

受賞者総説

魚類の染色体変異に関する遺伝育種学的研究

(平成 14 年度日本水産学会賞進歩賞受賞)

荒井 克俊*

(北海道大学大学院水産科学研究科)

Genetics and breeding science on chromosome variation in fish

KATSUTOSHI ARAI*

Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido, 041-8611 Japan

魚類には倍数体, 異数体, モザイク等の染色体変異が見られる。この様な変異の一部は, 染色体操作, 交雑により人為的にも誘起が可能なことから, 育種素材として重視され, 不妊集団, 単性集団, 近交集団等の作出に利用されてきた。これらの変異は自然集団にも生じ, 種形成, 非還元配偶子形成, 単性生殖等と密接に関連することから, 基礎生物学的にも興味深い。しかしながら, 染色体変異の出現実態と創出のメカニズム, ならびに, これらの生残, 成長, 成熟等に与える影響については不明な点が多い。筆者は, これらの問題について, 交配実験と染色体操作に, 発生・細胞・分子遺伝学的手法を加え, 基礎的知見を明らかにするとともに, 染色体変異を育種に利用する道を探ってきた。ここでは, それらの研究成果の概要を紹介する。

1. 交雑と染色体操作による変異誘起—サケ・マス類での研究を中心に

異種間雑種の遺伝的構成: サケ・マス類では, 有用形質のヘテロシス(雑種強勢)を期待した交雑育種を目的として, 交雑の組合せと雑種の生存能力, 雑種第一代および後代の生殖能力, 計量・計数形質の解析等が精力的に研究されてきた。しかし, 本研究を開始した 1970 年代には, 異種間交配より生じる個体が, 両親種由来のゲノムをもつ真の雑種か否かについて, 詳しい遺伝学的検討は成されていなかった。¹⁾ そこで, 筆者は当時発達してきたアイソザイム分析技法に注目し, これらを遺伝的マーカーとして, この問題を検討した。まず, サクラマス—カラフトマス間, サクラマス—マスノスケ間, サクラマス—イワナ間等で正逆交雑を行い, これらの発生過程の観察から, これらの組合せに由来する胚が正常な形

態をもち, 生存性の稚魚として孵化することを確認した。²⁾ そして, 経時的に採取・凍結した胚について, デンブゲル電気泳動法により, 乳酸脱水素酵素, リンゴ酸脱水素酵素等複数のアイソザイムを分析した。材料とした種では, これらの酵素を支配する遺伝子座において, 種間で対立遺伝子の違いがあったため, 雑種において母系, 父系の遺伝形質を容易に区別することができた。²⁾ その結果, 生存性の孵化稚魚が生じる組合せでは, 受精から胚体形成にいたる発生初期において, 常に母系種のアイソザイム成分のみが見られ, 父系種由来対立遺伝子の産物を含む雑種成分は胚体形成から尾芽胚期前後までに出現することが観察された。²⁾ このことは, 初期発生は卵細胞質に依存して進行するが, 一定のステージから両親由来の対立遺伝子の発現が生じ, 雑種の表現型となることを示す。以上の結果から, 生存性の交雑では両親種に由来するゲノムを受け入れており, 真の意味での雑種になっていることが判明した。

ところが, 発生の途中で異常を呈し, 正常発眼胚や孵化稚魚が全く得られない致死性の交雑に由来する胚では, この様な結果は得られなかった。例えば, サクラマス雌×サケ雄のアイソザイム遺伝子座を見ると, 尾芽胚期以降も母系成分のみが見られ, 雑種成分の発現はまったく認められないか, 著しく遅れることが観察された。²⁾ このことは致死性の雑種においては, 一部の遺伝情報が欠失しているか, 発現抑制が起こっていることを示唆する。

そこで, 生存性および致死性の雑種について, 細胞遺伝学的に雑種性を検討した。その結果, イワナ雌×カラマス雄, サクラマス雌×マスノスケ雄等の生存性雑種は, いずれも母系種と父系種のゲノム(染色体セット)

* Tel : 81-138-40-5535. Fax : 81-138-40-5537. Email : araikt@fish.hokudai.ac.jp

を1セットずつ受け入れ、両親種の中間の染色体構成を示すことが認められた。²⁾ すなわち、生存性雑種では、雌雄両前核の融合と胚の体細胞有糸分裂過程は正常に進行し、異常は無いものと判断された。ところが、胚発生過程で異常を示し、孵化以前に死亡する致死性雑種の染色体構成は、生存性雑種の場合と大きく異なった。サケ雌×イワナ雄は致死的な異常胚となり、孵化稚魚は全く得られないが、生存性雑種と同様に、両親種の中間の染色体構成をもつ。²⁾ 一方、イワナ雌×サケ雄、カワマス雌×サケ雄は、いずれも理論値よりも低い染色体数の分布を示す異数体であった。²⁾ 同じ交雑組合せであっても、交雑の方向（正逆）により、結果が異なることから、異数体の出現は、受精後の卵割、発生過程において、核と細胞質の不和合により父系種の染色体が細胞分裂に取り残され、核外に排除されたためと推測された。²⁾ 以上の結果から、サケ・マス類の雑種が致死性となる原因として、染色体の削減による構造的な異数体化と遺伝子発現に問題のある機能的な異数体化の二通りが考えられた。本研究の実施当時、魚類の染色体を識別する分染技術は極めて未熟だったため、これ以上、内容を深化させることはできなかったが、最近、Fujiwara *et al.*³⁾は fluorescence *in situ* hybridization, whole chromosome painting 等の分子細胞遺伝学的手法を用いて、サケ・マス類致死雑種における父系染色体の削減を見事に証明しており、本領域のさらなる発展が期待される。

異質三倍体による生存性の回復：1980年代前半において種々の染色体操作技術が開発されたことから、染色体倍数化の交雑に及ぼす影響を検討することが可能になった。¹⁾ 異種精子の媒精直後、圧力あるいは高温処理等により第二極体放出（第二減数分裂）の阻止を行い、極体を卵内に封じ込めることができれば、母系ゲノム2セット（卵核+第二極体核）と父系ゲノム1セット（精子核）をもつ異質三倍体を誘起することができる。¹⁾ 両親種の中間の染色体構成（ $2n=79$ ）となる致死雑種サケ（ $2n=74$ ）雌×イワナ（ $2n=84$ ）雄では異質三倍体（ $3n=116$ ）とすることにより、正常な形態をもつ孵化稚魚が得られた。²⁾ これらの異質三倍体は複数のアイソザイムにおいて、ゲノムの量比に従った発現を示した。²⁾ 同様の異質三倍体化による生存能力の劇的向上は、サケ雌×カワマス（ $2n=84$ ）雄の組合せについても認められた。⁴⁾ これに対して、染色体異常の生じるイワナ雌×サケ雄では、生存性の異質三倍体雑種は全く得られなかった。²⁾ 以上の結果は、異数体化の生じない交雑組合せであれば、母系：父系ゲノムの比を1：1から2：1に変えることにより、発生を異常から正常に回復しうることを示し、交雑可能な組合せを拡大しうる点で注目に値する。しかしながら、生存性回復機構の詳細は現在に至るまで不明であり、今後の検討が待たれる。

倍数体モザイク：異質倍数体化、高次倍数体化の影響を検討する上で、二倍体配偶子を形成する同質四倍体は重要である。もし、各魚種において四倍体系統が作出できれば、異なる種のゲノムを2セットずつもつ複二倍体や、様々なセット数で異種ゲノムをもつ異質倍数体を誘起しうる。¹⁾ 複二倍体は、各原種より由来する相同染色体が対合し、妊性が期待できることから、人工的な合成種作成の素材となる。¹⁾ しかし、卵割を阻止して四倍体をつくるのが極めて困難なため、このことが障害となりその研究は進んでいない。ところが、最近、卵割阻止処理に伴い出現する二倍体—四倍体モザイクが二倍体の配偶子を形成し、倍数体子孫を残しうることを明らかにできた。⁵⁾ 従って、四倍体細胞を含むモザイク個体を最大限利用することにより、同質ならびに異質四倍体系統の作出が可能と考えられた。

このような倍数体モザイク個体は、何の操作も加えていない養殖集団のサケマス類にも見られる⁶⁾。血液、肝臓、脾臓が半数体細胞で、脳が二倍体細胞で構成される半数体-二倍体イワナが成魚のサイズまで生育している例があった。⁷⁾ これらの事実は、モザイク現象が種苗生産の過程で比較的高頻度で起きていることを示唆し、今後、このような現象を遺伝学的発生学的に解明する必要があることを示している。

2. 自然倍数体の起源—ドジョウをモデルとした実験的研究

ドジョウは本邦の多くの地域において二倍体（ $2n=50$ ）であるが、一部地域では比較的高い頻度で自然三倍体（ $3n=75$ ）が出現する。⁶⁾ また、市販のドジョウのなかには由来不明の四倍体（ $4n=100$ ）がしばしば認められる。⁶⁾ これらはいずれも天然の染色体変異であり、倍数体や特殊な生殖形質に関する遺伝子資源と考えられることから、自然倍数体の起源、特性等についてドジョウをモデルとした実験的研究を行った。

自然四倍体とその子孫：作出が困難な人為四倍体の代わりに、偶然見出した自然四倍体を使うことにより、倍数体の特性に関する種々の研究をパイロット的に行おうとした。それには、自然四倍体がゲノムを4セットもつ真の四倍体であることを証明することが重要と考え、人為雌性発生・雄性発生の誘起を行った。脊椎動物では、半数体は致死である。従って、もし見出された四倍体が、進化の過程で既に二倍体（ $2n=100$ ）化したものであれば、その配偶子から雌性発生あるいは雄性発生した胚は半数体（ $1n=50$ ）となり生存できないはずである。しかし、四倍体ドジョウから得た卵を人為的に雌性発生させても、精子のみで雄性発生させても、生存性の二倍体子孫（ $2n=50$ ）が生じた。^{8,9)} 従って、自然四倍体ドジョウは4セットのゲノムをもつ遺伝的な四倍体

($4n=100$)であり、2セットのゲノムをもつ二倍体配偶子を作ると結論できる。

二倍体と自然四倍体を交配して三倍体 ($3n=75$) を作出し、その生殖機能を調べたところ、三倍体雄は不妊であったが、雌は大型 (卵径約 1.4 mm) の $3n$ 卵と小型 (卵径約 1.1 mm) の $1n$ 卵を同時に産んだ。¹⁰⁾ 従って、一般に雌で不妊、雄で異数性精子が形成される人為三倍体の結果とは大きく異なった。大型卵については、三倍体雌が三倍体の卵を産むことになるので、正常な減数分裂が行われていない可能性がある。そこで、大型の $3n$ 卵を紫外線照射精子で受精して雌性発生三倍体を誘起し、DNA フィンガープリント分析を行ったところ、子孫は母親と全くあるいはほとんど遺伝的に同一であった。¹¹⁾ 従って、三倍体ドジョウは減数分裂によらず (非還元的) に、母親と基本的には同じ遺伝的構成の卵を形成していることになる。

それでは、半数体の卵はどの様にできるのだろうか。複数のアイソザイムを遺伝マーカーとして検討してみたところ、二倍体は *aa*、四倍体は *bbbb* の遺伝子型で示された。¹²⁾ 従って、三倍体は *abb* となる。そこで、この三倍体 (*abb*) に二倍体 (*aa*) を交配した。もし、3本の染色体が機会的に $1n$ 卵に分配されれば、二倍体子孫には *aa* と *ab* が $1:2$ で生じるはずである。しかし、子孫の多くは *ab* 型であった。¹²⁾ このことは、三倍体の三本の染色体のうち、四倍体由来の染色体 (*b*) 同士で対合がおこり、これらが選択的に卵に伝達されたことを示唆する。¹²⁾ すなわち、二倍体由来の染色体が排除されている可能性がある。種間雑種において、父系のゲノムを排除し、母系ゲノムのみで卵形成を行う生殖が「雑種発生 (hybridogenesis)」として知られている。三倍体ドジョウにおける $1n$ 卵の形成はこの様式に似ているようである。¹²⁾ しかし、現在のところ、三倍体のすべての染色体でこの様なことが起こっているという証拠は得られていない。

以上の推論は細胞学的にも支持された。¹³⁾ 三倍体の卵巣において染色体を観察すると、三倍体細胞の他に、六倍体細胞 ($6n=150$) が多く見られた。¹³⁾ また、二価染色体を 75 近く計数できる細胞が見られた。¹³⁾ これらの観察は、減数分裂以前に卵原細胞の一部が染色体の倍化を起こして偶数の六倍体となった後、元々同じ姉妹染色体の間で対合し、さらに擬似的に二回の減数分裂を起こすことにより遺伝的に同一な三倍体卵を形成した可能性を示唆する。この様な「減数分裂前核内分裂 (premeiotic endomitosis)」機構の関与による非還元卵形成は、*in vitro* で最終成熟を誘起した時、卵母細胞が第一極体を放出したことから確認された。¹³⁾ また、一部の卵母細胞において、約 25 の二価染色体と同数の一価染色体の存在を示唆する像と、第一極体放出の過程で一部染色

体を取り残される像が見られたことから、半数体卵の形成は、三倍体の 3 セットの染色体のうち、2 セットのみで減数分裂が進行する「雑種発生」に似た機構により生じることが推定された。¹³⁾

自然四倍体は二倍体の卵と精子を作り、二倍体と四倍体の交配に由来する三倍体は三倍体卵を作ることが判明した。これらの配偶子を用いると様々な倍数体を誘起しうる。⁶⁾ 例えば、四倍体同士の交配の後、第二極体の放出を阻止することにより六倍体が誘起できた。⁶⁾ これらの性比は $1:1$ であり、雌雄とも成熟した三倍性の配偶子を作る。⁶⁾ 従って、六倍体同士の交配により六倍体を、六倍体と四倍体あるいは二倍体との交配により、それぞれ五倍体、四倍体を作出できる。⁶⁾ これらは、いずれも高次倍数体の特性解明の素材として利用しうる。現在までに、これらを用いた生残、成長等の検討が進められている。

自然三倍体の出現機構：日本全国 57 地点の 3000 個体以上のドジョウについて DNA 量フローサイトメトリにより倍数性調査を行ったところ、ほとんどが二倍体であり、四倍体は全く見られなかった。しかし、自然三倍体の出現頻度が高い地点がいくつかあった。¹⁴⁾

まず、その一つである新潟県広神村に出現した三倍体について生殖能力を調査したところ、雄は不妊であったが、雌は半数体の小型卵と三倍体の大型卵の両方を産んだ。¹⁴⁾ このことは、正常精子との受精により、自然に四倍体が発現する可能性を示すが、当地において四倍体は見つかっていない。¹⁴⁾ DNA フィンガープリント分析を行ったところ、三倍体同士は互いに類似し、さらにその一部は二倍体と著しく似ていた。¹⁵⁾ そこで、二倍体から三倍体が受精により生じると考え、同所的に生息する二倍体の中に、非還元二倍体卵を作る個体がいなかうかを調査した。方法としては、人為雌性発生法を利用した。すなわち、二倍体が通常通り半数体卵を産んだ場合、紫外線照射精子で受精した雌性発生子孫は半数体症候群の発現により奇形となるが、非還元二倍体卵を産んだ場合、子孫は正常な二倍体となると考えた。実際に使用した雌 7 個体の雌性発生子孫はすべて奇形であったが、8 番目の雌からは正常仔魚と奇形仔魚が半々生じ、前者は二倍体、後者は半数体であった。¹⁴⁾ 念のため、8 番目の雌の卵に正常な精子を受精すると、三倍体と二倍体の子孫が得られた。¹⁴⁾ 以上の結果は、二倍体の中に二倍体卵を産む個体があり、この様な二倍体卵と半数体精子の受精により、自然三倍体が発現することを示す。

自然クローン二倍体：北海道北部の女満別町でも自然三倍体が比較的高い頻度で生じた。¹⁶⁾ 従って、この地域の二倍体にも非還元卵を産む個体がいるはずである。そこで、新潟の場合と同様に、雌から得た卵を紫外線照射精子で受精し、雌性発生を誘起する実験を繰り返した。

驚いたことに、用いた雌6個体中2個体が正常な雌性発生二倍体子孫を残した。¹⁶⁾ このことを確認するため半数体精子で受精後、子孫の倍数性を調べたところ、期待した三倍体は少なく、多数の二倍体が出現した。¹⁶⁾ このことは、二倍体の産む非還元卵の多くが精子のゲノムを取り込まず、卵のみで発生（雌性発生）している可能性を示す。そこで、このことを明らかにするためキンギョの精子を受精したところ、生き残った子孫は全てドジョウであった。¹⁶⁾

ドジョウでは、マイクロサテライトマーカーが相当数開発され、遺伝地図も部分的に作成されていることから、¹⁷⁾ これらのマーカーを用いて、二倍体非還元卵に由来する二倍体子孫を分析した結果、子孫のマーカー型は母親体細胞のそれと完全に一致した。¹⁶⁾ また、三倍体子孫は母親と同一のマーカー型に加えて、交配に用いた雄親魚のマーカーを有した。¹⁶⁾ さらに、DNAフィンガープリント分析でも、二倍体卵から生じた二倍体子孫は同胞間で同一の像を示し、三倍体子孫はその二倍体の断片にさらに精子由来の断片を含む像を示した。¹⁶⁾ 以上の結果は、北海道女満別町の二倍体の一部は、二倍体非還元卵を産み、そのほとんどは単性的に発生しクローン集団を作ること、また、一部は精子ゲノムを取り込むことにより三倍体となることを示す。

ドジョウ二倍体の中にクローン集団が存在することが実験的に確認された。この様なクローン二倍体集団の分布ならびに在来両性生殖二倍体集団との遺伝的關係の解明を通じた、クローンの起源に関する研究が次の課題である。

自然に生じる染色体変異（倍数体、雌性発生、クローン等）は染色体操作技術を駆使することで誘起しうる。しかしながら、人為的に作出した変異は、自然に生じる変異と創出の機構、特性また起源において著しく異なる。従って、自然の変異が出現する機構を明らかにすることができれば、従来の操作手法とは異なる原理に基づく育種技術の開発に資することができると考えている。

謝 辞

本研究にあたり、ご指導とご助言を賜った、北海道大学名誉教授濱田啓吉先生、同山崎文雄先生、北里大学名誉教授藤野和男先生、広島大学元教授鈴木亮先生、信州大学教授小野里坦先生、広島大学教授中川平介先生に謹んで感謝の意を表す。また、共同研究者としてご協力を賜った、多くの方々にお礼申し上げる。

文 献

- 1) 荒井克俊. 異質倍数体. 「水産増養殖と染色体操作」(鈴木亮編) 恒星社厚生閣, 東京, 1989; 82-94.
- 2) Arai K. Developmental genetic studies on salmonids. Morphogenesis, isozyme phenotypes and chromosomes in hybrid embryos. *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 1984; **31**: 1-94.
- 3) Fujiwara A, Abe S, Yamaha E, Yamazaki F, Yoshida MC. Uniparental chromosome elimination in the early embryogenesis of the inviable salmonid hybrids between masu salmon female and rainbow trout male. *Chromosoma* 1997; **106**: 44-52.
- 4) Arai K. Effect of allotriploidization on development of the hybrids between female chum salmon and male brook trout. *Nippon Suisan Gakkaishil* 1986; **52**: 823-829.
- 5) 山本 勝, 佐藤治平, 谷浦 興, 荒井克俊. 二倍体-四倍体モザイクアマガの子孫. 日水誌 1999; **65**: 1084-1089.
- 6) Arai K. Genetic improvement of aquatic finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture* 2001; **197**: 205-228.
- 7) Yamaki M, Kawakami K, Taniura K, Arai K. Live haploid-diploid mosaic char *Salvelinus leucomaenis*. *Fish. Sci.* 1999; **65**: 736-741.
- 8) Arai K, Matsubara K, Suzuki R. Production of polyploids and viable gynogens using spontaneously occurring tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture* 1993; **117**: 227-235.
- 9) Arai K, Ikeno M, Suzuki R. Production of androgenetic diploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* using spermatozoa of natural tetraploids. *Aquaculture* 1995; **137**: 131-138.
- 10) Matsubara K, Arai K, Suzuki R. Survival potential and chromosomes of progeny of triploid and pentaploid females in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture* 1995; **131**: 37-48.
- 11) Arai K, Mukaino M. Clonal nature of gynogenetically induced progeny of triploid (diploid x tetraploid) loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Pisces: Cobitidae). *J. Exp. Zool.* 1997; **278**: 412-421.
- 12) Arai K, Mukaino M. Electrophoretic analysis of the diploid progenies from triploid x diploid crosses in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Pisces: Cobitidae). *J. Exp. Zool.* 1998; **280**: 368-374.
- 13) Zhang Q, Arai K, Yamashita M. Cytogenetic mechanisms for triploid and haploid egg formation in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *J. Exp. Zool.* 1998; **281**: 608-619.
- 14) Zhang Q, Arai K. Distribution and reproductive capacity of natural triploid individuals and occurrence of unreduced eggs as a cause of polyploidization in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Ichthyol. Res.* 1999; **46**: 153-161.
- 15) 森島 輝, 工藤紀子, 荒井克俊. DNAフィンガープリント法によるドジョウ三倍体-二倍体間の遺伝的類似性. 水産育種 1999; **28**: 113-120.
- 16) Morihima K, Horie S, Yamaha E, Arai K. A cryptic clonal line of the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) evidenced by induced gynogenesis, interspecific hybridization, microsatellite genotyping and multilocus DNA fingerprinting. *Zool. Sci.* 2002; **19**: 565-575.
- 17) Morishima K, Nakayama I, Arai K. Microsatellite-centromere mapping in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Genetica* 2001; **111**: 59-69.