



Title	異なる起源のゲノムを持つドジョウの配偶子形成過程における特殊な染色体挙動に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	黒田, 真道
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第13884号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77876
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Masamichi_Kuroda_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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：黒 田 真 道

学 位 論 文 題 目

異なる起源のゲノムを持つドジョウの配偶子形成過程における

特殊な染色体挙動に関する研究

日本国内に生息するドジョウ (*Misgurnus anguillicaudatus*) の多くは両性生殖で繁殖する二倍体 ($2n=50$) であり、遺伝的に大きく異なる二系統 (A 系統、B 系統) の野生集団が存在する。また、北海道の網走管内大空町には有性生殖で繁殖する A 系統の他にクローン二倍体とクローン由来三倍体が生息する。クローン二倍体の雌は二倍性の非還元卵を産出し、精子核を取り込まず雌性発生によりクローン系統を維持している。クローンドジョウの起源については、人為的に作出した系統間雑種の雌の中に二倍性卵を産出する個体が出現したことや、核遺伝子 *RAG1* や *IRBP2* の塩基配列がヘテロ接合となっていることから過去における二系統の交雑起源が推定され、核ゲノム構成は AB であると考えられた。ドジョウは雄ヘテロ型の性決定様式を持つためクローンドジョウは基本的に全雌であるが、人為的に性転換したクローン二倍体雄は非還元の二倍性精子を形成する。ところが、クローンドジョウと同じゲノム構成の系統間雑種の雄は半数性 ($1n$)、二倍性 ($2n$)、四倍性 ($4n$) の精子あるいは精子様細胞を形成するが、受精能力を持つ精子は極めて少なく不妊とされる。また、クローンドジョウが産出する二倍性卵に精子核が偶発的に取り込まれるとクローン由来三倍体が出現する。クローン由来三倍体の雌は 3 つのゲノムのうち、遺伝的に相同性の低い 1 セットを卵形成過程で排除して半数性 ($1n$) 卵を産出することが DNA マーカーを用いた研究から明らかになっている。その一方で、雄は半数性 ($1n$)、三倍性 ($3n$)、六倍性 ($6n$) の精子あるいは精子様細胞を形成するが、系統間雑種と同様に受精能力を持つ精子は極めて少ない。

上述の特殊な配偶子形成を行う個体に共通する点として、いずれも由来の異なるゲノムを併せ持つことがあげられる。従って、特殊な配偶子形成には生殖細胞における異質なゲノム構成が関係していることが強く示唆される。そこで、もし異なる系統の染色体を識別することができれば、異質なゲノム構成が配偶子形成に与える影響を減数分裂における染色体の挙動から理解できると考えた。しかしながら、二系統やクローンは二倍体が 50 本の染色体をもち、それらの核型は全て中部動原体着糸 (M) 型 5 対 10 本、次中部動原体着糸 (SM) 型 2 対 4 本、端部動原体着糸 (T) 型 18 対 36 本から構成されており、核型の情報から染色体の由来を決定することはできない。

そこで本研究では、二系統の染色体を分子細胞遺伝学的に識別する方法を確立し、生殖細胞の異質なゲノム構成が配偶子形成過程の染色体挙動に与える影響を解明することを目的とした。本研究成果となる主論文は、下記の五章より構成される。

第一章では、B 系統の染色体を分子細胞遺伝学的に識別する方法を確立するため、反復配列 DNA マーカー ManDra-B をプローブとして Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) を行った。その結果、A 系統の染色体ではシグナルが検出されなかったのに対して、B 系統では全 50 本の染色体のセントロメア領域に明瞭なシグナルが検出された。従って、ManDra-B プローブを用いることで B 系統に由来する染色体を分子細胞遺伝学的に識別することが可能となった。

第二章では、A 系統の染色体を分子細胞遺伝学的に識別する方法を確立した。すなわち、A 系統のゲノム DNA から制限酵素 *Dra* I を用いて単離した反復配列 (ManDra-A) と、ManDra-A 領域が 5 単位連続して存在することが確認された配列 (ManDra-A 5 repeats) をプローブとして FISH を行った。その結果、どちらのプローブを用いた場合でも、A 系統では 2 本の M 型と 24 本の T 型染色体のセントロメア領域にシグナルが検出されたのに対して、B 系統ではシグナルが検出されなかった。従って、ManDra-A および ManDra-A 5 repeats プローブを用いることで分子細胞遺伝学的に A 系統の染色体を識別することが可能となった。しかしながら、ManDra-A 5 repeats プローブの方が強いシグナルを安定的に検出することが可能であったため、A 系統の染色体を識別するプローブとしては ManDra-A 5 repeats がより適当と結論した。

第三章では、クロンドジョウが過去における二系統の交雑起源であることを分子細胞遺伝学的に証明するため、第一、二章で開発した系統識別プローブ (ManDra-B, ManDra-A 5 repeats) を用いて FISH を行った。その結果、50 本の染色体のうち半数の 25 本で ManDra-B シグナルが検出されたため、クロンドジョウが由来の異なる二つのゲノムを併せ持つ交雑起源であり、その一方が B 系統由来であることが分子細胞遺伝学的に証明された。次に ManDra-A 5 repeats と ManDra-B プローブを用いて two-color FISH を行った結果、ManDra-B シグナルが検出されなかった 25 本のうち、12 本の T 型染色体のセントロメア領域に ManDra-A 5 repeats シグナルが検出された。従って、クロンドジョウを構成するゲノムの一方が A 系統由来であることが判明した。ところで、クロンドジョウが有する A 系統由来の染色体 25 本のうち 12 本の T 型染色体で ManDra-A 5 repeats シグナルが検出されたのに対して、現在生息する野生型の A 系統では 12 対 24 本の T 型染色体に加えて、1 対 2 本の M 型染色体でも ManDra-A 5 repeats シグナルが検出された (第二章)。従って、クロンを構成している A 系統由来のゲノムと現存の A 系統を構成しているゲノムでは、それぞれ独自の変異が生じている可能性が示唆された。

第四章では、クロンドジョウが産出する非還元配偶子のクローン性を担保する減数分裂時の染色体挙動を解明するため、クローン雌の卵母細胞と性転換クローン雄の精母細胞を材料として FISH による減数分裂像観察を行った。その結果、有性生殖を行う B 系統ドジョウ雄では二価染色体 25 本が観察されたのに対して、クロンドジョウでは雌雄ともに二価染色体 50 本が観察された。さらに、系統識別プローブを用いた FISH 解析により、対合が由来の異なる相同染色体間 (A ゲノム-B ゲノム) ではなく、元々同じ染色体である姉妹染色体間 (A ゲノム-A ゲノム、B ゲノム-B ゲノム) で行われることが判明した。この場合、乗換えが生じて元々は同じ染色体であるため遺伝的な変化は生じず、配偶子のクローン性は維持される。従って、クロンドジョウでは減数分裂前にゲノムを倍加し、起源の同じ姉妹染色体間で対合することで遺伝的に均一なクローン性配偶子を形成することが分子細胞遺伝学的に証明された。

第五章では、不妊であるクローン由来三倍体と系統間雑種の雄が受精能力を持たない配偶子を形成するメカニズムを解明するため、対合の成否に注目して減数分裂時の染色体挙動を観察した。その結果、遺伝的に非相同な由来の異なる染色体間では、対合の失敗が高頻度で生じていることが判明した。対合の失敗により娘細胞への均等な染色体分配ができず、最終的に様々な染色体数から構成される精子または精子様細胞が形成されると推定された。

本研究によって明らかになったクロンドジョウの非還元配偶子形成を水産重要種で人為的に再現することができれば、短期間で形質の固定が可能な新しい育種技術の開発に繋がるかもしれない。不妊化技術は作出した品種が飼育施設外へ逸出した場合、在来集団の遺伝子攪乱の防止や、借り腹生産におけるドナーの配偶子のみを生産するホスト樹立のために重要な技術である。不妊ドジョウで観察された対合不全を誘起することが出来れば、細胞遺伝学的なアプローチによる不妊化技術の開発も期待される。本研究は、生殖細胞における異質なゲノム構成が配偶子形成過程の染色体挙動に与える影響を明らかにしただけでなく、ドジョウが持つ特殊な配偶子形成機構が新たな育種技術として貢献できる可能性を示唆した。