

4) ニゴロブナの雌性発生第二代の作出とそのDNAフィンガープリント法による分析

上野世司・景 崇洋*1・中山一郎*2

【背景・ねらい】これまでニゴロブナ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。この中で得られた雌性発生二倍体の同型接合性を確認するためアイソザイム分析を行い、アイソザイム分析に供した雌性発生二倍体の姉妹の1尾から雌性発生第二代を作出し、それらの遺伝的均一性の検討をDNAフィンガープリント法を用いて行った。

【成果の内容・特徴】①雌性発生第一代のアイソザイム分析による同型接合性の確認；雌性発生第一代はニゴロブナ卵にホンモロコUV精子を媒精し、卵を23.5℃に保ち、媒精後26分に40～46℃の温水への5～130秒間の浸漬処理により得た個体である。なお、このときの雌性発生無処理区の正常魚出現率は0.0%、卵割阻止区の正常魚出現率は0.3～11.7%であった。雌性発生第一代12尾とその雌親をアイソザイム分析に供し、PGM、 α GPDの2酵素および筋漿タンパク（MP）の検出を行った。その結果、母親の α GPD、MPはホモ型、PGMはヘテロ型を示し、雌性発生第一代では全個体のPGM、 α GPD、MPがホモ型を示した（表1）。このPGMホモ型の出現率の結果は、昨年度の第二極体放出阻止型雌性発生二倍体（親のPGMがヘテロ型である場合）のPGMの分析結果（33尾中12尾がヘテロ型、21尾がホモ型）と比較して有意に差が認められた（ χ^2 検定、 $P < 0.05$ ）。

②雌性発生第二代の作出；雌性発生第二代は、雌性発生第一代から得た卵にホンモロコUV精子を媒精した後、媒精後6～8分間に0℃の氷水への40分間の浸漬処理によって得た。その結果、正常魚出現率は通常発生対照区で49.4%、雌性発生無処理区で5.4%、雌性発生第二代作出区で41.5～53.5%であった（表2）。

③DNAフィンガープリント法による遺伝的均一性の検討；DNAフィンガープリントは雌性発生第二代の体側筋から抽出したDNAをHinf IまたはHae IIIで切断し、アガロースゲル電気泳動後、(GACA)₄および(GGAT)₄プローブをハイブリダイズさせて得た。対照として通常発生対照区の6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、通常発生対照区の6個体はいずれの検出法でも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、いずれの検出法でも泳動パターンは互いに類似していたが、同一の電気泳動パターンとは判断できず、互いに遺伝的に均一ではないことが示された（図1、図2、図3）。

【成果の活用面・留意点】これら雌性発生第二代の6個体が互いに遺伝的に均一でなかった原因は不明である。なお、これらの雌性発生第二代は遺伝的に均一とはいえなかったものの、姉妹間で極めて類似したパターンを示したことから、オリゴヌクレオチドによるDNAフィンガープリント法は第一卵割阻止型雌性発生二倍体以外の雌性発生第二代の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 雌性発生第一代およびその母親のPGM、 α GPD、MPの表現型の分析結果。

	母親	雌性発生第一代	
PGM	AB	AA	5
		AB	0
		BB	7
α GPD	AA	AA	12
		AB	0
		BB	0
MP	AA	AA	12
		AB	0
		BB	0

表2 ニゴロブナ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	低温処理	使用卵数	孵化数	孵化率 (%)	正常魚孵化数	正常魚出現率 (%)
	開始時期 (分)					
通常発生	-	536	265	49.4	265	49.4
	無処理	239	125	52.3	13	5.4
雌性発生	6	362	167	46.1	151	41.7
	7	691	335	48.5	326	47.2
	8	703	408	58.0	376	53.5

*低温処理開始まで受精卵は20.7°Cに保った。

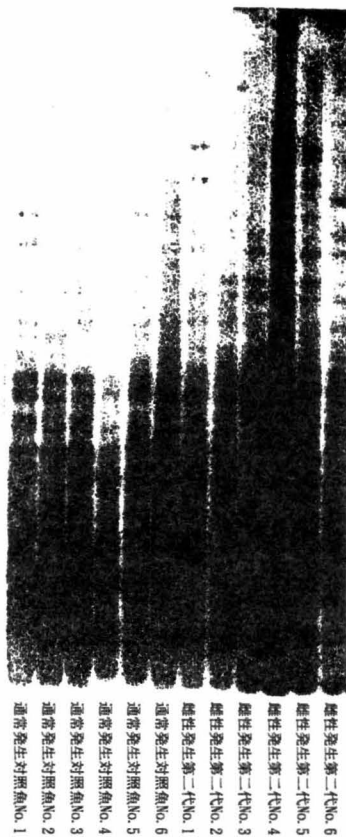


図1 ニゴロブナ通常発生対照群および雌性発生第二代のDNAフィンガープリント。DNAはHinfi Iにより切断後、(GACA)_nプロープにより検出した。

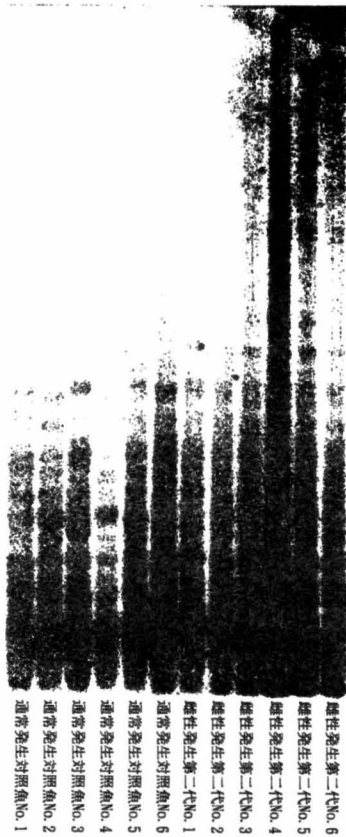


図2 ニゴロブナ通常発生対照群および雌性発生第二代のDNAフィンガープリント。DNAはHinfi Iにより切断後、(GGAT)_nプロープにより検出した。



図3 ニゴロブナ通常発生対照群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)_nプロープにより検出した。