

学 位 論 文 題 名

ヒラメの人為的性統御とクローン集団作出に関する研究

学位論文内容の要旨

本研究は、重要な養殖対象魚種であるヒラメについて、遺伝的および生理的性の人為的統御技術を開発するとともに、クローン集団を作出し、これを利用した新しい育種技術を開発することを目的とした。この目的を遂行するため、本研究では主として下記の項目について検討した。

① 性分化過程： ヒラメの性分化過程を組織学的に調査した。仔魚および変態着底直後の稚魚は形態的に性的未分化期にあった。卵巢および精巢はそれぞれ全長 27 mm および 37 mm の個体で互に区別できる形態的分化を示した。性分化は生殖腺の体細胞性要素による形態形成が先行し、生殖細胞の減数分裂開始はこれより遅れて、卵巢では 69 mm、精巢では 129 mmの個体で認められた。

② 遺伝的性決定とその人為的統御： ヒラメの遺伝的性決定機構を明らかにするため、雌性発生2倍体やその後代等について性比調査を行なった。性転換阻止レベル(後述)のエストラジオール- 17β (E_2) 処理群の性比調査から、遺伝的性決定は基本的に雄ヘテロ型(XY型)であることが明らかとなった。従って、遺伝的全雌群を得るための遺伝的統御法として、雌性発生2倍体の作出および性転換雄(XX雄)と通常雌(XX雌)の交配が有効である。性転換雄は、雌性発生2倍体の雄への誘導によっても、通常ヒラメの雄への誘導(検定交配が必要)によっても得ることができた。しかし、遺伝的雌(XX個体)の性分化は遺伝的に強く固定されておらず、通常の飼育条件下でも雄への性転換が容易に生じることが判明した。それゆえ、雌を安定して作出するには、遺伝的全雌群の作出に加え、

遺伝的雌の雄への性分化の転換を阻止することも必要であることが分った。

③ 生理的性の人為的統御：環境要因および性ステロイドがヒラメの性分化に与える影響を明らかにし、生理的性の人為的統御を可能とした。

環境要因の主要な一つである水温と、性分化の関連を調べた。その結果、性分化時期の飼育水温が、遺伝的雌の性分化に関与することが判明した。とくに、高水温条件下(25～27.5℃)で飼育すると、遺伝的雌が生理的雄へ高頻度で性転換することが明らかとなった。また、低水温条件下(15℃)でもその傾向が強かった。遺伝的雌が雄に転換する高水温の感受期は、全長12 mm から30 mm 前後の時期にあることが分った。高水温飼育は、性転換雄の作出手法として利用できること、また、適水温(20℃)による着底期から全長 50 mm までの期間の飼育は、雄への性転換阻止に有効であることが判明した。しかし、遺伝的雄は飼育水温によって生理的雌に転換することはなかった。

性ステロイドがヒラメの性分化に及ぼす影響を調査し、生理的性の統御法を検討した。遺伝的雌を生理的雄に誘導する 17α -メチルテストステロンの有効な浸漬および経口処理濃度は、それぞれ 1～10 ppb(下限不明)および 0.01～10 ppm(下限不明)であり、低濃度側に非常に幅広い有効範囲を示した。一方、遺伝的雄を生理的雌に誘導する E_2 の有効な経口処理濃度は 3～10 ppm (上限不明)であり、0.3 ppm 以下の処理は有効ではなかった。また、遺伝的雌の雄への性転換を阻止し、雌への分化を促進する E_2 の有効な経口および浸漬処理濃度は、それぞれ 0.1 ppm 以上および 1 ppb 以上と下限が低かった。従って、 E_2 の 0.1～0.3 ppm の濃度での経口投与は、1～10 ppb の濃度での浸漬処理同様、遺伝的雄の雌への転換には有効でないが、遺伝的雌の雄への性転換阻止に有効なことが判明した(性転換阻止レベル)。遺伝的雌の雄への転換阻止における E_2 の感受期は、全長 28 mm から 39 mm 前後の時期にあることが判った。

④ 雌性化種苗の大量生産方法と成長特性：ヒラメの雌雄による成長特性を調査し、単性養殖の有効性を調べた。また、ヒラメの成熟特性に一致した性統御技術を検討し、雌性化種苗の効率的な生産を試行した。

ヒラメの雌雄による成長差を確認する目的で、遺伝的に均質な同一クローン

集団内の雌雄の成長差を調査した。その結果、平均体重で雌は雄の 1.8 倍(日齢 445)ないし 2.9 倍(日齢 773)に達した。これは、雄が早熟で成熟体サイズが小さく、その成熟時の著しい成長停滞に起因することが分った。このことから、全雌種苗を用いた養殖の有効性が確かめられた。

効率的なヒラメの雌性化技術を確立するため、まず、その生殖周期を組織学的に調査した。その結果、雄は満 1 歳で成熟する一方、雌は満 2 歳で初回成熟した。卵巢では、繁殖期の 2 カ月前から卵黄形成が開始された。繁殖盛期の卵巢卵組成から、ヒラメの卵母細胞の発達様式は典型的な非同期発達型であることが確認された。さらに、雌親魚の個体別産卵実験から、ヒラメは、約 3 カ月の産卵期の間、同一個体がほぼ毎日産卵することが判明した。それゆえ、ヒラメの採卵は、搾出採卵ではなく、水槽内での自然産卵による採卵が効率的である。そこで、性転換雄と通常雌による自然産卵実験を行ない、性転換雄の放精行動の正常性と、全雌卵(XX卵)が容易に大量作出できることを確認した。得られた全雌卵を用い、性分化時期の 20℃の恒水温飼育による雄への転換阻止を施し、準量産規模で雌性化種苗を多数生産することができた。作出された雌性化種苗は、生育において正常であり、成長の速い雌を高率に含むことから、養殖効率において著しく優れることが実証された。

⑤ クローン集団の作出と育種利用： ヒラメのクローン集団を作出し、その特性調査などを通じて、クローンを利用した育種技術を検討した。

第 1 卵割阻止型雌性発生 2 倍体の作出例では、奇形胚の増加と仔稚魚の生残率の低下が特徴的であった。作出魚のいくつかの形質において顕著な変異幅の拡大がみられた。作出群は完全同型接合体のみからなることが、アイソザイムをマーカーにして確認された。

第 1 卵割阻止型雌性発生 2 倍体雌を親魚とするクローン世代の作出例では、卵発生成績と仔稚魚の生残率が親世代より回復する例が多かった。作出魚の種々の形質で変異幅の縮小が認められた。作出群が遺伝的に均質なクローン集団であることが、組織移植実験および DNA フィンガープリント法で確認された。

クローン世代雌雄の交配でクローン第 2 世代が得られ、一度作出したホモ型

クローン(完全同型接合体のクローン)の継代に渡る維持増殖が可能ながことが確かめられた。さらに、クローン集団内の雌雄による産卵群から正常な胚形成卵が得られ、水槽内での自然産卵でクローン卵が量産される可能性が示された。

異なるホモ型クローン間の交雑（完全同型接合体雌雄の交雑）によって、ヘテロ接合体の遺伝子座を多数持ちながらも、遺伝的に均質なヘテロ型クローンが作出された。ヘテロ型クローンは、仔稚魚期から1歳魚について、成長度、生存性、および耐病性において、ホモ型クローンを大きく上回る成績を示し、養殖実用性に勝ることが示された。有用形質を固定されたホモ型クローンを素材に、優れたヘテロ型クローンを作出することで、ヒラメの育種に要する時間を著しく短縮させることができると期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	山崎文雄
副査	教授	尼岡邦夫
副査	教授	山内皓平
副査	助教授	後藤晃

学位論文題名

ヒラメの人為的性統御とクローン集団作出に関する研究

本論文は申請者が1987年以降10年間に亘り、行った実験と観察結果をまとめたものである。研究材料としたヒラメは、現在我国における重要な養殖対象魚であり、生産も年々増加をたどっている。本研究はヒラメ養殖における雌雄性統御の有効性を示したもので、基礎研究を積み上げて、応用の道を拓いた研究として評価できる内容となっている。

先ず申請者はヒラメ増養殖の現況を明らかにして、同じ増養殖努力によって得られる成果は雌雄によって異なることに注目し、特に雌の成長は雄と比較して約2倍に達することから全雌種苗の生産を可能にすること、および遺伝的な管理を目的としたヘテロクローンの作出を可能にすることを目的として、その基礎研究を行い、更に大量に雌種苗を生産するための新しい方法の開発を試みた。

本研究は5章から成り、第1章ではヒラメの性統御に必要な性決定時期を明らかにしようとした。生殖腺を組織学的に観察した結果、雌の性分化時期は全長27mm、雄では37mmにあり、生殖腺の性分化は、生殖腺の体細胞性要素による形態形成が先行していること、および生殖細胞の減数分裂開始は卵巣で69mm、精巣で129mmの個体に認められ、性の分化は雌で早く、雄では遅れて生ずることを明らかにした。この事実はヒラメの基本的性が雌にあり、雄は、何かの要因により誘導されて生ずる性であることを示唆するもので、ヒラメの性を考える上で極めて重要な知見である。第2章では遺伝的性決定機構を明らかにしようとした。これまでヒラメの遺伝的性決定機構が、雌性発生魚に雄が出現することからZZ-ZW型も推察されていたが、申請者は、雌性発生魚に Estradiol 17 β (E2)を処理した実験結果から、性決定機構は基本的にはXX-XY型で、雌がホモ型(XX)であること、しかし、遺伝的には雌への分化は強く固定されておらず、飼育条件によって雄への転換が容易に生ずることを初めて明らかにした。この発見はこれまでヒラメの集団の性比が一定しない理由を遺伝的に説明するもので極めて貴重な知見である。第3章では受精によって決定される遺伝的性が、性ステロイド処理によって、機能的なXX雄やXY雌に転換できることを明らかにした。雄へ転換する Methyltestosterone の浸漬処理濃度は1-10ppb、経口処理濃度は0.01-10ppmであること、雌へ転換する E2 の経口処理濃

度は3-10ppmであることを示し、雌から雄へ転換する環境条件として性分化時期の温度が重要であることを初めて明らかにした。性分化時期の水温が25-27.5℃では遺伝的雌が効率に雄へ転換し、XX雄を性ステロイドを使用することなく作出できること、また遺伝的雌の雄への転換を阻止するE2の浸漬処理濃度は1ppb以上、経口処理濃度は0.1ppm以上であることを明らかにし、生理的性統御に関する基礎研究の大方を完成させた。第4章では第3章までに記述された基礎知見をもとに、雌性化種苗の大量生産方法について検討し、人為的に作出された全雌種苗が期待どおりの成長特性を示すことを実験的に証明した。XX雌とXX雄との交配によって作出した全雌魚の平均体重は雄の1.8倍（日齢445）ないし、2.9倍（日齢773）に達し、人為的性統御が養殖上極めて有効な手段であることを実証した。更に水槽内での自然産卵による採卵が効率的であることを利用して、XX雄とXX雌による自然産卵による全雌集団を作出し、性分化時期に飼育水の水温を20℃に保って雄への転換を阻止することにより、準量産規模で雌性化種苗を大量生産できることを実証した。この結果はヒラメ養殖産業に貢献するところ極めて大きく、高く評価できる。第5章ではヒラメのクローン集団を作出し、異質なクローン集団の交配によるヘテロ型クローンの作出が可能であることを実証した。クローン集団の作出には、第1卵割阻止型雌性発生によって得られた雌親魚から採卵し、これを第2極体放出阻止型雌性発生により、発生させる方法を採用して、多数の異質なクローン集団の作出に成功した。このクローン集団は組織移植実験およびDNAフィンガープリントで遺伝的に同一のクローンであることを確認した。更にクローン世代雌雄の交配でクローン第2世代が得られること、一度作出したホモ型クローンの継代に渡る維持増殖が可能であること、クローン集団の雌雄による産卵群から正常な胚形成卵が得られ、水槽内での自然産卵によりクローン卵が大量に生産できることを示し、産業への応用の道を拓いた。更に異質なクローンの交配によって得られたヘテロ型クローンは成長、生残性、および耐病性において、ホモ型クローンを大きく上回る成績を示し、有用形質を固定させたホモ型クローンを素材に、優れたヘテロ型クローンの作出が可能となり、ヒラメで初めて新しい育種の道を拓いた。

以上、本研究は、ヒラメの性統御に関する基礎研究を積み重ね、更に産業への応用の道を拓いたもので、審査員一同は本研究が博士（水産学）に相当する業績と判断した。