

報告番号	※ 第 号
------	-------

主論文の要旨

論文題目 Molecular cytogenetic studies on hybrid sterility and chromosome evolution in Anseriformes (カモ目における雑種不妊と染色体進化に関する分子細胞遺伝学的研究)

氏名 ISLAM Fhamida Binte

論文内容の要旨

人類は、古くから様々な家畜を用いて種間・属間交配をおこない、雑種強勢（ヘテロシス）効果を農業や生活の向上に役立ててきた。しかし、異なる種や属の間の雑種では、多くの場合、発育不全や不妊という現象が見られる。そして、この生殖後隔離は、種の分化や維持のための重要な遺伝的メカニズムのひとつである。この現象は両親の種の染色体やゲノム構造、あるいは遺伝子の違いによって生じるものと考えられているが、その詳細についてはまだほとんど不明である。本研究では、鳥類の雑種に見られる不妊現象の分子・細胞遺伝学的メカニズムを明らかにする目的で、成長が早く肉質も優れていることから東南アジア諸国において重要な経済動物となっている、アヒル (*Anas platyrhynchos*) とバリケン (*Cairina moschata*) の雑種（ドバン）に着目し、雑種雄における精子形成と減数分裂について、分子細胞遺伝学的手法を用いた解析をおこなった。また、カモ目における染色体の相同性や核型進化の過程を明らかにする目的で、アヒル、バリケン、ガチョウ (*Anser cygnoides*) の3種を対象に、FISH (Fluorescence in situ hybridization)を用いた比較染色体マッピングを実施して、これら3種間に生じた染色体構造変化を明らかにし、核型進化の過程について考察した。さらに、異種間のゲノム・染色体構造の違いを、染色体を構築する動原体ヘテロクロマチンの反復配列の進化の視点から明らかにし、減数分裂における染色体対合に及ぼす影響について調べた。

1) アヒルとバリケンの F₁ 雑種の雄性不妊に関する細胞遺伝学的解析

アヒル雌とバリケン雄の交配によって得られた F₁ 雑種の精巣組織切片の観察の結果、精巣上皮は正常に発達し精母細胞は存在するが、染色体が異常に凝縮した核を持つ第一精母細胞が大量に存在し、第二精母細胞ならびに精子細胞、精子は存在しなかった。精巣細胞の染色体標本を観察した結果、減数分裂はパキテン期までは正常に進

行するが、ほとんどはパキテン期で退縮し、移動期から第一減数分裂中期で退縮した細胞もわずかに観察された。そしてこれらの細胞はアポトーシスによって消失するため、染色体対合期以降の正常な減数分裂細胞は観察されなかった。これらの結果から、この F₁ 雑種では、染色体対合が阻害されることによって、染色体組換え、キアズマの形成、それに続く染色体の分離が正常に進行せず、主に染色体対合期以降に精子形成が停止することが示唆された。

アヒルとバリケン¹の体細胞で核型解析をおこなった結果、染色体数はともに 80 本であるが、2 種間で 1 番染色体と 2 番染色体の動原体の位置に違いが見られ、これらの染色体で逆位が生じた可能性が示唆された。また、5 番染色体のサイズに大きな違いが見られ、さらにアヒルの Z 染色体がもつサテライト腕がバリケンの Z 染色体には存在しなかった。これらの染色体構造の違いによって、第一減数分裂における染色体対合が阻害され、その結果、減数分裂が停止することによって第二減数分裂以降のステージの細胞が形成されず、不妊となる可能性が示唆された。

2) アヒル、バリケン、ガチョウ間の染色体相同性と核型進化に関する分子細胞遺伝学的解析

アヒルとバリケン¹の間では、1、2、5 番、Z 染色体で染色体の形態に違いが見られたが、ガチョウと比較した結果、アヒルとバリケンの 4 番染色体と Z 染色体がアクロセントリック型であるのに対し、ガチョウでは 4 番染色体がメタセントリック、Z 染色体がサブメタセントリックであった。ニワトリ染色体特異的 DNA プロブを用いて染色体ペインティングをおこなった結果、アヒル、バリケン、ガチョウ 3 種ともに 4 番染色体がアクロセントリック染色体とマイクロ染色体に分かれたが、その他の染色体はそれぞれニワトリの 1 対の染色体に対応し、3 種間で同じ遺伝連鎖群をもつことが分かった。FISH マッピングの結果、18S-28S リボソーム RNA 遺伝子のクラスターは、アヒルとバリケンでは 4 対、ガチョウでは 8 対のマイクロ染色体に存在した。また、バリケンとガチョウのマイクロ染色体では、染色体テロメアの繰り返し TTAGGG 配列がアヒルのそれらに比べて大きく増幅していた。さらに、ニワトリとアヒルの機能遺伝子 cDNA クローンを用いて、ニワトリ-アヒル-バリケン-ガチョウ間で 1、2、3、4 番、Z 染色体の比較染色体マッピングをおこない、これら 4 種間に生じた染色体構造変化について調べた。その結果、ニワトリとカモ目 3 種間で、1、2 番染色体に挟動原体逆位が、ガチョウと他の 3 種の間で、4 番染色体と Z 染色体で挟動原体逆位が存在することが判明した。また、アヒル-バリケン間では、1、2 番染色体の動原体の位置が異なるが遺伝子オーダーに違いが検出されなかったことから、挟動原体逆位が存在したとしても微小なものであることが予想された。これらの結果は、キジ目とカモ目における遺伝連鎖群は非常に保存的であり、同一染色体内の構造変化は低頻度で生じているが、異なる染色体間の構造変化はほとんど存在しないことを示している。

3) アヒルの動原体特異的反復配列の構造と進化に関する研究

染色体の動原体ヘテロクロマチンを構築する反復配列の構造とその進化過程を調べる目的で、アヒルのサテライト DNA のクローニングをおこなった。20 を超える制限酵素を用いてゲノム DNA を消化し、電気泳動によって高度反復配列のスクリーニングをおこなった結果、*HaeIII* の認識サイトをもち 190 bp を基本単位とする新規の高度反復配列 (AFL-*HaeIII*) が得られた。サザンブロットハイブリダイゼーションでラダー上のバンドが得られ、FISH 解析の結果、この反復配列が染色体の動原体に存在し動原体 C-ヘテロクロマチンの分布と一致することから、この反復配列はアヒルの major サテライト DNA であり、また、強いメチル化を受けていることも判明した。これまでに報告されているダチョウ目 2 種、キジ目 3 種から得られた動原体特異的反復配列はすべてマイクロ染色体特異的であり、染色体サイズ特異的な区画化が見られるが、アヒルの AFL-*HaeIII* はマクロ染色体とマイクロ染色体の両方に分布する新たなタイプの動原体反復配列であった。また、スロットブロットハイブリダイゼーションの結果、この配列は、カモ科 (バリケン、ガチョウ、ヒシクイ、オオハクチョウ) 特異的に存在し、他の目では検出されなかった。以上の結果は、アヒルから得られた AFL-*HaeIII* は、制限酵素サイトの保存性が高く、また塩基置換率の速いカモ目特異的な動原体反復配列であることを示している。また、マクロ-マイクロ染色体間で均質化が起こっていることから、カモ科鳥類の染色体では、動原体反復配列の染色体サイズ依存的な区画化が消失している可能性が示唆された。したがって、この反復配列はマイクロ染色体のゲノム構造の特異性 (高い遺伝子密度、GC 含量、組換え率) の起源とその進化過程を解明するうえで重要な情報を提供するものである。また、バリケンにおいても塩基配列の高い相同性が認められたことから、動原体反復配列がアヒル-バリケン間の F_1 雑種の減数分裂における染色体の対合異常の原因ではないことが示唆された。

以上のように、本研究では、分子細胞遺伝学的な手法を用いて、アヒルとバリケンの染色体構造の違いを明らかにした。そして、 F_1 雑種の不妊が、染色体構造の不適合性によって減数分裂の染色体対合に異常が生じ、減数分裂を停止した精母細胞のアポトーシスによって配偶子形成が停止することによって引き起こされることを明らかにした。また、比較染色体マッピングによって、キジ目ニワトリとカモ目 3 種間の染色体構造を比較し、染色体と遺伝連鎖群の保存性が非常に高いことを示すとともに、これらの種間で生じた核型進化の過程を明らかにした。さらに、カモ目鳥類の染色体の動原体を構築する新規反復配列を単離し、その塩基配列の進化速度が速いこと、そしてマクロ-マイクロ染色体間の染色体サイズ依存的な動原体反復配列の区画化がカモ目鳥類では消失している可能性を示した。本研究は、鳥類におけるゲノム・染色体の進化、そして、それにとまなう生殖後隔離と種の維持機構の解明に重要な情報を提供するものである。