



Title	低温処理によって誘起した家蚕倍数体の諸性状に関する研究
Author(s)	佐原, 健
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第5158号
Issue Date	1997-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3122433
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51436
Type	doctoral thesis
File Information	000000307624.pdf



低温処理により誘起した家蚕倍数体の
諸性状に関する研究

佐原 健

①

低温処理により誘起した家蚕倍数体の
諸性状に関する研究

佐原 健

謝辞

本稿を草するにあたって、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、本論文の御校閲と御助言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助教授中田徹博士、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農学部遺伝子資源研究センター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。

低温処理により誘起した家蚕倍数体の諸性状に関する研究

目次

第 I 章	緒言	---	1
第 II 章	研究史	---	3
第 III 章	家蚕4倍体雌における性染色体対合の選択性		
第1節	次世代3倍体蚕を用いた配偶子形成の解析	---	5
第2節	次世代3倍体蚕を用いた性染色体対合の解析	---	12
第3節	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	---	18
第4節	限性系統の卵母細胞染色体における非相称な対合子の観察	---	22
第5節	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	---	27
第 IV 章	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の解析		
第1節	2種類の3倍体雌における卵サイズの比較	---	33
第2節	卵巣移植による卵サイズ決定遺伝子の発現機構の解析	---	36
第3節	卵巣移植ならびに片側卵巣摘出による卵サイズと卵数の関係について	---	44
第 V 章	卵殻紋様の大きさを決定する遺伝子		
第1節	様々な倍数体雌における卵殻紋様サイズの比較	---	58
第2節	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	---	68

第VI章	4倍体雄蚕における人為的処理による妊性獲得	
第1節	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	--- 75
第2節	絶食処理時間と受精率の関係	--- 85
第3節	4倍体雌雄相互交配により得られたF ₁ 4倍体蚕の性状	--- 92
第VII章	総合考察	--- 106
第VIII章	要約	--- 111
第IX章	英文要約	--- 114
第X章	文献	--- 117

第 I 章 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、生産の安定と生産性の向上をもたらすこととなった雑種強勢(一代雑種)の導入の検討(外山, 1906)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、黄血遺伝子によるメンデル遺伝の再発見(Toyama, 1906)を行うといった遺伝的研究も進み、多数の遺伝子突然変異系統が蓄積され、実験動物としての地位も確立された。また、個体サイズが大きく昆虫ホルモンの解析(Fukuda, 1944)など生理化学的研究や、染色体の同定(Kawaguchi, 1938)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(Suzuki and Brown, 1972)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。

植物の倍数体では細胞サイズが大型化することが、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、多くの作物において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、動物においては人為的な誘起法の開発はカエル(Kawamura, 1939)、サンショウウオ(Fankhauser, 1939)、イモリ(Fankhauser and Griffiths, 1939)およびコイ(Makino and Ojima, 1943)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(川口, 1933; 橋本, 1934; 広部, 1939; 室賀, 1947; Astaurov, 1957; Tazima and Onuma, 1967; 滝沢・玉沢, 1968; Kawamura, 1981)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(1968)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モザイク個体が同時に誘起可能である(玉沢, 1977)。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 (1979a, 1983)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、Astaurov(1969)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等の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Ⅲ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Ⅳ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。また、この遺伝子を用いて1個体に形成される卵数と卵サイズの関係を検討した。第Ⅴ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。

第Ⅱ章 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(Tanaka, 1916)。さらに田中(1939)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示し、W染色体が存在しない場合に雄が生ずることを示唆した。以来、性決定を支配している遺伝子の遺伝学的解析を行うために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)(田島, 1941)の利用により、W染色体上に雌を決定する遺伝子(*Fem*)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(田島, 1948; Tazima, 1954)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(廣川, 1995)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(1932)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(1933)により高温処理法が確立された他、コルヒチン処理(広部, 1939)、低温接触(室賀, 1947; 橋本, 1957)、温湯処理(Astaurov, 1957)ならびに炭酸ガス処理(Tazima and Onuma, 1967)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(橋本, 1933)、田島(1944)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(橋本, 1933; 川口, 1934)、激しい議論が交わされた(橋本, 1934, 1935, 1941; 川口, 1936 a, 1938; 佐藤, 1937; 田島, 1944; Ito, 1977)ものの適当なマーカー遺伝子が用いられなかったことと、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。しかしながら近年、Kawamura(1988)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。

遠心処理法、高温処理法、コルヒチン処理法、低温接触法、温湯処理法ならび

に炭酸ガス処理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(川口, 1936b, 1937; Kawaguchi, 1938)。その後、Astaurov(1967)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倍体と変化がないことが示された。形態的特徴としては3倍体雄の不妊と雌の不正形卵産下が認められ、3倍性の確認に用いられてきた。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示された(Tazima, 1964)。しかしながら、4倍体の効率的な誘起法は開発されていなかったことと、繭質の飛躍的な向上が認められないことが明らかになり(川口, 1937)、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た。

低温処理によって家蚕4倍体が効率的に誘起可能である(滝沢・玉沢, 1968)ことが、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Kawamura(1979b)の研究以降であった。低温処理では、6倍体と8倍体も誘起可能であり、細胞遺伝学的な研究が進展した(Kawamura, 1981)。特に、4倍体雌雄の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(Rasmussen and Holm, 1979; Rasmussen, 1987)。また、4倍体と6倍体の精母細胞の第一分裂の観察から、性染色体特異的な異常分裂が示唆されている(Kawamura, 1994)。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(Katsuno, 1984a)。

家蚕の性決定は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、Kawamura(1988)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求は、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、昆虫の正常な精子形成の検討にも重要である倍数体蚕の精子形成の研究は、Katsuno and Tamazawa(1979)の精子形成の形態的異常に関する研究と廣川(1992)により3倍体雄にごくわずかに妊性があるケースが報告されているだけで依然不明の点が多く残されている。

第Ⅲ章 家蚕4倍体雌における性染色体対合の選択性

第1節 次世代3倍体蚕を用いた配偶子形成の解析

序論

家蚕の性はW染色体上に座位する雌決定遺伝子 (*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 (田島, 1944; Tazima, 1954)。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 (川口, 1934) とする説と、Z、ZWおよびZWWが形成されるとする (橋本, 1933; 田島, 1944) 2つの説が提出された。

本節では、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を明らかにすることを目的とした。

材料および方法

a) 4倍体の誘起: *re9*(黒縞、赤卵: p^S/p^S , *relre*)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の低温に24時間放置した(滝沢・玉沢, 1968; Kawamura, 1978)。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(Kawamura, 1979b)。

b) 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, p Y/p Y*)およびEq(長節、姫蚕、赤卵、かすり：*ele, p/p, relre, q/q*)の4品種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。

c) 倍数性の確認：rw4n雌に伴性劣性遺伝子を持つ4品種の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時間の精巣をカルノア液(MA; メタノール3 : 酢酸1)で固定し、Takagi(1971)の方法に従って染色体標本を作製した。

d) 伴性劣性形質個体の判別と雌雄鑑別：RWs3nではKawamura(1988)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日目に油個体としてd油形質個体を判別した。RWNo3nならびにRWeq3nでは、5齢24時間に伴性油形質ならびに長節形質を判別した。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。

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(Fig. 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3倍性が確認された。

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。

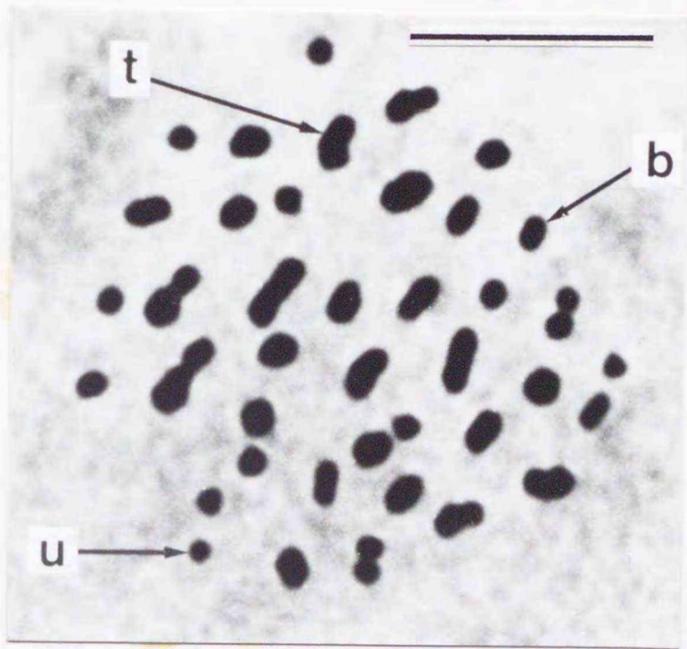


Fig. 1. Chromosomes of the primary spermatocyte of a triploid male.
Bar: $10\ \mu\text{m}$. u: univalent, b: bivalent, t: trivalent.

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 (Fig. 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Table 1に示した。自然孵化できなかつた個体については、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個体は存在しなかつたが、RWs3nのZWW個体はいづ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。

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(1934)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、橋本(1934)は高温処理によってd油遺伝子(od)をヘテロに持つ4倍体雌(ZodZ+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(1934)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(1944)は限性セーブル・形蚕で伴性油遺伝子(os)とod遺伝子を持つ4倍体雌(ZosZodWpSa +pWpSa +p)を高温処理によって誘発し、この雌に伴性油蚕雄(ZosZos)もしくはd油蚕雄(ZodZod)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(1934)の仮説を支持した。

本実験において、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

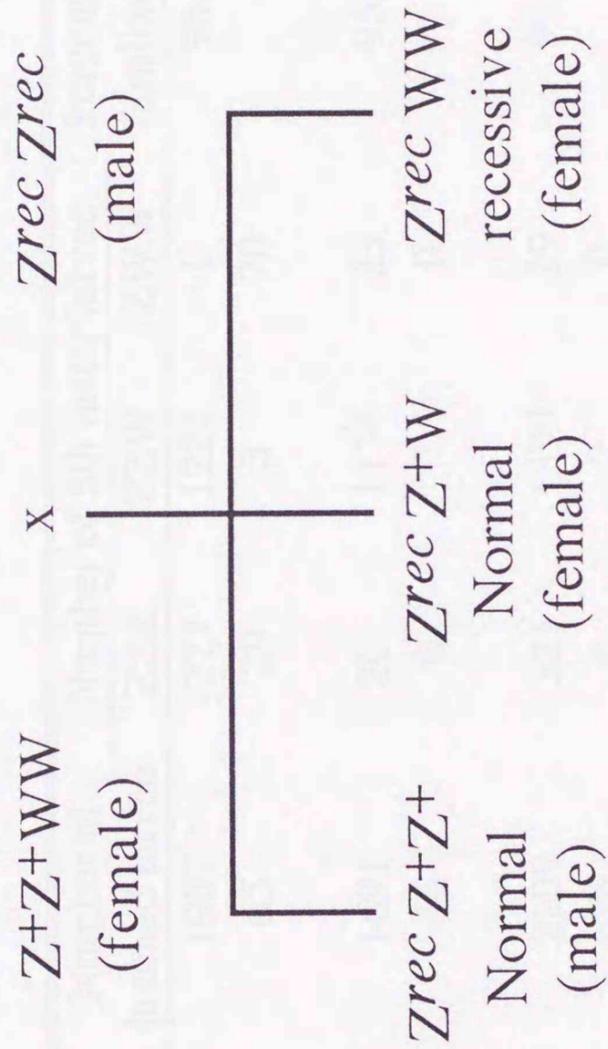


Fig. 2. Sex chromosome constitution revealed by morphological character and their sex of F₁ triploids, rec : sex-linked recessive gene, +: allelic dominant gene.

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

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本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(Fig.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(1934)を支持するもので、橋本(1934)ならびに田島(1944)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ことが考えられる。

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(Table 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%とほとんど変わらなかった。RWs3n区の受精率と孵化率が非常に高いこと(Table 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つた。しかしながら、人為的に卵殻を剥くことにより正常な生育を示した(Table 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。

第2節 次世代3倍体蚕を用いた性染色体対合の解析

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動原体である。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(Rasmussen, 1987; Kawamura, 1994)。しかしながら、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(Rasmussen, 1977; Kawamura *et al.*, 1994)ことから、性染色体の対合子は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。これら性染色体対合は両極へと分離し、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ことが考えられる。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。

本節においては前節と同様の方法で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を求め、その分離比により性染色体対合の解析を行った。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。

材料および方法

a) 供試家蚕品種：本節の4倍体誘起用の母体には、正常蚕品種のre9(黒縞、赤卵： p^S/p^S , rel/re)、Eq(姫蚕、赤卵、かすり： p/p , rel/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) $+od$ W $p^{Sa}+p$, $odlod$, p/p)、Cre(限性セーブル・形蚕、赤卵：T(W:2) $p^{Sa}+p$, p/p , rel/re)、Ze(限性虎蚕：T(W:3)Ze, p/p)およびSy(限性黄繭：T(W:2)Y, $p+Y/p+Y$)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。

b) 倍数体の誘起：上記蚕品種を用いて前節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 x Tw1)、Ct4n(Cre x Tw1)、Zt4n(Ze x Tw1)およびSyt4n(Sy x Tw1)とした。正常3品種ならびに限性4品種の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。

c) 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前節と同様、Kawamura(1988)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. Fig. 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・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。

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Table 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(Table 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。

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

Group (N)	Number of individuals			fertility	survival	sex ratio
	ZZZ	ZZW	ZWW	(%)	rate(%)	♀ / ♂
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

Table 3. The ratio of gametes and calculated pairing ratio of sex 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

考察

前節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配偶子は品種間差が認められたものの非常に少なかった(Table 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(Table 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%)よりも明らかに低かった。

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。Table 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(Rasmussen, 1977)。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(新野ら, 1987; 田島, 1944; Tazima, 1964)。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(Tazima, 1964)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(Table 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。

第3節 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

序論

前節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(ZZWW)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。本節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品種である場合に雌の性染色体対合の選択性を検討した。

材料および方法

- a) 供試家蚕品種：本節では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。
- b) 倍数体の誘起：4倍体の誘起には、ほまれxほまれ(Homo type)ならびにほまれx Tw1(Hetero type)用いて本章第1節と同様の低温処理を行った。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。
- c) 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第2節の限性系統と同様にZWWを伴性赤蟻形質により判定し、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雄として行った。
- d) 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、前節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。

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Homo type (HHs3n)で平均231.4個に対してHetero type (Hws3n)で374.4個と大きく異なった。Table 4ならびにTable 5に示したように、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、Hetero type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から数個体しか存在せず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Homo typeで1:2.60とランダムな対合(2:1)の約5倍の選択性を示した。Hetero typeでは1:7.82でHomo type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。

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ように変化するのかを明らかにするため、様々な限性系統を用いて同品種内ならびに異品種間の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。Homo typeにおいては死亡率がやや高かったため対合割合にばらつきが認められたものの、平均の対合比は(ZW+ZW):(ZZ+WW)=1:2.60とランダムな対合が行われた場合の理論値(2:1)に近い値を示したのに対し、Hetero typeでは1:7.82と大きく異なった。

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。

Table 4. The number of triploid individuals from the cross between homotype HOMARE 4n females and *sch* 2n 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

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

第4節 限性系統の卵母細胞染色体における非相称な対合子の観察

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の対合子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が転座した限性系統が数種類存在する。Kawamura and Niino(1991)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。本節では、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第2節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。

材料と方法

a) 供試家蚕品種：本節の4倍体誘起用の雌にはZWII(限性非d油・形蚕： $T(Z:W:2)+od\ W\ p^{Sa}+p, od/od, p/p$)、Cre(限性セーブル・形蚕、赤卵： $T(W:2)p^{Sa}+p, p/p, rel/re$)、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、対照区として正常蚕品種のre9(黒縞、赤卵： $p^S/p^S, rel/re$)雌とTw1雄の交雑個体を用いた。

b) 卵母細胞染色体標本の作製：それぞれの雌個体を通常飼育し、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Takagi(1971)の方法に従って作成した。

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て、限性系統には非相称の染色体対が1つ存在した(Fig. 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(Fig. 4)。

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(Fig. 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(新野ら, 1987; 田島, 1944)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(Tazima, 1964)、ZWIIでは第2とZ染色体がそれぞれの末端に転座した(Tazima, 1964)ことが遺伝的な調査により明らかにされている(Fig. 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、WII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。

本章第2節ならびに第3節の結果より、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対合子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

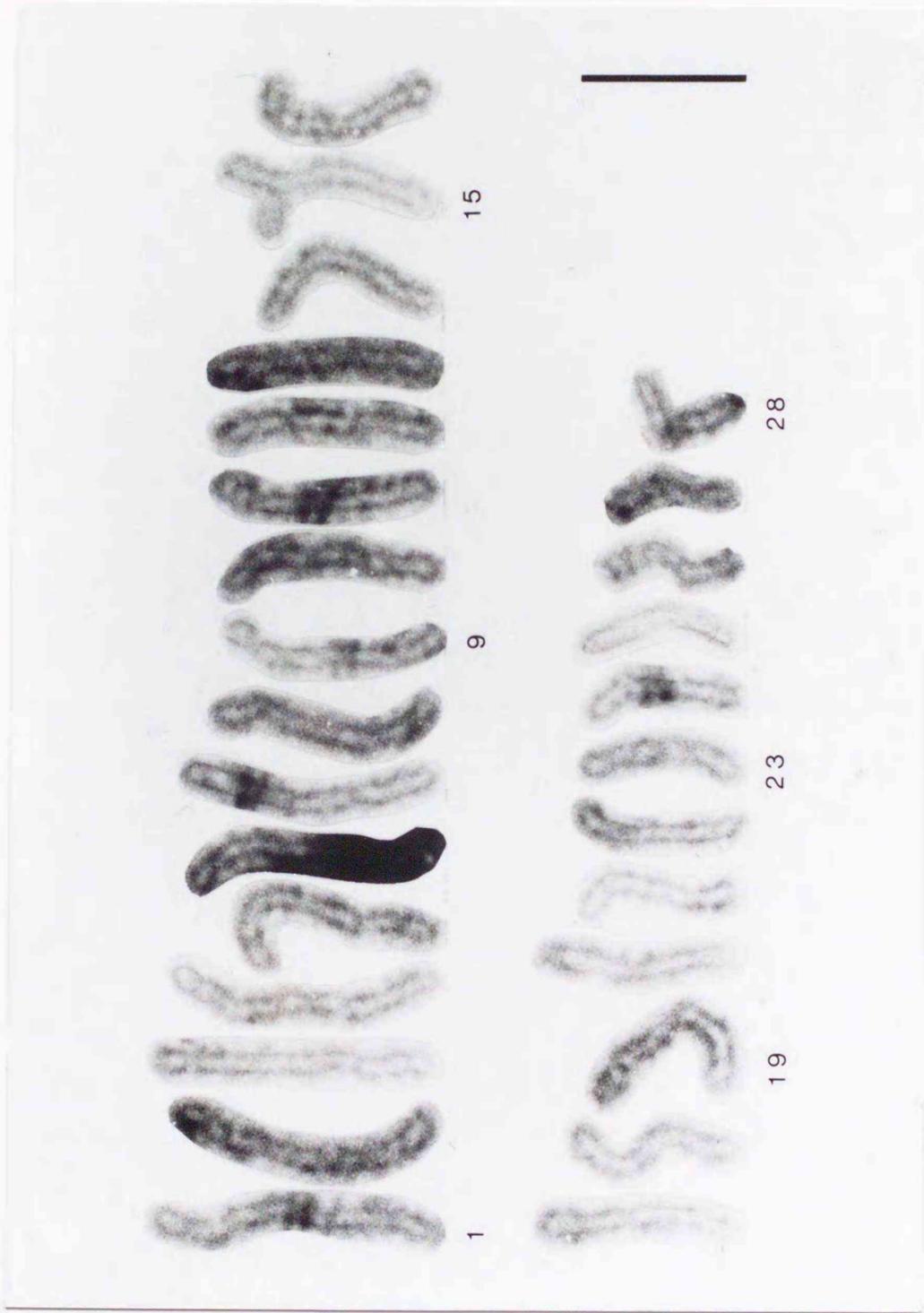


Fig. 3. 28 pachytene bivalents of an oocyte in sex-limited strain arranged in order of length.

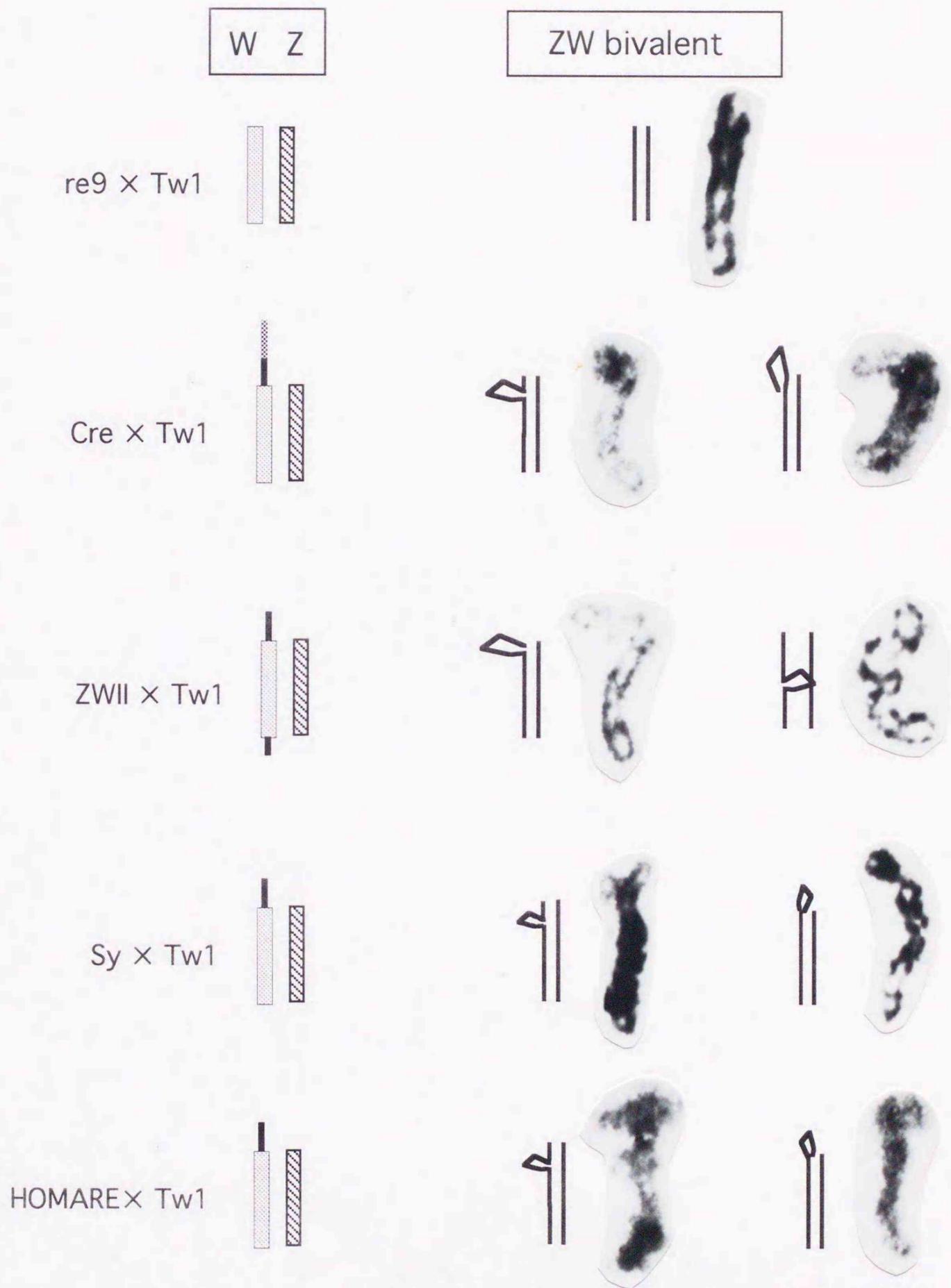


Fig. 4. Patterns of synapsis of Z-W bivalents in control and four kinds of sex-limited strains.

染色体がWに付加している Cre(田島,1944)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す可能性を示唆している。

第5節 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

序論

本章第2節ならびに第3節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。

前節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合子は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ならびに異品種間交配型の倍化型4倍体の性染色体の対合割合を調査した。

材料および方法

- a) 供試家蚕品種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})雌雄を、異品種交配型には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(滝沢・玉沢, 1968; Kawamura, 1978)に従って倍化型4倍体(Sy4nならびにSyr4n)を誘起した。
- b) 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巢を用いて、前節と同様にTakagi(1971)の方法に従って標本作製を行った。

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(Fig. 5)と全てが相称の染色体対であるもの(Fig. 6)が観察された。染色体対をその長さで大まかな形から2対ずつ並べたところ、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(Fig. 5)。一方、全て

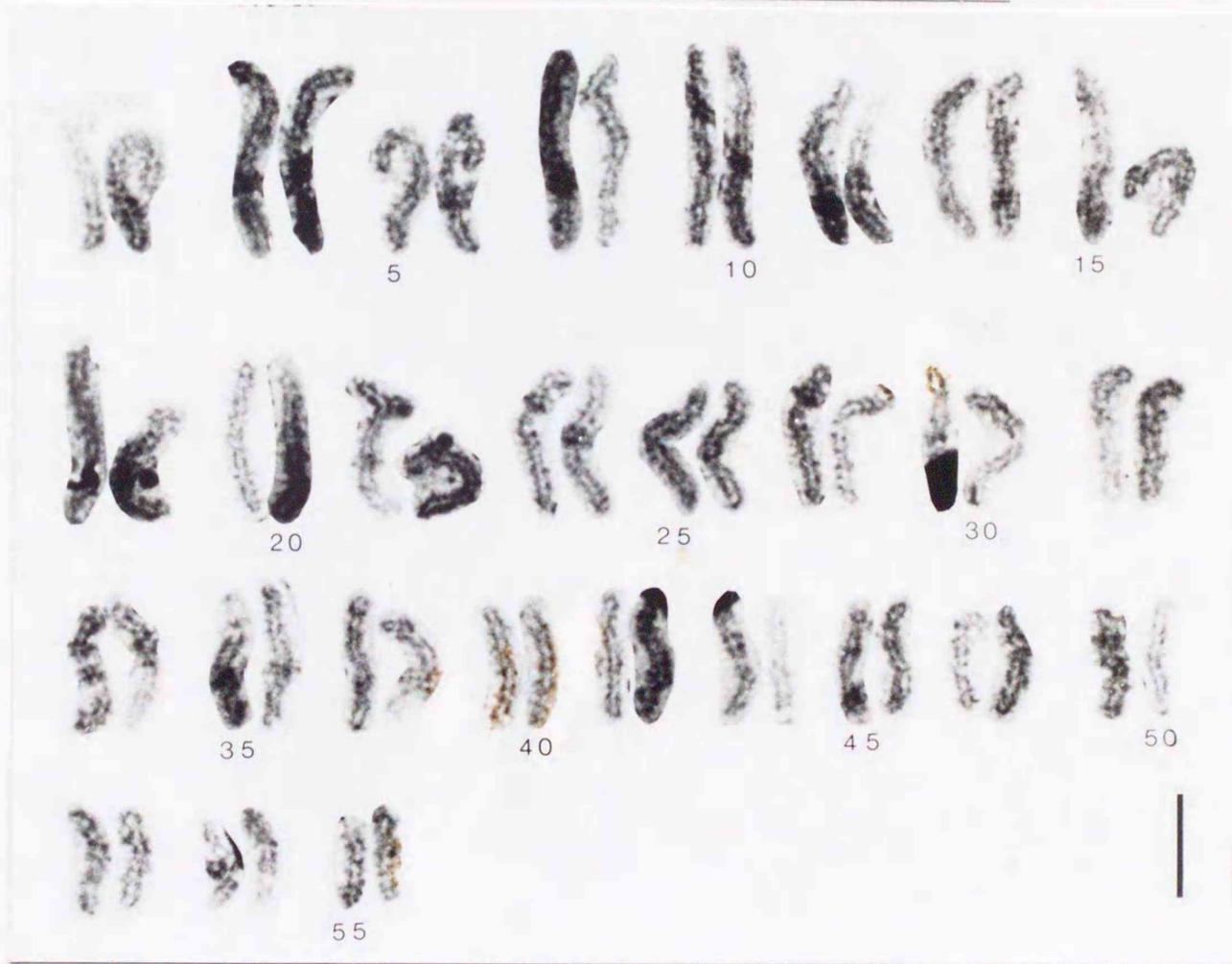
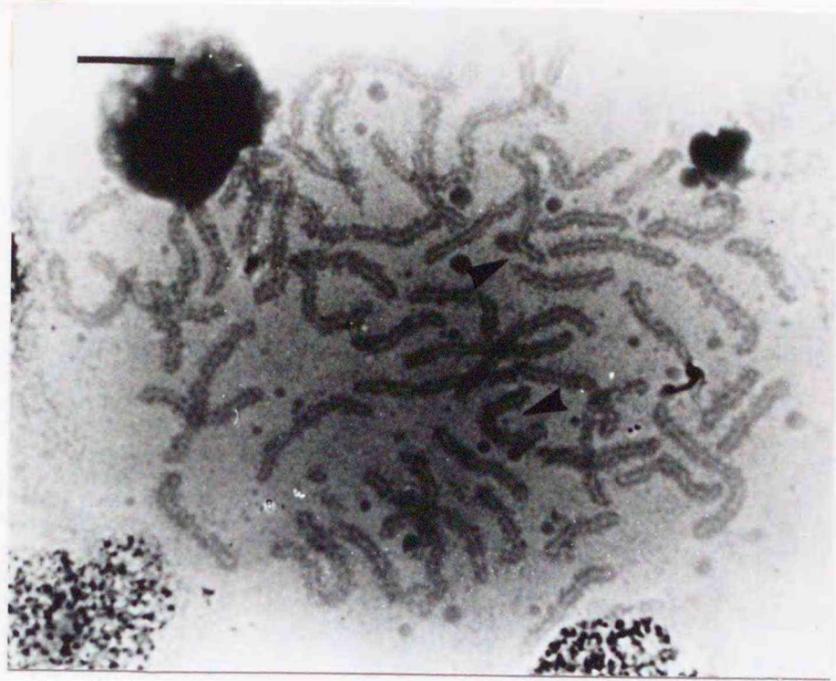


Fig. 5. Pachytene chromosomes in an oocyte of *Syr* 4n. Arrows in the oocyte show the asymmetric Z-W bivalents, which are number 21 and 22 in the 56 bivalents. This oocyte is ZW + ZW type. Bars: 10 μ m.

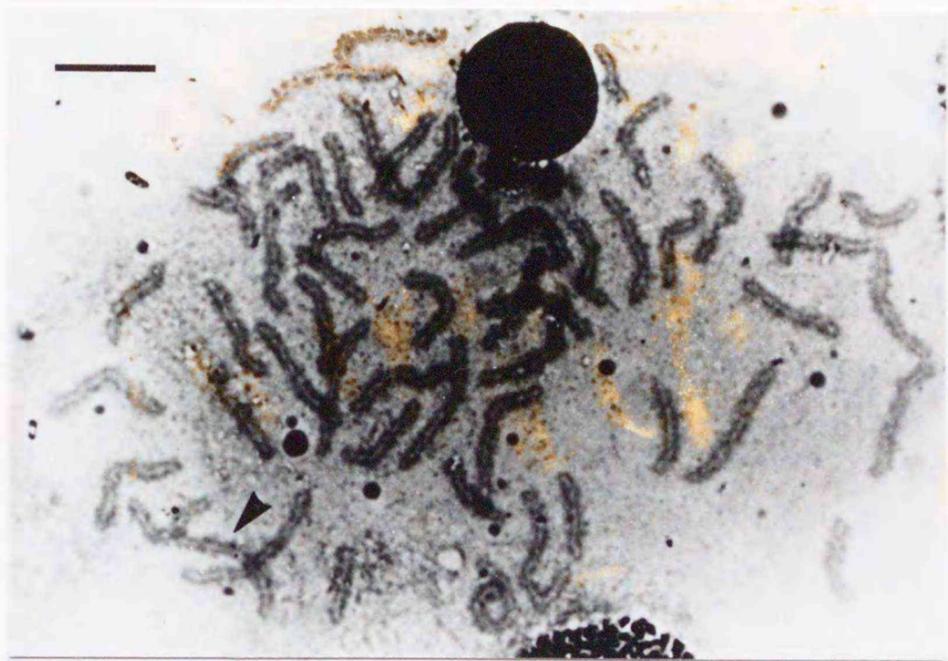


Fig. 6. Pachytene chromosomes in an oocyte of *Sy* 4n. An arrow in the oocyte shows the unusually long W-W bivalent (number 1). Z-Z bivalent may be one of the chromosomes ranging 21 to 23. This oocyte is ZZ + WW type. Bars: 10 μ m.

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対合子が認められたものとZZならびにWW対合子が観察されたものの割合をTable 6に示した。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、Str4n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を示した。

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(新野ら,1987)、ZW染色体対が同定されている(Kawamura and Niino, 1991)。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。

Fig. 5、Fig. 6に示したようにZW対を2対有する卵母細胞と、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と約4.9倍も選択的にZZとWW対が形成されていた(Table 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 Traut(1986)は*Ephestia kuehniella* (スジコナマダラメイガ)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 Pearson(1971)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(Weith and Traut, 1980)のに対して、

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

ヒトY染色体にはSRY遺伝子が座乗している(Muller, 1994)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*) (Tazima, 1964)と卵サイズ決定遺伝子(*Esd*) (Kawamura, 1988)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示した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可能性がある。

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と考えられる。そのためには、家蚕倍数体が一つの有効な材料になり得ると考えられる。

第IV章 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の解析

第1節 2種類の3倍体雌における卵サイズの比較

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(橋本1933; 川口, 1934; 広部, 1939; Astaurov, 1967; Tazima and Onuma, 1967; 滝沢・玉沢, 1968)。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倍体雌が異常形卵を産下することが知られており、それぞれ4倍性、3倍性の確認に用いられてきた。Kawamura(1988)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った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明らかにするとともに、 ZWW 雌が大型卵を産下することを示した。この結果より、 W 染色体上に存在する数量因子の卵サイズ決定遺伝子(*Esd*)が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なのかを調査した。

材料と方法

供試家蚕品種ならびに倍数体の誘起：第三章第1節と同様に $re9$ (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 F_1 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： $schod/schod, p/p$)、 $o06$ (d 油、姫蚕： $od/od, p/p$)、 No (伴性油、姫蚕・黄血： $os/os, p Y/p Y$)および Eq (長節、姫蚕、赤卵、かすり： $ele, p/p, re/re, q/q$)の4品種の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前節

第1節と同様に識別した。

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(Fig. 7)。

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(Tazima, 1964)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(Kawamura, 1988)。

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の産下卵よりもいずれも大型であり、伴性赤蟻系統のZWW雌の卵と同様の大きさであった(Fig. 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っていることから、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Fankhauser (1939)により示された核-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Kawamura(1988)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。

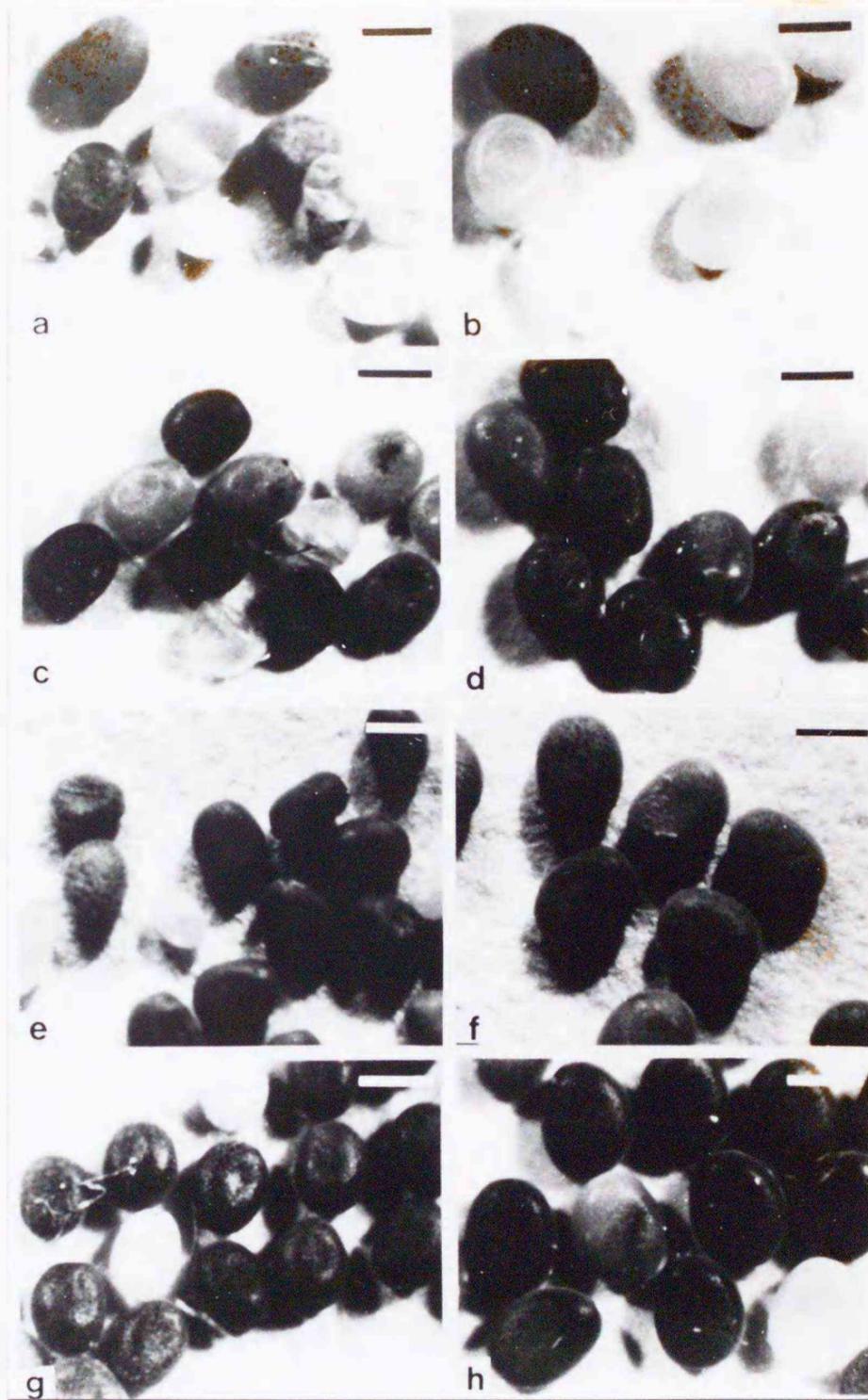


Fig. 7. The eggs deposited by triploid females. a: RWs3n (ZZW), b: RWs3n (ZWW), c: RWNo3n (ZZW), d: RWNo3n (ZWW), e: RWeq3n (ZZW), f: RWeq (ZWW), g: RWod (ZZW), h: RWod (ZWW). Bars: 1mm.

第2節 卵巣移植による卵サイズ決定遺伝子の発現機構の解析

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雌よりも大型である(Kawamura, 1988)。本節では、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卵巣のZZW個体への移植を行った。

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存在し、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(有賀, 1943)。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(Kawamura, 1990)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。

材料と方法

- a) 供試家蚕品種：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。
- b) 3倍体の誘起：第Ⅲ章第1節と同様に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同様にZWWを伴性赤蟻形質、ZZWを正常形質雌として識別した。
- c) 卵巣移植の手順：5齢72時間にジエチルエー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。
- d) 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。

e) 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1mm方眼の面積から算出した。

結果

1. 3倍体雌間における卵巣移植

無処理区の3倍体雌卵は前節で示したのと同様、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(Fig. 8a, Fig. 8b)。ZWW雌卵巣を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(Fig. 8c, Fig. 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Table 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(Fig. 9a, Fig. 9b, Fig. 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(Fig. 9d, Fig. 9e, Fig. 9f)。

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

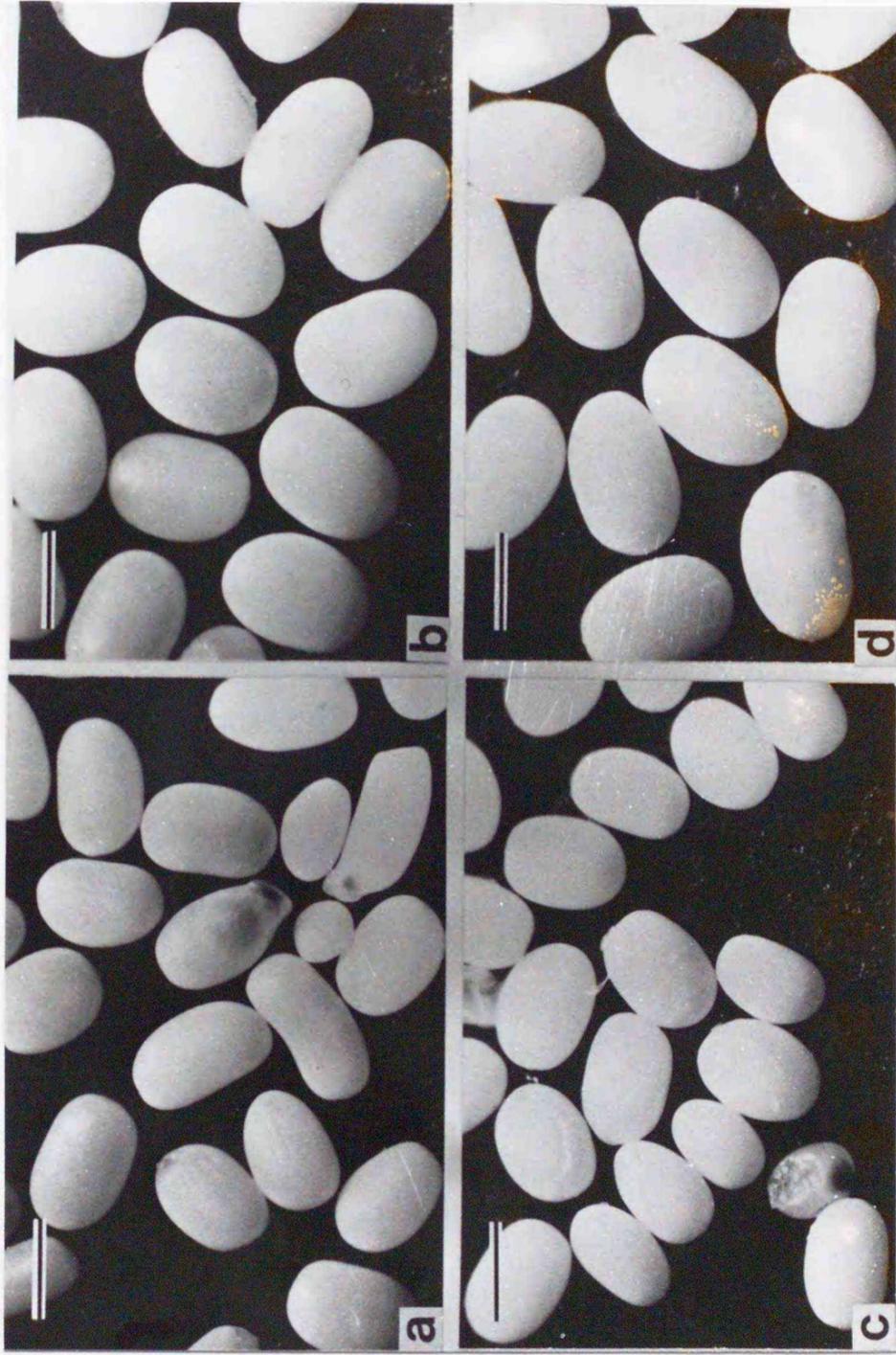


Fig. 8. The eggs produced in the triploid ovaries. a: Control ZZW, b: Control ZWW, c: Host ZZW, d: Donor ZWW. Bars: 1mm.

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	152	104	1.020 ± 0.011	0.55
ZZW(L**)	124.7	170	99	1.027 ± 0.010	0.53
ZWW(R)	74.5	90	59	1.508 ± 0.010	0.95
ZWW(L)	68	80	56	1.482 ± 0.010	0.97
Transplant					
Host(ZZW)	68.5	120	9	0.996 ± 0.017	0.56
Donor(ZWW)	16.5	32	7	1.554 ± 0.019	1.03

* : right ovary at dorsal view

** : left ovary at dorsal view

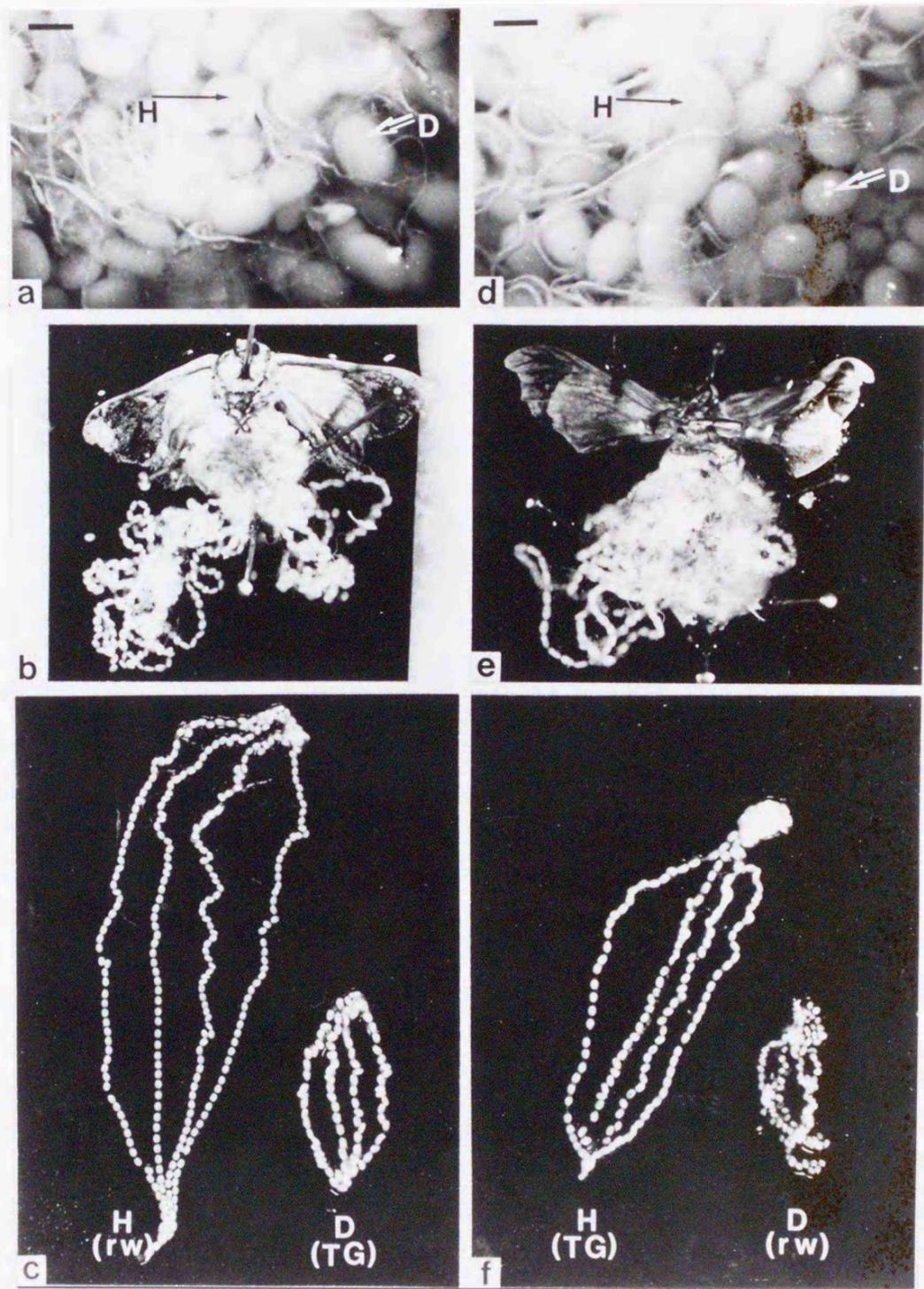


Fig. 9. Two kinds of ovaries from an $rw2n$ female received a $TG2n$ ovary (a-c).
 Two kinds of ovaries from a $TG2n$ female received an $rw2n$ ovary (d-f).
 H: Host, D: Donor. Bars: 1mm.

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

かった。移植卵巢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、移植卵巢に形成された卵数は無処理区よりも明らかに減少した。

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(橋本, 1933; 川口, 1934)。Tazima(1954)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。

前節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*)の働きによるものであると考えられる(Kawamura, 1988)。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卵巢のZZW個体への移植実験を行った。ZZW個体に移植されたZWW卵巢には大型卵が形成され、宿主卵巢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巢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統(木村ら, 1971)のZW対は、卵母細胞において他の染色体と区別できる(Kawamura and Niino, 1991)。大卵系統のZ染色体が正常系統より長いことからKawamura(1990)は、*Ge*突然変異(有賀, 1943)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(佐原ら, 1990)ことから、本研究において3倍体の卵巢移植は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巢移植を行い、*Esd*遺伝子を2つ持つ個体内における正常卵巢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(Fig. 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*)(土井良ら, 1974)と正常卵系統を用いた交互卵巣移植実験(Kawaguchi *et al.*, 1990)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を示したことから、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唯一のマーカー遺伝子である*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(川口ら, 1989)。また、20-Hydroxyecdysoneの大量投与は*Ge*系統にも同様の効果を示し、卵をさらに大型化した(Kawaguchi *et al.*, 1994)。これらの結果は、卵巣内に存在するエクダイ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章第4節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。

第3節 卵巣移植ならびに片側卵巣摘出による卵サイズと卵数の関係について

序論

前節において*Esd*遺伝子の発現は卵巣内に限られ、宿主環境には影響されないことが明らかになったが、卵サイズと卵数の関係は不明である。橋本(1930)は5齢初期と末期に、長谷川(1943)は5齢3日目に片側卵巣摘出を行い、残された卵巣卵の数が20%増加したことを報告している。また、卵サイズも片側卵巣を摘出した場合に増加が認められた(橋本, 1930)。

本節においては、*Esd*遺伝子の働きが卵数とどのような関係にあるのかを調査するために、卵巣を移植して1個体内に3個の卵巣を发育させた場合ならびに卵巣1つを除去して1個体内に1卵巣を发育させた場合の卵サイズを無処理の個体と比較した。卵巣移植においては宿主卵巣と移植卵巣を区別するために正常系統には大卵系統の卵巣を、大卵系統には正常系統卵巣を移植したが、手術が困難であったこぶ遺伝子(*K*)をもつ大卵系統を避け、*Ge2*系統(土井良ら, 1992)を用いた。また、5齢起蚕から24時間ごとに片側卵巣摘出を行って、卵サイズと卵数の最終決定される時期を調査し、家蚕における卵形成ではサイズと数のどちらが優先されるのかを調査した。

材料と方法

- a) 供試家蚕品種：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/swch od, p/p*)ならびにd21(大卵、形蚕：*Ge2/Ge2, +p/+p*)を用いた。
- b) 卵巣移植ならびに片側卵巣除去手術の手順：正常卵系統にはTR(Tw1 x re9)、大卵系統にはTGe2(Tw1 x d21)をそれぞれ用いて、5齢24時間に宿主となる個体をジエチルエーテル麻醉し、サイズの異なる卵を形成する卵巣(5齢24時間)を相互に1つず

つ移植した。宿主卵巣2個と移植卵巣1個を持った手術個体は70%エタノールで消毒・止血して飼育を続け、成虫で卵を取り出し計測した。片側卵巣除去手術はTR、TGe2ともに5齢0時間から24時間ごとに化蛹7日目まで行った。

c) 卵数ならびに卵サイズの測定：移植個体に形成された卵巣卵を成虫から摘出し、各卵巣ごとに卵数を調査した後、前節と同様の手順で卵重と卵面積を測定した。卵巣除去個体においても同様に卵数と卵重を計測した。

結果

1. 移植により過剰卵巣を持った個体が形成した卵

正常卵系統ならびに大卵系統の個体にそれぞれ相互の卵巣を移植し1個体内に3つの卵巣を発育させたところ、前節の結果と同様、正常系統個体に移植された大卵系統卵巣には大型卵が形成され、大卵系統個体に移植された正常卵系統卵巣には普通サイズの卵が形成されており、宿主卵巣卵と移植卵巣卵が容易に区別できた(Fig. 10)。移植個体の移植卵巣に形成された卵数は一様ではなかったが、いずれも無処理区よりも少なかった。無処理の場合にも、家蚕卵の大きさや卵数は飼育時期により多少違いがあることから、卵数、卵面積ならびに卵重の2シーズンにわたる調査結果はTable 9ならびにTable 10に個別に示した。

TR個体にTGe2卵巣を移植した場合も、TGe2個体にTR卵巣を移植した場合にも、移植卵巣卵のサイズは無処理よりも減少した(Table 9, Table 10)が、移植卵巣に形成された卵数は、TRが宿主の場合51から157個、TGe2を宿主とした場合10から194個と大きくばらついた。TRにTGe2卵巣を移植した実験区では移植卵巣に形成される卵数が多くなるほど、宿主卵巣に形成される卵数は減少する傾向を示した。一方、TGe2を宿主にした場合には、必ずしもそのような傾向は認められなかったが、移植卵巣に形成された卵数が極端に少ない場合(Table 10, Trans-15~18)には、宿主卵巣にコントロール区と同様の卵数が形成された。また、移植卵巣に形成された卵数が150個を越えた場合(Table 10, Trans-24~27)には、移植卵の面積ならびに卵重が減少する傾向が認められた。

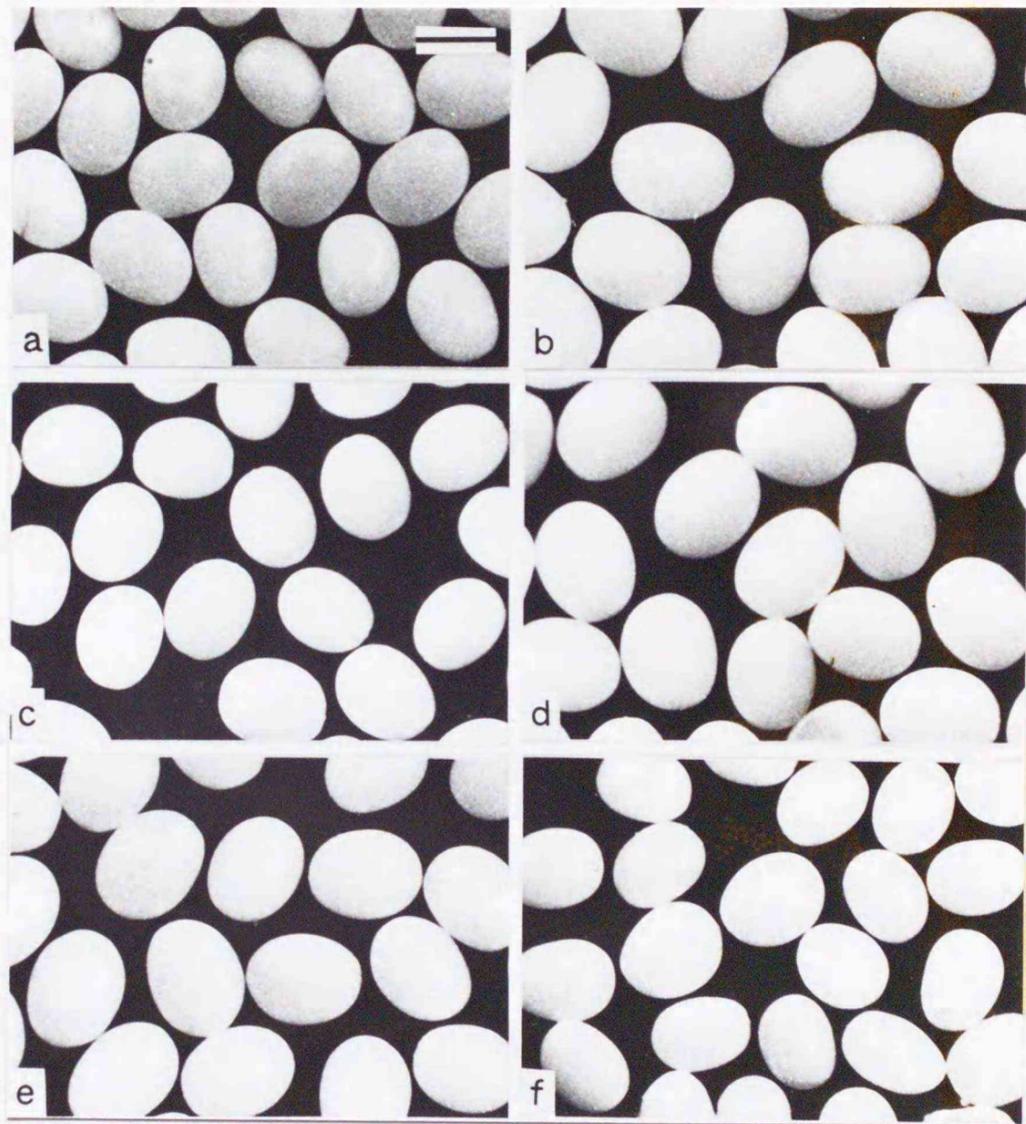


Fig. 10. The eggs produced in the individuals which was received an additional ovary. a: Control TR, b: Control TGe2, c: Host TR, d: Donor TGe2, e: Host TGe2, f: Donor TR. Bar: 1mm.

Table 9. The egg number and size of individuals with an additional ovary (1992 summer).

Experimental group	Number	Area (mm ²)	±SE	Weight (mg/100eggs)
TR-control	324.4	1.119	0.011	56.4
TGe2-control	215.7	1.426	0.011	80.8
Trans-1				
Host(TR)	263.5	1.046	0.010	54.1
Donor(TGe2)	64	1.340	0.013	79.7
Trans-2				
Host(TR)	273.5	1.026	0.008	54.1
Donor(TGe2)	75	1.307	0.012	84.0
Trans-3				
Host(TR)	215	1.017	0.011	52.6
Donor(TGe2)	106	1.255	0.008	75.5
Trans-4				
Host(TR)	220	1.023	0.014	52.9
Donor(TGe2)	157	1.327	0.011	72.6
Trans-5				
Host(TGe2)	179	1.405	0.011	81.3
Donor(TR)	22	1.046	0.033	45.5
Trans-6				
Host(TGe2)	188.5	1.405	0.012	80.2
Donor(TR)	29	0.967	0.014	44.8
Trans-7				
Host(TGe2)	166.5	1.401	0.012	80.9
Donor(TR)	32	1.065	0.027	46.9
Trans-8				
Host(TGe2)	206	1.324	0.011	75.7
Donor(TR)	67	1.052	0.013	46.3
Trans-9				
Host(TGe2)	172.5	1.317	0.017	76.7
Donor(TR)	82	0.967	0.014	46.3
Trans-10				
Host(TGe2)	181.5	1.345	0.010	77.7
Donor(TR)	99	1.026	0.013	50.5
Trans-11				
Host(TGe2)	166	1.327	0.013	74.7
Donor(TR)	140	1.013	0.012	51.4

Table 10. The egg number and size of individuals with an additional ovary (1992 fall).

Experimental group	Number	Area (mm ²)	±SE	Weight (mg/100eggs)
TR-control	353.3	1.072	0.011	56.1
TGe2-control	269.6	1.318	0.018	80.4
Trans-12				
Host(TR)	309.5	1.059	0.010	53.5
Donor(TGe2)	51	1.344	0.017	76.5
Trans-13				
Host(TR)	331	1.059	0.014	53.4
Donor(TGe2)	92	1.253	0.013	69.6
Trans-14				
Host(TR)	232	1.007	0.013	52.7
Donor(TGe2)	146	1.234	0.018	72.6
Trans-15				
Host(TGe2)	265.5	1.341	0.017	79.8
Donor(TR)	10	0.864	0.041	40.0
Trans-16				
Host(TGe2)	254	1.299	0.017	74.1
Donor(TR)	11	0.948	0.011	45.5
Trans-17				
Host(TGe2)	242.5	1.335	0.010	80.4
Donor(TR)	12	0.812	0.024	33.3
Trans-18				
Host(TGe2)	236.5	1.371	0.019	81.3
Donor(TR)	22	0.922	0.017	40.9
Trans-19				
Host(TGe2)	224	1.309	0.017	80.8
Donor(TR)	64	0.974	0.010	48.4
Trans-20				
Host(TGe2)	239	1.305	0.020	77.9
Donor(TR)	72	0.922	0.008	47.2
Trans-21				
Host(TGe2)	234	1.315	0.016	80.4
Donor(TR)	79	0.955	0.010	48.1
Trans-22				
Host(TGe2)	235.5	1.286	0.018	79.0
Donor(TR)	81	0.955	0.013	49.4
Trans-23				
Host(TGe2)	202	1.350	0.017	78.8
Donor(TR)	91	0.994	0.017	50.5
Trans-24				
Host(TGe2)	212	1.247	0.017	77.7
Donor(TR)	152	0.929	0.012	50.5
Trans-25				
Host(TGe2)	195	1.276	0.015	74.7
Donor(TR)	162	0.961	0.012	50.0
Trans-26				
Host(TGe2)	237	1.221	0.019	73.1
Donor(TR)	165	0.896	0.011	42.2
Trans-27				
Host(TGe2)	205.5	1.273	0.018	76.0
Donor(TR)	194	0.935	0.011	48.5

2. 片側卵巣摘出個体に形成された卵

正常卵系統と大卵系統について5齢桑付けの起点(0日)から24時間ごとに化蛹7日まで片側卵巣を摘出し、1個体内に1卵巣とした場合に形成される卵数、卵重を調査した。化蛹1日までの卵巣はその内部に4本の卵管を含んでいるが、それ以降卵管の成長は著しく卵巣から突出し、卵母細胞は肥大成長した。化蛹1日から6日までの卵巣について調査したところ、rw系統では化蛹4日には最初の成熟卵が完成した(Fig. 11)のに対して、TGe2系統では5日から6日にかけてであった(Fig. 12)。化蛹4日以降の摘出では卵管がかなり肥大成長していたため、4本の卵管を取り出すことで片側卵巣摘出とした。

本実験は数回の蚕期にわたって行われ、卵数や卵サイズは飼育時期により多少の変動が認められた。このため、卵数と卵重は無処理のコントロールを100とした指標によってTable 11に示した。吐糸期における幼虫の切開手術では高頻度で死亡個体を誘発したため引き続き実験を行ったが、TGe2系統では十分な個体を得ることが出来なかった。TRにおける1卵巣摘出個体に形成された卵数は吐糸1日で最も増加し、さらに5齢1日と5日ならびに化蛹1日で無処理区と比較して有意な増加が認められたが、その他の実験区には有意差が認められなかった。一方、TGe2では5齢期間全体およびそれ以降、化蛹3日まで有意な増加を示した(Table 11)。その増加数の推移は5齢3日を極小とし、吐糸1日を極大とした。卵サイズの指標として調査した卵重は双方の系統ともに10%以上の有意な増加が5齢0日から化蛹4日まで続いたが、TRでは5日から、TGe2では6日から無処理区とほとんど同様な値を示した。

考察

有賀(1943)により発見された大卵突然変異(*Ge*)はZ染色体上の14.0の位置に座位する。この遺伝子を持つ大卵系統のZ染色体が正常系統のそれよりも長いことから*Ge*突然変異は*Esd*遺伝子を含むW染色体のZ転座によることが明らかにされている(Kawamura, 1990)。本実験で卵巣移植実験ならびに摘出実験に使用されたd21系統は従来の大卵系統とは全く別の品種から出現した突然変異(*Ge*²)であるが、卵形質遺伝子の座位する染色体がZであること、さらにZ染色体が*Ge*系統と同様に長いことから*Ge*の繰り返し突然変異であり、この系統もW染色体のZ転座により出現

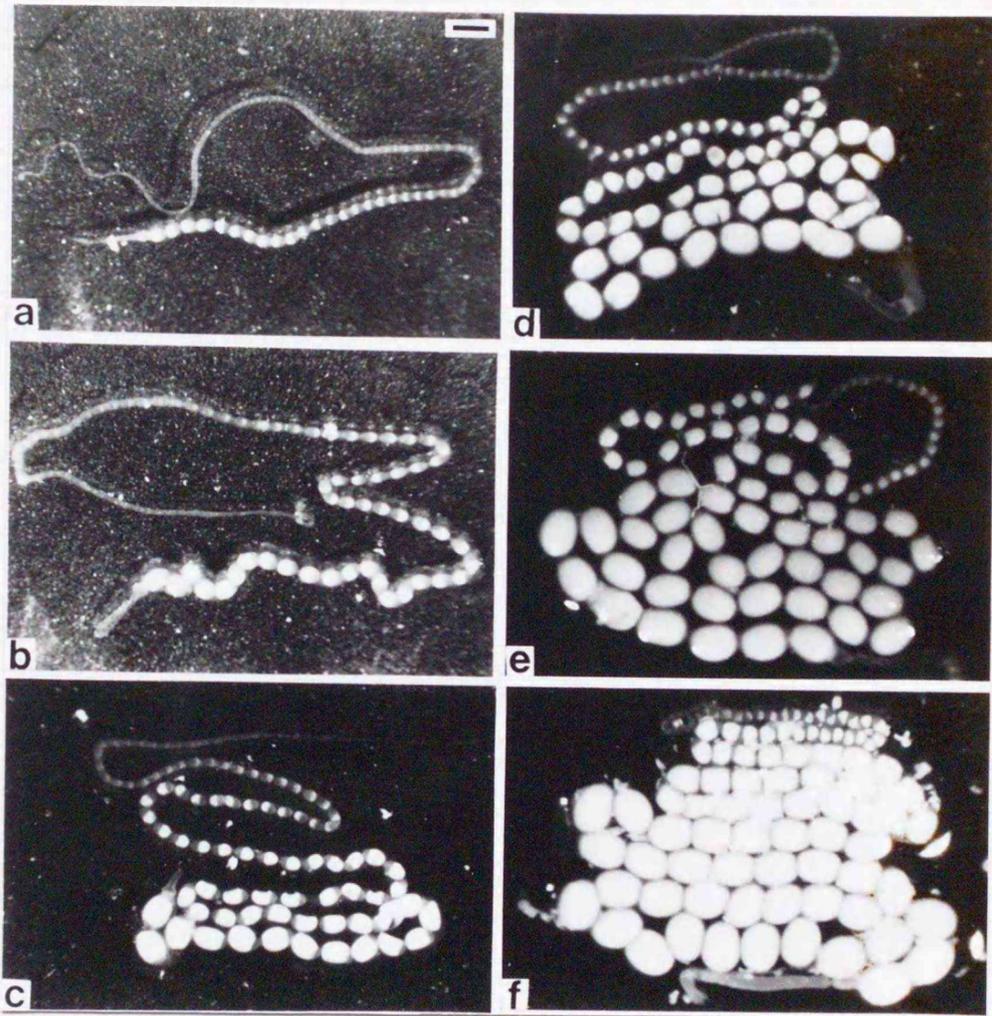


Fig. 11. The ovarioles of the TR strain in the pupal stage from day-1 (a) to day-6 (f). Bar: 1mm.

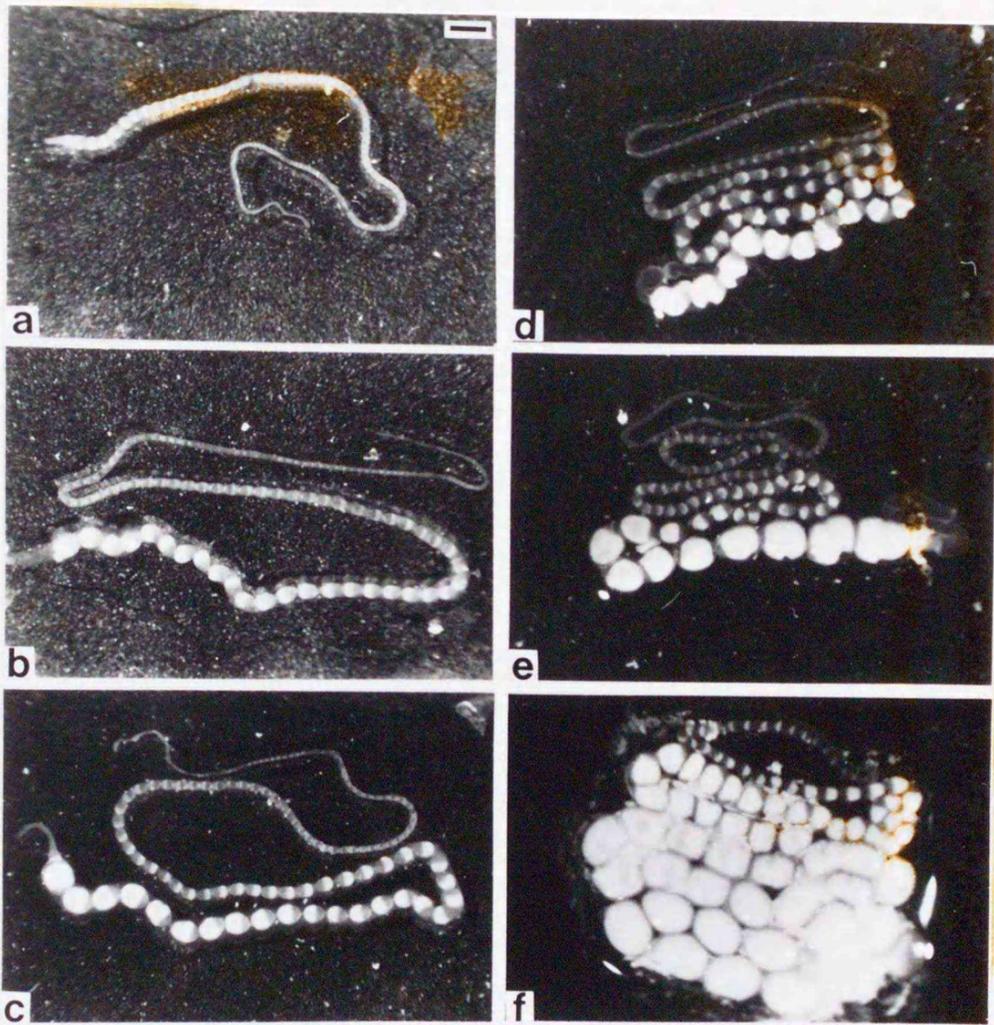


Fig. 12. The ovarioles of the TGe2 strain in the pupal stage from day-1 (a) to day-6 (f). Bar: 1mm.

Table 11. Comparative values of egg number and weight in an ovary of operated individuals.

Operated stage	TR (Normal egg strain)			TGe2 (Gaint egg strain)						
	N	number	±SE	weight	±SE	N	number	±SE	weight	±SE
control	50	100.0	0.73	100.0	0.35	40	100.0	0.97	100.0	0.60
V* ¹ -0d	19	103.3	1.40	117.5	1.00	12	136.5	4.86	116.7	0.92
V-1d	16	107.6	1.40	119.1	0.86	13	132.2	3.18	117.1	0.63
V-2d	17	100.9	1.91	118.8	1.24	11	123.5	5.23	118.3	1.08
V-3d	20	98.4	1.39	117.0	1.06	11	113.6	6.17	114.5	0.62
V-4d	18	100.4	1.27	114.5	0.99	17	125.4	3.78	114.9	0.84
V-5d	19	106.8	1.92	116.0	1.02	10	137.0	5.21	112.5	1.08
sp* ² -1d	7	108.5	2.43	118.1	2.36	3	152.5	6.45	111.2	0.93
sp-2d	12	105.2	4.32	117.1	2.02	-	-	-	-	-
sp-3d	5	100.4	4.69	118.5	2.77	-	-	-	-	-
p* ³ -1d	13	112.9	1.73	121.3	0.47	12	144.7	4.46	113.6	1.57
p-2d	17	105.0	3.15	114.7	3.73	15	121.0	7.58	116.1	4.46
p-3d	7	98.7	6.75	118.8	7.61	11	120.2	8.74	110.9	1.09
p-4d	10	96.8	6.33	112.9	4.87	13	109.8	5.70	112.2	3.82
p-5d	14	94.6	5.15	102.6	1.31	8	94.0	9.88	108.7	3.56
p-6d	9	107.6	4.74	102.7	1.27	5	97.1	6.55	103.9	4.01
p-7d	7	104.7	8.97	100.6	2.23	7	123.1	11.04	101.7	1.03

*¹: stage in 5th larval instar

*²: spinning stage

*³: pupal stage

したと考えられる(Sahara *et al.*, in preparation)。

卵サイズを決定する数量遺伝子の*Esd*の発現に対する造卵数の影響を調査するために1個体内に余分な卵巣を1つ移植して3卵巣を持たせた個体において、大卵卵巣を移植された正常個体は移植卵巣の造卵数が増加するに従って、宿主卵巣卵のサイズと数が減少した(Table 9, Table 10)。正常卵系統において移植卵巣を1つあるいは2つにして1個体内に3もしくは4つの卵巣を成長させた場合の宿主卵巣卵でも卵数、卵重ともに減少する(戸谷, 1984)ことから、家蚕の卵形成には数とサイズのバランスを調整する機構が存在することが示唆される。大卵系統に正常卵巣を移植した実験で移植卵巣に形成された卵数がごく少なかった場合に、宿主卵巣の形成卵数もサイズも変化が無かったことは、卵巣移植そのものは宿主卵巣の卵形成に影響を与えないことを物語る。大卵個体への正常系統卵巣の移植において、移植卵巣卵の形成卵数が150を越える場合では宿主卵巣卵の数、サイズともに減少するものの形成卵数が数十個の場合には、宿主卵巣卵の数とサイズの減少に関しては一定の傾向はなかった。この結果より、*Esd*遺伝子を2つ持つ場合には1つの時とは別の卵数決定機構が存在する事が示唆された。また、正常系統、大卵系統ともに移植卵巣に多くの卵が形成される場合には宿主卵巣の卵数、卵サイズともに減少することから、卵数決定機構は1個体内の限られた栄養条件のもとに働くと考えられる。

1卵巣あたりの栄養条件を良くするために片側卵巣摘出を正常系統と大卵系統で行ったところ、双方の系統ともに5齢0日から化蛹4日目まで卵重の有意な増加が認められた(Table 11)。これは、橋本(1930)の結果と一致しており、正常に2卵巣を有する個体では*Esd*の数に関わらず卵サイズが10%から20%程度制限されることを意味すると考えられる。

家蚕の卵形成においては、蛹から成虫への変態に関わるホルモンなどの体内環境の変化に応じて卵管先端近くに退化卵が発生し、それ以降の卵形成は中止される(戸谷, 1984)。このため、卵形成に対する栄養供給が十分な場合には、化蛾への準備に対応する体内変化のみが卵数を規定するため、卵数の決定は片側卵巣摘出により作出される体内環境の影響を全く受けないはずである。

片側卵巣摘出実験で有意な卵数増加が認められたのは、正常系統で4実験区にとどまったのに対して、大卵系統で5齢0日から化蛹3日までの実験区いずれにも有意

な増加が認められた。また、正常系統における増加割合は、大卵系統に比べ非常に小さかった。この結果、正常系統では橋本(1930)や長谷川(1943)の結果と同様、手術の時期により多少の増加は認められるものの、正常個体と同様の卵数しか形成されないことを示した。正常系統においては退化卵発生のみが卵数を規定する要素となっていると考えられる。しかしながら、大卵系統では卵巣摘出個体で1卵巣あたりの卵数と卵サイズが有意に増加した。無処理の大卵形成において卵数を規定する要因は退化卵の出現ではなく、それ以前に卵形成に必要な栄養の不足を招くことであると考えられる。

先に述べたように、片側卵巣を摘出し1個体内の卵形成に必要な栄養を十分に供給できる条件を作成した場合、正常卵系統ならびに大卵系統いずれにおいても卵サイズの増加が認められたことは、家蚕における卵形成は卵数を規定する機構が卵サイズ決定に先んじて働いており、*Esd*遺伝子は栄養条件が十分である場合にその能力の完全な発現が可能となると推測される。

卵巣摘出により卵数ならびに卵サイズの増加が抑制される時期を知ることで、卵数と卵サイズの決定バランス機構がどの時期まで働いているかを知ることが出来る。Fig. 13ならびにFig. 14に示したように、卵サイズは両系統ともに化蛹5日で有意な増加が停止する。大卵系統での卵数増加は5齢4日で一度極小を迎えた後、増加が続くが化蛹4日で有意な増加が停止した。5齢中期に見られる増加率の減少は家蚕体内のホルモンバランスの変化(諸星, 1976)と良く一致したことから、両者の間には何らかの関係があると考えられる。卵数決定と卵サイズ決定の1日のずれは、卵数決定の後、さらに続けて*Esd*遺伝子が卵サイズをその能力いっぱいまで大型化できることを示していると考えられる。Fig. 11ならびにFig. 12に示したように、家蚕の卵形成では卵巣の基部から卵母細胞が肥大成長して完成卵が順次形成されている。化蛹4日、5日には完成卵も認められることから、卵数が決定された後にも*Esd*遺伝子が発現できることで二次的な卵質の向上が確保されているとも考えられる。

家蚕に十分な桑を与えることなく5齢盛食期半ばで上簇させる(緑蚕上簇)(戸谷, 1984)もしくは5齢期に絶食を施し(河口ら, 1991)、体内の栄養不足ストレスをかけると卵数と卵サイズの減少が認められるが、ストレスが弱いほど卵サイズよりも卵数の減少が著しい。退化卵の発現時期や蛹期間は無処理と同様であったことか

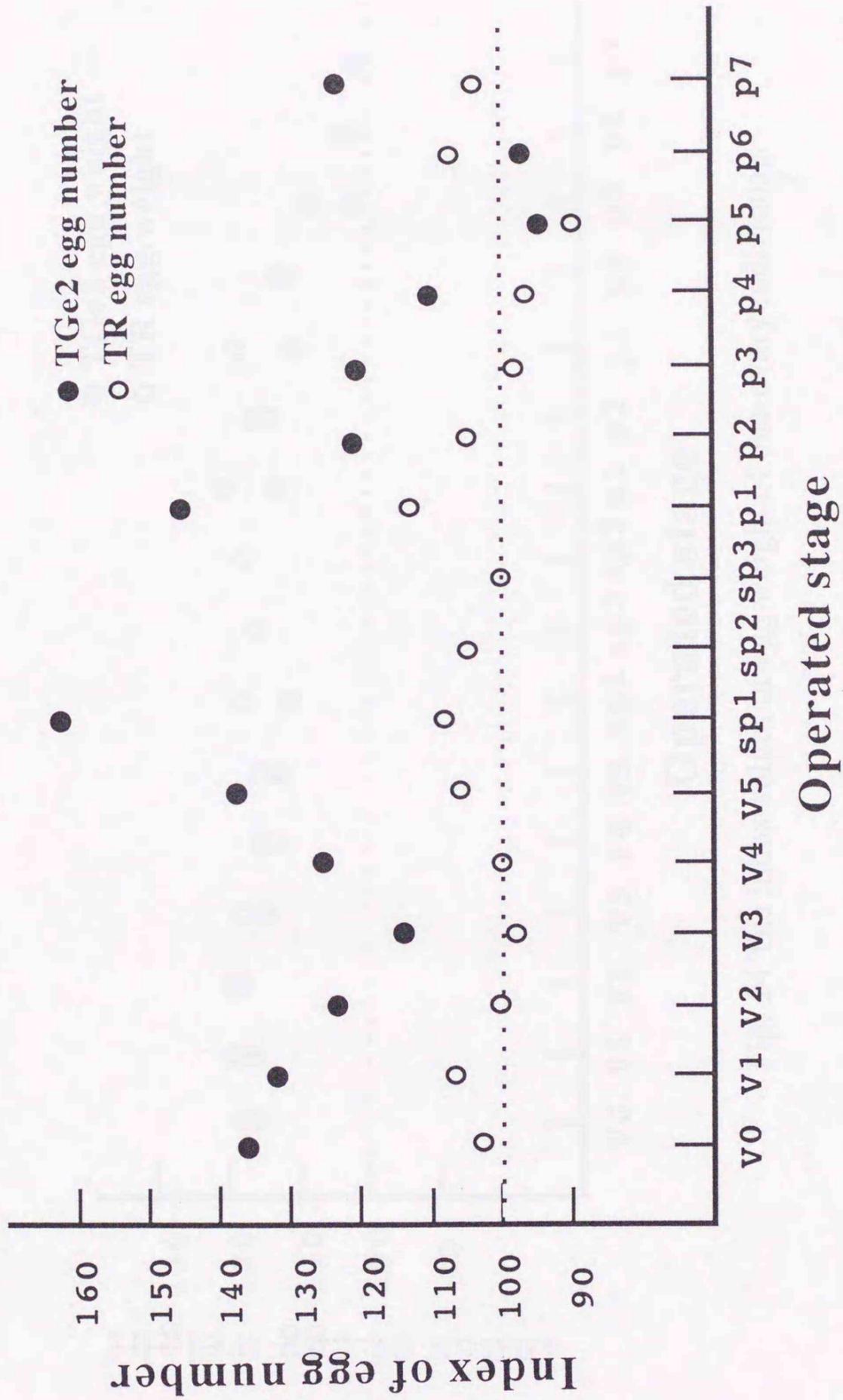


Fig. 13 The index values of egg number of one-ovary individuals

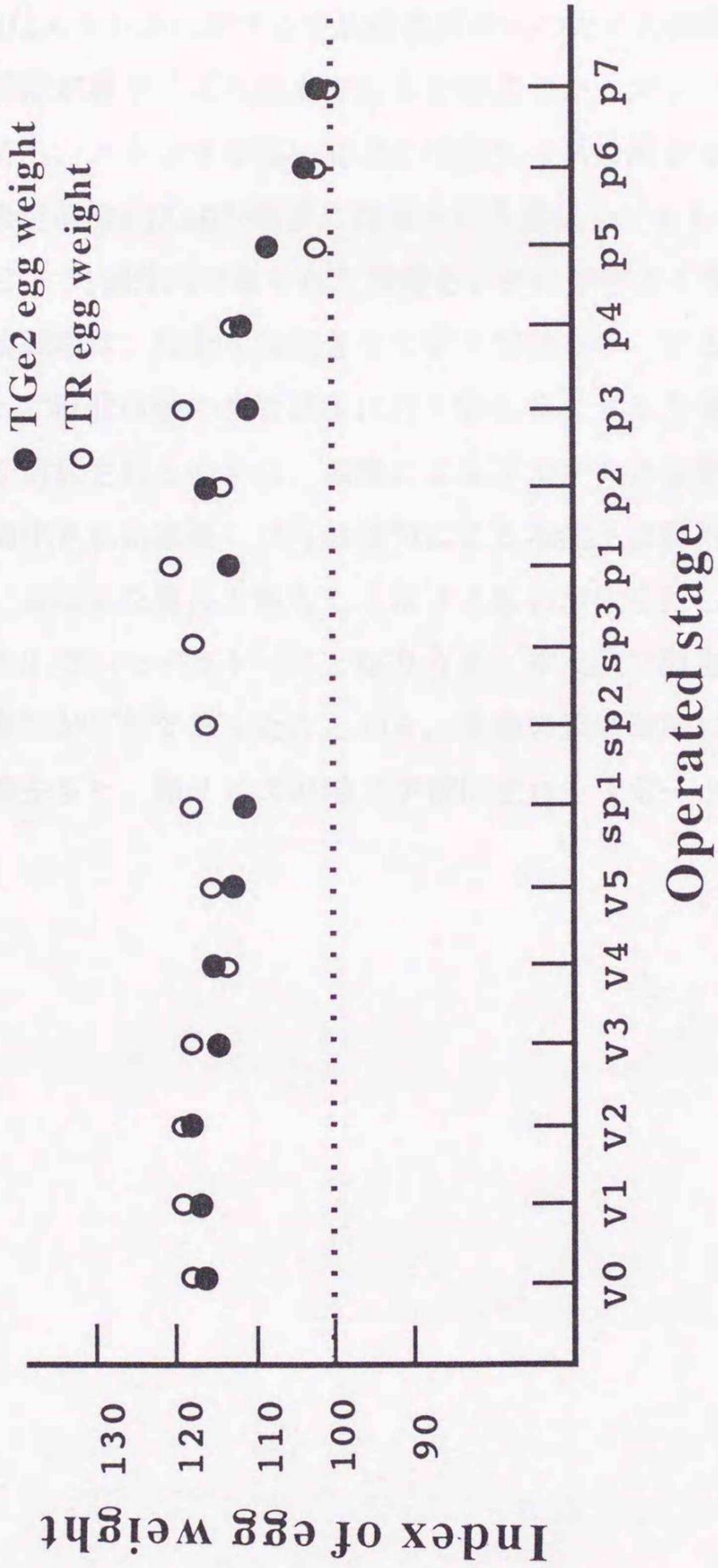


Fig. 14 The index values of egg weight of one-ovary individuals

ら、戸谷(1984)はこの要因を栄養不足による卵巣の発育速度の遅延により、退化卵発現までに発育を完了した卵細胞数が減少したためであると推測した。一方、河口ら(1991)はストレスに対する完成成熟卵造成のための調整は第一段階に卵数の減少、第二段階が卵サイズの減少であると推測した。ストレスによる卵数の減少が誘導されても、ストレスが弱い場合には卵サイズの減少が抑えられたことから、卵サイズ決定遺伝子(*Esd*)が卵質の補償を行う遺伝子であると考えられる。

昆虫において1個体内の限られた栄養をいかに効率よく次世代に伝えていくのかという繁殖戦略は、卵数を増加させて孵化個体を多くする方法と卵サイズを大型化することで孵化直後の生存競争に打ち勝とうとする方法のいずれかである。このいずれが選択されるのかは、環境による圧力が大きな影響を与えるが、人類によって家畜化された家蚕には自然環境による淘汰圧は卵形成に影響を及ぼしていないため、遺伝的な要因が数もしくはサイズの決定を行っており、昆虫の繁殖戦略を考える上でのモデルケースとなりうる。本実験で卵数が決定された後にも卵サイズの増加が可能であったことから、昆虫の繁殖戦略における卵形質は一義的には数を優先させ、卵サイズの増大が常にそれをサポートしていることが考えられる。

第V章 卵殻紋様の大きさを決定する遺伝子

第1節 様々な倍数体雌における卵殻紋様サイズの比較

序論

家蚕の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*)、卵形態が変化する腎臓形卵(*ki*)、紡錘形卵(*sp*)ならびに長形卵(*elp*)が発見されている(有賀, 1943; Doira, 1983; 河口ら, 1988, 1993a; 藤川ら, 1993)。また、卵殻の表面構造は卵の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(赤井, 1957; 神田ら, 1974; 大槻ら, 1977 a)。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(大村・片岡, 1943; Kawaguchi *et al.*, 1996)。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(河口ら, 1988, 1993b)。

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(玉沢・滝沢, 1977)。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的特徴は2倍体と変化ないが、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(Katsuno, 1984a; 1984b)。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章で示され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其中的小瘤数について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。

材料と方法

a) 供試家蚕品種：本実験にはre9(黒縞、赤卵： p^S/p^S , $relre$)、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。

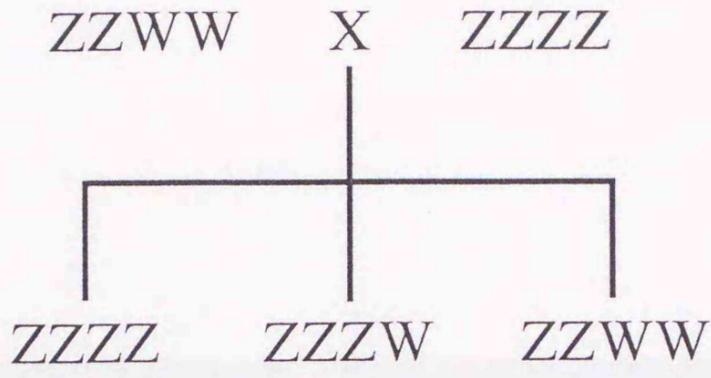
b) 倍数体の誘起：re9雌とTw1雄のF₁卵(rw)から第Ⅲ章第1節と同様に低温処理によって4倍体を誘起した(rw4n)。rw4n雌にsd雄を交配して得た3倍体(rws3n)は伴性赤蟻形質をZWW、正常形質雌をZZWとして識別した。4倍体雄は本来不妊であるが、偶然に妊性のある雄が出現したことから4倍体雌雄の交配(ZZWW x ZZZZ)による次代4倍体(RW4n)を作出した。RW4n雌の2種類の雌の性染色体構成(ZZZWとZZWW, Fig. 15a)はそれぞれの個体にsd雄を交配し次代3倍体の形質と性比によって確認した。つまり、ZZZW雌の孵化時体色は全て黒となり性比は1:1であるのに対して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(Fig. 15b, Fig. 15c)。また、対照として2倍体にはrw2nを用いた。

c) 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-2100A)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画像処理システム(TEKMATE Inc)を用いて測定した。同様に測定された1mm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。

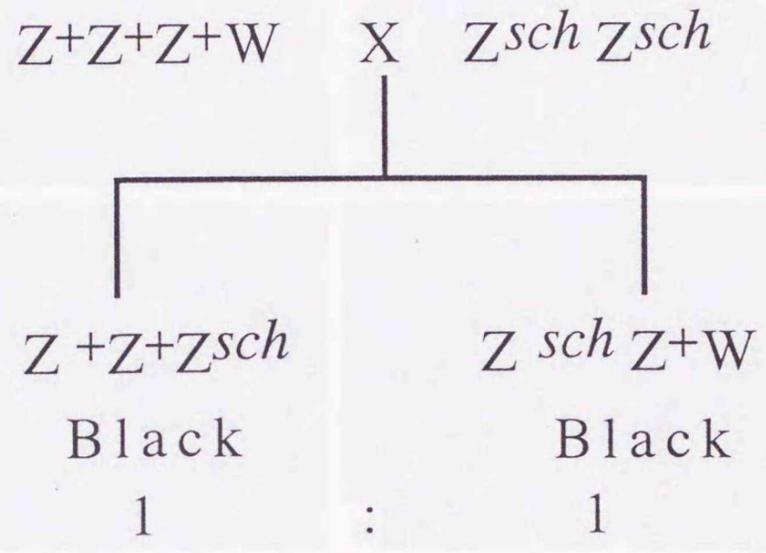
結果

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倍体雌の卵殻側面部の走査型電子顕微鏡写真をFig. 16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)を除いて倍数体が2倍体よりも大きかった。rws3n(ZWW)の網目面積は2倍体と同様であった(Fig. 16a, Fig. 16b)。

a.



b.



c.

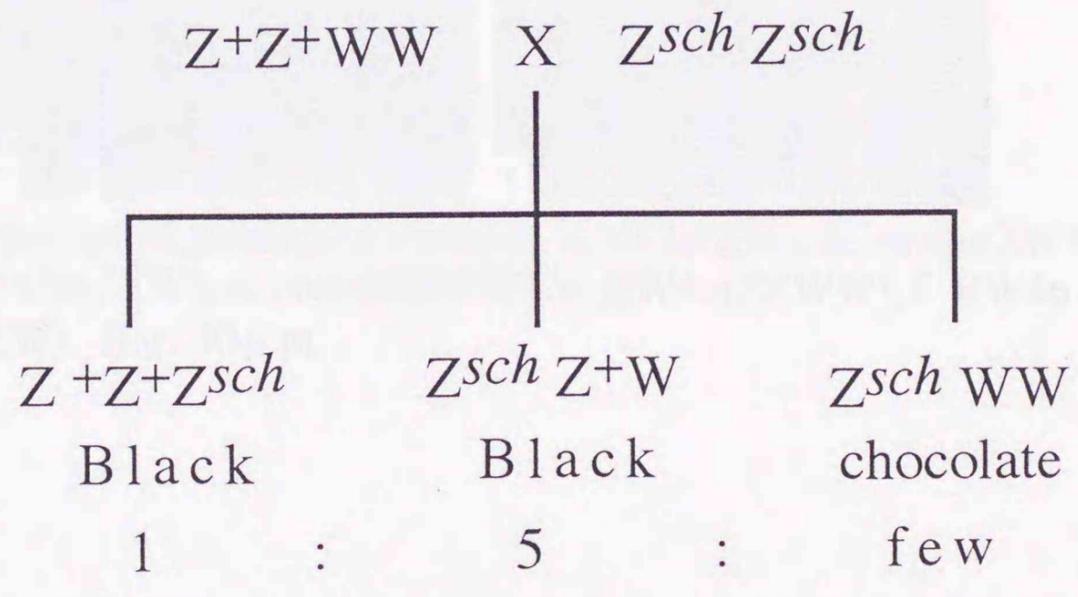


Fig. 15. Sex chromosome constitution of parents and offspring. The body color of the newly hatched larvae and the segregation ratio are given underneath. a. $rw4n \times rw4n$, b. $RW4n(ZZZW) \times sd$, c. $RW4n(ZZWW) \times sd$.

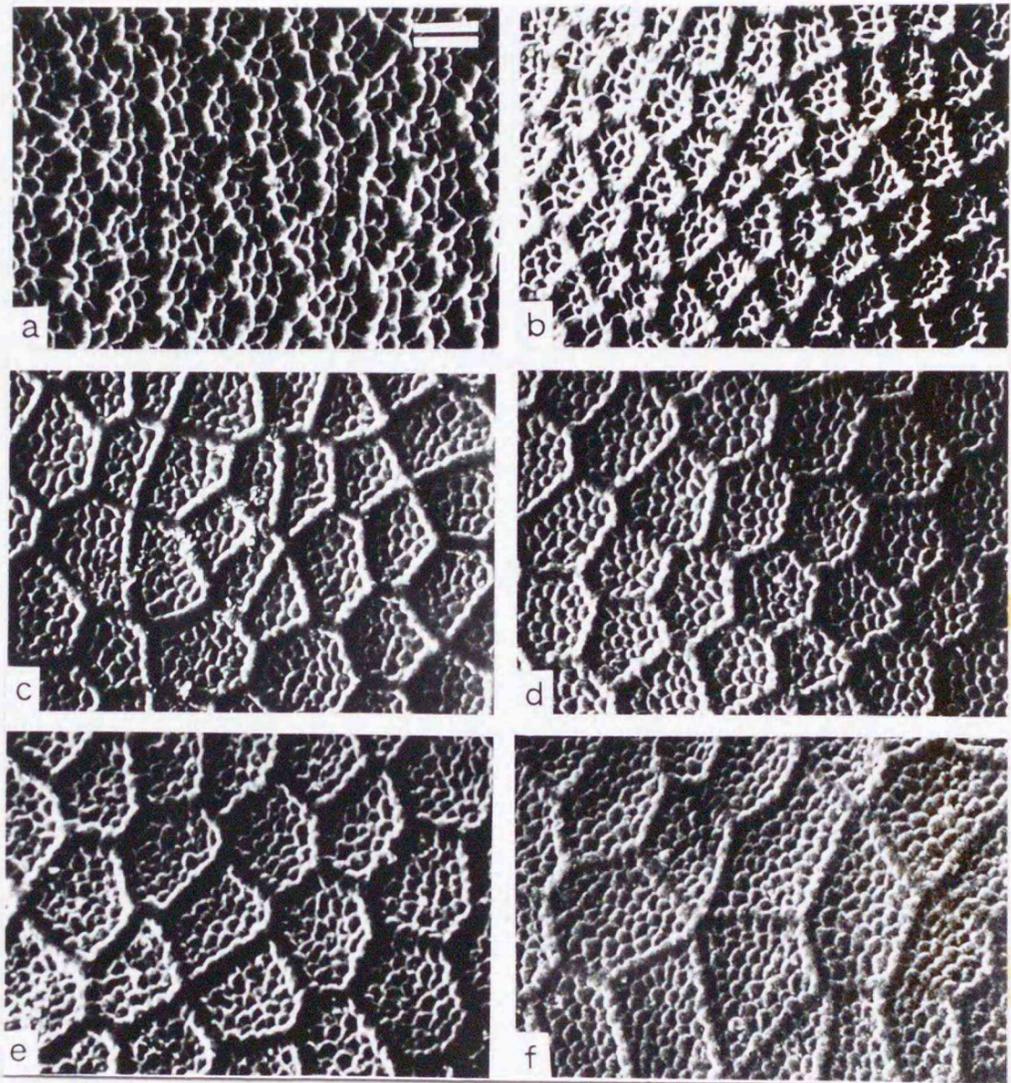


Fig. 16. The polygonal patterns of chorion. a: $rw2n(ZW)$, b: $rws3n(ZWW)$, c: $rws3n(ZZW)$, d: $rw4n(ZZWW)$, e: $RW4n(ZZWW)$, f: $RW4n(ZZZW)$. Bar: $30\ \mu\text{m}$.

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を示したのみならず、2種類の4倍体雌(ZZZWとZZWW)においても面積は異なった(Fig. 16c, Fig. 16d, Fig. 16e, Fig. 16f)。

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示した(Table 12)。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れた。網目面積については、タイプ1に対してタイプ2で1.7倍、タイプ3で2倍といずれもタイプ1よりも大きかった。小瘤数についてもタイプ1が最も少なく、タイプ1に対してタイプ2では3倍、タイプ3では4倍の値であった。面積についても小瘤数でもタイプ3>タイプ2>タイプ1の順序であった。

面積と小瘤数の関係については、Fig. 17に示したように正の比例関係が認められた。2倍体の面積と小瘤数については限られた部分に位置したのに対して、倍数体の分散度は高く、 $RW4n(ZZZW)$ で特に顕著であった。

考察

家蚕卵殻では前極精孔を中心とした花卉状紋構造、腹側・背側ならびに後極周辺の小瘤構造および側面部の網目状構造と部位によって様々な特異構造が存在する(赤井, 1957)。この特異構造は卵殻形成期の胞卵皮膜組織の局所的特異性によりコリオンタンパク質の堆積過程が異なるために生ずると推測されている(大概ら, 1977a, 1977b)。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(Kawaguchi *et al.*, 1996)。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(河口ら, 1988, 1993b)。

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(1943)によって初めて行われ、側

Table 12. The mean value of the area and the number of knobs in polygonal patterns.

	Area($\mu\text{ m}^2$)	\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

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倍体胞卵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胞卵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の把握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マーカーによって判別した($rws3n$; 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(Fig. 15)。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。Fig. 16に示されたように、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)と類似した大きさを示した。この事実は3倍体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)には明らかな差が認められた(Table 12)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。

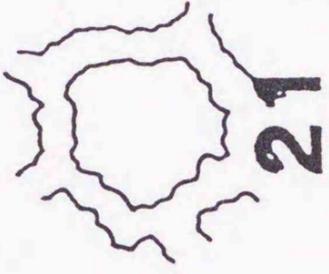
Z染色体数に応じてタイプを1~3に分類して網目面積と小瘤数を比較し(Table 12)、それぞれのタイプ内のF検定を行ったところ有意差は認められなかった。遺伝的背景と倍数性の異なる個体の卵の網目面積がZ染色体数の増加に従って増大した(Fig. 18)ことから、網目面積はZ染色体上に存在する数量因子によって支配されていると考えられる。この遺伝子はW染色体に存在する卵サイズ決定遺伝子(Kawamura, 1988)に続いて発見された家蚕における第2の数量遺伝子であり、卵殻網目サイズ決定遺伝子(Polygonal pattern size determining gene; *Pgd*)と命名する。

Fig. 17に示したように、網目面積と小瘤数とは比例関係が存在した。しかしながら、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。胞卵細胞形状の異常や胞卵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(河口ら, 1985; 大槻・神田, 1978)ことから*Pgd*遺伝子の発現と胞卵細胞内でのコリオン分泌

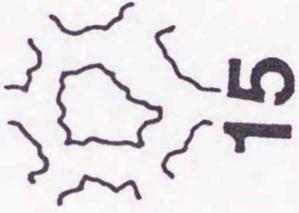
ZZZ

ZZ

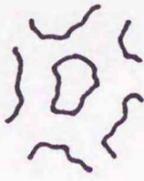
Z



21



15



4

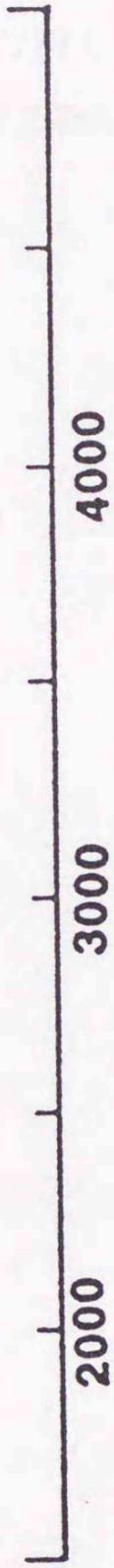


Fig. 18. The relation of the number of Z with the size of polygonal patterns ($\mu\text{ m}^2$).
The number in the figure gives the average number of the knobs.

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 Niino (1991)は卵母細胞染色体の中でZ-W対合子を同定した。しかしながら、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。

第2節 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

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(Kawaguchi, 1936)。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には、Fankhauser and Griffiths(1939)により提唱された核-細胞質比に従い、単細胞である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胞卵細胞のサイズ増加に伴うものであると推測されてきた(大村・片岡, 1943)。

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章第1節の実験より明らかにされ、W染色体上にはKawamura(1988)によって提唱された数量因子の卵サイズ決定遺伝子(*Esd*; Egg size determining gene)が存在することが確認された。さらに、本章前節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。これらの遺伝子の発見は、家蚕における数量形質が核-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(有賀, 1943)、この系統は4倍体と同様の大型卵を産下する。Kawamura(1990)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ことを示した。第IV章第2節の結果より、*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巣外の体内環境に影響されずに発現すると考えられた。

本節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ら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。

材料と方法

- a) 供試家蚕品種：本実験にはre9(黒縞、赤卵： p^S/p^S , $relre$)、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。
- b) 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章第1節と同様に低温処理して4倍体を誘起した($rw4n$ および $TG4n$)。
- c) 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章第2節と同様に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。

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Fig. 19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(Table 13)。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(Fig. 20)。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(Table 13)。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。

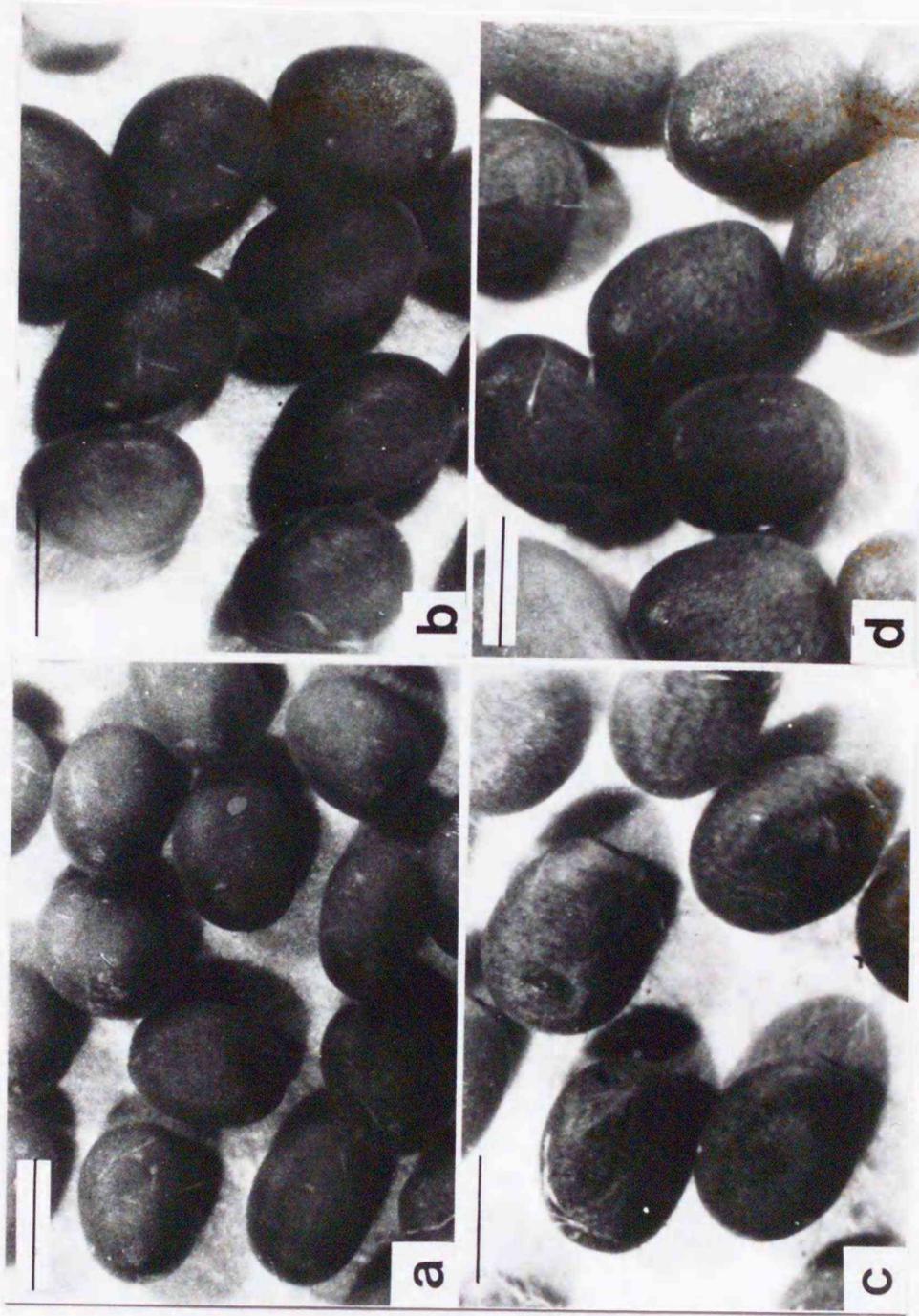


Fig. 19. Eggs laid by diploid and tetraploid females of TG and rw. a: rw2n, b: rw4n, c: TG2n, d: TG4n. Bars: 1mm.

Table 13. Egg size and polygonal pattern size in normal and *Ge* strains.

	Number of		Average size of		Average size of	
	<i>Esd</i> genes	<i>Pgd</i> genes	eggs (mm ²)	±SD	polygonal patterns (μ m 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

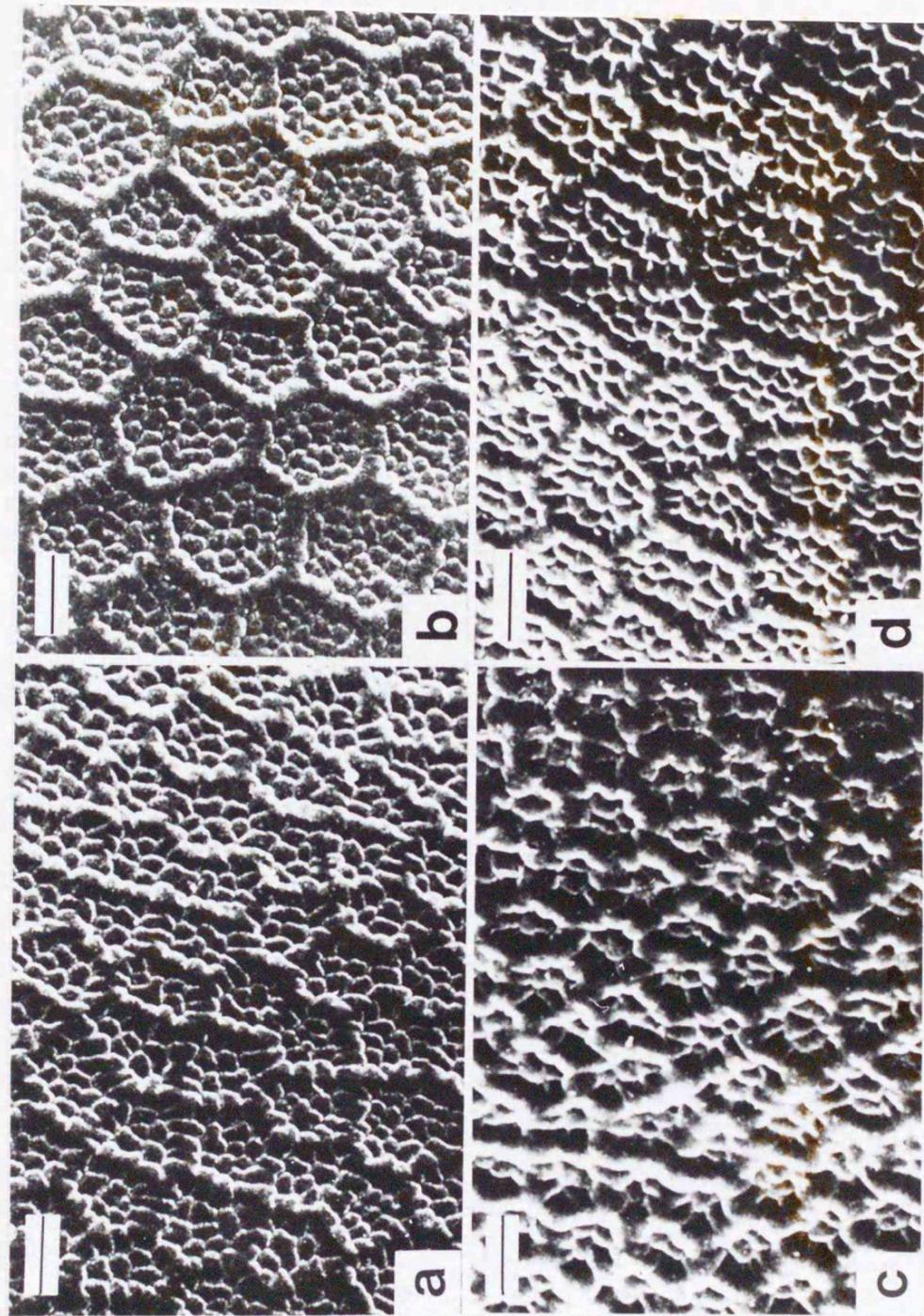


Fig. 20. Polygonal patterns of chorion. a: rw2n(ZW), b: rw4n(ZZWW), c: TG2n(ZW), d: TG4n(ZZWW). Bars: 1mm.

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(Kawamura, 1990)。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 $TG_{4n} > TG_{2n} \geq rw_{4n} > rw_{2n}$ であった(Fig. 19)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(Table 13)。

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(佐藤・杉浦, 1934)ことや、網目面積には品種間差が認められた(大村・片岡, 1943)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(Table 13)。

2つの*Esd*遺伝子を持つグループに属した*rw*_{4n}とTG_{4n}の卵サイズは1.5mm²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*rw*_{4n}においてTG_{2n}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.*(1993)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を示した。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(Kawaguchi *et al.*, 1994)。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。

家蚕において発見された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Ⅲ章第4節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第一歩となるが、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。本節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。

第VI章 4倍体雄蚕における人為的処理による妊性獲得

第1節 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

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Muller(1925)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確立した(橋本, 1933; 川口, 1934; 広部, 1939; Tazima and Onuma, 1967)。しかしながら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(川口, 1938; Astaurov, 1967)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Astaurov(1969)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(滝沢・玉沢, 1968)。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。

材料と方法

a) 供試家蚕品種：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(限性セーブル・形蚕、赤卵： $T(W:2)p^{Sa+p}, p/p, relre$)を用いた。

b) 4倍体の誘起： $re9$ 雌 x $Tw1$ 雄の産下卵を第Ⅲ章第1節と同様に低温処理して4倍体を誘起した($rw4n$)。

c) 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時間、24時間、48時間、72時間および96時間に黄色(1976)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。

D) 高温-多湿処理：5齢6時間、24時間、48時間および72時間の各ステージの $rw4n$ 雄個体を桑を与えた状態で、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 に24時間処理した(Oshiki and Morohoshi, 1973)。その後は、通常通り飼育を続けた。

E) 絶食処理：5齢の様々なステージ(0, 24, 48, 54, 60, 72, 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ら変化を加えなかった。

F) 処理した個体の受精率と倍数性の確認：片側アラタ体摘出、高温-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。

結果

アラタ体片側除去もしくは高温-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Table 14に示した。 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-多湿

Table 14. 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				
Control		77	980	166	16777	1.31	5.90	3.93
-1 CA*	6h	3	79	13	1034	2.68	6.08	0.43
TM**		3	53	10	894	2.07	5.30	0.03
-1 CA	24h	6	66	17	1630	4.99	3.88	0.87
TM		7	332	64	2244	4.47	5.19	0.07
-1 CA	48h	20	1052	223	5221	1.38	4.72	0.62
TM		9	208	46	2163	3.86	4.52	0.38
-1 CA	72h	5	154	36	1594	4.54	4.28	0.72
TM		3	23	5	1234	0.62	4.60	0.03
-1 CA	96h	10	743	147	2225	9.49	5.05	0.01

* : excision of one corpus allatum

** : temperature-moisture treatment

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

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。しかしながら、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(Table 14)。

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の分離比を示し、4倍体雄は絶食開始時期により様々な受精率を示した(Fig. 21)。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Table 15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、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時間をピークにして、さらに遅い時間からの絶食はその効果が減少した。

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(Katsuno and Tamazawa, 1979)。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-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-多湿処理ではほ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区はアラタ体摘出を5齢48時間ならびに96時間で行ったグループであった(Table 14)。一方、5齢72時間における高温-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-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る。

アラタ体摘出実験においては止血のために手術後、15℃に24時間静置した後、

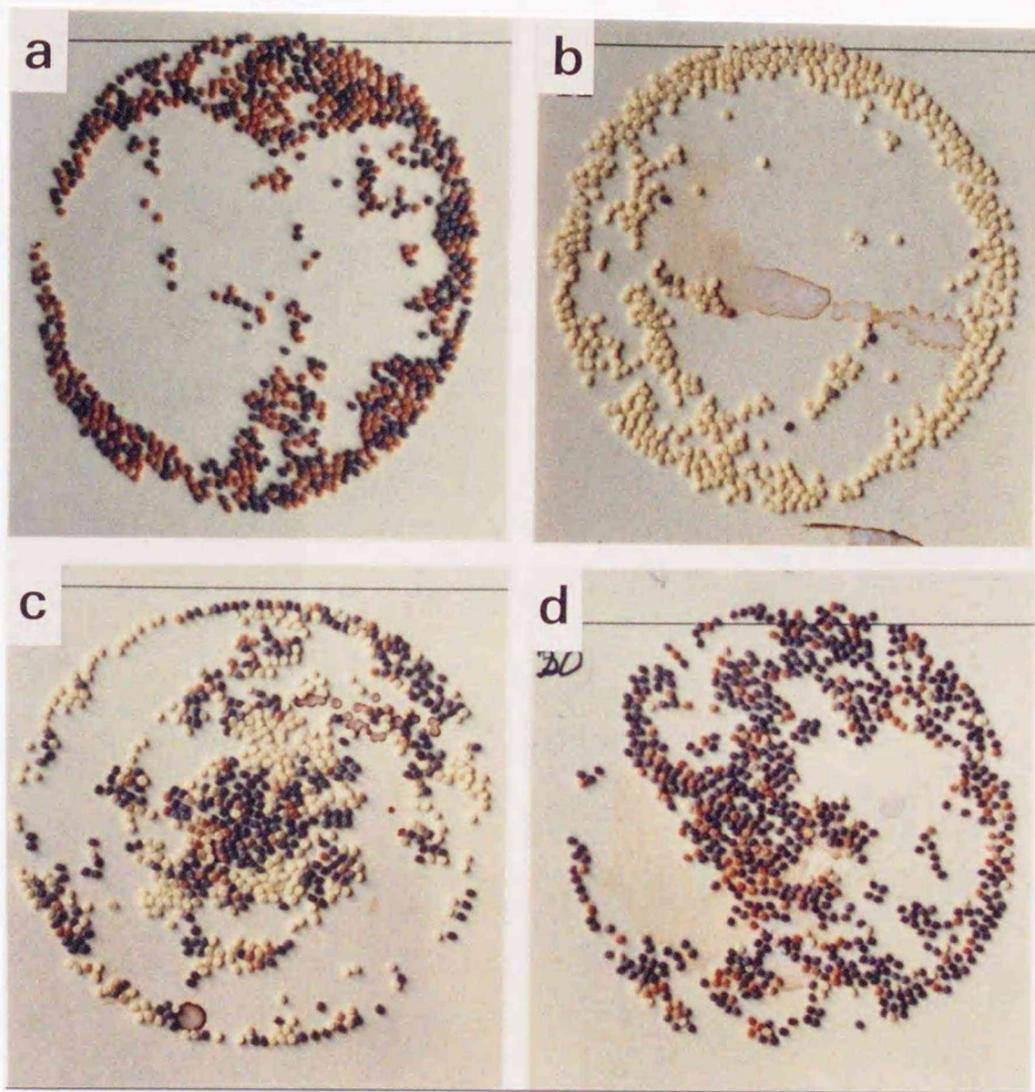


Fig. 21. Fertility shown by the eggs of red strain (Cre) back-crossed with diploid and tetraploid males. a; The eggs of a Cre mother crossed with a diploid male. Fertility is 99.3% and the ratio of black to red (b:r) is $329:333=1:1.01$. b; The eggs of a Cre mother crossed with a tetraploid male. White 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.

Table 15. 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	13833	5.19 ± 1.90	5.71	1.16
	0h	23	7757	6.18 ± 3.78	5.47	0.51
	24h	18	7317	12.85 ± 4.42	4.91	0.04
	48h	16	5501	24.63 ± 5.98	5.02	0.00
	72h	20	8714	18.27 ± 3.41	4.77	0.51
1993 Fall	Control	21	10055	1.18 ± 0.81	4.17	0.61
	0h	19	9948	1.71 ± 0.59	5.30	0.08
	24h	10	4320	9.33 ± 2.92	5.72	0.92
	48h	15	6964	19.73 ± 6.99	4.70	0.75
	72h	20	10926	30.48 ± 5.78	5.00	0.00
	96h	18	9324	6.63 ± 2.33	5.37	0.42
	Diploid	10	6834	97.67 ± 0.56	1.01	0.13
1994 Summer	Control	30	12088	5.68 ± 1.48	5.48	0.76
	0h	16	5320	13.91 ± 3.16	4.78	0.21
	48h	20	8116	28.91 ± 4.75	4.87	0.25
	54h	48	20289	39.42 ± 3.41	5.08	0.26
	60h	56	23038	25.12 ± 2.81	4.85	0.80

* : Start of starvation

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

桑を与えたのに対して高温-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ために、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受精率の向上が認められたものの無処理と比較した場合に有意差はなかった。残りの実験区においては有意に受精率が増加した(Table 15)。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(Table 15)。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、Table 16に示すように無処理区における4齢脱皮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、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(Fig. 22)。

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(Rasmussen and Holm, 1979)。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(Rasmussen, 1987)。Rasmussen(1987)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 Akai(1971)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

Table 16. 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

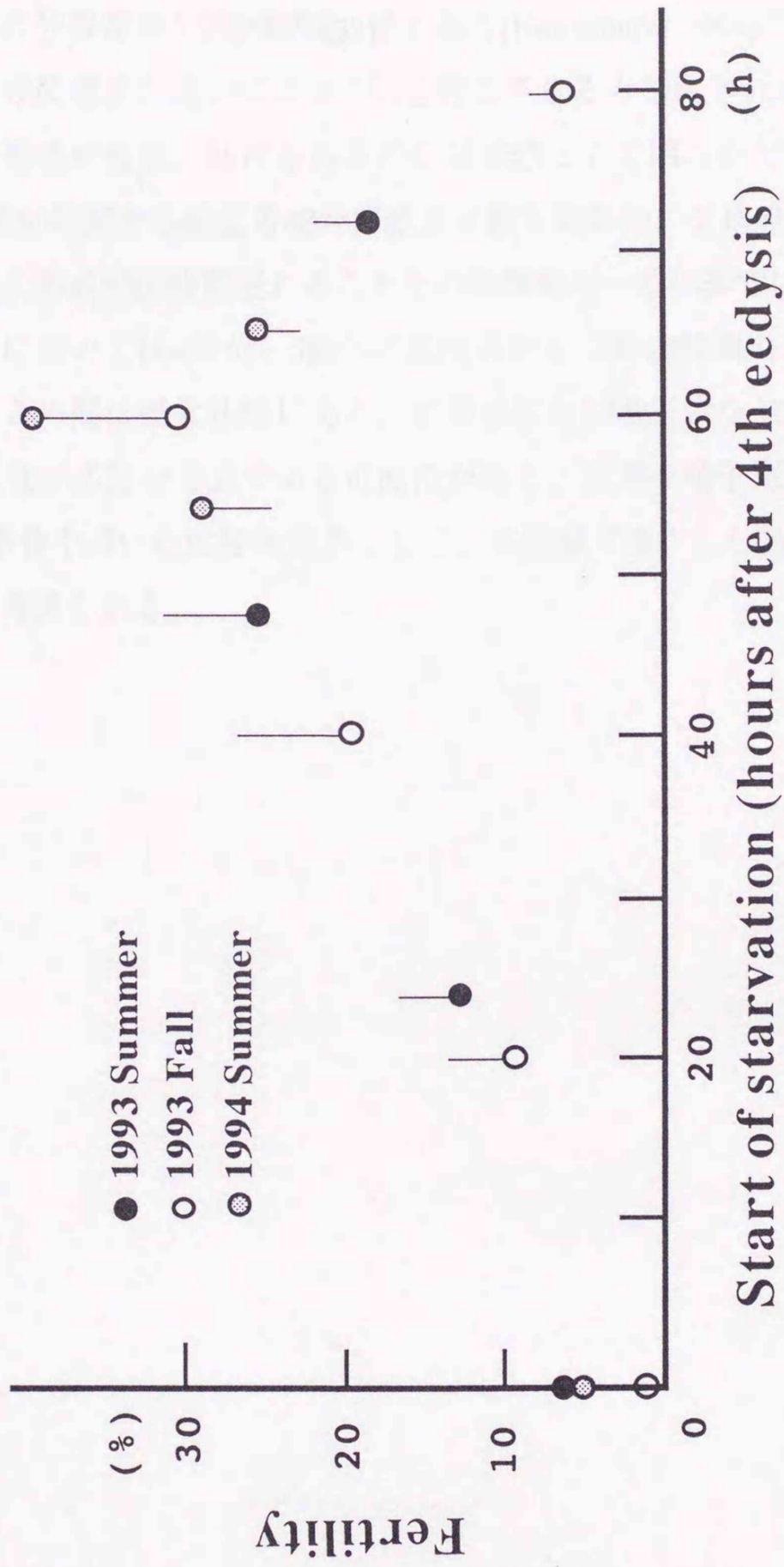


Fig. 22 Average fertility plotted for the start of starvation. The fertility curve obtained in the three seasons were put together by adjusting the length of the fifth instar to 5 days (120h), which is the normal for weather.

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示した。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(Kawamura, 1994)ことから、精細胞形成の遅れは分裂速度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60時間遅れ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ためには家蚕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。

第2節 絶食処理時間と受精率の関係

序論

前節の4倍体雄に対するアラタ体摘出、高温-多湿処理および絶食処理のうち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、前節で指摘された、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。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。

材料と方法

- a) 供試家蚕品種：本実験にはre9(黒縞、赤卵： p^S/p^S , $relre$)、Tw1(姫蚕、第2白卵： p/p , $w-2/w-2$)ならびにCre(限性セーブル・形蚕、赤卵： $T(W:2)p^{Sa+p}$, p/p , $relre$)を用いた。
- b) 4倍体の誘起：re9雌 x Tw1雄の産下卵を第Ⅲ章第1節と同様に低温処理して4倍体を誘起した($rw4n$)。
- c) 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。
- D) 処理した個体の受精率と倍数性の確認：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。

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倍性の確認された絶食個体の受精率をTable 17に示した。絶食期間が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の推移を示した。

処理個体の生存率は24時間以内の処理時間の短い区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(Table 18)。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をTable 19に示した。処理期間と成育期間の延長が一致したのは1時間処理の吐糸から羽化までの期間と12時間処理の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さなかった。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。

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。前節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効果があることが示され、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、絶食時間の長さとう受精率の関係を調査した。

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(Table 17)で

Table 17. 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	32789	4.84	7.22	1.18
1h	39	20747	4.78	4.63	1.40
3h	18	10336	4.94	3.73	1.87
6h	37	20297	4.50	5.34	2.52
12h	41	21570	5.14	11.27	2.37
24h	43	22246	4.91	14.96	2.47
30h	24	5571	5.11	28.94	4.48
33h	10	1457	5.20	19.56	3.92
36h	41	18947	4.74	13.70	2.91
39h	34	12758	4.66	13.61	2.99
42h	37	13649	4.61	13.56	2.34
45h	16	7775	5.07	10.15	2.92
48h	66	28867	4.88	30.39	3.43
51h	25	8302	4.79	36.85	5.03
54h	24	6113	4.95	25.31	4.25
60h	10	6142	4.94	28.23	7.31
72h	37	20485	4.79	25.52	4.57

* : groups classified by length of starvation

** : ratio of black eggs to red eggs

Table 18. 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

Table 19. The comparison of time difference between control and starved males in the tetraploid males.

Experimental group	5th instar (h)	Spinning to adult (h)	Oh 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

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。Fig. 23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示した。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%と高い値を示したことから、絶食時間の短縮と生存率の観点から30時間絶食も有効な妊性向上方法であると結論できる。

前節でも述べたように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(Kawamura, 1994)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(Table 19)。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(Tazima, 1964)ならびに絶食による受精率の向上が時間の長さに応じて、2つのピーク(30および51時間)を示したこと(Fig. 23)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。

この仮説を検討するために、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巣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。

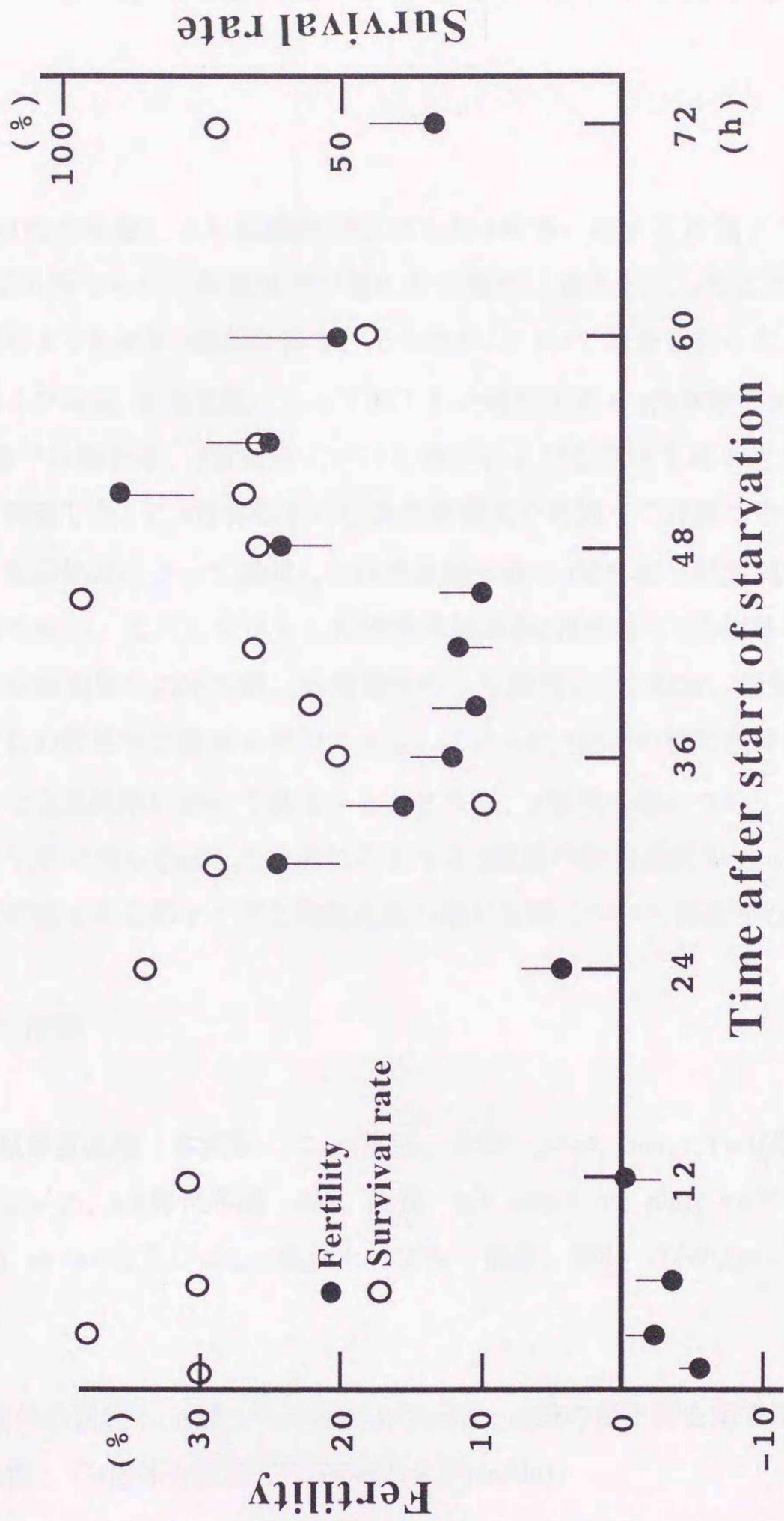


Fig. 23 Fertility and survival rate of starved tetraploid males.

第3節 4倍体雌雄相互交配により得られたF₁4倍体蚕の性状

序論

本章1節の実験により低温処理誘起した4倍体に対する片側アラタ体除去、高温-多湿処理ならびに絶食処理が雄の妊性獲得に効果を示したことから、4倍体相互交配によるF₁4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-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。F₁4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判別できる。これらF₁4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。

材料と方法

- a) 供試家蚕品種：本実験にはre9(黒縞、赤卵： p^S/p^S , rel/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： sch/sch , $+p/+p$)ならびにCre(限性セーブル・形蚕、赤卵： $T(W:2)p^{Sa\ +p}$, p/p , rel/re)を用いた。
- b) 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章第1節と同様に低温処理して4倍体を誘起した(rw4nおよびrssd4n)。
- c) 4倍体雄の妊性獲得とF₁4倍体の作成：本章第1節と同様にrw4n雄に片側アラタ

体除去もしくは高温-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F₁4倍体を得た(RW4n)。また、絶食処理を施したrssd4n雄も同様に倍数性を確認した後、rw4n雌と交配してF₁4倍体を得た(RWRS4n)。

D) 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章第2節と同様に走査電子顕微鏡(HITACHI,S-2100A)で写真撮影した後、ATTO画像解析システム(AE-6910およびDensitograph)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(Kawaguchi *et al.*, 1996)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1mm方眼紙をスタンダードとして算出した。

結果

1. RW4nの性状

アラタ体片側摘出ならびに高温-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、F₁4倍体雌の性状を調査した。Table 20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分離比は平均値で雌:雄=1.32:1を示したが、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)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(Table 21)。

低温処理によって誘起された4倍体雌(ZZWW)と雄(ZZZZ)の交配により得られたF₁4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ことから、羽化したF₁4倍体雌個体とre9雄との交配から得られた次代3倍体の性比を調査した。160個体の雌成虫のうち正

Table 20. Hatchability, survival rate and sex ratio in diploids, triploids and F_1 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	8115	3796	46.78	1319	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

Table 21. 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	1213	892	429	160

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 χ^2 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(Table 22)。

2. RWRS4nの性状

RW4nでは3,796の孵化個体を得たものの、F₁4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。F₁4倍体は*rw4n*雌に*rssd4n*雄を交配して得られたF₁4倍体(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(Fig. 24)。

RWRS4nにおける孵化率は92.69%と高い値を示した。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(Table 23)。5齢脱皮以降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の詳細を調査したところ、ZZZW雌の死亡は吐糸前日から吐糸日にかけて、極めて高かった(Fig. 25)。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(Table 23)。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%を示した(Table 23)。

F₁4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)の卵と卵殻表面の網目状構造域をFig. 26に示した。それぞれの卵サイズと網目面積を計測した結果をTable 24に示した。卵サイズはZW=ZZZW<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。

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F₁4倍体の作出は非常に困難であったため、孵化率や精子形成などのごく限

Table 22. Sex ratio of triploid progeny from the cross between F₁ tetraploid females and diploid re9 males.

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

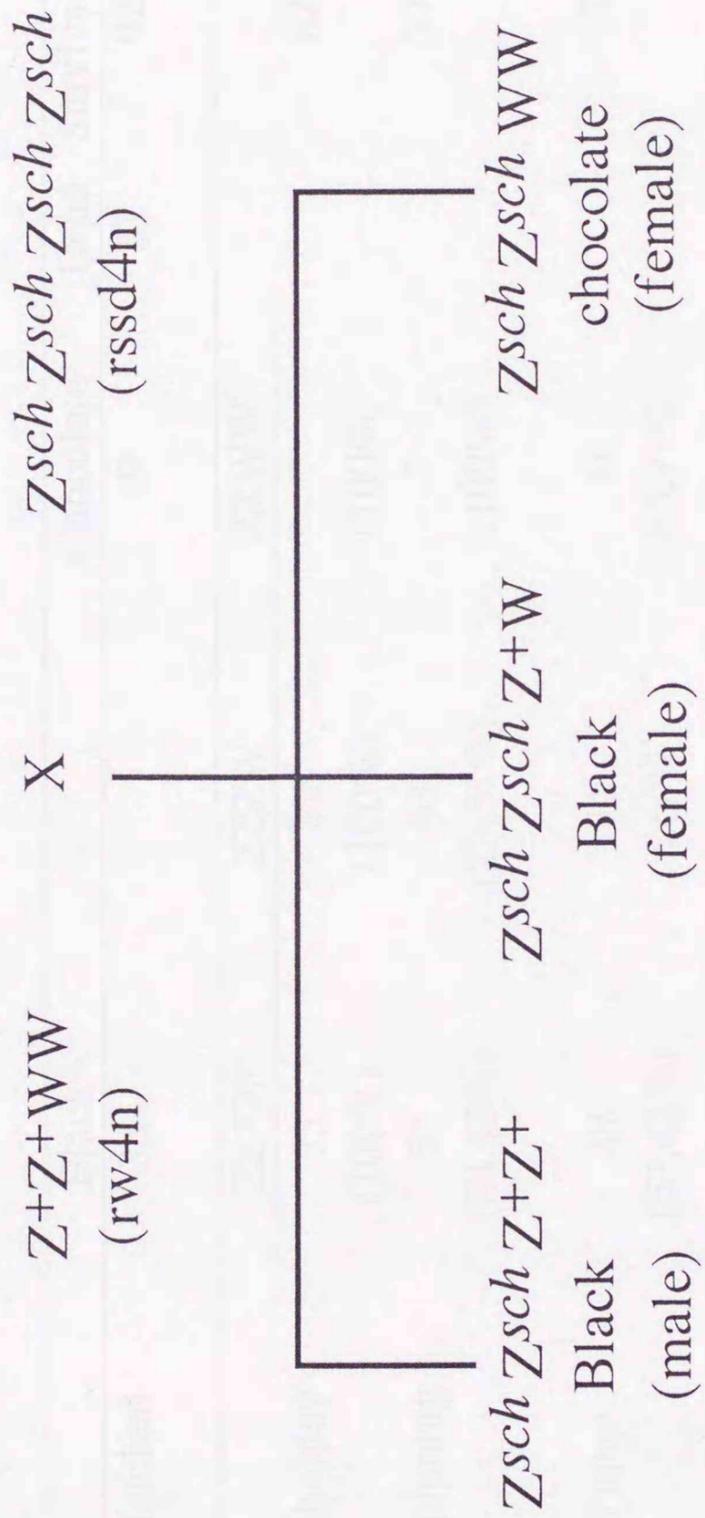


Fig. 24. Sex chromosome constitution and colors of newly hatched larvae of F₁ tetraploids.

Table 23. Survival rate in F₁ tetraploids of RWRS4n.

	Black	Chocolate	Dead	Survival rate(%)
Hatched	384	9	31	92.69
	<i>ZZZZ</i>	<i>ZZWW</i>		
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.

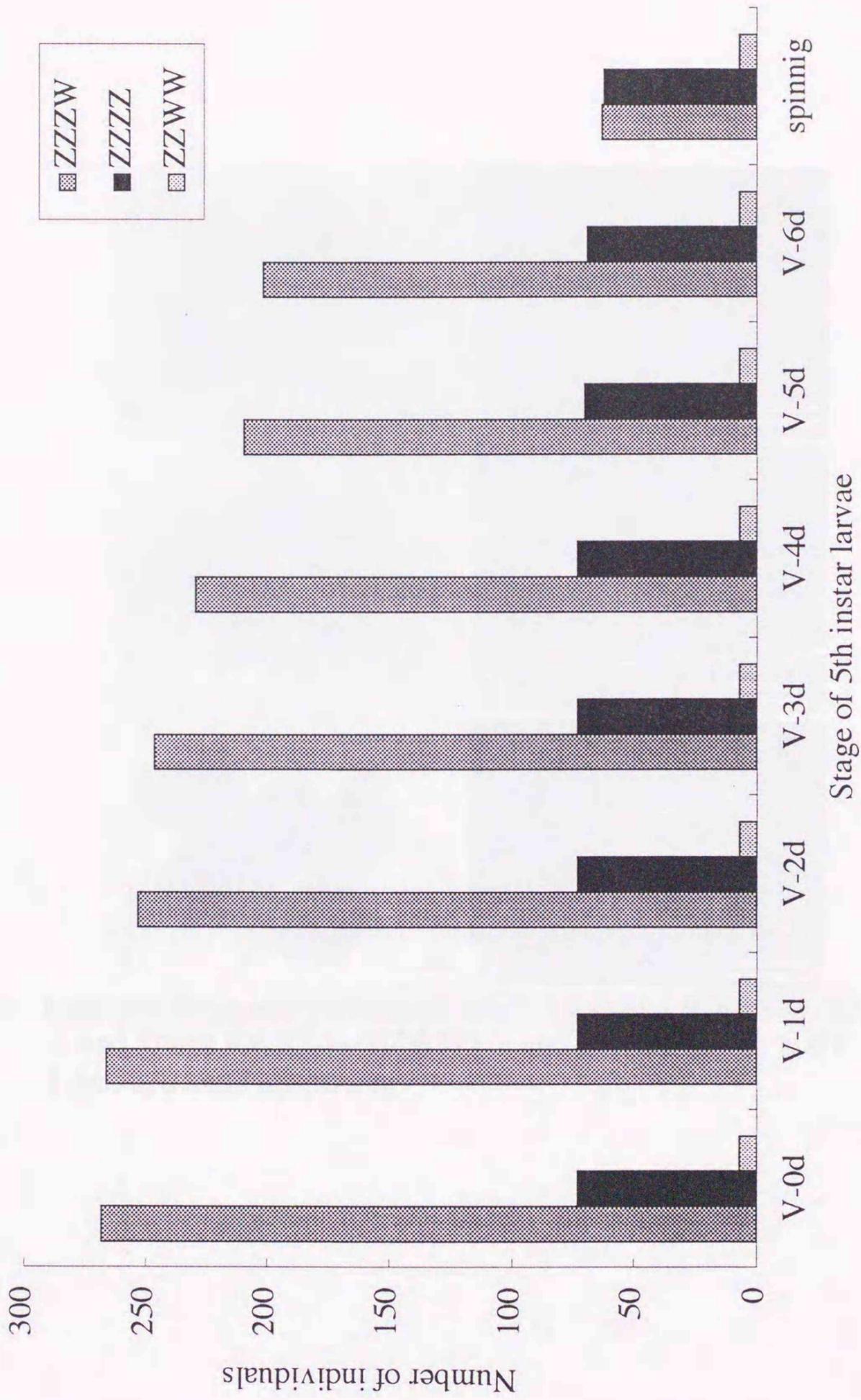


Fig. 25. Survivors of F₁ tetraploids during the 5th instar.

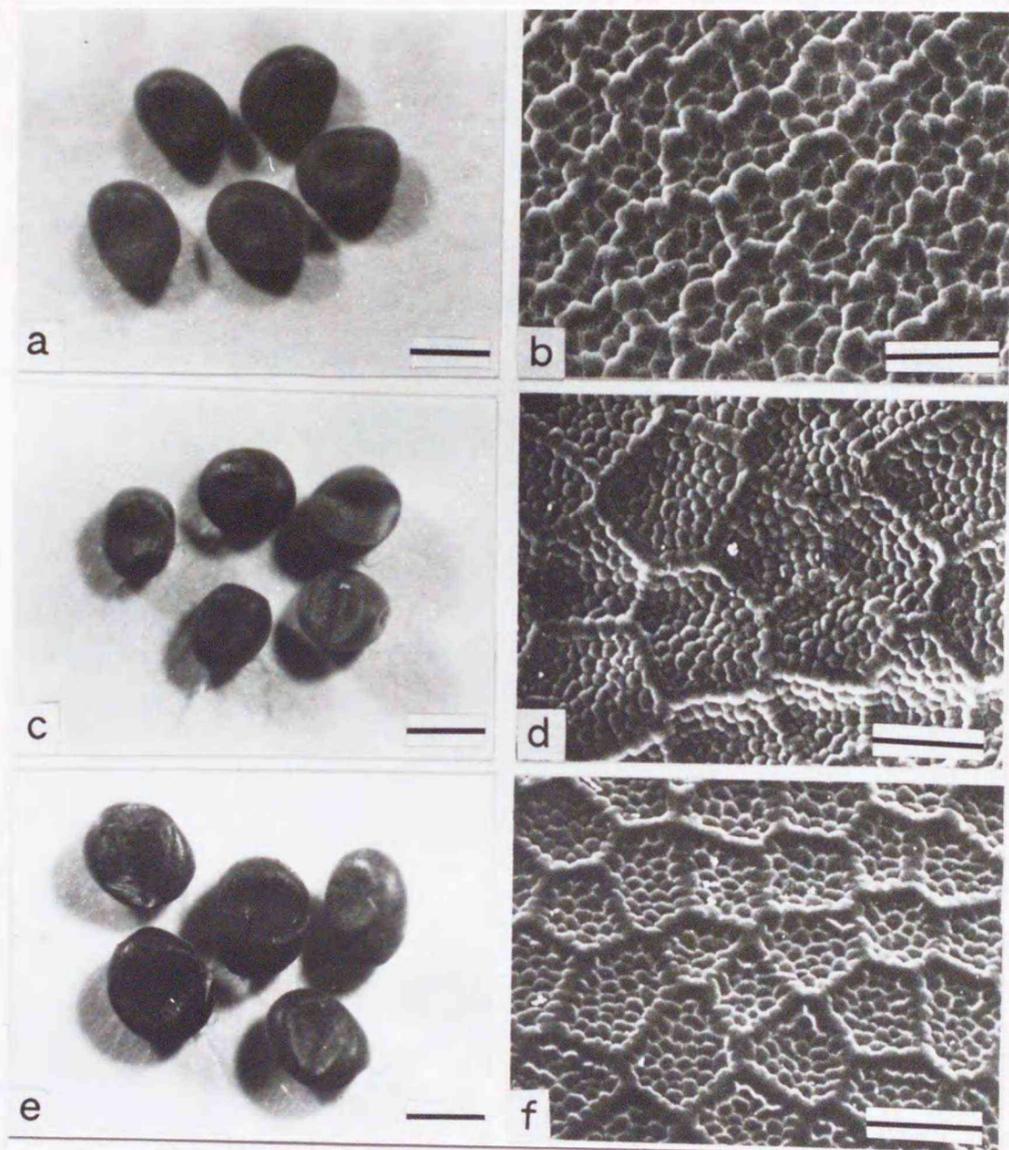


Fig. 26. Eggs and polygonal patterns of *rwrs2n* (a and b), *RWRS4n* (ZZZW) (c and d) and *RWRS4n* (ZZWW) (e and f). Bars of a, c and e are 1mm, b, d and f are 50 μ m.

Table 24. 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	1828.4	28.26
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

られた範囲での性状調査が行われているにすぎない(Astaurov, 1969; Katsuno and Tamazawa, 1979)。本実験においては、本章第1節で確立したアラタ体摘出、高温-多湿処理および絶食処理を用いて誘起した妊性を有する4倍体雄と4倍体雌を交配してF₁4倍体を得て、孵化率、生存率、羽化率および2種類の雌(ZZZWとZZWW)の卵形質の調査を行った。

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分離比も理論値(雌:雄=5:1)と大きく異なる値(1.32:1)であった(Table 20)。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)に分類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(Table 21, Table 22)、F₁4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ZZZ W: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、伴性赤蟻系統4倍体雄に絶食処理を施し妊性を持たせ、rw4n雌と交配してF₁4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(Fig. 24)。RWRS4nの孵化率は92.69%、孵化個体の5齢到達率も88.55%(Table 23)と2倍体(Table 20)と変わらなかったが、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と同様の値を示した。3種類のF₁4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、F₁4倍体ではZZZW雌が特異的に高い死亡率を示すことが明らかになった。

Table 23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ZZWW雌の割合(Kawamura, 1988; 佐原ら, 1990)と非常に近い値を示した。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%前後の羽化率を示したことから、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(Fig. 25, Table 23)であり、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、F₁4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、特定の染色体がブリッジを形成すると考えられる(Kawamura, 1994)。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F₁4n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。

Kawamura(1983)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*の2つの数量遺伝子が存在し、それぞれ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F₁4倍体を用いて2つの数量因子の存在の確認とそれぞれの独立性を検証した。

Fig. 26ならびにTable 24に示したように卵サイズは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(Table 24)ことから、Z染色体の一部欠失の可能性がある。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さの要因は高度に分化した性染色体にあるとMuller (1925)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。

第Ⅶ章 総合考察

他の動物倍数体と同様に、低温処理によって誘起された家蚕4倍体は、幼虫ならびに成虫ともに外見的特徴からは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雌の産下卵サイズの大型化を性染色体構成が明らかとなる遺伝的形質をマーカーとして解析すること、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)の配偶子形成においては、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(川口, 1934)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(橋本, 1933)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が存在することから、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、転座染色体の長さに依存することが推測された。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(Rasmussen, 1977)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するのかどうかを調査するために、限性形蚕(カタコ)系統の「ほまれ」を用いて同品種内の交配由来の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不相称な染色体対が1対観察された。このうち、遺伝解析が進んでおり(新野ら, 1987)不相称な染色体対がZW対であると証明されている(Kawamura and Niino, 1991)限性黄繭系統(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 Traut(1986)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 Pearson(1971)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(Weith and Traut, 1980)のに対して、ヒトY染色体にはSRY遺伝子が座位している(Muller, 1994)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 Groffiths(1939)により示された、核-細胞質比により説明されていた。ところが、Kawamura(1988)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が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 (Kawamura, 1990)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における遺伝的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なっている(河口, 1989)。また、*Ge*系統に対する投与も同様の効果を示すことから、*Esd*の発現をさらに追求するためにはエクダイス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と考えられる。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による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。

*Esd*遺伝子は卵巣以外の体内環境の影響から独立しており、従って卵サイズは本来の卵巣に形成されるのと同じサイズである。このことを利用して、卵巣を1つ過剰にした場合の卵サイズと卵数の関係を調査したところ、卵サイズも卵数も抑制された。閉鎖環境である家蚕体内において栄養の分配が起こる環境下では、*Esd*遺伝子と卵数の関連を明らかにすることが困難であると考えられたために、逆に5齢起蚕から化蛹7日目まで、片側卵巣摘出により1個体に1卵巣としてその関係を調査した。家蚕の卵形成では蛹から成虫への変態に関わるホルモンなどの体内環境の変化に応じて卵管先端近くに退化卵が発生してそれ以降の卵形成は中止される(戸谷, 1984)。正常系統と大卵系統のいずれにおいても卵サイズが10~20%増加したことにより、*Esd*遺伝子は限られた栄養条件下ではその能力を制限されていることが明らかとなった。また、大卵系統において化蛹3日目まで認められた卵数の増大は、化蛹4日目に無処理区との有意差が認められなくなった。これに対して、卵サイズの増加は化蛹4日まで続いたことから、家蚕において1個体内の限られた栄養を効率よく次世代に伝えるための手段として一義的に数を優先させる機構を持ち、卵サイズの増大がそれを補償しているとも考えられる。家蚕は昆虫の繁殖戦略における卵形質の調査を行う上でのモデルとして取り扱うことも可能である。

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 $rw2n = TG2n < rw4n = TG4n$ とZ染色体の数と網目面積が正の比例関係を示した。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(Kawaguchi *et al.*, 1994)。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する因子であ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-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(King and Akai, 1971)。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(2*n*)ができる

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)ができることを示した。

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)が形成される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感させる。

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、 F_1 4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(Kawamura, 1994)。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 F_1 4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。Kawamura(1983)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。倍数体の研究も2倍体を知るための比較材料にすぎない。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だせた。今後は、これらの現象をいかにして分子レベルとし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。現在、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。家蚕はこの様な研究を行う上で非常に有益な材料であると考えられる。

第Ⅷ章 要約

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)の性染色体の対合選択性は、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)の卵母細胞の性染色体対の割合(Z+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*遺伝子は卵巣内の遺伝的要因以外の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。

Ge系統と正常系統を用いた片側卵巣摘出による卵サイズと卵数の関係の調査を

行ったところ、双方の系統ともに卵サイズが10~20%増加したが、卵数の増加が認められたのは*Ge*系統に限られた。また、*Ge*系統における卵数の増加は化蛹3日までであったのに対して、卵サイズの増加は化蛹4日まで続いた。これらの事実は、家蚕の卵形成において、栄養条件の限られた環境下では*Esd*遺伝子とその発現を抑制されて、卵数を優先して卵質の決定を行っていることを示した。

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-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-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

The genetical and morphological features in the polyploid silkworms induced by low temperature treatment

In the silkworm, the triploid progeny from the cross between tetraploid females induced by low temperature treatment and diploid males carrying the sex-linked recessive genes consisted of three 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 because a *Z* gamete was always transmitted from diploid males. The ratio of three 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 preference that occurred in the tetraploids from the four strains harboring sex-limited marker genes was much higher than that in the tetraploids of three normal strains. Furthermore, within the tetraploid of sex-limited strains, the length of the translocated autosomes appeared to be one of factors to cause the preference in the pairing.

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 was cytologically observed in *Sy4n* (Homotype) and *Syr4n* (Heterotype) and the ratio of two pairing patterns was calculated. These two experiments revealed that the sex chromosomes in Heterotype tetraploids paired in preference between the same kind at 5 fold of those in Homotypes.

Deposition of large eggs by ZWW triploid females was confirmed in four 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 the diploids with or without a giant egg gene (*Ge*) which is identical with *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. The fact revealed that the environmental factors had no effects on the gene expression.

One ovary excision from an individual in the normal and *Ge* strains showed 10 to 20% increase in egg size in both cases. The increase in egg size within one ovary suggests some suppressing mechanism working in the normal condition where two ovaries are present. In the *Ge* strains, the increase of egg size was observed in the individuals which the operation was performed up to the pupa-5day. As to egg number, the increase continued in the individuals operated up to pupa-4day. The difference suggests that egg number was determined prior to egg size.

The size of polygonal patterns was shown as the following equation, $ZW(2n)=ZWW(3n)<ZZW(3n)=ZZWW(4n)<ZZZW(4n)$. The size increase did not depend on ploidy but on the number of Z chromosomes. The fact leads to the conclusion that the polygonal pattern size determining gene (*Pgd*) is present on the Z chromosome. The *Pgd* gene on the Z is 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; $rw_{2n}<rw_{4n}=TG_{2n}<TG_{4n}$ for the egg size and $rw_{2n}=TG_{2n}<rw_{4n}=TG_{4n}$ for the polygonal pattern size. The expression of the *Esd* and the *Pgd* appeared to be independent each other. This was confirmed in two kinds of F₁ tetraploid females (ZZZW and ZZWW).

In the silkworms, tetraploid males are sterile in nature. The experiments such as excision of a corpus alatum, high temperature-moisture treatment and starvation were carried out in the tetraploid males during the 5th larval instar. These stimuli were effective to produce fertile tetraploid males. Especially, starvation of tetraploid males for 30h or 51h at 60h of 5th larval instar was found to be most effective. Start of meiosis in the 5th instar larvae is delayed 60h in the tetraploid males. It is noteworthy that the 60h of the delay well coincided with the most effective stage, 60h of the 5th instar, to induce fertile tetraploid males.

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

第X章 文献

赤井 弘(1957): 家蚕卵殻の微細構造について(I). 日蚕雑, **26**, 335-340.

有賀 久雄(1943): 家蚕における伴性遺伝をなす一突然変異. 蚕試報, **11**, 499-507.

Astaurov, B. L.(1957): High temperature as a tool for controlling development and sex determination: a review of studies in artificial parthenogenesis, androgenesis and elimination of embryonic diapause in the silkworm, *Bombyx mori* Linnaeus. Proc. Zoo. Soc., Calcutta, Mookerjee Memor., 29-55.

Astaurov, B. L.(1967): Experimental alternation of the developmental cytogenetic mechanisms in mulberry silkworm: Artificial parthenogenesis, polyploidy, gynogenesis and androgenesis. Advance. in Morphogenesis, **6**, 199-275.

Astaurov, B. L.(1969): Polyploidy in animals. Ann. Rev. Genet., **3**, 99-125.

Doira, H. (1983): Linkage maps of *Bombyx mori* - Status quo in 1983. Sericologia, **23**, 245-269.

土井良 宏・木原 始・筑紫 春生(1972): 第2小形卵の遺伝的研究. 日蚕雑, **43**, 369-372.

土井良 宏・藤井 博・河口 豊・木原 始・伴野 豊(1992): 「家蚕遺伝子資源系統の特性情報」 p20, p47.

Fankhauser, G.(1939): Polyploid in salamander, *Eurycea bislineata*. J. Hered., **30**, 379-388.

Fankhauser, G. and Griffiths, R. B.(1939): 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.

藤川 和博・河口 豊・伴野 豊・赤木 俊介・古賀 克己(1993): カイコにおける白妙卵の卵形質. 日蚕雑, 62, 286-291.

Fukuda, S.(1944): The hormonal mechanism of larval moulting and metamorphosis in the silkworm. J. Fac. Sci. Tokyo Imp. Univ. Sec. IV., 6, 477-532.

長谷川 金作(1943): 家蚕卵細胞の発育に関する研究 (I) 蛹期間における卵巢の発育. 蚕試報, 11, 359-377.

橋本 春雄(1930): 家蚕の卵巢片側別出の次代に及ぼす影響. 日蚕雑, 1, 136-153.

橋本 春雄(1933): 蚕のテトラプロイド雌の遺伝的研究. 蚕試報, 8, 359-381

橋本 春雄(1934): 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.

橋本 春雄(1935): 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.

橋本 春雄(1941): 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.

橋本 春雄(1957): 産下直後のカイコ卵の温度処理と性比. 蚕糸研究, 20, 11-13.

広部 達道(1939): 蚕卵コルヒチン処理に因る倍数蚕の出現. 遺雑, 15, 69-74.

廣川 昌彦(1992): 家蚕3倍体雄の妊性. 東北蚕糸研報, 17, 6.

廣川 昌彦(1995): 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.

Hulten, M. and Pearson, P. L.(1971): Fluorescent evidence for spermatocytes with two Y chromosomes in an XYY male. Ann. Hum. Genet., **34**, 273-277.

Ito, S.(1977): 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.

神田 俊男・松村 初太郎・大槻 良樹(1974): 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.

Katsuno, S. and Tamazawa, S.(1979): Studies on apylene and eupylene spermatozoa in the male reproductive organ of the tetraploid male of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepdoptera: Bombycidae). Appl.Ent. Zool., **14**, 438-444.

Katsuno, S.(1984a): 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.

Katsuno, S.(1984b): Surface structure of the egg-shell in polyploid silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn., **53**, 97-107.

川口 栄作(1934): 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.

Kawaguchi, E.(1936): Der Einfluß der Einerbehandlung mit Zentrifugierung auf die Vererbung bei dem Seidenspinner. I. Über experimentelle Auslösung der polyploiden Mutation. J. Facul. Hokkaido Imp. Univ. Sapporo, **38**, 111-133.

川口 栄作(1936a): テトラプロイド蚕 F_1 とその両性比(予報). 日蚕雑. **7**, 93-94.

川口 栄作(1936b): ヘキサプロイドの蚕(予報), 日蚕雑, **7**, 95.

川口 栄作(1937): 倍数性の経済的特質, 日蚕雑, **8**, 121-126.

Kawaguchi, E.(1938): Der Einfluß der Einerbehandlung mit Zentrifugierung auf die Vererbung bei dem Seidenspinner. III. Beweise für die Beziehung der Geschlechtschromosomen zu den Nukleolen. *Cytologia*, **9**, 88-96.

川口 栄作(1938): 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.

河口 豊・伴野 豊・土井良 宏・藤井 博(1989): カイコの大卵突然変異遺伝子による形質発現 2. 20-ヒ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.

Kawaguchi, Y., Banno, Y., Koga, K., Doira, H. and Fujii, H.(1993): Polygonal patterns on eggshell of giant egg mutant and large eggs induced by 20-hydroxyecdysone in *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, **39**, 437-443.

Kawaguchi, Y., Banno, Y., Koga, K., Doira, H. and Fujii, H.(1994): Induction of larger egg by 20-hydroxyecdysone in giant egg mutant phenotype in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, **63**, 443-448.

河口 豊・伴野 豊・古賀 克己・藤井 博(1991): カイコ5齢幼虫の絶食処理が卵形成におよぼす影響. 九大農学芸誌, **45**, 145-151.

河口 豊・伴野 豊・古賀 克己・藤井 博(1993b): 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.

Kawaguchi, Y., Banno, Y., Koga, K., Kawarabata, T. and Doira, H.(1996): Comparison of chorion of structure eggs from *Bombyx mori*, *Bombyx mandarina* (Lepidoptera: Bombycidae) and their first filial generation. *Appl. Entomol. Zool.*, **31**, 407-

Kawaguchi, Y., Doira, H., Banno, Y. and Fujii, H.(1990): 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.

河口 豊・末永 博・藤井 博・坂口 文吾(1985): 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.

河口 豊・廬 時甲・宮路 由香利・藤井 博(1988): カイコにおける第2小形卵の特徴. *日蚕雑*, **57**, 157-164.

河口 豊・恒成 直美・伴野 豊・古賀 克己・土井良 宏・藤井 博(1993a): 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.

Kawamura, N.(1978): The early embryonic mitosis in normal and cooled eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Morph.*, **158**, 57-72.

Kawamura, N.(1979a): Cytological studies on the mosaic silkworms induced by low temperature treatment. *Chromosoma*, **74**, 179-188.

Kawamura, N.(1979b): Polyploidy and size of serosa nuclei and cells in eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, **48**, 77-85.

Kawamura, N.(1981): Induction of hexaploid and octaploid specimens in the silkworm (*Bombyx mori*) by exposing to low temperature. *Proc. Jpn. Acad.*, **57**, 77-82.

Kawamura, N.(1983): Cytological studies on mixoploidy and embryonic development in mosaic silkworms induced by low temperature treatment. *Genetica*, **60**, 181-190.

Kawamura, N.(1988): The egg size determining gene, *Esd*, is a unique morphological marker on the W chromosome of *Bombyx mori*. *Genetica*, **76**, 195-201.

- Kawamura, N.(1990):** 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.
- Kawamura, N.(1994):** Male meiosis in polyploid silkworm, *Bombyx mori*. L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.*, **23**, 311-317.
- Kawamura, N. and Niino, T.(1991):** Identification of the Z-W bivalent in the silkworm, *Bombyx mori*.. *Genetica*, **83**, 121-123.
- Kawamura, N., Sahara, K. and Iizuka, T.(1994):** Preferential pairing of the sex chromosomes in the tetraploid silkworms (*Bombyx mori*.). *Hereditas*, **121**, 73-78.
- Kawamura, T.(1939):** The occurrence of triploid in the frog. *Zool. Mag.*, **51**, 629-632.
- 木村 敬助・原田 忠次・青木 秀夫(1971): 家蚕の黄血遺伝子のW転座に関する研究. **21**, 日蚕雑, 199-203.
- King, R. C. and Akai, H.(1971):** Spermatogenesis in *Bombyx mori* L. I. The canal system joining sister spermatocytes. *J. Morph.*, **134**, 47-56.
- Makino, S. and Ojima, Y.(1943):** 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.
- 諸星 静次郎(1976): 「蚕の発生生理」5章 各齢期における幼若ホルモンとエクジソンの消長. 東京大学出版会, p103-123.
- Muller, U.(1994):** The human Y chromosome. *Molecular Genetics of Sex Determination* (ed. S. S. Wachtel), Academic Press, New York, p206-224.
- Muller, H. J.(1925):** Why polyploidy is rarer in animals than in plants? *Am. Nat.*, **59**, 346-353.

室賀 兵左衛門(1947): 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.

新野 孝男・神田 俊男・江口 良橘・島崎 旭・渋谷 明郎(1987): 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.

大村 清之助・片岡 平(1943): 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.

大槻 良樹・神田 俊男(1978): カイコの潰れ卵系統の卵殻の特異的構造. 日蚕雑, 47, 215-220.

大槻 良樹・神田 俊男・松村 初太郎(1977a): 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.

大槻 良樹・北沢 敏男・神田 俊男(1977b): 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.

黄色 俊一(1976): 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.

Oshiki, S. and Morohoshi, S.(1973): 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.

Rasmussen, S. W.(1976): The meiotic prophase in *Bombyx mori* females analyzed by three-dimensional reconstructions of synaptonemal complexes. Chromosoma, 54, 245-293.

Rasmussen, S. W.(1987): Chromosome pairing in autotetraploid *Bombyx* males.- Inhibition of multivalent correction by crossing over- Carlsberg Res. Commun., 52, 211-

- Rasmussen, S. W. and Holm, P. B.(1979):** Chromosome pairing in autotetraploid *Bombyx* females. -Mechanism for exclusive bivalent formation. Carlsberg Res. Commun., **44**, 101-125.
- 佐原 健・川村 直子・飯塚 敏彦(1990): 劣性伴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.
- 佐藤 春太郎(1937): 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.
- 佐藤 市兵衛・杉浦 勇次郎(1934): 蚕卵殻の斑紋に就いて. 日蚕雑, **5**, 288-231.
- Suzuki, Y. and Brown, D.D.(1972):** Isolation and identification of the messenger RNA for silk fibroin from *Bombyx mori*. J. Mol. Biol., **63**, 409-429.
- Takagi, N.(1971):** A simple technique to demonstrate the centromeric 'heterochromatin' in the mouse and other animals. Jpn. J. Genet., **46**, 361-363.
- 滝沢義郎・玉沢 享(1968): ポリプロイドとserosa細胞の大きさの関係. 日蚕雑, **37**, 248.
- 玉沢 享(1977): 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.
- 玉沢 享・滝沢義郎(1977): 蚕卵の過冷却処理による倍数体の出現. -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.
- Tanaka, Y.(1916):** Genetic study on the silkworm. J. Coll. Agric. Tohoku. Imp. Univ., **7**, 129-255.

田中 義麿(1939): 蚕の性染色体不分離, 遺雜, 15, 359-361.

田中 義麿・川口 栄作(1932): 人為的に獲たる triploidの蚕, 遺雜, 7, 186-187.

田島 弥太郎(1941): 蚕児の斑紋利用による簡易なる雌雄鑑別法. 日蚕雜, 12, 184-188.

田島 弥太郎(1944): 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.

田島 弥太郎(1948): X線による蚕の突然変異の研究. 蚕研彙報, 2, 26-29.

Tazima, Y.(1954): Mechanisms of the sex determination in the silkworm, *Bombyx mori*. Proc. 9th Internat. Cong. Genet. Caryogia 6 Suppl., 958-960.

Tazima, Y.(1964): "The Genetics of the silkworm." Logos press, London.

Tazima, Y. and Onuma, A.(1967): Experimental induction of androgenesis, gynogenesis and polyploidy in *Bombyx mori* by treatment of CO₂ gas. J. Seric. Sci. Jpn., 36, 286-292.

戸谷 和夫(1984): 家蚕における退化卵発現に関する研究. 蚕試報, 29, 285-369.

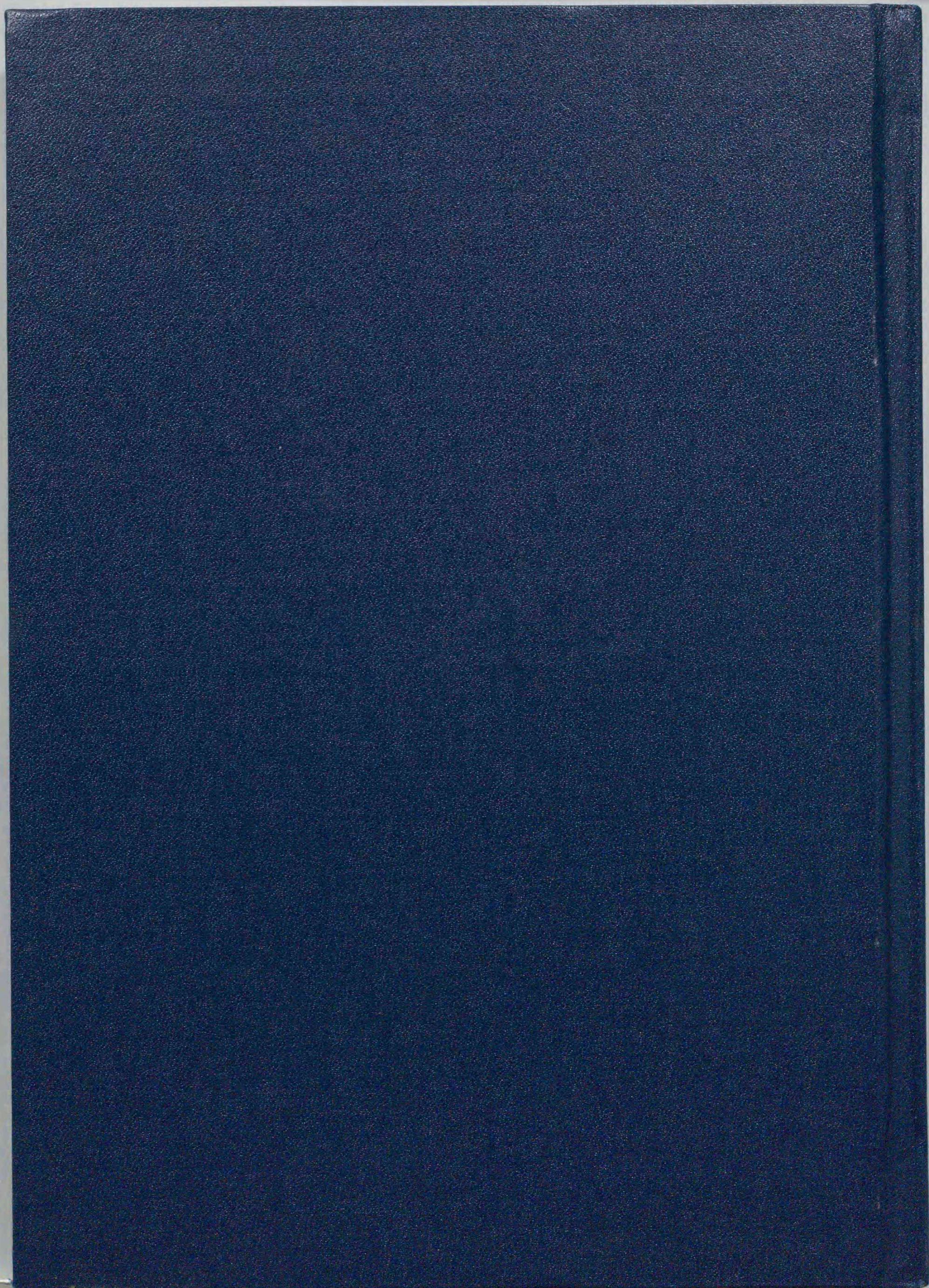
Toyama, K.(1906): Studies on the hybridology of insects. I. On some silkworm crosses with special reference to Mendel's law of heredity. Bull. Coll. Agri. Tokyo Univ., 7, 259-393.

外山 亀太郎(1906): 蚕種類の改良. 蚕業新報. 158, 4-8.

Weith, A. and Traut, W.(1980): Synaptonemal complexes with associated chromatin in

a moth, *Ephesia kuehniella* Z. Chromosoma, **78**, 275-291.

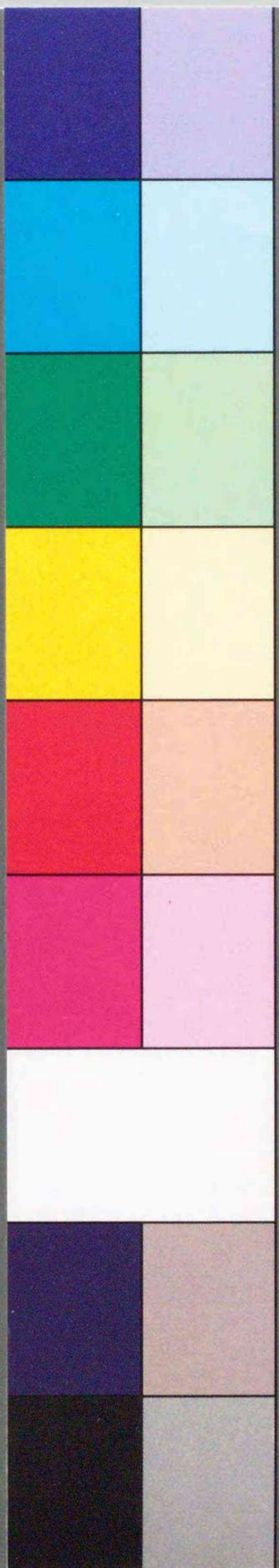
Weith, A. and Traut, W.(1986): Synaptonemal adjustment, non-homologous pairing, and non-pairing of homologous segment in sex chromosome mutation of *Ephesia kuehniella* (Insecta, Lepidoptera). Chromosoma, **94**, 125-131.



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM: Kodak