

# クニマスの性決定様式の解明－ I

## ～クニマスとヒメマスにおける *sdY* 遺伝子の検出～

岡崎 巧

2010年に西湖でクニマス *Oncorhynchus kawamurae* が再発見されたことを受け、当所では本種の域外保全と将来的な養殖対象種としての活用を図るため、養殖技術の確立に向けた研究を行ってきた<sup>1-5)</sup>。

本種が再発見された西湖では、本種とともに近縁種であるヒメマス *O. nerka* が同所的に生息しているが、マイクロサテライト遺伝子解析（以下、MS 遺伝子解析）により、両種の間には何らかの生殖隔離機構が存在するものと考えられている<sup>6)</sup>。一方、西湖と同時期（1935年）にクニマスが移植された本栖湖では、クニマスの生息は確認されていないが、MS 遺伝子解析により、クニマスとヒメマスとの雑種が生息することが知られている<sup>7)</sup>。また、筆者ら<sup>8)</sup>が人工授精により両種の正逆雑種を作出したところ、これら雑種 F<sub>1</sub> は正常な配偶子形成能を持ち、これらの配偶子を用いた雑種 F<sub>2</sub> の作出も可能であった。このように、両種間における天然水域での生殖隔離機構は未だ解明されていない点が多く、また、人為交雑では生殖能を持つ雑種が作出されるため、クニマスの将来的な養殖対象種としての活用にあたっては、ヒメマスとの交雑による遺伝的攪乱を防ぐ観点から、本種の不妊化技術を確立しておくことが必要である。

サケ科魚類の不妊化技術としては、全雌三倍体化によるものが広く用いられており、不妊化による成長や肉質の改善を目的とした三倍体魚が生産され養殖魚として活用されている<sup>9)</sup>。ここで全雌化が必要となるのは、三倍体雌の多くが不妊となる一方で、三倍体雄は精巣を発達させ、少量の異数体精子を作るためである<sup>9)</sup>。このため、雄ヘテロ型の性決定機構（XX 雌, XY 雄）を持つサケ科魚類では、完全な不妊三倍体作出のために、性転換雄（XX 雄）の作る X 精子を用いることで全雌三倍体（XXX 雌）が生産されている<sup>9)</sup>。また、サケ科魚類の多くが雄ヘテロ型の性決定様式を持つ一方で、クニマスの近縁種であるヒメマスでは、基本的に雄ヘテロ型の性決定様式を持つものの、ふ化開始直前から一定期間、高水温処理を施すことで、遺伝的雌を機能的雄に性転換できることが知られており<sup>10,11)</sup>、温度処理により作出した性転換雄（XX）を用いた全雌生産が可能となっている<sup>12)</sup>。ここで、クニマスの近縁種であるヒメマスがこの様な温度依存型性決定様式を持つことを踏まえると、今後、クニマスの全雌三倍体を生産するにあたっては、全雌化をより確実なものとするため、本種の性決定様式を明らかにしておくことが重要である。そこで、全雌三倍体生産に用いるクニマス親魚について、性の遺伝子型と表現型の整合について事前に明らかにするため、西湖産クニマス天然魚、山梨県水産技術センター忍野支所（以下、忍野支所）産クニマスを用い、多くのサケ科魚類の性（雄）決定遺伝子とされる *sdY* 遺伝子<sup>13)</sup>の検出を試みることにした。また、例年、雄に性比が偏る忍野支所産ヒメマスについても同様に検討したので併せて報告する。

なお、本研究は山梨県総合理工学研究機構の研究課題の一環として実施した。

## 材料及び方法

### 供試魚

2017年12月～2019年3月に採捕された西湖産クニマス天然魚雄15個体、雌12個体及び2017年12月に西湖産天然親魚からの人工授精により得た忍野支所産クニマスのうち、飼育中にへい死した1～2歳魚の雄32個体、雌32個体を用いた。また、2017年9～10月に継代親魚より作出した忍野支所産ヒメマス2歳魚の雄17個体、雌13個体を用いた（表1）。いずれの供試魚も開腹して生殖腺を目視あるいは実体生物顕微鏡下で観察して性別を記録し

Okazaki Takumi

た後、*sdY* 遺伝子検出用組織サンプルとして脂鰭を切除し 99.5%エタノールで固定した。なお、忍野支所産クニマスの作出にあたっては、人工授精後、吸水から発眼期（検卵時）まで 12.5°Cの井水で管理した後、以降、性比の偏りを防ぐため、浮上期まで冷却機を備えた水槽により 8°Cで管理し、餌付け開始以降、再び 12.5°Cの井水で飼育した。また、忍野支所産ヒメマスについては、人工授精後の吸水以降、全て 12.5°Cの井水で管理して飼育されたものであり、例年、親魚の性比は6~7割程度雄に偏ることがわかっている。

表1 *sdY* 遺伝子検出に用いた供試魚

供試魚	受精年月	ふ化及び飼育水温	年齢	供試尾数	備考
西湖産クニマス	不明 (2017.12-2019.3採捕)	不明	不明	♂15/♀12	採卵用親魚 (成熟個体)
忍野支所産クニマス	2017.12	吸水～発眼期: 12.5°C, 発眼期～浮上期: 8°C, 浮上期(餌付け開始)～12.5°C	1~2歳	♂32/♀32	へい死個体
忍野支所産ヒメマス	2017.9-10	吸水以降全て12.5°C	2歳	♂17/♀13	

### *sdY* 遺伝子の検出

*sdY* 遺伝子の検出には、*sdY* 遺伝子と陽性対照としての 18SrDNA を対象とし、サケ科魚類の種間共通塩基配列から設計されたプライマーによるマルチプレックス PCR 法<sup>14)</sup>を用いた。テンプレートに用いたゲノム DNA は、99.5%エタノール固定した脂鰭(約5~15mg)から GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) を用いて抽出した。プライマーの塩基配列と PCR 反応液組成及び反応条件を表 2,3 に示した。PCR 反応には Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems) を用いた。次に、得られた PCR 産物に 1/6 量の DNA 染色試薬を含むローディングバッファー (EZ-Vision<sup>®</sup> One, DNA Dye As Loading Buffer 6×, AMRESCO) を加え、2%アガロースゲル (AGAROSE 3:1 HRB™, AMRESCO) を用い、100V, 40 分間の条件で電気泳動した。この際の泳動バッファーには TAE を用いた。その後、泳動終了後のゲルをトランスイルミネーター上で観察しデジタルカメラで撮影した。

表2 プライマーの塩基配列

増幅遺伝子	プライマー塩基配列	増幅産物サイズ
<i>sdY</i>	sdY227U-F 5'-TTTCTTGCTCAGTGGAGTACTGCGAAGAG-3'	約227bp
	sdY227U-R 5'-CTTCCTCCCTAGAGCTTAAAACCACTCCAC-3'	
18SrDNA	18S514U-F 5'-GACTCTTTCGAGGCCCTGTAATTGG-3'	約514bp
	18S514U-R 5'-GACGGTATCTGATCGTCTTCGAACC-3'	

表3 PCR 反応条件

PCR反応液の組成	濃度	Vol.	終濃度
PCR Buffer for KOD FX Neo (TOYOBO)	2×	5uL	1×
dNTPs (TOYOBO)	各2mM	2uL	各0.4mM
Primer Mix*	1.25/3.75uM	1.2uL	0.15/0.45uM
SDW		0.6uL	
KOD FX Neo (TOYOBO)	1U/uL	0.2uL	0.2U/10uL
Template		1uL	
計		10uL	
PCR温度条件: 94°C・2分→98°C・10秒→68°C・30秒)×30→12°C・∞			

\*18S514U-F及び18S514U-Rを1.25μM, sdY227U-F及びsdY227U-Rを3.75μMの濃度でTEに溶解

## 結果

各供試魚の PCR 産物の泳動像を付図 1~3 に、*sdY* 遺伝子の検出結果を表 4 に示した。西湖産クニマスでは、分析に供した雄 15 個体の全てで *sdY* 遺伝子が検出された一方で、雌 12 個体中 4 個体で *sdY* 遺伝子が検出され (33.3%)、*sdY* 遺伝子がクニマスの性決定遺伝子であると仮定した場合、遺伝子型と性の表現型が一致しないもの (XY 雌) が出現した。

忍野支所産クニマスでは、分析に供した雄 32 個体中、*sdY* 遺伝子陰性のものが 1 個体検出された (3.1%)。また、雌では 32 個体中 4 個体の *sdY* 陽性個体が検出され (12.5%)、*sdY* 遺伝子がクニマスの性決定遺伝子であると仮定した場合、雌雄ともに性の遺伝子型と表現型が一致しないもの (XX 雄, XY 雌) が出現した。

忍野支所産ヒメマスでは、雌では分析に供した全ての個体が *sdY* 陰性であったのに対し、雄では *sdY* 陰性のものが 17 個体中 5 個体検出され (29.4%)、*sdY* 遺伝子がヒメマスの性決定遺伝子であると仮定した場合、雄で性の遺伝子型と表現型が一致しないもの (XX 雄) が出現した。

表 4 各供試魚における *sdY* 遺伝子検出結果

供試魚	<i>sdY</i> 陽性個体数	
	雄	雌
西湖産クニマス	15/15	4/12
忍野支所産クニマス	31/32	4/32
忍野支所産ヒメマス	12/17	0/13

## 考察

*sdY* 遺伝子は、サケ科魚類の多くの種 (サケ亜科 5 属 11 種, コレゴヌス亜科 1 種, カワヒメマス亜科 1 種) において雄の Y 染色体上に存在する性決定遺伝子と考えられているが<sup>13)</sup>、ヒメマス及びクニマスでは確認されていない。今回得られた結果において、*sdY* 遺伝子が他のサケ科魚類と同様、クニマス及びヒメマスの主たる性決定遺伝子であると仮定した場合、クニマスでは XY 雌及び XX 雄、ヒメマスでは XX 雄が検出され、性の遺伝子型と表現型が一致しないものが出現した。

東<sup>12)</sup>によると、ヒメマスでは性転換雄 (XX) を用いて作出した受精卵 (XX) に対し、通常 9°C で管理しているところ、孵化直前の発眼卵を 18°C で 1 週間管理することで 90% 以上の雄化率が得られ、14°C でも 46% の雄化率が得られるという。ここで 9~14°C での雄化率は検討されていないが、*sdY* 遺伝子がヒメマスの主たる性決定遺伝子であると仮定した場合、忍野支所の孵化水温 12.5°C では約 30% の XX 雄が出現していたことになる。このことは、例年、忍野支所における種苗生産用ヒメマス雄親魚の割合が概ね 60~70% であり、雄に性比が偏っていることともつじつまが合う。ただし、*sdY* 遺伝子がヒメマスの主たる性決定遺伝子であることを確認するためには、性の遺伝子型と表現型が一致し、性比が 1 : 1 となる水温環境下で孵化管理されたヒメマスを用いて *sdY* 遺伝子を検出し、雄の全てで *sdY* 遺伝子が検出され、雌で検出されないことを確認する必要がある。また、ヒメマスには性染色体が存在し、雌の染色体数  $2n=58$  に対し、雄では  $2n=57$  と 1 本少ないことが知られており<sup>15)</sup>、染色体数と *sdY* 遺伝子の検出状況との整合を確認することも *sdY* 遺伝子がヒメマスの主たる性決定遺伝子であることを確認する上で有効と考えられ、いずれも今後の検討課題としたい。

一方、今回、*sdY* 遺伝子の検出を試みたクニマスでは、*sdY* 遺伝子が本種の主たる性決定遺伝子であると仮定した場合、西湖産クニマスでは、XY 雌が 33% (4/12) 出現した。また、忍野支所産クニマスでは、XY 雌が 12.5% (4/32) 出現した他、XX 雄が 3.1% (1/32) 出現し、いずれも性の遺伝子型と表現型の一致しないものが確認さ

れた。このことは、ヒメマスで見られるような温度依存型性決定によるものとも考えられるが、ヒメマスでは遺伝的雌から雌への分化は確認されていない。また、今回供試した忍野支所産クニマスについては、作出の際、ヒメマスで見られる雄への性比の偏りを想定し、西湖におけるクニマス産卵場の礫地内水温が 5.6~9.1°Cであったこと<sup>3)</sup>を参考に、発眼期から浮上期まで 8°Cで管理したものであるが、XY 雌と XX 雄が同一群から出現しており、8°Cの温度条件下でどちらかの性に性比が偏ったとは考えにくい。こうしたことを踏まえると、クニマスにおいては、*sdY* 遺伝子が主たる性決定遺伝子ではないとの見方もできる。例えば、*sdY* 遺伝子の近傍に遺伝子重複によって生じた真の性決定遺伝子が存在し、変異を蓄積した上、減数分裂の際に、両遺伝子座の間で低頻度での組換えが起こっていたとすれば、今回クニマスで見られたような *sdY* 遺伝子の有無と表現型との不整合について説明できる。

本研究では、将来的にクニマス全雌三倍体を作成するにあたり、近縁種であるヒメマスが温度依存型性決定様式を持つことを踏まえ、クニマス親魚の性の遺伝子型と表現型の整合について事前に明らかにするため、*sdY* 遺伝子が他のサケ科魚類と同様、クニマス及びヒメマスの性決定遺伝子であると仮定して両種でその検出を試みた。特にクニマスにおいては、天然魚も含め、ヒメマスで知られている遺伝的雌から雄への温度依存型性決定様式では説明できない個体が出現するなど、今回得られた結果のみでは、*sdY* 遺伝子が本種の性決定遺伝子であると断定することは出来ず、性の表現型と遺伝子型の整合について明らかにするに至らなかった。*sdY* 遺伝子が本種の性決定遺伝子であるかを明らかにするためには、孵化水温と性比の関係についても併せて検討する必要がある。ヒメマスと併せ今後の課題としたい。

なお、現時点においては、*sdY* 遺伝子がクニマスの性決定遺伝子である可能性を否定できないため、本種的全雌三倍体作成にあたり使用する性転換雄及び雌親魚については *sdY* 遺伝子陰性の個体を用いることが必要である。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、静岡県水産技術研究所富士養鱒場の木南竜平氏には、*sdY* 遺伝子を検出するための PCR 法の手技についてご教示頂いた。また、東京海洋大学吉崎悟朗教授には、結果の考察にあたり有益な助言を頂いた。ここに記して厚く御礼申し上げます。

## 要 約

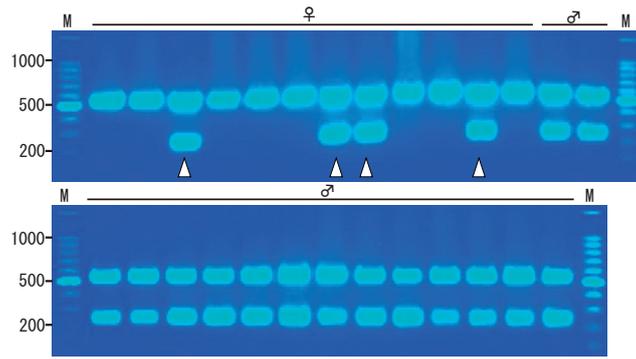
1. 将来的なクニマス全雌三倍体の作成にあたり、近縁種であるヒメマスが温度依存型性決定様式を持つことを踏まえ、クニマス親魚の性の遺伝子型と表現型の整合について事前に明らかにするため、*sdY* 遺伝子が他のサケ科魚類と同様、クニマスの主たる性決定遺伝子と仮定し、PCR 法によりその検出を試みた。また、例年、雄に性比が偏る当所産ヒメマスについても同様に検討した。
2. PCR の結果、西湖産クニマスでは全ての雄で *sdY* 陽性 (XY 雄) となり、性の遺伝子型と表現型が一致していた。一方、雌では *sdY* 陽性のもの (XY 雌) が 33.3% 検出され、性の表現型と遺伝子型が一致しないものが出現した。忍野支所産クニマスでは、西湖産のものと同様に *sdY* 陽性の雌 (XY 雌) が 12.5% 検出されたが、*sdY* 遺伝子陰性の個体 (XX 雄) も 3.1% 検出され、雌雄ともに性の表現型と遺伝子型が一致しないものが出現した。
3. 忍野支所産ヒメマスでは、全ての雌で *sdY* 陰性となり、性の遺伝子型と表現型が一致していた。一方、雄では *sdY* 陰性の個体 (XX 雄) が 29.4% 検出され、雄では性の表現型と遺伝子型が一致しないものが出現した。
4. 忍野支所産ヒメマスについては、忍野支所の孵化水温 (12.5°C) で遺伝的雌が雄に分化した可能性が示唆されたが、クニマスにおいては、ヒメマスで知られている遺伝的雌から雄 (XX 雄) への温度依存型性決定

様式では説明できない個体 (XY 雌) が出現するなど, 今回得られた結果のみでは, *sdY* 遺伝子が両種の性決定遺伝子であると断定することはできず, 性の表現型と遺伝子型の整合について明らかにするに至らなかった。

5. 現時点においては, *sdY* 遺伝子がクニマスの性決定遺伝子である可能性を否定できないため, 本種の全雌三倍体作出にあたり使用する偽雄及び雌親魚については *sdY* 遺伝子陰性の個体を用いることが必要である。

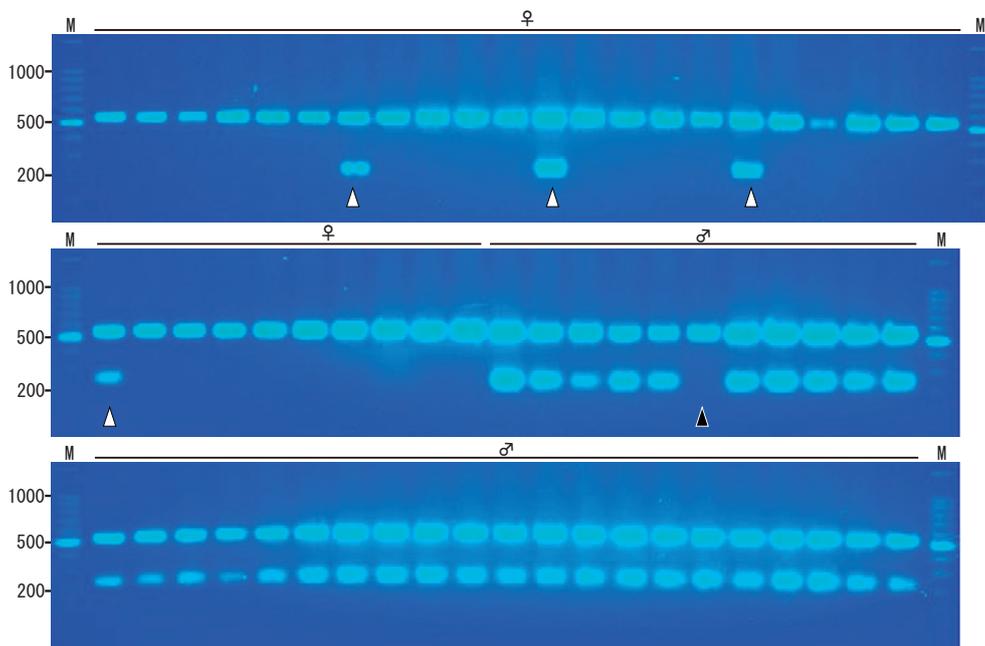
## 文 献

- 1) 青柳敏裕・加地奈々・長谷川裕弥 (2013) : クニマスの生態解明及び増養殖に関する研究. 山梨県総合理工学研究機構研究報告書, 8, 89-102.
- 2) 青柳敏裕・岡崎 巧・加地奈々・大浜秀規・長谷川裕弥・勘坂弘治・市田健介・吉崎悟朗 (2014) : クニマスの生態解明及び増養殖に関する研究 (第2報) . 山梨県総合理工学研究機構研究報告書, 9, 49-65.
- 3) 青柳敏裕・岡崎 巧・大浜秀規・三浦正之・谷沢弘将・小澤 諒・長谷川裕弥・吉澤一家・坪井潤一・勘坂弘治・市田健介・Lee Seungki・吉崎悟朗・松石 隆 (2015) : クニマスの生態解明及び増養殖に関する研究 (第3報) . 山梨県総合理工学研究機構研究報告書, 10, 43-65.
- 4) 岡崎 巧・平塚 匡・小澤 諒・加地奈々・三浦正之 (2019) : クニマス池産養成親魚 (3~6歳) の成熟と採卵—2015~2017年度の結果—. 山梨県水産技術センター事業報告書, 46, 60-67.
- 5) 岡崎 巧・平塚 匡・加地奈々・青柳敏裕・名倉 盾・加地弘一・大浜秀規 (2020) : 生物餌料給餌によるクニマス初期生残率の向上. 山梨県水産技術センター事業報告書, 47, 55-58.
- 6) Nakabo, T., Nakayama, K., Muto, N., Miyazawa, M., (2011) : *Oncorhynchus kawamurae* “Kunimasu,” a deepwater trout, discovered in Lake Saiko, 70 years after extinction in the original habitat, Lake Tazawa, Japan. *Ichthyol. Res.*, 58, 180-183.
- 7) Nakayama, K., Tohkairin, A., Yoshikawa A., Nakabo T. (2018) : Detection and morphological characteristics of “Kunimasu” (*Oncorhynchus kawamurae*) / “Himemasu” (*O. nerka*) hybrids in Lake Motosu, Yamanashi Prefecture, Japan. *Ichthyol. Res.*, 65, 270-275.
- 8) 岡崎 巧・平塚 匡・三浦 正之 (2019) : クニマス・ヒメマス正逆雑種F<sub>1</sub>の成熟と採卵. 山梨県水産技術センター事業報告書, 46, 68-74.
- 9) 荒井克俊・藤本貴史・山羽悦郎 (2017) : 染色体操作と育種「水産遺伝育種学」(中嶋正道・荒井克俊・岡本信明・谷口順彦 編). 東海大学出版会, 東京, 99-118.
- 10) Craig, J. K., Foote, C. J., Wood, C. C. (1996) : Evidence for temperature-dependent sex determination in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53, 141-147.
- 11) Azuma, T., Takeda, K., Doi, T., Muto, K., Akutsu, M., Sawada, M., Adachi, S. (2004) : The influence of temperature on sex determination in sockeye salmon *Oncorhynchus nerka*. *Aquaculture*, 234, 461-473.
- 12) 東 照雄 (2007) : 水温制御による安全かつ簡易なヒメマス全雌生産技術の開発. SALMON情報, 1, 12-13.
- 13) Yano, A., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Fostier, A., Guyomard, R., Guiguen, Y. (2013) : The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (*sdY*) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evol. Appl.*, 6, 486-496.
- 14) 木南竜平・松山 創・渡邊 清・植松久男 (2016) : さけます類の遺伝的雌雄を簡便に判別する手法の開発. 第40回全国養鱒技術協議会要録, 83-86.
- 15) 上田高嘉・小島吉雄 (1984) : ヒメマスの性染色体. 日本水産学会誌, 50(9), 1495-1498.



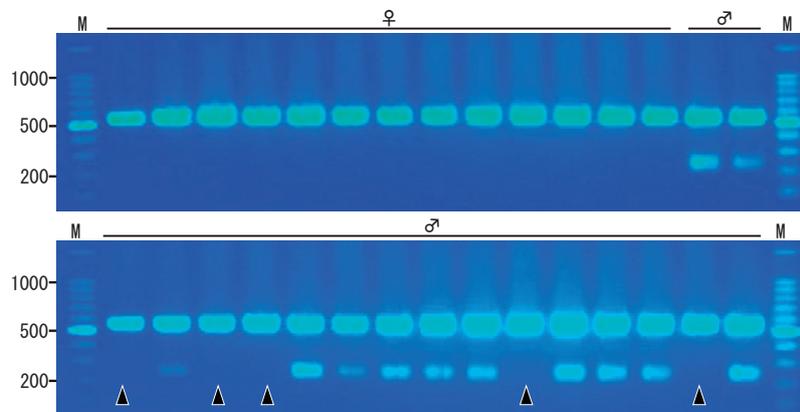
付図1 西湖産クニマスの *sdY* 遺伝子検出結果

M: 分子量マーカー, △: *sdY*陽性の雌 ※*sdY*陽性の場合2本のバンドが検出される。



付図2 忍野支所産クニマスの *sdY* 遺伝子検出結果

M: 分子量マーカー, △: *sdY*陽性の雌, ▲: *sdY*陰性の雄



付図3 忍野支所産ヒメマスの *sdY* 遺伝子検出結果

M: 分子量マーカー, ▲: *sdY*陰性の雄