HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	魚類における異種由来細胞質が胚発生および配偶子形成に与える影響に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	遠藤, 充
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第13883号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77874
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Mitsuru_Endoh_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）　　氏名：遠　藤　　充

学 位 論 文 題 目

魚類における異種由来細胞質が胚発生および配偶子形成に与える影響に関する研究

ミトコンドリアは独自のゲノムであるミトコンドリア DNA（mtDNA）を持ち、細胞質母系遺伝により子孫に受け継がれる。mtDNA の突然変異や、核と細胞質の組み合わせの変化により、核－細胞質間に不適合性が生じると、胚発生や生殖能力に異常をきたす。細胞質に起因する不妊には哺乳類の男性不妊症や植物の細胞質雄性不稔があり、不妊機構解明に向けた研究が行われている。これらの研究には、異種の核と細胞質からなる細胞で構成される核－細胞質雑種や、細胞内に変異型の mtDNA が混在するヘテロプラスミーを用いた解析が必要となる。魚類の核－細胞質雑種の作出方法には、紫外線照射で遺伝的に不活性化した卵を異種の精子で受精する異種間雄性発生法が用いられる。魚類のヘテロプラスミー胚は、単離した異種由来のミトコンドリアを初期胚に顕微注入することで誘起される。

不妊形質は水産増養殖においても有用である。不妊魚を養殖に用いることで、野生集団との交雑による遺伝子汚染のリスクを低減できるほか、生殖腺発達のエネルギーを体成長に転換するため、高成長個体の作出が期待される。従来、魚類の不妊化は、雑種化や三倍体化による核のゲノム構成に着目した方法で行われてきたが、魚類においても細胞質に起因する不妊機構が存在するならば、新たな生殖統御技術としての応用が期待される。

本研究では、モデル生物のゼブラフィッシュ *Danio rerio* と、発生工学や育種のモデルとして有用なドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* を含むコイ目魚類を材料に、核－細胞質雑種やヘテロプラスミー個体の誘起法を確立し、それらの生物学的特性を明らかにすることを目的とした。

第 1 章では、まず核－細胞質雑種誘起に向け、ゼブラフィッシュ雄性発生誘起における最適な紫外線照射量を検討した。雄性発生の条件検討では、25、50、75、100、125、150、200 mJ/cm^2 の照射を行い、各照射群の生残率、外部形態、倍数性測定を行った。25–200 mJ/cm^2 のすべての照射群で半数体が検出されたが、25 mJ/cm^2 では二倍体や異数体も検出されたことから照射が不十分と考えられた。100–200 mJ/cm^2 では、胚発生能力の低下や、卵細胞質中の母系因子や微小管に紫外線照射の影響が及んだ胚が観察された。以上から、雄性発生誘起には 50–75 mJ/cm^2 の照射が最適と考えられる。卵への 75 mJ/cm^2 の紫外線照射により誘起したゼブラフィッシュの雄性発生半数体を第一卵割阻止処理に供すことにより、正常な外部形態の雄性発生二倍体（倍加半数体）の誘起に成功した。

次に異種間雄性発生により、細胞質（卵）提供種にゼブラフィッシュ、半数性（精子）核提供種としてパールダニオ *D. albolineatus*、キンギョ *Carassius auratus auratus*、ドジョウ、二倍性（精子）

核提供種として四倍体ギンブナ *C. a. langsdorfii*、クローンドジョウを用いた核－細胞質雑種を誘起し、ゼブラフィッシュとの類縁関係の違いや、核の倍数性の違いによる胚発生能力への影響を調査した。*Danio* 属魚類であるパールダニオを核提供種とした核－細胞質雑種は孵化期まで生残したが、ゼブラフィッシュ雄性発生半数体および雄性発生二倍体よりも重篤な奇形を呈して死亡した。ゼブラフィッシュと同じコイ目コイ科に属するキンギョとギンブナを核提供種とした異属間核－細胞質雑種ではどちらも胞胚期で胚発生を停止した。そしてコイ目ドジョウ科に属するドジョウと性転換クローンドジョウを核提供種とした異科間核－細胞質雑種では、どちらも嚢胚形成過程の 50% エピボリー期で胚発生を停止した。以上から、致死となる核－細胞質雑種の胚発生能力は、核の倍数性によらず、核提供種と細胞質提供種の組み合わせに起因されることが明らかとなった。さらにゼブラフィッシュ雌と上述の核提供種雄との交雑胚では、ゼブラフィッシュの細胞質環境下に母系核と父系核の比が 1：1 の異質二倍体雑種よりも、1：2 の異質三倍体雑種のほうが奇形の程度が高くなったことから、父系ゲノムの増加により母系細胞質との不適合性が強く表れた可能性が示された。

第 2 章では、ゼブラフィッシュ細胞質内に異種のミトコンドリアを移植して胚発生能力への影響を調査した。移植のドナーとして用いるミトコンドリアは、ゼブラフィッシュ、キンギョ、ドジョウの排卵卵から単離し、MitoTracker Green FM で蛍光標識した後、ホストのゼブラフィッシュ 1 細胞期胚の胚盤に顕微注入することにより、同種間、異属間、異科間ヘテロプラスミー胚を誘起した。3 つの移植群間の生残率には有意差が検出されず、ドナー種による胚発生能力の違いは認められなかった。ゼブラフィッシュ同種間のミトコンドリア移植では、蛍光標識したドナー由来ミトコンドリアは孵化期までシグナルが確認できた。しかし、本研究で用いた PCR-RFLP 法では、ドナー由来 mtDNA を移植直後の胚からも検出できなかったため、検出力の高い解析系の構築が必要である。キンギョとドジョウのミトコンドリアを用いた異種間移植では、ドナーミトコンドリアの蛍光シグナルは体節形成期以降に弱くなっていったが、種特異的に増幅するプライマーを用いた PCR により、移植直後から孵化期胚まですべての胚発生段階でドナー由来の mtDNA が検出された。今後、孵化胚以降から成魚のドナー由来 mtDNA の残存について経時的に調査することで、ドナー種の違いよるゼブラフィッシュ細胞質との適合性の差を明らかにできる可能性がある。

第 3 章では、生存性の核－細胞質雑種を誘起し、異種由来細胞質の配偶子形成への影響を調査した。供試魚のドジョウは日本国内に遺伝的に分岐した A 系統、B 系統に加えて、二倍性卵を産出し雌性発生により繁殖する自然クローン二倍体が生息する。クローン系統は過去に A 系統雌と B 系統雄との交雑に起源し、クローン系統が誕生した時代に生息した祖先型の A 系統 mtDNA を引き継ぐ。本研究ではクローンドジョウが配偶子へ遺伝的に同一のゲノムを受け継ぐ点に着目し、核ゲノムはクローン由来、細胞質が B 系統由来に置換した個体の作出を試みた。

異系統間雄性発生の受精率は 0.4%（3/836）だったが、クローン核－B 系統細胞質雑種の成魚が 2 個体得られた。このクローン核－B 系統細胞質雑種雌は二倍性の大卵（直径約 0.90–0.95 mm）と半数性の小卵（直径約 0.71–0.81 mm）を産出した。子孫の *RAG1* 遺伝子の PCR-RFLP 解析とマイクロサテライトマーカー解析では、大卵はクローンのゲノム構成（AB）を維持していたが、小卵ではクローン核の祖先型 A 系統由来あるいは祖先型 B 系統由来の染色体をランダムに受け継いだ。さらに小卵では、一部の遺伝子座で不等組換えによるアレルの重複や欠損が高頻度で生じていた。これは、祖先型系統間における染色体構造の違いを反映した結果と考えられる。半数性卵の増加はクローンドジョウの生殖能力を低下させていると考えられ、魚類においても細胞質に起因する生殖能力への影響が生じることが強く示唆された。