

増養殖技術開発事業 (ヒラメの雌性発生2倍体の作出)

藤川裕司・石田健次・吉尾二郎

近年、本県においては島前海域を中心にヒラメ養殖がさかんになり、その生産量は昭和62年では138トンで、魚類養殖として重要な地位を占めつつある。

ヒラメは、その生物特性として、雄より雌の方が成長が良いことが認められており、特に養殖魚では1才以降その差が顕著になることが認められている。現在、養殖業者が用いている種苗は、雌雄が、ほぼ同率の割合で含まれていると考えられるので、成長の速い雌と遅い雄の両方を飼育していることになる。そのため、成長にバラツキが生じ、選別を行わなければならない、あるいは、出荷期間が、だらだら長びくというやっかいな問題が生じる。ここで、全雌の種苗により養殖を行なうことが可能となれば、成長が良く、しかもバラツキの少ないヒラメを生産することができ、前述した問題点のかなりの部分を解決することが可能と考えられる。

このような理由により、平成元年度より5ヵ年計画で、ヒラメの雌性発生2倍体の作出技術の開発に着手した。

方 法

第2極体放出阻止（加圧）による雌性発生2倍体の作出方法については、以下のとおりである。なお、これは鳥取県水産試験場において行なわれている方法である。

1) 成熟した雄を水槽より取り上げ、魚体の水分をタオルで拭きとり、腹部を軽く搾って精子を集める。なお、養殖魚であれば、雌は満2歳、雄は満1歳で成熟する。また、雌雄は、同一年級群であれば、大きい群が雌、小さい群が雄である。

2) 表1に示したリンゲル液¹⁾で、精子を50～100倍に希釈し、精子の活力が落ちないように、氷等で冷やしておく。これより、1ccをピペットでとりシャーレに広げ、振とうしながら、 $760\mu\text{W}/\text{cm}^2$ の強度の紫外線を照射して、精子を遺伝的に不活化にする。この作業を繰り返し行ない、遺伝的に不活化にした精子を冷却下で集める。

3) 腹部が膨満し、十分に成熟している雌を取り上げ、魚体の水分をタオルで拭きとり、腹部を軽く搾り採卵を行なう。

4) 2)で作った遺伝的に不活化した精子と3)の搾出卵の間で媒精を行ない、2分後にフレンチプレ

表1 Pleuronectes platessa の
リンゲル液組成

組成	mM/l	g/l
NaCl	140.7	8.22
KCl	5.2	0.39
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4.9	0.72
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.1	0.22
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1.8	0.28
NaHCO ₃	2.4	0.20
Glucose	5.6	1.01

スで600kg/cm²で6分間の加圧を行なう。この操作により、第2極体放出阻止による雌性発生2倍体が作出される。このとき、受精後の加圧を行なわない、雌性発生半数体を作成しておく。

- 5) 受精卵を、ふ化用のネットに入れふ化させる。雌性発生半数体はふ化するが、まもなく死亡する。しかも、形態は、正常発生2倍体や雌性発生2倍体に比較して、丸みをおびているという特徴を有している。これらの特徴が認められれば、雌性発生半数体が作出されたこととなり、このことは、紫外線照射により精子の遺伝的な不活化が完全であったことを説明するものである。なお、雌性発生半数体の作出の確実性を、さらに客観的にみるためには、小刻法により染色体数を調べれば良い。

平成1年5月に、鳥取県水産試験場において上述した方法で作出した、雌性発生2倍体および正常発生2倍体の卵を当分場へ持ち帰り飼育を行なった。

当初は100ℓのポリカーボネイト水槽5個で飼育したが、日齢57日で500ℓのポリカーボネイト水槽に移し、さらに日齢150日には1トン水槽へ移した。飼育水は生海水を用い、換水率は、ふ化後4日までは止水としたが、その後1～3回転/日とし、さらに日齢30日以降は回転率を上げた。餌料系列は、ワムシ→アルテミア→配合とした。なお、ワムシはクロレラと油脂酵母で2次培養を行なった。

また、日齢31～140日にかけて、雌性ホルモン（ β -エストラジオール）および雄性ホルモン（17-メチルテストステロン）により浸漬処理を行なった。両者ともエチルアルコールに溶かし、前者では10 μ g/ℓ、後者では5 μ g/ℓとなるように、飼育水中に溶入した。溶入後2時間は止水とし、その後は流水とした。

結 果

ヒラメは、性を決定する遺伝子が雄性ヘテロ型（XX-XY型）と考えられている²³。雌性発生2倍体は、遺伝的には雌であるが、成長過程で一部は性転換を行ない、表現形が雄に変わる。性転換により表現形が雄に変わった、雌性発生2倍体は偽雄（ニセオス）と呼ばれている。偽雄は、後述するが、利用価値の高いものである。

この性転換を抑制するために、雌性ホルモン（ β -エストラジオール）処理を、また、効率的に偽雄を作出するために雄性ホルモン（17-メチルテストステロン）処理を行ない、その結果を表2に示した。雌性発生2倍体で無処理のものでは、雌の割合は37%であったが、 β -エストラジオール

表2 雌性発生2倍体と正常発生2倍体の性別

作出法	処理	雌	雄	雌：雄（%）	雌雄の判定
雌性発生2倍体	無処理	11	19	37：63	日齢216-535日
雌性発生2倍体	β -エストラジオール	24	0	100：0	日齢216-419日
雌性発生2倍体	17-メチルテストステロン	1	42	2：98	日齢216-536日
正常発生2倍体	無処理	8	20	29：71	日齢216-536日

で処理したものでは雌が100%，17-メチルテストステロンで処理したものは雄が98%であった。

また、正常発生2倍体で無処理のものは、雌の割合は29%であった。

このことより、雌性発生2倍体は、無処理では全雌の種苗をつくることはできないが、 β -エストラジオールで処理すれば、すべてが雌になることが認められた。また、17-メチルテストステロンで浸漬処理することにより、効率的に偽雄を作出できることが認められた。

なお、雌性発生2倍体の成長や留止まりは、正常発生2倍体と比較しても遜色はなかった。

今後の研究の方向

雌性発生2倍体を大量に作出する場合は、前述した方法は非効率的である。前述したように、ヒラメの性を決定する遺伝子は、雄性ヘテロ型（XX-XY型）と考えられているので、偽雄は表現形は雄であるが遺伝的には雌（XX）である。ということは、偽雄と正常雌の間で自然産卵を行なった場合は、生まれてくるヒラメは、すべて遺伝的には雌ということになる。この方法を利用すれば、雌性発生2倍体を大量に作出することが可能となる。

次に、その後の性転換の問題であるが、 β -エストラジオールによる浸漬処理により、雄化を抑制することは可能であるが、現行の法律では、このような目的での β -エストラジオールの使用は禁止されており、実用性はない。山本ほか³³⁾は、ヒラメの性の分化が飼育水温により影響を受ける可能性を認めている。すなわち、日齢36～100日の飼育水温を20℃に保つことにより、雌の出現割合は93%になるが、15℃飼育では80%，25℃飼育では66%であった。現段階では、雄化の抑制法としては、この方法がもっとも実用性があると考えられる。ただし、ここで問題となるのは、飼育水を20℃に保つことの困難性である。5月上旬に採卵したものでは、その後水温が上昇し、夏期には28～29℃となるため、20℃に冷却することは極めて困難となる。そこで、親魚の電照飼育による早期採卵を行ない、例えば、2月上旬に採卵が可能となれば、20℃飼育は3月下旬～5月中旬にかけて行なえば良いことになる。この期間の水温は約13～18℃なので、冷却する必要はなく、加温すれば良いことになり、大量生産の可能性が生まれてくる。

今後は、ヒラメの雌性発生の実用化を目ざすためには、偽雄と正常雌との間の早期の自然産卵技術の開発およびその後の飼育温度の制御の性の分化への影響について研究を、重点的に行なう必要があると考えられる。

文

献

- 1) 水上 稔 1979：生理的塩類溶液，啓学出版，東京。
- 2) 鳥取県栽培漁業試験場 1989：ヒラメの染色体操作技術等を応用した優良種苗生産に関する研究（昭和63年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書）。
- 3) 鳥取県水産試験場 1990：ヒラメの染色体操作技術等を応用した優良種苗生産に関する研究（平成元年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業日本海ブロック会議資料）。