

## トラフグ *Takifugu rubripes* における低温、 高温処理による雌性発生二倍体の誘起

柿本 芳久・相田 聡\*  
荒井 克俊・鈴木 亮

広島大学生物生産学部, 東広島市 724

1994年9月16日 受付

**要 旨** トラフグ *Takifugu rubripes* の卵に紫外線照射精子を媒精すると、雌性発生半数体が生じるが、これらは奇形で生存できなかった。そこで、受精後5分あるいは30分に0℃、45分間の低温処理あるいは30℃、5分間の高温処理を卵に加えたところ、生存性の雌性発生二倍体が得られた。これらの魚のアコニット酸ヒドラーゼ(AH)とイソクエン酸脱水素酵素(IDHP)について電気泳動分析を行ったところ、各酵素支配遺伝子座において二種類のホモ接合遺伝子型の他、遺伝子-動原体間組換えによるヘテロ接合遺伝子型が見られた。従って、得られた雌性発生二倍体は、第二極体放出阻止により倍化したものと判断される。対照の雌雄比がほぼ1:1であるのに対し、雌性発生魚の93%が雌であったことから、トラフグは雄性ヘテロ(XX-XY)型と考えられるが、雄の出現要因については現状では明かではない。

キーワード: 遺伝子-動原体間組換え, 雌性発生, 性決定, トラフグ,

### 緒 言

トラフグ *Takifugu rubripes* の雌は成熟による肉質低下が雌ほど顕著でなく、しかも精巢(白子)が美味であることから、価格が高く、雄の単性養殖が望まれる。

雄ヘテロ(XX-XY)型の性決定機構をもつ魚種では人為雌性発生により誘起した超雄(YX)(小野里, 1989)あるいは、雌性ホルモンにより雌化した性転換雌(XY)と正常雄(XY)の交配より生じた超雄(岡田, 1985)を用いて次世代で全雄化をはかる方法がある。しかし、このような技術をトラフグにおいて実用化するためには、まづ、本種の性決定機構を解明する必要がある。遺伝的に不活性化精子で受精後、第二極体放出あるいは第一卵割を阻止して作出した雌性発生二倍体では、父系染色体の関与がないので、雄ヘテロ型魚種では、全雌となる(Chourrou and Quillet, 1982, Suzuki *et al.*, 1985)。従って、雌性発生二倍体の性比調査から、性決定機構の推定が可能である。

本研究では、トラフグ全雄生産技術の開発に資するため、雌性発生二倍体誘起のための受精卵の低温、高温処理条件について検討した。誘起の成否確認には、染色体観察、赤血球測定ならびにアイソザイム分析を併用し、得られた雌性発生二倍体について性比を調査した。

### 材 料 と 方 法

**供試親魚** 本研究に用いたトラフグ雌(♀102, ♀103)雄(♂101)は1991年4-5月に広島県福山市の業者より購入した天然採捕魚であり、体長は34.5-42.7 cm, 体重は2150-3500 gであった。

**紫外線照射** 雄(♂101)の生殖孔を海産魚用リンゲル液(NaCl, 13.5g; KCl, 0.6g; CaCl<sub>2</sub>, 0.25g; MgCl<sub>2</sub>, 0.35g/l, pH7.0)で洗浄後、腹部圧迫により得た精液を注射筒で採取した。採取精液は淡水魚用リンゲル

\* 広島県水産試験場, 広島県安芸郡音戸町 737-12

ル液 (NaCl, 7.5g; KCl, 0.2g; CaCl<sub>2</sub>, 0.4g/l, pH7.2) で希釈した。希釈率は、実験 I では30倍, II では20倍とした。希釈精子 15 ml をガラス製シャーレ (直径, 15 cm) に入れ, 15 W 殺菌灯 2 灯直下 30 cm で120秒間, 震盪させながら照射を行った。

**温度処理** 実験 I, II において, 1 個体の雌より搾出した成熟卵を正常精子あるいは紫外線照射 (UV) 精子により媒精攪拌後, 15°C の濾過海水を加え受精し, 前者を対照区 (Normal control), 後者を半数体対照区 (Haploid control) とした。そして, 半数体対照区の卵を分けて, 温度処理試験区とした。処理条件は, 広島県水産試験場のトラフグ三倍体作出成績\*を参考にして決めた。すなわち, 低温処理 5 分 (Cold, 5 min) 区では, 第二極体放出阻止による倍数化を目指して, 受精後 5 分に受精卵を 0°C 海水に45分間浸漬した。低温処理30分 (Cold, 30 min) 区では, 第一卵割阻止による倍数化を目指して受精後30分に 0°C 海水で45分間処理した。高温処理 5 分 (Heat, 5 min) 区では, 受精後 5 分に, 受精卵を30°C 海水に 5 分間曝して第二極体放出阻止による倍化をはかった。処理前後の海水水温は15.0-16.8°C の範囲であった。

上記 3 試験区の他, 広島県安芸郡倉橋町の業者より得たマコガレイ *Limanda yokohamae* の精子と広島県水産試験場の作出したトラフグ三倍体\*\*の精子で受精した区を設け, 各々交雑 (Hybrid) 区, 三倍体精子 (Triploid spermatozoa) 区とした。

**受精卵管理と仔稚魚の飼育** 処理後の各区受精卵は室内パンライト水槽 (300-500 l) に孵化まで収容した。孵化は受精後 9 日目に完了したので, この時点より少量の濾過海水を注入し流水飼育した。パンライト 1 水槽当たりの最大仔魚数は5000個体とした。5000個体より孵化仔魚が少ない場合は生残全個体を収容した。孵化後 2 日目からは常法に従い, シオミズツボムシを与えるとともに, ナンノクロロフィス培養海水を添加した。15日目には広島県水産試験場池先で採取したコペポーダ類を, 20日目からは人工配合飼料を併用し, 1ヶ月目頃からは配合飼料のみで飼育した。

生残性推定のためには各区より無作為に抽出した250個の受精卵を小型のバットに収容し, 受精卵あたりの胚体形成率 (Embryo, %), 孵化率 (Hatch, %) と孵化仔魚あたりの正常仔魚出現率 (Normal fry, %) を調査した。

パンライト水槽毎の生残仔魚数は無作為に抽出した単位容積あたりの仔魚数から推定した。実験 I と II の対照区, 低温処理 5 分区, 低温処理30分区, 高温処理 5 分区の生残仔魚数を孵化後30, 43, 191日目に推定し, 推定孵化仔魚あたりの生残率として算出した。

**染色体標本** 成魚体重 g あたり 0.5 μg のコルヒチンを海産魚用リンゲル液に溶解し, 腹腔内注射後3.5時間放置した。鰓を取り出し, 0.075 MKCl で50分間低張処理後, カルノア液 (メタノール: 酢酸 = 3 : 1) で固定し, YAMAZAKI *et al.* (1981) に従い, 鰓組織の一部をスライドガラス上で小刻, ギムザ染色の後, 標本とした。

胚の場合, 卵膜を除去した後0.5%コルヒチン液で3~4時間処理し, 成魚の場合と同様に, 低張処理, カルノア固定後, 小刻法により標本とした。

**赤血球径測定** 孵化後73日目, 各区より幼魚 (体長約 5 cm) 20個体を採取し, 尾柄切断により採血, 常法により塗抹標本を作製した。標本はメチルアルコールで2分間固定後, ギムザ染色を施し鏡検に供した。1 供試魚あたり30細胞について赤血球長径を接眼マイクロメーターで測定し, 平均と標準偏差を算出した。

**アイソザイム分析** 凍結保存した親魚♂101, ♀102, ♀103の筋肉, 心臓, 肝臓, 眼, および実験 I, II の対照区, 低温処理 5 分区, 同30分区, 高温処理 5 分区に由来する幼魚30~50個体を試料として以下の25酵素と筋肉蛋白について電気泳動分析を行った。Aconitate hydratase (AH, E.C.4.2.1.2), Adenosine deaminase (ADA, E.C.3.5.4.4), Alanine aminotransferase (ALAT, E.C.2.6.1.2), Alcohol dehydrogenase (ADH, 1.1.1.1), Aspartate aminotransferase (AAT, E.C.2.6.1.1), Creatine kinase (CK, E.C.2.7.3.2), Esterase (EST, E.C.3.1.1.-), Fructose-biphosphate aldolase (FBALD, E.C.4.1.1.13), Glucose-6-

\* 昭和61年度広島県水産試験場事業報告, p9-11 (1987)

\*\* 昭和63年度広島県水産試験場事業報告, p25-27 (1987)

phosphate isomerase (GPI, E.C.5.3.1.9), Glutamate dehydrogenase (GDH, E.C.1.4.1.2), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, E.C.1.2.1.12), Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH, E.C.1.1.1.8), Guanine deaminase (GDA, E.C.3.5.4.3), Hexokinase (HK, E.C.2.7.1.1), Isocitrate dehydrogenase (IDHP, E.C.1.1.1.42), Lactate dehydrogenase (LDH, E.C.1.1.1.27), Malate dehydrogenase (MDH, E.C.1.1.1.37), Malic enzyme (ME, E.C.1.1.1.40), Mannose-6-phosphate isomerase (MPI, E.C.5.3.1.8), Phosphoglucomutase (PGM, E.C.5.4.2.2), Phosphogluconate dehydrogenase (PGDH, E.C.1.1.1.44), Purine-nucleoside phosphorilase (PNP, E.C.2.4.2.1), Sorbitol dehydrogenase (SDH, E.C.1.1.1.14), Superoxide dismutase (SOD, E.C.1.15.1.1), Xanthine oxidase (XO, E.C.1.2.3.2). 緩衝液系としては、GPI 以外は CLAYTON and TRETIAK (1972) のクエン酸-N-(3-アミノプロピル) モルホリン (pH7.0) を用いた。GPI には RIDGWAY *et al.* (1968) の水酸化リチウム-ホウ酸-EDTA (pH8.0), Tris-クエン酸 (pH7.0) を用いた。ゲルは加水分解澱粉 (Sigma 製) を13%の濃度で緩衝液と混合後、加熱して作成した。泳動は定電圧 (100~200 V) で、氷冷しながら冷蔵庫中で行った。泳動後ゲルを約 1 mm の厚さに水平にスライスし、ALLENORF *et al.* (1988) あるいは AEBERSOLD *et al.* (1990) の処方に従って染色した。蛋白の染色にはアミドブラック 10 B を用いた。

**性比調査** 1991年12月17日から、1992年7月20日の間に、実験 I の対照区、低温処理 5 分区分、同30分区分、高温処理 5 分区分、実験 II の対照区、低温処理 5 分区分のトラフグをすべて取り上げ、体重 (BW)、体長 (BL)、生殖腺重量 (GW) を測定した。また生殖腺の外観から性を判別するとともに、生殖腺指数 (Gonad Somatic Index, GSI) を算出した。また、一部標本については、常法によりブアン固定後、パラフィンに包埋し、組織切片を作り、ヘマトキシリン-エオシン染色の後、鏡検し性別を判定した。なお、実験 II の低温処理30分区分、高温処理 5 分区分は飼育中に死亡したため、性の判定はできなかった。

## 結 果

**生残性** 各試験区から無作為抽出した受精卵についての胚体形成率、孵化率、正常仔魚出現率を Table 1 に示す。実験 I, II のいずれでも対照区は約70%の孵化率を示した。UV 精子の受精による半数体区の胚体形成率は低く、孵化率は著しく低かった。そして、半数体区で生じる仔魚のほぼすべて (96.8~100%) が体軀の矮小、歪曲、小頭、小眼のいわゆる半数体症候群の奇形を示した。半数体区に比べ、低温処理 5 分区分では正常仔魚が比較的高い率 (88.9, 92.0%) で出現した。低温処理30分区分でも、正常稚魚は約80%の率で出現した。実験 I の高温処理区では、バット中の全ての仔魚は奇形であったが、実験 II の同じ区では、正常仔魚が高い率 (90%) で得られた。マコガレイ精子で受精した区では、発生は開始したが、胚は胚体形成に到らず死亡した。トラフグ三倍体由来する精子で受精した区では孵化する個体が生じ、外見上正常と見られる仔魚も少数得られたが、孵化後11日目までにすべて死亡した。

パンライト水槽に収容した各区の孵化仔魚の推定生残数と孵化後30, 43, 191, 382日目における生残率を Table 2 に示す。孵化後30日, 43日目までは、実験 I の低温処理 5 分区分を除き、比較的高い生残が見られたが、約 1 年後には 0~5.7% の生残率となり歩留りは対照群を含め著しく悪かった。

**染色体** 実験 I の対照区の発生胚20個体中15個体に分裂像がみられ、 $2n=44$  前後の染色体が観察できた (Fig. 1a)。これに対し、半数体区では発生胚18個体中10個体に分裂像が見られ、これらはすべて  $n=22$  前後の染色体数を示した (Fig. 1b)。また、低温処理 5 分区分の成魚では、10個体中 5 個体に分裂像が見られ、これらは  $2n=44$  前後の染色体数を示した。

**赤血球径** 実験 I の対照区、低温処理 5 分区分、低温処理30分区分、高温処理 5 分区分の各区より抽出した20個体の赤血球長径の平均値と標準偏差は、各々、 $8.20 \pm 0.66$ ,  $8.10 \pm 0.63$ ,  $8.30 \pm 0.74$  および  $8.20 \pm 0.63 \mu\text{m}$  で対照区と実験区の間には差はみられず二倍性と判定できた (Fig. 2a)。実験 II の対照区長径は  $8.50 \pm 0.88 \mu\text{m}$  ( $n=20$ ) で、低温処理 5 分, 30分, 高温処理 5 分区分の長径は各々  $8.20 \pm 0.88$  ( $n=20$ ),  $8.39 \pm 0.50$  ( $n=18$ ),  $8.01 \pm 0.32$  ( $n=19$ )  $\mu\text{m}$  であったが、低温処理30分区分に 2 個体 ( $11.50 \pm 0.14 \mu\text{m}$ ,  $11.0 \pm 1.38 \mu\text{m}$ ),

Table 1. Survival potential of gynogenetic progeny developed from eggs subjected to cold (0°C, 45 min duration) or heat (30°C, 5 min duration) treatment after fertilization with UV irradiated spermatozoa.

Exp #	Treatment, timing	Embryo (%) <sup>a)</sup>	Hatch (%) <sup>a)</sup>	Normal fry (%) <sup>b)</sup>
I	Normal control	79.2	74.4	99.5
	Haploid control	54.8	0.8	0.0
	Cold, 5 min	4.4	3.6	88.9
	Cold, 30 min	10.4	4.4	81.8
	Heat, 5 min	50.4	0.4	0.0
	Hybrid <sup>c)</sup>	0.0	0.0	—
	Triploid spermatozoa <sup>d)</sup>	65.6	5.6	35.7
II	Normal control	75.2	68.8	98.8
	Haploid control	34.4	12.4	3.2
	Cold, 5 min	29.2	20.0	92.0
	Cold, 30 min	39.4	24.8	80.6
	Heat, 5 min	48.4	26.0	90.0
	Triploid spermatozoa <sup>d)</sup>	57.8	24.4	32.8

<sup>a)</sup> relative to initial 250 eggs in each group

<sup>b)</sup> relative to number of hatched fry

<sup>c)</sup> fertilized with heterospecific marbled sole *Limanda yokohamae* spermatozoa.

<sup>d)</sup> fertilized with spermatozoa of triploid ocellated puffer *Takifugu rubripes* male.

Table 2. Survival of gynogenetic and control progeny after hatching.

Exp #	Treatment	Estimated no. of hatched fry	Survival after hatching (%)			
			30 days	43 days	191 days	382 days
I	Normal control	66,748	50.0	53.8	12.1	<0.1
	Cold, 5 min	2,230	52.7	9.2	5.3	1.0
	Cold, 30 min	1,130	59.5	44.6	7.1	2.1
	Heat, 5 min	418	43.8	41.3	16.9	5.7
II	Normal control	143,512	74.8	66.0	8.7	<0.1
	Cold, 5 min	15,100	63.3	56.3	3.8	0.2
	Cold, 30 min	10,622	37.7	32.7	1.8	0
	Heat, 5 min	33,225	80.7	63.3	6.4	0

高温処理5分区に1個体(10.90±1.24 μm)長径が大きい個体(Fig. 2b)が見られ、三倍体と推定された。アイソザイム遺伝子型 ♀102, ♀103, ♂101の凍結筋肉、肝臓、心臓、眼を用いて、25酵素1蛋白について泳動を行ったところ、AAT, ADH, AH, CK, FBALD, GAPDH, GDH, GPI, G3PDH, HK, IDHP, LDH, MDH, Me, MPI, PGDH, PGM, SDH の18酵素と筋肉蛋白に染色活性が認められた。雌性発生成功の確認には、母親(雌親魚)のアイソザイム遺伝子型には見られない遺伝子を父親がもてば、良いマーカーとなるが、本研究に用いた親魚間には、この様な関係の遺伝子座は見られなかった。しかし、♀102の心臓 *AH\** 遺伝子座、♀103の肝臓 *IDHP-1\** 遺伝子座では♂101との間で差異が見られた。

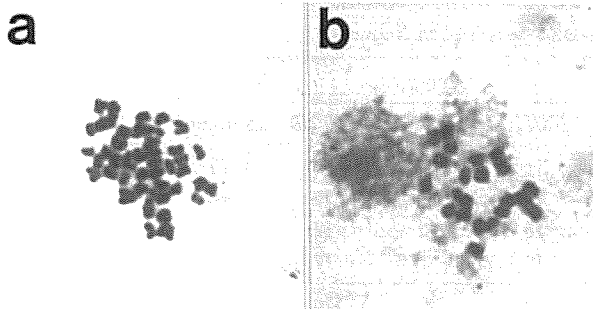


Fig. 1. Diploid (a) and haploid (b) chromosome spreads.

AH\* 遺伝子座において、コンフォーマーを含むと思われる4本のバンドを有する♀102をヘテロ接合 (\*100/60) 型と推定し、2本バンドを有する♂101をホモ接合 (\*100/100) 型と推定した (Fig. 3)。実験 I の対照区における遺伝子型頻度を見ると、Table 3 に示すようにヘテロ接合 (\*100/60) 型とホモ接合 (\*100/100) 型がメンデルの法則に従いほぼ1:1の比で出現した (0.5 < P < 0.7)。低温処理5分区の雌性発生二倍体40個体について

分析したところ、対照区では見られなかったホモ接合 (\*60/60) 型が見られた (Table 3)。第二極体放出阻止による雌性発生二倍体の作出に成功していると仮定すると、ヘテロ接合体の親からは、二種類のホモ接合体が同数生じ、遺伝子と動原体間の組換え (交叉) 率に応じてヘテロ接合体が生じることになる (谷口, 1989)。低温処理5分区における3種類の遺伝子型の出現は、これらが第二極体放出阻止であることを示す。同様の遺伝子型出現頻度は低温処理30分区、高温処理5分区においても見られた (Table 3)。従って、これらも第二極体放出阻止型雌性発生二倍体と判定できた。組換えより生じるヘテロ接合体の出現頻度 (第二減数分裂

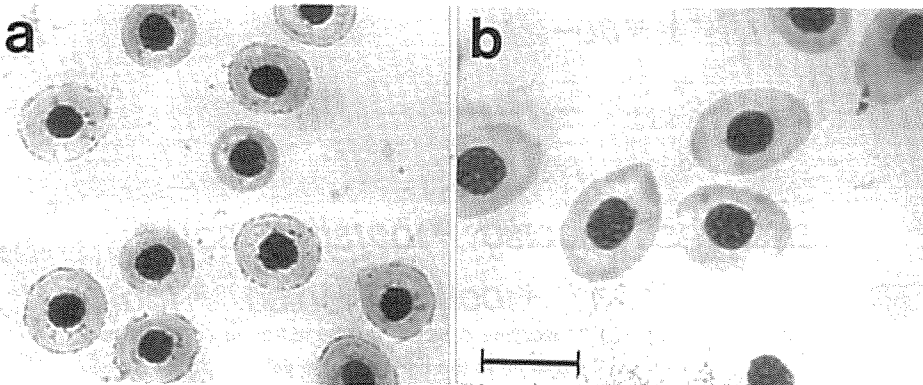


Fig. 2. Erythrocytes of diploid (a) and triploid (b) ocellated puffer scale indicates 10  $\mu$ m.

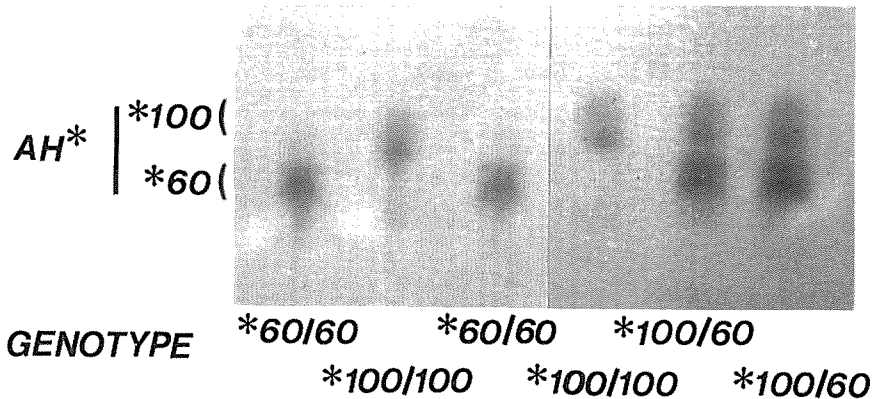


Fig. 3. Zymogram of AH isozyme detected in heart tissue of ocellated puffer. Genotypes were designated at the bottom of the gel.

Table 3. Genotypic distribution at *AH\** and *IDHP-1\** loci and gene-centromere recombination rates (second division segregation frequency,  $y$ ,  $0 \leq y \leq 1$ ).

Locus	Exp	Treatment	Genotype			No. of fish examined	y-value
			*100/100	*100/60	*60/60		
<i>AH*</i>	I	Normal control	11	9	0	20	—
		Cold, 5 min	13	5	22	40	0.13
		Cold, 30 min	16	2	12	30	0.07
		Heat, 5 min	12	1	17	30	0.03
<i>IDHP-1*</i>	II	Normal control	0	30	20	50	—
		Cold, 5 min	3	38	9	50	0.76
		Cold, 30 min	8	37	5	50	0.74
		Heat, 5 min	7	39	2	50	0.78

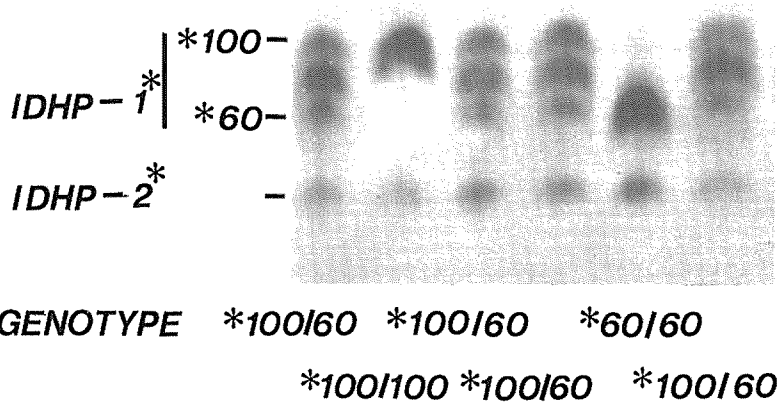


Fig. 4. Zymogram of IDHP isozyme detected in liver tissue of ocellated puffer. Genotypes were designated at the bottom of the gel.

Table 4. Sex ratio, gonad somatic index (GSI), body length (BL), and body weight (BW) in the control and gynogenetic progeny.

Exp	preatment	Date	Sex ratio		GSI(%)		BL(cm)		BW(g)	
			Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male
I	Normal control	Dec.17,'91	13	7	0.16±0.01	0.09±0.03	14.79±1.14	14.99±1.51	99.77±16.61	103.71±24.48
	Normal control	Jul.20,'92	14	17	0.22±0.07	0.10±0.03	18.28±1.05	17.43±1.46	197.36±42.87	172.00±37.26
	Cold, 5 min	Mar.17,'92	17	5	0.15±0.04	0.12±0.04	15.35±1.66	15.92±0.97	116.82±38.48	121.20±17.70
	Cold, 30 min	May.26,'92	24	0	0.24±0.07	—	16.15±6.54	—	102.42±27.53	—
	Heat, 5 min	May.25,'92	23	1	0.21±0.04	0.08	15.69±0.92	14.80	148.30±37.56	131.00
II	Normal control	Mar.17,'92	20	10	0.13±0.06	0.06±0.04	14.51±0.68	14.38±1.41	110.50±22.32	104.50±32.08
	Cold, 5 min	Mar.18,'92	28	1	0.14±0.05	0.11	13.30±1.07	13.8	86.14±20.98	91

分離率,  $y: 0 \leq y \leq 1$  (THORGAARD *et al.*, 1983) から, 遺伝子座 (G)-動原体 (C) 間組換率を算定したところ, *AH\** 遺伝子座では  $y=0.03 \sim 0.13$  (平均 0.08) と推定でき, この遺伝子座は動原体近傍に位置するこ

とが判った。

トラフグの IDHP は2つの遺伝子座に支配されるが、*IDHP-1\** 遺伝子座において、♀103は3本バンドより成るヘテロ接合体 (\*100/60) 型を示したが、♂101は1本バンドより成るホモ接合体 (\*60/60) 型を示した (Fig. 4)。対照区ではヘテロ接合体とホモ接合体がメンデルの法則に従い1:1の比で出現した ( $0.1 < P < 0.2$ ) (Table 3)。これに対して、低温処理5分区分、同30分区分、高温処理5分区分では二種類のホモ接合体とヘテロ接合体が生じ (Table 3)、第二極体放出阻止による雌性発生二倍体の作出が示された。温度処理区では、比較的高い率でG-C組換えにより生じるヘテロ接合体が見られ、IDHP-1\* 遺伝子座のG-C組換え率は  $y=0.70-0.78$  (平均0.76) であった (Table 3)。このことは、この遺伝子座は染色体末端に近い位置にあることを示す。

AH および IDHP 電気泳動分析において、三倍体型のアイソザイム発現は見られなかった。

性比 1991年12月から1992年5月にかけて、性比を調べた結果を Table 4 に示す。実験 I, II の対照区では、雌雄は1:1の性比で出現した ( $P > 0.05$ ) が、温度処理区では雌の出現が有意に高く、雌性発生魚全体の93%が雌であった。しかし、実験 I の低温処理30分区分以外の雌性発生群中に雄が見られ、特に実験 I の低温処理5分区分では雄出現率は23%であった。

実験 I では、各区の取り上げ日が2~5ヶ月異なるので比較はできなかったが、実験 II では体長、体重とも、低温処理区雌が、対照区雌より劣っていたが ( $P < 0.01$ )、GSI に差は見られなかった (Table 4)。

## 考 察

本実験の半数体対照区では、ほとんどの仔魚がいわゆる半数体症候群を示し、かつ、半数性の染色体像が見られたことから、精子の遺伝的不活性化はほぼ成功し、半数性雌性発生が生じたと考えられる。しかし、実験 II では半数体対照区の奇形率が100%ではなく、かつ、低温処理区に不活性化が不十分であった精子の受精により生じると考えられる三倍体が見られたことから、少数ではあるが、UV 照射が不十分であった精子の存在を否定できない。従って、今後、照射条件を再検討するとともに、照射不足の精子の受精による個体を雑種致死により淘汰させる手法を考える必要がある。マコガレイ精子は、受精後トラフグ卵を発生させるが、孵化以前に胚は死亡するので雌性発生誘導に有利な素材と思われる。三倍体トラフグ精子で卵を受精した場合も、生存性の仔魚は得られなかったが、三倍体由来の精子は大型化のため卵門を通過しにくいことが考えられ、倍数化の後生存性の  $3.5n$  個体が生じる例 (UEDA *et al.*, 1991) があるので、利用には慎重な検討が必要となる。

半数体対照区に比較して、低温処理5分、30分区分の正常仔魚出現率は高く、これら正常仔魚は、二倍化により生存性を回復したものと考えられる。実験 I の高温処理5分区分では奇形仔魚のみが出現したが、パンライト水槽中に正常仔魚が得られたこと、実験 II の同じ条件の処理区で90%が正常であったことから、高温処理による倍数化も成功したと考えられる。染色体観察、赤血球測定の結果も、正常個体は、二倍体であることを示した。

AH\* および IDHP\* 遺伝子座のアイソザイム分析においても、温度処理区では対照区に見られなかったホモ接合遺伝子型が生じたことから、雌性発生の成功が示された。そして、雌親魚と同じヘテロ接合型遺伝子型の魚が、遺伝子と動原体間の組換えにより生じたことは、これらの雌性発生個体が第二極体の放出阻止により二倍化したことを示す。従って、トラフグにおいては、受精後30分の処理開始も第二極体放出を阻止していることから、第一卵割阻止のためには、さらに受精後の時間が経過した時点で処理を行う必要がある。

対照区の性比が1:1であったのに対し、雌性発生区では、77.3~100%の高率で雌が出現したことから、トラフグの性決定機構は雄ヘテロ (XY) 型の可能性が高いと思われる。広島県水産試験場が、この魚種について予備実験として作出した雌性発生魚中にも少数の雄の出現が見られている\*。ドジョウ (SUZUKI *et al.*, 1985)、コイ (KOMEN *et al.*, 1991)、ヒラメ (田畑・五利江, 1988; TABATA, 1988) 等、雄 XY 型と推

\* 昭和62年度広島県水産試験場事業報告書, p31, (1988)

定されている他の魚種においても、雌性発生魚中に雄が出現した例がある。雄 XY 型と推定される魚類で雌性発生させた場合、理論通り100%雌が出現しない理由として、1) 精子の紫外線照射不足による二倍体、三倍体の出現 2) 性転換による機能的雄 (XX♂) の出現が想定される。少なくとも本実験 I では、半数体対照区のすべての稚魚が奇形となり致死性であったこと、雌性発生二倍体 (低温、高温処理) 区中に三倍体が見られなかったことから、1) の可能性は低いように思われる。従って、むしろ、*Menidia* (CONOVER and FLEISHER, 1986) やヒラメ\*\*におけるような初期稚魚の飼育水温の影響、あるいは、コイにおけるような親魚の遺伝的要因 (KOMEN *et al.*, 1992) によって、性転換が起こった可能性が高いように思われる。

一方少数の雄の出現結果から雌ヘテロ (ZW) 型の可能性も否定できない。ZW 染色体が性染色体として十分分化しておらず、性決定遺伝子 (群) が動原体より遠い位置にあると仮定すると、第二極体放出阻止型雌性発生魚では ZZ (雄) と WW (超雌) の他、組換えにより ZW (雌) が生じることが考えられる。従って、組換え率が高ければ、多くが雌 (ZW) となり、非組換え型の半数が雄 (ZZ) となる。性決定遺伝子 (群) を担う染色体間に組換えが生じるとは、性転換した XY 型雌アマゴの雌性発生実験により示されている\*\*\*。以上の点は、今後、トラフグ雌性発生魚に生じた雄の後代検定によりさらに明かとなると考えられる。

本研究で作出した第二極体放出阻止型の雌性発生魚では完全なホモ接合体とはならないので純系動物の作出素材とすることは難しい (谷口, 1989)。今後、本種においてもすべての遺伝子座とホモ化する第一卵割阻止型の雌性発生魚作出を行う必要がある。このような完全ホモ型魚の次世代で雌性発生を繰り返すことにより、クローン魚を作出できることはいくつかの魚種で示されている (STREISINGER *et al.*, 1981; NARUSE *et al.*, 1985; KOMEN *et al.*, 1991; HAN *et al.*, 1991)。

#### 引用文献

- AEBERSOLD, P.B., WINANS, G.A., TEEL, D.J., MILNER, G.B. and UTTER, F.M., 1987, Manual for starch gel electrophoresis: A method for the detection of genetic variation. *NOAA Technical Report NMFS*, 61 : 1-19.
- ALLENORF, F.W., MITCHELL, N., RYMAN, N. and STAHL, G., 1977, Isozyme loci in brown trout (*Salmo trutta* L.): detection and interpretation from population data. *Hereditas*, 86 : 179-190.
- CHOURROUT, D. and QUILLET, E., 1982, Induced gynogenesis in the rainbow trout: Sex and survival of progenies Production of all-triploid populations. *Theor. Appl. Genet.*, 63 : 201-205.
- CLAYTON, J.W. and TRETIAK, D.N., 1972, Amino citrate buffer for pH control of starch gel electrophoresis. *J. Fish Res Board Canada*, 29 : 1169-1172.
- CONOVER, D.O. and FLEISHER, M.H., 1986, Temperature-sensitive period of sex determination in the Atlantic silverside, *Menidia menidia*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43 : 514-520.
- HAN, H.S., TANIGUCHI, N. and TSUJIMURA, A., 1991, Production of clonal ayu by chromosome manipulation and confirmation by isozyme marker and tissue grafting. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57 : 825-832.
- 原 素之・羽根厚二・山本栄一, 1993, DNAフィンガープリント法によるクローンヒラメの解析, 日水誌, 59 : 731.
- KOMEN, J., BONGERS, A.B.J., RICHTER, C.J.J., VAN MUISWINKEL, W.B., and HUISMAN, E.A., 1991, Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) II. The production of homozygous gynogenetic clones and F1 hybrids. *Aquaculture*, 92 : 127-142.

\*\* 平成2年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書, ヒラメの染色体作出技術等を応用した優良種苗生産に関する研究. 鳥取県水産試験場, p1-20, 1991.

\*\*\* ONOZATO, H.: Sex control in salmonids, with special reference to all male seed production. Abstract of 4th Indo-Pacific Fish Conference, Bangkok, Thailand 28 Nov.-4 Dec. p37, 1993.



- KOMEN, J., YAMASHITA, M., and NAGAHAMA, Y., 1992, Testicular development induced by a recessive mutation during gonadal differentiation of female common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Develop. Growth. Differentiation*, 34 : 535-544.
- NARUSE, K., IJIRI, K., SHIMA, A. and EGAMI, N., 1985, The production of cloned fish in the medaka (*Oryzias latipes*). *J.Exp.Zool.*, 236 : 335-341.
- 岡田鳳二, 1985, ニジマスの人為的性統御に関する研究, 北海道立孵化場研究報告, 40 : 1-49.
- 小野里坦, 1989, 雄性発生, 水産増養殖と染色体操作 (鈴木亮編), pp60-69, 恒星社厚生閣, 東京.
- RIDGWAY, G.J., SHERBURNE, S.W. and LEWIS, R.D., 1970, Polymorphisms in the serum esterases of Atlantic herring. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 119 : 2-15.
- STREISINGER, G., WALKER, C., DOWER, N., KNAUBER, D. and SINGER, F., 1981, Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 291 : 293-196.
- SUZUKI, R., OSHIRO, T. and NAKANISHI, T., 1985, Survival, growth and fertility of gynogenetic diploids induced in the cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture*, 48 : 45-55.
- 田畑和男・五利江重昭, 1988, 同一水槽飼育による雌性発生2倍体と正常発生ヒラメの成長試験. 日水誌, 54 : 1143-1147.
- TABATA, K., 1991, Induction of gynogenetic diploid males and presumption of sex determination mechanisms in the hirame *Paralichthys olivaceus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57 : 845-850.
- 谷口順彦, 1989, 染色体操作の遺伝学的意義, 水産増養殖と染色体操作 (鈴木亮編). pp104-117, 恒星社厚生閣, 東京.
- THORGAARD, G.H., ALLENDORF, F.W. and KNUDSEN, K.L., Gene-centromere mapping in rainbow trout: High interference over long map distances. *Genetics*, 103 : 771-783.
- UEDA, T., SATO, R., IWATA, M., KOMARU, A., and KOBAYASHI, J., 1991, The viable 3.5 n trouts produced between diploid female and allotriploid males. *Jpn.J. Genet.* 66 : 71-75.
- YAMAZAKI, F., ONOZATO, H. and ARAI, K., 1981, The chopping method for obtaining permanent chromosome preparation from embryos of teleost fish. *Bull.Jpn.Soc. Sci.Fish.*, 47 : 963.

## Induction of Gynogenetic Diploids in Ocellated Puffer *Takifugu rubripes* by Cold and Heat Treatments

Yoshihisa KAKIMOTO\*<sup>1</sup>, Satoshi AIDA\*<sup>2</sup>,  
Katsutoshi ARAI\*<sup>1</sup> and Ryo SUZUKI\*<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup> Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, 724 Japan

\*<sup>2</sup> Hiroshima Prefectural Fisheries Experimental Station, Ondo, Hiroshima, 732-12 Japan

Fertilization with UV irradiated spermatozoa induced inviable gynogenetic haploid development in ocellated puffer *Takifugu rubripes*. Cold treatment (0°C, 45 min duration) initiated 5 and 30 min after fertilization with UV irradiated spermatozoa gave viable gynogenetic diploid progeny. Heat treatment (30°C, 5 min duration) from 5 min after fertilization also produced viable diploid gynogens. Since the resultant fish showed a heterozygous genotype which occurred by gene-centromere recombination as well as two homozygous genotypes at aconitate hydratase or isocitrate dehydrogenase isozyme coding locus, they were considered diploid gynogens which were produced by inhibition of the second polar body extrusion. Control progeny exhibited 1:1 sex ratio between females and males, while 93% of the gynogens were female. This result suggests that this species has basically XX-XY sex determination system.

**Key words:** gene-centromere recombination, gynogenesis, puffer, sex determination