

PCRを用いたコイとフナ類及びキンギョの雑種F3が有するゲノムの推定

メタデータ	言語: ja 出版者: 公開日: 2022-09-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 正岡, 哲治, 名古屋, 博之, 岡本, 裕之, 荒木, 和男, 藤原, 篤志, 小林, 敬典 メールアドレス: 所属: 水産研究・教育機構, 水産研究・教育機構 (退職), 水産研究・教育機構, 水産研究・教育機構 (退職), 水産研究・教育機構, 水産研究・教育機構
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/64

PCRを用いたコイとフナ類および キングヨの雑種F₃が有するゲノムの推定

Estimation of genome composition of F₃ hybrids among carp, crucian carp, and goldfish using PCR methods.

正岡哲治¹, 名古屋博之², 岡本裕之¹,

荒木和男¹, 藤原篤志¹, 小林敬典¹

Tetsuji Masaoka^{1*}, Hiroyuki Nagoya², Hiroyuki Okamoto¹, Kazuo Araki¹,

Atushi Fujiwara¹ and Takanori Kobayashi¹

¹国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所,

²元国立研究開発法人水産研究・教育機構増養殖研究所

¹Fisheries Technology Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency

²National Research Institute of Aquaculture, Japan Fisheries Research and Education Agency

*Corresponding author : Tel : 0596-58-6411. Fax : 0596-58-6413. E-mail : tmasa@fra.affrc.go.jp

Abstract

Carp (*Cyprinus carpio*), *Carassius* fish, and goldfish (*Carassius auratus*) are popular cyprinid species bred for use in aquaculture as a food source, in aquaria, and biological research in many countries. Hybrids derived from a cross between carp and *Carassius* fish containing the genome of crucian carp and goldfish have been artificially produced for use as food and aquarium fish. We obtained a third generation of diploid and triploid hybrids (F₃) derived from crosses between the F₂ hybrid of family 1 [F₁ hybrid (*C. carpio* ♀ × *Carassius cuvieri* ♂) ♀ × *C. carpio* ♂] ♀ and *C. auratus* ♂ and cross between the F₂ hybrid of family 2 [F₁ hybrid (*C. carpio* ♀ × *C. cuvieri* ♂) ♀ × *C. cuvieri* ♂] ♀ and *C. auratus* ♂. However, it is difficult to estimate the genome composition of the F₃ hybrids by morphological measurement. We previously developed three methods of species distinction between carp and *Carassius* fish : (1) analysis by PCR amplification using carp- and crucian carp-specific primers targeting the IGF-1 gene region, (2) PCR-RFLP analysis of the TGF-beta gene region, and (3) PCR-RFLP analysis of the mitochondrial 16S ribosomal RNA gene region. In this study, we estimated the genome composition of eight F₃ hybrids by these methods. We estimated that five F₃ hybrids contained the genomes of *C. carpio*, *C. cuvieri*, and *C. auratus*. Thus,

the five F₃ hybrids are considered to be allotriploids and include the genomes of three fish species. We estimated that two F₃ hybrids contained the genomes of *C. carpio* and *C. auratus*. We also estimated that one F₃ hybrid contained the genomes of *C. cuvieri* and *C. auratus*. Thus, these three F₃ hybrid types are considered to be diploid hybrids. Moreover, all the eight F₃ hybrids were estimated to contain the mitochondrial DNA derived from *C. carpio* as the maternal species.

Key words

carp, crucian carp, goldfish, genome, hybrid

はじめに

日本をはじめとする温暖な地域の湖沼や河川に分布しているコイ科のコイ (*Cyprinus carpio*) やフナ属 (*Carassius*) 魚種は、食用だけでなく観賞魚、生物学の実験生物等として利用されている (Nelson 2006)。さらに、選抜育種によりコイからニシキゴイ、フナ属魚種からキンギョ (*Carassius auratus*) も開発され、観賞魚、生物学の実験生物等として利用されている (Nelson 2006)。また、育種の観点から新しい優良家系を作出するため、コイとフナ属魚種は人為的に属間交雑されてきた (Anil et al. 2016, Cherfas et al. 1994, Delomas et al. 2016, Gomelsky and Schneider 2012, Hamaguchi 1961, Liu et al. 2001, Liu 2010, 名古屋ら 2016, 小島1983, Ojima et al. 1975, Takayama et al. 1961)。このうち、名古屋ら (2016) はフローサイトメトリーによる1細胞あたりのDNA量の測定から、コイ雌とゲンゴロウブナ (*Carassius cuvieri*) 雄の交雑後代F₁が2倍体 (2n) であったのに対し、この交雑後代F₁雌とコイ雄またはゲンゴロウブナ雄とを交雑した交雑後代F₂は、全て3倍体 (3n) であったと報告している (Figure 1)。これから、コイ雌とゲンゴロウブナ雄の交雑後代F₁雌は、コイのゲノム1個とゲンゴロウブナのゲノムを1個有する2倍性 (2n)

の卵を産生すると推測されている (名古屋ら 2016)。さらに、名古屋ら (2018) は、コイとゲンゴロウブナの交雑後代F₁の雌とコイ雄またはゲンゴロウブナ雄とを交雑した交雑後代F₂と、キンギョの雄を交雑して交雑後代F₃を作出し、これらの倍数性をフローサイトメトリーによって調査したところ、2倍体 (2n) と3倍体 (3n) が混在していることを報告している (Figure 1)。また、名古屋ら (2018) は、このことから上記交雑後代F₂は2倍性 (2n) の卵と半数性 (n) の卵を産生したと推測している。異種間交雑を利用する交雑育種や3倍体 (3n) および4倍体 (4n) に代表される倍数性育種においては、妊性等の生物学的特性を推測するため、倍数性だけでなく、ゲノムの組成も把握することが重要となる。しかし、交雑後代F₃の外部形態やフローサイトメトリー等によるDNA量の測定では、ゲノムの組成を推測することはできなかった。

一方、様々な生物種でPCRを用いた種判別手法が開発されており、魚介類では雑種の判別にも利用されつつある (Kednapat et al. 2018, Masaoka et al. 2015, 2018, McKeown et al. 2015, Schmidt et al. 2015)。著者らも各遺伝子のDNA多型を用いて、コイと在来のフナ属魚種 (ギンブナ (*Carassius auratus langsdorffii*), ゲンゴロウブナ, ニゴロブナ (*Carassius auratus*

grandoculis), ナガブナ (*Carassius auratus* subsp. 1) (以降「フナ類」) とを判別できる polymerase chain reaction (PCR) および PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) の DNA マーカーを開発し, これらが人工交配で作出したコイとフナ類の雑種 F₁ の判別にも利用できることを確認した (正岡ら 2013, 2014, 2015, 2016)。また, 屋外飼育池を用いてコイとフナ類の自然産卵試験を実施し, 上記 DNA マーカーの一部を用い, 自然産卵により得られた仔魚に雑種が存在することを確認した (正岡ら 2017, 2018)。さらに, 上記 PCR 解析と PCR-RFLP 解析から, キンギョはコイと異なるバンドパターンが得られることを確認した (正岡ら 2019)。

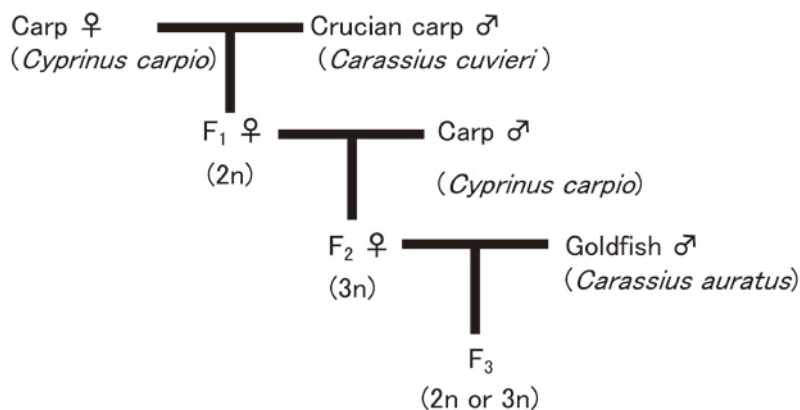
そこで, 上記 PCR 解析と PCR-RFLP 解析を用いて, 名古屋ら (2018) が作出した, 上記コイとゲンゴロウブナおよびキンギョの交雑後代 F₃ のゲノム組成を推定した。また, 交雑後代 F₃ が受け継いでいるミトコンドリア DNA の種類についても確認した。

材料と方法

供試魚

親魚種としてコイとゲンゴロウブナおよびキンギョ (リュウキン) をそれぞれ 1 個体用いた (Figure 1, Table 1)。また, コイの雌とゲンゴロウブナ雄を人工交雑して作出した交雑後代 F₁ (以降, F₁) を 1 個体と, この F₁ 雌とコイ雄を人工交雑

a: Family 1



b: Family 2

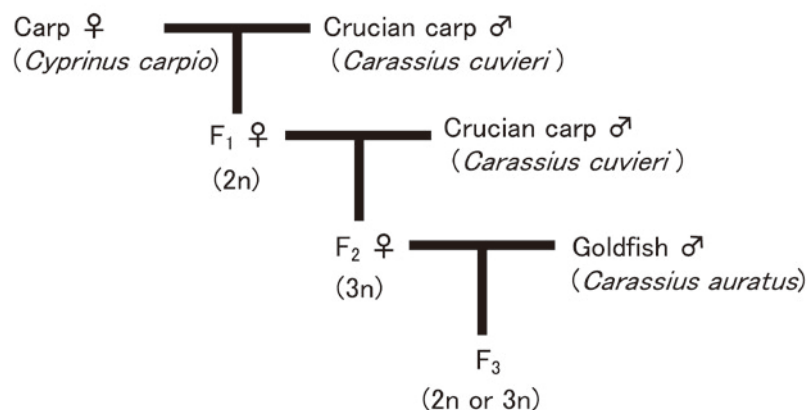


Figure 1. Formation scheme for F₃ hybrids among *C. carpio*, *C. cuvieri*, and *C. auratus* (ryuukin).

Table 1. *Cyprinid* species and hybrids examined

Species or Hybrid	No. of Samples
Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	1
Crucian carp (<i>Carassius cuvieri</i>)	1
Goldfish (Ryuukin) (<i>Carassius auratus</i>)	1
F ₁ hybrid (<i>C. carpio</i> ♀ × <i>C. cuvieri</i> ♂)	1
F ₂ hybrid of family 1 (F ₁ hybrid (<i>C. carpio</i> ♀ × <i>C. cuvieri</i> ♂) ♀ × <i>C. carpio</i> ♂)	1
F ₂ hybrid of family 2 (F ₁ hybrid (<i>C. carpio</i> ♀ × <i>C. cuvieri</i> ♂) ♀ × <i>C. cuvieri</i> ♂)	1
F ₃ hybrid of family 1 (F ₂ hybrid (F ₁ hybrid (<i>C. carpio</i> ♀ × <i>C. cuvieri</i> ♂) ♀ × <i>C. carpio</i> ♂) ♀ × <i>C. auratus</i> ♂)	6
F ₃ hybrid of family 2 (F ₂ hybrid (F ₁ hybrid (<i>C. carpio</i> ♀ × <i>C. cuvieri</i> ♂) ♀ × <i>C. cuvieri</i> ♂) ♀ × <i>C. auratus</i> ♂)	2

して作出した交雑後代F₂ (以降, 家系1のF₂) およびF₁雌とゲンゴロウブナ雄を人工交雑して作出した交雑後代F₂ (以降, 家系2のF₂) を各1個体用いた (Figure 1, Table 1)。さらに, 家系1のF₂雌とリュウキン雄を人工交雑して作出した交雑後代F₃ (以降, 家系1のF₃) を6個体と, 家系2のF₂雌とリュウキン雄を人工交雑して作出した交雑後代F₃ (以降, 家系2のF₃) を2個体用いた (Figure 1, Table 1)。

DNA抽出

家系1と2のF₃以外の個体は, エタノール固定または冷凍保存した筋肉や鱗組織からDNAを抽出した。また, 家系1と2のF₃は孵化仔魚の全身からDNAを抽出した。組織片または孵化仔魚を500 μ lのTNES-6M Urea緩衝液 (Asahida et al. 1996) に投入後, 20mg/mlのProteinase K.10 μ lを加えて37°Cで一晩反応した。次に, フェノール・クロロホルムでDNAを抽出し, エタノール沈殿した (Asahida et al. 1996)。これを300 μ lの0.1倍に希釈したTris-EDTA (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) に溶解してDNAサンプルとした。

コイとフナ類およびキンギョの判別用PCR

IGF-1遺伝子のDNA多型を利用したコ

イのDNAを特異的に増幅するコイ判別用 (for carp) プライマーセットまたはフナ類およびキンギョのDNAを特異的に増幅するフナ類判別用 (for *Carassius*) のプライマーセットをそれぞれ用いて, PCRによりIGF-1遺伝子の増幅を行った。PCR反応液は, 1 μ lのDNA溶液, 2 μ lの2.5 mM dNTPおよび10 \times 緩衝液 (100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 0.01 % gelatin), 0.1 μ lの100 pmol/ μ lプライマー, 0.1 μ lのTaKaRa EX *Taq* Hot Start Versionポリメラーゼ5U/ μ lに超純水を加えて総量を20 μ lとした。プライマー配列は前報 (正岡ら 2013) と同じ (for carpプライマーセットは, Forward primer (5'-3'): CAAAGCAAATAGGCACCTTG, Reverse primer (5'-3'): GCATTGTGGTTCA CCTACAG, for *Carassius*プライマーセットは, Forward primer (5'-3'): CAAAGCAAATAGGCACCTTG, Reverse primer (5'-3'): AACGCACA ACTAGGCTAT GC)である。PCR反応では, 94°Cで5分間加熱後, 94°Cで30秒, 57°Cで30秒, 72°Cで30秒間のサイクルを30回行い, 最後に72°Cで7分間の伸長を行った。このPCR反応液3 μ lをとり, 3%アガロースゲルとTAE (40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA) 緩衝液による100Vで約2時間の電気泳動を

行った。その後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色（ゲル染色）し、紫外線照射下で撮影した。

コイとフナ類およびキンギョの判別用PCR-RFLP

TGF- β 遺伝子とミトコンドリアDNAの16S ribosomal RNA (16S rRNA) 遺伝子領域を用いたPCR-RFLP解析により、供試魚間でバンドパターンを比較した。これらのPCR反応液は、プライマー以外はコイとフナ類およびキンギョの判別用PCRと同じである。なお、TGF- β 遺伝子のプライマーは前報（正岡ら 2015）と同じ（Forward primer (5'-3') : TGTACAACACGCTGAACCCC, Reverse primer (5'-3') : TACAAATCCCTAAAGTGACA) である。また、16SrRNA遺伝子はユニバーサルプライマー(16SAR-L (5'-3') : CGCCTSTTKMHYAAAAACAT, 16SBR-H (5'-3') : CCGGTYTGA ACTCAGATCAYGT) を用いた (Palumbi et al. 1991)。TGF- β 遺伝子のPCR反応では、94°Cで5分間加熱後、94°Cで30秒、58°Cで30秒、72°Cで30秒間のサイクルを35回行い、最後に72°Cで7分間の伸長を行った。また、ミトコンドリアDNAの16S rRNA遺伝子のPCR反応では、94°Cで5分間加熱後、94°Cで30秒、55°Cで30秒、72°Cで30秒間のサイクルを35回行い、最後に72°Cで7分間の伸長を行った。

TGF- β 遺伝子のPCR-RFLP解析では、PCR産物を2Uの制限酵素*Afa* I (Rsa I) (TaKaRa), または*Hpy*CH4 IV (New England Biolabs) を用いて切断した。ミトコンドリアDNAの16S rRNA遺伝子のPCR-RFLP解析では、PCR産物を2Uの制限酵素*Tsp*E I (TOYOBO) を用いて切断した。また、制限酵素処理は総量10ulで行い、PCR産物3 μ lを各酵素の至

適温度 (*Afa* I, *Hpy*CH4 IVは37°C, *Tsp*E Iは65°C) で16~18時間かけて切断した。得られたPCR-RFLP反応液5 μ lを用いて電気泳動を行った。その後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色（ゲル染色）し、紫外線照射下で撮影した。

バンドパターンの確認とゲノムの推定

各PCRとPCR-RFLPの電気泳動像から、目視によりバンドパターンを確認した。なお、コイ、ゲンゴロウブナ、キンギョのバンドパターンから、交雑後代のバンドパターンを判定した。また、コイとフナ属のゲノムあるいはそれぞれの種のゲノムを表していると考えられる上記3種のバンドパターンから、交雑後代のゲノム組成を推測した。

結果

IGF-1遺伝子のPCRを行った結果、コイはコイ判別用プライマーでのみ増幅産物（バンドパターンA）が見られ、ゲンゴロウブナとキンギョはフナ類判別用プライマーでのみ増幅産物（バンドパターンB）が見られた（Figure 2a, 2b, コイはレーン1, ゲンゴロウブナはレーン2, キンギョはレーン3）。これに対し、コイとゲンゴロウブナのF₁と家系1と2のF₂は、上記2種類のプライマーをそれぞれ用いたPCRで増幅産物（バンドパターンAおよびB）が得られた（Figure 2a, 2b, F₁はレーン4, 家系1のF₂はレーン5, 家系2のF₂はレーン6）。家系1のF₃では、6個体全てで上記2種類のプライマーをそれぞれ用いたPCRで増幅産物（バンドパターンAおよびB）が得られた（Figure 2a, 2b, 家系1のF₃のNo. 1~6はレーン7~12, Table 2）。これに対し、家系2のF₃では、No. 1は上記2種類のプライマーをそれぞれ用い

たPCRで増幅産物（バンドパターンAおよびB）が得られたのに対し、No. 2はフナ類判別用プライマーでのみ増幅産物（バンドパターンB）が見られた（Figure 2a, 2b, 家系2のF₃のNo. 1と2はレーン13, 14, Table 2）。

TGF- β 遺伝子におけるAfa I (Rsa I) を用いたPCR-RFLP解析では、コイは約250bpの長さのバンドと約380bpの長さのバンドを含むコイ特異的なバンドパターンA（レーン1）が見られ、ゲンゴロウブナとキンギョは約620bpの長さのバンドを含むフナ類およびキンギョ特異的なバンドパターンB（レーン2, 3）が見られた（Figure 3）。また、F₁と家系1と2のF₂は、両者のバンドを合わせたバンドパターンAB（レーン4～6）が見られた（Figure 3）。家系1のF₃のNo. 1～6と、家系2のF₃のNo. 1においても、両者のバンドを合わせたバンドパターンAB（レーン7～13）が見られた（Figure 3）。これに対し、家系2のF₃のNo. 2は、フナ類およびキンギョ特異的なバンドパターンB（レーン14）が見られた（Figure 3）。

一方、HpyCH4 IVを用いたPCR-RFLP解析では、コイは約280bpの長さのバンド（塩基配列からほぼ同じ長さ（277bpと280bp）の2本のDNA断片から成ると推測される）を含むコイ特異的なバンドパターンA（レーン1）が見られた（Figure 4）。ゲンゴロウブナは約120bpの長さの

バンドと約160bpの長さのバンドおよび約280bpの長さのバンドを含むゲンゴロウブナ特異的なバンドパターンB（レーン2）が見られた（Figure 4）。キンギョは約170bpの長さのバンドと約440bpの長さのバンドを含むキンギョ特異的なバンドパターンC（レーン3）が見られた（Figure 4）。ゲンゴロウブナのバンドパターンBに対し、コイのバンドパターンAのみに見られるバンドがなかったため、F₁と家系1と2のF₂（レーン4～6）は、バンドパターンBであるのか、あるいはバンドパターンAとバンドパターンBを合わせたバンドパターンABであるのか確認できなかった（Figure 4）。家系1のF₃のNo. 1, 2, 4, 6（レーン7, 8, 10, 12）と、家系2のF₃のNo. 1と2（レーン13, 14）は、上記と同様にゲンゴロウブナのバンドパターンBとキンギョのバンドパターンCを合わせた、バンドパターンBCであるのか、これにコイのバンドパターンAも含めたバンドパターンABCであるのか確認できなかった（Figure 4）。家系1のF₃のNo. 3と5（レーン9と11）は、コイとゲンゴロウブナに共通の約280bpの長さのバンドは見られたが、約120bpのゲンゴロウブナ特異的なバンドは見られず、キンギョ特異的な約440bpの長さのバンドが見られた（Figure 4）。これから、コイのバンドパターンAとキンギョのバンドパターンCを合わせたバンドパターンACと確認で

Table 2 Estimation of genome composition in hybrid F₃ among carp (*C. carpio*), crucian carp (*C. cuvieri*), and goldfish (Ryuakin) (*C. auratus*)

F ₃ hybrids	Sample No.	IGF-1 gene		TGF- β gene		Estimated genome composition
		PCR carp-specific primer	PCR crucian carp-specific primer	PCR-RFLP Afa I (Rsa I)	PCR-RFLP Hpy CH4 IV	
F ₃ hybrid of family 1 [F ₂ hybrid (F ₁ hybrid (<i>C. carpio</i> ♀ × <i>C. cuvieri</i> ♂) ♀ × <i>C. carpio</i> ♂) ♀ × <i>C. auratus</i> ♂]	1	A ^{*1}	B	AB	ABC ^{**}	carp, crucian carp, and goldfish
	2	A	B	AB	ABC	carp, crucian carp, and goldfish
	3	A	B	AB	AC	carp and goldfish
	4	A	B	AB	ABC	carp, crucian carp, and goldfish
	5	A	B	AB	AC	carp and goldfish
	6	A	B	AB	ABC	carp, crucian carp, and goldfish
F ₃ hybrid of family 2 [F ₂ hybrid (F ₁ hybrid (<i>C. carpio</i> ♀ × <i>C. cuvieri</i> ♂) ♀ × <i>C. cuvieri</i> ♂) ♀ × <i>C. auratus</i> ♂]	1	A	B	AB	ABC	carp, crucian carp, and goldfish
	2	- ^{**}	B	B	BC	crucian carp and goldfish

*¹: A, B, AB, AC, BC, ABC: Fragment types, see Figs. 2-4, ** : Not detected

*²: Fragment types of Hpy CH4 IV for TGF- β gene identified on the basis of fragment type by PCR amplification using carp- and crucian carp-specific primers targeting IGF-1 gene and by PCR-RFLP analysis using Afa I (Rsa I) for TGF- β gene

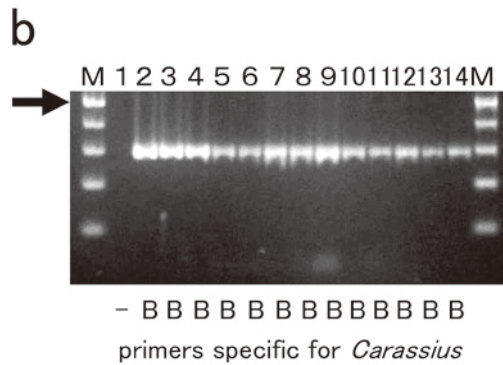
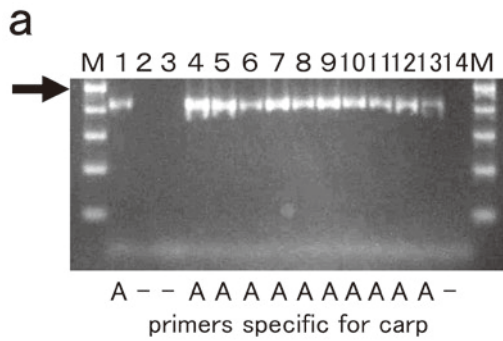


Figure 2. PCR amplification using carp- and crucian carp-specific primers targeting the IGF-1 gene region from *C. carpio*, *C. cuvieri*, *C. auratus*, and their hybrids. Lane 1, *C. carpio*; Lane 2, *C. cuvieri*; Lane 3, *C. auratus*; Lane 4, F₁ hybrid(*C. carpio* ♀ × *C. cuvieri* ♂); Lane 5, F₂ hybrid of family 1[F₁ hybrid(*C. carpio* ♀ × *C. cuvieri* ♂) ♀ × *C. carpio* ♂]; Lane 6, F₂ hybrid of family 2[F₁ hybrid(*C. carpio* ♀ × *C. cuvieri* ♂) ♀ × *C. cuvieri* ♂]; Lane 7-12, F₃ hybrid of family 1[F₂ hybrid(F₁ hybrid(*C. carpio* ♀ × *C. cuvieri* ♂) ♀ × *C. carpio* ♂) ♀ × *C. auratus* ♂]No. 1-6; Lane 13, 14, F₃ hybrid of family 2 [F₂ hybrid(F₁ hybrid(*C. carpio* ♀ × *C. cuvieri* ♂) ♀ × *C. cuvieri* ♂) ♀ × *C. auratus* ♂]No. 1, 2; M, 100-bp DNA size ladders. Arrows indicate 500 bp; A, B, Fragment types; -, Not detect.

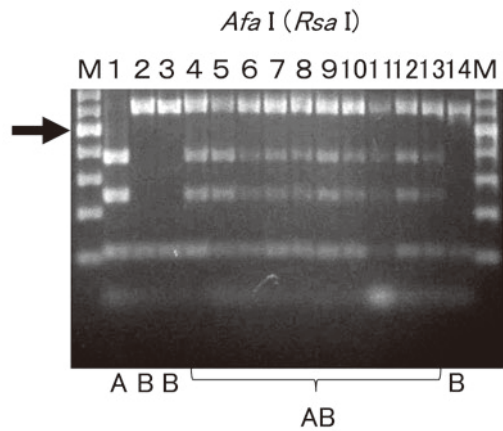


Figure 3. Restriction analysis of DNA amplified by PCR of TGF- β gene digested with *Afa* I (*Rsa* I) from *C. carpio*, *C. cuvieri*, *C. auratus*, and their hybrids. Lane 1, *C. carpio*; Lane 2, *C. cuvieri*; Lane 3, *C. auratus*; Lane 4, F₁ hybrid(*C. carpio* ♀ × *C. cuvieri* ♂); Lane 5, F₂ hybrid of family 1[F₁ hybrid(*C. carpio* ♀ × *C. cuvieri* ♂) ♀ × *C. carpio* ♂]; Lane 6, F₂ hybrid of family 2[F₁ hybrid(*C. carpio* ♀ × *C. cuvieri* ♂) ♀ × *C. cuvieri* ♂]; Lane 7-12, F₃ hybrid of family 1[F₂ hybrid(F₁ hybrid(*C. carpio* ♀ × *C. cuvieri* ♂) ♀ × *C. carpio* ♂) ♀ × *C. auratus* ♂]No. 1-6; Lane 13, 14, F₃ hybrid of family 2 [F₂ hybrid(F₁ hybrid(*C. carpio* ♀ × *C. cuvieri* ♂) ♀ × *C. cuvieri* ♂) ♀ × *C. auratus* ♂]No. 1, 2; M, 100-bp DNA size ladders. Arrows indicate 500 bp; A, B, Fragment types; -, Not detect.

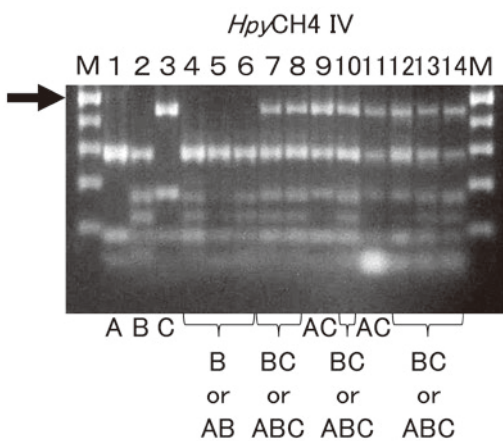


Figure 4. Restriction analysis of DNA amplified by PCR of TGF- β gene digested with *Hpy*CH4 IV from *C. carpio*, *C. cuvieri*, *C. auratus*, and their hybrids. Lane 1, *C. carpio*; Lane 2, *C. cuvieri*; Lane 3, *C. auratus*; Lane 4, F₁ hybrid(*C. carpio* ♀ × *C. cuvieri* ♂); Lane 5, F₂ hybrid of family 1[F₁ hybrid(*C. carpio* ♀ × *C. cuvieri* ♂) ♀ × *C. carpio* ♂]; Lane 6, F₂ hybrid of family 2[F₁ hybrid(*C. carpio* ♀ × *C. cuvieri* ♂) ♀ × *C. cuvieri* ♂]; Lane 7-12, F₃ hybrid of family 1[F₂ hybrid(F₁ hybrid(*C. carpio* ♀ × *C. cuvieri* ♂) ♀ × *C. carpio* ♂) ♀ × *C. auratus* ♂]No. 1-6; Lane 13, 14, F₃ hybrid of family 2 [F₂ hybrid(F₁ hybrid(*C. carpio* ♀ × *C. cuvieri* ♂) ♀ × *C. cuvieri* ♂) ♀ × *C. auratus* ♂]No. 1, 2; M, 100-bp DNA size ladders. Arrows indicate 500 bp; A, B, Fragment types; -, Not detect.

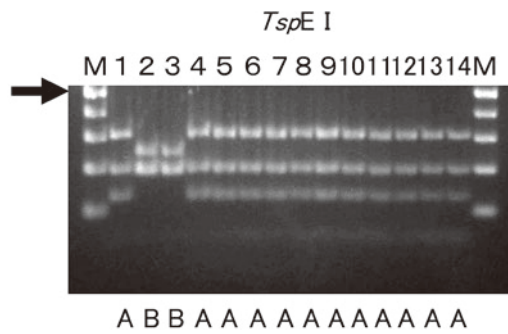


Figure 5. Restriction analysis of DNA amplified by PCR of 16S rRNA gene digested with TspE I from *C. carpio*, *C. cuvieri*, *C. auratus*, and their hybrids.

Lane 1, *C. carpio*; Lane 2, *C. cuvieri*; Lane 3, *C. auratus*; Lane 4, F₁ hybrid(*C. carpio* ♀ × *C. cuvieri* ♂); Lane 5, F₂ hybrid of family 1[F₁ hybrid(*C. carpio* ♀ × *C. cuvieri* ♂) ♀ × *C. carpio* ♂]; Lane 6, F₂ hybrid of family 2[F₁ hybrid(*C. carpio* ♀ × *C. cuvieri* ♂) ♀ × *C. cuvieri* ♂]; Lane 7-12, F₃ hybrid of family 1[F₂ hybrid(F₁ hybrid(*C. carpio* ♀ × *C. cuvieri* ♂) ♀ × *C. carpio* ♂) ♀ × *C. auratus* ♂]No. 1-6; Lane 13, 14, F₃ hybrid of family 2 [F₂ hybrid(F₁ hybrid(*C. carpio* ♀ × *C. cuvieri* ♂) ♀ × *C. cuvieri* ♂) ♀ × *C. auratus* ♂]No. 1, 2; M, 100-bp DNA size ladders. Arrows indicate 500 bp; A, B, Fragment types; -, Not detect.

きた (Figure 4)。

ミトコンドリアDNAの16S rRNA遺伝子のTspE Iを用いたPCR-RFLP解析では、コイは約120bpと約310bpの長さのバンドを含むコイ特異的なバンドパターンA (レーン1)が見られ、ゲンゴロウブナとキンギョは約245bpの長さのバンドを含むゲンゴロウブナとキンギョ特異的なバンドパターンB (レーン2, 3)が見られた (Figure 5)。また、コイを雌親としているF₁ (レーン4)や、F₁を雌親としている家系1と2のF₂ (レーン5, 6) および家系1と2のF₂をそれぞれ雌親としている家系1と2のF₃ (レーン7~14) は、コイ特異的な約120bpと約310bpの長さのバンドが見られ、ゲンゴロウブナとキンギョ特異的な約245bpの長さのバンドは見られなかったため、バンドパターンAと確認できた (Figure 5)。

考察

コイとゲンゴロウブナのF₁と家系1と2のF₂は、IGF-1遺伝子のコイ判別用プライマーを用いたPCRとフナ類判別用プライマーを用いたPCRでそれぞれ増幅産物 (バンドパターンAとバンドパターンB)が見られた (Figure 2a, 2b, レーン4~6)。F₁と家系1と2のF₂において、このバンドパターンAはコイのゲノム、バンドパターンBはゲンゴロウブナ

のゲノムを示していると考えられる。また、*Afa* I (*Rsa* I)を用いたPCR-RFLP解析においても、F₁と家系1と2のF₂は、コイとゲンゴロウブナのバンドを合わせたバンドパターンAB (Figure 3, レーン4~6)が見られた。F₁と家系1と2のF₂において、このバンドパターンAはコイのゲノム、バンドパターンBはゲンゴロウブナのゲノムを示していると考えられる。TGF-β 遺伝子におけるHpyCH4 IVを用いたPCR-RFLP解析だけでは、F₁と家系1と2のF₂ (Figure 4, レーン4~6) は、ゲンゴロウブナのバンドパターンBであるか、コイとゲンゴロウブナのバンドを合わせたバンドパターンABであるか確認できない (Figure 4)。しかし、上記IGF-1遺伝子のPCRとTGF-β 遺伝子における*Afa* I (*Rsa* I)を用いたPCR-RFLPの結果から、HpyCH4 IVを用いたPCR-RFLP解析においても、F₁と家系1と2のF₂(Figure 4, レーン4~6) は、コイとゲンゴロウブナのバンドを合わせたバンドパターンABであると考えられた。また、これまでにコイとゲンゴロウブナの交雑後代F₁は雑種2倍体であり、一部の雌が成熟してコイとゲンゴロウブナのゲノムを1個ずつ持つ2nの非還元卵を産生することが報告されている (名古屋ら 2016, 小島1983, Ojima et al. 1975)。このため、F₁は、コ

イとゲンゴロウブナのゲノムを1個ずつ持つ雑種2倍体であると推測される。また、F₁の雌がコイとゲンゴロウブナのゲノムを1個ずつ持つ2nの非還元卵を産生していた場合、これとコイ雄とを交雑して作出した家系1のF₂は、コイのゲノムを2個とゲンゴロウブナのゲノムを1個持つ雑種3倍体（異質3倍体）であると推測される。一方、F₁の雌とゲンゴロウブナ雄とを交雑して作出した家系2のF₂は、コイのゲノムを1個とゲンゴロウブナのゲノムを2個持つ雑種3倍体（異質3倍体）であると推測される。

家系1のF₂のNo. 1, 2, 4, 6 (Figure 4, レーン7, 8, 10, 12) と、家系2のF₃のNo. 1 (Figure 4, レーン13) においても、上記と同様に*Hpy*CH4 IVを用いたPCR-RFLP解析だけでは、ゲンゴロウブナのバンドパターンBとキンギョのバンドパターンCを合わせた、バンドパターンBCであるのか、これにコイのバンドパターンAも含めたバンドパターンABCであるのか確認できなかった (Figure 4)。しかし、上記F₃は、IGF-1遺伝子のコイ判別用プライマーを用いたPCRとフナ類判別用プライマーを用いたPCRでそれぞれ増幅産物（バンドパターンAとバンドパターンB）が見られた (Figure 2a, 2b, レーン7, 8, 10, 12, 13, Table 2)。また、*Afa* I (*Rsa* I) を用いたPCR-RFLP解析では、上記F₃はコイとフナ属魚種のバンドを合わせたバンドパターンAB (Figure 3, レーン7, 8, 10, 12, 13, Table 2) が見られた。これらのバンドパターンAはコイのバンドパターンを示している。よって、*Hpy*CH4 IVを用いたPCR-RFLP解析において、家系1のF₃のNo. 1, 2, 4, 6と、家系2のF₃のNo. 1は、コイとゲンゴロウブナおよびキンギョのバンドを合わせたバンドパターンABCであると考

えられた (Table 2)。また、家系1のF₃のNo. 1, 2, 4, 6 と、家系2のF₃のNo. 1は、コイとゲンゴロウブナおよびキンギョの3種類のゲノムを持つと推測された (Table 2)。

家系1のF₃のNo. 3と5は、IGF-1遺伝子のコイ判別用プライマーを用いたPCRとフナ類判別用プライマーを用いたPCRでそれぞれ増幅産物（バンドパターンAとバンドパターンB）が見られた (Figure 2a, 2b, レーン9と11, Table 2)。また、*Afa* I (*Rsa* I) を用いたPCR-RFLP解析では、バンドパターンAB (Figure 3, レーン9と11, Table 2) が見られた。上記PCR解析とPCR-RFLP解析において、ゲンゴロウブナとキンギョは同じバンドパターンBとなる (Figure 2a, 2bおよびFigure 3, レーン2と3, Table 2)。このため、家系1のF₃のNo. 3と5においては、バンドパターンAはコイを示しているが、バンドパターンBがゲンゴロウブナかキンギョ或いは両者を示しているかは分からなかった。一方、*Hpy*CH4 IVを用いたPCR-RFLP解析において、家系1のF₃のNo. 3と5 (Figure 4, レーン9と11) は、コイとゲンゴロウブナに共通の約280bpの長さのバンドと、キンギョ特異的な約440bpの長さのバンドは見られたが、約120bpのゲンゴロウブナ特異的バンドが見られなかった。このため、コイのバンドパターンAとキンギョのバンドパターンCを合わせたバンドパターンACと確認できた (Figure 4, レーン9と11, Table 2)。これらのPCR解析とPCR-RFLP解析の結果から、家系1のF₃のNo. 3と5は、コイとキンギョのゲノムを持つと推測された (Table 2)。

家系2のF₃のNo. 2は、IGF-1遺伝子のコイ判別用プライマーを用いたPCRでは増幅産物が見られず、フナ類判別用プラ

イマーを用いたPCRでのみ増幅産物（バンドパターンB）が見られた（Figure 2a, 2b, レーン14, Table 2）。また, *Afa* I (*Rsa* I)を用いたPCR-RFLP解析では, 家系2のF₃のNo. 2はバンドパターンB（Figure 3, レーン14, Table 2）が見られた。上記PCR解析とPCR-RFLP解析において, ゲンゴロウブナとキンギョは同じバンドパターンBとなる（Figure 2a, 2bおよびFigure 3, レーン2と3, Table 2）。このため, 家系2のF₃のNo. 2においては, バンドパターンBがゲンゴロウブナかキンギョあるいは両者を示しているかは分からなかった。一方, *Hpy*CH4 IVを用いたPCR-RFLP解析において, 家系2のF₃のNo. 2（Figure 4, レーン14）は, コイとゲンゴロウブナに共通の約280bpの長さのバンドと, キンギョ特異的な約440bpの長さのバンドおよび約120bpのゲンゴロウブナ特異的なバンドが見られた。これらから, *Hpy*CH4 IVを用いたPCR-RFLP解析においては, ゲンゴロウブナおよびキンギョのバンドを合わせたバンドパターンBCであると考えられた（Table 2）。よって, 家系2のF₃のNo. 2は, ゲンゴロウブナとキンギョのゲノムを持つと推測された（Table 2）。

名古屋ら（2018）はフローサイトメトリーによる倍数性の調査で, 本研究と同じ交配区のF₃は, 2倍体（2n）と3倍体（3n）が混在していることを報告している。これと本研究結果から, F₃のうち, 家系1のF₃のNo. 1, 2, 4, 6と, 家系2のF₃のNo. 1は, コイとゲンゴロウブナおよびキンギョの3種類のゲノムを持つ完全異質3倍体で, 家系1のF₃のNo. 3と5は, コイとキンギョのゲノムを持つ雑種2倍体, 家系2のF₃のNo. 2は, ゲンゴロウブナとキンギョのゲノムを持つ雑種2倍体であると推測された。

これにより, 家系1のF₂の雌は, コイとゲンゴロウブナのゲノムを持つ2倍性（2n）の卵とコイのゲノムを持つ半数性（n）の卵を産生したと考えられた。また, 家系2のF₂の雌は, コイとゲンゴロウブナのゲノムを持つ2倍性（2n）の卵とゲンゴロウブナのゲノムを持つ半数性（n）卵を産生したと考えられた。

ミトコンドリアDNAの16S rRNA遺伝子における*Tsp*E Iを用いたPCR-RFLP解析では, コイは個体変異があり, 約430bpの長さのバンドを含むコイ特異的なバンドパターンが見られる個体（正岡ら2019）の他に, 約310bpの長さのバンドを含むコイ特異的なバンドパターンが見られる個体がある（Figure 6）（正岡ら データ未公表）。これは1塩基置換によりGATT（Accession No. AB741887）が*Tsp*E Iの認識部位であるAATT（Accession No. FJ655285）になったことから, 約430bpのDNAが切断され, 約310bpと約120bpの長さの2本のバンドとして検出されたためと考えられた。本研究のF₁は, 約310bpの長さのバンドを含むコイ特異的なバンド

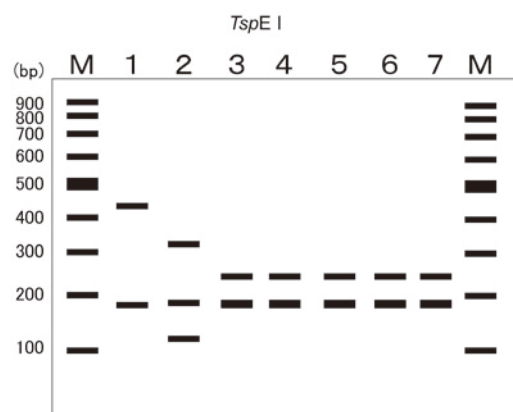


Figure 6. Schematic diagram of restriction analysis of DNA amplified by PCR of mitochondrial 16S rRNA gene digested with *Tsp*E I.

Lanes 1, 2, *C. carpio*; Lane 3, *C. auratus*; Lane 4, *C. auratus langsdorffii*; Lane 5, *C. cuvieri*; Lane 6, *C. auratus grandoculis*; Lane 7, *C. auratus* subsp. 1; M, 100-bp DNA size ladders.

パターンAであるコイを雌親としていた (Figure 5, レーン1)。これに対し, ゲンゴロウブナとキンギョは約245bpの長さのバンドを含むフナ属特異的なバンドパターンBが見られた (Figure 5, レーン2, 3)。コイを雌親に持つF₁とこのF₁を雌親に持つ家系1と2のF₂, さらにこれらのF₂を雌親に持つ家系1と2のF₃は, バンドパターンAであった (Figure 1, Figure 5, レーン4~14)。このため, ミトコンドリアDNAは母系遺伝するという理論通り, これらの交雑後代はコイのミトコンドリアDNAを受け継いでいると考えられた。

魚類の交雑育種では, 倍数性やゲノム組成により, 交雑後代の妊性等の生物学的特性が大きく変わる (荒井ら 2017)。特に異なるゲノムを有する雑種や3倍体が不妊であれば, 高成長が期待されることがある (荒井 1989, 荒井ら 2017, Suzuki and Fukuda 1971, 1973)。また, コイやキ

ンギョ等のフナ属魚種は, 移植先の在来生物に悪影響を及ぼす問題が指摘されているが (Arthington 2006, Costedoat et al. 2005, 2007, Crossman 1991, Hänfling et al. 2005, Holčík 1991), 雑種が不妊であれば繁殖や交雑を通じた悪影響を軽減できる。このため, 交雑後代の倍数性やゲノム組成を推測することは重要となる。今後もDNAの多型に基づくPCRを用いた手法は, 簡便なゲノム組成を推測できる手法として利用できると考えられる。

謝辞

本研究の実施にあたり貴重な助言, 便宜を図って頂いた国立研究開発法人水産研究・教育機構増養殖研究所育種研究センターの方々に深謝する。本研究は国立研究開発法人水産研究・教育機構の支援を受けた。

文献

- Anil A, Gomelsky B, Schneider KJ (2016) Variability in microsatellite DNA markers in gynogenetic and backcross progenies obtained from ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio* L.) × goldfish (*Carassius auratus* L.) hybrid females. *Aquaculture Res* 47 : 1150-1155
- 荒井克俊 (1989) 8 異質倍数体「水産増養殖と染色体操作」, 鈴木亮編, 水産学シリーズ, 75, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 82-94.
- 荒井克俊, 藤本貴史, 山羽悦郎 (2017) 第10章 交雑と育種「水産遺伝育種学」, 中嶋正道・荒井克俊・岡本信明・谷口順彦編, 東北大学出版会, 仙台, pp 171-186.
- Arthington AH (2006) Ecological and genetic impacts of introduced and translocated freshwater fishes in Australia. *Can J Fish Aquat Sci* 48 : 33-43
- Asahida T, Kobayashi T, Saitoh K, Nakayama I (1996) Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fish Sci* 62 : 727-730
- Cherfas NB, Gomelsky BI, Emelyanova OV, Recoubratsky AV (1994) Induced diploid gynogenesis and polyploidy in crusian carp, *Cyprinus carpio*., hybrids. *Aquac Fish Manag* 25 : 943-954

- Costedoat C, Pech N, Salducci, MD, Chappaz R, Gilles A (2005) Evolution of mosaic hybrid zone between invasive and endemic species of Cyprinidae through space and time. *Biol J Linn Soc Lond* 85 : 135-155
- Costedoat C, Pech N, Chappaz R, Gilles A (2007) Novelty in hybrid zones : crossroads between population genomics and ecological approaches. *PLOS ONE* 4 : e357
- Crossman EJ (1991) Introduced freshwater fishes : A review of the North American perspective with emphasis on Canada. *Can J Fish Aquat Sci* 48 : 46-57
- Delomas TA, Gomelsky B, Anil A, Schneider KJ Warner JL (2016) Spontaneous polyploidy, gynogenesis and androgenesis in second generation (F2) koi *Cyprinus carpio* × goldfish *Carassius auratus* hybrids. *J Fish Biol* doi : 10.1111/jfb.13157
- Gomelsky B, Schneider KJ (2012) Koi x Goldfish hybrid female produce triploid progeny when backcross to koi male. *N Am J Aquac* 74 : 449-452
- Hamaguchi A (1961) Morphological investigations in the carp, the funa and their hybrids. *Hyogo Suisan Jigyo Hohkoku* : 121-141
- Hänfling B, Bolton P, Harley M, Carvalho GR (2005) A molecular approach to detect hybridization between crucian carp (*Carassius carassius*) and non-indigenous carp species (*Carassius* spp. and *Cyprinus carpio*). *Freshw Biol* 50 : 403-417
- Holčík J (1991) Fish introductions in Europe with particular reference to its central and eastern part. *Can J Fish Aquat Sci* 48 : 13-23
- Kednapat S, Uthairat NN, Sirawut K (2018) Species identification of non-hybrid and hybrid Pangasiid catfish using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Agri Natural Resources* 52 : 99-105
- Liu S, Liu Y, Zhou G, Zhang X, Luo C, Feng H, He X, Zhu G, Yang H (2001) The formation of tetraploid stocks of red crucian carp × common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization. *Aquaculture* 192 : 171-186
- Liu SJ (2010) Distant hybridization leads to different ploidy fishes. *Sci China* 53 : 416-425
- 正岡哲治, 名古屋博之, 岡本裕之, 荒木和男, 藤原篤志, 小林敬典 (2013) コイとフナ類における種判別用DNAマーカーの開発. *DNA多型* 21 : 94-98
- 正岡哲治, 名古屋博之, 岡本裕之, 荒木和男, 藤原篤志, 小林敬典 (2014) DNAマーカーによるコイとフナ類の雑種判別. *DNA多型* 22 : 80-83
- 正岡哲治, 名古屋博之, 岡本裕之, 荒木和男, 藤原篤志, 小林敬典 (2015) PCRを利用したコイとフナ類の判別手法の開発. *DNA多型* 23 : 79-83
- Masaoka T, Oku H, Okamoto H, Araki K, Nagoya H, Yanagimoto T, Fujiwara A, Kobayashi T (2015) Distinction of hybrids between *Salvelinus leucomaenis* and *Salmo salar* using aromatase gene. *DNA Testing* 7 : 27-35
- 正岡哲治, 名古屋博之, 岡本裕之, 荒木和男, 藤原篤志, 小林敬典 (2016) PCRを利用したコイとフナ類の雑種判別. *DNA多型* 24 : 23-26
- 正岡哲治, 名古屋博之, 岡本裕之, 荒木和男, 藤原篤志, 小林敬典 (2017) 産卵を誘発する人為的環境におけるコイとフナ類の自然交雑の確認. *DNA多型* 25 : 11-15
- 正岡哲治, 名古屋博之, 岡本裕之, 荒木和男, 藤原篤志, 小林敬典 (2018) 屋外大型飼育

- 池におけるコイとフナ類の自然交雑の確認. DNA多型 26 : 25-29
- Masaoka T, Okamoto H, Araki K, Nagoya H, Fujiwara A, Kobayashi T (2018) Distinction between non-native and Japanese native cyprinid fishes based on mitochondrial 16S ribosomal RNA gene regions. DNA Testing 10 : 30-42
- 正岡哲治, 名古屋博之, 岡本裕之, 荒木和男, 藤原篤志, 小林敬典 (2019) DNAマーカーを用いたコイとキンギョの雑種判別. DNA鑑定 11 : 19-30
- McKeown NJ, Robin J, Sha, PW (2015) Species-specific PCR-RFLP for identification of early life history stages of squid and other applications to fisheries research. Fish Res 167 : 207-209
- 名古屋博之, 野村和晴, 伊東尚史, 正岡哲治, 荒木和男 (2016) コイとゲンゴロウブナの交雑と戻し交雑個体について. 平成28年度日本水産学会秋季大会講演要旨 : 17
- 名古屋博之, 野村和晴, 正岡哲治 (2018) コイとフナ類の交雑個体の妊性と倍数性-3 4倍体作出の試みと3倍体F2の成熟. 平成30年度日本水産学会秋季大会講演要旨 : 30
- Nelson JS (2006) Fishes of the World fourth edition. John Wiley & Sons, Hoboken : 139-143
- 小島吉雄 (1983) 魚類細胞遺伝学. 緑書房, 東京
- Ojima Y, Hayashi M, Ueno K (1975) Triploidy appeared in the back-cross offspring from Funa-carp crossing. Proc Jpn Acad 51 : 702-706
- Palumbi SR, Martin A, Romano S, McMillan WO, Stice L, Grabowski G (1991) The simple fool's guide to PCR. Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu
- Schmidt BF, Amorim AF, Hilsdorf AWS (2015) PCR-RFLP analysis to identify four ray species of the genus *Dasyatis* (Elasmobranchii, Dasyatidae) fished along the southeastern and southern coast of Brazil. Fish Res 167 : 71-74
- Suzuki R, Fukuda Y (1971) Survival potential of F₁ hybrids among salmonid fishes. Bulletin of Freshwater Fisheries Research Laboratory, 21 : 69-83
- Suzuki R, Fukuda Y (1973) Sexual maturity of F₁ hybrids among salmonid fishes. Ibid, 24 : 11-31
- Takayama S, Hamaguchi A, Ojima Y, Kusa M (1961) On the mosaic organization of cortical alveoli in eggs of Carp-funa hybrids. Annot Zool 34 : 128-131

【連絡著者】

正岡哲治

国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所

養殖部門育種部育種基盤グループ

〒519-0423 三重県度会郡玉城町昼田224-1

電話：0596-58-6411

FAX：0596-58-6413

E-mail：tmasa@fra.affrc.go.jp

Tetsuji Masaoka

Japan Fisheries Research and Education Agency, Fisheries Technology Institute,

Aquaculture Research Department, Aquatic Breeding Division

224-1 Hiruta, Tamaki, Mie 519-0423, JAPAN

Phone：+81-(0)596-58-6411, FAX：+81-(0)596-58-6413

E-mail：tmasa@fra.affrc.go.jp

【Running title】

Estimation of composition of genome in hybrid F₃

【Abbreviations】

水産機構水技研