



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Induced androgenetic diploids without egg irradiation in loach and zebrafish [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	侯, 吉倫
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第11332号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55401
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Jilun_Hou_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：Jilun HOU（侯吉倫）

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

Induced androgenetic diploids without egg irradiation in loach and zebrafish

（卵の照射によらないドジョウとゼブラフィッシュの雄性発生二倍体誘起）

雄性発生 androgenesis とは雄（精子）核由来の染色体だけをもつ胚を生じる現象を言い、自然では希である。体外受精を行う魚種では、予め卵をガンマ線、エックス線、あるいは紫外線で照射して、核を遺伝的に不活性化した後に、正常精子で受精することで雄性発生を人為的に誘起することができる。この様に誘起した雄性発生胚は、通例 1 セットの染色体しかもたないため、半数体症候群と言われる一群の異常を起こし致死性である。しかし、二倍性の精子で照射卵を受精すれば生存性の雄性発生二倍体を作成できる。また、卵割期に温度あるいは圧力等で処理することにより染色体を 1 セットから 2 セットへ倍加させることができれば、生存性の雄性発生二倍体（倍加半数体）を作成できる。この様に作成した倍加半数体は完全にホモ接合であるので、産する配偶子は遺伝的に均質である。従って、このような配偶子を用いて、次世代で再度、雄性発生を行えばクローン集団を誘起できる。

雄性発生二倍体の誘起の第一歩は卵の照射による遺伝的不活性化にあるが、申請者の所属する研究室では、近年、ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* の受精直後卵を冷水に曝すこと（低温処理）により雄性発生半数体が生じることを報告した (Morishima et al. 2011)。しかし、受精直後卵の低温処理による雄性発生の手法と二倍性精子を用いた受精、あるいは、同じ雄性発生の手法と卵割期の処理の組み合わせによる生存性の雄性発生二倍体の作成は行われていない。さらに、ドジョウ以外の魚種において、低温処理による雄性発生法が有効か否かは不明である。本研究では、異なる二つの方法により雄性発生二倍体ドジョウ

ウの作出を試みるとともに、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* における低温処理による雄性発生の誘起、雄性発生二倍体（倍加半数体）の作出、さらに、その卵を用いたクローン系統の作出を検討し、以下の成果を得た。

1. 野生型ドジョウの卵を四倍体ドジョウ（二倍体雌×四倍体雄の交配直後の第二極体放出阻止により作出）の二倍性精子で受精し、その直後（約 10 秒以内）の $3\pm0.5^{\circ}\text{C}$ で 30 分間の低温処理条件により雄性発生二倍体を作成した（作出率 $12.29\pm3.25\%$ ）。そして、それらの倍数性をフローサイトメトリーにより、また、精子由来ゲノムのみの存在をマイクロサテライト (MS-) DNA マーカー分析により確認した。
2. 野生型ドジョウの卵をヒドジョウ系統（劣性形質）の精子により受精直後、上記と同条件で低温処理を施し、 $20\pm0.5^{\circ}\text{C}$ で 35 分間培養した後（受精後 65 分）、 $42\pm0.5^{\circ}\text{C}$ で 2 分間の高温処理を行うことにより、雄性発生二倍体（倍加半数体）を作成した（作出率 $10.43\pm1.69\%$ ）。これら倍加半数体の二倍性をフローサイトメトリーにより、精子由来ゲノムのみの存在をヒドジョウ形質の発現と父系 MS-DNA マーカーのみの出現により確認した。完全ホモ接合性を殆どが異なる連鎖群にある 28MS-DNA マーカー座の分析から確認した。
3. ゼブラフィッシュにおいても、 $7\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 、30 分間の低温処理により効率的に雄性発生が誘起でき、さらに $28.5\pm0.5^{\circ}\text{C}$ で 13 分間培養後、 $41.4\pm0.5^{\circ}\text{C}$ で 2 分間の高温処理を加えることにより、 $1.10\pm0.19\%$ の率で雄性発生二倍体（倍加半数体）を作成できた。これらの 30 MS-DNA マーカー座は父親由来のアレルについてホモ接合を示し、母親由来のアレルは出現しなかった。
4. 低温処理前後のゼブラフィッシュ受精卵の組織学的観察から、低温処理により卵核が第二極体と一緒に卵外に放出され、卵内には精子核のみが残ることにより半数性の雄性発生が生じることが判明した。従って、雄性発生誘起の細胞学的なメカニズムはドジョウの場合と同じであった。
5. 生残した雄性発生二倍体（倍加半数体）は全て雄であったが、その 1 尾からの精子を用いて野生型の卵を受精し、再度低温処理と高温処理の組み合わせにより雄性発生二倍体クローン系統を作成した。これらの個体間の AFLP 法による DNA フィンガープリントは完全に同一であり、クローン（遺伝的同一性）が証明できた。

以上の結果は、魚類では受精直後卵の低温処理が、従来の卵の照射と同様に、雄性発生的人為的誘起に有効であり、そのメカニズムは魚種間で共通であること、また、卵割期の高温処理と組みあわせることにより、クローンの素材となる完全ホモ接合の倍加半数体の誘起が可能であり、少なくともゼブラフィッシュでは、第二世代の雄性発生誘起によるクローン系樹立が可能であることを示した。すなわち、この学位論文は基礎発生生物学上、興味深い現象を明らかにしたばかりか、魚類の染色体操作による育種技術の発展に大きく寄与するものである。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。