

平成11年度地域先端技術共同研究開発促進事業報告書

オニオコゼ全雌3倍体作出に関する研究

平成12年3月

石川県水産総合センター

目 次

1. 研究の背景及び目的	2
2. 研究計画	2
3. 研究方法	3
4. 結果及び考察	6
(1) 圧力処理による第1卵割阻止条件の高度化	6
(2) 圧力処理型第1卵割阻止法以外による4倍体誘起方法	6
(3) 4倍体の作出	9
(4) 雄性化ホルモンによる偽雄化の条件	9
(5) ホルモン注射による催熟	9
(6) 精液保存方法	12
5. 文 献	15

<担当機関及び担当者>

石川県水産総合センター

所	長	高橋 稔彦
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
技 師		戒田 典久 *
技 師		田中 正隆

* : 試験及び執筆担当

オニオコゼ全雌3倍体作出に関する研究

石川県水産総合センター

1. 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、ブリ、マダイでは生産魚価の低迷、またヒラメで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ですが、雌は成熟すると高水温期に死に易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する。

2. 研究計画

研究項目	H 9	H 10	H 11	H 12	H 13	H 14
第1 卵割阻止条件						
4倍体作出に関する 他の技術						
4倍体の作出						
4倍体の飼育特性、 生態特性						
ホルモン処理による偽雄化 の条件と作出						
ホルモン注射による催熟						
精液保存方法						
4倍体を用いた 全雌3倍体の作出						
全雌3倍体の飼育特性、 生態特性						

3. 研究方法

(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ける発生に伴う核の挙動を観察した。

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。

今年度は水温23℃について観察し、発生段階の基準を作成した。

(2) 圧力処理型第1卵割阻止法以外による4倍体誘起方法

魚類の4倍体を誘起する方法として、圧力処理によって第1卵割を阻止する方法が知られている。しかし、その誘起率は高いとは言えない。そこで他の方法として、卵割阻止における電気刺激の有効性について検討した。

電気刺激が細胞分裂阻止に対して有効であるかを調べるために、卵割阻止よりも容易に分裂阻止ができる極体の放出に対して処理をした。

刺激は、浸透圧360mOsm/kgに調製したマンニトール溶液中で、パルスパターン2、電気刺激強度5を30~420秒間施した。

(3) 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。

処理は精子を卵へ媒精し、22分後に30MPaの圧力で6分間の加圧処理を施した。

(4) ホルモン処理による偽雄化の条件

全雌3倍体を大量作出するために必要である、偽雄の作出に有効な雄性化ホルモンの餌料への添加濃度を調べた。

配合餌料1g当たりヘメチルテストステロン(MT) 0.01、0.1、1.0、10、100 μ gを添加し、孵化後15日目から110日目までの雌性発生2倍体に給餌した。

試験終了後、供試魚の頭部及び尾鰭を切除し腹部を切開して、生殖腺とその周辺の組織をブアン液で固定した。

組織標本の作製は、サンプルをパラフィンに包埋し、7 μ mの連続横断面組織切片標本作製し、マイヤーのヘマトキシリンとエオシンの二重染色を施して光学顕微鏡で観察した。

(5) ホルモン注射による催熟

完熟した卵を計画的に得られるようにし、試験の効率化を図るため、雌の体側筋へヒト胎盤性性腺刺激ホルモンを500、750、1,000IU/kg·BWの濃度で注射し催熟を試みた。

実験期間中は無給餌とし、飼育水温を23℃に一定させた。

成熟度の判定は経過日数ごとに重量測定を行い、注射前の重量に対する増重率及び腹部膨満状況による成熟評価によって判断した。すなわち、それらは以下の方法で算出あるいは評価した。

$$\text{増重率 (\%)} = (\text{t 日後の重量 g} - \text{開始時の重量 g}) \times 100 / \text{開始時の重量 g}$$

成熟評価

- 0：腹部の膨満が全く見られない
- 1：少し腹部が膨満しているが堅い
- 2：少し腹部が膨満していて柔らかい
- 3：大きく腹部が膨満していて柔らかい

(6) 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、試験の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の希釈液とその濃度について以下の方法で検討した。

(ア) 精液の希釈液 1

希釈液は、精漿のイオン組成の分析結果を基に1997年と1998年に組成した人工精漿(ASP)に、卵アルブミン(EgA)、牛血清アルブミン(BSA)を別々に1.0あるいは5.0g/l添加し、更に凍害防御のためにDMSOを最終濃度8%となるように添加した。

この溶液で精液を4倍に希釈し、ドライアイス上で凍結した後に液体窒素中で保存した。

4日後に解凍して挙動性を観察して活力指数を算出すると共に、卵へ媒精し受精能を確認した。

活力指数の算出は、顕微鏡の一定視野内の全精子を対象に、海水添加15秒後の1秒間に移動した距離を測定し表1の5段階に運動能を分類し評価した。更にそれぞれの評価段階の存在率を求め、それらの段階に与えた評価値に乗じた。この乗数の総和を100で除した値を精子活力指数とした。

表1 精子運動能の評価段階と評価値

評 価 段 階		評 価 値
+++	80 μ m < (著しく活発な前進運動を行うもの)	100
++	40 μ m < \leq 80 μ m (活発な前進運動を示すもの)	75
+	0 μ m < \leq 40 μ m (緩慢な前進運動をするもの)	50
±	小さな旋回または振り子運動を行うもの	25
-	運動を停止しているもの	0

*それぞれの評価段階が一定視野内にどれだけの割合で存在するかを求め、5段階評価に+++; 100, ++;75, +;50, ±25, -; 0なる数値を与え、これに掛け合わせた値を総計し、その値を100で割ったものを精子活力指数とした。例えば、70+++、30++、0+、0±、0-の場合は以下の通りとなる。

$$\text{精子活力指数} = (100 \times 70 + 75 \times 30 + 50 \times 0 + 25 \times 0 + 0 \times 0) / 100 = 92.5$$

(イ) 精液の希釈液2

希釈液は、1997年と1998年に組成したASP (それぞれ1997ASP、1998ASP)、1998ASPのイオン組成を少し改変した1998modi-ASP、そして400mOsm/kgGlu溶液を用いた。これに5.0g/lのEgAとBSAを別々に添加し、更に凍害防御のためにDMSOを最終濃度8%となるように添加した。

この溶液で精液を4倍に希釈し、ドライアイス上で凍結した後に液体窒素中で保存した。

4日後に解凍して挙動性を観察して活力指数を前項に準じ算出した。

(ウ) 希釈濃度

1998modi-ASP、浸透圧400mOsm/kgのグルコース (Glu) 溶液に5.0g/lのEgAとBSAを別々に添加し、更に凍害防御のためにDMSOを最終濃度8%となるように添加した溶液で、精液を2倍あるいは4倍に希釈してドライアイス上で凍結した後に液体窒素中で保存した。

4日後に解凍して挙動性を観察して活力指数を前々項に準じ算出した。

4. 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

卵発生における核の挙動を時間を追って観察すると以下の12ステージに分けることができた。

- ステージ1：第2成熟分裂後期
- ステージ2：第2極体放出
- ステージ3：前核の形成（第1卵割前期）
- ステージ4：一つの前核の縮合（第1卵割前中期）
- ステージ5：他の前核の縮合（第1卵割前中期）
- ステージ6：第1卵割中期
- ステージ7：第1卵割後期
- ステージ8：染色体の脱凝縮（第1卵割後期）
- ステージ9：卵割溝が形成され、娘核のクロマチンが縮合する。
- ステージ10：第2卵割中期
- ステージ11：第2卵割後期
- ステージ12：第2卵割終期

これらのステージの出現頻度を各時間ごとに調べると図1の通りであった。

第1卵割の阻止に有効である卵割中期は、媒精20分後から出現し、26分後から40分後くらいまでがその頻度が高く、その後もわずかながら観察された。

平成9年度の卵割溝の出現観察において推察した通り卵発生が同調しておらず、卵割中期の出現が14分間以上に渡っていた。これを同調化し一時に集中させることができれば卵割阻止率を高めることができる。

(2) 圧力処理型第1卵割阻止法以外による4倍体誘起方法

電気刺激で極体放出を阻止したところ、正常孵化仔魚を誘起することが出来たが、その率は0.4%以下であった（図2）。これは、低温や加圧処理による極体放出阻止の誘起率と比べると非常に低い。従って、電気刺激は極体放出阻止より誘起が困難な卵割に対して、加圧処理に代わる技術として利用するには、種々の大きな課題を解決しなければならない。

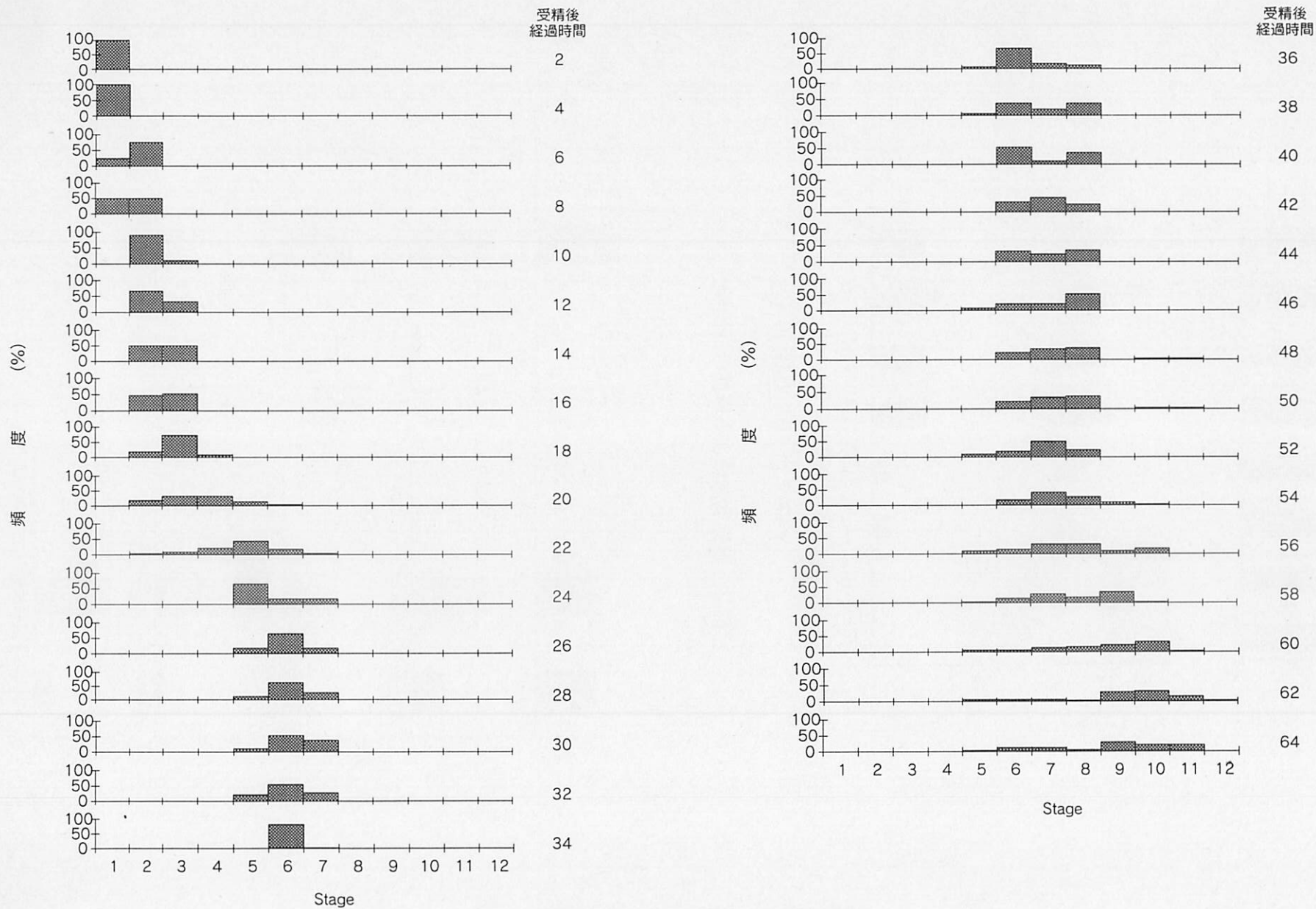


図1 時間経過に伴う受精卵の発生過程

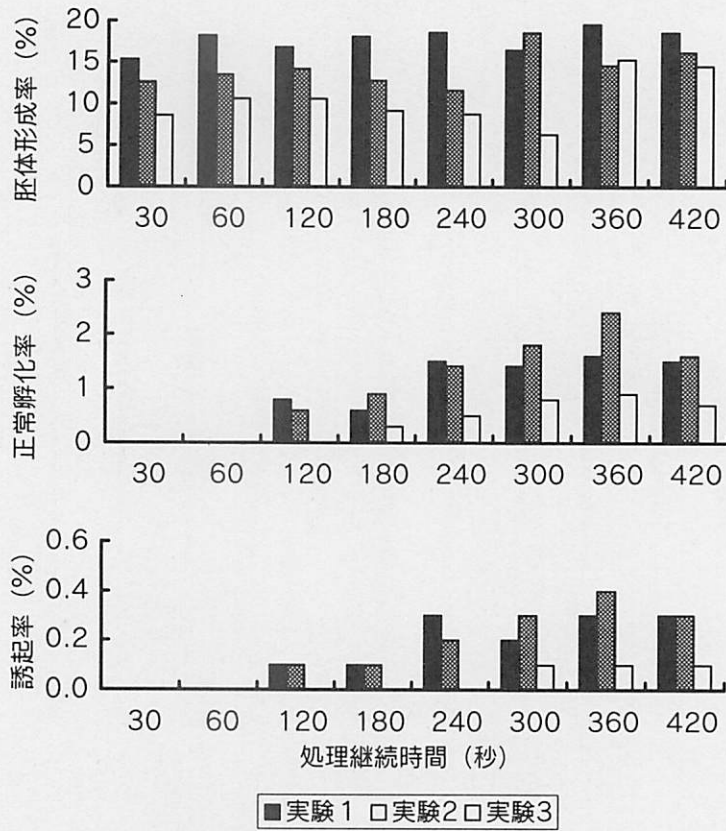


図2 電気刺激による極体の放出阻止

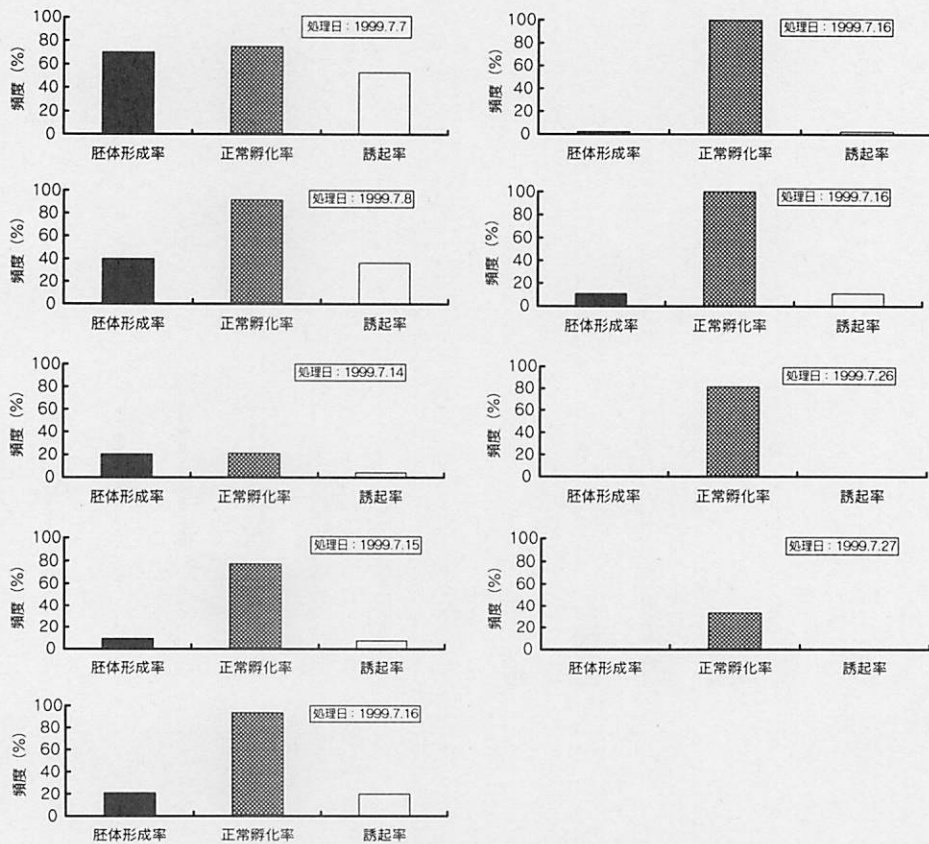


図3 4倍体の誘起

(3) 4倍体の作出

卵割阻止により9回の誘起を試みたところ、誘起率は0.2～53.1%と誘起処理ごとに大きな差が見られた(図3)。これは胚体形成率の影響を受けているためで、卵発生が同調しておらず、卵割中期の出現するピークが媒精時の微妙な条件や卵の成熟状態等の違いにおいて時間的にわずかながら前後移動するためである。従って、誘起率を常に高くするには、卵発生の同調化が最も重要となる。

誘起した魚の赤血球径及び核小体数を調べたところ、4倍体と思われる個体があった。しかし、4倍体であると確定するには実際に染色体数を調べる必要がある。供試魚を殺さずに染色体観察をするには、血液や鱗細胞を培養する必要がある。来年度は、オニオコゼの血液培養の方法を検討し、染色体観察により4倍体を確定する。

(4) ホルモン処理による偽雄化の条件

図4に示した通り、全長、体重ともに同じ傾向が見られ、 $1.0\mu\text{g}/\text{餌料g}$ までMT濃度が濃くなると、成長が悪くなり、それ以上の濃度になると回復する傾向が見られた。生残率についても同様な傾向が見られたものの、いずれの濃度であってもその割合は低かった。対照区に対してMT区の成長が悪いのは、雄性化ホルモンの影響で40～100%の割合で雄化したためであると考えられる。また生残率の著しい低下は、水に溶解しないMTを配合餌料へ添着するのにエタノールに溶解したことで嗜好性が低下し、摂餌が悪くなったこと、また生物餌料の併用給餌を止めたことに起因する。

性転換は、 1.0 、 $10\mu\text{g}/\text{餌料g}$ で100%転換することができた。現在、偽雄を7尾継続飼育している。

(5) ホルモン注射による催熟

1回目の試験で500、750、 $1,000\text{IU}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ の濃度を注射したところ、 $1,000\text{IU}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ で増重したのみで、他の区では顕著な変化は見られなかった(図5)。また成熟評価に関しても、変化が見られなかった(図6)。しかしながら、750、 $1,000\text{IU}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ でそれぞれ2尾ずつから卵を得ることができた。

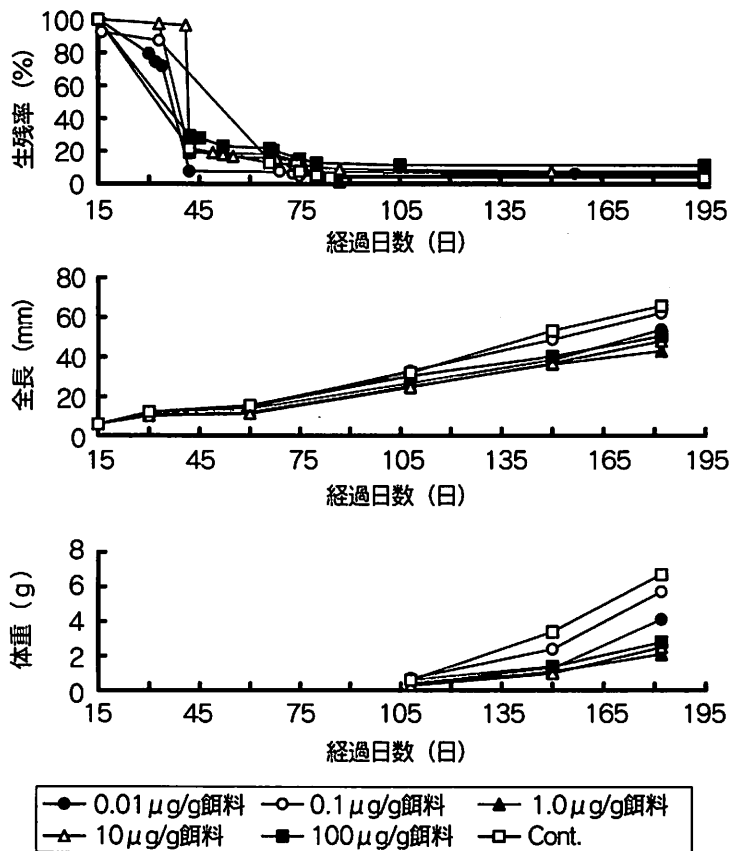
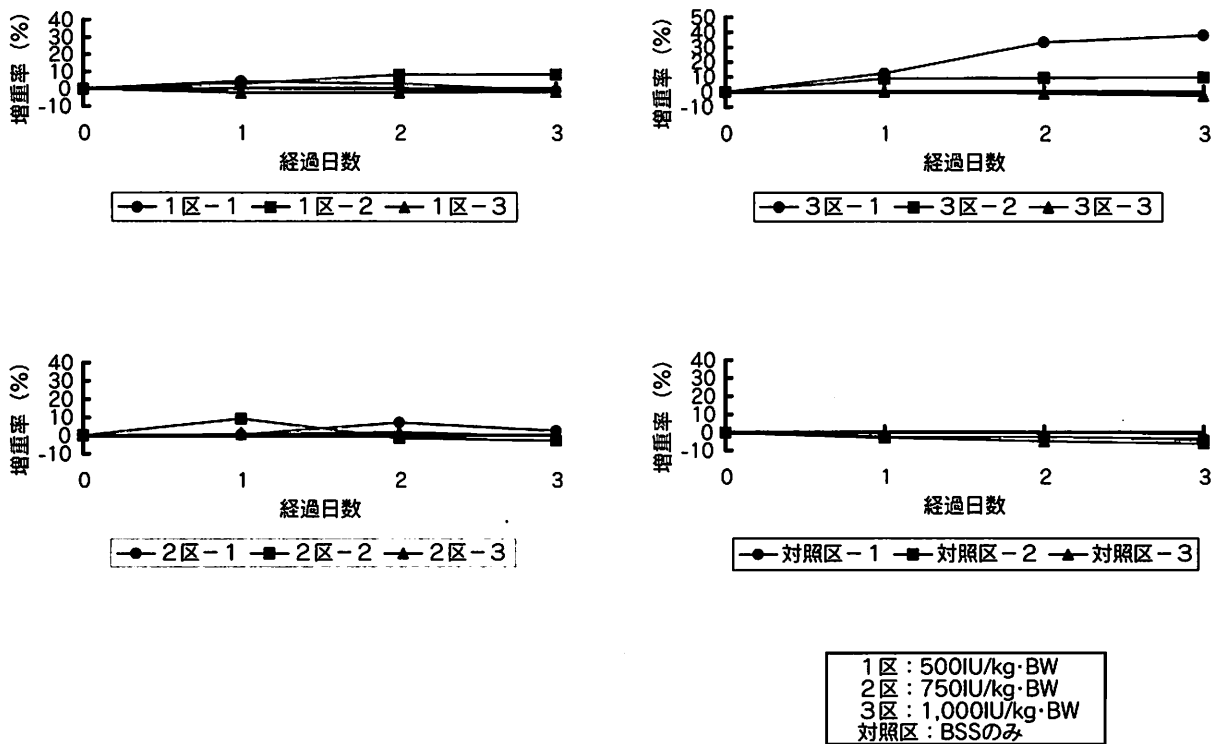


図4 MT添加餌料による飼育



増重率 = (t日後の重量 - 開始時の重量) × 100 / 開始時の重量

図5 ヒト胎盤性性腺刺激ホルモンの注射による増重率の変化1

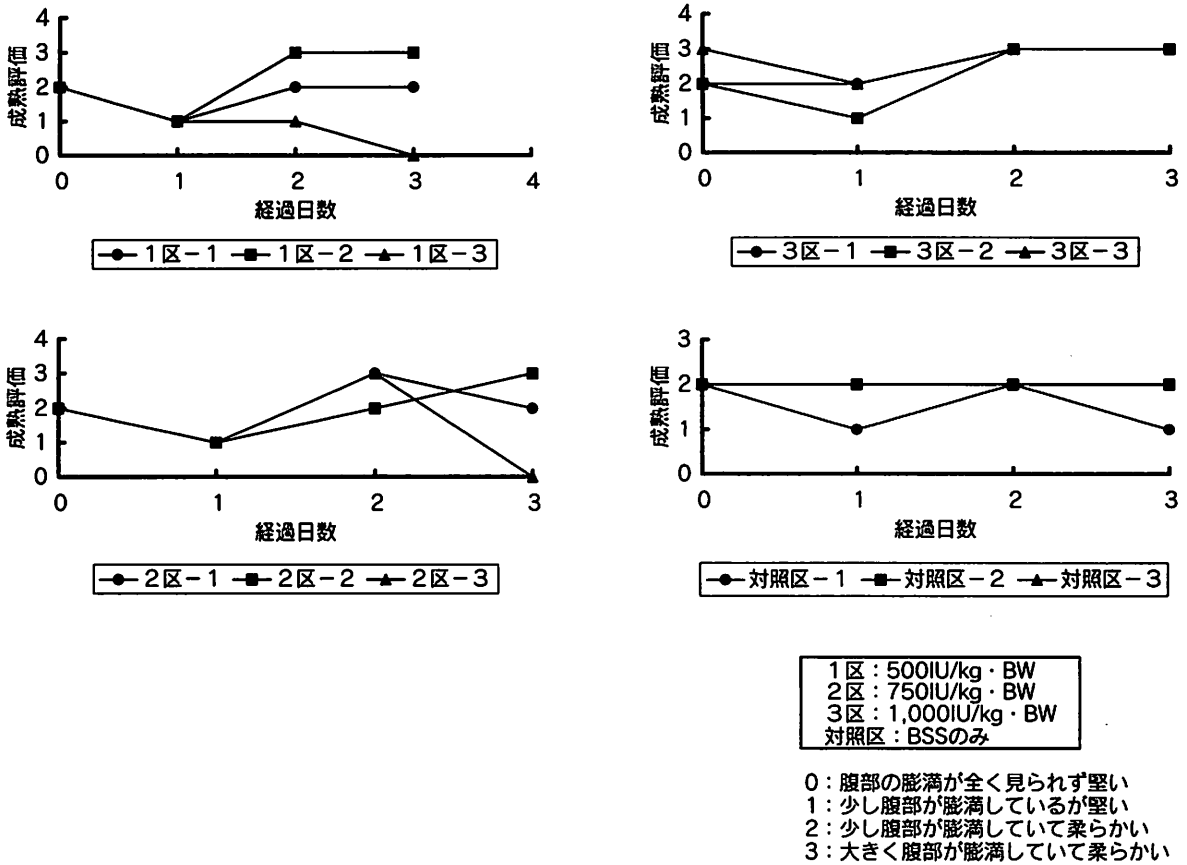
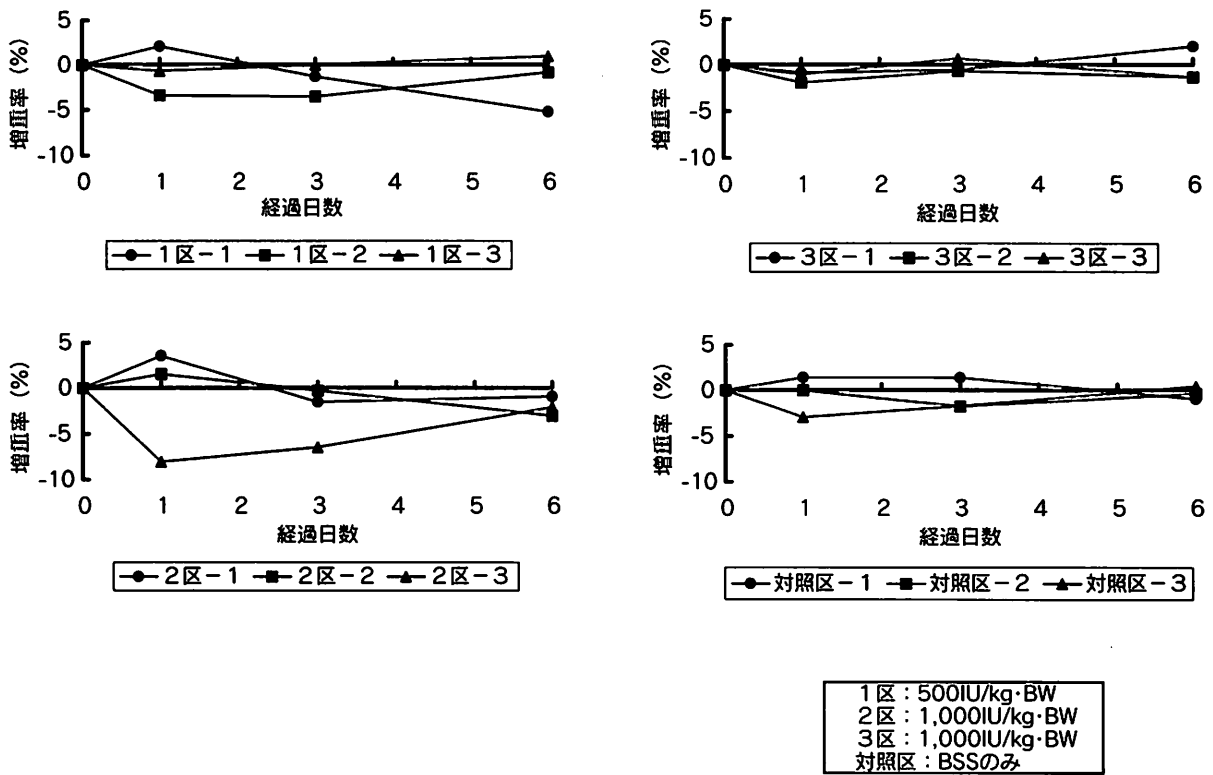


図6 ヒト胎盤性性腺刺激ホルモンの注射による成熟評価の変化1



増重率 = (t日後の重量 - 開始時の重量) × 100 / 開始時の重量

図7 ヒト胎盤性性腺刺激ホルモンの注射による増重率の変化2

2回目の試験では、500、1,000IU/kg・BWの濃度で注射をしたところ、増重する個体はほとんど見られず、逆に体重を減じる個体も見られた（図7）。成熟評価についても評価を上げる個体もあったが、採卵されるまでには至らず卵黄吸収のためか、生殖巣が硬化し始めた（図8）。

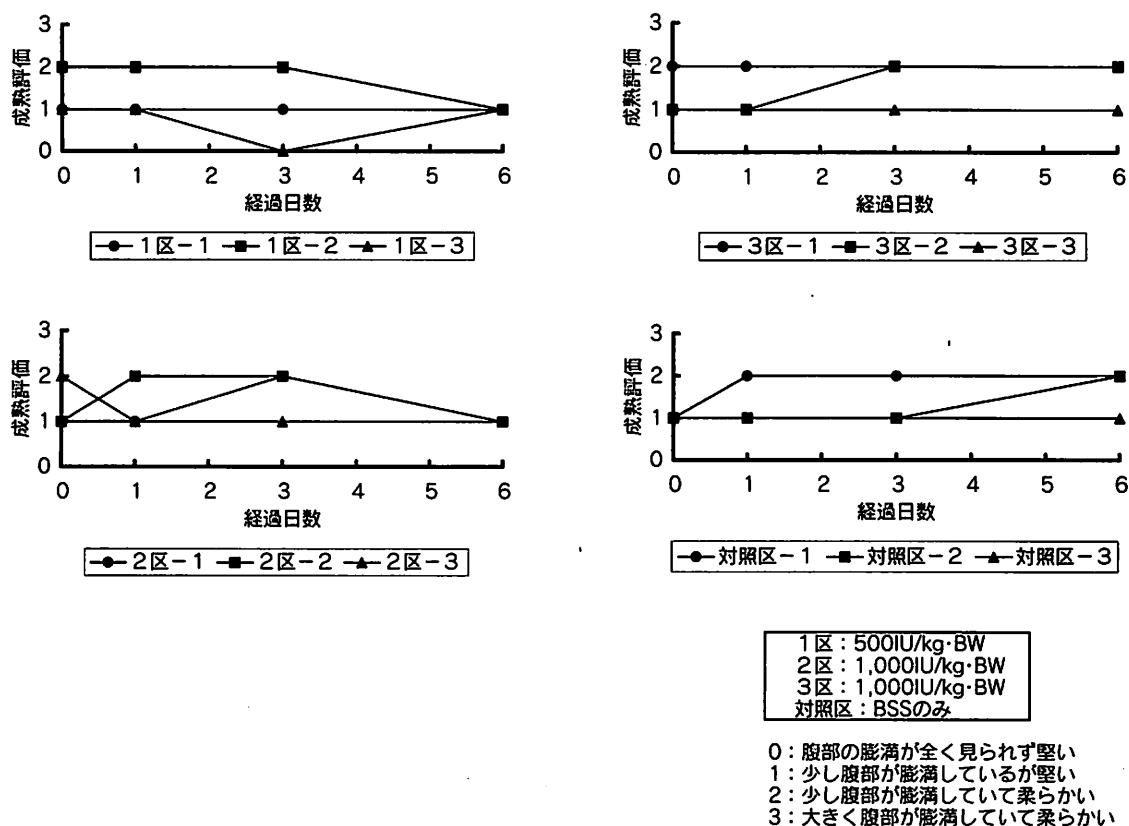


図8 ヒト胎盤性性腺刺激ホルモンの注射による成熟評価の変化2

(6) 精液保存方法

(ア) 精液の希釈液 1

EgA、BSAのいずれについても、添加量が多いほど活力指数は高かった（図9）。凍害防御剤には分子量の低い細胞膜透過型と分子量が大きい細胞膜非透過型がある。前者には、今回使用しているDMSOがある。またEgAやBSAは、分子量が大きいことから後者の役割を果たしていると考えられる。従って、EgAやBSAの添加量が多いほど活力指数が高かったのは、精細胞の内部と外部で凍害防御が成されたためであると思われる。希釈液の違いによる活力指数への影響は、1998ASPより1997ASPの方が高くなった。これは1997ASPの方が浸透圧が低く、凍結にともなう溶液の濃縮による塩害の影響が少なかったためであると思われる。

受精能でも1997ASPの方が高く、その中でも1997ASP-BSAが最も良く、誘起率は6.1%であった（図10）。

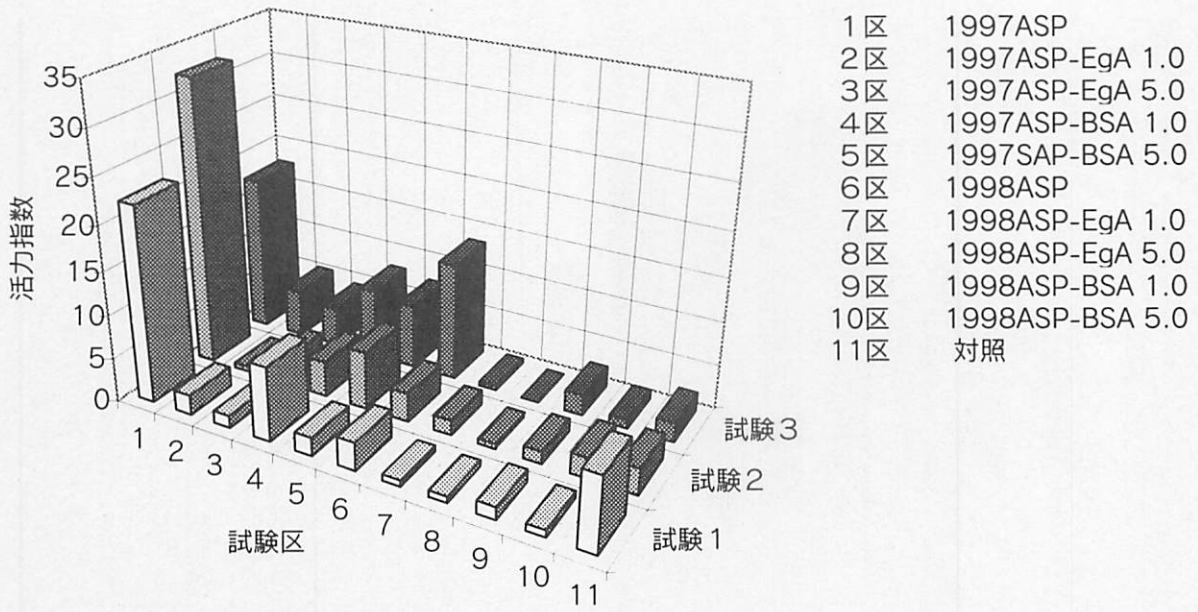


図9 各種希釈液で凍結保存した精子の活力1

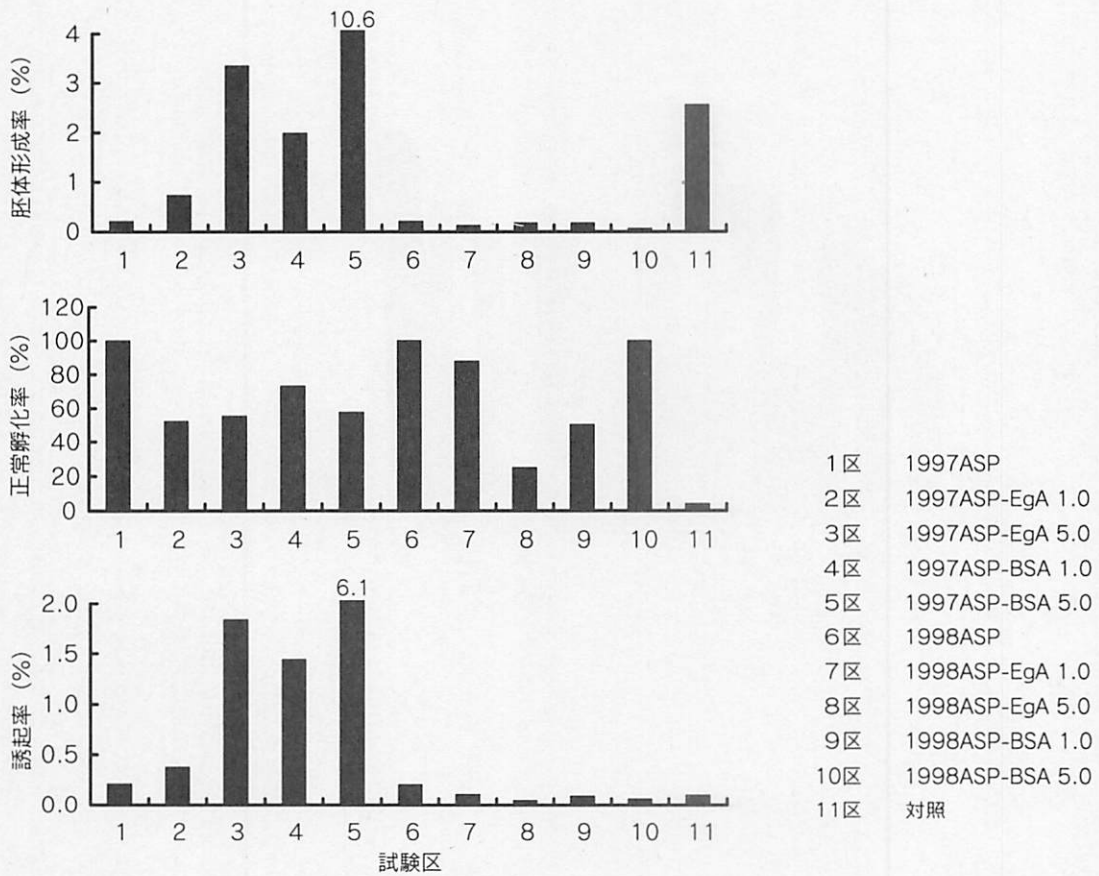


図10 各種希釈液で凍結保存した精子の受精能

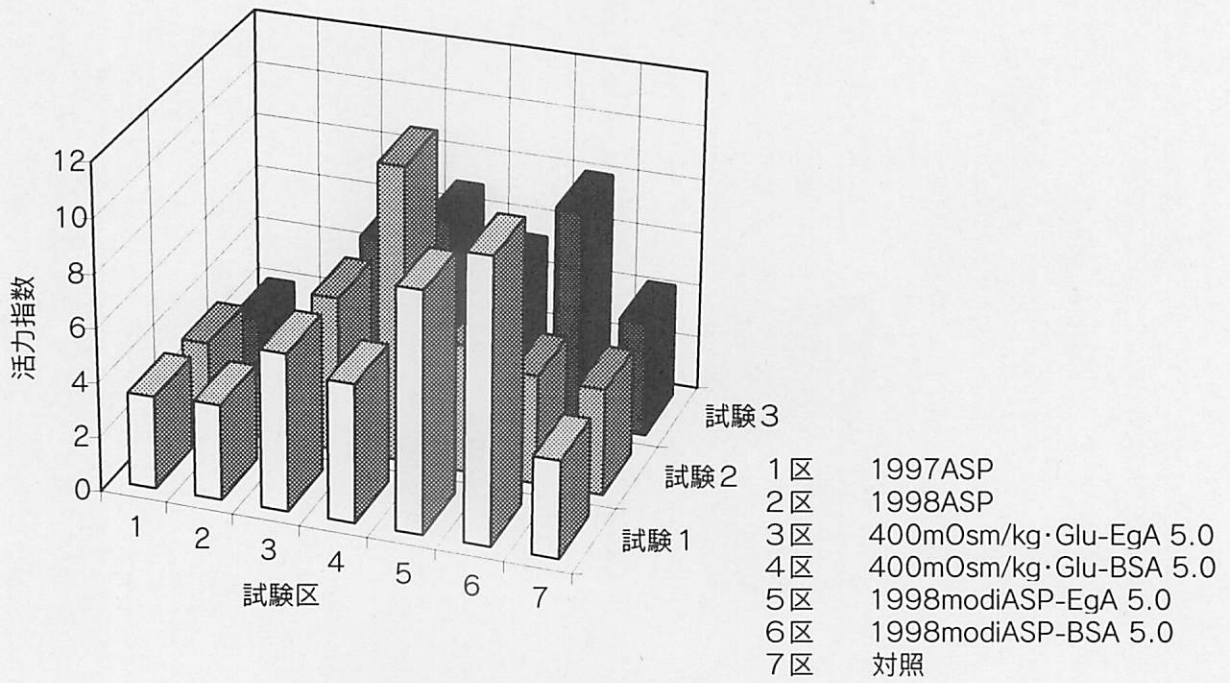


図11 各種希釈液で凍結保存した精子の活力2

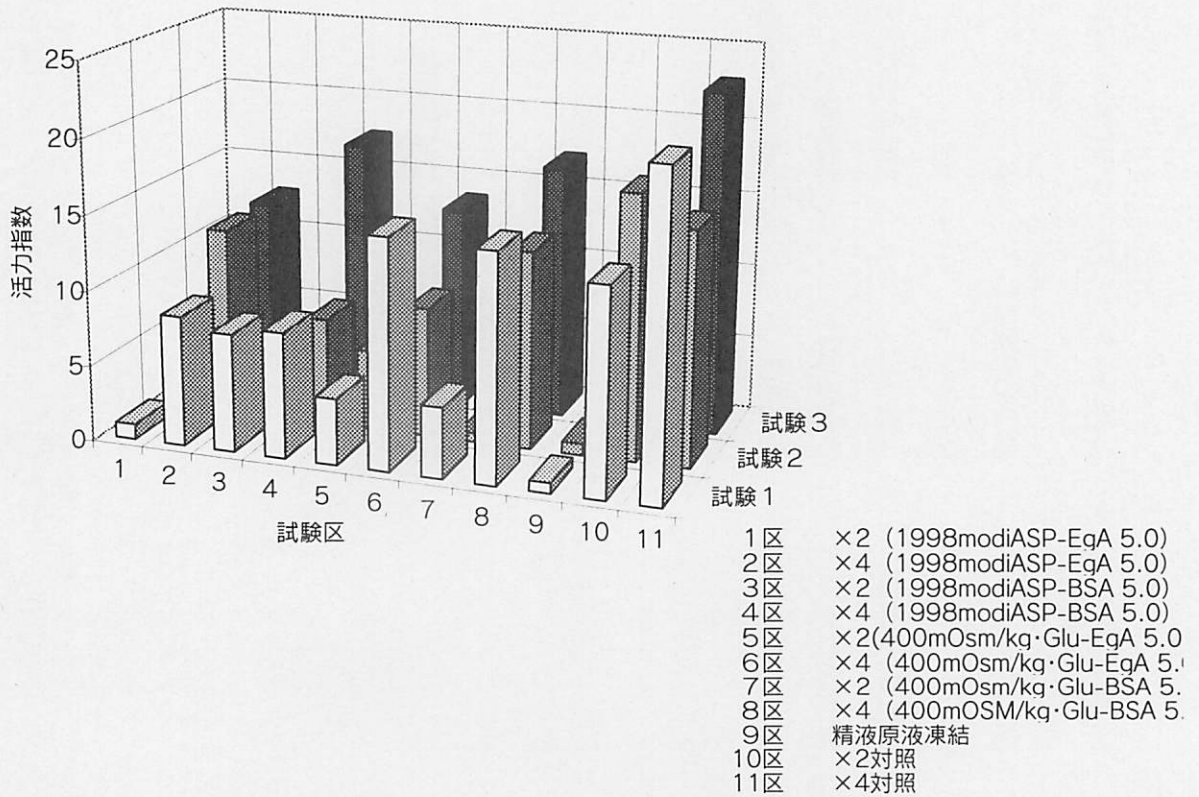


図12 希釈濃度を変えたときの凍結保存した精子の活力

(イ) 精液の希釈液2

前項で説明した通り、凍害防御剤として働くアルブミンを添加した希釈液の方が、活力指数が高かった。400mOsm/kgGlu型と1998modi-ASP型では、活力指数に大きな差は見られなかった(図11)。しかしながら、解凍した精子の細胞膜を顕微鏡で観察すると、1998modi-ASP型より400mOsm/kgGlu型の方が明瞭な像が観察できた。これもDMSOとGluによる精細胞の内側と外側とで凍害防除機能が働いたためと思われる。

(ウ) 希釈濃度

希釈倍率を上げる方が良い結果が得られた(図12)。希釈倍率が高い方が凍結及び解凍に要する時間が短く済み、結晶生成温度帯を速やかに通過し、凍害が生じにくかったからであると思われた。

5. 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, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **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