

カネヒラ（タナゴ亜科魚類）における ロバートソン型転座を伴った染色体多型

上 田 高 嘉

宇都宮大学教育学部紀要
第65号 第2部 別刷
平成27年（2015）3月

Chromosomal polymorphisms with Robertsonian translocation
in the flat bitterling (Pisces, Acheilognathinae)

UEDA Takayoshi

カネヒラ（タナゴ亜科魚類）における ロバートソン型転座を伴った染色体多型

Chromosomal polymorphisms with Robertsonian translocation in the flat bitterling (Pisces, Acheilognathinae)

上田 高嘉
UEDA Takayoshi

Karyotypes of *Acheilognathus rhombeus* from the Imjin River, the Han River, the Geum River, the Mongyong River, the Dongjin River, the Tamjin River and the Nakdong River in South Korea were comparatively examined, using C-, CMA₃-, Ag- and B-banding techniques, in order to enrich the knowledge of karyotype evolution in Acheilognathine fishes. Chromosome slides were prepared from the kidney and the fin cells of fishes or the embryo (around the gastrula stage) cells. Diploid and androgenic haploid karyotypes were analysed.

Interindividual chromosomal variations, namely 44 (14M+14SM+16ST), 45 (13M+14SM+18ST), 46 (12M+14SM+20ST) and 47 (11M+14SM+22ST) in diploid numbers, were observed. Because all karyotypes had the same FN (fundamental arm number), 74, the chromosomal variations are explicable as a result of Robertsonian translocation through the chromosomal differentiation. It was presumed that between two M pairs and four ST pairs were concerned with these chromosomal changes, and that the gametes with 22 chromosomes were formed from the fish with $2n=44$, those with 22 and 23 chromosomes from the fish with $2n=45$, those with 22, 23 and 24 chromosomes from the fish with $2n=46$ and those with 23 and 24 chromosomes from the fish with $2n=47$.

It is not clear whether these translocations would be due to the centric fusion or the centric fission. Judging from the facts that there was no acrocentric chromosome in all karyotypes, some M had large C-bands at the centromeric region and the characteristic B-bands at the centromeric region were observed, the inactivation or the activation of the centromere could have been caused in these changes. Future analyses of base compositions in the centromeric region and so on would make this speculation clear.

キーワード：タナゴ亜科魚類、カネヒラ、*Acheilognathus rhombeus*、核型進化、ロバートソン型転座、構成的異質染色質、C-バンド

タナゴ亜科魚類は東アジアを中心に世界に約60種／亜種が生息する (Froese and Pauly, 2008)¹⁾。いずれも二枚貝に産卵するという特異な習性を持ち、その一生を淡水中で過ごす。多数の共有派生形質と特異な産卵生態からタナゴ亜科の単系統性が支持されるが、タナゴ亜科内の系統類縁関係は明確ではない。タナゴ亜科をいくつかの属に分けるのかには議論が残されているが、私は取りあえ

ず、Arai and Akai (1988)²⁾による*Acheilognathus*、*Rhodeus*および*Tanakia*の3属分類に従っている。ミトコンドリアDNA塩基配列の比較に基づく系統解析から*Acheilognathus*の単系統性は支持されるが、*Rhodeus*と*Tanakia*の単系統性は明確ではない(Okazaki et al., 2001³⁾; Kawamura et al., 2014⁴⁾)。

タナゴ亜科の通常のギムザ染色による核型については、日本産 (Ojima, Hayashi and Ueno, 1972⁵⁾; 小島・上野・林, 1973⁶⁾)、中国産 (Yu et al., 1987⁷⁾; Arai, Suzuki and Akai, 1988⁸⁾; Arai, Akai and Suzuki, 1992⁹⁾) および韓国産 (Lee, So and Kim, 1982¹⁰⁾; Lee et al., 1983¹¹⁾; Lee, 1983¹²⁾; Ueno and Ojima, 1984¹³⁾) の報告がある。染色体数は $2n=42$ から48 (*Acheilognathus*では42あるいは44、*Rhodeus*では46あるいは48、*Tanakia*では48) であった。染色体バンディングについては、日本産6種/亜種のAg-バンド (Takai and Ojima, 1986¹⁴⁾; Inafuku et al., 2000¹⁵⁾; Kikuma et al., 2000¹⁶⁾)、*A. macropterus* (Hong and Zhou, 1985a¹⁷⁾) および*R. ocellatus* (Kikuma et al., 2000¹⁶⁾) のDNA複製-バンド、*R. ocellatus*のB-バンド (Ueda and Naoi, 1999¹⁸⁾)、などの報告がある。さらに、5S rDNAをプローブとしたFISH (*in situ* hybridization) 分析が*R. ocellatus*および*A. tabira* (Inafuku et al., 2000¹⁵⁾; Kikuma et al., 2000¹⁶⁾) で、18S rDNAをプローブとしたFISH分析が*R. ocellatus kurumeus*および*T. limbata* (Sola et al., 2003¹⁹⁾) でなされた。また、中国産および韓国産6種/亜種のC-バンドおよびAg-バンド分析から、ロバートソン型転座、逆位、縦列結合等の関わるタナゴ亜科の染色体進化の融通性について考察された (Ueda, Naoi and Arai, 2001)²⁰⁾。

Takai and Ojima (1986)¹⁴⁾はNORs (染色体上の仁形成部位) は魚類の種分化や系統進化を論じる上で重要なマーカーであるとした。上田 (2013)²¹⁾は亜種内にNORsの多型を認め、タナゴ亜科においては種内および種間の多型が一般的であるとして、NORsの関わる核型進化のしくみについて検討を行った。また、NORsを持つ染色体の変異とも関係するが、以前から核型変化には構成的異質染色質が大きく関与するとされ、染色体上の構成的異質染色質に対応するC-バンドは核型進化を考える上で極めて重要であり、サケ科魚類においても多くの情報を提供している (上田, 1993)²²⁾。

本論では、科学研究費補助金による研究の一環で韓国7河川から採集できたカネヒラについて、C-バンドを中心にAg (銀)、CMA₃ (クロモマイシン A₃) およびB-バンド染色法を適用して核型分析を行い、韓国産カネヒラ種内の核型の変化について検討を行った。

材料および方法

韓国の臨津江 (Imjin River)、漢江 (Han River)、錦江 (Geum River)、萬頃江 (Mongyong River)、東津江 (Dongjin River)、耽津江 (Tamjin River) および洛東江 (Nakdong River) の7河川から採集されたカネヒラ*Acheilognathus rhombeus* (コイ科、タナゴ亜科魚類) を用いて染色体標本を作製した (Fig. 1)。

成魚の腎臓細胞、鱗細胞および人工授精によって得られた原腸胚細胞を用いて、Ueda (1986)²³⁾ およびUeda et al. (1991²⁴⁾, 1997²⁵⁾) の方法を多少改良して空気乾燥染色体標本を作製した。二倍体標本に加えて、卵への紫外線照射による雄性発生胚から半数体標本の作製も行った。標本には通常のギムザ染色を行った。染色体の分類はLevan, Fredga and Sandberg (1964)²⁶⁾の方法に従った。

また、染色体分染法も適用した。Sumner (1972)²⁷⁾のBSG法を多少改良した方法によってC-バンド染色を施した。G-C (グアニン-シトシン) に富む染色体部位を特定する方法として、Phillips and Hartley (1988)²⁸⁾の方法に従ってCMA₃による蛍光染色を行い、Howell and Black (1980)²⁹⁾の

方法に従ってAg染色を行った。さらに、B-バンド染色 (Ueda and Naoi, 1999)²⁰⁾も試みた。

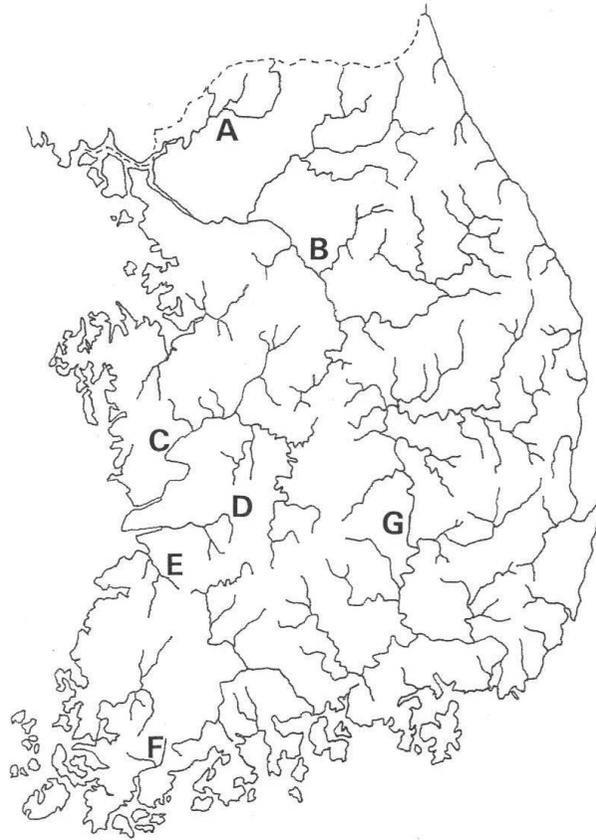


Fig. 1. Localities in South Korea. The Imjin River (A), the Han River (B), the Geum River (C), the Mongyong River (D), the Dongjin River (E), the Tamjin River (F) and the Nakdong River (G).

結果

各採集河川における染色体数の結果をTable 1に示した。

耽津江産では、雌雄ともに $2n=44:14M$ (メタセントリック染色体) + $14SM$ (サブメタセントリック染色体) + $16ST$ (サブテロセントリック染色体) であった。その他の採集河川では、耽津江産と同じ $2n=44$ の個体の他に、 $2n=45$ ($13M+14SM+18ST$) の個体が臨津江、漢江、錦江、萬頃江および東津江産で、 $2n=46$ ($12M+14SM+20ST$) の個体が臨津江および萬頃江産で、 $2n=47$ ($11M+14SM+22ST$) の個体が漢江産で確認された (Table 1; Figs. 2および3)。 $2n=44\sim47$ のFN値 (fundamental arm number) はいずれも74であった。また、いずれの核型にもアクロセントリック染色体の存在は認められなかった。

錦江の $2n=44$ (雌) と $2n=45$ (雄) の交配から得られた個体 (胚) は $2n=44$ か $2n=45$ であった (Table 1)。臨津江、錦江および萬頃江産の $2n=45$ 雄の精子からの雄性発生胚は $n=22$ か $n=23$ であった (Table 1)。洛東江産での雄性発生胚では $n=22$ と $n=23$ の個体が認められているが (Table 1)、その親となる雄の染色体数は確認できなかった。東津江産において雄性発生胚10個体は全て $n=22$ であった

が、この親の核型は確認できなかった。

$2n=46$ (雄) および $2n=47$ (雌) からは精子あるいは卵を採取できなかった。

Fig. 4に $2n=45$ のC-バンドを示した。全ての動原体部に濃染が認められた。4対以上のMおよびSMの動原体部のバンドは大きく際だって観察された。1番STの長腕の中間部に濃染が認められたが、この部位はCMA₃染色によっても明るいバンドが観察された (Fig. 4)。CMA₃染色では5番STの短腕部にもバンドが認められたが、この部位はAg染色でも濃染された (Fig. 4)。Ag-バンドはTakai and Ojima (1986)¹⁴⁾に一致し、この部位はNORsと考えられた。

B-バンド染色によって時折極めて伸張した染色体が観察されることがあるが、数本のMあるいはSMには動原体部が細く長く伸びた特徴的な像が認められた (Fig. 5)。転座との関連が示唆された。

Table 1. Diploid or haploid chromosomal numbers of the flat bitterling *A. rhombeus* in each locality in South Korea.

Locality	Tissue	Sex	No. of chromosome	No. of individual
Imjin River	Kidney	Female	$2n=44$	1
	Kidney	Male	$2n=45$	1
	Fin	Female	$2n=46$	1
	Embryo (Androgenesis)*	?	$n=22$	12
	Embryo (Androgenesis)*	?	$n=23$	22
Han River	Kidney	Female	$2n=45$	1
	Kidney	Female	$2n=47$	1
Geum River	Kidney	Female	$2n=44$	2
	Kidney	Male	$2n=45$	3
	Embryo	?	$2n=44$	3
	Embryo	?	$2n=45$	3
	Embryo (Androgenesis)*	?	$n=22$	8
	Embryo (Androgenesis)*	?	$n=23$	7
Mongyong River	Kidney	Male	$2n=45$	1
	Kidney	Male	$2n=46$	1
	Embryo (Androgenesis)*	?	$n=22$	10
	Embryo (Androgenesis)*	?	$n=23$	7
Dongjin River	Fin	Male	$2n=45$	1
	Embryo (Androgenesis)*	?	$n=22$	10
Tamjin	Kidney	Female	$2n=44$	1
	Kidney	Male	$2n=44$	1
	Kidney	?	$2n=44$	1
	Embryo (Androgenesis)*	?	$n=22$	15
Nakdong River	Kidney	Female	$2n=44$	1
	Kidney	?	$2n=44$	3
	Embryo (Androgenesis)*	?	$n=22$	11
	Embryo (Androgenesis)*	?	$n=23$	9

* Embryos were obtained from artificial androgenesis with UV-irradiated eggs of the rose bitterling *Rhodeus ocellatus ocellatus*.



Fig. 2. Two conventional Giemsa stained karyotypes of *Acheilognathus rhombeus*.
 a : $2n=44$ (14M+14SM+16ST). b : $2n=45$ (13M+14SM+18ST).

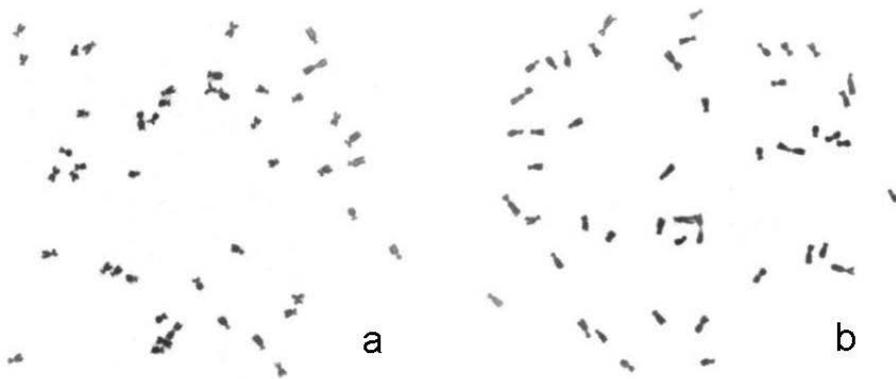


Fig. 3. Two metaphase figures of *A. rhombeus*. a : $2n=46$ (12M+14SM+20ST).
 b : $2n=47$ (11M+14SM+22ST).

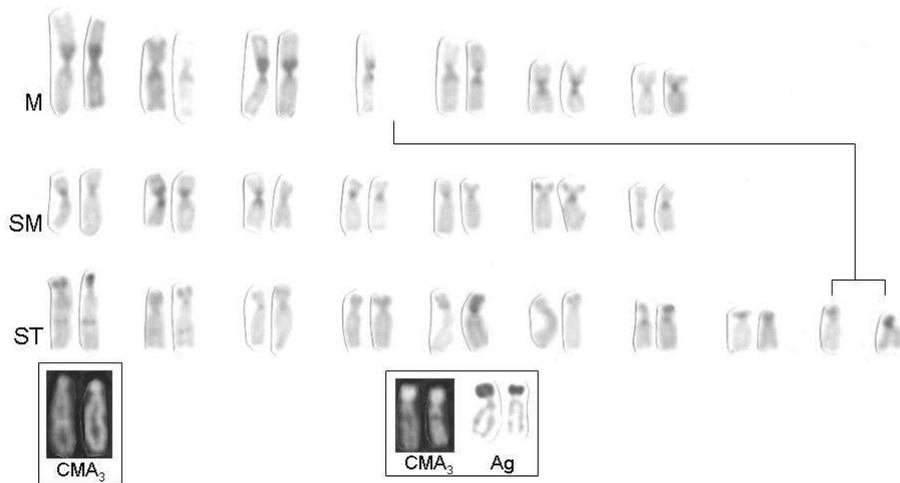


Fig. 4. A C-banding karyotype of *A. rhombeus*. $2n=45$ (13M+14SM+18ST). CMA₃-banded 1st ST and 5th ST, and Ag-banded 5th ST are shown in two squares. Robertsonian translocation between one M and two ST with the intense C-band on the whole of the short arm are speculated.

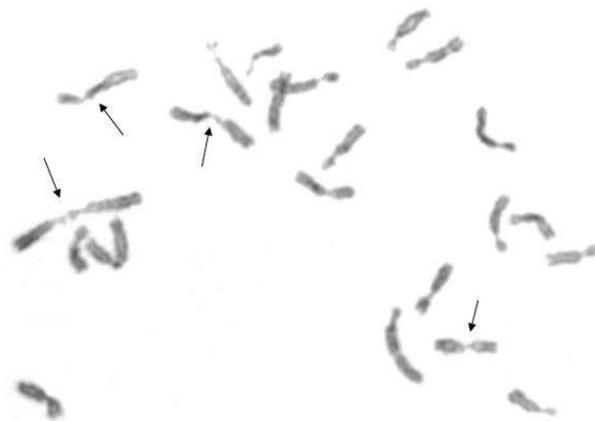


Fig. 5. A B-banded haploid ($n=22$) metaphase figure from androgenic embryo of *A. rhombeus*. Arrows indicate some centromeric regions of M/SM with characteristic long shape.

考察

カネヒラが属する *Acheilognathus* では、唯一 *A. gracilis* の $2n=42$ (Hong and Zhou, 1985b)³⁰⁾ を除いては $2n=44$ の報告だけであった。Hong and Zhou (1985b)³⁰⁾ はこの $2n=44$ から $2n=42$ の変化をロバートソン型融合として説明した。本研究では、カネヒラ *A. rhombeus* において $2n=44$ 、 45 、 46 および 47 の染色体多型が認められた。いずれも FN 値が 74 であり、ロバートソン型転座が関与した染色体変化と考えられる。

$2n=44$ と $2n=45$ の染色体変化について、核型変化には構成的異質染色質が大きく関与すると考えられるので C-バンドを中心に検討し、4番Mと短腕全体がC-バンド濃染のSTが関与するロバートソン型転座によるものと推定された (Fig. 4)。ロバートソン型転座の融合か切断かの方向性である

が、 $2n=45$ 、 46 および 47 が他のタナゴ亜科の $2n=48$ から*Acheilognathus*の 44 へ進化する途上の結果なのか、一旦 $2n=44$ のカネヒラに進化した後の染色体切断による多型なのかは明言することはできない。染色体融合であった場合、2つの動原体が生じ細胞分裂に支障を来す恐れから2本のSTの一方の動原体部の欠失を伴う必要があると考えられる。ここで、チンパンジーからヒトへの染色体変化を参考にしてみたい。チンパンジーの12番と13番染色体が端部で結合してヒトの2番染色体に変化したとされる(Yunis and Prakash, 1982³¹⁾; Wienberg et al., 1994³²⁾)。その際に13番染色体の動原体の不活性化を伴ったという。13番染色体の動原体の不活性化により二動原体染色体が形成されることなく、進化を可能にしたと考えられる。本研究では転座に伴う明確な動原体部の欠落は認められず、カネヒラの場合も動原体部の不活性化を伴う染色体変化の可能性が考えられる。4対以上のM/SMに観られた大きなC-バンド濃染、B-バンドで観られた動原体部の細長く伸長した特徴的な像はこの推論を支持するものかもしれない。こう考えると、動原体部が新たに付け加わることなく、逆に動原体が活性化されるとすれば、カネヒラの場合、染色体切断による核型変化の可能性も想定できる。これらを明確にするには動原体部の塩基組成の検討が不可欠である。

耽津江産では、雌雄ともに $2n=44$ であり、雄性発生個体はすべて $n=22$ であったことから、雌雄ともに $n=22$ の配偶子を形成し、 $2n=44$ のみの集団であると考えられる。

錦江産では、雌雄で $2n=44$ と $2n=45$ とに分かれ、人工授精からは 44 と 45 の個体が生じ、雄性発生胚の分析から雄は $n=22$ か $n=23$ の精子を形成することが推定される。

この2型が性と関係し、 $n=22$ の卵を形成する $2n=44$ の雌と $n=22$ か $n=23$ の精子を形成する雄からなる集団であるかに見える。臨津江および萬頃江産の結果もこの可能性を裏付けているようにも思える。しかし、漢江産で $2n=45$ の雌が確認されたこと、またUeno and Ojima (1984)¹³⁾は錦江産に $2n=44$ の雄1個体を観察しており、さらに本研究において臨津江で $2n=46$ 雌、漢江で $2n=47$ 雌が存在したこともあり、性染色体の存在の可能性を断定するには分析個体数を増やすなど詳細な検討が必要である。

本研究で確認されたロバートソン型転座によるカネヒラの染色体多型が維持されるしくみであるが、ニジマス (rainbow trout) の $2n=60, 61, 62, 63$ および 64 のロバートソン型転座による多型(Ueda and Ojima, 1986)³³⁾と同様ではないかと考えている。すなわち、2対のMと4対のSTがこの転座に関与し、 $2n=44$ 個体は $n=22$ の、 $2n=45$ 個体は $n=22$ あるいは 23 の、 $2n=46$ 個体は $n=22, 23$ あるいは 24 の、 $2n=47$ は $n=23$ あるいは 24 の配偶子を形成するものと考えられる。 $2n=48$ のカネヒラは未だ確認されていないが、恐らく存在し、 $n=24$ の配偶子を形成するのであろう。

要約

韓国の臨津江、漢江、錦江、萬頃江、東津江、耽津江および洛東江産のカネヒラ*Acheilognathus rhombeus*の核型分析が行われた。成魚の腎臓細胞、鱗細胞および人工授精によって得られた二倍体、雄性発生半数体の原腸胚細胞を用いて、空気乾燥染色体標本を作製し、通常のギムザ染色を行った。また、C-バンド染色を中心にCMA₃蛍光染およびAg染色、さらにB-バンド染色を施した。 $2n=44$ (14M+14SM+16ST)、 45 (13M+14SM+18ST)、 46 (12M+14SM+20ST) および 47 (11M+14SM+22ST) の多型が観察された。FN値はいずれも74であり、ロバートソン型転座による多型と考えられた。いずれの核型にもアクロセントリック染色体の存在は認められなかった。2対のMと4対のSTがこの転座に関与し、 $2n=44$ 個体は $n=22$ の、 $2n=45$ 個体は $n=22$ あるいは 23 の、 $2n=46$

個体は $n=22$ 、23あるいは24の、 $2n=47$ は $n=23$ あるいは24の配偶子を形成しながら多型が維持されているものと推定された。

謝辞

本研究に用いた材料の採集には、祥明大学校（韓国）の田祥麟名誉教授に一方ならずお世話いただきました。本研究の一部は科学研究費補助金(B(2)10041156, B(1)12575009)により行いました。ここに厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) R. Froese and D. Pauly, World Wide Web electronic publication. URL : <http://www.fishbase.org> (2008).
- 2) R. Arai and Y. Akai, Bull. Natl. Sci. Mus. Tokyo (A) 14 : 199-213 (1988).
- 3) M. Okazaki, K. Naruse, A. Shima and R. Arai, J. Fish Biol. 58 : 89-106 (2001).
- 4) K. Kawamura, T. Ueda, R. Arai and C. Smith, Zool. Sci. 31 : 321-329 (2014).
- 5) Y. Ojima, M. Hayashi and K. Ueno, Japan. J. Genetics 47 : 431-440 (1972).
- 6) 小島吉雄・上野紘一・林真, 動物学会誌 82 : 171-177 (1973).
- 7) X. Yu, T. Zhou, K. Li, Y. Li and M. Zhou, Genetica 72 : 225-236 (1987).
- 8) R. Arai, A. Suzuki and Y. Akai, Bull. Natl. Sci. Mus. Tokyo (A) 14 : 43-46 (1988).
- 9) R. Arai, Y. Akai and N. Suzuki, Bull. Natl. Sci. Mus. Tokyo (A) 18 : 73-77 (1992).
- 10) G. Y. Lee, J. N. So and S. J. Kim, Ann. Rep. Biol. Res. Jeonbug Nat. Univ. 3 : 19-24(1982). (In Korean with English abstract.)
- 11) H. Y. Lee, C. H. Yu, S. K. Jeon and H. S. Lee, Bull. Inst. Basic Sci. Inha Univ. 4 : 79-86(1983). (In Korean with English abstract.)
- 12) G. Y. Lee, Ann. Rep. Biol. Res. Jeonbug Natn. Univ. 4 : 1-9 (1983). (In Korean with English abstract.)
- 13) K. Ueno and Y. Ojima, Japan. J. Ichthyol. 31 : 338-344 (1984).
- 14) A. Takai and Y. Ojima, Proceedings the Second International Conference of Indo-Pacific Fishes. Ichthyological Society of Japan, Tokyo. pp.899-909 (1986).
- 15) J. Inafuku, M. Nabeyama, Y. Kikuma, J. Saith, S. Kubota and S. Kohno, Chrom. Res. 8 : 193-199 (2000).
- 16) Y. Kikuma, J. Inafuku, S. Kubota and S. Kohno, Chrom. Sci. 3 : 101-103 (2000).
- 17) Y. Hong and Zhou, Acta Gen. Sinica 12 : 67-71 (1985a). (In Chinese with English abstract.)
- 18) T. Ueda and H. Naoi, Genome 42 : 531-535 (1999).
- 19) L. Sola, E. Gornung, H. Naoi, R. Gunji, C. Sato, K. Kawamura, R. Arai and T. Ueda, Genetica 119 : 99-106 (2003).
- 20) T. Ueda, H. Naoi and R. Arai, Genetica 111 : 423-432 (2001).
- 21) 上田高嘉, 宇都宮大学教育学部紀要 63 II : 1-7 (2013).
- 22) 上田高嘉, 生物科学 45 (4) : 182-186 (1993).
- 23) Ueda, Bull. Fac. Educ. Utsunomiya Univ. 36 II : 81-85 (1986).

- 24) T. Ueda, M. Hayashi, N. Koide, T. Sofuni and J. Kobayashi, *Chrom. Inf. Serv.* 51 : 12-14(1991).
- 25) T. Ueda, N. Mashiko, H. Takizawa, Y. Akai, T. Ishinabe, R. Arai and H. Wu, *Ichthyol. Res.* 44 : 302-305 (1997).
- 26) A. Levan, K. Fredga and A. A. Sandberg, *Hereditas* 52 : 201-220 (1964).
- 27) A. T. Sumner, *Exp. Cell Res.* 75 : 304-306 (1972).
- 28) R. B. Phillips and S. E. Hartley, *Genome* 30 : 193-197 (1988).
- 29) W. M. Howell and D. A. Black, *Experientia* 36 : 1014-1015 (1980).
- 30) Y. Hong and Zhou, *Acta Gen. Sinica* 12 : 143-148 (1985b). (In Chinese with English abstract.)
- 31) J. J. Yunis and O. Prakash, *Science* 215 : 1525-1530 (1982).
- 32) J. Wienberg, A. Jauch, H-J. Ludecke, G. Senger, B. Horsthemke, U. Claussen, T. Cremer, N. Arnold and C. Lengauer, *Chromosome Res.* 2 : 405-410 (1994).
- 33) T. Ueda and Y. Ojima, *Proc. Japan Acad.* 60 (B) : 183-186 (1984).

