

ハタ科魚類のAATおよびADH アイソザイムにおける単量体様変異

横川浩治 (香川県水産試験場)

Monomeric Electrophoregrams of AAT and
ADH Isozymes in Serranid Fishes

Koji YOKOGAWA

Kagawa Prefectural Fisheries Experimental Station

Abstract

Isozyme analyses of a serranid fish *Epinephelus akaara* indicated monomeric patterns in electrophoregrams at aspartate aminotransferase and alcohol dehydrogenase, which indicate dimeric patterns in fishes and shellfishes. Their fitness for Hardy-Weinberg equilibrium was examined by chi-square tests. We regarded single banded individuals being homozygotes, and double banded individuals being heterozygotes, respectively. The expected values according to Hardy-Weinberg law corresponded well with the observed values; that is, no significance was recognized. Isozyme analyses of the other 21 serranid species wholly indicated monomeric patterns at the loci of the two enzymes, except the loci in which heterozygous patterns were not confirmed because of genetic monomorphism. The results suggested the possibility that it is a common characteristic in family Serranidae that the two enzymes are monomers.

近年、さまざまな生物において電気泳動法によるアイソザイム分析の技術がほぼ確立し、魚類においても多くの種でアイソザイム分析によりその遺伝的特性が明らかにされている^{1, 2)}。アイソザイムの変異の表現型にはホモ接合型とみなされる1本バンドのほかに、2本バンド、3本バンド、あるいは5本バンドを示すヘテロ接合型などが認められており、このような表現型の相違は、酵素の化学的性質から1サブユニットで構成される単量体酵素、2サブユニットで構成される二量体酵素、および4サブユニットで構成される四量体酵素として解釈されている^{1, 2)}。また魚介類では極めて少ないが、3サブユニットで構成され、ヘテ

ロ接合型で4バンドとなる三量体酵素の存在も知られている^{3, 4)}。

このようなアイソザイムの変異の表現型は一般に酵素によって共通しており、魚類においては種による相違はこれまでに知られていない^{1, 2)}。ところで今回、ハタ科魚類の1種キジハタ *Epinephelus akaara* のアイソザイム分析を行なったところ、魚介類では一般に二量体様変異を示すアスパラギン酸アミノ転移酵素およびアルコール脱水素酵素^{1, 2)}が、単量体様変異と思われる泳動パターンを示した。そこで他のハタ科(マハタ亜科)魚類についてもこれらの酵素を調べ、アイソザイム変異の表現型の特徴について検討した。

材料と方法

材料に用いたキジハタは日本産および韓国産のもので、日本産キジハタは香川県西部の燧灘に位置する伊吹島周辺で1994年6月～7月に刺網によって漁獲されたものである。一方、韓国産キジハタは、大韓民国慶尚南道忠武近海で漁獲され、放流用種苗として1993年12月に香川県に移入されたものの一部である。アイソザイム分析に供した尾数は日本産のものが31個体、韓国産のものが29個体の計60個体である。

その他のハタ科魚類としてTable 1に示す5属21種のアイソザイムを調べ、キジハタを含めて合計140個体を実験に供した。標本魚の採集場所は、マハタは韓国産キジハタと同じ朝鮮半島南東部の沿岸海域であり、その他の種はすべて沖縄本島近海で漁獲されたものである。これらの魚種の検索と同定については瀬能⁵⁾およびHeemstra and Randall⁶⁾に従った。

電気泳動実験の方法は谷口・岡田⁷⁾の方法に基本的に従い、クエン酸アミノプロピルモルフォリン緩衝液 (pH 6.0) による連続系水平式デンブング泳動によった。泳動には肝臓組織からの粗抽出液を用い、アスパラギン酸アミノ転移酵素 (E.C. 2.6.1.1) およびアルコール脱水素酵素 (E.C. 1.1.1.1) を前述の方法⁷⁾により染色した。酵素および遺伝子座の表記法はShaklee et al.⁸⁾に従い、最も頻度の高い遺伝子が支配するバンドをA遺伝子とし、以下頻度の順にアルファベットの略号を与えて表記した。

結 果

キジハタのアスパラギン酸アミノ転移酵素 (AAT) およびアルコール脱水素酵素 (ADH) の泳動像をFig. 1に示す。AAT では陽極側に二つ、陰極側に一つのバンドゾーンが出現し、AAT-1*~AAT-3*の計3遺伝子座が推定された。

Table 1. List of serranid species examined

Japanese name	Scientific name	Specimens examined
アオノメハタ	<i>Cephalopholis argus</i>	7
アカハナ	<i>Cephalopholis aurantius</i>	5
ユカタハタ	<i>Cephalopholis miniatus</i>	6
ヤミハタ	<i>Cephalopholis pachycentron</i>	2
アザハタ	<i>Cephalopholis sonnerati</i>	1
ニジハタ	<i>Cephalopholis urodelus</i>	2
キジハタ	<i>Epinephelus akaara</i>	60
ヒレグロハタ	<i>Epinephelus corallicola</i>	3
アカハタ	<i>Epinephelus fasciatus</i>	8
ツチホゼリ	<i>Epinephelus hoedtii</i>	4
キビレハタ	<i>Epinephelus macrospilos</i>	1
シロブチハタ	<i>Epinephelus maculatus</i>	6
スミツキハタ	<i>Epinephelus melanostigma</i>	1
カンモンハタ	<i>Epinephelus merra</i>	6
マダラハタ	<i>Epinephelus microdon</i>	6
マハタ	<i>Epinephelus septemfasciatus</i>	5
ナミハタ	<i>Epinephelus summana</i>	10
タテスジハタ	<i>Gracila albomarginata</i>	1
スジアラ	<i>Plectropomus leopardus</i>	6
コクハンアラ	<i>Plectropomus melanoleucus</i>	1
オジロバラハタ	<i>Variola albigmarginata</i>	4
バラハタ	<i>Variola louti</i>	1

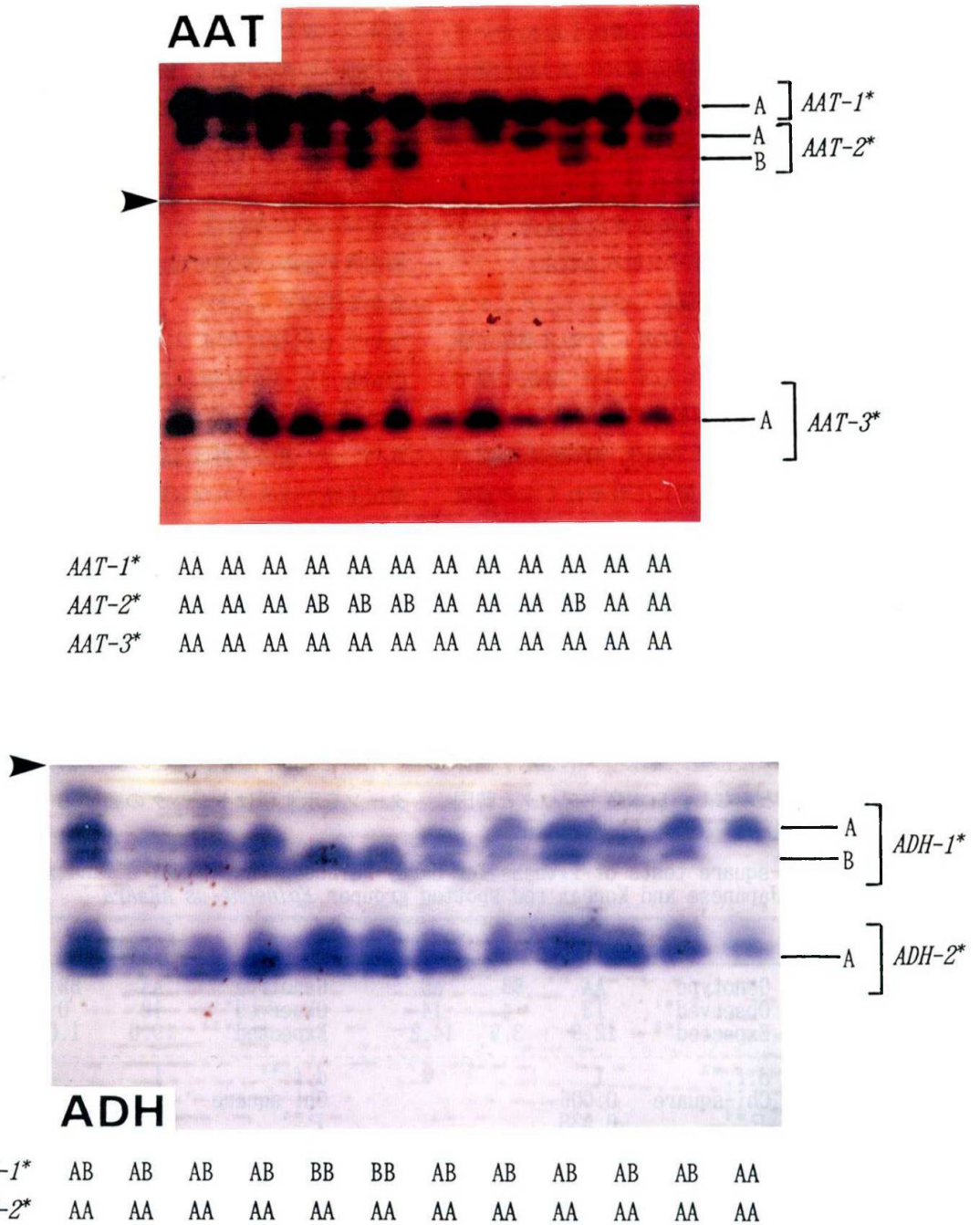


Fig. 1. Electrophoregram of aspartate aminotransferase (AAT) and alcohol dehydrogenase (ADH) of red spotted grouper *Epinephelus akaara*.

このうち陽極側の $AAT-2^*$ 遺伝子座において変異が認められ、相対移動距離100 (A) の位置に1本のバンドが出現する個体、相対移動距離100 (A) と65 (B) の位置にそれぞれ1本の濃度がほぼ等しいバンドが出現する個体、および頻度は低いが相対移動距離65 (B) の位置に1本のバンドが出現する個体の3パターンがみられた。

次にADHでは、陰極側に二つのバンドゾーンが出現し、 $ADH-1^*$ と $ADH-2^*$ の2遺伝子座が推定された。このうち $ADH-1^*$ 遺伝子座で変異が認められ、相対移動距離-100 (A) の位置に1本のバンドが出現する個体、相対移動距離-100 (A) と-165 (B) の位置にそれぞれ1本の濃度がほぼ等しいバンドが出現する個体、および相対移動距離-165 (B) の位置に1本のバンドが出現する個体の3パターンがみられた (Fig. 1)。これらの遺伝子座におけるバンドの出現パターンは単量体酵素が示すパターン^{1, 2)} と考えられた。

ここで、これらの遺伝子座において1本バンドを示す個体をホモ接合型、2本バンドを示す個体をヘテロ接合型とみなし、日本産キジハタと韓国

産キジハタのそれぞれについてHardy-Weinbergの法則への適合性を χ^2 検定によって調べた (Table 2)。それによれば、両集団とも表現型の実測値と期待値はよく一致し、統計的有意差は認められなかった。

キジハタのAATとADHで認められた単量体様変異が他のハタ科魚類についても同様にみられるかを確認するために、他のハタ科魚類21種についても同様にアイソザイムの変異を調べた (Table 3)。その結果、AATについては多くの種で単型的であり、キジハタで変異のみられた $AAT-2^*$ 遺伝子座は活性が不安定か、あるいは遺伝子座が認められない種が多かった。しかし、いくつかの種では $AAT-1^*$ あるいは $AAT-2^*$ 遺伝子座でキジハタと同様の単量体様のバンドパターンがみられた。一方ADHの場合は多くの種で多型的であり、変異がみられた場合はすべて2本バンドのヘテロ型で、キジハタと同様に単量体様の泳動パターンを示した。

AATとADHにおいてこのような単量体様のパターンを示す種はキジハタの属する *Epinephelus*

Table 2. Chi-square tests of fitness for Hardy-Weinberg law at $AAT-2^*$ and $ADH-1^*$ loci of Japanese and Korean red spotted grouper *Epinephelus akaara*

		Japanese			Korean			
$AAT-2^*$	Genotype	AA	BB	AB	Genotype	AA	BB	AB
	Observed* ¹	13	4	14	Observed* ¹	18	0	11
	Expected* ²	12.9	3.9	14.2	Expected* ²	19.0	1.0	8.9
	d.f.* ³	1			d.f.* ³	1		
	Chi-square P* ⁴	0.006 0.938			Chi-square P* ⁴	1.589 0.207		
$ADH-1^*$	Genotype	AA	BB	AB	Genotype	AA	BB	AB
	Observed* ¹	10	3	18	Observed* ¹	14	2	13
	Expected* ²	11.6	4.6	14.7	Expected* ²	14.5	2.5	12.0
	d.f.* ³	1			d.f.* ³	1		
	Chi-square P* ⁴	1.551 0.212			Chi-square P* ⁴	0.194 0.660		

*¹ Number of individuals observed

*² Number of individuals calculated by Hardy-Weinberg law

*³ Degree of freedom

*⁴ Risk percentage for chi-square value

Table 3. Status of electrophoregram of aspartate aminotransferase (AAT) and alcohol dehydrogenase (ADH) in serranid species

Locus	AAT-1*	AAT-2*	AAT-3*	ADH-1*	ADH-2*
<i>C. argus</i>	Monomorphic	Monomorphic	Monomorphic	Monomorphic	Monomorphic
<i>C. aurantius</i>	Monomorphic	Monomorphic	Monomorphic	Monomeric	Monomorphic
<i>C. miniatus</i>	Monomorphic	Monomorphic	Monomorphic	Monomorphic	Monomeric
<i>C. pachycentron</i>	Monomorphic		Monomorphic	Monomorphic	Monomorphic
<i>C. sonnerati</i>	Monomorphic		Monomorphic		Monomorphic
<i>C. urodelus</i>	Monomorphic		Monomorphic	Monomeric	Monomorphic
<i>E. akaara</i>	Monomorphic	Monomeric	Monomorphic	Monomeric	Monomorphic
<i>E. corallicola</i>	Monomorphic		Monomorphic	Monomorphic	Monomorphic
<i>E. fasciatus</i>	Monomorphic		Monomorphic	Monomeric	Monomorphic
<i>E. hoedtii</i>	Monomorphic	Monomorphic	Monomorphic	Monomeric	Monomorphic
<i>E. macrospilos</i>	Monomorphic	Monomorphic	Monomorphic		Monomeric
<i>E. maculatus</i>	Monomorphic		Monomorphic		Monomeric
<i>E. melanostigma</i>	Monomorphic		Monomorphic	Monomeric	
<i>E. merra</i>	Monomeric		Monomorphic	Monomeric	Monomeric
<i>E. microdon</i>	Monomorphic		Monomorphic	Monomeric	Monomeric
<i>E. septemfasciatus</i>			Monomorphic	Monomeric	Monomeric
<i>E. summana</i>	Monomorphic	Monomeric	Monomorphic	Monomorphic	Monomorphic
<i>G. albomarginata</i>	Monomorphic		Monomorphic		Monomorphic
<i>P. leopardus</i>	Monomorphic	Monomorphic	Monomorphic	Monomeric	
<i>P. melanoleucus</i>	Monomorphic		Monomorphic		Monomorphic
<i>V. albimarginata</i>	Monomeric		Monomorphic	Monomeric	Monomeric
<i>V. louti</i>	Monomorphic		Monomorphic	Monomeric	Monomorphic

Blank parts show that loci are not obvious or are not recognized

属のみに限られず、別属の *Cephalopholis*, *Gracila*, *Plectropomus*, *Variola* にもみられ、二量体様のパターンを示す種はなかったことから (Table 3), これらのアイソザイムの変異はおそらくハタ科魚類全体に普遍的な特性ではないかと思われた。

考 察

生物の種によってアイソザイムの変異様式が相違するという事例は魚類ではこれまでに報告されていないが、貝類ではいくつかの例が知られている。グリセロアルデヒドリン酸脱水素酵素 (GA PDH) は現在までに調べられている魚類および大部分の貝類で二量体を示すが^{1, 2)}, イタヤガイ科のホタテガイ *Patinopecten yessoensis*^{1, 9, 10)} とヤミノニシキ *Volachlamys hirasei*¹⁾ ではこれが単量体様の変異を示すことが知られている。しかしこれはイタヤガイ科の科としての普遍的な特

徴ではなく、同科のイタヤガイ *Pecten albicans* では他の魚介類と同じ二量体様の変異である¹¹⁾。

また、マリックエンザイム (MEP) は魚類および大部分の貝類で四量体であるが^{1, 2)}, マルスダレガイ科のカガミガイ *Phacosoma japonicum* では明瞭な二量体様の泳動パターンを示す¹²⁾。しかしこれもマルスダレガイ科の科としての普遍的な特徴ではなく、同科のアサリ *Ruditapes philippinarum*¹³⁾, ハマグリ *Meretrix lusoria*¹⁴⁾, チョウセンハマグリ *Meretrix lamarcki*¹⁵⁾ では他の魚介類と同じ四量体様の変異である。

冒頭で述べたように AAT および ADH は魚介類では一般に二量体であり、単量体の種はこれまでに知られていない^{1, 2)}。今回、ハタ科の科に共通してこれらのアイソザイム変異が単量体様であることが示された。ハタ科魚類の近縁種としてはスズキ科のスズキ属 (*Lateolabrax*) 魚類のアイ

*1 横川 (未発表)

ソザイムが調べられているが、スズキ属では AAT と ADH は他の多くの魚類と同じく二量体様であり^{16, 17)}、ハタ科魚類とは異なる。また検出される酵素システム数にも相違がみられ、AAT ではハタ科魚類の多くが3個であるのに対してスズキ属魚類では2個、ADH ではハタ科魚類の多くが2個であるのに対してスズキ属魚類では1個である^{16, 17)}。スズキ属魚類と現在のハタ科魚類は以前はスズキ科として分類上ひとつにまとめられていたほど近縁であり^{18, 19)}、それほど近縁なグループにおいてアイソザイムの変異様式や酵素システム数が相違するという現象は系統進化の観点からも非常に興味深い。

このように、アイソザイムの変異様式は酵素の種類によって特異的であるにもかかわらず特定の科あるいは種によって変異様式が異なる現象について、そのメカニズムは現段階では明らかではない。前述のように近縁な分類群間で変異様式が相違するという事は、ある特定の種分化の過程で酵素の化学的性質に変化が生じることを示唆するものと思われる。

前述のハタ科魚類とスズキ属魚類の例について考えてみれば、スズキ型魚類の祖先型から何らかの原因により AAT および ADH アイソザイムの生化学的性質が変化したハタ科魚類の祖先種が分化し、その後の適応放散によってハタ科という大きなグループとなったという仮設が考えられる。ハタ科やスズキ科はスズキ目魚類の中でも原始的なグループとして位置づけられているが^{18, 20)}、この仮設が正しいとすればハタ科魚類はその中でも特殊化したグループと言えるのかも知れない。

近年、多くの魚介類でアイソザイム分析が行なわれるようになってきたとは言え、生物全体の夥しい種数からすれば現在までに情報の得られているものはそのほんの一握に過ぎない。このような

アイソザイムの変異様式の相違は種分化や系統進化を考える上でひとつの重要な情報となる可能性もあり、この現象のメカニズムを明らかにするためには酵素化学的手法により酵素の量体構成を確実に把握する必要がある。いずれにせよ、このような興味深い現象について今後の研究の発展が期待されるところである。

謝 辞

本研究に用いた標本魚の入手にご協力頂いた香川県水産試験場の宮川昌志主任研究員および一色正主任研究員、香川県漁業協同組合連合会の各位、沖縄県那覇市の仲田鮮魚の各位、滋賀県能登川町の笠松まち子氏、広島県大竹市の(有)湊水産の各位、および福岡市の太平洋貿易の田嶋 猛社長にお礼を申し上げます。

要 約

ハタ科魚類の一種キジハタのアスパラギン酸アミノ転移酵素 (AAT) およびアルコール脱水素酵素 (ADH) アイソザイムをデンブングル電気泳動により調べたところ、AAT-2* と ADH-1* 遺伝子座に変異がみられ、泳動像は単量体様の変異パターンを示した。これらの遺伝子座について、1本バンドの個体をホモ接合型、2本バンドの個体をヘテロ接合型とみなし、Hardy-Weinberg の遺伝平衡への適合性を χ^2 検定によって調べたところ、観察値と期待値はよく一致し、統計的に有意差は認められなかった。また、ハタ科魚類の他の21種についてこれらの酵素を調べたところ、遺伝的単型のため量体の確認できなかった遺伝子座を除きすべての種で単量体様の泳動パターンを示した。このことから、ハタ科魚類の AAT と ADH は単量体酵素である可能性が示唆された。

文 献

- 1) 藤尾芳久 (1984) アイソザイム分析手法による魚介類の遺伝的特性の解明に関する研究. 東北大学農学部, 65 pp.
- 2) 日本水産資源保護協会 編 (1989) アイソザイムによる魚介類の集団解析. 555 pp.
- 3) 沼知健一 (1982) アイソザイムによる魚類の集団遺伝学. 淡水魚, 8, 41-57.
- 4) 堀 勝治 (1994) アイソザイムの分子生物学. 共立出版, 東京, viii+254 pp.
- 5) 瀬能 宏 (1993) ハタ科. 日本産魚類検索 (中坊徹次 編), 東海大学出版会, 東京, pp.601-632.
- 6) Heemstra, P. C. and J. E. Randall (1993) Groupers of the world. FAO species catalog vol. 16, Food Agri. Organ. United Nations, Rome, viii+382 pp., 31 pls.
- 7) 谷口順彦・岡田容典 (1980) マダイの生化学的多型に関する遺伝学的研究. 日水誌, 46, 437-443.
- 8) Shaklee, J. B., F. W. Allendorf, D. C. Morizot and G. S. Whitt (1990) Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. Trans. Amer. Fish. Soc., 119, 2-15.
- 9) 山中良一・藤尾芳久 (1983) ホタテガイの遺伝的変異. 水産育種, 8, 33-37.
- 10) Kijima, A., K. Mori and Y. Fujio (1984) Population differences in gene frequency of the Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* on the Okhotsk Sea coast of Hokkaido. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 50, 241-248.
- 11) 木島明博 (1989) イタヤガイ *Pecten albicans*. アイソザイムによる魚介類の集団解析 (日本水産資源保護協会 編), pp. 234-237.
- 12) Sato, S. (1996) Genetic variability and population structure of *Phacosoma japonicum* (Bivalvia: Veneridae). Venus, 55, 51-63.
- 13) 木島明博・谷口順彦・森 直樹・萩原寿太郎 (1987) アサリの遺伝的変異と繁殖構造. Rep. Usa Mar. Biol. Inst., Kochi Univ., 9, 173-181.
- 14) 木島明博 (1989) ハマグリ *Meretrix lusoria*. アイソザイムによる魚介類の集団解析 (日本水産資源保護協会 編), pp. 242-245.
- 15) 木島明博 (1989) チョウセンハマグリ *Meretrix lamarcki*. アイソザイムによる魚介類の集団解析 (日本水産資源保護協会 編), pp. 246-256.
- 16) 津田恭敬 (1989) アイソザイム自動解析システム. アイソザイムによる魚介類の集団解析 (日本水産資源保護協会 編), pp. 531-551.
- 17) Yokogawa, K. and S. Seki (1995) Morphological and genetic differences between Japanese and Chinese sea bass of the genus *Lateolabrax*. Japan. J. Ichthyol., 41, 437-445.
- 18) 松原喜代松 (1955) 魚類の形態と検索. 石崎書店, 東京, 1603 pp., 135 pls.
- 19) 落合 明 監修 (1981) 学研生物図鑑, 魚類. 学習研究社, 東京, 289 pp.
- 20) Nelson, J. S. (1994) Fishes of the world. 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, xvii+600 pp