

氏 名(本籍)	おお 大 はら 原 けん 健 いち 一
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 6 7 5 号
学位授与年月日	平 成 13 年 3 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科環境修復生物学専攻 (博士課程)
学位論文題目	ギンブナの単性発生とクローンの多様化に関する集団 遺伝学的研究
論文審査委員	(主 査) 教 授 谷 口 順 彦 教 授 谷 口 旭 教 授 大 森 迪 夫

論文内容要旨

序論

フナ属魚類(*Carassius*)はユーラシア大陸に広く分布し、特に内水面漁業の盛んな地域では水産重要魚種として広く利用されている。ギンブナ(*C. langsdorfi*)は雌性発生、倍数体、クローンといった一般的な有性生殖種にはない特徴を数多く備えている。ギンブナのようにクローンを1つの単位とした魚類の分布と集団構造に関する研究は、単性脊椎動物種の進化の過程と解明するための基本的な情報として重要である。ギンブナのような単性(全雌)で雌性発生により再生産する脊椎動物種の起源は雑種の可能性が高いと考えられているが、ギンブナの場合その両親種は明らかでない。

本研究では、第一章でギンブナのクローン判別と集団構造解析に適したDNA多型マーカーを探索するために三つのDNA多型マーカーを比較した。また、ギンブナDNAよりマイクロサテライトDNAを設計した。第二章ではギンブナにおけるクローンの多様化が、配偶子形成時の組換えによるものか突然変異によるものかを検証するために、マイクロサテライトDNAを用いて一腹子のG-C組換え率を推定した。第三章では、ギンブナと二倍体集団の遺伝的独立性について調査した。第四章では、ギンブナの集団構造を把握するために、ギンブナのクローン構成と地理的分化について調査した。第五章では、中国産三倍体フナが日本産ギンブナにおける種の特徴(二倍体種からの遺伝的独立性、クローン性)を保有しているかどうか調査した。また、中国産二倍体フナと日本産ギンブナとの関係より起源を推定した。第六章では、ギンブナ集団の多様化のメカニズムとその起源について考察した。

第一章 ギンブナの集団遺伝分析用

DNAマーカーの開発 ギンブナのクローン判別と集団構造解析に適したDNA多型マーカーを探索するために、マルチローカスミニサテライトDNAフィンガープリント、シングルローカスマイクロサテライトDNA多型、mtDNA RFLP(制限断片長多型)の3つのDNA多型マーカーを比較した。ミニサテライトDNAは高い多型性を示し、クローンの判別に有効であったが、再現性や個体数の処理能力の点から集団構造解析には不適であった。マイクロサテライトDNAは高い多型性を示し、クローンの判別に有効であると共に対立遺伝

子や遺伝子型の記録が可能であり、集団構造解析に有効であった(Table 1). mtDNA RFLP は、マイクロサテライト DNA で判別されたクローン複数のクローンが一つのハプロタイプに含まれ、クローン判別はできなかったが、雑種起源と考えられるギンブナの母系種の判定には有効である可能性が示された. 新たにギンブナより 19 のマイクロサテライトマーカー (*SCR1**~*19**) を単離・設計することができた(Table 2).

第二章 マイクロサテライト DNA を用いたギンブナの G-C 組換え率の推定

ギンブナの多様化が、配偶子形成時の組換えによるものか検証するために、マイクロサテライト DNA を用いて一腹子の G-C 組換え率を推定した. 同時に、有性生殖種であるオオキンブナ (*C. buergeri buergeri*) の第二極体放出阻止型雌性発生二倍体を用いて G-C 間距離を推定し、ギンブナのそれと比較した. ギンブナの一腹子は雌親と全く同一の遺伝子型を示し、組換え型の個体は全く出現しなかった(Table 3). 一方、オオキンブナの G-C 間距離は 0~50cM まで分布し、染色体の動原体に近い部分から末端まで広く分布していた(Table 3). 天然集団で採集された 24 クローン系統のヘテロ接合体率とオオキンブナの G-C 間距離には有意な相関は見られなかった(Fig. 1). ギンブナは、減数分裂の第一分裂を省略し、最終的に体細胞分裂と同じ過程で均等分裂が起こり、非還元的に卵形成を行うと考えられた. その際、相同染色体の分離、交叉はなく卵は母親の完全なコピーとなると考えられた. これらのことからギンブナの配偶子形成は apomixis 型の一例であると考えられた(Fig. 2).

第三章 DNA マーカーを用いたギンブナの二倍体フナ集団からの遺伝的独立性の証明

近年、全国各地にゲンゴロウブナの改良品種であるヘラブナが放流され、各地で在来種との交雑個体が確認されている. ギンブナとゲンゴロウブナおよび在来二倍体フナ集団との遺伝的関係と、放流されたゲンゴロウブナの遺伝的影響について DNA マーカーを用いて調査した. 形態形質の結果から鳥取県

湖山池にはギンブナ、ナガブナ、ゲンゴロウブナ以外に、形態的にナガブナとゲンゴロウブナの中間的な形態形質を持つ個体(ハイブリッド個体群)が認められた。ギンブナ集団は7系統のクローンで構成され、mtDNA および CK^* で二倍体ブナにはない特異的なパターンが示され、他の二倍体ブナからのギンブナの遺伝的独立性が証明された。マイクロサテライト DNA においてナガブナとゲンゴロウブナの間で主対立遺伝子対頻度の置換が認められ、ハイブリッド個体群はその両者の対立遺伝子を保有していた。マイクロサテライト DNA においてハイブリッド個体群はヘテロ過剰であった(Table 4)。ハイブリッドインデックスはナガブナで 0.771~0.906 (平均 0.907)、ゲンゴロウブナで 0.068~0.157 (平均 0.110)、ハイブリッド個体群で 0.102~0.806 (平均 0.476)であった(Fig. 3)。これらのことからハイブリッド個体群はナガブナとゲンゴロウブナ交配によって生じた二倍体雑種であることが証明された。ゲンゴロウブナは交雑による遺伝子の移入によりは在来ナガブナ集団の遺伝的な特異性を失わせていると考えられた。また、ゲンゴロウブナに関しても交雑によりその特性が失われ放流効果の減少を招く一因となっていると考えられた。

第四章 DNA マーカーを用いたギンブナのクローン構成比較

ギンブナの集団構造を把握するために、6地点(琵琶湖、高知(仁淀川、物部川)、鳥取県湖山池、新潟県福島潟、千葉県印旛沼、茨城県霞ヶ浦)より採集したギンブナのクローン構成と地理的分化について DNA マーカーを用いて調査した。すべての地点で複数のクローンからなる集団を構成しており、それらの中にそれぞれの地点で特異的なクローンと、2地点以上の地域に認められる共通クローンが存在していた。総クローン数は 61 系統であり、そのうち 14 系統が共通クローンであった(Table 4)。また、それぞれの地点で地域特異的クローンが認められた。共通クローンの多く(13/14 系統)が琵琶湖で確認された。ヘテロ接合体率はすべての地点で極めて高い値を示した。地域特異的クローンのみを用いて作成したデンドログラムは、地理的距離とよく一致した(Fig. 3)。在来二倍体の三亜種と“地域特異的クローン”の分布様式とはよく対応していた。これらのことから共通クローンは、琵琶湖を中心として移殖により分布していることが示され、ギンブナのクローン数は移殖により増加し

ていることが示唆された。

第五章 DNA マーカーを用いた中国産フナの集団構造

中国には日本と同様に二倍体と三倍体のフナの存在しているが、三倍体フナが日本産ギンブナにおける種の特徴(三倍体種からの遺伝的独立性、クローン、全雌集団)を保有しているか調査した。また、中国産二倍体フナの *CK** の遺伝子型より日本産ギンブナの起源を考察した。中国産フナは黒竜江水系の双鳳ダム、双龍ダム(黒竜江省方正県)、一心湖、除下村(ハルビン市近郊)の4地点より採集し、倍数性の判定後、DNA マーカーを用いて集団構造を調査した。三倍体の中に雄個体が認められたが、雄個体は雌個体と同一の遺伝子型を持つクローンであったことから、これらの個体は雌雄どちらも非還元卵から発生したものと推定された。三倍体フナは 33 クローン系統が認められ、日本のクローンとの共通性は認められなかったものの混合クローン集団を形成していた(Table 5)。また、日本と中国のクローン系統間のデンドログラムでは2つのクラスターを形成し、一方にすべての中国産クローンが含まれた(Fig. 4)。また集団間のデンドログラムより、中国産三倍体フナと日本のギンブナが異なるクラスターに含まれたことから、日本と中国のギンブナは遺伝的に分化していることが示唆された(Fig. 4)。中国産三倍体フナはクローン集団を形成していたことから、基本的には二倍体種からの遺伝的独立性は保有しているものと考えられた。一方、中国産二倍体フナは日本の二倍体フナには見られずギンブナ特有の *CK** の *c 対立遺伝子を保有しており、ギンブナの起源種の片親である可能性が示された。

第六章 総合考察

ギンブナの多様化が、配偶子形成時の組換えによらないことから、ギンブナは突然変異の蓄積によって多様性を維持している可能性が考えられた。一般的にクローン生物は遺伝的に均質なため環境の変化に弱いと考えられている。ギンブナではマイクロサテライト DNA においてヘテロ接合体率が極めて高い値を示している。このような高いヘテロ接合体率はギンブナが雑種起源であること、その異祖接合の遺伝子型を非還元卵の産出により維持している

ことが原因であると考えられた。その結果、突然変異によって蓄積した弱有害遺伝子の顕在化が押さえられているものと考えられる。また、そのような特徴を持ったクローンが天然集団には多数存在することにより、多様性を維持し他の有性生殖種と同等に生物学的ニッチを獲得しているものと考えられた。

日本の淡水魚にはゲンゴロウブナやアユ等の放流種への混入により分布を拡大した種が多く認められ、ギンブナの共通クローンもこの一例であると考えられた(Fig. 5)。ギンブナでは移殖魚から在来クローンへの遺伝子の侵入はないものの、クローンの競合という形で間接的に在来個体群に影響している可能性が考えられた。また、放流されたゲンゴロウブナは在来の二倍体集団へ遺伝的な影響を与えており、一度侵入した遺伝子は除去することが困難であることから、遺伝資源の保全の観点からも大きな問題であると考えられた。水産資源における生物多様性の保全と利用は両方の観点から考えるべきであり、その評価のために DNA マーカーを有効に利用すべきであると考えられた。

中国産の二倍体と日本の二倍体の二倍体個体群が両親種であれば、日本のギンブナの CK^* における abc の遺伝子型を形成することが可能である。ギンブナの形成過程の仮説を Fig. 6 に示した。日本のギンブナの多くが中国産二倍体フナとは異なる mtDNA のハプロタイプを保有していることから、母系種は日本産ギンブナで、父系種には中国産二倍体フナがあたるものと推定された。

Table 1. Comparison of genetic variability in DNA fingerprint, microsatellite DNA and mtDNA

	DNA markers		
	DNA fingerprint	Microsatellite DNA	mtDNA RFLP*
Identified clonal lines	16	17	7
Genetic distance among clonal lines	0.708±0.139	0.627±0.192	0.017±0.019

*Number of haplotypes and Sequence divergence among haplotypes

Table 2. Primer sequence, microsatellite repeat, fragment size and annealing temperature developed from *Ginbuna*

Locus	Primer sequence	Repeat	Size	Ann.*
<i>SCR-1*</i>	CTT CTC AGC ACT ACA ACA TTC A ACC AAA AAT AAC ATC AAA TCA	(ACC)	129	50
<i>SCR-2*</i>	GAG GTC GTT CAT TTA CTT ATT ATT CTC CAC CCA GCA	(GT)CT(GT)	177	53
<i>SCR-3*</i>	ACC CGT CCC ATC ACA GCC C AAT ACA TAC ACA CTC AAC A	(CA)	194	53
<i>SCR-4*</i>	ATT GAG TTC ATC TGG AGT TTG TGT TCT GTT CAT TTC TGT	(CA)	148	53
<i>SCR-5*</i>	GGC TCC ATA CCT CCC TTC T GTC TGT AAT GCT GCT TCT TCT	(GT)	157	53
<i>SCR-6*</i>	TGA AGG GTT GTA GGA TAG A TGT TGG CAG CAG GAA ATG TGG	(AC)	123	53
<i>SCR-7*</i>	GTT ATT CCC GTC GCA ATG TAG TGT GAG TCA GAG CAG AG	(GT)	111	53
<i>SCR-8*</i>	GGG AGA ATA CTG GTC GGG CAA ATC ATA CAC ACG AAG AAC AC	(GT)	101	53
<i>SCR-9*</i>	CCA GAC AGA CAG ACA CGA GGA GAG AGA AAA ATA GAC AG	(CA)	123	53
<i>SCR-10*</i>	GTG CTG AAC TCG CCG ATG GGA GGG TAA GAA AGA AAT AA	(CA)GA(CA)	124	50
<i>SCR-11*</i>	GCG AGG TTG TAT GTG TGA GA CAG ACT GAG TGC GAA AGG	(AC)(AT)	184	53
<i>SCR-12*</i>	TAA AAT GGA CAG TAG TGG A TAT GGC ACA AAA ACA AGA	(GT)(AT)(GT)	150	50
<i>SCR-13*</i>	AGA TAC ATT TTT ACT TGG TGA ATT ATG AGA GGG GAA AGG CGA	(CA)(CG)	131	53
<i>SCR-14*</i>	TAA AAA CAG AGG GGG TGA CAC AAT AAT ACA CAA GAC CAA	(TA)	131	50
<i>SCR-15*</i>	GGA GCG TGA ATG ATG GAA TGA GTG TGT TTT ACT GCT GCC TGA	(CA)	130	53
<i>SCR-16*</i>	CAT CCC CTT CAT TAT CAA ACC TCT CAC TCA CTC ACT CAC TCT	(GT)	202	50
<i>SCR-17*</i>	AGC ACT CAC TTG GAC CTT CTT ATC GCC TAT TAT TTT GTT	(AC)	190	53
<i>SCR-18*</i>	CTG CTT GGG GTT TAT TTT GTT CTG TTG AGT GGG ATG TAA TGA	(GT)	183	53

*Ann; annealing temperature

Table 3. Frequency of second division segregation (y) and G-C map distance in Ginbuna and Okinbuna

Locus	Ginbuna		Okinbuna		G-C map distance (cM)
	P or M *	y	P or M *	y	
<i>SCR-1*</i>	P	0.00	M	-	-
<i>SCR-2*</i>	P	0.00	P	0.471	24
<i>SCR-3*</i>	P	0.00	M	-	-
<i>SCR-4*</i>	P	0.00	P	1.000	50
<i>SCR-5*</i>	P	0.00	P	0.933	47
<i>SCR-6*</i>	P	0.00	M	-	-
<i>SCR-7*</i>	P	0.00	P	0.500	25
<i>SCR-8*</i>	M	-	P	0.480	24
<i>SCR-9*</i>	P	0.00	M	-	-
<i>SCR-10*</i>	P	0.00	P	0.000	0
<i>SCR-11*</i>	P	0.00	P	0.545	27
<i>SCR-12*</i>	M	-	P	0.313	16
<i>SCR-13*</i>	P	0.00	M	-	-
<i>SCR-14*</i>	P	0.00	M	-	-
<i>SCR-15*</i>	M	-	M	-	-
<i>SCR-16*</i>	P	0.00	P	0.235	12
<i>SCR-17*</i>	M	-	m	-	-
<i>SCR-18*</i>	P	0.00	P	0.000	0
<i>GF1*</i>	P	0.00	M	-	-
<i>GF17*</i>	P	0.00	P	0.606	30
<i>GF29*</i>	P	0.00	M	-	-

*M; Monomorphic locus, P; polymorphic locus

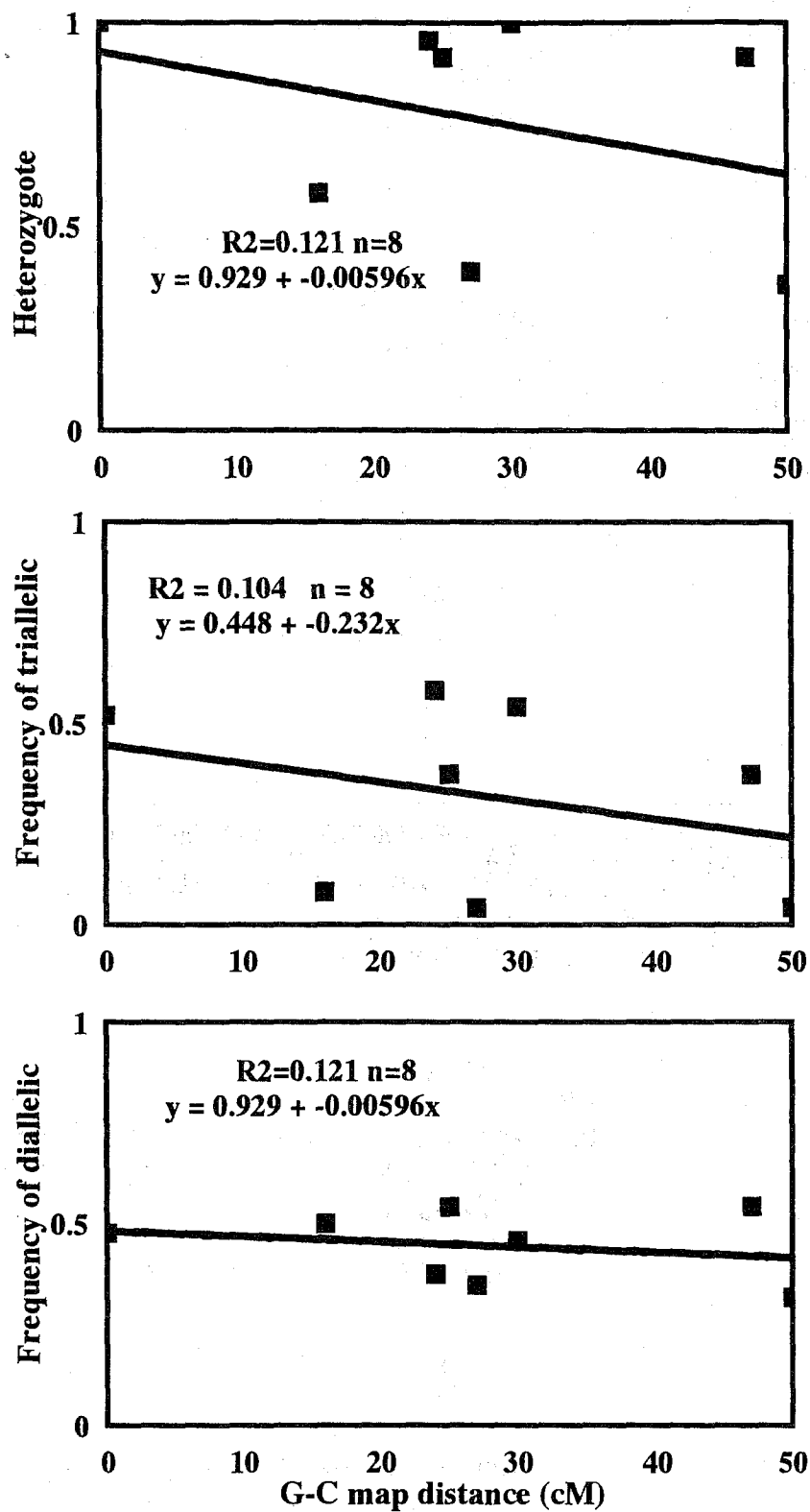


Fig. 1. Relationship between G-C map distance of microsatellite loci in Okinbuna and frequency of allelic combinations in 24 clonal lines in Ginbuna.

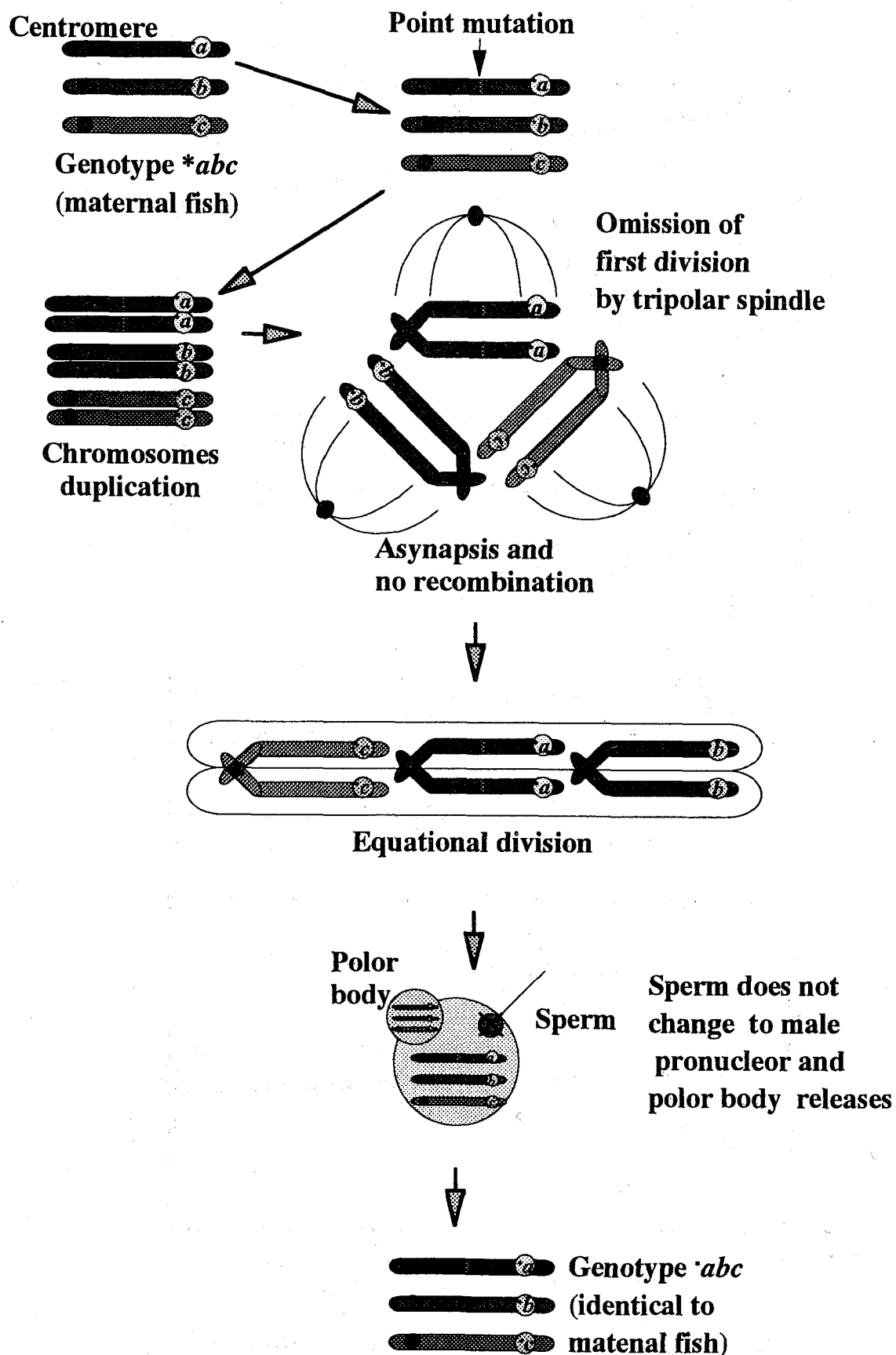


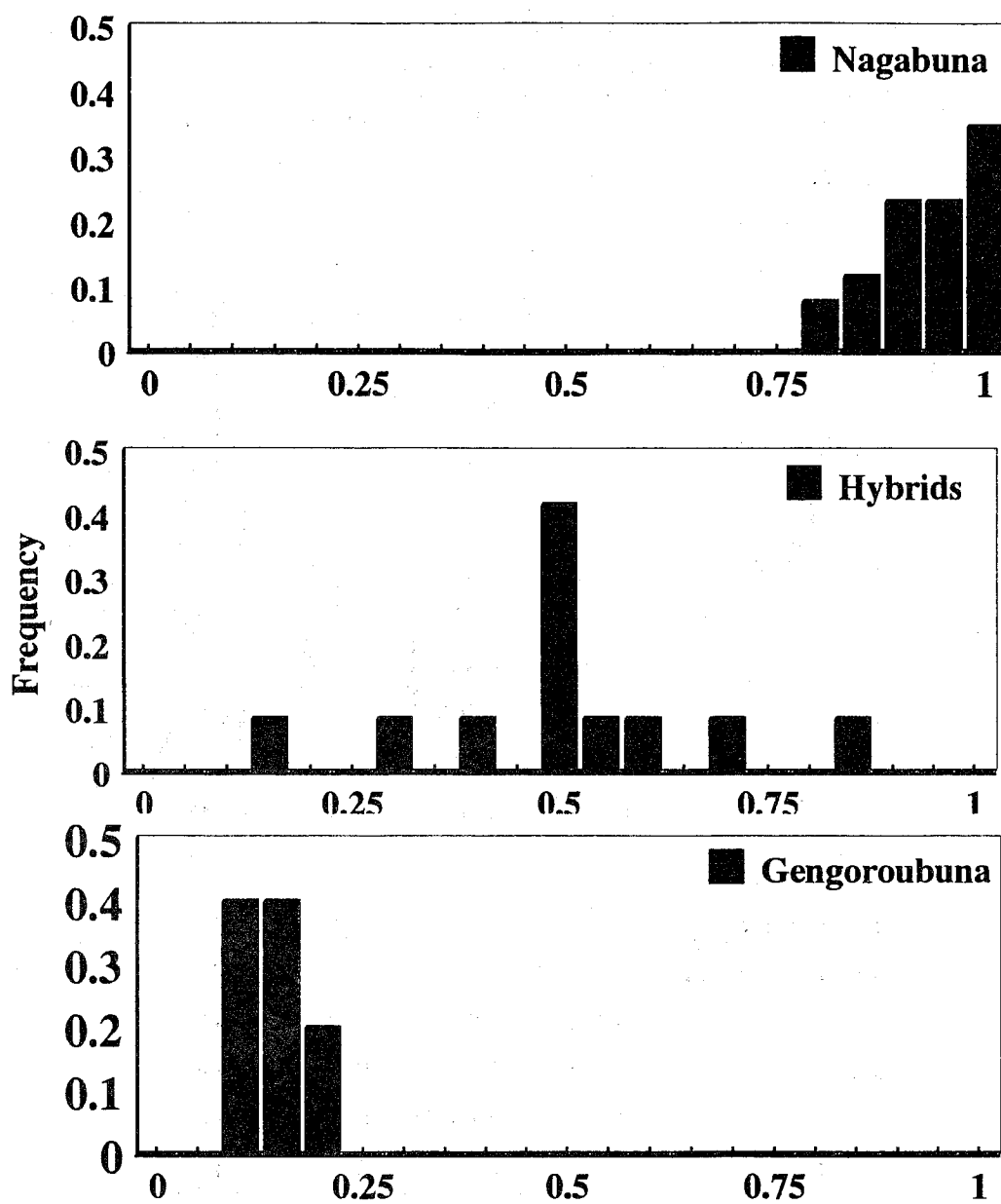
Fig. 2. Cytological mechanisms underlying Ginbuna reproduction.

Table 4. Estimation of genetic diversity at the three microsatellite loci in the three diploid groups

	<i>GF1*</i>	<i>GF17*</i>	<i>GF29*</i>	Avg*2
Nagabuna				
No. of alleles	6	11	3	7
No. of genotypes	7	11	3	7
<i>Ho</i>	0.423	0.462	0.077	0.321
<i>He</i>	0.338	0.506	0.075	0.306
<i>Ho/He</i>	1.251	0.913	1.030	1.065
P*1	0.674	0.404	1.000	0.693
Hybrids				
No. of alleles	5	8	5	6
No. of genotypes	5	5	6	5
<i>Ho</i>	0.750	0.667	0.833	0.750
<i>He</i>	0.587	0.694	0.672	0.651
<i>Ho/He</i>	1.278	0.961	1.240	1.160
P	0.586	0.407	0.583	0.525
Gengoroubuna				
No. of alleles	3	5	4	4
No. of genotypes	3	8	4	5
<i>Ho</i>	0.300	0.700	0.300	0.433
<i>He</i>	0.265	0.790	0.415	0.490
<i>Ho/He</i>	1.132	0.886	0.723	0.914
P	1.000	0.296	0.127	0.474

***1 Probability of Hardy-Weinberg expectations**

***2 Average**



Hybrid index (I_H)

Fig. 3. Distribution of hybrid index score (I_H) for three diploid groups , Nagabuna, Hybrids and Gengoroubuna.

Table 5. The genotypes of 61 donal lines in Ginbuna collected from six locations in Japan

Common clones	Microsatellite locus				CK*	mtDNA	Sampling location					
	GF1*	GF1*	GF1*	GF1*			Biwa	Kochi	Koyama	Niigata	Kasumi	Inba
COM-001	*297/301/303	*186/(186or194)/194	*194/196/202	*194/196/202	*bbb	#13	2	0	0	0	0	2
COM-002	*297/303/305	*186/(186or194)/194	*194/196/202	*194/196/202	*aab	#6	9	0	0	0	0	2
COM-003(KOC-001)	*307/(307or311)/311	*185/192/193	*188/(188or194)/194	*188/(188or194)/194	*abc	#1	0	10	0	1	0	2
COM-004(KOC-002)	*299/303/335	*186/192/198	*190/198/202	*190/198/202	*bbc	#2	1	16	0	0	0	0
COM-005(KOC-004)	*303/(303or305)/305	*185/187/216	*188/(188or194)/194	*188/(188or194)/194	*abc	#1	3	26	0	3	1	2
COM-006(KOC-005)	*299/(299or303)/303	*188/189/198	*186/188/194	*186/188/194	*abc	#4	4	4	0	0	0	0
COM-007(KOC-006)	*303/307/311	*191/192/216	*186/188/194	*186/188/194	*abc	#1	1	20	1	3	0	2
COM-008(KOC-008)	*297/(297or303)/303	*194/(194or204)/204	*192/(192or200)/200	*192/(192or200)/200	*abc	#5	2	36	0	0	0	3
COM-009(KOC-010)	*293/309/311	*184/188/216	*194/(194or196)/196	*194/(194or196)/196	*abc	#6	1	10	4	0	0	1
COM-010(KOC-013)	*303/(303or305)/305	*194/(194or200)/200	*196/(196or202)/202	*196/(196or202)/202	*abc	#6	2	11	0	0	0	0
COM-011(KOC-014)	*303/(303or311)/311	*182/184/216	*188/192/196	*188/192/196	*abc	#6	2	11	0	0	0	0
COM-012(KOC-015)	*303/311/335	*186/192/216	*190/194/196	*190/194/196	*abc	#6	3	2	0	0	1	0
COM-013(KOC-017)	*299/303/311	*188/192/216	*194/(194or196)/196	*194/(194or196)/196	*abc	#6	2	7	15	1	0	0
COM-014(KOY-003)	*297/307/315	*186/(186or192)/192	*192/(192or194)/194	*192/(192or194)/194	*abc	#6	1	0	6	1	0	0
*Specific clones												
L. Biwa												
BIW-001	*293/297/301	*184/(184or190)/190	*194/(194or198)/198	*194/(194or198)/198	*abc	#13	1	0	0	0	0	0
BIW-002	*297/(297or303)/303	*186/188/196	*192/194/196	*192/194/196	*abc	#6	3	0	0	0	0	0
BIW-003	*293/301/313	*186/(186or194)/194	*194/(194or202)/202	*194/(194or202)/202	*abc	#14	2	0	0	0	0	0
BIW-004	*297/303/305	*184/(184or194)/194	*192/194/200	*192/194/200	*abc	#6	3	0	0	0	0	0
BIW-005	*297/303/311	*194/198/200	*194/(194or196)/196	*194/(194or196)/196	*abc	#14	4	0	0	0	0	0
BIW-006	*303/(303or305)/305	*184/186/194	*186/194/196	*186/194/196	*abc	#15	6	0	0	0	0	0
BIW-007	*297/299/303	*186/(186or194)/194	*190/192/196	*190/192/196	*abc	#17	10	0	0	0	0	0
BIW-008	*301/303/317	*194/(194or204)/204	*202/202/202	*202/202/202	*abc	#14	1	0	0	0	0	0
BIW-009	*303/(303or311)/311	*184/188/189	*184/188/194	*184/188/194	*abc	#15	1	0	0	0	0	0
BIW-010	*297/307/313	*184/186/192	*192/194/202	*192/194/202	*abc	#6	2	0	0	0	0	0
BIW-011	*293/297/301	*184/(184or194)/194	*194/(194or196)/196	*194/(194or196)/196	*abc	#6	1	0	0	0	0	0
BIW-012	*301/(301or307)/307	*188/(188or192)/192	*186/(186or194)/194	*186/(186or194)/194	*aab	#16	3	0	0	0	0	0
BIW-013	*297/301/303	*184/(184or194)/194	*194/196/202	*194/196/202	*abc	#6	1	0	0	0	0	0
BIW-014	*295/297/303	*186/188/194	*194/196/202	*194/196/202	*abb	#13	1	0	0	0	0	0
BIW-015	*295/301/303	*184/(184or194)/194	*192/194/200	*192/194/200	*bcc	#14	1	0	0	0	0	0
Kochi												
KOC-003	*303/307/311	*188/(188or192)/192	*188/(188or194)/194	*188/(188or194)/194	*abc	#3	0	5	0	0	0	0
KOC-007	*303/(303or311)/311	*194/(194or204)/204	*188/(188or194)/194	*188/(188or194)/194	*abc	#3	0	4	0	0	0	0
KOC-009	*303/(303or311)/311	*184/(184or216)/216	*188/(188or194)/194	*188/(188or194)/194	*aab	#1	0	6	0	0	0	0
KOC-011-1	*307/(307or311)/311	*182/192/194	*188/(188or194)/194	*188/(188or194)/194	*abc	#3	0	63	0	0	0	0
KOC-011-2	*307/(307or311)/311	*182/(182or194)/194	*188/(188or194)/194	*188/(188or194)/194	*abc	#3	0	1	0	0	0	0
KOC-012	*303/(303or305)/305	*185/186/187	*188/(188or194)/194	*188/(188or194)/194	*abc	#7	0	3	0	0	0	0
L. Koyama												
KOY-005	*303/(303or307)/307	*184/186/202	*188/(188or194)/194	*188/(188or194)/194	*abc	#6	0	0	1	0	0	0
KOY-006	*297/303/311	*182/184/186	*192/(192or194)/194	*192/(192or194)/194	*abc	#6	0	0	2	0	0	0
Niigata												
NII-001	*301/303/307	*194/(194or200)/200	*188/194/196	*188/194/196	*abc	#6	0	0	0	0	0	0
NII-002	*297/301/303	*184/(184or186)/186	*194/(194or202)/202	*194/(194or202)/202	*abc	#6	0	0	0	8	0	0
NII-003	*303/309/311	*193/193/193	*194/(194or200)/200	*194/(194or200)/200	*aab	#17	0	0	0	1	0	0
NII-004	*295/307/311	*184/184/184	*188/(188or204)/204	*188/(188or204)/204	-	#14	0	0	0	1	0	0
NII-005	*297/309/311	*195/(195or197)/197	*188/194/196	*188/194/196	-	#4	0	0	0	1	0	0
NII-006	*303/(303or307)/307	*184/185/216	*188/(188or194)/194	*188/(188or194)/194	-	#17	0	0	0	1	0	0
NII-007	*299/303/305	*188/(188or190)/190	*194/(194or204)/204	*194/(194or204)/204	-	#6	0	0	0	3	0	0
NII-008	*295/(295or303)/303	*185/193/194	*186/194/196	*186/194/196	*abb	#16	0	0	0	1	0	0
L. Kasumi												
KAS-001	*309/313/343	*192/194/204	*194/(194or204)/204	*194/(194or204)/204	*bbb	#13	0	0	0	0	45	0
KAS-002	*297/301/303	*194/194/194	*188/(188or194)/194	*188/(188or194)/194	*abc	#14	0	0	0	0	2	0
KAS-003	*297/(297or301)/301	*184/190/194	*192/196/202	*192/196/202	*abc	#6	0	0	0	0	1	0
KAS-004	**295/8295or297/297	*184/(184or186)/186	*196/198/202	*196/198/202	*abc	#6	0	0	0	0	1	0
KAS-005	*303/(303or305)/305	*188/193/194	*188/(188or194)/194	*188/(188or194)/194	*abc	#1	0	0	0	0	1	0
KAS-006	*295/301/309	*194/(194or196)/196	*186/(186or194)/194	*186/(186or194)/194	*aab	#16	0	0	0	0	1	0
KAS-007	*293/293/293	*188/190/216	*188/194/196	*188/194/196	*abc	#17	0	0	0	0	1	0
KAS-008	*297/(297or317)/317	*188/(188or194)/194	*186/194/196	*186/194/196	*abc	#16	0	0	0	0	1	0
KAS-009	*303/307/309	*194/194/194	*186/194/196	*186/194/196	*aab	#16	0	0	0	0	15	0
KAS-010	*301/303/307	*186/(186or194)/194	*188/194/196	*188/194/196	*abb	#16	0	0	0	0	1	0
L. Inba												
INB-001	*303/309/311	*194/194/194	*184/186/194	*184/186/194	*aab	#16	0	0	0	0	0	18
INB-002	*293/307/311	*184/(184or216)/216	*184/186/194	*184/186/194	*aab	#16	0	0	0	0	0	3
INB-003	*303/(303or311)/311	*188/192/216	*194/194/194	*194/194/194	*aab	#13	0	0	0	0	0	2
INB-004	*297/303/309	*194/194/194	*186/194/196	*186/194/196	*bbb	#16	0	0	0	0	0	4
INB-005	*297/303/311	*184/(184or188)/188	*188/(188or194)/194	*188/(188or194)/194	*aab	#16	0	0	0	0	0	1
INB-006	*303/305/311	*182/194/216	*188/192/196	*188/192/196	*abc	#6	0	0	0	0	0	3

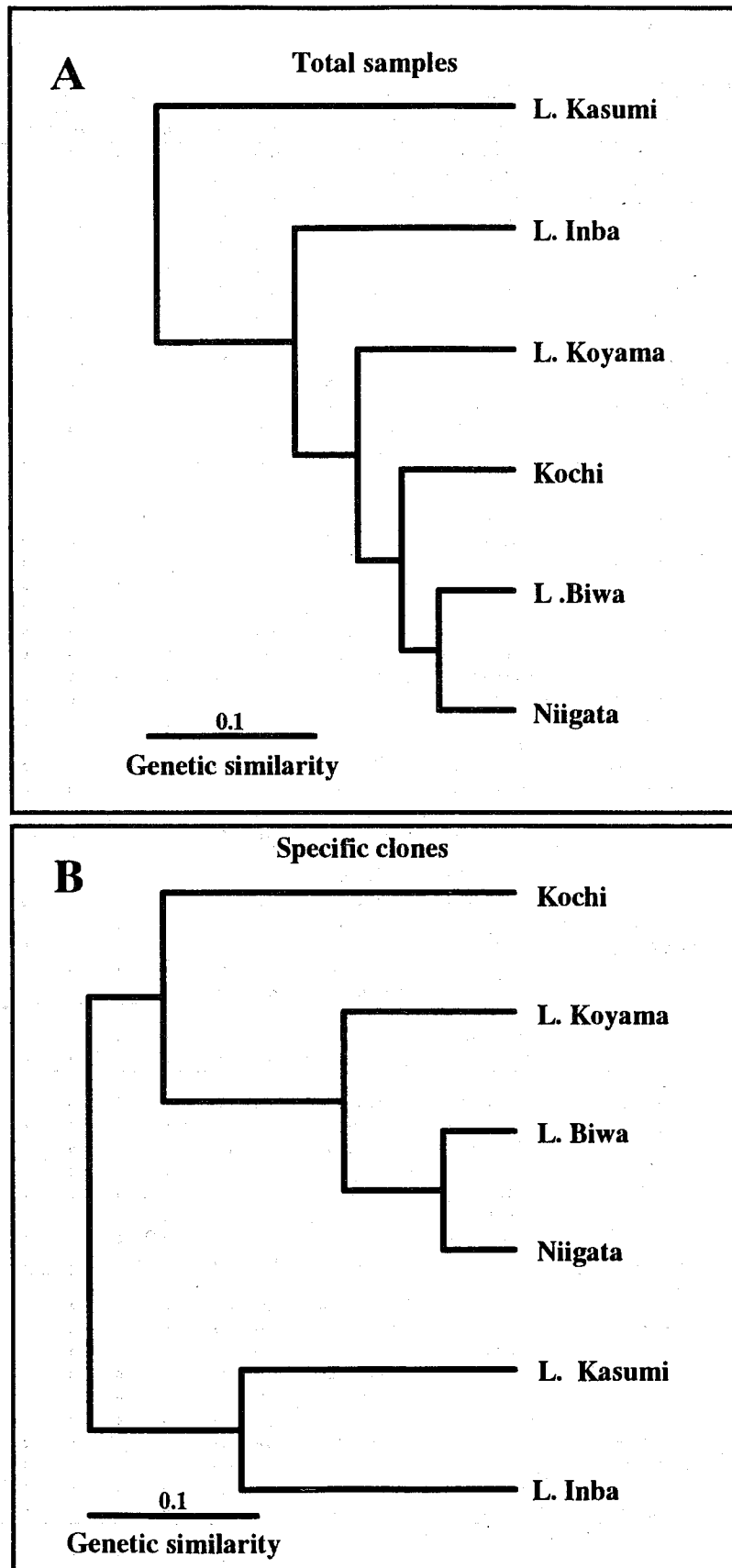


Fig. 4. A; UPGMA dendrogram based on genetic similarity among six locations using total samples. B; UPGMA dendrogram based on genetic similarity among six populations using "Specific clones".

Table 6. The genotypes of 33 clonal line in triploid crucian carp collected from China

"Common clones"	CK*	mtDNA	Microsatellite loci			Locations*2			
			GF1*	GF17*	GF29*	LY	XJ	SF	SL
CHI-001	*bcc	#18	*297/297or303)/303	*188/192/198	*190/(190or198)/198	2	11	0	0
CHI-002	*bbb	#18	*297/297or303)/303	*186/(186or188)/188	*194/(194or202)/202	0	4*	0	1
CHI-003	*bcc	#18	*297/303/321	*192/194/208	*194/196/202	0	1	19*	0
CHI-004	*bcc	#18	*297/297or313)/313	*188/188/188	*188/194/196	0	1	0	1
CHI-005	*bcc	#18	*297/297or313)/313	188/(188or200)/200	*188/194/196	0	0	1	1
CHI-006	bcc	#18	*297/303/321	*192/194/208	*194/(194or196)/196	0	0	5	5
"Specific clones"									
Lake Yixin									
CHI-007	*bbc	#18	297/303/355	*178/190/210	*186/194/200	5	0	0	0
CHI-008	*bbb	#13	*297/297/297	*192/196/200	*190/(190or196)/196	5	0	0	0
CHI-009	*bbb	#18	297/303/319	*178/188/192	*188/194/200	5	0	0	0
CHI-010	*bbb	#18	*293/293/293	*188/(188or198)/198	*194/194/194	1	0	0	0
CHI-011	*ccc	#18	*297/297or303)/303	*188/200/206	*190/194/202	1	0	0	0
CHI-012	*bbb	#18	*297/297or303)/303	*200/(200or208)/208	*188/196/200	1	0	0	0
Xujiacun									
CHI-013	*bbc	#18	*301/(301or303)/303	*188/192/208	*192/194/200	0	5*	0	0
CHI-014	*bcc	#18	*297/297or303)/303	*188/192/198	*190/(190or198)/198	0	12*	0	0
CHI-015	*bbc	#18	*301/(301or303)/303	*188/192/208	*194/(194or200)/200	0	2	0	0
CHI-016	*bbc	#18	*297/303/313	*192/202/208	*194/(194or198)/198	0	2*	0	0
CHI-017	*bcc	#18	*297/297or313)/313	*188/188/188	*188/(188or194)/194	0	1	0	0
CHI-018	*bcc	—	*297/297or303)/303	*188/(188or208)/208	*188/190/194	0	1	0	0
CHI-019	*bcc	#18	*297/297/297	*194/(194or208)/208	*188/(188or194)/194	0	1	0	0
CHI-020	*bbc	#18	*297/297/297	*196/8196or210)/210	*194/(194or196)/196	0	1	0	0
CHI-021	*bcc	#18	*297/297or303)/303	*178/188/208	*188/190/194	0	1	0	0
CHI-022	*bcc	#18	*297/297or313)/313	*188/(188or196)/196	*188/194/196	0	1	0	0
CHI-023	*bcc	#18	*297/297or303)/303	*192/(192or208)/208	*194/194/194	0	1	0	0
CHI-024	*bbb	—	301/(301or309)/309	*194/(194or2109)/210	*192/(192or194)/194	0	1	0	0
CHI-025	*bcc	#18	*297/297or301)/301	*188/190/198	*194/(194or200)/200	0	1	0	0
Shuangfengjin									
CHI-026	*bcc	#18	*297/297or303)/303	*192/194/208	*194/196/202	0	0	1	0
CHI-027	*bbb	#18	*297/303/321	*186/(186or188)/188	*194/(194or202)/202	0	0	1	0
CHI-028	*bcc	#13	*297/303/321	*188/(188or192)/192	*192/196/202	0	0	1*	0
Shuanglong									
CHI-029	*bbc	#18	*297/297/297	*188/200/202	*190/192/198	0	0	0	2
CHI-030	*bbc	#18	*297/297/297	*188/190/194	*188/190/194	0	0	0	1
CHI-031	*bbb	#18	285/297/303	188/(188or190)/190	*188/(188or194)/194	0	0	0	1
CHI-032	*bbc	#18	*297/297/297	*188/192/198	*188/(188or204)/204	0	0	0	1
CHI-033	*bbc	#18	*297/297/297	*188/188/188	*196/198/200	0	0	0	1

* Include male fish in a clonal lines

*1 SF; Shuangfengjin,SL; Shuanglong, LY; Lake Yixin, XJ; Xujiacun

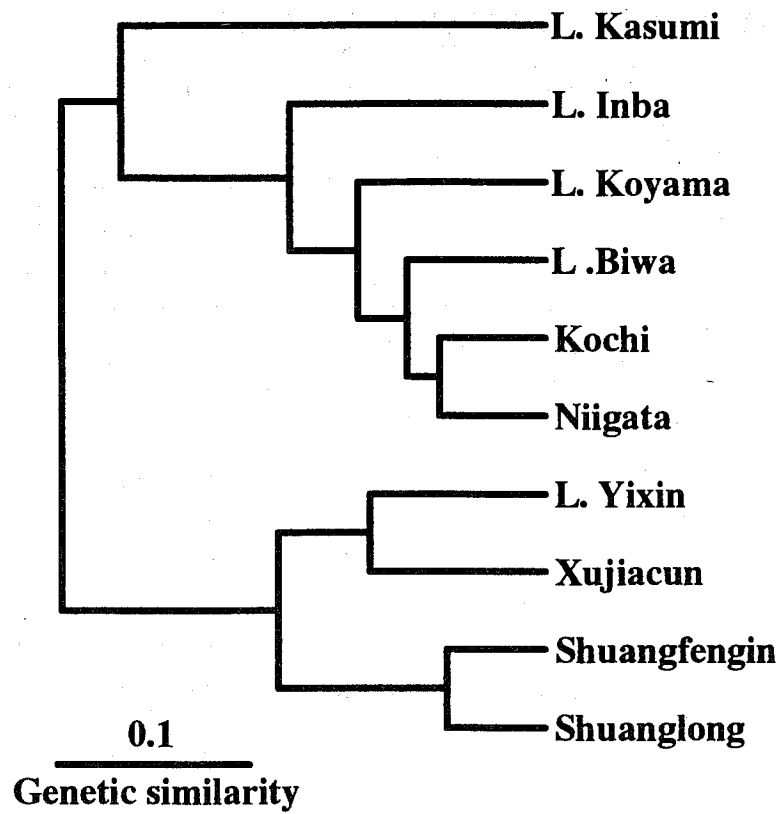


Fig. 5. UPGMA dendrogram based on genetic similarity among six locations in Japan and four locations in China.

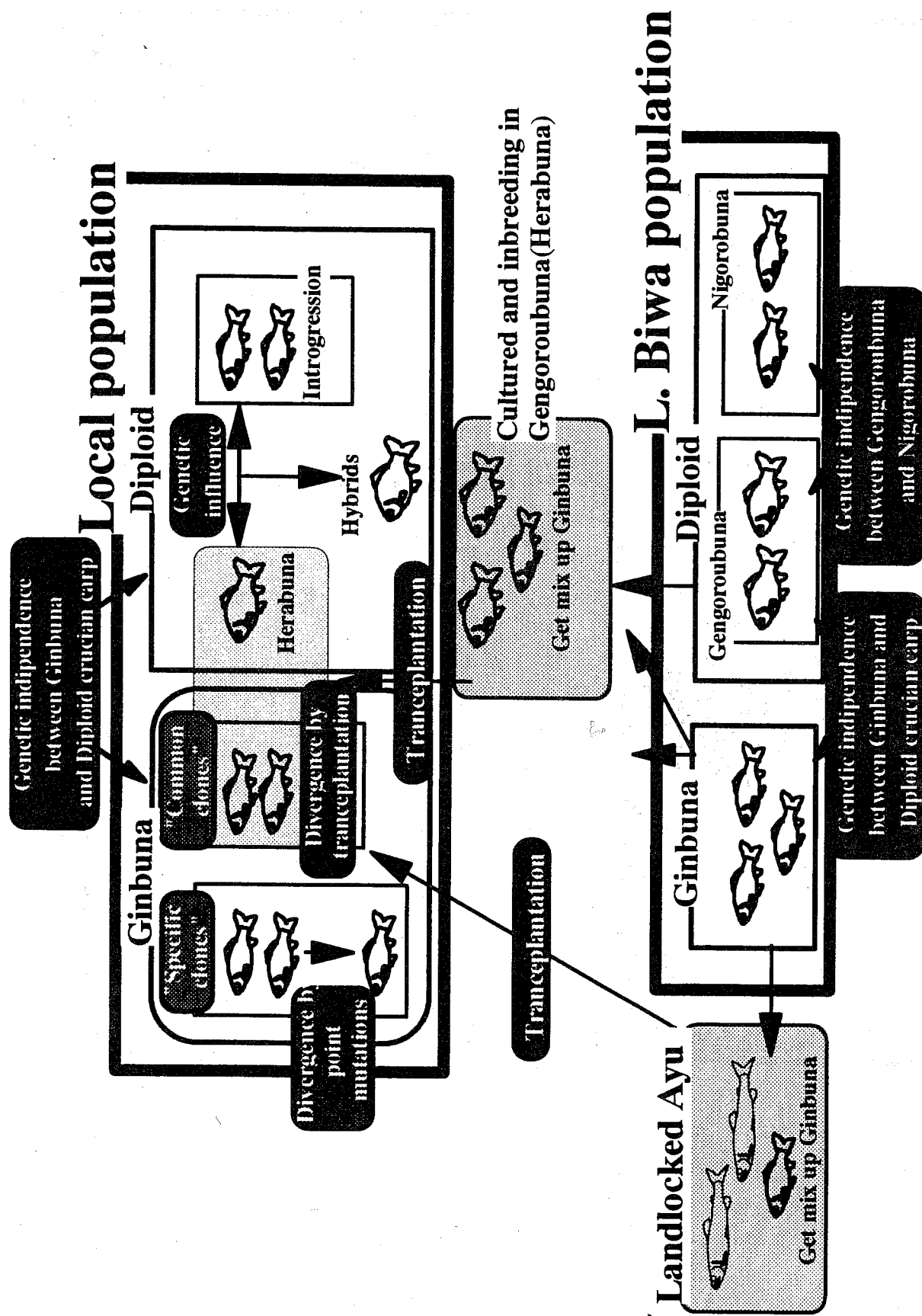


Fig. 6. Population structure of Japanese crucian carp.

Origin of Ginbuna

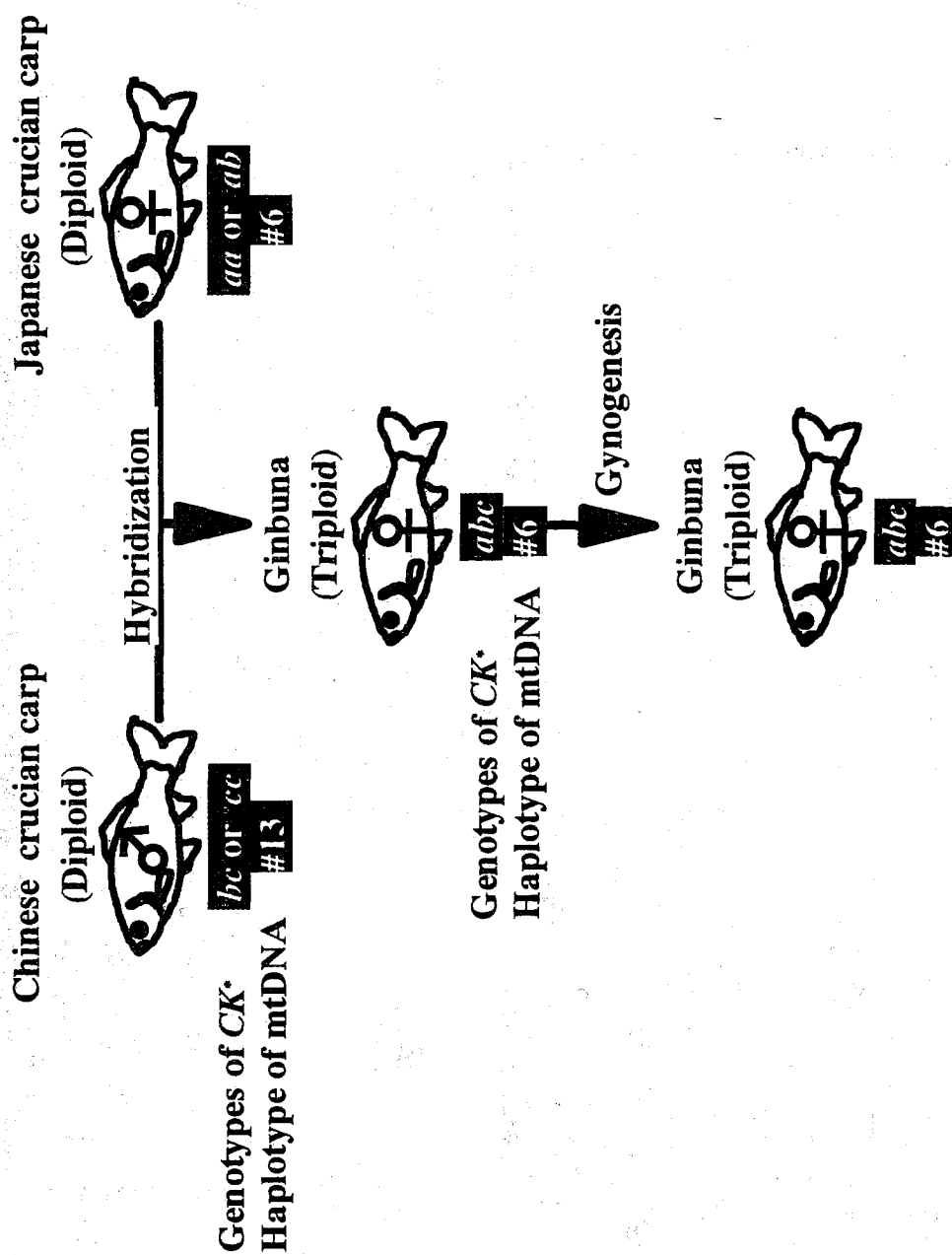


Fig. 7. Hypothesis of process in Ginbuna formation.

論文審査結果要旨

フナ属魚類 (*Carassius*) はユーラシア大陸に広く分布し、特に内水面漁業の盛んな地域では水産重要魚種として広く利用されている。ギンブナ (*C. langsdorfii*) は雌性発生、三倍体、クローン性といった有性生殖種にはない特徴を数多く備えている。本論文は、本種の遺伝的多様性とクローン構成を調査研究し、本種のクローン系の多様性の維持とその生殖様式の起源について解明することを目的としている。

第1章では、本研究で用いる集団分析用遺伝マーカーの利用性について比較検討し、マイクロサテライトDNA多型がクローンの判別や集団構造解析に有効であることを明らかにしている。

第2章では、クローン構成の多様化に関して、非還元卵の形成過程で発生する遺伝子一動原体間組換えが関与しているか否かを検証するために、マイクロサテライトDNA多型を用いて一腹子におけるG-C組換えの有無を調べている。その結果、ギンブナの一腹子は雌親と全く同一の遺伝子型を示し、組替え型と思われる個体は全く出現せず、クローンの多様化に、G-C組換えが関与している可能性は否定された。

第3章では、2倍体集団と3倍体集団間の遺伝子流動の有無を検討している。供試魚として鳥取県湖山池のフナ類を用い、DNAマーカーを精査した結果、ギンブナは7系統のクローンで構成され、mtDNAおよびCKで2倍体フナが保有しない特異的な遺伝子型を備えていることが判明した。また、形態的に在来2倍体フナとゲンゴロウブナの間隔的な形態形質を持つ個体は、DNAマーカーにより2倍体どうしの種間交雑によって生じた雑種であることが判明し、ギンブナとの遺伝的独立性が証明された。

第4章では、DNAマーカーにより日本の各地から採集したギンブナのクローン構成を判定し比較検討している。すべての調査地点で複数のクローン系統が検出され、それぞれの地点にのみ存在する特異的クローンと、他の2地点以上の地域に認められる共通クローンが存在しており、共通クローンの多くが琵琶湖で確認された。地域特異的クローンのみを用いて作成したデンドログラムは、地理的距離とよく対応していることが分かった。

第5章では、日本のギンブナの起源と深く関わっていることが推測されてきた中国産フナとの遺伝的類縁関係を解明するため、黒竜江水系よりフナを採集し、倍数性の判定後、DNAマーカーを用いて集団構造の解析を行っている。三倍体フナ (ギンブナ) には多数のクローン系統が認められ、日本のクローン系統との共通性は認められなかった。また、日本と中国のギンブナは遺伝的に異なることが示唆された。

日本の淡水魚には、アユやヘラブナなどの放流種苗に混入して分布を拡大した種が多く認められ、ギンブナの一部のクローンが複数地点で認められるのもこの一例であると考えられた。ギンブナでは、移植魚から在来クローンへの遺伝子の移入はないものの、クローン間の競合という形で間接的に在来個体群に影響を与えている可能性が考えられていた。全国的に放流されているゲンゴロウブナは、在来のギンブナ系 (2倍体) と交配を通じて在来集団に遺伝的な影響を与えている事が明らかになった。

本研究において、フナ属魚類の遺伝的多様性に関していくつかの新しい知見を示しており、それらの保全生物学的意義は大きい。よって、審査員一同は本論文の著者を博士 (農学) の学位を授与するに値するものと判定した。