

学 位 論 文 題 名

ドジョウの遺伝地図作成とそれを用いた
特殊な卵形成機構の解析

学位論文内容の要旨

遺伝地図は育種および基礎遺伝学の分野で重要とされ、近年、魚類を含む様々な生物種において、作成が進められている。遺伝地図が作成されると、遺伝マーカーを利用した効率的選抜育種や有用遺伝子の単離が可能となるばかりか、異なる種間におけるゲノム構成の相同性（シンテニー）が解明でき、進化に関して有用な情報を与える。

本研究では、小型の淡水魚ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* の遺伝地図作成を目指して、DNAマーカーの開発を行った。各マーカーについて遺伝様式を調べた後、その一部について染色体の動原体からの地図距離を推定した。そして、CAP-PCR法により得たマーカーと色彩形質を含む52マーカー（遺伝子）座間の連鎖関係を、戻し交配家系の分析により調査し、遺伝地図作成を試みた。また、遺伝地図より得た情報を非還元卵ならびに異数性卵の形成機構に関する遺伝学的解析に応用した。

本論文は5つの章より構成され、第1章では83のマイクロサテライト領域を単離し、それらの塩基配列より63のマイクロサテライトについて遺伝的多型解析用プライマーを設計した。良好な増幅断片が得られ、かつ調査家系の中で多型性を示した30のマーカー座中、29の座が共優性であり、メンデルの法則に従うことが確認できた。以上の遺伝様式と多型性に関する結果から、ドジョウにおいてもマイクロサテライトマーカーは遺伝地図作成に好適なマーカーであることが判明した。さらに、遺伝地図を補完するマーカーとして29のCAP-PCRマーカーを開発し、それらがメンデル遺伝の様式に従い、連鎖解析に利用可能であることを示した。

第2章においては、染色体操作法により作出した第二極体放出阻止型雌性発生二倍体家系を材料としてマーカーと動原体間における組換え率の解析を行い、マイクロサテライトの動原体からの地図距離を推定した。15のマイクロサテライトマーカー座のマーカー動原体間組換え率(y)は、0.06～0.95と推定され、これらは動原体からの地図距離3～45cMの広い範囲にあることが判った。従って、マイクロサテライトマーカー座は、染色体の動原体近傍からテロメア近傍までの広い領域に分布することが判明した。また、ほぼ100%($y=1$)のマーカー動原体間組換え率を示すマーカー座が4つ観察されたことから、ドジョウの染色体において非常に強いキアズマ干渉が働いていることが示唆された。これら

のテロメア側マーカー座におけるホモ接合型から、クローンの素材となる第一卵割阻止型雌性発生二倍体（完全ホモ接合体）作出の成功が判定できた。

第3章では体色の形質を含む52マーカー（遺伝子）の連鎖関係の分析から遺伝地図作成を試みた。その結果、13の連鎖群が明らかになり、4連鎖群は複数のマイクロサテライトマーカーを含んでいた。ヒドジョウ体色形質は、CAP-PCRマーカー（*cap13*）と連鎖していた。

第4章では、第1～3章において得られた情報をもとに、一部のドジョウが産する特殊な非還元性二倍体卵の形成機構解明を行った。新潟県広神村産ドジョウの生む非還元性二倍体卵から紫外線照射精子の受精により誘起した雌性発生二倍体は母親とは異なるマイクロサテライトマーカー型を示すことから、「減数分裂前核内有糸分裂(Premeiotic endomitosis)」により非還元卵が形成されていることが推定された。一方、北海道女満別町産ドジョウの産む非還元性二倍体卵に由来する人為雌性発生子孫は、母親と全く同一のマイクロサテライトマーカー型とDNAフィンガープリント像を示すことから、「無配偶生殖(Apomixis)」の機構により非還元卵が形成されていることが示唆された。また、これらの非還元卵は通常に受精した場合、二倍体子孫に精子の遺伝的関与が無いことから、単性的にクローンとして生殖していることが示された。さらに、同地の野生集団のマイクロサテライトマーカーとDNAフィンガープリント分析から、自然三倍体は、クローン二倍体の産する非還元性二倍体卵と精子核ゲノムの偶発的取り込みに由来することが示された。

第5章では、女満別産の自然三倍体雌の産する異数性配偶子形成に関する遺伝学的解析を行った。三倍体雌親魚の3つの対立遺伝子がそれぞれ区別可能であった6つのマイクロサテライトマーカーにより分析したところ、異数性の配偶子（卵）では、3対立遺伝子の1つが分配される場合（子孫は二染色体性マーカー型）と2つが分配される場合（子孫は三染色体性マーカー型）があることがわかった。さらに、対立遺伝子の分離には、極端な偏りが観察された。対立遺伝子の分離の様式より、三倍体に含まれるクローン由来の2つの相同染色体の片方は、精子由来の相同染色体とは対合しにくいことが示唆され、三倍体の起源となったクローン系統は異質二倍体であると考えられた。

本研究によりドジョウのDNAマーカーの動原体からの地図距離と連鎖関係を明らかにすることができ、さらに作成された遺伝地図を利用して一部に見られる特殊な卵形成機構を明らかにすることができた。これらの結果は水産育種のための基礎的知見となるばかりか、本種における自然倍数体、クローン集団、単性集団の起源と成立機構について重要な示唆を与えた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 荒 井 克 俊
副 査 教 授 嵯 峨 直 恆
副 査 助 教 授 山 羽 悦 郎

学 位 論 文 題 名

ドジョウの遺伝地図作成とそれを用いた 特殊な卵形成機構の解析

遺伝地図が作成されると、遺伝マーカーを利用した効率的選抜育種や有用遺伝子単離が可能となるばかりか、ゲノム解析に有用な基礎情報が得られる。しかしながら、魚類においてはこの方面の研究は、他の産業種に比べ乏しい。本研究は、繁殖・飼育法ならびに染色体操作法が確立している小型の淡水魚ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* についてマイクロサテライトを中心としたDNAマーカーを開発し、マーカー—動原体間組換え率分析と連鎖解析による遺伝地図作成を行うとともに、さらに、得た遺伝地図情報を用いて、本種に見られる特殊な非還元卵ならびに異数性卵の形成機構を解析することを目的に行われ、以下の成果が得られた。

- 1) ドジョウ核ゲノムより83のマイクロサテライト領域を単離し、それらの塩基解析結果より遺伝変異を解析するためのプライマーセットを63組設計し、多型的な29マーカー座が共優性でメンデル遺伝の様式に従うことを示した。さらに、補完的なDNAマーカーとして29のCAP-PCRマーカーを開発し、実験的に作成した家系におけるこれらの遺伝様式の分析から連鎖分析に利用可能であることを示した。
- 2) 紫外線照射精子と第2極体放出阻止を用いた人為雌性発生二倍体

家系を材料とした、遺伝マーカーと染色体動原体間の組換え率(y)の解析から、15マーカー座は $y = 0.06 \sim 0.95$ を示し、動原体からの地図距離3 - 45cMの範囲にあること、すなわち動原体近傍からテロメア近傍の広い領域に位置することを示した。また、 $y=1$ に近い組換え率をもつ座の存在から強いキアズマ干渉の存在を示唆した。このようなテロメア側マーカー座におけるホモ接合型から、クローン作出の素材となる第一卵割阻止による雌性発生二倍体において、完全ホモ接合個体作出の成否判定が可能なことを示した。

3) 戻し交配家系における体色を含む52マーカー(遺伝子)の連鎖解析から13の連鎖群が示され、そのうち4連鎖群は複数のマイクロサテライトマーカーからなることを明らかにした。体色形質はCAP-PCRマーカー座の一つと連鎖することを示した。

4) 遺伝地図情報をもとに、新潟県広神村と北海道女満別町の二つの産地由来のドジョウの産む非還元卵について各々解析したところ、前者ではマイクロサテライトマーカー型に変異があること、後者では全く変異が無く母親の体細胞と遺伝的に同一であることが示され、前者の非還元卵形成過程にはPremeiotic endomitosisの機構が関与し、後者はApomixisにより形成されることが示唆できた。また、女満別の非還元卵は、精子の遺伝的関与無しに母親、同胞と遺伝的に同一なクローンとして発生するが、精子核ゲノムを取り込んだ卵は三倍体となることを明らかにした。

5) 二倍体クローンと半数性精子の受精からできた三倍体は、異数性卵を産むことが示され、3つのマーカー対立遺伝子のうち、卵へ1つが分配される場合と2つが分配される場合があることが明らかになった。さらに、異数体卵への対立遺伝子の分配には偏りがあること、および組換え型の存否から、クローン自体が異なる遺伝的特性を持つ集団間の異質二倍体に起源することを示唆した。

申請者による以上の成果は、遺伝地図を基礎とした魚類育種の進展に寄与するばかりか、本種を含む魚類における非還元配偶子および異

数性配偶子の形成、自然倍数体、単性生殖、およびクローン集団の起源と成立機構の解明に重要な示唆を与えるものであり、審査員一同は、本研究が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。