

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

大沢康典・筒井 清・町田秀夫・梶島孝雄

信州大学理学部生物学教室
(1984年3月21日受理)

緒 論

ギンブナ (*Carassius auratus langsdorfii*) には、染色体数100の2倍性、156の3倍性、206の4倍性個体が存在し (小林ら1970)、3倍性ギンブナはすべて雌で、雌性発生により繁殖することが知られている (小林1971, 1976)。3倍性ギンブナは、卵成熟分裂過程において同型核分裂を1回行うだけであり、親の染色体数がそのまま卵に引き継がれる (小林1976)。さらにその卵は近縁魚類の精子で付活され発生を開始するが、精子核は雌性前核と融合しない (小林1971)。従って3倍性ギンブナの子孫は、雌親と同一の遺伝子組成を持つクローンであると考えられている。

土方ら (1983) は、自然集団の3倍性ギンブナについて、酵素と水溶性筋タンパク質の電気泳動実験、および鱗移植免疫実験を行い、自然個体間におけるクローンの検討を行った。その結果、3倍ギンブナの自然集団は多様性に富むことが示された。本研究は、その原因を明らかにする目的から、3倍性ギンブナの同腹の F₁ 個体を用いて、倍数性の判定と電気泳動法によりアイソザイムパターンの比較を行った。また F₁ 個体が安定した成魚のアイソザイムパターンに達する時期を決定するため、発生に伴うアイソザイムパターンの変化についても検討した。

材料および方法

材料魚を得るための雌親には長野県諏訪湖、上田市周辺で採集した3倍性ギンブナを用い、雄親には諏訪湖産の2倍性フナと実験室で飼育したシュブンキン (ヘテロ透明鱗性; 優性形質)、ワキンを用い、これらの間の媒精により得られた F₁ 個体を使用した。使用した材料魚については表1に示してある。

倍数性の判定

倍数性は、赤血球核をフォイルゲン染色後、オリンパス顕微分光光度計により、DNA量の相対値を求めて判定した。また可能なものについては、腎細胞または尾びれ上皮由来培養細胞を用いて通常の空気乾燥法により染色体標本を作成し、算定した。

電気泳動法

アルコール脱水素酵素 (Adh)、グルコン酸6リン酸脱水素酵素 (6 Pgdh)、グルコースリン酸ムターゼ (Pgm)、エステラーゼ (Est) の各アイソザイム、および水溶性筋タンパク質 (M. P.) について調査した。

表1 材料に用いた交配系

名 称	交 配 系			子 孫 数		
	♀	♂		♀	♂	?
1(D)	ギンブナ	1 (3n)	× フナ (2n)	不	明	
2(D)	ギンブナ	2 (3n)	× フナ (2n)	不	明	
3(Tt)	ギンブナ	3 (3n)	× シュブンキン (2n)	4	—	—
4(D)	ギンブナ	4 (3n)	× フナ (2n)	4	—	—
4(Tt)	ギンブナ	4 (3n)	× シュブンキン (2n)	1	1	—
5(D)	ギンブナ	5 (3n)	× フナ (2n)	7	—	1
6(Tt)	ギンブナ	6 (3n)	× シュブンキン (2n)	—	3	—
7(D)	ギンブナ	7 (3n)	× フナ (2n)	5	—	—
7(G)	ギンブナ	7 (3n)	× ワキン (2n)	2	—	2
8(D)	ギンブナ	8 (3n)	× フナ (2n)	1	1	—
9(Tt)	ギンブナ	9 (3n)	× シュブンキン (2n)	3	—	—

材料魚は、1ヶ月以上実験室内で同一飼料を与え、23~25°Cの定水温の水槽中で飼育した。これらの材料魚を断頭後解体し、肝臓および背びれ下の筋肉を摘出し、-20°Cで冷凍保存した。肝臓試料は、Adh, Estでは約3倍量、6Pgdh, Pgmでは約5倍量の0.01 M Tris-HCl pH7.0の緩衝液と共にホモゲナイズし、0°C, 15,000回転/分で30分間遠心した。筋肉試料は、約5倍量のD.W.と共にホモゲナイズし、0°C, 15,000回転/分で30分間遠心した。遠心後それぞれの上清を電気泳動用試料とした。

ただし発生に伴うアイソザイムパターンの変化を調べる場合、肝臓摘出が不可能な小型のF₁個体は、個体全体を試料とした。

Adh, 6Pgdh, Pgm, Estの各アイソザイムについては、水平平板加水分解デンブングル電気泳動法を用いた。泳動条件については表2に示してある。泳動終了後直ちにSHAW and PRASAD (1969), PHILIPP *et al.* (1974) に準じゲルに酵素特異染色を施し、染色終了後

表2 電気泳動実験の方法

	アルコール 脱水素酵素 (1.1.1.1)	エステラーゼ (3.1.1.-)	グルコン酸6リン 酸脱水素酵素 (1.1.1.43)	グルコースリ ン酸ムターゼ (2.7.5.1)	筋タンパク質
ゲルの種類	加水分解デンブングル (手製) 14-15%(W/V)				アクリルアミド 5%(W/V)
電極緩衝液	0.180M トリス-0.150M ホウ酸 pH 8.5		0.155M トリス-0.043M クエン酸 pH 7.0		0.180M トリス-0.150M ホウ酸 pH 8.4
ゲル緩衝液	電極緩衝液を10倍希釈して使用				
泳動条件	200V, 17時間		200V, 15時間		30mA B.P.B.が9 cm 移動するまで.

固定液（メタノール：酢酸：D. W.=5：1：5）で固定した。

M. P.については、水平平板ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いた。泳動条件は表2に示してある。泳動終了後ゲルを12.5% TCA で固定し、クーマシプリリアントブルー R250 で染色した後、10%トリクロロ酢酸で弁色を行った。

結 果

発生に伴うアイソザイムパターンの変化

1 (D), 2 (D)の2系列のF₁ 個体について受精後60日目からほぼ10日間隔で200日目まで調査した。Adh は, 1 (D)で受精後116日以降パターンが安定して雌親と一致し, 2 (D)では105日以降安定した。6 Pgdh は, 1 (D)で157日で雌親と一致し, 2 (D)では105日以降パターンが安定した。Pgm は, 1 (D)で152日, 2 (D)で131日以降パターンが安定した。また Est は, 1 (D)で130日, 2 (D)では105日以降パターンが安定した。

同腹 F₁ のアイソザイムパターンおよび M. P. の電気泳動パターン

3 (Tt)以下の9系列で調査した。3 (Tt)のF₁ 4個体は, すべて雌であり, 雄親の持つ透明鱗の形質は認められなかった。4 酵素のアイソザイムパターンは, F₁ 個体ですべて一致し, また雌親とも完全に一致した (図版1-1)。

4 (D)と4 (Tt)は, 同一個体の3倍性ギンブナ卵を異った雄の精子で媒精して得られたF₁であるが, 4 (D)の4個体はすべて雌であり, 4 (Tt)の2個体は雌雄各1個体ずつであった。また雄親の透明鱗の形質を発現したものは1個体もなかった。4 酵素のアイソザイムパターンおよび M. P. の電気泳動パターンは, これらのF₁ 6個体ですべて一致した (図版1-2)。

5 (D)のF₁ 8個体, 6 (Tt)のF₁ 3個体でも, 4 酵素のアイソザイムパターンおよび M. P. の電気泳動パターンは, それぞれの系列の同腹 F₁ 個体においてすべて一致した。

以上のF₁ 個体は, 4 (D)の2個体, 5 (D)の8個体を除いてすべて3倍性を示した。

7 (D)と7 (G)も, 同一3倍性ギンブナ雌の卵を異った雄の精子で媒精して得られたF₁である。7 (D)のF₁ 5個体 (7 (D)-1, 2, 3, 4, 5) はすべて雌であり, 7 (G)の4個体 (7 (G)-1, 2, 3, 4) は雌2個体 (7 (G)-2, 3), 不明2個体 (7 (G)-1, 4) であった。4 酵素のアイソザイムパターンおよび M. P. の電気泳動パターンは, 7 (D)-1, 2, 3, 4, 7 (G)-2, 3, 4の7個体ではすべて一致し (図版2 A-2, B-2, C-2, D-2, E), また雌親とも一致した。しかし, 7 (D)-5では, 6 Pgdh のアイソザイムパターンはB-4を示し, 陽極側から4番目, 7番目のバンド (a, b) の移動度が異っていた (図版2)。7 (G)-1では, Adh のアイソザイムパターンはA-3を示し, 陽極側から3本のバンド a, b, c の染色度が異なっていた (図版2)。また, 6 Pgdh で2本 (B-3), Pgm で1本 (C-3), Est で2本 (D-3), それぞれバンドの増加が認められた。

この7 (D), 7 (G)のF₁ 個体について培養細胞を用いて培数性の判定を行った結果, 7 (D)-1, 2, 3, 4, 5, および7 (G)-2, 3, 4の染色体数のモードは156で3倍性を示し, 7 (G)-1は染色体数のモードが206で4倍性であった。また, この雌親の染色体数のモードは156で3倍性であった (表3, 図版3)。

8 (D)のF₁ 2個体は, Adh, 6Pgdh および Pgm においては相違は認められなかった

表3 7(D)と7(G)の第一世代の培養細胞における染色体数の分布

個体番号	性別	染 色 体 数																			計									
		147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	//	199		200	201	202	203	204	205	206	207	208
7 (D)-1	♀			1		1	2	3	3	9																				19
2	♀	1					2	3	2	10	1		1																20	
3	♀			1	1		1	2	4	12																			21	
4	♀				1	1	2		1	7	1	1																	14	
5	♀			1	1	2	3	4	2	5																			18	
7 (G)-1	♀																			1	1	2	1	1	1	1	9	1	1	19
2	?			1	1	1		1	2	7		1	1	1	2		1												19	
3	?				2	1	2	2	1	10																			18	
4	♀					1	1	1		2																			5	
ギンブナ7 (3n) ♀				1	1		1	1	3	8																			15	

が, Est および M. P. においてバンド数, バンドの移動度, 染色濃度に相違が認められ, 染色体数はいずれも4倍性を示した。また9 (Tt) の F₁ 3 個体は, Adh, 6 Pgdh および Est において相違が認められ, 染色体数はすべて3倍性を示した。

考 察

Adh, 6 Pgdh, Pgm, Est の発生に伴うアイソザイムパターンの変化について調査した結果, 安定した成魚のアイソザイムパターンに達する時期は酵素によって少しずつ異っており, Adh は最も早く110~120日で安定化するが, 6 Pgdh, Pgm では遅く, 150~160日で始めて安定したパターンを示す様になる。Est は両者の中間で125~135日で安定化するものと考えられ, いずれも以後変化は認められない。従って, 上記4酵素をマーカーとした個体間の比較を行う場合, 少なくとも受精後160日以上を経過した個体について行う必要がある。

そのような個体を用い, 同腹 F₁ 個体間の比較を行った結果, 9 系列のうち5系列, 3 (Tt), 4 (D), 4 (Tt), 5 (D), 6 (Tt) で, 4 酵素のアイソザイムパターンおよび M. P. の電気泳動パターンが, すべて一致した。

このうち, 4 (D) と 4 (Tt) の F₁ 個体は雄親を異にしたものであるが, そのアイソザイム, M. P. の電気泳動パターンは完全に一致し, これら両系列の F₁ 個体が雌性発生によって生じたものであることが示された。また, 3 (Tt) の F₁ 個体と雌親の4酵素のアイソザイムパターンおよび M. P. の電気泳動パターンも全く一致し, その F₁ 個体の倍数性は調べた限りではすべて3倍性を示した。

これらの事実より, 同腹3倍性 F₁ 個体はすべて電気泳動型クローンであり, 1 個体の3倍性ギンブナ雌より生ずる F₁ 個体は, すべて雌親と同一の遺伝子組成から成るクローンを形成するということが示唆された。

また、3 (Tt), 6 (Tt) の同腹 F_1 個体は、鱗移植免疫実験により、組織適合性クローンであることが示されている (NAKAKUKI *et al.*, 1984)。このことは、この系列の同腹 F_1 個体が同一クローンに属することを示すものと思われる。しかし、残りの4系列7 (D), 7 (G), 8 (D), 9 (Tt) では、4 酵素のアイソザイムパターンおよび M. P. の電気泳動パターンにおいて、同腹 F_1 個体中に相違を示す個体が認められた。このうち、7 (G) の F_1 1 個体 7 (G)-1 の染色体数は206で雌親の染色体数156と雄親の生殖細胞染色体数50の和に一致した。この4倍性 F_1 個体 7 (G)-1 では、4 酵素のアイソザイムパターンのいずれにおいても、同腹の3倍性 F_1 個体よりバンド数の増加が認められた。また7 (G)-1 から同腹の3倍性 F_1 個体への移植鱗は拒絶されたのに対し、その逆は生着した。さらに、この系列では受精過程の組織学的観察から、卵細胞質中に侵入した精子核は膨潤し、雄性前核化していることが確認されている (中久木ら, 1983)。以上より、7 (G)-1 は雄ゲノムが3倍性ギンブナ卵に導入され、4倍性個体となったものと判断された。この様な4倍性 F_1 個体の出現は、自然集団にまれに存在する4倍性ギンブナの起源を暗示するものではないかと考えられる。

一方、3倍 F_1 個体 7 (D)-5 は、6 Pgdh において同腹の3倍性 F_1 個体と異なるアイソザイムパターンを示した。このことは、同腹3倍性 F_1 個体に遺伝的相違が生じたことを示すものと思われる。このような遺伝的相異を生ずる原因は、今回の実験では明らかでないが、3倍性ギンブナ卵成熟分裂過程において、一部の個体で複糸期にキアズマを持つランブラス染色体が2~3個観察されることから、3倍性ギンブナにおいても遺伝的組み換えの起こる可能性が示唆されている (児島ら, 1983)。また、3倍性ギンブナ卵受精過程において、3倍性 F_1 個体を生じた一部の系列では、卵細胞質中に侵入した精子核の膨潤が認められ、これら同腹 F_1 個体間で鱗移植免疫実験を行った結果、一方向の組織適合性が認められた。これらのことは、雄性遺伝子の関与の可能性も否定することができないことを示すものと思われる (NAKAKUKI *et al.* 1984)。

一般的に3倍性ギンブナは雌性発生によりクローナルな繁殖を行っているものと考えられている。しかし、今回の実験で同腹3倍性 F_1 個体に、遺伝的相違を生じた個体が発見された。この個体から生ずる F_1 も、雌性発生によりクローンを形成すると仮定すると、既存のクローンから新しいクローンが分岐する可能性が考えられる。3倍性ギンブナ自然集団において、MURAYAMA *et al.* (1984) は多様性の存在を報告しているが、その原因の一つとして今回見られた様な同腹 F_1 個体間の遺伝的組み換えが関与しているものと考えられる。

文 献

- 小林弘, 川島康代, 竹内直政 (1970) 魚類学雑誌 17: 153-160
 ——— (1971) 動物学雑誌 80: 316-322
 ——— (1976) 魚類学雑誌 22: 234-240
 児島勝明, 梶島孝雄, 松村清隆, 川島真帆 (1983) 動物学雑誌 92: 510
 土方誠, 梶島孝雄, 野村照明, 村山裕一 (1983) 動物学雑誌 92: 509
 MURAYAMA, Y., M. HIJIKATA, T. NOMURA and T. KAJISHIMA. (1984) *J. Fac. Sci. Shinsyu Univ.* 19: .

中久木正則, 沢野敬一, 戸谷弘之, 梶島孝雄 (1983) 動物学雑誌 92 : 510

NAKAKUKI, M., H. TOYA, K. SAWANO and T. KAJISHIMA. (1984) *J. Fac. Sci. Shinsyu Univ.* 19 :

PHILLIPP, D. P., F. W. CHILDERS and G. S. WHITT. (1979) *J. Exp. Zool.* 210 : 473-488

SHAW, C. R. and R. PRASAD. (1970) *Biochem. Genet.* 4 : 297-370

**Gene analysis on the progenies of gynogenetic
triploid ginbuna,
*Carassius auratus langsdorfii***

Y. OSAWA, H. MACHIDA, K. TSUTSUI and T. KAJISHIMA

Department of Biology, Faculty of Science,
Shinshu University

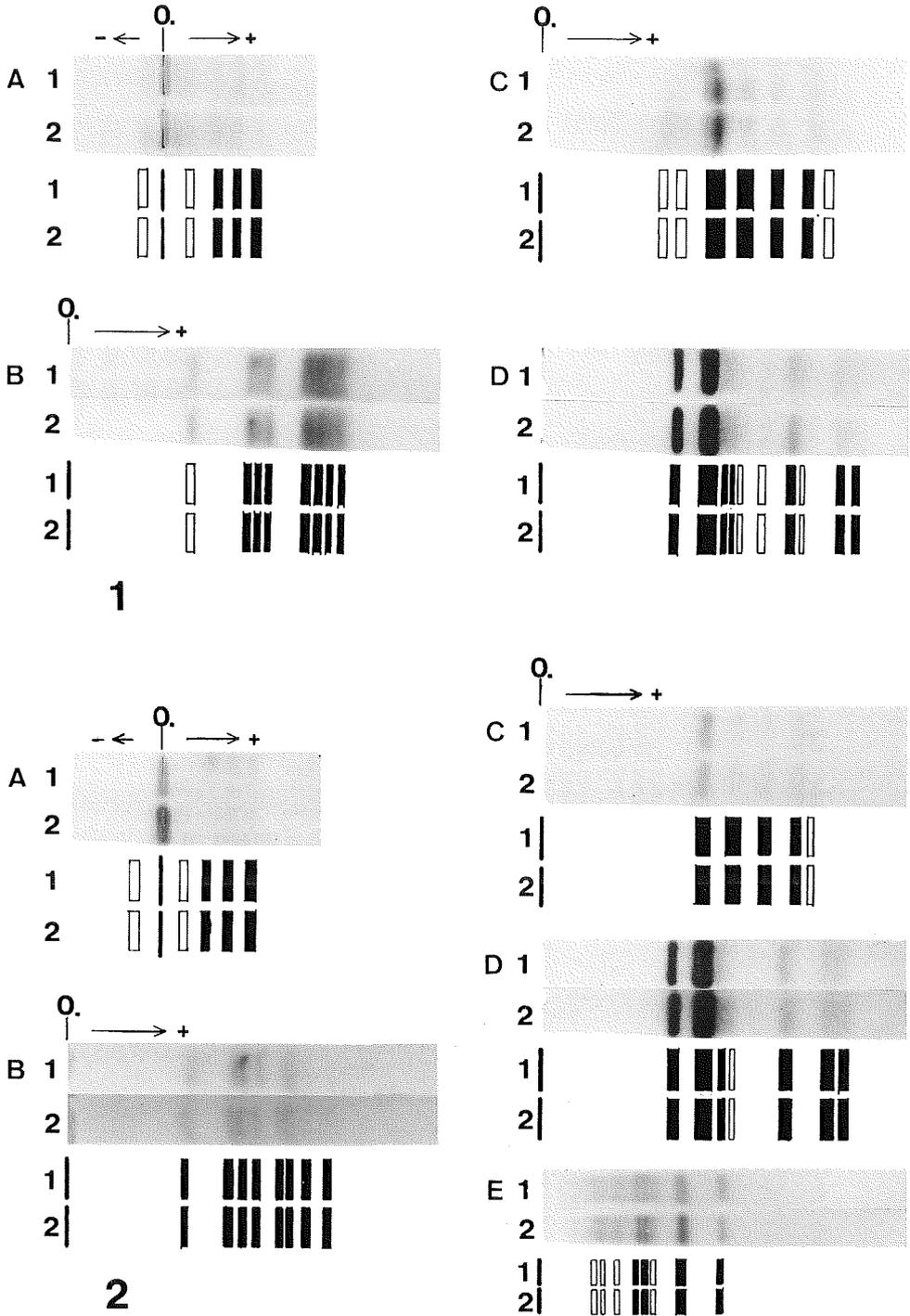
(Received 21 March, 1984)

図版 1-1

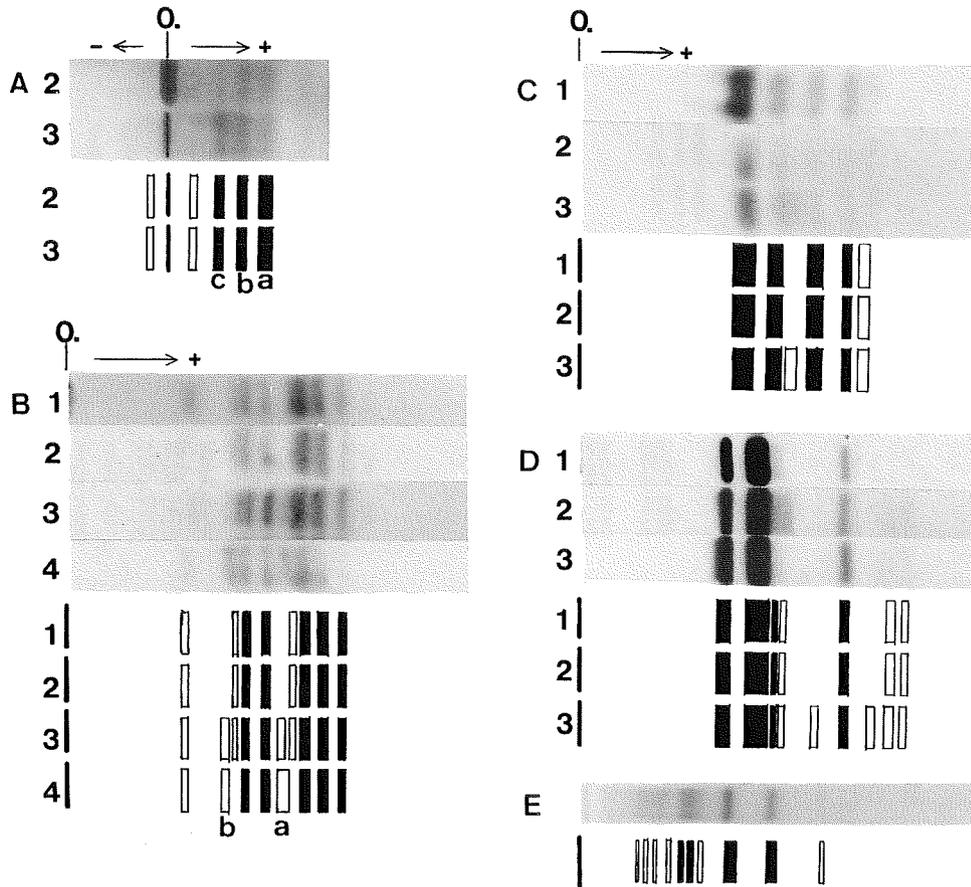
- 3 (Tt) のアイソザイムパターン
A ; アルコール脱水素酵素
B ; グルコン酸 6 リン酸脱水素酵素
C ; グルコースリン酸ムターゼ
D ; エステラーゼ
1 ; 母親
2 ; すべての 3 倍性 F₁

図版 1-2

- 4(D) と 4(Tt) のアイソザイムパターン
A ; アルコール脱水素酵素
B ; グルコン酸 6 リン酸脱水素酵素
C ; グルコースリン酸ムターゼ
D ; エステラーゼ
E ; 水溶性筋タンパク質
1 ; すべての 4 (D) の F₁
2 ; すべての 4 (Tt) の F₁



図版 1



図版 2

図版 2

7 (G)と 7 (D)のアイソザイムパターン

A ; アルコール脱水素酵素

B ; グルコン酸 6 リン酸脱水素酵素

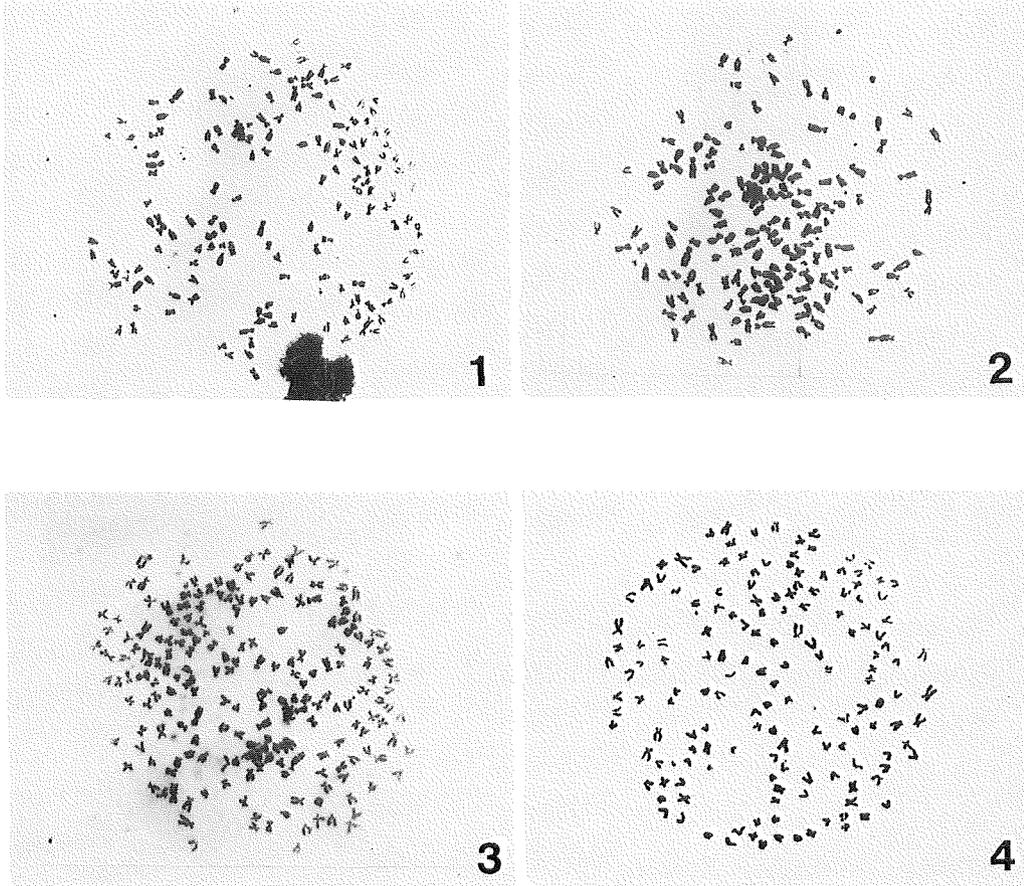
C ; グルコースリン酸ムターゼ

D ; エステラーゼ

E ; 水溶性筋タンパク質

1 ; 母親

2 ; 3 倍性 F_1 3 ; 4 倍性 F_1 (7 (G) - 1)4 ; 3 倍性 F_1 (7 (D) - 5)



図版 3

図版 3

- 1 : 7 (D) - 3
- 2 : 7 (D) - 5
- 3 : 7 (G) - 1
- 4 : 7 (G) - 3