

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850140

研究課題名(和文) 完全養殖技術を利用したウナギのクローン系統作出技術の開発

研究課題名(英文) Studies on production of cloned populations by chromosome manipulation techniques in Japanese eel

研究代表者

野村 和晴 (Nomura, Kazuharu)

独立行政法人水産総合研究センター・増養殖研究所・主任研究員

研究者番号：90372044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ニホンウナギにおいて2世代でクローン系統作出を可能にする雌性発生条件について検討した。ウナギ精子を遺伝的に不活性化する紫外線の照射条件は $400 \mu\text{W cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度で35～75秒間(1,400～2,800 erg/mm^2)だった。第二極体放出阻止は、受精後3分に、水温0℃の海水に、5～15分間浸漬という低温処理で可能だった。さらに、第一卵割阻止を可能にする高圧処理条件について検討したところ、受精後40～45分に、9,000～10,000 psiの圧力条件で、4分間という条件によりゲノムを倍加した4倍体の作出が可能であった。

研究成果の概要(英文)：We investigated effective conditions for the induction of meiotic and mitotic gynogenesis through UV irradiation of sperm followed by a cold shock or a pressure shock in Japanese eel. As a first step, we examined suitable dose of UV irradiation on genetic inactivation of spermatozoa. Haploid gynogenesis was successfully induced by 35-70 s UV irradiation of $400 \mu\text{W cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1,400-2,800 erg/mm^2). Second, the optimal conditions for retention of the second polar body were investigated by altering the timing, intensity and duration of cold shocks. Treatment optima were 0℃ for 5-15 min at 3 min after fertilization. Besides, we also investigated the optimal conditions for suppression of first cleavage by altering the timing, intensity and duration of hydrostatic pressure shocks. Tetraploids caused by suppression of first cleavage were successfully induced by hydrostatic pressure shocks applied on 9,000-10,000 psi for 4min at 40-45 min after fertilization with Non-UV-irradiated sperm.

研究分野：水産育種学

キーワード：ニホンウナギ 雌性発生 ダブルハプロイド 低温処理 高圧処理 クローン系統

1. 研究開始当初の背景

これまでウナギに関する研究では、主に人工種苗生産技術開発と天然での回遊生態に関する研究に重点が置かれてきたが、人工生産したウナギから次世代を作り出す、いわゆる完全養殖が達成されたことにより、今後は本格的に育種研究の重要性が増すと考えられる。しかしながら、他のウナギ属魚類も含めて継代飼育が可能な種は本種以外に存在せず、従ってウナギ類の遺伝育種学的研究の蓄積は、極めて断片的であった。我々はこれまでウナギの遺伝育種学的研究に早期から着手し、高温処理による人為三倍体作出技術の開発 (Nomura et al., 2004) や、人為三倍体家系を用いたマイクロサテライトマーカーの動原体マッピング (Nomura et al., 2006) 遺伝連鎖地図の作製 (Nomura et al., 2011) などに取り組んできた。これらの成果は、ウナギ属魚類の遺伝育種を対象とした先行的な研究であった。

近年、ヨーロッパウナギでのゲノム解読 (Henkel et al., 2012) やニホンウナギにおけるゲノミクス研究 (Minegishi et al., 2012) が報告されており、今後も本種のゲノム解析研究は急速に進展していくと考えられる。このようなゲノム研究のバイオリソースとしても、クローン等の染色体操作魚を用いた家系構築が非常に重要なツールとなると考えられたため、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ニホンウナギにおいて2世代でクローン系統を作出するための技術基盤を確立することである。すべての遺伝子型について完全にホモ化された、遺伝的に均一なクローン系統を作出すれば、養殖集団における成長や形態の斉一性が向上し、生産性向上に繋がることが期待される。また各種実験のリファレンス家系としても有用なツールとなりうる。通常、このようなクローン系統を作出するためには兄妹交配の繰り返す必要があるが、完全にホモ化するためには、15世代以上の継代が必要となる。それに対し、図1に示すような染色体操作技術を用いた方法ではわずか2世代で可能となる。本研究はこれを可能にする技術基盤を整備することを目的とした。

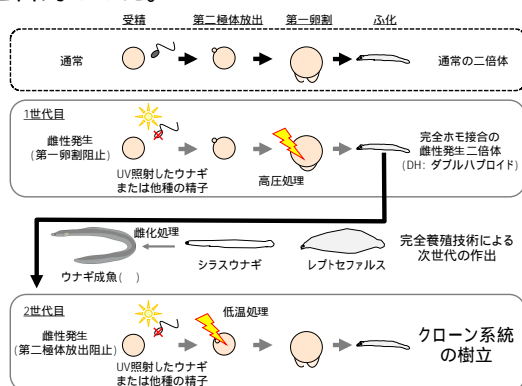


図1. ウナギクローン系統作出のフローチャート

3. 研究の方法

(1) ウナギ精子を遺伝的に不活性化する最適紫外線照射条件の解明

ホルモン投与により人為的に成熟させた雄ウナギより精子を得た。人工精漿で50倍希釈した後、親水処理したプラスチックシャーレに薄く均一に展開し、6W殺菌直下に置いて緩やかに振盪しながら、種々の紫外線強度(380~11,400 erg/mm²)で照射した。照射後に450mM NaCl溶液で精子を活性化し、顕微鏡下で精子運動率を測定した。また、UV照射量を変えた精子を用いて人工授精を行い、受精率・ふ化率・ふ化仔魚の倍数性について比較した。

(2) 第二極体放出阻止による母親ゲノム倍加を可能にする低温条件の解明

ホルモン投与により人為的に成熟させた雌ウナギより得た成熟卵に、UV照射精子および非UV照射精子を媒精して人工授精に供した。得られた受精卵について、受精後3分、0に調整した海水に、5、10、15分間浸漬して低温処理を行った。各処理群について、相対ふ化率および仔魚の倍数性を比較検討した。

(3) 第一卵割阻止によるゲノム倍加を可能にする高圧処理条件の解明

ホルモン投与により人為的に成熟させた雌ウナギより得た成熟卵に、非UV照射精子を媒精して人工授精に供した。得られた受精卵について、受精後30、35、40、45、50、55、60、65分に、650、750、850 kgf/cm²の水圧条件下に、4分間曝露して高圧処理を行った。各処理群について、相対ふ化率および仔魚の倍数性を比較検討した。

4. 研究成果

(1) ウナギ精子を遺伝的に不活性化する最適紫外線照射条件の解明

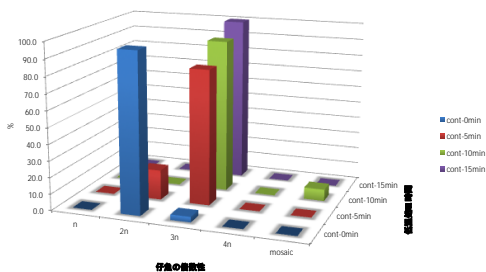
種々の線量で紫外線照射した精子の運動活性を調べたところ、およそ5,000 erg/mm²の照射量を超えると運動率が低下しはじめ、11,400 erg/mm²の照射量ではほぼ運動能を喪失した。照射量を変えたUV照射精子で受精した卵の受精率やふ化率は、380 erg/mm²では著しい低下がみられるものの、700 erg/mm²ではいったん回復し、その後は線量の増加に伴って漸減していき、11,400 erg/mm²の照射量で受精能を喪失した。ふ化仔魚の倍数性との関連を調べたところ、380 erg/mm²からまで11,400 erg/mm²幅広い照射範囲で雌性発生半数体の出現が認められた。半数体の出現頻度は1,400 erg/mm²以上の照射量でほぼ100%と

なった。以上の結果を総合的に勘案し、最適な紫外線照射量の範囲を 1,400 ~ 2,800 erg/mm² と判定した。

(2) 第二極体放出阻止による母親ゲノム倍加を可能にする低温条件の解明

低温処理の主要な 3 条件、すなわち処理温度、処理時間、タイミングについて予備的検討を行った結果、処理のタイミングは受精後 3 分、処理温度は 0 が適していると考えられた。そこで、これらの条件を固定し、処理時間を 5、10、15 分と変えて処理を行ったところ、通常精子で受精した群では低温処理無しの対照区では 2 倍体が 96.7% を占めたのに対し、低温処理区ではいずれの処理時間でも 3 倍体の出現が認められ、その出現率は、処理時間が 5、10、15 分の区でそれぞれ 81.8、92.9、100.0% であった (図 2 上)。UV 照射精子で受精した群では、対照区では半数体が 89.5% を占めたのに対し、低温処理区ではいずれの処理時間でも 2 倍体の出現が認められ、その出現率は、処理時間が 5、10、15 分の区でそれぞれ 100.0、84.2、93.3% であった (図 2 下)。相対ふ化率については処理時間による差は認められなかった。以上の結果から、第二極体放出阻止に適した低温処理条件は、「受精後 3 分、処理温度 0、処理時間 5 ~ 15 分間」が適していると結論した。

通常精子による受精後の低温処理条件の検討



UV 照射精子による受精後の低温処理条件の検討

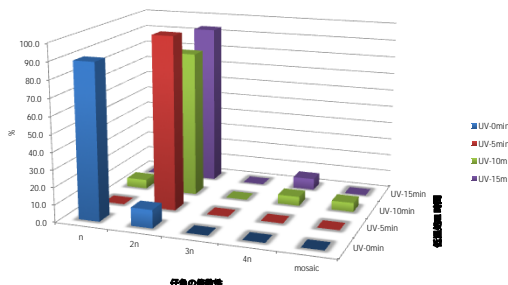


図 2. 通常精子 (上) および UV 照射精子 (下) で受精後、低温処理により得られたふ化仔魚の倍数性

(3) 第一卵割阻止によるゲノム倍加を可能にする高压処理条件の解明

種々の条件で高压処理を行った結果、受精後 40 分および 45 分に、圧力 650 および 750 kgf/cm²、処理時間 4 分間の条件時のみ、ふ化仔魚の出現がみとめられた。それ以外の条件で処理した場合は、すべてふ化率は 0% であった。「受精後 40 分、圧力 650 kgf/cm²、4 分間処理」と「受精後 45 分、圧力 750 kgf/cm²、4 分間処理」によって得られたふ化仔魚の倍数性を調べたところ、どちらの処理においても高率で 4 倍体の出現が認められた (図 3)。相対ふ化率は、いずれの条件においても 21.2% であった。以上の結果から、第一卵割阻止に適した高压処理条件は、「受精後 40 ~ 45 分、圧力 650 ~ 750 kgf/cm²、処理時間 4 分間」が適していると結論した。

通常精子による受精後の高压処理条件の検討

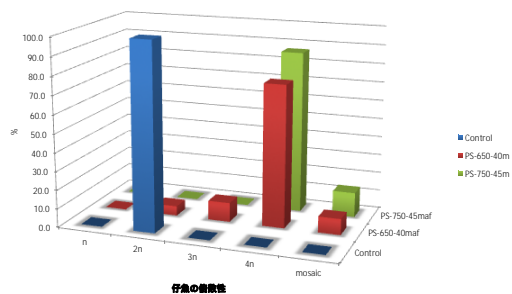


図 2. 通常精子で受精後、高压処理により得られたふ化仔魚の倍数性

以上、本研究の成果により、ニホンウナギにおいて 2 世代でクローン系統作出を可能にする雌性発生条件について明らかにした。今後は、本成果を活用することにより、短期間で遺伝的に均一な人工種苗を生産することが可能となるだけでなく、染色体操作魚をゲノム解析のバイオリソースとして利用することが可能となった。特に、UV 照射精子による受精と高压処理による第一卵割阻止の組み合わせによって得られる完全ホモ接合 2 倍体 (ダブルハプロイド) は、効率的なゲノム解析の材料としての利用価値が高いと考えられる。

このように、本研究によって得られた成果は、今後、学術的にも育種学的にも広範に活用されることが期待される。

5．主な発表論文等

6．研究組織

(1)研究代表者

野村 和晴 (NOMURA, Kazuharu)

国立研究開発法人水産総合研究センタ

ー・増養殖研究所・主任研究員

研究者番号：90372044