

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14916

研究課題名（和文）小型マグロ類スマの半数体誘起と育種素材への応用

研究課題名（英文）Induction of haploids in eastern little tuna, *Euthynnus affinis*, and application to fish breeding materials

研究代表者

遠藤 充 (Endoh, Mitsuru)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(南勢)・研究員

研究者番号：20897714

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マグロ類の養殖対象種であるスマの育種に向けて、人工授精や染色体操作に関する基盤的研究を行った。まず、排卵卵を体外で保存するための溶液や温度条件を検討するため、保存条件ごとに人工授精を行い、胚発生成績を調査した。排卵卵はHanks' solutionに浸漬して20℃で保存することにより、採卵3時間後まで高い受精率と胚発生能力が維持されることを明らかにした。また、紫外線照射によるスマの雌性発生及び雄性発生半数体の誘起に適した紫外線照射量を、倍数性解析の結果から決定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スマの排卵卵の短期保存と人工授精手法の確立により、選抜育種において計画的な交配を行うことが可能となった。また、半数体誘起のように人工授精前に配偶子への処理を伴う染色体操作や、人工授精直後の顕微注入処理が必要なゲノム編集など、育種技術をスマの育種に適用する上でも有用な知見となった。さらにスマ半数体の誘起は、倍加半数体の作出に繋がるだけでなく、半数体ゲノム利用したゲノム情報解析を可能にするなど、育種を支える周辺情報の整備への応用も期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted fundamental research on artificial fertilization and chromosome manipulation for the breeding of eastern little tuna, *Euthynnus affinis*, a related species of the bluefin tuna. First, we examined the adequate procedure for ovulated egg storage for efficient artificial fertilization. Ovulated eggs with high productivity were achieved 3 hour after egg collection when maintained in Hanks' solution at 20℃. Additionally, we determined the optimum UV irradiation dose for inducing gynogenetic and androgenetic haploid by ploidy analysis using the cell analyzer.

研究分野：遺伝育種

キーワード：人工授精 染色体操作 雄性発生 雌性発生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国内では新規養殖魚種を含めた養殖生産が各地で展開されており、効率的な生産や飼育コストの削減などの実現のため、短期間での育種が求められている。実際には、有用形質の固定に数世代の継代飼育を要し、養殖用種苗の改良には長い年月を要する。

植物では、倍加半数体を利用した半数体育種法により、短期間で純系や新品種が作出されている。しかし、魚類では倍加半数体の生残率は極めて低いことに加え、養殖対象種のライフサイクルの多様さなどの理由から、倍加半数体の作出とその利用は容易ではない。一方で、魚類では半数体は致死であるが、半数体由来 PGC 用いて、遺伝的に均一な配偶子の誘導が可能であることが知られている。代理親を介してドナー由来の配偶子を得る借腹生産技術は、国内外で研究が進められ、小型モデル生物での検証に続き、海産の大型養殖対象種での研究が行われている。そこで、半数性細胞の利用と借腹生産技術を組み合わせることであれば、有用形質の固定までの期間を大幅に短縮できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、マグロ類の新規養殖魚種として注目されているスマ (*Euthynnus affinis*) の育種に向けて、スマの半数体誘起法の確立、半数体の生物学的特性の解析、半数性細胞の細胞活性の評価を行い、半数体育種法と借腹生産技術を組み合わせた方法の技術的な基盤を整備することを目的とした。

3. 研究の方法

供試魚

海面生簀で飼育したスマの2歳魚の雌13個体(体重2,117-3,164g)と、2歳魚または3歳魚の雄15個体(体重2,147-3,846g)を使用して実験を行った。排卵卵および精子は、産卵期のスマから卵巣、精巣を摘出して採取した。また、本研究におけるスマの人工授精は以下の手順で行った。プラスチックカップに排卵卵を0.15-0.2g(およそ350-500粒)を入れ、希釈精液を100 μ L媒精したあと、50mLの濾過滅菌海水を加えて精子を活性化した。その5分後に、200mLの濾過滅菌海水を追加してから受精卵をインキュベーターで培養した。なお、当初は卵と精子両方の保存条件を検討する計画であったが、精子はHanks' solutionで100倍希釈後、10のインキュベーター内で保存することで、保存12時間後以降も運動性、受精能を維持することを確認したため、この希釈率と保存条件をそのまま適用した。

スマの産卵期以外には、モデル生物のゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を使用して実験を行った。ゼブラフィッシュはナショナルバイオリソースプロジェクトからRIKEN Wild (RW) 系統の提供を受けて使用した。人工授精と染色体操作の手順はEndoh et al., 2018に従った。

(1) 排卵卵の保存溶液の検討

スマの排卵卵について受精能を維持したまま保存可能な溶液を検討するため、生理的塩類緩衝溶液であるHanks' solution (Hanks')、細胞培養に用いられるLeibovitz's L-15 medium (L-15)、海産魚用リンゲル液 (Ringer's) の3種類を用いた。これらの溶液中で排卵卵を保存し、12時間後まで経時的に人工授精を行い、受精率、孵化率、正常仔魚率を調査した。また、各溶液中で保存した卵を観察し、受精能を維持していると考えられる透明卵と、受精能を失っていると考えられる過熟卵および壊卵の割合から、各保存溶液を評価した。

(2) 排卵卵の保存温度の検討

スマ排卵卵の保存温度の検討では、排卵卵を異なる温度(5、10、15、20、25、30)で保存し、5時間後まで経時的に人工授精を行い、受精率、孵化率を調査した。

(3) 半数体の誘起条件の検討

紫外線照射による半数体誘起(雌性発生及び雄性発生)と、低温処理による雄性発生半数体誘起を試みた。紫外線照射による方法では、卵および精子の遺伝的不活性化に適した紫外線照射量を検討した。照射量の異なる実験区を設定し、各実験区について受精率、受精18時間後の体節形成期の生残率と、受精36時間後の孵化期における生残率、孵化率、奇形仔魚率を調査し、紫外線照射による胚発生能力への影響を調べた。卵および精子への紫外線照射は、配偶子を載せたシャーレを振盪機に置き、水平方向に振盪しながら行った。孵化期まで生残した胚は、セルアナライザーのMuse Cell Cycle Kitを用いた倍數性解析に供し、各実験区の半数体誘起効率を調べた。低温処理による方法では、異なる処理時間と処理温度の実験区を設定して、条件検討を行った。

(4) 半数性細胞の解析

半数性細胞の利用に向け、周年採卵が可能なゼブラフィッシュをモデルとして、雌性発生半数体及び雄性発生半数体を誘起し、両者の胚発生過程における外部形態の比較と、細胞活性の解析を

行った。細胞活性の解析では、胞胚期および孵化期の胚から細胞を分散し、セルアナライザーの Muse Count & Viability Kit を用いて細胞の生残性、Muse Annexin V & Dead Cell Kit を用いてアポトーシス関連細胞の有無を解析した。

4. 研究成果

(1) 排卵卵の保存溶液の検討

3種類の溶液中で排卵卵を保存したあとに人工授精を行い、胚発生成績を比較したところ、保存3時間後までは、Hanks'及びRinger's保存群において受精率は95%以上を維持し、溶液を加えずに保存した対照群と同等またはそれ以上の値だった。保存12時間後においても、3.5-12.1%程度の正常な孵化個体が得られたが、保存時間が長くなるに伴い、胚発生成績は悪化した(図1)。また、各溶液で保存した卵を観察した結果、過熟卵や壊卵の割合がRinger's保存群で早期から増加した。以上の結果から、スマの排卵卵の保存には、Hanks'がより適していると考えられた。

(2) 排卵卵の保存温度の検討

5 から 30 の異なる温度で排卵卵を保存したあとに人工授精を行い、胚発生成績を比較したところ、20 で保存した群では、保存5時間後も受精率、孵化率共に低下はなかった。一方、5、10、30 で保存した群では、受精卵が得られたものの、保存3時間後の孵化率が10%以下と極めて低く、15及び25保存群の受精率及び孵化率も20保存群より低かった(図2)。以上(1)(2)の結果から、スマの排卵卵をHanks'に浸漬して20 で保存することにより、3時間後まで高い受精率と胚発生成能力を維持できることが明らかになった。

(3) 半数体の誘起条件の検討

各実験区の胚発生成績については、照射量の増加に伴い、精子への紫外線照射(雌性発生誘起)では顕著に受精率が低下し、卵への紫外線照射(雄性発生誘起)では受精率に影響は少ないものの、生残率が低下する傾向が見られた。セルアナライザーを用いた孵化期胚の倍数性解析の結果、雌性発生誘起では、試みた全ての照射量で半数体が高効率に得られた。しかし、精子に一定量以上の照射を行った実験群では、受精率が低下

したことから、高効率で雌性発生を誘起するためには、過剰な紫外線照射であると考えられた。雄性発生誘起では、一定量以下の照射量の実験区では、半数体と二倍体が混在していたことから、照射量が不十分であったが、特定の範囲の照射量の実験区において、孵化期まで生残する胚が得られ、半数体が高効率に検出されたことから、雄性発生誘起に適した照射量であったと考えられた。この範囲を超えて紫外線照射を行った実験群では、受精胚が得られたものの、その後の生残率が極めて低く、照射量が過剰と考えられた。雄性発生処理における卵への紫外線照射は、卵を水平方向に振盪しながら行うため、卵同士の接触による物理的ダメージも予測された。そこで、保存溶液中で振盪しながら保存した卵と、静置して保存した卵について、受精率などの胚発生成績を比較した。保存中の振盪の有無によって、胚発生成績に差が生じなかったことから、雄性発生誘起のための一時的な卵の振盪による胚発生への悪影響がないことを確認した。以上のように、紫外線照射によるスマの雌性発生半数体および雄性発生半数体の誘起条件を明らかにした。一方で、低温処理による雄性発生誘起は、処理時間や処理温度を複数設定し、実験を行ったが、発生胚が得られなかった。低温処理による雄性発生は、受精後の処理のみで半数体を誘起できる方法であるため、人工授精が容易とは言えないスマなどの海産養殖魚では、有用な手法になると考えられ、処理条件の見直しが引き続き必要である。

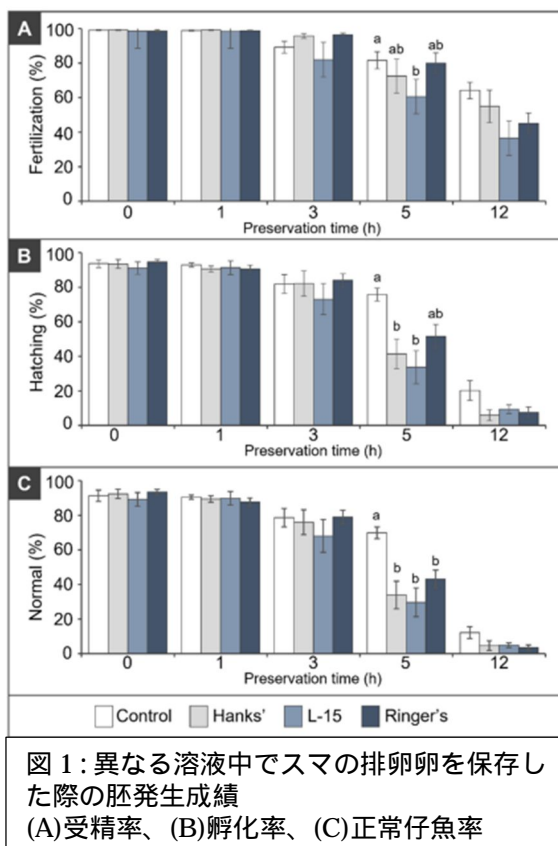


図1: 異なる溶液中でスマの排卵卵を保存した際の胚発生成績 (A)受精率、(B)孵化率、(C)正常仔魚率

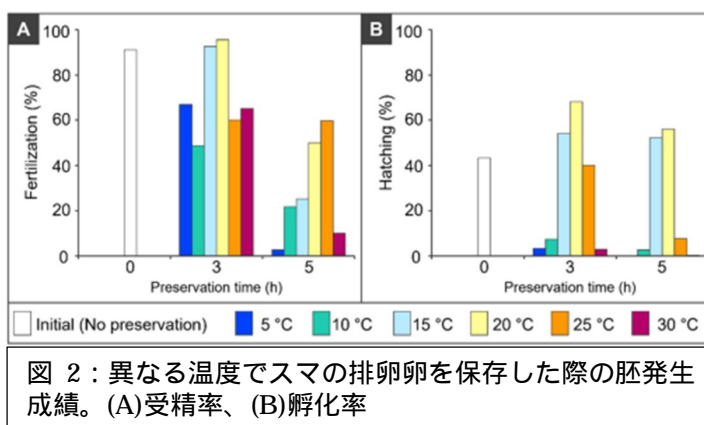


図2: 異なる温度でスマの排卵卵を保存した際の胚発生成績。(A)受精率、(B)孵化率

(4) 半数性細胞の解析

胚発生過程における外部形態の観察では、雌性発生胚と雄性発生胚の両方で、通常二倍体に対する胚発生が遅れが観察された。特に雄性発生胚の発生遅延が大きく、囊胚形成期に胚盤葉が全体的に肥厚する形態異常も雄性発生胚において顕著だった。2種類の半数体胚の間に胚発生異常の程度の差異が生じたのは、雄性発生胚では作出の過程で、卵への紫外線照射を必要とすることが原因と考え、通常二倍体の受精卵に紫外線照射をしたときの胚発生の観察を追加で行った。二倍体胚であっても雄性発生誘起と同じ照射量の紫外線を照射した胚は、囊胚形成の遅れと胚盤葉の肥厚が観察されたことから、雄性発生胚では、半数体であることに加えて、卵への紫外線照射が行われることで形態異常が悪化したと考えられる。

細胞活性の解析では、半数体は個体レベルでは致死となるが、細胞レベルでは生残性をもつという先行研究を踏まえて、胚発生段階ごとの細胞活性を比較した。本解析では2種類の半数体胚の間に違いを検出することができなかったが、胞胚期の半数体の細胞分散において初期アポトーシス細胞が、通常二倍体よりも多く検出された。従って、胞胚期における半数体胚の死亡は、アポトーシスにより誘導されている可能性が示唆された。一方、孵化期胚から分散した半数性細胞では、アポトーシス誘導が検出されなかったことから、孵化期の半数体個体の致死は別の要因から引き起こされる可能性がある。

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 1件）

1. 著者名 Endoh Mitsuru, Hazama Ryuji, Kaya Keita, Futamura Yusuke, Doi Sakurako, Makinose Izumi, Pandey Dipak, Nishimiya Osamu, Havelka Milos, Saito Taiju, Goto Rie, Matsubara Takahiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Efficient Artificial Fertilization and Ovulated Egg Preservation in Kawakawa Euthynnus affinis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Marine Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 599 ~ 599
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jmse10050599	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------