

5. 絶滅に瀕したミヤコタナゴの保存および 増殖に関する研究（その3）

- I. 調査研究の目的
- II. 産卵行動
- III. タナゴ類の産卵条件
 - 1. 年中産卵条件
 - 2. タナゴと貝の関係
- IV. タナゴ類の雑種の核型
 - 1. タイリクバラタナゴ雌とカゼトゲタナゴ雄との雑種
 - 2. タイリクバラタナゴ雌とヤリタナゴ雄との雑種
 - 3. タイリクバラタナゴ雌とカネヒラ雄との雑種
 - 4. タイリクバラタナゴ雌とゼニタナゴ雄との雑種
 - 5. 雜種の染色体
- V. 卵の老化と染色体
 - (1) 胚発生
 - (2) 染色体異常
- VI. 物理的刺激と染色体異常
- VII. タナゴ類の発生温度と性
- VIII. むすび

宇都宮大学教育学部生物学教室 上田高嘉

I. 調査研究の目的

ミヤコタナゴは昭和49年より天然記念物として国指定されている絶滅に瀕した魚種の一つである。年々その生息数が減少し、保存および増殖への意識が高まっている。最近、環境庁から国内希少野生動植物種に指定された。現在では、栃木県の周辺のごく限られた地域に生息が確認されているだけで、その保存および増殖についての検討は、栃木県内の魚類研究者に背負わされた大きな課題であると認識している。大田原市内の生息地では、市、県および地元の住民による20年以上前から保護活動が続けられている。栃木県水産試験場では水槽内での人工繁殖試験が行われており、現在のところ順調に繁殖がすすんでいる。また、宇都宮大学において、人工受精による増殖および保存法が確立されている。しかし、遺伝的性質についての情報は乏しい。保存および増殖法を検討する上で、遺伝的諸性質を明らかにしておくことは極めて重要な課題である。

人間は遠い昔より小動物をいたわる心を持ち続けてきた。絶滅に瀕した種に対してもつ人間の哀れむ気持ちには計り知れないものがある。絶滅に瀕したミヤコタナゴの保存および増殖についての取り組みは、必ずや河川美化意識の向上の一助になるものと考える。

本研究では、遺伝的諸性質を明らかにするとともに、ミヤコタナゴの保存および増殖についての検討を行い、河川美化意識の向上に役立てることを目的とする。

II. 産卵行動

タナゴ類は二枚貝に卵を産み付けるという特殊な産卵生態をもっている。バラタナゴ Rhodeus ocellatus の産卵行動の観察は比較的よく行われている（宮藤 1980、浅野 1981、藤川ら 1982、長田と福原 1985、太田と小倉 1986）。それらの行動はおおよそ次のように分けられる。①貝のぞき、②威嚇、威圧、追撃および吻突きなど雄同士の闘争、③巡回など雄のなわばり作り、④雄による雌の貝への誘導、⑤小刻みに鰓をふるわせる雄による雌への求愛、⑥逆立ち姿勢による産卵ポーズ、⑦貝の出水管への産卵管基部押し付け、⑧産卵、⑨雄による貝の入水管への放精。一方、ミヤコタナゴ Tanakia Tanago の産卵については、最近新井良一博士（国立科学博物館）の研究室で見事なビデオが作成されている。これまでの著者らの観察からも、バラタナゴとミヤコタナゴの産卵行動は極めて類似している。

今回、栃木県水産試験場の協力を得て、6月4日～7月16日の期間内の11日、19例について、ミヤコタナゴの産卵行動の観察を行った。60cmガラス水槽で、水温は20.8～27.0°Cであった。貝はマツカサガイを用いて、2へい（13例）、3へい（5例）および5へい（1例）の三つの場合について行った。11日の内、産卵行動が見られたのは4日であった。種々の行動を観察することができたので、以下に気の付いた点を列挙する。

- (1) ミヤコタナゴは、いくつかある貝の内、出入水管が上を向いて、産卵しやすそうに見えるもの1へいに興味を示した場合が多いが、同じような状態の貝がいくつかあるとき、複数の貝に興味を示した。

- (2) 婚姻色のよく発達した雄と産卵管のよく伸びた雌を水槽に入れると、産卵行動のみられたときには、1時間以内には行動が始まり、早い場合には、水槽に入れた直後に雄が鰓を震わせる行動が見られた。
- (3) 雄を2匹～数匹入れたときは、はじめに雄同士の闘争行動が見られる。大きい方が強いことが多いが、小さい方が強いこともあった。雄は追撃行動に忙しく、求愛行動が途中で中断されることが多く観察され、産卵シーンの観察には産卵に関わらない魚は除いた方がいいと考えている。
- (4) 産卵行動がはじまってから、産卵はしなくとも、1時間程度魚は落ち着いてしまった。
- (5) 雄は鰓を頻に震わせて雌に近づいても雌が全く反応を示さなかったり、逆に雄の誘いがないのに雌が出水管に産卵管を押し当てたことがあった。卵の熟成度など雌雄の生理的状態との関連も考慮して検討する必要があるように思う。
- (6) 雄に誘導された雌は貝の出水管を覗いて逆立ち姿勢のまま、短い“静”の状態の後、産卵管の基部を出水管に押し当てる。雄は雌の後ろで鰓を震わせたまま待っている。ここまで行動は何十回も見られたが、残念ながらミヤコタナゴの産卵は一度も見ることができなかった。タイリクバラタナゴでは、研究室内で産卵が観察できた。瞬間貝は出水管を閉じ、絞り出されるように産卵管を抜く。直後雄は忙しそうに、出水管付近に放精を行った。
- (7) ミヤコタナゴは多数の個体が混合飼育されている水槽から婚姻色の鮮やかな雄および産卵管の充分伸長した雌を選んだが、その水槽にはマツカサガイが入っていた日と入っていなかった日があった。マツカサガイの入っていないときに選んだ場合は、4回中3回まで産卵行動を示したが、貝が入っているところから選んだ場合は産卵行動を全く示さないことが多かった。また、貝の入ったところから雄を、貝の入っていないところから雌を選んだことが一度あったが、雌しか貝に興味を示さなかった。しかし、長期間（数週間）貝に触れていない雌2、雄1匹を選んだ場合について2日間、4回の観察を行ったが、ほんの少しの時間雄が鰓を震わせたぐらいで、活発な行動は見られなかった。また、今年一度も貝を入れていない水槽のミヤコタナゴは、産卵管の伸長した個体は目立って少なく、その中から雄1、雌1匹（数多くいる雌の中で産卵管の充分伸長しているものは他にいなかった）を選んだが、全く産卵行動を示さなかった。研究室内で飼育のタイリクバラタナゴでも、一度も貝に触れていない個体群では著しく産卵管の伸長は鈍く、貝の存在が産卵管伸長の大きな要因になっていることが推定された。
- (8) 水槽内でのミヤコタナゴあるいはタイリクバラタナゴの観察において、個体数が少ないとには繩張り形成、雄による雌の誘い等一連の産卵行動がなされるが、個体数が多くなると、一連の行動は省略され、次々と多数の個体が入り乱れるように貝への放卵および放精行動を繰り返す場合もしばしばあった。産卵管基部の押し付け行動は産卵管が充分に伸長していない雌でも認められた。また、タナゴ類の貝の付近での雄の追撃行動は自然状態で観察された例は少ない。自然状態では通常ある程度の個体数が同居しているものと考えられ、集団産卵状況が日常であるかもしれない。

III. タナゴ類の産卵条件

1. 年中産卵条件

これまでの研究で、人工受精が容易で、飼育も簡単であることから、人工的生産はさほど困難ではないことが明らかにされた。タイリクバラタナゴでの試験であるが、昼夜20Wの蛍光灯を付けた60cm水槽で、水温を20~25°Cに保ち、ほぼ週一度の水換えを行い、カラスガイを1~2個入れた環境で、年中の採卵および採精が可能であった。45cm水槽に雌雄各1匹、カラスガイ1個の条件で、1個体のタイリクバラタナゴの産卵管の長さの変化を追ってみると、25~27°Cにおいて3~4日で伸縮を繰り返し、周期的であるようだ。

2. タナゴと貝の関係

上述したように、産卵管の伸長に貝の存在が大きく関わることが推定された。当研究室でのタイリクバラタナゴの飼育経験から、一旦産卵管が伸長した雌は貝がなくても周期的に産卵可能であり、宮藤（1980）が報告するように、貝は産卵管伸長の引き金的役割をするものと考えられる。それでは貝の何が産卵管伸長の引き金になるのであろうか？ 藤川ら（1982）および太田ら（1986）は魚の臭覚に関する生きた貝由来「物質」が産卵行動を誘因するものとした。彼らは産卵行動に視点を置き、産卵管の伸長との関わりには触れていない。そこで、産卵管の伸長と貝の関わりについて検討を行った。

貝の入っていない60cm水槽で100匹以上混合飼育された中からタイリクバラタナゴを選んだ。いずれの雌も今年一度も産卵管の際だった伸長は認められていない。40cmの水槽にはほぼ同体長の雌5、雄2匹ずつ入れ、貝はカラスガイを用いた。雄は婚姻色の鮮やかな個体を選んだ。次の五つの試験群を設けて、12日間ほぼ1日置きに産卵管の長さを測った。(1)タナゴだけで、貝が入っていない状態。(2)生きた貝を1へい入れ、産卵ができる状態。(3)生きた貝1へいにナイロン製の網を掛け、タナゴが貝に触れられない状態。(4)針金でしばって固定された貝殻を1個入れ、視覚的、触覚的に貝を捕らえられる状態。(5)上面ろ過装置の中に生きた貝1へいを入れ、タナゴには貝の姿は見えないが、貝の出す物質は水槽中を循環している状態。

測定結果を表1に示した。各測定値は5匹の合計である。各条件における伸長の総計を表の右端に示した。貝が入っていない群では伸長が著しく少なかった（試験区(1)）。産卵可能な状態にあるとき（試験区(2)）、最も伸長した。この試験に用いる直前まで貝のない状態で飼育されており、そのときには目立った産卵管の伸長はなく、貝の存在が産卵管伸長の引き金になるものと強く感じる。ミヤコタナゴにおいても、産卵行動のところで触れたが、長期間貝のはいっていない状態で飼育されていた群では、産卵管を伸ばした雌の割合は極めて少なかったことからもうなづける。目隠し状態（試験区(5)）でも伸長したことから、そのきっかけには貝の出す物質が関与する可能性が大きい。しかし、貝殻だけでも伸長が認められたことから（試験区(4)）、視覚的、触覚的にも誘引される可能性があり、さらに検討を要する。

表1 産卵管の伸長と貝との関係

飼育条件	日 数 (日)										
	0	1	-- 4	5	6	7	8	9 -- 11	12	総計	
貝なし	0.0	0.8	1.2	2.0		0.8	0.6	1.2	0.8	0.8	8.4
貝あり	0.0	0.6	3.8	3.6	5.6	3.4	7.8	9.2	7.0	7.8	38.8
貝を網で包む	0.0	0.0	0.6	3.0	4.6	5.0	7.2	7.6	7.6	13.0	36.6
貝殻だけ	0.0	0.8	1.4	3.2	6.4	5.0	3.0	5.0	4.2	4.4	34.4
貝の体液のみ	0.0	1.8	9.0	5.8	3.8	2.4	3.6	6.8	2.2	2.4	37.8

ともあれ、貝の存在がタナゴ類の産卵行動、産卵管伸長の誘因に重要な働きことは明らかである。人工受精にて繁殖を行おうとする場合でも、貝の存在が必要であるといえる。タナゴ類の保存および増殖を考えた場合、貝の保存および増殖を併せて検討する必要のあることを改めて感じる。

産卵条件がほぼ揃めたことから、適当な数が確保されていれば、毎日採卵、採精も可能であり、タナゴ類の人工的生産はさほど困難なものではないことを実感する。実験材料としても有効であるように考える。また、産卵管伸長の引き金となるものがおい物質であるとした場合、その物質が単離でき、その物質により産卵管の伸長を促すことができれば、タナゴ類の保存および増殖において極めて朗報となる。検討の価値はあるだろう。

IV. タナゴ類の雑種の核型

タナゴ類の生息数減少の原因を探ることは重要な課題である。水質汚染、河川改修等による環境の悪化の他、タナゴ同士の生態系の争奪も見逃せない。放流等何らかの原因で、新たに侵入した種によって元いた種の生息が脅かされることもあるようである。雑種が生じることも個体数の減少につながるであろう。種の保存および保護の観点からも、雑種の種々の性質を明確にしておくことは極めて重要であると考える。特に繁殖力の強いタイリクバラタナゴとの雑種についての検討の必要性を感じられる。

魚類での雑種研究は有用魚生産の一手法として育種的な面において古くから盛んにすすめられてきた。種間の類縁関係の推定にも貢献をなしている。また、進化要因の一つとして雑種の関わりを注目される。

本論では、タイリクバラタナゴを雌親にした4種類の雑種の染色体分析を行った。

1. タイリクバラタナゴ雌とカゼトゲタナゴ雄との雑種

タイリクバラタナゴ *Rhodeus ocellatus* 雌とカゼトゲタナゴ *R. atremius* 雄から人工受精により9群の雑種を得た。各群とも、卵は多数の個体中産卵管を十分に伸長させた雌1～数個体から、精子は同じ雄2個体中1～2個体から採取した。

タイリクバラタナゴは雌5個体から、カゼトゲタナゴは雄2個体（雑種の親に当たる）から腎臓を取り出し、上田ら（1990）の方法により染色体分析を行った。雑種は囊胚期前後の胚から以下の方法により染色体分析を行った。

- ① 受精後約7時間の卵を培養液（Eagle's MEM培地 + 5%牛胎仔血清 + 15mM HEPES + 0.005%コルヒチン、pH7.0に調整）に取り、卵膜と卵黄を除いた胚細胞塊を1.5mlの培養液がはいった1本のマイクロチューブ（1.5ml用、岩城硝子社）に移し、約1時間室温（26°C）で静置した。
- ② 1,000rpmで5分間遠心後上澄を捨て、1mlの0.6%クエン酸ナトリウム水溶液を加え、チップで穏やかに攪拌し、2～3分間室温で静置した。
- ③ 1:3の酢酸エタノールを0.5ml加え、チップで穏やかに攪拌した後、1,000rpmで5分間遠心した。
- ④ 上澄みを捨て、1:3の酢酸エタノールを1.5ml加え、穏やかに攪拌した後、1,000rpmで5分間遠心した。
- ⑤ 上澄を捨て、少量の1:1の酢酸エタノールを加え、チップで穏やかに攪拌した後、裏面を水で濡らしたスライドグラス上に1滴落とし、自然乾燥させた。
- ⑥ ゼーレンゼンの磷酸緩衝液（pH5.8）で5%にしたギムザ液で5～10分間染色した。
- ⑦ 600～1,000倍の光学顕微鏡下で観察を行った。

タイリクバラタナゴの染色体数は $2n=48$ で、メタセントリック（M）およびサブメタセントリック（SM）染色体が28本、サブテロセントリック（ST）およびアクロセントリック（A）染色体が20本であった。カゼトゲタナゴの染色体数は $2n=46$ で、MおよびSM染色体が4本、STおよびA染色体が42本であった。いずれもこれまでの報告に一致した（小島ら 1973）。雑種の内8群は全個体が染色体数47本で、MとSM染色体が16本、STとA染色体が31本であり、両親の中間の核型を示した。残りの1群では、1個体は両親の中間の核型を示したが、4個体は4倍体、2個体は2倍体と4倍体のモザイクであった（表2）。この4倍体は染色体数が94本で、MとSM染色体が32本、STとA染色体が62本であり、両親のゲノムを二つずつ持っていた。

表2 タイリクバラタナゴ雌とカゼトゲタナゴ雄との
雑種の染色体数の分布（A群）

グループ	個体番号	染色体数						
		40--45	46	47	48--87--89	90--93	94	95
A	1				1 1	2	45	1
	2					1 1	19	1
	3					2	14	
	4						9	
	5	2	1	15			4	
	6	1		15 1	1		6	
	7	1	1	15 1				

2. タイリクバラタナゴ雌とヤリタナゴ雄との雑種

タイリクバラタナゴ雌3個体とヤリタナゴ*Acheilognathus lanceolate*雄1個体から人工受精によって雑種を得た。上述と同様の方法で染色体標本を作製し、分析を行った。

ヤリタナゴの染色体数は $2n=48$ で、MおよびSM染色体が28本、STおよびA染色体が20本であった。分析された雑種10個体は、いずれも染色体数が48本で、MおよびSM染色体が28本、STおよびA染色体が20本であり、両親の中間の核型を示した。

3. タイリクバラタナゴ雌とカネヒラ雄との雑種

タイリクバラタナゴ雌3個体とカネヒラ*A. rhombea*雄1個体から人工受精によって雑種を得た。上述と同様の方法で染色体標本を作製し、分析を行った。

カネヒラの染色体数は $2n=44$ で、MおよびSM染色体が28本、STおよびA染色体が16本であった。分析された雑種10個体は、いずれも染色体数が46本で、MおよびSM染色体が28本、STおよびA染色体が18本であり、両親の中間の核型を示した。

4. タイリクバラタナゴ雌ゼニタナゴ雄との雑種

タイリクバラタナゴ雌とゼニタナゴ*Pseudoperilampus typus*雄とで、両親の異なる3群の雑種を人工受精によって得た。いずれの雑種の両親も雌雄各1個体であった。上述と同様の方法で染色体標本を作製し、分析を行った。ゼニタナゴの染色体数は、腎臓の短期培養法によって標本を作製し、 $2n=44$ で、MおよびSM染色体が28本、STおよびA染色体が16本であった。雑種の染色体数の分布を表3に示した。グループAの3個体はいずれも染色体数が46本で、MおよびSM染色体が28本、STおよびA染色体が18本であり、両親の中間の核型と見られた。グループBの1個体は染色体数が46本であったが、残りの2個体は48本にモードをもち、47本をもつ細胞も高頻度に認められ、モザイクの

表3 タイリクバラタナゴ雌とゼニタナゴ雄
との雑種の染色体数の分布

個体番号	グループ	染色体数					
		43	44	45	46	47	48
1	A				6		
2	A				10		
3	A			1	11		
4	B				8		
5	B		1		2	6	
6	B				5	10	
7	C			structural aberrations			
8	C			structural aberrations			

可能性が強い。グループCの個体群は、2個体いずれも、切断、小形染色体、細粉化など多くの構造異常を含み、正確な染色体数のカウントが行えなかった。

タイリクバラタナゴ雌とカゼトゲタナゴ、ヤリタナゴおよびカネヒラ雄との雑種は、生き残って、生長する場合が多いが、ゼニタナゴ雄との雑種は、両親の異なる7群について飼育を試みたが、餌を探るまでに至った個体は認められていない。

5. 雜種の染色体

胚から安定して良質の染色体標本が得られた。マイクロチューブおよびマイクロピペット用チップを用いることにより細胞の損失が抑えられ、低張液にクエン酸ナトリウムを用いることにより細胞を容易に解離することができ、分裂頻度も高く、染色体の1本1本がよく伸長した良質の標本が安定して得られた。また、これまでの胚からの標本では染色体の流失が時々あり、正確な染色体数が捕らえにくくことがあったが、本論での方法では染色体の流出がほとんどなく、極めて利用価値の高い方法と考えられる。

タナゴ類の雑種の核型についての報告は極めて少ない。鈴木（1987）は、ニッポンバラタナゴとカゼトゲタナゴの雑種の核型を調べ、両親の中間型とした。本論でのタイリクバラタナゴとカゼトゲタナゴの2倍体雑種の染色体構成はこれに一致した。これまでに報告されたタナゴ類の雑種の核型はいずれも両親の中間型で、倍数体等の染色体変化は認められていない。本論で何故4倍体雑種が生じたのかについては明確な答えは得られていない。魚類の雑種形成において、自然に3倍体が生じる場合はしばしばみられるが、4倍体が生じることは希である。フナ雌とクロゴイ雄を交配したF₁の雌にコイ雄を戻し交雑して得られた雑種に、2倍体および3倍体の他に僅かの4倍体が認められた場合があるが、その生成因については不明のままである。本論の雑種では、同群中に両親中間型の2倍体が含まれていること、4倍体が両親のゲノムを二つずつ持っていることから、倍数性の配偶子によるとは考えにくい。モザイク個体の出現もあり、初期卵割時の異常細胞分裂によるものと考えている。両親由来の染色体と細胞質の不和合性が初期発生時の異常な染色体分離を引き起こす可能性がサケ・マス類の雑種で報告されている（Arai 1984, Goodier et al. 1987, Yamazaki et al. 1989, Ueda et al. 1990）。この不和合性が初期発生時に異常細胞分裂を引き起こした可能性は考えられる。しかし、9群中1群での現象で、この不和合性だけを要因とすることには慎重を要する。

タイリクバラタナゴ雌とゼニタナゴ雄との雑種でも、両親が異なると核型に相違が見られた。同じ組み合わせでも異なった結果を示す場合は他の魚類にもある。ニジマス雌とカワマス雄との雑種は通常両親の中間の核型をもつが、高率で異質3倍体が生じた場合がある（Ueda et al. 1984）。また、雌性発生二倍体が生じるとされるギンザケ雌とカワマス雄の組み合わせであるが（Uyeno 1972）、著者も同交雫を両親の異なる3群について試みたが、両親の中間の核型しか認めていない（上田、未発表）。哺乳類では卵の過熱が倍数体および異数体の一つの出現要因とされている。魚類でも、排卵後体腔内に保留されている時間が長くなれば異常胚発生が起こることは周知の通りである。Yamazaki et al. (1989) は体腔内に長く保留されると染色体の数的異常および構造異常が増加することを示した。卵の老化が初期発生時に異常な細胞分裂をもたらす可能性は大いに考えられ、倍数体の生成因と

して老化等卵の状態を考慮する必要性も感じられる。核型分化機構解明のヒントが得られる可能性も窺われ、生成因解明のためさらに検討を行いたい。

V. 卵の老化と染色体

卵の老化が染色体異常を引き起こす可能性があり、種の保存および増殖を考える場合、卵の老化と染色体異常保有魚の出現との関わりについて明確にしておく必要がある。

その一つの試みとして、体外での卵の老化試験を行った。タイリクバラタナゴの未受精卵を淡水中(25°C)に取り、5、10、15、20、25および30分後に媒精した。20°C前後に保ち、約20時間後(正常な発生では囊胚期前後)に胚発生および染色体異常の生むを調べた。

(1) 胚発生

受精率、囊胚形成率および孵化率を調べた結果を表4に示した。受精率は、培養顕微鏡下で第一卵割溝が観察されたものを受精卵と判断し、その卵数をカウントして求めた。未受精卵が淡水中に置かれる時間が長くなるに従って発生率は落ち、25分以上では全く胚発生は認められなかった。第一卵割溝が認められた胚のほとんどは孵化まで進んだ。

表4 タイリクバラタナゴ体外受精卵の受精率、囊胚形成率および孵化率

卵の体外 老化(分)	供試卵	受精卵	囊胚形成	孵化
5	25	23 (92.0%)	23 (92.0%)	22 (88.0%)
10	19	12 (63.2%)	12 (63.2%)	12 (63.2%)
15	20	14 (70.0%)	14 (70.0%)	10 (50.0%)
20	20	4 (20.0%)	4 (20.0%)	3 (15.0%)
25	20	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
30	20	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

(2) 染色体異常

両親の異なる5群(A、B、C、DおよびE群)について、囊胚期前後に染色体標本を作製し、染色体の数的および構造異常について分析を行った。表5に各条件での囊胚形成率および染色体異常をもった胚の出現率を示した。染色体異常は8胚に認められた。1個体は、染色体数のモードは正常値と同じ48に存在したが、48本をもつ細胞には正常細胞にはない小形の染色体を1本含み、明らかに正常核型とは異なっていた。2個体は、47と48本のモザイクであった。残りの5個体は、染色体数の分布が広く、モード細胞がはっきりしなかった。いずれも多数の小形染色体を含んでいた。その内の1個体では、半数体の24本の染色体をもった細胞が多数存在した。また、小形染色体を1本含む25本の細胞、小形染色体を2本含む26本の細胞および小形染色体を8本含む32本の細胞が数多く認められ、

染色体多型は24本の半数体細胞から派生したのではないかと考えている。また別の1個体では、環状、二動原体、細粉化などの構造異常が目立った。

グループEでは、5分間の老化でも染色体異常をもった個体が出現した。体内で既に老化した過熟卵であった可能性が考えられる。

以上の結果は、卵の老化が染色体の数的および構造異常を引き起こす可能性があることを示している。また、ニジマスおよびブラウントラウト卵についても体外での卵の老化の染色体に与える影響について調査した。4°C、7日間遮光保存後、受精し、培養法により発眼胚の染色体分析を行った。その結果、卵の老化が3倍性、異数性および染色体構造異常を増加させることができた（表6と7）。

表5 タイリクバラタナゴ体外老化卵の囊胚形成率および染色体異常出現率

グループ 老化(分)	卵の体外 (%)	囊胚形成 分析胚	染色体	染色体異常
A	0	—	3	0 (0.0%)
	5	—	3	0 (0.0%)
	10	—	5	0 (0.0%)
	15	—	5	2 (40.0%)
	20	—	2	2 (100.0%)
B	5	80.0	4	0 (0.0%)
	10	30.0	3	1 (33.3%)
	15	40.0	4	1 (25.0%)
	20	0.0	—	—
	25	0.0	—	—
	30	0.0	—	—
C	5	95.2	5	0 (0.0%)
	10	36.8	5	0 (0.0%)
	15	4.8	—	—
	20	0.0	—	—
	25	0.0	—	—
	30	0.0	—	—
D	5	94.7	5	0 (0.0%)
	10	50.0	4	1 (25.0%)
	15	5.6	—	—
	20	0.0	—	—
	25	0.0	—	—
	30	5.3	0	—
E	5	52.2	7	1 (14.3%)
	10	0.0	—	—
	15	0.0	—	—
	20	0.0	—	—
	25	0.0	—	—
	30	0.0	—	—

表6 ニジマス体外老化卵による胚の染色体数分布および染色体異常頻度

個体番号	染色体数										染色体異常	染色体異常(%)
	59	60	61	62--65--80	81--83--88	89	90	91				
1	1	5	2	1	1						5	50.0
2				1	2	2	3	16	3	8	29.6	
3						2	8			1	10.0	
4						1	1	5	1	3	33.3	

表7 ブラウントラウト体外老化卵による胚の染色体数分布および染色体異常頻度

個体番号	染色体数								染色体異常	染色体異常(%)	
	72--74	75	76	77	78	79	80	81--85			
1	2	1	1	1	1	3	2	18	1	3	10.0
2				2	2	17	2			4	17.3
3		1	1			1	15			2	11.1
4					4	8				0	0.0
5					1	11				0	0.0

VI. 物理的刺激と染色体異常

種の保存および増殖を検討する場合、染色体異常の出原因を把握しておくことは重要な課題の一つである。上述した雑種形成および卵の老化の他に、染色体異常誘導因として、初期発生時における物理的刺激についても検討を進めている。

一方、水産学の分野では染色体操作による有用魚生産の検討がすすめられている。第二極体放出阻止法および精子の遺伝的不活性化法はほぼ確立され、三倍体魚生産および全雌魚生産等実用段階に至っているものもある。第一卵割阻止も同じように行えれば、全雄生産、四倍体魚生産およびクローン魚生産等の可能性がある。また、精子の凍結保存との組み合わせで、絶滅に瀕している種等、貴重魚の保存にも貢献できるであろう。しかし、多くの研究者により第一卵割阻止による染色体倍加が試みられているにもかかわらず、いずれも良好な生残率は得られていない。生残率の低下あるいは奇形胚の出現が倍加処理により染色体異常が引き起こされることに因るとの指摘もあるが、初期胚から良質の染色体標本を安定して得ることが困難であったことから、倍加処理と染色体異常出現との関係について詳細に検討された例はない。このように、水産分野においても、初期胚における物理的刺激の染色体に及ぼす影響について明確にしておく必要がある。

本論では、タイリクバラタナゴを用いて、受精直後から2細胞期にかけてのいくつか時点に低温刺

激を与える、囊胚期前後に染色体分析を行い、低温刺激が初期発生胚の染色体に与える影響について検討した。

受精卵は人工受精によって得て、低温刺激後20°Cで発生させ、囊胚期前後に上述した同様の方法で染色体分析を行った。20°Cでは受精後約1時間に第一卵割溝が観察される。受精後0（受精直後）、5、20、30、40、50、55、60、65および70分に各群1回の低温刺激を与えた。また、低温刺激は染色体倍加条件として適当とされる0°C、1時間であった。

それぞれの条件における染色体数の分布を表8～11に示した。無処理群では染色体数48本に集中した（表8のNo.1～3）。受精後5分に低温処理された群には3倍体が出現した（表8のNo.10～12）。受精直後処理群では3倍体が多く含まれていたが、受精後5分処理群より染色体数の分布が広かった。また、1個体は46本の染色体数をもつ異数体とみられた（表8のNo.7）。受精後20、30、60、65および70分処理群では全体的に染色体数の分布が広く、モード細胞が不明確であった。受精後30分処理群の1個体では細粉化、環状などの染色体構造異常が目立ち、染色体数の正確なカウントができなかっただ（表9のNo.7）。受精後60分処理群の1個体は45本と51本のモザイクとみられた（表11のNo.15）。受精後40分処理群には4倍体とみられる1個体が認められ（表10のNo.4）、他の個体は染色体数の分布が広くモード細胞が明確な個体がほとんどであった。50および55分後処理群では48本に集中し、無処理群に近い結果であった。また、受精直後に低温刺激を与えられた群で染色体数24本の半数体が認められた（表8のNo.9）。ドジョウを用いた研究で、同様の刺激条件で半数体症候群が観察されている（Suzuki et al. 1984）。最近の当研究室でのタイリクバラタナゴ雌とカネヒラ雄との雑種を用いた研究で、この半数体が雄核由来であるらしい結果を得ている。

これらの結果は、初期発生時における卵への低温刺激が細胞分裂時の染色体不分離あるいは染色体構造異常等を引き起こす可能性があることを示している。何故染色体異常が生じたのかについては明確に示すことはできないが、紡錘体の形成あるいは染色体の合成との関連を推定している。雑種形成あるいは卵の老化による染色体変化との関わりも含めて、染色体変化の種類の分類など詳細な分析から染色体変化機構を解く重要な知見が得られるかもしれません、さらに深く検討を行っていきたい。

本結果は、これまでの第一卵割阻止による染色体倍加研究における生残率の低下の要因の一つに染色体異常が関わっていることを暗示している。また、正四倍体生産が極めて困難であることも示唆している。しかし、例は少ないが、生存性のニジマス四倍体が報告されており、さらに、成熟した四倍体で次世代魚を得ている（Chourrout 1982, 1984, Chourrout et al. 1986）。これらは、確立は低いが生残性の四倍体作出が可能であることを示している。一方、作出実験の課程で染色体異常保有魚の出現の可能性もあり、第一卵割阻止法の検討とともに、作り出された個体について個体レベルに加え細胞レベルあるいは遺伝子レベルの性質を明確にしていくような検査システム作りの重要性を感じさせる。

表8 媒精後0および5分に低温刺激されたタイリクバラタナゴ胚の染色体数の分布

個体番号	低温刺激(分)	染 色 体 数																				
		22	23	24	25	28	33	42	45	46	47	48	49	58	59	64	66	68	69	70	72	73
1	-															10						
2	-															1	15					
3	-															1	1	20				
4	0					1										2		1	1		6	
5	0						1										1		1	3	2	
6	0															1			1	6		
7	0															11						
8	0															3						
9	0	1	21																			
10	5							1								1			3	1	11	
11	5																1			5	1	
12	5																1				7	

- : 無処理

表9 媒精後20および30分に低温刺激されたタイリクバラタナゴ胚の染色体数の分布

個体番号	低温刺激(分)	染 色 体 数																				
		20--23--30--32	33--39--44	45	46	47	48	--87--94														
1	20	1														13						
2	20															7	1	1				
3	20		1	1	1	1	1	3	1	1	9											
4	30									1	1	8										
5	30									1	10											
6	30										7											
7	30		structural aberrations																			

表10 媒精後40分に低温刺激されたタイリクバラタナゴ胚の染色体数の分布

個体番号	低温刺激(分)	染 色 体 数																			
		32	33--37	38	39	40--50--53--55--61	62	63	64	65--87	88--92	93	94	95	96						
1	40	1		1	2	4	3	1	1												
2	40	12	1							1	2	1	2	1							
3	40	1					1		4												
4	40															1	1	2	11		
5	40															1	1	1	4	1	
6	40															1	1				

表11 媒精後50、55、60、65および70分に低温刺激されたタイリクバラタナゴ胚の染色体数の分布

個体番号	低温(分)	染色体数																		
		13--23--25	26--38	39--41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	63--82
1	50				1													4		
2	50																	3		
3	50																	6		
4	50									1	1	1	3	18	1					
5	50																	8		
6	50									1								5		
7	50																	7		
8	55						1				1	4	17	1						
9	55																	5		
10	60				1		1	1	1	1	1	1	10				1	3	1	
11	60																	1		3
12	60			1							1	2	3	9	1					
13	60					1					2		9	4						
14	60							2	2		1	1	1							
15	60						1			5	1	1	1	5						
16	60	9								2	1	2	1						1	1
17	60													8	3					
18	65				2	3											1		1	
19	65			1	3					1	2	2		1	1	1	1		1	1
20	70												1	10						
21	70									1		1	2	2						

VII. タナゴ類の発生温度と性

タナゴ類の性決定機構についての研究は少なく、不明な点が多い。河村（1993）の染色体操作研究によると、バラタナゴの性決定が雌ヘテロ型であるらしい。また、タナゴ類の雑種では雄様の婚姻色を呈する個体の出現率が圧倒的に高い。当研究室においても、タイリクバラタナゴ雌とカゼトゲタナゴ雄との2倍性雑種は、調査した21個体全てが雄様婚姻色を呈した。また、ミヤコタナゴの試験をはじめた当初、60cm水槽内でタイリクバラタナゴと混合飼育しており、その中に自然雑種が生まれたことがある。7匹の雑種は生長がよく、生長とともにいすれも雄様の婚姻色を呈した。以上の事実は、タナゴ類の性決定が遺伝的要因によることを示している。一方、当研究室のイリコバラタナゴの数多い交配の中で、性比が片寄る場合を時々経験している。遺伝子の発現が環境要因に左右される可能性も大いに考えられる。ハ虫類等では、発生温度により性比が大きく変わるものが多く報告されている。そこで、発生温度がタイリクバラタナゴの性比に及ぼす影響について調査した。

受精直後から、肉眼で観察して眼が黒く見える時期（15°Cでは約4週間、20°Cでは約2週間、25°Cでは約8日間、30°Cでは約6日間；既に孵化して泳ぎ出している）まで、10、15、20、25、30および35°Cの水温で保ち、その後25°Cで飼育した。孵化後約6ヶ月に、婚姻色および産卵間の有無によって

雌雄の判定を行った。10および35℃に保たれた卵は発生が認められなかった。15℃に保たれた場合は、発育は悪く、雌雄の判定時期まで生き残らなかった。20および25℃試験区では雌雄どちらも存在したが、30℃試験区では明らかな雌は認められなかった。発生温度により性比が左右される可能性を示しているが、一度の試験で、しかも個体数も少なく、再度の試験が要求される。

VIII. むすび

種の保存および増殖を検討する場合、その遺伝的諸特性について明確にしておくことは極めて重要である。これまでの研究で、タナゴ類のいくつかの性質を明らかにしてきたが、今後もデータの蓄積を積極的に行っていきたい。

タナゴ亜科魚類は中村（1969、1974）により4属15種・亜種に分類されている。ミヤコタナゴに限らず、その中には生息数が激減しているものも多く、保存および保護について早急の検討が要求される。環境庁が1989年に著したレッドデータブックの中に、イタセンパラ *Acheilognathus longipinnis*、ミヤコタナゴ *Tanakia tanago*、スイゲンゼニタナゴ *Rhodeus suigensis*、ニッポンバラタナゴ *R. ocellatus smithi* およびゼニタナゴ *Pseudoperilampus typus* の5種類が絶滅の恐れのある種として挙げられている。イタセンパラおよびミヤコタナゴは1974年に国の天然記念物に指定され保存および保護に努められている。生息数減少の原因を探ることは重要な課題である。化学物質等による水質汚染はその大きな要因として挙げられる。しかし、水質汚染だけの問題ではなさそうである。タナゴ類は二枚貝のさい葉内に卵を産み落とすという特異な産卵生態をもち、二枚貝の存在なくしての繁殖は望めない。水質の汚染がなくても、河川改修等によりタナゴあるいは貝の生息空間が壊されることも減少要因の一つとされる。さらに興味深いこととして、タナゴ類の繁殖が稻作と深く関わっており、「人里の魚」と表現され、人の手の入らない自然な状況を作れば保存および保護が実現できるという訳ではなさそうであることがある。地下水の復活も重要視されている。水質汚染との関わりがあり、タナゴ類の保存および保護への取り組みは、我々人間の環境問題を考えることでもある。人間にあっての環境の在り方を考える一つのモデルとして見つめて行きたい。

タナゴ類の他の減少要因としてタナゴ類同士の争いがあるとされる。他のタナゴ類の存続にとって、タイリクバラタナゴの存在は見逃せない。タイリクバラタナゴ、産卵期が長い、産卵する二枚貝の種類および大きさの選り好みが少ないとされることもある。全国的に広く分布し、繁殖力盛んな種である。タイリクバラタナゴの侵入が他のタナゴ類の生息を脅かしていると見る向きもある。混成された場合に雑種の形成による生息数の減少もあり得るであろう。人工受精によりタナゴ類間で生存性の種々の雑種が作り出されている。そして、ほとんどの場合不妊であるが、ヤリタナゴ *A. lanceolata* とアブラボテ *A. limbata* との雑種のように妊性をもつものもある。また、タナゴ類では産卵行動が似通っている。鈴木（1965）は水槽内での混合飼育で、バラタナゴとアブラボテの自然雑種を認めている。そして、タナゴ類の未受精卵は淡水に放出されてから約30分の間、精子は約7分の間受精能力を保持しており、正確な産卵行動による異種間での放卵および放精のタイミングが完全に一致しなくとも、異種の卵と精子の間で受精は起こり得るとしている（鈴木 1965）。著者らの水槽

内でのタイリクバラタナゴあるいはミヤコタナゴの観察では、個体数が少ないと。きには縄張り形成、雄による雌の誘い等一連の産卵行動がなされるが、個体数が多くなると、一連の行動は省略され、次々と多数の個体が入り乱れるように貝への放卵および放精を繰り返す場合もしばしばある。混成された場合、産卵行動が完全に一致する種間でなくとも、雑種のできる可能性は大に考えられる。ヤリタナゴとアブラボテの間では天然雑種も認められている（鈴木と日比谷1986）。種の保存および保護を考えた場合、種々の雑種の妊性、核型等遺伝的諸性質を明確にしておくことも、特にタイリクバラタナゴの雑種について、重要であり、検討を行っていく必要がある。

極端に生息数が少なくなった場合には、種の保存において遺伝子の単一化が危惧される。遺伝子の多様度を把握しておくことは極めて重要であると考える。種内の遺伝的変異度をみる指標としてミトコンドリアDNAがすぐれていることは種々の魚種で立証されており、現在2系統のミヤコタナゴについてミトコンドリアDNAの分析を行っている。ミトコンドリアDNAのD-Loop領域をPCR法により増幅し、これをRFLPs（制限酵素断片長多型）によって遺伝的差異を検討した。D-LoopはミトコンドリアDNAの複製に関わる領域で、分子進化上の制約がほとんどないといわれ、タンパク質のコーディング領域に比べて約4倍変異速度が速い。そのため、多くの多型を検出できる可能性があり、遺伝的標識として、または集団内および集団間の遺伝的解析に有効であると考えられている領域である。4塩基対認識の制限酵素4種類、6塩基対認識の9種類、合計13種類の制限酵素を用いてD-Loop領域の消化を行ったところ、7種類の制限酵素（Af a I, Hae III, Hha I, Mbo I, Ava I, Eco RI, Hin c II）において切斷型が検出できた。そのうち6種類の制限酵素（Hae III, Hha I, Mbo I, Ava I, Eco RI, Hin c II）で全てのサンプルについて消化を行ったところ、2種類の制限酵素（Hin c II, Hae III）において切斷型多型が検出できた。その結果、栃木県北部に生息する系統には多型が認められなかったが、栃木県水産試験場で系統保存されているミヤコタナゴに4種類の多型が認められた。今後さらにデータの蓄積を行っていきたい。遺伝的諸特性を正確に捕らえる上で、遺伝子レベルの検討も行っていく必要があるように思える。

ミヤコタナゴは、天然記念物としての指定に加え、希少野生動物種にも指定され、また地元の住民の努力により保護されているとはいえ、絶滅がいつくるとも知れない。過去の長い生命の歴史の自然原理の中で、数多くの生物が絶滅してきた。しかし、これほど短期間に数え切れない動植物種が絶滅し、絶滅に瀕している状況はなかった。人間によって自然の原理は大きく変えられ、今後の自然の成り行きは大きく人間がその鍵を握っているといえるだろう。世間の動きを見ると、これまでの経済発展重視の姿勢を抑えてでも自然環境保護を優先させるべきであるとする機運が高まっているように感じられる。我々人間は単独では存続できず、種の多様性の意味が問いかれていている。人間は遠い昔より小動物をいたわる気持ちを持ち続けてきた。環境中の一員としてしか存続し得ないと知るが故に内在されている優しさに違いない。世の中の流れを大きく変える原動力となるのは、理屈ではなく、結局一人一人の気持ちの重なりであろうと思われる。絶滅に瀕した水生生物の保存および増殖への努力は、“絶滅に瀕している”ことの意味を考えさせ、この人間に内在する優しさを大きく膨らませる助けとなり、環境保全意識の向上につながるものと信じる。