

# キンギョ第一卵割阻止型雌性発生魚を親魚としたクローン魚作出の試み

有馬多恵子

第一卵割阻止型雌性発生魚はゲノム遺伝子がホモ化するため、これを親魚として再度雌性発生を行うことでクローン魚の作出が可能となる。クローン魚では量的、質的形質の変異幅が減少するため<sup>1)</sup>、優良な第一卵割阻止型雌性発生魚を親魚とすれば、優良で均質な種苗の生産が期待できる。

有馬・長谷川<sup>2)</sup>は、1993年に第一卵割阻止型雌性発生魚（以下、卵割阻止魚と表記）を作出し、これらを親魚にまで養成したところ、1996年4月以降産卵した。そこでこれらの卵割阻止魚を親魚として、まず第二極体放出阻止による雌性発生を行いクローン魚作出を試みた。一方、これらの親魚の中には放精するものが認められたので、卵割阻止魚同士の交配も行って、同じくクローン魚の作出を試みたので報告する。

## 材料と方法

**供試魚** 実験は全て東京都水産試験場水元飼育池で行われ、供試魚も同飼育池で作出されたものである。

親魚の作出年月日と産卵時の大きさを表1に示した。雌親魚は第一卵割阻止型雌性発生魚のチャキン1尾とワキン5尾で、その体重は26.0~76.6gであった。対照として通常発生二倍体（以下通常魚）の雌親魚を用いた。雄はワキンの通常魚4尾と第一卵割阻止型雌性発

生魚1尾である。

**親魚の養成方法** 有馬・長谷川<sup>2)</sup>の飼育方法に従った。

**クローン魚の作出** 1996年4月17日から7月5日までの間に、卵割阻止雌親魚を用いて合計11回の作出実験を行った。作出実験は、ワキン通常魚の雄から採取した精子と受精させる（対照区）、紫外線処理した精子と受精させた後、40℃の温水に2分間浸漬して極体放出処理を施す（極体放出阻止区）、紫外線処理した精子と受精させ極体放出処理を施さない（半数体区）、雌性発生魚の精子と受精させる（ヘテロ区）の4区を設定した。人工受精や第二極体放出阻止による雌性発生実験の基本的な操作は木本<sup>3)</sup>に従った。

## 結果

実験結果を雌親魚の個体別にまとめて表2に示した。雌性発生魚から得られた卵と通常雄魚精子を交配した対照区のふ化率は0~38.8%、平均18.2%で、ワキン通常交配によるふ化率62.8%を下回った。雌性発生のワキンⅡは2回の実験とも、どの区においても発眼、ふ化が全く認められなかった。

極体放出阻止区のワキンⅤでは、極体放出阻止の温度処理開始を、受精後の経過時間を変えて行ったが、3分30秒後で発眼率が10.4%と最も高く、次いで4分後8.3%、5分後5.9%の順となった。ワキンⅤでふ化仔魚が得られたのは発眼率が最も高かった受精後3分30秒区のみで、ふ化率は0.7%（3尾）であった。このほかにふ化仔魚が得られたのは受精後5分から温度処理を実施したワキンⅠで、ふ化率は0.2%（1尾）であった。他の雌性発生魚を用いた極体放出阻止区ではふ化仔魚は得られなかった。なお、これらのふ化仔魚はふ化後8日目までにすべてへい死した。また、ワキン通常魚から得られた卵で、温度処理開始時間を受精5分後に設定して極体放出阻止阻止型雌性発生を行ったが、ふ化仔魚は得られなかった。

表1 発生実験に用いた親魚の形質

	作出年月日	全長	体長	体重
雌親魚				
チャキン雌性発生魚	1993/5	16.6	8.0	55.2
ワキン雌性発生魚Ⅰ	1993/4/18	12.5	9.5	37.2
ワキン雌性発生魚Ⅱ	1993/4/18	11.3	8.5	26.0
ワキン雌性発生魚Ⅲ	1993/4/18	13.3	10.3	46.5
ワキン雌性発生魚Ⅳ	1993/4/18	13.2	10.0	55.3
ワキン雌性発生魚Ⅴ	1993/4/18	14.0	11.0	76.6
ワキン通常魚		20.5	13.3	219.8
雄親魚				
ワキン雌性発生魚Ⅰ	1993/4/18	18.0	14.0	131.0
ワキン通常魚1	—	19.2	15.0	171.8
ワキン通常魚2	—	19.5	15.0	150.5
ワキン通常魚3	—	19.0	15.0	132.7
ワキン通常魚4	—	20.5	16.0	177.6

表2 第一卵割阻止型雌性発生魚を用いた発生実験結果

実験年月日	1996/5/9.5/22	4/17	4/26.5/11	5/20,6/5	5/23	6/6,7/5	61/1
雌親魚	ワキン通常魚	チャキキン雌性発生魚	ワキン雌性発生魚I	ワキン雌性発生魚II	ワキン雌性発生魚III	ワキン雌性発生魚IV	ワキン雌性発生魚V
供試卵数 (合計)	1436	1049	1050	1516	745	5742	1995
雄親魚	ワキン通常魚4	ワキン通常魚1	ワキン通常魚1+2+3	ワキン通常魚4		ワキン通常魚2,4	ワキン通常魚2
供試卵数	917	67	54	190		3151	103
発眼率 (%)	66.3	50.9	35.2	0.0		29.9	40.8
ふ化率 (%) 正常	54.3	19.3	18.5	0		11.0	34.0
合計	62.8	19.3	18.5	0		14.5	38.8
ふ化仔魚の奇形率 (%)	13.5	0.0	0.0			23.9	12.5
ふ化後累積へい死亡率 (%)	-	72.7	0			32.9	2.5
ふ化後 5 日	-	72.7	0			41.7	20.0
ふ化後 10 日	-	72.7	0			45.2	35.0
ふ化後 20 日	-						
受精後温度処理開始時間	5'	5'	5'	5'		5'	3'30" 4' 4'30" 5'
供試卵数	166	840	548	670		691	413
発眼率 (%)	0.0	0	2.0	0.0		0.0	10.4
ふ化率 (%) 正常	0	0	0.2	0		0	8.3
合計	0	0	0.2	0		0	0
ふ化仔魚の奇形率 (%)			0.0			0	0.5
ふ化後累積へい死亡率 (%)			0			0	0.7
ふ化後 5 日			0				33.3
ふ化後 10 日			0				100.0
ふ化後 20 日			100.0				
供試卵数	58	152	52	293		187	114
発眼率 (%)	5.2	0	21.2	0.0		0.0	11.4
ふ化率 (%) 正常	0	0	1.9	0		0	0
合計	0	0	1.9	0		0	0
ふ化仔魚の奇形率 (%)			0.0				
ふ化後累積へい死亡率 (%)			0				
ふ化後 5 日			0				
ふ化後 10 日			0				
ふ化後 20 日			100.0				
雄親魚	ワキン雌性発生魚1		ワキン雌性発生魚1	ワキン雌性発生魚1	ワキン雌性発生魚	ワキン雌性発生魚1	
供試卵数	295		396	396	745	1713	
発眼率 (%)	13.6		27.0	0.0	33.3	15.6	
ふ化率 (%) 正常	9.5		19.2	0	16.6	3.9	
合計	13.6		23.7	0	27.7	5.0	
ふ化仔魚の奇形率 (%)	30.0		19.1		39.8	23.3	
ふ化後累積へい死亡率 (%)							
ふ化後 5 日	2.5		14.9		5.3	64.0	
ふ化後 10 日	17.5		31.9		41.3	96.5	
ふ化後 20 日	22.5		33.0		50.0	98.8	

ヘテロ区では、ワキン雌性発生魚Ⅱを除きすべての実験区でふ化仔魚が得られ、そのふ化率は5.0~27.7%であった。雌性発生雌魚4尾のふ化率の平均値は14.1%で、通常ワキン雌のふ化率13.6%とほぼ等しかった。

対照区の発眼率とふ化率の差は、雌親魚がワキン通常魚の場合は3.5%であった。これに対し、ワキン雌性発生魚Ⅰ、Ⅳではそれぞれ16.7、15.4%、チャキン雌性発生魚の場合は31.6%で、発眼率とふ化率の差が大きかった。また雌親魚が雌性発生魚の場合には通常魚の場合に比べてふ化後のへい死率もやや高かった。

## 考 察

雌性発生魚を雌親魚として極体放出阻止による再雌性発生を行いクローン作出を試みたが、発眼率は低く、発眼後もへい死魚が多かった。わずかにふ化した仔魚もふ化後8日目以降は生残しなかった。今回、この原因は明らかにすることはできなかったが、クローン化により、劣悪遺伝子が強く発現した可能性も考えられる。ただし、通常二倍体親魚を用いた極体放出阻止区でもふ化魚がみられなかったので、この問題については今後検討の余地が残された。

極体放出阻止区で受精後の高温処理開始時間を変えておこなった実験では、木本<sup>3)</sup>が最適とした受精5分後よりも短い3分30秒および4分後の方が良い結果が得られた。適切な受精後の温度処理開始時間について、雌性発生魚の場合にはさらに検討が必要である。

ヒラメではヘテロ型クローンは、ホモ型クローンよりふ化率、生残率等で勝るといわれている<sup>4)</sup>。今回、キンギョでも雌性発生魚同士の交配ではふ化率、生残率ともに高く、クローン魚作出の手段として有効である可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) 小野里坦 (1992) 染色体操作による魚類のクローン作出, 特殊実験動物としての魚類—クローン魚を用いたライフサイエンス研究の展望. 細胞工学, **11** (8): 563-568.
- 2) 有馬多恵子・長谷川敦子 (2000) 第一卵割阻止型雌性発生キンギョの飼育特性. 東京水試調査研報, (212): 144-148.
- 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) 山本栄一 (1992) ヒラメの雌性発生および倍数化を利用した育種. 水産育種, **16**: 13-23.