

雄性発生によるアマゴのクローン作出

水産庁 養殖研究所
細胞工学研究室 名古屋博之

本講演の演題は「雄性発生によるアマゴのクローン作出」ということであるが、本日はここ10数年間で、染色体操作と呼ばれ、水産分野で用いられるようになった技術について紹介し、今後の水産業への応用について考えることにする。なお、貝類でも盛んに染色体操作は行われているが、本日は魚類に限った話題とする。

1. 染色体操作とは

遺伝子工学、細胞工学という言葉は今やごく一般的になっており、多くの人に耳慣れた言葉だと思われる。しかし、染色体工学あるいは染色体操作とは聞き慣れない言葉かもしれない。そこで、水産分野における染色体操作の中身について簡単に触れてみたい。

生物のいろいろの情報を持っている遺伝子は、わずか4種の塩基の並び方によって決められている。これら4つの塩基が組合わさってDNAとなり、このDNAがコイル状に巻いてできたものを染色体という。染色体の数は種によって決まっており、人間であれば46本、ニワトリは78本、アマゴは66本となっている。これらは形の等しい2組の染色体からなっており、一方は母方、もう一方は父方由来のものである。生殖細胞（精子や卵）では、染色体数は減数分裂を経て半分の数となっており、1セットずつが分配されている。これらの染色体数は体細胞で $2n$ と表され、生殖細胞で n と表わされる。我々人間を例にとると、体を作っている細胞では $2n = 46$ 本（2セット）の染色体を持っており、卵や精子では $n = 23$ 本（1セット）の染色体を持っている。この1セットの染色体を用いて、いろいろの操作をすることを染色体操作という。

2. 配偶子形成・発生初期における染色体の挙動

配偶子（卵、精子）が形成される時、まず、同じ形をした染色体（相同染色体）が並び、対合を起こす。この時、染色体はすでに複製されている（四倍染色体）。次に第1成熟分裂が起こり染色体が分かれる。精子の場合は2つの精母細胞となるが、卵の場合、一方は第1極体として卵外に放出され、一方が卵内に残る。続いて、第2成熟分裂が起こるが、精子の場合は第2成熟分裂を経て精子に変態するが、卵の場合、第2成熟分裂中期の状態で止まり、このままで排卵が起こる。精子が進入することによって第2成熟分裂が進行し、染色体の半分が第2極体として卵外に放出され、残った染色体の1セットと精子由来の1セットが融合して発生が進む。第1卵割に向けて染色体は複製され、第1卵割によってそれぞれの細胞に分かれ、以後同様の分化を行って、2倍体個体となる。

3. 単為発生の誘起

受精に先立って、精子あるいは卵を放射線などによって、遺伝的に不活性化する。不活性化した精子と正常な卵、不活性化した卵と正常な精子を受精すると発生は進むが、相手の染色体は持ち込まれず、1セットだけの染色体で発生が進む。しかし、これらの個体は半数体胚となり、目が小さい、体が矮小などといった、いわゆる半数体症候群を示して、ふ化前後で全て死んでしまう。精子核を破壊して発生を進めた場合を雌性発生、卵核を破壊して発生を進めた場合を雄性発生という。以下、具体的に話を進めたい。

(1) 精子の遺伝的不活性化

精子の不活性化には、実験当初、 γ 線が用いられた。しかし、実用上の問題から、現在は殺菌灯(UV260nmの紫外線ランプ)が用いられている。精子は精しょうやリングル液で希釈し、攪拌するなどして均一に照射する。最適照射量は各魚種で異なるのでHertwig効果を調べ決定する。

Hertwig効果

卵あるいは精子に照射する放射線量を増やしていくと、その受精卵の発生率は照射線量の増加とともに減少するが、ある線量以上照射すると再び発生率は上昇する。この現象をHertwig効果と呼ぶ。

(2) 卵核の遺伝的不活性化

卵核の不活性化には、 γ 線が用いられてきた。しかし、最近のコイ、ドジョウ、カレイ等の比較的小さい卵で紫外線を用いて不活性化を行った報告がある。また、X線照射によって不活性化した報告もある。放射線量は精子の不活性化と同様にHertwig効果を調べ、決定する。

4. 倍数体の誘起

雌性発生・雄性発生を誘起したのみでは、それぞれの個体は染色体を半数持つだけであり、これらの個体はふ化前後で全て死亡してしまう。そこで、ある段階で染色体を倍化し、2倍体とすることで生存性の個体を得る。また、通常の受精を行った後でこの倍化操作を行えば3倍体、4倍体の個体を得ることができる。

(1) 雌性発生2倍体

雌性発生の場合、染色体を倍加するタイミングとして2つある。魚類の場合、第2成熟分裂中期の状態では排卵されるので、この第2極体の放出を阻止して染色体を倍化する方法と単為発生のまま発生を進め、第1卵割に先だって複製された染色体が分かれるのを1回阻止して倍化する方法の2つの方法がある。

①第2極体の放出を阻止する場合

第2成熟分裂中期の状態では排卵され、精子進入後、極体を放出するが、この極体の放出を温度(高温、低温)処理、圧力処理あるいは薬品処理によって阻止する。このことによって、ほんらい放出されるはずだった1セットの染色体がもとに戻り2セットとなり、生存性の個体を得ることができる。ところで、魚類の場合、第1成熟分裂の時に高い確率で交叉が起これると考えられている。したがって、第2成熟分裂阻止法では完全同型接合体を得ることは難しい。

②第1卵割を阻止する場合

雌性発生させた卵は染色体が1セットのまま発生を進める。そして、第1卵割に先立って、染色体が複製され、分裂する時に圧力処理などによって分裂を1回阻止すると染色体は全く同じ染色体が2セットできた状態になる。これらの個体は完全同型接合体となる。したがって、この個体からできる卵は全て同じ遺伝子を持ち、雌性発生を繰り返せば（この場合は第2成熟分裂阻止でよい）、その子供は母親と全く同じ遺伝子を持つクローンの集団となる。

（2）雄性発生2倍体

放射線などで不活性化した卵核と精子を受精させて雄性発生を誘起する。その後、染色体を倍化し生存性の個体を得るが、染色体の倍化方法として第1卵割阻止雌性発生と同様第1卵割を阻止する方法とあらかじめ精子を融合し、融合した精子と受精させることによって2倍体の個体を得る2通りの方法が考えられる。

①第1卵割を阻止する場合

代1卵割阻止雌性発生と基本的に同様である。処理方法、開始時期など同じ方法で行える。また、この個体からとれる精子は全て同じ遺伝子を持つので、雄性発生を繰り返せば、その子供は父親と全く同じ遺伝子を持つクローン集団となる。しかし、厳密な意味では、卵を放射線で照射した場合、核内遺伝子は完全に破壊されるが、核外遺伝子は破壊されず残っているため、細胞質-核雑種となる。したがって、雄性発生を繰り返し行った場合、細胞質因子は用いた母親由来のものである。

②融合した精子と受精させる場合

この方法は単為発生させた後、染色体を倍加する方法ではなくて、あらかじめ精子を融合し、2セットそろった精子と不活性化した卵を受精することで2倍体を得る方法である。精子の融合法はポリエチレングリコール法、エレクトロポレーション法、カルシウム法などがある。

（3）3倍体

卵は第2成熟分裂中期の状態で排卵され精子と受精後第2極体を放出し、その後、雌性前核と雄性前核が融合し発生が進むことは前述した。ここで、第2極体の放出を阻止すると、核内に染色体を3セット持ったまま発生が進む。これらの個体を3倍体（ $3n$ ）個体と呼ぶ。3倍体の確認方法として最も信頼できる方法は染色体標本作製し、染色体数を数えることである。例えば、 $2n=66$ のアマガオの場合、 $3n$ であれば99本の染色体が数えられるはずである。しかし、染色体標本作製には多くの労力を必要とすることから、簡便な方法として、赤血球の大きさを測る方法、蛍光色素を用いた相対的DNA量を測定する方法などがある。3倍体は一般に不妊となる。そのため、正常魚が成熟に向かう時期に成長の停滞を起こさない利点がある。また、異質3倍体（異種間の交配による3倍体）では通常の交配では致死になる組み合わせでも3倍体にすることによって、生存性の個体になるものがあり（シロサケ雌×イワナ雄）興味深い。

（4）4倍体

卵と精子を受精させ、発生を進め、第1卵割中期の時に圧力処理などをして染

色体を倍化すると、4セットの染色体を持った個体が生産される。4倍体は妊性があり、 $2n$ の配偶子が作られる。したがって、4倍体集団の維持や n の配偶子との交配による3倍体の作出あるいは5倍体の作出などが可能となる。しかし、4倍体作出は難しく、成功した例はニジマスに限られている。

5. ホルモンによる偽雌・偽雄化

サケ・マス類の場合、性の決定様式はXX雌、XY雄である。雌性発生の場合、精子を不活性化するのでY精子の関与がなく生まれてくる個体は全て雌である。したがって全雌生産が可能である。一方、雄性発生の場合、卵核を不活性化するのでX精子とY精子を持った個体から、それぞれXX個体とYY個体が1:1の割合で生じる。XX個体は通常の雌と変わらないが、YY個体（超雄）は自然界では生じない。このYY個体は外見は通常の雄と変わりなく、精子も正常なものがとれる。しかし、Y精子しか持たずXX雌と掛け合わせた場合、生まれてくる子供は全てXY型となり、雄である。従って、全雄生産が可能となる。なお、3倍体の場合はX精子と受精するかY精子の受精するかでXXX型とXXY型の2つの個体がでてくる。XXY型は精子を作るものもあり、成熟期には外見上も変わってくる。しかし、この精子と受精してできた個体は殆どが染色体が異数性となり生存できない。

第1卵割阻止雌性発生あるいは雄性発生を行った場合、その遺伝子は全て同じであり、完全ホモ個体となることはすでに述べた。この個体から雌性発生（この場合は第2成熟分裂阻止でも第1卵割阻止でもかまわない）や雄性発生を繰り返し子供を得れば、これらの集団はクローンとなり（厳密な意味では雄性発生の場合はクローンでないことは前述した）、実験生物や育種の素材としても利用価値がある。第3代以降も雌性発生、雄性発生を繰り返してもかまわないが、これらの方法は一般的に成功率が低い。そこで、クローンの一部をホルモンによって、偽雄、偽雌とすることにより次世代以降を通常の受精方法によって得ることが考えられる。例えば、雄性発生させたアマゴの場合、 17α -エチニルエストラジオールを $50\mu\text{g}/\text{l}$ （飼育水）でふ化後、週2回、1回2時間で60日間浸漬処理することで100%雌化できる。雌性発生させた場合には、 17α -メチルテストステロンをふ化から摂餌開始までは $0.1\mu\text{g}/\text{l}$ （飼育水）で週2回、1回2時間浸漬処理をする。摂餌開始後は餌に $0.1\mu\text{g}/\text{g}$ （餌）の割合で混ぜて60日間与える。このような方法で偽雌、偽雄を作り、同じクローンの雄あるいは雌と交配することによって大量のクローンを生産する。

6. クローン魚の産業への利用

遺伝的に全く均一なクローン魚の産業への利用としては次のようなことが考えられる。

(1) 実験魚としての利用

近年、化学物質などの人体や環境に対する影響評価が重要視されるようになり、そのモニターとして水域において魚類を用いられるようになった。その際、遺伝

的背景が不確実では実験の精度があがらないことも考えられる。クローン魚では遺伝的背景は全く同一なので環境要因に絞った研究が行えることが考えられる。

(2) 品種の固定

第1卵割阻止によっていろいろの諸特質を持った魚類が現れれば、それが遺伝的なものによるものであれば、その特質は遺伝されるはずである。したがって、親と全く同じ遺伝子を持つ子供にも伝わり、その特質が固定されることになる。

(3) 育種素材としての利用

(2)のようにある特質を持った系が集まれば、それらの掛け合わせによって常に一定の特質を持った個体が出現することが期待される。

(4) 劣性有害遺伝子の除去

第1卵割阻止型2倍体を作成する過程で、生存性に対して致命的な遺伝子がホモになった場合、その個体は生存できず、結果的にその集団からは除外される。

7. 染色体操作の水産業への応用

染色体操作全般の技術で水産への応用を考えると次のようになる。

(1) 雑種の作出

種間交雑を行った場合、一般に「雑種強勢」と言った言葉が示すように、両親よりも優れた形質を持つ場合もある。今まで雑種が得られなかった組み合わせも3倍体化することによって生存性の個体ができ、優れた形質を持った個体が出現することも考えられる。

(2) 不妊化

成熟期にはいると、成熟にエネルギーが費やされ成長は停滞気味になる。3倍体化することによって成熟を押さえ、その時期の成長を落とさないようにできる。例えば、鮎は通常1年魚と呼ばれ秋に生まれた鮎は翌年の秋に産卵して死ぬ。ところが3倍体化して不妊とすることにより、2年生存し、非常に大型になる。また、成熟期のXXX型鮎は成熟期にも外見上の変化をきたさず、出荷できる。

(3) 性統御

魚類の場合、雌雄間により商品価値の異なるものがある。サケ、シシャモ、アユなど、その卵巣が喜ばれるため、雌の方が商品価値が高い。一方、ティラピアという魚は雄の方が成長が早く、雌が混じっていると増えて成長が遅れる。そこで雄ばかりの単性養殖が望まれる。そういう場合に、雌性発生や雄性発生を用い、全雌生産、全雄生産を行うのである。

(4) 精子凍結保存による遺伝資源の保存

雄性発生を行えば精子から個体を得ることができる。そこで、希少種や絶滅しそうな魚の精子を凍結保存によって保管しておき、将来、その種によって環境が良くなったときに近縁種の卵を借りて、雄性発生を行いその種を復活させるのである。