

2. バイテク応用技術開発研究費

1) DNAフィンガープリント法によるクローンホンモロコの遺伝的均一性の検討

上野世司・景 崇洋*1・中山一郎*2

【背景・ねらい】 現在、ホンモロコの育種を目的として、雌性発生によるクローン作出技術の開発を進めており、この中で、クローン作出の第一ステップとしての第一卵割阻止型雌性発生二倍体の作出法について検討してきた。第一卵割阻止型雌性発生二倍体の次世代を再び雌性発生によって得るとそれらは母親の遺伝的コピーとなると同時に、互いに均一なクローンとなる。この方法を用いてホンモロコのクローン作出を試み、DNAフィンガープリント法を用いて遺伝的均一性の検討を行った。また、生残率、成長についても調べた。

【成果の内容・特徴】 雌性発生第一代は、ホンモロコ卵に紫外線照射により遺伝的に不活性化したニゴロブナ精子を媒精し、受精卵を22.0℃に保ち、媒精後26～29分の間に39～42℃の温水への30～90秒間の浸漬処理により得た個体である。雌性発生第二代は雌性発生第一代から得た卵に紫外線照射精子を媒精した後、第二極体放出阻止（媒精後7～9分の間に41℃の温水に50秒間または0℃の氷水に40分間浸漬）によって得た。対照として雌性発生第一代目から得た卵に通常発生雄の精子3尾分を混合して媒精した通常発生対照区、紫外線照射精子を媒精して倍数化処理をしない雌性発生無処理区を設けた。その結果、外観上正常と判断される個体の割合は、通常発生区で72.2%、雌性発生無処理区で13.0%、雌性発生二倍体の高温処理区で11.3～14.1%、低温処理区で1.0～9.1%であった（表1）。

DNAフィンガープリントは、雌性発生第二代の血液から抽出したDNAを制限酵素 Hae III で切断し、アガロースゲル電気泳動後、オリゴヌクレオチド (GACA)₄ および (GGAT)₄ プロンプをハイブリダイズさせて得た。対照として通常雌雄を親魚とする通常発生二倍体ホンモロコ5個体のDNAフィンガープリントを同様にして得た。その結果、通常発生二倍体5個体ではDNAフィンガープリントにより個体識別が可能であった。一方、雌性発生第二代の6個体では同一の電気泳動パターンを示した（図1、図2）。このことは、これら6個体のDNA塩基配列が非常に高い確率で同じであることを示しており、雌性発生第二代が互いに遺伝的に均一なクローンであることが強く示唆された。

雌性発生第二代、通常発生対照群の孵化後30日目の生残率は、それぞれ、54.9%、96.2%であった（図3）。また、180日目の被鱗体長の平均値±標準偏差（変動係数）は、それぞれ40.06±3.42mm（8.53%）、43.36±2.84mm（6.55%）、体重の平均値±標準偏差（変動係数）は、それぞれ1.19±0.21g（17.72%）、1.14±0.19g（16.70%）であった（図4、図5）。

【成果の活用面・留意点】 今後作出されるクローンについても遺伝的均一性を確認していく必要がある。なお、DNAフィンガープリント法は通常発生二倍体の個体識別が可能であったことから、作出した系統ごとの識別にも利用可能と考えられる。

* 1 : 三重大生物資源 * 2 : 養殖研

表1 ホンモロコにおける雌性発生第二代および通常発生対照群の作出成績

発生方法	作出方法		使用卵数	発眼卵数	発眼率 (%)	孵化数	孵化率 (%)	正常魚 正常魚出現率 (%)
	倍数化処理法	倍数化処理 開始時期(分)						
通常発生	-	-	36	27	75.0	27	75.0	26 72.2
	無処理	-	77	62	80.5	56	72.7	10 13.0
雌性発生	高温処理	7	282	175	62.1	137	48.6	32 11.3
		8	366	213	58.2	165	45.1	52 14.2
	9	198	109	55.1	76	38.4	28 14.1	
	低温処理	7	98	11	11.2	8	8.2	1 1.0
		8	166	54	32.5	38	22.9	4 2.4
		9	175	109	62.3	74	42.3	16 9.1

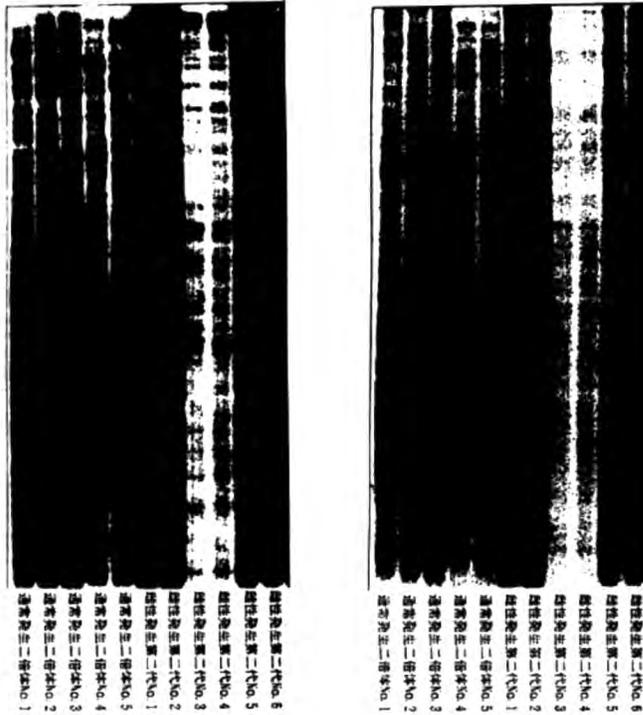


図1 ホンモロコ通常発生二倍体および雌性発生第二代のDNAフィンガープリント。DNAはHae IIIにより切断後、(GACA)プローブにより検出した。

図2 ホンモロコ通常発生二倍体および雌性発生第二代のDNAフィンガープリント。DNAはHae IIIにより切断後、(GGAT)プローブにより検出した。

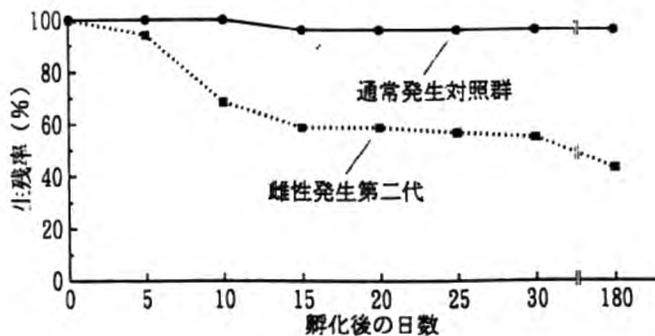


図3 ホンモロコの雌性発生第二代と通常発生対照群の生存率の推移。

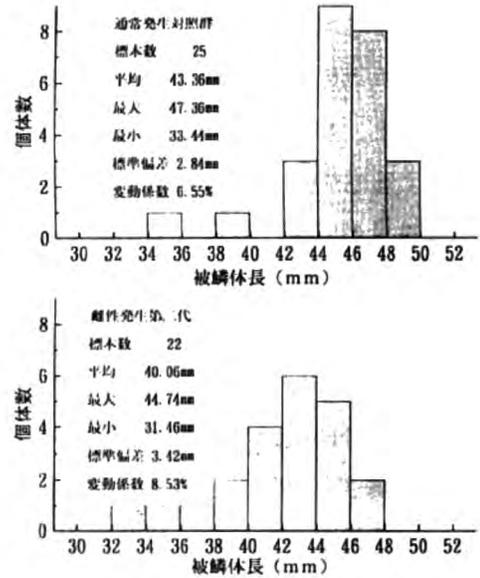


図4 ホンモロコ雌性発生第二代と通常発生対照群の被鱗体長のヒストグラム。

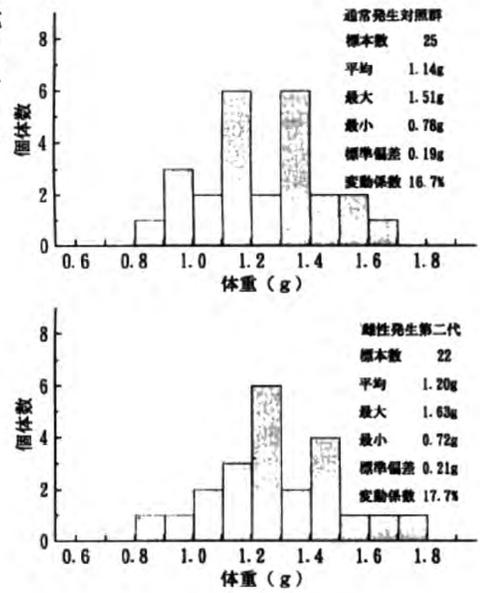


図5 ホンモロコ雌性発生第二代と通常発生対照群の体重のヒストグラム。