

種が違となぜ子供ができぬのか？

-生殖隔離の分子細胞機構-

生物科学専攻（生物学）生体情報分子学講座
山下正兼

はじめに

地球上にはいろいろな生物が棲んでいます。それらは「種」という単位でまとめられ、固有の名前（学名）が付けられています。例えば、我々はヒト *Homo sapiens* という種です。異なる種の間で簡単に子供ができて、それらが繁殖した場合、雑種の子供たちは、通常、二つの種の特徴を併せ持ちますから、それぞれの種を特徴づける形質が曖昧になり、種の独自性が失われます。従って、生物が確固たる種として存続するためには雑種を作らない仕組みが必要です。逆の言い方をすれば、雑種ができなくなれば種が確立します。この仕組みは「生殖（的）隔離」と呼ばれています。生殖隔離の最も判りやすい例は、生息場所や生殖時期が異なるといった生態学的なレベルで交配を阻止する仕組み、つまり、異なる種の間で交配が起こるのを物理的に防ぐ方法です。しかし、生殖隔離は、より根元的な分子細胞レベルでも働いています。例えば、自然状態では絶対に交雑しない種間で人工授精をすることは可能ですが、それでも、受精卵の発生がおかしくなって途中で死んでしまい成体にまで到らない、あるいは成体になっても卵や精子がうまく作れないために子孫を残せない、といったことが多くの生物種で知られています。たとえ人工的に卵と精子を受精させても、種が異なると次世代を残せないこの仕組みは、生殖隔離の最も基本的で、かつ重要な仕組みです。しかし、これまで、どのような仕組みでこれが保証されているのかは、ほとんど判っていません。生殖隔離の基本機構を知ることが「種がどのようにして確立し、維持されるのか」という、生物科学に課せられた基本命題の一つを解き明かす重要な研究テーマです。

メダカの仲間（*Oryzias* 属）は、日本はもとより、中国や東南アジア地域に広く分布し、これまでに 20 種近くが知られています。メダカは人工授精が簡単で、別種でも任意に交雑させることが可能ですが、親の組み合わせによって、種々のレベルで様々な程度の異常が生じます（文献 1）。雑種で見られる異常の原因を分子や細胞のレベルで明らかにすることで、生殖隔離の最も基本的な仕組みを探ることができると期待されます。ここでは、ニホンメダカ *Oryzias latipes* とジャワメダカ *O. javanicus* における胚発生の異常と、ニホンメダカとハイナンメダカ *O. curvinotus* [中国の海南（ハイナン）島に生息するメダカ] の雑種における生殖細胞（卵と精子）の形成異常の原因を分子細胞レベルで明らかにすることで、生殖隔離の基本機構を探ろうとしている私たちの研究を紹介いたします（図 1）。

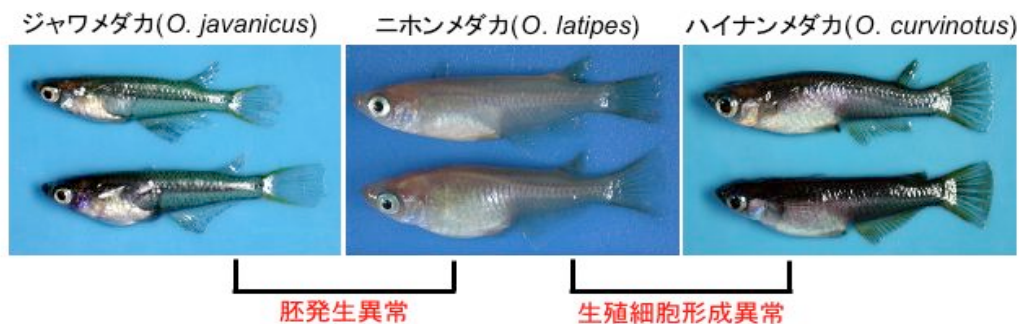
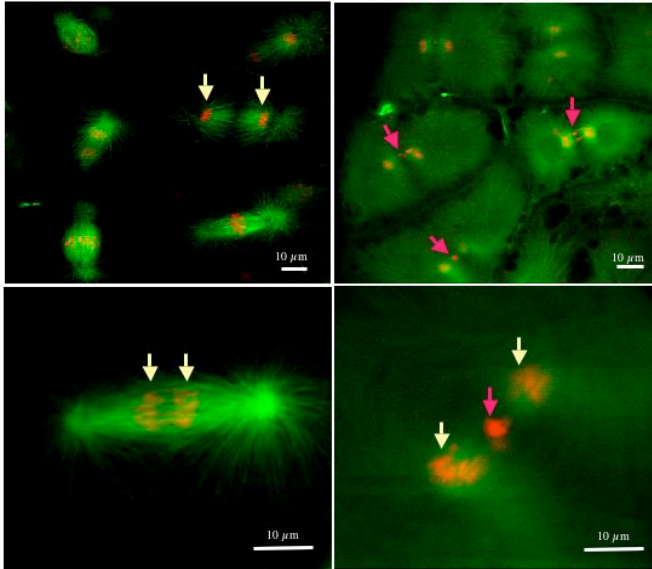


図 1 メダカの雑種における様々な異常

ニホンメダカとジャワメダカの雑種における胚発生異常の原因

ニホンメダカの卵にジャワメダカの精子をかけると、ニホンメダカ同士やジャワメダカ同士の掛け合わせと同じように、高率で受精が起こり、胚は発生を開始しますが、雑種胚は発生異常を起こして全て死んでしまい、メダカの形を作るまで至りません（文献 2）。ニホンメダカもジャワメダカも、染色体の数はいずれも、母親から由来する 24 本と父親から由来する 24

ニホンメダカ×ニホンメダカ ニホンメダカ×ジャワメダカ



本を合わせた 48 本で、この数は細胞分裂を経ても変わりません（ただし、卵や精子を作る時は減数分裂により染色体数が半分になります）。しかし、雑種胚の染色体を数えたところ、明らかに数が少ないことが判りました。しかも、その数は両親種の半分の 24 本であることが多いことも判りました。雑種胚で染色体の数がなぜ減るのかを調べるため、胚発生過程での細胞分裂を観察しました。その結果、正常胚では染色体が綺麗に二つに分かれて新しい細胞（娘細胞）に分配されるのに対し（図 2、左）、雑種胚では細胞分裂の時に染色体の一部が取り残され、娘細胞に入らないことが明らかになりました（図 2、右）。

図 2 ニホンメダカ胚とニホン/ジャワメダカ雑種胚の発生過程における染色体の挙動

正常胚（左図）では、全ての染色体(赤色に染められている)は完全に分離するが（白矢印）、雑種胚（右図）では、一部の染色体が分裂装置（緑色に染められている）の中央に残される（赤矢印）。

雑種胚の染色体数がちょうど両親種の半分になっているということは、両親種のいずれかの染色体が選択的に削減されていることを予想させます。そこで、このことを確かめるために、ニホンメダカの染色体とジャワメダカの染色体を染め分ける実験を行いました。その結果、分裂期に取り残しを受ける染色体（すなわち胚から削除される染色体）はジャワメダカ由来であることが判りました（図 3）。ニホンメダカ雌とフィリピンメダカ *O. luzonensis* 雄の雑種も胚致死になりますが（文献 1）、この場合も削減される染色体は雄（フィリピンメダカ）由来であることを私たちは明らかにしました。

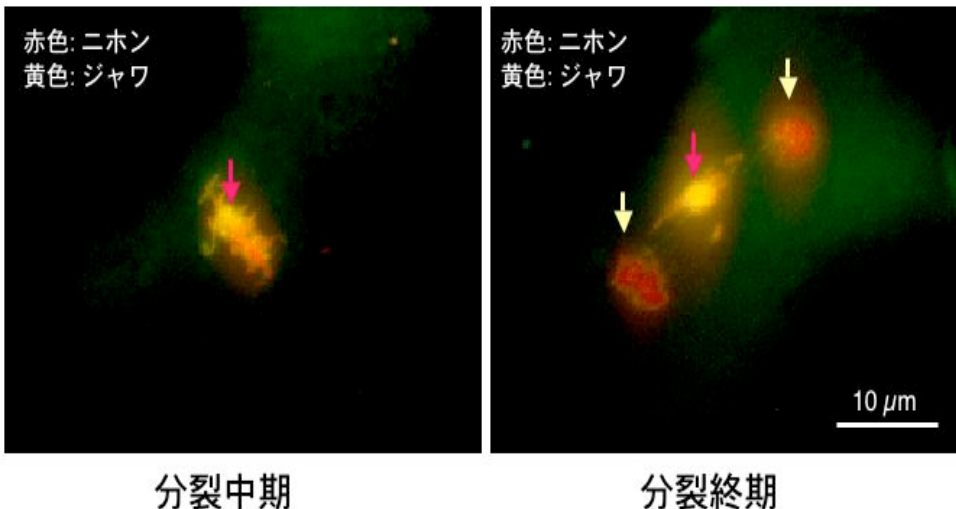


図 3 ニホン/ジャワメダカ雑種胚におけるジャワメダカ染色体の削減

ニホンメダカの染色体を赤色、ジャワメダカの染色体を黄色で染め分けた。分裂中期ではジャワメダカ染色体（赤矢印）は紡錘体の赤道面で集合して存在する。分裂終期では、ニホンメダカ染色体（白矢印）は正常に分離しているのに対し、ジャワメダカ染色体（赤矢印）は分裂装置の中央に取り残されている。

ニホンメダカとジャワメダカの雑種では、胚発生の過程で細胞分裂の異常により、ジャワメダカの染色体が失われて死に至ることが判りました。それでは、雑種で細胞分裂の異常が起こるのはなぜでしょうか？私たちはその原因となる分子としてM期促進因子（M-Phase-Promoting Factor: MPF）に着目しました。MPFは全ての真核生物に共通の細胞分裂を制御する重要な分子であり、その機能が異常になることは細胞分裂の異常に直結すると予想されます（文献3）。MPFはCdc2とサイクリンBと呼ばれる2種の蛋白質が結合した蛋白質リン酸化酵素で、他の蛋白質をリン酸化（蛋白質の特定の部分にリン酸を付けること）して、それらの機能を調節する働きを持ちます。雑種胚には同種由来のCdc2・サイクリンBからなる野生型MPFの他に、異種由来のCdc2・サイクリンBからなる雑種型MPFが存在します（図4）。

雑種型MPFは、本来リン酸化するものとは異なる蛋白質をリン酸化したり、本来リン酸化しなければならない蛋白質をリン酸化できない可能性があります。実際、培養細胞で各種メダカのCdc2とサイクリンBを任意に組み合わせて作った雑種型MPFを、メダカの胚に存在する蛋白質と反応させると、野生型MPFとは異なる蛋白質をリン酸化することを私たちは明らかにしました。そこで、異種由来のCdc2・サイクリンBからなる雑種型MPFによる“間違った”蛋白質リン酸化が細胞分裂を異常にし、これが雑種胚発生異常の原因である可能性を検討しました。

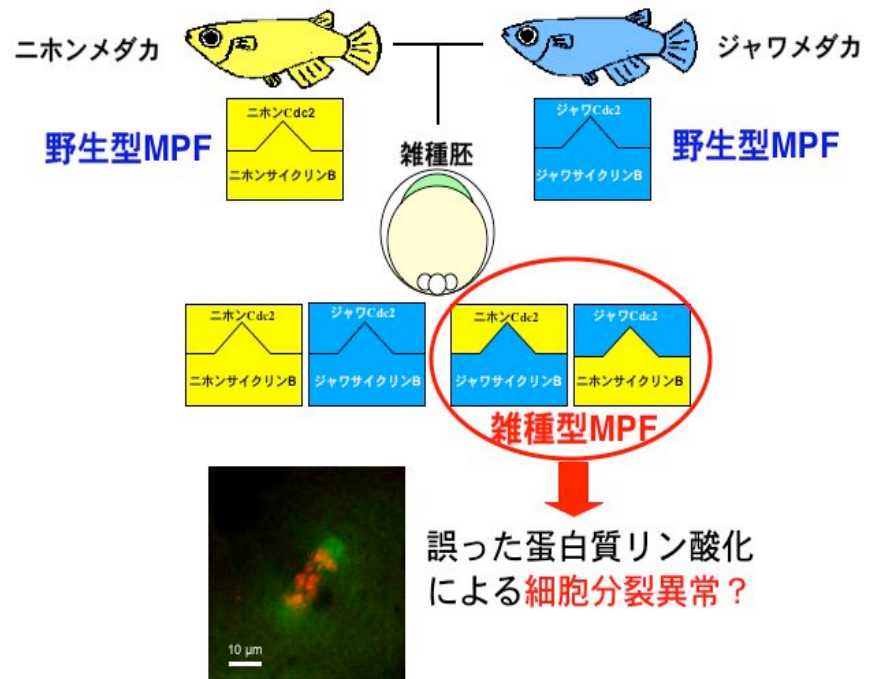


図4 野生型MPFと野種型MPF

卵母細胞にはサイクリンBと結合していない単独のCdc2が大量に存在するため、任意のサイクリンBを卵内に導入すると、それは既存のCdc2と結合してMPFを形成します(文献3)。

従って、ニホンメダカの卵にジャワメダカのサイクリンBを導入することで、ニホンメダカCdc2とジャワメダカサイクリンBからなる雑種型MPFを作製できます。具体的には、ニホンメダカの受精卵にジャワメダカのサイクリンB mRNAを注射して雑種型MPFを作らせ、また、対照実験として、ニホンメダカ受精卵にニホンメダカサイクリンB mRNAを注射して野生型MPFを作らせる実験をしました（図5）。それぞれのサイクリンBは卵にもともと存在するニホンメダカCdc2と結合してMPFを形成し、蛋白質リン酸化酵素として働くことが確認されました。

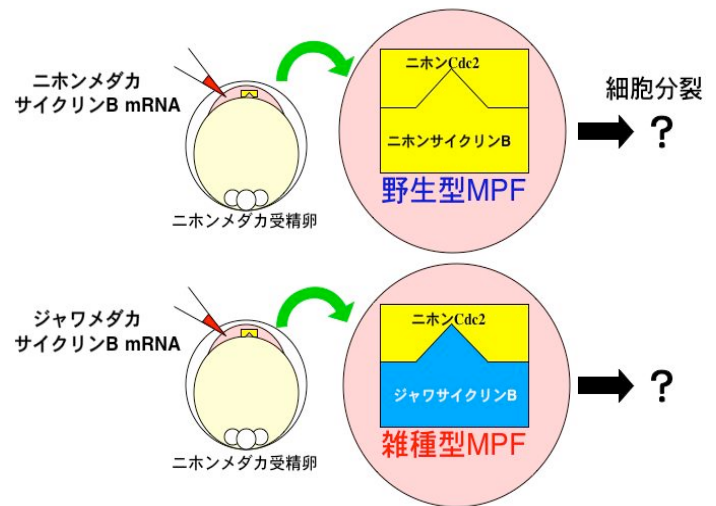


図5 雑種型MPFが発生異常の原因かどうかを調べる実験

ニホンメダカサイクリン B を注射して野生型 MPF を作らせた胚では、染色体は分裂中期で紡錘体の赤道面に整列し (図 6A)、後期で完全に分離する (図 6B) という、正常な細胞分裂が観察されました。一方、ジャワメダカサイクリン B を注射して雑種型 MPF を形成させた胚では、分裂装置が異常 (図 6D)、染色体が完全に消失 (図 6F) などの様々な異常が観察されました。染色体が分裂中期で異常に集合したり (図 6E)、分裂装置の中央に取り残される (図 6C) といった、実際の雑種胚で観察されるものと同じような異常も観察されました。以上の結果より、異種由来の Cdc2・サイクリン B からなる雑種型 MPF による間違った蛋白質リン酸化が細胞分裂を異常にし、これが雑種胚発生異常の原因となることが確認されました。

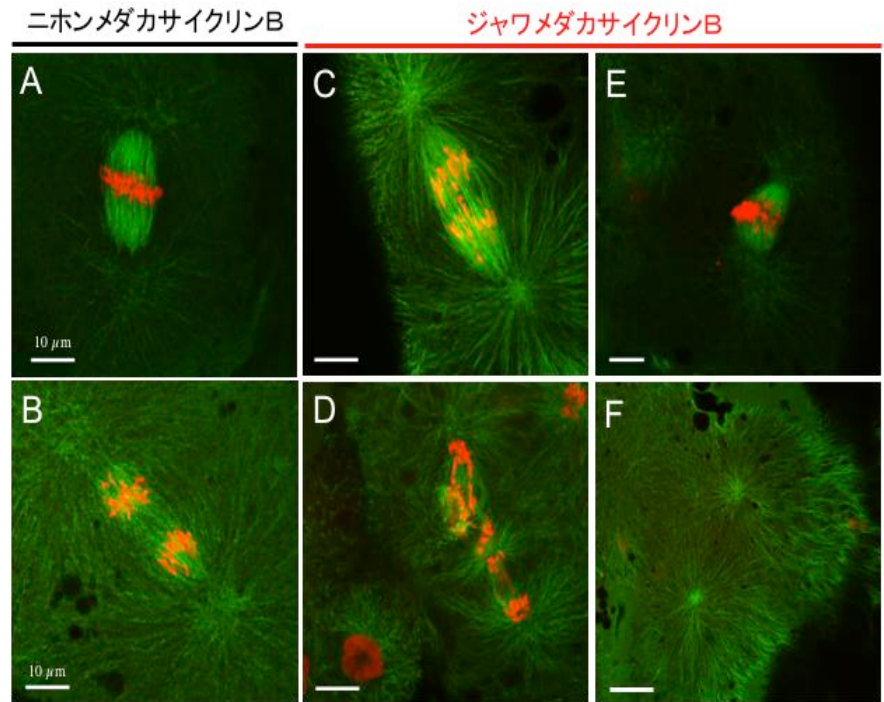


図 6 サイクリン B を注射した胚での細胞分裂

ニホンメダカとハイナンメダカの雑種における生殖細胞形成異常の原因

ニホンメダカとジャワメダカの雑種と異なり、ニホンメダカとハイナンメダカの雑種では、胚発生は正常に進行して成体になりますが、雑種メダカは異常な生殖細胞 (卵や精子) を作るため、子供ができません。この雑種における生殖細胞形成異常の原因を探りました。私たちの体を作る大部分の細胞は、母親由来と父親由来の 2 セットの染色体を持つ 2 倍体です。これを $2n$ と表します。卵と精子が合体して私たちが生まれますので、卵と精子は染色体のセットを一つしか持たない半数体 (n) でなければなりません。ニホンメダカとハイナンメダカの雑種の雌が作る卵を通常の精子 (n) と受精させると、胚は 3 倍体 ($3n$) になって死んでしまいます。従って、この雑種が作る卵は 2 倍体 ($2n$) であることが判ります (文献 4)。私たちはどのようにして $2n$ の卵が作られるのかを調べました (文献 5)。その結果、減数分裂に入った直後の卵母細胞は正常の 2 倍の染色体を持つことと、卵母細胞の減数分裂は正常で、2 個の極体を放出することが判りました (図 7)。つまり、この雑種の卵母細胞は、減数分裂の直前に染色体の複製を 1 回だけ余分に起こし (核内有糸分裂)、その後、正常な減数分裂を行うため、 $2n$ の卵になるのです (図 10 参照)。

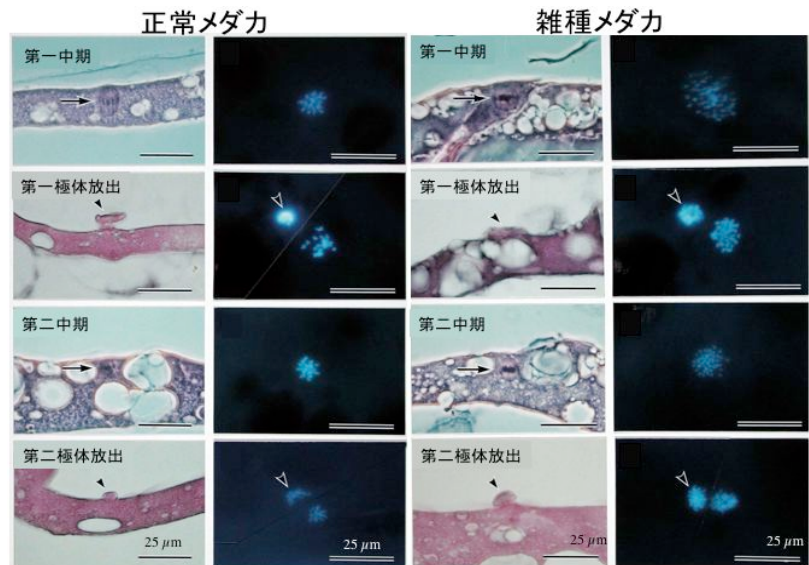


図 7 メダカ卵母細胞の減数分裂における紡錘体(矢印)と極体(矢頭)

この雑種の雌は非常に少ない数の卵しか作りません。大多数の卵母細胞は減数分裂の初期（ザイゴテン期）で分裂を停止し、それ以降は成長しません。減数分裂の時に母親由来と父親由来のよく似た染色体（相同染色体）が結合（対合）します。雑種の雌では、この相同染色体の対合がうまく行かず、減数分裂は途中で止まり、卵形成も止まるのです（文献 6）。つまり、ニホンメダカとハイナンメダカの雑種の雌では、核内有糸分裂をしたごく一部の卵母細胞だけが成長して排卵され、その他の大多数の卵母細胞は形成の途中で止まってしまいます。これは次に述べる減数分裂の進行と精子形成の進行が関連しない雄の場合と大きく異なります。

ニホンメダカとハイナンメダカの雑種の雄が作る精子と正常な卵を混ぜても子供はできません

ので、雌だけでなく、雄でも異常な生殖細胞が作られています。私たちはこの原因も調べました（文献 7）。雑種の精巣では減数分裂過程で相同染色体の対合がうまく行かず、分裂装置（紡錘体）から取り残された染色体が観察できました（図 8 左、矢頭）。また、できあがった精子は、普通の精子に比べて頭部が異常に大きく、鞭毛の内部形態もおかしいことが判りました（図 8 右、B）。

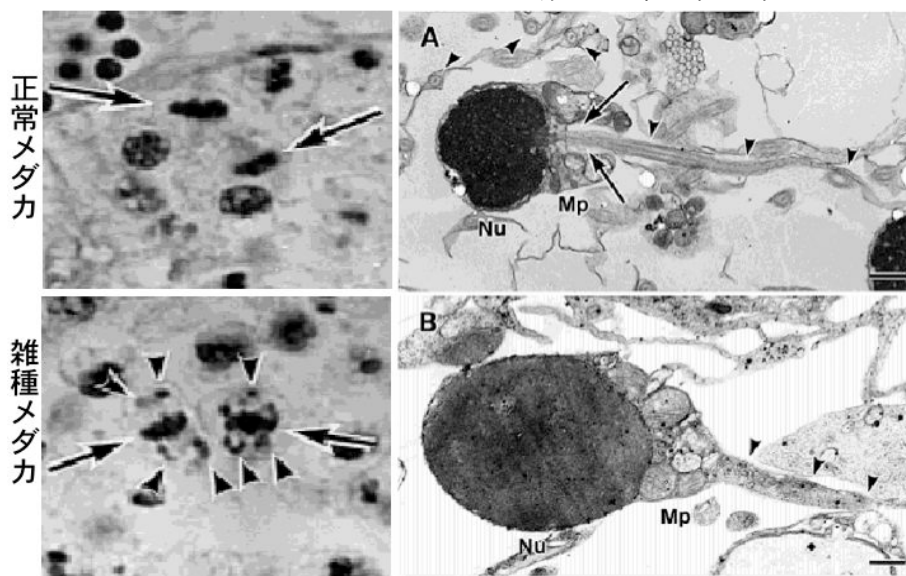


図 8 ニホン/ハイナンメダカ雑種における精子形成

光学顕微鏡像（左）と電子顕微鏡像（右）。左図の矢印は紡錘体の赤道面に正常に配列した染色体を示し、矢頭は異常な配置の染色体を示す。右図の Nu は核、Mp は中片、矢頭は鞭毛、矢印は鞭毛膜の中片への陥入を示す。スケールは 5 μm (A, B)。

この雑種の異常な精子形成をさらに詳しく調べるため、メダカの精巣から精子の元になる細胞（精母細胞）を取り出し、試験管の中で精子形成過程を再現する実験を行いました。

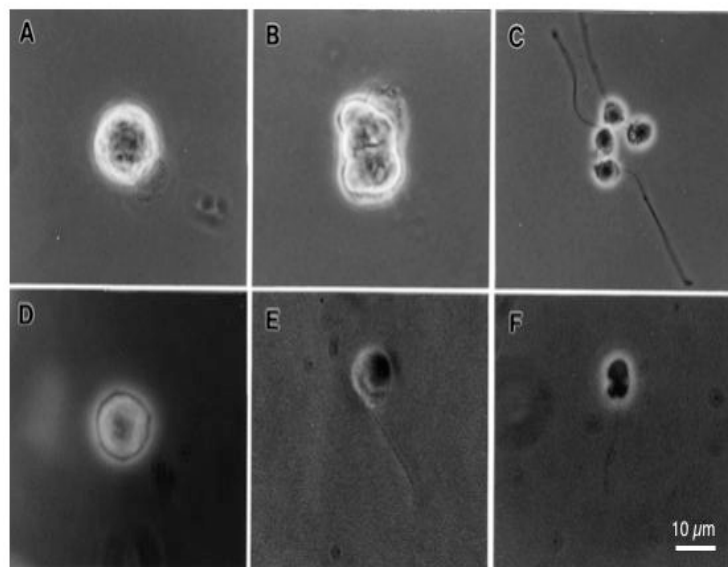


図 9 培養系におけるメダカの精子形成 (A-C, ニホンメダカ; D-F, 雑種メダカ)

ニホンメダカの精母細胞 (A) は減数分裂を経て (B) 4 個の精子 (C) になるのに対し、雑種メダカの精母細胞 (D) は減数分裂を経ずに (E) 1 個の精子様細胞 (F) になる。

ニホンメダカとハイナンメダカの雑種で見られる異常な生殖細胞形成を図 10 にまとめました。雌では減数分裂前に細胞質分裂を伴わない染色体複製 (核内有糸分裂) が一回だけ起こる

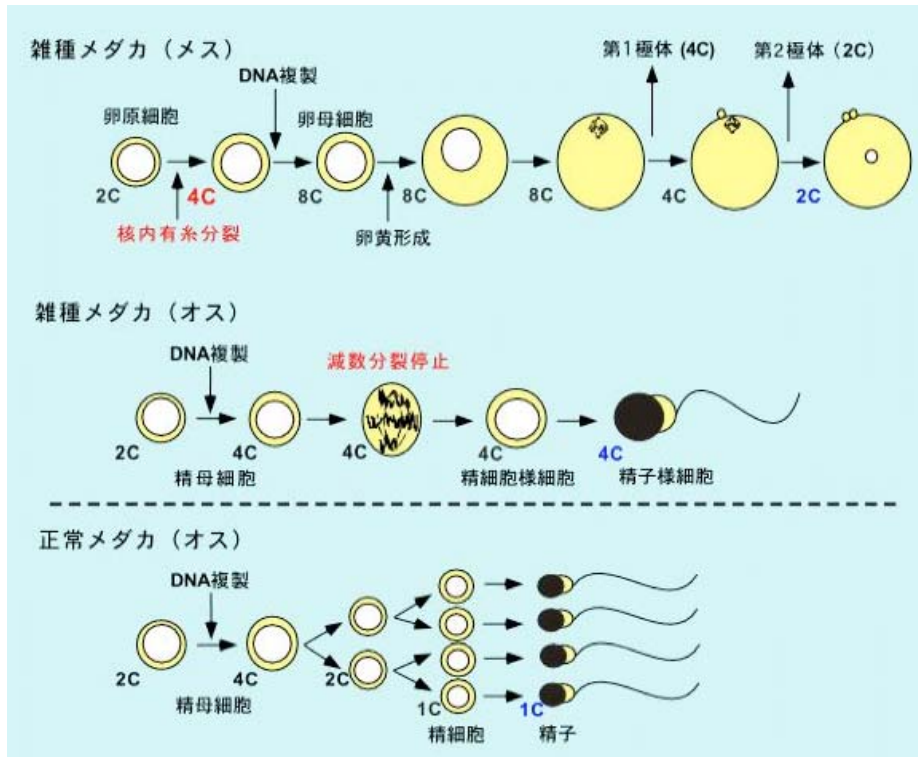


図 10 ニホン/ハイナンメダカ雑種における生殖細胞形成

ために 2 倍体 ($2n$, DNA 量で表すと $2C$) の卵ができることが判りました。ただし、核内有糸分裂を行う卵母細胞はごく少数で、多くの卵母細胞は相同染色体の対合不全のためザイゴテン期で減数分裂を停止し、卵形成もそれ以上は進みません。雄でも相同染色体の対合不全を起こしますが、減数分裂とは無関係に精子形成が進行するために、1 個の精母細胞から $4C$ の精子様細胞が 1 個作られます。

以上のように、ニホンメダカとハイナンメダカの雑種における生殖細胞形成異常の細胞生物学的な原因が明らかになりました。次は分子レベルの原因を解明しなくてはなりません。上記の細胞生物学的知見から、生殖細胞形成異常への関与が予想される分子として、細胞が分裂する前に染色体の複製により生じた姉妹染色分体を結びつけるコヒーシンと呼ばれる蛋白質と、父親由来と母親由来の相同染色体を結びつけるシナプトネマ構造を作る蛋白質が挙げられます(文献 8)。そこでこれらの遺伝子を単離し、大腸菌で発現させた組換え蛋白質に対する抗体

を作製し、ニホンメダカと雑種メダカで蛋白質の発現の違いを調べました。ニホンメダカの精巣をシナプトネマ構造の構成蛋白質に対する抗体で染めると、24 本の線状の構造が観察されました(メダカは $2n=48$ なので相同染色体を結合するシナプトネマ構造は 24 本あります)(図 11 上)。一方、雑種メダカでは綺麗な線状構造は観察されませんでした(図 11 下)。

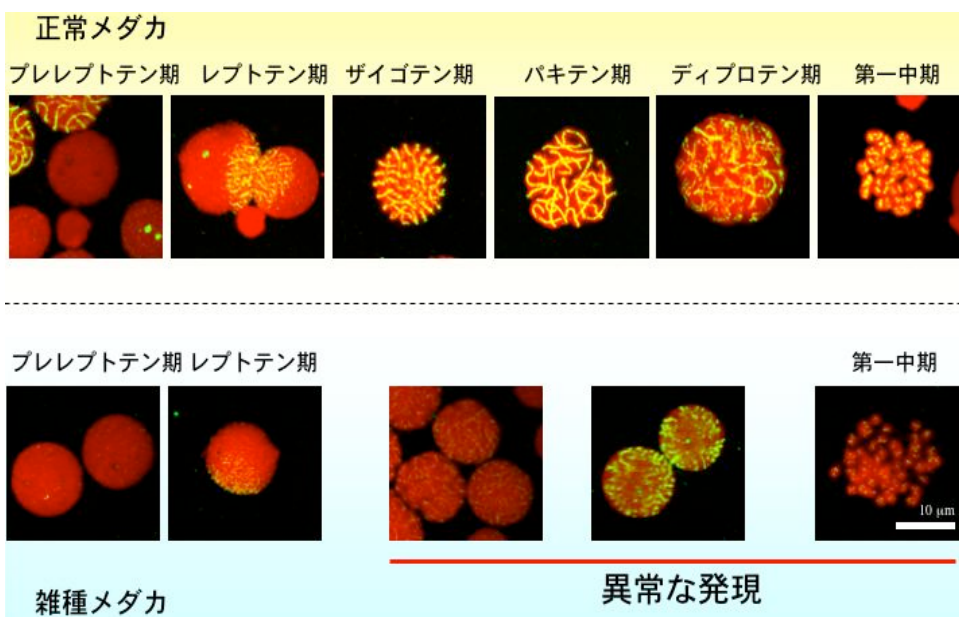


図 11 雑種メダカに見られるシナプトネマ構造構成蛋白質の異常な発現

シナプトネマ構造は、大まかに言うと、染色体と直接結合する側方要素とそれを繋ぐ中心要素の二つの部分からなります。側方要素にはSCP3 という蛋白質が存在し、中心要素にはSCP1 という蛋白質が存在します (図 12、模式図)。これら二つの蛋白質の発現の違いを、両親種のメダカと雑種メダカで比べました。両親種のメダカでは、SCP1 も SCP3 も減数分裂の初期 (レプトテン期) から発現します (厳密に言うと、SCP3の方がSCP1より発現時期が少し早い)。また、その発現は核の一方向から始まり、ザイゴテン期やパキテン期になると相同染色体の対合の数に見合った数の線状の構造を取ります (図 11 上)。一方、雑種の精巣では、SCP3 は両親種と同様な発現パターンを示しましたが、SCP1 は両親種とは異なり、発現量が少ない上に、ザイゴテン期やパキテン期でシナプトネマ構造に沿った線状の形態を示さないことが明らかになりました (図 12)。以上のことより、雑種の精巣では減数分裂過程において SCP1 を含まない不完全なシナプトネマ構造が形成されるために相同染色体間の対合が維持できず、精子形成不全が引き起こされると推測されました。

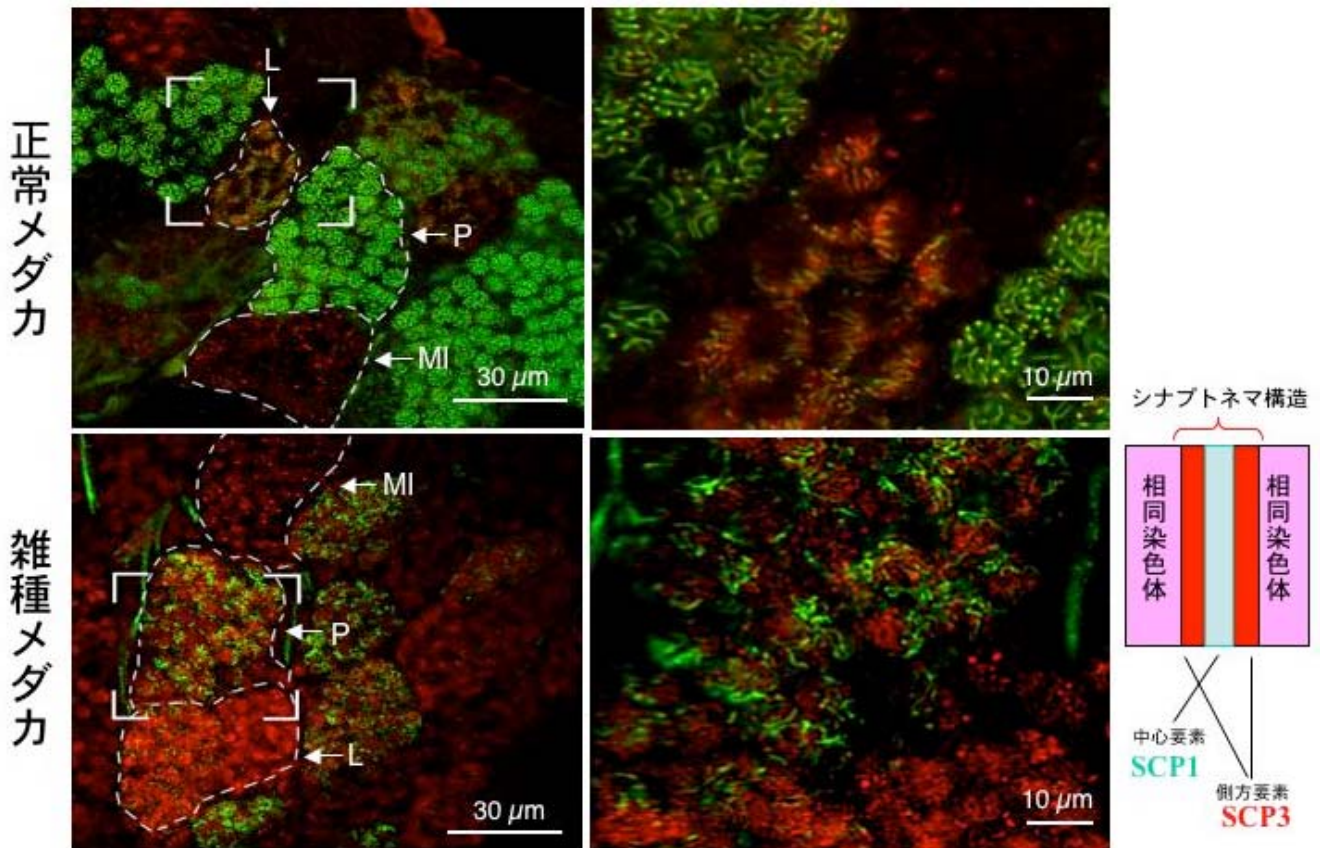


図 12 シナプトネマ構造構成蛋白質(SCP1, SCP3)の精巣での発現 (左, 低倍: 右, 四角で囲った領域の拡大) SCP1 の局在は緑色、SCP3 は赤色で示されている。L, レプトテン期; P, レプトテン期; MI, 第一中期 SCP3 は両親種でも雑種でもシナプトネマ構造に沿った線状の局在を示すが、雑種での SCP1 の発現は、両親種と異なり、シナプトネマ構造に沿っていない。

精巣と同様、卵巣においても雑種の卵母細胞で SCP1 の発現異常が観察されました。すでに述べたように、雑種の卵巣では核内有糸分裂を起こした極めて少数の卵母細胞が減数分裂を完了して 2 倍体の卵となりますが、多くの卵母細胞はザイゴテン期で減数分裂を停止し、次のパキテン期には進行しません。減数分裂の停止時期と SCP1 の発現の異常時期が一致することから、卵巣における異常にも SCP1 が関わる可能性は高いと思われます。すなわち、この分子は、精巣と卵巣に共通して、生殖細胞の形成異常に関与することが強く示唆されました。雑種における生殖細胞形成異常は、メダカに限らず、多くの種で知られていますが、その原因を分子レベルで解明したのはこれが最初と思われます。

まとめ

ニホンメダカとジャワメダカの雑種胚が発生異常を起こすのは、ジャワメダカ由来の染色体が胚発生過程で選択的に脱落することが原因であることが示されました。また、この現象の分子レベルでの原因は、異種のサブユニットからなる雑種型 MPF による間違っただ蛋白質リン酸化であることが示されました。ニホンメダカとハイナンメダカの雑種における生殖細胞形成異常の細胞生物学的原因も明らかになりました。すなわち、雌では大多数の卵母細胞における相同染色体の対合不全による減数分裂と卵形成の停止、一部の卵母細胞における減数分裂前の核内有糸分裂による 2 倍体 (2C) 卵の形成、雄では減数分裂とは無関係に精子変態が行われることによる精子様 (4C) 細胞の形成が、生殖細胞形成異常の細胞レベルでの原因でした。さらに、これらの細胞生物学的異常を引き起こす分子レベルの原因は、相同染色体を結合するシナプトネマ構造の構成蛋白質である SCP1 の発現異常であることが強く示唆されました。

今回紹介したように、私たちの研究により、雑種で起こる様々な異常の原因を細胞レベルや分子レベルで解き明かす糸口が見つかってきました。今後、これらの研究がさらに進展することで「種が異なるとなぜ子供ができないのか？」という生物科学における極めて根源的な疑問に、分子の言葉で答えることができるようになることを期待しています。

謝辞

ここで紹介した研究は、山下研の大学院生だった清水洋平（現北海道立栽培漁業総合センター）、小谷友也（現国立遺伝学研究所）、岡亜希恵（現呉羽化学工業）、中野治（現理研ビタミン）、古屋江美子（現月寒東内科クリニック）、吉井敦（現大正製薬）、現在の大学院生である横田雄洋、岩井俊治、酒井千春、金野芙美子の各氏、ポスドクの李智博博士（現神戸大学）、及び助手の箕田康一博士（現徳島文理大学助教授）が得たデータをまとめたものであり、これらの方々に感謝の意を表します。ジャワメダカとハイナンメダカは、岩松鷹司博士（愛知教育大学）、酒泉満博士（新潟大学）、柴田直樹博士（信州大学）のご厚意で提供されました。染色体の観察技術をご教示いただいた松田洋一博士と黒岩麻里博士（北海道大学・創成科学共同研究機構）に感謝申し上げます。

文献

1. 岩松鷹司 (1997). メダカ学全書. 大学教育出版.
2. Iwamatsu, T., Kobayashi, H., Yamashita, M., Shibata, Y., and Yusa, A. (2003). Experimental hybridization among *Oryzias* species. II. Karyogamy and abnormality of chromosome separation in the cleavage of interspecific hybrid between *Oryzias latipes* and *O. javanicus*. *Zoological Science* **20**, 1381-1387.
3. Yamashita, M., Mita, K., Yoshida, N., and Kondo, T. (2000). Molecular mechanisms of the initiation of oocyte maturation: general and species-specific aspects. *Progress in Cell Cycle Research* **4**, 115-129.
4. Sakaizumi, M., Shimizu, Y., Matsuzaki, T., and Hamaguchi, S. (1993). Unreduced diploid eggs produced by interspecific hybrids between *Oryzias latipes* and *O. curvinotus*. *Journal of Experimental Zoology* **266**, 312-318.
5. Shimizu, Y., Shibata, N., Sakaizumi, M., and Yamashita, M. (2000). Production of diploid eggs through premeiotic endomitosis in the hybrid medaka between *Oryzias latipes* and *O. curvinotus*. *Zoological Science* **17**, 951-958.
6. Hamaguchi, S., and Sakaizumi, M. (1992). Sexually differentiated mechanisms of sterility in interspecific hybrids between *Oryzias latipes* and *O. curvinotus*. *Journal of Experimental Zoology* **263**, 323-329.
7. Shimizu, Y., Shibata, N., and Yamashita, M. (1997). Spermatogenesis without preceding meiosis in the hybrid medaka between *Oryzias latipes* and *O. curvinotus*. *Journal of Experimental Zoology* **279**, 102-112.
8. Iwai, T., Lee, J., Yoshii, A., Yokota, T., Mita, K., and Yamashita, M. (2004). Changes in the expression and localization of cohesin subunits during meiosis in a non-mammalian vertebrate, the medaka fish. *Gene Expression Patterns* **4**, 495-504.

山下研ではここで述べた生殖隔離の分子細胞生物学的研究の他に、卵成熟における翻訳開始の分子機構の研究、培養系を用いた精子形成の制御機構の解析、試験管内精子形成系を用いた新しいトランスジェニック生物の作製法など、いろいろと面白い研究を行っています。興味のある方はホームページ <http://bio2.sci.hokudai.ac.jp/bio/seitai1/Welcome.html> をご覧ください。