

染色体操作による有用魚種の品質改善研究－VII

温度処理によって作出したニジマス卵割阻止型 雌性発生魚の再生産特性について

桑田知宣・都竹仁一

Studies on Genetic Improvement Useful Fishes by Chromosome Manipulation-VII

Reproductive Characteristics of Mitotic-Gynogenetic Diploid
Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Induced by Heatshock

Tomonori KUWADA・Niichi TSUZUKU

近年、数種の養殖対象種においてクローンの作出が可能となり^{1~4)}、この技術の育種への応用が期待されている。クローンは卵割阻止型雌性発生魚を親魚に用いて雌性発生魚を作出することにより得られるため、卵割阻止型雌性発生魚の再生産特性を調査することは、この技術の育種への応用を図る上で重要である。水圧処理によって作出したニジマスの卵割阻止型雌性発生魚の次世代の作出については、小野里³⁾、田原ら^{5) 6)}の報告があるが、大量処理が可能な温度処理によって作出したそれらの次世代の作出についての報告はない。温度処理による第一卵

割阻止試験では、処理開始時期に対する正常魚出現率の変化が二峰性を示し、それぞれ積算水温34.1~58.9°C・hに処理を開始した区に出現した正常魚は第一卵割阻止型雌性発生魚（以下GⅡとする）、積算水温68.2~74.4°C・hに処理を開始した区に出現した正常魚は第二卵割阻止型雌性発生魚（以下GⅢとする）と考えられた⁷⁾。そこでこれら二群の雌性発生魚とこれらの群と同一の卵を用いて交配した通常発生魚（以下ICとする）を同一の飼育条件で別々に飼育したところ満2年でこれらの一部が成熟した。そこで、温度処理によって作出したこれらの再

生産特性について調査したので報告する。

材料及び方法

1992年1月14日から4月22日まで10~12日間隔で熟度鑑別調査を行い、腹部を圧迫することによって卵を排出する個体を排卵個体とした。G IIとG IIIの排卵個体から個体別に採卵し、野村ら⁸⁾に従い肉眼観察により卵の過熟状況を判別した。各個体から採卵した卵それぞれに、人工精漿⁹⁾で100倍希釈し3,600ergs/mm²の紫外線を照射した通常ニジマスの精子を媒精し、孵化用水収容10分後に26°C、20分間浸漬の温度処理を行い、雌性発生第2代（G II-g 2およびG III-g 2）を作出した。温度処理をしない卵を雌性発生半数体区（GC）、通常魚雄1尾の精子を媒精した卵を交配区（OC）とした。なお、各OCについて同じ採卵日のものは同一の雄親魚の精子を使用した。各区の発眼期および浮上期に発眼状況と浮上状況の調査を行なった。発眼状況の調査では、眼胚の形成されているものをすべて発眼卵として計数した。浮上状況の調査では、調査時に生残している個体を浮上魚とした。浮上魚は、肉眼観察により脊椎骨の湾曲、腹部の膨満等を指標にして正常魚と奇形魚に分けた。

卵割阻止型雌性発生魚の卵質を評価するための対照としてICの卵質について調査した。1月24日および2月3日に排卵を確認したICの6尾より、2月5日に採卵した。それらの卵を

プールし、その一部にICの雄1尾より採精した精子を媒精した。発眼期に眼胚および胚体の形成状況から正常発眼卵のみ計数し発眼状況を調査した。

G III No.1のGCに多数の正常魚が出現した原因を推察するため、G III No.1のOCの三倍体化率を赤血球の長径差⁹⁾により調査した。

結果

各群の排卵日の調査結果を第1表に、G IIとG IIIの採卵親魚の体重、体長、採卵重量、平均卵重を第2表に、G IIとG IIIの次世代の作出成績を第3表に示した。

G IIとICの半数採卵日は、それぞれ2月12日と2月3日であり、今回用いたG IIおよびICの作出日である1月20日より遅くなった。G IIの採卵期間はICより37日間長かった。G IIおよびG IIIの排卵個体は、採卵前および採卵時には何ら異常は認められなかった。しかし、採卵後の親魚は水生菌の寄生による斃死が多発し全滅した。

G IIとG IIIより採卵した卵は、G IIのNo.3とNo.10の卵に野村らによるStage IIの過熟現象が見られたほかは、肉眼観察による異常は認められなかった。

発眼率、正常魚出現率は、G II、G IIIとも全体的に低く、その作出成績は各親魚ごとに異なっていた。それらは、G II-g 2、OCとともに発眼卵が得られないかまたは極めて低率な場合、

第1表 各群の排卵日比較

試験群 排卵月日	G II群			G III群			I C群		
	排卵尾数（出現率）								
1月14日	尾	%	尾	%	尾	%			
	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)			
1月24日	3	(20.0)	0	(0.0)	3	(23.1)			
2月3日	3	(20.0)	0	(0.0)	4	(30.7)			
2月12日	2	(13.3)	1	(100.0)	1	(7.7)			
2月24日	0	(0.0)	0	(0.0)	2	(15.4)	G II	2月12日	
3月6日	0	(0.0)	0	(0.0)	2	(15.4)		7	1520
3月17日	4	(26.7)	0	(0.0)	1	(7.7)		8	910
3月28日	2	(13.3)	0	(0.0)	0	(0.0)	3月17日	9	2300
4月22日	1	(6.7)	0	(0.0)	0	(0.0)		10	2250
排卵親魚数	15		1		13			11	900
1月14日 雌尾数	20		13		23		3月28日	12	1950
親魚排卵率 (%)	75.0		7.7		56.5			13	730
半数排卵日	2月12日		—		2月3日			14	2300
排卵期間 (日間)	90		—		53		4月22日	15	540

G II 第一卵割阻止型雌性発生魚

G III 第二卵割阻止型雌性発生魚

I C 通常発生魚

O Cでは正常魚が得られるが、G II-g 2では低率(数%)でしかそれらが得られない場合、O CとG II-g 2の両区で正常魚が得られる場合と様々であった。奇形率は全体的に高く、出現率は各親魚、各区ごとに異なっていた。G II-g 2とO Cを比べると、G II-g 2で奇形率が高い例が多かった。また、同一の雄親魚の精子を媒精したO Cにおいても奇形率は各雌親魚ごとに異なっていた。O Cの発眼卵に半数体様の奇形胚が比較的多く観察され、それらの発眼

第2表 採卵親魚、体重、採卵重量、平均卵重

作出群	作出月日	親魚No.	体重 g	体長 cm	採卵重量		平均卵重 mg
					1	2	
1月24日		2	2150	45.0	175	39.9	
		3	1730	41.0	100	28.5	
		4	2150	42.6	100	28.4	
2月3日		5	1740	40.2	240	57.8	
		6	1980	45.1	190	51.9	
G II	2月12日	7	1520	36.2	110	33.1	
		8	910	32.5	94	30.7	
		9	2300	41.0	246	49.3	
3月17日		10	2250	43.5	122	34.1	
		11	900	33.5	90	47.8	
		12	1950	44.0	178	47.5	
3月28日		13	730	31.0	74	30.3	
		14	2300	46.0	166	51.4	
4月22日		15	540	30.0	87	29.3	
		G III	2月12日	1	2300	45.0	220
							48.8

G II 第一卵割阻止型雌性発生魚

G III 第二卵割阻止型雌性発生魚

卵に対する比率は親魚ごとに異なっていた(1.2~26.2%)。また、G Cに比較的多くの正常魚が出現する例も観察された(最大19.5%)。特にG II No. 3とG III No. 1のG Cの正常魚出現率は、温度処理を施したG II-g 2とG III-g 2のそれよりも高かった。G III No. 1のO Cの三倍体化率は25%であった。

2月5日に採卵したI Cの卵のうち1月24日に排卵を確認した2尾より採卵した卵にはStage IIの過熟現象が見られた。プールしたI Cの卵

第3-1表 卵割阻止型雌性発生魚の次世代作出成績 (個体No.G II 1~10)

親魚No.	区	供試卵数	発眼率	浮上率	正常魚出現率	奇形率
		粒	%	%	%	%
G II No. 1	G II - g 2	2942	44.2	35.4	30.7	13.1
	O C	1041	40.9	37.5	35.0	6.7
	G C	833	5.6	0	0	—
G II No. 2	G II - g 2	2747	31.7	11.6	5.8	49.7
	O C	997	68.0	60.4	54.2	10.3
	G C	640	1.3	0	0	—
G II No. 3	G II - g 2	2268	19.8	4.4	3.1	28.3
	O C	430	43.3	36.5	31.6	13.4
	G C	808	17.1	7.1	5.0	29.8
G II No. 4	G II - g 2	3125	0	0	0	0
	O C	392	0	0	0	0
	G C	—	—	—	—	—
G II No. 5	G II - g 2	3044	17.7	2.9	1.9	33.3
	O C	651	57.8	42.4	37.6	11.2
	G C	457	4.6	1.1	1.1	0
G II No. 6	G II - g 2	2741	55.1	13.6	11.1	18.5
	O C	641	91.1	67.4	62.1	7.9
	G C	280	30.0	4.6	4.6	0
G II No. 7	G II - g 2	2573	38.2	2.3	2.0	13.6
	O C	754	79.8	51.3	43.5	15.2
	G C	—	—	—	—	—
G II No. 8	G II - g 2	2215	6.4	0.3	0.1	50.0
	O C	851	75.6	46.1	40.4	12.2
	G C	—	—	—	—	—
G II No. 9	G II - g 2	3901	11.2	1.7	1.3	27.9
	O C	1089	1.2	0.9	0.8	10.0
	G C	—	—	—	—	—
G II No. 10	G II - g 2	2152	11.2	0.7	0.5	21.4
	O C	547	35.6	16.6	10.1	39.6
	G C	—	—	—	—	—

第3-2表 卵割阻止型雌性発生魚の次世代作出成績（個体No.G II 11～15、G III-1）

親魚No.	区	供試卵数	発眼率	浮上率	正常魚出現率	奇形率
		粒	%	%	%	%
G II No.11	G II-g 2	1255	73.5	37.2	32.9	11.6
	O C	629	47.7	25.8	19.1	25.9
	G C	—	—	—	—	—
G II No.12	G II-g 2	3207	32.6	18.4	15.1	18.0
	O C	538	67.1	59.3	54.3	8.2
	G C	—	—	—	—	—
G II No.13	G II-g 2	1683	2.3	0.4	0.2	33.3
	O C	469	19.6	13.6	11.9	12.5
	G C	—	—	—	—	—
G II No.14	G II-g 2	2743	1.3	0.5	0.4	26.7
	O C	485	9.1	7.4	6.4	13.9
	G C	—	—	—	—	—
G II No.15	G II-g 2	1986	0.0	0.0	0.0	—
	O C	787	0.0	0.0	0.0	—
	G C	193	0.0	0.0	0.0	—
G III No.1	G III-g 2	3154	67.6	10.4	8.1	22.3
	O C	871	55.8	39.3	34.9	11.1
	G C	483	37.1	20.7	19.5	6.0

発眼率、浮上率、正常魚出現率は供試卵数に対する割合

奇形率は浮上魚中の奇形魚の割合

G II-g 2 は第一卵割阻止型雌性発生魚より作出了した雌性発生第2代

G III-g 2 は第二卵割阻止型雌性発生魚より作出了した雌性発生第2代

O C はoutbred control

G C は雌性発生半数体区

の正常発眼率(正常発眼卵／供試卵数×100)は
88.3%であった。

考 察

1990年1月20日に行った試験の供試魚の母群
(満4年晚期産卵系ニジマス)の半数採卵日は

1月25日であり、その初産（満3年）時の半数採卵日は2月6日であった。このように当場で飼育している晚期産卵系ニジマスでは、成熟年齢が若い程産卵時期が遅いことが知られている¹⁰⁾。今回調査したGⅡ、GⅢおよびICの年齢は満2年であり、それらの作出に使った親魚より2年若い。このため、それらの半数排卵日がそれらの作出日より遅くなったと考えられる。

卵割阻止型雌性発生魚では、母親で異型接合であった遺伝子座において、その各々で2種類の同型接合型に分離するため、通常魚に比べると遺伝変異が拡大すると考えられており¹¹⁾、実際にアユ^{12) 13)}およびヒラメ²⁾の卵割阻止型雌性発生魚では、成長、再生産等の形質で変異の拡大が認められることが報告されている。本試験において卵割阻止型雌性発生魚の排卵時期が通常発生魚より長期化したのも同様な理由によるものと考えられる。当場において産卵期の遅い系統を作成するため8代の継代を行ったニジマスの満2年時の最終排卵日は4月18日であった¹⁴⁾。これを考慮すると、排卵日が4月22日となったGⅡNo.15のような個体は、当場飼育のニジマスとしては特異であると言える。1代目にしてこのような個体が出現することから、卵割阻止型雌性発生の利用は、産卵時期に関する育種の有効な手法となり得ると考えられる。

水圧処理により作出したニジマスの第一卵割阻止型雌性発生魚からの次世代の作出については、小野里³⁾、田原ら^{5) 6)}の報告があり、ともに作出成績が悪いとしている。温度処理によってこれらを作出した本試験の結果も同様であり、

卵割阻止による雌性発生の育種利用に問題が残った。酒井ら¹⁵⁾は、肉眼観察による卵の熟度判別によって正常卵（Stage I）と判別された卵群の63.6～79.7%は、発眼率が80%以上となるのに対し、過熟卵（Stage II）と判別された卵群ではそれが16.3～20.6%と低くなり、卵の熟度によって次世代の作出成績が異なることを報告している。本試験の通常魚の産出した卵の正常発眼率は88.3%と高く、肉眼観察による過熟卵が多数混在したにもかかわらず、卵質に大きな問題は認められなかった。一方、卵割阻止型雌性発生魚の産出した卵は、肉眼観察においてそのほとんどが正常卵と判別されたにもかかわらず、それらのOCで発眼率が80%以上であったものは16例中1例のみであり、酒井らのStage IIの卵の成績にも及ばなかった。このことより、卵割阻止型雌性発生魚では産出卵の熟度以外の要因によって次世代の作出成績が大きく変動したことが考えられる。卵の熟度以外に卵質に影響を及ぼす要因として、親魚の卵質に係わる遺伝的影響が考えられる。滋賀県醒井養鱒場⁴⁾は、アマゴの第一卵割阻止型雌性発生魚において、親魚によっては高率で次世代を得ることが可能であることを報告している。親魚の卵質に係わる遺伝的欠陥が、次世代の作出成績が悪い原因であるならば、ニジマスにおいても親魚によっては、アマゴの例のように高率で次世代を作出することが可能であると考えられる。今後、他の親魚、系群について同様の試行を繰り返す必要があろう。

精子を遺伝的に不活性化し雌性発生された胚

には、1%以下で自然発生的な二倍体が出現することが知られている¹⁶⁾。G Cに多くの正常魚が出現(19.5%)したG III No. 1では、O Cに多く(25%)の三倍体が観察された。このことより、G III No. 1の卵では通常よりも第二成熟分裂抑制による自然倍数化が起こりやすかったことが推察される。

要 約

1. 温度処理によって作出した卵割阻止型雌性発生魚の再生産特性(排卵時期、次世代の作出成績)について調査した。
2. 卵割阻止型雌性発生魚の排卵期間は通常発生魚のそれに比べて37日間長く、変異の拡大が認められた。
3. 温度処理によって作出した卵割阻止型雌性発生魚の次世代の作出成績は、各親魚ごとに異なっており全体的に低率であった。この原因として親魚の卵質に係わる遺伝的な欠陥が考えられた。
4. 卵割阻止型雌性発生魚の中に自然倍数化が起こり易いと考えられる卵を産出する個体が観察された。

文 献

- 1) HAN, H., N. TANIGUCHI, and A. TSUJIMURA, 1990; Production of Clonal Ayu

by Chromosome Manipulation and Confirmation by Isozyme Marker and Tissue Grafting. Nippon Suisan Gakkaishi, 57, 825-832.

- 2) 山本栄一, 1992; ヒラメにおけるクローンの作出と育種利用. 第13回基礎育種学シンポジウム報告, 41-52.
- 3) 小野里坦, 1992; 第一卵割阻害による純系化魚の遺伝的特性解明 魚介類の雌性発生による育種技術の開発. 農林水産技術会議事務局, 研究成果267, 57-60.
- 4) 滋賀県醒井養鱒場, 1991; マス類の人為倍数体利用による育種に関する研究. 平成2年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書.
- 5) 田原偉成・細江 昭・山本 聰, 1991; ニジマスのクローン魚作出. 平成元年度長野水試事報, 5.
- 6) ——————・—————・—————, 1992; ニジマスのクローン魚作出-II. 平成2年度長野水試事報, 3-4.
- 7) 桑田知宣・臼田 博・熊崎隆夫・都竹仁一, 1992; 染色体操作による有用魚種の品種改善研究-IV ニジマスの卵割阻止最適処理方法について. 岐水試研報, 37, 1-8.

- 8) 野村 稔・酒井 清・隆島忠夫, 1974; ニジマス卵の過熟現象について-I “過熟卵”の形態ならびに出現時

- 期. 日水誌, 40 (10), 977-984.
- 9) 高橋一孝, 1985; マス類の染色体操出による育種試験—I 温度ショックによるニジマスの染色体の倍数化. 昭和59年度山梨魚苗センター事報, 84-91.
- 10) 浅野篤志, 1989; ニジマスの産卵時期の遅い系統の選抜飼育. 昭和62年度岐水試業報, 14.
- 11) 谷口順彦, 1989; 染色体操作の遺伝学的意義 水産増養殖と染色体操作. 水産学シリーズ, 恒星社厚生閣 東京, 75, 104-117.
- 12) TANIGUCHI, N., A. TSUJIMURA, and S. SEKI, 1990; Genetic Variation in Quantitative Characters of Meiotic-and Mitotic-Gynogenetic Diploid Ayu, *Plecoglossus altivelis*. Aquaculture, 85, 232-233.
- 13) 述村明夫・堀江康浩・松本全弘, 1992; 雌性発生法によるアユの有用形質の識別・評価に関する研究—I. 和歌山内漁センター事報, 16, 8-25.
- 14) 後藤功一, 1993; 産卵期の遅い系統の選抜飼育 ニジマスの育種に関する研究. 平成3年度岐水試業報, 12.
- 15) 酒井 清・野村 稔・隆島史夫・大渡 斎, 1975; ニジマス卵の過熟現象について—II 過熟過程における発眼率 ふ化率および異常稚魚出現率の変化. 日水誌, 41 (8), 855-860.
- 16) ヴェエス キルピチニコフ, 1983; 魚類育種遺伝学. 恒星社厚生閣 東京, 22.