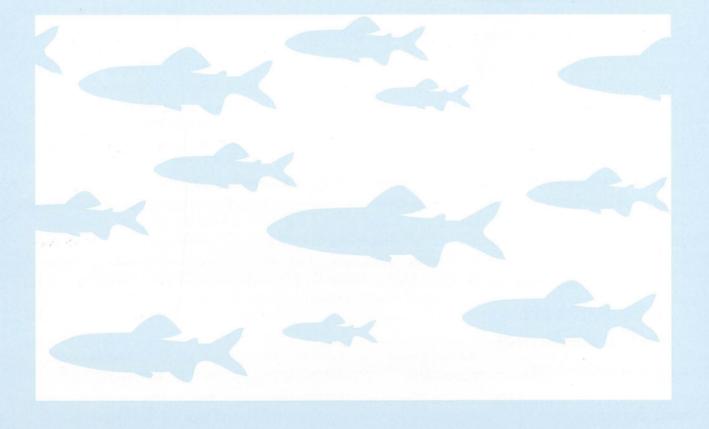
## 水產育種

# FISH GENETICS AND BREEDING SCIENCE

Volume 33 Number 2 June 2004



水産育種研究会

The Japanese Society of Fish Genetics and Breeding Science

## 水 種

第33巻 2 号

目 次

## 報文

ギンブナの尾鰭細胞による高水温耐性形質の評価(英文)
ミトコンドリア DNA の制限酵素切断多型から見た日本・韓国産ブルーギルの遺伝的特徴
河村功一・米倉竜次・石川正樹・片野 修 93
核 rDNAのITS 領域を利用した PCR によるアコヤガイ属の種判別(英文) 正岡哲治・小林敬典 101
北海道蓴菜沼産二倍体ドジョウにおける非還元二倍性卵の形成 糸納正樹・荒井克俊 107
シロザケのミトコンドリア DNA ハプロタイプ判別用 DNA マイクロアレイの開発
尾鰭遊離細胞の生残率により評価したクローンギンブナの高温耐性形質の馴致水温による変化
DNAトポイソメラーゼⅡ遺伝子を用いたウシケノリ目植物の系統解析
日本産アコヤガイ Pinctada fucata martensii と外国産アコヤガイの遺伝的特性
会員通信
Genetics in Aquaculture 2003 in Chile に参加して ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
水産育種研究会会報
日本学術会議関係の報告 和田克彦 148
水産育種研究会会則
水産育種研究会投稿要領

平成16年6月30日

水産育種研究会

## Thermal Resistance Traits in the Clonal Lines of Silver Crucian Carp Carassius langsdorfii Evaluated by Caudal Fin Cells

(ギンブナの尾鰭細胞による高水温耐性形質の評価)

Kenji SAKAMOTO<sup>\*1,2</sup>, Worawut KOEDPRANG<sup>\*2,3</sup>, Masamichi NAKAJIMA<sup>\*2</sup> and Nobuhiko TANIGUCHI<sup>\*2</sup>

- \*1 Department of Marine Biotechnology, Faculty of Life Science and Biotechnology, Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama University, Innoshima, Hiroshima 722-2101, Japan.
- \*2 Laboratory of Applied Population Genetics, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai, Miyagi 981-8555, Japan.
- \*3 Department of Aquaculture, Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala Institute of Technology, 179 Mu 3, Maifad, Sikao, Trang 92150, Thailand.

(阪本憲司(福山大学・生命工、東北大・院農)・Worawut Koedprang(東北大・院農, Rajamangala Institute of Technology)・中嶋正道・谷口順彦(東北大・院農))

#### **Abstract**

The thermal resistance of the silver crucian carp *Carassius langsdorfii* was measured in offspring assay derived from six different clonal lines, each of which presumed to be genetically identical by using three assay methods. Juveniles reared at  $25^{\circ}$ C were exposed to thermal stress at  $40 \pm 0.5^{\circ}$ C, and the time to death during the exposure was measured and then compared among the clonal lines. Juveniles of the clonal line SCC-1 could survive longer than those of the other clonal lines. Assay of primary culture cells from each clone was conducted at  $43^{\circ}$ C by trypan blue assay. Under this condition, the thermal resistance of primary cultures of the SCC-1 was higher than those of the other clonal lines (p<0.05). We used the same assay at  $43^{\circ}$ C to determine the thermal resistance of free cells from caudal fin clips from each clonal line and found that the thermal resistance of the free cells of SCC-1 was higher than those of the other clonal lines (p<0.05). Thermal resistance values observed in the whole body of the test subjects correlated significantly (p<0.01) with the values obtained from the primary cultured cells and also those from the free cells of the six clonal lines examined in this study. These results suggest that there is a significant correlation between *in vivo* and *in vitro* thermal resistance. Therefore, the use of primary culture cells and free cells from a caudal fin clip could be useful for evaluating thermal resistance traits in selective fish breeding.

(accepted March 29, 2004)

#### Introduction

Water temperature is a very important factor affecting the survival, growth, and reproduction in aquatic organisms. Because thermal resistance is a physiological trait that is significantly related to the ability to reproduce and grow, a simple, rapid, and reproducible method for evaluating thermal resis-

tance is needed<sup>1)</sup>.

Clonal fish are considered to be useful as experimental animals because there is no genetic variance within the clone<sup>2-5)</sup>. The silver crucian carp *Carassius langsdorfii* is a unisexual triploid species<sup>6-11)</sup>. All female of triploid silver crucian carp generate unreduced triploid eggs. The embryonic development is

Corresponding author; Kenji Sakamoto, Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama University, Ohama, Innoshima, Hiroshima 722-2101, Japan.

Tel: +81-8452-4-2933 Fax: +81-8452-4-3449 E-mail: sakamoto@ma.fuma.fukuyama-u.ac.jp

triggered by the sperm of diploid bisexual *Carassius* or other genera. However, the introduced sperm nucleus does not contribute to the zygotic genome<sup>12-14)</sup>. This strongly suggests that each progeny is genetically identical to the mother, and the sib-progeny of a triploid female silver crucian carp is considered to be a clonal line<sup>7,13,14)</sup>.

Fish cell culture is a good model for in vitro studies. To determine the differences between clonal silver crucian carp, it is necessary to record as many data of characteristics for clonal genotypes as possible. Furthermore, if the cells developed from a single clonal line could possibly reflect specific features of the whole clone, the tissue donor descended from maternal fish. The parallel test of clonal silver crucian carp and cultured cells from the same clonal line can show any possible correlation between traits recorded from individual fish and the performance of cells from the same genotype. If cells were available and the existence of a corresponding correlation could be proven, the evaluation of thermal resistance measured by cultured cells could be a useful method of selective breeding.

In the previous paper<sup>15)</sup> we reported a relationship between the thermal resistance of three clonal lines of silver crucian carp and those of primary culture cells, measuring the thermal resistance of primary culture cells from these three clonal lines at 37, 40, or 43°C by the trypan blue assay. In the present study, we examined the thermal resistance traits of six clonal lines of the silver crucian carp together with the thermal resistance of primary culture cells of each clone, and compared the thermal resistances of the clonal fish lines with those of cells to elucidate the relationship between resistance in vivo and that in vitro. In addition, we determined the thermal resistance of free cells from a caudal fin clip from each clonal line and compared the results with the thermal resistance of respective clonal lines to understand the relationship between the in vitro data and the in vivo data.

#### Materials and Methods

#### Production and identification of clonal lines

For the production of clones, brood fish of silver crucian carp were collected from a natural population in the lower reach of the Monobe River system, Kochi Prefecture, Japan.

A primer set of *GF17*, a microsatellite DNA markers developed by Zheng et al.<sup>16)</sup> was used in this study to distinguish between clonal lines. PCR (polymerase chain reaction) cycling conditions were as described elsewhere<sup>1,15)</sup>.

Six clonal lines (SCC-1, -2, -3, -4, -6, and -9) were produced. Mature females ovulated artificially in response to injection with 2000 IU/kg of human chorionic gonadotropin (hCG, Teizo, Tokyo, Japan). Stripped eggs from each female were inseminated with goldfish *Carassius auratus* sperm and progenies were used in the experiments.

#### Rearing systems

The fish were reared in a 60-l recirculating tank at  $25^{\circ}$ C. Each clonal line was maintained separately in an individual cage at a density of 30 fish per cage ( $22 \times 10 \times 10$  cm). The fish were fed *ad libitum* three times daily on pellet feed and a supplement of red worms (Chironomid larvae).

#### Test of high-temperature resistance

Ten fish (65 days after hatching) were selected from each clonal line in a random fashion and held in a mesh cage ( $22 \times 10 \times 10$  cm, one cage per clonal line) placed in an aquarium regulated at  $40 \pm 0.5 ^{\circ}{\rm C}$ . The rearing water was mixed by aeration, and oxygen was supplied to the aquarium. Dissolved oxygen was measured by a dissolved oxygen meter (YSI model 58, YSI Inc., USA), and solubility of oxygen in the experimental water was maintained at saturation concentration.

Each time, a fish was observed to have died, its standard body length was measured. Death was determined by the complete cessation of gill cover movement. The mean death time (min.) of each clonal line represents the average of 10 determinations  $\pm$  SD. Mean standard body length of each clonal line are shown in Table 1.

#### Primary culture of fin cells

The primary culture cells from 9 fish of each clonal line were prepared by same methods as described elsewhere<sup>15)</sup>.

Thermal sensitivity assay of primary culture cells and free cells

The thermal sensitivity of the primary cultures was determined by trypan blue assay as described elsewhere<sup>15</sup>. Then, we counted the numbers of non-stained and stained cells as living and dead cells with a hemocytometer (200-300 cells per clonal line).

In addition to culture cells, to obtain free cells we cut the caudal fins from 9 fish of each clonal line and rinsed them with CMF-PBS. The fins were trypsinized with 0.25% trypsin at 37°C for 10 min, suspended in the dispersant. Cell suspensions were used for the assay of thermal sensitivity as described above, and then we counted the numbers of non-stained and stained cells as living and dead cells with a hemocytometer (200-300 cells per clonal line).

#### Statistical analysis

Statistical comparisons among clonal lines of the death time of fish, and among clonal lines of the percentage of living cells from the fish were assessed using the Steel-Dwass test.

#### Results

The responses to thermal stress as a thermal resistance were measured in the six clonal lines of the silver crucian carp. Figure 1 shows the survival rates of the six clonal lines after the high-temperature treatment. Table 1 shows the mean time to death under the thermal stress. The mean times to death ranged from 26.0 to 348.0 min among clonal lines, and a significant difference in the time to death was

observed. The mean time to death of SCC-1 was the highest of the six lines (p<0.05). The thermal sensitivities of primary culture cells from each clonal line are shown in Table 1. Significant differences in

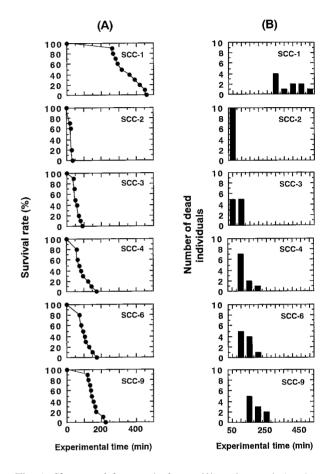


Fig. 1. Change of the survival rate (A) and cumulative frequency (B) of dead individuals of six clonal lines of the silver crucian carp. Ten fish of each clonal line were exposed to thermal stress at 40 ± 0.5℃ during experiment.

Table 1. The mean death times of ten fish from six clonal lines of the silver crucian carp (65 days after hatching) exposed to thermal stress at  $40 \pm 0.5$ °C, and percentages of living primary culture cells and living dispersed caudal fin cells from clonal lines incubated at 43°C for 2h

Clonal line	SCC-1	SCC-2	SCC-3	SCC-4	SCC-6	SCC-9
Standard length (mm ± SD)	$33.6 \pm 0.8$	$34.3 \pm 0.9$	$32.9 \pm 0.7$	$32.5 \pm 1.0$	$34.5 \pm 1.2$	$32.8 \pm 1.1$
Mean death time (min; mean ± SD)	$348.0 \pm 77.5^{d}$	$26.0 \pm 5.9^{\mathrm{a}}$	$58.5 \pm 17.1^{\text{b}}$	$94.1 \pm 40.1^{b,c}$	$105.8 \pm 32.7^{c}$	$158.7 \pm 35.4^{\circ}$
Percentage of living primary culture cells *1,2	$68.2 \pm 3.3^{\circ}$	$31.9 \pm 4.0^{a}$	$35.8 \pm 2.0^{a,b}$	$45.1 \pm 1.9^{\circ}$	$38.9 \pm 2.9^{b}$	$50.6 \pm 3.4^{d}$
Percentage of living dispersed caudal fin cells*2	$74.4 \pm 1.6^{d}$	$44.9 \pm 2.4^{\mathrm{a}}$	$51.7 \pm 3.2^{b,c}$	$53.7 \pm 3.0^{b,c}$	$50.0 \pm 1.4^{b}$	$55.9 \pm 2.1^{\circ}$

<sup>\*1</sup> Primary culture cells maintained for 15-20 days.

Means in the same row with different superscript letters are significantly different by Steel-Dwass test (p < 0.05).

<sup>\*2</sup> Number of cells counted per clonal line was 200-300.

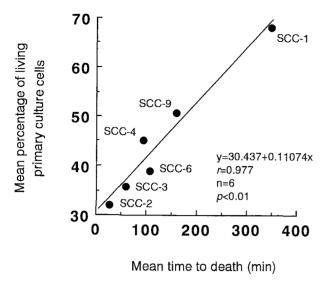


Fig. 2. Correlation between the mean percentage of living primary culture cells from six clonal lines incubated at  $43^{\circ}$ C for 2 h and the mean times to death of fish of each clonal line of the silver crucian carp exposed to thermal stress at  $40 \pm 0.5^{\circ}$ C.

the percentage of living cells were observed among the clonal lines in response to this treatment. The thermal resistance of primary culture from SCC-1 was significantly different from those from others (b) <0.05). A significant positive correlation (p<0.01) was observed between the mean percentage of living primary culture cells and the mean death time of fish among the clonal lines, as shown in Fig. 2. The thermal sensitivities of free cells from the caudal fin clips from each clonal line are also shown in Table 1. With this treatment, we observed significant differences in the percentage of living cells among the clonal lines. The thermal resistance of free cells from SCC-1 was the highest of the six lines (p < 0.05). A significant positive correlation (p<0.01) was observed between the mean percentage of living free cells from the caudal fin clip and the mean time to death of fish among the clonal line, as shown in Fig. 3. Furthermore, a significant positive correlation (p< 0.01) was observed between the thermal resistance values of primary cultures and those of free cells from the caudal fin clip (Fig. 4).

#### Discussion

The present study demonstrated the relationship between thermal resistance of six clonal lines of the silver crucian carp and thermal resistance in caudal

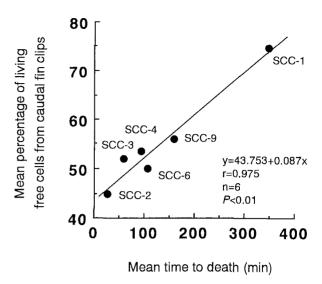


Fig. 3. Correlation between the mean percentage of living free cells from caudal fin clips from six clonal lines incubated at  $43^{\circ}\text{C}$  for 2 h and the mean times to death of fish of each clonal line of the silver crucian carp exposed to thermal stress at  $40 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .

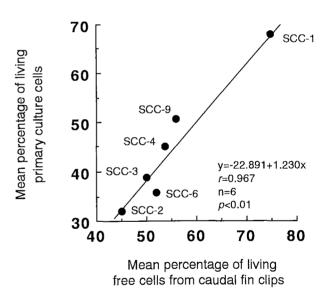


Fig. 4. Correlation between the mean percentage of living primary culture cells from six clonal lines incubated at 43°C for 2 h and the mean percentage of living free cells from caudal fin clips of each clonal line incubated at 43°C for 2 h.

fin cells from respective clonal fish. Because these genetically different clonal lines were reared under common environmental conditions, most of these differences may be caused by genetic factors. Sakamoto et al.  $^{1)}$  reported high that the heritability (0.883) of the thermal resistance on the basis of mean time to death at  $40^{\circ}\text{C}$  estimated from the comparison among

clonal lines in the silver crucian carp at 150-152 days after hatching. These results indicate the probability that the selection of the resistance and sensitivity traits to high temperature would be applicable for the selective breeding in other fish species.

Several authors reported correlations between toxicity values obtained from toxicity tests using cultured fish cells (in vitro data) and values obtained from tests using the whole fish body (in vivo data)<sup>17-24)</sup>. Mori and Wakabayashi<sup>24)</sup> conducted a toxicity assay with 11 synthesized chemicals using suspension-cultured fish cells and compared toxicity values with the assay using monolayer-cultured fish cells. The in vitro data obtained by the neutral red assay using both of these types of fish cells correlated with the *in vivo* data. In the present study, the thermal resistances of whole fish body of six clonal lines of the silver crucian carp were compared with those of primary culture cells from the respective clones. A significant definite positive correlation p < 0.01) was observed between them. A similar result was observed between the individuals of a clonal line and free cells from caudal fin clips. A significant positive correlation (p < 0.01) was also observed among the clonal lines. Furthermore, a significant positive correlation (p<0.01) was observed between the thermal resistance values of primary cultures and free cells from caudal fin clips. This indicates that the thermal resistance of caudal fin cells is dependent on the thermal resistance of individuals. The results of the present study may be useful during the further evaluation of thermal resistance of the silver crucian carp using caudal fin cells. When these *in vivo* methods are applied to other traits, careful examination will be needed to test the relation between *in vivo* and *in vitro* observations, because the mechanisms of resistance are not yet well understood.

We succeeded in developing a simple and rapid assay of thermal resistance using caudal fin cells to examine thermal resistance of whole fish in the silver crucian carp. The evaluation of thermal resistance using caudal fin cells seems to be a useful method for selective breeding. We will continue our research by applying this thermal resistance assay to other useful fish species and to molecular and cellular studies on the mechanism of thermal acclimation of fish cells.

#### References

- 1) Sakamoto, K., M. Nakajima and N. Taniguchi (2002) Influence of age and rearing water temperature on high temperature resistance traits of the clonal silver crucian carp (*Carassius langsdorfii*) and estimation of broad cense heritability. Fish. Genet. Breed. Sci., 32: 33-38. (in Japanese)
- 2) Taniguchi, N. and H. S. Han (1993) Use of chromosome manipulated fish in aquaculture and related problems of conservation of wild stock. In: Main KL, Reynolds E (eds). Selection Breeding of Fishes in Asia and the United States. The Ocean Institute, Honolulu., pp. 67-80.
- 3) Umino, T., K. Sakae, K. Morishima, K. Arai and H. Nakagawa (1996) Influences of the first-feeding delay on subsequent growth and viability of clonal crucian carp, *Carassius langsdorfii*. J. Fac. Appl. Biol. Sci. Hiroshima Univ., 35: 125-138.
- 4) Koedprang, W., K. Ohara and N. Taniguchi (2000) Genetic and environmental variances on growth and reproductive traits of silver crucian carp *Carassius langsdorfii* using communal and separate rearing systems. Fisheries Sci., 66: 1092-1099.
- 5) Koedprang, W., M. Nakajima, M. Maita and N. Taniguchi (2001) Genetic variation on hematology and plasma chemistry traits of silver crucian carp *Carassius langsdorfii* collected from natural habitat. Suisanzoshoku, 49:97-102.
- 6) Liu, S. M., K. Sezaki, K. Hashimoto and M. Nakamura (1980) Distribution of polyploids of "Ginbuna" *Carassius auratus langsdorfii* in Japan. Bull. Japan Soc. Sci. Fish., 46: 413-418.
- 7) Dong, S. and N. Taniguchi (1996) Clonal nature of offspring of ginbuna *Carassius langsdorfii* by RAPD-PCR and isozyme patterns. Nippon Suisan Gakkaishi, 62: 891-896.
- 8) Dong, S., K. Ohara and N. Taniguchi (1997) Introduction of sperm of common carp Cyprinus carpio into

- eggs of ginbuna *Carassius langsdorfii* by heat shock treatment and its confirmation by DNA markers. Nippon Suisan Gakkaishi, 63: 201-206.
- 9) Umino, T., K. Arai and H. Nakasawa (1997) Growth performance in clonal crucian carp, *Carassius langsdor-fii*. Effects of genetic difference and feeding history. Aquaculture, 155: 271-283.
- 10) Ohara, K., S. Dong and N. Taniguchi (1999) High proportion of heterozygotes in microsatellite DNA loci of wild clonal silver crucian carp, *Carassius langsdorfii*. Zool. Sci., 16: 909-913.
- 11) Ohara, K., T. Ariyoshi, K. Sitizyo and N. Taniguchi (2000) Natural hybridization between diploid crucian carp species and genetic independence of triploid crucian carp elucidate by DNA markers. Zool. Sci., 17: 357-364.
- 12) Nakakuki, M., H. Toya, K. Sawano and T. Kajishima (1984) On the fertilization of the triploid ginbuna. J. Fac. Sci. Shinshu Univ., 19: 25-35.
- 13) Yamashita, M., H. Onozato, T. Nakanishi and Y. Nagahama (1990) Breakdown of the sperm nuclear envelope is a prerequisite for male pronucleus formation: direct evidence from the gynogenetic crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*. Devel. Biol., 137: 155-160.
- 14) Yamashita, M., J. Jiang, H. Onozato, T. Nakanishi and Y. Nagahama (1993) A tripolar spindle formed at meiosis 1 assures the retention of the original ploidy in the gynogenetic triploid crucian carp, ginbuna *Carassius auratus langsdorfii*. Develop Growth & Differ., 35: 631-636.
- 15) Sakamoto, K., W. Koedprang, M. Nakajima and N. Taniguchi (2002) Thermal resistance traits of the clonal silver crucian carp *Carassius langsdorfii* and evaluation of these traits using primary culture cells. Fisheris Sci., 68: 1029-1033.
- 16) Zheng, W., N. E. Stacey, J. Coffin and C. Strobeck (1995) Isolation and characterization of microsatellite loci in the goldfish *Carassius auratus*. Mol. Eco., 4:791-792.
- 17) Babich, H. and E. Borenfreund (1987a) Fathead minnow FHM cells for use in in vitro cytotoxicity assays of aquatic pollutants. Ecotoxicol. Environ. Saf., 14: 78-87.
- 18) Babich, H. and E. Borenfreund (1987b) In vitro cytotoxicity of organic pollutants to bluegill sunfish (BF-2) cells. Environ. Res., 42: 229-237.
- 19) Diericky, P. J. and I. E. Van De Vyver (1991) Correlation of the neutral red uptake inhibition assay of cultured fathead minnow fish cells with fish lethality tests. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 46: 649-653.
- 20) Saito, H., M. Sudo, T. Shigeoka and F. Yamauchi (1991) In vitro cytotoxicity of chlorophenols to goldfish GF-scale (GFS) cells and quantitative structure-activity relationships. Environ. Toxicol. Chem., 10: 235-241.
- 21) Brandao, J. C., H. H. L. Bohets, I. E. Van De Vyver and P. J. Dierickx (1992) Correlation between the invitro cytotoxicity to cultured fathead minnow fish cells and fish lethality data for 50 chemicals. Chemosphere, 25: 553-562.
- 22) Saito, H., J. Koyasu, K. Yoshida, T. Shigeoka and S. Koike (1993) Cytotoxicity of 109 chemicals to goldfish GFS cells and relationships with 1-octanol/water partition coefficients. Chemosphere, 26: 1015-1028.
- 23) Segner, H., D. Lenz, W. Hanke and G. Schuurmann (1994) Cytotoxicity of metals toward rainbowtrout R1 cell line. Environ. Toxicol. Water Qual., 9: 273-279.
- 24) Mori, M. and M. Wakabayashi (2000) Cytotoxicity evaluation of synthesized chemicals using suspension-cultured fish cells. Fisheries Sci., 66: 871-875.

## ミトコンドリアDNAの制限酵素切断多型から見た 日本・韓国産ブルーギルの遺伝的特徴

河村功一(養殖研)·米倉竜次(環境研)·石川正樹(三重大·生物資源) 片野 修(中央水研)

Genetic Characteristics of a Bluegill Sunfish, *Lepomis macrochirus*, in Japan and Korea in the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of Mitochondrial DNA

Kouichi KAWAMURA\*<sup>1</sup>, Ryuji YONEKURA\*<sup>2</sup>, Masaki ISHIKAWA\*<sup>3</sup>, and Osamu KATANO\*<sup>4</sup>

- \*1 National Research Institute of Aquaculture
- \*2 National Institute for Environmental Studies
- \*3 Faculty of Bioresources, Mie University
- \*4 National Research Institute of Fisheries Science

#### **Abstract**

The genetic characteristics of a bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*, in Japan and Korea were examined by PCR-RFLP analysis of the D-loop and ND1 regions of the fishes' mitochondrial DNA (mtDNA). Four haplotypes were observed in both Japanese and Korean populations. Haplotype diversity of mtDNA was the highest in the localities which *L. macrochirus* invaded in the 1960', while it was low in the localities which it invaded after 1980. The decline of haplotype diversity with the lapse of time can be explained by the accumulation of founder effects in the repeated transplantations. In both Lake Kasumigaura-Kitaura and Lake Biwa, haplotype frequencies of mtDNA did not differ among populations in the same drainage, which indicates not only the presence of a single reproductive unit in each drainage, but also the high ability of movement and the width of niche selection in *L. macrochirus*.

(accepted March 29, 2004)

ブルーギル(Lepomis macrochirus)はスズキ目サンフィッシュ科ブルーギル属に属する淡水魚である。本種の原産地はアメリカ北東部とされているが、広範囲な移殖により現在では北は五大湖水系から南はメキシコ北部に至るほぼアメリカ全域の湖沼と河川に生息している。本種の移殖はアメリカ国内だけでなく、ヨーロッパ、南アフリカにおいても行われており<sup>1,2</sup>、日本には1960年に持ち込まれた。本種は最初、新しい食用対象魚として日本各地で盛んに養殖と放流が試みられたが<sup>2)</sup>、1970年代後半に入ると産業的価値を殆ど持たない事が判明したため、次第に増養殖は行われなく

なった。こうした状況下で本種は水産業界から見放されたにも関わらず、旺盛な繁殖力と釣り人等による移殖放流により分布を次第に拡大し $^{20}$ 、現在では北は北海道から南は沖縄本島までのほぼ全都道府県に生息する $^{30}$ 。本種は幅広い食性と高い繁殖力を持つことから、現在、オオクチバス(Micropterus salmoides)、コクチバス(M. dolomieu)とならび日本の淡水生態系を脅かす外来種のトップに位置付けられている $^{40}$ 。

日本産ブルーギルの生態的特徴については、これまで Azuma<sup>5,6)</sup>、Yonekura<sup>7)</sup>らにより幾つかの報告がなされているが、遺伝的特徴については Matsuoka *et al.*<sup>8)</sup>

連絡先: 〒516-0193 三重県度会郡南勢町中津浜浦 養殖研究所生産技術部育種研究室 河村功一

ちによる琵琶湖産ブルーギルのアロザイムについての報告が唯一あるだけである。この様に、日本産ブルーギルの遺伝的特徴については殆ど判っていないのが現状である。本研究では、日本産ブルーギルならびに1960年代後半に日本から持ち込まれたとされる韓国産ブルーギル<sup>9</sup>についてその遺伝的特徴を明らかにするため、ミトコンドリア DNA(mtDNA)の調節領域(D-loop)と NADH subunit 1 領域(ND1)について PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism:制限酵素切断多型)分析によるハプロタイプの検出を行い、各

集団における mtDNA のハプロタイプ構成について調べた。

#### 材料と方法

供試魚 平成14年5月から平成15年9月にかけて、日本54地点、韓国3地点の合計57地点において釣りないしは投網によりブルーギルの採集を行った(Fig. 1, Table 1)。採集個体は野外にて100%エタノールに固定後、研究室に持ち帰り分析に供した。全DNAの抽出は尾鰭の一部を試料とし、TNES-Urea 緩衝液を用

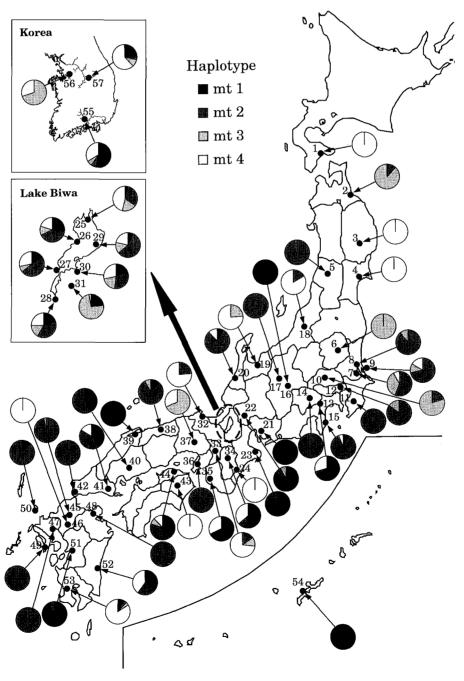


Fig. 1. Haplotype frequencies of mtDNA of *Lepomis macrochirus* in populations of Japan and Korea. Each number corresponds to population number in Table 1.

Table 1. Haplotype frequencies (D-loop and ND1) of mtDNA of Lepomis macrochirus in Japan and Korea

	Population	N*1		Haplo	type		
no.	Locality	IN -	mt1	mt2	mt3	mt4	n
1	Goryokaku, Hokkaido (pond)	25	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000
2	Hachinohe, Aomori (pond)	25	0.000	0.120	0.880	0.000	0.220
3	Hanamaki, Iwate (pond)	25	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000
4	Sendai, Miyagi (pond)	11	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000
5	Sakata, Yamagata (pond)	25	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
6	Kurobane, Tochigi (pond)	25	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000
7	Osugatsu, Ibaragi (Lake Kasumigaura)	25	0.000	0.560	0.360	0.080	0.573
8	Yakimaki, Ibaragi (Lake Kasumigaura)	9	0.000	0.889	0.111	0.000	0.222
9	Kitaura, Ibaragi (Lake Kitaura)	25	0.000	0.720	0.120	0.160	0.460
10	Higashimatsuyama, Saitama (pond)	25	0.000	0.200	0.800	0.000	0.333
11	Kameyama, Chiba (Kameyama Reservoir)	27	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
12	Crown Prince Palace, Tokyo (pond)	34	0.000	0.853	0.147	0.000	0.258
13	Hakone, Kanagawa (Lake Ashinoko)	24	0.667	0.042	0.000	0.292	0.489
14 15	Kawaguchiko, Yamanashi (Lake Kawaguchi)	24 50	$0.000 \\ 0.080$	$1.000 \\ 0.840$	$0.000 \\ 0.020$	0.000	$0.000 \\ 0.290$
16	Ito, Shizuoka (Lake Ippeki) Shiojiri, Nagano (Lake Midori)	25	1.000	0.000	0.020	$0.060 \\ 0.000$	0.290
17	Matsumoto, Nagano (Lake Tamizo)	25 25	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
18	Shimota, Niigata (Otani Reservoir)	$\frac{25}{24}$	0.000	0.167	0.000	0.833	0.290
19	Toyama, Toyama (pond)	2 <del>4</del> 25	0.000	0.000	0.000	0.833	0.290
20	Katayamatsu, Ishikawa (Lake Shibayamagata)	$\frac{25}{25}$	0.000	0.800	0.240	0.780	0.353
$\frac{20}{21}$	Ofu, Aichi (pond)	$\frac{25}{25}$	1.000	0.000	0.000	0.120	0.000
$\frac{21}{22}$	Kaizu, Gifu (pond)	25 25	0.840	0.000	0.080	0.000	0.293
23	Tamaki, Mie (pond)	25 25	0.800	0.200	0.000	0.000	0.233
$\frac{23}{24}$	Shimokitayama, Mie (Nanairo Reservoir)	25 25	0.000	0.200	0.000	1.000	0.000
25	Oura, Shiga (Lake Biwa)	$\frac{25}{26}$	0.038	0.308	0.192	0.462	0.680
$\frac{25}{26}$	Adogawa, Shiga (Lake Biwa)	25	0.280	0.400	0.132 $0.120$	0.402	0.737
27	Katada, Shiga (Lake Biwa)	25 25	0.160	0.480	0.120	0.280	0.687
28	Seta, Shiga (Lake Biwa)	$\frac{23}{24}$	0.208	0.375	0.167	0.250	0.757
29	Okinoshiraishi, Shiga (Lake Biwa)	14	0.271	0.571	0.143	0.214	0.648
30	Nishinoko, Shiga (Lake Biwa)	25	0.200	0.320	0.200	0.214	0.770
31	Kusatsu, Shiga (Lake Oiwake)	69	0.217	0.014	0.739	0.029	0.411
32	Miyazu, Kyoto (pond)	25	0.000	0.240	0.000	0.760	0.380
33	Osaka Castle, Osaka (pond)	$\frac{26}{26}$	0.000	0.154	0.115	0.731	0.446
34	Nara, Nara (pond)	25	0.560	0.080	0.000	0.360	0.573
35	Kishigawa, Wakayama (pond)	25	0.680	0.000	0.000	0.320	0.453
36	Hokutan, Hyogo (pond)	25	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
37	Tojo, Hyogo (pond)	25	0.000	0.000	0.680	0.320	0.453
38	Daisen, Tottori (pond)	25	0.120	0.800	0.080	0.000	0.353
39	Matsue, Shimane (pond)	22	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
40	Saijo, Hiroshima (pond)	25	0.440	0.560	0.000	0.000	0.513
41	Kumage, Yamaguchi (Nakayama Reservoir)	25	0.400	0.440	0.000	0.160	0.647
42	Shimonoseki, Yamaguchi (pond)	25	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
43	Miyoshi, Tokushima (pond)	25	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000
44	Takamatsu, Kagawa (pond)	25	0.400	0.400	0.080	0.120	0.687
45	Amagi, Fukuoka (Terauchi Reservoir)	25	0.000	0.960	0.040	0.000	0.080
46	Yame, Fukuoka (Hanamune Reservoir)	25	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000
47	Takeo, Saga (pond)	25	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
48	Innai, Oita (Kashita Reservoir)	25	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
49	Kawahara, Nagasaki (Lake Kawahara)	23	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
50	Gounoura, Nagasaki (pond)	25	0.120	0.880	0.000	0.000	0.220
51	Matsubashi, Kumamoto (Hagio Reservoir)	25	0.920	0.080	0.000	0.000	0.153
52	Hitotsuse, Miyazaki (Hitotsuse Reservoir)	25	0.360	0.240	0.000	0.400	0.680
53	Fukiage, Kagoshima (Lake Satsuma)	25	0.080	0.040	0.040	0.840	0.297
54	Kanade, Okinawa (pond)	5	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
55	Jinju, Korea (Jinyang Reservoir)	15	0.533	0.067	0.067	0.333	0.638
56	Yongin, Korea (pond)	30	0.000	0.000	0.700	0.300	0.434
57	Jecheon, Korea (Chungju Reservoir)	21	0.238	0.048	0.095	0.619	0.576
	Total	1428					

<sup>\*1</sup>number of individuals, \*2Haplotype diversity

いたフェノール・クロロホルム法<sup>10</sup>により行った。集団解析においては採集個体が少なかった地点を除き、 1採集地点につき約25個体を分析に供し、計1,428個体について分析を行った(Table 1)。

PCR-RFLP 分析 mtDNA の D-loop 全域を含む約 1.8kbps と ND1 領域全体を含む約1.5kbps について PCRによる増幅を行った。D-loopの増幅にはPalumbi et al.<sup>11)</sup>により人(Homo sapiens) から報告されている CB3R-L (5'-CAYATYMARCCMGAATGRTATTT-3') ≥ 12SAR-H (5'-ATARTRGGGTATCTAATCCYAGTT-3') のプライマーペアを、ND1の増幅にはブルーギルの 配列情報に基づき筆者らが16S-rRNA上に設計した L2949-LMA (5'-AGTTACCCTAGGGATAACAGCGCA ATC-3') と tRNA-Met 上に設計した S2-LMA (5'-GGT ATGGGCCCAAAAGCTTA-3') のプライマーペアをそ れぞれ用いた。PCR 反応液は、DNA 200ng、10xPCR Buffer 2.5µl、dNTP Mixture 2µl (各2.5mM)、各プライ マー 0.2 µM、Takara Ex Taq (TaKaRa 社) 0.2 µl (5U/ μl) に超純水を加え25μlとした。PCRは、GeneAmp PCR System 9700 (アプライドバイオシステムズ社) を用いて、94℃ 2分間の熱変性後、94℃ 1分、55℃ 1 分、72℃2分を40サイクル繰り返し、最後に72℃10 分の伸長反応を行った。PCR終了後、1%アガロー スゲル (Agarose L03: TaKaRa 社) を用いた電気泳 動により増幅産物の確認を行った後、制限酵素処理 を行った。制限酵素は、4 塩基認識 9 種類 (Afa I、

Alu I、Cfr 13I、Hae III、Mbo I、Msp I、Taq I:TaKaRa社; Dde I、Scr FI:TOYOBO社)、5塩基認識1種類(Mbo II:TaKaRa社)の計10種類を用い、酵素処理は各酵素に添付のプロトコルに従った。酵素消化産物の泳動は、3%のNuSieve GTG Agarose(TaKaRa社)を用いて行った。RFLPの検出は、電気泳動後、エチジウムブロマイド染色したアガロースゲルをトランスイルミネーター上で写真撮影することにより行った。

データ解析 切断多型の見られた制限酵素について切断パターンを整理する事により、ハプロタイプを決定し、ハプロタイプ間の塩基置換率 $^{(2)}$ ならびに各集団におけるハプロタイプ頻度とハプロタイプ多様度  $(h)^{(3)}$ を求めた。また、霞ヶ浦・北浦と琵琶湖における各集団については水系内における集団間の遺伝的交流の有無を確かめるため、ハプロタイプ頻度についての正確確率検定 $^{(4)}$ をARLEQUIN ver  $2.000^{(5)}$ により行った。

#### 結 果

分析に用いた10酵素のうち制限酵素切断多型は、D-loopではMbo I、Msp I、Scr FI、Taq I 0 4 酵素、ND1 ではMbo II 0 1 酵素において認められ、他の酵素においては切断パターンに違いは見られなかった。これらの切断パターンを整理する事により、mt1 からmt4 までの計4 つのハプロタイプが検出された(Tables 2, 3)。ハプロタイプ間の塩基置換率は、D-loopが0.000-0.0094、ND1が0.000-0.0024となり、

Table 2. Approximate size in base pairs (bp) of all fragment pattern observed on D-loop (A) and ND1 (B) regions in mtDNA of *Lepomis macrochirus* 

Restriction endonuclease	Mt	oo I	Msf	ÞΙ	Scr	FI	Tae	q I
Restriction morph	A	В	A	В	A	В	A	В
Fragment	1,350	1,350	850		450	450	930	930
sizes (bp)	•	340		560	430	430		900
	290		390	390	400		850	
	130	130	370	370	310	310	50	
	50			290		290		
			160	160	160	160		
			60	60		110		
					80	80		

Restriction endonuclease	$Mbo \ { m II}$		
Restriction morph	A	В	
Fragment		1,200	
sizes (bp)	900		
_	300		
	150	150	
	110	110	
	80	80	

D-loop では mt1 と mt4 の 2 つ、ND1 では mt1、mt2、mt4 の 3 つのハプロタイプの間で、それぞれ塩基置換率が 0 であった(Table 4)。

各集団におけるハプロタイプ構成について見ると、 日本では琵琶湖水系の7地点(no. 25-31)、一碧湖 (no. 15)、高松 (no. 44)、薩摩湖 (no. 53) において、 韓国では晋州 (no.55)、龍仁 (no.57) において、4 つの同じハプロタイプが観察された。しなしながら20 地点(全体の35%)においては1つのハプロタイプ、 15地点(全体の26%)においては2つのハプロタイプ しか見られなかった。個々のハプロタイプの分布につ いて見ると、mt2 が最も多く42地点(全体の75%) に おいて見られ、次いで mt4 (32地点:全体の56%) が 多かった。mt1 は mt3 と同じく26地点(全体の46%) において見られたが、確認されたのは中部以西と韓国 で、関東、上越、東北、北海道においては全く見られ なかった (Fig. 1)。なお、各地域におけるハプロタイ プの特徴について見ると、関東ではmt2とmt3、近畿 では mt1、北九州では mt2 が各地域の採集地点におい て共通して認められた。

各採集地点の mtDNA のハプロタイプ多様度について見ると琵琶湖水系は全体的に高く、追分湖 (no. 31) を除く6地点 (no. 25-30) はいずれも0.6以上の高い値を示した。中でも安曇川 (no. 26)、瀬田 (no. 28)、西の湖 (no. 30) はかなり高く、0.7以上で

Table 3. Composite haplotypes (D-loop and ND1) of mtDNA for restriction enzyme polymorphism in *Lepomis macrochirus* 

-		Compos	ite fragn	ent pat	tern
Haplotype		ND1 region			
	Mbo I	Msp I	Scr FI	Taq I	Mbo II
mt1	A	Α	A	A	A
mt2	Α	В	В	A	Α
mt3	A	Α	Α	Α	В
mt4	В	A	Α	В	Α
Total					
number of					
fragment					
patterns	<b>2</b>	2	2	2	2

Table 4. Nucleotide substitution ratio between haplotypes of mtDNA in *Lepomis macrochirus*. Values in D-loop are below the diagonal and those in ND1 are above the diagonal

Haplotype	mt1	mt2	mt3	mt4
mt1	-	0.0000	0.0024	0.0000
mt2	0.0044	-	0.0024	0.0000
mt3	0.0000	0.0044	-	0.0024
mt4	0.0046	0.0094	0.0046	-

あった。琵琶湖以外では、中山ダム (no. 41)、高松 (no. 44)、一ツ瀬ダム (no. 52)、晋州 (no. 55) の 4 地点が0.6以上と琵琶湖水系に匹敵する値を示したが、全体の35%に当たる20地点においてハプロタイプ多様度は0であった (Table 1)。地域別に見ると、近畿と韓国のハプロタイプ多様度は最も高く0.5以上であり、関東、中国、四国、南九州は0.3前後を推移した。逆に、北海道・東北と北九州は他の地域と比べてハプロタイプ多様度が著しく低く、0.05以下であった (Table 5)。

MtDNAのハプロタイプ頻度における同一水系内の採集地点間での有意差を霞ヶ浦・北浦の3地点 (no.7-9) と琵琶湖水系の7地点 (no.25-31) について、それぞれ正確確率検定により調べたところ、霞ヶ浦・北浦の3地点については集団間で有意差は全く認められなかった (P>0.05; Table 6)。琵琶湖水系の7地点においては、追分湖 (no.31) を除き (P<0.001)、湖内の6地点 (no.25-30) の間では有意差は全く認められなかった (P>0.05)。

#### 考察

これまでアメリカから日本へ導入されたブルーギルのうち、持ち込みが正式に確認されているのは、1960年にシカゴのシェド水族館から日本政府に贈られた15個体のみである<sup>16</sup>。現在、日本産ブルーギルの起源については、日本に生息する全ての個体がこの15個体由来のものであるとする説<sup>20</sup>と、ブルーギル以外にもその近縁種が持ち込まれ、日本産はブルーギルと近縁種の雑種であるとする説<sup>17,18</sup>の2つがあるが、その起源を含めた詳しい集団構造についてはまだよく判っていないのが現状である。

今回、mtDNAのハプロタイプ分析において韓国産ブルーギルでは4つのハプロタイプが認められた。これらはいずれも1960年のシェド水族館由来の個体が放流された水域である一碧湖 (no.15)、薩摩湖 (no.53)

Table 5. Average haplotype diversity of mtDNA in *Lepomis* macrochirus in Japanese regions (mean ± SD)

	Haplotype diversity	n*1
Hokkaido and Tohoku	$0.044 \pm 0.098$	5
Kanto	$0.292 \pm 0.215$	8
Joetsu, Chubu and Hokuriku	$0.171 \pm 0.189$	6
Tokai	$0.183 \pm 0.168$	5
Kinki	$0.538 \pm 0.214$	13
Chugoku	$0.303 \pm 0.295$	5
Shikoku	$0.343 \pm 0.486$	2
North Kyushu	$0.050 \pm 0.089$	6
South Kyushu	$0.282 \pm 0.291$	4
Korea	$0.550 \pm 0.104$	3
Total		57

<sup>\*1</sup> number of localities

Table 6. Exact test of population differentiation based on haplotype frequencies of mtDNA in *Lepomis macrochi-*rus. Exact P values are above the diagonal and significant difference are below the diagonal. Population number corresponds to Table 1

#### (A) Lake Kasumigaura-Kitaura

Population no.	7	8	9
7	_	0.2046	0.1115
8	NS	_	0.8027
9	NS	NS	-

#### (B) Lake Biwa

Population no.	25	26	27	28	29	30	31
25	_	0.037	0.1611	0.1874	0.2738	0.2943	0.0000
26	NS	-	0.6874	0.8519	0.5030	0.7001	0.0000
27	NS	NS	_	0.7317	0.7572	0.5846	0.0000
28	NS	NS	NS	_	0.5593	0.9340	0.0000
29	NS	NS	NS	NS	_	0.4800	0.0000
30	NS	NS	NS	NS	NS	_	0.0000
31	***	***	***	***	***	***	-

\*\*\*P<0.001. NS=not significant.

のものと完全に一致した事から<sup>2)</sup>、今回分析した韓国 3地点 (no. 55-57) の集団が1960年代後半に日本から 移殖された個体に由来する可能性は極めて高いと言え る<sup>9</sup>。ハプロタイプ間の塩基置換率が、D-loopにおい てはmt1とmt4の2つ、ND1においてはmt1、mt2、 mt4の3つのハプロタイプの間で0であった事から判 断して、今回見られた mtDNA の4ハプロタイプは何 れもブルーギルのものであると考えられる。また、 筆者らは今回遺伝子分析に用いた全個体において、体 色、鰭条数、側線鱗数等の分類形質について調べたが、 いずれの個体もブルーギルの特徴を備えており、パン プキンシード(L. gibbosus)といったブルーギル属の近 縁種に見られるような特徴を備えた個体は全く見られ なかった<sup>19)</sup>。これらの事から、宮地ら<sup>17)</sup>や寺島<sup>18)</sup>が述 べている様な日本産の個体をブルーギルと近縁種の雑 種であるとする可能性は極めて低いと言える。しかし ながら、今回分析に用いたのは mtDNA のみであり、 アルプスイワナ (Salvelinus alpinus) とブルックトラ ウト(S. fontinalis)の交雑に見られる様な、特定種由 来の mtDNA のみが消滅している可能性も考えられる ことから<sup>20</sup>、過去における交雑の有無の検証に当たっ ては、mtDNA だけでなくマイクロサテライト、AFLP (Amplified fragment length polymorphism: 增幅断片長 多型)等によるゲノム分析も併せて行う必要がある。 また、原産地である北米集団の遺伝的特徴を明らかに する事により、日本と韓国におけるブルーギルの正確 な起源ならびに集団構造は解明可能と考えられる。

今回分析した各集団における mtDNA のハプロタイプ構成についてみると (Fig. 1, Table 1)、一碧湖 (no. 15)、琵琶湖 (no. 25-30)、高松 (no. 44)、薩摩

湖 (no.53)、韓国 (no.55、57) は今回検出された4 つのハプロタイプの全てが認められた。この中で、一 碧湖、薩摩湖は1960年代にシェド水族館由来のブルー ギルが移殖されている場所であり、一碧湖、琵琶湖、 薩摩湖では1960年代後半といった最も早い時期に日本 での定着が確認されている<sup>21)</sup>。逆に mtDNA のハプロ タイプが単一である九州北部 (no. 46-49)、中部 (no. 14、16、17)、東北 (no. 3-6)、北海道 (no. 1) はいず れもブルーギルの侵入年代が遅く、1980年後半以降に 生息が確認された場所である21)。これらの結果は、日 本・韓国における mtDNA のハプロタイプ多様度が、 ブルーギルの侵入年代が古い生息地においては高く、 逆に新しい生息地においては低い事を示している。生 息地間でハプロタイプ多様度が大きく異なる理由とし て考えられる事は、多くの生息地においてブルーギル の移殖が少数個体により行われ、遺伝的多様性が失わ れているとする創始者効果22)の影響の可能性である。 また、侵入年代の新しい生息地ほど mtDNA のハプロ タイプ多様度が低い理由としては、ブルーギルが生息 地に侵入するまでの間に他の生息地で経験する創始者 効果の回数が増える事により、遺伝的多様性が低下す る事が考えられる。

MtDNAの各ハプロタイプの分布において、mt1 は中部以西と韓国においてのみ見られるという特徴的な分布を示した(Fig. 1)。ブルーギルは1970年代前半に近畿、南九州、広島、静岡を中心に分布を拡大し、mt1 が見られなかった関東、上越、東北、北海道は1980年後半以降に本種の生息が確認された地域である<sup>21</sup>。この事から関東、上越、東北、北海道においてmt1が存在しない理由として考えられる事は、ブルー

ギルの分布拡大の途中において何らかの遺伝的浮動により、mt1が失われたとするものである。また、関東、上越、東北、北海道の各採集地点におけるハプロタイプの数が、霞ヶ浦・北浦(no. 7-9)と芦ノ湖(no. 13)を除き、全て1ないしは2であった事はこれら4地域における過去の遺伝的浮動の大きさを示すものと言える(Table 1)。各地域における mtDNAハプロタイプの特徴について見ると、関東では mt2と mt3、近畿では mt1、九州北部では mt2といった隣接した生息地間で特定のハプロタイプが共通して見られる傾向が認められた(Fig. 1)。しかしながら、八戸(no. 2)においては mt3という隣接する採集地点では全く見られないハプロタイプが認められ、場所によってはかなりの長距離に渡る移殖が行われている可能性が窺える。

霞ヶ浦・北浦では水系内の3地点(no.7-9)の間 では mtDNA のハプロタイプ頻度に有意差が見られな かった (P>0.05)。また琵琶湖においては、広義では 琵琶湖水系に属するものの隔離された水系である追 分湖 (no. 31) を除き、湖内の6地点 (no. 25-30) の 間ではハプロタイプ頻度に有意差は見られなかった (Table 5)。これらの結果は、原産地の1つであるフ ロリダにおいて、同一水系内の採集地点の間ではアロ ザイム頻度に殆ど差が見られなかった事とよく一致し ており<sup>23)</sup>、各水系における単一繁殖集団の存在の可能 性だけでなく、ブルーギルの移動能力の高さと生息環 境の選択幅の広さを示すものと言える。日本における ブルーギルの定着成功の理由は、幅広い食性と旺盛な 繁殖力にあるとされているが<sup>2)</sup>、ブルーギルの移動能 力と生息環境の選択幅の広さも定着成功の理由として 挙げることができる様に思われる。特に琵琶湖の場合 は水域が広く環境が多様性に富み、在来種においては アブラヒガイ (Sarcocheilichthys biwaensis)<sup>24)</sup>、ビワマ ス (Onchorhynchus masou subsp.)<sup>25)</sup>の様に湖内の特定 の水域にしか生息しない種も存在する事から、過去40 年間に琵琶湖全沿岸域に分布を広げ、一大繁殖集団を 形成したブルーギルの繁殖力と環境適応力は特記すべ きものであると言える。現在、淡水生態系における生 物多様性を維持して行く上で本種とオオクチバス・コ クチバスの駆除は最優先課題であり<sup>3)</sup>、駆除技術の開 発において繁殖生態の実態解明と集団構造の把握は必 須である。本研究の様な遺伝子分析を野外調査と平行 して行うことにより、ブルーギルの詳しい繁殖生態と 集団構造を明らかにする事が必要である。

#### 要 約

日本・韓国産ブルーギルの遺伝的特徴を明らかにす

るため、日本54地点と韓国3地点の計57地点の1.428 個体について、ミトコンドリア DNA の D-loop 領域 と ND1 領域における PCR-RFLP によるハプロタイプ の検出を行った。その結果、日本と韓国においてはお 互い共通する4つのハプロタイプが確認された。各採 集地点における侵入年代と mtDNA のハプロタイプ多 様度の間には相関が見られ、1960年代に侵入が確認さ れた地点においてはハプロタイプ多様度が最も高く、 逆に1980年以降に侵入が確認された地点においては低 かった。これは、少数個体による移殖とこうした移殖 の繰り返しという創始者効果の蓄積により、遺伝的多 様性が失われた事によると考えられた。また、霞ヶ浦・ 北浦と琵琶湖においては各湖内で mtDNA のハプロタ イプ頻度に全く有意差が見られず、これは各水系にお ける単一繁殖集団の存在だけでなく、ブルーギルの移 動能力の高さと生息環境の選択幅の広さを示すものと 考えられた。

#### 謝辞

本研究は平成14-15年度水産庁ブルーギル食害等影 響調査事業の一環として行われたものである。本報 をまとめるに当たり、養殖研究所生産技術部秋山敏 夫部長と岡内正典育種グループ長には貴重な助言を 頂いた。なお、本研究を進めるに当たり、サンプル収 集ならびに情報提供において下記の方々には大変お世 話になった。心から厚く御礼申し上げる(敬称略): 工藤 智(北海道立水産孵化場)、長崎勝康(青森県 総合水産研究センター内水面研究所)、三浦励一(京 都大学農学部)、尾田紀夫·久保田仁志(栃木県水産 試験場)、三好 勝(新潟県内水面水産試験場)、飯 野哲也(埼玉県農林総合研究センター水産支所)、芳 賀 稔(山梨県水産技術センター)、半澤浩美(茨城 県内水面水産試験場)、河野 博(東京海洋大学海洋 科学部)、山本 聡(長野県水産試験場)、小林秀司(中 京女子大学アジア文化学科)、井出充彦(滋賀県水産 試験場)、東山憲行(京都府教育委員会)、細谷和海・ 北川忠生,藤田朝彦(近畿大学農学部)、上原一彦(大 阪府水生生物センター)、高橋芳明(和歌山県水産試 験場)、古川未来(島根県立宍道湖自然館ゴビウス)、 谷口義則(山口県立大学生活環境学科)、土井啓行(下 関市立しものせき水族館)、吉松定昭(香川県水産試 験場)、清水孝昭(愛媛県中予水産試験場)、恵崎 摂 (福岡県水産海洋技術センター内水面研究所)、小早川 みどり (九州大学理学部)、東 幹夫 (長崎大学教育 学部)、宮原孝博(大分県海洋水産研究センター内水 面研究所)、立原一憲・太田英利(琉球大学理学部)、 田 祥麟(韓国:祥明大学)。

#### 文 献

- 1) Fuller, P. L., L. G. Nico and J. D. Williams (1999) Nonindigenous fishes Introduced into inland waters of the United States. American Fisheries Society Special Publications 27. American Fisheries Society, Maryland.
- 2) 横川浩治 (1992) ブルーギル, pp.75-89, 120-128, 「ブラックバスとブルーギルのすべて 外来魚対策検討委託事業報告書-」、全国内水面漁業共同組合連合会、東京、
- 3) 財団法人 自然環境研究センター (2002) 生物多様性調査 動物分布調査・淡水魚類報告書, 環境省自然環境 局生物多様性センター, 東京.
- 4) 外来魚対策・検討委員会(2001)河川における外来種対策に向けて[案], リバーフロント整備センター, 東京.
- 5 ) Azuma, M. (1992) Ecological release in feeding behaviour: the case of bluegills in Japan. Hydrobiologia, 243/244: 269-276.
- 6) Azuma, M. (2001) Ecological disturbance by two alien fish species to the indigenous community of a small lake in western Japan. Verh. Inrernat. Verein. Limnol., 27: 3794-3797.
- 7) Yonekura R., K. Nakai and M. Yuma (2002) Trophic polymorphism in introduced bluegill in Japan. Ecol. Res. 17: 49-57.
- 8) Matsuoka, N., H. Shichiri and A. Ito (1996) Genetic variation in the population of the bluegill, *Lepomis macrochirus* of the family Centrarchidae from Lake Biwa in Japan and phylogenetic relationships among three species of the suborder Percoidei inferred from electrophoretic analysis of allozymes. Sci. Rep. Hirosaki Univ. 43: 61-68.
- 9) 鄭 文基(1979) 韓国魚図譜, 一志社, 京城, pp. 371-372.
- 10) Asahida, T., T. Kobayashi, K. Saitoh, and I. Nakayama (1996) Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. Fisheries Sci., 62:727-730.
- 11) Palumbi, S. R., A. Martin, S. Remano, W. O. Mcmillian, L. Stice and G. Grabowski (1991) The simple fool's guide to PCR, ver 2.0. Zoology of Department, University of Hawaii, Honolulu.
- 12) Nei, M. and W. H. Li (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci., 76: 5269-5273.
- 13) Nei, M. and F. Tajima (1981) DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. Genetics, 97: 145-163.
- 14) Raymond, M. and F. Russet (1995) An exact test for population differentiation. Evolution, 49: 1280-1283.
- 15) Schneider, S., D. Roessli and L. Exocoffier (2000) ARLEQUIN, version 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- 16) 丸山為藏・藤井一則・木島利通・前田弘也(1987)外国産新魚種の導入過程,水産庁研究部資源課・水産庁養殖研究所,東京.
- 17) 宮地傳三郎·川那部浩哉·水野信彦(1980) 原色日本淡水魚類図鑑(全改訂新版), 保育社, 東京,
- 18) 寺島 彰 (2001) ブルーギル. 日本の淡水魚 改訂第3版 (川那部浩哉·水野信彦·細谷和海編), 山と渓谷社, 東京, pp 506-511.
- 19) Scott, W. B. and E. J. Crossman (1973) Freshwater fishes of Canada. Bulletin 184, Fisheries Research Board of Canada, Ottawa.
- 20) Glémet, H., P. Bliber and L. Bernatchez (1998) Geographical extent of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) mtDNA introgression in brook char populations (*S. fontinalis*) from eastern Québec, Canada. Mol. Ecol., 7: 1655-1662.
- 21) 桐生 透(1992)ブルーギル, pp. 89-91,「ブラックバスとブルーギルのすべて 外来魚対策検討委託事業報告書-」,全国内水面漁業共同組合連合会,東京.
- 22) 野澤 謙(2001) 集団構造. 動物遺伝育種学辞典(動物遺伝育種学辞典編集委員会編), 朝倉書店, 東京, pp. 261-265.
- 23) Felley, J. D. and J. C. Avise (1980) Genetic and morphological variation of bluegill populations in Florida lakes. Trans. Amer. Fish. Soc., 109: 108-115.
- 24) Hosoya, K. (1982) Classification of the cyprinid genus *Sarcocheilichthys* from Japan, with description of a new species. Jpn. J. Ichthyol., 29: 127-138.
- 25) 田中哲夫(2001) ビワマス. 日本の淡水魚 改訂第3版(川那部浩哉·水野信彦・細谷和海編), 山と渓谷社, 東京, pp. 180-181.

## Polymerase Chain Reaction-Based Species Identification of Pearl Oyster Using Nuclear Ribosomal DNA **Internal Transcribed Spacer Regions**

(核 rDNA の ITS 領域を利用した PCR によるアコヤガイ属の種判別)

Tetsuji MASAOKA\*1 and Takanori KOBAYASHI\*2

\*1 Farming Biology Division, National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency.

(正岡哲治 (養殖研・生産技術)・小林敬典 (中央水研・企画連絡室))

#### Abstract

It is sometimes difficult to identify the pearl oyster species of the genus *Pinctada* by its shell characteristics. We developed a PCR-based method to discriminate five pearl oyster species or groups using Internal Transcribed Spacer (ITS)-1 and ITS-2 regions of nuclear ribosomal DNA. This technique includes only two steps; 1) amplification of the specific inter-ITS region by PCR, and 2) 1% agarose gel electrophoresis of the PCR product for 20 min. (100 V). Amplification of 700-800 bp DNA fragments was unequivocally species-or group-specific, thereby allowing identification of pearl oyster species not only in adult but in larval (umbo stage) samples as well.

(accepted April 21, 2004)

#### Introduction

Hayami<sup>1)</sup> described 7 species of Genus *Pinctada* (Family Pteriacea; pelecypod mollusk) in Japanese sea field. They are *Pinctada martensii* Dunker, P. fucata Gould, P. maculata Gould, P. albina Lamarck, P. nigra Gould, P. margaritifera Linnaeus, and P. maxima Jameson. Among these, P. martensii is an important commercial species to be used for cultured pearl production in Japan. In southwestern Japan farmers collect wild spats of P. martensii as a mother of pearl. Sometimes, other species such as P. maculata, P. albina and P. nigra are attractive for pearl collectors although they are not suitable for pearl production.

Identification of the species of *Pinctada* has been based on their shell morphology in most cases. However, there is much variation of shell morphology within species, and shell morphology is affected by environmental condition. In particular, at the larvae or juvenile stages, it is difficult to identify the species of Pinctada morphologically, because their morphology are very similar each other. While most previous studies about Pinctada taxonomy have been based on morphology, some studies<sup>2,3)</sup> on allozymes have shown that their variation could be used to identify partly populations of Pinctada species but did not give complete evidences of population differentiation from not only Japan but other regions. Thus, it is highly desirable to develop more stable and simple technique for the species identification for the studies on genetic breeding, resource management, taxonomy, and ecology of the genus *Pinctada*.

Recently, species identification methods using Polymerase Chain Reaction (PCR) have been developed in many organisms including fish and shellfish. It depends on the simple and sensitive technique

Corresponding author; Tetsuji Masaoka, Farming Biology Division, National Research Institute of Aquaculture, 411-2, Hiruta Tamaki Mie 519-0423, Japan.

E-mail:tmasa@fra.affrc.go.jp

<sup>\*2</sup> Research Planning and Coordination Division, National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency

applicable to small or fixed samples<sup>3-10)</sup>.

Masaoka et al<sup>11)</sup> reported that they could distinguish five species or groups (species 1: *Pinctada. maxima*, species 2: *P. margaritifera*, group 3: *P. albina* and *P. nigra*, species 4: *P. maculata*, and group 5: *P. martensii*, *P. fucata* and *P. imbricata* Roding<sup>12)</sup>) among the species of *Pinctada* by sequence analysis of Internal Transcribed Spacer(ITS) 1 and ITS-2 regions of nuclear ribosomal DNA(rDNA). The objective of the present work is to develop a simple and rapid method for species identification of the 5 species or groups using PCR amplification of the same regions.

#### Materials and Methods DNA Sample

Table 1 shows the detailed information of the samples used in the present study. All adult and juvenile samples were raw or fixed in 70% ethanol. Ten to 100 mg muscle tissue was soaked in  $500\,\mu l$  of TNES-Urea 6 M buffer for crude DNA extraction. Each umbo stage larva fixed in 70% ethanol was similarly treated for DNA extraction. For tissue or larva

digestion, 0.4 mg of Proteinase K was added and the mixture was incubated for 12-16 hours at  $37^{\circ}$ C. Total DNA was then extracted with phenol-chroloform and hydroxyapatite (Masaoka et al<sup>13)</sup>).

#### PCR amplification

The portion between the ITS-1 and ITS-2 was amplified by PCR. Table 2 shows 5 sets of primer pairs for identification of the 5 species or groups of Pinctada species; primer set S is for species 1, K for species 2, MO for group 3, MI for species 4, and A for group 5, respectively. Forward primers were constructed based on the sequence of the 5' region of ITS-1 and reverse primer was based on the sequence of the 3' region of ITS-2. PCR mixture contained 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 3.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatin,  $100\mu M$  each of dNTPs,  $0.5\mu M$ each of primers, 0.5 U of ExTag DNA polymerase (TAKARA), and 1µ1 DNA sample in 20µ1. PCR condition included preheating at 94°C for 5 min, 25 cycle of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 62°C for 30 sec, and extension at 72°C for 1 min, and postcycle extension at 72°C for 7 min. In the case of larval

Table 1. Samples of Pinctada species examined

Species or Groups	Species	Location	Sources*1	Number of sample
Species 1	P. maxima	Philippines	A	8
Species 2	P. margaritifera	Okinawa, Japan	A	9
		Kochi, Japan	$\mathbf{W}$	1
Group 3	P. albina	Amami, Kagoshima, Japan	W	8
	P. nigra	Amami, Kagoshima, Japan	W	8
Species 4	P. maculata	Amami, Kagoshima, Japan	W	14
Group 5	P. martensii	Ishikawa, Japan	W	2
		Ishikawa, Japan <sup>*2</sup>	Α	16
		Mie, Japan	W	2
		Oki, Shimane, Japan	$\mathbf{W}$	2
		Nagasaki, Japan	W	2
		Ehime, Japan	A	2
	P. fucata	Kamikoshiki, Kagoshima, Japan	$\mathbf{W}$	2
		Amami, Kagoshima, Japan	W	2
		Hainan, China	A	5
		Liusha, China	A	5
		Cambodia	W	10
		Myanmar	Α	10
		Perth, Australia	W	1
	P. imbricata	Florida, USA	W	5

<sup>\*1</sup>A, samples produced in hatcheries and W, wild samples.

\*2 Umbo stage larva.

Table 2. Primer sets for each species or groups of *Pinctada* 

Primer set (Species or Groups)	<del>-</del>	Primer sequence
S	Forward:	5'-CAGAGGTTAGCCTCTCGCT-3'
(Species 1)	Reverse:	5'-CCCTCAACACGGAAATA-3'
K	Forward:	5'-CAAATTCTCGAAAGAGAAAAAGAT-3'
(Species 2)	Reverse:	5'-CGTCGTCATGACAGAACAGGCC-3'
MO	Forward:	5'-GACCTCGTCTCTTCGCTGAACAAT-3'
(Group 3)	Reverse:	5'-GTTTTTTCGAATAAGAGAAGTAGCAA-3'
MI	Forward:	5'-CTTGGGTCTCTACCCTTGACTGAT-3'
(Species 4)	Reverse:	5'-GGATGGAGGTGTAAAGCCAAGAAACC-3'
A (Group 5)	Forward: Reverse:	5'-CTCAGCAAGAGTGAAAACTTGC-3' 5'-GTCATCCATCGACAGTCTTGGA-3' 5'-GTCATCCATCGACAAGTCTTG-3'

Two reverse primers of Primer set A were mixed equally in PCR. Species or Groups 1-5: See Table 1.

samples cycling increased to 40 to 45. PCR products were examined by electrophoresis on a 1.0% agarose gel in TAE buffer at 100 V for 20 min, and stained in ethidium bromide.

#### Results and Discussion

Each primer set amplified only specific inter-ITS DNA fragments of 700-800 bp in each species or group of samples examined (Fig.1). Primer set S amplified DNA fragments only from 8 samples of species 1, primer set K did so only from 10 samples of species 2, primer set MO did so only from 16 samples of group 3, primer set MI only from 14 samples of species 4, primer set A only from 66 samples of group 5, respectively (Table 3). We confirmed that all these amplified PCR products were the portion flanked with the ITS-1 and ITS-2 region by sequencing (data not shown). These results indicate that PCR using these primer sets are useful to identify *Pinctada* species. We could also amplify the specific DNA sequence for 16 umbo stage larvae of *P. mar*tensii (group 5, Ishikawa, Japan) with the primer set A, indicating the availability of the present method for identification of the umbo stage larvae of pearl oyster. The method would be extended to discriminate other species of *Pinctada* which are sometimes difficult to be identified morphologically.

Species identification methods using mtDNA sequence are developed in many species of fish and shellfish. Most of these methods include three steps, 1) amplification of specific DNA region by PCR, 2) digestion by restriction enzyme and 3) agarose gel

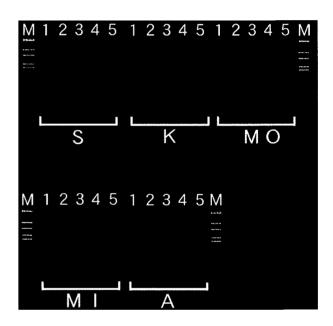


Fig. 1. Electrophoretic analysis of PCR products to identify pearl ovster species.

S: Products of PCR using the primer set S, K: Products of PCR using the primer set K, MO: Products of PCR using the primer set MO, MI: Products of PCR using the primer set MI, A: Products of PCR using the primer set A. Lane 1: *Pinctada maxima* (Species 1), Lane 2: *P. margaritifera* (Species 2), Lane 3: *P. albina* (Group 3), Lane 4: *P. maculata* (Species 4), 5: *P. martensii*, (Group 5), M: Molecular size markers (λ/Hind III digestion).

electrophoresis. Compared with the method using restriction fragment length polymorphism (RFLPs), the present technique includes two steps, amplification of specific DNA region by PCR and agarose gel electrophoresis. Thus it is more convenient and easier than the PCR-RFLPs method. Furthermore we would be

San anima and Guarana			Primer set		
Species or Groups	S	K	MO	MI	A
Species 1	100	0	0	0	C
Species 2	0	100	0	0	C
Group 3	0	0	100	0	0
Species 4	0	0	0	100	C
Group 5	0	0	0	0	100

Table 3. Amplification rate of inter-ITS DNA fragments in each species or groups of *Pinctada* by PCR using each primer set

Amplification rate:  $100 \times$  (number of specimens from which DNA fragment was amplified/number of specimens tested). Species or Groups 1-5: See Table 1.

able to identify a hybrid between species or groups of *Pinctada* with this method, since we analyze nuclear DNA region.

ITS regions of rDNA have been used for the phylogenetic analysis of salmonid<sup>14-16)</sup> or the intraspecific phylogeography of shellfish<sup>17-20)</sup>. We here present the PCR method using ITS regions of rDNA which can be used for a rapid species identification of the genus *Pinctada*. This technique would contribute to studies of ecology, taxonomy, genetic breeding, and resource management of pearl oysters. For these purposes, however, we need further research on other populations of *Pinctada* since many species of

the genus have been described over the world, some of which, however, could not be analyzed in the present study.

#### Acknowledgments

We are grateful to Dr. Katsuhiko Wada, National Research Institute of Aquaculture for his helpful suggestion and critical review of the manuscript. We thank Drs. Hideo Aoki and Masahiro Hayashi, Fisheries Research Institute of Mie, and Dr. John Scarpa, Oceanographic Institution, INC. FORT PIERCE, FLORIDA, U. S. A. for providing the specimens.

#### References

- 1) Hayami, I. (2000) Family Pteriacea, pp880-883, in "Marine Mollusks in Japan", eds. by T. Okutani, Tokai University, Tokyo.
- 2) Wada, K. T. (1982) Inter- and intraspecific electrophoretic variation in three species of the pearl oysters from the Nansei islands of Japan. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture, 3: 1-10.
- 3) Colgan, D. J. and W. F. Ponder (2002) Genetic discrimination of morphologically similar, sympatric species of pearl oyster (Mollusca: Bivalvia: *Pinctada*) in eastern Australia. Mar. Freshwater Res., 53: 697-709.
- 4) Cespedes, A., T. Garcia, E. Carrara, I. Gonzalez, B. Sanz, P. E. Hernandez and R. Martin (1998) Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a short fragment of the cytochrome *b* gene for identification of flatfish species. J. Food Protection, 12: 1684-1685.
- 5) Wakao, T., Y. Hikida, T. Tsuneyoshi, S. Kaji, H. Kubota and T. Kubota (1999) A simple DNA analysis for identifying eel species by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method. Nippon Suisan Gakkaishi, 65: 391-399.
- 6) Russell, V. J., G. L. Hold, S. E. Pryde, H. Rehbein, J. Quinteiro, M. Rey-Mendez, C. G. Sotelo, R. I. Perez-Martin, A. T. Santos and C. Rosa (2000) Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species. J. Agric. Food Chem., 48: 2184-2188.
- 7) Asensio, L., I. Gonzalez, A. Fernandez, A. Cespedes, P. E. Hernandez, T. Garcia and R. Martin (2000) Identification of Nile Perch (*Lates niloticus*), Grouper (*Epinephelus guaza*), and Wreck Fish (*Polyprion americanus*) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of a 12S rRNA gene fragment. J.

- Food Protection, 9: 1248-1252.
- 8) Sebastio, P., P. Zanelli and T. Maria Neri (2001) Identification of Anchovy (*Engraulis encrasicholus* L.) and Gilt Sardine (*Sardinella au rita*) by polymerase chain reaction, sequence of their mitochondrial cytochrome b gene, and restriction analysis of polymerase chain reaction products in semipreserves. J. Agric. Food Chem., 49: 1194-1199.
- 9) Takeyama, H., S. Chow, H. Tsuzuki and T. Matsunaga (2001) Mitochondrial DNA sequence variation within and between tuna *Thunnus* species and its application to species identification. J. Fish Biology, 58: 1646-1657.
- 10) Klinbunga, S., N. Khamnamtong, A. Tassanakajon, N. Puanglarp, P. Jarayabhand and W. Yoosukh (2003) Molecular genetic identification tools for three commercially cultured oysters (*Crassosterea belcheri*, *Crassostrea iredalei*, and *Saccostrea cucullata*) in Thailand. Mar. Biotechnol., 5: 27–36.
- 11) Masaoka, T. and T. Kobayashi (2003) Estimation of phylogenetic relationships in Pearl Oysters (Genus: *Pinctada*) based on 28SrRNA and ITS sequences. DNA Polymorphism, 11:76-81.
- 12) R. T. Abbot and S. P. Dance (1985) *Pinctada imbricata*, pp. 306, in "Compendium of seashells Japanese edition", eds. by T. Habe and T. Okutani, Heibonsha, Tokyo.
- 13) Masaoka, T. and T. Kobayashi (2004) DNA extraction method for organisms contain mucopolysaccarides. DNA Polymorphism, 12 (in press).
- 14) Phillips, R. B., L. Gudex, K. M. Westrich and A. L. DeCicco (1999) Combined phylogenetic analysis of ribosomal ITS1 sequences and new chromosome data supports three subgroups of Dolly Varden char (*Salvelinus malma*). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 56: 1504-1511.
- 15) Phillips, R. B., M. P. Matsuoka, I. Konon and K. M. Reed (2000) Phylogenetic analysis of Mitochondorial and nuclear sequences supports inclusion of *Acantholingua ohridana* in the Genus *Salmo*. Copeia, 2:546-550.
- 16) Presa, P., B. G. Pardo, P. Martinez and L. Bernatchez (2002) Phylogeographic congruence between mt DNA and rDNA ITS markers in Brown Trout. Mol.Biol.Evol., 19: 2161-2175.
- 17) Toro, J. E. (1998) Molecular identification of four species of mussels from southern Chile by PCR-based nuclear markers: The potential use in studies involving planktonic surveys. J.Shellfish Res., 17: 1203-1205.
- 18) Hedgecock, D., G. Li, M. A. Banks and Z.Kain (1999) Occurrence of the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* in the Ariake Sea, Japan. Mar. Biol., 133: 65-68.
- 19) King, T. L., M. S. Eackles, B. Gjetvaj and W. R. Hoeh (1999) Intraspecific phylogeography of *Lasmigona sub-viridis* (Bivalvia: Unionidae): conservation implications of range discontinuity. Mol. Ecol., 8: S65-S78.
- 20) Fernandez, A., T. Garcia, L. Asensio, M. A. Rodriguez, I. Gonzalez, P. E. Hernandez and R. Martin (2001) PCR-RFLP analysis of the Internal Transcribed Spacer (ITS) region for identification of 3 clam species. J. Food Sci., 66: 657-661.

### 北海道蓴菜沼産二倍体ドジョウにおける非還元二倍性卵の形成

糸納正樹・荒井克俊(北大・院水)

### Unreduced Diploid Eggs in the Diploid Loach Misgurnus anguillicaudatus, from Lake Junsai-Numa, Hokkaido, Japan

#### Masaki ITONO and Katsutoshi ARAI

Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University

#### **Abstract**

In a population with relatively high frequency of triploid individuals, triploid loaches appear as a result of the accidental fertilization of unreduced diploid eggs, spawned by unisexual diploid loaches, by normal haploid sperm. However, in other populations where a few triploid loaches were found, the mechanism for the occurrence of triploid has not been resolved. We investigated the ploidy status of loach specimens collected from Lake Junsai-Numa, Nanae Town, Hokkaido, Japan. We produced progeny from these loaches by experimental crosses and induced gynogenesis, then determined their ploidy status. Although all the loach individuals (n=25) examined were flow-cytometrically determined as diploid, we found based on the ploidy status of the progeny, that some females laid some diploid unreduced eggs. Microsatellite genotyping disclosed that gynogenetic diploid progeny induced from such unreduced eggs were not clonal, and gave genotypes genetically different from the mother. Genetic results also suggest that most diploid eggs might be formed by spontaneous inhibition of the second meiotic division after fertilization.

(accepted May 12, 2004)

日本産ドジョウ(Misgurnus anguillicaudatus)の多 くは染色体数50の二倍体であるが、魚市場より得られ た標本の中には染色体数75の三倍体や、100の四倍体 が存在することが知られている10。自然四倍体の起源 は不明であるが、人為的な雌性あるいは雄性発生にお いて、生存性のある二倍体を生じることから、これら は4セットの相同染色体をもち、二倍性配偶子(卵、 精子)を産する遺伝的四倍体と推定されている2-4)。自 然四倍体は、野生集団の中からは未だ見出されていな いが、自然三倍体は一部の地域において、比較的高頻 度で出現することが報告されている5-6)。

自然三倍体の産地の一つである新潟県広神村では、 三倍体と同所的に生息する二倍体の中に、通常の半 数性卵に加えて非還元二倍性卵を産む個体が存在し、 当地の三倍体はこれらの非還元卵と通常精子の受精に より生じていた<sup>5)</sup>。また、これらの非還元二倍性卵を

UV照射精子で受精させて作出した雌性発生二倍体に ついて、DNAフィンガープリント法により調査した 結果、これらの子孫は互いに類似するが、必ずしも遺 伝的に同一でなく、個体間でわずかな変異が認められ た<sup>n</sup>。しかしながら、広神村と同じく自然三倍体が高 頻度で出現する北海道女満別町の野生集団では、二倍 体雌の中に母親と遺伝的に同一な非還元二倍性卵を産 む個体があり、これらの卵は単為発生することから必 然的にクローン系統となる<sup>6</sup>。これら非還元二倍性卵 は、通常精子と受精した場合、しばしば精子核を取り 込み三倍体となることから、当地に生じる自然三倍体 はこれらの非還元クローン二倍性卵の受精に由来する と結論されている6。

以上のように、自然三倍体出現の原因となる非還 元二倍体卵の遺伝的特性は広神村と女満別町のドジョ ウの間で大きく異なっているものの、これら二地点に

連絡先:〒041-8611 函館市港町3-1-1 北海道大学大学院水産科学研究科 育種生物学講座 糸納正樹

E-mail: i-masa@fish.hokudai.ac.jp

おける高頻度での三倍体出現は非還元卵の精子核取り 込みにより説明される。しかしながら、 $1 \sim 3\%$ の低 頻度で三倍体が見られる他の地点<sup>5</sup>においては、どの ような機構により三倍体が生じているかはこれまでの ところ不明である。そこで、本研究では低頻度の三倍 体の出現機構解明のため、三倍体の出現が1.2%で認 められた北海道大野町<sup>5)</sup>に隣接する七飯町蓴菜沼産の ドジョウ集団について調査を行った。研究方法として は、倍数体の出現頻度を調査するとともに、ドジョウ 卵をドジョウないしはキンギョの精子、あるいは紫外 線照射キンギョ精子で受精させ、孵化個体の倍数性判 定と DNA マーカー分析を行うことにより、非還元卵 産出の可能性を検討した。さらに、女満別町の二倍体 -三倍体モザイク個体は、遺伝的に同一なクローン性 非還元二倍性精子を形成することが知られていること から<sup>8</sup>、雄起源の三倍体出現の可能性を探るため、精 子の倍数性についても検討した。

#### 材料と方法

供試魚 2002年6月に北海道亀田群七飯町にある湖、蓴菜沼より採集したドジョウ(Misgurnus anguillicaudatus)雌17個体(F1~F17)、雄8個体(M1~M8)を材料とした。なお、受精実験においては、北海道大学水産学部水槽センターで飼育中のヒドジョウ雄2個体(A,B)とキンギョ雄1個体を用いた。

採卵と採精 リンゲル液(NaCl 8.5 g, KCl 0.2 g, CaCl<sub>2</sub> 0.4 g, MgCl<sub>2</sub> 0.2 g/1000 ml 蒸 留 水, pH8.0)に HCG(ゴナトロピン, 帝国臓器製薬)を溶解し、魚体重 1 g あたり 20-25 IU を腹腔内に注射した。供試魚を25  $\mathbb{C}$  に保った水槽に収容し、雌では10-12 時間後に排卵を確認した後、腹部を圧迫し採卵した。雄も同様に腹部を圧迫し、得られた精液を毛細管で採精した。

DNA フローサイトメトリー 供試魚の尾鰭または胸鰭より採取した少量の鰭断片および雄 8 個体(M1~M8)から得られた精液をリンゲル液で約100倍に薄めた希釈精液 $50\mu$ l、そして孵化直後の仔魚全体は山羽ら $^9$ 記載の方法により DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole) 染色を行い、フローサイトメーター(PA, Ploidy Analyser, Partec Germany)により相対 DNA量の分析を行った。この際、二倍体ドジョウの鰭のDNA量を正常二倍体(2C)の基準とした。

人工受精、交雑および雌性発生誘起 採取した卵は、ドジョウ精子、キンギョ精子、あるいはキンギョ 紫外線照射精子(以降 UV キンギョ精子)のいずれか を用いて媒精し、あらかじめ淡水を入れたプラスチックシャーレに落下させることで人工受精を行った。

キンギョ精子の紫外線照射はOnozato and Yamaha<sup>10)</sup>の方法に従った。すなわち、イオンスパッタ装置で親水化処理を行った直径90 mm シャーレに、サケの精漿で約100倍に薄めた希釈精子を取り、横方向に振とうさせながら直上に設置した15 W 殺菌灯により紫外線照射を行った。照射量は約6000 erg/mm²(照射強度50 erg/mm²/sec×120 sec)とした。

ドジョウ精子による受精実験において、F1、2、5、6 に対してはM6の精子を、F7、8、9、10、12に対してはヒドジョウAの精子を、 $F13\sim F17$ に対してはヒドジョウBの精子を用いた。キンギョ精子による受精実験においては、F3、4以外の15個体のドジョウ雌を用いた。これらの個体より得られた卵を各々1個体のキンギョより採取した精子により受精させた。 $F13\sim F17$ 雌より得た卵にはUVキンギョ精子を受精させ、人為雌性発生を誘起した。

受精卵の管理および孵化率の推定 受精直後にシャーレあたりの卵数を計数し、これを使用卵数とした。その後、約12時間毎に換水を行うとともに、死卵の除去とその計数を行った。また、仔魚がすべて孵化した時点で孵化数を計数した。この孵化数の使用卵数に対する割合を孵化率とした。

遺伝解析 F16とドジョウ精子との交配の子孫6個体および、F17とドジョウ精子との交配の子孫6個体、そして、UVキンギョ精子との交配の雌性発生子孫4個体を用いた。稚魚は鰭あるいは頭部のDNAフローサイトメトリー分析により、倍数性を判定後、遺伝解析に供した。DNA抽出を行う親魚の試料としては筋肉約100mg、子孫の試料としては倍数性判定後の稚魚全体を用いた。これらの材料よりArai and Mukaino<sup>11)</sup>の方法に従いDNAを抽出し、TEバッファーに溶解して4℃で保存した。

Morishima et al. <sup>12)</sup>により開発された6種類のマイクロサテライト(MS)マーカー(Mac3、15、24、35、37、49)を遺伝解析に用いPCR法により増幅した。反応後、PCR産物をローディングバッファーと混合し、15%アクリルアミドゲルにより電気泳動を行った。DNA断片の検出は、臭化エチジウム溶液で染色後、UVトランスイルミネーター上で観察した。泳動像をプリントグラフAE-6905H(アトー株式会社製)により撮影し、記録媒体を介してパソコンに取り込んだ。各個体のサンプルのDNA断片(アリル)はマーカー(20 bpおよび100 bp DNA Ladder, TakaRa 製)の移動度をも

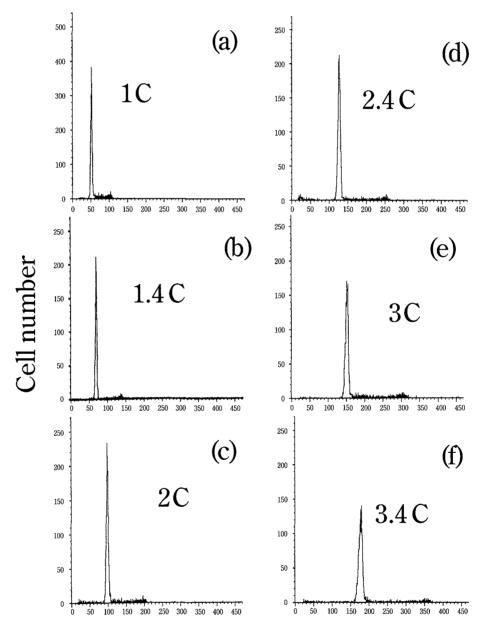
とにし、サイズを推定した。

#### 結 果

供試魚の倍数性 供試魚鰭断片の DNA フローサイトメトリーの結果、供試魚25個体はすべて DNA  $\frac{1}{2}$  2C の二倍体であり (Fig. 1c)、三倍体および他の倍数体はまったく認められなかった。

精子の倍数性 雄8個体  $(M1\sim M8)$  のフローサイトメトリーの結果、全個体において、 $1C \cap DNA$  量をもつ半数体精子 (Fig. 1a) が観察された。

受精実験 成熟雌14個体を親魚とし、ドジョウ精子により人工受精を行ったところ、9家系において孵化仔魚が得られた(Table 1)。孵化率は家系の間で2.9%から66.7%と大きく異なった(Table 1)。これら



## Channel number

Fig. 1. Flow cytometric histograms for relative DNA content of somatic cells and spermatozoa, when erythrocytes of normal diploid loach are used as standard of 2C.

(a) 1C DNA content of loach spermatozoa, (b) 1.4C DNA content of goldfish spermatozoa, (c) 2C DNA content of diploid loach, (d) 2.4C DNA content of the hybrid between haploid eggs of diploid loach female and spermatozoa of goldfish male, (e) 3C DNA content of triploid loach, (f) 3.4C DNA content of the hybrid between diploid eggs of diploid loach female and spermatozoa of goldfish male

孵化仔魚のほとんどが正常な外部形態を示した。これ らのほとんどは2CのDNA量を示す二倍体であった が (Fig. 1c)、4家系において3CのDNA量を示す三 倍体が見られた (Fig. 1e、Table 1)。半数体 (DNA量 1C)、半数体-二倍体モザイク (DNA 量 1C と 2C) が 1家系において見られた(Table 1)。

成熟雌15個体からの卵をキンギョ精子により人工受 精させたところ、14家系において孵化仔魚が得られ、 孵化率は1.5%から66.2%と家系ごとに大きく異なった (Table 1)。キンギョ精子との受精に由来する子孫は、 すべて奇形であった。ドジョウ精子の相対 DNA 量を 1Cとした時 (Fig. 1a)、キンギョ精子は1.4Cの相対 値を示した(Fig. 1b)。二種の交雑に由来する個体の 多くは2.4CのDNA量を示し、両者の雑種であったが (Fig. 1d)、これらの他に3.4CのDNA量を示す三倍体 雑種(Fig. 1f) あるいはそれ以上の DNA 量、または モザイク性を示す個体が8家系において確認された (Table 1)<sub>o</sub>

成熟雌5個体より得た卵をUVキンギョ精子により 人為雌性発生誘起したところ、4家系において孵化個 体が得られた (Table 1)。この中で F17家系以外の3 家系の雌性発生個体は、すべて短躯、小頭、小眼、 扁平等の半数体症候群を示したのに対し、F17家系の 個体はほとんどが奇形であったが、少数は正常であっ た。倍数性について見ると、F17家系以外の3家系 では、調べた個体のすべてが、半数体(1C)であった

Table 1. Hatching rate and relative DNA content of the progenies from normal fertilization using normal sperm, hybridization using goldfish sperm and induced gynogenesis using UV irradiated sperm

Cross		Egg	Ha	tch	Relative DNA content									
Female	Male	n	n	%*1	n	1C	2C	2.4C	3C	3.4C	4.4C	5.4C	mosaic	
F1	M6	229	17	7.5	10	0	3	0	7	0	0	0	0	
F2	M6	115	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F5	M6	137	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F6	M6	126	11	13.3	9	0	9	0	0	0	0	0	0	
F7	A	75	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F8	A	112	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>F</b> 9	A	156	104	66.7	15	1	12	0	1	0	0	0	1*4	
F10	Α	90	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F12	Α	108	38	35.1	<b>1</b> 5	0	13	0	2	0	0	0	0	
F13	В	173	5	2.9	5	0	5	0	0	0	0	0	0	
F14	В	156	9	5.8	9	0	9	0	0	0	0	0	0	
F15	В	177	38	21.4	10	0	10	0	0	0	0	0	0	
F16	В	157	93	59.2	10	0	10	0	0	0	0	0	0	
F17	В	187	51	27.2	20	0	18	0	2	0	0	0	0	
F1	Goldfish*2	131	2	1.5	2	0	0	1	0	1	0	0	0	
F2	Goldfish	210	41	22.7	10	0	0	4	0	6	0	0	0	
F5	Goldfish	186	97	58.4	10	0	0	8	0	2	0	0	0	
F6	Goldfish	253	54	21.8	10	0	0	9	0	1	0	0	0	
F7	Goldfish	163	57	34.9	10	0	0	10	0	0	0	0	0	
F8	Goldfish	152	9	5.9	8	0	0	3	0	5	0	0	0	
F9	Goldfish	176	64	36.3	15	0	0	15	0	0	0	0	0	
F10	Goldfish	144	0	0	-	-	-	-	-	-	-	***	_	
F11	Goldfish	209	3	1.4	2	0	0	2	0	0	0	0	0	
F12	Goldfish	153	81	52.9	15	0	0	13	0	1	0	1	0	
F13	Goldfish	163	10	6.1	7	0	0	7	0	0	0	0	0	
F14	Goldfish	159	23	14.5	10	0	0	10	0	0	0	0	0	
F15	Goldfish	146	10	6.8	9	0	0	8	0	0	0	0	1*5	
F16	Goldfish	175	116	66.2	10	0	0	10	0	0	0	0	0	
F17	Goldfish	127	15	11.8	14	0	0	11	0	1	1	0	1*6	
F13	UV goldfish*3	325	0	0	-	_	-	-	_	-	-	-	-	
F14	UV goldfish	270	98	36.3	9	9	0	0	0	0	0	0	0	
F15	UV goldfish	257	13	5.1	10	10	0	0	0	0	0	0	0	
F16	UV goldfish	287	35	12.2	8	8	0	0	0	0	0	0	0	
F17	UV goldfish	182	14	7.7	10	7	3	0	0	0	0	0	0	

<sup>\*</sup>¹Relative to total number of eggs \*²DNA content of goldfish spermatozoa is 1.4C \*³Ultraviolet ray irradiated goldfish sperm \*⁴1C/2C mosaic \*⁵1.4C/3.4C mosaic \*62.4C/4.4C mosaic \*3 Ultraviolet ray irradiated goldfish sperm \*41C/2C mosaic

のに対して、F17家系では10個体中、7個体が半数体 (1C)、3個体が二倍体(2C)であった。

遺伝解析 受精実験において、子孫が二倍体のみであったF16家系の二倍体子孫(n=6)、子孫に三倍体が生じるF17家系の二倍体子孫(n=4)、三倍体子孫(n=2)、および雌性発生二倍体子孫(n=4)を材料として6種類のMSマーカー(Mac3、15、24、35、37、49)を用いて解析を行った。

マーカー - 動原体間の組み換え率  $(y=0.67)^{12}$ からテロメア側に位置すると考えられる Mac24 座において、F16家系(雌親100/110、雄親104/114)の二倍

体では、雌親と雄親由来のアリルを持つマーカー型(110/114:3個体、100/104:3個体)が見られた(Fig. 2a、Table 2)。F17家系(雌親104/112、雄親104/114)の二倍体もメンデルの法則より期待されるマーカー型(104/112:2個体、104/114:1個体、104/104:1個体)のみを示した(Fig. 2a、Table 2)。F17由来の三倍体子孫2個体では、104/104/112と104/112/114のマーカー型が見られ、それらは雌親由来の2本(104と112)と雄親由来の1本のアリル(104または114)で構成されていた(Fig. 2a、Table 2)。F17由来の雌性発生二倍体では、雌親と同じマーカー型(104/112)の子孫が2個体、いずれかのマーカーについてホモ接

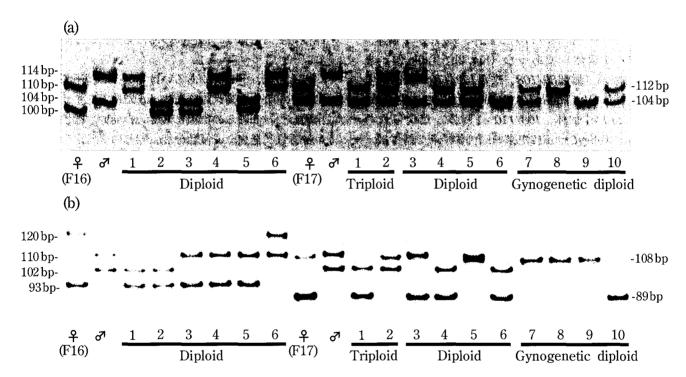


Fig. 2. Microsatellite genotypes in the normally fertilized and gynogetically induced progeny of the loach. (a) *Mac* 24 and (b) *Mac* 49 genotypes among diploid progeny developing from normally fertilized eggs of female F16 and triploid, diploid and UV-induced gynogenetic diploid progeny developing from normally and gynogetically fertilized eggs of female F17.

Table 2. Microsatellite genotypes in the normally fertilized and gynogetically induced progeny of the loach females F16 and F17

Microsatellite	Female	Parental ge	enotype	Diploid		Triploid			Gynogenetic diploid				
locus	No.	Female	Male	n	Genotype: n	n	Genotype: n	n	Genotype: n				
Mac3	F16	103/132 1	. ,	6	,,,,	0	-	_	110/1109 117/1171				
[0.06]*1	F17	110/117 1		4	103/110:2, 103/117:1, 105/117:1	Z	103/110/110:1, 103/117/117:1	4	110/110:3, 117/117:1				
<i>Mac15</i> [0.91]	F16 F17	161/164 1 151/161 1	,		151/164:3, 161/164:1, 151/161:1, 164/164:1 161/164:3, 151/151:1	2	- 151/151/161:2	4	- 151/161:3, 151/151:1				
<i>Mac24</i> [0.67]	F16 F17	100/110 1 104/112 1	,		110/114:3, 100/104:3 104/112:2, 104/114:1, 104/104:1	2	- 104/104/112:1, 104/112/114:1	4	- 104/112:2, 104/104:1, 112/112:1				
Mac35 [0.90]	F16 F17	117/121 1 111/111 1		6	123/121:2, 123/117:2, 114/121:1, 117/121:1 111/114:2, 111/123:2	2	- 111/111/114:2	4	- 111/111:4				
Mac37 [0.47]	F16 F17	,	79/89 79/89		79/89:4, 79/79:2 89/93:2, 79/79:2	2	- 79/89/93:1, 79/79/93:1	4	79/93:4				
Mac49 [0.06]	F16 F17	93/120 1 89/108 1		6	93/102:2, 93/110:3, 110/120:1 89/102:2, 89/110:1, 108/110:1	2	89/89/102:1, 102/108/108:1	4	89/89:3, 108/108:1				

<sup>\*1</sup> Microsatellite-centromere recombination rate (second meotic division segregation frequency=y) 120

合型 (104/104と112/112) を示す子孫が2個体見られた (Fig. 2a、Table 2)。

その他のテロメアに近いと考えられる3つの座 (Mac15、35、37; Morishima et al. 12) において、Mac35 座では雌がホモ接合型であり解析が不可能であった点を除いて、各家系における両親由来アリルの子孫への伝達は上記の Mac24 座と同様であった(Table 2)。すなわち、F16とF17家系に由来するドジョウニ倍体は雌親と雄親のアリルを片方ずつ持ち、F17家系に由来する三倍体や雌性発生二倍体では、雌親と同じヘテロ接合型がホモ接合型よりも多く確認された。

動原体近くに位置すると考えられる Mac49 座  $(y=0.06)^{12}$ において、F16家系(雌親93/120、雄親 102/110) の二倍体子孫は、雌親と雄親由来のアリル を持つマーカー型 (93/110:3個体、93/102:2個体、 110/120:1個体) であった (Fig. 2b、Table 2)。ま た、F17家系(雌親89/108、雄親102/110)に由来す る二倍体についても同様のマーカー型(89/102:2個 体、89/110:1個体、108/110:1個体)が見られた (Fig. 2b、Table 2)。F17由来の三倍体子孫 2 個体は、 89/89/102と102/108/108であった。すなわち、雌親 に由来する2つのアリルのいずれか一方(89または 108) についてホモ接合型となり、加えて雄親に由来 するアリル (102) を有した (Fig. 2b、Table 2)。F17 の雌性発生二倍体子孫で見られたマーカー型は、雌親 に由来するアリルのいずれか一方(89または108)に ついてホモ接合型であった(Fig. 2b、Table 2)。

同様に動原体付近に位置すると考えられる Mac3 座においても、両親の DNA 断片の子孫への伝達様式は上記の Mac49 座と同じであった (Table 2)。すなわち、F16とF17家系に由来するドジョウ二倍体は雌親と雄親由来のアリルを一方ずつ持ち、F17家系に由来する三倍体や雌性発生二倍体では雌親のアリルのいずれか一方についてホモ接合型の個体のみが確認された。

七飯町蓴菜沼は Zhang and Arai $^5$ により、低頻度で三倍体が認められた大野町に隣接する地域であることから、三倍体の出現が期待されたが、調査した全ての個体 (n=25) は二倍体であり、三倍体や他の倍数体はまったく認められなかった。

また、雄個体 (n=8) の精子の倍数性判定により、全個体において正常な半数性精子が形成されていることが確認された。

ドジョウ卵をドジョウ精子で受精させた場合、9家系中4家系(F1、9、12、17)では二倍体以外に他の倍数体やモザイク個体が出現し、その中でも三倍体が

特に多かった。キンギョ精子(DNA量1.4C)で受精 させた場合、子孫の多くはドジョウとキンギョ間の奇 形雑種(DNA 量2.4C= ドジョウ半数体卵1C+ キンギョ 精子1.4C) であったが、14家系7家系(F1、2、5、6、 8、12、17) では三倍体雑種 (DNA 量3.4C=ドジョウ 二倍体卵2C+キンギョ精子1.4C)の出現が見られた。 UV 精子を用いて雌性発生を誘起した場合では、4家 系中1家系(F17)において、半数体症候群を示す奇 形個体だけでなく正常な二倍体が出現した。以上の 結果は雌17個体のうち8個体(F1、2、5、6、8、9、 12、17) は通常の半数性卵の他に、二倍性の卵を産 出することを示唆する。すなわち、三倍体は二倍性卵 と半数性精子の受精により、三倍体雑種はドジョウニ 倍性卵とキンギョ精子との受精により、そして、正常 雌性発生二倍体は二倍性卵のみの発生により説明でき る。

以上の他、ドジョウあるいはキンギョ精子の受精により、半数体や高次の倍数体、また様々なモザイクが出現した。これらの原因として、自発的な雌性(あるいは雄性)発生や、減数分裂、卵割の異常が考えられるが、目下のところこれらの出現原因と機構は不明である。

F17個体は3種類の精子を用いた実験のすべてにお いて、二倍性の卵を産む可能性が強く示された。この F17家系を用いたマイクロサテライトマーカーの遺伝 解析において、雌性発生二倍体では、テロメア付近の マーカー座 (Mac15、24、37) の場合、雌親と同じヘテ 口接合型がホモ接合型よりも多く確認された。一方、 動原体付近のマーカー座 (Mac3、49) の場合、雌親の アリルのいずれか一方についてホモ接合型の個体の みが確認された。以上の結果は生じた二倍性卵の多く において、減数分裂時に動原体とマーカー間で組換え が起きている可能性を示している。従って、これらの 卵は遺伝的に同一ではない。女満別町産ドジョウの産 む非還元卵に由来する雌性発生二倍体はすべてのマー カー座において雌親と同じマーカー型を持つクローン である<sup>6</sup>。しかしながら、F17家系で生じた二倍性卵 に由来する雌性発生二倍体の多くが雌親のマーカー型 と一致しないことから、この家系の非還元卵形成機構 は女満別町産クローンドジョウとは明らかに異なる。

各マーカー型から判断して、F17家系で生じた二倍性卵の多くは第二極体放出の自然抑制により生じた可能性が高いと考えられる。減数第一分裂の省略による非還元卵の出現も考えられるが、この場合、子供に出現する雌親由来のアリルにおいて、動原体付近のマーカー座(Mac3、49)ではヘテロ接合型が著しく高い率で生じるはずである<sup>13)</sup>。このことは、今回の結果と矛

盾するため減数第一分裂の省略は考えにくい。第二極体放出の自然抑制による卵形成機構は、希な自然三倍体出現機構としてニジマス<sup>14)</sup>やカワマス<sup>15)</sup>で報告されている。この機構では第二極体が放出されず、そのまま卵内に残り二倍性の卵が形成される。今回のドジョウにおける三倍体の出現は、第二極体放出の自然抑制によるものと考えられるが、このようなことが野生集団における低頻度での三倍体出現の原因となっているかについては、今後さらに多くの家系について調査を行う必要がある。

#### 要 約

日本産ドジョウにおいて、1~3%の頻度で三倍体の出現する地域が報告されている。こうした地域にお

いて三倍体の出現機構を明らかにするため、三倍体の出現が知られている北海道大野町に隣接する七飯町蓴菜沼のドジョウについて倍数体の調査、人工受精実験、ならびに DNA マーカーを用いた遺伝解析を行った。その結果、採集個体 (n=25) はすべて二倍体であった。しかしながら、人工受精実験の結果から、17個体中8個体で半数性卵の他に二倍性の卵を産出する雌の存在が示唆された。遺伝解析で、この二倍性卵を産む雌親1個体由来の雌性発生子孫における各マーカー型は、必ずしも雌親のマーカー型と一致しなかった。従って、今回の調査地点では、第二極体放出の自然抑制により少数の三倍体が生じる可能性が高いことが示唆された。

#### 文 献

- 1) Arai, K., K. Matsubara and R. Suzuki (1991) Karyotype and erythrocyte size of spontaneous tetraploidy in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Nippon Suisan Gakkaishi, 57: 2167-2172.
- 2) Arai, K., K. Matsubara and R. Suzuki (1991) Chromosome and developmental potential of progeny of spontaneous tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Nippon Suisan Gakkaishi, 57: 2173-2178.
- 3) Arai, K., K. Matsubara and R. Suzuki (1993) Production of polyploid and variable gynogens using spontaneously occurring tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Aquaculture, 119: 11-23.
- 4) Arai, K., M. Ikeno and R. Suzuki (1995) Production of androgenetic diploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* using spermatozoa of natural tetraploids. Aquaculture, 137: 131-138.
- 5) Zhang, Q. and K. Arai (1999) Distribution and reproductive capacity of natural triploid individuals and occurrence of unreduced eggs as cause of polyploidization in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Ichthyol. Res., 46: 153-161.
- 6) Morishima, K., S. Horie, E. Yamaha and K. Arai (2002) A cryptic clonal line of the loach *Misgurnus anguilli-caudatus* (Teleostei: Cobitidae) evidenced by induced gynogenesis, interspecific hybridization, microsatellite genotyping and multilocus DNA fingerprinting. Zool. Sci., 19: 565-575.
- 7) Arai, K., K. Morishima, S. Momotani, N. Kudo and Q. Zhang (2000) Clonal nature of gynogens induced from spontaneous diploid eggs in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, Folia. Zool. 49(Suppl. 1): 31-36.
- 8) Morishima, K., K. Oshima, S. Horie, T. Fujimoto, E. Yamaha and K. Arai (2004) Clonal diploid sperm of the diploid-triploid mosaic loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitididae). J. Exp. Zool., 301A: 502-511.
- 9) 山羽悦郎・木村志津雄・田中 稔・坂尾寿々・藤本貴史・荒井克俊(2002)カットスロート *Oncorhynchus clarki* にみられた半数体-二倍体モザイク胚. 水産育種, 32(2): 121-126.
- 10) Onozato, H. and E. Yamaha (1983) Induction of gynogenesis with ultraviolet rays in four species of Salmoniformes. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 49(5): 693-699.
- 11) Arai, K. and M. Mukaino (1997) Clonal nature of gynogenetically induced progeny of triploid (diploid × tetraploid) loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Pisces: Cobitididae). J. Exp. Zool. 278: 412-421.
- 12) Morishima, K., I. Nakayama and K. Arai (2001) Microsatellite -centromere mapping in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Genetica., 111(1-3): 59-69.
- 13) 荒井克俊 (1997) 染色体操作, pp32-62, 「魚類の DNA」, 青山 宙・隆島史夫・平野哲也編, 恒星社厚生閣, 東京.
- 14) Thorgaard, G. H. and G. A. E. Gall (1979) Adult triploids in rainbow trout family. Genetics., 93: 961-973.
- 15) Allen, S. K. and J. G. Stanley (1978) Reproductive sterility in polyploid brook trout, *Salvelinus fontinalis*. Trans. Am. Fish. Soc., 107: 473-478.

## シロザケのミトコンドリア DNA ハプロタイプ判別用 DNA マイクロアレイの開発

守屋彰悟(日清紡・研)・佐藤俊平(さけ・ます資源管理セ)・浦和茂彦(さけ・ます資源管理セ)・ 浦野明央(北大・院理)・阿部周一(北大・院水)

## Development of DNA Microarray for Rapid Identification of Mitochondrial DNA Haplotypes in Chum Salmon

Shogo MORIYA<sup>\*1</sup>, Shunpei SATO<sup>\*2</sup>, Shigehiko URAWA<sup>\*2</sup>, Akihisa URANO<sup>\*3</sup>, and Syuiti ABE<sup>\*4</sup>

- \*1 Research and Development Center, Nisshinbo Industries, Inc.
- \*2 Genetics Section, National Salmon Resources Center
- \*3 Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University
- \*4 Laboratory of Breeding Science, Division of Marine Biosciences, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University

#### **Abstract**

For genetic stock identification, an oligonucleotide (DNA) microarray hybridization method was developed for rapid and accurate detection of nucleotide sequence variations in 20 previously identified variable nucleotide sites in the approximately 500 bp 5' half of the control region of mitochondrial (mt) DNA of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) for genetic stock identification. The method is composed of 3 steps: 1) the immobilization of synthesized oligonucleotides containing respective polymorphic sites on a slide glass pre-coated with Poly-carbodiimide resin, 2) a two-hour hybridization with a DNA microarray of biotinylated PCR fragments spanning the 5' variable portion followed by short washing, and 3) the visualization of hybridization signals using the conventional ABC method and the comparison of scanner-taken signal images on a computer. All the process of hybridization and detection was completed within eight hours. This developed DNA microarray could detect all the single nucleotide mutations and therefore could identify the sequence variations defining 30 mtDNA haplotypes of chum salmon as revealed previously by nucleotide sequence analysis.

近年、分子生物学的手法の発達により遺伝子マーカーを用いたサケ(シロザケ Oncorhynchus keta)の系群識別に関する研究が進められている<sup>1)</sup>。系群とは、魚類などの一つの種内において遺伝的に分化した河川あるいは地方ごとの集団をいう。遺伝子マーカーとしてはミトコンドリア DNA(mtDNA)の多型が多く用いられているが<sup>2-4)</sup>、PCR-RFLP法(Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism)を用いて得られた少数の多型

について解析しているため、系群識別の精度が低いという問題を抱えていた。

最近、我々はシロザケの mtDNA コントロール領域の塩基配列解析により多数の多型を検出した<sup>5,6)</sup>。日本、韓国、ロシア、北米の48集団から2000を越える個体について mtDNA コントロール領域 5'側前半の塩基配列の解析を行い、20個所の塩基変異個所とその組み合わせによる30のハプロタイプを見出した。そのハプロタイプの分布は地域により偏りがあることが分か

連絡先:〒267-0056 千葉県千葉市緑区大野台1-2-3 日清紡研究開発センター バイオグループ 守屋彰悟 E-mail: moriya@nisshinbo.co.jp り、さらに海洋のシロザケ混合集団の系群解析を試みたところ従来法と高い相関が得られたことから、このmtDNAハプロタイプ解析は高精度な系群識別法として高い可能性をもつことが示唆された<sup>6,7)</sup>。しかしながら、シーケンス法による解析には特殊な装置が必要であり、時間と手間もかかる。また、PCR-RFLP法では、上述のように分析精度が低いほか、十分な数の多型を検出するために多種類の制限酵素が必要なため、解析にやはり時間と手間がかかる。シーケンス法とPCR-RFLP法ともに、系群解析のために必要な多数の個体を短時間で分析することは難しく、これらに代わる方法が求められている。

多型を検出する際、シーケンス法やPCR-RFLP法に代わる簡易な方法として、ハイブリダイゼーションを利用したinvader法、TaqMan法、DNAマイクロアレイ法等が挙げられる。中でもDNAマイクロアレイ法は一度に多数の多型を検出できる有力な方法として期待されている。DNAマイクロアレイとは基板上に異なる種類のDNAを整列・固定したものであり、検体DNAをマイクロアレイ上のDNAとハイブリダイズさせ、水素結合により生じた2本鎖DNAの有無を検出する方法である\*10。DNAマイクロアレイ法は、元来、多種類の遺伝子発現を同時に検出するために考案されたが、単一ヌクレオチド多型(single nucleotide polymorphisms、SNPs)を含む塩基配列の変異も検出できる優れた方法である\*9。

このように有効な技術として考えられる DNA マイクロアレイ法だが、一枚あたりのコストが高いこと、さらにハイブリダイゼーションによって選択的に得られた 2 本鎖の検出に蛍光値や電流値の変化を測定するため高価な専用の検出装置が必要であり、シロザケの系群識別を行うことを目的として DNA マイクロアレイを用いることは不可能と考えられていた。

我々は、これらの問題点を克服し、簡便なシロザケの mtDNA ハプロタイプ判別用 DNA マイクロアレイの開発を試みたので、その結果を報告する。

#### 材料と方法

DNA 抽出 シロザケの肝臓、心臓、筋肉、または全血から常法のフェノールークロロフォルム法により DNA を抽出した $^{5.6}$ 。抽出した $^{5.6}$ の、抽出した $^{5.6}$ の、由出した $^{5.6}$ の、表には $^{5.6}$ の、表にない。

標的領域のPCR 増幅と同時標識 抽出したDNA を用い、mtDNAコントロール領域 5' 側前半の高変異部位約500塩基対(bp)を、2対のPCR プライマーを用いて1つまたは2つのPCR 断片として増幅した。これらのプライマーの配列はそれぞれ以下のとおりで

ある: 5'-AAC TAC TCT CTG GCG GCT-3' (forward)、 5'-TTG GTG GGT AAA GAC GGA-3' (reverse); 5'-AGT CCT GCT TAA TGT AGT-31 (forward), 51-ATA AGA TTG ACA CCA TTA-3' (reverse)。PCR 断片の増幅と 標識が同時にできるように、2本の reverse プライ マーはそれぞれ3'末端をビオチン化した。反応液は、 25-100 ng の鋳型 DNA、10 mM Tris-HCl (pH8.3)、 50 mM KCl、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.25 mM の 各 dNTP、 1Uの Taq DNA (TaKaRa)、そして1μMの forward と reverse の各プライマーを加え、全量を $50\mu l$  とし た。標的領域から2つのPCR断片を得る場合、1対ず つのプライマーを用いて個別に増幅した。PCRの条 件は、プレサイクル加熱を95℃で3分、次いで95℃1 分の変性、45℃ 30秒のアニーリング、72℃ 30秒の伸 長反応を40サイクル、さらに72℃3分のポストサイク ル伸長反応を行った。PCR産物のサイズは、2%アガ ロース電気泳動と臭化エチジウム染色により確認し た。

DNA マイクロアレイの作製-オリゴマー DNA 固定 化の改良 通常 DNA マイクロアレイの作製には、樹 脂を基板にコートし、さらにアミノ化やチオール化 等の修飾したオリゴマー DNA を用いて固定するが、 この修飾 DNA がアレイのコスト高の一因となってい た。これらの問題を解決するために開発されたポリカ ルボジイミド樹脂をコートした基板(CarboStation®、 日清紡)を用い、DNA マイクロアレイを作製した。

まず、シロザケ mtDNA コントロール領域 5' 側約 500 bp に見出された20箇所の変異(DDBJ/EMBL/GenBank アクセス番号 AB039890~AB039901 および AB091514~AB091531) のそれぞれを含むように、 17 mer から20 mer の38種類のオリゴマー DNA(キャプチャー DNA)を設計した。それぞれの配列を表1に示す。このように設計された38種類のオリゴマー DNA を合成し、開発した CarboStation 上にマイクロスポッターによりスポットして共有結合させ、600 mJの紫外線照射を照射してオリゴマー DNA を固定した。DNA マイクロアレイの製造工程の概略を図 1 に示す。

ハイブリダイゼーションとシグナル検出の目視化前述したようにハイブリダイゼーションによるシグナルの検出には専用の検出装置が必要であるが、我々は発色法を用いることにより専用の検出装置を不要とした。発色方法は組織化学的手法として一般に用いられている ABC 法(Avidin – Biotin Complex)と呼ばれるビオチンとアビジンの特異的な結合を利用した方法を用いた。この方法を用いた実験の流れを図2に示す。

まず、作製した DNA マイクロアレイをブロッキン

変異 個所	番号	配列	鎖長 (mer)	変異 個所	番号	配列	鎖長 (mer)
10	1	···ACATCCC···	20	194	20	···AGCAAAA···	20
	2	$\cdots$ ACACCCC $\cdots$	20		21	···AGCTAAA···	20
30	3	···TGCTATA···	20	231	22	···AAC <b>T</b> GAT···	20
	4	$\cdots$ TGCCATA $\cdots$	20		23	$\cdots$ AAC $\mathbf{C}$ GAT $\cdots$	20
42	5	···TAAACCC···	19	242	24	···TGCCGCA···	18
	6	$\cdots$ TAAGCCC $\cdots$	19		25	$\cdots$ TGC <b>T</b> GCA $\cdots$	18
57	7	···ACTACAC···	20	250	26	···CAATAAA···	17
	8	$\cdots$ ACTTCAC $\cdots$	20		27	$\cdots$ CAACAAA $\cdots$	17
70	9	···TAATATT···	20	260	28	···CCAACTA···	20
	10	$\cdots$ TAACATT $\cdots$	20		29	$\cdots$ CCAGCTA $\cdots$	20
79	11	$\cdots$ ATA <b>T</b> TAT $\cdots$	20	339	30	···ATATCAG···	20
	12	$\cdots$ ATACTAT $\cdots$	20	&340	31	···ATAACAG···	20
					32	···ATA <b>A</b> TAG···	20
96	13	···ATA -TAT···	19				
	14	$\cdots$ ATA <b>A</b> TAT $\cdots$	20	386	33	$\cdots$ AGGTC $\cdots$ CTCGTG $\cdots$	20
108	15	···TGCTCGT···	20	&395	34	$\cdots \text{AG-TC} \cdot \cdot \text{CTAGTG} \cdot \cdot \cdot$	19
	16	$\cdots$ TGCACGT $\cdots$	20				
	17	$\cdots$ TGCCCGT $\cdots$	20	401	35	· · · GAA <b>T</b> TAT · · ·	20
					36	···GAACTAT···	20
154	18	···TAACCCC···	20	471	37	···TAAAGCA···	20
	19	$\cdots$ TAA $G$ CCC $\cdots$	20		38	···TAACGCA···	20

表 1 固定化したオリゴマー DNA 一覧

多型部位は太字で示した。多型個所はシロザケの mtDNA コントロール領域 5' 末端からの塩基番号で示す。固定化したオリゴマー DNA は1から38まで番号をつけた。

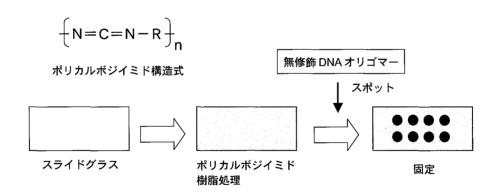


図1 DNAマイクロアレイ作製工程概略。

グバッファー(100 mM Tris-HCl、pH 7.5、100 mM NaCl、0.1% Triton-X、3% 仔牛血清アルブミン)に室温で30分間浸漬した後、TE バッファー(10 mM Tris-HCl、pH7.5、1 mM EDTA)によりリンスし、使用時まで冷暗所に保存した。次いで、標的領域から得た前述のビオチン標識産物を含む PCR 反応液  $4\mu$ l(2本の断片に分けた場合それぞれ  $2\mu$ l ずつ混合)を95℃で1~2分加熱変性させ、氷冷後16 $\mu$ l のハイブリダイゼーションバッファー(日清紡)に混ぜて DNA マイクロアレイ上に滴下、カバーグラスをかけて37℃で

#### 2時間静置した。

ハイブリダイゼーション後、37°C 00.2×SSC 中でカバーグラスをはずし、5分間 DNA マイクロアレイを洗浄した。次に発色用 conjugate(streptavidin とhorse-radish peroxidase)を含むバッファー(日清紡)1.4 ml をマイクロアレイに載せ、室温で30分反応させた。反応終了後、conjugate を含まないバッファー中で5分ずつ2回マイクロアレイを洗浄し、tetramethylbenzidine を含む発色液(日清紡)1.4 mlにより室温で30分発色反応を行った。反応後、マイク

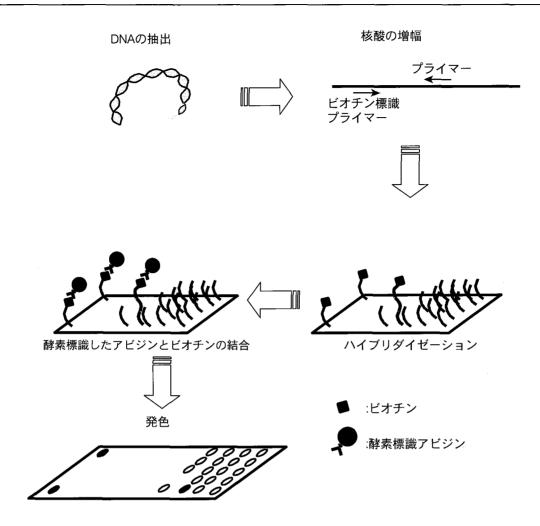


図2 DNAマイクロアレイ実験の流れ。細胞より DNAを抽出し、ビオチン化プライマーを用いて核酸を PCR 増幅 する。増幅産物を DNA マイクロアレイ上でハイブリダイゼーションにより相補的な配列と 2 本鎖を形成させる。その後 ABC 法によりビオチンとアビジンの複合体を形成し、発色基質を反応させてハイブリダイゼーションシグナルを可視化する。

ロアレイを蒸留水でリンス、乾燥させてから、通常のオフィス用スキャナーによりマイクロアレイの画像をコンピュータに取り込み、その発色シグナルの濃度を目視により比較した。

#### 結果と考察

シロザケ DNA マイクロアレイ改良の要点 今回の 改良は、ポリカルボジイミド樹脂コートによる基板へ の無修飾オリゴマー DNA の固定化、および ABC 発 色反応によるハイブリダイゼーションシグナルの目視 検出、が主な要点である。

ポリカルボジイミド樹脂コートは、高価な修飾無しに DNA を共有結合によりスライドグラスに固定でき、ハイブリダイゼーションや発色反応の過程を通してオリゴマー DNA の基盤からの脱落がほとんどないきわめて安定な固定化方法であった(データ省略)。これにより、配列や鎖長に関係無く DNA を固定化す

ることが可能になった。

また、ABC法によるシグナルの目視検出は、ハイブリダイゼーションの失敗がない限り、きわめて再現性が高かった。ただ、標的領域の全体を増幅した1つのPCR産物より、2つの断片として分けて増幅した産物の方がより再現性の高い検出結果が得られた(データ省略)。これは、鎖長の長い産物の場合、短い産物に比べ配列の特異性が下がることと、2次構造などを作り易いことなどがハイブリダイゼーションに影響するためと考えられる。このことから、シロザケmtDNAコントロール領域の塩基変異検出には、検体DNAを2つの断片にしてハイブリダイズすることが最適である。

シロザケ mtDNA ハプロタイプの判別 図3に、標的領域を2つの断片に分けてハイブリダイゼさせたシグナルの検出例を示す。各多型個所について2から3種類のキャプチャー DNA が固定化されているが、そ

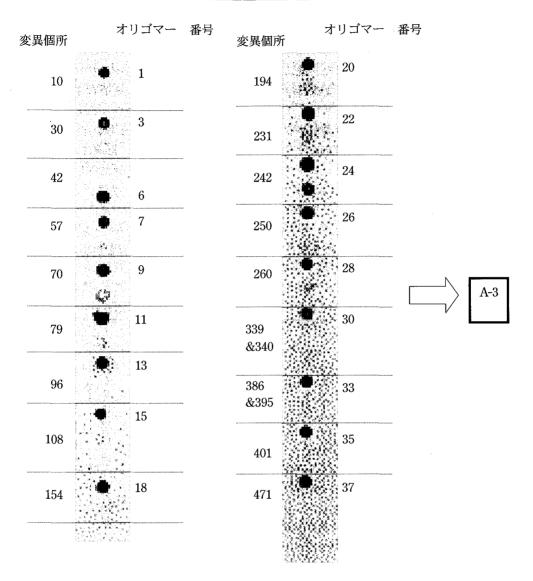


図3 DNAマイクロアレイを用いたシロザケの mtDNA コントロール領域 5' 前半の多型検出結果を示す。多型 個所の番号は mtDNA コントロール領域 5' 末端からの塩基番号を示し、その塩基は表1に示すオリゴマー DNA 配列 (太字) と一致する。オリゴマー番号は表1に示したオリゴマー番号と一致する。各多型個所で発色の強いオリゴマー番号を右に示す。このオリゴマー番号の組み合わせによりハプロタイプが決定される。この場合、ハプロタイプは A-3 と判定された。

の中で最も濃く発色しているキャプチャー DNA の配列を PCR 産物が含むと考えられる。一方、発色が薄いかまたはまったく観察されないキャプチャー DNA は PCR 産物がその配列をもたないと考えられる。このように各多型個所について最も発色が強いオリゴマー番号を選び出し、組み合わせることによってハプロタイプを決定する。図3ではオリゴマー番号1、3、6、7、9、11、13、15、18、20、22、24、26、28、30、33、35、37がそれぞれ選択され、多型箇所の配列は TTGAT-ACATCTAAGCTA となり、このハプロタイプは 'A-3' と決定された6'。

このようにして作製された DNA マイクロアレイの性能を確認するため、予めシーケンス法によって塩基

配列を決定した16サンプルを用い、DNAマイクロアレイにより20の多型個所すべてが検出できるか否か調べた。その結果を表2に示す。すべての多型が検出できており、かつシーケンス法と一致した結果を得た。また、現在知られている30種類のハプロタイプすべてについて、DNAマイクロアレイを用いて検出を試みたところすべて検出され、さらに、37サンプルについてDNAマイクロアレイを用いてmtDNAハプロタイプの判定をしたところ、すべてシーケンス法と一致した結果を得た(データ省略)。

以上のことから、今回我々が開発したシロザケ DNA マイクロアレイは、SNPs などゲノム DNA 配列 変異を高精度に検出できる方法である。

シロザケ DNA マイクロアレイの利点と応用 開発された DNA マイクロアレイは、DNA 抽出からハプロタイプの決定まで 8 時間以内で終了する。また、既に述べたように、この方法による解析に必要な機器はPCR 法に用いるサーマルサイクラーとハイブリダイゼーション用オーブンだけであり、特殊な装置が不要である。これらのことより、今回開発した DNA マイクロアレイは、迅速、低コストかつ高精度にシロザケの mtDNA ハプロタイプを検出できる方法といえる。そのため、解析は実験室のみならず、調査船上や採卵場等の現場で実験を行うことが可能となった。

実際、2002年9月にベーリング海航海中の水産庁

調査船開洋丸船上で18定点より得られた合計約1000個体のシロザケについてmtDNAハプロタイプ判別を試みた。すべての個体のハプロタイプが判別でき、抜き取りでシーケンス解析を行った20検体についても、DNAマイクロアレイ法と比較したところ一致した結果を得た。このうち2定点におけるハプロタイプの分布を図4に示す。海域によってハプロタイプの分布には偏りがあり、統計的解析により北緯56°30′経度180°00′では日本系が優位であり、北緯55°00′東経175°00′ではロシア系が優位であった(投稿準備中)。さらなる解析によりベーリング海や北太平洋、および周辺海域での系群の分布が明らかになると思われる。

表 2 シロザケ mtDNA コントロール領域 5' 側20個所の多型検出結果と決定されたハプロタイプ																
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4
	_ 5	6	5	5	5_	5	5	5	5	5	5	5_	5	5	5	5
	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7_	7	8	7	_ 7
	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	10	9
	11	11	11	11	11	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	13	13	13	13	14	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
2. 28 July 11.	15	15	15	15	15	15	17	15	15	15	15	15	15	15	15	16
シグナル 陽性オリゴ	18	18	18	18	18	19	19	19	19	19	19	19	19	18	18	18
マーの番号	20	20	21	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
, "Уд."	22	22	22	23	22	22	_22_	22	22	22	22	22_	22	_22	22	22
	24	24	24	24	24	24	24	25	24	24	24	24	24	24	24	24
	26	26	26	26_	26	26	_26_	26	27	26	26	26_	26	26	_ 26	26
	_28	28	28	28	28	28	28	28	28	29	28	28	28	28	28	28
	_30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	32_	31	30	30	30
	33	33	33	33	33	34	34	34	34	34	34	34	34	33	33	33
	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	36	35	35	35
	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	38	37	37	37	37	37
決定された ハプロタイプ	A-2	<b>A-</b> 3	<b>A-</b> 5	A-6	A-8	B-7	B-8	B-10	B-11	B-12	B-15	B-16	B-17	C-2	C-3	C-4

表 2 シロザケ mtDNA コントロール領域 5 側 90 個所の多 7 総出結果と決定されたハプロタイプ

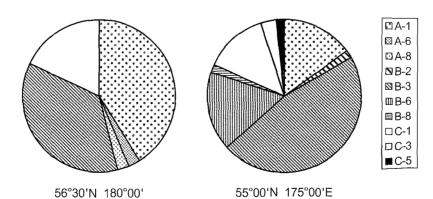


図 4 ベーリング海におけるシロザケ mtDNA ハプロタイプの分布。2002年9月にベーリング海 2 定点において水産庁調査船開洋丸により採捕されたシロザケ39個体(北緯56°30′ 経度180°00′)および60個体(北緯55°00′ 東経175°00′) の、DNA マイクロアレイにより判別された mtDNA ハプロタイプの分布を示す。既報の環太平洋48集団の mtDNA ハプロタイプ基準データ $^{60}$ を基にした統計解析により、北緯56°30′ 経度180°00′では日本系が優占し、北緯55°00′ 東経175°00′ではロシア系が優占することが分かった。

このように、今回開発された DNA マイクロアレイによって大量サンプル解析が可能となり、海洋調査における採用にも道を開いた。これにより高精度な系群識別が可能となり、シロザケの回遊経路の解明や資源管理のための基礎的知見の蓄積がなされることを願っている。

今回開発したDNAマイクロアレイは、塩基の置換・欠失・挿入などを迅速かつ正確に検出できる有効なポストシーケンス遺伝子解析法と考えられる。塩基配列情報さえあれば、動植物を問わずどのような生物にも応用ができる。シロザケDNAマイクロアレイ(OligoArrayシロザケ出生地判別用キット、日清紡)は、現在、1枚あたり数千円であるが、数百円レベルを目標とした開発も進めている。低コスト、簡便性の実現によりDNAマイクロアレイを用いた遺伝子検査は基礎研究だけでなく、系群識別をはじめとする水産生物の資源管理や増養殖にも貢献できるものと考えている。

#### 要約

シロザケのミトコンドリア (mtDNA) DNA コントロール 領域ハプロタイプの簡易検出のために、既報の塩基配列多 型を基にDNAマイクロアレイを開発した。今回の開発によ り、ポリカルボジイミド樹脂コートによる基板への無修飾オ リゴマー DNA の固定化、および ABC 発色反応によるハイ ブリダイゼーションシグナルの目視検出が可能になり、従来 の DNA マイクロアレイに比べ簡便な塩基変異の検出に成功 した。DNAマイクロアレイ法とシーケンス解読の結果はす べて一致し、シロザケ mtDNA コントロール領域における既 報の20箇所の変異サイトと30種類のハプロタイプをすべて検 出することができた。開発した DNA マイクロアレイは、検 体 DNA の PCR 増幅と標識からシグナル検出まで 8 時間以内 に終わるため、きわめて迅速、低コストかつ高精度なシロザ ケmtDNAハプロタイプ検出法である。本法は、特殊な実験 機器が不要なため、船上や孵化場など生産の現場でも利用で きる、優れたシロザケ系群識別法であると考える。

## 文 献

- 1) Ferguson A., J. B. Taggart, P. A. Prodohl, O. McMeel, C. Thompson, C. Stone, P. McGinnity and R. A. Hynes (1995) The application of molecular markers to the stocking and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. J. Fish Biol., 47 (Suppl A): 103-126.
- 2) Wilson, G. M., W. K. Thomas and A. T. Beckenbach (1987) Mitochondrial DNA analysis of Pacific northwest populations of *Oncorhynchus tshawytscha*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 44: 1301-1305.
- 3) Cronin, M. A., W. J. Spearman, R. L. Wilmot, J. C. Patton and J. W. Bickham (1993) Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. Can. J. Fish. Aguat. Sci., 50: 708-715.
- 4) Bickham, J. W., C. C. Wood and J. C. Patton (1995) Biogeographic implications of cytochrome *b* sequences and allozymes in sockeye (*Oncorhynchus nerka*). J. Hered., 86: 140-144.
- 5) Sato, S., J. Ando, H. Ando, S. Urawa, A. Urano and S. Abe (2001) Genetic variation among Japanese populations of chum salmon inferred from the nucleotide sequences of the mitochondrial DNA control region. Zool. Sci., 18: 99-106.
- 6) Sato, S., H. Kojima, J. Ando, H. Ando, R. L. Wilmot, L. W. Seeb, V. Efremov, L. LeClair, W. Buchholz, D.-H. Jin, S. Urawa, M. Kaeriyama, A. Urano and S. Abe (2004) Genetic population structure of chum salmon in the Pacific Rim inferred from mitochondrial DNA sequence variation. Environ. Biol. Fish., 69: 38-50.
- 7) Abe, S., S. Sato, H. Kojima, J. Ando, H. Ando, R. L. Wilmot, L. W. Seeb, V. Efremov, L. LeClair, W. Buchholz, D.-H. Jin, S. Urawa, M. Kaeriyama and A. Urano (2002) Development of molecular markers for genetic stock identification of chum salmon. Fish. Sci., 68 (Suppl): 353-356.
- 8) Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis and P. O. Brown (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science, 270: 467-470.
- 9) Hacia, J. G. (1999) Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. Nature Genet., 21: 42-47.
- 10) Landa, E. S. (1999) Array of hope. Nature Genet., 21: 3-4.
- 11) Moriya, S., S. Urawa, O. Suzuki, A. Urano and S. Abe (2004) DNA microarray for rapid detection of mitochondrial DNA haplotypes of chum salmon. Marine Biotechnol., in press.

# 尾鰭遊離細胞の生残率により評価したクローンギンブナの 高温耐性形質の馴致水温による変化

有澤佳紘・中嶋正道・谷口順彦(東北大・院農)

Change in the Thermal Tolerance of Silver Crucian Carp at Different Acclimated Temperatures Evaluated by the Survival of Cells Isolated from Tail Fin

Yoshihiro ARISAWA, Masamichi NAKAJIMA and Nobuhiko TANIGUCHI

Laboratory of Applied Population Genetics, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

#### **Abstract**

To evaluate the change of thermal tolerance of the three clonal lines of silver crucian carp (KAS1, KAS2 and KAS3) acclimated to different temperatures, we compared the thermal resistance of individuals and that of cells isolated from the tail fin. Individuals of three clonal lines acclimated at 19°C, 25°C, and 31°C were examined in terms of their survival. Furthermore, the survival of cells isolated from tail fins of individuals of each clone was examined at 40°C. At acclimation temperatures of 19°C and 25°C, the thermal tolerance of KAS3 was higher than those of the other two clones at both individual and cell levels. However, at 31°C, the tolerance of KAS1 was higher than that of the others. The same tendency for clonal lines to differ between individuals and cells was observed regarding thermal tolerance at each acclimation temperature. These results suggest that cells isolated from the tail fin are a useful material for evaluation of thermal tolerance in silver crucian carp.

(accepted June 1, 2004)

水温は魚類の成長や生残、繁殖などに影響を及ぼす 重要な環境要因の一つであり、魚類における種の分布 を決めている制限要因の一つでもある。魚類における 温度耐性は種間1)や亜種間2)、品種間3)、系統間4)の比 較がなされ、グッピーでは高温耐性の系統差には遺伝 的要因が関与していることが示されている<sup>4</sup>。また、 高温に対する抵抗性が平均値を中心とした幅を持つ分 布を示すことから、複数の遺伝子が関与していると考 えられる。グッピーでは高温耐性における遺伝率が算 出されており、その値が0.183であることから遺伝的 要因の他に環境要因も強く関与していることが示され ている<sup>5)</sup>。環境要因としては個体が曝されていた前歴 温度や健康状態等が考えられるが、環境要因の影響を 明らかにしようとする場合には遺伝的に同一の個体を 用いて、異なった環境下での応答を観るのが理想的で ある。

ギンブナ(Carassius langsdorfii)は三倍体で雌性発

生による生殖を行うことにより、雌親と全く同一のゲ ノム型を備えるクローンを産出することが知られてい る<sup>6,7)</sup>。ギンブナの一腹子がクローンであることは赤血 球のサイズ、アイソザイムの電気泳動パターンおよび 鱗移植法 $^{\eta}$ や、RAPD-PCR およびアイソザイムパター ン<sup>8)</sup>を用いた実験により証明されている。ギンブナに おけるクローンは1種類だけでなく、各地に異なるク ローンが多数存在することが知られている9,100。ユー ラシア大陸原産と考えられるギンブナは日本で分布を 広げた後、各地で再生産を繰り返し、それぞれの地域 の環境に適応してきたと考えられる。このことから、 各地に生息するギンブナは遺伝的に異なった環境適応 能力を有している可能性が考えられる。また、これら のクローン系統間で異なった環境条件における適応能 力を評価できれば、環境への適応能力の遺伝的要因に ついて明らかにできる可能性がある。

高水温耐性の評価方法としては1)ある温度での死

連絡先:〒981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1 東北大学大学院農学研究科 中嶋正道

亡するまでの時間(死亡時間)、2)ある温度での一定 時間後の生残率、3)ある温度での成長や繁殖能力、 等がある。3)の方法は最も自然な形での温度耐性を 評価できると考えられるが、実験時間の長さや環境要 因を実験期間中一定に保つことの困難さから、方法と しては不適と考えられる。1)や2)の方法は3)と比 べて簡便であるためにサケ科魚類11)やグッピー 4,5)の高 温耐性評価に用いられてきた。一方、個体を用いた高 温耐性評価法に対して培養細胞や遊離細胞を用いての 高温耐性評価が試みられている。Sakamoto et al.<sup>12)</sup> は クローン系統間における高温耐性形質の差異を鰭遊離 細胞や初代培養細胞の高温における生残率を用いて評 価し、個体を用いて評価した場合と同様に高温耐性評 価法として有効であることを示した。しかし、鰭遊離 細胞は個体から遊離させた細胞を直接評価に用いるた めに個体が置かれていた環境水温(個体が曝されてい た前歴温度)の影響を強く受けると考えられる。鰭遊 離細胞は初代培養細胞と比較して調製が容易である反 面このような問題がある。

そこで本研究では異なる水温に馴致させた3クローン系統のギンブナの高温耐性試験を行い、個体の死亡時間と、尾鰭遊離細胞の高温ストレス処理における生残率を比較し、個体が曝されていた前歴温度が個体や尾鰭遊離細胞の高温耐性にどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的とした。

#### 材料と方法

供試魚 供試魚は2002年4月に茨城県霞ヶ浦で採取された雌ギンブナの3クローン系統 KAS1、KAS2、KAS3を用いて得た。それぞれのクローン系統の倍数性は血球を用いて判定した。それぞれのクローン系統の親魚より得られた卵をマゴイの精子を用いて人工授精をおこない、ふ化仔魚を得、高温耐性実験用個体として供した。孵化仔魚は601水槽に収容し、水温25℃で実験まで飼育した。孵化後60日目まではブラインシュリンプを、その後は人工餌料(オリエンタル ヤマト3号)および冷凍赤虫を餌として与えた。

# 実験 I : 高温馴致に伴う個体と尾鰭遊離細胞の高温 耐性の変化

水温25℃で飼育したクローン系統 KAS1の200日齢の供試魚を水温25℃、28℃、31℃の水槽に収容し、各水温への馴致を行った。馴致開始から30日後、供試魚の高水温耐性実験を行った。実験では恒温水槽に10×10×10 cmのメッシュ籠を3つ入れ、それぞれの水温へ馴致した供試魚をそれぞれ10個体収容した。恒温水槽にはサーモスタットで温度調節するヒーターを入れ、エアストーンを用いて十分な通気を行った。急激

な温度上昇によるショック死を避けるために、それぞれの馴致水温から水温を1時間に5℃ずつ上昇させ、38℃に達した時点で死亡時間の測定開始とした。以後38±0.5℃を維持し、30分毎に生死判定を行い、それぞれの供試魚が死亡するまでの経過時間を測定し、高温耐性の指標とした。生死の判定では鰓の動きが無く、外部刺激に対して反応しなくなった個体を死亡と判定した。このような実験を3回繰り返した。

鰭遊離細胞は個体の高温耐性実験と同時期にそれぞれの馴致水温より5個体を取り出し、鰭遊離細胞を調製し、高温耐性実験に供した。各実験区でランダムに100個の細胞をカウントし、生残率を算出した。したがって生残率の算出は各実験区でのカウントされた500個の細胞の生死から算出されている。

# 実験Ⅱ:異なる水温に馴致させた個体と尾鰭遊離細胞を用いたクローン系統間の比較

クローン間での高温耐性の強弱が馴致水温によって変化するかどうかを調べた。クローン 3 系統(KAS1、KAS2、KAS3)の供試魚各50個体を同じ水槽内で混合飼育し、60日齢魚を水温19 $\mathbb{C}$ 、25 $\mathbb{C}$ 、31 $\mathbb{C}$ の水槽へ収容した。その後、200日齢まで馴致させ耐性実験を行った。耐性実験には実験 I と同様装置を用いて行い、それぞれの馴致水温から 1 時間に 5 $\mathbb{C}$  ずつ上昇させ試験水温に達した時点で死亡時間測定開始とし、以後は試験水温  $\pm 0.5$  $\mathbb{C}$  を維持して供試魚が死亡するまでの経過時間を測定した。供試魚の生死判定は実験 I と同様である。試験水温は予備実験からクローン系統間で死亡までの時間に差が出る水温とした。水温はそれぞれ19 $\mathbb{C}$ 、25 $\mathbb{C}$ 、31 $\mathbb{C}$ で飼育した供試魚に対して、36 $\pm 0.5$  $\mathbb{C}$ 、37 $\pm 0.5$  $\mathbb{C}$ 、41 $\mathbb{C}$   $\pm 0.5$  $\mathbb{C}$ に設定した。

鰭遊離細胞の高温耐性実験も実験 I と同様に行った。

# クローン系統の判別

混合飼育を行った供試魚を実験に用いた実験 $\Pi$ において各個体のクローン系統を判別するために、尾鰭から抽出したゲノム DNA を鋳型とし、マイクロサテライトマーカー  $GF17^{(3)}$ を用いてクローン系統の判別を行った。PCR 産物は8%アクリルアミドゲル電気泳動により分画し、増幅断片のパターンの違いからクローン系統を識別した(Fig. 1)。

#### 尾鰭游離細胞の調製と高温ストレス処理

供試魚の尾鰭の一部を切り取り PBS で洗浄した後、0.25% trypsin-PBS(-)が入ったマイクロチューブに収容し、Cool thermo unit(TAITEC CTU-2515)を用いて37.5℃で10分間処理した。5分間1000 rpm(約200 g)で遠心し、トリプシンを取り除き、10%子牛血清(GIBCO)入り Leibovitz's L15培地(GIBCO)

を加えた。次に Cool thermo unit を用い、高温処理として40℃で2時間インキュベートした。2時間後、遠心器を用いて5分間1000 rpm で遠心した後、上清を $20\mu l$ 残し取り除いた。同量の PBS(-)溶液で0.3%に調製したトリバン・ブルー(GIBCO)を加え(最終濃度0.15%)染色し、生細胞と死細胞とを分染した。血球計算盤を用い細胞数を算出し、生細胞と死細胞の割合から生残率を計測した。

## 統計処理の方法

馴致水温別またはクローン系統別における個体の死亡時間と尾鰭遊離細胞の生残率について統計処理を行った。実験区間の有意差の検定には Fisher's Protected LSD を用いた。

# 結 果

高温馴致に伴う個体と尾鰭遊離細胞における高温耐性の変化(実験I)

Fig. 2 に通常飼育魚(水温25℃で飼育)の高温処理 (40℃ 2 時間処理)を行った尾鰭遊離細胞の染色結果 を示す。死亡した細胞が青く染められている。

25℃、28℃、31℃のそれぞれの水温に馴致させたギンブナの高温耐性試験における平均死亡時間と尾鰭遊離細胞の平均生残率を示した(Fig.3)。個体の平均死亡時間とその標準偏差は馴致水温25℃、28℃、31℃についてそれぞれ $1.9 \pm 2.1$ 時間、 $4.9 \pm 1.6$ 時間、 $11.3 \pm 2.6$ 時間となり、馴致水温が高いほど耐性を増すことが示された。各馴致水温におけるクローン間での高温耐性を比較した結果、水温28℃に馴致させた個体の平均死亡時間は危険率5%において有意に長く、水温31℃に馴致させた個体は危険率1%において有意に長かった。また、それぞれの馴致水温における遊離細胞の生残率は、25℃、28℃、31℃についてそれぞれ $56.9 \pm 7.7$ %、 $61.7 \pm 4.0$ %、 $65.6 \pm 13.5$ %となり、馴致

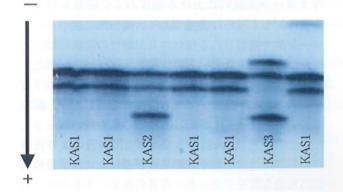


Fig. 1. Microsatellite banding patterns in the fingerlings of three clonal lines of silver crucian carp in the microsatellite DNA marker of GF17.

水温間に有意差は観察されなかったが、馴致水温が 高いほど平均生残率は上昇していた。これらのことか ら、高温馴致による個体の死亡までの時間が長くなる のと比例して尾鰭遊離細胞の平均生残率が上昇するこ とが示された。

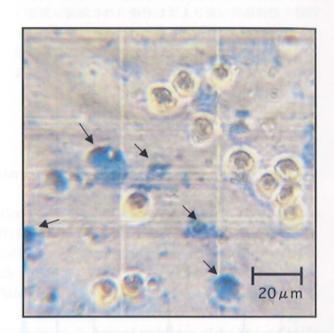


Fig. 2. The cells isolated from caudal fin of silver crucian carp by 0.25% trypsin, which were stained by 0.15% trypan blue after high temperature treatment at 40°C. The dead cells were stained to blue (→) and living sells were not stained.

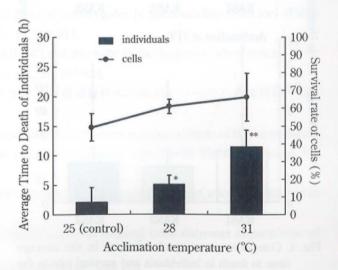


Fig. 3. The average time to death in individuals of silver crucian carp exposed at  $38\pm0.5^{\circ}$ C and survival rate in the cells isolated from caudal fin after the acclimation at the different temperature for 5 months. "\*" and "\*\*" indicate significant differences compared to control by Fisher's PLSD at P<0.05 and P<0.01, respectively.

異なる水温に馴致させた個体を用いたクローン系統 間の比較(実験Ⅱ)

馴致水温別の異なる3クローン系統ギンブナの平均 死亡時間および尾鰭遊離細胞の平均生残率を比較した(Fig. 4)。その結果、馴致水温19℃および25℃においては KAS3 が他の2系統と比較し、平均死亡時間お

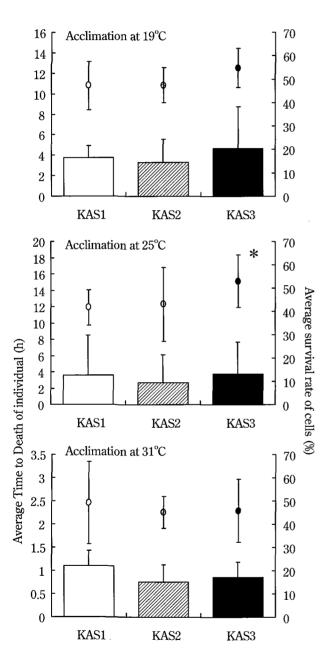


Fig. 4. Comparison among clonal lines in the average time to death in individuals and survival rate in the cells isolated from caudal fin at different acclimated temperature. The tested temperatures were  $36.5\pm0.5$ °C,  $37.5\pm0.5$ °C, and  $41.0\pm0.5$ °C after expose to the acclimated temperatures of 19°C, 25°C and 31°C, respectively. Significant differences were examined by Fisher's PLSD and \* indicate significant differences (P<0.05).

よび遊離細胞の平均生残率について最も高い値を示した。馴致水温25℃における遊離細胞の生残率について検定を行ったところ、KAS3系統がKAS1とKAS2よりも有意に高い値を示した。また、水温31℃においてはKAS1系統が個体の平均死亡時間と細胞の平均生残率の両者において最も高い値を示した。これらのことから、全ての飼育水温において個体の平均死亡時間が最も長い系統は遊離細胞の平均生残率も最も高い値を示す傾向があることが示された。

# 考 察

馴致水温が高くなるにつれ、個体の平均死亡時間 および尾鰭遊離細胞の生残率が上昇する傾向がみられ た。このように、ギンブナでは馴致水温が上がるにつ れ高温耐性が上昇することが示された。このことは個 体および細胞レベルにおいて馴致水温が高いほど高温 への耐性を獲得していることを示している。同様の現 象は小型カラシン<sup>14)</sup>やヒメダカ<sup>15)</sup>、ギンザケ<sup>16)</sup>におい ても観察されており、馴致水温の上昇に伴い上限致死 水温が高くなることが報告されている。高温が致死的 に働く原因としては、タンパク質の熱変性、酸素の熱 不活性化、高温による酸素の需要の増大に基づく酸素 不足、相互依存的な一連の代謝反応に対する異なる温 度効果、膜構造に対する温度効果などが一般的に考え られている17)。しかし、タンパク質の熱変性や酵素の 熱不活性化、膜構造に対する温度効果等は今回の実験 温度で発生するような生理的変化ではない。最も妥当 な要因としては代謝の増大に伴う酸素需要の増大とこ れらに基づく酸素不足への適応能力の差異が考えられ る。これらの要因は細胞レベルにおいても働いている と考えられる。

個体の平均死亡時間が最も長いクローン系統は遊 離細胞の平均生残率も高い傾向を示した。このような 現象は坂本ら18日報告している。このことから、1つ のクローン系統内における個体および細胞レベルの 高温に対する反応は共通であり、遺伝的に異なったク ローン間で観察される個体の高温耐性の差異は細胞レ ベルにも反映されている可能性を示している。また、 馴致水温19、25℃では KAS3 が平均死亡時間および遊 離細胞の生残率において最も高い値を示したが、馴致 水温31℃では KAS1 が両者において最も高い値を示し た。このことは KAS1 や KAS3 が高温馴致により獲得 した高温耐性はそれぞれの系統が遺伝的に有する最も 適応可能な温度であったと考えられる。すなわち、各 クローン系統にとって、最も適した馴致温度とそれに よって得られる高温耐性が存在していることを示して いる。

### 铭 態

本研究を遂行するにあたり、遊離細胞調製および 培養法に関して多大なご支援をいただいた福山大学の 阪本憲司博士に厚く御礼申し上げる。また、本研究の 一部は日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究(B) (2)(課題番号15380129) に拠った。

#### 要 約

個体が曝されていた前歴温度の高温耐性形質に及ぼす影響を評価するために、異なる水温に馴致させたギンブナ3クローン系統を用いて、高温に対する個体の

死亡時間と尾鰭遊離細胞の生残率を測定した。その結果、個体は高温に馴致させたほど高温耐性試験における平均死亡時間が長くなり、同様に尾鰭遊離細胞の高温処理における平均生残率も長くなる傾向がみられ、個体の平均死亡時間が最も長い系統は遊離細胞の平均生残率も最も高い値を示した。このことから、より高い温度に馴致された個体ほどより強い高温耐性を獲得することが示された。また、馴致水温が個体および細胞レベルの高温耐性に及ぼす影響はクローン系統間で異なることが示された。

## 文 献

- 1) Scott, D. P. (1964) Thermal resistance of Pike (*Esox lucius L*), Muskellunge (*E. Masquinongy Mitchill*), and their F<sub>1</sub> hybrid. J. Fish. Res. Bord. Can., 21:1043-1049.
- 2) Hirsfield, M. F., C. R. Feldmeth, and D. L. Soltz (1989) Genetic differences in physiological tolerance of Amagosa pupfish (*Cyprinodon nevadensis*) population. Science, 207: 999-1001.
- 3) Feminella, J. W. and W. J. Matthewe (1984) Interspecific difference in thermal tolerance of *Eteostoma spectabile* in constant versus fluctuating environments. J. Fish Biol., 25:455-461.
- 4) Kanda, N., M. Nakajima and Y. Fujio (1991) Strain differences at thermal resistance in the guppy, *Poecilia reticulata*. Tohoku J. Agr. Res., 42:25-31.
- 5) Fujio, Y., M. Nakajima and G. Nomura (1995) Selection response on thermal resistance of the guppy *Poecilia reticulata*. Fish. Sci., 61:731-734.
- 6) 谷口順彦(1982) 西日本のフナ族魚類, オオキンブナをめぐって. 淡水魚, 8:59-68.
- 7) 小野里坦(1983) クローンブナの話淡水魚, 9:33-41.
- 8) 董仕・谷口順彦 (1996) 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, 日水誌, 62:891-896.
- 9) Ohara, K., S. Dong, and N. Taniguchi (1999) High proportion of hetrozygotes in microsatellite DNA loci of wild clonal silver crucian carp, *Carassius langsdorfii*. Zool. Sci., 16, 909-913.
- 10) Ohara, K., T. Ariyoshi, E. Sumida, and N. Taniguchi (2003) Clonal diversity in the Japanese silver crucian carp, *Carassius langsdorfii* inferred from genetic markers. Zool. Sci., 20, 797-804.
- 11) 中嶋正道·藤原 健·佐伯光広·藤尾芳久(1992) サクラマスの高温耐性の系統差について、水産育種、17: 63-69.
- 12) Sakamoto, K., W. Koedprang, M. Nakajima, and N. Taniguchi (2002) Thermal resistance traits of the clonal silver crucian carp *Carassius langsdorfii* and evaluation of these traits using primary culture cells. Fisheries Science, 68, 1029-1033.
- 13) Zhang, W., N. E. Stacey, J. Coffin, and C. Strobeck (1995) Isolation and characterization of microsatellite loci in the goldfish *Carassius auratus*. Mol. Ecol., 4, 791-792.
- 14) Chung, K. S. (2000) Heat resistance and thermal acclimation rate in tropical tetra *Astyanax bimaculatus* of Venezuela. Environ. Biol. Fish., 57, 459-463.
- 15) 佃 弘子・片山トシ子 (1957) 生理生態, 7, 生理生態刊行会, 京都, 113-122.
- 16) 藤尾茂久・木島明博(1994)ギンザケの形質に関与する遺伝特性の解明,平成5年度新品種作種出基礎技術開発事業研究成果の概要,水産庁研究部研究課,pp214-225.
- 17) 藤尾芳久(1998)「水産育種に関わる形質の発現と評価」, 水温適応性, 水産学シリーズ117. 恒星社厚生閣刊.
- 18) 阪本憲司・中嶋正道・谷口順彦 (2002) クローンギンブナの高水温耐性形質における日齢と飼育水温の影響および広義の遺伝率の推定,水産育種,32:33-38.

# Phylogenetic Analysis of Bangiales Plants (Rhodophyta) using Type II DNA Topoisomerase Gene

(DNAトポイソメラーゼⅡ遺伝子を用いたウシケノリ目植物の系統解析)

Kengo SHIMOMURA\*1,\*5, Shuuji OOTSUKA\*2, Yukihiro KITADE\*2, Kazuyoshi KUWANO \*3, Jong-Ahm SHIN \*4, and Naotsune SAGA \*2

- \*1 Graduate School of Marine Science and Technology, Tokai University
- \*2 Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University
- \*3 Graduate School of Science and Technology, Nagasaki University

(下村謙悟(東海大・院海洋)・大塚周二・北出幸広(北大・院水)・桑野和可(長崎大・院生産)・ 宗岩 (麗水大・水圏生命)・嵯峨直恆 (北大・院水))

#### **Abstract**

Nucleotide sequences of PCR-cloned fragments of the gene encoding type II DNA topoisomerase (TOP2) were determined for two Bangiales plant species, Porphyra dentata and P. haitanensis. These TOP2 sequences and those of the other five Bangiales species, P. onoi, P. tenera, P. yezoensis, P. suborbiculata, and Bangia sp. retrieved from DNA databanks were used to reconstruct the phylogeny of these seven species with Arabidopsis thaliana as an outgroup, using maximum likelihood (ML), most parsimony (MP), and neighbor-joining (NJ) methods. Nucleotide sequences of small-subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) obtained from databanks were used for comparative phylogenetic analysis. Generally, TOP2 gave a more accurate estimation of genetic distance among the examined species than did SSU rDNA, suggesting a faster evolution of the former than the latter. The phylogenetic trees of TOP2 using all the three algorithms always gave a clade of two species, P. dentata and P. haitanensis, and three species, P. onoi, P. tenera and P. yezoensis, respectively, with more than 90% statistical support, as seen in the trees of SSU rDNA. However, the phylogenetic positions of P. suborbiculata and Bangia sp. were inconclusive in both TOP2 and SSU rDNA trees, which might be related to a large sequence difference between these two and the other five species. TOP2 therefore seems available to resolve phylogenetic relationships among closely related species of Bangiales.

(accepted June 3, 2004)

#### Introduction

Bangiales plants are conspicuous component of rocky intertidal habitats in temperate and cold waters worldwide. Selected species are commercially cultivated in Japan, Korea and China, serving as one of the most important fisheries resources. Systematics or phylogenetic studies are important subjects for genetic resource preservation and breeding in economically valuable organisms. The

morphological simplicity of Bangiales plants often makes species identification difficult by morphological characters. Thus DNA and protein sequence data are very useful in the phylogenetic study. However, recent molecular phylogenetic studies using smallsubunit ribosomal DNA (SSU rDNA), ribosomal DNA internal transcribed spacer 1 (ITS1), large subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase gene (rbcL), small subunit of ribulose-1,

Corresponding author; Naotsune Saga, Division of Marine Biosciences, Graduate School of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan; E-mail: nsaga@fish.hokudai.ac.jp

<sup>\*4</sup> Division of Aqua Life Science, Yosu National University

<sup>\*5</sup> Present address; NCIMB Japan, Shimizu, Shizuoka 424-0056, Japan.

5-bisphosphate carboxylase/oxygenase gene (*rbcS*), and *rbcLrbcS* intergenic spacer (RUBISCO spacer)<sup>1-5)</sup> have so far provided ambiguous phylogenetic trees of Bangiales. SSU rDNA sequence data have been most frequently utilized in the phylogenetic studies of Bangiales<sup>3,5-10)</sup>, although the level of sequence divergence in this region is not high to infer reliable relationships in Bangiales. Information about sequences of other regions evolving more rapidly than SSU rDNA is necessary to have a clearer understanding of the phylogeny of Bangiales plants.

Reliable phylogenetic study requires multi-gene analysis to avoid a bias toward a particular gene analysis<sup>11)</sup>. For example, 13 genes were employed to infer relationships between red algae and green plants<sup>12)</sup>. However, molecular markers available for phylogenetic studies in Bangiales are still limited.

DNA gyrase B subunit gene (*gyr B*) evolved much faster than rDNAs and provides higher resolution than the use of 16S rRNA sequences<sup>13,14)</sup>. Eucaryotic type II DNA topoisomerase gene (*TOP2*), which is a gene homologous to bacterial DNA gyrase<sup>15)</sup>, was expected as a promising molecular marker for phylogenetic analysis in Rhodophyta plants<sup>16)</sup>. In the present study, we selected *TOP2* as a molecular marker and examined the adequacy for the phylogenetic studies of some aqua-industrially valuable species of Bangiales plants.

# Materials and Methods DNA preparation, PCR, and sequencing

DNA was prepared from the sporophytic thalli of *Porphyra dentata* Kjellman and *Porphyra haitanensis* T. J. Chang et Zheng Baofu. They were obtained from the culture collection of the Center for

Advanced Technology, Tokai University. Degenerate oligonucleotide primers, PT2F-NT (5'-CGA RAT HII IGT NAA YGC NGC NGA-3') and PT2R-NT (5'-GIS WIC CRT CII IRT CYT GRT C-3'), were designed based on two conserved regions of the type II DNA topoisomerases<sup>16</sup>. The degenerate PCR products were cloned and sequenced as described in Shimomura *et al.*<sup>16</sup>.

## Data analysis

TOP2 sequences of *P. dentata* and *P. haitanensis* were aligned with those of other Bangiales species including *P. onoi*, *P. tenera* (strain T-8), *P. yezoensis* (strain TU-1), *Bangia* sp. (strain OM-1), *P. suborbiculata*, and a green plant *Arabidopsis thaliana*, as an outgroup, from DDBJ/EMBL/GenBank (Table 1), using CLUSTAL W<sup>17)</sup>. The sequences corresponding to the above PCR primers at the 5' and 3' ends were excluded from the alignment.

To estimate *TOP2* evolution rate, genetic distances calculated with the nucleotide sequence data of *TOP2* were compared with those of SSU rDNA. HKY85 was used as a model of nucleotide substitution<sup>18</sup>. Phylogenetic trees of seven Bangiales species were constructed with the sequence data of *TOP2* and SSU rDNA using algorithm of maximum likelihood (ML)<sup>19</sup> with PUZZLE program<sup>20</sup>, most parsimony (MP) with PAUP program<sup>21</sup>, and neighborjoining (NJ)<sup>22</sup> with PHYLIP program (gaps treated as missing data)<sup>23</sup>. Puzzling steps (1,000 replicates) were completed for likelihood analysis<sup>20</sup>. Bootstrap resamplings (1,000 replicates) were also completed for NJ and ML analyses, respectively, to estimate the robustness of internal branches<sup>24</sup>.

Table 1. Sequence data sets used in this study

	•	•
	TOP2	SSU rDNA
	DDBJ/EMBL/GenBank acc. No.	DDBJ/EMBL/GenBank acc. No
Porphyra dentata*	AB050101	AB013183
Porphyra haitanensis*	AB050102	AB015795
Porphyra onoi	AB048183	AB015794
Porphyra tenera (strain T-8)	AB048184	AB000964
Porphyra yezoensis (strain TU-1)	AB034766	D79976
Bangia sp. (strain OM-1)	AB034765	D88387
Porphyra suborbiculata	AB048182	AB015796
Arabidopsis thaliana	L21015	X16077

<sup>\*</sup> Sequenced in the present study.

#### Results

## TOP2 sequence

TOP2 were successfully amplified from *P. dentata* and *P. haitanensis*. Because PCR products included a few additional fragments, putative *TOP2* fragments were cloned prior to sequencing. The length of the cloned *TOP2* of *P. dentata* was 1,078 bp and that of *P. haitanensis* was 1,146 bp, both of which were deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank with acces-

sion numbers of AB050101 and AB050102, respectively. These sequences well matched to those of other Bangiales species retrieved from databanks.

#### Genetic distance

The genetic distances among seven Bangiales species, including the two species sequenced in the present study, were calculated with the nucleotide sequence data of *TOP2* and SSU rDNA (Table 2).

Table 2. Genetic distances inferred from *TOP2* (below diagonal) and SSU rDNA (above diagonal) using HKY85 method

	P. yezo	P. subo	P. den	P. ono	P. tene	P. haita	Bang	A. thali
P. yezəensis		0.04394	0.02664	0.00864	0.00685	0.02841	0.01957	0.17925
P. suborbiculata	0.13849		0.04639	0.04185	0.04391	0.04753	0.04273	0.18766
P. dentata	0.15835	0.18686		0.02805	0.02602	0.01546	0.02605	0.18954
P. onoi	0.01058	0.14151	0.16172		0.00864	0.02566	0.02211	0.18335
P. tenera	0.01772	0.14791	0.16753	0.00704		0.0272	0.01956	0.18307
P. haitanensis	0.13788	0.17599	0.08442	0.14411	0.15271		0.03078	0.19465
Bangia sp.	0.15769	0.22688	0.20023	0.16086	0.16969	0.18159		0.18652
A. thaliana	0.66606	0.66398	0.70505	0.65786	0.6666	0.69938	0.66862	

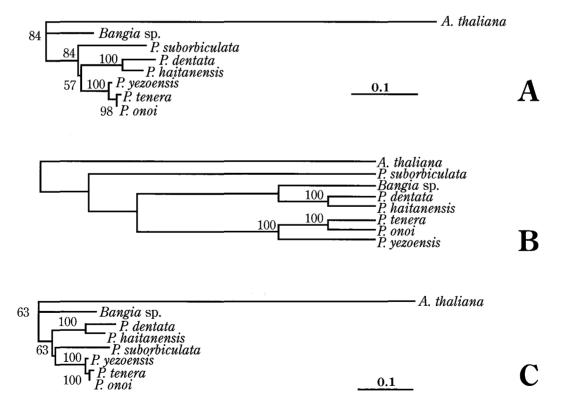


Fig. 1. A: Phylogenetic tree of seven Bangiales plants constructed by maximum likelihood method based on the *TOP2*. Nodal numbers indicate QP values greater than 50%. Scale bar represents the number of substitution per site for unit branch length. B: Most parsimonious analysis of the *TOP2*. Tree length=917. CI=0.875. RI=0.631. Nodal numbers indicate bootstrap resampling results (% of 1,000 replicates), showing more than 50% support. C: Neighbor-joining tree inferred from the *TOP2*. Nodal numbers indicate bootstrap values greater than 50% of 1,000 resampling. Scale bar represents the number of substitution per site for unit branch length.

The genetic distances based on *TOP2* ranged from 0.00704 to 0.22688, while those based on SSU rDNA ranged from 0.00685 to 0.04753. All of the genetic distances based on *TOP2*, except for that between *P. onoi* and *P. tenera*, were larger than those based on SSU rDNA. The relationship between *P. onoi* and *P. tenera* was suggested to be closest among the examined Bangiales species.

# Phylogenetic analysis

Phylogenetic trees based on *TOP2* and SSU rDNA sequence data were constructed by ML, MP, and N-J methods. *P. dentata* and *P. haitanensis* always coupled in both *TOP2* and SSU rDNA trees (Figs. 1 and 2). *P. onoi*, *P. tenera* and *P. yezoensis* formed a distinct clade in the trees based on *TOP2* sequence data. SSU rDNA analysis also placed these species in a clade, although the bootstrap and quartet puzzling

(QP) values were low compared with those of *TOP2* trees. The phylogenetic positions of *P. suborbiculata* and *Bangia* sp. were inconclusive in the *TOP2* trees. In SSU rDNA trees *P. suborbiculata* was placed at the base of Bangiales, but the position of *Bangia* sp. was inconsistent.

#### Discussion

The present study suggested that *TOP2* evolves more rapidly than SSU rDNA, and that *TOP2* analysis is advantageous to examining relationships among closely related species. For example, *TOP2* analysis estimated the genetic distance between *P. onoi* and *P. yezoensis* at approximately 1.2 times larger than SSU rDNA analysis. Kunimoto *et al.*<sup>10)</sup> reported that the level of SSU rDNA sequence divergence between *P. tenera* and *P. yezoensis* was insufficient to resolve them into two distinct species.

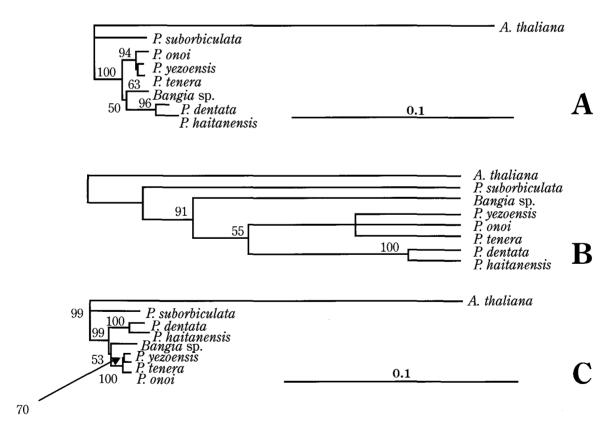


Fig. 2. A: Phylogenetic tree of seven Bangiales plants constructed by maximum likelihood method based on the SSU rDNA. Nodal numbers indicate QP values greater than 50%. Scale bar represents the number of substitution per site for unit branch length. B: Most Parsimonious analysis of the SSU rDNA. Tree length=424. CI=0.947. Nodal numbers indicate bootstrap resampling results (% of 1,000 replicates), showing more than 50% support. C: Neighbor-joining tree inferred from the SSU rDNA. Nodal numbers indicate bootstrap values greater than 50% of 1,000 resampling. Scale bar represents the number of substitution per site for unit branch length.

However, *TOP2* analysis clearly resolved them. In addition, *P. onoi*, *P. tenera* and *P. yezoensis* formed a monophyletic clade in the *TOP2* trees with high bootstrap and QP supports.

The relationship between *P. dentata* and *P. haita-nensis* based on *TOP2* analysis was consistent with that based on SSU rDNA analysis. They always coupled in the *TOP2* and SSU rDNA trees with high statistical support. Interestingly, only they are dioecious among the examined species.

On the other hand, *TOP2* analysis was unsatisfactory to define the phylogenetic position of *Bangia* sp. and *P. suborbiculata*. The inconsistent *TOP2* trees using ML, MP, and NJ methods are probably due to statistical errors resulting from a large sequence difference between these two and the other five species, as shown by increased genetic distances (Table 2). Attention should be paid for deducing relation-

ships between distantly related species of Bangiales.

Since the molecular phylogeny using single gene is not always sufficient to trace the phylogenetic relationships of organisms, analyses of multiple genes are necessary to infer a reliable phylogeny. Our results suggest that *TOP2* is useful tool for the phylogenetic studies in Bangiales, especially for deducing relationships among closely related species.

# Acknowledgements

We are grateful to Drs. S. Miyachi, S. Harayama and S. Yamamoto, Marine Biotechnology Institute, Kamaishi, Japan for their encouragements. This study was partly supported by a Grant-in-aid for Scientific Research to N. S. (no.B-15380126) and for a postdoctral fellowship to Y. K. (No. 00053) from the Japan Society for the Promotion of Science.

#### References

- 1) Brodie, J., P. K. Hayes, G. L. A. Barker and L. M. Irvine (1997) Speciation with the genus *Porphyra* (Bangiophycidae, Rhodophyta): evidence for a Pacific element within the Atlantic flora. Phycologia (Suppl.), 36:11.
- 2) Brodie, J., P. K. Hayes, G. L. A. Barker, L. M. Irvine and I. Bartsch (1998) A reappraisal of *Porphyra* and *Bangia* (Bangiophycidae, Rhodophyta) in the Northeast Atlantic based on the *rbcL-rbc*S intergenic spacer. J. Phycol., 34: 1069-1074.
- 3) Müller, K. M., R. G. Sheath, M. L. Vis, T. J. Crease and K. M. Cole (1998) Biogeography and systematics of *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) based on the Rubisco spacer, *rbc*L gene and 18S rRNA gene sequences and morphometric analyses. I. North America. Phycologia, 37: 195-207.
- 4) Woolcott, G. W. and R. J. King (1998) *Porphyra* and *Bangia* (Bangiaceae, Rhodophyta) in warm temperate waters of eastern Australia: morphological and molecular analysis. Phycol. Res., 46: 111-123.
- 5) Shimomura, K., S. Yamazaki, S. Fukuda, T. Miyata and N. Saga (1999) A preliminary study on phylogenetic position of *Bangia atropurpurea* strain OM-1 (Bangiales, Rhodophyta) based on the SSU rDNA sequence. Bull. Inst. Ocean. Res. Develop., Tokai Univ., 20: 99-102.
- 6) Ragan, M. A., C. J. Bird, E. L. Rice, R. R. Gutell, C. A. Murphy and R. K. Singh (1994) A molecular phylogeny of the marine red algae (Rhodophyta) based on the nuclear small-subunit rRNA gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:7276-7280.
- 7) Oliveira, M. C., J. Kurniawan, C. J. Bird, E. L. Rice, C. A. Murphy, R. K. Singh, R. R. Gutell and M. A. Ragan (1995) A preliminary investigation of the order Bangiales (Bangiophycidae, Rhodophyta) based on sequences of the nuclear small-subunit ribosomal RNA genes. Phycol. Res., 43: 71-79.
- 8) Yamazaki, S., Y. Kitade, T. Maruyama and N. Saga (1996) Phylogenetic position of *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) based on the 18S rDNA sequence. J. Mar. Biotechnol., 4: 320-322.
- 9) Kunimoto, M., H. Kito, Y. Kaminishi, Y. Mizukami and N. Murase (1999a) Molecular divergence of the ssu rRNA gene and internal transcribed spacer 1 in *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). J. Appl. Phycol., 11: 211-216.

- 10) Kunimoto, M., H. Kito, Y. Yamamoto, D. P. Cheney, Y. Kaminishi and Y. Mizukami (1999b) Discrimination of *Porphyra* species based on small subunit ribosomal RNA gene sequence. J. Appl. Phycol., 11: 203-209.
- 11) Graybeal, A. (1998) Is it better to add taxa or characters to a difficult phylogenetic problem? Syst. Biol., 47: 9-17.
- 12) Moreira, D., H. Le Guyader and H. Philippe (2000) The origin of red algae and the evolution of chloroplasts. Nature, 405: 69-72.
- 13) Yamamoto, S. and S. Harayama (1995) PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. Appl. Environ. Microbiol., 61: 1104-1109.
- 14) Yamamoto, S. and S. Harayama (1996) Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. Intl. J. Syst. Bacteriol., 46: 506-511.
- 15) Lynn, R., G. Giaever, S. L. Swanberg and J. C. Wang (1986) Tandem regions of yeast DNA topoisomerase II share homology with different subunits of bacterial gyrase. Science, 233: 647-649.
- 16) Shimomura, K., S. Yamamoto, S. Harayama and N. Saga (2002) Type II DNA topoisomerase (*TOP2*) as promising molecular marker for phylogenetic analysis in Rhodophyta. Bot. Mar., 45: 87-90.
- 17) Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res., 22: 4673-4680.
- 18) Hasegawa, M., H. Kishino and T. Yano (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. J. Mol. Evol., 22: 160-174.
- 19) Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. J. Mol. Evol., 17: 368-376.
- 20) Strimmer, K. and A. von Haeseler (1996) Quartet puzzling: a quartet maximum-likelihood for reconstructing tree topologies. Mol. Biol. Evol., 13: 964-969.
- 21) Swofford, D. L. (1993) PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1.1. Laboratory of Molecular Systematics, Smithonian Institution, Washington.
- 22) Saitou, N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining model: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., 4: 406-425.
- 23) Felsenstein, J. (1995) PHYLIP: phylogeny inference package, version 3.57c. University of Washington, Seattle.
- 24) Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. Evolution, 39: 783-791.

# 日本産アコヤガイ Pinctada fucata martensii と 外国産アコヤガイの遺伝的特性

渥美貴史・古丸 明・岡本ちひろ (三重大・生物資源)

# Genetic Relationship Among the Japanese Pearl Oyster *Pinctada fucata martensii* and Other Pearl Oysters

Takashi ATSUMI, Akira KOMARU, and Chihiro OKAMOTO

Faculty of Bioresources, Mie University

#### **Abstract**

To estimate the genetic relationship among the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* (Oki, Uwa-kai) and pearl oysters *Pinctada fucata* from China (Beihai), Vietnam (Phu Quoc Island), and Thailand (Pattaya), 5 allozyme loci (*GPI*, *AAT*, *SOD*, *LAP*, *PT*) were analyzed by starch gel electrophoresis and the development of embryos and larvae were examined in crosses among local populations. The genetic distances between the Japanese and foreign local populations were higher than that within the Japanese local populations, especially in the geographically most distant population between Japan (Oki) and Thailand (0.0688). In the diallel crosses between Japanese and Chinese local populations and those among Japanese, Vietnamese and Thai oysters, the fertilization rate was over 85% and the zygotes could develop to the veliger larvae in all crosses. These results indicated that reproductive isolation is not present at the gamete level. Thus the present study suggests that the Japanese and other pearl oyster investigated in this study may be the same species judging from allozyme data and cross experiments. It is likely that introduced foreign pearl oysters may hybridize with the Japanese local population and give rise to introgression if they are cultured within the same area.

(accepted June 14, 2004)

アコヤガイ真珠養殖業は、日本の貝類養殖業において重要な位置を占めてきた。多岐にわたって行われてきたアコヤガイ研究の中で育種分野においては、日本産アコヤガイの選抜育種、交雑育種に関する研究などが行われてきた。それらの研究成果として、親貝の選抜を行うことや遺伝的に異なる貝の交雑を行うことで、貝殻や真珠層の形質改善ができ、真珠養殖に適した貝を育成できる可能性が示された<sup>1)</sup>。これらの研究成果を基盤として、真珠養殖現場においては、高品質真珠を安定的に生産するためのアコヤガイ作出の試みがなされてきた。親貝選抜により貝殻真珠層色を改良したアコヤガイを作出し、それを外套膜片給与体(ピース貝)として使用することで、経済価値が高いとされる白色系真珠を高率に生産できることが示された<sup>2)</sup>。また、真珠層を厚く巻いた貝を親貝として作出

したアコヤガイからは、真珠層の厚い真珠が高率に生産できることも示された<sup>3)</sup>。このように、選抜育種によりアコヤガイの品種改良を行うことで、高品質真珠の高率生産が可能になってきた。

近年、日本の真珠養殖業は度々起こるアコヤガイの大量へい死により、大きな打撃を受けている。へい死対策の一つとして、夏期の高水温に対して強く、耐病性にも優れているとされる中国産アコヤガイが、育種素材として利用された。現在では、日本産アコヤガイと中国産アコヤガイとの交雑貝を真珠母貝として使用することが主流となり、日本産アコヤガイを使用する真珠養殖業者は少ない。実際に養殖されているアコヤガイのかなりの量が、日本産アコヤガイと中国産アコヤガイとの交雑貝と思われる40。

これまで、アコヤガイの地域集団の変異性に関する

連絡先:〒517-0501 三重県志摩郡阿児町鵜方川向井3098-9 三重県科学技術振興センター水産研究部 渥美貴史

研究としては、アロザイム分析による日本の各地域集団における遺伝的変異性に関する研究<sup>5-7)</sup>や、日本の各地域集団の貝殻形や真珠層色等の地理的変異に関する研究<sup>1)</sup>が行われてきた。外国産アコヤガイと日本産アコヤガイとの遺伝的相違、遺伝的類縁関係等の遺伝的特性に関する研究としては、アロザイム分析によるオーストラリア産 Pinctada 属の真珠貝と日本産アコヤガイの遺伝的類縁関係<sup>8)</sup>が調べられている。また、Pinctada 属の各種の系統類縁関係が、rRNA や ITS の比較<sup>9-11)</sup>により行われている。しかし、外国産アコヤガイと日本産アコヤガイの遺伝的特性に関する知見は乏しい。また、外国産アコヤガイを日本で養殖した場合の産卵期、成長、生理的活性等の生物学的特性に関する知見についても十分ではない<sup>12)</sup>。

中国産アコヤガイをはじめ外国産アコヤガイが、日本産アコヤガイと同じ海域に垂下された場合、容易に交雑する可能性がある。しかし、その交雑による日本産アコヤガイへの遺伝的影響については全く不明である。

そこで本研究では、日本産アコヤガイと外国産アコヤガイ(中国、ベトナム、タイ)の遺伝的類縁関係を明らかにするため、アロザイム分析を行った。また、日本産アコヤガイと外国産アコヤガイ間に生殖隔離(配偶子隔離)があるかどうか明らかにするため交配実験を行った。

## 材料と方法

調査標本 日本産アコヤガイは、島根県隠岐諸島の天然生息貝と愛媛県宇和海で天然採苗によって得られた貝を用いた。中国産アコヤガイは、ベイハイの天然生息貝を用いた。ベトナム産アコヤガイは、フークオック島の天然生息貝を用いた。タイ産アコヤガイは、パタヤの天然生息貝を用いた。

隠岐と宇和海、ベトナム、タイの標本は、実験室に搬入し、アロザイム分析を行うまで軟体部を-30℃で冷凍保存した。中国の標本は、中国にて軟体部を凍結し、実験室に搬入後、アロザイム分析を行うまで-30℃で冷凍保存した。

アコヤガイの種、亜種に関する分類学的見解は近年 流動的であるが、本研究で用いた地域集団は、日本産 についてはアコヤガイ Pinctada fucata martensii、外国 産については外国産アコヤガイ Pinctada fucata とし て記載した。

アロザイム分析 アロザイムの検出は、常法の水平式デンプンゲル電気泳動法により行った。調査した酵素およびタンパク質は、Aspartate aminotransferase(AAT)、Glucosephosphate isomerase(GPI)、 Leucine

aminopeptidase(LAP), Superoxide dismutase(SOD), Protein(PT)の4酵素1タンパク質である。使用した 組織は、AAT、GPI、PTの分析には閉殻筋を、LAP、 SODの分析には中腸腺を用いた。泳動用緩衝液は AAT、GPI の分析には、ゲル、泳動槽共に0.0135Mト リス -0.0043M クエン酸 (pH7.0)<sup>13)</sup>を用いた。LAP の分析には、ゲル、泳動槽共に0.1Mトリスーホウ酸 (pH8.3) に0.001M 塩化マグネシウムを加えたもの $^{5}$ を 用いた。SODの分析には、ゲル、泳動槽共に0.087M トリス -0.0087M ホウ酸 -0.0011M EDTA (pH9.0)<sup>14)</sup> を用いた。PTの分析には、ゲル緩衝液は0.018Mリチ ウム-0.191M ホウ酸と0.0076M クエン酸-0.04M ト リスを1:2の割合で混合したもの (pH7.8)、泳動槽 緩衝液は0.018Mリチウム-0.191Mホウ酸(pH7.8)<sup>15)</sup> を用いた。アロザイムの染色方法について、AAT、 GPI、SOD、PT は藤尾<sup>13)</sup>の方法に、LAP は Avala<sup>14)</sup>の 方法に準じて行った。ゲルはデンプン濃度12%で作 成し、電気泳動は4℃でAAT、GPIは8時間・170V 定電圧、LAP は18時間・120V 定電圧、SOD は6時 間・170V 定電圧、PT は 3 時間・170V 定電圧下で行っ た。

交配実験 日本産アコヤガイと外国産アコヤガイ間で交配実験を行った。交配実験は、5地域集団全てが十分成熟した6月に行った。日本産アコヤガイと中国産アコヤガイの交配実験は、雌雄全ての組み合わせ(4通り)で行った。日本産、ベトナム産、タイ産アコヤガイを用いた交配実験は、雌雄全ての組み合わせ(9通り)で行った。

卵、精子の採取は切開法で行った。まず雌の生殖 巣を採取し、メスで切り込みを入れた後ガーゼに包 み、25℃のアンモニア海水(濾過海水2*l*に1N-アン モニア水を1.5 ml添加)中に卵を軽く絞り出した。そ の後卵核胞の消失を顕微鏡で確認してから実験に用 いた。また、雄も雌と同様の方法で精子を得た。精 子の運動能力を顕微鏡で確認後、媒精した。サンプ リングは媒精後、0分、10分、20分、30分、40分、50 分、60分、75分、18時間と9回行い、ベリジャー幼生 に至るまでの発生過程を観察した。サンプルは、リン 酸緩衝液(pH7.5)にパラホルムアルデヒドを4%に なるように混合したもので固定し、4℃で冷蔵保存し た。媒精後0分から75分までに固定したサンプルを、 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) 染色後、落射式蛍 光顕微鏡で観察した<sup>16,17)</sup>。媒精後18時間で固定したべ リジャー幼生サンプルは、染色等をせずそのまま透過 光で観察した。なお、各サンプルの卵または幼生は、 それぞれ100以上観察した。

## 結 果

アロザイム分析

#### 1) アロザイムの検出

4 酵素 1 タンパク質を支配する 5 アロザイム遺伝子座を推定した。その 5 アロザイムのいくつかのバンドパターンを Fig. 1 に示した。同アロザイムの対立遺伝子については、電気泳動による移動度が同じものを同じ遺伝子とし、より陽極側に泳動される遺伝子から順にアルファベットで示した。

AATは1遺伝子座があり、個体により1本または 3本のバンドが観察された。その移動度の違いから8 対立遺伝子を推定した。

GPIは1遺伝子座があり、個体により1本または 3本のバンドが観察された。その移動度の違いから7 対立遺伝子を推定した。 LAPは2つのゾーンにバンドが観察され、2遺伝子座の存在を確認した。より陽極に近い遺伝子座を LAP-1、原点に近い遺伝子座を LAP-2 とした。LAP-1 では、バンドの出現位置が僅差であったため、変異は 観察されたものの、正確に対立遺伝子の推定を行えないと判断した。LAP-2 では、個体により1本または2本のバンドが観察された。その移動度の違いから8対立遺伝子を推定した。

SOD は2つのゾーンにバンドが観察され、2遺伝子座の存在を確認した。より陽極に近い遺伝子座を SOD-1、原点に近い遺伝子座を SOD-2 とした。SOD-1 では、変異は観察されなかった。SOD-2 では、個体により1本または3本のバンドが観察された。その移動度の違いから3対立遺伝子を推定した。

PTは2つのゾーンにバンドが観察され、2遺伝子座

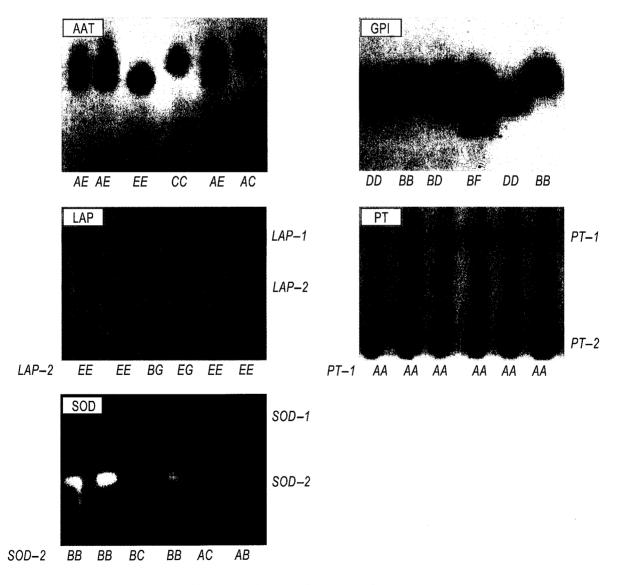


Fig. 1. Allozyme variations in Japanese and other pearl oysters.

の存在を確認した。より陽極に近い遺伝子座をPT-1、 原点に近い遺伝子座をPT-2とした。PT-1では、個体 により1本または2本のバンドが観察された。その移 動度の違いから2対立遺伝子を推定した。PT-2では、 バンドの出現が不鮮明であったため、変異は観察され たものの、対立遺伝子の推定を行わなかった。

また、5アロザイムのバンドパターンの中から、日 本産アコヤガイ、外国産アコヤガイを識別するマー カーを見つけることはできなかった。

#### 2)遺伝子頻度

5アロザイム5遺伝子座の遺伝子頻度をTable 1に 示した。5遺伝子座のうち、5地域集団とも遺伝子頻 度が0.1以上あった7つの対立遺伝子で、5地域集団間 全10通りのt-検定を行った。その結果、PT-1遺伝子 座では5%水準で有意差が認められなかったが、他4 遺伝子座では5%水準で多くの組み合わせにおいて有 意差が認められた。

なお、表現型頻度の観察値とハーディ・ワインベ ルグの法則に基づく期待値との間でカイ二乗検定を 行った。その結果、一部の遺伝子座(隠岐の SOD-2、 *LAP-2*、宇和海の*PT-1*、ベトナムの*PT-1*、タイの*PT-1*) を除いて、表現型頻度の観察値と期待値はよく一致し ていた。よって、アロザイム分析に用いた5地域集団 は、ハーディ・ワインベルグの法則に適合していると 判定された。

## 3)遺伝的類縁関係

5地域集団間のNeiの遺伝的距離をTable 2に、そ の遺伝的距離に基づいた UPGMA 法によるデンドロ グラムを Fig.2 に示した。デンドログラムから、中国 の地域集団は遺伝的にベトナムやタイよりも日本の2 地域集団に近かった。また、日本の2地域集団間やベ トナムとタイ間のように地理的に近い地域集団同士 は、遺伝的距離が小さくなる傾向がみられた。そして、 日本とタイのように地理的に隔たりのある地域集団同 士は、遺伝的距離が大きくなる傾向がみられた。

## 交配実験

アコヤガイの受精卵の発生過程を Fig. 3 に示した。 各サンプル毎に各発生段階の頻度を観察した。

Table 3に日本(雄)とベトナム(雌)の交配区の 観察結果を示した。全ての交配区において、正常に 発生が進み、発生過程における顕著な異常はみられな かった。また、各交配区の発生速度に顕著な差はみら れなかった。

Table 1. Allele frequencies at the 5 loci in 5 local populations of pearl oyster

		local population							
Locus	Alleles	Japan (Oki)	Japan (Uwakai)	China	Vietnam	Thailand			
AAT	* n	80	48	50	62	49			
	$\boldsymbol{A}$	0.044	0.042	0.330	0.105	0.286			
	B	0.138	0.115	0.000	0.016	0.041			
	C	0.175	0.219	0.100	0.306	0.245			
	D	0.013	0.135	0.000	0.040	0.051			
	$\boldsymbol{E}$	0.624	0.468	0.570	0.372	0.336			
	$\boldsymbol{F}$	0.000	0.021	0.000	0.153	0.031			
	G	0.000	0.000	0.000	0.008	0.010			
	H	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000			
	**P	$\leq 0.05$	$\leq 0.05$	$\leq 0.05$	$\leq 0.05$	$\leq 0.05$			
GPI	n	81	59	49	62	49			
	$\boldsymbol{A}$	0.025	0.008	0.051	0.008	0.020			
	B	0.858	0.797	0.786	0.726	0.777			
	C	0.000	0.000	0.000	0.024	0.010			
	D	0.080	0.136	0.153	0.194	0.173			
	$\boldsymbol{E}$	0.000	0.008	0.000	0.000	0.010			
	$\boldsymbol{F}$	0.031	0.051	0.010	0.048	0.010			
	G	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000			
	P	$\leq 0.05$	$\leq 0.05$	≤0.05	$\leq 0.05$	≤0.05			
LAP-2	n	64	54	50	57	42			
	$\boldsymbol{A}$	0.008	0.009	0.030	0.018	0.024			
	B	0.188	0.157	0.090	0.132	0.071			
	C	0.008	0.037	0.010	0.079	0.000			
	D	0.000	0.000	0.000	0.009	0.000			
	$\boldsymbol{E}$	0.631	0.648	0.740	0.622	0.751			
	$\boldsymbol{\mathit{F}}$	0.102	0.028	0.090	0.070	0.071			
	G	0.063	0.102	0.040	0.070	0.071			
	H	0.000	0.019	0.000	0.000	0.012			
	P	>0.05	≤0.05	≤0.05	$\leq 0.05$	≤0.05			
SOD-2	n	64	50	50	58	46			
	$\boldsymbol{A}$	0.000	0.010	0.000	0.009	0.033			
	B	0.648	0.770	0.740	0.922	0.924			
	C	0.352	0.220	0.260	0.069	0.043			
	P	>0.05	≤0.05	<b>≤</b> 0.05	<b>≤</b> 0.05	<u>≤0.05</u>			
PT-1	n	49	49	45	57	49			
	$\boldsymbol{A}$	0.673	0.745	0.778	0.754	0.704			
	B	0.327	0.255	0.222	0.246	0.296			
	P	≤0.05	>0.05	≤0.05	>0.05	>0.05			

Table 2. Nei's genetic distance between local populations of pearl oyster

local population	Japan (Oki)	Japan (Uwakai)	China	Vietnam
Japan (Uwakai)	0.0190			
China	0.0323	0.0299		
Vietnam	0.0627	0.0221	0.0464	
Thailand	0.0688	0.0310	0.0313	0.0158

<sup>\*</sup>n: number of individuals examined.

\*\*P: the probability of Hardy-Weinberg equilibrium.

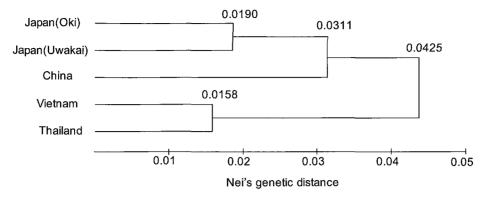


Fig. 2. Dendrogram (UPGMA) of Nei's genetic distance among 5 local populations of pearl oyster.

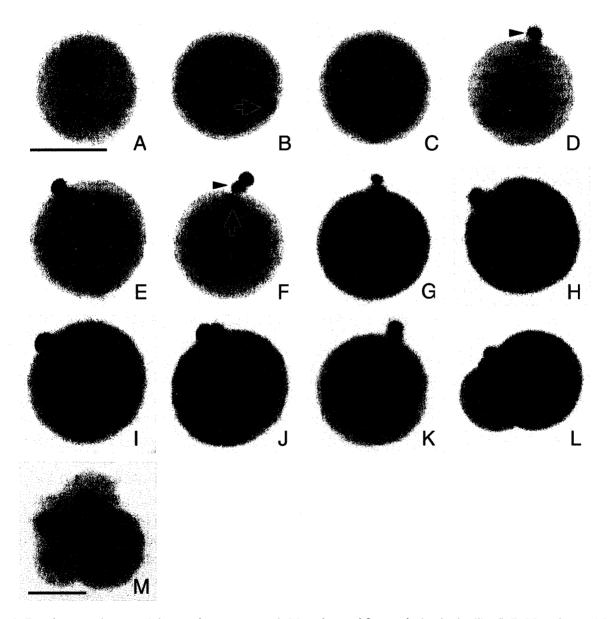


Fig. 3. Developmental stage of the pearl oyster eggs. A: Metaphase of first meiosis. (unfertilized) B: Metaphase of first meiosis. Arrow indicates male pronucleus. C: Anaphase of first meiosis. D: First polar body formation. Arrowhead indicates first polar body. E: Metaphase of second meiosis. F: Second polar body formation. Arrowhead indicates second polar body. Arrow indicates female pronucleus. G: Male pronucleus and Female pronucleus expand. H: Condensed chromatin of male and female pronucleus. J: Intertwined chromatin of male and female pronucleus. J: Metaphase of first cleavage. K: Anaphase of first cleavage. L: 2 cells. M: 4 cells. (Scale bar = 50 µm).

Table 3. Development of eggs from Vietnamese pearl oyster fertilized by sperms from Japanese pearl oyster

1 00			-		• -		-	•
	Time after spawning (min)							
Stages (%)	0	10	20	30	40	50	60	75
M-I (unfertilized)	89.8	2.9	5.0	0.6		2.7	2.1	2.3
M-I (fertilized)		57.4	42.9	2.4	1.1			
A-I		21.3		4.2				
PB-I formation		7.4		3.6		0.4		
A-II			44.7	14.5			1.5	
PB-II formation				57.8	1.1	1.3		
MP, FP expand				4.2	13.2			
Chromatin condensed					9.8	8.5	1.5	0.6
Chromatin intertwined					55.7	30.0		
Metaphase of first cleavage					5.2	27.8	16.5	5.7
Anaphase of first cleavage					0.6	17.5	21.1	4.5
2 cells					1.1		48.5	68.8
4 cells							1.5	8.5
Others	10.2	11.0	7.5	12.7	12.1	11.7	7.2	9.7
Number of eggs	128	136	161	166	174	223	194	176

M-I shows metaphase of first meiosis. A-I shows anaphase of first meiosis. PB-I shows first polar body. A-II shows metaphase of second meiosis. PB-II shows second polar body. MP shows male pronucleus.

FP shows female pronucleus.

Table 4に日本と中国の各交配区のベリジャー幼生発生率を示した。Table 5に日本、ベトナム、タイの各交配区のベリジャー幼生発生率を示した。日本と中国、日本とベトナム、日本とタイのすべての交配区において、ベリジャー幼生発生率は85.0~98.5%の範囲内にあり、顕著な発生率の低下はみられなかった。すべての交配区においてベリジャー幼生期まで正常に発生は進んでおり、顕著な発生異常はみられなかった。

Table 4. The % of veliger larvae obtained cross between Japan and China

9 In term transfer	5 P						
3 9	Japan	China					
Japan	77.4	85.0					
China	85.9	63.6					

% = 100 × number of normal veliger larvae/observed eggs.

Table 5. The % of veliger larvae obtained cross between local populations

8 9	Japan	Vietnam	Thailand
Japan	96.7	98.5	90.6
Vietnam	92.7	91.5	88.8
Thailand	97.1	94.8	66.4

% = 100 × number of normal veliger larvae/observed eggs.

# 考 察

日本産アコヤガイの各地域集団間の遺伝的特性に 関して、和田<sup>11</sup>は千葉県小湊、石川県穴水から沖縄県 西表島に到る38~45地点の3アロザイム4遺伝子座 (LAP-1、LAP-2、SOD、PT) の遺伝的変異を調査した。 その結果、真珠養殖の歴史や他海域からの移植の歴 史のない鹿児島県ナマコ池と、真珠養殖の歴史がほと んどない沖縄および八重山を除く、他海域では地域集 団間の遺伝的な差がそれ程大きくないことを報告して いる。一方、三並ら<sup>7</sup>は静岡県沼津と石川県穴水、九 州2地域集団(長崎県大村、鹿児島県阿久根)の4地 域集団の単型遺伝子座を含めた13アロザイム17遺伝子 座の遺伝的変異を調査した。その結果、遺伝子頻度の 差異および遺伝的分化の状況から、日本の各海域に独 立した繁殖集団を形成していると報告している。しか し、調査した4地域集団間のNeiの遺伝的距離をみる と、沼津と阿久根が最小値0.0023、また大村と阿久根 が最大値0.0073であった。本研究でも、愛媛県宇和海 と島根県隠岐諸島の2地域集団間の遺伝的類縁関係解 析をするため、遺伝的距離を求めた。その結果、本研 究で得られた遺伝的距離も0.0190程度であった。従っ て、本研究結果や和田、三並らの報告結果から、日本 産アコヤガイの各地域集団間での遺伝的な差はそれ程 大きくないと考えられた。

日本産アコヤガイと外国産アコヤガイの遺伝的特性に関して、Colgan and Ponder<sup>8</sup>は、オーストラリア産 *Pinctada* 属の真珠貝と日本産アコヤガイの14アロザイム14遺伝子座の遺伝的類縁関係を調査した。

その結果、オーストラリアに生息する真珠貝2種 (P. imbricata, P. albina) のうち、P. imbricata と日本 産アコヤガイでは Nei の遺伝的距離が0.08以下であ り、さらに各集団を識別するマーカーもなかったとし て、P. imbricata と日本産アコヤガイは同種であると 報告している。またミトコンドリアや核の DNA 多型 を利用した研究9-11)においても、分析されている標本 数は少ないが、能登半島、上甑島ナマコ池、奄美大島、 カンボジア、オーストラリア西岸から得た天然採苗貝 および人工採苗した中国広東省、海南島、ミャンマー の Pinctada 属の真珠貝を比較した結果、産地間で明 瞭な遺伝的分化は認められないことが報告されてい る。本研究では、外国産アコヤガイとして中国、ベト ナム、タイの3地域集団を調査し、日本産アコヤガイ と比較したところ、外国産アコヤガイとの遺伝的分化 は、日本の地域集団間より大きいことが明らかになっ た。しかし、Colgan ら<sup>8</sup>同様、各集団を識別するマー カーを見つけることはできなかった。このことから、 アコヤガイは遺伝的にあまり分化しておらず、かなり 広い範囲で種を形成していると考えられた。

交配実験において日本産アコヤガイと外国産アコヤガイ間の生殖隔離(配偶子隔離)の有無を調査した。その結果、Table 4、Table 5に示したとおり、全ての交配区において、正常にベリジャー幼生まで発生が進んだことから、少なくとも配偶子レベルでの生殖隔離はないことが明らかとなった。さらに、現在日本の真珠養殖の現場では、日本産アコヤガイと中国産アコヤガイの交雑貝が広く用いられ、その交雑貝にも稔性があることから、日本産アコヤガイと中国産アコヤガイの間に生殖隔離があるとは考えにくい。従って、本研究で調査した日本産、外国産アコヤガイは同種であると推測された。

和田<sup>1)</sup>は、日本産アコヤガイの各地域集団間の遺伝的分化が小さい理由として、生息域近くを流れる暖流によって浮遊幼生が運ばれることによる遺伝子流動と、真珠産業による人為的な種苗移動を挙げている。本研究の結果は、日本産アコヤガイと外国産アコヤガイにおいて、地理的な隔たりが大きいにも拘らず遺伝的分化が小さいことを示した。アコヤガイは、体外受精を行い、数週間の長い浮遊幼生期を経て付着生活に入る上、流れの速い暖流域に棲息する。そのため、幼

生の浮遊拡散により、遺伝的分化が起こりにくいと考えられた。

外国産アコヤガイが日本産アコヤガイと同じ海域に 垂下された場合には、交雑がおこり、日本産アコヤガ イの遺伝的特性が変化する可能性が大きい。そして、 遺伝的特性の変化は水温耐性等の生理学的特性や、 真珠の品質そのものに影響を与える可能性も考えられ る。中国産アコヤガイを親とした人工採苗の養殖集団 が日本産アコヤガイとほぼ同時期に成熟・産卵する例 も報告されている<sup>12)</sup>。今日の真珠養殖現場では、主に 交雑貝が利用されていることから、すでに中国産アコ ヤガイによる日本産アコヤガイへの遺伝的影響が出て きている可能性が大きい。従って、純粋な日本産アコ ヤガイを得ることが難しい状況になっていると考えら れる。このため、日本産アコヤガイの集団レベルまた は配偶子レベルでの遺伝子保存をすべきであると考え る。そのためには、真珠養殖の歴史や他海域からの移 植の歴史がない、純粋な日本産アコヤガイが生息する 可能性の高い海域の地域集団を隔離し、系統保存をす る等の対策が早急にとられる必要があろう。

#### 要 約

日本産アコヤガイと外国産アコヤガイ(中国、ベト ナム、タイ)の遺伝的類縁関係を明らかにするため、 アロザイム分析を行った。その結果、日本産と外国産 アコヤガイ間の遺伝的距離は、日本の地域集団間の値 より大きくなった。また、ベトナムとタイのように地 理的に近い地域集団同士は、遺伝的距離が小さく、日 本とタイのように地理的に隔たりのある地域集団同士 では、遺伝的距離が大きくなる傾向がみられた。また 生殖隔離(配偶子隔離)の有無を明らかにするため、 日本産と外国産アコヤガイ間で交配実験を行った。そ の結果、全交配区でベリジャー幼生まで正常に発生が 進んだことから、少なくとも配偶子レベルでの生殖隔 離はないことが明らかとなった。これらのことから、 日本産と外国産アコヤガイは、同種であると推測され た。つまり、日本産アコヤガイと外国産アコヤガイを 同じ海域に垂下した場合、両者の間で容易に交雑がお こり、日本産アコヤガイに遺伝的影響を及ぼす可能性 が高いと考えられた。

## 文 献

- 1)和田克彦 (1984) アコヤガイ *Pinctada fucata* の改良に関する研究. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture, 6: 79-157
- 2) 林 政博(1999) アコヤガイの殻体真珠層色の改良について、全真連技術研究会報、14:1-13.
- 3) 林 政博・青木秀夫 (2001) アコヤガイ母貝の選抜育種による真珠の巻き (真珠層の厚さ) の改良について. 全真連技術研究会報, 15:1-7.
- 4) 和田浩爾・山下吉宏・植村作治郎・蝶野一徳・堤 美香 (2002) 日本種アコヤガイと中国種アコヤガイ×日本種アコヤガイの第1代交雑貝の生態生理に関する比較、全真連技術研究会報、16:1-18.
- 5) Wada, K. T. (1975) Electrophoretic variants of leucine aminopeptidase of the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould). Bull. Natl. Pearl Res. Lab., 19: 2152-2156.
- 6) Wada, K. T. (1982) Inter- and intraspecific electrophoretic variation in three species of the pearl oysters from the Nansei islands of Japan. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture, 3: 1-10.
- 7) 三並 宏・明楽秀作・木島明博 (2000) アロザイムによるアコヤガイ *Pinctada fucata martensi* の天然集団に おける遺伝的変異性. 水産育種、29:103-111.
- 8) Colgan, D. J. and W. F. Ponder (2002) Genetic discrimination of morphologically similar, sympatric species of pearl oysters (Mollusca: Bivalvia: *Pinctada*) in eastern Australia. Mar. Freshwater Res., 53: 697-709.
- 9) 小林敬典・正岡哲治 (2001) ミトコンドリア rRNA 塩基配列からみたアコヤガイ類の系統関係. DNA 多型, 9:90-94.
- 10) 正岡哲治・小林敬典 (2002) 18SrRNA 及び 28SrRNA 領域を用いたアコヤガイ属における系統関係. DNA 多型, 10:100-104.
- 11) 正岡哲治・小林敬典(2003) 28SrRNA全領域及びITS 領域を用いたアコヤガイ属の類縁関係. DNA 多型, 11: 76-81.
- 12) 堤 美香 (2002) 中国種×中国種、中国種×日本種アコヤガイの閉殻筋の着色および生殖腺の周年変化. 全真連技術研究会報, 15:19-30.
- 13) 藤尾芳久(1984) アイソザイム分析手法による魚介類の遺伝的特性の解明に関する研究. 農林水産業特別試験 研究費補助金による研究報告書, 農林水産省, pp. 65.
- 14) Ayala, F. J., J. R. Powell, M. L. Tracey, C. A. Mourão and S. Pérez-salas (1972) Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. Genetics, 70: 113-139.
- 15) Fujino, K. and N. Nagaya (1977) Biochemical polymorphism in the Pacific oyster-I. Variants in myogen and esterases. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 43: 983-988.
- 16) Hamada, S. and S. Fujita (1983) DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry. Histochemistry, 79: 219-226.
- 17) Komaru, A., H. Matsuda, T. Yamakawa and K. T. Wada (1990) Meiosis and fertilization of the Japanese pearl oyster eggs at different temperature observed with a fluorescence microscope. Nippon Suisan Gakkaishi, 56(3): 425-430.

# -会員通信-

# Genetics in Aquaculture 2003 in Chile に参加して

東北大学大学院農学研究科 中嶋 正道

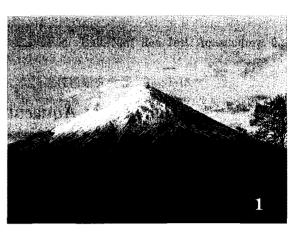


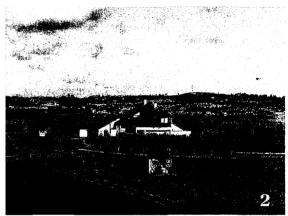
Genetics in Aquaculture 2003(GA2003)は前回2000年にオーストラリア、タウンズビルで開催されてから早くも3年が経過し、今回は11月9日~15日にかけて南米チリのプエルトヴァラス(Puerto Varas)での開催であった。日本との時差はちょうど12時間で昼と夜が反転している。仙台を出発してから35時間でやっと目的地、プエルトヴァラスのホテルに着いた。アメリカ国内での乗り継ぎの際のセキュリティーの厳しさにうんざりしたせいか、飛行機の中で良く眠ったため、あまり時差はけは感じなかった。マイアミからの便でサンチャゴへ近づくと赤茶けた乾燥した大地が見え、サンチャゴ国際空港も砂漠の真中にあるような空港だったが、今回の開催地であるプエルトヴァラスはサンチャゴから南へさらに600 km ほどの小さな町で、最寄の飛行場はプエルトモント(Puerto Monto)になる。プエルトモントからさらに車で30分ほどの緑に覆われた小さな町がプエルトヴァラスで、日本の地図には載っていない。町は湖(Lago Llanquihue)に面し、遠くに富士山に似たオソルノ山(Volcan Osorno)(写真 1)を望む風光明媚なリゾート地である(写真 2)。会場のホテル(Hotel Y Cabanas Los Alerces)はコテージを備えた瀟洒な建物で町の東端にあったが、町自体がさほど大きくなかったのでWeb上で紹介されたホテルのいずれからでも徒歩30分程度の距離となり、朝の適当な運動となった。受付時にアブストラクトとミールクーポンを渡され、昼食とポスターセッション時のワインと引き換えられた(写真 3)。昼食は毎回会場となったホテルの食堂でとったが、バイキング方式ではなくコース料理がふるまわれ、質はまあまあであったが量的には少し多めだった(写真 4)。

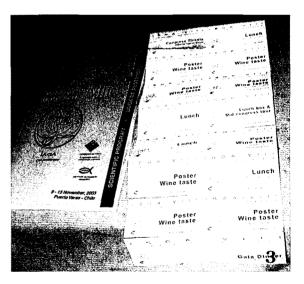
Genetics in Aquaculture 2003が開催される前日の11月8日にはワークショップ(Genetics Applied to Aquaculture)が開催された。このワークショップは地元チリの水産業に従事する人たちを対象としたワークショップだったようで、進行はスペイン語で進められ、同時通訳(英語の講演をスペイン語に直し、スペイン語の講演を英語に直す)がついた。通訳ブースの脇に席をとったせいでブース内の声と演者の声が重なり非常に聞き辛かった。

Genetics in Aquaculture 2003 のセッションは11月10日から始 まった。今回はチリ大学の Roberto Neira 教授がオーガナイザー の労を取られた(写真 5)。Neira 教授の開会の挨拶、Dr. Ken Overturf の基調講演 (Genetic selsction and molecular analysis of rainbow trout for enhanced growth and utilization of alternative diet sources) に引き続き各セッションが開始された。セッショ ンは "Genomics and Proteomics"、"Molecular Markers"、"Genes and Genome Mapping & manipulations", "Chromosome and Chromosome Manipulations", "Breeding and Quantitative Genetics I Breeding Programms", "Breeding and Quantitative Genetics II General Breeding", "Breeding and Quantitative Genetics III Breeding and Disease Resistance", "Natural and Cultivated Aquatic Genetic Resources"の8セッションからな り、口頭発表72題、ポスター発表78題の発表がなされた。参加 者は約140名で前回とほぼ同数で、日本からは大学院生も含め 12名が参加した。

今回の演題で多かったのは Breeding and Quantitative Genetics で3パートに分かれ25題の口頭発表と34題のポスター発表が行 われた。3パートのうち一つはBreeding Programsで、これま でに無かった新しいセッションである。高感度遺伝マーカーが 開発されつつあることからか個体判別や親子関係を判別した上 での生産管理の理論、プログラム、シミュレーション等が発表 され、熱い論議が交わされたセッションの一つだった。しかし、 シミュレーションや理論的なモデルによる研究が先行してお り、現実の養殖集団や自然集団への応用に関してはまだ問題が 多い感じがした。Genes and Genome Mapping & Manipulations では、前回のタウンズビルでの大会の時に見られた単にマッピ ングをしただけの発表は少なくなり、成長や耐病性など何らか の形質との連鎖関係を主にした発表が多くなっていた。特に耐 病性と関連する遺伝子との連鎖関係に関しては耐病性遺伝子の 存在が期待される領域が特定されるなど成果が得られ始めてい る。また、Genomics and Proteomics はマッピングだけでは解 決できない特定の形質に関与する具体的な原因遺伝子に迫る手 法として今後の発展が見込まれる分野である。今回発表数は少 なかったが、今後の更なる発展が期待される。一方で、従来の 育種方法を用いた研究発表も多くなされており、Breeding and Quantitative Genetics II General Breeding では10題の発表がな され、餌料効率や成長、塩分耐性等に関する研究発表がなされ た。









ポスター発表は口頭発表終了後に毎日17:30より行われた。チリワインが飲めるクーポンが毎日2枚あり、ワイン片手に Discussion が行われていた。ポスター会場がやや手狭であったせいか大混雑であった(写真6)。

多くの講演が行われたが、ここで個々の講演についての紹介はしきれないので詳しい内容は Aquaculture に掲載されるプロシーディングを参考にしていただきたい。

セッションの中日に行われた Mid Conference Tour は近郊のリャマ牧場(写真7)や渓谷、湖を回るツアーで、途中バスが故障するトラブルに見舞われたが南米の自然を見ることが出来た。今回周った地域はオソルノ山からの火山灰で出来た原野と森林地帯が比較的はっきりと分かれており、原野ではやや粗い砂地が延々と続いていた。また、何処へ行っても黄色いきれいな花が咲いていたが、帰化植物で南米原産ではないとのことだった。湖を周遊するツアーでは船上でワインや軽食が出され、飲みながら周りのフィヨルドに似た地形を楽しんだ(写真8)。

セッションの最終日、口頭発表終了後に IAGA General Meeting が行われた。ここで学生参加者におけるベストロ頭発表賞とベストポスター賞の発表が行われた。口頭発表では Norway の Marte Holtsmark 氏(Base populations in fish breeding programs – A sumulation study)、ポスター賞は日本の Eriko Ohara 氏(Towards the identification of benedeniasis resistance genes in yellowtails)が栄えある賞を獲得した。日本人の受賞は前回に続き連続であった。今後のさらなる発展を期待したい。

次に次回の開催地の選考が行われた。開催地に立候補したのはタイ(アユタヤ)、フランス(モンペリエ)、アメリカ合衆国(ヴァージニア)の3カ国だった。それぞれの立候補地の紹介が行われた後、最終日の参加者による挙手採決が行われた。結果はタイが30票、フランスが50票となり、2006年の次期開催地はフランス、モンペリエと決まった。次回は Dr. Chatain がオーガナイザーの労をとられる予定である。

最後に運営方式に関しての論議も行われ口頭発表の時間や開催の間隔についての論議がなされた。口頭発表に関してはセッション毎にキーノートをおく案や発表時間を30分とする案が出されたが、結論は出ず、次回のオーガナイザーに一任されることとなった。開催間隔については2年毎とする案が出されたが、運営が難しいとのことで、従来通り3年毎となった。

帰り際に今回のオーガナイザーである Dr. Robert Neiraへお礼とお別れの挨拶へうかがったところ、「日本も若手の人ががんばって是非 Genetics in Aquaculture を招致して欲しい」とのコメントをいただいた。いずれは日本開催を検討しなければならないだろう。









# 水産育種研究会組織

会 長

和田克彦

庶務幹事

嵯峨直恆

会計幹事

山羽悦郎

編集幹事

荒井克俊(主任)、阿部周一、池田 寒、木島明博、

古丸明、関伸吾、田畑和男、中嶋正道、西田睦

国際学会担当幹事 谷口順彦、岡本信明

総括幹事

藤尾芳久、山崎文雄

会計監査

青木 宙

# 水産育種 第33巻2号

2004年(平成16年) 6月30日印刷 2004年(平成16年) 6月30日発行

編集者

荒井 克俊

代表者兼発行者 和田 克彦

発行所及び著作権者 水産育種研究会

〒041-8611 函館市港町3-1-1

北海道大学大学院水産科学研究科

TEL (0138) 40-5535 FAX (0138) 40-5537

印刷所:(有)西村謄写堂

〒780-0901 高知市上町1丁目6-4

TEL (088) 822-0492 FAX (088) 825-1888

# FISH GENETICS AND BREEDING SCIENCE Volume 33 Number 2, June 2004 CONTENTS

# Originals

Thermal Resistance Traits in the Clonal Lines of Silver Crucian Carp <i>Carassius langsdorfii</i> Evaluated by Caudal Fin Cells	
K. SAKAMOTO, W. KOEDPRANG, M. NAKAJIMA, and N. TANIGUCHI	87
Genetic Characteristics of a Bluegill Sunfish, <i>Lepomis macrochirus</i> , in Japan and Korea in the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of Mitochondrial DNA K. KAWAMURA, R. YONEKURA, M. ISHIKAWA, and O. KATANO	93
Polymerase Chain Reaction-Based Species Identification of Pearl Oyster Using Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Regions T. MASAOKA and T. KOBAYASHI	101
Unreduced Diploid Eggs in the Diploid Loach <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> , from Lake Junsai-Numa, Hokkaido, Japan M. ITONO and K. ARAI	107
Development of DNA Microarray for Rapid Identification of Mitochondrial DNA Haplotypes in Chum Salmon S. MORIYA, S. SATO, S. URAWA, A. URANO, and S. ABE	115
Change in the Thermal Tolerance of Silver Crucian Carp at Different Acclimated Temperatures Evaluated by the Survival of Cells Isolated from Tail Fin Y. ARISAWA, M. NAKAJIMA, and N. TANIGUCHI	123
Phylogenetic Analysis of Bangiales Plants (Rhodophyta) using Type II DNA Topoisomerase Gene K. SHIMOMURA, S. OOTSUKA, Y. KITADE, K. KUWANO, J. SHIN, and N. SAGA	129
Genetic Relationship Among the Japanese Pearl Oyster <i>Pinctada fucata martensii</i> and Other Pearl Oysters  T. ATSUMI, A. KOMARU, and C. OKAMOTO	135
Information	143
Notification and Announcement	147
Information for Contributors	149