

学 位 論 文 題 名

アマゴ *Oncorhynchus masou ishikawae* の

卵割阻止処理に伴って出現する

倍数体モザイクとその特性に関する研究

学位論文内容の要旨

魚類における染色体操作は、配偶子の遺伝的不活性化と受精卵の第 2 極体放出阻止技術を基本に、不妊三倍体、単性種苗の生産および有用形質の固定等の育種に応用され、養殖産業および基礎遺伝学の進展に大きく貢献してきた。極体放出阻止法による染色体倍化技術のみでは、倍数体育種の応用範囲を拡大するには限界があることから、卵割を阻止して染色体の倍化を図る技術の開発とその応用が望まれている。しかしながら、現在のところ、その技術が未完成であり、四倍体や完全ホモ接合体型雌性発生二倍体等の作出が不安定である点に大きな問題がある。通常受精卵の第 1 卵割を阻止して四倍体の作出を図った場合、目的とする四倍体は得られず、少数の二倍体—四倍体モザイクが出現することがある。モザイク魚の特性に関する報告は殆どないが、モザイク魚の生殖腺が四倍体細胞を含む場合、二倍体の配偶子が形成されることが期待される。このことは、これらを四倍体親魚の代わりに用いた三倍体や四倍体生産の可能性を示唆する。そこで、本研究では、アマゴを材料に、卵割阻止処理に伴う倍数体モザイクの出現機序とモザイク化機構を明らかにするとともに、モザイク魚が産生する卵および精子の倍数性および特性を明らかにし、二倍体—四倍体モザイク魚の倍数体育種への応用について論議を行った。

本論文は 5 つの章より構成される。第 1 章においては、第 1 卵割阻止処理により染色体の倍化を図って四倍体を作成するための最適処理条件を検討するため、胚および成魚期に核小体最多出現数、核 DNA 量および血球サイズによる調査を行った。核小体最多出現数 4 を示す胚が受精 4 ～ 7 時間後（積算水温 52 ～ 103 °C・h の高水圧処理（650kg/cm<sup>2</sup>, 6 分間）群にのみ見られた。

フローサイトメトリー (FCM) 調査から、核小体最多出現数 4 を示す四倍体候補魚中に二倍体－四倍体モザイクが見出された。このモザイク魚の血液塗抹標本からは四倍体細胞と判定され得る大型赤血球が見られた。以上の調査結果から、積算水温  $52 \sim 103\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{h}$  の高水圧処理が卵割阻止による染色体倍化に有効であり、生存性の二倍体－四倍体モザイク魚が作出されることが示された。

第 2 章においては、卵割阻止処理により作出されるモザイクの誘起機序を人為雌性発生卵を用いて検討した。紫外線照射 ( $3,600\text{ erg/mm}^2$ ) 精子の受精による雌性発生誘起後、媒精 4 ～ 7 時間 (積算水温  $56 \sim 104\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 後の間に高水圧処理 ( $650\text{ kg/cm}^2$ , 6 分間) を行わなかった胚は全て半数体症候群を示し斃死したが、処理区からは正常魚が孵出した。これらは完全ホモ接合体型雌性発生二倍体と推定された。成魚となった子孫のうち、7 個体は二倍体であったが、1 個体が半数体－二倍体モザイクであった。以上の結果は、倍数体モザイクは 2 細胞期以降、いずれか一方の割球における染色体の倍化により生じることを示唆する。半数体－二倍体モザイク雌では雌性発生二倍体と同様に正常な卵が形成されていたことから、これらの卵は二倍体生殖細胞に由来すると考えられた。魚類において、一般に半数体は致死性であるが、半数体－二倍体モザイク魚は生存性であったことから、組織あるいは器官の一部の細胞が二倍体であれば、半数体魚の生存性が回復することが示唆された。

第 3 章では、卵割阻止処理魚における倍数体モザイク化機構について、胚では処理開始時間毎、稚魚では器官・組織毎に核 DNA 量調査を行って検討した。四倍体および二倍体－四倍体モザイクは、それぞれ卵割処理に由来する異常胚および正常胚に高い率で見られた。処理より生じた稚魚を鰭細胞の核小体最多出現数を基準に二倍体候補魚と四倍体候補魚に選別し、倍数性を器官別に調査した結果、両候補魚の多くがいずれかの器官において二倍体細胞と四倍体細胞の両方を含むモザイク性を示し、完全な四倍体魚は見られなかった。以上の結果から、胚期に見られた四倍体は発生過程で斃死し、生残している成魚の殆どはいずれかの器官において二倍体－四倍体モザイクであることが示された。このことは、四倍体自体の発生能力が著しく低いことを示す。一方、二倍体－四倍体モザイクは生残性であることから、二倍体細胞が四倍体の低い生存能力を回復させる可能性を示唆した。二倍体細胞の存在が四倍体細胞を含むモザイクの生存性と強く関係していると推察された。また、四倍体細胞の比率は個体、器官あるいは部位毎に異なっていたことから、モザイク化は二倍体と四倍体細胞のそれぞれの割球が増殖する胚発生過程に

において四倍体細胞が偏在することにより生じると推察された。

第4章においては、二倍体—四倍体モザイク魚が産生する卵および精子の倍数性と特徴について、交配子孫の倍数性および配偶子サイズの調査により検討した。また、二倍体配偶子と染色体操作の併用により、四倍体の作出を試みた。赤血球のFCMとサイズ調査から、成熟した四倍体候補（核小体最多出現数4）69個体中、1個体（雄）が四倍性を示し、24個体（雌17個体、雄7個体）が二倍体—四倍体モザイクであることが判った。四倍体候補雌4個体由来の卵を半数体精子により受精した群に三倍体子孫が生じたことから、これら三倍体はモザイクの産する二倍体（ $2n$ ）卵と正常の半数体精子の受精により生じたと判じられた。三倍体となった発眼卵の直径は大きかったことから、モザイクが産する二倍体卵は大きいことが推察された。また、四倍体雄の精子頭部は大型であったことから、二倍体であると推察された。生殖腺において二倍体—四倍体モザイクであった雌の子孫に異数体（高二倍体、高三倍体）胚が高率に見られたことから、四倍体生殖細胞では成熟分裂が必ずしも正常に行われていないことが示された。

本研究により、受精卵の卵割阻止処理法により生じる二倍体—四倍体モザイク化機構とその個体の特性が次の様に示された。①四倍体細胞は、2細胞期以降の割球の染色体倍化により誘起され、発生過程の細胞の偏在により器官別モザイクとなる。②四倍体細胞が生殖細胞系列に分化した場合、二倍体配偶子が形成される。③二倍体配偶子のサイズは大型であることから、交配時に判別することが可能である。④四倍体の低い生存性は二倍体細胞の機能補償により回復する可能性が高い。以上のことから、モザイク魚を二倍体配偶子の供給源として利用することにより、二倍体魚との交配による三倍体の大量作出や四倍体系統の作出が可能になることが示された。このことは、今後の養殖魚の育種と品種改良を進めていく上で重要な知見となり得る。

# 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

### アマゴ *Oncorhynchus masou ishikawae* の 卵割阻止処理に伴って出現する 倍数体モザイクとその特性に関する研究

魚類において倍数体育種の応用範囲を拡大するためには、受精卵の卵割を阻止して染色体の倍数化を図り、四倍体や完全ホモ接合型雌性発生二倍体を作成する必要があるが、これらの生残率が著しく低い点に実用上の問題がある。このような四倍体等の作出の際、倍数体モザイクが出現することが報告されてきたが、その誘起機序およびモザイク魚の特性に関する研究はほとんど行われてこなかった。本研究は、アマゴ *Oncorhynchus masou ishikawae* において、受精卵の卵割阻止処理に伴って出現する倍数体モザイクに着目し、高水圧処理条件とモザイク出現の関係の解明、および、二倍体－四倍体モザイクを用いた次世代倍数体の作出を試み、以下の成果を得た。

1. 受精4～7時間（積算水温 $52\sim 103^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}$ ）に高水圧（ $650\text{kg}/\text{cm}^2$ 、6分間）処理を行った群では、胚期において核小体最多出現数の調査から四倍体が認められたが、生残した成魚の中には正四倍体は認められず、二倍体および二倍体－四倍体モザイクのみが見られた。このことから、二倍体－四倍体モザイクは生存性であることが判明した。
2. 紫外線照射精子の受精による雌性発生半数体誘起後の同様な卵割阻止処理から生残した雌性発生二倍体（完全ホモ接合体雌性発生二倍体）成魚中に半数体－二

倍体モザイクが見出された。このことから、卵割阻止処理が二細胞期以降の一方の割球に作用し、倍数体モザイクが誘起されることが示唆された。また、半数体魚は致死性であるが、半数体細胞と二倍体細胞の両者から構成されるモザイクでは、生存性が回復すると考えられた。

3. 卵割阻止処理を行った群の細胞核DNA量をフローサイトメトリーにより調査したところ、四倍体は異常胚において、二倍体-四倍体モザイクは正常胚において高い率で見られた。一方、生残した稚魚からは完全な四倍体は見出されなかったが、いずれかの器官が二倍体-四倍体モザイクとなっており、四倍体細胞をもつ可能性が示された。したがって、卵割処理に由来する生残魚は基本的に二倍体-四倍体モザイクと考えられた。すなわち、卵割阻止処理に由来する四倍体魚の発生能力は極めて低い、モザイクとなった魚では、二倍体細胞が四倍体細胞の低い機能を補償し、生存能力を回復させる可能性があると考えられた。また、器官のモザイク性は、胚発生過程における二倍体および四倍体割球の器官形成と関係する可能性が示唆された。
4. 血球が四倍性を示す雄の産生した精子頭部が大型であることから、精子の二倍性が示唆された。また、二倍体-四倍体モザイク雌が通常サイズの半数体卵の他に大型二倍体卵を同時に産生することが、正常精子の受精に由来する子孫において二倍体と三倍体が出現することにより確認された。しかし、異数体子孫も出現したことから、四倍体細胞に起源する生殖細胞において、減数分裂が必ずしも正常に進行しない可能性も認められた。
5. 以上の結果から、卵割阻止処理法と倍数体モザイク化機構の関係が明らかになった。また、生残性が高い二倍体-四倍体モザイク親魚を二倍体配偶子の供給源として倍数体育種に利用することにより、三倍体の大量生産および四倍体系統作出が可能となることが示された。

申請者による以上の成果は、染色体操作による魚類の倍数体育種の進展に大きく寄与するものであり、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。