

論文内容の要旨

氏名 野村和晴^{のむらかずはる}

学位の種類 博士(農学)

学位記番号 農第115号

学位授与の日付 平成20年3月22日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 ニホンウナギの種苗生産技術および育種技術の開発に関する研究

論文審査委員 (主査) 教授 太田博巳

(副主査) 教授 上野紘一

(副主査) 教授 熊井英水

ニホンウナギ *Anguilla japonica* は我が国の伝統的な食文化を代表する魚種であるとともに、東アジアにおける重要養殖対象種でもある。現在のウナギ養殖は100%天然のシラスウナギ資源に依存した養殖形態となっており、不安定な種苗供給とそれに伴う種苗価格の乱高下が安定的な養殖経営を困難にしている。また、近年、ウナギ資源の急激な減少傾向に伴う資源保護の気運の高まりから、種苗供給そのものが制限される恐れもでてきた。このような問題を根本的に解決し、安定的で健全なウナギ養殖事業を存続させるためには、ウナギの人工種苗生産技術の確立、すなわちウナギの完全養殖化による産業形態の転換が必要不可欠である。

近年の人工種苗生産技術開発の研究の進展により、実験室レベルでのウナギの完全養殖実現は目前となっている。しかし、親魚ごとに得られる卵や仔魚の質がばらついて安定しないことや、仔魚期の減耗が極めて大きく、飼育が不安定であることが安定的な人工シラスウナギ生産を困難なものにしている。そこで本研究は、安定的な人工シラスウナギの生産を実現する種苗生産技術の開発を第一の目的とし、得られる卵や仔魚の質を向上させる人為催熟技術や人工授精技術、仔魚の飼育技術の開発・改善に取り組んだ。

また、卵から親魚までの完全養殖が可能になれば、世代を重ねるごとに遺伝的改良を行うこと、すなわち育種の導入が可能になる。そこで本研究では、本種における将来の育種に必要な遺伝学的基礎情報や育種技術の基盤を先行的に整えることを第二の目的とし、染色体操作技術やDNAマーカーの開発を行うとともに、遺伝地図の作成を行った。

第1章 ニホンウナギにおける種苗生産技術の開発

第1節 ウナギ人工ふ化仔魚に生じる倍数性変異現象の解明

人為催熟由来のウナギ仔魚には、三倍体や二倍体-三倍体モザイクなどの倍数性変異を示す個体がしばしば高率に含まれるが、このような倍数性変異の原因や詳しい実態は不明であった。32家系におけるウナギ人工ふ化仔魚の倍数性をフローサイトメトリー (FCM) 分析により調査したところ、21家系 (65.6%) において倍数性変異個体の出現がみられた。各家系における二倍体の割合は56.3%から100%の範囲で大きく変動し、家系ごとの平均は90.9%であった。受精率およびふ化率と仔魚に占める二倍体の割合には有意な正の相関がみられ ($P < 0.001$)、卵質との関連が示唆された。倍数性変異個体の大部分は三倍体であり、その他の変異としてわずかに半数体やモザイク、異数体の出現がみられた。異数体はふ化後1日目以降出現しなくなったが、三倍体やモザイクは給餌開始期まで出現頻度が変わらなかったことから生存可能と考えられた。

倍数性変異を誘発する要因として配偶子の過熟の影響が考えられたため、実験的に関連を調査した。まず精子について、人工受精直前に採精した精子と、3週間人工精漿で保存した精子で同腹の卵に受精させて仔魚の倍数性を比較したところ、二倍体率に差はみられなかった。次に卵について、排卵を確認した後、雌の腹腔内あるいは生体外に一定時間卵を維持した後で人工受精を行うと、急激な卵質の低下がみられ、倍数性変異個体の出現頻度も高くなった。また、未受精卵の核相観察から、排卵後の経過時間に伴って正常な第二減数分裂中期像を示す未受精卵の割合が急激に減少することが明らかとなり、このことが

卵質低下および倍数性変異を誘発する主な要因となっていることが示唆された。さらに、マイクロサテライトマーカーを用いた遺伝解析から、人工ふ化仔魚に含まれる三倍体仔魚は受精後の第二極体放出異常によって発生したと考えられた。以上の結果から、排卵後の卵の過熟化に伴い正常な減数分裂ステージにある卵の割合が減り、受精後の第二極体放出が阻害されることによって三倍体が出現することが倍数性変異現象の主な要因であることが明らかとなった。

第2節 最終成熟誘起ステロイドホルモン投与が卵質に及ぼす影響について

近年開発されたウナギ人為催熟技術により、比較的安定的に成熟配偶子を得ることが可能になった。しかし、この方法により得られる卵の質は雌親魚ごとに大きくばらつき安定しないことが問題となっている。本研究では、現在ウナギの最終成熟の誘起に用いているステロイドホルモン、17,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP)の投与濃度や、DHPの前駆体である17α-hydroxy-progesterone (17α-OHP)の投与が排卵までの時間や排卵される卵の量、得られる卵や仔魚の質に及ぼす影響を調査した。その結果、通常の1/3倍から9倍の範囲でDHP投与濃度を変えて最終成熟誘起を行うと、排卵までの時間や排卵される卵数には変化が起こらず、得られる卵の質には影響がみられることが明らかとなった。通常の1/3倍のDHP投与濃度(0.67mg/kgBW)においては顕著な卵質の低下がみられ、9倍のDHP投与濃度(18mg/kgBW)においては卵質の向上がみられた。また、DHPの前駆体ホルモンである17α-OHP投与でも、排卵率や排卵に要する時間、卵質はDHPと変わらず、17α-OHPを高濃度で投与しても卵質の向上はみられないことも明らかとなった。

第3節 飼育水への高物質物質添加が仔魚の生残に及ぼす影響

ウナギ人工ふ化仔魚の飼育において、特に給餌飼育初期にしばしば大量斃死が起こり、安定した飼育が困難となっている。そこで、給餌飼育初期の大量斃死を防ぐことを目的として、飼育水への高分子物質添加が仔魚の成長や生残に与える影響を調べた。ウナギ仔魚の飼育水に、水溶性多糖類(10mg/L)、大豆タンパク質(10mg/L)、卵白(80μl/L)などの高分子物質を加えて生残率を比較したところ、無添加の対照区に比べ、卵白添加区で顕著に生残率が向上した。そこで、卵白の添加濃度について検討したところ、飼育水に3.7-11μl/Lの範囲で卵白を添加すると、仔魚の成長を阻害せずに生残率を向上させることが明らかとなった。また、死亡した仔魚の形態観察から、卵白添加は主に夜間に起こる仔魚の浮上斃死を防ぐことが明らかとなった。さらに、卵白の添加は海水の表面張力を低下させ、それにより仔魚の浮上斃死が防除されることが考えられた。本成果により、ウナギ仔魚飼育における初期の大量斃死を防ぐことが可能になり、安定した飼育が可能となった。

第2章 ニホンウナギにおける育種技術の開発

第1節 マイクロサテライトDNAマーカーの開発

効率的な育種選抜に必要な遺伝連鎖地図の作製には、大量のマイクロサテライト(MS)マーカーが必要となる。FCM分析によりニホンウナギのゲノムサイズを推定したところ、

1.51pg/C=1500Mbとなった。推定されたゲノムサイズから、ゲノム全体をカバーする連鎖地図の作製には109個以上のマーカー数をマップすることが必要と考えられた。従来法であるサイズ選択DNAライブラリーからの単離では、4300クローン中MS領域を持つクローンは50クローン(1.16%)だったが、磁気ビーズを用いてMS領域を濃縮したDNAライブラリーからの単離では、1404クローンのうちの420クローンが陽性となり(29.91%)、25倍以上効率的な単離が可能だった。これらの手法により得られた合計470の陽性クローンの挿入領域の塩基配列を決定し、MS領域を挟み込む266セットのPCR用プライマーセットを設計した。開発したこれらのプライマーセットのうち、164セットにおいて良好なPCR増幅が認められた。

第2節 染色体操作技術の開発(第二極体放出阻止条件の検討)

染色体操作技術は、QTL解析に好適な材料家系の構築やその応用であるマーカー選抜育種の効果を飛躍的に高めることに役立つことが期待される。ニホンウナギにおいて染色体操作育種技術を確立することを目的に、受精卵の三倍体化(第二極体放出阻止)に好適な高温処理条件を検討した。その結果、通常受精の10分後に、37℃の海水に3分間浸漬処理することにより、仔魚の三倍体率が最高値(83.9%)を示すことが明らかとなった。作出した人為三倍体仔魚は、FCM分析および染色体標本の核型分析から3セットの相同染色体を持つ正常な三倍体であることが確認された。

論文審査結果の要旨

ウナギは東アジアにおける重要養殖対象種であるが、現在のウナギ養殖は不安定な種苗供給とそれに伴う種苗価格の乱高下が安定的な養殖経営を困難にしている。このような問題を根本的に解決し、安定的で健全なウナギ養殖事業を存続させるためには、ウナギの人工種苗生産技術の確立、すなわちウナギの完全養殖化による産業形態の転換が必要不可欠である。申請者は、このウナギの人工種苗生産技術の開発を第一の目的とし、得られる卵や仔魚の質を向上させる人為催熟技術や人工授精技術、仔魚の飼育技術の開発・改善に取り組んだ。また、本種における将来の育種に必要な遺伝学的基礎情報や育種技術の基盤を先行的に整えることを第二の目的とし、染色体操作技術やDNAマーカーの開発を行うとともに、遺伝地図を作成した。

人為催熟由来のウナギ仔魚には、三倍体や二倍体-三倍体モザイクなどの倍数性変異を示す個体がしばしば高率に含まれるが、このような倍数性変異の原因や詳しい実態は不明であった。そこで、フローサイトメトリー（FCM）分析により21家系の倍数性異常について調査を行い、倍数性変異個体の大部分は三倍体であること、それらが生存可能であることを明らかにした。次に倍数性変異を誘発する要因について検討を加え、その要因として排卵した卵の過熟化による第2減数分裂の異常であることを実験的に明らかにした。さらに、マイクロサテライトマーカーを用いた遺伝解析から、人工ふ化仔魚に含まれる三倍体仔魚は受精後の第二極体放出異常によって発生することを確認した。以上の結果から、排卵後の卵の過熟化に伴い正常な減数分裂ステージにある卵の割合が減り、受精後の第二極体放出が阻害されることによって三倍体が出現することが倍数性変異現象の主な要因であることを明らかにした。

次に、現在ウナギの最終成熟の誘起に用いているステロイドホルモン、17,20 \cdot -dihydroxy-4 \cdot -pregnen-3-one (DHP)の投与濃度や、DHPの前駆体である17 \cdot -hydroxy-progesterone (17 α -OHP)の投与が排卵までの時間や排卵される卵の量、得られる卵や仔魚の質に及ぼす影響を調査した。その結果、9倍のDHP投与濃度(18mg/kgBW)においては卵質の向上がみられ、また、DHPの前駆体ホルモンである17 α -OHP投与でも、排卵率や排卵に要する時間、卵質はDHPと変わらないこと、17 α -OHPを高濃度で投与しても卵質の向上はみられないことを明らかにした。

次に給餌飼育初期に起こる大量斃死の防除を目的として、飼育水への高分子物質添加が仔魚の成長や生残率に及ぼす影響を調べ、飼育水に3.7-11 μ l/Lの範囲で卵白を添加すると、仔魚の成長を阻害せずに生残率を向上させることを明らかにした。また、死亡した仔魚の形態観察から、卵白添加は主に夜間に起こる仔魚の浮上斃死を防ぐことを明らかにした。さらに、卵白の添加は海水の表面張力を低下させ、それにより仔魚の浮上斃死が防除される事を示した。本成果により、ウナギ仔魚飼育における初期の大量斃死を防ぐことが可能になり、安定した飼育が可能となった。

効率的な育種選抜に必要な遺伝連鎖地図の作製には、大量のマイクロサテライト（MS）マーカーが必要となる。FCM分析によりニホンウナギのゲノムサイズを推定し、ゲノム全体をカバーする連鎖地図の作製には109個以上のマーカー数をマップすることが必要であることを明らかにした。磁気ビーズを用いてMS領域を濃縮したDNAライブラリーから単離

を行い、従来法に比べ25倍以上効率的な単離が可能であることを示した。得られた合計470の陽性クローンの挿入領域の塩基配列を決定し、MS領域を挟み込む266セットのPCR用プライマーセットを設計し、このうち164セットにおいて良好なPCR増幅を確認している。

染色体操作技術は、QTL解析に好適な材料家系の構築やその応用であるマーカー選抜育種の効果を飛躍的に高めることに役立つことが期待される。そこで、ニホンウナギにおいて染色体操作育種技術を確立することを目的に、受精卵の三倍体化（第2極体放出阻止）に好適な高温処理条件を検討し、通常受精の10分後に、37 $^{\circ}$ Cの海水に3分間浸漬処理することにより、仔魚の三倍体率が最高値（83.9%）を示すことを明らかにした。作出した三倍体は、FCM分析および染色体標本の核型分析から3セットの相同染色体を持つ正常な三倍体であることを確認した。

次に、上述のMSマーカー、および人為三倍体作出技術を利用することで、ウナギの人為三倍体家系を用いたマーカー-動原体間のマッピングを行った。26座のMSマーカーについて、二倍体家系を用いて遺伝様式を調べたところ、メンデルの法則に従った遺伝分離が観察された。三倍体家系を用いて26座のMSマーカーについて動原体との組換え率（ y 値）を調べたところ、0.008-0.968の範囲で平均は0.645であった。 y 値の分布は一律ではなく、テロメア側への偏りがみられたことから、強いキアズマ干渉の存在が示唆された。

MSマーカーを用いて、ニホンウナギにおける遺伝連鎖地図作製を試み、18連鎖群、109座のMSマーカーからなる遺伝連鎖地図を作製した。この連鎖地図は、用いたマーカーのほとんどがマップされたことから、本種の全ゲノム領域をほぼカバーするものであると考えられた。

以上のように、申請者は完全養殖の実現が重要課題であるニホンウナギを材料として、その種苗生産技術、並びに育種技術の開発に資する多くの知見を得ている。得られた知見は、本種の健全な種苗を生産するための抜本的な技術改良を導くとともに、本種の完全養殖実現に先行して育種基盤の構築を行ったものであり、高い評価を与える業績と考えられる。

よって本論文は博士（農学）論文として価値あるものと認める。

なお、審査に当たっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経た上、平成20年2月8日の農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。