

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380100

研究課題名(和文) UV照射等の卵核遺伝的不活性化を用いない新規雄性発生誘起法の開発と応用

研究課題名(英文) Development and application of induced androgenesis without irradiation of eggs

研究代表者

荒井 克俊 (ARAI, KATSUTOSHI)

北海道大学・水産科学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00137902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：従来、精子核のみの雄性発生誘起には、紫外線UV照射等による卵核の遺伝的不活性化が不可欠であった。しかし、ドジョウでは授精直後卵の3で30分間の低温処理により、精子核のみによる雄性発生が生じた。四倍体の産する二倍体精子での授精直後の低温処理により生存性雄性発生二倍体の、半数体精子の授精直後の低温処理とその後35分経過後の42で2分間の高温処理により雄性発生倍加半数体作出が可能となった。ゼブラフィッシュでは授精直後卵の7で30分間の低温処理により雄性発生が生じ、その後の高温処理により倍加半数体が作出できた。その精子を用いて次世代で雄性発生倍加半数体を作ることによりクローン系統を樹立できた。

研究成果の概要(英文)：Genetic inactivation of egg nucleus by UV-irradiation is prerequisite to induce androgenesis (all-male inheritance). We found that cold-shock (3°C for 30 min) of loach eggs just after fertilization eliminated egg nucleus together with second polar body release and sperm nucleus (male pronucleus) initiated androgenesis. Cold-shock of eggs fertilized with diploid sperm of tetraploid loach produced viable androgenetic diploid progeny. Heat-shock (42°C for 2 min) 35 min after the cold-shock treatment successfully produced androgenetic doubled haploids with homozygous genotypes in all the loci. In zebrafish, cold-shock (7°C for 30 min) of eggs just after fertilization also induced androgenetic haploids. Subsequent heat-shock of androgenetic haploids at the first cleavage successfully induced doubled haploids, which produced genetically identical spermatozoa. Cloning was succeeded by the second round production of androgenetic doubled haploids.

研究分野：水族遺伝育種学

キーワード：倍加半数体 倍数体 配偶子 クローン 受精 染色体操作 ドジョウ ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

雄性発生とは、精子核のみによる発生であり、自然界では希である。魚類では、育種および生殖統御を目的とした人為雄性発生の誘起とその応用が 1960 年代より研究されてきた。雄性発生誘起とそれに続く人為二倍体化(卵割阻止)が可能となれば、凍結精子を用いた個体再生、XX-XY 型性決定をもつ魚種では超雄(YY)利用による全雄生産、形質のホモ接合化(倍加半数体)とそれによる次世代でのクローン系統確立、異種精子による核細胞質雑種誘起等が可能となる。以上の様に、染色体セット(ゲノム)の数と組み合わせを変更する染色体操作の中で、雄性発生は特に高いポテンシャルをもつ技術と考えられる(Komen and Thorgaard 2007)。

魚類で、人為雄性発生を誘起するには遺伝的に不活性化した卵に正常精子を授精する。すなわち、卵核の遺伝的不活性化が不可欠であり、魚卵へのエックス線あるいはガンマ線照射が広く使われてきた。これらの放射線照射には、防護・安全確保のため、特殊な施設と備品が必要であり、その利用は限られてきた。比較的小さい卵を持つドジョウ等の魚類では、市販の殺菌灯を線源とする紫外線照射を用いた卵核の遺伝的不活性化による雄性発生誘起が成功したが(Fujimoto et al. 2007)、サケ・マス類やチョウザメ類の大きい卵では透過力の弱い紫外線による卵核不活性化は未だに困難である。また、いずれの照射方法においても、卵細胞質の損傷が生じることは避けえない(Komen and Thorgaard 2007)。

研究代表者らは、授精直後の卵を低温に曝すことにより、雄性発生が起こることを発見した(Morishima et al. 2011)。すなわち、ドジョウの授精直後卵を 0~3 の水温に 60 分曝すことにより、精子核のみの発生(雄性発生)が生じ、半数体胚が多数見られ、遺伝マーカーによる分析の結果、これらは父親由来ゲノムのみを有することが判明した。さらに、組織学的手法により、低温処理前後の受精卵を観察したところ、卵核が第二極体とともに卵外に放出され、卵内に残った精子核のみが雄性前核となり、発生が生じることが分かった。

以上の先行研究は、少なくともドジョウにおいては紫外線照射等による卵核の遺伝的不活性化によらず、雄性発生を誘起しうることを示しており、本手法を用いることにより照射に起因する卵細胞質の損傷を避けることができる。しかしながら、本研究計画を提案した当時は、低温雄性発生の条件は完全に適正化されてはならず、また、従来の紫外線照射法と同様に、染色体倍加の方法と組み合わせることにより雄性発生二倍体(倍加半数体)を誘起しうるか否かは不明であった。さらに、本手法がドジョウ以外の魚種についても広く使えるか否かは全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究課題は紫外線照射等による卵核の不活性化を用いた従来の人為雄性発生誘起法に代わる方法として、授精直後卵の低温処理による方法を検討し、魚種ごとの好適処理条件の決定と誘起機構の解明を行うとともに、多くの魚種において利用できる技術とすること、また、染色体倍加の方法と組み合わせることにより、従来の方法と同様に、生存性の雄性発生二倍体および完全ホモ接合の雄性発生倍加二倍体の作出が可能であることを示すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 材料: 北海道大学大学院水産科学研究院先端環境制御実験棟(函館キャンパス)において飼育中のドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* 野生型系統(北海道岩見沢市原産)、アルピノあるいはオレンジ系統(劣性形質)、キンギョ *Carassius auratus* 和金系統、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* 野生型系統、ゴールドデン系統(劣性形質)を用いた。可視的な劣性形質をもつ系統を父親として使うことにより、色彩マーカー発現による雄性発生の成否判定を容易にした。

二倍体精子の給源としてネオ四倍体および自然四倍体を用いた。前者は、市場標本に見られた自然四倍体雄の二倍体精子により、野生型二倍体の卵を授精した後に、温度処理により第二極体放出阻止を行い作成した四倍体個体であり、雄は二倍体精子を産することが判明している。後者は中国湖北省武漢近辺に由来する自然四倍体で、遼寧省大連市の大連海洋大学に運び込み、現地での実験に供した。これらの雄も二倍体精子を産することが判明している。

(2) 採卵・採精: ドジョウについては、ヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン hCG を体重 g 当たり 20 国際単位注射し、約 27 の水温に 10-12 時間静置することにより人為排卵と排卵を誘発した。採卵は腹部圧迫により行った。同様に、腹部圧迫により得た精液はヘマトクリット管で採取し、Kurokura 液で希釈した(Kurokura et al. 1984)。キンギョについても、ほぼ同様の方法で採卵・採精を行った。ゼブラフィッシュは 28.5 の水槽で 14 時間明期 10 時間暗期の条件で飼育し、実験前日に雌雄を同じ産卵水槽中に入れた(ただし、雄は金属製の籠に隔離)。実験当日に雌雄を同居させ、産卵行動の後、排卵を調べた。採卵と採精はドジョウの方法に従った。ゼブラフィッシュの精液は 10 μ L のピペットチップにとり、50 μ L の Hanks 液で希釈した。

(3) 紫外線(UV)照射: ドジョウにおける UV 照射は既報の Fujimoto et al. (2007) の条件に従った。すなわち、約 180 粒の卵をサクラマス精漿 2 ml に入れ、150 mJ/cm² の線量で照射した。

(4) 授精直後卵の低温処理: ドジョウでは授精直後卵(おおよそ 10 秒以内)に 3 \pm 0.5 の条件で 20~60 分間の低温処理を加え、好

適な処理持続時間を検討した。

ゼブラフィッシュにおいては、1、4、7、 10 ± 0.5 の条件で 30 分間低温処理を加え、好適処理水温を検討した。

キンギョでは 2~6 で 30 分間の低温処理を受精直後卵に加え、低温処理雄性発生の可能性を検討した。

(5) 高温処理による染色体倍加：ドジョウでは低温雄性発生処理後 25、30、35、40 分後(授精後 55、60、65、70 分後)に 42 ± 0.5 の条件で 2 分間の高温処理を与え、染色体倍加(倍加半数体作出)のための好適処理開始時期を検討した。

ゼブラフィッシュでは低温処理 (7 ± 0.5 、30 分間)の後、 28.5 ± 0.5 で 13 分間維持し、その後、Corley-Smith et al.(1996)の報告した 41.4 ± 0.5 の条件で 2 分間の高温処理を与え、染色体倍加を試みた。

(6) 発生成績：使用した全卵あたりの卵割卵数を受精卵とした。孵化率は全卵あたりの孵化胚数から算出した。正常率は全卵あたりの正常形態を持つ孵化胚数から算出した。雄性発生半数体誘起率は劣性色彩形質の発現と半数性から判定した。雄性発生二倍体あるいは倍加半数体誘起率は使用全卵数あたりの正常雄性発生胚(正常かつ劣性色彩形質発現胚)数から算出した。

(7) 倍数性判定等：Fujimoto et al.(2007)に従って、フローサイトメトリー法により、倍数性を判定した。ゼブラフィッシュを用いた実験では、エアドライ法により胚から染色体標本作製し、顕微鏡観察に供した。

(8) マイクロサテライト DNA 分析：ドジョウにおいては、二倍体精子を用いた実験では 5 座、倍加半数体作出の実験では、27 の連鎖群をカバーする 28 座についてマイクロサテライト DNA マーカー分析を実施した。ゼブラフィッシュにおいて 25 連鎖群をカバーする 30 座についてマイクロサテライト DNA マーカー分析を実施した。

(9) クローン誘起と遺伝的同一性の確認：ゼブラフィッシュにおいては、倍加半数体より得た精子を用いて、再度、低温処理雄性発生と高温処理による倍加半数体誘起を行い、クローン系統を作出し、遺伝的同一性について 64 プライマーセットを用いた AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法により分析した。

(10) 低温雄性発生機構の分析：ゼブラフィッシュにおいては、低温処理直前および直後の受精卵をブアン固定後、パラフィンに包埋し、切片を作製して組織学的観察に供した。

4. 研究成果

(1) 二倍体精子を用いたドジョウ低温雄性発生二倍体の作出：野生型二倍体ドジョウの卵にネオ四倍体の産する二倍体精子を授精直後、低温処理 (3 ± 0.5) を 30 分間施した。その結果、低温処理をしなかった対照群では約 60%の率で生じた正常胚のすべては三

倍体であったが、低温処理群では 20%の率で正常胚が生じ、その 46% (51/110) は二倍体であったことから、これらは生存性の雄性発生二倍体と推定された。低温処理群ではこれらのほか、三倍体 (33%; 36/110)、四倍体 (17%; 19/110)、その他モザイク・異数体等 (4%; 4/110) も出現した。同時に作出した UV 照射卵に二倍体精子をかけた実験群 (UV 処理群) では、18%の率で正常胚が生じ、これらは二倍体であった。独立した 5 マイクロサテライト DNA マーカー座における分析の結果、低温処理群に生じた二倍体は父系由来のマーカーのみをもつことから、雄性発生二倍体であることが示された。使用全卵に対する正常な雄性発生二倍体誘起率は低温処理群 12.3%、UV 処理群 22.3%であった。

中国湖北省産の自然四倍体ドジョウについても低温雄性発生誘起の実験を行った。すなわち、遼寧省大連産の野生型二倍体の産む卵に四倍体のつくる二倍体精子を授精直後、3、30 分間の低温処理を施したところ、約 40%の率(対照は 52%)で孵化胚が生じ、それらのうち約 38%(対照は 83%)が孵化後 7 日まで生残した。対照が三倍体であったのに対し、低温処理より生じた子孫は二倍体であったので、これらは雄性発生により生じたと考えられた。マイクロサテライト DNA マーカー 2 座を用いた分析では、二倍体個体には母系アレルは生じていなかった。

以上の結果は、二倍体精子の授精直後卵に低温処理を加えることにより、生存性の雄性発生二倍体ドジョウを作出しうることを示した。

(2) 低温処理雄性発生群の高温処理によるドジョウ倍加半数体作出：授精直後に 3 ± 0.5 、20~60 分間の低温処理を与えた群間で、劣性形質の発現と半数性から判定した雄性発生半数体誘起率を調べた。その結果、30 分間処理群で約 32%と他の群より有意に高かった。そこで、好適処理持続時間を 30 分間とした。

次に、処理卵を 20 ± 0.5 で維持し、処理後 25~40 分(授精後 55~70 分)後に 42 ± 0.5 の高温処理を施し、卵割阻止による染色体倍加のための好適処理開始時期を劣性形質と正常形態をもつ子孫の出現率(倍加半数体誘起率)から調べた。その結果、処理後 35 分(授精後 65 分)が最適処理開始時間と判明した。以上の最適条件で得られた倍加半数体誘起率は約 10%で、他の実験群よりも有意に高かった。

マイクロサテライト DNA マーカー 28 座の分析の結果、上記の倍加半数体はいずれも、父親由来のアレルのみをもち、ヘテロ接合体は全く出現せず、完全ホモ接合体であった。

(3) ゼブラフィッシュにおける低温雄性発生処理条件：1~10 の低温で授精直後卵を 30 分間処理した場合、24 時間後の生存率と半数体誘起率から雄性発生半数体誘起率を見ると、7 が最も高かった。次に 20~60

分の間で好適な処理持続時間を検討したところ、実験群間に有意な差は見られなかった。そこで、ゼブラフィッシュの雄性発生には、授精直後卵に対して 7 ± 0.5 で、30 分間の低温処理を行うこととした。

授精直後卵に低温処理を行った後に、時間経過を追って固定した処理卵について、組織切片を作製し、卵核の動態を細胞学的組織学的に観察したところ、好適処理条件により卵核と第二極体の両者が卵外に放出された場合に雄性発生半数体が出現することが明らかになった。また、不適切な処理により、中途半端な放出が生じた場合は異数体が、第二極体放出が完全に阻止された場合は三倍体が生じることが明らかになった。以上の観察より、低温雄性発生が起こる細胞学的なメカニズムはドジョウ (Morishima et al. 2011) とゼブラフィッシュで共通であることが判明し、同様の機構が他の魚種においても雄性発生を起こす可能性を示唆された。

(4) 低温雄性発生群の高温処理によるゼブラフィッシュ倍加半数体およびクローン系統の作出：授精直後卵を 7 ± 0.5 で、30 分間低温処理をして雄性発生を誘起後、 28.5 ± 0.5 で13分間維持し、その後、Corley-Smith et al (1996)の条件により 41.4 ± 0.5 , 2分間の高温処理を加え、卵割処理による染色体倍加を行った結果、約1%の率で正常形態を示し、劣性形質を示し、かつ二倍体の倍加半数体誘起に成功した。25連鎖群をカバーする30座のマイクロサテライトDNAマーカーの分析の結果、全座において父系由来アレルについてホモ接合体であることから、遺伝学的にこれらが倍加半数体であることが確認できた。生じた倍加半数体19個体はすべて雄で雌は全く生じなかったことから、ゼブラフィッシュにおけるZW-ZZ型性決定システムの基本的関与が示唆された。

作出した雄性発生倍加半数体を成魚まで飼育育成し、成熟した1個体より精子を得て、野生型ゼブラフィッシュ雌の卵を授精直後、 7 ± 0.5 で、30分間低温処理をして雄性発生を誘起し、第二世代を作出した。倍加半数体は遺伝的に均一な精子を形成するはずであるので、その精子による雄性発生子孫はクローン系統になるはずである。そこで、AFLP法で分析したところ、通常授精から生じた子孫は変異のあるDNAフィンガープリント・パターンを示したのに対して、クローン世代のDNAフィンガープリント・パターンは調べた7個体間でまったく同一であった。以上の分析より、倍加半数体精子を用いた雄性発生倍加半数体第二世代は遺伝的に同一なクローンであることが判明した。一連の検討から、モデル実験魚ゼブラフィッシュにおいて、低温雄性発生胚から完全ホモ接合の倍加半数体を誘導し、その配偶子を用いた次世代の雄性発生倍加半数体誘起によるクローン作製までの技術が確立した。

(5) キンギョにおける低温雄性発生の可能

性：キンギョ授精直後(5秒以内)卵について、低温処理(2~6 : 30分間)を試みた。使用した卵の卵質不良のため、生残についての正確なデータを得ることができなかったが、発生胚について倍数性を検討した。その結果、2処理群では半数体が73%(44/60)、二倍体が5%(3/60)、三倍体が20%(12/60)、不明が25%(1/60)生じた。4処理群では半数体が74%(28/38)、二倍体が24%(9/38)、三倍体が2%(1/38)生じた。6処理群では半数体が18%(8/45)、二倍体が67%(30/45)、三倍体が13%(6/45)、モザイクが2%(1/45)生じた。対照では、二倍体84%(27/32)の外に三倍体が16%(5/32)生じたことから、使用したキンギョが偶々、第二極体放出阻止を自然に起こす傾向があることが判明したが、2~4の低温処理で約3/4が半数体となった。これらの父系マーカーによる雄性発生誘起の確認には到らなかったが、キンギョにおいても授精直後卵の低温処理による雄性発生の可能性が強く示唆された。以上のことから、低温雄性発生はドジョウのみならず、キンギョ、ゼブラフィッシュにおいて有効な誘起技術と判断され、多くの魚種での汎用性が示唆された。

<引用文献> 引用順に記載

H Komen and G H Thorgaard: Androgenesis, gynogenesis and the production of clons in fishes. A review. *Aquaculture*, Vol. 207, page 150-173, 2007.

T Fujimoto, S Sakao, E Yamaha and K Arai: Evaluation of different doses of UV irradiation to loach eggs for genetic inactivation of the maternal genome. *J. Exp. Zool.* Vol.307A, page 449-462, 2007.

K Morishima, T Fujimoto, M Sato, A Kawae, Y Zhao, E Yamaha, and K Arai: Cold-shock eliminates female nucleus in fertilized eggs to induce androgenesis in the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*), a teleost fish. *BMC Biotechnology*, Vol. 11, page 116, 2011.

H Kurokura, R Hirano, M Tomita, and M Iwahashi: Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture*, Vol.37, page 267-273, 1984.

G E Corley-Smith, C J Lin, and B P Brandhorst: Production of androgenetic zebrafish (*Danio rerio*). *Genetics* Vol. 142, page 1265-1276, 1996.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Jilun Hou, Taiju Saito, Takafumi Fujimoto, Etsuro Yamaha, Katsutoshi Arai: Androgenetic doubled haploids induced without irradiation of eggs in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*).

Aquaculture, Vol. 420-421, page S57-S63, 2014.

DOI:10.1016/j.aquaculture.2013.05.021

査読有

Jilun Hou, Takafumi Fujimoto, Etsuro Yamaha, Katsutoshi Arai: Production of androgenetic diploid loach by cold-shock of eggs fertilized with diploid sperm. *Theriogenology*, Vol.80, page 125-130, 2013. DOI:10.1016/j.theriogenology.2013.03.014
査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

李 雅娟・高 養春・周 賀・姜 志強・王 玉生・斉 紅蕊・李 嘉奇・馬 海艶・荒井克俊：自然四倍体ドジョウの2n精子を用いた低温処理による雄性発生二倍体誘起。日本水産増殖学会第13回大会 広島大学大学院生物圏科学研究科 広島県東広島市 2014(平成26)年10月18日

Katsutoshi Arai: Recent progress in studies on androgenesis of fishes. Diversification in Inland finfish Aquaculture II, 2013年9月24日 南ボヘミア大学水産および水系保護学部 Vodnany, Czech Republic.

Jilun Hou, Taiju Saito, Takafumi Fujimoto, Etsuro Yamaha, Katsutoshi Arai Androgenetic doubled haploids induced without irradiation of eggs in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). International Symposium on Genetics in Aquaculture XI, 2012年6月26日 Auburn University, Auburn, Alabama, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒井 克俊 (ARAI, Katsutoshi)

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授

研究者番号：00137902

(2) 研究分担者

山羽 悦郎 (YAMAHA, Etsuro)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授

研究者番号：60191376