

学 位 論 文 題 名

性転換クロードジョウを用いた
非還元配偶子形成機構に関する研究

学位論文内容の要旨

ドジョウ (*Misgurnus anguillicaudatus*) の多くは染色体数 $2n=50$ を持ち、両性生殖により繁殖する。しかしながら、北海道網走支庁管内では、特殊な配偶子形成により維持されているクローン系統の存在が確認されている。これらのクロードジョウは、自身と同一の遺伝情報を持つ二倍体卵を非還元的につくり、精子核が取り込まれた場合には三倍体となるものの、基本的には精子の遺伝的関与なしに雌性発生し、生じる子孫は母親と同じゲノムを持つクローンとなる。

魚類では、温度処理、ホルモン投与による人為性転換が可能であり、全雌であるクロードジョウの雄への性転換が成功すれば、生じた性転換個体は、クローンと遺伝的に同一の二倍体精子を形成することが期待される。二倍体精子を非還元的に産生する個体は、脊椎動物では非常に希少であり、もし非還元二倍体精子をつくる個体を誘起できたならば、その個体は非還元配偶子形成機構を理解する有用な材料となる。精子形成では、卵形成にみられる卵黄形成と成長に伴う第一減数分裂前期での休止期を伴わないことから、その過程を比較的容易に解析することが可能であり、非還元配偶子形成機構に関し、有益な知見をもたらすと考えられる。

本研究は、下記の四章により構成され、人為的に作出した性転換クローンを材料として、どのように二倍体精子が形成されるかについて、組織学的、細胞遺

伝学的手法により、その細胞学的機構を解明すると共に、その分子機構の一端を明らかにしたものである。

第一章では、全雌であるクロードジョウへの性転換を試み、その生殖特性を調査した。クロードジョウ雌に対し、孵化後1ヶ月目より1ヶ月間、 17α -Methyltestosterone (MT, 0.5ppm)を含む飼料を与えることにより、クロード個体の雄化に成功した。DNA フローサイトメトリーによる倍数性調査の結果、性転換クロード雄より生じる精子は二倍体に相当する DNA 量を有することが明らかとなった。性転換クロードの二倍体精子は、頭部サイズが正常二倍体の半数体精子よりも大型であり、運動能力は著しく悪いものの、受精能力を持つ機能的精子であった。正常二倍体雌と性転換クロード雄の人工交配により生じた三倍体子孫は、マイクロサテライト DNA 解析においてクロードと同一の2つのアリルと母親である正常二倍体雌に由来した1つのアリルを示し、性転換クロード雄が、クロードと同一の遺伝情報を持つ二倍体精子を産生することを明らかにした。

第二章では、非還元配偶子形成におけるゲノム構成の影響を明らかにすることを目的として、クロードの二倍体ゲノムを2セット持つ、クロード四倍体を作成し、その生殖特性を調査した。クロード雌の二倍体卵と性転換クロード雄の二倍体精子の人工授精により作出したクロード四倍体は、非還元配偶子形成を行わず、還元性の二倍体精子を形成した。マイクロサテライト DNA 解析から、正常二倍体雌とクロード四倍体雄の人工交配により生じた三倍体子孫は、クロードと同一の2つのアリルと母親である正常二倍体雌に由来する1つのアリルを持ち、クロード四倍体雄が、クロードと同一の遺伝情報を持つ二倍体精子を産生することが明らかとなった。これらの結果は、クロード二倍体の持つ2種類の異質な半数体ゲノム間では対合が生じず、同質な半数体ゲノム間でのみ相同染色体の対合が起きたことを示す。即ち、対合を行いうるゲノム構成であれ

ば正常な減数分裂が生じるが、対合ができないゲノム構成の時は非還元配偶子形成が生じる。本結果は、対合の可否が、正常な減数分裂により配偶子が生じるか、非還元的に配偶子が生じるかを決める根本的要因であることを示唆した。

第三章では、性転換クローンを用いて、非還元精子形成の細胞学的機構を解明した。精巣の染色体観察において、正常二倍体雄が二価染色体 25 本を示すのに対し、性転換クローンが二価染色体 50 本を示すこと、また性転換クローンでは、 $4n=100$ の体細胞分裂中期像が見られることから、性転換クローンの非還元二倍体精子が、減数分裂前の染色体の倍加による核内分裂 (premeiotic endomitosis or endoreduplication) により形成されることが明らかになった。精巣の組織学的観察では、性転換クローンにおいて、B 型精原細胞の分裂回数に基づいて分類したすべてのステージで、正常二倍体よりも大型の核が観察されたこと、および A 型精原細胞で、大型の核を持つ細胞以外に、正常二倍体と同等の核サイズを持つ細胞が観察されたことから、染色体倍加が A 型精原細胞の時期に生じることが示唆された。さらに、anti-SGSA-1 標識により識別された初期精原細胞 (A 型および初期 B 型精原細胞) に関する DNA フローサイトメトリーにより、多数の四倍体細胞 (4C) が、性転換クローンの初期精原細胞中に存在することが確認され、染色体倍加が A 型精原細胞で起きるという結論を強く支持した。即ち、性転換クローンでは、A 型精原細胞において染色体が倍加し、四倍性の精原細胞が生じる。これらが 7~8 回の有糸分裂を繰り返した後、もともと同一であった姉妹染色体があたかも相同染色体の様に複製・対合し、この後擬似減数分裂的な 2 回の分裂を行うことにより二倍体精子が形成される。

第四章では、非還元配偶子形成における分子機構の解明を目指し、初期精原細胞を多く含む精巣細胞より、性転換クローンおよび正常二倍体間で発現差のある遺伝子群を差分化した cDNA サブトラクションライブラリー (normal-clone subtractive cDNA library および clone-normal subtractive cDNA library) を作製し、網羅的遺伝子発現解析を実施した。ドットプロット解析によるスクリ

ーニングを行い、発現差のある normal-clone subtractive cDNA library の 22 遺伝子 (既知遺伝子:15、未知配列:7)、および clone-normal subtractive cDNA library の 55 遺伝子 (既知遺伝子:21、未知配列:34) の部分配列を明らかにした。

クロードジョウにみられる非還元配偶子形成機構に関する知見は、正常な減数分裂機構の理解を深化させ、配偶子形成機構の理解へと繋がると思われる。また、クローン配偶子形成や雌性発生の分子細胞機構が解明されれば、生殖や発生を操作する新しい生命操作技術の開発へとつながり、育種・養殖の効率を格段に高めることが可能となると考えられる。

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

副 査 准教授 井 尻 成 保

学 位 論 文 題 名

性転換クロードジョウを用いた 非還元配偶子形成機構に関する研究

ドジョウ (*Misgurnus anguillicaudatus*) の自然クローン系統は、自身の体細胞と同一な遺伝情報を持つ二倍体卵を非還元的につくり、精子核が取り込まれた場合には三倍体となるものの、基本的には精子の遺伝的関与なしに雌性発生する。魚類では、人為性転換が可能なことから、全雌クロードジョウを雄へ性転換すれば、生じたクローン雄は、遺伝的に同一な二倍体精子を形成することが期待される。二倍体精子を産生する個体は、脊椎動物では非常に希少である。精子形成過程では、卵形成にみられる卵黄形成と成長に伴う第一減数分裂前期での休止期がないことから、非還元二倍体精子の形成機構に関して、比較的容易に解析することが可能と考えられる。本研究では、人為性転換処理により作出した性転換クローンを用い、どのように二倍体精子が形成されるかについて、組織学的、細胞遺伝学的手法によりその細胞学的機構を解明すると共に、その分子機構の一端を明らかにし、以下の評価すべき成果を得た。

1) 全雌であるクロードジョウへの性転換を試み、その生殖特性を調査した。クローン雌仔魚に対し、 17α -Methyltestosterone (MT, 0.5ppm)を含む飼料を孵化後1ヶ月から1ヶ月間与えることにより、クローン個体の雄化に成功した。DNAフローサイトメトリーにより、性転換クローン雄の精子は、二倍体に相当するDNA量を有した。これは、正常半数体精子に比べ、大型の頭部を持ち、運動能が著しく悪かった。マイクロサテライトDNA解析により、正常二倍体雌と性転換クローン雄の人工交配により生じた三倍体子孫は、クローンと同一の2つのアレルと母親である正常二倍体雌に由来する1つのアレルを持つことが判明した。以上の結果より、性転換クローン雄は、自然クローン系統と同一の遺伝情報を持つ二倍体精子を産生することが明らかとなった。

2) 非還元配偶子形成におけるゲノム構成の影響を明らかにすることを目的として、クローンの二倍体ゲノムを2セット重複して持つ、四倍体クローンを作出し、その生殖特性を調査した。クローン雌の二倍体卵と性転換クローン雄の二倍体精子の人工授精から生じたクローン四倍体は、還元性の二倍体精子を形成した。マイクロサテライト DNA 解析から、正常二倍体雌とクローン四倍体雄の人工交配により生じた三倍体子孫は、クローンと同一の2つのアレルと母親である正常二倍体雌に由来する1つのアレルを持ち、クローン四倍体雄が、クローンと同一の遺伝情報を持つ二倍体精子を産生することが明らかとなった。これらの結果は、クローン二倍体の持つ2種類の異質な半数体ゲノム間では対合が生じず、同質の半数体ゲノム間でのみ相同染色体の対合が起きたことを示し、対合を行いうるゲノム構成であるか否かが、正常な減数分裂による配偶子が生じるか、非還元配偶子が生じるかの根本的な要因であることを示唆した。

3) 性転換クローンの非還元精子形成を細胞遺伝学的に調査した。精巣の染色体観察において、正常二倍体雄が二価染色体25本を示すのに対し、性転換クローンが二価染色体50本を示すこと、また性転換クローンでは、 $4n=100$ の体細胞分裂中期像が見られることから、性転換クローンの非還元二倍体精子形成では、減数分裂前に染色体数が倍加することを明らかにした。

精巣の組織学的観察では、性転換クローンのB型精原細胞で、正常二倍体よりも大型の核が観察されたこと、およびA型精原細胞で、大型の核を持つ細胞以外に、正常二倍体と同等の核サイズを持つ細胞が観察されたことから、染色体倍加がA型精原細胞の時期に生じることが示唆された。

さらに、anti-SGSA-1 標識により識別された初期精原細胞(A型および初期B型精原細胞)に関するDNAフローサイトメトリーにより、多数の四倍体細胞(4C)が、性転換クローンの初期精原細胞中に存在することが確認され、染色体倍加がA型精原細胞で起きるという結論を強く支持した。

4) 非還元配偶子形成における分子機構の解明を目指し、初期精原細胞を多く含む精巣細胞より、性転換クローンおよび正常二倍体間で発現差のある遺伝子群を差分化したcDNAサブトラクションライブラリーを作成し、網羅的遺伝子発現解析を実施した。ドットプロット解析によるスクリーニングを行い、発現差のあるnormal-clone subtractive cDNA libraryの22遺伝子(既知遺伝子:15、未知配列:7)、およびclone-normal subtractive cDNA libraryの55遺伝子(既知遺伝子:21、未知配列:34)の部分配列を明らかにした。

申請者による以上の研究成果は、脊椎動物で希な非還元配偶子形成機構に資するものであり、基礎生物学および水産育種学上重要な成果と考えられ、審査員一同は、申請者が博士(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。