

## ホウライマス（無斑ニジマス）の第一卵割阻止型雌性発生2倍体の作出における最適水圧処理開始時間

服部 克也

### The Optimum Starting Time of the Hydrostatic Pressure Shock Treatment for Induction of Mitotic Type of Gynogenetic Diploids in Houraimasu (Non-spotted Rainbow Trout)

HATTORI Katsuya\*

In the 1965s, a single non-spotted male rainbow trout was found as a mutant at the Hourai fish-culture experimental station. The mutant was fixed subsequently as a spotless strain of *Oncorhynchus mykiss* which came to be known as Houraimasu.<sup>1)</sup>

The Houraimasu is expected to become an unique strain with commercial values being different from wild type in rainbow trout culture. In order to establish the Houraimasu as unique and prosperous strain, we made a plan of genetic improvement of the present strain by means of chromosome manipulation.<sup>2)</sup>

Introduction of gynogenetic diploids by suppression of first cell cleavage (abbreviated as mitotic-G2N) in many fishes are considered to be effective for production of the complete homozygous diploid being necessary for further induction of clonal strains.<sup>2,3)</sup>

In this study, the optimum starting time of the hydrostatic pressure treatment (650 kg/cm<sup>2</sup> for 6 min) for introducing mitotic-G2N of Houraimasu was examined by two experiments. In the first experiment, hatching rate of the eggs which were treated by hydrostatic pressure with different starting time. The starting time indicating high hatching rate were from 240 min to 280 min and 360 min to 420 min.

In the other experiment, the component of eggs with different cell cleavage stage were observed at different time to determine the time of first cell cleavage. Eggs of two cells stage were appeared at 340 min after fertilization.

Therefore, the optimum starting time were assumed from 240 min to 280 min after fertilization (from 50°C · hour to 60°C · hour as cumulative temperature). The induction of gynogenetic diploids were verified by allozymes which indicated their parental genes.

キーワード ; ホウライマス, 第一卵割阻止, 雌性発生, 水圧処理, 最適処理開始時間

ホウライマスは、昭和40年に愛知県水産試験場鳳来養魚場で発見、固定された無斑のニジマスである。<sup>1)</sup> 無斑形質を持つホウライマスは、有斑型である野生型のニジマスとは外見から明瞭に識別することができるため、特異な品種として利用されることが考えられる。しかし、養殖対象魚としては、成長に優れる、体型が良い等の形質を有している優良系統の作出が必要とされる。

魚類における第一卵割阻止型雌性発生は、完全ホモ個体の作出、さらにはクローンの作出方法として期待されている。<sup>2,3)</sup> マス類では、ニジマス、アマゴ等について第一

卵割阻止型雌性発生の育種への応用が試みられ、<sup>4)</sup> 第2代目において発現形質の変異の縮小と育種効果等が論じられている。そこで、ホウライマスからさらに優良な系統を作出する効果的な手段として第一卵割阻止型雌性発生を行い、完全ホモ個体の作出および完全ホモ個体からクローンを作出することが考えられる。ニジマスを始めとする魚類については、第一卵割阻止型雌性発生を誘起する方法として水圧処理が最も良い<sup>3)</sup>とされているが、その処理開始時間については十分検討されているとは言えない。第一卵割阻止型雌性発生2倍体を確実に作出するため

\* 愛知県水産試験場鳳来養魚場

(Hourai Fish-Culture Experimental Station, Aichi Fisheries Research Institute, Hourai, Minamishitara, Aichi 441-19, Japan)

には適切な処理開始時間を把握する必要があるので、本報では、ホウライマスについて第一卵割阻止型雌性発生の最適処理開始時間を検討した。

### 材料および方法

#### 第一卵割阻止型雌性発生のための水圧処理開始時間の検討

供試雌魚には、鳳来養魚場で継代飼育されているホウライマス *Oncorhynchus mykiss* の満2年魚(平均体重680g)を用い、7試験区(No. 1~7)を設定した。なお、1試験区あたり3~6尾の卵をプールして供試した。精子の供与種としては、アマゴ *Oncorhynchus rhodurus* (1年魚・2年魚, 平均体重210g)、およびイワナ *Salvelinus leucomaenis* (2年魚, 平均体重550g)を用いた。精子の遺伝子不活性化は、森沢の人工精漿<sup>5)</sup>で100倍に希釈し、紫外線を照射して作成した。紫外線の照射方法は、人工精漿希釈精液を90mmφのガラスシャーレに3ml分取し、これを紫外線殺菌灯(15W, 1本)下30cmに置き、振動を加えながら照射した。照射線量は、アマゴについては6,000 erg/mm<sup>2</sup> (No. 3~4)、イワナについては5,000 erg/mm<sup>2</sup> (No. 1~2) および4,000 erg/mm<sup>2</sup> (No. 5~7)であった。

卵と遺伝子不活性化精子を常法により受精・吸水させ、これを流水中に静置した(以下処理卵)。処理卵の一部(500粒~1,200粒)を経時的に分取し、加圧装置(セル容量約600ml)により650気圧を6分間施した。各試験区における処理開始時間についてはTable 1に示した。また、対照(Control)として同腹卵をニジマス雄(2年魚, 平均体重630g)と通常交配を行い、第二極体放出阻止型雌性発生区(G-control)として処理卵の一部を受精・吸

水10分後に同様の水圧処理を行った。処理時の流水の水温については、積算水温(水温℃・時間)としてTable 1に処理開始時間と共に示した。

水圧処理後、卵は通常のふ化管理を行ったが、発眼率の算出は積算水温で約250℃・日、ふ化率の算出は積算水温で約600℃・日に行った。

ふ化仔魚浮上後、No. 3~4で得られた仔魚を混合した飼育試験区(I区)、およびNo. 5~7で得られた仔魚を混合した飼育試験区(II区)を設定し、通常飼育を行った。これら飼育魚の一部について、アロザイムの分析および赤血球長径の計測を行い、雌性発生の確認(雄側遺伝子の関与確認および倍数性の確認)を行った。アロザイムの分析は、水平式デンブングル電気泳動法により、ゲル濃度11.5%、定電流4mA/cm<sup>2</sup>で行った。アロザイム検出用試料としては、心臓の解凍ドリップを用いた。なお、分析した酵素は、I区についてはPhosphoglucomutase (PGM), Malate dehydrogenase (MDH), II区については6-Phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD), MDHを用いた。このうちPGMと6-PGDは泳動像により雄側遺伝子の関与の判別が可能と考えられ、MDHでは泳動像により第一卵割阻止型雌性発生の確認が可能と考えられた。赤血球長径は、抹梢血により血液塗抹標本を作成し、これを400倍の視野にて計測した30個の平均を求めたが、これにより倍数性を判定した。

なお、I区では飼育魚10個体(個体番号1~10)、および対照としてニジマス1個体(Co. A), アマゴ1個体(Co. B), II区では飼育魚10個体(個体番号11~20)および対照としてニジマス1個体(Co. C), イワナ1個体(Co. D)をアロザイムの分析および赤血球長径の計測に供試した。

Table 1. Cumulative temperature (°C·hour) at the starting time of the hydrostatic pressure shock treatment.

Time* (min)	Experiment number						
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7
180	-	-	37.1	37.2	-	-	-
200	-	-	41.1	41.3	-	-	-
220	-	-	45.1	45.4	46.4	-	-
240	-	-	49.1	49.5	50.7	48.0	51.2
260	-	-	53.1	53.6	55.0	52.0	55.5
280	59.5	59.0	57.1	57.7	59.3	56.0	59.8
300	64.0	63.5	61.1	-	63.6	60.0	64.1
320	68.4	67.9	-	-	67.9	-	-
340	72.8	72.3	-	-	-	-	-
360	77.3	76.8	-	-	-	-	-
380	81.6	81.1	-	-	-	-	-
400	85.9	85.4	-	-	-	-	-
420	90.2	89.6	-	-	-	-	-

(\* ) Time: time after fertilization.

#### 胚発生の観察による第一卵割が行われる時間の推定

供試雌魚(平均体重660g)および雄魚(平均体重710g)には、鳳来養魚場で飼育しているホウライマスおよびニジマスの2年魚を用いた。試験区は、A, B, C, およびDの4区であり、1試験区について供試卵は1~2尾の卵を混合し、常法により受精・吸水させ、流水中に静置した。これを経時的(A区については受精後60分から540分までの60分間隔, B, C, およびD区については受精後280分から440分までの20分間隔)に分取し、SERA液(組成: Ethyl alcohol 60% Formalin 30% Acetic anhydride 10%)にて固定した。固定された卵の胚の分割状況を肉眼で観察した。

## 結 果

第一卵割阻止型雌性発生のための水圧処理開始時間の検討  
各試験区における正常魚ふ化率については Table 2 に示した。結果から、受精・吸水後 240~280 分（積算水温としては 50~60℃・時間）と 360~420 分（積算水温としては 75~90℃・時間）の間にふ化率が高い傾向が認められた。また、ふ化率は、高いものでも 8.5% であり、対照区および第二極体放出阻止型雌性発生区と比べると低いことが認められた。

**Table 2.** Hatching rates\* (%) in every experiments at the starting time of the hydrostatic pressure shock treatment.

Starting time (min)	Experiment number						
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7
180	-	-	0.2	0	-	-	-
200	-	-	0	0	-	-	-
220	-	-	0.3	0	2.1	-	-
240	-	-	1.3	0.2	8.5	6.9	4.8
260	-	-	1.4	8.4	5.7	7.8	0.6
280	0	0	4.2	0.1	0.7	0.5	0.6
300	0	0	0.9	-	3.1	1.5	0.2
320	0	0	-	-	0.4	-	-
340	0	0	-	-	-	-	-
360	2.4	0	-	-	-	-	-
380	0	0.2	-	-	-	-	-
400	0.7	0.7	-	-	-	-	-
420	1.0	1.1	-	-	-	-	-
Control	72.2	46.5	81.0	62.3	83.6	96.6	96.6
G-cont.**	12.2	6.9	0.7	2.5	15.4	7.0	7.2

(\*) Hatching rate: number of normal swim-up fries  
× 100 / number of treated eggs.

(\*\*) G-cont: meiotic-G2N control.

**Table 3.** Body length, body weight, and erythrocyte major axis of samples for analyzing allozymes in groups I and II.

No.	Group I			Group II			
	B.L. (cm)	B.W. (g)	E.M.Axis (μ)	B.L. (cm)	B.W. (g)	E.M.Axis (μ)	
1	9.0	11.3	14.9	11	4.1	1.1	15.2
2	8.3	10.9	15.4	12	4.6	1.5	15.4
3	7.8	7.1	14.0	13	4.9	1.5	15.2
4	7.2	5.8	13.7	14	4.4	1.1	14.6
5	8.6	10.2	15.7	15	4.8	2.0	15.2
6	8.8	9.8	15.2	16	4.6	1.5	15.0
7	8.3	10.2	15.4	17	4.5	1.5	14.3
8	7.9	8.5	14.5	18	3.8	0.9	15.3
9	8.0	8.2	14.5	19	4.4	1.2	15.3
10	7.8	6.9	15.2	20	4.5	1.8	15.3
Co.A*	9.0	11.0	-	Co.C*	10.1	16.2	-
Co.B*	11.2	19.7	-	Co.D*	7.8	7.6	-

(\*) Co.A: rainbow trout, Co.B: amago salmon, Co.C: rainbow trout, Co.D: japanese char.

分析した個体の体重, 体長, 赤血球長径平均値を Table 3 に示した。また, I 区における泳動像を Figs. 1~2, II 区における泳動像を Figs. 3~4 に示した。

I 区においては, Fig. 1 でアマゴに認められる PGM-2 遺伝子座の B 遺伝子および PGM-3 遺伝子座の C 遺伝子が, 個体番号 1~10 には認められなかったことから, 雌性発生に用いたアマゴ精子の遺伝的関与はなかったと考

えられた。また, II 区においては, Fig. 3 でイワナに認められる 6-PGD 遺伝子座の A 遺伝子が個体番号 11~20 に認められなかったことから, 雌性発生に用いたイワナ精子の遺伝的関与はなかったと考えられた。

Table 3 に示したように, 個体番号 1~20 の赤血球長径平均値はいずれも 14~15.5 μ であり, これらの値は 2 倍体であることを示していた。<sup>6,7)</sup>

このようにアロザイムの結果および赤血球長径平均値から, 個体番号 1~20 については雌性発生 2 倍体とされ, I 区および II 区の飼育魚は雌性発生 2 倍体と考えられた。

つぎに, Fig. 2 および Fig. 4 に認められた泳動像から, 雌性発生 2 倍体が第一卵割を阻止されて得られたものであるかどうかを推定した。Fig. 2 において個体番号 8 と個体番号 10 が MDH-1,2 遺伝子座でヘテロ型であることが判った。第一卵割阻止型雌性発生が完全に行われた場合には, 全ての遺伝子座においてホモ型となるはずである<sup>8)</sup> から, ヘテロ型を示した 2 個体は第二極体放出阻止型雌性発生 2 倍体と考えられた。

Fig. 4 において個体番号 15 が MDH-1, 2 遺伝子座でヘテロ型であることが判った。したがって, 個体番号 15 も第二極体放出阻止型雌性発生 2 倍体と考えられた。

ニジマスにおいては, MDH-1, 2 遺伝子座 (MDH-B<sup>9)</sup> または MDH-3,4<sup>10)</sup> と同一遺伝子座) における組換え率は 0.9810) とされており, Fig. 2 および Fig. 4 に認められたヘテロ型個体は, 親魚の一部にヘテロ型が存在していたために得られたと推定された。なお, 第一卵割を阻止する処理操作を行っているにもかかわらず, 第二極体放出阻止型雌性発生 2 倍体が出現することについては, 極体放出の自発的抑制の可能性が指摘されている。<sup>11)</sup>

また, MDH-1, 2 遺伝子座における雌性発生 2 倍体の遺伝子型とヘテロ接合体率 (He) を Table 4 に示した。供試した雌親魚の遺伝子型が不明ではあるが, BB 型と CC 型のホモ型が分離して出現していること, およびヘテロ接合体率が 0.1~0.2 であり, ホモ型の比率が高いことから, 概ね第一卵割阻止型雌性発生の誘導は成功していると思われた。

**Table 4.** Genotypic segregation and heterozygosity of offspring in groups I and II.

Group	Mdh-1, 2			He*
	BB	BC	CC	
I	3	2	5	0.2
II	6	1	3	0.1

(\*) He: heterozygosity

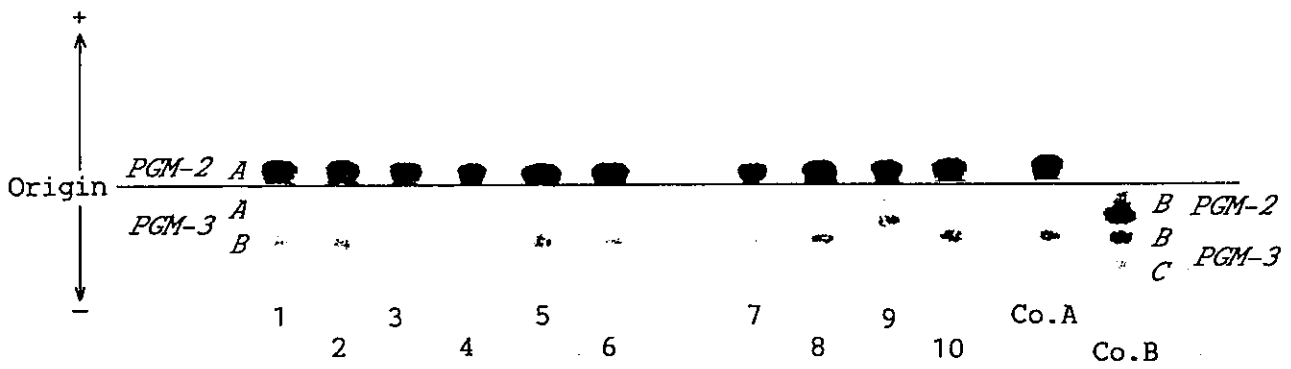


Fig. 1. Electrophoretic patterns and presumed loci in PGM.  
(1-10 : samples in group I, Co.A : rainbow trout, Co.B : amago salmon)

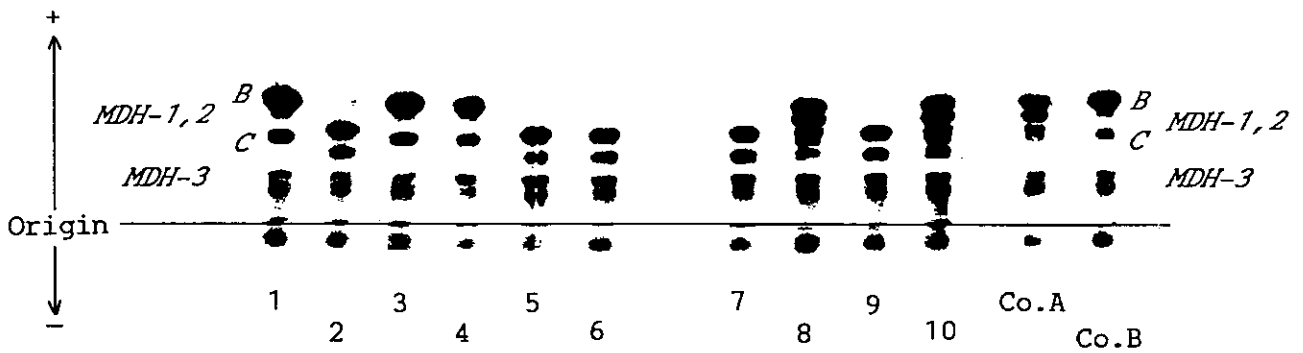


Fig. 2. Electrophoretic patterns and presumed loci in MDH.  
(1-10 : samples in group I, Co.A : rainbow trout, Co.B : amago salmon)

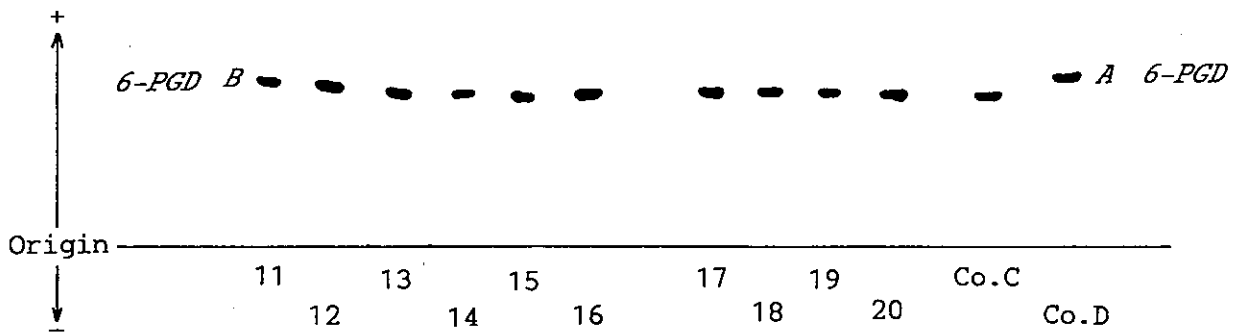


Fig. 3. Electrophoretic patterns and presumed locus in 6-PGD.  
(11-20 : samples in group II, Co.C : rainbow trout, Co.D : japanese char)

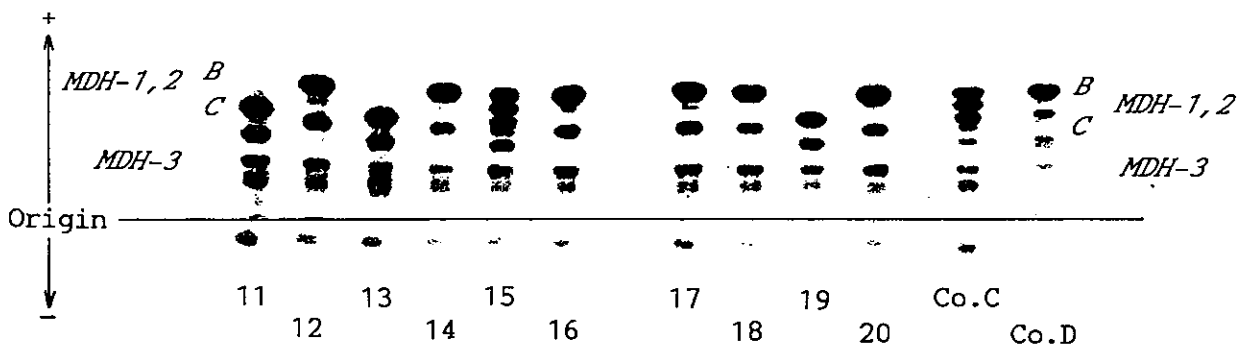


Fig. 4. Electrophoretic patterns and presumed loci in MDH.  
(11-20 : samples in group II, Co.C : rainbow trout, Co.D : japanese char)

### 胚発生の観察による第一卵割が行われる時間の推定

A, B, C, および D 試験区における卵分取時の積算水温 (°C・時間) と胚の細胞分割についての観察結果 (卵の出現比率) を Table 5 に示した。

受精後 340 分 (積算水温として約 70°C・時間) に 2 細胞胚の出現が認められ, 受精後 380 分 (積算水温として約 80°C・時間) には 2 細胞胚の比率は最大となった。その後 4 細胞胚が受精後 400~420 分 (積算水温として 84~87°C・時間) には出現し, 時間の経過とともにその比率は増加した。

以上から積算水温として約 70°C・時間には第一卵割が行われて細胞分割が終了した卵が出現し, また 80~90°C・時間には第二卵割が行われて細胞分割が終了した卵が出現するものと推定された。しかし, 2 細胞胚または 4 細胞胚の出現する時間に差異が認められ, 卵により細胞分割の発生速度が異なることが考えられた。

Table 5. Distribution (%) of egg stages from 1 cell to 4 cells in every observation time after fertilization.

Cum. temp*. (°C・hour)	Time* (min)	Exp.*	Egg stage		
			1cell	2cells	4cells
12.7	60	A	100	0	0
25.6	120	A	100	0	0
39.0	180	A	100	0	0
52.9	240	A	100	0	0
61.9	280	B	100	0	0
62.0	300	C	100	0	0
63.0	300	D	100	0	0
65.2	320	C	100	0	0
66.3	300	B	100	0	0
67.2	320	A,D	100	0	0
70.4	340	C	94.1	5.9	0
70.7	320	B	100	0	0
71.4	340	D	96.4	3.6	0
74.6	360	C	81.7	18.3	0
75.1	340	B	83.9	16.1	0
75.6	360	D	27.7	72.3	0
78.8	380	C	54.3	45.7	0
79.4	360	B	27.1	72.9	0
79.8	380	D	7.1	92.4	0.5
81.4	360	A	30.2	69.8	0
82.9	400	C	24.1	75.9	0
83.7	380	B	13.8	86.2	0
84.0	400	D	6.6	91.4	2.0
87.0	420	C	13.0	87.0	0
88.0	400	B	6.1	93.9	0
88.2	420	D	4.7	92.8	2.5
91.0	440	C	10.7	86.8	2.5
92.3	420	B	4.5	93.7	1.8
92.4	440	D	6.6	88.1	5.3
95.5	420	A	1.0	89.4	9.6
109.1	480	A	7.5	49.3	43.2
122.3	540	A	2.7	12.8	82.9

(\*) Cum. temp.: cumulative temperature.

Time: time after fertilization.

Exp.: number of experiment.

### 考 察

胚の細胞分割から, 受精後 340 分 (積算水温として 70°C・時間) には第一卵割が完了する卵が出現することから, 第一卵割阻止型雌性発生を行うためには, この時間以前に処理を行う必要があると思われる。受精後 340 分以前において, 正常浮上仔魚の出現率が高い処理開始時間は, 受精後 240~280 分であり, 第一卵割阻止型雌性発生の水圧処理による適正処理開始時間としては, 受精後 240~280 分 (積算水温として 50~60°C・時間) にあると考えられた。なお, 受精後 360~420 分においても正常浮上仔魚が得られているが, これは胚の細胞分割の観察から第二卵割が阻止されて雌性発生したものである可能性が考えられた。

また, 卵の発生速度に差異が認められることから, 処理開始時間においても差異を考慮して, 最適と思われる時間の前後にも水圧処理を実施することが望ましいと思われる。

本報においては, 得られた仔魚のアロザイム分析を実施したが, 供試した親魚のアロザイム分析を行わなかったため, 仔魚が第一卵割の阻止された完全ホモ個体である正確な確認はできなかった。しかし, 仔魚の遺伝子型の出現頻度から, 第一卵割が阻止されて得られた雌性発生 2 倍体である可能性は高いと判断された。また, 雌性発生 2 倍体の一部にヘテロ型の個体が確認されたことから, 極体の自発的抑制により発生したと考えられる第二極体放出阻止型雌性発生 2 倍体が混在していることが認められた。

したがって, 完全ホモ個体を効率的に作出して行くためには, 第二極体放出阻止型雌性発生 2 倍体が混在することのない処理方法の検討, および卵割阻止型雌性発生 2 倍体の選別手法の検討が必要とされる。

### 謝 辞

本報を稿するにあたり, 校閲および有益な助言を賜りました高知大学 谷口順彦教授に心より御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) 石井吉夫, 小山舜二, 今泉克英: ホウライマス(無斑ニジマス)の養殖について. 水産増殖, 28(3), 128-133 (1980).
- 2) 谷口順彦: 魚類の雌性発生 2 倍体における G-C 組換率と固定指数について. 水産育種, 11, 49-58 (1986).
- 3) 小野里 坦: 魚類の人為倍数化とその利用. 水産育種, 8, 17-28 (1983).

- 4) 小林 徹：ニジマス・アマゴにおける雌性発生法の育種への応用とクローン作出。水産育種, 17, 1-4(1992).
- 5) 山梨県魚苗センター：昭和62年度バイオテクノロジー連絡試験計画案。第12回全国養鱒技術協議会要録, 岩手, 1987, pp. 143-147.
- 6) Benfey T. J., Sutterlin A. M., and Thompson R. J. : Use of erythrocyte measurements to identify triploid salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41, 980-984(1984).
- 7) 服部克也：ニジマス染色体倍数化のための加温処理条件と排卵後経過日数の影響について。水産増殖, 38(1), 1-6(1990).
- 8) Taniguchi N., Seki S., Fukai J., and Kijima A. : Induction of two types of gynogenetic diploids by hydrostatic pressure shock and verification by genetic marker in ayu. *Nippon suisan gakkaiishi*, 54(9), 1483-1491(1988).
- 9) Bailey G. S., Wilson A. C., Halver J. E., and Johnson C. L. : Multiple forms of supernatant malate dehydrogenase in salmonid fishes. *J. Biol. Chem.*, 245, 5927-5940(1970).
- 10) Thorgaard G. H., Allendorf F. W., and Knudsen K. L. : Gene-centromere mapping in rainbow trout : High interference over long map distances. *Genetics*, 103, 771-783(1983).
- 11) 谷口順彦：染色体操作による魚類の量的形質の新しい評価法。第12回基礎育種学シンポジウム報告(日本学術会議育種学研究連絡委員会), 岐阜大学, 岐阜, 1992, pp. 42-60.

## 要 約

ホウライマス（無斑ニジマス）の第一卵割阻止型雌性発生2倍体の作出における最適水圧処理開始時間

服部克也

第一卵割阻止型雌性発生は、完全ホモ個体、クローンを作出するために有効な方法とされており、ホウライマスの優良品種作出のため、本報では、ホウライマスにおける水圧処理による第一卵割阻止型雌性発生の適性処理開始時間を検討した。処理開始時間は、受精後240～280分（積算水温として50～60℃・時間）にあると考えられた。また、得られた雌性発生2倍体のアロザイム分析から、第二極体放出阻止型雌性発生2倍体が少数認められたものの、第一卵割阻止型雌性発生2倍体の誘導の成功が概ね確認された。