



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 [全文の要約]
Author(s)	遠藤, 充
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/77875
Type	doctoral thesis
File Information	Mitsuru_Endoh_summary.pdf



主論文の要約

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

多くの真核生物では、細胞質母系遺伝により母系のミトコンドリアおよび mtDNA を受け継いできた。ミトコンドリアに関係するタンパク質の多くはその遺伝子を核に移行しており、細胞が正常に機能するためには核と細胞質が協調して働くことが必要とされる。mtDNA の突然変異や核と細胞質の組み合わせの変化により生じる核－細胞質間の不適合性は、哺乳類の男性不妊症や、植物の細胞質雄性不稔を引き起こし、生殖能力へ影響する例がある。水産養殖において不妊形質は、養殖個体と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ことや、生殖腺発達のエネルギーを体成長に転換する高成長個体作出の手段となることから、有用形質とされている。従来の不妊化は、異種間交雑や染色体操作技術を用いた三倍体化による核のゲノム構成に着目したものが多く、核と細胞質の相互作用を利用した例は少ない。魚類においても細胞質に起因する不妊機構を発見できれば、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、核と細胞質が異種の組み合わせである核－細胞質雑種や、細胞内に異種由来のミトコンドリアが混在するヘテロプラスミー胚の誘起法を確立し、それらの生物学的特性を調査した。

第1章では、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* を用いた核－細胞質雑種の誘起に向け、ゼブラフィッシュ雄性発生半数体作出のための条件検討を行った。また、異種間雄性発生によりゼブラフィッシュを細胞質提供種とした核－細胞質雑種を誘起し、核提供種として用いる生物種の細胞質提供種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。第2章では、ゼブラフィッシュの受精胚に異種由来のミトコンドリアを移植することにより、ゼブラフィッシュの細胞質内に異種のミトコンドリアが混在するヘテロプラスミー胚を誘起した。ヘテロプラスミー胚ではゼブラフィッシュの通常二倍体を構成する細胞の細胞質に、異種のミトコンドリアが混在する状態であるため、核と細胞質の相違による不適合性が緩和されと考えられる。第3章では、核－細胞質雑種における異種由来細胞質の配偶子形成への影響を調査するため、異なる系統のドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* を用いた異系統間雄性発生を行い、生存性の核－細胞質雑種の誘起を目指した。成魚が得られたクローン系統二倍性核－B 系統細胞質雑種、すなわちクローンドジョウの細胞質（ミトコンドリア）を B 系統ドジョウの細胞質へ置換した個体が産出する卵の特性を解析した。

ゼブラフィッシュ雄性発生誘起条件の検討

ゼブラフィッシュ雄性発生誘起には 50–75 mJ/cm² の紫外線照射が最適だと結論づけた。75

mJ/cm² の紫外線照射により誘起したゼブラフィッシュ雄性発生半数体と、加えて高温処理による第一卵割阻止を行った雄性発生二倍体は父親由来のアレルのみを持つことが確認された。この雄性発生二倍体（倍加半数体）は遺伝的に均一な精子を産出した。

ゼブラフィッシュ卵を用いた核－細胞質雑種誘起

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た。ゼブラフィッシュと同じ *Danio* 属魚類であるパールダニオを核提供種に用いた異種間核－細胞質雑種では、第一卵割阻止による二倍性回復を行うことで、パールダニオ二倍性核－ゼブラフィッシュ細胞質雑種の正常個体作出を期待したが、ゼブラフィッシュ雄性発生二倍体のような正常な外部形態の胚や成魚は得られなかった。異属間核－細胞質雑種では、キンギョ半数性核－ゼブラフィッシュ細胞質雑種とギンブナ二倍性核－ゼブラフィッシュ細胞質雑種はどちらも胞胚期で胚発生を停止して死亡した。異科間核－細胞質雑種では、ドジョウ半数性核－ゼブラフィッシュ細胞質雑種とクローンドジョウ二倍性核－ゼブラフィッシュ細胞質雑種はどちらも囊胚形成過程の 50% エピボリー期で胚発生を停止して死亡した。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ゲノムと父系核ゲノムの比が 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。

ゼブラフィッシュ胚へのミトコンドリア移植によるヘテロプラスミー誘起

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ず、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。ゼブラフィッシュの細胞質内に異種のミトコンドリアが混在するヘテロプラスミーの状態であることを確認した。

ドジョウ卵を用いた核－細胞質雑種誘起と卵形成の解析

クローン核－B 系統細胞質雑種の成魚が得られたことから、B 系統ドジョウの細胞質環境下で、祖先型 A 系統と祖先型 B 系統を併せ持つクローン核は正常に機能し、胚発生過程における核と細胞質の不適合性は生じなかったと考えられる。クローン核－B 系統細胞質雑種雌は二倍性の大型卵と半数性の小型卵を産出した。大型卵はクローンのゲノム構成を維持していたが、小型卵ではクローン由来の祖先型 A 系統ゲノムと祖先型 B 系統ゲノム間での組換えが起こり、通常の減数分裂の結果生じた還元卵であった。半数性小型卵由来の子孫では、不等組換えによる遺伝子重複や欠損が生じており、

正常な発生能力を持たないと考えられる。不等組換えを生じた *Mac2* と、同じ連鎖群の *Mac3* では、マイクロサテライト-セントロメア間の地図距離が系統間異なるため、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。

本研究を通して、紫外線照射によるゼブラフィッシュ卵核の遺伝的不活性化法が確立し、ゼブラフィッシュを細胞質提供種とした核-細胞質雑種の誘起が可能となった。核-細胞質雑種や雑種の胚発生能力は、ゼブラフィッシュ細胞質環境下に存在する核ゲノムの種類や組み合わせによって変化した。またゼブラフィッシュ細胞質に、異種の排卵卵由来のミトコンドリアを移植したヘテロプラスミー胚の誘起に成功したことから、魚類において細胞質構成の人為的操作の可能性が示された。ドジョウ異系統間の核-細胞質雑種では、異系統細胞質への置換がクロードジョウの特殊な減数分裂機構に変化を生じさせることを示した。魚類においても核-細胞質間の不適合性によって、生殖能力への影響が生じることが強く示唆された。しかし、一部の生殖細胞だけが減数分裂前核内倍加を起こさなかった原因は解明できておらず、今後、配偶子形成への細胞質の関与とそのメカニズムについて詳細に調査する必要がある。