水産における染色体操作と育種

誌名	農林水産技術研究ジャーナル
ISSN	03879240
著者名	小野里,坦
発行元	農林水産技術情報協会
巻/号	10巻3号
掲載ページ	p. 24-29
発行年月	1987年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

水産における染色体操作と育種

小　野　里　坦

200海里体制に入って，養殖を含む沿岸漁業の重要性が一段と高まって来た。このような情勢の基で養殖は近年急速な進歩をみせ，波静かな内湾は養殖用の筏や簀子で埋め尽くされている光景が全国的にみられる。しかし今日でも尚，採卵から稚魚養成までの再生産技術の確立している魚種は非常に限られて居り，まして育種の手の加えられているものは殆んど皆無に等しい。例えば養殖を代表するハマチ，ウナギ，ホタテ，コンブ等いずれも野生種をそのまま養殖しているのが現状である。育種が品質の向上，収量の増大その他種々の経済効果をもたらすことは，農業や畜産の例をあげるまでもない。これから育種を始めようとする水産は，数千年の歴史を持つ農業や畜産に比べ大きな遅れをとっている。従って我々は，新しい育種技術を積極的に採り入れ，短期間に育種効果があがるよう努力しなければならない。幸い水産動物の多くは体外受精で発生時の操作が容易であり，また1個体当たりの産卵数も哺乳類に比べ桁はずれに大きいという利点を持っている。さらに魚介類は種類数も多く生理，生態，形態等あらゆる面で多岐に富んでおり，育種素材が豊富であると言える。このような利点を生かして，早急に水産育種にとり組む必要がある。

この10数年の間に，水産における染色体操作技術が進歩し，実用化の段階に入ろうとしている。染色体操作は，現在ではセット単位で操作するセット操作に限られているが，特別な装置を必要とせず，簡単な操作で，雌雄の生み分け，形質の固定，クローン動物の作成，悪性劣性遺伝子の排除，新種の合成，不妊化，遺伝子及び種の保存等様々の応用が可能となるユニークな方法と言える。

魚類の染色体操作は Makino & Ojima (1943) によるコイの低温処理による第2極体放出阻止の研究に始まり，1960年代の終りから1970年代の初めにかけてソ連やイギリスで多くの研究が行われ魚類の染色体操作の一応の手法が確立した。1970年代後半から1980年代にかけて，日本を初め各国で染色体操作に関する研究が精力的に行われ，本手法が一般化された。現在では養殖研を主体に「魚介類の雌性発生等による育種技術の開発」及び県単位で地域バイテクが進められており，実用化に向けての研究が盛んに行われている。

染色体操作技術は大きく分けて，一方の配偶子の核を基に発生を誘起する単性発生と，染色体のセット数を増加させる倍数化に分けられる。

1. 単性発生

(1) 雌性発生

雄性核を遺伝的に関わらせず雌性核のみで発生を開始させる発生を雌性発生と呼んでいる（図1，b～e）。雌性核のみで胚体形成が起る点では単為発生と同じであるが，単為発生では物理的，化学的或いは機械的刺激で発生を誘起させるのに対し，雌性発生では精子を発生刺激に用いる点で区別している。雌性発生を誘起するためには，受精に先立って精子を放射線或いは化学物質で処理して遺伝的に不活性化する必要がある。サケの精子に種々の線量の γ 線を照射した後，正常な卵子に媒精し，その後の生残率を線量毎に比較してみると，3,000 (≒$10^{3.5}$) rad までは線量の増加に伴い生残率は低下し，3,000rad では18日以内に殆んどの卵が死亡する（図2－a）。しかしさらに線量が増加すると逆に回復現象が認められ，100,000(＝10^5) radでは，40日後も90%近くが生残していた（図2－b）。このような一見矛盾した現象を解明するために，10日目の胚の染色体を観察した。その結果，線量の増加に伴い父親由来の染色体は断片化し，動原体を欠く断片及び動原体が障

Hiroshi ONOZATO: Chromosome manipulation and breeding in fish.

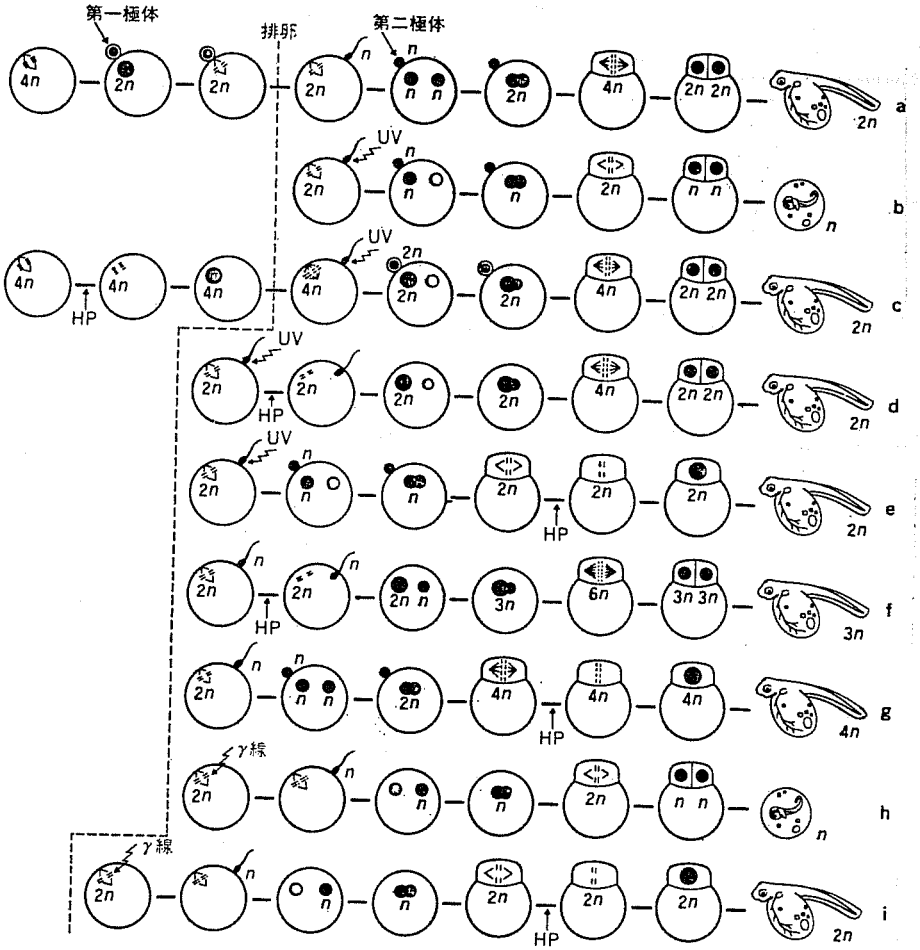

図1　染色体操作

a）正常発生，b）雌性発生半数体，c）第一成熟分裂の阻害による雌雄発生2倍体，d）第二成熟分裂の阻害による雌性発生2倍体，e）第一卵割の阻害による雌性発生2倍体，f）3倍体，g）4倍体，h）雄性発生半数体，i）雄性発生2倍体，HP：加圧（分裂阻害），UV：紫外線

害を受けた染色体は細胞分裂の過程で脱落して染色体数が減少し，10万rad では父親由来の染色体は完全に消失して母親由来の正常な1セットの染色体によって胚体形成の行われていることが明らかとなった。照射によって突然変異が起り発生に対し害作用を及ぼすが，線量がさらに増加すると，障害を受けた染色体が消失するために回復が起るものと解釈される。このような線量の増加に伴う興味深い現象は Hertwig 効果として知られて居り，雌性発生を誘起する為の適正な線量を知る上で有用な指標となる。同様 Hertwig の効果は紫外線でも認められ（図3），雌性発生を誘起することが可能である。紫外線は γ線に比べ手軽に扱うことができ，しかも約1分間という短時間で目的の線量に達する点でも便利である。ただ紫外線は透過力が小さいので，照射にあたって精液を希釈し，うすくひき延ばす必要がある。この他トルイジンブルー等化学物質によっても雌性発生の誘起されることが知られているし，特殊な例としては，異種間交雑によっても雌性発生の誘起されることがある。例えば，カワマスの卵子にギンザケの精子を媒精すると子供は全て雑種になるが，逆にギンザケの卵子にカワマスの精子を媒精すると，孵化して来る個体は全て雌性発生ギンザケとなる。

（2）　雄性発生

雌性発生とは逆に受精前の卵子に多量の γ線を照射して正常な精子を媒精すると，精子核のみで発生が起り雄性発生が誘起される（図1-h，i）。雌性発生と同様，サケの卵子に種々の線量の γ線を照射

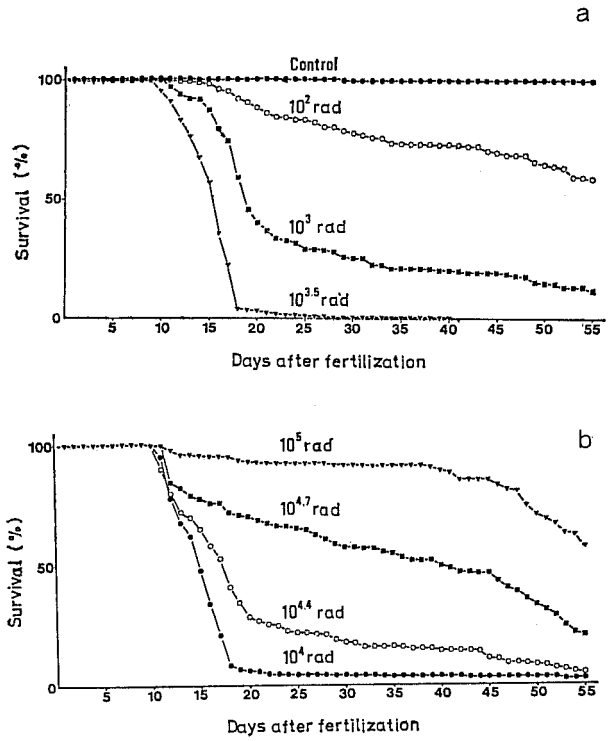

図2　種々の線量の γ 線をサケの精子に照射したときの受精卵の生残率

a．低線量域　　b．高線量域

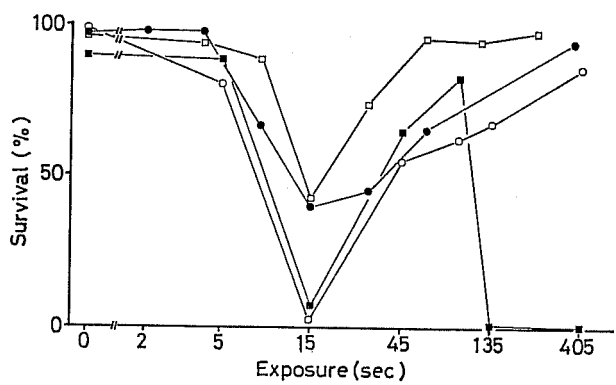

図3　精子に種々の時間の紫外線を照射したときの受精卵の生残率　■；キュウリウオ，受精後3日目　□；イワナ，受精後29日目　○；ニジマス，受精後18日目　●；サクラマス，受精後25日目

し，正常精子を媒精したときの発生時における生残率を線量毎に比較した（図4）。精子に照射したときにみられたように10^4radで生残率は最低となりその後回復がみられる。しかし10^5rad照射時の生残率は精子に照射したときに比較して著しく低く，しかも生存卵の中には発生を中止している卵も数多く含まれている。その最大の原因は，卵子中に含まれる発生に不可欠な核酸，酵素等が照射によって障害を受けるからであろう。しかしいずれにしても精子核由来の胚体が形成されることが確認された。以上述べてきた単性発生により生ずる個体は，一方の配偶子由来の染色体しか持たず，半数体となる。魚類の半数体は，体が矮小で目が小さく，体軸が湾曲し，器官形成が不完全といった半数体症候群を示し，孵化期の前後で全個体が死亡する。従って産業的に単性発生を利用するためには，染色体を倍数化して2倍体とする必要があり，倍数化技術が不可欠となる。

2.　染色体の倍数化

染色体の倍数化法としては，後述するように細胞融合も1つの技法と考えられるが，一般には細胞分裂を阻害することにより行っている。倍数化を起す化学物質として，植物ではコルヒチンが広く用いられて来たが，魚卵では倍数体誘起が困難で殆んど用いられていない。魚類では，低温処理，高温処理および水圧処理といった物理的処理法が一般的である。一般に温水性の魚種には高温処理が，冷水性の魚種には低温処理が有効とされている。水圧処理はいずれの魚種にも有効で，しばしば倍数化に著効を示す。

魚類の卵子は哺乳類と同様第2成熟分裂の中期で分裂が中止した状態で排卵が起る。精子の進入により第2成熟分裂が再開されて，1セットの染色体は第2極体として卵外に放出され，残った1セットの染色体を基に雌性前核が形成される。卵に進入した精子核は膨潤して雄性前核となり，両前核は接着・融合して発生が開始する（図1－a）。ところで受精後間もなく，細胞分裂を阻害してやると，第2極体として細胞外に放出されるべき1セットの染色体が卵内に留まって2セットの染色体から成る大型の雌性前核が形成される。従って雌性発生卵に本処理を加えると生存性

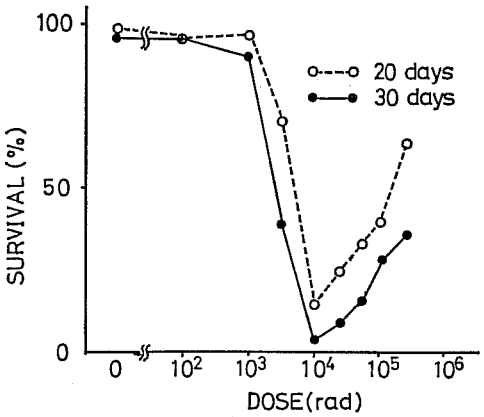

図4　サケの未受精卵に種々の線量を照射したときの発生中の生残率

の2倍体となる（図1－d）し，正常受精卵について行うと2倍性の雌性前核と1倍性の雄性前核が合体して3倍体となる（図1－f）。受精を完了した受精卵はやがて卵割を開始するが，卵割に先立って各染色体は複製され，一次的に倍数化するがやがて染色体は均等に両極に移動し細胞膜が形成されて二細胞となる。従って雌性発生卵又は雄性発生卵の第1卵割を阻害すると，倍数化した染色体がそのまま1つの細胞内に留まるため，これも生存性の2倍体となる（図1－e及びi）。正常受精卵の第1卵割を阻害すると，4セットの染色体を有する4倍体が得られる（図1－g）。魚類の場合，第1成熟分裂は体内で完了する為，その阻害は困難であるが，軟体動物等海産無背椎動物の中には，受精後に第1成熟分裂を完了するものが少なくないので，この場合は第1成熟分裂阻害によっても3倍体及び雌性発生2倍体（図1－c）が得られる。またこれらの組合せによって5倍体，6倍体の作成も理論的には可能である。写真1は，染色体操作によって得られた1倍体から4倍体までのサクラマスの染色体を示したものである。

加圧処理による倍数化機構を解明するために，水圧処理を行う前と直後の細胞分裂像を比較してみた。その結果水圧処理によって分裂装置である紡錘体が完全に消失していることが明らかになった。従って紡錘体の消失によって染色体の移動が妨げられ，倍数化が起るものと考えられる。魚類では第2成熟分裂阻害は比較的容易であるが，第1卵割阻害は非常に困難で，孵化時の生存率が1％以下であることが少なくない。その理由を明らかにするために，第1卵割細胞分裂中期に水圧処理を行ったサクラマス卵

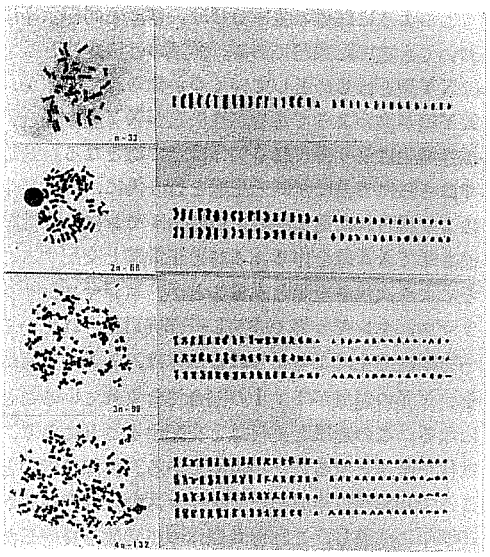

写真1　染色体操作を行ったサクラマスの種々の倍数体の核板，上から1倍体，2倍体，3倍体及び4倍体

のその後の経過を経時的に組織学的に追跡した。サクラマスは10℃で受精後6時間30分で第1卵割の細胞分裂中期に入るが，水圧処理によって紡錘体は完全に消失していた。しかし1時間以内に紡錘糸の再生が起り，一部又は全染色体の両極への移動が観察された。多分一部の染色体の移動は異数体をもたらし，死亡の大きな原因になっていると考えられ，第1卵割阻害胚の死亡の一つの原因を成していると思われる。

3.　染色体操作による育種

（1）　雌雄の生み分け

雌雄によって商品価値が異なったり，養殖効率の異なるものは少なくない。サケやシシャモは卵巣が珍重され雌の方が商品価値が高い。またヒラメでは雄に比べ雌の方が成長が早い。人工受精を行う場合，雌に対し雄の個体数はかなり少なくとも目的を達することができる。従って孵化場では，雌雄の生み分けが可能となれば，雄は必要な数だけ飼養しておけばよいことになり，従来と同じ経費で2倍近い生産をあげることが可能となる。資源量の減少している種の回復には雌の比率を高くする方が効率が良い。一方ティラピアでは雄の方が成長が早く，かつ旺盛な繁殖による密度過剰を防ぐ目的で雄の単性養殖が行われている。

このように雌雄の生み分けは，畜産と同様水産においても重要な課題である。魚類の性決定法としてはＸＹ型をはじめとしていくつか知られているが，ＸＹ型が多いようである。性決定がＸＹ型の場合，雌性発生により得られる個体は全て雌となる。最近ではさらに容易に全雌魚生産を行う為に，雌性発生により得られた遺伝的雌を雄性ホルモンにより性転換させてＸＸ雄を作る。これを正常雌と交配することにより次代を全雌とすることが，ニジマス，サクラマス，キンギョ等で成功し一部実用化されている。一方雄性発生により得られる個体は，ＸＸの正常雌と，ＹＹの超雄が１：１の割合で含まれていることになる。この超雄と正常雌と交配することにより，次代を全雄とすることが可能である。実際著者のところで1982年に作成したサクラマスの雄性発生雄が1985年に成熟し，これを５個体の正常雌と交配した結果，４尾の雌の子供が全て雄であることが確認され，雄性発生雄が超雄（ＹＹ）であることが証明された。

（２） 形質の遺伝的固定とクローン作成

単性発生卵の第１卵割を阻害して作られる２倍体は，１セットの染色体が複製によって２セットとなったものであるから，全ての遺伝子が同型接合体となっている。従って２代目も単性発生によって子供を採れば，遺伝的分離の起りようがないから全て母親の遺伝的コピーとなりクローンを生ずることになる。初代に得られた個体のなかから耐病性，成長等の育種目標を設定して選抜すれば，それらが遺伝的に支配されている形質であれば，２代目には100％それを期待することができる。それは取りも直さず形質の遺伝的固定である。実験用動物として遺伝的に均一な純系は不可欠である。これら純系は兄妹交配を20代以上繰り返すことによって得られるが，成熟に１年以上要す魚類では純系作成に20年以上かかることになり現実的な方法とは言えない。しかし単性発生によれば二代目には遺伝的に100％均一な個体群を作成することが可能となる。これらのクローンの維持には，毎代単性発生を繰り返えすことによっても可能となるが，クローンの一部を性転換しておけば単なる交配だけでクローンが維持できる。また異系統の異なる優良形質を保有するクローンを作る上でも交配は有効であり，同時に雑種強勢を期待することもできる。このような方法で，ゼブラやメダカでクローン作成及びその維持が実現して居り，著者のところでも完全ホモのニジマスを多数有しているので，今季にもクローンニジマスが得られると期待している。

（３） 劣性悪性遺伝子の除去

劣性の悪性遺伝子は正常な個体でもいくつかは保有していると考えられる。ランダム交配でもこれらはある確率でホモ化し，致死性となったり重度の遺伝病を発現することになる。これらの遺伝子はヘテロ接合体の形で表に現われずに代々遺伝していく為，ある集団からこれらの遺伝子を完全に除去することは困難である。しかし第１卵割阻害による単性発生２倍体は全ての遺伝子がホモ化する為，これらの悪性遺伝子は確実に発現し致死性となって自然に除かれるか，或いは容易に区別して排除することができる。

（４） 不妊化による品質劣化防止と巨大化

サケやベニザケで代表される太平洋産サケは，生涯のうち１度しか産卵しない。すなわち最初の産卵後全個体が死亡する。従ってこれらの魚種の最大寿命及び最大体長は成熟によって支配されて居り，本来の最大寿命や最大体長はみることができなかった。種無しスイカで知られるように魚類も３倍体化することにより，しばしば不妊化が伴う。1983年に大量の３倍体サクラマスを作成し，２倍体と共に海中養殖したところ，２倍体の大部分は1985年秋に成熟した。一方３倍体は雌雄いずれも完全に不妊であったが，雄は第２次性徴を現わし，多くが産卵期末期に死亡した。しかし３倍体雌は産卵期に至っても全く第２次性徴を現わさず，銀白色のまま摂餌を続け，1986年６月には５kg に達するものも出現し，現在なお生存中である。何年生存し，どの位まで成長できるかは生物学的にも興味あるところであり，また大型魚を作成する目的にもこの方法が応用できよう。現在，１年もののアユや，釣の餌のゴカイの養殖への応用研究が成されている。また産卵後必らずしも死亡しないニジマス等においても，成熟期のブナ毛（第２次性徴）による品質低下防止や，成長の停滞防止に応用できると考えられる。植物では倍数性の増加による個体の大型化や果実，花の大型化が知られているが，魚類では単なる高倍数性による顕著な大型化は起らない。

（５） 新種の合成

魚類の精子は尖体を持たず卵門を通して卵に進入する為，かなり離れた種間でも交雑が可能である。しかし交雑が可能であっても，多くの場合は不妊となる。その大きな原因は相同染色体の欠如にあると

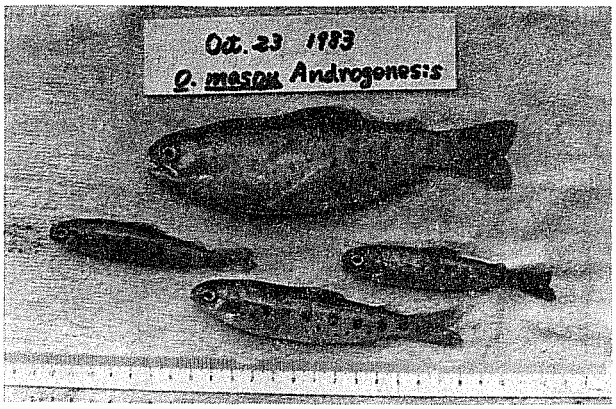

写真２　雄性発生により作成されたサクラマス　最大の個体が後に超雄(ＹＹ)であることが確認された。

されている。植物では異種間で交雑してその後４倍体化して，稔性を回復して新種の生じた例が天然でも知られて居り，又人為的にもこのような異質４倍体を作成して新種を合成している。魚類においても染色体操作が確立された現在，このような方法によって新種を合成することも夢では無くなった。

（６）　遺伝子資源の保存と稀少種の保存

野生の動植物は遺伝的変異に富み，遺伝子資源の宝庫と言える。近年耕作地面積が増えるに伴い野生種の分布域が著しく狭められている。この野生種の持つ遺伝子資源を如何に豊富に保有しておくかが，育種を行う上での大きな鍵となる。従って最近では国家的規模で遺伝子資源の蒐集を行っている。近年乱開発によって魚類の生息できる小さな湖沼は悉く埋め立てられ，本来蛇行しながら流れる河川は各所でよどみと浅瀬を作って魚類の産卵場であり稚魚の生息場所であったが，最近では殆んどが直線的に流路が切り替えられ，魚類の生息環境は著しく悪化して来た。このような状況のもとで個体数を著しく減少させ，絶滅の危機に瀕している魚種は少なくない。植物の場合は種子の低温保存によって遺伝子資源の長期保存が可能であるが，動物の場合はこれに代る方法がなく，トキで代表されるようにその種を飼い続けるしか保存の手立てがない。しかし雄性発生が可能となれば，種を精子の形で凍結保存しておくことが可能となり，その種を復活させたいときには，異種の卵子を借りて保存精子から個体を作成することができる。この場合，卵子は単なる栄養の袋として使うのであって，必ずしも同種のものである必要はない。雄性発生をこのような目的に応用するためには，次の各項を満足する必要がある。1）雄性発生により生存性の個体が得られること。2）成熟するまで生存可能なこと。3）妊性のあること。4）凍結保存精子を用いて雄性発生が誘起できること，5）異種の卵子を用いて雄性発生が誘起できること。先述したように1982年に作成したサクラマスの雄性発生２倍体（写真２）のうち１個体は成熟して２代目を採ることに成功した。また1985年には，凍結保存しておいたサケ，サクラマス，カラフトマスの精子を用いて，これらとは属の異なるイワナの卵子を用いて雄性発生が誘起されることが確認できた。さらにサクラマスの卵子を用いてアマゴの精子から個体を作成することに成功した。本個体は完全にアマゴの特徴を有し現在も生存中である。これらの結果は，1）から5）までのいずれの条件もクリアできることを示している。本法の最大の難点は，第１卵割阻害処理によって大部分が死亡し，雄性発生により得られる個体の誘起率が極端に低いことにある。最近精子を細胞融合させて２セットの染色体を有する精子を作成しこれを受精させることにより３倍とする方法がニジマスで報告されている。本法を雄性発生に利用すると，受精後の倍数化処理が不要となるので，誘起率を著しく高めることが可能と考えられる。現在このような意図のもとに実験を行っている。

染色体操作は特別な装置を必要とせず，簡単な操作で思いもよらないことが可能となる点で非常にユニークな手法と言えよう。しかし染色体をセット単位で操作する為に，特定の形質のみを導入するような木目の細かな育種に不向きである。その点では魚類においても今後異種遺伝子導入等の技法を早急に確立する必要がある。また染色体操作においても，特定の染色体，或いは染色体の部分的導入技術を確立する必要があると考える。

（養殖研究所細胞工学研究室長）