



Title	皇居道灌濠における雌性発生ギンブナクロンの識別と分布
Author(s)	前田, 克明; 西村, 大介; 前村, 浩隆 他
Citation	日本水産学会誌, 69(2), 185-191 https://doi.org/10.2331/suisan.69.185
Issue Date	2003
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/35172
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-76.pdf



皇居道灌濠における雌性発生ギンブナクロンの識別と分布

前田 克明,¹ 西村 大介,¹ 前村 浩隆,¹ 森島 輝²
張 全啓,³ 海野 徹也,¹ 中川 平介,¹ 荒井 克俊^{2*}

(2002 年 4 月 15 日受付, 2002 年 10 月 7 日受理)

¹広島大学大学院生物圏科学研究科, ²北海道大学大学院水産科学研究科, ³中国海洋大学海洋生命学院

Identification and distribution of gynogenetic clones in silver crucian carp *Carassius langsdorfii* collected from the Dokanbori moats of the Imperial Palace, Tokyo, Japan

KATSUAKI MAEDA,¹ DAISUKE NISHIMURA,¹ HIROTAKA MAEMURA,¹
KAGAYAKI MORISHIMA,² QUANQI ZHANG,³ TETSUYA UMINO,¹
HEISUKE NAKAGAWA¹ AND KATSUTOSHI ARAI²

¹Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Hiroshima 739-8528,

²Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan, ³College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003 China

A total of 201 silver crucian carp *Carassius langsdorfii* were collected from the inner moats, Kami-dokanbori, Naka-dokanbori and Shimo-dokanbori of the Imperial Palace, Tokyo, Japan, in 1996, 1997 and 1998. These moats were constructed about 400 years ago and the Kami-dokanbori has been separated by a 10 m high causeway from the other moats for at least 100 years. Ploidy determination by DNA content measurements using flow cytometry revealed that all the specimens examined were categorized to 196 triploids and 5 tetraploids. All the triploids sex-checked ($n=136$) were female except for 6 immature individuals. All tetraploids examined ($n=5$) were female. Multilocus DNA fingerprinting identified 7 clonal lines (clone I-VII) based on the genetic identity between at least two samples. Individual specific DNA fingerprints were detected in eight specimens, suggesting the presence of 8 or more independent clonal lines. Among the 7 clones, clone I was the most predominant in the three Dokanbori moats, but the frequency was different among the samples examined in each year. Clone I and VI in the Imperial Palace were genetically identical to clone 8 and 6 detected in the Chugoku district, respectively. High genetic similarities between clone I triploid and four tetraploid individuals shown by DNA fingerprinting analysis suggest that these tetraploids may be produced by accidental incorporation of haploid sperm genome into gynogenetic triploid genotype.

キーワード: *Carassius*, クローン, 倍数体, 雌性発生, 皇居

魚類では雌性発生あるいは雑種発生により単性的に生殖する種・集団の存在が報告されている。^{1,2)} 本邦に生息するギンブナ *Carassius langsdorfii* もその一つであり、小林³⁾は細胞学的研究から、これらが雌性発生を行っていることを認めた。ギンブナには二倍体(染色体数 100)の他に、三倍体(染色体数 156)、四倍体(染色体数 206)が存在し、⁴⁾ これらのうち三倍体と四倍体が雌性発生を行っていた。^{3,5,6)} すなわち、三倍体のギンブナにおいては非還元卵が形成され、^{7,8)} 精子の進入により雌性

発生が開始される。しかし、進入した精子は雄性前核として膨潤せず、雌性前核と合核しない。⁹⁾ 従って、子孫は母親の遺伝的コピーとして発生し、クローンとなる。¹⁰⁾

この様なクローン生殖を行うギンブナ三倍体は日本各地に出現することから、¹¹⁾ 単性生殖における遺伝的多様性の維持機構や倍数性・単性生殖の起源解明の格好の研究材料と捉えられる。現在までに比較的多数のギンブナを含むフナ類の自然集団について調査が行われ、北海

* Tel : 81-138-40-5535. Fax : 81-138-40-5537. Email : araikt@fish.hokudai.ac.jp

道,¹⁰⁾ 広島県,¹²⁾ 広島・山口両県,¹³⁾ 高知県^{14,15)} のギンブナについて鱗移植あるいは DNA 多型分析の手法によりクローン構造が明らかにされてきた。

皇居は東京の中心部に位置し, その自然環境は周囲に比べ良好である。¹⁶⁾ 皇居は 13 の濠に取り巻かれ, 内に 8 つの濠と 2 つの池を持つ。¹⁶⁾ この中の道灌濠は上道灌濠, 中道灌濠および下道灌濠の三つの濠よりなるが, とくに上道灌濠は高い位置にあり, 他の濠より高さ約 10 m の土手により分離され, 他の濠からの水の供給も無い。¹⁶⁾ これらの濠の築造に関する正確な記録はないが約 400 年前の徳川幕府成立前後にさかのぼるといわれる。¹⁷⁾ また, 土手により上道灌濠が分離されたのは 1884 年といわれており,¹⁷⁾ 少なくとも 100 年間は分離されていたようである。

現在のところ, 関東地方のギンブナについて, 倍数性とクローン性の精査が成された例はない。また, 都市化が著しく進んだ首都圏では, 本来の自然分布を期待することは困難であろう。ところが, 皇居の生物相調査により, 上記の皇居道灌濠には三倍体, 四倍体のギンブナが見られ,^{16,18)} それらの卵とキンギョ精子による交配実験と子孫の DNA 分析の結果, 雌性発生によりクローン生殖が行われていることが判明した。¹⁹⁾ 従って, これら倍数体ギンブナは隔離された環境で, 長い期間, 単性的にクローンとして繁殖してきたことになる。このような特殊な環境における倍数性ギンブナについて, クローン生殖の実態を遺伝学的手法により精査した例はない。本研究は, 皇居道灌濠におけるギンブナについて, 倍数性, 性比およびクローン組成を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

供試魚 トラップ, 投網, 刺網, タモ網を用いて, 皇居内上道灌濠より, 1996 年 6 月, 1997 年 6 月, 1998 年 6 月にギンブナ *Carassius langsdorfii* 36 個体, 72 個体, 48 個体を各々採集した。また, 同中道灌濠より 1997 年 6 月に 15 個体, 同下道灌濠より 1998 年 6 月に 30 個体のギンブナを採取した。これらのギンブナは十分に酸素を充填したビニール袋に少量の淡水とともに入れ, 発泡スチロール製の箱に梱包して, 活魚の状態で広島大学生物生産学部(広島県東広島市)に輸送した。本研究で使用した標本は, 一部交配実験¹⁹⁾に供した個体を除き, ホルマリン固定標本として国立科学博物館動物研究部に収蔵した。¹⁶⁾

採血 注射器を用いて, フェノキシエタノールにより麻酔した供試魚の尾部静脈より採血した。血液は通常の方法により血液塗抹標本作製に供される他, 後述の方法により DNA 量フローサイトメトリー, DNA フィンガープリントの試料とした。1997 年の調査では, 塗抹

標本の観察から, 赤血球サイズ²⁰⁾に基づいて四倍体(3 個体)と三倍体(37 個体)を選び出し, クローン性確認のための交配実験¹⁹⁾に供した後, フローサイトメトリーにより, 倍数性を確認した。

性判定 採血後, 一部の個体は開腹し, 生殖腺の肉眼観察により雌雄を判定した。

DNA 量フローサイトメトリー 前報^{12,13,19)}に従い, クエン酸-DMSO 緩衝液(70 mM クエン酸ナトリウム, 250 mM スクロース, 0.5 mL ジメチルスルホキシド, pH 7.6) 1 mL 中に採取血液一滴を取り, 1000 rpm で 5 分間遠心分離を行った。上清除去後, 1 mL の低張染色液(0.1% クエン酸ナトリウム, 50 μ g Propidium Iodide, 2 μ g Nonidet P40)を加え, 混合後, 4°C の冷暗所で 30 分以上染色した。分析前に 40 μ m のフィルターを通し, 細胞の破片を除去した。Coulter EPICS Profile II あるいは Becton Dickinson FACS Calibur フローサイトメーターを用い, アルゴンレーザーイオンの波長を 488 nm に調整して, 相対 DNA 量の分析を行った。

DNA フィンガープリント 前報^{12,13,19)}に従って DNA フィンガープリント分析を行った。すなわち, 常法により抽出した DNA を制限酵素 *HinfI* で消化した後, 0.8% アガロースゲル電気泳動により分離し, ナイロンメンブレンへ転写した。市販のマルチローカスプローブ 33.6 および 33.15 (NICE™ Cellmark Diagnostics, UK), あるいは受託合成したオリゴヌクレオチド (GACA)₄, (GGAT)₄ を Lightsmith II (Promega, USA) によりアルカリファスファターゼ標識したプローブを用いて, メンブレン上に固着した DNA とのハイブリダイゼーションを行い, 化学発光により DNA 断片を検出した。いずれかのプローブにより得られた DNA フィンガープリントについて個体間ですべての断片が共通となったとき, これらの個体を同一クローンのメンバーとして識別した。

遺伝的類似度 同一メンブレン上の DNA フィンガープリントについて, クローンの識別と次式²¹⁾による BSI (Band Sharing Indices) の算定を行った。

$$BSI = 2N_{AB} / (N_A + N_B)$$

ただし, N_A と N_B は個体 A と個体 B の断片数, N_{AB} は両個体の共通断片数である。

結 果

倍数体の出現頻度 Umino *et al.*¹²⁾の場合と同様に, 蛍光ピークの位置により相対 DNA 量を判定し, 倍数性を区別した。それぞれの採集地点, 採集年月の標本における倍数体出現頻度を Table 1 に示す。上道灌濠で見いだした合計 5 個体の四倍体を除いて, 上, 中, 下の道灌濠において本調査で得られたすべてのギンブナ個体は三倍体であり, 二倍体は全く見られなかった。

倍数体の性比 一部の三倍体の性比を調査したところ (Table 2), 肉眼観察により生殖腺の雌雄性を確認できなかった 6 個体を除く全ての個体が雌であった。

三倍体のクローン組成 皇居道灌濠で得たギンブナ三倍体標本の DNA フィンガープリント分析結果の一例を Fig. 1 に示す。Table 3 に示す様に, 皇居の三倍体ギンブナにおいて 7 種類のクローン系統 (クローン I ~ VII) が識別できた。どのクローンにも属さず 1 個体に特異的な DNA フィンガープリントが上道灌濠の 1996 年採取標本で 2 個体, 同 1997 年採取標本で 1 個体, 下道灌濠の 1996 年採取標本で 5 個体見られた。これらも雌性発生により繁殖しているクローンと考えると, 道灌濠全体のクローン数は 15 となる。

Table 1. Frequencies of diploid, triploid and tetraploid silver crucian carp *Carassius langsdorfii* collected from three different inner moats, Kami-dokanbori, Naka-dokanbori, and Shimo-dokanbori of the Imperial Palace, Tokyo, Japan

Moat	Year	Fish no.	Ploidy (%)		
			Diploid	Triploid	Tetraploid
Kami-dokanbori	1996	36	0(0)	35(97.2)	1(2.8)
	1997	72	0(0)	71(98.6)	1(1.4)
	1998	48	0(0)	45(93.8)	3(6.2)
Naka-dokanbori	1997	15	0(0)	15(100)	0(0)
Shimo-dokanbori	1996	30	0(0)	30(100)	0(0)
Total		201	0(0)	196(97.5)	5(2.5)

Table 2. Sex ratio of triploid and tetraploid silver crucian carp *Carassius langsdorfii* collected from the inner moats, Kami-dokanbori and Naka-dokanbori of the Imperial Palace, Tokyo, Japan

Moat	Year	Triploid				Tetraploid			
		No.	Female	Male	Unknown	No.	Female	Male	Unknown
Kami-dokanbori	1996	35	35	0	0	1	1	0	0
	1997	41	37	0	4	1	1	0	0
	1998	45	45	0	0	3	3	0	0
Naka-dokanbori	1997	15	13	0	2	—	—	—	—

Table 3. Clonal lines in the silver crucian carp *Carassius langsdorfii* collected from three different inner moats, Kami-dokanbori, Naka-dokanbori, and Shimo-dokanbori moats, of the Imperial Palace, Tokyo, Japan

Moat	Year	Fish no.	Clone (%)							
			I	II	III	IV	V	VI	VII	Others
Kami-dokanbori	1996	35	11(31.4)	7(20.0)	6(17.3)	9(25.3)	0	0	0	2(5.8)
	1997	71	47(66.2)	4(5.6)	3(4.2)	11(15.5)	0	2(2.8)	3(4.2)	1(1.4)
	1998	45	25(55.5)	0	12(26.7)	5(11.1)	0	0	3(6.7)	0
	Sum	151	83(54.9)	11(7.3)	21(13.9)	25(16.6)	0	2(1.3)	6(4.0)	3(2.0)
Naka-dokanbori	1997	15	7(46.7)	4(26.7)	0	0	0	4(26.7)	0	0
Shimo-dokanbori	1996	30	23(76.6)	0	0	0	2(6.7)	0	0	5(16.7)
	total	196	113(57.6)	15(7.7)	21(10.7)	25(12.7)	2(1.0)	6(3.1)	6(3.1)	8(4.1)

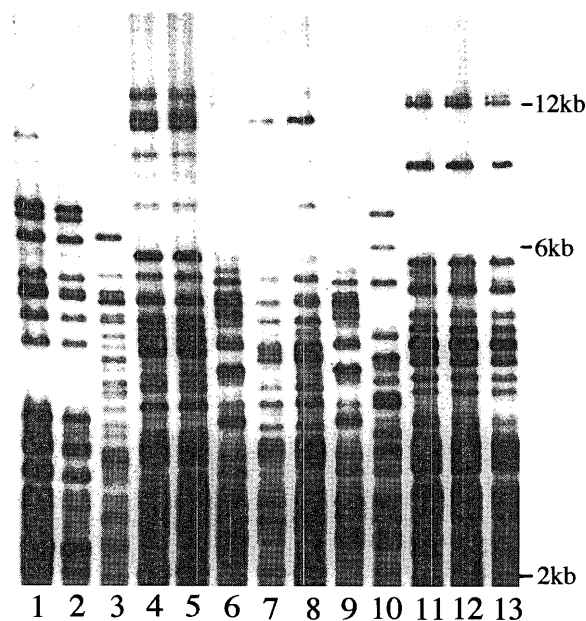


Fig. 1. DNA fingerprints of triploid silver crucian carp *Carassius langsdorfii* specimens from the Kami-dokanbori moat, the Imperial Palace, Japan, digested with *Hinf* I and hybridized with a probe (GACA)₄. Lanes 1-2: clone IV, lane 3: individual specific DNA genotype, lanes 4-5: clone VII, lane 6: clone II, lanes 7-8: clone III, lane 9: clone II, lane 10: clone VI, lanes 11-13: clone I. Molecular sizes are shown in the right side of the gel.

複数個体の出現からクローンであることが確認できたクローンⅠ～Ⅶの分布を見ると, Ⅰ, Ⅱ, Ⅵは上道灌濠と中道灌濠の両方に見られた。クローンⅤは下道灌濠に特異的であった。クローンⅢ, Ⅵ, Ⅶは上道灌濠のみに見られた。道灌濠全体において, クローンⅠの出現率が最も高かったが (57.6%, 113/196), 上道灌濠におけるその頻度は, 1996 年で 31.4%, 1997 年で 66.2%, 1998 年で 55.5% と年毎に異なった。クローンⅣが次に優占的なクローン (12.7%, 25/196) であったが, その上道灌濠における頻度は 1996 年で 25.3%, 1997 年で 15.5%, 1998 年で 11.1% と異なった。1996 年には第 3 位のクローンⅡは, 1997 年には激減し, 1998 年には全く見られなくなった。年ごとの出現率の違いはクローンⅢにおいても見られた。

三倍体クローン間の遺伝的類似度 道灌濠のギンブナの内クローンⅤを除く 6 クローンの DNA フィンガープリントを同一メンブレンで比較して BSI を算出した (Table 4)。BSI 値平均はプローブ 33.6, 33.15, (GGAT)₄ の各々で 0.382 ± 0.127 , 0.351 ± 0.085 , 0.334 ± 0.084 であった。クローンⅠとⅡ, クローンⅢとⅦ, クローンⅠとⅥの組み合わせでは, すべてのプローブにおいて平均よりも高い値を示し, 特にクローンⅢとⅦの間の遺伝的類似度は高かった。

地域間共通クローン 中国地方 (広島県, 山口県) と皇居道灌濠に共通するギンブナクローンの存否を確かめるために, 両者の DNA フィンガープリント像を比較し

たところ, 皇居のクローンⅠ系統とクローンⅥ系統が, 中国地方の 16 クローン¹³⁾中のクローン 8 系統とクローン 6 系統と, それぞれ同一のクローンと判断された (Fig. 2)。

三倍体と四倍体の遺伝的關係 1997 年に 1 個体, 1998 年に 3 個体得られた四倍体について DNA フィンガープリント分析をおこなったところ, 4 個体とも皇居の三倍体クローンⅠと類似度が高かった (Fig. 3)。四倍体は, 三倍体のクローンⅠのパターンに複数の DNA 断片を加えた DNA フィンガープリント像を示し, 遺伝的には 1 個体毎に異なった (Fig. 3)。

皇居クローンⅠと四倍体の間で, 1 制限酵素と 2 プローブで得られた DNA フィンガープリント像の BSI を同一メンブレン上で比較したところ, 平均で 0.946～0.948 の極めて高い値が得られた (Table 5)。

考 察

前報^{16,18,19)}において, 皇居道灌濠にはギンブナ三倍体および四倍体が生息し, 交配実験と DNA フィンガープリント分析から, これらの子孫は雌性発生クローンであることが判明した。本研究において, 3 年間にわたり 201 個体の皇居道灌濠のギンブナを調査したところ, 97.5% が三倍体, 2.5% が四倍体で, 二倍体は全く出現しなかった。これらの内, 性判定を行った個体はすべて雌であった。以上の結果は, これらの倍数体ギンブナのすべてが雌性発生により単性的に繁殖することを示す

Table 4. Interclonal BSI values between 6 clones (Ⅰ～Ⅳ, Ⅵ, Ⅶ) of the silver crucian carp *Carassius langsdorffii* collected from the inner moats of the Imperial Palace, Tokyo, Japan

Probe	Clone	Band no. (>2 kb)	Clone				
			Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅵ	Ⅶ
33.6	Ⅰ	29	0.621	0.222	0.250	0.393	0.441
	Ⅱ	29		0.349	0.250	0.361	0.441
	Ⅲ	34			0.393	0.262	0.644
	Ⅳ	27				0.295	0.475
	Ⅵ	32					0.339
	Ⅶ	30		(m ± s.d. = 0.382 ± 0.127)			
33.15	Ⅰ	36	0.494	0.250	0.267	0.405	0.304
	Ⅱ	41		0.368	0.300	0.238	0.333
	Ⅲ	35			0.378	0.359	0.538
	Ⅳ	39				0.341	0.341
	Ⅵ	43					0.349
	Ⅶ	43		(m ± s.d. = 0.351 ± 0.085)			
(GGAT) ₄	Ⅰ	32	0.421	0.413	0.433	0.345	0.358
	Ⅱ	25		0.286	0.302	0.345	0.328
	Ⅲ	31			0.203	0.421	0.448
	Ⅳ	28				0.259	0.25
	Ⅵ	26					0.194
	Ⅶ	36		(m ± s.d. = 0.334 ± 0.108)			

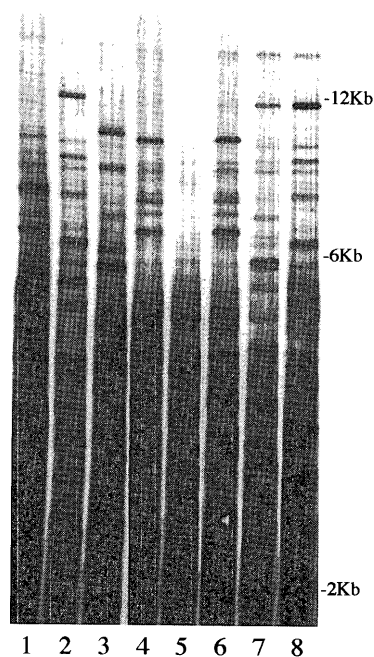


Fig. 2. DNA fingerprints of triploid silver crucian carp *Carassius langsdorfii* specimens from the inner moats of the Imperial Palace, Tokyo (lanes 1–4) and the Kurose River, Hiroshima, Japan (lanes 5–8), digested with *Hinf* I and hybridized with (GGAT)₄. Lane 1: clone IV, lane 2: clone VI, lane 3: clone VII, lane 4: clone I, lane 5: clone 9, lane 6: clone 8, lane 7: clone 7, lane 8: clone 6. Note the identical DNA fingerprinting patterns between clone VI (lane 2) and clone 6 (lane 8), clone I (lane 4) and clone 8 (lane 6). Molecular sizes are shown in the rightside of the gel.

が、今回調査した標本には両性生殖を行う二倍体が全く見いだせなかった。また、倍数体の中にも雄は全く見られなかった。雌性発生には精子は遺伝的に全く関与しないが、発生を開始するための刺激として精子は必須である。^{3,9)} 従って、繁殖には別の種類の雄が精子の供与者として関与している可能性がある。四倍体の DNA フィンガープリント像は三倍体クローンの一つの系統と遺伝的に酷似することから、四倍体個体は精子ゲノムの偶発的取り込みにより生じている可能性が高い。実際、三倍体の卵の温度処理により精子が取り込まれ、四倍体が生じた例も報告されている。^{22–24)} 従って、四倍体のゲノムから、三倍体クローン・ゲノムを引き算した残り 1 セットのゲノムの由来が判れば、精子の供与者となった種が特定できる可能性がある。

魚類では系統分類学的に著しく異なった他属、他科の魚種の精子によっても雌性発生は開始され、¹⁾ 例えばドジョウの精子によってもギンブナの雌性発生は生じる。⁵⁾ しかし、ギンブナと形態と生態が著しく異なる魚種が、精子の供与者となっている可能性は考えにくい。皇居の魚類相調査の結果¹⁶⁾ では、ギンブナ以外のコイ

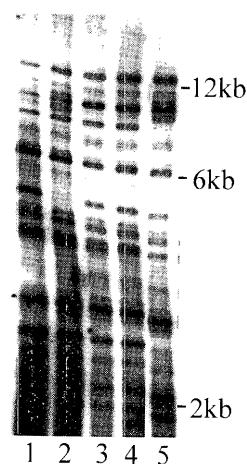


Fig. 3. DNA fingerprints of triploid (lane 5: clone I) and tetraploid silver crucian carp *Carassius langsdorfii* (lanes 1–4) from the Kami-dokanbori moat, digested with *Hinf* I and hybridized with 33.6 probe. Molecular sizes are shown in the rightside of the gel.

Table 5. BSI values between clone I triploid and four tetraploids of the silver crucian carp *Carassius langsdorfii* collected from the Kami-dokanbori moat of the Imperial Palace, Tokyo, Japan

Probe	Clone/ Tetraploid	Band no. (.2 Kb)	Tetraploid			
			4 nA	4 nB	4 nC	4 nD
33.6	I	22	0.936	0.913	0.933	0.913
	4 nA	25		0.980	0.958	0.980
	4 nB	24			0.936	0.958
	4 nC	23				0.979
	4 nD	24	(m ± s.d. = 0.946 ± 0.026)			
(GGAT) ₄	I	17	0.955	0.918	0.977	0.933
	4 nA	21		0.958	0.978	0.979
	4 nB	22			0.936	0.939
	4 nC	18				0.913
	4 nD	23	(m ± s.d. = 0.948 ± 0.025)			

科魚類として、ゲンゴロウブナ *Carassius cuvieri*, ハクレン *Hypophthalmichthys molitrix* が中道灌濠で、そして、上、中、および下道灌濠でモツゴ *Pseudorasbora parva* が採取された。また、ニシキゴイ *Cyprinus carpio* 複数個体が中道灌濠で視認されている。¹⁶⁾ 道灌濠以外の外濠等ではキンブナ *C. auratus* subsp., ゲンゴロウブナ、コイ、ハクレン、ソウギョ *Ctenopharyngodon idellus* の生息が知られている。¹⁶⁾ 現在のところ、これらが道灌濠の倍数体ギンブナに対する精子の供与者候補と考えられるが、その特定は今後の課題として残された。

DNA フィンガープリント法によるクローン組成解析から三倍体においては 7 種類のクローン系統が識別され、さらに個体特異的な DNA フィンガープリントをも

つ個体もクローンと考えると, 系統の総数は 15 となった。上, 中, 下道灌濠の間でクローン組成は異なり, クローン I は三つの濠に共通して出現したが, クローン III, IV, VII は上道灌濠のみに, II と IV は上道灌濠と中道灌濠に見られた。下道灌濠にはクローン I のほか, 上, 中道灌濠に見られないクローン V がいた。

以上の結果は各濠に特有なクローン組成の存在を示唆するが, 道灌濠全体を見ると, クローン I が優占的に出現し, クローン IV と II がこれに次いだ。そして, これらクローンの出現率は年度により異なった。このような少数クローンの優占と年度による組成変動は, 中国地方のギンブナ野生集団においても認められている。¹³⁾ おそらく, クローン組成は, 年ごとの環境変化により影響を受け, 発生した多数のクローン系統のうち, 生息環境に適応したクローンがその水域において優占するものと考えられる。

BSI により DNA フィンガープリントの遺伝的類似度を比較すると, 特にクローン III と VII が類似し, クローン I と II, クローン I と VI も良く似ていた。このような遺伝的類似度が何に起因するかは目下不明であるが, クローンが成立の時点で既に多系統であった場合と, 一つのクローンから複数クローンが派生する場合の二つの可能性が考えられる。後者については, Murayama *et al.*²⁵⁾ と Zhang *et al.*²⁶⁾ が, 本来生じないはずの相同染色体間の部分的対合により遺伝的変異が生じる可能性を示唆しているが, これが複数クローン形成の機構であるか否かは不明である。

中国地方のギンブナ三倍体の DNA 標本^{12,13)} との比較から, 皇居のクローン I と VI は中国地方のクローン 8 と 6 にそれぞれ同一であることが認められた。このような地理的に隔たった水系間における共通クローンの存在は, 中国地方の錦川 (山口県岩国市)―黒瀬川 (広島県東広島市)―沼田川 (広島県三原市),¹³⁾ 黒瀬川―太田川 (広島県広島市)¹³⁾ ならびに四国地方の仁淀川水系と物部川水系の間¹⁵⁾ で確認されてきた。しかし, 中国地方と関東地方の間で遺伝的に同一の共通クローンが出現したことは, クローンの組成, 分布, 成因を考える上で興味深い。このような共通クローン成立の機構を明らかにするためには, 今後, 日本全国におけるギンブナクローンの分布に関する実態の徹底解明が必要と考えられる。

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頂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) の使用にあたっては広島大学遺伝子実験施設の協力を得た。ギンブナの標本整理と分析に当たっては広島大学大学院生物圏科学研究科 (当時) の勢登章司氏, 間田康史氏の協力を得た。記して各位に深く感謝する。

文 献

- 1) Dawley RM. An introduction to unisexual vertebrates. In: Dawley RM, Bogart JP (ed) *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*. New York: State Museum, Albany 1989; 1-18.
- 2) Vrijenhoek RC, Dawley RM, Cole CJ, Bogart JP. A list of known unisexual vertebrates. In: Dawley RM, Bogart JP (ed) *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*. New York: State Museum, Albany 1989; 19-23.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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. 日本誌 1977; **43**: 31-37.
- 7) 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.
- 8) 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, ginbuna *Carassius auratus langsdorfii*. *Dev. Growth Differ.* 1993; **35**: 631-636.
- 9) 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.
- 10) 小野里坦. クローンブナの話. 淡水魚 1983; **9**: 33-41.
- 11) 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.
- 12) Umino T, Arai K, Maeda K, Zhang Q, Sakae K, Niwase I, Nakagawa H. Natural clones detected by multilocus DNA fingerprinting in gynogenetic triploid ginbuna *Carassius langsdorfii* in Kurose river, Hiroshima. *Fish. Sci.* 1997; **63**: 147-148.
- 13) 前田克明, 海野徹也, 森島 輝, 前村浩隆, 張 全啓, 荒井克俊, 中川平介. 広島県と山口県の三倍体ギンブナにおける雌性発生クローンの識別と分布. 広大生物生産紀要 2001; **40**: 15-25.
- 14) 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. 日本誌 1996; **62**: 747-753.
- 15) 大原健一, 董 仕, 谷口順彦. 仁淀川および物部川水系における DNA 多型によるギンブナのクローン判別とそれらの分布. 魚類学雑誌 1998; **45**: 21-27.
- 16) Matsuura K, Shinohara G, Arai K, Nishida M. Fishes from the inside moats of the imperial palace, Tokyo, Japan. *Mem. Natn. Sci. Mus., Tokyo* 2000; (35): 57-68.
- 17) Biological Laboratory of Imperial Household (ed) *Flora*

- Sedis Imperatoris Japoniae*. Hoikusha Publishing Co., Osaka, 1989; 1-546.
- 18) 荒井克俊. お父さんは誰? 皇居上道灌濠ギンブナの謎. 皇居吹上御苑の生き物 (国立科学博物館皇居調査グループ編) 世界文化社, 東京. 2001; 102-107.
 - 19) 間田康史, 海野徹也, 荒井克俊. 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. 日水誌 2001; **67**: 217-221.
 - 20) 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.
 - 21) Wetton JH, Carter RE, Parkin DT, Walters D. Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature* 1990; **327**: 147-149.
 - 22) Takai Y, Ojima Y. Tetraploidy appeared in the offspring of triploid gimbuna, *Carassius auratus langsdorfii* (Cyprinidae, Pisces). *Proc. Japan Acad.* 1983; **59B**: 347-350.
 - 23) 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.
 - 24) 間田康史, 宮川真紀子, 林 大雅, 海野徹也, 荒井克俊. 雌性発生ギンブナにおける精子核導入による四倍体の作出. 水産増殖 2001; **49**: 103-112.
 - 25) 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.
 - 26) 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.

日本水産学会誌掲載報文要旨

全周型スキャニングソナーによる表層魚群の体積散乱強度の計測方法

湯 勇, 古澤昌彦 (東水大), 青山 繁 (古野電気),
樊 春明 (東水大), 西森 靖 (古野電気)

計量魚群探知機による表層魚群の資源調査は、魚群が船に対して逃避行動を示すなどの問題があり、結果の信頼性が低い。そこで、計量用のソナーの開発が期待される。本研究は、その第一歩として、市販の漁業用全周型スキャニングソナーの定量化を試みる。定量化ソナーシステムを構成し、標準球を用いてソナーの校正を行い、表層魚群の観測実験を行った。受信系から生のエコー信号をコンピュータに取り込み、後処理で、表層魚群のエコーを追跡し、生の体積散乱強度 (SV) を求め、調査船の航走海域における表層魚群の生の SV の分布を表示した。本研究により、ソナーによる表層魚群計測の有効性と、本格的な計量用ソナーの開発の可能性が確かめられた。

日水誌, **69**(2), 153-161 (2003)

アカアマダイ漁獲鮮魚から採取した精巢精子の運動活性と冷蔵保存

藤浪祐一郎, 竹内宏行, 津崎龍雄 (日裁協宮津),
太田博巳 (養殖研)

漁獲され、死亡したアカアマダイ雄成魚の精巢精子の採取方法、運動活性、冷蔵保存方法を検討した。精巢を細かく切断する方法とホモジナイズする方法で精子を採取したところ、後者では運動精子比が有意に低下した。精子を種々の濃度の NaCl 溶液で希釈すると、450 mM で最も高い運動精子比が得られた。この溶液中では 20 分後でも精子は運動を持続していた。冷蔵保存は pH を 6.0~8.5 に調整した人工精漿で精巢精液を 50 倍以上に希釈し、4℃で保存する方法が適していた。

日水誌, **69**(2), 162-169 (2003)

モノクローナル抗体を用いた浮遊性魚卵の同定

大西庸介, 池田知司 (KANSO),

広石伸互 (福井県大生物資源), 沖山宗雄 (東大海洋研)

モノクローナル抗体 (単抗体) 法による魚卵同定の有効性を確認することを目的とし、マダイ卵を抗原として作製した単抗体 (MT-1) を用いて、マダイの種内、類縁種間、および野外採集卵に対する反応性を調べた。MT-1 は親魚の異なるマダイ卵に対し全て陽性反応を示し、類縁種のヘダイ、クロダイ、キダイに対しては陰性反応を示した。また、野外で採取したマダイを除く 8 種類の浮遊性魚卵に対し全て陰性反応を示し、マダイの産卵期を過ぎた 7 月に採取した浮遊性魚卵に対しては全て陰性反応を示した。

以上、MT-1 はマダイ卵に特異的に反応することを確認し、単抗体法は従来同定の困難であった浮遊性魚卵の同定に適用可能な技術であることを明らかにした。

日水誌, **69**(2), 170-177 (2003)

日本の主要な漁港におけるサメ類の種別水揚げ量の推定

松永浩昌, 中野秀樹 (遠洋水研),
石橋陽一郎, 中山健平 (NUS)

日本におけるサメ類の種別・漁法別水揚げ量を明らかにする目的で、主要な漁港で市場伝票整理に基づくサメ類の水揚げ量調査を行なった。製品重量では 1992~98 年の漁法全体で年平均 19,600 トン、延縄で 15,000 トンの内、ヨシキリザメが 11,600 トン (59%), 11,000 トン (73%) であった。更に生体重量に換算した結果、全漁法で年平均 28,700 トン、延縄 23,400 トンとなり、同様にヨシキリザメが 18,800 トン (66%), 17,800 トン (76%) であり、何れの場合も 6~8 割程度がヨシキリザメで占められていた。ヨシキリザメ以外ではネズミザメ、アオザメが 10% 前後、オナガザメ類が 5% 程度と、比較的多く水揚げされていた。また、これら主要種の水揚げ量が減少しているような傾向は見られなかった。

日水誌, **69**(2), 178-184 (2003)

皇居道灌濠における雌性発生ギンブナクロンの識別と分布

前田克明, 西村大介, 前村浩隆 (広大院生物圏),
森島 輝 (北大院水), 張 全啓 (中国海洋大),
海野徹也, 中川平介 (広大院生物圏),
荒井克俊 (北大院水)

1996-1998 年の皇居の上、中および下道灌濠で得たギンブナ 201 個体は三倍体 (196) と四倍体 (5) であり、それらの内、性判別を行った個体はすべて雌であった。DNA フィンガープリント分析の結果、7 クローン (I-VII) が識別され、他に 8 個体が個体特異的パターンを示した。各クロンの出現頻度は年と濠により異なったが、クローン I が最も優占的であった。三倍体クローン I と VI は広島県黒瀬川のクローン 8 と 6 と各々同一であった。三倍体クローン I と四倍体個体の DNA フィンガープリントは酷似し、四倍体は三倍体から生じたものと示唆された。 日水誌, **69**(2), 185-191 (2003)

コイの遊泳時の心拍数変化と回復過程

伊東裕子, 秋山清二, 有元貴文 (東水大)

回流水槽を用いてコイに強制遊泳させ、遊泳時の心拍数変化とその後の回復過程について検討した。遊泳速度 1 BL/s では大きな心拍数変化はなかったが、2~5 BL/s では遊泳時に急激に増加し、最大で平常時の 2.7 倍に達した。しかし、遊泳速度を速めても心拍数の増加割合がさらに増すことはなかった。遊泳後の心拍数は、低速条件では早い段階で平常時レベルまで回復したが、3 BL/s 以上では回復に時間のかかる個体が認められた。遊泳時間を 60 分に延長しても、全体的に遊泳時間 10 分の場合と同様の心拍数変化を示した。

日水誌, **69**(2), 192-196 (2003)