短報・*Short Report*

魚類学雑誌 62(1):51–57
2015 年 4 月 25 日発行

ミトコンドリア DNA および核 DNA の解析による魚取沼テツギョの起源

冨澤輝樹[1†]・木島　隆[1†]・二見邦彦[1]・高橋清孝[2]・岡本信明[1]

[1] 〒 108–8477　東京都港区港南 4–5–7　東京海洋大学海洋科学部海洋生物資源学科
[2] 〒 981–3625　宮城県黒川郡大和町吉田字旗坂地内　宮城県水産技術総合センター　内水面水産試験場
[†]同等貢献

（2014 年 3 月 13 日受付；2014 年 9 月 5 日改訂；2014 年 9 月 8 日受理）

キーワード：魚取沼テツギョ，キンギョ，フナ，mtDNA，c-*myc*，魚取沼

魚 類 学 雑 誌
Japanese Journal of Ichthyology
© The Ichthyological Society of Japan 2015

Teruki Tomizawa, Takashi Kijima, Kunihiko Futami, Kiyotaka Takahashi and Nobuaki Okamoto*. 2015. Mitochondrial and nuclear DNA evidence for the hybrid origin of wild tetsugyo in Yutori-numa Pond, Miyagi Prefecture, Japan. Japan. J. Ichthyol., 62(1): 51-57.

Abstract　A genetic analysis of wild-caught tetsugyo from Yutori-numa Pond, Miyagi Prefecture, a long-finned fish of uncertain origin designated as a National Natural Monument in Japan, demonstrated that some specimens were hybrids of goldfish (*Carassius auratus*) and crucian carp (genus *Carassius*). Phylogenetic analysis of sequences from part of the D-loop region of mitochondrial and nuclear DNA of 87 Yutori-numa tetsugyo indicated that 66 belonged to the goldfish group and 21 to the Japanese crucian carp group, subsequent PCR-RFLP analysis of c-*myc* gene revealing three different restriction fragment digest profiles, 21 and 60 specimens possessing goldfish or Japanese crucian carp genes, respectively, and the remaining 6, both genes, indicating their hybrid origin.

**Corresponding author: Department of Marine Biosciences, Faculty of Marine Science, Tokyo University of Marine Science and Technology, 4–5–7 Konan, Minato-ku, Tokyo 108–8477, Japan (e-mail: nokamoto@kaiyodai.ac.jp)*

魚取沼テツギョは，宮城県魚取沼で見つかった，各鰭が伸張したフナの呼称であり，1933 年，その生息地は国の天然記念物に指定された（文化庁，2014）．その後，交配実験などから，魚取沼テツギョには長尾型と短尾型の 2 種類が存在することが明らかとなり，長尾型同士の交配からも短尾型が出現することが報告されている（木島，2000）．それらは一つのメンデル集団として世代を超えて繁殖維持している（織田，1989；木島，1997）．このことから，本論文では鰭の形態に関わらず，魚取沼に生息するフナ個体群を便宜的に魚取沼テツギョと呼ぶこととした．

古くは，キンギョ（*Carassius auratus*）とフナを交配させるとテツギョに似た形態を有する雑種が生じることから，一般的には，テツギョはキンギョとフナの雑種であると考えられていた（松井，1935）．しかしその一方で，アイソザイム分析から魚取沼テツギョの祖先はキンブナ（*Carassius buergeri* subsp.2）であり，キンギョの遺伝子が混入している可能性は低いとする報告もなされ（木島，1995，1997），現在のところ，魚取沼テツギョの起源について統一的な見解はなされていない．

ミトコンドリア DNA（mtDNA）解析は，家畜などの起源の特定に広く用いられており（Jansen et al., 2002；Savolainen et al., 2002；Joshi et al., 2004），魚類においても，母系起源の推定に利用されている（Murakami et al., 2001）．我々はこれまでにキンギョの mtDNA の D-loop 領域の一部分を解析し，キンギョは中国ブナのヂイ（鯽）（*Carassius auratus auratus*）を起源としていること，およびキンギョの

mtDNA には多型がほとんどないことを明らかにした（木島ら，2008）．もし魚取沼テツギョの起源にキンギョが関与していれば，キンギョの mtDNA の配列が検出され，逆に，魚取沼テツギョが日本産のフナ属魚類に由来するのであれば，既報の日本産のフナ属魚類の配列と相同性が高い配列が得られると考えられる．

しかし，mtDNA 解析では，その個体が雑種起源であることを証明することはできない．雑種起源であることを証明するためには，mtDNA と核 DNA の解析を併用する必要がある（Young et al., 2001；Bensch et al., 2002）．核 DNA の遺伝子である c-*myc* は細胞の増殖・分化を制御する遺伝子である（Oster et al., 2002）．c-*myc* のように生命現象の維持に重要な遺伝子は安定で多型が少なく，種の類縁関係の検討に適していることが報告されており（木村，1984），張（1994）は，タイプ 1 c-*myc* の第 2 イントロンの塩基配列を用いた系統解析で，キンギョと日本産のフナ属魚類の識別が可能であることを示した．

そこで，本研究では魚取沼テツギョの起源を明らかにするために，母系の遺伝標識となる mtDNA の D-loop 領域の塩基配列情報に基づく分子系統解析と，母系，父系双方の遺伝標識となる核遺伝子の c-myc を用いた解析を行った．

材料と方法

供試魚　1992 年に宮城県内水面水産試験場により特別再捕され，木島（1997）がアイソザイム分析に用いた魚取沼テツギョ 24 個体（魚取沼 Y：YT1-YT24），それを起源として東北大学大学院農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センターで 1994 年から粗放的に飼育・繁殖・維持されてきた魚取沼テツギョの子孫 58 個体（魚取沼 T），および 1992 ～ 1993 年に宮城県内水面水産試験場が魚取沼で採捕した魚取沼テツギョを親魚として 1994 年に人工繁殖したもの 5 個体（魚取沼 F：F1-F5）を解析に用いた．

解析に用いた個体のうち，魚取沼 T の短尾型魚取沼テツギョ 5 個体（標本登録番号：MTUF30628–MTUF30632），魚取沼 T の長尾型魚取沼テツギョ 5 個体（標本登録番号：MTUF30633–MTUF30637）および魚取沼 F の 4 個体（標本登録番号：MTUF30638–MTUF30641）は，東京海洋大学海洋科学部魚類学研究室に標本登録されている．

DNA 抽出と mtDNA 領域の増幅　サンプルの鰭または筋肉よりフェノール・クロロホルム法，または Puregene Core Kit A（QIAGEN 社）で DNA を抽出した．それを鋳型として，Komiyama et al.（2009）により設計されたプライマー（H16521：5'-AAC TCT CAC CCC CTG GCT CCC AA-3' および L950：5'-AGG TCT CAT CTT AGC ATC TTA GCA TCT TCA GTG-3'）を用いて mtDNA の D-loop 領域の約 900 bp を PCR により増幅した．PCR は 94°C で 2 分間の熱変性の後，94°C で 30 秒間，36°C で 30 秒間，72°C で 30 秒間を 30 サイクル，最終伸長を 72°C で 3 分間行った．

mtDNA のシーケンス解析　得られた PCR 産物を ExoSAP-IT（GE ヘルスケア社）処理をし，PCR に用いたプライマーで BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems 社）によりサイクルシーケンスを行った．シーケンス産物を Ethanol / EDTA 法で精製し，ABI PRISM 310 Genetic Analyzer（Applied Biosystems 社）で解析した．得られた塩基配列について BLAST による相同性検索を行った後，MEGA5.2（Tamura et al., 2011）を用いてマルチプルアラインメントおよび塩基置換モデルの選択を行い，最尤法により分子系統樹を作成した．系統樹作成の際の塩基置換モデルには Tamura 3-parameter を用いた．なお，ブートストラップ確率は 500 回の疑似データセット作成により求めた．系統樹作成において，GenBank/EMBL/DDBJ に登録されているキンギョ 5 品種（シュブンキン，クロデメキン，オランダシシガシラ，ランチュウ，チョウテンガン）（Komiyama et al., 2009），キンブナ（Komiyama et al., 2009），ギンブナ（*Carassius* sp.）（Murakami et al., 1998），ゲンゴロウブナ（*Carassius cuvieri*）（Murakami et al., 1998），コイ（*Cyprinus carpio*）（Zhou et al., 2003；Mabuchi et al., 2005, 2006；Thai et al., 2005, 2006）の配列を加えた．

c-*myc* 遺伝子の PCR-RFLP 分析　タイプ 1 c-*myc* 遺伝子の第 2 イントロン領域を増幅するプライマーセットを，GenBank/EMBL/DDBJ に登録されているキンギョ c-*myc*（AB040746）の配列情報を基に第 2 エキソンと第 3 エキソン内部に設計し，約 600 bp を増幅した．1st PCR は，プライマー F1: 5'-CCT GAG TCC ATC AAA TCG AGT G-3'，R1: 5'-AGT GAG GTT GCT CCA TCA GAG-3' を用い 95°C で 4 分 30 秒間の熱変性の後，95°C で 1 分間，55°C で 1 分間，72°C で 1 分間を 40 サイクル行い，最終伸長を 72°C で 7 分間行った．アガロースゲル電気泳動の結果，増幅断片が見られなかったため，PCR 産物 1 μL をテンプレートとして nested PCR を行っ

た．nested PCR は，プライマー F2: 5'-GGT ACC TTG AAT CTG ACG CG-3' および R2: 5'-CTC GTT CTT TTT CTG CCG CC-3' で行い，95°C で 2 分間熱変性の後，95°C で 15 秒間，55°C で 30 秒間，72°C で 40 秒間を 45 サイクル行い，最終伸長を 72°C で 7 分間行った．

魚取沼テツギョから得た塩基配列およびデータベースに登録されているキンギョの塩基配列から RFLP 多型を検出することのできる部位を検索し，制限酵素 *Spe*I を選出した．得られた PCR 産物を *Spe*I で消化し，1.5％アガロースゲル（アガロース ME，岩井科学）で電気泳動を行った．電気泳動は，i-Mupid（アドバンス社）を用い，1 × TAE を緩衝液として 100 V または 135 V の定電圧で行った．泳動後，ゲルをエチジウムブロマイドで染色し，Densitograph（ATTO 社）によって RFLP 多型を検出した．

また，魚取沼 Y のうち 18 サンプルの同領域についてダイレクトシーケンスを行い，RFLP 解析の結果と塩基配列との整合性の有無を確認した．

結果と考察

本研究で用いた魚取沼 T の 58 個体には，鰭が長い長尾型（TOFL1–TOFL28）と鰭が短い短尾型（TOFS1–TOFS30）の両方が混在していた（Fig. 1A）．これらの供試魚として用いた魚取沼テツギョの外部形態を Table 1 に示した．いずれの型も背鰭軟条数は 13 で，キンブナの背鰭軟条数（細谷，2013）と類似していた（Fig. 1B）．

mtDNA D-loop 領域の配列について BLAST による相同性検索を行った結果，魚取沼 Y，魚取沼 T，魚取沼 F の計 87 個体の魚取沼テツギョは 52 のハプロタイプに分けられ，そのうちハプロタイプ HT101 を示した 20 個体はデータベースに既登録のキンギョの配列（AB379915，AB379916）と 100％の相同性を示した．最尤法による分子系統樹では，

Table 1. Numbers and morphological types of tetsugyo analyzed in this study

Sample	Number of individuals sampled	Fin type	
		Long	Short
Yutori-numa Y	24	5	19
Yutori-numa F	5	5	0
Yutori-numa T	58	28	30

Abbreviations: Yutori-numa Y: wild Yutori-numa tetsugyo; Yutori-numa F: generations descended from the parents collected in 1992 and reproduced by natural mass mating; Yutori-numa T: filial generations artificially crossed with parents (long fin type) collected from Yutori-numa Pond.

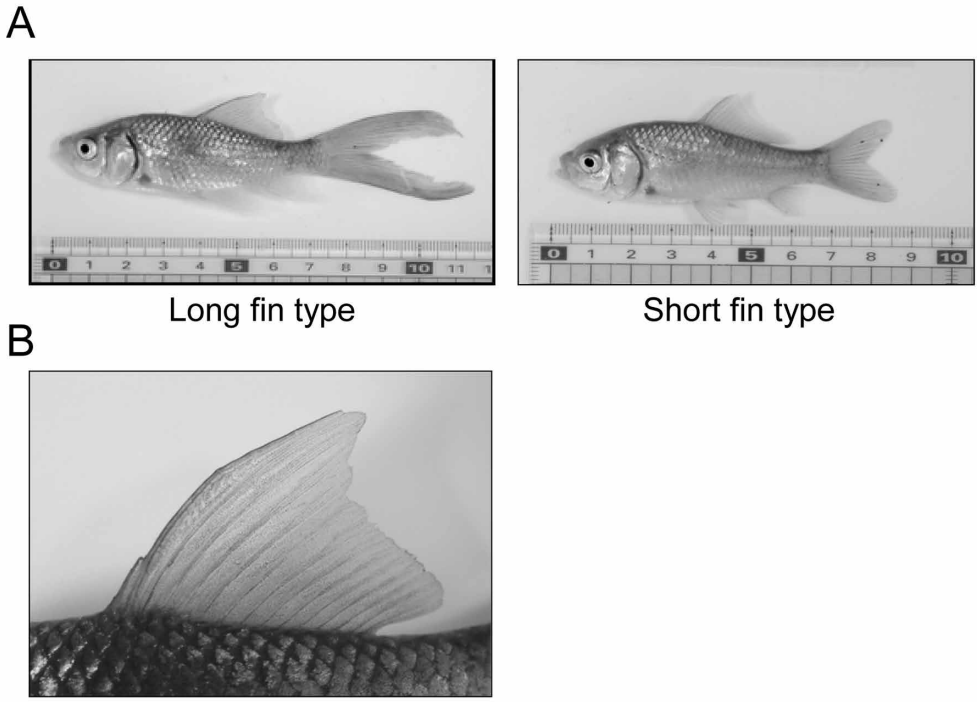

Fig. 1. (A) Two morphological types of tetsugyo living in Yutori-numa Pond, Japan. (B) Dorsal fin of tetsugyo, supported by 13 soft rays.

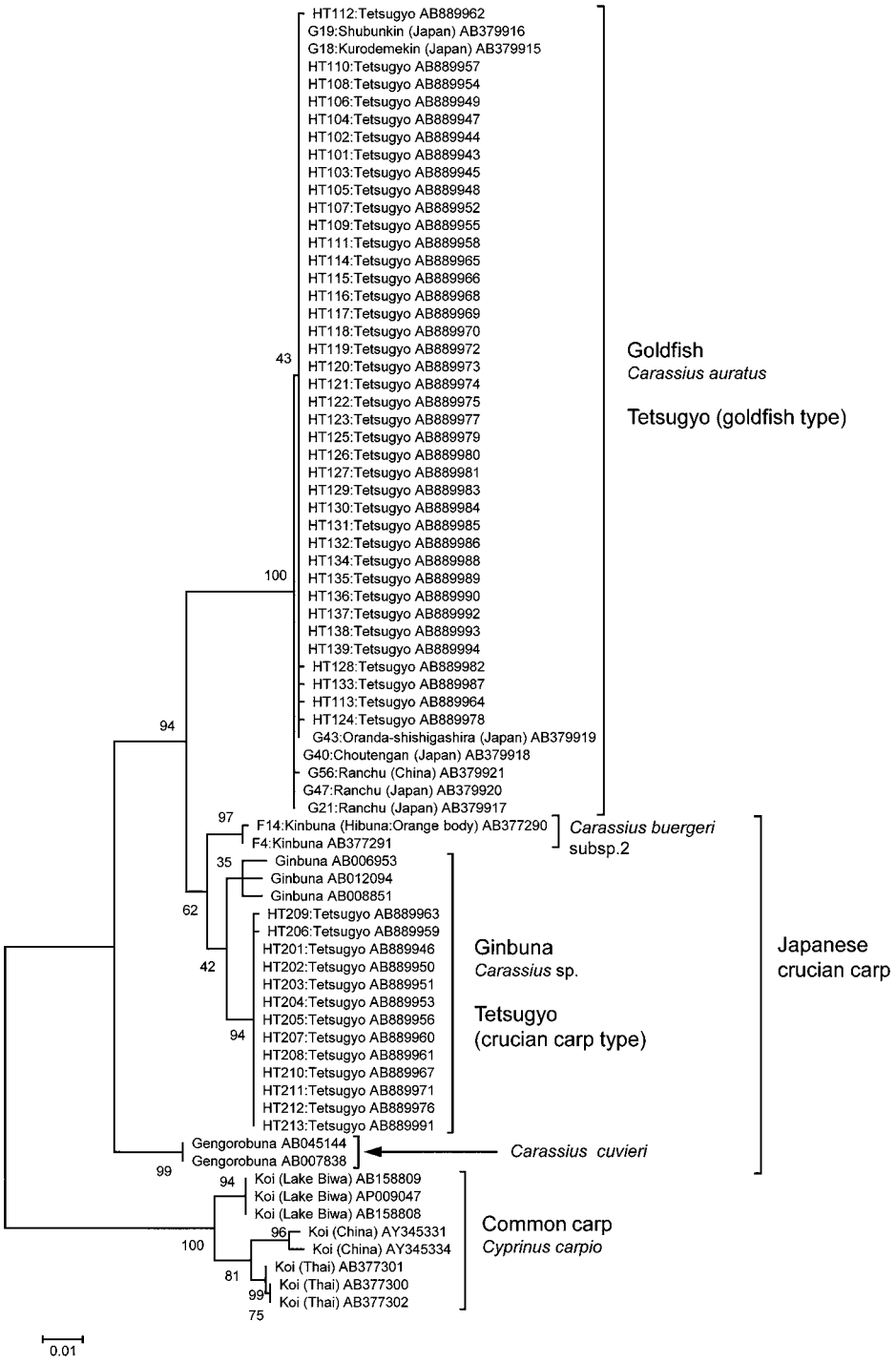

Fig. 2. Maximum likelihood tree of tetsugyo and Japanese crucian carp based on the D-loop region of mtDNA sequences. Scale bar represents number of nucleotide replacements per site. Nucleotide sites including a gap in one or more sequences in the alignment were deleted. Reliability of the tree-topology was evaluated by a bootstrap analysis with 500 replicates. The tree was rooted with common carp as the outgroup. Scientific names follow Hosoya (2013). Sequence data for goldfish, Japanese crucian carp and common carp were obtained from GenBank/EMBL/DDBJ.

HT101 を加えた 39 のハプロタイプを示した 66 個体はキンギョと同じクレードに含まれ，13 のハプロタイプを示した 21 個体はゲンゴロウブナを除く日本産フナ属魚類と同じクレードに含まれた（Fig. 2）．

核 DNA の遺伝子であるタイプ 1 c-*myc* の第 2 イントロン領域を PCR により増幅した結果，魚取沼 Y，魚取沼 T，魚取沼 F の計 87 個体全てのサンプルにおいて約 600 bp の断片が得られ，それ以外の増幅断片は見られなかった．一部のサンプルについて塩基配列解析を行い，張（1994）に従って検討したところ，魚取沼テツギョから c-*myc* キンギョ型と c-*myc* フナ型の 2 つの c-*myc* 遺伝子のハプロタイプが検出された（Fig. 3A）．87 個体の魚取沼テツギョの PCR 産物を *Spe*I で処理したところ，21 個体からは c-*myc* キンギョ型の約 200 bp と約 400 bp の 2 本の断片が，60 個体からは c-*myc* フナ型の約 600 bp の 1 本の断片が検出され，6 個体からは c-*myc* キンギョ型と c-*myc* フナ型のヘテロ接合体であることを示す約 600 bp，400 bp，200 bp の 3 本の断片が検出された（Fig. 3B）．

核 DNA の結果と mtDNA の結果を対比させたところ，核 DNA と mtDNA が共にキンギョである個体が 15 個体，核 DNA と mtDNA が共にフナである個体が 14 個体であった．一方，核 DNA と mtDNA の結果が矛盾する個体は，核 DNA 解析でヘテロ接合体であった 6 個体を含めると 58 個体であった（Table 2）．これより，本研究は魚取沼テツギョにキンギョ由来の遺伝子が存在していることを示すと同時に，魚取沼テツギョはゲンゴロウブナを除く日本産フナ属魚類とキンギョの交雑起源であることを示した．現存する魚取沼テツギョの野生集団は，それらの雑種または雑種個体の子孫であると考えられる．このことは，キンギョとフナを交配すると魚取沼テツギョに似た体型を持つ個体が生じること（松井，1935），および魚取沼には魚取沼テツギョが発見される以前にキンギョが放されたという伝聞（朴澤，1931）と矛盾しない．

なお，核 DNA と mtDNA が共にフナである個体が，87 個体のうちわずか 14 個体であったことから，魚取沼個体群内で交雑が進み，ほぼ全ての個体にキンギョの遺伝子が混入していることが推察される．

また，既報のアイソザイム分析（木島，1995，1997）ではキンギョの遺伝子は検出されなかったのに対し，本研究ではキンギョの c-*myc* 遺伝子が検出された．既報において核 DNA からキンギョの遺伝子が検出されなかった理由として，mtDNA は母種のものがそのまま受け継がれるために検出されやすいのに対し，核 DNA は両種の染色体間で組換えが生じるために，侵入した対立遺伝子がそのまま残るとは限らないことや，少ない遺伝子を解

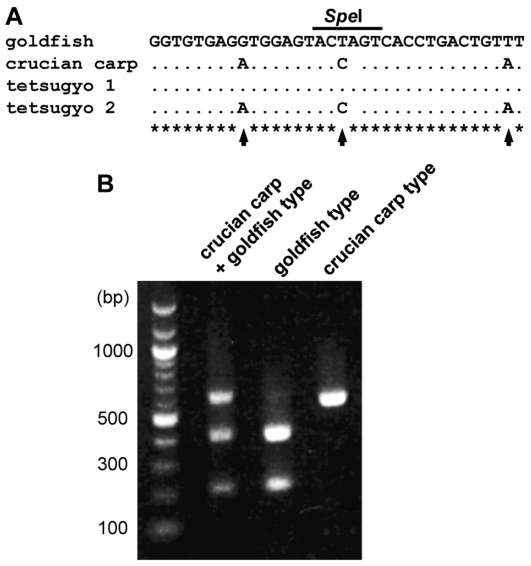

Fig. 3. RCR-RFLP analysis of second intron of type 1 c-*myc* gene. (A) Multiple alignment of c-*myc* gene sequences of goldfish and tetsugyo. Goldfish type and crucian carp type sequences (Zhang, 1994) are indicated as tetsugyo 1 and tetsugyo 2, respectively. At any given site, nucleotides identical to the corresponding goldfish nucleotide are indicated by dots (.). Asterisks (*) represent identity among all four sequences. The restriction site of *Spe*I is shown by a bold horizontal line above the goldfish sequence. (B) Electrophoretic patterns of PCR-RFLP products of c-*myc* gene of tetsugyo.

Table 2. Mitochodrial and nuclear DNA types of tetsugyo

MtDNA clade	Goldfish						Crucian carp					
Type of nuclear DNA	GF		CC		GC		GF		CC		GC	
Fin type	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S
Number of individuals	7	8	22	24	3	2	1	5	4	10	1	0

Abbreviations: L: long fin type; S: short fin type; GF: goldfish type; CC: Japanese crucian carp type; GC: heterogeneous type including a mixture of goldfish and Japanese crucian carp types.

析対象にしていたことが考えられる．また，本研究において c-*myc* キンギョ型と c-*myc* フナ型のヘテロ接合体が極端に少なすぎることは，魚取沼テツギョがメンデル集団であることを棄却することにもなるため，他の核遺伝子の解析により魚取沼テツギョがメンデル集団であるかを調査し、交配実験により c-*myc* 遺伝子を追跡する必要性が今後の課題として生じた．

本研究では，魚取沼テツギョの交雑起源となったキンギョとフナのうち，フナについては，ゲンゴロウブナを除く日本産フナ属魚類であることは系統解析から明らかとなったものの，亜種の特定には至らなかった．日本産フナ属魚類の分類については，現在でも議論の余地があるとされており（Takada et al., 2010；Yamamoto et al., 2010），魚取沼テツギョの交雑起源となったフナの特定のためには日本産フナ属魚類の分類に関するゲノムレベルの網羅的な解析等による今後の研究成果をベースにした詳細な解析が必要であると考える．

謝　　辞

本研究を行うに当たり，サンプル収集にご協力いただいた東北大学大学院農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センターの木島明博教授および仙台市科学館の高取知男副館長に御礼申し上げる．また，本研究の一部は株式会社神畑の援助によって行われたものであり，ここに記して御礼申し上げる．

引 用 文 献

Bensch, S., A. J. Helbig, M. Salomon and I. Seibold. 2002. Amplified fragment length polymorphism analysis identifies hybrids between two subspecies of warblers. Mol. Ecol., 11: 473–481.

朴澤三二．1931．宮城縣魚取沼に産する珍魚，鐵魚の話．海鼠の骨．朴澤先生随筆講演集発行會，215–233.

文化庁．2014．国指定文化財等データベース．文化庁ホームページ：http://kunishitei.bunka.go.jp/bsys/maindetails.asp（参照 2014-6-30）.

細谷和海．2013．コイ目．中坊徹次（編），日本産魚類検索全種の同定，第三版，東海大学出版会，東京．pp. 308–334.

Jansen, T., P. Forster, M. A. Levine, H. Oelke, M. Hurles, C. Renfrew, J. Weber and K. Olek. 2002. Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 99: 10905–10910.

Joshi, M. B., P. K. Rout, A. K. Mandal, C. Tyler-Smith, L. Singh and K. Thangaraj. 2004. Phylogeography and origin of Indian domestic goats. Mol. Biol. Evol., 21: 454–462.

木島明博．1995．魚取沼テツギョのルーツを遺伝子から追う．遺伝，49：7–8.

木島明博．1997．魚取沼テツギョの起源と成因に関する遺伝学的調査報告．魚取沼テツギョ保全対策事業基礎調査報告書，宮城県，37–53.

木島明博．2000．遺伝学的観点からみた魚取沼のテツギョの保全について．魚取沼テツギョ保全対策事業基礎調査報告書，宮城県，17–38.

木島隆・二見邦彦・方波見弥穂・山根允文・王志勇・黄金田・尾崎照遵・坂本崇・岡本信明．2008．ミトコンドリア DNA D-loop 領域からみたキンギョの起源．水産育種，38：97–103.

木村資生．1984．分子進化学入門．培風館，東京．296 pp.

Komiyama, T., H. Kobayashi, Y. Tateno, H. Inoko, T. Gojobori and K. Ikeo. 2009. An evolutionary origin and selection process of goldfish. Gene, 430: 5–11.

Mabuchi, K., H. Senou, T. Suzuki and M. Nishida. 2005. Discovery of an ancient lineage of *Cyprinus carpio* from Lake Biwa, central Japan, based on mtDNA sequence data, with reference to possible multiple origins of koi. J. Fish Biol. 66: 1516–1528.

Mabuchi, K., M. Miya, H. Senou, T. Suzuki and M. Nishida. 2006. Complete mitochondrial DNA sequence of the Lake Biwa wild strain of common carp (*Cyprinus carpio* L.): further evidence for an ancient origin. Aquaculture, 257: 68–77.

松井佳一．1935．科学と趣味から見た金魚の研究．弘道閣，東京．448 pp.

Murakami, M., Y. Yamashita and H. Fujitani. 1998. The Complete Sequence of Mitochondrial Genome from a Gynogenetic Triploid “Ginbuna” (*Carassius auratus langsdorfi*). Zool. Sci. 15: 335–337.

Murakami, M., C. Matsuba and H. Fujitani. 2001. The maternal origins of the triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfi*): phylogenetic relationships within the *C. auratus* taxa by partial mitochondrial D-loop sequencing. Genes Genet. Syst., 76: 25–32.

織田秀実．1989．テツギョと昭和天皇のご研究．採集と飼育，51：102–107.

Oster, S. K., C. S. Ho, E. L. Soucie and L. Z. Penn. 2002. The myc oncogene: MarvelouslY Complex. Adv. Cancer Res., 84: 81–154.

Savolainen, P., Y. P. Zhang, J. Luo, J. Lundeberg and T. Leitner. 2002. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. Science, 298: 1610–1613.

Takada, M., K. Tachihara T. Kon, G. Yamamoto, K. Iguchi, M. Miya and M. Nishida. 2010. Biogeography and evolution of the *Carassius auratus*-complex in East Asia. BMC Evol Biol., 10: 7.

Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei

and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. Mol. Biol. Evol., 28: 2731–2739.

Thai, B. T., C. P. Burridge, T. A. Pham and C. M. Austin. 2005. Using mitochondrial nucleotide sequences to investigate diversity and genealogical relationships within common carp (*Cyprinus carpio* L.). Anim. Genet. 36: 23–28.

Thai, B. T., T. A. Pham and C. M. Austin. 2006. Genetic diversity of common carp in Vietnam using direct sequencing and SSCP analysis of the mitochondrial DNA control region. Aquaculture, 258: 228–240.

Yamamoto, G., M. Takada, K. Iguchi and M. Nishida. 2010. Genetic consutitution and phylogenetic relationships of Japanese crucian carps (*Carassius*). Ichthyol. Res., 57: 215–222.

Young, W. P., C. O. Ostberg, P. Keim and G. H. Thorgaard. 2001. Genetic characterization of hybridization and introgression between anadromous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss irideus*) and coastal cutthroat trout (*O. clarki clarki*). Mol. Ecol., 10: 921–930.

Zhou, J. F., Q. J. Wu, Y. Z. Ye and J. G. Tong. 2003. Genetic divergence between *Cyprinus carpio carpio* and *Cyprinus carpio haematopterus* as assessed by mitochondrial DNA analysis, with emphasis on origin of European domestic carp. Genetica. 119:93–97.

張寰．1994．4 倍性コイ科魚類，コイ，フナの c-*myc* 遺伝子の単離とそれを用いた系統進化．博士学位論文．東京水産大学，東京．