

学位論文題名

Genetic studies on polyploid variations of sturgeon species and hybrids

(チョウザメ類とその雑種の倍数性変異に関する遺伝学的研究)

学位論文内容の要旨

チョウザメ類は原始的な体制をもつ生きた化石といわれる貴重な魚類である。そして、その卵は貴重な食材キャビアとして高額で取引されるため、各国で過度な漁獲が行なわれてきた。さらに、近年の産業化による生息環境の悪化も影響して、多くの種が絶滅あるいは絶滅の危惧に到っている。従って、保護と保全を目的とした人為的な種苗生産のみならず、養殖産業化も注目されている。希少なチョウザメ類資源の保護およびその復活、さらに、北方冷水域における養殖実現が水産科学上のゴールであるが、その実現のためにはチョウザメ類に関する基礎生物学的な知見の収集と集積が必要である。本研究は、チョウザメ類の生物学的特徴として、特に顕著な種間および種内の倍数性変異に注目して、その実態と起源について、遺伝学的研究を行った結果をとりまとめたものである。

チョウザメ類は染色体数および核 DNA 量から推定したゲノムサイズに基づいて、機能的な二倍体あるいは進化的な四倍体と考えられる A グループ（体細胞 DNA 量約 3.2-4.6 pg、染色体数約 120）、四倍体あるいは八倍体と考えられる B グループ（DNA 量約 6.1-9.6 pg、染色体数約 240）、および六倍体あるいは十二倍体と考えられる C グループ（DNA 量約 13.1-14.2 pg）の 3 群に大別される。しかし、過去の研究報告においては、同じ種であっても大きな相違が見られ、特に極東のミカドチョウザメ *Acipenser mikadoi*、カルーガ *Huso dauricus* のゲノムサイズについては研究者間で異論があった。しかし、本研究の基盤となる、博士前期課程までの結果をとりまとめた Zhou et al. (2011)により、これら二種はいずれも約 8-9 pg の DNA 量をもち、グループ B に属することが明らかにされた。さらに、いくつかのチョウザメ類の飼育個体、人工受精により生じたミカドチョウザメおよびその交雑種において、遺伝的な三倍体、四倍体が比較的高い頻度で出現することから、現在も倍数性変異が生じていることも明らかにされた。以上の事実は、チョウザメ類は倍数性変異の出現メカニズムやそれによる進化を研究するための好適なモデルであることを示すとともに、将来の養殖における倍数体育種の素材としても有望であることを示す。

本研究では、先ず現在飼育されているチョウザメ類の純粋種 5 種、カルーガ *H. dauricus*、アムールチョウザメ *A. schrenckii*、ミカドチョウザメ *A. mikadoi*、シロチョウザメ *A. transmontanus*、ロシア

チョウザメ *A. gueldenstaedtii* および複数組の交雑種、ならびに、これらの人工繁殖子孫において、できるだけ多数の標本について、DNA量フローサイトメトリー (FCM) を行なうことにより、ゲノムサイズに基づく倍数性を決定しようとした。特に Zhou et al. (2011)において、DNA量 4pg と 8pg を示す個体の両方が出現しグループが決定できなかったロシアチョウザメのグループ分けを行った。加えて、雑種を含めた飼育個体、人工繁殖個体における倍数性変異の出現状況を詳細に検討することにより、チョウザメ類の倍数性変異の実態を明らかにしようとした。

そこで、ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* (DNA量、2.53 pg) を標準対照標本として、フローサイトメーター (PA, Partec GmbH, ドイツ) により分析したところ、分析したカルーガ、アムールチョウザメ、ミカドチョウザメ、シロチョウザメ、ロシアチョウザメはいずれも 8-9 pg を示し、Bグループであった。ロシアチョウザメ成魚については 10 個体の測定結果は約 8 pg であり、本種は Bグループと判定した。しかし、交雑種ロシアチョウザメ雌 × ミカドチョウザメ雄の子孫 ($n=32$) には、ゲノムが半減した一個体(4 pg)が見られたことから、チョウザメ類においてはゲノムの倍加のみならず、減少も起こりうる可能性が示唆された。

人工受精から生じたミカドチョウザメの幼魚には、遺伝的三倍体が出現した(16.7%)。同様に交雑種カルーガ雌×ミカドチョウザメ雄、カルーガ雌×アムールチョウザメ雄、ベステルBester (ベルーガ *H. huso* 雌 × コチョウザメ *A. ruthenus* 雄) F1、F2、ベステル雌×カルーガ雄、カラムKalam (カルーガ×アムール) 雌×アムール雄のいずれにおいても、遺伝的三倍体の出現が1.4-11.8%の率で見られた。以上のように、純粋種および交雑種子孫に倍数体が出現することから、現在においても倍数性変異がチョウザメ類に生じていることが再確認された。

紫外線(UV)照射精子による受精、および、圧力処理(PS)による第二極体放出阻止による染色体操作を行った。その結果、ベステル×シロチョウザメの交配後、圧力処理を行った群より生じた子孫(ベステル×シロチョウザメ/PS)からは三倍体が、カラム卵のベステル由来UV精子による受精から生じた子孫(カラム×ベステル/UV)からは雌性発生半数体、そして、カラム卵をベステル由来UV精子で受精後、圧力処理を行った群より生じた子孫(カラム×ベステル/UV・PS)からは雌性発生二倍体が生じた。三倍体、雌性発生半数体および雌性発生二倍体の作出はDNA量の測定から確認した。また、雌性発生を確認するために、複数のプライマーによるRAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)-PCRを行った。その結果、カラム×ベステル/UV・PSおよびカラム×ベステル/UVは、母系ゲノムのみで発生していることが示された。以上の結果は染色体操作技術がチョウザメ類の育種のため、今後利用可能であることを示す。

次に、DNA量に基づく倍数性を細胞遺伝学的に確認するために、予め倍数性判定を行ったミカドチョウザメの遺伝的二倍体 (約8-9 pg) と三倍体 (約12 pg) 仔魚にコルヒチン処理(0.0025%、6 時間)、

低張処理(0.075M KCl, 30分)、カルノア固定を施し、空気乾燥法で染色体標本を作成し、ギムザ染色の後、顕微鏡観察と核型分析に供した。その結果、ミカドチョウザメの中期分裂像には250-272の染色体が見られた。多数の微小染色体の存在により正確な計数は著しく困難であったが、最も良好な分裂像について、核型分析を行ったところ、二倍体 ($2n=268$) の核型は80M/SM (中部/次中部着系型染色体) + 48T (端部着系型染色体) + 140m (微小染色体) の構成であった。遺伝的に三倍体と考えられる標本は360・402の染色体数を示し、最も良好な分裂像からの核型は120M/SM + 72T + 210mであった。以上の結果はDNA量から遺伝的三倍体と考えられる個体は、同種の遺伝的二倍体の1.5倍の染色体要素、すなわち、3セットの相同染色体をもつことを示した。

さらに、ヒト由来5.8S・28SrDNA配列をプローブとしてFISH (fluorescence *in situ* hybridization)を二倍体の50分裂像、三倍体の20分裂像について行ったところ、前者では最大18、後者では27のシグナルが見られた。以上の結果はDNA量から遺伝的三倍体と考えられる個体は、相同染色体を3セットもつことを支持した。

最後にマイクロサテライトDNAマーカー分析を用いて倍数性を推定することにした。Fontana et al. (2008)はチョウザメ類の三グループを二倍体、四倍体、六倍体、Blackledge and Bidwell (1993)は四倍体、八倍体、十二倍体と考えている。しかし、現在まで、これらのどちらが妥当であるか確証は得られなかった。そこで、本研究ではマイクロサテライトDNAマーカー座あたりの最大アレル数から相同染色体数を推定し、倍数性を確認しようとした。

材料として、Aグループよりホシチョウザメ *A. stellatus*, コチョウザメ, 雑種ベステルの3種、Bグループよりカルーガ、アムールチョウザメ、ミカドチョウザメ、ロシアチョウザメ、シベリアチョウザメ *A. baerii*の5種のチョウザメを選び、これらよりゲノムDNAを抽出、精製した。そして、チョウザメ科魚類において配列が報告されている24プライマーセット(May et al., 1997; Welsh et al., 2003; McQuown et al., 2000; Rozen and Skaletsky, 1996; Henderson-Arzapalo and King, 2002)について、PCR増幅が可能で多型性があるか否かを検討した。その結果、21セットは全ての種でPCR増幅ができることが判明した。しかし、Atr1173、LS-54による増幅は一部の種に限られ、Spl27では増幅がみられなかった。

通常、硬骨魚類では、ヘテロ接合体であっても、2つのアレルが見られるのみであったが、チョウザメ類では多数のアレルが検出された。個体あたり座あたりの最大アレル数を見ると、Aグループのチョウザメは最大4、Bグループは8であった。これらの結果からAグループは四倍体、Bグループは八倍体であることが推定された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 足 立 伸 次
副 査 教 授 荒 井 克 俊
副 査 准教授 藤 本 貴 史
副 査 教 授 山 羽 悦 郎 (北方生物圏フィールド科学センター)

学位論文題名

Genetic studies on polyploid variations of sturgeon species and hybrids

(チョウザメ類とその雑種の倍数性変異に関する遺伝学的研究)

チョウザメ類は原始的な体制をもつ生きた化石といわれる貴重な魚類である。そして、その卵は貴重な食材キャビアとして高額で取引されるため、各国で過度な漁獲が行なわれてきた。さらに、近年の産業化による生息環境の悪化も影響して、多くの種が絶滅あるいは絶滅の危機に到っている。従って、保護と保全を目的とした人為的な種苗生産のみならず、養殖産業化も注目されている。希少なチョウザメ類資源の保護およびその復活、さらに、北方冷水域における養殖実現が水産科学上のゴールであるが、その実現のためにはチョウザメ類に関する基礎生物学的な知見の収集と集積が必要である。本研究は、チョウザメ類の生物学的特徴として、特に顕著な種間および種内の倍数性変異に注目して、その実態と起源について、遺伝学的研究を行い、以下の評価すべき成果を得た。

(1) チョウザメ類は染色体数および核 DNA 量から推定したゲノムサイズに基づいて、A グループ (体細胞 DNA 量約 3.2-4.6 pg, 染色体数約 120)、B グループ (DNA 量約 6.1-9.6 pg, 染色体数約 240)、C グループ (DNA 量約 13.1-14.2 pg, 染色体数 372) の 3 群に大別されるが、過去の報告では、同じ種であっても大きな相違が見られ、極東のミカドチョウザメ *Acipenser mikadoi*、カルーガ *Huso dauricus* のゲノムサイズについては異論があった。しかし、本研究の基盤となる、博士前期課程までの結果をとりまとめた Zhou et al. (2011)により、これら二種はいずれも約 8-9 pg の DNA 量を持ち、グループ B に属すること、いくつかのチョウザメ類の飼育個体、人工受精により生じたミカドチョウザメおよびその交雑種において、遺伝的な三倍体、四倍体が比較的高い頻度で出現することが明らかにされた。本研究では、以上の結果をさらに確認するため、現在飼育されているチョウザメ類純粋種 5 種、カルーガ *H. dauricus*、アムールチョウザメ *A. schrenckii*、ミカドチョウザメ *A. mikadoi*、シロチョウザメ *A. transmontanus*、ロシアチョウザメ *A. gueldenstaedtii* および複数組の交雑種、ならびに、これらの人工繁殖子孫において、DNA 量フローサイトメトリー

(FCM) により、チョウザメ類の倍数性変異の実態を明らかにしようとした。ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* (DNA 量、2.53 pg) を標準対照標本として、フローサイトメーター (PA, Partec GmbH, ドイツ) により分析したところ、カルーガ、アムールチョウザメ、ミカドチョウザメ、シロチョウザメ、ロシアチョウザメはいずれも 8-9 pg を示し、B グループであった。ロシアチョウザメ成魚 10 個体の測定結果は約 8 pg であり、本種は B グループと判定した。

人工受精から生じたミカドチョウザメの幼魚には、遺伝的三倍体が出現した (16.7%)。同様に交雑種カルーガ雌×ミカドチョウザメ雄、カルーガ雌×アムールチョウザメ雄、ベステル Bester (ペルーガ *H. huso* 雌 × コチョウザメ *A. ruthenus* 雄) F1、F2、ベステル雌×カルーガ雄、カラム Kalam (カルーガ×アムール) 雌×アムール雄のいずれにおいても、遺伝的三倍体の出現が 1.4-11.8% の率で見られた。しかし、交雑種ロシアチョウザメ雌 × ミカドチョウザメ雄の子孫 ($n=32$) には、ゲノムが半減した一個体 (4 pg) が見られたことから、チョウザメ類においてはゲノムの倍加のみならず、減少も起こりうる可能性が示唆された。以上のように、純粋種および交雑種子孫に倍数体やゲノム半減個体が出現することから、現在においても倍数性変異がチョウザメ類に生じていることが再確認された。

紫外線照射 (UV) 精子による受精、および、圧力処理 (PS) による第二極体放出阻止による染色体操作を行った。その結果、ベステル×シロチョウザメの交配後、圧力処理を行った群より生じた子孫 (ベステル×シロチョウザメ/PS) からは三倍体が、カラム卵のベステル由来 UV 精子による受精から生じた子孫 (カラム×ベステル/UV) からは雌性発生半数体、そして、カラム卵をベステル由来 UV 精子で受精後、圧力処理を行った群より生じた子孫 (カラム×ベステル/UV・PS) からは雌性発生二倍体が生じた。三倍体、雌性発生半数体および雌性発生二倍体の作出は DNA 量の測定から、雌性発生は複数のプライマーによる RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)・PCR により確認した。その結果、カラム×ベステル/UV・PS およびカラム×ベステル/UV は、母系ゲノムのみで発生していることが示された。以上の結果は染色体操作技術がチョウザメ類の育種のため、今後利用可能であることを示した。

(2) DNA 量に基づく倍数性を細胞遺伝学的に確認するために、予め倍数性判定を行ったミカドチョウザメの遺伝的二倍体 (約 8-9 pg) と三倍体 (約 12 pg) 仔魚にコルヒチン処理 (0.0025%、6 時間)、低張処理 (0.075M KCl、30分)、カルノア固定を施し、空気乾燥法で染色体標本作製し、ギムザ染色の後、顕微鏡観察と核型分析に供した。その結果、ミカドチョウザメの中期分裂像には 250-272 の染色体が見られた。多数の微小染色体の存在により正確な計数は著しく困難であったが、最も良好な分裂像について、核型分析を行ったところ、二

倍体 ($2n=268$) の核型は80M/SM (中部/次中部着系型染色体) + 48T (端部着系型染色体) + 140m (微小染色体) の構成であった。遺伝的に三倍体を考えられる標本は360-402の染色体数を示し、最も良好な分裂像からの核型は120M/SM + 72T + 210mであった。以上の結果はDNA量から遺伝的三倍体を考えられる個体は、同種の遺伝的二倍体の1.5倍の染色体要素、すなわち、3セットの相同染色体をもつことを示した。

さらに、ヒト由来5.8S-28SrDNA配列をプローブとしてFISH (fluorescence *in situ* hybridization) を二倍体の50分裂像、三倍体の20分裂像について行ったところ、前者では最大18、後者では27のシグナルが見られた。以上の結果はDNA量から遺伝的三倍体と考えられる個体は、相同染色体を3セットもつことを支持した。

(3) 前述したチョウザメ類の三つグループを二倍体、四倍体、六倍体と考えている研究者と、四倍体、八倍体、十二倍体と考えている研究者がおり、いずれが妥当であるか結論は得られていない。そこで、マイクロサテライトDNAマーカー座あたりの最大アレル数から相同染色体数を推定し、倍数性を確認しようとした。

材料として、Aグループよりホシチョウザメ *A. stellatus*, コチョウザメ, 雑種ベステルの3種、Bグループよりカルーガ、アムール、ミカドチョウザメ、ロシアチョウザメ、シベリアチョウザメ *A. baerii* の5種のチョウザメを選び、これらよりゲノムDNAを抽出、精製した。そして、チョウザメ類魚類において配列が報告されている24プライマーセットについて、PCR増幅が可能で多型性があるか否かを検討した。その結果、21セットは全ての種でPCR増幅ができることが判明した。しかし、Atr1173、LS-54による増幅は一部の種に限られ、Spl27では増幅がみられなかった。

通常、硬骨魚類では、ヘテロ接合体であっても、2つのアレルが見られるのみであったが、チョウザメ類では多数のアレルが検出された。個体あたり座あたりの最大アレル数を見ると、Aグループのチョウザメは最大4、Bグループは8であった。これらの結果からAグループは四倍体、Bグループは八倍体であることが推定された。

申請者による以上の研究成果は、チョウザメ類野生集団の保全および養殖集団の育種に寄与する、基礎生物学および水産科学上重要な成果と評価でき、審査員一同は、申請者が博士 (水産科学) の学位を授与される資格のあるものと判定した。