

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月23日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21658067

研究課題名（和文） チョウザメ類にゲノム重複とクローン生殖をもたらすアポミキシスは起きているか

研究課題名（英文） Does apomixis occur to cause genomic duplication and clonal reproduction in sturgeons?

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

研究成果の概要（和文）：植物で倍加やクローン生殖をもたらすアポミキシスがチョウザメ類で生じている可能性を検討するため、飼育個体および人工繁殖により作出した子孫のゲノムサイズ、染色体を解析したところ、種間の倍数性変異に加え、人工繁殖子孫において三倍体、四倍体が見られた。また、一部の交雑種では正常な外見をもちながら DNA 量が半減した子孫も生じた。以上の結果は、現在も倍数性変異が生じている可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：Possible involvement of “apomixis”, which causes clonal reproduction and polyploidy in plants, was investigated in sturgeon species. Genome size estimation by DNA content flow cytometry and molecular cytogenetic analyses including FISH clearly showed elevation and reduction of ploidy status among different species as well as occurrence of genetic diploid and tetraploid in artificially propagated con-specific and hybrid progeny. The results suggest ploidy variation should happen in present sturgeon species.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	0	1,300,000
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	270,000	3,370,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：ゲノムサイズ 倍数体 生殖細胞 染色体 FISH 雑種 希少種 凍結保存

1. 研究開始当初の背景

一部の野生植物(例：タンポポ)では配偶子の染色体が倍加し、クローン生殖により遺伝的に同一な株をつくる「アポミキシス」という現象がある。この現象を人為的に誘導できれば、有用な形質をもつ植物体をクローン化できる。一部のクローン生殖を行う魚類では植物のアポミキシスに相当する機構が働い

ていると考えられるが、一般にこのような現象は脊椎動物では希である。

チョウザメ類は原始的な魚類に位置づけられ、そのほとんどが希少種である。しかし、産業的にはその卵がキャビアとして珍重され、保全の一方で養殖が試みられている。チョウザメ類に特徴的なことは、種間あるいは種内でゲノム量および染色体数が大きく変異していること、他の魚種では繁殖ができな

い異属間雑種であっても妊性を示すことである。

これらの事象は、チョウザメ類において「アポミキシス」類似の現象が生じており、これによりゲノムの重複や雑種の生殖能力回復が生じている可能性を示唆する。

2. 研究の目的

ミカドチョウザメおよび他の種について人為的な繁殖により得た、純粋種および交雑種の子孫について、フローサイトメトリーによるゲノムサイズ推定、染色体観察、DNAマーカー分析などを実施し、倍数体、クローンの出現の存否を確認する。もし、アポミキシスが確認できたら、それを原理とする育種の方法を提案する。

3. 研究の方法

(1) チョウザメ類供試魚

北海道大学北方生物圏フィールド科学センター七飯淡水実験所および国内施設において、飼育・育成を行っているチョウザメ類（人為・自然交雑種を含む）を材料とした。人工産卵・受精における必要に応じて国内各地の施設より、チョウザメ類配偶子の供与をうけた。人工繁殖による純粋種、交雑種についても、適宜材料とした。

(2) 人工繁殖

生検により得た卵巣から卵濾胞を分離し、卵濾胞あるいは卵の直径を測定した。L1 5培養液で17 α ヒドロキシprogesterone (17 α OHP) 存在下で培養し、卵核胞崩壊 (GVBD) の存否により成熟度判定を行った。GVBDを示した親には、LHRHaを投与し、排卵を誘導した。雄についても雌同様に投与した。卵は搾出法により、精子は吸引法により採取し、洗卵法あるいは等張受精法により人工受精を行った。受精卵については、尿素・タンニン酸による脱粘処理をした後、孵化槽に収容した。

(3) ゲノムサイズの推定

胚（仔魚）および成魚鱗組織の一部を切り出し、核の単離処理を行なった後に、50 μ mのメッシュで濾過し、DAPIを含む溶液で染色後、常法に従ってフローサイトメーター (Partec Ploidy Analyzer) により、細胞核あたりのDNA量を分析した。

(4) 染色体標本作製とFISH・分染

検体のコルヒチン処理後、鰓、腎臓等の組織あるいは胚から0.075MKCLによる低張処理、カルノア液による固定を経て、清浄なスライドガラス上に細胞懸濁液を滴下し、空気乾燥

法により標本を作成した。スライド標本は、ギムザ液による染色あるいはrDNAプローブによるFISH (Fluorescence *in situ* hybridization) に供した。rDNAプローブとしては、ヒト5.8S+28SrDNA配列を用いた。

(5) 生殖細胞の観察と可視化

生検により得た生殖腺については、常法により固定し、組織切片とした後、HE染色を施し、光学顕微鏡観察に供した。精子について走査型電子顕微鏡 (SEM)、透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察を行った。また、未受精卵、受精卵についても、超薄切片を作成し観察した。

始原生殖細胞の可視化のため、植物極半球にGFP-zebrafishにGFP-zebrafish *nos1* 3' UTR mRNAを顕微注入し、蛍光実体顕微鏡で観察した。また、FITC-Biotin dextranによる始原生殖細胞可視化についても同様におこなった。

(6) 遺伝マーカーの探索

既報のマイクロサテライトDNAマーカーについてPCR用プライマーを得て、増幅条件の最適化をはかるとともに、多型の存否を確認した。

4. 研究成果

(1) ゲノムサイズ変異

チョウザメ目魚類10種、ミカドチョウザメおよびカルーガ (ダウリアチョウザメ) の人工繁殖子孫、さらに、これら2種と人為交雑種ベステル (オオチョウザメ \times コチョウザメ) を親魚とした交雑種子孫、さらに、ロシアチョウザメとミカドチョウザメ交雑子孫、自然雑種カラム (カルーガ \times アムールチョウザメ) の戻し交配 (カラム \times アムールチョウザメ) についてフローサイトメトリー法により、体細胞核あたりのDNA量を測定した。

その結果、調査したチョウザメ目魚類は、進化的な二倍体 (体細胞核DNA量約3-4pg) と四倍体 (8-9pg) のグループに分けられた。ミカドチョウザメとカルーガは約8-9pgのDNA量を示したことから、既報の結果とは異なり、いずれも四倍体グループの種と判断された。

コチョウザメ、シベリアチョウザメ、シロチョウザメ、交雑種ベステルの標本では、他の個体の約1.5倍のDNA量を持つ個体が少数見られた。他の個体を遺伝的な二倍体とすると、これらは遺伝的な三倍体と判断される。

人工繁殖 (2008) による進化的四倍体種ミカドチョウザメの子孫では、遺伝的な二倍体 (8-9pg) 53%以外に、三倍体 (13-14pg) が45%、四倍体 (18pg) が2%生じた。同様の倍数体子孫の出現は、カルーガ純粋種、ミカ

ド×カルーガ、ミカド×ベステルにおいても生じた。同様に、自然交雑種カラム（カルーガ×アムール）×アムールチョウザメ戻し交配群においても、遺伝的二倍体（＝進化的四倍体 8pg）が殆どであったが、遺伝的三倍体（約 13pg）が 5%（4/79）生じた。以上のように、チョウザメ類では現在も倍数性変異が種内で生じていることが示唆された。

ロシアチョウザメ成魚では、4pg を示す個体と 8pg を示す個体が 1 尾ずつ見られた。ロシアチョウザメ×ミカドチョウザメ子孫のほとんど（55/56 個体）が 9pg を示すが、1 個体 4pg を示し外観も正常な子孫が得られた。従って、倍数性変異はゲノムサイズを少なくする方向にも生じている可能性が示された。

（2）倍数性変異の分子細胞遺伝学的証明

ミカドチョウザメ人工繁殖遺伝的二倍体および三倍体子孫について、染色体標本を作成し、コンベンショナルなギムザ染色による観察に加え、rDNA をプローブとした FISH を行った。

その結果、遺伝的二倍体では $2n=268$ の分裂像が見られ、この染色体数から、進化的四倍体グループであることが確認された。遺伝的二倍体の核型分析の結果、中部着糸型（M 型）あるいは次中部着糸型（SM 型）染色体 80 本、端部着糸型（T 型）染色体 48 本、微小染色体（マイクロクロゾーム）140 本から構成されることが判明した。遺伝的三倍体の核型は M・SM 型 120 本、T 型 72 本、微小染色体 210 本から構成されていた。rDNA をプローブとした FISH により、二倍体では最大 18、三倍体では最大 27 のシグナルを検出した。

以上の結果のように、ミカドチョウザメの遺伝的三倍体は二倍体の 1.5 倍の染色体と FISH シグナルをもつことから、三倍体は 3 セットの相同染色体をもつこと、すなわち、倍数性を伴う染色体変異が現在生じていることが、フローサイトメトリーのみならず、細胞遺伝学的に確認された。

（3）ゲノムサイズと生殖能力

純粋種コチョウザメ三倍体、交雑種ベステル（オオチョウザメ×コチョウザメ）三倍体、交雑種ベステル×アムールチョウザメ、ロシアチョウザメ×ベステル、ベステル×カルーガは約 6pg の DNA 量を示し、これらの雄は全て生検により得た精巢の組織像から、可妊と判断された。一方、これらチョウザメ類の雌は周辺任期卵母細胞が見当たらないか、著しく少なく、不妊と判断された。

シロチョウザメの遺伝的二倍体、三倍体はそれぞれ 8pg、12pg のゲノムサイズを示すが、いずれも妊性を示した（三倍体雄は不明）。

以上のように生殖能力は交雑あるいは遺伝的三倍性とではなく、ゲノムサイズと関連

する可能性が示唆された。すなわち、チョウザメ類においては雑種、三倍体であっても、妊性が回復し、次世代作出が可能な場合が考えられた。

（4）生殖細胞の特性

倍加の原因としては、多精あるいは極体の自発的放出抑制、非還元配偶子形成が考えられる。これらの原因を探るため、始原生殖細胞、卵および精子の構造と機能を検討した。

ミカドチョウザメの精子について、まず、SEM、TEM による観察を行った結果、本種の精子は他のチョウザメ類と同様に先体（acrosome）を有し、中片には 6 個のミトコンドリアが見られた。しかし、本種の精子の鞭毛の持つ波動膜は他のチョウザメのそれ（0.5-0.7 μm ）と比べて、非常に幅が広がった（1.3 μm ）。

ベステル受精卵について TEM 観察を行ったところ、植物極側に電子密度の高い生殖質様の構造が確認できた。そこで、ここに GFP-zebrafish-nos1 3' UTR mRNA を顕微注入したところ、神経胚期までに GFP 標識細胞が出現した。これらは孵化期には卵黄伸長付近に形成される腸管上部に定着した。以上の結果は、チョウザメの始原生殖細胞は無尾両生類のように生殖質によって形成されることを示唆した。なお、FITC-Biotin dextran を顕微注入した場合も、始原生殖細胞を可視化できることが判明した。

（5）人工繁殖の改善

本研究の実施にはチョウザメ類の人為採卵、人工受精による、繁殖が重要であり、その効率化と最適化が急がれる。そこで、同一個体の卵濾胞を経時的に培養し、これに 17 α OHP を添加し、卵成熟能と排卵能を調べた。その結果、高い排卵能をもつ時期が採卵の最適期であることが判明した。

（6）遺伝学的解析

既報の多型的マイクロサテライト DNA マーカーのミカドチョウザメ、カルーガ等での最適化を試みたが、遺伝的な分離を追跡するために好適なマーカー選定には至らなかった。

（7）まとめと結論

フローサイトメトリーによる DNA 量（ゲノムサイズ）と染色体解析から、チョウザメ類では、現在においても倍数性の増減を含むゲノムサイズ変異が生じていることが明らかになった。さらに、種間の交雑種であっても、ゲノムサイズによっては妊性が示された。しかし倍加の機構や交雑種の妊性が「アポミキシス」に起因するか否かを結論するまでには至らなかった。しかし、生殖細胞の可視化等の操作法の基礎、人工繁殖の改善方法が明ら

かになり、本課題は今後の本格的な研究へと発展するための萌芽となった。

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 1 件)

① He Zhou, Takafumi Fujimoto, Shinji Adachi, Etsuro Yamaha, Katsutoshi Arai. Genome size variation estimated by flow cytometry in *Acipenser mikadoi*, *Huso dauricus* and other species of Acipenseriformes reared in Japan. Journal of Applied Ichthyology 27 巻 484-491 頁 (2011) 査読有
DOI: 10.1111/j.1439-0426.2010.01648.x

[学会発表] (計 11 件)

① 石原学(発表者)・徳井文平・安部智貴・山羽悦郎・木村志津雄・井尻成保・足立伸次. 卵成熟能および排卵能を指標としたチョウザメ類採卵時期の推定. 平成24年度日本水産学会春季大会. 2012年3月27日. 東京海洋大学(東京都)

② 齋藤大樹・後藤理恵・Psenicka Martin・川上優・足立伸次・荒井克俊・山羽悦郎(発表者). チョウザメ始原生殖細胞のFITC-biotin dextransによる可視化. 平成23年度日本水産学会秋季大会. 2011年9月29日. 長崎大学(長崎市)

③ Maritin Psenicka(発表者), Taiju Saito, Shinji Adachi, Katsutoshi Arai, Etsuro Yamaha. Isolation of sturgeon spermatogonia as material for biotechnological application. 3rd International Workshop on the Biology of Fish Gametes. 2011年9月7日、ブダペスト(ハンガリー).

④ Taiju Saito(発表者), Rie Goto, Martin Psenicka, Yutaka Kawakami, Shinji Adachi, Katsutoshi Arai, Etsuro Yamaha. Origin and migration of primordial germ cells in sturgeon. 3rd International Workshop on the Biology of Fish Gametes. 2011年9月7日、ブダペスト(ハンガリー).

⑤ 石原学(発表者)・安部智貴・山羽悦郎・木村志津雄・井尻成保・足立伸次. チョウザメの卵成熟能および排卵能の経時的変化. 平成23年度日本水産学会春季大会. 2011年3月29日. 東京海洋大学(東京都)

⑥ 齋藤大樹(発表者)・後藤理恵・Psenicka Martin・川上優・足立伸次・荒井克俊・山羽悦郎. チョウザメの始原生殖細胞の起源と移動. 平成23年度日本水産学会春季大会. 2011年3月28日. 東京海洋大学(東京都)

⑦ 周賀(発表者)・藤本貴史・足立伸次・山羽悦郎・荒井克俊. 二倍体および三倍体ミカドチョウザメ *Acipenser mikadoi* の核型とFISHによるrDNAの検出. 平成23年度日本水産学会春季大会. 2011年3月28日. 東京海洋大学(東京都)

⑧ Psenicka Martin(発表者)・足立伸次・山羽悦郎・荒井克俊. Ultrastructure of *Acipenser mikadoi* spermatozoa (ミカドチョウザメ精子の微細構造). 平成22年度日本水産学会秋季大会. 2010年9月22日. 京都大学(京都市)

⑨ 安部智貴(発表者)・石原学・山下勝正・申東煥・井尻成保・足立伸次. チョウザメの生体外卵成熟、排卵および発生誘導. 平成22年度日本水産学会春季大会. 2010年3月27日. 日本大学(藤沢市)

⑩ He Zhou(発表者)・Takafumi Fujimoto, Shinji Adachi, Etsuro Yamaha, Katsutoshi Arai. Diploid and polyploidy karyotypes observed in the progeny of artificially propagated Mikado sturgeon *Acipenser medirostris mikadoi*. 6th International Symposium on Sturgeons. 2009年10月26日-2009年10月29日. 武漢市(中国)

⑪ He Zhou(発表者)・Takafumi Fujimoto, Shinji Adachi, Etsuro Yamaha, Katsutoshi Arai. Genome size variation estimated by nuclear DNA content flow cytometry in ten sturgeon species and several interspecific hybrids reared in Japan. 6th International Symposium on Sturgeons. 2009年10月27日. 武漢市(中国)

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

足立 伸次 (ADACHI SHINJI)
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授
研究者番号：40231930

山羽 悦郎 (YAMAHA ETURO)
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