RAPD-PCR およびアイソザイムパターンによる
ギンブナー腹子のクローン性の証明

董 仕, 谷口順彦

(1995年12月18日受付)

Clonal Nature of Offsprings of Ginbuna *Carassius langsdorffii*
by RAPD-PCR and Isozyme Patterns*¹Shi Dong*² and Nobuhiko Taniguchi*²

The eggs of Ginbuna *Carassius langsdorffii* (all female triploids) were inseminated by the sperm of a Gengoroubuna *Carassius cuvieri* and a common carp *Cyprinus carpio* respectively. DNA extracted from blood of parents and offsprings were amplified using 20 random primers and separated by electrophoresis (RAPD-PCR). Isozymes of muscle and liver of parents and offsprings were assayed by the horizontal starch gel electrophoresis. Distinct differences by maternal fish were observed in the patterns of both RAPD-PCR (17 primers) and isozymes (CK, EST, GPI, PGM), but those of offsprings produced by crossing with Gengoroubuna and common carp respectively were the same completely within the maternal fish. Therefore, the results obtained in this study verified that the offsprings from Ginbuna were clonal genetically, being the same with maternal fish throughout the genome.

キーワード: ギンブナ, 一腹子, クローン, RAPD, アイソザイム, RAPD-PCR

西日本のギンブナ *Carassius langsdorffii*¹⁾は三倍体で、雌性発生による生殖を行うと言われている。¹⁻⁴⁾ ギンブナの雌性発生に関しては、それらの子供は雄親の遺伝物質を備えていないことを確かめる必要がある。また、親魚の遺伝子型が子供にどのように伝わるかということも解明すべき課題である。大沢ら⁵⁾は染色体数、筋漿タンパクとアイソザイムの電気泳動パターンで一部の交配において雄親ゲノムが三倍体の卵に導入され、三倍体ギンブナの子供が四倍体となったことを観察した。Murayama *et al.*⁶⁾は三倍体ギンブナの子供が雄親の透明鱗の特徴を持つことを明らかにした。また、雌性発生については雄親の遺伝物質が三倍体の卵に導入されず、子供がクローンである場合とクローンではない場合がある。⁵⁻⁹⁾ 一方、高知県の天然ギンブナはDNAフィンガープリントとアイソザイムの分析によって複数のクローン系の混合集団であることが明らかにされた。¹⁰⁾

アイソザイムは遺伝的マーカーとして魚の自然集団や人工種苗の遺伝的特性の解明に有用である。¹¹⁻¹³⁾ また、最近開発されたRAPD-PCR (random amplified poly-

morphic DNA-polymerase chain reaction) はPCR法によりランダムプライマーを用い、サンプルの鋳型DNAを増幅して、遺伝的マーカーを検出する方法である。RAPDマーカーは親から子へ正確に遺伝することが知られ、¹⁴⁾ 魚種の判別に有用であると報告されている。^{15,16)}

本研究はギンブナの子供に雄親由来の遺伝物質が全く発現しないかどうか、成熟分裂の過程で動原体と遺伝子の組み換えが起こるか否かなどの現象を解明するため、人工交配により作出した一腹子のRAPDとアイソザイム多型の解析を行った。

実験方法

交配 1994年5月高知県物部川水系から採集したギンブナの雌親2尾から採卵し、それぞれの卵を2分し、ゲンゴロウブナ *Carassius cuvieri*¹⁾ 1尾とコイ *Cyprinus carpio* 1尾の精子でそれぞれ媒精することにより、4つの実験区を設けた。それぞれの子供を別々の100 l水槽で飼育した。

*¹ 1995年度日本魚類学会年会において口頭発表した。

*² 高知大学農学部栽培漁業学科 (Department of Aquaculture, Faculty of Agriculture, Kochi University, Monobe, Nankoku, Kochi 783, Japan)。

供試魚の倍数性の判別 親魚および子供の倍数性は赤血球のサイズ¹⁷⁾および筋漿タンパクの電気泳動パターン¹⁾により判別した。血液標本は供試魚の尾部血管から得た血液を塗抹することにより作成し、塗抹標本をギムザ染色した後、1000倍顕微鏡で赤血球の長径および赤血球の核の長径を測定した。¹⁸⁾

DNAの抽出およびRAPD-PCR法 雌親2尾、雄親2尾および4つの実験区各3尾ずつの供試魚の尾部血管から0.02–0.25 ml採血した。各血液サンプルに10 mlのNaCl/EDTA溶液(0.8% NaCl, 1 mM EDTA・2Na)に加え、遠心して得た赤血球に10 ml TNE-バッファー(10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA・2Na), 1 ml 10% SDS, 1100 µgのプロティナーゼKを加え、58°Cで4時間、37°C 1晩インキュベートした。中性フェノールで2回、中性フェノールとクロロホルムおよびイソアミルアルコールの混液(25:24:1)で1回、クロロホルムとイソアミルアルコール混液(24:1)で1回処理した後、3M酢酸ナトリウムと–20°CのアルコールでDNAを沈澱させ、TE-バッファー(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA・2Na)で溶解した。それぞれのDNAサンプルをRAPD-PCRの鋳型とし、

OPA-01からOPA-20までの20個のランダムプライマー(10塩基)(Operon社, USA)およびProgrammable Thermal Controller, Models-60(MJ・Research社, USA)を用い、94°C 1分間変性→36°C 1分間アニーリング→72°C 2分間の伸長反応の35サイクルのPCR法で増幅した。増幅したDNA断片をミュービットー2電気泳動システム(コスモ・バイオ社)で1.2%アガロース(FMC, USA)ゲル電気泳動法により分離し、臭化エチジウムで染色したあと、ボラロイドカメラで写真撮影した。電気泳動にTOYOBOのλ/Hind III digest-φX174/Hinc II digestをDNAサイズマーカーとして用いた。

アイソザイムの検出 雌親2尾、雄親2尾および4つの実験区各4尾ずつの供試魚を–20°C冷凍し、筋肉と肝臓を試料とし、水平式デンブングル電気泳動法によりアイソザイムを検出した。¹¹⁾ 検出したタンパクおよびアイソザイムは筋漿タンパク(PROT), クレアチンキナーゼ(CK; EC: 2.7. 3.2), エステラーゼ(EST; EC: 3.1. 1.-), グルコースリン酸イソメラーゼ(GPI; EC: 5.3. 1.9), ホスフォグルコムターゼ(PGM; EC: 5.4. 2.2)であった。電気泳動用バッファーはPROT, CKに

Table 1. Parents and offsprings used for measurement of red blood cell (RBC) size, and analysis of RAPD marker and isozyme pattern

Samples	Major diameter of RBC (µm)	Major diameter of nucleus of RBC (µm)	Fish used for RAPD	Fish used for isozyme
Parents				
1. Female Ginbuna	18.0±0.47	7.8±0.41	+	+
2. Female Ginbuna	19.0±0.78	7.5±0.29	+	+
3. Male Gengoroubuna	12.6±0.67	5.3±0.11	+	+
4. Male Common carp	14.8±0.98	5.5±0.34	+	+
Offsprings				
1×3 (1)	18.1±0.87	8.0±0.50	+	+
(2)	18.1±0.45	7.7±0.21	+	+
(3)	17.7±0.78	7.9±0.28	+	+
(4)	17.8±0.90	7.9±0.40	–	+
1×4 (1)	17.9±0.11	7.4±0.14	+	+
(2)	17.6±0.32	8.0±0.27	+	+
(3)	18.2±0.16	7.8±0.23	+	+
(4)	18.0±0.24	7.9±0.27	–	+
2×3 (1)	17.0±0.63	7.1±0.19	+	+
(2)	16.0±0.56	7.1±0.17	+	+
(3)	17.1±0.45	7.1±0.19	+	+
(4)	16.6±0.72	7.0±0.37	–	+
2×4 (1)	17.7±0.28	7.9±0.24	+	+
(2)	16.9±0.68	7.5±0.14	+	+
(3)	16.8±0.75	7.5±0.19	+	+
(4)	17.5±0.65	8.1±0.31	–	+

対して、トリスホウ酸-EDTA 緩衝液 (TBE Buffer)¹¹⁾ を、EST, GPI, PGM に対して、トリスクエン酸緩衝液 (T-C Buffer, pH 8.0)¹¹⁾ を用いた。

結 果

赤血球のサイズおよび筋漿蛋白 (PROT) の電気泳動パターン 供試魚の赤血球および核の長径を Table 1 に示した。雌親ギンブナ 1 の赤血球の長径は $18.0\ \mu\text{m}$ であり、雌親ギンブナ 2 の赤血球の長径は $19.0\ \mu\text{m}$ であった。雄親ゲンゴロウブナの子供の赤血球の長径は $12.6\ \mu\text{m}$ であり、雄親コイの子供の赤血球の長径は $14.8\ \mu\text{m}$ であった。ギンブナ 1×ゲンゴロウブナの子供の赤血球の長径は $17.7\text{--}18.1\ \mu\text{m}$ であり、ギンブナ 1×コイの子供の赤血球の長径は $17.6\text{--}18.2\ \mu\text{m}$ であった。ギンブナ 2×ゲン

ゴロウブナの子供の赤血球の長径は $16.0\text{--}17.1\ \mu\text{m}$ であり、ギンブナ 2×コイの子供の赤血球の長径は $16.8\text{--}17.7\ \mu\text{m}$ であった。全ての交配において子供の子供の赤血球と核の長径はそれぞれの雄親の赤血球と核の長径より明確に長く、三倍体と判定された。PROT においては雌親ギンブナ 1 と雌親ギンブナ 2 の電気泳動パターンは谷口¹⁾のギンブナの PROT パターンのタイプ II と一致し、雄親ゲンゴロウブナのパターンはタイプ III であった。雄親コイのパターンは雌親ギンブナと雄親ゲンゴロウブナと明らかに異なっていた。雌親ギンブナ 1 とギンブナ 2、雄親ゲンゴロウブナ、雄親コイおよびそれらの子供の PROT の電気泳動像を Fig. 1 に示した。

以上の結果より雌親ギンブナ 1 と雌親ギンブナ 2 は明らかに三倍体、雄親ゲンゴロウブナとコイは二倍体、

Fig. 1. Electrophoretic patterns of general protein (PROT) of skeletal muscle of parental fish: Ginbuna (♀), Gengoroubuna (♂), common carp (♂) and their offsprings.

1 and 2: Female Ginbuna; 3 and 4: Male Gengoroubuna and common carp.

Fig. 2. Electrophoretic patterns of DNA fragments amplified by RAPD-PCR in Ginbuna, Gengoroubuna, common carp and their offsprings.

Primer: OPA-0.2 1 and 2: Female Ginbuna; 3 and 4: Male Gengoroubuna and common carp.

それぞれの子供は雄親に関わりなく、すべて三倍体であることが分かった。

RAPD-PCR パターン 20 個のプライマーのうち、OPA-5, OPA-17, OPA-19 の三つのプライマーではほとんど DNA 断片を増幅しなかったが、残りの 17 個のプライマーで増幅 DNA 断片が得られ、それらの電気泳動パターンを得た。いずれも用いた親魚種間およびギンブ

ナ雌親魚間に明瞭な差が認められた。Figs. 2, 3, 4 はそれらの代表例である。Figs. 2, 3, 4 は OPA-02, OPA-07, OPA-11 プライマーで得た電気泳動像で、Figs. 2, 3, 4 に示したように 495-4361 塩基対の間に 2 尾雌親ギンブナ、雄親ゲンゴロウブナおよび雄親コイにおいて出現した DNA 断片のバンドには顕著な差が認められ、増幅した DNA 断片のサイズが異なった。それぞれの子供

Fig. 3. Electrophoretic patterns of DNA fragments amplified by RAPD-PCR in Ginbuna, Gengoroubuna, common carp and their offsprings. *

Primer: OPA-0.7. 1 and 2: Femal Ginbuna; 3 and 4: Male Gengoroubuna and common carp.

Fig. 4. Electrophoretic patterns of DNA fragments amplified by RAPD-PCR in Ginbuna, Gengoroubuna, common carp and their offsprings.

Primer: OPA-11. 1 and 2: Female Ginbuna; 3 and 4: Male Gengoroubuna and common carp.

には用いた雄親に関わりなく、雌親ギンブナ由来のバンドしか見られなかった。増幅したそれぞれの子供のDNA断片の電気泳動像で出現したバンド数とバンドの位置はそれぞれの雌親と同じであった。

アイソザイムの電気泳動パターン 供試魚のCK, EST, PGM, GPIの電気泳動像をFig. 5に示した。

供試魚のCKにおいて雌親ギンブナ1は二本のバンドを示した。CK遺伝子座には二つの対立遺伝子B, Cが推定され、遺伝子型はヘテロ型, BBC型と判定された。雌親ギンブナ2は三本のバンドを示し、遺伝子型はヘテロ型, ABC型と判定された。雌親ギンブナ1と2はギンブナの特徴のC遺伝子を持っていた。^{*3} それぞれの子供は雌親のバンドを持つことなく、それぞれの雌親と一致し、全部ヘテロ型で、BBC型およびABC型であった。

ESTの泳動像においては雌親ギンブナ1は三本のバンド、雌親ギンブナ2は四本のバンド、雄親ゲンゴロウブナは二本のバンド、雄親コイは一本のバンドを示した。雌親ギンブナ1の子供は三本のバンド、雌親ギン

ブナ2の子供は四本のバンドで、それぞれの雌親と同じであった。

PGMの泳動像においては雌親ギンブナ1は四本のバンド、雌親ギンブナ2は二本のバンド、雄親ゲンゴロウブナは一本のバンド、雄親コイは一本のバンドであった。それぞれの子供はそれぞれの雌親と同じであった。

GPIの泳動像においては雌親ギンブナ1, 雌親ギンブナ2, 雄親ゲンゴロウブナおよび雄親コイの間に顕著な差が認められ、それぞれの子供はそれぞれの雌親と同じであった。

なお、EST, PGM, GPIにおいては複数の遺伝子座が推定されたが、それらを区別することはできなかった。

以上の結果、アイソザイムにおいて子供は遺伝子型はそれぞれの雌親と完全に同じであることが判明した。

考 察

RAPD-PCRによる雌性発生の証明と親子の判別 Dinesh *et al.*¹³⁾は9-20塩基のスクレオチドプライマーで熱帯と温帯の12種類の魚のDNAを、Takagi and

Fig. 5. Schematic diagrams of electrophoresis of isozymes extracted from skeletal muscle (CK, PGM), liver (EST, GPI) in Ginbuna, Gengoroubuna, common carp and their offsprings.
1 and 2: Female Ginbuna; 3 and 4: Male Gengoroubuna and common carp.

^{*3} 董 仕, 谷口順彦: 平成6年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, 1994, p. 130.

Taniguchi¹⁶⁾は10塩基のランダムプライマーで3種類のウナギのDNAをランダムに増幅し、それぞれの魚種の判別ができることを示した。Garcia and Benzie¹⁴⁾は14種類のプライマーでテナガエビのDNAを鋳型とし、増幅したDNA断片が優性と劣性遺伝子の特徴を示し、親から子へ正確に遺伝することを報告した。本研究では17個のプライマーを用いたところ、明らかにギンブナの雌親個体間およびギンブナと雄親に用いたゲンゴロウブナとコイの間にRAPDパターンの違いが認められた。また、ギンブナの子供は雌親ゲンゴロウブナとコイの遺伝物質を持っていないことが証明された。2尾のギンブナの子供はそれぞれの雌親と同じRAPDパターンを示し、雌親による違いが認められた。以上のRAPDマーカーによる結果はアイソザイムの分析結果と一致した。

以上の結果、ギンブナが雌性発生による繁殖をすることがあらためて遺伝標識により証明された。

ギンブナの子供のクローン性 Murayama *et al.*,⁶⁾ 大沢⁵⁾は組織移植、染色体数、筋漿タンパクとアイソザイムの電気泳動などの方法により三倍体ギンブナが三倍体クローン、三倍体非クローン、四倍体の子供を産出したことを報告した。Kojima *et al.*,⁷⁾ Zhang *et al.*⁸⁾は配偶子形成の観察およびアイソザイムの電気泳動パターンに基づき、ギンブナの卵形成時に動原体と遺伝子の間に組み換えが起こり、子供が必ずしもクローンでない可能性を示唆した。小林,²⁾ 小林, 越智³⁾およびYamashita *et al.*⁴⁾は三倍体ギンブナが雌性発生により繁殖することを細胞学的に解明している。小野里⁹⁾は赤血球サイズ、アイソザイムの電気泳動パターンおよび鱗移植により三倍体ギンブナの一腹子がクローンであることを証明した。

本研究では赤血球サイズ、RAPDマーカーおよびアイソザイムの電気泳動パターンにおいてギンブナは雌性発生により繁殖し、しかも一腹子アイソザイムの遺伝子型は全て雌親と同じで、ギンブナの一腹子はクローン魚となることが証明された。また、卵形成時に動原体と遺伝子の間に組み換えの証拠は認められなかった。しかし、ギンブナのクローン性については前述のように一腹子内にアイソザイムなどの変異が認められる事例もある。⁵⁻⁸⁾したがって、今後事例内の供試魚数をもっと増やす必要がある。また、より多くの地方のより多くの事例について研究を展開してゆく必要があると思われる。

文 献

- 1) 谷口順彦：西日本のフナ属魚類オオキンブナをめぐって。淡水魚, 8, 59-68 (1982)。
- 2) 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, 80, 316-322 (1971)。
- 3) 小林 弘, 越智尚子：キ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, 81, 67-71 (1972)。
- 4) M. Yamashita, J. Jiang, H. Onozato, T. Nakanishi, and Y. Nagahama: A tripolar spindle formed at meiosis I assures the retention of the original ploidy in the gynogenetic triploid crucian carp, *Ginbuna Carassius auratus langsdorffii*. *Develop. Growth & Differ.*, 35, 631-636 (1993)。
- 5) 大沢康典, 筒井 清, 町田秀夫, 梶島孝雄：三倍性ギンブナ *Carassius auratus langsdorffii* の同腹 F₁ 個体間のクローン性の検討。J. Fac. Sci. Shinshu University, 19, 27-35 (1984)。
- 6) Y. Murayama, M. Hijikata, T. Nomura, and T. Kajishima: Analyses of histocompatibility and isozyme variations in triploid fish, *Carassius auratus langsdorffii*. J. Fac. Sci. Shinshu University, 19, 9-25 (1984)。
- 7) K. Kojima, K. Matsumura, M. Kawashima, and T. Kajishima: Studies on the gametogenesis in polyploid *Ginbuna Carassius auratus langsdorffii*. J. Fac. Sci. Shinshu University, 19, 37-52 (1984)。
- 8) F. Zhang, T. Oshiro, and F. Takashima: Chromosome synapsis and recombination during meiotic division in gynogenetic triploid *Ginbuna Carassius auratus langsdorffii*. *Japan. J. Ichthyol.*, 39, 151-155 (1992)。
- 9) 小野里坦：クローンブナの話。淡水魚, 9, 33-41 (1983)。
- 10) 董 仕, 谷口順彦, 辻 莊一：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, 62, 747-753 (1996)。
- 11) 谷口順彦, 岡田容典：マダいの生化学的多型に関する遺伝学的研究。日本誌, 46, 437-443 (1980)。
- 12) 董 仕, 谷口順彦：コイの同質三倍体と異質三倍体のアロザイム、成長および形態。水産増殖, 41, 35-43 (1993)。
- 13) N. Taniguchi, H. Hatanaka, and S. Seki: Genetic variation quantitative characters of meiotic and mitotic-gynogenetic diploid Ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Aquaculture*, 85, 223-233 (1990)。
- 14) D. K. Garcia and J. A. H. Benzie: RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. *Aquaculture*, 130, 137-144 (1995)。
- 15) K. R. Dinesh, T. M. Lim, K. L. Chua, W. K. Chan, and V. P. E. Phang: RAPD analysis: an efficient method of DNA fingerprinting in fishes. *Zoological science*, 10, 849-854 (1993)。
- 16) M. Takagi and N. Taniguchi: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of three species of *Anguilla*, *A. japonica*, *A. australis* and *A. bicolor*. *Fisheries Science*, 61, 884-885 (1995)。
- 17) 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, 30, 184-190 (1983)。
- 18) 瀬崎啓次郎, 小林 弘, 中村守純：2倍体および3倍体ギンブナの赤血球の比較。魚類学雑誌, 24, 135-140 (1977)。