

マイクロサテライト DNA マーカーによる 金魚品種の遺伝的多型解析

高木基裕*・河野智子*・酒井治己*・鬼頭 鈞*

Genetic Polymorphism Analysis of Goldfish Breeds using Microsatellite DNA Markers

Motohiro Takagi*, Tomoko Kawano*, Harumi Sakai*,
and Hitoshi Kito*

The genetic variability of 9 goldfish breeds were surveyed using 3 microsatellite markers. Distinct differences in the frequency distribution of the alleles were not observed among the breeds. The mean numbers of the efficient alleles and mean heterozygosities were lower in Kurodemekin, Orandashishigashira, Tancho, Seibungyo and Suihogan, (1.157-1.948, 0.107-0.479) than in Wakin, Comet, Syubunkin and Ryukin (2.352-2.560, 0.538-0.609). The difference in the genetic variability among the goldfish breeds may be caused by the founder effect and/or by the difference in the selection intensity. Closer genetic relationships between Kurodemekin and Orandashishigashira, and also among Wakin, Comet and Ryukin than among the others were inferred from the allelic composition.

1 はじめに

フナ属魚類 (*Carassius*) の色彩変異を祖先とする金魚は、古くから中国において育種が行われているが、わが国においても1500年代に中国から移入されて育種が進み、現在では約20余品種が知られている¹⁾。松井²⁾は、外部形態の変異と交配実験に基づいた金魚の系統図を日本で初めて作成した。しかし、形態学的手法のみでは、その妥当性を評価し検証するすべが無く、推測の域を出ないと言わざるを得ない。そこで、Takase *et al.*^{3, 4)}や Ikeda *et al.*^{5, 6)}は、一連の研究で金魚のアイソザイム対立遺伝子組成を推定し、いくつかの品種の遺伝的類縁関係を検討した。しかし、同種内の比較ということもあり、品種間の分化は必ずしも高いものではなく、多型検出感度の高い遺伝マーカーを用いた金魚品種の遺伝的解析が必要と考えられる。

一方、核DNA上に存在する2~5塩基を単位とした反

復配列数多型は、マイクロサテライトDNA多型と呼ばれ、極めて高い多型性を示すことから、集団遺伝学的研究への有用性が期待されている⁷⁾。近年、金魚においてもマイクロサテライトマーカー座がいくつか特定され⁸⁾、それらは三倍体のギンブナ (*C. auratus langsdorffii*)⁹⁾や二倍体のナガブナ (またはオオキンブナ) (*C. a. buergeri*) およびゲンゴロウブナ (*C. cuvieri*) の多型解析にも応用されている¹⁰⁾。そこで本研究では、マイクロサテライト増幅断片を検出し、それらのプライマーのDNA多型解析への有用性について検討するとともに、金魚品種の遺伝的変異性と類縁関係についての基礎的知見を得ることを目的とした。

2 試料および実験方法

供試魚の金魚品種は、松井¹⁾の定義によるワキン、コメット、シュブンキン、リュウキン、クロデメキン、オラ

ンダシシガシラ、タンチョウ、セイブングヨ、スイホウガンの9品種をそれぞれ10個体程度用いた。なお、これらの品種は、有名な金魚産地の一つである愛知県弥富町の弥富金魚漁業共同組合から仕入れたもので、組合に所属する養殖業者で累代選別された品種であるが、養殖場名の詳細は不明である。

サンプルDNAは、各個体の腹鰭からフェノール・クロロホルム法¹¹⁾を用いて抽出・精製を行い、DNA多型解析を行うまで、4℃で保存した。

マイクロサテライトDNA多型解析には、Zheng *et al.*⁹⁾により開発された金魚マイクロサテライトマーカー座、GF-1*, GF-17*, GF-29*の3種(Table 1)を用いた。PCRは、抽出した各金魚個体のDNAサンプル1 μ l (10 ng / μ l)に4 μ lのPCRカクテルを加え、94℃、53℃、72℃各30秒の温度サイクルを30回行った。なお、PCRカクテルの組成は、1×添付 Buffer {100mM Tris-HCl (pH8.0), 500mM KCl, 15mM MgCl₂}, 0.2mM dNTP Mixture, 0.

1 μ M ビオチン標識および未標識プライマー組、1%ホルムアミド、0.25U Taq DNA Polymerase (TAKARA)である。PCR終了後、反応液を95℃で10分間熱変性し、6%変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により増幅断片を分画した。電気泳動終了後、増幅断片をナイロンメンブランに移し、Phototope-Star Detection Kit (Biolabs)を用いて検出し、X線フィルムに露光させてバンドとして発色させた。

フィルムのバンドパターンからマーカー座ごとに各個体のアレル型を判別し、各品種のアレル頻度を算出した。さらに平均ヘテロ接合体率の観察値(Ho)、期待値(He)および有効アレル数(Ae=1/(1-He))を求めた。

求められたアレル頻度から、Nei¹²⁾による遺伝的距離を計算し、非加重双群比較法¹³⁾によって樹状図を作成した。各分岐点の支持を、100回試行によるブートストラップ確率¹⁴⁾によって求めた。

Table 1. Nucleotide sequence of the gold fish microsatellite PCR primers after Zheng *et al.*⁹⁾

Locus	Repeat motif ^{*a}	Primer sequence (5'-3') ^{*b}	Accession number
GF-1*	(TG) ₁₄	F: ATGAAGGGTAGGAAAAGTGTGA R: CAGGTTAGGGAGAAGAAGGAAT	U35612
GF-17*	(TG) ₈	F: GGAAGTAGAGCCCACTGACA R: TGCATTTGGGAGACGATA	U35616
GF-29*	(TG) ₄ CA(TG) ₈	F: ATGCTAGGTGACTGTTTGT R: CACCTCCACTCCTAATAAT	U35618

*a=Core repeat motif from cloned gold fish sequence.

*b=F and R refer to forward and reverse primer sequence respectively.

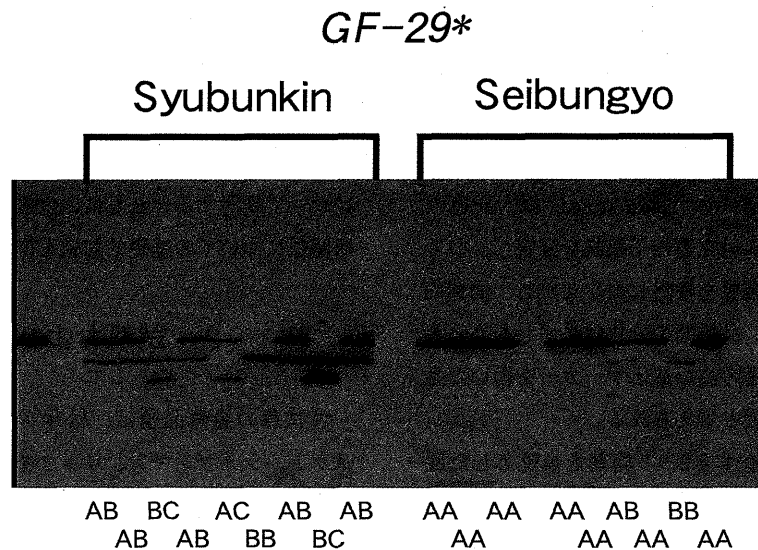


Fig. 1. Microsatellite electrophoretic pattern of GF-29* Locus.

3 結果

各品種の対立アレル頻度を Table 2 に示した。また、泳動像の1例 (GF-1*) を Fig.1 に示した。GF-1* と GF-17* では4個、GF-29* では3個のアレルが認められ、それぞれ分子量で表示した。調査した全てのマーカー座において、品種間のアレルの置換がないことが判明した。

GF-1* において、ワキン、コメット、シュブンキンは *311, *309, *305, *301 の4アレル、リュウキン、クロデメキン、オランダシシガシラは *311, *309, *301 の3アレル、タンチョウ、セイブンギョは *309, *301 の2アレルを有しており、スイハウガンはアレル *309 に固定されていた。

GF-17* において、シュブンキンは *212, *198, *190 の3アレル、タンチョウは *212, *210, *190 の3アレル、ワキン、コメット、リュウキン、クロデメキン、オランダシシガシラ、セイブンギョは *212, *190 の2アレルを有していた。*210 のアレルはタンチョウにのみ低頻度で出現していた。また、*198 のアレルはシュブンキンにのみ出現していた。スイハウガンはアレル *212 に固定されていた。全体的にみてアレル *212 の頻度が高かった。

GF-29* において、ワキン、コメット、シュブンキン、リュウキンは *196, *192, *188 の3アレルを有しており、いずれもアレル *192 の頻度が高かった。クロデメキン、オランダシシガシラ、タンチョウ、セイブンギョ、スイハウガンは *196, *192 の2アレルを有しており、スイハウガン以外はアレル *196 のアレル頻度が高かった。

Table 3 に各品種のアレル数、有効アレル数、ヘテロ接合体率 (観測値 H_o 、期待値 H_e 、および H_o と H_e の比 H_o/H_e) を示した。

GF-1* においては、スイハウガンは全てアレルが *309 のホモ型であり、これに対してリュウキンは全て *311, *309, *301 のうちの2つの組み合わせのヘテロ型であった。他の品種のヘテロ接合体率の観察値は0.333-0.800で、スイハウガンとリュウキンを加えた平均値は0.533であった。コメット、シュブンキン、リュウキン、タンチョウ、セイブンギョは、いずれもヘテロ接合体率の期待値よりも観察値の方が高く、ヘテロ過剰の傾向がみられた。一方、ワキン、クロデメキン、オランダシシガシラは逆にホモ過剰の傾向がみられた。

GF-17* においては、スイハウガンは全てアレル *212 のホモ型であった。他の品種のヘテロ接合体率観察値は0.200-0.800で、スイハウガンを加えた平均値は0.444であっ

Table 2. Allele frequency for 3 microsatellite loci surveyed for 9 breeds of goldfish *Carassius* sp.

Locus	Allele	Wakin	Comet	Syubunkin	Ryukin	Kuro-demekin	Oranda-shishigashira	Tancho	Seibungyo	Suihogan
GF-1*	*311	0.200	0.200	0.500	0.300	0.222	0.150	0.000	0.000	0.000
	*309	0.400	0.200	0.056	0.200	0.056	0.250	0.600	0.800	1.000
	*305	0.200	0.150	0.056	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	*301	0.200	0.450	0.389	0.500	0.722	0.600	0.400	0.200	0.000
GF-17*	*212	0.600	0.650	0.444	0.550	0.278	0.400	0.750	0.250	1.000
	*210	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.150	0.000	0.000
	*198	0.000	0.000	0.389	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	*190	0.400	0.350	0.167	0.450	0.722	0.600	0.100	0.750	0.000
GF-29*	*196	0.100	0.300	0.333	0.400	0.889	0.722	0.750	0.833	0.200
	*192	0.750	0.650	0.500	0.450	0.111	0.278	0.250	0.167	0.800
	*188	0.150	0.050	0.167	0.150	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

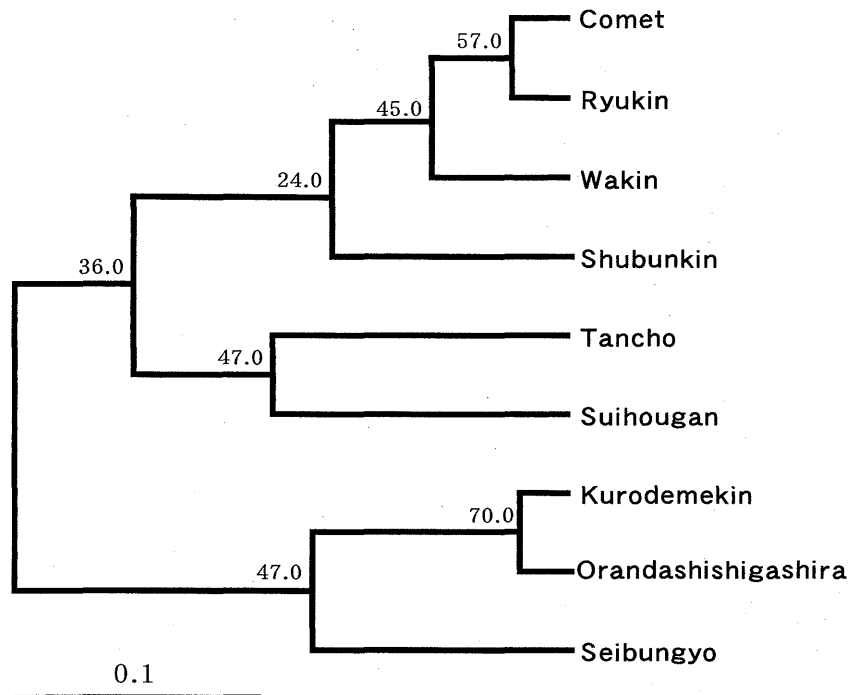


Fig. 2. UPGMA dendrogram and bootstrap value of Gold fish breeds.

た。シュブンキン、リュウキン、オランダシシガシラ、タンチョウ、セイブングヨはヘテロ過剰の傾向がみられ、一方、ワキン、コメット、クロデメキンはホモ過剰の傾向がみられた。

GF-29*においては、クロデメキンはアレル*196、*192いずれかのホモ型であった。他の品種のヘテロ接合体率観察値0.111-0.889で、クロデメキンを加えた平均値は0.473であった。ワキン、コメット、シュブンキン、リュウキン、オランダシシガシラ、スイホウガンはヘテロ過剰の傾向がみられ、タンチョウ、セイブングヨは逆にホモ過剰の傾向がみられた。

ヘテロ接合体率の3マーカー座での平均値では、ワキン、クロデメキン以外はヘテロ過剰の傾向を示した。

キングヨ品種各サンプルの遺伝的距離から求めた樹状図を Fig. 2に示し、ブートストラップ確率を付記した。コメットとリュウキン間およびクロデメキンとオランダシシガシラ間において遺伝的距離が小さく、それぞれを結び付ける分岐点のブートストラップ確率も50%以上を示した。コメットーリュウキンのクラスターに、ワキン、シュブンキンが、ついでタンチョウースイホウガンのクラスターが次々に結びつき、最後に、クロデメキンーオランダシシガシラのクラスターにセイブングヨが結びついたクラスターと結合した。

4 考 察

Table 2より、調査した全ての品種間でアレルの置換がないことが判明した。平均アレル数、有効アレル数、ヘテロ接合体率 (Table 3) より、遺伝的多様性の高い品種 (ワキン、コメット、シュブンキン、リュウキン) と低い品種 (クロデメキン、オランダシシガシラ、タンチョウ、セイブングヨ、スイホウガン) が認められた。特にスイホウガンにおいては、GF-1*、GF-17*は単型であった。また、GF-29*では、*188のアレルが遺伝的多様性の高い品種だけに出現していた。これらのうち、遺伝的多様性の低い品種は、中国から近年に移入されたものが多く¹⁵⁾、その時の個体数が少なかったための創始者効果や人為的選択圧の強い品種が多いことも関わっているかもしれない。ヘテロ接合体の観察値と期待値の比 (H_o/H_e) は、ほとんどの品種で1以上、すなわちヘテロ過剰の傾向を示した。これは、種苗生産に使われる親の数が少なく、雌雄でアレル頻度が異なっていることが多いためではないかと考えられる。いずれにせよ、今回用いたサンプル個体数が各品種10個体程度と少なかつたにもかかわらず、ヘテロ接合体率の平均は、ナガブナ (0.693) やゲンゴロウブナ (0.914)¹⁰⁾などの野生種より低いながら0.107-0.609と高い値を示し、マイクロサテライト DNA 多型の育種マーカーとしての価値は十分高いと考えられる。

本研究でのキンギョ品種間のクラスター解析においても、先のアイソザイム研究⁵⁾と同様にオランダシシガシラとデメキン系の遺伝的距離が近く、コメット、リュウキン、ワキンが同一のクラスターを形成した。このことは、これらの品種どうしでの類縁の高さを支持する結果であり、マイクロサテライト DNA 多型もキンギョ品種の遺伝的類縁解析に有用であることが示された。

このたび金魚において検出されたアレルのうち、GF-1*の*311、*305、およびGF-29*の*188はナガブナと¹⁰⁾、GF-1*の*305およびGF-17*の*198はゲンゴロウブナと¹⁰⁾、またGF-1*の*311、*305、GF-17*の*198、GF-29*の*196、*192および*188は三倍体のギンブナ⁹⁾と共通のアレルであった。一方、ナガブナ¹⁰⁾はタンチョウ、セイブンギョおよびスイハウガンと、ゲンゴロウブナ¹⁰⁾はクロデメキン、オランダシシガシラ、タンチョウ、セイブンギョおよびスイハウガンと、またギンブナ⁹⁾はスイハウガンと共通なアレルを全く持っていなかった。そのため、これらのフナ類を系統解析に組み入れることはできなかったが、共通なアレル数および共通なアレルを持たない品種数から判断すると、金魚はゲンゴロウブナよりむしろナガブナあるいはギンブナの二倍体祖先種、すなわち *Carassius auratus* 系のフナに近縁であろうと推測される。

今後さらに詳しい金魚品種の遺伝的変異性と類縁関係についての情報を得るためには、調査個体数、調査産地・系統数およびマーカー座数を増やすとともに、大陸産を含めた他のフナ属野生種との比較も必要であろう。

謝 辞

本研究の遂行にご協力いただいた水産大学校生物生産学科学生の渡邊理沙、丸岡憲一、古谷直美、生駒賢、松岡亮介諸氏に深く感謝申し上げます。なお、本研究の一部は財団

法人伊藤魚学研究振興財団の助成によった。記して謝意を表する。

文 献

- 1) 松井佳一：水産講習所研報，30，1-82 (1934)。
- 2) 松井佳一：金魚と錦鯉 —鑑賞と飼い方—，金園社，東京，1968，288pp。
- 3) T. Takase, A. Kijima, and Y. Fujio : *Tohoku J. Agr. Res.* , 47, 67-75 (1997)。
- 4) T. Takase, A. Kijima, and Y. Fujio : *Fish. Sci.* , 64, 31-34 (1998)。
- 5) M. Ikeda, T. Kawakami, and Y. Fujio : *Fish. Sci.*, 65, 182-185 (1999)。
- 6) M. Ikeda, S. Yamamoto, and Y. Fujio : *Tohoku J. Agr. Res.*, 48, 43-52 (1997)。
- 7) 高木基裕：水産大研報，47，151-252 (1999)。
- 8) W. Zheng, N. E. Stacey, J. Coffin, and C. Strobeck : *Mol. Ecol.*, 4, 791-792 (1995)。
- 9) K. Ohara, S. Dong, and N. Taniguchi : *Zool. Sci.*, 16, 909-913 (1999)。
- 10) K. Ohara, T. Ariyoshi, E. Sumida, K. Sitizyo, and N. Taniguchi : *Zool. Sci.*, 17, 357-364 (2000)。
- 11) A. S. Harris, S. Bieger, R. W. Doyle, and J. M. Wright : *Aquaculture*, 92, 157-163 (1991)。
- 12) M. Nei : *Am. Nat.*, 106, 283-292 (1972)。
- 13) P. H. Sneath, and R. R. Sokal : *Numerical taxonomy*, Freeman, San Francisco, 1973, 573pp。
- 14) B. Efron : *Ann. Stat.*, 7, 1-26 (1979)。
- 15) 熊谷孝良：金魚の飼い方，東京書店，東京，1996，223pp。