



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	魚類における異種由来細胞質が胚発生および配偶子形成に与える影響に関する研究
Author(s)	遠藤, 充
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第13883号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13883
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94648
Type	doctoral thesis
File Information	Mitsuru_Endoh.pdf



魚類における異種由来細胞質が胚発生および
配偶子形成に与える影響に関する研究
(Studies on the effects of xenocytoplasm on
embryogenesis and gametogenesis in fish)

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

遠藤 充
Mitsuru Endoh

2020 年

目次

序章

・ 生命活動を支えるミトコンドリア	4
・ 細胞質母系遺伝	4
・ 母系遺伝における mtDNA	5
・ 核－細胞質の不適合性	5
・ 魚類の不妊化技術への応用	6
・ 本研究の概要	7

第 1 章 ゼブラフィッシュ卵を用いた核－細胞質雑種誘起

緒言	8
材料・方法	10
・ 供試魚	10
・ 排卵誘起	10
・ 卵核の遺伝的不活性化	10
・ 雄性発生誘起条件の検討	10
・ 胚発生過程における外部形態の観察	11
・ 胚発生能力の評価	11
・ フローサイトメトリーによる相対 DNA 量の測定	11
・ ゼブラフィッシュを細胞質提供種とした核－細胞質雑種の誘起	11
・ DNA 抽出	12
・ ゼブラフィッシュ雄性発生二倍体の遺伝解析	12
・ ゼブラフィッシュ雄性発生二倍体の配偶子の解析	13
・ RAPD-PCR	13
・ 統計解析	13
結果	14
・ 雄性発生誘起条件の検討	14
・ <i>Danio</i> 属を核提供種とする異種間核－細胞質雑種の胚発生能力	16
・ <i>Carassius</i> 属を核提供種とする異属間核－細胞質雑種の胚発生能力	17
・ <i>Misgurnus</i> 属を核提供種とする異科間核－細胞質雑種の胚発生能力	19
・ ゼブラフィッシュ雄性発生二倍体の遺伝解析	20
・ ゼブラフィッシュ雄性発生二倍体の配偶子の解析	21

考察	22
・ゼブラフィッシュ雄性発生誘起に最適な紫外線照射量.....	22
・核一細胞質雑種の胚発生能力.....	23
・雑種の胚発生能力.....	23
・ゼブラフィッシュ雄性発生二倍体.....	24

第2章 ミトコンドリア移植によるヘテロプラスミー誘起

緒言	26
材料・方法	28
・供試魚.....	28
・排卵誘起.....	28
・ミトコンドリアの単離.....	28
・顕微注入によるミトコンドリア移植.....	29
・移植胚の胚発生能力の評価.....	29
・移植胚におけるドナー由来ミトコンドリアの動態.....	29
・移植胚におけるドナー由来 mtDNA の調査.....	29
・PCR-RFLP によるゼブラフィッシュの系統判別.....	29
・PCR によるゼブラフィッシュ、キンギョ、ドジョウの種判別.....	30
・統計解析.....	31
結果	32
・ミトコンドリア移植胚の胚発生能力.....	32
・移植胚におけるドナー由来ミトコンドリアの動態.....	32
・ドナー由来 mtDNA の存否.....	33
考察	34
・ミトコンドリア移植胚の胚発生能力.....	34
・移植胚におけるドナー由来ミトコンドリアの動態.....	35

第3章 ドジョウ卵を用いた核一細胞質雑種誘起と卵形成の解析

緒言	37
材料・方法	39
・供試魚.....	39
・排卵誘起.....	39
・卵核の遺伝的不活性化.....	39
・B 系統ドジョウを細胞質提供種とした核一細胞質雑種の誘起.....	39

・ 胚発生過程における外部形態の観察	39
・ クローン系統核-B 系統細胞質雑種由来の卵を用いた人工授精	40
・ 卵径の測定	40
・ フローサイトメトリーによる相対 DNA 量の測定	40
・ <i>RAG1</i> 遺伝子の PCR-RFLP	40
・ マイクロサテライトマーカー解析	40
結果	42
・ B 系統ドジョウを細胞質提供種とする系統間核-細胞質雑種の胚発生能力	42
・ 卵径測定	43
・ 核-細胞質雑種卵の胚発生能力	43
・ 核-細胞質雑種子孫の倍数性解析	44
・ 遺伝解析	45
考察	46
・ 系統間核-細胞質雑種の生存性	46
・ 核-細胞質雑種卵の卵径と倍数性	47
・ 核-細胞質雑種卵のゲノム構成	48
・ 異系統細胞質への置換による卵形成への影響	50

第4章 総合考察

・ 異種由来細胞質による胚発生能力への影響	52
・ 異種由来細胞質による配偶子形成への影響	54
・ クローンドジョウ誕生時の推察	55
・ 魚類のヘテロプラスミー研究の可能性	56
・ 核-細胞質間に生じる不適合性の育種への応用	57

摘要	58
-----------------	----

謝辞	62
-----------------	----

引用文献	63
-------------------	----

図表

序章

生命活動を支えるミトコンドリア

われわれ人類を含めたあらゆる真核生物の生命活動は、細胞質に存在するミトコンドリアからのエネルギー供給によって支えられている。ミトコンドリアは、好気性細菌の α -プロテオバクテリアの細胞内共生を起源とする細胞小器官であり、核ゲノムとは異なる独自のゲノムであるミトコンドリア DNA (mtDNA) を持つ。mtDNA の塩基置換 (変異) 速度は核ゲノムに比べて 10 倍程度速いとされ、ヒトとチンパンジーのように共通祖先から進化してきた 2 種間でも、核ゲノムの相同遺伝子の塩基置換率は 1% 程度であるのに対して、mtDNA では 10% 程度である (宝来, 2001)。ミトコンドリアが正常に機能するためのミトコンドリア遺伝子の多くは核に移行しており、ミトコンドリアの動態制御に働くタンパク質である分裂因子 Drp1 や融合因子 Mitofusin (Mfn1, Mfn2)、転写因子 TFAM などは核ゲノムからの遺伝子発現を必要とする (石原, 2010)。また、ATP 合成に必要な呼吸鎖複合体の形成において、複合体 II は核ゲノムの遺伝子のみで構築されることから、ミトコンドリア酸素呼吸活性の発現には核とミトコンドリア両方の遺伝子発現が必要となる。したがって核とミトコンドリア (細胞質) が協調して働くことによって正常な生命活動が維持されている (石原, 2010)。

細胞質母系遺伝

有性生殖を行う多くの生物種において、両親由来のゲノムを 1 セットずつ受け継ぐ遺伝様式の核ゲノムと異なり、ミトコンドリアを含む細胞質はすべて母親から受け継ぐ。ミトコンドリア母系遺伝を保証するためには、精子に存在する父系ミトコンドリアの排除が重要となる。近年ではモデル生物の一種のセンチュウを用いた研究により、受精卵内での父系ミトコンドリアの排除にオートファジーが関与することが発見された (佐藤と佐藤, 2019)。哺乳類では、マウスやウシの精子ミトコンドリアにおいて、ミトコンドリア膜タンパク質であるプロヒビチンがユビキチン化を受け、選択的に排除されることが明らかにされている (Sutovsky et al., 1999; Thompson et al., 2003)。また例外としてチャイニーズハムスターでは、受精時に父系ミトコンドリアを含む精子の中片部分が卵外に取り残されることにより、父系ミトコンドリアを排除する (Pickworth and Change, 1969)。魚類では、メダカを用いた研究から、精子形成過程の精細胞から精子にかけて mtDNA を含む核様体の数が減少し、受精後の 2 細胞期までに父系ミトコンドリアが消失することが明らかにされた (Nishimura et al., 2006)。受精前の mtDNA 減少は、ショウジョウバエの精子形成過程でも観察されている (DeLuca and O'Farrell, 2012)。このように父系 mtDNA とミトコンドリアの排除メカ

ニズムは生物によって多様であり、受精前と受精後に異なる機構を併用していると考えられている（佐藤と佐藤, 2019）。

母系遺伝における mtDNA

母系遺伝のための父系ミトコンドリアおよび父系 mtDNA 排除のメカニズムと同様に、母親からの mtDNA の遺伝メカニズムについても未解明な点がある。子孫に受け継がれる mtDNA は卵を介してのみ遺伝するため、卵形成における mtDNA 量の増減が子孫に伝わる mtDNA 型の決定に重要と考えられている。一般に子孫に受け継がれる際には、1 種類のハプロタイプのみを持つ同質性（ホモプラスミー）の状態では伝播するとされている。しかし、母親の生殖細胞において、多コピー存在する mtDNA に変異が生じ、変異型 mtDNA が混在する異質性（ヘテロプラスミー）状態となっている場合、遺伝様式は異なり、子孫はホモプラスミーあるいは様々な割合のヘテロプラスミーとなる。ウシにおいて制限酵素断片型が異なる 2 種類の mtDNA が生殖細胞に存在するヘテロプラスミー系統では、それぞれのハプロタイプの mtDNA が子孫に様々な割合で伝達し、数世代後にはどちらか一方の mtDNA 型のみを持つホモプラスミー個体が出現する（Ashley et al., 1989）。マウスでは C57BL/6 系統と NZB 系統の mtDNA を併せ持つヘテロプラスミー系統が人為的に作出され、同様の現象が観察されている（Meirelles and Smith, 1997）。これらの事例から、ヘテロプラスミー個体から次世代への mtDNA 伝達比率が大きく変化させるメカニズムの存在が示唆されているが、詳細なメカニズムは明らかにされていない。

核－細胞質の不適合性

母系遺伝により核とともに進化してきたミトコンドリアや mtDNA は突然変異や核との組み合わせの変化などによって機能不全や不適合性を生じることが報告されている。細胞質に起因する生殖能力への影響の例では、mtDNA の変異による男性不妊症もその一つと考えられている。男性不妊患者の運動能の低下した精子には *tRNA-Leu* 遺伝子領域の 3243 変異を起こした mtDNA が存在したことから、精子形成過程におけるエネルギー供給の低下により不妊が引き起こされたと考えられている（Spiropoulos et al., 2002; Nakada et al., 2006）。また、マウスにおける異なる 2 系統間の核移植では、B6 系統マウス由来の核と、PWD 系統マウス由来の細胞質をもつ個体が生み出され、B6 系統の核が PWD 系統の細胞質環境下に移植され細胞質が入れ替わることで、雄の妊性が低下することが報告されている（Ma et al., 2016）。植物では、トウモロコシやダイコン、イネなど複数の種で、雄性生殖器官である葯の形成不全や、花粉が形成しないといった表現型を示す細胞質雄性不稔が知られ、育種に応用されている（板橋ら, 2012）。雄性不稔関連遺伝子はミトコンドリアにコードされるため、細胞質の母系遺伝を介して次世代へ遺伝し、核ゲノムに稔性回復遺伝子が存

在する際には稔性が回復する (Hanson and Bentolila, 2004)。これらの細胞質不妊の研究は、連続した戻し交配や核移植によって誘起する核-細胞質雑種に加えて、変異型 mtDNA を人為的に導入したヘテロプラスミー個体をモデルに行われている。

魚類の不妊化技術への応用

魚類においても異種間核移植によって核-細胞質雑種が誘起され、異種の細胞質環境下に核が移植されることで、形質は核提供種と細胞質提供種のどちらに由来するかが調査されている。コイ科魚類の *Carassius auratus*, wild type と *Cyprinus carpio* の組み合わせでは、正逆の核移植ともに成魚が得られ、*Carassius auratus* 核-*Cyprinus carpio* 細胞質雑種は雌雄ともに妊性があった (Tung, 1980; Yan et al., 1984)。魚類では染色体操作の一つである雄性発生を用いて、精子由来のゲノムのみを持った個体を作出できる。したがって、卵が由来する種とは異なる種の精子で雄性発生を行うことによって、核-細胞質雑種を一代で誘起することが可能である。この手法を用いて *Carassius auratus auratus* 核-*Cyprinus carpio* 細胞質雑種が誘起され成魚が得られている (Bercsényi et al., 1998)。また、近年キンギョの組織からミトコンドリアを単離し、ゼブラフィッシュの初期胚に顕微注入することでヘテロプラスミー胚が誘起された (Peng et al., 2018)。しかし、魚類の核-細胞質雑種やヘテロプラスミー個体において、核と細胞質の不適合性による生殖能力への影響は明らかにされていない。先に述べた哺乳類や植物の細胞質不妊機構が魚類にも存在するならば、育種や新たな生殖統御技術となる可能性がある。

魚類の不妊形質は、水産養殖において広く利用されうる。例えば、借腹（代理親）生産の宿主個体は宿主由来の配偶子の混入を避けるため不妊化が不可欠である。借腹生産では性成熟までに長期間を要する魚種の配偶子を短期間で生産させることや、飼育が容易な小型魚に大型魚の配偶子を生産させることが可能となり、育種の短縮化と効率化につながる。また、養殖魚を不妊化することにより、養殖個体と野生集団との交雑による遺伝子汚染のリスクを大きく低減できる。逆に不妊魚を放流し、不妊形質を野生集団に浸透させることにより、特定の外来魚を駆逐する試みも進められている (岡本, 2017)。これまでの成功事例には、農業害虫として被害をもたらすウリミバエを根絶する手法に適用された不妊虫放飼法がある。不妊化したウリミバエを野外へ放飼することで、野生虫との交尾を繰り返させ、そのうちに次世代を減少させた (垣花, 1998)。このような生殖統御以外では、不妊魚は生殖腺発達のエネルギーを体成長に転換することから、高成長個体作出の手段とされる (荒井, 1997)。

現在、魚類の不妊化は、種間交雑や染色体操作技術を用いた三倍体化による、核のゲノム構成に着目した方法で行われている。しかし、種間交雑個体や三倍体個体は希に配偶子を産出することが報告されており (Michalik et al., 2014; Zhang et al., 1998)、新たな不妊化技術の開発が求められている。

本研究の概要

本研究では、魚類における核－細胞質雑種やヘテロプラスミー個体の誘起法を確立し、それらの生物学的特性を明らかにすることを目的とした。核－細胞質雑種とヘテロプラスミー個体における核－細胞質の相互作用は、初期胚発生から生じると考えられるため、胚発生能力の調査を行った。第1章ではゼブラフィッシュを用いた核－細胞質雑種の誘起に向け、ゼブラフィッシュ雄性発生半数体作出のための条件検討を行った。そして異種間雄性発生により、ゼブラフィッシュ由来の細胞質とコイ目近縁種の核をもつ核－細胞質雑種を材料に、異種由来細胞質が胚発生に与える影響を調査した。第2章では、ゼブラフィッシュの細胞質内に異種由来のミトコンドリアが混在するようなヘテロプラスミー胚を、ミトコンドリア移植により誘起して胚発生能力を調査した。第3章では、核と細胞質提供種がより近縁の組み合わせとなるよう、異なる系統のドジョウを用いた異系統間雄性発生を行い、胚発生能力と生殖能力を調査した。これらの結果から、核と細胞質の組み合わせや、母系核ゲノムと父系核ゲノムのセット数、異種のミトコンドリアの混在が胚発生過程あるいは配偶子形成過程にどのような影響を及ぼしたかについて、第4章で考察した。

第1章 ゼブラフィッシュ卵を用いた核－細胞質雑種誘起

緒言

魚類では染色体操作の一つである雄性発生を用いて、精子由来のゲノムのみを持った個体を作出できる (Komen and Thorgaard, 2007)。雄性発生では卵の核をあらかじめ放射線や紫外線の照射により不活性化し、正常な精子で受精する。雄性発生法により作出された個体は致死性の半数体となり、小眼、小頭、体軸の湾曲、体軀の矮小といった半数体症候群として特徴的な奇形を呈する。雄性発生半数体は第一卵割阻止を行うことによって二倍性を回復し、全ての遺伝子座で同型接合となる。そのため雄性発生により誘起された完全同型接合体は有用な遺伝形質をもつ純系の作出や、雄ヘテロ型性決定をもつ種において超雄 (YY) を用いた全雄集団作成が可能となる。しかし、卵核の不活性化のための照射に加え、第一卵割阻止のための温度・圧力処理による副作用や、さらに有害劣性遺伝子の同型接合化により、生残率は低く、作出は困難とされる (荒井ら, 2017)。

ゼブラフィッシュ *Danio rerio* における雄性発生では、ガンマ線照射 (Brandhorst and Corley-Smith et al., 2004) やエックス線照射 (Corley-Smith et al., 1996) によって雄性発生半数体を作出する方法が報告されている。しかしながら、これらの放射線を用いる手法は大規模な設備を要すること、使用する機器が非常に高価であることなどから汎用性の高い手法とは言えない。一方で、卵への紫外線照射でも雄性発生半数体を誘起できることが報告されている (Ungar et al., 1998)。市販の殺菌灯を用いた紫外線照射による雄性発生法は、より簡便な半数体誘起法と言えるが、卵核を破壊するための紫外線照射量や照射方法については言及されておらず、最適な紫外線照射の条件は未だ調査されていない。また、最適な紫外線照射量の使用は、卵核の胚発生への関与を防ぎ、完全に精子核のみで構成される雄性発生個体を作出するために重要である。卵核の遺伝的不活性化が不十分な際には卵核由来の染色体断片が残存することや、作出個体が異数体となることが他の魚種において報告されている (Arai et al., 1992; Lin and Dabrowski, 1998; Fujimoto et al., 2007)。

一方、これらの雄性発生において異種の精子を用いることで異種のゲノムのみで発生する個体を作出できる。これまでサケ科では、遺伝的に不活性化したサクラマス *Oncorhynchus masou* の卵をアマゴ *Oncorhynchus masou ishikawae* の精子で受精させ、倍加処理を施すことで亜種間雄性発生から成魚が得られている (小野里, 1989)。一方、多くのサケ科での異種間または異属間の雄性発生では生残性個体を得られておらず、卵細胞質に含まれる母系因子と父性ゲノムの不適合性の影響と考えられている (Babiak et al., 2002)。このように異種間雄性発生により誘起された異種の核と細胞質からなる細胞で構成される個体は核－細胞質雑種とよばれ、核と細胞質の相互作用の解明に有用である。コイ目では、ガンマ線照射したコイ *Cyprinus carpio* の卵とキンギョ *Carassius auratus auratus* 精子によ

る異属間の核-細胞質雑種 (Bercsényi et al., 1998) や紫外線照射したコイ卵とカラドジョウ *Misgurnus mizolepis* 精子による異科間の核-細胞質雑種 (Nam et al., 2000) が報告されている。また紫外線照射したドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* 卵とキンギョ精子による核-細胞質雑種では胞胚後期で発生が停止するものの、始原生殖細胞 (Primordial germ cells: PGCs) の形成が確認されており (藤本, 2005; Fujimoto et al., 2010a)、異種の生殖細胞質により始原生殖細胞や配偶子の誘導ができる可能性が示唆されている。核-細胞質雑種では、核と細胞質が別の生物種に由来することによる新たな形質の顕在化や、近縁種の卵を用いた精子からの希少種復活の可能性が考えられる。

しかし、紫外線照射を用いた卵核の遺伝的不活性化と第一卵割阻止の併用による異種間雄性発生 (核-細胞質雑種) の二倍体の誘起は、生残性の低下が起こる。そこで、本研究では受精時に二倍性精子を用いた異種間雄性発生を行うことで、第一卵割阻止を行わず、雄性発生二倍体の作出を試みた。ゼブラフィッシュと同じコイ目魚類では、四倍体のギンブナ *Carassius auratus langsdorfii* とクローン系統のドジョウにおいて二倍性精子の産出が報告されている。ギンブナは日本各地に分布し、両性生殖を行う二倍体 ($2n=100$) のほかに三倍体 ($3n=156$)、四倍体 ($4n=206$) が生息する (小林ら, 1970)。中でも四倍体雄は、二倍性の還元型精子を産出する (Murakami and Fujitani, 1997)。キンギョ *C. a. auratus* はギンブナと亜種の関係にあり、近縁であることから、四倍体ギンブナはキンギョと相同な二倍性精子の給源として扱える。一方ドジョウでは、野生集団に雌性発生により繁殖する自然クローン二倍体が生息する (Morishima et al., 2002)。これらの自然クローン二倍体は減数分裂前に染色体が倍加すること (減数分裂前核内分裂) により、非還元二倍性卵を産生する (Itono et al., 2006)。この自然クローン二倍体を雌性発生により継代し、ホルモン処理を行うとクローン系統ドジョウの雄個体が得られる。クローン雄個体も同様に非還元精子を産出することから (Yoshikawa et al., 2007)、ドジョウにおいても二倍性精子の使用が可能となる。

第1章では、ゼブラフィッシュにおける紫外線を用いた雄性発生の誘起条件を決定し、第一卵割阻止によるゼブラフィッシュ雄性発生二倍体の作出を試みた。併せて、ゼブラフィッシュ雄性発生二倍体雄の精子の遺伝的特性について解析した。また、細胞質提供種にゼブラフィッシュ、核提供種にゼブラフィッシュと同じ *Danio* 属であるパールダニオ *Danio albolineatus*、同じコイ目コイ科のキンギョと四倍体ギンブナ、ドジョウ科の野生型ドジョウとクローンドジョウを用いて、異種間・異属間・異科間の核-細胞質雑種を誘起し、胚発生能力を調査した。

材料・方法

供試魚

供試魚には北海道大学水産学部水槽センター（先端環境制御棟）で飼育しているゼブラフィッシュ *Danio rerio* の雌雄個体と、パールダニオ *Danio albolineatus*、キンギョ *Carassius auratus auratus*、四倍体ギンブナ *C. auratus langsdorfii*、野生型ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus*、クローン系統ドジョウの性転換雄個体を用いた。

排卵誘起

ゼブラフィッシュの排卵誘起は、室温 28.5°C、明期 14 時間、暗期 10 時間の条件下で飼育し、雌雄のペアリングにより行った。

卵核の遺伝的不活性化

ゼブラフィッシュ卵の卵核の遺伝的不活性化は、未受精卵に対する紫外線照射により行った。卵への紫外線照射には二灯の紫外線殺菌灯（GL-15W, National）を設置した箱型紫外線照射装置を用い、手法は Fujimoto et al. (2007) に従った。紫外線照射の際に、未受精卵を収容するチャンバーは、底面を取り除き、代わりにサランラップ（旭化成）を張った 90 mm プラスチックシャーレに、底面を取り除いた 60 mm プラスチックシャーレを配置したものを使用した。ゼブラフィッシュの未受精卵は pH 8.0 の Hank's 液 + 0.5% BSA 中で保存し、チャンバーの内側に収容した。紫外線照射中は卵に均一に紫外線が照射されるように、チャンバーを振盪機（VS-2, SAKURA SEIKI Co. LTD.）を用いて水平に振盪した。照射後の卵は直ちに人工授精に供した。

雄性発生誘起条件の検討

ゼブラフィッシュ雄性発生半数体誘起に最適な紫外線照射条件の検討では、紫外線は 1.0 mW/cm² の強度で照射するよう設定した。実験 I では照射時間を 0 秒、25 秒、75 秒、150 秒、200 秒とし、それぞれ 0 mJ/cm²（コントロール）、25 mJ/cm²、75 mJ/cm²、150 mJ/cm²、200 mJ/cm² の照射を行い、実験 II では照射時間を 0 秒、50 秒、75 秒、100 秒、125 秒、150 秒とし、それぞれ 0 mJ/cm²（コントロール）、50 mJ/cm²、75 mJ/cm²、100 mJ/cm²、125 mJ/cm²、150 mJ/cm² の照射を行った。照射後の卵は遮光して保存し、全照射群の紫外線照射処理が終了後、同時に人工授精に供した。実験 I は 5 個体、実験 II は 6 個体の雌親

を使用し、各照射群の生残率、外部形態、倍数性測定から最適な紫外線照射量を決定した。

胚発生過程における外部形態の観察

実体顕微鏡 (MZ16F-RCFL, LEICA 社製) を用いて、胚発生過程の外部形態を観察した。ゼブラフィッシュ卵を用いた各実験群の発生段階は Kimmel et al. (1995) に従った。

胚発生能力の評価

人工授精後、卵割期 (4–128 細胞期) に各実験群の全卵数あたりの受精卵数を計数し、受精率を算出した。その後、受精後 4 時間 (Sphere 期)、8 時間 (75%エピボリー期)、12 時間 (尾芽胚期)、24 時間 (Prim-5 期)、36 時間 (Prim-25 期)、48 時間 (Long-pec 期、孵化期) に死亡胚の除去と生残胚の計数を行い、各実験群の受精卵 (卵割が観察された卵) 数あたりの生残胚数の割合を算出して生残率とした。なお胚全体が完全に白濁したものを死亡胚と判定した。

フローサイトメトリーによる相対 DNA 量の測定

測定に用いるサンプルは、動物細胞分析用 DNA 試薬キット (Cystain DNA 2 step, Sysmex 社製) を用いて処理した。サンプル (ヒレ、胚、精子) を A 液 (核単離溶液) 100 μ L の中に入れ、ボルテックスにより細胞を混合・遊離させ、そのうち 10 μ L の A 液を B 液 [4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色液] 400 μ L と共に 50 μ m のメッシュ (Cell Trics 50 μ m, PALTEC 社製) を通して細胞片を除去し、アルミホイルで遮光しながら 30 分ほど静置した。そしてフローサイトメーター (CyFlow, PARTEC 社製) を用いて、ゼブラフィッシュ通常二倍体をコントロールとして相対 DNA 量を測定した。

ゼブラフィッシュを細胞質提供種とした核-細胞質雑種の誘起

核-細胞質雑種は異種間雄性発生法を用いて誘起した。紫外線照射 (75 mJ/cm²) により遺伝的に不活性化したゼブラフィッシュ卵に、異種精子 (半数性精子としてパールダニオ、ドジョウ、キンギョ、二倍性精子としてクローン系統ドジョウ、四倍体ギンブナ) を媒精し、核-細胞質雑種を誘起した。*Danio* 属では二倍性精子が得られなかったため、パールダニオ半数性核-ゼブラフィッシュ細胞質雑種を誘起した後、高温処理による第一卵割阻止を行い、パールダニオ二倍性核-ゼブラフィッシュ細胞質雑種を作出した。高温処理条件は受精 13 分後から 41.4°C で 2 分間とした (Endoh et al., 2018)。また、対照群としてゼブラフィッシュ通常受精群、雑種群、ゼブラフィッシュ同種間雄性発生群を作出した。作出した全実験

群は Table 1 にまとめた。

DNA 抽出

サンプルを 1.5 mL チューブに入れ、TNES-Urea バッファー (10 mM Tris-HCl; pH7.5, 125 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, 4 M Urea; Asahida et al., 1996) 400 μ L および 20 mg/mL Proteinase-K 10 μ L を加え、37°Cで一晩インキュベートした。試料が完全に消化されていることを確認後、Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (ニッポンジーン社製) を 800 μ L 加え、20 分間転倒混和した。その後、20,630 $\times g$ (20°C) で 15 分間卓上マイクロ冷却遠心機 (3520, MA-2024, KUBOTA 社製) を用いて遠心分離し、上清を新しいチューブに移した。この作業を 2 回繰り返した後、3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 40 μ L および 100%エタノール 800 μ L を加え転倒混和し、-30°Cで 30 分間静置した。そして、20,630 $\times g$ (4°C) で 30 分間遠心分離し、DNA ペレットを得た。DNA ペレットは 70%エタノールで洗浄し、60°Cで乾燥させた後、TE バッファー 52 μ L に溶解した。Nano Drop 2000 (Thermo Scientific 社製)により各 DNA 溶液の濃度を測定後、100 ng/ μ L になるように TE バッファーで希釈し、-30°Cで保存した。なお倍数性解析に用いた A 液の残りから DNA 抽出を行う際には、DNA 共沈剤として Dr. GenTLE Precipitation Carrier (TaKaRa 社製) を用いた。

ゼブラフィッシュ雄性発生二倍体の遺伝解析

核-細胞質雑種誘起の対照群として作出したゼブラフィッシュ雄性発生二倍体群 (倍加半数体: DH) における雄性発生の成否を確認するため、マイクロサテライトマーカー解析を行った。孵化期胚の倍数性測定後、DNA 抽出を行い、Bacth A-C について、Shimoda et al. (1999) で報告されているマイクロサテライトマーカーを使用して、子孫のアレルを調査した。Batch A では、Z8874, Z644, Z8495, Z7576, Z6622, Z992, Z6010, Z5265, Batch B では、Z8874, Z644, Z8495, Z10215, Z7576, Z9331, Z9708, Z5265, Batch C では、Z1781, Z8874, Z8495, Z7576, Z992, Z6010, Z9331, Z9708 の各 8 座について調査した。使用したプライマーの塩基配列情報は Table 2 に示した。

PCR は、TaKaRa Taq HS Perfect Mix (R300A, TaKaRa 社製) 5 μ L、M13 プライマー 0.33 μ L、Forward-Reverse mix プライマー 0.37 μ L、DDW 3.3 μ L、DNA 溶液 (25-100 ng/ μ L) 1.0 μ L を混合した合計 10 μ L の反応系で行った。Forward-Reverse mix プライマーは、Forward プライマー 1 μ L、Reverse プライマー 10 μ L、TE バッファー 89 μ L を混合した合計 100 μ L となるよう事前に調製した。PCR 反応は、Predenature 処理 94°C 3 分の後、熱変性 92°C 1 分、アニーリング 58°C 1 分、伸長反応 72°C 90 秒を 1 サイクルとして 27 サイクル行い、さらに伸長反応を 72°C 7 分行った。その後、PCR 産物 1 μ L と

Hidi Formamide 9 μ L、Gene Scan-500LIZ Size Standard (Applied Biosystems) 0.5 μ L を混合し、95°Cで5分間ヒートショックを加えた。サンプルを氷冷した後、ABI DNA Sequencer 3130xl (Applied Biosystems) で電気泳動を行い、Gene Mapper software v3.7 (Applied Biosystems) を用いた解析からアレルサイズを決定した。

ゼブラフィッシュ雄性発生二倍体の配偶子の解析

核-細胞質雑種誘起の対照群として作出したゼブラフィッシュ雄性発生二倍体（倍加半数体:DH）雄が産出した精子（DH精子）を用いて検定交配を行った。検定交配では通常受精群（ゼブラフィッシュ卵×通常雄の精子）、検定交配群（ゼブラフィッシュ卵×DH精子）、検定雄性発生群（UVゼブラフィッシュ卵×DH精子）の3群を作出し、胚発生能力の調査と子孫の倍数性解析、RAPD-PCRによる子孫の遺伝解析を行った。

RAPD-PCR

DNA 溶液 1.0 μ L、DDW 8.8 μ L、プライマー 0.4 μ L、Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO 社製) 10 μ L を 0.2 mL チューブに入れ、熱変性 94°C 30 秒、アニーリング 36°C 1 分、伸長反応 72°C 1 分を 1 サイクルとして 35 サイクル PCR を行った。その後、PCR 産物 5 μ L を 1.5%アガロースゲルにより、100V で 70 分間電気泳動を行った。分子マーカーとして Gene Ladder 100 (ニッポンジーン社製) を用いた。泳動後、エチジウムブロマイド染色を行い、トランスイルミネーターでDNA断片を検出した。プライマーは OPA-04 (5'- AATCGGGCTG -3')、OPA-09 (5'- GGGTAACGCC -3')、OPA-18 (5'- AGGTGACCGT -3') を用いた。

統計解析

ゼブラフィッシュ雄性発生誘起条件の検討における各紫外線照射群の受精率、生残率、半数体症候群率、エピボリー不完全胚率および細胞塊胚率は、一元配置分散分析の後、Tukey法を用いて多重比較を行った。有意水準は5%とした。

核-細胞質雑種誘起における各実験群の受精率と受精後経過時間ごとの生残率は、Kruskal-Wallis 検定の後、Scheffe の方法を用いて多重比較を行った。有意水準は5%とした。

結果

雄性発生誘起条件の検討

紫外線照射量を 0、25、75、150、200 mJ/cm² と設定した実験 I では、各照射群の受精率と生残率を算出し、孵化期胚の倍数性測定を行った。紫外線照射を行わず、採卵後すぐに人工授精したコントロール群の受精率は $59.3 \pm 12.63\%$ (平均値 $\pm$ 標準誤差) であった (Table 3)。紫外線照射群では、25 mJ/cm² 照射群は $75.6 \pm 6.50\%$ 、75 mJ/cm² 照射群は $60.3 \pm 10.32\%$ 、150 mJ/cm² 照射群は $35.5 \pm 13.13\%$ 、200 mJ/cm² 照射群は $21.8 \pm 6.36\%$ であった。25–200 mJ/cm² の照射群では、紫外線照射量の増加に伴って受精率が低下する傾向が見られ、150 mJ/cm² と 200 mJ/cm² 照射群では、コントロール群より受精率が低かった。一方で 25 mJ/cm² と 75 mJ/cm² 照射群では、紫外線照射を行ったにも関わらず受精率がコントロール群より高かった。また 25 mJ/cm² 照射群の受精率は 200 mJ/cm² 照射群の受精率より有意に高かった。

受精後 12–48 時間までの生残率は、紫外線照射を行った群はコントロール群より低く、紫外線照射量の増加に伴って生残率は低下した (Table 3)。受精後 48 時間における生残率は、コントロール群では $91.3 \pm 3.61\%$ (平均値 $\pm$ 標準誤差)、25 mJ/cm² 照射群では $55.6 \pm 6.70\%$ 、75 mJ/cm² 照射群では $28.1 \pm 10.76\%$ 、150 mJ/cm² 照射群では $8.2 \pm 5.66\%$ 、200 mJ/cm² 照射群では $1.3 \pm 1.30\%$ であった。150 mJ/cm² 照射群の受精後 24 時間以降、200 mJ/cm² 照射群の受精後 12 時間以降の生残率は、受精後 12–48 時間後のコントロール群の生残率より有意に低い値を示した。特に 200 mJ/cm² 照射群では受精後 48 時間における生残率は著しく低く、5 回の実験を繰り返した中で得られた 277 個の受精卵のうち生残胚はわずか 2 個体であった。

通常受精胚 (0 mJ/cm²) を二倍体コントロールとして、フローサイトメトリーを用いて生残胚の倍数性解析を行った。紫外線照射群の中で、25 mJ/cm² 照射群のみで観察された 6 個体の正常個体はすべて二倍体胚であった (Table 4)。一方、奇形個体は 25 mJ/cm² 照射群では 151 個体中 132 個体、75 mJ/cm² 照射群では 83 個体全て、150 mJ/cm² 照射群では 20 個体中 17 個体、200 mJ/cm² 照射群では 2 個体全てが半数体を示した。奇形個体でその他の倍数性を示した個体は、25 mJ/cm² 照射群では二倍体胚が 11 個体、四倍体胚とモザイク胚が 1 個体ずつ、異数体胚が 5 個体検出され、150 mJ/cm² 照射群でも二倍体胚が 2 個体、異数体胚が 1 個体検出された。なお調査個体のうち 25 mJ/cm² 照射群の 1 個体は DNA 量のピークが得られず、倍数性を明らかにできなかった。

紫外線照射量を 0、25、50、75、100、150 mJ/cm² と設定した実験 II では、各照射群の受精率と生残率を算出し、生残胚の外部形態観察と倍数性解析を行った。紫外線照射を行わずに採卵後すぐに人工授精したコントロール群の受精率は $62.6 \pm 4.28\%$ (平均値 $\pm$ 標準誤差) であった (Table 5)。紫外線照射群では、50 mJ/cm² 照射群は $73.0 \pm 3.98\%$ 、75

mJ/cm²照射群は 64.8 ± 3.14%、100 mJ/cm²照射群は 59.3 ± 5.23%、125 mJ/cm²照射群は 61.0 ± 5.07%、150 mJ/cm²照射群は 45.7 ± 5.44%であった。50 mJ/cm²と 75 mJ/cm²照射群では、受精率がコントロール群より高く、100–150 mJ/cm²照射群では、コントロール群より受精率が低かった。紫外線照射群の受精率は、照射量の増大と共に低下する傾向にあった。また 25 mJ/cm²照射群の受精率は 200 mJ/cm²照射群の受精率より有意に高かった。

受精後 12–48 時間までの生残率は、紫外線照射を行った群はコントロール群より低く、紫外線照射量の増加に伴って生残率は低下した (Table 5)。受精後 48 時間における生残率は、コントロール群では 88.6 ± 4.27% (平均値 ± 標準誤差)、50 mJ/cm²照射群では 44.6 ± 8.07%、75 mJ/cm²照射群では 41.3 ± 12.3%、100 mJ/cm²照射群では 31.5 ± 7.87%、125 mJ/cm²照射群では 22.2 ± 6.72%、150 mJ/cm²照射群では 16.7 ± 7.91%であった。受精 12 時間後では 125, 150 mJ/cm²照射群、受精 24 時間後では 75–150 mJ/cm²、受精 48 時間後では 50–150 mJ/cm²照射群すべてで、それぞれのコントロール群の生残率より有意に低い値を示した。

受精後 48 時間の生残胚は、コントロール群では Fig. 1a のような正常個体が得られたのに対し、紫外線照射を行った群では、75 mJ/cm²照射群の 1 個体を除いてすべての個体が奇形を呈していた。奇形は小頭、短軸、体軸の湾曲などの特徴的な症状を示す半数体症候群と考えられるものが多くを占めたが (Fig. 1b)、体軸の一部が二軸となっている胚 (以下、エピボリー不完全胚、Fig. 1c) や、明確な胚軸の形成がなされず細胞塊となる胚 (以下、細胞塊、Fig. 1d) が観察された。半数体症候群の特徴を示す奇形個体の割合は、紫外線照射量の増加に伴って減少し、エピボリー不完全胚は 100 mJ/cm²以上の紫外線照射を行った群のみで観察された。また細胞塊の個体は、125 mJ/cm²以上の紫外線照射を行った群において、低照射量群よりも高い割合で検出された (Table 5)。なお、コントロール群においても生残胚のなかに奇形個体が存在したが、半数体症候群、エピボリー不完全胚、細胞塊に該当する個体はなかった。

通常受精胚 (0 mJ/cm²) を二倍体コントロールとして、フローサイトメトリーを用いて生残胚の倍数性解析を行った。紫外線照射群では 75 mJ/cm²で観察された 1 個体の正常個体は二倍体胚であった (Table 6)。一方、奇形個体は 50 mJ/cm²照射群では 130 個体中 124 個体、75 mJ/cm²照射群では 116 個体中 112 個体、100 mJ/cm²照射群では 105 個体中 101 個体、125 mJ/cm²照射群では 103 個体中 96 個体、150 mJ/cm²照射群では 43 個体中 41 個体がコントロールの半分の DNA 量の半数体であった。50–150 mJ/cm²のすべての照射群において調査個体の 9 割以上が半数体として検出された。奇形個体でその他の倍数性の二倍体胚、異数体胚も各照射群でわずかに検出された。なお調査個体のうち 125 mJ/cm²照射群の 2 個体は DNA 量のピークが得られず、倍数性を明らかにできなかった。

Danio 属を核提供種とする異種間核－細胞質雑種の胚発生能力

細胞質提供種のゼブラフィッシュと同じ *Danio* 属魚類であるパールダニオを核提供種として、「パールダニオ半数性核－ゼブラフィッシュ細胞質雑種」と「パールダニオ二倍性核－ゼブラフィッシュ細胞質雑種」を誘起し、異種間核－細胞質雑種の胚発生能力を調査した。対照群としてゼブラフィッシュ通常受精群（ゼブラフィッシュ卵×ゼブラフィッシュ精子）、雑種群（ゼブラフィッシュ卵×パールダニオ精子）、ゼブラフィッシュ雄性発生半数体群（UV ゼブラフィッシュ卵×ゼブラフィッシュ精子）およびゼブラフィッシュ雄性発生二倍体（UV ゼブラフィッシュ卵×ゼブラフィッシュ精子＋第一卵割阻止）群を作出した。

受精 8 時間後では通常受精群、雑種群では 50%エピボリ一期に達し、囊胚形成が開始していたが（Fig. 2A1, B1）、ゼブラフィッシュ雄性発生群、核－細胞質雑種群では囊胚形成開始前の sphere 期から dome 期であり、胚発生に遅れが生じていた（Fig. 2C1, D1, E1, F1）。受精 12 時間後では通常受精群と雑種群はエピボリを完了した尾芽胚期まで胚発生が進行し、体節形成を開始する段階にあったが（Fig. 2A2, B2）、ゼブラフィッシュ雄性発生群では 70–80%エピボリ一期（Fig. 2C2, D2）、核－細胞質雑種群では 50–60%エピボリ一期であり（Fig. 2E2, F2）、核－細胞質雑種群では雄性発生群よりも胚発生の進行が遅かった。受精 24 時間後の体節形成期では、通常受精群と雑種群の尾部方向への正常な卵黄伸長が観察されたが（Fig. 2A3, B3）、ゼブラフィッシュ雄性発生半数体群では卵黄伸長が短く（Fig. 2C3）、核－細胞質雑種群では卵黄の伸長はほとんど見られなかった（Fig. 2E3, F3）。ゼブラフィッシュ雄性発生二倍体群では、胚体の形成や卵黄伸長において、ゼブラフィッシュ雄性発生半数体群と比べてやや改善が見られた（Fig. 2D3）。受精 48 時間後の生残胚では、通常受精群と雑種群、ゼブラフィッシュ雄性発生二倍体群において正常個体が得られたのに対し（Fig. 2A4, B4, D4）、ゼブラフィッシュ雄性発生半数体群とパールダニオ半数性核－ゼブラフィッシュ細胞質雑種群では、小頭、短軸、体軸の湾曲などの特徴的な症状を示す半数体症候群と考えられる奇形個体が観察された（Fig. 2C4, E4）。第一卵割阻止により二倍性回復をはかったパールダニオ二倍性核－ゼブラフィッシュ細胞質雑種群では、半数体の核－細胞質雑種と比較し外部形態は改善されなかった（Fig. 2F4）。また、倍数性に関わらず核－細胞質雑種群では、ゼブラフィッシュ雄性発生群と比較して小頭、短軸、水腫の形成といった奇形がより重篤になっていた。

受精 8–48 時間後までの各実験群（ゼブラフィッシュ雄性発生二倍体群を除く）の受精率と生残率を Table 7 に示した。すべての実験群において受精率と受精 4 時間後、受精 8 時間後の生残率に差は無かった。パールダニオ二倍性核－ゼブラフィッシュ細胞質雑種群は、パールダニオ半数性核－ゼブラフィッシュ細胞質雑種群と同じシャーレ内で人工授精を行ったため、受精率は算出しなかった。受精 12 時間後では、パールダニオ二倍性核－ゼブラフィッシュ細胞質雑種群の生残率が $41.7 \pm 20.6\%$ （平均値±標準偏差）まで低下し、ゼブラフィッシュ通常受精群の $95.8 \pm 1.7\%$ に対して有意に低い値だった。ゼブラフ

イッシュ通常受精群と雑種群では、受精 48 時間後までそれぞれ $88.8 \pm 2.4\%$ 、 $91.6 \pm 6.9\%$ と高い値で推移した。一方、ゼブラフィッシュ雄性発生半数体群とパールダニオ半数性核ーゼブラフィッシュ細胞質雑種群では、受精 24 時間後においてそれぞれ $53.5 \pm 29.2\%$ 、 $49.5 \pm 25.5\%$ であり、通常受精群と雑種群に対して大きく低下した。また、受精 48 時間後では、それぞれ $49.5 \pm 26.9\%$ 、 $42.7 \pm 25.3\%$ を示し、パールダニオ半数性核ーゼブラフィッシュ細胞質雑種胚はゼブラフィッシュ雄性発生半数体胚と同等の生残率を示した。パールダニオ二倍性核ーゼブラフィッシュ細胞質雑種群の受精 48 時間後の生残率は $8.5 \pm 3.6\%$ で最も低く、ゼブラフィッシュ通常受精群および雑種群と比較して有意に生残率が低下した。

ゼブラフィッシュ雄性発生二倍体群の受精率と生残率を Table 8 に示した。雄性発生二倍体群の受精率は、Batch B と Batch D で雄性発生半数体群を上回ったが、すべての実験回で通常受精群より低い値だった。どの実験回においても生残率は受精 8–48 時間後を通して、通常受精群で最も高かった。Batch A–C では、受精 8–48 時間後までの雄性発生二倍体群生残率は雄性発生半数体群よりも低かった。しかし Batch D では、受精 12 時間後までは雄性発生二倍体群は雄性発生半数体群よりも低い生残率を示したが、受精 24 時間後以降における雄性発生二倍体群の生残率は雄性発生半数体群を上回った。4 回の実験の受精 48 時間後における雄性発生二倍体群の生残率を比較すると、Batch A と Batch C ではそれぞれ 0.4%、4.4%であったのに対し、Batch B と Batch D では 21.7%、33.8%と高い値だった。孵化後に摂餌を開始した生残個体は 4 回の受精実験のうち、Batch B と Batch D からそれぞれ 1 個体ずつ得られた。Batch B の生残個体は受精後 1 ヶ月後に死亡したが、Batch D の生残個体（雄）は性成熟まで成長し、精子を産出した。

***Carassius* 属を核提供種とする異属間核ー細胞質雑種の胚発生能力**

細胞質提供種のゼブラフィッシュと同じコイ目コイ科に属するキンギョとギンブナを核提供種として、「キンギョ半数性核ーゼブラフィッシュ細胞質雑種（UV ゼブラフィッシュ卵×キンギョ半数性精子）」と「ギンブナ二倍性核ーゼブラフィッシュ細胞質雑種（UV ゼブラフィッシュ卵×ギンブナ二倍性精子）」を誘起し、異属間核ー細胞質雑種の胚発生能力を調査した。対照群としてゼブラフィッシュ通常受精群（ゼブラフィッシュ卵×ゼブラフィッシュ精子）、キンギョ雑種群（ゼブラフィッシュ卵×キンギョ精子）、ギンブナ雑種群（ゼブラフィッシュ卵×ギンブナ精子）、ゼブラフィッシュ雄性発生群（UV ゼブラフィッシュ卵×ゼブラフィッシュ精子）を作出した。

受精 4–48 時間後における各実験群の外部形態を Fig. 3 に示した。受精 4 時間後の胞胚期まで、キンギョ半数性核、およびギンブナ二倍性核の核ー細胞質雑種は、ゼブラフィッシュ通常受精群、キンギョ雑種群、ギンブナ雑種群、ゼブラフィッシュ雄性発生半数体群と同様に正常発生した（Fig. 3A1, B1, C1, D1, E1, F1）。受精 8 時間後、対照群の通常受精群とキ

キンギョ雑種群では 50%エピボリー期 (Fig. 3A2, B2)、ギンブナ雑種群とゼブラフィッシュ雄性発生半数体群では 30%エピボリー期 (Fig. 3C2, D2) に達していた。一方、キンギョ半数性核およびギンブナ二倍性核の核-細胞質雑種群ではさらに胚発生が遅れ、エピボリーは開始しておらず、卵黄の中央部が動物極側に隆起する胚が見られる程度だった (Fig. 3E2, F2 矢頭)。またギンブナ二倍性核-ゼブラフィッシュ細胞質雑種群では、胚盤中心部に影のようなものが見える異常が見られる胚もあった。これ以降、キンギョ半数性核およびギンブナ二倍性核の核-細胞質雑種は胚発生が停止し、受精 12-24 時間後までに胚盤が卵黄から分離するようにして死亡した (Fig. 3E3, F3)。受精 12 時間後の対照群では、ゼブラフィッシュ通常受精群、キンギョ雑種群、ギンブナ雑種群では 100%エピボリー期から尾芽胚期に達し (Fig. 3A3, B3, C3)、ゼブラフィッシュ雄性発生半数体群も 80-100%エピボリー期まで発生が進行した (Fig. 3D3)。受精 24 時間後の 4 つの対照群は、いずれも体節形成期まで発生が進行したが、キンギョ雑種群およびゼブラフィッシュ雄性発生半数体群では、ゼブラフィッシュ通常受精群よりも体軸が短く、尾部方向へ卵黄伸長も短かった (Fig. 3A4, B4, D4)。ギンブナ雑種群ではさらに短軸となり、卵黄伸長は見られなかった (Fig. 3C4)。受精 48 時間後の生残胚では、ゼブラフィッシュ通常受精群のみから正常な外部形態を示す孵化仔魚が得られ (Fig. 3A5)、キンギョ雑種群、ギンブナ雑種群、ゼブラフィッシュ雄性発生半数体群ではすべて奇形であった (Fig. 3B5, C5, D5)。2 つの雑種群を比較すると、ギンブナ雑種はキンギョ雑種よりも重篤な奇形を呈していた。

各実験群の胚発生能力を Table 9 に示した。ゼブラフィッシュ雌 1 個体から得られる卵数を考慮し、キンギョ雑種群とキンギョ半数性核-ゼブラフィッシュ細胞質雑種群および対照群の胚発生能力の調査を実験 1 とした。また、ギンブナ雑種群とギンブナ二倍性核-ゼブラフィッシュ細胞質雑種群および対照群の胚発生能力の調査を実験 2 とした。実験 1 と実験 2 においてゼブラフィッシュ通常受精群の受精率および受精 4-48 時間後の生残率に有意差がなかったため、実験に用いた卵の卵質は同等のものであったと評価した。

受精率は、ギンブナ二倍性精子を用いたギンブナ雑種群では $2.4 \pm 1.3\%$ 、ギンブナ二倍性核-ゼブラフィッシュ細胞質雑種群では $3.1 \pm 1.7\%$ であり、キンギョ雑種群を除く他の実験群より有意に低かった。受精 8 時間後における生残率は、キンギョ半数性核-ゼブラフィッシュ細胞質雑種群では $39.8 \pm 20.3\%$ であり、ギンブナ二倍性核-ゼブラフィッシュ細胞質雑種群を除いたすべての実験群の生残率よりも有意に低い値だった。またギンブナ二倍性核-ゼブラフィッシュ細胞質雑種群の生残率は $66.7 \pm 16.7\%$ であり、半数性の核-細胞質雑種よりも高い値だった。受精 12 時間後では、キンギョ半数性核-ゼブラフィッシュ細胞質雑種群、ギンブナ二倍性核-ゼブラフィッシュ細胞質雑種群の生残率は、ギンブナ雑種群を除くすべての実験群よりも有意に低い値であった。また二倍性のギンブナ核をもつ核-細胞質雑種では $14.4 \pm 17.1\%$ 、半数性のキンギョ核をもつ核-細胞質雑種では $0.9 \pm 0.9\%$ であり、ギンブナ二倍性核-ゼブラフィッシュ細胞質雑種群の生残率が上回った。キンギョ半数性核-ゼブラフィッシュ細胞質雑種群とギンブナ二倍性核

ーゼブラフィッシュ細胞質雑種群は受精 12–24 時間後にかけてすべて死亡した。受精 24 時間後では、ギンブナ雑種群の生残率がゼブラフィッシュ通常受精群とキンギョ雑種群より有意に低下した。受精 36–48 時間後においても、ギンブナ雑種群の生残率はゼブラフィッシュ通常受精群より有意に低かった。

Carassius 属のキンギョとギンブナを用いて作出した、雑種群と核ー細胞質雑種群からは成魚まで生残する個体は得られなかった。

***Misgurnus* 属を核提供種とする異科間核ー細胞質雑種の胚発生能力**

細胞質提供種のゼブラフィッシュと異なりコイ目ドジョウ科に属するドジョウとクロン系統ドジョウを核提供種として、「ドジョウ半数性核ーゼブラフィッシュ細胞質雑種 (UV ゼブラフィッシュ卵×ドジョウ半数性精子)」と「クロンドジョウ二倍性核ーゼブラフィッシュ細胞質雑種 (UV ゼブラフィッシュ卵×クロンドジョウ二倍性精子)」を誘起し、異科間核ー細胞質雑種の胚発生能力を調査した。対照群としてゼブラフィッシュ通常受精群 (ゼブラフィッシュ卵×ゼブラフィッシュ精子)、ドジョウ雑種群 (ゼブラフィッシュ卵×ドジョウ半数性精子)、クロンドジョウ雑種群 (ゼブラフィッシュ卵×クロンドジョウ二倍性精子)、ゼブラフィッシュ雄性発生群 (UV ゼブラフィッシュ卵×ゼブラフィッシュ精子) を作出した。

受精 8–48 時間後における各実験群の外部形態を Fig. 4 に示した。受精 8 時間後では、ゼブラフィッシュ通常受精群とドジョウ雑種群は 75%エピボリー期に達していたのに対して (Fig. 4A1, B1)、クロンドジョウ雑種群、ゼブラフィッシュ雄性発生半数体群、ドジョウ半数性核およびクロンドジョウ二倍性核の核ー細胞質雑種群は 50%エピボリー期であり、胚発生に遅れが見られた (Fig. 4C1, D1, E1, F1)。受精 9 時間後では、ゼブラフィッシュ通常受精群、ドジョウ雑種群、クロンドジョウ雑種群は 90%エピボリー期 (Fig. 4A2, B2, C2)、ゼブラフィッシュ雄性発生群は 60%エピボリー期まで胚発生が進行した (Fig. 4D2)。しかし、ドジョウ半数性核ーゼブラフィッシュ細胞質雑種群とクロンドジョウ二倍性核ーゼブラフィッシュ細胞質雑種群では、胚盾期に至る胚が見られるのみで、さらに胚発生が遅れていた (Fig. 4E2, F2)。受精 10–12 時間後にかけて通常受精群、ドジョウ雑種群、クロンドジョウ雑種群では 100%エピボリー期から尾芽胚期まで発生が進行し (Fig. 4A3–5, B3–5, C3–5)、ゼブラフィッシュ雄性発生群においても 75%エピボリー期から 100%エピボリー期に達した (Fig. 4D3–5)。一方で、ドジョウ半数性核ーゼブラフィッシュ細胞質雑種群とクロンドジョウ二倍性核ーゼブラフィッシュ細胞質雑種群では、受精 10 時間後以降の胚発生の進行は見られなかった。まず、ドジョウ半数性核ーゼブラフィッシュ細胞質雑種では、受精 10 時間後は胚盾期のままであり (Fig. 4E3)、受精 11 時間後には動物極側の細胞同士の接着がなくなり、胚盤の下に卵黄が露出したような状態になっていた (Fig. 4E4 黒色矢頭)。さらに受精 12 時間後には、動物極側を覆っていた胚盤が卵黄から分離しはじめ、

胚盤の下部の卵黄が露出した胚が観察された (Fig. 4E5)。一方クロードジョウ二倍性核ーゼブラフィッシュ細胞質雑種では、受精 10 時間後から胚盾期の胚盤がいびつな形態をとり始め (Fig. 4F3)、受精 11 時間後には表層の細胞接着が弱まり、胚盤葉下層の細胞が卵黄から乖離するような異常な形態を示した (Fig. 4F4 白色矢頭)。そして受精 12 時間後にはエピボリーの形態が崩れた (Fig. 4F5)。以上のように、ドジョウ半数性核およびクロードジョウ二倍性核をもつ核ー細胞質雑種では、胚盾期以降に正常な胚発生をした胚はなかった。

受精 48 時間後の生残胚では、ゼブラフィッシュ通常受精群のみから正常な外部形態を示す孵化仔魚が得られ (Fig. 4A6)、ドジョウ雑種群、クロードジョウ雑種群、ゼブラフィッシュ雄性発生半数体群ではすべて奇形であった (Fig. 4B6, C6, D6)。2 つの雑種群を比較すると、クロードジョウ雑種はドジョウ雑種よりも重篤な奇形を呈していた。

各実験群の胚発生能力を Table 10 に示した。ドジョウ雑種群とドジョウ半数性核ーゼブラフィッシュ細胞質雑種群および対照群の胚発生能力の調査を実験 1 とした。また、クロードジョウ雑種群とクロードジョウ二倍性核ーゼブラフィッシュ細胞質雑種群および対照群の胚発生能力の調査を実験 2 とした。実験 1 と実験 2 においてゼブラフィッシュ通常受精群の受精率および受精 4–48 時間後の生残率に有意差がなかったため、実験に用いた卵の卵質は同等のものであったと評価した。

受精率は、クロードジョウ雑種群では $6.7 \pm 3.5\%$ 、クロードジョウ二倍性核ーゼブラフィッシュ細胞質雑種群では $8.2 \pm 1.7\%$ であり、他の実験群より有意に低かった。受精 4–12 時間後の生残率は各実験群間に有意な差は検出されなかったが、受精 12 時間後においてドジョウ半数性核ーゼブラフィッシュ細胞質雑種群では $66.4 \pm 23.0\%$ 、クロードジョウ二倍性核ーゼブラフィッシュ細胞質雑種群では $57.8 \pm 15.8\%$ であり、他の実験群よりも低い値だった。受精 24 時間後にかけてドジョウ半数性核ーゼブラフィッシュ細胞質雑種群はすべて死亡し、クロードジョウ二倍性核ーゼブラフィッシュ細胞質雑種群はわずかに生残する胚があったが、生残率は $5.6 \pm 9.6\%$ と他の実験群より有意に低下した。このわずかな生残胚も受精 36 時間後までにすべて死亡した。受精 36–48 時間後における生残率は、ゼブラフィッシュ通常受精群、ドジョウ雑種群、クロードジョウ雑種群およびゼブラフィッシュ雄性発生半数体群の間に有意差はなかった。

Misgurnus 属のドジョウとクロードジョウを用いて作出した、雑種群と核ー細胞質雑種群からは成魚まで生残する個体は得られなかった。

ゼブラフィッシュ雄性発生二倍体の遺伝解析

雄性発生二倍体誘起の成否を調査するため、Batch A–C のうち二倍体の生残胚合計 20 個体についてマイクロサテライトマーカー解析を行った (Table 11–13)。通常受精群と雄性発生半数体も各 6 個体ずつ解析した。雄性発生半数体候補個体および雄性発生二倍体候

補個体では、調査した 8 座すべてで雄親由来アレルのみを受け継いでいた。例えば、Batch B の Z9331 を用いて解析した際は、使用した雄親のアレルサイズは 291/293、雌親のアレルサイズは 277/280 であった。二倍体の子孫は 10 個体が 291/291、6 個体が 293/293 の同型接合であった。雄性発生二倍体候補の 20 個体の二倍体子孫は、調査した 8 座すべてで雄親由来アレルの同型接合だった。一方、通常受精による二倍体子孫は雌親と雄親のアレルサイズを一つずつ受け継いでいた。

ゼブラフィッシュ雄性発生二倍体の配偶子の解析

ゼブラフィッシュ雄性発生二倍体 (DH) が産出した DH 精子を用いて、ゼブラフィッシュ雌との検定交配を行ったところ、検定交配群、検定雄性発生群の両方で受精卵が得られた。検定交配における各実験群の受精率と生残率を Table 14 に示した。検定交配群 (ゼブラフィッシュ卵×DH 精子) と検定雄性発生群 (UV ゼブラフィッシュ卵×DH 精子) の受精率はそれぞれ 68.5%、66.0%であり、対照の通常受精群の 75.8%よりも低い値だった。受精 48 時間後の生残率は、通常受精群では 94.0%、検定交配群では 95.1%、検定雄性発生群では 56.6%であり、検定交配群の生残率が通常受精群をやや上回った。通常受精群と検定交配群の生残胚 10 個体、検定雄性発生群の生残胚 20 個体を倍数性解析に供したところ、通常受精群と検定交配群はすべて二倍体、検定雄性発生群はすべて半数体であった (Table 14)。このうち、検定交配群の二倍体子孫 3 個体、検定雄性発生群の半数体子孫 6 個体について RAPD-PCR 解析を行った。3 つの RAPD プライマー (OPA-04, 09, 18) による電気泳動像を Fig. 5 に示した。検定交配群の子孫は検定雌と DH 雄の両親に由来する増幅が見られ、さらに子孫間でのバンドパターンに差があった。一方で、検定雄性発生群の子孫は DH 雄に由来する増幅のみが見られ、子孫のバンドパターンが均一であった。以上の結果より、ゼブラフィッシュ雄性発生二倍体は受精能と正常な胚発生を可能とする精子を産出し、その精子は遺伝的に均一であることが示された。

考察

ゼブラフィッシュ雄性発生誘起に最適な紫外線照射量

ゼブラフィッシュ雄性発生半数体誘起のための紫外線照射量検討における実験 I、II の結果より、通常受精したコントロール群の受精率と比較して受精率が大きく低下したのは、150 mJ/cm² 照射群と 200 mJ/cm² 照射群であった。125 mJ/cm² 以下の紫外線照射ではコントロール群の受精率と同程度の受精率であり、コントロール群より高い受精率が得られた照射群も存在した。したがってゼブラフィッシュ未受精卵に対する紫外線照射において、150 mJ/cm² 以上の照射は卵の受精能を低下させることが考えられる。生残率は紫外線照射量の増加に伴って低下する傾向が得られ、特に 200 mJ/cm² 照射群では生残率の低下が顕著であり、通常受精胚の孵化時期に相当する受精後 48 時間における生残胚はわずかに 2 個体であった。以上より、ゼブラフィッシュ雄性発生半数体の作出において 200 mJ/cm² の照射量は過剰であると考えられる。

フローサイトメトリーを用いた生残胚の倍数性解析の結果、実験 I、II を含めて 25–200 mJ/cm² のすべての照射群から半数体が検出されたことより、ゼブラフィッシュ雄性発生半数体の作出において、25 mJ/cm² 以上の紫外線照射を行うことで卵核の遺伝的不活性化が可能であることが明らかになった。しかしながら、25 mJ/cm² 照射群では正常な外部形態を示す個体や二倍体胚、異数体胚が検出されたことから、雄性発生半数体の作出効率は他の照射群と比較して低いと考えられる。したがって、卵核の遺伝的不活性化には 25 mJ/cm² の照射でも雄性発生半数体は作出可能だが、その効率が低いため 25 mJ/cm² の照射は最適ではないと考えられる。

最適な紫外線照射量を 25–200 mJ/cm² の範囲から決定するため、生残胚の外部形態に着目した。実験 II の各照射群からは半数体に特徴的な奇形に加えて、エピボリー不完全胚や細胞塊となる個体が観察された。これらの奇形個体はより重度の奇形を呈しているものと考えられる。そして、エピボリー不完全胚、細胞塊の個体はどちらも異常な胚軸形成により出現したと考えられる。このエピボリー不完全胚は UV 照射を行った群における発生遅延が影響している可能性がある。エピボリーの進行速度は紫外線照射量に対して負の相関を示す傾向にあり、エピボリー不完全胚が観察されたのは照射量が大きい 100–150 mJ/cm² のみであった。ゼブラフィッシュでは受精胚に紫外線照射を行うと照射量依存的にエピボリーの遅延が生じる (Strähle and Jesuthasan, 1993)。エピボリーの駆動には微小管が機能しており、エピボリーの遅延は微小管の長さや配列に異常が生じることに起因すると考えられている (Solnica-Krezel and Driever, 1994)。胚軸の形成は卵黄細胞の植物極に存在した背側決定因子が胚盤に運ばれ、胚盤の一箇所に背側を誘導することによって一本の胚軸が形成されると考えられている (Yamanaka et al., 1998)。この卵黄細胞内の物質輸送にも微小管が関与している (Jesuthasan and Strähle, 1997)。また、本研究と同様に紫外線照射を用い

た雄性発生の誘起を行ったゼブラフィッシュでは高照射量になると胚軸形成が見られなくなり細胞塊を形成することが報告されている (Ungar et al., 1998)。これらの先行研究より、未受精卵への紫外線照射の際に、卵核だけでなく卵細胞質中の母系因子が影響を受けることによってエピボリー不完全胚や細胞塊の胚が生じたと考えられる。以上より、卵核の遺伝的不活性化には 100 mJ/cm^2 以上の照射量は過剰であると考えられる。

ゼブラフィッシュ雄性発生における紫外線照射量は、紫外線照射胚の生残率、生残胚の倍数性解析、外部形態の観察から、 $50\text{--}75 \text{ mJ/cm}^2$ が最適と考えられる。

核－細胞質雑種の胚発生能力

本研究では、核－細胞質雑種の誘起にあたり、細胞質提供種にゼブラフィッシュ、核提供種にパールダニオ、キンギョ、四倍体ギンブナ、ドジョウ、クローン系統ドジョウを用いた。ゼブラフィッシュと同じ *Danio* 属のパールダニオ半数性核－ゼブラフィッシュ細胞質雑種では、ゼブラフィッシュ雄性発生半数体胚と同様に、受精 48 時間後の孵化期まで生残したが孵化期胚における奇形は重篤化した。第一卵割阻止による二倍性回復を行うことで、パールダニオ二倍性核－ゼブラフィッシュ細胞質雑種の正常個体作出を期待したが、ゼブラフィッシュ雄性発生二倍体群のような正常な外部形態の胚や成魚は得られなかった。したがってパールダニオの核とゼブラフィッシュの細胞質には、正常な胚発生のプログラムを進める上での何らかの不適合性が存在すると考えられる。次に *Carassius* 属を核提供種とした、キンギョ半数性核－ゼブラフィッシュ細胞質雑種とギンブナ二倍性核－ゼブラフィッシュ細胞質雑種では、どちらも胞胚期で胚発生を停止した。二倍性の核－細胞質雑種のほうが生残率の低下はゆるやかであったが、核－細胞質雑種の生残個体は得られなかった。同様に *Misgurnus* 属を核提供種とした核－細胞質雑種では、二倍性核をもつドジョウ核－ゼブラフィッシュ細胞質雑種群において、受精 30 時間後まで生残する個体がわずかに得られた。しかしこれらの胚も胚発生が停止したままの状態ですべて死亡したにすぎず、ほとんどの胚は 50% エピボリー期で胚発生が停止し、受精 24 時間後までに死亡した。異なる倍数性の精子を産出するドジョウを用いて、核－細胞質雑種の胚発生能力を比較したことにより、致死となる核と細胞質の組み合わせの核－細胞質雑種では、致死的な半数性の状態から、正常な倍数性である二倍性になったとしても、生残性の回復は困難であると考えられる。したがって、核－細胞質雑種の生残性は倍数性に関わらず、核と細胞質の組合せに起因することが明らかとなった。

雑種の胚発生能力

Carassius 属と *Misgurnus* 属の核－細胞質雑種誘起の対照群として作出した、二倍体雑種（キンギョ雑種群、ドジョウ雑種群）と三倍体雑種（ギンブナ雑種群、クローンドジョウ雑

種群)では、三倍体雑種の受精率が有意に低かった。クローンドジョウ二倍性精子は精子濃度や運動性が低く、運動時間も短いことが報告されており (Yoshikawa et al., 2007; Zhao et al., 2012)、本研究の受精率の低下の原因であると考えられる。一方、ギンブナ二倍性精子では人工授精前に運動性を確認したところ、ほとんどの精子が運動していたことから、精子頭部のサイズが受精率低下に影響していると考えられる。すなわち、ギンブナ二倍性精子では頭部が大きく、ゼブラフィッシュ卵の卵門を通過しにくかったと推察する。今後、ギンブナ二倍性精子の形態的解析や運動性について詳細な解析を行う必要がある。

また、二倍体雑種と三倍体雑種の生残胚の外部形態を比較したところ、三倍体雑種のほうが重篤な奇形を呈していた。三倍体雑種では、二倍性精子を使用したことにより、父系核ゲノムセット数が増加し、父系核ゲノムと母系細胞質との不適合性が悪化したものと考えられる。サケ科魚類ではシロサケ雌×イワナ雄などの致死性雑種において、第二極体放出阻止による三倍体化、すなわち母系ゲノムセット数の増加により雑種の生残性が回復する例が報告されている (Arai, 1984, 1986, 1988; Seeb et al., 1988; Yamano et al., 1988)。コイ目魚類ではドジョウ雌×キンギョ雄やシマドジョウ雌×コイ雄などの致死性の科間雑種において、同様に母系核ゲノムセットを増加させた異質三倍体が誘起され、生存性回復には至らないが奇形の程度が緩和した (木島ら, 1996a, 1996b)。生存性回復が見られるサケ科雑種では胚発生過程の酵素の分子多型 (アイソザイム) が調査されており、致死の二倍体雑種では母系のアイソザイム発現のみが観察され、生残性の三倍体雑種では父系のアイソザイムも発現した。この例では母系と父系の核ゲノムセット数の比を 1:1 から 2:1 とすることで、父系由来の遺伝子発現に影響した。本研究では、母系と父系の核ゲノムセットの比を 1:1 から 1:2 にすることで奇形の程度が悪化したことから、遺伝子発現に悪影響が及んだ可能性がある。今後二倍体雑種と三倍体雑種の胚発生過程における母系と父系由来の遺伝子発現動態を調査する必要がある。雑種生存の可否において、核ゲノム同士の親和性だけでなく、母系細胞質と父系核ゲノムの親和性が大きく関与している可能性が示された。

ゼブラフィッシュ雄性発生二倍体

第一卵割阻止を行うことによって作出したゼブラフィッシュ雄性発生二倍体 (倍加半数体) は、全ての遺伝子座で同型接合となると考えられている。Batch A-C の雄性発生半数体候補個体、および雄性発生二倍体候補個体は調査したすべてで雄親由来のみのアレルを有していた。従って、本研究で決定した 75 mJ/cm² の紫外線照射により卵核は遺伝的に不活性化され、ゼブラフィッシュ雄性発生半数体を誘起できることを確認した。さらに高温処理により第一卵割阻止を行うことで得られた二倍体は父親由来のアレルの同型接合であり、雄性発生二倍体 (倍加半数体) であった。よってゼブラフィッシュにおいて紫外線照射と高温処理により倍加半数体が作出可能であることを示した。

この雄性発生二倍体誘起条件から得られた雄の生存個体の精子を用いて検定交配を行っ

た。RAPD-PCR による遺伝解析の結果、検定雄性発生子孫はすべて同一のバンドパターンを示したことから、本研究で得られた DH 精子は遺伝的に均一な精子であったと考えられる。ゼブラフィッシュでは低温処理による雄性発生で得られた倍加半数体から、遺伝的に均一な精子が得られ、これを次世代で再度雄性発生することによりクローンが得られた (Hou et al., 2015)。本研究では、紫外線照射による雄性発生により得られた倍加半数体からも正常な受精能をもつ精子が得られることが示された。

第2章 ミトコンドリア移植によるヘテロプラスミーの誘起

緒言

有性生殖を行う多くの生物種において、ミトコンドリアを含む細胞質は母系遺伝により子孫に受け継がれる。ミトコンドリアは独自の DNA であるミトコンドリア DNA (mtDNA) を持ち、その変異率は核 DNA よりも高いとされている。そのため mtDNA はミトコンドリアマトリックス内で、ミトコンドリア転写因子 (TFAM) と結合して高次構造の核様体として存在することで安定性を保っている (Takamatsu et al., 2002)。同一の mtDNA ハプロタイプのみが存在する同質性 (ホモプラスミー) 状態に対して、細胞内に多コピー存在する mtDNA に変異が生じ、変異型の mtDNA が混在する状態は異質性 (ヘテロプラスミー) 状態と呼ばれる。変異蓄積の程度は組織によって異なり、変異比率が閾値を超えた場合、後天的に様々な疾患を発症するとされている。ミトコンドリアに起因する男性不妊症もその一つと考えられており、男性不妊患者の運動能の低下した精子には突然変異を起こした mtDNA が存在したことから、精子形成過程におけるエネルギー供給の低下により不妊が引き起こされている。この現象を検証するため、約 4600 bp を欠失した欠失変異型 mtDNA を持つ培養細胞を受精胚に電気融合してヘテロプラスミーマウスが作出された。このマウスでは精子数の減少や精子の形態異常が生じ、欠失変異型 mtDNA の含有率が高い雄ほど、産仔数が減少した (Nakada et al., 2006)。

一方で、母親の生殖細胞にヘテロプラスミーが生じていた場合、様々な割合で変異型 mtDNA が子孫へ伝達される。特に病原変異型 mtDNA の母系遺伝により子孫に発症する先天的な疾患であるミトコンドリア病では、代表的な変異パターンが明らかにされ、*tRNA-Leu* 遺伝子領域の 3243 変異や *ND5* 遺伝子領域の 13153 変異は、Leigh 脳症やミトコンドリア脳筋症 (MELAS) を引き起こす (三牧, 2018)。近年、ミトコンドリア病の母系遺伝を防ぐための生殖補助医療の一つとして、核移植による細胞質置換が行われている。病原変異型 mtDNA を持たない健常な受精卵提供者の除核胚に、患者両親由来の受精卵の前核を移植することで、子孫は細胞質提供者の細胞質と患者両親由来の核を受け継ぐ。ミトコンドリア病の母系遺伝を防ぐには有用な手法だが、細胞質提供者の細胞質と核の適合性や、核移植時に核周辺にあるミトコンドリアの持ち込みが懸念されている。ヒト以外の哺乳類においても、クローン作出などを目的とした核移植が行われ、ドナー核と共にドナー由来 mtDNA が混入する事例が報告されている (Wang et al., 2014)。混入した mtDNA の複製様式は明らかになっておらず、移植時は微量であっても胚発生過程、あるいは成体となっていく過程でドナー由来 mtDNA の割合 (ヘテロプラスミー率) がどのように変化するかは予測できない。そこで、ミトコンドリア移植により人為的にヘテロプラスミー胚を誘起し胚発生能力や、ヘテロプラスミー率、子孫への mtDNA 伝達様式を明らかにする研究が行われている。

哺乳類のミトコンドリア移植では、マウス系統間 (NZB/BinJ-BALB/cByJ)、ウシ亜種間 (*Bos primigenius taurus*-*B. p. indicus*)、ウシ科異属間 (*Bubalus bubalis*-*Bos primigenius taurus*) でのミトコンドリア移植胚は産仔が誕生するが (Ferreira et al., 2010; Chiaratti et al., 2010; Jenuth et al., 1996)、マウスとウシの同綱異目間 (*Mus musculus*-*Bos primigenius taurus*) でのミトコンドリア移植では着床前に胚発生が停止する (Kawahara et al., 2015)。これらのことから、ヘテロプラスミーによる胚発生への影響が示された。

魚類では、キンギョの心臓、肝臓、精子からミトコンドリアを単離し、ゼブラフィッシュの初期胚に顕微注入したところ、孵化仔魚までキンギョ由来 mtDNA が残存することが示された (Peng et al., 2018)。しかし魚類においてミトコンドリアヘテロプラスミーが初期胚発生に与える影響に関する知見は未だ少なく、その他の組み合わせでは調査されていない。さらに魚類のミトコンドリア移植個体における異種 mtDNA の生殖能力への影響や子孫での伝達の有無も不明である。

本研究では、魚類が多数の卵を産出する点、卵内に mtDNA が大量に含まれる点 (Otten et al., 2016) に着目し、卵から単離したミトコンドリアの移植を試みた。本章では、ゼブラフィッシュ同種間、キンギョ-ゼブラフィッシュの異属間、ドジョウ-ゼブラフィッシュの異科間におけるミトコンドリア移植を行い、ヘテロプラスミー個体の胚発生能力の調査を目的とした。

材料・方法

供試魚

供試魚には北海道大学水産学部水槽センター（先端環境制御棟）で飼育しているゼブラフィッシュ *Danio rerio* [育種生物学講座（旧発生学遺伝学講座）の継代系統: ZFH] と B 系統ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* および、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター七飯淡水実験所で飼育しているゼブラフィッシュ（七飯淡水実験所の継代系統: ZFN）とキンギョ *Carassius auratus* を用いた。

排卵誘起

ゼブラフィッシュの排卵誘起は、室温 28.5°C、明期 14 時間、暗期 10 時間の条件下で飼育し、雌雄のペアリングにより行った。キンギョとドジョウの排卵誘起は、雌親魚に約 10–20 IU/g 体重のヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン (hCG; ゴナトロピン: あすか製薬) を腹腔内に注射して行った。ホルモン注射後、キンギョは水温約 20°C、ドジョウは水温約 26–28°C の水槽で 10–12 時間静置し、排卵を確認した。キンギョは七飯淡水実験所から分譲された排卵卵を使用した。

ミトコンドリアの単離

ミトコンドリア移植に用いるドナーのミトコンドリアはゼブラフィッシュ、キンギョおよびドジョウの排卵卵から単離した。採卵後の排卵卵は、媒精せずに加水し、賦活化した。賦活化卵を卵膜除去液 [0.1%トリプシン (DIFCO) と 0.4%尿素を含む淡水魚用リンゲル液 (7.5 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L CaCl₂)] で処理し、卵膜を除去した。卵膜除去した賦活化卵は淡水魚用リンゲル液で洗浄した後、ミトコンドリア単離に供した。ミトコンドリアの単離はミトコンドリア単離キット (KC010100, BIOCHAIN INSTITUTE INC.) を用い、添付のプロトコルを一部改変して行った。卵膜除去した賦活化卵 200 個を氷冷 PBS で満たしたガラスシャーレに入れ、PBS を入れ替えて 2 回洗浄した。未受精卵を 1x Mitochondria Isolation Buffer 1.5 mL、MitoTracker Green FM (M7514, Thermo Fisher Scientific) 1.5 μ L とともにスクリュウキャップチューブに入れ、ビーズクラッシャーを用いてホモジナイズした。ホモジナイズの過程で MitoTracker Green FM を添加することにより、ミトコンドリアを緑色蛍光染色した。ホモジェネートは氷上で 1.5 mL チューブに移し、4°C、600 $\times g$ で 10 分間卓上マイクロ冷却遠心機 (3520, MA-2024, KUBOTA 社製) を用いて遠心した（遠心①）。次に上清を新しいチューブに移し、4°C、12,000 $\times g$ で 15 分間遠心した（遠心②）。

上清を除去し、ペレットを 1x Mitochondria Isolation Buffer 500 μ L に溶解し、遠心①と遠心②を繰り返した。ペレットを 50 μ L の Mitochondria Storage Buffer に溶解し、遮光して冷蔵保存した。

顕微注入によるミトコンドリア移植

ミトコンドリア移植のホストとなるゼブラフィッシュ受精卵は、人工授精により作出し、卵膜除去液を用いて卵膜除去した。排卵卵から単離したミトコンドリアをおよそ 1-5 μ L、ゼブラフィッシュ 1 細胞期胚の胚盤下部に顕微注入することにより、ミトコンドリア移植を行った。ゼブラフィッシュの同種間ミトコンドリア移植では、ZFN をドナー、ZFH をホストに用いた。異種間ミトコンドリア移植では、キンギョあるいはドジョウをドナー、ゼブラフィッシュをホストとした。また、対照群として、人工授精後に卵膜除去のみを行い、ミトコンドリア移植を行わなかった群を卵膜除去群 [Injection (-)]とした。卵膜除去とミトコンドリア移植のどちらも行わなかった群を無処理群 (Intact) とした。移植実験は、異なるゼブラフィッシュの雌雄から得た受精卵をホストに用いて 3 回行った。

移植胚の胚発生能力の評価

ミトコンドリア移植群 [Injection (+)] と卵膜除去群、各 24-32 個体を 96 穴プレートで個別培養し、生残率と奇形率を算出した。無処理群は、シャーレで混合培養した。

移植胚におけるドナー由来ミトコンドリアの動態

MitoTracker Green FM により緑色蛍光標識されたドナー由来ミトコンドリアの動態を、蛍光顕微鏡 (MZ16F-RCFL, LEICA 社製) で経時的に観察した。

移植胚におけるドナー由来 mtDNA の調査

8 細胞期、胞胚期、囊胚期、尾芽胚期、体節形成期、孵化期の各胚発生段階におけるドナー由来 mtDNA の存否を調査した。ゼブラフィッシュの同種間移植では PCR-RFLP 法、異種間移植では種判別プライマーによる PCR を用いて調査した。使用したプライマーは Table 15 にまとめた。

PCR-RFLP によるゼブラフィッシュの系統判別

ゼブラフィッシュ ZFH と ZFN の mtDNA 調節領域に存在する多型を用いて、PCR-RFLP

により系統判別を行った。PCR は、KOD FX Neo (TOYOBO 社製) 0.4 μ L, Forward プライマー 0.6 μ L, Reverse プライマー 0.6 μ L, 2x Buffer for KOD FX Neo 10 μ L, 2 mM dNTPs 4 μ L, DDW 3.4 μ L, DNA 溶液 (25–100 ng/ μ L) 1.0 μ L を混合した合計 20 μ L の反応系で行った。プライマーは mtDNA 調節領域に隣接する、*tRNA-Pro* 領域に Forward プライマー、*tRNA-Phe* 領域に Reverse プライマーをそれぞれ設計した (Table 15)。ゼブラフィッシュの mtDNA の塩基配列情報は、NCBI に登録されている 7 つの系統 (NC002333, KT624622, KT624623, KT624624, KT624625, KT624626, KT624627) を参照した。PCR 反応条件は、Predenature 処理 94°C 2 分の後、熱変性 98°C 10 秒、アニーリング 62°C 30 秒、伸長反応 68°C 1 分を 1 サイクルとして 30 サイクルとした。その後、PCR 産物を制限酵素 *AfaI* を用いて 37°C で 12 時間処理し、1.5% アガロースゲルで電気泳動を行った。泳動後、エチジウムブロマイド染色を行い、トランスイルミネーターで DNA 断片を検出した。

制限酵素 *AfaI* の認識配列の違いから、ZFH ではおよそ 90 bp、130 bp、330 bp の PCR-RFLP 断片が得られ、ZFN ではおよそ 90 bp、130 bp、220 bp、330 bp の PCR-RFLP 断片が得られる。したがって 2 つの系統は、220 bp の断片の有無により判別可能である。

PCR によるゼブラフィッシュ、キンギョ、ドジョウの種判別

キンギョーゼブラフィッシュ間の種判別プライマーは、*atp6* 遺伝子領域に対して設計した。キンギョ mtDNA 塩基配列情報は、NCBI に登録されている NC_006580 を参照した。キンギョとゼブラフィッシュ共通の塩基配列に対して Reverse プライマー (*atp6_CR*)、キンギョとゼブラフィッシュで異なる塩基配列に対して、キンギョ特異的な Forward プライマー (*CAA_atp6_F*) とゼブラフィッシュ特異的な Forward プライマー (*DR_atp6_R*) を設計した (Table 15)。PCR は、KOD FX Neo を用いた上述の 20 μ L 反応系と同様の組成で行った。PCR 反応条件は、Predenature 処理 94°C 2 分の後、熱変性 98°C 10 秒、アニーリング 61°C 30 秒、伸長反応 68°C 15 秒を 1 サイクルとして 30 サイクルとした。

B 系統ドジョウーゼブラフィッシュ間の種判別プライマーは、*ND5* 遺伝子領域に対して設計した。ドジョウ mtDNA 塩基配列情報は、NCBI に登録されている KC_509900 を参照した。ドジョウとゼブラフィッシュで異なる塩基配列に対して、ドジョウ特異的な Forward プライマー (*MA_ND5_F*) と Reverse プライマー (*MA_ND5_R*)、ゼブラフィッシュ特異的な Forward プライマー (*DR_ND5_F*) と Reverse プライマー (*DR_ND5_R*) を設計した (Table 15)。PCR は、KOD FX Neo を用いた上述の 20 μ L 反応系と同様の組成で行った。PCR 反応条件は、Predenature 処理 94°C 2 分の後、熱変性 98°C 10 秒、アニーリング 60°C 30 秒、伸長反応 68°C 10 秒を 1 サイクルとして 32 サイクルとした。

PCR 産物は 1.5% アガロースゲルで電気泳動を行った。泳動後、エチジウムブロマイド染色を行い、トランスイルミネーターで DNA 断片を検出した。

統計解析

同種間、異属間、異科間のミトコンドリア移植群と、対照の無処理群、卵膜除去群において、受精 72 時間後の生残率は、Kruskal-Wallis 検定の後、Scheffe の方法を用いて多重比較を行った。有意水準は 5%とした。また、受精 72 時間後の奇形率は、ミトコンドリア移植群と卵膜除去群間において、Student の t 検定により平均値の差の検定を行った。有意水準は 5%とした。

ミトコンドリア移植に用いるドナー種の違いによる胚発生能力への影響の調査では、相対生残率と相対正常胚率は、Kruskal-Wallis 検定の後、Scheffe の方法を用いて多重比較を行った。有意水準は 5%とした。

結果

ミトコンドリア移植胚の胚発生能力

移植実験のホストに用いたゼブラフィッシュ卵では、受精率（平均値±標準偏差）が同種間移植（実験1）では $76.1 \pm 21.3\%$ 、キンギョとゼブラフィッシュの異属間移植（実験2）では $87.8 \pm 7.4\%$ 、ドジョウとゼブラフィッシュの異科間移植（実験3）では $89.8 \pm 4.5\%$ であった（Table 16）。移植実験1-3で用いた無処理群の受精72時間後における生残率は、実験1では $76.1 \pm 8.0\%$ 、実験2では $89.9 \pm 2.6\%$ 、実験3では $93.9 \pm 4.1\%$ であり、実験1と実験2の間、および実験1と実験3の間に有意差があった（Kruskal-Wallis test と Scheffe's test、 $P < 0.05$ ）。したがって移植実験1のホストとして用いたゼブラフィッシュの卵質は、実験2、実験3で用いた卵よりも低質だった。

同種間移植におけるミトコンドリア移植群の受精72時間後の生残率は $50.0 \pm 36.3\%$ であり、無処理群（ $76.1 \pm 8.0\%$ ）、卵膜除去群（ $93.1 \pm 4.8\%$ ）よりも低下したが、有意差はなかった。移植群の奇形率は $19.9 \pm 4.4\%$ であり、卵膜除去群の $4.3 \pm 7.5\%$ よりも有意に高かった。異属間移植におけるキンギョミトコンドリア移植群の受精72時間後の生残率は $81.3 \pm 8.3\%$ であり、無処理群（ $89.9 \pm 2.6\%$ ）、卵膜除去群（ $83.3 \pm 7.9\%$ ）よりも低下したが、有意差はなかった。移植群の奇形率は $11.1 \pm 6.8\%$ であり、卵膜除去群の $5.7 \pm 10.0\%$ よりも高い値であったが、有意差はなかった。異科間移植におけるドジョウミトコンドリア移植群の受精72時間後の生残率は $78.1 \pm 27.1\%$ であり、無処理群（ $93.9 \pm 4.1\%$ ）、卵膜除去群（ $88.5 \pm 19.8\%$ ）よりも低下したが、有意差はなかった。また、移植群の奇形率は $28.9 \pm 7.7\%$ であり、卵膜除去群の $7.9 \pm 7.3\%$ よりも有意に高かった。このように、実験1-3それぞれにおいて、ミトコンドリア移植群の生残率が対照の卵膜除去群に対して低下し、奇形胚の割合が上昇した。

同種間、異属間、異科間のミトコンドリア移植胚の胚発生能力を比較するため、無処理群に対する相対生残率と、卵膜除去群に対する相対正常胚率を算出した（Table 17）。各移植群の相対生残率は、同種間では 0.67 ± 0.50 、異属間では 0.90 ± 0.07 、異科間では 0.82 ± 0.26 であり、有意な差はなかった。また各移植群の相対正常率は同種間では 0.84 ± 0.11 、異属間では 0.95 ± 0.05 、異科間では 0.77 ± 0.33 であり、同様に有意差はなかった。

移植胚におけるドナー由来ミトコンドリアの動態

移植胚におけるドナー由来ミトコンドリアの動態を、MitoTracker による緑色蛍光を指標として観察した。ミトコンドリア移植直後にあたる8-32細胞期の移植胚では、ドナー由来ミトコンドリアを示す蛍光シグナルは顕微注入した胚盤下部に集まっていた（Fig. 6A1, B1,

C1)。中でも同種間移植胚では、胚盤下部底面に沿うような蛍光シグナルの広がりがあるが他の異種間移植胚よりも顕著に見られた (Fig. 6A1)。胞胚期に達した移植胚においても、蛍光シグナルは顕微注入を行った領域の周辺にとどまった (Fig. 6A2, B2, C2)。エピボリーを開始した囊胚形成期の移植胚では、胚盤表層付近の細胞にも蛍光シグナルが観察された (Fig. 6A3, B3, C3)。100%エピボリー期から尾芽胚期では胚細胞が多く存在する胚軸に沿って蛍光シグナルが観察され、強いシグナルが維持されていた (Fig. 6A4, B4, C4)。体節形成期の移植胚では頭部から尾部までシグナルの存在を確認できたが、同種間移植胚の明瞭なシグナルに比べて異属間および異科間の移植胚ではシグナルが弱くなっていた (Fig. 6A5, B5, C5)。孵化期に達した移植胚では、同種間移植の奇形胚において眼に強いシグナルが観察されたが (Fig. 6A6)、その他の移植胚は胚全体に弱い蛍光と卵黄周辺にシグナルの局在が見られた (Fig. 6A6, B6, C6)。蛍光を有する移植胚においても、対照の卵膜除去胚と同様の胚発生過程を経て、正常な孵化胚まで発生が進行した個体が存在した (Fig. 6A6, B6, C6)。また、卵膜除去群では、蛍光シグナルを有する胚はなかった (Fig. 6D1–D6)。

ドナー由来 mtDNA の存否

ミトコンドリア移植胚の 8 細胞期、胞胚期、囊胚期、尾芽胚期、体節形成期、孵化期の各胚発生段階におけるドナー由来 mtDNA の存否を調査した。8 細胞期から体節形成期までは各 6 個体、孵化期では生残率調査用に 96 穴プレート個別培養した胚のうち生残胚すべてを個体毎に解析した。

同種間移植におけるミトコンドリア移植胚では、移植直後の 8 細胞期から孵化期までのすべての胚発生段階で、ドナーである ZFN 由来 mtDNA の PCR-RFLP 断片は検出されなかった (Fig. 7)。

異属間移植におけるキンギョミトコンドリア移植胚では、移植直後の 8 細胞期から孵化期までのすべての胚発生段階で、キンギョ mtDNA 特異的な増幅を検出した (Fig. 8)。これらの移植胚ではゼブラフィッシュ mtDNA に特異的な増幅も見られ、2 種の mtDNA を併せてもつことが確認された。孵化期胚では、3 回の移植実験で生残した合計 78 個体中 75 個体でキンギョとゼブラフィッシュ両方の mtDNA が検出されたが、残りの 3 個体ではゼブラフィッシュ mtDNA に特異的な増幅のみが見られた。

異科間移植におけるドジョウミトコンドリア移植胚も同様に、移植直後の 8 細胞期から孵化期までのすべての胚発生段階で、ドジョウとゼブラフィッシュ両方の mtDNA の増幅を検出した (Fig. 9)。孵化期胚では、3 回の移植実験で生残した合計 74 個体すべてでドジョウとゼブラフィッシュ両方の mtDNA が検出された。しかしドジョウ mtDNA 検出において、尾芽胚期以降から孵化期のサンプルでは、どの生存胚も電気泳動像におけるバンドが薄くなり、それに加えて高分子のラダー状の増幅産物が見られた。

考察

ミトコンドリア移植胚の胚発生能力

本研究ではゼブラフィッシュ、キンギョ、ドジョウのミトコンドリアをドナーとして、ゼブラフィッシュ受精胚への移植を行ったところ、すべての組み合わせで移植群の生残率が対照の卵膜除去群および無処理群よりも低い傾向があったが、有意な生残率の低下はなかった。3つの移植群の奇形率をそれぞれ対照の卵膜除去群と比較すると、ゼブラフィッシュ同種間移植、およびドジョウミトコンドリアをドナーとした異科間移植では奇形率は有意に上昇し、キンギョミトコンドリアをドナーとした異属間移植でも有意差はないが奇形率が上昇する傾向がみられた。哺乳類では、加齢による卵子の機能低下が疑われる不妊症患者に対し、若年ドナーのミトコンドリアを含む卵細胞質を移植することで妊娠率が回復した事例がある (Cohen et al., 1999)。しかし本研究ではゼブラフィッシュ同種間のミトコンドリア移植であっても、胚発生能力が向上することはなかった。また、移植群の対照群に対する相対生残率と相対正常率を算出することで、ドナーの違いによる移植群の胚発生能力を比較した。しかし3つの移植群間に有意な差はなく、同種間、異属間、異科間の組み合わせではミトコンドリア移植のドナーに用いる種による胚発生能力の違いは認められなかった。

魚類のミトコンドリア移植ではキンギョの肝臓、心臓および精子から単離したミトコンドリアをゼブラフィッシュ1細胞期胚へ移植した例がある (Peng et al., 2018)。このときの相対生残率は 0.46–0.63、相対正常率は 0.97–0.99 であり、相対生残率は本研究 (0.90) より低く、相対正常率は本研究 (0.95) と同程度だった。キンギョをドナー、ゼブラフィッシュを宿主とした同じ組み合わせのミトコンドリア移植だが、相対生残率に差が生じたため、その原因について実験手法の違いから考察する。本研究との実験手法の違いとして、Peng et al., (2018) では卵膜を除去せずに行っている点、排卵卵ではなく肝臓などから単離したミトコンドリアを使用している点がある。卵膜除去を行わずに移植胚を培養することは、胚が保護されるため生残率低下の原因とは考えにくい。したがって移植に用いるミトコンドリアをどこから調整するかによって、移植後の生残率に影響する可能性がある。特に母系生殖系列の細胞である卵由来のミトコンドリアを使用することによりミトコンドリア移植胚の生残率を高く維持できる可能性がある。

哺乳類のミトコンドリア移植においても卵由来のミトコンドリアが移植に用いられている。スイギュウミトコンドリアをドナー、ウシを宿主に用いた異属間移植の場合では、胚盤胞期までの相対生残率 (胚発生率) は 0.82 であり、ミトコンドリア移植胚から産仔が得られた (Chiaratti et al., 2010)。一方で、発生遅延などの異常が観察され産仔が得られない、ドナーにウシミトコンドリア、宿主にマウスを用いた異日間移植の組み合わせでは、胚盤胞期までの相対胚発生率は 0.28 であり、マウス同種間のミトコンドリア移植群 (0.99) よ

りも胚発生率が有意に低下した (Kawahara et al., 2015)。

魚類においてもさらに遠縁種をドナーに用いた場合は、発生停止や発生遅延が生じる可能性がある。魚類ではミトコンドリア移植の実施例が少ないため、さらなる研究が必要である。

移植胚におけるドナー由来ミトコンドリアの動態

移植後ドナー由来ミトコンドリアを示す蛍光シグナルは顕微注入した領域の周辺にとどまった。また囊胚形成から尾芽胚期にかけての移植胚の観察から、ドナー由来ミトコンドリアの蛍光シグナルは、すべての細胞に存在しているわけではないことがわかった。したがって本実験のミトコンドリア移植により誘起したヘテロプラスミー胚は、ヘテロプラスミーの細胞をモザイク状に有している胚、という表現が適している。さらなる組織学的解析や共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析を行うことで、移植胚におけるドナーミトコンドリアの分布を詳細に解析する必要がある。ミトコンドリアは分裂と融合を繰り返していることが知られている (石原, 2010)。そのため、外部から移植したミトコンドリアと内在性のミトコンドリアが融合し、そのまま細胞内に残存する可能性も考えられる。すなわち、本実験で用いた Mito Tracker Green FM はミトコンドリア二重膜を染色しているが、この染色された二重膜が観察できなくても、内在性のミトコンドリアにドナー由来 mtDNA のみを取り込まれて残存している可能性がある。

ゼブラフィッシュ同種間のミトコンドリア移植では、孵化期までのすべての胚発生段階で蛍光シグナルが観察されたが、PCR-RFLP では mtDNA が検出されなかった。一方でマウスの系統間ヘテロプラスミー胚では PCR-RFLP によりヘテロプラスミーを検出した事例がある (Shitara et al., 2017)。しかし、ドナー種の mtDNA が 20%以下の混入率である場合は明瞭な PCR-RFLP 断片が検出されておらず、本研究においてもホストの mtDNA 量に対してドナーmtDNA 量が少なかったため検出できなかった可能性がある。同種間移植におけるドナーmtDNA の検出力を高めるため、異属間および異科間のヘテロプラスミーの検出に用いたような種特異的な増幅が得られるプライマーを、ゼブラフィッシュ系統特異的に設計する必要がある。また、食品検査機関などでは mtDNA を標的とする TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR により、わずかな DNA の混入を検出する方法が開発された (鈴木ら, 2010)。このように 1 塩基多型を検出するリアルタイム PCR による解析系を構築することも検出力向上につながると考えられる。

キンギョおよびドジョウのミトコンドリアをドナーに用いた、異属間、異科間移植では、MitoTracker による観察と種判別プライマーを用いた PCR の併用により、移植胚の胚発生がヘテロプラスミーの状態で行進したことを確認した。しかしドジョウを用いた異科間のミトコンドリア移植胚では、PCR 後の電気泳動像において尾芽胚期以降のドジョウ mtDNA の残存を示すバンドが薄くなっており、ドジョウ mtDNA の分解が始まっている可能性が

示された。一方でキンギョでは孵化期の移植胚においてもキンギョ mtDNA の残存を示すバンドが明瞭であったため、ゼブラフィッシュにより近縁のキンギョ mtDNA はゼブラフィッシュ細胞質内に維持されたと考えられる。肝臓、心臓、精子から単離したミトコンドリアを用いたキンギョーゼブラフィッシュ間のミトコンドリア移植においても、キンギョ mtDNA は孵化期まで残存することが種特異的プライマーを用いた PCR によって確認された (Peng et al., 2018)。さらにキンギョ mtDNA 由来の転写産物も孵化期まで検出されたことから、移植されたミトコンドリアは機能的であることが示された (Peng et al., 2018)。

哺乳類では、マウス系統間 (Jenuth et al., 1996)、ウシ亜種間 (Ferreira et al., 2010)、スイギュウとウシの異属間 (Chiaratti et al., 2010) でのミトコンドリア移植が行われ、いずれの組み合わせからも正常な産仔が得られた。系統間および亜種間移植の子孫では成体においてもドナー由来 mtDNA が検出されヘテロプラスミーの状態となっていたが、異属間移植胚のドナーmtDNA は胚盤胞期以降検出されておらず、核と細胞質の不適合性によりドナーミトコンドリアが排除されたと考えられている。また、ウシ属の *Bos primigenius taurus* とアジアスイギュウ属の *Bubalus bubalis* の交雑では、胚発生が進行するものの生残個体は得られていないことから、ウシ核とスイギュウ細胞質の不適合性の存在が示唆されている (Kochhar et al., 2002; 石原, 2015)。本研究では、哺乳類よりも胚発生速度が速い魚類を用いているため、異属間、異科間移植の孵化期胚においてもドナーmtDNA が残存したが、その後移植個体が成魚に至る過程でドナーミトコンドリアの排除が進む可能性がある。

これらの哺乳類のミトコンドリア移植は、過排卵処理で得られた卵のミトコンドリアが用いられている。魚類でもゼブラフィッシュやキンギョ、ドジョウのように排卵誘起法が確立している種では、未受精卵からのミトコンドリア単離を行うことによって、ドナー個体を殺さずに移植に用いるミトコンドリアを調整できる方法となりうる。

第3章 ドジョウ卵を用いた核－細胞質雑種誘起と卵形成の解析

緒言

ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* は、同種内に倍数性変異や特殊な生殖様式を生じていることから、脊椎動物における配偶子形成や減数分裂機構など、生殖特性研究のモデルとして期待されている（荒井, 2009; Arai and Fujimoto, 2013）。倍数体の生殖特性解明にむけ、種間交雑や染色体操作による人為的な倍数体作出もさかんに行われており、ドジョウでは人為雌性発生（Suzuki et al., 1985）や人為雄性発生（Fujimoto et al., 2007）の技術が確立されている。また、倍数体や系統によって変化する多様な生殖様式を遺伝学的に明らかにすることを目的とし、マイクロサテライトマーカーの開発が行われ、連鎖地図が作成された（Morishima et al., 2008b）。

日本国内のドジョウは遺伝的に大きく分岐した2つの集団であるA系統とB系統から構成されることが、mtDNAの調節領域（Morishima et al., 2008a）や核遺伝子である *RAG1* 遺伝子や *IRBP2* 遺伝子の分子系統解析により明らかになった（Yamada et al., 2015）。そして、細胞質の mtDNA と核の DNA マーカーを用いた系統判別法も開発された（Fujimoto et al., 2017）。

また、北海道や石川県の集団の一部の個体において、二倍体でありながら子孫が母親と同一の遺伝子型をもつクローン系統の存在が発見された（Morishima et al., 2002, 2008a）。前述の mtDNA の分子系統解析より、このクローン系統のハプロタイプはA系統のクレードに属することや（Morishima et al., 2008a）、核ゲノムの *RAG1* 遺伝子と *IRBP2* 遺伝子の解析からはA系統とB系統のそれぞれのクレードに属すハプロタイプが検出された（Yamada et al., 2015）。さらに、細胞遺伝学的解析においても、B系統に特異的なプローブにより全染色体の半数が検出されたことからクローン系統の核ゲノムはA系統とB系統のゲノムを1セットずつ持ちあわせることが明らかとなった（Kuroda et al., 2018）。これらの結果から、クローン系統は過去にA系統の雌とB系統の雄との交雑に起源し、現在でもクローン系統が誕生した時代に生息した祖先型のA系統 mtDNA を引き継いでいると考えられている（Morishima et al., 2008a）。

このクローン系統は、野生集団においては自然雌性発生により再生産している。すなわち、自然雌性発生では、クローン系統の雌は二倍性の非還元卵を産出し、同所的に生息する野生型雄の精子の刺激のみで個体発生が生じる。この非還元卵の形成では、減数分裂前に染色体が倍加し（減数分裂前核内分裂）、その後、複製を経て通常の減数分裂を行うことにより非還元二倍性卵を産生する（Itono et al., 2006）。このクローン系統が産する非還元卵は、第一減数分裂の際に倍加により生じた姉妹染色体間での対合が行われ、たとえ組換えが生じた

としても同じ染色体エレメントの交換であるため、卵のクローン性は担保されることが、二価染色体における系統特異的なプローブを用いた FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) 解析から細胞遺伝学的にも明らかとなった (Kuroda et al., 2018)。また、クローン系統は、メチルテストステロン処理により雄への性転換も可能であり、性転換した雄個体も同様に非還元二倍性精子を産出する (Yoshikawa et al., 2007)。しかしながら、クローンドジョウ非還元配偶子形成において、精原細胞での倍加が示唆されているが (Yoshikawa et al., 2009)、倍加を引き起こすメカニズムは明らかにされていない。

性転換クローンドジョウの二倍性精子は受精能をもつことから、染色体操作技術を用いて様々なゲノム構成、倍数性をもつドジョウ作出が可能となり、それらの胚発生能力や生殖特性の研究が期待される (Yoshikawa et al., 2008)。雄性発生に二倍性精子を用いることで、卵核の遺伝的不活性化と媒精のみで雄性発生二倍体を作成できる。クローン系統に由来する二倍体－三倍体モザイク個体 (Morishima et al., 2004)、四倍体由来の精子 (Fujimoto et al., 2010b) や、凍結保存された二倍性精子 (Yasui et al., 2010) で雄性発生が試みられ、正常な雄性発生二倍体が得られている。しかし、この雄性発生二倍体の生殖能力については調査されていない。

本研究では、クローンドジョウが配偶子へ遺伝的に同一のゲノムを受け継ぐ点に着目し、性転換クローンドジョウの遺伝的に均一な二倍性精子と、雄性発生法を組み合わせることによって、核ゲノムはクローン由来でありながら、細胞質が異系統由来の個体の作出を試みた。これはクローンの核と、異系統の細胞質を併せ持つため、遺伝的には遠縁な異系統間の核－細胞質雑種と考えることができる。この手法で作出した核－細胞質雑種では、核ゲノムのクローン性は維持されるため、細胞質が異系統由来の細胞質に置き換わったことによる影響のみを調査することができる。

本章では、生存性の核－細胞質雑種の誘起と生殖能力の調査のため、クローンドジョウ二倍性精子と B 系統ドジョウ卵を用いた異系統間での雄性発生を行った。さらに得られたクローン系統核－B 系統細胞質雑種、すなわちクローンドジョウの細胞質 (ミトコンドリア) を B 系統ドジョウの細胞質へ置換した個体が産出する卵の特性を解析した。

材料・方法

供試魚

ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* の A 系統雄（網走由来）、B 系統の雌雄（七飯町由来の B1 系統）、性転換クローン雄個体およびクローン系統核-B 系統細胞質雑種雌個体を用いた。また、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* とパールダニオ *Danio albolineatus*、キンギョ *Carassius auratus* の雄個体を用いた。

排卵誘起

ドジョウの排卵誘起は第 2 章と同様に行った。

卵核の遺伝的不活性化

ドジョウ卵の卵核の遺伝的不活性化は、第 1 章と同様の方法で行った。ドジョウの未受精卵はサクラマス精漿または Hank's 液 + 0.5% BSA 中で保存した。紫外線は 1.0 mW/cm^2 の強度で照射するように設定し、ドジョウ卵では 150 秒間、すなわち 150 mJ/cm^2 の照射を行った（Fujimoto et al., 2007）。

B 系統ドジョウを細胞質提供種とした核-細胞質雑種の誘起

系統間の核-細胞質雑種は異種間雄性発生法を用いて誘起した。B 系統ドジョウを細胞質提供種として使用し、紫外線照射により遺伝的に不活性化した B 系統ドジョウ卵に、異系統精子（半数性精子として A 系統ドジョウ、二倍性精子として性転換クローン系統ドジョウ）を媒精し、核-細胞質雑種を誘起した。また、対照群として B 系統ドジョウ通常受精群、B×A 雑种群、B×クローン雑种群およびドジョウ B 系統間雄性発生群を作出した。作出した全実験群は Table 18 にまとめた。

胚発生過程における外部形態の観察

実体顕微鏡（MZ16F-RCFL, LEICA 社製）を用いて、胚発生過程の外部形態を観察した。各実験群は 18°C で孵化まで培養し、発生段階は Fujimoto et al. (2006) に従った。

クローン系統核-B 系統細胞質雑種由来の卵を用いた人工授精

クローン系統核-B 系統細胞質雑種の雌 2 個体から採卵後、遺伝的に不活性化したキンギョ精子を用いて雌性発生を誘起した。キンギョ精子核の遺伝的不活性化は、Fujimoto et al. (2010a) に従い、50 mJ/cm²の紫外線照射により行った。雌性発生のための UV キンギョ精子群に加え、UV 照射していないキンギョ精子、A 系統ドジョウ、または B 系統ドジョウ、ゼブラフィッシュ、パールダニオ精子を媒精した実験群を合わせて計 6 群を作出した。

卵径の測定

人工受精 15 分後、1 細胞期に達する前の卵径を調査した。受精 15 分後に実体顕微鏡下で受精卵を撮影し、Image J を用いて卵の直径を算出した。

フローサイトメトリーによる相対 DNA 量の測定

第 1 章と同様に行った。

RAG1 遺伝子の PCR-RFLP

PCR は、Quick Taq HS DyeMix 10 μ L, Forward プライマー 0.4 μ L, Reverse プライマー 0.4 μ L, DDW 8.2 μ L, DNA 溶液 (25–100 ng/ μ L) 1.0 μ L を混合した合計 20 μ L の反応系で行った。プライマーは Fujimoto et al. (2017) より、RAG1-M.aF と RAG1-M.aR を用いた (Table 19)。PCR 反応条件は、Predenature 処理 94°C 2 分の後、熱変性 94°C 30 秒、アニーリング 60°C 30 秒、伸長反応 68°C 1 分を 1 サイクルとして 35 サイクルとした。その後、PCR 産物を制限酵素 *Pvu*II を用いて 37°C で 12 時間処理し、1.5% アガロースゲルで電気泳動を行った。泳動後、エチジウムブロマイド染色を行い、トランスイルミネーターで DNA 断片を検出した。

マイクロサテライトマーカー解析

卵がもつゲノム構成の調査のため、Morishima et al. (2001) により開発されたマイクロサテライトマーカー *Mac2*, *Mac3*, *Mac24*, *Mac37*, *Mac45* の 5 つの遺伝子座を用いて、クローンドジョウ核-B 系統ドジョウ細胞質雑種の子孫の遺伝解析を行った。各遺伝子座の増幅に使用したプライマーは Table 19 にまとめた。PCR は、Quick Taq HS DyeMix 10 μ L, Forward プライマー 0.2 μ L, Reverse プライマー 0.2 μ L, DDW 8.6 μ L, DNA 溶液 (25–100 ng/ μ L) 1.0 μ L を混合した合計 20 μ L の反応系で行った。PCR 反応条件は、

Pre-denaturation 処理 94°C 2 分の後、熱変性 94°C 30 秒、アニーリング 54°C または 60°C 30 秒、伸長反応 68°C 1 分を 1 サイクルとして 35 サイクルとした。その後、PCR 産物 4 μ L と Dilution Buffer 1x TE 20 μ L を混合し、フラグメントアナライザーを用いて電気泳動を行った。電気泳動像は PRO Size 2.0 を用いて解析し、各サンプルのアレルサイズを決定した。

結果

B 系統ドジョウを細胞質提供種とする系統間核一細胞質雑種の胚発生能力

卵核を遺伝的に不活性化した B 系統ドジョウ卵に、A 系統ドジョウ半数性精子を媒精した「A 系統半数性核-B 系統細胞質雑種（以下、UVB×A）」およびクローン系統ドジョウ二倍性精子を媒精した「クローン系統二倍性核-B 系統細胞質雑種（以下、UVB×クローン）」を誘起した。対照群として B 系統ドジョウ通常受精群（B 系統卵×B 系統精子、以下 B×B）、B×A 雑種群（B 系統卵×A 系統精子、以下、B×A）、B×クローン雑種群（B 系統卵×クローン系統ドジョウ二倍性精子、以下、B×クローン）およびドジョウ B 系統間雄性発生半数体群（UV 照射 B 系統卵×B 系統精子、以下、UVB×B）を作出した。

受精 8 時間後、対照の B×B 群、B×A 群、B×クローン群では Sphere 期まで胚発生が進行していたが（Fig. 10A1, B1, C1）、雄性発生により作出した UVB×B 群、UVB×A 群、UVB×クローン群では sphere 期以前の 1000 細胞期から oblong 期であり、胚発生に遅れが生じた（Fig. 10D1, E1, F1）。受精 24 時間後においても、対照の B×B 群、B×A 群、B×クローン群はいずれも 100% エピボリー期から 2 体節期であり、胚発生段階に差はなかった（Fig. 10A2, B2, C2）。一方、受精 24 時間後の UVB×B 群と UVB×A 群では、70-90% エピボリー期であり、エピボリーが完了していなかった（Fig. 10D2, E2）。UVB×クローン群ではさらに発生遅延が見られ、50-70% エピボリー期であった（Fig. 10F2）。受精 36 時間後、B×B 群、B×A 群、B×クローン群は 12-14 体節期まで胚発生が進み、対照の 3 群間に差は生じなかった（Fig. 10A3, B3, C3）。さらに受精 24 時間後までは最も胚発生が遅れていた UVB×クローン群も受精 36 時間後には 10-12 体節期となり、発生遅延の回復が見られた（Fig. 10F3）。一方、UVB×B 群と UVB×A 群では 10 体節期程度であり、体節構造や眼の形態異常が観察された（Fig. 10D3, E3）。受精 48 時間後の UVB×クローン群は、対照の B×B 通常受精群、B×A 雑種群、B×クローン雑種群と同様に尾部方向への正常な卵黄伸長が観察された（Fig. 10A4, B4, C4, F4）。しかし UVB×B 群と UVB×A 群では卵黄伸長は短かった（Fig. 10D4, E4）。受精 96 時間後の孵化胚では、B×B 通常受精群と同様に、B×A 雑種群、B×クローン雑種群、UVB×クローン群で正常孵化胚が得られた（Fig. 10A5, B5, C5, F5）。UVB×B 群と UVB×A 群では、B×B 通常受精群よりも体軸が短く、血腫が観察された（Fig. 10D5, E5）。さらに UVB×A 群では、UVB×B 群よりも大きな水腫が観察され、眼の形成不全も悪化した。

各実験群作出における胚発生成績を Table 20 に示した。受精率は、B×B 群では 56.6%、B×A 群では 63.2%、UVB×B 群では 20.3%、UVB×A 群では 34.6%であった。B×クローン群では 0.1%（1/757）、UVB×クローン群では 0.4%（3/836）であり、クローン系統ドジョウ二倍性精子を用いた群の受精率は低かった。しかしこれらのクローン精子を用いた

群では、受精した胚のほとんどは胚発生過程で死亡することなく生残し、受精 96 時間後の生残率は、B×クローン雑種群では 100% (1 / 1)、UVB×クローン群では 66.7% (2 / 3) であった。そしてそれらの生残胚は正常な外部形態であった。二倍体の対照群である B×B 群の生残率、正常率は、86.0%、89.2%であり、B×A 群の 83.3%、90.0%と同様の値だった。半数性の核-細胞質雑種である UVB×A 群の生残率は 79.0%であり、対照の UVB×B 群の 78.6%と差はなかった。また、これらの 2 群の生残胚はすべて奇形であった。

各実験群の生残胚の一部を用いてフローサイトメトリーによる倍数性解析を行い、子孫の倍数性を調査した。B×B 群と B×A 群では調査した 12 個体すべてが二倍体であった (Table 20)。また、UVB×B 群の 11 個体と UVB×A 群 12 個体はすべて半数体であり、雄性発生における卵核の遺伝的不活性化が確実に行われたことを確認した。クローン系統ドジョウ二倍性精子を用いた、B×クローン群は三倍体、UVB×クローン群は二倍体であり、二倍性精子により発生胚が生じたことを確認した。

卵径測定

クローン系統核-B 系統細胞質雑種 (UVB×クローン) の雌から得た卵を用いて、雌性発生および人工授精を行ったところ、大きさの異なる卵が観察された (Fig. 11)。

すべての受精卵は直径 0.70–1.00 mm であり、雌 No.1、雌 No.2 どちらの個体も直径 0.90 mm 以上 0.95 mm 未満の卵をもっとも多く産出していた (Fig. 12)。雌 No.1 では 16.4 % (21/128)、雌 No.2 では 25.8 % (24/93) の割合で小卵が存在した。これらの小卵は直径 0.71–0.81 mm であった。すなわち、クローン系統核-B 系統細胞質雑種が産出する卵では、卵径に 2 型が見られたと結論づけられる。

核-細胞質雑種卵の胚発生能力

各実験群の受精率と受精後 96 時間後における生残率を Table 21 にまとめた。クローン系統核-B 系統細胞質雑種雌 No.1 の卵を用いた際の受精率は 23.6–50.0%であり、B 系統ドジョウ精子の受精で最も高かった。また雌 No.1 の子孫の受精 96 時間後における生残率は、A 系統ドジョウを媒精した群で最も高く (34.1%)、UV キンギョ精子を媒精した雌性発生群で最も低かった (14.3%)。系統間核-細胞質雑種雌 No.2 の卵を用いた際の受精率は 16.1–30.1%であり、キンギョ精子を媒精した群で最も高かった。また雌 No.2 の子孫の受精 96 時間後における生残率は、キンギョ精子を媒精した群で最も高く (32.5%)、UV キンギョ精子を媒精した雌性発生群で最も低かった (6.3%)。

また、UV キンギョ精子で受精した雌性発生群、A 系統ドジョウおよび B 系統ドジョウ精子を媒精した実験群における胚発生過程を観察した (Fig. 13)。20℃条件下で培養したところ、受精 12 時間後ではいずれの群の大卵小卵ともに 50–70%エピボリー期 (Fig. 13A1, B1,

C1)、受精 32 時間後では体節形成期まで胚発生が進行した (Fig. 13A2, B2, C2)。受精 60 時間後では、孵化は迎えなかったが、UV キンギョ精子を媒精した雌性発生群の小卵を除いて、仔魚の形態を示していた (Fig. 13A3, B3, C3)。しかし、雌性発生群の小卵では体節形成期と同様の形態を示した (Fig. 13A3)。

核－細胞質雑種子孫の倍数性解析

受精 96 時間後の生残胚における、フローサイトメトリーによる倍数性解析の結果を Table 22 に示した。卵径に 2 型が見られたため、大卵由来の子孫と小卵由来の子孫を分けて倍数性解析を行った。

大卵に UV キンギョ精子 (0C) を媒精して誘起した雌性発生群では、12 個体中 11 個体が二倍体 (2C) であり、残り 1 個体は四倍体 (4C) であった。大卵にキンギョ精子 (1.4C) を媒精した群では、23 個体中 7 個体が二倍体 (2C)、8 個体 (34.8%) がキンギョ精子核を取り込んだ三倍体 (3.4C) であった。しかしそれらに加えて、1 個体の四倍体 (4C) と、4 個体の五倍体 (5.4C)、3 個体の 2C-3.4C モザイクが検出された。このうち精子核が胚発生に関与したのは三倍体、五倍体、モザイクを含めると 65.2%だった。大卵に A 系統ドジョウ精子 (1C) を媒精した群では、24 個体中 6 個体の二倍体 (2C)、5 個体 (20.8%) の三倍体 (3C)、13 個体の 2C-3C モザイクが検出された。三倍体とモザイク個体を合わせた精子核関与率は 75.0%だった。大卵に B 系統ドジョウ精子 (1C) を媒精した群では、28 個体中 8 個体の二倍体 (2C)、5 個体 (17.9%) の三倍体 (3C)、2 個体の四倍体 (4C)、13 個体の 2C-3C モザイクが検出された。三倍体とモザイク個体を合わせた精子核関与率は 64.3%だった。大卵にゼブラフィッシュ精子 (1.2C) を媒精した群では、5 個体中 5 個体すべてが、ゼブラフィッシュ精子核を取り込んだ三倍体 (3.2C) であり、精子核は胚発生に関与した。大卵にパールダニオ精子 (1.2C) を媒精した群では、18 個体中 13 個体 (72.2%) でパールダニオ精子核を取り込んだ三倍体 (3.2C) のほか、2 個体の五倍体 (5.2C)、1 個体の 3.5C-4.5C モザイクが検出され、2 個体は倍数性を判定できなかった。精子核が胚発生に関与したのは 83.3%であった。

小卵に UV キンギョ精子 (0C) を媒精して誘起した雌性発生群では、2 個体中 2 個体が半数体 (1C) であった。小卵にキンギョ精子 (1.4C) を媒精した群では、13 個体中 10 個体がキンギョ精子核を取り込んだ二倍体 (2.4C) であり、三倍体 (3.4C) と 1C-2.4C モザイクが 1 個体ずつ検出された。小卵に A 系統ドジョウ精子 (1C) を媒精した群では、6 個体中 1 個体の半数体 (1C)、1 個体の二倍体 (2C)、4 個体の 1C-2C モザイクが検出された。大卵に B 系統ドジョウ精子 (1C) を媒精した群では、9 個体中 1 個体の半数体 (1C)、3 個体の二倍体 (2C)、3 個体の 1C-2C モザイクと 1 個体の 0.8C-1.2C モザイクが検出され、1 個体は倍数性が不明だった。小卵にゼブラフィッシュ精子 (1.2C) を媒精した群では、解析した 1 個体はゼブラフィッシュ精子核を取り込んだ二倍体 (2.2C) であった。小卵に

パールダニオ精子 (1.2C) を媒精した群では、5 個体中 4 個体でパールダニオ精子核を取り込んだ二倍体 (2.2C)、残り 1 個体は三倍体 (3.2C) であった。

雌性発生子孫の倍数性から、大卵は二倍性、小卵は半数性であった。

遺伝解析

二倍性の小卵と半数性の小卵のゲノム構成を調査するため、*RAG1* 遺伝子に対する PCR-RFLP とマイクロサテライトマーカー解析を行った。

PCR-RFLP の結果、二倍性の小卵は AB 両方のゲノムを持ち、半数性の小卵は A ゲノムまたは B ゲノムどちらかを持っていた (Table 23)。

二倍性の小卵に UV キンギョ精子を媒精した雌性発生群における、雌 No.1 由来子孫 9 個体、雌 No.2 由来子孫 2 個体のマイクロサテライトマーカー解析の結果、調査した 5 つの遺伝子座すべてで同じ遺伝子型を示した (Table 23)。

雌 No.1 の小卵のゲノム構成は、UV キンギョ精子 (0C) を媒精した雌性発生半数体子孫 3 個体、キンギョ精子 (1.4C) を媒精した小卵×キンギョ雑種 (2.4C) 子孫 3 個体、B 系統ドジョウ精子 (1C) を媒精したが精子核を取り込むことなく雌性発生した半数体子孫 1 個体、パールダニオ精子 (1.2C) を媒精した小卵×パールダニオ雑種 (2.2C) 子孫 4 個体の計 11 個体の解析から推定した。*Mac3*、*Mac24* および *Mac37* では、ほとんどの子孫が雌親由来のどちらかのアレルを持っていた。*Mac2* では、雌親由来の両方のアレルを持つ個体が 3 個体おり、残りの 8 個体は *Mac2* での PCR 増幅断片が確認されなかった。*Mac45* においても雌親由来の両方のアレルを持つ個体が 1 個体おり、残りの個体は雌親由来のどちらかのアレルを持っていた。また *Mac3* で 1 個体、*Mac37* では 2 個体で雌親のアレルサイズと異なるサイズが検出された。

雌 No.2 の小卵のゲノム構成は、キンギョ精子を媒精した小卵×キンギョ雑種 (2.4C) 子孫 3 個体、A 系統ドジョウ精子を媒精したが精子核を取り込むことなく雌性発生した半数体子孫 1 個体、ゼブラフィッシュ精子を媒精した小卵×ゼブラフィッシュ雑種 (2.2C) 子孫 1 個体の計 5 個体の解析から推定した。*Mac3*、*Mac24*、*Mac37* および *Mac45* では雌親由来の片方のアレルのみが子孫に受け継がれた。*Mac2* では雌親由来の両方のアレルを持つ子孫が 2 個体、*Mac2* の PCR 増幅が確認できない子孫が 3 個体であった。

小卵に含まれるゲノムは、ほとんどの遺伝子座において、雌親由来のアレルがランダムに受け継がれていた。また、*RAG1* 遺伝子の PCR-RFLP 解析により判定された小卵のゲノム構成の判別結果と、マイクロサテライトマーカー解析による遺伝子型は一致しておらず、卵によって A ゲノムと B ゲノムの分配が異なった。

考察

系統間核－細胞質雑種および雑種の生存性

本章では、核－細胞質雑種の誘起にあたり、細胞質提供種に B 系統ドジョウ、核提供種に A 系統ドジョウと性転換クロンドジョウを用いた。

半数性の核－細胞質雑種である UVB×A では、同系統の雄性発生半数体である UVB×B と同様に孵化期まで生残したが、半数体であるため、孵化期以降の生残個体は得られなかった。UVB×A では、UVB×B よりも孵化期胚の奇形の程度が悪化したことから、A 系統核ゲノムと B 系統細胞質間の不適合性が生じている可能性がある。第 1 章では、核－細胞質雑種の生残性は倍数性に関わらず、核と細胞質の組合せに起因すると結論づけた。ドジョウの系統間核－細胞質雑種においてもこのことが言えるかを検証する必要がある。ドジョウでは雄性発生半数体の誘起と第一卵割阻止の併用や (Masaoka et al., 1995; Hou et al., 2014)、四倍体が産出する二倍性精子を用いて雄性発生二倍体が誘起されている (Arai et al., 1995; Fujimoto et al., 2010b; Hou et al., 2013)。今後、UVB×A に対する第一卵割阻止処理や、A 系統四倍体雄が産出する二倍性精子を用いた雄性発生により A 系統二倍性核－B 系統細胞質雑種 (UVB×AA) を作出し、胚発生能力や生残性を調査する必要がある。これらの UVB×AA が致死性であった場合、第 1 章の結論と同様に核－細胞質雑種の生残性は倍数性ではなく、核と細胞質の組み合わせに起因することを確認できる。

性転換クロンドジョウ精子を用いた二倍性の核－細胞質雑種である UVB×クロンは、少数ながら生存性の個体を誘起できた。A 系統と B 系統は種レベルの分岐があるにもかかわらず、細胞質が野生のクロンドジョウが持つ A 系統由来細胞質から、B 系統細胞質に入れ替わった核－細胞質雑種においても胚発生は正常に進行し生存性の個体が得られたことになる。UVB×クロンでは核ゲノムが AB である。細胞質提供種である B 系統と同じ系統のゲノムが核にあるために、胚発生過程に生じる核と細胞質の不適合性が低減した可能性がある。サケ科魚類のカワマス *Salvelinus fontinalis* とホッキョクイワナ *Salvelinus alpinus* は生存性の核－細胞質雑種が得られない組み合わせであるが (Babiak et al., 2002)、カワマス雌×ホッキョクイワナ雑種雄が産出する精子を用いて雄性発生を行うことにより、成魚まで生存する核－細胞質雑種が得られている (Ocalewicz et al., 2013)。本研究と同様に核ゲノムに細胞質提供種のゲノムがあることで、核と細胞質間に生じる不適合性が緩和することを示唆している。

UVB×クロン群では成魚が得られたが、その誘起率は極めて低かった。受精胚の生残率は高かったことから、生存個体が少数しか得られなかったことは低い受精率に起因している。性転換クロンドジョウの精子は運動性が低く、運動時間が短いとされており (Yoshikawa et al., 2007; Zhao et al., 2012)、本研究における受精率低下も精子の運動性が

原因と考えられる。同様に性転換クロードジョウ精子を用いて受精した B×クローン群 (B 系統ドジョウ卵×クロードジョウ精子) も受精率は低いものの、受精した 1 個体は正常に発生し、成魚に至っている。性転換クロードジョウ精子の運動性が向上すれば、UVB×クローンや B×クローンの誘起率の改善が見込まれる。また、三倍体雑種である B×クローンにおいて生存性の成魚が得られたことから、二倍体の系統間雑種である B×A 群と生存性に差はないと言える。

第 1 章では二倍性精子を使用して作出した三倍体雑種において、母系と父系の核ゲノムセット数の比を 1: 1 から 1: 2 にすることで奇形の程度が悪化したことから、父系核ゲノムセット数の増加による、父系核ゲノムと母系細胞質の不適合性が強く現れることを示した。本章のクロードジョウの二倍性精子を利用した B×クローン群でも同様に、母系と父系の核ゲノムセット数の比が 1: 1 から 1: 2 となっているが、生存性への悪影響は見られなかった。これはクロードジョウ精子のゲノム構成が関係すると思われる。クロードジョウ精子には祖先型 A 系統と祖先型 B 系統の核ゲノムが 1 セットずつ含まれ、B×クローンでは母系の B 系統細胞質と同系統の核ゲノムが精子から供給されることとなる。したがって、B×クローンの見かけ上のゲノム構成は母系核ゲノム 1 : 父系核ゲノム 2 となっているが、系統別にみると細胞質提供種である B 系統核ゲノムを 2 セット、異系統である A 系統核ゲノム 1 セットという構成である。このゲノム構成により父系核ゲノムセット数が B 系統ゲノムを上回る B×クローンも生存性の成魚が得られたと考えられる。

核－細胞質雑種卵の卵径と倍数性

クローン系統核－B 系統細胞質雑種 (UVB×クローン) の雌から得た卵の卵径に 2 型が見られたため、大卵由来の子孫と小卵由来の子孫を分けて倍数性解析を行った。UV キンギョ精子により雌性発生を誘起したところ、大卵由来の雌性発生子孫の多くは二倍体、小卵由来の雌性発生子孫は半数体であったことから、大卵は二倍性卵、小卵は半数性卵であることが明らかになった。加えて、大卵由来の雌性発生子孫では四倍体が生じ、精子核を取り込んだ子孫を含めると、大卵のキンギョ精子核 (1.4C) 取り込みによる五倍体 (5.4C)、大卵のパールダニオ精子核 (1.2C) 取り込みによる五倍体 (5.2C) が生じた。これらの子孫は雌親由来のゲノムを 4 セット持っていると考えられる。受精後の第二極体放出が起こらず自然倍加が生じ、卵由来のゲノムを 4 セット持つ個体は、野生クロードジョウの雌性発生誘起においても観察されている (Morishima et al., 2002)。また卵径測定より、卵サイズのピークは 2 つであり、大卵を上回る巨大卵は観察されなかったことから、核－細胞質雑種が四倍性卵を産出した可能性は低い。したがって大卵由来子孫の四倍体や五倍体は、受精後の第二極体放出阻害による自然倍加から生じたと考えられる。

雌性発生群以外の大卵由来子孫の倍数性解析の結果を見ると、雌性発生により生じる二倍体子孫よりも精子核を取り込んだ三倍体あるいはモザイクの子孫の割合が高かった。大

卵由来子孫の各受精群の三倍体率と、モザイクや倍数体を含めた精子核関与率は、大卵にキンギョ精子を媒精した群では、三倍体率が 34.8%、精子核関与率が 65.2%、大卵に A 系統ドジョウ精子を媒精した群では、三倍体率が 20.8%、精子核関与率が 75.0%、大卵に B 系統ドジョウ精子を媒精した群では、三倍体率が 17.9%、精子核関与率が 64.3%、大卵にゼブラフィッシュ精子を媒精した群では、三倍体率、精子核関与率はともに 100.0%、大卵にパールダニオ精子を媒精した群では、三倍体率が 72.2%、精子核関与率が 83.3%であった。すなわち、クローン核-B 系統細胞質雑種と同種のドジョウ A 系統あるいは B 系統の精子を用いて人工授精を行った群では、三倍体率は 20%程度であったが、異種のキンギョ精子ではさらに高く、*Danio* 属のゼブラフィッシュおよびパールダニオ精子ではほとんどが三倍体となった。Morishima et al. (2002) によると、野生クローンドジョウ (雌 No.3) 卵にドジョウ精子を媒精した群では、三倍体率が 6%、精子核関与率が 7%であり、異種のキンギョ精子を媒精した群では、三倍体率が 44.4%、精子核関与率が 51.9%であった。一方で、別のクローン個体 (雌 No.6) では、三倍体率が 60.0%、精子核関与率が 85.0%と個体差が見られている。本研究のクローン核-B 系統細胞質雑種における精子核関与率は、媒精した精子の種類に関わらず、野生クローンドジョウ雌 No.3 よりも高い値であり、雌性発生率の低下が示唆された。クローン核-B 系統細胞質雑種では、卵形成過程において、核ゲノムは野生クローンドジョウと同じであっても、B 系統ドジョウ由来の生殖細胞質や細胞質因子が作用することとなる。したがって細胞質の置換が、精子核の取り込み頻度に影響し、自然雌性発生が生じにくくなっている可能性がある。

核-細胞質雑種卵を用いて人工授精を行った際の子孫の胚発生能力に関しては、UV キンギョ精子を用いて媒精した雌性発生群で最も生残率が低かった。この生残率の低下は小卵が半数性であることに起因していると考えられる。UV キンギョ精子を用いた雌性発生群を除く 5 つの実験群では、精子核を正常に取り込んだ場合、子孫は二倍体あるいは二倍性雑種となる。しかし雌性発生群では精子核の発生への関与がないため、すべての子孫が半数体となる。二倍性の小卵を含めると、雌性発生群からは半数体または二倍体、その他の 5 つの実験群からは二倍体または三倍体が多く得られると考えられる。半数体は致死であるが、二倍体や三倍体は一般に生存性であるため、半数体を生じる可能性の高い雌性発生群において生残率が低下したと考えられる。しかし、致死性雑種や半数体も孵化期まで胚発生を進行することから、細胞質置換により核-細胞質雑種卵の胚発生能力が低下した可能性を考える必要がある。

核-細胞質雑種卵のゲノム構成

RAG1 遺伝子の RFLP 解析とマイクロサテライトマーカー解析より、大卵は AB 両方のゲノムをもち、調査したすべての遺伝子座で雌親と同じアレルサイズだったことから、クローンの核ゲノムを持つと考えられる。二倍性の小卵は、野生クローンドジョウと同様に減数

分裂前の核内倍加によって生じたと考えられる。一方、小卵では A あるいは B ゲノムどちらかに由来する *RAG1* 遺伝子をもち、遺伝子座によって受け継ぐアレルが異なっていた。小卵は A 系統由来染色体と B 系統由来染色体がランダムに混在していると考えられる。したがって、半数性の小卵形成においては、減数分裂前の核内倍加は起きずに減数分裂が進行した可能性がある。

またマイクロサテライトマーカー解析では小卵由来子孫の *Mac2* 遺伝子座において、2 つアレルを受け継ぐ子孫やヌルアレルの子孫がほとんどであった。*Mac2* と同じ連鎖群の *Mac3* のアレルサイズは *Mac2* のアレルパターンと対応する傾向にあった。このような染色体の分離異常はドジョウとカラドジョウの雑種においても報告されており (Fujimoto et al., 2008)、本研究のクローン核-B 系統細胞質雑種の半数性卵形成においても同様の染色体分離異常が生じている可能性がある。*Mac2* と *Mac3* は連鎖地図上ではセントロメア近傍に存在するとされており、一般に組換えは起こりにくいと考えられている (Morishima et al., 2008b)。しかし、核-細胞質雑種が産出した半数性卵では高頻度の組換えが確認された。さらにアレルの分離が異常であったため、減数分裂過程での不等組換えの可能性がある。これまでドジョウでは連鎖群 9 の *Mac73* と *Mac204* の地図距離にグループ間の違いが報告されている (Morishima et al., 2008c)。またマイクロサテライト-セントロメア間の地図距離が系統間で異なることも報告されている (Arias-Rodriguez et al., 2009a)。クローンドジョウの核ゲノムは祖先型 A 系統と祖先型 B 系統のゲノムを 1 セットずつ持ち合わせることに (Kuroda et al., 2018)、B 系統ゲノムにおける *Mac3* はセントロメア近傍だが、A 系統ゲノムにおける *Mac3* はセントロメアからより遠い位置に存在する可能性を考慮すると (Arias-Rodriguez et al., 2009a)、同じ連鎖群 12 の *Mac2* における組換えは地図距離の違いにより生じたと考えられる。今回の結果は、先行研究で報告されている系統間での染色体構造の違いを反映しており、クローンドジョウ誕生当時の祖先型ドジョウにおいても染色体構造の違いがあったと考えられる。

従来、クローンドジョウの非還元卵形成における減数分裂時には、A 系統ゲノムと B 系統ゲノムの親和性の低さから対合ができず、減数分裂前の核内倍加を生じていると考えられてきた。しかし、本研究でクローンドジョウの細胞質 (ミトコンドリア) をクローン由来から B 系統由来に置換したところ、およそ 20% の卵は減数分裂の過程を経た半数性の小卵であった。置換したのは細胞質のみであり、核ゲノムは遺伝的に均一なクローンである。したがって、クローンドジョウが持つゲノム自体は、染色体構造の違いやそれに起因する不等組換えを生じるものの、対合可能であると考えられる。しかし通常の減数分裂の開始を妨げる何らかの機構により、減数分裂前核内倍加を生じさせ非還元二倍性卵を形成する。系統間核-細胞質雑種においても、卵のおよそ 80% は非還元二倍性卵であったことから、細胞質が B 系統由来に置き換わったとしても、減数分裂前核内倍加を生じるメカニズムは維持されていると考えられる。

本研究では、系統間の異種間雄性発生により細胞質を置換することでクローンドジョウ

の非還元卵形成という特殊な生殖様式にゆらぎを生じさせた結果、クロードジョウ誕生当時の祖先型 A 系統と祖先型 B 系統ゲノム間で生じた可能性のある減数分裂を一部再現したとも考えられる現象を観察した。祖先型 2 系統の交雑が起こり始めたころは、非還元卵を形成する個体の他に、半数性卵を形成する個体も生息していたが、不等組換えによる染色体分離異常により半数性卵を産出する個体は子孫を残すことができず、結果として非還元卵を形成する個体、すなわちクロードジョウのみが現代まで生息している、という仮説が考えられる。

コイ目魚類の異属間雑種 *Carassius auratus red var* 雌 × *Cyprinus carpio* 雄では、二倍体の F1 世代において雄 4.7% と雌 44.3% が妊性を持った (Liu et al., 2001)。二倍体の F2 世代では、非還元二倍性卵と非還元二倍性精子を含む様々な倍数性の配偶子が形成され、F3 世代以降は二倍性配偶子を産する異質四倍体の系統が確立された (Liu, 2010)。このように雑種の F1 ではなく、後の世代で安定して二倍性配偶子が形成される例があり、クロードジョウ誕生時にも非還元卵を形成する個体の誕生まで数世代を要した可能性がある。

ドジョウでは、A 系統雌と B 系統雄との人為交配によって異系統間の雑種が作出された。この異系統間雑種の F1 世代の雄では半数性と二倍性の精子が形成され、雌では非還元二倍性卵を産む個体に加えて、半数性や異数性の卵を産む個体が確認されている (Arias-Rodriguez et al., 2009b, 2010)。ドジョウにおいても、F1 世代同士の人為交配や、人為雌性発生の誘起により安定的に非還元卵を産出するクロードジョウを再現できる可能性がある。また、本研究ではクロードジョウの細胞質を B 系統由来のものに置換しても二倍性卵が産出されたことから、B 系統由来の細胞質をもつ B 系統雌と A 系統雄の異系統間雑種も非還元卵を産出する可能性がある。したがってこれらの異系統間の正逆雑種を数世代にわたって作出し、各世代の生殖特性を調査することで、クローン系統確立までのメカニズムを検証できる可能性がある。

異系統細胞質への置換による卵形成への影響

系統間核-細胞質雑種の誘起において、B 系統由来細胞質環境の下でも、クローン由来ゲノムは正常に胚発生しており、異系統細胞質による胚発生への影響はなかった。これは胚発生過程においてクロードジョウの祖先型 A 系統ゲノムと B 系統細胞質の間に不適合性は生じなかったことを示唆している。魚類では正逆雑種の生存性の違いから、細胞質による胚発生への影響が報告されている。サケ科雑種のニジマス雌 × カワマス雄は生存性だが、カワマス雌 × ニジマス雄は致死性であることから、ニジマス核ゲノムとカワマス細胞質の不適合性の存在が示唆されている (Gray et al., 1993)。同様の生存性の違いは、サクラマスとニジマスの正逆雑種でも観察されており、胚発生過程で致死となるサクラマス雌 × ニジマス雄雑種では、細胞分裂時に父系のニジマス染色体が脱落することから、父系核ゲノムと母系細胞質の不適合性がセントロメアの分離に関与すると考えられている (Fujiwara et al.,

1997)。

しかし、B 系統由来細胞質に置換することにより、クローン核-B 系統細胞質雑種は倍数性の異なる 2 種類の卵を産出し生殖能力に影響が生じた。マウスでは、紡錘体（核）移植により、B6 系統マウス由来の核と、PWD 系統マウス由来の細胞質の核-細胞質雑種が誘起されている。B6 系統核は PWD 系統の細胞質環境下で正常に発生するが、雄の妊性が低下することが報告されている (Ma et al., 2016)。また、ショウジョウバエ雄の減数分裂前細胞では、ミトコンドリアの異常を感知すると分裂開始因子であるサイクリン B の核-細胞質間の移行が変化し、減数分裂の開始が阻害される機構が発見され、細胞質の状態を監視する細胞周期チェックポイントの存在が示唆された (井上, 2017)。

野生クローンドジョウでは本来、非還元二倍性卵の雌性発生により安定的にクローンゲノムを維持してきたが、細胞質が B 系統由来に置換されることで、ゲノム構成が不均一な半数性卵を形成するようになった。A 系統および B 系統由来の染色体が混在する半数性卵の胚発生能力に関しては、サンプル数を増やしてさらに調査する必要がある。この半数性卵ではアレルの重複や欠損が高頻度で生じたことから、子孫は生残しないと考えられる。雌性発生により子孫を残すことが可能なクローンドジョウ由来二倍性卵に比べて、このような半数性卵の増加は子孫を残しにくくなっている。したがって B 系統細胞質への置換は、クローンドジョウの生殖能力を低下させていると考えられる。またクローンドジョウではホルモン処理による性転換が可能であることから、今後はクローン核-B 系統細胞質雑種の雄個体を作成し、B 系統細胞質による精子形成への影響を調査する必要がある。

第4章 総合考察

異種由来細胞質による胚発生能力への影響

本研究では、ゼブラフィッシュ卵（第1章）およびドジョウ卵（第3章）を用いた異種間雄性発生により、核と細胞質の組み合わせ、核の倍数性が異なる核-細胞質雑種を誘起した。複数の組み合わせのうち成魚まで生残したのは、クローンドジョウの二倍性核とB系統ドジョウの細胞質を持ち合わせた系統間の核-細胞質雑種のみであった。

クローン系統ドジョウの核ゲノムの構成は祖先型A系統と祖先型B系統のゲノムを1セットずつ持つため、ここで予想される核-細胞質間の不適合性は、祖先型A系統のゲノムとB系統細胞質によるものである。この系統間の核-細胞質雑種は正常に胚発生し、成魚に至る子孫が得られたことから、胚発生過程においてはこれらの不適合性は生じなかったと考えられる。一方で、同時に誘起した半数性の系統間核-細胞質雑種（A系統半数性核-B系統細胞質雑種）では、対照のB系統ドジョウ同系統間雄性発生半数体と比較して、水腫や眼の奇形の程度が悪化したことから、核-細胞質間の不適合性が認められた。

クローンドジョウ核の二倍性の核-細胞質雑種とA系統ドジョウ核の半数性の核-細胞質雑種の結果をふまえると、A系統ゲノムとB系統細胞質との不適合性の有無には2つの可能性がある。

1つ目は、半数性の核-細胞質雑種の作出に用いたA系統ドジョウは、現代までに進化を続けたため、祖先型A系統とB系統細胞質との間に見られなかった不適合性が新たに生じた可能性である。すなわちクローンドジョウ誕生時の祖先型A系統ゲノムから現代に生息するA系統ドジョウまでのA系統ゲノムの進化の程度が不適合性の有無を生じさせた可能性について考える。祖先型A系統由来の半数性精子は現代で得ることはできないため、祖先型A系統半数性核-B系統細胞質雑種を誘起し、胚発生能力と胚の形態を観察することは不可能である。そこでA系統ゲノムとB系統細胞質間の不適合性の程度をさらに調査するために、A系統二倍性核-B系統細胞質雑種を誘起する必要がある。二倍性の核-細胞質雑種誘起には、半数性の核-細胞質雑種を第一卵割阻止によりゲノム倍加を行う方法に加えて、A系統ドジョウ四倍体に由来する二倍性精子を用いる方法が考えられる。

もう一つの可能性としては二倍性の核-細胞質雑種では細胞質提供種と同じB系統ゲノムが存在するため、胚発生過程で生じる不適合性を緩和したことが挙げられる。これはすなわち祖先型A系統ゲノムと現代のA系統ゲノム、どちらに対してもB系統細胞質との不適合性が生じるが、B系統ゲノムが存在するか否かによって不適合性の程度に違いが生じたという考え方である。現代のABゲノムとB系統細胞質を持つのが系統間雑種（B系統卵×A系統精子）である。本研究では、このB×AにおいてもB系統の細胞質環境で正常に胚発生し、A系統ゲノムとの不適合性は顕在化しなかった。すなわち、細胞質提供種のゲノ

ムが存在することにより、核－細胞質間の不適合性が改善したものと推測される。このような例は、サケ科魚類でも報告がある。カワマス *Salvelinus fontinalis* 核－ホッキョクイワナ *Salvelinus alpinus* 細胞質雑種と、ホッキョクイワナ核－カワマス細胞質雑種はいずれも孵化胚が得られなかった (Babiak et al., 2002)。そこでカワマス×ホッキョクイワナ雑種が産出した精子と、X 線照射により遺伝的に不活性化した両親種それぞれの卵を用いて異種間雄性発生を行い、圧力処理による第一卵割阻止で二倍性の核－細胞質雑種が誘起された。雑種精子の使用により、細胞質提供種のゲノムが付与された雑種由来二倍性核－カワマス細胞質雑種と雑種由来二倍性核－ホッキョクイワナ細胞質雑種では正常に孵化、浮上する個体を得られている (Ocalewicz et al., 2013)。本研究のクローン二倍性核－B 系統細胞質雑種においても、核提供種のクローンドジョウは交雑に起源し、細胞質提供種の B 系統ゲノムを持つことで、胚発生過程での不適合性は顕在化しなかったと考えられる。

ゼブラフィッシュを細胞質提供種とした核－細胞質雑種では、成魚まで生残する組み合わせはなかった。核の倍数性にかかわらず、核と細胞質の関係によって胚発生能力が決まることが明らかとなった。興味深い点に、ドジョウとゼブラフィッシュの異科間核－細胞質雑種は、キンギョ、ギンブナとゼブラフィッシュの異属間核－細胞質雑種よりも胚発生が進行したことがある。キンギョやギンブナは分類学上ではドジョウよりもゼブラフィッシュと近縁な関係である。コイ目魚類の異属間の組み合わせでは、紫外線照射したドジョウ卵とシマドジョウ *Cobitis biwae* 大型四倍体種族の二倍性精子による異属間の核－細胞質雑種において孵化個体が生じる (正岡ら, 1995)。魚類では異種間雄性発生が行われる以前から、異種間核移植によっても核－細胞質雑種が誘起されてきた。例えば、*Carassius auratus* 核－*Cyprinus carpio* 細胞質雑種は異属間核移植と (Yan et al., 1984)、異属間雄性発生 (Bercényi et al., 1998) 両方の手法で誘起され、どちらも成魚が得られている。核提供種に *C. auratus*、細胞質提供種にドジョウ科 (Cobitidae) を用いた核－細胞質雑種では、異科間核移植により誘起された *C. auratus* 核－*Paramisgurnus dabryanus* 細胞質雑種は孵化仔魚が得られた (Yan et al., 1990)。一方で、異種間雄性発生により誘起された *C. auratus* 核－*Misgurnus fossilis* 細胞質雑種と (Neifakh and Radzievskaya, 1967)、*C. auratus* 核－*M. anguillicaudatus* 細胞質雑種 (Fujimoto et al., 2010a) では胞胚期から囊胚形成過程で胚発生が停止する。このように、核と細胞質に用いる生物種の組み合わせを分類学上で比較しても、核－細胞質雑種の胚発生能力について統一した見解を導くのは難しい。

さらに、初期胚発生過程の発生停止については、核の不完全なリプログラミングによって生じる可能性が指摘されている (Sun and Zhu, 2014)。異種間雄性発生では異種の精子核が、異種間核移植では主に胞胚期細胞核がそれぞれ細胞質提供種の卵細胞質因子によってリプログラミングされる。どちらも異種由来の核だが、たとえばゲノムに含まれるヒストンタンパクの種類は精子核と細胞核では異なるため、今後は核提供種と細胞質提供種の組み合わせだけでなく、核－細胞質雑種の作出方法による胚発生能力の違いを調査することも必要だと考えられる。

以上の核-細胞質雑種を用いた胚発生能力の評価では、卵核を遺伝的に不活性化したため、ドジョウやゼブラフィッシュの細胞質環境下における母系核ゲノムと父系核ゲノムの比は、0:1 または 0:2 であった。本研究では核-細胞質雑種と同時に雑種を作出し、胚発生能力を調査した。雑種作出では卵核の遺伝的不活性化を行わないため、母系核ゲノムが1セット追加された場合の胚発生能力を評価できる。二倍性精子を用いて作出したギンブナ雑種三倍体およびクロードジョウ雑種三倍体は、二倍体雑種（キンギョ雑種、ドジョウ雑種）よりも孵化期胚の奇形が重篤化した。これはゼブラフィッシュ細胞質環境下に存在する異種由来父系核ゲノムが1セットから2セットに増えることによる形態への影響と考えられる。母系核ゲノムを2セットに増やした異質三倍体（母系核ゲノム2:父系核ゲノム1）では、サケ科雑種の生存性回復（Arai, 1984, 1986, 1988）やコイ目雑種の発生異常の改善（木島ら, 1996a, b）が見られている。異質三倍体であっても、母系核ゲノムと父系核ゲノムの比が、2:1 と 1:2 では異なる性質を示すことが予想される。今後、本研究で用いたゼブラフィッシュとキンギョ、ドジョウにおいて、ゼブラフィッシュ母系核ゲノム2:キンギョ父系核ゲノム1、ゼブラフィッシュ母系核ゲノム2:ドジョウ父系核ゲノム1の異質三倍体を作成し、胚発生能力を調査することで、母系核ゲノムが1セットから2セットに増えることによる形態への影響が明らかになるであろう。同様にゼブラフィッシュとギンブナ、クロードジョウにおいて、ゼブラフィッシュ母系核ゲノム2:ギンブナ父系核ゲノム2、ゼブラフィッシュ母系核ゲノム2:クロードジョウ父系核ゲノム2の異質四倍体を作成した場合の検証により、細胞質環境と核ゲノムの組み合わせによる胚発生能力の差異を明らかにできると考えられる。

異種由来細胞質による配偶子形成への影響

クロードジョウ核-B 系統ドジョウ細胞質雑種雌個体の卵形成を解析することにより、異系統由来細胞質による卵形成への影響を調査した。この異系統間の核-細胞質雑種は、A 系統細胞質をもつ自然分布する野生クロードジョウと同様にクローン性の二倍性大卵を産出したが、およそ 20%の割合で半数性の小卵を産出した。野生クロードジョウでは二倍性卵のみの産出が報告されていることから（Morishima et al., 2002）、卵形成の変化は細胞質置換に起因すると考えられる。

これらの卵形成を初期胚発生過程まで遡ると、始原生殖細胞（PGC）形成から考える必要がある。魚類の PGC 形成は卵細胞質因子として蓄えられた生殖細胞質が、卵割面に局在したのち細胞へ取り込まれ、PGC となる。ドジョウにおいても生殖細胞質に含まれる因子の一つである *vasa* mRNA の局在から同様の PGC 形成機構が確認されている（Fujimoto et al., 2006）。異系統間雄性発生に使用した B 系統卵には、B 系統ゲノムから蓄えられた卵細胞質因子のみが含まれる。したがって、クローン核-B 系統細胞質雑種の胚発生過程では、B 系統核ゲノム由来の生殖細胞質が細胞に取り込まれ PGC を形成する。一方、野生クロード

ジョウの卵形成過程では、A 系統の細胞質環境下で祖先型 A 系統と祖先型 B 系統の核ゲノム由来の卵細胞質因子が蓄積されるため、両方の祖先型ゲノム由来の生殖細胞質が存在すると考えられる。したがって、B 系統由来の生殖細胞質だけが存在する状況であっても、クローン核ゲノムに作用し、機能的な PGC が分化したと言える。この核-細胞質雑種は二倍性卵を産出するため、UV キンギョ精子を用いた雌性発生により次世代の作出が可能と考えられる。次世代では、B 系統の細胞質環境下で再び祖先型 A 系統と祖先型 B 系統由来の細胞質因子が蓄積される。このような核ゲノム構成と細胞質因子から胚発生や PGC 形成が行われた際の卵形成を解析することで、細胞質置換が次世代以降の生殖特性に与える影響を解明できると考えられる。

さらに今後はこの異系統間の核-細胞質雑種のメチルテストステロン処理により、性転換したクローン核-B 系統細胞質雑種雄個体における精子形成の解析も必要となる。雄は精子を産出するか、精子の倍数性に 2 型が生じるかを調査することで、細胞質置換による影響の雌雄差を明らかにできる。野生クロンドジョウの性転換により得られた雄個体が産出する二倍性精子は運動性や運動時間の低下が観察されている (Yoshikawa et al., 2007; Zhao et al., 2012)。この運動性低下の原因として、ミトコンドリア数と ATP 量が正常な運動性を持つ四倍体由来の二倍性精子よりも少ないことが挙げられた (Zhao et al., 2012)。野生クロンドジョウの性転換雄の精子は A 系統のミトコンドリアを持つが、核-細胞質雑種の性転換雄は B 系統のミトコンドリアを持つことになる。ドジョウの A 系統と B 系統の精子間で、運動性やミトコンドリア量、ATP 量の違いは調査されていないが、精子を駆動するミトコンドリアの系統差により運動性の向上や低下が生じる可能性がある。哺乳類の系統間細胞質置換や (Ma et al., 2016)、mtDNA 点変異による男性不妊 (Spiropoulos et al., 2002; Nakada et al., 2006) に加えて、植物のミトコンドリアの雄性不稔遺伝子による細胞質雄性不稔機構 (Hanson and Bentolila, 2004; 板橋ら, 2012) といった細胞質に起因する不妊現象はいずれも雄で生じている。したがって細胞質を B 系統由来に置換したクロンドジョウにおいても、精子形成への影響が卵形成への影響よりも大きくなる可能性がある。

クロンドジョウ誕生時の推察

ドジョウのクローン系統は減数分裂前に染色体が倍加し、その後複製を経て通常の減数分裂を行うため (Itono et al., 2006)、倍加により生じた姉妹染色体間で対合する (Kuroda et al., 2018)。したがって対合や組換えが生じるのは同じ染色体に由来するエレメント同士となり、卵のクローン性が維持されるとともに、祖先型 A 系統と祖先型 B 系統の染色体間での対合は回避されていた。しかし本研究で系統間核-細胞質雑種の産する小卵形成において、現代に生息する野生クロンドジョウでは生じるはずのない、祖先型の異系統ゲノム同士での対合と組換えが生じ、染色体倍加を起こさなかった際の生殖細胞における減数分裂を観察した。マイクロサテライトマーカー解析の結果から、減数分裂によって生じた半数

性の小卵はクローン核の祖先型 A 系統由来あるいは祖先型 B 系統由来の染色体をランダムに受け継いでいることが示唆された。さらに、対合時には不等組換えによる、遺伝子の重複や欠損が高頻度で生じた。クローンドジョウ誕生の交雑イベントが生じた時代には、このような異常な減数分裂により子孫を残すことができない系統間雑種が存在していた可能性がある。その中でも減数分裂前核内倍加により、非還元型の二倍性卵を産出できた雌のみが子孫を残すことができ、現代まで生き残ったことが示唆された。

コイ目魚類の異属間雑種では、ギベリオブナ *Carassius auratus gibelio* 雌 × *Cyprinus carpio* 雄雑種の F1 世代で非還元二倍性卵を得て、人為雌性発生を誘起することで二倍性雑種が維持された (Cherfas et al., 1994)。一方、同様のフナとコイの雑種の *Carassius auratus red var* 雌 × *Cyprinus carpio* 雄では、二倍体の F1 世代において雄 4.7% と雌 44.3% が妊性を持った (Liu et al., 2001)。二倍体の F2 世代では、非還元二倍性卵と非還元二倍性精子を含む様々な倍数性の配偶子が形成され、F3 世代以降において二倍性配偶子を産する異質四倍体の系統が確立された (Liu, 2010)。このように雑種の組み合わせによっては F1 世代ではなく、後の世代で安定して二倍性配偶子が形成される例があり、クローンドジョウ誕生時にも非還元卵を形成する個体の誕生まで数世代を要した可能性がある。また、交雑イベントが生じた時代には、祖先型 B 系統雌と祖先型 A 系統雄の交雑による系統間雑種も同時に存在していた可能性が高い。しかし祖先型 B 系統の mtDNA を引き継ぐクローンドジョウは発見されていないことから、祖先型 B 系統の細胞質環境下では非還元配偶子を産出する個体が出現しなかったことが推察される。

魚類のヘテロプラスミー研究の可能性

核-細胞質雑種では、核と細胞質が完全に置換するのに対して、ヘテロプラスミーではホストとドナーのミトコンドリアが共存するため、胚発生への影響が少ないと考えられる。さらに生殖細胞にドナー由来のミトコンドリアが残存した場合、核ゲノムと異種由来ミトコンドリアとの不適合性によって妊性に変化が生じる可能性がある。哺乳類のウシやマウスでは、ヘテロプラスミーの母親から子孫へ遺伝する mtDNA 型の比率は、子孫ごとに変化し、数世代以降にどちらか一方の mtDNA 型に収斂することが報告されている (Ashley et al., 1989; Meirelles and Smith, 1997)。魚類において同様の機構が存在するならば、配偶子形成の過程で異種由来 mtDNA の割合が大幅に増加し、異種の mtDNA に置換された卵または精子となる可能性がある。これは異種の核と mtDNA の核-細胞質雑種に近い構成とも考えられる。異種間雄性発生を介さず、ヘテロプラスミー個体を利用して細胞質構成を変化させるような、新たな細胞操作技術としての応用が可能となる。

核－細胞質間に生じる不適合性の育種への応用

天然資源の保護と水産物需要を満たすために養殖業の持続的発展が目指されている。国内では近年多くの企業がサーモン養殖に参入するなど養殖に注目が集まり、ブランド品種の確立に向けてそれぞれの差別化が求められている（小堀, 2019）。また閉鎖循環式陸上養殖を採用した養殖も推進され、養殖品種として利用可能な魚種や倍数体の増加が見込まれる。したがってすでに養殖ブランドの地位を確立している信州サーモンや絹姫サーモンのように、異種間交雑や染色体操作などのバイオテクノロジーを駆使した異質三倍体の利用は、さらに拡大する可能性がある。二倍性精子を利用することで、通常の半数性卵を産出する雌親との交雑だけで簡便に三倍体を作出可能となるが、本研究の結果より母系細胞質との不適合性を強く反映する可能性が考えられる。母系核ゲノム1：父系核ゲノム2のゲノム構成の異質三倍体において新たな有用形質が顕在化してくる可能性も考慮し、母系核ゲノム2：父系核ゲノム1の異質三倍体とは区別した養殖特性の再評価が必要である。

養殖対象魚の不妊化は、養殖魚が逃亡した際に天然の遺伝子資源に影響を与えるリスクを低減することに加えて、生殖腺発達のエネルギーを体成長に転換する高成長集団を作出可能であることから、有用な増養殖技術とされている（荒井, 1997）。従来、雑種化や三倍体化のように減数分裂における対合異常に起因する不妊化が広く用いられてきた。本研究ではクロードジョウの細胞質を置換することで、一部の卵で染色体分離異常が観察され、妊性が低下した。次世代以降の生殖能力の調査が必要となるが、細胞質の置換は配偶子形成過程で何らかの影響を及ぼしている可能性が強く示唆された。本研究でクローン生殖を乱し、染色体倍加を伴わない減数分裂の原因が mtDNA の変異にあるならば、その変異を利用した卵形成の変化や妊性の変化を誘導できる可能性がある。さらにその変異領域は個体発生を妨げず、生殖能力のみに関与する変異であったと考えられる。近年、TALEN を用いた mtDNA に対するゲノム編集技術（mitoTALEN）が確立され、哺乳類ではミトコンドリア病の治療法探索や（Reddy et al., 2015）、植物の細胞質雄性不稔のメカニズム解明に向けた研究が行われている（Kazama et al., 2019）。魚類においてもゲノム編集によって人為的に mtDNA の変異を誘起できれば、細胞質に起因する不妊魚を作出できる可能性がある。また、そのような変異を誘起可能であった場合、mtDNA の変異を有するミトコンドリアを移植したヘテロプラスミー系統を作出して、生殖能力への影響の程度や継代の可否を調査すれば、さらに細胞質に起因する不妊魚作出へ応用できる可能性が広がると考えられる。

摘要

多くの真核生物では、細胞質母系遺伝により母系のミトコンドリアおよび mtDNA を受け継いできた。ミトコンドリアに関係するタンパク質の多くはその遺伝子を核に移行しており、細胞が正常に機能するためには核と細胞質が協調して働くことが必要とされる。mtDNA の突然変異や核と細胞質の組み合わせの変化により生じる核-細胞質間の不適合性は、哺乳類の男性不妊症や、植物の細胞質雄性不稔を引き起こし、生殖能力へ影響する例がある。

水産養殖において不妊形質は、養殖個体と野生集団との交雑による遺伝子汚染のリスクを低減できることや、生殖腺発達のエネルギーを体成長に転換する高成長個体作出の手段となることから、有用形質とされている。従来の不妊化は、異種間交雑や染色体操作技術を用いた三倍体化による核のゲノム構成に着目したものが多く、核と細胞質の相互作用を利用した例は少ない。魚類においても細胞質に起因する不妊機構を発見できれば、新たな生殖統御技術としての応用が期待される。

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

ゼブラフィッシュ雄性発生誘起条件の検討

- (1) ゼブラフィッシュの雄性発生誘起では、半数体誘起効率が高く、卵細胞質中の母系因子や微小管への影響が少なかった $50\text{--}75\text{ mJ/cm}^2$ の紫外線照射が最適だと考えられる。
- (2) マイクロサテライトマーカー解析により、 75 mJ/cm^2 の紫外線照射により誘起したゼブラフィッシュ雄性発生半数体と、加えて高温処理による第一卵割阻止を行った雄性発生

二倍体は父親由来のアレルのみを持つことが確認された。

(3) 雄性発生二倍体(倍加半数体)に由来する精子を用いて誘起した雄性発生半数体子孫は、同一の RAPD-PCR バンドパターンを示し、倍加半数体に由来する増幅のみが見られたことから、倍加半数体は遺伝的に均一な精子を産出したことが示された。

ゼブラフィッシュ卵を用いた核-細胞質雑種誘起

(1) ゼブラフィッシュと同じ *Danio* 属魚類であるパールダニオ *Danio albolineatus* を核提供種に用いた異種間核-細胞質雑種では、第一卵割阻止による二倍性回復を行うことで、パールダニオ二倍性核-ゼブラフィッシュ細胞質雑種の正常個体作出を期待したが、ゼブラフィッシュ雄性発生二倍体群のような正常な外部形態の胚や成魚は得られなかった。

(2) キンギョ *Carassius auratus auratus* とギンブナ *Carassius auratus langsdorfii* を核提供種に用いた異属間核-細胞質雑種では、キンギョ半数性核-ゼブラフィッシュ細胞質雑種とギンブナ二倍性核-ゼブラフィッシュ細胞質雑種はどちらも胞胚期で胚発生を停止して死亡した。

(3) ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* と性転換クロードジョウを核提供種とした異科間核-細胞質雑種では、ドジョウ半数性核-ゼブラフィッシュ細胞質雑種とクロードジョウ二倍性核-ゼブラフィッシュ細胞質雑種はどちらも囊胚形成過程の 50% エピボリー期で胚発生を停止して死亡した。

(4) 半数性の核-細胞質雑種では、ゼブラフィッシュの細胞質環境下に母系核ゲノム 0 : 父系核ゲノム 1 で存在し、二倍性の核-細胞質雑種ではゼブラフィッシュの細胞質環境に母系核ゲノム 0 : 父系核ゲノム 2 の状態となっている。異種由来の父系核ゲノムが 1 セットでも 2 セットであっても、すなわち半数性、二倍性に関わらず核-細胞質雑種は同じ胚発生段階で異常となり死亡した。核-細胞質雑種の胚発生能力は、核の倍数性によらず、核提供種と細胞質提供種の組み合わせに起因されることが明らかとなった。

(5) 異属間の組み合わせの二倍体雑種(ゼブラフィッシュ×キンギョ)と三倍体雑種(ゼブラフィッシュ×ギンブナ)、および異科間の組み合わせの二倍体雑種(ゼブラフィッシュ×ドジョウ)と三倍体雑種(ゼブラフィッシュ×クロードジョウ)の胚発生能力を比較した。どの組み合わせの雑種も奇形の孵化期胚が得られたが、三倍体雑種では二倍体雑種よりも重篤な奇形を示した。

(6) 雑種ではゼブラフィッシュの細胞質環境下に母系核ゲノム 1 : 父系核ゲノム 1 の異質二倍体雑種よりも、母系核ゲノム 1 : 父系核ゲノム 2 の異質三倍体雑種のほうが、奇形の程度が高くなったことから、父系核ゲノムの増加により母系細胞質との不適合性が強く表れた可能性がある。母系核ゲノムを補填した異質三倍体化(母系核ゲノム 2 : 父系核ゲノム 1)では、生存性回復や発生異常の改善が見られており、本研究はそれらと異なる結果となった。

ゼブラフィッシュ胚へのミトコンドリア移植によるヘテロプラスミー誘起

(1) ミトコンドリア移植によって胚発生能力が改善されることはなく、ゼブラフィッシュ、キンギョ、ドジョウいずれのミトコンドリアをドナーとして移植した場合でも、対照群よりも生残率が減少し、奇形率は上昇した。ドナーに用いた種はゼブラフィッシュと同種、異属、異科の違いがあるものの、3つの移植群間の胚発生能力に有意差は検出されず、ドナー種による違いは認められなかった。

(2) ゼブラフィッシュのミトコンドリアをドナーとして、別の系統のゼブラフィッシュに移植を行ったところ、MitoTracker により標識したドナー由来ミトコンドリアは孵化期までシグナルを確認できた。しかし、ドナー由来 mtDNA は移植直後の胚からも検出できず、本研究で行った PCR-RFLP 法の検出限界以下だったと考えられる。ドナーとホストに用いる 2 系統に対する系統特異的プライマーの開発が必要である。

(3) キンギョとドジョウのミトコンドリアをドナーとした異種間移植では、ドナーのミトコンドリアの蛍光シグナルは体節形成期以降に弱くなっていったが、移植直後の卵割期から孵化期胚まですべての胚発生段階でドナー由来の mtDNA が検出された。しかしドジョウミトコンドリアをドナーに用いた移植胚では、尾芽胚期以降の mtDNA の残存を示すバンドが薄くなっており、ドジョウ mtDNA の分解が進んだ可能性がある。

(4) 今後は、本研究で誘起したヘテロプラスミー個体の各組織と生殖系列細胞におけるドナー由来 mtDNA 有無を調査し、ドナー由来 mtDNA の残存について経時的に調査する必要がある。

ドジョウ卵を用いた核-細胞質雑種誘起

(1) クローン核-B 系統細胞質雑種の成魚が得られたことから、B 系統ドジョウの細胞質環境下で、祖先型 A 系統と祖先型 B 系統を併せ持つクローン核は正常に機能し、胚発生過程における核と細胞質の不適合性は生じなかったと考えられる。

(2) 半数性の A 系統核-B 系統細胞質雑種は半数性の B 系統間雄性発生胚よりも水腫や眼の奇形の程度が悪化したことから、A 系統ゲノムと B 系統細胞質に不適合性が見られた。

(3) 雑種では、二倍体雑種 ($B \times A$) と三倍体雑種 ($B \times \text{クローン}$) はどちらも正常に胚発生し、成魚が得られた。三倍体雑種では B 系統ドジョウの細胞質環境下に、母系核である B 系統ゲノムと、父系核である祖先型 A 系統と祖先型 B 系統を 1 セットずつ持ち合わせるゲノム構成であった。父系核ゲノムセットが母系核ゲノムセットの数を上回り、母系核ゲノム 1 : 父系核ゲノム 2 の割合になったが胚発生に悪影響は生じなかった。

ドジョウの系統間核-細胞質雑種における卵形成の解析

(1) クローン核-B 系統細胞質雑種雌は二倍性の卵と半数性の小卵を産出した。大卵はクローンのゲノム構成を維持していたが、小卵ではクローン由来の祖先型 A 系統ゲノムと祖先型 B 系統ゲノム間での組換えが起こり、通常の減数分裂の結果生じた還元卵であった。

これらの半数性の小卵は野生クロノドジョウでは産出されておらず、B 系統由来の細胞質に入れ替えた影響と考えられる。

(2) クローン核-B 系統細胞質雑種が産出する半数性小卵由来の子孫では、不等組換えによる遺伝子重複や欠損が生じており、正常な発生能力を持たないと考えられる。野生のクロノドジョウで生じる減数分裂前核内倍加は、このような不等組換えを回避するために存在する機構であると考えられる。

(3) 不等組換えを生じた *Mac2* と、同じ連鎖群の *Mac3* では、マイクロサテライト-セントロメア間の地図距離が系統間異なるため、小卵の一部の遺伝子座で生じた不等組換えは、先行研究で報告されている系統間での染色体構造の違いを反映しており、クロノドジョウ誕生当時の祖先型ドジョウにおいても染色体構造の違いがあったと考えられる。

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

謝辞

本研究をまとめるにあたり多大な御指導を頂き、本論文の校閲を賜った北海道大学大学院水産科学研究科の水田浩之教授、都木靖彰教授、藤本貴史准教授、北海道大学高等教育推進機構の荒井克俊特任教授、ならびに北海道大学北方生物圏フィールド科学センターの山羽悦郎教授に謹んで感謝の意を表します。

また本研究を進めるにあたり御助言を頂いた Miloš Havelka 元特任助教（現 愛媛大学南予水産研究センター助教）、李大雄助教に心より御礼申し上げます。そして本研究に御協力を頂いた育種生物学講座の皆様に感謝申し上げます。

引用文献

- Arai, K. (1984) Developmental genetic studies on salmonids. Morphogenesis, isozyme phenotype and chromosomes in hybrid embryos. *Mem Fac Fish Hokkaido Univ*, **31**, 1–94.
- Arai, K. (1986) Effect of allotriploidization on development of the hybrids between female chum salmon and male brook trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**, 823–829.
- Arai, K. (1988) Viability of allotriploids in salmonids. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 1695–1701.
- Arai, K., T. Masaoka and R. Suzuki (1992) Optimum conditions of UV ray irradiation for genetic inactivation of loach eggs. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 1197–1201.
- Arai, K., M. Ikeno and R. Suzuki (1995) Production of androgenetic diploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* using spermatozoa of natural tetraploids. *Aquaculture*, **137**, 131–138.
- 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.
- 荒井克俊 (2009) ドジョウの倍数性とクローン, それらの特殊な生殖様式. 動物遺伝育種研究, **37**, 59–80.
- Arai, K. and T. Fujimoto (2013) Genomic constitution and atypical reproduction in polyploid and unisexual lineages of the *Misgurnus* Loach, a Teleost Fish. *Cytogenet Genome Res*, **140**, 226–240.
- 荒井克俊, 山羽悦郎, 藤本貴史 (2017) 第6章染色体操作と育種. 水産遺伝育種学 (中嶋正道・荒井克俊・岡本信明・谷口順彦編), 東北大学出版会, 仙台, pp. 99–118.
- Arias-Rodriguez, L., K. Morishima and K. Arai (2009a) Inter-population difference in microsatellite-centromere map distances in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Ichthyol Res*, **56**, 126–132.
- Arias-Rodriguez, L., G. S. Yasui, and K. Arai (2009b) Disruption of normal meiosis in

- artificial inter-population hybrid female *Misgurnus loach*. *Genetica*, **136**, 49–56.
- Arias-Rodriguez, L., G. S. Yasui, S. Kusuda and K. Arai (2010) Reproductive and genetic capacity of spermatozoa of inter-population hybrid males in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *J Appl Ichthyol*, **26**, 653–658.
- Asahida, T., T. Kobayashi, K. Saitoh and I. Nakayama (1996) Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fish Sci*, **62**, 727–730.
- Ashley, M. V., P. J. Laipis and W. W. Hauswirth (1989) Rapid segregation of heteroplasmic bovine mitochondria. *Nucleic Acids Res*, **17**, 7325–7331.
- Babiak, I., S. Dobosz, H. Kuzminski, K. Goryczko, S. Ciesielski P. Brzuzan, B. Urbanyi, A. Horvath, F. Lahnsteiner and J. Piironen (2002) Failure of interspecies androgenesis in salmonids. *J Fish Biol*, **61**, 432–447.
- Bercsényi, M., I. Magyary, B. Urbanyi, L. Orban and L. Horvath (1998) Hatching out goldfish from common carp eggs: interspecific androgenesis between two cyprinid species. *Genome*, **41**, 573–579.
- Brandhorst, B. P. and G. E. Corley-Smith (2004) Production of haploid and diploid androgenetic zebrafish. In “Germ Cell Protocols. Methods in Molecular Biology” (ed. by H. Schatten), Humana Press, Totowa, pp. 255–270.
- Chiaratti, M. R., C. R. Ferreira, P. S. Barusell, B. Gasparrini and J. M. Garcia (2010) Xenoplasmic transfer between buffalo and bovine enables development of homoplasmic offspring. *Cell Reprogram*, **12**, 231–236.
- Cherfas, N. B., B. I. Gomelsky, O. V. Emelyanova and A. V. Recoubratsky (1994) Induced diploid gynogenesis and polyploidy in crucian carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch), × common carp, *Cyprinus carpio* L., hybrids. *Aquacult Fish Manage*, **25**, 943–954.
- Cohen, M. A., S. R. Lindheim and M. V. Sauer (1999) Donor age is paramount to success in oocyte donation. *Hum Reprod*, **14**, 2755–2758.

- Corley-Smith, G. E., C. J. Lim and B. P. Brandhorst (1996) Production of androgenetic zebrafish (*Danio rerio*). *Genetics*, **142**, 1265–1276
- DeLuca, S. Z. and P. H. O’Farrell (2012) Barriers to male transmission of mitochondrial DNA in sperm development. *Dev Cell*, **22**, 660–668.
- Endoh, M., T. Fujimoto, E. Yamaha and K. Arai (2018) Improved procedure for induction of the androgenetic doubled haploids in zebrafish. *Zebrafish*, **15**, 33–44.
- Ferreira, C. R., J. P. Burgstaller, F. Perecin, J. M. Garcia, M. R. Chiaratti, S. R. Méo, M. Müller, L. C. Smith, F. V. Meirelles and R. Steinborn (2010) Pronounced segregation of donor mitochondria introduced by bovine ooplasmic transfer to the female germ-line. *Biol Reprod*, **82**, 563–571.
- 藤本貴史 (2005). 精子からの個体再生に向けた魚類の核－細胞質雑種に関する発生工学的研究. 北海道大学大学院水産科学研究科 博士論文, 函館, pp. 42–53.
- Fujimoto, T., T. Kataoka, S. Sakao, T. Saito, E. Yamaha and K. Arai (2006) Developmental stages and germ cell lineage of the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Zool Sci*, **23**, 977–989.
- Fujimoto, T., S. Sakao, E. Yamaha, and K. Arai (2007) Evaluation of different doses of UV irradiation to loach eggs for genetic inactivation of the maternal genome. *J Exp Zool Part A*, **307**, 449–462.
- Fujimoto, T., G. S. Yasui, H. Yoshikawa, E. Yamaha and K. Arai (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**, 430–437.
- Fujimoto, T., T. Saito, S. Sakao, K. Arai and E. Yamaha (2010a) Developmental potential of embryonic cells in a nucleocytoplasmic hybrid formed using a goldfish haploid nucleus and loach egg cytoplasm. *Int J Dev Biol*, **54**, 827–835.
- Fujimoto, T., G. S. Yasui, M. Hayakawa, S. Sakao, E. Yamaha and K. Arai (2010b) Reproductive capacity of neo-tetraploid loaches produced using diploid spermatozoa

from a natural tetraploid male. *Aquaculture*, **308**, 133–139.

Fujimoto, T., A. Yamada, Y. kudo, K. Nakaya, M. Okubo-Murata, T. Saito, K. Ninomiya, M. Inaba, M. Kuroda, K. Arai and M. Murakami (2017) Development of nuclear DNA markers to characterize genetically diverse groups of *Misgurnus anguillicaudatus* and its closely related species. *Fish Sci*, **83**, 743–756.

Fujiwara, A., S. Abe, E. Yamaha, F. Yamazaki and M. C. Yoshida (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.

Gray, A. K., M. A. Evans and G. H. Thorgaard (1993) Viability and development of diploid and triploid salmonid hybrids. *Aquaculture*, **112**, 125–142.

Hanson, M. R. and S. Bentolila (2004) Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell*, **16**, 154–169.

Hou, J., T. Fujimoto, E. Yamaha and K. Arai (2013) Production of androgenetic diploid loach by cold-shock of eggs fertilized with diploid sperm. *Theriogenology*, **80**, 125–130.

Hou, J., T. Saito, T. Fujimoto, E. Yamaha and K. Arai (2014) Androgenetic doubled haploids induced without irradiation of eggs in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Aquaculture*, **420-421**, 557–563.

Hou, J., T. Fujimoto, T. Saito, E. Yamaha and K. Arai (2015) Generation of clonal zebrafish line by androgenesis without egg irradiation. *Sci Rep*, **5**, 13346.

宝来聡 (2001) ミトコンドリアの遺伝子構造とその特徴. 新ミトコンドリア学 (内海耕造、井上正康編), 共立出版, 東京, pp. 81–87.

井上喜博 (2017) ショウジョウバエのミトコンドリア動態を監査する新規細胞周期チェックポイント機構. 科学研究費助成事業研究成果報告書.

石原直忠 (2010) ミトコンドリアの融合・分裂と哺乳動物の発生・分化. 細胞工学, **29**, 443–447.

- 石原慎也 (2015) フィリピンに生息する絶滅危惧水牛タマラオ (*Bubalus mindorensis*) の保全に関する調査研究. 筑波大学大学院生命環境科学研究科 博士論文, つくば, pp. 2–8.
- 板橋悦子, 川辺隆大, 藤本龍 (2012) 植物の細胞質雄性不稔性と核遺伝子による稔性の制御について. 新大農研報, **64**, 135–142.
- Itono, M., K. Morishima, T. Fujimoto, E. Bando, E. Yamaha and K. Arai (2006) Premeiotic endomitosis produces diploid eggs in the natural clone loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae). *J Exp Zool Part A*, **305**, 513–523.
- Jenuth, J. P., A. C. Peterson, K. Fu and E. A. Shoubri (1996) Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat Genet*, **14**, 146–151.
- Jesuthasan, S. and Strähle, U (1997) Dynamic microtubules and specification of the zebrafish embryonic axis. *Curr Biol*, **7**, 31–42.
- 垣花廣幸 (1998) 不妊虫放飼法によるウリミバエの根絶. 日本原子力学会誌, **40**, 91–100.
- Kawahara, M., S. Koyama, S. Iimura, Y. Yamazaki, A. Tanaka, N. Kohri, K. Sasaki and M. Takahashi (2015) Preimplantation death of xenomitochondrial mouse embryo harbouring bovine mitochondria. *Sci Rep*, **5**, 14512.
- Kazama, T., M. Okuno, Y. Watari, S. Yanase, C. Koizuka, Y. Tsuruta, H. Sugaya, A. Toyoda, T. Itoh, N. Tsutsumi, K. Toriyama, N. Koizuka and S. Arimura (2019) Curing cytoplasmic male sterility via TALEN-mediated mitochondrial genome editing. *Nat Plants*, **5**, 722–730.
- 木島圭助, 荒井克俊, 鈴木亮 (1996a) 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. *J Fac Appl Biol Sci Hiroshima Univ*, **35**, 1–12.
- 木島圭助, 荒井克俊, 鈴木亮 (1996b) 致死性科間雑種シマドジョウ雌×コイ雄およびドジョウ雌×コイ雄における異質三倍体と五倍体の誘起. *J Fac Appl Biol Sci Hiroshima Univ*, **35**, 13–26.

- Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann and T. F. Schilling (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dynam*, **203**, 255–310.
- 小林弘, 川島康代, 竹内直政 (1970) フナ属魚類の染色体の比較研究、特にギンブナに現れた倍数性について. 魚類学雑誌, **17**, 153–160.
- 小堀彰彦 (2019) 内水面におけるスペシャルトラウト開発史と発展. 養殖ビジネスよくわかる! ジャパンサーモン養殖 (秋元理編), 緑書房, 東京, pp. 24–28.
- Kochhar, H. P. S., K. B. C. Appa Rao, A.M. Luciano, S. M. Totey, F. Gandolfi, P. K. Basrur and W. A. King (2002) *In vitro* production of cattle–water buffalo (*Bos taurus*–*Bubalus bubalis*) hybrid embryos. *Zygote*, **10**, 155–162.
- Komen, H. and G. H. Thorgaard (2007) Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. *Aquaculture*, **269**, 150–173.
- Kuroda, M., T. Fujimoto, M. Murakami, E. Yamaha and K. Arai (2018) Clonal reproduction assured by sister chromosome pairing in dojo loach, a teleost fish. *Chromosome Res*, **26**, 243–253.
- Lin, F. and K. Dabrowski (1998) Androgenesis and homozygous gynogenesis in muskellunge (*Esox masquinongy*): evaluation using flow cytometry. *Mol Replod Dev*, **49**, 10–18.
- Liu, S. J., Y. Liu, G. J. Zhou, X. J. Zhang, C. Luo, H. Feng, X. X. He, G. H. Zhu and H. Yang (2001) The formation of tetraploid stocks of red crucian carp × common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization. *Aquaculture*, **192**, 171–186.
- Liu, S. J. (2010) Distant hybridization leads to different ploidy fishes. *Sci China Ser C*, **53**, 416–425.
- Ma, H., N. M. Gutierrez, R. Morey, C. V. Dyken, E. Kang, T. Hayama, Y. Lee, Y. Li, R. Tippmer-Hedges, D. P. Wolf, L. C. Laurent and S. Mitalipov (2016) Incompatibility between nuclear and mitochondrial genomes contributes to an interspecies reproductive barrier. *Cell Metab*, **24**, 283–294.

- Masaoka, T., K. Arai and R. Suzuki (1995) Production of androgenetic diploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* from UV irradiated eggs by suppression of the first cleavage. *Fish Sci*, **61**, 716–717.
- 正岡哲治, 荒井克俊, 鈴木亮 (1995) ドジョウ UV 照射卵とシマドジョウ精子による雄性発生誘起. 水産育種, **22**, 51–57.
- Meirelles, F. V. and L. C. Smith (1997) Mitochondrial genotype segregation in a mouse heteroplasmic lineage produced by embryonic karyoplast transplantation. *Genetics*, **145**, 445–451.
- Michalik, O., S. Dobosz, I. Wójcik, T. Zalewski and K. Ocalewicz (2014) Use of eggs derived from the interspecific charr hybrids to induce androgenetic development of the brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchell 1814). *Reprod Domest Anim*, **49**, 191–196.
- 三牧正和 (2018) 小児神経科医が知っておくべきミトコンドリア病の多様性. 脳と発達, **50**, 7–16.
- Morishima, K., I. Nakayama and K. Arai (2001) Microsatellite-centromere mapping in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Genetica*, **111**, 59–69.
- Morishima, K., S. Horie, E. Yamaha and K. Arai (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**, 565–575.
- Morishima, K., K. Oshima, S. Horie, T. Fujimoto, E. Yamaha and K. Arai (2004) Clonal diploid sperm of the diploid-triploid mosaic loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae). *J Exp Zool Part A*, **301**, 502–511.
- Morishima, K., Y. Nakamura-Shiokawa, E. Bando, Y. J. Li, A. Boron, M. M. R. Khan and K. Arai (2008a) Cryptic clonal lineages and genetic diversity in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) inferred from mitochondrial DNA analyses. *Genetica*, **132**, 159–171.
- Morishima, K., I. Nakayama and K. Arai (2008b) Genetic linkage map of the loach *Misgurnus*

anguillicaudatus (Teleostei: Cobitidae). *Genetica*, **132**, 227–241.

Morishima, K., H. Yoshikawa and K. Arai (2008c) Meiotic hybridogenesis in triploid *Misgurnus* loach derived from a clonal lineage. *Heredity*, **100**, 581–586.

Murakami, M. and H. Fujitani (1997) Polyploid-specific repetitive DNA sequences from triploid gimbuna (Japanese silver crucian carp, *Carassius auratus langsdorfi*). *Genes Genet Syst*, **72**, 107–113.

Nakada, K., A. Sato, K. Yoshida, T. Morita, H. Tanaka, S. Inoue, H. Yonekawa and J. Hayashi (2006) Mitochondria-related male infertility. *PNAS*, **103**, 15148–15153.

Nam, Y. K., Y. S. Cho and D. S. Kim (2000) Isogenic transgenic homozygous fish induced by artificial parthenogenesis. *Transgenic Res*, **9**, 463–469.

Neifakh, A. A. and V. V. Radzievskaya (1967) On the morphogenetic functions of nuclei in simple and androgenetic hybrids of goldfish and loach (*Carassius auratus auratus* × *Misgurnus fossilis*). *Genetika*, **3**, 80–88.

Nishimura, Y., T. Yoshinari, K. Naruse, T. Yamada, K. Sumi, H. Mitani, T. Higashiyama and T. Kuroiwa (2006) Active digestion of sperm mitochondrial DNA in single living sperm revealed by optical tweezers. *PNAS*, **103**, 1382–1387.

Ocalewicz, K., H. Kuzminski, K. Pomianowski and S. Dobosz (2013) Induction of androgenetic development of the brook charr (*Salvelinus fontinalis*) × Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) hybrids in eggs derived from the parental species. *Reprod Biol*, **13**, 105–112.

岡本裕之 (2017) 遺伝子編集技術を用いた不妊化魚による外来魚の根絶を目的とした遺伝子制圧技術の基盤開発 (4-1408). 環境省環境研究総合推進費終了研究等成果報告書.

小野里坦 (1989) 雄性発生. 水産増養殖と染色体操作 (鈴木亮編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 60–69.

Otten, A. B. C., T. E. J. Theunissen, J. G. Derhaag, E. H. Lambrichts, I. B. W. Boesten, M. Winandy, A. P. A. van Montfoort, K. Tarbashevich, E. Raz, M. Gerards, J. M. Vanoevelen,

- B. J. C. van den Bosch, M. Muller and H. J. M. Smeets (2016) Differences in strength and timing of the mtDNA bottleneck between zebrafish germline and non-germline cells. *Cell Rep*, **16**, 622–630.
- Peng, L., M. Wen, Q. Liu, A. Peng, S. Tang, Y. Hong, S. Liu and Y. Xiao (2018) Persistence and transcription of paternal mtDNA dependent on the delivery strategy rather than mitochondria source in fish embryos. *Cell Physiol Biochem*, **47**, 1898–1908.
- Pickworth, S. and M. C. Change (1969) Fertilization of Chinese hamster eggs *in vitro*. *J Reprod Fert*, **19**, 371–374.
- Reddy, P., A. Ocampo, K. Suzuki, J. P. Luo, S. R. Bacman, S. L. Williams, A. Sugawara, D. Okamura, Y. Tsunekawa, J. Wu, D. Lam, X. Xiong, N. Montserrat, C. R. Esteban, G. H. Liu, I. Sancho-Martinez, D. Manau, S. Civico, F. Cardellach, M. del Mar O’Callaghan, J. Campistol, H. Zhao, J. M. Campistol, C. T. Moraes, and J. C. I. Belmonte (2015) Selective elimination of mitochondrial mutations in the germline by genome editing. *Cell*, **161**, 459–469.
- 佐藤美由紀, 佐藤健 (2019) 受精卵における精子ミトコンドリアの排除機構. 実験医学, **37**, 52–57.
- Seeb, J. E., G. H. Thorgaard and F. M. Utter (1988) Survival and allozyme expression in diploid and triploid hybrids between chum, chinook, and coho salmon. *Aquaculture*, **72**, 31–48.
- Shimoda, N., E. W. Knapik, J. Ziniti, C. Sim, E. Yamada, S. Kaplan, D. Jackson, F. de Sauvage, H. Jacob and M. C. Fishman (1999) Zebrafish genetic map with 2000 microsatellite markers. *Genomics*, **58**, 219–232.
- Shitara, H., L. Cao, M. Yamaguchi, H. Yonekawa and C. Taya (2017) Establishment of a heteroplasmic mouse strain with interspecific mitochondrial DNA haplotypes and improvement of a PCR-RFLP-based measurement system for estimation of mitochondrial DNA heteroplasmy. *Transgenic Res*, **26**, 559–565.
- Solnica-Krezel, L. and W. Driever (1994) Microtubule arrays of the zebrafish yolk cell: organization and function during epiboly. *Development*, **120**, 2443–2455.

- Spiropoulos, J., Turnbull, D. M and Chinnery, P. F (2002) Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? *Mol Hum Reprod*, **8**, 719–721.
- Strähle, U. and S. Jesuthasan (1993) Ultraviolet irradiation impairs epiboly in zebrafish embryos: evidence for a microtubule-dependent mechanism of epiboly. *Development*, **119**, 909–919.
- Sutovsky, P., R. D. Moreno, J. Ramalho-Santos, T. Dominko, C. Simerly and G. Schatten (1999) Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, **402**, 371–372.
- Sun, Y. H. and Z. Y. Zhu (2014) Cross-species cloning: influence of cytoplasmic factors on development. *J Physiol*, **592**, 2375–2379.
- Suzuki, R., T. Oshiro and T. Nakanishi (1985) Survival, growth and fertility of gynogenetic diploids induced in the cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture*, **48**, 45–55.
- 鈴木智宏, 孝口裕一, 加藤芳伸 (2010) リアルタイム PCR による挽き肉製品中の肉種の識別定量. 道衛研所報, **60**, 71–74.
- Takamatsu, C., S. Umeda, T. Ohsato, T. Ohno, Y. Abe, A. Fukuoh, H. Shinagawa, N. Hamasaki and D. Kang (2002) Regulation of mitochondrial D-loops by transcription factor A and single-stranded DNA-binding protein. *EMBO Rep.*, **3**, 451–456.
- Thompson, W. E., J. Ramalho-Santos and P. Sutovsky (2003) Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. *Biol Reprod*, **69**, 254–260.
- Tung, T. C. (1980) Nuclear transplantation in teleosts. I. Hybrid fish from the nucleus of carp and the cytoplasm of crucian. *Scientia (Peking)*, **14**, 1244–1245.
- Ungar, A. R., K. A. Helde and R. T. Moon (1998) Production of androgenetic haploids in zebrafish with ultraviolet light. *Mol Mar Biol Biotech*, **7**, 320–326.
- Wang, T., H. Sha, D. Ji, H. L. Zhang, D. Chen, Y. Cao and J. Zhu (2014) Polar body genome

- transfer for preventing the transmission of inherited mitochondrial diseases. *Cell*, **157**, 1591–1604.
- Yamada, A., Y. Kodo, M. Murakami, M. Kuroda, T. Aoki, T. Fujimoto and K. Arai (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*, **323**, 593–606.
- Yamanaka, Y., T. Mizuno, Y. Sakai, M. Kishi, H. Takeda, C. H. Kim, M. Hibi and T. Hirano (1998). A novel homeobox gene, *dharma*, can induce the organizer in a non-cell-autonomous manner. *Genes Dev*, **12**, 2345–2353.
- Yamano, K., E. Yamaha and F. Yamazaki (1988) Increased viability of allotriploid pink salmon × Japanese chum hybrids. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 1477–1481.
- Yan S. Y., D. Y. Lu, M. Du, G. S. Li, L. T. Lin, G. Q. Jin, H. Wang, Y.Q. Yang, D. Q. Xia, A. Z. Liu, Z. Y. Zhu, Y. L. Yi and H. X. Chen (1984) Nuclear transplantation in teleosts. Hybrid fish from the nucleus of crucian and the cytoplasm of carp. *Sci Sin Ser B*, **27**, 1029–1034.
- Yan, S. Y., M. Tu, H. Y. Yang, Z. R. Mao, Z. Y. Zhao, L. J. Fu, G. S. Li, G. P. Huang, S. H. Li, G. Q. Jin, L. Ma, L. D. Lin, S. L. Xia and L. N. Yu (1990) Developmental incompatibility between cell nucleus and cytoplasm as revealed by nuclear transplantation experiments in teleost of different families and orders. *Int J Dev Biol*, **34**, 255–265.
- Yasui, G. S., T. Fujimoto and K. Arai (2010) Restoration of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, from cryopreserved diploid sperm and induced androgenesis. *Aquaculture*, **308**, 140–144.
- Yoshikawa, H., K. Morishima, S. Kusuda, E. Yamaha and K. Arai (2007) Diploid sperm produced by artificially sex-reversed clone loaches. *J Exp Zool Part A*, **307**, 75–83.
- Yoshikawa, H., K. Morishima, T. Fujimoto, L. Arias-Rodriguez, E. Yamaha and K. Arai (2008) Ploidy manipulation using diploid sperm in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*: a review. *J Appl Ichthyol*, **24**, 410–414.

- Yoshikawa, H., K. Morishima, T. Fujimoto, T. Saito, T. Kobayashi, E. Yamaha and K. Arai (2009) Chromosome doubling in early spermatogonia produces diploid spermatozoa in a natural clonal fish. *Biol Reprod*, **80**, 973–979.
- Zhang, Q., K. Arai and M. Yamashita (1998) Cytogenetic mechanisms for triploid and haploid egg formation in the triploid loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *J Exp Zool*, **281**, 608–619.
- Zhao, Y., M. Psenicka, T. Fujimoto, T. Saito, G. S. Yasui, E. Yamaha and K. Arai (2012) Motility, morphology, mitochondria and ATP content of diploid spermatozoa from sex-reversed clonal diploid and neo-tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *J Appl Ichthyol*, **28**, 1006–1012.

Table 1. Genomic constitution of diploid and triploid hybrids from inter-specific cross-fertilization and haploid and diploid nucleocytoplasmic hybrids from interspecific androgenesis

Biotype	Combination of eggs and sperm (Female x Male)	Resultant progeny	
		Cytoplasm	Nucleus (Ploidy)
Intra-specific crosses			
Diploid control	Zebrafish x Zebrafish	Zebrafish	Zebrafish (2n)
Androgenetic haploid	UV Zebrafish x Zebrafish	Zebrafish	Zebrafish (1n)
Androgenetic diploid	UV Zebrafish x Zebrafish + HS* ¹	Zebrafish	Zebrafish (2n)
Inter-specific crosses			
Diploid hybrid	Zebrafish x Pearl danio	Zebrafish	Zebrafish x Pearl danio (2n)
Haploid N-C hybrid* ²	UV Zebrafish x pearl danio	Zebrafish	Pearl danio (1n)
Diploid N-C hybrid* ²	UV Zebrafish x pearl danio + HS* ¹	Zebrafish	Pearl danio (2n)
Inter-generic crosses			
Diploid hybrid	Zebrafish x Goldfish	Zebrafish	Zebrafish x Goldfish (2n)
Triploid hybrid	Zebrafish x tetraploid crucian carp	Zebrafish	Zebrafish x Crucian carp (3n)
Haploid N-C hybrid* ²	UV Zebrafish x Goldfish	Zebrafish	Goldfish (1n)
Diploid N-C hybrid* ²	UV Zebrafish x tetraploid crucian carp	Zebrafish	Crucian carp (2n)
Inter-familial crosses			
Diploid hybrid	Zebrafish x Loach	Zebrafish	Zebrafish x Loach (2n)
Triploid hybrid	Zebrafish x Sex-reversed clone loach	Zebrafish	Zebrafish x Clone loach (3n)
Haploid N-C hybrid* ²	UV Zebrafish x Loach	Zebrafish	Loach (1n)
Diploid N-C hybrid* ²	UV Zebrafish x Sex-reversed clone loach	Zebrafish	Clone loach (2n)

*1: Heat shock for first cleavage inhibition.

*2: Nucleocytoplasmic hybrid.

Table 2. Primer information for microsatellite genotyping in zebrafish

Locus	Linkage group	Sequence (5'-3')	Locus	Linkage group	Sequence (5'-3')
Z1781 F	LG1	GCTCTGGCAGATTCCAAATTCC	Z6622 F	LG13	CAGTGGAGGCTCTGGCAG
Z1781 R		AAGGGTCAGCTGCAGGGGT	Z6622 R		ATCATGCTGGAGAAACCCTG
Z8874 F	LG1	TGTGTCATCTGCTTTTGTCTGA	Z992 F	LG16	ACACAGCCGTGTTTGACGTA
Z8874 R		ACTGCTGTGAAGTCCACACG	Z992 R		TCCCTCACGATTACCCAGAC
Z644 F	LG2	CACGGACAATCCAGTGACG	Z6010 F	LG17	CTGCGACCGTGAGTGAAGT
Z644 R		CCCAGCAACAACACTAAGCA	Z6010 R		CCAACAGCACTCTGAGGACA
Z8495 F	LG7	TCATAATCATGTGCTCCTCTTGA	Z9331 F	LG19	GGATAAATCCTGGCCTTTCC
Z8495 R		TTGTTGTTGACGCTGCTTTC	Z9331 R		CAGACACTGCAGAGCTCGAG
Z10215 F	LG11	ATATCCCGTCCTGCTCAGTG	Z9708 F	LG20	GAGCGGCAAGTATGTGGATT
Z10215 R		TCAGATGTGCACAACTGCAA	Z9708 R		AGGAGGCGAATCAGACTGAA
Z7576 F	LG12	AATGATGAAGGTCACCGCTC	Z5265 F	LG23	CTAACCACAGCTGCAACAACCG
Z7576 R		GTCCCTTTCCACAGTCTGA	Z5265 R		AGTGTCCGTGCAATCAGAGGC

Table 3. Effects of different doses on fertilization and survival (Experiment I)

UV dose (mJ/cm ²)	No. of eggs used	Fertilization [%]	Survival rate at 12 hpf [%]	Survival rate at 24 hpf [%]	Survival rate at 48 hpf [%]
0	80 ± 11	59.3 ± 12.63 ^{ab}	96.3 ± 2.42 ^a	91.7 ± 3.76 ^a	91.3 ± 3.61 ^a
25	168 ± 34	75.6 ± 6.50 ^a	88.3 ± 5.82 ^a	65.1 ± 7.95 ^{ab}	55.6 ± 6.70 ^b
75	170 ± 19	60.3 ± 10.32 ^{ab}	61.3 ± 12.44 ^{ab}	33.4 ± 11.49 ^{bc}	28.1 ± 10.76 ^c
150	210 ± 18	35.5 ± 13.13 ^{ab}	41.1 ± 13.81 ^{bc}	17.1 ± 10.66 ^{cd}	8.2 ± 5.66 ^c
200	245 ± 21	21.8 ± 6.36 ^b	15.1 ± 6.20 ^c	1.3 ± 1.30 ^b	1.3 ± 1.30 ^c

Each value is the mean ± SE of five replicates.

Different superscript letters in each column indicate significant differences as determined by one-way analysis of variance and Tukey's test ($P < 0.05$).

Table 4. Ploidy status resulting from different doses of UV irradiation (Experiment I)

UV dose (mJ/cm ²)	External appearance	No. of larvae for FCM	Ploidy status						
			1C	2C	3C	4C	Mosaic	Aneuploid	Unidentified
0 (Control)	Normal	85	1	84	0	0	0	0	0
	Abnormal	1	1	0	0	0	0	0	0
25	Normal	6	0	6	0	0	0	0	0
	Abnormal	151	132	11	0	1	1 ^a	5 ^b	1
75	Normal	N.A.	-	-	-	-	-	-	-
	Abnormal	83	83	0	0	0	0	0	0
150	Normal	N.A.	-	-	-	-	-	-	-
	Abnormal	20	17	2	0	0	0	1 ^c	0
200	Normal	N.A.	-	-	-	-	-	-	-
	Abnormal	2	2	0	0	0	0	0	0

Each value is the total of five replicates.

a. 1.0C-1.1C mosaic.

b. Two 1.1C, two 1.2C, one 1.8C.

c. One 1.7C.

Table 5. Effect of different doses on fertilization, survival, and external appearance (Experiment II)

UV dose (mJ/cm ²)	No. of eggs used	Fertilization [%]	Survival rate at 12hpf [%]	Survival rate at 24hpf [%]	Survival rate at 48hpf [%]	Haploid syndrome [%]	Incomplete epiboly [%]	Cell mass [%]
0	73 ± 15	62.6 ± 4.28 ^{ab}	93.6 ± 3.11 ^a	89.6 ± 4.38 ^a	88.6 ± 4.27 ^a	-	-	-
50	139 ± 18	73.0 ± 3.98 ^a	78.4 ± 4.01 ^{ab}	53.1 ± 8.52 ^{ab}	44.6 ± 8.07 ^b	93.2 ± 1.66	0.0 ± 0.00	6.8 ± 1.66
75	141 ± 25	64.8 ± 3.14 ^{ab}	73.5 ± 9.11 ^{ab}	49.4 ± 12.51 ^b	41.3 ± 12.26 ^b	92.7 ± 6.35	0.0 ± 0.00	7.3 ± 6.35
100	141 ± 26	59.3 ± 5.23 ^{ab}	70.3 ± 4.51 ^{ab}	41.3 ± 8.94 ^b	31.5 ± 7.87 ^b	74.1 ± 8.83	21.8 ± 9.96	4.2 ± 4.17
125	165 ± 27	61.0 ± 5.07 ^{ab}	62.2 ± 5.86 ^b	27.8 ± 6.58 ^b	22.2 ± 6.72 ^b	68.5 ± 11.26	18.5 ± 15.82	13.0 ± 8.07
150	167 ± 23	45.7 ± 5.44 ^b	56.0 ± 6.97 ^b	22.6 ± 8.82 ^b	16.7 ± 7.91 ^b	79.4 ± 2.42	8.3 ± 8.33	12.2 ± 6.19

"No. of eggs used," "Fertilization," and "Embryo survived" are the mean ± SE of six replicates.

"Haploid syndrome," "Incomplete epiboly," and "Cell mass" are the mean ± SE of the triplicate.

Different superscript letters in each column indicate significant differences as determined by one-way analysis of variance and Tukey's test ($P < 0.05$).

Table 6. Ploidy status resulting from different doses of UV irradiation (Experiment II)

UV dose (mJ/cm ²)	External appearance	No. of larvae for FCM	Ploidy status						
			1C	2C	3C	4C	Mosaic	Aneuploid	Unidentified
0 (Control)	Normal	104	0	104	0	0	0	0	0
	Abnormal	N.A.	-	-	-	-	-	-	-
50	Normal	N.A.	-	-	-	-	-	-	-
	Abnormal	130	124	1	0	0	0	5 ^a	0
75	Normal	1	0	1	0	0	0	0	0
	Abnormal	116	112	2	0	0	0	1 ^b	0
100	Normal	N.A.	-	-	-	-	-	-	-
	Abnormal	105	101	1	0	0	0	3 ^c	0
125	Normal	N.A.	-	-	-	-	-	-	-
	Abnormal	103	96	3	0	0	0	2 ^d	2
150	Normal	N.A.	-	-	-	-	-	-	-
	Abnormal	43	41	1	0	0	0	1 ^e	0

Each value is the total of six replicates.

a. Four 1.1C, One 1.8C.

b. One 1.1C.

c. Three 1.1C.

d. Two 1.1C.

e. One 2.1C.

Table 7. Developmental capacity of zebrafish diploid control, diploid inter-specific hybrid between zebrafish and pearl danio, androgenetic haploid zebrafish, and haploid and diploid nucleocytoplasmic hybrid induced by fertilization between UV-irradiated zebrafish egg and pearl danio haploid sperm

Cross		Treatment	No. of eggs used	Fertilization (%)	Survival (%)					
Female	Male				4 hpf	8 hpf	12 hpf	24 hpf	36 hpf	48 hpf
Zebrafish	Zebrafish	-	98 ± 22	63.5 ± 21.3	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	95.8 ± 1.7 ^a	91.5 ± 1.3 ^a	91.2 ± 1.6 ^a	88.8 ± 2.4 ^a
Zebrafish	Pearl danio	-	125 ± 20	65.4 ± 27.5	100.0 ± 0.0	97.4 ± 4.6	93.7 ± 5.6 ^{ab}	91.3 ± 6.9 ^a	91.3 ± 6.9 ^a	91.3 ± 6.9 ^a
UV Zebrafish [†]	Zebrafish	-	100 ± 36	69.3 ± 23.5	100.0 ± 0.0	85.7 ± 20.9	72.8 ± 22.2 ^{ab}	53.5 ± 29.2 ^{ab}	52.5 ± 27.6 ^{ab}	49.5 ± 26.9 ^{ab}
UV Zebrafish [†]	Pearl danio	-	107 ± 35	63.1 ± 25.7	100.0 ± 0.0	86.6 ± 15.2	66.3 ± 23.0 ^{ab}	49.5 ± 25.5 ^{ab}	45.5 ± 27.1 ^{ab}	42.7 ± 25.3 ^{ab}
UV Zebrafish [†]	Pearl danio	Heat shock [‡]	N.A.	N.A.	100.0 ± 0.0	70.5 ± 44.7	41.7 ± 20.6 ^b	10.9 ± 4.3 ^b	10.9 ± 4.3 ^b	8.5 ± 3.6 ^b

Each value is the mean ± SD of the triplicates.

Different superscript letters in each column indicate significant differences as determined by Kruskal-Wallis test and Scheffe's test ($P < 0.05$).

[†]: UV irradiated zebrafish egg.

[‡]: First cleavage inhibition by heat shock treatment at 41.4°C, for 2 min, at 13 min post fertilization.

Table 8. Developmental capacity of zebrafish diploid control, androgenetic haploid zebrafish, and androgenetic diploid zebrafish

	Cross		Treatment	No. of eggs used	Fertilization (%)	Survival (%)					
	Female	Male				4 hpf	8 hpf	12 hpf	24 hpf	36 hpf	48 hpf
Batch A	Zebrafish	Zebrafish	-	77	94.8	100.0	100.0	86.3	78.1	76.7	74.0
	UV Zebrafish [†]	Zebrafish	-	189	96.3	100.0	95.1	62.6	26.4	23.6	21.4
	UV Zebrafish [†]	Zebrafish	Heat shock [‡]	521	95.4	100.0	40.4	2.8	0.4	0.4	0.4
Batch B	Zebrafish	Zebrafish	-	77	94.8	100.0	94.5	94.5	90.4	90.4	90.4
	UV Zebrafish [†]	Zebrafish	-	176	89.8	100.0	90.5	71.0	65.8	63.9	63.0
	UV Zebrafish [†]	Zebrafish	Heat shock [‡]	397	94.0	100.0	90.3	53.6	24.9	22.3	21.7
Batch C	Zebrafish	Zebrafish	-	67	98.5	100.0	98.5	93.9	92.4	92.4	92.4
	UV Zebrafish [†]	Zebrafish	-	92	82.6	100.0	71.1	55.3	34.2	31.6	27.6
	UV Zebrafish [†]	Zebrafish	Heat shock [‡]	349	32.7	100.0	81.6	10.5	6.1	4.4	4.4
Batch D	Zebrafish	Zebrafish	-	78	93.6	100.0	100.0	98.6	98.6	98.6	98.6
	UV Zebrafish [†]	Zebrafish	-	109	66.1	100.0	70.8	40.3	20.8	20.8	18.1
	UV Zebrafish [†]	Zebrafish	Heat shock [‡]	380	77.9	100.0	57.7	38.9	35.5	34.5	33.8

[†]: UV irradiated zebrafish egg.

[‡]: First cleavage inhibition by heat shock treatment at 41.4 °C, for 2 min, at 13 min post fertilization.

Table 9. Developmental capacity of zebrafish diploid control, diploid hybrid between zebrafish and goldfish, triploid hybrid between zebrafish and tetraploid crucian carp, androgenetic haploid zebrafish, haploid nucleocytoplasmic hybrid induced by fertilization between UV-irradiated zebrafish egg and goldfish haploid sperm, and diploid nucleocytoplasmic hybrid induced by fertilization between UV-irradiated zebrafish egg and diploid sperm from tetraploid crucian carp

Experiment 1: Hybridization and androgenesis using haploid sperm of goldfish									
Cross		No. of eggs used	Fertilization (%)	Survival (%)					
Female	Male			4 hpf	8 hpf	12 hpf	24 hpf	36 hpf	48 hpf
Zebrafish	Zebrafish	85 ± 42	67.5 ± 17.3 ^a	100.0 ± 0.0	94.5 ± 4.2 ^a	84.6 ± 11.4 ^a	75.6 ± 20.1 ^{ab}	73.6 ± 18.8 ^{ab}	71.7 ± 21.1 ^{ab}
Zebrafish	Goldfish	112 ± 35	42.8 ± 22.4 ^{ab}	100.0 ± 0.0	94.4 ± 6.7 ^a	72.4 ± 28.9 ^a	67.3 ± 25.5 ^{ab}	61.7 ± 23.4 ^{abc}	60.3 ± 25.9 ^{abc}
UV Zebrafish [†]	Zebrafish	132 ± 47	84.0 ± 5.5 ^a	100.0 ± 0.0	94.8 ± 4.0 ^a	67.2 ± 13.4 ^a	41.5 ± 11.7 ^{bc}	38.8 ± 11.4 ^b	36.9 ± 9.4 ^b
UV Zebrafish [†]	Goldfish	216 ± 100	54.5 ± 15.0 ^a	100.0 ± 0.0	39.8 ± 20.3 ^b	0.9 ± 0.9 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d
Experiment 2: Hybridization and androgenesis using diploid sperm of crucian carp									
Cross		No. of eggs used	Fertilization (%)	Survival (%)					
Female	Male			4 hpf	8 hpf	12 hpf	24 hpf	36 hpf	48 hpf
Zebrafish	Zebrafish	86 ± 34	79.3 ± 8.8 ^a	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0 ^a	98.8 ± 1.2 ^a	97.9 ± 1.9 ^a	97.1 ± 0.6 ^a	97.1 ± 0.6 ^a
Zebrafish	Crucian carp	161 ± 57	2.4 ± 1.3 ^b	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0 ^a	50.0 ± 16.7 ^{ab}	16.7 ± 16.7 ^c	16.7 ± 16.7 ^{cd}	16.7 ± 16.7 ^{cd}
UV Zebrafish [†]	Zebrafish	109 ± 23	64.5 ± 6.6 ^a	100.0 ± 0.0	99.6 ± 0.7 ^a	93.7 ± 5.6 ^a	81.6 ± 7.0 ^{ab}	80.1 ± 7.2 ^{ab}	76.9 ± 8.0 ^{ab}
UV Zebrafish [†]	Crucian carp	213 ± 57	3.1 ± 1.7 ^b	100.0 ± 0.0	66.7 ± 16.7 ^{ab}	14.4 ± 17.1 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d

Each value is the mean ± SD of the triplicates.

Different superscript letters in each column indicate significant differences as determined by Kruskal-Wallis test and Scheffe's test ($P < 0.05$).

†: UV irradiated zebrafish egg.

Table 10. Developmental capacity of zebrafish diploid control, diploid hybrid between zebrafish and loach, triploid hybrid between zebrafish and sex-reversed clone loach, androgenetic haploid zebrafish, haploid nucleocytoplasmic hybrid induced by fertilization between UV-irradiated zebrafish egg and loach haploid sperm, and diploid nucleocytoplasmic hybrid induced by fertilization between UV-irradiated zebrafish egg and diploid sperm from sex-reversed clone loach

Experiment 1: Hybridization and androgenesis using haploid sperm of loach									
Cross		No. of eggs used	Fertilization (%)	Survival (%)					
Female	Male			4 hpf	8 hpf	12 hpf	24 hpf	36 hpf	48 hpf
Zebrafish	Zebrafish	97 ± 32	82.0 ± 3.2 ^a	100.0 ± 0.0	97.9 ± 0.1	92.2 ± 5.4 ^a	90.5 ± 5.7 ^a	89.8 ± 6.8 ^a	89.2 ± 7.9 ^a
Zebrafish	Loach	128 ± 39	85.8 ± 7.2 ^a	100.0 ± 0.0	97.4 ± 1.7	80.9 ± 19.2 ^a	79.4 ± 18.2 ^a	78.4 ± 18.8 ^a	78.1 ± 18.5 ^a
UV Zebrafish [†]	Zebrafish	142 ± 51	70.4 ± 8.7 ^a	100.0 ± 0.0	92.7 ± 1.9	77.2 ± 4.7 ^a	63.3 ± 5.4 ^a	60.0 ± 6.7 ^a	57.2 ± 9.6 ^a
UV Zebrafish [†]	Loach	170 ± 39	63.5 ± 23.5 ^a	100.0 ± 0.0	91.2 ± 7.0	66.4 ± 23.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b
Experiment 2: Hybridization and androgenesis using diploid sperm of clone loach									
Cross		No. of eggs used	Fertilization (%)	Survival (%)					
Female	Male			4 hpf	8 hpf	12 hpf	24 hpf	36 hpf	48 hpf
Zebrafish	Zebrafish	75 ± 40	71.0 ± 14.2 ^a	100.0 ± 0.0	92.7 ± 11.0	90.3 ± 8.9 ^a	87.6 ± 6.7 ^a	87.0 ± 6.0 ^a	86.3 ± 5.5 ^a
Zebrafish	Clone loach	87 ± 39	6.7 ± 3.5 ^b	100.0 ± 0.0	97.6 ± 4.1	92.9 ± 12.4 ^a	88.1 ± 20.6 ^a	85.7 ± 24.7 ^a	81.0 ± 33.0 ^a
UV Zebrafish [†]	Zebrafish	80 ± 2	66.3 ± 16.7 ^a	100.0 ± 0.0	93.5 ± 1.5	83.5 ± 2.6 ^a	55.4 ± 3.7 ^a	51.9 ± 7.8 ^a	45.1 ± 6.1 ^{ab}
UV Zebrafish [†]	Clone loach	325 ± 21	8.2 ± 1.7 ^b	100.0 ± 0.0	93.3 ± 6.7	57.8 ± 15.8 ^a	5.6 ± 9.6 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b

Each value is the mean ± SD of the triplicates.

Different superscript letters in each column indicate significant differences as determined by Kruskal-Wallis test and Scheffe's test ($P < 0.05$).

†: UV irradiated zebrafish egg.

Table 11. Genotypes of diploid control, androgenetic haploid, and androgenetic doubled haploid (Batch A)

Locus (LG)	Female	Male	Progeny		
			Control	Androgenetic haploid	Doubled haploid
Z8874 (LG1)	131 / 151	124 / 126	124 / 131 : 2	124 / - : 1	124 / 124 : 2
			124 / 151 : 1	126 / - : 5	126 / 126 : 0
			126 / 131 : 2		
			126 / 151 : 1		
Z644 (LG2)	223 / 227	227 / 230	223 / 227 : 1	227 / - : 4	227 / 227 : 0
			223 / 230 : 1	230 / - : 2	230 / 230 : 2
			227 / 227 : 4		
			227 / 230 : 0		
Z8495 (LG7)	241 / 241	241 / 285	241 / 241 : 4	241 / - : 3	241 / 241 : 0
			241 / 285 : 2	285 / - : 3	285 / 285 : 2
Z7576 (LG12)	121 / 121	160 / 160	121 / 160 : 6	160 / - : 6	160 / 160 : 2
Z6622 (LG13)	284 / 284	272 / 272	272 / 284 : 6	272 / - : 6	272 / 272 : 2
Z992 (LG16)	256 / 256	222 / 224	222 / 256 : 5	222 / - : 3	222 / 222 : 2
			224 / 256 : 1	224 / - : 3	224 / 224 : 0
Z6010 (LG17)	160 / 160	173 / 173	160 / 173 : 6	173 / - : 6	173 / 173 : 2
Z5265 (LG23)	219 / 219	184 / 219	184 / 219 : 2	184 / - : 3	184 / 184 : 1
			219 / 219 : 4	219 / - : 3	219 / 219 : 1

Table 12. Genotypes of diploid control, androgenetic haploid, and androgenetic doubled haploid (Batch B)

Locus (LG)	Female	Male	Progeny		
			Control	Androgenetic haploid	Doubled haploid
<i>Z8874</i> (LG1)	131 / 131	126 / 131	126 / 131 : 2 131 / 131 : 4	126 / - : 3 131 / - : 3	126 / 126 : 9 131 / 131 : 7
<i>Z644</i> (LG2)	223 / 227	223 / 230	223 / 223 : 1 223 / 227 : 2 223 / 230 : 2 227 / 230 : 1	223 / - : 2 230 / - : 4	223 / 223 : 8 230 / 230 : 8
<i>Z8495</i> (LG7)	285 / 285	241 / 285	241 / 285 : 3 285 / 285 : 3	241 / - : 5 285 / - : 1	241 / 241 : 9 285 / 285 : 7
<i>Z10215</i> (LG11)	128 / 132	119 / 119	119 / 128 : 4 119 / 132 : 2	119 / - : 6	119 / 119 : 16
<i>Z7576</i> (LG12)	206 / 206	121 / 161	121 / 206 : 3 161 / 206 : 3	121 / - : 4 161 / - : 2	121 / 121 : 10 161 / 161 : 6
<i>Z9331</i> (LG19)	277 / 280	291 / 293	277 / 291 : 1 277 / 293 : 4 280 / 291 : 0 280 / 293 : 1	291 / - : 2 293 / - : 4	291 / 291 : 10 293 / 293 : 6
<i>Z9708</i> (LG20)	284 / 284	207 / 207	207 / 284 : 6	207 / - : 6	207 / 207 : 16
<i>Z5265</i> (LG23)	219 / 219	184 / 219	184 / 219 : 3 219 / 219 : 3	184 / - : 2 219 / - : 4	184 / 184 : 7 219 / 219 : 9

Table 13. Genotypes of diploid control, androgenetic haploid, and androgenetic doubled haploid (Batch C)

Locus (LG)	Female	Male	Progeny		
			Control	Androgenetic haploid	Doubled haploid
<i>Z1781</i>	215 / 215	199 / 201	199 / 215 : 3	199 / - : 2	199 / 199 : 1
(LG1)			201 / 215 : 3	201 / - : 4	201 / 201 : 1
<i>Z8874</i>	118 / 131	126 / 131	118 / 126 : 0	126 / - : 4	126 / 126 : 1
(LG1)			118 / 131 : 2	131 / - : 2	131 / 131 : 1
			126 / 131 : 1		
			131 / 131 : 3		
<i>Z8495</i>	267 / 285	241 / 285	241 / 267 : 4	241 / - : 5	241 / 241 : 1
(LG7)			241 / 285 : 1	285 / - : 1	285 / 285 : 1
			267 / 285 : 1		
			285 / 285 : 0		
<i>Z7576</i>	121 / 206	160 / 160	121 / 160 : 2	160 / - : 6	160 / 160 : 2
(LG12)			160 / 206 : 4		
<i>Z992</i>	220 / 256	222 / 224	220 / 222 : 0	222 / - : 4	222 / 222 : 1
(LG16)			220 / 224 : 2	224 / - : 2	224 / 224 : 1
			222 / 256 : 3		
			224 / 256 : 1		
<i>Z6010</i>	160 / 160	173 / 189	160 / 173 : 1	173 / - : 2	173 / 173 : 1
(LG17)			160 / 189 : 5	189 / - : 4	189 / 189 : 1

Table 13. Continued

<i>Z9331</i> (LG19)	277 / 280	293 / 293	277 / 293 : 2 280 / 293 : 4	293 / - : 6	293 / 293 : 2
<i>Z9708</i> (LG20)	207 / 263	207 / 214	207 / 207 : 0 207 / 214 : 2 207 / 263 : 2 214 / 263 : 2	207 / - : 2 214 / - : 4	207 / 207 : 0 214 / 214 : 2

Table 14. Developmental capacity and ploidy status of back-crossings using sperm from androgenetic doubled haploid zebrafish

Cross		No. of eggs used	Fertilization (%)	Survival at 48 hpf (%)	No. of larvae for FCM	Ploidy status	
Female	Male					1N	2N
Zebrafish	Zebrafish	66	75.8	94.0	10	0	10
Zebrafish	Androgenetic diploid‡	149	68.5	95.1	10	0	10
UV Zebrafish†	Androgenetic diploid‡	150	66.0	56.6	20	20	0

†: UV irradiated zebrafish egg.

‡: Androgenetic doubled haploid (DH).

Table 15. Primer sets for species identification against for mitochondrial genes

Primer	Identification	Target region	Sequence (5'-3')
RFLP_F	ZFH ^{*1} and ZFN ^{*2}	Control region	CCCCTGACTCCCAAAGCCAG
RFLP_R	ZFH ^{*1} and ZFN ^{*2}	Control region	CCCATCTTGGCAGCTTCAGTG
DR_atp6_F	Goldfish and Zebrafish	<i>Atp6</i> (Zebrafish)	AACCCCCATCCCATTAATTCCG
CAA_atp6_F	Goldfish and Zebrafish	<i>Atp6</i> (Goldfish)	CCCATCCCCCTGATTCCAGTA
atp6_CR	Goldfish and Zebrafish	<i>Atp6</i> (Common)	AGTTGAATTAGTAGGTGGCCTGC
DR_ND5_F	Loach and Zebrafish	<i>ND5</i> (Zebrafish)	TTGACCATCGGGAAAATAGCCC
DR_ND5_R	Loach and Zebrafish	<i>ND5</i> (Zebrafish)	AAACTGCGGTAAATGATGTGGC
MA_ND5_F	Loach and Zebrafish	<i>ND5</i> (Loach)	GCCCCTCATTGGCCTAATCC
MA_ND5_R	Loach and Zebrafish	<i>ND5</i> (Loach)	TAGGGCAGAACTGGTGTGG

*1: Zebrafish reared in laboratory of Aquaculture Genetics and Genomics (Hassei).

*2: Zebrafish reared in Nanae Fresh-Water Station.

Table 16. Developmental ability of mitochondrial transplanted embryos

Experiment 1: Intra-specific mitochondrial transplantation (Zebrafish, Nanae -> Zebrafish, Hassei)					
	Dechoriation	Transplantation	Fertilization [%]	Survival at 72 hpf [%]	Abnormal at 72 hpf [%]
Intact	No	No	76.1 ± 21.3	76.1 ± 8.0	-
Injection (-)	Yes	No	-	93.1 ± 4.8	4.3 ± 7.5 ^a
Injection (+)	Yes	Yes	-	50.0 ± 36.3	19.9 ± 4.4 ^b
Experiment 2: Inter-generic mitochondrial transplantation (Goldfish -> Zebrafish)					
	Dechoriation	Transplantation	Fertilization [%]	Survival at 72 hpf [%]	Abnormal at 72 hpf [%]
Intact	No	No	87.8 ± 7.4	89.9 ± 2.6	-
Injection (-)	Yes	No	-	83.3 ± 7.9	5.7 ± 10.0
Injection (+)	Yes	Yes	-	81.3 ± 8.3	11.1 ± 6.8
Experiment 3: Inter-familial mitochondrial transplantation (Loach -> Zebrafish)					
	Dechoriation	Transplantation	Fertilization [%]	Survival at 72 hpf [%]	Abnormal at 72 hpf [%]
Intact	No	No	89.8 ± 4.5	93.9 ± 4.1	-
Injection (-)	Yes	No	-	88.5 ± 19.8	7.9 ± 7.3 ^a
Injection (+)	Yes	Yes	-	78.1 ± 27.1	28.9 ± 7.7 ^b

Each value is mean ± SD of the triplicates.

There was no significant difference in survival rates of each experiment as determined by Kruskal-Wallis test and Scheffe's test ($P < 0.05$).

Different superscript letters in abnormal rates of each experiment indicate significant differences as determined by Student's t test ($P < 0.05$).

Table 17. Comparison of developmental ability of mitochondrial transplanted embryos

Combinations	Relative survival rate at 72 hpf	Relative normal rate at 72 hpf
Intra-specific mitochondrial transplantation (Zebrafish, Nanae -> Zebrafish, Hassei)	0.67 ± 0.50	0.84 ± 0.11
Inter-generic mitochondrial transplantation (Goldfish -> Zebrafish)	0.90 ± 0.07	0.95 ± 0.05
Inter-familial mitochondrial transplantation (Loach -> Zebrafish)	0.82 ± 0.26	0.77 ± 0.33

Each value is mean $\pm$ SD of the triplicates.

Relative survival rate is calculated by the survival rate of injection (+) group relative to that of intact group.

Relative normal rate is calculated by the normal rate of injection (+) group relative to that of injection (-) group.

There was no significant difference as determined by Kruskal-Wallis test and Scheffe's test ($P < 0.05$).

Table 18. Genomic constitution of diploid and triploid hybrids from inter-group cross-fertilization and haploid and diploid nucleocytoplasmic hybrids from inter-group androgenesis

Biotype	Combination of eggs and sperm (Female x Male)	Resultant progeny	
		Cytoplasm	Nucleus (Ploidy)
Intra-group crosses			
Diploid control	Loach [B] x Loach [B]	Loach [B]	Loach [B x B]: (2n)
Androgenetic haploid	UV Loach ^{*2} [B] x Loach [B]	Loach [B]	Loach [B]: (1n)
Inter-group crosses			
Diploid hybrid	Loach [B] x Loach [A]	Loach [B]	Loach [B x A]: (2n)
Triploid hybrid	Loach [B] x Sex-reversed clone loach ^{*3} [AB]	Loach [B]	Loach [B x AB]: (3n)
Haploid N-C hybrid ^{*1}	UV Loach ^{*2} [B] x Loach [A]	Loach [B]	Loach [A]: (1n)
Diploid N-C hybrid ^{*1}	UV Loach ^{*2} [B] x Sex-reversed clone loach ^{*3} [AB]	Loach [B]	Clone loach [AB]: (2n)

Alphabets in square bracket indicate the types of genome or cytoplasm.

*1: Nucleocytoplasmic hybrid.

*2: Egg nucleus was genetically inactivated by UV irradiation (150 mJ/cm²).

*3: Sex-reversed clone loach produces unreduced (clonal) diploid sperm.

Table 19. Primer sets used for genetic analysis in loach

Primer	Purpose	Sequence (5'-3')
RAG1-M.aF	PCR-RFLP	GTTTGAATGGCAGCCAGCTCTG
RAG1-M.aR		CCACAAACATGAGACACAGAGGTC
Mac2 F	Microsatellite genotyping	CAGGTGTCCTCATAGACTGA
Mac2 R		TGGGATCTCTGCGGGACAGA
Mac3 F	Microsatellite genotyping	CAGCCTGTTAACCTTCCACT
Mac3 R		CCCCAAATTCAGAGAGCTAG
Mac24 F	Microsatellite genotyping	CAGACTGATGCTCTGACGTT
Mac24 R		TCATAACAGCACATCAGCAA
Mac37 F	Microsatellite genotyping	GCAAGTACATGCTCATCCTT
Mac37 R		CACCTGCATTCTTACATCT
Mac45 F	Microsatellite genotyping	GTTCAGTACGGCTTTAGCAG
Mac45 R		TGGGTGTTTATTTTATCCC

Table 20. Developmental capacity and ploidy status in induction of hybrids and nucleocytoplasmic hybrids

Crosses		No. of eggs used	No. of fertilized eggs (%)	No. of surviving larvae at 96 hpf (%)	No. of normal larvae (%)	No. of larvae for FCM	Ploidy status		
Female	Male						1C	2C	3C
Loach [B]	Loach [B]	76	43 (56.6)	37 (86.0)	33 (89.2)	12	0	12	0
Loach [B]	Loach [A]	57	36 (63.2)	30 (83.3)	27 (90.0)	12	0	12	0
Loach [B]	Clone loach [AB]	757	1 (0.1)	1 (100.0)	1 (100.0)	1	0	0	1
UV Loach ^{*1} [B]	Loach [B]	69	14 (20.3)	11 (78.6)	0 (0.0)	11	11	0	0
UV Loach ^{*1} [B]	Loach [A]	179	62 (34.6)	49 (79.0)	0 (0.0)	12	12	0	0
UV Loach ^{*1} [B]	Clone loach [AB]	836	3 (0.4)	2 (66.7)	2 (100.0)	2	0	2	0

Alphabets in square bracket indicate the types of genome or cytoplasm.

*1: Egg nucleus was genetically inactivated by UV irradiation (150 mJ/cm²).

Table 21. Developmental capacity of progeny arisen from fertilization between clone loach diploid nucleus – group B loach cytoplasm hybrid females and various males

Crosses		No. of eggs used	Fertilization (%)	Survival at 96 hpf (%)
Female x Male				
mtB-Clone ^{*1} No.1	UV Goldfish ^{*2}	296	23.6	14.3
	Goldfish	314	44.3	20.9
	Loach A	284	29.9	34.1
	Loach B	360	50.0	22.8
	Zebrafish	159	26.4	31.0
	Pearl danio	184	39.7	41.1
mtB-Clone ^{*1} No.2	UV Goldfish ^{*2}	199	16.1	6.3
	Goldfish	133	30.1	32.5
	Loach A	174	23.0	10.0
	Loach B	159	29.6	17.0
	Zebrafish	142	20.4	6.9
	Pearl danio	157	16.6	30.8

*1. Clone loach diploid nucleus – group B loach cytoplasm hybrid induced by inter-populational androgenesis.

*2. UV-irradiated goldfish sperm.

Table 22. Ploidy status of progeny developed from large or small eggs of clone diploid nucleus – group B cytoplasm hybrids

Eggs	Sperm	No. of samples	Relative DNA contents (C)											
			1	2	2.2	2.4	3	3.2	3.4	4	5.2	5.4	Mosaic	Unidentified
Large egg	UV Goldfish (0C)	12	0	11	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	Goldfish (1.4C)	23	0	7	0	0	0	0	8	1	0	4	3 ^{*1}	0
	Loach A (1C)	24	0	6	0	0	5	0	0	0	0	0	13 ^{*2}	0
	Loach B (1C)	28	0	8	0	0	5	0	0	2	0	0	13 ^{*2}	0
	Zebrafish (1.2C)	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0
	Pearl danio (1.2C)	18	0	0	0	0	0	13	0	0	2	0	1 ^{*3}	2
Small egg	UV Goldfish (0C)	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Goldfish (1.4C)	13	0	0	0	10	0	0	1	0	0	0	1 ^{*4}	1
	Loach A (1C)	6	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4 ^{*5}	0
	Loach B (1C)	9	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	4 ^{*6}	1
	Zebrafish (1.2C)	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pearl danio (1.2C)	5	0	0	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0

*1: 2C-3.4C mosaic.

*2: 2C-3C mosaic.

*3: 3.5C-4.5C mosaic.

*4: 1C-2.4C mosaic.

*5: 1C-2C mosaic.

*6: Three 1C-2C mosaic and One 0.8C-1.2C mosaic.

Table 23. Genotypes of progeny developed from clone loach diploid nucleus – group B cytoplasm hybrids

Progeny No.	Female	Sperm	Egg size	Ploidy of progeny	<i>RAGI</i> -RFLP	Locus (LG)				
						<i>Mac2</i> (12)	<i>Mac3</i> (12)	<i>Mac24</i> (16)	<i>Mac37</i> (10)	<i>Mac45</i> (10)
	mtB-Clone1			2n	AB	102 / 116	91 / 133	104 / 110	92 / 96	81 / 93
P1	mtB-Clone1	UVG* ¹ (0C)	Large	2n	AB	102 / 116	91 / 133	104 / 110	92 / 96	81 / 93
P2		UVG* ¹ (0C)	Large	2n	AB	102 / 116	91 / 133	104 / 110	92 / 96	81 / 93
P3		UVG* ¹ (0C)	Large	2n	AB	102 / 116	91 / 133	104 / 110	92 / 96	81 / 93
P4		UVG* ¹ (0C)	Large	2n	AB	102 / 116	91 / 133	104 / 110	92 / 96	81 / 93
P5		UVG* ¹ (0C)	Large	2n	AB	102 / 116	91 / 133	104 / 110	92 / 96	81 / 93
P6		UVG* ¹ (0C)	Large	2n	AB	102 / 116	91 / 133	104 / 110	92 / 96	81 / 93
P7		UVG* ¹ (0C)	Large	2n	AB	102 / 116	91 / 133	104 / 110	92 / 96	81 / 93
P8		UVG* ¹ (0C)	Large	2n	AB	102 / 116	91 / 133	104 / 110	92 / 96	81 / 93
P9		UVG* ¹ (0C)	Large	2n	AB	102 / 116	91 / 133	104 / 110	92 / 96	81 / 93
P10	mtB-Clone1	UVG* ¹ (0C)	Small	1n	A	102 / 116	133 / -	110 / -	92 / -	81 / 93
P11		UVG* ¹ (0C)	Small	1n	B	- / -	91 / -	110 / -	83 / -* ²	81 / -
P12		UVG* ¹ (0C)	Small	1n	B	102 / 116	63 / -* ²	104 / -	92 / -	93 / -
P13		Goldfish (1.4C)	Small	2.4C	B	- / -	91 / -	104 / -	96 / -	93 / -
P14		Goldfish (1.4C)	Small	2.4C	A	- / -	91 / -	110 / -	92 / -	93 / -
P15		Goldfish (1.4C)	Small	2.4C	B	- / -	91 / -	110 / -	92 / -	93 / -
P16		Loach B (1C)	Small	1n	A	- / -	91 / -	104 / -	92 / -	81 / -
P17		Pearl danio (1.2C)	Small	2.2C	A	102 / 116	133 / -	110 / -	83 / -* ²	93 / -
P18		Pearl danio (1.2C)	Small	2.2C	B	- / -	91 / -	110 / -	96 / -	93 / -
P19		Pearl danio (1.2C)	Small	2.2C	A	- / -	91 / -	110 / -	96 / -	81 / -
P20		Pearl danio (1.2C)	Small	2.2C	A	- / -	91 / -	110 / -	92 / -	81 / -

Table 23. Continued

Progeny No.	Female	Sperm	Egg size	Ploidy of progeny	<i>RAG1</i> - RFLP	Locus (LG)				
						<i>Mac2</i> (12)	<i>Mac3</i> (12)	<i>Mac24</i> (16)	<i>Mac37</i> (10)	<i>Mac45</i> (10)
	mtB-Clone2			2n	AB	102 / 116	91 / 133	104 / 110	92 / 96	81 / 93
P21	mtB-Clone2	UVG* ¹ (0C)	Large	2n	AB	102 / 116	91 / 133	104 / 110	92 / 96	81 / 93
P22		UVG* ¹ (0C)	Large	2n	AB	102 / 116	91 / 133	104 / 110	92 / 96	81 / 93
P23	mtB-Clone2	Goldfish (1.4C)	Small	2.4C	B	- / -	91 / -	110 / -	96 / -	93 / -
P24		Goldfish (1.4C)	Small	2.4C	B	- / -	91 / -	110 / -	92 / -	93 / -
P25		Goldfish (1.4C)	Small	2.4C	B	102 / 116	133 / -	104 / -	92 / -	93 / -
P26		Loach A (1C)	Small	1n	A	102 / 116	133 / -	104 / -	96 / -	93 / -
P27		Zebrafish (1.2C)	Small	2.2C	B	- / -	91 / -	104 / -	96 / -	81 / -

- / - : Null allele.

*1: UV-irradiated goldfish sperm.

*2: Unexpected allele size.

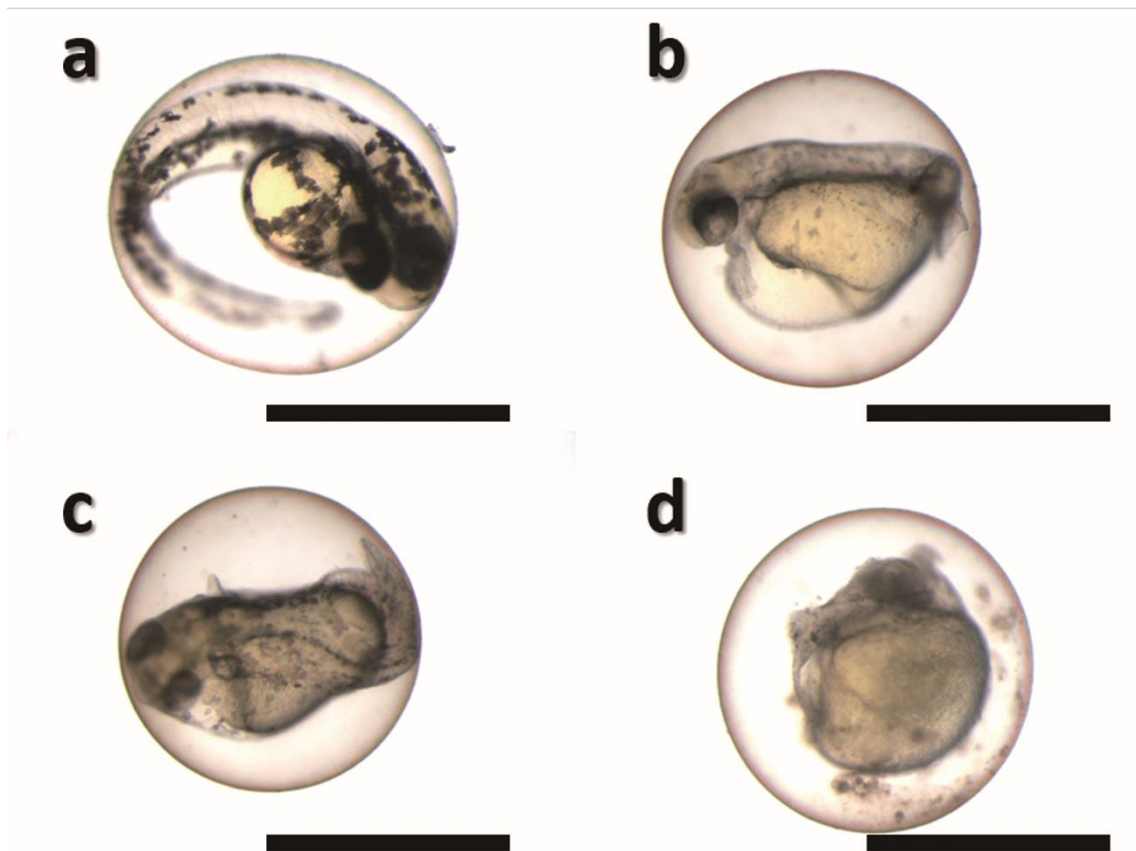


Figure 1. External appearance of embryos at 48 hpf in evaluation of the suitable UV dose. Normal diploid (a), haploid syndrome (b), incomplete epiboly (c), cell mass (d). Scale bars indicate 1 mm.

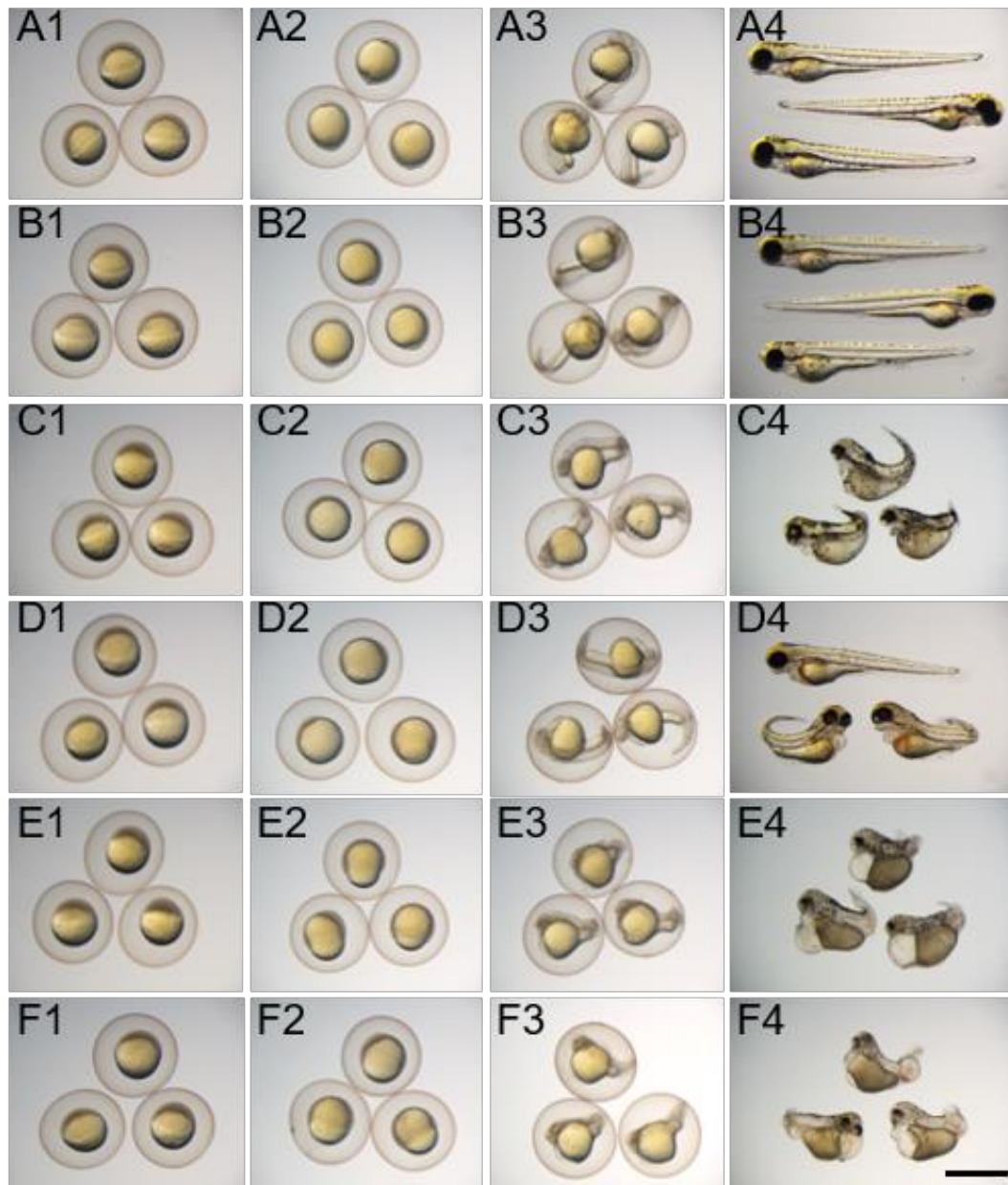


Figure 2. External appearances of zebrafish diploid control (A), diploid hybrid between zebrafish female and pearl danio male (B), androgenetic haploid zebrafish (C), androgenetic diploid zebrafish (D), pearl danio haploid nucleus – zebrafish cytoplasm hybrid (E), and pearl danio diploid nucleus – zebrafish cytoplasm hybrid (F). Column 1: 8 hpf, Column 2: 12 hpf, Column 3: 24 hpf, Column 4: 48 hpf. Scale bar indicates 1mm.

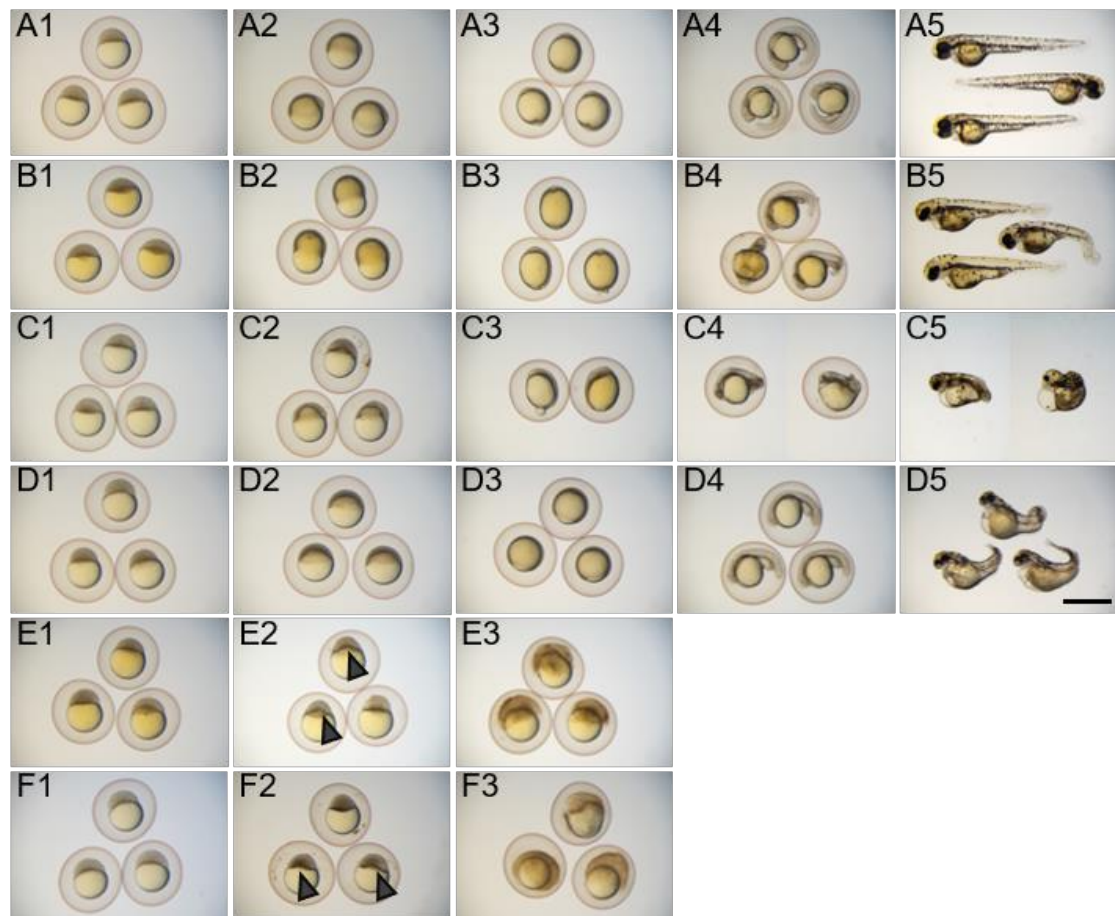


Figure 3. External appearances of zebrafish diploid control (A), diploid hybrid between zebrafish female and goldfish male (B), triploid hybrid between zebrafish female and crucian carp male (C), androgenetic haploid zebrafish (D), goldfish haploid nucleus – zebrafish cytoplasm hybrid (E), and crucian carp diploid nucleus – zebrafish cytoplasm hybrid (F). Column 1: 4 hpf, Column 2: 8 hpf, Column 3: 12 hpf, Column 4: 24 hpf, Column 5: 48 hpf. Arrowheads indicate bulging of yolk. Scale bar indicates 1mm.

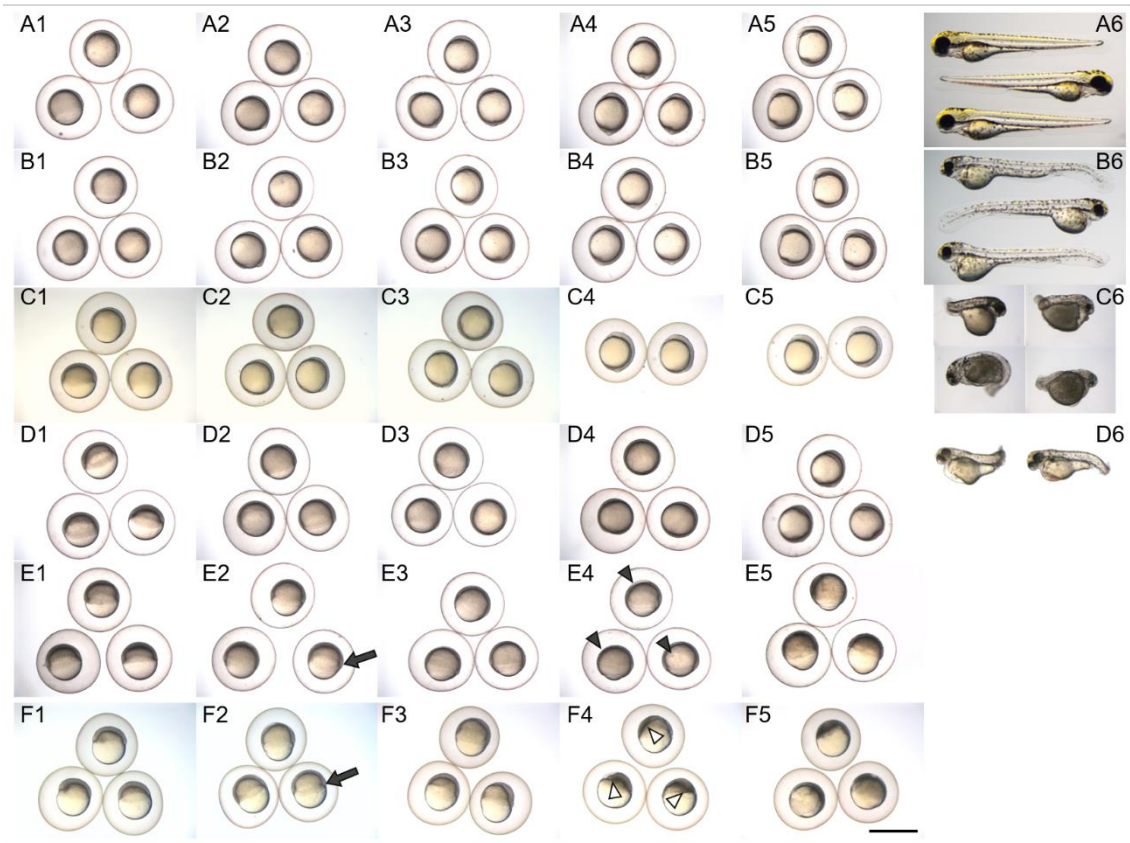


Figure 4. External appearances of zebrafish diploid control (A), diploid hybrid between zebrafish female and loach male (B), triploid hybrid between zebrafish female and sex-reversed clone loach male (C), androgenetic haploid zebrafish (D), loach haploid nucleus – zebrafish cytoplasm hybrid (E), and clone loach diploid nucleus – zebrafish cytoplasm hybrid (F). Column 1: 8 hpf, Column 2: 9 hpf, Column 3: 10 hpf, Column 4: 11 hpf, Column 5: 12 hpf, Column 6: 48 hpf. Arrows indicate embryonic shield. Solid arrowheads indicate that cell adhesion of animal pole side cells is weakened. Open arrowheads indicate separation of hypoblast cells from yolk. Scale bar indicates 1mm.

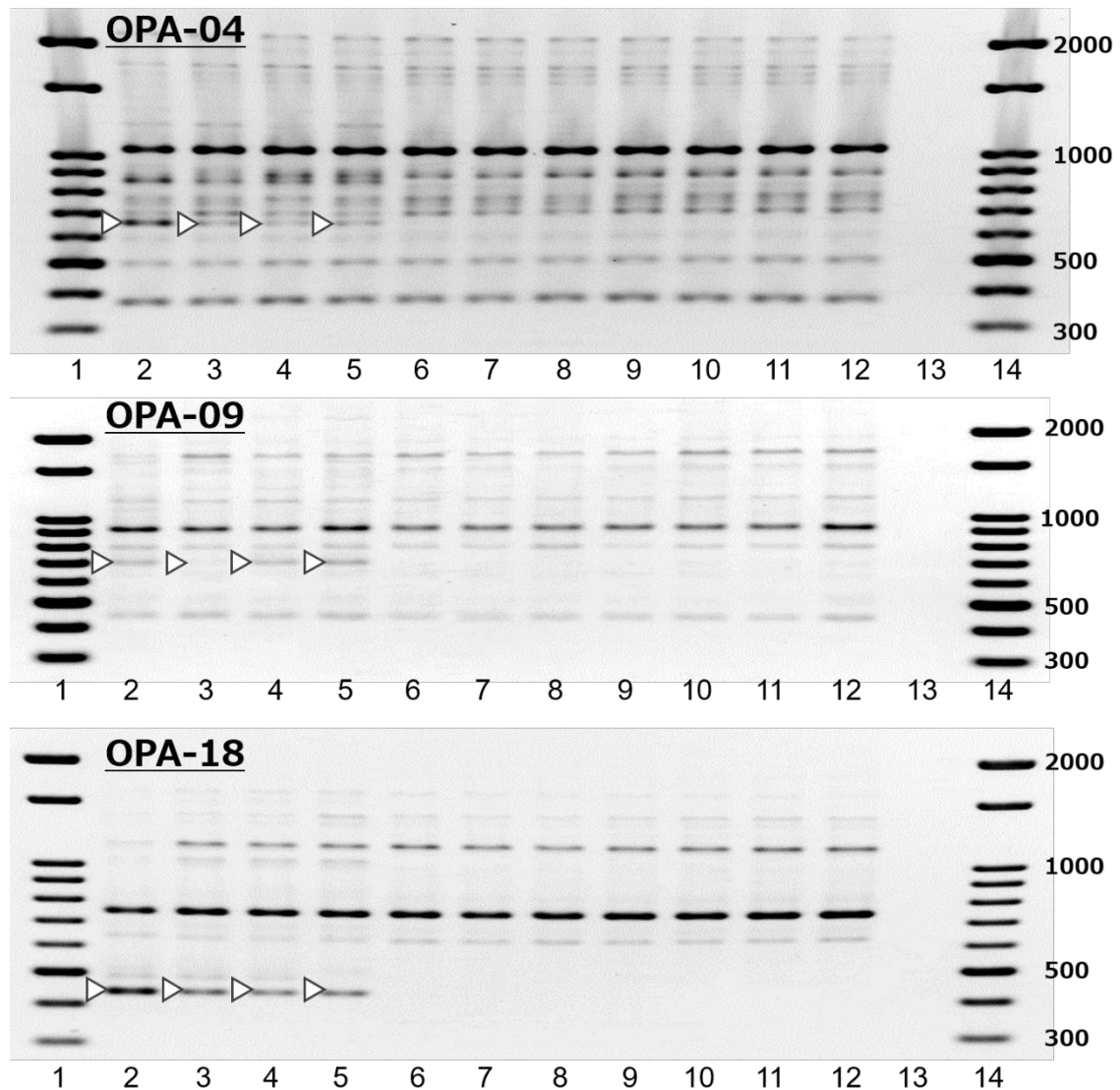


Figure 5. RAPD-PCR analysis of zebrafish female (lane 2), diploid progenies between zebrafish female and DH male (lanes 3–5), androgenetic haploid progenies between UV zebrafish and DH (lanes 6–11), and DH male (lane 12). Lane 1 and 14, molecular size marker. Lane 3–5, Diploid progenies possessed fragments from zebrafish female and DH male. Lane 6–11, Androgenetic haploid progenies possessed uniform pattern of fragments only from DH male. Lane 13, Negative control. Triangles indicate fragments originated from zebrafish female.

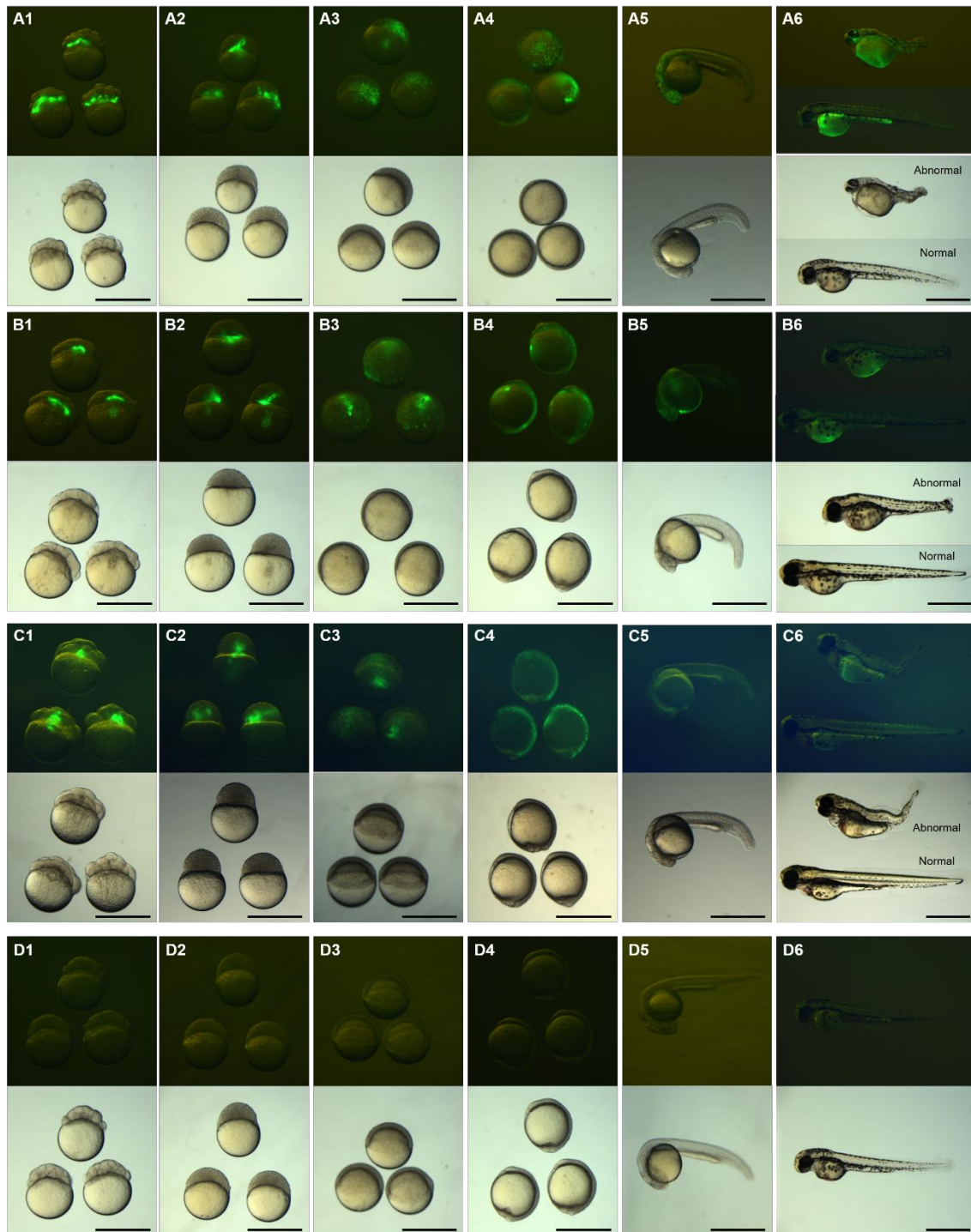


Figure 6. Embryonic development of intra-specific (A), inter-generic (B) and inter-familial (C) mitochondrial transplanted embryos, and zebrafish control embryos without transplantation (D). A, Isolated mitochondria from unfertilized eggs of zebrafish reared in Nanae fresh-water station was transplanted into 1-cell stage embryos of zebrafish reared in Hassei laboratory. B, Isolated mitochondria from unfertilized eggs of goldfish was transplanted into 1-cell stage embryos of zebrafish. C, Isolated mitochondria from unfertilized eggs of loach was transplanted into 1-cell stage embryos of zebrafish. Column 1: 8–32 cell stage, Column 2: Blastula (4 hpf), Column 3: Gastrula (7 hpf), Column 4: Tail bud stage (12 hpf), Column 5: Segmentation period (24 hpf), Column 6: Hatching stage (72 hpf). Scale bars indicate 500 μm.

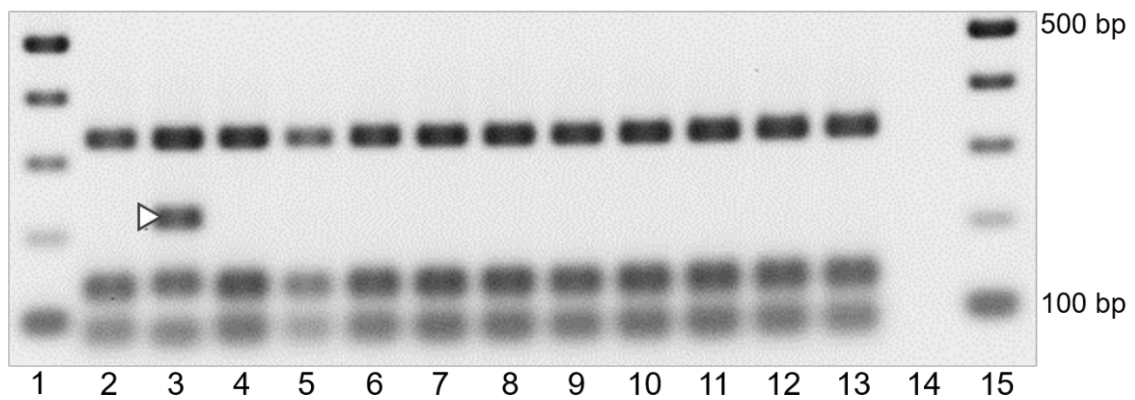


Figure 7. PCR-RFLP analysis of intra-specific mitochondrial transplanted embryos (lanes 5–13). Lane 1, molecular size marker. Lane 2, Zebrafish (ZFH) female used as host. Lane 3, Zebrafish (ZFN) mitochondria used as donor. Lane 4, No injection [Injection (-)]. Lane 5, Transplanted embryos at 8-cell stage. Lane 6, Transplanted embryos at blastula (4 hpf). Lane 7, Transplanted embryos at gastrula (7 hpf). Lane 8, Transplanted embryos at tail-bud stage (12 hpf). Lane 9, Transplanted embryo at segmentation period (24 hpf). Lanes 10–13, Transplanted embryo at hatching stage (72 hpf). Lane 14, Negative control. Lane 15, molecular size marker. Triangle indicates ZFN specific fragment.

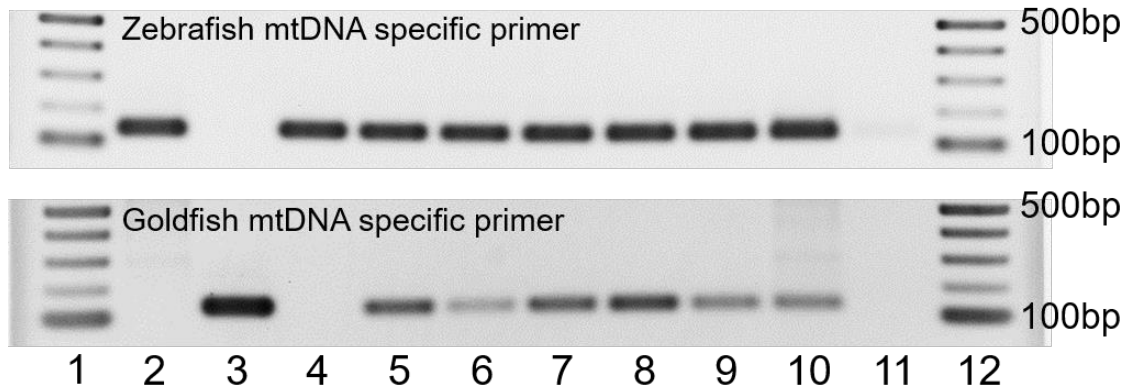


Figure 8. PCR analysis of inter-generic mitochondrial transplanted embryos (lanes 5–10) using species specific primers. Lane 1, molecular size marker. Lane 2, Zebrafish female used as host. Lane 3, Goldfish mitochondria used as donor. Lane 4, No injection [Injection (-)]. Lane 5, Transplanted embryos at 8-cell stage. Lane 6, Transplanted embryos at blastula (4 hpf). Lane 7, Transplanted embryos at gastrula (7 hpf). Lane 8, Transplanted embryos at tail-bud stage (12 hpf). Lane 9, Transplanted embryo at segmentation period (24 hpf). Lane 10, Transplanted embryo at hatching stage (72 hpf). Lane 11, Negative control. Lane 12, molecular size marker.

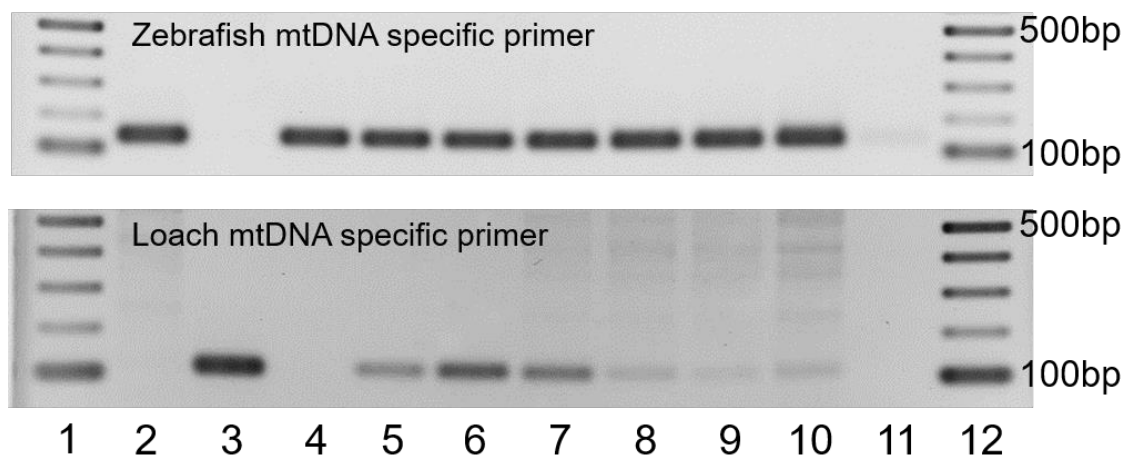


Figure 9. PCR analysis of inter-familial mitochondrial transplanted embryos (lanes 5–10) using species specific primers. Lane 1, molecular size marker. Lane 2, Zebrafish female used as host. Lane 3, Loach mitochondria used as donor. Lane 4, No injection [Injection (-)]. Lane 5, Transplanted embryos at 8-cell stage. Lane 6, Transplanted embryos at blastula (4 hpf). Lane 7, Transplanted embryos at gastrula (7 hpf). Lane 8, Transplanted embryos at tail-bud stage (12 hpf). Lane 9, Transplanted embryo at segmentation period (24 hpf). Lane 10, Transplanted embryo at hatching stage (72 hpf). Lane 11, Negative control. Lane 12, molecular size marker.

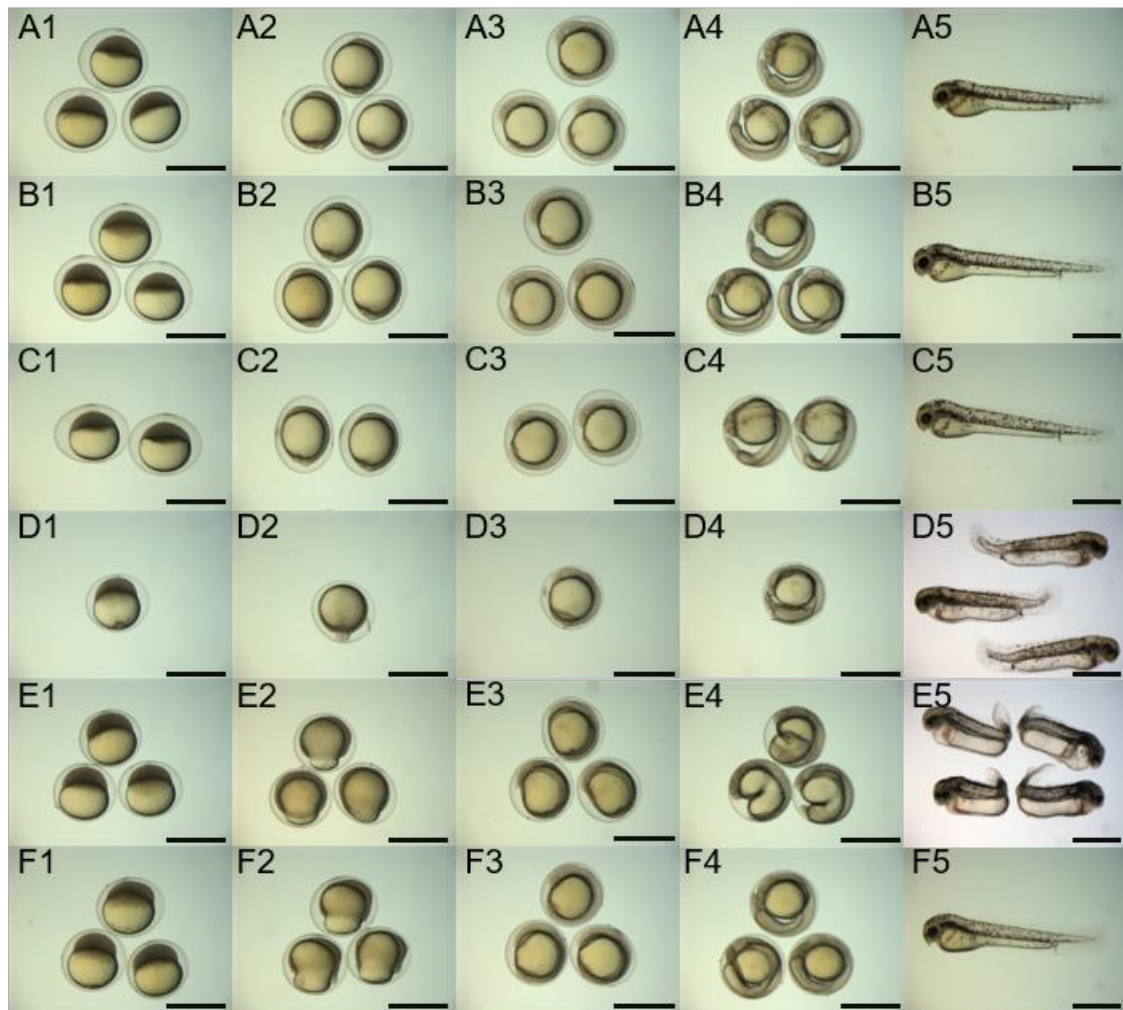


Figure 10. External appearances of group B loach diploid control (A), diploid inter-group hybrid between group B female and group A male (B), triploid hybrid between group B female and sex-reversed clone loach male (C), androgenetic haploid group B loach (D), group A haploid nucleus – group B cytoplasm hybrid (E), and clone loach diploid nucleus – group B cytoplasm hybrid (F). Column 1: 8 hpf, Column 2: 24 hpf, Column 3: 36 hpf, Column 4: 48 hpf, Column 5: 96 hpf. Scale bars indicate 1mm.

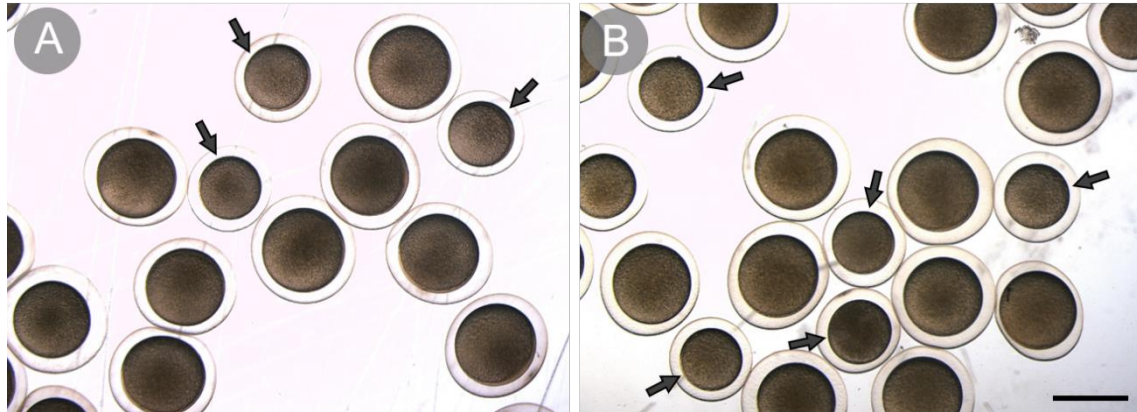


Figure 11. Insemminated eggs of clone loach diploid nucleus – group B strain loach cytoplasm hybrids at 15 min post-fertilization. (A): Eggs from female No.1. (B): Eggs from female No.2. Arrows indicate small eggs. Scale bar indicates 1 mm.

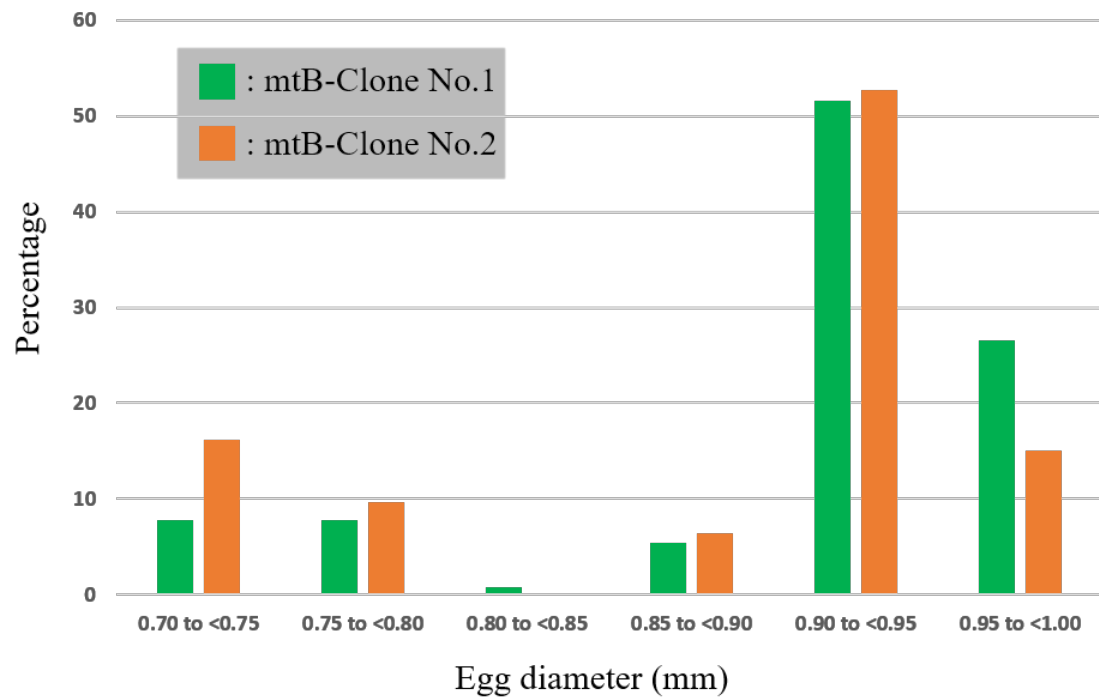


Figure 12. Percentage of egg diameter of clone loach diploid nucleus – group B strain loach cytoplasm hybrids.

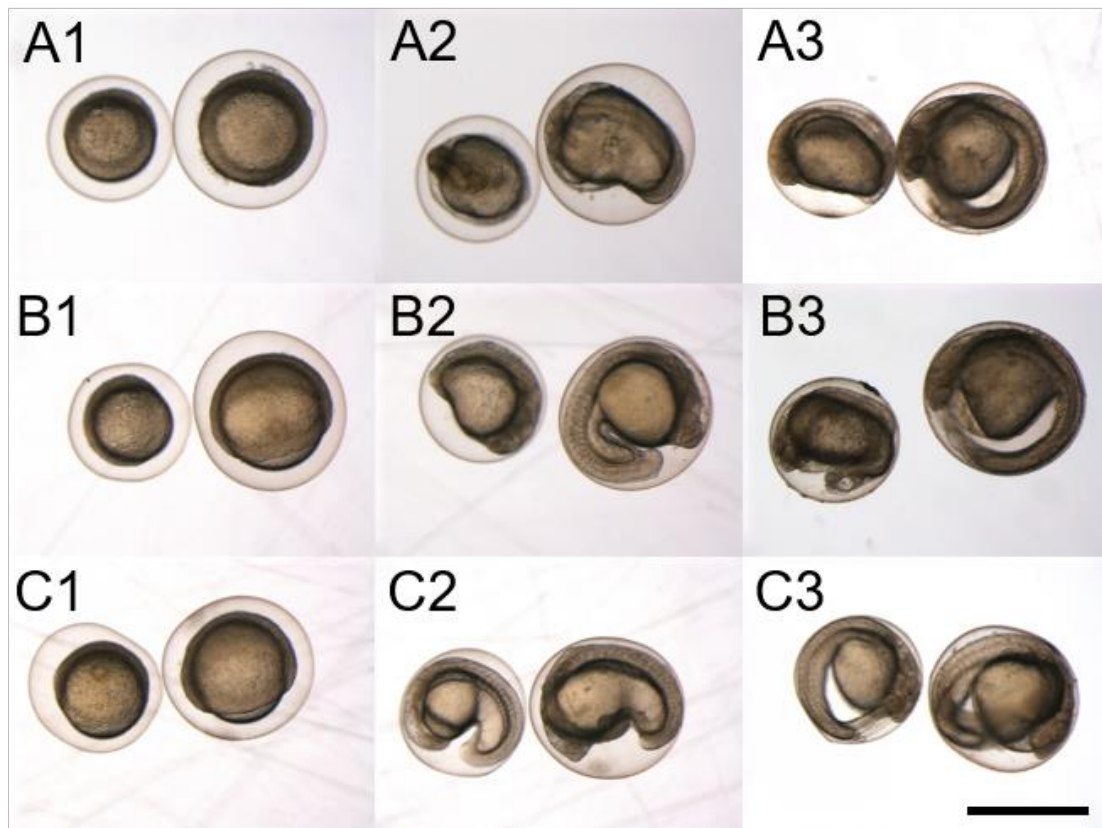


Figure 13. External appearance of progeny during embryogenesis. (A): Gynogenetic progeny between egg of clone loach diploid nucleus – group B loach cytoplasm hybrid and UV-irradiated goldfish sperm. (B): Progeny arisen from fertilization between clone loach diploid nucleus – group B loach cytoplasm hybrid female and group A loach male. (C): Progeny arisen from fertilization between clone loach diploid nucleus – group B loach cytoplasm hybrid female and group B loach male. Column 1: 12 hpf, Column 2: 32 hpf, Column 3: 60 hpf. Scale bar indicates 1 mm.