サケ科魚類の致死性雑種と染色体異常

伊藤大一輔^{1*}・藤原篤志²・阿部周一¹

¹北海道大学大学院水産科学研究科、²(独)水産総合研究センター養殖研究所、*現所属：京都大学大学院生命科学研究科

Hybrid Inviability and Chromosome Abnormality in Salmonid Fish

Daisuke ITO¹, Atushi FUJIWARA², Syuiti ABE¹

¹ Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University

² National Research Institute of Aquaculture

* Present address: Graduate School of Biostudies, Kyoto University

1. はじめに

魚類においては、雑種強勢を利用して成長率や肉質、耐病性などの形質を向上させるために、異種間交雑種が作出されてきた(Bartleyら2000)。サケ科魚類は水産上重要種を含むため、これまで育種を目的としてさまざまな組み合わせの異種間交雑が試みられている(Chevassus 1979; Seebら1988; McKayら1992; Grayら1993)。最近では、我国でもホウライニジマス♀×アマゴ♂もしくはイワナ♂の異質3倍体が「絹姫サーモン」としてブランド化され、東海地方を中心に刺身用として出荷されている。しかし、異種間雑種の多くは生存率が低く不妊であることから、種間交雑により有用品種が確立された例は少ないのが現状である(荒井1989; Grayら1993; Hulata 2001)。一部の致死性を示す雑種においては、染色体の削減や断片化などの数的・構造的異常が致死性の原因となることが示唆されている(Arai 1984)。また、致死性を示すものの染色体異常がみられない組み合わせもあり、雑種致死を引き起こす機構は各々の両親種の組み合わせにより異なっていると考えられる。

本稿では、サケ科魚類の致死性雑種における染色体異常について、我々の最新の研究成果をまじえて紹介するほか、異種間雑種をいかにして水産育種に利用してゆくべきかについて新たな視点で検討した。

2. 致死性雑種における染色体異常

サケ科魚類の雑種は組み合わせにより生存性を示すものと、致死性を示すものがみられる(表1)。さらに、生存性を示すものにも、妊性を示すものと不妊のものがみられる。幾つかの致死性雑種においては染色体異常が報告されており、致死性の原因のひとつと考えら

れている(表2)。ここでは致死性雑種で生じる染色体異常について詳しく調べられた例として、ニジマス(2n=60)とサクラマス(2n=66)の交雑について紹介する。ニジマス♀×サクラマス♂雑種胚は正常に発生しふ化に至るが、雌雄逆のサクラマス♀×ニジマス♂雑種胚は発生異常を示し、ふ化に至らず死亡する(SuzukiとFukuda 1971)。生存性雑種胚においては染色体異常は全く認められないが、致死性雑種胚では染色体数が両親種の半数和である63本よりも減少しており、一部の細胞では染色体の断片化が観察されることから、染色体削減と部分欠失の2種類の染色体異常が起きることが示された。また、FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法の一種である染色体ペインティング法を用いて両親種由来の染色体を識別したところ、これら2種類の染色体異常は全てオス親であるニジマス由来の染色体に特異的に起きていることが明らかになった(Fujiwaraら1997)。さらに、チミジンのアナログであるBrdUをDNA複製時に取り込ませることにより、染色体に縞模様を生じさせる複製バンド法を用いて各染色体を同定した結果から、染色体削減は特定のニジマス由来染色体に起きていることが示された(Fujiwara 1999)。このような染色体削減は、イワナ♀(2n=84)×シロザケ♂(2n=74)(Arai 1984)やシロザケ♀×ニジマス♂、カワマス♀(2n=84)×ニジマス♂(Fujiwara 1999)など多数の異種間交雑で報告されてお

連絡先: 阿部周一、北海道大学大学院 水産科学研究科
〒041-8611 北海道函館市港町3-1-1
(e-mail: abesyu@fish.hokudai.ac.jp)

表1. サケ科雑種における親種の組み合わせおよび生存性(○)と致死性(×)

<div>♀</div> <div>♂</div>		<i>Salvelinus</i>		<i>Oncorhynchus</i>								<i>Salmo</i>	
		<i>leucomaenis</i> White-spotted charr	<i>fontinalis</i> Brook trout	<i>mykiss</i> Rainbow trout	<i>masou masou</i> Masu salmon	<i>masou ishikawae</i> Amago salmon	<i>gorbuscha</i> Pink salmon	<i>nerka</i> Sockeye salmon	<i>keta</i> Chum salmon	<i>kisutch</i> Coho salmon	<i>tshawytscha</i> Chinook salmon	<i>trutta</i> Brown trout	<i>salar</i> Atlantic salmon
<i>Salvelinus</i>	<i>leucomaenis</i> White-spotted charr		○	×	○	○		×	×			○	
	<i>fontinalis</i> Brook trout	○		×	○	○		×	×	○		×	×
<i>Oncorhynchus</i>	<i>mykiss</i> Rainbow trout	○	○		○	○	○	×	×	×		×	×
	<i>masou masou</i> Masu salmon	○	×	×		○		×	×	○	○	×	
	<i>masou ishikawae</i> Amago salmon	○	○	×	○			×				○	
	<i>gorbuscha</i> Pink salmon	×						○	○		○		
	<i>nerka</i> Sockeye salmon	×	×	×	×	×	○		○	○	○	×	
	<i>keta</i> Chum salmon	×	×	×	×		○	○		○	×		×
	<i>kisutch</i> Coho salmon		×	×			○	○	×		○	×	×
	<i>tshawytscha</i> Chinook salmon				○		○	○	×	○			
<i>Salmo</i>	<i>trutta</i> Brown trout	○	○	×	○	○		×		×			○
	<i>salar</i> Atlantic salmon		○	×					×	×		○	

表2. サケ科致死性雑種において認められた染色体異常

Cross	Chromosome abnormalities	References
<i>Salvelinus fontinalis</i> ♀ × <i>Oncorhynchus keta</i> ♂	Aneuploidy (hypodiploid)	Arai (1984)
<i>S. fontinalis</i> ♀ × <i>O. mykiss</i> ♂	Aneuploidy (hypodiploid and hypotriploid) Paternal chromosome elimination, partial deletion	Fujiwara (1999)
<i>S. leucomaenis</i> ♀ × <i>O. keta</i> ♂	Aneuploidy (hypodiploid) Chromosome elimination	Arai (1984), Goodier <i>et al.</i> (1987)
<i>S. leucomaenis</i> ♀ × <i>O. mykiss</i> ♂	Aneuploidy (hypodiploid and hypotriploid)	Ueda <i>et al.</i> (1990)
<i>O. keta</i> ♀ × <i>O. mykiss</i> ♂	Aneuploidy (hypodiploid) Paternal chromosome elimination, partial deletion	Fujiwara (1999)
<i>O. masou</i> ♀ × <i>O. mykiss</i> ♂	Aneuploidy (hypodiploid and hypotriploid) Paternal chromosome elimination, partial deletion	Fujiwara <i>et al.</i> (1997)
<i>O. masou ishikawae</i> ♀ × <i>O. mykiss</i> ♂	Aneuploidy (hypodiploid) Chromosome elimination	Kobayashi (1997)

り、致死性雑種における染色体異常の中で最も主要なものの一つに挙げられる。

3. イトウを用いた異種間交雑

サケ科魚類の雑種を育種に用いるためには、さまざまな交雑により、生じる雑種の特徴を調査する必要があるが、サケ科魚類の多くの種は秋から冬に産卵するため、従来は春に産卵するイトウ *Hucho perryi* ($2n=62$) を用いた異種間交雑は不可能であった。しかし、精子の凍結保存技術の近年における向上(楠田 2004)により、産卵時期の異なる様々な種間で交雑を行うことができるようになった。筆者らの研究グループではイトウを用いた異種間交雑を試み、それぞれの雑種についてその生存性、初期発生を調べ、致死性雑種についてはその致死の原因を探るため、染色体異常の有無に着目して研究を進めている。現在までに、いくつかの雑種で過去に報告例のない染色体の数的および構造的異常が観察されており、雑種致死の原因が予想以上に多様であることがわかってきた。ここではその例として、イトウとニジマスの正逆交雑と、シロザケ♀×イトウ♂の交雑について紹介する。

イトウとニジマスの正逆交雑においては、ニジマス♀×イトウ♂雑種胚は正常にふ化、浮上したもの、雌雄逆のイトウ♀×ニジマス♂雑種胚は受精後 10～20 日に急激に死亡しふ化に至るものはみられなかった。この致死性雑種胚では、エビボリーが進行しているものの胚体がみられない奇形胚や矮小の胚体など、様々な形態形成異常が観察された(図 1)。また、細胞分裂像の観察からは、細胞分裂後期に分離が遅延する染色体や分裂溝に残留する染色体が確認された(図 2)。この致死性雑種胚は、染色体数により A (44～55 本)、B (70～86 本)、C (110～144 本) の 3 タイプに分類された。さらに、これらの数的異常に加え染色体断片や環状染色体などの構造的異常も観察された。染色体ペインティング法により両親種由来の染色体を識別したところ、上記の A、B、C タイプの胚は、イトウ由来の染色体セット ($n=31$) をそれぞれ 1 組、2 組、4 組持っていたが、いずれの場合もニジマス由来の染色体は 1 セット ($n=30$) より少ない 20 本以下しか持っていなかった。以上の結果から、イトウ♀×ニジマス♂雑種胚ではイトウ由来の染色体セットが倍加したことに加え、前述のサクラマス♀×ニジマス♂雑種胚と同様に、ニジマス由来の一部の染色体が細胞分裂の過程で特異的に脱落することが示された。異種間交雑により低三倍体がみられた例は、イワナ♀×ニジマス♂(Ueda ら

図 1. 致死性イトウ♀×ニジマス♂雑種における受精 12 日目の胚形成。イトウ対照胚 (A)、エビボリー進行のみで明瞭な胚体形成なし (B)、奇形胚 (C)～(E)。スケールバー 1 mm。

図 2. 致死性イトウ♀×ニジマス♂雑種胚における DAPI 染色細胞分裂像。前中期 (A)、中期 (B)、後期 (C, D)、および終期 (E)。矢頭は分配遅延または紡錘体中央部に取り残された染色体。DAPI; 4',6-diamidino-2-phenylindole

1990) および前述のサクラマス♀×ニジマス♂雑種胚 (Fujiwara ら 1997) において報告されているが、メス由来のゲノムが 4 倍まで増えた例は著者らの知る限り今回のイトウ♀×ニジマス♂雑種胚が初めてである。このゲノム倍加現象は、受精後の第二減数分裂と第一卵割のどちらか、もしくは両方が阻害されて生じたと予想されるが、その詳細は今後の遺伝学的解析から明らかにしたい。

一方、シロザケ♀×イトウ♂雑種胚は、イトウ♀×ニジマス♂やサクラマス♀×ニジマス♂雑種胚と同様の致死性を示したが、その染色体構成はこれまでに報告されている致死性雑種と大きく異なっていた。染色体ペインティング法を用いた分析により、この雑種胚には、シロザケ由来とイトウ由来の染色体セットをそれぞれ1組ずつ持つ胚(Aタイプ)と、イトウ由来の染色体が全くなくシロザケ由来の染色体のみで構成される胚(Bタイプ)の2タイプが、それぞれ約70%と30%の頻度で観察された。このうちBタイプは雌性発生により生じたと推察されるが、対照群のシロザケ($2n=74$)と異なり、染色体数は約77本(最頻値)という異数性を示し、その中にはシロザケにはない大型の異型染色体が見られるという奇妙な染色体構成を示していた。また、5.8S + 18S + 28S リボソーム RNA 遺伝子をマーカーとする FISH 分析を行ったところ、蛍光シグナルは、本来この遺伝子座を持つ染色体(Alonso ら 1999)と形態的に異なる3本の染色体上に検出された(図3)。つまり、Bタイプにおいては、リボソーム RNA 遺伝子座を巻き込んだ染色体の構造変化が起きていることが明らかになった。このように、シロザケ♀×イトウ♂雑種胚においては、過去に例のないほど複雑な染色体異常が起きていることが明らかになった。今回用いたイトウとシロザケのように、サケ科魚類の中でも系統分類学的に遠縁(Oakley と Phillips 1999)とされる種間の交雑では、染色体の倍加や再配列が起こりやすくなる傾向があるのかもしれない。

これまで述べたように、致死性のイトウ♀×ニジマ

図3. シロザケ対照(A)およびシロザケ♀×イトウ♂の交配により雌性発生した異数性胚(B)における5.8S + 18S + 28S リボソーム RNA 遺伝子座(矢印)のFISHによる分析。本来一対2本の染色体末端に位置するこの遺伝子座(A)は、雌性発生胚では全く別の3本の染色体上に認められた(B)。

ス♂およびシロザケ♀×イトウ♂雑種胚では、オス由来染色体の削減とメス由来染色体の倍加、メス由来染色体の倍加と構造異常など、それぞれ異なるタイプの染色体異常がみられた。このことは、受精や体細胞分裂にかかわる種特異的な因子の組み合わせが、染色体の脱落や倍加といった個々の現象を方向づけていることを示唆しているのかもしれない。また、致死性雑種では、尾芽胚期にあたる受精後10～20日に多くの胚が死亡するが、このことは上述のさまざまな染色体異常による遺伝的な攪乱が、尾芽胚期以降の発生を妨げたためと考えられる。

4. 染色体異常の発生メカニズム

サケ科魚類の致死性種間雑種でみられる染色体異常の成因については、まだよく分かっていない。サクラマス♀×ニジマス♂雑種胚をはじめ、ニジマスをオス親に用いた種々の種間雑種胚の組織学的観察によれば、細胞分裂中期から終期の染色体分配における一部の染色体の移動遅延、姉妹染色分体の不分離、および微小核形成が染色体削減の原因になっているのは確からしい(Fujiwara ら 1997; Fujiwara 1999)。サクラマス♀×ニジマス♂雑種胚におけるオス親由来の染色体が特異的に削減される原因として、雄性発生二倍体や受精直後の卵加圧処理による異質三倍体におけるオス由来染色体の削減から、卵の細胞質と異種の精子ゲノムとの不適合性(incompatibility)によることが示唆されている(Fujiwara ら 1997)。しかし、実際にどのような細胞質因子が関わっているのか、目下のところ不明である。上述の姉妹染色分体の不分離から、染色体削減を引き起こす原因として、紡錘体微小管と動原体との接続エラーが可能性として挙げられる。動原体は、体細胞分裂期に染色体の一次狭窄部であるセントロメア領域に構築されるタンパク質複合体であり、紡錘体微小管との接続部位となる(Cleveland ら 2003)。両極から伸びた紡錘体微小管と動原体が接続することは、複製された姉妹染色分体が正確に分配されるために重要である。植物では、コムギとトウモロコシの雑種胚において、トウモロコシ由来の染色体が細胞分裂の過程で特異的に削減されるが、赤道面に残留したトウモロコシ由来染色体の動原体は紡錘体微小管に接続していないことが観察された(Mochida ら 2004)。一方、サクラマス♀×ニジマス♂(Fujiwara ら 1997)およびイトウ×ニジマス雑種胚では、染色体は細胞分裂中期で赤道面に整列していることが観察されたため、動原体と紡錘体微小管との接続は正常であることが示唆され

た。それにもかかわらず、サケ科致死雑種においてはなぜ染色体が削減されるのであろうか？一つの可能性としては、動原体と紡錘体微小管との接続は正常であるものの、両極に姉妹染色分体を分配する動原体の機能不全が考えられる。もしくは、細胞分裂中期から後期に移行する際に、姉妹染色分体を接着させているコヒーシン複合体を分解し、姉妹染色分体を解離させるセパレーズなどのタンパク質分解酵素の機能不全が考えられる。最近、サケ科雑種と同様に致死性を示し、オス親由来の染色体が細胞分裂の過程で削減されるメダカ雑種において、それぞれ異種由来の Cdc2 と Cyclin B からなる雑種型 MPF が異常な細胞分裂を引き起こす可能性が示唆されている(岩井ら 2006)。今後はサケ科雑種においても、このような可能性を検討していく必要があるだろう。

一方、卵の細胞質因子と不適合を起こすと予想される精子ゲノムの因子については、どのように考えられているのだろうか。サクラマス♀×ニジマス♂雑種胚においては、ニジマス由来の染色体はランダムではなく、一部の染色体が選択的に失われる傾向にあることが報告されている(Fujiwara 1999)。この例では、個々のニジマス由来染色体の削減される頻度は、0% (脱落しない)～100% (必ず脱落する)まで、ほぼ連続した値をとることが示された。この結果は、削減の対象となる染色体上に、それ自身の削減されやすさを決定する量的なシス因子が存在することを示唆している。また、交雑するメス親の種類によって異なるが、ニジマス由来染色体は最大で半数程度まで削除されることから、このシス因子は殆どの染色体上に存在するものと推察できる。このような条件に合うシス因子の候補の一つとしては、動原体領域で高頻度に反復している動原体 DNA が考えられる。一般に動原体 DNA は、個々の染色体で反復回数が異なることが知られており、その量は染色体の細胞分裂時の安定性に影響することが知られている(Murphy と Karpen 1995; Vos 1998)。さらに、動原体 DNA は前述した姉妹染色分体の接着においても重要な役割を果たしていることが知られている(Strunnikov 1998)。魚類の動原体 DNA についての知見は未だに非常に乏しいが、今後は、動原体領域の構造ならびに機能解析も視野に入れて、染色体削減の原因を追求していく必要があるだろう。

5. 最後に

致死性雑種は水産育種の観点から見ると直接の利用は不可能なようであるが、雌性発生の誘起の成功率を

高めるために利用することが可能である。雌性発生法は紫外線処理により不活性化した精子を用いて受精を行い、続いて圧力処理や低温・高温処理により第二極体の放出や第一卵割を阻害することによりメスのゲノムを倍加させる染色体セット操作の一種であり、クローン系統や全雌集団を作出することができる(Arai 2001)。これまでの報告(Suzuki と Fukuda 1971; Scheerer と Thorgaard 1983; Kobayashi 1997; Fujiwara ら 1997)と我々の実験結果より、ニジマスをオス親にした場合生じる雑種はすべて致死性であることから、不活性化したニジマスの精子を用いて雌性発生を誘起すれば、不活性化が不十分な精子により受精した胚は初期発生過程で死亡するため、最終的には雌性発生胚のみが残ることになる。雑種が致死性となるような種の精子を用いて、凍結保存技術と組み合わせることにより人為雌性発生の効率を高めることに寄与できるものと考ええる。

これまで、サケ科異種間雑種は水産育種上の利用を目指して研究が進められてきたが、今後は育種目的のみならず、受精や体細胞分裂、形態形成など初期胚発生の基本的な機構を理解するモデルとして有用となり得るであろう。雑種に特有のさまざまな生物学的現象を解明するためには、更に遺伝学的、生化学的な分析を行うための基礎を確立することが急務である。

参考文献

- Alonso M, Fujiwara A, Yamaha E, Kimura S, Abe S. 1999. Ribosomal RNA gene loci and silver-stained nucleolar organizer regions associated with heterochromatin in Alaskan char *Salvelinus malma* and chum salmon *Oncorhynchus keta*. *Hereditas*, 131: 221–225.
- Arai K. 1984. Developmental genetic studies on salmonids: morphogenesis, isozyme phenotypes and chromosome in hybrid embryos. *Memoirs of Fisheries Sciences*, Hokkaido University, 31: 1–91.
- 荒井克俊. 1989. 水産増養殖と染色体操作. “異質倍数体の項執筆”. 鈴木亮編. 日本水産学会監修. 82–94. 恒星社厚生閣. 東京.
- Arai K. 2001. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture*, 197: 205–228.
- Bartley DM, Rana K, Immink AJ. 2000. The use of interspecific hybrids in aquaculture and fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10: 325–337.
- Chevassus B. 1979. Hybridization in salmonids: results

- and perspectives. *Aquaculture*, 17: 113–128.
- Cleveland DW, Mao YH, Sullivan KF. 2003. Centromeres and kinetochores: From epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell*, 112: 407–421.
- Fujiwara A, Abe S, Yamaha E, Yamazaki F, Yoshida MC. 1997. Uniparental chromosome elimination in the early embryogenesis of the inviable salmonid hybrids between masu salmon female and rainbow trout male. *Chromosoma*, 106: 44–52.
- Fujiwara A. 1999. Molecular cytogenetic studies on the hybrid inviability in salmonid fishes. Ph.D. Thesis, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
- Goodier J, Ma HF, Yamazaki F. 1987. Chromosome fragmentation and loss in two salmonid hybrids. *Bulletin of Fisheries Sciences, Hokkaido University*, 38: 181–184.
- Gray AK, Evans MA, Thorgaard GH. 1993. Viability and development of diploid and triploid salmonid hybrids. *Aquaculture*, 112: 125–142.
- Hulata G. 2001. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica*, 111: 155–173.
- 岩井俊治、横田雄洋、酒井千春、金野芙美子、山下正兼. 2006. メダカ雑種の特殊な生殖と発生から学ぶ細胞分裂と生殖細胞形成の分子細胞機構. 水産育種 35、印刷中.
- Kobayashi T. 1997. Survival and cytological observations on early development of normal, hybrid, and gynogenetic embryos of amago salmon. *Fisheries Science*, 63: 33–36.
- 楠田聡. 2004. 魚類精子と胚細胞の凍結保存における現状と展望. 水産育種, 34: 1–25.
- McKay LR, Ihssen PE, McMillan I. 1992. Early mortality of tiger trout (*Salvelinus fontinalis* × *Salmo trutta*) and the effects of triploidy. *Aquaculture*, 102: 43–54.
- Mochida K, Tsujimoto H, Sasakuma T. 2004. Confocal analysis of chromosome behavior in wheat × maize zygotes. *Genome*, 47: 199–205.
- Murphy TD, Karpen GH. 1995. Localization of Centromere Function in a *Drosophila minichromosome*. *Cell*, 82: 599–609.
- Oakley TH, Phillips RB. 1999. Phylogeny of salmonine fishes based on growth hormone introns: Atlantic (*Salmo*) and Pacific (*Oncorhynchus*) salmon are not sister taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11: 381–393.
- Seeb JE, Thorgaard GH, Utter FM. 1988. Survival and allozyme expression in diploid and triploid hybrids between chum, chinook, and coho salmon. *Aquaculture*, 72: 31–48.
- Scheerer PD, Thorgaard GH. 1983. Increased survival in salmonid hybrids by induced triploidy. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 40: 2040–2044.
- Strunnikov AV. 1998. SMC proteins and chromosome structure. *Trends in Cell Biology*, 8: 454–459.
- Suzuki R, Fukuda Y. 1971. Survival potential of F1 hybrids among salmonid fishes. *Bulletin of Freshwater Fisheries Research Laboratory*, 21: 69–83.
- Ueda T, Ojima Y, Kobayashi J. 1990. Hypodiploid and hypotriploid hybrids between female Japanese char and male rainbow trout. *La Kromosomo*, 59–60: 2008–2012.
- Vos JMH. 1998. Mammalian artificial chromosomes as tools for gene therapy. *Current Opinion in Genetics and Development*, 8: 351–359.