

氏名(本籍)	高瀬 有加里
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第100号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	ゲノムの比較分析による自然クローン繁殖系フナ (<i>Carassius auratus langsdorfi</i>) の遺伝学的特徴
論文審査委員	(主査) 有 嶋 和 義 (副査) 浅 利 昌 男 西 田 利 穂 村 上 賢 藤 谷 英 男 (本学名誉教授)

論文内容の要旨

雌性生殖 (gynogenesis) は、卵成熟過程において減数分裂をすることなしに卵を形成し、胚の発生に精子の刺激を必要とするものの、その精子核ゲノムと卵は融合しない。そのため、子供は母親と遺伝的に同一で、クローン発生といえる。雌性生殖は単性生殖のひとつであり、精子を必要とせずに胚が発生する単為生殖 (parthenogenesis) や、卵成熟過程において、片方の親由来のゲノムのみが排除され、通常受精を行って発生する雑種発生 (hybridogenesis) と異なる。

1932年にHubbsらによって、Amazon Molly (*Poecilia formosa*) が雌性生殖を行う魚として最初に発見され、それ以降、世界中には約17種類の雌性生殖を行う魚がいると言われている。そのうち、日本には3倍性ギンブナ (*Carassius auratus langsdorfi*) とドジョウ科の一部が棲息しているにすぎない。このような生殖機構は脊椎動物では大変珍しく、通常の有性生殖を理解する上で、その細胞学的、遺伝学的解明に関心がもたれる。ギンブナには雌性生殖を行う3倍性個体以外に、有性生殖を行う2倍体個体も存在する。したがって、ギンブナは雌性生殖機構と有性生殖機構を比較するのに適したモデルとなる。本研究では、雌性生殖機構の解明を目指す一環として、3倍性ギンブナゲノムの遺伝学的特徴を調べるため、以下の2つのアプローチを行った。

第一章 キンギョ (和金: *Carassius auratus auratus*) のミトコンドリアDNAの全塩基配列決定および日本産フナと大陸産フナの系統学的関係について

日本のギンブナ (*C. a. langsdorfi*) は、コイ Cyprinidae 科コイ Cyprininae 亜科 *Carassius auratus* に属し、この中にはギンブナの他に4つの亜種、ゲンゴロウブナ (*C. a. cuvieri*)、ナガブナ (*C. a. burgeri*)、

ニゴロブナ (*C. a. grandoculis*)、キンブナ (*C. a. subsp.*) が存在する。またユーラシア大陸にはギベリオブナ (*C. a. gibelio*) が、中国には中国普通鮠 (*C. a. auratus*) が知られている。

本研究では、中国普通鮠を祖先とされているキンギョ (和金: *C. a. auratus*) のミトコンドリアDNA (以下 mtDNA) の全塩基配列を決定し、既に報告されている3倍性ギンブナ、ゲンゴロウブナの mtDNA の全塩基配列と比較することから、その系統学的関係を明確にした。3倍性ギンブナ、ゲンゴロウブナの mtDNA の塩基配列からキンギョの全 mtDNA を増幅する 11 種類のプライマーを設定した。続いて、プライマーウォーキング法により、40 種類のシーケンシング用プライマーを作製し、塩基配列の決定を行った。キンギョ mtDNA の全長は 16,580bp であり、その遺伝子構成は既報告のコイやゲンゴロウブナ、3倍性ギンブナのものと同じであった。各遺伝子コード領域の塩基配列をゲンゴロウブナ、3倍性ギンブナと比較した結果、キンギョはゲンゴロウブナより3倍性ギンブナに近いものであった。これは、以前に報告されている D-loop 領域の解析による結果と一致した。mtDNA の遺伝子領域においても、3倍性ギンブナとキンギョの系統学的関係はゲンゴロウブナよりも近いものであることが示唆された。

また、日本産フナと大陸産フナの関係を詳細に調べた。日本産フナ 4 亜種、大陸産フナ 2 (亜) 種とキンギョ (和金と青文金) における mtDNA 上の NADH5 遺伝子とチトクローム b 遺伝子コード領域の塩基配列を用いて系統樹を作成した。その結果、オランダで採取されたフナが最初に分岐し、次にゲンゴロウブナが分かれ、その後、日本に分布しているその他の亜種と大陸に分布している亜種の 2 つに分岐した。さらに、大陸産フナはギベリオブナと中国普通鮠の 2 つのクラスターに分かれ、キンギョは中国普通鮠のクラスターに属した。これは、キンギョが中国普通鮠を祖先とするという説を支持するものである。日本の 3 倍性ギンブナは 2 倍体ギンブナを母系起源とし、一部はギベリオブナに遺伝的に近い大陸のフナ集団を母系起源とした。このことは、mtDNA の D-loop 領域の解析においても指摘されており、今回、遺伝子コード領域においても確認できた。

第二章 AFLP 解析による 3 倍性ギンブナに特異的なゲノムマーカーの探索

増幅断片長多型 (amplified fragment length polymorphism : AFLP) 解析を利用して、3倍性ギンブナを識別するゲノムマーカーの探索を行った。AFLP 解析は新しい DNA フィンガープリント法で、ゲノム DNA を制限酵素で切断し、その断片を PCR 法により選択的に増幅する。この方法を用いて、3倍性ギンブナ (3尾) と 2倍体ギンブナ (2尾) のゲノム DNA を比較し、3倍性ギンブナに特異的な DNA マーカーを探索した。得られたマーカーの存在を多くの個体について解析し、3倍性ギンブナのゲノム構成および起源について考察した。

AFLP 解析産物をポリアクリルアミドゲルによって電気泳動し、3倍性ギンブナに特有と思われる 14 種類の DNA 断片を得た。これらのクローニングを行って塩基配列を決定した。DNA データベースとの相同性検索の結果、その配列はどれも遺伝子コード領域を含まず、ゲノム DNA 上のジャンク (がら

くた) 配列と思われた。14種類の塩基配列に対して17対のプライマーを作製し、3倍性ギンブナ43尾、2倍体ギンブナ10尾、さらにギンブナ以外の日本産フナ4亜種、大陸産フナ2亜種とキンギョの計18尾についてPCRを行った。その結果、17対のプライマーのうちの、Y2-2プライマーとY2-16プライマーの2対のプライマーにおいて、3倍性ギンブナに特徴的な増幅産物が確認できた。

Y2-2プライマーによるPCRでは、多くの3倍性ギンブナにおいて300bpと350bpの2つのバンドが見られたのに対し、2倍体ギンブナは350bpバンド(1尾を除く)の、ギベリオブナは300bpバンドのそれぞれ単一のバンドであった。これらの塩基配列を解析したところ、3倍性ギンブナの300bpと350bpの2本のバンドは、それぞれギベリオブナの300bpバンドおよび2倍体ギンブナの350bpバンドと一致した。このことは、3倍性ギンブナの多くが、2倍体ギンブナとギベリオブナに由来するDNAから構成されていることを示唆した。また、ゲンゴロウブナ、ナガブナ、キンブナにも単一の300bpバンドが認められたが、ギベリオブナの300bpバンドとは塩基配列が異なっていた。一部の3倍性ギンブナは300bpのみのバンド、または350bpのみのバンドを示した。300bpバンドのみが見られた3倍性ギンブナは複数個体あり、ギベリオブナの300bpバンドと同一の配列である個体と、他の日本産フナの300bpバンドに近い配列を持つ個体が存在した。一方、350bpバンドのみが見られた3倍性ギンブナのバンドは2倍体ギンブナの350bpバンドと同一の配列であった。これらの事実は、3倍性ギンブナのゲノム起源が複数あることを示唆している。

Y2-16プライマーによるPCRにおいて、ほとんどの3倍性ギンブナは250bpバンドと270bpバンドの2つが見られ、一方、2倍体ギンブナは250bpバンドのみであり、ギベリオブナは260bpバンドと270bpバンドの2つが見られた。また、ゲンゴロウブナ、中国普通鮠は260bpバンドのみが認められ、キンブナでは増幅が見られなかった。それぞれのバンドの塩基配列を解析した結果、3倍性ギンブナの250bpバンドは2倍体ギンブナの250bpバンドと100%一致しており、270bpバンドはギベリオブナの270bpバンドと99.2%の相同性を持つものであった。したがって、3倍性ギンブナの多くは2倍体ギンブナとギベリオブナに由来するDNAを持つと考えられた。一部の3倍性ギンブナには260bpバンドのみを持つ個体が存在した。これには、ギベリオブナの260bpバンドと塩基配列が完全に一致している個体と、そうではない個体が存在した。ギベリオブナと同一の配列の260bpバンドのみが見られる3倍性ギンブナのゲノムは、ギベリオブナに由来すると考えられた。一方で、異なる配列の260bpバンドのみが見られる3倍性ギンブナは、ギベリオブナ以外のフナに由来することが示唆されたが、その起源について本研究で明らかにすることはできなかった。Y2-2プライマーによる結果と同様に、3倍性ギンブナの多起源が示された。

本研究でのmtDNAの遺伝子領域とAFLPマーカーによる解析から、国内の3倍性ギンブナの多くは2倍体ギンブナとギベリオブナの雑種起源であるとした説を支持した。この大多数を占める3倍性ギンブナ集団は、母性遺伝するmtDNAの解析から、母系起源は2倍体ギンブナであり、またAFLPマーカーの解析を組み合わせると、父系起源は大陸産のフナであるギベリオブナと考えられた。一方で、少

数ではあるが、母系起源および父系起源ともに、大陸産フナ（おそらくギベリオブナ）のみに由来する3倍性ギンブナも見られた。また2倍体ギンブナから産まれたと思われるものや、ギンブナ以外の日本産フナから産まれたと思われる3倍性ギンブナの存在も示唆された。その詳しい起源について本研究では明確にできなかった。このように、3倍性ギンブナの起源は単一ではなく複数あることが考えられる。

日本のほとんどの3倍性ギンブナがギベリオブナ由来のゲノムを保持しており、雌性生殖能とギベリオブナゲノムとの関係が重要であると思われる。今後は、ギベリオブナゲノムの詳細な解析と、3倍性ギンブナに特異的な数多くのゲノムマーカーを利用して、雌性生殖に関与するゲノム因子の探索を行なうことで、雌性生殖機構の解明に近付くのではないかとと思われる。

論文審査の結果の要旨

自然クローン繁殖の様式の一つとして雌性生殖（gynogenesis）がある。この雌性生殖は、卵成熟過程において減数分裂をすることなしに卵を形成し、また胚発生に精子の刺激を必要とするものの、その精子核ゲノムは排除され卵とは融合しないため、生まれた仔は母親と遺伝的に同一のクローンとなる繁殖様式である。この雌性生殖は、精子をまったく必要とせずに胚が発生する単為生殖（parthenogenesis）や、卵成熟過程において片方の親由来のゲノムのみが排除され、通常の受精を行って発生する雑種発生（hybridogenesis）とも異なる特殊な生殖様式である。

雌性生殖を行う魚として最初に発見されたAmazon Molly (*Poecilia formosa*) を代表として、世界中には約17種類の雌性生殖魚がいると言われている。そのうち日本には、本研究で対象としている3倍性ギンブナ (*Carassius auratus langsdorfi*) とドジョウ科の一部が棲息しているにすぎない。このような生殖様式をもつ脊椎動物は大変珍しく、通常の有性生殖を理解する上で、その細胞学的、遺伝学的解明に関心がもたれる。しかし、分子レベルでの詳細な解析はほとんど明らかになっていない。ギンブナには雌性生殖を行う3倍性個体以外に、有性生殖を行う2倍体個体も存在する。したがって、ギンブナは雌性生殖機構と有性生殖機構を比較する上で適したモデルであると言える。形態学的分類では、日本のギンブナは、コイ Cyprinidae 科コイ Cyprininae 亜科 *Carassius auratus* に属し、この中にはギンブナの他に4つの亜種、ゲンゴロウブナ (*C. a. cuvieri*)、ナガブナ (*C. a. burgeri*)、ニゴロブナ (*C. a. grandoculis*)、キンブナ (*C. a. subsp.*) が存在する。またユーラシア大陸にはギベリオブナ (*C. a. gibelio*)、中国には中国普通鮰 (*C. a. auratus*) の存在が知られている。

本研究は、雌性生殖さらには脊椎動物に普遍的な有性生殖の分子機構の解明を目指す一環として、雌性生殖系3倍性ギンブナと上述した他の有性生殖系フナ集団との相違をゲノムDNAに注目して探り、3倍性ギンブナを遺伝学的に特徴付けようと着手されたものである。ミトコンドリアDNA（以下 mtDNA）と核DNAの2つのゲノムからアプローチされており、本論文はこれらの2つの章から構成されている。

第1章では、先ず、中国普通鮠を祖先とすると言われ、これまでに報告されていなかったキンギョ（和名：*Carassius auratus auratus*）のミトコンドリアDNAの全塩基配列を初めて決定し、既に報告されている日本産の3倍性ギンブナ、ゲンゴロウブナのmtDNAの全塩基配列と比較することから、それらの系統学的関係を明確にした。新たに設定した11種類のプライマーセットを用いてキンギョの全mtDNA領域を増幅し、プライマーウォーキング法により塩基配列の決定を行った。キンギョmtDNAの全長は16,580bpであり、その遺伝子構成は既報告のコイやゲンゴロウブナ、3倍性ギンブナのものと同じであることを示した。各遺伝子コード領域の塩基配列をゲンゴロウブナ、3倍性ギンブナと比較した結果、キンギョはゲンゴロウブナより3倍性ギンブナに近いものであった。これは、以前に報告されているD-loop領域のみの解析結果と一致していた。このようにmtDNAの遺伝子領域においても、3倍性ギンブナとキンギョの系統学的関係はゲンゴロウブナよりも近いものであることを明らかにした。また、3倍性ギンブナを含む日本産フナと大陸産フナとの系統関係をより詳細に調べるため、日本産フナ4亜種、大陸産フナ2（亜）種とキンギョ（和名と青文金）を用いて、mtDNA上のNADH5遺伝子とチトクロームb遺伝子のコード領域の塩基配列に注目して分子系統樹を作成した。その結果、オランダで採取されたフナが最初に分岐し、次にゲンゴロウブナが分かれ、その後、日本に分布しているその他の亜種と大陸に分布している亜種の2つに分岐した。さらに、大陸産フナはギベリオブナと中国普通鮠の2つのクラスターに分かれた。この系統樹から日本の3倍性ギンブナの多くは2倍体ギンブナを母系起源とし、一部はギベリオブナに遺伝的に近い大陸のフナ集団を母系起源とすることを示した。このことは、mtDNAのD-loop領域の解析において指摘されていたことであったが、今回、遺伝子コード領域においても確認できた。また、キンギョは中国普通鮠のクラスターに属しており、キンギョが中国普通鮠を祖先とするという説をDNAから支持した。

第2章では、核ゲノムに注目して、3倍性ギンブナに特異的なゲノムマーカーを探るため、増幅断片長多型（amplified fragment length polymorphism : AFLP）解析を利用して、雌性生殖する3倍性ギンブナと有性生殖する2倍体ギンブナの核ゲノムDNAの比較を行った。AFLP解析は新しいDNAフィンガープリント法で、ゲノムDNAを制限酵素で切断し、その断片をPCR法により選択的に増幅し比較する方法である。核ゲノムは約20億塩基以上からなると考えられ、このような膨大なゲノム情報を比較することは容易なことではなく、特定の大きさのDNA断片に絞って比較できるAFLP法は有効であり、的確な選択と言える。本研究では、AFLP産物のポリアクリルアミドゲル電気泳動から3倍性ギンブナに特有と思われる14種類のDNA断片を得て、さらにクローニング、塩基配列決定、PCRによる確認作業を通して、3倍性ギンブナゲノムの由来やゲノム構成を考察する上で有用な2つのDNAマーカーを得ている。これらのマーカーは、論文中でY2-2プライマーによるDNA産物とY2-16プライマーによるDNA産物として表されている。

Y2-2プライマーによるDNA産物では、多くの3倍性ギンブナにおいて300bpと350bpの2つの電気泳動バンドが見られたのに対し、2倍体ギンブナは350bpバンドの、大陸産のギベリオブナは300bpバ

ンドのそれぞれ単一のバンドであった。これらのクローニングおよび塩基配列解析から、3倍性ギンブナの2本の電気泳動バンドは、それぞれギベリオブナの300bpバンドおよび2倍体ギンブナの350bpバンドと一致していることを示し、3倍性ギンブナの多くが、2倍体ギンブナとギベリオブナに由来するDNAから構成されていることを示唆した。一部の3倍性ギンブナには300bpのみのバンド、または350bpのみのバンドを示す個体も認められ、これらは、ギベリオブナのみ由来する個体やギンブナ以外の日本産フナ由来する個体が存在していることを示した。さらに、350bpバンドのみが見られた3倍性ギンブナは2倍体ギンブナ由来である可能性も指摘した。これらの事実は、3倍性ギンブナのゲノム起源が複数あることを示唆している。

Y2-16プライマーによるDNA産物では、ほとんどの3倍性ギンブナは250bpバンドと270bpバンドの2つが見られ、一方、2倍体ギンブナは250bpバンドのみであり、ギベリオブナは260bpバンドと270bpバンドの2つが見られた。また、ゲンゴロウブナと中国普通鮎には260bpバンドのみが認められ、ギンブナでは増幅が見られなかった。それぞれの電気泳動バンドの塩基配列を解析した結果、3倍性ギンブナの250bpバンドは2倍体ギンブナの250bpバンドと100%一致しており、270bpバンドはギベリオブナの270bpバンドと99.2%の相同性を持つものであった。したがって、3倍性ギンブナの多くは2倍体ギンブナとギベリオブナに由来するDNAを持つと考えられた。一部の3倍性ギンブナには260bpバンドのみを持つ個体が存在した。これには、ギベリオブナの260bpバンドと塩基配列が完全に一致している個体と、そうではない個体が存在した。ギベリオブナと同一の配列の260bpバンドのみが見られる3倍性ギンブナのゲノムは、ギベリオブナに由来すると考えられた。一方で、異なる配列の260bpバンドのみが見られる3倍性ギンブナは、ギベリオブナ以外のフナに由来することが示唆されたが、その起源について本研究で明らかにすることはできなかった。Y2-2プライマーによる結果と同様に、3倍性ギンブナの多起源が示された。

これまでに3倍性ギンブナは雑種多起源であることが推測されていたが、本研究で新規に発見された2つのAFLPマーカーの解析により、DNAレベルでの雌性生殖系3倍性ギンブナの多起源が支持された。さらに、その父系起源には大陸産のギベリオブナが大きく関与している可能性を指摘した。

以上、本研究において著者は相当数の比較ゲノム解析を実施することにより、脊椎動物において見られる自然クローン繁殖（雌性生殖）という特殊な生殖システムをもつ3倍性ギンブナのゲノム成分の由来とゲノム構成の一部を明らかにした。本研究の成果は、特殊な生殖様式だけでなく通常の有性生殖に関わる分子メカニズムの解明にも大きく貢献し、また今後の新たなクローン技術への礎にもなる基礎データとしても高く評価できることから、博士（獣医学）の学位を授与するのにふさわしい業績と判定した。