

ゲノムの比較分析による
自然クローン繁殖系フナ (*Carassius auratus langsdorfi*) の遺伝学的特徴

2005年

麻布大学大学院 獣医学研究科 分子生物学研究室

高瀬 有加里

ゲノムの比較分析による
自然クローン繁殖系フナ (*Carassius auratus langsdorfi*) の遺伝学的特徴

2005 年

麻布大学大学院 獣医学研究科 分子生物学研究室

高瀬 有加里

目次

はじめに	p.1
第一章 キンギョ (和金 : <i>Carassius auratus auratus</i>) のミトコンドリア DNA の全塩基配列 決定および日本産フナと大陸産フナの系統学的関係について	p.4
1 序論	p.5
2 方法	
2-1 材料	p.7
2-2 DNA の抽出	p.7
2-3 目的 DNA 断片の増幅	p.7
2-4 塩基配列の決定	p.8
2-5 塩基配列の解析	p.9
3 結果	
3-1 キンギョの mtDNA 塩基配列	p.10
3-1-1 コード遺伝子	p.10
3-1-2 tRNA 遺伝子	p.10
3-1-3 D-loop 領域	p.11
3-1-4 L 鎖複製開始点	p.11
3-1-5 GC 含量	p.12
3-1-6 相同性	p.12
3-2 日本産フナと大陸産フナの比較	
3-2-1 系統樹	p.13
3-2-2 相同性	p.13
4 考察	
4-1 キンギョの mtDNA 塩基配列	p.14
4-2 日本産フナと大陸産フナの比較	p.15
4-2-1 オランダ産のフナについて	p.15
4-2-2 日本産フナについて	p.16
4-2-3 キンギョについて	p.16
4-2-4 中国産フナについて	p.17
5 まとめ	p.18

6 参考文献	p.19
7 図表	
第二章 AFLP 解析による 3 倍性ギンブナに特異的なゲノムマーカーの探索	p.25
1 序論	p.26
2 方法	
2-1 材料	p.27
2-1-1 AFLP 解析のサンプル	p.27
2-1-2 特異的プライマーによる PCR 反応に用いたサンプル	p.27
2-2 DNA の抽出	p.27
2-3 倍数性の判定	p.27
2-3-1 フローサイトメトリーによる判定	p.27
2-3-2 Cal3nDr 配列による判定	p.28
2-4 制限酵素-ライゲーション反応	p.28
2-4-1 adaptor の熱ショック反応	p.28
2-4-2 master mix の作成	p.28
2-4-3 制限酵素-ライゲーション反応	p.29
2-5 preselective PCR 反応	p.29
2-6 selective PCR 反応	p.29
2-6-1 master mix の作成	p.29
2-6-2 selective PCR 反応	p.29
2-7 selective PCR 産物の電気泳動	p.30
2-8 特異的な断片の切り出しと TA クローニング	p.30
2-8-1 特異的な断片の切り出し	p.30
2-8-2 TA クローニング	p.30
2-9 クローニング産物の塩基配列決定	p.31
2-10 特異的プライマーの作製	p.31
2-11 作製した特異的プライマーによる PCR 反応	p.31
2-12 系統樹の作成	p.32
3 結果	
3-1 AFLP 解析	p.33
3-2 クローニングの結果	p.33
3-3 特異的プライマーによる PCR 反応の結果	p.34

3-3-1	Y2-2 プライマーによる PCR 反応の結果	p.34
3-3-2	Y2-16 プライマーによる PCR 反応の結果	p.35
4	考察	
4-1	AFLP 解析について	p.37
4-2	Y2-2 プライマーによる PCR 反応の結果について	p.37
4-3	Y2-16 プライマーによる PCR 反応の結果について	p.39
5	まとめ	p.41
6	参考文献	p.42
7	図表	
	謝辞	p.45

はじめに

Amazon Molly (*Poecilia formosa*) は単性生殖を行なう脊椎動物として最初に報告された (Carl and Laura Hubbs, 1932)。単性生殖は次の 3 つの種類に分けられる。1、単為生殖 (parthenogenesis)、卵は組み換えや減数分裂することなしに生み出され、精子を必要とせず発生する。2、雌性生殖 (gynogenesis)、卵は組み換えや減数分裂を行なわない。しかし、胚の発生に精子の刺激を必要とする。その精子と卵は融合しないため、子供は母親と遺伝的に同一である。3、雑種発生 (hybridogenesis)、配偶子形成において、片方の親由来のゲノムが排除されるため、配偶子は排除されていない方の親由来のゲノムのみを持つ。前述の Amazon Molly は全て雌からなる種で、配偶子の遺伝的組み換えが起らないために、母親と遺伝的に同一な子供 (娘) が生み出されることから、その生殖様式は雌性生殖に分類される。

世界中には約 17 種類の雌性生殖を行なう魚がいると言われているが (Vrijenhoek et al., 1989)、日本には 3 倍性ギンブナ (*Carassius auratus langsdorfi*) (Kobayasi, 1971; Kobayasi and Ochi, 1972; Ojima and Asano, 1977) とドジョウ科の一部 (Osinov et al., 1983) が存在するにすぎない。このような生殖機構は脊椎動物では大変珍しく、通常の有性生殖を理解する上で、その細胞学的、遺伝学的解明に関心がもたれる。ギンブナには雌性生殖を行う 3 倍性個体以外に、有性生殖を行う 2 倍体個体も存在する。これは雌性生殖機構と有性生殖機構を比較するのに適したモデルとなる。本研究では、雌性生殖機構の解明を目指す一環として、3 倍性ギンブナゲノムの遺伝学的特徴について調べた。以下の 2 つのアプローチを行なった。

ギンブナは *Carassius auratus* (コイ Cyprinidae 科コイ Cyprininae 亜科) に属し、この中にはギンブナの他に四つの亜種、ゲンゴロウブナ (*C. a. cuvieri*)、ナガブナ (*C. a. burgeri*)、ニゴロブナ (*C. a. grandoculis*)、キンブナ (*C. a. subsp.*) が存在する (中村, 1982)。またユーラシア大陸にはギベリオブナ (*C. a. gibelio*) が、中国には中国普通鮒 (*C. a. auratus*) が知られている (Cherfas, 1966, 1972; Kobayasi et al., 1973; Fan and Shen, 1990)。本研究では第一に、これらの系統学的関係を明確にするため、系統学的関係を調べる際によく利用されるミトコンドリア DNA (以下 mtDNA) (Avise et al., 1979; Moore, 1995) を解析した。中国普通鮒を祖先とすると言われているキンギョ (和金: *C. a. auratus*) (Ojima and Takai, 1979) の mtDNA の全塩基配列を決定し、既に報告されている 3 倍性ギンブナ (Murakami et al., 1998)、ゲンゴロウブナの mtDNA の全塩基配列との比較を行なった。また、日本産フナと大陸産フナとの関係を詳細に調べるため、mtDNA 上の NADH5 遺伝子とチトクローム b 遺伝子コード領域の塩基配列を解析した (第一章)。

次に、AFLP (amplified fragment length polymorphism) 解析を利用した、3 倍性ギンブナを識別するゲノムマーカーの探索を行なった。AFLP 法は新しい DNA フィンガープリント

法で、ゲノム DNA を制限酵素で切断し、その断片を PCR 法により選択的に増幅する方法である (Vos et al., 1995; Mueller and Wolfenbarger, 1999)。これを用いて 3 倍性ギンブナと 2 倍体ギンブナのゲノム DNA を比較し、3 倍性ギンブナに特異的な DNA マーカーを探索した。得られたマーカーの存在を多くの個体について解析し、3 倍性ギンブナのゲノム構成および起源について考察した (第二章)。

参考文献

Avise J. C., Gilbin-Davidson J., Laerm J. C., Patton and Lansman R. A. (1979) Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6694-6698.

Cherfas N. B. (1966) Natural triploidy in the females of the unisexual of the silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch). Genetika 2, 16-24.

Cherfas N. B. (1972) Results of a cytological analysis of unisexual and bisexual forms of silver crucian carp. In: Cherfas B. I. (eds.) Genetics Selection, and Hybridization of Fish. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, pp.79-90.

Fan Z. and Shen J. (1990) Studies on the evolution of bisexual reproduction in crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch). Aquaculture 84, 235-244.

Hubbs C. L. and Hubbs L. C. (1932) Apparent parthenogenesis in nature, in a form of fish of hybrid origin. Science 76, 628-630.

Kobayasi H. (1971) A cytological study on gynogenesis of the triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfii*). Zool. Mag. 80, 316-322.

Kobayasi H. and Ochi H. (1972) Chromosome Studies of the Hybrids, Ginbuna (*Carassius auratus langsdorfii*) x Kinbuna (*C. auratus* subsp.) and Ginbuna x Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). Zool. Mag. 81, 67-71.

Kobayasi H., Ochi H., Takeichi N. (1973) Chromosome studies of the silver crucian carps (*Carassius auratus gibelio*) from the valley of the Amur river, and their progenies. Jpn. Women's Univ. J. 20, 83-88.

Moore W. S. (1995) Inferring phylogenies from mtDNA variation : Mitochondrial-gene tree versus nuclear-gene tree. Evolution 49, 718-726.

Mueller U. G. and Wolfenbarger L. L. (1999) AFLP genotyping and fingerprinting. Trends Ecol. Evol. 14 , 389-394.

Murakami M., Yamashita Y., Fujitani H. (1998) The complete sequence of mitochondrial genome from a gynogenetic triploid "ginbuna" (*Carassius auratus langsdorffi*). Zool. Sci. 15, 335-337.

中村守純 (1982) 原色淡水魚類検索図鑑 北隆館 pp. 140-142

Ojima Y. and Asano N. (1977) A cytological evidence for gynogenetic development of the ginbuna (*Carassius auratus langsdorffi*). Proc. Japan Acad. Ser B. 53, 138-142.

Ojima Y. and Takai A. (1979) Further cytogenetical studies on the origin of the Goldfish. Proc. Jpn. Acad. 55 Ser B, 346-350.

Osinov A. G., Vasil'eva E. D., Vasil'ev V. P. (1983) The hybrid origin of the triploid form in g. *Cobitis* (Pisces, Cobitidae). Dokl. An. USSR. 272, 716-718.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans B., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acids Res. 23, 4407-4414.

Vrijenhoek R. C., Dawley R. M., Cole C. J., Bogart J. P. (1989) A list of the known unisexual vertebrates. In: Dawley R. M. and Bogart J. P. (eds.) Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrate. New York Museum, New York, pp.19-23.

第一章

キングヨ（和金：*Carassius auratus auratus*）のミトコンドリア DNA の
全塩基配列決定および日本産フナと大陸産フナの系統学的関係について

1 序論

Carassius auratus (コイ Cyprinidae 科コイ Cyprininae 亜科) は五つの亜種、ゲンゴロウブナ (*C. a. cuvieri*)、ギンブナ (*C. a. langsdorfi*)、ナガブナ (*C. a. burgeri*)、ニゴロブナ (*C. a. grandoculis*)、キンブナ (*C. a. subsp.*) に分類される (中村, 1982)。またユーラシア大陸には、さらに二つの亜種、ギベリオブナ (*C. a. gibelio*) と中国普通鰻 (*C. a. auratus*) が知られている (Cherfas, 1966, 1972; Kobayasi et al., 1973; Fan and Shen, 1990)。前者の五亜種は日本に広く分布し、ギベリオブナはユーラシア大陸全域に、中国普通鰻は中国に分布している (Chen and Leibenguth, 1995; Ueda and Ojima, 1978)。ギンブナには有性生殖を行なう 2 倍体個体の他に、雌性生殖を行なう 3 倍性 (稀に 4 倍性) 個体が存在している (Kobayasi, 1971; Kobayasi and Ochi, 1972; Ojima and Asano, 1977)。雌性生殖は単為生殖のひとつで、卵の賦活に精子を必要とするものの卵と精子の融合が起こらず、その結果母個体と遺伝的に同一な娘個体が産まれる生殖システムである。雌性生殖を行なう魚類として日本国内では、3 倍性ギンブナの他にドジョウ科の一部 (Osinov et al., 1983) が知られている。このような生殖機構は大変珍しく、脊椎動物の生殖メカニズムを解明する上で適した貴重なモデルといえる (Murakami and Fujitani, 1998a)。しかし現行の *Carassius* 属の分類は形態学的分類であり、棲息環境に応じて形態が変化し易いことや亜種間での交配が可能であることにより分類が不明確になっている。またギベリオブナや中国普通鰻にも倍数体個体が存在しており (Buth et al., 1991)、これら的大陸産フナと日本産フナとの関係もほとんど明らかになってはいない。このため、*Carassius* 属の系統学的分類を明確にすることは、倍数体個体の起源や雌性生殖機構の獲得メカニズムを解明する上で重要である。

ミトコンドリア (以下 mt) の DNA は核 DNA とは別の独自のもので、ATP (adenosine triphosphate) を生産する電子伝達系を構成するサブユニットのうち 13 種類のポリペプチドをコードしている。塩基配列の変異速度は核 DNA に比べて 5~10 倍速いと言われている (Brown et al., 1979)。また変異量は種や系統が分化してからの時間を反映しており、進化を調べる上で有用な指標となる。さらに、比較的サイズが小さいため扱いが容易であること、遺伝様式が母性遺伝をするため、1 個体が 1 つの母系集団の代表となり得る (Moritz et al., 1987) ことなどの特徴を持っている。これらの点から Murakami ら (1998b) は 3 倍性ギンブナの全 mtDNA 塩基配列を決定した。さらに最も多く変異が見られる部位である D-loop (displacement region) 領域 (Hoelzel et al., 1991; Lee et al., 1995) の塩基配列を、国内の各種フナについて比較することにより、多くの 3 倍性ギンブナの母系起源は日本の 2 倍体ギンブナにあることを報告した (2001)。

これまでに著者らは、ゲンゴロウブナの mtDNA の全塩基配列を決定した (DDBJ accession No. AB045144)。本研究では、mtDNA の一部分ではなく全長を用いたより詳細な解析を行な

うために、同じ *Carassius* 属に属し、中国大陸由来であると考えられている (Ojima and Takai, 1979) キンギョ (和金: *C. a. auratus*) の mtDNA の全塩基配列を決定し、既に報告されている 3 倍性ギンブナおよびゲンゴロウブナ、コイ (*Cyprinus carpio*) の塩基配列と比較した。さらに、ユーラシア大陸および日本各地に分布する多くのフナを採集し、遺伝子コード領域 [NADH5 (以下 ND5) 遺伝子とチトクローム b (以下 cyt b) 遺伝子] の塩基配列変異を比較することで、それらの系統関係を調べた。特に日本産フナと大陸産フナとの系統学的関係をより詳細に調べることを目的とした。

2 方法

2-1 材料

日本産フナ 5 尾、大陸産フナ 7 尾、キンギョ 2 尾、コイ 1 尾を用いた (表 1)。中国産フナ 4 尾は中国科学院昆明動物研究所所長、張亜平博士から、オランダ産のフナ 1 尾は北海道大学大学院水産科学研究科、荒井克俊教授から、ロシアのバイカル湖産のフナ 2 尾はフィンランドヘルシンキ大学生態系統学部、松葉周子博士から提供された。キンギョ mtDNA の D-loop 領域の塩基配列、3 倍性ギンブナ (AZ3 系統)、ゲンゴロウブナおよびコイ (Chang et al., 1994) の全 mtDNA 塩基配列はそれぞれ Genbank から得た (AB008802、AB006953、AB045144、X61010)。倍数性は DAPI 染色法 (Hamada and Fujita, 1983; 高山, 1989) により判定した。

2-2 DNA の抽出

DNA の抽出は肝臓または血液から行なった。肝臓からの抽出は Asahida ら (1996) の方法に従った。すなわち、TNES-尿素緩衝液 (6M 尿素、10mM Tris-HCl; pH7.5、125mM NaCl、10mM EDTA、1% SDS) 500 μ l 中に保存しておいたキンギョの肝臓 (数百 mg) を、保存液のままホモジナイザー (テフロン製ピストン) でホモジナイズし、プロテイナーゼ K を 0.8mg 加えて、37°C で 2 日間インキュベートした。フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) 処理を行ってタンパク質を変性除去した後、上清中の DNA をエタノール沈澱させ、乾燥後 TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl、1mM EDTA; pH8.0) に溶解した。血液からの抽出には Gen とるくん血液用 (宝酒造) を使い、その方法は添付のマニュアルに従った。DNA 溶液の濃度は波長 260nm での吸光度から求めた ($O.D._{260}=1$ の時の濃度を 50 μ g/ml とし、計算した)。

2-3 目的 DNA 断片の増幅

すでに全 mtDNA 塩基配列が決定されている 3 倍性ギンブナ (以下 AZ3) およびゲンゴロウブナの mtDNA 塩基配列に基づいて、キンギョ (和金) の全 mtDNA を増幅させる 11 種類のプライマー (表 2、プライマー No.①~⑪) を設定した。系統樹の作成に使用した mtDNA 上の ND5 遺伝子、cyt b 遺伝子コード領域を増幅させるプライマーは上記の中から 4 種類のプライマー (表 2、プライマー No.③④⑨⑩) を選択した。設定は National Biosciences, Inc. の OLIGO 6.5 Primer Analyzing Software で行ない、コンピューター上での増幅確認を University of Wisconsin, Genetics の Amplify For Analyzing PCR Experiments のソフトウェアを用いて

行なった。

PCR 反応は全量 25 μ l [鋳型 DNA 約 200ng、1 \times PCR 緩衝液、2.5mM MgCl_2 、0.25mM dNTPs、各プライマー 0.2 μ M、LA Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造) 2.5U を含む] で行なった。初期熱変性を 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 分間行った後、熱変性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒間、アニーリング 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒間、伸長反応 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 分 30 秒間のセットを 35 サイクル、最終反応として伸長反応 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 分間の条件で行った。この条件はすべてのプライマーについて同一にした。PCR 増幅産物の 2.5 μ l を電気泳動することで目的 DNA 断片の増幅を確認した。

2-4 塩基配列の決定

プライマーの作製はプライマーウォーキング法 (Strauss et al., 1986; Kaiser et al., 1989) を用い、キンギョ (和金) に対しては 40 種類のシークエンシング用プライマー (表 2、プライマー No.1~40) を設定した。そのうちの 9 種類のシークエンシング用プライマー (表 2、プライマー No.18~22、37~40) と、新たに作製した 6 種類のシークエンシング用プライマー (表 2、①~⑥) を、その他のフナ、キンギョ (青文金) の ND5 遺伝子および cyt b 遺伝子コード領域の塩基配列の決定に用いた。プライマーの設定は PCR 用プライマーを作成したときと同様のソフトウェアを用いて行なった。

PCR で増幅した断片を鋳型 DNA サンプルとしてシークエンス反応に用いた。サンプルは反応の前に、exonuclease I (Amersham Pharmacia Biotech, USA) による未反応の 1 本鎖プライマーの分解と、shrimp alkaline phosphatase (Amersham Pharmacia Biotech, USA) によるデオキシヌクレオチド 3 リン酸の脱リン酸化処理を行った。シークエンス反応は Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, USA) を用いた。鋳型 DNA 0.5pmol と FITC 標識プライマー 2pmol を含む全量 14 μ l の溶液を準備し、キット内に含まれる A 反応液、G 反応液、C 反応液、T 反応液 1 μ l にそれぞれ 3 μ l ずつ分注した。初期熱変性を 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 分間行った後、アニーリング 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒間、伸長反応 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 秒間、熱変性 98 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒間を 20 サイクル行い、その後、熱変性 98 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒間、伸長反応 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 秒間を 20 サイクルの条件で行なった。反応停止液を 4 μ l ずつ加えて反応を停止させた後、自動塩基配列決定装置 DSQ-2000L DNA シークエンサー (島津製作所) を用いて塩基配列を決定した。また必要に応じて、ABI Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystem, USA) を使用した。キット内に含まれる ready reaction mix 2 μ l に、鋳型 DNA、プライマー 0.8pmol を加え、96 $^{\circ}\text{C}$ 3 分間の初期熱変性を行ない、96 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒間、50 $^{\circ}\text{C}$ 25 秒間、60 $^{\circ}\text{C}$ 4 分間を 31 サイクル反応させた。エタノール沈澱後ホルムアミドに溶解し、ABI DNA シークエンサー 373A (ABI, USA) を用いて解析を

行なった。

2-5 塩基配列の解析

得られた配列はソフトウェア開発株式会社の GENETIX-MAC ver.12 遺伝情報処理ソフトウェアを用いてコンピューター解析を行なった。Clustal W によるアラインメント (Thompson et al, 1994) を行ない、近隣結合法 (NJ 法、Saitou and Nei, 1987) により系統樹を作成した。系統樹の作図には Tree View を用い (Page, 1996)、信頼性は 1000 回繰り返した場合のブートストラップ値により評価した (Felsenstein, 1985)。

3 結果

3-1 キンギョの mtDNA 塩基配列

キンギョ (和金) の mtDNA の全長は 16,580bp で (DDBJ accession No. AB111951、図 1)、既に報告されている 3 倍性ギンブナの AZ3 より 2bp 長く、ゲンゴロウブナより 1bp 短いものであった。この長さの違いは D-loop 領域の長さによった。タンパク質をコードする遺伝子領域やスパーサー領域において長さの違いは見られなかった。一方コイとの比較においては、ND 6 遺伝子で 3bp の、5 種類のトランスファーRNA (以下 tRNA) 遺伝子 (tRNA-Leu (UUR)、tRNA-Ile、tRNA-Ala、tRNA-Cys、tRNA-Tyr) で 1~2bp の、12S リボソーム RNA (以下 rRNA) 遺伝子で 3bp の長さの違いがあり、いずれもコイの塩基数より長くなっていた。

3-1-1 コード遺伝子

AZ3 およびゲンゴロウブナと同様に、キンギョの mtDNA の H 鎖には 12 種類のタンパク質コード遺伝子と 2 種類の rRNA 遺伝子、14 種類の tRNA 遺伝子が、L 鎖には 1 種類のタンパク質コード遺伝子と 8 種類の tRNA 遺伝子があった (図 2、表 3)。CO I 遺伝子を除いて全てのタンパク質コード遺伝子は ATG が開始コドンとなっていた。CO I 遺伝子の開始コドンには GTG が使用されており、これはマウスの ND I 遺伝子 (Bibb et al., 1981)、ニワトリ (Desjardins et al., 1990)、コイ、ドジョウ (Tzeng et al., 1992) の CO I 遺伝子において開始コドンとして報告されているのと同じである。6 種類のタンパク質コード遺伝子 (ND1、CO I、ATPase6、COIII、ND4L、ND5) は TAA が終止コドンであり、そのうち ATPase6 遺伝子と COIII 遺伝子の終止コドンの最後の A は COIII 遺伝子、tRNA-Gly 遺伝子の開始と重なっていた。4 種類のタンパク質コード遺伝子 (ND2、ATPase8、ND3、ND6) は TAG が終止コドンで、ND2 遺伝子と ND3 遺伝子の最後の AG は tRNA-Trp 遺伝子、tRNA-Arg 遺伝子の開始に重なっていた。CO II 遺伝子、ND4 遺伝子、cyt b 遺伝子には終止コドンが見られず、コード領域の後方に T が 1bp 挿入され、tRNA 遺伝子が連結している形となっていた。この部位では、プロセッシングの際に付加されるポリ A により、UAA の終止コドンが作られると考えられている (Anderson et al., 1981; Ojala et al., 1981)。これらの開始コドンおよび終止コドンは先に報告されているコイ、AZ3 と同様であったが、ゲンゴロウブナに対しては ND5 遺伝子 (TAG) のみ異なっていた。

3-1-2 tRNA 遺伝子

22 種類の tRNA 遺伝子は 69bp から 78bp の長さで、tRNA-Ser (AGY) 遺伝子を除いて典型的なクローバーリーフ型の二次構造に折り畳まれた (図 3)。この構造は 7bp のアミノ酸受容ステム、5bp の TC システムとアンチコドンステム、4bp の DHU システムから構成されていた (図

4)。tRNA-Ser (AGY)遺伝子はこのような構造をとらず、DHU ステムや DHU アームの見られない特異なものであった。これは他の脊椎動物やニジマス (*Onchorynchus myskiss*) (Zardoya et al., 1995)、サケ (*Salmo salar*) (Hurst et al., 1999)においても報告されている。22 種類の tRNA 遺伝子はすべて 3'末端に CCA 配列が欠如しており、転写後の付加が行なわれるとみられている (L'Abbe et al., 1990)。

3-1-3 D-loop 領域

tRNA-Phe 遺伝子と tRNA-Pro 遺伝子に挟まれた領域は control region または displacement region (D-loop)と呼ばれ (図 1、塩基配列番号 1~923)、H 鎖複製の起点と H、L 鎖の転写開始部位である (Clayton, 1982)。哺乳類における D-loop 領域の解析から特に保存性の高い部位 conserved sequence block (CSB)が報告された (Southern et al., 1988; Hoelzel et al., 1991; Saccone et al., 1991)。これは魚類においても解析が行なわれ、さらに魚類で保存されている領域として CSB-D が報告されている (Lee et al., 1995)。キングヨの D-loop 領域とコイ、ゲンゴロウブナ、AZ3 の D-loop 領域のアライメントを行ない、CSB の一つである central conserved region (CCR) および、CSB-D、CSB II、CSB IIIを確認した (図 5)。

H 鎖の転写プロモーター (heavy-strand promoter ; HSP) 配列として、tRNA Phe 遺伝子の 5'末端 51bp 上流に、ヒト (Chang and Clayton, 1984) やコイの HSP 配列と相同的な配列が予想され、HSP 部位であると思われた (図 5)。一方 L 鎖の転写プロモーター配列 (light-strand promoter ; LSP) は確認できなかった。

また H 鎖複製開始点もコイと同様にはっきり分からなかった。

3-1-4 L 鎖複製開始点

tRNA-Asn 遺伝子と tRNA-Cys 遺伝子に挟まれた 32bp のスペーサー領域において、tRNA-Cys 遺伝子に 4bp の重なりを持つヘアピンループ型の二次構造が見られた (図 6)。これは 11bp のステムと 14bp のループから構成され、L 鎖複製開始点であると考えられた。ヒトやマウス、ニジマス、サケの mtDNA において、複製開始期の RNA 合成から DNA 合成への変換に関係すると言われている 5'-GCCGG-3'配列 (Hixson et al., 1986) は見つからなかった。また RNA プライマーゼによる L 鎖複製の開始に関与している、ループ内の T-rich 領域 (Wong and Clayton, 1985) が多くの哺乳類で見られているが、ニジマスやサケなどの魚類では C-rich 領域として知られている。キングヨ (和金) の mtDNA においてはコイの場合と同様にこのような領域は明らかにならなかった。

3-1-5 GC 含量

D-loop 領域およびタンパク質コード遺伝子、rRNA 遺伝子、tRNA 遺伝子について GC 含量を調べた (表 4)。D-loop 領域の GC 含量は 34.9%で、AT-rich であった。さらに D-loop 領域を、CCR 部位を挟んで tRNA-Pro 遺伝子側をブロック 1、tRNA-Phe 遺伝子側をブロック 3、その間の CCR 部位をブロック 2 と三つのグループに分け (図 5)、それぞれの GC 含量を調べた (表 5)。ブロック 1 は 28.6%、ブロック 2 は 39.2%、ブロック 3 は 36.6%であり、特にブロック 1 が AT-rich であった。タンパク質コード遺伝子の平均は 42.0%、rRNA 遺伝子の平均は 46.0%、tRNA 遺伝子の平均は 44.4%だった。

3-1-6 相同性

コイ、ゲンゴロウブナ、AZ3 に対する各領域の相同性を求めた (表 6)。各タンパク質コード遺伝子における塩基配列の相同性では、同じ種 (*C. auratus*) に属する AZ3、ゲンゴロウブナと全ての領域が 90%以上の高い相同性を示し、アミノ酸配列においては CO I 遺伝子、ATPase8 遺伝子、ND4L 遺伝子、ND6 遺伝子で 100%一致していた。さらに ND4L 遺伝子では属の異なるコイ (*Cyprinus* 属) とも 100%一致していた。しかし COIII 遺伝子のアミノ酸配列はコイと同一なものであった。tRNA 遺伝子においては、AZ3、ゲンゴロウブナと 100%の相同性を示すものが多くみられ [tRNA-Phe、tRNA-Leu (UUR)、tRNA-Trp、tRNA-Ala、tRNA-Asn、tRNA-Tyr、tRNA-Ser (UCN)、tRNA-Gly、tRNA-Leu (CUN)、tRNA-Glu]、そのうち tRNA-Ser (UCN) 遺伝子、tRNA-Glu 遺伝子ではコイとの比較においても 100%一致した。tRNA-Cys 遺伝子、tRNA-His 遺伝子、tRNA-Thr 遺伝子は AZ3 と、tRNA-Met 遺伝子、tRNA-Arg 遺伝子、tRNA-Pro 遺伝子はゲンゴロウブナと同一なものであった。rRNA 遺伝子では全てが 90%以上で、特に 12S rRNA 遺伝子は AZ3 と 99.3%というかなり高い相同性を示した。

D-loop 領域では D-loop 全体の相同性においても、各ブロックごとの相同性においても AZ3 に対して高い値であった (表 7)。CCR (central conserved region) 部位であるブロック 2 はコイ、ゲンゴロウブナと比較しても相同性が高く、かなり保存された部位であることが確認された。

3-2 日本産フナと大陸産フナの比較

3-2-1 系統樹

AZ3 とゲンゴロウブナを除く日本産フナ 3 尾、大陸産フナ 7 尾、キンギョ 2 尾（和金 1 尾を含む）において、mtDNA の ND5 遺伝子、ND6 遺伝子、cyt b 遺伝子を増幅するために、表 2 のプライマー No. ③⑨と④⑩を使用して全長 3914bp の領域の塩基配列を得た（図 7）。この領域には他に 6 種類の tRNA 遺伝子がコードされている。ND5 遺伝子と cyt b 遺伝子の塩基配列を用い、コイを外群にして系統樹を作成した（図 8）。

オランダ産のフナは他と分岐し、続いてゲンゴロウブナが分かれた。その他のフナは 3 つのクラスター（図 8、クラスター I、II、III）を形成した。2 倍体ギンブナ、3 倍性ギンブナ、ギンブナはクラスター I に、大陸産フナのグループはギベリオブナ（クラスター II）と中国普通鮠（クラスター III）の 2 つのクラスターに分岐した。千葉県印旛沼産の 3 倍性ギンブナ（サンプル名、Imba）とロシアのバイカル湖から採取されたフナ 2 尾（S1、S2）はギベリオブナのクラスター II に、キンギョ 2 尾（GF-W、GF-S）は中国普通鮠のクラスター III に入った。3 倍性中国普通鮠のうち 1 尾（Caa-3n-20）はクラスター II、III から分岐した。

3-2-2 相同性

各フナに対する ND5 遺伝子および cyt b 遺伝子の相同性を表 8、表 9 に示した。どちらの遺伝子とも *Carassius* 内では 90%以上であった。ND5 遺伝子の塩基配列において、千葉県印旛沼の 3 倍性ギンブナ（サンプル名 Imba）とギベリオブナ（Cag）、和金（GF-W）と青文金（GF-S）はそれぞれ 99.8%、99.9%の非常に高い値を示した。これらのアミノ酸配列の相同性はともに 100%であった。一方 cyt b 遺伝子の塩基配列においては、印旛沼の 3 倍性ギンブナとギベリオブナ、和金と青文金、ギベリオブナとロシアのバイカル湖産のフナ（S1）がそれぞれ 99.9%、100%、99.8%で、そのアミノ酸配列ではすべて 100%の相同性であった。cyt b 遺伝子のアミノ酸配列ではこれらの他に、2 倍性ギンブナ（2n）と 3 倍性ギンブナ（AZ3）、印旛沼の 3 倍性ギンブナとロシア産フナ、ロシア産のフナ（S1、S2）同士、3 倍性中国普通鮠（Caa-3n-20、Caa-3n-24）同士でも 100%の相同性を示した。またロシア産フナと 3 倍性中国普通鮠は 2 倍性、3 倍性ギンブナに対しても 100%の相同性であった。

4 考察

4-1 キンギョの mtDNA 塩基配列

キンギョの歴史はA.D.265-419年まで遡ることができる。キンギョのプロトタイプは約1600年前に中国の南の地域に出現したフナの変異型であり、キンギョとフナ、キンギョとコイ、そしてコイとフナとの交配実験などからもキンギョの祖先はフナであると示されている (Ojima and Takai, 1979)。 *Carassius auratus* に属するフナには7種類の亜種が存在し、そのうちギベリオブナはユーラシア大陸全域に、中国普通鮪は中国に分布している。Ojima らは細胞遺伝学的研究により、キンギョの祖先は日本のフナ亜種ではなく、中国普通鮪であることを示した。和金は日本のキンギョのうち、形態的に最も原型に近いタイプで、1502年に中国から伝えられたと言われている。本研究ではキンギョの mtDNA のより詳細な遺伝学的情報を得るためにその全塩基配列を決定した。

キンギョの mtDNA 塩基配列の遺伝子構成は表3に示したように、既に報告されている AZ3、ゲンゴロウブナ、コイのものと同様であり、mtDNA にコードされている遺伝子や位置、長さなどについて特に特徴的な点はみつからなかった。

コイと同様に、D-loop 領域において三つの保存性の高い部位 (CCR、CSB II、CSB III) が確認された (図5)。このうち CCR には硬骨魚類で保存された領域である CSB-D も見られた。これらの領域の機能については不明のままであるが、ミトコンドリアの代謝において重要な働きを担っていると推測される (Mignotte et al., 1987; Saccone et al., 1987)。D-loop 領域を、CCR を挟んで三つのブロックに分けると、CCR であるブロック 2 はコイやゲンゴロウブナとも相同性が高く、保存された部位であることが確認された (表7)。mtDNA の D-loop 領域は変異が蓄積しやすい部位であると言われているが、その変異の多くはブロック 1、3 において見られることが分かった。また、D-loop 領域全体および各ブロックにおける相同性は AZ3 により近い値であった。

tRNA 遺伝子における相同性は、コイの tRNA-Ala 遺伝子と tRNA-His 遺伝子を除いて 90% 以上を示し (表6)、また AZ3、ゲンゴロウブナのみで 100% を示したものもあった (AZ3 では tRNA-Cys 遺伝子、tRNA-His 遺伝子、tRNA-Thr 遺伝子、ゲンゴロウブナでは tRNA-Met 遺伝子、tRNA-Arg 遺伝子、tRNA-Pro 遺伝子)。tRNA 遺伝子の変異はあまり起こらず、種を超えてもよく保存されているものと思われる。

タンパク質コード遺伝子および rRNA 遺伝子における塩基配列の相同性を比較すると、その差は遺伝子によって様々 (0.3~2.6%) であるが、どれも AZ3 に対して高い相同性を示した。またタンパク質コード遺伝子のアミノ酸配列において、その多くは AZ3 とゲンゴロウブナで変わらなかったが、ATPase6 遺伝子、COIII 遺伝子、ND4 遺伝子、ND5 遺伝子、cyt b 遺伝子の5つの遺伝子での差は0.2~1.1%の範囲で AZ3 に近いものとなった。

これはキンギョとゲンゴロウブナの遺伝学的関係より、キンギョと3倍性ギンブナの関係の方が近いことを示している。Murakamiら(1998a)によるギンブナの5S-related repetitive配列の解析においてもゲンゴロウブナよりキンギョに類縁であることが示されており、3倍性ギンブナとキンギョの系統学的関係はゲンゴロウブナとキンギョよりも近いものであろうとの考えが支持された。

4-2 日本産フナと大陸産フナの比較

ユーラシア大陸にはギベリオブナの他に、同じ *Carassius* 属に属するが種の異なる、*Carassius carassius* (ヨーロッパブナとよばれる) が分布している (Raicu et al., 1981)。これは *C. auratus* に属するフナとの関係を調べる上で重要である。今回、オランダとロシアのバイカル湖からフナを得ることができた。これらのフナと、中国で採取されたギベリオブナおよび中国普通鮪を大陸産フナとし、日本産フナのゲンゴロウブナ、2倍体および3倍性ギンブナ、キンブナと比較した。また、キンギョ(和金と青文金)と中国普通鮪の比較も行なった。

mtDNA塩基配列上のND5遺伝子とcyt b遺伝子を用い、系統樹を作成した(図8)。cyt b遺伝子は比較的塩基配列が短いため系統学的解析において様々な動物で利用されている (Sorenson et al., 1999)。このcyt b遺伝子と、mtDNA上で塩基配列の一番長いND5遺伝子を用いることにより、詳細な遺伝学的情報を得ることを目的とした。系統樹作成のために利用した領域にはND5遺伝子、cyt b遺伝子の他にND6遺伝子もコードされていた(図7)。ND6遺伝子はmtDNAによる系統樹作成に適していないことがRussoら(1996)やMiyaら(2000)により提示されており、実際、本研究で用いた各フナのND6遺伝子におけるアミノ酸配列の相同性はコイを除き、全てが100%であった(データには示していない)。このため本研究の系統樹作成にはND6遺伝子を利用しないものとした。

4-2-1 オランダ産のフナについて

Raicuら(1981)による研究は、ヨーロッパブナ(*C. carassius*)は染色体数が $2n=50$ で、一方ギベリオブナ(*C. a. gibelio*)は $2n=100$ であるため、*C. carassius*染色体の倍化が起こり、ギベリオブナ(*C. auratus*の祖先)が発生したのではないかと提示した。オランダ産のフナは系統樹において最初に分岐し、*Carassius auratus*とは異なることを示した(図8)。使用したフナは死亡したため、その染色体数は不明である。したがって、ヨーロッパブナであるとは断定できなかった。今後ユーラシア大陸のフナのサンプルを増やすなどのさらなる解析によって、*C. carassius*と*C. auratus*間の関係をより明確にする必要があるだろう。

4-2-2 日本産フナについて

ゲンゴロウブナは滋賀県琵琶湖の固有種で、食用として養殖されてきた。系統樹は他の *C. auratus* 亜種から最初に分岐した。これは mtDNA を用いた Luo らの RFLP (restriction fragment length polymorphism) 解析 (1999) や Murakami らの D-loop 解析によっても示されている。大陸から日本に渡ってきたゲンゴロウブナの祖先は他の日本産フナの祖先と同じ起源を持っていたものの、琵琶湖という隔離された地理的な要因を受けたことで、祖先の遺伝学的形質を維持した。一方、日本各地に分布し、交配や棲息地域に適応した他のフナは遺伝学的な交雑が生じ、それぞれの亜種が生まれたと思われる。

ゲンゴロウブナ以外の日本産フナでは、千葉県印旛沼の 3 倍性ギンブナを除き一つのクラスターを形成した (図 8、クラスター I)。キンブナはギンブナと同様に日本各地に分布し、地方的な分化が見られ、東日本ではキンタロウブナ、西日本ではオオキンブナと呼ばれている。分類学的にはナガブナ (*C. a. bruergeni*) と同じ学名が付けられていることもある。ND5 遺伝子、cyt b 遺伝子の塩基配列における相同性では 3 倍性ギンブナに近い値を示したが、アミノ酸配列では 2 倍体ギンブナとも変わらないものであった。3 倍性ギンブナはゲンゴロウブナやキンブナではなく、2 倍体ギンブナに由来した。

印旛沼産 3 倍性ギンブナは先の mtDNA の解析においてギベリオブナのクラスターに属したため、今回は遺伝子コード領域を用いることで、その母系起源をより解析することにした。結果はギベリオブナのクラスター (クラスター II) に入るものであった。印旛沼には日本産フナと遺伝的に異なるフナ集団が棲息しており、その遺伝学的起源は大陸のギベリオブナに近いものらしい。3 倍性ギンブナの母系起源の中には 2 倍体ギンブナ以外に、大陸産のフナ (ギベリオブナ) も関わっていることが、mtDNA の遺伝子コード領域においても確認された。

4-2-3 キンギョについて

キンギョは和金、青文金ともに中国普通鮪 (*C. a. auratus*) のクラスター (図 8、クラスター III) に入った。青文金 (中国名: チンウエンユイ) は中国で品種改良されたキンギョの一つで、日本のキンギョの原始的なタイプである和金とは起源が異なるように予想された。しかし、和金と青文金の ND5 遺伝子と cyt b 遺伝子における塩基配列の相同性はそれぞれ 99.9%と 100%であり、アミノ酸配列ではともに 100%であった。この他、増幅した mtDNA 上の約 4kbp の領域に含まれる 6 種類の tRNA 遺伝子 (図 6) も 100%一致していた (データは示していない)。これは、キンギョの祖先は日本のフナやギベリオブナではなく、中国普通鮪であるという Ojima らの説を支持したものとなった。

4-2-4 中国産フナについて

ロシアで採取されたフナ2尾はギベリオブナのクラスター(図8、クラスターII)に入った。ギベリオブナは中国の他、ユーラシア大陸にも広く分布している。ヨーロッパのギベリオブナは中国から人為的に運ばれたものであるとの説が言われていた(Banarescu, 1960; Libosvasky, 1962)。系統樹では、ヨーロッパに棲息するギベリオブナと中国に棲息するギベリオブナはその母系起源が異なった。今回の結果だけでは、ヨーロッパと中国で異なるギベリオブナが存在しているのか、単なる使用したサンプルの問題なのか言及できなかった。今後、ユーラシア大陸における広範囲のサンプリングが必要であると思われる。

3倍性中国普通鮠のうち1尾(Caa-3n-20)はギベリオブナのクラスターIIや中国普通鮠のクラスターIIIとは分岐した。大陸特に中国において、ギベリオブナや中国普通鮠以外のフナの存在が考えられた。倍数体フナや日本産フナとの関係を調べるためにも、注目したいフナである。

5 まとめ

3 倍性ギンブナとの系統学的関係を明確するために、キンギョ mtDNA の全塩基配列を決定した。その遺伝子構成は先に報告されているコイやゲンゴロウブナ、3 倍性ギンブナのもと同じであった。ゲンゴロウブナ、3 倍性ギンブナと比較した結果、キンギョとゲンゴロウブナの関係より、キンギョと 3 倍性ギンブナの関係の方が近いものであった。Murakami らによる解析と同様に、3 倍性ギンブナとキンギョの系統学的関係はゲンゴロウブナよりも近いものであるとの考えが支持された。

Carassius 属の分類をより明確にするために、mtDNA の、一般的によく利用される D-loop 領域や *cyt b* 遺伝子以外に ND5 遺伝子にも着目し、系統樹を作成した。日本に分布している亜種と大陸に分布している亜種は系統学的に分岐し、それは従来言われていたこと (Murakami, 2001) と一致した。日本の 3 倍性ギンブナの大部分は 2 倍体ギンブナに由来し、一部にはギベリオブナに遺伝的に近い、大陸のフナ集団の遺伝子も関わっていることが ND5 遺伝子と *cyt b* 遺伝子の解析からも示唆された。ギベリオブナでは、中国で採取されたものとロシアで採取されたもので母系起源が異なった。しかしそれは使用したサンプルの問題かもしれない。今後、ユーラシア大陸全域にわたるサンプリングが必要である。中国普通鮠は従来の説の通りキンギョの祖先であることが確認された。3 倍性中国普通鮠の中には中国普通鮠やギベリオブナとは系統学的に離れる個体が存在した。大陸、特に中国において、ギベリオブナや中国普通鮠とは別の亜種のフナの存在が示唆される。倍数体フナや日本産フナとの関係を調べるためにも今後の解析が期待されるものである。

6 参考文献

Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., de Bruijin M. H. L., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J., Staden R., Young I. G. (1981) Sequence and organization of human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465.

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. *Fisheries Sci.* 62, 727-730.

Banarescu P. (1960) Einige Fragen zur Herkunft und Verbreitung der Susswasserfischfauna der europaisch-mediterranen Unterregion. *Arch. fur Hydrobiol.* 57, 16-134.

Bibb M. H., van Etten R. A., Wright C. T., Walberg M. W., Clayton D. A. (1981) Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* 26, 167-180.

Brown W. M., George M. Jr., Wilson A. C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1967-1971.

Buth D. G., Dowling T. E., Gold J. R. (1991) Molecular and cytological investigations. In Winfield I. J., and Nelson J. S. (eds.) *Cyprinid Fishes: Systematics, Biology, and Exploitation*, Chapman & Hall, London.

Chang D. D. and Clayton D. A. (1984) Precise identification of individual promoter for transcription of each strand of human mitochondrial DNA. *Cell* 36, 635-643.

Chang Y. S., Huang F. L. and Lo T. B. (1994) The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. *J. Mol. Evol.* 38, 138-155.

Chen H. and Leibenguth F. (1995) Studies on multilocus fingerprints, RAPD makers, and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish (*Carassius auratus gibelio*). *Biochem. Genet.* 33, 297-306.

Cherfas N. B. (1966) Natural triploidy in the females of the unisexual of the silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch). *Genetika* 2, 16-24.

Cherfas N. B. (1972) Results of a cytological analysis of unisexual and bisexual forms of silver crucian carp. In: Cherfas B. I. (eds.) *Genetics Selection, and Hybridization of Fish*. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, pp.79-90.

Clayton D. A. (1982) Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28, 693-705.

Desjardins P. and Moraris R. (1990) Sequence and gene organization of chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. *J. Mol. Biol.* 212, 599-634.

Fan Z. and Shen J. (1990) Studies on the evolution of bisexual reproduction in crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch). *Aquaculture* 84, 235-244.

Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.

Hamada S., and Fujita S. (1983) DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry. *Histochemistry* 79, 219-226.

Hixson J. E., Wong T. W., Clayton D. A. (1986) Both the conserved stem-loop and divergent 5'-flanking sequences are required for initiation at the human mitochondrial origin of light-strand DNA replication. *J. Biol. Chem.* 261, 2384-2390.

Hoelzel A. R., Hancock J. M., Dover G. A. (1991) Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. *Mol. Biol. Evol.* 8, 475-493.

Hurst C. D., Bartlett S. E., Davidson W. S., Bruce I. J. (1999) The complete mitochondrial DNA sequence of the Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Gene* 239, 237-242.

Kaiser R. J., Mackellar S. L., Vinayak R. S., Sanders J. Z., Saavedra, R. A., Hood L. E. (1989) Specific-primer-directed DNA sequencing using automated fluorescence detection. *Nucl. Acids Res.* 17, 6087-6102.

Kobayasi H. (1971) A cytological study on gynogenesis of the triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfii*). *Zool. Mag.* 80, 316-322.

Kobayasi H. and Ochi H. (1972) Chromosome Studies of the Hybrids, Ginbuna (*Carassius auratus langsdorfii*) x Kinbuna (*C. auratus* subsp.) and Ginbuna x Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Zool. Mag.* 81, 67-71.

Kobayasi H., Ochi H., Takeichi N. (1973) Chromosome studies of the silver crucian carps (*Carassius auratus gibelio*) from the valley of the Amur river, and their progenies. *Jpn. Women's Univ. J.* 20, 83-88.

L'Abbe D., Lang B. F., Desjardins P., Morais R. (1990) Histidine tRNA from chicken mitochondria has an uncoded 5'-terminal guanylate residue. *J. Biol. Chem.* 265, 2988-2992.

Lee W.J., Conroy J., Howell W. H., Kocher T. D. (1995) Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *J. Mol. Evol.* 41, 54-66.

Libosvsky J. (1962) Zur palaeoborealen Verbreitung der Gattung *Carassius*. *Zool. Jb. Syst.* 90, 197-210.

Luo J., Zhang Y. P., Zhu C. L., Xiao W. H., Huang S. Y. (1999) Genetic diversity in crucian carp (*Carassius auratus*) *Biochem. Genet.* 37, 267-279.

Mignotte B., Dannon-Bluteau D., Reiss C., Mounolou J-C. (1987) Sequence deduced physical properties in the D-loop region common to five vertebrate mitochondrial DNAs. *J. Theor. Biol.* 124, 57-69.

Miya M. and Nishida M. (2000) Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: a tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Mol. Phylogenet. Evol.* 17, 437-455.

Moritz C., Dowling T. E., Brown W. M. (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 269-292.

Murakami M. and Fujitani H. (1998a) Characterization of repetitive DNA sequences carrying 5S rDNA of the triploid ginbuna (Japanese silver crucian carp, *Carassius auratus langsdorfi*). *Genes Genet. Syst.* 73, 9-20.

Murakami M., Yamashita Y., Fujitani H. (1998b) The complete sequence of mitochondrial genome from a gynogenetic triploid "ginbuna" (*Carassius auratus langsdorfi*). *Zool. Sci.* 15, 335-337.

Murakami M., Matsuba C., Fujitani H. (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.

中村守純 (1982) 原色淡水魚類検索図鑑 北隆館 pp. 140-142

Ojima Y. and Asano N. (1977) A cytological evidence for gynogenetic development of the ginbuna (*Carassius auratus langsdorfi*). *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.* 53, 138-142.

Ojima Y. and Takai A. (1979) Further cytogenetical studies on the origin of the Gold-Fish. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.* 55, 346-350.

Ojala D., Montoya J., Attardi G. (1981) tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290, 470-474.

Osinov A. G., Vasil'eva E. D., Vasil'ev V. P. (1983) The hybrid origin of the triploid form in g. *Cobitis* (Pisces, Cobitidae). Dokl. An. USSR. 272, 716-718.

Page R. D. (1996) Tree View: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput. Appl. Biosci. 12, 357-358.

Raicu P., Taisescu E., Banarescu P. (1981) *Carassius carassius* and *C. auratus*, a pair of diploid and tetraploid representative species (Pisces, Cyprinidae). Cytologia 46, 233-240.

Russo C. A., Takezaki N., Nei M. (1996) Efficiencies of different genes and different tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny. Mol. Biol. Evol. 13, 525-536.

Saccone C., Attimonelli M., Sbisa E. (1987) Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop-containing region in vertebrate mitochondrial DNA. J. Mol. Evol. 26, 205-211.

Saccone C., Pesole G., Sbisa E. (1991) The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA : structure-function model and evolutionary pattern. J. Mol. Evol. 33, 83-91.

Saitou N. and Nei M. (1987) The Neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406-425.

Sorenson M. D., Ast J. C., Dimcheff D. E., Yuri T., Mindell D. P. (1999) Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. Mol. Phylogenet. Evol. 12, 105-114.

Southern S. O. Southern P. J., Dizon A E. (1988) Molecular characterization of a cloned dolphin mitochondrial genome. J. Mol. Evol. 28, 32-42.

Strauss E. C., Kobori J. A., Siu G., Hood L. E. (1986) Specific-primer-directed DNA sequencing. Anal. Biochem. 154, 353-360.

高山清次 (1989) 雌性生殖系フナの実験動物化 博士論文 (麻布大学大学院)

Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl. Acids Res. 22, 4673-4680.

Tzeng C. S., Hui C. F., Shen S. C., Huang P. C. (1992) The complete nucleotide sequence of the *crossotoma lacustre* mitochondrial genome : conservation and variations among vertebrates. Nucl. Acids Res. 20, 4853-4858.

Ueda T. and Ojima Y. (1978) Differential chromosomal characteristics in the funa subspecies (*Carassius*). Proc. Jpn. Acad. Ser B 54, 283-288.

Wong T. W. and Clayton D. A. (1985) In vitro replication of human mitochondrial DNA : accurate initiation at the origin of light-strand synthesis. Cell 42, 951-958.

Zardoya R., Garido-Pertierra A., Baustista J. M. (1995) The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA genome of the rainbow trout, *Onchorynchus mykiss*. J. Mol. Evol. 41, 942-951.

1 GGATAACCAT CCCTGTATGG TTTAATACAT AATATGCATA ATATTACATT AGTGTATTAG 60
 →D-Loop

61 TACATATATG TATTATCACC ATATCATTAT ATTAACCCCA AAGCAAGTAC ATATAAACTA 120
 121 AGGTATGCAT AAAGCATAAT CTTAAGACTC ACAAGTAAA TTATTTTAA CCGGGTAATA 180

Sma I

181 TATTATTCCC CAAGAAATTG TCCCCACATT TTTCTTGAA TGA CTCAACT AAGGTTTTAT 240
 241 TCAAACATAT TAATGTAGTA AGAGACCACC AACCATTAT ATAAAGGAAT ATCATGCATG 300
 301 ATAGAATCAG GGACATCAAT TGTGGGGGTC GCACAATATG AACTATTACT GGCATCTGGT 360
 361 TCCTATTTCA GGTACATAAC TGTAATACTC CACCCTCGGA TAATTATACT GGCATCTGAT 420
 421 TAATGGTGTA GTACATATGG TTCATTACCC CACATGCCGA GCGTTCTTTT ATATGCATAA 480
 481 GGTATTTTTT TTTTGGTTTC CTTTCATCTT GCATCTCAGA GTGCAGGCAC AAATGTTGGT 540
 541 TTAAGGTTGA ACATTTTCCT TGAATGTGAT TATATAAATG AATTATCGTA AGACATAATT 600
 601 TAAGAACTGC AACTTTCTAA CTCAAGTGCA TAACATATTC ATCTCTTATT CAACTTATCC 660
 661 TTATATAGTG CCCCTTTGG TTTTTCGCGG ACAAACCCCTA CTACCCCTA CGCTCAAAGA 720
 721 ATCCTGTTAT CTTGTCAAAA CCCCAGAAACC AAGGAGGACC CAAGAACGTG TAAGCCAACG 780
 781 AGTTGAGGTA CGAATTGGCA TCCCATTATA TATATATATA TATATGTGCA TCGGTTTTTT 840
 841 TATCCCAATT CAGTAATCAC CAAAAATCT CTGCCAAAAA CCCCAAAAAA TCACCTCCAC 900
 901 ACTAAATTTT CTAACATTAT TTAGCTAGCG TAGCTTAATA CAAAGCATAG CACTGAAGAT 960

←→tRNA-Phe

961 GCTAAGATGA GACCTAAAAA TCTCCGCATG CACAAAGGCA TGGTCCCAGAC CTTATTATCA 1020

←→12S rRNA

1020 GCTCTAACTC AACTTACACA TGCAAGTCTC CGCACCCAG TGAATATGCC CTCAATCCCC 1080
 1081 CTACCCGGGG ACGAGGAGCG GGCATCAGGC ACAAATATTA GCCCAAGACG CCTAGCCGAG 1140

Sma I

1141 CCACACCCCC AAGGGAATTC AGCAGTGATA AACATTAAGC CATAAGTGAA AACTTGACTC 1200

*Eco*R I

1201 AGTTAGTGTT AAGAGGGCCG GTAAAACCTG TGCCAGCCAC CGCGGTTAGA CGAGAGGCC 1260
 1261 TAGTTGATAT TACAACGGCG TAAAGGGTGG TTAAGGATAA ATAAAAATAA AGTCAAATGG 1320
 1321 CCCCTTGGCC GTCATACGCT TCTAGGCGTC CGAAGCCCTA ATACGAAAGT AACTTTAATA 1380
 1381 AACCCACCTG ACCCCACGAA AGCTGAGGAA CAAACTGGGA TTAGATACCC CACTATGCTC 1440
 1441 AGCCGTAAAC TTAGACATCC AACTACAATA GATGTCCGCC AGGGTACTAC GAGCATTAGC 1500

1501 TTAAAACCCA AAGGACCTGA CGGTGTCTCA GATCCCCCTA GAGGAGCCTG **TTCTAGAACC** 1560

Xba I

1561 GATAACCCCC GTTCAACCTC ACCACTTCTA GCCAACCCAG CCTATATACC GCCGTCGTCA 1620

1621 GCTTACCCTG TGAAGGTAAT AAAAGTAAGC AAAATGGGTA CAACCCAAAA CGTCAGGTCG 1680

1681 AGGTGTAGCG CATGGAGTGG GAAGAAATGG GCTACATTTT CTAACATAGA ATATTACGAA 1740

1741 CATGCACCAT GAAACAGTGC TTGAAGGAGG ATTTAGTAGT AAAAGGGAAA TAGAGTGTCC 1800

1801 CTTTGAACCC GGCTCTGAGA **CGCGT**ACACA CCGCCCGTCA CTCTCCCTG TCAAAATGCA 1860

Mlu I

1861 CCAAAAATAT CTAATATAAT AGCACTGACA AGGGGAGGCA AGTCGTAACA CGGTAAGTGT 1920

1921 ACCGGAAGGT **GCAC**TTGGAT CAAACCCAGG GTGTGGCTGA GTTAGTCAAG CATCTCACTT 1980

*Apa*L I

←→tRNA-Val

1981 ACACCGAGAA GACATCCATG CAAGTTGGAT CGCCCTGAGC CAAACAGCTA GCTTAACTAC 2040

←→16S rRNA

2041 CTAATAACTA AACAAATATA ATAAAATAAG ATAGACCTAA CACTAAAAAT TAAATCATT 2100

2101 TTTTACCTGA GTATGGGCGA CAGAAAAGGT TCCACAAAGC GATAGAGATA GTACCGCAAG 2160

2161 GGAAAGCTGA AAGAGAAATG AAATAACCCA TATAAGCAAT AAAAAGCAAA GATTAAGCCT 2220

2221 TGTACCTTTT GCATCATGAT TTAGCCAGTA CACCCAAGCA AAGAGACCTT TAGTTTGAAA 2280

2281 CCCCAGAGCC AGGTGAGCTA CCCCAGAGACA GCCTATTGAG GGCCAACCCG TCTCTGTGGC 2340

2341 AAAAGAGTGG **GAAGAGCTCC** GGGTAGAAGT GACAGACCTA CCGAACCTGG TGATAGCTGG 2400

Ban II , *Sac* I

2401 TTGCCTAAGA GATGGATAGA AGTTCAGCCT CGTACTCCCC AAATCAAATA AACATTAATA 2460

2461 AGACAACAAG AGAAACATAC GAGAGTTAGT TAAAGGGGGT ACAGCCCCTT TGACAAAGGA 2520

2521 TACAACCTTT CTAGGAGGAT AAAGATCATA ATACATAAAA CATACTGTTC TAGTGGGCCT 2580

2581 AAGAGCAGCC ACCTAGATAG AAAGCGTTAG **AGCTC**AGACA GATAGAAGTT TATTATCCTG 2640

Ban II , *Sac* I

2641 ATAATATATC TTACTIONCCT AAATACTATG AGGCCAACCC ATGCCACAT GGAAGAGATT 2700

2701 ATGCTAAGAT GAGTAACAAG AAGGCCCGCC CTTCTCCAAG CACAAGTGTA AGCCAAATCG 2760

2761 GACAAGCCAT TGGCAACTAA CGAACTCAAC CCAAGAGAGC AATGTGGTAT CACAAAAAAA 2820

2821 CCTAGAAAAC CCCACAACCT AAATATCGTT ACCCCACAC TGGAGTGCAAC AAAGGAAAAG 2880

2881 ACTAAAAGAA AAGGAAGGAA CTCGGCAAAC ACAAGCCTCG CCTGTTTACC AAAAACATCG 2940

2941 CCTCCTGCAA CACAACCAAG TATAGGAGGT CCAGCCTGCC CAGTGACTAC AAGTTCAACG 3000

3001 GCCGCGGTAT TTTGACCGTG CAAAGGTAGC GCAATCACTT GTCTTTTAAA TAGAGACCTG 3060

Dra I

3061 TATGAATGGC TAAACGAGGG CTTAACTGTC TCCCCTTTCC AGTCAGTGAA ATTGATCTAC 3120

3121 CCGTGCAGAA GCGGGTATAA TAATACAAGA CGAGAAGACC CTTTGGAGCT TAAGGTACAA 3180

3181 AACTCAACCA CGTTAAGCAA CTCAATAAAA AGTGAAAACCT TTGTGGAACA TGAGATTTTA 3240

3241 CCTTCGGTTG GGGCGACCAC GGAGGAAAAA AAAGCCTCCA GGTGGAACGG GAAAATTTCC 3300

3301 TAAACTAAG AGAGACATCT CTAAGCCACA GAACATCTGA CCAAATATGA TCCGGCTAAT 3360

3361 ACAAGCCGAT CAACGAACCA AGTTACCCTA GGGATAACAG CGCAATCCTC TCCCAGAGTC 3420

3421 CATATCGACG AGGGGGTTTA CGACCTCGAT GTTGGATCAG GACATCCTAA TGGTGCAGCC 3480

3481 GCTATTAAGG GTTCGTTTGT TCAACGATTA AAGTCCTACG TGATCTGAGT TCAGACCGGA 3540

3541 GCAATCCAGG TCAGTTTCTA TCTGTAACGC TACTTTTCTT AGTACGAAAG GATCGGAAAA 3600

3601 GAGGGGCCAA TGCTCAAGGC ACGCCCCACC CTAATTTAT GAAAACAAAT AAATAAAATA 3660

3661 AAGGGAGGGC CAAAACCCA GCTGGCCAAA ATAAGGACAT ACTGGGGTGG CAGAGCATGG 3720

Pvu II

←→tRNA-Leu(UUR)

3721 TAAATTGCGA AAGGCCTAAG CCCTCTTAAC CAGAGGTTCA AATCCTCTTC CCAGTTTATG 3780

←→ND1

3781 CTAACACCC TAATAACCCA CCTAATTAAC CCCTTAGCCT ACATCGTACC CGTACTTCTA 3840

3841 GCAGTAGCCT TCCTAACACT TATTGAACGA AAGGTATTAG GATACATGCA ACTACGAAAG 3900

3901 GGACCAAACG TGGTAGGCC ATACGGATTA CTACAACCA TGTCTGACGG AGTAAAACCT 3960

3961 TTCATTAAAG AACCCGTCCG CCCATCTACA TCCTCCCAT TTCTGTTTTT AGCTGCTCCA 4020

4021 GTACTAGCAC TAACCCTAGC CATGACCTTA TGAGACCAA TACCTATACC TCACCCAGTA 4080

4081 ACTGATCTTA ACCTAGGGAT CCTCTTTATT CTGGCCCTAT CAAGCTTGC AGTATACTCA 4140

*Bam*H I

Hind III

4141 ATCCTAGGAT CAGGATGAGC ATCAAATTCG AAATACGCC TAATTGGAGC ACTACGAGCC 4200

4201 GTAGCCCAA CGATCTCATA TGAAGTCAGC CTAGGACTTA TCCTTTTATC CGTTATTATT 4260

4261 TTCTCCGGGG GATATACT ACAAACATTT AATACCACTC AGGAAAGCAT CTGATTACTA 4320

4321 ATTCCCGCCT GGCCTTTAGC CGCAATATGG TATATCTCAA CACTAGCCGA AACAAACCGA 4380

4381 GCACCATTTC ACCTAACAGA AGGAGAATCT GAACTAGTGT CCGGCTTTAA CGTAGAATAT 4440

4441 GCAGGAGGAC CATTTGCACT TTTCTTTCTA GCCGAATACG CCAACATCCT TCTAATAAAC 4500

4501 ACCCTCTCAG CTGTCTTATT TTTAGGAGCC TCACACATCC CAAACATACC AGAACTTACA 4560

Pvu II

4561 ACAATCAACC TCATAACTAA AGCTGCACTT CTATCCATTC TATTCCTATG AGTACGAGCC 4620

4621 TCGTACCCAC GATTCCGTTA TGACCAACTA ATACACCTAG TATGAAAAA TTTCTCCCT 4680

4681 CTCACACTAG CCTTTGACT ATGACATACC GCTCTGCCAA TTGCACTAGC GGGGCTCCCC 4740

Ban II

4741 CCACAACATAT AACTAAGGAA CTGTGCCTGA GCACCCAAGG ACCACTTTGA TAGAGTGAAT 4800

← →tRNA-Ile

4801 TACAGGGGTT AAAATCCCCT CAGTTCCTAG AAAGAAGGGA ATTGACCCCT TACTCAGGAG 4860

←

→tRNA-Gln

4861 ATCAAGACTC CTGGTGCTTC CTTTACACCA CTTTCTAAGG CGGGGTCAGC TAATGAAGCT 4920

← →tRNA-Met *Hind III*

4921 TTCGGGCCCA TACCCCGAAC ATGACGGTTA AAGTCCCTCC TCCGCCAATG AACCCATACG 4980

Apa I , Ban II ←→ND2

4981 TACTTATAAT TTTACTATCC AGCCTAGGAC TAGGAACTAC TCTAACCTTC GCCAGCTCTC 5040

5041 ACTGACTTCT AGCTTGAATA GGCCTAGAAA TTAACACACT AGCAATTACC CCCCTAATAG 5100

5101 CACAACACCA CCACCCCGC GCAGTAGAAG CAACAACAAA ATACTTCTTA ACCCAAGCCA 5160

5161 CTGCAGCAGC AATAATTCTA TTTGCCAGCA CAACAAATGC CTGAATAACA GGAGAATGGA 5220

Pst I

5221 ACATCACCGA CCTATCAGAC CCCCTCGCTA ACACAATATT TATAACCGCC CTAGCACTTA 5280

5281 AGATTGGACT TGCACCAATA CACTTCTGAA TGCCCGAAGT TATACAAGGA TTAGATCTAT 5340

5341 TAACAGGACT TATTCTCTCC ACATGACAAA AACTTGCCCC CTTGCACTT ATCATTCAA 5400

5401 CAGCACAAA CATTGACCCG CTA CTATTAA CACTACTAGG GGTAACATCT ACATTAGTGG 5460

5461 GCGGGTGAGG AGGCCTGAAC CAAACCCAGC TACGGAAAAT TCTAGCCTAC TCCTCAATTG 5520

5521 CACACATAGG ATGAATAATT ATTGTAATCC AATACGCCCC CCAGCTCACC CTAATTGCAC 5580

5581 TAGGGACATA CATTATCATG ACCTCCGAG CATTCTAAC CCTAAAATA TCACTGACAA 5640

5641 CTAAACTCAG CACGCTAGCA ACAACCTGAT CAAAAGCCC CATCCTAACG GCAACAACCTG 5700

5701 CCCTAGTATT ATTATCACTA GCGGCCTAC CGCCGCTCAC AGGGTTTATA CCAAATGAT 5760

5761 TAATTTTACA AGAACTGACA AAACAAGATC TCCCATTAT CGCCACAATC ATAGCCCTAG 5820

5821 CCGCCCTAAT TAGCCTATAC TTCTATCTAC GACTATGCTA CGCGATAACA TTAACCATCT 5880

5881 CCCCCAATAC AACCAACTCA ACCACCCCT GACGAACCCA AACAAACCAA ACCTCCATAC 5940

5941 CTCTAGCCCT ATTTACCATA GCCACCCTTG GACTACTGCC AATGACCCCA ACCATTCTAA 6000

6001 TACTAGCCAC CTAGGGACTT AGGATAATAT TAGACCAAAA GCCTTCAAAG CTTTAAGTAG 6060
← Hind III
→tRNA-Trp

6061 AAGTGAAAAT CTTCTAGTCC CTGATTAAGA CCTACGAGAG ATCAACTCGC ATCTCCTGAT 6120
← →tRNA-Ala

6121 TGCAAATCAG ATACTTTTAT TAAGCTAAGG CCTTACTAGA TGGGAAGGCC TCGATCCTAC 6180
← →tRNA-Asn

6191 AAACCTTTAG TTAACAGCTA AGCGCTCAAG CCAGCGAGCA TCCATCTACT TTTCCCGCCG 6240
←

6241 TTTAACTCAG AAAGGCGGGA AAAGCCCCGG CAGAGTATTA ATCTACGTCT TCGGATTTGC 6300
→tRNA-Cys

6301 AATCCAATAT GTTTCTTCA CCACGGGGCT GATAGGAAGA GGACTTAAAC CTCTGTCTTC 6360
←
→tRNA-Tyr

6361 GGGGCTACAA CCCACCGCT AAACACTCGG CTACCCTACC TGTGGCAATC ACGCGCTGAT 6420
← →CO I

6421 TCTTCTCTAC CAACCACAAA GACATTGGTA CCCTTTATCT AGTATTTGGT GCCTGAGCCG 6480

6481 GAATAGTAGG AACCGCTTAA AGCCTCCTCA TCCGAGCTGA ACTTAGTCAA CCCGGATCAC 6540

6541 TTCTAGGTGA TGACCAAATT TACAATGTAA TTGTTACCGC CCACGCCTTC GTAATAATTT 6600

6601 TCTTTATAGT AATGCCTATC CTCATTGGAG GATTTCGAAA CTGACTTGTA CCCCTGATAA 6660

6661 TCGGAGCCCC AGACATGGCA TTCCCACGAA TAAACAATAT AAGCTTCTGA CTTCTTCCCC 6720
Ban II Hind III

6721 CATCATTCTT GTTACTACTA GCTTCCTCTG GTGTTGAAGC CGGAGCTGGC ACCGGATGGA 6780

6781 CAGTATACCC CCCTCTTGCA GGAAACCTGG CCCACGCAGG AGCATCAGTA GACCTAACAA 6840

6841 TTTTCTCACT ACATTTAGCA GGTGTTTCAT CAATCCTGGG GGCAATCAAC TTCATTACTA 6900

6901 CAACCATTAA CATAAAACCT CCAGCCATTT CCCAATACCA AACACCCCTA TTTGTTTGAT 6960

6961 CCGTACTTGT AACCGCGGTC CTCCTTCTCC TACTACTACC TGTCTAGCT GCCGGTATTA 7020

7021 CAATGCTTTT AACAGATCGA AATCTTAACA CCACATTCTT TGATCCCGCA GGCGGGGGAG 7080

7081 ACCCAATTCT CTATCAACAC TTATTCTGAT TCTTTGGTCA CCCAGAAGTT TACATTTTAA 7140

7141 TCCTTCCAGG ATTTGGAATT ATTTCTCACG TTGTAGCCTA TTATTCAGGT AAAAAAGAAC 7200

7201 CATTGTTGTA TATAGGAATA GTATGAGCCA TAATGGCCAT TGGCCTCCTA GGGTTCATTG 7260

7261 TATGAGCCCA CCATATGTTT ACTGTCGGAA TGGACGTAGA CACCCGTGCA TATTTTACAT 7320
Ban II

7321 CCGCAACAAT AATTATCGCA ATTCCAACGG GTGTAAAAGT ATTTAGCTGA CTGGCTACAC 7380
7381 TTCACGGAGG ATCAATTAAT TGAGAAACAC CAATACTATG AGCCCTAGGA TTCATTTTCC 7440

Ban II

7441 TGTTTACAGT GGGAGGACTT ACAGGAATTG TCCTCTCTAA TTCATCACTT GATATTGTTC 7500
7501 TCCACGACAC CTATTATGTA GTAGCACATT TCCACTATGT ACTATCAATG GGTGCCGTAT 7560
7561 TCGCAATTAT GGCAGCCTTT GTACACTGAT TCCCCTACT AACAGGGTAC ACTCTGCATA 7620
7621 GCGCTTGAAC AAAAATCCAC TTTGGGGTTA TATTTATCGG AGTTAACCTC ACATTCTTCC 7680
7681 CACAACACTT CCTGGGTCTA GCAGGAATAC CACGACGGTA TTCTGATTAT CCAGACGCTT 7740
7741 ATGCCCTATG AAATACAGTA TCATCTATCG GATCCCTAAT CTCCTAGTA GCGGTAATTA 7800

*Bam*H I

7801 TGTTCTTATT TATTCTATGA GAAGCCTTCG CCGCTAAACG AGAAGTGTTA TCTGTAGAAC 7860
7861 TAACAATAAC AAATGTGGAA TGA CTCCATG GCTGCCCCCTCCTTACCAC ACATACGAGG 7920
7921 AACCAGCATT TGTTCAAATT CAATCAAATT AACGAGAAAG GGAGGAATTG AACCCCCATA 7980

←→tRNA-Ser(UCN)

7981 TGCTGGTTTC AAGCCAGCCA CATAACCACT CTGTCACTTC CTTCTAAAGA CATTAGTAAA 8040

← →tRNA-Asp

8041 ATGAAGATTA CATCACCTTG TCAAGGTGAA ATTGTAGGTT AAATCCCTGC ATGTCTTACA 8100

8101 CTTAAAATTA ATGGCACACC CAACGCAACT AGGATTCCAA GACGCGGCAT CACCCGTTAT 8160

→CO II

8161 AGAAGAACTT CTTCACTTCC ATGACCACGC ATTAATAAATT GTGTTTTTAA TTAGCACCTT 8220
8221 AGTGCTATAT ATTATTATTG CAATGGTATC AACCAAACCTT ACTAATAAAT ATATTTTAGA 8280
8281 CTCCCAAGAA ATCGAAATTG TATGAACTAT TCTACCAGCC GTTATTTTAG TATTAATTGC 8340
8341 TCTACCATCC CTACGAATTC TTTACCTTAT GGACGAAATT AATGATCCCC ACCTAACAAT 8400

*Eco*R I

8401 CAAAGCAATA GGACACCAAT GATACTGAAG CTATGAATAT ACAGATTACG AAAACCTAGG 8460
8461 ATTTGACTCT TATATAGTAC CTACCCAAGA CCTTGCCCCA GGACAATTCC GACTCTTAGA 8520
8521 AACAGACCAT CGAATAGTTG TCCAATAGA GTCCCCAGTC CGTGTCTTAG TATCCGCTGA 8580
8581 AGACGTACTA CACTCCTGAG CCGTTCCATC TTTAGGTGTA AAAATAGACG CAGTCCCAGG 8640
8641 CCGACTAAAT CAAACTGCTT TCATCGCCTC ACGCCAGGA GTATTCTACG GACAATGCTC 8700
8701 TGAAATCTGC GGAGCAAATC ATAGCTTTAT ACCAATTGTA GTTGAAGCAG TACCACTAGA 8760
8761 ACACTTCGAA AACTGATCCT CACTAATACT AGAAGACGCC TCGCGAGGAA GCTAAATATT 8820

←→tRNA-Lys

8821 GGACAAAGCG TTGGCCTTTT AAGCCAAAGA TTGGTGATT CCGACCACCT CTAGTGAAAT 8880
← →
ATPase8

8881 GCCACAATTA AACCCAGGCC CTTGATTTGC AATCTTAGTA TTTTCTTGAC TAGTTTTCTT 8940
8941 AACTATTATT CCAACTAAAA TCTTAAGCCA CATCTCACCA AATGAACCAA CCCAGTAAG 9000
9001 TGCTGAAAAA CACAAAACCTG AATCCTGAGA CTGACCATGA TAGTAAGCTT CTTGACCAA 9060
← HindIII
→ATPase6

9061 TTTGCAAGCC CATCCTACCT AGGAATCCA CTAATTGCCA TCGCAATTGC ACTACCCTGA 9120
EcoR I

9121 GTACTTTACC CAACTTCATC ATCTCGATGA ATTAATAACC GGCTTATTAC AATTCAAGGA 9180
9181 TGATTTATTA ATCGATTTAC AAATCAACTA ATACTCCCAC TAAATGTAGG AGGACATAAA 9240
Cla I

9241 TGAGCCCTAC TACTAGCCTC CTAATAATT TTCTTAATTA CGATTAACAT GTTAGGGCTC 9300
Ban II Ban II

9301 CTGCCATATA CCTTTACACC AACGACACAA CTATCACTCA ATATAGGGTT TGCTGTACCA 9360
9361 CTATGACTTG CTACAGTAAT TATCGGAATA CGAAATCAAC CAACAGTAGC TTTAGGTCAC 9420
9421 CTGTTACCAG AAGGTACACC CATCCCCCTG ATTCCAGTAC TAATTATTAT CGAAACAATT 9480
9481 AGTCTATTTA TTCGACCATT AGCCCTAGGA GTCCGACTCA CAGCCAACCT AACTGCAGGC 9540
Pst I

9541 CACCTTCTAA TTCAACTCAT TGCCACAGCT GTATTTGTCC TCCTACCAAT GATACCAACA 9600
Pvu II

9601 GTAGCAATTC TAACCGCCAC AGTATTATTT TTAATAACAC TATTAGAAGT AGCCGTAGCA 9660
9661 ATAATTCAG CTTATGTATT TTTACTTCTT CTAAGCCTAT ACCTACAAGA AAACGTTTAA 9720
HindIII
→COIII

9721 TGGCCACCA AGCACATGCC TATCATATAG TTGATCCAAG CCCATGACCA CTAACCGGAG 9780
9781 CTATCGCTGC CCTACTAATA ACATCCGGCT TAGCAATCTG ATTTCACTTC CACTCAACAA 9840
9841 CATTAAATAAC TCTAGGACTA ATTCTCCTAC TTCTTACTAT GTATCAATGA TGACGTGACA 9900
9901 TCATTCGAGA AGGAACCTTC CAAGGCCACC ACACACCCCC AGTACAAAAA GGACTACGAT 9960
9961 ACGGAATAAT CTTATTTATT ACCTCCGAAG TATTCTTCTT CCTAGGATTC TTCTGAGCAT 10020
10021 TCTACCACTC GAGTTTAGCA CCTACCCAG AACTAGGTGG ATGCTGACCT CCCACAGGAA 10080

10081 TCACCCCCT AGACCCATT GAAGTGCCCC TTCTCAACAC AGCTGTACTA TTAGCATCCG 10140

Pvu II

10141 GGGTTACAGT TACATGAGCC CACCACAGCA TTATAGAAGG GGAACGAAAA CAAGCTATTC 10200

Ban II

10201 AATCCCTAGC ATTAACCATT CTACTTGGAC TCTACTTTAC TGCTCTCCAA GCTATGGAAT 10260

10261 ATTATGAAGC ACCCTTCACA ATTGCAGACG GAGTATATGG CTC AACATTC TTTGTAGCTA 10320

10321 CAGGATTCCA TGGACTCCAT GTTATTATTG GATCAACCTT CCTAGCAGTA TGCCTTCTAC 10380

10381 GCCAAATCCA ATACCACTTT ACATCCGAAC ACCACTTCGG CTTTGAAGCC GCTGCCTGAT 10440

10441 ACTGACACTT GTGCGACGTA GTATGACTAT TCCTCTACGT GTCTATCTAT TGATGAGGCT 10500

Sal I

10501 CATAATCTTT CTAGTATTA AGTTAGTACA AGTGACTTCC AATCACACAG TCTTGGTTAA 10560

←

→tRNA-Gly

10561 ACCCCAAGGA AAGATAATGA ATCTAATTAT GACCATTTTA ACTATTACAG CCGCCCTTTC 10620

←→ND3

10621 ACTAATTTTA GCAACCATT CTTTCTGACT CCCACAAATA AACCCAGACG CAGAAAAGCT 10680

10681 ATCACCATAC GAATGTGGAT TTGACCCACT GGGATCTGCC CGATTGCCAT TTTCTTTACG 10740

10741 CTTCTTCCTA GTAGCTATTT TATTTCTTCT CTTTGACCTA GAAATTGCC TTTCTCTCCC 10800

10801 ATTACCCTGA GGGGATCAAC TTAACAATCC TACTGGAACA TTCTTCTGAG CCACAACAGT 10860

10861 CCTAATCTTA TTAACCCTAG GACTAATTTA TGAATGAACT CAAGGTGGCT TAGAATGAGC 10920

10921 AGAATAGGGA GCTAGTCCAA AACAAAGCT CTGATTCGG CTCAGAAAAT CGTGGTTTAA 10980

←

→tRNA-Arg

10981 TTCCACGGCC CCCTTATGAC ACCCGTACAT TTTAGCTTTA GCTCAGCATT CATCTTAGGC 11040

←→ND4L

11041 CTAATAGGAC TGGCATTTC CCGGACCCAC CTA CTCTCCG CACTCTTATG TTTAGAAGGA 11100

11101 ATAATATTAT CCCTATTTAT TGCACTGGCC CTATGAGCCC TACAATTTGA ATCTACAGGA 11160

Ban II

11161 TTTTCAACGG CCCCATATT ACTTTTGCC TTCTCTGCTT GCGAAGCTAG CACTGGTCTG 11220

11221 GCCCTACTAG TTGCCACTGC TCGTACCCAC GGCCTGACC GACTACAAAA CCTCAATCTT 11280

11281 CTACAATGCT AAAAGTACTT ATCCCCACAT TTATATTATT CCCAACAATT TGATTAACCT 11340

←

→ND4

11341 CTCCTAAATG ACTATGGACA GCTACAACCG CACACAGCCT CTAATTGCC TCCATTAGCC 11400
 11401 TAATATGATT TAAATGGACA TCTGAAACTG GATGAACTTC CTCCAACACA TACTTAGCCA 11460
 11461 CAGATCCACT ATCAACCCCC CTTTGTAGTAC TAACATGCTG ACTACTTCCC CTTATAATTT 11520
 11521 TAGCCAGCCA AAACCACATT AATCCAGAGC CAATTAGCCG ACAACGATTG TATATTACGC 11580
 11581 TCCTGGCCTC ACTACAAGCC TTTCTAATTA TAGCATTCTG CGCCACACAA ACTATTATAT 11640
 11641 TTTATATTAT ATTTGAAGCT ACACTTATCC CAACCCTTAT CATTATTACC CGATGAGGAA 11700
 11701 ATCAAACCGA ACGACTCAAT GCAGGAACCT ACTTCTTGTT TTATACCCTA GCAGGATCAC 11760
 11761 TCCCGCTCTT AGTTGCCCTT CTCCTTCTCC AGCAATCTAC GGGCACACTA TCAATATTAG 11820
 11821 TTCTCCAATA TTCACAACCT CTACAACCTA ATTCTTGAGG CCATATAATC TGATGAGCTG 11880
 11881 GCTGCCTAAT CGCATTTTTA GTTAAATAC CATTATATGG AGTACACCTT TGACTACCAA 11940
 11941 AAGCACATGT AGAAGCCCCT GTAGCAGGAT CAATAGTACT AGCAGCAGTC TTAATAAAGC 12000
 12001 TAGGTGGATA CGGAATAATA CGAATAATAG TGATATTAGA CCCCTATCA AAAGAACTGG 12060
 12061 CCTACCCATT TATTATTTTA GCCCTATGAG GCATTATTAT AACAGGGTCA ATTTGCCTCC 12120
 12121 GACAAACAGA CCTAAAATCA CTAATCGCCT ACTCATCCGT AAGTCACATG GGCCTTGTAG 12180
 12181 CAGGCGGAAT TTTAATCCAA ACCCATGAG GATTTTCAGG AGCAATTATT TTAATAATTG 12240
 12241 CCCACGGATT AGTCTCTCA GCACTATTTT GCTTAGCCAA CACAGCTTAT GAACGAACAC 12300
 12301 ACAGCCGAAC AATAATCCTT GCCCGAGGAC TACAAATTAT TTTTCCACTA ACCGCAGTAT 12360
 12361 GGTGATTCAT TGCTAACCTA GCTAACCTAG CACTCCCACC ACTGCCAAAC CTAATAGGAG 12420
 12421 AACTCATAAT CATTACAACA CTATTTAACT GATCCCCATG AACAATTCTA CTTACAGGTC 12480
 12481 TAGGAACACT TATTACAGCT GGCTACTCCC TATATATGTT CTTATATCA CAACGAGGCC 12540

Pvu II

12541 CTACACAAA TCACATTACG GGACTCCAAC CATTTCATAC CCGAGAACAC CTACTIONGATAA 12600
 12601 CACTACACCT AGTTCCCGTC ATCCTATTGG TAACAAAACC AGAACTCATA TGAGGATGAT 12660
 12661 GCTACTGTAA GTATAGTTTA GCCAAAATAT TAGATTGTGA TTCTAAAGAT AGGAGTTAAA 12720

←→tRNA-His

12721 GTCTCCTTAC TCACCAAGGG AGAACAGAAA ATAGCAAGCA CTGCTAATCC TTGCCCTCCA 12780

← →tRNA-Ser(AGY)

12781 TGGTTAAAAT CCATGGCTTC CTTGCGCTTT TAAAGGATAA CAGTTCATCC GTTGGTCTTA 12840

← →tRNA-Leu(CUN)

12841 GGAACCAAAA ACTCTTGGTG CAAATCCAAG TAGAAGCTAA AATGACATTA ATTATACACT 12900

← →NDS

12901 CATCACTTCT CCTAATCTTT TTTATTTTAG TGTACCCGCT ACTTACTACA TTAACCCCA 12960

12961 ACCAACAAGG ATCAAACATA GCAGGAATAA CCAAATTGC CGTTAGTTC GCATTCTTCA 13020

13021 TTAGTCTCTT ACCATTAATA ATTTTCTGA ATTTAAAAAC AGAAGGAATT ATCACAACT 13080

13081 GACAATGAAT GAATACCCAA ACATTTGACG TAAACATCAG CTTTAAATTT GACCACTACT 13140

13141 CCCTAATTTT TGTCCCAATT GCCCTCTATG TAACTGATC AATTCTAGAG TTCGCACTGT 13200

Xba I

13201 GATATATACA CTCCGACCCC TATATCGACC GATTCTTTAA ATATCTACTC ACGTTTTTAG 13260

13261 TAGCCATAAT TATTCTAGTT ACAGCTAACA ATATATTTCA ACTATTTATT GGTTGAGAAG 13320

13321 GAGTAGGAAT CATATCCTTC TTAATTATCG GATGATGGCA CGGACGGGCA GATGCCAACA 13380

13381 CAGCCGCTCT TCAAGCCGTA ATCTACAACC GGGTAGGAGA CATCGGGTTA ATCATAACTA 13440

13441 TGGCCTGATT TGCAATGAAC CTTAACTCCT GAGAAATTCA ACAAATCTTT GTCTTATCAA 13500

13501 AAAACTTCGA TTTAACAATT CCCTTAATAG GACTTGCTCT AACAGCAACG GGAAAATCAG 13560

13561 CCCAATTTGG CCTCCACCCC TGAATTCCCT CCGCCATGGA GGGCCCTACA CCAGTATCTG 13620

Apa I , *Ban* II

13621 CCCTACTCCA CTCAAGTACT ATAGTTGTTG CAGGAATTTT CCTGTTTATC CGCCTTACC 13680

13681 CCCTCATAGA AAATAACCAG TTAGCTCTAA CAACCTGCCT ATGCCTTGA GCACTAACCT 13740

13741 CACTATTCAC AGCCACCTGT GCTCTAACC AAAACGATAT CAAGAAAATT GTAGCTTTCT 13800

EcoRV

13801 CAACATCTAG TCAATTAGGC CTAATAATAG TTACAATTGG ACTAAACCAA CCACAACCTAG 13860

13861 CATTCCCTCA CATCTGCACC CATGCTTTCT TTAAGCCAT ACTATTCCTA TGCTCAGGGT 13920

13921 CCATTATTCA CAGCCTAAAC GACGAACAAG ATATCCGAAA AATAGGAGGC CTATTTAATA 13980

EcoRV

13981 TTATACCTGC AACCTCAACT TATTTTACGA TTGGTAGTTT AGCACTAACA GGAACCCCT 14040

14041 TCCTGGCAGG ATTCTTCTCA AAAGACGCAA TTATTGAAGC ACTAAACACC TCCCACCTAA 14100

14101 ACGCCTGAGC CTAACCCTG ACATTAATTG CCACATCATT CACCGCAGTA TACAGTTTCC 14160

Ban II

14161 GATTAGTATA TTTTGTAGTT ATAGGAACCC CACGATTCTT GGCCCTCTCC CCAATTAACG 14220

14221 AAAATAATCC ACTAGTGATT AACTCCATTA AACGACTCGC TTGAGGAAGC ATTATTGCAG 14280

14281 GCCTCATTAT TACACAAAAC TTCCTACCAA TAAAAACCCC AATTATGACA ATACCAGCAC 14340

14341 CCCTGAAAAT AGCAGCCCTT CTCGTAACAA TTGCAGGCCT ACTAGTAGCC ATAGAACTAG 14400

14401 CCAACATGAC GAGCAAACAA GTAAAAATTA TTCCAATAAT CCCATTACAC CATTCTCAA 14460

14461 ATATATTAGG ATTTTCCCC GCAATCATT ACCGACTCCT TCCAAGCTT AAATTACCT 14520

Hind III

14521 TAGGTCAGTC AGCCGCCACT CAACTAGACA AACGTGATT AGAAGCCATA GGACCAAAG 14580

14581 GCCTAGCACT AACACAAATG ACCATAGCAA AAGTTACAAA CGACATCTCA CGAGGAATAA 14640

14641 TTAAAAACATA CCTAACTATT TTCCTCCTAA CCCTAATTCT AGCTATCCTA CCTGTTCTCC 14700

14701 TCTAAACTGC ACGAAGGGCC CCACGACTTA AACCACGAGT GAGTTCCAAC ACAACAAGCA 14760

← *Apa* I , *Ban* II

→ND6

14761 GGGTTAAAAG CAGCACCCAA GCACAAATCA CCAATATTCC CCCACCCGAT GAGTATATCA 14820

14821 CAGCTACCCC ACTAACATCT CCACGTAAAA CGGAGAAGCTC CTTCAGTCCA TCAACAACCA 14880

14881 CCCACGATCC TTCATATCAG CCCCTCAAA AGAACCTGC CACCAAACCA ACCCCTAAAA 14940

14941 GATATACTAA CACATAACCT AAAACGGAAC GACTACCCA GGCTTCAGGA TAAGGCTCGG 15000

15001 CGGCCAAAGC CGCTGAATAA GCAAAAATA CAAGCATCCC CCCTAGATAG ATTAATAAGA 15060

15061 GAACTAAAGA TAAAAAGAG CCCCATGAC CAACCAAAC CCCGCATCCA ACCCAGCTG 15120

Ban II

Pvu II

15121 CAACCACTAA ACCAAGAGCA GCAAATAAG GAGTAGGATT AGAAGCAACA GCAACTAACC 15180

15181 CCACAACCAA AGCTATTAAT AATAAAAACA TGAAATAGGT CAT AATTCTT GCTCAGACTT 15240

←→tRNA-Glu

15241 TAACCGAGAC CAATGACTTG AAGAACCACC GTTGTTATTC AACTACAAGA ACCATTAATG 15300

← →cyt b

15301 GCAAGCCTAC GAAAGACACA CCCCTCATT AAAATCGCTA ATGACGCACT AGTTGACCTA 15360

15361 CCCACACCAT CCAACATTC AGCATGATGA AACTTTGGCT CTCTACTAGG ATTATGCTTA 15420

15421 ATTACTCAA TTCTAACCGG CTTATTTCTA GCTATACACT ATACCTCAGA CATTTC AACCT 15480

15481 GCATTCTCAT CCGTTACCCA CATCTGCCGA GATGTAACT ACGGCTGACT AATTCGTAAT 15540

15541 ATTCACGCCA ATGGAGCATC ATTCTTCTT ATCTGTATTT ACATACACAT TGGCCGAGGC 15600

15601 CTATATTATG GATCATACT TAACAAAGAA ACCTGAAACA TTGGAGTAGT TCTCCTACTC 15660

15661 CTAGTTATAA TGACAGCCTT TGTCGGTTAT GTTCTTCCAT GAGGACAAAT GTCCTTTTGA 15720

15721 GGCCTACAG TAATCACAAA CTTCTATCC GCCGTGCCAT ATATAGGAGA TATATTAGTT 15780

15781 CAATGAATTT GAGGAGGCTT CTCCGTAGAC AATGCAACAT TAACACGATT CTTTGCATTT 15840

15841 CACTTCCTTC TACCATTCAT TATCGCCGCC GCTACTGTCA TTCACCTACT GTTCTCCAC 15900

15901 GAAACAGGAT CAAATAACCC CATCGGACTG AACTCAGACG CAGACAAAAT TTCTTCCAC 15960


```

15961 CCATACTTTT CATACAAAGA CCTCCTTGGG TTCGTGATTA TACTACTAGC CCTCACACTC 16020
16021 CTGGCATTAT TCTCCCAA CTTTTAGGA GACCCAGAAA ACTTCACTCC AGCCAATCCC 16080
16081 CTGGTTACTC CCCCTCATAT TAAACCAGAG TGATATTTCC TGTTTGCCTA CGCCATTCTC 16140
16141 CGATCAATTC CCAACAAACT AGGAGGAGTT CTTGCACTAC TATTCTCCAT CCTCGTACTA 16200
16201 ATAGTGGTAC CCCTATTACA TACCTCAAAA CAACGAGGAC TAACGTTCCG CCCAATCACC 16260
16261 CAATTCCTAT TTTGAACTCT AGTCGAGAC ATGATTATCC TGACATGAAT TGGAGGAATA 16320
16321 CCAGTAGAAC ATCCATTCAT TATCATCGGA CAAATCGCAT CCGTCCTATA TTTCGCACTG 16380
19381 TTCCTTGTTT TCTTCCCCT AGCAGGATGA TTAGAAAATA AAGCACTGAA ATGAGCTTGC 16440
                                                                                   ←→
                                                                                   tRNA-Thr
16441 CCTAGTAGCT TAGCATAAAA GCATCGGTCT TGTAATCCGA AGATCGGAGG TTAAATTCCT 16500
16501 CCCTAGCGCC CAGAAAAGAG AGATTTTAAC TCTCACCCCT GGCTCCCAA GCCAGAATTC 16560
                   ←
                                                                                   EcoR I
                   →tRNA-Pro
16561 TAACTAAAC TATTTTCTGG
                   ←

```

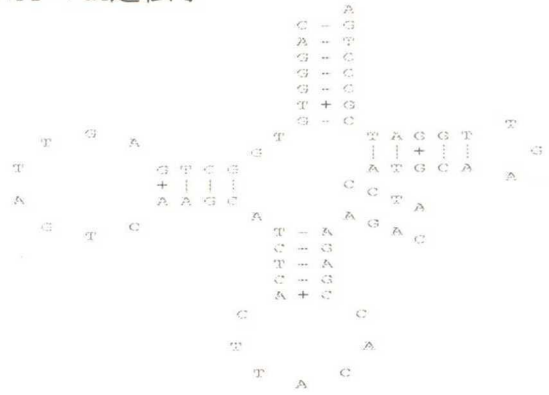
図1 決定したキンギョ（和金）mtDNAのH鎖の全塩基配列。

タンパク質遺伝子コード領域は box で囲み、tRNA 遺伝子は網かけ、rRNA は下線で示した。制限酵素認識部位は赤文字で、その下部に制限酵素名を示した。矢印はその領域の最初と最後を表す。

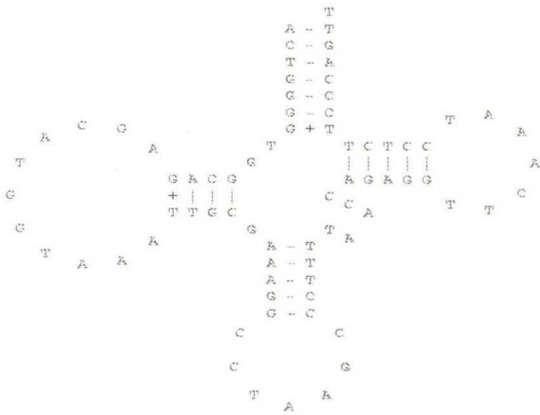
tRNA- Phe 遺伝子



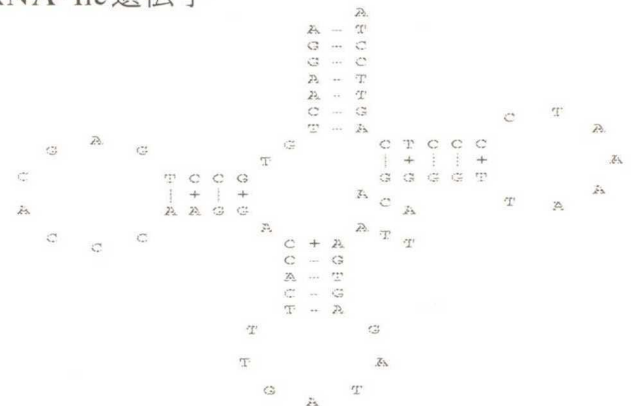
tRNA- Val 遺伝子



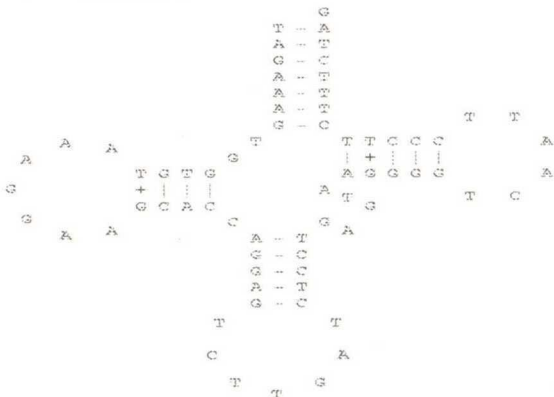
tRNA- Leu(UUR) 遺伝子



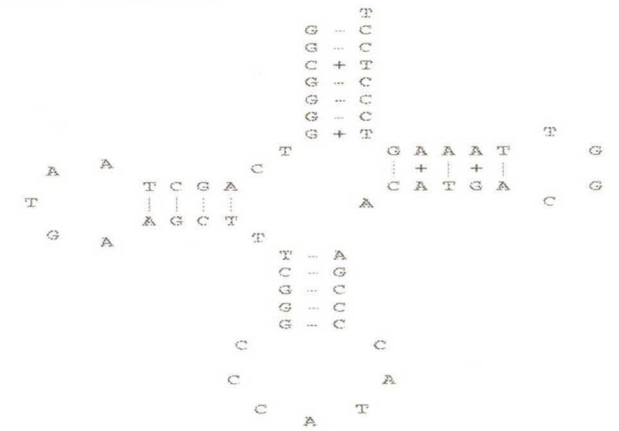
tRNA- Ile 遺伝子



tRNA- Gln 遺伝子



tRNA- Met 遺伝子



tRNA- Trp 遺伝子



tRNA- Ala 遺伝子

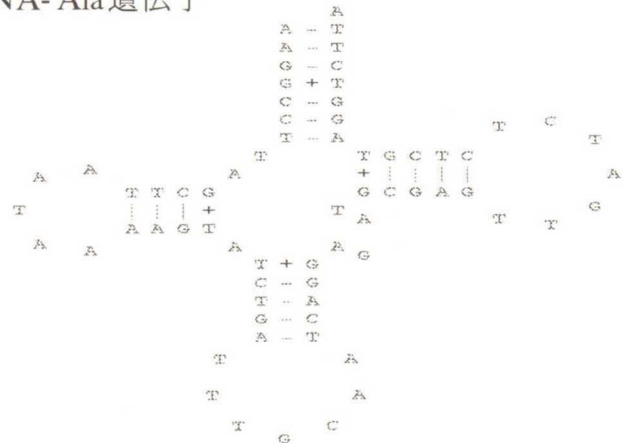


図3 キンギヨmtDNAにコードされているtRNA遺伝子の二次構造〔tRNA-Ser(AGY)遺伝子を除く〕
Watson-Crick塩基対は一で示した

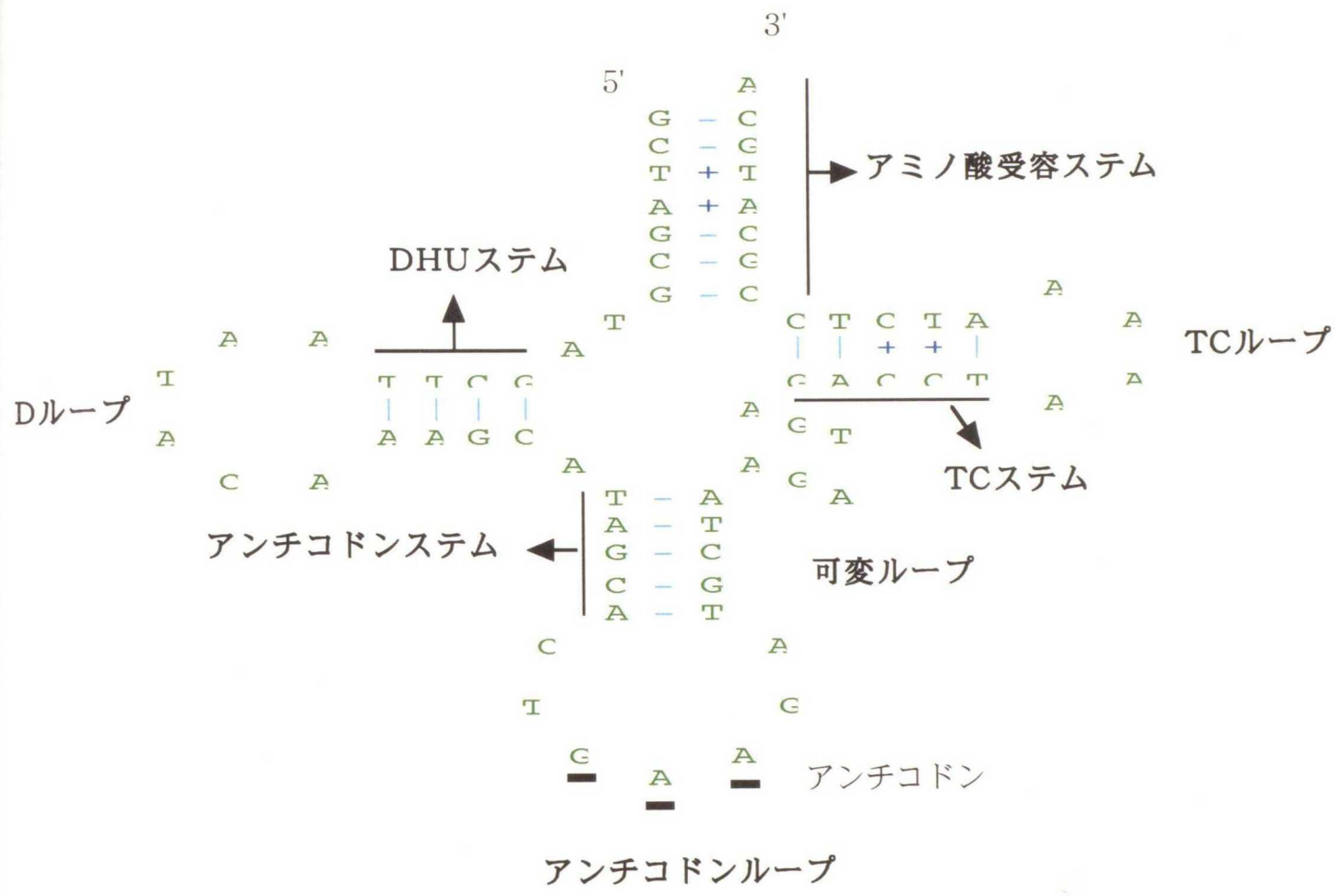


図4 tRNA-Phe遺伝子の二次構造

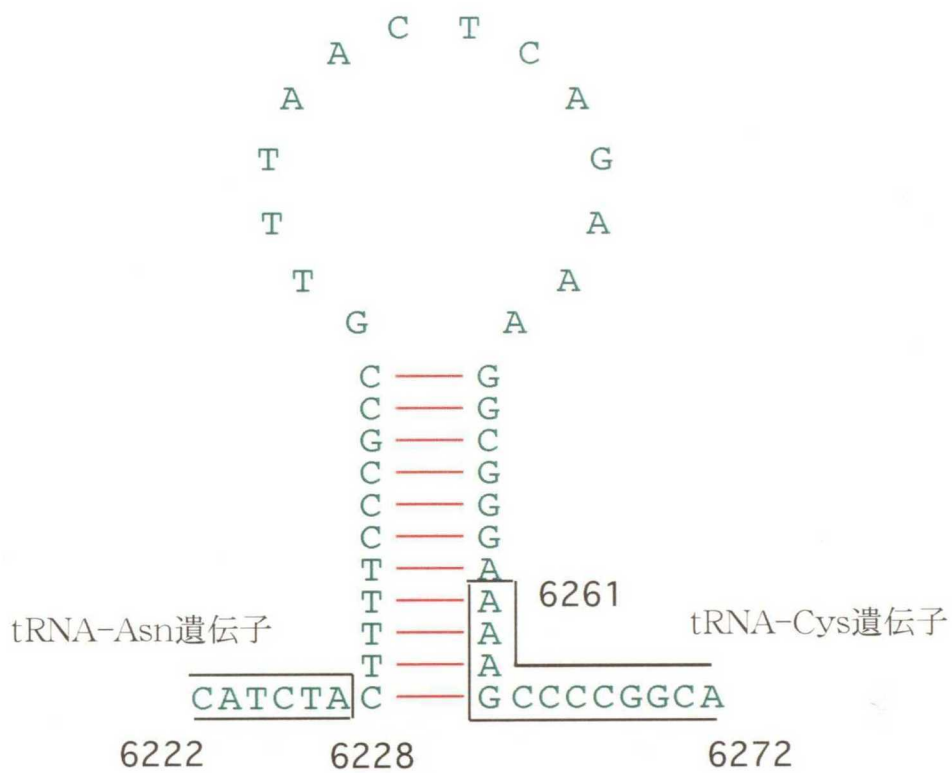


図6 キンギョ（和金）mtDNA上で予想されるL鎖複製開始点における二次構造
 数字は図1の塩基配列の番号を示す

プライマーNo. ⑨



3791bpの増幅



プライマーNo. ③

H S L

E



ND4

ND5

ND6

cyt b

D-loop

TP

プライマーNo. ④



1971bpの増幅



プライマーNo. ⑩

図7 増幅したmtDNA上の部位と使用したプライマーの位置

H鎖にコードされているものはマップの上には、L鎖にコードされているものは下に示した。

プライマー③④⑨⑩は表2のプライマーNo. ③④⑨⑩を示す。

H: tRNA His 遺伝子, S: tRNA Ser(AGY) 遺伝子, L: tRNA Leu(CUN) 遺伝子, E: tRNA Glu 遺伝子, T: tRNA Thr 遺伝子

P: tRNA Pro 遺伝子, ND4-6: NADH4-6 タンパク質コード 遺伝子, cyt b: チトクローム b タンパク質コード 遺伝子

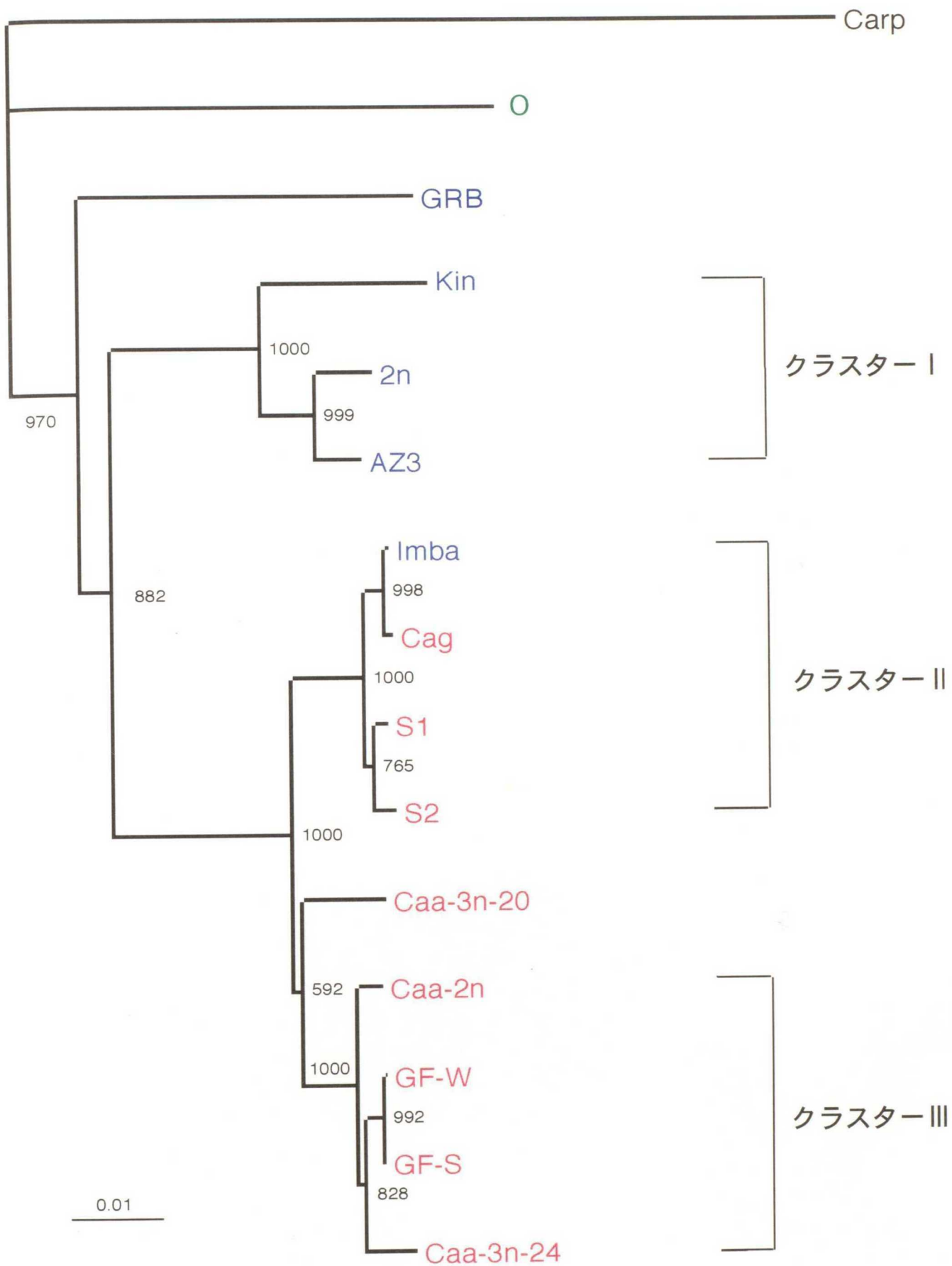


図8 mtDNAのND5およびcyt b遺伝子コード領域の塩基配列による系統樹 (NJ法) コイ (Carp)を外群にした。数字は1000回のブートストラップ値を表す。日本産フナは青文字、大陸産フナは赤文字、オランダ産のフナは緑文字で示した。クラスター I は日本産フナグループ、クラスター II はギベリオブナグループ、クラスター III は中国普通鰻グループをさす。各サンプル名については表1を参照のこと。

表1 使用したサンプル

属	種	亜種	和名など	倍数性※	サンプル名	産地	
<i>Cyprinus</i>	<i>carpio</i>	—	コイ	2n	Carp	accession No. X61010	
<i>Carassius</i>	<i>auratus</i>	<i>cuvieri</i>	ゲンゴロウブナ	2n	GRB	accession No. AB045144	
		<i>langsdorfi</i>	ギンブナ	2n	2n	日本 (神奈川県渋谷田川)	
	subsp.	<i>auratus</i>	キンブナ	3n	AZ3	accession No. AB006953	
				3n	Imba	日本 (千葉県印旛沼)	
	—	—	—	和名	2n	Kin	日本 (群馬県水産試験場)
					2n	GF-W	日本 (観賞魚店にて購入)
				青文金	2n	GF-S	日本 (観賞魚店にて購入)
					2n	Caa-2n	中国 (雲南省昆明池)
				中国普通鮒	3n	Caa-3n-20	中国 (雲南省昆明)
					3n	Caa-3n-24	中国 (雲南省昆明)
<i>gibelio</i>	ギベリオブナ	3n	Cag	中国 (新疆北部)			
—	—	—	フナ (不明)	2n	O	オランダ (De Heil自然保護区)	
			フナ (不明)	3n	S1	ロシア (バイカル湖)	
			フナ (不明)	3n	S2	ロシア (バイカル湖)	

※ DAPI染色法により (本文を参照)、キンギョの精子のDNA量をnとして測定した。

表2 作製したプライマーの塩基配列と位置

No.	プライマー名	塩基配列 (5'→3')	位置 5'末端の位置、LはL鎖を示す	対応するプライマーNo.と 増幅するサイズ (bp)
Forward				
①	CO3-57c-FW	AGTGTCAAGTATCAGGCAGCG	W※-COⅢ-10449L	⑥(9102)
②	ND5-1686C-FW	GAAGAATGCGGAACCTAACGG	W-ND5-13019L	⑦(7907)
③	CytB-3c-FW	GCTCATTTTCAGTCTTTATT	A-Cytb-16434L	⑧(7749)⑨(3791)
④	L938	TCTTCAGTGTCTATGCTTTGT	A-tRNA ^{Phe} -957L	⑩(1163)
⑤	FITC-16rRNA-897cFW	CTTGTGTTTGCCGAGTTCC	W-16rRNA-2915L	⑪(2988)
1	FITC-12rRNA-411c-FW	GCTTTTCGTGGGGTCAGGT	W-12rRNA-1403L	シュークエンシング用プライマー
2	FITC-16rRNA-1434c-FW	TCTCTTTTGCTTGGGTGTA	W-16rRNA-2266L	シュークエンシング用プライマー
3	FITC-16rRNA-897cFW	CTTGTGTTTGCCGAGTTCC	W-16rRNA-2915L	シュークエンシング用プライマー
4	FITC-16rRNA-142c-FW	GAAACTGACCTGGATTGCTC	W-16rRNA-3558L	シュークエンシング用プライマー
5	FITC-ND1-449c-FW	TGCTTTCCTGAGTGGTAT	W-ND1-4309L	シュークエンシング用プライマー
6	FITC-tRNAGln-11c-FW	TGTAAAGGAAGCACCAAGGAG	W-tRNAGln-4887L	シュークエンシング用プライマー
7	FITC-ND2-450c-FW	GCTGGGGGGCGTATTGGAT	W-ND2-5565L	シュークエンシング用プライマー
8	FITC-tRNATyr-3c-FW	TAGGGTAGCCGAGTGTIT	W-tRNATyr-6398L	シュークエンシング用プライマー
9	FITC-CO1-974c-FW	ACGGCGGTTACAAGTACG	W-CO I -6979L	シュークエンシング用プライマー
10	FITC-CO1-26c-FW	GCTGGTTCCTCGTATGTGTG	W-CO I -7927L	シュークエンシング用プライマー
11	FITC-CO2-532c-FW	CTGGGGACTCTATTGGGACA	W-CO II -8558L	シュークエンシング用プライマー
12	FITC-ATP8-165C-FW	ACTGGGGTGTGTTCAATTTGG	W-ATP8-8997L	シュークエンシング用プライマー
13	FITC-CO3-708c-FW	TTAGTAGGGCAGCGGATAG	W-CO III -9798L	シュークエンシング用プライマー
14	FITC-CO3-57c-FW	AGTGTCAAGTATCAGGCAGCG	W-CO III -10449L	シュークエンシング用プライマー
15	FITC-ND4-1183C-FW	AAAGGGGGTGTGATAGTGGA	W-ND4-11484L	シュークエンシング用プライマー
16	FITC-ND4-358C-FW	TTCGGCTGTGTGTTCCGTT	W-ND4-12309L	シュークエンシング用プライマー

表2の続き1

No.	プライマー名	塩基配列 (5'→3')	位置 5'末端の位置、LはL鎖を示す	対応するプライマーNo.と 増幅するサイズ (bp)
17	FITC-ND5-1686C-FW	GAAGAATGCGGAAC TAACGG	W-ND5-13019L	シークエンシング用プライマー
18	FITC-ND5-1149C-FW	TTTCCC GTGCTGTAGA	W-ND5-13555L	シークエンシング用プライマー
19	FITC-Takase-F	ATTGGTGT TTTATTGGTAGA	G-ND5-14324L	シークエンシング用プライマー
20	FITC-CYB-1089C-FW	AGTGC GTCATTAGCGATTT	W-Cytb-15350L	シークエンシング用プライマー
21	FITC-CYB-3C-FW	GCTCA TTTTCAGTGC TTTATT	A-Cytb-16434L	シークエンシング用プライマー
22	FITC-L351	CCTGAA ATAGGA ACCAGATG	A-Dloop-370L	シークエンシング用プライマー
Reverse				
⑥	12rRNA-358-RV	CCGAAG CCCC TAATACGAA	G-12rRNA-1351	①(9102)
⑦	ND2-148-RV	CCCCGAG CAGTAGAAGCAAC	G-ND2-5116	②(7907)
⑧	CO2-580-RV	GGACA ATGCTCGGAAATCTG	W-CO II -8690	③(7749)
⑨	ND4-1363-RV	ATGTGAG GATGATGCTA	A-ND4-12646	③(3791)
⑩	H16375	ACTAT TCC TCGT TCTCTTCC	A-Cytb-16375	④(1163)
⑪	H16506	GCCCAG AAAAGAGAGAT	A-Cytb-16506	⑤(2988)
23	FITC-12rRNA-358-RV	CCGAAG CCCC TAATACGAA	G-12rRNA-1351	シークエンシング用プライマー
24	FITC-tRNAVal-3-RV	GGGTGT GGTGAGTTAGT	W-tRNAVal-1949	シークエンシング用プライマー
25	FITC-16rRNA-727-RV	AGTGTA AGCCAAATCGGAC	W-16rRNA-2745	シークエンシング用プライマー
26	FITC-16rRNA-1523-RV	GCAATCC AGTCA GTTCTATC	W-16rRNA-3541	シークエンシング用プライマー
27	FITC-ND1-197-RV	CCGTCC GCCCCTCTACATC	W-ND1-3974	シークエンシング用プライマー
28	FITC-ND2-272-RV	CATTAGT GGGGGGTGAGGA	W-ND2-5452	シークエンシング用プライマー
29	FITC-tRNAAsn-52-RV	CAAGCCAG CCGATCCATC	W-tRNAAsn-6207	シークエンシング用プライマー
30	FITC-CO1-476-RV	TGGGGG CAAATCAACTTCA	W-CO I -6877	シークエンシング用プライマー

表2の続き2

No.	プライマー名	塩基配列 (5'→3')	位置 5'末端の位置、LはL鎖を示す	対応するプライマーNo.と 増幅するサイズ (bp)
31	FITC-CO1-1096-RV	GTTCTCCACGACACCTAT	W-CO I -7497	シークエンシング用プライマー
32	FITC-CO2-580-RV	GGACAATGCTCGGAAATCTG	W-CO II -8690	シークエンシング用プライマー
33	FITC-ATP8-165-RV	GAATCCTGAGACTGACCA	W-ATP8-9020	シークエンシング用プライマー
34	FITC-Takase-R	GGATTCTTCTGAGCAATTAC	G-CO III -10006	シークエンシング用プライマー
35	FITC-ND3-26-RV	CTATTACAGCCGCCCTTCA	W-ND3-10602	シークエンシング用プライマー
36	FITC-ND4-155-RV	CCTCCAACACATACTTAGCC	W-ND4-11440	シークエンシング用プライマー
37	FITC-ND4-1363-RV	ATGTGAGGATGATGCTA	G-ND4-12649	シークエンシング用プライマー
38	FITC-M15XA-R	TAGCGGCAACAGGAAAATCA	G-ND5-13560	シークエンシング用プライマー
39	FITC-M15XH-R	GTTCACCCGACTACTCCA	G-ND5-14405	シークエンシング用プライマー
40	FITC-CTB-5-RV	CAAGCCTACGAAAGACAC	W-Cytb-15302	シークエンシング用プライマー
①	ka-nd5-215	ACGTTTGACGTAAACATCAGC	K-ND5-215	ABIシークエンシング用プライマー
②	ka-nd5-1400	GCCTCATCATCACACAAAAT	K-ND5-1400	ABIシークエンシング用プライマー
③	ka-cytb-911	TACCCCTACTACACACCTCA	K-Cytb-911	ABIシークエンシング用プライマー
④	b20-nd5-1400	GCCTCATTATTACACAAAAC	B20-ND5-1400	ABIシークエンシング用プライマー
⑤	f42-cytb-929	CAAAACAACGAGGACTAACG	F42-Cytb-9	ABIシークエンシング用プライマー
⑥	h2-nd5-1344c	CGTGTACCATCCGATAAGT	H2-ND5-481	ABIシークエンシング用プライマー

※ W:キンギョ (和金)、A:3倍性ギンブナ、G:ゲンゴロウブナ、k:キンブナ、B20:3倍性中国普通鮒、

F42:2倍体中国普通鮒、H2:オランダ産フナのmtDNA塩基配列を示す

注) サンプル名 OはプライマーNo.18、19、22、37に代わってプライマーNo.①、③、⑥、17を使用

KinはプライマーNo.18、19、22、37、39に代わってプライマーNo.①、②、③を使用

Caa-2nはプライマーNo.19、22、37、39に代わってプライマーNo.①、⑤を使用

Caa-3n-20はプライマーNo.18、19、37、39に代わってプライマーNo.①、④を使用

表3 キンギョmtDNAにおける遺伝子の位置、長さ (bp) とタンパク質の開始コドン、
終止コドンについて

遺伝子	配列上の位置	長さ (bp)	鎖	開始コドン	終止コドン
D-loop	1-923	923			
tRNA-Phe	924-992	69			
12S rRNA	993-1946	954			
tRNA-Val	1947-2018	72			
16S rRNA	2019-3699	1681			
tRNA-Leu(UUR)	3700-3777	78			
ND1	3778-4752	975		ATG	TAA
tRNA-Ile	4756-4829	74			
tRNA-Gln	4827-4897	71	L		
tRNA-Met	4899-4967	69			
ND2	4968-6014	1047		ATG	T(AG)
tRNA-Trp	6013-6083	71			
tRNA-Ala	6086-6154	69	L		
tRNA-Asn	6156-6228	73	L		
tRNA-Cys	6261-6331	71	L		
tRNA-Tyr	6330-6400	71	L		
CO I	6402-7952	1551		GTG	TAA
tRNA-Ser(UCN)	7953-8023	71	L		
tRNA-Asp	8027-8098	72			
CO II	8111-8801	691		ATG	T
tRNA-Lys	8802-8877	76			
ATPase8	8879-9043	165		ATG	TAG
ATPase6	9037-9720	684		ATG	TA(A)
CO III	9720-10505	786		ATG	TA(A)
tRNA-Gly	10505-10576	72			
ND3	10577-10927	351		ATG	T(AG)
tRNA-Arg	10926-10995	70			
ND4L	10996-11292	297		ATG	TAA
ND4	11286-12666	1381		ATG	T
tRNA-His	12667-12735	69			
tRNA-Ser(AGY)	12736-12804	69			
tRNA-Leu(CUN)	12806-12878	73			
ND5	12882-14705	1824		ATG	TAA
ND6	14702-15223	522	L	ATG	TAG
tRNA-Glu	15224-15292	69	L		
cyt b	15298-16438	1141		ATG	T
tRNA-Thr	16439-16510	72			
tRNA-Pro	16509-16580	72	L		

表4 各遺伝子領域におけるGC含量 (%)

遺伝子	GC含量 (%)	遺伝子	GC含量 (%)
D-loop	34.9	CO II	40.6
tRNA-Phe	42.0	tRNA-Lys	47.4
12S rRNA	48.3	ATPase 8	37.0
tRNA-Val	51.4	ATPase 6	38.3
16S rRNA	43.7	CO III	44.3
tRNA-Leu (UUR)	47.4	tRNA-Gly	34.7
ND1	43.8	ND3	39.9
tRNA-Ile	47.3	tRNA-Arg	48.6
tRNA-Gln	45.1	ND4L	45.8
tRNA-Met	59.4	ND4	40.6
ND2	44.4	tRNA-His	31.9
tRNA-Trp	36.6	tRNA-Ser (AGY)	44.9
tRNA-Ala	39.1	tRNA-Leu (CUN)	39.7
tRNA-Asn	49.3	ND5	39.8
tRNA-Cys	46.5	ND6	45.8
tRNA-Tyr	53.5	tRNA-Glu	39.1
CO I	43.0	cyt b	42.2
tRNA-Ser (UCN)	49.3	tRNA-Thr	48.6
tRNA-Asp	33.3	tRNA-Pro	41.7

表5 D-loop領域における各部位のGC含量 (%)

部位	GC含量 (%)
ブロック1	28.6
ブロック2	39.2
ブロック3	36.6

表6 3倍性ギンブナ、ゲンゴロウブナ、コイに対するタンパク質コード遺伝子、rRNA遺伝子、tRNA遺伝子における相同性 (%)

遺伝子	3倍性ギンブナ		ゲンゴロウブナ		コイ	
	塩基配列	アミノ酸	塩基配列	アミノ酸	塩基配列	アミノ酸
ND1	93.1	99.7	92.1	99.7	89.1	97.8
ND2	92.6	97.4	91.9	97.7	85.0	91.4
CO I	96.3	100.0	95.6	100.0	88.1	98.8
CO II	98.3	99.6	97.4	99.6	88.7	97.8
ATPase 8	99.4	100.0	98.8	100.0	96.4	98.1
ATPase 6	95.5	99.6	95.5	99.1	85.7	96.0
CO III	96.7	99.6	95.8	99.2	91.2	100.0
ND3	96.6	99.1	95.4	99.1	86.0	97.4
ND4L	97.0	100.0	94.6	100.0	85.9	100.0
ND4	94.9	98.5	94.4	98.3	85.9	96.3
ND5	94.4	97.5	92.9	97.0	86.1	94.2
ND6	94.6	100.0	92.0	100.0	86.6	97.7
cyt b	93.8	99.5	93.5	98.4	87.9	97.6
12S rRNA	99.3	-	98.8	-	97.0	-
16S rRNA	98.2	-	97.2	-	94.1	-

表6 の続き

遺伝子	3倍性ギンブナ		ゲンゴロウブナ		コイ	
	塩基配列	アミノ酸	塩基配列	アミノ酸	塩基配列	アミノ酸
tRNA-Phe	100.0	-	100.0	-	94.2	-
tRNA-Val	98.6	-	95.8	-	98.6	-
tRNA-Leu (UUR)	100.0	-	100.0	-	97.4	-
tRNA-Ile	98.6	-	98.6	-	97.3	-
tRNA-Gln	95.8	-	95.8	-	93.0	-
tRNA-Met	98.6	-	100.0	-	98.6	-
tRNA-Trp	100.0	-	100.0	-	95.8	-
tRNA-Ala	100.0	-	100.0	-	89.9	-
tRNA-Asn	100.0	-	100.0	-	95.9	-
tRNA-Cys	100.0	-	98.6	-	93.0	-
tRNA-Tyr	100.0	-	100.0	-	95.8	-
tRNA-Ser (UCN)	100.0	-	100.0	-	100.0	-
tRNA-Asp	98.6	-	97.2	-	94.4	-
tRNA-Lys	96.1	-	97.4	-	98.7	-
tRNA-Gly	100.0	-	100.0	-	98.6	-
tRNA-Arg	98.6	-	100.0	-	94.3	-
tRNA-His	100.0	-	97.1	-	89.9	-
tRNA-Ser (AGY)	97.1	-	98.6	-	91.3	-
tRNA-Leu (CUN)	100.0	-	100.0	-	97.3	-
tRNA-Glu	100.0	-	100.0	-	100.0	-
tRNA-Thr	100.0	-	98.6	-	98.6	-
tRNA-Pro	98.6	-	100.0	-	97.2	-

表7 D-loop領域および各部位のキンギョに対する相同性 (%)

部位 サンプル名	ブロック1	ブロック2	ブロック3	D-loop全体
コイ	83.3	92.3	86.1	86.4
ゲンゴロウブナ	88.9	92.2	96.0	93.4
AZ3	96.4	92.8	96.2	95.7

表8 mtDNAのND5タンパク質コード遺伝子における塩基配列およびアミノ酸配列の相同性 (%)
 オランダ産フナは緑文字、日本産フナは青文字、大陸産フナは赤文字で示した。各サンプル名は表1を参照のこと。

ND5		Carp	O	GRB	Kin	2n	AZ3	Imba	Cag	S1	S2	Caa-2n	GF-W	GF-S	Caa-3n-20	Caa-3n-24
ア ミ ノ 酸 配 列	Carp		85.4	86.9	85.8	86.6	86.7	86.7	86.7	86.6	86.7	86.6	86.3	86.3	86.6	86.1
	O	93.4		90.7	89.6	90.4	90.5	90.4	90.2	90.4	90.4	90.4	90.1	90.1	90.7	89.9
	GRB	94.7	96.7		92.5	93.3	93.2	93.0	92.9	92.9	92.7	93.1	93.0	93.0	92.9	92.6
	Kin	93.4	95.6	96.9		96.6	96.8	93.6	93.5	93.6	93.4	93.8	93.6	93.6	93.8	93.6
	2n	94.1	96.0	97.4	98.0		98.8	94.7	94.6	94.7	94.5	94.7	94.5	94.4	94.6	94.2
	AZ3	94.1	95.9	97.2	97.9	98.8		94.6	94.5	94.6	94.4	94.8	94.6	94.5	94.6	94.4
	Imba	94.4	96.4	97.5	97.4	97.9	97.9		99.8	99.5	99.2	98.0	97.9	97.9	98.1	97.5
	Cag	94.4	96.4	97.5	97.4	97.9	97.9	100.0		99.3	99.1	97.9	97.9	97.8	98.0	97.4
	S1	94.4	96.4	97.5	97.4	97.9	97.9	99.3	99.3		99.6	97.8	97.8	97.7	97.8	97.4
	S2	94.4	96.4	97.5	97.4	97.9	97.9	99.3	99.3	99.7		97.7	97.7	97.6	97.8	97.3
	Caa-2n	94.4	96.2	97.4	97.4	97.9	97.9	99.2	99.2	98.8	98.8			99.2	99.3	98.2
	GF-W	94.4	96.2	97.2	97.2	97.7	97.7	99.0	99.0	98.7	98.7	99.5	99.5	99.9	98.1	99.2
	GF-S	94.4	96.2	97.2	97.2	97.7	97.7	99.0	99.0	98.7	98.7	99.5	99.5	100.0	98.1	99.1
	Caa-3n-20	94.4	96.4	97.5	97.7	97.9	97.9	99.3	99.3	99.3	99.0	99.2	99.2	99.0	99.0	97.9
Caa-3n-24	93.6	95.7	96.5	97.0	97.2	97.2	97.2	98.2	98.2	97.9	98.7	98.7	98.8	98.8	98.8	

表9 mtDNAのcytbタンパク質コード遺伝子における塩基配列およびアミノ酸配列の相同性 (%)
 オランダ産フナは緑文字、日本産フナは青文字、中国産フナは赤文字で示した。各サンプル名は表1を参照のこと。

cyt b		Carp	O	GRB	Kin	2n	AZ3	Imba	Cag	S1	S2	Caa-2n	GF-W	GF-S	Caa-3n-20	Caa-3n-24
	Carp		86.8	85.7	88.2	87.9	88.3	88.3	88.2	88.3	88.2	88.2	88.2	88.2	87.8	88.3
	O	95.5		91.1	91.1	91.3	91.8	91.3	91.4	91.5	91.5	91.8	91.7	91.7	91.1	91.5
	GRB	97.6	96.3		93.1	93.7	93.6	93.2	93.3	93.4	93.5	93.6	93.6	93.6	93.4	93.4
	Kin	97.9	97.1	98.7		97.3	97.7	93.5	93.4	93.6	93.5	93.5	93.5	93.5	93.3	93.7
	2n	98.2	97.4	98.9	99.7		99.0	93.8	93.7	93.9	94.0	94.0	94.0	94.0	93.4	94.1
	AZ3	98.2	97.4	98.9	99.7	100.0		94.0	94.0	94.1	94.0	94.2	94.2	94.2	93.7	94.4
	Imba	98.2	97.4	98.9	99.7	100.0	100.0		99.9	99.7	99.5	98.1	98.1	98.1	98.1	97.7
	Cag	97.9	97.1	98.7	99.5	99.7	99.7	99.7		99.8	99.6	98.2	98.2	98.2	98.2	97.8
	S1	98.2	97.4	98.9	99.7	100.0	100.0	100.0	99.7		99.7	98.3	98.3	98.3	98.3	98.0
	S2	98.2	97.4	98.9	99.7	100.0	100.0	100.0	99.7	100.0		98.4	98.4	98.4	98.4	98.1
	Caa-2n	97.9	97.6	98.7	99.5	99.7	99.7	99.7	99.5	99.7	99.7		99.8	99.8	98.4	99.5
	GF-W	97.9	97.1	98.7	99.5	99.7	99.7	99.7	99.5	99.7	99.7	99.5		100.0	98.4	99.5
	GF-S	97.9	97.1	98.7	99.5	99.7	99.7	99.7	99.5	99.7	99.7	99.5	100.0		98.4	99.5
	Caa-3n-20	98.2	97.4	98.9	99.7	100.0	100.0	100.0	99.7	100.0	100.0	99.7	99.7	99.7	98.4	98.1
	Caa-3n-24	98.2	97.4	98.9	99.7	100.0	100.0	100.0	99.7	100.0	100.0	99.7	99.7	99.7	100.0	98.1

アミノ酸配列

第二章

AFLP 解析による 3 倍性ギンブナに特異的なゲノムマーカーの探索

1 序論

AFLP (amplified fragment length polymorphism) 解析は新しい DNA フィンガープリント法で、ゲノム DNA を制限酵素で切断し、その断片を PCR 法により選択的に増幅する方法である (Vos et al., 1995; Mueller and Wolfenbarger, 1999)。AFLP 法は次の 3 つのステップからなる。1、DNA の制限酵素処理と、オリゴヌクレオチドアダプターの付加。2、制限酵素断片の二回の選択的増幅。3、増幅された断片のゲル電気泳動である。制限酵素断片の PCR 増幅はプライマーのアニールング標的的部位として、アダプターと制限酵素認識部位の配列を用いて行なう。一次選択的増幅に使用するプライマーは制限酵素認識部位の下流に 1 ヌクレオチドが付いており、断片の中でマッチするヌクレオチドを持つものだけを選択的に増幅する。次の二次選択的増幅に使用するプライマーは 3 つの選択的なヌクレオチドを持つ。1 つめは一次選択的増幅に用いたものと同じで、それに続く 2 つのヌクレオチドは任意で設定することができる。これら 3 つのヌクレオチドすべてが一致する断片だけが二次選択で増幅される。このように選択的増幅された断片の解析はポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動か、DNA シークエンサーを用いて行なう。

この方法は、従来の多型解析で用いられていた RFLP (restriction fragment length polymorphism) 解析 (Reilly and Thomas, 1980) や RAPD (random amplified polymorphic DNA) 法 (Williams et al., 1990) と比べて、得られるマーカーの数が多い点で優れている。Kocher らはティラピア (*Oreochromis niloticus*) に応用した (1998)。植物学の多型解析ではよく利用されており (Sharbel et al., 2000; Larson et al., 2001; Zawko et al., 2001)、最近では豚 (Kim et al., 2002) などの哺乳類への応用も行なわれている。

先の研究において、ミトコンドリア DNA (以下 mtDNA) を用い、日本産フナと大陸産フナの系統学的関係について調べた。mtDNA の D-loop 領域による解析 (Murakami et al., 2001) と同様に、NADH5 遺伝子およびチトクローム b 遺伝子による解析においても、日本産フナと大陸産フナは大きく二つに分かれ、多くの 3 倍性ギンブナの母系起源は 2 倍体ギンブナにあることが分かった。また一部の 3 倍性ギンブナは大陸産フナを母系起源としていた。本研究では核 DNA を解析することで mtDNA では不明な父系起源についても考慮し、3 倍性ギンブナの起源および日本産フナと大陸産フナの系統学的関係をより詳細に解析することを期待した。そこで、AFLP 解析を用いて 3 倍性ギンブナに特異的なゲノムマーカーの探索を行なった。得られたマーカーを使用し、3 倍性ギンブナのゲノム構成とその起源について考察した。

2 方法

2-1 材料

2-1-1 AFLP 解析のサンプル

AFLP 解析に使用したサンプルは山口県大屋川で採取された、2 倍体ギンブナ 2 尾と 3 倍性ギンブナ 3 尾である (表 1)。

2-1-2 特異的プライマーによる PCR 反応に用いたサンプル

使用したギンブナは山口県大屋川および阿武川、神奈川県平塚市小出川および渋田川、山梨県八代町笛吹川、長野県諏訪湖から採取された (表 2)。また、ゲンゴロウブナ 2 尾、ナガブナ 1 尾、ニゴロブナ 4 尾、キンブナ 2 尾、中国産フナ 5 尾、キンギョ 2 尾、そしてオランダ産フナ 2 尾とコイ 2 尾を用いた。サンプルに用いられたフナは形態的特徴によって (中村, 1982) 分類した。

2-2 DNA の抽出

DNA の抽出は肝臓または血液から行なった。肝臓からの抽出は Asahida ら (1996) の方法に従った。すなわち、TNES-尿素緩衝液 (6M 尿素、10mM Tris-HCl; pH 7.5、125mM NaCl、10mM EDTA、1% SDS) 500 μ l 中に保存しておいた肝臓 (数百 mg) を、保存液のままホモジナイザー (テフロン製ピストン) でホモジナイズし、プロテインナーゼ K を 0.8mg 加えて、37°C で 2 日間インキュベートした。フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール (25:24:1) 処理を行ってタンパク質を変性除去した後、DNA をエタノール沈澱させ、乾燥後、TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl、1mM EDTA; pH 8.0) に溶解した。血液からの抽出には Gen とるくん血液用 (宝酒造) を用い、その方法は添付のマニュアルに従った。DNA 溶液の濃度は波長 260nm での吸光度から求めた (O. D. 260=1 の時の濃度を 50 μ g/ml として計算した)。

2-3 倍数性の判定

2-3-1 フローサイトメトリーによる判定

倍数性の判定はフローサイトメトリーによる DNA の定量法に従って行なった (Zhang and Arai, 1996)。クエン酸 DMSO 緩衝液 1ml の入った 1.5ml チューブに血液を一滴入れ、静かに混和し、5 分間静置した後、90 \times g 1000rpm、4°C で 5 分間遠心した。その上清を捨て、PBS (137mM 塩化ナトリウム、8.10mM リン酸二水素ナトリウム、2.68mM 塩化カリウム、1.47mM リン酸一カリウム) を 1ml 入れて、沈殿物を爪で弾いて浮遊させた。その後 90 \times g

1000rpm、4°Cで5分間遠心し、上清を捨てた後、PI 溶液 (10mg/ml PI 1.0ml、100 μ g/10ml ノニデット P-40 0.2ml、クエン酸三ナトリウム 0.1g を蒸留水に溶かし、全量を 100ml とした) を 1ml 入れて沈殿物を溶解させ、4°Cで遮光しながら 30 分間静置し、フローサイトメーターで計測した。

2-3-2 Cal3nDr 配列による判定 (Murakami and Fujitani, 1997)

全量 50 μ l の PCR 反応液 [1 \times PCR buffer、0.2mM dNTPs、各 0.2 μ M の Cal3nDr プライマー※1、1.25U *Taq* DNA ポリメラーゼ (宝酒造) を含む] にフナのゲノム DNA 溶液 1 μ l (濃度 100~600ng/ μ l) を加えて、以下の PCR 反応を行なった。初期熱変性を 95°C 3 分間行なった後、95°C 30 秒間、50°C 30 秒間、72°C 1 分間を 17 サイクル、最後に 72°C 7 分間の伸長反応を行なった。反応産物は、その 5 μ l を 1.5%アガロースゲルで電気泳動することにより 137bp のラダーバンドの有無を確認した。137bp のラダーバンドは倍数体ギンブナにのみ見られる。

※1 Cal3nDr プライマー

C61U : 5'-TTTGCATGAAAAGTTACATT-3'

C41L : 5'-AGTGACCAATTCTGCCTAAA-3'

2-4 制限酵素-ライゲーション反応

2-4-1 adaptor の熱ショック反応

AFLP Ligation and Preselective Amplification Module Kit (Applied Biosystems, USA) を使用した。以下の手順は添付のプロトコールに従った。キット内に含まれている AFLP *Eco*R I adaptor pair と AFLP *Mse* I adaptor pair を 95°C で 5 分間熱処理した。室温で 10 分以上静置した後、5000rpm で 10 秒間遠心した。

2-4-2 master mix の作成

氷上の 600 μ l チューブに、10 \times T4 Buffer DNA Ligase Buffer with ATP、0.5M NaCl、1mg/ml BSA (bovine serum albumin)、20U/ μ l *Mse* I、100U/ μ l *Eco*R I、400U/ μ l T4 DNA Ligase を、サンプル数に応じて全量を調整し、混合した。混合液は 5000rpm で 10 秒間遠心した後、氷冷保存した。

2-4-3 制限酵素-ライゲーション反応

600 μ l チューブに、ゲノム DNA (滅菌蒸留水 5.5 μ l にゲノム DNA 0.5 μ g を溶解したもの)、10 \times T4 buffer DNA Ligase Buffer with ATP、0.5M NaCl、1mg/ml BSA、Mse I adaptor pairs、EcoR I adaptor pairs、master mix を混合した後、25 $^{\circ}$ C で 8 時間反応させた。さらに 65 $^{\circ}$ C で 20 分間インキュベートし、酵素活性を失活させた後、TE 0.1 buffer (20mM Tris-Hcl、0.1mM EDTA; pH 8.0) を 189 μ l 加えて希釈した。

2-5 preselective PCR 反応

600 μ l チューブに、制限酵素-ライゲーション反応の希釈液 4 μ l、キット内に添付されている preselective primer pairs 1 μ l と AFLP core mix 15 μ l を混合し、以下の条件下で PCR 反応を行なった。72 $^{\circ}$ C で 2 分間熱変性した後、94 $^{\circ}$ C 20 秒間、56 $^{\circ}$ C 30 秒間、72 $^{\circ}$ C 2 分間を 30 サイクル、最後に 60 $^{\circ}$ C 30 分間の伸長反応を行なった。PCR 反応後、反応産物の 10 μ l に TE 0.1 buffer 190 μ l を加えて希釈した。

2-6 selective PCR 反応

2-6-1 master mix の作成

氷上の 200 μ l チューブに、10 \times Buffer、0.2mM dNTPs、20 μ M EcoR I-selective primer、20 μ M Mse I-selective primer、1.25U Taq ポリメラーゼを混合し、preselective PCR 反応産物の希釈液を 3 μ l 入れた。使用した EcoR I-selective primer、Mse I-selective primer の塩基配列は表 3 に示した。

2-6-2 selective PCR 反応

94 $^{\circ}$ C 2 分間の熱変性の後、94 $^{\circ}$ C 20 秒間、66 $^{\circ}$ C (1 サイクルごとに 1 $^{\circ}$ C 温度を下げる、最終サイクル時のアニーリング温度は 57 $^{\circ}$ C) 30 秒間、72 $^{\circ}$ C 2 分間を 10 サイクル、さらに 94 $^{\circ}$ C 20 秒間、56 $^{\circ}$ C 30 秒間、72 $^{\circ}$ C 2 分間を 20 サイクル行ない、最後に 60 $^{\circ}$ C 30 分間の伸長反応を行なった。

2-7 selective PCR 産物の電気泳動

7.5%ポリアクリルアミドゲル (アトー株式会社)、3% Nusieve GTG agarose gel (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., USA)を用いて、selective PCR 反応産物の電気泳動を行なった。ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動は添付のマニュアルに従った。必要に応じて、1.5%アガロースゲル (株式会社ニッポンジーン) も使用した。

2-8 特異的な断片の切り出しと TA クローニング

2-8-1 特異的な断片の切り出し

3 倍性ギンブナ (必要に応じて、2 倍体ギンブナ) に特異的と思われる断片の切り出しと DNA の抽出には Wizard SV gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA)を使用した。PCR 産物を 3% Nusieve GTG agarose gel で電気泳動し、目的のサイズの断片を切り出した。ゲルからの DNA の抽出は添付のマニュアルに従った。切り出した断片は 1.5%アガロースゲル電気泳動により確認した。

2-8-2 TA クローニング

TA クローニングは pGEM-T Easy Vector System II (Promega, USA)を使用した。ライゲーション反応はベクターとインサートのモル比が 1:3 になるように DNA を調整し、キットに添付されている T4 DNA Ligase と 2×Rapid Ligation Buffer を用いて行なった。トランスフォーメーションは本研究室でコンピテント化した JM109 を使用した。-80℃に冷凍保存されているコンピテントセル懸濁液を氷上に静置して融解し、コンピテントセル懸濁液 100 μ l とライゲーション溶液 5 μ l を穏やかに混和し、氷上に 30 分間静置した。42℃で 1 分間インキュベートした後、氷上で 2 分間静置し、そこに滅菌蒸留水を 500 μ l 加え、アンピシリン (50 μ g/ml 含有 LB (Luria-Bertani's broth; bacto-tryptone 10g, bacto-yeast extract 5g, NaCl 10g/1L 蒸留水) 寒天培地に塗り広げ軽く乾燥させた後、37℃で一晩培養した。

インサートサイズの確認のために、PCR を用いてプラスミドベクターに対するフォワードプライマーとリバースプライマーによりインサート部分のみを増幅した。PCR 反応液は 200 μ l チューブに、1×PCR Buffer、0.2mM dNTPs、1.25 *Taq* ポリメラーゼ、0.4 μ M フォワードプライマーとリバースプライマーを加えて全量を 25 μ l とした。コロニーを滅菌した爪楊枝でつつき、マスタープレートに塗った後、PCR 反応液の入ったチューブに入れて液中でゆすいだ。最初に 95℃で 5 分間熱変性を行なった後、95℃1 分間、50℃30 秒間、72℃1 分間を 26 サイクル、最後に 72℃10 分の伸長反応を行なった。PCR 産物の 1.5%アガロースゲル電気泳動により、目的のサイズのインサートを含むことを確認した。

2-9 クローニング産物の塩基配列決定

目的のサイズのインサートを含む PCR 産物を鋳型 DNA サンプルとしてシーケンス反応に用いた。サンプルは反応の前に、*exonuclease I* (Amersham Pharmacia Biotech, USA) による未反応の 1 本鎖プライマーの分解と、*shrimp alkaline phosphatase* (Amersham Pharmacia Biotech, USA) によるデオキシヌクレオチド 3 リン酸の脱リン酸化処理を行なった。

シーケンス反応には BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer Applied Biosystem, USA) を使用した。キット内に含まれる 2.5×Ready Reaction Premix と 5×BigDye Sequencing Buffer を 2:1 の割合で混合し、その混合溶液 2 μ l に、鋳型 DNA と、インサート確認の際に使用したフォワードプライマーまたはリバースプライマー 0.8 μ mol を加えた。96°C 3 分間の初期熱変性を行ない、96°C 30 秒間、50°C 25 秒間、60°C 4 分間を 31 サイクル反応させた。エタノール沈澱後、ホルムアミドに溶解し、ABI PRISM 3100 DNA Analyzer を用いて解析を行なった。DNA Analyzer の使用方法については添付のマニュアルに従った。

2-10 特異的プライマーの作製

シーケンスの結果得られた配列は、ソフトウェア開発株式会社の GENETIX-MAX ver.12 遺伝情報処理ソフトウェアを用いてコンピューター解析を行なった。その配列を用い、National Biosciences, Inc. の OLIGO 6.5 Primer Analyzing Software により特異的プライマーを作製した (表 4)。

2-11 作製した特異的プライマーによる PCR 反応

PCR 反応は全量 25 μ l (1×PCR buffer、0.25mM dNTPs、各 0.2 μ M の各種プライマー、1.25U *Taq* DNA ポリメラーゼを含む) に鋳型 DNA として 各種フナ、キンギョ、コイのゲノム DNA 溶液 1 μ l (濃度 100~600ng/ μ l) を加えて行なった。初期熱変性を 95°C 3 分間行なった後、95°C 30 秒間、50°C 30 秒間、72°C 2 分 30 秒間を 30 サイクル、最後に 72°C 10 分間の伸長反応を行なった。反応産物は、その 5 μ l を 1.5%アガロースゲルで電気泳動することにより増幅を確認した。

2-12 系統樹の作成

前述 (2-11) の PCR 反応によって増幅した特異的断片を Wizard SV gel and PCR Clean-Up System によって切り出し、TA クローニングを行なった。その結果得られた配列は Clustal W によるアラインメントを行ない (Thompson et al., 1994)、近隣結合法 (NJ 法、Saitou and Nei, 1987) により系統樹を作成した。作図には Tree View を用い (Page, 1996)、信頼性は 1000 回くり返した場合のブートストラップ値により評価した (Felsenstein, 1985)。

3 結果

3-1 AFLP 解析

3 種類の selective primer を用い (表 3)、2 倍体ギンブナ 2 尾、3 倍性ギンブナ 3 尾に対して AFLP 解析を行なった。増幅産物を 3% Nusieve GTG agarose gel により電気泳動した。selective primer 1 では 400bp 付近に (図 1)、selective primer 2 では 300bp から 400bp 付近において 3 倍性ギンブナにバンドが見られた (図 2)。また 300bp と 600bp には 2 倍体ギンブナにバンドが見られた。selective primer 3 では、7.5%ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動で 350bp から 400bp 付近において 3 倍性ギンブナにバンドが見られた (図 3、矢頭)。このバンドの差は 3% Nusieve GTG agarose gel でははっきりと確認できないものであった (図 4)。

3-2 クローニングの結果

AFLP 解析における selective PCR 反応産物を 3% Nusieve GTG agarose gel により電気泳動し、selective primer 1 では 3 倍性ギンブナに見られたバンドを、selective primer 2 では 3 倍性ギンブナに見られたバンドの他に、300bp と 600bp において 2 倍体ギンブナにバンドが見られたので、このバンドも切り出した。selective primer 3 では、3% Nusieve GTG agarose gel による電気泳動では 2 倍体ギンブナと 3 倍性ギンブナではっきりとした差が見られなかったため (図 4)、2 倍体ギンブナからも同様のサイズのバンドを切り出した。

クローニングによって得た塩基配列の数を表 5 に示した。3 倍性ギンブナに特異的であると思われた配列は selective primer1 から 5 個、selective primer2 から 4 個、selective primer3 から 5 個得られた。また selective primer 2 からは 2 倍体ギンブナに特異的であると思われた配列が 6 個得られた。その塩基配列の、DNA データバンクとの相同性検索の結果を表 6 に示した。増幅した領域に遺伝子コード領域は含まれなかった。データバンク上の情報が多い、ヒト (*Homo sapiens*) やゼブラフィッシュの配列と相同性が高い配列であった。これらの配列を用いて、32 個 (17 対) の 3 倍性ギンブナに特異的なプライマーと、12 個 (6 対) の 2 倍体ギンブナに特異的なプライマーを作製した (表 4)。

3-3 特異的プライマーによる PCR 反応の結果

作製した 32 個 (17 対) の 3 倍性ギンブナに特異的と思われるプライマーと、12 個 (6 対) の 2 倍体ギンブナに特異的と思われるプライマーのうち、21 対のプライマーは 2 倍体ギンブナ、3 倍性ギンブナともに増幅するかまたは増幅できないものであった。残りの 2 対のプライマー (Y2-2 プライマー、Y2-16 プライマー) において、3 倍性ギンブナに特徴的な増幅産物を得た。

3-3-1 Y2-2 プライマーによる PCR 反応の結果

多くの 3 倍性ギンブナは 300bp と 350bp のバンドを持っていた (表 7)。2 倍体ギンブナでは 350bp バンドが (1 尾を除く)、ギベリオブナでは 300bp のバンドが見られた。3 倍性ギンブナの 350bp のバンドは 356bp の長さであり (図 5)、2 倍体ギンブナの 350bp バンドと同一な配列であった (表 8)。また、3 倍性ギンブナの 300bp バンドは 306bp の長さで、350bp バンドと比べて 7 箇所の部位で欠失が見られた (図 5)。その塩基配列はギベリオブナの 300bp バンドと同じであった (表 8)。

一部の 3 倍性ギンブナは 300bp バンドと 350bp バンドをそれぞれ一本ずつ持っていた (表 7)。300bp バンドが見られた 2 倍体ギンブナ (サンプル名、H7) 1 尾と長野県諏訪湖で採取された 3 倍性ギンブナ (Suwa4) の 300bp バンドは他の 3 倍性ギンブナの 300bp バンドと異なるものであった (表 8)。一方 350bp バンドのみが見られた 3 倍性ギンブナは 2 倍体ギンブナの 350bp バンドと同じ配列の 350bp バンドを持っていた。

ニゴロブナは 350bp バンドを示した。その塩基配列数は 350bp で (図 5)、ギンブナの 350bp バンドとの相同性は 97.5%であった (表 8)。3 倍性中国普通鮠、ゲンゴロウブナ、オランダ産フナの 300bp バンドはそれぞれ 301bp、304bp、306bp の長さであり、欠失、挿入部位は同じ部位も存在したが、多くはそれぞれで異なっていた (図 5)。3 倍性ギンブナとの相同性はそれぞれ 96.1%、91.9%、93.5%であった (表 8)。ゲンゴロウブナとオランダ産フナとの相同性は 95.8%と高いものであった。

ナガブナ、キンブナは 300bp バンドの他に 600bp のバンドが見られ、3 倍性ギンブナのうち山梨県笛吹川で採取された 2 尾 (YY1、YY8) にも 600bp のバンドが見られた (表 7)。その 600bp バンドは共に 556bp の長さで、塩基配列の違いは 1 塩基のみであった (図 6)。また 350bp、300bp バンドの塩基配列とは異なるもので、DNA データバンクとの相同性検索の結果、該当する遺伝子は見られなかった (表 6)。一方、ナガブナから得られた 600bp バンドは 566bp の長さであり (図 7)、3 倍性ギンブナ (YY1) およびキンブナからの 600bp バンドの塩基配列とは異なった。相同性検索の結果を表 6 に示した。一部分において、Cape Fear shiner (*Notropis mekistocholas*) のマイクロサテライト配列と相同性が見られた。また後半の 127bp

の領域は、3 倍性ギンブナの 350bp バンドと 1 塩基の、300bp のバンドと 3 塩基の違いであった。

得られた配列を用いて系統樹を作成した (図 8)。350bp バンドのグループ、オランダ産フナとゲンゴロウブナの 300bp バンドのグループ、その他のフナの 300bp バンドのグループの 3 つのクラスターが見られた。

3-3-2 Y2-16 プライマーによる PCR 反応の結果

2 倍体ギンブナには 250bp のバンドが、3 倍性ギンブナには 250bp と 270bp のバンドを持つ個体と、260bp のバンドを持つ個体が存在した (表 9)。260bp のバンドを持つ個体は主に神奈川県平塚市で採取された 3 倍性、4 倍性ギンブナ (サンプル名 H1~13、ただし H13 は増幅せず) で多く見られた。山梨県笛吹川で採取された 3 倍性ギンブナ 3 尾 (YY1、YY8、YY9) においては、2 倍体ギンブナと同様に 250bp のバンドのみが見られた。

250bp バンドは 253bp の長さで、2 倍体ギンブナと 3 倍性ギンブナで同一の配列であった (図 9)。3 倍性ギンブナの 270bp バンドは 267bp の長さであり、ギベリオブナの 270bp バンドと 99.2%の相同性があった (表 10)。一方、3 倍性ギンブナの 260bp バンドはギベリオブナの 260bp バンドと同一な配列であったが、神奈川県小出川採取の 3 倍性ギンブナ (H2) と、長野県諏訪湖採取の 3 倍性ギンブナ (Suwa4) の 260bp バンドは、ギベリオブナの 260bp バンドと塩基配列が異なった (表 10)。

中国普通鮨、ゲンゴロウブナ、ナガブナ、ニゴロブナ、キンブナにおいても同様に調べた。またキンギョ、オランダ産フナ、コイについても行った (表 9)。コイ、キンブナを除く全ての個体が 260bp のバンドのみを示した。

コイは 250bp バンドを持ち、その長さは 243bp で、2 倍体および 3 倍性ギンブナの 250bp バンドと比較すると 82.7%の相同性であった (表 10)。ギンブナの 250bp バンドよりも 15bp 欠失し、2bp の挿入が見られた (図 9)。2bp の挿入はオランダ産フナの 260bp バンドにも同様に見られた。

オランダ産フナとゲンゴロウブナの 260bp バンドはともに 259bp の長さで、両者の間の相同性は 91.8%であった (表 10)。ゲンゴロウブナの 260bp バンドには 2bp の挿入があり、これは神奈川県小出川採取の 3 倍性ギンブナ (H2) の 260bp バンドにも見られた (図 9)。

キンブナでは増幅が見られなかった。キンギョと 3 倍性普通鮨間の相同性は 99.2%と高いものであった (表 10)。

得られた配列を用いて系統樹を作成した (図 10)。系統樹は、コイのクラスター、オランダ産フナのクラスター、ゲンゴロウブナのクラスターに分かれ、その他のフナの 250bp、260bp、270bp バンドは 3 つのクラスター (クラスター I、II、III) に分岐した。クラスター I には 2

倍体および 3 倍性ギンブナの 250bp バンドと、長野県諏訪湖産 3 倍性ギンブナの 260bp バンドが含まれた。クラスターⅡには 3 倍性ギンブナとギベリオブナの 270bp バンドが、クラスターⅢには 3 倍性ギンブナ、ギベリオブナ、3 倍性中国普通鮒、キンギョの 260bp バンドが入った。神奈川県小出川採取の 3 倍性ギンブナ (H2) の 260bp バンドはこれらのクラスターとは異なる位置に存在した。

4 考察

4-1 AFLP 解析について

本研究で使用したのは任意に作製した 3 つの selective primer である。AFLP 解析は多数のマーカ―を検出できる点で、一般的に多型解析で用いられる RFLP 解析や RAPD 法より優れていると言われている。従来解析法では主として、多型頻度の算出と連鎖地図の作成を目的としていた (Young et al., 1998, Nakamura et al., 2001)。本研究では特異的マーカ―の検出以外に、得られたマーカ―の実用性について検討した。そのため selective PCR 産物をポリアクリルアミドゲルやアガロースゲルで電気泳動し、差の見られたバンドを切り出した。DNA シークエンサーを用いたときのような多数のサンプルの処理はできないが、バンドを切り出すことでその塩基配列を解析した。また塩基配列から作製したプライマーで PCR を行ない、実際に特定のフナだけを増幅できるかどうか調べた。PCR の結果、作製したプライマーの多くは 3 倍性ギンブナだけではなく 2 倍体ギンブナにおいても増幅するものであったが、Y2-2 プライマーと Y2-16 プライマーの 2 対のプライマーにおいて 3 倍性ギンブナに特徴的な増幅産物が得られた。AFLP 解析により 3 倍性ギンブナからの特異的なゲノムマーカ―の探索が可能であることが分かった。

4-2 Y2-2 プライマーによる PCR 反応の結果について

3 倍性ギンブナから 300bp と 350bp の二つのバンドが見られた (表 7)。バンドパターンは個体によって異なり、そのゲノム構成の違いを示したと思われる。2 倍体ギンブナは 350bp バンドのみ、ギベリオブナおよび中国普通鰯は 300bp バンドのみが見られた。

2 倍体ギンブナ 1 尾 (サンプル名、H7) と多くの 3 倍性ギンブナは 300bp バンドと 350bp バンドの 2 本のバンドを示した (表 7)。2 倍体ギンブナは 10 尾の 2 倍体ギンブナのうちの 1 尾であり、このタイプのゲノム構成を持つ 2 倍体ギンブナは少ないと思われる。その塩基配列は 3 倍性ギンブナやギベリオブナの 300bp のバンドとは異なり、これらのフナ以外のフナのゲノムが関わっている可能性が考えられた。この 300bp バンドの起源について、本研究では明らかにできなかった。一方、350bp バンドは 2 倍体ギンブナと同じ配列であり、多くの 3 倍性ギンブナが持つ 350bp バンドと 300bp バンドは、2 倍体ギンブナの 350bp バンドとギベリオブナの 300bp バンドに由来することが分かった。大陸に棲息するギベリオブナにおいても倍数体個体の存在と雌性生殖が知られており (Cherfas, 1966)、2 倍体ギンブナとギベリオブナの交雑を示唆した。

3 倍性ギンブナのうち、山口県阿武川採取の 2 尾 (YA10、YA14)、山梨県笛吹川採取の 2 尾 (YY1、YY8)、神奈川県小出川採取の 1 尾 (H9)、長野県諏訪湖採取の 1 尾 (Suwa4) は

300bp バンドのみであった (表 7)。山梨県の 2 尾を除く、これらの 3 倍性ギンブナの 300bp バンドは、他の 3 倍性ギンブナの 300bp バンドの塩基配列とは異なるものであった (表 8)。また山梨県の 2 尾についてはキンブナに見られる 600bp バンドが存在した。さらに、2 倍体ギンブナの 350bp バンドと同一の 350bp バンドのみを持つ 3 倍性ギンブナが 3 尾 (Yo6, YA1, YA13) 見られた (表 7)。本研究において、これらのフナの起源を明確にすることはできなかったが、2 倍体ギンブナやギベリオブナ以外のフナに由来する 3 倍性ギンブナが存在することが示唆された。

4 倍性ギンブナの多くは 300bp バンドのみであったが、300bp バンドと 350bp バンドの 2 本を持つ個体も 1 尾 (1992 鯉奇形) いた (表 7)。3 倍性ギンブナだけではなく、4 倍性ギンブナにおいても多起源であることが分かる。4 倍性ギンブナは、一般的に言われる 2 倍体ゲノムの倍加以外に、他の亜種からの遺伝的寄与によって産出することも考えられる。雌性生殖は卵の賦活に精子を必要とするものの卵と精子の融合は起らないため、その結果母個体と遺伝的に同一な娘個体が産まれる生殖システムである。しかし、ギベリオブナの人工的な交配実験から雌性生殖集団における父方由来遺伝子の取り込みが報告されている (Zhou et al., 2000)。また当研究室において、ある系統 (SS 系統) では常に一定の頻度で 3 倍性の他、4 倍性の仔を生じることを確認している。自然界でも交配によって 4 倍性ギンブナが産まれる可能性が十分に考えられる。そのため、3 倍性ギンブナと同様にその発生起源によってゲノム構成は様々であると思われる。

ゲンゴロウブナは 300bp バンドのみであった (表 7)。mtDNA 上の遺伝子コード領域の塩基配列から作成された系統樹で、ゲンゴロウブナは他の亜種とは離れた位置を示した。増幅された 300bp バンドの塩基配列を用いた系統樹においても、ゲンゴロウブナはオランダ産フナの 300bp バンドと同じクラスターを形成した (図 8)。ゲンゴロウブナは他の日本産フナがそれぞれの亜種へ分かれる以前に、独立したことがより明確に示された。琵琶湖自然史研究会 (1986) によると、ゲンゴロウブナ (フナ) の祖先型と見られる化石は 50 万年前の更新世の土層から発見されている。ゲンゴロウブナは大陸から移動してきたフナの祖先からいち早く環境に適応し、分化したものである。

ニゴロブナは 350bp バンドを示した (表 7)。2 倍体ギンブナの 350bp バンドとの相同性は 97.5%であった (表 8)。ニゴロブナは滋賀県琵琶湖に固有の種であるが、琵琶湖にはギンブナも棲息している。ニゴロブナと 2 倍体ギンブナが起源を同じくすることは十分に考えられる。

ナガブナとキンブナは 300bp の他に 600bp のバンドが見られた (表 7)。この 600bp バンドは 3 倍性ギンブナのうち山梨県笛吹川で採取された 2 尾 (YY1, YY8) においても見られた。YY1 とキンブナから得たバンドは共に 556bp の長さで、塩基配列の違いは 1 塩基のみであり (図 6)、また mtDNA の D-loop 領域のハプロタイプは同じであった。このことから、600bp

バンドは母方由来であると考えられる。多くの 3 倍性ギンブナの母系起源が 2 倍体ギンブナであるのに対して、これらの 3 倍性ギンブナはキンブナと母系起源が同じであることが分かった。

ナガブナからの 600bp のバンドは 566bp の長さで (図 7)、3 倍性ギンブナ (YY1) およびキンブナからの 600bp のバンドとは異なるものであった。一部分において、Cape Fear shiner (*Notropis mekistocholas*) のマイクロサテライト配列との相同性が見られた (表 6)。shiner とは北米産のコイ科魚類に与えられた通称で、多くは *Notropis* 属に属している。*Notropis* 属の中には反復配列を持つ種がいる (Moyer et al., 1988)。ナガブナに関しては 1 尾しか用いておらず、用いたナガブナは 3 倍性個体であったことから、3 倍性ゲノムの構成に反復配列を持つような魚種が関わっているのか、反復配列がナガブナにも存在するのかは、2 倍体個体を含めてさらに調べる必要がある。

Y2-2 プライマーによって増幅された各フナの 300bp と 350bp バンドは、どれも遺伝子コード領域を含まず、AT-rich な塩基配列であった。ゲノム DNA 上のジャンク (がらくた) 配列であると思われる。

4-3 Y2-16 プライマーによる PCR 反応の結果について

2 倍体ギンブナは 250bp バンドのみであった (表 9)。3 倍性ギンブナは 250bp と 270bp の 2 本のバンドを持つ個体と、260bp のバンドのみを持つ個体の二種類が存在した。ギベリオブナは 260bp と 270bp の 2 本のバンドを持ち、キンブナ以外の日本産フナと中国普通鮒、キンギョは 260bp バンドのみであった。キンブナは増幅しなかった。

3 倍性ギンブナのほとんどは、250bp と 270bp の 2 本のバンドを持っていた (表 9)。250bp バンドは 2 倍体ギンブナの 250bp バンドと同じものであった。270bp バンドはギベリオブナの 270bp バンドと 99.2% の相同性があり、ギベリオブナの 270bp バンドに由来すると考えられる (表 10)。したがって、多くの 3 倍性ギンブナの 250bp バンドと 270bp バンドはそれぞれ、2 倍体ギンブナの 250bp バンドとギベリオブナの 270bp バンドを起源としたものと思われた。

神奈川県小出川で採取された 3 倍性、4 倍性ギンブナ、長野県諏訪湖で採取された 3 倍性ギンブナは 260bp のバンドのみを持ち (表 9)、他の地域で採取された 3 倍性ギンブナとはゲノム構成が異なった。小出川産 3 倍性ギンブナ 1 尾 (サンプル名、H2) と諏訪湖産 3 倍性ギンブナ (Suwa4) の 260bp バンドを除いて、これらのフナの 260bp バンドはギベリオブナの 260bp バンドと同一なものであり、ギベリオブナに由来すると考えられた。系統樹において、諏訪湖産の 3 倍性ギンブナの 260bp バンドはクラスター I に含まれた (図 10)。諏訪湖産 3 倍性ギンブナの 260bp バンドは大陸産フナ由来ではなく、2 倍体ギンブナに由来するのではないかと考

えられる。また、小出川産の 3 倍性ギンブナの 260bp バンドには 269bp の長さのバンドが含まれていた (図 9)。これはプライマー作製時に使用した配列から 2bp (AA) の挿入が見られる配列である。2bp の挿入はゲンゴロウブナにも存在した。このバンドは系統樹でクラスター I、II、III から離れ (図 10)、250bp、260bp、270bp バンドと由来が異なることが示唆された。

Y2-16 プライマーによる PCR 産物を 7.5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。その結果、アガロースゲル 260bp と 270bp バンドは 3 種類のバンド (160bp、180bp、200bp) に分かれることが分かった (表 11、アガロースゲル泳動によるバンドのサイズと大きさが異なるのは泳動法が異なることによる)。この泳動パターンによる分類は mtDNA のハプロタイプによる分類と相似しており、Y2-16 プライマーによって増幅された領域は母方のゲノム DNA に由来するものと思われた。つまり、3 倍性ギンブナの母系起源には、アガロースゲルで 250bp と 270bp バンドを持つグループと 260bp バンドを持つグループの二つが存在する。先の mtDNA の解析で、多くの 3 倍性ギンブナの母系起源は 2 倍体ギンブナであることが示された。そのような個体はこのプライマーでは 250bp と 270bp のバンドを増幅する。一方、一部に見られた大陸産フナを母系起源とする 3 倍性ギンブナは 260bp バンドを増幅するのではないだろうか。

山梨県笛吹川で採取された 3 倍性ギンブナ 3 尾 (YY1、YY8、YY9) は 250bp のバンドのみで、270bp バンドを持っていなかった (表 9)。ギンブナは増幅が全く見られなかったことから、プライマーが結合する配列上の塩基置換が示唆された。同様に笛吹川の 3 倍性ギンブナ 3 尾においても塩基置換が存在し、増幅が見られなかったと思われる。

中国普通鮒とキンギョの 260bp バンドの相同性は 99.2%と高い値を示した (表 9)。中国普通鮒はキンギョの祖先であるとされており (Ojima and Takai, 1979)、この結果においてもそのゲノム構成が近縁であることが確認された。ギンブナの場合とは異なり、Y2-16 プライマーで 2 倍体と 3 倍性中国普通鮒の区別はできないことが分かった。

オランダ産フナは 260bp バンドのみを、コイは 250bp バンドのみを示した (表 9)。したがって、260bp バンドと 270bp バンドは *Carassius* 属に特異的であるといえる。コイの 250bp バンドは 2 倍体ギンブナで見られる 250bp バンドとは異なるものであった (表 10)。

Y2-16 プライマーによって増幅された各フナの 250bp、260bp、270bp バンドは、Y2-2 プライマーによって増幅されたバンドと同様に、どれも遺伝子コード領域を含まず、ゲノム DNA 上のジャンク (がらくた) 配列であると思われる。

5 まとめ

2つのゲノムマーカーによる解析の結果から、3倍性ギンブナはタイプ A~F の6種類に分類された(表 12)。本研究で利用した3倍性ギンブナの約43.5%は2倍体ギンブナとギベリオブナ由来のバンドを持っていた(A)。また約4.4%は2倍体ギンブナ由来のバンドを持たず、ギベリオブナ由来のバンドのみを持つものだった(B)。タイプ C、D、E はタイプ A とは結果が異なるものの、2倍体ギンブナとギベリオブナ由来のバンドを持つことが示唆された。タイプ F の3倍性ギンブナはキンブナと相似したバンドパターンを示した。このように他の日本産フナに由来すると思われる3倍性ギンブナも見られた。

本研究で利用した3倍性ギンブナの約87%(タイプ A、C、D、E)は2倍体ギンブナとギベリオブナに由来した。mtDNA の解析で、母系起源は2倍体ギンブナであると示されたことから、母親は2倍体ギンブナで、父親は大陸産のフナ、つまりギベリオブナを起源にする、3倍性ギンブナが日本に多く分布していると分かった。一方で、ギベリオブナのみ由来する3倍性ギンブナや、日本産フナの間で産まれたと思われる3倍性ギンブナの存在も示唆された。その詳しい起源について本研究では明確にできなかった。このように、3倍性ギンブナの起源は単一ではなく複数あることが考えられる。Iguchi ら(2003)も指摘するように3倍性ギンブナの起源は一つではなく、それぞれの環境においてそれぞれの起源から発生したと思われる。

6 参考文献

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. *Fisheries Sci.* 62, 727-730.

琵琶湖自然史研究会 (1986) 琵琶湖南西岸の古琵琶湖層群の淡水化石群集、瑞浪市化石博物館研究報告 13, 57-103

Cherfas N. B. (1996) Natural triploidy in the females of the unisexual of the silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch). *Genetika* 2, 16-24.

Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.

Iguchi K., Yamamoto G., Matsubara N., Nishida M. (2003) Morphological and genetic analysis of fish of a *Carassius* complex (Cyprinidae) in Lake Kasumigaura with reference to the taxonomic status of two all-female triploid morphs. *Biol. J. Linnean Soc.* 79, 351-357.

Kim K. S., Yeo J. S., Kim J. W. (2002) Assessment of genetic diversity of Korean native pig (*Sus scrofa*) using AFLP markers. *Genes Genet. Syst.* 77, 361-368.

Kocher T. D., Lee W. J., Sobolewska H., Penman D. (1998) A genetic linkage map of a cichlid fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics* 148, 1225-1232.

Larson S. R., Cartier E., McCracken C. L., Dyer D. (2001) Mode of reproduction and amplified fragment length polymorphism variation in purple needlegrass (*Nassella pulchra*): utilization of natural germplasm sources. *Mol. Ecol.* 10, 1165-1177.

Moyer S. P., Ma D. P., Tomas T. L., Gold J. R. (1988) Characterization of a highly repeated satellite DNA from the Cyprinid fish *Notropis lutrensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 91B, 639-646.

Mueller U. G. and Wolfenbarger L. L. (1999) AFLP genotyping and fingerprinting. Trends Ecol. Evol. 14, 389-394.

Murakami M. and Fujitani H. (1997) Polyploid-specific repetitive DNA sequences from triploid ginbuna (Japanese silver crucian carp, *Carassius auratus langsdorffi*). Genes Genet. Syst. 72, 107-113.

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

Nakamura K., Ozaki A., Akutsu T., Iwaki K., Sakamoto T., Yoshizaki G., Okamoto N. (2001) Genetic mapping of the dominant albino locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Mol. Genet. Genomics 265, 687-693.

中村守純 (1982) 原色淡水魚類検索図鑑 北隆館 pp. 140-142

Ojima Y. and Takai A. (1979) Further cytogenetical studies on the origin of the Goldfish. Proc. Jpn. Acad. 55 Ser B, 346-350.

Page R. D. (1996) Tree View: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput. Appl. Biosci. 12, 357-358.

Reilly J. G. and Thomas C. A. Jr. (1980) Length polymorphisms, restriction site variation, and maternal inheritance of mitochondrial DNA of *Drosophila melanogaster*. Plasmid. 3, 109-115

Saitou N. and Nei M. (1987) The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406-425.

Sharbel T. F., Haubold B., Mitchell-Olds T. (2000) Genetic isolation by distance in *Arabidopsis thaliana* biogeography and postglacial colonization of Europe. Mol. Ecol. 9, 2109-2118.

Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 11, 4673-4680.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans B., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23, 4407-4414.

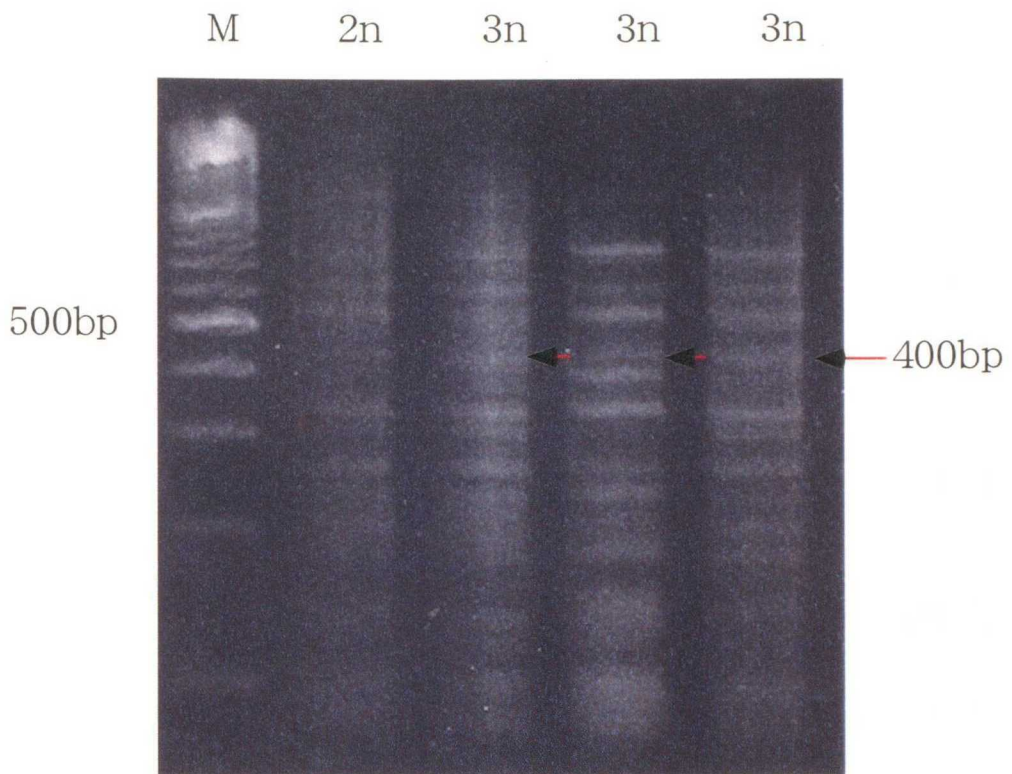
Williams J. G., Kubelik A. R., Lick K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18, 6531-6535.

Young W. P., Wheeler P. A., Coryell V. H., Keim P., Thorgaard G. H. (1998) A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids. *Genetics* 148, 839-850.

Zawko G., Krauss S. L., Dixon K. W., Sivasithamparam K. (2001) Conservation genetics of the rare and endangered *Leucopogon obtectus* (Ericaceae). *Mol. Ecol.* 10, 2389-2396.

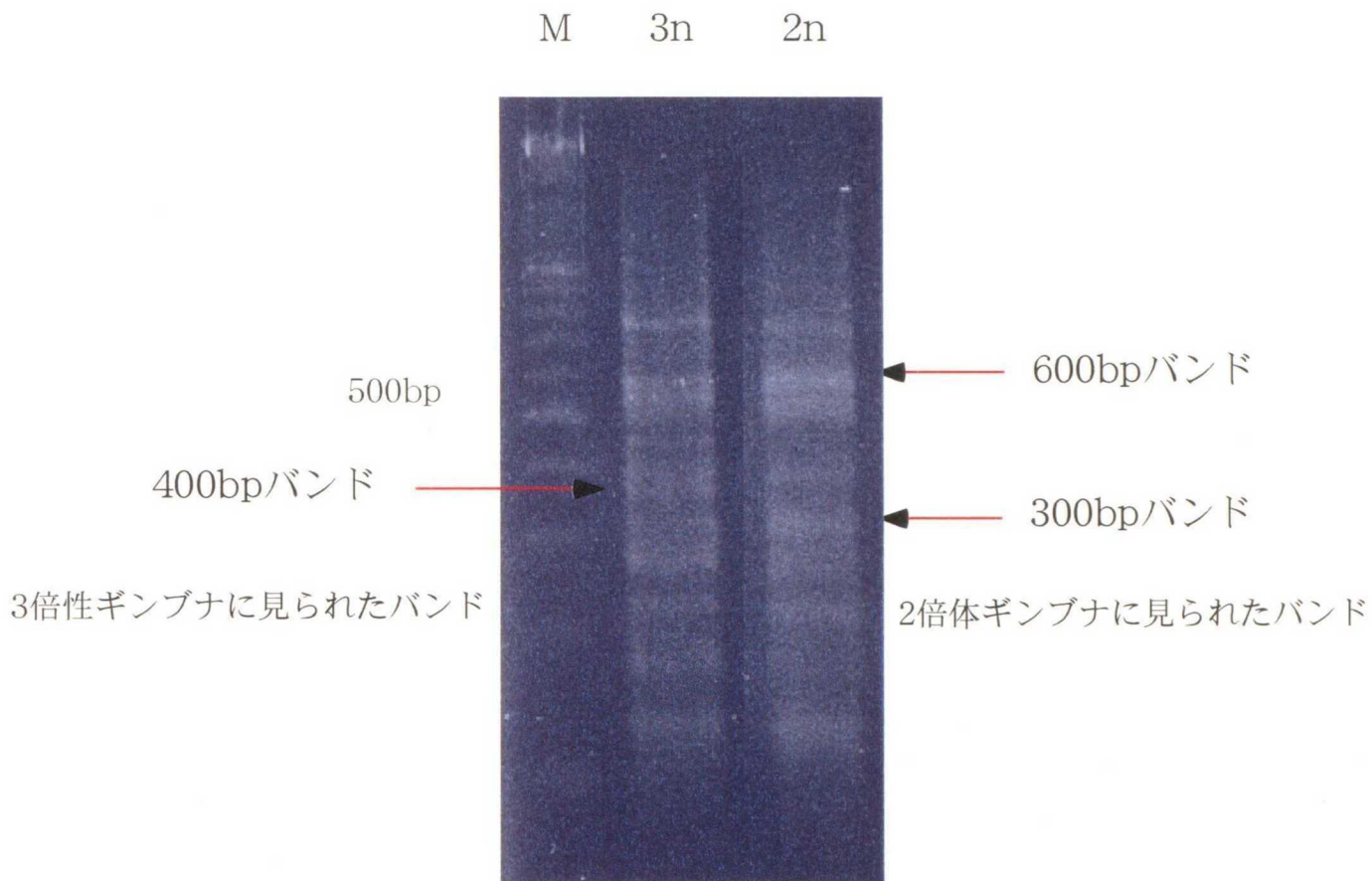
Zhang Q. and Arai K. (1996) Flow cytometry for DNA contents of somatic cells and spermatozoa in the progeny of natural tetraploid loach. *Fisheries Sci.* 62, 870-877.

Zhou L. Z., Wang Y., Gui J. F. (2000) Genetic evidence for gonochoristic reproduction in gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* bloch) as revealed by RAPD assays. *J. Mol. Evol.* 51, 498-506.



M: 100bp マーカー、2n: 2倍体ギンブナ、3n: 3倍性ギンブナ

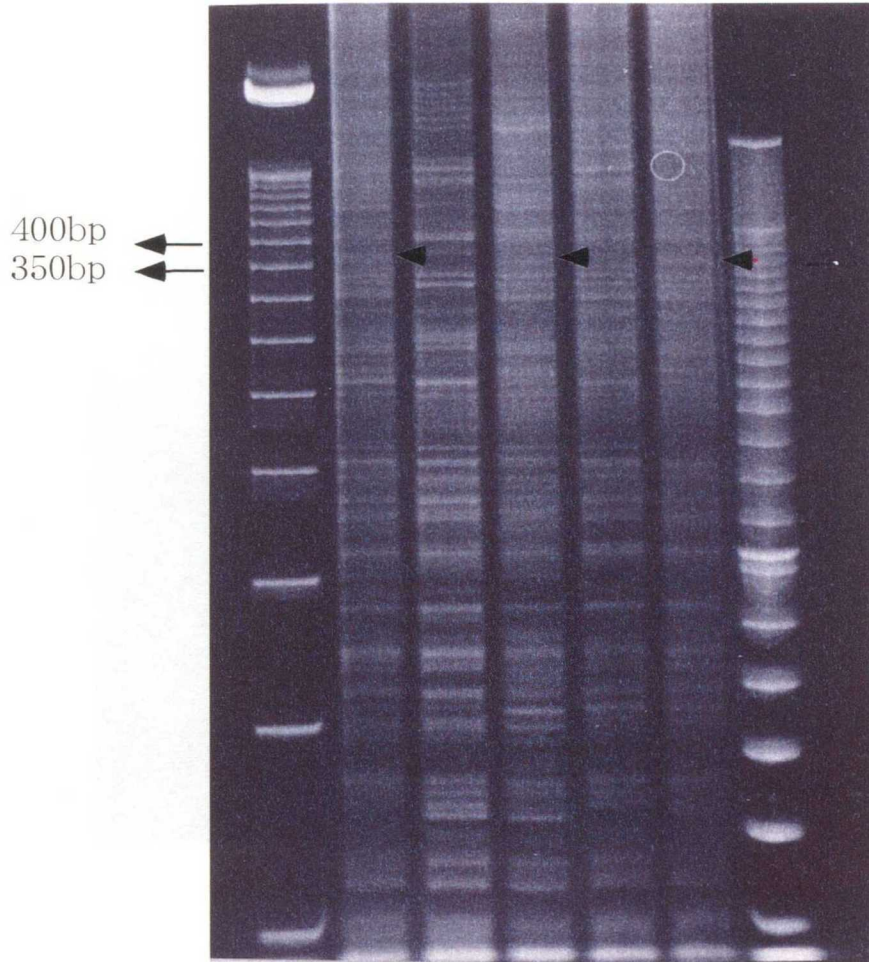
図1 selective primer 1によるselective PCR産物の結果
(3% Nusieve GTG agarose gel泳動写真)



M: 100bpマーカー、3n: 3倍性ギンブナ、2n: 2倍体ギンブナ

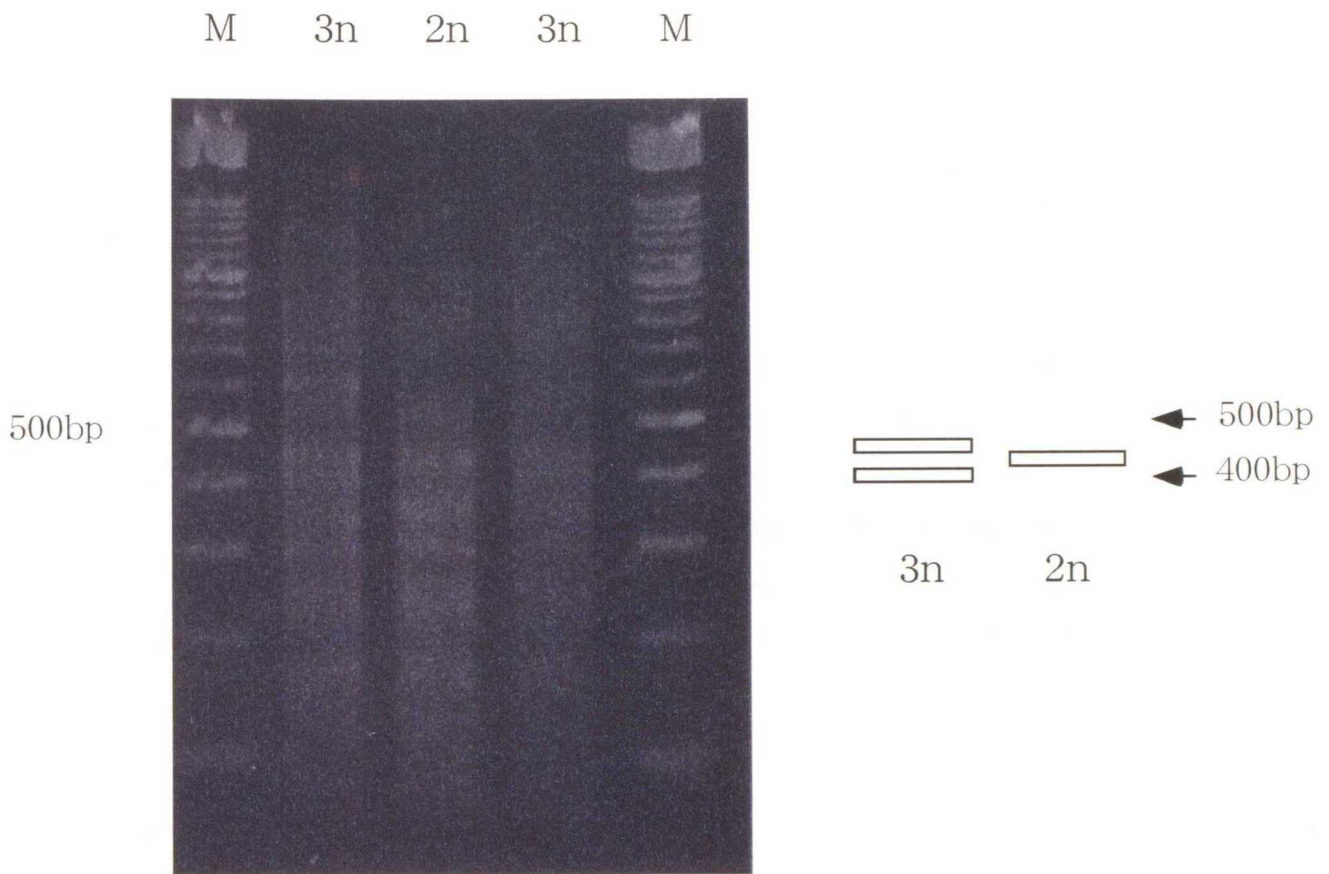
図2 selective primer2によるselective PCR産物の結果
(3% Nusieve GTG agarose gel泳動写真)

50bpM 3n 2n 3n 2n 3n 20bpM



50bpM: 50bpマーカー、3n: 3倍性ギンブナ、2n: 2倍体ギンブナ、20bpM: 20bpマーカー

図3 selective primer3によるselective PCR産物の結果
(7.5%ポリアクリルアミドゲル泳動写真)



M: 100bpマーカー、3n: 3倍性ギンブナ、2n: 2倍体ギンブナ

図4 selective primer3によるselective PCR産物の結果
(3% Nusieve GTG agarose gel泳動写真と模式図)

Y2-2 1 TCTCACTTGCTGCATTTGAAAAAAAAATACTACTAGAAAA-ATGCTG-TTTTTGATCATT 60

 2n 350 1 TCTCACTTGCTGCATTTGAAAAAAAAATACTACTAGAAAA-ATGCTG-TTTTTGATCATT 60
 3n 350 1 TCTCACTTGCTGCATTTGAAAAAAAAATACTACTAGAAAA-ATGCTG-TTTTTGATCATT 60
 NGR 350 1 TCTCACTTGCTGCATTTGAAAAAAAAATACTACTAGAAA-CATGCTG-TTTTTGATCATT 60

 2n H7 300 1 TCTCACTTGCTGCATTTG---AAAAAATACTAATAGAAA-CATGCTG-TTTTTGATCATT- 56
 3n Y2 300 1 TCTCACTTGCTGCATTTG---AAAAAATACTAATACAAAACATGCTG-TTTTTGATCATT- 57
 3n E2 300 1 TCTCACTTGCTGCATTTG---AAAAAATACTAATAGAAA-----CTG-AA-TAGATCATT- 51
 Su4 300 1 TCTCACTTGCTGCATTTG---AAAAAATACTAATAGAAA-CATGCTGTTTTTTATCATT- 57
 GRB 300 1 TCTCACTTGCTGCATTTGAAAAAATTATACTA---GAAA-CATGCTG-TTTTTGATCATT- 56
 EU 300 1 TCTCACTTGCTGCATTTG---AAAAAATTCTACTAGAAAACATGCTG-TTTTTATCATT 57

Y2-2 61 GCAAGTTTTAAATATATATTTTTTTTTGTTACCATTTTGAGATTCAATCAATATTTTACT 120

 2n 350 61 GCAAGTTTTAAATATATATTTTTTTTTGTTACCATTTTGAGATTCAATCAATATTTTACT 120
 3n 350 61 GCAAGTTTTAAATATATATTTTTTTTTGTTACCATTTTGAGATTCAATCAATATTTTACT 120
 NGR 350 61 GCAAGTTTTCAA--TATATTTTTTTTTGTTACCATTTTGAGATTCAATCAATATTTTACT 118

 2n H7 300 57 -CAGGATTT--CTAAAT-GTCTTTTTGTTACCATTTTAGATTC-ATCAAGATTTT--- 108
 3n Y2 300 58 -CAGGATTT--CTAAAT-GTCTTTTTGTTACCATTTTAGATTC-ATCAAGATTTT--- 109
 3n E2 300 52 -CAGGATTT--CTAAAT-GTCTTTTTGTTACCATTTTAGATTC-ATCAAGATTTTATG 106
 Su4 300 58 -CAGGATTT--CTAAAT-GTCTTTTTGTTACCATTTTAGATTC-ATCAAGATTTTATG 112
 GRB 300 57 -CAAGTTTTAAAT-----GTCTTTTTGTTACCATTTTGAGATTCAATCAAGATTTT--- 107
 EU 300 58 ACAAGTTTTAAAT-----GTCTTTTTGTTACCATTTTGAGATTCAATCAAGATTTTATG 113

Y2-2	121	AGATTACTAAATAAGTTCAAAGATTACTAAATAAATAAATAGATTACTAAATAAGTTCAA	180
2n 350	121	AGATTACTAAATAAATAAATAGATAAATAAATAAATAAATAGATTACTAAATAAGTTCAA	180
3n 350	121	AGATTACTAAATAAATAAATAGATAAATAAATAAATAAATAGATTACTAAATAAGTTCAA	180
NGR 350	119	AGATTACTAAATAAATAAATAG----ATAAATAAATAAATAGATTACTAAATAAGTTCAA	174
2n H7 300	109	-----AT-GATAACTAAATAAGTTCAA	129
3n Y2 300	110	-----AT-GATAACTAAATAAGTTCAA	130
3n E2 300	107	-----AT---AACTAAATAAGTTCAA	124
Su4 300	113	-----AT---AACTAAATAAGTTCAA	130
GRB 300	108	-----AT-GATTACTAAATAAGTTCAA	128
EU 300	114	-----TTTACTAAATAAGTTCAA	131

Y2-2 181 GTGGAAGAATAAAATTATTTATTTGAAAATTGTAAAGTATATGTGTAGCATTGTATCTTG 240

2n 350 181 GTGGAAGAATAAAATTATTTATTTGAAAATTGTAAAGTATATGTGTAGCATTGTATCTTG 240

3n 350 181 GTGGAAGAATAAAATTATTTATTTGAAAATTGTAAAGTATATGTGTAGCATTGTATCTTG 240

NGR 350 175 GTGGAAGAATAAAATTATTTATTTGAAAATTGTAAAGTATATGTGTAGCATTGTATCTTG 234

2n H7 300 130 GTGGAAGAATAAAATTATCTATTTGAAAATTGTAAAGTATATGTGTAGCATTGTATCTTG 189

3n Y2 300 131 GTGGAAGAATAAAATTATCTATTTGAAAATTGTAAAGTATATGTGTAGCATTGTATCTTG 190

3n E2 300 125 GTGGAAGAATAAAATTATCTATTTGAAAATTGTAAAGTATATGTGTAGCATTGTATCTTG 184

Su4 300 131 GTGGAAGAATAAAATTATCTATTTGAAAATTGTAAAGTATATGTGTAGCATTGTATCTTG 190

GRB 300 129 GTGGAAGAATAAAATTATTTATTTTAAATTTTAAAGTATATGTGTAGCATTGTATCTTA 188

EU 300 132 GTGGAAGAATAAAATTATTTATTTGAAAATGTTAAAGTATATGTGTAGCATTGTATCTTA 191

Y2-2 241 TCAGTTATAAAATGCCTGTTGTTTTTTT-CTAGGTGTTGCTTGTTTGCCCTAAAATCTG 299

2n 350 241 TCAGTTATAAAATGCCTGTTGTTTTTTT-CTAGGTGTTGCTTGTTTGCCCTAAAATCTG 299

3n 350 241 TCAGTTATAAAATGCCTGTTGTTTTTTT-CTAGGTGTTGCTTGTTTGCCCTAAAATCTG 299

NGR 350 235 TCAGTTATAAAATGCCTGTTGTTTTTTT-CTAGGTGTTGCTTGTTTGCCCTAAAATCTG 294

2n H7 300 190 TCAGTTATAAAATGCCTGTTTTTTTTTT-CTAGGTGTTGCTTGTTTGCCCTAATATCTG 248

3n Y2 300 191 TCAGTTATAAAATGCCTGTTTTTTTTTT-CTAGGTGTTGCTTGTTTGCCCTAATATCTG 249

3n E2 300 185 TCAGTTATAAAATGCCTGTTTTTTTTTTCTAGGTGTTGCTTGTTTGCCCTAATATCTG 244

Su4 300 191 TCAGTTATAAAATGCCTGTTTTTTTTT--CTAGGTGTTGCTTGTTTGCCCTAATATCTG 248

GRB 300 189 TCAGTTATAAAATGCCTGTTGTTTTTTT-CTAGGTGTTGCATGTTTGCCCTAAAATCTG 247

EU 300 192 TCAGTTATAAAATGCCTGTTGTTTTTTT-CTAGGTGTTGCTTGTTTGCCCTAATATCTG 250

Y2-2	300	CTTGCTGCATGAGGGACAGGTGATAATGCTCTGGAAT	GTGGGAGGTATCAGTGCTAT	356
2n 350	300	CTTGCTGCATGAGGGACAGGTGATAATGCTCTGGAAT	GTGGGAGGTATCAGTGCTAT	356
3n 350	300	CTTGCTGCATGAGGGACAGGTGATAATGCTCTGGAAT	GTGGGAGGTATCAGTGCTAT	356
NGR 350	295	CTTGCTGCATGAGGGG	CAGGTGATAATGCTCTGGAATGTGGGAGGTATCAGTGCTAT	350
2n H7 300	249	CTTGCTGCATGAGGGACAGGTGATAAT	TCTCTGGAATGTGGGAGGTATCAGTGCTAT	305
3n Y2 300	250	CTTGCTGCATGAGGGACAGGTGAA	AATTCTCTGGAATGTGGGAGGTATCAGTGCTAT	306
3n E2 300	245	CTTGCTGCATGAGGGACAGGTGATAAT	TCTCTGGAATGTGGGAGGTATCAGTGCTAT	301
Su4 300	249	CTTGCTGCATGAGGGACAGGTGATAATGCTCTGGAAT	GTGGGAGGTATCAGTGCTAT	305
GRB 300	248	CTTGCTGCATGAGGGACAGGTGATAATGCTCTGGAAT	GTGGGAGGTATCAGTGCTAT	304
EU 300	251	CTTGCTGCATGAGGGACAGGTGATAATGCTCTGGAAT	GTGGGAGGTATCAGTGCTAT	307

図5 Y2-2プライマー（赤字領域）により増幅された各バンドの塩基配列。-は欠失、緑字は挿入を示す。青字はプライマー作製時に使用した塩基配列と異なる部位を表す。

2n 350 (2倍体ギンブナ、サンプル名、Yo1)、3n 350 (3倍性ギンブナ、Yo2)、NGR 350 (ニゴロブナ、Biwa11)は1.5%アガロースゲル350bpバンド、2n H7 300 (2倍体ギンブナ、H7)、3n Y2 300 (Yo2)、3n E2 300 (3倍性中国普通鮒、E2)、Su4 300 (長野県産3倍性ギンブナ、Suwa4)、GRB 300 (ゲンゴロウブナ、G20)、EU 300 (オランダ産フナ、フナ1)は300bpバンドである。

図6 Y2-2プライマー（赤字領域）により増幅された600bpバンドの塩基配列。-は欠失を示す。青字はプライマー作製時に使用した塩基配列と異なる部位を表す。Kin-600はキンブナ（サンプル名Jo4）、YY1-600は3倍性ギンブナ（YY1）から得られた600bpバンドを示す。

```

Kin-600 1 TCTCACTTGCTGCATTTGAACCTACAGCTCATCTGTCAGATCATTAACCTACAACGCTTTG 60
YY1-600 1 TCTCACTTGCTGCATTTGAACCTACAGCTCATCTGTCAGATCATTAACCTACAACGCTTTG 60

Kin-600 61 CTAATTTCTTTGACCTGTCACTTGTTGACATCCCTGTGCTGCTAATGTTGTACAAAAGGA 120
YY1-600 61 CTAATTTCTTTGACCTGTCACTTGTTGACATCCCTGTGCTGCTAATGTTGTACAAAAGGA 120

Kin-600 121 GACCAGTCAAAGTGATGTAAGATTTCCCTTCAAATAGAAAGGATCAAACAGCTGCCAAGG 180
YY1-600 121 GACCAGTCAAAGTGATGTAAGATTTCCCTTCAAATAGAAAGGATCAAACAGCTGCCAAGG 180

Kin-600 181 TTTACATAAAGAGTGAGGGCGCAAAATGAGCTGTGATTTCCAGAGTGCTCTGCTAACAT 240
YY1-600 181 TTTACATAAAGAGTGAGGGCGCAAAATGAGCTGTGATTTCCAGAGTGCTCTGCTAACAT 240

Kin-600 241 GCTAATGAAGGGCAAATTCCAAATGGCATTCTTTTTTTCATGCACAGAAAGCAATGTTTT 300
YY1-600 241 GCTAATGAAGGGCAAATTCCAAATGGCATTCTTTTTTTCATGCACAGAAAGCAATGTTTT 300

Kin-600 301 TTTACAAACTCAAAGAGCGAACAATGGAGGTGTTTCACAGAGGGCCCTTCGACAAGGCCG 360
YY1-600 301 TTTACAAACTCAAAGAGCGAACAATGGAGGTGTTTCACAGAGGGCCCTTCGACAAGGCCG 360

Kin-600 361 TACAATTATAACTGTTTGAATAATAGCTGAAAAGAGTAATTGTCTCTACTAACTTTACA 420
YY1-600 361 TACAATTATAACTGTTTGAATAATAGCTGAAAAGAGTAATTGTCTCTCTAACTTTACA 420

Kin-600 421 TAATTCTTTAACAGGAAGTTGGGTTGGGACTTTTTGAAGACACTTAAAAAAAAACATA 480
YY1-600 421 TAATTCTTTAACAGGAAGTTGGGTTGGGACTTTTTGAAGACACTTAAAAAAAAACATA 480

Kin-600 481 GCCAACAGTGAATCATGTTTTGCTAGTTGCTATTGTTAGTTAAGCTGGCGATATTAGTGG 540
YY1-600 481 GCCAACAGTGAATCATGTTTTGCTAGTTGCTATTGTTAGTTAAGCTGGCGATATTAGTGG 540

Kin-600 541 GAGGTATCAGTGCTAT 556
YY1-600 541 GAGGTATCAGTGCTAT 556

```

図7 Y2-2 プライマー（赤字領域）によってナガブナ（サンプル名 Naga-1）から増幅された 600bp バンドの塩基配列。

ピンクの領域は *Notropis mekistocholas* (Cape Fear shiner) のマイクロサテライト配列と、網かけの領域は同プライマーで増幅される 300bp および 350bp バンドの塩基配列と相同性の高い部位を示す。

```
1 TCTCACTTGCTGCATTTGAAAAAAAAATACTACTAGAAACATGCTGTTTTTGATCATTCTG 60
61 CAAGTTTTAAATTTTTTTTATTTTTTTACCATTTTGAGATTCAATCAATATTTTACTAGA 120
121 TTACTAAATAAATAAATAGATAAATAAATAAATAGATTACTAAATAAGTTCAAGTGGAAG 180
181 AATAAATTATTTATTTGAAAATTGTAAAGTATATGTTTAGCATTGTATGAGGGGTGGTG 240
241 TTAGCGCAGTGGATAAGACACACATCTGTGGTGTGAGAGACCCGGGTTCGAATCCACTGT 300
301 GAGACACCAATGTGTCCCTGAGCAAGACACTTAACCCCTAGTTGCTCCAGAGGCGTGCGA 360
361 CCTCTGACATATATAGCAATTGTAAGTCGCTTTGGATAAAAAGCGTCAGCTAAATGAATAA 420
421 ATGTAAATGTAAATGTAAATTTGTATCTTGTGAGTTATAAAATGCCTGTTGTTTTTTTC 480
481 TAGGTGTTGCTTGTGTTGCCCTAATATCTGCTTGCTGCATGAGGGACAGGTGATAATGCTC 540
541 TGAATGTGGGAGGTATCAGTGCTAT 566
```

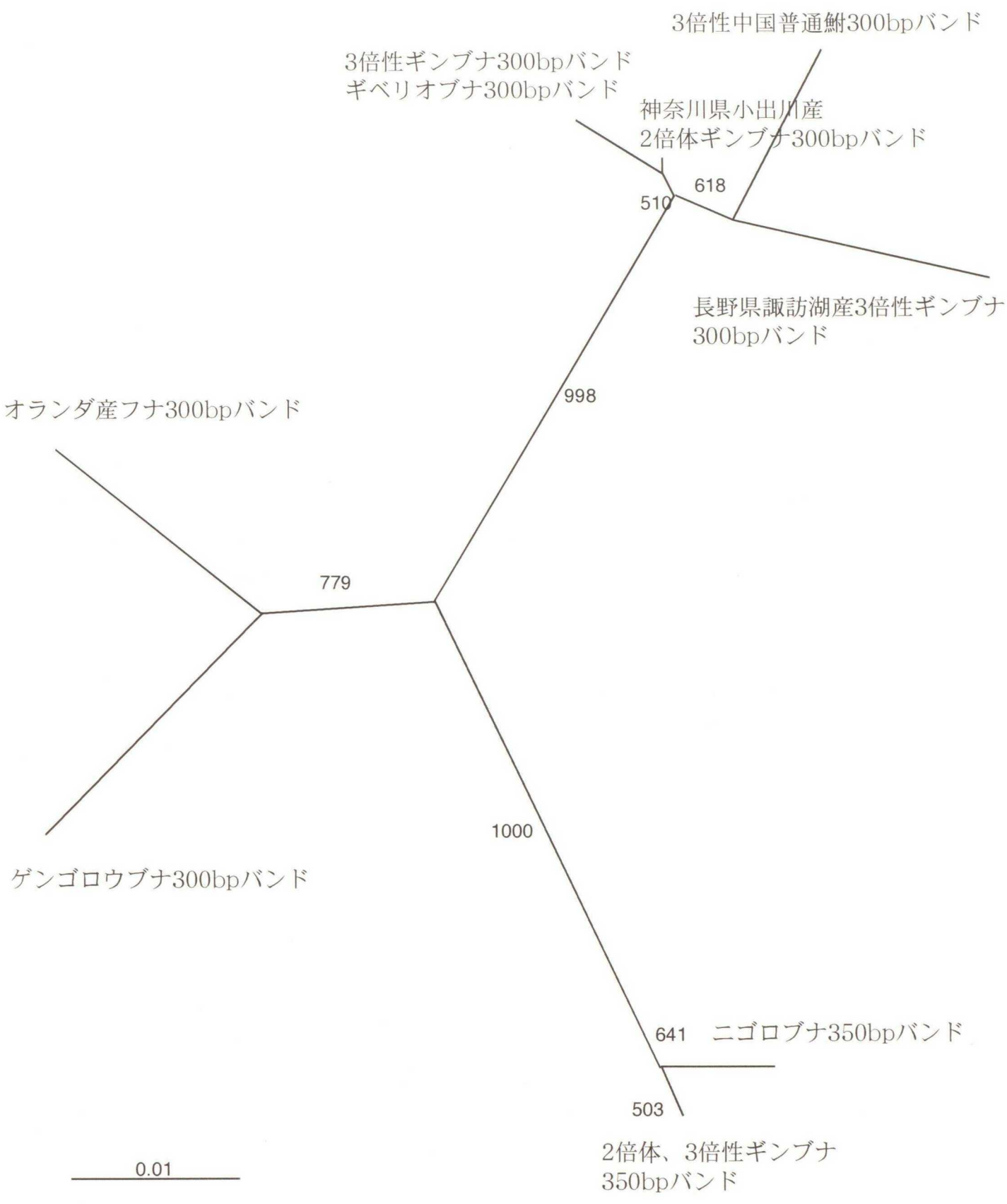


図8 Y2-2プライマーから得た塩基配列を用いた系統樹 (NJ法)

Y2-16	1 GAGCTTCCCAGCATGACATCACATAAATAGAAAGCAACTGAGCAGCAAACCAT--C--ATTAT	58
Carp 250	1 GAGCTTCCCAGCATGACATCACATAAATAGAAACAACCTGAGCAGCAAGAAAT--CATATTAT	60
2n Y1 250	1 GAGCTTCCCAGCATGACATCACATAAATGGAAACAATTGAGCAGCAAACCAT--C--ATTAT	58
3n Y2 250	1 GAGCTTCCCAGCATGACATCACATAAATGGAAACAATTGAGCAGCAAACCAT--C--ATTAT	58
3n H2 260	1 GAGCTTCCCAGCATGACATCACATAAATAGAAACAACCTGAGCAGCAAACCAT AAT--ATTAT	60
Si 260	1 GAGCTTCCCAGCATGACATCACATAAATAGAAAGCAACTGAGCAGCAAACCAT--C--ATTAT	58
EU 260	1 GAGCTTCCCAGCATGACATCACATAAATAGAAACAACCTGAGCAGCAAACCAT--AATATTAT	60
GRB 260	1 GAGCTTCCCAGCATGACATCACATAAATAGAAACAACCTGAGCAGCAAACCAT AAT--ATTAT	60
G 260	1 GAGCTTCCCAGCATGACATCACATAAATAGAAAGCAACTGAGCAGCAAACCAT--C--ATTAT	58
B24 260	1 GAGCTTCCCAGCATGACATCACATAAATAGAAAGCAACTGAGCAGCAAACCAT--C--ATTAT	58
3n Y2 270	1 GAGCTTCCCAGCATGACATCACATAAATAGAAAGCAACTGAGCAGCAAACCAT--C--ATTAT	58
Si 270	1 GAGCTTCCCAGCATGACATCACATAAATAGAAAGCAACTGAGCAGCAAACCAT--C--ATTAT	58

Y2-16 59 ACTTTGTTTGTCAAGGTCATGGATGGTCAGGGCATATTTTAGAGGGAGTCTAATTCTTTT 118

Carp 250 61 ACTTTGTTTGTCAAGGTCATGGCTGGTCAGGGCGTATTTTACTGGGAGTCTTATCCTTTT 120

2n Y1 250 59 GCTTTGTTTGTCAAGGTCATGGCTGGTCAGAGCATACTTTAGAGGGAGTCTAATTCTTTT 118

3n Y2 250 59 GCTTTGTTTGTCAAGGTCATGGCTGGTCAGAGCATACTTTAGAGGGAGTCTAATTCTTTT 118

3n H2 260 61 GCTTTGTTTGTCAAGGTCATGGCTGGTCAGAGCATACTTTAGAGGGAGTCTAATTCTTTT 120

Si 260 59 ACTTTGTTTGTCAAGGTCATGGATGGTCAGAGCATACTTTAGAG-----GTGTTT 108

EU 260 61 GCTTTGTTTGTCAA-----GGTCAGGGCATATTTTAGAGGGAGTCTAATTATTTT 110

GRB 260 61 GCTTTGTTTGTCAAGGTCATGGCTGGTCAGAGCATACTTTAGAGGGAGTCTAATTCTTTT 120

G 260 59 ACTTTGTTTGTCAAGGTCATGGCTGGTCATGGCATATTTTAGAGGGAGTCTAATTCTTTT 118

B24 260 59 ACTTTGTTTGTCAAGGTCATGGATGGTCAGGGCATATTTTAGAGGGAGTCTAATTCTTTT 118

3n Y2 270 59 ACTTTGTTTGTCAAGGTCATGGATGGTCAGGGCATATTTTAGAGGGAGTCTAATTCTTTT 118

Si 270 59 ACTTTGTTTGTCAAGTTCATGGATGGTCAGAGCATACTTTAGAGGGAGTCTAATTCTTTT 118

Y2-16	119	TATGTGTTTTATATTATGTATTTTCCTTAAGTCTAAACTTTTCTGACTGTGTGATGGAAT	178
Carp 250	121	TATGT-----GTTTAGACTTTTTGACCGTGTGATTGAAT	155
Zn Y1 250	119	T-----ATGTATTTTCCTTAAGTCTAAACTTTTCTGACTGTGTGATTGAAT	164
3n Y2 250	119	T-----ATGTATTTTCCTTAAGTCTAAACTTTTCTGACTGTGTGATTGAAT	164
3n H2 260	121	TATGTGTTTTATATTATGTATTTTCCTTAAGTCTAAACTTTTCTGACTGTGTGATGGAAT	180
Si 260	109	TATGTGTTTTATATTATGTATTTTCCTTAAGTCTAAA-ATTTCTGACTGTGTGATGGAAT	167
EU 260	111	TATGTGTTTTATATTATGTATTTTCCTTAAGTCTAAACTTTTCTGACTGTGTGATTGAAC	170
GRB 260	121	TATGTGTTTTATATTATGTATTTTCCTTAAGTCTAAACTTTTCTGACTGTGTGATTGAAT	180
G 260	119	TATGTGTTTTATATTATGTATTTTCCTTAAGTCTAAACTTTTCTGACTGTGTGATGGAAT	178
B24 260	119	TATGTGTTTTATATTATGTATTTTCCTTAAGTCTAAACTTTTCTGACTGTGTGATGGAAT	178
3n Y2 270	119	TATGTGTTTTATATTATGTATTTTCCTTAAGTCTAAACTTTTCTGACTGTGTGATGGAAT	178
Si 270	119	TATGTGTTTTATATTATGTATTTTCCTTAAGTCTAAACTTTTCTGACTGTGTGATGGAAT	178

Y2-16	179	TGACCAAAGAAATCACCAGTGGGTGAGGGTGTTCAGTCAAAAAATGATATGTTTGCCTTC	238
Carp 250	156	TGACCAAAG-AATCACCTGTGGGACAGGGTTTGCAGTGAAATTTTTTTTATGTTTGCATGC	214
2n 250	165	TGACCAAAGAAATCACCAGTGGGTGAGGGTGTGCAGTCAAAAAATGATATGTTTGCCTTC	224
3n Y1 250	165	TGACCAAAGAAATCACCAGTGGGTGAGGGTGTGCAGTCAAAAAATGATATGTTTGCCTTC	224
3n H2 260	181	TGACCAAAGAAATCACCAGTGGGTGAGGGTGTGCAGTCAAAAAATGATATGTTTGCCTTC	240
Si 260	168	TGACCAAAGAAATCACCAGTGGGTGAGGGTGTTCAGTCAAAAAATGATATGTTTGCCTTC	227
EU 260	171	TGACCAAAGATATCACCAGTGGGTGAGGGTGTGCAGTGAAAAAATGATATGTTTCCCTGC	230
GRB 260	181	TGACCAAAGAAATCACCAGTGGGTGAGGGTGTGCAGTGAAAAAATATATGTTTGCCTTC	240
G 260	179	TGACCAAAGAAATCACCAGTGGGTGAGGGTGTTCAGTCAAAAAATGATATGTTTGCCTTC	238
B24 260	179	TGACCAAAGAAATCACCAGTGGGTGAGGGTGTTCAGTCAAAAAATGATATGTTTGCCTTC	238
3n Y2 270	179	TGACCAAAGAAATCACCAGTGGGTGAGGGTGTTCAGTCAAAAAATGATATGTTTGCCTTC	238
Si 270	179	TGACCAAAGAAATCACCAGTGGGTGAGGGTGTGCAGTCAAAAAATGATATGTTTGCCTTC	238

Y2-16	239	AGTCAGCCGCGGTCTCATAGAGAAACCTT	267
Carp 250	215	GGTCAGCCGCGGTCTCATAGAGAAACCTT	243
2n Y1 250	225	AGTCAGCCGCGGTCTCATAGAGAAACCTT	253
3n Y2 250	225	AGTCAGCCGCGGTCTCATAGAGAAACCTT	253
3n H2 260	241	AGTCAGCCGCGGTCTCATAGAGAAACCTT	269
Si 260	228	AGTCAGCCGCGGTCTCATAGAGAAACCTT	256
EU 260	228	AGTCAGCCGCGGTCTCATAGAGAAACCTT	259
GRB 260	241	AGTCAGCTGCGGTCTCATAGAGAAACCTT	269
G 260	239	AGTCAGCCGCGGTCTCATAGAGAAACCTT	267
B24 260	239	AGTCAGCCGCGGTCTCATAGAGAAACCTT	267
3n Y2 270	239	AGTCAGCCGCGGTCTCATAGAGAAACCTT	267
Si 270	239	AGTCAGCCGCGGTCTCATAGAGAAACCTT	267

図9 Y2-16プライマー（赤字領域）により増幅された各バンドの塩基配列。-は欠失、緑字は挿入を示す。青字はプライマー作製時に使用した塩基配列と異なる部位を表す。

Carp 250（コイ、サンプル名 G17 小）、2n Y1 250（2 倍体ギンブナ、Yo1）、3n Y2 250（3 倍性ギンブナ、Yo2）はアガロースゲル 250bp バンド、3n H2 270（3 倍性ギンブナ、H2）、Si 260（ギベリオブナ）、EU 260（オランダ産フナ、フナ1）、GRB 260（ゲンゴロウブナ、G20）、G 260（キンギョ、キン1）、B24 260（3 倍性中国普通鮓、B24）は 260bp バンド、3n YY3 270（3 倍性ギンブナ、YY3）、3n Y2 270、Si 270 は 270bp バンドである。

コイ

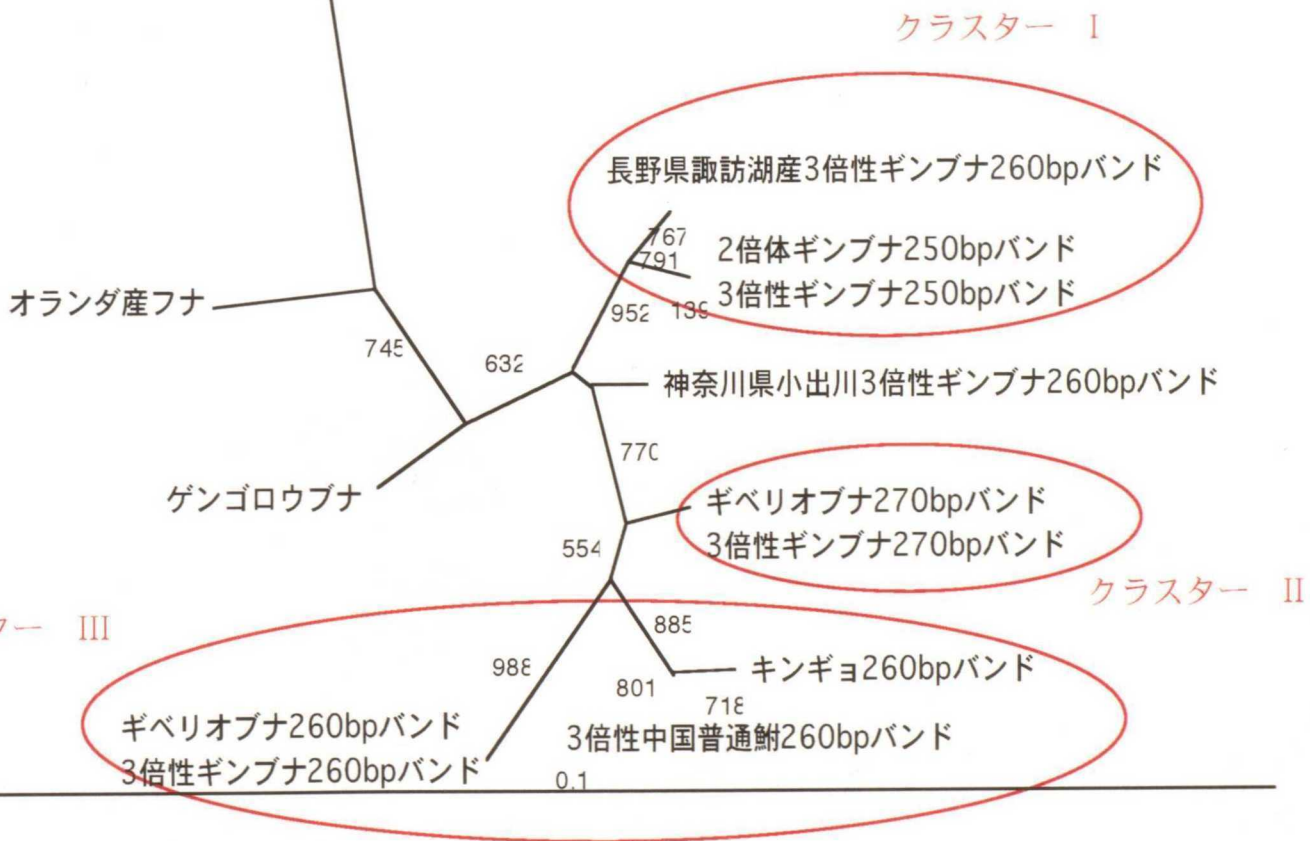


図10 Y2-16プライマーから得た塩基配列を用いた系統樹(NJ法)

表1 AFLP解析に使用したサンプルについて

サンプル名	種類(学名)	倍数性	性	採取地	HT※1
Y02	ギンブナ (<i>Carassius auratus langsdorfi</i>)	3n	雌	山口県大屋川	57
Y03	"	3n	"	"	57
Y05	"	2n	"	"	81
Y06	"	3n	"	"	63
Y07	"	2n	"	"	57

※1 ミトコンドリアDNAのD-loop領域の塩基配列のハプロタイプを示す

表2 特異的プライマーによるPCR反応に使用したサンプル

種類	学名	サンプル名	倍数性	性	採取地	HT※1	
ギンブナ	<i>Carassius auratus langsdorfi</i>	Yo1	2n	雌	山口県大屋川	57	
		Yo2	3n	"	"	57	
		Yo3	3n	"	"	57	
		Yo4	2n	雄	"	57	
		Yo5	2n	雌	"	81	
		Yo6	3n	"	"	63	
		Yo7	2n	"	"	57	
		YA1	3n	"	"	山口県阿武川	57
		YA2	2n	雄	"	"	63
		YA3	2n	雄	"	"	57
		YA4	2n	雄	"	"	81
		YA5	3n	雌	"	"	29
		YA6	3n	"	"	"	57
		YA7	2n	雄	"	"	57
		YA8	3n	雌	"	"	20
		YA9	3n	"	"	"	18
		YA10	3n	"	"	"	20
YA11	3n	"	"	"	57		
YA12	3n	"	"	"	29		
YA13	3n	"	"	"	63		
YA14	3n	"	"	"	20		
YA15	3n	"	"	"	29		
YA16	3n	"	"	"	57		
YY1			3n	"	山梨県八代町笛吹川	6	

表2の続き1

種類	学名	サンプル名	倍数性	性	採取地	HT※1
ギンブナ	<i>Carassius auratus langsdorfi</i>	YY2	3n	雌	山梨県八代町笛吹川	12
		YY3	3n	"	"	19
		YY4	3n	"	"	19
		YY5	3n	"	"	19
		YY6	3n	"	"	2
		YY7	3n	"	"	19
		YY8	3n	"	"	6
		YY9	3n	"	"	6
		YY10	3n	"	"	5
		YY11	3n	"	"	12
		YY12	3n	"	"	12
		YY13	3n	"	"	19
		YY14	3n	"	"	19
		YY15	3n	"	"	19
		YY16	3n	"	"	8
		YY17	3n	"	"	12
		YY18	3n	"	"	12
		YY19	3n	"	"	34
		YY20	3n	"	"	5
		YY21	3n	"	"	12
		YY22	3n	"	"	12
		YY23	3n	"	"	11
		YY24	3n	"	"	12

表2の続き2

種類	学名	サンプル名	倍数性	性	採取地	HT※1
ギンブナ	<i>Carassius auratus langsdorfi</i>	YY25	3n	雌	山梨県八代町笛吹川	12
		YY26	3n	"	"	20
		H1	3n	不明	神奈川県平塚市小出川	39
		H2	3n	不明	"	8
		H3	3n	不明	"	48
		H4	2n	不明	"	2
		H5	4n	不明	"	3
		H6	4n	不明	"	3
		H7	2n	不明	"	28
		H8	3n	不明	"	8
		H9	3n	不明	"	3
		H10	4n	不明	"	3
		H12	3n	不明	"	48
		H13	3n	不明	"	48
		Suwa4	3n	不明	長野県諏訪湖	34
		Suwa6	3n	不明	"	34
		Suwa7	3n	不明	"	34
		Suwa8	3n	不明	"	34
		Suwa10	3n	不明	"	34
Suwa11	3n	不明	"	34		
2000小	4n	不明	神奈川県平塚市渡田川	3		
1992鯉奇形	4n	不明	"	2		

表2の続き3

種類	学名	サンプル名	倍数性	性	採取地	HT※1
ギベリオブナ	<i>Carassius auratus gibelio</i>	S2210	3n	不明	ロシア (バイカル湖)	不明
中国普通鮒	<i>Carassius auratus auratus</i>	F42	2n	不明	中国 (雲南省昆明地)	CH4
		F41	2n	不明	中国 (雲南省昆明地)	CH3
		E2	3n	不明	中国 (雲南省Jiangchuan)	CH7
		B20	3n	不明	中国 (雲南省昆明)	CH5
		B24	3n	不明	中国 (雲南省昆明)	CH6
ゲンゴロウブナ	<i>Carassius auratus cuvieri</i>	G20	2n	雌	不明	37
		Biwa13	2n	"	滋賀県琵琶湖	36
ナガブナ	<i>Carassius auratus burgeri</i>	Naga-1	3n	雌	宮城県	33
ニゴロブナ	<i>Carassius auratus grandoculis</i>	Biwa2	2n	雌	滋賀県琵琶湖	30
		Biwa11	2n	"	"	32
		Biwa17	2n	雄	"	31
		Biwa21	2n	"	"	22
キンブナ	<i>Carassius auratus subsp.</i>	Jo-キン3	2n	不明	群馬県城沼	6
		Jo-キン4	2n	不明	"	6
キンギョ	<i>Carassius auratus auratus</i>	キン1	2n	雄	観賞魚店にて購入	不明
		キン4	2n	"	"	不明
コイ	<i>Cyprinus carpio</i>	G32	2n	雄	不明	不明
		G17小	2n	不明	不明	不明
オランダ産フナ	-	1	2n	不明	オランダ (De Hell自然保護区)	NL1
		3	2n	不明	"	NL1

※1 ミトコンドリアDNAのD-loop領域の塩基配列のハプロタイプを示す

表3 使用したselective primerの塩基配列

プライマー名	配列 (5'→3')
selective primer 1	<i>Eco</i> R I -ACT
	GACTGCCGTACCAATTCACT
selective primer 2	<i>Mse</i> I -CTT
	GATGAGTCCTGAGTAACTT
selective primer 3	<i>Eco</i> R I -AAC
	GACTGCCGTACCAATTCAAC
selective primer 3	<i>Mse</i> I -CTA
	GATGAGTCCTGCCGTAACATA
selective primer 3	<i>Eco</i> R I -ACA
	GACTGCCGTACCAATTCAACA
selective primer 3	<i>Mse</i> I -CTG
	GATGAGTCCTGAGTAACTG

表4 作製した特異的プライマーについて

作製に使用した selective primer名	No.	作製したプライマー名	配列 (5'→3')	対応するプライマーの No.	特徴的な増幅産物の 有無
selective primer 1	1	Y6-6-FW-ACT	GACTGCGTACCAAATTCACCTA	2, 3	-
	2	Y6-6-RV-ACT	TCTACATGAAGATCCGGTGC	1	-
	3	Y6-6-RV-ACT-2	AACTGTCAAGTTCTGCGTAT	1	-
	4	Y6-25-FW-ACT	CAAACTTGACAGACCCGAACA	5	-
	5	Y6-25-RV-ACT	CTGCGTACCAAATTCACCTCACAC	4	-
	6	Y6-25-FW-ACT-2	ACTTGACAGACCCGAACACTG	7	-
	7	Y6-25-RV-ACT-2	CATCAATACAGACGCTGCTCC	6	-
	8	Y6-22-FW-ACT	ACTTACTAATCACAGAACCG	9, 10	-
	9	Y6-22-RV-ACT	GAACAGTTAAAACCTTGCAGC	8	-
	10	Y6-22-RV-ACT-2	ACTGCGTACCAAATTCACCTTA	8	-
	11	Y6-21-FW-ACT	AAACAGGAGTCCTCTCTGGGCTG	12	-
	12	Y6-21-RV-ACT	GGATTAGGGCCAACTACCATCAC	11	-
selective primer 2	13	Y2-13-FW-AAC	ACTGCGTACCAAATTCAACTGATA	14	-
	14	Y2-13-RV-AAC	GGCTGTTGCACCTGGAAGATAAAC	13	-
	15	Y2-5-FW-AAC	CGCATTTCGATTATTGTG	16	-
	16	Y2-5-RV-AAC	ACATTTAGCCGTGAAACT	15	-
	17	Y2-1-FW-AAC	AAATGGGAAAATAGCGGGAGG	18	-
	18	Y2-1-RV-AAC	GAACTTCTAATGGGCTCCGA	17	-
	19	Y2-1-FW-AAC-2	ATCAGAGAACATAGCATCA	20	-
	20	Y2-1-RV-AAC-2	TAGCACAGTTTATTGACA	19	-
	21	Y2-8-FW-AAC	GCGGGTTTATTATTAGGTG	22	-
	22	Y2-8-RV-AAC	CAATCGAGTAAACGGCTTGCT	21	-
	23	Y2-18-FW-AAC	GCCACGCAGTTACCACAAAAA	24	-
	24	Y2-18-RV-AAC	ATCATCATCTCTAAGTGGCA	23	-

表4の続き

作製に使用した selective primer名	No.	作製したプライマー名	配列 (5'→3')	対応するプライマーの No.	特徴的な増幅産物の有無	
selective primer 2	25	Y3-23-FW-AAC	GCAGGAAGAAAACCCAAAGT	26	-	
	26	Y3-23-RV-AAC	CTGCGTACCAATTCAACA	25	-	
	27	Y5-300-3-FW-AAC	GACTGCGTACCAATTCAACA	28	-	
	28	Y5-300-3-RV-AAC	GGATCATACAAGTAGGCCAC	27	-	
	29	Y5-300-10-FW-AAC	CCAAATTC AAC CAGGCTCCTA	30	-	
	30	Y5-300-10-RV-AAC	AAGAGTCATGCACACACCTCCAT	29	-	
	31	Y5-300-12-FW-AAC	GACTGCGTACCAATTCAACT	32	-	
	32	Y5-300-12-RV-AAC	TCCTGAGTAACTATTGCAGC	31	-	
	33	Y5-600-3-FW-AAC	TTACCATCGCAAAAGCCCACA	34	-	
	34	Y5-600-3-RV-AAC	GCGTACCAATTCAACCGAAG	33	-	
	35	Y5-600-15-FW-AAC	CAGGAAAGGCAGTACAGCGT	36	-	
	36	Y5-600-15-RV-AAC	AGTGGGCACCTCCGAACCGA	35	-	
	selective primer 3	37	Y6-2-FW-ACA	CTGCGTACCAATTCAACAGACA	38	-
		38	Y6-2-RV-ACA	TTTGGCTACAAGTCAATTACACA	37	-
39		Y6-2-FW-ACA-2	TCACAGACAGTTTCAGTTGGA	40	-	
40		Y6-2-RV-ACA-2	TTGGCTACAAGTCAATTACA	39	-	
41		Y2-16-FW-ACA	GAGCTTCCCAGCATGACATC	42	○	
42		Y2-16-RV-ACA	AAGGTTTCTCTATGAGACCG	41	○	
43		Y2-2-FW-ACA	TCTCACTTGCTGCATTTGAA	44	-	
44		Y2-2-RV-ACA	ATAGCACTGATACCTCCAC	43	○	

表5 調べたクローン数について

selective primer 名	サンプル名	倍数性	調べたクローン数	独立したクローン数	共通したクローン数	共通したクローン数	個体間で共通した配列数	3倍性ギンブナに特有と思われた配列数
selective primer 1	Yo2	3n	21	14	7	5		
	Yo6	3n	31	18	13	5	5	
selective primer 2	Yo2	3n	21	13	8	4		
	Yo3	3n	22	10	12	7	4	
	Yo5	2n	25	10	15	6		
selective primer 3	Yo7	2n	25	9	16	7		
	Yo2	3n	20	8	12	7		
	Yo6	3n	14	7	7	5	5	
total			129	70	59	33	14	

表6 プライマー作製時に使用したクローン塩基配列の相同性検索の結果

selective primer名	使用したクローン名	Accession No.	相同性のあった配列
selective primer 1	Y6-6	BX004865	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-204E13, complete sequence
		AL954181	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-216B1, complete sequence
	Y6-25	BX890629	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-42G2, complete sequence
		AC146193	<i>Pan troglodytes</i> BAC clone CH251-483N24 from Y, complete sequence
		AF315553	<i>Homo sapiens</i> PRKY gene, partial sequence, in clone Y813, complete sequence
		BS000534	<i>Pan troglodytes</i> chromosome Y clone:PTB-092H12, complete sequence
		BX004888	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-286F18 in linkage group 14, complete sequence
		AC137744	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) chromosome 11 BAC clone OSJNBa0074L11, complete sequence
		AC146765	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) chromosome 11 plasmid clone B1008D06_A01, complete sequence
		NG_001891	<i>Mus musculus</i> olfactory receptor MOR177-13P(MOR177-13P) pseudogene on chromosome 2
selective primer 2	Y2-13	XM_230160	<i>Rattus norvegicus</i> similar to olfactory receptor MOR177-4, mRNA
		AY073438	<i>Mus musculus</i> olfactory receptor MOR177-4 gene, complete cds
	Y2-5	AL929568	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-59K8, complete sequence
		AC114652	<i>Mus musculus</i> chromosome 18, clone RP24-156O17, complete sequence
		AC093368	<i>Homo sapiens</i> chromosome 8 clone RP11-783P22, complete sequence
		BX649371	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-163G19 in linkage group 3, complete sequence
		BX511135	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-134D21 in linkage group 5, complete sequence
		AC069545	<i>Homo sapiens</i> chromosome 10 clone RP11-478B11, complete sequence
		AC074322	<i>Homo sapiens</i> chromosome 10 clone RP11-168O22, complete sequence
		BX247946	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-231B5 in linkage group 14, complete sequence
Y2-8	AL935131	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-276G21, complete sequence	
	BC047177	<i>Danio rerio</i> similar to cysteine-rich hydrophobic domain 2, mRNA, complete cds	
	BX088715	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-194B1 in linkage group 3, complete sequence	
	AY335181	<i>Maltus pumila</i> clone CAS-346 molecular marker linked to columnar gene sequence	
		AY263328	<i>Pimpinella brachycarpa</i> clone 287 AELP mRNA sequence

表6の続き1

selective primer名	使用したクローン名	Accession No.	相同性のあった配列	
selective primer 2	Y3-23	AC009600	<i>Homo sapiens</i> 2 BAC RP11-436K12(Roswell Park Institute Human BAC Library) complete sequence	
		AC138655	<i>Homo sapiens</i> 2 BAC clone RP11-436K12 from 2, complete sequence	
		AC093876	<i>Homo sapiens</i> BAC clone RP11-631I21 from 4, complete sequence	
	Y5-300-3	AY520581	<i>Rumex acetosa</i> RADAX-172 marker sequence	
		AY654005	<i>Pennisetum monodon</i> clone AFE19M19 sex and growth traits AFLP marker sequence	
	Y5-300-10	AL935148	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-196G in linkage group 8, complete sequence	
		BX088653	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-1202F3 in linkage group 23, complete sequence	
	Y5-300-12	AL954649	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-285P11, complete sequence	
		BX537270	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-378E24 in linkage group 4, complete sequence	
	Y5-600-3	BX323873	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-133L21 in linkage group 19, complete sequence	
		NM_012508	<i>Rattus norvegicus</i> ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 2 (Atp2b2), mRNA	
	Y5-600-15	NM_009723	<i>Mus musculus</i> ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 2 (Atp2b2), mRNA	
		AL929829	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-15F21, complete sequence	
	selective primer 3	Y6-2	BX855613	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-208F21 in linkage group 14, complete sequence
			BX004865	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-204E13, complete sequence
Y2-16		AL954181	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-216B1, complete sequence	
		AL954842	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-33E5 in linkage group 8, complete sequence	
Y2-2		AC117391	<i>Homo sapiens</i> 3 BAC RP11-3115 (Roswell Park Institute Human BAC Library) complete sequence	
		BC000825	<i>Homo sapiens</i> hypothetical protein LOC339524, mRNA (cDNA clone IMAGE:3454279), partial cds	
Y2-2		AC093155	<i>Homo sapiens</i> chromosome 1 clone RP11-384B12, complete sequence	
		D88193	<i>Brassica rapa</i> DNA for S-receptor kinase, complete cds	
		BX000437	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-10605 in linkage group 5, complete sequence	
		AJ606888	<i>Actinidia deliciosa</i> AFLP fragment P619	
		AC132810	<i>Homo sapiens</i> chromosome 3 clone RP11-134J14, complete sequence	

表6の続き2

selective primer名	使用したクローン名	Accession No.	相同性のあった配列
selective primer 3	Y2-2 Y600	BX119987	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-242G16 in linkage group 19, complete sequence
	※1	AL773598	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-207G4, complete sequence
	Y2-2 N600	AC079743	<i>Homo sapiens</i> BAC clone CTD-2323E18 from 7, complete sequence
	※2	AF532579	<i>Notropis mekistocholas</i> clone 4F4 microsatellite sequence
		BX572621	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-34E22 in linkage group 5, complete sequence
		BX469933	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-207E19 in linkage group 4, complete sequence
		BX677676	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-12A9 in linkage group 2, complete sequence

※1 Y2-2プライマーによって増幅された3倍性ギンブナ (YY1) における600bpバンドを示す

※2 Y2-2プライマーによって増幅されたナガブナ (Naga-1) における600bpバンドを示す

表7 Y2-2プライマーによる結果

種類	HT ※1	サンプル名	性	1.5%アガロースゲル		その他※2
				300bpバンド	350bpバンド	
2倍体ギンブナ	2	H4	不明	-	○	
	28	H7	不明	○	○	
	57	Yo1	雌	-	○	
		Yo4	雄	-	○	
		Yo7	雌	-	○	
		YA3	雄	-	○	
		YA7	"	-	○	
	63	YA2	雄	-	○	
	81	Yo5	雌	-	○	
		YA4	雄	-	○	
3倍体ギンブナ	57	Yo2	雌	○	○	
		Yo3	"	○	○	
		YA1	"	-	○	
		YA6	"	○	○	
		YA11	"	○	○	
		YA16	"	○	○	
	63	Yo6	雌	-	○	
		YA13	"	-	○	
	29	YA5	雌	○	○	
		YA12	"	○	○	
YA15		"	○	○		
20	YA8	雌	○	○		
	YA10	"	○	-		
	YA14	"	○	-		
18	YA9	雌	○	○		

表7の続き1

種類	HT ※1	サンプル名	性	1.5%アガロースゲル		
				300bpバンド	350bpバンド	
3倍性ギンブナ	39	H1	不明	○		
	48	H3	不明	○		
		H12	不明	○		
		H2	不明	○		
	8	H8	不明	○		
		YY1	雌	○		
	6	YY8	"	○		
		H9	不明	○		
	3		不明	○		
	34	Stwa4	不明	○		
4倍性ギンブナ	3	H5	不明	○		
		H6	不明	○		
		H10	不明	○		
		2000小	不明	○		
	2	1992 鯉奇形	雌	○		
	ギベリオブナ		SI2210	不明	○	
		2倍体中国普通鮎	F42	不明	○	
F41			不明	○		
3倍性中国普通鮎	CH7	E2	不明	○		
	CH6	B24	不明	○		
	CH5	B20	不明	○		
	キンギョ	キン1	雄	○		
		キン4	"	○		
オランダ産フナ	NL1	1	不明	○		
		3	不明	○		

その他※2

600bp○
600bp○

表7の続き2

種類	HT ※1	サンプル名	性	1.5%アガロースゲル	
				300bpバンド	350bpバンド
コイ	不明	G32	雄	-	-
ゲンゴロウブナ	37	G20	雌	○	-
	36	Biwa13	"	○	-
	33	Naga-1(3n)	雌	○	600bp○
ニゴロブナ	30	Biwa2	雌	-	○
	32	Biwa11	"	-	○
	31	Biwa17	雄	-	○
	6	Jo-キン4	不明	○	600bp○

※1 ミトコンドリアDNAのD-loop領域の塩基配列のハプロタイプ

※2 その他に見られたバンド

表8 Y2-2プライマーによって増幅される各配列の相同性 (%)

Y2-2	2n 350	3n 350	NGR 350	2n H7 300	3n Y2 300	Si 300	3n E2 300	S4 300	GRB 300	EU 300
2n 350		100.0	97.5	81.5	80.7	80.7	79.2	81.0	81.2	81.5
3n 350			97.5	81.5	80.7	80.7	79.2	81.0	81.2	81.5
NGR 350				82.9	82.1	82.1	80.3	82.3	82.3	81.9
2n H7 300					99.0	99.0	97.1	98.4	92.8	93.8
3n Y2 300						100.0	96.7	97.4	92.5	94.2
Si 300							96.7	97.4	92.5	94.2
3n E2 300								95.1	89.9	90.9
S4 300									92.2	93.8
GRB 300										95.8
EU 300										

※

2n 350 (2倍体ギンブナ、サンプル名Yo1)、3n 350 (3倍体ギンブナ、Yo2)、NGR 350 (ニゴロブナ、Biwa11)は1.5%アガロースゲル350bpバンド、
 2n H7 300 (2倍体ギンブナ、H7)、3n Y2 300 (Yo2)、Si 300 (ギベリオブナ)、3n E2 300 (3倍体中国普通鱈、E2)、
 S4 300 (長野県産3倍体ギンブナ、Suwa4)、GRB 300 (ゲンゴロウブナ、G20)、EU 300 (オランダ産フナ、Fナ1) は300bpバンドを示す。

表9 Y2-16プライマーによる結果

種類	HT※1	サンプル名	性	1.5%アガロースゲル		
				250bpバンド	260bpバンド	270bpバンド
2倍体ギンブナ	2	H4	不明	○	-	-
		H7	不明	○	-	-
	57	Yo1	雌	○	-	-
		Yo4	雄	○	-	-
		Yo7	雌	○	-	-
	63	YA3	雄	○	-	-
		YA7	"	○	-	-
	81	YA2	雄	○	-	-
		Yo5	雌	○	-	-
			YA4	雄	○	-
Yo2			雌	○	-	○
3倍体ギンブナ	57	Yo3	"	○	-	○
		YA1	"	○	-	○
	5	YA6	"	○	-	○
		YA11	"	○	-	○
		YA16	"	○	-	○
	63	YY10	雌	○	-	○
		YY20	"	○	-	○
	19	Yo6	雌	○	-	○
		YA13	"	○	-	○
			YY3	雌	○	-
YY4			"	○	-	○
YY5			"	○	-	○

表9の続き1

種類	HT※1	サンプル名	性	1.5%アガロースゲル		
				250bpバンド	260bpバンド	270bpバンド
3倍性ギンブナ	19	YY7	雌	○	-	○
		YY13	"	○	-	○
		YY14	"	○	-	○
		YY15	"	○	-	○
		YA5	雌	○	-	○
	29	YA12	"	○	-	○
		YA15	"	○	-	○
		YY6	雌	○	-	○
	2	YY2	雌	○	-	○
		YY11	"	○	-	○
	12	YY12	"	○	-	○
		YY17	"	○	-	○
		YY18	"	○	-	○
		YY21	"	○	-	○
		YY22	"	○	-	○
		YY24	"	○	-	○
		YY25	"	○	-	○
		YA8	雌	○	-	○
		YA10	"	○	-	○
		YA14	"	○	-	○
18	YY26	"	○	-	○	
	YA9	雌	○	-	○	
11	YY23	雌	○	-	○	

表9の続き2

種類	HT※1	サンプル名	性	1.5%アガロースゲル		
				250bpバンド	260bpバンド	270bpバンド
3倍性ギンブナ	6	YY1	雌	○	-	-
		YY8	"	○	-	-
		YY9	"	○	-	-
	39	H1	不明	-	○	-
		H3	不明	-	○	-
		H12	不明	-	○	-
	8	H2	不明	-	○	-
		H8	不明	-	○	-
		YY16	雌	-	○	-
	3	H9	不明	-	○	-
		YY19	雌	-	○	-
	34	Suwa4	不明	-	○	-
4倍性ギンブナ	3	H5	不明	-	○	-
		H6	不明	-	○	-
		H10	不明	-	○	-
		2000小	不明	-	○	-
		1992 鯉奇形	不明	○	-	○
	2					
ギベリオブナ	不明	S2210	不明	-	○	○
キンギョ	不明	キン1	雄	-	○	-
		キン4	"	-	○	-
2倍体中国普通鮒	CH4	F42	不明	-	○	-
	CH3	F41	不明	-	○	-

表9の続き3

種類	HT※1	サンプル名	性	1.5%アガロースゲル		
				250bpバンド	260bpバンド	270bpバンド
3倍性中国普通鮒	CH7	E2	不明	-	○	-
	CH5	B20	不明	-	○	-
	CH6	B24	不明	-	○	-
オランダ産フナ	NL1	1	不明	-	○	-
		3	不明	-	○	-
コイ	不明	G17小	不明	○	-	-
ゲンゴロウブナ	37	G20	雄	-	○	-
	36	Biwa13	"	-	○	-
ナガブナ	33	Naga-1(3n)	不明	-	○	-
ニゴロブナ	32	Biwa11	雌	-	○	-
	31	Biwa17	雄	-	○	-
キンブナ	6	Jo-キン4	不明	-	-	-
		Jo-キン3	不明	-	-	-

※1 ミトコンドリアDNAのD-loop領域の塩基配列のハプロタイプ

表10 Y2-16プライマーによって増幅される各配列の相同性 (%)

Y2-16	Carp 250	2n Y1 250	3n Y2 250	3n H2 260	Su4 260	Si 260	EU 260	GRB 260	G1 260	B24 260	3n Y2 270	Si 270
Carp 250		82.7	82.7	83.5	82.7	80.8	79.6	83.9	83.1	83.1	83.1	82.4
2n Y1250			100.0	97.6	99.2	93.7	91.0	97.6	96.4	96.4	96.4	97.2
3n Y2 250				97.6	99.2	93.7	91.0	97.6	96.4	96.4	96.4	97.2
3n H2 260					97.6	93.7	92.5	97.6	96.5	96.5	96.5	97.3
Su4 260						93.7	91.0	97.6	96.4	96.4	96.4	97.2
Si 260							86.7	92.9	94.9	95.7	95.7	98.4
EU 260								91.8	90.6	90.6	91.0	90.6
GRB 260									95.7	95.7	95.7	96.4
G1 260										99.2	99.2	97.6
B24 260											100.0	98.4
3n Y2 270												99.2
Si 270												

※

Carp 250 (コイ、サンプル名G17小)、2n Y1 250 (2倍体ギンブナ、Yo1)、3n Y2 250 (3倍体ギンブナ、Yo2) はアガロースゲル250bpバンド
 3n H2 260 (3倍体ギンブナ、H2)、Su4 260 (長野県産3倍体ギンブナ、Suwa4)、Si 260 (ギベリオブナ)、EU 260 (オランダ産フナ、フナ1)、
 GRB 260 (ゲンゴロウブナ、G20)、G1 260 (キンギョ、キン1)、B24 260 (3倍体中国普通鯉、B24) は260bpバンド、
 3n YY3 270 (3倍体ギンブナ、YY3)、3n Y2 270、Si 270は270bpバンドを示す。

表11 Y2-16プライマーによるPCR産物を7.5%ポリアクリリルアミドゲルで泳動した結果

種類	HT ※1	サンプル名	7.5%アクリルアミドゲル			1.5%アガロースゲル		
			150bp	130bp	200bp	250bp	260bp	270bp
2倍性ギンブナ	57	Yo1	○	—	—	○	—	—
	57	Yo2	○	○	—	○	—	○
3倍性ギンブナ	29	YA5	○	○	—	○	—	○
	20	YA8	○	○	—	○	—	○
	39	H1	—	○	—	—	○	—
	8	H2	—	○	○	—	○	—
4倍性ギンブナ	48	H3	—	○	—	—	○	—
	34	YY19	—	○	多数	—	○	—
	11	YY23	○	—	多数	○	—	○
	18	YA9	—	○	—	○	—	○
	12	YY2	○	○	—	○	—	○
	5	YY20	○	—	○	○	—	○
	3	H5	—	○	多数	—	○	—

※1 ミトコンドリアDNAのD-loop領域の塩基配列のハプロタイプを示す。

表12 mtDNAとAFLPマーカーによる解析の結果のまとめ

種類	mtDNAによる母系起源			AFLP Y2-2プライマーによる結果※1		AFLP Y2-16プライマーによる結果※2			タイプ	頻度 (%)	
	2倍体ギンブナ 由来	中国普通鮡 由来	ギベリオブナ 由来	2倍体ギンブナ 由来	その他の亜種 由来	ギベリオブナ 由来	その他の亜種 由来	ギベリオブナ1 由来			ギベリオブナ2 由来
2倍体ギンブナ	○			○		○					90
	○			○	○	○					10
3倍体ギンブナ	○			○		○			○		43.5
			○					○			4.4
	○					○			○		8.7
	○			○					○		13
	○			○				○			21.8
	○				○					○	8.6
4倍体ギンブナ	○			○		○			○		20
			○			○				○	80
ギベリオブナ			○						○		
中国普通鮡		○			○						
ギンギョ		○			○						

※1 2倍体ギンブナは350bpバンド、ギベリオブナは300bpバンドの有無を示す。その他の亜種はギベリオブナの300bpバンドとは異なる300bpバンドを持つ場合を表す。

※2 2倍体ギンブナは250bpバンド、ギベリオブナ1は260bpバンド、ギベリオブナ2は270bpバンドの有無を示す。
その他の亜種は260bpバンドのうち3倍体ギンブナ、ギベリオブナ以外に見られた260bpバンドを持つ場合、ギンブナは増幅しないバンドを持つ場合を表す。

謝辞

本論をまとめるにあたり、終始懇切なる御指導と御助言を賜りました麻布大学解剖学第二研究室および分子生物学研究室、有嶋和義教授、解剖学第一研究室、浅利昌男教授、生理学第一研究室、西田利穂教授ならびに藤谷英男麻布大学名誉教授に深く感謝の意を表します。

本研究を行なうにあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました麻布大学分子生物学研究室、村上賢助教授に心より感謝いたします。

本研究を行なうにあたり、多大な御指導と御協力を頂いた分子生物学研究室の皆様には厚く御礼申し上げます。最後に、学生生活を支えてくれた母、祖父、祖母に感謝いたします。