

論文内容の要約

人類は、古くから様々な家畜を用いて種間・属間交配を行い、雑種強勢（ヘテロシス）効果によって有用な家畜を作出して農業に役立ててきた。しかし、異なる種や属間の雑種では、多くの場合、発育不全や不妊をともなう。このような生殖後隔離は、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。この現象は両親種の染色体・ゲノムの不適合性に起因すると考えられているが、その詳細はほとんど不明である。鳥類では、これまでにニワトリと様々なキジ目鳥類の間で雑種が得られているが、雑種の発育不全が顕著であり、稀に雄だけが生まれてくる場合が多い。カモ目（Anseriformes）カモ科（Anatidae）に属するアヒル（*Anas platyrhynchos*）とバリケン（*Cairina moschata*）は分岐年代が約 1,900 万年と比較的新しく、正逆交配で F₁ 雑種を得ることが可能であり、孵化個体は雌雄ともに生存する。アヒルとバリケンの F₁ 雑種は、成長が早く肉質も優れていることから、台湾や東南アジアでは重要な経済動物となっている。これらは雌雄ともに不妊であることがわかっているが、その原因については、1940 年代に行われた細胞学的な解析研究の報告があるだけで、詳細はほとんど不明のままである。

イスラム・ファミダ・ビンテは、鳥類の雑種に見られる不妊現象の遺伝的メカニズムを明らかにする目的で、アヒルとバリケンの雑種に着目し、雑種雄における精子形成と減数分裂について解析を行った。また、カモ目の染色体構造や核型進化を明らかにするために、アヒル、バリケン、ガチョウ（*Anser cygnoides*）を対象として、FISH (Fluorescence *in situ* hybridization)法を用いた比較染色体マッピングによってカモ目 3 種間ならびにニワトリーカモ目間に生じた染色体構造変化を調べ、カモ目における核型進化の過程について考察した。さらに、アヒルの動原体ヘテロクロマチンを構築する反復配列を単離してその構造と特徴を明らかにし、動原体ヘテロクロマチンが減数分裂時の染色体対合に及ぼす影響についても考察した。

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

ドバンの精巣の組織学的な解析の報告例は 1940 年代に存在するが、精子形成が停止する時期についての詳細な解析は行われておらず、その原因については不明のままである。また、核型に関する記載もあるが、2 種間の染色体の形態の違いについては詳細に調べられていない。本研究では、アヒル雌とバリケン雄の交配によって得られた F₁ 雑種の精巣を用いて、組織学、細胞学、細胞遺伝学的手法によって不妊となる要因の詳細な解析を行った。さらに、両親種とドバンの染色体核型を比較し、染色体の形態学的な違いが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。

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細胞、精子は存在しなかった。精巣細胞の染色体標本を作製し観察した結果、減数分裂はパキテン期までは正常に進行するが、第一精母細胞の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、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。

次に、アヒルとバリケンの繊維芽細胞から染色体標本を作製し核型解析を行った結果、染色体数はともに 80 本であるが、2 種間で 1 番染色体の動原体の位置に違いが見られ、バリケンの染色体に比べアヒルの染色体の短腕が長かった。また、アヒルの 3 番染色体はアクロセントリック型であるのに対し、バリケンでは小さな短腕が存在しテロセントリック型であった。また、アヒルの Z 染色体はサブテロセントリック型であるのに対し、バリケンの Z 染色体はアクロセントリック型であった。以上の結果から、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、減数分裂が第一精母細胞で停止し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

カモ目においては、アヒルで細胞遺伝学的染色体地図が作製され、他の鳥類との染色体相同性が比較されているが、他のカモ目鳥類ではまだ染色体地図は存在しない。そのため、キジカモ類 (Galloanserae) からキジ目 (Galliformes) とカモ目 (Anseriformes) が分岐した後の核型進化過程については、まだ十分な情報が得られていない。そこで、カモ目内及びキジ目-カモ目間の染色体相同性と核型進化の過程を明らかにするために、アヒル、バリケン、ガチョウの 3 種について、ニワトリ染色体特異的 DNA プローブを用いた比較染色体ペインティングを行い、ニワトリとカモ目 3 種の染色体相同性を調べた。次に、18S-28S リボソーム RNA 遺伝子、染色体テロメアの繰り返し TTAGGG 配列、そして 37 機能遺伝子の比較染色体マッピングによって染色体構造の詳細な比較を行った。

第 1 章で述べたように、アヒルとバリケンの間では 1 番染色体、3 番染色体、Z 染色体で形態の違いが見られたが、ガチョウの染色体と比較した結果、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型、Z 染色体がサブメタセントリック型であった。そして、アヒルとバリケンの W 染色体がアクロセントリック型であるのに対し、ガチョウの W 染色体はメタセントリック型であった。

ニワトリの 1-9 番染色体と Z 染色体特異的 DNA プローブを用いた染色体ペイ

ンティングでは、ニワトリ 4 番染色体がカモ目 3 種の 4 番染色体とマイクロ染色体に対応したことを除き、他の染色体は全てニワトリの 1 対の染色体に対応し、ニワトリ-カモ目 3 種間で同じ遺伝連鎖群をもつことが分かった。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マップされた。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。よって、アヒルとバリケンのマイクロ染色体における TTAGGG 配列のコピー数の違いが、雑種の減数分裂における染色体対合に何らかの障害を引き起こす可能性が考えられた。

さらに、ニワトリもしくはカモ目 3 種から得られた機能遺伝子 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 番染色体と Z 染色体の比較染色体マッピングを行い、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、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 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。アヒルの Z 染色体はアクロセントリック型であり、ニワトリ Z 染色体はメタセントリック型で動原体の位置は異なるが、マップされた 9 個の遺伝子 (*TMOD*, *CHD1*, *SPIN*, *NTRK2*, *RPS6*, *RCL1*, *HMGCS1*, *GHR*, *ATP5A1*) のオーダーに違いは見られなかった。鳥類の祖先型 Z 染色体がアクロセントリック型であったことを考慮すれば、本研究の結果は、ガンカモ類の祖先型 Z 染色体において、1) 動原体の移動が生じたか、あるいは 2) 祖先型の Z 染色体において *RCL1* と *HMGCS1* の間に切断が起こり挟動原体逆位が生じた後、動原体と *TMOD1* の間と *RCL1* と染色体末端の間で再度切断が起こり偏動原体逆位が生じたことによって、ニワトリ Z 染色体が形成されたことが推定された。さらに、アヒルにおける Z 染色体の遺伝子オーダーは、染色体の中央部に位置する *CHD1-SPIN-NTRK2* の遺伝子オーダーが逆転していることを除けば、ガチョウ目の Z 染色体のオーダーと一致することから、祖先型の鳥類 Z 染色体に偏動原体逆位が生じたものが *Galloanserae* の祖先型 Z 染色体であり、キジ目が分岐した後にニワトリ型 Z 染色体の構造変化が生じたことが示唆された。また、ガチョウの Z 染色体がメタセントリック型であり *TMOD* と *CHD1* 遺伝子が短腕に位置することから、カモ目が分岐した後にガチョウの Z 染色体に挟動原体逆位が生じたことが示唆された。これらの結果は、キジ目とカモ目は約 1 億年前に分岐したにもかかわらず遺伝連鎖群は高度に保存的されており、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复配列の構造と進化に関する解析

染色体の動原体ヘテロクロマチンは、主に縦列型の高度反复配列によって構成されており、染色体の構築や染色体の分離、さらに減数分裂における染色体の対合において重要な働きを担っている。これまで鳥類では、ダチョウ目、キジ目、タカ目で動原体ヘテロクロマチンを構築する反复配列が単離され、それらの構造が明らかにされているが、カモ目ではまだ報告例がない。本研究では、カモ目における染色体の動原体ヘテロクロマチン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 のクローニングを行った。20 種類以上の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复配列のスクリーニングを行った結果、*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复配列 (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、この反复配列が染色体の動原体領域に存在し動原体 C-ヘテロクロマチンの分布と一致することから、この反复配列はアヒルの major 型のサテライト DNA であり、*HpaII* であまり消化されないことから強いメチル化を受けていることが明らかとなった。GC 含量は 51.6% で比較的 GC-rich な反复配列であり、ゲノム中に占める割合は 0.56% であった。

そして、FISH 法を用いて染色体上の分布を調べた結果、アヒルでは 1 番染色体を除いたすべてのマクロ染色体とマイクロ染色体、バリケンでは 2 番染色体を除いたすべてのマクロ染色体とマイクロ染色体の動原体領域にシグナルが観察された。これまでに報告されているダチョウ目 2 種、キジ目 4 種から得られた動原体特異的反复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* 配列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复配列であった。また、スロットブロットハイブリダイゼーションの結果、この配列はカモ目 (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复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、カモ目鳥類の染色体では、動原体反复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、この反复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、動原体反复配列がアヒル-バリケン間の雑種の減数分裂における染色体の対合異常の主たる原因ではないことが示唆された。

以上のように、本研究は、分子細胞遺伝学的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、そして、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

形成が停止し雑種の不妊が引き起こされることを明らかにした。この結果は、1900年
半ばからほとんど進展がなかった鳥類の雑種不妊の研究において新たな知見をもたら
した。また、これまで遺伝連鎖群の情報が乏しかったカモ目において3種の比較染色
体地図の作製に成功し、キジ目とカモ目の間では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、これらの種の間で生じた染色体構造変化の過程を明らか
にした。さらに、カモ目で初めて動原体特異的サテライト DNA の単離に成功し、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。こ
のように、本博士学位論文で得られた知見は、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。