

# タイリクバラタナゴ(タナゴ亜科魚類)における 染色体上の核小体形成部位の多型

上 田 高 嘉

宇都宮大学教育学部紀要  
第63号 第2部 別刷  
平成25年(2013)3月

Polymorphisms of nucleolar organizer regions on  
chromosomes in *Rhodeus ocellatus ocellatus*  
(Pisces, Acheilognathinae)

UEDA Takayoshi

# タイリクバラタナゴ (タナゴ亜科魚類) における 染色体上の核小体形成部位の多型

Polymorphisms of nucleolar organizer regions on chromosomes  
in *Rhodeus ocellatus ocellatus* (Pisces, Acheilognathinae)

上田 高嘉  
UEDA Takayoshi

Karyotypes of *Rhodeus ocellatus ocellatus* from China, Korea and Japan were comparatively examined, using Ag- and CMA<sub>3</sub>-banding techniques in order to enrich the karyological knowledge of 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). All specimens had the 10<sup>th</sup> ST pair with Ag-banded nucleolar organizer regions (Ag-NORs) at the terminal regions of short arms. The variation in size of this Ag-NORs was found and some of the specimens had heteromorphic Ag-NORs on this pair. Ag-NORs at the terminal region of long arms were found in some specimens from China and Japan. And, the regions of Ag-NORs were corresponded to CMA<sub>3</sub>-positive signals. *R. ocellatus* probably has intra-subspecies polymorphisms of NORs, because intense CMA<sub>3</sub>-bands are generally corresponded to major rDNA regions in fishes. Similar intra-species polymorphisms have been reported in a few Acheilognathine fishes, and it is supposed that NORs are unstable in Acheilognathine fishes and that inter- and intra-species polymorphisms are common. NORs in fishes still have some obscure points. More analyses using fishes from different localities and cells from different developmental stages are required.

キーワード： タナゴ亜科魚類, タイリクバラタナゴ, Ag-NORs, CMA<sub>3</sub>-バンド, NORs多型

タナゴ亜科魚類は東アジアを中心に、世界に60種・亜種が生息する (Froese and Pauly, 2008)<sup>1)</sup>。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* であるが、この亜種は1940年ごろにソウギョ *Ctenopharyngodon idellus* やハタレン *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)<sup>2)</sup>。

タイリクバラタナゴの通常ギムザ染色による核型は、中国産 (Hong et al., 1983)<sup>3)</sup>、韓国産 (Lee, 1983)<sup>4)</sup> および日本産 (Ojima et al., 1972)<sup>5)</sup> の報告がある。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核小体形成部位) は Takai and Ojima (1986)<sup>6)</sup> により報告されており、他の魚種の分析を合わせて、NORs (染色体上の核小体形成部位) 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。また、Takai and Ojima (1986)<sup>6)</sup> では10番 (最も小さい) ST (サブテロセントリック) - A (アクロセントリック) 染色体の短腕の端部に Ag-NORs を観察した。一方、Ojima et al. (1972)<sup>5)</sup> は通常のギムザ染色による分析のみではあるが、3番 ST-A 染色体の短腕の端部に

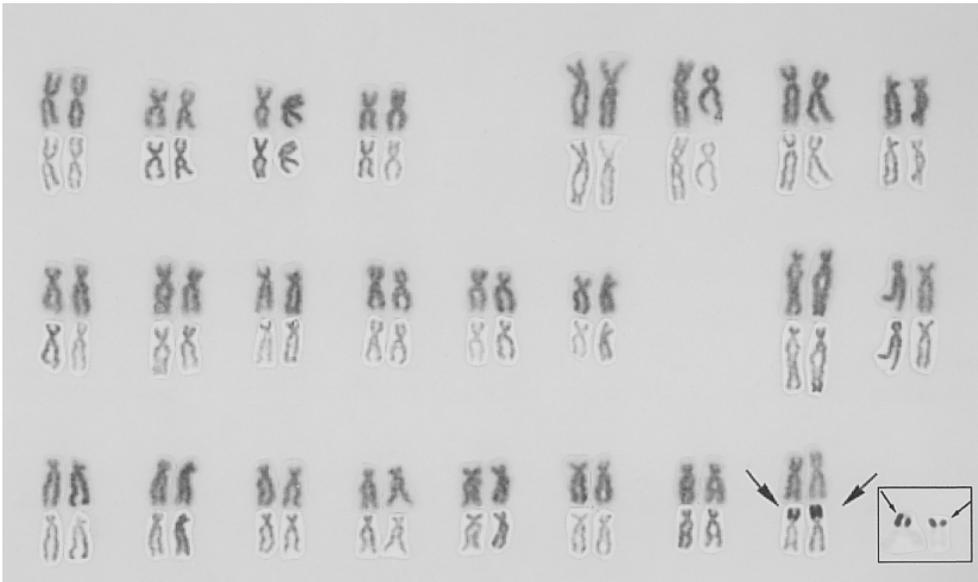


Fig. 1. Karyotype of *Rhodeus ocellatus ocellatus* from Shanghai.  $2n=48$  (8M + 20SM + 20ST). Routine Giemsa stain (upper row) and Ag-stain (lower row). Arrows indicate Ag-NORs found at the terminal regions of the short arms on the 10<sup>th</sup> ST pair. Heteromorphic Ag-NORs on the 10<sup>th</sup> ST pair from another specimen are shown in the square.

付随体を観察している。一般的に付随体部には NORs が存在するとされ、そうであれば両者は異なった位置に NORs が存在することになる。

いくつかのタナゴ亜科において、種・亜種内の Ag-NORs の多型が報告されている<sup>7-10</sup>。タナゴ亜科における NORs の種・亜種内の多型の実態、多型を生む機構の解明に向け情報収集が望まれる。そこで、中国産、韓国産および日本産のタイリクバラタナゴについて、Ag (銀) および CMA<sub>3</sub> (クロモマイシン A<sub>3</sub>) 染色法を適用して核型分析を行った。

### 材料および方法

上海 (Shanghai, China)、湖北省 (Hubei Prefecture, China)、京畿道 (Gyeonggi Prefecture, Korea) および栃木県 (Tochigi Prefecture, Japan) から採集したタイリクバラタナゴ *Rhodeus ocellatus ocellatus* を本研究に用いた。

成魚の腎臓細胞および原腸胚細胞を用いて、Ueda et al. (1991<sup>11</sup>), 1997<sup>12</sup>) の方法により染色体空気乾燥標本を作製した。標本には通常のギムザ染色を行った。また、Ag 染色は Howell and Black (1980)<sup>13</sup>) の方法に従った。G-C (グアニン-シトシン) に富む染色体部位を特定するため、Phillips and Hartley (1988)<sup>14</sup>) の方法に従って、CMA<sub>3</sub> による蛍光染色を行った。染色体の分類は Levan, Fredga and Sandberg (1964)<sup>15</sup>) の方法に従った。

### 結果

全ての個体は  $2n=48$  で、8本の M (メタセントリック)、20本の SM (サブメタセントリック) および 20本の ST 染色体の構成であった (Fig. 1)。二倍体当たりの Ag-NORs をもった染色体数は、上海産で 2 ~ 3 本、湖北省産で 1 ~ 4 本、京畿道産で 2 ~ 3 本、栃木県産で 1 ~ 7 本であり、モードは上海産、

Table 1. Chromosomal numbers and number of chromosomes bearing Ag-NORs per diploid genome in *Rhodeus ocellatus ocellatus*

Specimen no.	Locality	Tissue	Chromosomal number (2n)	Number of Ag-NORs:						
				1	2	3	4	5	6	7
1	Shanghai	Kidney	48	0	16	0	0	0	0	0
2	Shanghai	Kidney	48	0	12	0	0	0	0	0
3	Shanghai	Kidney	48	0	8	0	0	0	0	0
4	Shanghai	Embryo	48	0	6	0	0	0	0	0
5	Shanghai	Embryo	48	0	7	0	0	0	0	0
6	Shanghai	Embryo	48	0	16	0	0	0	0	0
7	Shanghai	Embryo	48	0	4	0	0	0	0	0
8	Shanghai	Embryo	48	0	2	0	0	0	0	0
9	Shanghai	Embryo	48	0	2	0	0	0	0	0
10	Shanghai	Embryo	48	0	3	0	0	0	0	0
11	Shanghai	Embryo	48	0	14	0	0	0	0	0
12	Shanghai	Embryo	48	0	7	0	0	0	0	0
13	Shanghai	Embryo	48	0	12	1	0	0	0	0
14	Shanghai	Embryo	48	0	8	0	0	0	0	0
15	Shanghai	Embryo	48	0	11	0	0	0	0	0
16	Shanghai	Embryo	48	0	17	0	0	0	0	0
-----										
17	Hubei	Embryo	48	0	15	0	0	0	0	0
18	Hubei	Embryo	48	1	16	2	1	0	0	0
19	Hubei	Embryo	48	0	2	0	1	0	0	0
20	Hubei	Embryo	48	0	24	1	0	0	0	0
-----										
21	Gyeonggi	Kidney	48	0	5	0	0	0	0	0
22	Gyeonggi	Embryo	48	0	3	0	0	0	0	0
23	Gyeonggi	Embryo	48	0	3	0	0	0	0	0
24	Gyeonggi	Embryo	48	0	2	1	0	0	0	0
25	Gyeonggi	Embryo	48	0	12	0	0	0	0	0
26	Gyeonggi	Embryo	48	0	5	2	0	0	0	0
-----										
27	Tochigi	Embryo	48	0	5	22	1	0	0	0
28	Tochigi	Embryo	48	2	2	14	0	0	0	0
29	Tochigi	Embryo	48	0	0	1	1	3	2	5
30	Tochigi	Embryo	48	0	1	2	11	0	0	0
31	Tochigi	Embryo	48	1	17	16	0	0	0	0
32	Tochigi	Embryo	48	0	0	3	18	0	0	0
33	Tochigi	Embryo	48	0	1	2	1	12	1	0

湖北省産および京畿道産では2本であったが、栃木県産ではモードが不明瞭であった (Table 1)。全ての個体において、10番 (最も小さい) ST染色体の短腕の端部に Ag-NORs が観察された (Fig. 1)。この Ag-NORs の大きさに多型があり、不對の個体も認められた (Fig. 1)。

湖北省産および栃木県産の数個体に長腕の端部に Ag-NORs が認められた。また、湖北省産では、二倍体当たり、Ag-NORs をもつ染色体に4パターンが認められた (Fig. 2)。

上海産の3個体 (Table 1 の nos. 14, 15, 16)、京畿道産の1個体 (Table 1 の no. 26)、栃木県産の4個体 (Table 1 の nos. 28, 30, 31, 32) については CMA<sub>3</sub> 染色も施され、Ag-NORs 部には CMA<sub>3</sub> の蛍光バンドが観察された (Fig. 3)。京畿道産の1個体では、2番と10番 ST の短腕の端部の Ag および CMA<sub>3</sub>-バンドは不對であった (Fig. 3)。また、栃木県産においても、染色体端部の不對の Ag および CMA<sub>3</sub>-バンドが観察された。

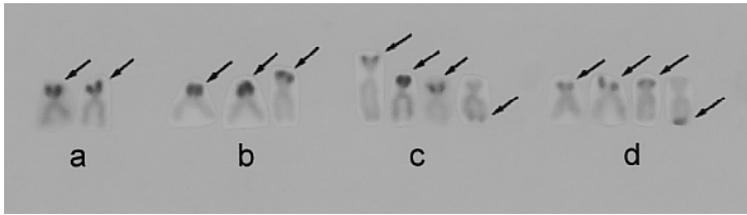


Fig. 2. Four patterns (a, b, c and d) per diploid genome on the group of chromosomes with Ag-NORs in *R. o. ocellatus* from Hubei Prefecture, China. Arrows indicate Ag-NORs.

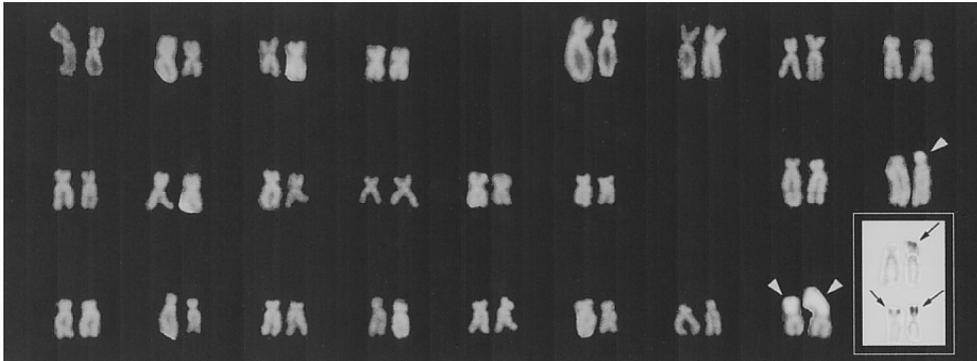


Fig. 3. CMA<sub>3</sub>-banded karyotype of *R. o. ocellatus* from Gyeonggi Prefecture, Korea (specimen no. 26 in Table 1). Arrow heads indicate intense CMA<sub>3</sub>-bands. The 2<sup>nd</sup> and 10<sup>th</sup> ST pairs with Ag-NORs are shown in the square. Arrows indicate Ag-NORs. The heteromorphic CMA<sub>3</sub>- and Ag-bands on the 2<sup>nd</sup> and 10<sup>th</sup> pairs are conspicuous in this specimen.

## 考察

本研究ではすべての個体が一つの染色体構成を示した ( $2n=48: 8M + 20SM + 20ST$ )。Ojima et al. (1972)<sup>5</sup> 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する。

Takai and Ojima (1986)<sup>6</sup> は日本産タイリクバラタナゴの Ag-NORs をもつ染色体は二倍体当たり 10 番 (最も小さい) ST 染色体対の 2 本とした。本研究の上海産、湖北省産および京畿道産において高頻度に観察された Ag-NORs と一致するが、本研究では Takai and Ojima (1986)<sup>6</sup> では認めていない余剰の Ag-NORs を観察している。Ag 染色法には、仁形成部位が存在していても機能 (転写) していないときには染め出されないという大きな特徴がある (Miller et al., 1976)<sup>16</sup>。余剰の Ag-NORs は胚細胞からの標本で観察された。Takai and Ojima (1986)<sup>6</sup> は腎臓細胞からの標本による。余剰の Ag-NORs は、Ueda (1997)<sup>17</sup> が議論したように、原腸胚の rDNA の転写が成魚細胞よりも盛んであることによるのかもしれない。それにしても、同様の胚細胞からの標本であるにも関わらず、上海産、湖北省産および京畿道産では Ag-NORs をもつ染色体数の分布は狭くモードもはっきりしている反面、栃木県産では分布も広く個体によってモードも 2~7 と異なる。本研究では確かに胚からの標本が多数を占めるが、転写の差によるだけではないのかもしれない。

湖北省産には長腕の端部など特異な Ag-NORs が観察された。さらに、前述したように Ojima et al. (1972)<sup>5</sup> は日本産タイリクバラタナゴの 3 番 ST-A 染色体の短腕に付随体を観察している。この付随

体部に NORs が存在するとすれば, Takai and Ojima (1986)<sup>6)</sup> および本研究での主要 Ag-NORs の位置とは異なることになる。

種内での相同染色体における Ag-NORs の大きさの多型がタナゴ亜科を含め種々の魚類で観察されている<sup>6, 18-20)</sup>。減数分裂時の不等交叉の結果とするのが一般的である。Ueda and Kobayashi (1990)<sup>21)</sup> はニジマス *Oncorhynchus mykiss* で相同染色体における Ag-NORs 大きさの多型を認め, メンデルの遺伝様式に従って次世代に伝えられることを示した。しかし一方, Takai (1984)<sup>22)</sup> はタイリクバラタナゴ *R. o. ocellatus* において個体内における Ag-NORs の大きさの多型を観察している。

最近では, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法により染色体上の 18S-5.8S-28S リボソーム RNA の遺伝子 (メジャー rDNA) 部位を特定して, Ag- および CMA<sub>3</sub>-バンドと合わせて魚類における NORs に関する情報が蓄積されつつある。一般的に Ag-NORs 部は CMA<sub>3</sub> 染色で明るい蛍光を発生し G-C に富む。*Lebias fasciata* では, Ag-NORs 部は CMA<sub>3</sub> 染色で明るい蛍光を発生し, 18S rDNA をプローブにした FISH シグナルは CMA<sub>3</sub>-バンドに一致した (Tigano et al., 2004)<sup>23)</sup>。*Cobitis vardarensis* では, CMA<sub>3</sub>-バンドと Ag-NORs および 28S rDNA をプローブにした FISH シグナルは一致した (Rabova et al., 2001)<sup>24)</sup>。FISH シグナル数の種内多型をも認めた。また, 二倍体当たりの FISH シグナルが奇数個である中期像も観察しているが, これは相同染色体の一方のシグナルが小さすぎて検出できなかったと解釈するのであろうか。同様に, Libertini et al. (2008)<sup>10)</sup> は, タナゴ亜科の *Rhodeus amarus* においても, CMA<sub>3</sub>-バンド, Ag-NORs および 18S rDNA をプローブにした FISH シグナルの一致と, 種内の FISH シグナルの多型, 二倍体当たりの奇数個の FISH シグナルを観察した。また, Sola et al. (2003)<sup>8)</sup> は, タナゴ亜科の *Tanakia limbata* において, 種内の CMA<sub>3</sub>-バンドの多型, 二倍体当たり奇数個の CMA<sub>3</sub>-バンドを観察している。

しかし一方で, Gromicho et al. (2005)<sup>25)</sup> は *Squalius alburnoides* と *S. pyrenaicus* において, 28S rDNA をプローブにした FISH シグナルの多型および二倍体当たりの奇数個の FISH シグナルを観察しているが, CMA<sub>3</sub>-バンドと FISH シグナルの不一致を認めて, NORs の検出に Ag あるいは CMA<sub>3</sub> 染色による分析が正確さに欠くと指摘している。

NORs の多型は転写の差によるだけではなくさそうに思う。前述したように日本産タイリクバラタナゴは 1940 年ごろ偶然に中国から日本に移入した外来種である (Nakamura, 1955)<sup>2)</sup>。Ag-NORs の大きさは rDNA 量と対応するとされ (Kligerman and Bloom, 1977)<sup>26)</sup>、この約 70 年の間に rDNA が増加した可能性は考えられないだろうか。また, NORs の位置を大きく変える仕組みがあるのではないだろうか。あるいは, 胚発生過程で NORs が減少していくような仕組みがあるのかもしれない。

魚類の NORs についてはまだまだ不明な点が多い。タイリクバラタナゴは東アジアに広く分布しているので, NORs の関わる核型進化機構を論じるには都合の良い材料と考える。様々な生息地から材料を集め, 種々の発生過程での分析を進めることが必要であろう。

## 要約

中国産, 韓国産および日本産のタイリクバラタナゴの核型分析を行った。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, 通常のギムザ染色を施した。標本の一部については Ag 染色および CMA<sub>3</sub> 蛍光染色を行った。いずれも染色体数は  $2n=48$  で, 染色体構成は, M 染色体が 8 本, SM 染色体が 20 本, ST 染色体が 20 本であった。分析された全ての個体において, 10 番 ST-A 染色体の短腕の端部に Ag-NORs が認められた。この Ag-NORs の大きさには多型が観られ, 不対である

個体が中国産，韓国産，日本産を問わず観察された。中国産および日本産には長腕の端部に Ag-NORs をもつ染色体が観察された。また，Ag-NORs の領域は全て CMA<sub>3</sub> 染色により強い蛍光バンドが認められた。魚類では一般的に CMA<sub>3</sub>-バンドは メジャー rDNA 領域に対応するので，タイリクバラタナゴでは亜種内の NORs の多型があると考えられる。同様の NORs の多型と考えられる報告が他のタナゴ亜科にも観られている。タナゴ亜科においては NORs は不安定であり，種内および種間の多型が一般的であると考えられる。魚類の NORs についてはまだまだ不明な点が多い。NORs の関わる核型進化機構解明に向け，様々な生息地の材料を用いて種々の発生過程での分析が要求される。

## 謝辞

本研究に用いた材料の採集には，上海水産大学（中国）の伍漢霖教授，鐘俊生教授並びに祥明大学（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, H. Naoi and R. Arai, Genetica 111: 423-432 (2001).
- 8) L. Sola, E. Gornung, H. Naoi, R. Gunji, C. Sato, K. Kawamura, R. Arai and T. Ueda, Genetica 119: 99-106 (2003).
- 9) T. Ueda, K. Iijima, H. Naoi, R. Arai, T. Ishinabe and S-R. Jeon, Cytologia 71: 251-255 (2006).
- 10) A. Libertini, L. Sola, M. Rampin, A. R. Rossi, K. Iijima and T. Ueda, Genes Genet. Syst. 83: 417-422 (2008).
- 11) T. Ueda, M. Hayashi, N. Koide, T. Sofuni and J. Kobayashi, Chrom. Inf. Serv. 51: 12-14 (1991).
- 12) T. Ueda, N. Mashiko, H. Takizawa, Y. Akai, T. Ishinabe, R. Arai and H. Wu, Ichthyol. Res. 44:302-305 (1997).
- 13) W. M. Howell and D. A. Black, Experientia 36: 1014-1015 (1980).
- 14) R. B. Phillips and S. E. Hartley, Genome 30: 193-197 (1988).
- 15) A. Levan, K. Fredga and A. A. Sandberg, Hereditas 52: 201-220 (1964).
- 16) D. A. Miller, V. G. Dev, R. Tantravahi and O. J. Miller, Exp.Cell. Res. 101 :235-243 (1976).
- 17) T. Ueda, Genet. And Breed. Sci. 25: 1-10 (1977). (In Japanese with English abstract.)
- 18) W. M. Howell and D. A. Black, Copeia 1979: 544-546 (1979).
- 19) J. R. Gold, Copeia 1984: 133-139 (1984).
- 20) T. Ueda, H. Fukuda and J. Kobayashi, Japan. J. Ichthyol. 37 (4): 354-357 (1991).
- 21) T. Ueda and J. Kobayashi, Bull. Fac. Educ. Utsunomiya Univ. 40 II : 45-49 (1990). (in Japanese with

English abstract.)

- 22) A. Takai, *Kaiyokagaku* 17 (2): 113-118 (1984). (In Japanese.)
- 23) C. Tigano, L. Rocco, V. Ferrito, D. Costagliola, A. M. Pappalardo and V. Stingo, *Genetica* 121: 95-100 (2004).
- 24) M. Rabova, P. Rab and C. Ozouf-Costaz, *Genetica* 111:413-422 (2001).
- 25) M. Gromicho, C. Ozouf-Costaz and M.J.Collares-Pereira, *Cytogenet. Genome Res.* 109: 507-511 (2005).
- 26) A. D. Kligerman and S. E. Bloom, *Cytogenet. Cell Genet.* 18: 182-196 (1977).

