

バラタナゴ（タナゴ亜科魚類）における 偏動原体逆位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64号 第2部 別刷
平成26年（2014）3月

Chromosomal polymorphisms with paracentric inversion
in the rose bitterling (Pisces, Acheilognathinae)

UEDA Takayoshi

バラタナゴ（タナゴ亜科魚類）における 偏動原体逆位を伴った染色体多型

Chromosomal polymorphisms with paracentric inversion
in the rose bitterling (Pisces, Acheilognathinae)

上田 高嘉

UEDA Takayoshi

Karyotypes of *Rhodeus ocellatus ocellatus* from PRC (People's Republic of China), Korea and Japan, and *R. o. kurumeus* from Japan were comparatively examined, using C-, CMA₃- and Ag-banding techniques, in order to enrich the knowledge of karyotype evolution in Acheilognathine fishes. Chromosome slides were prepared from the kidney cells of fishes or the embryo (around the gastrula stage) cells. All specimens showed $2n=48$, consisting 8 metacentrics (M), 20 submetacentrics (SM) and 20 subtelocentrics (ST), or $n=24$, consisting 4M, 10SM and 10ST. C-banding heterochromatin was observed at the centric region of all chromosomes and also at the terminal region of some chromosomes. At some localities, an additional intense C-bands in the middle region of the long arm in ST was recognized. The number of pairs with this C-band varied from 0 to 3, depending on the geographic location (0 pair; Shanghai, Heilongjian Province and Fujian Province in PRC, Pingtung Country in Taiwan, Tochigi Prefecture and Kumamoto Prefecture in Japan: 1 pair; Jiangxi Province, Hunan Province, Guangxi Province and Hainan Province in PRC: 3 pairs; Hainan Province in PRC, Gyeonggi-do Province and Jeollabuk-do Province in South Korea).

These interstitial C-bands probably resulted from paracentric inversions and originated from telomeric C-banding heterochromatin. It is thought that repetitive segments like the telomeric sequence played a role in this alteration.

Weak compartmentalization of the genomes due to the base composition (AT- or GC-rich DNA) of cold-blooded vertebrates has been reported (Hudson et al., 1980; Medrano et al., 1988). Weak compartmentalization in the fish chromosomes is thought to be a main cause of limited reports about the distinct structural Q- and G-banding patterns (Ueda and Naoi, 1999). On the one hand, the chromosome number per diploid genome in the rose bitterling is similar to that in the human race, but the amount of DNA per diploid genome in the rose bitterling is about half of that in the human race and the chromosome size in the rose bitterling is clearly small. It is presumed that main events on the karyotype evolution from Fishes to Mammals are the intra-chromosomal duplication and the accumulation of structural chromosomal changes like the inversion.

キーワード： タナゴ亜科魚類, バラタナゴ, 構成的異質染色質, C-バンド多型, 核型進化, 偏動原体逆位

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⁾。日本には、最近中国から人の手を介して移入し霞ヶ浦で繁殖するオオタナゴ *Acheilognathus macropterus* を含めると、16種・亜種が生息するとされる。その中で最も広く分布するのはタイリクバラタナゴ *Rhodeus ocellatus ocellatus* である。日本にも生息するこの亜種は、そもそも、1940年ごろにソウギョ *Ctenopharyngodon idellus* やハクレン *Hypophthalmichthys molitrix* に混じって偶然に中国から日本に移入した外来種である (Nakamura, 1955)²⁾。一方で日本には、このタイリクバラタナゴとは亜種関係にある在来種のニッポンバラタナゴ *R. o. kurumeus* が生息する。

通常ギムザ染色による中国産 (Hong et al., 1983)³⁾、韓国産 (Lee, 1983)⁴⁾ および日本産 (Ojima et al., 1972)⁵⁾ のタイリクバラタナゴ核型の報告があるが、互いの顕著な相違は認められない。タイリクバラタナゴの Ag-NORs (銀染色法により濃染される染色体上の仁形成部位) は Takai and Ojima (1986)⁶⁾ により報告されており、他の魚種の分析を合わせて、NORs 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。また、Ag 染色に加え CMA₃ (クロモマイシン A₃) 染色法を適用して、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が検討されている (Ueda, 2013)⁷⁾。

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 (Ueda, 1993)⁸⁾。

本論では、科学研究費補助金による研究の一環で採集できた中国産、韓国産および日本産のタイリクバラタナゴ、日本産のニッポンバラタナゴについて、C-バンド染色法を中心に CMA₃ および Ag 染色法を適用して核型分析を行い、バラタナゴ種内の核型の変化について検討を行った。さらに、魚類の核型進化について多少の考察を試みた。

材料および方法

中国の上海 (Shanghai, PRC (People's Republic of China)), 黒竜江省 (Heilongjian Province, PRC), 福建省 (Fujian Province, PRC), 江西省 (Jiangxi Province, PRC), 湖南省 (Hunan Province, PRC), 広西壮族自治区 (Guangxi Province, PRC), 海南省 (Hainan Province, PRC), 韓国の京畿道 (Gyeonggi-do Province, South Korea), 全羅北道 (Jeollabuk-do, Province, South Korea), 台湾の屏東県 (Pingtung Country, Taiwan), 日本の栃木県 (Tochigi Prefecture, Japan) から採集したタイリクバラタナゴ *Rhodeus ocellatus ocellatus*, 日本の熊本県 (Kumamoto Prefecture, Japan) から採集したニッポンバラタナゴ *R. o. kurumeus* を本研究に用いた (Fig. 1)。

成魚の腎臓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 et al. (1991)⁹⁾, 1997¹⁰⁾ の方法により染色体空気乾燥標本を作製した。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。また、Sumner (1972)¹¹⁾ 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-シートシン) に富む染色体部位を特定する方法として、Phillips and Hartley (1988)¹²⁾ の方法に従って CMA₃ による蛍光染色を行った。さらに、Howell and Black (1980)¹³⁾ の方法に従って Ag 染色を行った。染色体の分類は Levan, Fredga and Sandberg (1964)¹⁴⁾ の方法に従った。

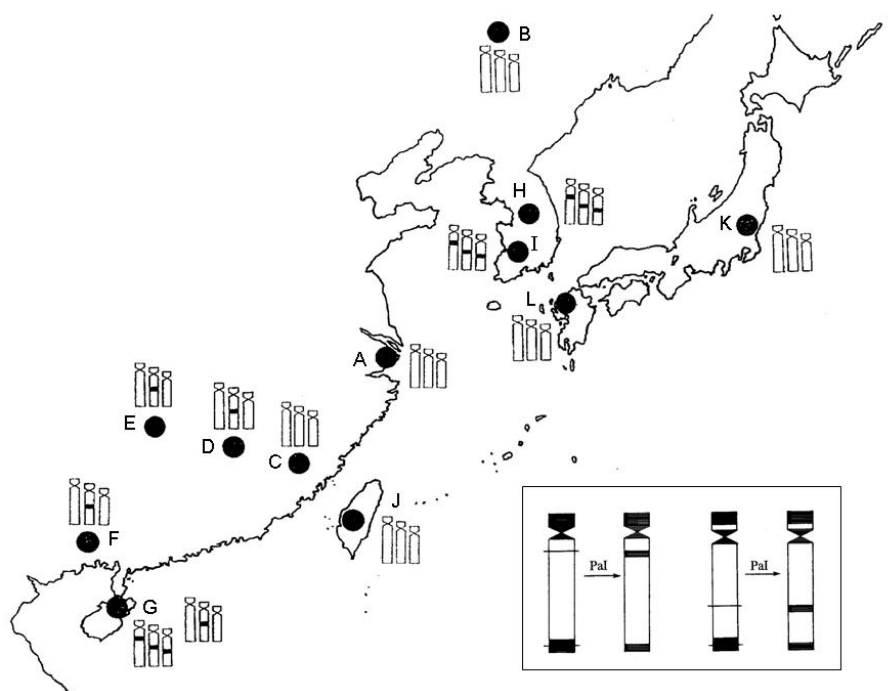


Fig. 1. Schematic figures of 3 ST pairs of homologous chromosomes with C-bands at the middle region of the long arm in each collecting spot. A: Shanghai, PRC. B: Heilongjian Province, PRC. C: Fujian Province, PRC. D: Jiangxi Province, PRC. E: Hunan Province, PRC. F: Guangxi Province, PRC. G: Hainan Province, PRC. H: Gyeonggi-do Province, South Korea. I: Jeollabuk-do Province, South Korea. J: Pingtung Country, Taiwan. K: Tochigi Prefecture, Japan. L: Kumamoto Prefecture, Japan. And, schematic representation of two types of chromosomal changes with C-band heterochromatin is shown in the square. Pal: paracentric inversion.

結果

すべての個体は $2n=48$ で、4対の M (メタセントリック)、10対の SM (サブメタセントリック) および10対の ST (サブテロセントリック) 染色体の構成、あるいは $n=24$ で、4本の M、10本の SM および4本の ST 染色体の構成であった (Figs. 2~5)。すべての採集地で、すべての染色体の動原体部にC-バンド濃染が認められた。いくつかの染色体で末端部にも濃染が観察された。また、4対の ST 染色体では短腕全体が C-バンド濃染であった (Fig. 2)。さらに、いくつかの採集地点

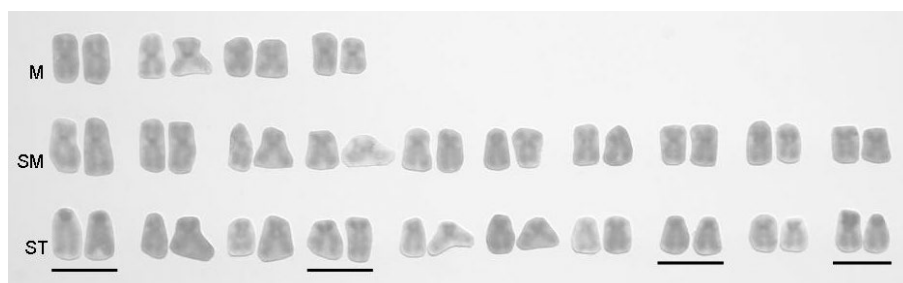


Fig. 2. C-banding karyotype of *Rhodeus ocellatus ocellatus* from Heilongjian Province, PRC. $2n=48$ (8M + 20SM + 20ST). Underlines show the chromosomes with intense C-bands on the whole of the short arm.

で長腕の中間部にもC-バンド濃染が観察された (Figs. 3, 4)。その染色体の数が採集地で0~3対と異なり、中国の海南省産、韓国の京畿道産および全羅北道産では3対 (1番, 2番および4番のST染色体)、中国の江西省産、湖南省産、広西壮族自治区産および海南省産では1対 (2番のST染色体) であった (Figs. 3, 4)。

この長腕部中間部のC-バンド部位は、CMA₃染色でも明るいバンドが現れたが (Figs. 4, 5)、Ag-染色では濃染されなかった。中国海南省では3対と1対の個体が認められたが、採集河川が異なり、3対は万泉河産、1対は渡江産から観察された。

ニッポンバラタナゴには動原体部および末端部のC-バンドはタイリクバラタナゴと同様であったが、長腕中間部のバンドは認められなかった。

性染色体と考えられるような不対の染色体は認められなかった。

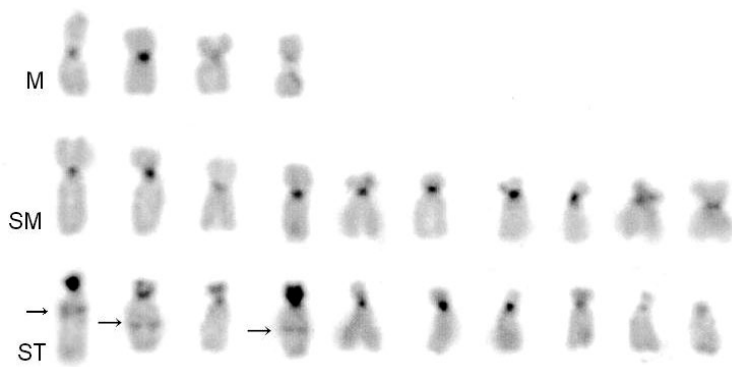


Fig. 3. C-banding karyotype of *R. ocellatus* from Jeollabuk-do Province, South Korea. $n=24$ (4M + 10SM + 10ST). Arrows indicate interstitial C-bands.



Fig. 4. CMA₃-banding karyotype of *R. ocellatus* from Guangxi Province, PRC. $2n=48$ (8M + 20SM + 20ST). Arrows indicate interstitial CMA₃-bands.

考察

本研究では、タイリクバラタナゴおよびニッポンバラタナゴにおいて、すべての個体が $2n=48$ (8M + 20SM + 20ST) あるいは $n=24$ (4M + 10SM + 10ST) を示し、染色体構成に相違は認められなかった。Ojima et al. (1972)⁵⁾ の報告 ($2n=48$: 8M + 20SM + 20ST-A) とは染色体構成において多少の違いはあるが、染色体分類の相違によるもので核型には違いはないものと考えている。C-バンド染色では、動原体部および末端部の他に、長腕の中間部にも濃染が観察された。こ

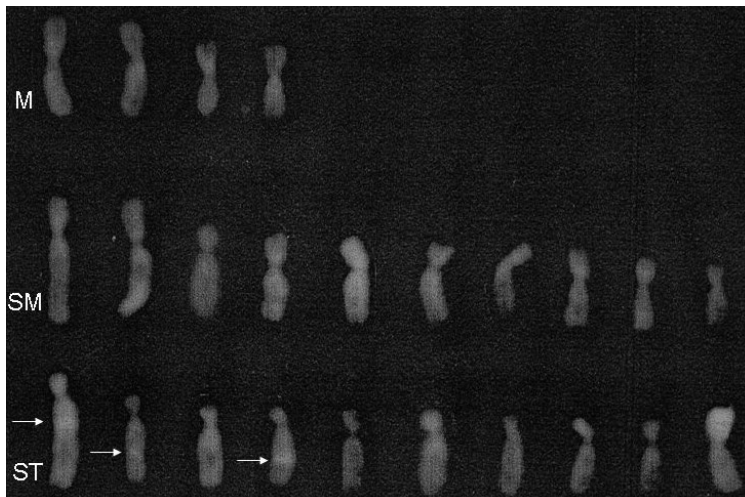


Fig. 5. CMA₃-banding karyotype of *R. o. ocellatus* from Jeollabuk-do Province, South Korea. n=24 (4M + 10SM + 10ST). Arrows indicate interstitial CMA₃-bands.

の中間部に濃染を持つ染色体には0～3対の地理的多型が認められた。この長腕部中間部のC-バンド部位は、CMA₃染色でも明るいバンドが現れたが (Figs. 4, 5), Ag-染色では濃染されなかった。この部位は繰り返し配列を含む凝縮された構造であることが推定される。

John and Miklos (1979)¹⁵⁾ は、構成的異質染色質が染色体変化に重要に働くと提言した。本論で観察された長腕中間部のC-バンドと同様のバンドは、サケ科魚類のアトランティックサーモン *Salmo salar* (Ueda and Kobayashi, 1990)¹⁶⁾ やオシヨロコマ *Salvelinus malma* (Ueda, Fukuda and Kobayashi, 1991)¹⁷⁾ などでも観察されており、染色体長腕中間部のC-バンドは逆位や縦列結合等の染色体変化の痕跡と考えられている。

本論で見られた長腕中間部にC-バンドを持つST染色体の生成においてC-バンド異質染色質が関与し、Fig. 1 の模式図に示すような逆位により端部のC-バンド異質染色質が長腕の中間部に異動したもと考えることができる。一方、染色体変化に介在性のテロメア配列が関与しているとの Meyne et al. (1990)¹⁸⁾ の指摘がある。また、テロメア配列が *Salmo salar* (Abuin et al., 1996)¹⁹⁾ で異質染色質の端部に存在することが知られている。逆位等の染色体変化に関与する塩基配列はテロメア配列等の繰り返し配列ではなかろうか。今後、染色体中間部のC-バンド部位の塩基配列を明らかにすることによって、染色体変化機構の一端を知ることができるものと期待される。また、長腕中間部にC-バンドを持つ染色体の数が採集地によって異なったことは興味深い。地理的に離れた中国海南省産および韓国産において、どちらも3対の染色体にこのC-バンドが観察された。ほぼ同じ位置にバンドが存在したが、G-バンド等で詳細に確認されたものではなく、全く同一の染色体であるのかは不明であり、同一起源であるとは断言できない。また、河川は異なるが、同じ海南省でも3対と1対の多型が認められた。C-バンド異質染色質の関わる逆位が起りやすい変異であることを示唆しているのかもしれない。

魚類等の冷血脊椎動物では、DNA塩基組成 (アデニン-チミンとグアニン-シトシン) の めり-はりが弱いことが指摘されている (Hudson et al., 1980²⁰⁾; Medrano et al., 1988²¹⁾)。めり-はりは逆位等の染色体構造変化の重なりによってもたらされるものであり、魚類において鮮明なQ-あ

るいはG-バンドの報告が少ないことと めり-はり の弱いこととが関係するのかもしれない (Ueda and Naoi, 1999)²²⁾。一方で、バラタナゴとヒトとを比較してみると、二倍体当たりの染色体数はほぼ同じであるが、バラタナゴのDNA量(ゲノムサイズ)はヒトのおよそ半分であり、個々の染色体の大きさもバラタナゴは明らかに小さい。魚類から哺乳類への核型進化の主役は、染色体内の重複等によるDNA量の増加と逆位等の染色体構造変化の積み重ねと考えられないだろうか。

要約

中国産、韓国産および日本産のタイリクバラタナゴおよびニッポンバラタナゴの核型分析が行われた。成魚の腎臓および原腸胚細胞から直説法により空気乾燥標本を作製し、通常のギムザ染色が施された。C-バンド染色を中心にCMA₃蛍光染色およびAg染色が行われた。いずれも染色体数は2n=48 (M 染色体が4対, SM 染色体が10対, ST 染色体が10対) あるいは n=24 (M 染色体が4本, SM 染色体が10本, ST 染色体が10本) であった。いくつかの採集地点で長腕の中間部にC-バンド濃染が観察され、その染色体の数が採集地で0~3対と異なり地理的多型が認められた。この部位は繰り返し配列を含む凝縮された構造であり、このST染色体の生成にC-バンド異質染色質が関与し、逆位により端部のC-異質染色質が長腕の中間部に異動したものと推定された。さらに、魚類から哺乳類への核型進化の主役が、染色体内の重複等によるDNA量の増加と逆位等の染色体構造変化の積み重ねとの推定がなされた。

謝辞

本研究に用いた材料の採集には、上海海洋大学(中国)の伍漢霖教授、鍾俊生教授並びに祥明大(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) M. Nakamura, Bull. Biogeogr. Soc. Japan, 16-19: 333-337 (1955). (In Japanese.)
- 3) Y. Hong, M. Zhou and T. Zhou, J. Wuhan Univ., (Nat. Sci) 1983: 96-102 (1983). (In Chinese with English abstract.)
- 4) G. Y. Lee, Ann. Rep. Biol. Res., (Jeonbug Natn. Univ.) 4: 1-9 (1983).
- 5) Y. Ojima, M. Hayashi and K. Ueno, Japan. J. Genetics 47: 431-440 (1972).
- 6) A. Takai and Y. Ojima, Proceedings the Second International Conference of Indo-Pacific Fishes. Ichthyological Society of Japan, Tokyo. pp.899-909 (1986).
- 7) T. Ueda, Bull. Fac. Educ. Utsunomiya Univ. 63 II: 1-7 (2013). (In Japanese with English abstract.)
- 8) T. Ueda, Seibutsukagaku 45 (4): 182-186 (1993). (In Japanese.)
- 9) T. Ueda, M. Hayashi, N. Koide, T. Sofuni and J. Kobayashi, Chrom. Inf. Serv. 51: 12-14 (1991).
- 10) T. Ueda, N. Mashiko, H. Takizawa, Y. Akai, T. Ishinabe, R. Arai and H. Wu, Ichthyol. Res. 44: 302-305 (1997).
- 11) A. T. Sumner, Exp. Cell Res. 75: 304-306 (1972).

- 12) R. B. Phillips and S. E. Hartley, *Genome* 30: 193-197 (1988).
- 13) W. M. Howell and D. A. Black, *Experientia* 36: 1014-1015 (1980).
- 14) A. Levan, K. Fredga and A. A. Sandberg, *Hereditas* 52: 201-220 (1964).
- 15) B. John and G. L. G. Miklos, *Int. Rev. Cytol.* 58: 1-114 (1979).
- 16) T. Ueda and J. Kobayashi, *La Kromosomo* II-58: 1967-1972 (1990).
- 17) T. Ueda, H. Fukuda and J. Kobayashi, *Japan. J. Ichthyol.* 37: 354-357 (1991).
- 18) J. Meyne, R. J. Baker, H. H. Hobart, T. C. Hsu, O. A. Ryder, O. G. Ward, J. E. Wiley, D. H. Wurster-Hill, T. L. Yates and R. K. Moyzis, *Chromosoma* 99: 3-10 (1990).
- 19) M. Abuin, P. Martinez and L. Sanchez, *Genome* 39: 1035-1038 (1996).
- 20) A. P. Hudson, G. Cuny, J. Cortadas, A. E. V. Haschemeyer and G. Bernaedi, *Eur. J. Biochem.* 112: 203-210 (1980).
- 21) L. Medrano, G. Bernardi, J. Couturier, B. Dutrillaux and G. Bernardi, *Chromosoma* 96: 178-183 (1988).
- 22) T. Ueda and H. Naoi, *Genome* 42: 531-535 (1999).

