水産生物のタンパク多型研究の新領域

藤 野 和 男

北里大学水産学部, 岩手県三陸町022-01

New Areas of Research on Protein Polymorphism in Aquatic Organisms

Kazuo Fujino

School of Fisheries Sciences, Kitasato University
Sanriku, Iwate 022-01

水産生物におけるタンパク多型研究の経緯

水産生物におけるタンパク多型研究が, 人および家畜類のそれより約30~50年遅れて1950年頃開始され, その後20数年間に急速な進歩を見せたことは既に述べた(藤野1978)。また近年におけるこの研究分野の遺伝・育種学への応用の成果と可能性に関しては, 昭和53年度日本水産学会主催のシンポジウムで討議され, 問題点の整理と将来展望が試みられ, 藤野(1979)はその総説で, タンパク多型の持つ生物学的意義を, その進化学的特性に基いていわゆる中立的なものと適応値を有するものとに分け, 前者の場合, 多型の遺伝子型頻度をHardy-Weinberg またはWright の遺伝的平衡の法則に基いて分析することにより繁殖構造を検討して水産資源の管理に役立て得ること, また後者の場合, 多型と受精率, 生残率, 成長・増重率, 広域適応性または生理活性との相関性を検討し, 育種学への応用の可能性を論じた。ここでは, 上述諸項中広域適応性に関連して最近アワビなどで明かにされた1) 酵素の耐熱性変異と温度適応性並びに2) アワビの種間交雑種にみられた多型現象などについて述べる。

酵素の耐熱性変異と温度適応性

1) 酵素の耐熱性変異研究の歴史 酵素の遺伝的性質に関して, 電気泳動の易動度の差に基く変異性とは別に, 熱抵抗性の差による変異性があることを初めて明かにしたのはBernstein ら(1973)であろう。即ち, 彼らはショウジョウバエの1種*Drosophila virilis* 標本の抽出液を予め $71.5^{\circ}\pm 0.25^{\circ}\text{C}$ で5, 10, または15分間異なる3段階で加熱処理後, 非加熱標本を対照として5.5%アクリルアミドゲル上で電気泳動し, キサンチン脱酸素酵素染色を行い, その熱変性に伴う活性低下の有無を検討した結果, 加熱5分で失活するものから同15分後においても活性を保持するものまで4群に分類可能で, それらの出現度数は*D. virilis* の異なる系統間で差を示したと報告している。また, *D. virilis* を含む数種の *drosophila* における対立遺伝子の数は, この耐熱性に基く変異性を加えることにより, 電気泳動の易動度のみによるその2~3倍に増加したとして

いる。そしてこれらの結果の進化学的意義をダーウィン説と非ダーウィン説の視点に立って論じた。Bernsteinらの研究に引続き、*drosophila*における耐熱性変異は、その後、アルコール脱水素酵素、エステラーゼ、アルファグリセロリン酸脱水素酵素、オクタノール脱水素酵素、およびフオススオグルコムターゼでも見出され、それらを含めた変異性は前述同様、電気泳動の易動度のみによる場合と比較して1.7～3倍に達し、電気泳動法で単型 (monomorphic) の場合でも耐熱変異性が存在することが明かにされている (Table 1)。その間、加熱処理法は、電気泳動前に抽出液

Table 1. Enzyme thermostability variations in the *Drosophila*.

Enzymes *	Heating conditions	Authors
Adh	35°C for 1.5 min. ; 40 or 43°C for 15 to 40 sec.	Sampsell 1977.
Es	57 or 59.5°C for 5, 10, 15, 20 min.	Cochrane 1976.
α Gpd	50 or 56°C for 5, 10, 15 min.	Bewley 1978.
Odh	55°C for 5, 10, 15 min.	Singh et al. 1975.
Pgm	37 or 60°C for 15 min.	Milkman 1976, Trippa et al. 1976 and 1978.
Xdh	66 or 71.5°C for 5, 10, 15, 20 min.	Bernstein et al. 1973. Singh et al. 1976.

* Adh, Es, α Gpd, Odh, Pgm, and Xdh denote alcohol dehydrogenase, esterase, alpha-glycerophosphate dehydrogenase, octanol dehydrogenase, phosphoglucomutase, and xanthine dehydrogenase respectively.

を試験管内で加熱する方法に加えて、泳動後のゲルを加熱する方法が用いられるようになった (Fig. 1 参照)。また、*drosophila* 集団間の遺伝的組成の比較では、電気泳動遺伝子頻度で差が見られぬ場合でも耐熱変異遺伝子頻度で屢々差が見られたとされている。そしてこのような耐熱変異の存在は、いわゆる selectionists と neutralists 間の意見の対立に解決を与え得るかも知れぬと論じられている。

このように、当初、*drosophila* で見出された耐熱性変異は、最近人のヘモグロビン (Hb) やグルコース6リン酸脱水素酵素 (G6pd) でも見られることが明かにされた。即ち、Bernsteinら (1980) は赤道アフリカにあるカメルーン共和国で部落住民の同意を得て家系調査と共に血液標本採集を行い、Hbの場合は赤血球から調整した溶血上澄を遠心後 $72.0^{\circ}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ で3, 6, 9分、またG6pdの場合は $52.5^{\circ}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ で3, 6, 9分熱処理し、耐熱性変異の検索を行ったところ、3種のヘモグロビン型、即ち、HbA (正常型)、HbS (鎌状赤血球症)、HbC (変異型) を通じて耐熱変異型3～13種類を、またG6pdでは同2～10種類を見出し、家系調査の資料と共に検討した結果、それらの耐熱性支配遺伝子座が、それぞれHbまたはG6pdの構造遺伝子座上にあること

Fig. 1. Zymogram, demonstrating pgm thermostability variations, consisting of a pair of unheated(upper) and heated (lower) layers of the sliced gel after electrophoresis of eight samples. Notice that some bands on the unheated gel disappeared on the heated gel. (Cited from Wilkins et al 1980).

を明かにし、これら変異型の進化学的意義を論じている。

以上述べた通り、現在迄に *drosophila* および人において血色素および7種の酵素の耐熱変異存在が明かにされ、またそれらの進化学的意義が論じられるに至ったが、例えば温度など特定の環境要素との相関に着目した論議は未だ行われていない。

2) 水産生物における酵素活性と温度との相関に関する研究 水産生物の酵素多型と生息地の水温との関連に関する先駆的研究について藤野(1978, 1979)は、Koehn(1969, 1970)およびWilliamsら(1973)の業績を紹介した。即ち、Koehnによれば、北アメリカ産の淡水魚 *Catostomus clarkii* の血清エステラーゼの3種の型 $E_s-1^{a/a}$, $E_s-1^{a/b}$, $E_s-1^{b/b}$ の酵素活性は温度相関性を示し、 $E_s-1^{b/b}$ は低温で、 $E_s-1^{a/a}$ は高温で、また $E_s-1^{a/b}$ は中間温度で高い活性を示した。野生集団中の出現率は、高温域(低緯度)では高温活性増大型 $E_s-1^{a/a}$ が高く、 $E_s-1^{b/b}$ は低く、緯度と共に多型の相対頻度は変化し、低温域(高緯度)では低緯度と逆の相対頻度を示し、これらの結果は酵素の生理作用の差にもとづく適応値の存在を示唆するものと解釈された。またWilliamsらは、アメリカウナギ *Anguilla rostrata* 野生集団に関する研究の結果、3種の酵素ソルビトール脱水素酵素、磷酸ヘキソーズアイソメラーゼ、およびアルコール脱水

素酵素支配の遺伝子頻度は、緯度相関性を示したことから、これらの事実はそれら酵素多型における適応値存在に基くものと推論した。しかし乍ら、この種の研究はその後酵素の耐熱性変異の様な多型が見出されぬまゝ見るべき進展を示さなかった。

ところが、前述の *drosophila* などにおける研究に刺激され、最近相次いで軟体動物の酵素耐熱性変異が明かにされた。

Gosling (1979) は、北アメリカ東岸ノースカロライナ州ビューフォート (北緯 35°) およびニューヨーク州ロングアイランド (北緯 41°) 産イガイ *Guekensia demissa* の標本から調整された閉殻筋抽出液を試験管に取り、60℃で15分間温浴加熱処理することにより、フオスフオグルコムターゼ (pgm) の耐熱性変異を見出し、ビューフォート産標本における耐熱 (R) 型の頻度は、ロングアイランド産のものより高く、その差は有意であったと述べ、それら産地における夏季最高水温 (ビューフォートで 33℃, ロングアイランドで 28℃) と pgm 耐熱性変異多型との相関を指摘し、この変異多型の生物学上の重要性を強調した。Wilkins ら (1980) は、エゾアワビ *Haliotis discus hanuui* またはクロアワビ *Haliotis discus* の貝殻筋抽出液をデンブソゲル電気泳動法により泳動後直ちにゲルをスライスして2層とし、その一方を冷蔵庫中に静置し、他方を気泡が入らぬ様注意しつつプラスチック膜で包み、55°±1℃で12分間温浴加熱・冷却後、前記非加熱ゲルと共に同一条件下で pgm 染色を行い、ゲル両層上の対応するバンドの pgm 活性を比較することにより、この酵素は電気泳動の易動度の差によって分けられる変異型とは全く異なる耐熱 (R) 型と非耐熱 (S) 型に区別可能なことを示した (Fig. 1)。更に、北海道から徳島県に至る4地域から得られたエゾアワビ標本127個体にみられた R-S 型支配遺伝子頻度と4地域に近い海洋観測

Table 2. Frequencies of pgm thermostability variant alleles in the Pacific abalone and water temperatures at the four locatinos of the coasts of Japan.*

Frequency of R-S allele	Okushiri Hokkaido	Sanriku Iwate	Oga Akita	Yuki Tokushima
p^R	0.530	0.610	0.857	0.923
q^S	0.470	0.390	0.143	0.077
No. of animals examined	50	50	14	13
Temperatures in C°	Washidomari Hokkaido	Todosaki Iwate	Nyudosaki Akita	Murotosaki Kochi
Highest	20.3 (August)	20.0 (September)	22.7 (Aug-Sep)	26.8 (August)
Lowest	2.0 (February)	5.7 (March)	7.2 (Feb-Mar)	14.0 (February)

* (cited from Fujino 1980).

Fig.2. Correlation between frequencies of thermosensitive variant allele q^S and the annual lowest temperatures (cited from Fujino 1980).

所における年間最高と最低水温との関係を検討したところ (Table 2), 非耐熱型遺伝子頻度 q^S は、北海道奥尻島から徳島県由岐町の間で 0.470~0.077 と順次低下し、これら 4 地域では年間的水温が最高・最低とも順次高くなって居り、 q^S とエゾアワビの生息地水温との間に負の強い相関がみられ、この相関は最低水温との間で一層明瞭に示された (Fig. 2)。藤野ら (1980) は、北海道サロマ湖産と岩手県野田村産ホタテガイの pgm の R-S 型について全く同様に q^S と生息地水温との相関が見られたと報告した。

この様に、今迄報告された水産生物 3 種すべてに共通して見られるこの現象は、一般に、酵素の耐熱性変異が生物の温度適応度と密接な関連性を有することを強く示唆する。藤野ら (1981) は、エゾアワビにおいて最近 pgm の外エステラーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などでも R-S 型変異が見られたとし、今後、海藻を含む水産生物において複数の酵素の耐熱性支配遺伝子の温度適応度に対する相加的作用を検討することにより、効果的な適地適作型水産増養殖が可能となりその生産性向上が期待出来ると育種学上の有用性を論じた (藤野 1980)。

酵素支配遺伝子座の存否による近縁種判別と雑種多型

我国に産する産業上有用なアワビは数種あるが、それらの中エゾアワビは冷水系種で他は暖水系種とされる。猪野 (1953) によれば、エゾアワビはクロアワビの地方的変種とされるが形態学的には互に酷似し、両者を区別する指標とされた貝殻の外部特性などは産地により顕著な変異性を示すため、個体毎に明快な種判別を行うことは困難である。そこで、Fujino ら (1980), Sasaki

Fig.3. Zymograms for six enzymes in some selected specimens from *Haliotis discus hannai* Ino (A), *H. discus* Reeve (B), *H. gigantea* Gmelin (C), *H. sieboldii* Reeve (D), and *H. japonica* Reeve (E) (cited from Sasaki et al. 1980).

ら (1980) は組織中酵素の電気泳動像を比較したところ、ソルビトール脱水素酵素 (Sdh)、アデニレートキナーゼ (Adk)、リンゴ酸脱水素酵素 (Mdh)、およびフォスフォグルコースアイソメラーゼ (Pgi) 支配遺伝子座の存否によって両種を極めて明確に区別出来ることを明かにした (Fig. 3)。この方法によって、秋田県男鹿市 (戸賀湾) および徳島県由岐町 (阿部) などから潜水によって採取された標本を分析したところ、これらの水域にはエゾアワビとクロアワビの外に両種間自然雑種が同所的分布をし、しかもそれら雑種は既述の4酵素支配遺伝子座の存否に関して多型を示すことを明かにした (Table 3)。このTableによれば、秋田、新潟、山口県などでは雑種多型の種類は、理論的に可能な14種類中2種類に限られているのに対して、徳島県ではより多く (現在までに8種類) が出現し、この現象は今後生態遺伝学上興味ある課題となろう。以上、水産生物の

Table 3. Polymorphic hybrids between *H. discus hannai* and *H. discus* as demonstrated by presence (+) or absence (−) of the four loci encoding Sdh, Adk·F, Mdh·F', and Pgi·F.

Parental species or hybrids	Locus of :				Oga, Akita		Niigata	Yamaguchi	Mie	Tokushima		Chiba	Total
	Sdh	Adk·F	Mdh·F'	Pgi·F	1979	1980	Awa Is.	Nagato	Shima	Yuki	Anan	Chikura	
<i>H. discus hannai</i>	+	−	−	−	14	9	6	4	4	13	9	8	67
<i>H. discus</i>	−	+	+	+	4				1	2	2		9
H*1 y b r i d s	1	+	+	+	5		8		1	8	8		30
	2	+	+	+	−					2			2
	3	+	+	−	+								0
	4	+	−	+	+						2		2
	5	+	−	−	+	32		1	1		7		41
	6	+	−	+	−						1		1
	7	+	+	−	−						2		2
	8	−	+	+	−								0
	9	−	+	−	+								0
	10	−	−	+	+								0
	11	−	−	−	+						1		1
	12	−	−	+	−								0
	13	−	+	−	−								0
	14	−	−	−	−						4	30	34
Number of animals examined					23	41	14	5	7	28	33	38	189

*1 Among 14 kinds of polymorphic hybrids theoretically possible, 8 kinds have been observed.

*2 Artificial origin (cited from Fujino et al 1981).

タンパク多型研究の2つの新しい領域について最近の事例を参考として述べた。これらの遺伝・育種学上の意義並びに今後の関連課題に関しては藤野ら（1981）を参照されたい。

謝 辞

本報中アワビ関連の研究実施に当り、外国人研究者招へいおよび学術奨励金供与でご援助を戴いた日本学術振興会並びに三島海雲記念財団に対して深甚の謝意を表す。

文 献

Bewley, G. C., 1978 Biochem Genet., 16 : 769-775.
Bernstein, S. C., J. E. Bowman and L. K. Noche, 1980 Biochem. Genet., 18 : 21-37.
Bernstein, S. C., L. H. Throckmorton and J. L. Hubby, 1973 Proc. Nat. Acad. Sci., 70 : 3928-3931.
Cochrane, B. J., 1976 Nature, 263 : 131-132.

- 藤野和男, 1978 家畜血液型研究情報, 6 : 1-11.
- 藤野和男, 1979 水産生物の遺伝と育種, 水産学シリーズ, 26, 140pp. 恒星社厚生閣, 東京.
- 藤野和男, 1980 遺伝, 35 : 77-84.
- 藤野和男・松谷誠, 1980 水産育種, 5 : 13-17.
- 藤野和男・佐々木喜代志・奥村誠一・荒井克俊, 1981 水産育種, 6 : 印刷中.
- Fujino, K., K.Sasaki and N.P.Wilkins, 1980 Bull.Jap.Soc.Sci.Fish., 46 : 543-548.
- Gosling, E., 1980 Nature, 279 : 713-715.
- 猪野峻, 1953 邦産アワビの増殖に関する生物学的研究, 108pp. 東海書房, 東京.
- Koehn, R.K., 1969 Science, 163 : 943-944.
- Koehn, R.K., 1970 Trans.Amer.Fish.Soc., 99 : 219-228.
- Milkman, R., 1976 Biochem.Genet., 14 : 383-387.
- Sampsell, B., 1977 Biochem.Genet., 15 : 971-988.
- Sasaki, K., K.Kanasawa and K.Fujino, 1980 Bull.Jap.Soc.Sci.Fish., 46 : 1169-1175.
- Singh, R.S., J.L.Hubby and L.H.Throckmorton, 1975 Genetics, 80 : 637-650.
- Singh, R.S., R.C.Lewontin and A.A.Felton, 1976 Genetics, 84 : 609-629.
- Trippa, G., A.Catamo, A.Lombardozzi and R.Cicchetti, 1978 Biochem. Genet., 16 : 299-305.
- Trippa, G., A.Loverre and A.Catamo, 1976 Nature, 260 : 42-44.
- Wilkins, N.P., K.Fujino and K.Sasaki, 1980 Bull.Jap.Soc.Sci. Fish., 46 : 549-553.
- Williams, G.C., R.K.Koehn and J.B.Mitton, 1973 Evolution, 27 : 192-204.