

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06242

研究課題名(和文) 魚類育種事業への新展開一倍加半数体系統の簡易量産技術開発 -

研究課題名(英文) New Stage of Development for Fish Breeding Business: Simple Mass Production Technology of Doubled Haploids

研究代表者

小林 徹 (Kobayashi, Toru)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：00298944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、魚類の養殖に「クローン系統育種」を実用化することを目的とする。「複数回の高温刺激処理」による分裂阻止効果を検討し、育種素材としての倍加半数体(完全ホモ型単性発生二倍体)の大量作出の実現を目指すものである。本研究では、主にホンモロコを材料に研究を進めた。本種の倍加半数体作出の諸条件は、精子の遺伝的不活性化のための照射UV量は20 mJ/cm²程度が有効、卵割阻止のための1分間の処理温度は40.5℃が適正、第一、第二の高温刺激処理のタイミングは20℃培養でそれぞれ受精後25分および40分、雌性発生卵の倍数化には熱刺激1分間の2～3回の反復が有効であることがそれぞれわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題で検討している「熱ショック反復処理を利用した卵割阻止によるゲノム倍加効率の向上」は、純系育種素材の作出頻度を向上し、遅滞している水産分野での純系育種事業に選抜操作や系統間交配を加えた展開をもたらすと期待される。また、凍結保存精子の遺伝子のみで発生させた雄性発生体を生存性のある二倍体にするにも応用できることから、希少魚種の保存や復元にも貢献できると期待される。すなわち、高温刺激の反復処理によって卵割阻止効率が向上すれば、絶滅に瀕している魚種を、その凍結保存精子と他の近縁種の卵を使用して希少種を雄性発生二倍体として復活させることにも応用できる。

研究成果の概要(英文)：The objective of this research is to put clonal line breeding into practical use in fish aquaculture. In other words, this project aims to study the effect of "multiple heat shock treatments" on suppression of cleavage of gynogenetically developing eggs and to realize the mass production of doubled haploids (fully homozygous monogenetic diploids) as breeding material. In this study, we used honmoroko (willow gudgeon *Gnathopogon caerulescens*) as the main material. The appropriate conditions for the production of doubled haploids of this species are as follows. 1. UV irradiation of about 20 mJ / cm² is effective for genetic inactivation of sperm. 2. The appropriate one-minute treatment temperature for suppression of egg cleavage is 40.5 °C. 3. The first and second heat shock treatments were timed at 25 and 40 minutes after fertilization, respectively, at 20 °C culture. 4. Two or three repetitions of heat shock for 1 minute are effective for Gynogenetic egg doubling.

研究分野：染色体操作を用いた育種技術開発

キーワード：倍加半数体 染色体操作 雌性発生 卵割阻止 中心体 中心小体 ホモ接合

1. 研究開始当初の背景

「倍加半数体(Doubled haploid)」は、ひところ前まで卵割阻止型単性発生二倍体(Mitotic gynogenetic diploid)と呼ばれていた。すべての遺伝子座がホモになることから、生殖巣における減数分裂の組換えの影響を受けず、すべての配偶子の遺伝子型が同じになり、単性発生での継代によって次世代をクローン集団とすることができる。

この倍加半数体の作出には、通常の場合卵割阻止による染色体倍加が必要である。卵割阻止は、高水圧処理や温度刺激処理などの物理的的刺激処理を発生卵に施すことで試みられてきたが、極めて困難とされてきた。近年、申請者らによって、熱ショック処理を複数回行うとこの卵割阻止が高頻度で実現できることが明らかになりつつある。物理刺激は、この卵割にはたらく分裂装置のうち、中心体の中心小体の破壊に関与するといわれているが、各中心体に2個ずつある中心小体のいずれかあるいは両方を破壊できるか否かによって、その後の発生に起こる現象が大きく異なってくる。

雌性発生卵の分裂装置の片方の中心体のみを選択的に完全に消滅させることが可能となれば、第1卵割を阻止することが可能となる。それには、雌性発生卵のどの時期にどのように処理を施せばよいかを解明する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、魚類養殖に新しい「クローン系統育種」を実現するため、雌性発生胚の卵割阻止を確実にかつ高頻度で実現することを目的とする。「複数回の熱ショック処理」による分裂阻止効果を検討し、その最適処理条件と細胞学的メカニズムを明らかにするとともに、育種素材としての倍加半数体(完全ホモ型単性発生二倍体)の大量作出の実現を目指す。通常発生卵の倍数化処理のタイミングは、20 培養で媒精後 23 - 25 分に第一処理、その終了後 15 分に第二処理を開始するのが最適と前課題の中で判断され、そのことは *Aquaculture Research* 50, 2666 - 2686 (2019)に掲載した。

本課題では、これを倍加半数体作出へ発展させるための諸条件について検討した。すなわち、雌性発生をより確実に高頻度で誘導するため、精子への紫外線照射条件を精査するとともに、雌性発生卵の倍数化のタイミングを検討するため、雌性発生卵の発生進行を通常発生の場合と比較した(2019)。さらに、第1熱ショック処理、第2熱ショック処理のタイミングについて精査し、倍加半数体の誘導効率を高める至適条件を検討した(2020)。また、1分間の熱ショック処理を2回行うことで卵割阻止の効率が向上する機構を検討するため、1分間の熱ショック処理を複数回重ねることによる処理強度の増強と、2分間の熱ショック強度を1、2、3、4回の複数回に分割することによる処理強度の緩和をそれぞれ検討し、その効果について生存状況や倍数性組成、孵化仔魚の形態に及ぼす影響を検討した(2021)。

3. 研究の方法

(1) ホンモロコの雌性発生誘導のための精子への紫外線照射量の再検討(2019)

卵の遺伝子のみで発生を開始させる雌性発生は、雌親の形質のみで次世代を作出することができるため育種において極めて有用である。従来、雌性発生誘導に必要な精子への紫外線(UV)照射量には、発生胚や孵化仔魚のほぼ全てが半数体症候群を示し、かつ精子の運動活性がやや低下した線量が十分条件として採用されてきた。しかし、その条件で誘導される発生胚の生存率は、それより低線量で照射した場合よりも低い。また、半数体症候群とはあくまで形態的症状を指し、その倍数性が確実に半数体か否かは検証されていない。また、低線量の UV を照射した精子が異数体を誘導するか否かも実証した例はない。本研究では、様々な線量の UV を照射した精子を卵に媒精し、そこから発生した個体の DNA 相対値を精査することで、雌性発生の誘導に最適な UV 照射量を再考するとともに、各照射量、とりわけ 0.5 ~ 2.0 mJ/cm² の極めて低線量の UV 照射精子が発生胚の倍数性に及ぼす影響も調べた。雄親魚から得た精子を人工精漿で 100 倍に希釈し、その 1 mL をシャーレ底面に広げ、0.5 mJ/cm²・sec の UV を 0.5 mJ/cm² から 80 mJ/cm² の様々な線量で照射した。それらの精子を約 70 粒の卵にそれぞれ媒精し、瀑気水を満たしたプラスチック容器(11.5 × 16.5 × 4.4cm)に撒いて、底面に敷いたすりガラスに付着させた。対照区は UV を照射しない精子で受精させた卵とした。受精卵は 20 で培養し、その後の生存数を毎日計数した。受精後 1 日あるいは 3 日に約半数の卵をカルノア液で固定した。残りの卵は培養を継続して孵化数を計数した。孵化仔魚はその形態によって正常・準奇形・奇形に分けて 99.5%エタノールで固定し - 25 で保存した。その後 Ploidy Analyzer で各区の受精後 1 日胚または 3 日胚および孵化仔魚の倍数性を判定し比較した。

(2) ホンモロコにおける雌性発生と通常発生の発生進行比較(2019)

2回の熱ショック処理は倍加半数体の量産に有用と期待される。ところが、通常発生の最適処理条件をそのまま雌性発生卵へ応用しても劇的な生存率の改善は見られない。雌性発生

も通常発生と同じ速さで進行するのだろうか。そこで、紫外線照射精子と非照射精子のそれぞれで媒精した受精卵の発生進行の状況と、通常発生卵における卵割阻止最適条件で熱ショック処理を行った場合の発生の進行状況を比較した。雌1尾の卵を2群に分けて雌性発生区および通常発生区とした。雄5尾の精液を等量ずつ混合して人工精漿で100倍希釈した。精子へのUV照射は、希釈精液1 mLに対し0.5 mJ/cm²・secで60秒間行った。このUV精子7 mLを雌性発生区へ、照射なしの希釈精液5 mLを通常発生区へ媒精した。これらを水温20℃の別々の水槽へ同時に接水させ、それぞれの底面に敷いたガラス板に付着させた。この接水のタイミングを受精時とした。また、両区から倍数化に供する群を分け(GH, NH)、それぞれに熱ショック処理(40.5℃、1分間)を、1回目(HST1)は受精後25分に、2回目(HST2)は41分に開始した。各区の卵は、受精後1分、5分、以後5分ごとに120分まで同時にプアン固定した。各卵の胚盤は10 μm厚切片としHE染色を施して、各区の発生進行を比較した。

(3) 高温二回処理による雌性発生ホンモロコ倍加半数体の作出効果 (2020)

ホンモロコの倍加半数体(DHs)作出のための二回熱ショック処理の第一処理(HST1)および第二処理(HST2)のタイミングについて至適条件を検討した。本種親魚から卵と精子を採取し、精子は紫外線照射で遺伝的不活性とした(UV精子)。雌性発生はUV精子の媒精で誘導し、受精卵への熱ショック処理のタイミングの違いで以下の実験を設定した。1度の熱ショック強度はいずれも40.5℃1分間とした。(実験1)雌性発生誘起後23~31分の様々な時期にHST1を施した。続くHST2は各HST1終了後15分に開始した。(実験2)媒精後26分にHST1を行い、HST1終了後10~25分のいずれかにHST2を行った。各群の孵化仔魚の形態、孵化率を比較し、8座のマイクロサテライト遺伝子型を分析して、SIDHY-index [(孵化率) × (正常形態率) × (DHsの割合)]を求めた。また、各熱ショック処理直前の卵を組織学的に観察した。

(4) 雌性発生ホンモロコ卵への多回熱ショック処理による卵割阻止

- 刺激の蓄積と緩和の効果 - (2021)

倍加半数体の作出法改善のため、これまで高温2回処理を精査してきた。しかし、熱ショック処理(HST)を2回行うことが有効となる機構は不明である。その解明の一助として、さらなるHST回数増による刺激の強化、および全処理時間(2分)の均等分割による1回あたりの刺激の緩和を試み、その変化を調べた。紫外線照射精子を卵に媒精し雌性発生を誘導した。これらの卵を、水温20℃の水槽に撒き、底に並べたすりガラスに付着させた。HSTは、卵を40.5℃の温水に浸漬して行った。また、無処理の精子を媒精した通常発生対照区(IC)、およびHSTを行わない雌性発生対照区(GC)を設けた。実験1(刺激蓄積): 最初のHSTは接水後25分から開始し、その後10分あるいは15分間隔で1~6回のHSTを行う計12区(10-1~10-6、15-1~15-6)を設けた。実験2(刺激緩和): 2分間のHSTを1回~4回で均等分割し、処理間隔を10分あるいは15分とする計8区を設けた。孵化期に各孵化仔魚の形態と倍数性を判定した。

4. 研究成果

(1) ホンモロコの雌性発生誘導のための精子への紫外線照射量の再検討 (2019)

受精後3日の生存率は0.5 mJ/cm²から1.5 mJ/cm²の低いUV照射区で最低29.9%にまで低下し、さらに高い線量ではその回復が確認されたことから、2.0 mJ/cm²以上の線量で雌性発生が高頻度で誘導されたと判断された。受精後1日の卵の倍数性は、対照区では2倍体が89.7%、半数体が1.7%のみであった。UV精子を媒精すると、0.5 mJ/cm²で半数体が56.9%、1.0 mJ/cm²から80 mJ/cm²まででは半数体が安定して80%前後を占めたが、2倍体も安定して10%前後検出された。また、対照区および50 mJ/cm²以下のUV照射区で異数体が検出され、0.5 mJ/cm²区では18.5%、それ以外では平均2.1%と少なかった。異数体は3日胚以降からは検出されなかった。検出された異数体の相対DNA量は、半数体と二倍体の間および二倍体と三倍体の間を示すものが検出された。孵化期では、対照区は2倍体が95.5%で、半数体は検出されなかった。0.5 mJ/cm²では半数体が55.2%、他の照射区では受精後1日後と同様半数体が80%前後を占めた。一方、孵化仔魚の形態ごとに倍数性を比較すると、「正常」では2倍体が92.7%、半数体は0.8%、3倍以上の個体が6.3%であった。「準奇形」では2倍体が75.7%、半数体は21.6%、3倍以上が2.7%、「奇形」では2倍体が5.0%となり半数体は93.4%、3倍以上は1.5%であった。これらのことから、誘導できる半数体の割合と生存率を考慮すると、雌性発生を誘導するUV照射量は、20 mJ/cm²程度が有効であると考えられた。

(2) ホンモロコにおける雌性発生と通常発生の発生進行比較 (2019)

通常発生区では受精後25分に第一卵割(1CV)の前期が始まり、中期は40分~50分、終期は50分~60分であった。これに対し、雌性発生区では1CVの前期開始は受精後30分で起こり、中期は45分~55分、終期は55分~65分であった。このことからG区の発生速度はN区より遅れることが明らかになった。また、HST2の直前(受精41分)ではNH区は1CV前中期の後半または中期、GH区は1CV中期であった。これらのことから、本種の雌性発生卵における卵割阻止の適正時期は、通常発生の場合よりやや遅いものと推定された。

(3) 高温二回処理による雌性発生ホンモロコ倍加半数体の作出効果 (2020)

(実験1)正常な形態の孵化仔魚は、HST1を受精後25~29分に行った群に比較的多く出現

した。SIDHY-index は、HST1 を受精後 23～26 分に行った群で高値となった。この時の HST1 直前の発生段階は接合期か前期の始めであった。(実験)HST2 を施した群の孵化率は HST2 の開始時間が遅くなるとともに低下する傾向がみられた。また、孵化率、形態正常率ともに、HST2 が HST1 の 10～12.5 分後に開始された群で高かった。これらの DHs の割合は 45.1、20.8%、SIDHY-index は、HST1 後 10～12.5 分に行った群で高値を示し、この時期の発生段階は前期および前中期の始めであった。

(4) 雌性発生ホシモノコ卵への多回熱ショック処理による卵割阻止

- 刺激の蓄積と緩和の効果 - (2021)

実験 (刺激蓄積): 生存率は HST の回数に伴い低下し、5 回以上では孵化しなかった。孵化仔魚中の二倍体の割合は、1 回処理で 8.9% だったものが、10 分間隔 2 回で 24.2%、10 分間隔 3 回で 81.9%、15 分間隔 2 回で 61.4%、15 分間隔 3 回で 70.2% と回数増加に伴って増加傾向を示した。HST を 15 分間隔で行った場合は、3 回以上の区で四倍体の割合が増加した。奇形個体の割合は HST 2 回、3 回で低下する傾向がみられた。実験 (刺激緩和): GC で 5.7% だった二倍体の割合は 2 分の HST を 1 回で行うと 23.6% となり、処理を 2 分割すると 10 分間隔では 45.5%、15 分間隔では 78.5% となった。さらに分割を 4 回とすると、生存率、二倍体の割合は減少し、奇形率は 10 分間隔では 3 回、15 分間隔では 2 回の HST で減少傾向がみられた。以上から、本種の雌性発生卵の倍数化には 1 分間の連続熱刺激を 2～3 回行うことが有効であることが分かった。

これらの結果により、雌性発生の誘導、倍数化がこれまでよりも確実に効率よく実践できるようになった。今後、さらに高効率に倍加半数体を誘導できる条件を精査するとともに、倍数化のメカニズムの解明を進めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi, Toru and Fujii, Hikaru	4. 巻 50
2. 論文標題 Double heat shock more potently suppresses cleavage of fertilized willow minnow (<i>Gnathopogon caeruleus</i>) eggs than single heat shock treatment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Aquaculture Research	6. 最初と最後の頁 2666 ~ 2686
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/are.14225	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林 徹, 竹田秋都, 原貫太
2. 発表標題 高温二回処理による雌性発生ホルモンコピ加半数体の作出効果.
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 徹, 渡邊祐大, 窪田龍之介
2. 発表標題 ホルモンコピにおける雌性発生と通常発生の発生進行比較.
3. 学会等名 日本水産学会(東京都港区港南)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 徹・亀甲武志
2. 発表標題 雌性発生ホルモンコピ卵への多回高温刺激処理による卵割阻止
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------