

## 魚類のクローン化技術とその実用化に関する最近の動向 —主としてヒラメのクローン化技術について—

兵庫県立水産試験場 田畑和男

### クローン化が研究されている魚種

魚類のクローンは雌性発生法により誘起されるが、第一段階として全遺伝子座がホモ型化されたいわゆるホモ型魚（第一卵割阻止型雌性発生二倍体）を誘起する必要がある。魚類で最初にホモ型魚が誘起された種類はゼブラフィッシュである（Streisinger ら、1981）。メダカ（Naruse ら、1985）を含めてこれらの種類は実験魚であって養殖生産や育種を目的としたものではない。養殖魚を対象としたものではニジマス（Chourrout、1984）、サクラマス（Onozato、1984）から始まり、淡水魚ではナイルティラピア（Mair ら、1987）、アユ（Taniguchi ら、1988）、イワナ（Arai ら、1989）、コイ（Komen、1991）、アマゴ（Kobayashi ら、1994）があり、海産魚ではヒラメ（田畑・五利江、1988）が最初の作出例であり、つぎにマダイ（Sugama ら、1990）がある。

以下にヒラメを例にして述べる。

### クローン作出のための種親(同祖接合型(ホモ型))ヒラメの作出と特性

ホモ型ヒラメは初代のクローン作出のための種親として必要である。ホモ型ヒラメは染色体セット操作の一種である第1卵割を阻止する方法で作出される。そのためホモ型ヒラメは第1卵割阻止型雌性発生2倍体ともよばれる。ホモ型ヒラメの一大特徴は、第2極体放出阻止型雌性発生2倍体の染色体(遺伝子)には異祖性のものが含まれるのに対して、染色体が同祖型になるため遺伝子もすべて同祖型になることである。これは1代で全遺伝子がホモ型化し純系として固定化されるということを示している。通常の交配で純系を作るためには20代の兄妹交配をくり返すことが必要であるといわれていることから、いかにホモ型ヒラメの価値が大きいかがわかる。ホモ型ヒラメのもう一つの重要な特徴は、1個体の通常発生ヒラメから作出された多数のホモ型ヒラメの染色体構成が1個体ごとにすべて(とっていいほど)異なることである。これは変異の拡大が起こることを意味し、育種的に重要である。ミニサテライトプローブを用いたDNAフィンガープリント法を利用してDNAバンドの共有率(BSI)を比較することによって数値的に変異の拡大状況を知ることができる。ごく最近、我々はより高感度なマイクロサテライト遺伝子を用いた方法によって変異の拡大現象を再確認した。この方法により、変異の拡大が予想以上に広範囲に起こっていることを可視的に理解できた。

ホモ型ヒラメ作出の証明法としては、雌親魚のヘテロ型遺伝子を持つ遺伝子座についてこの親魚から作出されたホモ型ヒラメの対立遺伝子がホモ型として1:1に分離することを確認することである。ただし、第2極体放出阻止型雌性発生2倍体においても遺伝子座によってはホモ型に分離するので、第2極体放出阻止型雌性発生2倍体では異祖性(ヘテロ型)の遺伝子の出現割合が極めて大きくなる遺伝子座を使うことが重要である。図1にIdhアイソザイム遺伝子による証明例を示した。ただし、アイソザイム遺伝子座では変異が少ないために本法を適用できる場合は多くない。そこで、現在、これと理論上同じであ

- る核 DNA のマイクロサテライト遺伝子座を利用して、いかなる場合においても証明ができるようにマニュアル化を急いでいる。

ホモ型ヒラメのマイナスの特性としては、作出率の低さがある。これは急激なホモ化のために劣性有害遺伝子が顕在化してくるためだと理解されている。多量の卵を生むヒラメではこの点はなんとかクリア可能である。そのほか、生殖腺の奇形化があるが、系統ごとの出現率に違いがあるようである。

### クローンの作出と特性

クローンはホモ型ヒラメから採った卵に再度雌性発生処理をすることによって得られる。このときの雌性発生処理は困難な第1卵割阻止型である必要はなく、容易な第2極体放出阻止型でよい。ホモ型ヒラメの染色体（遺伝子）はすべて同祖接合型であるので、染色体の乗り換えによる遺伝子の組換えが起こってもかまわないからである。ホモ型ヒラメまたはホモ型のクローン（ホモクローン）の一部をニセ雄化しておく、これと別の系統のホモ型ヒラメまたはホモクローンとの通常交配により、異祖接合型のクローン（ヘテロクローン）を作ることができる。図2には要約的にこれらクローンの作出法を示した。

クローンの証明には従来ミニサテライトプローブを用いた DNA フィンガープリント（図3）が使われてきたが、同一パターンが得られたとしても、これがクローン作出の必要条件にはなり得ても十分条件にはなり得ないことが最近分かってきた。十分条件としてはマイクロサテライト遺伝子座（アイソザイム遺伝子も含む）を用いて、クローンのホモ性（ヘテロクローンの場合にはヘテロ性）と親として利用したホモ型ヒラメのホモ性の確認をとることが必要である。この場合、さらにホモ型ヒラメの雌親魚（初代クローンからみれば祖母魚）の遺伝的情報があれば一つの遺伝子座の検討で済むが、それが無い場合には多くの遺伝子座における検討（ホモ型化の証明）が必要になってくる。マイクロサテライト遺伝子を用いた、ホモ型化およびクローン化の証明法は、近々別報で詳しく述べる。予定である

クローンヒラメのふ化率は、ホモ型ヒラメの低さに比べると充分高く、通常発生ヒラメと比べてやや低い場合もあったが、採卵のタイミングさえ間違わなければ、ほとんど通常発生ヒラメと差がないようである。

ホモクローンの雌出現率は調べたすべての群で100%であった。また、ホモ型ヒラメの自然発生雄と自然発生雌との交配により適水温下で全雄が生じている。通常発生ヒラメでは普通そういうことはない、親魚のホモ型化によって性決定に関係する遺伝子の分離が進んだのが原因であると思われる。この現象は通常のヒラメの性決定に関係する遺伝子が単一ではないことを示唆しており、今後さらに研究する価値のある興味ある問題である。

### クローンの利用

クローンの維持は、第2極体放出阻止型の雌性発生処理をくり返すことでも可能であるが、ホモクローンの一部をニセ雄化しておき、これと同系統のホモクローンとの通常交配によっておこなう方法が簡単である。また、ニセ雄は別系統のクローンとの交配によるヘテロクローンの大量作出にも利用できるという利点もある。なお、兵庫水試では、初代ク

クローンを親にした2代目クローンを作出し、初期の飼育まではおこなっているが、それ以上の飼育特性については確認していない。ともあれ以上の方法によって、クローン系統の維持は理論的には可能であろうが、純系の脆弱さがおもわぬ環境の変化によっては出るおそれもあり予断を許さない。

有用形質の遺伝的固定にホモ型ヒラメクローンを使う方法は遺伝的には完璧であるので、上記のような不安材料があるにもかかわらず、開発研究を続けているわけである。現在、兵庫水試で実施している課題は、ヒラメの養成時に頻発し、死亡率も高いエドワジェラ症という疾病に対して耐病性を持つ系統と、性分化期における高水温下においても雄化しにくい系統を見つけだし、それらをクローン化により遺伝的に固定するというものである。平成8年度から水産庁の補助事業により兵庫水試のほか山口県内海水試、神奈川県水産総合研究所、熊本県水産研究センター、北海道中央水試によってもヒラメを対象にしたクローンの研究がおこなわれている。

有用形質として認識される形質はそのほとんどが量的形質で、その遺伝的背景は、ポリジーン（個別的には作用が弱いが多数が補足し合い量的形質の発現に関係する遺伝子）によっているといわれている。さらにその発現はポリジーンと環境の相互作用の結果によっていることに加えて、魚類は全面的に環境の影響を受ける変温動物であるために、遺伝的固定化は額面どおりには進まない面も多い。

クローンの遺伝分散がゼロであることを利用すると、クローンを使ってある形質の発現に対する遺伝と環境の影響を知ることができる。成長量等の計量形質に対しては、この方法を比較的簡単に利用することができるが、疾病による死亡率等の悉無形質に対しては多くの試験群を全く同条件で飼育するということが必要なのでかなり困難な仕事になる。とはいえ、遺伝的背景が異なる通常発生ヒラメを使っておこなうよりはるかに単純化できることは確かである。

そのほか、体色の白化率、脊椎骨の異常率、左右逆位率についても興味ある結果が得られた。これらの形質は遺伝的要因以外に環境の影響を受ける、感受性因子によるものと考えられている。特に白化に関しては、最近、栄養学的知見から配合飼料の改良が急速に進んだために白化は出にくくなったが、逆に無眼側の黒化や骨異常の多発が問題となっている。ごく最近、我々は白化が極めて起こりやすい系統とその逆の白化が起こりにくい系統をクローンとして分離することに成功した。このことは、育種によってさらに骨異常の出にくい系統を作り出すことができる可能性もあることを示唆している。こういった系統を養殖用品種として使うことになれば、種苗の付加価値を増加させることになる。さらに、実験魚として使うことによって栄養学的研究の精度が上がることも期待される。

クローンの成長特性に関して、同時期に作出したホモクローンとヘテロクローンの成長比較を図4に示した。ヘテロクローンの成長の優位性は明らかである。ヘテロクローン化することによって種苗としての安定性が増すことが期待されるデータである。先述したように別系統のクローンと交配することによって養殖用種苗としてのヘテロクローンを生産することになっていくものと思われるが、それぞれのクローンが別の有用形質を持った系統であることがさらに新しい付加価値を付けるのに役立つものと思われる。

形質を遺伝的マーカーによって識別したり、品種を識別したりすることは育種の新しい手段であるので、魚類の場合もその方向に向かっていることは確かである。その一つに多

くのマイクロサテライト遺伝子座を使って形質との関連性を見つけていくという方法があるが、この場合にもクローンを使うことは遺伝解析に対して極めて有利である。

## 参考文献

### 最近の総説

- ・ 荒井克俊：染色体操作. 魚類の DNA (青木宙ほか編編), 恒星社厚生閣, 東京, 1997, 32-62.
- ・ T. J. Pandian and R. Koteeswaran: Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia* 384, 167-243 (1998).

### ヒラメの文献

- ・ 田畑和男：ヒラメの染色体操作に関する研究. 兵庫水試研報, (28), 1-134 (1991).
- ・ Kazuo Tabata: Induction of gynogenetic diploid males and presumption of sex determination mechanisms in hirame *Paralichthys olivaceus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(5), 845-850 (1991).
- ・ Kazuo Tabata: Reduction of female proportion in lower fish separated normal and feminized seedlings of hirame *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*, 61(2), 199-201 (1995).
- ・ 田畑和男・水田 章：ヒラメ雌性化種苗の生産マニュアル, 兵庫県立水産試験場, 明石, 1996, pp.1-46.
- ・ Kazuo Tabata and Akira Mizuta: Cryopreservation of sex reversed gynogenetic female sperm in hirame. *Fisheries Science*, 63(3), 482-483 (1997).
- ・ Kazuo Tabata and Akira Mizuta: The present situation and points at issue in breeding by chromosomal set manipulation in hirame *Paralichthys olivaceus*. *Bull. National Res. Inst. Aquaculture*, Supplement No. 3, 43-52 (1997).
- ・ 山本栄一：ヒラメの人為的性統御とクローン集団作出に関する研究. 鳥取水試報告, (34), 1-145 (1995).

## 図の説明

図1 雌性発生2倍体の *Idh* 遺伝子の動き：AB型の雌親魚から誘起されたI型〔第2極体放出阻止型雌性発生2倍体〕はすべてAB型になるが、II型（第1卵割阻止型雌性発生2倍体）はAA、BB型のホモ型が1：1の比率で出現する。

図2 ヒラメのクローン作出フロー

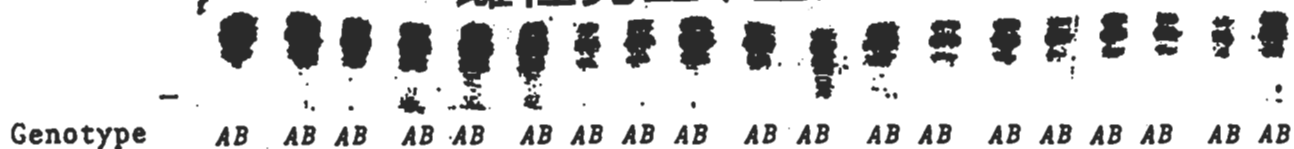
図3 クローンヒラメのDNAフィンガープリント：ホモ型クローン群（Homo）はホモ型雌親魚（M）ともクローンであり、ヘテロ型クローン群（Hetero）はホモ型雌（M）雄（F）親魚のDNAをすべて持っている。

図4 ヒラメのホモ型クローンとヘテロ型クローンの成長比較

# 通常発生



# 雌性発生(I型)



# 雌性発生(II型)

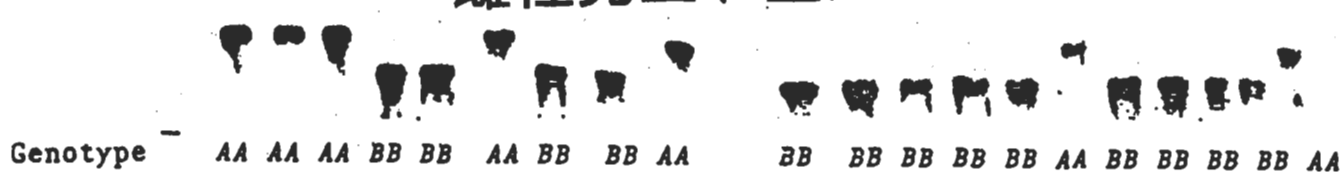


図1

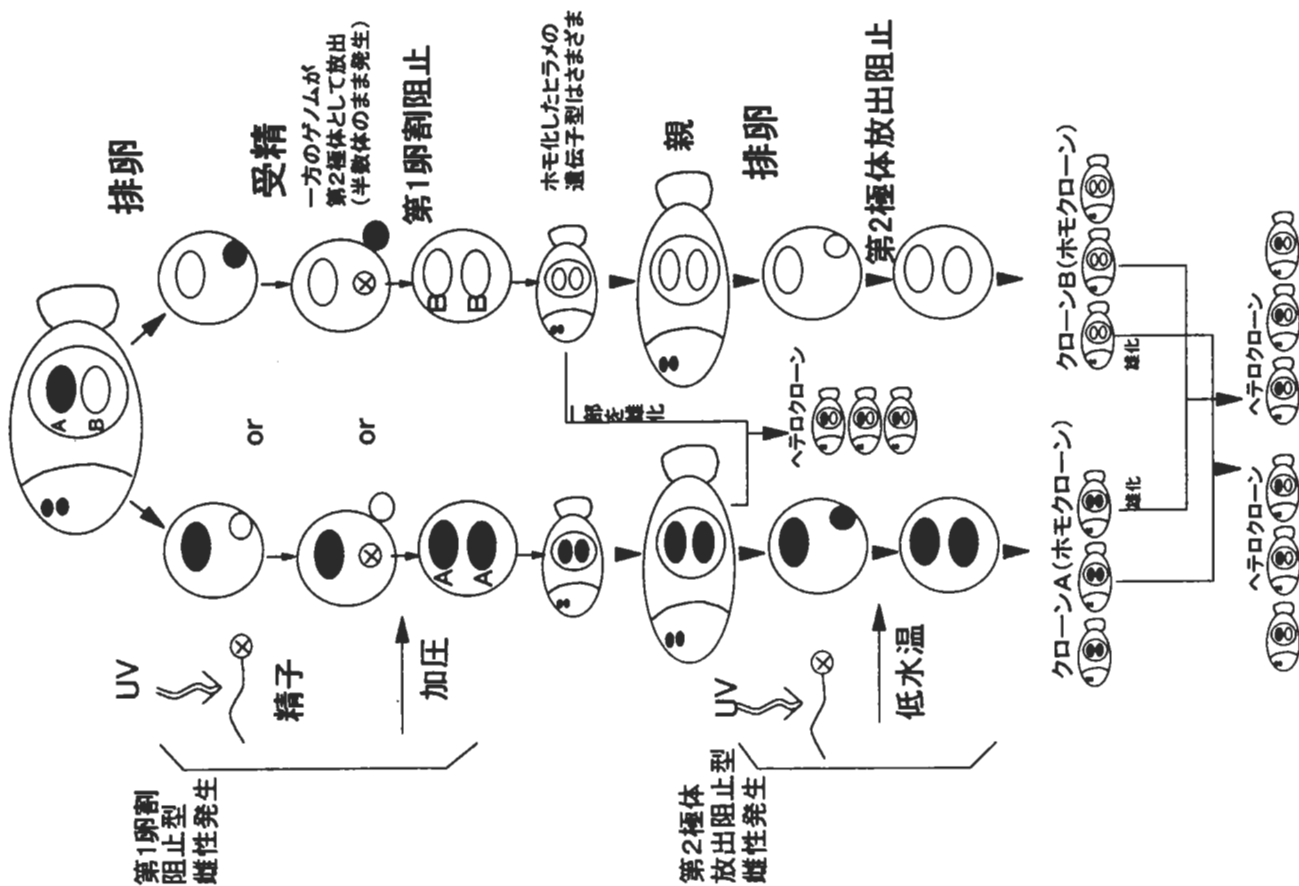


図2 ヒラメのクローン作出フロー(田畑原図)

図3

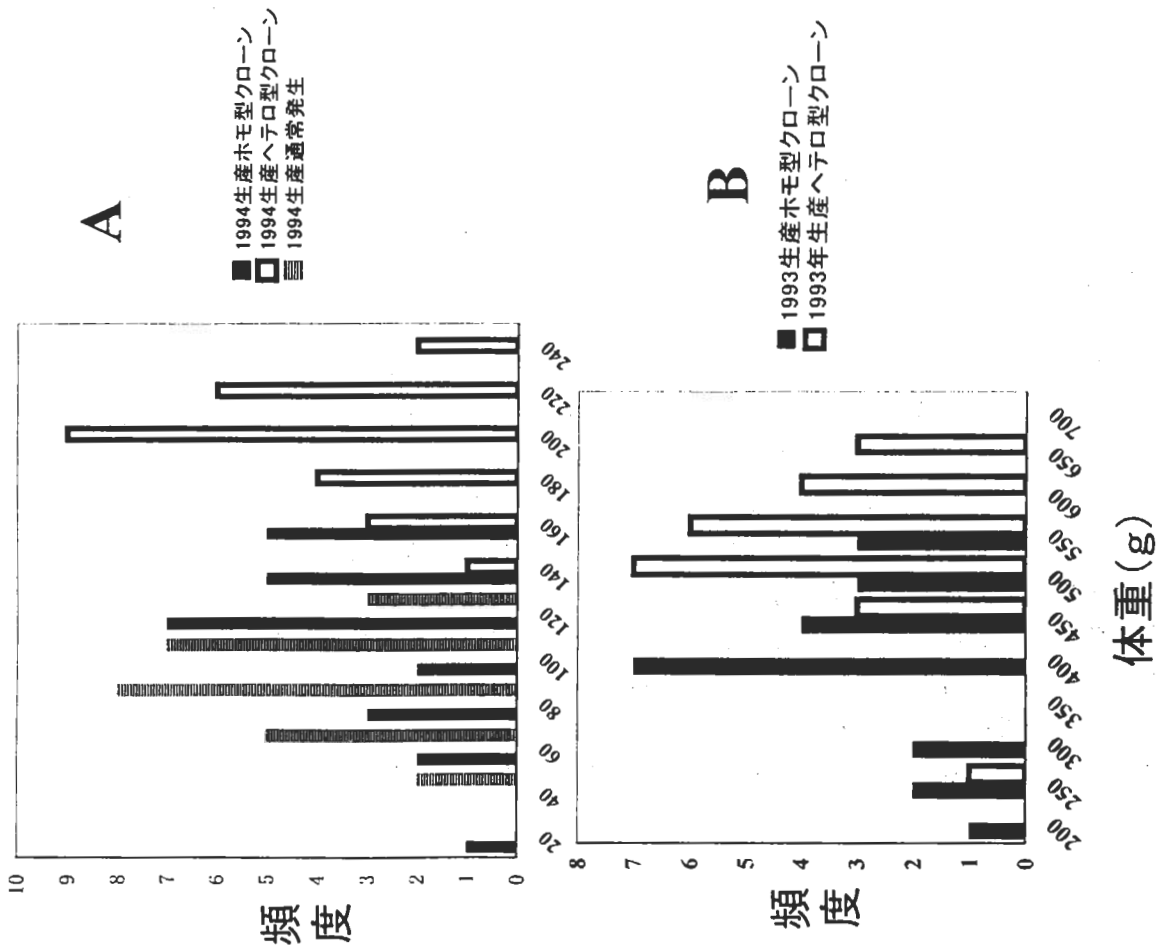
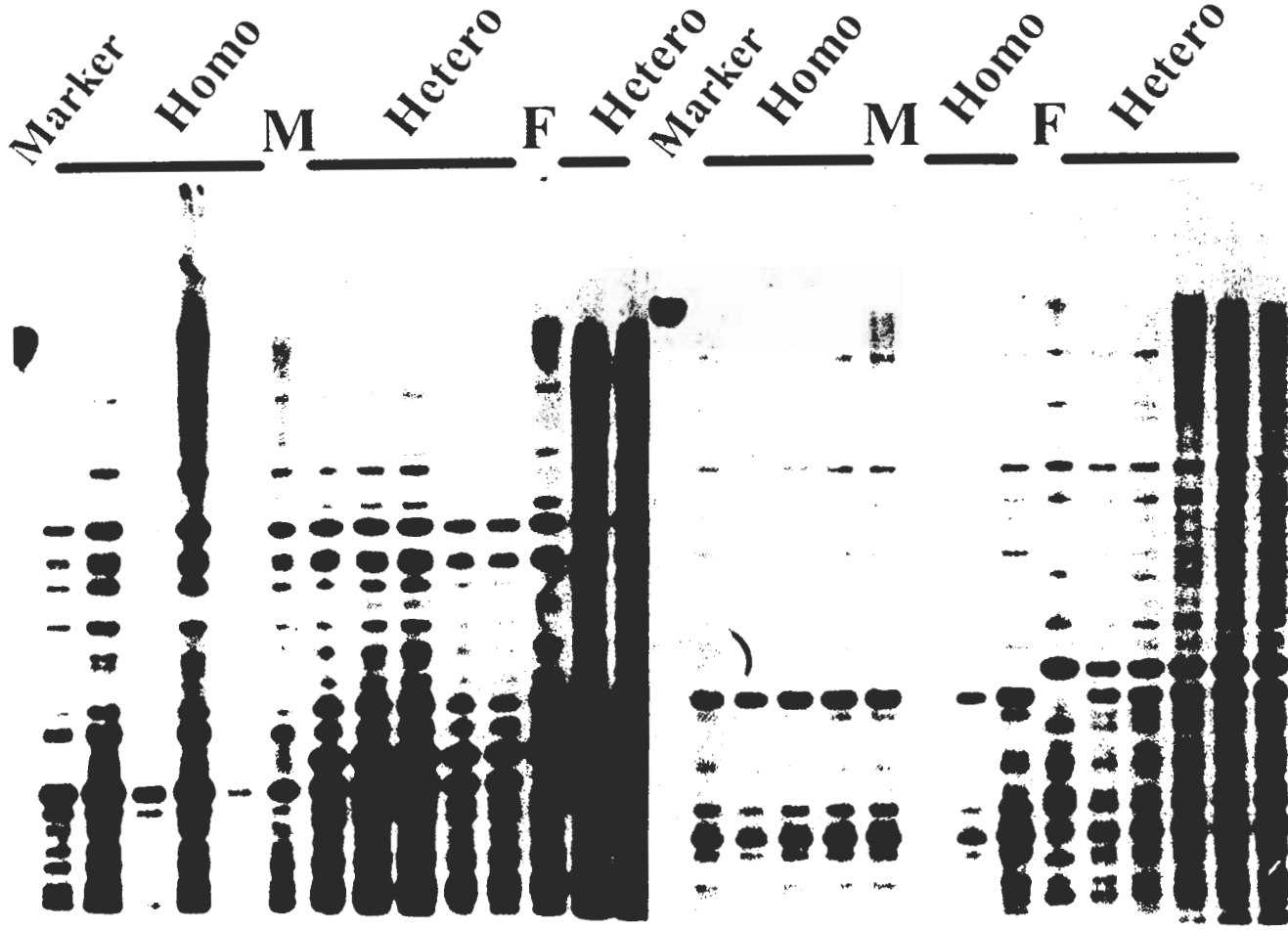


図4 ホモ型クローンとヘテロ型クローンの成長比較