

## キンギョの第一卵割阻止型雌性発生による出目性形質の発現

鯉江秀亮・都築 基・水野正之

Appearance of recessive globe-eye character by gynogenesis with suppression of first cleavage in Goldfish (*Carassius auratus*)

KOIE Hideaki\*, TSUZUKI Motoi\*, and MIZUNO Masayuki\*

## Abstract

The appearance of globe-eye character was examined in gynogenetic diploids induced by suppression of the first cleavage (mitotic-G2N), and by retention of the second polar body (meiotic-G2N) as well as normal diploids (normal 2N, female albino-ryukin × male albino-ryukin or female albino-ryukin × male normal ryukin) using eggs of 4 females of albino-ryukin brood stock.

Globe-eyed ryukin (albino-demekin) were found in gynogenetic diploids from one female. Appearance rate of albino-demekin was from 27% to 45% in the mitotic-G2N, and 2.6% in the meiotic-G2N, respectively.

The albino-ryukin brood stock was hybrid breed of albino-globe-eyed wakin, chakin and normal ryukin. Therefore some of them had a globe-eye gene. It was supposed that the appearance of globe-eye character was due to homologization of the recessive gene caused by suppression of the first cleavage or retention of the second polar body.

キーワード；キンギョ，雌性発生，出目性，劣性遺伝子

魚類における第一卵割阻止による雌性発生は、クローン作出のための第一段階として利用されているが、ふ化率、歩留りともに低く、成熟させるのは難しい。しかし、第一卵割阻止による雌性発生は、雌の遺伝子だけで発生させ、しかも第二極体放出後に、残された半数体の染色体を倍化し二倍体とする方法であり、相同染色体が同型接合となるため、有用形質遺伝子を持つ個体の選択が容易になるという利点がある。<sup>1)</sup> 理論的には、1因子劣性遺伝子であれば、第一卵割阻止によってその劣性遺伝子を形質発現させることができるはずである。

キンギョの出目性は、劣性遺伝することが知られている。<sup>2)</sup> したがって、通常交配では、キンギョが出目性となって出現するためには、雄親魚の精子と雌親魚の卵の双方に出目性遺伝子が存在し、受精しなければならない。出目性遺伝子が精子あるいは卵の一方にしか存在しなければ、普通目の個体となる。その出目性遺伝子は優

性遺伝子とともにヘテロとして存在するので、潜在的に保有する個体を外見から見つけ出すのは難しい。しかし、その個体が成熟した雌であれば、卵を第一卵割阻止することで、出目性と普通目性のキンギョが別個に出現すると予想される。

平成10年度に、アルビノリュウキン（出目性ワキン型アルビノから交雑によりアルビノ形質を導入したリュウキン）を親として第一卵割阻止及び第二極体放出阻止による雌性発生魚を作出した結果、出目性の個体が出現した。以下にその概要について報告する。

## 材料および方法

## 1 親 魚

雌親魚は、成熟した平成8年度作出のアルビノリュウキンを4尾用いた。また、通常交配用の雄親魚として、リュウキンとアルビノリュウキンをういた (Table 1)。

\* 愛知県水産試験場内水面漁業研究所弥富指導所 (Yatomi Station, Freshwater Resources Research Center, Aichi Fisheries Research Institute, Yatomi, Ama, Aichi 498-0017, Japan)

親魚に用いたアルビノリュウキンは、平成2年に名古屋大学から譲り受けた出目性ワキン型アルビノが原種である。最初、この原種雌とチャキン雄と交雑してF<sub>1</sub>を作出し、このF<sub>1</sub>雌と原種雄とを戻し交配してB<sub>1</sub>(アルビノ形質<sup>3)</sup>を持った個体)を得た。次に、B<sub>1</sub>とリュウキンを交雑し、平成8年度にその子同士の交配によりアルビノリュウキンは作出<sup>4)</sup>された(Fig. 1)。そのときの、アルビノ個体の出現率は7.1%で、出目性個体の出現率は0.9%であった。

Table 1. Date of taking eggs and method of generation and hatching ratio

Group	Date of taking eggs	Method of generation	Sperm used	Hatching ratio (%)
A1-cont.	1998	Artificial insemination	Ryukin's normal	*
A1-me.	Apr.	Retention of 2nd meiosis	Carp's UV irradiate	17.6
A1-mi.1	8	Suppression of first cleavage	Carp's UV irradiate	1.0
A1-mi.2		Suppression of first cleavage	Carp's UV irradiate	8.8
A2-cont.	1998	Artificial insemination	Ryukin's normal	75.3
A2-me.	Apr.	Retention of 2nd meiosis	Carp's UV irradiate	23.7
A2-mi.1	12	Suppression of first cleavage	Carp's UV irradiate	5.0
A2-mi.2		Suppression of first cleavage	Carp's UV irradiate	4.9
A3-cont.	1998	Artificial insemination	Ryukin's normal	63.6
A3-me.	Apr.	Retention of 2nd meiosis	Carp's UV irradiate	13.5
A3-mi.1	12	Suppression of first cleavage	Carp's UV irradiate	2.5
A3-mi.2		Suppression of first cleavage	Carp's UV irradiate	2.1
A4-cont.	1998	Artificial insemination	Albino-ryukin's normal	85.5
A4-me.	May	Retention of 2nd meiosis	Carp's UV irradiate	40.1
A4-mi.1	18	Suppression of first cleavage	Carp's UV irradiate	15.2
A4-mi.2		Suppression of first cleavage	Carp's UV irradiate	15.5

\* non hatched

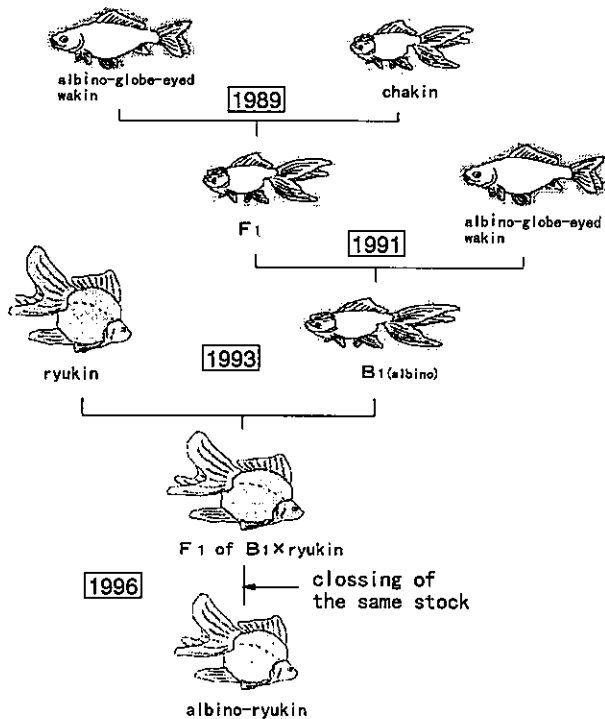


Fig. 1. Lineage of albino-ryukin. Schematic illustration to produce albino-ryukin.

2 雌性発生魚の作出方法

雌性発生のための精子はコイから採取し、pH7.0に調整したリンゲル液で100倍に希釈し、8,000erg/mm<sup>2</sup>の紫外線照射<sup>5)</sup>により遺伝的に不活化した。

第一卵割阻止による雌性発生は、成熟卵を20℃の条件下でUV処理した精子で媒精し、34分後に40℃の温水<sup>6)・7)</sup>に40秒間浸漬した後、20℃の水に1分間戻し、再び40℃の温水に40秒間浸漬して行った(Fig. 2)。

第二極体放出阻止による雌性発生は、成熟卵を20℃の条件下でUV処理した精子で媒精し、5分後40℃の温水に1分間浸漬<sup>8)</sup>して行った(Fig. 2)。

対照としての通常交配は、成熟卵を20℃の条件下で人工受精して行った。

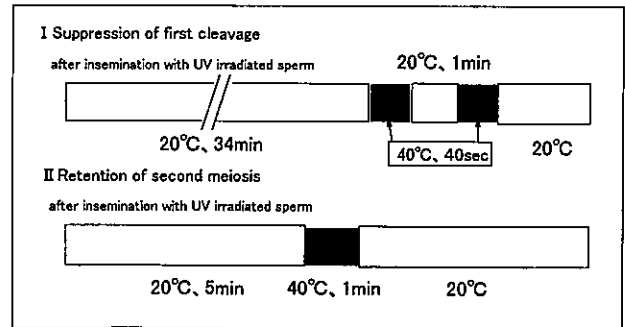


Fig. 2. Induction method of two types of gynogenetic diploids.

3 試験区と飼育方法

試験区として、親魚ごとに、通常交配による発生区(control区; 以下cont.区と略す)を1区、第二極体放出阻止による雌性発生区(meiotic区; 以下me.区と略す)を1区、第一卵割阻止による雌性発生区(mitotic区; 以下mi.区と略す)を2区設定した(Table 1)。

各試験区ごとのふ化仔魚は、受精15日後に、収容尾数を同一親魚ごとに調節し、15ℓまたは50ℓコンテナ水槽に収容し(Table 2)、エアレーションした止水にて飼育した。A1-cont.区は、原因不明でふ化せず、A1-mi.1区はふ化率が1.0%と低かったため、途中廃棄した。飼育時の水温は20~30℃であった。餌は、週5~6日与え、初期はアルテミアを単独で給餌し、途中から配合飼料も加えて複合給餌し、最終的に配合飼料単独へと切り替えた。換水は、1~2週間に1回全量行った。なお、A4については、受精3カ月後の生残がcont.区で2倍程度高かったため、2群(cont.区とcont.'区)に分けて、50ℓ水槽で飼育した。生残率は受精5ヶ月後に調査した。

Table 2. Admission number and survival of five month after insemination

Group	Admission number	Start date	Aquarium size(ℓ)	5 month after insemination		
				Survival	Survival ration	Date
A1-me.	44	Apr. 24	15	33	75.0	Sept. 7
A1-mi.2	44	Apr. 24	15	22	50.0	Sept. 7
A2-cont.	60	Apr. 27	15	55	91.7	Sept. 9
A2-me.	60	Apr. 27	15	39	65.0	Sept. 9
A2-mi.1	57	Apr. 27	15	20	35.1	Sept. 9
A2-mi.2	62	Apr. 27	15	26	41.9	Sept. 9
A3-cont.	30	Apr. 27	15	27	90.0	Sept. 9
A3-me.	30	Apr. 27	15	26	86.7	Sept. 9
A3-mi.1	31	Apr. 27	15	21	67.7	Sept. 9
A3-mi.2	21	Apr. 27	15	19	90.5	Sept. 9
A4-cont.	202	Jun. 2	50	183*	90.6	Oct. 16
A4-me.	124	Jun. 2	50	66	53.2	Oct. 15
A4-mi.1	213	Jun. 2	50	65	30.5	Oct. 15
A4-mi.2	277	Jun. 2	50	74	26.7	Oct. 15

\*A4-cont.=96, A4-cont.'=87

#### 4 出目性形質と遺伝子型調査

各試験区の出目性形質の発現を調査し、親魚と発生方法によって差異が生じるかどうか検討した。出目性個体の出現率は、各試験区ごとに生残尾数に対する出現個体数の割合で求めた。

また、アイソザイム分析による遺伝子型を調べるための試料として、受精5ヶ月後に各試験区の飼育魚を5尾ずつ選び、肝臓を取り出し-20℃で凍結した。アイソザイム分析は、肝臓の6-Phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) の遺伝子型について行い、第一卵割阻止によるホモ化の確認を行った。

### 結果

#### 1 生残率

受精5カ月後までの生残率は、cont.区が90%以上で良く、A2, A3とA4の平均は90.8%であった。me.区は、最小がA4の53.2%、最大がA3の86.7%で、平均70.0%であった。mi.区は、最小がA4-mi.2の26.7%、最大がA3-mi.2の90.5%で、平均48.9%であった (Table 2)。このことから、生残率は、第一卵割阻止魚、第二極体放出阻止魚、通常交配魚の順で高くなると考えられた。

#### 2 出目性個体の出現率

出目性個体の出現は、A2のme.区とmi.区でみられた。me.区は、39尾のうち1尾 (2.6%)、mi.1区は、20尾のうち9尾 (45.0%)、mi.2区は、26尾のうち7尾 (26.9%)の割合で出現した (Fig. 3)。出目性遺伝子は1因子劣性であるため、mi.区では、理論的に50%の出現が期待されるが、生残尾数が少なかったこともあり、mi.2区では、出目性個体の出現率は低かった。me.区での出目性個体の出現は、おそらく第一極体放出時に、普通目性遺伝子を放出し、卵に残された出目性遺伝子がホモ化され

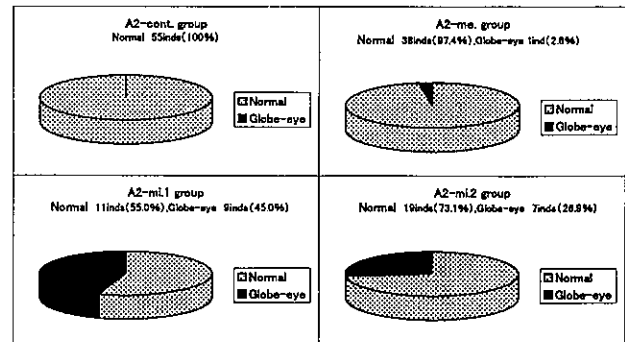


Fig.3. Rate of globe-eye for normal and meiotic and mitotic diploids.

ていたためと考えられた。

### 3 遺伝子型調査結果

キンギョのアイソザイム (肝臓6PGD) では、4パターンのバンドが出現すると報告<sup>9)</sup>されている。今回のアイソザイム分析結果では、そのうちの3パターンが現れた。そのパターンの各試験区における出現の様子をみると、A1, A2, A4のmi.区は全てホモ型のパターンであったが、A3-mi.区には、ヘテロ型のパターンを示す個体が存在した (Table 3)。よって、供試個体は少なかったものの、A3-mi.区には、第一卵割阻止が成功しなかった個体も発生していると考えられた。

Table 3. 6PGD isozyme pattern of the liver in each group

Group	Isozyme pattern		
	I	II	III
A1-me.	5	0	0
A1-mi.2	5	0	0
A2-cont.	1	0	4
A2-me.	0	0	5
A2-mi.1	3	2	0
A2-mi.2	1	4	0
A3-cont.	3	0	2
A3-me.	1	0	4
A3-mi.1	1	1	3
A3-mi.2	0	2	3
A4-cont.	0	0	5
A4-me.	4	0	1
A4-mi.1	5	0	0
A4-mi.2	5	0	0

	I	II	III
6PGD-1	BB	AA	AB
6PGD-2	AA	AA	AA

### 考察

出目性個体の出現がA2区のme.区とmi.区の雌性発生区のみで見られたことから、A2区の親魚は出目性遺伝子をヘテロ型で保持していたと考えられた。この結果を

もとに、通常交配で得られるデメキンの出現率と比較し、第一卵割阻止法の有用性について検討した。

普通目性の遺伝子をD、出目性の遺伝子をdとすれば、今回、第一卵割阻止により出目性個体を出現させることができたアルビノリュウキン親魚の遺伝子型はDdであり、4尾中1尾<sup>10</sup>存在した。

仮にアルビノリュウキンのDd型とDD型の割合が、雌雄共に1対3で通常交配させ、それぞれ同じ卵数で、精子も均等に受精し、さらに同等なふ化率と生残率であるとすれば、その発生個体の比率は

$$DD : Dd : dd = 4 : 9 : 14 : 1$$

となり、出目性個体の出現率は64分の1で1.5%である。

また、同様に1対4の割合なら

$$DD : Dd : dd = 8 : 11 : 18 : 1$$

となり、出目性個体の出現率は100分の1で1%である。

実際に、平成8年度アルビノリュウキン作出時では、出目性個体の出現率は0.9%であったことから推測すると、今回親として使ったアルビノリュウキンのDd型の割合は、4分の1以下と考えられ、通常交配での出目性個体の出現率は、かなり低いことが予想される。

通常のデメキンとの戻し交配でも、第一卵割阻止法同様、出目性遺伝子を保有する個体との交配であれば、その子供の半数は出目性個体となって出現するため、出目性遺伝子保有魚を見つけることができる。しかし、通常のデメキンと交配させて得た個体は、すべてアルビノではなくなり、出目性とならなかった個体はすべてヘテロ型で潜在的に出目性遺伝子を保有する個体となってしまうため、無駄な魚を多く作出することになる。

したがって、出目性遺伝子を保有する個体を取り除きたい場合、あるいは反対に出目性遺伝子を保有する個体を選びたい場合は、雌であれば、卵を第一卵割阻止し雌性発生させ、得られた子供の出目性の形質を調べ個体選別することで、それが可能となる。また、劣性の出目性個体を1尾から1代で量産化できるため、劣性形質の短期固定化が容易になる。

#### 要約

アルビノリュウキン4尾の卵を第一卵割阻止、第二極体放出阻止の雌性発生区と、リュウキンまたはアルビノリュウキンの精子で通常交配させた区に分けて発生させ、親魚ごとに区別して出目性形質の発現について調べた。その結果、出目性形質については、親魚としたアルビノリュウキン4尾のうちの1尾の卵から出目性個体の出現がみられたが、すべて雌性発生区からであった。第一卵割阻止の雌性発生では、27~45%出現し、第二極体放出阻止の雌性発生区では、2.6%出現した。

アルビノリュウキンは、出目性ワキン型アルビノから

交雑によりアルビノ形質をリュウキンに導入することにより作出した品種であり、出目性遺伝子を潜在的に保有する個体が存在し、第一卵割阻止により出目性遺伝子がホモ化され、出目の個体が出現したと考えられた。

#### 謝辞

本稿のご校閲並びに貴重なご助言をいただいた水産庁中央水産研究所内水面利用部の杉山元彦部長に深くお礼申し上げます。また、英文要旨のご校閲をいただいた水産庁養殖研究所遺伝育種部の名古屋博之主任研究官と中部国際空港株式会社調整部の長尾成人課長代理に感謝の意を表します。

#### 文献

- 1) 谷口順彦 (1989) 水産増殖と染色体操作 (日本水産学会編). 水産学シリーズ75. 恒星社厚生閣, 東京, 112-114.
- 2) 梶島孝雄 (1972) 金魚大鑑. 緑書房, 東京, 32-34.
- 3) Yamamoto, T. (1973) Inheritance of albinism in the Goldfish, *Carassius auratus*. Japan. JGenetics, 48(1), 53-64.
- 4) 鯉江秀亮・高須雄二・村松寿夫 (1997) 交雑による新品種 (アルビノリュウキン) 作出試験. 愛知県水産試験場業務報告, 29-30.
- 5) 新潟県内水面水産試験場 (1990) 雌性発生技術の応用実用化試験-IV. 平成元年度新潟県内水面水産試験場事業報告, 14-15.
- 6) 岡本俊治・平澤康弘・村松寿夫 (1993) キンギョの卵割阻止による雌性発生処理条件の検討-II. 愛知県水産試験場業務報告, 18-19.
- 7) 平澤康弘・高須雄二・村松寿夫 (1994) キンギョの卵割阻止による雌性発生処理条件の検討-III. 愛知県水産試験場業務報告, 28-29.
- 8) 宮本淳司・岩田靖宏・小寺和郎 (1989) キンギョの高温処理による雌性発生誘発について. 愛知県水産試験場業務報告, 40-41.
- 9) Takase, T., A. Kijima, and Y. Fujio (1997) Genetic Polymorphism and Patterns of 6-Phosphogluconate dehydrogenase in Goldfish and Crucian carp. Tohoku Journal of Agricultural Research, 37(3-4), 67-75.
- 10) 鯉江秀亮・水野正之・都築基 (1999) キンギョのクローンによる優良形質固定化促進技術等の開発. 平成10年度地域先端技術共同研究開発促進事業報告書, 1-23.