

学 位 論 文 題 名

マツカワ *Verasper moseri* の染色体操作と
性統御に関する研究

学位論文内容の要旨

マツカワ *Verasper moseri* は、北海道では、太平洋沿岸を主な分布域とする冷水性大型カレイで、天然魚の漁獲量は、極めて低水準となっており、現在では幻の魚と言われている。しかし、本種は、10万尾規模の種苗生産技術が確立し、陸上飼育試験の結果、低水温でも成長が良いことから北海道の特産種としての養殖適性が明らかとなり、現在、海面養殖試験と出荷試験が行われ、今後の進展が期待されている。

近年、北海道の海産魚養殖は、市場価格の低下、輸入魚の増加、冬季間の低温や時化および疾病の発生による生産の不安定化が大きな問題点となっている。現在、その解決策としては、地域特産化、ブランド化、品質と安全性の向上および魚病防除対策が提唱されている。従って、北海道において、マツカワ養殖を今後進展させるには、より一層の生産効率の向上や品質改善が求められると考えられる。

生産効率の向上、品質改善および地域特産化を行う上で、育種による品種改良や性の統御は非常に有効な手段である。染色体操作育種は、配偶子の遺伝的不活性化と、第二極体放出または第一卵割の阻止による染色体セットの倍加により、対象種のゲノム量と組み合わせを操作する技術であり、比較的短期間における性および成熟の統御と優良形質の遺伝的固定が可能となる。マツカワでは、雌の成長が雄よりも著しく良好であることから、全雌種苗の作出は養殖生産の効率化をもたらすと考えられる。また、三倍体化による産卵期の成長改善や肉質の向上が期待される。さらに、第二極体放出阻止型雌性発生魚の数世代による交配やクローン魚の作出により、マツカワ養殖における有用形質の遺伝的固定も可能と考えられる。

そこで、本研究ではマツカワの育種基盤の確立に資することを目的に、(1)雌性発生二倍体および三倍体の効率的誘起のための紫外線による精子の遺伝的不活化ならびに受精卵の第二極体放出および第一卵割阻止を用いた染色体倍數化に好適な処理条件を検討し、本種における基礎的な染色体操作法を確立した。

次に、(2)前述の条件に基づいて作出した雌性発生魚の性比とそれに及ぼす飼育環境要因および性ステロイドの影響を検討し、マツカワの遺伝的性決定様式についての考察を行った。さらに、(3)染色体操作技術により作出した第二極体放出阻止型雌性発生二倍体と(G1)および三倍体(3N)の正常発生二倍体(2N)との比較飼育試験を行い、これらの成長・成熟等の養殖特性について検討を行った。

(1) マツカワ染色体操作技術の開発

マツカワ精子は、 $10\sim 100\text{mJ}/\text{cm}^2$ の紫外線強度で遺伝的に不活性化され、半数体雌性発生を誘導できることが明らかとなった。第二極体放出阻止型雌性発生二倍体(G1)の誘起条件は、 $40\sim 45\text{mJ}/\text{cm}^2$ の条件で紫外線照射を行ったマツカワ精子を受精7～9分後、受精卵に処理水温 -1.5°C 、60～90分間の低温処理を施すことにより、第二極体放出阻止がなされ、作出できた。また、三倍体(3N)も未処理精子受精後、ほぼ同じ処理条件で誘起できた。G1と3Nの誘起については、 $650\text{kg}/\text{cm}^2$ 、6分間の圧力処理も有効であった。

第一卵割阻止による雌性発生二倍体(G2)の生残率は、著しく低いものの(0.04%)、紫外線照射精子で受精後150～240分に、 $650\text{kg}/\text{cm}^2$ 、6分間の圧力処理を受精卵に施すことにより、作出できた。同じ雌親魚由来のG1および2Nの生残率は、全長30mmでそれぞれ24.0%および36.7%であった。一方、同じ雌親魚由来のG2および2Nの生残率は、全長30mmでそれぞれ、0.04%および26.0%であった。3Nの確認は、フローサイトメトリーによる相対DNA量の測定により可能であった。また、赤血球長径による判定も有効であった。

(2) 雌性発生魚の性比とそれに及ぼす水温と性ステロイド投与の影響

全長100mmにおける生殖腺の組織学的観察から、2NおよびG1の生殖腺の発達段階は、同様であり、生殖腺の外部形態から性比判定が可能であった。

マツカワG1の性比には水温環境が影響を及ぼし、性分化期(全長15mm～50mm)における 16°C の高水温は遺伝的雌が雄へ性転換する要因となっていることが示唆された。 12°C 飼育では、 14°C 飼育と比べて、性比に明確な違いはみられなかった。性分化期における 14°C の飼育により、G1において、90%以上の雌比率が得られたことから、マツカワは、雄ヘテロ型(XX-XY型)の性決定機構を有することが強く示唆された。しかし、同一条件でも、雌比率が7.0～54.7%と低い場合もあったことから、親魚の遺伝的背景による性転換率の差が考えられた。また、本研究における2Nでは、雌雄1:1よりも雄比率がやや高く、水温以外の飼育環境要因が雄への性転換を促進している可能性が考えられた。

マツカワの性比は、性ステロイドの投与によって、雌、あるいは雄に転換し得ることが明らかとなった。効果的な投与期間および投与濃度は、エストラジオール17 β (E2)、17 α メチルテストステロンともに全長30～60mm、 $1\mu\text{g}/\text{g-diet}$ であった。

0.25 μ g/g-dietの低濃度E2投与では、雄への性転換阻止が可能となり、G1による全雌化と2Nにおける雌雄1:1が実現した。これにより、XX-XY型性決定機構の関与が一層強く示唆された。

(3) 染色体操作魚の生物学的特性

孵化後16ヶ月間における個別飼育によるG1の成長は2Nより優れていた。従って、雌比率の高いG1の成長の優位性は、明らかであり、今後、雌性化あるいは全雌種苗の養殖用種苗としての活用の可能性が示唆された。

マツカワ3Nおよび2Nの個別飼育(16ヶ月間)では、3Nの成長は、2Nに劣る傾向が認められた。混合飼育(36ヶ月)では、雄で未成熟期、産卵期の両期において、2Nより劣っていた。一方、雌では、生殖腺重量を除いた生殖腺除去体重で、両期において2Nとの間に差はないことが明らかとなった。従って、3N雌の成長は、2N雌と比べて差がないと考えられた。産卵期における可食部重量比では、3N雄は2N雄と違いはなかったが、3N雌の可食部重量比は、2N雌よりも明らかに高かった。

3N雌のGSIは2Nに比較して著しく低く、産卵期の卵巣は痕跡的であった。3Nでは卵巣中の多くは、未発達の卵母細胞であり、不妊であると判断された。

3N雄のGSIも、2Nを下回った。しかし、2歳時では、希薄な精液が少量認められた。電子顕微鏡観察から、3Nの形成する精子は形態の異常がみられた。これらの精子の頭部長径平均値は2Nより有意に大きく、フローサイトメリーの結果から、2Nの精子を1Nとすると1.46Nを中心とする異数性であった。これら異数性精子を2Nの卵に媒精したが孵化仔魚はまったく得られなかったことから、3N雄も不妊と判断した。

以上の結果より、マツカワはヒラメと同様に三倍体化による成長改善はみられなかった。しかし、雌は不妊で、可食部重量比が2Nよりも高いことから、全雌三倍体としての利用が今後の課題となった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 荒 井 克 俊

副 査 教 授 阿 部 周 一

副 査 教 授 山 羽 悦 郎

学 位 論 文 題 名

マツカワ *Verasper moseri* の染色体操作と 性統御に関する研究

マツカワ *Verasper moseri* は、北海道では、太平洋沿岸を主な分布域とする冷水性大型カレイで、低水温でも成長が良いことから北海道の特産種としての養殖適性が明らかとなり、現在、海面養殖試験と出荷試験が行われている。しかし、近年、北海道の海産魚養殖は、市場価格の低下、輸入魚の増加、冬季間の低温や時化および疾病の発生による生産の不安定化が大きな問題点となっている。今後、北海道において、マツカワ養殖を進展させるには、育種による品種改良や性の統御を行い、より一層の生産効率の向上や品質改善が求められている。

マツカワの育種に関する研究はこれまでに全く行われてこなかった。そこで、本研究では本種の育種基盤の確立に資することを目的に、染色体操作技術の開発、雌性発生魚の性比とそれに及ぼす飼育環境要因および性ステロイドの影響の検討とマツカワの遺伝的性決定様式の解明、染色体操作技術により作出した第二極体放出阻止型雌性発生二倍体(G1)および三倍体(3N)の成長・成熟等の養殖特性についての検討を行い、以下の成果を得た。

1. マツカワ精子は、10～100mJ/cm² の紫外線強度で遺伝的に不活性化され、半数体雌性発生を誘導できた。第二極体放出阻止型雌性発生二倍体(G1)の誘起条件は、40～45mJ/cm²の条件で紫外線照射を行ったマツカワ精子を受精7～9分後、受精卵に処理水温-1.5℃、60～90分間の低温処理を施すことにより作出できた。また、三倍体(3N)も未処理精子受精後、ほぼ同じ処理条件で誘起できた。G1と3Nの誘起については、650kg/cm²、6分間の圧力処理も有効であった。第一卵割阻止による雌性発生二倍体(G2)の生残率は、著しく低いものの(0.04%)、紫外線照射精子で受精後150～240分に、650kg/cm²、6分間の圧力処理を受精卵に施すことにより、作出できた。

2. マツカワG1の性比には水温環境が影響を及ぼし、性分化期(全長15mm~50mm)における16℃の高水温は遺伝的雌が雄へ性転換する要因となっていることが示唆された。12℃飼育では、14℃飼育と比べて、性比に明確な違いはみられなかった。性分化期における14℃の飼育により、G1において、90%以上の雌比率が得られたことから、マツカワは、雄ヘテロ型(XX-XY型)の性決定機構を有することが強く示唆された。

3. マツカワG1の性比は同一条件でも、雌比率が7.0~54.7%と低い場合もあったことから、親魚の遺伝的背景による性転換率の差が考えられた。本研究における2Nでは、雌雄1:1よりも雄比率がやや高く、水温以外の飼育環境要因が雄への性転換を促進している可能性が考えられた。また、低濃度E2投与では、雄への性転換阻止が可能となり、G1による全雌化と2Nにおける雌雄1:1が実現した。これにより、XX-XY型性決定機構の関与が一層強く示唆された。

4. 孵化後16ヶ月間における個別飼育によるG1の成長は2Nより優れていた。従って、雌比率の高いG1の成長の優位性は、明らかであり、今後、雌性化あるいは全雌種苗の養殖用種苗としての活用の可能性が示唆された。

5. マツカワ3Nおよび2Nの混合飼育(36ヶ月)では、雄で未成熟期、産卵期の両期において、2Nより劣っていた。一方、雌では、生殖腺重量を除いた生殖腺除去体重で、両期において2Nとの間に差はないことが明らかとなった。従って、3N雌の成長は、2N雌と比べて差がないと考えられた。産卵期における可食部重量比では、3N雄は2N雄と違いはなかったが、3N雌の可食部重量比は、2N雌よりも明らかに高かった。

6. 3N雌のGSIは2Nに比較して著しく低く、産卵期の卵巣は痕跡的であった。3Nでは卵巣中の多くは、未発達の卵母細胞であり、不妊であると判断された。3N雄は2歳時に希薄な精液が少量認められた。これらの精子はフローサイトメリーの結果から、異数性であることが分かり、これら異数性精子を2Nの卵に媒精したが孵化仔魚はまったく得られなかったことから、3N雄も不妊と判断した。

申請者による以上の成果は、海産魚類の染色体操作育種の進展に大きく寄与するものであり、審査員一同は本論文が博士(水産科学)の学位を授与される資格のあるものと判定した。