

学位論文題名

Proteomics on the inviability and sterility in
salmonid hybrids

(サケ類雑種の致死性と不妊性のプロテオミクス)

学位論文内容の要旨

交雑育種は遺伝的に異なる2種を交配させる事によって、それぞれの種が持つ優れた形質を備えた新品種を作ることにある。しかしながら過去の魚類の交雑育種においては、雑種退化(不妊, 成長率・生存率の低下, 雑種致死等)などにより、新品種の作出にほとんど成功していない。サケ類は水産上重要な種を多く含み、育種学的研究を進める必要がある。サケ類の雑種に関しては、両親種の組み合わせにより生存性や致死性のものが知られており、一部の致死性雑種では染色体異常が原因で胚形成異常や孵化まで至らないと考えられている。一方、生存性の雑種の中にも、妊性をもつものや不妊のものがある。不妊は、従来の報告によれば、その一因として相同染色体の対合不全などにより減数分裂の進行が止まり、配偶子形成に失敗するためと考えられている。しかし、雑種致死および不妊に係わる分子レベルの機構については、まだほとんど不明のままである。そこで本研究では、致死性雑種の発生初期胚および生存性不妊雑種の生殖巣における発現タンパクの網羅的解析を行い、発現が変化したタンパクとそれらのコード遺伝子を同定するプロテオミクスのアプローチによりサケ類雑種の致死および不妊の機構解明に資することを目的とした。

主論文は英文で書かれ、GENERAL INTRODUCTIONとGENERAL CONCLUSIONSのほか、4章からなる。まず、第1章では、受精後20日目までにほとんどの胚が死亡することが知られているサクラマス(Ms)♀×ニジマス(Rb)♂雑種(MR)において、受精後9日、12日、15日、20日目の胚におけるタンパク発現を、2次元ゲル電気泳動(2-DE)によるタンパクスポットの数および濃度の変化をもとに両親種MsとRbの同時期の胚と比較した。その結果、雑種胚では受精後9日から15日目まで発現に変化がみられたスポット数が増加したが、20日目には急減した。雑種胚では新規の発現または発現の亢進が一部のスポ

ットでみられたが、大部分のスポットは発現が低下または消失していた。一方、両親種の胚では調べた期間中スポット数は増加しており、新規の発現や発現の亢進がみられたものが大部分であった。雑種胚で発現の低下や消失がみられたスポットの回収後タンパクを抽出し、MALDI-TOF 質量分析装置によりアミノ酸配列を解読してデータベースで検索したところ、44 種類のタンパクとそのコード遺伝子が同定された。その多くは細胞内の物質代謝や細胞骨格形成に必須なハウスキーピング遺伝子の産物であり、一部は核酸代謝やクロマチン複製に関与するタンパクも含まれていた。これらのタンパクの発現異常が雑種胚における染色体異常や胚形成異常と密接に関連しており、結果として雑種胚を致死に至らしめることが示唆された。

第2章では、第1章で明らかになった致死性雑種胚 MR における発現異常タンパクのうち、いくつかのハウスキーピング遺伝子を中心にそれらの mRNA レベルを、MR、ニジマス (Rb) ♀×サクラマス (Ms) ♂生存性雑種 (RM)、および両親種 Ms と Rb の同時期胚において Real Time PCR を用いて定量的に比較した。その結果、致死性雑種胚 MR における mRNA レベルとタンパク発現レベルは必ずしも一致しないこと、生存性雑種 RM や両親種の胚に比べ MR における mRNA レベルは一般に低いことなどが分かった。これらの結果から、雑種胚 MR では、両親種のゲノムの間の何らかの相互作用により転写抑制や転写後調節あるいは翻訳後調節などが起きて、観察されたタンパク発現の異常が誘発されたものと考えられた。

第3章では、カワマス (Bt) ♀×サクラマス (Ms) ♂雑種 (BM) の不妊に係わるプロテオミクスの対照として、雄親である Ms の精子形成過程におけるタンパク発現を、第1章と同じく 2-DE と MALDI-TOF 質量分析を用いて調べた。精子形成早期と中期におけるタンパク発現の比較から、12種類の発現亢進タンパクと26種類の発現低下タンパクが同定された。発現低下タンパクの約半数は体細胞における物質代謝関連タンパクであり、一方、発現亢進タンパクは主に細胞分裂関連タンパクや細胞骨格関連タンパクであった。これらの知見は、精巣の組織学的観察結果と合わせ、精原細胞から精母細胞や精細胞への分化と増殖に密接に関与するタンパクレベルの変化を体系的に捉えたものとして極めて興味深い。

第4章では、上記の BM 不妊雑種雄の精巣と同時期の両親種雄の精巣におけるタンパク発現を、2-DE と MALDI-TOF 質量分析により比較した。BM 雑種の生殖巣は両親種に比べ未発達であったため形態的に精巣または卵巣の識別ができず、雌雄の判別には、組織学的

な観察の外、サケ属に特有な *GH-Y* 偽遺伝子を用いた。その結果、BM 雄の精巣において 16 種類の発現亢進タンパクと 48 種類の発現低下タンパクが同定された。発現低下タンパクの多くは、精巣特異的な機能をもつものやタンパク代謝に関与するものであった。特に、第 3 章で発現の亢進が認められた細胞分裂関連タンパクや細胞骨格関連タンパクの発現低下が著しかった。一方、発現亢進タンパクは体細胞において機能をもつものが多く、両親種雄の精巣におけるタンパク発現とは逆のパターンが認められた。また、BM 雑種雄の組織学的な観察から、精巣様構造の中に精母細胞や精細胞がない空洞化した精小囊のみをもつものや、少数の精母細胞や精細胞があるものの精子までの分化が起きていないものなどが認められた。これらの知見から、BM 雑種雄の不妊は、精巣の発達や精細胞の分化に必須なタンパクの発現低下によるものであることが示唆された。

本研究により、サケ類雑種の致死性と不妊性に係わるタンパクが質量分析により明らかにされ、解読されたアミノ酸配列から遡及的にコード遺伝子が同定された。本研究の成果は、雑種致死や不妊の機構を解明するための胚発生や配偶子形成に係わる基礎的知見を与えるとともに、サケ類雑種を用いた有用品種の作出など水産育種における新しいアプローチに資するものとして高く評価される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 阿 部 周 一
副 査 教 授 荒 井 克 俊
副 査 教 授 尾 島 孝 男
副 査 教 授 山 羽 悦 郎 (北方生物圏フィールド
科学センター)

学 位 論 文 題 名

Proteomics on the inviability and sterility in salmonid hybrids

(サケ類雑種の致死性と不妊性のプロテオミクス)

育種を目的として試みられてきたサケ類の種間雑種では、その多くが致死性か不妊である。しかし、雑種致死および不妊に係わる分子レベルの機構については、まだほとんど不明のままである。そこで本研究では、サクラマスとニジマスの致死性雑種初期胚およびカワマスとサクラマスの生存性不妊雑種の精巣における発現タンパクの網羅的解析を行い、発現が変化したタンパクとそれらのコード遺伝子を同定するプロテオミクスのアプローチによりサケ類雑種の致死および不妊の機構解明に資することを目的とした。

主論文は英文で書かれ、GENERAL INTRODUCTION と GENERAL CONCLUSIONS のほか、4章からなる。まず、第1章では、致死性のサクラマス (Ms) ♀×ニジマス (Rb) ♂雑種 (MR) において受精後9日、12日、15日、20日目の胚のタンパク発現を、2次元ゲル電気泳動 (2-DE) によるタンパクスポットの数および濃度の変化をもとに両親種 Ms と Rb の同時期の胚と比較した。雑種胚では受精後9日から15日目まで発現に変化がみられたスポット数が増加したが、20日目には急減した。一部のスポットで新規の発現または発現の亢進がみられたが、雑種胚の大部分のスポットは発現が低下または消失していた。一方、両親種の胚では調べた期間中スポット数は増加しており、新規の発現や発現の亢進がみられたものが大部分であった。雑種胚で発現の低下や消失がみられたスポットの回収後タンパクを抽出し、MALDI-TOF 質量分析装置によりアミノ酸配列を解読してデータベースで検索したところ、44種類のタンパクとそのコード遺伝子が同定された。その多くは細胞内の物質代謝や細胞骨格形成に必須なハウスキーピング遺伝子の産物であり、一部は核酸代謝やクロマチン複製に関与するタンパクも含まれていた。これらのタンパクの発現異

常が雑種胚における染色体異常や胚形成異常と密接に関連しており、結果として雑種胚を致死に至らしめることが示唆された。

第2章では、第1章で明らかになった致死性雑種胚 MR における発現異常タンパクコード遺伝子のうち、ハウスキーピング遺伝子を中心にそれらの mRNA レベルを MR、ニジマス (Rb) ♀×サクラマス (Ms) ♂生存性雑種 (RM)、および両親種 Ms と Rb の同時期胚において Real Time PCR を用いて定量的に比較した。その結果、致死性雑種胚 MR における mRNA レベルとタンパク発現レベルは必ずしも一致しないこと、生存性雑種 RM や両親種の胚に比べ MR における mRNA レベルは一般に低いことなどが分かった。これらの結果から、雑種胚 MR では転写抑制や転写後調節あるいは翻訳後調節などにより、タンパク発現の異常が誘発されたものと考えられた。

第3章では、カワマス (Bt) ♀×サクラマス (Ms) ♂雑種 (BM) の不妊に係わるプロテオミクスの対照として、雄親 Ms の精子形成過程におけるタンパク発現を、第1章と同じく 2-DE と MALDI-TOF 質量分析を用いて調べた。精子形成早期と中期におけるタンパク発現の比較から、12 種類の発現亢進タンパクと 26 種類の発現低下タンパクが同定された。発現低下タンパクの約半数は体細胞における物質代謝関連タンパクであり、一方、発現亢進タンパクは主に細胞分裂関連タンパクや細胞骨格関連タンパクであった。これらの知見は、精巣の組織学的観察結果と合わせ、精原細胞から精母細胞や精細胞への分化と増殖に密接に関与するタンパクレベルの変化を体系的に捉えたものとして極めて興味深い。

第4章では、上記の BM 不妊雑種雄の精巣と同時期の両親種雄の精巣におけるタンパク発現を、2-DE と MALDI-TOF 質量分析により比較した。BM 雑種の生殖巣は両親種に比べ未発達であったため形態的に精巣または卵巣の識別ができず、雌雄の判別には、組織学的な観察の外、サケ属に特有な *GH-Y* 偽遺伝子を用いた。その結果、BM 雄の精巣において 16 種類の発現亢進タンパクと 48 種類の発現低下タンパクが同定された。発現低下タンパクの多くは、精巣特異的な機能をもつものやタンパク代謝に関与するものであった。特に、第3章で発現の亢進が認められた細胞分裂関連タンパクや細胞骨格関連タンパクの発現低下が著しかった。一方、発現亢進タンパクは体細胞において機能をもつものが多く、両親種雄の精巣におけるタンパク発現とは逆のパターンが認められた。また、BM 雑種雄の組織学的な観察から、精巣様構造の中に精母細胞や精細胞がない空洞化した精小囊のみをもつものや、少数の精母細胞や精細胞があるものの精子までの分化が起きていないものなどが認められた。これらの知見から、BM 雑種雄の不妊は、精巣の発達や精細胞の分化に必要なタンパクの発現低下によるものであることが示唆された。

本研究により得られた以上の成果は、雑種致死や不妊の機構を解明するための胚発生や配偶子形成に係わる基礎的知見を与えるとともに、サケ類雑種を用いた有用品種の作出な

ど水産育種における新しいアプローチに資するものとして高く評価される。

よって審査員一同は、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。