水産研究・教育機構 機関リポジトリ
FRA Japan Fisheries Research and Education Agency Institutional Repository

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

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 水産大学校 公開日: 2024-10-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高木, 基裕, 河野, 智子, 酒井, 治己, 鬼頭, 鈞 メールアドレス: 所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2011730

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Journal of National Fisheries University 50 (1) 25−30 (2001)

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 langsdorfii*）[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

2000年12月26日受付．Received Dec. 26, 2000.

＊　水産大学校生物生産学科（Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University）

ンダシシガシラ、タンチョウ、セイブンギョ、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.*[8]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 μl (10 ng/μl)に4 μl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 $MgCl_2$}、0.2mM dNTP Mixture、0.1μM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リル型を判別し、各品種のアリル頻度を算出した。さらに平均ヘテロ接合体率の観察値(Ho)、期待値(He)および有効アリル数 (Ae=1/(1-He)) を求めた。

求められたアリル頻度から、Nei[12]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。

Table1. Nucleotide sequence of the gold fish microsatellite PCR primers after Zheng *et al.*[8]

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: GGAACTAGAGCCCACTGACA R: TGCATTTGGGAGACGATA	U35616
*GF-29**	$(TG)_4CA(TG)_8$	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.

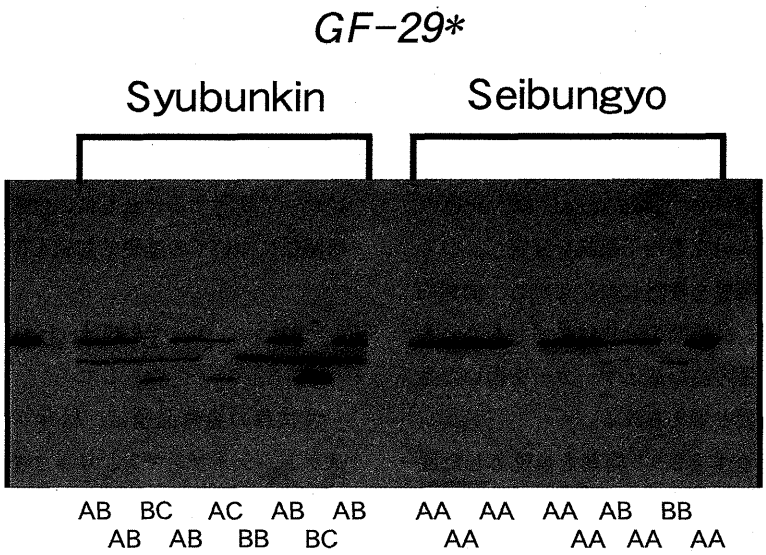

Fig. 1. Microsatellite electrophoretic pattern of *GF-29** Locus.

3 結 果

各品種の対立アリル頻度を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個のアリルが認められ、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、品種間のアリ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アリル、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アリル、タンチョウ、セイブンキンは**309, *301*の2アリルを有しており、スイホウガンはアリル**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アリル、タンチョウは**212, *210, *190*の3アリル、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アリルを有していた。**210*のアリルはタンチョウにのみ低頻度で出現していた。また、**198*のアリルはシュブンキンにのみ出現していた。スイホウガンはアリル**212*に固定されていた。全体的にみてアリル**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アリルを有しており、いずれもアリル**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、スイホウガンは**196, *192*の2アリルを有しており、スイホウガン以外はアリル**196*のアリル頻度が高かった。

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

*GF-1**においては、スイホウガンは全てアリルが**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、スイホ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、スイホウガンは全てアリル**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、スイホウガンを加えた平均値は0.444であっ

Table 2. Allele frequency for 3 microsatelite loci surveyed fou 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

Table 3. Genetic variability for 3 microsatelite loci surveyed for 9 breeds of goldfish *Carassius* sp.

		Wakin	Comet	Syubunkin	Ryukin	Kuro -demekin	Oranda -shishigashira	Tancho	Seibungyo	Suihogan
*GF-1**	No.of samples	(10)	(10)	(9)	(10)	(9)	(10)	(10)	(10)	(10)
	No.of allele	4	4	4	3	3	3	2	2	1
	Effective no.of allele	3.57	3.28	2.45	2.63	1.74	2.25	1.92	1.47	1.00
	Heterozygosity (Ho)	0.500	0.800	0.667	1.000	0.333	0.500	0.600	0.400	0.000
	(He)	0.720	0.695	0.592	0.620	0.426	0.555	0.480	0.320	0.000
	(Ho/He)	0.694	1.151	1.127	1.613	0.782	0.901	1.250	1.250	
*GF-17**	No.of samples	(10)	(10)	(9)	(10)	(9)	(10)	(10)	(10)	(10)
	No.of allele	2	2	3	2	2	2	3	2	1
	Effictive no.of allele	1.92	1.83	2.66	1.98	1.67	1.92	1.68	1.60	1.00
	Heterozygosity (Ho)	0.200	0.300	0.667	0.700	0.333	0.800	0.500	0.500	0.000
	(He)	0.480	0.455	0.624	0.495	0.401	0.480	0.405	0.375	0.000
	(Ho/He)	0.417	0.659	1.069	1.414	0.830	1.667	1.235	1.333	
*GF-29**	No.of samples	(10)	(10)	(9)	(10)	(9)	(9)	(10)	(9)	(10)
	No.of allele	3	3	3	3	2	2	2	2	2
	Effective no.of allele	1.68	1.94	2.57	2.60	1.25	1.67	1.60	1.38	1.47
	Heterozygosity (Ho)	0.500	0.700	0.889	0.800	0.000	0.556	0.300	0.111	0.400
	(He)	0.405	0.485	0.611	0.615	0.198	0.401	0.375	0.278	0.320
	(Ho/He)	1.235	1.443	1.455	1.301	0.000	1.387	0.800	0.399	1.250
Mean	No.of allele	3.00	3.00	3.33	2.67	2.33	2.33	2.33	2.00	1.33
	Effective no.of allele	2.391	2.352	2.560	2.403	1.552	1.948	1.733	1.485	1.157
	Heterozygosity (Ho)	0.400	0.600	0.741	0.833	0.222	0.619	0.467	0.337	0.133
	(He)	0.538	0.545	0.609	0.577	0.341	0.479	0.420	0.324	0.107
	(Ho/He)	0.748	1.101	1.217	1.444	0.651	1.292	1.112	1.040	1.243

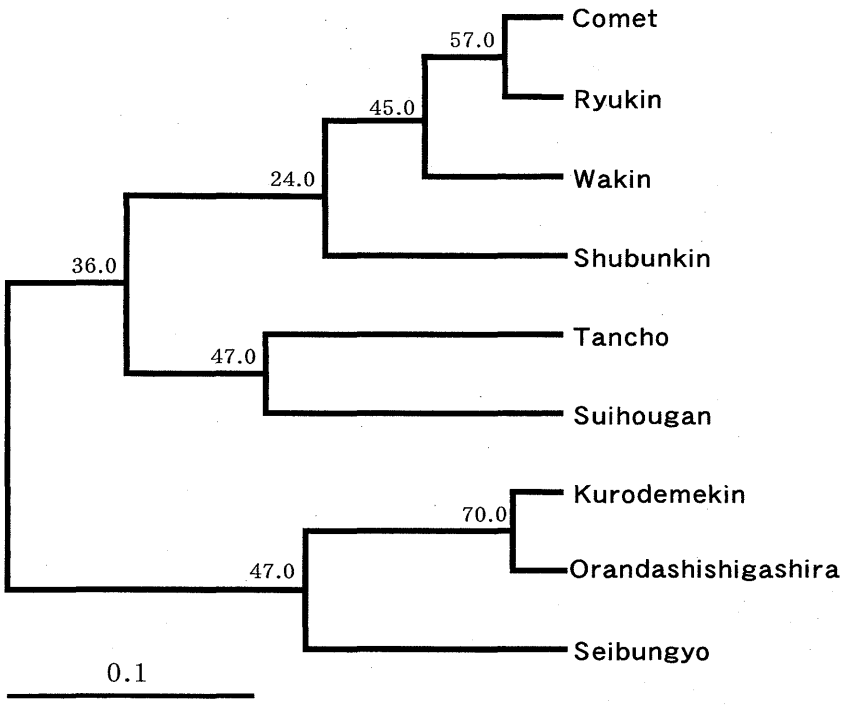

Fig. 2. UPGMA dendrogram and bootstrap value of Gold fish breeds.

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、セイブンギョ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、クロデメキンはアリル**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、セイブンギョ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。

キンギョ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ギョ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リルの置換がないことが判明した。平均アリル数、有効アリル数、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、セイブンギョ、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* のアリ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（Ho/He）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、雌雄でアリ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個体程度と少なかったにもかかわらず、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リルのうち、*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]と共通のアリルであった。一方、ナガブナ[10]はタンチョウ、セイブンギョおよびスイホウガンと、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ホウガンと、またギンブナ[9]はスイホウガンと共通なアリ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、共通なアリル数および共通なアリ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る。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.