

第5章 クローン集団の作出と育種利用

ヒラメのクローンを利用した育種技術について検討する目的で、ヒラメのクローン集団の作出と特性調査を行なった。すなわち、まず、第1卵割阻止型雌性発生2倍体の誘起による完全同型接合体の作出を行なった。次いで、これを親魚とする次世代のクローン群を得た。さらに、クローン世代の維持および増殖方法について検討した。また、クローン間雑種の特性について調査した。得られた結果をもとに、ヒラメのクローンの育種利用について考察した。

1. 完全同型接合体の作出と特性

雌性発生によるクローン集団作出の第1段階は、第1卵割阻止型雌性発生2倍体の誘起による完全同型接合体の作出である。そこで、ヒラメの第1卵割阻止型雌性発生2倍体の作出を試みるとともに、作出魚の特性を調査し、さらにアイソザイムマーカによる作出の確認を行なった。

1) 第1卵割阻止型雌性発生2倍体の作出と特性

4例の第1卵割阻止型雌性発生2倍体の作出を試みた。その作出例における卵発生成績と仔稚魚の生残率をTable 27に示した。このうち2例では、同一作出親魚による第2極体放出阻止型雌性発生2倍体と通常ヒラメの作出例の成績も併記した。

第1卵割阻止型雌性発生2倍体は、第2極体放出阻止型雌性発生2倍体や通常ヒラメと比較すると、卵の胚形成率ではそれほど変わらないが、奇形の胚およびふ化仔魚が多くて正常ふ化率が低く、また、仔稚魚の生残率も低かった。作出群 30 G2(N♀10), 32 G2(N♀11), および 33 G2(N♀12) では、各飼育群とも稚魚期初期の生残率がとくに低く、それぞれ10カ月齢で3ないし14個体を得るに留った。しかし、作出群 54 G2(F₁(G1♂2)♀1)では、稚魚期の生残が比較的安定し、10カ月齢で200個体以上を得ることができた。およそ3カ月齢まで生残した大型個体は強健であり、以後成熟するまで、疾病の発生に起因するもの以外、ほとんど斃死することはなかった。

Fig. 12に第1卵割阻止型雌性発生2倍体の作出群 54 G2(F₁(G1♂2)♀1)の飼育群2群(54-1, 54-E₂1)の変態完了後から日齢180までの平均全長と全長の変動係数の推移を示した。さらに、同一親魚に由来する第2極体放出阻止型雌性発生2倍体(38-1)および通常ヒラメ(47-1)についてもFig. 13に同様に示した。全長の変動係数は、第1卵割阻止型雌性発生2倍体では0.144から0.189の範囲の高い値で推移したが、第2極体放出阻止型雌性発生2倍体および通常ヒラメでは0.063から0.095の低い値で推移した。このように、第1卵割阻止型雌性発生2倍体世代では全長における変異幅の拡大を明確に認めることができた。このような第1卵割阻止型雌性発生2倍体における形質の変異幅の増大は、全長と同様、体各部のプロポーションや体側の斑紋パターンでも確認された。

Table 27. Embryonic development and survival rate of hirame flounder at larval and juvenile stages of G2(gynogenetic diploids induced by suppressing the first cell cleavage) progenies, and those of control G1 (gynogenetic diploids induced by retaining the second polar body) and N (normal diploids) progenies.

No. and code of group	Embryonic development				Code no. of rearing lot	Survival rate		
	FLR ¹⁾	FER ²⁾	EDR ³⁾	NFR ⁴⁾		(days after hatching)		
	%	%	%	%		0~30 ⁵⁾	30~90	0~90 ⁵⁾
30 G2(N♀10)	95.1	65.7	23.6	30.0	30-1	15.5	0.4	0.1
29 G1(N♀10)	92.5	72.3	21.4	82.0	30-E ₂ 1	15.5	7.0	1.1
					29-1	45.2	64.8	29.3
31 N(N♀10)	95.7	77.4	66.2	92.5	29-E ₂ 1	45.2	57.5	26.0
					31-E ₂ 1	62.4	35.4	22.1
32 G2(N♀11)	58.9	72.6	31.3	21.0	32-1	12.4	2.4	0.3
					32-E ₂ 1	12.4	2.0	0.1
33 G2(N♀12)	98.7	86.4	18.3	13.0	33-E ₂ 1	7.1	4.5	0.3
54 G2(F ₁ (G1♂2)♀1)	90.8	72.0	28.1	34.8	54-1	12.6	24.0	3.0
					54-E ₂ 1	12.6	30.6	3.9
38 G1(F ₁ (G1♂2)♀1)	61.8	78.2	14.7	92.6	38-1	59.7	62.3	37.2
					38-E ₂ 1	59.7	55.5	33.1
47 N(F ₁ (G1♂2)♀1)	79.8	84.3	42.6	96.6	47-1	71.7	60.0	43.0
					47-E ₂ 1	71.7	58.9	42.2

1 : Floated eggs/total eggs. 2 : Fertilized eggs/floated eggs. 3 : Embryo-developed eggs/floated eggs.

4 : Hatched normal fry/embryo-developed eggs. 5 : Survivals/embryo-developed eggs.

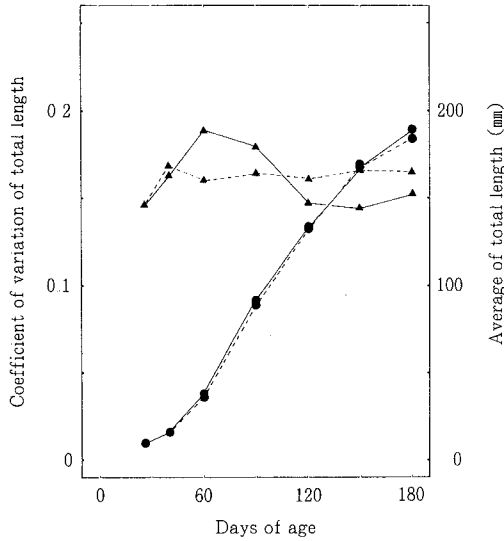


Fig.12. Growth curves (solid circle) with coefficients of variation (solid triangle) of total length in two rearing lots of gynogenetic diploids induced by suppressing the first cell cleavage (54-1, solid line; 54-E₂1, broken line).

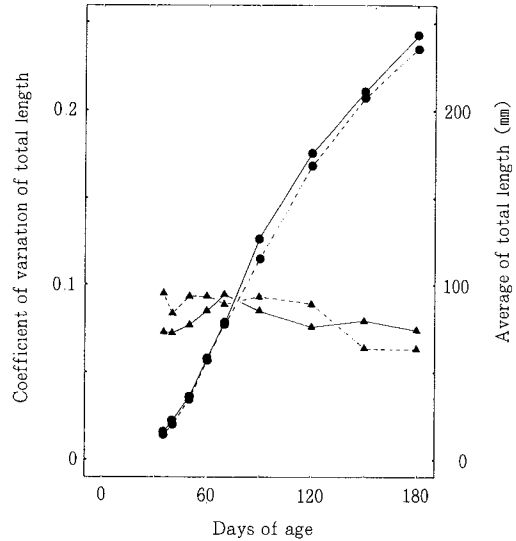


Fig.13. Growth curves (solid circle) with coefficients of variation (solid triangle) of total length in a rearing lot of gynogenetic diploids induced by retaining second polar body (38-1, solid line) and a rearing lot of normal diploids (47-1, broken line).

第1卵割阻止型雌性発生2倍体は遺伝的全雌群である。しかし、作出した第1卵割阻止型雌性発生2倍体の通常の飼育群では、雄も出現し、これは性転換雄であった(第2章)。

雄はすべての個体が満1歳で成熟した。一方、雌は、成長度によって、満2歳で初回成熟する個体と満3歳で初回成熟する個体に分れた。

2) アイソザイムによる完全同型接合体作出の確認

ヒラメのIDH遺伝子座は、AA, AB, BBで示される多型を持ち、成熟分裂における遺伝子座と動原体間の組換え率(谷口, 1986)が100%であることが判明している(田畑・五利江, 1987a; 田畑, 1991)。従って、第1卵割阻止型雌性発生2倍体の作出に際して、ヘテロ接合体(AB)の雌親魚を使用すれば、完全同型接合体の作出を証明するマーカーとしてIDH遺伝子型を利用することができる。すなわち、第1卵割阻止型雌性発生2倍体個体はホモ接合体(AA, BB)となる一方、第2極体放出阻止型雌性発生2倍体個体はヘテロ接合体(AB)となり、両者をIDH遺伝子型で判別することができる。

第1卵割阻止型雌性発生2倍体の作出群 54 G₂(F₁(G₁↑2)♀1)の作出の雌親魚のIDH遺伝子型はAB型であった。従って、作出個体個々についてIDH遺伝子型を明らかにすれば、第1卵割阻止型雌性発生2倍体が正しく誘導されているか否か確認することができる。そこで、この作出群の飼育群である54-1および54-E₂1について、日齢65から480までの採集個体および斃死個体83個体と、日齢604時点の生残魚59個体、合計142個体のIDH

遺伝子型を調べた。

Table 28 に IDH 遺伝子型の調査結果を示した。これには、共通の雌親魚に由来する第 2 極体放出阻止型雌性発生 2 倍体の作出群である 38 G1(F₁(G1 ♂ 2) ♀ 1) についての結果も併記した。

第 1 卵割阻止型雌性発生 2 倍体作出群では、遺伝子型が AA 型および BB 型の個体がそれぞれ 62 および 80 個体であり、AB 型の個体は見出されなかった。一方、第 2 極体放出阻止型雌性発生 2 倍体作出群では、調査個体はすべて AB 型であった。

このことから、第 1 卵割阻止型雌性発生 2 倍体作出群は、第 2 極体放出阻止型雌性発生 2 倍体個体を含まず、第 1 卵割阻止型雌性発生 2 倍体すなわち完全同型接合体が正しく誘導されていることが確認された。

なお、他の第 1 卵割阻止型雌性発生 2 倍体の作出群のうち、30 G2(N ♀ 10) および 32 G2(N ♀ 11) の作出に用いた雌親魚の IDH 型も AB 型であった。調べた作出個体のすべては AA 型または BB 型のホモ接合体であり、完全同型接合体であることが示唆された。

Table 28. Distribution of genotypes at the *Idh* locus in G2 (gynogenetic diploids induced by suppressing the first cell cleavage) and G1 (gynogenetic diploids induced by retaining the second polar body) progenies.

No. and code of group	Genotype of maternal parent	Dead samples 65th~480th days after hatching			Live samples 604th day after hatching			Sum			
		AA	AB	BB	AA	AB	BB				
54 G2(F ₁ (G1♂2)♀1)	AB	38	0	45	24	0	35	62	0	80	142
38 G1(F ₁ (G1♂2)♀1)	AB	0	38	0	-	-	-	0	38	0	38

2. クローン集団の作出と特性

雌性発生によるクローン集団作出の第2段階は、第1卵割阻止型雌性発生2倍体の誘起によって作出された完全同型接合体を親魚に、クローン集団を作出することである。クローン集団の作出には、第2世代をふたたび雌性発生で作出し、親魚と同じ完全同型接合体の群（本研究ではホモ型クローンと称する）を得る方法と、第1卵割阻止型雌性発生2倍体の雌雄を交配し、ヘテロ接合体の遺伝子座を持ちながらも遺伝的には均質な群（本研究ではヘテロ型クローンと称する）を得る方法がある。ここでは、第1卵割阻止型雌性発生2倍体を親魚としたクローン世代の作出を試み、その特性を調査するとともに、組織移植およびDNAフィンガープリントによる作出の証明を行なった。

1) 第1卵割阻止型雌性発生2倍体の次世代によるクローン集団の作出と特性

3群の第1卵割阻止型雌性発生2倍体に属する9個体の雌親魚から採卵し、それぞれの第2極体放出阻止型雌性発生2倍体の誘導によるホモ型クローンと、1例の第1卵割阻止型雌性発生2倍体雄との交配によるヘテロ型クローンの作出を試みた。それらの作出例における卵発生成績と仔稚魚の生残率をTable 29に示した。なお、クローン世代の作出親魚には、IDH遺伝子型をマーカーにして完全同型接合体であることが確認された個体を用いた。

ホモ型クローンの作出例では、卵の発生成績はおおむね高いものが多く、第1卵割阻止型雌性発生2倍体世代より明らかな改善が認められた。しかし、作出群52 HOMCL(G2♀5)や59 HOMCL(G2♀7)のように、胚形成率または正常ふ化率が低い例もみられた。また、作出群58 HOMCL(G2♀6)のように、外見的には正常な排卵直後の卵を用いたにもかかわらず、浮上率が0%で受精卵がまったく得られなかった例も存在した。一方、作出群52 HOMCL(G2♀5)の同腹姉妹群であるヘテロ型クローンの作出群53 HETCL(♀5・♂1)では、ホモ型クローンよりも顕著に高い卵の発生成績が得られた。

ふ化以後日齢40までの仔魚期の生残率は、1991年の作出例である作出群番号48から53で低く、1993年の作出例である作出群番号61および62で高かった。前者における不調は、摂餌を開始せずに減耗する仔魚の出現によるもので、これは新品の飼育水槽を飼育開始当初の止水飼育に使用した影響によるようであった。摂餌を開始した仔魚はむしろ強健であり、変態以後の稚魚期の生残率も高かった。1993年の作出飼育例では、仔魚期および稚魚期を通じて安定した生残が得られた。

Fig. 14~Fig. 20に、各作出飼育群の変態完了後から日齢180までの平均全長と全長の変動係数の推移を示した。作出群52 HOMCL(G2♀5)については、生残魚が少数であるために図示することができなかった。群ごとの全長の変異幅は、多くの例で、比較的小さく、変動係数は第1卵割阻止型雌性発生2倍体世代の場合を著しく下回って推移した。しかし、作出群49 HOMCL(G2♀2)の場合のように、変態後に変異幅の著しい増大が認められた例が存在し、これには仔稚魚の配合飼料への餌付けの不調が影響しているようであった。また、作出群48

Table 29. Embryonic development and survival rate at larval and juvenile stages of cloned progenies, sired by females which are gynogenetic diploids induced by suppressing the first cell cleavage.

No. and code of group	Embryonic development					Survival rate		
	FLR ¹⁾	FER ²⁾	EDR ³⁾	NFR ⁴⁾	(days after hatching)	0~40 ⁵⁾	40~90	0~90 ⁵⁾
	%	%	%	%	%	%	%	%
48 HOMCL(G2♀1)	29.6	53.6	32.0	43.5	4.3	86.2	3.7	
49 HOMCL(G2♀2)	95.9	47.8	20.5	55.3	4.5	60.0	2.7	
50 HOMCL(G2♀3)	71.0	82.1	59.2	62.6	4.5	60.4	2.7	
51 HOMCL(G2♀4)	67.6	89.7	60.0	76.0	15.2	67.8	10.3	
52 HOMCL(G2♀5)	67.6	63.9	16.0	8.5	0.8	76.2	0.6	
53 HETCL(♀5 • ♂1)	70.2	70.3	44.8	75.7	14.2	76.5	10.9	
58 HOMCL(G2♀6)	0	—	—	—	—	—	—	
59 HOMCL(G2♀7)	63.0	70.8	1.0	63.2	0	—	—	
61 HOMCL(G2♀8)	82.8	83.1	67.7	72.2	59.5	39.7	23.6	
62 HOMCL(G2♀9)	92.0	81.8	71.1	88.0	66.7	61.2	40.8	

1 : Floated eggs/total eggs. 2 : Fertilized eggs/floated eggs. 3 : Embryo-developed eggs/floated eggs. 4 : Normal hatched fry/embryo-developed eggs. 5 : Survivals/embryo-developed eggs.

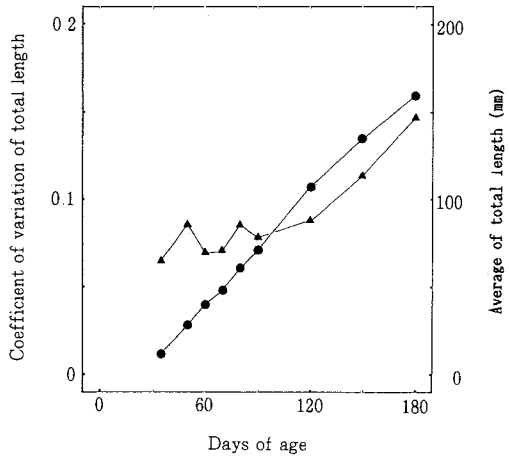


Fig. 14. Growth curve (solid circle) with coefficients of variation (solid triangle) of total length in a rearing lot of cloned diploids (48-1).

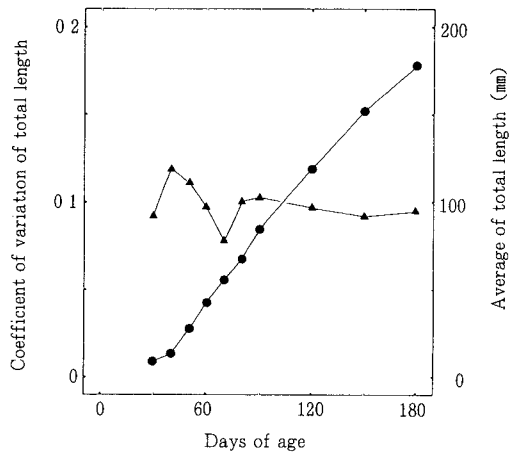


Fig. 16. Growth curve (solid circle) with coefficients of variation (solid triangle) of total length in a rearing lot of cloned diploids (50-1).

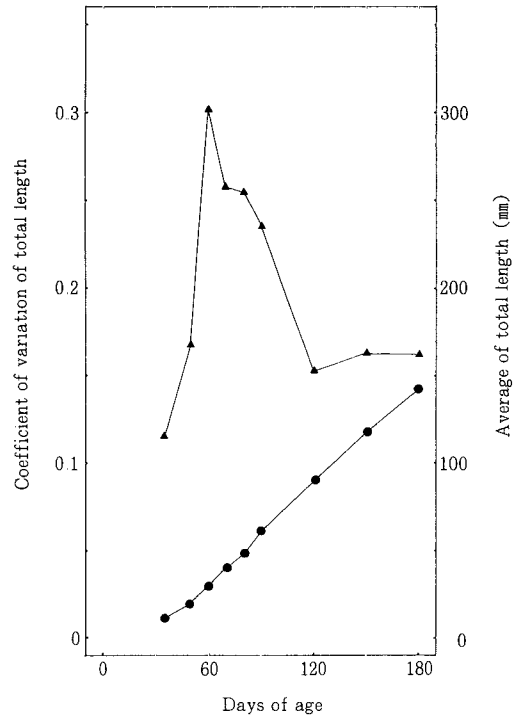


Fig. 15. Growth curve (solid circle) with coefficients of variation (solid triangle) of total length in a rearing lot of cloned diploids (49-1).

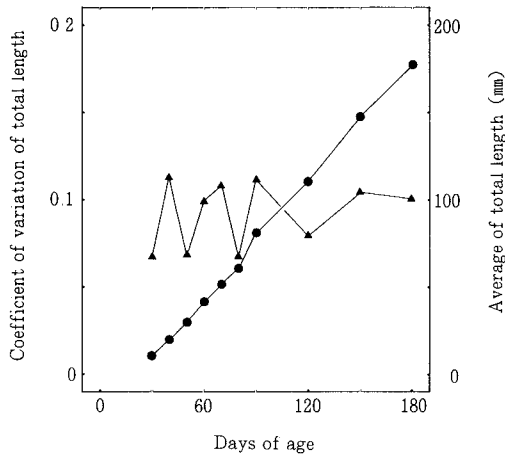


Fig.17. Growth curve (solid circle) with coefficients of variation (solid triangle) of total length in a rearing lot of cloned diploids (51-1).

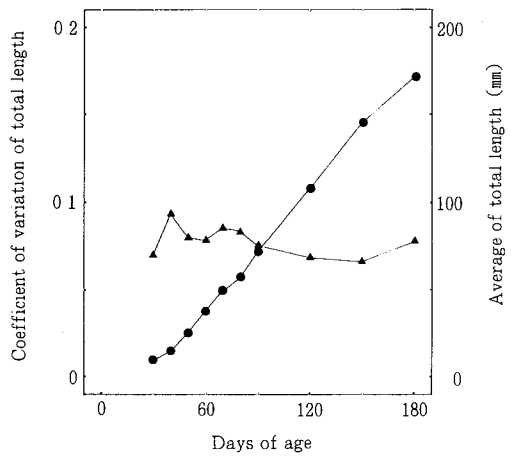


Fig.18. Growth curve (solid circle) with coefficients of variation (solid triangle) of total length in a rearing lot of cloned diploids (53-1).

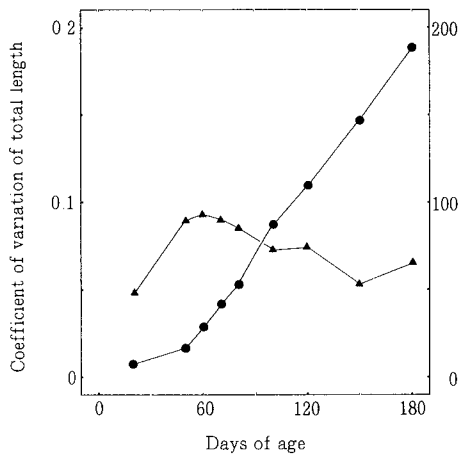


Fig.19. Growth curve (solid circle) with coefficients of variation (solid triangle) of total length in a rearing lot of cloned diploids (61-1).

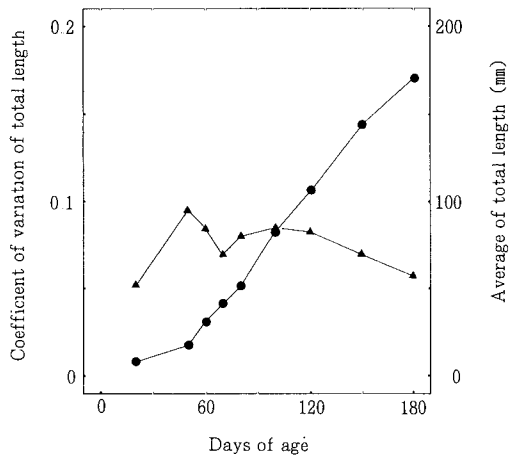


Fig.20. Growth curve (solid circle) with coefficients of variation (solid triangle) of total length in a rearing lot of cloned diploids (62-1).

Table 30. Sex distribution of cloned groups.

No. and code of group	Code no. of rearing lot	Sex distribution			Rate of Females %
		Sample size	♂ : ♀		
48 HOMCL(G2♀1)	48-1	19	7 : 12		63.2
49 HOMCL(G2♀2)	49-1	12	2 : 10		83.3
50 OMCL(G2♀3)	50-1	58	8 : 50		86.0
51 HOMCL(G2♀4)	51-1	66	48 : 18		27.3
52 HOMCL(G2♀5)	52-1	2	2 : 0		0
53 HETCL(♀5・♂1)	53-1	97	54 : 43		44.3

HOMCL(G2♀1) の場合のように、日齢 100 以降に全長の変異幅の増大した例があり、これは群内で共通した顎部の奇形が摂餌に与える影響に起因するものようであった。

Pl. XI-48, 49 にクローン作出群の内、49 HOMCL(G2♀2) と 53 HETCL(♀5・♂1) の日齢 180 における魚体を示した。クローン内では、個体間で体各部のプロポーシヨおよび体側の斑紋パターンはよく一致し、それらにおける変異幅の縮小が明らかであった。一方、各ホモ型クローンはそれぞれに固有の形態的特徴を示すために、クローン間ではプロポーシヨなどにおける相違が著しかった。

Table 30 に作出群番号 48 から 53 の各群のほぼ同条件で飼育された通常の飼育群の性比を示した。作出群 49 HOMCL(G2♀2) では生残が雄 2 個体に限られた。他のクローン群では、いずれの群でも雌雄の両方が出現し、雌の割合は 27.3 % から 86.0 % の範囲で様々であった。雌性発生に由来するクローン群は遺伝的全雌群であり、雄の出現は性分化の転換に起因すると判断され、性転換率がクローンによって異なった。雄はすべての個体が満 1 歳で成熟した。一方、雌は満 2 歳で初回成熟する個体が多かったが、成長の遅れたものでは満 2 歳時に未熟であった。

このように、作出を試みた第 1 卵割阻止型雌性発生 2 倍体の次世代であるホモ型クローン 9 例およびヘテロ型クローン 1 例のうち、それぞれ 7 例および 1 例で、多数の個体を得ることができた。また、その特性についても幾つかの知見が得られた。

2) 組織移植によるクローン集団作出の証明

組織移植実験はクローン集団作出の証明に有効であることが報告されている (Dawley *et al.*, 1987; Han *et al.*, 1991). そこで, 前項で作出した第1卵割阻止型雌性発生2倍体を親魚としたクローン世代の全群について, 組織移植実験を行ない, クローン集団作出の確認を試みた.

Table 31 に示したクローン世代8群と, 対照として第2極体放出阻止型雌性発生2倍体および通常ヒラメについて組織移植実験を行なった. クローン作出群では, 1個体のホストに自己の鰓蓋片, クローン作出群内の他個体の鰓蓋片, および他のクローン作出群の個体の鰓蓋片をそれぞれ移植し, それらの生着または拒絶状況を観察した. 対照群では, 1個体のホストに自己の鰓蓋片および群内の他個体の鰓蓋片を移植した. 移植実験は対象魚が6~8カ月齢の時点で開始したが, 第2極体放出阻止型雌性発生2倍体についての実験に限っては20カ月齢の時点で行なった.

いずれの実験例でも, 移植後数日以内に移植片が脱落する例はみられなかった. その後の移植片および移植部位の形態的变化には対称的な2つの経過が認められ, 組織移植に伴う拒絶反応の有無を明瞭に確認することができた. すなわち, 拒絶反応が起これず, 移植組織が生着する例では, 移植した鰓蓋片の皮膚が移植当初から移植3カ月以降まで外見的な異常がみられないまま生残し, ホストの皮膚の一部を形成するのが確認された. また, 移植した鰓蓋片の鰓蓋骨は移植3カ月以降でも硬く化骨していることが確認された. 一方, 拒絶反応が認められる例では, 移植数日後頃から1カ月後にかけて移植した鰓蓋片の皮膚が赤変する場合が多く, いずれの例でも移植組織の崩壊が認められた. 移植1カ月半後にはホストの皮膚が移植部位を覆い, 移植片がホストの組織中に埋没して外部より観察されなくなるとともに, 移植した鰓蓋片の鰓蓋骨は硬度を失い, 柔弱となった.

このような観察をもとに, 各実験における移植の成立の成否をTable 31 に示した. 結果はきわめて明瞭であった. すなわち, いずれの移植例でも, 自己の鰓蓋片は拒絶反応が起こることなく生着した. 各クローン作出群内の個体間の移植例でも, 拒絶反応はまったく起きず, すべての鰓蓋片が生着した. しかし, 異なるクローン作出群間での移植では, 鰓蓋片が生着した例はなく, 拒絶反応によって移植片が受入れられなかったことは明らかであった. また, 対照の第2極体放出阻止型雌性発生2倍体および通常ヒラメでは, 群内の個体間で移植した鰓蓋片はすべて拒絶された.

このような結果から, 調査したすべてのクローン作出群内で, 各個体はまったく等しい組織適合性遺伝子を持ち, これらは遺伝的に同質のクローン集団であることが示唆された.

Table 31. Number of graft-tissues accepted and rejected in the tissue grafting experiment.

Host	Donor	Number of donor/host	Number of accepted	Number of rejected
48 HOMCL(G2 ♀1)	self ¹⁾	19/19	19	0
	intra - clone ²⁾	5/19	19	0
	53 HETCL(♀5 • ♂1)	4/19	0	19
49 HOMCL(G2 ♀2)	self	20/20	20	0
	intra - clone	5/20	20	0
	53 HETCL(♀5 • ♂1)	4/20	0	20
50 HOMCL(G2 ♀3)	self	20/20	20	0
	intra - clone	5/20	20	0
	53 HETCL(♀5 • ♂1)	4/20	0	20
51 HOMCL(G2 ♀4)	self	19/19	19	0
	intra - clone	5/19	19	0
	53 HETCL(♀5 • ♂1)	4/19	0	19
52 HOMCL(G2 ♀5)	self	5/5	5	0
	intra - clone	2/5	5	0
	53 HETCL(♀5 • ♂1)	1/5	0	5
53 HETCL(♀5 • ♂1)	self	30/30	30	0
	intra - clone	8/30	30	0
	51 HOMCL(G2 ♀4)	6/30	0	30
61 HOMCL(G2 ♀8)	self	20/20	20	0
	intra - clone	5/20	20	0
	62 HOMCL(G2 ♀9)	4/20	0	20
62 HOMCL(G2 ♀9)	self	20/20	20	0
	intra - clone	5/20	20	0
	61 HOMCL(G2 ♀8)	4/20	0	20
38 G1(F ₁ (G1 ♂2) ♀1)	self	10/10	10	0
	intra - group	2/10	0	10
Normal diploids ³⁾	self	20/20	20	0
	intra - group	5/20	0	20

1 : Self tissue was grafted. 2 : Tissue of intra - clonal sibling was grafted.
 3 : Normal diploids from the cultured stock.

3) DNAフィンガープリントによるクローン集団作出の証明

Jeffreys *et al.* (1985) によって開発されたDNAフィンガープリント法は、魚類のクローン解析や遺伝的均一性の検討に有効であることが報告されている (Han *et al.*, 1992). そこで、ヘテロ型クローンである 53 HETCL(♀5・♂1) の4個体と、通常ヒラメの5個体についてDNAフィンガープリントを作製し、それぞれの比較を行った (原ら, 1993).

PI XII-50 にクローンと通常ヒラメのDNAフィンガープリントを示した。クローンでは、分析した4個体すべてで2.3 Kb より長いDNAバンドが20本認められた。一方、通常ヒラメ5個体では、25本から28本と個体によってバンド数が異なっていた。さらに、通常ヒラメでは、どの個体間においても同一の電気泳動パターンが認められなかった。しかし、クローン4個体では、20本すべてのバンドの電気泳動の位置が同一で、まったく同じ泳動パターンを示した。このことは、クローン群ではDNAの塩基配列が個体間で非常に高い確率で等しいことを示している。ちなみに、Han *et al.* (1992) が報告しているDNAフィンガープリントの遺伝的類似度指数を求めた結果、通常種苗が0.11から0.24であったのに対し、クローン群は1.0であった。すなわち、通常種苗では個体間の遺伝的類似度が低く、一方、クローン群では個体間の遺伝的均質性が示された。

以上のことから、DNAフィンガープリント法は、個体間の遺伝的識別と同様、ヒラメのクローン集団作出の判定にも有効であることが確認され、作出群53 HETCL(♀5・♂1) がクローン集団であることが証明された。

3. クローン集団の増殖方法

一度作出したホモ型クローンを育種素材として活用するためには、その維持および増殖は重要な事柄である。そこで、ホモ型クローンの作出群である50 HOMCL(G2♀3) を材料に、その雌雄の個別の交配による次世代のクローン集団の作出を試みるとともに、自然産卵によるクローン卵の大量作出および得られた卵による次世代のクローン集団の作出を試み、クローン集団の経代増殖の可能性を検討した。

1) クローン集団内雌雄の交配による増殖

クローン世代の雌雄の成熟の正常性について調査し、クローン集団の維持および増殖の可能性を検討する目的で、クローン第2世代の作出を試みた。

作出群50 HOMCL(G2♀3) の通常の飼育群である50-1の雌2個体と、同じく17 α -メチルテストステロン(MTと略記)処理(1ppbの濃度での浸漬処理)で全雄に誘導した飼育群である50-MT1の雄1個体を満2歳時に個別に交配し、64 HOMCL(G2♀3) および65 HOMCL(G2♀3) の2群を作出した。両群を育成し、その成績を求めるとともに、鰓蓋片移植によるクローン集団であることの証明を試みた。

Table 32 に、作出群の卵発生成績と仔稚魚期の生残率を示した。また、Fig. 21 および Fig. 22 に飼育群の平均全長および全長の変動係数の推移について示した。

いずれの作出飼育群でも仔稚魚を順調に育成することができた。仔稚魚の生残率がやや低率であったが、着底後から日齢 90 以前の噛み合いによる斃死の多い時期を生残した若魚は以後安定した生育を示した。

作出群 64 HOMCL(G2♀3) および 65 HOMCL(G2♀3) それぞれ、群内の 20 個体について、鰓蓋片の移植実験を行なったところ、すべての例で個体間で移植した鰓蓋片は生着し、各作出群がクローン集団であることが確かめられた。さらに、両作出群間で、各 10 個体ずつについて鰓蓋片の移植を行なったところ、この移植も成立し、異なる雌親魚に由来する両群が単一のクローン集団を形成することが確かめられた。

以上のように、クローン世代の雌雄の成熟は正常であり、これらが産した次世代は順調に生育することが判明した。作出群はクローン集団であることが確かめられ、ホモ型クローンの経代に渡る維持および増殖が可能であることが確認された。

Table 32. Embryonic development and survival rate at larval and juvenile stages of cloned progenies produced by the intra-clonal mating of a female and a male.

No and code of group	Embryonic development				Survival rate		
	FLR ¹⁾	FER ²⁾	EDR ³⁾	NFR ⁴⁾	(days after hatching)		
					0~30 ⁵⁾	30~90	0~90 ⁵⁾
	%	%	%	%	%	%	%
64 HOMCL(G2♀3)	39.4	60.8	30.8	81.8	38.3	37.1	14.2
65 HOMCL(G2♀3)	69.1	72.4	52.6	89.6	42.8	20.3	8.7

1 : Floated eggs/total eggs 2 : Fertilized eggs/floated eggs. 3 : Embryo-developed eggs/floated eggs. 4 : Hatched normal fry/embryo-developed eggs. 5 : Survivals/embryo-developed eggs.

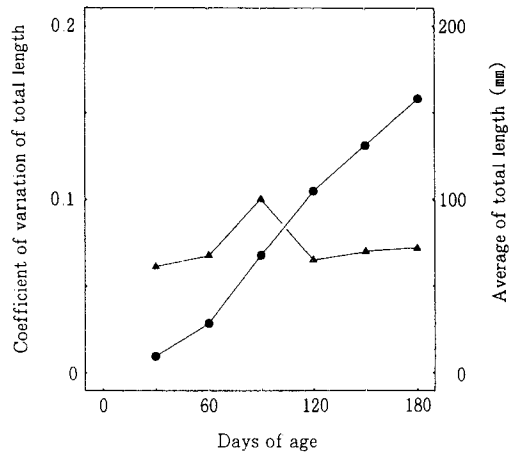


Fig.21. Growth curve (solid circle) with coefficients of variation (solid triangle) of total length in a rearing lot of cloned diploids (64-1).

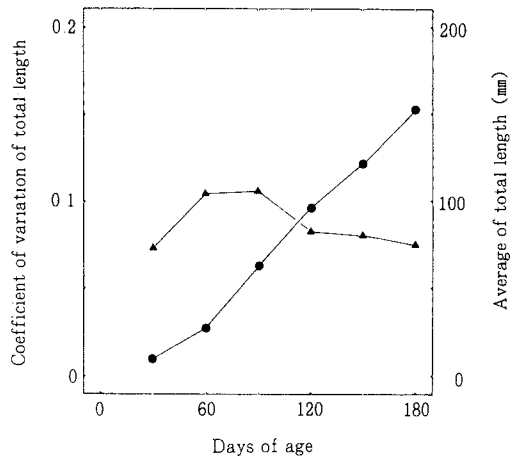


Fig.22. Growth curve (solid circle) with coefficients of variation (solid triangle) of total length in a rearing lot of cloned diploids (65-1).

2) 自然産卵によるクローン集団の増殖

クローン世代の雌雄の産卵行動の正常性について調査し、クローン卵の大量作出方法を検討する目的で自然産卵実験を行なうとともに、作出卵によるクローン第2世代の作出を試みた。

作出群 50 HOMCL(G2♀3) の通常の飼育群である 50-1 の雌 5 個体と、同じくMT処理で全雄に誘導した飼育群である 50-MT1 の雄 15 個体を組合せた産卵群 (G) を設定し、1992 年 12 月 1 日 (1 歳) から 1993 年 6 月 11 日 (2 歳) まで飼育した。産卵群の飼育開始および終了時の魚体サイズを Table 33 に示した。採卵を 3 月 20 日から 6 月 10 日まで行ない、産卵経過と卵の発生成績を記録した。

Table 33. Body size of parental hirame flounder at the beginning (1992 Dec.1) and end (1993 June 11) of the natural spawning experiment.

Spawning group	Parental cross	Sex	Number	TL or BW (Average ± SD)		
				Beginning	End	
G	HOMCL(G2♀)♂ × HOMCL(G2♀)♀	♂	15	TL (mm)	325 ± 11.4	332 ± 11.8
				BW (g)	402 ± 40.6	425 ± 42.5
		♀	5	TL	418 ± 14.3	438 ± 16.3
				BW	932 ± 111.2	1022 ± 120.0

Table 34. Totals and performance in embryonic development of hirame eggs, obtained throughout the spawning experiment.

Spawning group	Total number of eggs spawned	Number of eggs floated	Proportion ¹⁾ of eggs floated	Number of eggs with embryos developed	Proportion ²⁾ of eggs with embryos developed
G	6,046	1,297	21.5	173	13.4

1 : Floated eggs/spawned eggs 2 : Embryo-developed eggs/floated eggs.

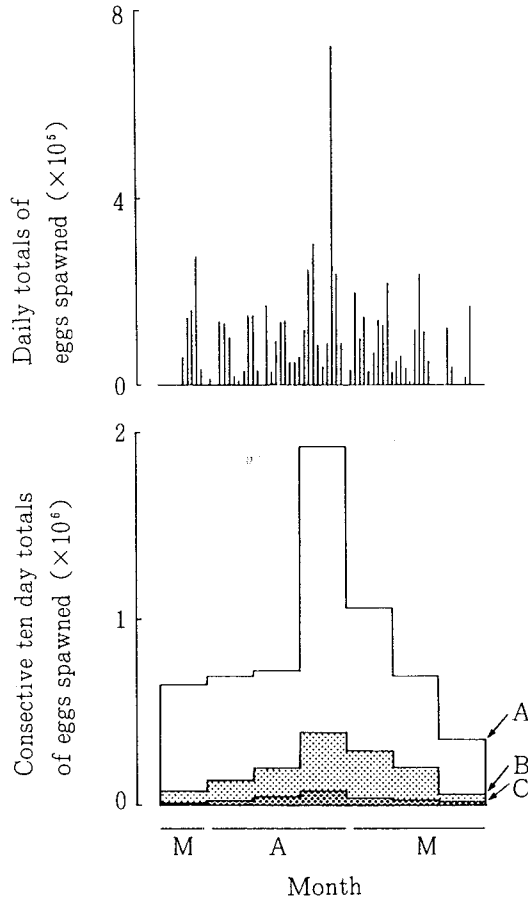


Fig.23 Daily (above) and consecutive ten day (below) totals of eggs spawned, the latter indicating embryonic development; in the spawning group of intra-clonal males and females (50 HOMCL(G2♀3)).
A, total eggs spawned; B, number of eggs floated; C, number of eggs with developed embryos.

産卵は、3月26日(水温12.6℃)から5月25日(17.1℃)までの期間に、54日に渡って確認された。産卵群の毎日の産卵数と10日ごとに集計した卵の発生成績をFig.23に示した。さらに、産卵期間を通じて得られた卵数およびその発生成績をTable34に示した。

産卵期の全般を通じて、卵の発生成績は必ずしも良好ではなかった。しかし、産卵がみられた54日のうちの43日で胚形成卵が得られ、雌雄による産卵行動が行なわれていることが確認された。合計17万粒以上の胚形成卵が得られ、自然産卵によるクローン卵の大量作出の可能性が示された。

4月27日に得られたふ化前日の胚形成卵を用いて作出群63HOMCLSP(G2♀3)を設定した。その育成成績をTable35に示すとともに、飼育群の平均全長と全長の変動係数の推移をFig.24に示した。

仔稚魚の生育はおおむね良好であり、多数の若魚が得られた。群内の20個体について鰓蓋片

Table 35. Survival rate at embryonic, larval and juvenile stages of cloned progeny, produced by the natural spawning of females and males in a homo-clone (50 HOMCL(G2 ♀3)).

No. and code of group	Proportion ¹⁾ of eggs with embryos developed	Survival rate		
		(days after hatching)		
		0~35 ²⁾	35~90	0~90 ²⁾
	%	%	%	%
63 HOMCLSP(G2 ♀3)	34.2	34.9	19.3	6.7

1 : Embryo-developed eggs/floated eggs. 2 : Survivals/embryo-developed eggs.

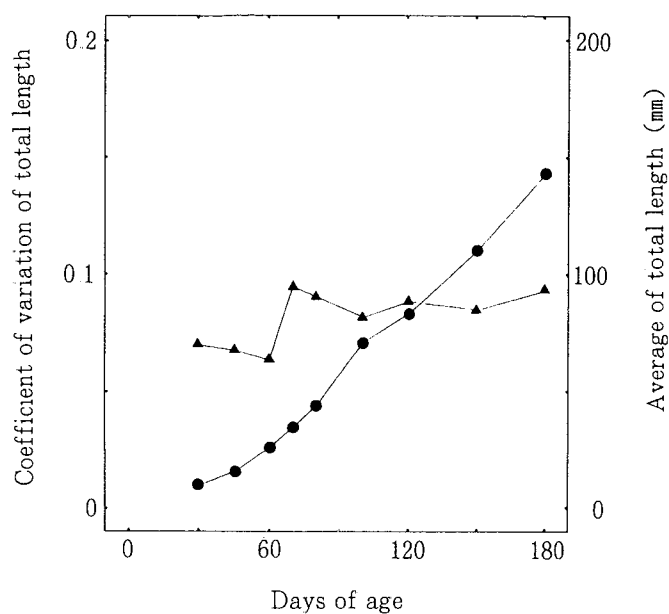


Fig.24. Growth curve (solid circle) with coefficients of variation (solid triangle) of total length in a rearing lot of cloned diploids (63-1).

の移植実験を行なったところ、すべての例で個体間で移植した鰓蓋片は生着し、作出群がクローン集団であることが確かめられた。

このように、クローン世代の雌雄の自然産卵によって次世代のクローン集団が作出されることが確認された。この方法によって、クローン卵が大量作出される可能性が示された。

4. ホモ型クローンとヘテロ型クローンの比較

異なるホモ型クローン間の雑種であるヘテロ型クローンは、ヘテロ遺伝子座を多数保有するために、完全同型接合体であるホモ型クローンより強健であることが予想される。それゆえ、クローン集団の養殖利用にあたっては、ヘテロ型クローンがより適しているものと考えられる。そこで、仔稚魚期から1歳魚について、ホモ型クローンとヘテロ型クローンの成長および生残特性の比較を行なった。

1) 変態期前後の仔稚魚期の成長と生残の比較

ホモ型クローンとヘテロ型クローンの変態期前後の仔稚魚期の成長と生残を比較する目的で、日齢 10 から 50 の期間の飼育実験を行なった。

材料には、共通の第1卵割阻止型雌性発生2倍体の雌親魚(G2♀2)に由来する姉妹群であるホモ型クローンの作出群 56 HOMCL(G2♀2)とヘテロ型クローンの作出群 57 HETCL(♀2・♀1)を用いた。作出にあたっては、作出群 49 HOMCL(G2♀2)および 48 HOMCL(G2♀1)のそれぞれMT処理で全雄に誘導した飼育群である 49-MT1および 48-MT1の雄各1個体ずつを雌親魚と個別に交配した。作出群の卵発生成績と初期仔魚の生残率を Table 36 に示した。

日齢 10 に、ホモ型クローン(全長:4.0±0.15 mm)とヘテロ型クローン(全長:4.0±0.14

Table 36. Embryonic development and survival rate of early larval stage of homo- and hetero-cloned progenies, produced by intra-clonal and inter-clonal matings.

No. and code of group	Embryonic development				Survival rate (days after hatching) 0~10 ⁵)
	FLR ¹⁾	FER ²⁾	EDR ³⁾	NFR ⁴⁾	
56 HOMCL(G2♀2)	% 97.3	% 96.4	% 81.7	% 81.4	% 71.9
57 HETCL(♀2・♀1)	95.1	96.7	84.5	82.4	77.1

1: Floated eggs/total eggs. 2: Fertilized eggs/floated eggs 3: Embryo-developed eggs/floated eggs. 4: Hatched normal fry /embryo-developed eggs. 5: Survivals/embryo-developed eggs.

mm) について、それぞれ単独飼育群と混合飼育群を設定した。単独飼育群では、ホモ型クローンおよびヘテロ型クローンとも、30ℓ円形水槽に仔魚を150個体ずつ収容した飼育群をいずれも2群(56-1, 56-2, 57-1, 57-2)設定した。混合飼育群では、30ℓ円形水槽にホモ型クローンおよびヘテロ型クローンの仔魚を75個体ずつ、計150個体を混ぜて収容した飼育群を3群(56・57-1, 56・57-2, 56・57-3)設定した。なお、混合飼育群では、各個体がホモ型クローンまたはヘテロ型クローンのいずれに属するのかの判別にIHD遺伝子型をマーカーとして利用した。すなわち、49 HOMCL(G2♀2)および48 HOMCL(G2♀1)のIDH遺伝子型はそれぞれBB型およびAA型であり、ホモ型クローン(56 HOMCL(G2♀2))はBB型、ヘテロ型クローン(57 HETCL(♀2・♀1))はAB型となり、各個体のIHD遺伝子型によって、その帰属を知ることができる。日齢50に、単独飼育群では計数と全個体の全長の計測を行なう一方、混合飼育群では全個体を凍結保存した。後者では、全個体について、計測を行なうとともに、肝臓を摘出してアイソザイム分析用試料とし、IDHアイソザイム型を調べて各個体の帰属を明らかにした。

Table 37に各飼育群の日齢50における生残と全長について示した。混合飼育群においては、ホモ型クローンとヘテロ型クローンの結果を分けて示した。

ホモ型クローン単独飼育群では、飼育実験期間である日齢10から50の生残率が低く、56-1で10.7%であり、56-2では日齢35に生残魚が0となった。56-1の日齢50の平均全長は14.2mmであった。

ヘテロ型クローン単独飼育群では、生残率は57-1, 57-2それぞれ46.7%, 62.7%であり、高率であった。平均全長も2群それぞれ22.5mmおよび21.2mmであり、ホモ型クローン単独飼育群を大きく上回った。

混合飼育群では、ホモ型クローンで生残率および平均全長がそれぞれ1.3%~8.0%および12.8mm~17.5mm、ヘテロ型クローンで同じく48.0%~69.3%および18.6mm~22.5mmであり、ヘテロ型クローンがホモ型クローンを生残率および平均全長とも一様に大きく上回った。

なお、ヘテロ型クローン(57 HETCL(♀2・♀1))では、群内の20個体について鰓蓋片の移植実験を行なったところ、すべての例で個体間で移植した鰓蓋片は生着し、作出群がクローンであることが確かめられた。

このように、単独飼育群および混合飼育群のいずれでも、ホモ型クローンとヘテロ型クローンの生残および成長において相違が著しかった。このことは、完全同型接合体であるホモ型クローンの弱勢を示すとともに、仔稚魚段階におけるヘテロ型クローンの強健性を明示している。

Table 37. Survivals and total length in 50th day after hatching, when the rearing experiment of homo-clone and hetero-clone was ended

Rearing lot	Group	Number of survivals	Survival rate	TL in 50th day after hatching		
				Average \pm SD		Range
56-1	HOMCL	16	10.7	14.2 \pm 2.32		11.0 ~ 19.0
56-2	HOMCL	0	0	— —		—
56・57-1	HOMCL	1	1.3	15.5 \pm 0		15.5
	HETCL	36	48.0	22.5 \pm 2.29		15.8 ~ 26.5
56・57-2	HOMCL	6	8.0	12.8 \pm 0.51		12.1 ~ 13.5
	HETCL	46	61.3	18.6 \pm 3.07		12.0 ~ 24.3
56・57-3	HOMCL	5	6.7	17.5 \pm 2.35		14.5 ~ 20.8
	HETCL	52	69.3	20.4 \pm 2.74		14.0 ~ 24.0
57-1	HETCL	70	46.7	22.5 \pm 1.82		16.0 ~ 24.0
57-2	HETCL	94	62.7	21.2	2.84	13.0 ~ 27.0

2) 作出から生後半年間の成長と生残の比較

ホモ型クローンとヘテロ型クローンの作出時から仔稚魚期の成長と生残を比較する目的で、生後半年間の飼育実験を行なった。

材料にはクローン第2世代を用いた。すなわち、作出群 50 HOMCL(G2♀3)の通常の飼育群である 50-1の雌1個体を雌親魚として、ホモ型クローン1群とヘテロ型クローン2群を作出した。この作出では、作出群 50 HOMCL(G2♀3)、48 HOMCL(G2♀1)、および 49 HOMCL(G2♀2)のそれぞれ同じくMT処理で全雄に誘導した飼育群である 50-MT1、48-MT1、および 49-MT1の雄各1個体ずつを満2歳時に個別に交配し、作出群 65 HOMCL(G2♀3)、66 HETCL(♀3・♀1)、および 67 HETCL(♀3・♀2)の計3群を作出した。これらを同条件で分離飼育し、成長と生残特性を比較した。なお、いずれの作出群においても当初飼育群を2群ずつ設定したが、ホモ型クローンでは初期の生残率の低さのために日齢20に飼育群を1群のみに再設定した。

各作出群の卵の発生成績および各飼育群の生残率を Table 38 に示した。また、生後半年間の30日ごとの全長の平均値、標準偏差、および変動係数を Table 39 に示した。

卵の発生成績には、ホモ型クローンとヘテロ型クローンで顕著な差異は認められなかった。しかし、成長および生残については、群による差が大きかった。成長において、ヘテロ型クローンはホモ型クローンを大きく上回った。日齢30時点で、すでにホモ型クローンは全長の平均値でいずれのヘテロ型クローンの飼育群より劣り、差は有意であった ($p < 0.001$)。以後、全

Table 38. Embryonic development and survival rate at larval and juvenile stages of homo- and hetero-cloned progenies, produced by the intra-clonal and the inter-clonal matings.

No and code of group	Embryonic development				Code no. of rearing lot	Survival rate		
	F ₁ L ¹⁾ %	F ₂ R ²⁾ %	E ₃ D ₃ R ³⁾ %	N ₄ F ₄ R ⁴⁾ %		(days after hatching) 0~30 ⁵⁾ %	30~90 %	0~90 ⁵⁾ %
65 HOMCL(G2 ♀3)	69.1	72.4	52.6	89.6	65-1	42.8	20.3	8.7
66 HETCL(♀3 • ♂1)	67.7	68.2	47.6	91.8	66-1	69.8	56.6	39.4
					66-2	75.5	48.7	36.8
67 HETCL(♂3 • ♀2)	64.5	72.2	50.0	95.0	67-1	93.0	67.4	62.7
					67-2	86.0	68.6	59.0

1 : Floated eggs/total eggs. 2 : Fertilized eggs/floated eggs. 3 : Embryo-developed eggs/ floated eggs.
4 : Hatched normal fry/embryo-developed eggs. 5 : Survivals/embryo-developed eggs.

Table 39. Total length measurements in mm (average, standard deviation and coefficient of variation with sample size in parenthesis) of rearing lots of homo-cloned and hetero-cloned progenies.

Code no. of rearing lot	Age (days after hatching)					
	30	60	90	120	150	180
65-1	10.0±0.74(64) 0.074	27.2±2.85(50) 0.105	63.1±6.65(47) 0.105	96.6±7.97(42) 0.083	121.7±9.74(40) 0.080	152.4±11.46(36) 0.075
66-1	11.1±0.46(56) 0.042	32.5±2.25(50) 0.069	72.5±4.25(50) 0.059	107.9±7.75(50) 0.072	151.0±7.69(50) 0.051	179.5±12.10(60) 0.067
66-2	11.4±0.50(57) 0.044	32.9±1.79(50) 0.055	70.6±5.48(50) 0.078	107.0±6.90(50) 0.064	151.1±7.14(50) 0.047	178.1±12.22(50) 0.069
67-1	10.9±0.53(58) 0.049	33.0±1.54(50) 0.047	70.7±5.39(50) 0.076	106.2±7.46(50) 0.070	148.1±8.44(50) 0.057	182.8±11.33(70) 0.062
67-2	11.2±0.44(54) 0.039	31.4±2.03(50) 0.065	72.1±5.33(50) 0.074	107.4±6.39(50) 0.060	150.2±6.88(50) 0.046	184.6±9.95(70) 0.054

長の平均値の差は拡大した。また、ホモ型クローンでは、全長の変動係数がヘテロ型クローンより大きな値で推移し、これはホモ型クローンが成長の遅れた小型個体を含むことに起因するようであった。ヘテロ型クローンは成長がより速やかであり、全長の変異幅も比較的小さく推移した。生残においても、ホモ型クローンはヘテロ型クローンの各飼育群より顕著に劣った。これは、仔魚期においても、稚魚期においても、同様であった。二つのヘテロ型クローンはやや相違した生残率を示したものの、それぞれクローン内の二つの飼育群では類似した生残状況を示した。仔稚魚期の減耗はとくに小型個体の斃死に起因するものが多く、ホモ型クローンでの高い斃死率は群内の成長のばらつきに関連するものようであった。

なお、各作出群について、それぞれ群内の 20 個体による鰓蓋片の移植実験を行ない、クローン集団作出の確認を行なった。その結果、群内個体間での移植はすべて成立し、各群がそれぞれクローン集団を形成することが確かめられた。

このように、この飼育実験においても、ホモ型クローンとヘテロ型クローンの相違が著しく、成長および生残ともヘテロ型クローンがホモ型クローンを上回る成績を示した。このことは、完全同型接合体であるホモ型クローンの弱勢を示すとともに、仔稚魚段階におけるヘテロ型クローンの強健性を明示している。

3) 0 歳および 1 歳魚の生残状況の比較

ホモ型クローンとヘテロ型クローンの 0 歳および 1 歳魚の生残状況を比較する目的で、ホモ型クローン 2 群 (50 HOMCL(G2♀3), 51 HOMCL(G2♀4)) のそれぞれ 50 個体と、ヘテロ型クローン 1 群 (53 HETCL(♀5・♂1)) の 60 個体をラテックス色素による標識で区別し、生後半年 (1991 年 10 月 29 日) から 1 年間、同一の 5 t 水槽で混合飼育した。飼育期間中に、2 または 3 カ月毎の計数と斃死魚数の調査によって、各群の生残魚数を確認した。

クローン 3 群の飼育期間における生残率の推移を Fig. 25 に示した。

日齢 300 (2 月下旬) まではすべてのクローン群とも全数が生存した。しかし、ホモ型クローンの 1 群 (50 HOMCL(G2♀3)) では、日齢 340 (4 月上旬) 頃より斃死が多くみられ、日齢 420 (6 月下旬) では生残率が 54.0 % まで低下した。他の 1 群 (51 HOMCL(G2♀4)) でも、同時期に斃死が生じ、日齢 420 (6 月下旬) で生残率が 86.0 % まで低下した。しかし、ヘテロ型クローン (53 HETCL(♀5・♂1)) では、斃死はまったく生じなかった。

斃死魚および斃死時期の生魚には繊毛虫トリコジナの寄生 (江草, 1983) が認められた。多くの斃死魚には、鰓および体表へのトリコジナの著しい寄生が認められるものの、それほど重度の病変は観察されず、体表の白濁と鰭のスレが主なものであった。しかし、中には腹水状態を示す個体もあり、他の疾病との合併症状であることも疑われた。4 月下旬より駆虫処理 (過酸化水素水 200 ppm, 酢酸 50 ppm, 1 時間浸漬) を繰り返し、6 月には斃死数を低下させることができた。

このように、トリコジナの寄生に対して、ホモ型クローンとヘテロ型クローンで異なる反応がみられた。前者がトリコジナ症に対して応答性が高く、1 群では約半数が斃死した。しかし、

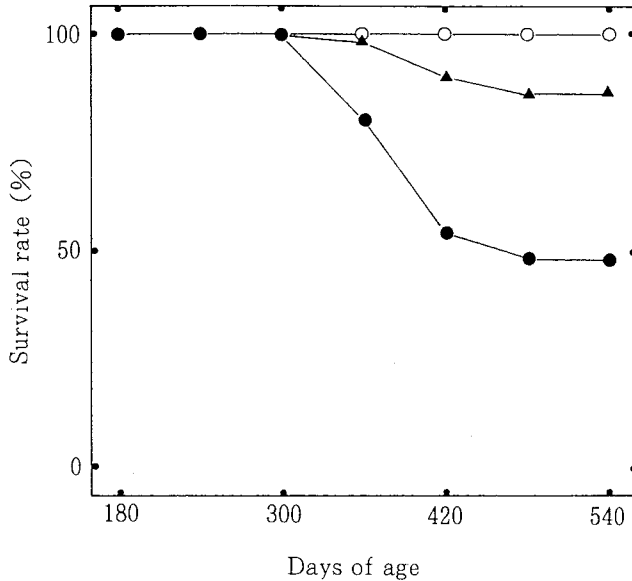


Fig.25. Survival curves of two homo-cloned groups (solid circle, 50 HOMCL (G2 ♀3); solid triangle, 51 HOMCL(G2 ♀4)) and a hetero-cloned group (open circle, 53 HETCL(G2 ♀5)) during the period of rearing experiment

後者では、斃死はまったくみられず、トリコジナ症にたいして耐性が高かった。トリコジナ症自体はそれほど大きな斃死要因となる疾病ではないので、ホモ型クローンにみられた高い割合での斃死は、遺伝子のホモ化に起因するホモ型クローンの弱さを示唆しているものと考えられる。一方、ヘテロ型クローンは、十分に強健であり、ホモ型クローンに対する優越性が示された。

5. 考 察

本研究ではヒラメのホモ型クローンの作出に雌性発生を応用した。すなわち、第1段階として第1卵割阻止型雌性発生2倍体の誘起によって完全同型接合体を作出した。第2段階として、完全同型接合体を親魚に次世代の第2極体放出阻止型雌性発生2倍体を作成することによってクローン集団を得た。このような手法は他魚種において採用されたクローン集団の作出方法と同様なものである (Streisinger *et al.*, 1981; Naruse *et al.*, 1985; 小野里, 1990; Han *et al.*, 1991; Komen *et al.*, 1991; 小林, 1992)。

雌性発生を利用したクローン集団作出において最も重要な点は、第1卵割阻止型雌性発生2倍体の誘導による完全同型接合体の作出である。第1卵割阻止型雌性発生2倍体は、雌性発生半数体の第1卵割で複製された染色体の分離を阻止して作出されるので、完全同型接合体となる。しかし、第1卵割阻止型雌性発生2倍体の作出は難しく、その成功例が限られている (Streisinger *et al.*, 1981; Chourrout, 1984; Naruse *et al.*, 1985; 小野里, 1987; Taniguchi

et al., 1988; 田畑・五利江, 1988b; Komen *et al.*, 1991; 小林, 1992). 一方, もう一種類の雌性発生2倍体である第2極体放出阻止型雌性発生2倍体は, その誘導が容易であり, 多くの魚種で作出されている. しかし, 第2極体放出阻止型雌性発生2倍体では, それを何世代に渡って繰り返しても, 完全同型接合体を得ることはできない. すなわち, 第2極体放出阻止型雌性発生2倍体では, 第1成熟分裂時の交叉に由来する組み換え型がほぼ100%の頻度で出現する遺伝子座が, 実際に, ニジマス (Guyomard, 1984; Allendorf and Leary, 1984; Allendorf *et al.*, 1986), アユ (Taniguchi *et al.*, 1987), およびヒラメ (田畑・五利江, 1987a) で確認されており, ヘテロ接合型の遺伝子座が完全に排除されることがない. それゆえ, 第1卵割阻止型雌性発生2倍体の誘導は, 雌性発生を利用したクローン集団作出において必須のものである.

ヒラメの第1卵割阻止型雌性発生2倍体の作出例では, 第2極体放出阻止型雌性発生2倍体の場合に比較して, 奇形胚の増加と仔稚魚の生残率の低下が特徴的であった. それらの要因として, 卵割阻止処理そのものの発生への悪影響 (山崎・Goodier, 1993) と, 完全同型接合体における近交弱勢の影響をあげることができる. 後者については, 悪性劣性遺伝子や, 致死性遺伝子の顕在化も推定される. このことは, 第1卵割阻止型雌性発生2倍体の作出例における生残個体は, 致死性遺伝子やかなり悪性の遺伝子がすでに排除されていることを示唆している.

第1卵割阻止型雌性発生2倍体では, いくつかの形質において変異幅の拡大を認めることができた. とくに, 全長における変異幅の拡大は顕著であり, 全長の変動係数は, 第2極体放出阻止型雌性発生2倍体や通常ヒラメのそれを大幅に上回って推移した. これと同様の現象はアユにおいても報告されている (Taniguchi *et al.*, 1987, 1990). このことは, 親魚の内在する遺伝的多様性を反映し, 第1卵割阻止型雌性発生2倍体世代において遺伝的分離が生じ, 個体間の遺伝変異が拡大したことを示唆している. 従って, それぞれが完全同型接合体である第1卵割阻止型雌性発生2倍体世代は, 環境要因の影響は無視できないものの, 個体ごとに遺伝的素質がよく現れ, 育種素材としての選抜が効率的に行なえるものと期待される (谷口, 1989).

一方, 第2極体放出阻止型雌性発生2倍体と通常ヒラメでは, 全長の変動係数は近似した値で推移し, 上記した変異幅の増大を認めることはできなかった. このことは, 第2極体放出阻止型雌性発生2倍体世代において, 近交度の上昇が顕著ではなく, ヘテロ接合型の遺伝子座が多数保有されたことを示唆している.

ヒラメの第1卵割阻止型雌性発生2倍体の作出群は, 完全同型接合体のみからなり, 第2極体放出阻止型雌性発生2倍体個体を含まないことが, アイソザイムを遺伝的マーカーにして確認された. 雌性発生の誘導に際してはマダイの紫外線照射精液を使用しているため, 雄親の遺伝子が発現した雌性発生の失敗個体は生残しない. ところが, コイにおいては, 異種精液を用いて誘導した第1卵割阻止型雌性発生2倍体の作出群に高頻度で第2極体放出阻止型雌性発生2倍体個体が出現した例が報告され (谷口ら, 1990), これは第2極体の自発的放出阻止に起因するものと考えられている. 従って, ヒラメにおいては, 第2極体の自発的放出阻止の可能性が低いものと示唆されるが, これが皆無とは言いきれず, クローン世代の作出において, 親魚の第1卵割阻止型雌性発生2倍体であることの証明は重要なものである.

第1卵割阻止型雌性発生2倍体雌を親魚とするクローン世代の作出例においては、群の卵発生成績、すなわち、胚の形成率や正常ふ化率は、ばらつきが大きいものの、多くの例で親世代である第1卵割阻止型雌性発生2倍体世代より明らかに向上した。また、変態期以後の稚魚の生残状況が通常のヒラメの場合を大きく上回る例も認められた。このことは、第1卵割阻止型雌性発生2倍体の生残個体において悪性遺伝子の排除がある程度実現し、クローン世代において遺伝的素性の改善が現れたことを示唆している。しかし、卵が得られてもクローン世代の作出に成功しなかった例もあり、クローン世代の作出にあたっては、親魚の吟味が重要であると考えられる。

クローン世代では種々の形質において変異幅の縮小が認められ、第1卵割阻止型雌性発生2倍体世代と対称的であった。とくに、体各部のプロポーションと体側の斑紋パターンで、クローン集団内の個体間の特徴がきわめて良く一致した。一方、クローン集団間の相違は著しかった。このことは、クローン集団内での遺伝的均質性ととも、クローン集団間での遺伝的独立性を示唆している。成長度を示す全長の変異幅についても、多くの場合、親世代である第1卵割阻止型雌性発生2倍体の場合より明らかに縮小した。しかし、通常のヒラメの場合より著しく小さくなるという程ではなく、反対に、変異幅が拡大した例も存在した。このことは、クローン群の遺伝的変異の消失に一致しないようにもみえるが、その要因として、近交の影響、卵質のバラツキ、さらにこれらと、ヒラメの成育の過程には変態期が存在し、浮遊仔魚から着底稚魚への形態的および生態的な大きな変換を経ることとの関連が推察される。

雌性発生によるクローン世代の作出には、親魚が完全同型接合体であるので、第1卵割阻止型雌性発生2倍体の誘導を必要とせず、第2極体放出阻止型雌性発生2倍体の誘導で実現することができる。本研究では、雌性発生に際してマダイの紫外線照射精液を使用しているため、ホモ型クローン作出の成否は親魚が正しく完全同型接合体であるか否かにかかっている。ヘテロ型クローンの作出の場合も同様である。しかし、ホモ接合体の親魚を用いた場合のように、第1卵割阻止型雌性発生2倍体の作出の証明にアイソザイムを遺伝的マーカーとして適用できないことも想定され、クローン世代の作出の証明手法の開発も重要な課題である。

組織移植実験においては、クローン群内ですべての移植が成立する一方、クローン群間での移植はいずれも成立しなかった。魚類においても、移植に関与する抗原は多様性に富んでおり、移植の成否は厳格な遺伝支配を受けていることが知られている(中西, 1986)。このことは、クローン群内の各個体はまったく等しい組織適合性遺伝子を持ち、遺伝的に均質な集団を形成する一方、クローン群間では組織適合性遺伝子に多くの相違が存在することを示している。また、本実験においては、通常の第2極体放出阻止型雌性発生2倍体の個体間における移植も成立しなかった。中西(1989)は、キンギョ、ホンモロコおよびニジマスを材料に、第2極体放出阻止型雌性発生2倍体の初代および第2世代目について、姉妹間で移植片の拒絶の遅れが認められたり、中には拒絶の確認されない例が出現するものの、完全な組織適合性の群は得られなかったことをみている。従って、本研究で実施した組織移植による判定は、クローン集団の作出を証明する手法として適切であるものと考えられる。

近年、法医学分野で、DNAフィンガープリント法の個人識別への利用が盛んになっている

(山内ら, 1989). これは, 家畜や果樹を対象とした手法としても用いられ (万年, 1991; 寺本, 1992), 魚類への応用も進められている (Harris *et al.*, 1991; Han *et al.* 1992). ヒラメのクローン集団についてDNAフィンガープリント法を適用したところ, クローン集団内でバンドパターンがまったく一致し, 個体間の遺伝的均質性が示された. 一方, 対照の通常ヒラメでは, 個体によって異なるバンドパターンがみられた. 従って, DNAフィンガープリント法は, クローン集団作出の信頼度の高い証明手法であると考えられる.

クローン世代の雌から採卵し, MT処理で雄に誘導した同一クローン集団の雄と通常の交配をすることによって, クローン第2世代を作出することができた. このことから, ヒラメにおいても, 一度作出したホモ型クローンの継代にわたる維持および増殖が可能であることが確かめられた. ゼブラフィッシュ (Streisinger *et al.*, 1981) およびメダカ (Naruse *et al.*, 1985) のクローン集団の作出例においても, MT処理で性転換された雄を雌と交配し, クローン集団の増殖が実現している. ヒラメの場合は, ゼブラフィッシュの場合と同様, クローン集団の通常の飼育群内にも雌雄の両方が出現し, MT処理による雄への誘導を必ずしも要さずに性転換雄が得られ, クローン集団の増殖が可能である. また, クローン世代における雌雄の成熟が正常に行なわれることは, ホモ型クローン間の交雑によって, ヘテロ型クローンが容易に作出されることを意味している.

さらに, クローン世代の雌雄による産卵群から正常な胚形成卵が得られ, 水槽内での自然産卵によってクローン卵が大量に作出される可能性が示された. 自然産卵実験では, 得られた卵の発生成績は必ずしも良好ではなかったが, これは親魚が低年齢であったことに起因する可能性が高い. すなわち, 実験期間に親魚は満2歳に達したにすぎず, 雌親魚は初回成熟であり, 一方, 雄親魚はかなり小型であった. それゆえ, より大型の高齢魚での再実験が必要であり, これは今後の課題である.

このように, ホモ型クローンが作出され, その継代にわたる維持および増殖が可能であることが確認された. しかし, ホモ型クローンは, 完全同型接合体による群であり, 優良形質が固定された群であっても, 近交弱勢による生存能力等の劣性のある程度排除し得ない可能性が考えられる. それゆえ, ホモ型クローンの養殖への直接利用には疑問が残る.

一方, 異なるホモ型クローン間の雑種であるヘテロ型クローンは, ヘテロ接合体の遺伝子座を多数保有するために, 雑種強勢が生じ, より強健であるものと考えられる. このことは, ホモ型クローンとヘテロ型クローンの特性の比較実験を通じて, 仔稚魚期から1歳魚について, 成長度, 生残性, および耐病性において, ヘテロ型クローンが実際にホモ型クローンより大きく上回る成績を示したことで, 十分に確かめられた. すなわち, ヘテロ型クローンは養殖実用性に著しく勝ることが判明した. しかし, クローン集団の維持はホモ型クローンのみで可能であり, ヘテロ型クローンはホモ型クローン間の交雑によって1世代限りで作出される. それゆえ, ホモ型クローンは家系の保存, 一方, ヘテロ型クローンは実際の養殖用種苗としての役割をそれぞれ担うことになる.

以上のような研究成果から, ヒラメのクローンを利用した育種技術の方法論としての可能性はほぼ実証されたものと思われる. クローンの育種利用を効率的に進めるためには, 次の手順

が有効であろう (山本, 1992b).

①有用形質 (成長度, 高水温耐性, 耐病性など) を備えた親魚の選抜. ②次世代の完全同型接合体の作出と育成. ③完全同型接合体の形質評価と選抜による有用形質の固定. ④選抜した完全同型接合体のホモ型クローン系の確立と雌雄の作出. ⑤種々のホモ型クローン系の組合せの交配によるヘテロ型クローンの作出. ⑥作出したヘテロ型クローンの評価による好適な交配の組合せの検索. ⑦優秀なヘテロ型クローン魚の養殖用種苗としての利用. ⑧優秀なヘテロ型クローン魚を親魚とした②~⑥の繰り返しによるさらに多数の有用形質を備えた傑出したクローン魚の作出.

これらの実行は今後の課題であるが, これによって, ヒラメの品種改良に要する時間が著しく短縮されることが期待される. ヒラメの養殖用の優良品種が作出され, その雌性化クローン種苗が養殖に利用され, ヒラメの養殖効率の飛躍的向上や, 養殖パターンの多様化が計られる可能性がある.

また, ヒラメのクローン集団は, 養殖対象としてばかりでなく, その遺伝的均質性ゆえに, 実験魚としてもきわめて有用であるものと考えられる. 淡水魚では, メダカなどの近交系やクローン集団が種々の実験の材料として利用されている (田口, 1981). しかし, 海産魚では, 未だそのような実例は存在しなかった. ヒラメのクローン集団は, ヒラメの生理的な諸事象そのものを扱う実験と同様, 飼料開発実験や魚病の薬剤投与実験などに用いた場合, 精度の高い結果を提供するものと期待される. さらに, 育種においても重要な意義を有する形質の評価に, クローン集団を利用することも考えられる. すなわち, クローン群を対照とした実験によって, 任意の形質について, 遺伝率の推定や環境要因の作用を明らかにすることが可能となろう. このことは, 上述のクローンの育種利用の過程においても, 貢献度が高いものと考えられる.