

上伊那産メダカの性転換体における産卵と系統の分析



研究者:長野県伊那北高校理数科 神山寧々 小松綾音 松澤椿皐 宮澤隆之介 宮下祥馬

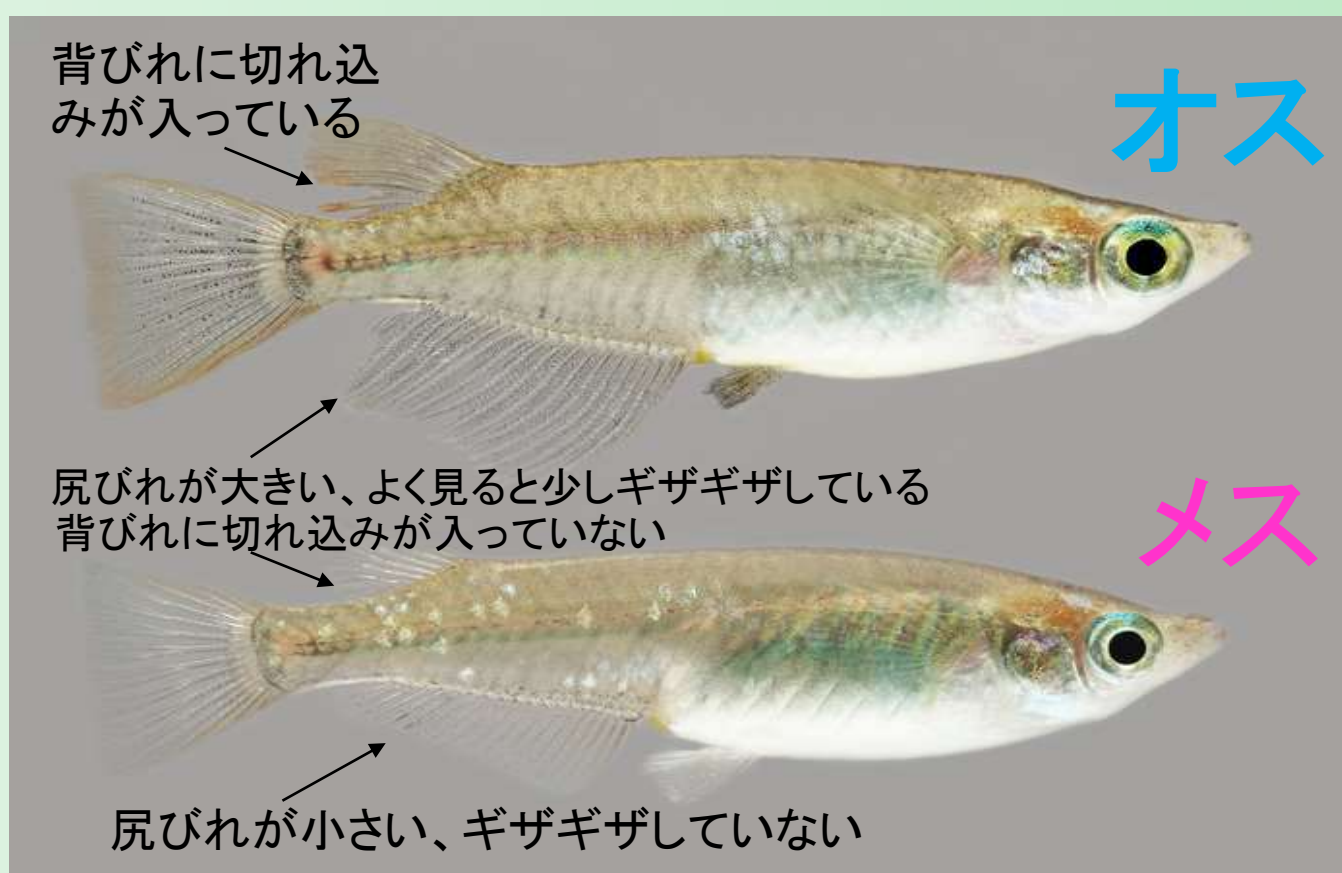
1.目的、動機

現在、メダカは「絶滅危惧種第Ⅱ類」に指定されている。昨年の先輩方の研究により、メダカが性転換することが明らかになったことから、このメダカの性転換を上手く利用し、メダカの個体数増加に貢献できないかと考えた。

2.実験方法

〈1〉メダカを雌雄鑑定する

(1)上伊那産のクロメダカ24匹を目視で雌雄判別する



特に背びれの切れ込みに着目して雌雄判別した

(2)形態がオスのメダカの尻びれの一部を採取、DNAを抽出



- ①メダカの尻尾の一部をカットし、溶解吸着液に溶かしてチューブに入れる。
- ②①に磁性ビーズ、洗浄液、20%エタノール、滅菌水、を加えながら、遠心分離を繰り返し、上澄みを捨てていく。
- ③検体数のマイクロチューブにそれぞれ、滅菌水、マスターミックス、プライマーミックスを入れ、DNA溶液を加え、PCRの機械にかける。(写真はμl単位で溶液の量を測れるマイクロピペットを用いて実験しているところ)

(3)抽出したDNAをPCR法で増幅



- ①1匹分のメダカのDNA溶液につき、滅菌水、Master Mix、プライマーMix加える。
- ②サーマルサイクラーにサンプルをセットし、95℃,3分 → 96℃,15秒 → 72℃,50秒の条件で反応させる。
- ③このステップを30サイクル行う。(今回は、上伊那農業高校のサーマルサイクラーを借用。)

(4)PCR法で増幅させたDNAをアガロースゲル電気泳動法で電気泳動する



- ①10×TAE bufferに水を加える。
- ②三角フラスコにアガロースを入れ、1×TAE bufferを加えて、電子レンジで溶解。
- ③ゲルにミドリグリーンアドバンスを加え、1×TAE bufferをかけ、冷蔵庫に入れて固める。
- ④③にメダカのDNAを注入。
- ⑤端のレーンのウェルにMerker(1kb ladder)を注入し、100Vの低電圧をかけて、30分泳動。

〈2〉1の実験により性転換したとみられる個体と通常のオスを掛け合わせる

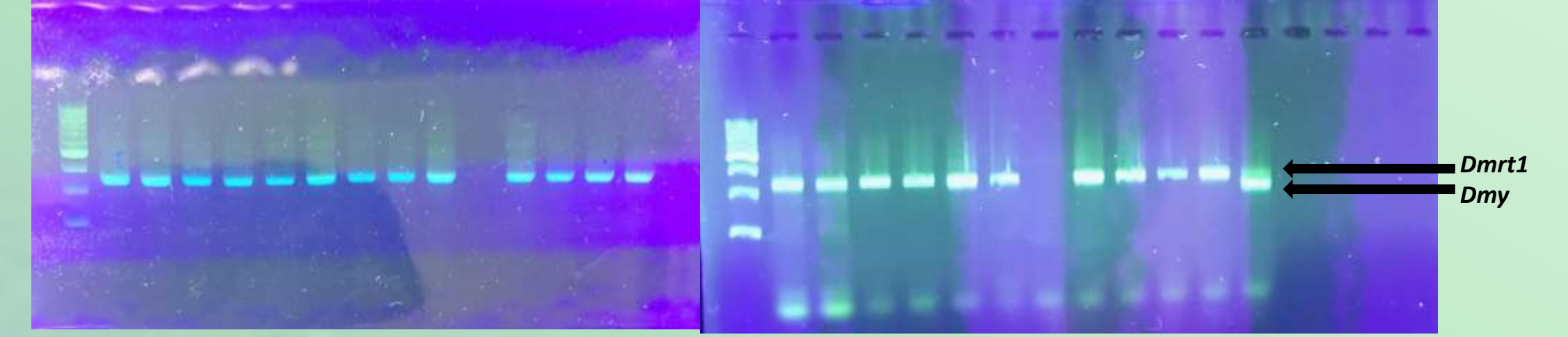
3.メダカの系統について

※雌雄鑑定のために用いたやり方と同じ方法でDNAを採取し、宇都宮大学の松田勝先生に依頼し、ミトコンドリアDNAの系統を鑑定していただいた。

東日本Ⅰ型:23匹 東日本Ⅱ型(ヒメダカ由来):7匹 不明:1匹
→Ⅰ型とⅡ型が約3:1の割合で生息している。Ⅱ型は飼育型のヒメダカの遺伝子に近いことから、ヒメダカが途中で放流されたと考えられる。

5.実験結果

[図1]



〈1〉[図1]より、右端(以下25番と呼ぶ)のバンドが少し下がっていることがわかる。このことから、25番のみDmy遺伝子を持つ、すなわちオスの遺伝子を持つことが確認できる。25番は昨年度の研究で性転換と分かったものである。つまり、今年度調べた個体の中には性転換体が発見できなかった。

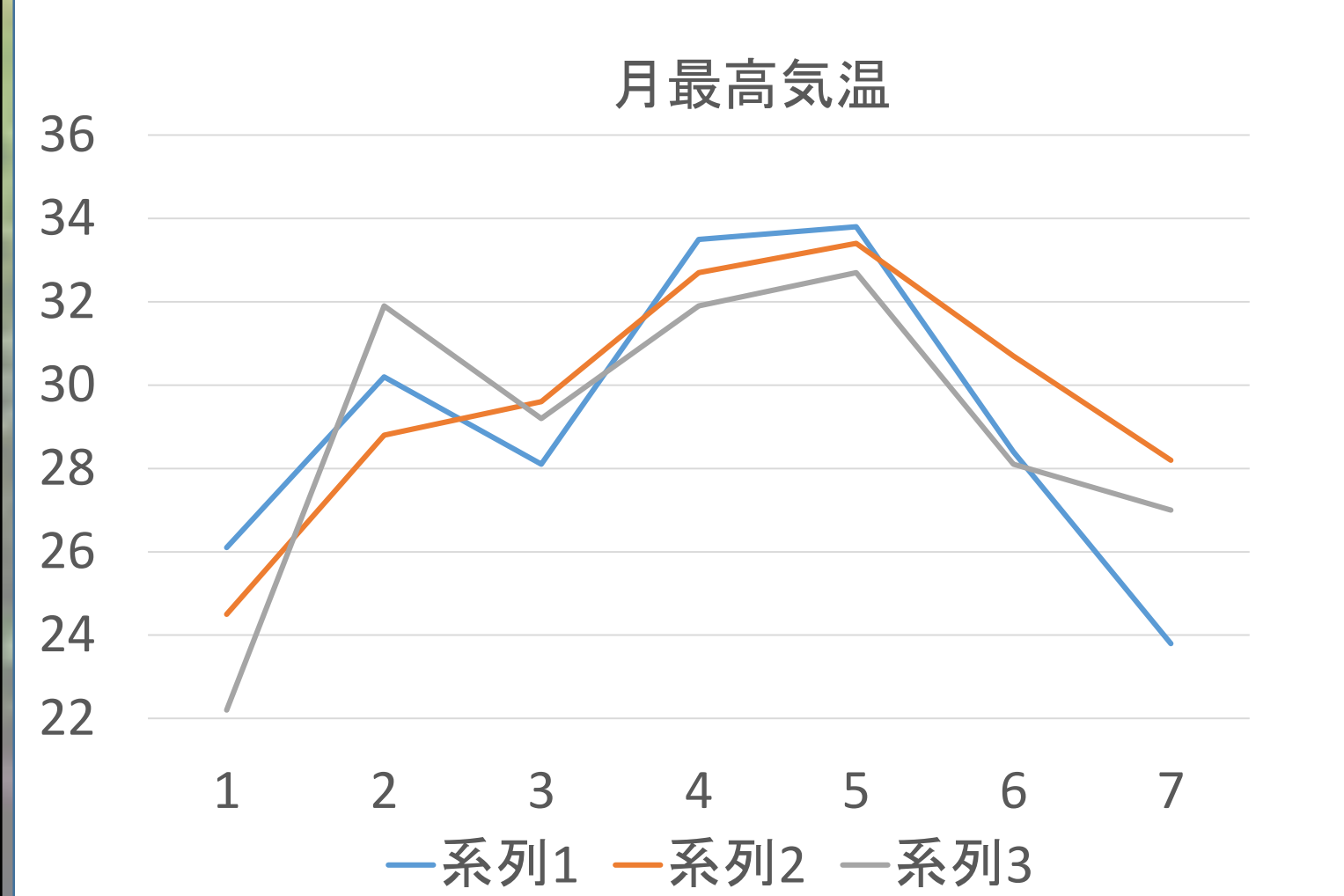
〈2〉性転換した個体と通常のオスを掛け合わせても、子供は生まれなかった。

6.考察

〈1〉性転換体が見つからなかった理由について

メダカの性別決定は成長の初期段階に起こると言われていて、水温が高い場合に雄の生殖腺の分化が進むとされている。通常、メダカの卵の孵化が始まるのは、水温が孵化に適当な高さになる5月ごろからである。

[図2]



今年度使用したメダカは、大部分が2017年に産まれたものであると考えられる。[図2]より、この2017年の気温について、4月から5月にかけて、他と比べて著しい上昇が見られた。昨年度使用したメダカの多くは2016年に産まれたものと考えられるので、この急激な気温の上昇は今年度の研究で使用したメダカにのみ当てはまる。

このことから、2017年の5月は気温が高くなり、水温も上昇したため、雄の生殖腺の分化が正常に進み、性転換が起きなかったと考えられる。逆に、2015年と2016年は5月頃の気温があまり上がらなかったため、水温もさほど上昇せず、雄のなかで生殖腺の分化が正常に進まなかった個体がいたために昨年度は性転換体が3匹も発見されたと考えられる。

〈2〉産卵しなかった理由について

産卵が見られなかった原因としては、12月の実験で水温が低いためヒーターを入れ、水温を25℃に設定したが実際には水温が22℃近くまでしか上がらなかったことが、少なからず影響していると考察した。

また、性転換体が1匹のみだったこと、飼育期間が15日間と短かったことから、性転換体が産卵しないという結論に至るのは尚早である。ぜひ来年引き継いで研究をしてほしい。

7.最後に

性転換した個体と通常の個体を掛け合わせて産卵しないというのは、なぜ性転換をするのかという疑問が残るので、産卵については条件を整えてもう一度吟味したい。

今後は、今年度性転換体が発見しなかった理由について更に詳しく研究を行っていきたく考えている。

また、研究を進めるにあたり、ご指導してくださった大石英一先生、小山由美子先生、メダカの飼育方法についてご指導して下さった関孝誠先生、メダカの系統の分析をして下さった宇都宮大学松田勝先生、メダカを提供して下さいました飯島町教育長様、また、DNAを採取するためにカラダを張ってくれたメダカたちに感謝申し上げます。

参考文献:

- ・2017年度課題研究報告集
- ・メダカの飼育方法 | 暮らしのLABO博士 | フジテレビ商品研究所
- ・どんなときでも身体をメスにしたがる細胞:生殖細胞 ~この特質によって身体はメスになる~
- ・メダカを殖やすための5つのポイント: Tetra ::: スペクトラム ブランズ ジャパン株式会社(旧テトラジャパン株式会社)
- ・StepOnePlusリアルタイムPCR 運用開始のお知らせ
- ・メダカの性別はどのように決定されているのか 松田勝
- ・改訂版 生物 数研出版
- ・六訂版 スクエア最新図説生物neo 第一学習社

※目視による区別を雌雄判別、PCR法と電気泳動法を用いて行った区別を雌雄鑑定と呼んでいる