4種のカワニナの酵素の電気泳動

尾庭きよ子・木村正雄*

岐阜県立大垣女子高校, 大垣市 503

*岐阜大学農学部, 岐阜市 501-11

Electrophoretic Patterns of Enzymes in Four Species of the *Semisulcospira* Snail.

Kiyoko Oniwa and Masao Kimura*

Gifu Prefectural Girl's High School at Ōgaki, Ōgaki 503

*Faculty of Agriculture, Gifu University, Gifu 501-11

日本産の *Semisulcospira* 属のカワニナには9種あることが知られているが、それらの内のいくつかのカワニナについては外観が相互に酷似していて分類が難しい。我々は遺伝学的な興味からこれまでにカワニナ44集団とチリメンカワニナ24集団について、これらの集団間の遺伝的組成についての比較、また集団内における遺伝子頻度、経時的変化について数年来調査を続けている。その際、遺伝標識としては蛋白質を支配する遺伝子を利用しているが、この電気泳動法がその他のカワニナの分類にどれ位有効であるかを検討しようとしてあらためて調査を開始した。今回は外観から比較的に分類同定が易い4種のカワニナについての調査結果について報告する。

分析したカワニナの和名と学名は次の通りである。カワニナ *Semisulcospira libertina*, チリメンカワニナ *S. reiniana*, ヤマトカワニナ *S. niponica*, タテヒダカワニナ *S. decipiens*。

カワニナは滋賀県の各地から採取した(第1図)。分析した蛋白質と電気泳動条件は第1表に示したとおりである。斧足筋の抽出物を電気泳動に供した。試料の調整, 酵素活性の検出方法, 電気泳動像の解釈, 実験結果のとりまとめなどは前報 (Kimura & Oniwa, 1984) のそれらに準じて行なった。

電気泳動像において種内で、あるいは種間で、易動度の差にもとづいた変異が認められ、さらに遺伝様式のあてはめが、可能であった蛋白質座位における対立遺伝子の頻度を第2表に示した。

PGMについては、遺伝子頻度の点で種間に差がみられた。なおこの第2表ではタテヒダカワニナにおいてのみ遺伝子AとCが出現しているが、この2つの遺伝子がタテヒダカワニナに固有のものというのではなく他のカワニナ集団においてもすでに発見されている (Kimura & Oniwa, 1984)。

第1図 カワニナ採取場所

PHIは、他の3つのカワニナ種では遺伝子Aが主要なものであるのに反して、タテヒダカワニナでは逆にBで固定されていた。6PGDは、ヤマトカワニナとタテヒダカワニナがそれぞれ異った遺伝子ではば固定されているといえる。カワニナとチリメンカワニナは遺伝子AとDの存在に関して特徴がみられ、Aの出現する集団はチリメンカワニナ、Dの場合はカワニナと考えてもよい。

MPIについては、各種内においては個体変異はみられず、チリメンカワニナのみが他の3種と異なり遺伝子Bで固定されていることが注目される。

ICDH-1とMDH-1については、ごくまれな遺伝子がヤマトカワニナに、あるいはヤマトカワニナとタテヒダカワニナにおいて存在した。さきの報告 (Kimura & Oniwa, 1984) ではこれら2つの酵素についてまれな遺伝子がカワニナでも同様に検出されている。AATについては、カワニナにおいてのみ個体変異が存在した。

非特異的エステラーゼについても分析したが、 α ナフチルブチレートを経質として用いた時には、濃く染まるバンドがスロットのところとその陽極側の計2カ所において検出される。その内のスロットのところのエステラーゼEs-3に個体変異がみられた。カワニナでは易動度の一番遅いCバンドの出現が注目された。逆にヤマトカワニナでは、頻度は低いだが、易動度の早いバンド(A)が出現した。

第1表 各蛋白質の分析条件

蛋白質名 (略号)	座位数	電気泳動条件※
ホスホグルコミターゼ (PGM)	1	A
6 ホスホグルコン酸脱水素酵素 (6 PGD)	1	D
ホスホヘキソース・イソメラーゼ (PHI)	1	A
マンノース・ホスホヘート・イソメラーゼ (MPI)	1	D
リンゴ酸脱水素酵素 (NAD依存性) (MDH)	2	C
〃 (NADP依存性) (ME)	1	B
アデニレート・キナーゼ (AK)	1	B
イソクエン酸脱水素酵素 (ICDH)	2	C
テトラゾリウム・オキシダーゼ (TO)	2	B
アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AAT)	1	E
エステラーゼ (Es)	3	D
エステラーゼD (Es-D)	2	D

※A：トリス・クエン酸緩衝液 pH7.0, 15V/cm, 4時間
(Shaw & Prasad., 1970)

B：トリス・ホウ酸・EDTA緩衝液 pH9.0, 20V/cm, 5時間
(Coonerら, 1969)

C：トリス・クエン酸緩衝液 pH8.0, 10V/cm, 2時間
(Schmidtkeら, 1978)

D：クエン酸・モルホリン緩衝液 pH6.1, 10V/cm, 18時間
(Clayton & Tretiak, 1972)

E：トリス・クエン酸・ホウ酸 pH8.4, 15V/cm, 3時間
(Blancoら, 1969)

中間の易動度のBバンドは、ごくわずかの易動度の差にもとづいて、さらにいくつかのサブバンドに分けることも不可能ではなかったが、あまりにも分類が複雑になり区分の正確さに疑問が生ずる恐れがあった。さらに的確な分析条件が確立されるまでは、これらのサブバンドは一括してBバンドとし、ここでは細分類はしないことにする。陽極域のエステラーゼEs-2には種内種間における易動度の差はみられなかった。このEs-2のさらに陽極寄りに別の1つのエステラーゼEs-1が存在するが、この酵素は α ナフチル・アセテートを基質にして用いた時にのみ検出され、Es-2と同様に変異はみられなかった。

エステラーゼDについては、ゲルの陽極端に強い活性が存在した(Es-D₁)。このエステラーゼに関しては種内変異は認められなかったが、種間に易動度の差が認められた。スロットの陰極側にも強い活性がみられたが、このEs-D₂については種内種間のいづれにおいても変異は認められなかった。

第2表 各蛋白質座位に

		PGM-1				PHI		6PGD			
		A	B	C	D	A	B	A	B	C	D
カワニナ	伊吹	(24)	—	0.063	—	0.937	(24) 0.958	0.042	(24)	—	0.750 0.125 0.125
	浅井	(48)	—	0.229	—	0.771	(48) 0.573	0.427	(48)	—	0.594 0.198 0.208
	湖北	(26)	—	—	—	1.000	(26) 0.827	0.173	(26)	—	0.577 0.135 0.288
チリメン	山東	(48)	—	0.927	—	0.073	(48) 1.000	—	(48)	0.042	0.385 0.573 —
	米原	(87)	—	0.966	—	0.034	(87) 1.000	—	(87)	0.126	0.512 0.362 —
	稲枝	(35)	—	1.000	—	—	(35) 1.000	—	(35)	0.129	0.486 0.385 —
ヤマト	近江八幡	(126)	—	0.940	—	0.060	(126) 0.996	0.004	(126)	—	1.000 — —
	マキノ	(104)	—	0.976	—	0.024	(104) 1.000	—	(104)	—	0.981 0.019 —
タテヒダ	近江八幡	(23)	0.087	0.674	0.065	0.174	(23) —	1.000	(23)	—	— 1.000 —
	マキノ	(38)	0.158	0.776	—	0.066	(38) —	1.000	(38)	—	— 1.000 —

		Es-3			Es-D ₁	
		A	B	C	A	B
カワニナ	伊吹	(24)	—	0.125 0.875	(24) 1.000	—
	浅井	(48)	—	0.312 0.688	(48) 1.000	—
	湖北	(26)	—	0.308 0.692	(26) 1.000	—
チリメン	山東	(48)	—	1.000 —	(48) 1.000	—
	米原	(56)	—	1.000 —	(56) 1.000	—
	稲枝	(35)	—	1.000 —	(35) 1.000	—
ヤマト	近江八幡	(116)	0.108	0.892 —	(116) —	1.000
	マキノ	(80)	0.019	0.981 —	(80) —	1.000
タテヒダ	近江八幡	(23)	—	1.000 —	(23) —	1.000
	マキノ	(38)	—	1.000 —	(38) —	1.000

脚注

() 内は調査個体数
種内あるいは種間に変異のない
蛋白質は, ME, To-1, To-
2, MDH-2, AK, ICDH-2,
Es-1, Es-2, Es-D₁の9つ
であった。

各集団における変異性も多型座位の割合 (P poly) と平均ヘテロ接合体率 ($\bar{H}$) であらわすと, カワニナ, チリメンカワニナ, ヤマトカワニナ, タテヒダカワニナの P poly はそれぞれ, 0.241 ± 0.064 , 0.093 ± 0.031 , 0.195 ± 0.038 , 0.084 ± 0.038 となった。また $\bar{H}$ についてはそれぞれ 0.081 ± 0.021 , 0.035 ± 0.002 , 0.019 ± 0.016 , 0.027 ± 0.009 となった。カワニナ とチリメンカワニナは各地に広く分布し, 一方ヤマトカワニナとタテヒダカワニナは, 琵琶湖と淀川水系に固有の種である。広域分布種のカワニナの変異性の値がヤマトカワニナやタテヒダカワニナの 2～3 倍大きいのは予想され得ることかもしれないが, 同じ広域種に属するチリメンカワニナのこれらの

おける遺伝子頻度

MPI		ICDH-1				MDH-1			AAT	
A	B	A	B	C	D	A	B	C	A	B
(24) 1.000	—	(24) 1.000	—	—	—	(24) —	1.000	—	(24) 0.708	0.292
(48) 1.000	—	(48) 1.000	—	—	—	(48) —	1.000	—	(48) 0.958	0.042
(26) 1.000	—	(26) 1.000	—	—	—	(26) —	1.000	—	(26) 1.000	—
(48) —	1.000	(48) 1.000	—	—	—	(48) —	1.000	—	(48) 1.000	—
(87) —	1.000	(87) 1.000	—	—	—	(87) —	1.000	—	(87) 1.000	—
(35) —	1.000	(35) 1.000	—	—	—	(35) —	1.000	—	(35) 1.000	—
(126) 1.000	—	(126) 0.952	0.004	0.040	0.004	(126) 0.087	0.913	—	(126) 1.000	—
(104) 1.000	—	(104) 1.000	—	—	—	(104) —	1.000	—	(104) 1.000	—
(23) 1.000	—	(23) 0.935	—	0.065	—	(23) —	1.000	—	(23) 1.000	—
(38) 1.000	—	(38) 1.000	—	—	—	(38) —	1.000	—	(38) 1.000	—

値が少し低すぎるようにみえる。これは今回の調査に限ってのことではないことは、遺伝距離の点で見ると、これまでに調べた中部地方のカワニナ（44集団）とチリメンカワニナ（24集団）における同一種内各集団間の遺伝距離が、それぞれ 0.0394 ± 0.0353 と 0.0027 ± 0.0031 であることからわかる（未発表）。広域分布種のチリメンカワニナの種内分化の程度がこのように比較的到低い理由についてはよくわからない。

4種10集団間の遺伝的な関係を見るため、第2表に示した18座位の遺伝子頻度を用いて根井（1977）の遺伝距離Dを計算して第3表に示した。さらにこの表にもとづきデンドログラムを作製し、第2図に示した。ここで得られた類縁関係はまったく予想どおりの結果で、この電気泳動法は各種のカワニナの分類に有効であるということがいえる。なお、従来行われているカワニナの分類法としては、核型分析、育児嚢中の胎児数、殻底の肋の数、成殻や胎殻の形態の計測、生態などに関するものがある。Davis（1969）によるとカワニナは2つの群に大別できるといわれ、1つはカワニナ（*libertina*）群で、他はヤマトカワニナ（*niponica*）群である。前者の染色体数は $n = 18 \sim 20$ 、殻座の肋数は7か或はそれ以上、胎児数は100或はそれ以上である。後者はそれぞれ $n = 7 \sim 14$ 、2～6、5～25位であるといわれる。チリメンカワニナは前者に属し、タテヒダカワニナは後者に属する。

現在これらのカワニナの他に、クロダカワニナ（*S. takasagoensis*）やイボカワニナ（*S. multigerranasa*）の分析を実施中であり、さらにその他の3種（*S. nakasekoeae*、*S. reticulata*、*S. habei*）についても分析を計画している。分析方法についてもさらに検討を加え、採取が可能であれば、亜種或は地方種のレベルでの検討を行いたいと考えている。

第3表 カワニナ各集団間の遺伝距離 $D \times 10^4$ 18座位の遺伝子頻度から計算した

		カワニナ			チリメン			ヤマト		タテヒダ	
		伊吹	浅井	湖北	山東	米原	稲枝	近江八幡	マキノ	近江八幡	マキノ
カワニナ	伊吹	×									
	浅井	176	×								
	湖北	100	74	×							
チリメン	山東	1774	1445	1602	×						
	米原	1750	1436	1598	20	×					
	稲枝	1799	1473	1647	18	1	×				
ヤマト	近江八幡	1644	1419	1565	1468	1362	1376	×			
	マキノ	1696	1451	1608	1421	1318	1329	10	×		
タテヒダ	近江八幡	2613	1689	2166	2047	2183	2171	1259	1482	×	
	マキノ	2709	1758	2271	2013	2142	2126	1236	1192	11	×

第2図 カワニナ集団間の類縁関係

調査を行うにあたり，数多くの御教示をいただいた関西大学・紀平 肇氏，琵琶研・前畑政善氏に感謝する。

文 献

Davis, G. M., 1969 *Malacologia.*, 7:211-294.

Davis, G. M., 1969 *Jap. J. Parasit.*, 18:93-119.

Kimura, M. & K. Oniwa, 1984 *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.* 15: 71-76.

根井正利, 1977 人類学講座 10 巻, 29 頁, 梶山閣出版, 東京

太田 秀, 1974 遺伝, 28 (7): 55-61.