（LDH）とリンゴ酸脱水素酵素（MDH）において、アイソザイムを支配する遺伝子が四倍体と二倍体の間で異なり、四倍体の遺伝子型はaaaa、二倍体はbb、三倍体はaabと表記できる。三倍体の作る半数体卵の遺伝子型を調べたと

表1. 正常二倍体および自然四倍体ドジョウの配偶子を用いた受精ならびに染色体操作により得られる各種倍数体の生殖特性

倍数体	交配（雌×雄）・操作*	性比　雌：雄	卵　倍数性　（卵径㎜）	精子倍数性	備考
正常二倍体	2n x 2n	16雌：14雄（他不明1）	1n (1.0-1.2)	1n	年齢不明
雌性発生二倍体	2n x UV/CS	1雌：0雄	1n (n.d.)	n.d	1歳魚
人為三倍体	2n x 2n/CS	63雌：27雄	不妊	不妊	1歳魚
人為三倍体	2n x 2n/PS	n.d.	不妊	異数体1.3 n	6-7歳魚
人為三倍体	2n x 2n/PS	n.d.	n.d.	異数体1.1-1.9 n	7歳魚
自然四倍体	4n x 4n	73雌：69雄	2n (1.2-1.4)	2n	2-6歳魚
雌性発生四倍体	4n x UV/PS	25雌：0雄	n.d.	n.d.	4-5歳魚
雌性発生二倍体	4n x UV	1雌：0雄	1n (1.11)	n.d.	4歳魚
三倍体	4n x 2n	n.d.	1n (1.06), 3n (1.41)	不妊	2歳魚
三倍体	2n x 4n	n.d.	1n (1.06), 3n (1.41)	不妊	2歳魚
雌性発生三倍体	3n(2n x 4n) x UV	7雌：0雄	1n (1.15), 1.4-1.5n (1.25-1.35), 3n (1.4)	n.d.	4歳魚
五倍体	4n x 2n/HS	4雌：0雄	2n (1.15)	n.d.	2歳魚
六倍体	4n x 4n/PS	11雌：10雄（他不明2）	3n (1.4)	3n	3-4歳魚

*** UVは紫外線照射精子の受精（雌性発生誘起）、CS, HS, PSはそれぞれ低温、高温、圧力処理による第二極体放出阻止を示す。点線以下の倍数体は自然四倍体の配偶子に由来する。**

ころ、「a」遺伝子の伝達される割合が高頻度であった。すなわち、「b」遺伝子を持つ二倍体由来相同染色体は対合に参加できず、「a」を持つ四倍体由来の相同染色体同士で対合し、減数分裂を行う傾向があり、雑種発生的（hyboridogenesis-like）な分離が生じていることが示唆された（Arai と Mukaino 1998）。雑種発生の関与に関しては 8-2 節において詳しく述べたい。

4-3. 自然四倍体に由来する倍数体の成長特性

植物では一般に、ある範囲で倍数性が上昇するにつれ体サイズが増加し、この様な性質をギガス性（gigantism）とよんでいる。魚類を含む下等脊椎動物では、一般に倍数性が増加することにより細胞が大型化しても、組織・器官・個体を構成する細胞数の減少により体サイズは一定に調節されると考えられており、人為三倍体魚における成長改善の多くの実例は不妊による成熟エネルギーの成長エネルギーへの転換によると考えられている（荒井 1997）。この様な倍数体魚の特性比較は養殖魚の性能改善の観点から水産育種の分野では広く研究されてきたが、多くの場合が二倍体と三倍体の間の比較であり、人為的な作出が困難な四倍体以上の倍数体で比較された例は乏しい（荒井 1997）。ニジマスにおける比較研究では、人為四倍体は対照二倍体ばかりか人為三倍体よりも成長で著しく劣ることが報告されている（Chourrout ら 1986）。そこで、ドジョウにおいて、自然四倍体から作出した三倍体（4n × 2n）と四倍体（4n × 4n）を通常の二倍体（2n×2n）と同一水槽で混合飼育して比較したところ、6 ヶ月令、2 年 3 ヶ月令まで三者間に成長差は見られず、筋肉単位重量当たりの DNA 量、脂質含量にも差は無かった（谷浦ら 2002）。しかし、3 年 1 ヶ月令になると、四倍体の成長は三倍体、二倍体に有意に劣った（Horie ら 2004a）。さらに、自然四倍体から染色体操作により作出した六倍体の子孫である四倍体（6n × 2n）、五倍体（6n × 4n）、六倍体（6n × 6n）を 3 年 2 ヵ月令まで飼育して比較したところ、六倍体の成長は四倍体、五倍体に著しく劣り、体重で半分程度であった（Horie ら 2004b）。以上の結果は、高次倍数体では、成長などに障害が生じる可能性があることを示唆している。

5. 自然三倍体―新潟県魚沼郡広神村（現　魚沼市）産ドジョウの事例

上述の自然四倍体は、偶々市販のドジョウの中に見出したものであり、どこの産地に由来するかは全く不明であった。そこで、初期には染色体観察、赤血球測定、そして、近年では DNA 量フローサイトメトリー（FCM）により、日本全国から収集したドジョウについて倍数性判定を行ってきた。その結果、本邦のドジョウはほとんどの地域で二倍体であり、四倍体は現在までに 1 個体も確認できないこと、低い頻度で三倍体が生じる地点と比較的高い頻度で生じる地点があることが判明した（Zhang と Arai 1999b）。

最初に注目したのは、新潟県魚沼群広神村（現　魚沼市）の集団である。FCM により検討すると、この地域のドジョウ標本の三倍体出現率は 2.0-15.8％と他所（0-3.2%）に比較して著しく高かった。Zhang と Arai（1999b）は、この様な三倍体が出現する原因として、同所的に生息する有性生殖を行う二倍体のなかに、2n 卵を非還元的に形成する個体が存在し、これらの非還元 2n 卵と正常の 1n 精子の受精により三倍体が生じるのではないかと考えた。そこで、広神村より採取した雌個体（8 尾）を成熟させ、各雌より得た卵を順次 UV 照射により遺伝的に不活性化したキンギョ精子の受精により人為雌性発生の誘起を行った。もし、これらの雌親魚が正常な二倍体であれば、卵は 1n であるので、UV 照射精子で受精すると致死的な雌性発生半数体胚として発生し、全て死亡する。しかし、もし、広神村の二倍体ドジョウの中に 2n 卵を産むものがいればどうなるだろうか。この様な卵は UV 照射精子で受精され雌性発生が誘起されたとしても、二倍体として正常に発生するはずである。

そこで、8 尾の雌より得た卵を UV 精子で次々と受精させていったところ、雌 No.1 から No.7 の卵より生じた雌性発生胚は全て異常を示し死亡した。しかし、最後の No.8 から得た卵に UV 照射精子を媒精した場合、異常な胚も生じたが、全体の半分は正常胚であった。染色体を見ると、異常胚は半数体（1n=25）であったが、正常胚は二倍体（2n=50）であった。そして、これらの卵に正常精子を受精した群からは、二倍体と三倍体（3n=75）の子孫が生じた。以上の結果は、広神村の二倍体ドジョウの中には通常の 1n 卵のほかに 2n の卵を同時に産む個体がいることを示しており、この地域の自然三倍体は、二倍体の産む 2n 卵と正常 1n 精子との受精に起源していると考えられた。広神村野生集団の二倍体と三倍体間で、DNA-FP を比較したところ、三倍体間ならびに特定の二倍体と三倍体間の類似度が高かったことも、当地の自然三倍体が特定の二倍体の産む 2n 卵に起源することを示唆した（森島ら 1999）。さらに、この広神村の特殊な二倍体が産む 2n 卵が母親と遺伝的に同一か否かを、これらの 2n 卵を雌性発生

させて作出した雌性発生二倍体子孫について、DNA-FP および MS マーカー分析により検討した結果、変異があることが判明した。したがって、この特殊な二倍体の産む 2n 卵は遺伝的クローンではなかった（Arai ら 2000; 森島と荒井 2004）。

この地域の三倍体はどの様な生殖特性をもつのであろうか。広神村産の自然三倍体では、雄は不妊であったが、雌は妊性をもった。FCM で確認した三倍体雌に hCG を注射し成熟卵を得たところ、各個体が多数の小型卵（卵径 1.03-1.04 ㎜）とごく少数の大型卵（卵径 1.44 -1.45 ㎜）を産むことが判明した。これらの卵を正常な 1n 精子で受精したところ、小型卵からは二倍体の胚が、大型卵からは四倍体の胚が生じた。従って、この広神村の自然三倍体は、自然四倍体と二倍体の交配に由来する三倍体と同様に、1n 小型卵と 3n 大型卵を産することが分かった。このことは、四倍体が自然三倍体の 3n 卵の受精から生じる可能性を示している。

広神村と同様、高頻度で自然三倍体が出現する地点として、愛知県宝飯郡一宮町、北海道北部、石川県能登半島がある（Arai 2003; Morishima ら 2008a; Zhang と Arai 1999b）。これらについては後述するが、他に低い頻度（1.2-2.8%）で自然三倍体が生じる地点がある。この様な低頻度で三倍体が生じる集団においても、特殊な雌が存在し、それらが産する 2n 卵の 1n 精子との受精により、三倍体が生じているのであろうか。糸納と荒井（2004）が、北海道亀田郡七飯町にある蕪菜沼のドジョウについて調べたところ、二倍体雌 17 個体中、8 個体が 1n 卵の他に少数の 2n 卵を産んでいた。2n 卵由来の人為雌性発生子孫の MS マーカーを用いた分析から、これらの 2n 卵は第二極体放出の自然抑制と考えられた。すなわち、比較的高頻度で自然三倍体が生じる地域には、非還元的に 2n 卵を産む特殊な二倍体が同所的に生息しており、一方、低頻度で生じる地域の三倍体は第二極体放出の自然抑制によると推定された。

6. 自然クローン二倍体

6-1. クローンの発見

FCM による自然倍数体の検索を継続したところ、新潟県広神村と同様に自然三倍体の出現が高頻度な地域として、北海道網走管内女満別町（現　大空町）があった（Morishima ら 2002）。そこで、採集した 6 個体の雌（No.1-6）の卵について、UV 照射精子の受精による人為雌性発生誘起を行った。その結果、4 個体（No.1, 2, 4, 5）の雌の卵から雌性発生した胚は全て致死的な半数体症候群を示し、孵化後まもなく全滅した。従って、これらの雌の産む卵は、多くの両性生殖ドジョウ二倍体と同様に 1n である。ところが、残り 2 個体（No.3, 6）の卵からは正常な形態を持つドジョウ雌性発生二倍体が生じた。このことは、これら 2 個体の雌は、非還元的に 2n 卵を形成していることを示す。もし、そうであればこれらの雌の卵を正常な 1n 精子で受精することにより、三倍体が生じるはずである。

そこで、これらの卵に正常二倍体から得た 1n 精子を受精し、子孫が全て三倍体として発生するかどうかを検証したところ、予想外の結果となった。すなわち、人工受精から生じる子孫が全て三倍体になっているとの期待のもと FCM を行ったところ、三倍体の出現率は低く、予想外の二倍体が多数出現した。三倍体は 2n 卵と 1n 精子の受精により説明できるとして、これら二倍体はどのようにして生じたのであろうか？ UV 精子で受精した場合、生じる雌性発生子孫は全てが二倍体であるので、卵が 2n であったことは間違いない。そこで、2n の卵が 1n ドジョウ精子の遺伝的あるいは生物学的な関与無く、卵の遺伝子型のみで発生を開始した可能性（雌性発生あるいは単為発生＝処女生殖）を検討した。

まず、女満別町のドジョウの卵に、別のコイ科に属するキンギョの精子を媒精してみた。ドジョウの卵にキンギョ精子をかけると、両親種のゲノムをもつ雑種が得られるが、これらは浮腫などの異常を示し致死的である（木島ら 1996ab）。雌 No.3 の卵にキンギョ精子を受精すると、雑種の奇形胚に加え、多数のドジョウ正常胚が出現した。すなわち、ドジョウの卵にキンギョの精子を受精した場合でもドジョウが生じたことになる。

ドジョウの 1n 精子の DNA 量を 1C とすると、キンギョの 1n 精子の DNA 量は 1.4C となる。生じた奇形はすべて 3.4C の DNA 量をもつので、これらはドジョウの 2n 卵（2C）とキンギョの精子（1.4C）の受精から生じたと説明できた。一方、キンギョ精子の受精から生じたドジョウは全て二倍体であった。以上のことから女満別のドジョウの中に、正常の有性生殖により繁殖する二倍体のほかに、2n の卵を産む二倍体が存在し、多くの場合 2n 卵は精子の遺伝的な影響を受けずに，雌性発生により無性生殖的に繁殖すると考えられた（Morishima ら 2002）。また、当地の三倍体は、一部の 2n 卵の 1n 精子の偶発的な取り込みにより生じると考えられた（Morishima ら 2002）。

そこで、これらの 2n 卵より生じる子孫について、

複数のMSマーカーを用いた遺伝的解析を行ったところ、生じた二倍体子孫は例外なく母親の体細胞と同一のマーカー型を示した。さらに、DNA-FP分析を行ったところ、生じるDNA断片の位置と濃度はこれらの二倍体子孫と母親の間で完全に一致した。以上の結果は女満別のドジョウの産む2n卵は母親と同一の遺伝子型をもち、これらから父親の影響を受けずに発生した二倍体子孫は遺伝的に均一なクローンであることを示している（Morishimaら2002）。また、三倍体子孫はクローン二倍体と同一のMSアレルに加えて、父親のアレルの何れかを持つこと、また、DNA-FPではクローン由来の全てのDNA断片に加えて、父親由来の断片を持つことから、クローン2n卵が偶然に1n精子核を取り込むことにより三倍体として発生したことが明らかになった（Morishimaら2002）。

6-2. クローンの探索

女満別を含む北海道北部にはどのくらいの頻度でクローン二倍体がいるのであろうか？以上述べたように、今回は卵を人為的に雌性発生させることにより、クローン二倍体の存在が明らかになったが、これらは野生集団では、形態に違いが見られず、隠蔽されている。遺伝的な手法で調べたところ、同一のDNA-FP像を示す二倍体個体が、野生集団の17個体中に5個体生じたことから、かなりの頻度で生息することが推定された（Morishimaら2002）。以上のDNAマーカーの分析から、少なくても1系統のクローンが北海道に存在することが判明した（Morishimaら2002）。

北海道女満別の野生集団で、自然三倍体がクローン二倍体の2n卵より生じていたとすると、これらのミトコンドリアDNAは同一のはずである。もしそうであれば、自然三倍体と同一のmtDNAハプロタイプを有する二倍体個体をスクリーニングすることによりクローン候補を洗い出し、これらについてDNA-FPあるいはRAPD-PCR分析を実施すれば、同一のフィンガープリント像を示す複数個体をクローンとして探し出すことができるはずである。Morishimaら（2008a）は、278尾の二倍体から、mtDNA分析により82個体をクローン候補として選び出し、これらの間でRAPD分析を行うことにより、北海道と石川県能登半島において4系統25個体のクローンドジョウを判別した。しかし、複数の個体が同一のフィンガープリント像を示すことでクローン判別を行うことができるので、プライベート（個体特異的）な像を示す残り57個体については、クローン判別ができなかったばかりか、有性生殖の二倍体であるか否かも目下不明である。このことを確認するためには、個体毎に配偶子を採取し、どの様な発生を行うかを実験的に調査するしか手段が無い。

7. クローンドジョウの生殖機構

7-1. クローン非還元卵形成機構

二倍体が2n卵を産むには二つの細胞学的機構が想定される（図2）。一つは、二倍体の生物が減数分裂ではなく、体細胞分裂のみで卵形成を行う仕組みであり、アマゾンモリー *Poecilia formosa*、ギンブナ *Carassius auratus langsdorfii*、ギベリオブナ *C. a. gibelio* で知られている無配偶生殖（apomixis）である（Dawley 1989）。この場合は、減数分裂過程が全く関与しないので、配偶子は遺伝的に均一となる（図2B）。もう一つは、減数分裂に入る前に、全ての相同染色体が倍加することにより、姉妹染色分体があたかも相同染色体のように、複製・対合し、その後擬似的に2回の減数分裂と同様の分裂を行う減数分裂前核内分裂（premeiotic endomitosis or endoreduplication）の仕組み（図2C）である（Dawley 1989）。

これらのどちらかであるかを確かめるために、「染色体の倍加」があるかどうか、また、「2回の減数分裂様の分裂」があるか否かを確かめた。減数分裂前に染色体倍加があるかどうかを調べるために、卵核胞の染色体、すなわち、第一減数分裂における染色体をみることにした。そのため、正常二倍体とクローン二倍体雌から、十分に成長した卵母細胞を有する卵巣を取り出し、それらを最終成熟にかかわる17 α -20 β - ジヒドロキシ-4-プレグネン-3－オンとともに培養したところ、卵核胞（germinal vesicle：GV）は動物極側に移動（GVM）し、崩壊（GVBD）した。これらの過程のGVを実体顕微鏡下で取り出し、染色体標本を観察した。その結果、正常二倍体では25、クローンでは50の二価染色体が計数でき、クローン卵母細胞は二倍の染色体数を持つことが判明した（Itonoら2006）。また、GVBDの後、経時的に卵を固定し、切片として観察すると、正常二倍体とクローンのいずれも、GVBDの後、第一減数分裂の紡錘体を示し、その後、第一極体を放出後、第二減数分裂中期で停止することが明らかになった（Itonoら2006）。以上の観察を総合すると、クローン二倍体ドジョウでは、2nの生殖細胞が、減数分裂前の何れかのステージで、全ての染色体を倍加させ4n化した結果、親和性の違いから相同染色体間よりも、もともと同じ染色体であった姉妹染色体間で優先的に対合が生じることになる。そして、複製・対合により8n化し

た卵母細胞が擬似的に2回の減数分裂様の分裂を繰り返すことにより、2nの非還元卵が生じることになる(図2C)。相同染色体ではなく、遺伝的に同一の姉妹染色体が対合するため、また、交差が生じても同じエレメントの交換となるため、このシステムでは生じる2n卵に遺伝的変異は起こらないことになる。この減数分裂前核内分裂こそが、ドジョウにおいてクローン2n卵を作る仕組みである（Itonoら2006)。

自然四倍体由来の三倍体が三倍体卵を形成するが、これらの卵もDNA-FPから見てほぼクローンと言って良い。三倍体ドジョウにおいても細胞学的な観察の結果、十分成長した卵で卵核胞の動物極への移動(GVM)、卵核胞崩壊（GVBD）が生じ、第一減数分裂が再開することになり、第一極体が放出されることが分った(Zhangら1998)。卵核胞での減数分裂像は確認していないが、卵母細胞において二価染色体が約75計数できるものがあった。したがって、3n生殖細胞の染色体が減数分裂前に倍加することにより6nとなり、これらの6n生殖細胞から卵形成が始まり、減数分裂前核内分裂（premeiotic endomitosis or endoreduplication）により、3n卵形成が生じていることが推察された（Zhangら1998)。Zhangら（1998）は、三倍体の産む卵の一部にDNA-FPの変異が生じる事象を、倍加に由来する姉妹染色体ではなく、本来の相同染色体間での対合が希に生じることにより説明している。

7-2. クローン2n精子形成機構

さて、非還元卵形成において、減数分裂前に染色体倍加が生じると述べたが、この倍加が起こる時期の特定はされてこなかった。人為雌性発生二倍体の研究において、生じる子孫がほぼ全雌であることから、本種の遺伝的性決定は雌XX－雄XY（雄ヘテロ）型であることが推定されてきた。したがって、雄の遺伝的関与なく発生するクローン二倍体は全て雌であることが予想される。しかし、雌では卵黄蓄積と成長のための減数分裂の長期休止があり、染色体倍加時期特定の研究材料として適当ではない。そこで、Yoshikawaら(2007a）は先ず、17α-メチルテストステロン投与によりクローン二倍体ドジョウを雄に性転換して、精子形成過程において減数分裂前核内分裂の時期を特定しようとした。その結果、性転換したクローン雄は2n精子を形成することがFCMにより明らかになった。次ぎに、これらの2n精子には受精能力があり、両性生殖の正常二倍体の成熟卵（1n）に受精することにより三倍体子孫を作出できることが判明した。MSマーカー分析により、これらの三倍体子孫は、雄のクローン由来の二つのアレルを常に受け継いでいた。したがって、クローン雄の産生する2n精子は遺伝的に均一のクロー

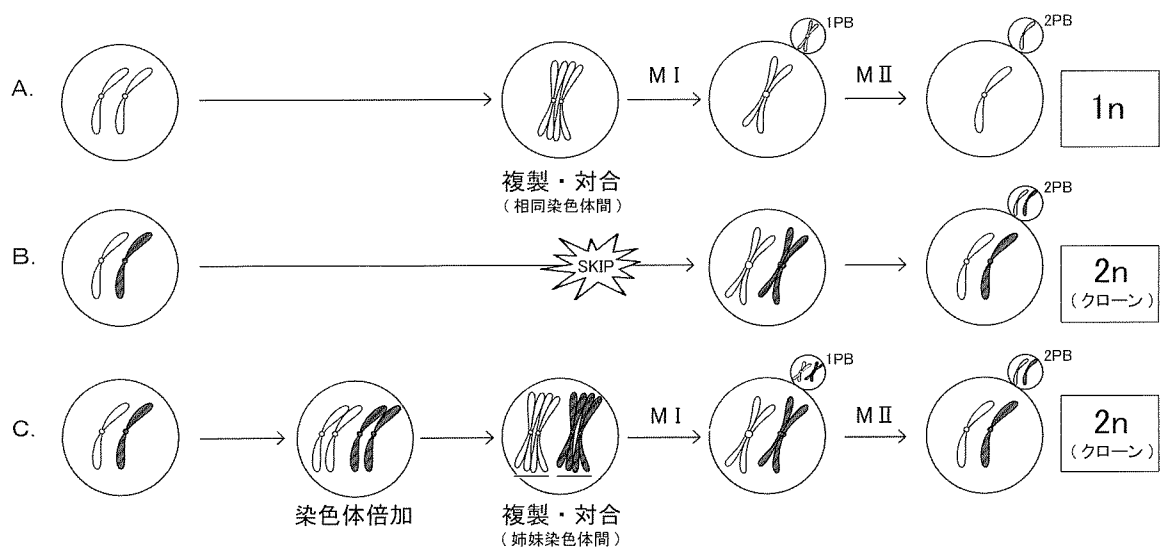

図2．非還元2n卵形成のメカニズム．A：通常の減数分裂による1n卵形成．複製・対合した相同染色体が第一減数分裂では対合面で分離し、姉妹染色分体が第二減数分裂では縦裂面で分離する。B：無配偶生殖(アポミキシスapomixis)による非還元2n卵形成．第一減数分裂の過程はスキップされ、体細胞分裂により卵形成をする。遺伝的な変異は生じない。C：減数分裂前核内分裂（premeiotic endomitosis or endoreduplication）による非還元2n卵形成．減数分裂に入る前の生殖細胞において、全染色体が倍加する。もともと同じ、二つの姉妹染色体があたかも相同染色体のように行動し、複製・対合を行い、減数分裂と同様の二回の連続した分裂を行うことにより、非還元2n卵が形成される。姉妹染色体がペアを作る限り、交差が生じても、染色体の同じエレメントの交換であるので、遺伝的変異は生じない。

ン精子であることが判明した。以上の結果より、クローン二倍体を人為的に性転換すると、クローン2n精子を作るクローン雄が生じることが分った。ドジョウでは、性分化期の高水温処理により雌から雄への性転換が生じることが明らかになっていることから（Nomura ら 1998）、野生集団においても環境要因によりクローン雄が生じ、これらが2n精子を作って、自然三倍体などの形成に関与している可能性を否定できない。

以上のように、性転換クローン二倍体ドジョウがクローン2n精子を作ることが判明したので、性転換雄の精子形成過程を調べたところ、精巣の減数分裂像において、50の二価染色体が数えられた（Yoshikawa ら 2009）。したがって、雌の場合と同じく「減数分裂前核内分裂」の機構により2n精子が形成されることが明らかになった。また、精巣において、多数の四倍体（4n=100）の体細胞分裂中期像が認められた（Yoshikawa ら 2009）。この観察は、クローン雄の精原細胞がすでに染色体倍加を起こして有糸分裂を繰り返していることを示す。そこで、クローン雄精巣の組織切片を作成し、その構成細胞を観察したところ、分裂回数に基づいて分類した全てのB型精原細胞において、正常二倍体雄に比べて有意に大きい核が観察され、A型精原細胞では大型の核を持つ細胞以外に正常二倍体と同等の核サイズの細胞が見られた（Yoshikawa ら 2009）。そこで、パーコールを用いた遠心分離により初期の精原細胞が多くなる画分をとり、抗精原細胞特異抗体（anti-SGSA-1, Kobayashi ら 1998）により識別された初期精原細胞（A型および初期B型精原細胞）についてFCMを行ったところ、このステージに四倍体細胞が認められた（Yoshikawa ら 2009）。以上の結果から、染色体倍加はA型精原細胞において起こると結論された。クローンにおける2n配偶子形成は、生殖幹細胞であるA型精原あるいは卵原細胞における染色体倍加が引き金になって生じていると考えられるが、その引き金を引く機構自体は、目下のところ不明である。

7-3. 雌性発生機構

クローン二倍体が2n卵を作る機構のみでは、クローン生殖を説明できない。合わせて、父親（精子）の関与なく卵のみで発生するかの説明が必要である。母親のみの遺伝型での発生として、単為発生（処女生殖）と雌性発生が知られている。単為発生とは父親の生物学的影響は全くなく、卵のみで発生する様式であり、脊椎動物では *Cnemidophorus* 属などの爬虫類（トカゲ）で知られている（Dawley 1989；Vrijenhoek ら 1989）。また、最近、本来両性生殖を行っている種の動物であっても、動物園、水族館において異性から極めて長期間隔離された条件で、特別な単為発生（facultative parthenogenesis といわれる）が生じる実例が、ニシキヘビ（Goots ら 2003）、コモドオオトカゲ（Watts ら 2006）、シュモクザメ（Chapman ら 2007）で相次いで報告されている。一方、後者の雌性発生は発生の開始に精子の侵入が必須な生殖様式であり、精子依存性単為発生（sperm-dependent parthenogenesis）ともいえる。

Itono ら（2007）は、クローン二倍体の2n卵を正常の1n精子で受精後、経時的に固定し、組織切片をヘマトキシリン・エオシンあるいはDAPIで染色し、精子核の挙動を追跡した。その結果、クローン卵に卵門より侵入した精子は凝縮したままであり、対照の正常二倍体における精子核の膨潤による雄性前核化は認められないことが判明した。したがって、正常二倍体に見られる雌雄両前核の融合は見られず、クローンの2n卵では大型の雌性前核のみが卵割に参加することになる。凝縮した精子核は、2細胞期、4細胞期においても割球の一つに認められた。以上の観察は、三倍体ギンブナにおける受精過程（Kobayashi 1971;Yamashita ら 1990）と酷似しており、クローンドジョウにおいても、侵入した精子核が雄性前核化できず、雌性前核と融合しないことにより、雌性発生が生じていると結論できた。しかしながら、ギンブナの場合と異なり、クローンドジョウにおいては、対照二倍体と同様に雄性前核が形成され、雌性前核と融合する像も見られた。遺伝的解析により、クローン2n卵の受精から三倍体が生じることが判明しており、これら三倍体はこの様な両前核の融合による精子核取り込みにより起こることが細胞学的にも証明された。また、発生の進んだ2細胞期以降の割球において、精子核が活性化し前核様の構造を示す像がまれに認められた。この場合、雄性前核様構造は割球の2n核と合核し3n核となることが予想される。この場合、他の割球の核はクローン2nであるから、この様な個体はまれに認められる二倍体－三倍体モザイク（後述）として発生するものと考えられる。なお、この様な精子核の取り込みは、受精温度を高くすることにより促進される傾向がみられた（Itono ら 2007）。雌性発生を行う動物における受精温度上昇による精子核とりこみは、サンショウウオ（Bogard ら 1989; Elinson ら 1992）、三倍体ギンブナ（董ら 1997; 間田ら 2001）で知られている。

8. クローン二倍体に由来する三倍体と雑種発生

8-1. クローン由来三倍体の生殖特性

上述のように、クローン二倍体の2n卵が同所的に生息する両性生殖二倍体の1n精子核を取り込むことにより、自然三倍体が出現する。北海道ならびに石川県能登半島の三倍体はほぼ全てがクローン由来と考えられた（Morishimaら2008a）。2n卵からの三倍体の出現は、機構的には新潟県魚沼郡広神村（現　魚沼市）で見られた事例（ZhangとArai 1999b）と類似している。広神村の三倍体は、雄で不妊であり、雌は多数の小型1n卵と少数の大型3n卵を産した。また、起源不明の自然四倍体と本邦の正常二倍体との交配に由来する三倍体（4n × 2n, 2n × 4n）も小型1n卵と大型3n卵を産んだ。それでは、クローン由来の三倍体の生殖特性はいかなるものであろうか？

Oshimaら（2005）はクローン由来三倍体2個体について調査した結果、1個体目は多数の異数体（1.1-1.7n）卵と少数の3n卵を、2個体目は多数の1n卵と少数の2n卵を産むことを報告している。また、Morishimaら（2008c）は、クローン雌の2n卵と正常1n精子の受精から生じた三倍体と性転換クローン雄の2n精子と正常1n卵の受精から生じた三倍体について調べたところ、これら三倍体の産する卵のほとんどは1n卵であることを報告している。したがって、異数体および少数の2n、3nの卵が生じる場合もあるが、クローン由来三倍体の産する卵の多くは1nであり、これらは正常1n精子との受精で二倍体として発生する。

三倍体雄においては、精液はわずかしか得られず、精液1 $\mu\ell$ あたりの濃度（2.6-4.2 × 10^3）も対照の正常二倍体精液（1-6 × 10^5）に比較して著しく低かった。光学顕微鏡の観察では、三倍体雄の精子あるいは精子様細胞のサイズは正常精子に比較して大きかった。また、尾部を欠くか、尾が異常に短いものが多くあった。これら三倍体由来精液に環境水を加えても運動性を示す精子（あるいは精子様細胞）はまれであり、その動きも鈍かった。これらの精液には1nの細胞が僅かに見られたが、殆どは3n（DNA量3C）および6n（6C）の細胞であった。これらの精子（あるいは精子様細胞）で正常卵を受精した時、卵割を示す胚は全く生じなかった。以上の結果から、クローン由来の三倍体雄は不妊と考えられた。

8-2. 雑種発生 hybridogenesis による卵形成

クローン由来の三倍体雌の産む卵のうち最も典型的なものは1n卵である。三倍体が1n卵を産む現象は、自然四倍体由来の三倍体（2n × 4n）において見られており、正常1n精子との受精による二倍体子孫の出現が確認されている（AraiとMukaino1998）。既に4-2節で述べたように、四倍体由来三倍体では、アロザイムを用いた研究から雑種発生に類似した生殖機構の関わりが示唆されている。そこで、クローン系統に由来する三倍体を材料にして、卵への遺伝子伝達のパターンを解析した（Morishimaら2008c）。

材料の三倍体には遺伝的に異なる2タイプを使用した。タイプ1はクローン二倍体の2n卵とクローンが生息する北海道北部集団の両性生殖二倍体の1n精子の受精に由来する。タイプ2は、クローン2n卵と北海道南部集団の1n精子の受精に由来する。まず、これら2タイプの三倍体より卵核胞（GV）を取り出し減数分裂像を観察すると、ほとんどの場合25本の二価染色体を示した。三倍体（3n=75）の卵母細胞では50本の染色体がペアを作り、25の二価染色体を構成することから、第一減数分裂の時までには、25本の1セットの染色体が既に削減され、残った50本の相同染色体が対合したことになる。すなわち、3セットの染色体のうち、親和性のより高い2セットの間で複製・対合が生じて、その後、正常な二倍体と同様に減数分裂を行うことにより1n卵が形成されるものと考えられる。

次に独立する10MSマーカーについて遺伝的な分析を行ったところ、タイプ1の三倍体ではクローンのヘテロ接合型のうち、決まった一つのマーカー（アレル）が卵に伝達されたのに対して、タイプ2では別のアレルが伝達された。今、仮にクローンのマーカー型をABとし、タイプ1の三倍体をAA'B，タイプ2をABB'とすると、前者では卵に伝達されるアレルはAあるいはA'，後者ではBあるいはB'となった。典型的な雑種発生（hybridogenesis）とは、雑種ゲノムABのうち、通例雄（父方）由来のBゲノムが排除され、雌（母方）由来Aゲノムのみが卵に伝達され、卵が父親種Bと再び交配することにより永遠にヘテロ接合の雑種（AB）が生じる生殖様式である（図3A）。しかし、ドジョウクローン由来三倍体においては、親和性の高いゲノム（A-A'あるいはB-B'）間で減数分裂が生じ、異質なゲノム（Bあるいは A）は排除される。この様な生殖はmeiotic hybridogenesis（減数分裂雑種発生）とよばれる（図3B）。クローン由来の三倍体でこの様な特殊な生殖様式が生じることは、クローン二倍体の起源に異質なゲノムをもつ集団の交雑が関わっていることを示唆する（Morishimaら2008c）。

9．クローン二倍体に由来する二倍体 - 三倍体モザイク

9-1．モザイク個体の出現機構

クローン二倍体の産む 2n 卵に侵入した 1n 精子が凝縮したまま雄性前核にならないことが、雌性発生が生じる原因である。しかし、既に 7-3 節で論じたように卵割開始前に、凝縮していた精子核が偶発的に活性化して膨潤し、前核様の構造をとる場合、これらは雌性前核と融合し3n核となり三倍体へと発生する。しかし、2 細胞期、4 細胞期の割球でこの様な現象（遅延受精）がおきれば、そのような割球は 3n となるが、他の割球はクローン 2n であり、遺伝子型（倍数性）の異なる二つの細胞集団をあわせもつ個体は二倍体 - 三倍体モザイクへと発生する。実際に、クローン二倍体より得た 2n 卵に 1n 精子を受精した場合、モザイク個体が生じることは実験的に確かめられている（Itono ら 2007）。しかしながら、実際に観察したモザイク個体では、二倍体細胞と三倍体細胞の比率が 1：1 である個体のほか、二倍体細胞の比率が 63%、85%、さらに 94%の個体が観察されている（Morishima ら 2004）。これらの相違は、三倍体の割球ができたステージの相違なのか、二倍体細胞と三倍体細胞を均等にもつモザイクが形成されたのちの発生過程で生じるのかは目下不明である。

倍数性モザイクはサケ科においては、染色体操作により生じる場合（山木ら 1999; Tanaka ら 2003; Yamaki ら 2006）のほか、自然にも生じることが報告されている（Yamaki ら 1999）。ドジョウの野生集団では二倍体 - 三倍体モザイク個体の出現頻度は非常に低く、2000 年の調査では 1.5％（2/136：Morishima ら 2002）、2001 年の調査では 1.2％（2/169：Morishima ら 2004）であった。

9-2．二倍体 - 三倍体モザイク雌の生殖特性

Yoshikawa ら（2007b）は野生から採取したモザイク雌、クローン二倍体より得た 2n 卵の 1n 精子による受精から生じたモザイク雌について、それらの生殖特性を調査した。先ず、得られた卵について UV 照射キンギョ精子で受精して作出した雌性発生子孫について倍数性を分析したところ、それらは半数体、二倍体、および三倍体であった。この結果より、モザイク雌は 1n、2n、および 3n 卵を同時に産むことが判明した。モザイクが産む卵は、肉眼的に小型と大型に区別でき、大型卵はすべて 3n であった。

これらの子孫について複数の MS 座について解析を行ったところ、雌性発生により生じた二倍体子孫はすべて、モザイクの起源となったクローン二倍体と同一

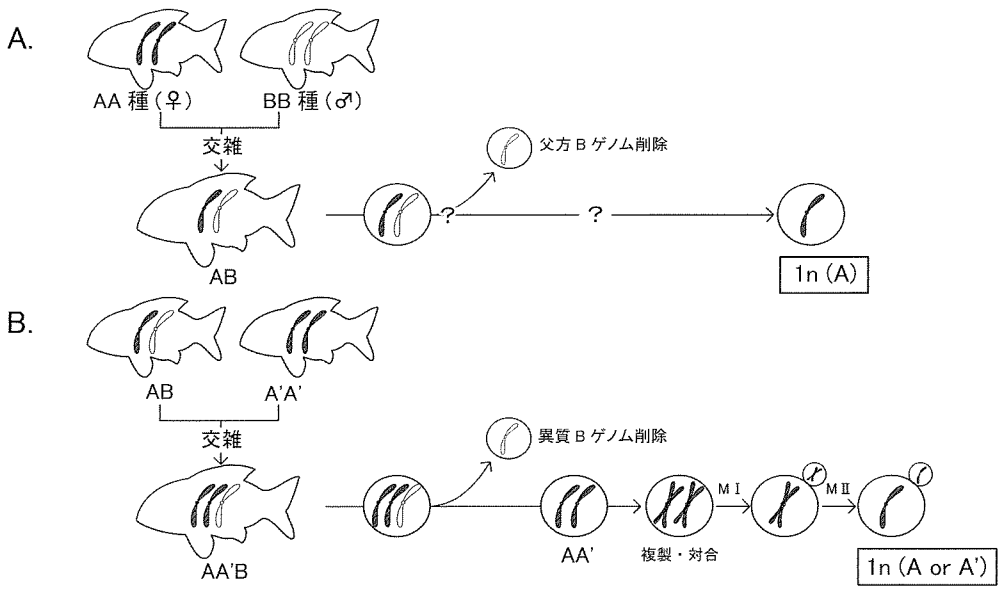

図 3．典型的な雑種発生 (hybridogenesis)（A）と三倍体で生じる減数分裂雑種発生 (meiotic hybridogenesis)（B）のメカニズム．A：AA 種と BB 種の交雑魚 AB において、父方由来 B ゲノムが排除され、母親由来の A ゲノムのみが伝達されることにより、1 n 卵が形成される。卵の 1n ゲノムは、母親の 1n ゲノムと遺伝的に同一なことからヘミ・クローン hemi-clone といわれる。B：減数分裂雑種発生（meiotic hybridogenesis）では、非還元 2n 卵 AB の受精により生じた三倍体 AA'B において相同性がより高い二組の相同染色体（この図では A と A'）の間で複製・対合が生じ、親和性の低い B ゲノムは排除される。卵母細胞に残った 2 セットのゲノム（A と A'）は通常の減数分裂と同じ様式で二回の分裂を行い、1n の卵を形成する。

のマーカー型を示したことから、二倍体 - 三倍体モザイクの産む 2n 卵は、クローン二倍体の生殖細胞に由来する非還元クローン 2n 卵であることが判明した。半数体および三倍体子孫の同様の分析から、1n 卵には、三倍体細胞のもつ３つのアレルのうち１つが伝達されること、3n 卵の遺伝子型はモザイクの三倍体細胞にほぼ一致することが判明した。以上の結果は、減数分裂による 1n 卵と非還元 3n 卵はモザイクを構成する三倍体由来の生殖細胞に起源することを示している。

9-3. 二倍体 - 三倍体モザイク雄のクローン 2n 精子

二倍体 - 三倍体モザイク雄が機能的な二倍体精子を作ることが判明している（Morishima ら 2004）。このような精子を紫外線照射により遺伝的に不活性化した卵に受精して人為雄性発生を誘起したところ、生じた二倍体個体の MS マーカー型と DNA-FP 像は、自然二倍体クローンと完全に一致した。また、モザイクの二倍体精子を用いて正常な卵を受精すると、生じた個体はすべて三倍体であり、常にクローン二倍体と同一の MS 座のアレルおよび DNA-FP 断片を含んでいた。したがって、二倍体 - 三倍体モザイク雄は、クローン 2n 精子のみを形成する（Morishima ら 2004）。

クローン二倍体は遺伝的に全雌（XX）と考えられるが、クローン二倍体として発生を開始した受精卵の割球がたまたま 1n 精子を取り込むと、三倍体胚細胞が形成される。もし、取り込んだ精子が機能的な Y 染色体（注：ドジョウでは形態的に分化した染色体は見られない）を持っていると、三倍体の染色体構成は XXY となる。三倍体細胞が XXX の場合は、二倍体－三倍体モザイクは雌として卵巣を発達させ、前述のように、三倍体生殖細胞に由来する 1n 卵および非還元 3n 卵、ならびにクローン二倍体生殖細胞に由来するクローン 2n 卵を産むことになるが、XXY の構成を持つ三倍体細胞を持つモザイク個体は雄として精巣を発達させることが考えられる。しかしながら、8-1 節に述べたように、三倍体雄は不妊であり、機能的な精子をほとんどの場合形成できない。結局、このようなモザイクでは、生殖腺は雄の方向に誘導されるので、クローン二倍体に由来する生殖細胞も精子形成に向けて誘導されることになる。すでに、7-2 節で述べた機構により、クローン二倍体に由来する初期精原細胞で染色体倍加が生じ、最終的にクローン 2n 精子が作られるものと思われる。

以上の状況は人為的に作成された生殖系列キメラの性分化と類似する。全雌キンギョ（XX）と超雄コイ（YY）の交雑に由来する全雄キンギョ－コイ不妊雑種（XY）をホストとして、それらの胚に、始原生殖細胞（PGC）を多数含む全雌（XX）キンギョ胚盤下部を移植して生殖系列キメラを作出すると、ドナーのキンギョは遺伝的に全雌（XX）であるにもかかわらず、ホストの生殖腺では精子が形成される（Yamaha ら 2003）。

10. ドジョウの集団構造

10-1. アロザイムマーカーによる集団遺伝学的研究

遺伝マーカーを用いて、初めてドジョウ集団を研究したのは Kimura（1978）である。彼は東北から近畿地方の 8 集団より標本を得て、酵素・タンパク質 10 遺伝子座の遺伝子頻度を明らかにし、東北・関東集団と中部・近畿集団の間の遺伝的距離（0.316）からドジョウの中に遺伝的に分岐した 2 グループがあることを示した。その後、董ら（1999）は茨城県東連津川より得た標本についてアロザイム分析を実施し、遺伝的に大きく異なる 2 型（遺伝的距離：0.400）が同所的に生息し、近隣河川集団との比較から、従来のドジョウと遺伝的に異なる個体（集団）が生息することを示した。彼らは、これら 2 グループが形態的にも異なることを指摘した。以上の研究はいずれも、日本国内のドジョウのなかに、遺伝的に分岐した複数グループが生息することを示唆する重要な成果を得ているが、調査地点が限られており、日本全国を網羅していない。Khan と Arai（2000）は、日本各地 44 地点より得た 925 個体の標本（すべて二倍体）について、9 酵素 12 遺伝子座を分析し、北海道北部の集団は、ほかの集団と大きく異なること（遺伝距離 0.286）、本州の中央部、関東・東海・甲信越に分布するドジョウは、北海道南部、本州東北地方、本州近畿・中国地方、四国に分布する集団と区別しうること（遺伝的距離 0.192）を示した。このことは、本邦に遺伝的に大きく分化した複数グループのドジョウが存在するという、既往の Kimura（1978）、董ら（1999）の結果を強く支持した。

10-2. ミトコンドリア DNA マーカーによる集団遺伝学的研究

Morishima ら（2008a）は、ミトコンドリア DNA 調節領域の塩基配列解析による集団構造解析を試みた。その結果、自然二倍体クローン系統を含み、主に北海道北部、石川県能登半島に出現するハプロタイプ（A グループ）は、本州の他地域に出現するハプロタイプ（B グループ）と大きく分岐しており（遺伝的距離 0.127）、異種レベルに相当する遺伝的分化が見られた。

このAグループは上記の10-1節のアロザイム分析による北海道北部に出現したグループに相当する。系統樹からBグループは、さらに日本各地に分布するB-1と関東・東海・甲信越に高い頻度で出現するB-2のグループに分けることができた（遺伝的距離0.048）。これら二つの集団は、アロザイム分析による「北海道南部・東北・近畿・中国・四国」に分布する集団と「関東・東海・甲信越」に分布するグループに相当する。以上のようにmtDNA塩基配列に基づく系統類縁関係は、上記10-1節で示したアロザイムマーカーによる系統関係とよく一致していた。最近、小出水（2009）は、123産地より444個体のドジョウを採集し、mtDNAのチトクロームb遺伝子配列を分析し、ほぼ同様の結果を得ている。

10-3. 集団間交雑種の生殖能力

以上のアロザイムならびにmtDNAの分析に基づくと、自然クローンを含む北海道北部に主に出現するグループAとそれ以外に多く出現するグループBの間には、種レベルの遺伝的な分化がありそうである。そこで、北海道北部（Aグループ）女満別由来の雌（M）と北海道南部（B-1グループ）岩見沢市北村由来の雄（K）との間で集団間交雑を行った。このように作出した雑種第一代MK群を養成し、これらの集団間雑種の生殖能力を調べた。その結果、雑種雌には、多数の2n非還元卵、あるいは多数の1n卵と少数の2n卵を同時に、あるいは倍数性の高い異常な卵を多数産む個体が見られた（Arias-Rodriguezら2009b）。MS分析の結果、非還元2n卵は遺伝的に同一なクローンであった。しかしながら、これらの卵に1n精子を受精した場合、非還元卵は雌性発生を行うことはなく、精子核を取り込み三倍体として発生した。一方、雑種雄においては、ほとんどの精子（あるいは精子様細胞）は接水後も運動を示すものは極わずかであり、受精能力をもつ精子の率は極めて低かった。なお、受精可能であった精子は1nあるいは2nであった（Arias-Rodriguezら投稿準備中）。

以上の結果は、異種間の交雑により非還元卵を産する雑種が生じる他魚種の例（Dawley 1989）と酷似しており、集団間雑種は種間雑種と同様の生殖特性を示した。このことは、交雑に用いた集団が、遺伝的に大きく分岐していることを示すもう一つの証拠である。

11. 外来ドジョウ問題

アロザイム遺伝子頻度、mtDNA塩基配列、集団間交雑の結果は、日本のドジョウ *M. anguillicaudatus* は分類上一種とされているが（斎藤 2002）、遺伝的に大きく分化した複数のグループ（種）を内包する可能性を強く示唆する。筆者らは、中国大陸でさらに調査を進行中であるが、大陸においても日本と同様に複数の遺伝的に大きく分化したグループの存在が認められている（李と荒井2009）。このことは、そもそも「どのグループのドジョウが本来の *M. anguillicaudatus* であるのか？」、あるいは、「どれも *M. anguillicaudatus* ではないのか？」という新たな問題を引き起こす。近年、外来種問題が取り上げられることも多いが、ドジョウに関しては、日本国内のみならず、中国など近隣諸国におけるドジョウ、すなわち、受け入れる側と送り出す側のそれぞれにおいて、ドジョウの分類学的・遺伝学的な整理が必要である。最近、日本の市場などにみられる自然四倍体ドジョウ（4節参照）のmtDNAハプロタイプは、中国中央部湖北省周辺長江流域の二倍体、四倍体ドジョウと極めて近縁であることが明らかになった（李と荒井2009）。すなわち、日本国内の市場で見られる四倍体は中国中央部に由来する。当地では二倍体と四倍体は同所的に分布することから（李ほか2008）、四倍体とともに複数グループの二倍体ドジョウも、最初に自然四倍体の報告があった1979年以前に（Ojima と Takai 1979）、すでに日本に移入されている可能性が高い。以上の事実、ならびにほかの様々な理由から、上記の10-1および10-2節で言及したB-2グループは、もともと中国中央部のドジョウであり、これらが食料、釣り餌、観賞魚の生餌などとして、日本に様々な経路で移入されたものと目下のところ考えている。カラドジョウは要注意外来生物となっている（環境省2009）。しかし、本種の学名として *M. mizolepis* あるいは *P. dabryanus* が与えられ、前者は後者のシノニムと考える見解が多いが、これら二つがおなじ種であるのか、十分な検討はなく、分類学的に未整理のままである（藤田2007）。従って、これらの近縁種も含め、遺伝学的な見地よりさらに検討を進める必要がある。

12. おわりに

ドジョウとの付き合いは20年になろうとする。この間、本種を材料として国内外で開発された種々の生殖・発生工学的手法、DNAマーカーなどの遺伝育種学研究ツールは、より産業的価値の大きい養殖魚の育種技術発展の基礎となっている。ドジョウには、倍数性変異の存在、雌性発生によるクローン生殖、三倍体における雑種発生あるいは非還元卵形成といった特殊な現象

が見られ、一見すると例外的な魚種のようにも見える。しかし、これらの現象は、脊椎動物に共通する減数分裂ならびに配偶子形成機構のわずかな変化に起因しているよう思われる。もし、将来、関与するメカニズムを解明できれば、その統御によりクローン生殖やゲノム倍加を人為的に誘起・制御する新たな育種技術を開発することができるかもしれない。このような考えに基づく育種技術を植物ではアポミキシス技術（apomixis technology）とよび、近年、盛んに研究が行われている（Koltunow と Grossniklaus 2003）。このような技術を陸上の産業動物（家畜、家禽）の育種へ利用することは困難が予想されるが、すでに見てきたように魚類ではその可能性がある。そのためには、ドジョウ野生集団におけるクローン、四倍体、その他の変異体集団は、すべて貴重な遺伝資源であり、これらの実態を解明し、保全することが重要である。

謝辞

本稿で紹介した研究において、特にドジョウのイロハからご指導いただいた鈴木亮広島大元教授、共同研究者の山羽悦郎北大教授、村上賢麻布大教授、李雅娟大連水産学院教授、そして、ドジョウを博士学位論文研究の材料として優れた成果を得た張全啓教授（中国海洋大）、MMR カーン准教授（バングラディシュ農科大）、森島輝博士（日本水産）、藤本貴史博士（北大）、L. アリアス－ロドリゲス博士（UJAT）、吉川廣幸博士（神畑養魚）に深く感謝する。また、修士論文、卒業論文の研究課題としてドジョウの生殖・発生・遺伝・育種研究に取り組んだ広島大学、北海道大学の学生・大学院生（当時）の皆様、様々な面でご協力いただいた多くの方々に厚くお礼申し上げる。本研究の一部は、科学研究費補助金（18380108, 14656073, 13460079, 10660181, 09556044, 03806029）、研究拠点形成費（21世紀ＣＯＥプログラムＫ-02，平成 16-20 年度）、水産庁受託研究費新品種作出基礎技術開発事業（平成 4 -8 年度）および秋山記念生命科学振興財団助成（平成 12 年度）により遂行した。記して謝意を表す。

引用文献

Arai K. 1984. Developmental genetic studies on salmonids: morphogenesis, isozyme phenotype and chromosomes in hybrid embryos. Memoirs of the Faculty of Fisheries, Hokkaido Univ., 31:1-94.

Arai K. 1986. Effect of allotriploidization on development of the hybrids between female chum salmon and male brook trout. Nippon Suisan Gakkaishi, 52: 23-829.

Arai K. 1988. Viability of allotriploids in salmonids. Nippon Suisan Gakkaishi, 54: 1695-1701.

荒井克俊 .1989. 異質倍数体．水産増養殖と染色体操作（鈴木亮編），82-94, 恒星社厚生閣，東京．

荒井克俊 .1997. 染色体操作．魚類のＤＮＡ 分子遺伝学的アプローチ（青木宙・隆島史夫・平野哲也編），32-62, 恒星社厚生閣，東京．

Arai K. 2001. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. Aquaculture, 197:205-228.

Arai K. 2003. Genetics of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*: recent progress and perspective. Folia Biologica (Krakow), 51 supplement: 107-117.

Arai K, Ikeno M, Suzuki R. 1995. Production of androgenetic diploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* using spermatozoa of natural tetraploids. Aquaculture, 137: 131-138.

Arai K, Inamori Y. 1999. Viable hyperdiploid progeny between diploid female and induced triploid male in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Suisanzoshoku, 47: 489-495.

Arai K, Masaoka T, Suzuki R. 1992 Optimum condition of UV ray irradiation for genetic inactivation of loach eggs. Nippon Suisan Gakkaishi, 58: 1197-1201.

Arai K, Matsubara K, Suzuki R. 1991a. Karyotype and erythrocyte size of spontaneous tetraploidy and triploidy in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Nippon Suisan Gakkaishi, 57: 2167-2172.

Arai K, Matsubara K, Suzuki R. 1991b. Chromosomes and developmental potential of progeny of spontaneous tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Nippon Suisan Gakkaishi, 57: 2173-2178.

Arai K, Matsubara K, Suzuki R. 1993. Production of polyploids and viable gynogens using spontaneously occurring tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Aquaculture, 117: 227-235.

Arai K, Morishima K, Momotani S, Kudo N, Zhang Q. 2000. Clonal nature of gynogens induced from spontaneous diploid eggs in the loach. Folia Zoologica, 49(Suppl.1): 31-36.

Arai K, Mukaino M. 1997. Clonal nature of gynogenetically induced progeny of triploid (diploid x tetraploid) loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Pisces:Cobitididae). Journal of Experimental Zoology, 278: 412-420.

Arai K, Mukaino M, 1998. Electrophoretic analysis of the diploid progenies from triploid x diploid crosses in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Pisces: Cobitidae). Journal of Experimental Zoology, 280: 368-374.

荒井克俊・田中敦・楠忠夫・鈴木亮。1994. シマドジョウ，*Cobitis biwae* 2種族とドジョウ，*Misgurnus anguillicaudatus* 間雑種のアロザイム発現．水産増殖，42：585-591.

Arai K, Taniura K, Zhang Q. 1999. Production of second generation progeny of hexaploid loach. Fisheries Science, 65:186-192.

Arias-Rodriguez L, Morishima K, Arai K. 2007. Genetically diversified populations in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* inferred from newly developed microsatellite markers. Molecular Ecology Notes, 7: 82-85.

Arias-Rodriguez L, Morishima K, Arai K. 2009a. Inter-populational difference in microsatellite-centromere map distances in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Ichthyological Research, 56: 126-132.

Arias-Rodriguez L, Yasui GS, Arai K. 2009b. Disruption of normal meiosis in artiicial inter-populational hybrid female *Misgurnus* loach. Genetica, 136: 49-56.

Bogart JP, Elinson RP, Licht LE.1989. Temperature and sperm incorporation in polyploid salamanders. Science, 246: 1032-1034.

Boron A. 2000. Cytogenetic characterization of the loaches of the genera *Sabanejewia*, *Misgurnus* and *Barbatula* (Pisces:Cobitidae) Folia Zoologica, 49(Supple.1): 31-36.

Chao NH, Chen SJ, Liao IC. 1986. Triploidy induced by cold shock in cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. In: The First Asian Fisheries Forum. (Maclean J, Dizon LB, Hosillos LV eds) 101-104. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

Chapman DD, Shivji MS, Louis E, Sommer J, Fletcher H, Prodohl P. 2007. Virgin birth in a hammerhead shark. Biology Letters, 3: 425-427.

Chen SJ, Chao NH, Liao IC. 1986. Diploid gynogenesis induced by cold shock in cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. In: The First Asian Fisheries Forum. (Maclean J, Dizon LB, Hosillos LV eds) 105-108. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

Chourrout D, Chevassus B, Krieg F, Happe A, Burger G, Renard P. 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females—Potential of tetraploid fish. Theoretical and Applied Genetics, 72:193-206.

Dawley RM. 1989. An introduction to unisexual vertebrates. In: Evolution and ecology of unisexual vertebrates. (Dawley RM, Bogart JP, eds), Museum Bull 466, 1-19, The New York State Museum, Albany.

Di Berardino MA. 2001. Animal cloning—the route to new genomics in agriculture and medicine. Differentiation, 68: 67-83.

Di Berardino MA, Mckinnell RG. 2004. The pathway to animal cloning and beyond—Robert Briggs (1911-1983) and Thomas J. King (1921-2000). Journal of Experimental Zoology, 301A: 275-279.

董　仕・大原健一・谷口順彦．1997. 高水温処理によるギンブナ卵へのコイ精子の導入とDNAマーカーによる確認．日本水産学会誌，63：201-206.

董　仕・谷口順彦・石田力三．1999. 茨城県東連津川で見られたドジョウの2型．魚類学雑誌，46：83-90.

Elinson RP, Bogart JP, Licht LE, Lowcock LA. 1992. Gynogenetic mechanisms in polyploid hybrid salamanders. Journal of Experimental Zoology, 264:93-99.

Ene C, Suciu R. 2000. Chromosome study of *Misgurnus fossilis* from Danube delta biosphere reserve, Romania. Folia Biologica, 49(supple.1): 91-95.

Fu H, Wu C. 2001. Nuclear transfer in loach (*Paramisgurnus dabryanus*) by cell to cell electofusion. Aquaculture Research, 32: 267-275.

Fujimoto T, Kataoka T, Otani S, Saito T, Aita T, Yamaha E, Arai K. 2004. Embryonic stages from cleavage to gastrula in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Zoological Science, 21: 747-755.

Fujimoto T, Kataoka T, Sakao S, Saito T, Yamaha E, Arai K. 2006. Developmental stages and germ cell lineage of the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). Zoological Science, 23：977-989.

Fujimoto T, Sakao S, Yamaha E, Arai K. 2007. Evaluation of different doses of UV irradiation to loach eggs for genetic inactivation of the maternal genome. Journal of Experimental Zoology, 307A: 449-462.

Fujimoto T, Yasui GS, Yoshikawa H, Yamaha E, Arai K. 2008. Genetic and reproductive potential of

spermatozoa of diploid and triploid males obtained from interspecific hybridization of *Misgurnus anguilicaudatus* female with *M.mizolepis* male. Journal of Applied Ichthyology, 24：430-437.

藤田朝彦.2007. 本邦で確認されている“カラドジョウ”の学名について. 魚類学雑誌,54：243-244.

Gasaryan KG, Hung NM, Neyfakh AA, Ivanenkov VV. 1979. Nuclear transplantation in teleost *Misgurnus fossilis* L. Nature, 280: 585-587.

Goots TVM, Bruins E, Breeuwer JAJ. 2003. Molecular genetic evidence for parthenogenesis in the Burmese python *Python molurus bivittatus*. Heredity, 90:130-135.

Hitotsumachi S, Sasaki M, Ojima Y. 1969. Comparative karyotype study in several species of Japanese loaches (Pisces, Cobitidae). Japanese Journal of Genetics, 44: 157-161.

Horie S, Taniura K, Umino T, Nakagawa H, Arai K. 2004a. Performance of the progeny of natural tetraploid loaches in long-term communal rearing experiments under a laboratory condition. Suisanzoshoku, 52: 91-98.

Horie S, Taniura K, Umino T, Nakagawa H, Arai K. 2004b. Retarded growth of hexaploid loaches. Suisanzoshoku, 52: 279-286.

稲森由絵・張 全啓・荒井克俊.1999. ドジョウ自然四倍体雌 - 人為三倍体雄の交配に由来する異数体一才魚について. 水産育種, 28: 35-40（1999）

糸納正樹・荒井克俊. 2004. 北海道蕈菜沼産二倍体ドジョウにおける非還元二倍性卵の形成. 水産育種, 33：107-113.

Itono M, Morishima K, Fujimoto T, Bando E, Yamaha E, Arai K. 2006. Premeiotic endomitosis produces diploid eggs in the natural clone loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei:Cobitidae). Journal of Experimental Zoology, 305A: 513-523.

Itono M, Okabayashi N, Morihsima K, Fujimoto T, Yoshikawa H, Yamaha E, Arai K. 2007. Cytological mechanisms of gynogenesis and sperm incorporation in unreduced diploid eggs of the clonal loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei:Cobitidae). Journal of Experimental Zoology, 307A: 35-50.

環境省. 2009. 外来生物法要注意外来生物リスト. 魚類. 環境省ホームページ. http://www.env.go.jp/nature/intro/1outline/caution/list_gyo.html

Khan MMR, Arai K. 2000. Allozyme variation and genetic differentiation of the loach *Misgurnsu anguillicaudatus*. Fisheries Science, 66: 211-222.

木島圭介・荒井克俊・鈴木亮. 1996a. 致死性科間雑種ドジョウ雌×キンギョ雄およびドジョウ雌×タモロコ雄における異質三倍体の誘起. 広島大学生物生産学部紀要, 35：1-12.

木島圭介・荒井克俊・鈴木亮. 1996b. 致死性科間雑種シマドジョウ雌×コイ雄およびドジョウ雌×コイ雄における異質三倍体と五倍体の誘起. 広島大学生物生産学部紀要, 35：13-26.

Kim DS, Jo JY, Lee TY. 1994. Induction of triploidy in mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and its effect on gonad development and growth. Aquaculture, 120: 263-270.

Kim DS, Nam YK, Jo JY. 1997. Effects of oestradiol-17 β immersion treatments on sex reversal of mud loach, *Misgurnus mizolepis* (Gunther). Aquaculture Research, 28: 941-946.

Kim DS, NamYK, Park IS. 1995. Survival and karyological analysis of reciprocal diploid and triploid hybrids between mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). Aquaculture 135: 257-265.

Kimura M. 1978. Protein polymorphism and geographic variation in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Animal Blood Groups and Biochemical Genetics, 9: 13-20.

Kobayashi H. 1971. A cytological study on gynogenesis of the triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfii*). Zoological Magazine. 80: 316-322.

Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Nagahama Y. 1998. A novel stage-specific antigen is expressed only in early stages of spermatogonia in Japanese eel, *Anguilla japonica* testis. Molecular Reproduction and Development 51: 355-361.

小出水規行. 2009. ＤＮＡ解析からみた淡水魚とその保全. 春の小川の淡水魚 その生息場と保全 (水谷正一・森淳編著)121-148. 学報社. 東京.

Koltunow AM, Grossniklaus U. 2003. Apomixis: A developmental perspective. Annual Review of Plant Biology, 54: 547-574.

Kopeika J, Kopeika E, Zhang T, Rawson DM, Holt WV. 2004. Effect of DNA repair inhibitor 3-Aminobenzamide on genetic stability of loach (*Misgurnus fossilis*) embryos derived from

cryopreserved sperm. Theriogenology 61: 1661-1673.

Kostmarova AA. 1991. The loach *Misgurnus fossilis*. In: Animal species for developmental studies: vertebrates (Dettraff TA, Vassetzky SG eds), 125-144, Plenum Publishing , New York.

Kusunoki T, Arai K, Suzuki R. 1994. Viability and karyotypes of interracial and intergeneric hybrids in loach species. Fisheries Science, 60: 415-422.

Letting DL, Fecteau DA, Haws TF, Reed SL, Hopkins RO, Coleman RD, Goddard KA. 1999. Unexpected ratio of allozyme expression in diploid and triploid individuals of the clonal hybrid fish *Phoxinus eos-neogaeus*. Journal of Experimental Zoology,. 284: 663-674.

李雅娟・荒井克俊 .2009. 外来倍数体ドジョウの起源 . 2009（平成 21）年度日本水産学会春季大会 , 要旨集 p.88、東京海洋大学 .

李雅娟・印傑・王嘉博・袁旭・魏傑・孫効文・荒井克俊 . 2008. 中国における倍数体ドジョウの分布に関する研究. 日本水産学会誌， 74(2)：177-182.

Li K, Li Y, Zhou D. 1983. A comparative study of the karyotypes in two species of mud loaches. Zoological Research, 4: 75-81.

間田康史・宮川真紀子・林　大雅・海野徹也・荒井克俊 .2001. 雌性発生ギンブナにおける精子核導入による四倍体の作出 . 水産増殖， 49: 103-112.

Masaoka T, Arai K, Suzuki R. 1995. Production of andorogenetic diploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* from UV irradiated eggs by suppression of the first cleavage. Fisheries Science, 61: 716-717.

Matsubara K, Arai K, Suzuki R. 1995. Survival potential and chromosomes of progeny of triploid and pentaploid females in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Aquaculture, 131:37-48.

Momotani S, Morishima K, Zhang Q, Arai K. 2002. Genetic analyses of the progeny of triploid gynogens induced from unreduced eggs of triploid (diploid female x tetraploid male) loach. Aquaculture, 204: 311-322.

Minamori S. 1953. Physiological isolation in cobitidae II. Inviability of hybrids between the mud loach and some local races of spinous loaches. Journal of Science of the Hiroshima University, Ser. B, Div. 1, 14:126-149.

皆森寿美夫 . 1956. ドジョウ類における生理的隔離の諸機構 . 集団遺伝学 (駒井卓・酒井寛一編), 163-167, 培風館，東京 .

森島輝・荒井克俊 . 2004. 雌性発生子孫のマイクロサテライトマーカー分析による新潟県広神村産ドジョウの非還元卵形成機構の推定 . 水産育種 , 34：27-30.

森島　輝・工藤紀子・荒井克俊 .1999. ＤＮＡフィンガープリント法によるドジョウ三倍体・二倍体間の遺伝的類似性 . 水産育種， 28: 113-120（1999）

Morishima K, Horie S, Yamaha E, Arai K. 2002. A cryptic clonal line of the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) evidenced by induced gynogenesis, interspecific hybridization, microsatellite genotyping and multilocus DNA fingerprinting. Zoological Science, 19: 565-575.

Morishima K, Nakamura-Shiokawa Y, Bando E, Li YJ, Boron A, Khan MMR, Arai K. 2008a. Cryptic clonal lineages and genetic diversity in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei:Cobitidae) inferred from mitochondrial DNA analyses. Genetica, 132: 159-171.

Morishima K, Nakayama I, Arai K. 2001. microsatellite － centromere mapping in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Genetica, 111:59-69.

Morishima K, Nakayama I, Arai K. 2008b. Genetic linkage map of the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei:Cobitidae). Genetica, 132: 227-241.

Morishima K, Oshima K, Horie S, Fujimoto T, Yamaha E, Arai K. 2004. Clonal diploid sperm of the diploid-triploid mosaic loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei:Cobitidae). Journal of Experimental Zoology, 301A: 502-511.

Morishima K, Yoshikawa H, Arai K. 2008c. Meiotic hybridogenesis in triploid *Misgurnus* loach derived from a clonal lineage. Heredity, 100: 581-586.

Nakagawa M, Kobayashi T, Ueno K. 2002. Production of germline chimera in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) and proposal of new method for preservation of endangered fish species. Journal of Experimental Zoology, 293: 624-631.

Nakagawa M, Ueno K. 2003. Pigmentation in chimeric loach produced by cell transplantation with genetically pigmented and orange embryos. Folia biologica (Krakow), 51(Suppl.): 119-123.

Nam YK. 2006. Tailoring fish genome and transgenic manipulation as exemplified by mud loach (*Misgurnus mizolepis*). Fish Genetics and Breeding Science, 35:113-121.

Nam YK, ChoYS, ChoHJ, Noh JK, Kim DS. 2002. Accelerated growth performance and stable germ-line transmission in androgenetically derived homozygous transgenic mud loach, *Misgurnus mizolepis*. Aquaculture, 209: 257-270.

Nam YK, Cho HJ, Cho YS, Noh JK, Kim CG, Kim DS. 2001a. Accelerated growth, gigantism and likely sterility in autotransgenic triploid mud loach *Misgurnus mizolepis*. Journal of the World Aquaculture Society, 32: 353-363.

Nam YK, Cho YS, Kim DS. 2000b. Isogenic homozygous transgenic fish induced by parthenogenesis. Transgenic Research, 9: 463-469.

Nam YK, Cho YS, Chang YJ, Jo Jy, Kim DS. 2000a. Generation of transgenic homozygous line carrying the CAT gene in mud loach *Misgurnus mizolepis*. Fisheries Science, 66: 58-62.

Nam YK, Choi GC, Kim DS. 2004. An efficient method for blocking the first mitotic cleavage of fish zygote using combined thermal treatment, exemplified by mud loach (*Misgurnus mizolepis*). Theriogenology, 61: 993-945.

Nam YK, Choi GC, Park DJ, Kim DS. 2001b. Survival and growth of induced tetraploid mud loach. Aquaculture International, 9: 6-11.

Nam YK, Jeong CH, Kim DS. 1998. A simple clearing method for improved visualization of lacZ expression in fish larvae. Transgenic Research 7: 397-399.

Nam YK, Kim DS. 2004. Ploidy status of progeny from the crosses between tetraploid males and diploid females in mud loach (*Misgurnus mizolepis*). Aquaculture, 236: 575-582.

Nam YK, Kim BS, Lee SJ, Park IS, Nam YK. 2004. Comparative analysis of inherited patterns of the transgene in transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis* line carrying CAT reporter gene. Fisheries Science, 70:201-210.

Nam YK, Noh CH, Kim DS. 1998. Effects of 17 α -methyltestosterone immersion treatments on sex reversal of mud loach, *Misgurnus mizolepis*. Fisheries Science, 64: 914-917.

Nam YK, Noh C, Kim DS. 1999. Transmission and expression of an integrated reporter construct in three generations of transgenic mud loach (*Misgurnus mizolepis*). Aquaculture 172: 229-245.

Nam YK, Noh JK, Cho Y, Cho HJ, Cho KN, Kim CG, Kim DS. 2001a. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach (*Misgurnus mizolepis*). Transgenic Research, 10: 353-362.

Nam YK, Park JE, Kim KK, Kim DS. 2003. A rapid and simple PCR-based method for analysis of transgeneic fish using a restricted amount of fin tissue. Transgenic Research, 12: 523-525.

Nomura T, Arai K, Hayashi T, Suzuki R. 1998. Effect of temperature on sex ratios of normal and gynogenetic diploid loach. Fisheries Science, 64:753-758.

Ojima Y, Takai A. 1979. The occurrence of spontaneous polyploidy in the Japanese common loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Proceedings of Japan Academy, 55B: 487-491.

Oshima K, Morishima K, Yamaha E, Arai K. 2005. Reproductive capacity of triploid loaches obtained from Hokkaido island, Japan. Ichthyological Research, 52: 1-8.

Otani S, Iwai T, Nakahata S, Sakai C, Yamashita M. 2009. Artificial fertilization by intracytoplasmic sperm injection in a teleost fish, the medaka (*Oryzias latipes*). Biology of Reproduction, 80: 175-183.

Park IS, Kim YS, Kim DS. 2006. Growth performance, morphometric traits and gonad development of induced reciprocal diploid and triploid hybrids between the mud loach (*Misgurnus mizolepis* Gunther) and cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus* Cantor). Aquculture Research, 37: 1246-1253.

Poleo GA, Denniston RS, Reggio BC, Godke RA, Tiersch TR. 2001. Fertilization of eggs of zebrafish, *Danio rerio*, by intracytoplasmic sperm injection. Biology of Reproduction, 65: 961-966.

Poleo GA, Godke RR, Tiersch TR. 2005. Intracytoplasmic sperm injection using cryopreserved, fixed and freeze-dried sperm in eggs of Nile tilapia. Marine Biotechnology, 7: 104-111.

Rabova M, Rab P, Ozouf-Costaz C. 2001. Extensive polymorphism and chromosomal characteristics of ribosoamal DNA in a loach fish, *Cobitis vardarensis* (Ostariophysi, Cobitidae) detected by different banding techniques and fluorescence in situ hybridization (FISH). Genetica, 111:413-422.

Raicu P, Taisescu E. 1972. *Misgurnus fossilis*, a tetraploid

fish species. Journal of Heredity, 63:92-94.

斎藤憲次　2002.　ドジョウ．日本の淡水魚 (川那部浩哉・水野信彦・細谷和海編).　382-385, 山と渓谷社．東京 .

Saito T, Goto-Kazeto R, Arai K, Yamaha E. 2008. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. Biology of Reproduction, 78:159-165.

斉藤大樹・山羽悦郎．2004.　硬骨魚類における借腹生産研究の現状と方向性．動物遺伝育種，31：47-55.

斉藤大樹・山羽悦郎．2006.　魚類の借腹生産技術の開発と育種への応用．水産育種 35：123-134.

Suwa M, Arai K, Suzuki R. 1994. Suppression of the first cleavage and cytogenetic studies on the gynogenetic loach. Fisheries Science, 60: 673-681

鈴木亮．1976.　ドジョウ卵の排卵後における母体内滞留時間と発生能力 . 水産増殖，3：93-99.

Suzuki R, Nakanishi T, Oshiro T. 1985a. Survival, growth and sterility of induced triploids in the cyprinid loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries, 51: 889-894.

Suzuki R, Oshiro T, Nakanishi T. 1985b. Survival, growth and fertility of gynogenetic diploids induced in the cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Aquaculture, 48:45-55.

鈴木亮・山口元吉．1975.　ドジョウの採卵におけるホルモンの効果と水温 . 水産増殖，22：135-139.

Takai A, Ojima Y. 1983. Tetraploidy appeared in the offspring of triploid ginbuna, *Carassius auratus langsdorfii* (Cyprinidae, Pisces). Proceedings.of Japan Academy, 59B:347-350.

Tanaka D, Takahashi A, Ueno K. 2009. Morphometric characteristics and reproductive capacity of nuclear transplants derived from embryonic cells of loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Journal of Experimental Zoology, 309A:311: 11-19..

Tanaka M, Kimura S, Fujimoto T, Sakao S, Yamaha E, Arai K. 2003. Spontaneous mosaicism occurred in normally fertilized and gynogenetically induced progeny of the kokanee salmon, *Oncorhynchus nerka*. Fisheries Science, 69: 174-178.

谷浦興・堀江晋・海野徹也・中川平介・荒井克俊 .2002. ドジョウ自然四倍体子孫の生残、成長、成熟およびその他の特性に関する研究．水産育種 ,32：109-120.

Ueno K, Senou H, Kim IS. 1985. A chromosome study of five species of Korean cobitid fish. Japanese Journal of Genetics, 60: 539-544.

Vrijenhoek RC, Dawley RM, Cole GJ, Bogart JP. 1989. A list of the known unisexual vertebrates. In: Evolution and ecology of unisexual vertebrates (Dawley RM, Bogart JP, eds), Museum Bull 466, 19-23, The New York State museum, Albany..

Watts PC, Buley KR, Sanderson S, Boardman W, Ciofi C, Gibson R. 2006. Parthenogenesis in Komodo dragon? Nature, 444:1021-1022.

山羽悦郎．2002.　魚類における借腹生産．海洋と生物，139：126-131.

山羽悦郎・風間真紀・大谷哲・長井輝美 .1999.　生殖細胞の起源．月刊海洋 , 31：266-271.

Yamaha E, Murakami M, Hada K, Otani S, Fujimoto T, Tanaka M, Sakao S, Kimura S, Sato S, Arai K. 2003. Recovery of fertility in male hybrids of a cross between goldfish and common carp by transplantation of PGC (primordial germ cell) － containing graft. Genetica, 119：121-131.

Yamaha E, Saito T, Goto-Kazeto R, Arai K. 2007. Developmental biotechnology for aquaculture, with special reference to surrogate production in teleost fishes. Journal of Sea Research, 58: 8-22.

Yamaha E, Kazama-Wakabayashi M, Otani S, T. Fujimoto T, Arai K. 2001. Germ-line chimera by blastoderm transplantation between diploid goldfish and triploid crucian carp. Genetica, 111: 227-236.

Yamaki M, Kawakami K, Taniura K, Arai K. 1999. Live haploid-diploid mosaic charr *Salvelinus leucomaenis*. Fisheries Science, 65: 736-741.

山木　勝・佐藤治平・谷浦　興・荒井克俊 .1999. 二倍体 - 四倍体モザイクアマゴの子孫．日本水産学会誌 , 65,　1084-1089.

Yamaki M, Yamaguchi S, Arai K. 2006. Mottled coloration of haploid-diploid and diploid-triploid mosaic amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae*. Fisheries Science, 72：157-165.

Yamashita M, Onozato H, Nakanishi T, Nagahama Y. 1990. Breakdown of the sperm nuclear envelope is a prerequisite for male pronucleus formation: direct evidence from the gynogenetic crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*. Developmental Biology, 137: 155-

160.

Yan SY. 1989. The nucleo-cytoplasmic interactions as revealed by nuclear transplantation in fish. In Cytoplasmic Organaization Systems (Malacinski GM, ed.), 61-81, McGraw-Hill Pub.Co., New York.

Yan SY, Tu M, Yang H, Mao Z, Zhao Z, Fu L, Li G, Huang G, Li S, Jin G, Ma L, Lin L, Xia S, Yu L. 1990. Develomental incompatibility between cell nucleus and cytoplasm as revealed by nuclear transplantation experiments in teleost of different families and orders. International Journal of Developmental Biology, 34: 255-265.

Yang C, Cao L, Wang W, Yang Y, Abbas K, Yan B, Wang H, Su L, Sun Y, Wang H. 2009. Comparative and evolutionary analysis in natural diploid and tetraploid weather loach *Misgurnus anguillicaudatus* based on cytochrome b sequence data in central China. Environmental Biology of Fishes, in press.

Yasui GS, Araias-Rodriguez L, Fujimoto T, Arai K. 2008. Simple and inexpensive method for cryopreservation of fish sperm combining straw and powdered dry ice. CryoLetters, 29: 383-390.

Yasui GS, Arias-Rodriguez L, Fujimoto T, Arai K. 2009. A sperm cryopreservation protocol for the loach *Misgurnus anguillicaudatus* and its applicability for other species. Animal Reproduction Science, in press.

Yoshikawa H, Morishima K, Kusuda S, Yamaha E, Arai K. 2007a. Diploid sperm produced by artificially sex-reversed clone loaches. Journal of Experimental Zoology, 307A: 75-83.

Yoshikawa H, Morishima K, Fujimoto T, Yamaha E, Arai K. 2007b. Simultaneous formation of haploid, diploid and triploid eggs in diploid-triploid mosaic loaches. Journal of Fish Biology, 71(Suppl. B): 250-263.

Yoshikawa H, Morishima K, Fujimoto T, Arias-Rodriguez L, Yamaha E, Arai K. 2008a. Ploidy manipulation using diploid sperm in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus* : a review. Journal of Applied Ichthyology, 24: 410-414.

Yoshikawa H, Morishima K, Fujimoto T, Saito T, Kobayashi T, Yamaha E, Arai K. 2009. Chromosome doubling in early spermatogonia produces diploid spermatozoa in a natural clonal fish. Biology of Reproduction, 80:973-979.

You C, Yu X, Tan D, Tong J. 2008. Gynogenesis and sex determination in large-scale loach *Paramisgurnus dabryanus* (Sauvage). Aquaculture International, 16: 203-214.

Zhang Q, Arai K. 1996. Flow cytometry for DNA contents of somatic cells and spermatozoa in the progeny of natural tetraploid loach. Fisheries Science, 62: 870-877.

Zhang Q, Arai K. 1999a. Distribution and reproductive capacity of natural triploid individuals and occurrence of unreduced eggs as a cause of polyploidization in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Ichthyological Research, 46: 153-161

Zhang Q, Arai K. 1999b. Aberrant meioses and viable aneuploid progeny of induced triploid loach (*Misgurnsus anguillicaudatus*) when crossed to natural tetraploids. Aquaculture, 175:63-76.

Zhang Q, Arai K. 2003. Extensive karyotype variation in somatic and meiotic cells of the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Pisces: Cobitidae). Folia Zoologica, 52:423-429.

Zhang Q, Arai K, Yamashita M. 1998. Cytogenetic mechanisms for triploid and haploid egg formation in the triploid loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Journal of Experimental Zoology, 281: 608-619

Zhang Q, Hanada K, Arai K. 2002. Aberrant meioses in diploid and triploid progeny of gynogenetic diploids produced from eggs of natural tetraploid loach. Folia Zoologica, 51: 165-176.

Zhu Z, Xu K, Li G, Xie Y, He L. 1986. Biological effects of human growth hormone gene microinjected into the fertilized eggs of loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Cantor). Kexue Tongbao, 31: 988-990 (In Chinese).