

# クローンヒラメの特性評価 第2報 性分化と形態形成のクローン間比較

齊藤節雄\*<sup>1</sup>, 森 立成\*<sup>2</sup>

Evaluation of traits of clonal lines induced by chromosome manipulation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

## II. Differences in gonadal sex differentiation and morphological development

Setsuo SAITOH\*<sup>1</sup> and Tatsunari MORI\*<sup>2</sup>

Gonadal sex differentiation and morphological development by rearing experiment were conducted to characterize the clonal lines in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Clone fish produced by chromosome manipulation techniques gynogenetically were artificially reared to juvenile stage and examined their sexuality and morphology. Female rates of no. 72, 75 and 82 clonal lines were high values (70.8%, 77.8% and 88.5%) and those of no. 71, 77 clonal lines and control group were almost 50%, but no. 83 clonal line showed the lowest rate (27.1%). Pseudoalbinism on the ocular sides of clonal lines were slightly (0.0~6.0%) observed compared with control group (35.0%), but the ambicoloration on the blind sides of them were recognized severely (57.5~100.0%) except the no. 82 clonal line (2.5%). Severe vertebral fusions (abdominal region 36.3%, caudal region 53.6%) were observed in no. 83 clone fish which body proportions (body height/standard length) were significantly different from other clonal lines. The appearance of no. 83 clone fish showed so-called shortened trunk.

キーワード：ヒラメ，クローン，性分化，形態形成

### はじめに

クローン魚は遺伝的に均一であるため、養殖魚としてバラツキの極めて少ない均質な製品が生産出来る可能性がある。齊藤ら<sup>1)</sup>においてクローンヒラメ6系統を用いて、成長性と耐病性のクローン間比較を行い明らかな違いが認められ、これらの形質に優れた特性を有する系統の存在が示された。そこで本報告では、クローンヒラメの性分化と形態形成に注目した特性評価を試みた。

ヒラメの場合、雄よりも雌の方が成長が良好であるため、全雌種苗を用いた養殖の有利性が示されている<sup>2)</sup>。しかし雌性発生により遺伝的に全雌種苗を作出しても、必ずしも100%雌の種苗が出来る訳ではないことも既に報告されている<sup>3)</sup>。一方、ヒラメ・カレイ類の種苗において一般的に出現が認められている白化、黒化、眼位異常などの形態異常魚は、商品価値の低下に繋がるため養殖魚とし

て不適であり、出現防除が重要な課題となっている<sup>4)</sup>。

本研究では、遺伝的に雌であるクローンヒラメ6系統を用いて、本来の遺伝的性の発現状況を調べると共に、有眼側の白化及び無眼側の黒化並びに体型等に関する形態異常魚の出現状況について調べ、系統間での明確な違いが認められたので報告する。

### 材料及び方法

#### 1. 供試魚及び仔稚魚の飼育

##### (1) クローンヒラメの作出

材料として齊藤ら<sup>1)</sup>と同様にホモ型クローンヒラメ6系統(71, 72, 75, 77, 82, 83)を用いた(Fig. 1)。各系統の親魚から採卵、採精し、人工受精により受精卵を得た。

##### (2) 通常発生魚の確保

報文番号A439 (2009年7月2日受理)

\* 1 北海道立栽培水産試験場 (Hokkaido Mariculture Fisheries Experiment Station, Funami-cho, Muroran, Hokkaido 051-0013, Japan)

\* 2 北海道立中央水産試験場 (Hokkaido Central Fisheries Experiment Station, Yoichi, Hokkaido 046-8555, Japan)

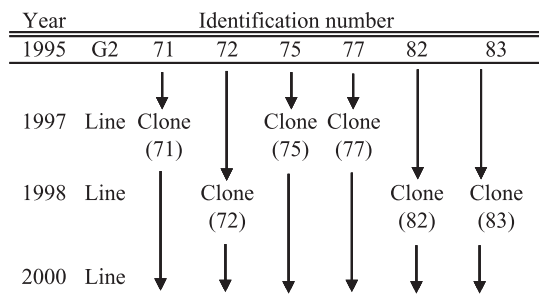


Fig.1 Schematic diagram for the production of mitotic-gynogenetic diploids(G2) and clones(No.71~83).

2001年に北海道栽培漁業振興公社羽幌事業場で採卵され、通常の種苗生産に使用される受精卵を中央水試に輸送し、孵化させた後対照魚として用いた。その後の飼育条件は、クローン魚と同様に設定した。

### (3) 仔稚魚の飼育

クローンヒラメ各系統及び対照魚の飼育には60Lアクリル水槽を用い、水温15℃で受精卵を孵化させ、3日後からは、18℃の調温海水でウオーターバスにより水温調節した。通常のワムシ、アルテミア、配合飼料の餌料系列で種苗の育成を行った。

## 2. 性分化

各クローン系統毎に同一の水温、収容密度、給餌条件で仔稚魚期を飼育し、性分化後の全長50~70mmの段階で各水槽から50尾ずつサンプルを採取し、生殖腺を含む腹部をブアン氏液で固定した。十分固定した後、腹部を解剖して生殖腺取り出し、その形状から雌雄を判別した。

## 3. 形態形成

### (1) 体色

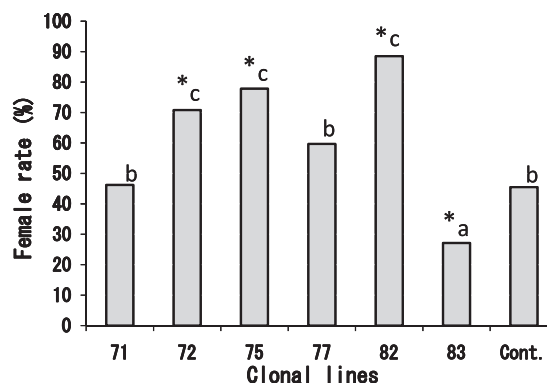


Fig.2 Female rates of clonal lines in Japanese flounder. Different letters on histograms show groups have significant difference among groups ( $p < 0.05$ ). Asterisks indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) from theoretical 1 : 1 sex ratio by  $\chi^2$  test.

全長120mmの段階で各水槽から50尾ずつサンプルを採取し、有眼側の白化及び無眼側の黒化の状況を調査した。

### (2) 体型

体色の状況を調査した魚各50尾について、体長及び体高並びに頭長を測定した。

### (3) 脊椎骨

全長100mmの時点で各水槽から70~80尾サンプルを採取し、軟X線撮影装置(SOFRON:SRO-iM50型)により撮影し、脊椎骨数とその癒合の状態を調べた。

## 4. 統計処理

雌の比率及び体色異常率は、 $\chi^2$ 検定により有意差を調べた。体高/体長比及び頭頂/体長比並びに脊椎骨数の有意差は、一元配置分散分析(ANOVA)を行った後、Tukeyの多重比較検定により行った。

Table 1 Occurrence frequency of abnormal coloration of clonal lines in Japanese flounder.

Clone	Pseudoalbinism on the ocular side (%)	Ambicoloration on the blind side (%)
71	0.0 <sup>a</sup>	60.0 <sup>c</sup>
72	5.0 <sup>b</sup>	57.5 <sup>bc</sup>
75	2.5 <sup>a</sup>	72.5 <sup>c</sup>
77	2.5 <sup>a</sup>	67.5 <sup>c</sup>
82	2.5 <sup>a</sup>	2.5 <sup>a</sup>
83	6.0 <sup>b</sup>	100.0 <sup>d</sup>
Control	35.0 <sup>c</sup>	20.0 <sup>b</sup>

Data are mean  $\pm$  standard deviation (n=50).

Different superscripts in the same column indicate groups have significant differences among groups at  $p < 0.05$ .

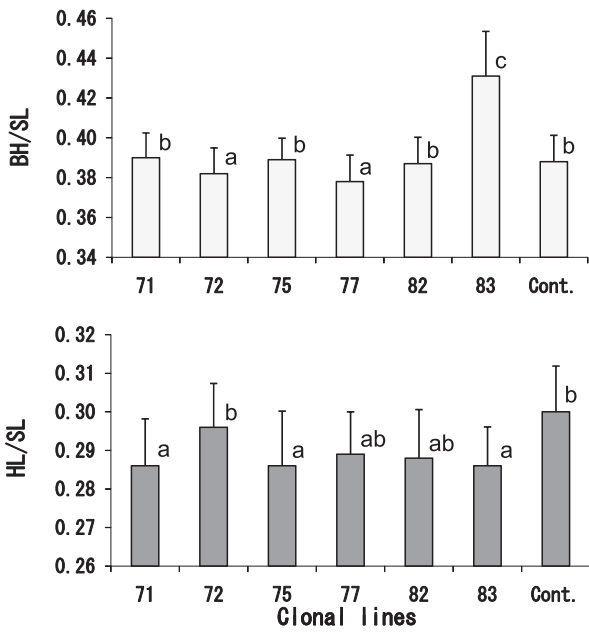


Fig.3 Comparison of BH/SL and HL/SL as a morphological characteristic of clonal lines in Japanese flounder. Vertical bars show standard deviations of the means. Different letters indicate groups have significant difference among groups ( $p < 0.05$ ).  
BH/SL: Body height/standard length ratio  
HL/SL: Head length/standard length ratio

Table 2 Vertebral number of clonal lines in Japanese flounder.

Clone	Abdominal region	Caudal region
71	10.9±0.3 <sup>b</sup>	26.6±0.7 <sup>c</sup>
72	10.8±0.4 <sup>b</sup>	26.0±0.8 <sup>c</sup>
75	10.9±0.2 <sup>b</sup>	24.8±1.8 <sup>b</sup>
77	11.0±0.5 <sup>b</sup>	26.7±0.5 <sup>c</sup>
82	10.8±0.5 <sup>b</sup>	26.1±1.0 <sup>c</sup>
83	9.3±1.6 <sup>a</sup>	23.7±2.3 <sup>a</sup>
Control	10.8±0.6 <sup>b</sup>	26.0±0.7 <sup>c</sup>

Data are mean ± standard deviation (n=70~80). Different superscripts in the same column indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

結果

1. 性分化

雌の比率 (Fig. 2) は, 82系統が88.5%と最高値を示したが, 75, 72, 77系統の順に率が低下し, 71系統では, 46.2%と対照区の45.5%とほぼ同様であり, 83系統では 27.1%と逆に雄の比率の方が高かった。雌の比率において, クローン系統間で明らかな違いが認められたが, 対照区の雌の比率は45.5%であり, 雌雄比ほぼ1 : 1であった。

2. 形態形成

(1) 体色

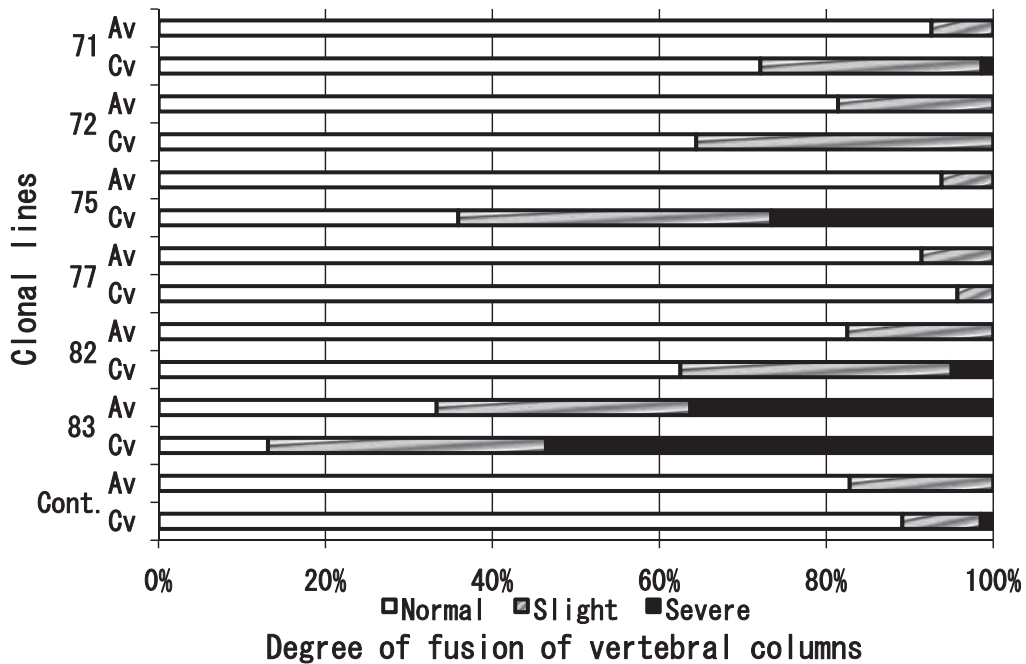


Fig.4 Occurrence frequency of vertebral fusion of clonal lines in Japanese flounder.  
Av: Abdominal vertebra  
Cv: Caudal vertebra  
Normal: No fused vertebra observed  
Slight: Only 1 or 2 vertebral fusion observed  
Severe: Over 3 vertebral fusion observed

対照区が有眼側の白化率において、35.0%と高かったが、クローン系統では全て6.0%以下であった (Table 1)。一方、無眼側の黒化率は対照区で20%と低く、クローン魚では、82系統を除いて57.5~100%と高い傾向を示した。しかし、82系統のみ2.5%と対照区より低かった。

## (2) 体型

体高比 (体高/体長) は、83系統が0.431で他の系統と比較して格段に ( $p < 0.01$ ) 高かった (Fig. 3)。一方、対照区は、0.388であり、71, 75, 82系統とほぼ同様の値であったが、72系統及び77系統は対照魚よりも有意 ( $p < 0.05$ ) に低かった。頭長比 (頭長/体長) は、対照区が、0.300で最も高く、次いで72系統が0.296であった。77系統と82系統は、0.288~0.289でほぼ同じ値であった。これら2系統を除く他の3系統において、対照区に比べて有意 ( $P < 0.05$ ) に小さい値であった。

## (3) 脊椎骨

脊椎骨数 (Table 2) は、対照区及び83系統を除くクローン系統の腹椎が平均10.8個なのに対して、83系統が平均9.3個であり、有意に ( $p < 0.05$ ) 低い値であった。尾椎についてもほぼ同様に、83系統のみ有意 ( $p < 0.05$ ) に少なかった。脊椎骨の癒合の状態をみると (Fig. 4)、癒合が3カ所以上起きている重度の個体が特に83系統に多く、腹椎及び尾椎共に約30%~50%の個体で認められた。他の系統では、75系統の尾椎で10%を超える個体で発生していた。一方対照区では、腹椎及び尾椎共に殆ど癒合は認められなかった。

## 考 察

### 1. 性分化

第一卵割阻止型雌性発生二倍体の次世代を雌性発生により作出したクローンヒラメは、遺伝的には全て雌 (XX) であるが、100%雌とはならず、高い比率で雄が出現する。この理由は、ヒラメは雄ヘテロ型 (XX-XY型) の遺伝的性決定機構を持ちながら、性分化に水温が影響を与えるためとされている<sup>3)</sup>。本研究では、本来の遺伝的性が発現される18~20℃で飼育した。また、孵化から性分化の完了する稚魚期を、水温以外の条件もほぼ同一の環境条件で飼育したにも拘わらず、雌の比率は、27.1~88.5%と大きな違いが系統間で認められた。従って、これらのことは、親魚の違い、すなわち雌親魚の遺伝的相違が性比に大きな影響を及ぼしていることを示す。一方、対照区の雌の比率は45.5%であり、雌雄比がほぼ1:1であったことから、飼育条件は正常に性分化が促される適正な環境であったと考えられた。

各クローン系統の雌比率を比較すると、82系統では90%近く雌となっており、高成長を期待する養殖用種苗生産においては、この系統が優れていると言える。一方、対照区よりもさらに低い雌比率を示した83系統は、著しく雄化し易い特性を持つ系統と言えよう。雌性発生により作出されたクローンヒラメにおいては、本来は全て雌になるはずであるが、雄に分化する個体が高い比率で出現するロットも多い。雌性発生により作出されたクローンヒラメ集団に出現した雄は、本来の遺伝的性とは逆に分化した、いわゆる偽雄であるが、機能的には雄であるため、クローン集団を世代を超えて維持するためには十分利用価値がある<sup>5)</sup>。しかし実際の養殖生産には、成長の良好な雌を使用の方が効率が良いため、雄の出現は極力避けなければならない。従って、雌比率の高い養殖種苗を生産するには、親魚管理の重要性が示唆される。

ヒラメの人工種苗生産・放流は現在全国的に実施されているが、採卵に使用される親魚の遺伝的性、特に偽雄が用いられることによるY遺伝子の消失の可能性が指摘されている<sup>6)</sup>。ヒラメの場合、染色体の形態的特徴から遺伝的性を判別することは不可能であることから、近年発展が著しい高感度DNAマーカーによる遺伝的性の判別技術開発が盛んに行われている<sup>7)</sup>。性特異的DNAマーカーを利用することで、本来の遺伝的雄、雌を種苗生産用の親魚として使用することが肝要であり、人工種苗の遺伝的多様性のみならず、遺伝的性にも配慮した「健苗」の育成が期待される。

### 2. 形態形成

本研究においては、クローンヒラメを用いて体色、体型、脊椎骨について調べたが、同一条件下における飼育においても、82系統の様に、ほとんど体色異常魚の出現しない系統が認められ、クローン系統による明らかな違いが示された。一方、体型に関しては、体高/体長の比率では、83系統が他の系統及び対照区に比較して、有意に大きな値を示しており、また脊椎骨の癒合の度合いと相まって、短軀体型となっていた。養殖魚においては、外見により商品価値に大きな差が生じる場合が多く<sup>8)</sup>、形態異常魚の出来るだけ出現しないことが、養殖用種苗が持つべき特性として重要である。その意味で82系統は、体色、体型ともに正常であり、養殖魚として求められる外見的特性に適合している系統といえるであろう。脊椎骨異常の最も顕著であった83系統は、前述の性分化においても本来の遺伝的性である雌に分化した割合が最も低かった。生殖腺の性分化は基本的に形態形成であると考えるとき、性分化と組織構築に関与する何らかの共通因子の存在が推察され、非常に興味深い結果であった。



ヒラメ・カレイ類においては、人工種苗生産を行うと、有眼側の白化や無眼側の黒化そして眼位異常などの形態異常魚が高い比率で出現する場合が多い。現在人工種苗生産が盛んに行われているヒラメにおいては、白化個体は養殖用種苗や放流用種苗として価値が低いため、その発現機構と防除法の確立が求められ、栄養学的、内分泌学的観点から様々な研究が行われてきた<sup>9-13)</sup>。異体類の左右不相称は変態により獲得され、白化魚は両側とも無眼側に、黒化魚は両側とも有眼側に変態したものとされている。即ち、形態異常は、「変態異常」であり、天然における本来の成長・発育段階に沿った育成がなされなかった場合に高率で出現するものとされている<sup>14)</sup>。一方、異体類の形態形成、特に変態との関連においては、その分子機構の解明も進められている<sup>15-17)</sup>。本研究で明らかとなった83系統の様に、形態異常の発現し易いクローン魚を実験材料として用いることで、形態形成更には性分化に関する分子機構の解明にも役立つものと考えられた。

体色異常個体は、放流後の生き残りが低いことや、養殖魚としての商品価値を損なうことから、有効な出現防除法の確立が求められてきた。しかし一方で、我が国で全国的に展開されているヒラメの種苗放流による栽培漁業では、放流魚の「無眼側黒化」を天然魚と区別する標識として利用することで、放流効果が算定されてきた<sup>18)</sup>。したがって、ヒラメの栽培漁業は、無眼側黒化無くしては、あり得なかったという側面も存在する。今後は、ヒラメ栽培漁業の更なる発展のための「モニタリング」手法として、体色異常魚に頼らない、真に有効な「標識法」の開発が望まれる。

## 要 約

1. ヒラメ養殖における育種素材としてのクローンヒラメの特性を評価するため、性分化と形態形成に着目して飼育試験を行った。クローン系統6系統及び通常発生魚を用いて、仔稚魚期を同一条件で飼育し、雌の比率、有眼側の白化、無眼側の黒化、体型、脊椎骨について調べた。
2. 雌の出現率の比較を行ったところ、82系統の雌の比率が88.5%と最も高く、83系統は27.1%で、対照区の45.5%よりも低い値であった。
3. 体色では、82系統は白化率、黒化率ともに極めて低かった。他の系統では、白化率は対照区よりも明らかに低かったが、逆に黒化率は、有意に高い値であった。
4. 体型については、体高/体長の比率及び脊椎骨癒合の度合いにおいて、83系統が他の系統と比較して有意に値が高く、短軀体型となっていた。

## 謝 辞

ヒラメの受精卵を提供して頂いた北海道栽培漁業振興公社羽幌事業所（現在；伊達事業所）の川下正己所長に感謝いたします。本研究の一部は、水産庁の補助事業「地域先端技術共同研究開発促進事業」により実施された。

## 文 献

- 1) 齊藤節雄, 森 立成, 伊藤慎悟, 鈴木邦夫: クローンヒラメの特性評価 第1報 成長性と耐病性のクローン間比較. 北水試研報. 76, 31~37 (2009)
- 2) 山本栄一: ヒラメの人為的性統御とクローン集団作出に関する研究. 鳥取水試報告. 34, 1-143 (1995)
- 3) 山本栄一: ヒラメの雌性発生および倍数化を利用した育種. 水産育種. 18, 13-23 (1992)
- 4) 青海忠久: “体色異常発現機構”. ヒラメの生物学と資源培養 (南 卓志・田中克編). 東京, 恒星社厚生閣, 1997, 63-73.
- 5) 山本栄一: “バイオテクノロジー”. ヒラメの生物学と資源培養 (南 卓志・田中克編). 東京, 恒星社厚生閣, 1997, 83-97.
- 6) 原田泰志: 野生集団への遺伝的影響の小さい種苗生産・放流方策の数理的研究 (水産育種研究会シンポジウム-天然集団の育種管理-). 水産育種. 27, 15-31 (1999)
- 7) 中山一郎: “性決定と関連するDNA/遺伝子”. 魚類のDNA (青木 宙・隆島史夫・平野哲也編). 東京, 恒星社厚生閣, 1997, 391-413.
- 8) 村田 修: “ヒラメ”. 最新海産魚の養殖 (熊井英水編). 東京, 湊文社, 2000, 109-130.
- 9) Seikai, T.: Reduction in occurrence frequency of albinism in juvenile flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery-reared on wild zooplankton. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 51, 1261-1267 (1985)
- 10) 三木教立, 谷口朝宏, 浜川秀夫: ヒラメの白化出現に及ぼす脂溶性ビタミン類投与ワムシの効果. 水産増殖. 36, 91-96 (1988)
- 11) Kanazawa, A.: Nutritional mechanisms involved in the occurrence of abnormal pigmentation in hatchery-reared flatfish. *J. World Aquaculture Soc.*, 24, 162-166 (1993)
- 12) Estevez, A., Kaneko, T., Seikai, T., Tagawa, M. and Tanaka, M.: ACTH and MSH production in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae fed arachidonic acid-enriched live prey. *Aquaculture*, 192, 309-319

(2001)

- 13) 竹内俊郎：“ヒラメ体色異常のメカニズムと防除法”. 東京, アクアネット, 1999, 2(10), 48-52.
- 14) 有瀧真人：カレイ類の変態と形態異常. 東京, 月刊海洋, 1995, 27, 732-739.
- 15) Suzuki, T., Oohara, I. and Kurokawa, T.: Hoxd-4 expression during pharyngeal arch development in flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos and effects of retinoic acid on expression. *Zool. Sci.*, 15, 57-67 (1998)
- 16) Suzuki, T., Oohara, I. and Kurokawa, T.: Retinoic acid given at late embryonic stage suppresses sonic hedgehog and Hoxd-4 expression in the pharyngeal area and induces skeletal malformation in flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. *Develop. Growth Differ.*, 41, 143-152 (1999)
- 17) Hashimoto, H., Mizuta, A., Okada, N., Suzuki, T., Tagawa, M., Tabata, K., Yokoyama, Y., Sakaguchi, M., Tanaka, M. and Toyohara, H.: Isolation and characterization of a Japanese flounder clonal line, *reversed*, which exhibits reversal of metamorphic left-right asymmetry. *Mech. Dev.*, 111, 17-24 (2002)
- 18) 北田修一：“放流効果の評価”. 栽培漁業と統計モデル分析(北田修一著). 東京, (株)共立出版, 2001, 171-206.