

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450270

研究課題名(和文) 純系養殖品種作出のための簡易な卵割阻止法の開発 - 微小管の再生メカニズムの解明 -

研究課題名(英文) Development of a simple method to suppress the cleavage for the production of purely cultured cultivars - Elucidation of microtubule regeneration mechanism -

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) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：ホンモロコ受精卵に高温処理を複数回施すことにより効果的に卵割阻止を誘導する条件を明らかにするとともに、この操作による倍数化の細胞学的メカニズムを検討した。その結果、水温20℃で培養した通常発生受精卵の卵割を40.5℃1分間の高温処理によって阻止するには、受精後25分の第一卵割前期に1回目の処理を施し、その終了15分後に再び同高温処理を施すことで高頻度に倍数化が成功(孵化仔魚の46%)することが分かった。この処理条件では、既報のような第二卵割阻止でなく、2回目処理完了直後の第一細胞周期時点で単極紡錘体を形成し、染色体は分離せずに1極に集まることで第一卵割が阻止されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Conditions for the efficient suppression of the cleavage of fertilized eggs of honmoroko by multiple times of heat shock treatment (HST) and the cytological mechanism of the polyploidization by this manipulation was elucidated. In order to prevent cleavage of normally fertilized eggs cultured at 20°C by HST at 40.5°C for 1 minute (min), it was found that the first treatment should be conducted 25 min after the fertilization (the prophase of the first cleavage), and that second treatment should be conducted 15 min after the end of the first treatment. Then polyploidization will be done successfully with high frequency (46% of hatched larvae). Under this treatment condition, it was revealed that the first cleavage was prevented with formation of a monopolar spindle at the first cell cycle immediately after the second treatment, and the daughter chromosomes could not be separated, and gathers to one pole.

研究分野：魚類の育種学、細胞工学

キーワード：卵割阻止 高温刺激 四倍体 倍数化 単極紡錘体 中心小体 完全同型接合体 クローン

1. 研究開始当初の背景

魚類における染色体操作は、水産育種分野の発展に大いに貢献すると期待されている。現在のところ、倍数化にはそのタイミングにより「極体放出阻止」および「卵割阻止」の二通りの方法があり、作出される個体の遺伝性はそれぞれ異なっている。この倍数化には水温・水圧などの物理的刺激が用いられる (Thorgaard et al. 1981; Streisinger et al. 1981)。特に卵割阻止を施せば、通常発生卵では四倍体、雌性発生卵または雄性発生卵ではホモ接合型の二倍体を誘導することが可能とされ、得られたホモ接合型二倍体の配偶子を用いて再度雌性発生と倍数化処理を行うことで、わずか2世代でクローン作出が可能となる (Kobayashi et al. 1994; 小野ら 2000)。これまで選抜育種には膨大な時間と労力が費やされてきたが、この卵割阻止技術を用いることで、純系養殖品種を短期間に多数作出することができることから、本方法には品種改良のための起爆剤の効果が期待されてきた。また、通常発生の卵割阻止で作出される四倍体は、その配偶子を用いて二倍体と交配すると効率よく三倍体が作出される。さらに、交雑発生の卵割阻止で作出される複二倍体は、通常交雑発生では不稔を示してしまう組み合わせの雑種を世代交代可能な系統の作出につなげる可能性を秘めている。このように、卵割阻止には多くの特筆すべき利点があり、これまでそれぞれの倍数化の最適条件が検討されてきた。しかし、比較的容易な第二極体放出阻止と比較し、卵割阻止は極めて困難であるとされている。ところが、ニジマスにおいて高温処理を2回行った場合に卵割阻止の効率の向上が報告されている (桑田 1998)。

2. 研究の目的

本研究では、ホンモロコの受精卵に、水圧処理よりも凡庸性の高い高温処理を複数回施すことによって、より効果的な卵割阻止の誘導条件を検討するとともに、この操作による倍数化の細胞学的メカニズムを解明するため、高温刺激処理前後およびその後の経過における分裂装置および核の動態を観察した。

3. 研究の方法

高温処理は、水温 20 で培養した受精卵を水温 40.5 に保った水槽に1分間浸漬することで行った。2回の高温処理のうち、1回目の処理開始時間はそれぞれ受精後 15、20、25、30、35分 (15AF, 20AF, 25AF, 30AF, 35AF) とし、2回目は各1回目処理完了の 5、10、15分後とした。処理後の卵は、ただちに水温 20 の水槽に戻した。処理後、それぞれの時期における卵内の分裂段階等の細胞学的観察を行うため、様々なタイミングで Bouin 固定液 (飽和ピクリン酸 : ホルマリン液 : 酢酸 = 15 : 5 : 1) に 24 時間浸漬して固定し、そ

の後細胞学的観察に供した。まず、1回目処理の各開始時間に処理を行っていない卵を対照区として固定し、高温処理を1回のみ行った試験区は、処理直後、その5分後、10分後、15分後にそれぞれ固定した。高温処理を2回行った試験区は、2回目処理の直後、その5分後、10分後、15分後、20分後、25分後をそれぞれ固定した。卵の受精後1日の生死を目視によって判定し、その生存数の供試卵数に対する割合を受精1日後生存率として算出した。また、それらが孵化 (受精後約7日) した個体の数を記録して、孵化数の供試卵数に対する割合として孵化率を算出した。すべての実験区を比較するため、すべて実験時の対照区の値 (受精1日後生存率および孵化率) を平均し、その平均値に対する各実験の対照値の倍率をもとに各実験区データの値を標準化した。この値により、各実験条件での受精1日後生存率および孵化率の平均値の差の有無を比較検討した。孵化した仔魚は 99.5% エチルアルコールで固定した後、フローサイトメーターにより倍数性を判定した。標本仔魚の1細胞あたりの DNA 相対値をニジマスのそれと比較することによって測定し、各個体の倍数性を判定した。本研究では上記で固定された卵のうち、最も倍数化成績の良かった 25AF のシリーズをそれぞれ脱水・透徹し、パラフィンにより包埋した後、ミクロトームで 10 μm 厚の薄切切片を作製した。これらをヘマトキシリン・エオシンで染色して組織切片標本とし、卵内の組織学的観察を行った。

4. 研究成果

(1) 生存率および孵化率

各実験区の生存率は、15AF~35AF の全ての倍数化条件の間で顕著な差は認められなかったが、すべての条件での受精1日後生存率の平均値が 58.6% である中で、いずれのタイミングで1回目高温処理を行った場合も S05 (1回目処理完了の5分後に2回目処理を行った場合) の生存率は、比較的低い値 (15AF~35AF でそれぞれ 34.3%、54.0%、51.9%、26.2%、63.1%) を示し、なかでも 15AF と 30AF で低くなる傾向があった。一方孵化率では (Fig. 2)、0-20AF に対して F15S05、F15S10、F30S15 のそれぞれは低い値を示した。0-20AF は各処理区の中で最も高い孵化率を示し (65.6%)、2回処理を行った区においては、15AF および 30AF は生存率同様低い傾向を示した (F15S05, 5.6%; F15S10, 6.4%; F15S15, 7.7%; F30S05, 9.8%; F30S10, 6.8%; F30S15, 5.2%)。

(2) 倍数化効果

各実験区の孵化時まで生存した個体の倍数性を分析したところ、無処理区では 2n が 15AF~35AF でそれぞれ 97.4%、97.0%、96.6%、92.4%、89.5% であった。どの実験区も 4n は出現せず、異数体 (3n) がそれぞれ 1.3%、0.2%、

1.1%、1.3%、4.0%であった。モザイクは 15AF で $n-2n$ (0.4%)、 $2n-3n$ (0.6%)、 $2n-4n$ (0.2%)、20AF で $n-2n$ (2.7%)、25AF で $2n-3n$ (1.7%)、 $2.5n$ (0.6%) であり、30AF と 35AF では出現しなかった。1 回処理を行った場合 (0-**) では、 $2n$ が 0-15AF~0-35AF でそれぞれ 89.1%、97.4%、97.8%、98.5%、89.7%であった。 $4n$ は 0-20AF のみで出現した (0.4%)。異数体はそれぞれ、3.0% ($3n$)、0.7% (n)、0.4% ($3n$)、1.1% ($3n$)、1.5% ($3n$)、7.7% ($3n$) が出現した。モザイクは 0-15AF で $n-2n$ (0.3%)、 $n-3n$ (0.3%)、 $2n-3n$ (2.4%)、 $2n-4n$ (0.3%)、 $n-2n-3n$ (3.7%)、 $n-2n-3n-4n$ (0.7%)、0-20AF で $n-4n$ (0.4%)、 $n-2n-3n$ (0.7%)、 $2n-3n-4n$ (0.2%)、0-25AF で $2n-3n$ (1.1%) であり、0-30AF と 35AF では出現しなかった。1 回目処理完了の 5 分後に 2 回目処理を行った場合、 $2n$ が F15S05~F35S05 でそれぞれ 79.1%、97.5%、95.9%、100%、72.2%であった。 $4n$ は F15S05、F20S05、F35S05 で出現し、それぞれ 7.0%、0.6%、5.6%であった。異数体は F30S05 以外の区で出現し、F15S05 からそれぞれ 2.3% ($3n$)、1.1% ($3n$)、4.1% ($3n$)、27.8% ($3n$)、5.6% ($5n$) であった。モザイクは F25S05 と F30S05 以外で出現し、F15S05 で $2n-4n$ (2.3%)、 $n-2n-3n$ (9.3%)、 $n-2n-3n-4n$ (2.3%)、F20S05 で $n-2n$ (0.8%)、 $2n-3n$ (0.8%)、 $2n-4n$ (0.3%)、 $n-2n-3n$ (0.3%)、 $n-2n-3n-4n$ (0.6%)、F35S05 で $2n-4n$ (5.6%) であった。1 回目処理完了の 10 分後に 2 回目処理を行った場合、 $2n$ が F15S10~F35S10 でそれぞれ 66.7%、88.8%、81.4%、100%、88.5%であった。 $4n$ は F30S10 以外で出現し、F15S10 からそれぞれ 11.9%、3.4%、6.7%、7.7% となった。異数体は F20S10 と F30S10 以外で出現し、F15S10 からそれぞれ 2.4% (n)、4.8% ($3n$)、2.0% ($3n$)、3.8% ($3n$) であった。モザイクは F30S10 以外で出現し、F15S10 で $1.5n-2n$ (2.4%)、 $2n-4n$ (4.8%)、 $n-2n-3n$ (7.1%)、F20S10 で $n-2n$ (2.2%)、 $2n-3n$ (2.2%)、 $2n-4n$ (3.4%)、F25S10 で $2n-4n$ (8.8%)、 $n-2n-3n$ (1.0%)、F35S10 で $2n-3n$ (3.8%) となった。1 回目処理完了の 15 分後に 2 回目処理を行った場合、 $2n$ が F15S15~F35S15 でそれぞれ 85.4%、16.6%、34.2%、100%、88.6%であった。 $4n$ は F30S15 以外で出現し、F15S15 からそれぞれ 2.3%、33.7%、43.3%、2.3% となり、F25S15 の倍数化率が最高値を示した。次いで F20S15 が高い値となった。異数体 ($3n$) は F25S15 と F30S15 以外で出現し、F15S15 からそれぞれ 3.3%、0.8%、11.4%であった。モザイクは F15S15~F25S15 で出現し、F15S15 で $n-2n$ (0.5%)、 $1.5n-2n$ (3.8%)、 $2n-2.5n$ (0.5%)、 $2n-3n$ (2.3%)、 $2n-4n$ (6.1%)、 $n-2n-3n$ (1.4%)、F20S15 で $2n-3n$ (0.4%)、 $2n-4n$ (25.5%)、 $3n-4n$ (22.4%)、 $4n-6n$ (0.2%)、 $n-2n-4n$ (0.2%)、 $2n-3n-4n$ (0.2%)、F25S15 で $n-2n$ (0.8%)、 $2n-3n$ (1.7%)、 $2n-4n$ (14.2%)、 $4n-5n$ (0.8%) であった。

(3) 組織学的観察

受精後 25 分に 1 回目の処理を行い、1 回目処理完了から 15 分後に 2 回目の処理を行った試験区では、核および分裂装置の動態について大きく分けて 3 つの細胞学的パターンが観察された。1 つめは、2 回目処理完了直

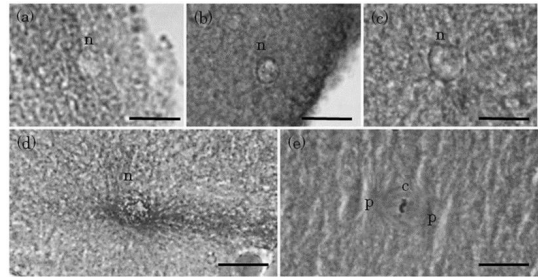


図 1 . 25-15 区 (1 回目 HST : 受精後 25 分に開始 ; 2 回目 HST : 1 回目終了の 15 分後に開始) における微小管の形成と核の動態 . (a), 1 回目 HST の直前(受精後 25 分); (b), 1 回目 HST の直後 ; (c), (d), (e), 1 回目 HST の 5 分後, 10 分後, 15 分後. 2 回目 HST はこれらの時間からそれぞれ開始した。n, 核; p, 極; c, 染色体. スケール = 20 μm .

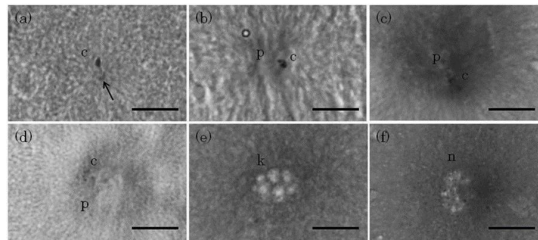


図 2 . 25-15 区における微小管形成と核の動態における 1 つめのパターン . (a): 2 回目 HST の直後; (b), (c), (d), (e), (f): 2 回目 HST のそれぞれ 5 分後, 10 分後, 15 分後, 20 分後, 25 分後. 単極紡錘体の形成で各染色体は分離せず一つの極に集まった。P, 極; c, 染色体; k, カリオメア; n, 核. スケール = 20 μm .

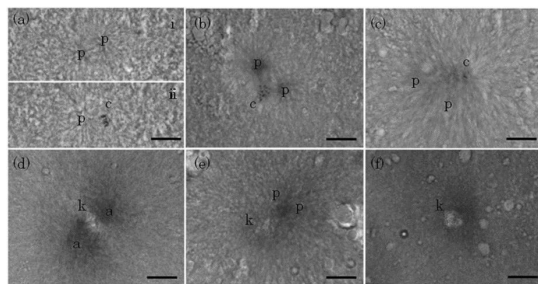


図 3 . 25-15 区における微小管形成と核の動態における 2 つめのパターン . (a): 2 回目 HST の直後; (b), (c), (d), (e), (f): 2 回目 HST のそれぞれ 5 分後, 10 分後, 15 分後, 20 分後, 25 分後. 極の形成は核の両側とは偏っており、娘染色体は分離せず、いったん一つに統合された。p, 極; c, 染色体; k, カリオメア; n, 核. スケール = 20 μm .

後、第一細胞周期時点で微小管は萎縮し、極が1つとなるパターンである(図2)。この過程では、その後も単極のまま染色体は分離できずに1つの極に集まった。その後それぞれがカリオメアを形成し、後に大きな核を形成した。このような卵では第一卵割が阻止されたと考えられた。

2 つめは、2 回目処理完了直後、極は遍在し、2 つの極が接近して位置するパターンである(図3)。この過程では、核近傍に極は2組存在しているが、それらは対極に位置していないため染色体が分離されず1つの核に統合された。この場合は、第一細胞周期終了時点では倍数化が起きているが、核近傍に2組の中心体が存在し第二細胞周期に向けた複製期に中心体が複製されて4つになるため、第二卵割で二倍体に戻ってしまうと推測された。

3 つめは、2 回目処理完了直後、いったん紡錘糸が萎縮したが、その後は両極から微小管が再び発達して染色体を引き離すパターンである(図4)。このパターンでは、その後それぞれが核を形成することで、正常に第一卵割を行った。これらの結果から、今回用いた高温処理条件は、紡錘体を構成する紡錘糸を破壊するだけでなく、中心体を脱重合し、対極に存在すべき2組の中心体の片方を消失させたり、2極を接近させたりすることによって卵割が阻止され、四倍体が誘導されたものと考えられた。このことによって、従来の1回の処理では低頻度であった卵割阻止が、高温処理を2回繰り返すことで比較的高い頻度で成功するに至ったものと思われる。

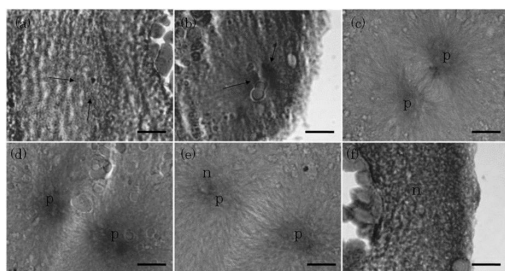


図4 . 25-15 区における微小管形成と核の動態における3つめのパターン . (a): 2 回目 HST の直後; (b), (c), (d), (e), (f): 2 回目 HST のそれぞれ 5 分後, 10 分後, 15 分後, 20 分後, 25 分後. 核分裂は正常に進行した . p, 極; c, 染色体; k, カリオメア; n, 核. スケール = 20 μ m.

以上のことから、水温 20 で培養した通常発生受精卵の卵割を 40.5 1 分間の高温処理によって阻止するには、受精後 25 分の第一卵割前期に1回目の処理を施し、その終了 15 分後に再び同高温処理を施すことが最適であり、これによって高頻度に倍数化が成功し、孵化した仔魚の 46%もの四倍体が得られることが明らかとなった。従来1回の高温処理を用いた倍数化率が通常 0~5%、高くても

10%以下であったことを考えると、この値は格段に高いと考えられる。卵割阻止は、既報では第二卵割を阻止されるケースが報告されているが (Zhang and Onozato 2004; Lin et al. 2015; Lin et al. 2016) 本研究では一部の卵で第一細胞周期で単極性紡錘体が形成されることによって第1卵割の阻止が達成されているのが観察された。高温処理では、圧力処理よりも大量の卵を一度に処理できることから、本方法は多数の倍数化個体を効率よく得ることにつながると期待される。第一卵割阻止による倍数体の作出は、クローン系統の量産を可能にし、複数のクローン間の交配による純系育種事業を広範に展開することができる。また、雄性発生二倍体の生産効率も向上させることができるため、凍結保存された精子からの種の復元などにも大きく貢献できるものと考えられた。

<引用文献>

Kobayashi, T., Ide, A., Hiasa, T., Fushiki, S., Ueno, K. (1994). Production of cloned amago salmon *Oncorhynchus rhodurus*. *Fisheries Science*, 60: 275-281.

桑田知宣 (1998). ニジマスの温度二回処理による第一卵割阻止について. 平成 10 年度 岐阜県水産試験場研究報告 . 43: 10-14.

Lin, ZM., Zhu, XP., You, F., Wu, ZH., Cao, YS. (2015). Nuclei fluorescence microscopic observation on early embryonic development of mitogynogenetic diploid induced by hydrostatic pressure treatment in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Theriogenology*, 83: 1310 - 20.

Lin, ZM., Zhu, XP., Zhang, TR., You, F., Wu, ZH., Cao, YS. (2016). Effects of hydrostatic pressure on microtubule organization and nucleus changes in gynogenetically activated eggs of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). 85: 1610 - 1624.

小野 淳, 工藤真弘, 城 智聡 (2000). ヤマメ・ニジマスの第一卵割阻止型雌性発生二倍体の作出条件 (4) 温度二回処理の最適条件. 東京都水産試験場調査研究報告 . 212: 85-92.

Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., Singer, F. (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 291: 293-296.

Thorgaard, G., Jazwin, M., Stire, A. (1981). Polyploidy Induced by Heat Shock in Rainbow Trout. *Journal*, 110: 546-550.

Zhang, XL., Onozato, H. (2004). Hydrostatic pressure treatment during the first mitosis does not suppress the

first cleavage but the second one.
Aquaculture, 240: 101 - 13.

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

藤井ひかる, 山崎景也, 小林 徹. ホンモロコ卵の第一卵割に対する2回の高温処理の阻止効果. 平成28年度日本水産学会秋季大会, 2016年9月9日, 近畿大学農学部(奈良市), 講演No.946, 要旨集p.65.

小林 徹, 猪熊 徹, 大橋昭汰, 藤井ひかる. 高温処理によるホンモロコ受精卵の卵割阻止. 平成27年度日本水産学会春季大会, 2015年3月28日, 東京海洋大学(東京都港区), 講演No.1138, 要旨集p.168.

6. 研究組織

(1)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

(4)研究協力者

藤井 ひかる (FUJII, Hikaru)
山崎 景也 (YAMAZAKI, Keiya)
猪熊 徹 (INOKUMA, Toru)
大橋 昭汰 (OHASHI, Shota)