

学 位 論 文 題 名

サクラマス四倍体の誘起ならびに発生特性に関する研究

学位論文内容の要旨

近年、漁獲量の減少や人口増加に対する水産資源の供給不足に対し、効率的な生物生産を目指した育種技術の開発が求められている。染色体の数と組み合わせを人為的に統御する染色体操作技術を基盤とする倍数体も、育種上非常に有効な方法であると考えられている。すなわち、染色体操作技術を用いることにより、配偶子形成を行わせない「不妊個体の誘導」、全雌や全雄の養殖集団を作出する「性統御」、成長等の経済形質において「優良な系統や品種の作出」とそれらを遺伝的に固定する「クローン化」等が可能となる。

染色体操作のうち、第一卵割阻止法では完全同型接合型の雌性発生二倍体と四倍体が誘起できる。雌性発生二倍体を用いた次世代でのクローン系統の作出はすでに実験魚や有用種で報告されているのに対し、四倍体は親魚まで成育した例が極めて少ない。しかし、もし四倍体親魚が作出できれば、二倍体との通常交配による不妊三倍体のほか、異種間での交雑から複二倍体、すなわち新種をも合成できる可能性がある。このように、有用な形質を備えた個体を受精後の染色体の倍加処理なしで得られることから、二倍性配偶子を産出する四倍体親魚の作出は育種の幅を飛躍的に拡大するツールになると期待されている。しかし、前述のように四倍体の生残率は極めて低いため実用化には程遠く、四倍体の死亡要因の解明や二倍性配偶子獲得のための新たな手法の開発は急務である。

本研究では、サクラマス *Oncorhynchus masou* を材料として用い、第一卵割阻止胚および誘起された四倍体の死亡要因の解明と、生殖系列キメラを介して四倍性始原生殖細胞(PGCs)由来の二倍性配偶子を誘導する方法の確立を目的とし研究を行った。

第1章 第一卵割阻止により誘起した四倍体および雌性発生二倍体の発生能力の比較

雌雄 1 対 1 交配による受精卵から、四倍体(4N)と雌性発生二倍体(G2N)の両群を同一処

理条件(700kg/cm², 7 分間)で誘起し、第一卵割阻止の最適時期の検討と両群の発生能力の比較を行った。受精後 10°C で培養した時、受精後の最適な処理開始時間は G2N 群の方が 30 分遅れていたが、細胞学的に最適な処理時期は、両群共に第一卵割前中期の後半であった。また、最適時期は受精後のごく短い限られた時間であり、それから前後に 30 分/10°C ずれた処理群では、生残率と胚体形成率の低下が認められた。この 30 分/10°C の差は、一定の培養条件下における家系間の発生速度の差の範囲内であることから、受精卵に最適時期で効率よく処理を施すことは非常に困難であり、また四倍体誘起の成否を大きく左右する要因であると考えられた。

両群共に、最適時期での処理群は他の処理群と比較して孵化直前まで高い生残率を維持した。しかし、G2N 群では正常な孵化稚魚が実験期間終了(受精後 50 日)以降も生残したのに対し、4N 群では孵化期直前に急激に死亡し生残個体は得られなかった。孵化直前の四倍体胚の殆どは、小眼、小頭、体軸の湾曲等の重度の奇形胚であり、正常な外部形態を示す個体でも血管系の発達が著しく悪かった。このことから、四倍体の死亡要因は、第一卵割阻止処理の副作用よりむしろ、四倍体への倍数性の上昇に起因する遺伝学的あるいは生理学的要因にあると考えられた。

第2章 第一卵割阻止胚の発生の特性

雌雄 1 対 1 交配による受精卵を 4 等分し、コントロール(Cont)群、第一卵割阻止群として最適時期より早い処理群、最適時間での処理群、最適時期より遅い処理群の計 4 群を作出し、処理後の発生を比較した。最適時期より早い処理群では後期での染色体の分離異常、遅い処理群では処理直後の染色体の塊状化や断片化が顕著に見られた。これらの処理群では、異常細胞数を示す胚や胞胚期に核の存否や細胞のサイズが不均一となる異常胚が高頻度で出現した。一方、最適時期での処理群では、処理後の異常は見られず、胞胚期では正常胚の出現頻度が高かった。このことから、最適時期以外での処理は第一卵割阻止胚の死亡要因を引き起こすことが示された。

最適時間での処理群では、外部形態上、2 細胞期が長期に亘り観察され、Cont 群より 1 細胞周期遅れて卵割が進行した。また、細胞学的には、処理後、Cont 群と同様に第一卵割を終了して 2 細胞期に達したが、この後、Cont 群では中心体が 2 つに複製され、第二卵割終了

後 4 細胞期に達したのに対し、処理群では中心体が複製されず、中心体が 1 つしか存在しないまま娘核の膨潤、核膜の形成、染色体の形成、核膜の消失、娘核の形成の一連の細胞分裂過程が観察された。この時、細胞質分裂は伴わず、分裂終了後も 2 細胞期のままであった。このことから、処理群では第一卵割終了後に、細胞数が変化しない「隠された」第二卵割が存在することが示唆された。また、この第二卵割で、染色体は複製されるが中心体が複製されないために染色体の分離と細胞質分裂が阻害され、四倍体化すると考えられた。

10°C 培養下でのサクラマス二倍体の正常胚発生過程について受精から孵化までの発生段階を規定し、四倍体の発生を検討した。四倍体について、二倍体とほぼ同時に胞胚期に到達したことから、四倍体では非同調分裂に入るまでの分裂回数が減少し、胚盤を構成する割球数も減少すると考えられた。胞胚期から 100%エピボリー期の第一卵割阻止胚の一部に、エピボリー運動の停止胚や胚軸構造が異常な奇形胚が観察され、これらの胚では YSL と卵黄細胞表面の微小管繊維が正常に機能していないものと考えられた。さらに、低率ながら受精後 2 ヶ月まで生残した四倍体稚魚では 91.8%で水腫が認められた。また、組織学的には、鰓弁や腹大動脈の血管壁、腸管の粘膜層の発達が不十分であり、浸透圧調節に関わる器官あるいは細胞に生理学的な変化が生じた可能性が考えられた。

第3章 四倍性始原生殖細胞の特性と生殖系列キメラを介した二倍性配偶子の誘導

第一卵割阻止により誘起した四倍体胚における PGCs の存否を調べた。組織学的観察、Whole mount *in situ* hybridization 法による生殖細胞に特異的な *vas* mRNA の検出、生殖隆起細胞の生体観察の結果、四倍体においても運動能を有する PGCs の存在が確認され、生殖系列キメラ作出への応用が可能であると考えられた。また、奇形胚においても、数は減少するが PGCs が確認された。

四倍性 PGCs を移植した二倍体宿主のうち 3 個体の雌および 11 個体の雄が成熟した。雌 3 個体のうち 1 個体で、二倍体雄と交配した子孫の中に三倍体と四倍体の出現が確認された。また、雄 11 個体中 2 個体の精子から二倍体が検出された。このうち 1 個体から通常の精子より大型の頭部を持つ精子が観察され、これが二倍体に相当する可能性が考えられた。

以上、第一卵割阻止処理により誘起した四倍体の致死性として様々な死亡要因が明らか

となった。また、この致死性の四倍体には機能的な PGCs が存在することが明らかとなり、生殖系列キメラを介した借腹生産技術により二倍性配偶子の誘導が可能であると考えられた。しかしながら、現時点では移植した四倍性 PGCs 由来の子孫か否かは不明であり、今後、移植した四倍性 PGCs が宿主生殖腺内で配偶子に分化・増殖したかどうか、詳細に解析する必要がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 荒 井 克 俊

副 査 教 授 阿 部 周 一

副 査 教 授 山 羽 悦 郎

学 位 論 文 題 名

サクラマス四倍体の誘起ならびに発生特性に関する研究

染色体操作により誘起される四倍体は、不妊三倍体や複二倍体を誘起するための二倍性配偶子を得る上で重要な役割を持つ。しかしながら、魚類においては処理後の胚が低生残率であるため限られた種においてしか誘起されていない。誘起条件やその後の生物学的特性を明らかにすることは、四倍体を様々な魚種で作り出していく上で重要である。また、二倍性配偶子を得るための方法を開発することも求められる。本論文では、サクラマスを材料として用い、第一卵割阻止胚および誘起された四倍体の死亡要因の解明と、生殖系列キメラを介して四倍性始原生殖細胞(PGCs)由来の二倍性配偶子を誘導する方法の確立を目的として研究を行ない、以下の評価すべき成果を得た。

- 1) 雌雄1対1交配による受精卵から、四倍体と雌性発生二倍体の両群を同一処理条件で誘起し、第一卵割阻止の最適時期の検討と両群の発生能力の比較を行った。第一卵割阻止の最適な処理開始時間は、両群共に第一卵割前中期の後半であり、それぞれ四倍体、雌性発生二倍体が誘起された。しかしながら、前者が孵化前後に高死亡率を示したのに対し、後者は実験期間終了(受精後50日)以降も生残した。このことから、四倍体の死亡要因は、第一卵割阻止処理の副作用よりむしろ、四倍体への倍数性の上昇に起因する遺伝学的あるいは生理学的要因にあると考えられた。
- 2) 第一卵割阻止の最適時期より早い処理群、遅い処理群を作出し、処理後の発生を比較した。最適時期より早い処理群では後期での染色体の分離異常、遅い処理群では処理直後の染色体の塊状化や断片化が顕著に見られ、初期卵割期での異常細胞数や胞胚期での核や割球サイズの不揃いなど異常胚が高頻度で出現した。このことから、限られた最適時期で第一卵割阻止を引き起こす必要性が示された。

3) 最適時間での処理群の処理後の細胞学的な観察の結果、処理群では第一卵割終了後に、細胞数が増加しない「隠された」第二卵割が存在し、染色体は複製されるが中心体が複製されないために染色体の分離と細胞質分裂が阻害され、四倍体化すると考えられた。その後の四倍体の発生を二倍体対照群と比較した結果、エピボリー運動の停止胚や胚軸構造が異常な奇形胚が観察され。さらに、低率ながら受精後2ヶ月まで生存した四倍体稚魚では91.8%で水腫が認められ、組織学的には、鰓弁や腹大動脈の血管壁、腸管の粘膜層の発達が不十分であり、浸透圧調節に関わる器官あるいは細胞に生理学的な変化が見られた。これらの形態形成や器官形成の異常が死亡の原因であると予想された。

これまでの結果より、本種において第一卵割阻止による四倍体の誘起は可能であるが、その個体としての致死性が明らかとなった。そのため、二倍性配偶子を得るために、四倍体始原生殖細胞 (PGC) による借腹生産の検討を行なった。

4) 第一卵割阻止により誘起した四倍体胚における PGCs の存否を、組織学的観察、Whole mount *in situ* hybridization 法による生殖細胞に特異的な *vas* mRNA の検出、生殖隆起細胞の生体観察により調べた。その結果、四倍体においても運動能を有する PGCs の存在が確認され、生殖系列キメラ作出への応用が可能であると考えられた。

5) 四倍性 PGCs を分離し二倍体孵化稚魚へ移植して生殖系列キメラを誘起した。成熟した雌3個体のうち1個体で、二倍体雄と交配した子孫の中に三倍体と四倍体の出現が確認された。また、雄11個体中2個体で二倍性の精子が検出された。しかしながら、現時点では移植した四倍性 PGCs 由来の子孫か否かは不明であり、今後、移植した四倍性 PGCs が宿主生殖腺内で配偶子に分化・増殖したかどうか、詳細に解析する必要があると考えられた。

申請者による以上の成果は、魚類における二倍性配偶子誘起を目指す染色体工学の研究に大きく寄与するものであり、さらには今後の魚類の発生工学技術の発展に資するものとして、審査員一同は本論文が博士（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。