第1卵割阻止によるヒラメの雌性発生2倍体の誘起と飼育特性^{*1}

田 畑 和 男, 五利江 重 昭

(1988年3月22日受付)

Induction of Gynogenetic Diploids in *Paralichthys olivaceus* by Suppression of the 1st Cleavage with Special Reference to their Survival and GrowthKazuo Tabata^{*2} and Shigeaki Gorie^{*2}

The following results were obtained from the experiments to find optimum conditions for induction of gynogenetic diploids in hirame *Paralichthys olivaceus* by suppression of the 1st cleavage, and to clarify their survival and growth rates. Induction of gynogenetic diploids by suppression of the 1st cleavage was achieved by adding hydrostatic pressure of 650 kg/cm² for a duration of 6 min at 60 min after insemination, but the induction rate was low (2.7-5.3%). Genotypes of gynogenetic diploids induced by suppression of the 1st cleavage from female whose genotype in IDH isozyme was heterozygous, separated into 2 homozygous types. Since genotype of IDH isozyme in gynogenetic diploids induced by retention of the 2nd meiosis was heterozygous, induction of homozygous hirame has been easily identified. However, their survival rates were very low, growth rate was not good, and coefficient of variations of total length was relatively large in gynogenetic diploids.

最近、魚類の第2極体放出阻止型雌性発生2倍体において多くのアロザイム遺伝子座で組換え型が高頻度で発現することが報告されている。¹⁻⁸⁾ 筆者らもヒラメの雌性発生2倍体に関する一連の研究をおこなう中で肝臓のIDHの遺伝子座 (*Idh*) において高率で組換え型が発生することを報告した。⁹⁾ この現象は魚類においては一般的であることが分かってきたため、第2極体放出阻止型の雌性発生2倍体を純系作出の手段として使用することは不適当と考えられるようになった。¹⁰⁾ したがって、染色体操作によってヒラメの純系作出を意図するならば、第1卵割阻止による雌性発生2倍体を作出することが必要になるが、一般的に卵割阻止型の雌性発生2倍体に関する報告は極めて少なく、¹¹⁻¹⁴⁾ ヒラメについても作出例がないので検討の余地があると思われる。そこで、ヒラメの第一卵割阻止型雌性発生2倍体の誘起条件、アイソザイムを利用した証明方法および飼育特性についての試験を行ったところ、いくつかの知見を得ることができたのでここに報告する。

材 料 と 方 法

第1卵割阻止型の誘起条件 適正水圧を求める実験

は、水圧処理開始時間を第2極体放出阻止に有効な媒精後3分¹⁵⁾に固定して行った。4,800 erg/mm²の紫外線を照射し遺伝的に不活性化したヒラメ精子で媒精したヒラメ卵を1回あたり400~600粒づつ100 ml容のセルに収容し、100~700 kg/cm²の間を100 kg/cm²間隔に区分して、フレンチプレス (大缶製作所製) によって6分間加圧処理した。

加圧開始の適正時間を求める実験では、卵を不活性化処理したヒラメ精子で媒精し、3, 30, 60, 75, 90, 105および135分後に650 kg/cm²の水圧を6分間作用させた。媒精から加圧処理を開始するまでの温度は非常に重要であるので、今回の実験では全て17°C (±0.3°C) に保った。

適正水圧および加圧開始の適正時間を求める実験ともに加圧処理後も卵を17°C (±0.3°C) で培養し、ふ化率と半数体症候群発生率 (ふ化仔魚中に占める短尾、眼の發育不全等の特徴とする奇形仔魚の率¹⁶⁾) を求めた。ふ化率が最高でかつ半数体症候群発生率が最低を示す水圧値および加圧開始の時間を水圧処理の適正值と推定した。

第1卵割阻止型の誘起の証明 ヘテロ型の遺伝子型

^{*1} ヒラメの雌性発生2倍体に関する研究—第7報 (Studies on the gynogenesis in hirame *Paralichthys olivaceus*—VII).

本稿の一部は昭和62年度日本水産学会春期大会で報告した。

^{*2} 兵庫県立水産試験場 (Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station, Nakazaki, Akashi 673, Japan).

を持つ雌親魚を使用して第 1 卵割阻止型雌性発生 2 倍体を誘起するならば、子孫は例外なくホモ型になるはずである。また、第 2 極体放出阻止型の雌性発生 2 倍体において遺伝子座 *Idh* と動原体間の組換え率は 100% であるのでヘテロ型の雌親魚から得られる子孫は全てヘテロ型になり、⁹⁾ 第 1 卵割阻止型と明瞭に区別できるはずである。

そこで、バイオブシー検査によって肝臓の IDH アイソザイムの遺伝子型が AB 型であることを確認したヒラメ雌親魚を供試魚とし、その搾出卵 (1.8 万粒) に紫外線 (4,800 erg/mm²) によって不活性化処理したマダイ精子で媒精し 17°C で 60 分間培養した後、650 kg/cm² の水圧を 6 分間作用させ第 1 卵割阻止型の雌性発生 2 倍体ヒラメを誘起した。ふ化仔魚を海水流水式で 34 日間飼育した後、魚体全体を試料として IDH のアイソザイム分析を行った。

アイソザイム分析 電気泳動による酵素の検出にあたっては、試料の解凍ドリップを粗酵素液とした。アイソザイムはデンブング電気泳動法⁹⁾ (ゲル濃度 12%, 通電量はゲル 1 cm² あたり 4 mA) によって検出した。

飼育試験の方法 飼育試験に供した第 1 卵割阻止型雌性発生 2 倍体ヒラメはマダイの精子を使用して前述の方法で計 5 回誘起した (A~E グループ)。ふ化仔魚は 100 l 水槽 (円形の透明ポリカーボネート製) に放養し、シオミズツボムシとアルテミア・ノウブリウスを与えて海水流水式で飼育した。このうち A および D グループについては全長が 20 mm になる頃から 500 l 水槽に移し、生餌 (冷凍イカナゴ) で餌付けした後、さらに飼育を継続して飼育特性を調べた。なお、A グループについては飼育数が少なかったため全長の測定は行わなかった。

結 果

適正水圧と適正タイミング 遺伝的に不活性化した精子で媒精後 3 分に水圧処理し、ふ化率と半数体症候群発生率を求めた (Fig. 1)。対照区のふ化率は 70% であったが、100 および 200 kg/cm² 処理区のふ化率は 0% と最低を示した。300 kg/cm² 以上では水圧の増加とともに、ふ化率も上昇する傾向がみられ、600~700 kg/cm² でふ化率は 16.1 および 11.6% と最も高くなった。一方、半数体症候群発生率は 0.100 および 200 kg/cm² 処理区ではいずれも 100% であったが、水圧の増加とともにその発生率は低下し、600 kg/cm² では 0% を示したほか、700 kg/cm² でも 4.5% と低い値を示した。以上の結果から 600~700 kg/cm² がヒラメ卵に対する適正水圧であろうと推定できた。

加圧の適正タイミングを知るために、媒精後の加圧開

Fig. 1. Relationship between percentage of hatching (○-○) or percentage of haploid syndrome (●-●) and hydrostatic pressures carried out at 3 min after insemination to eggs in hirame *Paralichthys olivaceus* inseminated by milt irradiated with UV rays.

IC: Intact control, GC: Gynogenetic control

Fig. 2. Relationship between percentage of hatching (○-○) or percentage of haploid syndrome (●-●) and timing at which hydrostatic pressure treatment (650 kg/cm²) was carried out to eggs in hirame *Paralichthys olivaceus* inseminated by milt irradiated with UV rays.

IC: Intact control, GC: Gynogenetic control

始時間を変えて 650 kg/cm^2 6 分間の水圧処理を行い、結果を Fig. 2 に示した。2 回の実験の結果、ふ化率は媒精後 60 分において最も高く (21.3, 29.8%), ついで 3 分後が続いた (0.5, 5.3%) が、その他の時間はほとんど 0% であった。一方、半数体症候群発生率は 0 kg/cm^2 処理区 (Gyno. control) が 100% であったのに対し、60 分後処理区では 34.2 および 0% であった。同時に一部の卵をヒラメ正常精子で媒精後、 17°C で培養し顕微鏡下で経時的に外観変化を観察したところ、媒精後 80 分から 2 細胞期の卵が見え始め、85~90 分にはほとんどの卵が 2 細胞期になった。なお、4 細胞期は 120 分ごろから、8 細胞期は 145 分ごろから、16 細胞期は 160 分ごろからそれぞれ見え始めた。一方、媒精後 60 分から水圧処理をおこなった卵群は 100~145 分には 2 細胞期であるが 160 分では 4 細胞期になっていた。以上の観察結果から 60 分後の水圧処理は第 1 卵割を阻止しているものと思われる。

媒精後 60 分に 650 kg/cm^2 の水圧処理を行って得られたふ化仔魚 (79 および 294 尾) のうち正常ふ化仔魚は 12.6 および 17.0% であり、軽度の奇形 (Fig. 3-B) が 24.1 および 63.9% であった。さらに、尾柄部の発育不全、双頭 (Fig. 3-C) や躯幹部の屈曲 (Fig. 3-D) などの中程度から重度の奇形は 24.1 および 19.0% であった。また、飼育試験を行ったグループのうちでは A グループについてのみ奇形の発生率を調べたが、結果は、正常ふ化仔魚 14.4%, 軽度の奇形 37.3% および重度の奇形 48.3% であった。重度の奇形仔魚はもちろんのこと軽度

Fig. 3. Newly hatched fry in hiram induced by suppression of the 1st cleavage. A: Normal fry, B, C, D: Abnormal fry.

Fig. 4. Examples of IDH isozyme pattern of control diploids (A), gynogenetic diploids induced by retention of the 2nd meiosis (B), and gynogenetic diploids induced by suppression of the 1st cleavage (C) in hiram *Paralichthys olivaceus*. Genotype of *ldh* of parents was $AB(\text{♀}) \times AB(\text{♂})$ in A, $AB(\text{♀})$ in B and C. Patterns of A and B were quoted from Tabata (1987).⁹⁾

Table 1. Example of survival rates of control diploids and gynogenetic diploids in hirame *Paralichthys olivaceus* induced by suppression of the 1st cleavage

Groups	No. of eggs	(S.R.*1)	No. fry*2	(S.R.)	No. fry	(S.R.)	No. fry	(S.R.)	No. fry	No. fry
Gyno. diploids	A 18,200	(.369)	6,720 ^(10*)	(.002)	38 ^{H12}	(.173)	27 ^{H33}	(.174)	42 ^{H107}	42 ^{H210}
	B 107,700	(.015)	1,600 ^{H10}	(.024)	18 ^{H11}	(.406)	242 ^{H58}	(.174)	42 ^{H107}	42 ^{H210}
	C 171,400	(.012)	2,000 ^{H10}	(.059)	566 ^{H10}	(.011)	2 ^{H41}	(.174)	42 ^{H107}	42 ^{H210}
	D 32,900	(.158)	5,200 ^{H10}	(.115)	153 ^{H10}	(.043)	698 ^{H10}	(.457)	179 ^{H110}	98 ^{H220}
	E 101,000	(.042)	4,200 ^{H10}	(.043)	1,000 ^{H11}	(.728)	725 ^{H44}	(.151)	104 ^{H110}	103 ^{H204}
Control diploids	F 22,400	(.304)	6,800 ^{H10}	(.779)	1,000 ^{H11}	(.653)	628 ^{H53}	(.218)	124 ^{H110}	122 ^{H215}
	G 7,600	(.645)	4,900 ^{H10}	(.374)	1,000 ^{H10}	(.856)	806 ^{H40}	(.124)	30 ^{H110}	29 ^{H200}
	H 37,300	(.802)	29,900 ^{H10}	(.550)	1,000 ^{H11}					
	I 87,500	(.330)	9,000 ^{H10}	(.381)	1,000 ^{H10}					

*1 S.R.: Survival rate. *2 Number of fry was recorded at the day (H) when the fry were placed into the new tank. *3 H: Days after hatching.

Table 2. Growth and coefficient of variation of control diploids and gynogenetic diploids in hirame *Paralichthys olivaceus* induced by suppression of the 1st cleavage

Gynogenetic diploids induced by suppression of the 1st cleavage						Control diploids					
Groups	Days after hatching	No. measured	Average TL (mm)	Stand. dev. (mm)	Coef. variat.	Groups	Days after hatching	No. measured	Average TL (mm)	Stand. dev. (mm)	Coef. variat.
D	10	30	3.35	.897	.268	F	11	30	4.38	.341	.078
E	10	28	4.59	.679	.148	G	10	30	4.34	.386	.089
						H	11	30	5.47	.437	.080
						I	10	30	4.90	.397	.081
B+C	53	27	19.9	3.71	.187	F	46	30	21.6	2.57	.119
D	41	53	16.1	2.23	.138	G	44	30	18.2	3.04	.167
						H	53	25	19.4	3.35	.173
						I	46	30	21.7	2.66	.123
D	76	25	37.9	5.73	.151	F	88	24	82.4	15.46	.188
						G	72	25	59.0	7.98	.135
D	107	25	97.8	13.05	.133	F	119	25	148.5	14.05	.095
						G	103	25	132.3	12.37	.093
						H	109	25	122.2	12.75	.104
						I	95	25	88.1	16.42	.186
D	216	42	209.7	33.91	.162	F	226	98	268.3	26.62	.099
						G	204	103	254.9	22.67	.089
						H	215	122	248.4	31.95	.129
						I	200	29	221.4	36.27	.164

の奇形仔魚もふ化後まもなく死亡するので、第1卵割阻止による雌性発生の誘起率はふ化率に正常発生率をかけたものになると考えられる。したがって、採卵数からの誘起率は適正タイミングの実験では2.7% (0.213×0.126) および5.1% (0.298×0.170)、そしてAグループでは5.3% (0.369×0.144) と計算できる。

アイソザイム分析 IDH アイソザイムの遺伝子型がAB型であるヒラメ雌親魚から搾出した卵にマダイの紫外線処理精子を媒精し、60分後から6分間水圧処理した後、通常の飼育方法でふ化後34日間飼育したヒラメ仔魚のIDHアイソザイムパターンをFig. 4に示した。検体数は22で、うち遺伝子型がAA型の個体が9 (40.9%)、BB型の個体が13 (59.1%) であり、AB型を示す個体は皆無であった。なお、比較のためにAB型同士の親魚を使用した正常交配群 (AA:AB:BB=10:27:13 となった結果の一部⁹⁾) と、AB型の雌親魚を使用して作出した第2極体放出阻止型の雌性発生2倍体群 (AB=174 となった結果の一部⁹⁾) のIDHアイソザイムのパターンを併せ示した。

成長と生残 飼育を行った群について、生残の経過をTable 1に示した。なお、比較のためにほぼ同じ方法で飼育した正常発生ヒラメの生残経過をTable 1に併記した。

ふ化率は比較的高い群と低い群の2型がみられたが、これは卵質の違いによるものと思われる。しかし、比較的高いふ化率が得られた群においてもふ化後10日までの生残率は最高のD区においても11.5%と極めて低かった。その後長期飼育を行ったD区ではふ化後10~58日目の間の生残率は40.6%、餌付け期にあたる58~107日目では17.4%であったが、107日目以後のへい死は大きく安定した状態が続いた。

全長の成長経過については、ほぼ同じ方法で飼育した正常発生ヒラメの成長経過とともにTable 2に示した。ふ化後10日目前後では第1卵割阻止型雌性発生2倍体の成長はすでにやや劣る傾向があるほか、変動係数が正常発生群に比べて高いのが特徴である。しかし、飼育日数の経過とともに変動係数は正常発生群と比較して高い水準を維持するが、しばしば正常発生群の方が上回るケースもみられた。

考 察

第1卵割阻止の適正水圧は魚種によって異なるといわれているが、¹²⁾ ヒラメの倍数化に対する適正水圧は600~700 kg/cm² と推定され、これはサケ卵、ニジマス卵¹²⁾ アユ卵¹⁴⁾ と同様であった。しかし、サケ科魚類の卵では500 kg/cm² 以下では全く倍数化しないのに対し、ヒラメでは400 kg/cm² ですでに約半数が倍数化されて

いる点が異なっていた。また、ウグイ卵¹²⁾ では400 kg/cm² 以上が適正水圧であることから魚種による特異性は確かに存在するようである。

ヒラメの第1卵割を阻止するための水圧開始時間は、17°Cで卵を前培養した場合、媒精後60分であることがわかった。サケ科魚類では媒精後300分が最適時間であるが、当然のことながら培養水温によって大きく影響される。また、ヒラメ卵に対して0°Cの低水温処理 (前培養水温16.5°C) を媒精後60分および75分に行った実験では全く倍数化が起こらなかったが、¹³⁾ ヒラメの第1卵割阻止に対しては水圧処理が効果的であるという点は興味の持たれるところである。逆に第2極体放出阻止 (媒精後3分処理) には水圧処理の効果が低いことも示唆された。また、媒精後60分に水圧処理を行って得られたふ化仔魚は奇形が多く、かつ奇形の程度に顕著な差が見られたことは、媒精後60分にはすでに発生速度にかなりの個体変異が存在することを示唆している。したがって、水圧処理のタイミングを非常に厳密に規定しても第1卵割阻止型雌性発生2倍体の成功率は一定の限界があると思われる。

ヒラメのIDHの遺伝子座 (*Idh*) は100%組換えが起こる遺伝子座であることが第2極体放出阻止型の雌性発生によって確認されているが、⁹⁾ 媒精後60分に水圧処理をしたヒラメ仔魚のIDHアイソザイムは完全にホモ型の2型 (AA, BB) に分離した。このことは第1卵割阻止型の雌性発生2倍体が正しく誘起されたことを証明しているものであると同時に、極体放出阻止方法ではすでに絶望視されていたヒラメの純系作出が第1卵割阻止法によって可能であることを示した点で意義があると思われる。

第1卵割阻止型雌性発生2倍体ヒラメの生残率は無処理区に比べて極めて悪いほか、成長も良くなく、また成長の変動も大きい傾向があった。これらの特性はすでに実験が行われたアユと同様であった。¹⁴⁾ 生残率の点は親魚の卵質によるところが大きいと思われるので、親魚を厳選することである程度改善できるだろう。例えば、排卵から採卵までの時間短縮、親魚養成時の栄養強化等の技法の検討が考えられる。また、成長の変異が大きい傾向については第1卵割阻止型雌性発生2倍体は母親の相同染色体が異祖性のため遺伝子型は理論的には極めて多様に分離するが、これを反映した結果と思われる。ただし、成長の変動はふ化後10日目では正常発生群に比べて大きい、ふ化後日数の経過とともに正常発生群との差が小さくなっていくのは、弱小個体が淘汰される率が大きいためと思われる。また、これは生残率の低さからも説明できる。

ともあれ実際に卵割阻止型雌性発生2倍体ヒラメが

誘起され成育できた事実は, 種々の形質の遺伝分散の解析や有用形質の固定に利用できる可能性を示したものと見える。

謝 辞

本稿のご校閲をいただいた高知大学農学部谷口順彦教授に深謝する。

文 献

- 1) G. H. Thorgard, F. H. Allendorf, and K. L. Knudsen: *Genetics*, **103**, 771-783 (1983).
- 2) D. Thompson: *Aquaculture*, **33**, 237-244 (1983).
- 3) F. W. Allendorf and R. F. Leary: *Aquaculture*, **43**, 413-420 (1984).
- 4) J. Gervai and V. Csanyi: *Theor. Appl. Genet.*, **68**, 481-485 (1984).
- 5) R. Guyomard: *Theor. Appl. Genet.*, **67**, 307-316 (1984).
- 6) F. W. Allendorf, J. E. Seeb, K. L. Knudsen, G. H. Thorgard, and R. F. Leary: *J. Heredity*, **77**, 307-312, (1986).
- 7) J. E. Seeb and L. W. Seeb: *J. Heredity*, **77**, 399-402 (1986).
- 8) N. Taniguchi, A. Kijima, and J. Fukai: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 717-720 (1987).
- 9) 田畑和男, 五利江重昭: 水産育種, **12**, 51-56 (1987).
- 10) 谷口順彦: 水産育種, **11**, 49-58 (1986).
- 11) G. S. Streisinger, C. Walker, N. Dower, D. Knauber, and F. Singer: *Nature*, **291**, 293-296 (1981).
- 12) 小野里 坦: 水産育種, **8**, 17-37 (1983).
- 13) D. Chourrout: *Aquaculture*, **36**, 111-126 (1984).
- 14) N. Taniguchi, S. Seki, J. Fukai, and A. Kijima: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 1483-1491 (1988).
- 15) 田畑和男, 五利江重昭, 中村一彦: 日本水誌, **52**, 1901-1904 (1986).