

染色体操作によるサケ科魚類の育種に関する研究－II

ニジマスの温度二回処理による第一卵割阻止について

桑田 知宣

Studies on Breeding of Salmonid Fishes by Chromosome Manipulation

Suppression on the First Cell Cleavage by Two Times
Heat-Shock-Treatment to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Tomonori KUWADA

卵割阻止型の雌性発生魚は完全ホモ型となり、雌性発生を再度繰り返すと次世代はクローンとなるため^{1, 2, 3, 4, 5)}、このクローン作出法は新しい育種法として期待されている。その場合、多くの優秀な親魚からより多くの卵割阻止型魚を作出し、選抜を加えるのが最も効果的であるが、卵割阻止は一般的に成功率が低く^{6, 7, 8, 9)}、卵割阻止型雌性発生魚を選抜が加えられるほど大量に作出することは困難である。

ニジマスの水圧処理による卵割阻止型作出率の低下原因として、処理によって一度消失した紡錘体が、処理後再生されることが上げられる。このため紡錘体の再生を阻止し作出率の向上を図るため、水圧処理を二回行う試験が行われているが、期待される効果は得られていない。

一方、水圧処理と温度処理では卵割阻止の最適処理時期が異なっており^{11, 12, 13)}、処理方法によって卵割阻止の分裂阻害作用点が異なっている可能性がある¹³⁾。

そこでニジマス卵割阻止の作出効率の向上を目指し、前報で報告した温度処理の場合の第一卵割阻止の最適処理開始時期¹¹⁾を考慮して、温度処理による二回処理を行ったところ作出率の向上が認められたので報告する。

材料及び方法

1. 作出方法

試験は1992年2月4日に行った。卵は当场で飼育している晚期産卵系ニジマスの4年魚3尾から採卵し、混合して供試した。精子は、同系の雄より採取し、人工精漿¹⁴⁾で100倍に希釈した後、直徑9cmのガラスシャーレに3ml注入して均一に伸ばし、その後振盪しながら400μW/cm・secの紫外線を90秒照射して遺伝的に不活性化し供試した。媒精は洗卵用等調液中で行い、媒精時間を1分間とした後、飼育水（水温5.8°C）中に収容した。処理条件は、29.5°Cの温水に6分間浸漬する場合と28°Cの温水に10分間浸漬する場合の二通りについて検討した。一回目の処理は、媒精後6時間54分（積算水温40.0°C・h）に開始した。二回目の処理は、一回目の処理開始30分後から120分後（積算水温 2.9~11.6°C・h）までそれぞれ15

分間隔で行った。二回の処理を行った区を卵割阻止型雌性発生二回処理区（以下G II-2とした。）倍数化処理を行わなかった卵を雌性発生半数体区（以下GCとする）とした。媒精後11分に倍数化処理を施した卵を極体放出阻止型雌性発生区（以下GIとする）とした。一回目の処理のみを行った卵を卵割阻止型雌性発生一回処理区（以下G II-1とする）とした。紫外線未照射の精子を媒精した卵を通常発生区（以下ICとする）とした。なお、通常発生区は媒精時間が1時間と長かった。処理後卵を堅型孵化水槽に収容し管理した。検卵は48日後（積算水温 273°C・day）に行い、正常、異常に係わらず全ての発眼卵を計数した。浮上状況の調査は86日後（積算水温 586°C・day）に行い、肉眼観察により脊椎骨の湾曲等を指標に正常浮上魚と奇形魚に分けて集計した。

2. 初期生残状況及び体重組成

IC、 GI、 G II-1 の全ての正常浮上魚と二回処理

を行った区のうち、処理条件29.5°Cで二回目の処理を一回目の処理から45分、60分、75分後に行った区と処理条件28°Cで二回目の処理を60分、75分後に行った区の全ての正常浮上魚（以下これらをG II - 2aとする）について、餌付け50日後までの斃死魚数を計数し、各区の初期生残状況を調査した。なお、生残状況については5日ごとに集計した。

餌付け60日目の各区の稚魚について各区90尾ずつ無作為に抽出し、1尾毎の体重を測定し、各区の体重組成を調査した。なお、給餌は各区1日2回の飽食給餌とした。

3. 作出魚のアイソザイム遺伝子型

供試魚には、G I、G II - 1、G II - 2a、から各区30尾を無作為に抽出し、分析まで-20°Cで凍結保存したもの用いた。アイソザイムの検出は、水平式デンプンゲル電気泳動法に依った。ゲル濃度は9%とし、クエン酸-N-（3-アミノプロピル）モルホリン（pH 7.0）緩衝液を用い、定電流（4 mA/cm²）とした。検出した遺伝子座は、SODとIDH-3であり、検出用組織にはそれぞれ肝臓と筋肉を用いた。検出試料は、組織の解凍ドリップとした。これらの遺伝子座はG Iにおいて比較的多くヘテロ型が検出されたものである。

結果

1. 作出成績

発眼率及び浮上成績を第1表に、一回目処理開始から二回目処理開始までの経過時間と発眼率及び正常魚出現率との関係を第1～2図に示した。

G Cにおいて正常魚が1尾認められ、正常魚出現率は0.1%であった。処理条件29.5°Cの二回処理区の発眼率は、処理開始時期が45分の時が最高で54.1%であったが、処理条件29.5°CのG II - 1の発眼率87.3%より低かった。その後発眼率は、二回目の処理開始が遅くなるに従い低下した。処理条件29.5°Cの二回処理区の正常魚出現率は、再処理開始時期が60分の時に最高となり14.3%であった。処理開始時期が30～60分の区の正常魚出現率は、処理条件29.5°CのG II - 1の正常魚出現率6.4%より有意に高かった（P<0.01）。しかし、処理開始時期75分以後に二回目の処理を行った区の正常魚出現率は、G II - 1のそれより低く、二回目の処理開始が遅くなるに従い順次低下した。

二回処理区の奇形率は、G II - 1の奇形率よりも低い傾向があった。

第1表 発眼率及び浮上成績

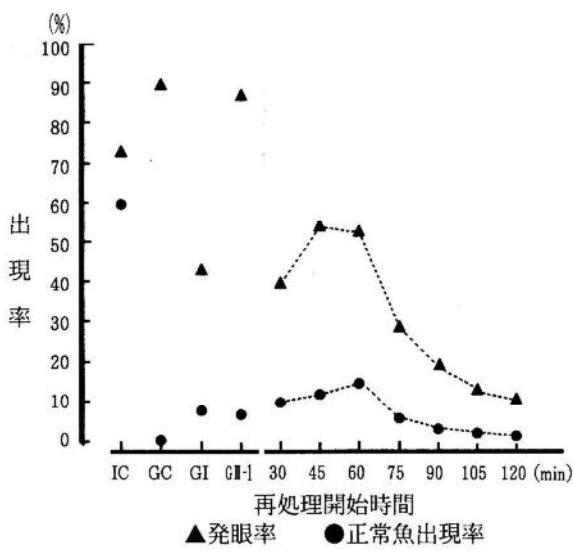
処理条件	試験区	再処理開始時間	処理卵数	発眼率		正常魚出現率	奇形魚出現率
				分	℃・h	粒	%
29.5°C 6分間浸漬	卵割阻止型 雌性発生 二回処理区 (G II - 2)	30 (2.3)	753	39.8		9.6	22.6
		45 (3.8)	1394	54.1		11.6	22.9
		60 (5.2)	1374	52.9		14.3	23.4
		75 (6.7)	1198	29.9		5.8	30.3
		90 (8.1)	1329	19.3		2.7	16.3
		115 (10.5)	1181	13.1		1.8	16.0
		120 (11.0)	711	11.0		0.8	40.0
		G II - 1	1817	87.3		6.4	33.5
		G I	673	43.1		7.4	5.7
		G II - 1	1457	82.5		0.1	77.8
28°C 10分間浸漬	卵割阻止型 雌性発生 二回処理区 (G II - 2)	30 (1.9)	525	66.5		1.7	47.1
		45 (3.4)	1445	68.3		1.6	51.1
		60 (4.8)	1451	59.1		4.1	47.8
		75 (6.3)	1323	30.3		1.9	44.4
		90 (7.7)	1338	15.8		1.1	25.0
		115 (10.2)	1346	9.6		0.2	57.1
		120 (10.6)	649	2.2		0.2	50.0
		G II - 1	1457	82.5		0.1	77.8
		G I	691	59.2		33.6	6.8
		通常発生区(G I C) 雌性発生半数体区(G C)	279 1183	73.1 89.8		59.9 0.1	5.6 80.0

G II - 1 卵割阻止型雌性発生一回処理区 G I 極体放出阻止型雌性発生区

() 内の数字は一回目の処理終了からの経過積算水温

発眼率、正常魚出現率は供試卵数に対する割合

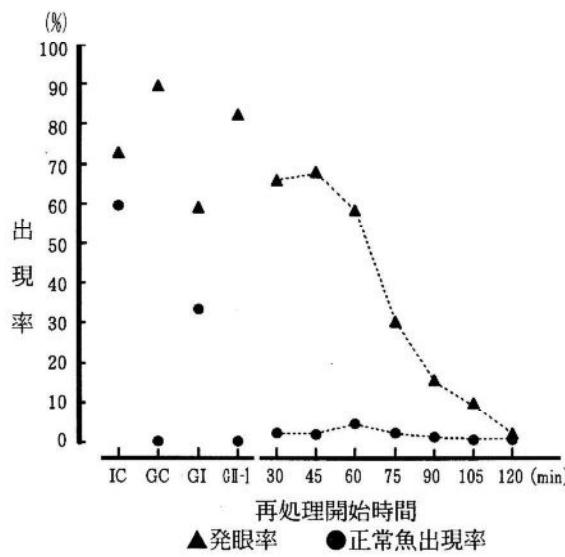
奇形魚出現率は調査時に生存していた個体中の奇形魚の割合



第1図 再処理開始時間と発眼率▲、正常魚出現率●との関係(ニジマス)

処理条件(29.5°C、6分間)

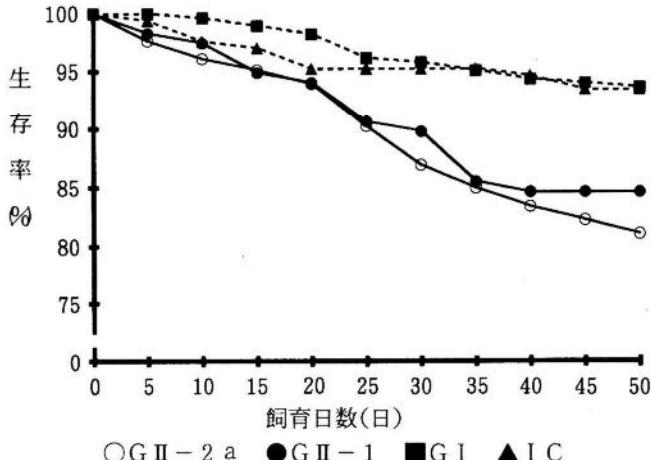
I C	通常発生区
G C	雌性発生半数体区
G I	極体放出阻止型雌性発生区
G II - 1	卵割阻止型雌性発生区



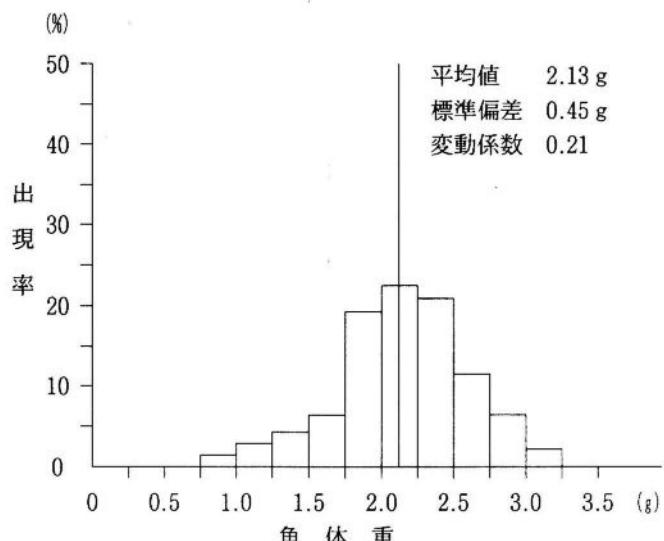
第2図 再処理開始時間と発眼率▲、正常魚出現率●との関係(ニジマス)

処理条件(28°C、10分間)

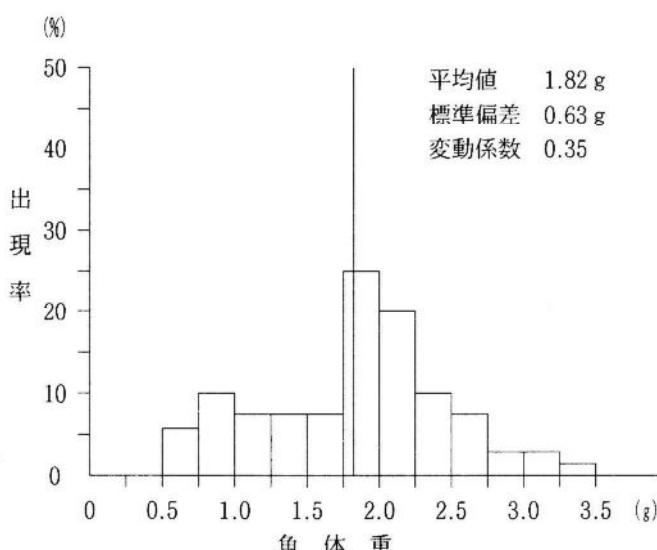
I C	通常発生区
G C	雌性発生半数体区
G I	極体放出阻止型雌性発生区
G II - 1	卵割阻止型雌性発生区



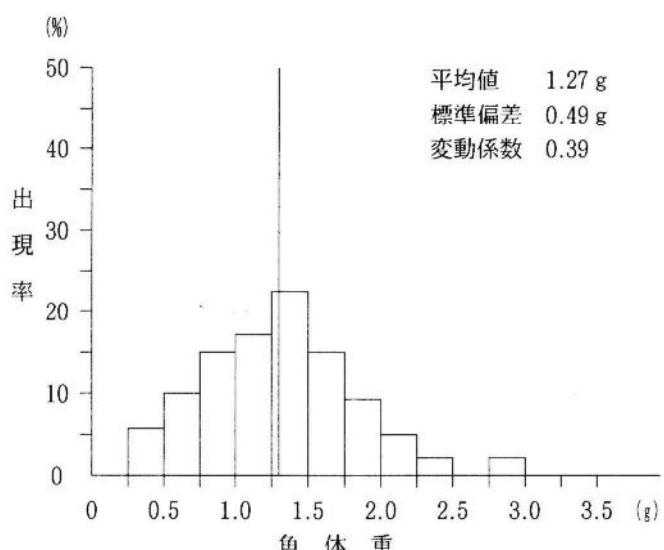
第3図 飼育日数と各区の生存率との関係(ニジマス)



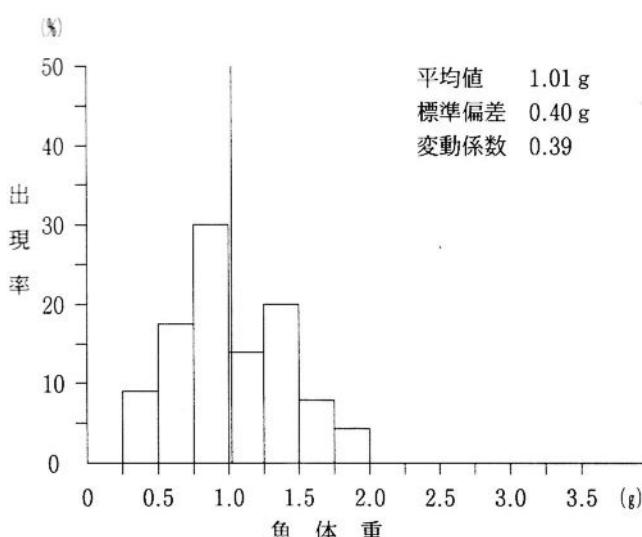
第4図 飼付け60日後の通常発生区の体重組成(ニジマス)



第5図 飼付け60日後の極体放出阻止型雌性発生区の体重組成(ニジマス)



第6図 飼付け60日後の卵割阻止型雌性発生一回処理区の体重組成(ニジマス)



第7図 飼付け60日後の卵割阻止型雌性発生二回処理区の体重組成(ニジマス)

第2表 各区のSOD、IDH-3のアイソザイム遺伝子型

遺伝子座	組織	遺伝子型	G I	G II-1	G II-2 a
SOD	肝臓	AA	0	1	6
		AB	6	0	0
		BB	24	29	24
IDH-3	筋肉	AA	15	17	20
		AB	12	0	0
		BB	3	13	10

G I 極体放出阻止型雌発生区

G II-1 卵割阻止型雌発生一回処理区

G II-2 a 卵割阻止型雌性発生二回処理区

処理条件28°Cの二回処理区の発眼率は、処理開始時期が45分の時が最高で68.3%であったが、処理条件28°CのG II-1の82.5%より低かった。処理条件28°Cの二回処理区の正常魚出現率は、処理開始時期が60分の時に最高となり4.1%であった。また、処理条件28°Cの全ての二回処理区において、正常魚出現率は、処理条件28°CのG II-1の0.1%より高かったが、処理条件29.5°CのG II-1の正常魚出現率6.4%より低かった。

2. 初期生残状況及び体重組成

餌付け後の飼育日数と各区の生残率との関係を第3図に示した。餌付け60日後の各区の体重組成を第4~7図に示した。

餌付け50日後の生残率は、G I、I C、G II-1、G II-2の順で高く、それぞれ0.39%・0.39%・0.35%・0.21%であった。G II-1とG II-2はほぼ同様の傾向で生残率が低下した。

餌付け60日後の各区の体重の平均値は、I C、G I、G II-1、G II-2の順で高く、それぞれ2.13 g・1.82

g・1.26 g・1.01 gであった。餌付け60日後の各区の変動係数は、G II-2、G II-1、G I、I Cの順で大きく、それぞれ0.39、0.39、0.35、0.21であった。

3. 作出魚のアイソザイム遺伝子型

各区のSODとIDH-3のアイソザイム遺伝子型を第2表に示した。

G IにはSOD、IDH-3とともにヘテロ型の遺伝子型の個体が認められた。G II-1、G II-2にはヘテロ型の遺伝子型の個体は認められなかった。

考 察

G Cの正常魚出現率は、0.1%と極めて低率であり、精子の遺伝的不活性化はほぼなされていたと判断される。

G Iには、SODとIDH-3の遺伝子型がヘテロ型である個体が多数出現したのに対し、G II-1とG II-2には、ヘテロ型の個体が認められないため、G II-1とG II-2の個体はともに第一卵割の阻止により倍数化した個体であると推定される。

今回の作出結果から、高温処理によるニジマスの第一卵割阻止を行う場合、一回目の処理から30~60分後に二回目の処理を行うことが有効であると考えられ、特に一回目の処理から60分後に二回目の処理を行うのが最も効果的であると判断される。

二回処理が有効となる原因として、処理条件の処理強度が弱いため、それを二回処理により補う場合と、卵割阻止をより効果的に抑制する分裂メカニズムがある場合と考えられる。今回の試験では、正常魚出現率のピークは、一回目の処理から60分後に二回目の処理を行った区であった。これは温度処理でタイミング良く二回の処理を行うことにより、卵割が阻止されやすくなるようなメカニズムが存在することを示唆している。

著者は、ニジマスの温度処理(30°C、5分間処理)による第一卵割阻止処理卵と未処理卵の初期発生を、水温5.4°Cの条件下で、卵割溝の形成を指標に4細胞期まで観察し、第一卵割阻止処理卵の大部分は、未処理卵に比べて、卵割がおよそ1時間遅れて進行することを確認している(未発表)。

今回の試験で最も二回処理が効果的であった再処理開始時期は60分後であり、それは卵割阻止処理卵の卵割の遅れとほぼ一致している。このことより、二回処理が有効となる原因の1つは、二回処理による処理後の分裂再開の抑制によるものであると推察される。

処理条件28°Cで二回処理を行っても、処理条件29.5°C

のG II-1より各区ともに正常魚の出現率が低かった原因是、卵割阻止のための処理強度不足と考えられ、二回処理を行う場合においても適切な処理強度で処理する必要があると考えられる。

以上の結果より、今回の試験では温度処理によってニジマスの第一卵割を阻止する場合、受精卵を、媒精後積算水温40°C・hのタイミングで29.5°Cの温水に6分間浸漬し、その一時間（積算水温5.8°C・h）後に再度同様の処理をするのが最も効果的であると考えられる。

卵割阻止型雌性発生魚（G II-1とG II-2）の初期生残がG IやI Cのそれに劣ったのは、生残に係わる悪性の劣性遺伝子の顯在化の影響によるものと考えられ、他の報告例と同様であった^{4,15,16)}。また、G II-1とG II-2との間に大きな差が認められないことより、二回処理が、餌付け以後の生残に大きな影響をおよぼすことはないと考えられる。

雌性発生技術を応用した育種の利点の1つとして、卵割阻止型雌性発生魚に選抜を加えた場合その選抜反応が良いことが考えられる。これは、卵割阻止型雌性発生魚では全ての遺伝子座で同祖接合型となるため、遺伝子の分離により遺伝変異が拡大し、環境変異に対する遺伝変異の割合が高くなると考えられるためである。従って、卵割阻止型雌性発生魚の量的形質の変異幅が大きいことは、育種への応用を考える上で重要な特性である。実際に、水圧処理によって作出された卵割阻止型雌性発生魚では、量的形質の変異幅が増大することが知られている^{4,16,17)}。本試験においても、G II-1とG II-2の餌付け60日目の体重の変動係数が、G IやI Cより高く、同様の傾向がみられた。二回処理によって作出された卵割阻止型雌性発生魚においてもこの特性が確認されたことより、作出方法によってこの特性が変化することはないと推察され、この作出方法を育種に応用することについて問題はないと考えられる。

要 約

- ニジマスについて第一卵割阻止方法の確立を目指し、温度処理による二回処理の効果について検討した。
- 媒精後積算水温40°C・hの時に一回目の処理を行い、一回目の処理開始から60分後に二回目の処理を行った時が最も正常魚出現率が高く、二回処理による作出率の向上が認められた。
- 作出魚のアイソザイムの遺伝子型から、媒精後積算

水温40°C・hに処理を開始した区に出した正常魚は、一回処理、二回処理とともに第一卵割阻止型雌性発生魚であると判断された。

4. 作出した第一卵割阻止型雌性発生魚は、通常発生魚や極体放出阻止型雌性発生魚よりも飼育初期の生残が悪く、体重のバラツキも大きかった。

文 献

- 1) Hyon-Sob Han・Nobuhiko Taniguchi・and Akio Tsujimura, 1991; Production of Clonal Ayu by Chromosome Manipulation and Confirmation by Isozyme Marker and Tissue Grafting. Nippon Suisan Gakkaishi 57,82 5-832
- 2) 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.
- 3) T.KOBAYASHI, A. IDE, T.HIASA, S.FUSIKI, and K. UENO, 1994; Production of Cloned Amago Salmon, *Oncorhynchus rhodurus*. Fisheries Science, 60, 3, 275-281.
- 4) 山本栄一, 1995; ヒラメの人為性統御とクローン集団作出に関する研究.鳥取水試場報, 34, 1-145.
- 5) Kazuo Tabata ,and Akira Mizuta, 1997; The Present Situation and Important Issue in Breeding by Chromosomal Set Manipulation in Hirame, *Paralichthys Olivaceus*. Bull. Nalt.Res.Inst.Aquacult.,Suppl.3 43-52.
- 6) 小野里坦, 1987; ニジマス及びサクラマスの第一卵割阻止による雌性発生2倍体.昭和62年度日本水産学会春季大会要旨, 61.
- 7) 田畑和男・五利江重昭, 1988; 第一卵割阻害によるヒラメの雌性発生2倍体の誘起と飼育特性, 日水誌, 11, 1867-1872.
- 8) 高橋一孝, 1986; マス類の染色体操作による育種試験-VII 温度処理による第一卵割阻止の開始時期と時間.昭和61年度山梨魚苗センター

- 事報, 34-38.
- 9) 小林 徹・伏木省三・八木久則・木村忠亮, 1987 ;
マス類の人為倍数体利用による育種に関する研究 ニジマスの雌性発生における倍数化処理時期の検討.昭和62年度滋賀醒井鰐業報, - .
- 10) 小野里坦, 1992 ; 四倍体作出技術の開発 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, 研究成果267, 86-87.
- 11) 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.本誌 No37, 1-7.
- 12) 青森県水産試験場, 1992 ; 平成3年度地域バイオテクノロジー実用化技術研究開発促進事業報告書 形質固定技術の確立によるニジマス、サクラマスの新品種魚の作出技術開発研究
- 13) Yniv Palti, Jane J. Li, Gary H. Thorgaard, 1997 ; Improved Efficiency of Heat and Pressure Shocks for Producing Gynogenetic Rainbow Trout. The Progressive Fish-Culturist, 59, 1-13.
- 14) 高橋一孝・猪田利夫・森沢正昭, 1987 ; ニジマス精子の簡便な保存法.養殖, No280, 101-105.
- 15) 小林徹, 1988 ; マス類の人為倍数体利用による育種に関する研究 第一卵割阻止によるアマゴの雌性発生二倍体について.昭和63年度滋賀醒井鰐業報, - .
- 16) 桑田知宣, 1993 ; 染色体操作による有用魚種の品種改善研究－V 極体放出阻止型及び卵割阻止型雌性発生の飼育初期における特性について.本誌, No38, 1-7.
- 17) Nobuhiko Taniguti • Akio Tsujimura and Shingo Seki, 1990 ; Genetic Variation in Quantitative Characters of Meiotic- and Mitotic-Gynogenetic Diploid Ayu, *Plecoglossus altivelis*. Aquaculture, 85, 223-233.