

平成13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14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. 全雌3倍体（3倍体）の生理特性	3
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. 全雌3倍体（3倍体）の生理特性	4
VI 結果及び考察	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	8
3. 雄性化ホルモンによる偽雄化の条件と作出	8
4. 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	永田 房雄
	研 究 主 幹		沢矢 隆之
	主 任 技 師		戒田 典久 (実験・執筆担当)
	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、18、23、28℃と卵培養水温を変えることで受精卵発生の同調化を試みた。18℃で発生させた受精卵を観察したところ、圧力処理に有効な開始タイミングである卵割前期から後期の出現は、培養水温23、28℃より遅延した。また、発生段階にばらつきが見られた。

2. 4倍体の作出

媒精22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3尾を飼育している。昨年度に4倍体化を施した個体について、赤血球面積の測定により誘起率を調べたところ、通常2倍体のそれと違いが見られなかった。

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。試験開始約2ヶ月後に全供試魚がへい死したため、試験を中止した。

4. 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、鰓後腺の形態について調べた。鰓後腺は、通常2倍体、3倍体とも横中隔壁の内臓側に不規則で扁平な袋状の構造物として1個見つかった。

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。しかしながら、これらは魚価の低迷により、生産が伸び悩んでいる。

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ですが、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、細胞分裂前期から後期に加圧処理を施す必要がある。しかしながら、同時に媒精した受精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、受精卵の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ける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ために必要な偽雄2倍体を作出するため、雄性化ホルモンであるメチルテストステロン (MT) の餌料への有効な添加時期を調べた。

4. 全雌3倍体 (3倍体) の生理特性

倍数体の生理生態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り扱い等の知見が得られる。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の作用について調べることにした。本年度は、鰓後腺の形態について調べた。

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受精卵を、媒精後2分間隔でサンプリングし、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。また、昨年度は28℃で発生させたサンプルを観察し、本年度は水温18℃で発生させたサンプルを観察した。

2. 4倍体の作出

オニオコゼの卵に精子を媒精し、22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日目まで給餌することとした。

4. 全雌3倍体(3倍体)の生理特性

鯉後腺は、食道およ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、ブアン氏液で固定後、定法によりパラフィン包埋し、10 μ mの連続切片とした。それらをスライドガラスに貼り付ける際に2群に振り分け、一方は通常のHE染色を施したが、もう一方はカルシトニン抗体を用いた免疫組織化学染色に供した。

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卵割の阻止に有効な時間は、第1卵割前期から後期の間、すなわちstage 3からstage 7である(表1)。よって、これらのステージの出現時間において処理開始のタイミングを詳細に検討すれば良い。これらのステージが出現するピークは、培養水温18℃では媒精24分後から70分後(図1)、培養水温23℃では媒精16分後から46分後(図2)、培養水温28℃では媒精8分後から30分後(図3)の間であった。この様に各ステージのピークが出現する時間は、水温が低ければ時間が遅れ、逆に水温が高ければ時間が早くなった。また、そのステージが観察できる時間幅は、水温が低ければバラツキが大きく、逆に水温が高ければバラツキが小さくなった。すなわち、培養水温が高いと卵発生が同調化されており、加圧処理による倍数体の高い誘起率が期待できる。しかしながら、この時、第2極体の放出を阻止するのに有効な時間と、第1卵割を阻止するのに有効な時

間が近接していることから、第1卵割阻止を施しているつもりでも、第2極体放出阻止を施している可能性がある。逆に、培養水温が低いと卵発生は非同調化しているため、処理による倍数体誘起は低くなると考えられる。しかしながら、第2極体の放出阻止に有効な時間と、第1卵割の阻止に有効な時間は離れているため、第1卵割阻止の処理を施した時、第2極体の放出阻止を施すことは少ないと考えられる。

今後はこれらのことを踏まえて、それぞれの培養水温において、あるいは、これらの培養水温を組み合わせ、第1卵割阻止の開始時間を詳細に検討する必要がある。

表1 オニオコゼ受精卵における核の挙動

発生ステージ	挙動の様子
0	未受精卵（第2成熟分裂中期）
stage 1	第2成熟分裂後期 中期核板の染色体は分極して両極へ移動し始める。
stage 2	第2極体放出（第2成熟分裂終期）
stage 3	雄性前核、雌性前核の形成（第1卵割前期）
stage 4	性前核のクロマチンの縮合（第1卵割前中期）
stage 5	雄性前核のクロマチンの縮合（第1卵割前中期）
stage 6	第1卵割中期 雄性、雌性両前核が接合し、核板を形成する。
stage 7	第1卵割後期 核板の染色体は分極して両極へ移動し始める。
stage 8	染色体の脱凝縮（第1卵割終期）
stage 9	卵割溝が形成され、娘核のクロマチンが縮合する。（第1卵割終期・第2卵割前期）
stage10	第2卵割中期 染色体が核板を形成する。
stage11	第2卵割後期 核板を形成していた染色体分体が両極へ移動する。
stage12	第2卵割終期 卵割溝が形成される。

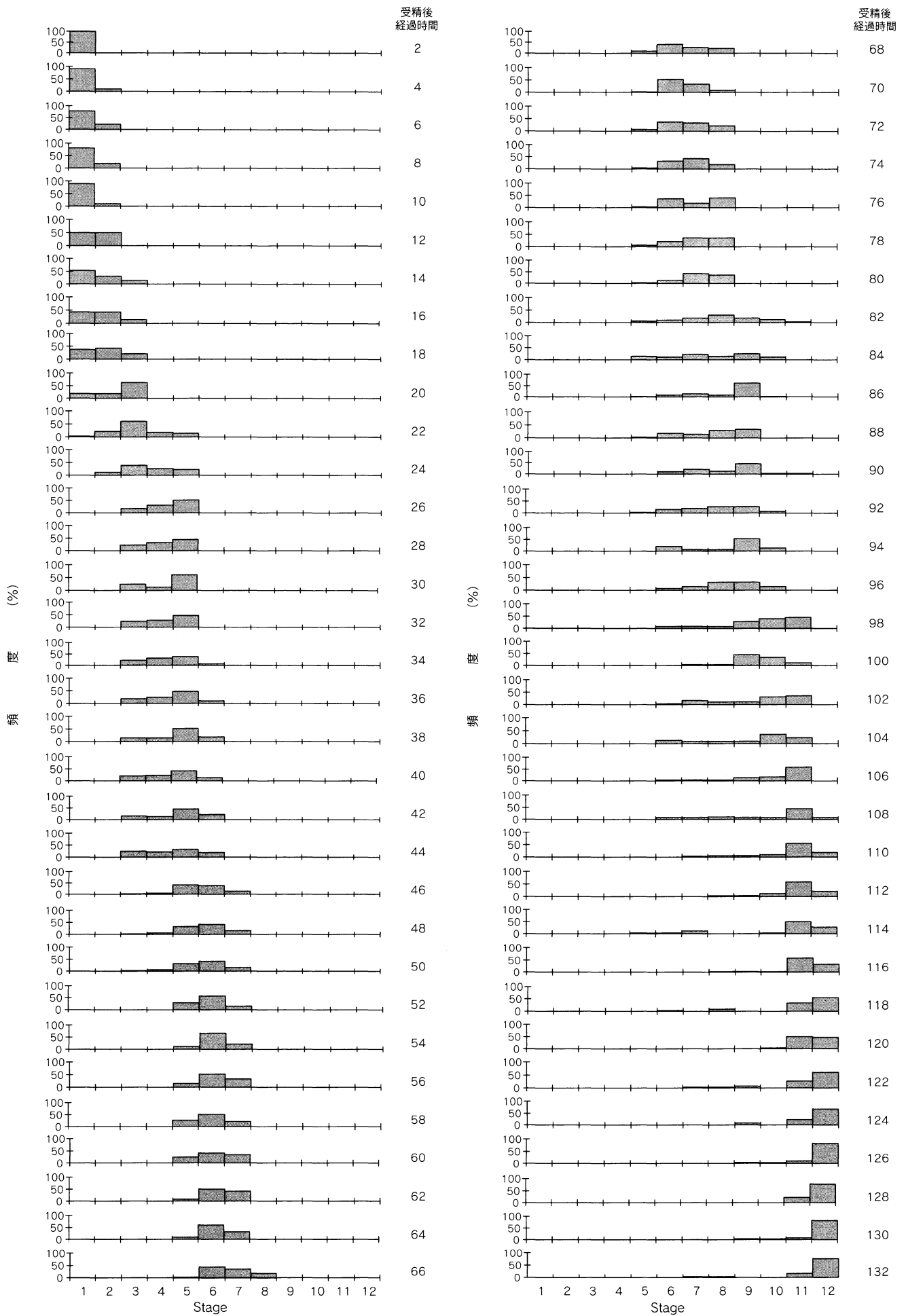


図1 水温18℃での時間経過に伴う受精卵の発生過程

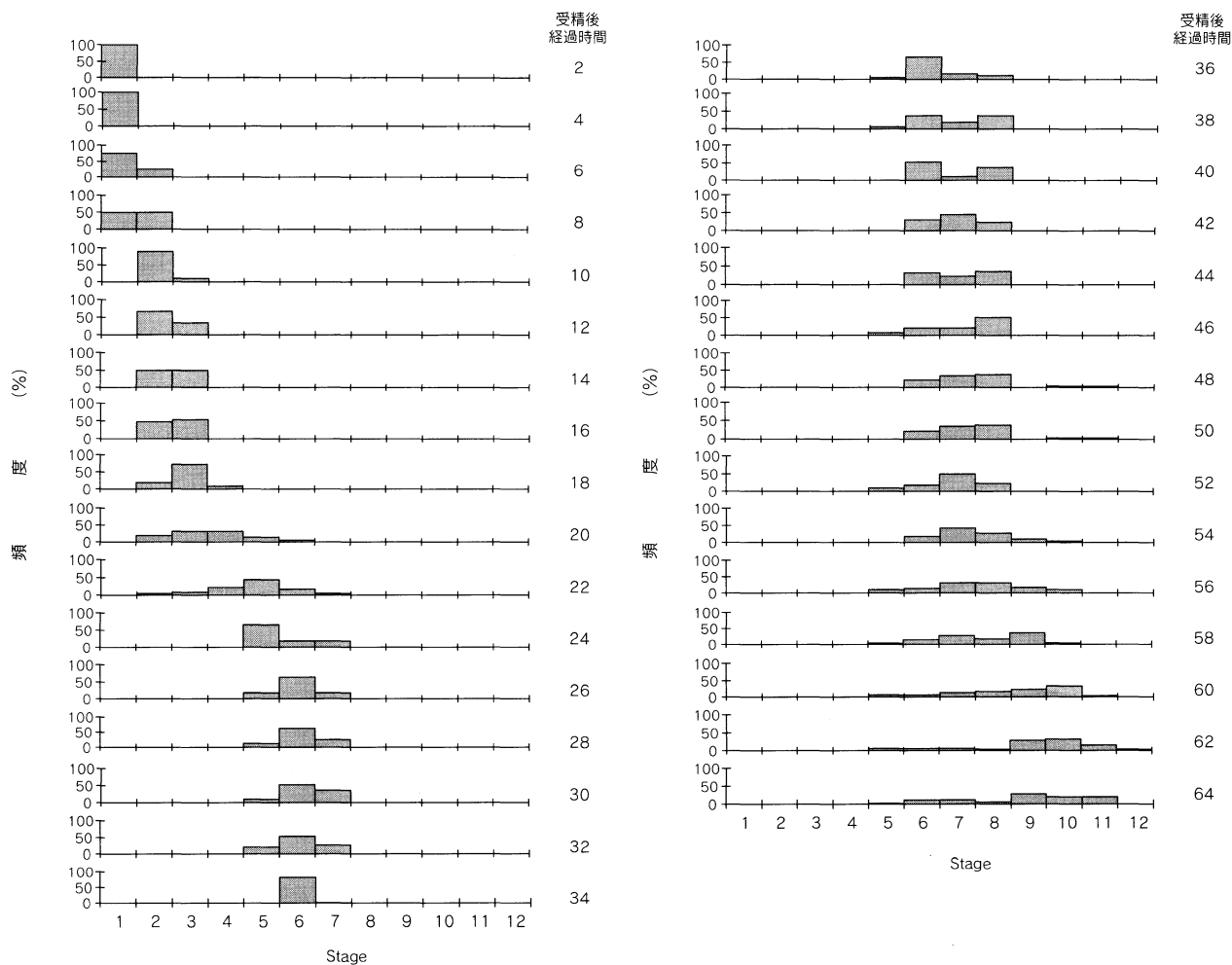


図2 水温23°Cでの時間経過に伴う受精卵の発生過程

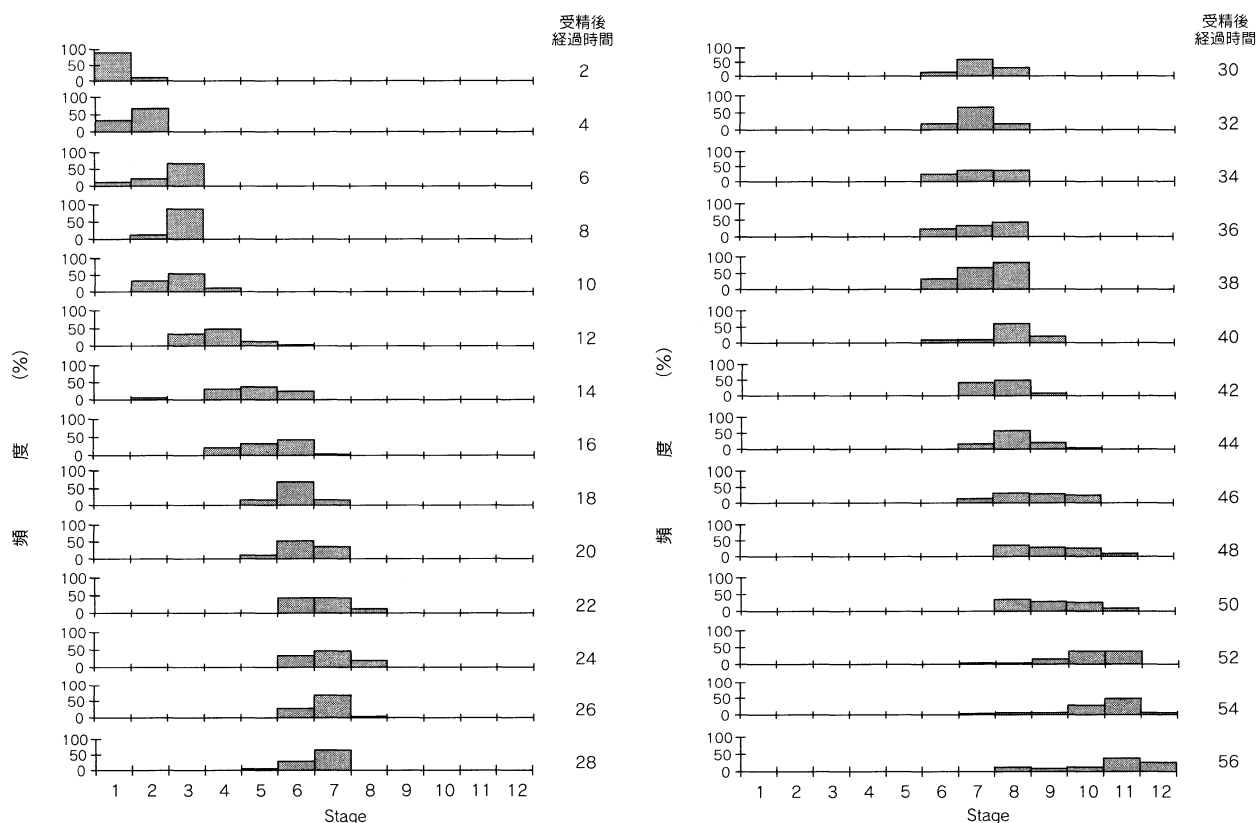


図3 水温28°Cでの時間経過に伴う受精卵の発生過程

2. 4倍体の作出

4回の誘起を試みたところ、4倍体の誘起率は0.2~43.8%と処理ごとに大きな差が見られた(図4)。しかしながら、胚体形成にまで至った卵は、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、生残率は極めて低かった。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3尾(平均全長55.6mm、平均体重3.3g)である。

なお、昨年度に誘起した4倍体は、28尾(平均全長126.4mm、平均体重47.7g)が生残している。これらの4倍体化率は、赤血球面積を測定して調べた。その結果、28尾の全個体の赤血球面積(mean=57.12 μm^2)が通常2倍体のもの(mean=99.77 μm^2)と有意差を認めなかった。従って、誘起処理魚は、4倍体化している可能性が低いと判断された。

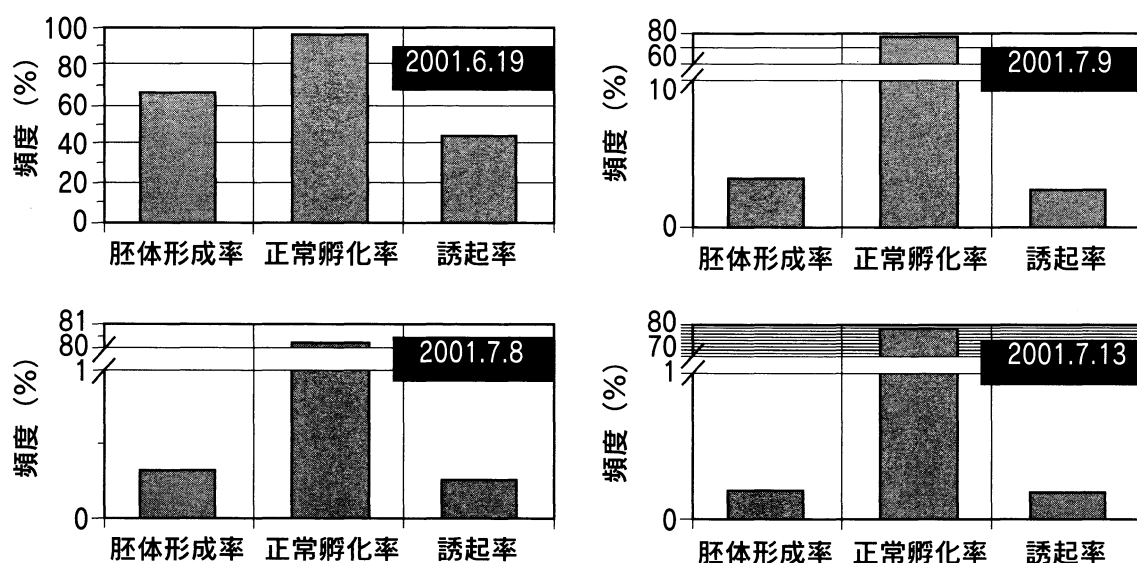


図4 4倍体の誘起

3. 雄性化ホルモンによる偽雄化の条件と作出

供試魚の雌性発生2倍体は、誘起率が1.0%と低く、正常孵化仔魚は約60尾であった。さらに試験開始の孵化後15日目には生残尾数が9尾となり、計画時の試験区を設定できなかった。

このため、代替の試験として、配合飼料1g当たりメチルテストステロン(MT)10 μg を添加して、孵化後15-115日目まで給餌することで偽雄を作出することとした。しかしながら、孵化後82日目に供試魚が全てへい死し、試験期間の途中で終了した。

4. 全雌3倍体(3倍体)の生理特性

HE染色と免疫組織化学染色を施した鰓後腺の組織切片像をそれぞれ図5と図6に示した。非生殖期にある通常2倍体と3倍体の鰓後腺の形には、顕著な差は観察されず、横中隔壁の内臓側に不規則で扁平な袋状の構造物が1個見つかった。また、鰓後腺活性

時に見られる内腔は、ほとんど認められなかった。鰓後腺を構成する細胞の核は、基底部に位置することが多く、細胞質は極めて伸張しており、単位面積あたりの核の数は、2倍体より3倍体の方が少なかった。これは3倍体の鰓後腺を構成する細胞は、2倍体よりゲノムが多く、細胞数が少ないためであると考えられた。

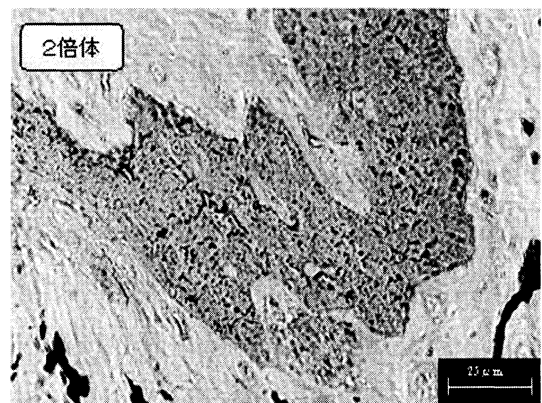
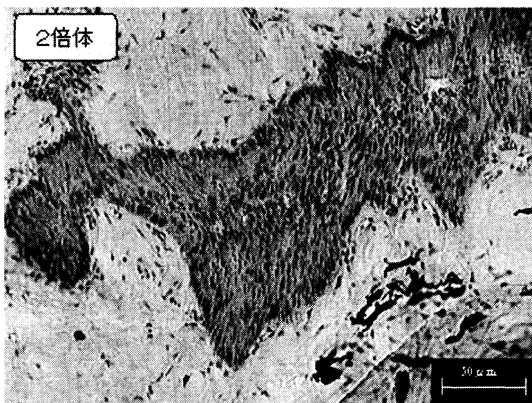
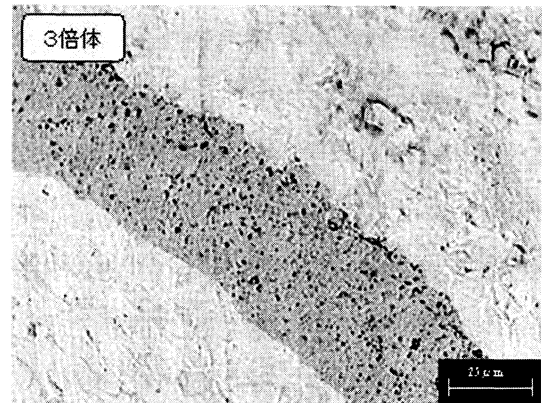
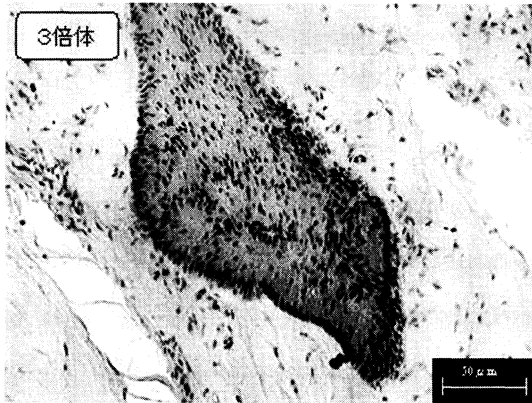


図5 3倍体と2倍体の鰓後腺 (HE染色)

図6 3倍体と2倍体の鰓後腺 (免疫組織化学染色)

VII. 今後の課題

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倍体を作成する必要がある。

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
- (10) 石川県水産総合センター, 平成12年度地域先端技術共同研究開発促進事業報告書, 2001