



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on genetic and reproductive characteristics of natural polyploid silver crucian carp <i>Carassius auratus langsdorfii</i> [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	董, 捷
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第11331号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55373
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Dong_Jie_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）

氏名：Jie DONG（董 捷）

審査委員	主査	教授	水田浩之
	副査	教授	荒井克俊
	副査	教授	山羽悦郎
	副査	准教授	藤本貴史

学 位 論 文 題 目

Studies on genetic and reproductive characteristics of natural polyploidy silver crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*
(自然倍数体ギンブナの遺伝および生殖特性に関する研究)

日本に分布するギンブナ *Carassius auratus langsdorfii* は二倍体と倍数体（三倍体と四倍体）を含み、前者は通常の有性生殖により繁殖するのに対し、後者は非還元卵を産し、これらが雌性発生によりクローンとして繁殖することが知られている。従って、倍数体ギンブナはほとんどが雌である。これに対して、中国のギンブナ *C. a. gibelio* は三倍体であるが、約 20% 程度の雄が出現し、雌性発生と有性生殖の二通りの生殖様式をもつ。すなわち、三倍体の産する非還元卵が異種精子で授精された場合、雌性発生が起こるが、同種の三倍体雄の精子で授精された場合、精子の取り込みが生じ、三倍体子孫には遺伝的変異をもつ雌雄が出現する。三倍体雄は体細胞の半分の DNA 量をもつ精子を産生するが、この精子で三倍体雌の作る卵を授精した後、子孫が三倍体となる機構は明らかではない。日本産ギンブナにおいては四倍体および倍数体雄の出現頻度が希なことから、それらの生殖における役割は十分に検討されてこなかった。申請者は、主に群馬県城沼の野生集団に由来する四倍体ギンブナ雌雄を材料に、その三倍体との関係を遺伝学的手法により検討するとともに、四倍体雌雄の自然交配より生じた子孫の遺伝学的、細胞遺伝学的解析から生殖特性解明を試み、以下の成果を得た。

1. 北大北方生物圏フィールド科学センター七飯淡水実験所では、群馬県城沼産に由来するギンブナ四倍体雄と由来不明の四倍体雌を飼育している。これらに加え、2013 年に城沼由来ギンブナを採取し、フローサイトメトリー法による倍数性判定、ならびに配偶子の観

察による性判別を試みたところ、14 個体が三倍体雌、1 個体が四倍体雌、1 個体が四倍体雄であり、二倍体は得られなかった。ギンブナ倍数体（三倍体 14 個体、四倍体 4 個体）について、マイクロサテライト (MS) DNA マーカー 6 座を分析したところ、三倍体 9 個体は同一のマーカー型を示し自然クローンと判定された。残りの三倍体、四倍体は個体特異的なマーカー型をもつことから、クローン性は確認できなかった。MS-DNA を用いて作成した系統樹から、四倍体は三倍体から生じる可能性が示唆された。

2. クローン性が確認された三倍体から卵を得て、キンギョの精子により授精したところ、正常な孵化仔魚が得られた。これらの倍数性をフローサイトメトリー法で調べたところ、ほとんどは三倍体であったが、少数の異数体 ($3.6n$) が生じた。これらから DNA を常法により抽出、精製し、複数のランダムプライマーを用いた RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法により得た DNA フィンガープリント (FP) 像を解析したところ、雄由来の DNA 断片は認められず、DNA-FP 像は雌親三倍体と同一であった。このことより、城沼由来三倍体ギンブナは雌性発生をしていることが判明した。

3. ギンブナ四倍体雌の産む卵を同種の四倍体雄の精子 ($2n$) で授精した場合、卵が精子を取り込むのか、あるいは、精子は雌性発生の引き金となるだけであるのか不明であった。七飯淡水実験所で四倍体雌と雄を一つの水槽に入れたところ、自然産卵により多数の子孫が得られたことから、これらの倍数性をフローサイトメトリーにより、遺伝特性を RAPD 法と MS-DNA マーカーの分析から検討した。その結果、子孫はすべて四倍体であり、RAPD 法による DNA-FP は母親と子孫間で同一であった。5 座の MS-DNA マーカー型には雄由来アレルは生じず、母親と子孫間で同一であった。以上の結果は、同種四倍体雄の精子で授精した場合も、四倍体雌の産する四倍体非還元卵は雌性発生を起こすことを示した。

4. ギンブナと近縁なキンギョ二倍体とギンブナ四倍体について染色体を観察したところ、前者が $2n=100$ を示すのに対し、後者は $4n=206$ を示し、三倍体 ($3n=156$) と同様に微小染色体 6 本をもつことから、四倍体は三倍体から精子取り込みにより生じたものと推定した。また、5.8S+28SrDNA 配列をプローブとした FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法ではキンギョが 4 シグナルを示すのに対し、四倍体は 8 シグナルを示したことから、ゲノムは 4 セットあることが推定された。

以上、申請者は、出現頻度の低い四倍体ギンブナは三倍体から生じたことを MS-DNA マーカーの分析および分子細胞遺伝学的観察から強く示唆したばかりか、希な四倍体雄の $2n$ 精子により、同種四倍体雌の産する非還元卵を授精した場合にも、中国産ギンブナで見られる精子核の取り込みは生じず、非還元卵では雌性発生が起こることを明らかにした。以上の成果は自然倍数体魚の出現機構および起源に示唆を与えるばかりか、有用養殖魚の倍数体育種技術開発の資となる。よって、審査員一同は申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。