

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14786

研究課題名(和文)雌/非還元型、雄/還元型の配偶子形成をする四倍体フナの減数分裂機構解明

研究課題名(英文)Studies on reduced 2n sperm and unreduced 4n egg formation in tetraploid crucian carp

研究代表者

荒井 克俊 (ARAI, Katsutoshi)

北海道大学・水産科学研究院・教授

研究者番号：00137902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ギンブナ四倍体(4n)には雌雄両性が生じる。雌は4n卵を産み、雌性発生により繁殖するが、雄は減数分裂により2n精子を産する。本研究は4nギンブナを材料に、減数分裂を「する(雄)」、「しない(雌)」が何により決められるかを明らかにしようとした。その結果、(1)4nには2n精子を産する雄の外に、異数性精子を産する雄もいること、(2)キンギョ雄との人工交配では、3n雌個体により、3nのみ、4nのみ、あるいは3nと4n両方の子孫が生じる場合があること、(3)材料とした群馬県城沼由来集団には大陸系ギンブナを多く含むことが判明した。4nのゲノム構成により、多様な生殖が生じる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although triploid (3n) silver crucian carp reproduces by gynogenesis as all-female clonal line, both female and male appear in tetraploid (4n). 4n females generate unreduced 4n eggs which reproduce by gynogenesis, while 4n males produce reduced 2n sperm. Here, the mechanism responsible for such a different meiotic manner between the two sexes is attempted to disclose and obtained results are as follows: (1) some males produced aneuploid sperm, (2) 3n progeny, 4n progeny, or both 3n and 4n progeny occurred in cross-fertilization between 3n female and diploid goldfish male, (3) Samples analyzed here included unusually high rates of Chinese silver crucian carp. Thus, irregular meiosis and gametogenesis in 4n crucian carp may relate to the genomic constitution of each 4n individual.

研究分野：水産遺伝育種学

キーワード：水産学 農林水産物 発生・分化 バイオテクノロジー 遺伝学 クローン 倍数体 減数分裂

## 1. 研究開始当初の背景

ギンブナ *Carassius langsdorfii* には、雄(精子核)の遺伝的関与なく雌性発生により繁殖する三倍体 3n がいる。3n 雌は第一減数分裂をスキップして、アポミキシス(無配偶生殖 apomixis)により 3n 非還元卵を作る(Yamashita *et al.*, 1993)。そして、3n 卵は二倍体ギンブナあるいは近縁種の精子を用いて雌性発生をすると考えられるので、子孫は遺伝的変異の無いクローンとなる。このようなギンブナ 3n の雌性発生は広く知られており、全国各地の 3n ギンブナのクローン集団解析も詳細に行われている(前田ら 2001)。ところが、ギンブナにはクローン生殖をする四倍体 4n も低頻度で見られる(間田ら 2001; 前田ら 2003)。4n ギンブナのゲノム構成、起源、分布に関する知見は断片的であり、非還元 4n 卵形成、雌性発生機構については、全く分かっていない。しかも、これら 4n には雄が生じ、4n 雄はゲノムの減数した 2n 精子を産生する(Dong *et al.*, 2013)。ギンブナ 4n の不思議は、雌が非還元 4n 卵を作るのに対して、雄はゲノムを減数した 2n 精子を作るところである。同じ 4n であるのに、雌では減数分裂に拠らず(非還元的に)、雄では減数分裂によって(還元的に)配偶子形成を行っている。

## 2. 研究の目的

### (1) ギンブナ集団の遺伝的構造

群馬県館林市の城沼に起源するギンブナ集団は比較的高い頻度で 4n が出現し、これら 4n の中に雌雄両性が見られることが予備的調査により判明していた。しかしながら、城沼ならびにここに由来する群馬県水産試験場(以下群馬水試)飼育集団における倍数体の出現頻度や、雌雄の性比、遺伝的なクローン構造は不明であった。そこで、まず材料となるギンブナ集団の遺伝的な構造を明らかにすることを目的とした。

### (2) 四倍体の出現機構

ギンブナ 4n では非還元 4n 卵が雌性発生することが報告されているが、3n とは異なり雌雄両性が出現する。従って、4n の起源は 3n 非還元卵の精子核取込にあることが予想される。この点を確認するために、3n 卵の授精実験と温度処理による精子核取込の促進を調べ、4n 出現機構を明らかにすることを目的とした。

### (3) 四倍体の非還元卵形成機構

ギンブナ 3n では 3 セットの染色体が存在するため異常な三極紡錘体が第一減数分裂に相当する時期に形成され、これが物理的に減数分裂の進行を妨げることにより、体細胞分裂による非還元 3n 卵形成が生じるとされている(Yamashita *et al.*, 1993)。それでは 4n は四極紡錘体を形成するのであるか? 現在のところ、4n 雌がどのような機構により 4n 卵を形成するのか不明である。そこで、4n 卵がどのように形成されるかを細胞学・組織

学・遺伝学的に明らかにすることを目的とした。

### (4) 四倍体の精子形成機構

4n 雄については、どのように二倍体精子が形成されるかについて、組織学的にも、細胞遺伝学的にも明らかにされていない。どのようなプロセスで 4n 生殖細胞から 2n 精子が作成されるかを明らかにするとともに、同じクローンに由来する 4n 雌雄間で減数分裂前に作動する遺伝子の発現の相違を明らかにすることを目的とした。

### (5) 減数分裂の雌雄差の分子機構解明

クローンあるいは遺伝的に極めて近縁の 4n 雌雄において、その生殖細胞を分離し、そこで発現している RNA を採取し、cDNA を合成し、発現量に性差のある遺伝子候補を検討することから、雌雄差、すなわち減数分裂の off/on をコントロールする分子機構解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料

群馬県館林市の城沼に起源し、群馬水試(前橋市)において、継代、繁殖、飼育してきたギンブナ集団(キンギョを含む)を材料とした。2014 年 4 月にはギンブナ雌 101 尾、ギンブナ雄 13 尾、キンギョ *Carassius auratus* 4 尾の合計 118 尾の提供を受けた。2016 年 4 月には、同飼育集団より 214 尾の提供を受けた。それ以前に、群馬県水産試験場より提供され、北海道大学北方生物圏フィールドセンター七飯淡水実験所において飼育しているギンブナ集団も材料とした。適宜、PIT タグによる個体識別を施した。提供されたギンブナの一部は北海道大学大学院水産科学研究院先端環境制御実験棟(水槽センター)において飼育した。

### (2) 倍数性判定

材料より鱗、精巢の一部あるいは精液、血液を採取し、カルノア液(メタノール:酢酸 = 3:1)で固定し、フローサイトメーター(Partec PA あるいは CyFlow)により倍数性判定を行った。標本を淡水魚用リングル液(128mM NaCl, 2.8mM KCl, 1.9 mM CaCl<sub>2</sub>, pH7.0)で洗浄後、核単離溶液(Cystain DNA 2 step kit A, Partec) 100μL に懸濁し 20 分間処理した。処理溶液に核染色液(DAPI)を加え、50μm のフィルターでろ過後、処理溶液と染色液を混合したサンプルを測定に供した。体細胞核 DNA 量(2C)の対照として、ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* 野生型二倍体(2.5pg/N)の鱗を用いた。

一部の標本については、血液を採取し、スライドガラスに塗抹標本を作製し、赤血球のサイズにより、倍数体判定を行う場合もあった。

### (3) 分子遺伝学的分析

#### DNA 標本の調製

フローサイトメトリー用にカルノア固定した標本を 100%エタノールに置換した後、保

存した。適宜、標本を TNES-Urea 緩衝液に浸漬した後、Proteinase-K により消化し、フェノール/クロロフォルム/イソアミルアルコール (PCI) を加え、よく転倒混和した。遠心分離により得た上清について、再度、PCI を加え、同様の手法で上清を得て、3M 酢酸ナトリウムと 100%エタノールを加え、静置した。沈殿物を 70%エタノールで洗浄、風乾し、TE 緩衝液中に溶解し、DNA 標本溶液とした。分光光度計 (NanoDrop 2000 サーマサイエンティフィック) で吸光度を測定し、100ng/ $\mu$ L となるように TE 緩衝液で調製した。

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR による DNA フィンガープリント

オペロン社のランダムプライマー (10mer) OPA シリーズ 16 種類、OPB シリーズ 11 種類を用いて RAPD-PCR 法による DNA フィンガープリントングを行った。PCR (熱変性 95 30 秒の後、95 30 秒、36 1 分、72 1 分を 1 サイクルとして 35 サイクル、伸長反応 72 7 分) の後、増幅産物を 1.5%アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウム染色後、UV により増幅断片の検出を行った。

ミトコンドリア DNA (mtDNA) 部分配列分析 *tRNA-thr* の一部分、*tRNA-pro* の全領域、調節領域の一部を増幅した。反応条件は熱変性 94 4 分 30 秒の後、94 30 秒、55 1 分、72 1 分を 1 サイクルとして 35 サイクル行い、その後、72 10 分の伸張反応をした。プライマーは Murakami *et al.* (2001) を使用した。PCR の後、Agencourt AMPure XP (Beckman coulter) で精製した。Forward primer L16454 を用いた塩基配列決定は外部に受託した。塩基配列決定後、MEGA7 (Tamura *et al.*, 2013) を用いてアライメントを行い、Jukes and Kantor (1969) のモデルにより遺伝的距離を求めた。2016 年入手標本については mtDNA D-loop 領域の塩基配列分析も行った。

2016 年 4 月入手の標本については、別途、D-loop (323-327bp) についても Murakami *et al.* (2001) の手法により分析した。

核 DNA マーカーによる種判別と系統判別

Micro- or mini-satellite associated sequence amplification (MASA)-PCR により得られた、2n あるいは 3n ギンブナに特徴的と思われる断片からクローニングとシーケンスを行うとともに、サザンハイブリダイゼーション用のプローブも作成し、3n ギンブナに特徴的な 2 断片 (GB+GF) 2n ギンブナに特徴的な 1 断片 (GB) キンギョに特徴的な 1 断片 (GF) ゲンゴロウブナ *C. cuvieri* に特徴的な 1 断片 (GRB) が得られた。これらの配列を調べ、2n ギンブナ (GB) キンギョ (GF) ゲンゴロウブナ (GRB) を識別するプライマーを設計した。これらにより、ギンブナ 2n、キンギョ、ゲンゴロウブナを種判別し、日本産ギンブナ 3n を GB と GF 両方の出現より識別した。

また、倍数体に特徴的な反復配列が *Dral*

消化で得られたサテライトに見られ、倍数体特異的な断片を増幅する Cal3nDr プライマーが開発された (Murakami and Fujitani, 1997)。Cal3nDra はギンブナ倍数体にも出現することから、Cal3nDra がプラスで、GF のみを示す個体は大陸系の 3n (*C. gibelio*) と判断した。

(4) 細胞遺伝学的分析

Itono *et al.* (2006) に基づき、卵巣から成長した卵母細胞を取り出し、淡水魚用リングルに最終成熟を促す 17 $\beta$ -20 $\alpha$ -dihydroxy pregnen-3-one を加えて、培養した。卵核胞 (GV) の移動中から GV 崩壊の前に単離し、スライドグラスに置き、減数分裂染色体標本の作製を行った。染色体標本は DAPI 染色し、蛍光顕微鏡観察に供した。

(5) 細胞・組織学的観察

組織標本は常法により、ブアン固定標本を脱水後パラフィンに包埋し、切片とし、ヘマトキシリン-エオシン染色を施すことで作成した。

精液はスライドグラス上にとり、位相差顕微鏡あるいはノマルスキー微分干渉顕微鏡により精子を観察した。

必要に応じて、血液から赤血球塗抹標本をつくり、サイズの測定による倍数性判定に供した。

(6) 交配実験

雌親魚に 300IU、雄親魚に 100IU のヒト絨毛性腺刺激ホルモン (あすか製薬) を腹腔内注射し、排卵、排精を促した。雄から搾出した精子を Kurokura 液 (128mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.4mM CaCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>; Kurokura *et al.*, 1984) で希釈し、人工受精に供した。人工受精は乾導法によった。人為雌性発生を誘起する場合は、キンギョより得た精子を希釈後、UV 照射して、受精に用いた。4n の受精卵において、精子核の取り込み促進を図る目的で、Takai and Ojima (1983) に従って、受精後 15 分後に 1、15 分間の低温処理を施した。

受精卵 (胚) は 20 で培養し、毎日水替えと死卵除去と計数を行った。孵化後は一日に 2-3 回、*Artemia* を与えるとともに、換水を行い、孵化個体数を計数した。全受精卵に対する孵化個体の割合から孵化率を計算した。

(6) 人為性転換実験

2013 年に群馬水試より入手したギンブナ 4n 雌 1 尾より人為排卵により得た非還元 4n 卵に、UV 照射により遺伝的に不活性化したキンギョ精子を媒精し、雌性発生 4n 子孫を 1 組得た。これらの孵化仔魚の飼育水中に 17 $\beta$ -メチルテストステロンを 0.1 $\mu$ g /L 添加し、7 月 20 日から 10 月 23 日までの約 3 か月間処理し、人為性転換を図った。これらの処理魚を解剖し、精巢の存否より、性転換の成否を判断した。精巢の一部については、組織切片を作成して、観察に供した。精液が得られた場合は、位相差顕微鏡あるいは微分干渉顕微鏡により形態観察を行い、精子頭部径を測定した。

さらに、性転換雄の精子をキンギョの成熟卵に人工受精して、受精率、孵化率、正常率を調べるとともに、得られた胚の外部形態観察を行った。併せて、胚のフローサイトメトリーにより、倍数性判定を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ギンブナ集団の遺伝的構造

###### 2014年親魚候補集団

2014年に入手した群馬水試における親魚候補を含む集団(雌101尾)について、FCMによる倍数性判定を行った。その結果、2n 1尾、3n 78尾、4n 12尾となった。残り10尾は正倍数体ではなく、5尾は2nと3n間のDNA量をもつ高二倍体、5尾は3nと4n間のDNA量をもつ高三倍体と推定された。同時に入手した雄13尾はすべて4nであった。

これらの集団のmtDNAを解析したところ2つのハプロタイプ(仮にHT1、HT2とする)が見られた。3n雌35尾、4n雌2尾、4n雄2尾はHT1を示し、3n雌43尾、4n雌10尾、4n雄11尾、高二倍体5尾、高三倍体5尾はHT2を示した。これらのハプロタイプはキンギョ(仮にHT3、HT4とする)とは明確に区別できた。キンギョとギンブナの間には0.543-0.594の遺伝的距離があったが、ギンブナの2ハプロタイプ間は0.0193であった。なお、これらと4ハプロタイプと既報(Murakami *et al.* 2001)との対応が目下不明であり、今後、この点を明らかにすることが課題として残された。

次に多型性を示したランダムプライマー16種を用いて、4n 23尾について、クローン関係の有無を調べた。その結果、全個体がいずれかのプライマーを用いたRAPD-PCRによるDNAフィンガープリントで変異を示した。従って、遺伝子型は個体特異的であり、調査した標本のなかでクローン関係にある個体は見いだせなかった。しかし、雌のうち1尾と雄のうち2尾は16プライマーのうち13プライマーで同一のフィンガープリントを示した。また、別の雌2尾は15プライマーで同一のフィンガープリントを示し、これらは遺伝的に近縁であり、共通の3nから生じたことが考えられた。

###### 群馬水試倍数体混雑集団の遺伝的構造

県内館林市城沼に由来するフナ類集団217尾について、性別、倍数性、MASA-PCR由来プライマーによるGF、GB、GRBの出現による種・系統判別、倍数体特異性反復配列Cal3nDrの存否、mtDNA D-loop領域塩基配列解析による遺伝構造解析を行った。

その結果、GRBの出現からゲンゴロウブナと判定された3尾を除いた。残り214尾はギンブナと判定されたが、37尾が2nであり、うち雌26尾、雄11尾であった。これらのうち、典型的なGBのみを持つ個体は30尾であり、他はGBとGFの両方を示した。3nは169尾出現し、うち雌が168尾、雄が1尾であった。これらのうち108尾の3n雌はGFとGB

の両方の断片を示し、なおかつCal3nDrをもち、日本在来系のギンブナと判断された。しかし、残りの雌60尾と雄1尾はGF断片のみをもち、かつCal3nDrを示したことから大陸系3nと考えられた。4nは4尾見られ、うち3尾が雌、1尾が雄であった。これらはGFとGB断片を示し、Cal3nDrを有した。このほか、2n-3nモザイクが1尾、1n-2nモザイクが2尾、倍数性判定に失敗した個体が1尾生じた。

ゲンゴロウブナは1つのハプロタイプのみ、大陸系は3つの特有のハプロタイプのみを示したが、2n、在来系3n、および4nはそれぞれ12種類、12種類、および4種類の多様なハプロタイプ組成を示した。これらのうち、2n、3nおよび4nの三者に共通のハプロタイプは1種類、2nと3nに共通のハプロタイプは2種類、3nと4nに共通のハプロタイプは2種類であった。

##### (2) 倍数体から生じた子孫の遺伝的特性

2014年に得た合計101尾からギンブナ35尾を選び、個体識別の後に、交配実験を行った。すなわち、人為排卵誘導を行い35尾中27尾の3n雌で排卵を確認した。そのうち、24B4(#1)、24D6(#2)、24BB(#3)、24BC(#4)から得た卵をキンギョ1尾の精子で受精した。また、授精後の低温処理による精子核取込促進による四倍体化を試みた。

これら実験群の孵化率は22.9から96.3%とばらついたが、いずれの組からも正常な子孫を得ることができた。#1と#4では、無処理、低温処理に関わらず3n子孫のみが生じた。#2では低温処理の有無にかかわらず子孫に3nと4nの両方が同程度の頻度で生じた。#3では低温処理の有無にかかわらず4nのみが生じた。3nが生じた#1、#2および#4の雌親魚のmtDNAはHT1であったが、4nのみが生じた#3の雌親魚のそれはHT2であった。核ゲノム構成については検討に至らなかった。

上記の#1、#2および#3から生じた子孫について、RAPD-PCR法によるフィンガープリント分析を行った。その結果、生じた3n子孫は分析したすべての個体で母親と同一のフィンガープリントを示し、これらが3n非還元卵の雌性発生により生じたクローンであることが確認できた。一方、4n子孫は、雌親のDNA断片に加えて、雄親に由来するDNA断片を示したことから、精子核の取り込みにより生じたことが明らかになった。

しかしながら、3n雌から、あるものは3n子孫のみ、あるものは4n子孫のみ、あるものからは3nと4nの両方が生じる現象が今回明らかになった。今後、このような現象が生じる機構を明らかにする必要がある。

##### (3) 四倍体雄における二倍体と異数体の2タイプの精子形成

###### 群馬水試由来四倍体雄の精子形成

2013-2016年に群馬水試より入手した4n雄14尾のうち12尾についてFCMができた。その結果、うち11尾は2nにピークを示し、CV値も4.5~6.4%であったのに対し、1尾は0.5n

から 8n に相当する広い範囲に DNA 量ヒストグラムを示し、モードはおおよそ 1.5n と 2n の間にあった。また、CV 値は 21.4% と非常に高かった。2n 精子について微分干渉顕微鏡および位相差顕微鏡で観察したところ、その頭部サイズは均一であったのに対し、広い DNA 量を示す精子の頭部サイズは不均一であった。このような雄の精巣組織切片においても、多様な大きさの精子（あるいは精子様細胞）が認められた。

ギンブナ 3n 雌とキンギョ雄間の交配由来 4n 子孫における精子形成

前述(2)の交配実験#2 では 3n と 4n の子孫が生じたことから、これらの 4n 子孫を飼育育成して、その精子を観察したところ、広いヒストグラムと高い CV 値を示すだけでなく、精子頭部のサイズが不均一なことから、これらの 4n 子孫雄においても、異数体精子形成が示された。

ギンブナ 4n 雌の雌性発生子孫からの性転換雄における精子形成

人為性転換を試みた 12 月令魚（体長 55.3 ± 7.6mm、体重 3.9 ± 1.5g、6 尾）と 17 月令魚（体長 63.8 ± 4.9mm、体重 6.4 ± 1.5g、5 尾）の魚を開腹して調べたところ、全個体が精巣を有しており、性転換は成功した。12 月令魚からは精子が得られなかったが、17 月令魚では 5 尾中 4 尾が排精した。精巣には 2n、4n および 8n 相当のピークが生じたが、精液では広い範囲にヒストグラムが分布し、CV 値は 40.5% であった。

位相差顕微鏡で観察したところ、対照のキンギョ精子の頭部のサイズは均一であったのに対し、ギンブナ性転換雄のそれは不均一で大きかった。また、鞭毛を二本持つ奇形精子や極端に短い鞭毛を持つ奇形精子が見られた。キンギョ精子の頭部直径は 2.95 ~ 3.15 μm に分布したが、性転換ギンブナの精子頭部直径 3.85 ~ 4.2 μm にモードが見られたが、サイズは 2.1 ~ 7 μm に広く分布した。

性転換雄の精子をキンギョの卵に媒精して、受精卵の発生を調査した。対照のキンギョ × キンギョでは 84% の受精率、40.9% の孵化率、20% の正常率を示し、卵質は必ずしも良くなかったが、キンギョ × 性転換雄では受精率は 47. ~ 68.5%、孵化率は 0% であり、正常な胚は生じなかった。

これらのキンギョ雌 × 性転換雄由来子孫について FCM を用いた倍数性判定を行った。その結果、倍数性は 0.6n から 4.9n に分布し、平均は 2.14n、モードは 1.9n であり、異数体であった。以上の結果より、今回検討した性転換 4n 雄は異数性精子を形成したことが明らかになった。

(4) ギンブナ 4n 減数分裂の細胞遺伝学的研究

4n 雌のうち成熟に至った個体を選び、卵巣を摘出した。そして、研究方法(4)に記述の方法により、卵核胞 (GV) を取り出し、その染色体像を蛍光顕微鏡下に観察した。その

結果、各 GV に 145-164 の染色体が見られた。しかしながら、各染色体の対合状態を結論するには至らなかった。

4n 雄については、上述のように 2 タイプが出現したので、それらの精子を用いた観察、交配実験を優先するため、精巣の摘出と観察を中止した。今後、3n の交配実験から生じた 4n を利用して観察することとした。

(5) 本成果のインパクトと今後の展望

以上の様に、4n 雄のなかには、二倍体精子を作る個体に加えて、異数性精子を作る個体が存在することが、初めて明らかになった。本研究は、ギンブナ 4n 雄は還元的に 2n 精子をつくるという前提から、立案されたものであるが、4n 雄の作る精子には 2n のみではなく、異数体もあるという予想外の結果が得られた。2n 精子形成にはギンブナ 4n ゲノムの複二倍体的な構成（例：AA' BB' など）が予想され、類似したサブゲノム染色体間での、均衡的な減数分裂によることが想定される。一方、異数体精子形成には非均衡的な、異質四倍体的な構成（例：ABBC、ACCC など）に起因する減数分裂の異常による一価染色体や多価染色体の形成によるのかもしれない。今後は、4n ゲノムの構成と精子形成の関係解明が重要課題となる。4n の精子形成については、未だ知見が不足しており、その全プロセスの組織学的観察と減数分裂時の染色体の挙動の観察が今後特に重要と考えられた。

4n 雄の精子形成に 2 型があることは、4n の給源となる 3n ギンブナに在来系と大陸系がいることが関係するのかもしれない。大陸のギベリオブナ *C. gibelio* は日本のギンブナとは異なる生殖を行っており、同じクローンの精子で受精する場合は有性生殖 (1.5n 卵 + 1.5n 精子) を行い、他種の精子による受精では精子核が凝縮したまま前核化しない典型的な雌性発生生殖 (3n) を行い、同種内の他クローン精子による受精の場合は雑種と類似した父系染色体排除の後、雌性発生生殖を行うという (Gui and Zhou, 2010)。大陸系ギベリオブナが 4n となった場合にどのような精子形成がおこるか不明である。従って、2n 精子を形成するギンブナと異数性精子を形成するギンブナの系統をまず遺伝学的手法により確認する必要がある。

さらに、3n 雌において、キンギョ精子の授精から雌性発生により 3n 子孫のみを産する個体、精子核取込により 4n 子孫のみを産する個体、両方を産する個体の 3 種類が見られた。そして、既報において精子取り込みに効果のあった受精卵の温度処理は全く効果がなかった。このような雌個体による生殖・発生の相違も、予想外の結果であり、この現象も 3n を構成するゲノムの相違から説明できるのかもしれない。この問題を解明するためには今回の交配実験に用いた 3n 雌親魚の系統とゲノム構成を明らかにする必要がある。

本研究では異数体精子を産する 4n 雄の出現、3n 雌の卵の受精による 4n 子孫のみの出

現のような、当初予想しなかった結果が得られた。城沼由来の群馬水試集団が大陸系ギンブナを多数含むことも当初予想できなかった結果である。本集団にはゲノム構成の異なる倍数体が含まれている可能性が高く、今回、認められた生殖現象についても、材料の系統、ゲノム構成から再整理が必要である。

本研究では 4n 雌の非還元卵形成機構ならびに 4n 雌雄間の減数分裂 off/on 機構の解明にまで切り込むことはできなかった。しかし、今まで知られていなかった生殖特性を見出すことができ、次の研究に繋がる成果を得ることができた。

#### 引用文献

- Dong *et al.* (2013) *Fish. Sci.* 79:935-941.  
Gui and Zhou (2010) *Sci. China Life Sci.* 53:409-415.  
Itono *et al.* (2006) *J. Exp.Zool.*305A:513-523.  
Jukes and Cantor (1969) *Mammalian Protein Metabolism* (Munro, ed.) Academic Press, NY.  
Kurokura *et al.*(1984)*Aquaculture* 37:267-273  
間田ら (2001) *日水誌* 67 : 217-221.  
前田ら (2001) *広大生物生産紀要* 40 : 15-25.  
前田ら (2003) *日水誌* 69 : 185-191.  
Murakami and Fujitani (1997) *Genes Genet. Syst.* 72:107-113.  
Murakami *et al.* (2001) *Genes, Genet. Syst.* 76:25-32.  
Takai and Ojima (1983) *Proc. Japan Acad.* 59B:347-350.  
Tamura *et al.* (2013) *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.  
Yamashita *et al.* (1993) *Dev. Growth Differ.* 35:631-636.

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 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

藤本 貴史 (FUJIMOTO, Takafumi)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号 : 10400003

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

村上 賢 (MURAKAMI, Masaru)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号:80271360

鈴木 紘子 (SUZUKI, Hiroko)

群馬県水産試験場・生産技術係・研究員

研究者番号 : 00450388

田中 英樹 (TANAKA, Hideki)

群馬県水産試験場・生産技術係・研究員

研究者番号 : 50450383

(平成 28 年度より研究分担者)

##### (3)連携研究者

##### (4)研究協力者

山口 文 (YAMAGUCHI, Fumi)

北海道大学・大学院水産科学院・修士課程

加藤 勇 (KATO, Yu)

北海道大学・水産学部・四年生