

マコガレイ *Limanda yokohamae* における温度および圧力処理による 雌性発生二倍体の作出とメチルテストステロン浸漬処理による性転換

柿本 芳久*¹・相田 聡*²
荒井 克俊*^{1,3}・鈴木 亮*^{1,3}

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 マコガレイ *Limanda yokohamae* における雌性発生二倍体作出のための温度, 圧力処理諸条件ならびに遺伝的雌の雌化のための17 α -メチルテストステロン浸漬処理条件について検討した。本種の卵を紫外線照射精子で受精すると, 致死性の雌性発生半数体が生じるが, 受精後5分に, 低温(-2.0~-0.8 $^{\circ}$ C, 60分間), 高温(30 $^{\circ}$ C, 5分間)あるいは圧力処理(700 kg/cm², 6分間)を施すと, 比較的高率で生存性の個体が得られた。これらは PGM* あるいは IDHP* アイソザイム遺伝子座において, 遺伝子-動原体間の組換えにより生じるヘテロ接合遺伝子型と二種類の非組換え型ホモ接合遺伝子型を示すことから, 第二極体放出阻止により倍数化した雌性発生二倍体と判断された。UV 精子受精後165-205分に低温処理を行った区では正常仔魚は得られなかったが, 受精後175-205分に圧力処理を施した区では少数の正常個体が得られた。アイソザイム分析の結果, これらの中に, 第一卵割阻止型完全ホモ接合雌性発生二倍体が存在することが示唆された。

14ヶ月飼育した通常二倍体の雌雄間で体重, 体長を比較したところ有意に雌が大きかった。しかし, 雌性発生二倍体雌は通常二倍体雌に比較すると有意に小さかった。

雌性発生二倍体は調査したすべての個体で雌であった。孵化後21-80日目まで雌性発生仔魚を17 α -メチルテストステロンで浸漬処理したところ, 濃度が高いほど性転換雄の出現率が高く, 1, 5, 10, 20 μ g/l の区で, それぞれ53, 60, 73, 80%であった。

キーワード: 遺伝子-動原体間組換え, 雌性発生, 性決定, 性転換, マコガレイ,

緒 言

マコガレイ *Limanda yokohamae* の雌は雄よりも成長が良好であり (SOLOMON *et al.*, 1987), 卵巣を有する雌の商品価値が高いことから (鈴木ら, 1992), 全雌養殖種苗の生産が望まれる。また, 養殖生産の上で優良系統の作出は重要である。これらを実現するための技術のひとつとして雌性発生が挙げられる。生存性の雌性発生二倍体は, 紫外線照射等で遺伝的に不活性化した精子で受精後, 第二極体放出あるいは第一卵割を阻止することにより得られる (PURDOM, 1976; 1983; THORGAARD, 1983; YAMAZAKI, 1983)。第二極体放出阻止型の雌性発生魚の作出は比較的容易であるが, 減数分裂時の組換え (交叉) の影響をさけることができず純系にはなり得ない (THORGAARD *et al.*, 1983; TANIGUCHI *et al.*, 1987; 1988; 田畑ら, 1988)。しかし, 雄ヘテロ (XX 雌 - XY 雄) 型の魚種の雌性発生では Y 精子の関与がないので, 理論的にはすべての個体が雌となり全雌化が達成できる (THORGAARD, 1983; YAMAZAKI, 1983)。魚類では性の分化していない稚魚期に性ホルモンを投与することにより遺伝的性と逆の方向に性を転換することができる (YAMAZAKI

*1 広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 724

*2 広島県水産試験場, 広島県音戸町 737-12

*3 広島大学生物生産学部, 東広島市 724

1976; 1983; 高橋, 1978)。この手法により雄性ヘテロ型の魚種を性転換させると機能的雄 (XX) が得られ、通常の雌との交配により次代で全雌化を達成できる (OKADA *et al.*, 1979; YAMAZAKI, 1983)。一方、卵割阻止型雌性発生二倍体では、体細胞分裂において複製された染色体を倍化するので、完全ホモ接合となり、次世代で雌性発生を繰り返すことによりクローン魚が得られ、短期間で優良系統の樹立が可能となる。しかし、この型の雌性発生魚の作出率は、一般に低く、成熟親魚まで養成しクローン魚を作出した例は少ない (STREISINGER *et al.*, 1981; NARUSE *et al.*, 1985; HAN *et al.*, 1991; KOMEN *et al.*, 1991; 山本1992; 原ら, 1993)。

マコガレイでは、既に温度処理による第二極体放出阻止型の雌性発生二倍体の作出が試みられているが (田畑ら, 1985)*、技術は未だ確立されていない。また、第一卵割阻止型の雌性発生二倍体作出についての知見は極めて乏しい。本研究では、温度および圧力処理による第二極体放出阻止型および第一卵割阻止型の雌性発生二倍体の誘起条件について検討した。そして、得られた個体が第二極体放出阻止型あるいは第一卵割阻止型の雌性発生二倍体であることを証明するためアイソザイム遺伝子型の分析を行った。また、本種の遺伝的性決定機構解明のため通常発生個体と雌性発生個体を飼育し、性比の調査を行うとともに、雌雄間の成長差についても検討し、さらに雌性発生魚を材料として、雄への性転換のための 17α -メチルテストステロン至適浸漬処理濃度を解明することにより、全雌魚生産技術の確立を目指した。

材料と方法

採卵および採精法 マコガレイ親魚雌4個体、雄4個体は、広島県安芸郡倉橋町の業者より1992年および、1993年1月に購入した天然魚である。後述の実験1～4に1対づつ使用後、これら親魚の眼、心臓、筋肉を、 -20°C で冷凍保存し電気泳動分析に供した。実験5では同じ業者より1993年1月に購入した雌5個体、雄1個体を親魚とした。また、一部の実験では同じ業者より得たイシガレイ *Kareius bicoloratus* 雌親魚も用いた。一部の雌親魚 (実験2) では、予め海産魚用リングル (NaCl 13.5 g, KCl 0.6g, CaCl_2 0.25 g, MgCl_2 0.35 g/l, PH7.0) に溶解したゴナドトロピン (帝国臓器製薬株式会社) 500 unit/kg・体重を腹腔内に注射した。そして48時間後、さらにサケの脳下垂体 7 mg/kg・体重を腹腔内に注射したところ、24時間後に排卵が認められたため、搾出によりシャーレ ($\phi 90$ mm) 上に採卵した。その他の親魚では、自然催熟した親魚より採卵した。

採精は、雌親魚の生殖孔を淡水魚用リングル液 (NaCl 7.5 g, KCl 0.2 g, CaCl_2 0.4 g/l, pH7.2) で洗浄した後、腹部を圧迫することによって排出された精子を注射筒で採取した。採取精子は、淡水魚用リングルで100倍に希釈した。

精子の遺伝的不活性化と人工受精 精子の遺伝的不活性化は Suzuki *et al.* (1985) の方法に従った。即ち、希釈した精液 2 ml を直径 90 mm のガラス製シャーレの底に均一に延ばした後、振蕩器 (大洋科学工業 KK 製) により揺り動かしながら300 mm 直上より紫外線 (東芝ライテック株式会社製殺菌灯 GL-15, 2本) を2分間照射することにより行った。

搾出した成熟卵にほぼ等量の紫外線照射 (UV) 精液を加え攪拌後、実験1-4ではあらかじめ濾過海水を張ったバット (410×285×65 mm)、そして、実験5では100 l 円型パンライト水槽に落下させることにより受精させた。前者の場合、底には前もってスリガラス板 (60×26 mm) を、そして、後者の場合は付着マット (1000×500×15 mm) を敷いておき沈下した受精卵を付着させた。照射精子媒精後、後述の方法で倍数化処理をすると共に、比較のために無処理の雌性発生半数体区 (Haploid control) と正常精子で受精させた対照区 (Normal control) も設けた。

温度処理 UV 精子で媒精した卵に低温および高温処理を加えることにより第二極体放出阻止 (実験1および5) と第一卵割阻止 (実験2) を試みた。まず、前者による倍数化を目標に田畑ら (1985) の結果を考

* 山賀賢一・棚野元秀・長野泰三・横川浩治 新品種種苗生産技術開発試験1. マコガレイ雌性発生二倍体および三倍体魚化基礎試験 昭和61年度 香川水試事報, p67-71, 1986.

慮して、UV 精子受精後5分に、低温処理を $-0.8\sim-1.6^{\circ}\text{C}$ (実験1)あるいは $-1.8\sim-2.0^{\circ}\text{C}$ (実験5)で60分間、高温処理を 30°C で5分間行った。この他、受精後60, 90分の処理開始時期についても検討した。

第一卵割阻止のための処理開始時間は次のように設定した。水温 10.1°C では約80-90%の卵が受精後210分に第一卵割、受精後270分に第二卵割することが確認できたので、両者の卵割間隔60分の1/2を第一卵割からさかのぼった時期を処理適正時間帯と推定して実験した (-2.2°C , 30分間)。

圧力処理 UV 精子で媒精した卵に圧力処理を加えることにより第二極体放出阻止 (実験2~4) あるいは第一卵割阻止 (実験2~4) を試みた。圧力量、処理持続時間はヒラメの成功例 (田畑・五利江, 1988) を参考にして 700 kg/cm^2 , 6分間に固定した。第一卵割のための処理開始時期は、160-205分とした。圧力処理にはフレンチプレス (大岳製作所) を用い、卵の付着したガラス板をシリンダー中に収容した。

胚の培養と仔稚魚の飼育 実験1~4では各処理後、受精卵を円筒型の孵化槽 ($\phi 140\text{ mm}$, 高さ 160 mm) に収容して孵化させた。孵化完了後 (受精後16日目)、孵化仔魚を30ℓのパンライト水槽に収容した。エアレーションすると共に各水槽に常時少量づつの濾過海水を注入した。孵化後1日目からシオミズツボワムシを与えた。17日目にはアルテミア, 19日目には天然コペポーダ, 78日目には配合飼料の併用を開始し、分析に供するまで飼育した。実験5では100ℓパンライト水槽に濾過海水を入れ孵化まで培養し、孵化後21日目より後述のメチルテストステロン処理に供した。孵化率 (孵化数/調査卵数), および正常仔魚率 (正常孵化仔魚数/調査卵数) は各試験区から513-786個づつ無作為に抽出した受精卵をバットに収容して調査した。

アイソザイム分析 本研究では以下の24酵素と筋肉タンパク質について分析した。Aconitate hydratase (AH, E.C.4.2.1.2), Adenosine deaminase (ADA, E.C.3.5.4.4), Alcohol dehydrogenase (ADH, E.C.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-biphosphatase (FBP, E.C.3.1.3.11), Fructose-biphosphate aldolase (FBALD, E.C.4.1.2.13), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, E.C.1.2.1.12), Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH, E.C.1.1.1.8), Glucose-6-phosphate isomerase (GPI, E.C.5.3.1.9), 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)。泳動用緩衝液系は 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) あるいは Shaw and Prasad (1970) のトリス-クエン酸 (pH7.0) を用いた。本研究における酵素、遺伝子座、対立遺伝子の命名法は SHAKLEE *et al.* (1990) に従った。実験1~4の親魚の凍結試料と各交配で作出した稚魚をアイソザイム分析に供した。標本より滲出したドリップ成分を濾紙 ($10\times 2\text{ mm}$) に付着させ試料とした。電気泳動用ゲルは、加水分解デンプン (SIGMA CHEMICAL 社製) を14%の濃度で緩衝液と混合し熱した後、脱気して作成した。試料を挿入後、100 V~200 V の定電圧で水冷しながら冷蔵庫中 (4°C) で4~6時間、水平式電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルを1 mm厚にスライスした後 ALLENDORF *et al.* (1977) および AEBERSOLD *et al.* (1987) の処法に従い、組織化学的染色を行った。

メチルテストステロン処理 実験5において得られた第二極体放出阻止型雌性発生二倍体稚魚を用いて、メチルテストステロン (17α -methyltestosterone, MT) 浸漬法による雄への性転換を試みた。鈴木ら (1992) による生殖腺の性分化過程に関する組織学的観察に基づき、処理期間は孵化後21日目から80日目までの60日間とした。浸漬濃度は、ヒラメでの成功例 (山本, 1992) を参考に、1, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\ell$ とし、所定量のメチルテストステロンを1.5 mlのエタノールに溶解し、さらに3ℓの濾過海水に入れた後、飼育槽に加え、2時間海水の注入を止め、毎日浸漬処理を行った。以上の処理区その他、メチルテストステロンもエタノールも入れない対照区 (Control) とエタノールのみを入れた偽対照区 (Sham control) を設定した。1つの試験

区当たりの個体数は、2000とし、500ℓパンライト水槽に収容した。孵化後85日目には屋外の円形コンクリート水槽（直径 1500 mm, 高さ 650 mm）に移した。これらの区では、孵化後1-37日目にはシオミズツボワムシを、18-128日目にはブラインシュリンプとコペポーダを、孵化後129日目からは配合飼料を与えた。

性比検査 性の確認は、開腹により孵化後約10ヶ月令（実験5）あるいは14ヶ月令（実験1）に行い、同時に体長、体重、生殖腺重量を測定した。肉眼による観察の他、取り出した生殖腺の一部を切り取り、スライドガラスにのせ、カバーガラスで押しつぶし顕微鏡で観察した。また、必要に応じてブアン固定の後、パラフィンに包埋し、常法により切片を作成し、ヘマトキシリン-エオシン染色を施し、生殖腺の組織学的性判別に供した。

Table 1. Proportion of hatched and normal fry developed from eggs subjected to cold, heat, or pressure treatments after fertilization with UV irradiated spermatozoa.

Exp. #	Treatment	Temperature (°C) or Pressure (kg/cm ²)	Starting time (min after fertilization)	Duration (min)	No. of eggs examined	Hatch (%)	Normal fry (%)
1	Normal control	—	—	—	725	54.8	53.9
	Haploid control	—	—	—	656	9.3	0.0
	Cold	-0.8~-1.0	5	60	613	65.1	60.0
	Cold ^{a)}	-0.8~-1.0	5	60	657	63.6	57.8
	Cold	-1.0~-1.5	60	60	624	10.9	0.0
	Cold	-1.4~-1.6	90	60	663	7.2	0.0
	Heat	30	5	5	732	9.0	6.0
	Hybrid ^{b)}	—	—	—	771	49.9	43.8
2	Normal control	—	—	—	554	76.0	75.9
	Haploid control	—	—	—	551	0.4	0.0
	Pressure	700	5	6	572	28.3	25.9
	Pressure	700	165	6	592	25.5	21.5
	Pressure	700	180	6	553	9.9	6.0
	Pressure	700	195	6	550	5.1	4.0
	Cold	-2.2	165	30	560	0.4	0.0
	Cold	-2.2	180	30	600	0.0	0.0
	Cold	-2.2	195	30	563	0.0	0.0
3	Normal control	—	—	—	534	30.0	24.2
	Haploid control	—	—	—	529	0.0	0.0
	Pressure	700	5	6	557	9.2	6.2
	Pressure	700	170	6	513	0.0	0.0
4	Normal control	—	—	—	543	96.5	94.8
	Haploid control	—	—	—	528	2.3	0.0
	Pressure	700	5	6	539	30.2	27.1
	Pressure	700	175	6	539	5.6	3.9
	Pressure	700	190	6	532	2.8	2.4
	Pressure	700	205	6	544	0.6	0.6
5	Normal control	—	—	—	577	33.4	31.9
	Haploid control	—	—	—	876	8.3	0.0
	Cold	-1.8~-2.0	5	60	712	52.3	32.7

^{a)} fertilized with UV-irradiated heterospecific *Kareius bicoloratus* spermatozoa.

^{b)} Hybrid between *Limanda yokohamae* female and *Kareius bicoloratus* male.

結 果

雌性発生二倍体誘起 Table 1 に結果を示す。対照区の孵化率は、実験 4 で96.5%、実験 2 で76.0%と高かったが、実験 1, 3, 5 では各々54.8%, 30.0%, 33.4%と低かった。全ての実験を通じ、半数体対照区では孵化前に多くの胚が死亡し、少数の孵化仔魚の全ては体躯の短いものや、歪曲しているもの、小頭、小眼の、いわゆる半数体症候群を示す奇形であった。この結果は遺伝的に不活性化した精子の授精により、雌性発生半数体が誘起されたことを示す。また、イシガレイ由来 UV 精子を用いても雌性発生誘起が可能であったが、マコガレイ卵とイシガレイ精子の受精による雑種の孵化率は良好(約50%)で正常仔魚の出現率も高かった。

Table 1 に示すように受精後 5 分に第二極体放出阻止のため低温処理を行った実験 1 では、処理区において、孵化率、正常仔魚率ともに回復傾向がみられた。高温処理においても正常仔魚が出現したが、その率は、低温処理より低かった。また、受精後60分、90分に低温処理を開始した区からは、正常仔魚は得られなかった。同様の仔魚の生残性回復は、受精後 5 分に圧力処理を行った実験 2, 3, 4 においても観察できた。実験 5 において、実験 1 とほぼ同じ条件で低温処理を加えたところ、正常形態の仔魚が生じた。以上の観察結

Table 2. *PGM** and *IDHP** genotypes in normal control and gynogens.

Gene locus	Exp. #	Treatment,	Genotypes ^{c)}			No. of fish examined	y= (0 ≤ y ≤ 1)
			AA	AB	BB		
<i>PGM*</i>	Exp. 1	Normal control	0	18	22	40	—
		Cold, 5 min ^{a)}	1	37	2	40	0.93
		Heat, 5 min ^{b)}	4	35	1	40	0.88
<i>IDHP*</i>	Exp. 4	Pressure, 5 min ^{c)}	3	31	6	40	0.78
		Pressure, 175~205 min ^{d)}	8	7	8	23	—

^{a)} Gynogens induced by the second polar body retention with cold treatment at 5 min after fertilization.

^{b)} Gynogens induced by the second polar body retention with heat treatment at 5 min after fertilization

^{c)} Gynogens induced by the second polar body retention with pressure treatment at 5 min after fertilization.

^{d)} Gynogens induced by the first cleavage inhibition with pressure treatment at 175, 190 and 205 min after fertilization.

^{e)} Common allele (*100) is designated as A, counterpart allele (*50 in *PGM**, *75 in *IDHP**) is designated as B.

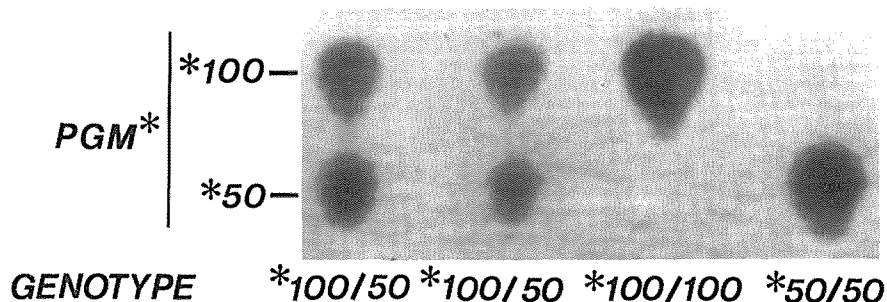


Fig. 1 Zymogram of phosphoglucosmutase (PGM) in muscle of marbled sole.

果は、受精後5分処理により第二極体放出が阻止され、母系染色体の倍化により生存性の雌性発生二倍体が作出されたことを示す。

第一卵割阻止による雌性発生二倍体の誘起を目的に、受精後165-195分に低温処理(実験2)を行った区では、孵化率は著しく悪く、最高でも0.4%であり、正常孵化仔魚は全く得られなかった(Table 1)。一方、受精後165-205分に圧力処理(実験2~4)を開始した試験区では、最高では21.5%の高い率で正常仔魚が出現した。以上の圧力処理で得られた正常仔魚は、主に第一卵割阻止による雌性発生二倍体と推定され、実験毎に一つの水槽にプールし、成否確認のためのアイソザイム分析に供するため飼育した。

アイソザイム遺伝子型 指標となるアイソザイム遺伝子を探索するため、実験1~4に供した雌雄親魚の眼、心臓、肝臓、筋肉の23酵素と蛋白について分析したところ、AH, AAT, CK, FBALD, GAPDH, GDA, G3PDH, GPI, HK, IDHP, LDH, MDH, ME, MPI, PGDH, PGM, の16酵素に染色活性が見いだされた。そして、実験1の親魚の筋肉では PGM* 遺伝子座に差があり、雌はヘテロ接合 *100/50 型を示すのに対し、雄はホモ接合 *50/50 型を示した。実験4の親魚の筋肉では、IDHP* 遺伝子座に差異がみられ、雌はヘテロ接合 *100/75 型を示すのに対し、雄はホモ接合 *75/75 型を示した。実験2, 3の親魚間では雌雄で差を示すアイソザイムは見られなかった。

実験1より得られた稚魚の PGM アイソザイム分析結果を Fig. 1 と Table 2 に示す。対照区では *100/50 型と *50/50 型がメンデルの法則に従い 1 : 1 の比で出現した ($0.80 > P > 0.70$)。これに対して、低温および高温処理により作出した雌性発生二倍体では、ヘテロ接合 *100/50 型の出現頻度が高く、かつ、対照区では見られなかった *100/100 型が出現した。3種類の遺伝子型出現とその頻度から、これらは第二極体放出阻止型雌性発生二倍体と推定できる。即ち、*100/50 型の雌より、ホモ接合 *100/100 型と *50/50 型が同数出現し、ヘテロ接合 *100/50 型が遺伝子(G)と動原体(C)間の組換え(交叉)率に応じて出現したと判断される。PGM* 遺伝子座の G-C 組換え率は $y = 0.88 - 0.93$ ($y: 0 \leq y \leq 1$) となり、染色体末端部近傍に存在することが判った。

実験4より得られた稚魚の IDHP* の分析結果を Fig. 2 と Table 2 に示す。5分後に圧力処理をした区ではホモ接合 *100/100 型が3個体、ヘテロ接合 *100/75 型が31個体、ホモ接合 *75/75 型が6個体出現した。これら3種類の遺伝子型は第二極体放出阻止型雌性発生により生じ、2種のホモ接合体は非組換え型、ヘテロ接合体は組換え型として説明しうる。ヘテロ接合体頻度より算出した G-C 組換え率は $y = 0.78$ であった。

実験4の受精後175-205分に圧力処理を加えた区について分析を行った(Table 2)。IDHP* 座の G-C 組換え率は0.78と比較的高いので、もし第一卵割阻止が成功している場合、生じる魚は全てホモ接合体となるはずである。しかしながら、調査した23個体中、7個体のヘテロ接合体が生じ、ホモ接合体 *100/100 型、*75/75 型が各々8個体ずつ生じた。本処理区の雌性発生二倍体が第二極体放出阻止によると仮定すると、

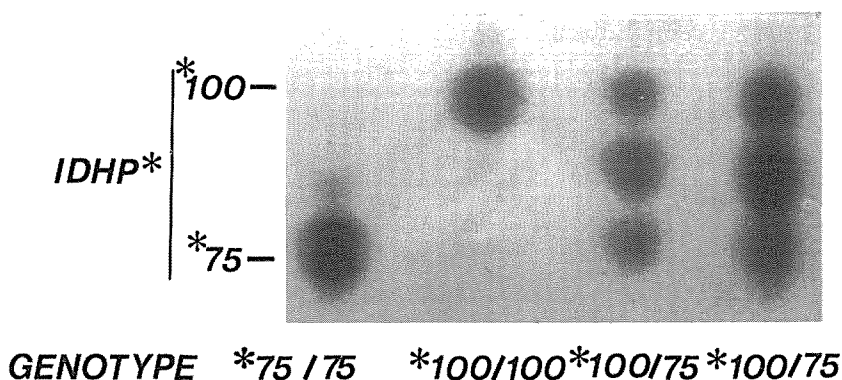


Fig. 2 Zymogram of isocitrate dehydrogenase (IDHP) in muscle of marbled sole.

Table 3. Sex ratio, gonad somatic index (GSI), body length (BL), and body weight (BW) of gynogens and normal control from Exp. 1.

Treatment,	No. of fish examined	Sex ratio		GSI(%)		BL(cm) ^{c1}		BW(g) ^{d1}	
		Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male
Normal control	30	15	15	0.208±0.071	0.603±1.155	15.43±2.56* ¹	13.92±2.58* ²	120.01±50.57* ¹	76.36±31.31* ²
Cold, 5 min ^{a1}	30	30	0	0.253±0.272	—	13.76±2.04* ²	—	86.25±24.41* ²	—
Heat, 5 min ^{b1}	30	30	0	0.239±0.078	—	14.51±1.73* ¹	—	83.93±23.95* ²	—

a, b) See remarks in Table 2

c¹) Means with the different superscript number show significant difference (P<0.05).

d¹) Means with the different superscript number show significant difference (P<0.05).

Table 4. Sex ratio, gonad-somatic index (GSI), body length (BL) and body weight (BW) of gynogenetic progeny subjected to different concentration of 17 α -methyltestosterone.

Treatment (μ g/l)	No. of fish examined	Sexuality		GSI(%)		BL(cm)		BW(g)		
		F	M	F(%)	Female ^{a1}	Male ^{a1}	Female ^{a3}	Male ^{a3}	Female ^{a5}	Male ^{a5}
0(Control)	30	30	0	0.0	0.226±0.098* ¹	—	11.5±2.11* ¹	—	35.0±20.11* ¹	—
0(Sham control)	30	30	0	0.0	0.209±0.088* ¹	—	10.6±1.51* ¹	—	26.9±9.61* ¹	—
1	30	14	16	53.3	0.165±0.206* ¹	0.079±0.060* ¹	10.3±1.86* ¹	9.7±2.05* ¹	27.6±12.19* ¹	25.4±13.09* ¹
5	30	12	18	60.0	0.194±0.317* ¹	0.126±0.237* ¹	11.3±1.59* ¹	10.8±1.75* ¹	34.4±14.66* ¹	28.1±13.48* ¹
10	30	8	22	73.3	0.123±0.068* ²	0.119±0.277* ¹	10.0±0.50* ²	10.3±1.29* ¹	23.3±4.81* ²	26.4±11.50* ¹
20	30	6	24	80.0	0.081±0.044* ²	0.123±0.289* ¹	9.4±0.84* ²	10.2±0.79* ¹	19.0±5.75* ²	24.1±5.68* ¹

a¹) Different superscript numbers within a column indicate significant difference (P<0.05).

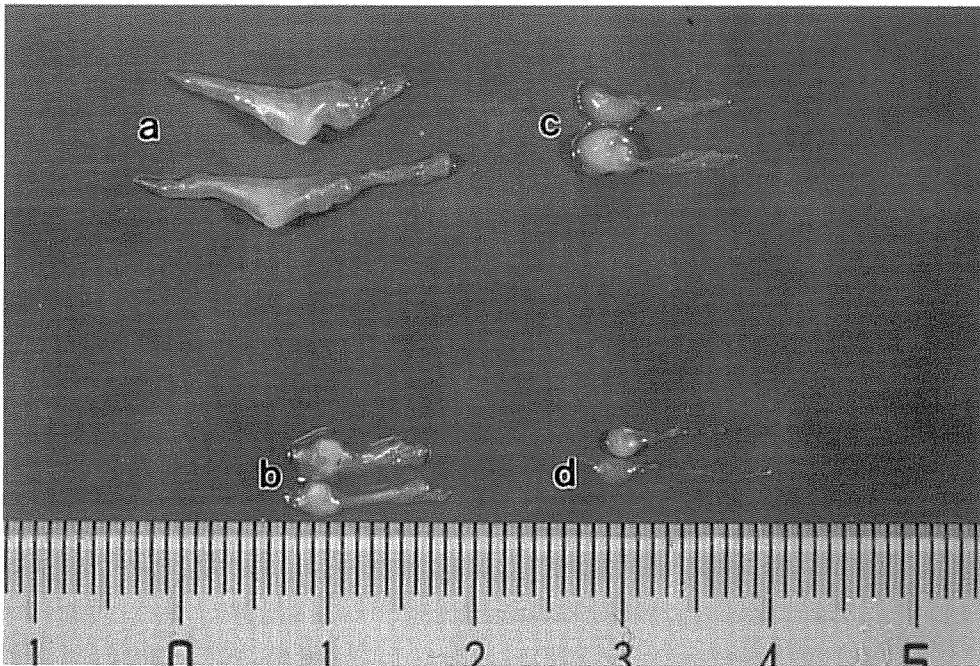


Fig. 3 External appearance of ovary (a) and testis (b) of control and abnormally shaped ovary of gynogenetic fish (c) and testis of sex-reversed gynogenetic fish (d).

G-C 組換え率より算出した *100/100 型, *100/75 型, *75/75 型の理論値は2.6, 17.8, 2.6, となり, 観察値とは有意に異なる ($P < 0.05$)。従って, ホモ接合を示した16個体中には, 卵割阻止により生じた個体が含まれている可能性がある。

通常二倍体と雌性発生二倍体の性比と成長 実験1において作出した対照区, 低温処理区, 高温処理区の魚を14カ月飼育後, 性比, 生殖腺重量比, 体長, 体重を調査した結果を Table 3 に示す。性比は, 対照区では雌:雄 = 1:1 となり, 雌雄同数が出現したのに対し, 受精後5分に低温, 高温処理により生じた第二極体放出阻止型雌性発生二倍体区では, 調査した全ての個体が雌であった。以上の結果はマコガレイの遺伝的性決定機構が雌性ヘテロ (XX 雌-XY 雄) 型であることを示す。

対照区の雌と雄の間で体長と体重について比較したところ, いずれも有意に雌が大きかった ($P < 0.05$)。また, 対照区の雌と低温, 高温処理区の雌性発生体の体長, 体重について比較したところ, 高温処理区の雌性発生体の体長以外は有意に雌性発生体が小さかった ($P < 0.05$)。

メチルテストステロン浸漬処理による性転換 実験5由来の雌性発生二倍体は実験1と同様全雌であった。これらに対し 1-20 $\mu\text{g}/\text{l}$ の濃度でメチルテストステロンの浸漬処理を行った結果を Table 4 に示す。対照区とした無処理の雌性発生二倍体は実験1の場合と同様, 全個体 ($n=30$) 雌であった。同様の全雌性は偽対照区でも見られ, エタノール処理は性転換に影響のないことが判った。メチルテストステロン処理区では濃度が 1, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{l}$ と高くなるにつれ, 雄の割合が53.3%, 60.0%, 73.3%, 80.0% と高くなった。次に各区の生殖腺指数, 体長, 体重について比較したところ, メチルテストステロン濃度の高い10および 20 $\mu\text{g}/\text{l}$ 区の性転換をしなかった雌の生殖腺指数, 体長, 体重は有意に低かった ($P < 0.05$)。一方, 雄の生殖腺指数, 体長, 体重では各区の間に有為差は見られなかった。

無処理対照区の雌性発生二倍体雌の卵巣は良く発達していたが (Fig. 3a), メチルテストステロン処理区で雌に転換しなかった雌の卵巣は小型で丸い形をしていた (Fig. 3c)。処理区の性転換雄の精巣 (Fig. 3d) と実験5の対照区の通常飼育集団の雄の精巣 (Fig. 3b) の間に形態的差異は見られなかった。

考 察

紫外線照射精子で受精した区では, いずれにおいても孵化率が極端に低く, しかもわずかに孵化した仔魚の全てが奇形となった。これに対して UV 精子で受精後5分に低温処理 ($-0.8 \sim -2.0^\circ\text{C}$, 60分間), 高温処理 (30°C , 5分間), あるいは圧力処理 ($700 \text{ kg}/\text{cm}^2$, 6分間) を行った区では, 正常形態の仔魚を得ることができ, これらは母系染色体の二倍体化により生存性が回復した雌性発生二倍体と判断した。そして, PGM* および IDHP* 遺伝子座において, 二種類の非組換え型ホモ接合体と遺伝子一動原体間の組換え (交叉) より生じる組換え型ヘテロ接合体が出現したことから, それらは第二極体放出阻止により生じたことが確認できた。

第一卵割阻止型雌性発生二倍体の作出をねらった実験区では, 低温処理区には全く正常孵化仔魚が生じなかったが, 圧力処理を加えた区では0.6~21.5%の正常仔魚が出現した。実験4において第一卵割阻止型雌性発生二倍体と思われる個体をプールして飼育し, IDHP* 遺伝子座について電気泳動分析を行ったところ, 予想された二種類のホモ接合体の他, ヘテロ接合体が生じた。これらのヘテロ接合体が卵割阻止に由来する個体でないことは明らかであるが, 試験区でのホモ接合体の頻度は第二極体放出阻止を仮定して算出した頻度よりも有意に高かったことから, これらホモ接合体の中には, 第一卵割により生じた完全ホモ接合体の雌性発生二倍体が含まれていることが考えられる。

本研究では, マコガレイにおける第一卵割阻止型雌性発生二倍体作出の可能性が示されたが, 十分な個体数を生産することはできなかった。今後, さらに処理条件を検討するとともに, 多くの親魚より誘起を試み, 成熟に達するに足る数の完全ホモ接合体ができれば, 既に, アユ (HAN *et al.*, 1991) およびヒラメ (山本, 1992) で進められているクローン作出並びにその実用化試験へと進むことができよう。以上のクローン魚生産には, 第一卵割阻止型雌性発生による完全ホモ接合体を作出することが基盤となるが, 本研究でも観察し

た通り、自然に生じたと思われる第二極体放出阻止等によるヘテロ接合体の混入がしばしば見られる。従って、遺伝子 (G) - 動原体 (C) 間組換え率の高い遺伝子座を指標として、第一卵割阻止型雌性発生の成否を検討する必要があることは TANIGUCHI *et al.* (1987;1988) の指摘の通りである。今回、マコガレイで明らかにした *PGM** ($y=0.98$), *IDHP** ($y=0.78$) の両遺伝子座はともに G-C 組換え率が高いことから、良い指標となることが考えられる。このような G-C 組換え率は、染色体上の遺伝子座の配列を示唆することから、カレイ類の種分化研究にも役立つものと思われる。PURDOM (1976) によると大西洋のツノガレイ (*Plaice*) *Pleuronectes platessa* の *PGM** 遺伝子座の G-C 組換え率は $y=0.82$ と比較的高く、本研究で調べたマコガレイの *PGM** 遺伝子座の G-C 組換え率は ($y=0.98$) と近い値を示した。また田畑・五利江 (1988) によるとヒラメ *Paralichthys olivaceus* 肝臓の *IDHP** 遺伝子座の G-C 組換え率は $y=1.00$ であり、本研究で調べたマコガレイの *IDHP** 遺伝子座の G-C 組換え率 ($y=0.78$) よりも高い値を示した。

本研究の実験 1 で得られた通常二倍体の性が雌:雄 = 1 : 1 であったのに対し、実験 1 と 5 に由来する雌性発生二倍体の性が全雌となっていることから、マコガレイの遺伝的性決定機構は、雄性ヘテロ型と結論できる。また今回常温で飼育した雌性発生魚の中に雄が出現しなかったことからみると、ヒラメ雌性発生魚が水温に影響されて雄に性転換するような現象 (山本, 1992) はマコガレイではないように思われる。しかし、常温飼育下でのことであるので、今後水温制御のもとで飼育実験を行って確認する必要がある。

対照区の雌と雄の体長と体重を比較すると有意に雌の方が大きかったことから、全雌の作出は産業的に大きな意義を持つことが考えられた。しかし、対照区の雌と低温処理、高温処理の雌性発生体を比較すると、高温処理の雌性発生体の体長以外は有意に雌性発生体が小さかった。一般に雌性発生体一代目のものは通常二倍体よりも成長が劣ることが報告されている (REFSTIE *et al.* 1982; THORGAARD, 1983)。雌性発生により、悪性劣性遺伝子の発現が群としての成長を低下させているようにも思われるが、現状では真相は明かでない。

マコガレイ全雌集団に対し、メチルテストステロン浸漬処理を行い全雌化を試みたところ、高濃度の区 (10, 20 $\mu\text{g}/\text{l}$) の性転換されなかった雌の生殖腺指数、体長、体重が有意に小さかったことから、これらの雌にはメチルテストステロンによる副作用があったことが推察される。しかし、雄の生殖腺重量比、体長、体重には各区とも有意差は認められず性転換に成功した雌にはメチルテストステロン処理の副作用はなかったものと思われる。また、メチルテストステロンの濃度が高くなるにつれ、雄の出現率 (性転換率) が高くなり、20 $\mu\text{g}/\text{l}$ の濃度で機能的雄 (XX♂) が 80% 出現した。従って、さらに高い濃度で処理を行うことにより 100% 雌化は可能と考えられる。しかし、メチルテストステロンの投与量が一定量を過ぎると逆に雌の出現が高くなるという報告があり (高橋, 1978), 山本 (1992) によると、ヒラメではメチルテストステロンの濃度が 1-10 $\mu\text{g}/\text{l}$ では雄が 100% 出現するが、50 $\mu\text{g}/\text{l}$ では 20%, 100 $\mu\text{g}/\text{l}$ では 74% 雌が出現する。従って、今後は以上のことを考慮にいれ、100% 雄への性転換を達成する好適処理濃度につき検討の必要がある。本研究の処理時間については鈴木ら (1992) のマコガレイ生殖腺の性分化過程に関する観察結果を参考にして設定して処理期間を孵化後 21 日目から 80 日までの 2 ヶ月間とした。本研究では処理期間が原因と考えられる悪影響はなかったと思われたので適切な処理期間であったと考えられる。今後、得られた機能的 (性転換) 雄の成熟を待ち、正常雌 (XX♀) と交配して後代検定を行い、次世代で全雌化が達成できるか否かを確かめる必要がある。

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 Tech. Rep. NMFS*, 61 : 1-19.
- ALLENDORF, 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.

- CLAYTON, J.W. and TRETIAK, D.N., 1972, Amine-citrate buffer for pH control in starch gel electrophoresis. *J.Fish.Res.Board Can.*, 29 : 1169-1172.
- 原 素之・出羽厚二・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.
- HAN, H.S., TANIGUCHI, H. 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.
- 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.
- 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.
- OKADA, H., MATSUMOTO, H., and YAMAZAKI, F., 1979, Functional masculinization of genetic females in rainbow trout. *Bull.Jpn.Soc.Sci.Fish.*, 45 : 413-419.
- PURDOM, C.E., 1976, Genetic techniques in flatfish culture. *J.Fish.Res.Board Can.*, 33 : 1088-1093.
- PURDOM, C.E., 1983, Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture*, 33 : 287-300.
- REFSTIE, T., STOSS, J., and DONALDSON, E.M., 1982, Production of all female coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) by diploid gynogenesis using irradiated sperm and cold shock. *Aquaculture*, 29 : 67-82.
- SHAKLEE, J.B., ALLENDORF, F.W., MORIZOT, D.C., and WHITT, G.S., 1990, Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. *Trans.Am.Fish.Soc.* 119 : 2-15.
- SHAW, C.R. and PRASAD, R., 1970, Starch gel electrophoresis of enzymes—a compilation of recipes. *Biochem.Genet.*, 4 : 297-320.
- SOLOMON, G., SANO, M., SHIMIZU, M. and NOSE, Y., 1987, Age and growth of the pleuronectid flounder *Limanda yokohamae* in Tokyo bay, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53 : 711-716.
- STREISINGER, G., WALKER, C., DOWER, N., KNAUBER, D. and SINGER, F., 1981, Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 291 : 293-296.
- 鈴木伸洋・田村正之・大内一郎・広松和親・杉原拓郎・1992, マコガレイ生殖腺の性分化過程. 水産増殖, 40 : 189-199.
- SUZUKI, R., OSHIRO, T., and NAKANISHI, T., 1985, Survival, growth, and fertility of gynogenetic diploids induced in the cyprinid loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture*, 43 : 45-55.
- 田畑和男・五利江重昭, 1988, 第1卵割阻止によるヒラメの雌性発生二倍体の誘起と飼育特性, 日水誌, 54 : 1867-1872,
- 田畑和男・中村一彦・五利江重昭, 1985, マコガレイの雌性発生誘起. 兵庫水試研報, 23 : 43-47.
- 高橋裕哉, 1978, ホルモンと生殖 I. 性と生殖リズム. 日本比較内分泌学会編, 初版, pp.23-58, 学会出版センター, 東京.
- TANIGUCHI, N., KIJIMA, A., and FUKAI, J., 1987, High heterozygosity at Gpi-1 in gynogenetic diploids and triploids of ayu *Plecoglossus altivelis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53 : 717-720.
- TANIGUCHI, N., SEKI, S., FUKAI, J., and KIJIMA, A., 1988, Induction of two types of gynogenetic diploids by hydrostatic pressure shock and verification by genetic marker in ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54 : 1483-1491.
- THORGAARD, G.H., 1983, In "Fish Physiology" (HOAR, W.S., RANDALL, D.J., and DONALDSON,

E.M.ed.), Vol.9B, pp. 405-434, Academic Press, New York.

THORGAARD, G.H., ALLENDORF, F.W., and KNUDSEN, K.L., 1983, Gene-centromere mapping in rainbow trout: high interference over long map distances. *Genetics*, 103 : 771-783.

山本栄一, 1992, ヒラメの雌性発生および倍數化を利用した育種. 水産育種, 18 : 13-23.

YAMAZAKI, F., 1976, Application of hormones in fish culture. *J.Fish.Res.Board Can.*, 33 : 948-958.

YAMAZAKI, F., 1983, Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture*, 33 : 329-354.

Production of Gynogenetic Diploids by Temperature and Pressure Treatments and Sex Reversal by Immersion in Methyltestosterone in Marbled Sole *Limanda yokohamae*

Yoshihisa KAKIMOTO*¹, Satoshi AIDA*²,
Katsutoshi ARAI*^{1,3}, and Ryo SUZUKI*^{1,3}

*¹ Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University,
Higashi-hiroshima 724, Japan.

*² Hiroshima Prefectural Fisheries Experimental Station, Ondo-cho,
Hiroshima 737-12, Japan.

*³ Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 724, Japan.

This study was made to optimize treating conditions of eggs for producing gynogenetic diploids as well as to determine optimal methyltestosterone concentration for sex reversal of fry from genetic females to functional males in marbled sole *Limanda yokohamae*.

Cold ($-2.0\sim-0.8^{\circ}\text{C}$ for 60 min duration), heat (30°C for 5 min duration) and hydrostatic pressure treatments (700 kg/cm^2 for 6 min duration) initiated 5 min after fertilization with genetically inactivated spermatozoa which had been irradiated with UV rays, gave relatively high frequencies of viable progeny. The resultant fish exhibited a heterozygous genotype which occurred by gene-centromere recombination and two unrecombinant homozygous genotypes at *PGM** or *IDHP** isozyme-coding locus, indicative of duplication of maternal chromosomes by inhibition of the second polar body extrusion. No viable fry was produced from the eggs subjected to cold shock at 165 to 205 min after fertilization. While, a small number of normal fish appeared in the groups treated with hydrostatic pressure at 175 to 205 min after fertilization. Isozyme analyses suggest presence of the complete homozygous gynogenetic diploids which were produced by inhibition of the first cleavage in these surviving fish.

In normal diploid 14-month-old fish, females showed significantly better growth than males. However, gynogenetic diploids were significantly smaller than normal diploids. All the gynogenetic diploids examined were female. Immersion of the gynogenetic fry in 1, 5, 10 and $20\text{ }\mu\text{g/l}$ of methyltestosterone between 21 and 80 days after hatching induced 53, 60, 73 and 80 percent of sex reversed males, respectively.

Key words: gene-centromere recombination, gynogenesis, marbled sole, sex determination, sex reversal