

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25712021

研究課題名(和文) 魚類の生殖細胞における異質なゲノム構成が配偶子形成に与える影響の解明

研究課題名(英文) Effects of genomic constitution in germ cell on gametogenesis in fish

研究代表者

藤本 貴史 (Fujimoto, Takafumi)

北海道大学・水産科学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10400003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,600,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム構成の異なるドジョウを人工交雑によって作出し、それらのゲノム構成と配偶子形成との関係を調査した。異質二倍体では雌では妊性が示唆され、雄では僅かに配偶子が形成された。異質三倍体においては雌では妊性が示唆されたのに対して、雄では強い不妊性が示された。オスでの不妊性は系統判別可能なプローブを用いた染色体解析の結果、相同染色体の対合に異常が生じていることが明らかとなり、系統間の染色体に遺伝的な違いがあることが示唆された。非還元配偶子形成に関するトランスクリプトーム解析では、非還元配偶子を形成するクローン系統において特異的に細胞分裂や細胞周期に関する遺伝子の発現に変動が見られた。

研究成果の概要(英文)：The effects of genomic constitution in germ cell on gametogenesis was studied using progeny, which were produced by artificial hybridization using loach derived from two genetically different groups and clonal line. Allodiploid males produced a small amount of haploid sperm and female suggested a fertility because of oocyte growth in the ovary. In allotriploids, males showed infertility due to the defect in meiosis, although females showed fertility as well as the allodiploid female. In the infertile allotriploid male, abnormal pairing in meiotic chromosomes were detected by Fluorescence in situ hybridization. Genomic in situ hybridization revealed genetic differences between chromosomes of the two groups. Transcriptome analysis based on RNA-seq to compare gene expressions between gonads with unreduced or reduced gametogenesis showed different expressing genes associated with cell division and cell cycle etc.

研究分野：魚類育種遺伝学

キーワード：減数分裂 クローン ゲノム構成 生殖細胞 染色体

1. 研究開始当初の背景

ゲノムは生物を構成する基本的な遺伝単位であり、その種に固有の遺伝子セットを一通り含んでいる。通常、脊椎動物では、雌雄の産する減数分裂を経た半数性の配偶子の受精により二倍性を回復し、遺伝的に多様な個体を形成する。しかし、一部の脊椎動物では、自然界において遺伝的に同一な配偶子を産し、クローン生殖することが知られている。魚類でもいくつかの魚種でこのような特殊な配偶子形成が確認されている。本邦ではコイ目魚類でこのような現象が発見され、特にドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* では、両性生殖する個体に混じって非還元卵から雌性発生によりクローン生殖する二倍体個体が見出されている (Morishima et al., 2002)。

本邦に分布するドジョウには遺伝的に大きく異なる系統 (ゲノム表記: AA, BB) が存在し (Morishima et al., 2008a)、クローン系統はこれらの系統間の雑種 (AB) を起源とするとされている (Yamada et al., 2015)。そして、クローン系統の雌では減数分裂前核内分裂によってゲノムを倍化した後、通常の減数分裂過程に入り、倍加時に生じた相同な姉妹染色体同士での対合による減数分裂を経て二倍性の非還元卵を形成する (Itono et al., 2007)。クローン系統と同様のゲノム構成を有する系統間雑種においても一部の個体では非還元卵形成が生じる (Arias-Rodriguez et al., 2009)。

一方、三倍体は一般的に不妊とされているが、ドジョウでは三倍体を構成するゲノム組成や雌雄によって妊性は変わりうる。同質三倍体では雌雄ともに不妊性を示すが、クローン系統と他系統との交雑によって生じるクローン由来三倍体 (AB+A/B) では、雄は不妊であるが、雌では3つのゲノムのうち、親和性の低い1つのゲノムを排除し、残ったゲノムで通常の減数分裂を行う減数分裂雑種発生の生殖様式を示す (Morishima et al., 2008b)。

このようなドジョウで観察されるゲノム構成の違いに起因する様々な配偶子形成について、現象としては報告されているものの、体系的に家系を樹立して比較した研究は少なく、染色体レベルでの系統間比較、遺伝子発現解析などは行われておらず、詳細なメカニズムについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では生殖細胞のゲノム構成が生殖特性に与える影響を明らかにすることを目的とし、(1)ゲノム構成と配偶子形成の関係を調査する。(2)減数分裂過程における染色体の挙動を明らかにするための系統間の染色体識別法を開発する。(3)トランスクリプトーム解析によりクローン系統におけるゲノム倍加関連遺伝子を探索する。

3. 研究の方法

(1) 親魚の準備

B系統とクローン系統のドジョウ、ならびにカラドジョウ *Misgurnus mizolepis* は北海道大学水産学部先端環境制御実験棟において継代飼育されている個体を人為環境下で成熟誘起し、親魚として使用した。一方、A系統ドジョウは2013年と2015年に北海道北部より採取した個体を北海道大学水産学部を持ち帰り、親魚として使用した。

(2) 様々なゲノム構成の家系の誘起

人工交配

採卵・採精の前日に成熟した親魚にhCGを注射することによって人為的に排卵・排精を促し、常法による人工授精に供した。

同質二倍体と異質二倍体

同質二倍体 (BB) はB系統の雌雄を交配することにより作出した。異質二倍体はB系統の雌とA系統の雄、カラドジョウ (ゲノム表記: M) の雄との間で人工授精し、ゲノム構成がBAとBMの異質二倍体を作出した。

同質三倍体と異質三倍体

同質三倍体 (BBB) はB系統の雌雄から得られた卵と精子を人工授精し、受精後に第二極体の放出を抑制することによって作出した。異質三倍体 (BBA) はB系統の卵にA系統の精子を人工授精し、受精後に第二極体の放出を阻止することによって作出した。またカラドジョウの精子を受精に用いることで、同様に、異種間での異質三倍体 (BBM) を作出した。

クローン二倍体とクローン由来三倍体

クローン二倍体 (AB) はクローン系統の卵に、紫外線照射によって遺伝的に不活性化したキンギョの精子を受精することによって作出した。一方、クローン由来三倍体の作出では、B系統の卵に、性転換処理したクローン二倍体雄の産する二倍性精子を受精することによって、クローン由来三倍体 (BAB) を誘起した。

(3) 倍数性判定

孵化仔魚では個体を、成魚の組織と生殖腺では一部を切り出し、核単離液による処理を行った後、それらを50 μ mメッシュで濾過し、DAPI溶液と混合することによって染色した。そして、フローサイトメーターにより、細胞核あたりの相対DNA量を分析することによって倍数性判定を行った。

(4) 組織学的解析

生殖腺の一部をブアン固定し、固定サンプルをパラフィン包埋もしくは、樹脂包埋した後、常法により切片を作製し、ヘマトキシリン-エオシン染色を施した後に観察に供した。

(5) 染色体標本作製と FISH, GISH

魚体、もしくは胚をコルヒチン処理後、魚体からは鰓、腎臓、生殖腺等の組織を取り出し、0.075M KCl による低調処理、カルノア氏液による固定を行い、細胞懸濁液をスライドグラス上に滴下し、空気乾燥法によって染色体標本作製した。作製した標本は、ギムザ液による染色、あるいは 5.8S+28S rDNA、ミニサテライトをプローブとした Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)、A 系統もしくは B 系統をプローブに用いた Genomic *in situ* hybridization (GISH) に供した。

(6) 系統解析

実験に用いた全ての個体を対象に、常法により組織から抽出した DNA を用いて、mtDNA 調節領域と RAG1 遺伝子の多型解析により A 系統、B 系統、クローン系統の判別を実施した。

(7) トランスクリプトーム解析

A 系統、B 系統、クローン系統の卵巣と精巣から全 RNA を抽出・精製後、個体毎にライブラリを作成し Illumina HiSeq2000 を用いて 100bp ペアエンドシーケンスを行い約 4Gb/個体のデータを得た。得られたリードは CLC Genomics Workbench を用いて *de novo* アセンブリに供し、300bp 以上で cDNA 配列 (コンティグ) を卵巣と精巣で構築した。その後、これらのコンティグに対し各個体のリードをマッピングし、各 cDNA の発現量を解析した後、発現差を示したコンティグの抽出を行った。それらのコンティグに関しては BLAST 解析を行い、BLAST2GO を用いた Gene Ontology 解析を行った。

4. 研究成果

(1) ゲノム構成と配偶子形成の関係

同質二倍体と異質二倍体

同質二倍体 (BB)、異質二倍体 (系統間雑種二倍体 (BA)、種間雑種二倍体 (BM)) の雄個体では、BB と BA から精子が得られ、それらの倍数性半数性を示した。精巣構成細胞の倍数性調査では、BB は半数精細胞が多くを占め、二倍性細胞が少量検出された。一方、BA と BM では二倍性細胞が最も多く検出され、次に四倍性細胞もしくは半数性細胞が検出された。半数精細胞が比較的多く検出された個体においてもその存在比は BB と異なり、大部分を占めることは無かった。組織学的解析からもこの結果を支持し、BB では精子が多数観察されたのに対して、BA、BM では精母細胞が多く存在し、精子と精細胞は多く観察されなかった。

一方、雌では BB の卵巣では卵黄形成が進んだ卵母細胞が多く存在したのに対して、BA と BM の卵巣ではごく僅かに卵黄形成期の卵母細胞が観察されたものの、ほとんどは卵黄形成期には進んでいなかった。

以上より、異質二倍体の雄では多くは精母細胞のままではあるが僅かに半数性の精子を作出することが示された。また、雌では一部の卵が発達する可能性が示唆された。

同質三倍体と異質三倍体

同質三倍体 (BBB) と異質三倍体 (系統間雑種三倍体 (BBA)、種間雑種三倍体 (BBM)) の雄個体では BBB と BBA から精子が得られ、BBB では異数性 (1.5n、4.5n)、三倍性、六倍性の倍数性を示す精子様細胞が検出され、BBA では六倍性のみが検出された。精巣構成細胞の倍数性では、BBB は、異数性 (1.5n)、三倍性、六倍性の細胞で構成されていたのに対して、BBA と BBM では三倍性と六倍性のみが検出された。組織学的解析においても、BBB では精細胞が観察されたが、BBA と BBM では精原細胞と精母細胞が大多数を占める組織像が観察された。

一方、雌では BBB では卵黄形成に至る卵母細胞は観察した中でごく僅かであった。しかしながら、BBA では卵黄形成期以降のステージに進んでいる卵母細胞が多数観察された。BBM では BBA より少ないが卵黄形成期以降のステージの卵母細胞が観察された。

以上より、同質三倍体の雄では減数分裂が進行し異数性 (1.5n) の精子が形成されたのに対して、異質三倍体の雄では六倍性のみであったことから、雄では異質三倍体が強い不妊性を示すことが示唆された。一方、雌では異質三倍体は妊性が示唆されたのに対して、同質三倍体では強い不妊性が示された。

クローン由来三倍体雌

クローン由来三倍体 (BAB) では親和性の低いゲノムを排除し、残ったゲノム間で減数分裂して卵形成を行う。このクローン由来三倍体の卵巣の初期発達過程を組織学的に観察したところ、孵化後 6 週以降に初期減数分裂期の細胞が多く観察され、10 週以降に卵黄形成期にある卵母細胞が観察された。この過程において、明瞭な核様物質の核外への放出や、細胞質内での残存は確認できなかった。しかしながら、卵原細胞での核面積を測定したところ、BAB では成長に伴って小型の核面積を示す細胞が検出された。同質二倍体 (BB) の卵原細胞と比較したところ、この細胞の核面積はほぼ同等であったことから、卵原細胞期でのゲノム排除が示唆された。また、一部の初期減数分裂期の卵母細胞には極端に大型化した細胞も認められた。クローン由来三倍体雌は、非還元三倍体卵を産することから、この大型細胞は非還元卵産出のもととなる細胞である可能性が示唆された。

(2) 減数分裂過程における染色体挙動

FISH 法による系統間染色体識別法の開発

ミニサテライトプローブを用いた FISH の結果、A 系統のドジョウ (AA) では $2n=50$ の全ての染色体で FISH シグナルが認められな

ったのに対して、B 系統のドジョウ(BB)では 50 本全ての染色体のセントロメア領域で強いシグナルが認められた。また、系統間雑種(BA)では 50 本の染色体のうち半数の 25 本でシグナルが認められた。以上のことから、これら 2 系統の染色体は分子細胞遺伝学的方法により識別することが可能となった。さらに、自然クローン二倍体(AB)においても 50 本の染色体のうち半数の 25 本でシグナルが認められたことからクローンも A 系統と B 系統に由来する染色体セットを持つことが明らかになった。この結果は、クローンが交雑起源であることを強く示唆する。

GISH 法による系統間染色体識別法の開発

A 系統、B 系統のそれぞれで GISH 法を行ったところ、A 系統(AA)では染色体の全領域で、B 系統(BB)ではセントロメア領域で強く染色された。また、系統間雑種(2n=50, BA)において GISH を行ったところ、各系統のプロープで特異的に染色体が染色され、いずれをプロープ DNA とした場合であってもそれぞれの系統由来の染色体を識別することは可能であると考えられた。自然クローン二倍体系統(2n=50, AB)では、どちらの系統をプロープ DNA に用いた場合でも約半数の染色体のセントロメア領域が強く染色された。以上の結果より、自然クローン系統は 2 つの異質ゲノムをあわせ持つことが示唆された。

B 系統通常二倍体、系統間雑種二倍体、クローン系統二倍体、クローン由来三倍体の精巣における減数分裂時の染色体挙動

二倍体の B 系統(BB)の減数分裂像では 25 本の二価染色体で構成され、全ての二価染色体でミニサテライトプロープのシグナルが 2 個ずつ合計 50 個検出された。クローン二倍体(AB)の減数分裂像は 50 本の二価染色体で構成され、半数である 25 本の二価染色体で ManDRA シグナルが 2 個ずつ合計 50 個検出され、各系統の染色体間で対合していることが示された。一方、系統間雑種二倍体(BA)の減数分裂像では 25 個のシグナルは観察されるものの、二価染色体と一価染色体が観察され、対合不全が認められた。クローン由来三倍体(ABA)の減数分裂像においても 25 個のシグナルは観察されるものの、二価染色体と一価染色体に加えて三価染色体が観察され、対合不全が認められた。不妊性を示すゲノム構成の個体では対合異常が生じていることが明らかとなった。

(3) トランスクリプトーム解析によるクローン系統におけるゲノム倍加関連遺伝子の探索

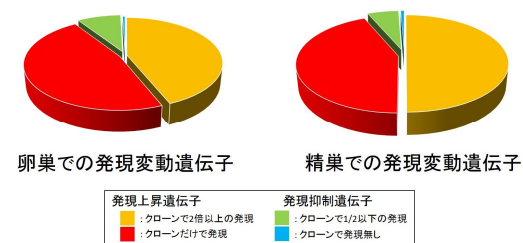
解析に供した雌の卵巣は、4 サンプルでは主に第一次成長期の卵母細胞で構成され、2 サンプルは卵黄形成期の卵母細胞を含んでいることが組織学的解析により確認された。*de novo* アセンブリの結果、合計約 2 億 5 千

万リードから、約 75,000 のコンティグ(N50 長: 759 b)が作成された。

一方、雄においては、精巣サンプルでは A 系統、B 系統では半数性の精子、クローン系統では二倍性の非還元精子の産出が倍数性解析によって確認された。組織学的解析ではクローン系統では両性生殖雄よりも大きな精原細胞が観察された。そして、*de novo* アセンブリの結果、合計約 2 億 9 千万リードから約 140,000 のコンティグ(N50 長: 597 bp)が構築された。

これらのコンティグの相同性検索の結果、卵巣、精巣から作成されたコンティグには生殖細胞特異的に発現している遺伝子や、減数分裂に関連する遺伝子の部分配列が得られ、卵巣と精巣における発現遺伝子のデータベースを構築することができた。

そして、発現量解析の結果、卵巣、精巣ともにクローン系統で特異的に発現変動を示すコンティグを特定することができた。それらの多くはクローン系統に特異的な発現もしくは両性生殖個体より 2 倍以上の発現上昇を示しており、発現抑制が起こっているコンティグは僅かであった。



これらのコンティグに対する BLAST 解析と Gene Ontology 解析の結果、その中の約半数にアノテーションが付き、その一部には細胞周期や細胞分裂に関連する遺伝子、染色体構造に関する遺伝子、繊毛運動に関する遺伝子が含まれることが明らかとなった。

引用文献

Arias-Rodriguez, L., Yasui, GS. and Arai, K. (2009) Disruption of normal meiosis in artificial inter-populational hybrid females of *Misgurnus loach*. *Genetica*, 136: 49-56

Itono, M., Okabayashi, N., Morishima, K., Fujimoto, T., Yoshikawa, H., Yamaha, E. and Arai, K. (2007) Cytological mechanisms of gynogenesis and sperm incorporation in unreduced diploid eggs of the clonal loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae). *Journal of Experimental Zoology*, 307A: 35-50

Morishima, K., Horie, S., Yamaha, E. and Arai, K. (2002) A cryptic clonal line of the loach *Misgurnus anguillicaudatus*

(Teleostei: Cobitidae) evidenced by induced gynogenesis, interspecific hybridization, microsatellite genotyping and multilocus DNA fingerprinting. *Zoological Science*, 19: 565-575

Morishima, K., Nakamura-Shiokawa, Y., Bando, E., Li, Y.J., Boroń, A., Khan, MMR. and Arai, K. (2008a) Cryptic clonal lineages and genetic diversity in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) inferred from nuclear and mitochondrial DNA analysis. *Genetica*, 132: 159-171

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

Yamada, A., Kodo, Y., Murakami, M., Kuroda, M., Aoki, T., Fujimoto, T. and Arai, K. (2015) Hybrid origin of gynogenetic clones and the introgression of their mitochondrial genome into sexual diploids through meiotic hybridogenesis in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Journal of Experimental Zoology*, 323A: 593-606

5. 主な発表論文等

[学会発表](計7件)

藤本貴史 (発表者)・長坂剛志・荒井克俊 . 「ドジョウ精巢のトランスクリプトーム解析による非還元配偶子形成関連遺伝子の探索」平成28年度日本水産学会春季大会 平成28年3月29日 東京海洋大学(東京都、港区)

Takafumi Fujimoto (発表者), Tsuyoshi Nagasaka, Takao Aoki, Katsutoshi Arai. "Isolating genes associated with clonal reproduction in clone loach using next generation sequencing" 5th International Workshop on the Biology of Fish Gametes. 平成27年9月10日 アンコーナ(イタリア)

黒田真道 (発表者)・村上賢・藤本貴史・荒井克俊 . 「Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法によるクローンと不妊雑種ドジョウの減数分裂時の染色体挙動の検証」平成27年度日本水産学会春季大会 平成27年3月28日 東京海洋大学(東京都、港区)

黒田真道 (発表者)・藤本貴史・荒井克俊 . 「Genomic in situ hybridization (GISH) 法によるクローンドジョウの異質ゲノム構成の検証」平成27年度日本水産学会春季大

会 平成27年3月28日 東京海洋大学 (東京都、港区)

藤本貴史 (発表者)・青木貴生・荒井克俊 . 「非還元卵形成関連遺伝子の探索に向けたドジョウ卵巣のトランスクリプトーム解析」平成27年度日本水産学会春季大会 平成27年3月28日 東京海洋大学(東京都、港区)

青木貴生 (発表者)・藤本貴史・山羽悦郎・荒井克俊 . 「自然クローンドジョウ非還元卵の精子核の取り込み」平成26年度日本水産学会北海道支部大会 平成26年12月19日 函館市国際水産・海洋総合研究センター(北海道、函館市)

黒田真道 (発表者)・村上賢・藤本貴史・荒井克俊 . 「反復配列をプローブとした FISH による染色体識別とクローンドジョウの雑種起源解明」平成26年度日本水産学会秋季大会 福岡 平成26年9月21日 九州大学(福岡県、福岡市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

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