

PCR法による養殖メガイアワビ高成長系の作出

増養殖対策科 中 島 敏 男

1 はじめに

メガイアワビ陸上養殖技術開発のため平成9、10年度に陸上型高密度アワビ養殖技術開発事業がおこなわれた。^{1) 2)} この後をうけて平成11年度からPCR法による養殖メガイアワビ高成長系の作出事業が5カ年計画で始まった。高密度アワビ養殖技術開発では放流用に種苗生産されたメガイアワビが使用された。飼育試験の結果、メガイアワビには6ヶ月の成長期と6ヶ月の成長停止・遅滞期が存在することが明らかになった。後者は主に生殖に起因するもので、天然メガイアワビでも同様の事象が報告されている。³⁾

しかし、高密度で飼育する陸上養殖では、生殖期に先立つ高水温が原因で成長停滞期が長くなる傾向にある。また、夏場の大雨などによる飼育海水の塩分低下も25pptを割るとアワビの摂餌活動を不活発にし、成長を阻害する要因となっている。²⁾ このため、成長期間を出来るだけ短縮するため、アワビを選抜して育てる、選抜育種の方法が導入されることになった。さらに、このことをPCR法を用いて塩基配列のレベルで確認し、選抜手法の確実性と短期化をめざした。

2 メガイアワビの飼育

1) 目 的

メガイアワビの成長に影響を及ぼすと考えられる遺伝的要因と環境要因の中から環境要因を排除できる試験区分の設定方法を検討した。環境要因の中でも特に前事業で明らかになった飼育密度の標準化を検討した。

2) 材料及び方法

施設、器材及びメガイアワビは平成9、10年度に使ったものを継続して使用した。このため、材料及び方法については10年度高知県水産試験場事業報告に詳しく、ここでは、重要な事項のみを再掲した。

プレハブ飼育施設にFRP製500ℓ飼育水槽を設置した。注水量は320ℓ/時で、換水率は15回転/日となった。エアレーションは注水を兼ねて供給するジェットノズル式と、エアポンプから供給するブロー式の2系統を同時使用した。

餌料は塩蔵ワカメを使用した。餌料に関する数値は塩蔵ワカメの重量を使用した。塩蔵ワカメは海水に戻すと倍の重量になる。

生物体量＝平均個体重量×個体数で求めた。

生物体量倍率＝試験終了時生物体量／試験開始時生物体量で求めた。

日間殻長増加係数＝(log e (試験終了時殻長／試験開始時殻長))／試験日数で求めた。

殻長を用いた肥満度＝体重(g)／殻長(mm)³×10,000で求めた。

日間死亡係数＝(-log e (生残率))／試験日数で求めた。

占有率＝付着面積×個体数／飼育水槽内付着可能面積で求め、百分率で表示した。

ただし、メガイアワビ殻長40～70ミリ未満の個体の付着面積＝殻長×殻幅(殻長×0.7)とした。飼育水槽内アワビ付着可能面積は

縦型付着板0.96×0.3m×2面×18枚＝11.4m²

容器内側面1.0×0.33×4面＝1.32m²

容器底面1.0×0.5／2×4面＝1.0m²

合計13.72m²となる。

餌料効率％＝増重量／摂餌量×100で求めた。

増肉係数＝摂餌量／増重量で求めた。

日間摂餌率＝摂餌量／期間平均重量／期間日数で求めた。

平成9年度及び10年度から継続していた試験結果と11年度に設定した試験結果を示した。

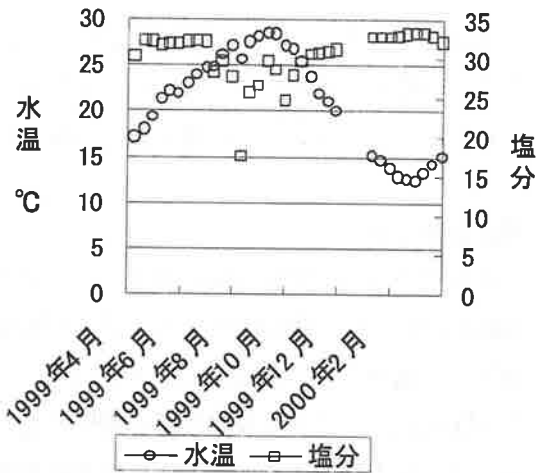


図1 陸上飼育水槽水温・塩分

試験期間中の水温℃、塩分pptを図1に示した。

水温は8月下旬から9月中旬まで28℃台を記録した。夏季は昨年より2℃低めに経過した。2月下旬から中旬まで12℃台であった。

塩分は7月末から8月下旬まで15～25pptの日が続いた。

3) 結果

飼育密度別成長

メガイアワビの成長期にあたる2000年1月7日から2000年3月13日までの試験結果を表1、2、図2に示した。

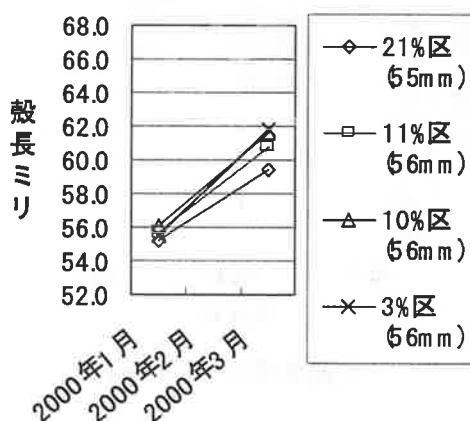


図2 殻長平均55-56ミリメガイアワビの成長量(％：占有率、mm：平均殻長)

表1 試験区分ごとの設定条件

試験区分	21%区	11%区	10%区	3%区
開始時				
平均殻長mm	55.2	55.7	56.1	55.5
最小殻長mm	51.3	50.5	51.4	51.8
最大殻長mm	59.4	60.8	60.1	59.3
平均重量 g	21.7	22.0	23.8	23.3
個体数	1,346	682	630	193
生物体量 g	29,211	14,997	15,020	4,503
占有率 %	20.97	10.83	10.13	3.04
終了時				
平均殻長mm	59.4	60.8	61.7	61.8
最小殻長mm	53.6	52.9	54.3	51.5
最大殻長mm	64.5	68.0	72.4	69.1
平均重量 g	28.3	32.5	33.4	31.4
個体数	1,345	650	591	192
生物体量 g	38,031	21,150	19,728	6,029
占有率 %	24.27	12.27	11.50	3.75

表2 陸上飼育メガイアワビの摂餌特性

	21%区	11%区	10%区	3%区
飼育日数	65	65	65	65
総餌料 g	49,700	37,380	34,650	13,100
餌料効率%	17.7471	16.4594	13.5848	11.6502
増肉係数	5.6347	6.0756	7.3612	8.5835
生物体量倍率	1.3020	1.4102	1.3134	1.3389
日間死亡係数	0.00001	0.0007	0.0010	0.0001
日間殻長増加量	0.0645	0.0770	0.0855	0.0967
日間体重増加量	0.1011	0.1623	0.1467	0.1242
日間摂餌率	0.0057	0.0080	0.0077	0.0096
日間殻長増加係数	0.0011	0.0013	0.0015	0.0016
日間体重増加係数	0.0041	0.0060	0.0052	0.0046

日間殻長増加係数と占有率の関係は、この間の旬平均水温12.3～15.0℃、塩分32.0～33.0ppt、試験開始時殻長平均55.2～56.1mm、開始時占有率3～21%の範囲で図3に示すように $R^2=0.9515$ の相関をえた。有意水準5%で直線の関数式は日間殻長増加係数 $Y = -0.000028X + 0.001638$ となる。

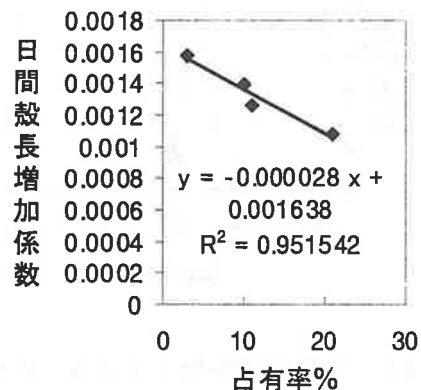


図3 殻長平均55-56ミリメガイアワビ
日間殻長増加係数と開始時占有率

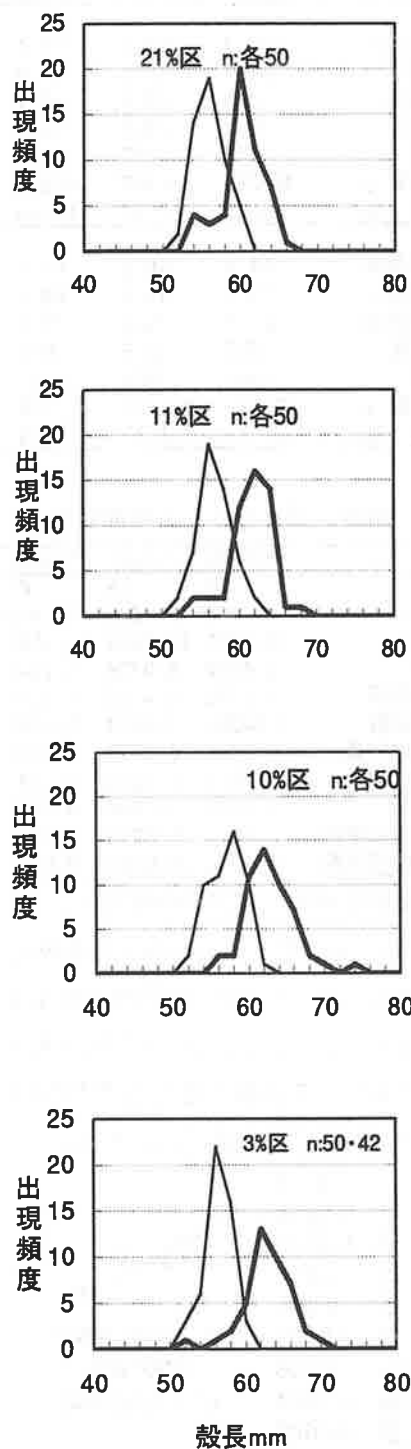


図4 殻長平均55-56ミリメガイアワビ
試験開始時と終了時の殻長組成
(%: 占有率、1~3月)

殻長組成を図4に示した。試験開始時の殻長階級と終了時の殻長階級を比較するとパターン図では占有率のちがいによる大きな差異は見られない。

親貝候補の選別

平成9年11月11日飼育試験を始めたメガイアワビ19,000個の中から、平成12年1月7日120個を親貝候補として選別した。選抜率は0.6%になる。

殻長70mm以上を目安に親貝候補を選別した。一般的に外部形態を比較するときの指標にされる殻幅を計測して殻長殻幅比と殻長の関係を求めたが、非選別グループと差異は見られない。(図5、6)

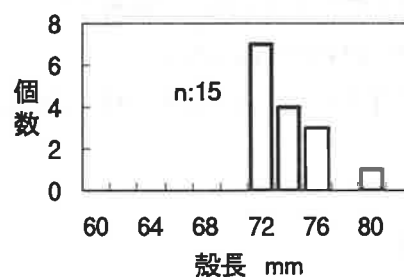


図5 親貝候補の殻長組成

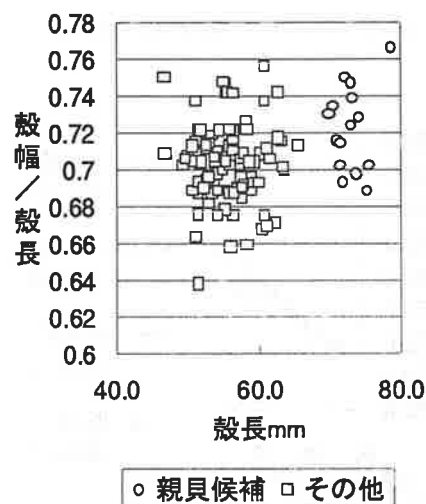


図6 殻長殻幅比率

高密度飼育における高水温と摂餌量

図7に摂餌量と水温との関係を示した。平成11年1月に生物体量45kg（占有率42%以下同じ）で飼育を始めた水槽は5月中旬に飼育水温が20℃を越すと、残餌が目立ち始め摂餌量が減少していった。この時点での生物体量は58kg（50%）になっていた。参考ではあるが旬平均水温13.9～27.2℃、塩分27.5～34.1pptの範囲で殻長41.0ミリのアワビは水温との関係で摂餌量 $y = -0.1068x^2 + 3.9651x - 24.078$ を示した。

生物体量13kg（12%）で飼育を始めた水槽は5月中旬に20kg（15%）になった。その後も水温の上昇とともに摂餌量は増加した。参考ではあるが上記と同一条件下で殻長45.4ミリのアワビは水温との関係で $y = -0.0089x^2 + 0.6508x - 4.7907$ を示した。

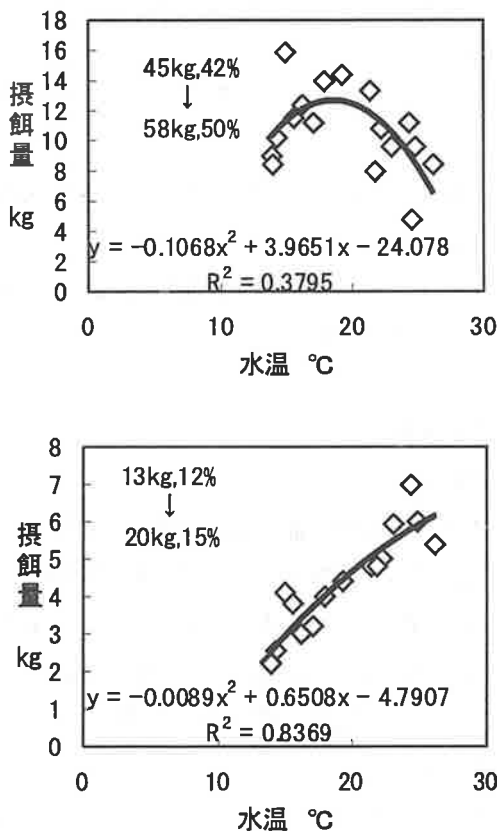


図7 飼育密度からみた水温上昇と摂餌量の関係
(kg：生物体量、%：占有率)

いずれの飼育水槽も7月末の河川出水にともなう飼育水の低鹹水化で投餌を中断した。

4) 考 察

飼育密度

平成9、10年度陸上型高密度アワビ養殖技術開発事業からメガイアワビの成長は飼育密度と高い相関を示す結果が得られた。飼育密度を占有率という指標で表現すると、成長期である1～5月、旬平均水温14.4～22.2℃、平均殻長41～54mm、占有率11～42%の範囲で、日間殻長増加係数 $Y = -0.000015X + 0.001294$ となった。

育種試験の条件設定を厳密におこなう上で成長に影響を与えない飼育密度の上限を確認する必要がある。占有率を例にとると10%前後にその限界があると推測して平成11年度の試験をおこなった。結果として占有率3～20%の範囲でも、成長が飼育密度に影響されることを示した。成長の差異を判断基準にする各種試験では、メガイアワビをマーキングして同居飼育をおこなうか、試験期間中に変動する密度を厳密に調整管理する必要があると考えられた。

選抜育種

成長に優劣をつけている原因が殻長・殻幅比、殻長・殻高比など外部形態の差異に基づくものでなく、成長期間、成長停止期間の長短にあることは十分考えられることである。これら期間の違いは極端な高水温、低水温、低鹹水など外的環境要因によっても起こりうるが、生殖に関わる期間の長短など内的要因によって起こりうる可能性がより大きい。成長の継続や停止が生殖という個体の成熟に伴ってもたらされていることは、成熟に達していない若齢アワビがその季節にも成長を続けていることからもうかがえる。³⁾

個体としては成熟年齢の遅いアワビほど成長が継続し、より大型のアワビとなる可能性が高い。しかし、種としてはその維持のために早い年齢で成熟して生殖にかかわることが、種としてのリスクが分散されて有利であると考えられる。この場合は成長停止期が早い年齢で訪れ、一般にはメガイアワビの成長に不利である。

現実にはこれらが混在することで種維持のためのリスクがより分散され、今日の種が存在する。放流

用に種の多様性を確保して種苗生産されのはこのようなメガイアワビである。他方、この様に混在しているからこそ、この中から陸上養殖用により大きなメガイアワビを選抜育種できるといえる。そのため、より確実で、しかも選抜期間を短縮できる選抜方法の開発が望まれる。

5) 摘 要

(1) アワビの密度をあらわす指標として占有率を使用した。日間殻長増加係数と高い相関を示した。

(2) 飼育密度はかなりの低密度でも成長と密接な関係にある。

(3) 日間殻長増加係数と占有率の関係は、旬平均水温 $12.3\sim 15.0^{\circ}\text{C}$ 、塩分 $32.0\sim 33.0\text{ppt}$ 、試験開始時殻長平均 $55.2\sim 56.1\text{mm}$ 、開始時占有率 $3\sim 21\%$ の範囲で日間殻長増加係数 $Y = -0.000028X + 0.001638$ となる。

(4) 親貝候補を飼育試験開始時からの選抜率 0.6% で選別した。

(5) 占有率 50% のメガイアワビは水温 20°C 以上になると摂餌量が急減した。参考であるが旬平均水温 $13.9\sim 27.2^{\circ}\text{C}$ 、塩分 $27.5\sim 34.1\text{ppt}$ の範囲で殻長 41.0 ミリのアワビは水温との関係で摂餌量 $y = -0.1068x^2 + 3.9651x - 24.078$ を示した。

3 DNA解析手法の開発

1) 目 的

育種などではその課程において目的とする形質が遺伝形質として次代に受け継がれたのか、環境などの一時的要因によってそう表現されているのかを判断するために、形態計測分析やアイソザイム分析による判定がおこなわれてきた。しかし、これらはいずれも成育結果としての表現型で、多少とも環境の影響を受ける。このため、より環境の影響を受けにくい、遺伝子情報を直接解析する方法がとられ始めた。中でもPCR法による遺伝子増幅技術とダイレクトシーケンス法による塩基配列決定技術の発達はこのことをますます確かなものになっている。

まず、DNA抽出法やPCR法マニュアルの多く

が脊椎動物用に造られてきた経緯があるため、これらは無脊椎動物用、とりわけ貝類に使用できるように調整してゆく。

次に、同一種内の個体間の差異を見るために、核DNAを分析対象にする。

そして、核DNAの塩基配列が挿入／欠落している変異部位を利用することで、出来ればダイレクトシーケンスをしなくても、簡易な電気泳動法で個体やグループ間の差異を見いだせるようにする。

2) 方 法

貝類DNA抽出マニュアル及び精製マニュアルを作成する。

シーケンス情報から利用可能な既知PCRプライマーを検索する。

DNA塩基配列情報から利用可能なPCRプライマーを設計する。

既知プライマーに対応したPCR反応条件を設定する。

設計プライマーに対応する基本のPCR反応条件を設定する。

ダイレクトシーケンスを目的としたDNA回収マニュアルを作成する。

3) 結果と考察

DNAの抽出

a. アワビ上足の一部($100\sim 200\text{mg}$)を削り取る。

b. 2ml 平底サンプルチューブの中に $700\mu\text{l}$ lysis buffer (10mM Tris-HCl, $\text{pH}7.5$; 125mM NaCl; 10mM EDTA, $\text{pH}7.5$; 0.5% SDS; $4\sim 8\text{M}$ Urea)、上足の一部($100\sim 200\text{mg}$)を入れ、ハサミで細断する。

c. プロテインキナーゼ(PK) $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を加え、手で穏やかに転倒混和する。

d. 55°C 6 時間又は 55°C 1 時間 37°C 16 時間インキュベートする。

この方法の特徴は組織の溶解、DNAの抽出に重要な役割を果たす緩衝液に尿素を入れることである。尿素はDNAのタンパク質に働いて二重鎖を解いて

1本鎖にすることで、DNA分解酵素であるDNAアーゼの活性を阻害する。さらにDNAアーゼ以外の酵素を含む全ての蛋白質を変性、失活させDNAをまもる。また、同時にタンパク質分解酵素であるプロテインキナーゼの働きを活発にして、タンパク質の分解を助ける。後に、溶液中から尿素を取り除くとDNAは再び2本鎖になり、その後の操作に支障をきたさない。本事業でもDNA抽出マニュアルに尿素をとりいれた。

DNAの精製

- 700 μ lフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（25：24：1）を加える。
- 20rpmで10分間転倒混合後、3,000rpmで10分間遠心分離する。
- 上澄を新しいチューブにとり、等量のクロロホルム／イソアミルアルコール（24：1）を加える。
- 20rpmで10分間転倒混合後、3,000rpmで10分間遠心分離する。
- 上澄を新しいチューブにとり、液量の10%相当の3M酢酸ナトリウムと、2倍量の95%エタノールを加える。
- 20℃に30分間おく。
- 5,000rpmで10分間遠心分離後、溶液を注意深くピペティングで捨てる。
- 70%冷エタノール1mlをそっと加え、5,000rpmで10分間遠心分離する。
- ピペティングで溶液をすて、37℃でインキュベート、乾燥させる。
- 100ml TEバッファー中に再懸濁し、4℃で保存する。

PCR反応条件

50 μ lのサンプル基本作成例を示す。

Sample mix	濃 度	容 量
Template DNA		4 μ l
プライマー (Forward)	100pmol	1 μ l
プライマー (Reverse)	100pmol	1 μ l
dNTPs		4 μ l
Ex Taq buffer(cont. MgCl ₂)		5 μ l
Ex Taq DNA polymerase		0.25 μ l
滅菌蒸留水		
Total volume		50 μ l

基本反応条件を設定する。

- 94℃ 2分
- 94℃ 2分
- 55℃ 30秒
- 72℃ 1分 b～dを25～35回繰り返す
- 72℃ 10分
- 4℃に戻す

反応条件は使用するDNA増幅機種によって多少の調整を要する。また、既知のプライマーについてはその反応条件に従う。

基本のアガロースゲル電気泳動

泳動槽：ATTO

パワーサプライ：ATTO 1000

ゲル：0.7、1.0、1.5%アガロースゲル

泳動buffer：1×TAEbuffer

電流電圧：10cmあたり100mV、100mA上限で約40分電気泳動を行う。

基本の目的DNAの回収

回収方法：ガラスパウダー吸着

キット名：Takara EASYTRAP Ver.2

使用法改変部：回転数については使用する遠心器に対応させる。(卓上遠心器で9,000～12,000rpm、5～10秒)

ダイレクトシーケンス

使用機種：373A Sequencing System (Applied Biosystems Inc.)

キット名：ABI PRISM Dye Terminator Cycle

Sequencing Ready Reaction Kit (PE)

- 精製回収したサンプルの一部を既知のマーカーと共に電気泳動して大まかなDNA含有量を調べる。
- 超純水を用いて、サンプルをキット指定の濃度に希釈する。
- キットマニュアルにしたがって処理する。
(Spin-Column Purification)
- シーケンサーにかける。
- 得られた結果を分析する。

文献調査

今年度の文献調査でメガイアワビに使用できる可能性のあるプライマーとして、福岡県水産海洋技術センター事業報告に掲載された東京大学海洋研究所の小島茂明氏の研究成果を見いだした。このプライマーはサザエ、クロアワビ及びエゾアワビの核DNA遺伝子エロンゲーションファクター-1 α (EF-1 α) 遺伝子に対応している。^{4, 5)}

a. エクソン領域に対応する塩基配列を決定するため一般的方法としてRNAに対する逆転写反応でcDNAサンプルを調整する。

b. これを鋳型としてPCRをおこなう。

c. このPCR産物を鋳型にしたシーケンスにより塩基配列を決定する。

d. 次にトータルDNAを鋳型にcDNAに使った同一プライマーを使ってPCRをおこなう。

e. トータルDNAはcDNAと違って、エクソン領域とイントロン領域を含んでいる。この時2つのエクソン領域を切り出しているプライマーが存在して、しかも、エクソン領域とエクソン領域の間に挟まれているイントロン領域が700~800塩基の様に検出に手頃な塩基数であれば、cDNAで得られたサンプルよりイントロン領域の塩基数だけ大きいサンプルが切り出されてくる。(エクソン領域：アミノ酸を指定する塩基配列をもつ領域。この領域に対応して酵素などがつくられる。

イントロン領域：上記領域の間に挟まっている塩基配列領域。)

f. このPCR産物を鋳型にしたシーケンスに

よって塩基配列を決定する。

g. イントロン領域はエクソン領域と違って、酵素やタンパク質を構成するアミノ酸に対応した遺伝子領域でない。このためエクソン領域で起きると生残に致命的な塩基の挿入/欠落がイントロン領域では起きている場合がある。

h. シークエンスによって挿入/欠落が見いだされれば、シーケンス情報に基づいたプライマーにより、より適切な長さの塩基配列を切り出すことで、PCR産物は長さの差で判別される。

i. 一本鎖DNAのわずかな塩基配列のちがいが高次構造で多型をつくることを電気泳動での判別に利用したSSCP法の開発により、数個の塩基の挿入/欠失が精度良く簡単に検出できる場合がある。

j. この挿入/欠落部位の有無が差異の有りそうな任意の個体やグループに対応しているという有意の検定結果がもたらされれば、両者の差異を遺伝子レベルで追跡できる分子マーカーとして確立される。

挿入/欠落部位のPCRに使用されたプライマーと反応条件

プライマー名	塩基配列
EF-H	5'-GATATTGCTCTGTGGAARTTYGARAC-3'
EF-B	5'-CCNCCDATYTTTANACRTCYTG-3'
EF-F	5'-GCTTTCACCTTNGGNGTNAARCA-3'
EF-Cr	5'-CGATTATAACCGATYTTTATDTRTA-3'
ABAL-1	5'-GGTTGATGCATATCATCGATCCC-3'
ABAL-2	5'-CTGAGTGGACAAGTAGTTGG-3'
ABALR-1	5'-TAGTGAACAATGGATGACTAGCACC-3'
ABALR-2	5'-CAAGTCTGGACCATAACAATCC-3'

試料DNAに対するプライマーEF-HとEF-BのPCR反応条件は

- 94℃ 1分
 - 92℃ 40秒
 - 45℃ 1分
 - 72℃ 3分
- b~dを40回繰り返す

である。

上記P C R産物であるD N Aサンプルに対しプライマーEF-FとABALR-1及びABAL-2とEF-CrでP C Rをおこなう。P C R反応条件は

- a. 94℃ 1分
- b. 92℃ 40秒
- c. 45℃ 1分
- d. 72℃ 2分 b～dを30～40回繰り返す

である。

4 文 献

- 1) 山口光明 (2000) : 陸上型高密度アワビ養殖技術開発Ⅰ. 平成10年度高知水試事報, (96), 307-310.
- 2) 中島敏男 (2000) : 陸上型高密度アワビ養殖技術開発Ⅱ. 平成10年度高知水試事報, (96), 311-322.
- 3) 米山純夫・斎藤実・堤清樹・河西一彦・江川紳一郎 (1989) : 伊豆大島におけるメガイアワビの季節成長. 水産増殖, 37(2), 147-154.
- 4) 太刀山透・深川敦平・篠原直哉・福澄賢二・小島茂明 (1999) : エゾアワビ、アカウニの放流技術開発調査. 平成9年度福岡県水産海洋技術センター事業報告, 82-101.
- 5) 太刀山透・深川敦平・篠原直哉・福澄賢二・小島茂明 (2000) : 放流技術開発事業、エゾアワビ、アカウニ. 平成10年度福岡県水産海洋技術センター事業報告, 24-35.