

エゾイワナ *Salvelinus leucomaenis leucomaenis* 胚の 倍数性の判定

松谷 武成¹・孔 明鋒¹・太田 裕達²・坂本 啓²・熊野 芳明³

Estimation of Ploidy in Embryo of *Salvelinus leucomaenis leucomaenis*

Takehige MATSUTANI¹, Myongbong KON¹, Hiroto OTA², Kei SAKAMOTO², Yoshiaki KUMANO³

Department of Biological Engineering, Faculty of Science and Engineering, Ishinomaki Senshu University,
Miyagi 986-8580, Japan

Miyagi prefectural Freshwater Fisheries Experimental Station, Taiwa, Miyagi 981-3625, Japan
Kesenuma Miyagi prefectural Fisheries Experimental Station, Kesenuma, Miyagi 988-0427, Japan

Abstract

In this study, a method for estimating the ploidy of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis leucomaenis*) embryos was examined. It involved counting the number of nucleoli in embryos that were fixed 29-315 h after fertilization. Contamination of other than the embryo cells considerably impeded the observation of the nuclei and nucleoli; therefore, pretreatment of the embryos was developed, and a morphological standard of nuclei for estimation of ploidy was set. Thus, the ploidy of the embryos that were fixed 99 h after fertilization was estimated.

序論

二倍体と四倍体の交配による三倍体の作出法が報告されている⁽¹⁾。エゾイワナ *Salvelinus leucomaenis leucomaenis* においても、成長が速い三倍体は産業的に有用と考えられ、三倍体および四倍体の作出が試みられているが、その成功率はいずれも極めて低い⁽²⁾。したがって、倍数化処理個体の倍数性を処理後できるだけ早く判定する手法の確立が、成功率の高い倍数体作出技術の開発に貢献すると考えられる。

染色体数、DNA量、赤血球サイズによる倍数性判定法が知られているが^(3,4,5)、これらのなかで最も簡易な判定法とされる赤血球サイズの利用においても、対象生物が血液採取可能サイズに生長するまで多くの時間と飼育スペースを要する。

そこで、銀染色法の応用が報告され⁽⁶⁾、アマゴの場合、発眼卵の倍数性が判定可能であると報告されている⁽⁷⁾。現在エゾイワナでも孵化仔魚の核小体から倍数性を判定することが可能である(熊野、私信)。しかし、全ての実験区の受精卵を体

組織の採取が可能となる仔魚期まで飼育するにはかなりの時間と施設を要することから、孵化前に倍数性を判定することができれば倍数体作出技術の改善に時間と費用の面で大きく貢献すると考えられる。そこで、本研究ではエゾイワナ胚における倍数性判定法を検討した。

材料と方法

宮城県内水面水産試験場で受精および倍数化処理したエゾイワナの無処理受精卵(二倍体)、三倍体化処理受精卵(2006年10月19日、水温9℃、吸水10分、28℃処理20分；第二極体放出阻止)、四倍体化処理受精卵(2006年11月2日；29℃処理15分、第一卵割阻止)を使用した。無処理受精卵と三倍体化処理受精卵を受精後29時間(A)、48時間(B)、74時間(C)、99時間(D)、147時間(E)、196時間(F)、315時間(G)に、四倍体化処理受精卵を受精後103時間(α)、270時間(β)にそれぞれカルノアで固定し、-20℃で保存した。これらの受精卵の胚を摘

¹ 石巻専修大学理工学部生物生産工学科

² 宮城県内水面水産試験場

³ 宮城県気仙沼水産試験場

出し、銀染色を以下のステップ(①~⑥)で行った。

- ①染色液の調整は Howell and Black⁽⁸⁾の方法を用いた。
- ②ピンセットとメスによって各サンプル(受精卵)の胚をその周囲部とともに摘出した。
- ③50%酢酸(マイクロチューブ)に試料を移し、30分間静置した。
- ④先端を加工したホモジナイザーペッスル(アズワン)でマイクロチューブ内の試料を攪拌(400 r.p.m)した。
- ⑤ホットプレート(70 °C)上で、パスツールピペットでスライドガラスに試料を滴下し、室温で試料を乾燥させた。
- ⑥スライドガラスの試料に前記①の方法で銀染色をし、カバーガラスで封入した。
- ⑦生物顕微鏡で核と核小体を観察して計数した。

結果

胚の部分をその周囲部とともに摘出して作製した細胞試料に銀染色を行ったが、全体的に黄色に染まり、核および核小体を確認することができなかった(図.1)。そこで胚の前処理法として、胚の摘出、酢酸濃度、浸漬時間、洗浄等を検討した。

胚の前処理法の検討

(1) 胚の摘出

受精卵を構成する胚、油球、卵膜を単離し、それぞれを銀染色した結果、黄色因子は、胚、油球、卵膜の全てに含まれ、そのなかでも油球が最も強く黄色に染まった。そこで、できる限り油球を含まないように胚を摘出した。卵膜に付着した胚を処理する場合は、マイクロチューブ内で軽く攪拌して卵膜と胚を分離し、卵膜(卵膜の断片)をマイクロチューブから取り出した後に攪拌を継続した。

(2) 酢酸濃度と浸漬時間

50%酢酸に30分間浸漬していたが(ステップ③)、胚が溶解しやすいので酢酸濃度と浸漬時間を検討した。

5%、10%、20%の酢酸に胚および油球を浸漬した結果、20%酢酸では25分後には胚および油球は完全に溶失した。5%、10%酢酸は30分以上

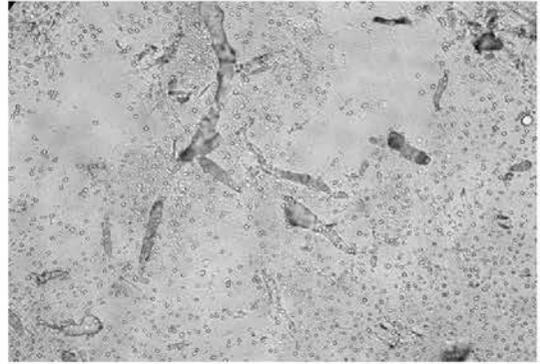


Fig. 1 A preparation with yellowish background.

経過しても胚および油球は残存していた。5%酢酸が胚および油球の保持が良好であったが、10%酢酸が胚の細胞の拡散性が良好であった。そこで酢酸濃度を10%、浸漬時間を10分とし、また、胚細胞の拡散率を向上させるために700 r.p.mで攪拌した。

(3) 洗浄

可能な限り試料中の油球成分を除くため、遠心分離操作による胚の洗浄法を検討した。

1000 r.p.m、2000 r.p.m、3000 r.p.m、5000 r.p.m、7000 r.p.mで3分間遠心し、その上澄み液を捨て、沈殿物をスライドガラスに滴下して銀染色を行った。その結果、7000 r.p.m試験区において核および核小体を最も確実に確認することができた。したがって洗浄ステップにおける遠心は3分間7000 r.p.mとした。

受精卵の倍数性の判定

以上のことから、受精卵を以下のステップで銀染色を行い、その倍数性を検討した。

- ①染色液の調整は Howell and Black⁽⁸⁾の方法を用いた。
- ②ピンセットとメスによって各サンプル(受精卵)から、“胚だけ”または“油球を含まないように卵膜に付着した胚”を摘出した。
- ③卵膜に付着した胚を処理する場合は、軽く攪拌して卵膜と胚を分離し、卵膜(卵膜の断片)をマイクロチューブから取り出した後に攪拌を継続した。
- ④10%酢酸(マイクロチューブ)に試料を移し、10分間静置した。

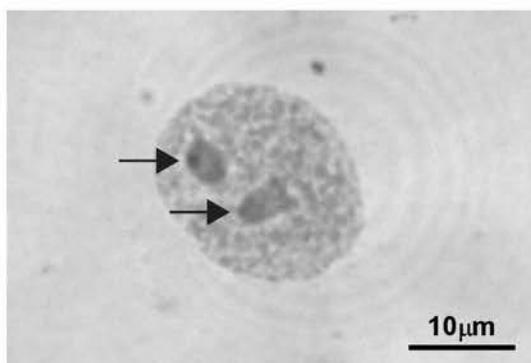


Fig. 2 Nucleus having three nucleoli (arrows).

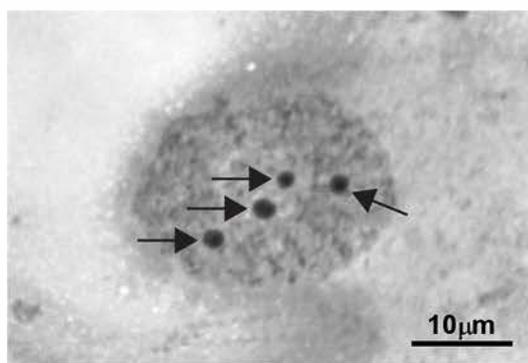


Fig. 4 Nucleus having three nucleoli (arrows).

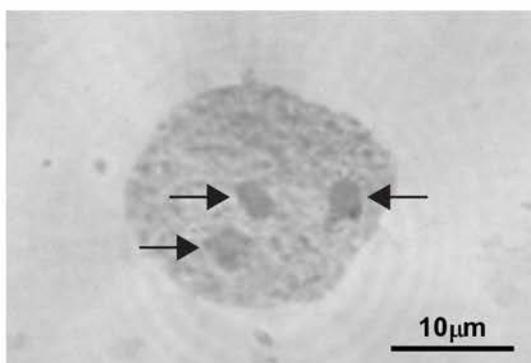


Fig. 3 Nucleus having three nucleoli (arrows).

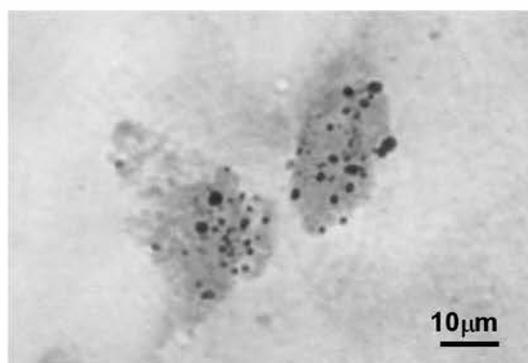


Fig. 5 Nuclei with many nucleoli of various size.

- ⑤静置後、前記のホモジナイザーペッスルでマイクログラフ内の試料を攪拌 (700 r.p.m) した。
- ⑥7000 r.p.m で3分間遠心した。
- ⑦沈殿試料をホットプレート (70 °C) 上で、パスツールピペットでスライドガラスに滴下し、室温で試料を乾燥させた。
- ⑧スライドガラスの試料に前記①の方法で銀染色をし、カバーガラスで封入した。
- ⑨生物顕微鏡で核と核小体を観察して計数した。

この方法で銀染色を行い、高い確率でエゾイワナの受精卵の胚細胞の核および核小体を観察できた (図. 2、図. 3、図. 4)。しかし、同一試料においても明らかに変形した核や様々な形状や数の核小体も確認された (図. 5)。したがって、倍数性を判定する際に計数対象とする核の形態に次の

ような基準 (計数対象基準) を設けた。

計数対象基準 - 1 円形か楕円形に近い核。

計数対象基準 - 2 円形か楕円形に近い形の核小体しか存在しない核。

計数対象基準 - 3 長径が $2.5 \mu\text{m} - 5 \mu\text{m}$ の核小体を含む核。

以上の条件を全て満たしている核だけを計数対象とし、各試料 (A-G、 α 、 β) につき核を200個計数した。また、同数の核小体を有する核の割合を求め、その割合をもとに倍数性判定の基準を定めた。

倍数性判定の基準 (図. 6.a、図. 6.b、図. 6.c)

二倍体：核小体数が2個の核が計数対象とした核の60%に達している個体。

三倍体：核小体数が3個の核が計数対象とした核の60%に達している個体。

四倍体：核小体数が4個の核が計数対象とした核

エゾイワナ *Salvelinus leucomaenis leucomaenis* 胚の倍数性の判定

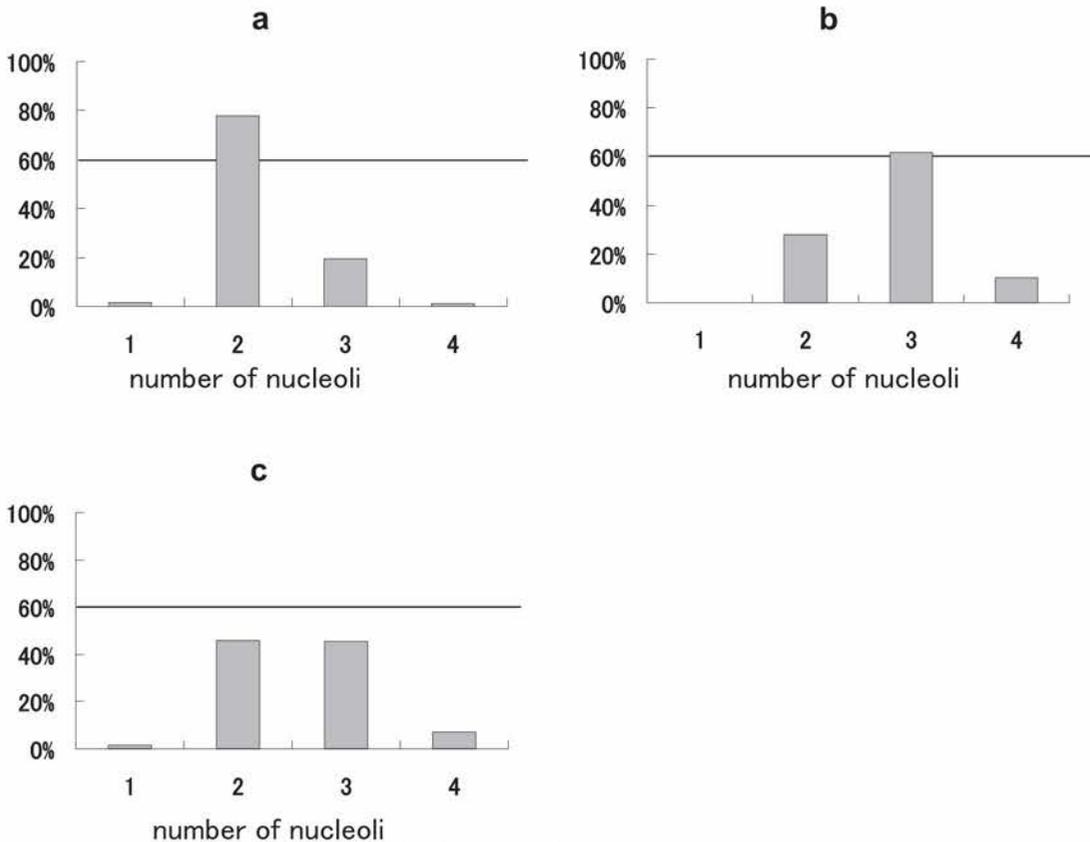


Fig. 6 Percentage of nucleus having each the number of nucleolus and ploidy a, diploid. b, triploid. c, not determined.

Table 1 Ploidy in the embryos

Tittime after fertilization sample	29-74h A-C		99h D		147h E		196h F		315h G		103h α	270h β
	2N	3N	2N	3N	2N	3N	2N	3N	2N	3N	4N	4N
treatment ⁽¹⁾												
diploid	-(⁽²⁾)	-	10	1	9	0	8	0	8	0	0	※(⁽³⁾)
triploid	-	-	0	4	0	6	1	5	0	7	0	※
tetraploid	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	3	※
not determined	-	-	0	1	1	4	1	5	2	3	4	※
total			10	6	10	10	10	10	10	10	7	

(1) 2N, embryos for production of diploid. 3N, embryos for production of triploid. 4N, embryos for production of tetraploid.

(2) Nucleoli were not observed.

(3) The number of nuclei in which nucleoli were observed was less than 200.

の60%に達している個体。

不明：計数対象とした核の60%に達する核小体数の核が観察されない個体。

以上の方法と判定基準に従って全ての試料を処

理した結果を表. 1 に示した。受精後 99 時間の無処理受精卵（二倍体）は 10 個体中 10 個体が二倍体と判定された。三倍体化処理受精卵は 6 個体中 1 個体が不明、5 個体が判定可能でそのうち 4 個

体が三倍体で1個体が二倍体と判定された。無処理受精卵（二倍体）の全てのサンプルの80-100%が二倍体と判定され、1個体が三倍体と判定された。三倍体化処理受精卵ではその50-70%が三倍体と判定された。四倍体化処理受精卵では、四倍体と判定されたのは受精後103時間のサンプルにおいては約43%だった。しかし、受精後270時間の全てのサンプルでは計数対象基準を満たす核が200個以下であったことから、倍数性の判定はできなかった。

本研究で開発した受精卵の胚の核小体染色法では、ほとんどの個体について倍数性を判定することができたが、受精後29時間から74時間までのサンプルでは核小体を確認できず、その倍数性を判定できなかった。しかし、本研究で開発した方法により受精後99時間の受精卵の倍数性をおおむね判定することができた。

考察

本研究において開発した処理法と判定基準では、無処理受精卵（二倍体）の1個体が三倍体であると判定された。無処理受精卵（二倍体）であっても第2極体放出の自然抑制により、三倍体が誕生する可能性は否定できない⁽⁹⁾。また、核小体は細胞分裂の時期に応じて核小体が離散、集合することから⁽¹⁰⁾、三倍体化処理受精卵や四倍体化処理受精卵のより正確な倍数性判定法の確立にはさらに検討の余地があると考えられる。そして、実用性を考慮して処理法の簡便化も検討する必要がある。しかし、発眼卵の倍数性を判定するにはアマゴの場合、受精後約432-480時間を要し⁽⁷⁾、エゾイワナの孵化仔魚の倍数性を判定するには受精後約1080時間を要するが（熊野、私信）、本研究では受精後99時間の受精卵の倍数性をおおむね判定することができた。したがって、本研究は倍数体作出技術の確立に時間と経費において貢献すると考えられた。

要約

受精29~315時間後に固定したエゾイワナ受精卵を用い、その倍数性を孵化前に判定する方法を検討した。胚以外の部位が少量でも試料に混入すると、核および核小体の観察を著しく妨げること

から、摘出した胚の前処理法を検討し、銀染色によって核および核小体を確認することができた。次に倍数性を判定する際に計数対象とする核の形態に基準（計数対象基準）を設けるとともに、同数の核小体を有する核の比率による倍数性判定基準を定めた。その結果、受精99時間後の受精卵の倍数性を推定することができた。

謝辞

本研究をまとめる際に、文献をご紹介いただくとともに貴重なアドバイスをいただいた東北大学大学院農学研究科谷口順彦教授に心より感謝申し上げます。

文献

- (1) Chourrout D, Chevassus B, Krieg F, A, Happe A, Burgr G, Renard P (1986) Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females-Potential of tetraploid fish. *Theor. Appl. Genet*, 74, 193-206.
- (2) 須藤篤史、小野寺毅 (2000) 不妊化イワナ養殖技術開発研究、平成12年度バイオテック利用養殖システム高度化事業報告書（宮城県内水面水産試験場）、1-11.
- (3) Yamazaki F, Onozato H, Arai K (1981) The chopping method for obtaining permanent chromosome preparation from embryos of teleost fishes. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 47, 963.
- (4) Zhang Q, and Arai. K (1996) Flow Cytometry for DNA of somatic cells and spermatozoa in the Progeny of natural tetraploid loach. *Fisheries Sci*, 62, 870-877.
- (5) 稲田善和・谷口順彦 (1990) 人為三倍体アユの諸特性について、水産育種, 15, 1-9.
- (6) Carman O, Oshiro T, Takashima F (1992) Variation in the maximum number of nucleoli in diploid and triploid common carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 2303-2309.
- (7) 山本 勝・佐藤正治・佐藤治平・昆 洋一・張全啓・内村祐之 (1997) 高水圧および高水温処理によるアマゴ四倍体の誘起とその最大核小体数とDNA量測定による確認 水産育種, 25, 37-48.
- (8) Howell WM and Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36, 1014-1015.

エゾイワナ *Salvelinus leucomaenis leucomaenis* 胚の倍数性の判定

- (9) 谷口順彦 (1997) 新しい遺伝資源の開発 [2] ゲノム操作法による魚類品種改良の現状と展開 農業および園芸, 72, 859-865.
- (10) Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1995) 細胞の分子生物学第3版, Newton Press, pp. 335-399.