

タイリクバラタナゴ雌とカネヒラ雄の雑種 (タナゴ亜科魚類)の染色体研究[†]

上田 高嘉

Abstract With a view to making clear the mechanism of karyotype differentiation or speciation, preserving endangered species, producing useful fishes, and others, I have been investigating about karyotypes of hybrids in fishes.

The chromosomes of the hybrids between female rose bitterling *Rhodeus ocellatus ocellatus* from Oyama in Japan and male flat bitterling *Acheilognathus rhombeus* from the Dongjin River, the Mongyong River and the Han River in Korea were analyzed. Chromosome slides were prepared from the kidney cells of parents or the embryo (from the early blastula stage to the gastrula stage) cells. *R. o. ocellatus* had $2n=48$ (8M + 20SM + 20ST). *A. rhombeus* from Dongjin River and Mongyong River had $2n=44$ (14M + 14SM + 16ST), and that from Han River had $2n=45$ (13M + 14SM + 18ST).

In the embryos, metaphases with intermediate karyotype between parents and those with structural chromosome aberration were recognized. Appearance frequencies of embryos or metaphase figures with the structural chromosome aberration varied according to the locality of males used. Those were high in the hybrid concerned with male *A. rhombeus* from the Dongjin River. And, those were rising after the gastrula stage. It is presumed that at the about blastula stage the confusion in the cycle of division between the cytoplasm from the female and the chromosome from the male was caused by some factors and that brought the structural chromosome aberration. The investigation of these factors may lead to finding the mechanism of the speciation.

キーワード：タナゴ亜科魚類, 韓国産カネヒラ, 雑種, 染色体異常

タナゴ亜科魚類は東アジアを中心に世界に約60種/亜種が生息し (Froese and Pauly, 2008)¹⁾, 種類数が多く種分化機構を探る上で優れている。人工授精が容易であることから雑種研究に適している。魚類の雑種研究は, 系統類縁関係の推定, 核型進化機構の解明, 有用魚作出法の開発あるいは希少種の保存・増殖の検討などの目的で, 進められてきた。タナゴ亜科においても種々の種間および属間の掛け合わせが行われている。これまでの掛け合わせで受精ができなかった組み合わせの報告はなく, タナゴ亜科の雑種は (1) 妊性をもつもの, (2) 生存性だ

が不妊のもの, (3) 致死性であるものの3つのタイプに大別される。致死性の多くの場合, その詳細な検討がなされることなく, 「雑種ができない組み合わせ」として片付けられてきた。Kim and Kim (1991)²⁾ は雑種ができないことを主な理由として *Tanakia koreensis* と *T. somjinensis* を別種とするなど, 一般に雑種ができるかどうか別種とするかどうかの根拠になっている。雑種致死要因を特定することが種分化の機構を解くことにつながる可能性がある。

日本には3属18種/亜種のタナゴ亜科が生息するが, 2013年の環境省レッドリストによると, そのほとんどが絶滅危惧類に挙げられている。その減少原因としては水質汚染, 河川改修等による環境悪化の他に, タナゴ類同士の生息空間の争奪, 遺伝的攪乱も見逃せない。外来種によって在来種の生息が脅かされることもありうる。雑種が生じることも在来種

[†] Chromosomal studies of the hybrid between female rose bitterling and male flat bitterling (Pisces, Acheilognathinae)

UEDA Takayoshi

(連絡先: ueda@cc.utsunomiya-u.ac.jp)

減少に影響するであろう。種の保存・保護の観点からも雑種の種々の性質を明らかにしておくことは重要であろう。特に繁殖力の強いタイリクバラタナゴとの雑種についての検討の必要性を感じる。また、進化要因の一つとしての雑種の関わりも注目されている (Ueda, 1993)³⁾。

そこで、本研究では、タナゴ亜科の致死性雑種における致死要因を細胞遺伝学的に解明することを目的に、タイリクバラタナゴ *Rhodeus ocellatus ocellatus* 卵とカネヒラ *Acheilognathus rhombeus* 精子から人工的な掛け合わせで得られた胚の染色体分析を行った。

材料および方法

小山 (栃木県, 日本) 産のタイリクバラタナゴ (rose bitterling, *Rhodeus ocellatus ocellatus*) 雌3尾, 韓国の東津江 (Dongjin River), 萬頃江 (Mongyong River), 漢江 (Han River) の3河川 (Fig. 1) 産 カネヒラ (flat bitterling, *Acheilognathus rhombeus*) 雄を各1尾ずつ人工授精に用いた。雌3尾から得られた未受精卵を一つのプラスチックベトリ皿に採った後に3等分して、河川別に媒精した。受精卵を20℃で発生させ、受精後8時間 (初期胞胚) から23時間 (原腸胚) に Ueda et al. (1991)⁴⁾ の方法に従って空気乾燥染色体標本作製した。親魚の染色体標本は腎臓細胞から Ueda et al. (1997)⁵⁾ の方法に従って作製した。標本には通常のギムザ染色を行い、染色体の分類は Levan, Fredga and Sandberg (1964)⁶⁾ の方法に従った。

結果

雌親のタイリクバラタナゴは3尾ともに $2n=48$: 8M (メタセントリック染色体) + 20SM (サブメタセントリック染色体) + 20ST (サブテロセントリック染色体) であった (Fig. 2)。

雄親の東津江と萬頃江産のカネヒラは $2n=44$: 14M + 14SM + 16ST であった (Fig. 3)。一方、漢江産は $2n=45$: 13M + 14SM + 18ST であった。韓国産には、いずれも妊性のある、 $2n=44, 45, 46$ および 47 のロバートソン型の多型が認められている (Ueda, 2015)⁷⁾。 $2n=45$ 個体は $n=22$ と $n=23$ の配偶子を形成するとされる (Ueda, 2015)⁷⁾。本論の漢江産カネヒラもロバートソン型の変異であり、 $n=22$ と $n=23$ の精子が形成されるものと考えられる。

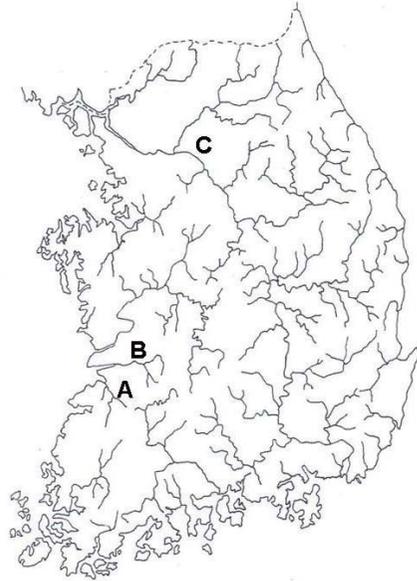


Fig. 1. Localities in South Korea. The Dongjin River (A), the Mongyong River (B) and the Han River (C).

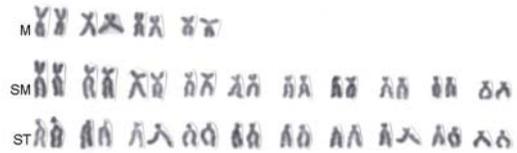


Fig. 2. The karyotype of *Rhodeus ocellatus ocellatus*. $2n=48$ (8M + 20SM + 20ST).



Fig. 3. The karyotype of *Acheilognathus rhombeus*. $2n=44$ (14M + 14SM + 16ST).

各胚 (1 ~ 45番) の染色体数の分布および染色体構造異常の有無を Table 1 に示した。染色体数 (46 ~ 50本) の下の数字はその染色体数を持つ中期像の数を示す。観察された中期像の多くは両親の中間の核型であった (Figs. 4, 5a)。漢江産雄からの胚 (36 ~ 45番) では $2n=46$ と $2n=47$ の胚が観察された。親は $2n=45$ であり、 $n=22$ か $n=23$ の精子が形成される (Ueda, 2015)⁷⁾、 $2n=47$ は $n=23$ の精子による

両親中間の正常な核型と考えられる。

Table 中の「Time (h)」は受精後の時間を示し、受精後8時間は初期胚期に当たり、受精後17時間後は原腸胚期に当たる。「A*」は、切断によって生じたと考えられる小さなアクロセントリック染色体を示す (Fig. 5b)。「SCA」は極端に小型の染色体断片、二動原体染色体あるいは環状染色体の染色体構造異常を一つでも含む中期像の数を示す。17番の胚は数個の染色体構造異常を含む約30本の染色体を持っていた (Fig. 5c)。

東津江および萬頃江産の精子からの胚では稀であった染色体構造異常が、漢江産の精子からの胚では目立って多く観察された。また、発生が進んだ胚に多く観察される傾向が見られた。

考察

染色体構造異常を持った胚の割合は、東津江産の精子を用いた場合では 29.0%、萬頃江産では 3.4%、漢江産では 3.9% であった。また、染色体構造異常を持った中期像の割合は、東津江産では 76.5%、萬

Table 1. The distribution of the chromosomal numbers in the hybrid.

Embryo No..	Hybrid	Time (h)	Number of Chromosome								
			46	47	47(1A*)	48(1A*)	48(2A*)	49(2A*)	50(4A*)	SCA	
1		8	17								
2		8	1				1			2	
3		9	5								
4		9	5	1							
5		10	2								
6		10			1					1	
7	rose bitterling (♀)	16	1	1			2		1		
8	×	17	4				1			6	
9	flat bitterling (♂)	17	5								
10	from	17	6		2						
11	Dongjin River	17	11			5					
12		17	9		2				1	3	
13		17	5				2				
14		23	10							1	
15		23	13							3	
16		23	1							4	
17		23			About 30 chromosomes including some SCA						
18		10	3								
19		10	2								
20		10	5								
21		10	4								
22		10	4								
23		10	3								
24	rose bitterling (♀)	10	3								
25	×	10	6								
26	flat bitterling (♂)	17	17								
27	from	17	10								
28	Mongyong River	17	11								
29		17	7								
30		17	12								
31		17	6		1						
32		17	5				1				
33		17	8							2	
34		17	3								
35		23	3								
36		9		1							
37		9		3							
38	rose bitterling (♀)	17		8							
39	×	17		9		1					
40	flat bitterling (♂)	17		5							
41	from	17	3								
42	Han River	17	6								
43		17		10		2					
44		17		17							
45		17		11							

Time (h): Time after fertilization. A*: Small acrocentric chromosome. SCA: Number of metaphase figures including structural chromosome aberrations of the fragment, the dicentric chromosome and ring chromosome.

頃江産では 17.7%，漢江産では 20.0% であった。このタイリクバラタナゴ卵とカネヒラ精子との人工授精は以前にも行われているが、日本産カネヒラ雄を用いた通常の人工的な掛け合わせによる雑種胚では、染色体異常もなく両親の中間の核型しか観察されていない (Ueda and Takahashi, 1995⁸⁾; Ueda and Aoki, 1996⁹⁾)。カネヒラの生息地によって差が見られたことから、各生息地のカネヒラには何らかの遺伝的な違いがあるのかもしれない。

一方、同様の染色体構造異常出現頻度を受精後10時間までとそれ以降で比較してみると、東津江産では10時間までだと胚数が 50.0% で中期像数が 16.7%，10時間以降だと胚数が 90.9% で中期像数が 34.3% であった。そして、萬頃江産では胚数 0.0% と中期像数 0.0% (10時間まで)、胚数 30.0% と中期像数 4.7% (10時間以降)、漢江産では胚数 0.0% と中期像数 0.0% (10時間まで)、胚数 25.0% と中期像数 4.8% (10時間以降) であった。受精後約10時間を境にして発生が進むと染色体構造異常が増加する傾向が読み取れる。

一般に雑種ができるかどうか別種とするかどうかの根拠になっているので、雑種致死要因が特定できれば種分化の機構を解くヒントにならないだろうか。胞胚期は多くの遺伝子が働き出す時期と考えられている。胞胚期ごろに何らかの因子によって雌親由来細胞質の分裂サイクルと雄親由来染色体の分裂サイクルに狂いが生じ、その不和合から染色体異常が引き起こされるのかもしれない。胞胚期ごろに働く細胞分裂のサイクルを決める種特異的因子があるとすると、その因子は種分化の機構を解く一つのカギを与えるものと考えられる。

種特異的因子が分子レベルで比較することができれば、数値化され、類縁関係の推定に大きく貢献するであろう。非コード領域の比較よりも類縁関係が正確につかめるのではないかと考える。染色体異常生成要因 (細胞分裂調節因子) が特定できれば、水産等多くの分野への貢献も期待される。また、理科教育、環境教育の推進にとって、基礎生物学的な知見は貴重なデータとなる。環境保全において「生物多様性」が重要視されており、「総合学習」のテーマとしても取り上げられている。タナゴ亜科魚類が適応してきた「人間と自然の共生」の上に成り立つ「里地・里山」が生物多様性にとっての模範的な持続可能システムとして見直されており、特にタナゴ亜科魚類の基礎研究から得られる情報は重要であろう。

このような種特異的な因子の探究を進める意義を感じている。

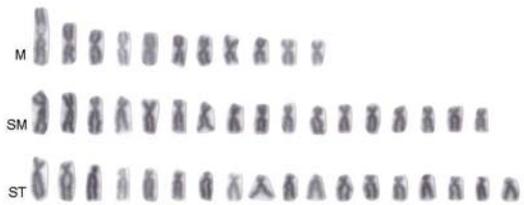


Fig. 4. The intermediate karyotype between parents. This karyotype in the hybrid had 46 chromosomes (11M + 17SM + 18ST).

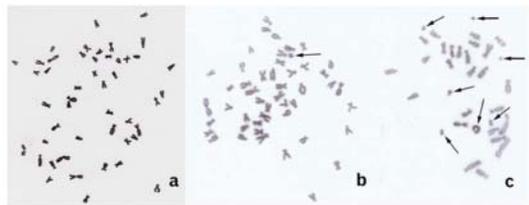


Fig. 5. Three metaphase figures from the hybrid. a: A metaphase figure with 47 chromosomes (10M + 17SM + 20ST). This karyotype is intermediate between parents. b: A metaphase figure with 47 chromosomes including a small acrocentric chromosome. An arrow indicates a small acrocentric chromosome. c: A metaphase figure in the no. 17 embryo. Seven arrows indicate structural chromosome aberrations.

要約

日本産タイリクバラタナゴ *Rhodeus ocellatus ocellatus* 卵と韓国産カネヒラ *Acheilognathus rhombeus* 精子の掛け合わせから得られた初期胞胚期から原腸胚期かけての胚から染色体標本作製した。カネヒラは東津江、萬頃江および漢江の3河川産の雄を用いた。親魚は腎臓細胞から染色体標本作製を作製し、タイリクバラタナゴは $2n=48$ (8M + 20SM + 20ST) で、カネヒラは東津江および萬頃江産は $2n=44$ (14M + 14SM + 16ST) で漢江産は $2n=45$ (13M + 14SM + 18ST) であった。観察された胚の中期像の多くは両親中間の核型を示したが、染色体構造異常を含むものも認められた。観察された染色体構造異常保有の胚および中期像の頻度は掛け合わせに用いた雄の生息地によって異なった。東

津江産からの胚では目立って高かった。また、胞胚期以降で染色体異常出現頻度が高まる傾向が見られた。胞胚期ごろに何らかの因子によって雌親由来の細胞質分裂サイクルと雄親由来の染色体分裂サイクルに狂いが生じ、その不適合によって染色体異常が引き起こされることが推察された。このような種特異的な因子の探究は種分化機構の解明につながるかもしれない。

謝辞

本研究に用いた材料であるカネヒラの採集では、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) I. S. Kim and C. H. Kim, Korean J. Syst. Zool. 7: 189-193 (1991).
- 3) T. Ueda, Seibutsukagaku 45 (4): 182-186 (1993). (In Japanese.)
- 4) T. Ueda, M. Hayashi, N. Koide, T. Sofuni and J. Kobayashi, Chrom. Inf. Serv. 51: 12-14 (1991).
- 5) T. Ueda, N. Mashiko, H. Takizawa, Y. Akai, T. Ishinabe, R. Arai and H. Wu, Ichthyol. Res. 44: 302-305 (1997).
- 6) A. Levan, K. Fredga and A. A. Sandberg, Hereditas 52: 201-220 (1964).
- 7) T. Ueda, Bull. Fac. Educ. Utsunomiya Univ. 65 II : 1-9 (2015). (In Japanese with English abstract.)
- 8) T. Ueda and Y. Takahashi, Bull. Fac. Educ. Utsunomiya Univ. 45 II : 59-65 (1995). (In Japanese with English abstract.)
- 9) T. Ueda and K. Aoki, Nippon Suisan Gakkaishi 61: 245-246 (1996). (In Japanese with English abstract.)

(2015年 3月31日 受理)

