

アゲマキの生態 - X

- アゲマキのアイソザイム -

古川泰久・夏莉 豊*・吉本宗央

Ecological Study of Jack Knife Clam, *Simonovacula constricta*- X Allozyme of Jack Knife Clam

Yasuhisa FURUKAWA, Yutaka NATSUKARI
and Muneo YOSHIMOTO

まえがき

アゲマキガイ *Simonovacula constricta* (以下、アゲマキと呼ぶ) は有明海特産の二枚貝であり¹⁾、主産地である本県においては産業的にも重要な水産資源の一つである。しかし、有明海では1988年から原因不明の異常弊死が発生し、1992年以降、湾奥部のアゲマキは全域にわたって激減状態となっている。このため、アゲマキ資源再生のため他海域から成貝を移植して母貝集団を育成することを1992年に計画された。しかし、移植に際しては、地域間の相違を明らかにする必要がある。これまで、アゲマキの相違については、形態学的には検討されているものの、集団遺伝学的解析はまだ行われていないので遺伝的差異を明らかにする必要がある。ここではアゲマキの集団遺伝学的解析に必要なアイソザイムの検索結果および遺伝解釈について述べる。本報告は、長崎大学水産学部資源生物学研究室で実施した受託研究の結果に基づいている。

材料及び方法

1. 供試標本

電気泳動諸条件の検討には有明海産アゲマキ10個体を供した。この研究で使用したアゲマキは、入手後直ちに斧足、中腸腺、外套膜の3部位を切り取り、各個体ごとに5mlのスクリー管に入れ-20℃または-40℃の冷凍庫に凍結保存した。

遺伝解釈の検討には図1に示す韓国の華城郡産 (st.1,

st.2)の2標本群、国内産は早津江川の2標本群と八代海の1標本群の5標本群で合計156個体を供した。このうち、韓国華城郡産のst.1とst.2との採集地点間の距離は

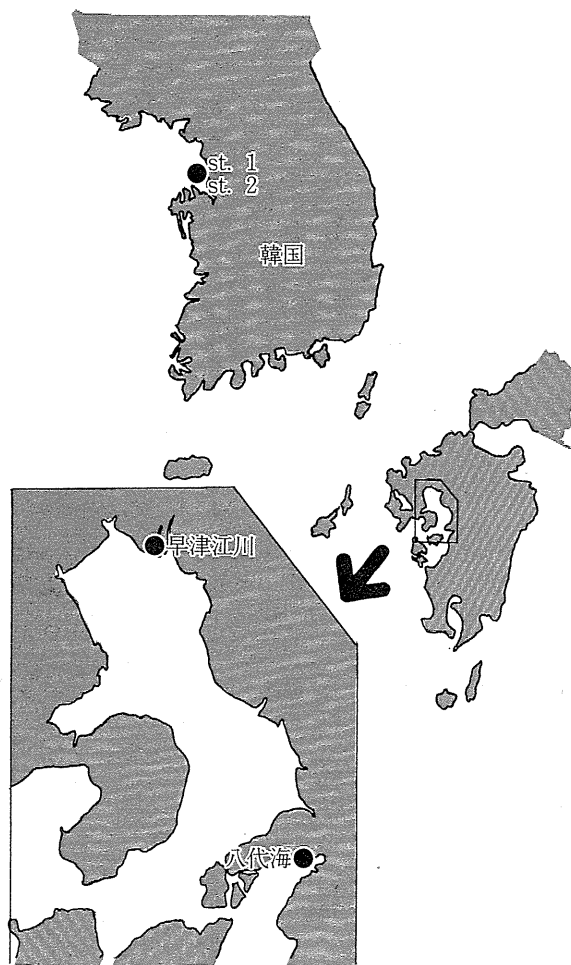


図1 アゲマキ標本の採取地点 (●)

* 長崎大学水産学部

表1 アゲマキの採集場所, 採集日, 個体数, 及び平均殻長

採集場所	採 集 日	個体数	平均殻長±SD
韓国 (st.1)	May. 28 1991	34	69±18
韓国 (st.2)	May. 28 1991	27	69±7
早津江 (大)	Jun. 28 1991	20	80±5
早津江 (小)	Jun. 28 1991	20	60±4
八代海	Sep. 15 1991	55	53±5

約10kmである。また、早津江川産の2標本群はほぼ同じ場所で採集されているが年級群が違ふ(吉本:未発表)。以下、89年生まれを早津江川(大)、90年生まれを早津江川(小)と表す。これらの採集年月日、個体数、殻長および重量を表1に示す。

2. 電気泳動

電気泳動用緩衝液には、表2に示すクエン酸-アミノプロピルモルホリン緩衝液 pH7.0(以下、C-APMと略す)²⁾とトリスクエン酸緩衝液 pH8.0(以下、T-Cと略す)³⁾を用いた。デンブengel作成にはコンノート社製加水分解デンブengelを用いた。

表2 デンブengel電気泳動用緩衝液

No.	緩 衝 液	電気泳動層用緩衝液	デンブengel用緩衝液
		1リットル当たりの成分	1リットル当たりの成分
1.	C-APM ²⁾	クエン酸8.4061gに3アミノプロピルモルホリンを加えpH7.0に調整	電気泳動層用緩衝液50mlに蒸留水を加え1リットルにする
2.	T-C ³⁾	クエン酸8.4061gにトリスクエン酸を加えpH8.0に調整	電気泳動層用緩衝液50mlに蒸留水を加え1リットルにする

表3 酵素の活性

酵 素 名 (略 号 と 酵 素 番 号)	緩衝液系と供試器官						
	C-APM ²⁾ (PH 7. 0)			T-C ³⁾ (PH 8. 0)			
	斧	足	外套膜	中腸腺	斧	足	外套膜
Alcohol dehydrogenase (ADH,1.1.1.1)	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH,1.1.1.8)	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol dehydrogenase (SDH,1.1.1.14)	-	-	-	+	+	+	+
Lactate dehydrogenase (LDH,1.1.1.27)	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GLYDH,1.1.1.29)	-	-	-	-	-	-	-
Malate dehydrogenase (MDH,1.1.1.37)	+++	++	++	++	++	++	++
Malic enzyme (ME,1.1.1.40)	+++	++	++	++	++	++	++
Isocitrate dehydrogenase (IDH,1.1.1.42)	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Phosphogluconate dehydrogenase (PGDH,1.1.1.44)	-	-	-	-	-	-	-
Glucose-6-phosphat dehydrogenase (G6PDH,1.1.1.49)	-	-	-	-	-	-	-
Octanol dehydrogenase (ODH,1.1.1.73)	-	-	-	-	-	-	-
Xantin dehydrogenase (XDH,1.2.1.37)	-	-	-	-	-	-	-
Xanthine oxidase (XO,1.2.3.2)	-	-	-	-	-	-	-
Superoxide dismutase (SOD,1.15.1.1)	-	-	-	-	-	-	-
Aspartate aminotransferase (AAT,2.6.1.1)	+++	++	-	++	+	-	-
Hexokinase (HK,2.7.1.1)	+	+	-	+	-	-	-
Adenylate kinase (AK,2.7.4.3)	+	+	-	+	+	-	-
Esterase (EST,3.1.1.1)	-	-	+++	-	-	+++	+++
Alkaline phosphatase (ALP,3.1.3.1)	-	-	-	-	-	-	-
Leucine aminopeptidase (LAP,3.4.11.1)	+++	+++	-	+++	++	-	-
Mannosephosphate isomerase (MPI,5.3.1.8)	++	-	-	++	-	-	-
Glucosephosphate isomerase (GPI,5.3.1.9)	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
Phosphoglucomutase (PGM,5.4.2.2)	++	++	-	+	-	-	-

+++ , 活性が強く収斂がよかったもの ;
 ++ , 活性が強いが収斂が悪く不安定のもの ;
 + , 活性が弱いもの ;
 - , 活性がないもの .

作成したテンプレートの陰極側から4分の1の所に切断面を入れ、その間に泳動用試料の解凍ドリップ液を染み込ませた大きさ3×6mmの濾紙(東洋科学製No.50,51)を挿入した。さらに、泳動距離の目安として1%アミドブラックを含ませた濾紙もゲルの両端に挿入した。電源には東洋科学製PS1510型電源装置を用い、通電量はゲル断面1cm²当たり3mA(1枠当たり18mA)とした。約15分間予備泳動した後、濾紙を抜き取り、その後約5時間泳動した。

検索を行った酵素は表3に示す23種類である。酵素名は以下、表中の略号で表す。泳動終了後、日本水産資源保護協会(編)⁴⁾に従って酵素を染色した。染色後のゲルは、約20分~1時間水道水で洗浄した。洗浄を終えたゲルの保存にはNumachi⁵⁾の方法を用い、フィルム状にして保存した。

スクリーニングを行った酵素の染色とゲルの保存も検索方法と同様に行った。

結果及び考察

1. 電気泳動条件

2種類の緩衝液における各酵素の電気泳動像の良否(活性と像の収斂)を表3に示す。斧足についてはMDH, ME, IDH, AAT, LAPおよびGPIの6

表4 遺伝解釈が可能な酵素, 組織, 緩衝液の組み合わせと推定された遺伝子座と対立遺伝子数

酵素	組織	緩衝液	遺伝子座	対立遺伝子数
MDH	斧足	C-APM pH7.0	MDH-1*	4
			MDH-2*	1
			MDH-3*	1
ME	斧足	C-APM pH7.0	ME-1*	—
			ME-2*	1
IDH	斧足	C-APM pH7.0	IDH-1*	6
			IDH-2*	4
AAT	斧足	C-APM pH7.0	AAT*	3
EST	中腸腺	T-C pH8.0	EST-1*	—
			EST-2*	4
LAP	斧足	C-APM pH7.0	LAP-1*	4
			LAP-2*	10
GPI	斧足	C-APM pH7.0	GPI-1*	6
			GPI-2*	—

—, 対立遺伝子数が推定できなかったもの

酵素がC-APMにおいて、中腸腺についてはESTのみがT-Cにおいて特に活性が強く、またバンドの収斂も良く、鮮明であった。

遺伝解釈の検討に供した酵素は検索で活性が強く、かつバンドの収斂がよかった先の7酵素を用いた。酵素活性があった組織と最適な緩衝液系、推定される遺伝子座、対立遺伝子数を表4に示す。遺伝子座と対立遺伝子の命名法はShaklee *et al.*⁶⁾に従った。以下にその酵素の遺伝解釈を述べる。

2. 遺伝解釈

1) MDH

スクリーニングの結果、泳動像に多型がみられ、泳動像から、本酵素は2量体の酵素で、3遺伝子座に支配されていると推測された。最も陽極側に移動する遺伝子座をMDH-1*、原点付近の遺伝子座をMDH-2*、陰極側に移動した遺伝子座をMDH-3*とした。泳動像からみて、MDH-1*には4対立遺伝子が推定された。MDH-2*とMDH-3*は多型はみられなかった。

2) ME

スクリーニングの結果、泳動像から2遺伝子座が推測されたが、より陽極側に移動する遺伝子座ME-1*は、像が不明瞭なため解析を行わなかった。原点寄りの遺伝子座ME-2*では、多型はみられなかった。

3) IDH

スクリーニングの結果、泳動像に多型がみられ、泳動像から、本酵素は2量体の酵素であり、2遺伝子座に支配されていると推測された。より陽極側に移動する遺伝子座をIDH-1*、原点付近の遺伝子座をIDH-2*とした。泳動像からみて、IDH-1*には6対立遺伝子、IDH-2*では4対立遺伝子が推定された。

4) AAT

スクリーニングの結果、泳動像に多型がみられ、泳動像から、本酵素は2量体の酵素で1遺伝子座に支配されており、3対立遺伝子があると推測された。

5) EST

スクリーニングの結果、泳動像に多型がみられ、泳動像から、本酵素は2量体の酵素であり、2遺伝子座に支配されていると推測された。より陽極側に移動する遺伝子座EST-1*は、像が不明瞭なため解析を行わなかった。原点よりの遺伝子座EST-2*では多型がみられ、4対立遺伝子があると推定された。

6) LAP

スクリーニングの結果、泳動像に多型がみられた。その泳動像から、本酵素は単量体の酵素であり、2遺伝子

座に支配されていると推測された。より陽極側に移動する遺伝子座を *LAP-1**, 原点よりの遺伝子座を *LAP-2** とした。泳動像からみて, *LAP-1** には 4 対立遺伝子, *LAP-2** では 10 対立遺伝子が推定された。

7) GPI

スクリーニングの結果, 泳動像に多型がみられた。その泳動像からみて, 本酵素は 2 量体の酵素であり, 2 遺伝子座に支配されていると推測された。より陽極側に移動する遺伝子座を *GPI-1**, 原点よりの遺伝子座を *GPI-2** とした。*GPI-2** は, 像が不明瞭なため解析を行わなかった。*GPI-1** には 6 対立遺伝子が推定された。

要 約

1. アゲマキの 23 酵素についてアイソザイムの有無を検討した。その結果, 斧足では MDH, ME, IDH, AAT, LAP および, GPI の 6 酵素が C-APM において, 中腸腺では EST のみが T-C において特に活性が強く, また電気泳動像の収斂も良く, 鮮明であった。
2. アゲマキのアイソザイム分析には韓国産 2 標本群および国内産アゲマキ 3 標本群の計 5 標本群, 合計 156 個体を使用した。分析には MDH, ME, IDH, AAT, EST, LAP, GPI の 7 酵素を用いた。こ

れら 7 酵素に 14 遺伝子座数が推定されたが, 3 遺伝子座は像が不明瞭なため解釈しなかった。以上の結果アゲマキでは 7 酵素, 11 遺伝子座, 計 44 対立遺伝子が遺伝解析に使えることがわかった。

文 献

- 1) R. T. Abbott, and S. P. Dance, (波部忠重・奥谷喬司監訳) 1985: 世界海産貝類大図鑑. 446pp, 平凡社, 東京.
- 2) J. W. Clayton, and D. N. Tretiak, 1972: Aminecitate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. *J. Fish. Res. B. Canada*, 29(8), 1169-1172.
- 3) C. R. Shaw, and R. Prasad, 1970: Starch gel electrophoresis of enzymes a compilation of recipes. *Biochem. Genetics*, 4, 297-320.
- 4) 日本水産資源保護協会 (編) 1989: 昭和 61~63 年度, 海洋生物集団の識別等に関する先導的評価手法の開発事業報告書アイソザイムによる魚介類の集団解析. 555pp, 日本水産資源保護協会.
- 5) K. Numachi 1981: A simple method for preservation and scanning of starch gels. *Biochem. Genetics*, 19 (3), 233-236.
- 6) J. B. Shaklee, F. W. Allendorf, D. C. Morizot, and G. S. Whitt, 1990: Gene nomenclature for protein coding loci in fish. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 119, 2-15.