



Title	皇居上道灌漑における三倍体および四倍体ギンブナ <i>Carassius langsdorfii</i> の雌性発生生殖とクローン性の証拠
Author(s)	間田, 康史; 海野, 徹也; 荒井, 克俊
Citation	日本水産学会誌, 67(2), 217-221 https://doi.org/10.2331/suisan.67.217
Issue Date	2001
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/35171
Rights	本文データは学協会の許諾に基づきCiNiiから複製したものである
Type	journal article
File Information	arai-58.pdf



皇居上道灌濠における三倍体および四倍体ギンブナ *Carassius langsdorfii* の雌性発生生殖とクローン性の証拠

間田 康史, 海野 徹也,* 荒井 克俊^a

(2000 年 6 月 19 日受付, 2000 年 9 月 25 日受付)

広島大学生物生産学部

Genetic Evidence of Gynogenetic Reproduction and Clonal Nature of Triploid and Tetraploid Cyprinid Fish *Carassius langsdorfii* Collected from the Kami-dokanbori Moat in the Imperial Palace

Yasufumi Mada, Tetsuya Umino,* Katsutoshi Arai^a

Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University, Hiroshima 739-8528, Japan

Triploid ($n=71$) and tetraploid ($n=1$) ginbuna *Carassius langsdorfii* were collected from the Kami-dokanbori moat in the Imperial Palace in the spring, 1997. The eggs of mature triploid ($n=3$) and tetraploid ($n=1$) individuals were inseminated by the milt of goldfish *C. auratus* in 1998, so as to examine ploidy status, sex, and genotypes of the resultant progeny. Flow cytometry for DNA content of somatic cell nuclei showed triploidy of the progeny of the triploid females and tetraploidy of the progeny of the tetraploid female. Histological observation of the gonads revealed that all the progeny examined were female. All the progeny of the triploid female examined exhibited the DNA fingerprint identical to that of the mother. Identical DNA fingerprint was also detected between the tetraploid mother and its progeny. These results conclude that the triploid and the tetraploid ginbuna in the Imperial Palace produce unreduced triploid and tetraploid eggs, respectively, and these triploid and tetraploid ginbuna reproduce gynogenetically as unisexual clones.

キーワード：ギンブナ, 皇居上道灌濠, 四倍体, クローン, DNA フィンガープリント

三倍体ギンブナは体細胞と遺伝的に同一な非還元卵を形成し,^{1,2)} かつ, これらの卵が精子の遺伝的関与なく雌性発生により繁殖することが知られている。³⁻⁵⁾ 従って, 三倍体ギンブナの一腹仔は母親と遺伝的に同一なクローンとなることが期待される。これまで日本各地より採集された三倍体ギンブナの一腹仔のクローン性については, 鱗移植,⁶⁻⁸⁾ アイソザイム,^{9,10)} RAPD-PCR,⁹⁾ DNA フィンガープリント,¹⁰⁻¹²⁾ マイクロサテライト DNA 解析¹³⁾ により確認されている。しかし, 長野県諏訪湖の集団では同腹の子孫中にアイソザイムあるいは組織適合性の変異を示す個体が出現し,^{14,15)} その原因として雌性遺伝子の関与¹⁶⁾ あるいは三倍体卵の減数分裂過程における相同染色体の部分的対合と組換え¹⁷⁾ が示唆された。同様の変異出現とその機構は埼玉県由来の材料について Zhang *et al.*¹⁸⁾ が報告している。

また, ギンブナには三倍体の他に四倍体の存在が報告されている。^{6,19-24)} 小林ら²¹⁾ は千葉県産のギンブナ四倍体より得た卵をギンブナ精子により受精し, これら子孫の四倍性と全雌性から, 雌性発生による繁殖を結論した。また, 諏訪湖産の三倍体ギンブナの中に近縁種の精子を受け入れ四倍体となる系統があり,²⁴⁾ Nakanishi and Ototake²⁵⁾ はこれらの四倍体ギンブナが雌性発生により四倍体クローンの子孫を作ること組織移植により検証している。このように本邦産ギンブナにはまれに四倍体ギンブナが確認されているが, その出現率は極めて低く, 生殖様式についての知見は乏しい。従って, 四倍体子孫のクローン性も含めより多くの地方事例について観察を積み重ねていく必要がある。

著者らは, 1997 年 6 月に, 皇居の生物相調査の一環として, 江戸城築城以来外界との接触がないと言われる

* Tel : +81-824-24-7944, Fax : +81-824-22-7059, E-mail : umino@hiroshima-u.ac.jp

^a 現住所：北海道大学大学院水産科学研究科 (Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate 041-8611, Japan)

上道灌濠よりフナを採取し、これらの中に多数の三倍体と一個体の四倍体ギンブナを見出すことが出来た。そこで、四倍体と三倍体の一部を親魚として養成し、これら三倍体および四倍体より得た成熟卵をキンギョ *C. auratus* の精子により受精し、生じた子孫の核 DNA 量、性別、DNA フィンガープリント像を調査することにより、皇居のギンブナの生殖様式とクローン性を検討した。なお、1996 年より開始した皇居の上道灌濠ならびに中、下道灌濠におけるギンブナの倍数性、性比、クローン組成の調査結果は別途報告の予定である。

試料および方法

供試魚 1997 年 6 月に皇居内の上道灌濠より 72 個体のフナを得た。これらの標本を広島大学生物生産学部に生かしたまま輸送し、尾部静脈より採血後、常法により血液塗抹標本を作成した。未固定、未染色のまま血球サイズを鏡検し、Umino *et al.*²⁶⁾ の基準に従って、個体毎の倍数性を判定した。このようにして、選びだした四倍体 1 個体を鰭切除により標識し、複数の三倍体とともに 1998 年 5 月までの約 11 月間、広島大学内実験池で養成した。これら個体の倍数性は交配実験終了後に後述のフローサイトメトリーにより確認した。

交配 1998 年 5 月、三倍体 3 個体 (A~C) と四倍体 1 個体 (D) の成熟親魚を得た。Umino *et al.*¹¹⁾ に従って、親魚に体重 1 g あたり 10 単位の HCG (ゴナトロピン R, 帝国臓器) を腹腔内注射し、約 10~12 時間に成熟卵を得た。各個体より得た成熟卵子を塩化ビニリデンフィルム (サランラップ) を敷いたシャーレ (直径 9 cm) に取り、同一個体のキンギョの精液で媒精後、淡水を入れたホウロウ製バット (25×30×3 cm) 中の磨りガラス板に散布した。各親魚由来の受精卵は別々のバットに収容し、一日に一回換水した。受精卵は約 20°C の一定水温で培養した。孵化率および孵化後 30 日目の生残率は受精卵数に対する孵化あるいは生残仔魚数の百分率とした。初期餌料として孵化後 3 日目よりアルテ

ミア幼生を与え、全長 25 mm 前後になるまで屋内の上記バット中で飼育した。その後は 60 l ガラス製水槽に移し、テトラミン (テトラペルケ社, ドイツ) を与え、10 月以降はアユ用人工飼料を与えた。

フローサイトメトリー 倍数性判定のためフローサイトメトリーにより核 DNA 量を測定した。雌親魚としたギンブナおよび雄親魚としたキンギョは、交配に使用後、尾部静脈より採血し、試料とした。交配由来子孫 (6~8 月齢) は、鰓をマイクロチューブ中で Eagle MEM 培地を加え細切後、試料とした。フローサイトメトリー用試料は Zhang and Arai²⁷⁾ に従って調整し、フローサイトメーター (Becton Dickinson FACS Calibur) により測定した。

DNA フィンガープリント法 前報^{11,12)} に従って、親魚の血液および 6~8 月齢子孫の筋肉より DNA を抽出精製し、制限酵素 *Hin* fl により消化した。0.8% アガロースゲルで電気泳動分離後、市販の Jeffereys *et al.*²⁸⁾ のマルチローカスプローブ NICE 33.6, 33.15 (Cellmark Diagnostic, 連合王国) あるいは Spruell *et al.*²⁹⁾ に従って、Light-Smith II (Promega, 米国) を用いてアルカリファスファターゼ標識した合成オリゴヌクレオチド (GACA)₄ をプローブとして、Lumi-Phos 530 (和光純薬工業) により化学発光させ、オートラジオグラフにより DNA 断片を検出した。

性の判定 フローサイトメトリー用試料採取後、魚体をブアン氏液で固定し、常法によりパラフィン包埋後、10 μm の縦断切片を作製した。H-E 染色の後、生殖腺部域の鏡検により性を判別した。

結 果

使用した雌雄毎の供試卵数、孵化率、および孵化後 30 日の生残率を Table 1 に示す。三倍体雌 (A~C) に由来する子孫の孵化率、30 日目生残率は各々、24.5~77.3%, 4.6~27.7% であった。四倍体雌 (D) の子孫の孵化率、30 日目生残率は各々 66.5%, 11.1% であり、

Table 1. Survival rates and ploidy status of the progeny from the cross, tetraploid ginbuna ♀ × diploid goldfish ♂ and triploid ginbuna ♀ × diploid goldfish ♂

Female		No. of Used eggs	Survival rates at		No. of Examined progeny*3	Ploidy		
Ploidy	Fish I.D.*		Hatch (%)*1	30 days (%)*2		Triploid	Tetraploid	Aneuploid*4
Triploid	A	1244	77.3	14.4	24	24	0	0
Triploid	B	1692	24.5	4.6	12	12	0	0
Triploid	C	137	42.3	27.7	23	23	0	0
Tetraploid	D	1094	66.5	11.4	52	0	51	1

*1 Relative to no. of used eggs.

*2 Relative to no. of used eggs; 30 days after hatching.

*3 Six to eight months old after hatching.

*4 Aneuploid with 3.2C DNA as show in Fig. 1C.

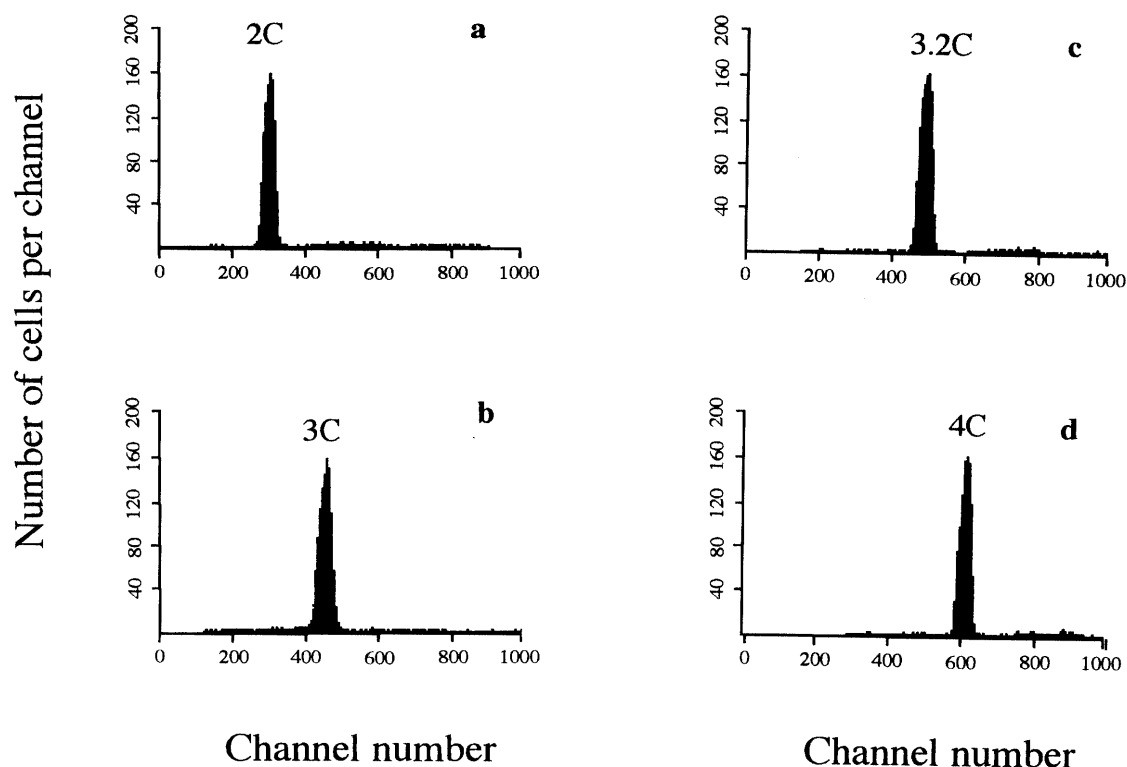


Fig. 1. Diploid (a), triploid (b), hyper-triploid (c), and tetraploid (d) individuals flow-cytometrically determined by 2C, 3C, 3.2C, and 4C relative DNA content of erythrocytes, respectively. Ploidy status is assessed by fluorescence intensity (channel number).

三倍体由来の子孫の示した率の範囲内にあった。

孵化後6～8月齢子孫についてフローサイトメトリーにより赤血球核DNA量を測定し、雄親魚としたキンギョ（二倍体）のDNA量を2C (Fig. 1a) として、倍数性の判定を行った (Table 1)。三倍体親魚 (A～C) に由来する子孫 ($n=59$) は3CのDNA量を示し (Fig. 1b), 全て三倍体であった。四倍体雌 (D) の子孫 ($n=52$) は、3.2CのDNA量を示した1個体の異数体 (Fig. 1c) を除き、すべて4CのDNA量をもつ四倍体 (Fig. 1d) であった。

三倍体雌 (A) に由来する三倍体子孫 ($n=9$) について、雌親魚 (ギンブナ)、雄親魚 (キンギョ) とともにプローブ33.6を用いてDNAフィンガープリント分析を行ったところ、Fig. 2aに示すように、調査した三倍体子孫は雌親魚と同一の像を示し、雄親魚であるキンギョのDNA断片を含まなかった。他のプローブ (33.15, (GACA)₄) を用いたDNAフィンガープリントの場合も同様の結果が得られた。四倍体雌 (D) に由来する四倍体子孫 ($n=11$) についても、同様にDNAフィンガープリント分析を行ったところ (Fig. 2b, c), 雌親魚と同一の像を示した。

三倍体雌 (A) 由来子孫 ($n=4$, Fig. 3a) および四倍体雌 (D) 由来子孫 ($n=11$, Fig. 3b) の生殖腺につい

て組織学的観察を行ったところ、すべての個体で卵母細胞が見られ、いずれの子孫も雌と判定できた。

考 察

皇居上道灌濠に生息する三倍体ギンブナ雌の子孫はすべて三倍体雌であり、母親と同一のDNAフィンガープリントを示した。従って、北海道大沼と奥尻島⁶⁾ 高知県物部川水系^{9,10,13)} および広島県黒瀬川^{11,12,26)} の三倍体ギンブナと同様に、雌性発生によりクローン繁殖を行っていると言えよう。同所的に出現した四倍体ギンブナの卵をキンギョの精子で受精した場合、その子孫は1個体の異数体 ($3.2n$) を除き四倍体雌であった。このことから皇居上道灌濠の四倍体も、千葉県²¹⁾ や諏訪湖産²⁵⁾ の四倍体ギンブナと同じく、ほとんどの場合、雌性発生により繁殖していることが判明した。そして、これら四倍体子孫のDNAフィンガープリントが同胞間で同一で、かつ雌親魚と同じであったことから、これらはクローン系であることが明らかになった。

四倍体ギンブナが三倍体と同様に雌性発生によりクローンとして繁殖しているとする、成熟分裂の過程において第一分裂をせずに、四倍性を維持した卵を形成し、精子の侵入後は雌性前核と精子核の融合が起きないと考えられる。Yamashita *et al.*²⁾ は三倍体ギンブナ

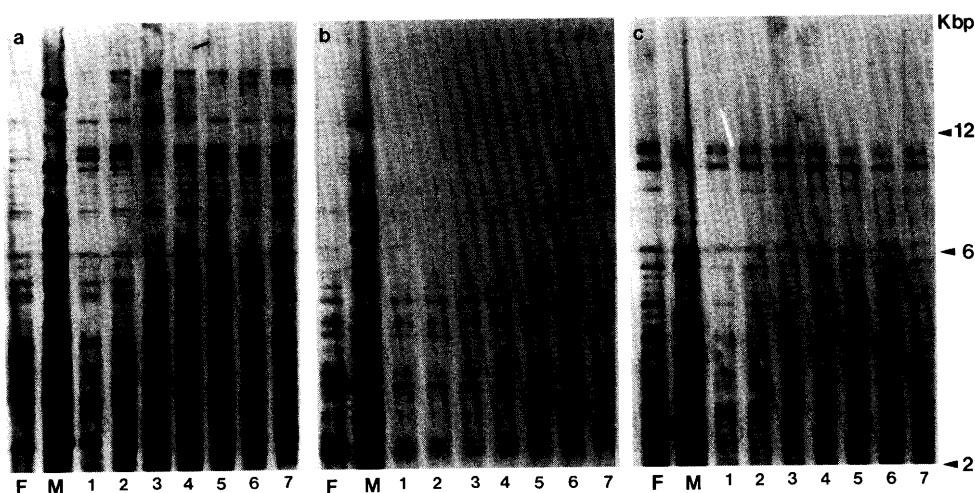


Fig. 2. DNA fingerprints of the progeny of triploid (a) and those of tetraploid ginbuna female (b, c). F, female ginbuna; M, male goldfish; 1–7, progeny. DNA was digested with *Hin* fl and hybridized to probe 33.6 (a), 33.15 (b), and $(GACA)_4$ (c). Molecular sizes shown at the right is given in kilobase pairs.

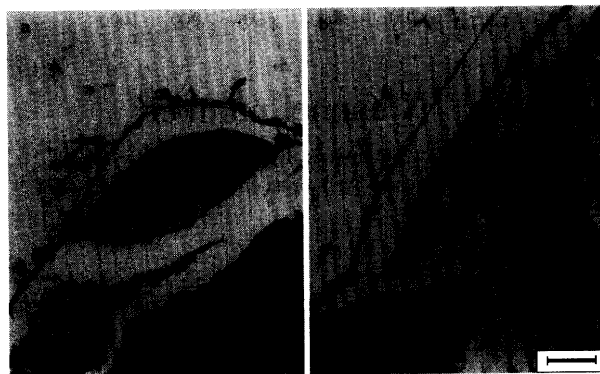


Fig. 3. Transverse section of tetraploid (a) and triploid progeny (b) at four months after hatching. Note the formation of ovary both in tetraploid and triploid progeny. Scale indicates 50 μ m.

の卵で染色体数の半減が生じないのは、第一減数分裂で三極紡錘体が形成されるため、分裂が正常に進行しないためとしている。このことは三倍体に3組の相同染色体セットがあるため、対合と分離が阻害された結果と考えられる。それでは、四倍体の場合ではどうなるのであろうか。四倍体(4n)に4組の相同染色体セットがあれば、通常の減数分裂過程のような対合により二価染色体が2n数(100)形成される可能性がある。また、同質四倍体のように四価染色体が1n数(50)形成されたり、³⁰⁾二価と四価が混在する可能性がある。³¹⁾しかし、本研究結果より、四倍体ギンブナが四倍性の卵を非還元的に形成することは明らかであり、三倍体と同様に非還元卵をつくる可能性がある。三倍体に観察された三極紡錘体と同様に減数分裂の阻害に働く異常紡錘体²⁾が四倍体においても生じているか否かは興味深い問題であるが、この点は、本研究で得た四倍体クローン集団の成熟

を待って、その卵成熟過程の詳細な細胞学的観察を行う必要がある。本研究で、1個体の異数体が見られたが、その出現機構は目下不明である。四倍体の卵成熟に関する細胞学的研究は異数体卵の形成機構についても解明の糸口を与えるであろう。

小野里ら,⁶⁾は北海道の天然ギンブナ集団における鱗移植法によるクローン解析の過程で、四倍体クローンは三倍体クローンの組織(鱗)を生着するが、三倍体クローンが四倍体クローンの鱗を急性拒絶する事例を報告している。同様の現象はNakanishi^{8,24)}により報告されている。彼らは、この結果を四倍体のクローンは三倍体のもつゲノムをすべて有しているが、三倍体のクローンは四倍体のもつゲノムの一部をもたないためと説明し、天然の四倍体は三倍体クローンが1n分の精子ゲノムを受け入れることにより形成される可能性を強く示唆した。この推定は、諏訪湖産の三倍体ギンブナには近縁種の精子を受け入れ四倍体となる系統が存在すること²⁴⁾や、人為的に受精卵の温度処理により精子核の取り込みが生じること^{32,33)}が報告されていることから支持されよう。この推定が正しいとすると三倍体ギンブナの受精卵中の雌性前核(3n)が、何らかの環境要因あるいは偶然により精子核(1n)と融合することにより、四倍体(4n)が生じることになる。新たに形成された四倍体では雌雄が生じることが予想されるが、そのうち雌のみが雌性発生によりクローンとして継代されていくのであろう。四倍体が上述の過程により形成されたとすると、ギンブナ四倍体の正体は異種由来の半数体ゲノムを含む異質四倍体である場合も考えられる。今後、四倍体の起源と成立機序については、皇居上道灌漑に同所的に存在する三倍体と四倍体クローンの間で遺伝学的な相違点を比較検討していくことにより解明していきたい。

謝 辞

本研究は「皇居の動物相調査」の一環として行った。ギンブナ標本の採取と輸送にご協力戴いた国立科学博物館動物研究部の松浦啓一博士、篠原現人博士、生物学御研究所および宮内庁庭園課の職員の方々に深く感謝する。フローサイトメーター（FACS Calibur, Becton Dickinson 社製）の使用に当たっては広島大学遺伝子実験施設の協力を得た。ギンブナの飼育と交配実験にあたって広島大学生物生産学部勢登章司氏（現山口県萩市水産事務所）と西村大介氏（現長崎県庁）の助力を得た。記して関係各位に深く感謝する。

文 献

- 小林 弘. 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 1976; **22**: 234-240.
- Yamashita M, Jiang J, Onozato H, Nakanishi T, Nagahama Y. A tripolar spindle formed at meiosis I assures the retention of the original ploidy in the gynogenetic triploid crucian carp, gimbuna *Carassius auratus langsdorfii*. *Dev. Growth Differ.* 1993; **35**: 631-636.
- 小林 弘, 越智尚子. ギンブナとドジョウの精子の媒精により生じた 3 倍体ギンブナの仔魚の染色体について. 動物学雑誌 1972; **81**: 67-71.
- 小林 弘. 3 倍体ギンブナの gynogenesis に関する細胞学的研究. 動物学雑誌 1971; **80**: 316-322.
- Yamashita M, Onozato H, Nakanishi T, Nagahama Y. Breakdown of the sperm nuclear envelope is a prerequisite for male pronucleus formation: Direct evidence from the gynogenetic crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*. *Dev. Biol.* 1990; **137**: 155-160.
- 小野里 坦. クローンブナの話. 淡水魚 1983; **9**: 33-41.
- Nakanishi T. Kinetics of transfer of immunity by immune leucocytes and PFC response to HRBC in isogenic gimbuna crucian carp. *J. Fish Biol.* 1987; **30**: 723-729.
- Nakanishi T. Histocompatibility analyses in tetraploids induced from clonal triploid crucian carp and in gynogenetic diploid goldfish. *J. Fish Biol.* 1987; **31**(Suppl. A): 35-40.
- 董 仕, 谷口順彦, RAPD-PCR およびアイソザイムパターンによるギンブナ一腹子のクローン性の証明. 日水誌 1996; **62**: 891-896.
- 董 仕, 谷口順彦, 辻 壮一. DNA フィンガープリントとアイソザイムパターンによるギンブナクローンの識別. 日水誌 1996; **62**: 747-753.
- Umino T, Sakae K, Morishima K, Arai K, Nakagawa H. Influence of the first-feeding delay on subsequent growth and viability of clonal crucian carp, *Carassius langsdorfii*. *J. Fac. Appl. Biol. Sci., Hiroshima Univ.* 1996; **35**: 125-138.
- Umino T, Arai K, Nakagawa H. Growth performance in clonal crucian carp, *Carassius langsdorfii*. Effect of genetic difference and feeding history. *Aquaculture* 1997; **155**: 271-283.
- Ohara K, Dong S, Taniguchi N. High proportion of heterozygotes in microsatellite DNA loci of wild clonal silver crucian carp, *Carassius langsdorfii*. *Zool. Sci.* 1999; **16**: 909-913.
- Murayama Y, Hijikata M, Nomura T, Kajishima T. Analyses of histocompatibility and isozyme variations in triploid fish, *Carassius auratus langsdorfii*. *J. Fac. Sci., Shinshu Univ.* 1984; **19**: 9-25.
- 大沢康典, 筒井 清, 町田秀夫, 梶島孝雄. 3 倍性ギンブナ *Carassius auratus langsdorfii* の同腹 F1 個体間のクローン性の検討. 信州大学理学部紀要 1984; **19**: 27-35.
- Nakakuki N, Toya H, Sawano K, Kajishima T. On the fertilization of the triploid gimbuna. *J. Fac. Sci., Shinshu Univ.* 1984; **19**: 53-61.
- Kojima K, Matsuyama K, Kawashima M, Kajishima T. Studies on the gametogenesis in polyploid gimbuna *Carassius auratus langsdorfii*. *J. Fac. Sci., Shinshu Univ.* 1984; **19**: 37-52.
- Zhang F, Oshiro T, Takashima F. Chromosome synapsis and recombination during meiotic division in gynogenetic triploid Gimbuna, *Carassius auratus langsdorfii*. *Jpn. J. Ichthyol.* 1992; **39**: 151-155.
- 小林 弘, 川島康代, 竹内直政. フナ属魚類の染色体の比較研究. 特にギンブナに現れた倍数性について. 魚類学雑誌 1970; **17**: 153-160.
- 関谷伸一, 本間義治. 新潟県のフナ属魚類. 新潟の自然 1977; **3**: 263-270.
- 小林 弘, 中野和枝, 中村守純. キンブナ雄との交配により生じた 4 倍体ギンブナの仔魚と, その染色体について. 日水誌 1977; **43**: 31-37.
- 小野里 坦, 鳥澤 雅, 草間政幸. 北海道に於ける倍数体フナの分布. 魚類学雑誌 1983; **30**: 184-190.
- 小林 弘. 倍数性ギンブナの日本および日本周辺地域の分布とその起源について. 月刊海洋科学 1984; **17**: 75-81.
- 中西照幸. クローンギンブナを用いた免疫学・遺伝学研究. 細胞工学 1992; **11**: 569-574.
- Nakanishi T, Ototake M. The graft-versus-host reaction (GVHR) in the gimbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Dev. Comp. Immunol.* 1999; **23**: 15-26.
- Umino T, Arai K, Maeda K, Zhang Q, Sakae K, Niwase I, Nakagawa H. Natural clones detected by multilocus DNA fingerprinting in gynogenetic triploid gimbuna *Carassius langsdorfii* in Kurose river, Hiroshima. *Fisheries Sci.* 1997; **63**: 147-148.
- Zhang Q, Arai K. Flow cytometry for DNA contents of somatic cells and spermatozoa in the progeny of natural tetraploid loach. *Fisheries Sci.* 1996; **62**: 870-877.
- Jeffreys J, Wilson V, Thein S. Individual-specific "fingerprint" of human DNA. *Nature* 1985; **316**: 76-79.
- Spruell P, Cummings A, Kim Y, Thorgaard G. Comparison of three anadromous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) populations using DNA fingerprinting and mixed DNA samples. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1994; **51**(Suppl. 1): 252-257.
- Beçak M, Beçak W, Rabello M. Cytological evidence of constant tetraploidy in the bisexual south american frog *Odontophrynus americanus*. *Chromosoma* 1966; **19**: 188-193.
- 荒井克俊. 魚類の染色体変異とその遺伝資源としての利用. 水産育種 1997; **24**: 3-20.
- Takai A, Ojima Y. Tetraploidy appeared in the offspring of triploid gimbuna, *Carassius auratus langsdorfii* (Cyprinidae, Pisces). *Proc. Jpn. Acad.* 1983; **59B**: 347-350.
- 董 仕, 大原健一, 谷口順彦. 高水温処理によるギンブナ卵へのコイ精子の導入と DNA マーカーによる確認. 日水誌 1997; **63**: 201-206.