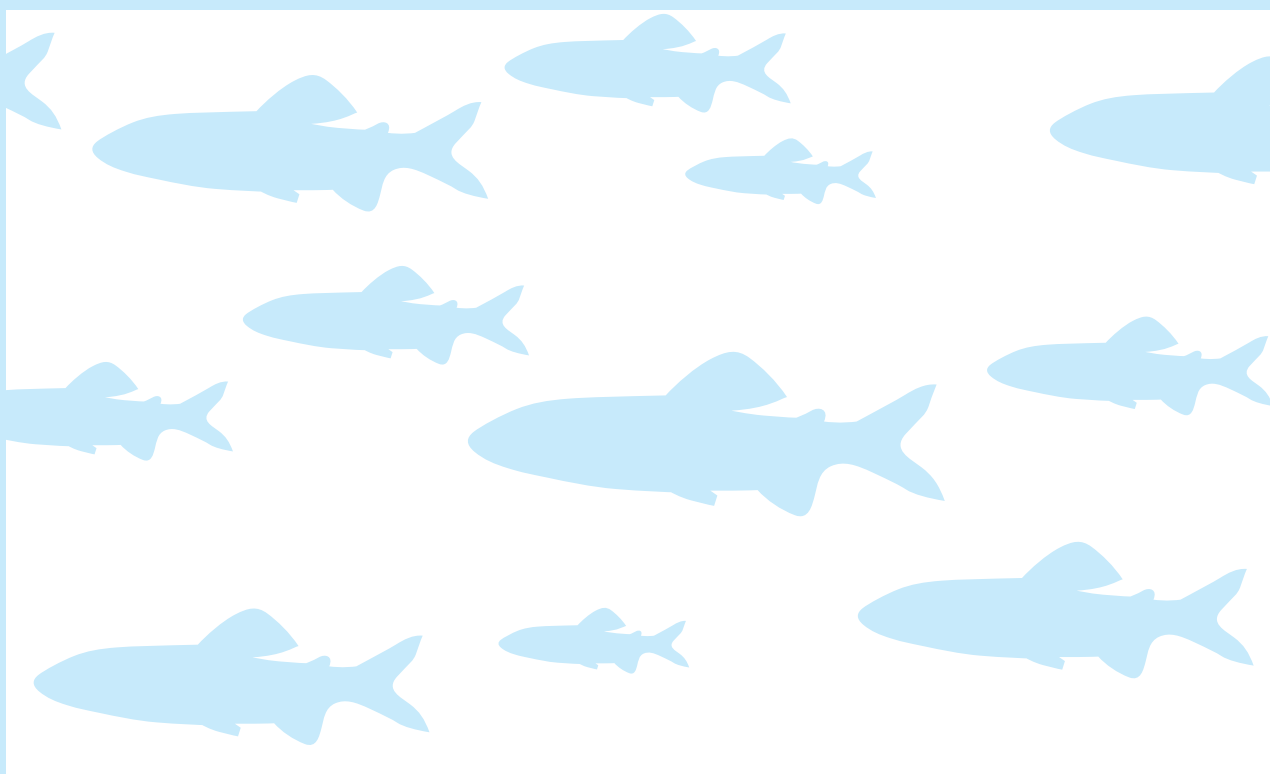


水産育種

FISH GENETICS AND BREEDING SCIENCE

Volume 42
Number 2
January 2013



水産育種研究会

The Japanese Society of Fish Genetics and Breeding Science

水産育種

第42巻 2号

目次

観賞魚育種シンポジウム記録

シンポジウム開催にあたって 岡本信明 47

第一部 観賞魚における遺伝育種の基礎研究

水産育種学における観賞魚の利用 中嶋正道 49

キンギョの性行動の内分泌調節とその性的可逆性 小林牧人・竿代誠二・早川洋一 55

観賞魚育種と水産育種研究 尾崎照遵 63

ニシキゴイの親魚管理と育種戦略 谷口順彦 71

第二部 観賞魚における品種改良の試み

民間養魚場における品種改良の取り組み 杉本俊輔 79

新潟県におけるニシキゴイ育種の取り組み 佐藤 将 81

観賞魚育種の取組（埼玉県） 田中深貴男 85

愛知県におけるキンギョ研究の取り組みと平成24年度金魚日本一大会 本田是人 89

報文

グッピーにおける非致死高温処理による高温耐性の獲得と HSP70 発現量との関係
..... 望月健彦・酒井則良・中嶋登代子・中嶋正道 91

会員通信

新たなシンポジウム「観賞魚育種シンポジウム」の試み 中嶋正道 99

水産育種研究会会則 101

水産育種投稿要領 102

平成25年 1月31日

水産育種研究会

－ 観賞魚育種シンポジウム記録 －

シンポジウム開催にあたって

岡本信明（水産育種研究会 観賞魚部会長）

本シンポジウム開催の目的は、観賞魚における遺伝育種研究の発展と観賞魚に関わる人々の幅広い連携を目指すものです。水産生物の育種の中で最も成功している例の一つとして観賞魚があり、研究者や自治体のほか、生産者やアマチュア愛好家まで多くの人が携わっています。しかし、観賞魚の水産生物としての認知度は低く、水産研究者の間では別物として扱われているのが現状です。一方で、小型の観賞魚は実験動物としての利便性から、水産有用魚類のモデル動物として育種や遺伝、発生等様々な分野で用いられ、多くの知見が集積されつつあります。本シンポジウムではこのような基礎的研究から得られている情報とそれら情報の観賞魚育種への応用・発展ならびに産業としての観賞魚の重要性について、話し合う機会になればと考えております。本シンポジウムでは、鑑賞魚を用いた基礎研究と自治体や生産者が行っている観賞魚の新品種開発などへの取り組みについて、話題提供をいただき、議論を深めていただければと思っております。

振り返ってみますと、設立以来43年の歴史を有する水産育種研究会ですが、今までは観賞魚における育種を必ずしも積極的には研究対象にしてこなかったように思います。しかし、過去に遡れば、名著、松井佳一先生の「科学と趣味から見た金魚研究」（復刻版発行、成山堂書店）に、金魚の遺伝が章立てされているように、決して観賞魚の育種に向けた取り組みがなかったわけではありません。私はこの本の復刻にあたり「……、約70年前に出版された本書は、松井佳一先生の22年間にわたる研究成果をまとめたもので、その内容は多岐にわたっています。……、特に遺伝に関するところは圧巻です。模様や色などの表現型から、それを支配している遺伝子（遺伝型）を推定したくんだり、

先生の執念を感じます。……」と推薦の言葉を書かせていただきました。遺伝形質としての表現型からそれに関わる遺伝子を想定してきた遺伝学は、分子生物学の手法を取り入れた分子遺伝学へと発展し、表現型を支配する遺伝子を同定することを可能にしました。さらには、一つの表現型に及ぼす異なる遺伝子の相互関係すら明らかにできるようになりました。松井先生の時代には想像もつかなかった研究環境を私たちは手にしています。チャンスが巡ってきたと思います。

金魚は中国で誕生したことは間違いないところですが*、世界で愛される金魚にまで改良したのは日本と言ってよいでしょう。錦鯉に至っては、日本で誕生し、日本で改良した自慢の一品です。グッピー等の熱帯魚にも日本発の改良や新品種の誕生が期待されています。私は分子遺伝学がもたらした新しい知見とその研究方法（解析ツール）を有する研究者と観賞魚生産者やアマチュア愛好家が合体すれば、「観賞魚飼育のプロと遺伝解析のプロとの合体集団」が出来上がり、育種成果は後年に譲るとしても、少なくとも「遺伝・育種談義」に花が咲くに違いないと思っています。第一回でもあり、観賞魚飼育のプロの参加は少ないかもしれませんが、本シンポジウムがその第一歩となることを願っています。研究者にとっては、“仮説” 検証の場を得ることになり、観賞魚生産者やアマチュア愛好家にとってはその成果を“夢” の実現への足掛かりにすることができます。

観賞魚生産者やアマチュア愛好家の皆様への本会の周知は、ひとえに、現会員の皆さんの口コミ宣伝にしか頼るものではありません。観賞魚生産者やアマチュア愛好家の皆様への口コミ宣伝をよろしくお願い申し上げます。

*：木島 隆・二見邦彦・方波見弥穂他（共著者9名）（2008）ミトコンドリア DNA D-loop 領域からみたキンギョの起源，水産育種，38: 97-103；Komiyama T, H. Kobayashi, Y. Tateno, *et al.* (6 co-authors) (2009) An evolutionary origin and selection process of goldfish. *Gene*, 430(1-2): 5-11.

－ 第一部 観賞魚における遺伝育種の基礎研究 －

水産育種学における観賞魚の利用

中嶋正道 (東北大院農)

The Application of Ornamental Fish for the Study of Fish Breeding

Masamichi NAKAJIMA

Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

Abstract

From the early 1900s, fishes have been used as experimental animal for the genetics, physiology and behavior etc. Especially, medaka, guppy, zebra fish and gold fish have been used frequently. The reasons why the fishes were used as experimental animal are the ease of maintenance and culture which were constructed by commercial system. From these reasons, many strains and varieties have been produced as ornamental strains, since recent 150~100 years. These strains which have conspicuous morphological and genetic characters were useful for the experiment of fish genetics and breeding. These strain differences were used for the examination of genetic influence to the certain character, such as growth, tolerance to environmental stress and behavior.

In the case of the guppy, the number of genes which affecting to the strain differences of the body size in adults was estimated. And the possibilities of the selection breeding used breeding value in fishes were suggested from the model experiment.

Thus, the ornamental fish occupies the status important not only as a hobby and/or appreciation, but also as an experimental fish. And even if this importance will increase, it will not decrease.

(accepted January 15, 2013)

1. はじめに

近年魚類養殖が盛んになり、様々な魚種で品種改良が試みられている。これら魚種の中での遺伝育種において最も成功している例は観賞魚であると言える。観賞魚では体色や模様、鰭の形などの形質において様々な系統や品種が作出されている。これは魚類に限らず犬や猫、鳥類においても同様である。Dawin¹⁾は「種の起源」の中で最初の章に「飼育下に生ずる変異 (Variation under domestication)」を充てている。意識的、無意識的な選択によりこの時代はすでに多種多様な犬やハトなど自然界では観察されないような変種 (品種) が作出されていたことに注目している。観賞魚の品種改良、品種作出と言えばキングジョーやニシキ

ゴイが思い浮かぶと思う。いずれもコイ科の魚で人為管理下での飼育が容易であったためと考えられる。中国では晋の時代 (AD265年ころ) の文献には既に記載がみられる²⁾。グッピーは1850年にイギリスの植物学者レクメア・グッピーがトリニダード島で見つけた小型で模様の美しい魚を大英博物館に報告したのが観賞魚としての歴史の始まりである。それからわずか150年余りの間に様々な品種が作出されているが、もともとの色彩は現在の華やかな品種と比べると地味である (Fig. 1)。グッピーの色彩や模様の特徴は雄が美しく、雌が地味であることである。このことが研究者の興味を誘ったのか、魚類の遺伝的実験動物として最初に用いられた種のひとつはグッピーであった。



Fig. 1 Wild type of the guppy.

2. 観賞魚の実験魚としての歴史

Schmidt³⁾ は色彩の多くの遺伝子がグッピーでは Y 染色体上に存在していることを示した。また、Winge^{4, 5)} や Winge and Ditlevsen⁶⁾ は色彩や模様に関与する遺伝子の多くは Y 染色体上に存在するが、一部は Y 染色体から X 染色体へ、およびその逆へ乗り代わることを示した。常に Y 染色体上に存在する遺伝子によって支配される形質は雄にしか現れないことから「限性遺伝」と呼ばれる。Morgan がショウジョウバエで伴性遺伝を発見し、染色体地図を作製した際、Y 染色体上には遺伝子が見つからず、Y 染色体上

には遺伝子はないものとされていた。グッピーにおけるこれらの遺伝子は Y 染色体上に存在する遺伝子として最初に示された例となった。一方、日本でもメダカを用いた遺伝学的実験が行われ、Aida⁷⁻⁹⁾ はヒメダカの体色が X 染色体上の遺伝子で決まることを示している。その後、メダカはこのほかに放射線の影響評価の実験など様々な研究に用いられるようになった¹⁰⁻¹²⁾。このように観賞魚が実験動物として用いられるようになった歴史は結構古いことがわかる。

グッピーは1900年代の初めに Winge が実験魚として用いて以来、実験魚として用いられた例はあまり多くない。これはグッピーが卵胎生で、人工授精ができず、初期発生の観察もできないことによる。魚類の初期発生や形態形成の研究にメダカやゼブラフィッシュ、キンギョ等が用いられるのは体外受精で初期発生の過程を観察できることが大きい。しかし、グッピーは繁殖力が強く、卵管理の必要がなく発生が安定している、したがって初心者でも容易に扱えるなど集団レベルや育種学的研究には適した一面も有している。我々の研究室でグッピーを実験魚として用いているのはこの理由によるところが大きい。一方、近年では詳細な連鎖地図が作成され、様々な系統の特性である模様や色彩に関与する遺伝子の同定が進められている¹³⁾。

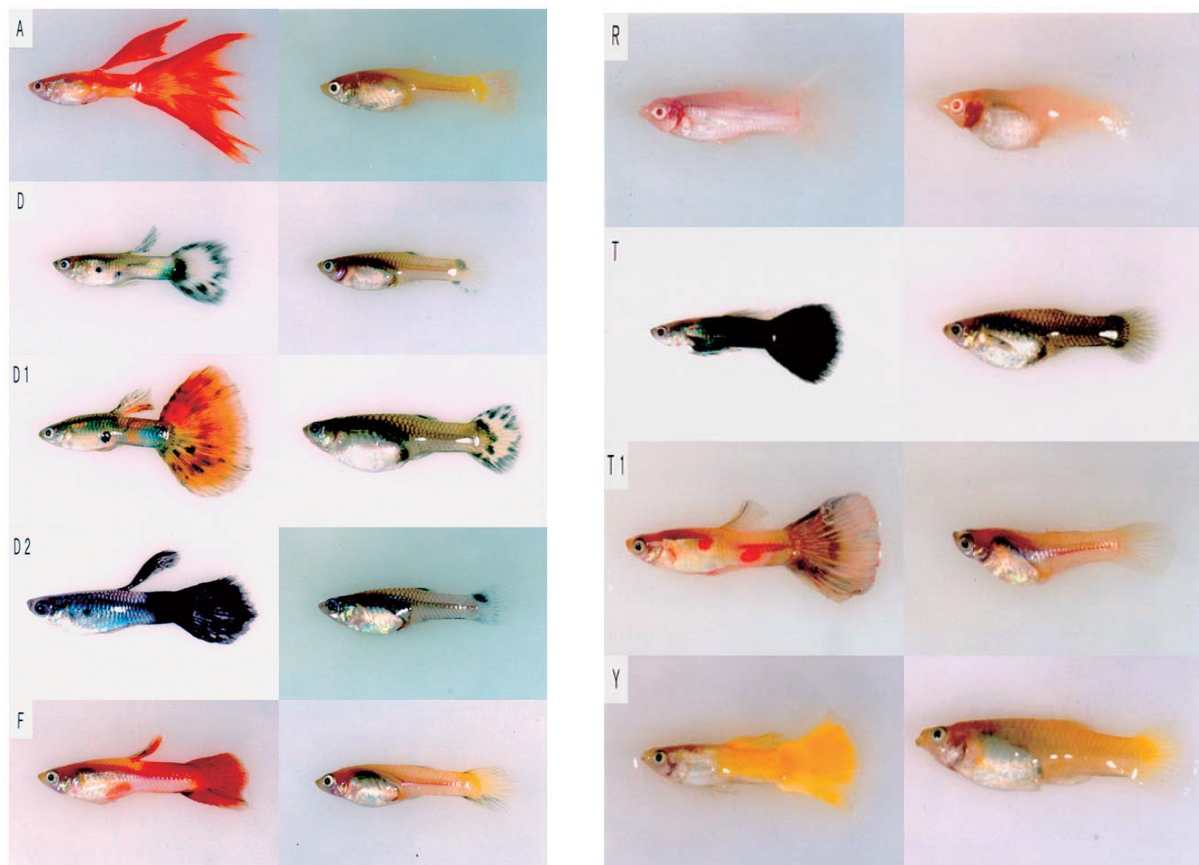


Fig. 2 Closed colonies maintained in our laboratory.

3. 観賞魚を用いることの利点

遺伝育種における実験動物として用いられるための必要条件として以下の三つの点が挙げられる。①遺伝的に均一であるかそれに近い状態にあるいくつかの遺伝的に異なった系統が存在する。観賞魚はその品種作出の過程で特定の形質に特化するように選択を受け遺伝的にかなりそろった状態にあるため実験動物としての必要条件を満たしていると言える。②世代時間が短い。グッピーやメダカ、ゼブラフィッシュの世代時間は約3か月である。上手く繁殖させれば1年間で4世代の更新が可能となる。バッククロスやF₂の分離を見たい時などは世代時間の短さが強みとなる。③入手が比較的容易で飼育方法が確立されている。グッピーやメダカ、ゼブラフィッシュ、キンギョなどは観賞魚として一定規模の市場があるため入手が比較的容易で飼育方法が確立されていることから比較的容易に維持管理ができる。自ら選択を行うことにより系統を作出することが比較的容易であるとともに、実験魚として確立された系統も存在し、有料あるいは無料で提供されている。

当研究室で維持されているグッピークローズドコロニーを Fig. 2 に示す。いずれも特定の形質について選択された後、クローズドコロニーとして維持されている。実験魚として確立された系統の遺伝的変異性は一般に低い。グッピーの野生化個体と品種として確立された系統、品種として確立された系統をさらに研究室でクローズドコロニーとして維持した場合、三グループ間で平均ヘテロ接合体率 (He) を比較するとクローズドコロニーが圧倒的に低く、野生化個体が高い値を

示す (Fig. 3)。また、同一系統を起源としていても、時間の経過に伴い分化した二つの系統間に遺伝的差異が生じてくる (Fig. 4)。これらの結果は、観賞魚においては遺伝的に性質の異なった系統 (品種) が既に存在していることを示している。

ある形質の差異が遺伝的なものであるか環境要因によるものかを明らかにしたい場合、まず初めに行うのが同一条件下で飼育したいくつかの系統間での差異を調べることである。Kanda *et al.*¹⁴⁾ はグッピーにおける高温耐性で、Shikano *et al.*¹⁵⁾ は塩分耐性で、系統間比較からそれぞれの形質の個体差に遺伝的要因が関与していることを示している。また、Nakajima and Fujio¹⁶⁾ は成長の系統間比較から体長の系統差が遺伝的要因によることを示しており、Yamanaka *et al.*¹⁷⁾ は系統間の比較から体長の系統差に關与する遺伝子数の推定を行っている。観賞魚ではこのような系統がすでに作出されていることや商業的に飼育方法が確立されていること、飼育機材が安価で容易に入手できることなどから、実験魚として大きな利点を有しているといえる。

4. 観賞魚を用いた育種研究

観賞魚を用いた育種研究として以下に実例を挙げる。

1) 成長の系統差と遺伝的要因：グッピーには大きく分けて大型系と小型系の2系統が存在している (Fig. 5)。大型系はファンシータイプと呼ばれる色彩や模様等に関して選択を受けた系統が多く、小型系にはスタンダード (ワイルド) タイプと呼ばれる野

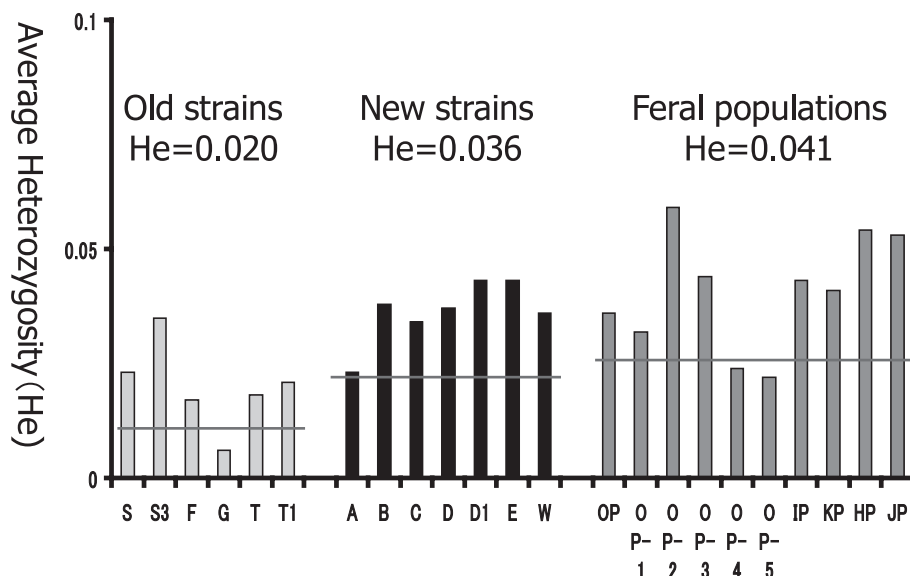


Fig. 3 Comparison of average heterozygosity among old strains, new strains and feral populations.

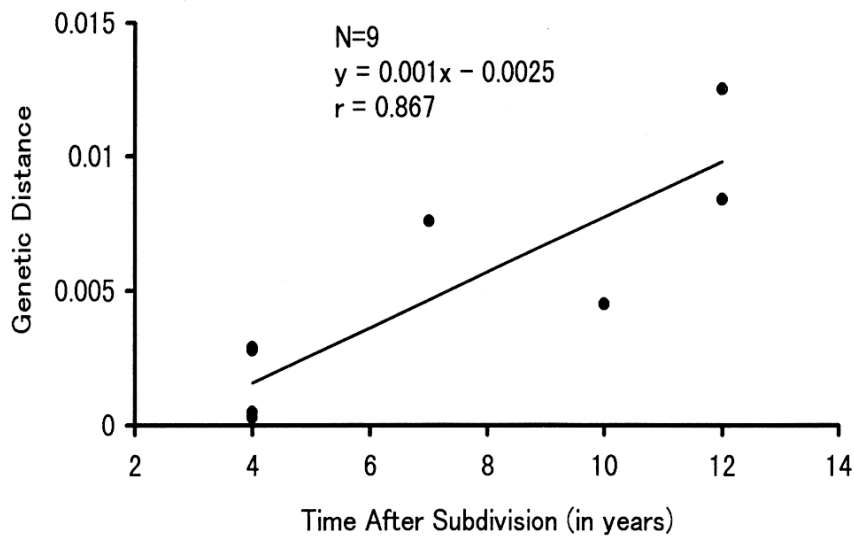


Fig. 4 Relationship between genetic distance (Nei 1972) and divided time. Significant positive correlation was observed.

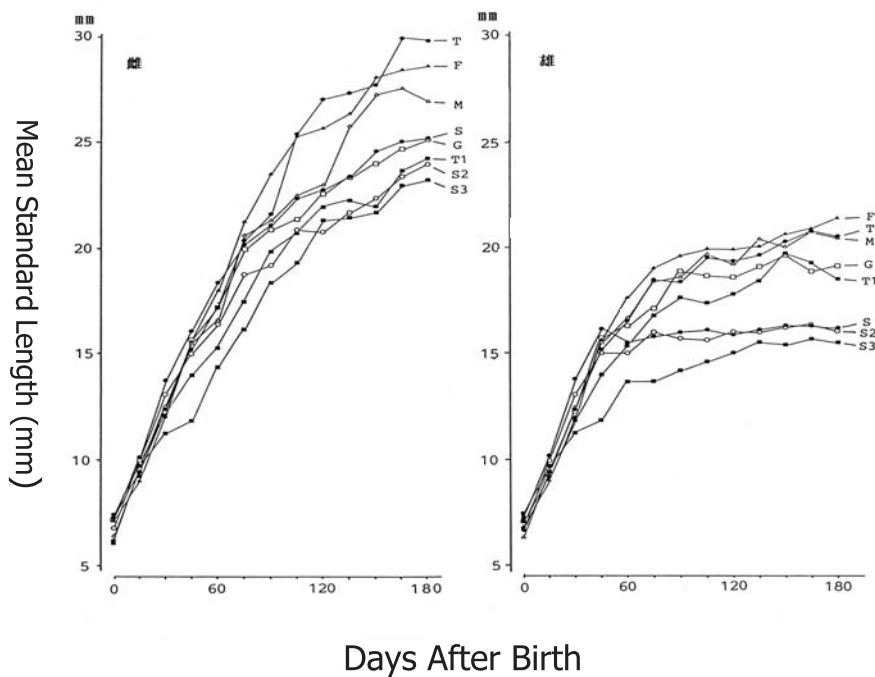


Fig. 5 Growth curve of 8 strains maintained in our laboratory. Clear differences of final body size are observed among strains.

生型に近いあまり選択を受けていないと考えられる系統が多く含まれる。これら二つの系統間の体長の際には遺伝要因が強く関与していることがわかってい。特に雄の成熟後の体長には雄親の遺伝的影響が強く、高い遺伝率が推定されている¹⁸⁾。Nakajima and Taniguchi¹⁸⁾によると誕生直後のグッピーの体長の遺伝率は約0.4で、このほとんどが雌親からの成分で占められ、雄があまり影響していないことが示されている。雌仔魚では生後180日目まで雌親が強く影響しているのに対して、雄仔魚では生後90日目以降雄親の影

響が強くなっている (Fig. 6)。このような結果から雄成魚の体長を決める遺伝子が Y 染色体上に存在している可能性が示されている。一方、これらの体長差に関与する遺伝子数も推定されており、2～4 個の遺伝子の関与が示されている。

また、成長ホルモン (GH) やインシュリン様成長因子 I (IGF-I) の遺伝子内における一塩基多形がイヌやヒラメにおいて品種間の体サイズの差異や成長、成長速度に影響していることが報告されている¹⁹⁻²¹⁾。グッピーにおいても GH や IGF-I がクローニングさ

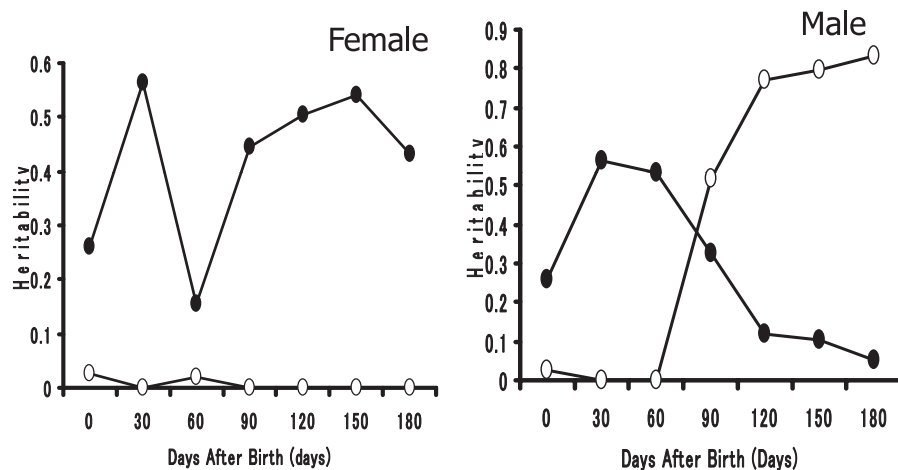


Fig. 6 Change of heritabilities from maternal (●) and paternal (○) half in female and male offspring.

れており、遺伝子内に変異があることが報告されている。今のところ大型系と小型系との間での体長差との関連性は観察されていないが、GH 遺伝子の上流領域においても差異が観察されており、関連性の解析が進められている。

2) 個体の遺伝的能力評価：産業対象種で重要な形質の多くは量的形質と呼ばれる多数の遺伝子の複合効果によって現れる形質である。このような形質を選抜しようとする場合、表現型を選抜の基準として選抜するが多い。しかし、表現型には遺伝要因の他に環境要因が働いているため、表現型を選抜の基準としても環境要因が多く働くため、効率的ではない場合が多い。このような場合、個体の遺伝的能力を統計的手法を用いて解析する手法が有効となる。個体の能力を評価する指標として育種価がある。個体の遺伝的能力（育種価）を家系情報やそれぞれの個体の観測値から偏りなく推定する手法は BLUP (Best Linear Unbiased Prediction) と呼ばれ1950年代に Henderson²²⁾ により開発された。しかし、計算に多数のデータを用いることや複雑な計算をすることなどから、算出に大型のコンピュータを必要とし、一般的ではなかった。近年のコンピュータの高性能化と様々なソフトの開発に伴いデータさえ集まれば容易に算出することが可能となった。この手法は主に家畜育種で用いられている。魚類養殖では親子関係の特定が困難な場合が多いため、これまであまり用いられてこなかった。魚類においてはモデル実験としてグッピーが用いられている。グッピーを用いたモデル実験では表現型を用いた選抜よりも育種価を用いた選抜の方が5～10%程度効率が良いことが示されている (Obinata *et al.* 未発表)。今後この手法が産業対象種へ応用されることが期待される。

5. おわりに

観賞魚には選択を受けてきた長い歴史がある。このような選択は必ずしも科学的根拠に基づくものではなく経験的なものが主ではあったが、様々な品種や系統を生み出してきた。このような品種や系統の中には魚類における遺伝や育種研究に役立つものが多く含まれていることは、これまでの実験動物としての観賞魚の活躍を見れば容易に理解できる。このように観賞魚は模様や色彩で人々の目を癒すだけではなく、実験動物としても重要な役割を担っていると言える。観賞魚で得られた結果は直接、間接的に産業対象種への応用は可能である。今後、観賞魚に携わる愛好者、企業、研究者の連携を深め、新たな可能性を探ってゆく必要がある。

要 約

魚類の遺伝育種において最も成功している例の一つとして観賞魚を上げることができる。飼育手法が確立されていることや飼育機器が容易に入手可能なことなどから、観賞魚として作出された様々な系統や品種は実験動物としても有用である。観賞魚は作出されている品種や系統それぞれが遺伝的に異なった特徴を有していることから、遺伝学、生理学、行動学などの研究に用いられている。グッピーでは系統差を用いて成長や高温耐性、塩分耐性、行動などの系統差に及ぼす遺伝要因の解析に用いられ、成果を上げている。グッピー以外のメダカやゼブラフィッシュ、キンギョなども同様で、重要な実験動物となっている。

これらの品種は実験動物としても大きな利点を有しており、様々な育種研究にも用いられている。今後も観賞魚は模様や色彩で人々の目を癒すだけではなく、実験動物としても重要な役割を担っていると言える。

引用文献

- 1) Darwin, C. (1859) The Origin of species by means of natural selection, pp. 71, A Venel Books, New York. 460.
- 2) 松井圭一 (1935) 科学と趣味から見た金魚の研究, 弘道閣, 東京, pp. 421.
- 3) Schmidt, J. (1919) Racial studies in fishes. II. Experimental investigations with *Lebistes reticulatus* (Peters) Regan. J. Genetics, 8: 147-153.
- 4) Winge, O. (1922) One-side masculine and sex-linked inheritance in *Lebistes reticulatus*. J. Genet., 12, 145-162.
- 5) Winge, O. (1927) The location of eighteen genes in *Lebistes reticulatus*. J. Genet., 18: 1-43.
- 6) Winge, O. and E. Ditlevsen (1948) Color inheritance and sex determination in *Lebistes*. C. R. T. Lab. Carlsberg, 24: 248-277.
- 7) Aida, S. (1921) On the inheritance of color in a freshwater fish, *Aplocheilichthys latipes* Temminck and Schlegel, with special reference to sex-linked inheritance. Genetics, 6: 554-573.
- 8) Aida, S. (1922) Sex-limited inheritance in *Aplocheilichthys latipes*. Japanese J. Genetics, 1: 159-177.
- 9) Aida, S. (1930) Further genetical studies of *Aplocheilichthys latipes*. Genetics, 15: 1-16.
- 10) Egami, N., and H. Etoh (1973) Effect of X-irradiation during embryonic stage on life span in the fish, *Oryzias latipes*. Exp. Gerontol., 8: 219-222.
- 11) Egami, N. and Y. Hyoudo (1965) Inhibitory effect of X-irradiation on the development of the ovaries of the fish, *Oryzias latipes*, in sexually inactive seasons. Annot. Zool. Japon., 38: 8-11.
- 12) Egami, N. and Y. Hyoudo-Taguchi (1967) An autoradiographic examination of rate of spermatogenesis at different temperatures in the fish, *Oryzias latipes*. Exp. Cell Res., 47: 665-667.
- 13) Tripathi, N., M. Hoffmann, E. M. Willing, C. Lanz, D. Weigel and C. Dreyer (2009) Genetic linkage map of the guppy, *Poecilia reticulata*, and quantitative trait loci analysis of male size and colour variation. Proc. Royal Soc. B: Biol. Sci., 276: 2195-208.
- 14) Kanda, N., M. Nakajima and Y. Fujio (1991) Strain differences at thermal resistance in the guppy, *Poecilia reticulata*, Tohoku J. Agr. Res., 42: 25-31.
- 15) Shikano, T., M. Nakajima and Y. Fujio (1997) Difference in osmoregulatory function in sea water among strains of the guppy *Poecilia reticulata*. Fisheries Science, 63: 69-72.
- 16) Nakajima, M. and Y. Fujio (1993) Genetic determination of the growth of the guppy. Nippon Suisan. Gakkaishi, 59: 461-464.
- 17) Yamanaka, M., M. Nakajima and Y. Fujio (1995) Estimation of the number of loci controlling the male body size in the guppy, Tohoku J. Agr. Res., 46: 21-28.
- 18) Nakajima, M. and N. Taniguchi (2002) Genetic control of growth in the guppy (*Poecilia reticulata*). Aquaculture 204, 393-405.
- 19) Sutter, N. B., C. D. Bustamante, E. A. Ostrander *et al.* (21 co-authors) (2007) A single IGF1 allele is a major determinant of small size in dogs. Science, 316: 112-115.
- 20) Tang, S., J. Ou, D. Sun, Y. Zhang and G. Xu (2011) A novel 62-bp indel mutation in the promoter region of transforming growth factor-beta 2 (TGFB2) gene is associated with body weight in chickens. Animal Genetics, 42: 108-12.
- 21) Liu, W., Y. Yu, G. Li, S. Tang, Y. Zhang, Y. Wang, S. Zhang and Y. Zhang (2011) Single-nucleotide polymorphisms in the promoter of the growth hormone-releasing hormone receptor gene are associated with growth and reproduction traits in chickens. Animal Genetics, 43: 564-569.
- 22) Henderson, C. R. (1950) Estimation of genetic parameters. Ann. Math. Stat., 21: 309-310.

キンギョの性行動の内分泌調節とその性的可逆性

小林牧人・竿代誠二・早川洋一（国際基督教大・生命科学）

Endocrine Control and Sexual Plasticity of Behavior in Goldfish

Makito KOBAYASHI, Seiji SAOSHIRO and Youichi HAYAKAWA

Department of Life Science, International Christian University

Abstract

In mammals, sex-typical patterns of reproductive behavior are considered to conform to the sex of the brain, which is determined during neonatal development. Our recent studies in goldfish, *Carassius auratus*, suggest that unlike mammals, teleost species retain a bipotential brain sex. The goldfish is a gonochoristic (non-sex changing) teleost and exhibits sex-typical behavior during spawning. Female sex behavior (egg release) is elicited by prostaglandin produced in the ovary, and the ovarian estrogen is not essential for female sex behavior. In contrast, male sex behavior (chasing and ejaculation) is triggered by sex pheromones from ovulatory females, and androgen is a requirement for male sex behavior. Sexual behaviors of the opposite sex do not normally occur in the goldfish but can be induced in adult fish by hormone treatment. Prostaglandin injection induces female-type sex behavior in males, and androgen implantation induces male-type sex behavior in females in response to female sex pheromones without changing the gonadal sex. Interestingly, these hormone treatments do not affect the sexual behavior of the original sex. Such sexual plasticity is also observed in hermaphroditic (sex changing) teleosts which exhibit reproductive functions of both sexes during their life time. Existence of naturally occurring hermaphroditism and the results of our studies in goldfish suggest that teleosts, regardless of their reproductive strategy (hermaphroditism and gonochorism), may commonly possess a sexually bipotential brain.

(accepted December 18, 2012)

1. はじめに

観賞魚の中でも養殖されていて、かつ比較的小型の魚種は、生物学あるいは環境毒性学においてモデル動物としてよく使われる。その理由としては、養殖による安定した生産および供給により必要に応じて研究のための魚の入手が可能ということがあげられる。さらに小型のものであれば、大規模の飼育設備は不要で、限られたスペースで多くの個体数を飼育、活用することができる。これらの条件に加えて、飼育がし易い、価格が低い、などの条件が加わることにより、より研究の効率化を図ることができる。このような条件を満たす観賞魚としては、メダカ、ゼブラフィッシュ、キンギョがあげられる。メダカ、ゼブラフィッシュで

は、小型、繁殖が容易、生活史が短いといったことから、発生学、遺伝学の研究、さらに化学物質の毒性試験などに使用されている^{1,3)}。また近年の分子生物学的技術の発展、豊富な遺伝学情報といった要因が加わり、その汎用性は増し、医学、薬学の分野においても脊椎動物のモデルとしてマウス、ラットの代替モデルとして活用されるようになってきた⁴⁾。一方、キンギョは、メダカ、ゼブラフィッシュほど小型ではないが、ホルモンの測定に十分な量の採血ができる大きさであることから、個体の血液中のホルモン濃度の変化を調べる必要のある内分泌学研究の分野において、モデル魚として活用されている⁵⁾。さらにホルモン投与によるキンギョの性行動の誘起方法が確立されて以来、こ

の方法を活用してキンギョの性行動を調節するホルモン、フェロモン、神経系の研究が進み、その結果、魚類の性行動の生殖生理学が飛躍的に発展した⁶⁻¹⁰⁾。本稿では、はじめにキンギョの性行動がホルモン、フェロモンによってどのように調節されているのかを概説する。次にキンギョの性行動の性的可逆性、すなわちキンギョは性成熟後も雌雄両方の性の性行動をする能力を潜在的にもっている、ということを説明し、最後に魚類の脳の両性性についての筆者らの仮説を紹介する。

2. キンギョの性行動（産卵行動）

キンギョは、コイ科に属する魚で、春の産卵期に数回産卵を行う⁶⁾。キンギョの産卵行動は雌雄の性行動から成り立つが、雌の性行動は、卵を放出する（放卵）ための一連の「放卵行動」であり、雄の性行動は、雌を追いかける「追尾」（求愛）と精子を放出する（放精）ための一連の「放精行動」である（図1）。雄は排卵過程に入った雌に対して弱い追尾を行うが、まだ放卵・放精には至らない。雌が排卵すると雄は排卵雌に対して激しく追尾を行うようになり、そして一連の放卵行動・放精行動へと進む。まず雌が水面近くの水草に向かって上昇し、雄が追従する。水面に達した雌雄の魚は体を横にして（横転）、雌が上、雄が下となり、このとき雌は放卵、雄は放精をする。放卵、放精後、雌雄の魚は尾鰭を振って水を攪拌する。この結果、卵と精子が水中でよく混ざり、受精率が高まるものと考えられる。その後、雌雄のキンギョは水底へと下降し、再び雄の雌に対する追尾が始まる。雌は排卵した卵を少しずつ放卵するため、一連の産卵行動は、数時間か

キンギョの産卵行動

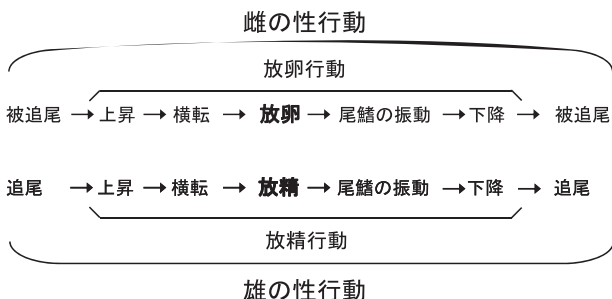


図1. キンギョの産卵行動。はじめに雄が排卵した雌をさかんに追いかけるようになり（追尾）、次に放卵・放精のための一連の行動（放卵行動・放精行動）が行われる。雌雄の魚は水面近くにある水草（産卵床）に向かって上昇し、体を横転させる。この時雌は放卵し、雄は放精する。その後魚は尾鰭を振動させ、水を攪拌し、卵と精子を混ぜ、水面下へと下降する。そして追尾が再開する。受精卵は粘着性で水草に付着する。

けて数十回繰り返される。キンギョの受精卵は粘着性を持ち、水草に付着する。通常、キンギョの雌の排卵は光周期に同期して夜中に起こり、産卵行動は夜中から明け方にかけて行われる。

3. キンギョの性行動のホルモンおよびフェロモンによる調節

プロスタグランジンと性行動 キンギョの産卵行動は、ホルモンとフェロモンによって調節されている。カナダの Stacey らの研究により、キンギョの雌が排卵すると、卵巣内でアラキドン酸を前駆体としてできるホルモン、プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ (PG) が産生され、この PG が雌の脳に作用して雌の性行動（放卵行動）を誘起することが明らかとなっている（図2）⁶⁻¹⁰⁾。同時にこの PG は尿とともに水中に放出され、フェロモンとして雄を刺激する。このフェロモンを嗅覚器で受容した雄は、性的に興奮し、雌に対して性行動（追尾と放精行動）を行う。また排卵していない雌に外部から PG を投与すると、この PG は脳に作用して雌の性行動を誘起し、水中に放出されてフェロモンとして雄を刺激し、雄の性行動を誘起する（図

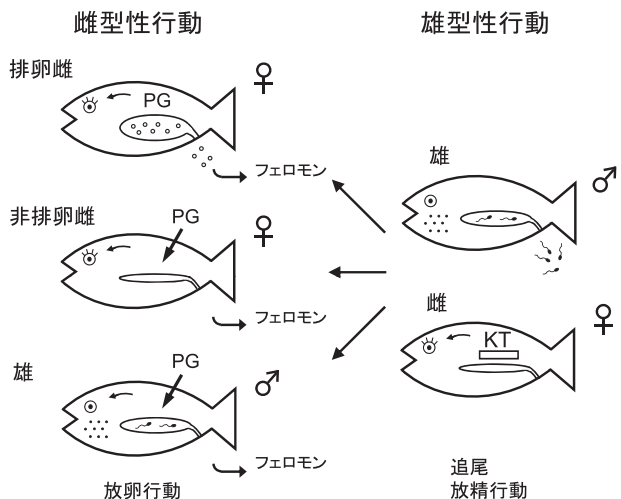


図2. キンギョの性行動のホルモン、フェロモンによる制御および性的可逆性。雌では排卵後、卵巣内でプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ (PG) が産生され、この PG が脳に作用して雌の性行動（放卵行動）を誘起する。同時に PG はフェロモンとして水中に放出され、雄を刺激し、雄の性行動（追尾と放精行動）を誘起する。非排卵雌に PG を投与すると、排卵雌と同様、この雌はフェロモンの放出および雌型の性行動を行う。ただしこの場合、卵の放出は起こらない。また雄に PG を投与すると、非排卵雌の場合と同様、この雄が他の雄を相手に雌型の性行動を行う。一方、雄は雌からのフェロモンの刺激によって雄の性行動を行うが、雌に雄性ホルモン (KT) を与えておくと、この雌がフェロモンに反応するようになり、雄型の性行動を行う。

2)。ただしこの場合、PG を投与された非排卵雌は排卵雌と同様な行動を行うものの、排卵していないため卵の放出は伴わない。相手役の雄は排卵雌、PG 投与非排卵雌を区別することなく、どちらの雌に対しても同様な性行動を行い、放精を行う。

この PG 投与による雌雄の産卵行動は、雄が性成熟していれば、雌が排卵していなくても、また雌が性的に成熟していなくても誘起可能である。この方法は、PG を雌に注射後、5 分ほどで雄の追尾が始まり、10 分ほどで放卵行動・放精行動がみられるようになる極めて迅速、簡便な産卵行動誘起法である。さらにこの方法では、産卵期以外の季節でも 1 年中、また 1 日のうちのどの時刻でも PG 投与により産卵行動を誘起することが可能であるため、効率よく集中的に行動実験を進めることができる。

なおキンギョの雌の放出するフェロモンとしても 1 種類のフェロモンが同定されている。魚類の雌では、排卵前に卵巣内で卵成熟が起こるが、この卵成熟を起こすホルモン、 $17,20\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン (DHP) が卵巣内で産生される¹¹⁾。このホルモンはキンギョでは卵巣内で卵成熟を誘起したあと、PG 同様、水中に放出されてフェロモンとなる。このフェロモンの雄に対する作用は、雄の下垂体における黄体形成ホルモンの分泌を促進し、産卵に先立ち精液の産生を促進することである^{10, 12, 13)}。同時に雄における弱い追尾も引き起こすが、このフェロモンの作用では産卵行動にまでは至らない。「DHP フェロモン」の雌から雄へのメッセージは、数時間後に排卵が起こるので、精液を準備するように、ということである。また「PG フェロモン」は、雌が排卵して受精可能な卵を保持し、産卵行動が可能である、ということを雄に伝えるメッセージである。

性ホルモンと性行動 キンギョでは PG がホルモンとして雌の性行動の引き金となり、雌からのフェロモンが雄の性行動の引き金となることを説明した。しかし、一般に脊椎動物では生殖腺で産生される性ホルモンが性行動に重要であると考えられている。すなわち雄の性行動が起こるには精巣で作られる雄性ホルモンが必要で、雌では卵巣でつくられる 2 種類の雌性ホルモン、発情ホルモンと黄体ホルモンのうちの発情ホルモンが、性行動の発現に必要であると言われている¹⁴⁾。それでは、キンギョの場合、生殖腺で産生される性ホルモンは性行動にどのように関与しているのだろうか。

キンギョの性ホルモンの性行動への関与について述べる前に脊椎動物での性ホルモンと性行動の関係について少し説明をしておく。多くの脊椎動物において性ホルモンは性行動を誘起する、といった表現が使われ

るが、この場合、性行動が起こるには性ホルモンが必要である、といった意味で、性ホルモンが生殖腺で作られると性ホルモンが引き金となってすぐに性行動が開始するということではない。また性ホルモンを投与したからといって投与後すぐにその個体が性行動を始めるわけではない。生殖腺で性ホルモンが十分につくられて脳に作用しているとき、あるいは外部から性ホルモンを十分に投与した際、その他の何らかの要因が引き金となって、性行動が開始する。すなわち性ホルモンは性行動のための必要条件であるが、引き金ではない。この引き金は、動物種、性によって異なる。

性ホルモンはコレステロールを前駆体として生殖腺で合成されるホルモンであるが、キンギョの卵巣では、エストラジオール（発情ホルモンの 1 種）、テストステロン（雄性ホルモンの 1 種）および DHP（黄体ホルモンの 1 種）が産生される¹¹⁾。はじめに雌のキンギョにおいてこれらの性ホルモンが雌の性行動の必要条件かどうか調べた。その結果、キンギョの雌では卵巣で産生される性ホルモンがなくても、性行動が起こることが明らかとなった¹⁵⁾。雌の卵巣を摘出して体内の卵巣由来の性ホルモンがなくなっても、PG を投与すると雌は性行動を行った。また卵巣摘出魚に上記の 3 種類の性ホルモンを投与しても、性行動が活発になることはなかった。これらの実験に用いた魚は、1 度性成熟をして性ホルモンを産生したことのある雌であるが、まだ 1 度も性成熟をしたことのない孵化後 6 か月の雌に PG を投与すると、やはりこれらの稚魚は成熟雌と同様な性行動を行った。さらにこの後で述べるが、雄においても PG により雌型の性行動が誘起される。雄の精巣で産生される性ホルモンは雌と同じものもあれば異なるものもある。未熟雌、雄での実験結果は、PG によって雌型性行動が起こる際、性ホルモンの量、種類は行動に影響を与えないことを示している。以上の結果から、キンギョの雌では、PG が引き金となって性行動が誘起され、その際、哺乳類とは異なり、性ホルモンが性行動の必要条件とはなっていないことが明らかとなった。

次に筆者らは、雄における性ホルモンの性行動への関与についての検証を試みた。雄における性ホルモンの影響を調べるには、雄の精巣を摘出して精巣由来の性ホルモンの除去および性ホルモンの投与を行って行動への影響をみるのが正しい実験計画である。しかしキンギョの雄の精巣を完全に取り除くことが困難であったため、雌に雄性ホルモンを与えて雄型性行動が誘起されるか調べてみた。キンギョの精巣では 11-ケトテストステロン (KT) およびテストステロンの 2 種類の雄性ホルモンが作られることが知られている。

これらの雄性ホルモンを、シリコンカプセルを利用して雌に3か月ほど投与し続けると、興味深いことにKTを投与された雌がPGを投与された雌に対して雄型の性行動（追尾と放精行動）を行った¹⁶⁾。ただし、雄型の性行動といっても生殖腺は卵巣であるから、実際の放精は起こらない。また雄性ホルモンをまだそれほど産生していない性的に未熟なキンギョの雄は性行動を行わないことをあわせて考えると、キンギョの雄では、雌からのフェロモンが引き金となって性行動が誘起され、この場合、哺乳類と同様、精巣で作られる雄性ホルモンが必要条件であると考えられる。ただしここでは雌を使って実験をしているので、やはり本当にこのことがキンギョの雄にあてはまるのかどうかは、実際にキンギョの雄を使って検証する必要がある。

4. キンギョの性行動の性的可逆性

一般に脊椎動物の性行動は、雌雄で異なるパターンを示す¹⁴⁾。たとえば哺乳類のラットでは、雌は交尾の際に背中を湾曲させるロードーシスという雌特有の性行動を行い、雄は雌の背後から上に乗るマウンティングという雄特有の性行動を行う。このような雌雄に特有な性行動は、脳の発達過程において脳の性分化が起こり、分化した脳の性に従って行われると考えられている。すなわち雄の脳内には雄の神経回路、雌の脳内には雌の神経回路がつくられ、これらの神経回路がその性に従った性行動を起こさせる。哺乳類ではこのような脳の性分化は出生前後の時期に起こり、脳が一方の性に分化して脳の性が決まると、その後、脳の性は変わらない。したがって、通常、一生のうちで、ある動物が雌雄両方の性行動を行うことはない。しかし自然界に目を向けてみると、魚類には一生のうちに性転換をする魚種（隣接的雌雄同体）が数多く存在する¹¹⁾。たとえばクロダイは、はじめに雄として成熟し、精巣で精子をつくる。その後、精巣が退縮し、卵巣が発達して雌になって卵を産むようになる。このような性転換を雄性先熟という。またベラの仲間のある魚種は、はじめは雌で後に雄になる雌性先熟の性転換を行う。これらの性転換魚類では、生殖腺の性転換と性行動の性転換が起こる。すなわち一生のうちに1個体の魚が雌雄両方の性行動を行う。またオキナワベニハゼのように、一生のうちに性転換を繰り返し行う魚種も知られている（双方向性転換）。このことから、哺乳類でみられる脳の性分化という考え方は魚類にはあてはまらないことがわかる。

キンギョは通常性転換を行わない非性転換魚であるが、我々のこれまでの研究から、性転換魚と同様、1個体の魚が雌雄両方の性行動を行う能力を潜在的に持

つことが明らかとなった。すなわち非性転換魚であっても、行動の性転換が可能であるということである。ただし、この場合、生殖腺の性転換は伴わない。

これまでのキンギョの性行動の制御についてまとめると、雌型の性行動はPGが脳に作用することで起こり、その場合、雌性ホルモンは必要条件ではない。雄型の性行動は、雌からのフェロモン（PG）が引き金となり、雄性ホルモン（KT）が必要条件であると考えられる。興味深いことにStaceyらは、雄にPGを投与すると、この雄が雌型の性行動を行うことを見いだした（図2）¹⁷⁾。もちろん生殖腺は精巣であるから、卵の放出は起こらない。PGを投与された雄は、非排卵雌にPGを投与した場合と同様、投与されたPGがフェロモンとして水中に放出されて雄を誘引し、PG注射後10分ほどで雌型の放卵行動を行う。正常な雄は、排卵雌、PG投与雌、PG投与雄を区別することなく、どの魚に対しても同様な追尾、放精行動を行う。このようにキンギョの雄では、一度雄として性成熟してもホルモンの投与により雌型の性行動を、しかも雌同様、ホルモン投与後10分程度で行うことが明らかとなった。最近我々は、1度雄型の性行動を行った雄において、1週間後にPG投与により雌型の性行動を誘起させ、さらにその1週間後、この雄が雄本来の性的機能を保持しているか確認する実験を行った。その結果、興味深いことに雄はPGにより雌型の性行動を行っても、雄本来の機能は失われることなく、PG投与雌と一緒にすると正常な雄型の追尾・放精行動を行うことが示された¹⁸⁾。

一方、雄型の性行動は、フェロモンが引き金となり、雄性ホルモンが重要であると考えられ、実際にキンギョの雌に雄性ホルモンを与えると雄型の性行動を行うことは既に述べた¹⁶⁾。当初の実験では、雌にKTカプセルを与えて3ヶ月後に行動実験を行ったが、最近の我々の実験から、雌にメチルテストステロン（MT：合成の雄性ホルモン、KTと同様の作用をもつ）のカプセルを与えて早いものでは、翌日に雄型の性行動が起こることが明らかとなった。さらにPGを投与された雄が雄本来の機能を失わなかったのと同様に、MTを投与された雌が雌本来の機能を保持することが明らかとなった。すなわち、はじめにMT投与雌にPGを投与して雌型の性行動を行わせ、1週間後にこのMT投与雌をPG投与雌と一緒にすることにより雄型の性行動を行わせた。さらに1週間後にこのMT投与雌にPGを投与したところ、雌型の放卵行動が行われた¹⁸⁾。

以上の結果は、キンギョは通常性転換をせず、逆の性の性行動は行わないが、いったんどちらかの性で

性成熟したあとでも、ホルモンの投与により雌雄両方の性行動を行うことが可能であることを示している。しかも、ホルモン投与後、比較的短時間で逆の性の性行動が誘起できることから、ホルモンが脳内に新たにもう一方の性の性行動を制御する神経回路を作らせるとは考えにくく、むしろキンギョはもともと両方の性の性行動を制御可能な神経回路をもち、ホルモンによって、それまで使われていなかった神経回路が作動した、ということが考えられる。さらにこれらの魚がホルモンにより逆の性の性行動を行っても、本来の性の性行動を行う能力は保持されることも明らかとなった。このことは、非性転換魚のキンギョでも、行動レベルでは、性転換魚類のようにいったん性成熟した後でももう一方の性の性行動ができること、さらに双方性転換魚のように一度性転換を行っても、もとの性の性質は失わず、本来の性の性行動ができることを示している。

最近筆者らは、このキンギョの脳の両性性をさらに裏付ける実験結果を得た。キンギョは雌雄両方の性行動ができるといっても、これまでは一方の性の性行動を行っているときは、フェロモンあるいはホルモンの作用が弱まってその性行動が終わるまで他方の性行動を行うことは不可能である、といったなかば先入観のような誤解を筆者らは持っていた。しかし実験により

この考えは誤りで、雌雄のキンギョは、一方の性の性行動を活発に行っているときでも、相手の性に応じて自分の性行動の性を瞬時に変えられることが明らかとなった。

PG 投与雌 (PG 投与相手雌) と成熟雄 (相手雄) を水槽内に入れておくとこの 2 個体の間で雌雄の性行動が行われるが、この水槽に PG を投与した実験雄を入れると、この実験雄は、PG 投与相手雌に対しては雄型の性行動を行い、相手雄とは雌型の性行動を行うことが観察された (図 3)。しかも雌雄の型の性行動は、一方の性の性行動だけを続けて行うのではなく、相手の性に応じて性行動の性を瞬時に入れ替えることが可能であることが明らかとなった。

同様に、PG 投与相手雌と相手雄が性行動を行っている水槽に、雄性ホルモン (MT)、PG の両方を投与した実験雌を入れると、この実験雌は、PG 投与相手雌に対しては雄型の性行動を行い、相手雄とは雌型の性行動を繰り返し行うことが観察された (図 3)。

魚類の中には、同時的雌雄同体魚 (*Seranus subligarius*) がみられ、卵巣と精巣が同時に成熟し、2 個体の魚が交互に卵と精子を出して、お互いの卵を受精させるという生殖様式 (ここでは便宜的に性役割交代型と呼ぶ) をとるものがみられる^{11, 19)}。この場合、雌雄両方の性行動を短時間で交互に行うことから、この魚

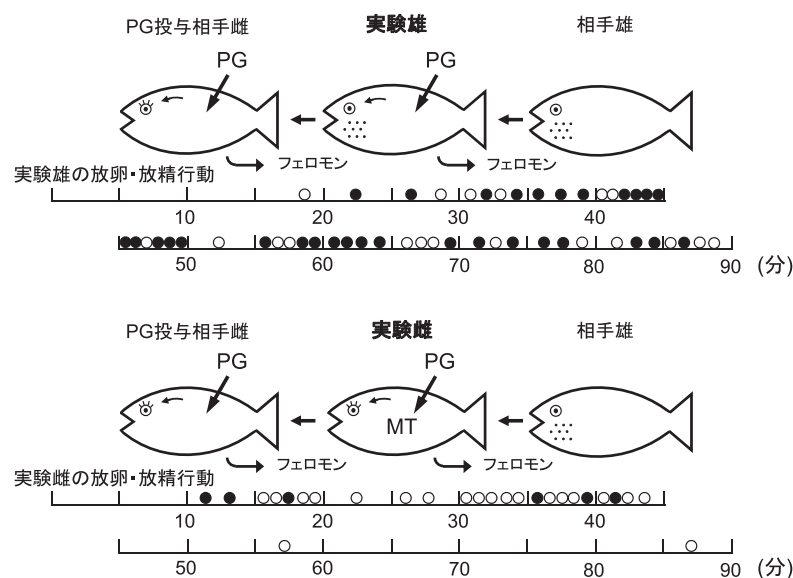


図 3. キンギョの性行動の性的可逆性。上段：実験雄は PG 投与相手雌に対して雄型の性行動を行う。またこの実験雄は PG を投与されているので、相手雄に対しては雌型の性行動をとる。90分間の観察で、実験雄は雄型、雌型の両方の行動を行った。図中には代表的な一例の行動結果を示している。横軸は90分の観察時間を示し、●が雄型性行動1回、○が雌型性行動1回を表している。下段：実験雌は雄性ホルモン (メチルテストステロン、MT) を投与されているので、PG 投与相手雌に対して雄型の性行動を行う。また実験雌は PG を投与されているので、相手雄に対しては雌型の性行動をとる。90分間の観察で、実験雌は雄型、雌型の両方の行動を行った。図中には代表的な一例の行動結果を示している。横軸は90分の観察時間を示し、●が雄型性行動1回、○が雌型性行動1回を表している。

種の脳は、雌雄両方の神経回路を持つ、すなわち脳は両性であると考えられる。今回、性転換を行わないキンギョにおいても、一連の実験結果から、同時的雌雄同体魚と同様、脳は瞬時に雌雄の性行動の切り替えが可能な両性であることが強く示唆された。これまで、性転換魚類の研究において、性転換を起こすのに必要な要因として特定のホルモンの分泌、特定の遺伝子の発現、特定の神経細胞の増殖、などが提唱されている²⁰⁾。同時雌雄同体魚の性行動、キンギョの性行動については、上記の要因は時間的にいずれもあてはまらず、両性の脳を持つ個体が、外部からの刺激に反応して瞬時に雌雄両方の性行動を使い分けている、というのが適切な解釈ではないかと考えられる。

5. 魚類の脳の両性性についての仮説

脊椎動物の脳の性および脳の性分化については、哺乳類および鳥類で詳細に研究がなされている（図4）²¹⁻²⁴⁾。ラットでは、脳の性は基本的に雌型で、脳の発達過程における雄性ホルモンの有無により脳が雌型あるいは雄型に分化する。すなわち遺伝的に雌であれば発生過程において卵巣が形成され、雄性ホルモンはつくられず、脳はそのまま雌型となる。一方、遺伝的に雄の場合、精巣が形成され、精巣で産生される雄性ホルモンの作用により脳は雄型に分化する。またこのとき脳の雌型の機能の抑制が起こる。このようにして決まった脳の性は不可逆で、その後変わることはない。そして個体が性成熟に達すると、性ホルモンの

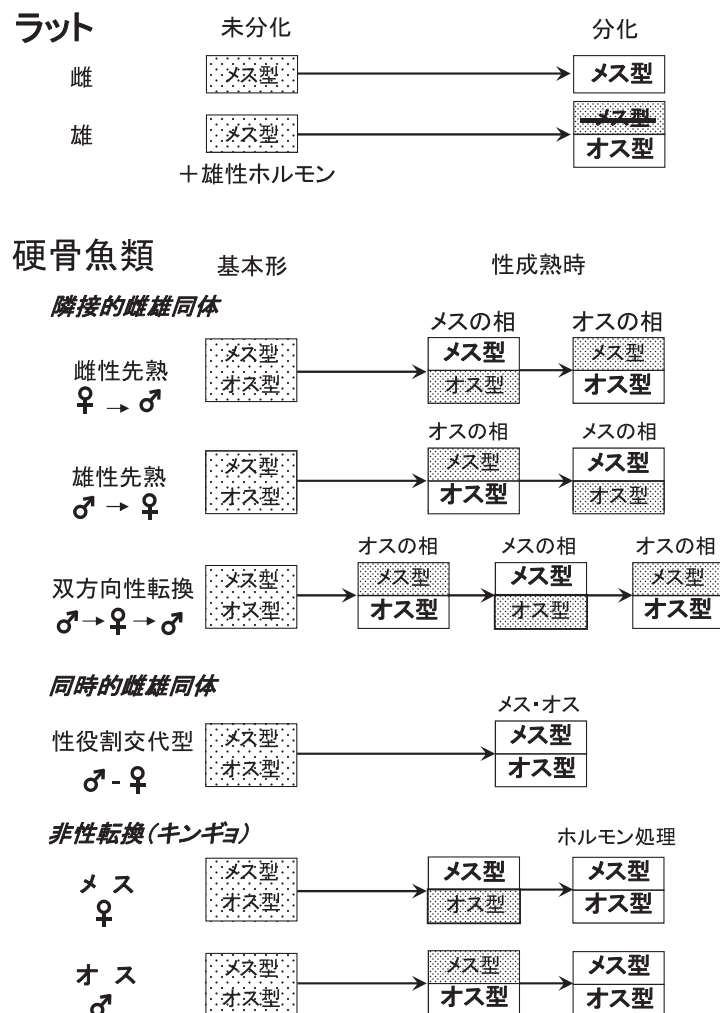


図4. 魚類の脳の両性性についての仮説。ラットでは、脳の基本型は雌型で、雄では雄性ホルモンの作用により脳に雄の部分ができ、同時に雌の部分に抑制がかかる。隣接的雌雄同体魚類（性転換魚類）には雌性先熟、雄性先熟および双方向性性転換がある。これらの魚において、それぞれの性の相のとき、脳の一方の性の部分が機能し、その性の性行動が行われる。もう一方の性（影の付けてある部分）の機能は停止していると考えられるが、性転換後、活性化される。すなわち、脳は両方の性の性行動を制御できる両性性をもつ。同時的雌雄同体魚類においては、脳の雌雄の部分は同時に活性化され、雌雄両方の性の性行動を必要に応じて、短時間で交互に行うことができる。キンギョなどの非性転換魚類では、通常脳の片方の性の部分しか使われないが、潜在的に脳は両方の性の性行動を制御できる。ホルモンの投与により、雌雄両方の性の性行動を必要に応じて、交互に行うことができる。

たらきにより、脳の性と同性の性行動が起こる。すなわち、雌型の脳は卵巣で産生される発情ホルモンの作用により雌型性行動を制御し、雄型の脳は精巣で産生される雄性ホルモンに反応して雄型性行動を制御する。このとき雌に雄性ホルモン、雄に発情ホルモンを与えても、それぞれ雄型性行動、雌型性行動が起こることはない。ラットでは、脳が性分化しているため、雄は雄のホルモンしか受け付けず、雌のホルモンを与えても反応が起こらない。また雌は雌のホルモンにのみ反応し、雄のホルモンは受け付けない。ラットとは異なるが、ある動物の雌雄に同じホルモンを与えて、雌雄で異なる反応が起これば、この場合も脳が性分化をしている可能性が考えられる。一方、キンギョでは、雄のホルモンを与えれば雄でも雌でも雄型の性行動を行い、雌のホルモンを与えれば雄でも雌でも雌型の性行動を行う。このことから、脳の性分化が起こっているとは考えにくく、脳には雌雄の違いがなく、個体は生殖腺の性に従って産生されるホルモンにより、性行動の性が決まると考えられる。

性転換魚類では、生殖腺、性行動において両性性を示すが、性転換魚類の脳においては、個体が「雌の相」の時、すなわち魚が雌として活動すべき時は、脳の雌の神経回路が機能して、雄の回路の機能は停止する。個体が「雄の相」に変わると脳の雄の神経回路が活性化して雌の回路は停止する、といった機構が考えられる。多くの場合、性転換魚類における性の切り換えは、年齢あるいは社会的刺激によって引き起こされる。同時的雌雄同体魚では、産卵行動時に雌雄の両方の神経回路が同時にスイッチオンの状態となり、外部刺激によってどちらの性の性行動もすぐにできるような状態にあると考えられる。

一方、性転換を行わないキンギョでは、通常どちらか一方の性の神経回路しか働かないが、ホルモンの投与により、眠っていたもう一方の性の神経回路を活性化することができる。さらに興味深いことに、ホルモン投与により、同時的雌雄同体魚と同様、雌雄両方の神経回路を同時に活性化することも可能である。

さらに筆者らは、雌性発生魚であるギンブナに雄性ホルモン (KT) を投与することによって、雄型の性行動を誘起している²⁵⁾。ギンブナは雌だけで進化してきた魚種と考えられるが、このように雌しかいない魚種においても脳に雄の神経回路が保持されているということは、魚類の脳の両性性という観点から大変興味深い。

このように自然界における性転換魚類および同時的雌雄同体魚の存在、キンギョおよびギンブナでの実験結果から、魚類の脳の両性性という性質は、性転換魚類に特

別にみられるものではなく、魚類全般にみられる共通の性質ではないかと考えられる。またこのなかで性転換魚類および同時的雌雄同体魚というのは、この脳の両性性を積極的に繁殖戦略として活用している魚類である、ということも考えられるのではないだろうか。

6. おわりに

本稿では、魚類の脳の両性性という仮説を掲げているものの、これまでの研究はすべて脳以外の要因、すなわちホルモン、フェロモンといったソフトウェア的なものについての研究であり、脳そのものについての研究結果は何もない。脳の両性性の本質を解明するには、脳自身というハードウェアについての研究が必要であり、現在筆者らはこの点に着手して研究を進めている。また魚類の脳が基本的に両性で、鳥類、哺乳類では脳の性分化が起こるとしたら、脊椎動物の進化の過程で、どのような経過を経て脳が変化をしてきたのか、またこのような脳の変化はどのような生物学的意味をもつのか、興味深い問題であると思われる。一方、ミミズ、マイマイなどの無脊椎動物では雌雄同体現象がみられるが、これらの動物において卵の発達を制御する神経系、精子の発達を制御する神経系をもつとすると、これは雌雄両方の神経系をもつことであり、魚類の脳の両性性に対応するものではないかとも考えられる。このようなことから脳の両性性、脳の性分化というのは、生殖様式の進化のプロセスを反映しているのではないかと筆者らは考えている⁸⁾。

要 約

キンギョでは、性行動の生理学的研究が詳細になされている。雌の性行動 (放卵行動) は卵巣で産生されるプロスタグランジン (PG) によって誘起され、卵巣由来の雌性ホルモンは性行動の発現に必須ではない。雄では、雌が放出するフェロモンの刺激により性行動 (追尾と放精行動) が誘起され、このとき精巣由来の雄性ホルモンは必須である。キンギョは通常雌雄逆の性の性行動を行うことはないが、雌に雄性ホルモンを、雄に PG を投与すると、それぞれ雄型、雌型の性行動が誘起される。さらにホルモン投与により逆の性の性行動を行っても、本来の性の性行動を行う能力は保持される。哺乳類では脳の性分化により、このような性行動の逆転は起こらない。自然界にみられる性転換魚類は一生のうちに雌雄両方の性行動を行い、その脳は性的両性性をもつと考えられる。性転換魚類の存在とキンギョでの実験結果をあわせて考えると、魚類の脳では性分化が起こらず、性転換、非性転換を問わず、脳は性的に両性ではないかと考えられる。

文 献

- 1) Zhiyuan, G. and V. Korzh (2006) Molecular aspects of fish and marine biology Vol.2, Fish development and Genetics, The zebrafish and medaka models, World Scientific Pub., Singapore.
- 2) Shima, A. and H. Mitani (2004) Medaka as a research organism: past, present and future. *Mech. Dev.* 121: 599-604.
- 3) Padilla, S., J. Cowden, D. E. Hinton, B. Yuen, S. Law, S. W. Kullman, R. Johnson, R. C. Hardman, K. Flynn and D. W. T. Au (2009) Use of medaka in toxicology testing. *Curr. Protoc. Toxicol.* Unit 1. 10, 39: 1-36.
- 4) Shin, J. T. and M. C. Fishman (2002) From zebrafish to human: modular medical models. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3: 311-340.
- 5) Popesku, J. T., C. J. Martyniuk, J. Mennigen, H. Xiong, D. Zhang, X. Xia, A. R. Cossins and V. L. Trudeau (2008) The goldfish (*Carassius auratus*) as a model for neuroendocrine signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 293: 43-56.
- 6) Kobayashi, M., P. W. Sorensen and N. E. Stacey (2002) Hormonal and pheromonal control of spawning behavior in the goldfish. *Fish Physiol. Biochem.*, 26: 71-84.
- 7) 小林牧人 (2002) 魚類の性行動の内分泌調節と性的可逆性 - 魚類の脳は両性か? -, 「魚類のニューロサイエンス」, 植松一眞・岡良隆・伊藤博信編, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 255-272.
- 8) 小林牧人 (2007) 魚類の脳の性的両性性 - 脊椎動物の脳の性の進化を考える - 日本 = 性研究会議会報, 19: 38-51.
- 9) Munakata, A. and M. Kobayashi (2009) Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 456-468.
- 10) Stacey, N. E. (2011) Hormonally derived sex pheromones in fishes. pp. 169-192, in *Hormones and Reproduction of Vertebrates, Vol. 1, Fishes*, eds. by D. O. Norris and K. H. Lopez, New York, Academic Press (Elsevier).
- 11) 小林牧人・大久保範聡・足立伸次 (2013) 生殖, 「増補改訂版 魚類生理学の基礎」, 会田勝美・金子豊二編, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 149.
- 12) Kobayashi, M., K. Aida and I. Hanyu (1986) Gonadotropin surge during spawning in male goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 62: 70-79.
- 13) Kobayashi, M., K. Aida, I. Hanyu (1986) Pheromone from ovulatory female goldfish induces gonadotropin surge in males. *Gen. Comp. Endocrinol.* 63: 451-455.
- 14) 近藤保彦・小川園子・菊水健史・山田一夫・富原一哉 (2010) 「脳とホルモンの行動学 行動神経内分泌学への招待」, 西村書店, 東京.
- 15) Kobayashi, M. and N. E. Stacey (1993) Prostaglandin-induced female spawning behavior in goldfish (*Carassius auratus*) appears independent of ovarian influence. *Horm. Behav.* 27: 38-55.
- 16) Stacey, N. E. and M. Kobayashi (1996) Androgen induction of male sexual behaviors in female goldfish. *Horm. Behav.*, 30: 434-445.
- 17) Stacey, N. E. and A. L. Kyle (1983) Effects of olfactory tract lesions on sexual and feeding behavior in the goldfish. *Physiol. Behav.* 30: 621-628.
- 18) Saoshiro, S., Y. Kawaguchi, Y. Hayakawa and M. Kobayashi (2013) Sexual bipotentiality of behavior in male and female goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 181: 265-270.
- 19) Cheek A. O., P. Thomas, C. Sullivan (2000) Sex steroids relative to alternative mating behaviors in the simultaneous hermaphrodite *Seranus subligarius* (Perciformes: Serranidae). *Horm. Behav.* 37: 198-211.
- 20) Larson, E. T. (2011) Neuroendocrine regulation of sex-changing fishes. pp. 149-168, in *Hormones and Reproduction of Vertebrates, Vol. 1, Fishes*, eds. by : D. O. Norris, K. H. Lopez, New York, Academic Press (Elsevier).
- 21) 山内兄人・新井康允 (2006) 「脳の性分化」, 裳華房, 東京.
- 22) Balthazart, J., C. A. Cornil, T. D. Charlier, M. Taziaux and G. F. Ball (2009) Estradiol, a key endocrine signal in the sexual differentiation and activation of reproductive behavior in quail. *J. Exp. Zool.* 311A: 323-345.
- 23) Adkins-Regan, E. (2012) Hormonal organization and activation: Evolutionary implications and questions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 176: 279-285.
- 24) Bao, A. M. and D. F. Swaab (2011) Sexual differentiation of the human brain: relation to gender identity, sexual orientation and neuropsychiatric disorders. *Frontier in Neuroendocrinol.* 32: 214-226.
- 25) Kobayashi, M. and T. Nakanishi (1999) 11-Ketotestosterone induces male-type sexual behavior and gonadotropin secretion in gynogenetic crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 115: 178-187.

観賞魚育種と水産育種研究

尾崎照遵 (水研セ・増養殖研)

Difference Between Ornamental Fish Breeding and
Economical Fish Breeding in Aquaculture

Akiyuki OZAKI

National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency

Abstract

One hundred years have passed since the re-discovery of Mendel's laws. The genetics of Mendelians essentially is a principle of reductionism. In other words, starting from analysis of the most basic unit gene of genetic traits, individual genes that are responsible for complicated characters are solved one by one. The essential conditions for DNA marker-assisted selection "MAS" is development of useful resource families to evaluate phenotypes and information about genetic linkages and a large number of polymorphic genetic markers. Some of the cases have already reached a practical stage, and have been used as genetic improvement productions. The methodology of MAS is based on "linkage and recombination". And target species needs highly polymorphism using by molecular markers. In the case of Cyprinid fish species as ornamental, these fish are low polymorphism about molecular markers, because of inbred crossing in their history. But some case is possible to improve about phenotypes. I would like to introduce the case of improvement about gold fish, which are selective breeding of "Edonishiki and Sakuranishiki" by the principle of "linkage and recombination".

(accepted December 28, 2012)

1. はじめに

遺伝育種による表現形質の改良において、「突然変異」と「選抜と交配」という普遍的な作業は、育種という行為が始まった遠い過去から科学技術の発展した現代においても変わっていない。それは芸術性に着目した表現形質を求める観賞魚育種においても、成長や耐病性などの生産効率を優先した経済形質を求める水産育種研究においても同じことが言える。観賞魚の中で最も古い歴史のあるキンギョは、今から1600年前の中国に始まり、「突然変異」という表現形質として〈外れ値〉が現れる現象と、表現形質の固定と他の系統に移行する行為である「選抜と交配」を用いて行うことにより、様々な「品種」としての定義がされている。

現代の水産育種研究・技術において、認知されるようになったマーカー選抜育種法 (marker-assisted selection : MAS) は、天然遺伝資源から〈外れ値〉である表現型を持つ個体を探し、染色体上にある遺伝マーカーと遺伝子との連鎖不平衡 (組み換えと連鎖) という現象を利用して、「選抜と交配」を行う方法である。水産育種研究においては10年ほどの短い歴史ではあるが、国内外の産業対象種でその一部が実用化に至っている。しかしながらこの方法論は遺伝マーカーになる DNA 上に高度な多型性を示すことが前提なため、極度に系統化が進んだ伝統的な観賞魚であるキンギョやニシキゴイでは多型性が乏しく、高速かつ大量なマーカー開発技術がなければ現実的な方法ではな

連絡先：〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦422-1

独立行政法人 水産総合研究センター・増養殖研究所 養殖技術部 育種研究グループ 尾崎照遵

Tel: 0599-66-1830 (代表) Fax: 0599-66-1962 E-mail: aozaki@affrc.go.jp

い。そこには最新の育種技術を用いても難易度が高いとされるコイ科魚類の育種が、伝統的な観賞魚の育種においてはごく普通に行われているという驚くべき事実がある。

キンギョの品種のひとつである「エドニシキ」は二代目秋山吉五郎氏の発想により、長澤兵次郎氏の苦心により完成したランチュウ型モザイク透明鱗の品種である。完成から40年以上が経過してはいるが、金魚愛好家には品種としては未完成品と評価されている。著者は個人的にこの品種の育種の改良に20年ほど取り組んでおり「エドニシキ」の育種を通して、この品種の持つ育種の難しさの原因を形質同士の連鎖不平衡（組み換えと連鎖）という現象を推定して、「選抜と交配」を行っている現代の育種技術からなる発想が、芸術的かつ伝統を重んじる観賞魚育種で、どこまで認知される系統ができていないかを、事例を交えて説明したい。

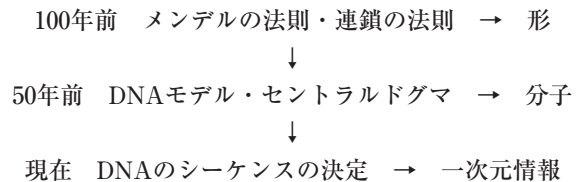
2. 育種を行う上で背景として共有する知識

育種研究の目的は「表現形質の制御」であり、表現型を見て判断する古典的な選抜育種も、近代のクローン・倍数体のバイテク技術や、ゲノム情報を用いたマーカー選抜育種や、多変量解析を用いた統計遺伝育種や、あるいは遺伝子組み換えによる育種も「表現形質の制御」のために用いる方法論であり、その方法論のみに注視した研究開発では、目的とする表現形質を持つ育種産物を得ることはできないことを述べておく。

育種研究とは、人間が都合の良い様に他の生物の表現形質を改良する研究であり、育種においては改善したい目的・目標とする表現形質をどのように設定するかが最も重要なことである。その点において食用とする経済動物種では、抗病性、高成長、給餌効率などの生産性に関する表現形質が重要になるのに対し、観賞魚の育種では、芸術性、珍奇性など個人的な価値観により、表現形質について様々な評価がされる。つまり経済動物種と観賞魚育種では目的とする表現形質が大きく異なっており、すなわち育種の目的・目標が大きく違っていると言える。目的・目標が大きく違っているがゆえに、育種のための方法論が必ずしも共通である必要性はないことを理解することが重要である。

また育種研究は遺伝学の応用科学として発展してきた。裏を返すと「育種」という行為は、遺伝育種という学問形体が出来より前に、人類が「育種」という行為を経済活動として行ってきたということである。その点において観賞魚であるキンギョの遺伝育種は、遺伝学の学問形体が出来より前から存在していることになり、学術的根拠があてはまらない場合もある。

遺伝育種という研究分野においては、生物の表現形質を理解するための概念も時代と共に変化していった。例えば学問としては近代から現代までに表現形質を理解するために以下のように変化してきたといえる。



現在の遺伝育種研究は表現型に対してDNAなどの分子、あるいは一次元情報の根拠が求められるため、一般愛好家でも取り組みが可能な観賞魚育種が、学問としての育種研究とは乖離していく理由の一つでもある。

表現型は何で決まるのか？ということ客観的にとらえてみると、いくつかの要素に分けられる（図1）。

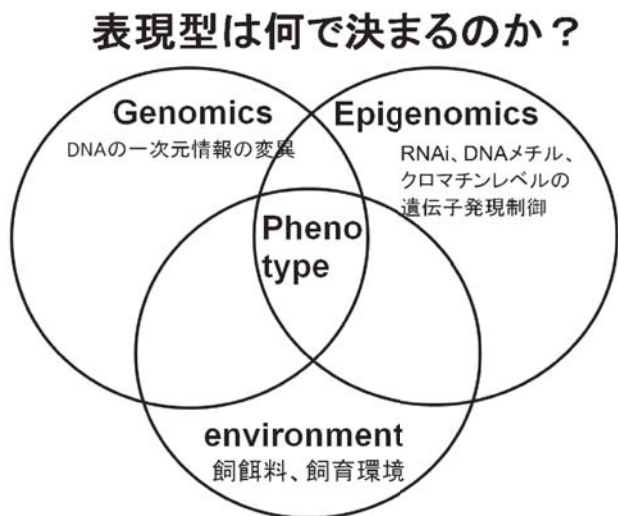


図1. 表現形質を決める要素

簡略ではあるが、大きく分けて3つの要素があると考えられる

1. DNAの一次元情報の変異、(Genomics)
2. 飼餌料、飼育環境、(environment)
3. RNAi、DNAメチル、クロマチンレベルの遺伝子発現制御、(Epigenomics)

現在の科学技術では、1.と2.においては努力次第で、ある程度は制御可能であり、安定した条件下で得られる表現型には再現性がある。3.に関しては、

遺伝子発現の時空間制御を受けるので、未知の部分が
多く、研究領域も普遍的に定義されたものではなく、
現段階では方法論として表現型を制御することは難し
い。例えばここで観賞魚であるキンギョの表現形質を
例に当てはめてみると、普通・透明鱗性、あるいは出
目性などは、1.のゲノミクスレベルである程度は説
明できるであろう。成長や肉瘤の出方は2.の飼餌料、
飼育環境で一定の範囲内で制御可能であろう。更紗の
模様や三毛の色の変化は、クローン魚の研究報告^{1,2)}
を考察すると、3.のエピジェネティクスに起因する
ことが考えられる。このように観賞魚における育種目
的・目標である表現形質は、目に見えるわかりやすい
表現型ではあるが、その制御すべき表現形質の要因を
考慮すると非常に複雑な要素が関連していることがわ
かる。

また、経済動物種と観賞魚育種では目的・目標とす
る表現形質の分類もその効果と頻度において大きな相
違点がある、例えば、セオール・ライトによる形質と
遺伝子数との関係を簡略化したモデルがある（図2）。
これは時代が変化した現在の遺伝学においても共通し
た概念として理解できる。

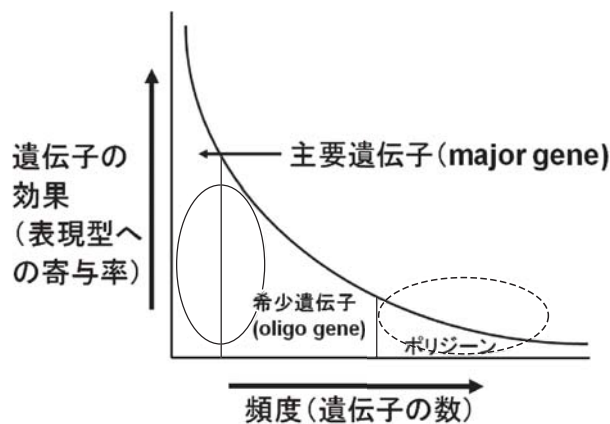


図2. Wright S. による形質と関連遺伝子数のモデル

経済動物種の育種研究として、遺伝解析で分かる
部分、あるいは現在の育種研究で改良できることは実
線にあたる部分、主要遺伝子または希少遺伝子で決ま
るメンデル様式かそれに近い遺伝様式を示す表現形質
であり、それら形質の再現性は後代まで比較的安定し
ている。一方観賞魚育種において必要とされる多くの
表現形質は、破線の部分にあたるポリジーン形質にな
る、すなわち複数の遺伝子の小さな効果の積み重ね、
あるいは相互作用が表現型効果として現れることに
加えて、現代のエピジェネティクスの概念も考慮する
と、系統の形質として表現型の再現性は後代において

不安定であり、確率として望ましい表現型の個体を得
られる程度にとどまる。観賞魚育種において目的・目
標の形質を持つ個体を得るには非常に高度な系統管理
や経験、飼育技術が要求され、再現性のある結果を示
せる育成者はキンギョ・ニシキゴイなどの観賞魚の世
界では、「カリスマ」として称賛されている。

3. 組み換えと連鎖

前述で説明したが経済動物種の育種研究において、主
要遺伝子または希少遺伝子で決まるメンデル様式かそ
れに近い遺伝様式を示す表現形質については、再現性
を示す結果が得られることと、その表現形質が後代ま
で安定していれば、その時点で産業利用可能となる。
それら形質を利用し次世代でその表現形質の効果を
得るためには、遺伝子の「組み換えと連鎖」という現
象を理解しなければならない。すなわち育種研究にお
いては、系統内の連鎖不平衡な領域にわたって、減数
分裂時の相同組み換えにより、染色体上のブロック間
配列を崩さないように交配をしていけば、目的の表現
形質を維持して系統を確立できる。言葉で表現すると
少し難しいが、高校生の生物の授業レベルのことであ
り、生物を扱う職種についている人にとっては誰もが
一度は理解した生命現象である。改めてここで簡単に
解説するために、相同染色体対合と減数分裂の仕組み
を図にしたものを以下に示す。

さらに簡略化して染色体の「組み換えと連鎖」とい
う現象に限って、染色体領域、及び染色体上にある形
質について、連鎖不平衡な状態ということを説明する
と（図4）のように同じ染色体上に異なる表現形質が
存在している場合でも、形質同士お互いの距離が離れ
ている場合は、次世代で形質Aと形質Cを合わせ持
つ生殖細胞ができる確率が高くなる。

逆に異なった形質の局在する位置が隣接し、お互い
の距離が近い場合は（図5）のように、その間で組み
換えの起きる確率が低いため、次世代で形質Aと形
質Bを合わせ持つ生殖細胞ができにくい。この状態
を連鎖不平衡という。

ここでの「組み換えと連鎖」の説明には、染色体
の位置上の関係から、相同組み換えにより、二つの形
質が相加される生殖細胞ができる場合と、できない場
合とを例に説明をしたが、現在の育種技術で必須な分
子マーカーにも同じことがいえ、分子マーカーと分子
マーカーの関係を構築することにより、遺伝子連鎖地
図が作成でき、分子マーカーと表現形質との関係を明
らかにすることが遺伝解析であり、この原理を利用し
たものがすなわちマーカー選抜育種法になる。

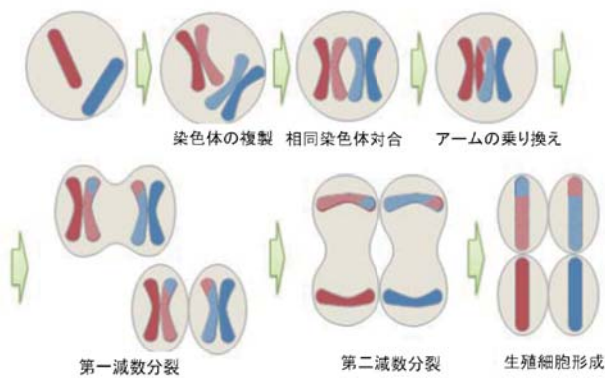


図3. 相同染色体対合と減数分裂

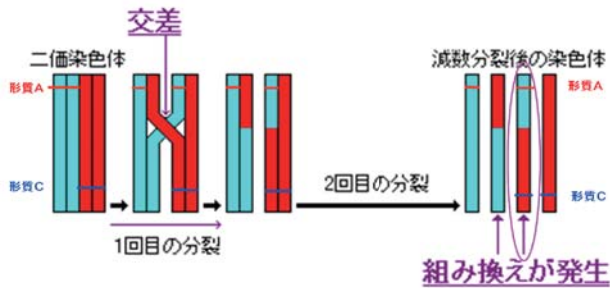


図4. 染色体領域の連鎖関係が崩れる場合
形質Aと形質Cを合わせ持つ生殖細胞ができる

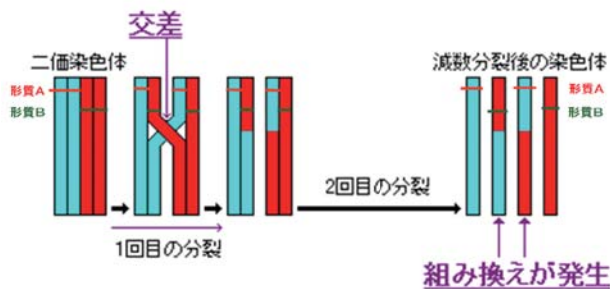


図5. 染色体領域の連鎖関係が崩れない場合
形質Aと形質Bをもつ生殖細胞ができない

4. マーカー選抜育種法（水産育種の実例）

マーカー選抜育種法は Lande R. and Thompson R.³⁾ により分子マーカーでの利用が提案され、方法論として一般的に定義されたと認識されている。マーカー選抜育種法は連鎖解析などにより目的遺伝子の候補領域の特定を行い、その遺伝子候補領域を指標として次世代を作成する。水産経済動物種では10年ほど前に、ニジマスにおいて伝染性脾臓壊死症（IPN）耐性の領域の特定と、マーカー選抜育種の成功例^{4,5)}があったが、その当時の研究状況下ではマーカー選抜育種法の認

知度も低く、またニジマス養殖の産業規模からその実用化には至らなかった。しなしながらその後マーカー選抜育種法は、比較的産業規模の大きい水産経済動物種で数例が実用レベルに至っている。現在、ヒラメのリンホシスチス病耐性^{6,7)} においては、日本のヒラメ生産種苗の約4分の一程度が、マーカー選抜育種魚に置き換わり、ノルウェーにおいては、大西洋サケで伝染性脾臓壊死症（IPN）耐性の領域が特定され^{8,9)}、マーカー選抜育種魚として、大規模に種苗生産・販売されており、育成魚は海外からフィレとして国内に輸入されている。最近この2魚種において口にしたことのある読者の方は、おそらくすでにマーカー選抜育種魚を食べていることになる。このように生産規模の多い魚種においては、一度その利点が理解されると、少数の種苗会社がすべてその系統の交配からなる種苗を使うことにより、ほとんどの生産種苗・中間育成魚がその系統に置き代わってしまうため、育種の効果は大きい。現在そのほかの対象魚種では、ニジマスの旋回病耐性¹⁰⁾、アジアシーバス可食部増¹¹⁾、ヨーロッパシーバス可食部増¹²⁾、ヨーロッパヘダイ可食部増¹³⁾ などで主要な QTL 領域が存在するとの報告があり、次期マーカー選抜育種魚の予備群として期待されている。このように魚種の違いこそはあるが、マーカー選抜育種法の正しい知識とその利用への理解は、実用例と共に次第に浸透してきている。確かに初めてこの育種法の原理を理解するには生物学の難しい言葉や多くの知識が必要ではあるが、すでに前述で示した通り、マーカー選抜育種法の原理自体は決して難しい方法ではなく、染色体（遺伝子）の組み換えと連鎖という生命現象の法則を単に可視化しているだけの育種法である。

5. 「エドニシキ・サクラニシキ」の育種

研究としてマーカー選抜育種法を行うには、表現形質と分子マーカーとの関係を明らかにし、その候補領域が次世代に正確に伝わっていることを確認し、後代でその表現型が改良されたかどうかを評価することが重要で、養殖生産において問題となることを解決するために効率的な育種を行ったかどうかの評価の対象である。だが単に育種としての成功の目的が、望ましい形質を持つ個体を手に入れることならば、分子マーカーは必ずしも必要としない。前述で述べた通り、観賞魚育種で求められる形質も、その形質のカテゴリーも経済動物種とは異なるため「研究風な育種に陥らないこと」が重要である。すなわち手段を目的・目標にしないということである。

例えばニシキゴイ・キンギョのマーカー育種は可能

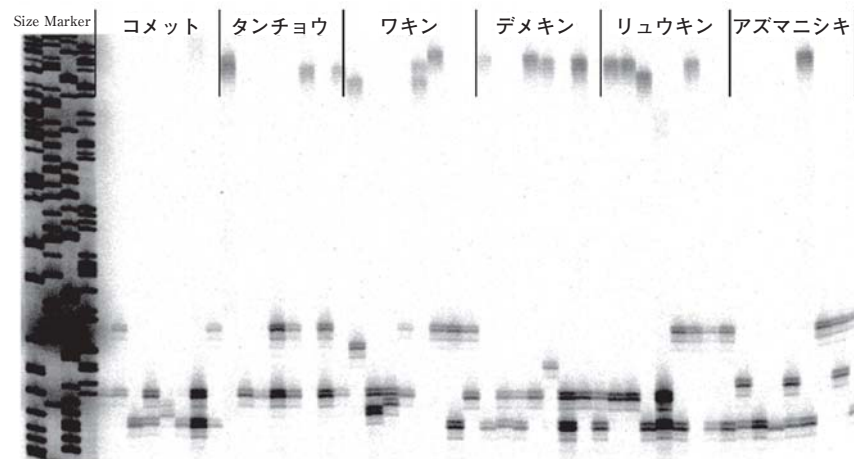


写真1. チャンピオンデータのとれたマイクロサテライトマーカー金魚6品種の電気泳動結果

このような2倍体のアレルとして判別できるマイクロサテライトマーカーの作製できる数は極めて少なく、品種間でのアレルタイプのバリエーションも少ない。

か?という問いに対して、私ならばニシキゴイ・キンギョのマーカー選抜育種法は利用しないと回答している。その理由は4倍体性魚種で分子マーカーを使って育種をしようと思うと、ゲノム情報のインフラ整備に途方もないお金と労力と時間がかかるし、数々のマイクロサテライトマーカーの多型性の確認をした経験から、ニシキゴイ・キンギョ自体は、系統を確立したものが共通祖先集団で、おそらくは系統が確立した後に生じた変異でしかDNA多型性がとれない(写真1、坂本ら・未発表データ)。他の野性個体が存在する魚種と比較しても、極度に多型性が乏しく、ほとんどのマイクロサテライトマーカーが役に立たないという事実を理解しているからである。

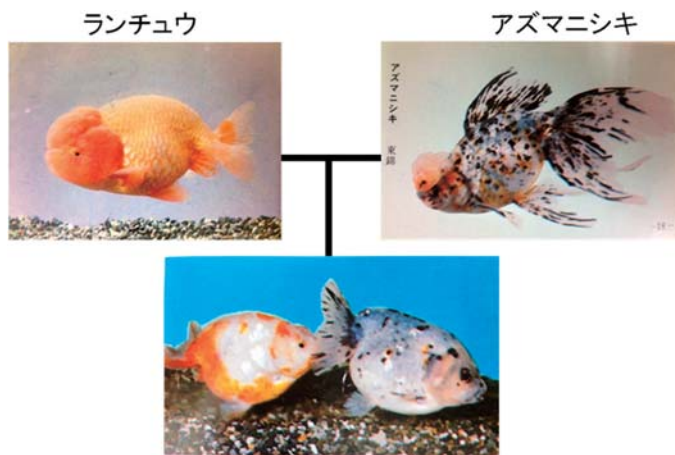
ただし「組み換えと連鎖」の説明で、二つの形質が相加される生殖細胞が出来る場合と、できない場合とを例に説明をしたように、形質と形質との関係で、「連鎖」の関係が疑われる場合は、分子マーカーを用いずとも、古典的な方法で表現型を指標に育種を進めることが可能である。

キンギョの品種のひとつである「エドニシキ」は、二代目秋山吉五郎氏の発想により、長澤兵次郎氏の苦心により完成したランチュウ型モザイク透明鱗の品種(写真2)である^{14,15)}。品種の完成から40年以上が経過しているが、金魚愛好家には品種としては未成品とされている。その理由として対象となる形質、1.「背びれなし」、2.「モザイク透明鱗・浅葱色」、3.「ランチュウのような四角く発達した肉瘤」を同時に持つ個体が安定して現れないと言うことが愛好家の間では広く認識されているからである。特にランチュウ、ア

ズマニシキの両品種とも、肉瘤がよく発達するのに対して、両品種の交配品種のエドニシキでは、肉瘤の発達が悪く、それを改良するために比較的良い親魚を選んで交配したり、再びランチュウと交配しても、後代においてなかなか改善されない(サクラニシキは比較的肉瘤の発達が改善されやすい)。また浅葱色の安定した良魚を作出することも出来ない。私は個人的にこの品種の育種・改良に20年ほど取り組んでおり、「エドニシキ・サクラニシキ」の育種を通して、この品種の特徴であるそれら形質の重複化に関する品種改良の難しさの原因を、前述に述べた形質同士が隣接し、お互いの距離が近い場合であること(連鎖不平衡な状態が崩れない)を想定して、「選抜と交配」を行っている。

私がこの品種の育種・改良に用いているオリジナル系統は、1990年に愛知県、蒲郡市清田町の金魚養魚家、渡辺茂夫・義春氏から「ベッコウ」と当時御本人達が呼んでいた<背びれなし・モザイク透明鱗(浅葱色)のキンギョ>に由来するもので(以降ベッコウ系統)、これを原種として導入したが(写真3・左、中央)肉瘤はほとんど発達しない系統であった。これに対して浜松・(株)清水金魚より導入した浜松系ランチュウを改良すべき表現形質のコントロールとして、飼育環境、飼育技術の安定性を確認するために同一条件で飼育した、約3世代にわたり同じ条件下でもベッコウ系統では肉瘤の発達がないことを再確認し、後に浜松系ランチュウとの交配をした。その後代交配系統においては、数世代にわたり肉瘤の発達はいびつで、浅葱色の発色のある個体は出現しなかった(写真3・右)。

またその後代の改良で、エドニシキの前駆体である



二代目秋山吉五郎氏と長澤兵次郎氏による
オリジナルのエドニシキとサクラニシキ

写真2. エドニシキ・サクラニシキの作成過程

ランチュウ、アズマニシキの両品種とも、肉瘤がよく発達するのに比べ、両品種の交配種であるエドニシキ・サクラニシキでは肉瘤の発達が悪い（松井佳一・金魚と錦鯉、金園社より引用）



写真3. 「エドニシキ・サクラニシキ」の品種改良に用いた系統の過程

左・中央：1992年 渡辺茂夫氏ベッコウ系統、右：1999年 ランチュウ との交配から F_2 世代

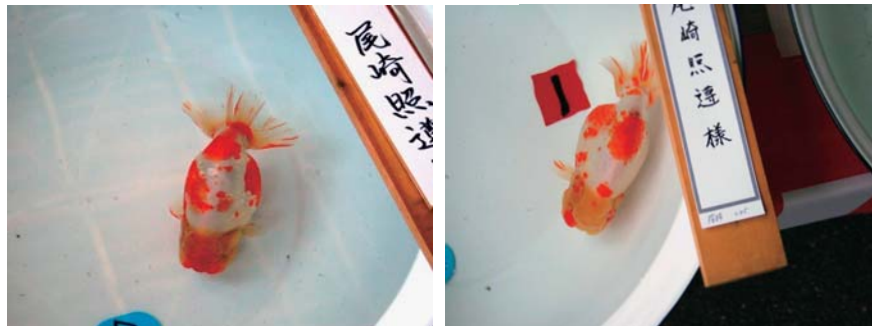


写真4. 「金魚日本一大会」で優等賞としての一定の評価を得たサクラニシキ



写真5. 現在も品種改良の途中であるエドニシキ

左：2010年 F_8 世代 参歳 右：2011年 F_{11} 世代 当歳

サクラニシキにおいては、F₆、F₇世代において、毎年秋季に弥富市で行われる品評会である「金魚日本一大会」で優等賞などをもらうなど、品種の完成度として一定の評価が得られている。(写真4)

しかしながら、エドニシキに関してはやはり難易度が高く、ベッコウ系統のような浅葱色の発色のある個体が出現する確率が非常に低く、個体として出現するにいたってはF₈世代までかかり(写真5・左)、体系・体色・肉瘤が比較的安定した個体を一定の個体数を得るにはF₁₁世代までかかっている(写真5・右)。現在も品種改良の途中であり、品種改良の完成度の評価基準にしている「金魚日本一大会」の品評会では、現在までに入賞には至っていないが、オリジナル系統であったベッコウ系統に比べ、ランチュウのような四角く発達した肉瘤や体型というような表現形質において顕著な改良が進んだと考えている。

キンギョのような観賞魚では、現状ではマーカー選抜育種法のように形質同士の関係を遺伝子地図上に可視化することはできないが、形質の局在する遺伝子座同士が隣接しているであろうということを、愛好家同士の情報交換による知見や、自分の経験、直観などを生かして、交配実験の結果を考察し、目に見える形質の関連性を推定しながら「選抜と交配」をすることにより、比較的短期間で目的の形質を持つ個体の作出は可能であるというのが私の見解である。

6. 育種産物に関わる知的財産と不妊化

育種によって対象種の系統・品種の確立に伴い、次の段階として心配される問題としてよく問われるのが、確立した系統・品種が生産種苗として、開発した研究機関以外の人手に渡り、あるいは海外に輸出されて、累代・継代され、知的財産の流出に繋がる可能性から、「不妊化の技術開発」が必要であるという意見を、一般の方、業界の方、あるいは研究者を問わず良く耳にするが、私個人は、対象種の系統・品種の知財の問題に対しては以下のような理由から楽観的に考えている。

遺伝子と表現形質の関連(マーカー選抜育種法)に関しては、すでに「組み換えと連鎖」の中で述べてきたように、ただ単純に他者が開発した系統・品種を手に入れ、継代・累代したとしても、後代で目的の形質を再現できるわけではない。目的とする形質を再現するには、形質の遺伝子領域に隣接するアリルタイプとその並び方(ハプロタイプ)を確認し、遺伝子領域の信頼区間のハプロタイプが、組み換えなどの影響を受けず保存された理想的な両親を選び出し、確実に交配することが必要で、その情報は系統・品種を開発した

研究機関でなければ正確には分らない。またそれら情報は、マーカーの特許化などで知財が守られているため、知財を免れながら完全なコピーをすることは難しく、たとえ知財を無視して情報を調べ上げたとしても、労力に見合ったメリットが生じないため効率的な方法とは言えない(種苗に対して別途付加されたコストを支払った方がはるかに安い)。

またニシキゴイ・キンギョなど観賞魚育種においては、目的・目標とする形質の特性は常に不安定で、後代では良い親から必ずいい子供の集団が出てくるわけではなく、確率として良魚が得られることはすでに述べた。既存の系統の流出の心配をすることよりも、今まで自分たちで培ってきた高度で特殊な系統管理や経験、飼育技術を次世代の人材に確実に継承し、今後もさらに良いものを作出するという育成者の姿勢がなければ、再現性のある良い結果を得ることはできない。

持続的な養殖産業発展のためには、今後は養殖魚の不妊化の技術開発に対してさらに注視して取り組む必要性はあるが、確立した系統・品種の知財保護の観点というよりも、欧米諸国に合わせた生命倫理観、及び価値観に配慮する必要がある、養殖魚が自然水域に逃げ出した場合の遺伝的攪乱の危険性の対処法としての「生物多様性に配慮した持続的養殖業の技術開発」という意味合いの方がはるかに重要性は高い。

7. 謝 辞

キンギョの形質に関して洞察する機会を与え、遺伝育種研究に従事するきっかけを与えてくれた父・尾崎照正に感謝いたします。貴重な系統を譲渡して頂いた故・渡辺茂夫氏、及び渡辺義春氏に感謝いたします。遺伝育種研究を通じて、科学的視野からキンギョを考察する機会を与えてくれた岡本信明・坂本崇、両博士に感謝いたします。

8. 終わりに

本稿は水産育種研究会・観賞魚育種シンポジウムで、今までは学術研究分野からはタブー視されてきた観賞魚育種について、遺伝育種研究で用いる専門用語や概念を当てはめて解説した。また逆に伝統や芸術性を重んじる観賞魚愛好家のために、表現形質についてより科学的・論理的理解を進めてもらうために行った一般講演内容をまとめたものであるため、用語や内容に関して学術的、あるいは観賞魚業界での呼称には適切ではない部分があるが、一般の観賞魚愛好家、水産養殖業者の方、及び研究者の双方に向けてできるだけ分かりやすい表現を用いて説明していることに御理解いただきたい。

引用文献

- 1) 松村貴晴・五藤啓二・山本直生・能嶋光子・田中健二・岩田靖宏 (2011) クローンリュウキンの尾の開きに対する環境と遺伝の影響. 水産育種40: 97-103.
- 2) 松村貴晴・五藤啓二・岩田靖宏 (2005) 優良形質魚量産実用化試験 (タンチョウクロンの飼育環境と斑紋の関係). 平成16年度愛知水試業報, 42-43.
- 3) Lande, R. and Thompson R., (1990) Efficiency of Marker-Assisted Selection in the Improvement of Quantitative Traits. Genetics, 124: 743-756.
- 4) Ozaki, A., Sakamoto, T., Khoo, S., Nakamura, K., Coimbra, M. R. M., Akutsu, T. and Okamoto, N., (2001) Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Mol. Genet. Genom., 265: 23-31.
- 5) Ozaki, A., Sakamoto, T. and Okamoto, N., (2003) The contribution of quantitative genetics to fish breeding; Aquatic Genomics-Step Toward a Great Future. Springer-Verlag, Tokyo, 309-409.
- 6) Fuji, K., Kobayashi, K., Hasegawa, O., Coimbra, M. R. M., Sakamoto, T. and Okamoto, N., (2006) Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture, 254: 203-210.
- 7) Fuji, K., Hasegawa, O., Honda, K., Kumasaka, K., Sakamoto, T. and Okamoto, N., (2007) Marker-assisted breeding of a lymphocystis disease-resistant Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture, 272: 291-295.
- 8) Moen, T., Baranski, M., Sonesson, A. K. and Kjøglum, S., (2009) Confirmation and fine-mapping of a major QTL for resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*): population-level associations between markers and trait. BMC Genomics, 10: 368.
- 9) Houston, R. D., Haley, C. S., Hamilton, A., Guy, D. R., Tinch, A. E., Taggart, J. B., McAndrew, B. J. and Bishop, S. C., (2008) Major quantitative trait loci affect resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Genetics, 178: 1109-1115.
- 10) Baerwald, M. R., Petersen, J. L., Hedrick, R. P., Schisler, G. J. and May, B., (2011) A major effect quantitative trait locus for whirling disease resistance identified in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Heredity, 106: 920-926.
- 11) Wang, C. M., Lo, L. C., Zhu, Z. Y., Pang, H. Y., Liu, H. M., Tan, J., Lim, H. S., Chou, R., Orban, L. and Yue, G. H., (2011) Mapping QTL for an Adaptive Trait: The Length of Caudal Fin in *Lates calcarifer*. Marine Biotechnology, 13: 74-82.
- 12) Massault, C., Hellemans, B., Louro, B., Batargias, C., Van Houdt, J. K., Canario, A., Volckaert, F. A., Bovenhuis, H., Haley, C. and de Koning, D. J., (2009) QTL for body weight, morphometric traits and stress response in European sea bass *Dicentrarchus labrax*. Animal Genetics, 41(4): 337-345.
- 13) Loukovitis, D., Sarropoulou, E., Tsigenopoulos, C. S., Batargias, C., Magoulas, A., Apostolidis, A. P., Chatziplis, D. and Kotoulas, G., (2011) Quantitative trait loci involved in sex determination and body growth in the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) through targeted genome scan. PLoS One, 31; 6(1): e16599.
- 14) 松井佳一 (1968) 金魚と錦鯉, 金園社, 東京, pp16, 136.
- 15) 長澤兵次郎 (1984) 金魚のすべて, マリン企画, 東京, pp58-61.

ニシキゴイの親魚管理と育種戦略

谷口順彦 (福山大学生命工学部)

Breeding Strategy and Broodstock Management in Ornamental Koi Carp

Nobuhiko TANIGUCHI

Faculty of Life Science and Biotechnology, Fukuyama University

Abstract

In order to prevent inbreeding depression in the ornamental koi carp breeding, the minimal-kinship selective breeding (MKSB) was simulated using the allelic data of microsatellite DNA markers. The allelic number and heterozygosity in the 10th generation of MKSB lines was observed to be relatively higher than that of the 10th generation of non-selective breeding lines. It was suggested that the MKSB is significantly effective in the brood stock management in the ornamental koi carp breedings.

(accepted February 15, 2013)

1. ニシキゴイにおける育種の現状

ニシキゴイは鑑賞魚の一つとして国の内外で生産され根強い人気がある。国内では新潟県、福岡県、広島県、静岡県などが産地として知られている。日本のニシキゴイの育種は新潟県の山古志村に始まり、色彩や斑紋などの模様で特徴づけられる様々な系統が作出されてきた。しかし、ニシキゴイ育種の歴史は浅く、紅白はおおよそ200年前に作出され、大正三色や昭和三色などもそれらの名のとおり大正、昭和年間に作出され、長く見つもってもおおよそ100年程度と言われる¹⁾。

これまで作出された品種または系統として扱われているものには、白無地、赤無地、大正三色、白ベッコウ、赤ベッコウ、昭和三色、白写し、赤写し、黄写し、黄金、プラチナ、浅黄、秋翠などがあるが、白無地、赤無地、黄金、プラチナ以外は遺伝的な固定が困難であり、親魚選択や育種の技法について定番と言われる手技は未完成の状態にある。

ここではニシキゴイ育種の現状、特性、近交対策などについて解説するとともに、今後の育種のあり方についても考察を加えたい。

2. 個体選抜か家系選抜か

選抜育種法は、その手法により個体選抜法と家系選抜法に大別される。個体選抜法は、魚類では成長や産卵期のような連続的形質（量的形質）に対して有効な手法と言われる。この方法では育種対象として好都合な形質（特徴）をそなえる個体（親魚）を家系とは関わりなく選抜するので、植物育種においては集団選抜法と呼ばれている。このような個体選抜法はマダイのような魚類養殖の対象種で採用され実績をあげている。マダイの種苗生産では、50～200個体の魚が毎代選抜され再生産が継代的に実施され、改良種苗が生産現場へむけて大量に供給されている。マダイの養殖種苗には遺伝的に改善された複数の系統が確認されている²⁾。

他方、家系選抜法は色彩や形態などの好ましい質的形質を備える家系を代表する少数の親魚（個体）を選抜する方法である。家系選抜の代表例は犬種の育種の世界であり、おおよそ2万年の歳月をかけて野生オオカミから600種類を超える極めて多様な犬種が作出されている。

ニシキゴイの場合、家系選択法が採用され色彩等の質的形質の改良が試みられいくつかの系統が作出されている。しかし、それらの系統の特徴をなす系統の遺伝的固定は依然として不完全と考えられている^{3,4)}。

3. 色彩発現に関わる遺伝モデル

赤斑・黒斑・白色の遺伝：1950年以降、ニシキゴイの色彩、斑紋、鱗などの変異の遺伝様式を解明するため、様々な交配試験が積極的に実施され、多くの知見が集積された¹⁾。

それらのうち紅白と大正三色の色彩の遺伝モデルについては交配実験が重ねられ、紅白系統の体色は赤色(R)と白色(W)の2対立遺伝子による支配を受けることが解明された。しかし、単純な2対立遺伝モデルでは十分説明できない現象があることも明白であった。

いくつかの交配実験の結果から、白(W)は赤(R)に対して発現面ではやや優性であり、赤(R)と白(W)の2対立遺伝子が4コの遺伝子座に配置される同義遺伝子モデルが提案された。この遺伝モデルにより紅白の遺伝変異の出現状況がよく説明出来るとされた⁵⁾。

以上のような紅白の体色変異に黒斑が加わると大正三色となる。黒と白は対立遺伝子Bとbに支配され、Bb型となったときに白地に黒斑が発現する。従って、大正三色を作出するためには大正三色同士の交配、または大正三色と紅白が交配され、その際の形付き率は50%となる⁶⁾。この場合も紅白の場合と同じく、品質を左右する黒斑と赤斑の形や出現位置については解明すべき育種課題として残されている。

紅白および三色における親の選び方：このような遺伝モデルに基づき紅白を作出する場合には紅白の親魚同士の交配、または赤無地純系と白無地の純系の間の交配が紅白の作出における親魚選択の基本となる。ただし、赤無地や白無地と言っても、個体が保有する4遺伝子座の8対立遺伝子のうちRとWの比率は個体により異なり多数の遺伝子型変異が想定される。また、紅白の品質を左右する赤斑の形、数、赤斑の出現位置についてはそれらの遺伝モデルは未開明であり、今後の重要な課題として残されている。

大正三色の選抜については、黒色の形付き魚がB-bのヘテロ型であるので、大正三色を親魚として選抜したのでは遺伝的な固定を達成することは不可能である。つまり、親魚として鑑賞価値のある個体を親魚候補として確保したとしても目的を達成するための親として適切か否かは交配の相方となる親魚次第であり、優れた子供を残すかどうか判らない。

このような問題を解決できる唯一の方法は、優良親魚と同一の遺伝的型の個体を誘導する方法を考案する

ことである。たとえば、染色体操作または細胞操作によるクローン作出技術を導入することはその一つかもしれない。

4. 新しい育種技法の応用について

染色体操作法：ニシキゴイにおいて染色体操作による三倍体等の誘導条件が検討され、育種への可能性が示唆された⁷⁻⁸⁾。さらに、母親の遺伝子のみで子供をつくる雌性発生二倍体の作出が試みられた⁹⁾。親魚から採り出した成熟卵を、遺伝的に不活化したフナの精子で媒精し、併せて雌親の染色体を倍加する処理を併用することにより雌性発生二倍体の誘導に成功している。染色体の倍加処理法には第二極体放出阻止法と第一卵割阻止法とがある。同じ雌性発生二倍体と言ってもその手法により子供の色彩の現れ方は著しく異なる。図1は親魚として紅白を用いて、二種類の雌性発生二倍体を誘導して、それらの色彩の発現状態を正常二倍体のそれらと比較したものである。極体放出阻止型雌性発生二倍体においては、対照区の正常二倍体に比べ紅白の出現率が明らかに多かった。これは紅白の雌親の対立遺伝子の保有状態が子孫へより強く遺伝した結果と考えられた。また、卵割阻止型雌性発生二倍体では赤無地が高頻度で出現し、紅白もわずかながら出現した。これは赤(R)または白(W)の遺伝子がいずれの遺伝子座でもホモ型になることを反映したものと考えられた。

また、卵割阻止型雌性発生二倍体では赤無地および白無地の純系を確実に作出できるので、この方法により作出された赤無地と白無地を用いてそれらのF1を誘導することは紅白の形付き率を高める手法の一つと考えられる。

染色体操作によるクローン作出：卵割阻止型雌性発生二倍体では第1代目において全ての遺伝子座において対立遺伝子はホモ型となる。従って、雌性発生2代目においてはその母親と全く同じ遺伝子構成を備える子供の集団(クローン魚集団)を誘導することが可能である。ただし、この方法では、クローン魚を作出するために使用する親魚はニシキゴイの理想的特徴を備えた通常の二倍体の親魚ではなく、その親から作出された卵割阻止型雌性発生二倍体を親魚として使用することになる。卵割阻止型雌性発生二倍体では第1代目の集団では個体毎に全ての遺伝子座で同型接合(ホモ)型であるが、個体間では著しく遺伝的に多様化する⁹⁾。このような多様化した集団の中からニシキゴイの理想的特徴を備えた親魚個体を選抜して、雌性発生二倍体を誘導できれば2代目にして同じ遺伝子構成を備える子供の集団(クローン魚集団)を誘導することが可能

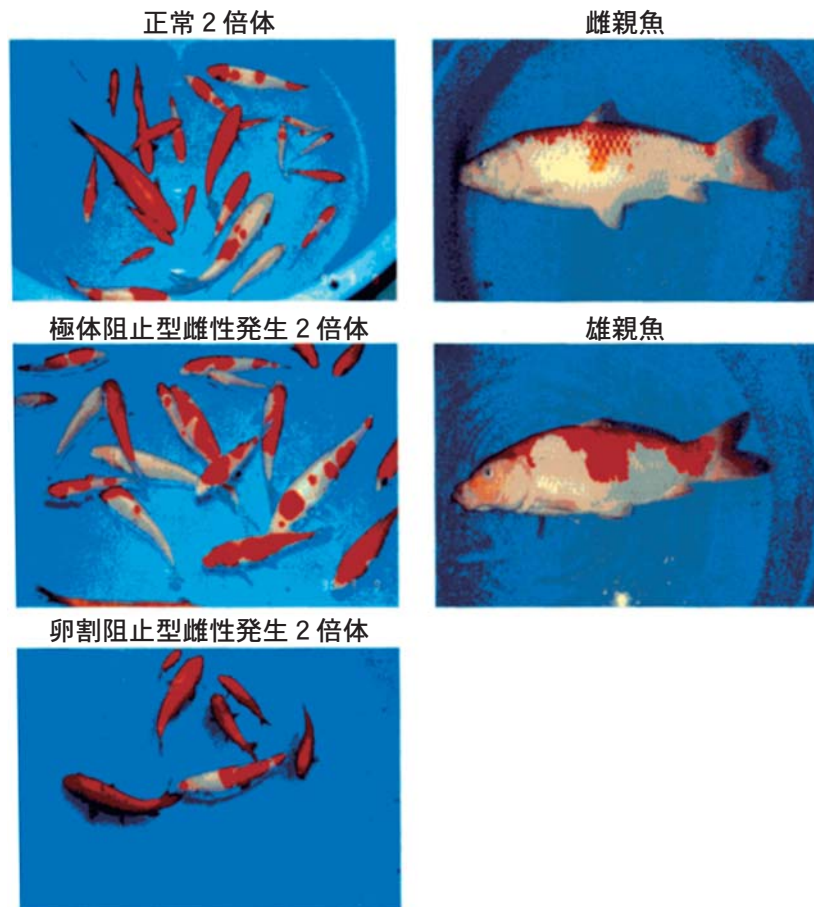


図 1. 紅白を親として染色体操作により誘起された雌性発生二倍体.

正常二倍体の生産において雌親と雄親ともに紅白を使用. 雌性発生二倍体では雌親は紅白, 雄親は雌性発生二倍体の誘導のためフナを使用. 媒性には紫外線照射により遺伝的に不活性化したフナ精子を使用. 極体阻止型において紅白の発生率が高かった.

であり、すでにアユやヒラメではクローン集団が作出されている⁹⁾。ただし、この方法は赤無地、白無地、黄金、プラチナなどの単色のニシキゴイに応用出来るが、紅白や大正三色、昭和三色など発現形質の遺伝子型がヘテロ型の場合には当てはまらない。紅白の形付き率を高めるためには、卵割阻止型雌性発生二倍体で作出された赤無地および白無地の純系間のF1を誘導することになる。

ニシキゴイでは卵割阻止型雌性発生二倍体を採卵可能な成魚にまで育成することが難しく、第2減数分裂が正常に生起しないケースがみられる。新潟県内水試では雄性発生二倍体を経由したクローン魚の作出が試みられており¹⁰⁻¹¹⁾、この手法は雌発生二倍体における技術的問題をクリアできる可能性があると期待されている。

ES 細胞および iPS 細胞の利用とクローン作出：染色体操作法では母親と同じ遺伝子型のクローンを作成

できるのは雌性発生を2世代にわたり実施した場合である。このことは育種家が理想とするニシキゴイ個体(元の母親)と遺伝的同質のクローン魚を作成することはできないことを意味している。理想とするニシキゴイの親魚と遺伝的同質の子供を作成するには如何にすればよいのであろうか。

家畜育種分野においては、胚幹細胞 (embryonic stem cell) および人工多能生幹細胞 (induced pluripotent stem cell = iPS) を利用したクローンを作成する試みが実用化されている。このような ES 細胞の研究が魚類の育種分野にも採り入れられ標的形質を発現させる試みが始められているが実用化には至っていない。

魚類でも始原生殖細胞および精原細胞を用いた発生工学技法がすでに開発されつつあり、研究が進められている¹²⁾。胚細胞 (胚幹細胞、MS) クローンは対象となる1つの受精卵から得られた始原細胞を複数取り

出し、仮腹のなかで発生させて作出されるが、この場合も親魚の体内で減数分裂を経て得られた細胞を使用しているのでクローン魚は目標とした親魚と同一の遺伝子構成を備えたクローンではない。

他方、体細胞性クローンは親魚の体細胞を始原化して発生させるため、目標親魚と同一の遺伝子構成を備えたクローン魚を作出することが可能となる。

ニシキゴイの世界でこの技術が導入され、体細胞性クローンの生産が実現すればメリットは極めて大きいと考えられる。

5. 遺伝的多様性の減退と近交の問題

近交弱勢への対処法：ニシキゴイの育種では親魚候補（個体）の特徴と血統に注目して選抜を行う家系選抜法が採用されてきた。しかし、ニシキゴイの世界では対象個体の家系を正確に認識するための血統登録システムがなく、家系情報としてはニシキゴイ生産者の記憶や屋号を頼りにする以外に情報を得る方法がなく、結局、生産者の経験と勘に頼る選抜育種にならざるを得なくなる。

犬、牛、馬で代表される家畜育種の世界では、改良が続けられ多様な品種が作出されている。このような家系選抜では遺伝病が近親交配の必然的副作用として多発していることもよく知られた事実である。しかし、肉牛や乳牛などの育種においてはそれぞれ種親候補には血統書があるため、遺伝病の疑いがある個体のルーツを祖先にさかのぼってその原因となった因子を系図上で追跡し、発生源となった個体を探りあて、その個体に由来する子孫および後代は再生産系から除去する措置が実施されている。

ニシキゴイの選抜育種には、その成功の鍵となる血統登録システムが利用できないので近交リスク管理体制は望めない。ニシキゴイには近親交配の影響は存在しないのであろうか。前出の各県内水試で実施された交配試験において、近交の劣化が疑われる現象が継代系において確認されている¹⁾。また、食用ゴイに比べてもニシキゴイの成長や生残率が低いことは実験系では確認済みである。

DNA マーカーによる近交度の推定：ニシキゴイは主として家系選抜法によって継代されてきた。ふ化後成魚になるまでの間に数度の選別を経て育成され最終的に残される個体はごく少数である。このため、全般的に遺伝的多様性は著しく低下する傾向があり、同時に近交係数の急速な上昇を伴う。そこで、ニシキゴイの育種の盛んな新潟県において代表的3系統、紅白、大正三色、昭和三色を対象としてDNA多型マーカーを用いて遺伝的多様性と近交度の測定を試みた¹³⁾。

現時点でのニシキゴイの遺伝的多様性のレベルを評価するため、新潟県の生産者および新潟県内水面水産試験場から試料（鱸の小片）の提供を受け、マイクロサテライトDNA多型分析を実施した。

遺伝的多様性水準と近交度の上昇：新潟県産ニシキゴイの遺伝的変異性（多様性）は、平均有効アリル数および平均ヘテロ接合体率で見ると、非選択系のマゴイ集団に比して全般的に著しく低下していることが判明した（表1、図2）。このように遺伝的多様性が低い集団では、予想どおり H_o/H_e の低下（表1、図3）と近交係数の上昇とが確認された（図4）。このような集団では、近交係数の上昇にともなう劣性有害遺伝子の顕在化リスクが想定され、それを疑わせる生残率の低下や成長の鈍化といった現象が実際に確認されている¹⁾。

ニシキゴイ系統間、個体間の関係：ニシキゴイ3系統のマイクロサテライトDNAのアリル型データ¹³⁻¹⁴⁾を用いて、紅白、大正三色、昭和三色の遺伝的関係について分析を行った（図5）。3系統のうち、紅白と昭和三色の関係がやや近く、大正三色はそれらとはやや遠い関係にあることが判明した。系統間の差の統計的有意性については、大正三色と昭和三色の間で有意、紅白とそれら2系統の間では有意差は検出されなかった（表2）。このような結果はニシキゴイの3系統の遺伝的分化が不完全であり、紅白を介して大正三色や昭和三色との間に遺伝子流動のあることが示唆される。

次に、使用したニシキゴイ3系統のマイクロサテライトDNAのアリル型データを用いてニシキゴイ個体間の類縁図を作成した（図6）。紅白、大正三色、昭和三色の間には明確な遺伝的分化は見られなかったが、3系統の分布にはそれらの異質性を反映した偏りが認められた。この類縁図において各個体を生産者別に色分けしたところ、生産者の分布の偏りは見られなかった。

次に、同様の個体間類縁図を系統毎に作成した（図

表1. ニシキゴイ各系統の平均ヘテロ接合体率と有効アリル数

	H_o	H_e	有効アリル数
紅白	0.321	0.378	1.60
大正三色	0.319	0.376	1.58
昭和三色	0.285	0.382	1.61
野生マゴイ	0.924	0.778	6.0

多様性指標はマイクロサテライトDNA多型分析による。多型検出には19プライマーセットを使用した (Aliah *et al.* 2000). 供試サンプル（鱸の細片）として新潟県下の11業者および新潟県内水面試験場から提供を受けた。

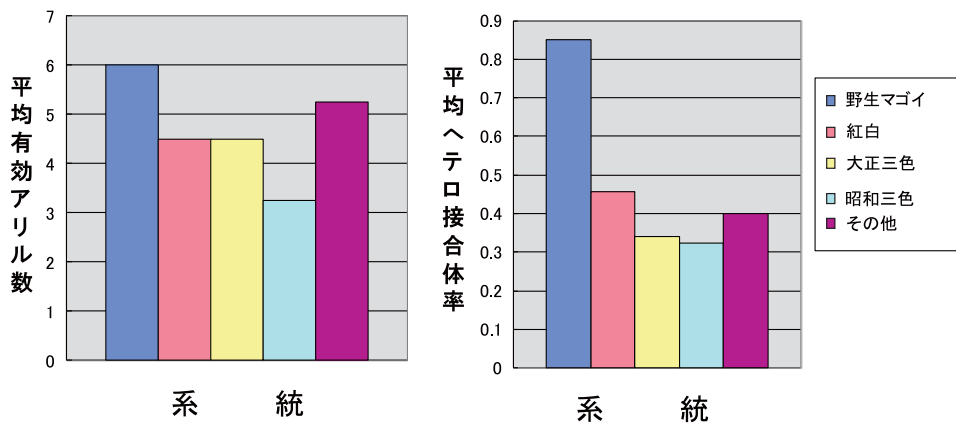


図2. マイクロサテライト DNA マーカー (19プライマーセットを使用) によるニシキゴイ 3 系統および高知県の河川産野生マゴイの遺伝的多様性水準の比較 (Aliah *et al.* 2000).

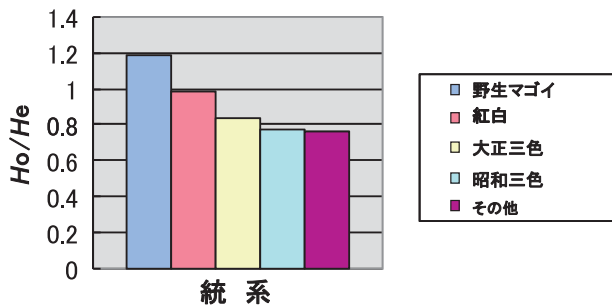


図3. ニシキゴイ各系統における平均ヘテロ接合体率の実測値 (H_o) と理論値 (H_e) の比. ニシキゴイ系統で H_o/H_e 値が 1 以下に低下しているのは近親交配によるホモ接合体過剰現象を反映している.

7)。それぞれの系統内にいくつかのグループが認められたがその分化レベルは微弱であった。生産者の分布については系統による弱い偏りが認められた。

次に、ニシキゴイ 3 系統のマイクロサテライト DNA のアリル型データを用いて、個体レベルの系統判別を試みた。対数尤度比分析の結果、個体レベルの識別率は 67–86% であり (図 8)、3 系統間の遺伝的分化が不完全であることが明らかとなった。これらのマイクロサテライト DNA 分析はニシキゴイ 3 系統の遺伝的固定が依然として不完全であることを意味している。

遠縁個体間選択交配による近交の緩和：近交弱勢の対策としては、通常、創始者集団の更新、親魚集団サイズの拡大、系統間交雑などの対処方法が採られるが、ニシキゴイでは色彩の固定が重要な育種の課題となるため、それらを採用することは困難と考えられる。

ニシキゴイにおける遺伝的多様性の維持と近交防止策としては、系統内の遠縁個体間交配を実施すること

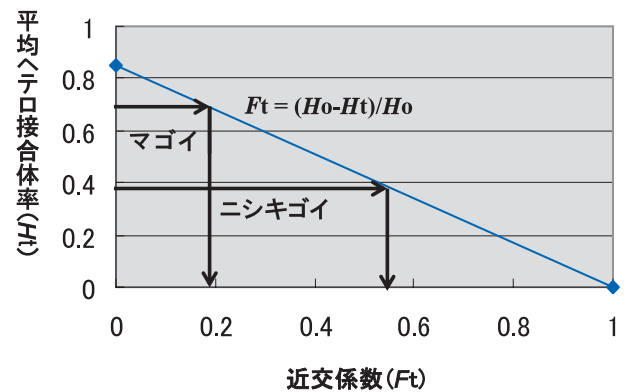


図4. ニシキゴイ集団における平均ヘテロ接合体率の低下と近交係数 (F_t) の推定.

近交係数は $F_t = (H_o - H_t) / H_o$ により推定. ここで, H_o は非近交集団である野生の魚類集団の平均ヘテロ接合体率を, H_t は現在のニシキゴイ集団の平均ヘテロ接合体率を採用した.

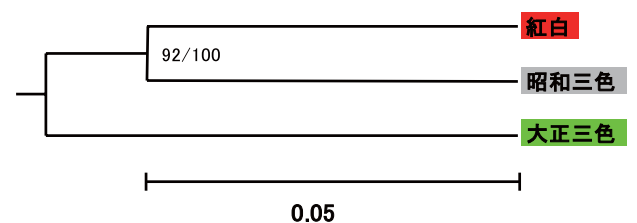


図5. マイクロサテライト DNA マーカーによるニシキゴイ 3 系統間の遺伝的類縁関係 (Aliah *et al.* 2000).

表2. 系統におけるペアワイズ F_{st} 分析の結果

	紅白	大正三色	昭和三色
紅白	*		
大正三色	0.016	*	
昭和三色	0.012	0.024	*

(*) は Bonferroni 補正を行った後の $P < 0.05$ での有意差)

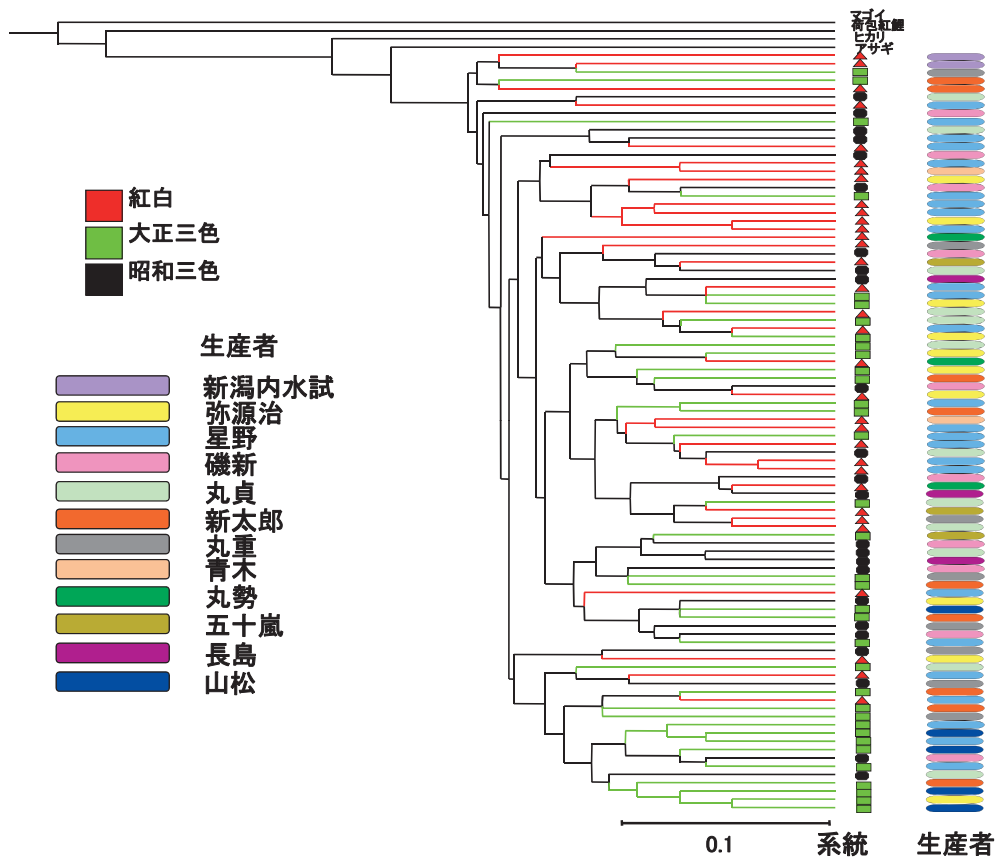


図 6. マイクロサテライト DNA アリル型によるニシキゴイ各系統における個体レベルの遺伝的類縁図。供試魚は新潟県下の11生産者および新潟県内水面試験場から提供を受けたもので、生産者別に色わけしてある。

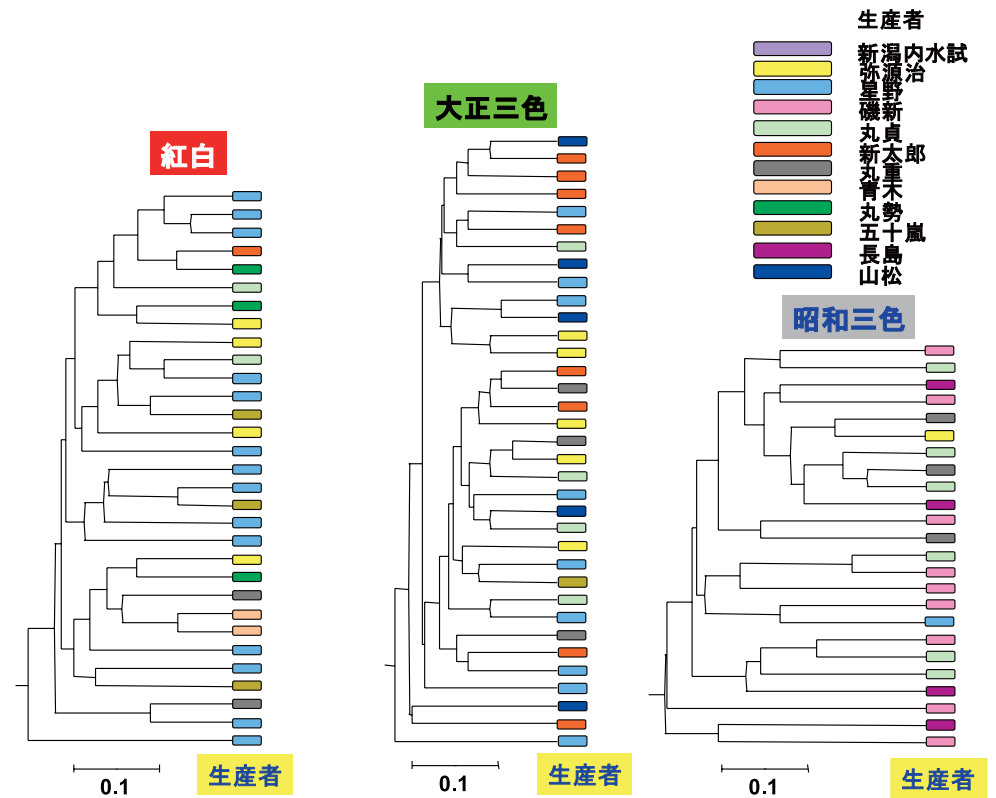


図 7. マイクロサテライトDNAマーカーによる ニシキゴイの系統別に見た個体レベルの遺伝的類縁関係。供試魚は新潟県下の11生産者および新潟県内水面試験場から提供を受けたもので、生産者別に色わけしてある。

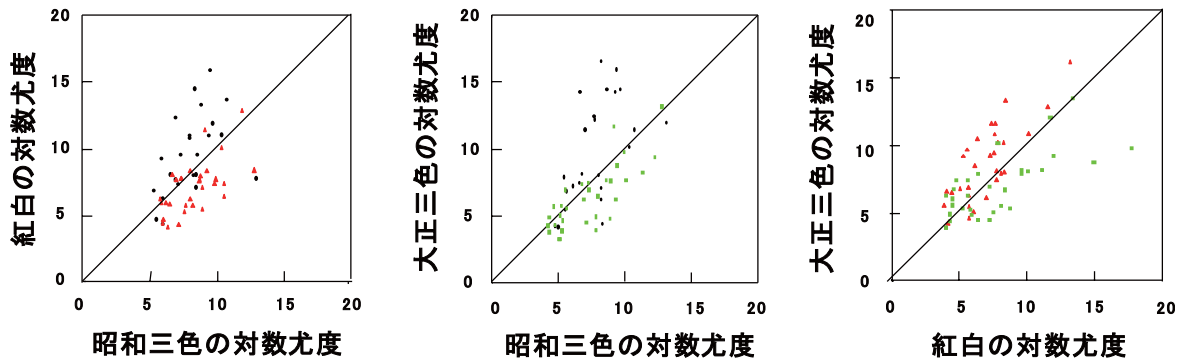


図8. 尤度法（Which Run ソフト使用）による個体レベルの系統判別. マイクロサテライト DNA 全マーカー座による判別率は61-79%. 異質性が確認されたマーカー 4 座（*Cca-8*, *Cca-30*, *MFW-2*, *MFW-24*）における判別率は67-86%であった.

表3. 遺伝子型と個体間アレル共有度

X	Y	アレル共有度
AiAi	AiAi	1
AiAi	AiAj	0.75
AiAi	AjAj	0
AiAj	AiAj	1
AiAi	AjAk	0
AiAj	AiAk	0.5
AiAj	AkAm	0

アレル共有度 = $(\sum (a * N) / 4) / l$

* a ...1つのマーカー座において、2個体が共有するアレルの種類数（0～2）

* N ...1つのマーカー座において、共有する1種類のアレルの総数（2～4）

* l ...マーカー座数

により、ヘテロ接合性の高い子供世代を作出するという方法が考えられる¹⁵⁾。

親魚候補間の遺伝的類縁性の評価は、アレル共有度（遺伝的類似性指標）を指標とし（表3）、遠縁の2個体を順次選び、バーチャルな個体間選択交配を系統別に実施した。このような遠縁個体間選択交配シミュレーションの結果、同選択系における次世代のヘテロ接合体率は、どの系統においても、70%以上となり、相対的に高く維持された（図9）。これに対して無作為選択交配系では、70%を越えることはなく、明らかに低い値となり、遠縁個体間選択交配の有効性が確認された。このことから、後代においてヘテロ接合体率の増加が予測され、同時に有害遺伝子の顕在化を抑制する有効があることが示唆された¹⁵⁾。ニシキゴイは全体として近交度の高い集団であることはすでに述べた（図3）。従って、すでに失われた遺伝的多様性が回復することは期待できない。遠縁個体間選択交配によって子世代のヘテロ性を高めることにより近交弱勢の発

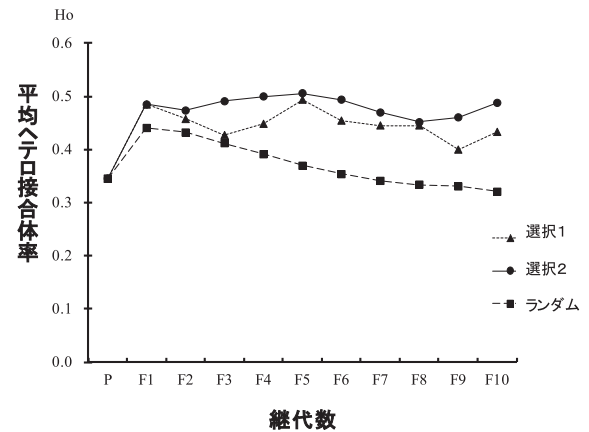


図9. 仮想再生産における平均ヘテロ接合体率の遠縁個体選択交配と非選択交配による継代の変化. 遠縁個体の選択は個体間のアレル共有度による遺伝的類似度を基準とした. アレル共有度 = $(\sum (a * N) / 4) / l$ については表2を参照. 選択1は親間の遺伝的遠縁度が相対的に大きくした場合、選択2は遺伝的遠縁度が相対的に小さくした場合である.

現を少しでも抑制できればという考え方と理解してほしい。ニシキゴイの種苗生産においては色彩の遺伝モデルに対応した従来型の親魚候補選びに加え、遠縁個体間選択交配法を加味した親魚の採卵を実行することが薦められる。本来家系選択に必要な血統登録システムが採用できないかぎり、ニシキゴイ育種においてはDNAマーカーによる遠縁個体間選択交配は近交リスク管理上きわめて大きい意義があると考えられる。

要 約

ニシキゴイの選抜育種において近交弱勢の抑制対策を効果的に実施するため、DNA多型マーカーを用いて遺伝的多様性指標を推定し、集団レベルの近交係数を算出した。まず、遺伝的多様性レベルおよび近交

係数を推定し、ニシキゴイにおける近交度と遺伝的変異性喪失の現状を解明した。弱勢防止のための1つの方法として、遠縁個体間選択交配シミュレーションを実施したところ、遠縁個体間選択系におけるヘテロ接合体率は、調べたどの系統においても、70%以上とな

り、遠縁個体間選択交配の有効性が確認された。以上より、ニシキゴイの種苗生産においては色彩のパターンに注目した従来型の親魚個体の選択に加え、遠縁個体間選択交配法を加味した親魚の採卵を実行することが薦められる。

文 献

- 1) ニシキゴイ養殖研究会 (1982)「ニシキゴイ養殖技術に関する近年の知見と問題点水産増」水産養殖叢書, 31, 日本水産資源保護協会, 東京, 125-152.
- 2) 谷口順彦・松本聖治・小松章博・山中弘雄 (1995) 同一条件で飼育された由来の異なるマダイ5系統の質的および量的形質に見られた差異. 日本水産学会誌, 61 : 717-726.
- 3) 富田政勝・岩橋正雄 (1980) ニシキゴイ (*Cyprinus carpio*) の遺伝に関する研究-I. 斑紋における選抜の効果. 新潟県内水面水産試験場研究報告, 8 : 71-73.
- 4) 星野欽一 (1982) 育種の現状, 「ニシキゴイ養殖技術に関する近年の知見と問題点水産増」水産養殖叢書, 31, 日本水産資源保護協会, 東京, 138-139.
- 5) 岩橋正雄・富田政勝 (1980) ニシキゴイ (*Cyprinus carpio*) の遺伝に関する研究-II. 紅白の遺伝について. 新潟県内水面水産試験場研究報告, 8 : 74-79.
- 6) 林穰二 (1979) 大正三色のスミの遺伝について. 昭和52年広島県淡水指事業報告 6.
- 7) Taniguchi, N., A. Kijima, T. Tamura, K. Takegami and I. Yamasaki (1986) Color, growth and maturation in ploidy manipulated fancy carp. *Aquaculture*, 57 : 321-328.
- 8) 谷口順彦 (1990) ニシキゴイの新しい改良法について, 日鱗, 7 : 28-35.
- 9) 谷口順彦 (1991) ゲノム操作による魚類の品種改良法, 第12回基礎育種学シンポジウム報告, 42-60.
- 10) 佐藤将 (1997) ニシキゴイの雄性発生魚の作出-II. 卵核不活化のための紫外線照射量と照射時間の検討. 新潟県内水面水産試験場研究報告, 22 : 9-12.
- 11) 近藤伸一・佐藤将・富田政勝 (1989) ニシキゴイの雄性発生誘起. 新潟県内水面水産試験場研究報告, 15 : 19-23.
- 12) 吉崎悟朗・竹内裕・奥津智之 (2007) シリーズ21世紀の農学 動物・微生物の遺伝子工学研究, 養賢堂, 77-95.
- 13) Aliah, R. S., S. Sato and N. Taniguchi (2000) An evaluation of genetic variability in nishikigoi, *Cyprinus carpio*, stocks from Niigata prefecture, based on microsatellite DNA markers. *Suisanzoshoku*, 48(1): 25-31.
- 14) Aliah, R. S., M. Takagi, S. Dong, C. T. Teon and N. Taniguchi (1999) Isolation and inheritance of microsatellite markers in the common carp *Cyprinus carpio*. *Fisheries Science*, 65 : 235-239.
- 15) 渡邊智久・佐藤将・細野敏明・谷口順彦 (2004) マイクロサテライト DNA マーカーによるニシキゴイ系統間交配効果のモニタリング, 平成16年度日本水産学会東北支部大会.

－ 第二部 観賞魚における品種改良の試み －

民間養魚場における品種改良の取り組み

杉本俊輔（松田養鯉場）

要 旨

泳ぐ宝石と呼ばれ国内外で人気を誇る錦鯉ですが、その現場では、より美しい鯉を作ろうと各々の生産者が日々努力しています。品種改良の方法は、親鯉の選定で、その後の結果がほぼ決まってしまうため慎重に行います。目的としては「同品種における形質の向上」と「新品種の作出」と二つありますが、特に前者が重要です。

錦鯉の評価基準は三つあり①体型の良さ②質の良さ③模様の良さ、でその鯉の価値が決まります。①体型は最も重視される基準で、系統による差異も比較的わかりやすく表れます。メス親から遺伝しやすいと言われています。②錦鯉の主たる色彩である緋質・墨質・白地も、各生産者がこだわりを持って改良に取り組んでいます。オス親から遺伝しやすいと言われています。③錦鯉の模様も親鯉に影響され、選別での残留率に大きく関わってきます。

上記とは別に、新しい品種を作るために交配を工夫する場合があります。異なる品種を掛け合わせ、銀鱗・ドイツ・光りもの等の特徴を既存の品種に加えたり、見たことのない特徴をもった鯉を作り出したりしようと試みています。

(accepted November 3, 2012)

新潟県におけるニシキゴイ育種の取り組み

佐藤 将 (新潟内水試魚沼)

Breeding in Nishikigoi, *Cyprinus carpio* of Niigata prefecture

Shoh SATO

Niigata prefectural Inland Water Fisheries Experiment Station, Uonuma Branch

Abstract

Nishikigoi (ornamental carp, *Cyprinus carpio*) which have its origins in common carp have been bred by farmers in Niigata over 200 years. Chromosome set manipulation studies were carried out in Nishikigoi breeding after 1980's. Black color of common carp and metallic colors of Nishikigoi are used as genetic markers because their colors are dominant to almost colors of Nishikigoi. So a parent was used common carp or metallic color Nishikigoi in gynogenesis and androgenesis. Usually normal mating of Kohaku (red patterns on white) shows 60–70% in the incidence of Kohaku. Higher incidence of Kohaku than normal Kohaku were observed in meiotic gynogenesis of Kohaku. On the other hand, almost progeny in mitotic gynogenesis of Kohaku were Akamuji (whole body red) and Shiromuji (whole body white). The second generation, i.e. "clone" was induced from mitotic gynogenesis. The induction was identified by genetic markers, not only color but also microsatellite DNA marker. The androgenesis also were carried out, the second generations were obtained. The males from androgenetic Nishikigoi were "YY, super male". Crossbreeding between Nishikigoi and Chinese red common carp from Heilongjiang sheng were tried to improve weakness against ulcer disease of Nishikigoi. The F1 hybrids were very stronger against the disease than Nishikigoi.

(accepted January 16, 2013)

1. はじめに

ニシキゴイは新潟県中越地方の山間部で江戸時代後期に誕生したと言われている¹⁾。食用で飼育されていたマゴイの色彩変異を出発点に、以来、交配を繰り返し、現在では100を超える種類が創り出されている。遺伝育種学的に品種として固定していると言えるものはごくわずかだが、ニシキゴイ業界では色彩や鱗性の違いにより分けたものを品種と呼んでいる。生産現場での品種改良の歴史は別の機会に譲るとして、ここでは、新潟県内水面水産試験場での育種研究について紹介したい。

新潟県ではニシキゴイの品種改良の基礎的情報を得るため、主要品種の遺伝性や紅白（白地に赤斑紋）の遺伝様式の調査を行った²⁴⁾が、十分には解明されていない。1980年代以降、染色体操作技術が様々な魚種⁵⁾

で取り組まれ、ニシキゴイでも優良形質の固定や遺伝様式の解明を期待し、主要品種である紅白について研究が行われた⁶⁻¹⁰⁾。

2. 雌性発生

ニシキゴイで雌性発生を行う場合、マゴイの体色（黒色）がニシキゴイの体色に対して優性であるため、体色で雌性発生の成否が判定できることから、紫外線により遺伝的不活化を行ったマゴイ精子を用いる。受精卵を40℃の温水に2分間浸漬することで染色体の倍数化を図り、媒精時の水温が20℃の場合、第二極体放出阻止型雌性発生二倍体（以下、極体型雌性発生）では媒精から8分前後、第一卵割阻止型雌性発生二倍体（以下、卵割型雌性発生）では40分前後に倍数化処理を行う。通常交配の紅白からは赤無地、白無地、紅白

が得られ、紅白出現率が60～70%であることが多い。紅白雌から得た極体型雌性発生では通常より紅白出現率が高い場合があり、雌性発生による継代で95%以上の値を示すことがあった¹⁰⁾。一方の卵割止型雌性発生では、紅白の出現はわずかで、赤無地と白無地とにほぼ分離した(図1)^{6,10)}。こうして得られた卵割型雌性発生から再度雌性発生を行うことによりクローンを作成し、体色および遺伝マーカーを用いてクローン化の確認を行った。しかしながら雌性発生によるクローン作出は、これまでのところ、この一例にとどまっている(未発表)。これは雌性発生魚(特に卵割型雌性発生)自体の生き残りの悪さ(近交弱勢の顕在化)が一因と考えられる。加えて、紅白において卵割阻止処理をしたのにもかかわらず、出現品種が赤無地と白無地とに分離せず、紅白が多数出現する事例があった^{6,7)}。卵割型雌性発生=完全ホモであるはずがヘテロ化しているものと思われる、また、雌性発生半数体区から正常魚が出現する事例もあった。これらは遺伝マーカーによってヘテロ型の出現を確認しており、極体放出の自然抑制が原因と考えられる¹¹⁾。

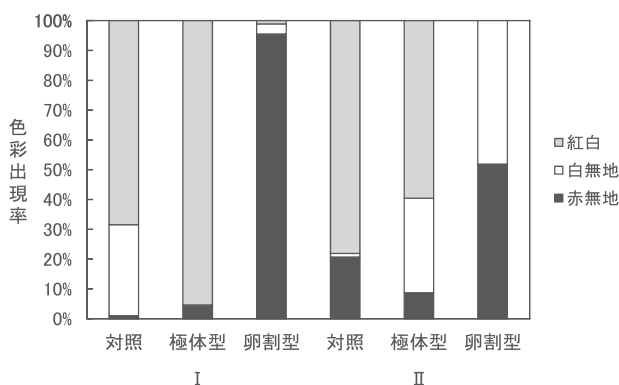


図1 二型の雌性発生における色彩出現率
I：極体型雌性発生で紅白出現率が高い事例
II：卵割型雌性発生で赤無地と白無地とに分離した事例

3. 雄性発生

雄性発生二倍体(以下、雄性発生)は卵核を遺伝的不活化する必要がある、透過力の問題からサケ・マス類ではガンマ線を用いている¹²⁾が、地方水試では施設面での制約があるため、ニシキゴイでは紫外線を用いた¹³⁻¹⁵⁾。山吹黄金(全身が黄金光沢色の無地魚)の体色(光沢色)が非光沢色のニシキゴイ体色に対して優性なので、マゴイ卵のほか、山吹黄金等を用いることもある。雄性発生では、第一卵割阻止により染色体倍数化を行う。紅白雄から得られた雄性発生の子魚の体色は、卵割型雌性発生のように概ね赤無地と白無

地ではあるものの、紅白の小斑紋が出現することがある¹³⁾。雄性発生から得た雄性発生二代目はクローンとなるはずであるが、雄性発生二代目を作成したところ体色には変異があった。また、雄性発生の特徴として、コイのようにXY性決定型の場合、得られた雄魚はYY型の「超雄」¹⁶⁾であり、実際に雄性発生の雄魚と普通魚雌とを交配したところ、子魚のすべてが雄となった(未発表)。

4. 雌性・雄性発生魚の利用

実際の養殖現場での雌性・雄性発生魚の利用は、残念ながら実現していない。しかし、全雌または全雄生産といった性の統御ができるため、内分泌攪乱物質の影響調査¹⁷⁾やキメラの作出¹⁸⁾など実験動物としての利用が行われている。

5. 交雑育種

新潟県では1992年～2000年にかけて、中国・黒竜江省との交流が実施され、交流事業の一環として、同省からコイの改良品種である「荷包紅鯉」を導入した^{19,20)}。耐寒性を付与した品種であることから、近年、体質が弱くなったと言われるニシキゴイの弱体化防止を目的に交雑試験を行った。荷包紅鯉は体高が高く²⁰⁾、いわゆる寸詰まり体型であるため、ニシキゴイとのF1も体高が高いが、このF1をニシキゴイに戻し交雑するとニシキゴイ体型に近づく²¹⁾。また、ニシキゴイ養殖において大きな被害をもたらしている新しいタイプの穴あき病²²⁾について、その原因菌である非定型 *Aeromonas salmonicida* を用いて攻撃試験を行ったところ、通常のニシキゴイでは100%近くが死亡するのに対し、F1は逆にほぼ100%が生残し

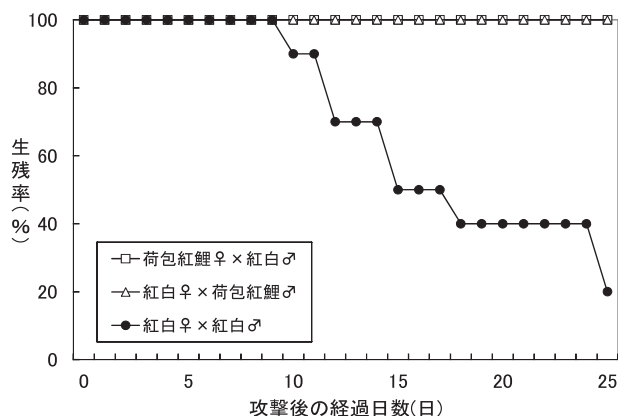


図2 荷包紅鯉とニシキゴイとの交雑魚に対する穴あき病原菌(非定型 *Aeromonas salmonicida*)攻撃試験*の生残率
*攻撃条件: 1.50×10^8 cfu/ml (2L)・2時間浸漬

た(図2)²³⁾。しかしながら、ニシキゴイとしての優良化を図るため、戻し交雑を行うと耐病性を喪失する場合があった²¹⁾。このため、ニシキゴイとしての一定の品質を保持した交雑魚の中から、攻撃試験で耐病性を評価する個体選抜によって品質と耐病性を両立させる手法を検討した²⁴⁾。この手法も攻撃試験がネックとなり汎用性に欠けるため、耐病性に関連したDNAマーカーの開発を試みたが、現在のところ有益な結果は得られていない。

6. ニシキゴイ育種(研究)の課題

ニシキゴイは遺伝的多様性が低いことが指摘され²⁵⁾、経験的に生産者も近親交配を回避するため、他家から親魚導入を行っている。しかし、親魚導入がコイヘルペス病などの持ち込みにつながる事例があり、

重大疾病の拡散や親魚導入の機会減少による品質低下等の問題を引き起こしている。また、海外の新興生産国が台頭してきており、生産のみならず研究分野^{26,27)}にも力を入れていることから、国内のニシキゴイ経営体や関係自治体研究機関²⁸⁾の減少と相まって、将来への不安要素となっている。

7. 謝 辞

本稿に記載した研究の実施にあたり、新潟県内水面水産試験場に在籍した職員諸氏の協力、特に試験魚の飼育管理に尽力された下条義信氏に感謝するとともに、適切な助言をくださった谷口順彦博士に深謝いたします。なお、本研究の一部は農林水産省補助事業として実施された。

文 献

- 1) 星野 季(2007)「錦鯉問答」錦鯉のルーツ, 新日本教育図書, 東京, pp. 15-46.
- 2) 富田政勝・岩橋正雄(1980)ニシキゴイ(*Cyprinus carpio*)の遺伝に関する研究-I. 斑紋における選抜の効果. 新潟県内水面水産試験場研究報告, 8: 71-73.
- 3) 岩橋正雄・富田政勝(1980)ニシキゴイ(*Cyprinus carpio*)の遺伝に関する研究-II. 紅白の遺伝について. 新潟県内水面水産試験場研究報告, 8: 74-79.
- 4) 富田政勝(1990)ニシキゴイの遺伝に関する研究-III. ニシキゴイにおける選抜・交雑について. 新潟県内水面水産試験場研究報告, 16: 59-64.
- 5) 荒井克俊(1997)「魚類のDNA」染色体操作, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 32-62.
- 6) 佐藤 将・近藤伸一・富田政勝(1990)高温処理によるニシキゴイ雌性発生的大量処理. 新潟県内水面水産試験場研究報告, 16: 65-71.
- 7) 網田健次郎(1994)ニシキゴイにおける再雌性発生魚の発現状況. 新潟県内水面水産試験場研究報告, 20: 29-34.
- 8) 佐藤 将(1999)ニシキゴイの透明鱗の遺伝様式. 新潟県内水面水産試験場研究報告, 23: 31-35.
- 9) 佐藤 将(2000)丹頂紅白からの極体型雌性発生について. 新潟県内水面水産試験場研究報告, 24: 32-35.
- 10) 佐藤 将・網田健次郎(2001)ニシキゴイ第1卵割阻止型雌性発生2倍体の作出. 新潟県内水面水産試験場研究報告, 25: 1-5.
- 11) 渡邊智久(2004)DNAマーカーマッピングによる養殖魚の遺伝・育種学的研究. 遺伝地図を用いたニシキゴイ非還元卵産出の証明. 東北大学大学院学位論文, 123-151.
- 12) 小野里坦(1989)「水産増養殖と染色体操作」雄性発生, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 60-69.
- 13) 近藤伸一・佐藤 将・富田政勝(1989)ニシキゴイの雄性発生誘起. 新潟県内水面水産試験場研究報告, 15: 19-23.
- 14) 近藤伸一・佐藤 将(1990)ニシキゴイの雄性発生魚の作出(短報). 新潟県内水面水産試験場研究報告, 16: 107-109.
- 15) 佐藤 将(1997)ニシキゴイの雄性発生魚の作出-II. 卵核不活化のための紫外線照射量と照射時間の検討. 新潟県内水面水産試験場研究報告, 22: 9-12.
- 16) Bongers, A. B. J., B. Zandieh-Doulabi, C. J. J. Richter and J. Komen (1999) Viable androgenetic YY genotypes of common carp (*Cyprinus carpio* L.). The Journal of Heredity, 90(1): 195-198.
- 17) Lange, A., Y. Katsu, S. Miyagawa, *et al.* (16 co-authors) (2012) Comparative responsiveness to natural and

- synthetic estrogens of fish species commonly used in the laboratory and field monitoring. *Aquatic Toxicology*, 109: 250–258.
- 18) Yamaha, E., M. Murakami, K. Hada, *et al.* (10 co-authors) (2003) Recovery of fertility in male hybrids of a cross between goldfish and common carp by transplantation of PGC (primordial germ cell)-containing graft. *Genetica*, 119: 121–131.
 - 19) 新潟県内水面水産試験場 (1999) 新魚種導入試験. 平成9年度新潟県内水面水産試験場事業報告, 25.
 - 20) 新潟県内水面水産試験場 (2000) 新魚種導入試験. 平成10年度新潟県内水面水産試験場事業報告, 66.
 - 21) 新潟県内水面水産試験場 (2004) ニシキゴイ健苗育成技術の開発研究. 平成14年度新潟県内水面水産試験場事業報告, 21.
 - 22) 加来佳子・山田義行・若林久嗣 (1999) 最近流行している穴あき病様疾病のコイから分離された非定型 *Aeromonas salmonicida* の性状. 魚病研究, 34(3): 155–162.
 - 23) 新潟県内水面水産試験場 (2001) ニシキゴイ健苗育成技術の開発研究. 平成11年度新潟県内水面水産試験場事業報告, 27.
 - 24) 新潟県内水面水産試験場 (2008) ニシキゴイ健苗育成技術の開発研究. 平成18年度新潟県内水面水産試験場事業報告, 30.
 - 25) Aliah, R. S., S. Sato and N. Taniguchi (2000) An evaluation of genetic variability in nishikigoi, *Cyprinus carpio*, stocks from Niigata prefecture, based on microsatellite DNA markers. *Suisanzoshoku*, 48(1): 25–31.
 - 26) David, L., S. Rothbard, I. Rubinstein, *et al.* (7 co-authors) (2004) Aspects of red and black color inheritance in the Japanese ornamental (Koi) carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 233: 129–147.
 - 27) Liu, J., L. Zhou, Z. Zhao and J. Gui (2002) Studies on microsatellite markers of four artificially gynogenetic families in ornamental carp. *Zoological Research*, 23(2): 97–105.
 - 28) 能嶋光子 (2011) 水産研究のフロントから. 全国観賞魚養殖技術連絡会議に参加して. 日本水産学会誌, 77(4): 723.

観賞魚育種の取組 (埼玉県)

田中深貴男 (埼玉県農林総合研究センター水産研究所)

The Contents of the Research on Ornamental Fish Breeding in Saitama Prefecture

Mikio TANAKA

Saitama Prefecture Agriculture and Forestry Research Center Fisheries Laboratory

(accepted December 5, 2012)

1. はじめに

埼玉県では1970年代からニシキゴイ及びキンギョの養殖が盛んになり、これらの養殖技術開発を中心に養殖分野の試験研究を進めている。育種関係の取り組みについては、ニシキゴイでは色や形の良い魚(形付魚)の出現率が高い系統の選抜、ヒレナガニシキゴイの作出、全雌魚の作出に、キンギョでは尾形や体形の良い系統や珍しい形質を持ったキンギョの作出やキンギョの造血器壊死症耐病系の育成などに取り組んできた。

ここでは、インドネシアから導入したヒレナガゴイと我が国のニシキゴイを交配したヒレナガニシキゴイの作出及びキンギョ養殖の中で大きな被害をもたらしているキンギョの造血器壊死症に対する耐病系育成に関する取り組みを紹介する。

2. ヒレナガニシキゴイの作出

新しい観賞魚として鰭の長いニシキゴイを作出するため、1980年2月にインドネシアからヒレナガゴイ(*Cyprinus carpio var.flavipinnis* C.V.; Ikan Kumpai)を導入し、ニシキゴイとの交配を行った。

(1) ヒレナガゴイの導入と継代

導入したヒレナガゴイはインドネシア国立淡水研究所養殖試験池で、1980年1月に鰭の長い普通色の鯉と緋色の鯉を交配したもので、導入時の平均体重は0.9 gで体色は普通色であった(表1)。

導入直後は25℃の水槽で飼育し、水温が上昇した5月からは露地池で当研究所のニシキゴイと同様な方

法で飼育したところ、11月には平均体重が約700 gとなった(図1)。また、冬期には水深60 cmの露地池で越冬を行ったが異常は認められず、1981年5月に採卵をすることができた。

導入したヒレナガゴイの産出仔の体色は、普通色(72.6%)の他、赤色系(5.9%)、白色系(2.3%)、浅黄系(19.2%)が出現し、鱗についてもドイツ鱗(22.5%)が出現した(表2)。これらのヒレナガゴイは親魚として育成し、目指すニシキゴイの体色や鱗性を考慮して当研究所保有のニシキゴイと交配を行った(図2)。

(2) ニシキゴイとの交配

ヒレナガゴイとニシキゴイを交配してこれまでにヒレナガニシキゴイとして10品種を作出してきた(図3)。

品質を決定する緋盤や墨、光沢などの色彩や模様の質を向上するためには数回の戻し交配が必要で現在も継続しているが、紅白、大正三色、昭和三色、浅黄、秋水、光無地については、当研究所保有の錦鯉と同等の形付魚の選抜率が得られている(図4)。

鰭の長さについては、鰭が長い個体同士の交配では鰭の長い個体の出現率は39.8%~97.7%で平均73.4%であった。鰭が長い個体と鰭が短い個体の交配では、36.9%~100%で平均54.1%であった(図5)。

ニシキゴイは一般的に30 cm以上のものが庭池等で飼育されているが、ヒレナガニシキゴイでは水槽飼育用として小型魚の消費拡大を図っている。

表1 導入したヒレナガゴイの体形 (1980. 2. 20)				
全長 (cm)	体長 (cm)	体高 (cm)	体幅 (cm)	体重 (g)
3.98	2.85	1.03	0.58	0.93



図1 インドネシアから導入後10ヶ月したヒレナガゴイ (体重700g)

表2 導入したヒレナガゴイ同士の交配で出現した体色	
出現した体色	比率 (%)
赤色系 (赤・黄色)	5.9
白色系 (白・薄い青色)	2.3
浅黄系 (青色)	19.2
普通色系 (黒色)	72.6
合 計	100.0

3. キンギョの造血管壊死症 (GFHN) 耐病系の育成

耐病系育成は、まず耐過魚の産出仔や生産者が飼育しているキンギョの中から病気に強い群を探すことを行い、次に、耐病性を示すキンギョとの交雑によって耐病性品種の拡大を図っている。

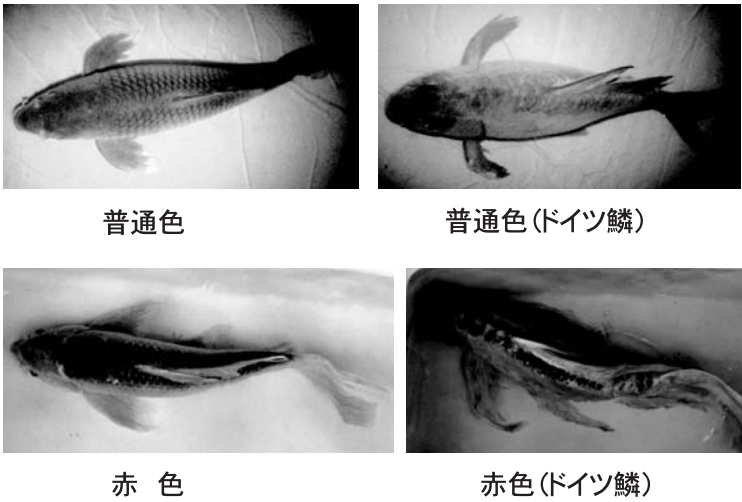


図2 ニシキゴイとの交配に用いたヒレナガニシキゴイ

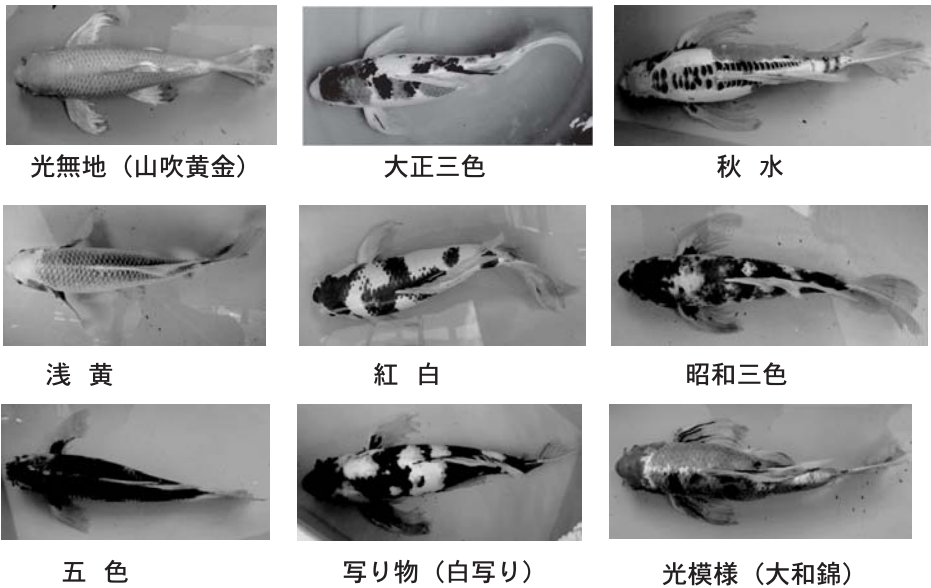


図3 作出したヒレナガニシキゴイ

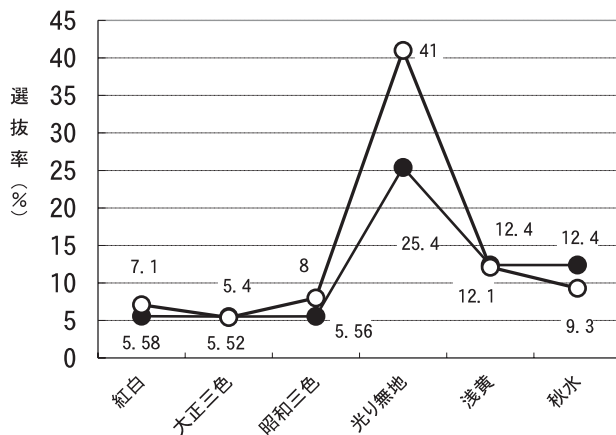


図4 品種と形付魚の選抜率
●ニシキゴイ ○ヒレナガニシキゴイ

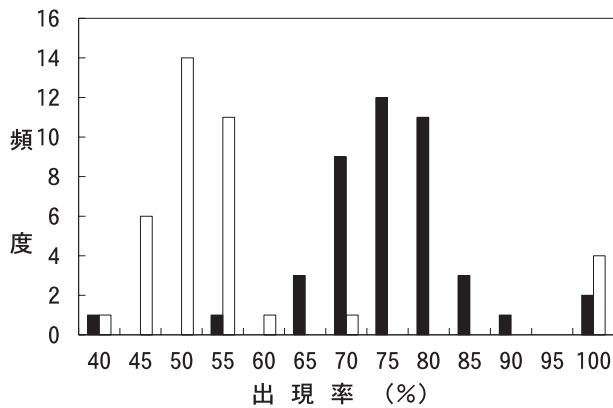


図5 ヒレの長い個体の出現率と頻度
■ヒレナガ同士の交配 (n=43)
□ヒレナガとニシキゴイ (普通鱈) の交配 (n=38)

(1) 耐過魚産出仔の耐病性

生産者池で自然発病した群の生残魚の産出仔の耐病性を人為感染による攻撃試験によって調べたところ、アズマニシキでは死亡率が低かった (26.3%、45.5%) が、他のリュウキン、オランダシシガシラ、スイホウガン、クロデメキンでは、死亡率が高いまま (92.7%~100%) であった (表3)。また、耐病性を示したアズマニシキを継代した群でも同様に低い死亡率であった。

(2) 生産者が飼育しているキンギョの耐病性

生産者の養殖池で発病した際に死亡率が低かった小赤ワキンの2群について、攻撃試験によって耐病性を調べたところ、1群については明らかに低い死亡率であった (図6)。この群の攻撃試験では、試験中の水温が22℃以下または26℃以上では著しく死亡率が低かった (20%以下) が、24℃~25℃の水温では死亡率が上がる傾向 (40%~70%) が見られた (図7)。

表3 耐過魚産出仔の耐病性

品種等		平均 体重	供試 尾数	死亡 尾数	死亡率
非耐過魚 産出仔	琉金	0.5	34	33	97.1
		2.6	55	54	98.2
	東錦	2.9	55	55	100.0
耐過魚 産出仔	琉金	0.92	41	41	100.0
		3.1	55	51	92.7
	オランダ 獅子頭	1.25	38	38	100.0
		2.7	56	56	100.0
	水泡眼	1.3	35	35	100.0
	黒出目金	2.8	57	56	98.2
	東錦	0.88	38	10	26.3
		3.1	55	25	45.5

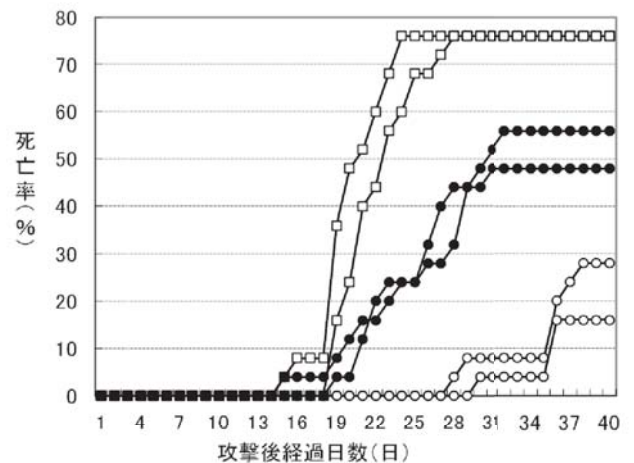


図6 養魚者が飼育しているキンギョ (小赤和金) の人為感染

□発病歴のない系群 (水産研究所系)
●発病歴のある養魚場の系群①
○発病歴のある養魚場の系群② (耐病系)

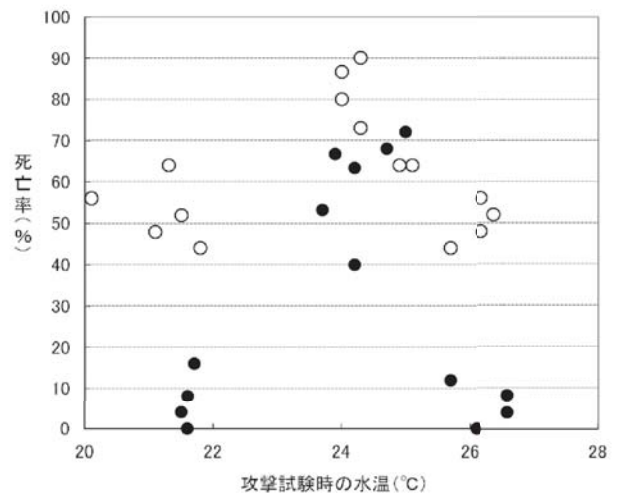


図7 耐病系小赤和金の攻撃試験中の水温と死亡率

○水産研究所系 ●耐病系

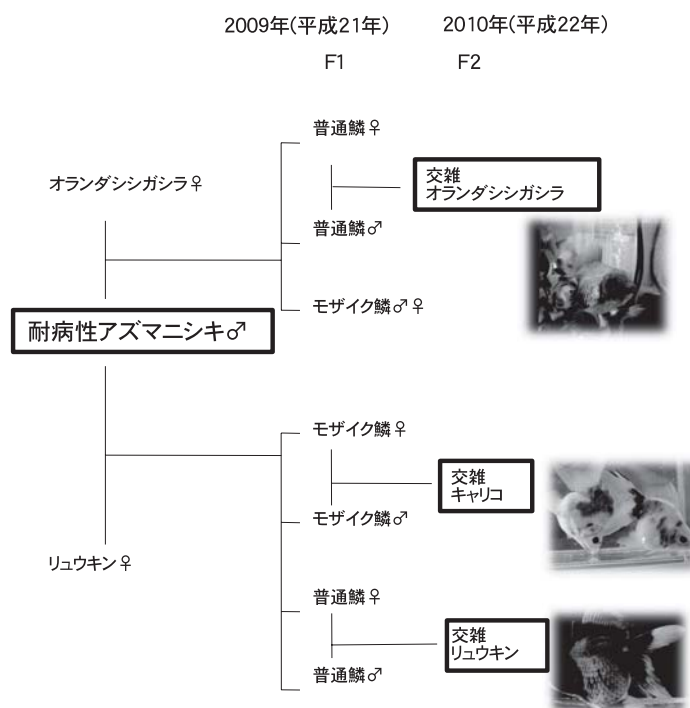


図8 交雑による耐病性品種の作出

(3) 交雑による耐病性品種の拡大

耐病性が見られたアズマニシキと発病経験のないオランダシシガシラ及びリュウキンを交雑して得たオランダシシガシラ、キャリコ、リュウキンに人為感染を行ったところ、交雑したキンギョの死亡率（オランダシシガシラ35.0%、キャリコ41.7%、リュウキン51.7%）は、親のリュウキン群の死亡率（85.0%）より低かった（図8、図9）。

(1) のアズマニシキ群は選抜の過程で耐病性に重点を置いたため色彩や形の質が低下しており、耐病性を維持しつつ品種の特性を十分に発現する系統にしていなければならない。

(2)(3) の品種については、耐病性の向上を図りながら生産現場で評価を行うことが必要である。

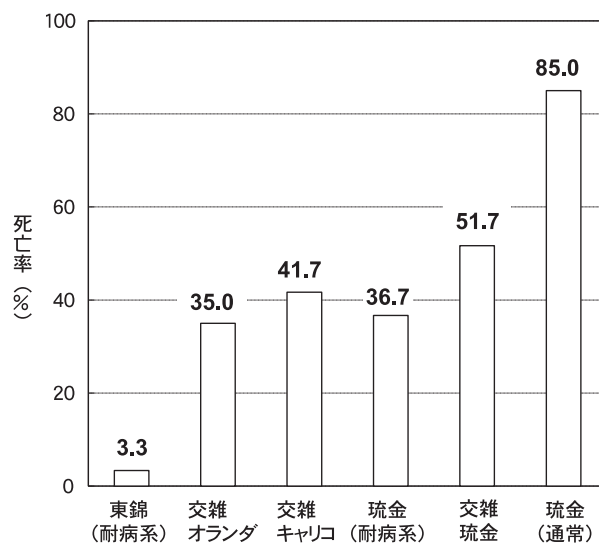


図9 人為感染時の耐病系及び交雑キンギョの死亡率

文 献

- 1) 渡辺国夫・福田一衛 (1982) インドネシア産ヒレナガゴイ (仮称) の移殖と養成について. 埼玉県水産試験場研究報告, 41: 89-91.
- 2) 福田一衛 (1986) インドネシア産ヒレナガゴイとニシキゴイの交配. 埼玉県水産試験場研究報告, 45: 6-10.
- 3) 福田一衛 (1986) インドネシア産ヒレナガゴイとニシキゴイ紅白の交配試験. 埼玉県水産試験場研究報告, 47: 14-18.
- 4) 福田一衛 (1990) 新品種ヒレナガニシキゴイの作出について. 埼玉県水産試験場研究報告, 49: 53-61.
- 5) 岡田隆平 (1993) ヒレナガニシキゴイの鰭の長さについて. 埼玉県水産試験場研究報告, 51: 12-19.
- 6) 田中深貴男 (2005) ヘルペスウイルス性造血器壊死症を生残したキンギョ産出仔の耐病性について. 埼玉県農林総合研究センター研究報告, 5: 88-90.

愛知県におけるキンギョ研究の取り組みと 平成24年度金魚日本一大会

本田是人 (愛知水試弥富)

(accepted November 3, 2012)

1. はじめに

弥富指導所は観賞魚、特に、金魚の品種改良や疾病対策等の試験研究および養殖技術の指導を目的に昭和49年に設置された。ここでは、弥富指導所がこれまで取り組んできた主な研究内容と、弥富金魚漁業協同組合が主催する金魚日本一大会の模様を紹介する。

2. 愛知県におけるキンギョ研究の取り組みについて

(1) 新品種の開発

1988年に2因子劣性形質のワキン (アルビノ性、出目性) を原種とし、交配および交雑によりリュウキン型 (1988~)、ランチュウ型 (1992~) への改良に取り組んだ。「アルビノリュウキン」 (図1) は、組合研究部の試験飼育を経て2007年から一般生産者に配布されている。「アルビノランチュウ」 (図2) についても、2008年から同研究部による試験飼育が行われるようになった (図2)。現在、両品種とも、さらに付加価値を高める改良を進めている。また、2006年からアルビノランチュウ (出目性) とチョウテンガンの交配に取り組み、新たな品種「アルビノチョウテンガン」 (図3) を開発中である。

雌性発生技術を利用したクローン化については、アルビノランチュウの作出やリュウキンの優良系統の作出等を試み、いくつかの知見が得られている。

(2) キンギョヘルペスウイルス症対策の取り組み

2002年から養殖池の実態調査を行い、降雨や水温変化が発症の環境要因になると推測された。2004年からは免疫賦活剤 (β -グルカゴン、フコイダン、ラクトフェリン、IP-PA1) を利用した予防技術の開発に取り組んだが、これら賦活剤の有効性は限定的であった。このため、2009年にワクチン開発を目指した研究に着

手し、現在、新たに樹立した感受性細胞 (アルビノリュウキン鱗由来細胞) による原因ウイルスの培養およびこれを用いた人為感染が可能となっている。

(3) 新たな需要を創出する取り組み

水泡眼とよばれる眼の周囲に巨大な水泡を形成するキンギョの一品種に着目し、この水泡の内部に蓄積するリンパ液様の体液 (水泡内液) が、ヒト血管内皮細胞に対して増殖活性を有することを発見した (平成21年度 JST シーズ発掘試験および22年度 JST A-STEP 探索タイプの成果)。さらに、水泡内液に対して活性炭処理を加えることによって、水泡内液の細胞増殖活性を向上させることに成功し (名古屋大学と共同で特許出願2012-120515)、細胞培養添加剤の実用化を目指している。一方、水泡眼が有望な免疫動物になる可能性も示唆され (23年度 JST A-STEP 探索タイプの成果)、受動免疫を利用した予防技術への応用を探索している (図4)。

3. 平成24年度金魚日本一大会について

観賞魚の代表である金魚は弥富近郊では古く江戸時代から養殖され、愛知県は全国2位の生産を誇っている。また、生産地としてだけでなく流通拠点としてわが国有数の市場となっており、日本で飼育されている25品種が全てそろそろ一大産地を形成している。

金魚日本一大会は業界の発展と飼育技術の向上や金魚の普及を目的に、日本一の品評会を目指して平成6年から弥富市で開催されており、平成24年度は11月28日 (土) に海南こどもの国で開催された。品評会には当歳魚の部、親魚の部に別れ、それぞれ28種別 (その他を含む) が出品され、当歳魚の部はオランダシギシラ (図5)、親魚の部には東錦 (図6) が日本一大賞に輝いた。弥富指導所も会場に「キンギョ相談コーナー」を開設し、一般参加者の相談に応じた。



図1 アルビノリュウキン



図5 オランダシシガシラ (当歳魚の部)



図2 アルビノランチュウ



図6 東錦 (親魚の部)



図3 アルビノチョウテンガン



図4 水疱内液由来 IgM を用いた予防、治療の可能性

– Original –

The Relationship Between HSP70 Accumulation and Acquisition of Thermal Tolerance in the Guppy, *Poecilia reticulata*

Takehiko MOCHIDUKI¹, Noriyoshi SAKAI², Toyoko NAKAJIMA¹ and
Masamichi NAKAJIMA^{1,*}

¹ Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

² Genetic Strains Research Center, National Institute of Genetics

Abstract

Fish that are tolerant of high temperatures are needed if mortality by increasing water temperatures is to be avoided. It has been noted that animals exposed to brief preliminary heat stress acquire transient tolerance to temperatures that are normally lethal. We investigated the validity of this method on fish by experimenting on the guppy, *Poecilia reticulata*, as a model fish. In addition, we investigated the relationship between acquired thermal tolerance and HSP70 accumulation. We confirmed that guppies could acquire thermal tolerance after preliminary heat treatment and that the acquired thermal tolerance was maintained for 16 days. However, there was no correlation between acquired thermal tolerance and HSP70 accumulation in this study. Although we obtained no new knowledge about the mechanisms of thermal tolerance, we found that acquired thermal tolerance could be maintained for a relatively long period.

(accepted February 17, 2013)

Introduction

Water temperature is one of the most important limiting factors for growth, reproduction, and survival in aquatic species. Although various fish are cultured around the world, many institutions for cultivation are out of doors and the water temperatures fluctuate widely. Therefore, mortality of cultured fish by high water temperatures is not rare, and it will increase as global warming progresses. Thus, the need to clarify the genetic mechanisms that influence the thermal tolerance of fish has been increasing in recent years.

There are two ways to affect thermal tolerance, genetic factors and acquired factors. In this paper, we focus on acquired thermal tolerance. Cells or animals exposed to brief preliminary heat stress

acquire transient tolerance to temperatures that are normally lethal¹⁻⁴). Many researches on induced thermal tolerance targeting various species have been performed. For example, mice^{5,6}), *Drosophila*⁷) and *E. coli*⁸) have been researched. Among aquatic organisms, several researches on shellfish have been reported⁹⁻¹²).

One response to thermal stress is the immediate induction of heat shock proteins (HSP). HSPs are molecular chaperones; they assist cells in their recovery from stress and promote cytoprotection. Heat shock protein expression has been linked to increases in immunoresponses to bacteria¹³), increased development rate¹⁴), neurological diseases¹⁵), reduced metabolic condition¹⁶), reproductive delays, and other

*Corresponding author: Masamichi Nakajima, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai, Miyagi 981-8555, Japan

Tel.: 022-717-8741 Fax.: 022-717-8743 e-mail: mnkjm@bios.tohoku.ac.jp

physiologically important responses^{17,18}. HSPs can be divided into several families including HSP90, 70, 60, 40 and small HSPs (sHSPs) on the basis of molecular weight and the homology of amino acid sequences¹⁹. Among HSPs, HSP70 is the major heat-inducible molecular chaperone, with an unusually high conservation in protein sequence and functional features²⁰. One of the physiological functions associated with the stress-induced accumulation of inducible Hsp70 is acquired thermal tolerance, which is defined as the ability of a cell or organism to become tolerant to heat stress after a prior preliminary heat exposure²¹. It has been reported that the physiological mechanisms of thermal tolerance induction and decay show changes parallel to those of HSP70 induction and degradation^{22,23}.

The guppy, *Poecilia reticulata*, is a well-known ornamental fish species that exhibits varying phenotypic characteristics such as body color, coloration, and body size. This fish has been studied for about 90 years²⁴. This fish has been used as an experimental model to assay genetic differences in various physiological conditions among individuals or strains, subsequent to establishment of several experimental strains with certain quantitative traits such as growth rate²⁵, thermal tolerance²⁶ and male body-color variation²⁷. By prior study, we knew that HSP70 mRNA expression is elevated in response to heat shock in guppies (unpublished).

We investigated the phenomenon by which organisms acquire thermal tolerance after prior preliminary heat exposure using guppies as a model fish. In addition we measured the amount of HSP70 and examined the correlation between the acquired thermal tolerance and HSP70 accumulation.

Material and Method

1. Fish Specimen

The guppy samples were selected from the Ws strain maintained in our laboratory as closed colonies. The origin of the Ws strain was the guppy population living wild in a Singaporean river. It has been maintained since 2003. The fishes are kept at a temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$. We selected mature individuals for the experiments.

2. High Temperature Treatment

A schematic view of the temperature change is shown in Fig. 1. The guppy samples were transferred from the breeding aquarium to a $60\text{ cm} \times 35\text{ cm} \times 30\text{ cm}$ constant-temperature bath containing 15 L of water kept at 23°C . The water temperature in the constant-temperature bath was increased to 35°C using a thermostat and maintained at 35°C for 2 h as the preliminary high water temperature treatment. The time it took for the water temperature to rise from 23 to 35°C was about 1 h. After 2 h at 35°C , the guppies were transferred to 23°C breeding water and reared in the same conditions they had enjoyed before the 35°C treatment for different fixed terms. After the passing of the term, they were transferred to a 23°C constant-temperature bath, after which the water temperature was increased to 37°C and then maintained at that temperature. Survival time was measured from the time when the water temperature reached 37°C until death. The judgment of death was performed every hour. The normal recovery terms fixed for every experimental group after the 35°C treatment for 2 h were 10 h, 2 days, 4 days, 6 days, 9 days, 12 days and 16 days. These groups are called the 10-h group, 2-day group, 16-day group, and so on. An experimental group which had no 35°C exposure pretreatment was considered the control. We used 8 individuals for every experimental group.

3. Measurement of the Amount of HSP70

3-1. Protein Extraction

The 35°C treatment and fixed-term recovery for experimental groups were performed by the same method as above. When the term of normal-temperature recovery expired, we immediately dissected

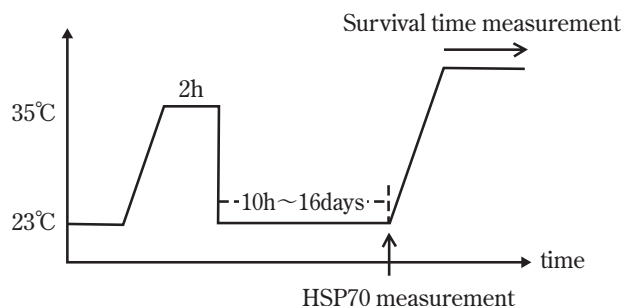


Fig. 1. The schematic view of the temperature change imposed on guppy samples.

the livers from the guppies. The livers were homogenized in hypotonic solution [100mM Tris-HCl buffer containing 0.1% SDS, pH7.5]. The solutions were centrifuged at 15,000 rpm for 10 min, and the supernatant fluids were collected. The protein concentrations were measured by monitoring absorbance at 260 nm and equalized by dilution. We used 6 individuals for every experimental group.

3-2. SDS-PAGE and Western Blotting

Protein solutions were placed on 7.5% polyacrylamide gels (ATTO). After electrophoresis, proteins were electroblotted to a PVDF membrane (GE Healthcare). The membrane was blocked by 1-h incubation in blocking buffer [3% non-fat powdered milk in Tris buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBS-T)]. The blocked membrane was incubated for 1 h at room temperature with anti-HSP70 antibody (Stressgen) diluted 1:2000 in blocking buffer. The membrane was washed 3 times, 5 min each in TBS-T, and then incubated with AP-conjugated anti-mouse IgG secondary antibody (Promega) diluted

1:7500 in blocking buffer for 1 h at room temperature. The membrane was washed 3 times with TBS-T and then developed by BCIP/NBT (TAKARA BIO). The protein levels that correspond to HSP70 were quantified using the image analysis software 'Image J' (rsbweb.nih.gov/ij/).

4. Statistic Analysis

Differences between experimental groups were compared by Kruskal-Wallis analysis. The dates were denoted as mean $\pm$ SE (Standard Error of Mean). The symbols * and ** expressed significant differences at levels of $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

Result

1. Survival Time at 37°C

The average survival times of each experimental group are shown in Table 1 and Fig. 2. The average survival time of the control group was 3.13 h and that of the 10-h group was 6.13 h. A significant difference in average survival time was observed between the 10-h group and control group. We could confirm that guppies had acquired thermal tolerance by the 35°C treatment. The highest average survival time, 8.13 h, was shown in the 4-day group. After 4 days, the average survival time decreased gradually, except for the 12-day group. In the 16-day group, the average survival time was 5.75 h, significantly lower than the 4-day group, but significantly higher than the control group. In all experimental groups, the value of the average survival time was significantly higher than that of the control group.

Histograms expressing the distribution of individual survival times are shown in Fig. 3. The longest

Table 1. The average survival time (h) and significant difference versus control group. * and ** expressed $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively

	Mean $\pm$ SD	p (vs control)	
control	3.13 $\pm$ 0.83		
10 h	6.13 $\pm$ 3.04	0.0208	*
2 days	7.75 $\pm$ 2.71	0.0080	**
4 days	8.13 $\pm$ 1.73	0.0007	**
6 days	7.00 $\pm$ 2.56	0.0012	**
9 days	6.63 $\pm$ 1.19	0.0007	**
12 days	7.38 $\pm$ 3.11	0.0019	**
16 days	5.75 $\pm$ 2.05	0.0042	**

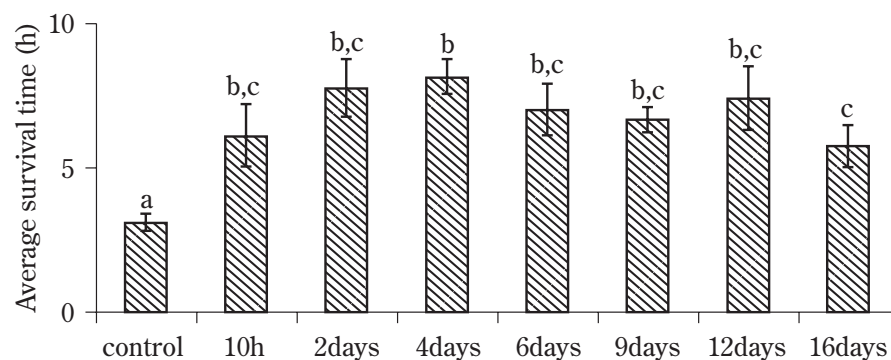


Fig. 2. The average survival time at 37°C. Error bars represent the standard error around the means. Different letters denote significant difference ($p > 0.05$).

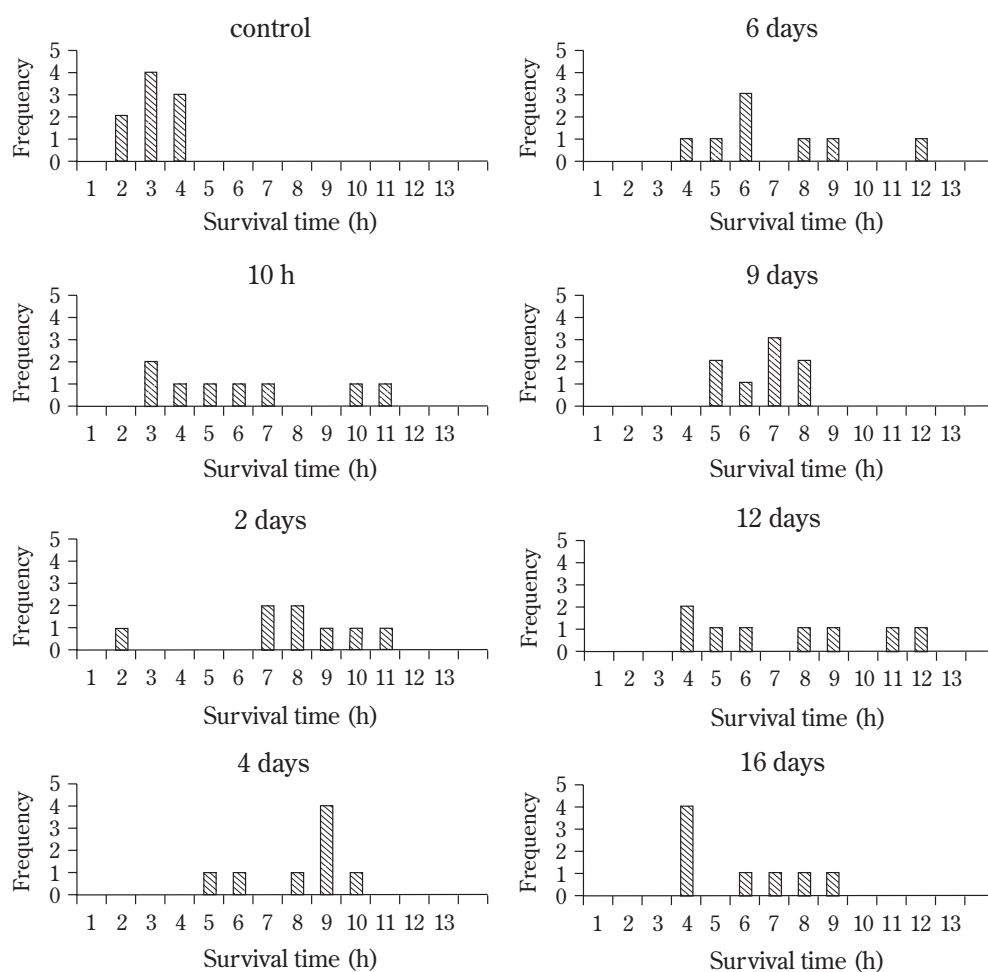


Fig. 3. The histograms which express individual survival time.

survival time of all individuals was 12 h. Such individuals were found in both the 6-day group and the 12-day group. Individuals surviving for 11 h were found in the 10-h group, 2-day group, and 12-day group. However, in the 10-h group and 2-day groups, there were other individuals that couldn't survive over 4 h.

2. The Amount of HSP70

The amounts of HSP70 of each experimental group are shown in Table 2 and Fig. 4. The quantified HSP70 by western blotting and its image analysis were compared among each group. In the 10-h group, the amount of HSP70 was 3 times larger than that in the control group. But in the 2-day group, the value was equivalent to that of the control group. After that, the amount of HSP70 decreased and in the 6-day group became significantly lower than that in the control group. In the 12-day and 16-day groups

Table 2. The amount of HSP70 and significant difference versus control group. * and ** expressed $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively

	Mean $\pm$ SD	p (vs control)
control	1.23 $\pm$ 0.67	
10 h	3.73 $\pm$ 1.54	0.0039 **
2 days	1.24 $\pm$ 1.10	0.7488
4 days	0.88 $\pm$ 0.97	0.3367
6 days	0.30 $\pm$ 0.39	0.0240 *
9 days	0.39 $\pm$ 0.31	0.1087
12 days	0.94 $\pm$ 0.49	0.2002
16 days	1.21 $\pm$ 0.26	0.6310

the levels returned to a statistical equivalence with that of the control group.

Discussion

This study showed that guppies exposed to brief preliminary heat stress acquired tolerance to temperatures that are normally lethal. Because we had

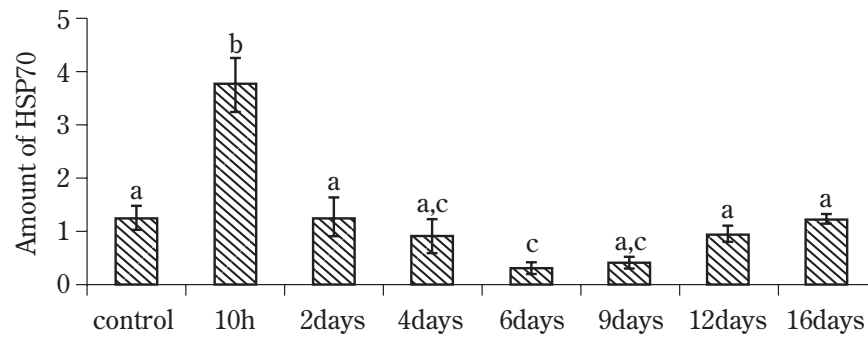


Fig. 4. The amount of HSP70. Error bars represent the standard error around the means. Different letters denote significant difference ($p > 0.05$).

known that guppies of the Ws strain can survive at 35°C for over 24 h, 35°C was considered a preliminary temperature for guppy. We carried out a long-term experiment spanning 16 days, in which the average survival times of all experimental groups significantly increased compared to the control group. Thus, we found that 35°C treatment for 2 h gives thermal tolerance to guppies for the long term (Table 1). However, since the average survival time decreased gradually after 4 days, more prolonged experiments are required to understand how long acquired thermal tolerance could be maintained (Fig. 2). It has been shown that greater initial heat stress induces greater magnitude and duration of thermal tolerance²¹⁾, and that the duration of acquired thermal tolerance is within 3–5 days²³⁾.

There were individuals that couldn't survive over 5 hours in the 10-h group. It seems that they had not acquired thermal tolerance because their survival times were equivalent to those of individuals in the control group. But in the 4-day group, there were no individuals that couldn't survive over the 5-hour point. So it seems that a certain amount of recovery time is required for guppies to acquire thermal tolerance after preliminary temperature treatment. In fact, the survival time did not increase when individuals had no time for recovery at 23°C between the 35°C and 37°C treatments (data not shown).

In terms of HSP70 levels, the only experimental group that had a significantly higher value than the control group was the 10-h group. The HSP70 level after preliminary treatment was elevated for only a short time relative to the survival time, which was maintained at elevated even 16 days after the

preliminary treatment. In addition, in the 6-day group, the HSP70 level was significantly lower than that of the control group (Fig. 3). So in this study there was no correlation between the accumulation of HSP70 and the thermal tolerance in guppies.

While acquisition of thermal tolerance is not fully understood at the molecular level, a transient relationship between HSP production and acquired thermal tolerance has been reported^{1,4)}. Many papers have reported that induced HSP70 correlated with thermal tolerance^{22,28,29,30,31)}. It has been also been shown that HSP70 accumulation is directly linked to thermal tolerance. For example, transfection of a plasmid containing the *Drosophila* HSP70 gene into a monkey fibroblast cell line produced large increases in HSP70 accumulation in these cells and improved their resistance to heat shock³²⁾. Conversely, microinjections of monoclonal antibodies specific for HSP70 inhibited the synthesis of these proteins, resulting in a reduction in thermal tolerance³³⁾. In fish, it has been reported that HSP70 induction is closely linked to the temperature most preferred by fish³⁴⁾.

Other HSPs besides HSP70 also play important roles for thermal tolerance. In rainbow trout, for example, HSP27 and HSP90 are related to thermal tolerance in addition to HSP70³⁵⁾. In this study, a degradation in the HSP70 level was observed in the 6-day group. This may mean that HSP70 was not required for their cytoprotection at that time. Proteins in the HSP70 family are involved in preventing protein denaturation and/or processing denatured proteins and protein fragments that are produced by stressors such as heat shock. It is possible that the reason for the degradation of HSP70 is that other

proteins having functions for cytoprotection, such as other HSPs, were induced by the preliminary-temperature treatment.

Since *Hsp70* mRNA was detected and the mRNAs of other *Hsps* were not detected when we performed Suppression Subtractive Hybridization to determine which genes showed increased expression levels increase at high temperature in guppies (unpublished), we only sought to measure HSP70 levels in this study. However, in the above-mentioned experiment, we used a strain of guppy other than the Ws strain. Divergences of gene expressions in different guppy strains were found in another previous study (unpublished). Thus, it is possible that other HSPs show elevated expression at high temperatures in Ws strain guppies. The proteins responsible for thermal tolerance may include other major HSPs such as HSP40, HSP60, HSP90 and HSP110^{2,21,36}. Furthermore, expression levels of every organ may need to be examined. For example, the small intestine is capable of generating thermal tolerance and is reported to be the tissue most sensitive to heat damage in mice^{5,37}. It has been also reported that the gut and liver are the first organs to accumulate HSP70 following whole-body hyperthermia³⁸. In this study, we used

only liver for measurement of HSP70 expression. Thus, we should examine gene expression in more organs in the following study.

In this study, we could confirm that guppies can acquire remarkable thermal tolerance after preliminary heat treatment, and that the acquired thermal tolerance is maintained for a relatively long term. Breeding industrial species for heat tolerance by selection requires a great deal of time. A method that imposes preliminary heat shock on fish to achieve the same ends is much easier than such breeding. This may be a useful technique in actual aquaculture; however there are many check points to investigate, such as treatment water temperature and treatment periods at preliminary high water temperature treatment. Research on this phenomenon using industrial species should be performed in the future.

Acknowledgements

We would like to thank Kenji Saito and other members of Sakai Laboratory, National Institute of Genetics. This study was partly supported by a grant-in-aid for scientific research from JSPS (No. 23658156) and NIG Collaborative Research (2012-A29).

References

- 1) Lindquist, S., 1986, The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem.*, 55: 1151-1191.
- 2) Lindquist, S. and E. Craig, 1988, The heat-shock proteins. *Ann. Rev. Genet.*, 22: 631-677.
- 3) Nover, L., 1991, Induced thermotolerance. *Heat shock response*. Boca Ration, FL: CRC Press: 409-452.
- 4) Parsell, D. and S. Lindquist, 1993, The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Ann. Rev. Genet.*, 27: 437-496.
- 5) Hume, S. P. and J. C. L. Marigold, 1980, Transient, heat-induced thermal resistance in the small intestine of mouse. *Radiation Research*, 82: 526-535.
- 6) Lunec, J. and S. R. Cresswell, 1983, Heat-induced thermotolerance expressed in the energy metabolism of mammalian cells. *Radiation Research*, 93: 588-597.
- 7) Dahlgaard, J., V. Loeschcke, P. Michalak and J. Justesen, 1998, Induced thermotolerance and associated expression of the heat-shock protein Hsp70 in adult *Drosophila melanogaster*. *Functional Ecology*, 12: 786-793.
- 8) Sanchez, Y. and S. L. Lindquist, 1990, HSP104 required for induced thermotolerance. *Science*, 248: 1112.
- 9) Chapple, J. P., G. R. Smerdon, R. J. Berry and A. J. S. Hawkins, 1998, Seasonal changes in stress-70 protein levels reflect thermal tolerance in the marine bivalve *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 229: 53-68.
- 10) Clegg, J., K. Uhlinger, S. A. Jackson, G. N. Cherr, E. Rifkin and C. S. Friedman, 1998, Induced thermotolerance and the heat shock protein-70 family in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 7: 21-30.

- 11) Brun, N. T., V. M. Bricelj, T. H. MacRae and N. W. Ross, 2009, Acquisition of thermotolerance in bay scallops, *Argopecten irradians irradians*, via differential induction of heat shock proteins. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 371: 77-83.
- 12) Sakamoto, K., M. Nakajima and N. Taniguchi (2002) Influence of age and rearing water temperature on high temperature traits of the clonal silver crucian carp (*Carassius langsdorfi*) and estimation of broad sense heritability. *Fish Genet. Breed. Sci.*, 32: 33-38 (in Japanese).
- 13) Stewart, G. R., V. A. Snewin, G. Walzl, *et al.* (10 co-authors), 2001, Overexpression of heat-shock proteins reduces survival of *Mycobacterium tuberculosis* in the chronic phase of infection. *Nature medicine*, 7: 732-737.
- 14) Hart, P. J. B., 2006, The Behavior and Ecology of Pacific Salmon and Trout. *Fish and Fisheries*, 7: 75-76.
- 15) Morimoto, R. I. and M. G. Santoro, 1998, Stress-inducible responses and heat shock proteins: New pharmacologic targets for cytoprotection. *Nature biotech.*, 16: 833-838.
- 16) Viant, M., I. Werner, E. S. Rosenblum, A. S. Gantner, R. S. Tjeerdema and M. L. Johnson, 2003, Correlation between heat-shock protein induction and reduced metabolic condition in juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) chronically exposed to elevated temperature. *Fish Physiol. Biochem.*, 29: 159-171.
- 17) Iwama, G. K., P. T. Thomas, R. Forsyth and M. M. Vijayan, 1998, Heat shock protein expression in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 8: 35-56.
- 18) Sørensen, J. G. and V. Loeschcke, 2002, Natural adaptation to environmental stress via physiological clock-regulation of stress resistance in *Drosophila*. *Ecol. Letters*, 5: 16-19.
- 19) Feder, M. E. and G. E. Hofmann (1999). "Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology." *Annual Review of Physiology* 61(1): 243-282.
- 20) Boorstein, W. R., T. Ziegelhoffer and E. A. Craig, 1994, Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J. Mol. Evo.*, 38: 1-17.
- 21) Kregel, K. C., 2002, Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Applied Physiol.*, 92: 2177.
- 22) Landry, J., D. Bernier, P. Chrétien, L. M. Nicole, R. M. Tanguay and N. Marceau, 1982, Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. *Cancer Res.*, 42: 2457-2461.
- 23) Li, G. C., 1985, Elevated levels of 70,000 dalton heat shock protein in transiently thermotolerant Chinese hamster fibroblasts and in their stable heat resistant variants. *Inter. J. Radiation Oncol. Biol. Phys.*, 11: 165-177.
- 24) Winge, Ö., 1922, One-sided masculine and sex-linked inheritance in *Lebistes reticulatus*. *J. Genet.*, 12: 145-162.
- 25) Nakajima, M. and N. Taniguchi, 2002, Genetic control of growth in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Aquaculture*, 204: 393-405.
- 26) Fujio, Y., M. Nakajima and Y. Nagahama, 1990, Detection of a low temperature-resistant gene in the guppy (*Poecilia reticulata*), with reference to sex-linked inheritance. *Jpn. J. Genet.*, 65: 201-207.
- 27) Tripathi, N., M. Hoffmann, E. M. Willing, C. Lanz, D. Weigel and C. Dreyer, 2009, Genetic linkage map of the guppy, *Poecilia reticulata*, and quantitative trait loci analysis of male size and colour variation. *Proc. Royal Soc. B: Biol. Sci.*, 276: 2195-2208.
- 28) Li, G. C. and Z. Werb, 1982, Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc. Nat. Aca. Sci. USA*, 79: 3218.
- 29) Landry, J. and P. Chretien, 1983, Relationship between hyperthermia-induced heat-shock proteins and thermotolerance in Morris hepatoma cells. *Canad. J. Biochem. Cell Biol.*, 61: 428-437.
- 30) Li, G. C., J. L. Meyer, J. Y. Mak, and G. M. Hahn, 1983, Heat-induced protection of mice against thermal death. *Cancer Research*, 43: 5758-5760.
- 31) Mizzen, L. A. and W. J. Welch, 1988, Characterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein

- synthesis activity and the regulation of heat-shock protein 70 expression. *J. Cell Biol.*, 106: 1105-1116.
- 32) Lewis, M. J. and H. Pelham, 1985, Involvement of ATP in the nuclear and nucleolar functions of the 70 kd heat shock protein. *EMBO Journal*, 4: 3137.
- 33) Riabowol, K. T., L. A. Mizzen, *et al.*, 1988, Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science*, 242: 433.
- 34) Hightower, L. E., C. E. Norris, P. J. Diiorio and E. Fielding, 1999, Heat shock responses of closely related species of tropical and desert fish. *American Zoologist*, 39: 877-888.
- 35) Mosser, D. D. and N. C. Bols, 1988, Relationship between heat-shock protein synthesis and thermotolerance in rainbow trout fibroblasts. *J. Comp. Physiol. B: Biochem. System. Environ. Physiol.*, 158: 457-467.
- 36) Lin, C. Y., J. K. Roberts and J. L. Key, 1984, Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings: synthesis and accumulation of heat shock proteins and their cellular localization. *Plant Phys.*, 74: 152-160.
- 37) Henle, K. and D. Leeper, 1982, Modification of the heat response and thermotolerance by cycloheximide, hydroxyurea, and lucanthone in CHO cells. *Radiation Research*, 90: 339-347.
- 38) Flanagan, S., A. Ryan, *et al.*, 1995, Tissue-specific HSP70 response in animals undergoing heat stress. *Ame. J. Physiol. Regu. Inte. Comp. Physiol.*, 268: R28-R32.

グッピーにおける非致死高温処理による高温耐性の 獲得と HSP70 発現量との関係

望月健彦¹・酒井則良²・中嶋登代子¹・中嶋正道¹

(¹東北大学大学院農学研究科、²国立遺伝学研究所系統生物研究センター)

高水温による養殖魚の死亡を避ける方法として高温耐性系統の作出が考えられる。そこで我々は非致死温度高温処理による高温耐性の獲得という現象に注目した。これまでに様々な生物種において穏やかな熱ストレスを課すことで生来よりも高い高温耐性を獲得することが報告されているが、魚類におけるこの現象の報告はあまりない。そこで本研究では、魚類においても非致死温度高温処理により高温耐性が獲得されるかをグッピー (*Poecilia reticulata*) をモデル生物として用いて検証した。その結果、グッピーでは非致死温度高温処理により大きく高温耐性が增強することがわかった。また、獲得した高温耐性は非致死温度高温処理の16日後でも維持されていた。さらに、獲得した高温耐性とHSP70の蓄積量の関係を検証したが、HSP70は非致死温度高温処理の2日後には元のレベルに戻っており、HSP70蓄積量と獲得した高温耐性の間に相関は見られなかった。今回の研究で魚類でも非致死温度高温処理により高温耐性を獲得すること、そして、獲得した高温耐性が比較的長期間維持されることを示すことができた。

－ 会 員 通 信 －

新たなシンポジウム「観賞魚育種シンポジウム」の試み

中嶋 正道（東北大院農）

観賞魚に関する育種シンポジウムを開催しようという話は岡本信明水産育種研究会観賞魚部会会長の観賞魚を用いた研究を行っている研究者と観賞魚の生産業者、観賞魚愛好家の間での連携の強化と情報交換の場をつくらうとの発案からでした。毎年、愛知県弥富市で金魚日本一大会が開催されていることから愛知県弥富市を開催地とし、金魚日本一大会の翌週、11月3日を開催日としてシンポジウムが企画されました。弥富市は名古屋から近鉄名古屋線で15分ほどの市で、最近は名古屋市のベッドタウンとして発展しているとのこと。開催に際しては愛知県水産試験場内水面漁業研究所弥富指導所の本田是人氏にご協力をいただき、開催場所や懇親会会場等の確保をしていただきました。

会場となったのは弥富市産業会館で、100名ほどが収容できるホールを有しており、ここが会場となりました(写真1)。



写真1：弥富市産業会館

当日は8時より愛知水試の方々のご協力のもとに会場設営が行われました(写真2)。結構広い会場で、何名の参加があるか少々不安を感じながら受付を開始しました。最終的な参加者は講演者も含め44名で、会場はかなりいっぱいになった感じでした(写真3)。

岡本部会長の開会の挨拶、開催地代表として弥富金魚漁業協同組合代表理事組合長の伊藤恵造氏の挨拶に引き続き講演が行われました(写真4)。午前中は第一部として観賞魚を用いた育種研究について、午後は第二部として県や業者による観賞魚研究の試みについて講演が行われ、活発な討議が行われました(写真5)。

今回のシンポジウムは観賞魚という初めての試み



写真2：開催準備の終わった産業会館ホール



写真3：シンポジウム開会を待つ参加者

であったことと、愛知県弥富市という少々交通の便が不案内なところで開催されるということもあり、どの程度の参加者があるか多少不安がありました。しかし、大学、水研、水試関係者以外にも漁業協同組合や業者、愛好者等予想以上の参加者があり、観賞魚育種への関心の高さがうかがえました。議論の中では観賞魚研究や業者・愛好者との連携の重要性が論じられた一方で、海外との競争の激化や後継者や事業環境の悪化などが話されました。海外の最大の競争相手はやはり中国で、昔日本から輸出された優良親魚を元として作成された品種などが安価で大量に日本に輸入されるようになり、日本としての特徴を出してゆかないと苦しいとのことでした。また、弥富市は名古屋市のベッドタウンとして発展しているとのことで、多くの養殖池を維持するには難しい環境となりつつあるとのことでした。

シンポジウム終了後は場所を変えて懇親会が行われ、ここでも終電の時間ぎりぎりまで観賞魚の話題で盛り上がっていました。今回の懇親会は会場の関係で希望者全員の参加とできなかったのが残念でした。総合討論や懇親会の席などで観賞魚とその育種に対する関心の高さから、このようなシンポジウムを継続的に開催してほしい旨の要望が出されており、観賞魚育種シンポジウムが今後も継続的な開催となるようにしてゆきたいと思います。

今回のシンポジウム開催に際しては本田是人氏をはじめ多くの愛知県水産試験場の方々にご助力いただきました。改めて御礼申し上げます。



写真4：開催地代表として挨拶する伊藤恵造組合長



写真5：質疑応答では活発な論議が行われた

水産育種研究会組織

会 長	荒井克俊
庶務幹事	山羽悦郎、藤本貴史
会計幹事	三上浩司
編集幹事	中嶋正道（主幹）、池田 実、奥村誠一、河村功一、木島明博、 古丸 明、坂本 崇、関 伸吾、高木基裕、吉崎悟朗
観賞魚部会担当	岡本信明
会計監査	山中一郎

水産育種 第42巻 2 号

2013年(平成25年) 1 月31日印刷

2013年(平成25年) 1 月31日発行

編集者 中嶋正道
代表者兼発行者 荒井克俊
発行所及び著作権者 水産育種研究会
〒981-8555 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町1-1
東北大学大学院農学研究科
TEL 022-717-8741 FAX 022-717-8743
印刷所：(有)西村謄写堂
〒780-0901 高知市上町 1 丁目6-4
TEL (088)822-0492 FAX (088)825-1888

FISH GENETICS AND BREEDING SCIENCE

Volume 42 Number 2, January 2013

CONTENTS

Symposium

Symposium on Ornamental Fish Breeding	N. OKAMOTO	47
The Application of Ornamental Fish for the Study of Fish Breeding	M. NAKAJIMA	49
Endocrine Control and Sexual Plasticity of Behavior in Goldfish	M. KOBAYASHI, S. SAOSHIRO and Y. HAYAKAWA	55
Difference Between Ornamental Fish Breeding and Economical Fish Breeding in Aquaculture	A. OZAKI	63
Breeding Strategy and Broodstock Management in Ornamental Koi Carp	N. TANIGUCHI	71
The Trial of The Genetic Improvement of Koi Carp in a Private Fish Farm	S. SUGIMOTO	79
Breeding in Nishikigoi, <i>Cyprinus carpio</i> of Niigata prefecture	S. SATO	81
The Contents of the Research on Ornamental Fish Breeding in Saitama Prefecture	M. TANAKA	85
The Examination of the Goldfish Research in Aichi Prefecture and Goldfish festival 2012 in Yatomi	K. HONDA	89

Original

The Relationship Between HSP70 Accumulation and Acquisition of Thermal Tolerance in the Guppy, <i>Poecilia reticulata</i>	T. MOCHIDUKI, N. SAKAI, T. NAKAJIMA and M. NAKAJIMA	91
---	---	----

Information

A new trial "Symposium on the Ornamental Fish Breeding"	M. NAKAJIMA	99
---	-------------	----

The Regulations

101

Instructions for Authors

102