

紫外線によるヤマメ精子の遺伝的不活化

米沢純爾・長谷川敦子・渡辺裕之*

紫外線照射により魚類の精子を遺伝的に不活化させる手法が開発され¹⁾、雌性発生の誘起が比較的簡易な設備で可能になった。ヤマメの精子についても雌性発生誘起への活用が期待されるが、そのために必要な遺伝的不活化条件については研究事例が少ない²⁾。そこで今回、紫外線によるヤマメ精子の遺伝的不活化条件をより明確にするための実験を行った。また、この実験にあわせて、紫外線照射が精子の運動機能におよぼす影響を調査した。

材料と方法

供試魚 東京都水産試験場奥多摩分場産ヤマメ1+年魚より採取した精液と卵を用い、1987年10月に実験を行った。精液を人工精漿³⁾で100倍希釈した後、内側にワセリンを塗った内径90mmのガラスシャーレに分注した。分注量を0.5mlとした場合を実験1、1mlとした場合を実験2とした。

紫外線照射 東芝製殺菌灯GL-15を用い実験1、2とも希釈精液に対し120~10,800erg/mm²の範囲で10段階の線量の紫外線照射を行った。紫外線照射にあたっては照射時間を60秒に固定し、殺菌灯とシャーレ底面との距離調節により線量を調整した。紫外線強度の測定にはTOPCON社の紫外線強度計UVR-254を使用し、紫外線照射中はシャーレを振とうした。

遺伝的不活化の判定 各区の紫外線照射精液と紫外線を照射していない対照区精液を、それぞれ150~200粒の卵に媒精した。受精卵の発生を観察し、半数体症候群¹⁾の発現状況から精子の遺伝的不活化を判定した。

紫外線照射精子の運動率と卵の受精率 実験1、2で作出した10段階の紫外線照射精液および紫外線を照射していない対照区希釈精液から各区ごとに5 μ lの照射精液を取り出し、45 μ lの等張液を加えて精子の運動を開始させた。その際、倒立顕微鏡に装着したビデオ

カメラを用いて精子の運動状態を録画した。再生画像の重ね合わせにより等張液添加約10秒後における運動精子と非運動精子の判別を行い、精子運動率(運動精子数/観察精子数 \times 100)を算出した。卵の受精率は実験1、2における媒精卵から各区30粒の卵を抽出し、2~8細胞期における卵割の有無を観察することにより算出した。

結果

実験1 (0.5ml 処理) 紫外線照射量と発眼率の関係を図1に示した。発眼率は紫外線照射量の増加に伴って低下した後、1,200erg/mm²区でいったん上昇し、その後再び低下した。発眼卵を、半数体症候群を呈した個体(以下、奇形発眼卵と記す)と正常な個体(以下、正常発眼卵と記す)に区分すると、図1に示したように紫外線照射量が1,200erg/mm²以上の区では正常発眼卵は出現せず、発眼卵は全て奇形発眼卵であった。奇形発眼卵からのふ化個体は皆無であった。

実験2 (1ml 処理) 紫外線照射量と発眼率の関係を図2に示した。発眼率は紫外線照射量の増加に伴って低下した後、2,400erg/mm²区でいったん上昇し、その後再び低下した。紫外線照射量が2,400erg/mm²以上の区では正常発眼卵は出現せず、発眼卵は全て奇形発眼卵であった。奇形発眼卵からのふ化個体は皆無であった。

紫外線照射精子の運動率と卵の受精率 紫外線照射量と精子の運動率および受精率の関係を図3、4に示した。実験1、2とも概ね紫外線照射量の増加に伴い精子運動率が減少する傾向がみられ、とくに実験1における5,400erg/mm²以上の照射区では精子運動率は0%であった。卵の受精率は実験1、2とも概ね紫外線照射量の増加に対応して減少する傾向がみられ、実験1における5,400erg/mm²以上の照射区では受精率が0

*日本大学農獣医学部

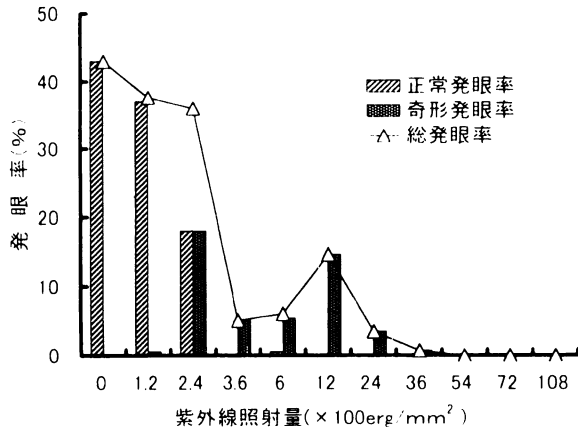


図1 発眼率 (0.5ml 処理)

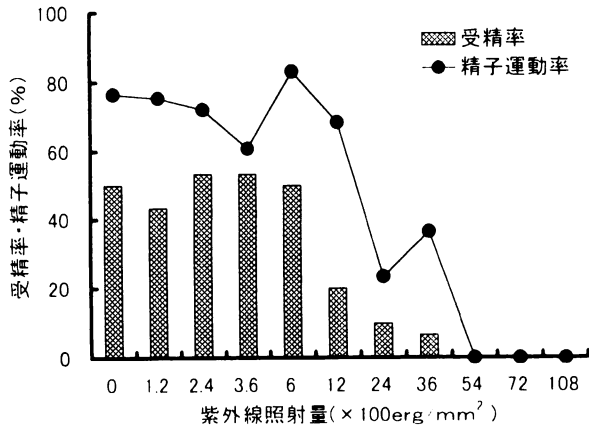


図2 受精率と精子運動率 (0.5ml 処理)

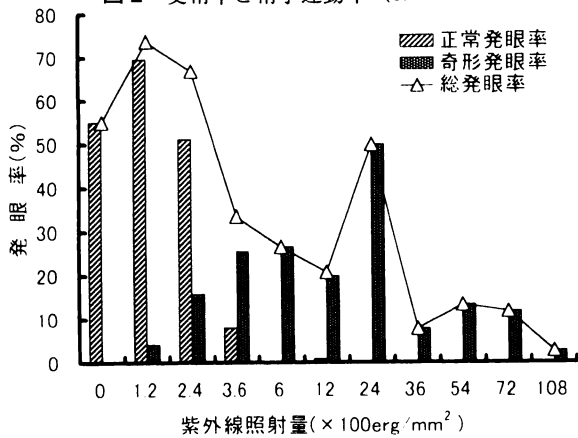


図3 発眼率 (1.0ml 処理)

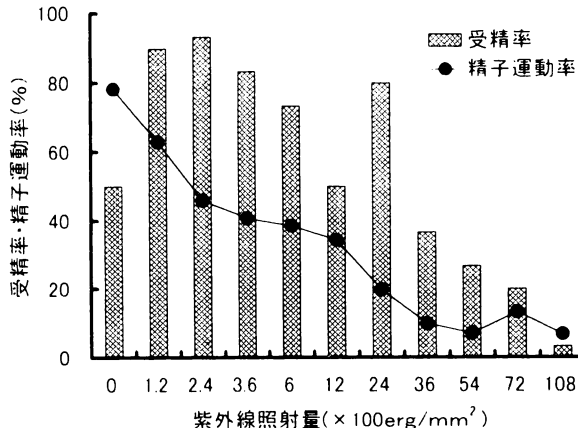


図4 受精率と精子運動率 (1.0ml 処理)

%であった。

考 察

0.5ml 処理では 1,200erg/mm² 以上で、1ml 処理では 2,400erg/mm² で全ての発眼卵が半数体症候群を呈し、ふ化個体は皆無であった。従って、それらの紫外線照射量以上の区では精子が遺伝的に不活化され、雌性発生が誘起されたと考えられる。吉沢ら²⁾は精液の 100 倍希釈、0.5ml 処理の条件において、2,700erg/mm² 以上でヤマメの精子が遺伝的に不活化されたと報告しているが、今回の実験 1 で得られた不活化必要線量はそれよりも低い値であった。実験 1, 2 の結果から処理精子の密度が高まると、遺伝的不活化にはより多くの照射線量が必要であることがわかった。従って精子の不活化条件をより明確にするには、今後、精液の希釈倍数だけでなく、供試精液の精子密度に配慮した実験が必要と考える。

今回の実験 1, 2 において紫外線照射量の増加に伴い低下した発眼率が Hertwig 効果⁴⁾によりいったん上昇するものの、照射紫外線量がさらに増えると発眼率が再び低下する現象がみられた。このような現象は吉沢ら²⁾の実験でも出現している。今回行った精子の運動率に関する実験結果から、紫外線照射量の増加が精子の運動機能を衰弱させ、受精率の低下を招くことが示唆された。従って、Hertwig 効果が期待される紫外線照射量域における発眼率の低下は、運動精子の減少による受精率の低下が原因となっている可能性が高い。多数の卵に対し雌性発生を確実に誘起するためには、不活化精子を用いる場合の適正媒精量を明らかにしていく必要があると考える。

文 献

- 1) 小野里坦・山羽悦郎 (1983) 紫外線照射によるサケ目魚類 4 種の雌性発生誘起。日本水産学会誌, 49(5): 693-699.
- 2) 吉沢和俱・高橋麻次郎・林不二雄 (1987) 染色体操作による魚類の改良品種作出研究-I, ヤマメ, ニジマスの三倍体および雌性発生二倍体の誘導条件。群馬農業研究, E 水産 (3): 1-9.
- 3) 森沢正昭 (1984) サケの精子の運動開始。遺伝, 38(1): 18-33.
- 4) Hertwig, O. (1911) Die Radiumkrankheit Tierischen Keimzellen. Arch. Mikroskop. Anat., 77: 1-95.