

## キンギョのクローン化初動判定法への RAPD-PCR 法の適用

松村貴晴\*<sup>1</sup>・五藤啓二\*<sup>2</sup>・日比野学\*<sup>2</sup>・岩田靖宏\*<sup>3</sup>・間瀬三博\*<sup>4</sup>

### Application of RAPD-PCR for the initial identification of gynogenetic clones in goldfish (*Carassius auratus*)

MATSUMURA Takaharu\*<sup>1</sup>, GOTOH Keiji\*<sup>2</sup>, HIBINO Manabu\*<sup>2</sup>, IWATA Yasuhiro\*<sup>3</sup>, and MASE Mitsuhiro\*<sup>4</sup>

**Abstract :** In teleost, genetically clonal lines could be induced by continuous gynogenetic treatments, inhibition of first cleavage in the first generation and subsequent suppression of polar body release in the second one. And to identify the genetic homogeneity of these prospective clonal lines, scale transplantations are performed in goldfish. In this study, we tried to apply RAPD-PCR as an initial identification method.

First, we tried screening of optimal primers for genetic identification in the first generation of six gynogens induced by first cleavage inhibition, and found 5 primers which show polymorphic appearance. Then, the DNA amplifications by these 5 primers were carried out to two prospective clonal lines A-G2f and B-G2. While polymorphic appearance was observed in B-G2 line, monomorphic appearance was observed in A-G2f line. Furthermore, transplanted donor scales were accepted between individuals of A-G2f line. These results suggest that RAPD-PCR is useful as an initial method to identify the genetic homogeneity of the prospective clonal lines in goldfish.

キーワード；キンギョ，RAPD-PCR，雌性発生，クローン

キンギョには 1500 年といわれる飼育の歴史があり、その中で品種改良が盛んに行われ、現在、日本観賞魚振興会により 25 品種が認定されている。愛知県の弥富地方は、全国でも有数のキンギョ生産地であり、高級品種の生産がその特徴に挙げられるが、生産者の高齢化に伴う労働力の低下、産地間競争や海外からの観賞魚の流入などにより、歩留まりのさらなる向上、耐病性、新品種など生産の効率化、高付加価値化を目指した品種改良が要求されている。しかし、選抜と交雑によるこれまでの品種改良法では長い時間がかかり、消費者の嗜好の変化に対応

できない。そこで、短期間で品種改良を行う技術が必要とされ、クローン技術の導入が検討されてきた。

魚類のクローン作出技術は、1 世代目で第 1 卵割阻止法、2 世代目で第 2 極体放出阻止法の 2 種類の雌性発生法を組み合わせることで、姉妹間で遺伝的均一度の極めて高い群を作出する技術である。この技術によるクローンは、ゼブラフィッシュ<sup>1)</sup>で最初に報告され、その後、メダカ、<sup>2)</sup>コイ、<sup>3)</sup>アユ、<sup>4)</sup>アマゴ、<sup>5)</sup>キンギョ、<sup>6)</sup>ヒラメ、<sup>7)</sup>マダイ<sup>8)</sup>など様々な魚種での報告がある。この技術は、1 世代目の第 1 卵割阻止により、すべての遺

\*1 愛知県水産試験場 内水面漁業研究所 弥富指導所 (Yatomi Station, Freshwater Resources Research Center, Aichi Fisheries Research Institute, Yatomi, Aichi498-0017, Japan)

\*2 愛知県知多農林水産事務所 (Chita Agriculture, Forestry and Fisheries Regional Office, Aichi Prefectural Government, Handa, Aichi475-0903, Japan)

\*3 愛知県水産試験場 内水面漁業研究所 (Freshwater Resources Research Center, Aichi Fisheries Research Institute, Isshiki, Hazu, Aichi444-0425, Japan)

\*4 愛知県水産試験場 漁業生産研究所 (Marine Resources Research Center, Aichi Fisheries Research Institute, Toyohama, Minamichita, Aichi470-3412, Japan)

伝子，染色体がホモ型の完全ホモ 2 倍体を作成することに要点がある。完全ホモ 2 倍体から得られる配偶子は，組み替えの影響を受けないために，再び雌性発生を行うと次世代の個体がすべて遺伝的に均一になる。しかし，第 1 卵割阻止が不成功で，第一世代の個体が第 2 極体の不放出により生じた場合，完全ホモ型とならず，その結果，第二世代がクローンになっていない可能性がある。従って，第 2 世代の第 2 極体放出阻止群が，遺伝的に均一かどうかを確かめてはじめてクローン化に成功したといえることができる。特に，キングヨにおいてはこの第 2 極体不放出「自然雌性発生」という現象が知られており，<sup>9)</sup>それが第 1 卵割阻止型雌性発生魚に混入する可能性が高い。従って，作出魚は入念に遺伝的均一性を確認する必要がある。

クローン化の確認は，DNA フィンガープリント，<sup>10)</sup>マイクロサテライト PCR 法<sup>11)</sup>などによって行なわれている。これまで当試験場では，キングヨのクローン化の確認を鱗移植法と DNA フィンガープリント法によって行なってきた。DNA フィンガープリント法は，分析に多量の DNA が必要で，魚体の小さいキングヨにとっては大きな負担がかかる。また，DNA フィンガープリント法によるバンド出現パターンに差が見られないような個体間であっても，鱗移植が成立しないケースが認められ，クローン化の判定精度としては，DNA フィンガープリント法は鱗移植法に劣っている，と考えられた。一方，鱗移植法は，ある程度個体が成長しないと操作が行えない，移植操作に熟練を要する，移植の成功を判定するために 2 ヶ月の経過観察を要する，などの実作業上の欠点があり，研究の進行を遅らせる原因となつて

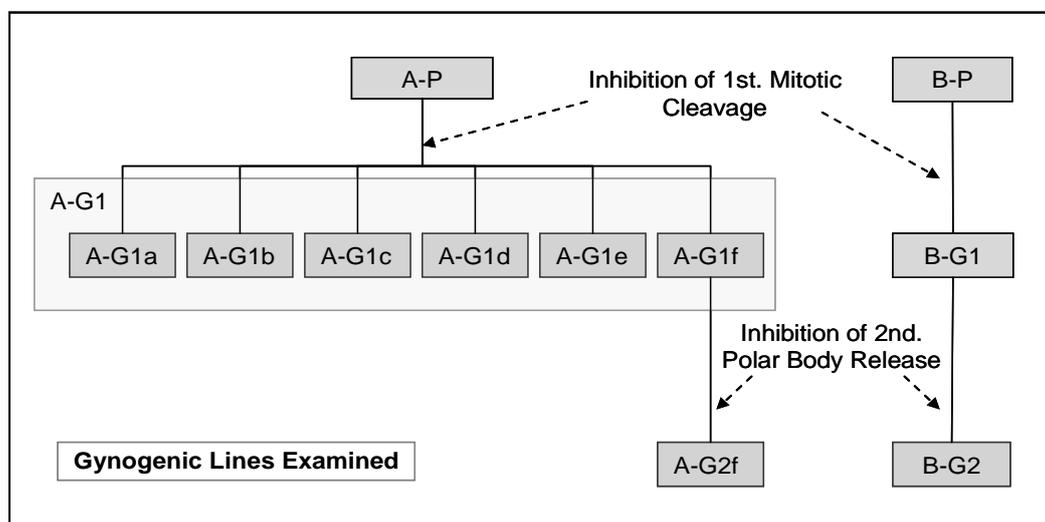
いる。また，鱗移植法は組織適合性のみで判定するために，偶然に免疫関連遺伝子群が一致すればクローンでなくても移植が成立してしまう，という欠点もある。

RAPD-PCR 法は近年発展してきた PCR 技術の一つであり，10bp 程度のランダムに配列されたプライマーを用いて個体群の遺伝的多様度などを調べる目的で使われる。魚類においても，ギンブナ<sup>12)</sup>やドジョウ<sup>13)</sup>のクローン性の証明などに用いられている。プライマーの開発や煩雑な操作が必要なく，PCR を行える者なら誰でも取り組める，少量の DNA から分析が行え，何種類ものプライマーを用いることでより僅かな遺伝的変異を検出できる，などの利点がある。そこで今回，鱗移植を行えない仔魚期のキングヨに対して適用できるクローン化初動判定法として，この RAPD-PCR 法が有効かどうか検討を行ったので報告する。

#### 材料及び方法

##### 材料とした系統

試験に用いた 2 系統の魚の由来を Fig.1 に示した。1 系統は，2004 年に当試験場内で飼育されていた 1 尾のリユウキン（以下 A-P）を祖母とする。A-P の第 1 卵割阻止型雌性発生群（以下 A-G1 区）に由来する 6 尾（A-G1a～A-G1f）のうち，A-G1f からさらに 2005 年に第 2 極体放出阻止型雌性発生により作出したのが A-G2f 区である。もう 1 系統は，2002 年に弥富町の生産者から購入したり



**Fig. 1** Schematic presentation of gynogenetic lines examined in this article. Group A-G1 and B-G1 are gynogenetically produced from individual female A-P and B-P, respectively, by the inhibition of the first cleavage. A-G2f and B-G2 are gynogenetically produced from A-G1f (one individual female of A-G1) and one B-G1 female, respectively, by the suppression of the second polar body release.

ユウキン 1 尾 (以下 B-P とする) に由来する。B-P より採卵し, 第 1 卵割阻止型雌性発生を行った群 (以下 B-G1 区) の内の 1 尾から, 2005 年に第 2 極体放出阻止型雌性発生を行い作出した区が B-G2 である。A-G2f 区及び B-G2 区はクローン化されている可能性がある群である。

#### 雌性発生と飼育管理

雌性発生の諸条件は以下のとおりである。媒精に用いた不活化精子は, ニシキゴイの精子をコイ人工精漿<sup>14)</sup>で 100 倍に希釈し, 顕微鏡下で運動性を確認後, 8000 erg/mm<sup>2</sup> の紫外線を照射して調製した。媒精後, ふ化までは第 1 卵割阻止, 第 2 極体放出阻止のための高温処理を除き, 20 で飼育した。第 1 卵割阻止は, 媒精 34 分後から 40 , 40 秒間に引き続き, 20 , 1 分間, 40 , 40 秒間という工程で 2 回の高温処理を施すことにより行った。第 2 極体放出阻止は, 媒精 5 分後に 40 , 1 分間の高温処理によって行った。

ふ化仔魚は, ふ化後 3 週間はアルテミアを, その後は配合飼料に切り替えて給餌した。止水で飼育し, 水質に応じて適宜, 換水や底掃除などを実施した。水槽は 15 L 容から開始し, 1 m<sup>3</sup> 容, 2 m<sup>3</sup> 容へと適宜拡大した。

#### RAPD-PCR

A-G1 区は A-G1a~A-G1f の 6 尾から A-G2f 区は 7 尾から, B-G2 区は 6 尾から, それぞれ約 20 mg の尾鱗断片を採取し, そこから DNA を抽出した。抽出は PUREGENE (Gentra System) を用いて添付の抽出マニュアルに従って行い, 最終産物は 50 µL の滅菌蒸留水に溶解した。抽出した DNA サンプルは 5 倍に希釈して RAPD-PCR の鋳型に用いた。陰性対照には希釈に用いた滅菌蒸留水を使用した。

PCR 反応は Williams *et al.*<sup>15)</sup> の手法に従って行った。PCR は反応液 25 µL あたり, Taq DNA polymerase (TaKaRa) 1.25 units, 添付 10×buffer 2.5 µL, dNTP mixture 終濃度 0.2 mM, プライマー終濃度 0.2 µM, 鋳型 DNA 1 µL として行った。プライマーにはオペロン社 OPA-1 から OPA-20 までの 20 個のランダムプライマー (10 塩基) を用い, 増幅には Applied Biosystems 社の Geneamp2400 を用いた。温度条件は 94 で 4 分間プレヒートした後, 94 で 1 分間, 36 で 1 分間, 72 で 2 分間の温度サイクルを 35 回繰り返す, 最後に, 72 で 5 分間の伸張反応を行った。

増幅 DNA 断片は, 1% アガロースゲル (ナカライテスク), 電気泳動槽 Mupid-2 (アドバンス) を用いて 50 V で 1 時間, 電気泳動で分画し, エチジウムブロミドで染色して検出した。ゲル上でバンドとして確認された増幅断片のうち, 明瞭に他の断片と区別できるものを分析に用いた。分子量マーカーは Hind digest (TaKaRa) を用いた。

#### 鱗移植

A-G2f 区について, 2 尾を 1 組として 2 組, 計 4 尾を選び, 鱗移植を行った。体表のほとんどが赤い魚とほとんどが白い魚の 2 尾を麻酔剤 FA-100 (田辺製薬) で麻酔した後, バットにあげ, 左体側側線下, 前から 5 番目と 8 番目の鱗をピンセットで採取した。白い魚から採取した 5 番目の鱗を赤い魚の 5 番目の鱗のあった位置に, 代わりに赤い魚の 5 番目の鱗を白い魚の 5 番目の位置に移植した。白い魚の 8 番目の鱗と赤い魚の 8 番目の鱗も同様に交換移植した。同じ処置をもう 1 組の赤い魚と白い魚に対しても行い, 合計 4 尾 8 枚の鱗の移植を行った。移植を行った魚は 50 L 水槽で最低水温 15 になるようヒーターをかけて通常通り止水で飼育し, 毎週 1 回, 移植鱗の脱落の有無を調査した。

#### 結 果

##### (1) プライマーのスクリーニング

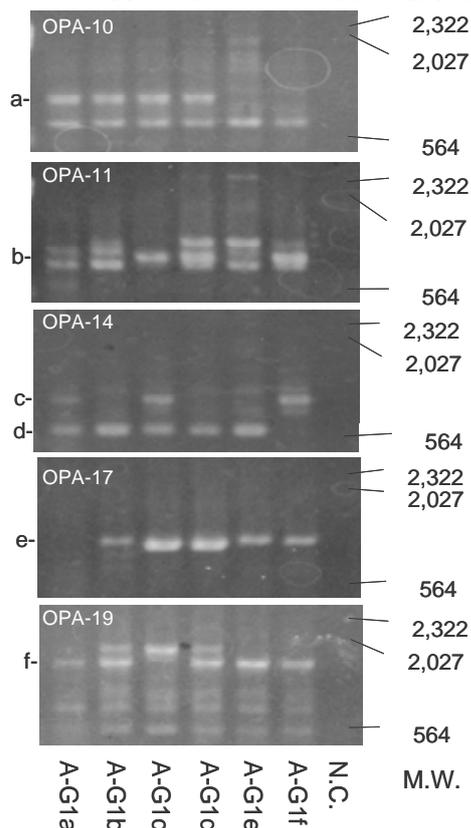
最初に, A-G1 区 6 検体 (A-G1a~A-G1f) の鋳型 DNA を用い, 分析に有効なプライマーのスクリーニングを行った。卵割阻止型雌性発生群である A-G1 区は, 理論上, 個体間の遺伝的変異が大きく認められるはずであり, 群内変異を検出するためのプライマーを探索するのに適当と考えられたためである。6 試料に対して OPA-1 から OPA-20 までのプライマーを用いて増幅反応を行い, 試料間で多型を示す増幅断片が認められたプライマーについては, 追試を行い, 再現性を確認した。

その結果, 20 個のプライマーで合計して 72 個の明瞭なバンドが検出された。このうち, OPA-10, 11, 14, 17, 19 の 5 つのプライマーを用いた場合に, バンド a (OPA-10, 約 1240bp), バンド b (OPA-11, 約 1200bp), バンド c, d (OPA-14, それぞれ約 1220bp, 750bp), バンド e (OPA-17, 約 1060bp), バンド f (OPA-19, 約 1820bp) の合計 6 個の再現性のよい, 多型を示すバンドが認められた (Fig. 2)。従って, これらのプライマーが, A-P を祖母とする群に

ついて群内個体間の多型を分析するのに適当と判断し、以後の分析に用いた。なお、以後の実験では、この5つのプライマー全てで増幅産物が認められた、A-G1d から抽出したDNAを陽性対照として使用することとした。

### (2)クローン候補のRAPD-PCRによる分析

A-G2f 区の個体7尾とその親魚 A-G1f について5つのプライマーを用いて増幅を行った結果を Fig.3 に示した。バンド a-f 全てについて、A-G2f 区のすべての個体が母親である A-G1f と同じバンドの出現パターンを示し、これらのバンドに由来するゲノム部位は群内個体間及び親



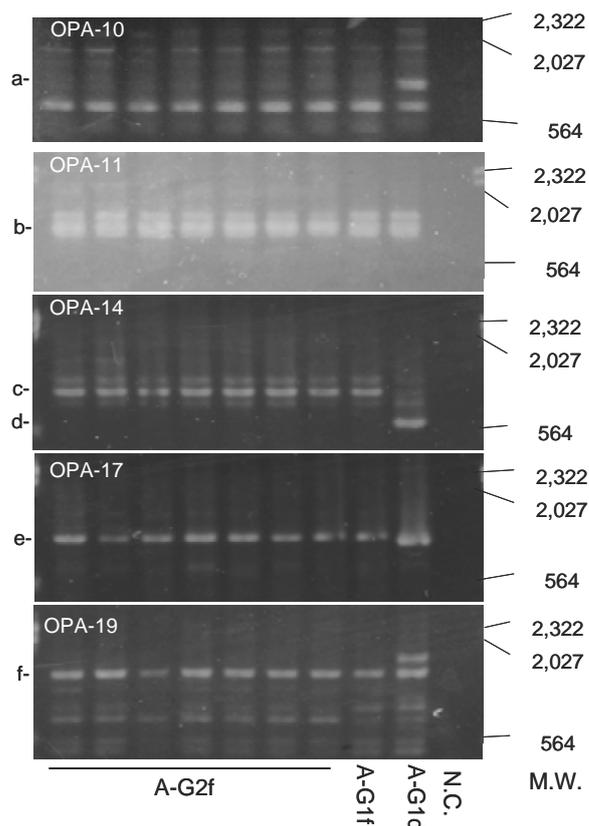
**Fig.2** Electrophoretic profiles of RAPD-PCR in the first generation of six gynogens (A-G1a-f) amplified with five primers (OPA10, 11, 14, 17 and 19). Polymorphic appearance was identified at the bands shown a-f. N.C. shows negative control, and the numbers on right side are the positions of molecular weight markers.

子間すべて同一であったと考えられた。一方、B-G2 区では、バンド a, b, c, e には多型が観察されなかったが、バンド d 及び f が個体間で多型を示した (Fig.4)。

### (3)鱗移植によるクローン化の確認

A-G2f 区の魚4尾について、各2枚、計8枚の鱗移植を行った (Fig.5)。移植した4尾8枚の鱗のうち、2尾の各1枚について移植後1週間で脱落が確認されたが、

その後の脱落は見られなかった。移植2ヵ月後の観察で、2尾は2枚、残りの2尾は1枚ずつの移植鱗の生着が確認された。移植鱗に由来する赤い色素の宿主体表への浸潤の例も確認された。また、移植1週間後に脱落していた2枚の移植鱗について、鱗が脱落した痕に炎症反応などは見られなかったことから、脱落は組織の拒絶反応によるものではなく、鱗の挿入が不十分だったために自然に脱落したものと判断された。これらの結果から、すべての魚で1枚以上の移植が成立しており、A-G2f 区はクローン化されていた、と判断された。



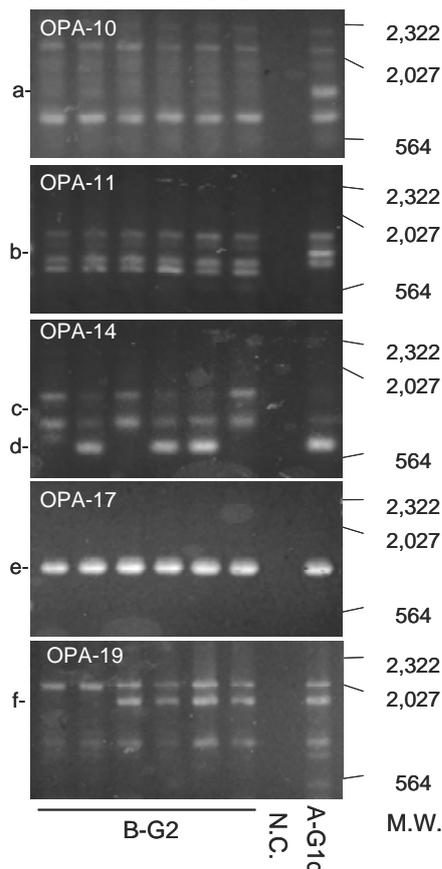
**Fig.3** Electrophoretic profiles of RAPD-PCR in seven individuals from the prospective clonal line (A-G2f) and its maternal parent (A-G1f). Monomorphic appearance was identified in all individuals, suggesting that those were clone. a-f are the prospective positions which polymorphic bands shown in Fig.2 should appear. A-G1d is one of the individuals of A-G1 (see Fig.1, 2) used as a positive control and N.C. shows negative control. The numbers on the right side are the positions of molecular weight markers.

### 考 察

今回の研究は、キンギョのクローン化初動判定法としての RAPD-PCR 法の有効性を調べる目的で行った。これま

での研究では、キングヨのクローン化の確認は鱗移植法によって行われてきた。鱗移植法による判定は、免疫関連遺伝子群のみしか判定対象とならないものの個体ごとの特異性が非常に高いこと、また、DNA フィンガープリント法などの生化学的手法が鱗移植法に比べて十分な判定精度が得られなかったことから、現在も標準法として用いられている。今回の実験で鱗移植の成立した A-G2f 区は、この判定基準に従い、クローン化された、と判定される。

この鱗移植の成立した A-G2f 区について、今回の

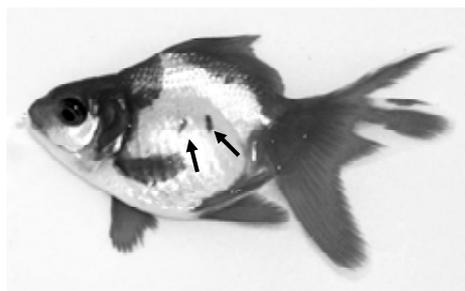


**Fig.4** Electrophoretic profiles of RAPD-PCR in six individuals from the prospective clonal line (B-G2). Polymorphic appearances were identified by OPA-14 and OPA-19 primers, indicating that this line was not clone. a-f are the prospective positions which polymorphic bands shown in Fig.2 should appear. A-G1d is one of the individuals of A-G1 (see Fig.1, 2) used as a positive control and N.C. shows negative control. The numbers on the right side are the positions of molecular weight markers.

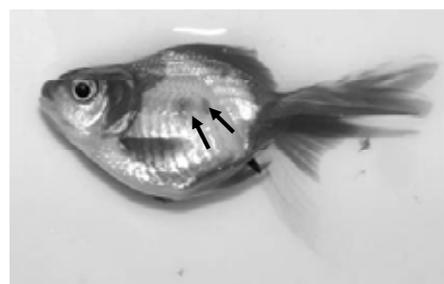
RAPD-PCR 法による判定を試みた結果、群内多型が検出されなかったことは、A-G2f 区がクローン化されたことを

裏付ける結果といえる。本稿ではデータを示していないが、A-G1b を親として作出した A-G2b 群や、A-G1c を親として作出した A-G2c 群でも同様に、RAPD-PCR で群内多型が検出されず、また、鱗移植が成立したことを確認している。一方、B-G2 区では、OPA-14, 19 によって群内で変異が検出されており、今回の方法で選定したプライマーが、クローン化されていない群を発見するプライマーとして有効であることを示している。

以上のことから、RAPD-PCR 法でもある程度のクローン化の確認が可能である、と考えられた。また、RAPD-PCR



a. 2 weeks after transplantation



b. 2 months after transplantation

**Fig.5** Clonal identification by scale transplantation between two individuals in A-G2f line, reciprocally. Red scales, transplanted from the other individual to the host abdominal region without red scale, were accepted in the host fish at 2 months after operation, indicating that this pair of fish is clone.

法と鱗移植法の判定精度については、今回の実験では比較できないが、鱗移植の結果と RAPD-PCR の結果が対応していることから、RAPD-PCR 法は、初動判定法としては十分な精度が得られた、と考えられた。今回の研究で使用したプライマーは 20 個だったが、さらに高い精度が要求されるならば、プライマーの数を増やすことで対応が可能と考えられる。

B-G2 区がクローン化していなかった原因については、これまで言われてきたような、第 2 極体の不放出により生じた自然雌性発生による可能性の他にも、B-G2 の祖母

である B-P が四倍体魚だった場合，その卵に第 1 卵割阻止が起きなければ，B-G1 はヘテロな部分を有する 2 倍体魚として生まれてくる，といった可能性が考えられる。また，四倍体魚から得た卵が第 1 卵割阻止に成功したとしても，4 本の相同染色体がどの様に対合するかによっては，次の世代でヘテロな部分を有する四倍体が出現する可能性もある。これらのような事例が実際に存在するのかどうか，クローン化に失敗した事例を収集し，マイクロサテライト DNA 解析など染色体の動きを追跡できる解析方法を組み合わせることで，その染色体の挙動が明らかにできれば，コイ科魚類の複雑な遺伝のメカニズムを解き明かす端緒となるであろう。

今回の研究は，RAPD-PCR 法の導入によるクローン化判定の効率化が目的であった。本研究において，RAPD-PCR は採卵から約半年後の魚，鱗移植は約 1 年半後の魚を用いている。すなわち RAPD-PCR 法の導入により，確認に要する飼育期間を 1 年間短縮し，これまでの約 1/3 にすることが可能になった。初動判定でクローン化されていない系統は飼育する必要がなくなるため，水槽の数や，養殖にかかる手間を減らすことができるので，同一施設で 1 年当たり育成できる群の数も大幅に増やすことができる。これにより優良クローン作出の成功率も向上できると考えられる。

雌性発生技術を用いたキンギョのクローン作出技術は，商業的に付加価値の高い系統を短期間に作出することを期待された技術である。RAPD-PCR 法によるクローン化の初動判定法を導入することにより，体型が良い，歩留まりが高い，耐病性が高い，などの商業的価値の高い形質を有するクローンの作出のための研究の効率化に資することが期待できる。また，効率的に様々なクローン系統が作出できれば，それに比例してクローン同士を掛け合わせた F1 品種を多数作出することができるようになる。本手法が，キンギョのクローン育種の発展に寄与することが期待される。

## 要 約

キンギョ雌性発生クローンは第 1 世代の第 1 卵割阻止型雌性発生に引き続き，第 2 世代の第 2 極体放出阻止型雌性発生により作出される。このクローン候補のクローン化判定法として，通常，鱗移植法が用いられるが，今回，初動判定法として RAPD-PCR 法を適用させることを試みた。まず，第 1 卵割阻止魚群 A-G1 を用いて，A-G1 群内で多型を示すプライマーをスクリーニングし，多型を示した OPA10, 11, 14, 17, 19 の 5 つのプライマーを用いてクローン候補 A-G2f を調べたところ，群内多型はみ

られず，鱗移植も成立した。一方で別系統クローン候補の B-G2 群については，OPA14, 19 で多型が検出され，RAPD-PCR 法でクローン化されていない群を検出できることが示された。以上から，RAPD-PCR 法はクローン化の初動判定法として有効である，と考えられた。

## 文 献

- 1) Streisinger, G., C. Walker, N. Dower, D. Knauber and F. Singer. (1981) Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, **291**, 293-296.
- 2) Naruse, K., K. Ijiri, A. Shima and N. Egami. (1985) The production of cloned fish in the medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.*, **236**, 335-341.
- 3) Komen, J., A. B. J. Bongers, J. J. Richter, W. B. van Muiswinkel and E. A. Huisman. (1991) Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.). The production of clones of homozygous gynogenetic clones and F1 hybrids. *Aquaculture*, **92**, 127-142.
- 4) Han, H. S., N. Taniguchi and A. Tsujimura. (1991) Production of clonal ayu by chromosome manipulation and confirmation by isozyme marker and tissue grafting. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 825-832.
- 5) Kobayashi, T., A. Ide, T. Hiasa, S. Fushiki and K. Ueno. (1994) Production of cloned amago salmon *Oncorhynchus rhodurus*. *Fish. Sci.*, **60**, 275-281.
- 6) 鯉江秀亮・水野正之・都築 基 (2001) 作出クローンのクローン化確認と特性調査 .平成 13 年度愛知県水産試験場業務報告, 43-44.
- 7) Yamamoto, E. (1999) Studies on sex-manipulation and production of cloned population in hirame, *Paralichthis olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture*, **173**, 235-246.
- 8) Kato, K., R. Hayashi, D. Yuasa, S. Yamamoto, S. Miyashita, O. Murata and H. Kumai. (2002) Production of cloned red sea bream, *Pagrus major*, by chromosome manipulation. *Aquaculture*, **207**, 19-27.
- 9) 岡本俊治・平澤康弘・村松寿夫 (1990) キンギョの卵割阻止による雌性発生の処理条件の検討. 平成 3 年度愛知県水産試験場業務報告, 26-27.
- 10) 森 立成, 斉藤節雄 (2004) クローンヒラメのクローン性の証明と系統判別. 第 1 報 DNA フィンガープリント法による証明と判別. 北水試研報, **67**, 81-88.

- 11) 齊藤節雄, 森 立成 (2005) クローンヒラメのクローン性の証明と系統判別. 第 2 報 マイクロサテライト DNA 多型による証明と判別. 北水試研報, **68**, 65-70.
- 12) 董仕, 谷口順彦 (1996) RAPD-PCR およびアイソザイムパターンによるギンブナー腹子のクローン性の証明 日水誌 **62**(6), 891-896.
- 13) Itono, M., K. Morishima, T. Fujimoto, E. Bando, E. Yamaha, and K. Arai. (2006) Premeiotic endomitosis produces diploid eggs in the natural clone loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei:Cobitidae). J. Exp. Zool., **305A**, 513-523.
- 14) Kurokura, H., M. Hirano and M. Iwahashi. (1984) Cryopreservation of carp sperm. Aquaculture, **37**, 267-273.
- 15) Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research, **18**(22), 6531-6535.