

# アコヤ貝の形質評価と品種判別技術の開発に関する研究

栗田 修<sup>\*</sup>, 林 政博<sup>\*\*</sup>

## Study on Character and Discrimination of the Breeding for Akoya Oyster (*Pinctada fucata*)

by Osamu KURITA and Masahiro HAYASHI

The activity of carbonic anhydrase (CA) was positively correlated to the respiratory activity in crude extracts prepared from grill of Akoya oyster. The availability for estimation of character preferred the ratio of the CA activities of mantle and grill to that of grill that has been used as an index of character so far. Two dimensional electrophoresis analysis for crude extracts of shell-ligament revealed that the breeding between the Japanese oyster and the cross oyster between Japan and China was able to discriminate. These observations point to a significant utilization of the distinguished breeding for Akoya oyster.

Key words: *Pinctada fucata*, carbonic anhydrase, grill, mantle

### 1. はじめに

近年、病原体の感染によるアコヤ貝の大量斃死が問題となり、その対策として中国系貝の導入が行われている。しかしながら、中国系貝は成長が遅く、その真珠も日本貝と比べて品質が劣るなどの問題がある。このことから、三重県でも感染症に対する耐病性の優れた貝の作出を行ってきた<sup>1)</sup>。その優良系統の作出を行うためには、選抜育種の指標が重要で、これまでに血球の性状や炭酸脱水酵素活性がその指標として知られている<sup>2)</sup>。病原体に感染したアコヤ貝は、その血球崩壊が著しく、併せて貝柱の赤変が起こることが知られており、この血球の性状指標を利用して耐病性貝の「松」が作出された<sup>2)</sup>。一方、炭酸脱水酵素活性は、貝殻及び真珠の主成分である炭酸カルシウムの代謝

に関わる酵素であることから、真珠の品質向上のための指標とされてきた。近年、炭酸脱水酵素活性の高い貝が、感染症に対して抵抗性があることが明らかとなり、親貝の選抜育種の指標としても広く利用されつつある<sup>3)</sup>。この炭酸脱水酵素活性は、外套膜または血液をその試料としていたが、本研究では、外套膜と鰓の炭酸脱水酵素に注目し、その活性比が斃死率と高い相関があることを報告する。

現在、アコヤ貝の中国産系貝と日本系貝との交雑（ハイブリッド）系貝が広く真珠生産の母貝として利用されている。このことから、日本並びに中国産貝の遺伝的指標による識別法が求められ、遺伝子レベルによる系統解析が盛んに行われている<sup>4), 5)</sup>。これらの識別法は品種判別が主目的で、優良貝の選抜指標として利用するには不十分である。本研究では、品種判別方法として、タンパク質の

\* 生物食品グループ

\*\* 水産研究部水産資源育成グループ

二次元電気泳動解析を用いた。そして、アコヤ貝の貝柱抽出タンパク質の二次元電気泳動解析は品種判別・形質評価に有用であることを報告する。

## 2. 実験方法

### 2. 1 材料

アコヤ貝は山口県下関産，東京都八丈産，和歌山県田辺産，長崎県五島産，三重県産松 No. 2, 4, 5, 8, 11 を用いた。

### 2. 2 酵素液の調製と酵素活性

アコヤ貝の外殻膜または鰓 30-500mg を 1mM EDTA, 1mM DTT を含む 50mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.6) 約 10ml に懸濁し，ホモジナイザーで 30 秒間粉碎後，8,000×g で 10 分間遠心した上清を粗酵素液とした。炭酸脱水酵素活性の測定は，Armstrong らの方法<sup>6)</sup> に従った。タンパク質の濃度は Bradford 法<sup>7)</sup> により，牛血清アルブミンを標準物質として決定した。

### 2. 3 貝柱抽出タンパク質の調製と二次元電気泳動解析

貝柱約 1g を 6M 尿素，1mM EDTA，4% Tergitol NP-40 を含む 50mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) 5ml に懸濁し，ホモジナイザーで 2 分間粉碎した後，14,000×g，10 分間遠心した上清を二次元電気泳動の試料とした。調製した約 20 μg のタンパク質を用いて，アマシャム・バイオサイエンス製の Multiphor II で二次元電気泳動を行った<sup>8)</sup>。一次元目は，Immobiline DryStrip pH4-7 ゲルを用いて 300V，1 時間行った後，1200V で 18 時間泳動した。次に，二次元目は 12.5%SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて，600V で約 2 時間泳動した。タンパク質の検出は，アマシャム・バイオサイエンス製の Protein Silver Staining Kit を用いて行った。

## 3. 結果と考察

アコヤ貝の鰓からの粗酵素液について，呼吸活性と炭酸脱水酵素活性の関係について検討した。その結果，図 1 に示すように，呼吸活性と炭酸脱水酵素活性との間に，高い正の相関を確認した。この事は，鰓はアコヤ貝自体の呼吸を行う器官としてだけでなく，呼吸により生じた二酸化炭素の炭酸への変換と，引き続いて起こる炭酸イオンの炭酸カルシウムへのバイオミネライゼーションと

深く関わっていることが推測できる。これらの呼吸活性と炭酸脱水酵素活性を形質評価指標として考えた場合，前者は測定に対して特殊な機器（クラーク型溶存酸素計）を要するのに対して，後者は汎用機器である分光光度計で測定できることから，炭酸脱水酵素活性の方が養殖現場での測定法として優位であると考えられる。

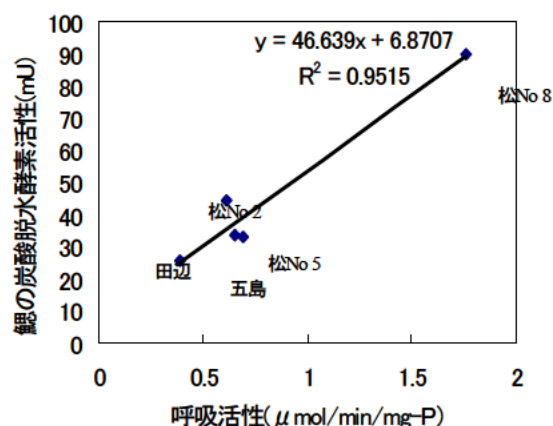


図 1 鰓抽出粗酵素液中の炭酸脱水酵素と呼吸活性との関係

5 種類（田辺，五島，松 No. 2，5，8）の国内産アコヤ貝の鰓を分離し，組織破碎後抽出して得られた粗酵素液について活性を測定。

次に，斃死率で見た場合の形質評価について，従来用いられていた外殻膜の炭酸脱水酵素と鰓及び外殻膜の活性比の形質評価指標について比較した。その結果を図 2 に示す。外殻膜の活性では，斃死率にばらつきがあり，特に試料間の差は認められなかった。それに対して，外殻膜／鰓の炭酸脱水酵素活性比では，試料間の差が認められ，かつその比が大きいほど斃死率が低いことが明らかとなった。なお，八丈産のアコヤ貝についてはその相関からはずれた。少なくとも，今回の結果から同一系統の種についての斃死率の優劣は外殻膜／鰓の炭酸脱水酵素活性比により，判別できると考える。

アコヤ貝の類縁関係の識別として，正岡らは，アコヤ貝の貝柱より DNA を抽出し，18S, 28SrRNA の遺伝子領域の塩基配列により，系統間の識別が可能であることを報告している<sup>4)</sup>。また，晦日は

3種のアコヤ貝について、7通りのプライマーを用いることで識別ができることを報告した<sup>9)</sup>。しかしながら、これらの研究は系統間の差を見いだすに留まっており、系統判別と形質評価を兼ね備えた判定法はこれまでのところ知られていない。本研究では、斃死の際に貝柱の赤変化が起きるといふ事実に注目し、貝柱のタンパク質を二次元電気泳動で解析した。

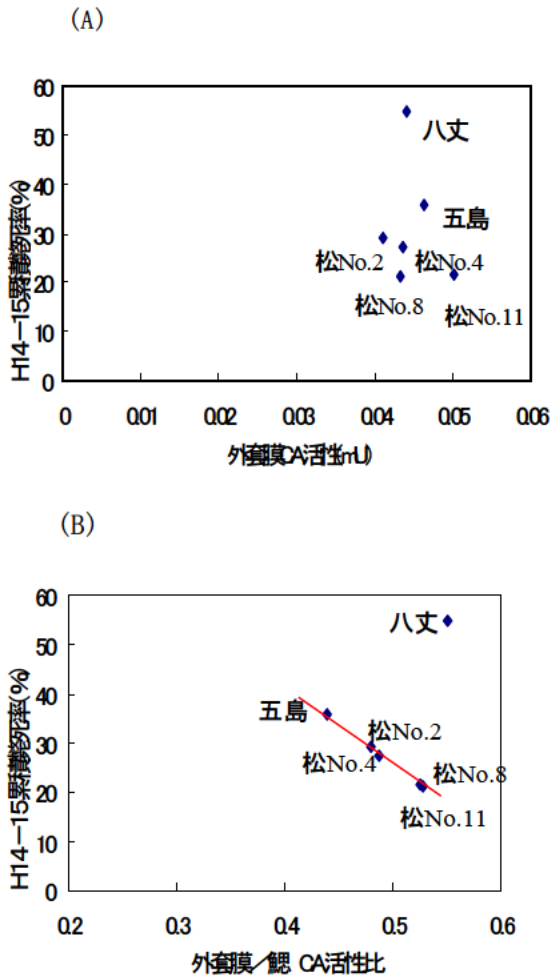


図2 外套膜における炭酸脱水酵素活性A及び外套膜/鰓の炭酸脱水酵素活性比Bと平成14-15年度累積斃死率との関係について  
6種類(八丈, 五島, 松No.2, 4, 8, 11)の国内産アコヤ貝の鰓又は外套膜を分離し, 組織破碎後抽出して得られた粗酵素液について, 炭酸脱水酵素活性を測定。

アコヤ貝貝柱抽出タンパク質の二次元電気泳動

パターンを図3に示す。等電点pH4-7の範囲に検出されるタンパク質は多く, 特に酸性側に等電点を有するタンパク質が多く含まれることを確認した。なお, 等電点pH4-10についても検討を行ったが, より多くのタンパク質が検出されるものの, 分離能の点から識別法に用いるには困難と判断した。

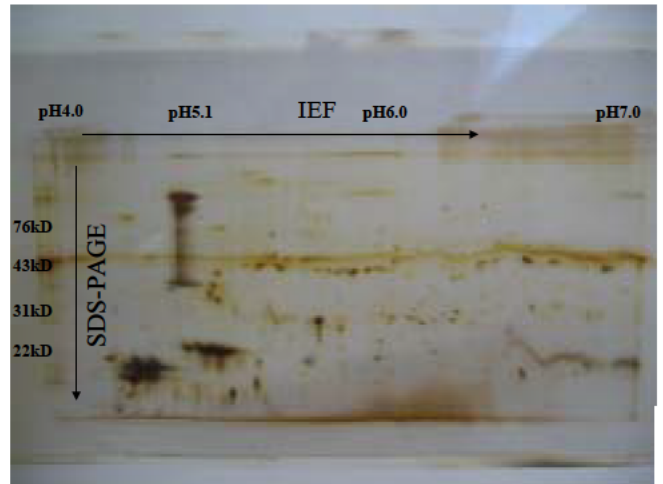


図3 アコヤ貝抽出タンパク質の二次元電気泳動パターン

貝柱を6M尿素, 1mM EDTA, 4% Tergitol NP-40を含む50mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0)に懸濁・粉碎した後, 14,000×g, 10分間遠心した上清液を二次元電気泳動の試料とした。

次に, 日本系貝と中国・日本交雑系貝(ハーフ貝)について, 同方法により識別ができるかどうかを検討した。その結果, 等電点5.2, 分子量33kDと等電点5.4, 分子量48kDの2つのタンパク質に

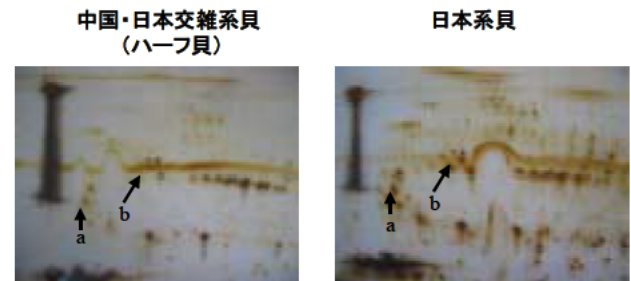


図4 中国・日本交雑系貝と日本系貝の二次元電気泳動パターンの比較

- a. pI5.2, MW33kD
- b. pI5.4, MW48kD

おける発現量が、ハーフ貝と日本系貝との間に差があることを確認した(図4)。日本系貝は中国・日本交雑系貝と比べて、この2つのタンパク質の発現量が多いことが明らかとなった。

また、閉殻筋力に差のある日本系貝について検討した結果、等電点5.5、分子量31kDと等電点5.5、分子量29kDの2つのタンパク質における発現量が、閉殻力の強い貝と弱い貝で差があることを確認した(図5)。アコヤ貝は斃死率が高いほど、その閉殻力が弱い傾向にあり、今回の結果から、二次元電気泳動を用いたタンパク質の発現量の差により、系統判別に加えて、斃死率などの形質評価についても利用できる可能性を見いだした。

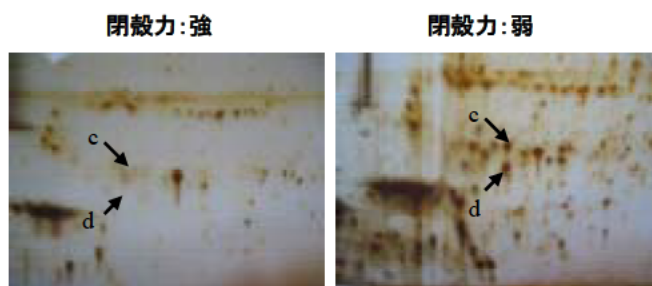


図5 閉殻力に差のある日本系貝の二次元電気泳動パターンの比較

- c. pI5.5, MW31kD
- d. pI5.5, MW29kD

本研究では、二次元電気泳動パターンの比較から識別法の確立のための検討を行ったが、今後差異タンパク質の同定を行うことにより、より精密・迅速な識別・形質評価法が確立されるであろう。

#### 4. まとめ

アコヤ貝の形質評価において、従来用いられていた外套膜の炭酸脱水酵素活性よりも外套膜/鰓の炭酸脱水酵素活性比の方が斃死率の観点から有用であることを確認した。また、アコヤ貝の貝柱抽出タンパク質の二次元電気泳動解析により、国別の判定と斃死率と関係のある形質評価にも利用できる可能性を見いだした。

#### 参考文献

1) 林政博: “高品質アコヤ貝育成強化事業”。三重

県科学技術振興センター水産研究部事業報告, 1-7 (2003)

2) 内村祐之他: “新しい選抜育種による日本産アコヤガイの選抜育種”. <http://www2.ocn.ne.jp/~chusui/sg13-4.html>

3) 西川智他: “アコヤガイの炭酸脱水酵素の貝体形成への関与”. 愛媛県水産試験場研究報告 9, 1-4 (2001)

4) 正岡哲治他: “18SrRNA及び28SrRNA領域を用いたアコヤガイ属における系統関係”. DNA多型 10, 100-104 (2001)

5) 正岡哲治他: “28SrRNA全領域及びITS領域を用いたアコヤガイ属の類縁関係”. DNA多型 11, 76-81 (2002)

6) Armstrong J.M. et al.: “Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrases.” *J. Biol. Chem.* 241, 5137-5149 (1966)

7) Bradford, M. M.: “A rapid and sensitive method for the quantification of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Anall. Biochem.* 72, 248-254 (1976)

8) Dunn M.J. et al.: “2-Dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.” *Methods. Enzymol.* 271, 177-203(1996)

9) 晦日房和: “真珠形成における優良アコヤ貝の育種に関する研究”. 長崎県工業技術センター研究報告, 50-57 (2000)

西川智他: “アコヤガイの炭酸脱水酵素の貝体形成への関与”. 愛媛県水産試験場研究報告 9, 1-4 (2001)