

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32658

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22593

研究課題名(和文)三倍体ドジョウの配偶子形成を可能にする特殊なゲノム挙動の解明

研究課題名(英文)Elucidation of genomic behavior in gametogenesis of fertile triploid loach

研究代表者

黒田 真道(Kuroda, Masamichi)

東京農業大学・生物産業学部・助教

研究者番号：70880764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：三倍体魚類の多くは減数分裂が正常に進行せず不妊になる。一方、一部地域に生息する三倍体ドジョウ(ゲノム構成：AAB)のメスは減数分裂前に異質なゲノム(B)1セットを排除して1n卵(A)を形成するがその機構は不明点も多い。また、生殖細胞内に由来の異なるゲノムが混在するため特殊な配偶子形成が生じると考えられるが、3ゲノムが異なる三倍体(ABC)で生じる配偶子形成の特徴は不明であった。本研究ではCゲノムに外来種のカラドジョウを用いて三倍体を作出し、これまで不可能だったカラドジョウの染色体を識別するプローブ開発、ドジョウ・カラドジョウを容易に判別する複数のDNAマーカー開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

三倍体の個体は不妊になることが多いが、ドジョウなど一部の魚類では不妊にならず正常な配偶子を形成できる三倍体も存在する。このような特殊な配偶子形成には由来の異なるゲノムの存在が大きく影響すると考えられているが詳細は不明である。本研究では由来の異なるゲノムを持つ雑種を作出した。また、外来種としてドジョウとの競合や交雑が懸念されているカラドジョウの染色体を識別するプローブ、ドジョウとカラドジョウを判別可能なDNAマーカーの開発に成功した。形態的特徴からは判断し難いドジョウ×カラドジョウ雑種が自然界に存在するか調査する際に非常に有効なツールとなり、本研究成果が大きく貢献すると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Most of triploid fishes are sterile because of aberrant meiosis. In some parts of Japan, natural triploid dojo loaches *Misgurnus anguillicaudatus* (genomic constitution: AAB) exist and they produce haploid eggs (A) since B genome is excluded before meiosis. Existence of different genomes in germ cell should generate such atypical gametogenesis. The characteristics of gametogenesis in triploid with three different genomes (ABC) are unknown. We generated triploid (ABC), using *Paramisgurnus dabryanus* as C genomes. We developed FISH probe to identify C genomes and some DNA markers for species or group identification.

研究分野：魚類の細胞遺伝学

キーワード：特殊な配偶子形成 減数分裂 染色体識別 FISH 雑種 異質なゲノム構成 種・系統の判別 クロー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

3つの染色体セット(ゲノム)を持つ三倍体魚類の多くは、減数分裂における染色体対合の異常により正常な配偶子(卵、精子)を作ることができず不妊となる。一方で、日本の一部地域において不妊にならない三倍体のドジョウ(*Misgurnus anguillicaudatus*)が発見された。日本のドジョウには遺伝的に分岐した、A系統(ゲノム構成:AA)、B系統(BB)、そして二系統の交雑を起源とするクローン系統(AB)が存在する。通常の減数分裂とは異なり、クローン系統では減数分裂前に全ての染色体を倍加し、元々同じ染色体(姉妹染色体)同士で対合するため、母親の体細胞と遺伝的に同一な2n卵(AB)が形成される[Kuroda et al, 2018]。この2n卵の多くは精子核を取り込まずに雌性発生する。従って、子孫も母親の体細胞と遺伝的に同一のクローン(AB)となる。しかし、2n卵(AB)がA系統の精子核(A)を偶発的に取り込むことで上述の三倍体(AAB)が生じる。この三倍体メスは3セットのゲノム(AAB)のうち相同性の低いBゲノムを減数分裂前に排除し、生殖細胞内に残った2セット(AA)で減数分裂を行うため、1n卵(A)が形成される[Morishima et al, 2008]。同様に、三倍体(ABB)の場合はAゲノムを排除して1n卵(B)を形成する。

すなわち、由来の異なる2ゲノムを併せもつ三倍体の生殖細胞内では、各ゲノム間の相同性がチェックされており、そのうち遺伝的に親和性の低いゲノム1セットを排除する機構が備わっていると考えられるが、その機構の詳細は不明であった。また、特殊な卵形成を行うクローンドジョウ(AB)と三倍体(AAB, ABB)がどちらも異質な2ゲノム(AとB)を併せもつことから、生殖細胞内に異質なゲノムが混在することで特殊な配偶子形成が生じると考えられる。その一方で、3ゲノムとも異なる異質三倍体(ABC)ではどのような配偶子が形成されるのか全く予想がつかず、これらが妊性を持つか否かも不明であった。

2. 研究の目的

本研究ではドジョウをモデルとして、異質三倍体(AAB)の卵形成過程でBゲノムの排除が生じるステージを決定し、排除完了までの細胞内における各ゲノムの挙動解明を目的とした。さらに国外から持ち込まれ、ドジョウとの競合や交雑が懸念されている外来種のカラドジョウ(*Paramisgurnus dabryanus*)ゲノムをCとして、3ゲノムとも異なる三倍体(ABC)がどのような配偶子を形成するのか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) サンプルの選抜

クローン由来三倍体(AAB): クローンに由来する三倍体(AAB)が生息する北海道東部でサンプリングを行い、核・ミトコンドリアDNAマーカーと、プロイディアナライザーによる倍数性解析からクローン由来三倍体の選抜を行う。

三倍体(ABC): クローンドジョウが産出する2n卵(AB)にカラドジョウ精子(C)を人工授精する。通常は雌性発生するため子孫は二倍体(AB)となるが、偶発的にカラドジョウの精子核が取り込まれた場合に三倍体(ABC)が出現する。一定期間仔魚を飼育後、倍数性解析を行い三倍体(ABC)の選抜を行う。

(2) カラドジョウゲノムを細胞遺伝学的に識別する目印(プローブ)の開発

3 ゲノムとも異なる異質三倍体 (ABC) における配偶子形成機構を理解するためには、減数分裂中の各ゲノム (A・B・C) の挙動を正確に追跡することが極めて重要である。これまでにドジョウの A および B 系統由来の染色体を識別する反復配列プローブ (ManDra-A, ManDra-B) が開発されており、これらを用いてクロードジョウが行うクローン性の 2n 卵形成を担保する特殊な染色体挙動が明らかになった [Kuroda et al, 2018, 2021a]。一方で、カラドジョウの染色体を識別するプローブは開発されていなかった。当初の計画では開発予定はなかったのが、予備実験の結果から開発できる可能性が高いこと、カラドジョウの染色体を識別するツールを開発することで本研究の精度を高めることができると考え、プローブ開発を行うことにした。

カラドジョウのゲノム DNA を様々な制限酵素を用いて断片化処理後、電気泳動を行い、反復配列の有無を調査する。得られた反復配列のシーケンス解析後、プローブとして用いる。

(3) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

ドジョウ A 系統由来の染色体を識別する ManDra-A プローブ、B 系統由来の染色体を識別する ManDra-B プローブに加えて、本研究で開発するカラドジョウ由来の染色体識別が期待される新規プローブを用いて FISH 解析を行う。

(4) カラドジョウ判別 DNA マーカーの開発

これまでにドジョウ二系統の染色体をそれぞれ識別するプローブとして利用されている反復配列の ManDra-A と ManDra-B は、ドジョウの系統判別 DNA マーカーとしても利用されている。従って、本研究でカラドジョウから単離した反復配列においても細胞遺伝学的なツールとしての利用に留まらず、外来種として問題視されているカラドジョウを識別する DNA マーカーとして応用できる可能性がある。

カラドジョウ DNA から得られた反復配列を増幅するプライマーセットを開発後、PCR と電気泳動を行い、ドジョウとカラドジョウ間での増幅パターンを比較する。

4. 研究成果

(1) サンプルの選抜

クローン由来三倍体 (AAB): クローンに由来する三倍体 (AAB) が生息する北海道東部でサンプリングを行った。コロナ禍でサンプリング期間が制限された中で可能な限りサンプリングを行ったが野生のクローン由来三倍体を選抜できなかったため、クロードジョウの 2n 卵 × A 系統 1n 精子の人工授精によりクローン由来三倍体を作成した。三倍体 (ABC): クロードジョウが産出する 2n 卵にカラドジョウ精子 (C) を人工授精して作成した。

また、本研究においては正確に二系統およびクローン系統を識別する必要がある。本研究では新たに系統判別用の核 DNA マーカーを 2 種類開発することに成功し、それぞれ査読付きの国際誌からパブリッシュ済みである [Kuroda et al, 2021a, 2021b]

(2) カラドジョウに特徴的な反復配列の単離と配列比較

カラドジョウのゲノム DNA を様々な制限酵素で断片化処理した結果、制限酵素 *Dra*I を用いた際に約 100-200bp の位置にサテライト DNA と推定される明瞭なバンドが観察された。この DNA 断片を回収し、シーケンス解析を行った。その結果、ドジョウの A 系統に特徴的な反復配列である ManDra-A、B 系統に特徴的な反復配列である ManDra-B と類似した配列であり、一部の配列が異なっていた。すなわち、対象とした 137bp のうち ManDra-A と比較すると 22 塩基の置換と 2 塩

基の挿入、ManDra-Bと比較すると30塩基の置換と1塩基の挿入が確認された。

(3) 反復配列プローブを用いた染色体識別法の確立

制限酵素 *DraI* を用いてカラドジョウ DNA から単離した反復配列をプローブとして FISH を行った。その結果、カラドジョウの体細胞において全48本(中部動原体着系型:12本、次中部動原体着系型:4本、端部動原体着系型:32本)の染色体のセントロメア領域に明瞭な FISH シグナルが検出された。さらに現在解析中ではあるが、A系統とB系統の染色体では今回開発したプローブの FISH シグナルは検出されていない。従って、本研究で開発した FISH プローブを用いることで、カラドジョウ由来の染色体を識別可能であると考えられた。

(4) カラドジョウ判別 DNA マーカーの開発

本研究で単離した反復配列をプローブに用いた FISH の結果、カラドジョウの染色体のみで明瞭な FISH シグナルが検出された。この反復配列がカラドジョウに特異的であるか検証するため、反復配列を増幅するプライマーを設計して PCR、電気泳動を行った。その結果、カラドジョウでは広範囲にわたってスメア状に PCR 産物が検出された。従って、単離した反復配列はカラドジョウゲノム中に高頻度で存在することが判明した。一方で、ドジョウのA系統とB系統ではスメア状の PCR 産物は検出されず、ラダー状に PCR 産物が検出された。この結果はドジョウゲノムにも同様の反復配列は存在するが、カラドジョウと比較して頻度が低いことを強く示唆する。

カラドジョウはもともと中国大陆や朝鮮半島に分布しているが、輸入されたドジョウに混ざって国内に侵入し [清水・高木, 2010]、一部の地域で定着したと考えられている。ドジョウ×カラドジョウ雑種は生存性であることが報告されており [Fujimoto et al, 2008]、在来ドジョウの遺伝子汚染を防ぐための対策が必要である。これまでにドジョウとカラドジョウを識別する種判別式が示されているが [小出水ら, 2012]、簡便かつ正確に両者を識別する DNA マーカーはなかった。本研究で開発した DNA マーカーを用いることで、カラドジョウを判別できるだけでなく、既存のドジョウの二系統を識別するマーカーと組み合わせることで、形態的特徴からは判別困難なドジョウ×カラドジョウ雑種を識別できる可能性が高い。本研究で開発した DNA マーカーは、自然界における在来ドジョウ×カラドジョウ雑種の有無について実情を把握する上でも極めて重要な役割を持つ。

引用文献

小出水 規行, 森 淳, 水谷 正一, 渡部 恵司, 竹村 武士, 西田 一也. 農村生態系保全に向けてのドジョウとカラドジョウの簡易な種判別式. 農村工学研究所技報. 2012; 212: 167-175.

清水 孝昭, 高木 基裕. 愛媛県に侵入したカラドジョウ集団内に見られた起源の異なる2つの遺伝子系統. 魚類学雑誌. 2010; 57(2): 125-134.

Fujimoto T, Yasui S. G, Yoshikawa H, Yamaha E, Arai K. Genetic and reproductive potential of spermatozoa of diploid and triploid males obtained from interspecific hybridization of *Misgurnus anguillicaudatus* female with *M. mizolepis* male. Journal of applied Ichthyology. 2008; 24(4): 430-437.

Kuroda M, Fujimoto T, Murakami M, Yamaha E, Arai K. Clonal reproduction assured by sister chromosome pairing in dojo loach, a teleost fish. Chromosome Research. 2018; 26(4): 243-253.

Kuroda M, Shibata K, Fujimoto T, Murakami M, Yamaha E, Arai K. FISH Identifies Chromosome Differentiation Between Contemporary Genomes of Wild Types and the Ancestral Genome of Unisexual Clones of Dojo Loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Cytogenetic and Genome Research. 2021a; 161: 178-186.

Kuroda M, Fujimoto T, Yamaha E, Arai K. Improvement in group identification of dojo loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, using PCR-restriction fragment length polymorphism. Conservation Genetics Resources. 2021b; 13: 457-463.

Morishima K, Yoshikawa H, Arai K. Meiotic hybridogenesis in triploid *Misgurnus* loach derived from a clonal lineage. Heredity. 2008; 100: 581-586.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Masamichi Kuroda, Kiko Shibata, Takafumi Fujimoto, Masaru Murakami, Etsuro Yamaha, Katsutoshi Arai | 4. 巻 161 |
| 2. 論文標題 FISH Identifies Chromosome Differentiation Between Contemporary Genomes of Wild Types and the Ancestral Genome of Unisexual Clones of Dojo Loach, <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cytogenetic and Genome Research | 6. 最初と最後の頁 178-186 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000515107 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Masamichi Kuroda, Takafumi Fujimoto, Etsuro Yamaha, Katsutoshi Arai | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Improvement in group identification of dojo loach, <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> , using PCR-restriction fragment length polymorphism | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Conservation Genetics Resources | 6. 最初と最後の頁 457-463 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12686-021-01230-7 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|