

平成14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15年3月

石川県水産総合センター

# 目 次

I 研究課題名	2
II 研究担当者名・所属	2
III 要 約	2
1. 圧力処理による第1卵割阻止条件の高度化	2
2. 4倍体の作出	2
3. 雄性化ホルモンによる偽雄化の条件と作出	2
4. 全雌3倍体(3倍体)の生理特性	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	5
3. 雄性化ホルモンによる偽雄化の条件と作出	5
4. 全雌3倍体(3倍体)の生理特性	5
VI 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. 4倍体の作出	6
3. 雄性化ホルモンによる偽雄化の条件と作出	9
4. 全雌3倍体(3倍体)の生理特性	9
VII 今後の課題	10
VIII 文 献	10

# 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	仙北屋 圭

## III. 要 約

### 1. 圧力処理による第1卵割阻止条件の高度化

細胞分裂阻止剤であるコルセミドで受精卵を処理することにより、卵発生を同調化させることを試みた。

卵発生水温18°Cで媒精20分後に処理を施した時、第1卵割中期へ同調させるためのコルセミド濃度は、0.1~0.5 $\mu$ g/mlが適正な濃度であると考えられた。

### 2. 4倍体の作出

オニオコゼの卵へ精子を媒精した後、受精卵を18°Cで発生させた。その後、次の5種類の処理条件で加圧処理を施した。媒精33分後に水温31.6、33.0もしくは38.0°Cの海水へ、媒精37分後に28.0°Cの海水へ、媒精42分後に43.0°Cの海水へ移し、30MPaで7分間の加圧処理である。

誘起した個体を飼育し、赤血球面積を測定したところ、通常発生2倍体の赤血球面積より有意 ( $p < 0.01$ ) に大きい個体が生残個体数45尾の中に2尾いた。

### 3. 雄性化ホルモンによる偽雄化の条件と作出

雌性発生2倍体の正常孵化仔魚を2回の誘起により、約1,190尾と約5,620尾得た。これらに孵化後15日目から孵化後115日目まで、配合飼料1gあたりにメチルテストステロン (MT) 10 $\mu$ gを添加した餌を給餌して偽雄化した。

現在の生残尾数は、5尾 (全長約30mm) で飼育を継続している。

### 4. 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。

通常発生 2 倍体と 3 倍体の血漿Ca濃度は、雌雄で有意な差は認められなかった。

しかしながら、血漿カルシトニン濃度は、3 倍体 (1,593.8pg/ml) と 2 倍体 (13,702.4 pg/ml) で、2 倍体の方が有意 ( $p < 0.01$ ) に高かった。また、2 倍体では、2 倍体雄 (5,498.2pg/ml) より雌 (21,906.6pg/ml) の方が有意 ( $p < 0.01$ ) に高かった。

## 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、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

受精卵を卵割阻止するには、細胞分裂中期付近で加圧処理を施す必要がある。しかしながら、一腹の卵を同時に媒精しても卵の発生は同調していないため、卵割阻止の成功率が低くなる。そこで、細胞分裂阻止剤であるコルセミドで受精卵を処理することにより、卵発生を同調化させることを試みた。

### 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。昨年まで、受精卵を水温18、23、28°Cで発生させたときの核および染色体の挙動を観察した。それにより、発生水温が高ければ、同時期に同発生ステージの出現頻度が高くなることが分かった。この知見を踏まえて、4 倍体の誘起を試みた。

### 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、偽雄の作出が必要不可欠である。そこで、雄性化ホルモン (メチルテストステロン) を添加した配合飼料を給餌することによって、オニオコゼ雌性発生 2 倍体を偽雄化した。

### 4. 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。昨年度は、鰓後腺の形態とカルシウム代謝について調べた。本年度は、産卵期における 3 倍体と 2 倍体の血中Ca濃度と血中カルシトニン濃度について調べた。

## 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

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。

実験1として、オニオコゼの受精卵を媒精0 (媒精後直ぐ)、5、10、20、30、40分後の各時間から媒精120分後までコルセミド10 $\mu$ g/mlを含む海水へ浸漬した。また、対照 (control) として、無処理でも発生させた。さらに、実験2として、0 (control)、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、7.5、10.0 $\mu$ g/mlのコルセミド海水へ媒精20分後から媒精120分後まで浸漬した。卵の発生水温は、終始18 $^{\circ}$ Cを維持した。コルセミドでの処理終了後直ちに、これらの卵の一部を0 $^{\circ}$ Cの2%パラホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒドで一晩固定した。その後、サンプルの卵から、卵膜および卵黄を除去して細胞質部分を取り出し、ヘキスト33342溶液で染色した。そして、発生ステージを観察し (表1)、第1卵割中期への同調率を調べた。また、コルセミド処理を施した他の一部は、清浄な海水で洗浄し、通常通りに発生そして孵化させ、正常孵化率を求めた。

同調率および正常孵化率の統計処理は、 $\chi^2$ 検定の後、Tukeyの方法による比率の差の多重比較検定を行った。

## 2. 4倍体の作出

表2 処理条件

媒精水温 (°C)	処理開始時間 (分)	処理水温 (°C)	処理時間 (分)
18	33	31.6	7
18	33	33.0	7
18	33	38.0	7
18	37	28.0	7
18	42	43.0	7

オニオコゼの卵へ精子を媒精した後、受精卵を18°Cで発生させた。その後、次の5種類の処理条件で加圧処理を施した(表2)。媒精33分後に水温31.6、33.0もしくは38.0°Cの海水へ、媒精37分後に28.0°Cの海水へ、媒精42分後に43.0°Cの海水へ移し、30MPaで7分間の加圧処理である。そして、その結果を誘起率によって評価した。

誘起した個体の倍数性は、定法で血液塗沫標本を作製し、赤血球面積の大きさにより判定した。赤血球面積は、赤血球像をデジタルカメラでコンピュータへ取り込み、画像解析ソフトを用いて、1個体当たり50個以上を計測した。

誘起率に対しての統計処理は、 $\chi^2$ 検定の後、Tukeyの方法による比率の差の多重比較検定を行った。また、血球面積に対しては、ANOVA分析の後、シェフェの多重比較分析を行った。

## 3. 雄性化ホルモンによる偽雄化の条件と作出

媒精水温および卵発生水温を23°Cとした。そして、媒精4分後に30MPaで7分間の加圧処理を施して第2極体の放出を阻止し、雌性発生2倍体を誘起した。これによって得られた孵化仔魚の餌は、孵化後14日目までは栄養強化したシオミズツボワムシとアルテミア、そして配合飼料を給餌した。その後、孵化後15日目から孵化後115日目までは、配合飼料1g当たりメチルテストステロン(MT)10 $\mu$ gを添加した餌を給餌した。そしてそれ以降は、再び通常の配合飼料を給餌した。

## 4. 全雌3倍体(3倍体)の生理特性

3倍体および2倍体の雌雄各8尾ずつの尾柄部から、ヘパリン処理したシリンジによって、血液を採取した。採血後直ぐに血漿成分を分離し、分析に用いるまで-80°Cで保存した。血漿Ca濃度はカルシウムC-テストワコーを用いたOCPC法で測定し、血漿カルシトニン濃度は、Calcitonin (Salmon) Enzyme Immunoassay Kit: High Sensitivity (PENINSURA LABORATORIES, INC.)を用いて測定した。

血漿Ca濃度と血漿カルシトニン濃度の時系列変化についての統計処理は、ANOVAの後、FisherのPLSD検定を行った。また、3倍体と通常発生2倍体の間における時間的に対応した比較については、Mann-WhitneyのU検定を行った。

## 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

媒精後0、5、10分後にコルセミド処理した卵は、第2成熟分裂後期のステージ(stage 1)にあった。しかしながら、媒精10分後の処理卵では、第1卵割中期のステージ(stage 6)の卵も若干観察された。媒精20分後に処理した卵は、第1卵割中期ステージ(stage 6)の卵が多数観察できた。媒精30、40分後に処理した卵および無処理区の卵は、第2卵割終期以降のステージ(stage 12)であった。これにより、水温18°Cで受精卵を発生させた場合、媒精20分後にコルセミドで処理すると、卵発生を第1卵割中期ステージ(stage 6)へ同調化させることができた(図1)。

さらにコルセミドの処理濃度について検討したところ、第1卵割中期ステージ(stage 6)における同調率は、無処理の通常発生で3.1%であったのに対し、コルセミド濃度0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で50%以上の同調率であった。コルセミド濃度0.5~10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の同調率に有意差は認められなかった(図2)。

正常孵化率は、同調率と逆にコルセミド濃度が高くなると低くなる傾向であった。コルセミド濃度0~5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の正常孵化率は、33.3~75.0%で有意差が認められなかった。一方、コルセミド濃度7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では、正常に孵化した卵がなかった(図3)。これは、コルセミドの毒性によって分裂阻害を受けた状態で発生が停止したためと考えられた。

以上のように、コルセミド濃度0.5~10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で同調率に差がなく、加えて5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で正常孵化率に差がなかったことから、卵発生水温18°Cで媒精20分後に処理を施した時に、第1卵割中期へ同調させるためのコルセミド濃度は、0.1~0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ が適正な濃度であると考えられた。

### 2. 4倍体の作出

受精卵を水温18°Cで培養し、媒精33分後に水温33.0°Cの海水へ移して30MPaで7分間の加圧処理を施すと、他の処理条件より誘起率が有意( $p < 0.01$ )に高く21.9%であった。次いで誘起率が高かったのは、媒精33分後に水温31.6°Cの海水へ移し、30MPaで7分間の加圧処理を施した処理条件であった。しかしながら、この条件による誘起率は、先の条件による誘起よりも有意( $p < 0.01$ )に低かった(図4)。

誘起した個体は、平成15年3月において45尾の生残が確認できた。そこで、これらの個体および対照として作出した通常発生2倍体の赤血球面積を計測した。

通常発生2倍体の赤血球面積は、平均で $85.21 \pm 0.37 \mu\text{m}^2$ (最大 $116.01 \mu\text{m}^2$ )であった。それに対し、4倍体誘起魚45尾のうち2尾のみが有意に大きく( $p < 0.01$ )、赤血球面積は、 $104.54 \pm 1.58 \mu\text{m}^2$ (最大 $128.04 \mu\text{m}^2$ )と $102.07 \pm 1.90 \mu\text{m}^2$ (最大 $129.56 \mu\text{m}^2$ )であった。この様に赤血球面積のみを比較しても、4倍体誘起魚の中には、通常発生2倍体とは異なるゲノム数を持つ個体が存在する可能性が高い。しかしながら、4倍体化の成功の有無については、さらに詳細な検査が必要である。しかも、ニジマスの4倍体では、4倍体性細胞が魚体にモザイク状に存在することが知られている。従って、オニオコゼにおいても同様のことが考えられる。本研究では全雌3倍体の作出を目指していることから、同じ

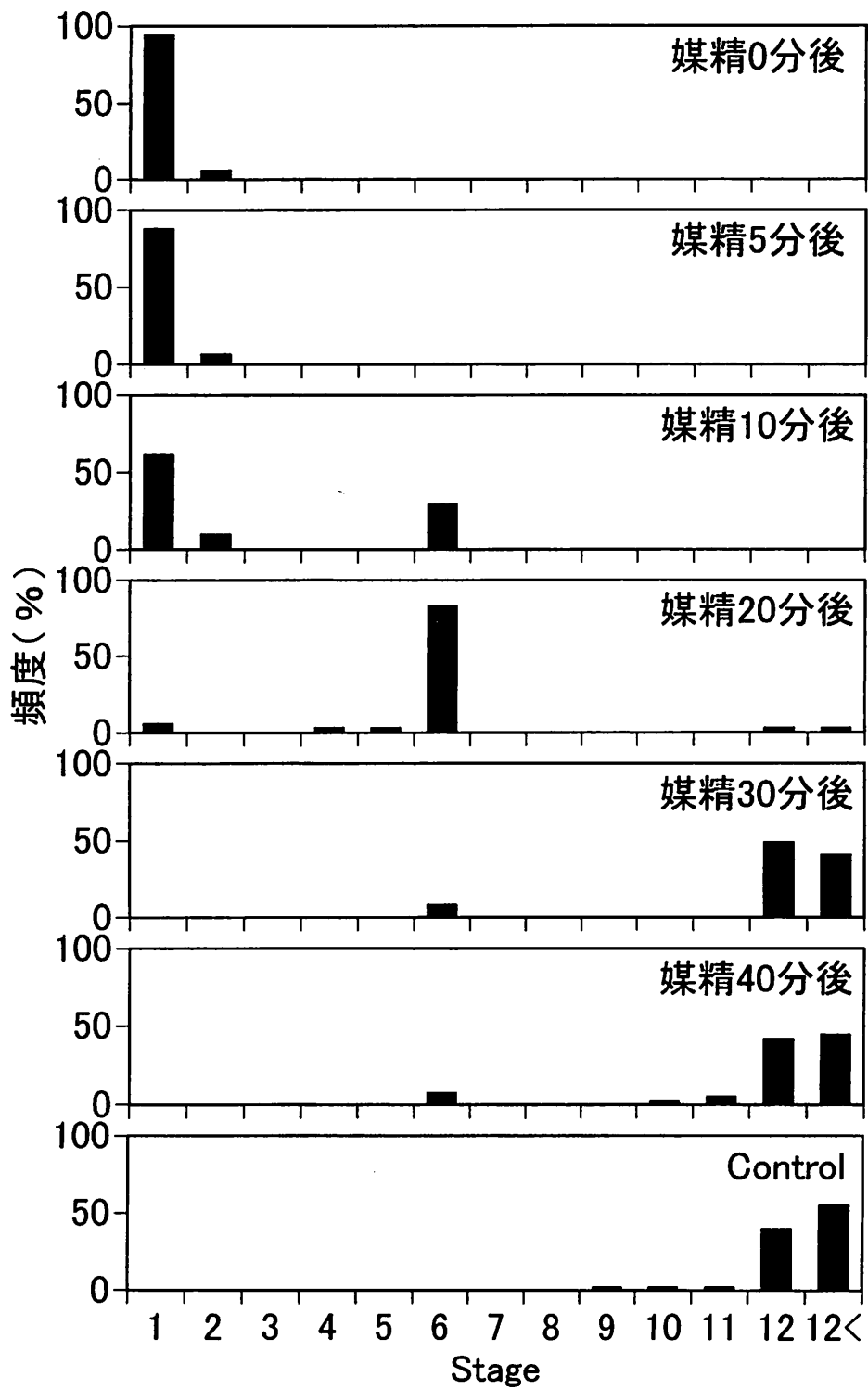


図1 コルセミドの処理開始時間が媒精120分後の発生ステージに与える影響



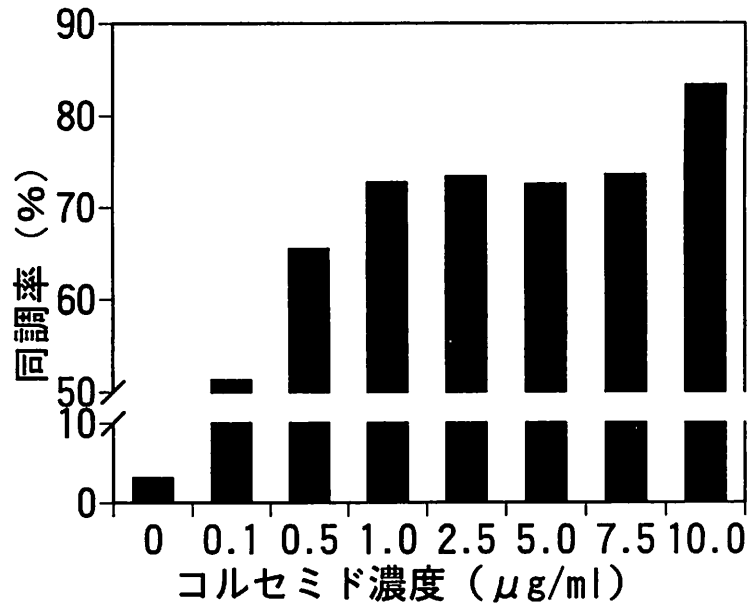


図2 コルセミド濃度が同調率へ与える影響

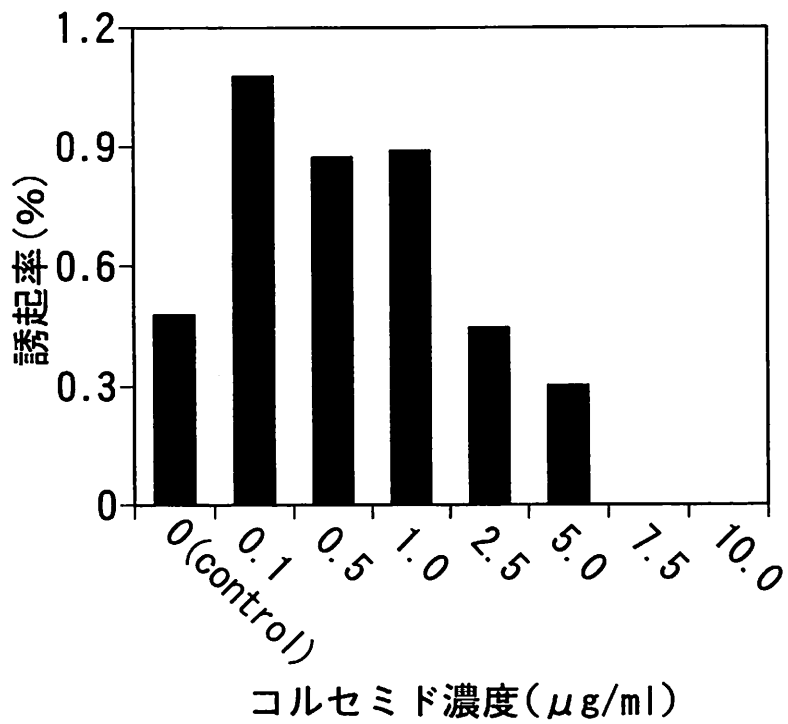


図3 コルセミド処理が正常孵化率へ与える影響

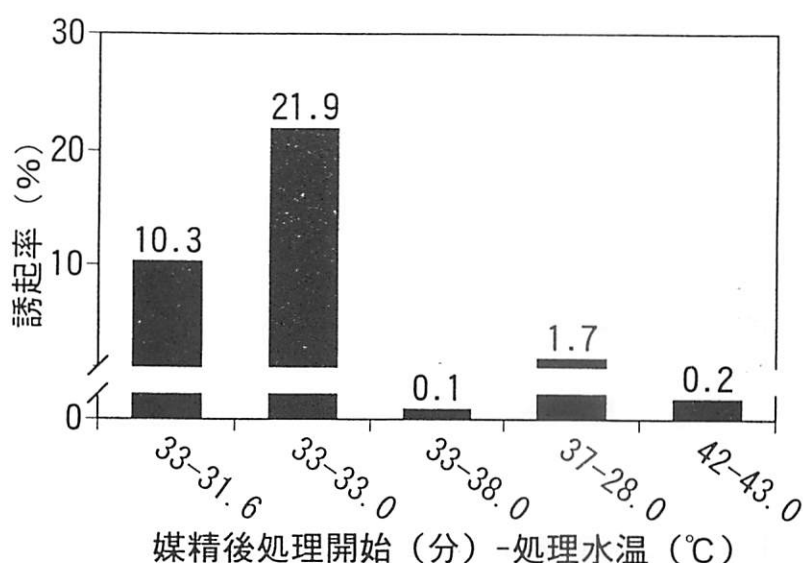


図4 第1卵割阻止の誘起率へ与える処理開始時間と処理水温の影響

4倍体でも生殖原細胞が4倍体化されている必要がある。

今後は、4倍体誘起魚を成魚まで飼育して性成熟させ、通常発生2倍体と交配させたF1の倍数性を調べる。今回の4倍体誘起魚が全雌3倍体作出に有用か否かを確認したいと考えている。

### 3. 雄性化ホルモンによる偽雄化の条件と作出

本実験の供試魚を得るために雌性発生魚を2回誘起した。それらの誘起率は、11.0%と7.3%であった。これにより正常孵化仔魚をそれぞれ約1,190尾と約5,620尾得ることができた。しかしながら、孵化後14日目までに約150尾まで減耗した。さらに、MTを添加した飼料を投与し始めると減耗がますます多くなり、孵化後88日目には20尾になった。

現在の生残尾数は、5尾(全長約30mm)で飼育を継続している。

### 4. 全雌3倍体(3倍体)の生理特性

血漿Ca濃度と血漿カルシトニン濃度の測定結果を図5へ示した。

血漿Ca濃度は、3倍体と2倍体の雌雄で有意差は認められず、3.2~3.9mMであった。

しかしながら、血漿カルシトニン濃度は、3倍体と2倍体で違いが認められた。すなわち、3倍体の血漿カルシトニン濃度は1,593.8pg/mlであったのに対し、2倍体のそれは有意( $p < 0.01$ )に高く、13,702.4pg/mlであった。また、2倍体では、雌雄の違いにおいても違いが見られた。2倍体雄の血漿カルシトニン濃度は、5,498.2pg/mlであったのに対し、2倍体雌のそれは有意( $p < 0.01$ )に高く、21,906.6pg/mlであった。

カルシトニンを分泌する鰹後腺は、生殖期とそれ以外の時期では、生殖期の方が発達し、また生殖期の雄よりも雌で著しく発達し、血中カルシトニンレベルも上昇すること

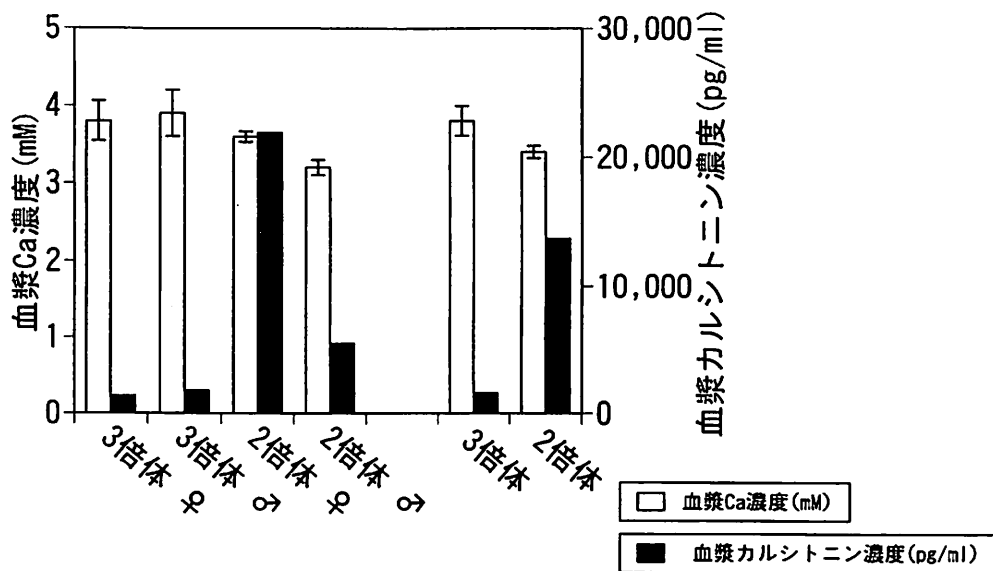


図5 産卵期における3倍体および2倍体の血漿Ca濃度と血漿カルシトニン濃度

が知られている。これは、生殖とカルシトニンが強く関係していることを強く示唆している。従って、不妊化されている3倍体は、鰓後腺が活性化されないためカルシトニンの分泌量が少ないと考えられる。また、オニオコゼの雌の生殖巣は、雄の生殖巣より著しく発達することから、雌の鰓後腺の方が良く発達し、カルシトニン分泌量も高い考えられる。

## VII. 今後の課題

4倍体作出処理を施して得られた個体について、さらに詳細な倍数性の検査が必要である。

## 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, *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **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, *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **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, 日水誌, **53** (6) , 933-939 (1987)
- (4) 小島吉雄, 魚類細胞遺伝学, 水交社, 東京, 1983
- (5) 岡山博人 編, バイオマニュアルUPシリーズ, 細胞周期研究法 発生分化・癌・細胞死の解明へ, 羊土社, 東京, 1995
- (6) 山木勝, 佐藤治平, 山口聡, 荒井克俊：卵割阻止処理に由来するアマゴ *Oncorhynchus masou ishikawae* の様々な器官に見られるモザイク性, 水産育種, **32**, 93-101 (2002)

- (7) 折茂肇, 須田立雄 監修, カルシトニン –基礎と臨床–, ライフサイエンス出版, 東京, 1998
- (8) Mikio Oguri : Seasonal Histologic Changes in the Ultimobranchial Gland of Goldfish, *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **39** (8) , 851-858 (1973)
- (9) Sigetaka Yamane and Juro Yamada : Histological Changes of the Ultimobranchial Gland through the Life History of the *Masu Salmon*, *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **43** (4) , 375-386 (1977)
- (10) Shigetaka Yamane : Sexual Difference in Ultrastructure of the Ultimobranchial Gland of Mature Eels (*Anguilla japonica*) , *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **32** (1) , 1-5 (1981)
- (11) 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
- (12) 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
- (13) 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
- (14) 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
- (15) 石川県水産総合センター, 平成13年度地域先端技術共同研究開発促進事業報告書, 2002