

## キングョ第一卵割阻止型雌性発生方法の検討-2

長谷川敦子

ニシキゴイ・キングョなどの観賞魚では、近年染色体操作の一技法である雌性発生を行いて、親と同じ遺伝子を持つクローン魚の作出が試みられている<sup>1,2)</sup>。

従来の選抜育種では、多くの世代選抜を繰り返すため、優良系統を得るまでに長い年月が必要であった。また観賞魚では、その外観によって評価が決まるため、選別淘汰が年に数回以上行われ、この間に淘汰される尾数は膨大で、選別に関わる作業量も非常に大きいものがあった。

バイオテクノロジー技術を応用した、クローン魚の作出は、こうした従来型育種法の問題点を克服し、短期間で優良品種を純系化するとともに、淘汰尾数の少量化や作業量の軽減をもたらすものと期待される。

本実験では、クローン魚作出のための第一段階として、高温処理による第一卵割阻止を行い、ホモ個体の作出を試みた。また、より高率に雌性発生魚を得るため、媒精後の処理開始時間によって複数の実験区を設け、第一卵割阻止型雌性発生方法における至適処理条件の検討を行ったので報告する

### 材料と方法

**供試魚** 供試魚は、東京都水産試験場水元飼育池で飼育したもので、雌親魚にはアカメリウキン2, 3歳魚を、雄親魚にはリュウキン3歳魚を用いた。親魚の測定データは表1に示した。親魚の個体識別は、アルファベットで記載し、雌を大文字、雄を小文字で示した。また、リュウキンの体色については、全身が赤

色の素赤(すあか)をa、赤色と白色の更紗(さらさ)をsとして表記した。

**方法** 実験は、1993年5月8日から6月19日までの間に、表2に示した条件下で実験1から4まで4回行った。

第一卵割阻止による雌性発生法は、木本<sup>3)</sup>に従った。すなわち、紫外線照射によるリュウキン不活化精子を、水温20℃下でアカメリウキン未受精卵に媒精し、その後40℃、2分間の高温処理を行った。不活化に用いた紫外線照射量は、6000erg/mm<sup>2</sup>、2分間であった。

処理条件は、高温処理開始時間を媒精後30~48分まで2分間隔に区分し、最高10区まで設定した。なお、希釈精子および紫外線照射精子で受精させたものを、それぞれ対照区と半数体区とした。

高温処理後は、水温20℃の水槽に収容し、適宜換水および死卵の除去を行い、正常ふ化率と奇形率を求めた。正常ふ化魚と奇形魚は、ふ化時点で肉眼によって判別し、体躯の湾曲や遊泳異常などの認められるものを奇形魚とした。鰭の変形は奇形には含めなかった。

ふ化仔魚期以降は、恒温室内で止水飼育を行った。餌料はふ化後2日目からアルテミアやミジンコを与え、成長に伴い配合飼料を給餌した。

雌性発生の成否判定には赤眼形質<sup>4)</sup>を利用した。

### 結 果

高温処理区の供試卵は、発眼時にはメラノフォアが認められず、ふ化後1~2日目にかけて仔魚の眼や体

表1 供試親魚の各測定値

	品 種		全 長 (cm)	体 長 (cm)	体 重 (g)	卵 重 (g)	
						1 回目	2 回目
雌親魚	アカメリウキン	A	17.5	8.1	113.8	11.17	
		B	11.8	6.2	55.9	9.00	
		C	11.3	6.1	41.5	6.07	5.54
雄親魚	リュウキン	ab	13.5	6.6	67.7		
		sb	16.2	6.8	122.4		

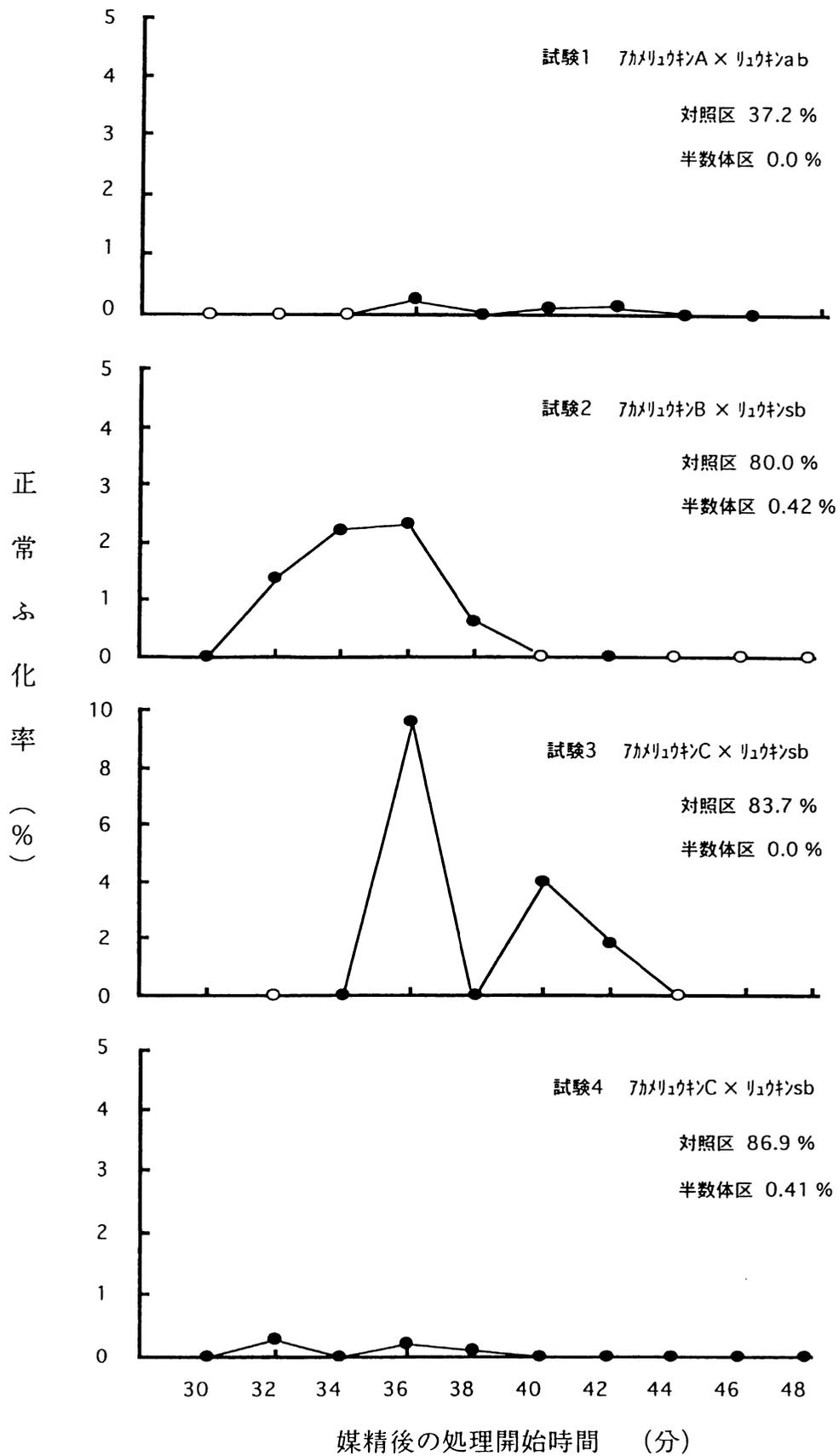


図1 アカメリュウキンにおける受精後の処理開始時間と正常ふ化率 (%)

表2 アカメリユウキンにおける第一卵割阻止型雌性発生結果

実験 No.	実験日	供試親魚		処理開始 時間(分)	供試卵数 (粒)	ふ化尾数 (尾)	正常ふ化 尾数(尾)	奇形尾数 (尾)	ふ化率 (%)	正常ふ化率 (%)	奇形率 (%)	
		♀	♂									
1	93.5.8	アカメリユウキン A		30	520	0			0.00	*	*	
				32	752	0			0.00	*	*	
				34	690	0			0.00	*	*	
				36	813	20	2	18	2.46	0.25	90.0	
				38	724	2	0	2	0.28	0.00	100.0	
				40	811	16	1	15	1.97	0.12	93.8	
				42	688	10	1	9	1.45	0.15	90.0	
				44	913	1	0	1	0.11	0.00	100.0	
				46	1085	7	0	7	0.65	0.00	100.0	
				48	—	—	—	—	—	—	—	
					処理区	6996	56	4	52	0.80	0.06	92.9
					半数体区	817	3	0	3	0.37	0.00	100.0
					リュウキン ab 対照区	296	111	110	1	37.50	37.16	0.9
				2	93.5.27	アカメリユウキン B		30	257	2	0	2
32	790	38	11					27	4.81	1.39	71.1	
34	994	90	22					68	9.05	2.21	75.6	
36	950	72	22					50	7.58	2.32	69.4	
38	492	8	3					5	1.63	0.61	62.5	
40	273	0							0.00	*	*	
42	224	2	0					2	0.89	0.00	100.0	
44	504	0							0.00	*	*	
46	576	0							0.00	*	*	
48	398	0							0.00	*	*	
	処理区	5458	212					58	154	3.88	1.06	72.6
	半数体区	238	7					1	6	2.94	0.42	85.7
	リュウキン sb 対照区	576	469					461	8	81.42	80.03	1.7
3	93.5.28	アカメリユウキン C						30	—	—		
				32	379	0			0.00	*	*	
				34	1223	1	0	1	0.08	0.00	100.0	
				36	566	101	54	47	17.84	9.54	46.5	
				38	396	2	0	2	0.51	0.00	100.0	
				40	576	69	23	46	11.98	3.99	66.7	
				42	545	13	10	3	2.39	1.83	23.1	
				44	543	0			0.00	*	*	
				46	—	—	—	—	—	—	—	
				48	—	—	—	—	—	—	—	
					処理区	4228	186	87	99	4.40	2.06	53.2
					半数体区	359	42	0	42	11.70	0.00	100.0
					リュウキン sb 対照区	919	802	769	33	87.27	83.68	4.1
				4	93.6.19	アカメリユウキン C		30	296	3	0	3
32	682	10	2					8	1.47	0.29	80.0	
34	271	3	0					3	1.11	0.00	100.0	
36	429	5	1					4	1.17	0.23	80.0	
38	844	8	1					7	0.95	0.12	87.5	
40	620	7	0					7	1.13	0.00	100.0	
42	601	6	0					6	1.00	0.00	100.0	
44	316	10	0					10	3.16	0.00	100.0	
46	458	1	0					1	0.22	0.00	100.0	
48	253	1	0					1	0.40	0.00	100.0	
	処理区	4770	54					4	50	1.13	0.08	92.6
	半数体区	245	50					1	49	20.41	0.41	98.0
	リュウキン sb 対照区	778	757					676	29	97.30	86.89	3.8

—：未処理区， \*：ふ化尾数0尾の処理区

の一部に少量のメラノフォアが観察された。その後飼育日数の経過とともに体色はやや薄い茶色を呈し、褪色開始後は、赤、オレンジまたは白の体色となった。また、眼色は親魚と同じ赤目であった。

第一卵割阻止型雌性発生実験の結果を表2に示した。各処理開始時間区ごとの正常ふ化率を表3および図1に、奇形率を表4に示した。

表3 アカメリユウキンにおける媒精後の処理開始時間と正常ふ化率<sup>1)</sup>(%)

実験 No.	1	2	3	4
試験日	93.5.8	5.27	5.28	6.19
親魚	♀ A	B	C	C
	♂ リユウキン ab	sb	sb	sb
30	*0	0	—	0
32	*0	1.39	*0	<u>0.29</u>
34	*0	2.21	0.00	0
36	<u>0.25</u>	<u>2.32</u>	<u>9.54</u>	0.23
38	0	0.61	0.00	0.12
40	0.12	*0	3.99	0
42	0.15	0	1.83	0
44	0	*0	*0	0
46	0	*0	—	0
48	—	*0	—	0
処理区	0.06	1.06	2.06	0.08
半数体区	0	0.42	0.00	0.41
対照区	37.16	80.03	83.68	86.89

—: 未処理区, \*: ふ化尾数0の処理区, 数字の下線は, 各実験ごとに奇形率の最低値を意味する。  
1) 正常ふ化率 (%) = 正常ふ化尾数(尾) / 供試卵数(粒)  
2) 奇形率 (%) = 奇形尾数(尾) / ふ化尾数(尾)

表4 アカメリユウキンにおける媒精後の処理開始時間と奇形率<sup>2)</sup>(%)

実験 No.	1	2	3	4
試験日	93.5.8	5.27	5.28	6.19
親魚	♀ A	B	C	C
	♂ リユウキン ab	sb	sb	sb
30	*	100	—	100
32	*	71.1	*	80.0
34	*	75.6	100	100
36	<u>90.0</u>	69.4	46.5	80.0
38	100	<u>62.5</u>	100	<u>87.5</u>
40	93.8	*	66.7	100
42	<u>90.0</u>	100	<u>23.1</u>	100
44	100	*	*	100
46	100	*	—	100
48	—	*	—	100
処理区	92.9	72.6	53.2	92.6
半数体区	100	85.7	100	98.0
対照区	0.9	1.7	4.1	3.8

表中の符号の意味は表3に同じ。

1~4の各実験において54~212尾の第一卵割阻止型雌性発生魚が作出され、このうち実験2, 3では、50尾以上の正常ふ化仔魚が得られた。正常ふ化率の最高値は、実験1~3で処理開始時間36分(0.25~9.54%)、実験4で同32分(0.29%)で記録された。実験3と4では、同一親魚を用いたにもかかわらず、36分における正常ふ化率は前者で9.54%、後方で0.23%と差が認められた。

奇形率は、各実験を通して23.1~100%の範囲にあった。実験1, 4では処理条件に関わらず高い奇形率を示した。全体的な傾向として、奇形率は30~32分および44~48分において高い値を示した。

半数体区では、実験2, 4で各1尾の正常魚が得られたが、その他の個体では、項部の湾曲や尾部の変形などの半数体症候群が観察された。

対照区の正常ふ化率は、実験1の37.2%を除いて80.03~86.89%と高い値を示し、奇形率はすべての実験において5%以下であった。

## 考 察

高温処理区の作出魚は眼色や体色においてアカメリユウキンの形質を示したことから、これらは雌性発生魚と考えられた。

4回の実験を通して各回の正常ふ化率には大きな差異が認められ、第一卵割阻止型雌性発生魚作出の至適処理条件は、これまでの報告<sup>1,2,5,6)</sup>と同様、供試親魚により異なるという結果が得られた。すなわち正常ふ化率は、同一処理条件下における同一品種間交配でも供試親魚による差異が認められ、さらには実験3と4でみられたように、同一親魚を用いた場合でも異なる結果となった。その理由としては、卵質(高・低水温に対する耐温性や発生にかかわる活力等)やホモ化による致死性遺伝子の発現が考えられる。また、正常ふ化率は媒精後36~42分の間で高くなる傾向が認められ、この時間帯に加温処理することで、低率ながらも卵割阻止型雌性発生魚の得られることが判明した。

理論上、第一卵割阻止型雌性発生魚は、全ての遺伝子座で同祖接合体になるが、母型の相同染色体が異祖性のため、染色体数が2nならば2<sup>n</sup>種類に分離し、きわめて変異性に富む集団となる。一方、キンギョ第一卵割阻止型雌性発生魚では、供試卵が発眼前に大量へい死する例や、発眼率は高いがふ化率が低い例などい

くつかの傾向が認められる<sup>7)</sup>。これらを考えあわせると、キンギョ第一卵割阻止型雌性発生魚では、これまでの通常交配ではみられなかった致死性遺伝子の発現やその発現時期の変異性によって、正常ふ化率の大幅な違いや低ふ化率現象を生じた可能性が示唆される。

一方、半数体区で得られた正常魚が赤目形質を有していたことから、これらはすでに報告されている自然雌性発生魚<sup>1)</sup>と考えられる。また、同様の自然雌性発生魚が処理区に混入している可能性も否定できない。従って、本実験の作出魚が、全て第一卵割阻止型雌性発生魚であるか、また真に全ての遺伝子座でホモ化しているかについては、さらに詳細な実験と遺伝学的解析が必要である。

今後は、上記処理条件の範囲で大量に卵を処理し、卵割阻止魚を多数作出することによって、優良品種の出現率の高まることが期待される。また、あわせてこれら卵割阻止魚が持つ形質、特に観賞魚として重要な鱗や体色といった表現形質についても明らかにしていく必要がある。

## 文 献

- 1) 著者不詳 (1992) 第4回観賞魚養殖技術研究会：30p.
- 2) 宮本淳司・岡本俊治・高尾充英 (1990) キンギョの第一卵割阻止による雌性発生の処理条件の検討. 平成2年度愛知水試業務報告. :23-25.
- 3) 木本巧 (2000) キンギョ雌性発生技術マニュアル. 東京水試調査研報., (212) :119-122.
- 4) 木本巧 (2000) キンギョ赤目形質の遺伝. 東京水試調査研報., (212) :108-109.
- 5) 岡本俊治・平澤康宏・村松寿夫 (1991) キンギョの卵割阻止による雌性発生処理条件の検討. 平成3年度愛知水試業務報告. :24-26.
- 6) 岡本俊治・平澤康宏・村松寿夫 (1992) キンギョの卵割阻止による雌性発生処理条件の検討-2. 平成4年度愛知水試業務報告. :28-29.
- 7) 長谷川敦子・有馬多恵子 (2000) キンギョ4品種における第一卵割阻止型雌性発生魚作出条件の差異. 東京水試調査研報., (212) :129-138.