

倍数性ギンブナ雌の雄性ホルモン による性の転換

野田正彦・田下 聡・福田達也・梶島孝雄

信州大学理学部生物学教室
(1984年3月21日 受理)

我が国に広く分布するギンブナ (*Carassius auratus langsdorffii*) の性比が、地域により著しく雌に傾くことは古くから指摘されて来た所である (SASAKI, 1926; KATO, 1932; KINOSHITA, 1933; EGASHIRA, 1935)。小林 (1967) は関東地方で採集したギンブナ雌に、リュウキン、ゲンゴロウブナ、コイ等の精子を人工的に媒精し、その稚魚が何れも雌親のギンブナと同一形態を示し、雌である事を確かめ、ギンブナが雌性発生により繁殖する可能性を示唆した。中村 (1969) はギンブナが或る地方では全く雄を生ぜず雌のみの unisexual type であるのに対して、別の地方では雌雄比がほぼ 1:1 の bisexual type である事を報告している。その後小林 (1970) は日本各地のギンブナの染色体数を研究し、関東系ギンブナ (unisexual type) は $3n=156$ 、又は $4n=206$ であるのに対して、宮崎産ギンブナ (bisexual type) は $2n=100$ である事を見出し、雌のみの unisexual type が倍数性個体である事を明らかにした。更に小林 (1971, 1976) は 3 倍性ギンブナ卵の細胞学的研究から、倍数性ギンブナの雌性発生の機構について報告している。

著者等の一人は 1963 年以降キンギョを材料として、性ホルモンの経口投与による性の転換を試み、雌雄両方向への転換に成功した (YAMAMOTO and KAJISHIMA, 1968)。その結果キンギョの性染色体は雄ヘテロ型の雌=XX,雄=XY である事を報告している。しかしキンギョではあらかじめ材料魚の雌雄を識別する事が出来ず、処理個体を正常個体と交配し、生じた稚魚の雌雄比から性転換の行なわれた事を判断するしか方法が無かった。倍数性のギンブナは上に述べた様に原則的にすべて雌個体を生ずる事に注目して、キンギョに於ける実験を追試すると同時に、ギンブナの生殖法の特異性を解析する目的から、以下の実験を試みた。

倍数性ギンブナを材料とした事により特に注意した点は、(1)卵形成の過程で観察される様に、精子形成の過程でも減数分裂を一回省略するか否か、(2)形成された精子核の染色体数は幾つか、(3)その精子で受精し、発生した稚魚の染色体数は幾つになるのか、(4)倍数性個体の卵を性転換魚の精子で媒精した場合、その精子も他の精子と同じ様に凝縮したままの状態で膨潤しないか否か等である。この中(1)(2)については、本誌の別の論文 (KOJIMA *et al.*, 1984) でもその結果を報告したので、重複部分をさけて、ここでは主として性転換の経過と、性転換魚の精子を用いて行なった媒精実験の結果について報告する。

材料と方法

材料の稚魚を得るために用いた雌親は、上田産、諏訪湖産及び研究室で産卵飼育をして

来た個体で、雄親には諏訪湖産とシュブンキン（ヘテロ透明鱗性個体）を用いた。これ等の個体の倍数性は赤血球 DNA 量から判定し、雌親はすべて3倍性のものを、雄親は2倍性のものを用いた。雌親の腹部を圧迫して成熟卵を放卵させ、精子稀釈液を幹導法によって加えて媒精した。これ等の方法によって発生を開始した個体の染色体数は、成長後鰭の培養細胞、或いは腎臓細胞を用いて検定したが、すべて3倍性であり、雌性発生によって発生した個体である事を確認した。

用いた雄性ホルモンは17 α -メチルテストステロン（シグマ）で、予備実験では材料魚が3倍性である事を考慮して、キンギョで用いた25 γ /g 餌料の他に、倍量の50 γ /g 餌料のホルモンを与えたが、何れも発生異常を生ずる個体が多いため、本実験では12.5 γ /g 餌料とし、一部短期間処理の個体でのみ25 γ /g 餌料を用いた。これ等の濃度になる様にメチルテストステロンを熱帯魚の餌料であるテトラミンと混合し、乳鉢で粉末状になる迄充分に攪拌したものをを用いた。処理期間は孵化後10日目から50日間で、日に数回上記のホルモン餌料を与え、コントロール及び処理期間をすぎたものにはテトラミンのみを与えた。

飼育は室温で行ない、孵化直後から処理期間の60日目迄は10日間隔で、その後は80日目、100日目、150日目に夫々数個体づつを Bouin's 液で固定し、定法にもとづき組織切片を作製して生殖巣の発達を観察した。性転換魚の精子による媒精は上に述べた方法に準じて行なった。

結 果

生殖腺分化の過程 始原生殖細胞は大型の楕円形の細胞で、中央に大きな核を持ち、酸性色素で細胞質が染まり難いため、容易に他の細胞と区別する事が出来る。始原生殖細胞は孵化後20日目（体長10mm前後）の稚魚では後部浮袋の後端附近に位置し、腹膜に沿って予定生殖腺域に向かって移動している。30日目になると生殖腺域である浮袋前中部に到達し、40日目（15mm前後）には数個の始原生殖細胞が集まって生殖隆起を構成し、腹腔内に下垂してくる。この頃から始原生殖細胞は分裂を開始し急速にその数を増してくる。50日目になると生殖隆起は更に大きくなり、生殖腺原基となって腹腔内に下垂している。生殖腺原基内では先端部に生殖細胞が、基部には体細胞が位置し、将来血管系になると思われる空洞が形成されてくる。生殖細胞はその数を増し結合組織により夫々が独立してくるが、未だ雌雄による相異は認められない。孵化後60日目（20mm前後）になると、始めて雌雄の分化が認められる様になり、将来卵巢に分化するものでは生殖腺内に大堅の第一次卵母細胞が形成され、それに対して精巢分化を行なうものでは比較的小堅の生殖細胞が密集してくる。生殖腺分化の過程は此の後急速に進行し、孵化後80日目（25mm前後）には雌雄の分化は明瞭になる。

ホルモン処理個体 ホルモン処理を行なった個体の生殖腺分化の過程も正常個体と変りがないが、性転換をする個体一少なくとも今回の雌から雄への転換の場合、若干分化の過程に遅れが見られる様である。表1. は80日目以降の生殖腺分化の過程を組織標本で追ったものであるが、無処理のコントロールではすべての時期に卵巢分化が認められたのに対してホルモン処理を行なった個体では80日目、100日目に精巢への分化が認められたものは一例もなく、100日目の一個体で大型の精巢卵が認められたにすぎなかった。但し今回の実

表1 80日目以降の性ホルモン処理個体の生殖腺分化の過程。表中の Gonad は生殖腺の未分化を示す。

	80 day	100 day	150 day
Experimental	Gonad 21	Gonad 10	Gonad 9 Testis 18
Control	Gonad 3 Ovary 13	Gonad 1 Ovary 13	Ovary 13

験でコントロールに用いたのは、すべて雌に分化する3倍性卵であったので、正常の2倍性個体でも精巣分化が卵巣分化よりも遅れるのか、或いは卵巣から精巣への転換に時間を要するのかが確定する事が出来なかった。150日目の処理個体では未だ生殖腺未分化の個体も残っていたが、多くのもので明らかに精巣の分化が認められた。

以後2才魚になるまで組織学的検査を行なわなかったが、翌年産卵期には追星を生ずる個体も見られ、開腹して調査した個体はすべて精巣を分化し、精子形成が認められた。なお精巣を分化した個体の中、一部のもので鱗細胞を培養し染色体数を検定したが、何れも染色体数は150以上であり、DNA量から判定した個体もすべて3倍性を示し、3倍性雌から転換したものである事が確認された。

精子形成過程 2倍性個体の精原細胞は結合組織に囲まれる小葉中に1乃至数個が集まって存在している。核の直径は5~6 μm で、核内には核小体が認められる。第一精母細胞は精原細胞より小型で、核の直径は3.5~4 μm 、一つの葉中に数十個が集まって存在している(第1図)。核内の染色体は同一小葉内のはほぼ同一構造を示し、その形態から、接合期、厚糸期、複糸期を識別する事が出来る。減数分裂の進行に伴い、第一精母細胞の核膜は消失し、染色体は赤道面に集合して核板を形成する。第一成熟分裂中期の核板の長径は平均すると3.3 μm であった(第1図)。第一精母細胞の分裂によって生じた第二精母細胞の核の直径は2~2.5 μm で明らかに第一精母細胞より小型であり、その第二成熟分裂中期の核板の長径は1.5 μm 程で、成熟分裂過程で明らかに二回の分裂を行なうことが確認された(第2図)。形成された精細胞は球形で1.7 μm 程のヘマトキシリンで濃染される核を持っている(第3図)。

性転換を行なった3倍性ギンブナ雄の精巣中にみられる分裂中期の核板の長径は4.3 μm 前後の大型のもの一種類だけで(第5図)、雌個体同様に成熟分裂を一回省略するものと考えられる。ただ形成された精細胞の大きさは同一小葉内でも一様ではなく、さまざまの大きさのものが観察され(第6図)、核の大きさも最大のもは直径2.1 μm 、最少のもの1.2 μm 程度であった(表2)。恋態を完了した精子核のDNA量も、2倍性キンギョを1とすると、0.5~3.0迄広い中の変異を示した(第一図)。

性転換の精子によって発生した稚魚 2倍性ギンブナ卵を性転換雄の精子で媒精した場合、殆んどすべての卵は正常に発生を開始し卵割をくりかえすが、胞胚期以後発生は異常となり発眼期(St-21, 梶島1960)迄達したものは7%程度にとどまり、すべてそこで発生を停止してしまった。それに対して、性転換雄の精子で媒精を行なった3倍性ギンブナ

卵は正常に発生し孵化したが、孵化後100日目にその性巣を組織切片にして調べた所、11個体中10個体で卵巣が分化しており、残り1個体の性巣は未分化であった。又これ等の個体の赤血球 DNA 量は2倍性個体の1.5倍を示して3n域にあり、一部の個体の鱗培養細胞の染色体数は150前後で、明らかにこれ等稚魚が3倍性個体であることを示した。更に受精直後の細胞学的観察によると、卵細胞質中に入った精子はすべて凝縮した状態で、雌性前核との間で融合の行なわれたものは皆無であった。従ってこれ等の個体はすべて雌性発生により発生を開始したものと判断された。

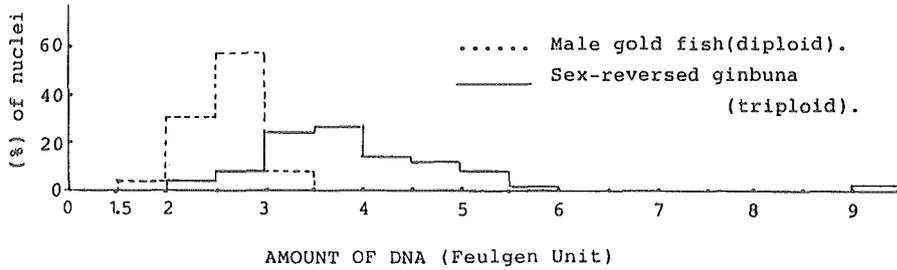
考 察

今回の実験から雌性発生により雌のみを生ずる3倍性ギンブナも、雄性ホルモン処理によりその性を転換して雄になり得る事が明らかになった。1953, 1958年山本によってメダカの性が、性ホルモンの経口投与により雌雄何れの方へも転換可能であることが示されて以来、硬骨魚類ではグッピー (DZWILLO '62, TAKAHASHI '75), ティラピア (CLEMENS '65), キンギョ (YAMAMOTO and KAJISHIMA '68) 等で性ホルモンによる性の転換が報告されている。しかしこれ等の魚類は何れも2倍性個体であって、性染色体は一对の2本しか持たないものと考えられる。今回材料として用いたギンブナは3倍性であり、しかもその染色体数は正確に3倍の150ではなく $2n=156\pm$ であることが確かめられている (小林等'70)。従って3倍性ギンブナの性染色体は少なくとも3本以上、場合によっては更に多い可能性が残されている。そうした配慮から予備実験ではキンギョで有効であった25 γ /g 餌料の他に50 γ /g 餌料のホルモン濃度を用いたが、25 γ /g 餌料の場合でもキンギョでは見られなかった強度の発生異常を生じ、特に脊椎骨の極端な腕曲が観察された。

CLEMENS and INSLEE (1968) はティラピアで30 γ /g 餌料のメチルテストステロンを69日間経口投与すると遺伝的雌の完全雄化を招くが、40 γ /g 餌料, 50 γ /g 餌料では時として雌個体を生ずることのあるのみをみて、メチルテストステロン過剰による逆説的な雌化ではないかと考えている。この様に性ホルモンは種類によって有効量に上限と下限が有り、その有効濃度は与える動物の種類によっても異っている。今回用いたギンブナはキンギョと同一亜種に属し、種による有効濃度の相異は考え難い。それにもかかわらず両者間で相異がみられたことは、3倍性ギンブナでは性の決定状況がキンギョよりも不安定なためではないかと考えられる。事実自然集団の中でも3倍性ギンブナ雄の存在が報告されている

表2 2倍性ギンブナ, 3倍性ギンブナの精子形成過程における生殖細胞の核の直径, 及び成熟分裂中期の核板の長径 (単位は何れも μm)。

Stage of spermatogenesis	2n	3n
Spermatogonium	5.32 \pm 0.12	
1st spermatocyte	3.74 \pm 0.04	3.37 \pm 0.04
Metaphase I	3.31 \pm 0.03	4.27 \pm 0.04
Metaphase II	1.47 \pm 0.04	
Spermatid	1.74 \pm 0.04	1.2 - 2.1



第1図 精細胞あるいは精子核のDNA量。破線は2倍性キンギョの精子核。実線は性転換魚の精細胞、精子核のDNA量の分布を示す。

し、我々の研究室でもシュブンキン精子によって人工媒精した3倍性ギンブナ卵から、これまでに相当数の雄個体が得られている。

STROMSTEN (1931) はキンギョの生殖腺分化の過程を報告しているが、それによると体長15mmの個体から生殖腺分化が始まるとしている。一方TAKAHASHI and TAKANO (1971) は同じくキンギョで生殖腺の分化は必ずしも体長とは比例せず孵化後の日数と関係があることを指摘し、キンギョの生殖腺分化は孵化後25~30日、体長11~12mmの個体から始まるが、卵巣が明瞭に識別出来るようになるのは、孵化後50日からであるとしている。今回のギンブナにおける観察では、卵巣の分化はキンギョにより若干遅く、孵化後60日、体長20mm前後に始めて雌雄の性巣の分化が認められた。何れにせよ今回の実験でホルモン処理を施した期間は、性分化開始直前迄の時期で、此の間に性の決定が行なわれるものと考えられる。予備実験で25 μ g/g 餌料のホルモンを孵化後20日から40日迄の間、20日間投与した個体でもすべて性の転換が行なわれ、雄個体のみを生じたことから考えると、性決定の時期は恐らく始原生殖細胞が生殖腺隆起を構成する前後と思われる。

3倍性ギンブナ雌の特長は云うまでもなく雌性発生を行なうことである。そうした生殖法が可能な原因の一つは卵形成の過程で減数分裂を行わず、ただ一回の同型核分裂を行なうことにより、雌親と同一の染色体数、ゲノムを卵に引き継ぐことにある(小林, '76)。性転換を行ない精巣を分化した個体においても卵形成過程と同様に減数分裂を省略するであろうか。REMACLE *et al.* (1977) はキンギョの精子形成過程における染色体の動体を報告しているが、それによると精巣内の小葉には明らかに大きさを異にする精母細胞群が存在し、大型のものが第一精母細胞、小型のものは第二精母細胞期にあるとしている。今回のギンブナにおける観察でも、コントロールとして用いた2倍性個体の精巣では、明らかに分裂中期の核板の長さを異にする二種類の小葉が区別され、2回の減数分裂を経て精細胞が形成されることが確認された。それに対して性転換雄の精巣では、精母細胞期の細胞の大きさは均一で、その分裂中期の核板は2倍性個体のものより大型であった。このことは性転換魚の染色体数が2倍性のものより多く、又減数分裂過程を一回省略することを示すものと考えられる。

児島等 (1983) は自然産3倍性ギンブナ雄、ならびに性転換雄を用いてその減数分裂過程の細胞学的観察を行なっている。それによると、中期分裂像で少数ではあるが2価染色体が観察されるが、その他に棒状の2価、3価、多価染色体が多数存在するので、恐らく

これ以後染色体は不等分裂をする可能性があるとは指摘している。今回の組織学的観察ではその後の染色体の動態を追うことは出来なかったが、分裂によって生じた精細胞核の大きさには中広い変異が認められ、又 DNA 量にも著るしい変異が存在した。これ等の現象は精母細胞核の不等分裂によって生じたものと考えたと極めて合理的に理解することが出来る。もしこの仮定が正しいとすると、性転換雄の精子は染色体数について異数性 (aneuploid) であることが考えられる。

性転換雄の精子を用いて両性生殖を行なう 2 倍性ギンブナ卵を媒精すると、初期卵割期はほぼ正常に進行するが、胞胚期以後発生異常を生じ、発眼期 (St-21)迄発生したものは 7%程度で、それ以後すべて死滅してしまった。また培養系に移した胚細胞も、正常胚のものと比較すると極めて増殖が悪く、早晩死滅してしまった。フナ卵は淡水によって付活され、卵割を開始するが、これ等の卵はすべて胞胚期までに発生を停止するところから、今回発眼期迄発生した胚は単なる淡水付活によって発生を開始したものではなく、一応精子によって受精されたものと思われる。しかしこれ等の卵が初期胚の段階で発生を停止したのは、恐らく胚細胞の染色体異常に起因するものと考えられるが、今回の実験では確認出来なかった。

性転換雄の精子で媒精した 3 倍性ギンブナ卵はすべて正常に発生した。ただ受精時に卵細胞質内に入った精子は凝縮したままで雌性前核と合一せず、それから発生した稚魚は性巣未分化の一例を除きすべて卵巢を分化した。これ等の事実はこの発生過程が雌性発生によるものであることを示すもので、事実これ等個体の DNA 量、染色体数はすべて雌親同様 $3n$ 域を示した。2 倍性卵、3 倍性卵との媒精実験の結果明らかになったことは、性転換 3 倍性雄の精子も、すべてであるかどうかは明らかでないが、発生を開始させる能力をもったものであるということである。ただその染色体数は恐らく異数性で、それによって正常な発生を保証することは困難と思われるが、通常の染色体数 n をもった精子、或いは $2n$, $3n$ の精子が形成される可能性も皆無ではないので、今後更に高倍性の染色体をもった個体が生ずる可能性も残されているものと思われる。

謝 辞

本誌に発表したギンブナに関する論文は、田中慶子、古市貞一、土屋芳子、松浦正、斉藤祐見子、居原範道、鈴木節男、笹間進一等の諸君の地道な研究を基礎として逐行されたもので、此所に之等の諸氏の御尽力に対し、著者等一同心からなる感謝の意を表明する次第である。

又材料を提供して下さった、上田水試の鈴木亮氏、佐久水産指導所の山崎隆義氏に御礼を申し上げると共に、DNA 量測定にかかせなかった MMSP の記録装置を御貸与下さった信大教養部の清水建美教授に厚く御礼を申し上げます。

猶本号に掲載した論文 8 篇の中、最初の 1 篇を除く 7 篇は昭和 55 年度、56 年度の文部省研究費補助金の援助により実施されたものであり、此所に附記して感謝の意を表明する。

文 献

CLEMENS, H. P. (1965) Sex direction in presumptive female, *Tilapia mossambica*. in "Intersexuality in

fishes”

- CLEMENS, H. P. and T. INSLEE (1968) The production of unisexual broods by *Tilapia mossambica* sex-reversed with methyltestosterone. *Trans. Am. Fish. Soc.* **97** : 18-21.
- DZWILLO, L. (1962) Über künstliche Erzeugung funktioneller Männchen weiblichen Genotypus bei *Lebistes reticulatus*. *Biol. Zbl.* **81** : 575-584.
- EGASHIRA, M. (1935) On the survival powers of males and females of *Carassius auratus* (L.) under some harmful external condition. *Sci. Rep. Tohoku Univ.* **4**, **9** : 415-426.
- 梶島孝雄 (1960) キンギョ *Carassius auratus* の正常初期発生段階。魚類学雑誌 **8** : 20-28.
- KATO, G. (1932) On the sex ratio and the growth of body in *Carassius auratus* and its variety "the Iron-fish". *Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ.* **4**, **7** : 365-381.
- KINOSHITA, T. (1933) A new case of hermaphroditism in *Carassius auratus* (L.). *J. Sci. Hiroshima Univ.* **2** : 1-7.
- 小林 弘 (1967) 他種魚類との交雑よりみた関東地方のギンブナとギンブナについて。動雑 **76** : 375.
- (1971) 3倍体ギンブナの gynogenesis に関する細胞学的研究。動雑 **80** : 316-322.
- (1976) 3倍体ギンブナの卵形成における成熟分裂の細胞学的観察。魚類学雑誌 **22** : 234-240.
- , 川島康代, 竹内道政 (1970) フナ属魚類の染色体の比較研究, 特にギンブナに現われた倍数性について。魚類学雑誌 **17** : 153-160.
- 中村守純 (1969) 日本のコイ科魚類 資源科学シリーズ4.
- REMACLE, C., P. DELAERE, F. HARRISON, and P. JACQUET (1977) Contributions à l'étude de la différenciation des cellules germinales des Poissons Téléostéens. 1977. *Inv. pesq.* **41** : 39-65.
- SASAKI, K. (1926) On the sex ratio in *Carassius auratus*. *Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ.* **4**, **1** : 229-238.
- STROMSTEN, F. A. (1931) The development of the gonads in the goldfish, *Carassius auratus* (L.). *Univ. Iowa studies, Nat. Hist.* **13** : 2-24.
- TAKAHASHI, H. (1975) Process of functional sex reversal of the gonad in the female guppy, *Poecilia reticulata*, treated with androgen before birth. *Devel. Growth. differ.* **17** : 167-175.
- TAKAHASHI, H. and K. TAKANO (1971) Sex hormone-induced precocious hypertrophy and ciliation of epithelial cells in the ovarian lumen of the goldfish. *Ann. Zool. Jap.* **44** : 32-41.
- YAMAMOTO, T. (1953) Artificially induced sex reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.* **123** : 571-594.
- . 1958. Artificial induction of functional sex reversal in genotypic females of the medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.* **137** : 227-264.
- YAMAMOTO, T. and T. KAJISHIMA (1968) Sex hormone induction of sex reversal in the goldfish and evidence for male heterogamity. *J. Exp. Zool.* **168** : 215-222.

**Sex Hormone Induced Sex Reversal in Triploid
All Female Ginbuna,
*Carassius auratus langsdorfii***

M. NODA, A. TASHITA, T. FUKUDA and T. KAJISHIMA

Department of Biology, Faculty of Science,
Shinshu University

(Received 21 March 1984)

Abstract

The sex of triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfii*) are all females, reproducing gynogenetically. The artificial sex reversal was carried out successfully by the oral treatment of methylteststeron for two months after hatching out. In the sex reversed triploid ginbuna, the processes of spermatogenesis from spermatogonia to the primary spermatocyte was similar with diploid males. But thereafter though in the diploid male two different types of nuclear plate in diameter were observed, in the triploid ginbuna it was observed only the same diameter of nuclear plate. From these observations, it was concluded that the first maturation division might be omitted in these males as in females. Further, the triploid males produced the unequal diameter and DNA contents of sperms. This might be caused by unequal nuclear division during meiosis. Artificial insemination of triploid female with the sperm of sex reversed triploid male, resulted in the all triploid females. The sperm of triploid male might be possess the ability to activate the egg of triploid female gynogenetically.

図版 2倍性ギンブナ(第1図～第3図)、性転換3倍性ギンブナ(第4図～第6図)の精子形成過程。

- 第1図 2倍性ギンブナの第一次精母細胞と第一回成熟分裂中期核板。
- 第2図 2倍性ギンブナの野二次精母細胞と第二回成熟分裂中期核板。
- 第3図 2倍性ギンブナの精細胞と精子。
- 第4図 3倍性ギンブナの精母細胞。
- 第5図 3倍性ギンブナの成熟分裂中期核板。
- 第6図 3倍性ギンブナの精細胞。

