

借腹レシピエントとしてのマサバの生殖巣分化について

小林 徹,^{1*} 石橋 亮,² 大谷 哲,² 村田 修²

(種苗生産・養殖グループ)

¹ 近畿大学大学院農学研究科, ² 近畿大学水産研究所

* kobayasi@nara.kindai.ac.jp

生殖系列キメラ形成技術を応用した借腹生産は、魚類養殖における開発品種の保存や、生産種苗の遺伝的多様性の維持に大きく貢献するものと期待される。我々は、クロマグロ養殖集団の遺伝的多様性の維持、および親魚養成の省力化を目的として、生殖細胞の前駆体である始原生殖細胞(PGCs)の単離、保存にかかわる技術、および保存 PGCs を胚体に移植して安定的に生殖細胞を形成させる技術を開発し体系化しようとする研究を進めている。すなわち、初期胚の中で唯一次世代を担う生殖細胞に分化することのできる始原生殖細胞を現在の養殖クロマグロ胚から単離し、保存しておき、数年後の必要に応じてそれらを別種の胚に移植し、その代理魚種(レシピエント)を借腹として初期の遺伝的多様性を持つ

たマグロ系統を維持するというコンセプトを、生殖系列キメラ作出技術を開発することで進めようとしている。マサバをレシピエントとして利用するサバ科魚類の借腹生産技術の開発および体系化には、本種生殖細胞の生殖巣への加入経路、生殖巣形成過程、性分化過程など始原生殖細胞の発生とその後の分化過程を詳細に知る必要がある。本報告ではマサバの雌雄両生殖巣における生殖巣の分化過程について記載する。

試料および方法

採卵に供したマサバ親魚は、近畿大学水産研究所白浜実験場の 30t 水槽内で飼育し 5 日ごとに、また 30-100 日は 10 日ごとに、20～

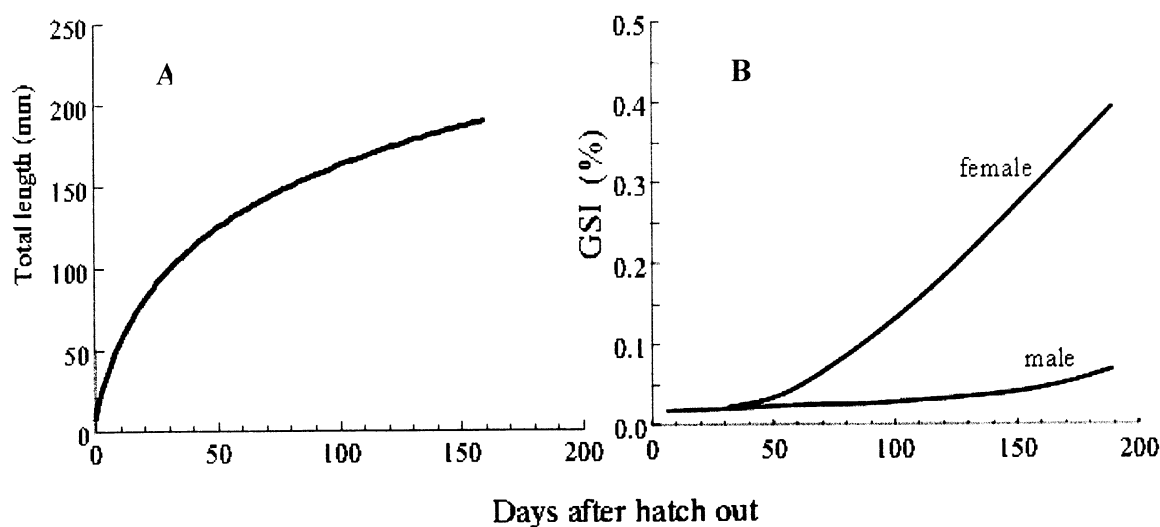


図1. マサバ *Scomber japonicus* における仔稚魚期の全長と生殖腺指数の変化.

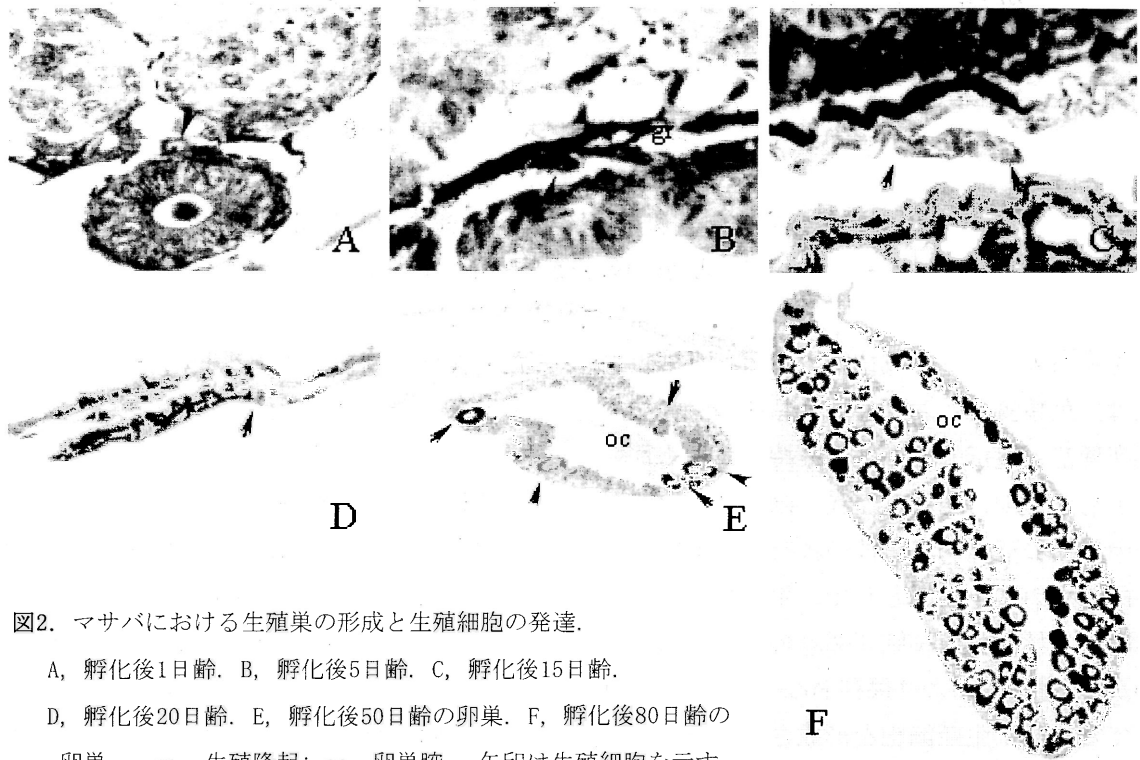


図2. マサバにおける生殖巣の形成と生殖細胞の発達.

A, 孵化後1日齢. B, 孵化後5日齢. C, 孵化後15日齢.

D, 孵化後20日齢. E, 孵化後50日齢の卵巢. F, 孵化後80日齢の卵巢. gr, 生殖隆起; oc, 卵巢腔. 矢印は生殖細胞を示す.

30 個体ずつの連続サンプリングを行った。固定はブアン液を用いて4°Cで24時間行った後、70%エタノールで置換し冷暗所に保存した。

水槽内の環境情報はパンライト水槽収容時から水温、水質の記録を開始し、給餌を開始した日からは餌の種類、および給餌量を記録した。

サンプリングは、孵化日の午後4時頃に0日齢のサンプリングを行い、それ以降10日までは午後3時に24時間ごとのサンプリングを行った後、30日までは5日ごと、その後40日から160日までは30日ごとに20-25尾取上げて、全長を計測するとともに、50日以降は生殖腺指数(GSI)の変化を調べた。これらの生殖腺はブアン氏液で固定して、常法によって6-8 μ m厚のパラフィン切片とし、ヘマトキシリンエオシン二重染色を施して、光学顕微鏡下で生殖巣組織および生殖細胞の発達状態を観察した。

結果および考察

環境条件 収容開始からの水温は当初25°Cであったが、夏季には30°C以上に上昇し、その後徐々に低下して160日には15°Cとなった。その間、最低で25.7°C(6月28日午前)、最高は27.9°C(7月2日午後)であった。環境水のDOは4.01から8.32(mg/l)の範囲で、また、pHは8.15から8.61の範囲で変動した。

成長 平均全長は孵化後10日には9.8mmであったのが20日には38.7mm、30日には62.4mmと急激に成長し、さらに100日には156.6mm、そして160日には197.6mmときわめて良好な成長を示した(図1A)。

生殖腺指数の変化 GSIは成長に伴って増加し、50日には0.03%であったのが、その後の増加傾向は雌雄で異なり、100日齢には雄0.03%に対し雌0.14%、そして160日では雄0.04%に対し雌0.32%となった。従って、両

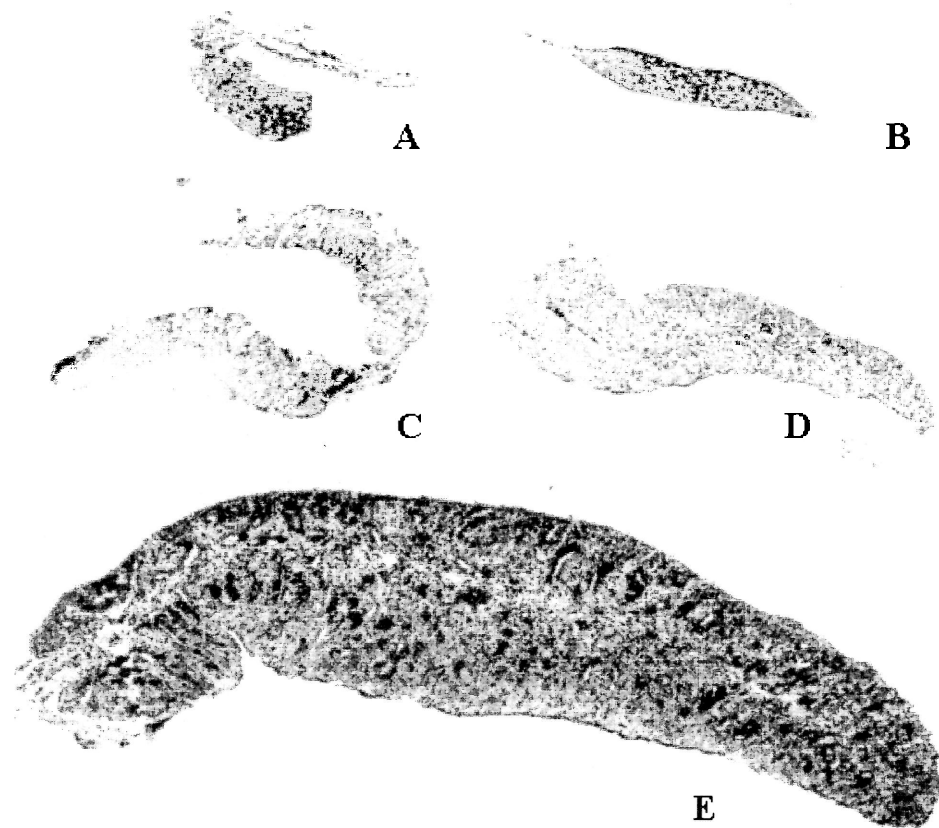


図3. マサバにおける精巣発達と生殖細胞.

A, 孵化後50日齢. B, 孵化後60日齢. C, 孵化後80日齢. D, 孵化後100日齢.
E, 孵化後160日齢.

者の GSI からみた分化時期は、孵化後、約 40 日頃と推定された(図 1B)。

生殖巣の形成過程 始原生殖細胞は孵化後 1 日齢の仔魚の消化管後部の腸管膜付近に認められ(図 2A),それが 5 日齢には腹膜の下面を移動している像が観察された(図 2B)。さらに、15~20 日には生殖隆起の根元や先端に存在した(図 2C, D)。

卵巣生殖細胞の発達推移 卵巣では 50 日(図 2E)にはすでに卵巣腔が形成されており、一部に減数分裂に入っている卵母細胞が散見された。そして、80 日にはその殆どが直径 50 μm の周辺仁期の卵母細胞となり(図 2F), 160 日にはさらに直径 90 μm に肥大した。

精巣生殖細胞の発達推移 一方精巣では、孵化後 50 日(図 3A)には精原細胞が生殖巣原基の外側に散見されたが、それらは 60 日、80

日には急速に増加し(図 3B, 3C), 100 日には精母細胞や精細胞が(図 3D), 160 日にはすでに完成された精子が観察された(図 3E)。

借腹生産への応用性 上記のことから借腹生産を目途とした PGCs を移植するタイミングはレシピエント体内で生殖巣が形成される以前に移植することが重要であるといわれている。これらのことから、借腹代理魚種レシピエントとしてマサバを使用する場合、少なくとも孵化後 15 日以前に移植することが必要であろうと考えられた。今後、クロマグロ PGCs を利用した育種学的技術開発に向けて、細胞判別技術、単離技術、保存技術、移植技術など、細分化された各技術について個々に開発解明を進めていくことが重要である。特に異種間の生殖巣と生殖細胞がどこまで親和性を持つのかが本技術体系を発展させ

るに当たってきわめて重要なポイントであると考えられる。

文 献

- 1) Braat AK, Zandbergen T, Water Van S, GOOS HJ, Zivkovic D. Characterization of Zebrafish Primordial Germ Cells: Morphology and Early Distribution of *vasa* RNA. *Developmental Dynamics* 1999; 216:153-167.
- 2) Kato K, Hayashi R, Ishitani Y, Yamamoto S, Miyashita S, Murata O, Kumai H. Gonadal sex differentiation of red sea bream of a selected strain. *Suisanzoshoku* 1999; 47: 29-34.
- 3) Koya Y, Fujita A, Niki F, Ishihara E, Miyama H. Sex differentiation and pubertal development of gonads in the viviparous mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Zool. Sci.* 2003; 20: 1231-1242.
- 4) 松浦修平, 内藤 剛, 新町充人, 松山倫也. トラフグ生殖腺の性分化過程. *水産増殖* 1994; 42: 619-625.
- 5) Nagai T, Yamaha E, Arai K. Histological differentiation of primordial germ cells in zebrafish. *Zool. Sci.* 2001; 18: 215-223.
- 6) Saito T, Otani S, Nagai T, Nakatsuji T, Arai K, Yamaha E. Germ cell lineage from a single blastomere at 8-cell stage in shiro-uo (ice goby). *Zool. Sci.* 2002; 19: 1027-1032.
- 7) Saito T, Otani S, Fujimoto T, Suzuki T, Nakatsuji T, Arai K, Yamaha E. The germ line lineage in ukigori, *Gymnogobius* species (Teleostei: Gobiidae) during embryonic development. *Int. J. Dev. Biol.* 2004; 48: 1079-1085.
- 8) Takeuchi Y, Yoshizaki G, Kobayashi T, Takeuchi T. Mass isolation of primordial germ cells from transgenic rainbow trout carrying the green fluorescent protein gene driven by the *vasa* gene promoter. *Biol. Reprod.* 2002; 67: 1087-1092.
- 10) Yoshizaki G, Takeuchi Y, Kobayashi T, Ihara S, Takeuchi T. Primordial germ cells: The blueprint for a piscine life. *Fish Physiol. Biochem.* 2003; 26: 3-12.
- 11) Kobayashi T, Yoshizaki G, Takeuchi Y, Takeuchi T. Isolation of highly pure and viable primordial germ cells from rainbow trout by GFP-dependent flow cytometry. *Mol. Reprod. Dev.* 2004; 67: 91-100.