

ギバチの地理的集団間にみられた 染色体と酵素分子型の多型現象

上野 紘一

(1974年5月18日受領)

Chromosomal Polymorphism and Variant of Isozymes in Geographical Populations of *Pseudobagrus aurantiacus*, Bagridae

Koichi UENO

Two populations of *Pseudobagrus aurantiacus* (Temminck and Schlegel) are discontinuously distributed in Kyushu and the districts from Kanto north. These two geographically isolated populations were analyzed karyologically as well as biochemically.

Distinct differences in the karyotypes were observed between two populations indistinguishable in the morphological characters. The karyotype of the Kyushu population has a diploid number of 48 consisted of 10 metacentrics, 6 submetacentrics and 8 telo- and subtelocentrics. While, the karyotype of northern population invariably has 56 chromosomes including 12 metacentrics, 6 submetacentrics and 10 telo- and subtelocentrics.

Lactate dehydrogenase was separated into five major components in the respective population. The results of subunit-dissociation and recombination test with salt solution indicated that the five isozymes are tetramers composed of two subunits encoded in two different loci, A and B. The electrophoretic mobilities of LDH-B isozymes were clearly different between the two populations, the northern population has a markedly fast anodally migrating LDH-B isozyme. Also, esterase of each population is different in the number of components, activity, and mobility.

(Department of Fishery, Faculty of Agriculture, Kinki University, Higashi-Osaka, 557, Japan)

ギギ科魚類の1種ギバチ *Pseudobagrus aurantiacus* (Temminck and Schlegel)は、日本の関東地方以北と、九州西部・南部に不連続に分布し、生物地理学的に興味をもたれている。著者は魚類の細胞遺伝学的研究の一環として本種の核型分析を行なったところ、この2地域のギバチの間に極端な染色体多型がみられ、また、乳酸脱水素酵素とエステラーゼのアイソザイムにも差異があることをみいだした。核型とアイソザイムの変化は種分化と関連をもつと考えられており、ギバチのこうした相異は本種の特異な分布や、2つの地域的集団の分類学的位置を思考する上に意義あるものと思われた。したがって、これらの点について若干の議論をこころみる。

実験方法

供試魚は岩手県北上川、千葉県小櫃川、東京都多摩川および熊本県菊池川の各河川から採集した。それらの詳細は形態的形質の測定値と共に Table 1 に示す。

染色体の観察標本は、air-drying 法で作製した。すなわち、腎臓と脾臓の単離細胞をコルセミッド $1\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む生理的塩類溶液中に懸濁させ、 0.045 M 塩化カリウム溶液で低調処理した。固定はカルノア液(酢酸 1:メチルアルコール 3)を数回とりかえることにより行ない、標本の染色にはギムザ液を用いた。染色体数は、中期核板のうちから、染色体がいちぢるしく四散・重複するものを除いてすべて計数した。また、核型の形態的分析にはそれらのうちから良好な数例を選んだ。形態的区分は Levan ら (1964) にしたがって、動原体の位置から腕比 1.7 までを中部着糸型、3 までを次中部着糸型としたが、次端部着糸型(腕比 7 まで)と端部着糸型(腕比 7 以上)は短腕の確認と測定がむずかしく両者を1群にまとめた。

乳酸脱水素酵素 (LDH) とエステラーゼのアイソザイムはポリアクリルアミド薄層電気泳動法(ゲル濃度 5 %, 層板 2 mm)によって分析した。LDH は pH 8.3

Table 1. Counts and proportional measurements of *Pseudobagrus aurantiacus* used for analysis.

Locality	Individual No.	Sex	B.L. (mm)	B.L.	Head	L.C.P.**	P.D.***	Fin counts				Gill-reker	Vertebrae
				Head	D.E.*	D.C.P.	A.D.	D.	P.	V.	A.		
Kyushu	K- 1	F	137.5	4.5	6.4	1.9	2.3	I ,6	I ,7	6	18	21	3+ 7=10 15+27=42
	K- 2	F	137.6	4.6	6.8	1.9	2.2	I ,6	—	6	18	21	3+ 9=12 14+27=41
	K- 3	F	144.6	4.5	6.1	1.8	2.1	I ,6	I ,7	6	19	22	4+ 9=13 14+29=43
Kumamoto pref. (The Kikuchi river)	K- 4	F	156.5	4.8	7.0	2.0	2.2	I ,6	—	6	18	20	3+10=13 12+28=40
	K- 5	F	161.5	4.7	6.8	1.7	2.5	I ,6	I ,7	5	18	21	4+ 9=13 15+30=45
	K- 6	F	173.4	4.8	7.2	2.1	2.6	I ,6	I ,7	6	19	19	3+ 8=11 14+30=44
	K- 7	F	202.5	4.7	7.1	2.0	2.7	I ,6	I ,7	6	19	20	3+ 9=12 15+30=45
	K- 8	F	203.5	4.9	7.2	2.4	2.4	I ,6	I ,7	6	18	20	3+ 9=12 14+28=42
	K- 9	M	124.2	4.3	6.4	2.0	2.3	I ,6	—	6	18	19	4+ 8=12 14+30=44
	K-10	M	184.5	5.4	7.0	2.8	2.7	I ,6	I ,7	6	18	21	3+ 9=12 14+30=44
	K-11	M	208.2	5.0	6.5	2.6	2.5	I ,6	I ,7	6	17	19	4+ 7=11 13+29=42
From Kanto north	T- 1	F	99.1	4.1	6.0	2.0	2.1	I ,6	I ,7	6	18	20	3+ 7=10 15+30=45
Tokyo pref. (The Tama river)	T- 2	F	164.2	4.7	6.7	1.9	2.4	I ,6	I ,7	6	17	20	3+ 6= 9 12+30=42
	T- 3	M	121.6	4.2	6.7	1.9	2.1	—	I ,7	6	19	20	3+ 8=11 15+30=45
	T- 4	M	136.2	4.1	6.6	1.9	2.2	I ,6	I ,7	6	18	21	3+ 7=10 14+29=43
	T- 5	—	66.0	4.1	5.7	1.7	1.9	I ,6	I ,7	5	18	20	3+ 8=11 14+30=44
Chiba pref. (The Obitsu river)	C- 1	—	69.7	4.3	6.2	1.9	2.2	—	I ,6	6	18	18	2+ 7= 9 14+29=43
Iwata pref. (The Kitakami river)	I- 1	F	71.9	4.1	6.3	2.0	2.2	I ,6	I ,7	5	18	20	3+ 7=10 15+30=45
	I- 2	F	104.2	4.3	6.1	2.2	2.1	I ,6	I ,7	6	19	21	3+10=13 14+30=44
	I- 3	F	105.6	4.5	6.0	1.9	2.1	I ,6	I ,7	5	18	22	3+ 8=11 14+30=44

* Diameter of eye.

** Length of caudal peduncle/depth of caudal peduncle.

*** Distance from the origin of dorsal fin to the middle point of the crease at the caudal base/distances from the tip of snout to origin of dorsal fin.

トリス・クエン酸(ゲル調製用)一pH 8.2, $\mu=0.05$ 硼緩衝液(槽用)で分離し, 乳酸ナトリウム, ニトロブルーテトラゾリウム, β -DPN, PMS を含む pH 7.3 リン酸緩衝液中で検出した。エステラーゼは pH 7.4 トリス・クエン酸一pH 7.3, $\mu=0.05$ 磷酸緩衝液で泳動し, 非特異性エステラーゼは α -ナフチルアセテートのアセトン溶液とファーストブルー RR 塩を含む pH 7.3 磷酸緩衝液中で, また特異性エステラーゼは基質にトリプチリン, フェニルアセテート, メチル-n-ブチレートを用いて Ogita ら (1965) の pH-indicator 法でそれぞれ検出した。

試料には組織と血漿を用いた。組織は汎紙上で血液を除いて同量の水でホモジエナイズし, 10000 g で 15 分遠心分離して上澄を試料液とした。また, 血漿はヘパリン処理したガラス毛細管で動脈球から血液を採取した 5000 g で 10 分遠心して分離した。

サブユニットの分離と再結合は, 泳動ゲルから目的の成分を含んだゲル片を切りとり, リン酸緩衝液中に成分を溶出させ, この液をコロジオンバック (Sartorius Membranfilter) で吸引濃縮したのち, Markert (1963) の方法で処理した。

Table 2. Distribution of chromosome numbers in *P. aurantiacus* from Kyushu and from Kanto north.

Locality	Indiv- idual No.	Sex	Diploid chromosome number													No. of cells observed	
			42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	
Kyushu	K- 1	F	1	3	5	2	5	6	26								48
	K- 2	F				2	1	2	33	1							39
	K- 3	F				1	1		1	6							9
	K- 4	F	2	1	1			2		14							20
Kumamoto Pref.	K- 5	F						1	2	5							8
	K- 6	F	2	5	10	10	32	53	239								351
	K- 7	F	1	1	1			3	1	25							32
	K- 8	F	1		2			5	1	57							66
	K- 9	M		1	1	1	1	2	34								39
	K-10	M		1	1	4	1	5	64	1							77
	K-11	M		1	1	1	5	11	38								57
From Kanto north	T- 1	F							1					1	12		14
	T- 2	F												1	51		52
Tokyo Pref.	T- 3	M								1	1	2	1	4	17		26
	T- 4	M											2	2	46		50
	T- 5	—								1	1	1	2	3	47		55
Chiba Pref.	C- 1	—												1	28		29
Iwate Pref.	I- 1	F							1	1	2	3	5	31			43
	I- 2	F								1	4	3	7	8	161		184
	I- 3	F								1	1	1	4	4	109		116

結 果

核型分析

染色体数に関する観察結果は Table 2 に示す。また、それぞれの分裂中期像を Fig. 1 に、それらの分析結果を Fig. 2 に示した。関東地方以北のギバチの核型は $2n=56$ で、中部着糸型 12 対、次中部着糸型 6 対、次端部・端部着糸型 10 対で構成されている。第 21 染色体の動原体の近くに明瞭な 2 次狭窄がみられ、多くの場合、第 22, 28 染色体に付随体が観察される。一方、九州産の核型は $2n=48$ で、中部着糸型 10 対、次中部着糸型 6 対、次端部・端部着糸型 8 対で構成され、多くの場合、第 23 染色体に付随体が、また第 11, 17, 18 染色体の長腕には 2 次狭窄が観察される。両者の核型は、たがいに類似した中部着糸型の対をもち、端部着糸型のほぼ同大の対に付随体をもつなど類似する点があるが、すくなくとも関東以北産の第 19, 21 染色体および九州産の第 17, 18 染色体などはそれぞれの核型に固有のものである。核型は 2 つの地域的集團の間で明瞭に区別されるが、各集團内には多型がなく、両地域の個体を通じて両者の複合の核型をもつものもなかつた。

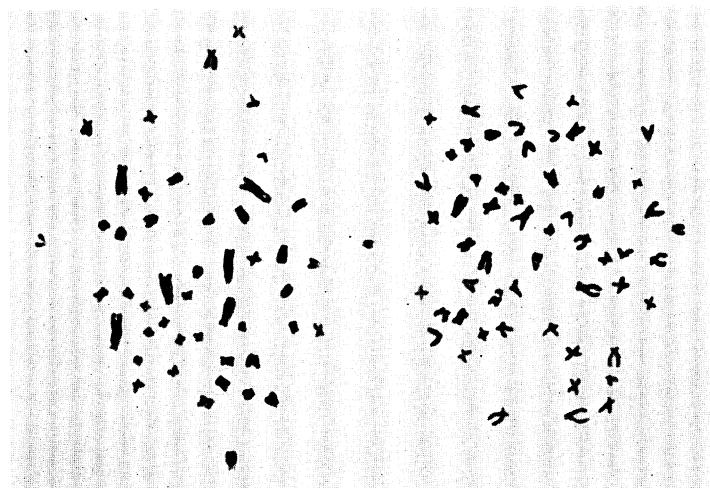


Fig. 1. Metaphase figures of kidney cells of *P. aurantiacus* from Kyushu (left) and from Kanto north (right).

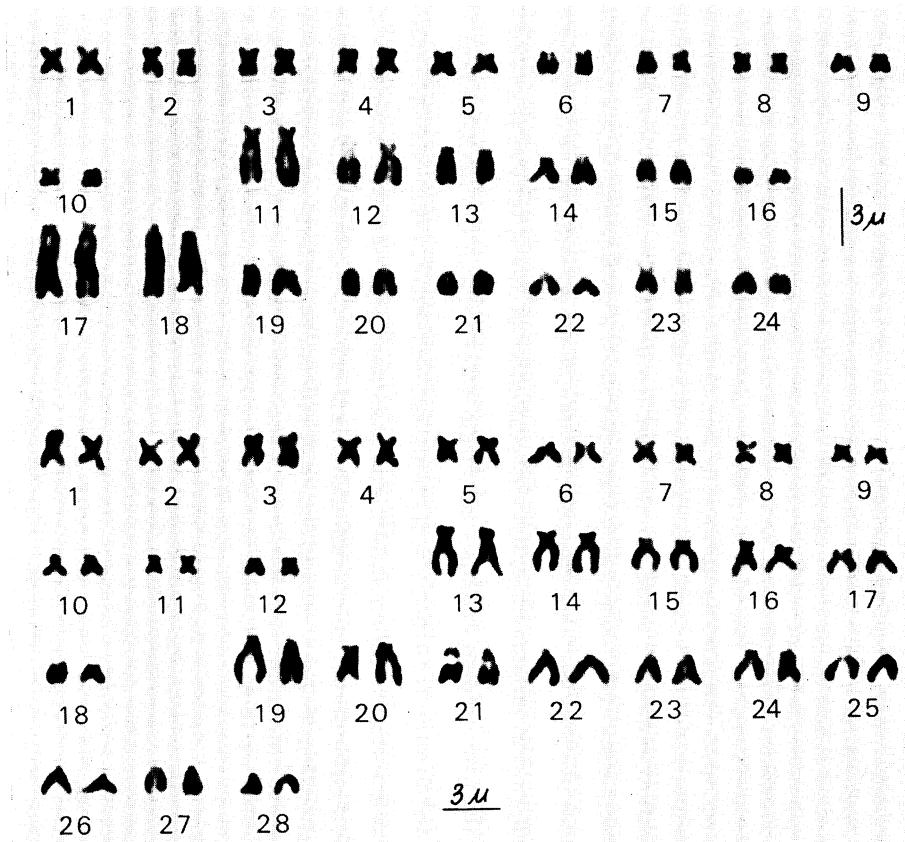


Fig. 2. Karyotypes of *P. aurantiacus* from Kyushu (top) and from Kanto north (bottom).

動原体融合・分離による Robertson 型の多型現象がマス類の *Salmo irideus*, *S. salar*, *Oncorhynchus nerka* から同一個体の同一臓器にみられているが (Ohno ら, 1965; Roberts, 1968; Fukuoka, 1972), 本研究においては、こうした様式の多型を観察できなかった。また、Robertson 結合と種分化との関連を論じた報告もあるが (Nygren, 1968; Rees, 1964; Roberts, 1968; Simon, 1963; Simon and Dollar, 1963; Uyeno, 1972), ギバチの異なる 2 つの核型はこうした様式の分化に由来するものでなく、より複雑な構造変化によってもたらされたと考えられた。なお、各集団において、染色体数は雌雄同数で形態的分化もみられなかった。

アイソザイム

関東地方以北と九州産ギバチの LDH は、体側筋、心筋、肝臓、腎臓の各組織および血漿を通じて 5 つの成分に分離された(最も陽極側へ移動した成分から 1-5 の番号を付した)。また多くの場合、九州産の肝臓組織からは、易動度において関東以北産の成分に類似した 1 つの付加的分画 (SF) がみとめられる。関東以北および九州産の、成分 1 と 5 をそれぞれ別々に、また成分 1 と 5 の混合物にサブユニットの分離・再結合処理をほどこすと、成分 1 と 5 の単独処理からはそれぞれの単一の成分が検出されるにすぎないが、1 と 5 の混合からは 1-5 のすべての分画が検出された。こうした点と、分画間の距離がひとしく、臓器特異性を示す点を合わせて、ギバチにおける LDH のサブユニット構成とその遺伝的支配は Markert (1963) のサブユニット仮説に適合するものと思われた。すなわち、アイソザイム分子は、それぞれ別の遺伝子に支配された 2 種類のサブユニットの 4 量体で、5 つのアイソザイムはサブユニットを A および B とすると、 A_4 , A_3B_1 , A_2B_2 , A_1B_3 , B_4 の構成をとる。

関東地方以北と九州産のパターンを比較すると、両者の LDH-5 は全く同じ易動度を示しているが、LDH-1 から LDH-4 にかけては明らかに易動度に差がみられ、九州産の易動度が小さい。これは B-サブユニットを支配する構造遺伝子に突然変異を生じたためと考えられる。なお、九州産ギバチの肝臓にみられる付加的分画 SF の性質については明らかにできなかった。関東地方以北と九州産の臓器における LDH 分布はたがいに類似しており、筋肉には LDH-5 が、肝臓では LDH-1 が主要な分布をしめ、心筋は LDH-2, 3, 4 が他にくらべて多く、逆に、腎臓と血漿は LDH-1, 5 が大部分で LDH-2, 3, 4 は少ない。

エステラーゼの比較には、試料に肝臓、筋肉および血漿をとりあげた。Fig. 4 に α -ナフチルアセテートを基質とする非特異性エステラーゼの泳動図を示す(以下、肝臓、筋肉および血漿をそれぞれ L, M, P と略記、成分番号は陽極側より付した)。この非特異的に検出される成分のうちで、特異的に、フェニルアセテートによって検出される成分は、関東以北産の L-2, M-5, P-1, 2、九州産の L-1, M-3, P-1, 2 であり、トリプチリンとメチル-n-ブチレートによって検出される成分は関東以北と九州産の P-1, 2 であった。両者のパターンを比較すると、易動度と活性の類似した分画もみられるが(関東以北産の L-2, 3, M-4, P-2

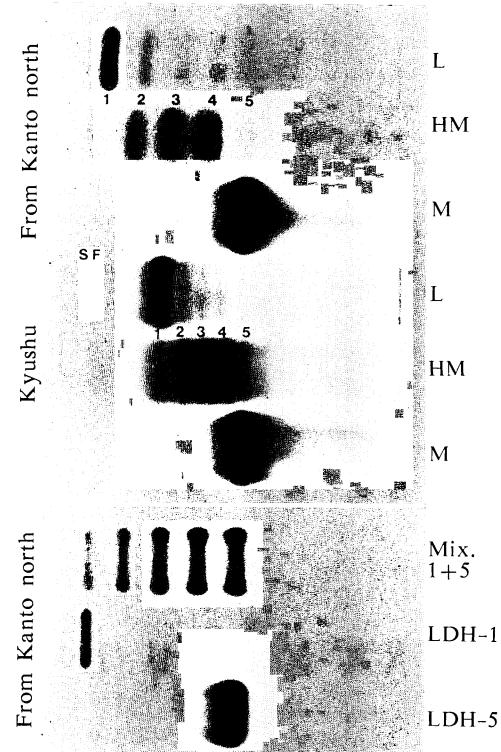


Fig. 3. Lactate dehydrogenase zymograms of *P. aurantiacus* by polyacrylamide thin layer electrophoresis. The structural gene which control B-subunit is different in populations from Kanto and Kyushu. The mixture of LDH-1 and LDH-5 (Mix. 1+5), after subunit-dissociation and recombination treatment, produced all the five isozymes. However, identical test of LDH-1 or LDH-5 alone gave only the original isozyme (LDH-1, LDH-5). L, HM and M stand for liver, heart muscle and muscle, respectively. The anode is to the left.

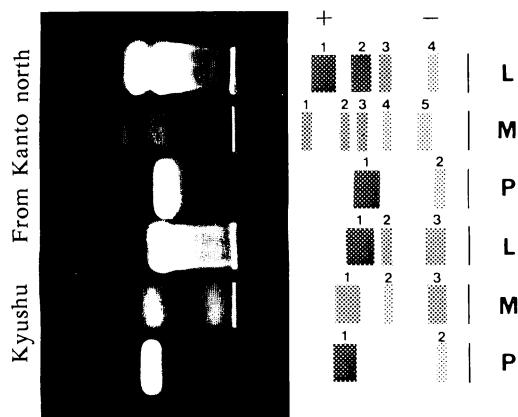


Fig. 4. Zymograms and diagrams of non-specific esterase of *P. aurantiacus* by polyacrylamide thin layer electrophoresis. Gel was stained in a reaction mixture containing α -naphthylacetate. L, M and P stand for liver, muscle and plasma, respectively. The anode is to left.

に対して、九州産の L-1, 2, M-3, P-2), 一方のみに検出される成分や(関東以北産の L-1, M-1), 基質特異性から、同一のエステラーゼ類に属すると思われるのもで易動度を異にするものなどがみられた(関東以北産の P-1, M-5 に対して九州産の P-1, M-4).

種内のアイソザイム変異については、いくつかの例が報告されている(Hodgins ら 1969, Numachi 1971, 1972 など)。それによると、同一種内の集団では、一般にもっている対立遺伝子は同じで、ただそれらの頻度が相異している。これに対してギバチの変異は九州と関東以北の地域で明瞭に区別されており、その遺伝的な差異は大きいと考えられる。

考 察

関東地方以北と九州産のギバチを形態的に比較すると、両者間に明瞭な差異はみられない(Table 1)。頭長比、眼径比、背鰭前部鰭底から尾鰭基底/背鰭前部鰭底から吻端、の各値にわずかな差異がみられるが、これらの値は成長に伴って変化しており(体長の大きな九州の個体においては値も大きくなっている)、それらはグラフ上にプロットした場合、1つの曲線上に分布する。また頭部の孔器の開口数とその位置についても調査したが両者に差異はみられなかった(左体側、眼上部4、眼下部から吻8、鰓蓋下頸部11)。以上のように観察した形態的形質からは、両者を区別できないが、先のように核学的、生化学的には明瞭に異なる。両者は、同一の祖先型の種から分化したか、あるいは

両者のうちで一方から他方へ分化したものと考えられ、形態的分化に先立ち生理的面の分化が先行した一例と理解される。両者の交配において、交配種 F_1 の生産は容易であると思われるが、2つの異なった半数の染色体組(haploid set)を持つ F_1 の生殖細胞における分裂が正常に進むかどうかは疑問である。種的特徴をどこにおくかは議論のある点であるが、もしも、交配種(F_1, F_2, \dots)に不穏や劣勢がみられるならば、両者は分類学的に種の段階で区別するのが適当と考える。

一方、ギバチの不連続分布と染色体の多型現象との間にも直接間接的関係が予想される。間接には、なんらかの要因で(生物的要因として、ギギ *Pelteobagrus nudiceps*とのすみわけが考えられる)2つの地域に隔離された両者が、その後、別々にあるいは一方のみ分化をとげたと考える場合である。また、直接的関連としては、核型分化が不連続分布を誘発させた場合であり、それには2つの方向が予想される。染色体多型のみられる種、種群において、それぞれの核型集団が生態的場や地域を異にする例が報告されているが(Yosida ら, 1971 a, b; White, 1968)、それらの集団は核型分化によってもらされた遺伝的変化によって生態的嗜好性を変えたと考えられる。ギバチの2つの集団がこうした理由によって分布を異にしているかどうかは推定の域を出ないが、核型の関連において興味深い。また先に、核型の相異から生理的不穏性を予想し、生殖的隔離の可能性について述べたが、こうしたことがみられるならば、異なる2つの型はたがいに別々の集団と分布域を獲得するであろう。

懇意なる指導と校閲の労をとられた関西学院大学理学部小島吉雄教授に心から感謝する。また技術的助言を下さった同研究室の林真氏に感謝の意を表する。材料採集には熊本県菊池川漁業組合の高木緑氏、日本大学農獸医学部在学中の君塚芳輝氏に多大の援助を受けた。ここに厚く御礼申し上げる。

引 用 文 献

- Fukuoka, H. 1972. Chromosomes of the sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). Japan. J. Genet., 47(6): 459~464, figs. 1~2.
- Hodgins, H. O., W. E. Ames and F. M. Utter. 1969. Lactate dehydrogenase isozymes in sera of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). J. Fish. Res. Bd. Canada. 26 (1): 15~19, fig. 1.
- Levan, A., K. Fregga and A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas. 52: 201~220, figs. 1~3.

- Markert, C. L. 1963. Lactate dehydrogenase isozymes: Dissociation and recombination of subunits. *Science*. 140: 1329~1330, fig. 1.
- Numachi, K. 1971. Genetic polymorphism of α -glycerophosphate dehydrogenase in saury, *Cololabis saira*-I. Seven variant form and genetic control. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 37(8): 755~760, figs. 1~3.
- Numachi, K. 1972. Genetic control and sub-unit composition of lactate dehydrogenase in *Pseudorasbora parva*. *Japan. J. Genetics*. 47(3): 193~210, figs. 1~3.
- Nygren, A., B. Nilsson, and M. Jahnke. 1968. Cytological studies in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Annales Academiae Regiae Scientiarum Upsaliensis Kungl. Vetenskapssamhallets I. Uppsala Arsbox*. 12: 21~52, figs. 1~30.
- Ogita, Z. and T. Kasai. 1965. Genetico-biochemical analysis of specific esterases in *Musca domestica*. *Japan. J. Genet.*, 40(3): 173~184, fig. 1~5.
- Ohno, S., C. Stenius, E. Faisst, and M. T. Zenzes. 1965. Postzygotic chromosomal rearrangements in rainbow trout (*Salmo irideus* Gibbons). *Cytogenetics*. 4: 117~129, figs. 1~10.
- Rees, H. 1964. The question of polyploidy in the Salmonidae. *Chromosoma (Berl.)*, 15: 275~279, figs. 1~3.
- Roberts, F. L. 1968. Chromosomal polymorphism in North American land-locked *Salmo salar*. *Canad. J. Genet. Cytol.*, 10: 865~875, figs. 1~4.
- Simon, R. C. and A. M. Doller. 1963. Cytological aspects of speciation in two North American teleosts, *Salmo gairdneri* and *Salmo clarki* Lewis. *Canad. J. Genet. Cytol.*, 5: 43~49, figs. 1~4.
- Simon, R. C. 1963. Chromosome morphology and species evolution in the five North American species of Pacific salmon (*Oncorhynchus*). *J. Morph.*, 112: 77~97, figs. 1~7.
- Uyeno, T. 1972. Chromosomes of offspring resulting from crossing coho salmon and brook trout. *Japan. J. Ichthyol.*, 19(3): 166~171, figs. 1~2.
- Yosida, T. H., K. Tsuchiya and K. Moriwaki. 1971a. Frequency of chromosome polymorphism of *Rattus rattus* collected in Japan. Chromosome polymorphism of *Rattus rattus* collected in Japan. *Chromosoma (Berl.)*, 33: 30~40, figs. 1~5.
- Yosida, T. H., K. Tsuchiya and K. Moriwaki. 1971b. Karyotype differences of black rats *Rattus rattus*, collected in various localities of East and Southeast Asia and Oceania. *Chromosoma (Berl.)*, 33: 252~267, figs. 1~4.
- White, M. J. D. 1968. Models of speciation. New concepts suggest that the classical sympatric and allopatric models are not the only alternatives. *Science*. 159: 1065~1070, figs. 1~3.

(557 東大阪市小若江 近畿大学農学部水産学科)