



HOKKAIDO UNIVERSITY

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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13884
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94645
Type	doctoral thesis
File Information	Masamichi_Kuroda.pdf



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

(Studies on atypical chromosome behavior in the course of
gametogenesis of the dojo loach *Misgurnus
anguillicaudatus*, comprising non-homologous
genomes from different origin)

北海道大学大学院水産科学院

海洋応用生命科学専攻

Graduate School of Fisheries Sciences

Division of Marine Life Science

黒田 真道

Masamichi Kuroda

2020 年

目次

緒論	1
第一章 DNA 反復配列をプローブとした FISH による B 系統識別法の確立	9
材料と方法	12
結果	24
考察	26
第二章 DNA 反復配列をプローブとした FISH による A 系統識別法の確立	29
材料と方法	31
結果	38
考察	42
第三章 FISH によるクロードジョウの雑種起源の解明	45
材料と方法	47
結果	49
考察	51
第四章 クロードジョウにおける減数分裂時の染色体挙動解明	53
材料と方法	56
結果	60
考察	63
第五章 FISH を用いた不妊ドジョウの減数分裂時の染色体挙動解明	66
材料と方法	69
結果	70
考察	73
総合考察	77
要約	89
謝辞	92
引用文献	93
表	
図	

緒論

近年、世界的な人口増加や経済発展、そして水産資源が持つ栄養評価の高まりを受けて、水産物の需要が増加しているのに対し、多くの水産資源が既に満限あるいはそれ以上に利用されている（水産庁, 2017）。また、消費者からの需要があるにも関わらず、漁獲漁業による安定供給が困難な魚類の生産を補完するため、養殖生産量が世界的に増加傾向にある（水産総合研究センター, 2013）。従って、水産資源の持続的利用を可能にするためには、天然資源だけに依存せず、自分たちの手で資源をつくり育てる必要がある。そのためには養殖技術の向上と、技術を支える周辺基盤の整備が重要である。しかしながら、養殖現場では、近年高騰している餌料の確保や疾病対策、また海外から輸入された水産物との競争により、経営は厳しい状況にある（水産総合研究センター, 2013; 中嶋ら, 2017）。

これまでに、水産生物では効率的な生産を目的として、高成長や耐病性などの生産者が求める形質を持つ品種の開発が進められてきた。特に個体の選抜と交配を繰り返すことで目的形質の固定を行う選抜育種は、古くから多くの魚種で行われている（水産総合研究センター, 2013）。しかし、選抜育種には長期的な継代飼育が必要であるため、膨大な時間を要することや、飼育スペースが確保できないといった課題もあり、実際に品種の開発に至った魚類の例は我が国では少ない。これまでに新たな養殖品種を作出するア

アプローチも試みられており、その一つに染色体操作がある。染色体操作とは、細胞分裂の阻止や、配偶子への紫外線照射などによる核の遺伝的不活化処理を組み合わせることで、染色体の数と組み合わせを統御する技術である（荒井, 1997）。例えば、魚類の精子核を紫外線照射により不活化し、卵と受精させることで母親由来のゲノムのみを持つ雌性発生個体を誘起できる。この場合、精子核を不活化するため半数性（1n）となり致死性を示すが、第二極体放出を阻止することで二倍体化が可能となる（荒井, 1997）。しかし、第二極体放出阻止型の雌性発生二倍体では、減数分裂において相同染色体間の交叉が生じることで、ヘテロ接合の遺伝子座を持つため完全なホモ接合体にはならない。これに対して、受精後の第一卵割を阻止すると、全遺伝子座でホモ接合の個体（倍加半数体）を誘起することができる（Komen and Thorgaard, 2007）。倍加半数体個体から得た卵は遺伝的に均一なことから、それらを用いて雌性発生を再度誘起することで、母親と遺伝的に同一のクローン集団を作出できる。従って、目的の優良形質を持つ個体からクローン集団を作出することができれば、短期間で形質の固定が可能になると期待される。しかし、第一卵割阻止型の雌性発生二倍体（倍加半数体）は生存率が著しく低く、成功例は一部の魚種に限られていた（Komen and Thorgaard, 2007）。

遺伝的に均一なクローンは染色体操作技術により人工的に誘起されるだけでなく、天然にも存在する。すなわち、自然界には特殊な配偶子形成を行うことで集団のクローン性を維持する生物も存在する。その一つがコイ目ドジョウ科の淡水魚のドジョウ

(*Misgurnus anguillicaudatus*) である。日本国内に生息するドジョウの多くは両性生殖で繁殖する二倍体 ($2n=50$) であるが、北海道の網走管内大空町には雌性発生により繁殖するクローン二倍体 ($2n=50$) が存在する (Morishima et al. 2002)。これらのクローン二倍体では、母親の体細胞と遺伝的に同一な二倍性卵を非還元的に産出する (Morishima et al. 2002; Itono et al. 2006)。この二倍性卵は同所的に生息する両性生殖ドジョウが提供する精子と受精するが、多くの場合で精子核は凝縮したままで雄性前核を形成せず、精子の遺伝的関与なく雌性発生することでクローン系統が維持されている (Itono et al. 2007)。さらに、ドジョウは雄ヘテロ型 (XX: 雌、XY: 雄) の性決定様式を持つため (Suzuki et al. 1985)、卵のみで発生するクローンドジョウは基本的に全雌集団を形成する。しかしながら、ホルモン投与によって人為的に性転換したクローン二倍体雄の作出も可能であり、これらは遺伝的に同一な二倍性精子を産生する (Yoshikawa et al. 2007)。すなわち、クローン二倍体は雌雄ともに非還元のコローン性配偶子を形成する。卵母細胞および精母細胞を用いた第一減数分裂時の染色体観察の結果、通常の有性生殖を行うドジョウでは 25 本の二価染色体が観察されたのに対して、クローンドジョウでは雌雄ともに 50 本の二価染色体が確認された (Itono et al. 2006; Yoshikawa et al. 2009)。従って、クローンドジョウでは減数分裂を開始する前に染色体セットの倍加が生じており、その後、複製・対合を経て通常の減数分裂を行うと考えられた。すなわち、減数分裂前核内分裂機構 (Premeiotic endomitosis) (Dawley, 1989) による二倍性

配偶子の形成が推定されている。もし、水産重要種でもクローン性の配偶子形成を再現することができれば、短期間で目的形質の固定が可能な新しい育種技術になると期待される。

これまでドジョウは単一種とされてきたが（斎藤, 1989）、アロザイム解析（Khan and Arai, 2000）やミトコンドリア DNA における調節領域の配列解析（Morishima et al. 2008a）、核遺伝子である *RAG1* と *IRBP2* の配列解析（Yamada et al. 2015）による集団遺伝学的研究から、日本には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ことが明らかになった。さらに B 系統は日本全国に分布する B-1 と、関東、東海、そして甲信越に高頻度に分布する B-2 に分岐した（Morishima et al. 2008a）。

これまでに、核遺伝子 *RAG1* および *IRBP2* の配列解析においてクローンが A と B の二系統に由来する塩基配列を両方持っていたこと（Yamada et al. 2015）、および核 DNA マーカー ManDra と ManBgl を用いた解析（Fujimoto et al. 2017）の結果から、クローンドジョウは過去における二系統の交雑を起源としており、両者を起源とする異質なゲノムを併せ持つこと（ゲノム構成：AB）が強く示唆されている。しかし、遺伝的に異なる二系統間（A, B）の人為交雑により作出した系統間雑種 A（雌）×B（雄）では二倍性（2n）卵を産出する雌が生じたのに対して（Arias-Rodriguez et al. 2009）、雄は半数性（1n）、二倍性（2n）、および四倍性（4n）の精子あるいは精子様細胞を形成したが、受精能力を持つ精子は極めて少なかった（Arias-Rodriguez et al. 2010）。従って、これら

の雑種は A および B 系統に由来するゲノムを持つが、二倍性の精子を形成する性転換クロードジョウとは異なり、同様のゲノム構成であるにも関わらず雄は不妊であった。

クローン二倍体が産出する二倍性の卵 (AB) は、多くの場合において精子核を取り込むことなく雌性発生により二倍体子孫を産する。しかし、偶発的に精子核を取り込むことがあり、その場合にはクローン由来の三倍体が出現する (Morishima et al. 2002; Itono et al. 2007)。つまり、二倍性のクローン卵 (AB) が野生型 A 系統由来の精子 (A) を取り込んだ場合は、A 系統由来のゲノム 2 セットと B 系統由来のゲノム 1 セットから構成された三倍体 (AAB) が出現する。同様に、二倍性のクローン卵 (AB) が野生型 B 系統由来の精子 (B) を取り込んだ場合は A 系統由来のゲノム 1 セットと B 系統由来のゲノム 2 セットから構成された三倍体 (ABB) が出現する。クローン由来三倍体の配偶子形成については、子孫の DNA マーカー解析から、雌では 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、半数性 (1n) 卵を産出すること、すなわち減数分裂雑種発生 (Meiotic hybridogenesis) が生じることが明らかになった (Morishima et al. 2008b)。それに対して、クローン由来三倍体の雄は半数性 (1n)、三倍性 (3n)、および六倍性 (6n) の精子あるいは精子様細胞を形成したが、これらの精子の受精により卵割する胚は見られなかった (Oshima et al. 2005)。

これら一部のドジョウが持つ不妊形質の研究は、育種周辺技術で最重要と考えられる不妊化技術 (水産総合研究センター, 2013) を開発するための基礎知見となる。個体の

不妊化は、養殖品種の逃避による生態系への遺伝子攪乱を防止することや、借り腹生産を効率的に行うためにドナー由来の配偶子のみを生産するホストの樹立に重要な技術である。さらに不妊魚では、本来は配偶子形成と成熟に利用されるエネルギーが体成長に転用されるため、高成長も期待できる（荒井, 1997）。代表的な不妊化技術として現在のところ、圧力処理や温度処理を用いた第二極体放出阻止による個体の三倍体化と、異種間交雑による雑種化がある。しかし、三倍体や雑種が不妊になる原因については不明な点が多く、特に配偶子形成過程における染色体挙動から不妊機構の解明を試みた研究は少ない（Schwenk et al. 2008）。ドジョウの系統間雑種やクローン由来三倍体の雄は不妊と考えられており（Oshima et al. 2005; Arias-Rodriguez et al. 2010）、不妊機構を理解する上で格好のモデル動物となる。

ドジョウにおける特殊な配偶子形成の特徴を以下にまとめる。まず、二系統間における過去の交雑起源が推定されるクローン二倍体（AB）は雌雄とも二倍性の配偶子を形成する。しかし、同様のゲノム構成を持つ系統間雑種（AB）では、雌には二倍性卵を形成する個体が出現する一方、雄は受精能力をほとんど持たず、様々な倍数性の精子または精子様細胞が形成される。クローン由来三倍体（AAB, ABB）では、雌は減数分裂雑種発生により半数性の卵を産生するが、雄は系統間雑種と同様の不妊性を示す。通常の野生型ドジョウ（二倍体、 $2n=50$ ）は半数性の配偶子を産出して有性生殖により繁殖するが、上述の特殊な配偶子形成を行う個体は、どれも由来の異なるゲノムを併せ持つこ

とが共通の特徴としてあげられる。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、もし異なる系統に由来する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解明できることが期待される。しかしながら、ドジョウの野生型二系統とクローンの核型は全て $2n=50$ （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、核型の形態的情報から各々の染色体が二つの系統 A と B のどちらに由来するかを決定することは不可能であった（Itono et al. 2006）。

本研究では、ドジョウ野生型二系統由来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。

本研究は下記の五章より構成される。第一章では、反復配列 DNA マーカー ManDra（以降、第二章で開発した ManDra-A と区別するため ManDra-B と表記する）をプローブとして Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) を行い、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した。第二章では、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）をプローブとして FISH を行い、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。第三章では、第一および第二章で開発した系統識別プローブを用いた FISH により、クローンドジョウが二系統の

交雑起源であることを分子細胞遺伝学的に証明した。第四章では、クロードジョウの非還元配偶子形成過程における減数分裂時の染色体挙動を FISH 解析することで、配偶子のクローン性を担保するメカニズムを明らかにした。第五章では、不妊雑種ドジョウ雄における減数分裂時の染色体挙動、特に相同染色体の対合の成否に注目して、受精能力を持たない配偶子が形成される原因を分子細胞遺伝学的に検証した。本研究では、これらの結果を持って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について論じた。

第一章

DNA 反復配列をプローブとした FISH による B 系統識別法の確立

緒論において述べたように、日本国内に生息する野生型ドジョウには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（Khan and Arai, 2000; Morishima et al. 2008a; Yamada et al. 2015）。そして、北海道の網走管内大空町には母親の体細胞と遺伝的に同一な二倍性卵を産出し、雌性発生で繁殖するクローン二倍体が存在する（Morishima et al. 2002; Itono et al. 2006）。ホルモン投与によって人為的に性転換したクローン二倍体雄も遺伝的に同一な二倍性精子を産生する（Yoshikawa et al. 2007）。クローンドジョウは二系統間の交雑を起源とし、両系統のゲノムを併せ持つことが示唆される。しかし、系統間雑種 A（雌）× B（雄）では二倍性（2n）卵を産出する個体が生じた一方で、雌性発生をする卵は観察されなかった（Arias-Rodriguez et al. 2009）。また、系統間雑種の雄は不妊精子を作った（Arias-Rodriguez et al. 2010）。クローン二倍体では、卵が精子核を取り込むことにより三倍体が出現し（Morishima et al. 2002）、クローン由来三倍体の雌では減数分裂雑種発生（Meiotic hybridogenesis）により半数性の卵を形成するが（Morishima et al. 2008b）、雄は不妊精子のみをわずかに産生する（Oshima et al. 2005）。

以上に述べた特殊な配偶子形成を行うドジョウは、いずれも由来の異なるゲノムを併せ持っており、特殊な配偶子形成にゲノム構成が関係していることを強く示唆する。従って、クローンを含むドジョウ集団において二系統の染色体を識別することができれば、染色体の挙動から異質なゲノム構成が配偶子形成に与える影響を理解できる。しかしながら、二系統やクロンの核型は全て同一の構成（ $2n=50$ ，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）であり、核型から系統の由来を決定することはできない（Itono et al. 2006）。

B 系統ドジョウを材料として制限酵素 *Dra* I を用いたゲノム DNA の断片化処理を行ったところ、サテライト DNA（約 130 bp）が得られた（Fujimoto et al. 2017）。そこで、このサテライト DNA を単離してクローニングと塩基配列解析を行うことにより、反復配列 DNA マーカー ManDra-B が開発された（Fujimoto et al. 2017）。その結果、ManDra-B 領域を特異的に増幅するプライマーセット（ManDra-F, ManDra-R）（Table 1）を用いて PCR 解析を行うと、ドジョウでは系統に特異的な増幅産物を得られることが判明した。そこで、あらかじめミトコンドリア DNA 調節領域（Morishima et al. 2008a）と核 *RAG 1* 遺伝子（Yamada et al. 2015; Fujimoto et al. 2017）を用いた DNA 解析で判別した A 系統、B 系統、およびクロンの標本について PCR 産物の電気泳動を行うと、A 系統はラダー状の泳動像を示したのに対して、B およびクローンではスメア状の泳動像を示した（Fujimoto et al. 2017）。この結果は、B 系統ゲノムには A 系統よりも高頻

度に ManDra-B 領域が存在することを強く示唆しており、ManDra-B をプローブとして FISH を行うことで B 系統の染色体識別が可能になると考えられた。

そこで第一章では、ManDra-B 領域が挿入されたプラスミドをプローブとして FISH を行い、B 系統ドジョウの染色体を分子細胞遺伝学的に識別する方法の確立を試みた。また併せて、A 系統と B 系統が有する ManDra-B 領域における塩基配列の違いについても調査を行った。

材料と方法

供試魚

2013 年から 2014 年の期間に人工授精により作出した眼胞期胚と、成魚から摘出した腎臓を染色体標本作製に用いた (Table 2)。すなわち、北海道網走管内大空町産の A 系統ドジョウを 2 個体 (腎臓:2 個体)、北海道渡島管内七飯町産の B 系統を 5 個体 (腎臓:3 個体、眼胞期胚:2 個体)、北海道空知管内岩見沢市産の B 系統ドジョウ雌と大空町産の A 系統ドジョウ雄を用いて作出した系統間雑種 3 個体 (眼胞期胚:3 個体) を染色体標本作製の材料に供した (Table 2)。また大空町産の A 系統、七飯町産の B 系統それぞれを各 2 個体ずつ ManDra-B 領域の塩基配列解析に供した。

採卵・採精

排卵と排精を促進するため、ゴナトロピン (あすか製薬) を魚体重 1 g あたり雌では 20-25 IU、雄ではその半分量を注射した。供試魚をヒーターにより 25°C に保った水槽内に静置し、雌では 10-12 時間後に排卵を確認後、腹部を圧迫して採卵した。雄も同様に腹部を圧迫して、ヘマトクリット採血管 (テルモ社) で採精した。得られた精液は Kurokura's solution (NaCl 750 mg, CaCl₂ 20 mg, NaHCO₃ 20 mg, KCl 20 mg/DW 100 mL) (Kurokura et al. 1984) 200 μ L で希釈して実験に用いた。

人工授精による子孫の作出

雌から得られた卵に精液を媒精後、汲み置きの水道水と混合することで人工授精を行った。受精後は汲み置きの水道水が入ったシャーレに移し、20°Cのインキュベーター内で静置した。

DNA の抽出

個体から鰭または筋肉を切除し、使用するまで 100% エタノールが入った 1.5 mL チューブ内に保管した。TNES-Urea buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 125 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, 4 M Urea) (Asahida et al. 1996) 400 μ L と Proteinase-K (20 mg/mL) 10 μ L が入った 1.5 mL チューブに鰭または筋肉を移し、37°Cで一晩転倒混和した。試料が完全に消化されていることを確認後、Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol 混合液（ニッポンジーン）を 800 μ L 加えて 20 分間の転倒混和を行った。その後、15 分間の遠心分離（13000 $\times g$, 20°C）を行い、上澄みを新しい 1.5 mL チューブに移した。この操作をもう一度繰り返した後、3 M 酢酸ナトリウム（pH 5.2）40 μ L と 100% エタノール 800 μ L を加えて十分に転倒混和した。−20°Cで 30 分間冷却後、30 分間の冷却遠心分離（13000 $\times g$, 4°C）を行い、DNA ペレットを沈殿させた。70% エタノール 800 μ L を加えてリンスした後に 70% エタノールを除去し、乾燥後の DNA を TE

buffer 102 μL に溶解した。その後、DNA 溶液 2 μL を用いて Nano Drop 2000 (Thermo SCIENTIFIC) で濃度を測定後、TE buffer で 100 ng/ μL に調整した。

ミトコンドリア DNA 調節領域の RFLP 分析による系統判別

濃度を 100 ng/ μL に調整した DNA 溶液 2 μL 、Ultra Pure Distilled Water (Life technologies) 11.3 μL 、dNTP Mixture (TaKaRa) 1.6 μL 、10 $\times$ PCR Buffer (TaKaRa) 2.0 μL 、rTaq DNA Polymerase (TaKaRa) 0.1 μL にミトコンドリア DNA 調節領域を増幅するプライマーセット (0F, 1565R) (Table 1) (10 μM) をそれぞれ 1.5 μL ずつ 0.2 mL チューブで混合した。そして 93°C-3 分、(93°C-1 分、58°C-1 分、72°C-1 分) を 1 サイクルとして 30 サイクルの PCR 反応 (Morishima et al. 2008a) を行った。その後、PCR 産物 5.0 μL 、制限酵素 1.0 μL (10 U)、10 $\times$ M buffer (TaKaRa) 1.0 μL 、Ultra Pure Distilled Water 3.0 μL を 0.2 mL チューブで混合して 37°C で 4 時間以上インキュベートを行った。この処理では制限酵素に *Hinf*I (TaKaRa) を用いたサンプルと *Hae*III (TaKaRa) を用いたサンプルを作製した。処理後のサンプル 4.0 μL を Loading Buffer (TaKaRa) 1.0 μL と混合して 1.5% アガロースゲルのウェルにアプライ後、100V で 40 分間電気泳動を行った。分子マーカーとして 100 bp DNA Ladder H3RTU (Gene Direx) を用いた。泳動後、臭化エチジウム染色とトランスイルミネー

ター (306 nm) を用いて DNA 断片の検出を行い、既報 (Morishima et al. 2008a) と照合して系統の判別を行った。

核 *RAG1* 遺伝子領域の RFLP 分析による系統判別

濃度を 100 ng/ μ L に調整した DNA 溶液 2 μ L、Ultra Pure Distilled Water 11.3 μ L、dNTP Mixture 1.6 μ L、10 $\times$ PCR Buffer 2.0 μ L、rTaq DNA Polymerase 0.1 μ L に核 *RAG1* 遺伝子領域を増幅するプライマーセット (RAG1-M.aF, RAG1-M.aR) (Table 1) (10 μ M) をそれぞれ 1.5 μ L ずつ 0.2 mL チューブで混合した。そして 93°C-3 分、(93°C-1 分、60°C-1 分、72°C-1 分) を 1 サイクルとして 35 サイクル、72°C-7 分の PCR 反応 (Fujimoto et al. 2017) を行った。PCR 産物 5.0 μ L、制限酵素 *Pvu*II (TaKaRa) 1.0 μ L (10 U)、10 $\times$ M buffer 1.0 μ L、Ultra Pure Distilled Water 3.0 μ L を 0.2 mL チューブで混合して 37°C で 4 時間以上インキュベートを行った。制限酵素処理後、サンプル 4.0 μ L を Loading buffer 1.0 μ L と混合して 1.5% アガロースゲルのウェルにアプライ後、100 V で 40 分間電気泳動を行った。分子マーカーとして 100 bp DNA Ladder H3RTU を用いた。泳動後、臭化エチジウム染色とトランスイルミネーター (306 nm) を用いた DNA 断片の検出を行い、既報 (Fujimoto et al. 2017) と照合して系統の判別を行った。すなわち、得られたバンドが 443 bp のみの場合は A または B2 系統、147

bp と 296 bp の場合は B1 系統、そして 147 bp、296 bp および 443 bp の 3 つの断片が生じた場合はクローンと判定した。

染色体標本の作製

① 腎臓組織

標本作製の 5 日前および前日に供試魚の体重 1 g あたり約 100 μ L のヤギ血清を筋肉に注射後、ヒーターにより 25°C に保った水槽内に静置し免疫系を感作した。2 回目の血清を注射した 24 時間後に、供試魚体重 1 g につき淡水魚用リンゲル液 (NaCl 7.5 g, KCl 0.2 g, CaCl₂ 0.264 g/DW 1 L) で希釈したコルヒチン溶液 (0.01%) 50 μ L を注射器で腎臓と腹腔内に直接注射し、2.5 時間水槽内に静置した。十分な麻酔後、肛門付近から腹部を切り開き腎臓を摘出した。そして腎臓組織をハサミで細かく裁断し、細胞懸濁液を得た。その後、0.075 M KCl で 60 分間の低張処理を行い、カルノア液 (メタノール：酢酸 = 3 : 1) で固定して -30°C で保存した。この懸濁液をスライドグラス上に滴下し、空気乾燥法により染色体標本作製した。また、染色体の剥離を防ぐため 65°C に設定したインキュベーター内で 24 時間のハードニング処理を行った。

② 眼胞期胚

人工授精後、20°C で 18-20 時間が経過した眼胞期の胚を淡水魚用リンゲル液中に移し、ピンセットを用いて卵黄を除去した。胚体を淡水魚用リンゲル液で希釈したコルヒ

チン溶液 (0.0025%) に 30 分間浸漬後、0.075 M KCl で 20 分間の低張処理を行い、その後カルノア液で固定して -30°C で保存した。メタノール $20\ \mu\text{L}$ 、酢酸 $10\ \mu\text{L}$ を混合した $1.5\ \text{mL}$ チューブ内に胚体を移して、ピペッティング操作により細胞懸濁液を作製した。この懸濁液をスライドガラス上に滴下し、空気乾燥法により染色体標本を作製した。また染色体の剥離を防ぐため、 65°C に設定したインキュベーター内で 24 時間のハードニング処理を行った。

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

FISH は Rampin et al. (2012) の方法を一部改変して行った。すなわち、ManDra-B 領域がインサートされたプラスミドをニクトランスレーションキット (Roche) を用いて Biotin-16-dUTP (Roche) による標識と断片化を行った。ManDra-B 領域がインサートされたプラスミド溶液 ($200\ \text{ng}/\mu\text{L}$) $1\ \mu\text{L}$ 、DDW $6.5\ \mu\text{L}$ 、ニクトランスレーションキットに同封の dATP ($0.4\ \text{mM}$) $2\ \mu\text{L}$ 、dGTP ($0.4\ \text{mM}$) $2\ \mu\text{L}$ 、dCTP ($0.4\ \text{mM}$) $2\ \mu\text{L}$ 、Nick Translation Buffer $2\ \mu\text{L}$ 、Enzyme Mixture $3.5\ \mu\text{L}$ 、そして Biotin-16-dUTP ($1\ \text{mM}$) $1\ \mu\text{L}$ を $1.5\ \text{mL}$ チューブ内で混合し (合計 $20\ \mu\text{L}$)、 15°C で 2 時間のインキュベートを行った。サケ精子 DNA と *E.coli* tRNA の混合液 {サケ精子 DNA 溶液 ($10\ \text{mg}/\text{mL}$) $1\ \text{mL}$ に *E.coli* tRNA $10\ \text{mg}$ を溶解して作製} $1\ \mu\text{L}$ 、100% エタノール $60\ \mu\text{L}$ 、4 M 酢酸アンモニウム $3\ \mu\text{L}$ をインキュベート後の反応溶液 $20\ \mu\text{L}$ に添加し

て、 -20°C で30分間冷却した。その後、30分間の冷却遠心分離 ($13000\times g$, -4°C) を
行い、上澄みを除去してプローブ DNA を精製した。精製後のプローブをハイブリダイ
ゼーションバッファー {50% 硫酸デキストラン (硫酸デキストラン 1 g/DDW 1 mL) :
20×SSC (NaCl 175.3 g, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 88.2 g/DDW 1 L) : 脱イオンホルムアミド :
DDW = 100 : 18.3 : 275 : 106.7} 40 μL に溶解して、使用するまで -30°C で保存した。

染色体標本を 65°C の 70% ホルムアミド/2×SSC (ホルムアミド : DDW : 20×SSC =
7 : 2 : 1) 50 mL が入った染色瓶の中で3分間の変性処理を施した後、 -30°C に冷却し
たエタノールシリーズ (70%, 90%, 100%) 内でそれぞれ10分間の脱水処理を行い、風
乾させた。プローブ DNA 溶液 40 μL を 83°C で7分間の変性処理後、氷中で10分間
静置した。風乾後のスライド上に変性後のプローブ DNA 溶液 40 μL を滴下してパラ
フィルムで覆い全体に広げた後、密閉容器内で 37°C 、20時間以上のインキュベートを
行った。インキュベート後、 42°C の 50% ホルムアミド/2×SSC (ホルムアミド : DDW :
20×SSC = 5 : 4 : 1) 50 mL が入った染色瓶で20分間、 42°C の 1×SSC 中で7分間を3
回、室温の 2×SSC 中で20秒間の洗浄を行った。バックグラウンドの発光を抑えるた
め、ブロッキング液 (BSA 0.05 g, 20×SSC 1 mL, Tween20 10 μL) 70 μL をスライド
上に滴下して 37°C で30分間インキュベートした。パラフィルムを外し、余分なブロッ
キング液を取り除いた後、Streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate 溶液 {1%
BSA/4×SSC 96 μL , Streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (2 mg/mL) (Life

technologies) 4 μ L} 100 μ L をスライド上に滴下して 37°C で 90 分間インキュベートを行った。42°C の 4 $\times$ SSC/0.1% Tween20 {4 $\times$ SSC (DDW : 20 $\times$ SSC = 4 : 1) 50 mL に Tween20 を 50 μ L 溶解} 50 mL が入った染色瓶中で 5 分間の洗浄を計 4 回、42°C の 4 $\times$ SSC で 10 分間の洗浄を 1 回行った後、ビオチン抗アビジン D 溶液 {1% BSA/4 $\times$ SSC 100 μ L, ビオチン抗アビジン D 溶液原液 (Vector) 0.4 μ L} 100 μ L をスライド上に滴下して 37°C で 45 分間インキュベートを行いシグナルの増幅を行った。42°C の 4 $\times$ SSC/0.1% Tween20 が 50 mL 入った染色瓶中で 5 分間の洗浄を計 4 回、42°C の 4 $\times$ SSC で 10 分間の洗浄を 1 回行った後、再び Streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate 溶液 100 μ L をスライド上に滴下して 37°C で 60 分間インキュベートを行った。その後、42°C の 4 $\times$ SSC/0.1% Tween20 で 5 分間の洗浄を計 4 回、42°C の 4 $\times$ SSC で 10 分間の洗浄を 1 回行った。室温のエタノールシリーズ (70%, 90%, 100%) 内でそれぞれ 5 分間の脱水処理を行い、風乾後に DAPI と退色防止剤の混合溶液 {DAPI 液 (10 μ g/mL) 40 μ L に SlowFade Diamond Antifade Mountant (Life technologies) を一滴添加} 40 μ L を滴下してカバーガラスで覆い、マニキュアで周縁部を密封した。

蛍光顕微鏡観察と撮影は冷却モノクロデジタルカメラ DFC 365FX (Leica) を搭載した DM5500B (Leica) を用い、AF6000Modular システムにて行った。撮影後は Photo Shop Elements11 (Adobe) を用いて画像の編集を行った。

Two-color FISH

Two-color FISH では Biotin 標識した ManDra-B プローブに加えて、ヒト由来 5.8S+28S rDNA 領域をインサートしたプラスミド (Fujiwara et al. 1998) をニククトランスレーションキットにより Digoxigenin 標識してプローブに用いた。すなわち、5.8S+28S rDNA 領域をインサートしたプラスミド溶液 (200 ng/ μ L) 1 μ L、DDW 6.5 μ L、ニククトランスレーションキットに付属する dATP (0.4 mM) 2 μ L、dGTP (0.4 mM) 2 μ L、dCTP (0.4 mM) 2 μ L、Nick Translation Buffer 2 μ L、Enzyme Mixture 3.5 μ L、そして Digoxigenin-11dUTP (1 mM) 1 μ L を 1.5 mL チューブ内で混合し (合計 20 μ L)、15°C で 2 時間のインキュベートを行った。また、Biotin 標識プローブを作成した時と同様に、エタノール沈殿後の精製された Digoxigenin 標識プローブはハイブリダイゼーションバッファ 40 μ L に溶解した。変性した Biotin 標識プローブ 40 μ L および Digoxigenin 標識プローブ 40 μ L を混合後、変性処理を施したスライドに滴下し 20 時間以上のインキュベートを行った。Two-color FISH では Streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate と Anti-Digoxigenin-Rhodamine, Fab fragments の混合溶液 {1% BSA/4 $\times$ SSC 95 μ L, Streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (2 mg/mL) 4 μ L, Anti-Digoxigenin-Rhodamine, Fab fragments (1 μ g/mL) (Roche) 1 μ L} 100 μ L をスライド上に滴下して 37°C で 90 分間インキュベートを行った。以降の手順は FISH と同じである。ドジョウでは 5.8S+28S rDNA プローブによって最大 M 型染色体の短腕末端に

存在する核小体（仁）形成域が検出される（Li et al. 2010, 2011, 2012, 2015, 2016）。そのため二倍体では2個のシグナル、三倍体では3個のシグナルが検出され、一組の相同染色体を識別することが可能である。

二系統における ManDra-B 領域の塩基配列解析

二系統間で ManDra-B 領域の塩基配列に違いがあるかを検証するために、TOPO TA Cloning Kit For sequencing (Life technologies) を用いて ManDra-B 領域のクローニングを行った。すなわち、濃度を 100 ng/ μ L に調整した DNA 溶液 2 μ L、Ultra Pure Distilled Water 11.3 μ L、dNTP Mixture 1.6 μ L、10 $\times$ PCR Buffer 2.0 μ L、Ex Taq DNA Polymerase (TaKaRa) 0.1 μ L に ManDra-B 領域を増幅するプライマーセット (ManDra-F, ManDra-R) (Table 1) (10 μ M) をそれぞれ 1.5 μ L ずつ 0.2 mL チューブで混合した。そして 95°C-3 分、(95°C-30 秒、50°C-30 秒、72°C-30 秒) を 1 サイクルとして 20 サイクル、72°C-5 分の PCR 反応 (Fujimoto et al. 2017) を行った。PCR 産物の電気泳動後に、ManDra-B 領域を 1 単位含んだバンド（約 130 bp）が確認された部分のゲルを切り出し、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (TaKaRa) を用い、プロトコルに従いゲルから PCR 産物の抽出を行った。抽出後の PCR 産物 3 μ L、クローニングキット中の Salt Solution 1 μ L、Water 1 μ L、TOPO Vector 1 μ L を 0.2 mL チューブで混合し室温で 30 分間静置した。静置後の反応液のうち、2 μ L を One shot TOP10

Chemically Competent cells (Life technologies) に付属のコンピテントセルに加えてゆっくりと混合した。氷中に移して 30 分間静置後に 42°C で 30 秒間ヒートショックを行い、再び氷中に 2 分間静置した。その後、コンピテントセルキットに付属する S.O.C Medium を 250 μ L 加え、37°C で 1 時間の振盪培養 (225 rpm) を行った。LB Agar プレート {LB Broth with agar (Sigma-Aldrich) 1 タブレットを DW 50 mL に溶解後、アンピシリン (100 mg/mL) 25 μ L を添加して作製} にサンプル溶液を 20-50 μ L 播種して 37°C で一晩インキュベートした。コロニーの形成が確認されたプレートから単独のコロニーを 0.1-10 μ L のマイクロピペット用チップを用いて少量採取し、TE buffer 10 μ L が入った 0.2 mL チューブ内で懸濁した。懸濁液 1 μ L、Ultra Pure Distilled Water 15.1 μ L、dNTP Mixture (TaKaRa) 1.6 μ L、10 $\times$ ExTaq Buffer (TaKaRa) 2.0 μ L、ExTaq Polymerase (TaKaRa) 0.1 μ L、M13 プライマーセット (M13 Forward (-20), M13 Reverse) (Table 1) (10 μ M) をそれぞれ 1.0 μ L ずつ 0.2 mL チューブで混合し、95°C-5 分、(96°C-20 秒、55°C-30 秒、72°C-1 分) を 1 サイクルとして 35 サイクル、72°C-10 分の PCR 反応を行った。PCR 産物 3 μ L を Loading Buffer 1 μ L と混合して、1.5% アガロースゲルを用いて 100 V で 40 分間電気泳動を行った。分子マーカーとして 100 bp DNA Ladder H3RTU (Gene Direx) を用いた。泳動後、トランスイルミネーターを用いて DNA 断片のサイズを確認してインサートチェックを行った。PCR 産物は AMPure XP (Beckman Coulter) を用いて精製後、Big Dye Terminator v 3.1

Cycle Sequencing Kit (Life technologies) のプロトコルに従い、M13 Forward (-20) プライマーを用いて 96°C-1 分、(96°C-10 秒、55°C-5 秒、60°C-4 分) を 1 サイクルとして 30 サイクルのシーケンス反応を行った。Agencourt Clean SEQ (Beckman Coulter) を用いて精製後、塩基配列を ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) により決定し、二系統間の配列比較を行った。

結果

ManDra-B プローブを用いた FISH

FISH の結果、A 系統 2 個体（計 58 細胞）では各細胞の染色体にシグナルが全く検出されなかった（Table 3, Fig. 1）（Kuroda et al. 2018）。染色体数は $2n=50$ であり、核型は中部動原体着糸（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 本により構成されていた（Fig. 1）（Kuroda et al. 2018）。

一方、B 系統 5 個体（計 73 細胞）では各細胞において全染色体のセントロメア領域にシグナルが検出された（Table 3, Fig. 2）（Kuroda et al. 2018）。また、染色体数は $2n=50$ であり、核型は M 型 5 対 10 本、SM 型 2 対 4 本、T 型 18 対 36 本により構成されていた（Fig. 2）（Kuroda et al. 2018）。核型については、二系統間で違いは見られなかった。

系統間雑種 2 個体（計 50 細胞）においても染色体数は $2n=50$ で、核型は M 型 5 対 10 本、SM 型 2 対 4 本、T 型 18 対 36 本により構成されていた（Fig. 3）（Kuroda et al. 2018）。二系統の核型と比べて違いは見られなかった。各細胞において染色体 50 本のうち半数の 25 本（M 型 5 本、SM 型 2 本、T 型 18 本）でセントロメア領域にシグナルが検出された（Table 3, Fig. 3）（Kuroda et al. 2018）。

ManDra-B および 5.8S+28S rDNA プローブを用いた two-color FISH

系統間雑種 1 個体（計 6 細胞）における two-color FISH の結果、1 対の最大 M 型染色体の短腕端部に 5.8S+28S rDNA シグナルが検出された。この結果は、先行研究（Li et al. 2010, 2011, 2012, 2015, 2016）と同等であった。これら 2 本は核小体形成域（Nucleolus Organizer Region, NOR）、すなわち rDNA 遺伝子座をもつ相同染色体であった（Table 4, Fig. 4a）（Kuroda et al. 2018）。これら 2 本の相同染色体のうち、一方ではセントロメア領域に ManDra-B シグナルが検出されたのに対し、もう一方ではシグナルは検出されなかった（Fig. 4b）（Kuroda et al. 2018）。

二系統間における ManDra-B 領域の塩基配列解析

各系統 2 個体において、ManDra-B 配列（137 bp）のうち ManDra-B プライマーによって増幅された領域（119 bp）を対象として、既報の ManDra-B 配列（Fujimoto et al. 2017）と比較した。A 系統個体-1 では最大で 11 塩基の置換と 1 塩基の欠失（コロニー5）が見られた（Table 5, Fig. 5）。A 系統個体-2 では最大 12 塩基の置換と 1 塩基の欠失（コロニー1）が見られた（Table 5, Fig. 6）。B 系統個体-1 では最大で 3 塩基の置換（コロニー1）、また 2 塩基の置換と 1 塩基の欠失（コロニー4）が見られた（Table 5, Fig. 7）。B 系統個体-2 では最大 4 塩基の置換、1 塩基の欠失、そして 1 塩基の挿入（コロニー1）が見られた（Table 5, Fig. 8）。

考察

ManDra-B プローブを用いて FISH を行った結果、A 系統の染色体にはシグナルが検出されなかったのに対して、B 系統では全ての染色体のセントロメア領域に強いシグナルが認められた。さらに、系統間雑種における two-color FISH では、まず 5.8S+28S rDNA プローブによって一对の相同な最大 M 型染色体を検出し、二本のうち一方においてのみ ManDra-B シグナルが認められた。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識別可能であり、分子細胞遺伝学的に B 系統に由来する染色体を識別する方法が確立された。

これまで、アロザイム分析 (Khan and Arai, 2000)、ミトコンドリア DNA 調節領域 (Morishima et al. 2008a) および核遺伝子 *RAG1*、*IRBP2* の配列解析 (Yamada et al. 2015) の結果から、二系統の間には種レベルの遺伝的な差異があると推測されてきた。本研究においても、B 系統の染色体でのみセントロメア領域近傍に ManDra-B シグナルが検出されたことから、二系統間では少なくともセントロメア領域の近傍で違いが生じており、分子細胞遺伝学的に上記の先行研究を支持する結果となった。

セントロメアとは 1 対の染色分体が結合する領域で、その領域上には動原体（キネトコア）が形成されている。分裂期にはセントロメア領域に局在する動原体と、分裂装置である紡錘体が結合することで、間期に複製された染色体 DNA が 2 個の娘細胞へ均等

に分配される。セントロメア領域には特定の配列が縦列（タンデム）に反復したサテライト DNA が存在し、一部はセントロメア領域の形成に大きな影響を与える（Sumner, 2006）。例えば、ヒトにおけるサテライト DNA の一つにセントロメア領域に存在するアルファサテライトがある（Masumoto et al. 2004）。アルファサテライトを人工染色体や他種の染色体上の異常な領域に挿入したところ、機能を有するセントロメアが形成された（Sumner, 2006）。サテライト DNA には他領域と比べて変異が多く生じるという特徴があり、塩基配列や反復単位のサイズ、反復数などに大きな変化が現れる（Yoshimura et al. 2006）。そのため、ヒトでは各染色体のセントロメア領域に存在するサテライト DNA 配列をプローブとして FISH を行うことで、個々の染色体の識別が可能である（Nietzel et al. 2001）。また、2-3 塩基の反復単位を持つマイクロサテライトは染色体上の様々な領域に散在し、同種内でも異なる反復数を持つ。そのため、集団遺伝学や親子鑑定など幅広い目的で利用されている（Sumner, 2006）。

本章でセントロメア領域に存在することが判明した ManDra-B 領域の配列解析について、A と B の二系統間では塩基配列に違いは見られたが、その相違は大きくなかった。ManDra-B 領域を増幅するプライマーセット（ManDra-F, ManDra-R）を用いた PCR 反応後の電気泳動像について、A 系統ではラダー状の増幅産物が観察されたのに対して、B 系統ではスメア状の増幅産物が観察された（Fujimoto et al. 2017）。この結果は、B 系統ゲノムには A 系統よりも高頻度に ManDra-B 領域が存在することを強く示

唆している。すなわち、A および B 系統のドジョウはいずれも ManDra-B で構成された配列を有するが、その反復数は二系統間で大きく異なり、このことが FISH シグナルの存否と関係している可能性がある。この点については今後サザンハイブリダイゼーション法や定量リアルタイム PCR 法を用いて、二系統間における反復数の違いを明らかにする必要がある。

第二章

DNA 反復配列をプローブとした FISH による A 系統識別法の確立

第一章では B 系統ドジョウの染色体を識別する ManDra-B プローブを開発した。これにより、B 系統に由来する染色体の挙動を追跡することが可能になった。しかし、異質なゲノム構成が減数分裂時の染色体挙動に与える影響を正確に理解する上で、B 系統のみならず A 系統の染色体を識別するプローブの開発も不可欠である。これまで、クロードドジョウは二系統の交雑起源が推定されてきたが (Yamada et al. 2015; Fujimoto et al. 2017)、この仮説を分子細胞遺伝学に証明するためにも、A 系統識別プローブは必要である。

本章では、先ず A 系統のゲノム DNA を制限酵素 *Dra* I により断片化してサテライト DNA の単離を試みた。次に、得られたサテライト DNA を ManDra-A と名付けて塩基配列解析を行い、ManDra-A 領域を特異的に増幅するプライマーを設計することで、各系統における PCR 反応後の増幅産物の特徴を明らかにした。そして、ManDra-A 領域が挿入されたプラスミドをプローブとして FISH を行い、A 系統の染色体識別が可能か否かを検証した。また、A 系統ゲノムにおいて上述の ManDra-A プライマーによって増幅された PCR 産物の一部において、塩基配列解析から ManDra-A 領域が 5 単位連続して存在することを見出した。そこで、この PCR 産物を ManDra-A 5 repeats と名づ

け、ManDra-A 5 repeats が挿入されたプラスミドをプローブとして FISH 解析を行った。このプローブにより A 系統の染色体識別が可能か否かを調べるとともに、FISH シグナルの数と強度を ManDra-A プローブと比較した。

材料と方法

供試魚

染色体標本には、2017 年から 2019 年の期間で人工授精により作出した眼胞期胚を用いた (Table 6)。具体的には、北海道網走管内大空町産の A 系統ドジョウ雌雄を用いて作出した 11 個体、北海道渡島管内七飯町産の B 系統ドジョウ雌雄を用いて作出した 6 個体、七飯町産の B 系統ドジョウ雌と大空町産の A 系統ドジョウ雄を用いて作出した系統間雑種 3 個体、そして石川県産の B 系統ドジョウ雌と大空町産の A 系統ドジョウ雄を用いて作出した系統間雑種 3 個体を染色体標本の材料に供した (Table 6)。

採卵・採精

第一章と同じ方法を用いた。

人工授精による子孫の作出

第一章と同じ方法を用いた。

DNA の抽出

第一章と同じ方法を用いた。

ミトコンドリア DNA 調節領域と核 *RAG1* 遺伝子領域の RFLP 分析による系統判別

第一章と同じ方法を用いた。ただし PCR 解析に供する反応液は、DNA 溶液 (100 ng/ μ L) 0.4 μ L、Ultra Pure Distilled Water 4.2 μ L、ミトコンドリア DNA 調節領域および核 *RAG1* 遺伝子を増幅するプライマーセット (10 μ M) (Table 1) をそれぞれ 0.2 μ L、2 $\times$ Quick Taq HS Dye Mix (TOYOBO) 5.0 μ L を 0.2 mL チューブ内で混合して作製した。

制限酵素を用いたサテライト DNA の単離

A 系統のゲノム DNA を計 29 種類の制限酵素 (Table 7) を用いて消化し、得られた DNA 断片からサテライト DNA の単離を行った。すなわち、各制限酵素に対応する 10 $\times$ buffer 10 μ L、制限酵素 (10-15 U/ μ L) 5 μ L、ゲノム DNA (1 μ g/ μ L) 3 μ L、Ultra Pure Distilled Water 2 μ L を 0.2 mL チューブ内で混合して反応液 (合計 20 μ L) を作製した。反応液は 37°C に設定したサーマルサイクラー内で一晩静置した。制限酵素処理後の反応液は SAFELOOK Load-Green (6 $\times$) (Wako) 3.0 μ L と混合して 1.5% アガロースゲルのウェルにアプライ後、100 V で 60 分間電気泳動を行った。分子マーカーとして 100 bp DNA Ladder H3RTU (Gene Direx) を用いた。泳動後、LED トランスイルミネーター (ゲルみえーる, Wako) を用いて DNA 断片を可視化し、サテライト

DNA を含んだゲルを切り出して NucleoSpin Gel and PCR Clean-up を用いてプロトコルに従い DNA 断片の抽出を行った。

サテライト DNA のクローニングおよび塩基配列解析

単離したサテライト DNA の塩基配列を明らかにするため、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing, without competent cells (Life technologies) を用いてクローニングを行った。本キットは平滑末端の DNA 断片を対象としているが、制限酵素はそれぞれ特異的な認識配列を持ち切断面も平滑末端になるとは限らないため、平滑末端ではない場合は平滑末端化処理をする必要がある。本研究でサテライト DNA が得られた制限酵素 *Dra* I の切断面は平滑であったため、追加の平滑末端化処理は行わなかった。ゲル抽出したサテライト DNA 溶液 2.0 μ L、上記クローニングキットに付属する Salt Solution 1.0 μ L、Sterile Water 2.0 μ L、TOPO vector 1.0 μ L を 0.2 mL チューブ内で混合後、室温で 10 分間静置した。静置後の反応液 2.0 μ L を One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Life technologies) キットに付属するコンピテントセルに加えて穏やかに混合した。氷中に移動後、30 分間静置して 42°C で 30 秒間のヒートショックを行い、その後再び氷中で静置した。混合液に One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* キットに付属する S.O.C Medium 250 μ L を添加し、37°C に設定したウォーターバスを用いて 1 時間の振盪培養を行った。LB Agar プレート {LB Broth

with agar 1 タブレットを DW 50 mL に溶解後、カナマイシン (50 mg/mL) 50 μ L を添加して作製}} に形質転換後の大腸菌を含んだ S.O.C Medium を 20-50 μ L 播種し、37°C に設定されたインキュベーター内で一晩静置した。コロニーの形成が確認されたプレートから単独のコロニーを 0.1-10 μ L のマイクロピペット用チップを用いて少量採取し、混合液 {Ultra Pure Distilled Water 4.6 μ L, 2 $\times$ Quick Taq HS Dye Mix 5.0 μ L, M13 プライマーセット (M13 Forward (-20), M13 Reverse) (10 μ M) (Table 1) をそれぞれ 0.2 μ L} 中に懸濁後、PCR 反応 {95°C-3 分、(95°C-30 秒、60°C-30 秒、72°C-30 秒) を 1 サイクルとして 30 サイクル、72°C-3 分} を行った。電気泳動により目的配列のインサートが確認された大腸菌は、混合液 {Ultra Pure Distilled Water 4.4 μ L、dNTPs (2 mM) 4.0 μ L、2 $\times$ PCR Buffer for KOD FX Neo (TOYOBO) 10 μ L、M13 プライマーセット (Table 1) (10 μ M) をそれぞれ 0.6 μ L、KOD FX Neo (TOYOBO) 0.4 μ L} 中に懸濁し、PCR 反応 {94°C-2 分、(98°C-10 秒、58°C-5 秒、68°C-5 秒) を 1 サイクルとして 30 サイクル、68°C-7 分} を行った。ExoSAP-IT Express PCR Cleanup Reagents (Thermo Fisher Scientific) のプロトコルに従い PCR 産物を精製後、ファスマック社の受託シーケンス解析サービスを利用した。また、得られたサテライト DNA の塩基配列と既報の ManDra-B 領域の塩基配列 (Fujimoto et al. 2017) の比較を塩基配列解析ソフトである Bio Edit を用いて行った。

サテライト DNA を増幅するプライマーの設計

塩基配列が明らかになったサテライト DNA を ManDra-A として、ManDra-A を増幅するプライマーセット (ManDra-A F, ManDra-A R) (Table 1) の設計を Primer-BLAST (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) を用いて行った。

ManDra-A プライマーを用いた PCR 解析

PCR 解析に供する反応液は、DNA 溶液 ($100 \text{ ng}/\mu\text{L}$) $0.4 \mu\text{L}$ 、Ultra Pure Distilled Water $4.2 \mu\text{L}$ 、ManDra-A プライマーセット (ManDra-A F, ManDra-A R) (Table 1) ($10 \mu\text{M}$) をそれぞれ $0.2 \mu\text{L}$ 、 $2\times\text{Quick Taq HS Dye Mix}$ $5.0 \mu\text{L}$ を 0.2 mL チューブ内で混合して作製した。PCR 解析 { 95°C -3 分、(95°C -30 秒、 50°C -30 秒、 72°C -30 秒) を 1 サイクルとして 20 サイクル、 72°C -5 分} を行い、増幅産物の電気泳動により各系統での増幅パターンを調査した。

A 系統における増幅産物の単離および塩基配列解析

A 系統のゲノム DNA ($100 \text{ ng}/\mu\text{L}$) $1 \mu\text{L}$ 、Ultra Pure Distilled Water $1.2 \mu\text{L}$ 、 $2\times\text{PCR Buffer for KOD FX Neo}$ $5 \mu\text{L}$ 、dNTPs (2 mM) $2.0 \mu\text{L}$ 、KOD FX Neo $0.2 \mu\text{L}$ 、ManDra-A プライマーセット (Table 1) ($10 \mu\text{M}$) それぞれ $0.3 \mu\text{L}$ を 0.2 mL チューブ内で混合して作製した。

ューブで混合した。PCR 解析 {95°C-3 分、(95°C-30 秒、50°C-30 秒、72°C-30 秒) を 1 サイクルとして 20 サイクル、72°C-5 分} により増幅された産物のうち、サイズから ManDra-A 領域が 5 単位連続して存在すると推定された領域のゲルを切り出し、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up を用いて PCR 産物の抽出を行った。その後、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing, without competent cells を用いてクローニングを行った。すなわち、ゲル抽出した PCR 産物溶液 2.0 μ L、上記クローニングキット付属の Salt Solution 1.0 μ L、Sterile Water 2.0 μ L、TOPO vector 1.0 μ L を 0.2 mL チューブ内で混合後、室温で 10 分間静置した。以降はサテライト DNA を対象としたクローニングとシーケンス解析の手順と同じである。

染色体標本の作製

第一章と同じ方法を用いた。

FISH・Two-color FISH

第一章と同じ方法を用いて FISH と two-color FISH を行った。ただしプローブの標識には、Biotin-Nick Translation Mix と DIG-Nick Translation Mix を用いた。つまり、ManDra-A、ManDra-A 5 repeats、または ManDra-B 領域が挿入されたプラスミド溶液 (200 ng/ μ L) 1 μ L、DDW 15 μ L を 1.5 mL チューブ内で混合後、Biotin 標識す

る場合は Biotin-Nick Translation Mix 4 μ L、Digoxigenin 標識する場合は DIG-Nick Translation Mix 4 μ L をプラスミド溶液と DDW を混合後の 1.5 mL チューブ内に加えて、15°C で 2 時間のインキュベートを行った。本章では、Biotin 標識した ManDra-A プローブを用いた FISH、Biotin 標識した ManDra-A 5 repeats プローブを用いた FISH、Biotin 標識した ManDra-A 5 repeats プローブと Digoxigenin 標識した ManDra-A プローブを用いた two-color FISH、そして Biotin 標識した ManDra-A 5 repeats プローブと Digoxigenin 標識した ManDra-B プローブを用いた two-color FISH を行った。DAPI による対比染色と退色防止には ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI (Life technologies) 40 μ L を用いた。

結果

制限酵素を用いたサテライト DNA の単離と塩基配列解析

A 系統のゲノム DNA を制限酵素 *Dra* I で消化した際、スメア状の電気泳動像とともに、約 130 bp の位置に明瞭なサテライト DNA バンドが検出された (Table 7, Fig. 9)。*Dra* I 以外のすべての制限酵素でもスメア状の電気泳動像が観察されたが、*Dra* I を用いた時のような明瞭なサテライト DNA バンドは確認できなかった (Table 7)。ゲル抽出により得られたサテライト DNA のクローニングを行い、得られた計 5 コロニーの塩基配列解析を行った。その結果、全 5 コロニーは全て同一の配列 (136 bp) を有していた (Fig. 10)。この配列を ManDra-A と名付けて ManDra-B 配列 (Fujimoto et al. 2017) と比較した結果、16 塩基で置換、2 塩基で欠失、1 塩基で挿入が生じていた (Fig. 11)。

ManDra-A を増幅するプライマーの設計と PCR 解析

ManDra-A 領域の配列をもとに、ManDra-A 領域内にプライマーセット (ManDra-A F, ManDra-A R) (Table 1, Fig. 10) を設計し PCR 解析を行った。その結果、A 系統およびクローン系統ではスメア状の増幅産物が検出されたのに対して、B 系統ではラダーバンドのみが検出された (Fig. 12)。

A 系統における増幅産物の単離および塩基配列解析

A 系統において ManDra-A プライマーセットで増幅された PCR 産物のうち、ManDra-A 領域が 5 単位連続して存在すると推測した約 650 bp のバンドを含むゲルを切り出し、クローニングによって得られた 1 コロニーを配列解析に供した。その結果、先に明らかにした ManDra-A 領域の塩基配列を基準とすると、ManDra-A と類似した配列が 5 単位連続して存在する領域であることが判明した (Fig. 13)。すなわち各反復単位を Unit-1-5 とすると、Unit-1 (121 bp) は ManDra-A F プライマーが結合したため部分的な ManDra-A 領域で、置換が 2 塩基と欠失が 3 塩基で生じていた (Table 8, Fig. 13)。Unit-2 から Unit-4 までは完全な ManDra-A 領域 (136 bp) を含んでおり、Unit-2 では置換が 7 塩基、Unit-3 では置換が 6 塩基、Unit-4 では置換が 4 塩基で生じていた (Table 8, Fig. 13)。Unit-5 (113 bp) は ManDra-A R プライマーが結合したため部分的な ManDra-A 領域であり、置換が 1 塩基で生じていた (Table 8, Fig. 13)。

ManDra-A プロブを用いた FISH

FISH の結果、A 系統 6 個体 (計 44 細胞)において、染色体数は $2n=50$ であり核型は中部動原体着糸 (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 本から構成されていた (Fig. 14)。さらに、各細胞において染色体 50 本のうち 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 (Table 9, Fig. 14) しかし、全体としては検出されるシグナル強度が弱く、シグナルの検出は不安定であった (Fig. 15)。

一方、B 系統 6 個体 (計 57 細胞) でも染色体数は $2n=50$ であり、核型は M 型 5 対 10 本、SM 型 2 対 4 本、T 型 18 対 36 本から構成されていたが、シグナルは検出されなかった (Table 9, Fig. 16)。

ManDra-A 5 repeats プローブを用いた FISH および two-color FISH

FISH の結果、A 系統 5 個体 (計 19 細胞) において染色体数は $2n=50$ で核型は M 型 5 対 10 本、SM 型 2 対 4 本、T 型 18 対 36 本から構成されていた。さらに、各細胞において染色体 50 本のうち 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 (Table 10, Fig. 17)。従って、シグナル数は ManDra-A プローブを用いた際に検出されたシグナル数と一致した。一方、B 系統 5 個体 (計 54 細胞) でも染色体数は $2n=50$ で、核型は M 型 5 対 10 本、SM 型 2 対 4 本、T 型 18 対 36 本であったが、シグナルは検出されなかった (Table 10, Fig. 18)。

次に ManDra-A および ManDra-A 5 repeats プローブが検出される染色体上の位置とシグナル強度を比較するため、系統間雑種 1 個体において上記 2 つのプローブをそれぞれ Digoxigenin と Biotin で標識後、two-color FISH を行った。その結果、どちらのプ

プローブも同一染色体上のセントロメア領域にシグナルが検出されたが、ManDra-A 5 repeats シグナルがより明瞭に検出された (Fig. 19)。

系統間雑種 5 個体 (計 31 細胞) において ManDra-A 5 repeats プローブと ManDra-B プローブを用いて two-color FISH を行った結果、染色体数は $2n=50$ で核型は M 型 5 対 10 本、SM 型 2 対 4 本、T 型 18 対 36 本であった (Fig. 20)。すなわち、二系統の核型と比べて違いは見られなかった。各細胞において染色体 50 本のうち半数の 25 本 (M 型 5 本、SM 型 2 本、T 型 18 本) でセントロメア領域に ManDra-B シグナルが検出された (Fig. 20)。そして、残り 25 本のうち 1 本の M 型と 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 (Table 11, Fig. 20)。

考察

ManDra-A プローブを用いて FISH を行った結果、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 は A 系統の染色体を識別するプローブとして利用可能であると考えられた。しかし、各細胞で検出されるシグナル強度にばらつきがあり、全体的にシグナルが微弱なため安定したシグナルの検出は困難であった。

塩基配列解析により ManDra-A 領域が 5 単位連続して存在することが判明した領域を ManDra-A 5 repeats プローブとして FISH を行った。その結果、ManDra-A プローブと比べて検出されるシグナル数に差はなかったが、より強いシグナルを安定的に検出することができた。従って、A 系統の染色体を識別するプローブとして、ManDra-A よりも ManDra-A 5 repeats の方が適当であった。以上のように、本章では A 系統由来の染色体を分子細胞遺伝学的に識別する方法が確立された。

ManDra-A 5 repeats プローブにおいて安定してシグナルが検出された要因として、プローブ量の増加による染色体とプローブ間の効率的なハイブリダイズが考えられる。プローブ量とシグナル強度の相関について以下の報告がある。ヨーロッパの一部地域に生息する *Squalius* 属の雑種を材料として、ゲノム DNA をプローブに用いて染色体全体を染め分ける方法である Genomic *in situ* hybridization (GISH) を行った結果、プロー

ブ量を増やすことで明瞭なシグナルが検出され、安定した染色体識別が可能であった (Rampin et al. 2012)。本研究では、ManDra-A プローブと比べて 5 倍量の ManDra-A 領域が存在する ManDra-A 5 repeats プローブを用いたことで、染色体とプローブ間におけるハイブリダイズの機会が増加し、安定したシグナル検出に繋がったと考えられる。また、ManDra-A 5 repeats の塩基配列解析から、各反復単位で変異が生じていることが判明した。このことは、染色体上に存在する ManDra-A 領域が全て同一の配列ではないことを示している。各反復単位で異なる配列を有する ManDra-A 5 repeats プローブを用いることで、様々な変異が生じた ManDra-A 領域とのハイブリダイズが可能になり、安定したシグナルが検出されたと考えられる。

サテライト DNA の形成について、ラットやマウスをモデルとした研究から、各サテライトの反復配列は一つの配列に由来するものだけでなく、塩基の置換や欠失による変異と増幅を繰り返すことで生じた別の反復配列も含むことが判明しており、サテライト DNA は反復配列の変異や増幅によって作られてきたと推定されている (Sumner, 2006)。従って、ドジョウの種内においても、二系統のセントロメア領域ではサテライト DNA の変異がそれぞれ進行しており、このことが各系統における ManDra-B、ManDra-A、および ManDra-A 5 repeats シグナルの違いを生み出したと考えられる。

ManDra-B 領域をプローブとして FISH を行くと、B 系統における全染色体のセントロメア領域にシグナルが検出された (第一章)。それに対して、ManDra-A および

ManDra-A 5 repeats 領域をプローブとして FISH を行うと、A 系統における一部染色体のセントロメア領域にのみシグナルが検出された（本章）。このことはサテライト DNA の変異が全染色体で同調して生じるのではなく、各染色体ごとに生じている可能性を示唆する。ManDra-A および ManDra-A 5 repeats シグナルが検出された染色体が 1 組の M 型を除いて全て T 型であったことから、形態の異なる染色体ごとに独立して変異が生じていた可能性も考えられる。セントロメアは存在する位置（染色体の中心または末端）によって異なる変異速度を持ち、セントロメアが染色体の中心に近いほど塩基は変化しやすいことがメダカをモデルとした研究から明らかになっており、セントロメアの位置が種分化に関わる可能性が示唆されている（Ichikawa et al. 2017）。本章で得られた結果から、ドジョウでもメダカと同様の現象が生じている可能性が考えられた。今後は ManDra-A および ManDra-A 5 repeats シグナルが検出されなかった染色体上のサテライト DNA 配列を明らかにし、ドジョウにおけるセントロメア領域の位置とサテライト DNA 配列の関連について検証する必要がある。

第三章

FISH によるクロードジョウの雑種起源の解明

ドジョウには有性生殖により繁殖する二系統 (A, B) のほかに、北海道の網走管内大空町など一部地域においてクローン生殖によって繁殖するクロードジョウが生息する (Morishima et al. 2002, 2008a)。クロードジョウが産出する非還元卵は、ほとんどの場合で精子核を取り込むことなく雌性発生するが、偶発的に精子核を取り込むことがあり、その場合にはクローン由来三倍体が出現する (Morishima et al. 2002, 2008b; Itono et al. 2007)。クロードジョウの起源について、核遺伝子 *RAG1* および *IRBP2* の配列解析 (Yamada et al. 2015) や、近年開発された核 DNA マーカー ManDra や ManBgl を用いた解析 (Fujimoto et al. 2017) によって、二系統の交雑起源であることが強く示唆されてきた。

交雑起源が推定されるクロードジョウで見られるクローン生殖や倍数性変異といった現象は、交雑起源が判明している他の脊椎動物でも確認されている。例えば、爬虫類において、アメリカとメキシコに生息する *Aspidoscelis* 属のトカゲには雌のみから構成される集団があり、この集団の雌は二倍性の非還元卵を産出し、雄の関与なく単為発生により繁殖する (Lutes et al. 2010)。また、魚類では、*Cobitis* 属のヨーロッパシマドジョウにおいて交雑起源と推定される三倍体が存在し、非還元の三倍性卵を産出し雌性

発生により繁殖する (Janko et al. 2007a, b)。これらの結果は、過去における交雑が特殊な配偶子形成や倍数性変異と深い関連があることを示唆している。すなわち、クロードジョウにおいても、由来の異なるゲノムを併せ持つことがクロン性の非還元配偶子形成に影響を与えていると考えられる。しかし、これまで二系統の染色体を識別するツールがなく、交雑起源であることを分子細胞遺伝学的に証明できていなかった。これまでに分子細胞遺伝学的な解析によって交雑起源が明らかになっているのは、先述の *Aspidoscelis* 属のトカゲ (Lutes et al. 2010) や、染色体全体を染め分ける方法である Genomic *in situ* hybridization (GISH) によって交雑起源だけでなく由来の異なるゲノム間での乗換えが生じていることも判明している両生類 *Ambystoma* 属のサンショウウオ (Bi et al. 2006, 2007) など一部に限られている。

本章では、第一および第二章で開発した二系統の染色体を識別するプローブ ManDra-B、ManDra-A 5 repeats を用いて FISH を行うことで、クロードジョウが A および B 系統由来の染色体を併せ持つ、すなわち二系統間の交雑起源であることを分子細胞遺伝学的に証明する。

材料と方法

供試魚

2013 年から 2019 年の期間に研究室で飼育していた北海道網走管内大空町産のクロ
ーン雌 6 個体が産出した卵に、紫外線照射により遺伝的に不活化したキンギョ精子を受
精させて作出したクロンドジョウの眼胞期胚 18 個体、そして大空町産のクロンド
ジョウの成魚 3 個体から摘出した腎臓を染色体標本作製の材料に供した (Table 12)。

紫外線照射によるキンギョ精子の遺伝的不活化

キンギョから得た精液を Kurokura's solution (Kurokura et al. 1984) 200 μ L で希釈
後、親水化処理したシャーレ上に薄く広げ、紫外線殺菌灯により紫外線照射処理 (50
mJ/cm²) を行った。処理後はシャーレから精液を回収して 1.5 ml チューブに移し、使
用するまで 4°C で保存した。親水化シャーレは、シャーレに体積の半分程度の水道水を
注ぎ、中性洗剤を適量混合後に一晩静置し、水道水で丁寧に洗浄することで作製した。

DNA の抽出

第一章と同じ方法を用いた。

クロードジョウの判別

第一章と同じく、ミトコンドリア DNA 調節領域と核 *RAG1* 遺伝子領域の RFLP 解析によりクロードジョウを判別した。

染色体標本の作製

第一章と同じ方法を用いた。

FISH・Two-color FISH

第一章と同じ方法を用いた。本章では、Biotin 標識した ManDra-B プローブを用いた FISH、Biotin 標識した ManDra-B プローブと Digoxigenin 標識した 5.8S+28S rDNA プローブを用いた two-color FISH、そして Biotin 標識した ManDra-A 5 repeats プローブと Digoxigenin 標識した ManDra-B プローブを用いた two-color FISH を行った。

結果

ManDra-B プローブを用いた FISH

クローン 7 個体（計 88 細胞）において、全染色体の半数である 25 本の染色体のセントロメア領域に強いシグナルが検出された（Table 13, Fig. 21）（Kuroda et al. 2018）。クローンの染色体数は $2n=50$ で、核型は中部動原体着糸（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 本から構成されていた。A 系統、B 系統のドジョウと染色体数および核型上の違いは認められなかった。

ManDra-B および rDNA プローブを用いた two-color FISH

クローン 2 個体（計 15 細胞）において、ManDra-B に加えて 5.8S+28S rDNA プローブを用いた two-color FISH の結果、先行研究（Li et al. 2010, 2011, 2012, 2015, 2016）と同様に 1 対の最大 M 型染色体短腕端部に 5.8S+28S rDNA シグナルが検出された（Table 14, Fig. 22）（Kuroda et al. 2018）。従って、これら 2 本は rDNA 遺伝子座を持つ相同染色体であったが、このうち 1 本はセントロメア領域に強い ManDra-B シグナルを示したのに対し、もう一方ではシグナルは検出されなかった（Fig. 22b）（Kuroda et al. 2018）。

ManDra-A 5 repeats および ManDra-B プローブを用いた two-color FISH

クローン 12 個体（計 117 細胞）において、ManDra-A 5 repeats と ManDra-B プローブを用いて two-color FISH を行った。その結果、全 50 本の染色体のうち 25 本の染色体のセントロメア領域に ManDra-B シグナルが検出され、残り 25 本のうち 12 本の T 型染色体のセントロメア領域で ManDra-A 5 repeats シグナルが検出された（Table 15, Fig. 23）。

考察

クローン二倍体において、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、さらに rDNA シグナルが検出された1対2本の相同染色体のうち1本のみ ManDra-B シグナルが陽性であった。従って、クローン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で ManDra-A 5 repeats シグナルが検出された。これにより、クローンが有するもう一方のゲノムが A 系統由来であることが判明した。以上の結果は、核遺伝子 *RAG1* および *IRBP2* の配列解析 (Yamada et al. 2015) や、核 DNA マーカー ManDra や ManBgl を用いた解析 (Fujimoto et al. 2017) で示唆された二系統の交雑起源を分子細胞遺伝学的に支持した。

クローンが有する A 系統由来と想定される染色体 25 本について、そのうち 12 本の T 型染色体で ManDra-A 5 repeats シグナルが検出された。それに対して、現存の A 系統を用いた FISH の結果、12 本の T 型染色体だけでなく 1 対 2 本の M 型染色体にも ManDra-A 5 repeats シグナルが検出された (第二章)。これらの結果を踏まえると、ク

クローンを構成している 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、それぞれで独自の変異が生じている可能性が考えられる。これまでにミトコンドリア DNA 調節領域の塩基配列解析において、クローンが他の A 系統に属する野生型ドジョウとは異なるハプロタイプ (III) を持っていることが判明している (Morishima et al. 2008a)。また、人工授精によって作出した系統間雑種はクローンと同じゲノム構成 (AB) を持つと考えられるにも関わらず、雌では二倍性卵の他に半数性や異数性の卵を産出した雌も存在しており、二倍性卵は雌性発生することなく精子核を取り込み三倍体が生じた (Arias-Rodriguez et al. 2009)。クローンに特異的なミトコンドリア DNA ハプロタイプが存在すること、系統間雑種ではクローンが行う雌性発生を再現できなかったこと、そしてクローンの M 型染色体では ManDra-A 5 repeats シグナルが検出されないという本研究で得られた結果は、クローンと A 系統野生型の持つ A ゲノムが遺伝的に異なっている可能性を示唆している。しかし、クローンおよび A 系統野生型それぞれが持つ A ゲノム間において、どの程度の染色体構造の違いが生じているのかは全く不明である。従って、ManDra-A 5 repeats シグナルが検出されなかった染色体が有するサテライト DNA を材料として新たなプローブを開発し、クローンと A 系統野生型の A ゲノム間でどのような構造的相違が生じているのかを明らかにする必要がある。

第四章

クロノドジョウにおける減数分裂時の染色体挙動解明

北海道の網走管内大空町には、母親の体細胞と遺伝的に同一の非還元卵を産出し、雌性発生で繁殖するクロン二倍体が存在する (Morishima et al. 2002, 2008a; Itono et al. 2006)。非還元配偶子が形成されるメカニズムとしては、① 減数分裂前核内分裂 (Premeiotic endomitosis) と ② 無配偶生殖 (Apomixis) が挙げられる (Dawley, 1989)。① では減数分裂を開始する前にゲノム倍加が生じることで、第一減数分裂時に両性生殖個体と比べて二倍の数の二価染色体が形成される。その後、通常の減数分裂を経て非還元配偶子が形成される。本機構は全雌集団を形成し単為発生で繁殖する爬虫類の *Aspidoscelis* 属トカゲで報告されている (Lutes et al. 2010)。このトカゲは雑種起源で由来の異なるゲノムを併せ持つが、ゲノム倍加後、起源の同じ染色体間で対合していることが祖先種に特異的なプローブを用いた FISH 解析によって明らかになった (Lutes et al. 2010)。一方、② では不完全な第一減数分裂により相同染色体間での対合が妨げられるため、第一減数分裂の影響を受けず体細胞分裂によって非還元配偶子が形成される。この機構は三倍体のギンブナ (*Carassius auratus langsdorfi*) やギベリオブナ (*C. a. gibelio*) で報告されており (Cherfas, 1966; Yamashita et al. 1993)、ギンブナ

では第一減数分裂に相当する時期における三極紡錘体の形成が第一減数分裂を阻害していると考えられている (Yamashita et al. 1993)。

これまで、クロードジョウにおける非還元配偶子の形成機構が上記 2 つのうち、どちらであるかを検証するために卵核胞を用いて減数分裂観察が行われた (Itono et al. 2006)。その結果、有性生殖により繁殖するドジョウの卵母細胞では 25 本の二価染色体が観察されたのに対して、クロードジョウでは 50 本が観察されたため、減数分裂前核内分裂による非還元卵の形成が強く示唆された (Itono et al. 2006)。また、ホルモン投与によって人為的に雄に性転換したクローンも二倍性の精子を作り、精巢の減数分裂像では雌と同様に 50 本の二価染色体が観察されたため、雄でも同じ機構で非還元精子の形成が行われていると考えられた (Yoshikawa et al. 2009)。

クロードジョウは二系統 (A, B) 由来のゲノムを併せ持つことが分子細胞遺伝学的に証明された (第三章)。しかし、母親の体細胞と遺伝的に同一な非還元配偶子の形成を担保するには、減数分裂前のゲノム倍加後、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) で対合が行われる必要がある。姉妹染色体間で対合が行われる場合、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に配偶子のクローン性は維持される。その一方で、相同染色体間で対合が行われる場合では、乗換えにより遺伝的なバリエーションが生じるため配偶子のクローン性を維持することができ

ない。しかし、これまでクローンを構成している由来の異なる染色体を識別するツールがなく、対合が姉妹染色体間で行われていることは証明されていなかった。

そこで本章では、第一、第二章で開発した二系統の染色体識別プローブを用いて FISH 解析を行い、クロードジョウの配偶子形成過程において対合が姉妹染色体間で行われていることを分子細胞遺伝学的に検証する。

材料と方法

供試魚

雌は、2017 年に研究室で飼育していた北海道網走管内大空町産のクローン二倍体 3 個体を用い、これらの卵巣から摘出した卵核胞を染色体標本の材料とした。雄は、2013 年から 2017 年の期間に研究室で飼育していた大空町産のクローン雌 2 個体が産出した卵に、紫外線照射で不活化したキングヨ精子を受精させて作出した子孫を、メチルテストステロン処理により性転換したクローン雄 6 個体を用い、これらの個体から摘出した精巣を染色体標本の材料とした。さらに、2014 年に北海道渡島管内七飯町産の B 系統ドジョウ雄 1 個体から摘出した精巣も用いた (Table 16)。

紫外線照射によるキングヨ精子の不活化

第三章と同じ方法を用いた。

性転換処理

孵化後一ヶ月目から一ヶ月間 0.5 ppm の 17 α -Methyltestosterone (MT) を含む餌を与えた。MT を含む餌は Yoshikawa et al. (2007) の方法に従い作製した。すなわち、エ

タノールに MT を溶解して餌に均等に噴霧した後、乾燥による脱アルコールを行うことで作製した。

減数分裂期の染色体標本の作製

クローン雌の第一減数分裂における二価染色体を観察するため、先行研究 (Itono et al. 2006) のプロトコルに従って染色体標本を作製した。すなわち、摘出した卵巣を小片に裁断後、最終成熟に関わるホルモン (17α - 20β -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン) を用いて *in vitro* で振盪培養 (20°C、暗所) を行った。動物極側へ移動を開始してから崩壊するまでの卵核胞を摘出しカルノア液で固定した。固定後の卵核胞をスライドグラス上に静置し空気乾燥法により固定液を取り除くことで染色体標本とした。また、卵核胞の剥離を防ぐため 65°C に設定したインキュベーター内で 24 時間のハードニング処理を行った。ハードニング後、Proteinase-K (1 μ g/mL) 100 μ L をスライドグラス上に滴下し、パラフィルムで覆った後に 37°C で 30 分間静置した。Proteinase-K 処理後のスライドグラスは 0.5% Tween20 (in PBS) 50 mL が入った染色瓶中で、37°C で 20 分間の洗浄を一回行い、その後 PBS 50 mL が入った染色瓶で再度 37°C で 20 分間の洗浄を行った。洗浄後のスライドは FISH 解析に供した。

雄では精母細胞の分裂を促すため、精巣を摘出する前日にゴナトロピン (あすか製薬) を供試魚体重 1 g あたり 10 IU 注射し、ヒーターにより 25°C に保った水槽内に静

置した。個体から精巢を摘出後、第一章と同じ方法で染色体標本を作製した。また染色体の剥離を防ぐため、65°Cに設定したインキュベーター内で24時間のハードニング処理を行った。

精子、精巢の倍数性調査

精巢および精子の倍数性をフローサイトメトリー (CyFlow SL 型, PARTEC 社) を用いて測定した。すなわち、適量の精巢、精液、または鰭を動物細胞分析用 DNA キット (High Resolution DNA Kit Type T, PARTEC 社) A 液 (核単離液) 100 μ L の中に入れ20 分間放置し、ボルテックスにより細胞を混合、遊離させた。その後、試料に B 液 (DAPI を含む染色液) 400 μ L を加えてボルテックスにより攪拌した。50 μ m のフィルターメッシュ (Cell Trics 50 μ m, PARTEC 社) に通し、細胞の断片を除去し、B 液を更に 400 μ L 加え、フローサイトメーターの分析に供した。この際、二倍体であることが既に判明しているクロン雄の鰭を二倍体の DNA 量 (2C) の基準とした。

FISH・Two-color FISH

第一章と同じ方法を用いた。本章では、Biotin 標識した ManDra-B プローブを用いた FISH、Biotin 標識した ManDra-B プローブと Digoxigenin 標識した 5.8S+28S rDNA

プローブを用いた two-color FISH、そして Biotin 標識した ManDra-A 5 repeats プローブと Digoxigenin 標識した ManDra-B プローブを用いた two-color FISH を行った。

結果

精子、精巢の倍数性

性転換クローン二倍体雄から採取した精子は体細胞と等しい DNA 量 (2C) を示し、少数であるが 4C の細胞の存在も確認された (Fig. 24a, b)。精巢中では、二倍性精子を含む 2C、4C、そして 8C の細胞の存在も少数確認された (Fig. 24c)。

性転換クローン雄の精母細胞における two-color FISH

ManDra-B および 5.8S+28S rDNA プローブを用いた two-color FISH の結果、B 系統雄 1 個体 (計 21 細胞) では、20/21 細胞の減数分裂像が 25 本の二価染色体で構成されており、ほとんどの二価染色体で ManDra-B シグナルが両端部に検出されたが、一部は中央部に 2 個のシグナルが重複して 1 個のシグナルとして検出された (Table 17, Fig. 25) (Kuroda et al. 2018)。中央部に 1 個の ManDra-B シグナルが検出された場合は 2 個のシグナルとしてカウントすると、25 本の二価染色体が観察された全細胞で 50 個の ManDra-B シグナルが検出された (Table 17)。5.8S+28S rDNA シグナルは、各細胞で 1 本の二価染色体の両端部に検出された (Table 17, Fig. 25) (Kuroda et al. 2018)。

性転換クローン雄 4 個体 (計 31 細胞) では、29/31 細胞の減数分裂像が 50 本の二価染色体で構成されていた。さらに two-color FISH の結果、これらの半数となる 25 本の

二価染色体で ManDra-B シグナルが検出され、その多くが両端部にシグナルを有していた (Table 17, Fig. 26) (Kuroda et al. 2018)。中央部に 1 個の ManDra-B シグナルが検出された場合は 2 個のシグナルとしてカウントすると、観察した全細胞で 50 個の ManDra-B シグナルが検出された (Table 17)。また 5.8S+28S rDNA シグナルは 2 本の二価染色体の両端に検出され、そのうち 1 本では ManDra-B シグナルが 2 つ検出されたが、もう一方では検出されなかった (Table 17, Fig. 26) (Kuroda et al. 2018)。

クローン雄 2 個体に対して ManDra-A 5 repeats および ManDra-B プローブを用いた two-color FISH を行った結果、ノイズが強く、明瞭なシグナルが検出された分裂像はわずかであった。明瞭なシグナルが検出された分裂像では 50 本の二価染色体のうち 25 本の二価染色体で ManDra-B シグナルが検出され、その多くが両端部にシグナルを有していた (Fig. 27)。そして、残り 25 本のうち 12 本で ManDra-A 5 repeats シグナルが検出され、多くが両端部にシグナルを有していた (Fig. 27)。

クローン雌の卵母細胞における FISH および two-color FISH

クローン雌 3 個体の卵巣から摘出した卵核胞を用いて ManDra-B プローブによる FISH を行った。その結果、50 本の二価染色体が観察され、そのうち 25 本で ManDra-B シグナルが検出された (Fig. 28) (Kuroda et al. 2018)。しかし、ほとんどの減数分裂像では安定したシグナル検出ができなかった。また、ManDra-B および 5.8S+28S rDNA

プローブを用いた two-color FISH においても安定したシグナルの検出は困難であったが、rDNA シグナルが検出された 2 本の二価染色体のうち、一方では ManDra-B シグナルが 2 つ検出されたのに対して、もう一方では検出されなかった (Fig. 29) (Kuroda et al. 2018)。

考察

これまでクロードジョウでは、減数分裂過程の組織学的解析による第一極体の放出や、卵母細胞と精母細胞の二価染色体が 50 本であることが確認され、減数分裂前核内分裂によって非還元配偶子が形成されると推定されてきた (Itono et al. 2006; Yoshikawa et al. 2009)。この機構でクロン性配偶子を形成するには、ゲノム倍加後の対合が由来の異なる相同染色体間ではなく、遺伝的に同一の姉妹染色体間で行われる必要がある。本章において、ManDra-B と 5.8S+28S rDNA プローブを用いた二価染色体に対する two-color FISH により、半数の二価染色体でのみ ManDra-B シグナルが検出された。さらに rDNA シグナルが検出された 2 本の二価染色体のうち、一方でのみ ManDra-B シグナルが検出されたことから、対合が姉妹染色体間で行われていることが明らかになった。この結果は ManDra-A 5 repeats および ManDra-B プローブを用いた two-color FISH において、対合が同一起源の染色体間で行われていたことから支持される。従って、クロードジョウではゲノム倍加後に姉妹染色体間で対合することで、乗換えが生じて元々同じ起源であるため同じエレメントの交換となり、遺伝的に均一なクロン性の非還元配偶子が形成されることが分子細胞遺伝学的に証明された (Fig. 30) (Kuroda et al. 2018)。姉妹染色体間の対合によりクロン性配偶子が形成されることを分子細胞遺伝学的に証明したのは、*Aspidoscelis* 属のトカゲ雑種 (Lutes et al. 2010)

における一例のみで、硬骨魚類では初めての成果である。また、本研究の結果の多くは人為的に性転換したクローン雄から得たものであるが、卵核胞を用いた FISH でも同一の結果が得られている。従って、雌雄ともに同一の機構によりクローン性の配偶子形成が行われていると考えられる。しかしながら、厳密には姉妹染色体間で対合が行われることを証明したのは 5.8S+28S rDNA シグナルが検出された最大の M 型染色体のみであるため、今後は各染色体に特異的なプローブの開発が望まれる。

性転換クローン雄を用いた研究において、A 型および初期 B 型精原細胞で大型の核が観察され、それらが四倍性であったことから、染色体倍加は初期の精原細胞で生じることが示唆された (Yoshikawa et al. 2009)。従って、クローン雌でも同様の初期卵原細胞ステージで染色体倍加が生じると推測されるが証明には至っていない。また、クローン二倍体 (AB) と比較して遺伝的には同一であるが倍数性のみが異なるクローン四倍体 (複二倍体、AABB) では、二倍性の還元卵 (AB) が形成された (Morishima et al. 2012)。従って、非還元配偶子形成のためのゲノム倍加はクローン二倍体では生じるが、ゲノム量以外は遺伝的に同一なクローン四倍体では生じず、通常の減数分裂を経て二倍性の卵が形成されたことになる (Morishima et al. 2012)。この結果は、減数分裂前の精原細胞、卵原細胞の段階で、生殖細胞を構成するゲノムセット (染色体セット) の対合の可否をチェックする機構の存在を示唆しており、ゲノムの異質性によって対合が困難

な場合のみ、染色体倍加によって対合を可能にすることで対合不全による異常な配偶子形成を回避すると考えられる。

第五章

FISH を用いた不妊ドジョウの減数分裂時の染色体挙動解明

日本に生息するドジョウの多くは有性生殖により繁殖する一方で、北海道の網走管内大空町には雌性発生で繁殖するクローン二倍体が存在する (Morishima et al. 2002, 2008a; Itono et al. 2006)。ドジョウの性決定様式は、雄ヘテロ型 (XX: 雌、XY: 雄) と推定されており (Suzuki et al. 1985)、卵のみで雌性発生するクローンドジョウは基本的に全雌と考えられる。クローンが産出する非還元卵は、同所的に生息し有性生殖を行う雄に由来する精子と受精することで発生を開始するが、精子核を取り込まず、子孫は母親と遺伝的に同一のクローン二倍体になる (Morishima et al. 2002; Itono et al. 2006, 2007)。これまでにクローンドジョウが二系統 (A, B) の交雑を起源とすることが強く示唆されていたが (Yamada et al. 2015; Fujimoto et al. 2017)、本研究においても系統識別プローブを用いた FISH 解析により、その結論は強く支持された (第三章)。従って、クローンドジョウのゲノム構成は AB であり、産生する非還元卵のゲノム構成も AB と考えられる。また、偶発的に非還元卵が精子核を取り込むことがあり、その場合にはクローン由来三倍体が出現する (Itono et al. 2007; Morishima et al. 2008b)。例えば、大空町で発見されたクローンドジョウは A 系統ドジョウと同所的に生息するため、精子核が取り込まれると A ゲノムを 2 セット、B ゲノムを 1 セットもつクローン由来三倍体

(AAB) が出現する。クローン由来三倍体の配偶子形成では、雌は卵形成過程で 3 セットのゲノムのうち遺伝的に相同性の低い 1 セットを排除し、最終的に半数性の卵を形成する（減数分裂雑種発生）(Morishima et al. 2008b)。それに対して、雄は半数性、三倍性、および六倍性の精子あるいは精子様細胞を形成するが、精子の受精により卵割する胚は見られなかった (Oshima et al. 2005)。さらに、正常の精子と比べて頭部が大きいものや、鞭毛が欠損または短いなどの形態的異常も観察された (Oshima et al. 2005)。

クロードジョウと同じゲノム構成を持つと考えられる系統間雑種も雌雄で異なる配偶子形成の特徴を持つ。雌では二倍性卵を産出する個体が生じ、二倍性卵は雌性発生をすることなく三倍体が出現した (Arias-Rodriguez et al. 2009)。一方、雄は半数性、二倍性、および四倍性の精子あるいは精子様細胞を形成したが、受精能力を持つ精子は極めて少なく、クローン由来三倍体と同様に形態的な異常も観察された (Arias-Rodriguez et al. 2010)。

クロードジョウは雌雄ともに非還元配偶子を作り妊性を持つ (Morishima et al. 2002; Itono et al. 2006, 2007; Yoshikawa et al. 2007, 2009)。しかし一方で、クローン由来三倍体と系統間雑種の雌は妊性を持つが (Morishima et al. 2008b; Arias-Rodriguez et al. 2009)、雄は正常な精子が形成されず不妊と考えられる (Oshima et al. 2005; Arias-Rodriguez et al. 2010)。これらは交雑起源で由来の異なるゲノムを併せ持つという共通点があり、ゲノム構成はクローン二倍体：AB、クローン由来三倍体：AAB、系統間雑

種：AB である。しかし、なぜクローン二倍体のみが雌雄で妊性を有し、クローン由来三倍体と系統間雑種では雄が不妊になるのかは不明である。

これまで様々な生物を対象として、雑種を作出したという報告は数多くあるが、分子細胞遺伝学的な視点から雑種の不妊機構を研究した例は魚類に限らず非常に少ない (Schwenk et al. 2008)。不妊雑種の減数分裂における染色体観察では、二価染色体だけでなく一価染色体や多価染色体が高頻度で存在しており、この現象は哺乳類 (Bhattacharyya et al. 2013; Torgasheva and Borodin, 2016)、鳥類 (Islam et al. 2013)、両生類 (Müller, 1977)、魚類 (Shimizu et al. 1997) で報告されている。これらの結果は、異なる種の染色体を併せ持つ雑種では染色体間の非相同性に起因する対合不全が生じており、その結果として、異常な配偶子形成が行われている可能性を示唆している。従って、雑種の不妊機構を理解するためには、由来の異なる染色体を識別した上で染色体挙動を追跡することが重要であるが、そのような研究は魚類においては知る限りない。

本章ではクローン由来三倍体と系統間雑種の雄のみで生じる不妊の原因を分子細胞遺伝学に解明する。特に由来の異なる染色体間で対合が正常に行われているのかを B 系統由来の染色体を識別する ManDra-B プローブと、一組の相同染色体を識別する 5.8S+28S rDNA プローブを用いた FISH 解析により検証した。

材料と方法

供試魚

2014 年に研究室で飼育していた北海道網走管内大空町産のクローン由来三倍体雄 1 個体、北海道渡島管内七飯町産の B 系統雌と大空町産の A 系統雄を用いて作出した系統間雑種雄 1 個体から摘出した精巢を染色体標本の材料とした (Table 18)。

減数分裂期の染色体標本の作製

第四章と同じ方法を用いた。

FISH・Two-color FISH

第一章と同じ方法を用いた。本章では、Biotin 標識した ManDra-B プローブと Digoxigenin 標識した 5.8S+28S rDNA プローブを用いた two-color FISH を行った。

統計解析

統計解析はスチューデントの t 検定を用いて行い、有意水準を 5% とした。統計解析の結果は平均 (mean) $\pm$ 標準偏差 (SD) で示した。

結果

Two-color FISH を用いたクローン由来三倍体のゲノム構成判別

ManDra-B および 5.8S + 28S rDNA プローブを用いた two-color FISH の結果、クローン由来三倍体の雄 1 個体で観察した 5 細胞のうち、4 細胞の体細胞分裂像が 75 本の染色体から構成されており、そのうち 25 本のセントロメア領域に ManDra-B シグナルが検出された (Table 19, Fig. 31a) (Kuroda et al. 2019)。また、5.8S + 28S rDNA シグナルが検出された 3 本の相同染色体のうち、1 本でのみ ManDra-B シグナルが検出された (Fig. 31b) (Kuroda et al. 2019)。従って、このクローン由来三倍体はクロードジョウが産出した二倍性卵 (AB) と半数性精子 (A) の受精を起源としており、ゲノム構成は AAB であることが判明した。

クローン由来三倍体における FISH を用いた減数分裂の観察

クローン由来三倍体雄 1 個体の減数分裂像 (計 34 細胞) では二価染色体以外にも、高頻度で一価染色体が観察され、三価染色体も確認された。また rDNA シグナルが検出された 1 組 3 本の相同染色体における ManDra-B シグナルの有無を基準とすると、構成される二価染色体には 2 つのパターンが存在した。1 つ目は、ManDra-B シグナルが検出されず A 系統由来の染色体間で対合が生じていると判断した二価染色体 (以降

II-AA と表記) (Fig. 32a, b) (Kuroda et al. 2019) である。そして 2 つ目が、1 個の ManDra-B シグナルが検出され A 系統由来と B 系統由来の染色体間で対合が生じていると判断した二価染色体 (以降 II-AB と表記) である (Fig. 32c, d) (Kuroda et al. 2019)。対合不全により生じた ManDra-B シグナルを有する B 系統由来の一価染色体 (以降 I-B と表記) と ManDra-B シグナルが検出されない A 系統由来の一価染色体 (以降 I-A と表記) 2 本から構成される分裂像も観察された (Fig. 32e, f) (Kuroda et al. 2019)。また、3 つの rDNA シグナルを持ち、そのうち 1 つでのみ ManDra-B シグナルが検出された三価染色体 (以降 III-AAB と表記) も出現した (Fig. 32g, h) (Kuroda et al. 2019)。

一価、二価、そして三価染色体の数は各分裂像で大きく異なっていたが、分裂像を構成している染色体数は全て 75 本であった (Table 20)。A 系統由来の染色体から構成された二価染色体 (II-AA) が最も頻繁に観察されたが、その数は 10–24 本と各分裂像で異なっていた。また、由来の異なる二系統の染色体から構成された二価染色体 (II-AB) の数も 1–9 本と各分裂像で違いが見られた (Table 20)。各細胞で観察された二価染色体の数は、II-AA で平均 $17.4 \pm$ 標準偏差 3.0、II-AB で平均 $3.8 \pm$ 標準偏差 1.9 であり、II-AA が有意に多かった ($t = 19.1$, $P = 1.96 \times 10^{-19} < 0.05$) (Table 20)。また、一価染色体の数は I-B が平均 $21.2 \pm$ 標準偏差 1.8、I-A が平均 $11.3 \pm$ 標準偏差 5.4 であり、I-B が有意に多かった ($t = 9.6$, $P = 4.2 \times 10^{-11} < 0.05$) (Table 20)。三価染色体は、観察した 34 細胞のうち 1 細胞でのみ確認された (Table 20)。

系統間雑種における FISH を用いた減数分裂の観察

系統間雑種の雄 1 個体における減数分裂像（計 43 細胞）では、25 個の ManDra-B シグナルが検出され、各細胞で異なる数の二価染色体と一価染色体が観察された（Fig. 33, Table 21）（Kuroda et al. 2019）。また two-color FISH により rDNA が検出された 1 組 2 本の相同染色体において、ManDra-B シグナルの有無を基準とすると、A 系統由来の染色体と B 系統由来の染色体間で対合が生じて二価染色体（II-AB）を構成している細胞が存在した（Fig. 33a, b）（Kuroda et al. 2019）。各細胞で観察された二価染色体（II-AB）の数は平均 $21.8 \pm$ 標準偏差 1.6 であった（Table 21）。また、一部の細胞では rDNA シグナルを有する 2 つの一価染色体があり、そのうち一方でのみ ManDra-B シグナルが検出された。従って、二つの一価染色体はそれぞれ A 系統由来（I-A）と B 系統由来（I-B）であることが判明した（Fig. 33c, d）（Kuroda et al. 2019）。各細胞で観察された一価染色体（I-A, I-B）の数は平均 $3.2 \pm$ 標準偏差 1.6 であった（Table 21）。一価染色体の数は二価染色体の数が増えると減少し、ほとんどの細胞（36/43）は、21–23 本の二価染色体と 4–8 本の一価染色体から構成されていた（Table 21）。

考察

ManDra-B シグナルの有無を基準とすると、クローン由来三倍体の雄では由来の同じ A 系統の染色体間で優先的に対合が行われ、二価染色体を構成していた。A 系統由来の一価染色体（平均 $11.3 \pm$ 標準偏差 5.4）は、B 系統由来の一価染色体（平均 $21.2 \pm$ 標準偏差 1.8）よりも観察される頻度は低く、これは遺伝的な相同性が高く同じ系統由来の染色体同士で優先的に対合した結果と考えられる。また、観察された二価染色体と一価染色体の数は各細胞で大きく異なっており、対合における明確な特徴はなかった。

本結果から、対合は同じ由来の相同染色体間で優先的に行われることが示唆された。一方、頻度は高くないが、A 系統と B 系統由来の染色体間での対合も生じており、異なる由来の染色体間でも対合は可能であると考えられた。三倍体雄の減数分裂像は、II-AA : 10-24、II-AB : 1-9、I-A : 1-23、I-B : 16-24 の多様な染色体構成を有していた。二価染色体は減数分裂の進行に伴い分離して両極に分配される。一方、一価染色体は両極への分配がランダムに行われると推測される。その結果、形成される精子は様々な倍数性を持つ異数性精子になると考えられる。先行研究では、三倍体雄の精巢を用いたフローサイトメトリー解析の結果、三倍性 (3n) と六倍性 (6n) の細胞集団の存在が確認されている (Oshima et al. 2005)。しかし、機能的な 1n 精子は極めて少なく、多くの精子または精子様細胞は、形態的な異常を示し運動性はなかった (Oshima et al.

2005)。従って、クローン由来三倍体の雄では DNA 量が 6C の細胞が複製によって形成されるが、一価染色体や三価染色体の構成を伴う対合の異常によって、第一減数分裂を完了することなく精巣内に蓄積されると考えられる。減数分裂が正常に進行しないまま精子形成が行われた例としてメダカ雑種の二倍体が報告されている (Shimizu et al. 1997)。メダカ雑種では精母細胞が減数分裂に相当する 2 回の分裂を試みるが、細胞質分裂が正常に進行せず、結果として運動性を持たない四倍性 (4C) の精子様細胞が形成された (Shimizu et al. 1997)。従って、クローン由来三倍体の雄においても同様の現象が生じている可能性がある。つまり、複製を行うことは可能であるが、その後の減数分裂を正常に進行することができず、先行研究 (Oshima et al. 2005) で報告されたような形態異常を持つ精子または精子様細胞が形成されると考えられる。

クローン由来三倍体の雌は、雄で見られる配偶子形成の特徴とは大きく異なる。三倍体の雌から摘出した卵核胞を用いて減数分裂像を観察すると、25 本の二価染色体が確認でき、最終的に形成される半数性 (1n) 卵は受精によって正常に発生した (Morishima et al. 2008b)。この機構では、卵形成過程で 3 セットのゲノムのうち遺伝的に相同性の低い 1 セットを排除し、残った 2 セットで通常の減数分裂が進行する (減数分裂雑種発生) (Morishima et al. 2008b)。クローン由来三倍体の雄でも僅かではあるが 1n の細胞が見られた (Oshima et al. 2005)。しかし、本研究で用いたクローン由来三倍体の雄では、25 本の二価染色体のみで構成された分裂像は確認できなかった。従って、

雄ではゲノム排除は行われぬか、または、行われるとしても本研究で観察したステージよりも後に行われると考えられる。

ドジョウの系統間雑種の雄が形成する精子または精子様細胞は、形態的な異常を持ち運動性はほとんど無い (Arias-Rodriguez et al. 2010)。本研究で系統間雑種の雄における減数分裂像を観察したところ、全ての細胞で二価染色体が形成され (17–24 本/細胞)、対合は由来の異なる二系統間で行われていた。しかし、相同性の違いから対合が正常に行われず生じたと考えられる一価染色体も全ての細胞で観察され (2–16 本/細胞)、二価染色体と一価染色体の数は各細胞で異なっていた。

これまで、哺乳類 (Bhattacharyya et al. 2013; Torgasheva and Borodin, 2016)、鳥類 (Islam et al. 2013)、両生類 (Müller, 1977)、魚類 (Shimizu et al. 1997) の不妊雑種における減数分裂時の染色体観察によって、一価染色体や多価染色体が高頻度で生じることが判明している。本研究においても、系統間雑種ドジョウの雄で対合不全が観察された。従って、細胞内には一価染色体と二価染色体が混在し、一価染色体はその後ランダムに両極へ分配されるため、最終的に異数性精子が形成される可能性が高い。ドジョウの系統間雑種における精巣および精子の倍数性解析により、四倍性 (4C) の細胞が検出された (Arias-Rodriguez et al. 2010)。この 4C 細胞はクローン由来三倍体ドジョウの雄で見られた六倍性 (6C) 細胞と、メダカ雑種の雄 (Shimizu et al. 1997) で観察され

た四倍性（4C）細胞のように、染色体間の遺伝的な相同性の違いに起因する対合不全によって、第一減数分裂を完了することなく精巣内に蓄積された細胞であると考えられる。

クロードジョウでは減数分裂前にゲノム倍加が生じ、対合が姉妹染色体間で行われることでクローン性の非還元配偶子を形成することが判明した（第四章）。もし、クローン由来三倍体や二系統間雑種の雄にも同じ機構があるならば、50 個の ManDra-B シグナルが検出されるはずである。しかし、本研究では観察した全ての細胞で 25 個のシグナルが検出されたことから、クロードジョウのような減数分裂前核内分裂は生じていないと考えられる。

本研究によってクローン由来三倍体と系統間雑種の雄では、由来の異なる染色体間における対合不全が生じており、これが受精能力を持たない精子または精子様細胞の形成に大きく影響していると考えられた。この結果は、これまで広く報告されてきた雑種不妊のメカニズムを分子細胞遺伝学的な視点から理解する上で大きな手助けとなる。

総合考察

本研究では、ドジョウにおいて遺伝的に大きく分岐した二系統（A, B）に由来する染色体を識別するプローブを開発し、FISH による顕微鏡観察からクロードジョウが過去における二系統間の交雑に起源することを分子細胞遺伝学的に証明した。次に、クロードジョウが産生する遺伝的に均一な二倍性配偶子の形成を担保する特殊な染色体挙動、すなわち、減数分裂前核内分裂により倍加した姉妹染色体間の対合を解明した。この非還元配偶子形成メカニズムを再現することができれば、短期間で目的形質の固定が可能な新しい育種技術になると期待される。加えて、不妊ドジョウである系統間雑種とクロード由来三倍体の雄では、由来が異なる非相同な染色体間で対合不全が高頻度で生じることを見出した。従って、対合不全を人為的に誘起することで新たな不妊化技術になると考えられた。本章では、本研究結果と先行研究を比較し、水産育種技術へと応用するために解決すべき課題について論じる。

クロード性配偶子の形成機構

本研究では非還元配偶子を形成する他の脊椎動物と同様に、クロードジョウが交雑起源であることを分子細胞遺伝学的に明らかにした（第三章）。一般に、遺伝的に近縁な種間交雑から生じた個体は生存性であり正常な配偶子形成を行う。例えば、シロザケ

(*Oncorhynchus keta*) とベニザケ (*O. nerka*) の正逆交雑個体は雌雄とも妊性を持ち、雑種個体から子孫を得ることも可能である (Chevassus, 1983)。また、生存性ではあるが不妊になる雑種も存在する。例えば、ニホンメダカ (*Oryzias latipes*) 雌とハイナンメダカ (*O. curvinotus*) 雄の交雑によって作出した雑種雄は生存性であるが、作出される精子の頭部は大きく、鞭毛の形態異常も生じており受精能を持たない (Shimizu et al. 1997)。遺伝的に遠縁な種間雑種の場合、ゲノム間や核-細胞質間の不和合性に起因する異常を示し、胚は致死性的になる (Chevassus, 1983; Ogielska, 2009)。例えば魚類では、ドジョウ雌とキンギョ雄の交雑により生じた仔魚のほとんどが体躯の矮小などの奇形を呈し、摂餌することなく死亡した (木島ら, 1996)。また、サクラマス (*Oncorhynchus masou*) 雌とニジマス (*O. mykiss*) 雄の交雑によって作出した雑種胚は発生異常を呈し致死性であるが、FISH および GISH 解析の結果、雄親であるニジマスに由来する染色体の特異的な削減と部分欠失が生じていた (Fujiwara et al. 1997)。鳥類ではウズラ (*Coturnix japonica*) 雌とニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) 雄の交雑から得た雑種胚の孵化率は低く発生遅延も生じており、ほとんどが致死性であった (Ishishita et al. 2016)。一方、遺伝的に近縁すぎず、遠縁すぎない距離を持つ二種間の雑種は非還元卵を形成する場合があります、このような現象は一般的にバランス仮説 (balance hypothesis) といわれる (Moritz et al. 1989; Lamatsch and Stöck, 2009)。例えば、ヨーロッパに生息する *Cobitis* 属のシマドジョウには、主に三つの近縁種 (*Cobitis elongatoides*, *C. tanaitica*,

C. taenia) の交雑を起源として様々なゲノム構成の雑種が存在する (Janko et al. 2007a, b; Choleva et al. 2012)。これらは程よく遠縁なため、非還元配偶子を産出する個体が確認されている (Janko et al. 2007a, b; Choleva et al. 2012)。爬虫類では、*Aspidoscelis* 属の異種間交雑に起源するトカゲ雌が二倍性の非還元卵を産出し、雄の関与なく単為生殖を行うことが知られている (Lutes et al. 2010)。これら一部の生物で見られる非還元配偶子は、異質なゲノム構成に起因する異常な配偶子形成と、それによる不妊性を回避するために生じたと考えられる。生物にとって自身の遺伝子を次世代に伝えるためには、正常な受精能力を持つ配偶子形成が必須である。しかし、生殖細胞内に由来の異なる非相同なゲノムが混在する場合、雑種ドジョウ雄で観察されたように、染色体の非相同性に起因する対合不全が生じ、その結果、受精能力を持たない配偶子の形成が予想される (第五章)。性転換クロードジョウでは、A 型および初期 B 型精原細胞で大型の核が観察され、それらが四倍性であったことから、染色体倍加は減数分裂前の初期精原細胞で生じることが強く示唆された (Yoshikawa et al. 2009)。これらを考えると、減数分裂の開始前に生殖細胞内に存在する染色体の相同性を検証し、正常な対合が可能か否かを確かめるチェックポイントが存在すると推定される。このチェックポイントにより染色体の間で対合不全が生じる可能性がある判断された場合、第四章においてクロードジョウで見られたように、全染色体を倍加して起源を同じくする姉妹染色体間であたかも相同染色体のように対合することで、配偶子形成異常を回避するものと考えられる。し

かしながら、配偶子形成過程において相同染色体がどのように対合の相手となる染色体を認識し対合を行うのか、その詳しい機構は全く不明である (Sumner, 2006)。一方、体細胞分裂が行われている細胞の間期核では染色体はランダムではなく組織化されて存在することが報告されている (Sumner, 2006; Mizuguchi et al. 2015)。すなわち、細胞内においてセントロメアが紡錘体の極付近の一か所に、テロメアがその対極へ集まるようにして染色体が並ぶ Rabl 配置である (Fig. 34)。Rabl 配置は、核内における特定の領域に染色体が存在するように促し、セントロメアを一か所に集めることで細胞分裂時に紡錘体とキネトコアを効率的に結合させる役割を持つと考えられている (Mizuguchi et al. 2015)。分裂酵母をモデルとした研究では、体細胞分裂で増殖する細胞の間期では Rabl 配置が観察されたが、減数分裂を行うように誘導すると、テロメアとセントロメアが移動を開始し、テロメアが紡錘体の極付近に、セントロメアがその対極に集合するブーケ構造 (Bouquet formation) を形成した (Mizuguchi et al. 2015) (Fig. 34)。ブーケ構造は染色体同士を近接させることで減数分裂における対合を効率的に行わせる役割があると考えられている。Rabl 配置の役割についてはまだ不明な点が多いが、Rabl 配置によりテロメアとセントロメアがそれぞれ一か所に集まることで、ブーケ構造の形成に先立って染色体間の相同性を確認し、正常な対合が可能か検証している可能性もある。従って、クロードジョウでは減数分裂前の生殖細胞において、Rabl 配置時に染色体間の非相同性による対合不全の可能性があると判断され、それを回避するため倍加が

生じたのかもしれない。本研究で開発した二系統識別プローブを用いた FISH 解析により、少なくともセントロメア領域に存在する反復配列が二系統間で異なることが強く示唆された（第一、第二章）。従って、セントロメア領域のみで染色体間の相同性を判断しているかは目下のところ定かではないが、一つの判断基準となっている可能性はある。しかしながら、クローンジョウが Rabl 配置を有するかは不明であり、Rabl 配置を形成しない生物も存在する。例えば、モロコシの根端細胞の間期核ではセントロメアとテロメアが核中に散在していた（Dong and Jiang, 1998）。また、マウスのリンパ球の間期核では、セントロメアが核の一方の極に局在したが、テロメアは散在していた（Vourc'h et al. 1993）。従って、クローンジョウにおいても Rabl 配置を形成しているのか検証する必要がある。

なお、非還元配偶子は減数分裂前核内分裂とは異なる機構によって生じる場合も多い。交雑起源のギンブナでは第一減数分裂が省略され、体細胞分裂と同様の分裂により非還元配偶子が形成される（無配偶生殖, Apomixis）（Dawley, 1989; Yamashita et al. 1993）。さらに、異質なゲノム構成を持つ個体で、非還元配偶子以外が形成される場合もある。例えば魚類では、北海道に生息する *Hexagrammos* 属のアイナメ雑種が父親由来のゲノムを配偶子形成過程で排除し、残った母親由来のゲノムが倍加後、減数分裂が進行することで半数性配偶子を産出する（雑種発生, Hybridogenesis）（Suzuki et al. 2017）。両生類においても、ワライガエル（*Pelophylax ridibundus*）とコガタトノサマガエル（*P.*

lessonae) の交雑起源であるヨーロッパトノサマガエル (*P. esculentus*) が同様の機構で半数性の配偶子を形成する (Chmielewska et al. 2018; Dedukh et al. 2019)。近年の研究から、このカエル雑種では配偶子形成過程で片方のゲノムを小核として生殖細胞から排除していることが明らかとなった (Chmielewska et al. 2018; Dedukh et al. 2019)。また、ドジョウのクローン由来三倍体雌は、卵形成過程で遺伝的に相同性の低いゲノム 1 セットを排除後、残ったゲノム 2 セットが減数分裂を経て半数性の卵が形成される (減数分裂雑種発生, Meiotic hybridogenesis) (Morishima et al. 2008b)。同様に、ドジョウ雌とカラドジョウ (*Misgurnus mizolepis*) 雄を親として、第二極体放出阻止で誘起した雑種三倍体雄でも、ドジョウ由来のゲノムのみを持つ半数性精子を産出した個体が存在した (Fujimoto et al. 2008)。これらは由来の異なるゲノムを併せ持つという共通点があり、異質なゲノム構成が特殊な配偶子形成の引き金になっていることは明らかである。一方で、異質なゲノム構成を持つ雑種における特殊な配偶子形成機構は減数分裂前核内分裂、無配偶生殖、雑種発生、減数分裂雑種発生など様々であり、何を基準として決定されるのかは不明である。しかしながら、ドジョウにおいてクローン二倍体 (AB) と比較して遺伝的には同一であるが倍数性が異なるクローン四倍体 (複二倍体、AABB) では、減数分裂前核内分裂は生じることなく二倍性の還元卵 (AB) が形成された (Morishima et al. 2012)。すなわち、非還元配偶子の形成はクローン二倍体では生じるが、四倍体では通常の減数分裂によって二倍性の卵が形成されたことになる

(Morishima et al. 2012)。さらに、ドジョウのクローン由来三倍体 (AAB, ABB) 雌は、相同性の低いゲノム 1 セットを排除して、同じ由来の相同染色体間で対合を行う (Morishima et al. 2008b)。これらから考えると、同じ由来の染色体間での対合が可能となるように配偶子形成機構が選択されている可能性がある。

雑種ドジョウ雄に特異的な不妊

不妊となる系統間雑種とクローン由来三倍体ドジョウ雄の減数分裂において、一価染色体が多く観察され、対合不全が高頻度で生じていた (第五章)。一方、系統間雑種の雌には非還元卵を産出した個体が確認されている (Arias-Rodriguez et al. 2009)。また、クローン由来三倍体の雌では 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、半数性の卵を産出する (Morishima et al. 2008b)。雌雄での妊性の違いについては、ホールデンの法則 (Haldane, 1922) により説明されてきた。ホールデンの法則では、雑種の第一世代において、雌雄のうち一方の性が現れない、現れても他方の性と比較して少ない、または不妊になるという特徴を示し、ヘテロ型の性染色体を持つ性に顕著にあらわれる (Haldane, 1922)。ドジョウは雄ヘテロ型 (XX: 雌、XY: 雄) の性決定様式を持つため (Suzuki et al. 1985)、雄不妊の事実はホールデンの法則と合致する。また、哺乳類においても、雄ヘテロ型の性決定様式を持つキャンベルハムスター (*Phodopus campbelli*) 雌とジャンガリアンハムスター (*P. sungorus*) 雄の交配か

ら得た雑種雌は妊性を持つ一方で、不妊の雄では多くの精母細胞が第一減数分裂中期で分裂を停止、蓄積され、精母細胞様細胞のアポトーシスも生じていた (Ishishita et al. 2015)。さらに鳥類では、雌ヘテロ型 (ZW: 雌、ZZ: 雄) の性決定様式を持つウズラ (*Coturnix japonica*) 雌とニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) 雄の交雑個体は雌が致死性である (Ishishita et al. 2016)。一方、雄では未発達な精巣のみが形成され不妊になるが、生き残る個体も存在する (Ishishita et al. 2016)。これらの結果もホールデンの法則と合致する。では、なぜヘテロ型の性で不妊が顕著にあらわれるのだろうか。先述のキャンベルハムスターとジャンガリアンハムスターの交雑個体から摘出した精巣を用いて減数分裂を観察した結果、常染色体間の対合不全だけでなく、性染色体間 (X-Y) の対合不全も非常に多く観察された (Ishishita et al. 2015)。従って、ヘテロ型の性染色体を持つ性では、常染色体間に加えて性染色体間の対合不全も同時に生じる可能性が高くなり、その結果、深刻な配偶子形成異常が生じて不妊が顕著にあらわれると考えられる。

これまでに、不妊の雑種や三倍体などを材料とした研究から、第一減数分裂前期のパキテン期において相同組換えや対合不全を監視する機構 (パキテンチェックポイント) の存在が判明している (Li et al. 2009)。パキテンチェックポイントによって組換えや対合の異常が確認された細胞は、欠陥のある配偶子形成を未然に防ぐためアポトーシスにより排除される (Li et al. 2009)。そのため、対合不全が生じた精母細胞でアポトーシスが起これば最終的に形成される精子数は減少すると考えられる。本研究において、不妊

ドジョウである系統間雑種とクローン由来三倍体の雄では対合不全が高頻度で観察されたが（第五章）、これらは有性生殖ドジョウと比べて少量の精子または精子様細胞を形成する（Oshima et al. 2005; Arias-Rodriguez et al. 2010）。従って、雑種ドジョウ雄においてもパキテンチェックポイントによって対合異常が確認された多くの細胞でアポトーシスが生じ、その結果、少量の精子または精子様細胞のみが産出されて不妊になると考えられる。

パキテンチェックポイントの分子機構については不明な点が多い。しかし、マウスにおいて減数分裂時に特異的に発現する *Hormad 1* 遺伝子をノックアウトした雌では、対合不全が観察されたのにも関わらず、アポトーシスが生じなかった（Kogo et al. 2012）。その結果、コントロール個体と同数の卵細胞が形成されたが、それらは様々な染色体数を持つ異常な卵細胞であった。そのため、マウスでは *Hormad 1* 遺伝子によって対合が正常に行われていることが監視されており、この遺伝子がチェックポイントに関与していることが強く示唆された（Kogo et al. 2012）。従って、ドジョウにおいてもマウスと同様に対合時の染色体挙動が特定の遺伝子によって監視されている可能性があるが、目下のところは不明であり分子機構の解明が望まれる。

今後の課題と展望

これまで述べてきたように、本研究ではドジョウをモデル動物として、クローン性の非還元配偶子の形成を担保する特殊な染色体挙動を明らかにした。従って、クローンドジョウで見られた染色体挙動を人為的に統御し、再現することができれば、短期間で目的形質の固定が可能な新しい育種技術になると期待される。しかしながら、染色体倍加を誘起する分子機構は不明であり、実用化には課題も多い。一方で、一部の魚類では雑種が形成した非還元配偶子を利用することで品種開発に成功している。例えば、中国ではフナ (*Carassius auratus* red. Var.) 雌とコイ (*Cyprinus Carpio* L) 雄の交雑により誘起した雑種では、雑種第二世代 (F2) において二倍性配偶子を産出する個体が出現し、これらの交配によって異質四倍体 (複二倍体) 系統が作出された (Liu, 2010)。この異質四倍体系統は、雌性発生および雄性発生二倍体、そして三倍体の作出に利用されている (Liu, 2010)。また、中国大陸のギベリオブナ (*Carassius auratus gibelio*) には、受精に関与した精子の種あるいは系統によって生殖様式が変化する特性があり、産業に応用されている。すなわち、ギベリオブナが産出した卵が異種由来の精子と受精した場合、雌性発生が生じて子孫はクローンになる (Gui and Zhou, 2010)。一方で、同種由来の精子と受精した場合には両性生殖が行われて雌雄の子孫が生じる。これらの原理を利用して高成長などの優良形質を持つクローン系統の開発に成功している (Gui and Zhou, 2010)。従って、一部の個体が持つ生殖特性と既存の染色体操作技術を上手く活用する

ことで、我が国における水産重要種においても新品種の開発が期待できる。しかしながら、自然に非還元配偶子を形成する雑種の組み合わせは限られており、非還元配偶子形成を導く染色体挙動を統御する分子機構を解明しなければ、人為的に非還元配偶子形成を誘起することは困難であると考えられる。そのためにも、クロードジョウをモデル動物とした非還元配偶子形成機構の研究が持つ意義は極めて大きい。

一部の魚類では先述のシロザケとベニザケの正逆交雑個体のように雑種化しても妊性を示す例外が存在する (Chevassus, 1983)。また、ドジョウの四倍体と二倍体の正逆交雑に由来する三倍体の雌は半数性と三倍性の卵を産出する (Matsubara et al. 1995)。本研究では不妊ドジョウにおいて高頻度で対合不全が生じていることを明らかにした (第五章)。従って、人為的に対合不全を誘起できれば、これまで広く利用されてきた種間交雑による雑種化や三倍体化に代わる新たな不妊化技術になる可能性がある。対合において、相同染色体同士を結び付ける役割を持つのがシナプトネマ複合体である。シナプトネマ構造は中心要素と側方要素から構成され、中心要素を構成するタンパク質の一つに SCP1 がある。ニホンメダカ (*Oryzias latipes*) 雌とハイナンメダカ (*O. curvinotus*) 雄の交雑個体雄は受精能を持たない精子様細胞を形成して不妊であるが、減数分裂像では対合不全に起因する一価染色体が観察された (Shimizu et al. 1997)。また、SCP1 抗体を用いた免疫組織学的発現解析の結果、メダカ雑種雄では SCP1 の発現が大きく乱れて不完全なシナプトネマ構造が形成されており、対合を維持することがで

きず、精子の形成不全が生じていると推測された（岩井ら, 2006）。従って、水産重要種においても、シナプトネマ構造に関与するタンパク質の発現を人為的に阻害することができれば、対合不全により不妊化を誘起する新たな技術として期待できる。

一部のドジョウにおいて見られるクローン性配偶子形成と雑種不妊に関する研究は、水産育種において効率的な生産を手助けする技術の開発だけでなく、減数分裂機構を深く理解するためにも非常に重要である。本研究において得られた知見は、特殊な配偶子形成機構を解明する上で、貴重な成果となった。

要約

本研究では、ドジョウ (*Misgurnus anguillicaudatus*) の遺伝的に異なる二系統 (A, B) 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 A 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。

第三章では、クロードジョウの起源を解明するため、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、残りの 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、クロードジョウが過去における二系統の交雑を起源とすることが分子細胞遺伝学的に明らかになった。

第四章では、クロー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、FISH による減数分裂観察を行った。その結果、有性生殖を行う B 系統ドジョウと比べて二倍の数となる 50 本の二価染色体がクロードジョウの卵母細胞および精母細胞で観察された。さらに、対合が元々同じ染色体である姉妹染色体間で行われることが明らかとなった。従って、クロードジョウでは減数分裂前に全染色体を倍加し、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、由来の異なる非相同な染色体間では対合不全が高頻度で

生じており、多くの一価染色体が観察された。対合不全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を持つ精子または精子様細胞が形成されると推定された。

謝辞

本論文の校閲を賜った北海道大学大学院水産科学研究院海洋応用生命科学部門増殖生物学講座の都木靖彰教授、育種生物学講座の水田浩之教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、多大なご指導を頂いた育種生物学講座の荒井克俊教授（現 北海道大学高等教育推進機構国際教育研究部 特任教授）、藤本貴史准教授、李大雄助教、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター水圏ステーション七飯淡水実験所の山羽悦郎教授に謹んで感謝致します。また本研究において大変貴重な助言を賜った麻布大学獣医学部分子生物学研究室の村上賢教授、国立研究開発法人水産研究教育機構中央水産研究所の藤原篤志博士、そして多くの大学院生と学部生の皆様に謹んで感謝致します。

引用文献

- 荒井克俊 (1997) 水産増養殖における染色体操作の現状. 水産増殖 45:411-416.
- Arias-Rodriguez L, Yasui GS, Arai K (2009) Disruption of normal meiosis in artificial inter-populational hybrid females of *Misgurnus loach*. Genetica 136(1):49-56.
- Arias-Rodriguez L, Yasui GS, Kusuda S, Arai K (2010) Reproductive and genetic capacity of spermatozoa of inter-populational hybrid males in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. J Appl Ichthyol 26(5):653-658.
- Asahida T, Kobayashi T, Saitoh K, Nakayama I (1996) Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffer containing high concentration of urea. Fish Sci 62:727-730.
- Bhattacharyya T, Gregorova S, Mihola O et al (2013) Mechanistic basis of infertility of mouse intersubspecific hybrids. Proc Natl Acad Sci USA 110(6):E468-E477.
- Bi K, Bogart JP (2006) Identification of intergenomic recombinations in unisexual salamanders of the genus *Ambystoma* by genomic in situ hybridization (GISH). Cytogenet Genome Res 112(3-4):307-312.
- Bi K, Bogart JP, Fu J (2007) Intergenomic translocations in unisexual salamanders of the genus *Ambystoma* (Amphibia, Caudata). Cytogenet Genome Res 116(4):289-297.
- Cherfas NB (1966) Natural triploidy in females of the unisexual form of silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch). Genetika 5:16-24.
- Chevassus B (1983) Hybridization in fish. Aquaculture 33(1):245-262.
- Chmielewska M, Dedukh D, Haczkiwicz K et al (2018) The programmed DNA elimination and formation of micronuclei in germ line cells of the natural hybridogenetic water frog *Pelophylax esculentus*. Sci Rep 8(1):7870.
- Choleva L, Janko K, De Gelas K et al (2012) Synthesis of clonality and polyploidy in vertebrate animals by hybridization between two sexual species. Evolution 66:2191-2203.

- Dawley RM (1989) An introduction to unisexual vertebrates. In: Dawley RM, Bogart JP (ed) Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates. New York State Museum, Albany, New York, pp 1-18.
- Dedukh D, Litvinchuk J, Svinin A et al (2019) Variation in hybridogenetic hybrid emergence between populations of water frogs from the *Pelophylax esculentus* complex. PLoS One 14(11):e0224759.
- Dong F, Jiang J (1998) Non-Rabl patterns of centromere and telomere distribution in the interphase nuclei of plant cells. Chromosome Res 6(7):551-558.
- Fujimoto T, Yasui GS, Yoshikawa H, Yamaha E, Arai K (2008) Genetic and reproductive potential of spermatozoa of diploid and triploid males obtained from interspecific hybridization of *Misgurnus anguillicaudatus* female with *M. mizolepis* male. J Appl Ichthyol 24(4):430-437.
- Fujimoto T, Yamada A, Kodo Y et al (2017) Development of nuclear DNA markers to characterize genetically diverse groups of *Misgurnus anguillicaudatus* and its closely related species. Fish Sci 83(5):743-756.
- Fujiwara A, Abe S, Yamaha E, Yamazaki F, Yoshida CM (1997) Uniparental chromosome elimination in the early embryogenesis of the inviable salmonid hybrids between masu salmon female and rainbow trout male. Chromosoma 106:44-52.
- Fujiwara A, Abe S, Yamaha E, Yamazaki F, Yoshida CM (1998) Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silver-stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. Chromosome Res 6(6):463-471.
- Gui J, Zhou L (2010) Genetic basis and breeding application of clonal diversity and dual reproduction modes in polyploid *Carassius auratus gibelio*. Sci China Life Sci 53(4):409-415.
- Haldane JBS (1922) Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. Journ of Gen 12:101-109.
- Ichikawa K, Tomioka S, Suzuki Y et al (2017) Centromere evolution and CpG methylation during vertebrate speciation. Nat Commun 8:1833.
- Ishishita S, Tsuboi K, Ohishi N, Tsuchiya K, Matsuda Y (2015) Abnormal pairing of X and Y sex chromosomes during meiosis I in interspecific hybrids of *Phodopus campbelli* and *P. sungorus*. Sci Rep 5:9435.

- Ishishita S, Kinoshita K, Nakano M, Matsuda Y (2016) Embryonic development and inviability phenotype of chicken-Japanese quail F1 hybrids. *Sci Rep* 6:26369.
- Islam FB, Ishishita S, Uno Y et al (2013) Male hybrid sterility in the mule duck is associated with meiotic arrest in primary spermatocytes. *J Poult Sci* 50(4):311-320.
- Itono M, Morishima K, Fujimoto T et al (2006) Premeiotic endomitosis produces diploid eggs in the natural clone loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae). *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 305(6):513-523.
- Itono M, Okabayashi N, Morishima K et al (2007) Cytological mechanisms of gynogenesis and sperm incorporation in unreduced diploid eggs of the clonal loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae). *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 307(1):35-50.
- 岩井俊治, 横田雄洋, 酒井千春, 金野美美, 山下正兼 (2006) メダカ雑種の特殊な生殖と発生から学ぶ細胞分裂と生殖細胞形成の分子細胞機構. *水産育種* 35:101-112.
- Janko K, Bohlen J, Lamatsch D et al (2007a) The gynogenetic reproduction of diploid and triploid hybrid spined loaches (*Cobitis*:Teleostei), and their ability to establish successful clonal lineages-on the evolution of polyploidy in asexual vertebrates. *Genetica* 131(2):185-194.
- Janko K, Flajšhans M, Choleva L et al (2007b) Diversity of European spined loaches (genus *Cobitis* L.): an update of the geographic distribution of the *Cobitis taenia* hybrid complex with a description of new molecular tools for species and hybrid determination. *J Fish Biol* 71:387-408.
- Khan MR, Arai K (2000) Allozyme variation and genetic differentiation in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Fish Sci* 66(2):211-222.
- 木島圭介, 荒井克俊, 鈴木亮 (1996) 致死性科間雑種ドジョウ雌×キンギョ雄およびドジョウ雌×タモロコ雄における異質三倍体の誘起. *広島大学生物生産学部紀要* 35 : 1-12.
- Kogo H, Tsutsumi M, Ohye T et al (2012) HORMAD1-dependent checkpoint/surveillance mechanism eliminates asynaptic oocytes. *Genes Cells* 17(6):439-454.

- Komen J, Thorgaard GH (2007) Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. *Aquaculture* 269(1-4):150-173.
- Kuroda M, Fujimoto T, Murakami M, Yamaha E, Arai K (2018) Clonal reproduction assured by sister chromosome pairing in dojo loach, a teleost fish. *Chromosome Res* 26(4):243-253.
- Kuroda M, Fujimoto T, Murakami M, Yamaha E, Arai K (2019) Aberrant meiotic configurations cause sterility in clone-origin triploid and inter-group hybrid males of the dojo loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Cytogenet Genome Res* 158(1):46-54.
- Kurokura H, Hirano R, Tomiya M, Iwahashi M (1984) Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture* 37:267-273.
- Lamatsch DK, Stöck M (2009) Sperm-dependent parthenogenesis and hybridogenesis in teleost fishes. In: Schön I, Martens K, Dijk P (eds) *Lost sex: the evolutionary biology of parthenogenesis*. Springer, Dordrecht, pp 399-432.
- Li XC, Barringer BC, Barbash DA (2009) The pachytene checkpoint and its relationship to evolutionary patterns of polyploidization and hybrid sterility. *Heredity* 102(1):24-30.
- Li YJ, Tian Y, Zhang MZ et al (2010) Chromosome banding and FISH with rDNA probe in the diploid and tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Ichthyol Res* 57(4):358-366.
- Li YJ, Yu Z, Zhang MZ et al (2011) The origin of natural tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) inferred from meiotic chromosome configurations. *Genetica* 139(6):805-811.
- Li YJ, Yu Z, Zhang MZ et al (2012) Induction of viable gynogenetic progeny using eggs and UV-irradiated sperm from the Chinese tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquac Int* 21(4):759-768.
- Li YJ, Gao YC, Zhou H et al (2015) Meiotic chromosome configurations in triploid progeny from reciprocal crosses between wild-type diploid and natural tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* in China. *Genetica* 143(5):555-562.

- Li YJ, Gao YC, Zhou H et al (2016) Aneuploid progenies of triploid hybrids between diploid and tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* in China. *Genetica* 144(5):601-609.
- Liu S (2010) Distant hybridization leads to different ploidy fishes. *Sci China Life Sci* 53(4):416-425.
- Lutes AA, Neaves WB, Baumann DP, Wiegand W, Baumann P (2010) Sister chromosome pairing maintains heterozygosity in parthenogenetic lizards. *Nature* 464:283-286.
- Masumoto H, Nakano M, Ohzeki J (2004) The role of CENP-B and α -satellite DNA: *de novo* assembly and epigenetic maintenance of human centromeres. *Chromosome Res* 12(6):543-556.
- Matsubara K, Arai K, Suzuki R (1995) Survival potential and chromosomes of progeny of triploid and pentaploid females in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture* 131(1-2):37-48.
- Mizuguchi T, Barrowman J, Grewal SI (2015) Chromosome domain architecture and dynamic organization of the fission yeast genome. *FEBS Lett* 589:2975-2986.
- Morishima K, Horie S, Yamaha E, Arai K (2002) A cryptic clonal line of the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) evidenced by induced gynogenesis, interspecific hybridization, microsatellite genotyping and multilocus DNA fingerprinting. *Zool Sci* 19(5):565-575.
- Morishima K, Nakamura-Shiokawa Y, Bando E et al (2008a) Cryptic clonal lineages and genetic diversity in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Genetica* 132(2):159-171.
- Morishima K, Yoshikawa H, Arai K (2008b) Meiotic hybridogenesis in triploid *Misgurnus* loach derived from a clonal lineage. *Heredity* 100:581-586.
- Morishima K, Yoshikawa H, Arai K (2012) Diploid clone produces unreduced diploid gametes but tetraploid clone generates reduced diploid gametes in the *Misgurnus* loach. *Biol Reprod* 86(2):1-8.
- Moritz C, Brown WM, Densmore LD et al (1989) Genetic diversity and the dynamics of hybrid parthenogenesis in *Cnemidophorus* (Teiidae) and *Heteronotia*

- (Gekkonidae). In: Dawley RM, Bogart JP (eds) Evolution and ecology of unisexual vertebrates. New York State Museum, Albany, New York, pp 87-112.
- Müller WP (1977) Diplotene chromosomes of *Xenopus* hybrid oocytes. *Chromosoma* 59:273.
- 中嶋正道, 荒井克俊, 岡本信明, 谷口順彦 (2017) 水産遺伝育種学. 東北大学出版会. pp1-21.
- Nietzel A, Rocchi M, Starke H et al (2001) A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum Genet* 108:199-204.
- Ogielska M (2009) Development and reproduction of amphibian species, hybrids, and polyploids. In: Ogielska M (ed) Reproduction of amphibians. Science Publishers, NewHampshire, pp 343-410.
- Oshima K, Morishima K, Yamaha E, Arai K (2005) Reproductive capacity of triploid loaches obtained from Hokkaido Island, Japan. *Ichthyol Res* 52(1):1-8.
- Rampin M, Bi K, Bogart JP, Collares-Pereira MJ (2012) Identifying parental chromosomes and genomic rearrangements in animal hybrid complexes of species with small genome size using Genomic *In Situ* Hybridization (GISH). *Comp Cytogenet* 6(3):287-300.
- 斎藤憲治 (1989) *Misgurnus anguillicaudatus*. 日本の淡水魚. 川那部浩哉, 水野信彦, 細谷和海 (編) 山と溪谷社. pp382-385.
- Schwenk K, Brede N, Streit B (2008) Extent, processes and evolutionary impact of interspecific hybridization in animals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:2805-2811.
- Shimizu Y, Shibata N, Yamashita M (1997) Spermiogenesis without preceding meiosis in the hybrid medaka between *Oryzias latipes* and *O. curvinotus*. *J Exp Zool* 279:102-112.
- 水産総合研究センター (2013) 水産育種研究戦略 水産育種研究の今後の進め方について.
(http://www.fra.affrc.go.jp/publications/manuals/Strategy_of_breeding_research.pdf). 最終アクセス日 2020 年 1 月 9 日.

- 水産庁 (2017) 水産白書. 水産庁 編. 一般財団法人農林統計協会.
- Sumner A (2006) クロモソーム 構造と機能. 福井希一 監訳. 大阪公立大学共同出版会.
- Suzuki R, Oshiro T, Nakanishi T (1985) Survival, growth and fertility of gynogenetic diploids induced in the cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Aquaculture 48:45-55.
- Suzuki S, Arai K, Munehara H (2017) Karyological evidence of hybridogenesis in Greenlings (Teleostei: Hexagrammidae). PLoS One 12(7):e0180626.
- Torgasheva A, Borodin P (2016) Cytological basis of sterility in male and female hybrids between sibling species of grey voles *Microtus arvalis* and *M. levis*. Sci Rep 6:36564.
- Vourc'h C, Taruscio D, Boyle AL, Ward DC (1993) Cell cycle-dependent distribution of telomeres, centromeres, and chromosome-specific subsatellite domains in the interphase nucleus of mouse lymphocytes. Exp Cell Res 205(1):142-151.
- Yamada A, Kodo Y, Murakami M et al (2015) Hybrid origin of gynogenetic clones and the introgression of their mitochondrial genome into sexual diploids through meiotic hybridogenesis in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. J Exp Zool A Ecol Genet Physiol 323(9):593-606.
- Yamashita M, Jiang J, Onozato H, Nakanishi T, Nagahama Y (1993) A tripolar spindle formed at meiosis I assures the retention of the original ploidy in the gynogenetic triploid crucian carp, gimbuna *Carassius auratus langsdorfii*. Dev Growth Differ 35(6):631-636.
- Yoshikawa H, Morishima K, Kusuda S, Yamaha E, Arai K (2007) Diploid sperm produced by artificially sex-reversed clone loaches. J Exp Zool A Ecol Genet Physiol 307(2):75-83.
- Yoshikawa H, Morishima K, Fujimoto T et al (2009) Chromosome doubling in early spermatogonia produces diploid spermatozoa in a natural clonal fish. Biol Reprod 80(5):973-979.
- Yoshimura A, Nakata A, Kuro-o M, Obara Y, Ando Y (2006) Molecular cytogenetic characterization and chromosomal distribution of the satellite DNA in the genome of *Oxya hyla* intricata (Orthoptera: Catantopidae). Cytogenet Genome Res 112:160-165.

Table 1 List of PCR primer sets used in this study

DNA	Amplified region	Primer name	Primer sequences 5' to 3'
Mitochondrial DNA	Control region	0F	CTGACATTCCGACCAATCAC
		1565R	CTCTCGTATAACCGCGGT
Nuclear DNA	<i>Recombination activating gene 1 (RAG1)</i>	RAG1-M.aF	GTTTGAATGGCAGCCAGCTCTG
		RAG1-M.aR	CCACAAACATGAGACACAGAGGTC
Nuclear DNA	ManDra-B region	ManDra-F	TGTTTCATCCTTAGAATGCC
		ManDra-R	CCAGCTCAGAAAAGCAGTTTAG
Nuclear DNA	ManDra-A region	ManDra-A F	TCATCATAAGAATGCTCCTGTAAGC
		ManDra-A R	GCATTTTAGTATGAGAATTCAACTT
Plasmid DNA	Inserted DNA fragment	M13 Forward (-20)	GTAAAACGACGGCCAG
		M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC

Table 2 Samples used for chromosome preparations in chapter 1

Sample	Fixation	No. of samples	Cells	Locality or Crosses
Group A	April, 2014	2	Kidney	Abashiri, Hokkaido
Group B	April, 2014	3	Kidney	Nanae, Hokkaido
Group B	October, 2013	2	Embryo	Nanae (F) $\times$ Nanae (M)
Inter-group hybrid	June, 2013	3	Embryo	Iwamizawa, Hokkaido (F) $\times$ Abashiri (M)

F: Female and M: Male.

Table 3 Number of chromosomes and ManDra-B FISH signals detected in somatic cells of dojo loach

Group	Number of signals		Number of chromosomes								Total	
	ManDra-B		36	...	44	45	46	47	48	49		50
Group A	0		1			1		3	4	5	44	58
		Total	1			1		3	4	5	44	58
Group B	50										70	70
	49									2		2
	48								1			1
		Total							1	2	70	73
Inter-group hybrid	25							1	2	3	35	41
	24							1	3	1		5
	23							1	1			2
	22				1							1
	21				1							1
		Total			2			3	6	4	35	50

Table 4 Number of chromosomes, ManDra-B, and 5.8S + 28S rDNA FISH signals detected in somatic cells of inter-group hybrid between groups A and B dojo loach

Group	Number of signals	Number of chromosomes								Total
	ManDra-B – rDNA	39	...	45	46	47	48	49	50	
Inter-group hybrid	25 – 2						1		2	3
	23 – 2				1					1
	22 – 2			1						1
	18 – 2	1								1
Total		1		1	1		1		2	6

Table 5 Sequence differences of ManDra-B region in dojo loaches from group A and B

Genetic group	Individual	Colony	Replacement	Deletion	Insertion
A	1	1	2	0	0
		2	2	0	0
		3	5	1	0
		4	2	1	0
		5	11	1	0
		6	5	0	0
A	2	1	12	1	0
		2	3	1	0
		3	2	0	0
		4	3	0	0
		5	3	0	0
		6	3	0	0
		7	2	0	0
B	1	1	3	0	0
		2	0	2	0
		3	1	0	0
		4	2	1	0
		5	1	0	0
		6	1	1	0
B	2	1	4	1	1
		2	2	0	0
		3	2	1	0
		4	3	0	0
		5	2	0	0
		6	3	0	0
		7	2	0	0

Table 6 Samples used for chromosome preparations in chapter 2

Sample	Fixation	No. of samples	Cells	Locality or Crosses
Group A	July, 2017	6	Embryo	Abashiri, Hokkaido (F) × Abashiri (M)
Group A	September, 2019	5	Embryo	Abashiri (F) × Abashiri (M)
Group B	May, 2017	4	Embryo	Nanae, Hokkaido (F) × Nanae (M)
Group B	May, 2019	2	Embryo	Nanae (F) × Nanae (M)
Inter-group hybrid	May, 2017	3	Embryo	Nanae (F) × Abashiri (M)
Inter-group hybrid	November, 2018	3	Embryo	Ishikawa (F) × Abashiri (M)

F: Female and M: Male.

Table 7 Restriction enzymes used for satellite DNA isolation and the presence of satellite DNA band

Restriction enzyme	Satellite band	Restriction enzyme	Satellite band
<i>Acc</i> I	-	<i>Kpn</i> I	-
<i>Afa</i> I	-	<i>Mse</i> I	-
<i>Alu</i> I	-	<i>Msp</i> I	-
<i>Apa</i> I	-	<i>Not</i> I	-
<i>Bam</i> H I	-	<i>Pst</i> I	-
<i>Bbs</i> I	-	<i>Pvu</i> II	-
<i>Bgl</i> I	-	<i>Rsa</i> I	-
<i>Bgl</i> II	-	<i>Sca</i> I	-
<i>Cfo</i> I	-	<i>Sma</i> I	-
<i>Dra</i> I	+	<i>Sph</i> I	-
<i>Eco</i> R I	-	<i>Stu</i> I	-
<i>Eco</i> T22 I	-	<i>Sty</i> I	-
<i>Hae</i> III	-	<i>Xba</i> I	-
<i>Hind</i> III	-	<i>Xho</i> I	-
<i>Hinf</i> I	-		

Table 8 Characteristics of each unit sequences in ManDra-A 5 repeats compared to ManDra-A

	Repeats number				
	1	2	3	4	5
Replacement	2	7	6	4	1
Deletion	3	0	0	0	0

Table 9 Number of chromosomes and ManDra-A FISH signals detected in somatic cells of dojo loach

Group	Number of signals		Number of chromosomes							Total
	ManDra-A		44	45	46	47	48	49	50	
Group A	26							4	31	35
	25							1	3	4
	24							1	2	3
	23								1	1
	22									
	21									
	20							1		1
		Total						7	37	44
Group B	0		3		1	3	2	4	44	57
		Total	3		1	3	2	4	44	57

Table 10 Number of chromosomes and ManDra-A 5 repeats FISH signals detected in somatic cells of dojo loach

Group	Number of signals	Number of chromosomes							Total
	ManDra-A 5 repeats	44	45	46	47	48	49	50	
Group A	26							15	15
	25							2	2
	24				1	1			2

	Total				1	1		17	19
Group B	0	3		1	3	2	3	42	54

	Total	3		1	3	2	3	42	54

Table 11 Number of chromosomes, ManDra-A 5 repeats, and ManDra-B FISH signals detected in somatic cells of inter-group hybrid between groups A and B dojo loach

Group	Number of signals		Number of chromosomes				Total
	ManDra-A 5 repeats	ManDra-B	47	48	49	50	
Inter-group hybrid	13 – 25			1	4	20	25
	13 – 24				3		3
	13 – 23		1			1	2
	12 – 25			1			1
		Total	1	2	7	21	31

Table 12 Samples used for chromosome preparations in chapter 3

Sample	Fixation	No. of samples	Cells	Locality or Crosses
Clone	July, 2018	2	Kidney	Abashiri, Hokkaido
Clone	December, 2018	1	Kidney	Abashiri, Hokkaido
Clone	March, 2013	2	Embryo	Clone (F) × Goldfish (M) *
Clone	November, 2013	7	Embryo	Clone (F) × Goldfish (M) *
Clone	July, 2017	2	Embryo	Clone (F) × Goldfish (M) *
Clone	July, 2018	1	Embryo	Clone (F) × Goldfish (M) *
Clone	August, 2018	3	Embryo	Clone (F) × Goldfish (M) *
Clone	September, 2019	3	Embryo	Clone (F) × Goldfish (M) *

F: Female and M: Male.

* UV irradiated sperm

Table 13 Number of chromosomes and ManDra-B FISH signals detected in somatic cells of clonal dojo loach

Group	Number of signals	Number of chromosomes				Total
	ManDra-B	46	...	49	50	
Clone	25				86	86
	24			1		1
	21	1				1
	Total	1		1	86	88

Table 14 Number of chromosomes, ManDra-B, and 5.8S + 28S rDNA FISH signals detected in somatic cells of clonal dojo loach

Group	Number of signals	Number of chromosomes							Total
	ManDra-B – rDNA	43	...	46	47	48	49	50	
Clone	25 – 2							11	11
	24 – 2				1	1			2
	21 – 2	1		1					2
	Total	1		1	1	1		11	15

Table 15 Number of chromosomes, ManDra-A 5 repeats, and ManDra-B FISH signals detected in somatic cells of clonal dojo loach

Group	Number of signals		Number of chromosomes				Total
	ManDra-A 5 repeats	ManDra-B	47	48	49	50	
Clone	12 – 25			1	1	87	89
	12 – 24		1	4	5	2	12
	12 – 23			4		1	5
	12 – 22		1				1
	11 – 25			1	3	1	5
	11 – 24			5			5
Total			2	15	9	91	117

Table 16 Samples used for chromosome preparations in chapter 4

Sample	Fixation	No. of samples	Cells	Locality or Crosses
Group B	April, 2014	1	Testis	Nanae, Hokkaido
Clone	July, 2017	3	Ovary	Abashiri, Hokkaido
Sex-reversed clone male	January, 2014	1	Testis	Clone (F) × Goldfish (M) *
Sex-reversed clone male	April, 2018	3	Testis	Clone (F) × Goldfish (M) *
Sex-reversed clone male	July, 2018	2	Testis	Clone (F) × Goldfish (M) *

F: Female and M: Male.

* UV irradiated sperm

Table 17 Number of bivalent chromosomes and ManDra-B and 5.8S + 28S rDNA FISH signals detected in meiotic cells of dojo loach

Group	Number of signals		Number of bivalent chromosomes							Total
	ManDra-B	rDNA	22	...	25	...	46	49	50	
Group B	50	2			20					20
	44	2	1							1
	Total		1		20					21
clone male	50	4					1	1	28	30
	50	2							1	1
	Total						1	1	29	31

Table 18 Samples used for chromosome preparations in chapter 5

Sample	Fixation	No. of samples	Cells	Locality or Crosses
Clone-origin triploid	April, 2014	1	Kidney Testis	Abashiri, Hokkaido
Inter-group hybrid	November, 2014	1	Testis	Nanae, Hokkaido (F) × Abashiri (M)

F: Female and M: Male.

Table 19 Number of chromosomes, ManDra-B, and 5.8S + 28S rDNA FISH signals detected in somatic cells in the clone-origin triploid male dojo loach

Group	Number of signals	Number of chromosomes			Total	
	ManDra-B — rDNA	68	...	75		
Clone-origin triploid	25-3		1		4	5
		Total	1		4	5

Table 20 Number of univalent, bivalent, and trivalent chromosomes in meiotic metaphases of clone-origin triploid male. I: Univalent chromosome, II: Bivalent chromosome, III: Trivalent chromosome

Univalent (I)		Bivalent (II)		Trivalent (III)	Chromo.	No. of
A	B	AA	AB	AAB	no.	cell
1	24	24	1	0	75	1
2	21	22	4	0	75	1
5	24	22	1	0	75	1
4	19	20	6	0	75	2
5	20	20	5	0	75	1
9	24	20	1	0	75	1
6	21	20	4	0	75	1
8	21	19	4	0	75	1
9	22	19	3	0	75	2
10	23	19	2	0	75	1
9	20	18	5	0	75	3
11	22	18	3	0	75	3
10	19	17	6	0	75	1
11	20	17	5	0	75	1
13	22	17	3	0	75	2
12	22	17	2	1	75	1
14	21	16	4	0	75	1
16	23	16	2	0	75	3
17	22	15	3	0	75	1
17	20	14	5	0	75	1
18	21	14	4	0	75	1
20	23	14	2	0	75	1
17	16	12	9	0	75	1
20	19	12	6	0	75	1
23	18	10	7	0	75	1
Mean 11.3	21.2	17.4	3.8			Total 34
SD 5.4	1.8	3.0	1.9			cells

SD : Standard deviation

Table 21 Number of univalent and bivalent chromosomes in meiotic metaphases of inter-group hybrid male between groups A and B. I: Univalent chromosome, II: Bivalent chromosome

Univalent (I)		Bivalent (II)	Chromo.	No. of
A	B	AB	no.	cell
8	8	17	50	1
7	7	18	50	2
6	6	19	50	1
5	5	20	50	1
4	4	21	50	10
3	3	22	50	11
2	2	23	50	15
1	1	24	50	2
Mean 3.2	3.2	21.8		Total 43
SD 1.6	1.6	1.6		cells

SD : Standard deviation

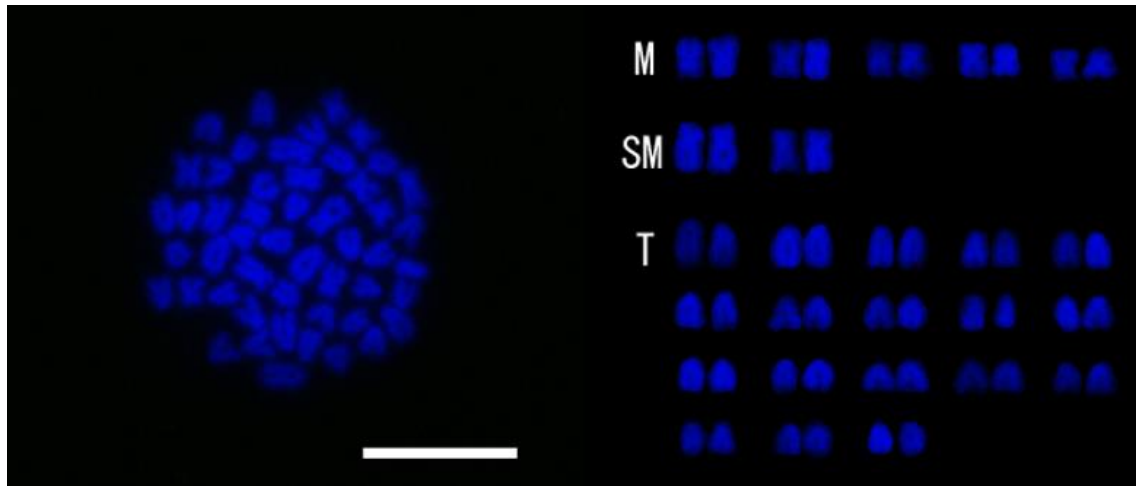


Fig. 1 FISH with ManDra-B probe in somatic cells from group A dojo loach. Representative metaphase (left) and karyotype (right) of somatic cells from wild-type diploid dojo loach of group A after FISH with ManDra-B probe. No signal was detected. ManDra-B probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected by streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (green). All chromosomes were counterstained with DAPI (blue). Scale bar denotes 10 μ m. M, metacentric chromosome; SM, submetacentric chromosome; T, telocentric chromosome. The figure was cited from Kuroda et al. (2018).

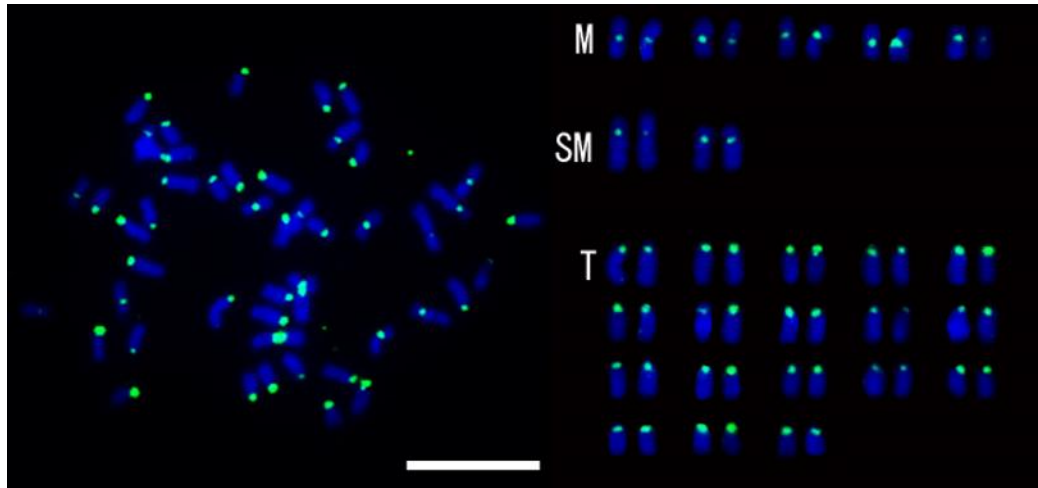


Fig. 2 FISH with ManDra-B probe in somatic cells from group B dojo loach. Representative metaphase (left) and karyotype (right) of somatic cells from wild-type diploid dojo loach of group B after FISH with ManDra-B probe. ManDra-B probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected by streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (green). All chromosomes were counterstained with DAPI (blue). Scale bar denotes 10 μ m. M, metacentric chromosome; SM, submetacentric chromosome; T, telocentric chromosome. The figure was cited from Kuroda et al. (2018).

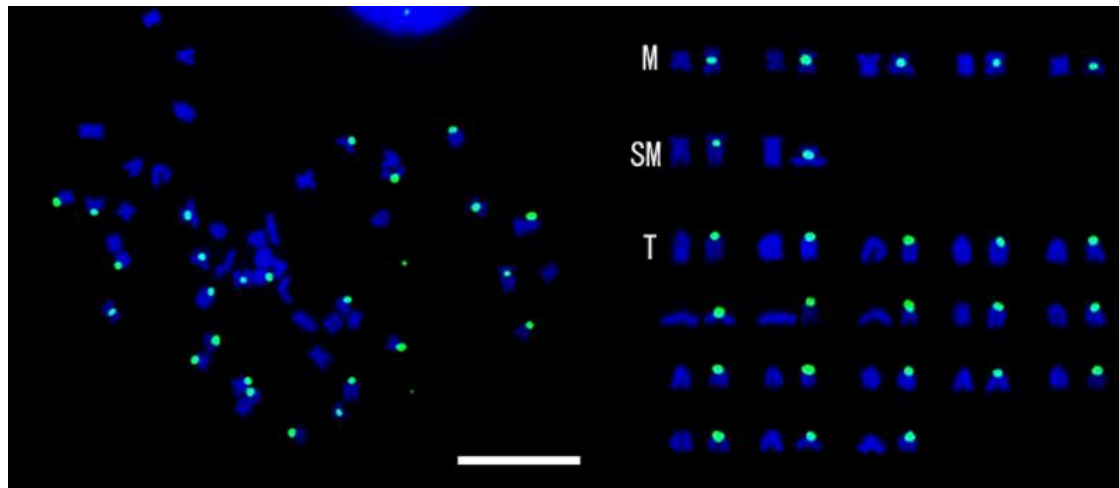


Fig. 3 FISH with ManDra-B probe in somatic cells from inter-group hybrid dojo loach. Representative metaphase (left) and karyotype (right) in somatic cells from inter-group hybrid between wild-type dojo loach of groups A and B after FISH with ManDra-B probe. ManDra-B probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected by streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (green). All chromosomes were counterstained with DAPI (blue). Scale bar denotes 10 μ m. M, metacentric chromosome; SM, submetacentric chromosome; T, telocentric chromosome. The figure was cited from Kuroda et al. (2018).

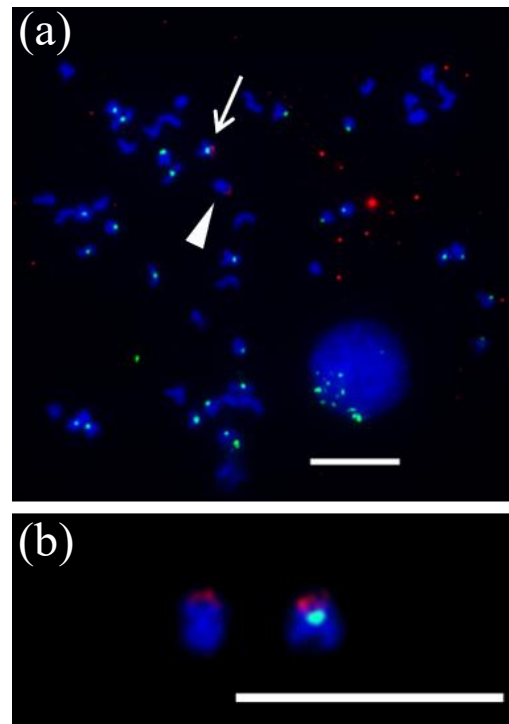


Fig. 4 Two-color FISH with ManDra-B probe and 5.8S + 28S rDNA probe in somatic cells of inter-group hybrid between wild-type dojo loach groups A and B. Representative metaphase (a) and partial karyotype of a pair of the largest homologous metacentric chromosomes (b) in somatic cell of inter-group hybrid between wild-type dojo loach groups A and B after two-color FISH with ManDra-B probe and 5.8S + 28S rDNA probe. Arrow indicates one of the largest homologous metacentric chromosomes with ManDra-B signal. Arrowhead indicates the other of the largest homologous metacentric chromosomes without ManDra-B signal. ManDra-B probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected by streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (green). A pair of the largest homologous metacentric chromosomes with nucleolar organizing regions (NORs) were determined using 5.8S + 28S rDNA probe labeled with digoxigenin-11-dUTP and detected by anti-digoxigenin-rhodamine, Fab fragments (Red). All chromosomes were counterstained with DAPI (Blue). Scale bars denote 10 μ m. The figure was cited from Kuroda et al. (2018).

	1								10								20								30							
ManDra-B	A	A	A	C	G	A	C	T	T	G	T	T	T	C	A	T	C	C	T	T	A	G	A	A	T	G	C	C	C	C		
Colony-1	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-2	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-3	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-4	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-5	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-6	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
	31								40								50								60							
ManDra-B	T	G	G	A	A	G	C	G	T	T	T	T	A	A	G	C	A	G	A	G	T	G	G	T	G	C	A	C	T	T		
Colony-1	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-3	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-4	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-5	•	•	T	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	G	•	•	•	•	•		
Colony-6	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•		
	61								70								80								90							
ManDra-B	T	T	G	C	A	T	G	A	A	A	A	G	T	C	A	C	A	T	T	T	C	A	G	C	T	T	G	A	A	A		
Colony-1	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-3	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	C	•	•	•	•	•		
Colony-4	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-5	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-6	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	C	•	•	•	•	•		
	91								100								110								120							
ManDra-B	C	G	T	A	G	A	T	T	T	T	T	C	A	C	T	C	T	A	A	A	C	T	G	C	T	T	T	T	C	T		
Colony-1	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-3	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	—	•		
Colony-4	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	—	•		
Colony-5	T	•	•	T	•	•	A	•	•	C	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	—	•		
Colony-6	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
	121								130								137															
ManDra-B	G	A	G	C	T	G	G	A	A	A	T	G	C	C	T	T	T															
Colony-1	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×															
Colony-2	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×															
Colony-3	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×															
Colony-4	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×															
Colony-5	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×															
Colony-6	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×															

Fig. 5 Comparison of ManDra-B sequences in wild-type dojo loach group A (individual-1). Red characters mean different base compared to ManDra-B reference sequence. Hyphen (—) indicates base deletion.

	1										10										20										30									
ManDra-B	A	A	A	C	G	A	C	T	T	G	T	T	T	C	A	T	C	C	T	T	A	G	A	A	T	G	C	C	C	C										
Colony-1	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-2	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	—	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-3	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-4	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-5	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-6	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-7	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
	31										40										50										60									
ManDra-B	T	G	G	A	A	G	C	G	T	T	T	T	A	A	G	C	A	G	A	G	T	G	G	T	G	C	A	C	T	T										
Colony-1	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	A	G	•	•	•	•	•	•										
Colony-2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-3	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-4	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-5	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-6	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-7	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•										
	61										70										80										90									
ManDra-B	T	T	G	C	A	T	G	A	A	A	A	G	T	C	A	C	A	T	T	T	C	A	G	C	T	T	G	A	A	A										
Colony-1	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	C	A	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-3	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-4	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-5	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-6	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-7	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
	91										100										110										120									
ManDra-B	C	G	T	A	G	A	T	T	T	T	T	C	A	C	T	C	T	A	A	A	C	T	G	C	T	T	T	T	C	T										
Colony-1	T	•	•	T	•	•	A	•	•	C	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	—	•	•										
Colony-2	T	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-3	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-4	•	•	•	T	•	•	•	A	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-5	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-6	•	A	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-7	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
	121										130										137																			
ManDra-B	G	A	G	C	T	G	G	A	A	A	T	G	C	C	T	T	T																							
Colony-1	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×																							
Colony-2	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×																							
Colony-3	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×																							
Colony-4	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×																							
Colony-5	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×																							
Colony-6	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×																							
Colony-7	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×																							

Fig. 6 Comparison of ManDra-B sequences in wild-type dojo loach group A (individual-2). Red characters mean different base compared to ManDra-B reference sequence. Hyphen (—) indicates base deletion.

	1								10								20								30							
ManDra-B	A	A	A	C	G	A	C	T	T	G	T	T	T	C	A	T	C	C	T	T	A	G	A	A	T	G	C	C	C	C		
Colony-1	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-2	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-3	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-4	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-5	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-6	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
	31								40								50								60							
ManDra-B	T	G	G	A	A	G	C	G	T	T	T	T	A	A	G	C	A	G	A	G	T	G	G	T	G	C	A	C	T	T		
Colony-1	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-3	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-4	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-5	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-6	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•		
	61								70								80								90							
ManDra-B	T	T	G	C	A	T	G	A	A	A	A	G	T	C	A	C	A	T	T	T	C	A	G	C	T	T	G	A	A	A		
Colony-1	•	•	•	T	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-3	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-4	•	•	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-5	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-6	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
	91								100								110								120							
ManDra-B	C	G	T	A	G	A	T	T	T	T	T	C	A	C	T	C	T	A	A	A	C	T	G	C	T	T	T	T	C	T		
Colony-1	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	—	•	•	•	•	•		
Colony-3	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-4	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	—	•	•	•	•		
Colony-5	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Colony-6	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	—	•	•	•	•		
	121								130								137															
ManDra-B	G	A	G	C	T	G	G	A	A	A	T	G	C	C	T	T	T															
Colony-1	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×															
Colony-2	•	•	•	•	•	—	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×															
Colony-3	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×															
Colony-4	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×															
Colony-5	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×															
Colony-6	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×															

Fig. 7 Comparison of ManDra-B sequences in wild-type dojo loach group B (individual-1). Red characters mean different base compared to ManDra-B reference sequence. Hyphen (—) indicates base deletion.

	1										10										20										30									
ManDra-B	A	A	A	C	G	A	C	T	T	G	T	T	T	C	A	T	—	C	C	T	T	A	G	A	A	T	G	C	C	C										
Colony-1	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-2	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	—	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-3	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	—	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-4	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	—	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-5	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	—	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-6	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	—	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-7	×	×	×	×	×	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	—	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
	31										40										50										60									
ManDra-B	C	T	G	G	A	A	G	C	G	T	T	T	T	A	A	G	C	A	G	A	G	T	G	G	T	G	C	A	C	T										
Colony-1	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-3	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-4	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-5	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-6	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	A	•	T	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-7	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•										
	61										70										80										90									
ManDra-B	T	T	T	G	C	A	T	G	A	A	A	A	G	T	C	A	C	A	T	T	T	C	A	G	C	T	T	G	A	A										
Colony-1	•	•	•	T	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-3	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-4	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-5	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-6	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-7	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
	91										100										110										120									
ManDra-B	A	C	G	T	A	G	A	T	T	T	T	T	C	A	C	T	C	T	A	A	A	C	T	G	C	T	T	T	T	C										
Colony-1	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	—	•										
Colony-2	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-3	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	—	•										
Colony-4	•	•	•	•	T	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-5	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-6	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
Colony-7	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
	121										130										138																			
ManDra-B	T	G	A	G	C	T	G	G	A	A	A	T	G	C	C	T	T	T																						
Colony-1	•	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×																						
Colony-2	•	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×																						
Colony-3	•	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×																						
Colony-4	•	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×																						
Colony-5	•	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×																						
Colony-6	•	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×																						
Colony-7	•	•	•	•	•	•	•	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×																						

Fig. 8 Comparison of ManDra-B sequences in wild-type dojo loach group B (individual-2). Red characters mean different base compared to ManDra-B reference sequence. Hyphen (—) indicates base deletion.

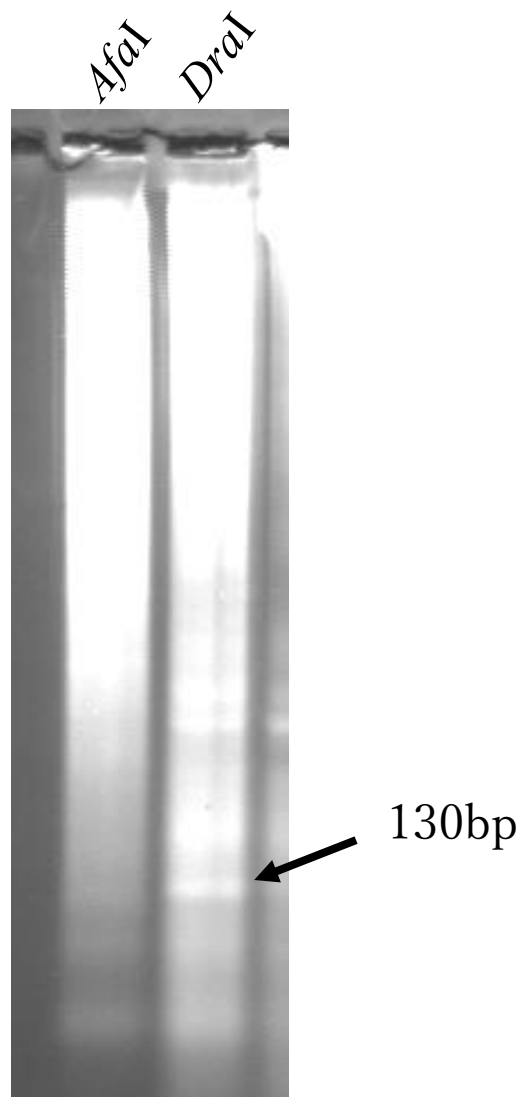


Fig. 9 Isolation of repetitive DNA sequences with restriction enzyme *Afa* I and *Dra* I in the genomic DNA of group A dojo loach. Arrow indicates a satellite band with approximately 130bp.

ManDra-A F

5'-AAACGACTTCTTTCATCATAAGAATGCTCCTGTAAGCTTTTAA
 GCAGAGTTGAGCACTTTGCATGAAAATTCACATTCAAGCTTGAA
 AAGTTGAATTCTCATACTAAAATGCTTTTCTGAGCTGGAAATGCCT
 TT - 3' ManDra-A R

Fig. 10 ManDra-A sequences with 136bp length. Arrows indicate the primer sequences to amplify ManDra-A sequences by PCR reaction.

	1										10										20										30									
ManDra-B	A	A	A	C	G	A	C	T	T	G	T	T	T	C	A	T	C	C	T	T	A	G	A	A	T	G	C	C	C	C										
ManDra-A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.										
	31										40										50										60									
ManDra-B	T	G	G	A	A	G	C	G	T	T	T	T	A	A	G	C	A	G	A	G	T	G	G	T	G	C	A	C	T	T										
ManDra-A	.	.	T	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.										
	61										70										80										90									
ManDra-B	T	T	G	C	A	T	G	A	A	A	A	G	T	C	A	C	A	T	T	T	C	A	—	G	C	T	T	G	A	A										
ManDra-A	.	—	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	—	.	.	A	.	.	.	.	.	.										
	91										100										110										120									
ManDra-B	A	C	G	T	A	G	A	T	T	T	T	T	C	A	C	T	C	T	A	A	A	C	T	G	C	T	T	T	T	C										
ManDra-A	.	A	.	.	T	.	.	A	.	.	.	C	.	.	T	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.										
	121										130										138																			
ManDra-B	T	G	A	G	C	T	G	G	A	A	A	T	G	C	C	T	T	T																						
ManDra-A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.																						

Fig. 11 Comparison of sequences between ManDra-B and ManDra-A. Upper sequence indicates ManDra-B, and lower sequence indicates ManDra-A. Red characters mean different base compared to ManDra-B reference sequence. Hyphen (—) indicates base deletion.

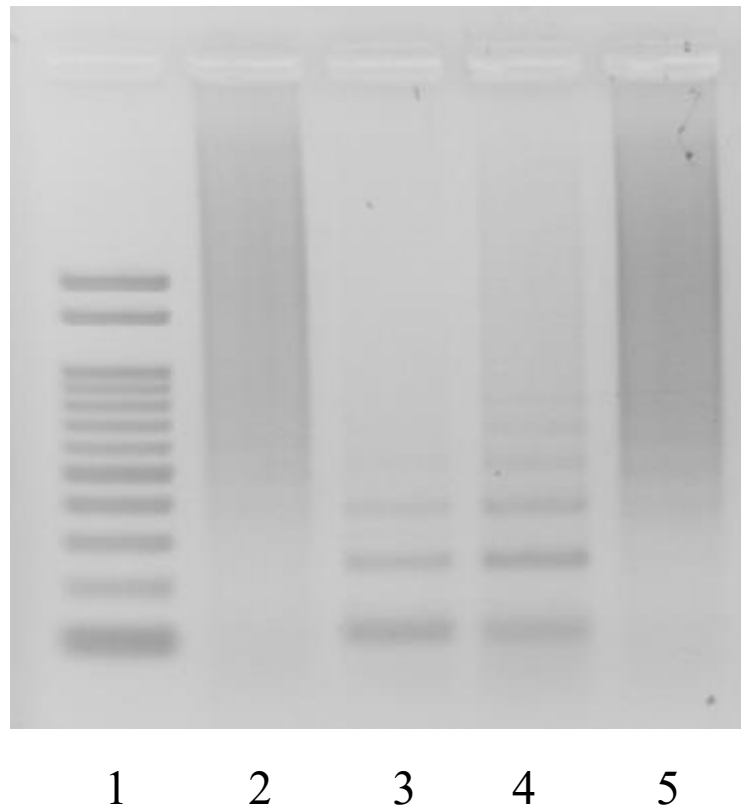


Fig. 12 Representative electrophoretic bands pattern after PCR using ManDra-A primers. Group B1 and B2 (lane 3, 4) show ladder-like pattern. Group A (lane 2) and clonal diploid (lane 5) show smear-like pattern. The molecular markers (lane 1) show a 100-bp ladder.

	1											10											20											30
ManDra-A	A	A	A	C	G	A	C	T	T	C	T	T	T	C	A	T	C	A	T	A	A	G	A	A	T	G	C	T	C	C				
Unit-1	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	—	—	—	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×				
	31											40											50											60
ManDra-A	T	G	T	A	A	G	C	T	T	T	T	T	A	A	G	C	A	G	A	G	T	T	G	A	G	C	A	C	T	T				
Unit-1	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·				
	61											70											80											90
ManDra-A	T	G	C	A	T	G	A	A	A	A	T	T	C	A	C	A	T	T	C	A	A	G	C	T	T	G	A	A	A	A				
Unit-1	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·				
	91											100											110											120
ManDra-A	G	T	T	G	A	A	T	T	T	C	C	A	T	A	C	T	A	A	A	A	T	G	C	T	T	T	T	C	T	G				
Unit-1	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	C	·	T	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·				
	121											130											136											
ManDra-A	A	G	C	T	G	G	A	A	A	T	G	C	C	T	T	T																		
Unit-1	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·																		
	1											10											20											30
ManDra-A	A	A	A	C	G	A	C	T	T	C	T	T	T	C	A	T	C	A	T	A	A	G	A	A	T	G	C	T	C	C				
Unit-2	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·				
	31											40											50											60
ManDra-A	T	G	T	A	A	G	C	T	T	T	T	T	A	A	G	C	A	G	A	G	T	T	G	A	G	C	A	C	T	T				
Unit-2	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	T	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·				
	61											70											80											90
ManDra-A	T	G	C	A	T	G	A	A	A	A	T	T	C	A	C	A	T	T	C	A	A	G	C	T	T	G	A	A	A	A				
Unit-2	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	C	·	A	·	·	·	T				
	91											100											110											120
ManDra-A	G	T	T	G	A	A	T	T	T	C	C	A	T	A	C	T	A	A	A	A	T	G	C	T	T	T	T	C	T	G				
Unit-2	·	A	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	T	·	A	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·				
	121											130											136											
ManDra-A	A	G	C	T	G	G	A	A	A	T	G	C	C	T	T	T																		
Unit-2	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·																		

Fig. 13 Sequences of ManDra-A and each repeat unit in ManDra-A 5 repeats region. Upper sequence indicates ManDra-A, and lower sequence indicates each repeat unit of ManDra-A 5 repeats. Unit-1 and Unit-2 contained partial ManDra-A sequences. Red characters mean different base compared to ManDra-A reference sequence. Hyphens (–) indicate base deletion.

	1											10											20											30
ManDra-A	A	A	A	C	G	A	C	T	T	C	T	T	T	C	A	T	C	A	T	A	A	G	A	A	T	G	C	T	C	C				
Unit-3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
	31											40											50											60
ManDra-A	T	G	T	A	A	G	C	T	T	T	T	T	A	A	G	C	A	G	A	G	T	T	G	A	G	C	A	C	T	T				
Unit-3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C				
	61											70											80											90
ManDra-A	T	G	C	A	T	G	A	A	A	A	T	T	C	A	C	A	T	T	C	A	A	G	C	T	T	G	A	A	A	A				
Unit-3	.	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
	91											100											110											120
ManDra-A	G	T	T	G	A	A	T	T	T	C	C	A	T	A	C	T	A	A	A	A	T	G	C	T	T	T	T	C	T	G				
Unit-3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
	121											130											136											
ManDra-A	A	G	C	T	G	G	A	A	A	T	G	C	C	T	T	T																		
Unit-3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.																		
	1											10											20											30
ManDra-A	A	A	A	C	G	A	C	T	T	C	T	T	T	C	A	T	C	A	T	A	A	G	A	A	T	G	C	T	C	C				
Unit-4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
	31											40											50											60
ManDra-A	T	G	T	A	A	G	C	T	T	T	T	T	A	A	G	C	A	G	A	G	T	T	G	A	G	C	A	C	T	T				
Unit-4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
	61											70											80											90
ManDra-A	T	G	C	A	T	G	A	A	A	A	T	T	C	A	C	A	T	T	C	A	A	G	C	T	T	G	A	A	A	A				
Unit-4	.	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
	91											100											110											120
ManDra-A	G	T	T	G	A	A	T	T	T	C	C	A	T	A	C	T	A	A	A	A	T	G	C	T	T	T	T	C	T	G				
Unit-4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
	121											130											136											
ManDra-A	A	G	C	T	G	G	A	A	A	T	G	C	C	T	T	T																		
Unit-4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.																		
	1											10											20											30
ManDra-A	A	A	A	C	G	A	C	T	T	C	T	T	T	C	A	T	C	A	T	A	A	G	A	A	T	G	C	T	C	C				
Unit-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
	31											40											50											60
ManDra-A	T	G	T	A	A	G	C	T	T	T	T	T	A	A	G	C	A	G	A	G	T	T	G	A	G	C	A	C	T	T				
Unit-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
	61											70											80											90
ManDra-A	T	G	C	A	T	G	A	A	A	A	T	T	C	A	C	A	T	T	C	A	A	G	C	T	T	G	A	A	A	A				
Unit-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
	91											100											110											120
ManDra-A	G	T	T	G	A	A	T	T	T	C	C	A	T	A	C	T	A	A	A	A	T	G	C	T	T	T	T	C	T	G				
Unit-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	×	×	×	×	×	×	×				
	121											130											136											
ManDra-A	A	G	C	T	G	G	A	A	A	T	G	C	C	T	T	T																		
Unit-5	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×																		

Fig. 13 Continued

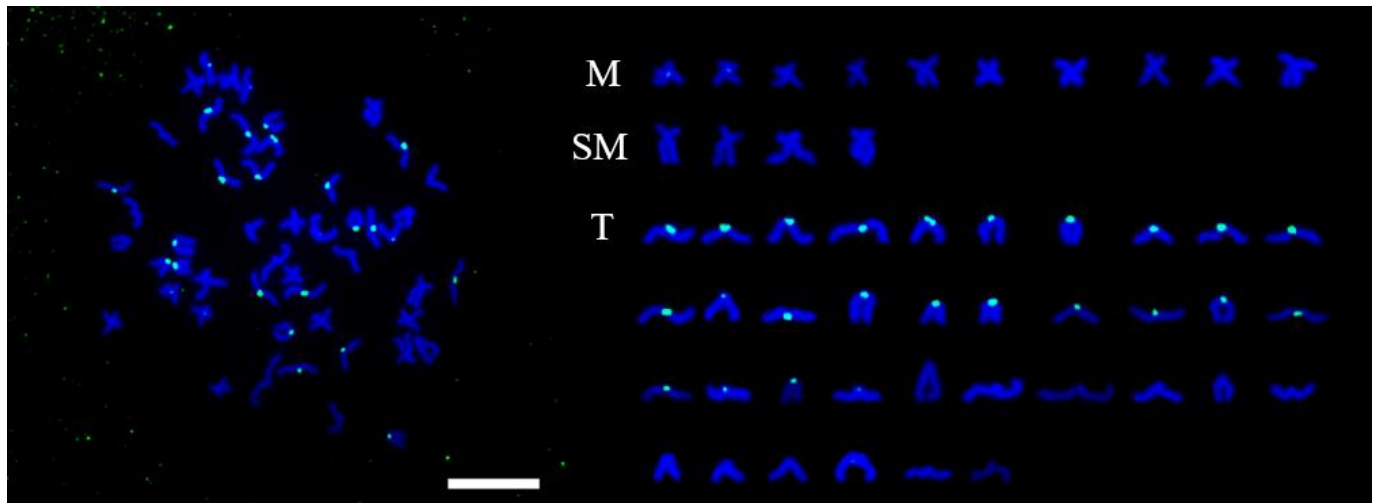


Fig. 14 FISH with ManDra-A probe in somatic cells from group A dojo loach. Representative metaphase (left) and karyotype (right) of somatic cells from wild-type diploid dojo loach of group A after FISH with ManDra-A probe. ManDra-A probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected by streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (green). All chromosomes were counterstained with DAPI (blue). Scale bar denotes 10 μ m. M, metacentric chromosome; SM, submetacentric chromosome; T, telocentric chromosome.

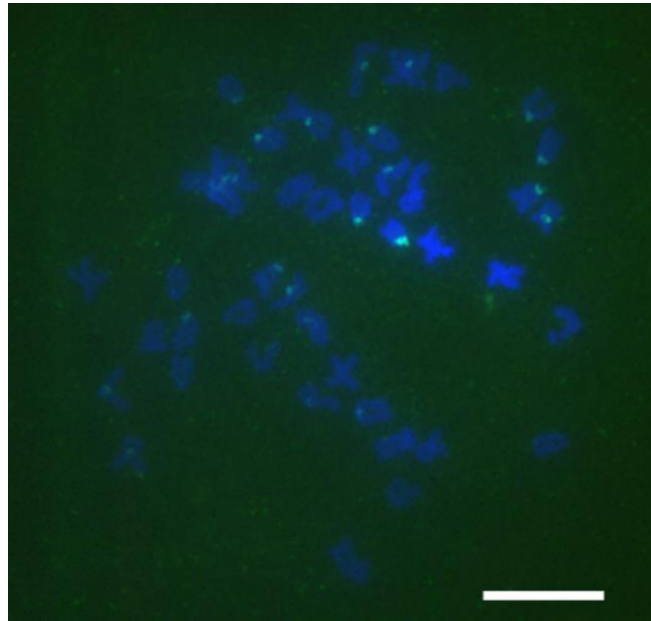


Fig. 15 Weak ManDra-A signals in somatic cells from group A dojo loach. Representative metaphase of somatic cells from wild-type diploid dojo loach of group A after FISH with ManDra-A probe. ManDra-A probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected by streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (green). All chromosomes were counterstained with DAPI (blue). Scale bar denotes 10 μm .

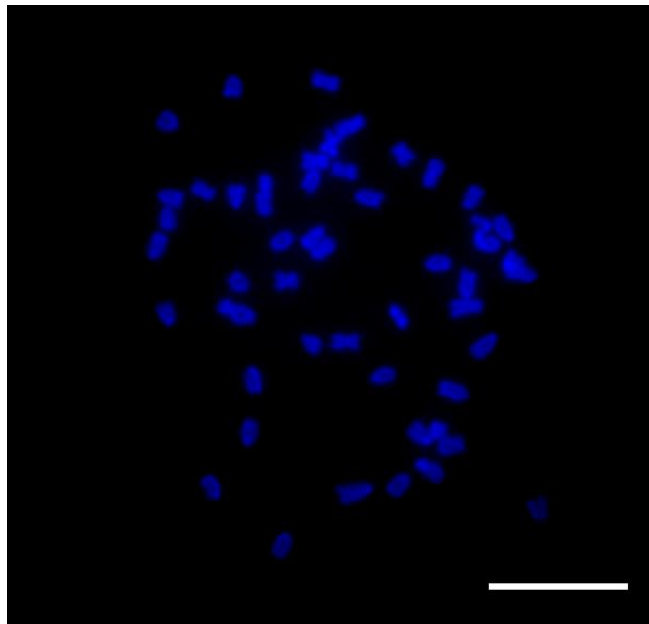


Fig. 16 FISH with ManDra-A probe in somatic cells from group B dojo loach. Representative metaphase of somatic cells from wild-type diploid dojo loach of group B after FISH with ManDra-A probe. No signal was detected. ManDra-A probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected by streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (green). All chromosomes were counterstained with DAPI (blue). Scale bar denotes 10 μm .

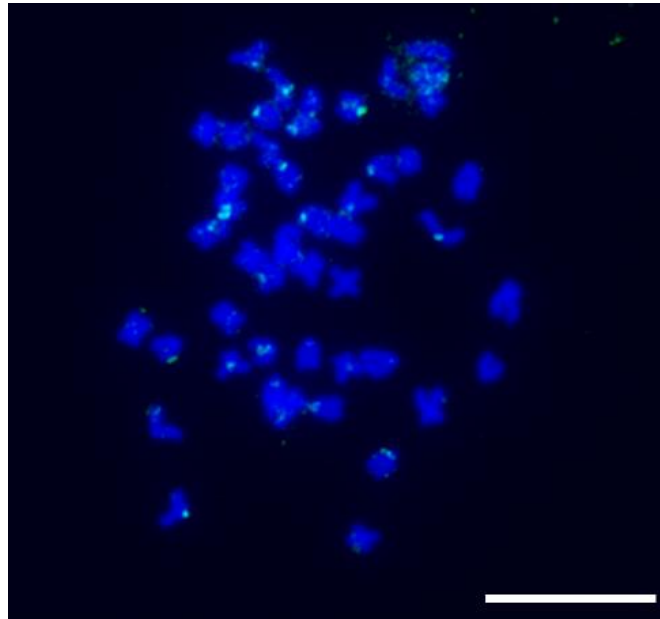


Fig. 17 FISH with ManDra-A 5 repeats probe in somatic cells from group A dojo loach. Representative metaphase of somatic cells from wild-type diploid dojo loach of group A after FISH with ManDra-A 5 repeats probe. ManDra-A 5 repeats probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected by streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (green). All chromosomes were counterstained with DAPI (blue). Scale bar denotes 10 μ m.

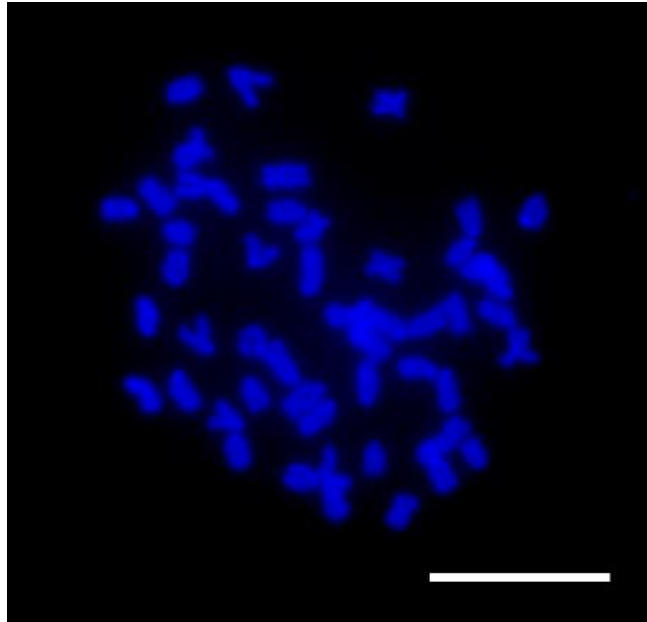


Fig. 18 FISH with ManDra-A 5 repeats probe in somatic cells from group B dojo loach. Representative metaphase of somatic cells from wild-type diploid dojo loach of group B after FISH with ManDra-A 5 repeats probe. No signal was detected. ManDra-A 5 repeats probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected by streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (green). All chromosomes were counterstained with DAPI (blue). Scale bar denotes 10 μm .

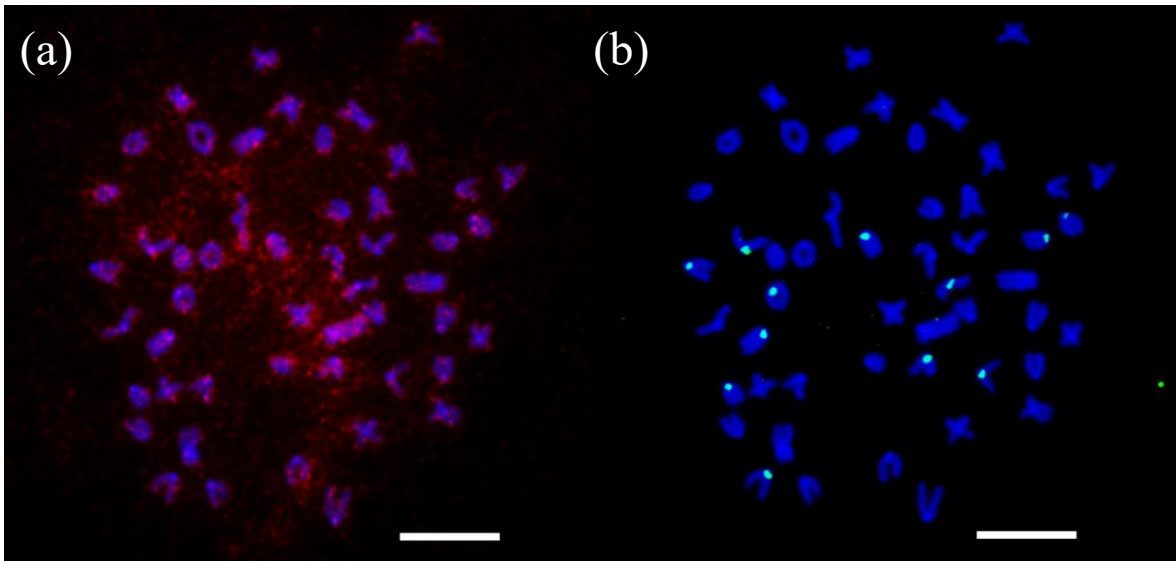


Fig. 19 Two-color FISH with ManDra-A probe and ManDra-A 5 repeats probe in somatic cells of inter-group hybrid between wild-type dojo loach groups A and B. Representative metaphase in somatic cell from inter-group hybrid between wild-type dojo loach groups A and B after two-color FISH with ManDra-A signals (a) and ManDra-A 5 repeats signals (b). ManDra-A 5 repeats probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected by streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (green). ManDra-A probe was labeled with digoxigenin-11-dUTP and detected by anti-digoxigenin-rhodamine, Fab fragments (Red). All chromosomes were counterstained with DAPI (Blue). Scale bars denote 10 μ m.

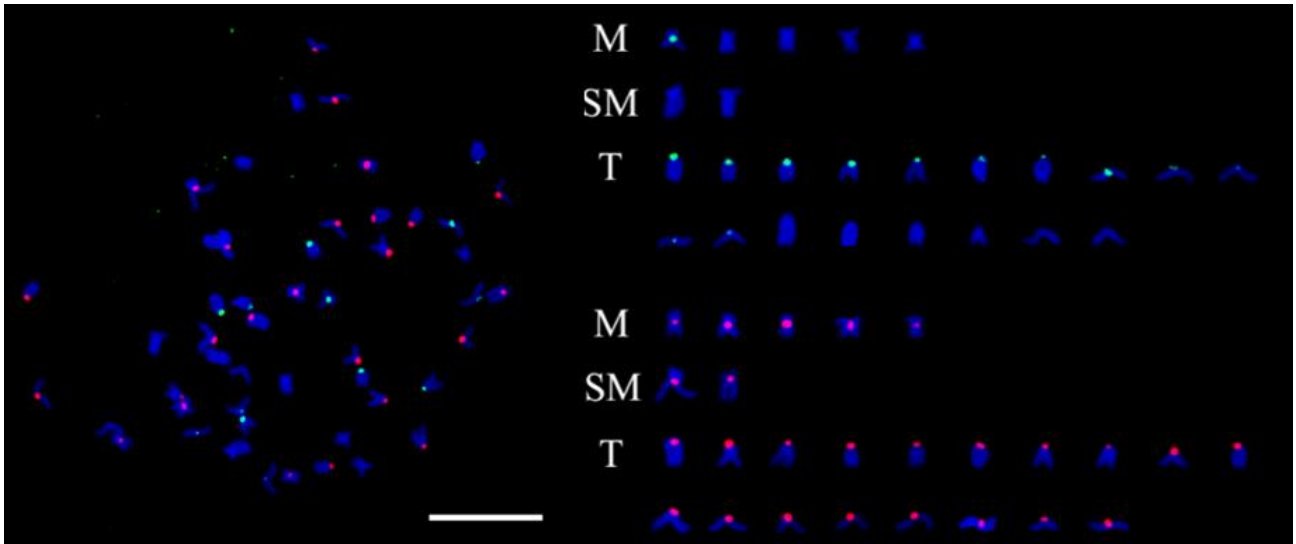


Fig. 20 Two-color FISH with ManDra-A 5 repeats probe and ManDra-B probe in somatic cells of inter-group hybrid between wild-type dojo loach groups A and B. Representative metaphase (left) and karyotype (right) of somatic cell from inter-group hybrid between wild-type dojo loach groups A and B after two-color FISH with ManDra-A 5 repeats probe and ManDra-B probe. ManDra-A 5 repeats probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected by streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (green). ManDra-B probe was labeled with digoxigenin-11-dUTP and detected by anti-digoxigenin-rhodamine, Fab fragments (Red). All chromosomes were counterstained with DAPI (Blue). Scale bar denotes 10 μm . M, metacentric chromosome; SM, submetacentric chromosome; T, telocentric chromosome.

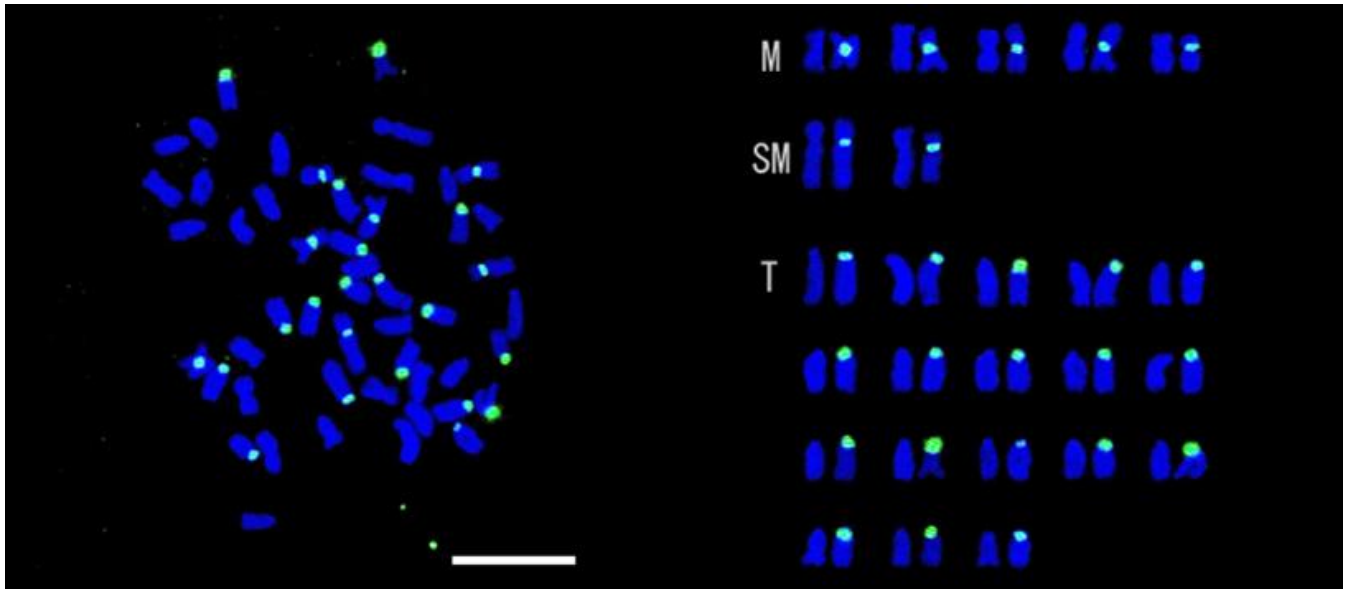


Fig. 21 FISH with ManDra-B probe in somatic cells from clonal diploid dojo loach. Representative metaphase (left) and karyotype (right) of somatic cells after FISH with ManDra-B probe. ManDra-B probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected by streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (green). All chromosomes were counterstained with DAPI (blue). Scale bar denotes 10 μm . M, metacentric chromosome; SM, submetacentric chromosome; T, telocentric chromosome. The figure was cited from Kuroda et al. (2018).

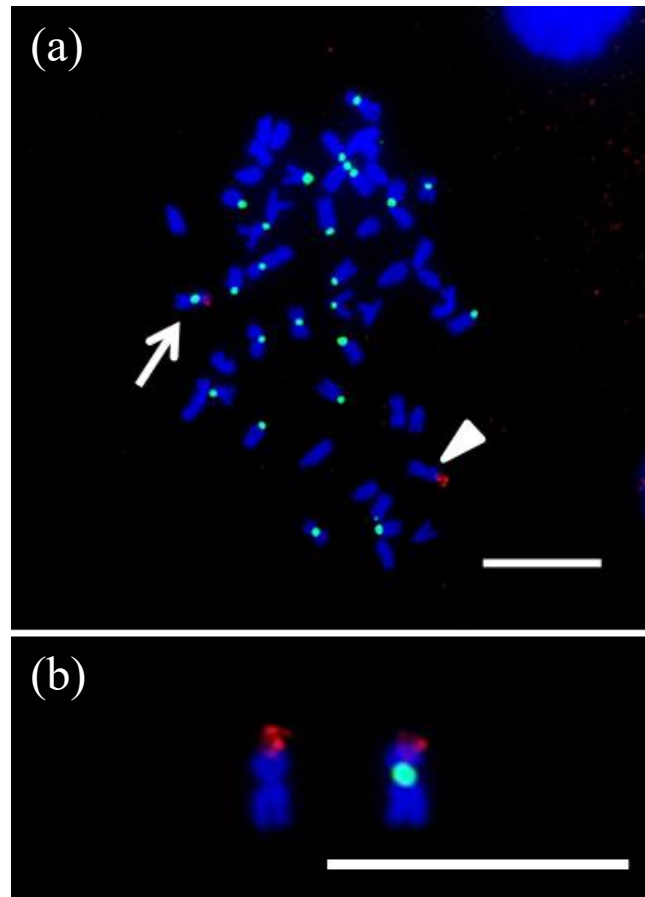


Fig. 22 Two-color FISH with ManDra-B probe and 5.8S + 28S rDNA probe in somatic cells of clonal diploid dojo loach. Representative metaphase (a) and partial karyotype of a pair of the largest homologous metacentric chromosomes (b) in somatic cell of clonal diploid dojo loach after two-color FISH with ManDra-B probe and 5.8S + 28S rDNA probe. Arrow indicates one of a pair of the largest homologous metacentric chromosomes with ManDra-B signal. Arrowhead indicates the other of a pair of the largest homologous metacentric chromosomes without ManDra-B signal. ManDra-B probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected by streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (green). A pair of the largest homologous metacentric chromosomes with nucleolar organizing regions (NORs) were determined using 5.8S + 28S rDNA probe labeled with digoxigenin-11-dUTP and detected by anti-digoxigenin-rhodamine, Fab fragments (Red). All chromosomes were counterstained with DAPI (Blue). Scale bars denote 10 μ m. The figure was cited from Kuroda et al. (2018).

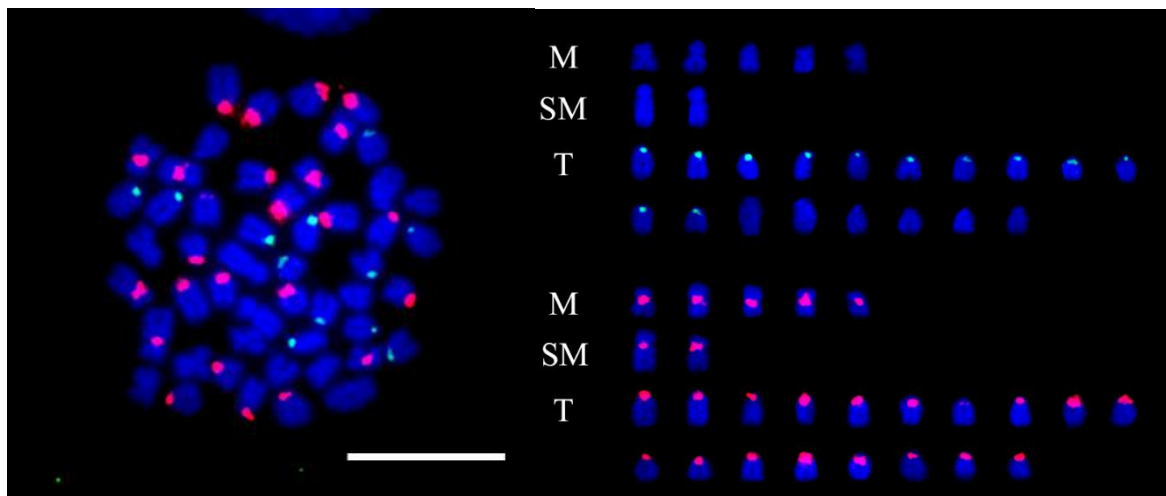


Fig. 23 Two-color FISH with ManDra-A 5 repeats probe and ManDra-B probe in somatic cells of clonal diploid dojo loach. Representative metaphase (left) and karyotype (right) of somatic cell from clonal diploid dojo loach after two-color FISH with ManDra-A 5 repeats probe and ManDra-B probe. ManDra-A 5 repeats probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected by streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (green). ManDra-B probe was labeled with digoxigenin-11-dUTP and detected by anti-digoxigenin-rhodamine, Fab fragments (Red). All chromosomes were counterstained with DAPI (Blue). Scale bar denotes 10 μ m. M, metacentric chromosome; SM, submetacentric chromosome; T, telocentric chromosome.

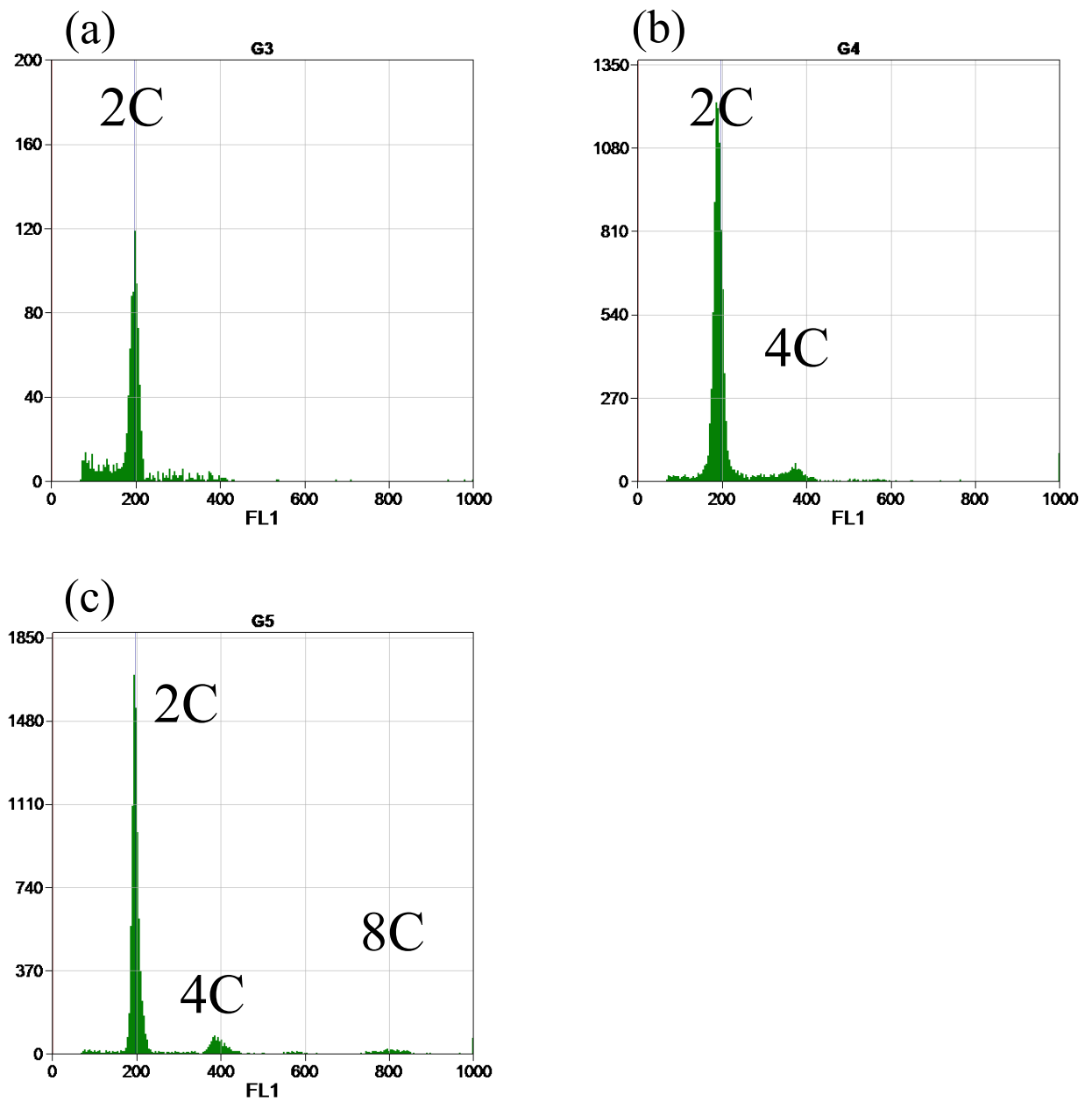


Fig. 24 Ploidy determination by flow cytometry. Fin clips of sex-reversed clonal diploid dojo loach male was used for standard sample of diploid (2C) DNA content (a). Sperm (b) and testis (c) from sex-reversed clonal diploid male showed diploid (2C) spermatozoa. Y axis of histogram is cell count. X-axis is channel number.

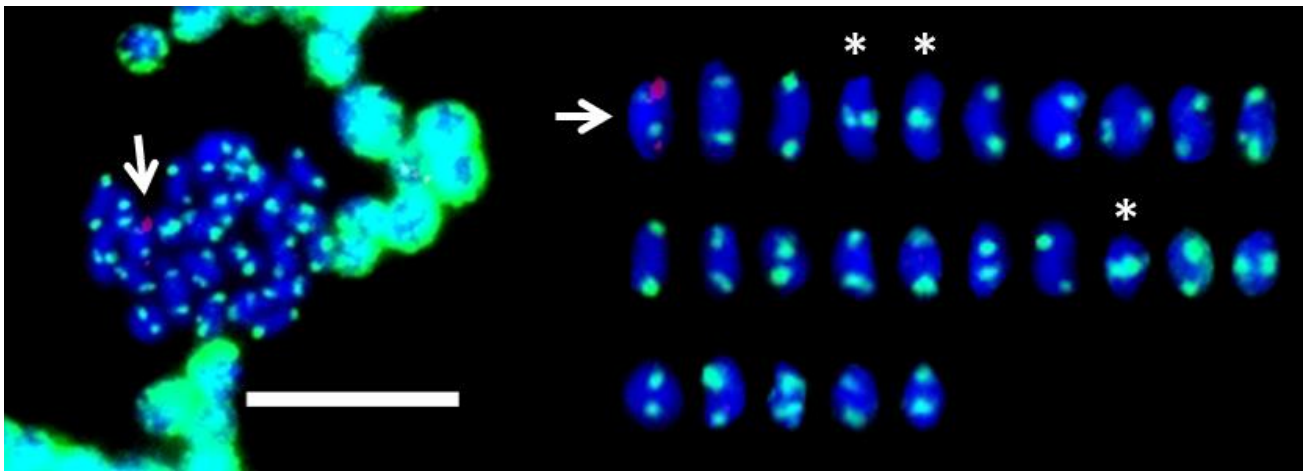


Fig. 25 Two-color FISH with ManDra-B and 5.8S+28S rDNA probes in spermatocytes of male dojo loach from group B. Representative meiotic metaphase (left) and karyotype (right) in spermatocytes from a wild-type male of group B dojo loach after two-color FISH with ManDra-B and 5.8S+28S rDNA probes. ManDra-B signals were detected on both sides of most bivalents. Asterisks mean bivalents with ManDra-B signals around the center. Arrows indicate the largest bivalents with ManDra-B signals. The largest bivalents were formed by two metacentric chromosomes bearing nucleolar organizing regions (NORs) detected by rDNA probe. ManDra-B probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected by streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (green). The rDNA sequences of the largest bivalents were visualized by 5.8S+28S rDNA probe labeled with digoxigenin-11-dUTP and detected by anti-digoxigenin-rhodamine, Fab fragments (red). All bivalents were counterstained by DAPI (blue). Scale bar denotes 10 μm . The figure was cited from Kuroda et al. (2018).

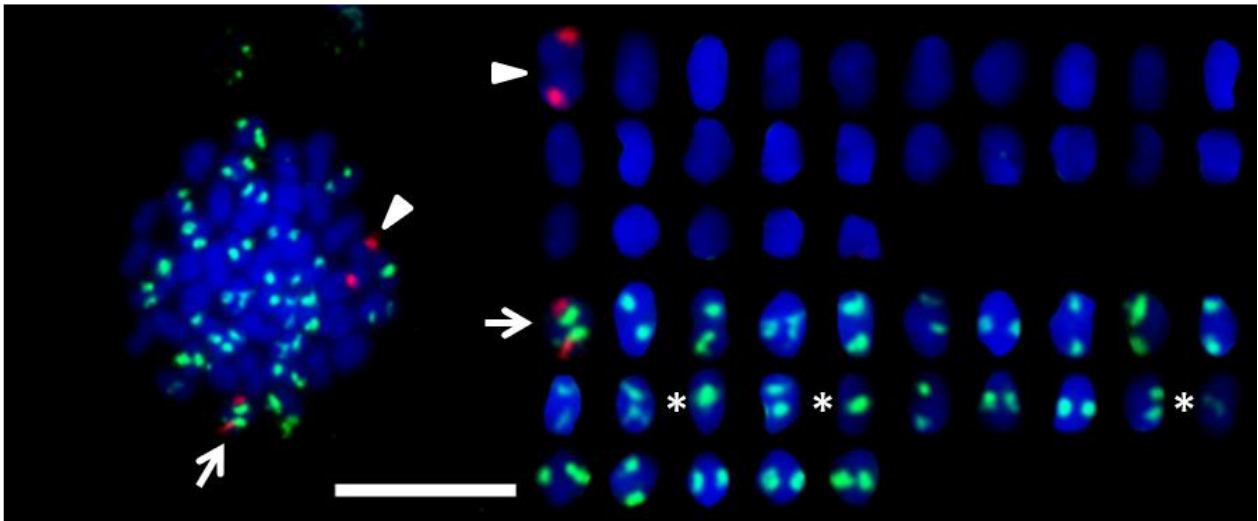


Fig. 26 Two-color FISH with ManDra-B and 5.8S+28S rDNA probes in spermatocytes of sex-reversed clonal diploid males dojo loach. Representative meiotic metaphase (left) and karyotype (right) in spermatocytes from sex-reversed clonal diploid male dojo loach after two-color FISH with ManDra-B and 5.8S+28S rDNA probes. ManDra-B signals were detected on both sides of most bivalents. Asterisks mean bivalents with ManDra-B signals around the center. Arrows indicate the largest bivalents with ManDra-B signals. Arrowhead indicates the largest bivalents without ManDra-B signals. The largest bivalents were formed by two metacentric chromosomes bearing nucleolar organizing regions (NORs) detected by rDNA probe. ManDra-B probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected by streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (green). The rDNA sequences of the largest bivalents were visualized by 5.8S+28S rDNA probe labeled with digoxigenin-11-dUTP and detected by anti-digoxigenin-rhodamine, Fab fragments (red). All bivalents were counterstained by DAPI (blue). Scale bar denotes 10 μ m. The figure was cited from Kuroda et al. (2018).

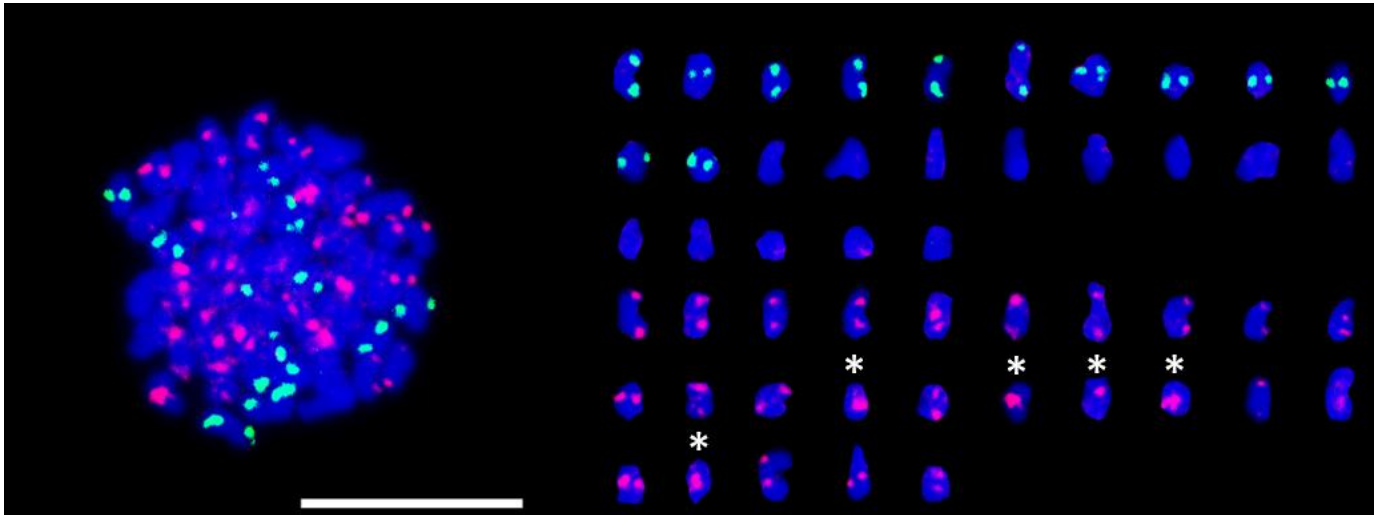


Fig. 27 Two-color FISH with ManDra-A 5 repeats and ManDra-B probes in spermatocytes of sex-reversed clonal diploid male dojo loach. Representative meiotic metaphase (left) and karyotype (right) in spermatocytes from sex-reversed clonal diploid males dojo loach after two-color FISH with ManDra-A 5 repeats and ManDra-B probes. Asterisks mean bivalents with ManDra-B signals around the center. ManDra-A 5 repeats probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected by streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (green). ManDra-B probe was labeled with digoxigenin-11-dUTP and detected by anti-digoxigenin-rhodamine, Fab fragments (red). All bivalents were counterstained by DAPI (blue). Scale bar denotes 10 μ m.

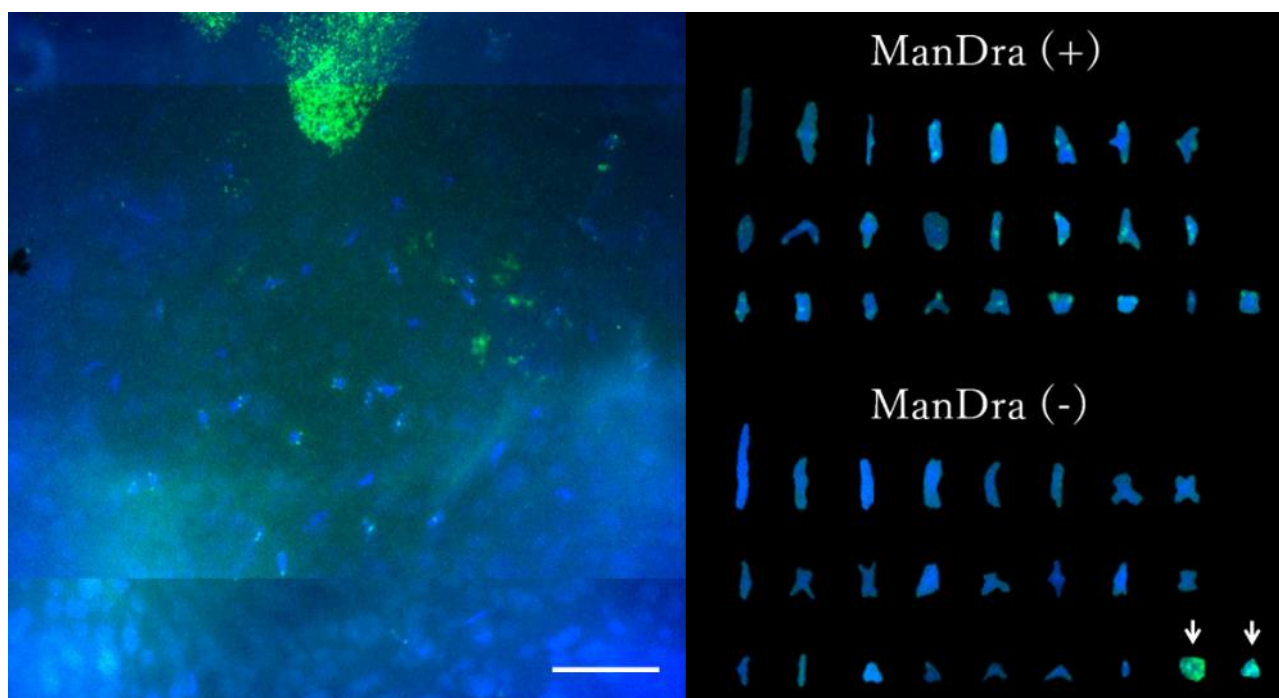


Fig. 28 FISH with ManDra-B probe in germinal vesicle (GV) from oocyte of clonal diploid loach. Representative meiotic metaphase (left) and karyotype (right) in GV from oocyte of clonal diploid females dojo loach after FISH with ManDra-B probe. Since the metaphase was large, three images were taken and merged into single image. Arrows indicate ambiguous bivalents, whether ManDra-B signal positive or negative due to the presence of fluorescence noise. ManDra-B (+): ManDra-B signal positive. ManDra-B (-): ManDra-B signal negative. ManDra-B probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected by streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (Green). All bivalents were counterstained by DAPI (Blue). Scale bar denotes 20 μ m. The figure was cited from Kuroda et al. (2018).

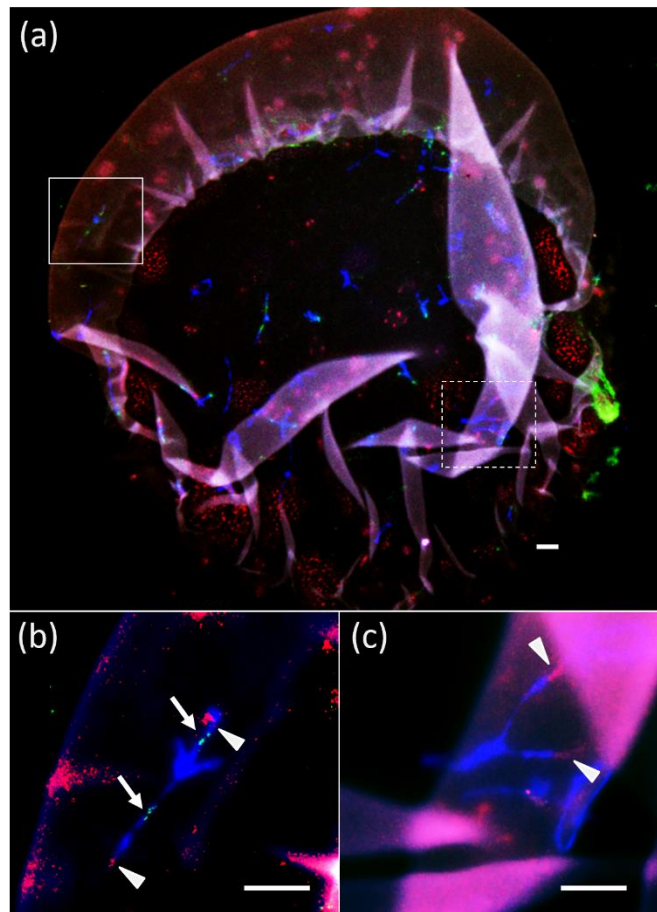


Fig. 29 Two-color FISH with ManDra-B and 5.8S+28S rDNA probes in GV from oocyte of clonal diploid female dojo loach. Representative meiotic metaphase (a), magnified area of solid line-square (b), and magnified area of broken line-square (c). Arrows indicate ManDra-B signals. Arrowheads indicate 5.8S+28S rDNA signals. The largest bivalents were formed by two metacentric chromosomes bearing nucleolar organizing regions (NORs) detected by the rDNA probe. ManDra-B probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected by streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (Green). The rDNA sequences of the largest bivalents were visualized by 5.8S+28S rDNA probe labeled with digoxigenin-11-dUTP and detected by anti-digoxigenin-rhodamine, Fab fragments (Red). All bivalents were counterstained by DAPI (Blue). Scale bars denote 10 μ m. The figure was cited from Kuroda et al. (2018).

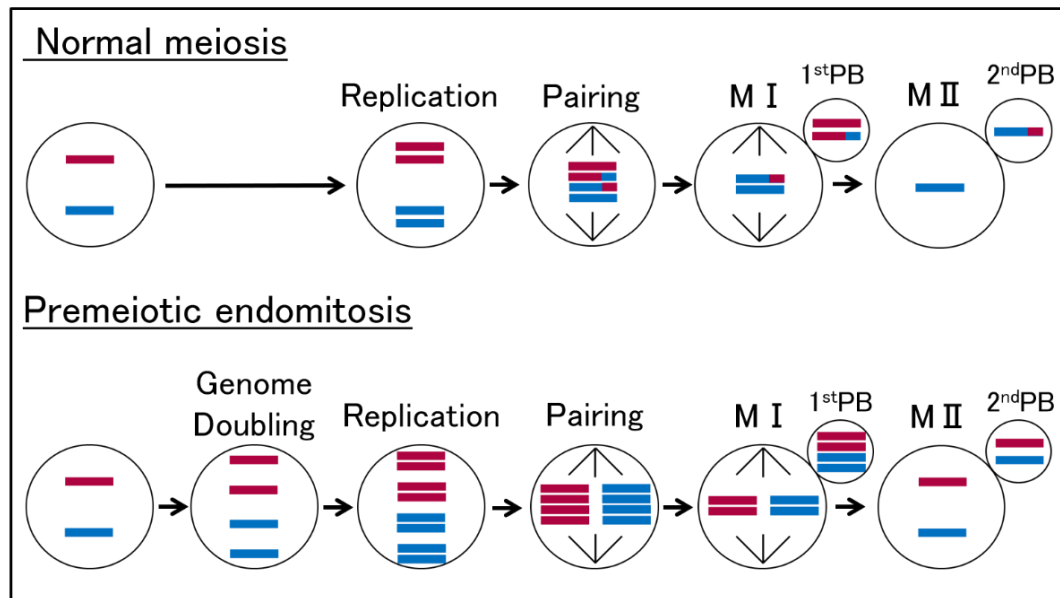


Fig. 30 Cytogenetic mechanisms for production of unreduced eggs by premeiotic endomitosis. Upper schema shows chromosome behaviors in normal meiosis. Lower schema shows premeiotic endomitosis involving pairing between sister chromosomes. M I: First meiosis, M II: Second meiosis, 1stPB: First polar body, and 2ndPB: Second polar body. The figure was cited from Kuroda et al. (2018).

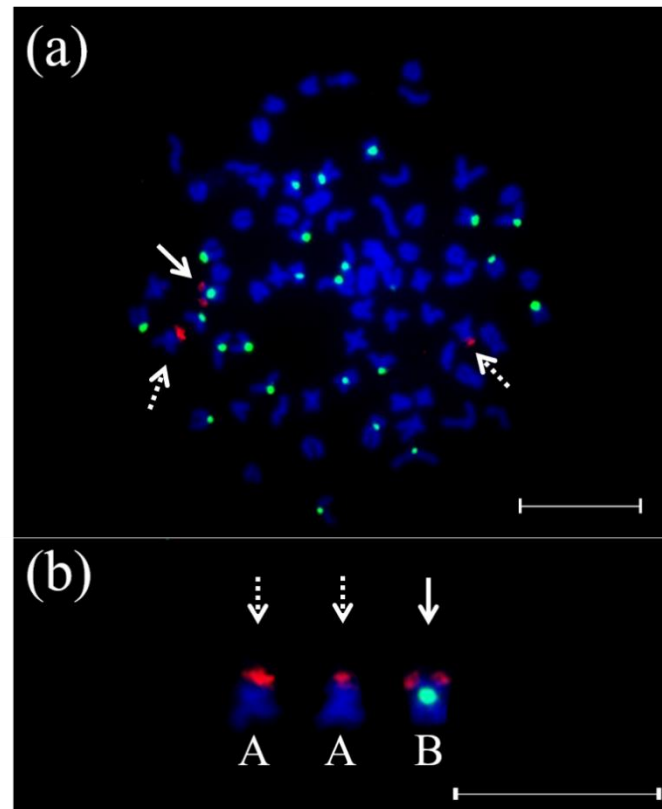


Fig. 31 Two-color FISH using ManDra-B and 5.8S + 28S rDNA probes in the somatic cells of the clone-origin triploid male dojo loach. Representative somatic metaphase (a) and the partial karyotype of the largest homologous chromosomes (b) in the clone-origin triploid dojo loach after two-color FISH with ManDra-B and 5.8S + 28S rDNA probes. The arrow indicates the largest homologous metacentric chromosome with ManDra-B and rDNA signals. Dotted arrows indicate the largest homologous metacentric chromosomes with rDNA signal but not ManDra-B signal. The ManDra-B probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected using streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (Green). The 5.8S + 28S rDNA probe was labeled with digoxigenin-11-dUTP and detected using anti-digoxigenin-rhodamine, Fab fragments (Red). All chromosomes were counterstained with DAPI (Blue). Scale bars denote 10 μ m. The figure was cited from Kuroda et al. (2019).

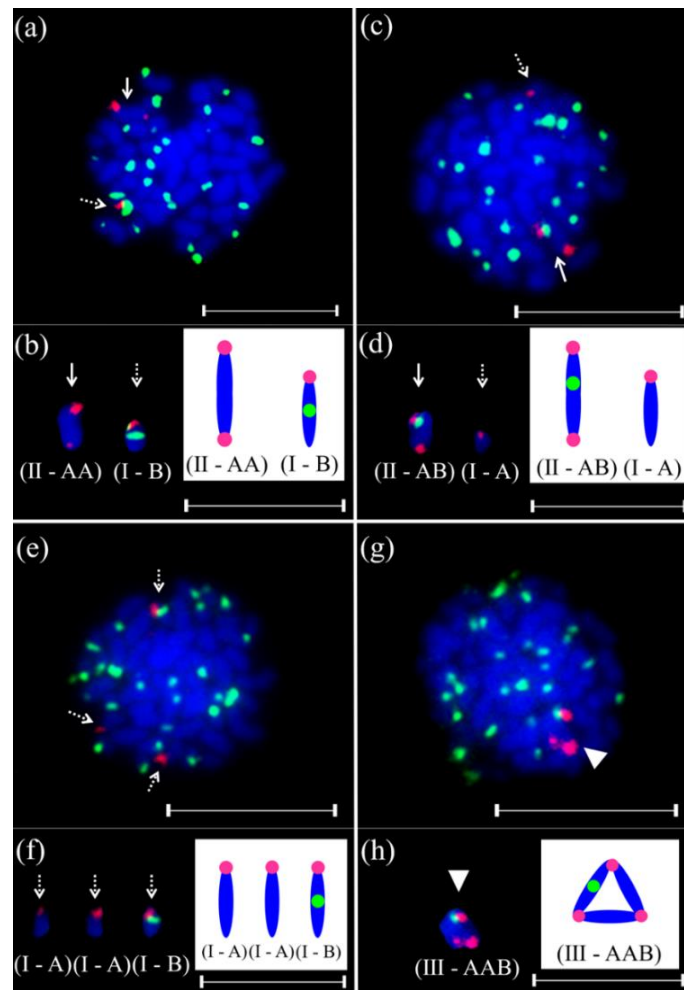


Fig. 32 Two-color FISH with ManDra-B and 5.8S + 28S rDNA probes in spermatocytes of clone-origin triploid male dojo loach. Representative meiotic metaphases (a, c, e, g), partial karyotypes and schematic diagrams (b, d, f, h). Bivalent chromosome that originated from group A and a univalent chromosome that originated from group B (b), bivalent chromosome originating from groups A and B and a univalent chromosome that originated from group A (d), three univalent chromosomes that originated from groups A and B (f), and one trivalent chromosome that originated from groups A and B (h) in spermatocytes of a clone-origin triploid after two-color FISH with ManDra-B and 5.8S + 28S rDNA probes. Arrows indicate the bivalent chromosome with two rDNA signals. Dotted arrows indicate the univalent chromosomes. The arrowhead indicates the trivalent chromosome with three rDNA signals. The ManDra-B probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected using streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (Green). The 5.8S + 28S rDNA probe was labeled with digoxigenin-11-dUTP and detected using anti-digoxigenin-rhodamine, Fab fragments (Red). All chromosomes were counterstained with DAPI (Blue). I: Univalent chromosome, II: Bivalent chromosome, and III: Trivalent chromosome. Scale bars denote 10 μ m. The figure was cited from Kuroda et al. (2019).

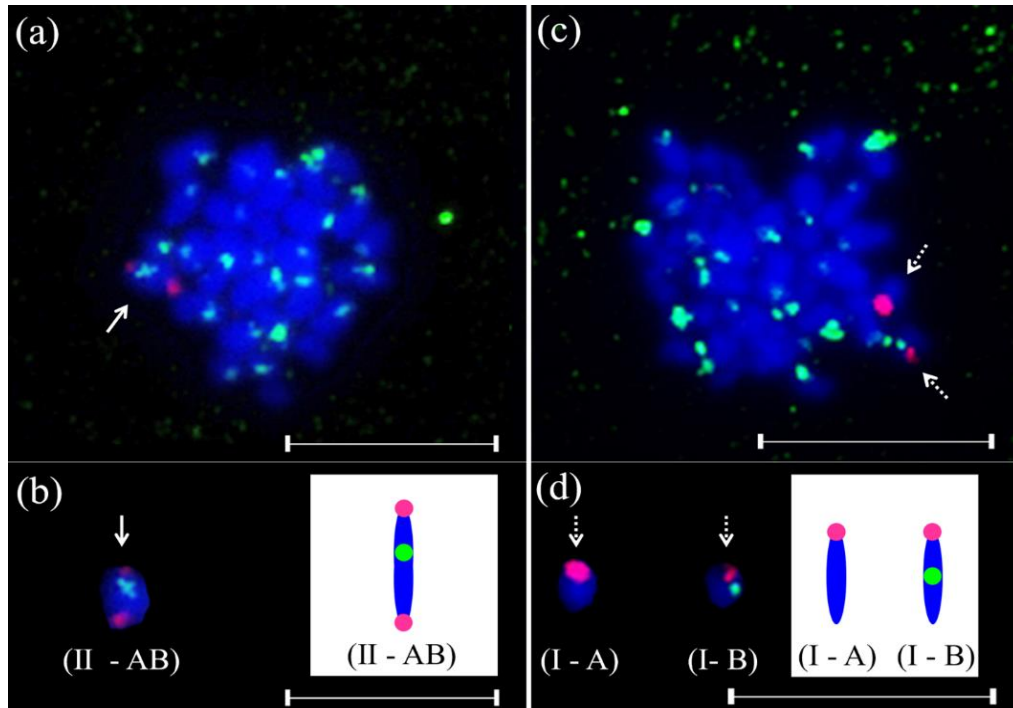


Fig. 33 Two-color FISH with ManDra-B and 5.8S + 28S rDNA probes in spermatocytes of the inter-group hybrid dojo loach. Representative meiotic metaphases (a, c) and partial karyotypes and schematic diagrams (b, d) of the bivalent chromosome (b) and two univalent chromosomes (d) in spermatocytes of the inter-group hybrid (between groups A and B) after two-color FISH with ManDra-B and 5.8S + 28S rDNA probes. The arrow indicates the bivalent chromosome with a ManDra-B signal and two rDNA signals. The dotted arrows indicate the two univalent chromosomes with rDNA signals. One of two univalent chromosomes with rDNA signals had a ManDra-B signal. ManDra-B probe was labeled with biotin-16-dUTP and detected using streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (Green). The rDNA sequences of the bivalents were visualized by labeling the 5.8S + 28S rDNA probe with digoxigenin-11-dUTP and detection using anti-digoxigenin-rhodamine, Fab fragments (Red). All chromosomes were counterstained with DAPI (Blue). I: Univalent chromosome. II: Bivalent chromosome. Scale bars denote 10 μ m. The figure was cited from Kuroda et al. (2019).

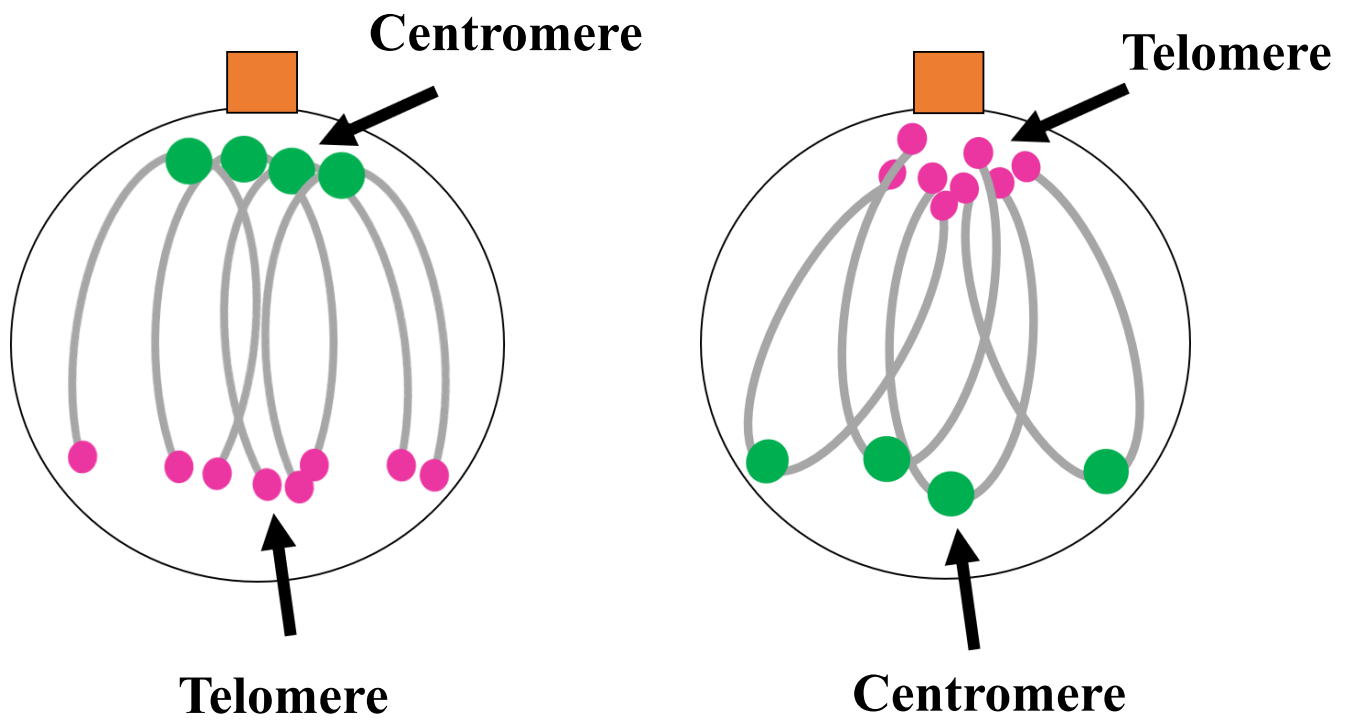


Fig. 34 Diagram of Rabl distribution and Bouquet formation. Diagram of Rabl distribution of chromosomes during interphase (left) and Bouquet formation of chromosomes in meiosis (right). Green circles indicate centromere, red circles indicate telomere, and orange squares indicate spindle pole body.