

学 位 論 文 題 名

中国産倍数体ドジョウの遺伝学的研究

学位論文内容の要旨

ドジョウ (*Misgurnus anguillicaudatus*) は中国大陸、朝鮮半島、日本列島、台湾などに広く分布するコイ目ドジョウ科ドジョウ属の淡水魚である。日本の野生集団では両性生殖により繁殖する正常二倍体 ($2n=50$) のほか、非還元二倍性卵を産するクローン二倍体とこれらと半数性精子との偶発的受精により生じる自然三倍体 ($3n=75$) が一部地域で出現する。自然四倍体は市場より得た標本以外には見られず、野生集団では目下発見されていない。しかし、これら四倍体は人為雌性発生の結果生存性の雌性発生子孫を産することから遺伝的四倍体 ($4n=100$) と推定されている。また、最近のミトコンドリア (mt) DNA の塩基配列分析から、日本産ドジョウは2つのグループ A、B に分けられることが判明した。グループ A はクローン系統を含み、主に北海道北部と石川県の一部に分布する。以上の結果は、アロザイムやマイクロサテライトを用いた遺伝学的研究結果と類似した。以上のように日本産ドジョウについての遺伝学的知見は集積されつつあるが、中国大陸のドジョウについてはこのような包括的な研究はなされておらず、遺伝学的研究の実施が望まれる。

中国産ドジョウにおいては染色体数 50 の二倍体 ($2n$) の他、染色体数 100 の個体が生息することが知られている。すなわち、中国産ドジョウには倍数性変異が存在する。しかしながら、中国産の染色体数 100 をもつドジョウが、既に日本市場で認められた四倍体と同様、染色体セットを 4 組もつ四倍体 ($4n=100$) であるか、あるいは既に遺伝的に二倍体化したドジョウ ($2n=100$) であるのかは不明である。その生殖についても日本のクローン二倍体と同様の特殊な生殖を行っているのか不明である。さらに、中国産四倍体ドジョウはゲノム全体の重複による同質四倍体化により生じたのか、あるいは非相同な異質ゲノムに係る交雑と倍加、すなわち、異質四倍体化により生じたのか不明である。

本研究では、中国産の倍数体ドジョウに着目し、これらの遺伝学的特性とその起源を明らかにするため、二倍体、三倍体および四倍体の識別と分布、これらの mtDNA 塩基配列を用いた集団の比較を行うとともに、分子細胞遺伝学的手法による染色体構成の検討を行った。そして、減数分裂における染色体の挙動の観察と染色体操作と交配より生じる子孫の生存能力等から倍数体のゲノム構成と起源を推定した。

まず、倍数体ドジョウの分布を検討するため、染色体標本観察と DNA 量フローサイトメトリーによる倍数性判定の結果に基づき、赤血球核サイズ測定による倍数体識別法を確立した。そして、この方法を用いて 29 地点より得た 762 個体について倍数性を判定した。その結果、29 地点のうち特に長江流域では四倍体と三倍体が二倍体と同所的に生息することが判明した。一方、湖北省から地理的に離れた天津市、杭州、呼和浩特で、低頻度で三倍体が出現した。また、上記以外の地点では二倍体のみが生じた。

次に、中国大陸 31 地点より得た 554 個体について mtDNA の調節領域の RFLP 分析と塩基配列分析を行った。その結果、日本に見られない 2 種類の新規 RFLPs が認められた。中国中央部の三倍体と四倍体は二倍体と同一のハプロタイプを共有する場合と非常に類似する場合のみならず、著しく異なる場合が見られた。また、日本産クローン二倍体は中国の倍数体と遺伝的に大きく異なった。日本の市場から得た四倍体と中国に生息する自然四倍体は近縁であった。

次いで、直接法により染色体標本を作成し、光学顕微鏡で観察したところ、二倍体の染色体数は $2n=50$ であり、核型は 5 対 10 本の中中部着系型 (M)、2 対 4 本の次中部着系型 (SM)、18 対 36 本の端部着系型 (T) 染色体により構成されていた。NF は 64 であった。三倍体の染色体数は 75 であり、3 本ずつ 5 組 15 本の M 型、2 組 6 本の SM 型、18 組 54 本の T 型染色体により核型は構成されており、基本数 NF は 96 であった。四倍体の染色体数は 100 であり、4 本ずつ 5 組 20 本の M 型、2 組 8 本の SM 型、18 組 72 本の T 型染色体により核型は構成されており、NF は 128 であった。二倍体ドジョウでは、最大の M 染色体 2 本の短腕端部において、そして、四倍体でも最大の M 染色体 4 本の短腕端部において Ag-NOR、CMA3 濃染部位、DAPI 淡染部位、rDNA に対する FISH シグナルが検出できた。四倍体では、分染部位、FISH シグナルに染色体間で濃淡があり、構造上の相違が生じていることが示唆された。

四倍体出現の機構としては、全ゲノムが重複する同質四倍体化と交雑が関与した後倍加が生じる異質四倍体化が考えられる。同質四倍体では親和性の高い 4 本の相同染色体をもつことから、四価染色体の形成が予想される。一方、異質四倍体は、複二倍体の構成、すなわち、非相同染色体が 2 組もつことから、二価染色体形成が予想される。そこで、四倍体化機構を推定するため、卵母細胞の卵核胞と精母細胞の核における減数分裂像を観察した。その結果、四倍体では雌雄にかかわらず 0-6 本の四価染色体と多数の二価染色体が見られた。四価染色体数は個体間のみならず個体内の細胞間で異なった。また、精巣では染色体倍加による高次倍数体細胞の出現と分裂異常による異数体細胞の出現が見られた。FISH 法により識別しうる最大 M 染色体は四倍体では、2 つの二価染色体に観察され、この染色体が四価染色体を構成する例はみられなかった。以上の結果から、中国産四倍体ドジョウは同質四倍体を起源とするが、目下、再二倍体化の過程にあると考えられた。

以上の細胞遺伝学的研究結果は、中国産四倍体ドジョウは同質四倍体起源であるが、目下、二倍体化していることを示唆した。そこで、これら四倍体のゲノム構成を実験遺伝学的手法、すなわち、人為雌性発生により確かめた。その結果、二倍体の卵から人為雌性発生誘起により生じた仔魚は半数体症候群による異常で致死性であったのに対し、四倍体の卵から生じた雌性発生仔魚は形態が正常であり、7 日をこえて生残した。染色体観察から前者は $n=25$ の半数性、後者は $2n=50$ の二倍体であることが判明した。従って、中国産四倍体ドジョウは 2 セットの染色体セット (ゲノム) を持つ配偶子を産生することが判明した。以上の結果から、中国産自然四倍体では、二倍体化は未だ完了しておらず、4 セットのゲノムを持つ遺伝的四倍体と推定した。

最後に、中国産の二倍体と倍数体が実際にどのような配偶子を形成するか、実験的に確認した。四倍体の精子活性、運動持続時間は二倍体の精子と変わらなかった。しかし、頭部サイズは四倍体の精子で有意に大きかった。三倍体の平均卵径は二倍体と変わらなかったが、四倍体の平均卵径は二倍体、三倍体より大きかった。四倍体および二倍体同士の交配群からは各々四倍体、二倍体の胚が、二倍体と四倍体間の交配からは三倍体の胚が高い孵化率で生じた。以上の結果は、四倍体、二倍体は各々二倍体、半数体の配偶子を産することを示す。二倍体雌と三倍体雄の間の交配から生じた胚は異数体であり、胚の形態は異常で孵化率は著しく悪かった。これに対し三倍体雌と二倍体雌の間の交配群からは、二倍体の子孫が、三倍体雌と四倍体雌の間の交配群からは三倍体子孫が生じた。従って、三倍体雄は異数体精子を産むが、三倍体雌は半数体卵を形成することが判明した。

以上の研究成果から、中国の四倍体ドジョウは同質四倍体化により生じたが、目下、再二倍体化の途上であり、未だ 4 セットのゲノム (染色体セット) をもつ遺伝的四倍体と考えられた。従って、これらは、倍数体育種に利用可能な二倍体配偶子の給源となる有用な遺伝資源 (育種素材) と考えられた。

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 都 木 靖 彰

学 位 論 文 題 名

中国産倍数体ドジョウの遺伝学的研究

ドジョウ(*Misgurnus anguillicaudatus*)は中国大陸、朝鮮半島、日本列島、台湾などに広く分布するコイ目ドジョウ科ドジョウ属の淡水魚である。日本の野生集団では両性生殖により繁殖する正常二倍体($2n=50$)のほか、雌性発生により繁殖するクローン二倍体とこれらに由来する自然三倍体($3n=75$)が一部地域で出現する。しかし、四倍体($4n=100$)は市場より得た標本以外には見られない。中国においては二倍体の他、四倍体ドジョウが生息するが、これらが、ゲノム(染色体セット)を4組もつ四倍体($4n=100$)であるか、あるいは既に二倍体化($2n=100$)したのかは不明である。また、これら四倍体がゲノム全体の重複による同質四倍体化により生じたのか、あるいは交雑と倍加、すなわち、異質四倍体化により生じたのかも不明である。本研究では、中国産の倍数体ドジョウに着目し、これらの特性とその起源を明らかにするため、一連の遺伝学的研究を行い、以下の評価すべき成果を得た。

1) 染色体標本観察と DNA 量フローサイトメトリーによる倍数性判定の結果に基づき、赤血球核サイズ測定による倍数体識別法を確立した。そして、この方法を用いて中国各地より得たドジョウ標本の倍数性を判定した。その結果、特に長江流域では四倍体と三倍体が二倍体と同所的に生息すること、長江から地理的に離れた天津市、杭州、呼和浩特で、低頻度で三倍体が出現すること、上記以外の地点では二倍体のみが生息することが明らかになった。

(2) 中国大陸 31 地点より得た 554 個体について mtDNA の調節領域の RFLP 分析と塩基配列分析を行った。その結果、日本に見られない 2 種類の新規 RFLPs が認められた。中国産ドジョウには遺伝的に分化するグループが見られ、中国中央部の三倍体と四倍体は二倍体と同一のハプロタイプを共有する場合と非常に類似する場合のみならず、著しく異なる場合が見られた。日本産クローン二倍体は中国の倍数体と遺伝的に大きく異なった。日本の市場から得た四倍体と中国に生息する自然四倍体は近縁であることが判明した。

(3) 細胞遺伝学的に二倍体と倍数体を比較した。その結果、二倍体の染色体数は $2n=50$ であり、核型は 5 対 10 本の中中部着系型 (M)、2 対 4 本の次中部着系型 (SM)、18 対 36 本の端部着系型 (T)染色体により構成されていた。NF は 64 であった。三倍体の染色体数は 75

であり、3本づつ5組15本のM型、2組6本のSM型、18組54本のT型染色体により核型は構成されており、基本数NFは96であった。四倍体の染色体数は100であり、4本づつ5組20本のM型、2組8本のSM型、18組72本のT型染色体により核型は構成されており、NFは128であった。二倍体ドジョウでは、最大のM染色体2本の短腕端部において、そして、四倍体でも最大のM染色体4本の短腕端部においてAg-NOR、CMA3濃染部位、DAPI淡染部位、rDNAに対するFISHシグナルが検出できた。四倍体では、分染部位、FISHシグナルに染色体間で濃淡が見られた。以上の結果から、四倍体は二倍体の倍加より生じる核型を有するが、一部の染色体で倍加後の構造変化が生じていることが示唆された。

(4) 卵母細胞の卵核胞と精母細胞の核における減数分裂像を観察した結果、四倍体では雌雄にかかわらず0-6本の四価染色体と多数の二価染色体が見られた。四価染色体数は個体間のみならず個体内の細胞間で異なった。また、精巣では染色体倍加による高次倍数体細胞の出現と分裂異常による異数体細胞の出現が見られた。FISH法により識別する最大M染色体は四倍体では、2つの二価染色体として観察された。以上の結果から、中国産四倍体ドジョウは同質四倍体を起源とするが、目下、再二倍体化の過程にあることが示唆された。

(5) 四倍体のゲノム構成を人為雌性発生により実験遺伝学的に確かめた。その結果、二倍体の卵から人為雌性発生誘起により生じた仔魚($n=25$)は致死的であったのに対し、四倍体の卵から生じた雌性発生仔魚($2n=50$)は生存性であった。以上の結果から、中国産自然四倍体は、現在も4セットのゲノムを持つ遺伝的四倍体であることが示された。

(6) 中国産の二倍体と倍数体が実際にどのような配偶子を形成するか、実験的に確認した。その結果、四倍体は妊性を持つ大型の精子、卵を産することが判明した。四倍体および二倍体同士の交配群からは各々四倍体、二倍体の胚が、二倍体と四倍体間の交配からは三倍体の胚が高い孵化率で生じた。以上の結果から、四倍体は二倍体の配偶子を産することが判明した。二倍体と三倍体の間の交配から生じた子孫の発生成績と染色体から、三倍体雄は異数体精子を産むこと、三倍体雌は半数体卵を産むことが明らかになった。

申請者による以上の研究成果は、中国の四倍体ドジョウは同質四倍体化により生じたが、目下、再二倍体化の途上にあり、未だ4セットのゲノム(染色体セット)をもつ遺伝的四倍体であること、そして、これらは倍数体育種の育種素材として利用可能であることを示し、基礎生物学および水産育種学上重要な成果と考えられた。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、