

平成12年度 厚岸湖別寒辺牛湿原学術研究奨励補助金報告書

地域特異的な遺伝子資源の保存と再生に関する研究

(1)「厚岸町床潭沼フナの集団耕造」

助教授 山羽 悦郎
北海道大学水産学部七飯養魚実習施設

要旨

生物の体を構成する細胞は、母親と父親に由来する設計図をそれぞれ一組ずつ2組持っています。このため、2倍体と呼ばれています。ほとんどの生物には2倍体しか見つかりません。しかし、自然界にはこの設計図を2組持っている集団に加え、3組も4組もそれ以上も持っている生物があり、これらの生物集団を倍数体と呼びます。

我が国の淡水域に広く分布するフナやドジョウの中には、普通の2倍体に加え、この倍数体が含まれています。これらの倍数体の個体は、通常雌です。その卵に雄の精子が受精してもその遺伝子は子供に伝わらない「雌性生殖」という繁殖様式で殖えています。そのため子供はすべて雌で、遺伝子はその母親と変わらないだけでなく、姉妹の間でも差がありません。

このような、倍数体がどのように生まれてきたかは、実はまだよくわかっていません。恐らくそれぞれの地域に棲んでいる2倍体の集団になんらかの変化が起こって、倍数体が生まれてきたと考えられます。どうやって生まれてきたかを調べるためには、2倍体も倍数体も棲んでいて、しかも人間の手が加わっていない自然の状態に残されている場所が必要になります。

厚岸町にある床潭沼は、赤いフナ、ヒブナが棲んでいることから、昭和47年に天然記念物に指定された場所です。そのため、人間が魚をとったり、放したりすることができません。また、周囲から新しい魚が入ってくることも考えにくい閉鎖された場所です。このような場所が、倍数体がどのようにできてきたかを明らかにするためにふさわしい場所なのです。

今年は、この床潭沼に棲んでいるフナに、他の場所で見つかるような倍数体がいるかどうかを調べました。倍数体は、細胞の中に設計図をたくさん持っていますから、この設計図を薬品で染めると、たくさんの薬品がくっつくことになります。どれ位くっついたかを機械で計ってやると、倍数体であることがわかります。そのように調べると、床潭沼のフナには2倍体が56.3%（36個体）、3倍体が31.3%（20個体）、4倍体が9.4%（6個体）いることがわかりました。また、不思議なことに、一尾の中に2種類の倍数性を持つ細胞が含まれている魚が2尾見つかりました。

倍数体の設計図を比べることで、同じ設計図を持った姉妹であるかがわかります。実際に設計図を比べて見ると、3倍体集団は18個体いたのですが設計図は2種類だけで、4倍体ではなんと6個体ともみんな同じ設計図を持っていることがわかりました。つまり、3倍体は2組の姉妹の集団で、4倍体はみんな姉妹だったのです。これからは、このような倍数体がどうやってできたかを調べていくつもりです。

床潭沼ではドジョウも採れたので、この倍数体も調べましたところ、一尾だけ見つかりました。一尾だけでは、設計図を比べることができません。また、来年以降に採集し比べていく予定です。

緒言

我が国の淡水域に広く分布するフナは、その馴染み深さに反して、分類学的にも、遺伝学的にも解明されていない多くの問題を残している。我が国に生息するフナは、キンブナ、オオキンブナ、ギンブナ、アムールブナ、ナガブナ、ニゴロブナ、ゲンゴロウブナに分類されている（中村，1969）。その学名は *Carassius auratus* 一種で、亜種として分類されるとする考え方や、異なる種として分類する考え方がある。フナ属は、主にその鰓耙数や背鰭条数により分類されている。しかしながら、これらの分類形質には重なりがあり、必ずしも確実な分類ができるわけではない。さらに、フナのカラ分を複雑にしている原因に、倍数体の存在が上げられる。

小林ほか（1970, 1973）は、フナ類の染色体観察の結果から、キンギョ、キンブナ、ヨーロッパブナは、染色体数 100 を有する 2 倍体の集団であるが、ナガブナ、ギンブナには染色体数約 150 を有する 3 倍体の集団、そしてギンブナにはさらに染色体数約 200 を有する 4 倍体集団が存在することを明らかにした。さらに、ギンブナ、ギベリオブナの 3 倍体、4 倍体は、雌性生殖により殖えていることが明らかにされている（Cherfas, 1966; 小林, 1971, 1976; 小林・越智, 1972; 小野里, 1981）。この雌性生殖では、雄の精子は受精するものの卵の細胞質の中で雄性前核にならず、その後の発生に関与しない（小林, 1971; Yamashita et al., 1991）。また、卵は減数第 1 分裂を欠き、第 1 極体の放出は観察されず、受精時には母親の体細胞と同じ遺伝子構成となることが明らかになっている。これらの結果、3、4 倍体の子孫は母親のみの遺伝子をそのまま受け継ぎ、母親・姉妹は遺伝的に均一な全雌のクローン集団を作ることになる（山下・長浜, 1992）。したがって、この集団内では、遺伝子の解析を行っても差は見られず、個体間で組織の移植を行うと生着することになる。これらの 3、4 倍体の起源については、様々に議論されているが、未だ明らかにはなっていない。

長谷部（1992）は、ミトコンドリアの塩基配列の違いを利用して、日本に分布するフナ集団の解析を行った。その結果、各水系に存在する 3 倍体は、他水系に分布する 3 倍体よりも、同水系の 2 倍体に遺伝的に近縁であることが明らかにされた。この結果は、3 倍体はある水系で生まれて分布を広げたのではなく、各水系で独立して生じたことを示唆する。

一方 4 倍体は、生息数が少ないため、その繁殖様式、起源の解析がほとんどなされていない。その中で、道南の大野川水系で採集された 4 倍体が同水系の 3 倍体の鱗を受容した例が鳥沢（1979）により報告されている。この実験結果は、この 4 倍体が同水系の 3 倍体から生じた可能性を示唆している。しかしながら、半数体分の染色体の由来は明らかでなく、またどのように 3 倍体の核に取り込まれたかも定かでない。

一方、長野県の諏訪湖に分布する3倍体のフナにキングヨの精子を媒精したとき、その子孫に4倍体が出現することが、中西(1992)により報告されている。これらの4倍体フナには雌雄の両性が出現する。したがって、3倍体の卵に侵入した精子が、何らかの理由で卵細胞質内で排除されず、3倍体の核に組み込まれた場合に4倍体が生じる可能性がある。

フナと同様に自然倍数体の存在するドジョウでは、その3倍体が、同水系の2倍体より生じたと考えられる結果が、Zhang and Arai (1999)や堀江(2001)により報告されている。これらの事を考えると、フナにおいて自然界に分布する3、4倍体も、同水域に生息する2、3倍体より起源した可能性がある。このような仮説を検証する上で、2から4の倍数体が同時に生息し人為的な攪乱の少ない水系で、フナの起源を研究する必要がある。

北海道には、人為的な攪乱の比較的少ない水系が残されている。ここでは、小野里ら(1983)により、フナの倍数体の分布が報告されている。彼等によれば、多くの水系で3倍体の存在が明らかにされており、また4倍体が特に道東地方に分布している事が報告されている。厚岸町に位置する床潭沼は、ヒブナの生息により昭和47年4月1日に北海道文化財保護条例で天然記念物に指定された保護水面である。この沼は、周囲の淡水域から隔絶されており生息する淡水魚が外部から侵入できず、人為的な攪乱も少ないと考えられる。このような点で、生物の集団構造を調べる上で格好なフィールドといえる。

床潭沼では、ヒブナが存在する事が知られているが、フナの倍数体については調べられてはいない。そこで、本研究では、フナにおける倍数体の起源を明らかにする前段階として、厚岸町の床潭沼に生息するフナの集団構造を明らかにする事を目的とし、フローサイトメトリーにより倍数体の出現頻度を解析するとともに、フィンガープリントにより倍数体のクローンの遺伝的な解析を行った。本論文では、フナ属魚類の分類の混乱及び困難さの理由から(垂)種についての同定は行わずフナ *Carassius auratus* と記載するに留めた。

材料および方法

材料

本研究で材料としたフナは、平成12年8月29-30日に、北海道厚岸町床潭沼において採集した64個体である。採集地点は、図1 A Bに示した国道沿いの一画である。採集には、組み立て式のトラップを用いた(図1 C)。トラップには鯖水煮を小麦粉で練った餌を入れ、沼の中に設置した。設置した後、5から12時間にトラップを引き上げフナを採集した(図1 D)。

試料の採取

倍数性の確認と、DNA の抽出するために、採集したフナの尾柄部よりディスプレイ注射筒を用いて血液を採取した(図1 E)。採取した血液は、フローサイトメトリー用に MEM 培養液に、また、DNA 抽出用には血液を TNES-Urea 緩衝液(10mM Tris-HCl, pH7.5, 125mM NaCl, 10mM EDTA, 0.5% SDS, 4M Urea)に個別別に懸濁し、氷冷して函館へ持ち帰った(図1 F)。血液の採集できない小さい個体については、鰭の先端を小片として採取し、血液サンプルと同様に処理液中に入れて実験室へ持ち帰った。

また血液の形態観察のために、血液をスライドグラスに塗抹した後、100%エチルアルコールにより数分間固定し風乾して、個体ごとの血液塗抹標本を作成した。

倍数性の解析

倍数性の確認のために、MEM 培養液に懸濁した血液細胞を遠心して回収し、核抽出用の A 液(Nudei Extraction Soln., Partec)で再懸濁した後、等量の核染色用の B 液(DAPI Staining Soln., Partec)を加えて 20 分間静置した B 鰭サンプルは、ボルテックスにより細胞を遊離させた後、遠心により遊離細胞を回収し、血液と同様の処理を行い核の染色を行った。染色した核は、Ploidy Analyser PA 型(Partec)で、相対 DNA 量を測定した。

DNA フィンガープリンティング

DNA フィンガープリンティングの試料として用いる DNA 抽出は以下の過程で行った。

約 50 μ l の血液、鰭の場合は 100mg 以下の試料を、TNES-Urea 緩衝液 400 μ l に懸濁した。すぐに DNA の抽出を行わない場合は、この状態で室温保存した。サンプルに 1mg/ml の proteinase-k 溶液を約 10 μ l 加え、37 で約 6 時間インキュベートし、蛋白を消化した。消化後、等量のフェノール溶液を加え、10 分間転倒混合した(フェノール抽出)。この混合液にクロロホルム・イソアミルアルコール混合液(24:1)を 400 μ l 加え、全体が白濁するまで混合した後、15000rpm で 15 分間遠心分離した。上層の水層を回収し、さらにフェノールによる抽出以降を繰り返した。回収した水層に、その 1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム溶液(pH5.2)と 2 倍量のエタノールを加え、20 分間転倒混合した後、15000rpm で 15 分間遠心分離した。上層を除き得られた DNA 沈殿を 70%エタノールで洗浄後、風乾し、TE buffer に溶解し DNA サンプルとした。

DNA フィンガープリント解析は以下の手順で行った。

8 μ g 相当の DNA サンプルを制限酵素 HaeIII で消化し、0.8%アガロースゲルにて 24 時間電気泳動を行った。泳動後、ゲルを Denature Bu. (0.5M NaOH, 1.5M NaCl) で 15 分間で 2 回処理した。その後、Neutralize Bu. (1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl) で 2 回処理した。このゲルからサザンプロット法により DNA をメンブロンに転写した DNA を転写したメンブロンは 乾熱滅菌機内で 80 $^{\circ}$ C、2 時間の処理を行い DNA の熱固定を行った。

サザンハイブリダイゼーションのプロープとして、アルカリフォスファターゼ標識をした (GGAT)₄ オリゴヌクレオチドを用いた。ハイブリダイゼーションは、Prehybri Bu. (2 \times SSC, 2% SDS, 1% Caseine) でメンブロンを 50 $^{\circ}$ C で 1 時間以上処理した後、上記プロープを加えた Hybridization Bu. (5 \times SSC, 2% SDS, 10% ポリエチレングルコール) で、48 $^{\circ}$ C で 1 時間以上の処理を行い、1 \times SSC, 1% SDS により 48 $^{\circ}$ C で 15 分、1 \times SSC, 1% Triton-X により 48 $^{\circ}$ C で 15 分、さらに 1 \times SSC で常温 10 分の洗浄を行った。その後、メンブロンを 100mM Tris, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂ で常温 10 分間の浸漬を行なった。さらに、発光基質である Lumi-Phos530 をメンブロンに均一に塗布し、ラップで表面を覆った後、感光カセット内で X 線フィルム (Fuji: OmatFilm?) に露出した。おおむね 1 ~ 2 時間の露光後、フィルムを現像、定着、水洗、乾燥しバンドの解析を行った。

BSI の算出

BSI は、フィンガープリント解析の結果示された、個体間で共有するバンドの頻度を数値で表したものである。この値は、字式で示されるように、2 個体間で共有しているバンド数を 2 倍したものを、両方のバンド数の和により割ることにより算出する。

$$BSI = 2 Bab / (Ba + Bb) \times 100$$

(Bab: ab2 個体間で共有するフィンガープリントバンド数)

(Ba: a 個体のみで観察されたフィンガープリントバンド数)

(Bb: b 個体のみで観察されたフィンガープリントバンド数)

この結果、全てのバンドが共通していれば値は 1 となり、全く一致していなければ 0 となる。すなわち、1 に近ければ近いほど遺伝的な類似性が高く、0 に近ければ近いほど、遺伝的な類似性が低くなる。

結果

床潭沼における倍数体フナの構成

フローサイトメトリーによる相対 DNA 量の検討の結果、床潭沼には、大きく分けて 3 つの倍数性の異なる個体群が存在することが明らかになった。最も相対 DNA 量の低い個体群の相対 DNA 量を 140 とすると、他の個体群は 210 あるいは 280 の相対 DNA 量を示した(図 2 A-C)。相対 DNA 量の異なる個体別に、血液塗抹標本を観察した結果、赤血球細胞の大きさが異なることが明らかとなった(図 3)。最も少ない相対 DNA 量を持つ個体を 2 倍体とすると、210 の相対 DNA 量は 3 倍体、280 の相対 DNA 量を持つ個体は 4 倍体と推定された。2 倍体、3 倍体および 4 倍体の個体数は、それぞれ 36 (56.3%)、20 (31.3%)、6 (9.4%) 個体であった(表 1)。

また、これらの単一の相対 DNA 量のピークを示す個体以外に、相対 DNA 量のピークを 2 つ有する、モザイクと考えられる個体 2 尾 (3.1%) が検出された。一尾は、2 倍体を 140 とすると、相対 DNA 量が 215 と 280 の細胞を同時に有する個体であった(図 2 D)。この個体は、3 倍体細胞と 4 倍体細胞から成るモザイク個体と推察された。この個体は、以下で 3-4 モザイク個体と記す。もう 1 尾の血液細胞は、280 と 305 の相対 DNA 量を示した(図 2 E)。相対 DNA 量 280 と 305 を有する細胞は、140 を 2 倍体細胞とした場合、4 倍体と 4.4 倍体の細胞と考えられた。正 4 倍体と高 4 倍体の細胞を有することから、この個体は以下では 4-4 モザイクと記す。

倍数体のクローン性

フローサイトメトリーにより検出された 3 倍体と 4 倍体の中のクローン集団の存在を明らかにするために、各倍数体より DNA を抽出し、フィンガープリント法により遺伝的な解析を行った。解析を行った 18 個体の 3 倍体では、9 個体ずつがすべて同じパターンを示した(図 4)。一方、6 個体の 4 倍体は、全て同じフィンガープリント像を示した。倍数体の 2 クローンの形態的特徴を表わす、体高比(体高/標準体長×100)をクローン間で比較したところ、両者の平均と 99%信頼区間は 35.6 ± 1.31 と 31.8 ± 1.51 を示し、有為差が認められた。したがって、この 2 クローン間には形態的な差が存在すると考えられる。

2 倍体の集団では、全ての組み合わせでバンドのパターンが一致しなかった(図 5)。また、2 倍体個体で出現したフィンガープリントのバンドの共有率(BSI)を、2 倍体間、3 倍体の 1 クローン、4 倍体のクローン、2 種類のモザイク個体と比較した(表 2)。その結果、2 倍体はそれぞれ異なった遺伝子構成を持つと判断された。

4-4 モザイクから得られたフィンガープリント像は、4 倍体を示した像と同じであった。一方、

3-4 モザイクから得られたフィンガープリント像は，3倍体の一方の群が示すフィンガープリントのバンドをすべて含んでいることが明らかとなった（図6）。

考察

本研究の結果，床潭沼には，2倍体のフナが56.3%，3倍体が31.3%，4倍体が9.4%の割合で生息することが明らかとなった。また，3倍体は，2つの特徴あるフィンガープリント像を示し，2つの遺伝的に均一なクローン集団に分離できた。4倍体の6個体は，すべて同じフィンガープリント像を示した。この結果は，床潭沼で見い出された3，4倍体が，他の水系で見い出されている3倍体と同様，遺伝的に均一な子孫を生む雌性発生により生殖していることを示している。また，3倍体には少なくとも2集団以上の，4倍体には1集団以上の遺伝的に均一なクローン集団が含まれると考えられた。これらの整倍数体以外に，3，4倍性の2種類の細胞，正・高4倍性の2種類の細胞から構成されるモザイク個体が検出された。

小野里ら(1983)の研究によると，北海道には，倍数体のフナが広く分布し，しかも2倍体に比べ個体数の上で優勢であることが報告されている。また，4倍体は比較的限られた地域，主として北海道東部に出現している。床潭沼では，倍数体は数的には優勢ではなかったが，半数近くが倍数体であった。また，4倍体が道東域に多く見い出されるという結果とも合致した。したがって，4倍体の起源を解析するという点で，床潭沼は良い研究フィールドであると考えられる。一方，道東域に4倍体フナが多く分布することがどういう事を意味するかは目下不明である。

倍数性集団は，次の3つの過程を経て生じてきたものと考えられている（小野里ら，1983）。1）3倍体集団と4倍体集団はそれぞれ独自に別々の過程を通して2倍体集団から生じた。2）まず，2倍体集団から雌性発生をする4倍体集団が出現し，通常は卵形成の過程で減数することなく4倍体の卵を生じるが偶然に減数して2倍体の卵ができ，この2倍体卵から雌性発生をする3倍体集団が生じた。3）まず，2倍体集団から雌性発生をする3倍体集団が出現し，3倍性を維持した卵の雌性前核は通常精子核と融合することはないが偶然に精子と受精して4倍体集団が生じた。小野里ら(1983)は，3倍体が北海道全域にわたって普遍的に分布しているのに対し，4倍体が非常に限られた地点で見い出されないという結果から，2）の可能性が小さいものであると考えている。フナと同様に倍数体が存在することが知られているドジョウにおいても，各地で3倍体が見い出されている（Zhang and Arai, 1999; 堀江, 2001）。これらの3倍体ドジョウは，卵形成の過程で染色体の非還元を起こす2倍体由来であることが，実験的に示されている（堀江, 2001）。したがって，ドジョウでは3）の過程で3倍体が生じたと考えられる。今回，床潭沼で見い出された

3倍体フナが、どのように生じたかは、フィンガープリントによる2倍体との遺伝的比較からは明らかにならなかった。ドジョウと同様の生殖様式で生み出されるとするならば、2倍体の卵形成の過程を解析することが、3倍体の起源を考える上で重要となる。しかし、フナではこのような3倍体出現の例は知られていない。

一方、4倍体ではどうであろうか。前述のように、3倍体の卵の雌性前核が偶然に精子核と合体して4倍体を生じた可能性が報告されている（鳥沢，1979）。本研究で見い出された4倍体の起源は明らかではない。フィンガープリントの結果は、これらの4倍体が今回見い出された3倍体2つのクローンとは遺伝的な類縁関係を持たないことも示している。これらの4倍体の起源については考察できる状態ではない。しかし、3-4モザイク個体は、フィンガープリント解析の結果、今回見い出された3倍体ゲノムのうちフィンガープリントで認識される塩基配列をすべて有することが示された。従って、この個体は今回の3倍体クローンの一方から生じたことが強く示唆される。もし、この個体が、雌個体であり、雌性生殖で4倍性の卵を生むならば、鳥沢の報告する3倍体クローンの鱗を受容する4倍体が生じることになる。したがって、この3-4モザイク個体は、小野里ら（1983）の考える4倍体出現の一つの機構の傍流に位置付けることができるであろう。もし雄ならば、2倍体のフナ集団との交雑により、様々な遺伝的な多様性を有する4倍体が生じると予想される。今後、この個体の次世代を得ることで、4倍体の出現機構の一端が明らかになると考えられる。

本研究で見い出された4-4モザイクは、奇妙な存在である。このモザイクの示す2つの相対DNA量のピークのうち、一方が正倍数体としても、一方は高4倍性の異数体であることが予想される。一般に動物における異数性の細胞は、培養系では生残可能であるが、個体は致死であると考えられている。したがって、この個体が、その致死性を免れている理由が明らかではない。イワナにおいては、異数性と同様に致死性である半数体の細胞が含まれた生残性の個体（体長33.5cm）が見い出されている（Yamaki et al., 1999）。この個体では、血液、肝臓、脾臓に高い頻度で半数体細胞が含まれていたが、脳ではほとんど含まれていなかった。このことから、致死性の細胞が含まれていても、組織によっては個体の生残能力に影響を与えないのかもしれない。今回見い出された4-4モザイク個体の中で、異数性の細胞がどのように分布しているかは定かでない。モザイクイワナと同様、このモザイク個体は、一部の正倍数体の細胞により、異数性細胞による致死性を抑制しているのかもしれない。しかしながら、どのように異数性の細胞が発生の過程で生じたのかは明らかではない。それぞれのピークを示す細胞を分離し、フィンガープリント法などでその遺伝子解析を行うことで、その起源を明らかにすることができると考えられる。残念ながら、今

回のもザイク個体は、血液を採取したのち床潭沼に放流したため、その細胞構成、次世代の倍数性などは明らかにすることができなかった。

一方は雌性発生をする集団は、世代を経てもその遺伝子構成が変化しないことから、自然淘汰の影響を受けやすいと考えられている。今回フナで見い出されたもザイク個体は、雌性発生をする倍数体が、その遺伝子構成を少しずつ変化させている例かもしれない。

これまで、倍数体は染色体数の計数、赤血球の長径等の測定により同定されてきた。これらの方法は、試料の準備に時間がかかる上、必ずしも明確な答えを与えない。一方、フローサイトメトリーは、個々の細胞に含まれる DNA を相対的な量として測定することが可能である。その結果、微量な組織からでも、倍数性などが容易に検出される。また、今回の結果に示されるように、これまで明確にできなかった体細胞のもザイク状態も検出することができた。前述したように、もザイク個体から4倍体が生じたり、4倍体からいくつかの変異が生まれる可能性が考えられるので、今後もザイク個体を容易に検出できる本法が重要な位置を占めると考えられる。

以上のように、今回の厚岸町・床潭沼でのフナの集団解析は数多くの興味深い知見が明らかになった。今回の集団解析は、その倍数体、特に4倍体の起源を明らかにする予備調査として行われた。そして、フナにおける4倍体の起源の説明に関して、新たな可能性が示された。しかし、3倍体の起源に関しては何も明らかにならなかった。また、もザイク個体という起源の不明な個体も見い出された。今後、1) 2倍体集団のミトコンドリア DNA を解析することにより3倍体の起源となる個体の探索、2) その2倍体個体の次世代の検定、3) 4倍体の生じる可能性のあるもザイク個体の次世代の検定、そして、4) もザイク個体の出現機構の解明などを明らかにして行く必要があると考えられる。

厚岸町の床潭沼は、このような研究を進めて行く上で、倍数体が高頻度で出現するという点、保護水面である点で非常に適したフィールドである。床潭沼は、ヒブナの存在により天然記念物に指定された。厚岸町に近い釧路の春採湖ヒブナにも3倍体が存在することが報告されている(鳥沢, 私信)。その意味で、床潭沼に生息するヒブナの倍数体の起源も興味あるところである。

謝辞

本研究を進めるにあたり，厚岸町からは厚岸湖別寒辺牛湿原学術研究補助金の助成をいただくとともに，天然記念物である床潭沼でのフナの採捕許可，漁業センターの使用許可をいただいた．また，厚岸町水産課技師の武山悟氏には，フナの採集を多くの面でお手伝いをいただいた．教育委員会の熊崎農夫博氏，水鳥観察館の渋谷辰生氏には，調査に至るまで多大なご足労を賜わった．記してお礼申し上げます．

フナ集団の解析には，北海道大学大学院水産科学研究科育種生物学講座 荒井克俊教授をはじめとし，大学院博士後期課程の森島輝君，大谷哲君，博士前期課程の堀江晋君，南昌芳君，田中稔君，藤本貴史君，そして，実際に実験を推進した大嶋耕造君にお世話になった．また，所属する北海道大学水産学部附属七飯養魚実習施設の木村志津雄技官，西田千賀子さんには，研究の遂行，取りまとめにお手伝いをいただいた．記して感謝の意を表する．

参考文献

- Cherfas, N.B. (1966) Natural triploidy in females of the unisexual form of silver carp (*Carassius auratus gibelio* Blach). *Genetika*, 5:16-24.
- 長谷部 優 (1992) 2倍体および3倍体フナの遺伝的類縁関係．北海道大学大学院水産学研究所修士論文．92p.
- 堀江 晋 (2001) ドジョウの倍数体の分布，生殖，起源および育種特性に関する研究．北海道大学大学院水産科学研究科修士論文．50p.
- 小林 弘，川島康代，竹内直政 (1970) フナ属魚類の染色体の比較研究，特にギンブナに現われた倍数性について．*魚雑*．17: 153-160.
- 小林 弘 (1971) 3倍体ギンブナの gynogenesis に関する細胞学的研究．*動物学雑誌*．80: 316-322.
- 小林 弘，越智尚子 (1972) キンブナとドジョウの精子の媒精により生じた3倍体ギンブナの仔魚の染色体について．*動物学雑誌*．81:67-71.
- 小林 弘，越智尚子，竹内直政 (1973) フナ属魚類の染色体の比較研究 (続報); 特にニゴロブナ，ナガブナ，ギンブナについて．*魚雑*，20: 7-12.
- 小林 弘 (1976) 3倍体ギンブナの卵形成における成熟分裂の細胞学的観察．*魚雑*．22: 234-240.
- 小林 弘，中野和枝，中村 守純 (1977) キンブナ雄との交配により生じた4倍体ギンブナの仔魚とその染色体について．*日本水産学会誌*，43: 31-37.
- 中村 守純 (1969) 日本のコイ科魚類 (日本産コイ科魚類の生活史に関する研究)．*資源科学シリ*

ーズ 4, 資源科学研究所, 東京 455pp., 149pls.

中西 照幸 (1992) クローンギンブナを用いた免疫学・遺伝学研究. 細胞工学. 11, 569-574.

鳥沢 雅 (1979) 北海道産フナ *Carassius auratus* の倍数性とクローン構成に関する遺伝学的研究.
63p. 昭和 55 年度北海道大学水産学部修士論文

小野里坦 (1981) 魚類の雌性発生. 水産育種. 6: 11-18.

小野里坦, 鳥沢雅, 草間政幸 (1983) 北海道に於ける倍数体フナの分布. 魚雑. 30: 184-190.

Yamaki, M., Kawakami, K., Taniura, K. and Arai, K. (1999) Live haploid-diploid mosaic charr *Salvelinus leucomaenis*. Fisheries Sci., 65: 736-741.

山下正兼, 長浜嘉孝 (1992) 魚類卵成熟および受精の分子機構. 細胞工学. 11: 583-592.

Yamashita, M., Onozato, H., Nakanishi, T. and Nagahama, Y. (1991) Breakdown of the sperm nuclear envelope is a prerequisite for male pronucleus formation: direct evidence from the gynogenetic crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*. Dev. Biol., 137: 155-160.

Zhang, Q. and Arai, K. (1999) Distribution and reproductive capacity of natural triploid individuals and occurrence of unreduced eggs as a cause of polyploidization in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Ichthyol. Res. 46, 153-161.

表1 . 床潭沼に生息するフナ倍数体の頻度とその体長

倍数体	個体数	頻度 (%)	最小体長 (cm)	最大体長 (cm)	平均体長 (cm)
2倍体	36	56.3	6.2	14.7	10.9
3倍体	20	31.3	3.2	14.2	9.2
4倍体	6	9.4	9.4	12.1	10.6
3-4モザイク	1	1.6	1.6	11.6	11.6
4-4モザイク	1	1.6	1.6	11.2	11.2

表2 . 床潭沼で採集された2倍体、3-4モザイク、4-4モザイク、3倍体、4倍体フナ個体間のBSI.

	4n	3n	4-4モザイク	3-4モザイク	2n-1	2n-2	2n-3	2n-4	2n-5	2n-6	2n-7	2n-8	2n-9	2n-10	2n-11	2n-12	2n-13	2n-14	2n-15	2n-16	2n-17	2n-18	2n-19	2n-20
4n	1.000	0.480	1.000	0.593	0.490	0.654	0.627	0.596	0.478	0.577	0.571	0.500	0.531	0.556	0.577	0.549	0.520	0.565	0.618	0.680	0.760	0.679	0.449	0.531
3n		1.000	0.480	0.875	0.372	0.348	0.444	0.439	0.350	0.478	0.372	0.381	0.558	0.500	0.435	0.400	0.591	0.450	0.612	0.500	0.545	0.596	0.372	0.419
4-4モザイク			1.000	0.593	0.490	0.654	0.627	0.596	0.478	0.577	0.571	0.500	0.531	0.556	0.577	0.549	0.520	0.565	0.618	0.680	0.760	0.679	0.449	0.531
3-4モザイク				1.000	0.426	0.520	0.612	0.489	0.455	0.520	0.468	0.435	0.553	0.654	0.600	0.449	0.708	0.545	0.679	0.583	0.708	0.627	0.468	0.553
2n-1					1.000	0.711	0.636	0.500	0.615	0.756	0.571	0.585	0.619	0.638	0.622	0.636	0.512	0.667	0.500	0.651	0.465	0.609	0.667	0.714
2n-2						1.000	0.723	0.558	0.619	0.583	0.756	0.636	0.533	0.680	0.750	0.681	0.609	0.619	0.627	0.696	0.652	0.612	0.578	0.622
2n-3							1.000	0.524	0.634	0.681	0.636	0.558	0.591	0.735	0.681	0.652	0.711	0.780	0.680	0.711	0.711	0.750	0.545	0.682
2n-4								1.000	0.541	0.605	0.550	0.564	0.700	0.622	0.558	0.619	0.537	0.486	0.609	0.634	0.537	0.636	0.500	0.600
2n-5									1.000	0.667	0.564	0.684	0.513	0.636	0.667	0.585	0.500	0.667	0.533	0.500	0.500	0.651	0.513	0.513
2n-6										1.000	0.667	0.636	0.711	0.760	0.625	0.766	0.609	0.714	0.627	0.609	0.565	0.735	0.622	0.667
2n-7											1.000	0.732	0.619	0.681	0.711	0.727	0.512	0.615	0.625	0.651	0.651	0.609	0.619	0.714
2n-8												1.000	0.585	0.652	0.682	0.651	0.619	0.526	0.638	0.476	0.524	0.578	0.537	0.585
2n-9													1.000	0.723	0.578	0.636	0.698	0.667	0.625	0.651	0.558	0.696	0.667	0.714
2n-10														1.000	0.720	0.735	0.750	0.636	0.717	0.667	0.667	0.706	0.681	0.681
2n-11															1.000	0.809	0.696	0.571	0.627	0.652	0.696	0.694	0.756	0.667
2n-12																1.000	0.622	0.585	0.720	0.667	0.622	0.750	0.727	0.545
2n-13																	1.000	0.650	0.653	0.591	0.636	0.681	0.558	0.698
2n-14																		1.000	0.622	0.650	0.700	0.744	0.564	0.769
2n-15																			1.000	0.694	0.694	0.846	0.583	0.625
2n-16																				1.000	0.818	0.681	0.651	0.651
2n-17																					1.000	0.681	0.558	0.605
2n-18																						1.000	0.652	0.696
2n-19																							1.000	0.714
2n-20																								1.000

図 1 . 厚岸町に床潭沼でのフナの採集と試料の収集

- A . 床潭沼におけるフナの採集位置 (赤の矢印) .
- B . 実際のフナ採集位置 (黄色の楕円内にトラップを設置した) .
- C . 設置したトラップを組み立てた図 . 左手に持っているのがフロート () で , 水面に浮いてトラップの位置がわかる .
- D . トラップで採集されたフナ . がトラップの入口
- E . 血液サンプルの採取 . 魚 (ここではドジョウ) の尾柄部から注射針を差し込み , 背大静脈から血液を採取する . この方法だと魚を殺すことがない .
- F . 採取した血液の保存 . 血液を培養液あるいは抽出液に懸濁する . この試料から個々体の DNA 量を測定あるいは DNA そのものを抽出する .

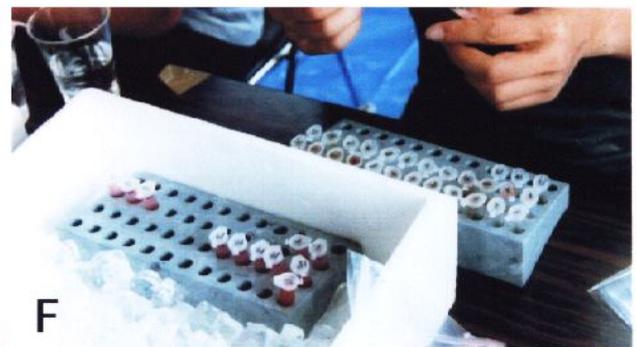
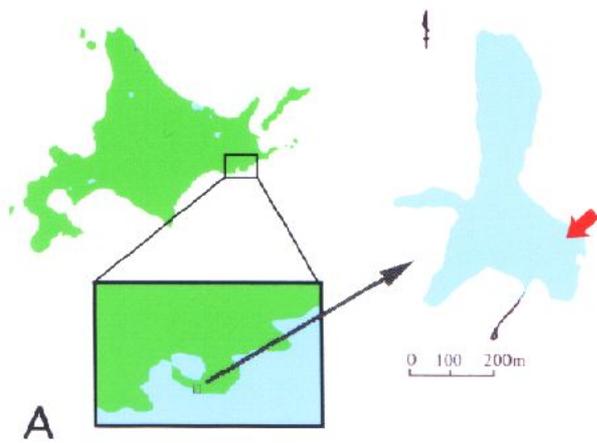


図 2 . フローサイトメトリーによる相対 DNA 量の測定

A . 140 の相対 DNA 量を示す 2 倍体と考えられる個体 .

B . 210 の相対 DNA 量を示す 3 倍体と考えられる個体 .

C . 280 の相対 DNA 量を示す 4 倍体と考えられる個体 .

D . 215 と 280 の 2 つの相対 DNA 量を示す 3-4 倍体モザイクと考えられる個体 .

E . 280 と 305 の 2 つの相対 DNA 量を示す 4-4.4 倍体モザイクと考えられる個体 .

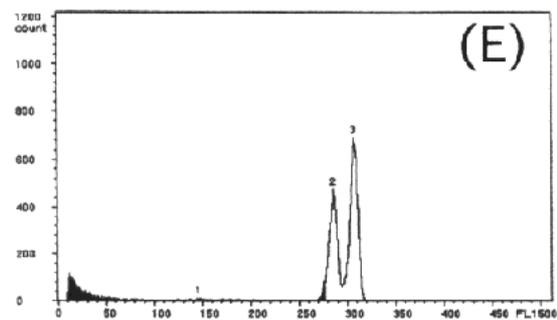
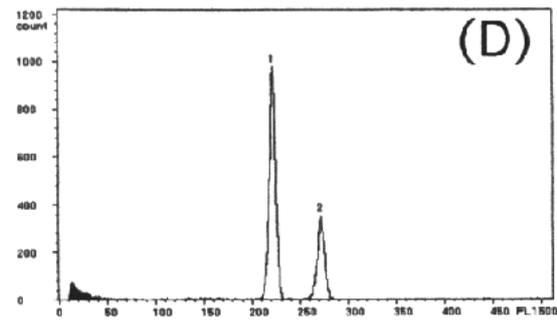
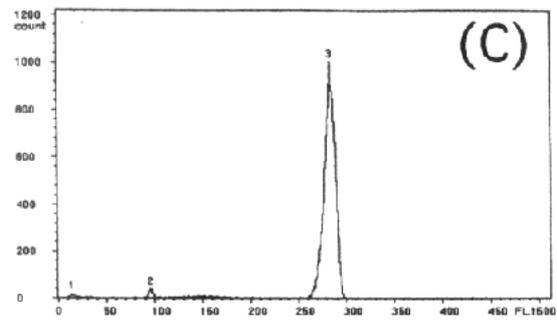
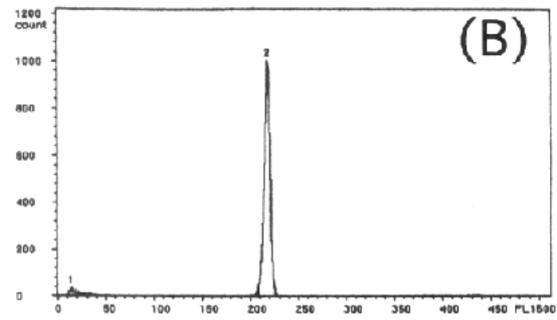
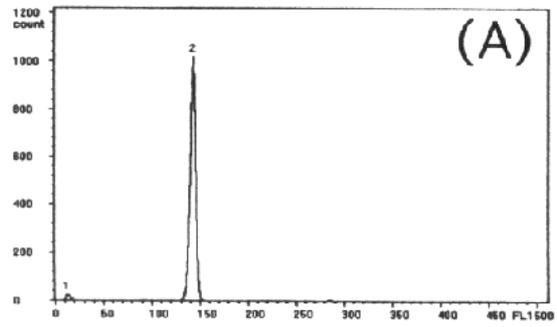
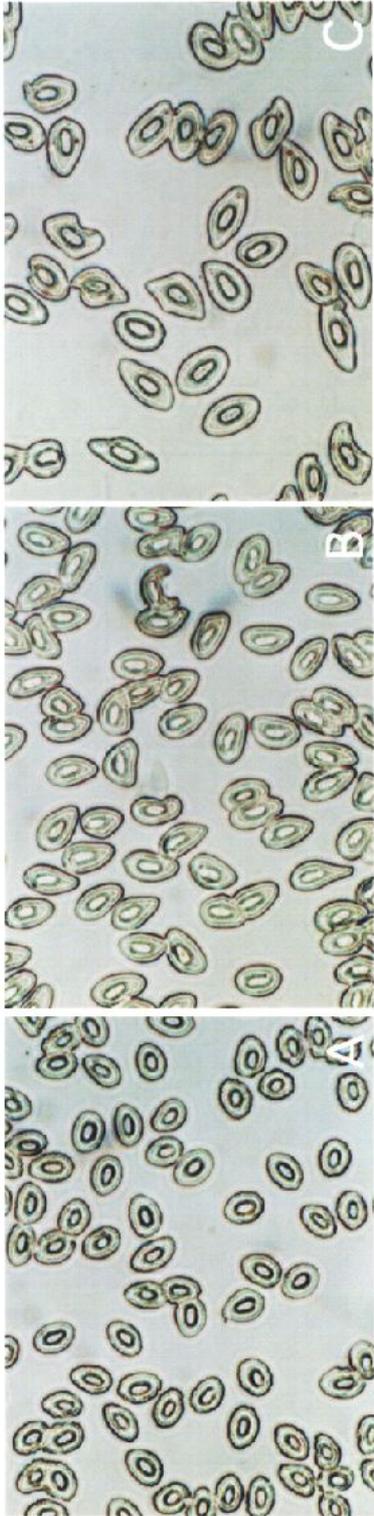


図 3 . 床潭沼で採集されたフナの赤血球標本

相対 DNA 量の少ない個体から採集された赤血球ほどの大きさ。



— 20 μm

図4. 3 , 4 倍体のフィンガープリント像

3 倍体の個体の中にはAとBで示した2種類のバンド像を 4 倍体個体はすべて同じバンド像を示していることに注意 .

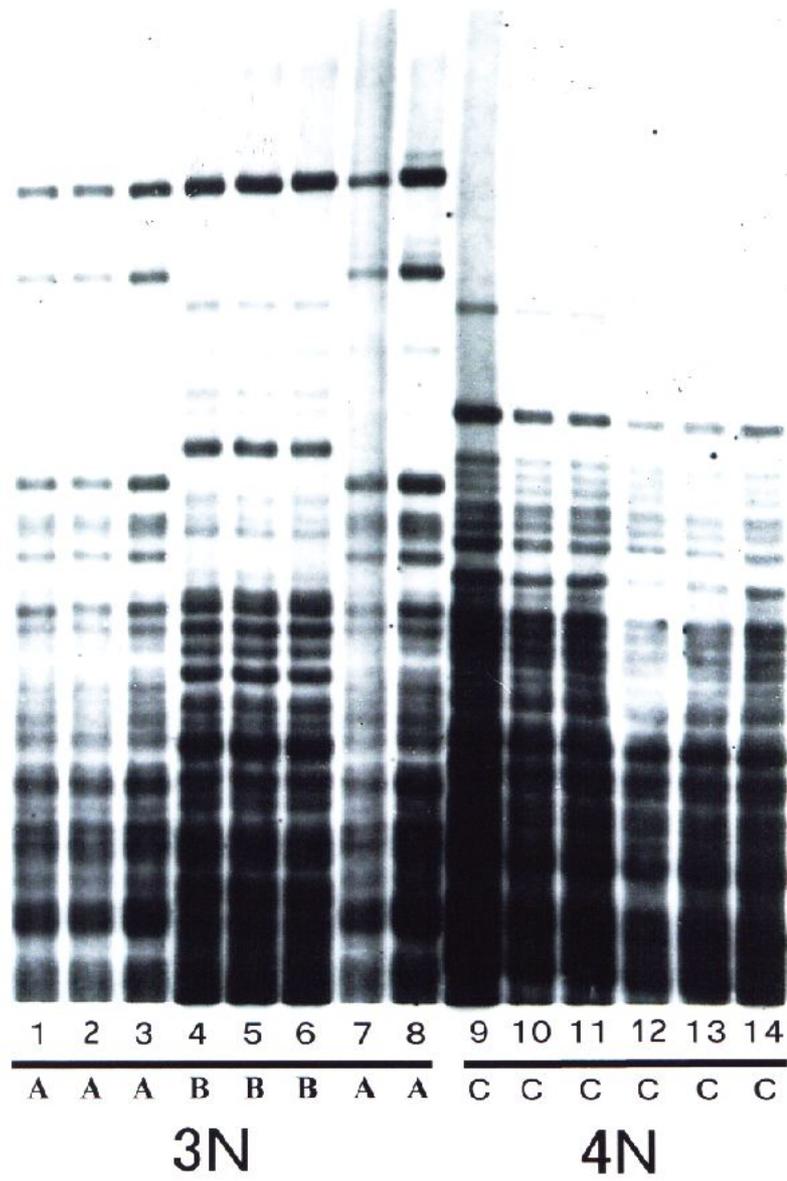
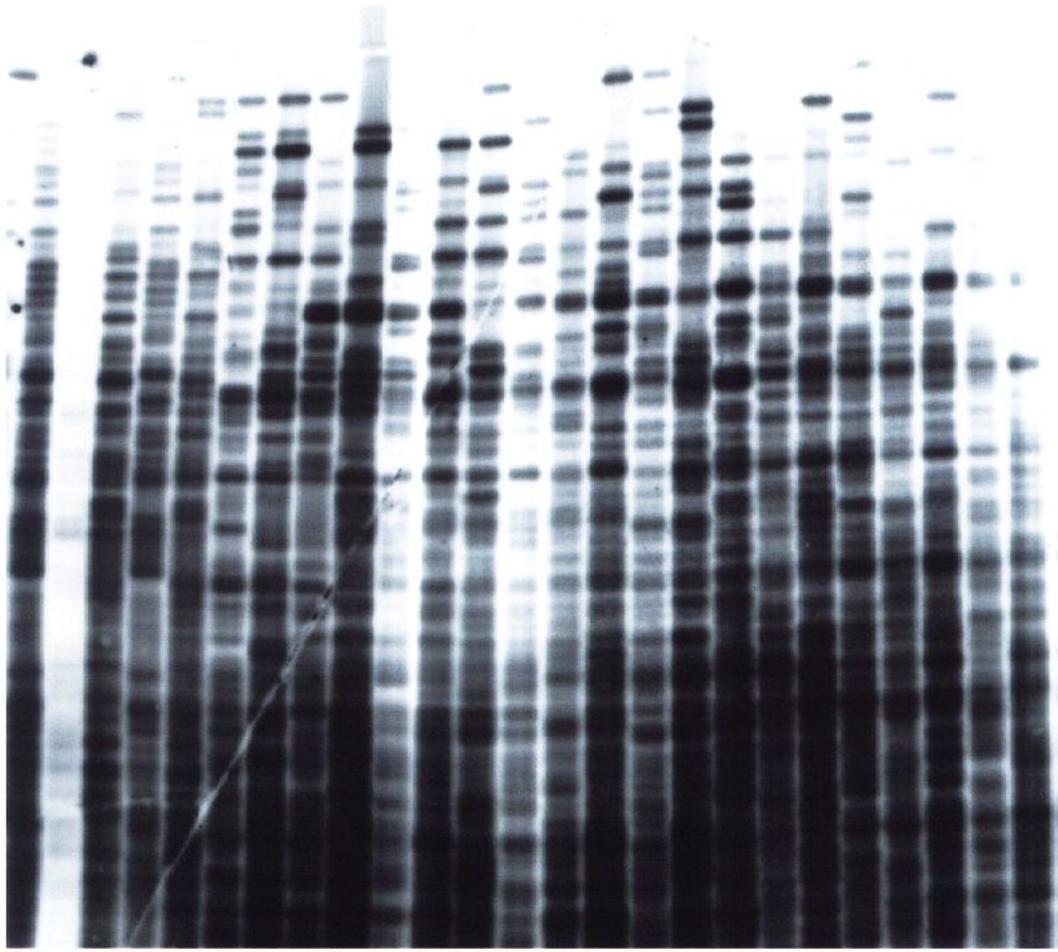


図5 . 2倍体、3-4、4-4モザイク個体と3 , 4倍体のフィンガープリント像の比較

2倍体のフィンガープリント像は個体間で同じものが見つからないことに注意 .



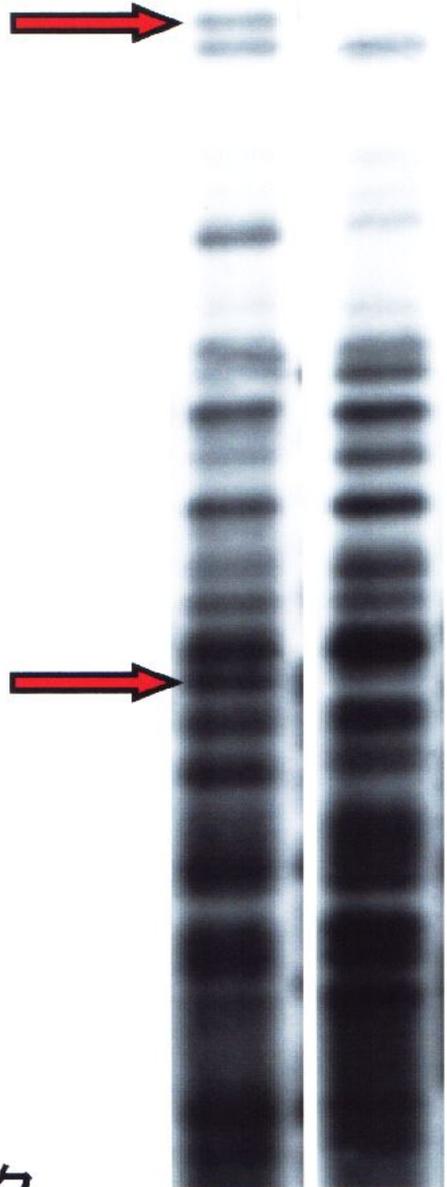
$4n$
 $3nB$
 $3nA$
 $4-4E$ がイク
 $3-4E$ がイク

2nグループ

図6 . 3-4 モザイク個体と3倍体のフィンガープリント像の比較

3-4 モザイク個体フィンガープリント像には3倍体のバンドがすべて含まれていることに注意 .

赤の矢印で示されたバンドが新たに出現しているバンド .



3-4モザイク

3倍体