

平成12年度先端技術等地域実用化研究促進事業報告書

オニオコゼ全雌3倍体作出に関する研究

平成13年3月

石川県水産総合センター

目 次

I 研究課題	2
II 研究担当者・所属	2
III 要 約	2
IV 研究の背景及び目的	3
1. 圧力処理による第1卵割阻止条件の高度化	3
2. 4倍体の作出	3
3. 雄性化ホルモンによる偽雄化の条件と作出	3
4. 精液保存方法	3
5. 全雌3倍体（3倍体）の生理特性	4
V 研究方法	4
1. 圧力処理による第1卵割阻止条件の高度化	4
2. 4倍体の作出	4
3. 雄性化ホルモンによる偽雄化の条件と作出	4
4. 精液保存方法	4
5. 全雌3倍体（3倍体）の生理特性	5
VI 結果及び考察	5
1. 圧力処理による第1卵割阻止条件の高度化	5
2. 4倍体の作出	5
3. 雄性化ホルモンによる偽雄化の条件と作出	5
4. 精液保存方法	8
5. 全雌3倍体（3倍体）の生理特性	8
VII 今後の課題	9
VIII 文 献	9

I. 研究課題名

オニオコゼ全雌3倍体作出に関する研究

II. 研究担当者名・所属

石川県水産総合センター

技術開発部	部	長	山田 悦正
	研 究 主 幹		高門光太郎
	水産研究専門員		浜田 幸栄
	主 任 技 師		戒田 典久 *執筆
	技 師		田中 正隆

III. 要 約

1. 圧力処理による第1卵割阻止条件の高度化

卵割阻止の成功率が低い一つの要因として、卵発生が同調していないことが考えられた。そこで、卵発生水温を変えることで同調化を試みた。28℃の水温で卵発生をさせたところ、適正な圧力処理の開始タイミングである卵割中期を、ある程度同調させることが出来た。

2. 4倍体の作出

媒精22、30分後に30MPaで6分間の圧力処理をし、4倍体を誘起した。現在、誘起魚29尾を飼育している。

3. 雄性化ホルモンによる偽雄化の条件と作出

偽雄を作出するために、配合餌料1g当たりヘメチルテストステロン (MT) 10 μ gを添加し飼育した。試験開始1ヶ月後に全供試魚がへい死したため、試験を中止した。

4. 精液凍結保存

細胞膜非透過型凍害防御剤であるグルコース、ソルビトース、スクロース、トレハロースをそれぞれ浸透圧300及び350mOsm/kgとなるように調製した。そして、これらの一部を別の容器に移し、細胞膜透過型凍害防御剤であるDMSOを最終希釈精液の濃度7.5%となるように添加し、精液を凍結した。浸透圧350mOsm/kgのグルコース、トレハロースで活力が高かった。

5. 全雌3倍体（3倍体）の生理特性

倍数体の生理特性調査の一つとして、骨代謝について調べた。基礎的知見を得るために血中Ca濃度調節に関与するペプチドホルモンであるカルシトニンの塩基配列を解明した。塩基配列はカレイ類の一種に近く、92%が一致した。

IV. 研究の背景及び目的

近年の海面魚類養殖は、ブリ、マダイ及びヒラメ等を対象として盛んに行われている。しかし、生産魚価の低迷、またはウイルス性疾病等による生残率の低下により、これら魚種の生産は頭打ちになりつつある。こういう状況の下で新たな養殖対象魚種の開発が強く望まれており、その一魚種としてオニオコゼも期待されている。本県では1990年から1994年にオニオコゼの陸上及び海面養殖の試験を実施し、養殖の可能性及びその方法について検討した。その結果、オニオコゼの雌は雄よりも成長は早い、雌は成熟すると高水温期に減耗が多い傾向にあることが明らかになった。本研究では、染色体操作技術を用いた4倍体及び全雌3倍体の作出によって、オニオコゼ養殖の生産性を向上させることを目的として試験を実施した。

1. 圧力処理による第1卵割阻止条件の高度化

卵割を阻止するには、細胞分裂中期に加圧処理を施す必要がある。しかしながら、同時に媒精した卵であっても発生は必ずしも同調していない。これが卵割阻止の成功率が低くなる一つの要因になっていると考えられる。そこで、卵発生を同調化させるために海水中での受精卵の管理水温を変え、それぞれの水温においての発生に伴う核の挙動を観察した。

2. 4倍体の作出

全雌3倍体は、4倍体雌と偽雄2倍体を交配することにより大量に効率よく作出できる。そこで4倍体の雌を得るために、現在までに得られた卵割阻止条件により誘起を試みた。

3. 雄性化ホルモンによる偽雄化の条件と作出

全雌3倍体を大量作出するには、偽雄の作出が必要である、そこで、作出に有効な餌料への雄性化ホルモンの添加時期を調べた。

4. 精液保存方法

精液の保存は、採精量がわずかな魚種に対しての試験効率化に関して有効な手段の一つである。また、遺伝子の保存の点からしても重要な技術である。そこで、オニオコゼ

の精液保存方法について試験を行った。今年度は、精液を凍結保存するために適した希釈液を調べた。

5. 全雌3倍体（3倍体）の生理特性

倍数体の生理特性を調べることにより、それらの養殖を実用化する時の取扱い等の知見が得られるとともに、魚が持つ生理活性物質を人間に対して有効な健康食品・医薬品として利用するための基礎的知見が得られる。これにより、食糧生産のための養殖に加え、健康食品・医薬品生産のための養殖を確立することができ、より付加価値を与えることができる。そこで、特に血液中のCa濃度調節に関与するペプチドホルモンであるカルシトニンについて調べることにした。本年度は、オニオコゼのカルシトニンの基礎知見を得るために遺伝子配列を調べた。

V. 研究方法

1. 圧力処理による第1卵割阻止条件の高度化

18、23、28℃のそれぞれの水温で発生させた卵を、媒精後2分間隔でサンプリングをし、2%パラホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒドで固定した。これをヘキスト33342で染色し、蛍光顕微鏡によって観察した。平成11年度に水温23℃で発生させたサンプルを観察し、オニオコゼ卵発生の基準型を確立した。本年度は、水温28℃で発生させたサンプルを観察した。

2. 4倍体の作出

オニオコゼの卵へ精子を媒精し、22或いは30分後に30MPaの圧力で6分間の加圧処理を施した。

3. 雄性化ホルモンによる偽雄化の条件と作出

加圧処理により極体の放出を阻止して雌性発生2倍体を作成した。これに給餌する配合餌料1g当たりヘメチルテストステロン（MT）10 μ gを添加し、孵化後15-115、35-115、55-115、75-115、95-115日目まで給餌した。

4. 精液保存方法

希釈液は、細胞膜非透過型凍害防御剤であるグルコース、ソルビトース、スクロース、トレハロースをそれぞれ浸透圧300及び350mOsm/kgとなるように調製した。そして、これらの一部を別の容器に移し、細胞膜透過型凍害防御剤であるDMSOを最終希釈精液の濃度7.5%となるように添加した。

採取した精液を試験区ごとに分注し、それぞれの試験区に対応したDMSO不含希釈液

を添加して精子濃度をそろえた。その後、DMSO含希釈液で希釈し、ドライアイス上で凍結した。そして、液体窒素中で保存した。

凍結21日後に解凍して精子の挙動を調べた。

5. 全雌3倍体（3倍体）の生理特性

カルシトニン遺伝子の塩基配列を調べるために鰓後腺を摘出した。すなわち、食道及び心嚢と内臓を分けている横中隔壁を含む部分を大きく切り取り、totalRNAを抽出し、RT-PCR法によりmRNAを鋳型としたcDNAを合成して増幅した。これにより得られたPCR産物をサブクローニングし、その後シーケンスした。

VI. 結果及び考察

1. 圧力処理による第1卵割阻止条件の高度化

第1卵割中期（stage 6）に至った卵は、23℃発生区で媒精20分後から出現した（図1）。28℃発生区では、それより8分早い媒精12分後からであった（図2）。また、stage 6の出現がピークを迎えた時間帯は、23℃区で14分間であったのに対し、28℃区では6分間と約1/2の時間であった。このことから水温28℃での発生は、23℃でのそれに比べ同調化させることができたと言える。この時の卵割阻止処理を始めるのに良い時間を推測すると、水温23℃ではstage 6が出現して間もない媒精22分後に加圧処理をすると誘起率が最も高かったことから、28℃での発生でも同じことが起こる媒精12～14分後が良いと思われた。

2. 4倍体の作出

5回の誘起を試みたところ、誘起率は0.03～12.1%と処理ごとに大きな差が見られた（図3）。しかしながら、胚体形成まで至った卵は、正常孵化率が50%以上と高い頻度が得られた。孵化仔魚の活力は、通常魚より弱く、生残率は極めて悪かった。これら誘起の結果、正常孵化仔魚を約1万尾得ることができたが、現在生残しているのは29尾である。

3. 雄性化ホルモンによる偽雄化の条件と作出

試験を始めた1ヶ月後に、原因不明で全試験区の仔魚がへい死したため結果は得られなかった。

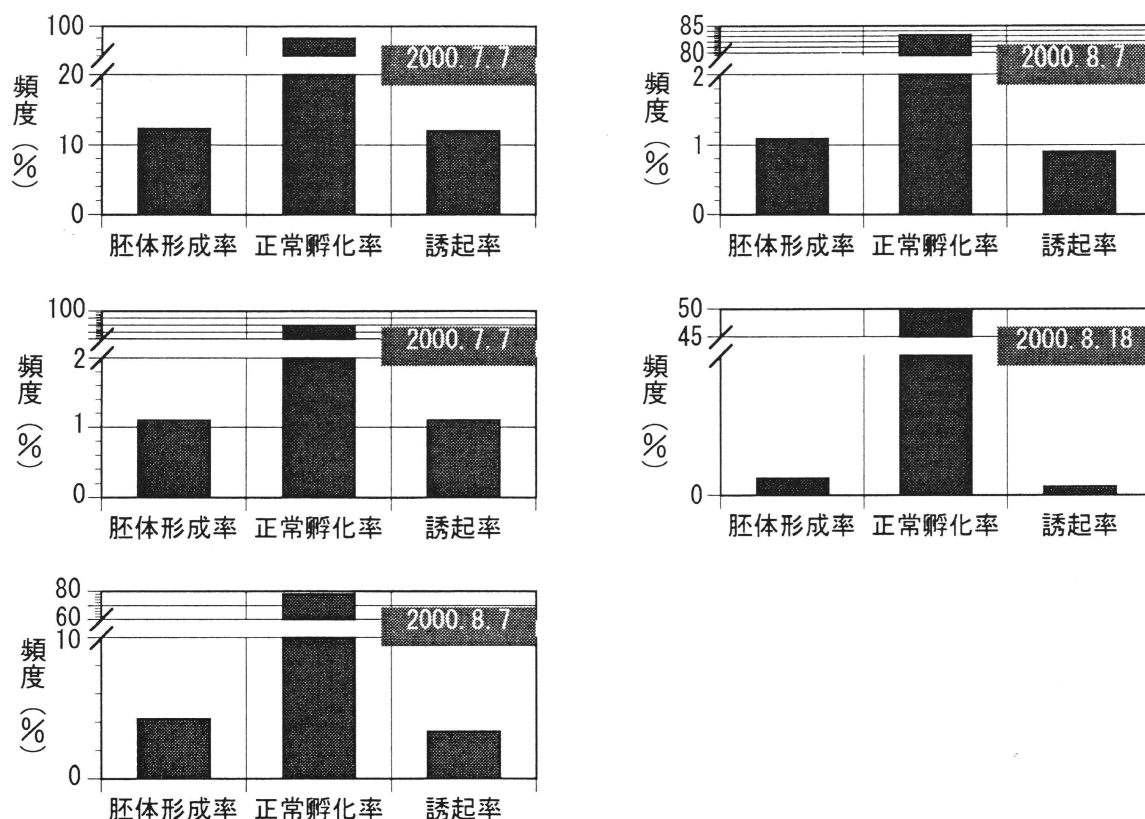


図3 4倍体の誘起

4. 精液保存方法

各希釈液の中で活力が良かったのは、グルコース、トレハロースであった。浸透圧については、昨年度の塩類を主成分とした結果と逆であった。すなわち、浸透圧 300 mOsm/kgより350mOsm/kgの方で活力が高かった（図4）。

本来のオニオコゼ精漿浸透圧は、約350mOsm/kgであるので、精子内外の浸透圧平衡を維持するには、これに近い希釈液を用いる方が良い。しかしながら、凍結保存では、希釈液が凍結する際に濃縮され一時的に浸透圧が高まる。また、凍結後は氷晶が生じ細胞内構造を破壊する現象が見られる。これらの現象は、糖類を主成分とした希釈液では、糖が緩衝作用を示すため起こりにくい、塩類を主成分とした溶液では、前者より起こりやすい。従って、塩類系希釈液では、これらの害が起こりにくい低浸透圧の方で、活力が良かったと考えられる。

5. 全雌3倍体（3倍体）の生理特性

オニオコゼのカルシトニン遺伝子は、他の魚種と同様に32個のアミノ酸から構成されていた。そして、92%の割合でカレイ類の一種のカルシトニン遺伝子の塩基配列と類似しており、アミノ酸配列としては100%一致した。塩基配列で他に類似していた魚種は、フグで79%、サケ76~77%、ウナギ75%で、これらをアミノ酸配列にすると、それぞれ84%、81%、84%の割合で類似していた。

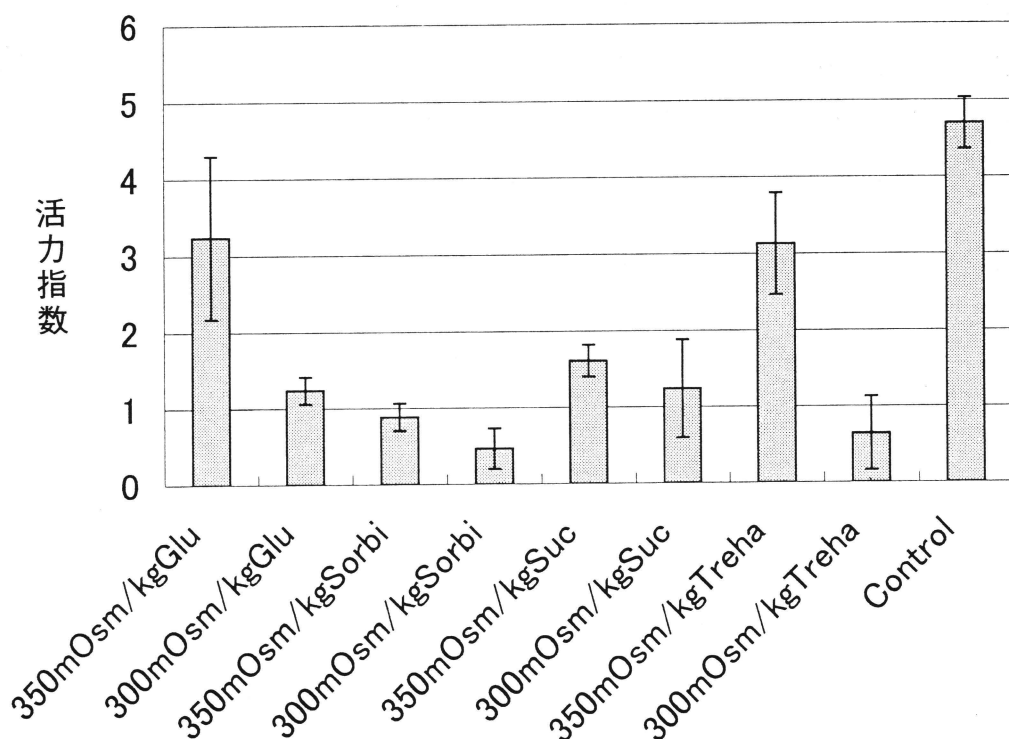


図4 各希釈液で凍結保存した精子の活力

VII. 今後の課題

1. 卵発生速度の同調化をはかり卵割阻止の成功率をより向上させ、4倍体を作成しなければならない。
2. 誘起魚を活かしたままで、容易に、かつ正確に4倍体化の確認が出来る方法を考えなければならない。

VIII. 文献

- (1) Akira Komaru, Hirokazu matsuda, Takashi Yamakawa, and Katsuhiko T.Wada : Meiosis and Fertilization of the Japanese Pearl Oyster Eggs at Different Temperature Observed with a Fluorescence Microscope, *Nippon suisan Gakkaishi*, **56** (3) , 425-430 (1990)
- (2) Etsuo Yamaha, Hiroshi Onozato, and Fumio Yamazaki : Visualization of Female Pronucleus in the Goldfish *Carassius auratus* using Fluorescent Dye, Hoechst 33342, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54** (3) , 537 (1988)
- (3) 尾城隆, ドジョウの人為2倍体性雌性発生に関する細胞学的研究, 日本誌, **53** (6), 933-939 (1987)
- (4) 小島吉雄, 魚類細胞遺伝学, 水交社, 東京, 1983
- (5) 一戸健司, 人工授精, 「ライフサイエンスにおける性と生殖」(朝山新一, 林基之, 北

川照男，一戸健司著)，共立出版，東京，1986，pp.166-214.

(6) 高橋恒夫，動物細胞の凍結傷害と凍害防御剤の作用機序「凍結保存－動物・植物・微生物－」(酒井昭編)，朝倉書店，東京，1987，pp.15-22.

(7) 石川県水産総合センター，平成9年度地域先端技術共同研究開発促進事業報告書，1998

(8) 石川県水産総合センター，平成10年度地域先端技術共同研究開発促進事業報告書，1999

(9) 石川県水産総合センター，平成11年度地域先端技術共同研究開発促進事業報告書，2000