

学 位 論 文 題 名

Molecular cytogenetic studies on the hybrid
inviability in salmonid fishes

（サケ科魚類の雑種致死に関する分子細胞遺伝学的研究）

学位論文内容の要旨

サケ科魚類では古くから育種目的で数々の種間・属間雑種が作出されてきた。しかし、交配の組み合わせによっては、得られた雑種が奇形などの異常を示し孵化期までに死亡する。一部の雑種では、このような致死性の原因の一つとして染色体異常が報告されているが、その機構については殆ど研究されていない。本研究では、分子細胞遺伝学的手法や染色体分染法を用いて、致死性雑種に生じる染色体異常の種特異性や染色体特異性を明らかにし、雑種致死の機構について追究することを目的とした。

実験には、サクラマス (*Oncorhynchus masou*, $2n=66$: Ms) 雌とニジマス (*O. mykiss*, $2n=60$: Rb) 雄の人為交配で得られる致死性雑種胚 (Ms x Rb) を用い、対照群として正逆交配で得られる生存性雑種胚 (Rb x Ms) を用いた。実験の一部では、 γ 線照射によって卵核を破壊して発生させた雄性発生雑種胚や圧力処理により誘起した3倍体雑種胚、シロサケ (*O. keta*, $2n=74$: Cm) およびオシヨロコマ (*Salvelinus malma*, $2n=82$: Al) 雌とニジマス雄の交配で得られる致死性雑種胚 (Cm x Rb, Al x Rb) を用いた。いずれの雑種においても核型分析は尾芽胚から作成した染色体標本を用い、細胞分裂像の観察は後期胞胚のパラフィン切片及び染色体標本を用いて行った。染色体分析には、染色体ペインティング法などの各種の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法やR分染法を用いた。

核型分析の結果、致死性雑種胚の染色体数は、両親の染色体数の中間値よりも少ない約50本 (Ms x Rb)、62本 (Cm x Rb)、56本 (Al x Rb) に減少しており、また染色体断片が平均20%の細胞において生じていることが分かった。つまり、これらの致死性雑種胚は、染色体消失と部分欠失という数的・構造的な染色体異常をもつ低2倍性個体になっていることが分かった。また、FISH法によってテロメア配列の有無を調べた結果、殆どの染色体断片にはテロメア配列が検出されないため、部分欠失の大部分は染色体の腕内欠失によるものと考えられた。染色体ペインティング法を用いて両親に由来する染色体を識別した結果、いずれの致死性雑種においても、染色体異常はニジマスに由来する染色体に特異的に生じており、結果的としてニジマス由来の染色体は約17本 (Ms x Rb)、25本 (Cm x Rb)、15本 (Al x Rb) に減少していることが分かった。さらに、これらのニジマス由来染色体をR分染法で同定した結果、いずれの雑種においても、全てのニジマス由来染色体が染色体消失の対象となっていたが、失われる頻度は個々の染色体で異なることが

分かった。以上の結果から、雑種致死の原因は、雄親由来染色体の選択的排除に伴う種々の遺伝情報の欠損であると考えられた。

染色体異常の発生頻度を調べた結果、染色体消失は受精直後の第1卵割から胞胚期の間集中しているが、部分欠失は殆どの雑種胚が死亡する発眼期までの間、ほぼ一定の頻度で起きていることが分かった。そこで胞胚期の細胞分裂過程におけるニジマス由来染色体の挙動を調べた結果、いずれの致死性雑種においても、分裂中期の染色体配置に異常は認められなかったが、分裂後期から終期にかけて、一部のニジマス由来染色体は姉妹染色分体のセントロメア領域の不分離によって細胞質中に取り残され、最終的に微小核として核から排除されることが分かった。染色体断片は分裂期の細胞質中に散在しており、同じく分裂期に核から排除されていた。以上の結果から、染色体消失の原因は、分裂後期におけるセントロメア分離欠損と、それに続く微小核形成であることが考えられた。一方、部分欠失を引き起こすような異常は分裂期において観察されなかったが、染色体断片の大部分が染色体型であったことから、部分欠失はG 1期からS期の核内で生じたものと推測された。

このような細胞分裂異常や染色体排除（染色体消失と部分欠失）は、正逆交配で得られる生存性雑種胚では全く観察されなかったことから、単にサクラマス卵ゲノムとニジマス精子ゲノムの相互作用によって生じた現象ではないことが考えられる。また、サクラマス卵ゲノムを欠く雄性発生雑種胚やサクラマス卵ゲノムの倍加した3倍体雑種胚においては染色体排除が観察されたことから、サクラマス卵ゲノムの増減は染色体排除の有無に関係していないと考えられる。このことから、致死性雑種胚における染色体排除は、ニジマス精子ゲノムとサクラマス卵細胞質の間の何らかの不調和が引き金となって起きているのではないかと推測された。

以上、本研究において、脊椎動物の種間雑種における片親由来染色体の選択的排除が初めて見いだされ、これがサケ科魚類雑種致死の直接的原因であることが示された。今後、染色体排除を引き起こすと推測されるゲノムと細胞質間の不調和の実体を、遺伝学および生化学的手法により、詳細に分析する必要がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 田 勉 弘

副 査 教 授 木 村 正 人

副 査 教 授 高 木 信 夫

副 査 助 教 授 阿 部 周 一

学 位 論 文 題 名

Molecular cytogenetic studies on the hybrid inviability in salmonid fishes

(サケ科魚類の雑種致死に関する分子細胞遺伝学的研究)

サケ科魚類では古くから育種目的で数々の種間・属間雑種が作出されてきた。しかし、交配の組み合わせによっては、得られた雑種が奇形などの異常を示し孵化期までに死亡する。一部の雑種では、このような致死性の原因の一つとして染色体異常が報告されているが、その機構については殆ど研究されていない。申請者は、雑種致死の機構解明のために分子細胞遺伝学的手法や染色体分染法を用いて、致死性雑種に生じる染色体異常の種特異性や染色体特異性を明らかにした。

サクラマス (*Oncorhynchus masou*, $2n=66$) 雌とニジマス (*O. mykiss*, $2n=60$) 雄の人為交配で得た致死性雑種胚、対照群として正逆交配で得られる生存性雑種胚を用いた。実験の一部では、 γ 線照射によって卵核を破壊して発生させた雄性発生雑種胚や圧力処理により誘起した3倍体雑種胚、シロサケ (*O. keta*, $2n=74$) およびオシヨロコマ (*Salvelinus malma*, $2n=82$) 雌とニジマス雄の交配で得られる致死性雑種胚を用いた。いずれの雑種においても核型分析は尾芽胚から作成した染色体標本を用い、細胞分裂像の観察は後期胞胚のパラフィン切片及び染色体標本を用いて行った。染色体分析には、染色体ペインティング法などの各種の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法やR分染法を用いた。

核型分析の結果、いずれの致死性雑種胚において染色体数の減少がみられ、さらに、染色体断片の染色体異常が観察された。すなわち、これらの致死性雑種胚は、染色体消失と部分欠失という数的・構造的な染色体異常をもつ低2倍性個体である。また、殆どの染色体断片にはテロメア配列が検出されなかったことより、断片染色体は腕内欠失によるものと考えられた。染色体ペインティング法により両種のそれぞれの染色体を識別した結果、いずれの致死性雑種においても、染色体異常は精子由来のニジマス染色体に特異的に生じていることが分かった。さらに、染色体消失の特異性をR分染法で調べた結果、いずれの雑種においても、消失は全ての染色体に見られたが、失われる頻度は個々の染色体で異なっていた。これらの結果は、雑種致死における染色体異常は精子由来染色体の選択的消

失（排除）と部分欠失であることを示すもので、片親由来染色体の選択的排除を初めて明らかにしたものとして高い評価がなされている。

また、染色体消失の時期としては、受精直後の第1卵割から胞胚期の間が最も多く、部分欠失は雑種胚が死亡する発眼期まではほぼ一定の頻度で起きていることを見いだしている。また、分裂後期における染色体の挙動を調べ、セントロメア分離欠損と、それに続く微小核形成を観察し、これら一連の異常が染色体消失の原因と推察しており、セントロメアの構造・機能解析に新たな知見が得られた。

また、雑種胚における染色体排除は、正逆交配での生存性雑種胚では生じないことから、単にサクラマス卵ゲノムとニジマス精子ゲノムの相互作用によって生じた現象ではないことが考えられる。また、サクラマス卵から核を除いた雄性発生雑種胚や核を倍加した3倍体雑種胚においても染色体排除が生じていることから、サクラマス卵の核の有無や増加は染色体排除に直接関与しておらず、卵の細胞質がより直接的に関与していることが分かり、卵細胞質と精子ゲノムの相互作用や細胞分裂・染色体分離における卵細胞質の機能・役割などの追求に新たな方向性が見い出された。

以上のように、申請者は脊椎動物の種間雑種における片親由来染色体の選択的排除とこれがサケ科魚類の雑種致死の直接的原因であること初めて明らかにしたものとして、高い評価を受けている。今後、染色体排除を引き起こしたゲノムと細胞質間の不調和の実体を詳細に分析することにより、雑種致死の機構を解明することができ、これらの成果は雑種作出など応用のみならず、育種遺伝学など基礎的分野の発展に寄与するものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。