

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380113

研究課題名(和文) マナマコの新しい人工受精法の開発と育種への応用

研究課題名(英文) Development of a new artificial fertilization method of the Japanese sea cucumber and its application to aquaculture

研究代表者

山野 恵祐 (Yamano, Keisuke)

独立行政法人水産総合研究センター・増養殖研究所・主幹研究員

研究者番号：10372020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：熟したマナマコ卵巣をクビフリンを含む海水中で培養することで成熟卵を作出できる手法を確立した。成熟卵は速やかに受精することで90%以上が正常幼生へと発達するが、時間経過とともに、幼生に奇形が生じることを明らかにした。

凍結精子の作成法に取り組み、2万粒の卵に媒精したときに概ね80%以上の受精率が得られる凍結手法、人工授精手法を確立した。

生体外卵成熟手法と凍結精子法を用いて産卵期の異なる北海道、三重のマナマコ間で交配試験を行い、有用な経済形質である疣足数、疣足高に遺伝性があることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We established the method to obtain mature eggs of the Japanese sea cucumber by incubating ripe ovaries in seawater containing 10-100nM cubifrin for 90 min. The mature eggs of >90% developed normally when immediately fertilized after the production of mature eggs. However, delayed fertilization increased the percentage of abnormally larvae because of polyspermy at fertilization and abnormal cleavages during embryogenesis.

By examining various conditions such as cryoprotectant, speed of freezing, the method for cryopreservation for sea cucumber sperm was established to obtain >80% fertilization rate.

Cross breeding between Hokkaido and Mie sea cucumber was performed by using above two methods. Morphological features of spines on the skin such as their number and height, which are economical important traits, were estimated to be genetically influenced.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：増養殖 ナマコ類 種苗生産 繁殖生理

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) マナマコ種苗生産の問題点

マナマコから採卵する場合、親マナマコを繁殖時期(九州~中部日本では3-5月、北海道では6-8月)に漁獲し、自然海水温より5°C程度高い水槽に収容して放卵、放精を誘発している。しかし、雌雄や成熟度の判別法がないこと、昇温刺激による産卵誘発の有効性が低いことから、数百個体に対して産卵誘発を行い、数個体が産卵するに過ぎない状況にある。このため育種する上で欠かせない特定の親から子供を得るということができない技術レベルにある。

### (2) 産卵ホルモンの発見

研究代表者は九州大学等との共同研究で、マナマコ神経から放卵、放精誘発活性をもつペプチドを2008年に発見し、これを「クビフリン」と命名した(1, 2)。クビフリンを成熟個体に投与すると、特有の繁殖行動を誘起し、60-80分後には放卵あるいは放精が始まる。さらにクビフリンとともに卵巣小片を生体外で培養すると、約1時間後に卵成熟(減数分裂が再開し受精可能な卵となる卵発達の最終過程)が起こる。無脊椎動物から、生殖腺刺激ホルモン様の卵成熟誘起作用をもつ生理活性物質が同定されたのは、ヒトデ類の生殖腺刺激物質(GSS)に次いで2例目である。

### (3) クビフリンを用いた新しい人工受精法の可能性

このようにクビフリンを用いれば培養器内でマナマコの成熟卵を得ることができるが、このことは生体外で成熟した卵を利用して人工受精さらには種苗生産を行うことができる可能性を示している。魚類の人工受精法では、体内で既に卵成熟・排卵した卵を搾出して利用しているが、この研究で開発するマナマコの手法では、未成熟卵の段階で生体外に取り出し受精可能な卵を作出する点からも、これまでにない画期的な新しい人工受精法となる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はマナマコ養殖の発展のために(1)効率的な採卵技術を開発すること、(2)養殖用品種として有用な形質の遺伝性を検証することである。

### (1) 新しい採卵技術の開発

#### 生体外卵成熟誘起法の開発

研究代表者らが見出したマナマコの卵成熟誘起ホルモンを用いて、生体外で卵成熟を誘起し、受精可能な成熟卵を得る手法を開発する。

#### 凍結精子作成法の開発

マナマコの精子を凍結保存する手法を開発し、有用形質を持った個体の精子を保存できるようにする。さらに生体外で卵成熟した卵と凍結保存した精子を用いて体外受精できるようにする。

### (2) 疣足形状の遺伝性の検証

北日本の体表に多数の大きな棘状突起(疣足)を有するマナマコは中国市場において高く評価され高値で取引されている。本研究で開発する生体外卵成熟誘起法と凍結精子を用いることで、産卵期の異なる北日本と三重県産のマナマコ間で交配試験を行い、疣足形状の遺伝性を検証する。

## 3. 研究の方法

本研究を(1)生体外受精卵作出法の開発、(2)精子凍結保存法の開発、(3)体表突起の形状の遺伝性の解析、の3つの小項目に分けて実施する。

### (1) 生体外受精卵作出の開発

本小項目では、マナマコ卵巣をクビフリンとともに生体外培養することで、受精、発生可能な成熟卵を作り出す手法を開発する。

適正な卵成熟誘起、受精条件を明らかにするために、種々の卵成熟誘起条件で作出した成熟卵や異なる受精条件で受精した場合の、受精率や正常発生率を調べる。

また、クビフリン処理後の卵減数分裂の進行に関する細胞学的な解析、卵の減数分裂の進行段階と受精の成立の関係、さらにはその後の胚の発生能への影響を細胞学的に明らかにする。

### (2) 精子凍結保存法の開発

精子凍結に用いる希釈液の組成や凍害防御剤の種類、濃度がマナマコ精子の運動性や凍結、解凍後の精子運動性に与える影響、凍結速度が解凍後の精子運動性に与える影響等を検討し、最適なマナマコ精子凍結保存法を確立する。

また凍結精子を用いて受精する場合の、凍結精子と卵の割合等を検討し、より高い受精率、正常幼生発生率が得られる受精方法を確立する。

### (3) 体表突起の形状の遺伝性の解析

疣足の形状の遺伝性を明らかにするために、突起の数、高さ等を指標として疣足を定量的に評価する手法を確立する。また北海道系と本州系のマナマコの間で同系、異系の交配を行い、家系間で疣足の数や大きさを比較し、親マナマコの産地との相関を解析する。

## 4. 研究成果

### (1) 生体外受精卵作出の開発

16-20の異なる温度条件下でマナマコ卵巣をクビフリンとともに培養したときの、卵成熟、減数分裂の進行過程を明らかにした。18°Cでは核膜消失は培養開始後約45分、第一極体放出は80-90分、第二極体放出は150-160分で起こった。この進行過程は、温度に依存して、すなわち16°Cではより遅く、20°Cではより起こった。またほとんどの卵生生物と異なり、マナマコ卵は卵成熟過程において減数分裂を再停止しないことが判明した。次いで卵成熟後30分と卵成熟後3時間経過した卵を用いて受精し、第一卵割まで細胞学的な変化を追跡した。30分後受精群では、

受精後 90 分で卵核、精子核の融合、150 分で核分裂、180 分で細胞分裂が観察された。3 時間後受精群では、それぞれ受精後 60 分、120 分、150 分に観察された。

クビフリンによる卵成熟誘起開始後 1.5-5 時間に受精した結果、時間経過に伴い受精率、ふ化率、正常幼生率が低下した。特に正常幼生率の低下は顕著であった。卵割停止、多精等が高率に観察され、卵成熟後は短時間のうちに多精拒否、細胞分裂の機構の劣化が進むと考えられた。一方、完熟した親を 15 で産卵抑制して飼育し、適宜卵質の評価を行ったところ、完熟後の日数(約 2 ヶ月まで)と正常幼生率等には有意な相関はなく、低温飼育することで良質卵を長期的に作出できることが判明した。

生体外卵成熟誘起法の条件について、摘出した卵巣の保存温度、卵成熟誘起時の培養液の pH 及び適正クビフリン濃度等を検討した。その結果、摘出した卵巣は 15 の海水中で 6 時間保存可能なこと、卵成熟誘起時の培養液は pH7.5-9、クビフリン濃度は 10-100nM が適していることが明らかとなった。

以上のような成果をとりまとめて、最適な生体外卵成熟誘起法を確立した。熟した卵巣を 10nM クビフリン海水溶液中で 18 - 20 で 90 分間培養することで卵巣 1g 当たり約 2 万粒作出可能である。作出した成熟卵は速やかに受精することで、放卵によって成熟卵を得た場合と同様に、90%以上の正常幼生率を示す。

#### (2) 精子凍結保存法の開発

マナマコ精子の凍結保存条件の良否を判定するための手法と凍結保存用溶液の組成について検討を行った。まず、マナマコ精子の運動活性化条件とその測定条件について検討し、アルブミンに精子活性化作用のあることを明らかにし、このアルブミンを加えた人工海水(ASW)で精子を希釈すると、新鮮精子では希釈 10 分後に、凍結解凍精子では 1 分後に運動活性がピークになることが明らかとなった。次に画像解析装置でマナマコ精子の運動を正確に自動測定するための種々の条件(運動精子と非運動精子の判定基準、運動速度や運動直線率を測定するためのフレーム数等)を明らかにした。また、マナマコ精子を凍結保存する際の希釈溶液として、20%ジメチルスルフォキシド+18%ウシ胎児血清+64%ASW が適していることが明らかとなった。

精液を 0 の保存液で 10-20 倍に希釈し、冷却速度を -10 /分、液体窒素に浸漬前の到達温度を 50 とした場合に、解凍後の精子運動率は最も高い値を示した。マイクロプレートを用いた受精試験では、卵 200 粒に対して解凍精子数 5000 万(凍結前精液量で 5  $\mu$ l)の時に、高い受精率が得られた。この媒精時の卵と精子量の比率を変えずに 1 万粒まで受精試験をした結果、受精率に有意な差はなかった。また精子の凍結保存耐性には用いた親

個体による差があること、受精時 1.5%以上の DMSO の混入は顕著な受精率の低下を招くことが判明した。

また精子凍結法の条件について、凍害防御剤の種類、解凍精液へのアンモニア、カオトロピック薬剤等の添加の影響等を検討した。その結果、凍害防御剤としてメタノールを用いた場合、濃度 10%で凍結速度を -12 /分とした場合に最適であることが判明したが、DMSO を用いて凍結した場合と比較すると受精率がやや劣ることが判明した。解凍精液へのアンモニアの添加は精子運動活性を向上させたが、授精に悪影響を与えた。一方カオトロピック薬剤では、NaBr に運動活性、受精率をやや向上させる効果が見られた。

以上のような成果をとりまとめて、生体外卵成熟誘起法で作出した成熟卵と凍結精子を用いて、2 万粒の卵に媒精し、概ね 80%以上の授精率を得る手順を確立した。

#### (3) 体表突起の形状の遺伝性の解析

北海道産マナマコと三重県産マナマコの間で交配試験を実施し、疣足形状の遺伝性を解析する家系を作成した。

三重県産雌と三重県産雄の 6 交配群(MxM)と三重県産雌と北海道産雄の 5 交配群(MxH)の F1 間で疣足の個数及び高さの比較を行った。疣足数は MxM が  $30.7 \pm 1.1$  に対して MxH は  $33.7 \pm 2.0$  だった。疣足高に対して体重の補正を行った疣足高指数は、MxM が  $0.99 \pm 0.03$  に対して MxH は  $1.20 \pm 0.07$  だった。

以上のことから北海道産マナマコの特性である疣足数が多いこと及び疣足高が高いことには遺伝性があると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

(1) Yamano, K., Fujiwara, A., Nakamura, A., Yoshikuni, M. (2013) In vitro induction of oocyte maturation in the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus* by cubifrin and the developmental ability of the eggs, *Fisheries Science* 79, 823-832. (査読有)

(2) 山野恵祐、藤原篤志、吉国 通庸 (2013) 生理活性ペプチド(クビフリン)を用いたマナマコの採卵技術の開発、*水産学会誌* 79, 782 - 784. (査読無)

[学会発表](計 10 件)

(1) 山野恵祐、藤原篤志、吉国通庸、マナコ類における卵成熟誘起関連因子の共通性と特殊性、平成 25 年度比較内分泌学会、2013 年 10 月 25 日

(2) Yamano, K., Fujiwara, A., Yoshikuni, M., Induced spawning in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* by neuropeptide, cubifrin, UJNR Symposium, 札幌市、2013 年 10 月 10 日

- (3) 山野恵祐、藤原篤志、吉国通庸、生理活性ペプチド(クビフリン)を用いたマナマコ採卵技術の開発、平成 25 年度日本水産学会春季大会(招待講演)、2013 年 3 月 28 日
- (4) 水野裕太、山野恵祐、鶴沼辰哉、太田博巳、精子活性化物質がマナマコ凍結保存精子の運動能や受精能に及ぼす影響、平成 25 年度日本水産学会春季大会、2013 年 3 月 27 日
- (5) 山野恵祐、甲斐涉、中村洋路、安池元重、重信裕 弥・藤原篤志、吉国通庸、種々のマナマコ類のクビフリン遺伝子と卵成熟誘起作用、平成 25 年度日本水産学会春季大会、2013 年 3 月 27 日
- (6) 水野裕太、山野恵祐、太田博巳、マナマコの凍結保存精子を用いた人工授精、平成 24 年度日本水産学会春期大会、2012 年 3 月 27 日
- (7) 水野裕太、山野恵祐、太田博巳、マナマコの精子凍結保存方法、平成 23 年度日本水産学会秋季大会、2011 年 9 月 29 日
- (8) 山野恵祐、中村昭文、藤原篤志、クビフリンを用いた in vitro 卵成熟誘起によるマナマコ採卵技術の開発-III、平成 23 年度日本水産学会秋期大会、2011 年 9 月 29 日
- (9) 山野恵祐、吉国通庸、マナマコの卵成熟を誘起するホルモンの発見と採卵技術への活用、日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 21 日
- (10) 山野恵祐、藤原篤志、中村昭文、吉国通庸、クビフリンを用いた in vitro 卵成熟誘起によるマナマコ採卵技術の開発-II、平成 22 年度日本水産学会秋期大会、2010 年 9 月 23 日
- (11) 水野裕太、山野恵祐、太田博巳、マナマコの精子活性、平成 23 年度日本水産学会春期大会、2010 年 3 月 28 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

平成 24 年度水産学技術賞受賞、「生理活性ペプチド(クビフリン)を用いたマナマコ採卵技術の開発(山野恵祐・藤原篤・吉国通庸)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山野 恵祐 (Yamano, Keisuke)

(独) 水産総合研究センター・増養殖研究所・養殖技術部・主幹研究員

研究者番号：10372020

### (2) 研究分担者

太田 博巳 (Ohta, Hiromi)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：10351579