

サロマ湖養殖ホタテガイの遺伝子解析による系統分類と原料性状に関する研究

太田智樹, 中村葵*, 佐藤希実*, 田中彰, 吉川修司, 錦織孝史, 長島浩二

Analysis of lineage and material properties of the Japanese scallop population in Saloma Lake

Tomoki Ohta, Aoi Nakamura*, Maremi Sato*, Akira Tanaka, Shuji Yoshikawa,
Takafumi Nishikiori and Koji Nagashima

To investigate the relationship between lineage and its material properties in the Japanese scallop population (*Mizuhopecten yessoensis*) in Saloma Lake in Hokkaido, Japan, we performed a lineage analysis based on sequence variation in the mitochondrial DNA segment (NcR2) and chemical analysis. Thirty five kinds of haplotype were detected by the lineage analysis in 240 samples of scallop and each haplotype was divided into four major groups, HG-001 (53%), HG-004 (15%), HG-012 (21%) and HG-021 (11%). The analysis of material properties in these groups showed significant differences in soft tissue and gonad index, alanine and glutamic acid contents in the ligament as free amino acids.

ホタテガイは北海道沿岸部で年間40万トン以上生産され、国内における重要な水産資源の一つである。しかし、近年生産量の増加に伴い採苗不良や成長不良などによるホタテガイの小型化や斃死、また原料レベルでの品質低下など多くの問題が顕在化してきている。このような課題を解決するためには環境要因を解析するだけでなく、ホタテガイの遺伝的背景を把握し、その多様性や遺伝的素因による原料性状の違いを究明することが必要である。一方、最近様々な生物についてDNA解析による多様性研究や系統比較が行われてきている。しかし、ホタテガイに関してDNAレベルでの系統解析や原料性状との関連性についての研究アプローチは行われていない。

本研究では道内で生産されるホタテガイについて貝柱細胞中のミトコンドリアDNA (mtDNA) の非遺伝領域であるNcR2領域を解析することにより系統を分類して遺伝系統別の原料性状について検討し、若干の知見を

得たので報告する。

実験方法

1. 試料および試薬

試料はサロマ湖内の同じ場所で養殖されたホタテガイを用い、佐呂間漁業協同組合から供与された。2002年6月に採取した240個のホタテガイを冷蔵(5℃)で翌日搬入し、各組織重量を測定後直ちに貝柱を分離して-80℃で凍結した。系統解析に供した試料は、凍結状態のまま電気ドリルを用いて採取した。成分分析に供した試料は、貝柱を半解凍の状態に細切し、一定量を採取してからホモジナイザーでペースト状にしたものを分析試料とした。試薬はすべて特級グレードのものを用いた。

2. ホタテガイ貝柱全DNAの調製

ホタテガイ貝柱全DNAはプロテイナーゼKを含むTNES-Urea緩衝液中で貝柱50~100mgを37℃、一昼夜振とうさせながらインキュベートした後、MultiScreen

*北海道ホタテ漁業振興協会 (〒060-0003 北海道札幌市中央区北3条西7丁目北海道漁業組合連合会内)

事業名: 民間共同研究 (北海道ホタテ漁業振興協会)

課題名: ホタテガイ集団の家系構造解析および系統特性に関する研究

96Well Filtration Plate (ミリポア社) を用いて回収し、96Well DNA Precipitation HL kit (Edge Bio System) により精製した。

3. ホタテガイ貝柱ミトコンドリア DNA (mtDNA) の高変異領域の増幅と塩基配列の決定

ホタテガイ貝柱 mtDNA の高変異領域である NcR2領域の増幅は貝柱由来全 DNA を鋳型とし 95°C で 5 分予備加熱後、94°C で 1 分 (熱変性)、55°C で 1 分 (プライマーのアニーリング)、72°C で 2 分 (伸長反応) の 40 サイクル反応後、最後に 72°C で 7 分の最終伸長反応により PCR を行った。プライマーは T7PysoMetF および SP6Pyso12SAR を用いた¹⁾。PCR 産物は 2% アガロースゲルを用いて電気泳動した後、エチジウムブロマイド染色で検出した。DNA の塩基配列は PRISM 310 Genetic Analyzer (ABI) を用い、増幅産物の精製後、ダイターミネーター法により決定した。

4. ホタテガイ貝柱の成分分析

ホタテガイ各系統の貝柱について、水分、グリコーゲン、および遊離アミノ酸含量を測定した。なお、水分およびグリコーゲンは系統別に 25 個の貝柱を用い、遊離アミノ酸は 10 個の貝柱をホモジナイザーでペースト状にして分析試料とした。水分は常法により行い、グリコーゲンはアンスロン硫酸法により行った。すなわち、精秤した試料約 1 g に 30% 水酸化カリウム 2 ml を加えて加熱溶解後、冷却してから 4 ml のエタノールを加えて、60°C で 10 分加温した。冷却後、3000rpm で 5 分間遠心分離を行い、得られた沈澱物を蒸留水で溶解し、塩酸で中和してから 200ml に定容した。定容した液を 4 倍に

希釈してから 0.2% アンスロン硫酸 4 ml を加え、沸浴中で 10 分加熱発色して 620nm における吸光値を測定した。同様に測定したグルコースの検量線からグルコース含量を求め、0.9 を乗じた値をグリコーゲン量とした。遊離アミノ酸の分析は精秤した約 1 g の試料に 24ml の蒸留水を加えポリトロンで破碎して試料液とした。試料液 1 ml に 2% スルホサリチル酸 1 ml を加え攪拌後、3000rpm で 15 分間遠心分離してタンパク質を除いた。得られた上清を 0.02N 塩酸で 5 倍希釈した後、0.20 μ m のフィルターでろ過し、アミノ酸自動分析計 (日立 L-8800 型) を用いて分析を行った。

5. 統計処理

各系統間における有意差は Kruskal-Wallis の順位検定法および Tukey-kramer 法を用い、有意水準 5% で検定を行った。

実験結果

1. サロマ湖内養殖ホタテガイの系統解析

北海道各海域および青森陸奥湾におけるホタテガイ遺伝構造の系統は 102 系統あり、これらの塩基配列をもとにした近縁関係図からホタテガイの系統は大きく 4 つのグループ (HG-001, HG-004, HG-012, HG-021) に分けられることが、佐藤らによって報告されている¹⁾。今回、サロマ湖内で養殖されたホタテガイ 240 サンプルの貝柱から mtDNA の非遺伝領域である NcR2 領域をこの 102 系統の塩基配列をもとにホモロジーサーチした。その結果、35 種類のハプロタイプが検出された (Fig.1)。それぞれのハプロタイプを 4 つの系統 (HG-001, HG-004, HG-012,

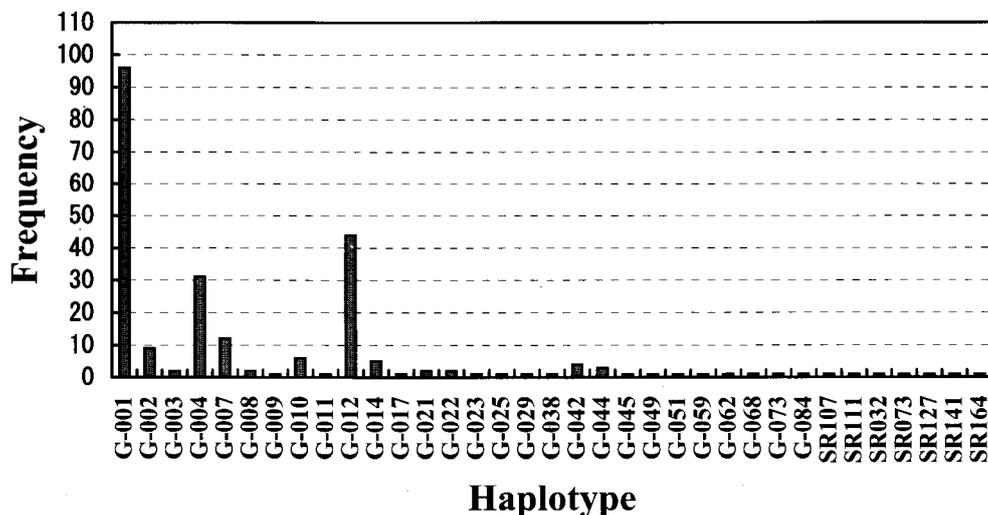


Fig. 1. Frequency of haplotypes of cultured scallop in Saloma Lake.

The detection of haplotype was performed using a method for lineage analysis based on sequence variation in a mitochondrial DNA segment (NcR2).

HG-021) に分類すると、240 サンプル中、HG-001系統は 127 サンプル (全体の 53%)、HG-004系統は 35 サンプル (15%)、HG-012系統では 51 サンプル (21%)、HG-021系統では 27 サンプル (11%) あることがわかった (Fig.2)。この結果から今回採取したサロマ湖内の養殖ホタテガイは HG-001 が優位な系統とわかった。それ以外の各系統に派生するハプロタイプの個体数は 1、2 個と検出数が少なかった。今回得られた 102 系統以外の新たなハプロタイプは HG-001 で 4 種類、HG-004 で 2 種類、HG-012 で 1 種類の、合計 7 種類が見つかった。また、変異サイト数は 7 ケ所見つかった。

2. 各系統間における性状比較

今回の遺伝子解析結果から分類した 4 つの系統グループ間で、軟体部指数 (軟体部重量 / 全重量 × 100)、貝柱指数 (貝柱重量 / 軟体部重量 × 100)、生殖巣指数 (生殖巣重量 / 軟体部重量 × 100)、中腸腺指数 (中腸腺重量 / 軟体部重量 × 100)、外套膜指数 (外套膜重量 / 軟体部重量 × 100)、鰓指数 (鰓重量 / 軟体部重量 × 100) の性状比較を行った。

その結果、貝柱や中腸腺、外套膜、鰓などの指数については、有意な差が認められなかった。しかし、軟体部指数で HG-001 と HG-004 の平均値 (HG-001 > HG-004) および HG-001 と HG-012 の平均値 (HG-001 > HG-012) に有意な差が認められ (Fig.3)、生殖巣指数では HG-001

と HG-012 の平均値 (HG-001 > HG-012) に有意な差が認められた (Fig.4)。

3. 各系統間における貝柱の成分比較

各系統からそれぞれ 25 サンプルの貝柱における水分、グリコーゲン含量を分析した結果、水分ではそれぞれの系統で平均値が 66.5% ~ 67.7% となり、各系統間での有意な差は見られなかった (Fig.5)。また、グリコーゲン含量の平均値は 7.0% ~ 7.8% で各系統間での有意な差は見られなかった (Fig.6)。さらに、遊離アミノ酸含量を

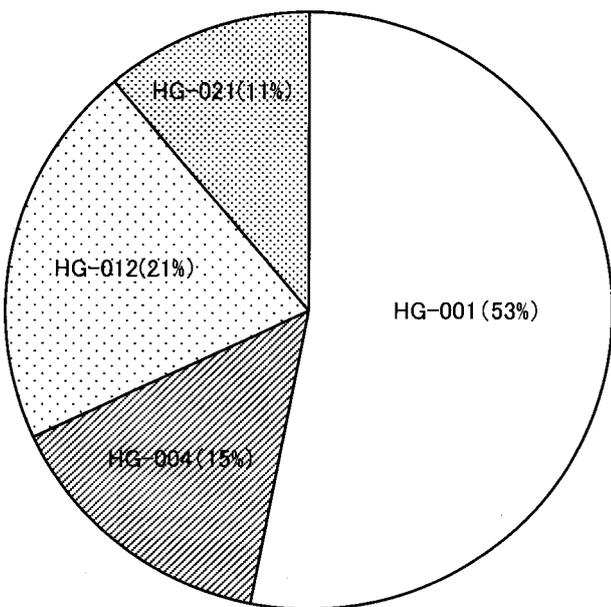


Fig. 2. Major haplotype of cultured scallop in Saloma Lake.

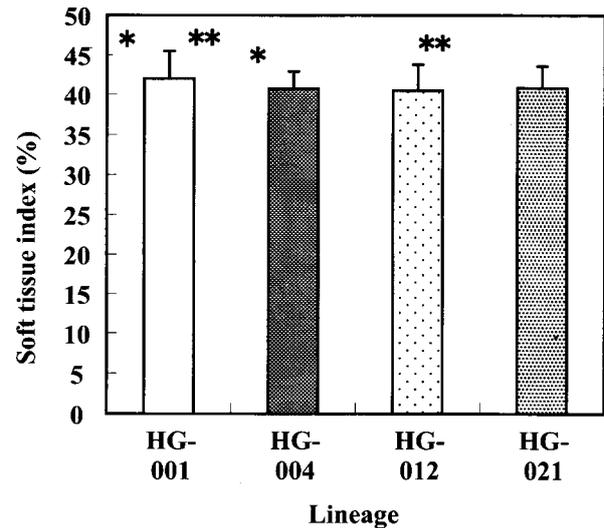


Fig. 3. Soft tissue index of cultured scallops belonging to four major groups in Saloma Lake.

*, **: Significant difference in each group, $P < 0.05$. Error bars represent standard deviations.

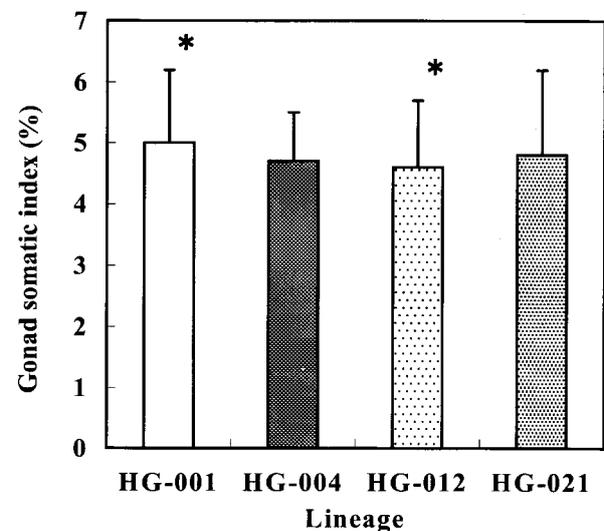


Fig. 4. Gonad somatic index of cultured scallops belonging to four major groups in Saloma Lake.

*: Significant difference in each group, $P < 0.05$. Error bars represent standard deviations.

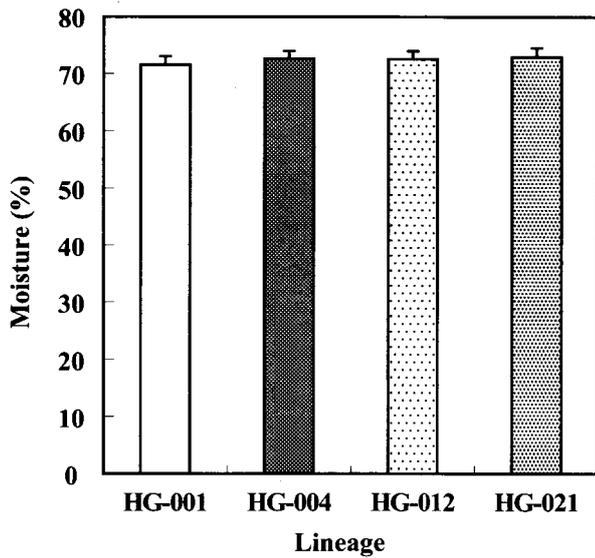


Fig. 5. Moisture of cultured scallops belonging to four major groups in Saloma Lake.

Error bars represent standard deviations.

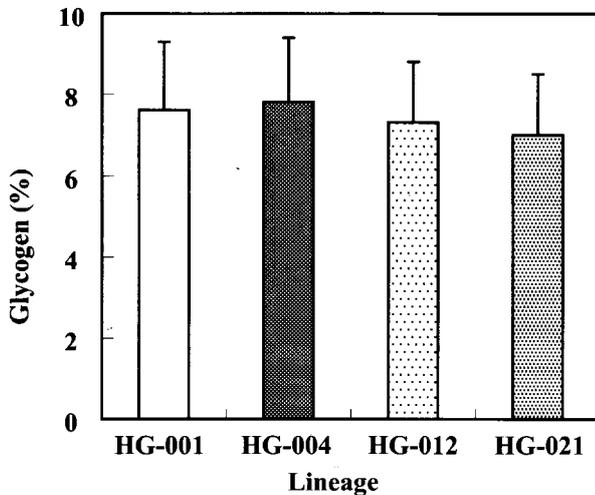


Fig. 6. Glycogen content of cultured scallops belonging to four major groups in Saloma Lake.

Error bars represent standard deviations.

分析した結果、100g 当たりの遊離アミノ酸含量は各系統で 2,509mg ~ 3,123mg の範囲であり、各系統間での遊離アミノ酸含量の有意差は見られなかった。4 系統の中では HG-021 の遊離アミノ酸含量が一番多い値を示し、HG-004 が一番少ない値を示した (Fig.7)。遊離アミノ酸組成については各系統間で比較すると、グリシン、タウリン、アルギニンには有意な差は無かったが、アラニンとグルタミン酸は、それぞれ HG-001 と HG-004 の平均値 (HG-001>HG-004) および HG-021 と HG-004 の平均値 (HG-021>HG-004) に有意な差を示した (Fig.8,9)。

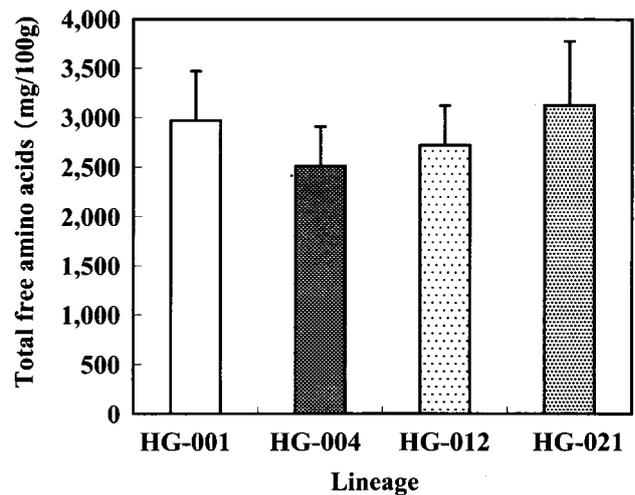


Fig. 7. Total free amino acid content of cultured scallops belonging to four major groups in Saloma Lake.

Error bars represent standard deviations.

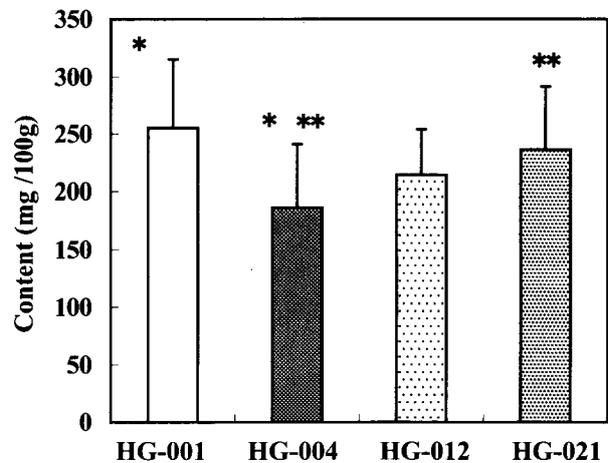


Fig. 8. Alanine content of cultured scallops belonging to four major groups in Saloma Lake.

*, **: Significant difference in each group, $P < 0.05$. Error bars represent standard deviations.

考 察

ホタテガイは北海道沿岸部で生産される国内における重要な水産資源の一つであり、養殖生産の安定化や原料品質についてこれまでも多くの研究がなされてきた^{3,4)}。また、近年ホタテガイ養殖の増産に伴い、採苗不良や成長不良などによるホタテガイの小型化や斃死問題が顕在化してきており、養殖環境や遺伝的多様性の確保など新たな研究課題を解決する必要が高まってきている。これまで養殖ホタテガイについては、川真田らが斃死問題に

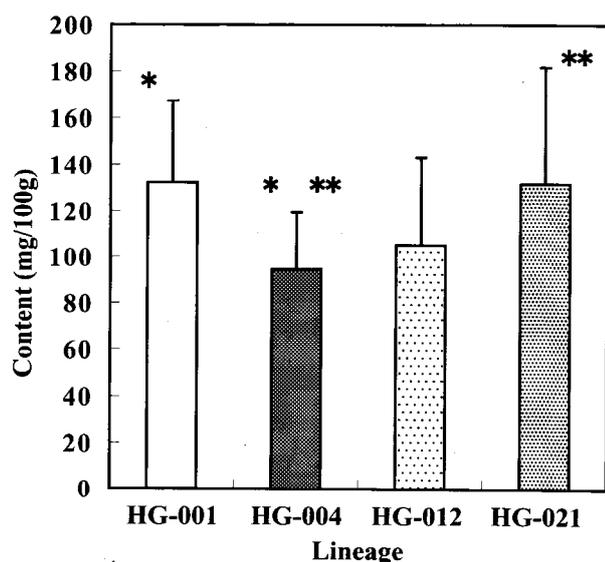


Fig. 9. Glutamic acid content of cultured scallops belonging to four major groups in Saloma Lake.

*, **: Significant difference in each group, $P < 0.05$. Error bars represent standard deviations.

ついて、その成熟や発達過程の側面から研究を行ってきた⁵⁻⁷⁾。また、遺伝的多様性について、佐藤らは北海道近海および陸奥湾で採集したホタテガイについてmtDNAを用いて遺伝構造の解析を行い、北海道におけるホタテガイ集団は遺伝的多様性を保持していることを示した^{1, 2)}。しかしながら、これらの集団における原料性状との比較研究は行われていない。

そこで今回の研究では、北海道各海域および青森陸奥湾におけるホタテガイmtDNAの遺伝子解析結果から分類した系統¹⁾からサロマ湖内で養殖されたホタテガイをモデルケースとして検討を行った。その結果、サロマ湖内のホタテガイはHG-001が全体の約半数を占める優位な系統であることがわかった。この優位な系統とその他の系統間における各組織指数を比較検討したところ、組織全体の成長度合いを示す軟体部指数でHG-001はHG-004やHG-012に比べて有意に高いことがわかった。また、成熟度の指標である生殖腺指数ではHG-012より有意に高いことが明らかとなった。これらの結果から主要な系統であるHG-001は他の系統と比べて可食組織において有意に大型であり、また成熟度も高い可能性が示唆された。さらに、食品原料の主要部位である貝柱の成分比較を行った結果、水分、グリコーゲンおよび遊離アミノ酸総量などについては各系統間で有意に差が見られなかったが、アラニンやグルタミン酸などの各遊離アミノ酸含量において有意差が認められHG-001が他の系統

と比較してこれらのアミノ酸含量が高いことが示唆された。これらのアミノ酸は食品の呈味性に強く関与するアミノ酸であり、これらのアミノ酸を多く含む原料はうま味の点で優位なものと考えられるため、今回の結果は今後うま味に優れたホタテガイ原料の育種に役立つものと思われた。また、軟体動物における遊離アミノ酸の生体中の役割としては浸透圧調節に利用されることが知られているが⁷⁾、今回得られた結果が各系統間のホタテガイの浸透圧調節など生理機能に影響するかどうかは不明であり、今後さらに詳細に検討する必要がある。

以上の結果からサロマ湖における養殖ホタテガイの系統間の組織全体の成長度や成熟度が遺伝構造の違いにより異なり、より高品質な原料の育種に遺伝子解析が役立つことが示唆されたが、今後さらに調査個体数を増やし、系統と性状および成分含有量との明確な相関性を明らかにする必要があると考えられる。

要 約

サロマ湖産ホタテガイについてmtDNA遺伝子解析により系統(HG-001, HG-004, HG-012, HG-021)を分類し、性状比較を行ったところ、HG-001とHG-012の生殖腺指数で平均値(HG-001>HG-012)に有意な差が認められた。軟体部指数ではHG-001とHG-004の平均値(HG-001>HG-004)およびHG-001とHG-012の平均値(HG-001>HG-012)に有意な差が認められた。また、各系統の水分、グリコーゲン量、遊離アミノ酸総量および遊離アミノ酸組成を分析した結果、水分、グリコーゲン量および遊離アミノ酸総量に有意な差は見られなかったが、遊離アミノ酸のアラニンとグルタミン酸の含量に有意な差が認められた。

文 献

- 1) Sato, M. and Nagashima, K., Molecular characterization of a mitochondrial DNA segment from the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*): Demonstration of a region showing sequence polymorphism in the population. *Mar. Biotech.*, **3**, 370-379 (2001).
- 2) Nagashima, K., Sato, M., Kawamata, K., Nakamura, A., and Ohta, T., Genetic structure analysis of the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*) population in Hokkaido, Japan, on the basis of mitochondrial haplotype distribution. *Mar. Biotech.*, **7**, 1-10 (2005).
- 3) 富士昭ほか, 水産学シリーズ, 「ホタテガイの増養

- 殖と利用」, 日本水産学会編 (恒星社厚生閣, 東京) (1980).
- 4) 辻浩司, 西田 孟, 根室海域産ホタテガイの原料性状について, 北水試研報, **31**, 27-54 (1988).
- 5) 噴火湾海域における養殖ホタテガイの成熟過程, 北水試研報, **38**, 132-146 (1981).
- 6) 留萌海域における養殖ホタテガイの生殖巣発達過程, 北水試研報, **31**, 9-13 (1988).
- 7) サロマ湖養殖ホタテガイの生殖巣発達過程, 北水試研報, **45**, 37-44 (1994).
- 8) 須山三千三, 鴻巣章二編, 「水産食品学」, (恒星社厚生閣, 東京), pp51-57 (1991).