

神奈川県城ヶ島産天然メガイアワビの 遺伝学的特性について

高田 啓 一 郎

The Genetic Studies on the Pacific Abalone *Haliotis sieboldii* in Jogashima, Kanagawa Prefecture

Keiichiro TAKADA*

Abstract

Electrophoretic analyses were carried out on the Pacific abalone *Haliotis sieboldii* harvested from the coastal water around Jogashima, Kanagawa Prefecture. Six loci were found in lactate dehydrogenase (LDH), malate dehydrogenase (MDH), phosphoglucomutase (PGM) and glucosephosphate isomerase (GPI). Polymorphism was observed in five loci encoded for Ldh-1, Mdh-1, Mdh-2, Pgm and Gpi, while one locus of Ldh-2 was monomorphic. The observed numbers of genotypes in respective loci well agreed with those expected under Hardy-Weinberg equilibrium. The results suggest that *H. sieboldii* in Jogashima is in a random mating population.

はじめに

神奈川県では1966年からアワビの種苗放流を始めたが、その数は年々増加し、1987年の放流数は67万個にまで達している。このうち、メガイアワビ *Haliotis sieboldii* の放流数は56万個で、クロアワビ *Haliotis discus* およびマダカアワビ *Haliotis gigantea* を含めた全放流数の約80%を占めている。このようにアワビの種苗生産はかなり安定してきたが、飼育技術の改善による放流サイズの大形化、より健康な種苗の生産、種苗の形質の改良など、多くの問題が未だ残されている。したがって、より高度な種苗生産を行うためには、素材に関する遺伝学的知見の蓄積をもとにした育種が不可欠である。このような目的から、藤野ら(1984)は、エゾアワビ *Haliotis discus hannai* の遺伝学的特性につき多くの知見を報告しているが、メガイアワビについては

ほとんど研究が行われていない。

本研究では、神奈川県三浦市城ヶ島産天然メガイアワビにつき乳酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ホスホグルコムターゼおよびグルコースリン酸イソメラーゼのアイソザイム分析を行い、二、三の遺伝学的特性に関する知見を得たのでここに報告する。

試料と方法

試料 1987年8月から10月までに神奈川県三浦市三崎町城ヶ島地先で漁獲された殻長105~176mmの天然メガイアワビ *Haliotis sieboldii* 73個を、種々の分析に供試した。なお、天然貝の判別には螺頂の色彩(褐色)を指標とした。分析の対象とした閉殻筋は、生貝から採取して-80℃で保存し、順次解凍して分析に供したが、保存期間は最長でも2ヶ月とした。

脚注

1989.12.19受理 神水試業績 No89-158

*増殖研究部

抽出液の調整 半解凍した閉殻筋 1 g に50%グリセリンを含む0.06 Mバルビタール緩衝液 (pH8.6) を等量加えて乳鉢で十分に摩砕した。次いで1,000×gで15分間遠心分離して、上清に電気泳動用の抽出液試料を得た。抽出液中の酸素の失活をできるだけ防ぐため、上記の操作は全て4℃で行った。なお、抽出液は-10℃で保存し、7日以内に分析に供したが、この間とくに酸素の性状の著しい変化は認められなかった。

デンブングル電気泳動 水平式デンブングル電気泳動法を用いた。電極槽には、0.135 M Tris-クエン酸緩衝液 (pH7.0) を用い、12% (W/V) デンブングル用緩衝液には、上記の電極槽緩衝液を15倍に希釈して用いた。

抽出試料は、5 mm角の東洋濾紙No2 に吸い込ませてデンブングル中に挿入し、25 V/cm²の定電圧下で4時間30分泳動した。なお、酸素の失活や泳動パターンの乱れを防ぐため、泳動は4℃の低温室内で行い、さらにデンブングル上には氷冷水を均一に設置した。

デンブングルの染色と保存 泳動後、デンブングルの厚さ1 mmずつに水平にスライスし、37℃で酵素活性染色を行った。染色には、SHAW and PRASAD (1970) および志村 (1982) の方法を一部改変した組成液を用いた (Table 1)。グルコースリン酸イソメラーゼで20分、その他の

酵素では1~2時間の染色後、7%酢酸液で反応を停止させた。染色後のゲルは、NUMACHI (1981) の方法に従って乾燥保存した。

結果と考察

遺伝子座および対立遺伝子数の推定 メガイアワビの閉殻筋につき、分析した酵素の泳動パターンおよびその模式図をFigs. 1~4に示す。模式図には泳動パターンから推定した遺伝子型をも併記した。

乳酸脱水素酵素 (LDH): LDHの泳動パターンは、Fig. 1のようで、供試個体全てに共通な染色度の高い1本のバンドと、より陽極側に1本または2本のバンドを認めた。したがって、メガイアワビLDHは、変異のある遺伝子座Ldh 1と変異のない遺伝子座Ldh 2が関与する2量体酵素と考えられ、Ldh 1には2対立遺伝子が想定された。なお、本実験でのLdh 1由来のバンドの染色像は薄く、分析に供した73個体のうち、62個体についてのみ遺伝子型が判別できた。哺乳動物や魚類のLDHは4量体で、2対立遺伝子から5本のバンドが生成される (沼知 1974)。したがってメガイアワビLDHの遺伝子組成については供試組織を変えるなど、今後さらに詳細な検討を要するものと考えられる。

Table 1. Stainig mixtures for lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase, phosphoglucomutase and glucosephosphate isomerase.

Lactate dehydrogenase(LDH)		Malate dehydrogenase(MDH)	
0.2M Tris-HCl buffer(pH8.0)	25ml	0.2M Tris-HCl buffer(pH8.0)	25ml
1M Na DL-lactate(pH7.0)	5ml	DL-malate Na	300mg
Nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized form(NAD)	10mg	NAD	10mg
Nitro blue tetrazolium(NBT)	10mg	NBT	10mg
Phenazine methosulfate(PMS)	2mg	PMS	2mg
H ₂ O	20ml	H ₂ O	25ml
Phosphoglucomutase(PGM)		Glucosephosphate isomerase(GPI)	
0.2M Tris-HCl buffer(pH8.0)	25ml	0.2M Tris-HCl buffer(pH8.0)	25ml
D-glucose-1-phosphate 2Na	300mg	D-Fructose-6-phosphate 2Na	80mg
MgCl ₂ · 6H ₂ O	100mg	MgCl ₂ · 6H ₂ O	100mg
Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, oxidized form (NADP)	100mg	Agar	250mg
Glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PD)	40 u	NADP	10mg
NBT	10mg	G6PD	40 u
PMS	2mg	NBT	10mg
H ₂ O	25ml	PMS	2mg
		H ₂ O	25ml

然エゾアワビ中腸腺のエステラーゼの分析結果からEst Fでホモ過剰を観察し、やはりこの原因を近親交配のためと推論している。本実験で多型と認められた遺伝子座について、各遺伝子型の観察値とハーディー・ワインベルグの法則から求めた期待値を比較したところ、期待値が5より低い階級があるため統計学的な検定はできなかったが、いずれの遺伝子座においても観察値と期待値はよく一致し、ハーディー・ワインベルグの平衡状態にあると判定された。この結果は、本実験で調査した城ヶ島産メガイアワビには、エゾアワビで報告されたようなホモ過剰がないことを示す。しかし前述のように、ホモ過剰の推定は対象とする酵素の種類に依存することから、今後さらに多くの遺伝子座を調べて、この点につき詳しい検討をすべきものと考えられる。また、本実験に用いたメガイアワビは、城ヶ島地先で漁獲され、城ヶ島漁業協同組合に集荷されたものから無作為に抽出した。したがって、これらのメガイアワビで種々の酵素の遺伝子型の観察値と期待値が一致したことは、城ヶ島周辺海域のメガイアワビは分集団から成るものではなく、単一の集団から構成されているものと考えられる。

神奈川県では、1983年からメガイアワビの種苗放流を始めた。アワビの成熟年齢は3年で、放流アワビが再生産されたとしても、本実験で用いたサイズには達していないはずである。したがって、Table 2に示した4酵素5遺伝子座における対立遺伝子の頻度は天然メガイアワビの遺伝的組成を表すものと考えられる。今後、当該海域のメガイアワビの遺伝的組成を経年的に調査して、放流の影響を調べることが可能と考えられる。また、他の海域におけるメガイアワビの遺伝的組成を調べて、その結果と比較することによって、系群の存否を判定することも期待できるものと考えられる。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、東京大学農学部水産化学研究室に種々のご便宜を計っていただいた。また、試料収集にあたり、城ヶ島漁業協同組合にご協力いただいた。ここに記して感謝する。

要 約

- 1 神奈川県城ヶ島産メガイアワビの遺伝学的特性を調べるため、閉殻筋を対象にアイソザイム分析を行った。
- 2 分析酵素は、LDH, MDH, PGMおよびGPIで、これら4酵素には計6遺伝子座が認められた。

- 3 Ldh 1, Mdh 1, Mdh 2, PgmおよびGpiでは、それぞれ2, 3, 3, 2および4対立遺伝子が推定され、これらはいずれも遺伝的多型($P < 0.99$)と認められた。
- 4 各遺伝子型の観察値と遺伝子頻度から求めた期待値はよく一致し、城ヶ島周辺海域のメガイアワビは、ハーディー・ワインベルグの平衡状態にある単一の集団から成るものと考えられた。

文 献

- FUJINO, K. (1978): Genetic studies on the Pacific abalone - . Inbreeding and overdominance as evidenced by biochemical polymorphism in a wild population. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 44, 357-361.
- 藤野和雄・佐々木喜代志・奥村誠一 (1984): エゾアワビの遺伝学的特性. *水産育種*, 9, 10-19.
- 成瀬了三 (1978): オリンピアガキ *Ostrea lurida* の他家受精について. *水産育種*, 3, 9-12.
- 西田 睦 (1978): スイショウガイ科マガキガイにおける酵素の遺伝的多型. *水産育種*, 3, 6-8.
- 沼知健一 (1974): 集団の遺伝学的特性. 資源生物論 (西脇昌治 編), pp. 5-36, 東京大学出版会, 東京.
- 沼知健一 (1976): ムラサキガイの酵素の遺伝的変異性. 昭和51年度日本水産学会春季大会講演要旨集, P. 81.
- 沼知健一 (1979): 無脊椎動物. 水産生物の遺伝と育種 (日本水産学会 編), pp. 93-113, 恒星社厚生閣, 東京.
- NUMACHI, K. (1981): A simple method for preservation and scanning of starch gels. *Biochem. Genet.*, 9, 233-236.
- 沼知健一・菅原義雄・岩田宗彦 (1983): エゾアワビ人工種苗の成長、生残についての遺伝学的分析. 昭和57年度科学研究費補助金 (一般研究B) 研究成果報告書, pp. 25-26.
- 大羽 滋 (1977): 集団の遺伝, 164pp., 東京大学出版会, 東京.
- SHAW, C.R. and R. PRASAD (1970): Starch gel electrophoresis of enzymes - A compilation of recipes. *Biochem. Genet.*, 4, 297-320.
- 志村悦子 (1982): 小型歯鯨類の酵素の遺伝的変異性と系統分類学的研究. 東京大学修士論文, 81pp.
- SINGH, S.M. and E. ZOUROS (1978): Genetic variation

associated with growth rate in the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Evolution*, 32, 342-353.

WILKINS, N. P., K. FUJINO, and K. SAKAI (1980) : Gene-

tic studies on the Pacific abalone - . Thermostability difference among phosphoglucomutase variants. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 46, 549-553.