

放流技術開発事業

(1)トラフグ

濱田弘之・宮内正幸

本事業はトラフグの効率的、経済的な放流技術の開発を目的として、平成7年度から実施されている。本年度が最終年であり、5カ年間の調査結果については放流技術開発事業報告書として平成12年3月に既にとりまとめられているので、ここでは5カ年の調査結果の要約を示す。

調査結果の要約

1. 適正放流技術開発

- ・平成7年度～11年度に60～132mmの種苗2万9千尾～11万1千尾を放流した。
 - ・中間育成時の適正収容密度は、全長7cmまでの育成の場合130尾/トン、8cmまでの場合100尾/トン、9cmまでの場合50尾/トンと考えられた。
 - ・自動給餌器は事業レベルでの補助的な使用が適当と考えられた。
 - ・健苗性評価手法として、肥満度、かみ跡数、尾鰭欠損度、無酸素耐性、遮光率、体成分について調査した。
 - ・現在種苗生産に使用する卵は天然の親魚から採取している。良質な卵は成熟が最終段階に達した（排卵した）直後の雌からでないことと確保できず、また、良質卵をもった親魚が高価であるため、天然魚が激減した現在では種苗生産に必要な卵の入手が極めて困難になっている。今後経済的に安定して良質卵を確保するには、短期養成親魚からのホルモン処理による採卵等の技術開発が急務となっている。
- ・本県筑前海で操業する延縄の漁獲量は平成9年度漁期で74トン、10年度漁期で33トンと推定され、そのうち、26%を放流魚が占めていた。
 - ・下関南風泊市場における外海産トラフグの水揚量は平成7年の262トンから平成11年の97トンまで減少した。このなかで、放流魚が占める割合は総水揚量の20%を占めるまでに至っている。この放流魚水揚量には、福岡、山口、長崎の3県がこの事業で放流したものに、漁協等によって小型サイズで稚魚の分布しない外海域に放流されたものも混じっている。種苗放流の経済効果を明らかにする上で、事業外のものとは本事業によるものの効果、また、本事業によるもののなかでも、どの県の放流種苗がどの程度水揚げに貢献しているのかを明らかにする必要がある。
 - ・全長10cm以上の大型サイズでは漁港内での飼付放流が有効と考えられたが、全長8cmサイズでは摂餌個体が少なかった。放流適正サイズより小型の種苗を放流し、放流後の生残率を漁港内放流によって適正放流サイズ並に高めることができれば、さらに効率の良い放流事業が可能となるが、小型種苗の漁港内飼付放流を有効に機能させるには海底地形の考慮等についてさらに工夫が必要であると考えられた。
 - ・平成2年から11年までの福岡湾での8月時点におけるトラフグ幼魚（放流魚を含む）の現存量は2万から24万尾と推定された。この現存量では相対成長が低下することはなかったため、24万尾の現存量であれば環境収容力の許容範囲であると考えられた。

2. 放流技術開発

- ・前期までの調査で適正放流サイズとして絞り込まれた全長8～9cmサイズでの放流による追跡試験の結果、この全長範囲では、内湾域における放流年度内の回収率に明瞭な差は認められなかったことから、放流経費を考慮すると本県の放流形態、放流場所では全長8cmが放流サイズとして適当であると考えられた。
- ・中間育成時には飼育密度が生残率に大きな影響を及ぼすが、飼育時の密度は放流後の生残には大きな影響を及ぼさないと考えられた。

放流技術開発事業

(2) エゾアワビ、アカウニの放流技術開発調査

太刀山透・深川敦平・岩渕光伸・福澄賢二・小島茂明*

本事業は、平成7～11年度の5年間実施したが、本年度が最終年度となり、5年間の技術開発の成果をとりまとめた。

1 放流技術開発調査<エゾアワビ>

1. 南方域におけるエゾアワビの分布生態

福岡県でのエゾアワビ (*Haliotis discus hanna*) の放流はクロアワビ (*Haliotis discus discus*) の病害による種苗放流数の減少に対する暫時的対策として実施された。また、漁業者サイドでも、民間種苗生産業者から種苗を購入し、放流する形態が定着しており、現在では年間約20万個が放流されている。しかしながら、南方域における放流エゾアワビの生態は明らかにされておらず、事業が先行しているのが現状である。

放流漁場におけるスキューバ潜水による観察では、エゾアワビは放流後、漁場の最も浅い水深帯へ移動し、潮間帯の低潮線付近（水深1m付近）の岩表面及び側面に生息する傾向がみられている。そこで、天然漁場及び屋内水槽での両者の生息状況を比較することにより、南方域での放流エゾアワビの分布生態を検討した。

本調査で実施したフィールド調査の位置を図1に示した。

方 法

(1) 漁場における放流アワビの表出状況調査

供試した種苗は平成5年度に福岡県栽培漁業公社で生産されたクロアワビ及びエゾアワビで、これらを1年間、

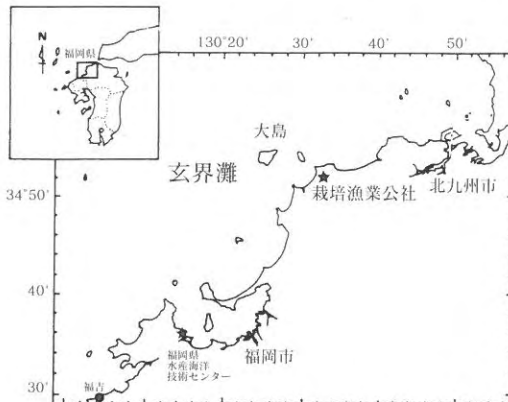


図1 調査地の位置図

糸島郡二丈町福吉地先で中間育成した後、試験に用いた。放流時の平均殻長はクロアワビが 27.9 ± 4.0 mm、エゾアワビが 26.0 ± 3.3 mmで、両者ともディスクタグにより標識を施した。放流場所は福吉地先の水深3m域に設置されている稚貝保護礁4基で、7年3月14日に両者とも各500個を潜水により放流した。なお、放流時には 0.5×0.5 mの海藻坪刈りを3点実施した。

追跡調査は7年4月5日、8月2日及び8年1月18日に実施し、4月は潜水によるアワビの生息状況の観察を、8月及び1月は発見した放流種苗について、種別の生息場所を記録するとともに、殻長を測定した。

(2) 屋内模擬漁場における表出状況観察

用いた施設は、屋内角型コンクリート水槽（ 3×3 m）に人頭大の岩を積み上げた 1.5×1.5 mの岩礁域、砂域及びレキ域（テニスボール〜こぶし大）からなる模擬漁場で、これにクロアワビとエゾアワビを同数収容した。両者の投入サイズは年級ごとの分布生態を比較するために殻長30mm、50mm、80mmの3サイズとした。

実験は2回に分けて行い、7年11月6日～8年1月8日に殻長50mm及び80mmの2サイズについて、8年1月23日～11月11日に30mm、50mm及び80mmの3サイズについて表出状況の観察を行った。30mm、50mmサイズのクロアワビ及びエゾアワビは5年度に福岡県栽培漁業公社で生産されたもので、80mmサイズについては、両者とも宗像郡大島で採取したものである。それぞれの殻長と個数を表1に示した。

表1 模擬漁場における試験概要

種・サイズ	個数	殻長	
		1回目	2回目
クロアワビ			
80mmサイズ	10個	78.4 ± 4.7	81.5 ± 5.4
50mmサイズ	20個	30.6 ± 1.7	43.9 ± 1.8
30mmサイズ	20個	—	26.9 ± 1.9
エゾアワビ			
80mmサイズ	10個	84.9 ± 2.5	90.2 ± 2.6
50mmサイズ	20個	32.0 ± 2.1	43.3 ± 2.8
30mmサイズ	20個	—	30.0 ± 2.6

* 東京大学 海洋研究所

また、天然の漁場環境に近づけるために、アカナマコ、サザエ、ウニ類及びトコブシを供試アワビに影響のない範囲で数個收容し、餌料としてアラメ、ホンダワラ類を岩に固定し、適宜交換した。2回の実験を通じて、以下の2項目について観察結果をまとめた。

1) 水温別表出状況

水温の変化に伴うエゾアワビ、クロアワビの表出状況を見るために、毎日午前9時に種別及びサイズ別の表出個体数と水温を記録した。

2) 時間別表出状況

エゾアワビ、クロアワビの異なる水温帯における24時間の活動状況を知るために、水温18℃から2~3℃変化することにより12時から翌日の12時まで1~2時間毎に種別及びサイズ別に表出個体数を記録した。

(3) エゾアワビとクロアワビの光に対する反応

供試した種苗はエゾアワビ、クロアワビの殻長30mm及び50mmの人工貝で、30mmサイズでは各20個、50mmサイズでは各10個を用いた。実験に用いた水槽は、縦200cm×幅100cm×深さ20cmのFRP製で、この半分をベニヤ板と黒のビニールシートを用いて明区と暗区を設け、照度、温度が調節可能な恒温室に收容した。水槽中央にアワビを置き、照度別、水温別に24時間後のアワビの付着位置を確認した。なお、実験中は、止水、微通気、無給餌とした。

結 果

(1) 漁場における試験放流貝の表出状況調査

放流場所の海藻組成は表2に示したが、アオサ、マクサ、ツノマタ等の小型の海藻が優占し、ホンダワラ類やクロメが点在しており、これらの着生量は2,728 g/m²であった。

アワビの採取場所及び付着場所を表3に示した。8月2日の調査では上面及び側面に付着していたエゾアワビの割合は41.7%で、クロアワビの19.4%に比べ高い表出割合であった。一方、1月18日では表出個体の割合はエゾアワビが83.6%、クロアワビが91.6%で両者とも高い結果となった。このように、夏季においてはエゾアワビはクロアワビに比べ高い表出傾向があると認められたが、冬季では両者間に大きな差はみられず、いずれも高い表出傾向を示した。

回収したアワビの殻長は表4に示したように、8年1月では両者間に成長の差はみられなかった。なお、両者の成長は過去の知見¹⁾から差がないことが明らかになっている。

表2 放流場所の海藻組成
単位：g/m²

種 類			着 生 量
ア	オ	サ	620
ク	ロ	メ	260
イ	ソ	モ	144
ハ	ハ	キ	20
フ	ク	ノ	64
マ	ク	サ	620
ユ	カ	リ	76
タ	オ	ヤ	20
フ	ダ	ラ	372
ツ	ノ	マ	404
ヒ	ト	ツ	60
イ	バ	ラ	24
カ	バ	ノ	12
計			2,728

表3 アワビの採取場所及び付着場所

単位：上段 個、下段 %

調査年月日	7年8月2日							8年1月18日									
	採取場所	計	稚貝礁内			稚貝礁外			計	稚貝礁内			稚貝礁外				
上面			側面	下面	上面	側面	下面	上面		側面	下面	上面	側面	下面			
クロアワビ																	
回収個数	31	0	6	21	0	0	4	24	1	1	1	12	8	1			
割合	100.0	0	19.4	67.7	0	0	12.9	100.0	4.2	4.2	4.2	50.0	33.2	4.2			
エゾアワビ																	
回収個数	96	14	26	56	0	0	0	49	2	8	5	25	6	3			
割合	100.0	14.6	27.1	58.3	0	0	0	100.0	4.1	16.3	10.2	51.0	12.2	6.2			

(2) 屋内模擬漁場における表出状況

1) 水温別表出状況

2サイズの水温別表出割合を図2に示した。この期間は水温下降期に当たり、全般にエゾアワビはクロアワビに比べて表出割合が高く、なかでも、大サイズは水温が16℃から12℃へ下降する秋から冬にかけて、クロアワビの10~30%に対して、エゾアワビは50~80%と非常に高い値を示した。3サイズの水温別表出割合を図3に示した。開始時の10℃でエゾアワビの表出割合は大サイズでクロアワビに比べ高いものの、両者の表出割合の差は小さかった。水温16~18℃前後で両者とも表出割合は最も低く、その後は両者とも再度上昇した。このように年間を通して、大中小サイズともエゾアワビがクロアワビに比べ表出割合が高い傾向は変わらなかった。また、両者の表出割合の差は水温下降期で大きく、水温上昇期には小さかった。また、大サイズでは両者の表出割合の差が最も大きく、中型、小型の順で低くなった。

2) 時間別表出状況

各水温別の時間別表出割合を図4(大サイズ)、5(中サイズ)、6(小サイズ)に示した。各サイズとも、エゾアワ

ビの表出傾向は昼夜問わず表出傾向が強いのにに対し、クロアワビは時間別に顕著な差があり、18~2時までの夜間に表出割合が高くなり、日中には隠棲する傾向が強かった。年間を通じて両者が積極的に活動し、摂餌を行っていたのは18~2時であり、日中は表出しているエゾアワビも摂餌する個体はほとんどなかった。

(3) エゾアワビとクロアワビの光に対する反応

水温15℃でのエゾアワビ及びクロアワビの照度別付着位置を図7に示した。殻長50mmサイズの明区に位置した個体の割合は、水面照度1,080lux以下ではエゾアワビが40~70%で、クロアワビの10%以下に比べ全般に高い値であった。30mmサイズでも同様に、エゾアワビの明区に位置した個体の割合は0~50%で、クロアワビの0~20%に比べ高いが、その割合は50mmサイズほど顕著ではなかった。1,170luxでは各サイズで、エゾアワビ、クロアワビとも10%以下となった。

水温20℃での両者の付着位置を図8に示した。全般的傾向は15℃と同様で、エゾアワビはクロアワビに比べ、明区に位置する個体の割合が高く、その傾向は30mmサイズより、50mmサイズで顕著であった。さらに、各サイズ、両者とも明区に位置する個体の割合は、15℃に比べ低かった。

表4 アワビ回収個体の殻長 単位: mm

種類	7年3月14日	8月2日	8年1月18日
クロアワビ	27.9±4.0	41.8±5.8	54.1±7.2
エゾアワビ	26.0±3.3	44.3±5.7	55.3±7.1

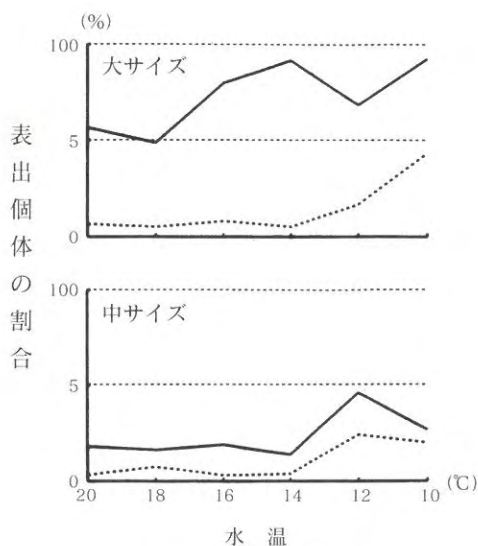


図2 水温別サイズ別表出割合の推移 (実線はエゾアワビ・点線はクロアワビ)

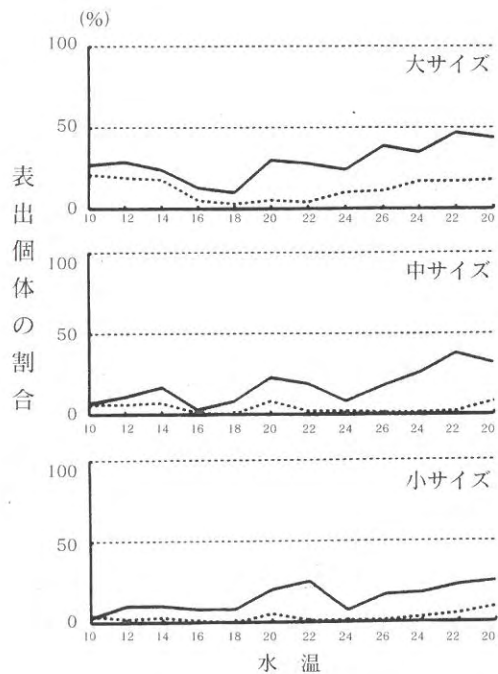


図3 水温別サイズ別表出割合の推移 (実線はエゾアワビ・点線はクロアワビ)

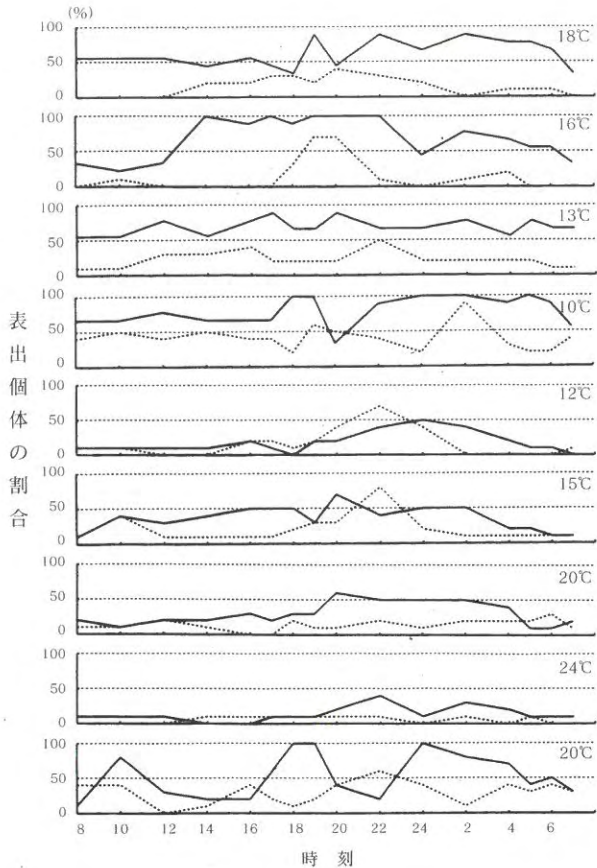


図4 水温別時間別表出割合の推移 (大サイズ; 80mm)
(実線はエゾアワビ・点線はクロアワビ)

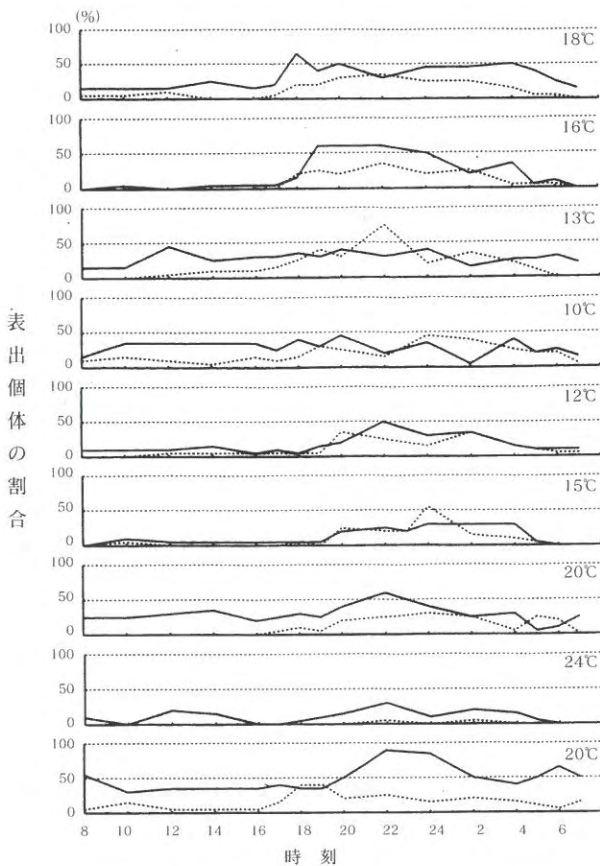


図5 水温別時間別表出割合の推移 (中サイズ; 50mm)
(実線はエゾアワビ・点線はクロアワビ)

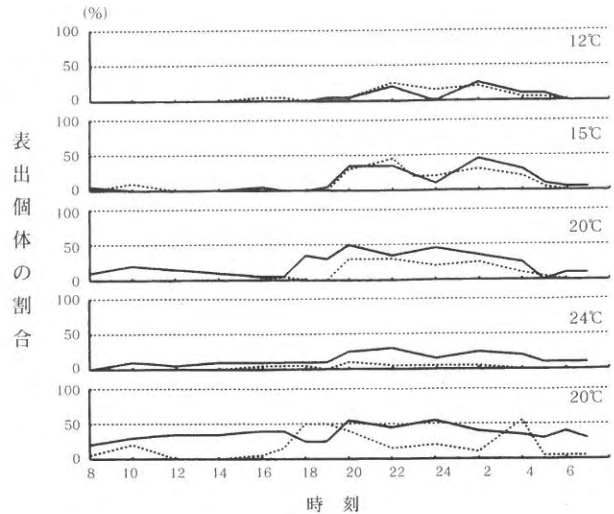


図6 水温別時間別表出割合の推移 (小サイズ; 30mm)
(実線はエゾアワビ・点線はクロアワビ)

考 察

漁場での観察から、筑前海においてはエゾアワビは放流後は漁場内の浅い場所へ移動し、岩の上面及び側面に表出するという2つの性質を持つことがうかがえた。

このうち、放流エゾアワビが岩の上面及び側面に表出する性質は、年間を通してクロアワビよりもその傾向が強いということが、屋内模擬漁場並びに試験放流の結果と一致しており、この性質が天然及び実験漁場で共通してみられることが明らかになった。

さらに模擬漁場での試験結果から、エゾアワビは秋から冬の降温期に表出傾向が強く、春～夏の昇温期に表出傾向が弱いこと、エゾアワビとクロアワビの表出傾向の差は大型の個体ほど大きく、中型、小型の順に小さくなること明らかになった。これらの結果は屋内実験でのみの確認であるが、天然漁場においても同様の性質であることが示唆される。また、光に対する反応、いわゆる、負の光走性の度合いは、エゾアワビはクロアワビより弱く、その傾向は大型貝で顕著で、特に低水温ほど差は明瞭であった。この結果は、漁場での生息状況並びに模擬実験漁場での結果とよく一致しており、表出並びに浅所への移動という、クロアワビとは異なるエゾアワビの生態は、負の光走性の度合いの差によるものと推察された。

エゾアワビの分布域である北海道、岩手県^{2) 3)}の報告によると、当種は岩の上面や側面に生息するとされており、その表出する時期は秋から冬にかけて高くなり、その傾向は小型貝よりも大型貝で顕著であるとされている。これらの性質は本研究の模擬漁場での結果及び漁場での観察結果とよく一致しており、本来のエゾアワビの性質であると考えられる。

エゾアワビ(30mm)

クロアワビ(30mm)

エゾアワビ(50mm)

クロアワビ(50mm)

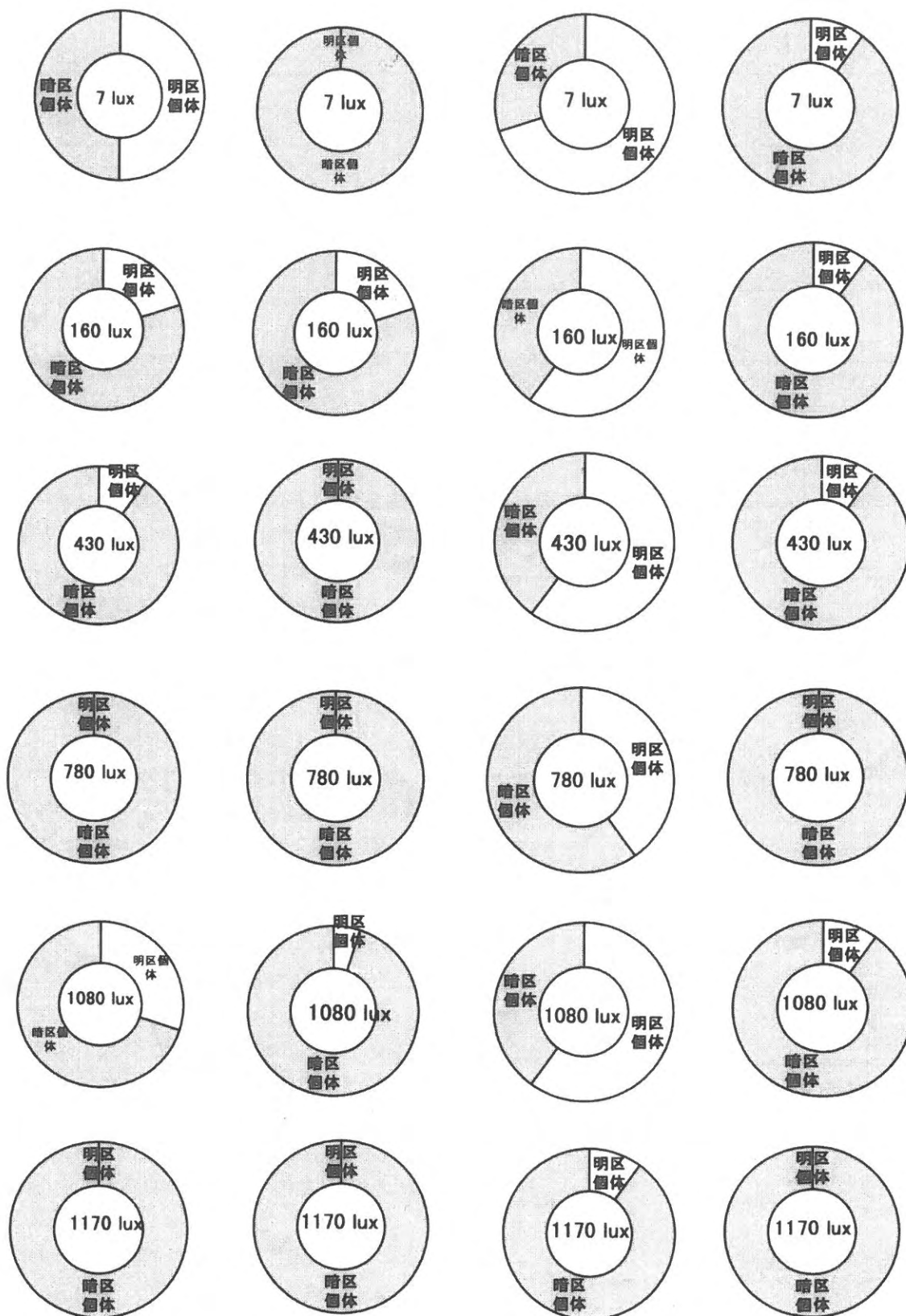


図7 水温15℃でのエゾアワビ、クロアワビの付着位置

エゾアワビ(30mm)

クロアワビ(30mm) エゾアワビ(50mm)

クロアワビ(50mm)

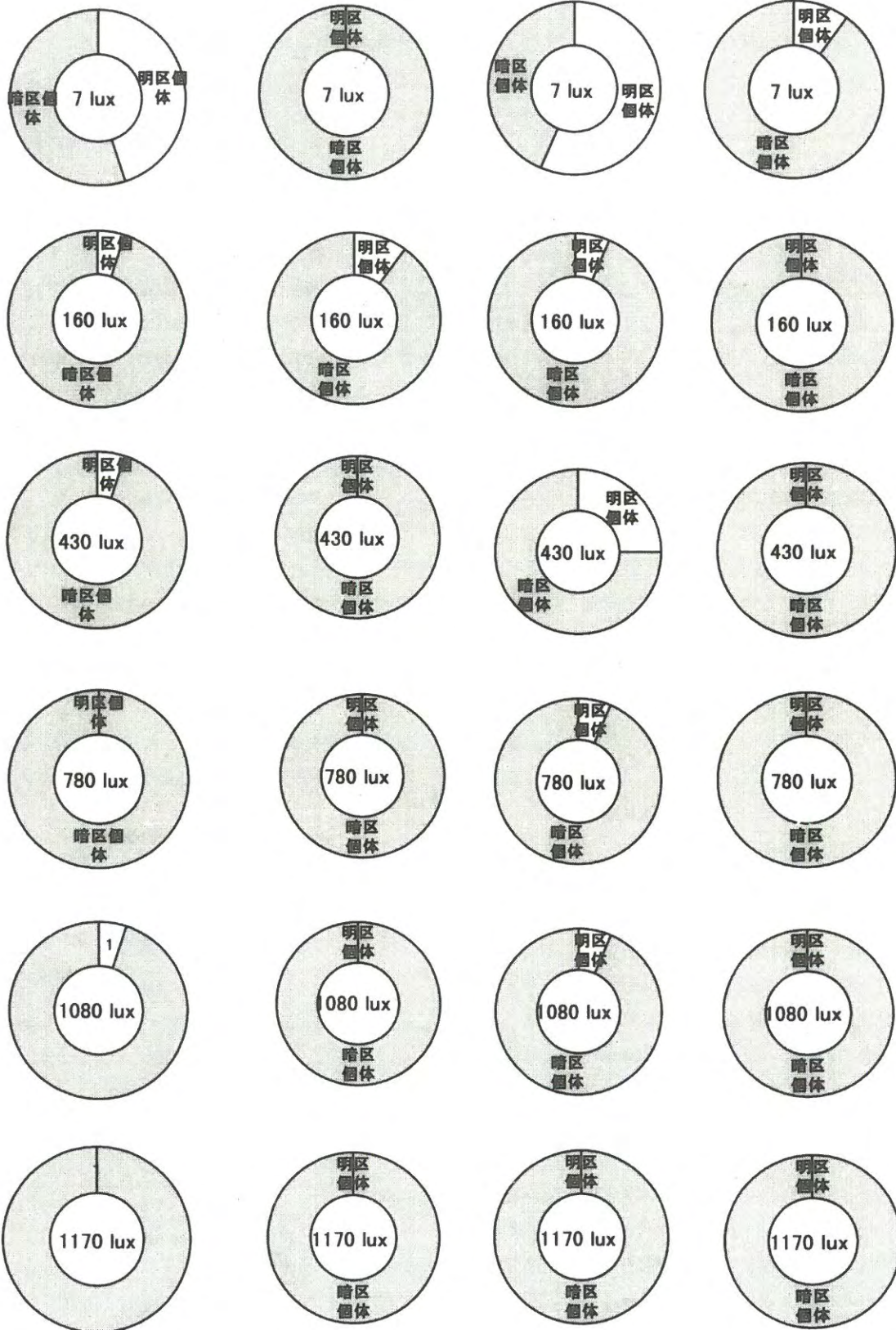


図8 水温20℃でのエゾアワビ、クロアワビの付着位置

一方、クロアワビがエゾアワビに比べ隠棲する傾向が強いことは漁場及び模擬漁場での観察結果から明らかである。これは、クロアワビが暗所に多く、洞穴内に集団で付着している等の隠棲する傾向が強いという野中ら⁴⁾⁵⁾⁶⁾の報告とも一致する。これらのことから、放流エゾアワビとクロアワビの生息生態に差があることは明らかである。

2. エゾアワビの回収率の把握

放流エゾアワビの回収状況を把握するため、放流エゾアワビに対する漁業者の漁獲意識を調査するとともに、事業的に放流されているエゾアワビの漁獲段階での累積回収率を漁獲物調査により把握した。

方 法

(1) 目的意識の差によるエゾアワビの採取状況

10年8月6日に、宗像郡大島二見浦地先の水深3m域で、3名が漁獲に対する異なる目的意識をもってスキューバ潜水し、発見した全てのアワビを採取した。調査範囲は3名ともほぼ同じ場所であり、調査時間も同一である。これを、A漁場、B漁場の2ヶ所で実施した。

各調査員の設定は次のとおりとした。

- ・エゾねらい者：エゾアワビ及びクロアワビの生息状況を熟知したうえで、エゾアワビを目的種として意識し漁獲調査する。
- ・クロねらい者：エゾアワビ及びクロアワビの生息状況を熟知したうえで、クロアワビを目的種として意識し漁獲調査する。
- ・経験が浅い者：アワビ漁獲経験が浅い者

(2) エゾアワビの累積回収率

宗像郡大島において、海士（夏季）漁並びに磯見（冬季）漁時に各2～3回、漁獲されたアワビの殻長の測定及び種類（エゾアワビ、クロアワビ、メガイアワビ、マダカアワビ）及びグリーンマークの有無による放流貝の識別を行った。回収された放流エゾアワビの年齢の推定は、漁法別殻長組成から5～6年齢群に分離し、それぞれの年齢から放流年度を特定し、任意の放流年度の回収群を累計することにより、累積回収率を導いた。調査対象とした放流群は、福岡県栽培漁業公社で生産した殻長10mmの種苗を、大島漁協において約1年間の中間育成で殻長約30mmまで育成し、漁場に放流したものである。殻長約30mmで放流したクロアワビは、放流後3年目か

ら漁獲され始め、その後5～6年間でほぼ回収が終了する。また、漁獲され始めてから3年間で総回収個数の約80%が漁獲される⁷⁾。さらに、エゾアワビとクロアワビの成長には大きな差は認められない¹⁾ことから、本報では、6～11年度に漁獲された2～5年度放流群について解析した。

結 果

(1) 目的意識の差によるエゾアワビの採取状況

アワビの潜水者別種類別の採取個数を図9に示した。A漁場でのエゾアワビ採取個数は、エゾねらい者が26個であったのに対し、クロねらい者は9個で、エゾアワビを漁獲する意識を持つことで17個の差が見られた。B漁場においても、エゾアワビの採取個数はエゾねらい者が21個、クロねらい者は4個であり、A漁場と同様にエゾアワビ採取個数の差は17個であった。

クロアワビの採取個数は、A漁場では、クロねらい者が9個であったのに対しエゾねらい者は0個で、エゾアワビ採取個数と逆の結果となった。一方、アワビ採取の経験が少ない調査員は、A漁場では6個の総採取個数のうちエゾアワビが5個で、クロアワビは0個であった。B漁場でも同様に採取個数はエゾアワビが3個、クロアワビが1個であり、両漁場とも採取個数が少ない中でもエゾアワビがその多くを占めた。

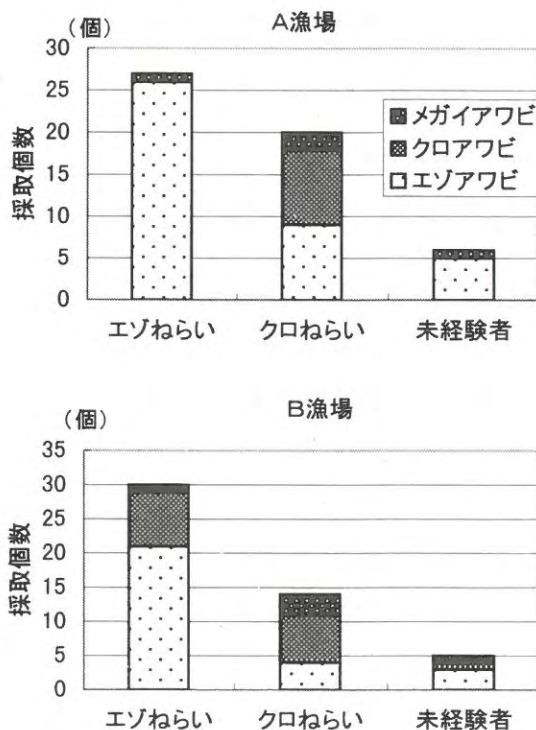


図9 アワビの潜水者別・種類別採取個数

(2) エゾアワビの累積回収率

総漁獲個数に占める調査個数と標本抽出率を図10に示した。6～11年度に調査したアワビの数は976～2,943個で、標本抽出率は13.0～30.9%であった。特に、10年度以降は操業日、操業者による放流エゾアワビの偏りにより生じる誤差を小さくするため、調査個数の増加に努め、標本抽出率を30%前後まで高めた。

6～11年度に漁獲したエゾアワビのうち、2～5年度に放流したエゾアワビの放流年度別累積回収率を表5に示した。放流エゾアワビの累積回収率は1.3～1.9%であり、同じ大島における2～4年度のクロアワビ放流群の4.5～6.9%に比べ低い値であった。

考 察

約10年前の昭和56～59年度の大島におけるクロアワビの累積回収率は23～37%⁷⁾であり、今回のクロアワビ放流群の回収率が過去の結果と大きく異なるため、エゾアワビ放流群の回収率をその種がもつ一般的回収率と断定することは危険であるが、放流エゾアワビの累積回

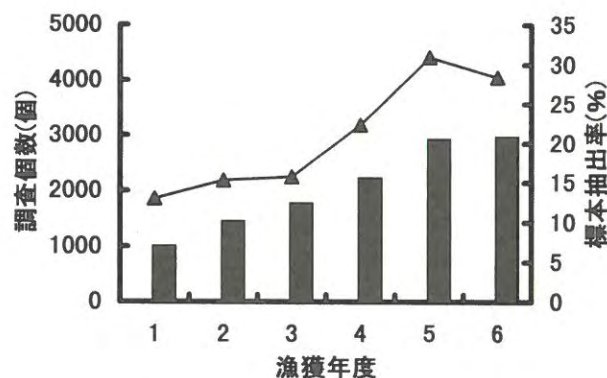


図10 総漁獲個数に占める調査個数と標本抽出率

表5 アワビの放流年度別累積回収率 (大島) 単位: 個

放流状況 年度 個数	漁獲年度別回収個数					累積回収 個数	累積 回収率	
	6	7	8	9	10			
エゾアワビ								
2 68,000	445	282	118	44	10	899	1.3%	
3 56,000	151	239	268	165	22	869	1.6%	
4 69,000		190	315	206	158	892	1.3%	
5 39,000			260	231	195	752	1.9%	
クロアワビ								
2 10,000	222	211	23	4	4	37	501	5.0%
3 3,000		53	13	8	9	52	135	4.5%
4 11,000			0	25	285	446	756	6.9%

率は1.3～1.9%で、2～4年度のクロアワビ放流群の4.5～6.9%に比べ低い値であった。この要因として以下のことが考えられた。

クロアワビの稚貝は水深0～3m程度の浅所に生育し、成長に伴い沖合いのアラメ等の繁茂域に移動していく生態を示す。また、岩の下部に隠棲し、その傾向は夏に特に強い。一方、筑前海に放流したエゾアワビは冬季、夏季とも稚貝から成貝に至るまで潮間帯～水深2m域の浅所に生息し、岩の上面及び側面に付着することが明らかになった。この生息生態の差は漁獲状況にも大きく影響する。

第1には、エゾアワビの生息水深帯とアワビへの漁獲努力が主に向けられる漁場の関係である。放流エゾアワビが生息する浅所は、漁獲努力が集中して向けられるクロアワビの主な生息水深帯である5m以深と異なる。漁獲の主たる目的種をクロアワビとして操業している筑前海の磯漁場においては、これまでと同じ水深帯に漁獲努力を向ければ、放流エゾアワビ資源に対する実質的漁獲強度は低下し、その結果回収率は低くなるということが予測される。

第2には、(1)で述べたように、漁獲者の目的種意識による漁獲状況の差である。エゾアワビの生息場所である浅い漁場で操業しても、漁獲時の目的種意識がクロアワビであれば、エゾアワビの漁獲個数は減少し、クロアワビが増加する。逆に、エゾアワビを目的種とすれば、エゾアワビの漁獲個数は増え、クロアワビが少なくなる。すなわち、隠棲するクロアワビを目的として漁をする漁業者の意識が石の表面に向かないため、表出するエゾアワビへの実質的漁獲強度が低下し、回収率も低くなるということが考えられる。

第3には、エゾアワビの生息場所で、それを目的種として漁獲するという漁業者の動機づけのために、エゾアワビ放流漁場が他の非放流漁場と同等のC P U Eが期待できる資源量、いわゆる放流エゾアワビの生息密度を確保することが必要であろう。

そのため、エゾアワビを放流するにあたっては、このようなクロアワビとは異なる生息生態を踏まえた放流、漁獲方法が必要となる。

放流場所としては、エゾアワビが放流した漁場の中で、最も浅い場所に移動してくる性質を利用して、沖合いの隆起岩礁域や入江的な水深が浅い漁場が適当と考えられる。また、C P U Eを高めるためにも放流場所を分散せず、集中して放流し、集約的に漁獲することが有効と考えられる。

<アカウニ>

1. 標識技術の開発

アカウニの移動生態、回収率の推定のためには、標識放流による追跡調査が有効な手段となる。ウニ類の標識に関しては、ナイロン糸でダイモテープ切片をウニの殻に貫通させ装着する方法⁸⁾等があるが、へい死率が高いこと、標識の装着によってアカウニの移動や成長への影響が懸念される等の問題がある。

そこで、標識ウニの行動等の生態に対する影響が少なく、継続観察が可能な標識について検討した。

方 法

(1) コーデッドワイヤータグによる標識

8年12月6日に、アカウニ（殻径34.6~66.1mm）の肛門部周辺にステンレス製のコーデッドワイヤータグ（以下CWTとする）を装着した。標識装着時には、CWTがアカウニの殻の中に止まり、腹腔内に達しないように注意した。アカウニに標識が装着されていることを調べるため、標識したウニをろ過海水で洗浄した後、金属探知器を用いて標識の有無を確認した。標識の脱落状況を調べるため標識個体60個と無標識個体30個を45×30×38cmの籠にそれぞれ30個ずつ収容し、流水飼育した。標識装着約1ヶ月後の9年1月16日と、約3ヶ月後の3月5日にへい死個体数と標識の脱落状況を金属探知器を用い調べた。

(2) ALCによる標識

染色液は、1NのNaOHにALC（同仁化学研究所）を200ppmの濃度で溶かし、HClによってPHを7に調整した。県栽培漁業公社で生産された種苗（平均殻径18.9±3.9mm）20,000個体を、11年5月23日にALC溶液に2時間浸漬した後、隣接した2t水槽に移し流水で12日間飼育した。

研究所職員立ち会いのもと、糸島郡志摩町姫島漁協の海士15名が素潜りによって、11年6月4日に姫島地先に15,200個体を放流した。また、100個体を研究所で継続飼育し、ALC標識の持続性について調査した。

結果及び考察

(1) コーデッドワイヤータグによる標識

CWTによる標識脱落率及びへい死率を表6に示した。9年1月16日までに、標識区で7個体（11.7%）、対照区

で5個体（16.7%）がへい死したが、その後3月5日までは両区ともへい死はなかった。標識区と対照区でへい死率に差がないこと、また、へい死は標識作業直後に見られたことから、へい死は標識装着作業時のハンドリングによるものと判断され、CWT標識は、アカウニの生残に影響しないと考えられた。標識の脱落率は1ヶ月後で28.3%、1~3ヶ月後で39.6%であった。

このように、CWT標識の3ヶ月後の脱落率が約40%と高く、生残率の調査には不相当と考えられるが、ウニを殺すことなく標識の有無が確認できることから、移動生態調査等の標識手法としては極めて有用であると判断された。

(2) ALCによる標識

ALC染色後のへい死率は、染色後12日間で23.5%であった。

染色約7ヶ月後の11年12月21日に、研究所で継続飼育しているアカウニ10個体のアリストテレス提灯の中間骨を蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、9個体は明瞭な蛍光マークが確認されたが、1個体は蛍光マークの確認ができなかった。今後も標識の持続性について観察を続けていく。

また、11年6月4日に姫島地先に放流した15,200個体の標識アカウニは13年から漁獲されると推定される。13年度以降、漁獲したアカウニを漁業者が板ウニに加工した後、残ったアリストテレス提灯を研究所が回収する事を漁業者と放流前に打ち合わせを行っており、これにより漁業者が行う素潜り放流による大型種苗放流の効果を把握したい。

2. 移動生態調査

これまでの調査から、アカウニの主たる漁獲漁場である浅所での漁獲率は70~80%で、漁期後のアカウニの生息数は漁期前の20~30%になるにもかかわらず、次年度の漁期には資源が回復していること、稚ウニの生息は浅所より深所に多く認められたことから、アカウニ資

表6 CWTによる累積斃死率及び累積標識脱落率

試験区	個数	累積斃死数(累積斃死率)		累積脱落数(累積脱落率)	
		9年1月16日	3月5日	1月16日	3月5日
標識区	60	7(11.7%)	7(11.7%)	15(28.3%)	21(39.6%)
対照区	30	5(16.7%)	5(16.7%)	—	—

試験期間 平成8年12月6日~9年3月5日

源は深所から浅所へ補給されると推測された。そこで、移植放流によりアカウニの移動生態を調査した。

方 法

調査場所は漁業者からの聞き取り調査の結果、アカウニの優良な漁場で、生息数も多いと判断された大島のヨ瀬を選定した。ヨ瀬は東側が隆起した岩盤域、西側が砂域であり、その間幅約20mに50~500kg程度の転石域が帯状に広がる。また、離岸距離110mで水深8mとなる緩やかな傾斜を持つ漁場である。アカウニのすみ場に対する選択性は転石域で高く、岩盤域では極めて低い⁹⁾。また、砂域には生息しないことから、転石域から岩盤域及び砂域への移動、あるいは岩盤域及び砂域から転石域への移入はほとんどないと考えられる。そこで、この幅約20mの転石域を調査範囲とした。

6年11月17日に調査範囲の水深2mから8m域にかけてチェーンを敷設し、水深別に調査定点を定めた。定線に沿って海底地形を調べるとともに、St.1(水深8m)、St.3(水深5m)及びSt.5(水深2m)において、動物生息量(2×2m, 3点)及び海藻着生量(0.5×0.5m, 3点)の坪刈り調査を行った。

次に、6年11月28~29日に調査範囲内をアカウニの低生息域とするため、発見したアカウニを採取・駆除した。さらに、駆除効果を確認するためSt.1, St.3, St.5において5×5m枠内の徹底採取を行った。採取したすべてのアカウニは水深8m域のSt.1に移植放流した。以後、6年12月、7年4月、6月及び8月に各調査点で5×5mの枠取り調査を行い、放流後の移動、拡散状況を調査した。

結果及び考察

ヨ瀬の水深別海藻着生量は表7に示したように、ホンダワラ類が優占する海域であり、水深2m域ではジョロモクが、5m及び8m域ではノコギリモクが多く、海藻着生量は水深2m域で5,107g/m²、5m域で2,304g/m²、8m域では3,813g/m²で2m域が最も多い。水深別動物生息量を表8に示したが、採取前のアカウニの生息数は水深2m域では0.8個/m²、5m域では1.7個/m²、8m域では3.4個/m²と水深が深いほど多い傾向にあった。アカウニ採取後の各調査点の生息数は、5m及び8m域が0個、2m域では0.4個/m²となった。

移植放流したアカウニ 2,006個の殻径は8.2~

80.1mmで、図11に示したような殻径組成であった。

移植放流後のアカウニの水深別生息密度を表9に示した。水深8m域では、放流約1ヶ月後である6年12月27日の生息密度は6.6個/m²であったが、7年8月22日には1.04個/m²と低下した。5m域では、6年12月27日に0.44個/m²であったが、7年8月22日には0.75個/m²と増加した。2m域も同様に6年12月27日の0個/m²から7年8月22日には0.96個/m²となり、アカウニが深所から浅所へ移動していることがうかがわれた。

表7 ヨ瀬の水深別海藻着生量(湿重量)

種類/定点	単位: g/m ²		
	St.5(2m)	St.3(5m)	St.1(8m)
ヤツマタモク	840	620	0
ジョロモク	3,813	0	0
ノコギリモク	13	1,433	3,813
カナギモク	73	0	0
ホンダワラ	300	0	0
マメダワラ	0	107	0
アカモク	0	4	0
イソモク	0	127	0
アラメ	20	13	0
マクサ	47	0	0
計	5,107	2,304	3,813

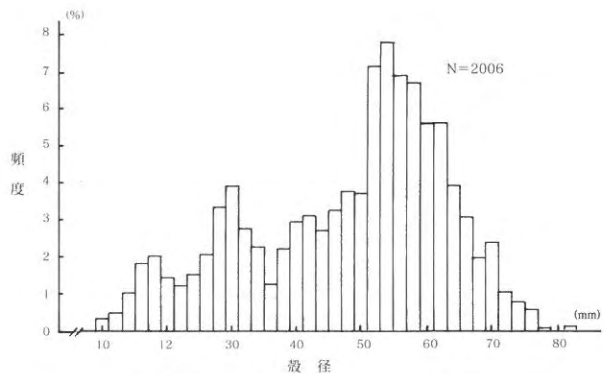


図11 放流したアカウニの殻径組成

表8 ヨ瀬の水深別動物生息量(アカウニ採取前)

種類	単位: 個/m ² , mm					
	St.5(2m)		St.3(5m)		St.1(8m)	
	個数	体長	個数	体長	個数	体長
アカウニ	0.8	36.3±15.7	1.7	40.6±16.4	3.4	48.3±12.5
ムラサキウニ	0.3	25.4±4.2	0.5	38.1±18.8	2.1	41.8±6.7
バフンウニ	15.3	23.3±6.1	3.2	30.2±6.0	0.4	33.2±3.7
アワビ	0	—	0	—	0	—
サザエ	0	—	0.4	56.2±15.0	0.4	49.0±21.9
トコブシ	0	—	0.1	60.2±0.0	0	—

表9 移植放流後のアカウニの水深別生息密度

調査日／水深(m)	単位：個/m ²				
	8	6.5	5	3.5	2
放流前	0	—	0	—	0
H6.12.27	6.60	0.48	0.44	0.24	0
7.4.17	3.80	0.12	0.60	0.16	0.56
7.6.28	1.72	—	0.60	—	0.48
7.8.22	1.04	0.38	0.75	0.44	0.96

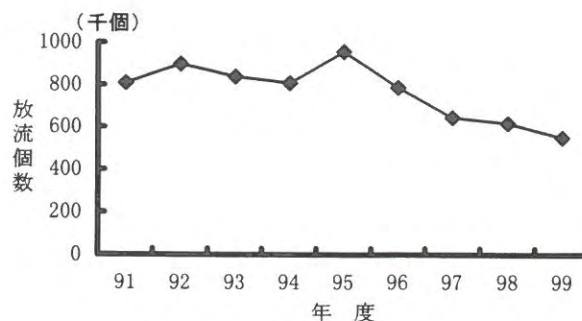


図12 福岡県内のアカウニ放流実績

3. 適正放流サイズの再検討

福岡県では、平成2年からアカウニの事業化が始まり、殻径10mmの放流用種苗100万個を安定的に生産している。しかし、地域漁協によって放流効果に対する認識に大きな差が生じている。その大きな原因の一つとして、漁業者による放流手法が考えられる。県では、アカウニの種苗放流は風の日に潜水で行い、転石の隙間に少量ずつ広範囲に丁寧に放流するよう指導している。

しかしながら、現地調査等によると漁業者のアカウニ放流実態は、船上から種苗をばらまいたり、素潜りであっても放流にかかった時間や人数から考えると丁寧とはいえず、漁業者に県の指導はあまり浸透していないと考えられる。また、このような放流をしている漁協では放流効果を疑問視する声が多く、放流規模を縮小したり、事業から撤退していく場合も少なくない。県内のアカウニ放流実績を図12に示したが、放流数は7年の958千個を境に減少傾向にあり、11年には551千個と7年の57.5%まで落ち込んでいる。

そこで、漁業者による放流方法の実態を把握した上で、漁業者の船上ばらまき放流や潜水による粗雑な放流を行った場合の着底時のアカウニ種苗の状態や、着底後安定状態を保つまでの時間、漁業者が行う素潜り放流のシュミレーションによる生残率の把握を、福岡県栽培漁業公社で生産された殻径10、15、20mmサイズの種苗を用いてそれぞれ行い、その結果から放流サイズの再検討を行った。

方 法

(1) 放流実態聞き取り調査

県内でアカウニの種苗放流を行っている主要11漁協に対し、11年に行った放流方法と放流効果に対する意識について聞き取り調査を行った。さらに、素潜りによる放流を行ったと回答した漁協からは、放流に要した時間、潜水作業に従事した人数について調査した。

(2) 水中落下試験

11年6月15日に宗像郡大島村地先にあるヨ瀬の水深5m域に漁船を停泊させ、サイズ別のアカウニ種苗10個体を船上から着水時の方向を変えて投入し、着底時のアカウニの向きを観察した。試験に使用したアカウニの平均殻径は、10mmサイズが 11.3 ± 0.9 mm、15mmサイズが 16.8 ± 1.6 mm、20mmサイズが 22.8 ± 2.0 mmであった。試験時の海況は風で、潮の流れによる影響がないように潮止まりの時間帯に行った。なお、着底時の観察はスキューバ潜水で行った。

(3) 種苗反転試験

裏返して着底した個体が、反転して安定状態を保つまでにかかる時間を把握するために、プラスチック製のバットに海水を張り、その中に口部を上にした裏返しの種苗10個体を入れ、反転するまでにかかった時間を計測した。試験時の水温は 22.5°C であった。試験に使用したアカウニ種苗の平均殻径は、10mmサイズ 11.4 ± 0.9 mm、15mmサイズ 15.3 ± 0.9 mm、20mmサイズ 20.5 ± 1.1 mmであった。試験は各サイズ3回行い、それぞれの試験ごとに種苗は取り替えた。

(4) 放流試験

11年6月15日に、宗像郡大島村ヨ瀬の水深3~4m域において、人頭大の石を敷き詰めた 5×5 mの人工礁を3基作成し、各サイズ500個体放流した。試験に使用したアカウニの平均殻径は10mmサイズ 11.3 ± 0.9 mm、15mmサイズ 16.8 ± 1.6 mm、20mmサイズ 22.8 ± 2.0 mmであった。放流時の海況は風で、潮止まりの時間に行った。放流方法は種苗をプラスチックの籠に移し、職員がスキューバ潜水で行ったが、漁業者による粗雑な素潜り放流に近づけるため、種苗を少量ずつ石の隙間に入れるのではなく、石の上約1mの場所から種苗をばらまく方法を

用いた。放流後の追跡調査は放流23日後の7月8日に行い、スキューバ潜水により人工礁を解体してすべての放流アカウニを回収した。

結 果

(1) 放流実態聞き取り調査

11漁協に対する聞き取り調査の結果、放流方法は船上からのばらまき放流が3漁協、水深1m程度の浅所に腰まで浸かって放流が1漁協、素潜りによる放流が6漁協、潜水器を用いての放流が1漁協であった。船上からのばらまき放流と浅所に腰まで浸かって行う放流をしたと回答した4漁協は、いずれも放流効果はあまりないと回答している。潜水器を用いて放流していると回答した漁協は、放流効果はあると回答している。

素潜りで放流を行ったと回答した6漁協について、さらに詳細な聞き取り調査をした結果を表10に示した。潜水に從事した人数はE漁協が15人であった他は1~6人という少人数で行われていた。放流作業にかかった時間は60~120分であり、大半が60分程度で放流作業を終了している。そこで、1人1時間あたりの種苗放流数をみると、800~25,000個/人・時であった。この数字と放流効果に対する意識を比較すると、1,000個以下の組合は放流効果があると回答し、それ以上になると放流効果はあまりないという回答をしている。

(2) 水中落下試験

船上ばらまき放流による着底時の種苗の状態を表11に示す。10mmサイズは、正逆どちら向きに着水しても、着底時にはすべて口部が上向きの裏返し状態となった。

表10 素潜り放流実施漁協の実態

漁協	潜水人数(人)	放流時間(分)	放流個数(個)	1人1時間あたりの放流個数(個)	放流効果に対する意識
A	1	60	25,000	25,000	あまりない
B	5~6	60	50,000	8,300	〃
C	3	90	20,000	4,400	〃
D	5~6	60	15,000	2,500	〃
E	15	120	30,000	1,000	ある
F	5~6	60	5,000	800	〃

表11 船上ばらまき放流による着底時の種苗の状態

サイズ	着水時 着底時	裏返し		正 常	
		裏返し	正 常	裏返し	正 常
10mm		10	0	10	0
15mm		10	0	0	10
20mm		10	0	0	10

15、20mmサイズは着水時の向きでそのまま落下し着底した。

潮流による影響を再現するため、足ひれを用いて落下途中の種苗をおおいでみたところ、船上から落下した場合と同様に、10mmサイズはすべて裏返し、15、20mmサイズは扇いだ後の安定した状態でそのまま着底した。

(3) 種苗反転試験

試験中バットの角を利用して起きあがった個体があったためそれを除外した結果、各サイズの有効個体数は29個となった。これらの反転にかかった時間を1分ごとにとりまとめ、その結果を図13に示した。

1分以内に反転を完了し、安定した体勢をとった個体は、20mmサイズが82.8%、15mmサイズが62.1%、10mmサイズが34.5%と大型個体ほどその割合が高かった。また、10mmサイズでは、3分を超えても反転できない個体が10.3%みられた。

(4) 放流試験

追跡調査の結果を表12に示す。各サイズ放流個体数500個に対し生残個数と生残率は、20mmサイズが484個、96.8%、15mmサイズが422個、84.4%、10mmサイズが207個、41.4%で、20mmサイズでは放流直後の減耗がほとんどみられなかったのに対し、10mmサイズでは1/2以下の生残率であった。

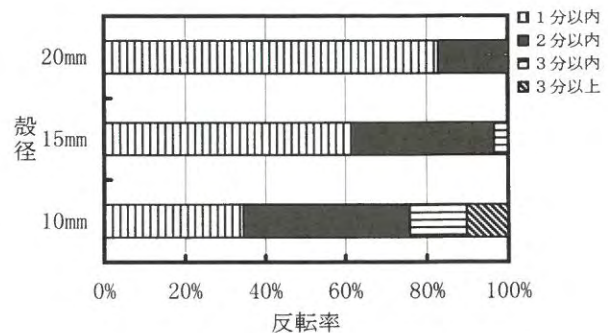


図13 裏返したアカウニの殻径別時間別反転率

表12 放流試験における放流1ヶ月後の生残率

サイズ	放流個数	回収個数	生残率
10mmサイズ	500	207	41.4%
15mmサイズ	500	422	84.4%
20mmサイズ	500	484	96.8%

考 察

県では平成2年の事業開始当初「アカウニ資源培養の手引き」というパンフレットを作成し、研究所職員が関係漁業者に対し放流指導を行った。はじめのうちは、指導した放流方法に沿って丁寧な放流を心がけてきた漁業者も、船上からのばらまき放流を行うなど次第に手を抜きはじめたため、7年には「アカウニ放流マニュアル」を作成し漁業者へ再度放流方法の周知徹底を図ってきた。

聞き取り調査の結果から、現在県内で行われている種苗放流の方法は4種類あるが、そのうち船上からのばらまき放流は、水中落下試験の結果から殻径10mmサイズの種苗では着底時にすべて口部が上向きの逆さま状態となるためウニやヒトデ、魚類等の外敵に襲われやすい。さらに、潮流や波浪によって種苗が流され、放流適地に着底させることが困難である。また、水深1m程度の場所に腰まで浸かって放流する方法は、この水深帯が放流直後の6～7月に行われるバフンウニ漁の主漁場と重なる場合が多く、バフンウニ漁場と重なる場所では放流直後の減耗は少なくとも、ウニ漁によって返される石につぶされるため放流効果は低いものとなる。これらのことから、この2種類はアカウニの放流方法としては適さないものといえる。

また、県の指導にそって素潜りによる放流を行っている組合でも、1人1時間あたりの放流個数に大きな差があることが分かった。研究所職員が種苗放流試験等でアカウニを放流する場合、スキューバダイビングを用いても、1時間あたり2,000～3,000個程度しか放流できない。素潜りであれば息継ぎの時間もあることから、石の隙間に少量ずつ丁寧に放流すると、半分の1,000～1,500個程度しか放流できないであろうと考えられる。このことから、素潜りで放流したという組合の中でも、

丁寧に放流していると思われる漁協はE、Fの2漁協しかなく、それ以外の漁協は、短時間に大量の種苗を放流していることから、石の上にばらまき等粗雑な放流を行っているかと判断される。

二島ら¹⁰⁾はアカウニ栽培漁業を事業化するにあたり、10mmサイズのアカウニの生残率を調査した結果、研究所職員がスキューバ潜水で丁寧に放流した場合、放流サイズ(0才)から漁獲サイズである殻径50mm(2才)までの生残率は漁場の底質や環境で大きく差があるものの、大島地先の山振で49.4%と推定されると報告している。今回漁業者とはほぼ同様な放流方法で行った10mmサイズの放流試験では、潜水による放流を行ったにもかかわらず放流後わずか23日目で41.4%まで生残率は低下している。この結果から考えると、漁業者の間からアカウニ種苗放流の効果を疑問視する声が出てきているのは、殻径10mmの放流サイズに必要な潜水による丁寧な放流が、漁業者にはなかなか受け入れられないことが原因と考えられる。これらのことから、これまで指導してきたような高度な放流手法を漁業者に要求することに無理があったのではと判断せざるを得ない。

今後も、県としては潜水による丁寧な放流を指導していくが、これまでの漁業者の放流実態を考えた場合、潜水による粗雑な放流であっても放流効果が望める、種苗の大型化も検討しなければならない。

そこで、漁業者が行う素潜りによる放流で、15mmサイズと20mmサイズのどちらがより放流効果の向上がみられるか検討してみた。

投資効率の比較を表13に示した。投資効率の算出は、まず二島ら¹⁰⁾が行ったアカウニの年齢別生残率の0才の生残率を今回行った放流試験の生残率に置き換え、そこから推定される3才までの生残率と、太刀山ら¹¹⁾が宗像郡地島地先の種苗放流漁場において、漁期前と漁期後の資源量の差から推定した漁獲率83.0%を用いて、種苗

表13 種苗サイズ別推定投資効率

	放流サイズ	放流個数	年齢別生残率	漁獲率	回収個数
回収個数	15mmサイズ	10,000個	$(0.844 \times 0.879 \times 0.896 \times 0.810)$	$\times 0.83$	$= 4,465$ 個
	20mmサイズ	10,000個	$(0.968 \times 0.879 \times 0.896 \times 0.810)$	$\times 0.83$	$= 5,129$ 個
投資効率	15mmサイズ	回収個数 4,465個	必要個数/箱 7	単価/箱 $\times 1,300$ 円	種苗購入費 $\div 150,000$ 円
	20mmサイズ	5,129個	7	$\times 1,300$ 円	$\div 200,000$ 円
					投資効率 $= 5.52$ $= 4.76$

10,000個放流した場合のサイズ別の推定回収個数を算出した。次に板ウニ1枚あたりに必要なアカウニ個体数を7個、板ウニ1枚あたりの販売単価を1,300円/枚、種苗の購入単価を1円/mmの基準を用い、15mmサイズ15円/個、20mmサイズ20円/個と仮定し投資効果を算出した。その結果、投資効率は15mmサイズが5.52、20mmサイズが4.76となり、15mmサイズの方が0.76上回った。しかし、15mmサイズ10,000個の購入費用150,000円で20mmサイズは7,500個購入できるが、この数値を基に投資効率算出と同じ計算をした場合、水揚げ金額は、15mmサイズが829,214円、20mmサイズが713,886円で、その差は115,328円である。また、今回の投資効率の算出については、放流1年後の生残率をわずかに約1ヶ月後の生残率に置き換えて算出したものであり、その後のへい死を考えるとこの数字の差は小さくなる。

さらに、反転試験の結果から潮の流れによる影響のない止水状態であっても1分以内に裏返し状態から反転し、安定した状態を保つ割合が15mmサイズは20mmサイズに比べ20ポイントも劣り、潮の流れによる影響が加わればその差はさらに広がると推察される。しかしながら、放流試験の結果を見ると15mmサイズと20mmサイズでは、初期減耗に反転試験結果ほどの大きな差は見られなかった。これは、今回の放流試験を行った日が凪であったこと、潮止まりの時間に放流を行ったことが原因と思われ、実際の漁業者は放流時の海況にあまりこだわらないため、サイズによる反転能力以上の差が加味されると考えられることから、15mmサイズと20mmサイズの生残率の差はさらに広がるものと推察される。

以上のことから、サイズによる反転能力の差や漁業者が放流を行う時の海況を総合して判断した場合、今後放流効果を向上させるためには、15mmサイズよりも20mmサイズの種苗を放流することが望ましいと考えられる。

II 放流環境要因調査（エゾアワビ）

1. 漁場におけるアワビの異常へい死（ヤセ貝）状況の把握

昭和60年6月に宗像郡地島でアワビの異常へい死が初めて報告され、以降、平成2、3、4年の6月に地島で、4年8月に岩屋で、6年6月には筑前海一帯でへい死の報告があった。また、極めて肥満度の低い「ヤセ貝」も認められている。そのため、漁場における「ヤセ貝」の発現状況を調査した。

方 法

(1) 飢餓試験

無給餌状態でのアワビの肥満度の変化をみるために、0.2 t のFRP製角型水槽にアワビ2個体を収容し、無給餌で流水飼育した。さらに、FRP製の蓋で覆い付着珪藻の増殖を防いだ。また、アラメを餌料として与える対照区を設け2個体を収容した。両区とも供試アワビには割ピンにより個体識別が可能な標識を施し、それぞれ2水槽、計4水槽設定した。試験期間は、8年5月7日～9年1月8日で、試験終了時に、殻長、体重、軟体部重量を測定し、肥満度を導いた。

(2) 漁場における「ヤセ貝」発現状況

8～11年度に宗像郡大島村で海士漁期（7～9月）及び磯見漁期（12～3月）に2～3回、漁獲された全てのアワビのうち外観上で極めて肥満度の低い「ヤセ貝」を抜き取り、発現状況を調べた。また、ヤセ貝が認められた9年1月13日調査分では、「ヤセ貝」及び「正常貝」の殻長、体重、軟体部重量を測定し、肥満度を比較した。

結果及び考察

(1) 飢餓試験

試験期間中のアワビのへい死は、無給餌区で8年7月15日に1個体、9月26日に1個体の2個体で、試験に用いた4個体のうち残り2個体は、約8ヶ月の試験期間、無給餌状態でもへい死せず生存した。また、給餌した対照区のへい死個体は1個体であった。

9年1月8日試験終了時に測定した肥満度を表14に示した。肥満度（軟体部重量/体重）の平均は、無給餌区は 0.53 ± 0.02 に対し、給餌区は 0.64 ± 0.04 であり、両者に有意な差（ $\alpha = 0.01$ ）が認められた。

表14 アワビの肥満度

試験区	肥満度（軟体部重量/体重）
飢餓試験	
無給餌区	0.53 ± 0.02
給餌区	0.64 ± 0.04
漁場	
痩せた貝	0.62 ± 0.03
正常貝	0.71 ± 0.02

(2) 漁場における「ヤセ貝」発現状況

「ヤセ貝」の出現割合を表15に示した。海士（夏季）漁では、8年度1,042個体、9年度1,452個体、10年度は2,028個体、11年度は1,949個体のアワビを調べたが、そのうち、外観で肥満度が低い個体は認められなかった。磯見（冬季）漁では、8年度は700個体のうち8個体、9年度は740個体のうち3個体の「ヤセ貝」が認められたが、兩年ともその割合はそれぞれ1.1%、0.4%と低かった。また、10年度は1,682個体、11年度は994個体を調べたが、外観で肥満度が低い個体は認められなかった

8年度磯見漁において肥満度が低かった8個体のうち6個体と正常貝10個体について肥満度を測定し、その結果を表14に飢餓試験結果とあわせて示した。肥満度の平均値は、痩せた貝が 0.62 ± 0.03 で、正常貝の 0.71 ± 0.02 に比べ低い値であった。さらに、痩せたアワビの組織切片を作成しHE染色により種苗生産で発生する筋萎縮症の症状の有無を調べたが、病変は確認できなかった。

2. 産卵実験による南方域におけるエゾアワビの再生産の確認

太刀山ら¹¹⁾は、室内試験においてクロアワビとエゾアワビの正逆交雑1代目の発生を確認している。また、門間¹²⁾はクロアワビ♀×エゾアワビ♂の交雑1代目と、それらを親貝に用いた交雑2代目の発生を確認しているが、その他の組み合わせについては検討されていない。

そこで、在来種であるクロアワビと北方種のエゾアワビ交雑2代目の各種組み合わせによる再生産の可能性について検討した。

方 法

(1) 自然産卵時期の確認

エゾアワビ及びクロアワビの自然産卵状況を把握するために、両者の成貝をそれぞれ別の水槽で飼育した。飼

育水には濾過海水を用い、排水を60μmのミューラガーゼを張った網で受け、毎日、網内の卵の有無を確認した。試験期間は7年8月24日～12月28日で、餌料としてアラメを用いた。

供試貝は試験直前に宗像郡大島村で採取したもので、クロアワビが殻長 120.7 ± 11.5 mm、体重 225.8 ± 61.2 gのもの9個体、エゾアワビは殻長 111.7 ± 12.2 mm、体重 183.5 ± 61.9 gのもの10個体である。

(2) クロアワビ×エゾアワビ交雑1代目・2代目の再生産

① 孵化幼生確認試験

親貝は糸島郡芥屋地先産クロアワビ、青森県産エゾアワビ及び平成5年度に筑前海研究所で生産したエゾアワビ♀×クロアワビ♂、クロアワビ♀×エゾアワビ♂それぞれの交雑1代目を用いた。飼育は砂濾過海水による流水で行い、アラメ等の生海藻や乾燥コンブを残餌を確認しながら給餌した。採卵は8年10月30日（水温 20.4°C ）に行った。それぞれの親貝を雌雄別に5～10個体30lパンライトに収容し紫外線照射海水と暗黒処理による誘発刺激を加えた。

試験区は表16に示した16区をそれぞれ各2セット設定した。受精は1lピーカー内で行い、800ccの紫外線照射海水を入れ、未受精卵を10粒/cc（8000粒/区）の密度で収容し、媒精した。受精後は同ピーカーを用い止水にして弱い通気を行い、温度調節可能なクローズキャビネットにて 20°C 恒温状態とし12時間照明、12時間暗黒状態で飼育した。

受精6時間後に各試験区100個体以上について光顕観察を2回行い、卵割の確認をもって受精とした。孵化率は1cc中に存在するベリジャー幼生の正常個体数を各試験区12回計数し、最大値、最小値を削除した10回分の平均値によるものとした。

② 着底確認試験

親貝は孵化幼生確認試験と同じものを用い、採卵は8年11月12日（水温 19.3°C ）に行った。誘発刺激は紫

表15 「ヤセ貝」の出現状況

漁業種類	海 士				磯 見			
	8	9	10	11	8	9	10	11
調査年度	8	9	10	11	8	9	10	11
サンプル数(個)	1,042	1,452	2,028	1,949	700	740	1,682	994
ヤセ貝の数(個)	0	0	0	0	8	3	0	0
出現割合 (%)	0	0	0	0	1.1	0.4	0	0

外線照射海水、暗黒処理、干出2時間及び3.7℃の加温を行った。

試験区は表16に示した8区を設定し、受精は301パネルライト水槽内で行った。受精後は、2001角形水槽に1.0粒/cc (200千粒/区)の密度で収容し、砂濾過海水を微流水にして弱い通気を行って飼育した。採苗時には予め珪藻をつけた波板を30枚収容した。着底は、波板上に付着した稚貝の有無によって確認した。

結果及び考察

(1) 自然産卵時期の確認

飼育水温は図14に示したように28~10℃であった。産卵が確認できたのは、エゾアワビでは7年10月16日(水温21.7℃)及び10月20日(21.2℃)の2回であったが、10月16日に得られた卵では精子の付着、受精及びその後の発生が認められなかったことから、放精はなかったと考えられる。一方、10月20日の卵は受精しており、その後付着稚貝まで確認した。他方、クロアワビの放卵はみられなかった。本県でクロアワビの卵が得られなかった原因として、用いた飼育水が濾過海水であったことが推測される。

(2) クロアワビ×エゾアワビ交雑1代目・2代目の再生産

母貝の殻長及び放卵数を表17に示した。交雑1代目のエゾアワビ♀×クロアワビ♂(平均殻長87.5mm)8個体は10,575千粒、クロアワビ♀×エゾアワビ♂(平均殻

長69.7mm)6個体は6,945千粒を放卵した。また交雑1代目の雄についても十分な放精が見られた。

各試験区における受精率を表18に、孵化率を表19に示した。エゾアワビ♀×クロアワビ♂、クロアワビ♀×エゾアワビ♂の交雑1代目雌が関与する試験区では受精率の平均が65.0、69.7%、孵化率が19.0、32.6%、純系クロアワビ、純系エゾアワビの雌が関与する試験区では受精率が80.0、66.5%、孵化率が47.2、27.2%であった。またエゾアワビ♀×クロアワビ♂、クロアワビ♀×エゾアワビ♂の交雑1代目雄が関与する試験区においては受精率が86.0、81.3%、孵化率が40.6、38.7%、純系クロアワビ、純系エゾアワビの雄が関与する試験区では受精率が89.7、29.7%、孵化率が21.3、25.5%であった。なお、全ての試験区でベリジャー幼生までの発生が確認された。

着底確認試験では、全試験区で付着稚貝が確認された。孵化幼生確認試験において全ての区で受精、孵化、及

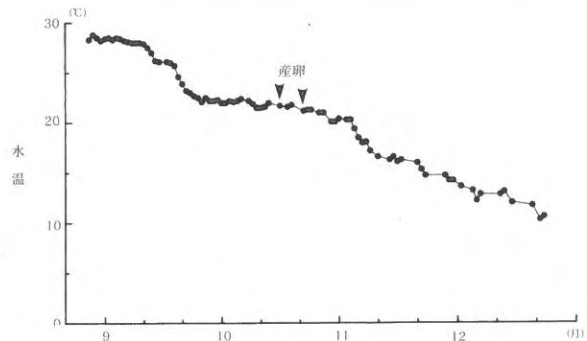


図14 飼育水温の推移

表16 孵化幼生及び着底確認試験区の概要

雄 \ 雌	純系クロアワビ	純系エゾアワビ	F1(エゾ♀×クロ♂)	F1(クロ♀×エゾ♂)
純系クロアワビ	◎○×	◎○×	○	○
純系エゾアワビ	◎○×	◎○×	○	○
F1(エゾ♀×クロ♂)	○	○	○×	○×
F1(クロ♀×エゾ♂)	○	○	○×	○×

○は孵化幼生確認試験を行った試験区、×は着底確認試験を行った試験区を示す。
◎は既に幼生までの発生が確認された報告があるもの。

表17 母貝の放卵状況

母貝	放卵母貝数(個)	放卵数(千粒)	殻長	履歴
純系クロアワビ	16	12,800	—	糸島郡芥屋地先採取
純系エゾアワビ	5	1,695	85.6~89.1	青森県地先採取
F1(エゾ♀×クロ♂)	8	10,575	72.2~97.6	5年度生産貝
F1(クロ♀×エゾ♂)	6	6,945	62.8~74.5	5年度生産貝

表18 各試験区における受精率

単位：%

雄	雌	純系クロ	純系エゾ	F1 (エゾ♀×クロ♂)	F1 (クロ♀×エゾ♂)
	純系クロ	84.5	87.7	93.8	92.8
純系エゾ	59.1	26.4	15.9	11.3	
F1 (エゾ♀×クロ♂)	88.3	76.9	88.4	89.3	
F1 (クロ♀×エゾ♂)	90.7	77.5	69.3	80.8	

表19 各試験区における孵化率

単位：%

雄	雌	純系クロ	純系エゾ	F1 (エゾ♀×クロ♂)	F1 (クロ♀×エゾ♂)
	純系クロ	24.2	25.0	13.4	22.5
純系エゾ	57.9	18.8	14.6	10.8	
F1 (エゾ♀×クロ♂)	64.2	35.0	29.6	33.4	
F1 (クロ♀×エゾ♂)	42.5	30.0	18.3	63.8	

びペリジャー幼生までの発生が確認された。ただ、受精率、孵化率が全体的に低い値を示していた。これは、ピーカー内で受精したため、洗卵が不十分であったことに加え、飼育環境が良好でなかったことによると考えられる。また、純系エゾアワビの精子を用いた試験区は他の精子を用いた試験区に比べ受精率、孵化率ともに低い傾向を示した。しかし、エゾアワビの雌と受精させたエゾアワビ純系区の場合も同様に低い値であったことから、媒精時に用いた純系エゾアワビの精子が良好な状態でなかったと推定される。

今回の実験でクロアワビとエゾアワビの交雑2代目は、受精、孵化、及び着底まで人為的には可能であることが確認された。しかしながら、天然域においてアワビの交雑種が発生するためには、両者が同じ場所に存在し、成熟期及び放卵・放精時期が重複すること等が必要条件となる。したがって、人為的に交雑した今回の実験から天然域での交雑種発生の有無を判断することはできない。

しかし、筑前海における放流エゾアワビの成長は、在来種であるクロアワビと差がないこと⁷⁾、今回の実験で少なくとも交雑1代目のエゾアワビ♀×クロアワビ♂は殻長97.6mm、エゾアワビ♀×クロアワビ♂は殻長74.5mmで放卵することから、4年秋にはクロアワビとエゾアワビの交雑1代目が、8年秋には交雑2代目が発生している可能性も否定できない。

3. 分子生物学的手法による南方域におけるエゾアワビの再生産の確認

(1) AFLP法によるアワビ集団の遺伝変異保有量の解析

近年、DNA解析は様々な研究分野で多様な生物種において利用されている。水産生物においてもDNA多型の検出による集団遺伝学的な解析や種の判別などが多くの魚種で進められている¹³⁾。DNA多型の検出法には多くの手法があり、塩基配列の情報が得られ、プライマーの設計開発が進んだ魚種ではDNAマイクロサテライト法と呼ばれる、感度が高く再現性の優れた手法が使われている。一方DNA塩基配列に関する情報が無いが、あっても少ない魚種の多型検出にはRFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)法、RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)法、AFLP(Amplified Flagment Length Polymorphism)法などがある。RFLP法は多くの実績があり技術的に確立されているが、多量のDNAを必要とし操作が煩雑であるため多サンプルの解析に適していない。RAPD法は簡便で、必要とするDNA量も微量で構わないが再現性が低いという欠点を抱えている。一方、AFLP法は必要とするDNAは微量であり、再現性も高く、1回の解析で検出されるマーカーの数も多いことから有望視される技術であるが、現状ではRIもしくはnonRIの場合にはシーケンサーを必要とする。

福岡県におけるアワビの栽培漁業は、種苗放流による生産性の増大が図られ成果を上げていたが、筋萎縮症の発生によるクロアワビ種苗生産の難しさから、一時期エ

ゾアワビの種苗生産、放流が積極的に行なわれた。また、現在でも、一部ではあるがエゾアワビの放流は続けられている。このことが生態系に与えた影響や、今後の種苗放流が遺伝的多様性に与える影響を検討し、種苗放流効果と再生産の推定を行なうことなどがアワビ栽培漁業の重要な課題である。これらの課題を解決するため、天然アワビDNAをAFLP法を用いて解析し、天然アワビ集団の遺伝変異保有量について推定した。また得られた多くのAFLPマーカーの中から、クロアワビとエゾアワビを識別できるマーカーが存在しないか検討した。

材料及び方法

サンプル クロアワビのサンプルとして8年に福岡県大島地先で採集された個体と11年に静岡県で採集された個体を用いた。また、エゾアワビのサンプルとして8年宮城県で採集された個体を用いた。供試個体数は各サンプル10個体であった。各サンプルは採集後、DNA抽出処理まで-20℃で冷凍保存した。

DNA抽出 DNAは各個体の筋肉部からSDS-フェノール法を用いて抽出した。抽出後AFLP処理を行なうまで-20℃で保存した。

AFLP法 AFLP処理はパーキンエルマーバイオシステムズ社のAFLP Plant Mapping Kit Regular Plant Genomes用を用いた。プロトコールは添付マニュアルに従い、以下のように行なった。

- 1) サンプルDNA0.05 μgを制限酵素EcoRIとMseI並びにT4DNAリガーゼで25℃ 1晩処理し、DNAの切断とアダプターのライゲーションを行なう。
- 2) アダプターに相補的なプライマーを用いてPre Selective PCRを行なう。
- 3) 電気泳動を行なって増幅断片が得られていることを確

認する。

4) EcoRI側にAGG、MseI側にCTTの塩基配列を加えたプライマーペアを用いてSelective PCRを行なう。

5) パーキンエルマーバイオシステムズ社のGenetic Analyzer 310によって増幅断片を検出する。

データの解析 各サンプルの遺伝的類似度を示す指標として2個体間で検出された総断片数に占める共有断片数の割合 (Band Sharing Indices : BSI) を用い、集団内と集団間の平均を求めて集団の遺伝的な類似度を求めた。

なお、 $BSI = 2N_{ab} / (N_a + N_b)$ によって計算した。なお N_{ab} は個体 a 及び b に共有する断片数、 N_a 、 N_b は a、b 各個体に認められた断片数を示すものとする。

結果及び考察

増幅断片は図15に示すように50bpから500bpの間に検出された。また、図16に示したように同一の個体から単離したDNAではAFLPパターンは完全に一致することを確認し、SDS-フェノール法で単離したDNAがAFLP解析に使用できること、植物用のAFLPキットでもアワビDNAを処理できることが判明した。

しかし、300bp以上の増幅断片では検出されるピークの幅が広くなり、データの信頼性が低下する傾向が認められたため、解析からは除外した。また、図中の縦軸に相当する検出断片のピークが200未満のものについても除外し、強い蛍光ピークが得られた増幅断片のみを解析することとした。

増幅断片サイズ50~300bpで、ピークが200を超える条件を満たした断片数は、福岡県のクロアワビが42~55本 (総断片数103本)、静岡県のクロアワビが39~51本 (総断片数89本)、宮城県のエゾアワビが38~55

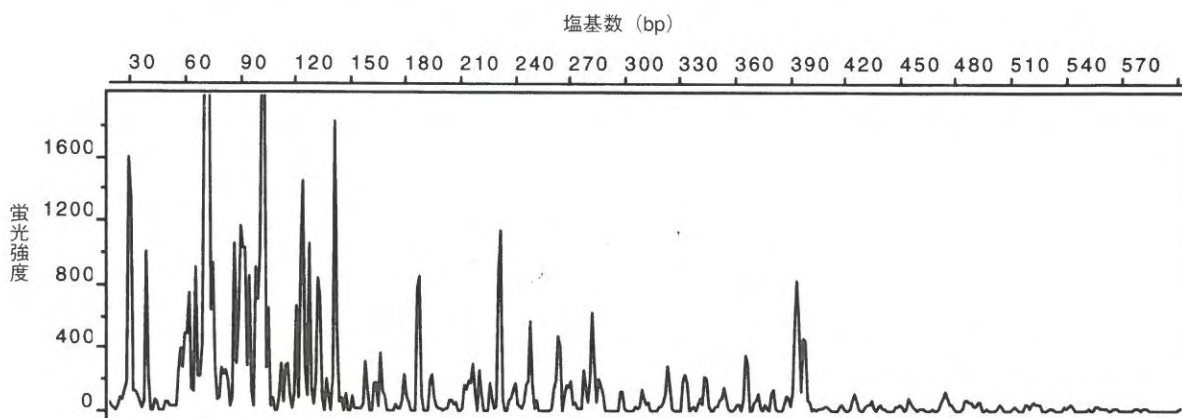


図15 アワビDNAのAFLP解析パターン

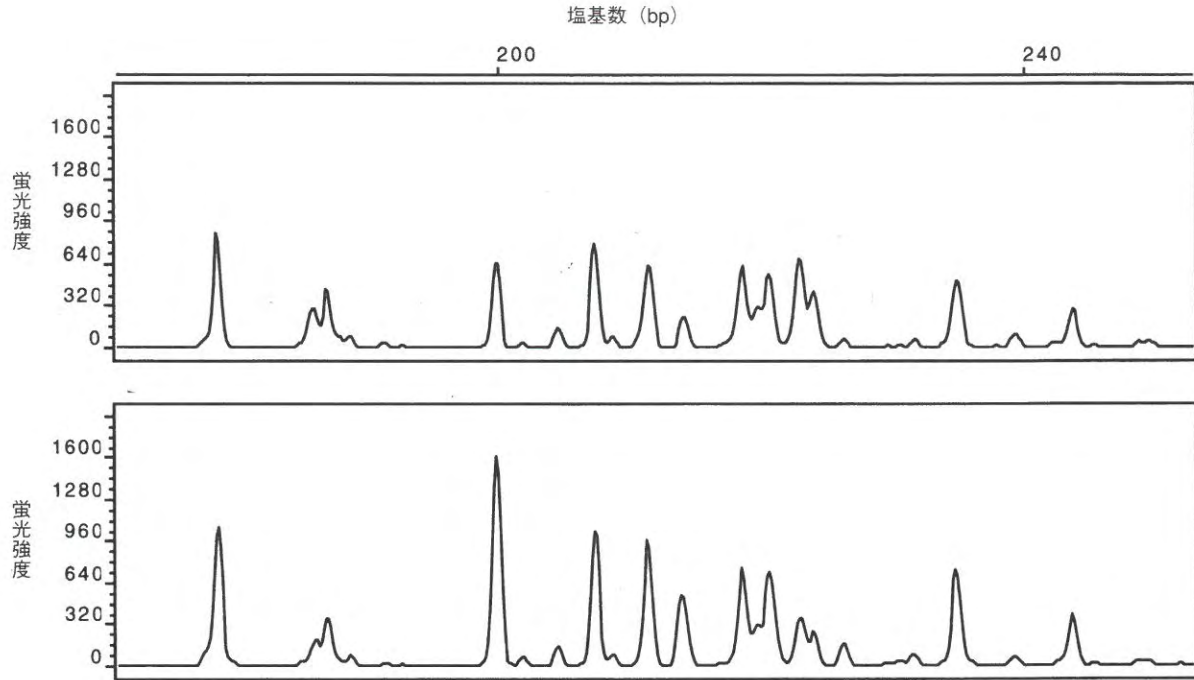


図16 同一の個体から採集したDNAのAFLPパターン

本（総断片数85本）認められ、総断片数は142本であった。各サンプルの遺伝的多様度の指標と考えられる各県ごとのすべてのサンプルで認められた断片数、すなわち単型を示した断片数は福岡県が16.5%にあたる17本、静岡県が24.7%にあたる22本、宮城県が18.8%にあたる16本であった。すべての30サンプルで認められた共通の断片は、塩基数61bp, 64bp, 98bp, 100bp, 122bp, 136bp, 200bp, 212bp及び279bpの9本であった。

各個体間のBSIから求めた各集団内と集団間のBSIの平均を表20に示した。集団内は静岡県0.749、宮城県0.722、福岡県0.713となり、静岡県がもっとも遺伝的類似度が高く、福岡県がもっとも低い結果となった。

集団間のBSIの平均は、福岡県と静岡県間が最も高く、0.709となり、福岡県と宮城県間が0.657と最も低くなった。各集団間のBSIは有意な差が認められた(t検定 $P < 0.05$)。これは地理的隔離距離が長いほど遺伝的類似度が低下することを示していると同時に、クロアワビとエゾアワビの遺伝的分化程度を示している可能性も推察された。これについては、数多くのサンプルを解析することによって明らかになるものと考えられ、現在各地のサンプルを採集、解析中である。また、クロアワビ、エゾアワビの他にメガイアワビ、マダカアワビ等も同様に解析し比較することも必要であると考えられるので、今後検討したい。

表20 各県アワビの集団内と集団間のBSIの平均

	福岡県	静岡県	宮城県
福岡県	0.7134 ± 0.050	0.7090 ± 0.045	0.6571 ± 0.051
静岡県		0.7494 ± 0.040	0.6720 ± 0.049
宮城県			0.7223 ± 0.055

今回使用したEcoRI-AGG, MseI-CTTのプライマーペアではクロアワビとエゾアワビを明確に識別するマーカーは見つからなかった。しかし、例えば112bpの増幅断片はすべての宮城県のエゾアワビで認められるが、クロアワビでは福岡県の1個体にしか認められなかった。また133bpの断片は多くのクロアワビで認められたが、エゾアワビでは1個体にのみ認められた特徴のある断片であった。キットにはプライマーペアの組み合わせは計64通りあり、残り63通りのプライマーペアの組み合わせの中に有効な識別マーカーが存在する可能性は高いものと考えられた。

今年度の研究の結果、蛍光標識によるAFLP法で、アワビ集団の遺伝変異保有量の推定が可能であった。これまで貝類に対してAFLP法を利用した解析例はなく、今後有望視される。AFLP法は再現性が高いため、RAPD法のように比較するサンプルを同時に処理する必要はなく、同じプライマーペアを使用した場合には、異なる解

析処理ごとのデータを比較することが可能である。つまり、今後他地区のアワビを解析した場合にも、今回のデータはそのまま利用できるということである。これはこれまでの多型解析手法ではできなかったことであり、AFLP法の最大のメリットであると言える。また、同じサンプルでもプライマーペアの組み合わせを変えることによって、データの信頼性は高まることが期待される。

(2) 遺伝子マーカーによるクロアワビ類の集団構造の分子生態学的研究 (委託研究分)

1) RFLP法によるエゾアワビ、クロアワビ判別手法開発の試み (平成8年度実施)

クロアワビ (*Haliotis discus*) は、暖水域に生息するクロアワビ (*Haliotis discus discus*) と冷水域に生息するエゾアワビ (*Haliotis discus hannai*) に分けられる。両者を別種とする説もあるが、多くの研究者は両者を同一種の亜種に相当すると考えている。

近年、クロアワビの生息域にエゾアワビ種苗の放流が行われるようになってきており、クロアワビ天然集団の遺伝的な攪乱をもたらす悪影響が懸念されている。こうした影響の有無や程度を評価するためには、1) 放流された種苗のうち、どの程度のものが、成熟し再生産をおこなっているのか、2) どのくらいの頻度で雑種が形成されているのか、3) 雑種の遺伝形質は、2代目以降に受け継がれるのか、などの点を定量的に明らかにする必要がある。しかし幼若期に両者を形態から弁別するのは、非常に困難であるので、形態以外の情報に基づく識別手法の開発が急務である。

最近の、PCR法やダイレクトシーケンス法の普及により、集団解析に十分な個体数のサンプルについて、遺伝子上の変異を直接定量化することが、比較的短時間・低コストで行えるようになってきた。遺伝子の情報は、組織や細胞の種類、個体の発生段階によらず一定である。またタンパク質を支配する遺伝子のうち、アミノ酸配列を変えないような変異は、自然選択を受けないので、これまでに行われてきたアイソザイム分析に比べ、より環境の影響を受けず、異なる環境下にある地方集団間を、同じ尺度で比較することができる。また、極少量のサンプルで解析が行えるので、浮遊幼生期や定着直後の個体についても、個体毎に分析することが可能である。遺伝情報は親から子へ代々受け継がれていくので、雑種第2代目以降の追跡も可能となる。このような意図のもと、様々な遺伝子マーカーを用いた判別法が研究されている^{14), 15)}。

著者らは最近、日本各地で採集されたサザエについて、ミトコンドリアDNA・チトクロームオキシダーゼI (COI) 領域の最も個体変異の大きな下流域の塩基配列を解析した結果、サザエ個体は、遺伝的に大きく異なる2つのグループに分かれることを発見し、それぞれの主な生息地にちなみ、黒潮型・対馬暖流型と名づけた。わが国におけるサザエの全分布域をカバーする12カ所の集団について、2つのグループの出現頻度を比較したところ、1) 黒潮流域の集団と対馬暖流流域の集団の間には有意な遺伝的差異が存在する。2) 瀬戸内海と日本海の間で、若干の遺伝的交流が見られることが明らかになった¹⁶⁾。図17に日本周辺における両グループの頻度分布を示す。サザエは暖流の流域にしか生息できず、幼生の分散能力は比較的低い。また黒潮と対馬暖流は九州沖で分岐した後、再び合流することがないので、ふたつのグループは各々の暖流流域に隔離され、分化したもので、最近(約5000年前)の関門海峡の形成後、日本海集団と瀬戸内海集団の間で個体の移動が起こり、現在の分布パターンが形作られたと考えている。

筆者らは、同様の手法がクロアワビ個体群の遺伝的構造の解析にも有効ではないかと考え、クロアワビについて同じ領域を解析したところ、サザエの場合と似た集団内個体変異を発見した。この変異について、クロアワビ及びエゾアワビの天然集団と種苗について、集団の特性を解析・比較した。

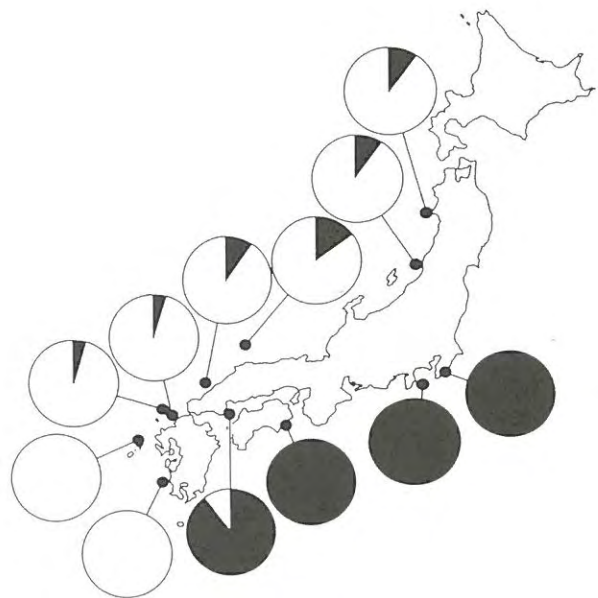


図17 日本周辺におけるサザエ集団の遺伝的構造。各集団20個体について、黒潮流域型ミトコンドリアDNAを持つ個体(黒)と対馬暖流流域型ミトコンドリアDNAを持つ個体(白)の割合を示す。

方 法

① ミトコンドリアDNAの抽出

以下の操作により、分析するアワビ各個体からミトコンドリアDNAを抽出する。試料が少量の時は、全ての操作をエッペンドルフチューブ (1.5ml) の中でおこなう。また他の個体のDNAによる汚染を防ぐため、乾熱滅菌 (180℃, 2時間) した金属製器具か、使い捨てプラスチック製品のみを用いる。

- a. アワビの中腸腺を緩衝液中ですりつぶす。
- b. 4℃, 毎分2300回転で遠心分離する。
- c. 沈澱物 (細胞片や核) を取り除く。
- d. 4℃, 毎分12000回転で遠心分離する。
- e. 沈澱 (ミトコンドリア) を緩衝液で2回洗浄する。
- f. SDSで、ミトコンドリア膜を破壊する。
- g. 塩化ナトリウムを添加し、SDSを沈澱させ取り除く。
- h. フェノール/クロロフォルムによりタンパク質を除去。
- i. ジメチルエーテルによりフェニールを除去。
- j. エチルアルコールを加え、DNAを沈澱させる。
- k. 4℃, 毎分12000回転で遠心分離し、DNAを回収する。
- l. 70%エチルアルコールで洗浄し、塩類を取り除く。
- m. 乾燥し、滅菌蒸留水に溶解する。
- n. 冷凍保存する。

② PCR反応

PCR法は、DNAの特定部分を特異的に増幅する方法である。

PCR法を阻害する物質を除去するため、反応に先立ち、GeneReleaser (BioVenture社) による処理をおこなう

PCRの反応条件は以下の通りである。

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

PCRプライマーとして、

COI-3 (5'-GTNTGRGCNCAYCATATRTTYACNGT-3')
COI-6 (5'-CCNCGNCGNTAY(T,A)(C,G)NGAYTAYCC-3')
を使用した。これらは、後生動物汎用プライマーとして設計されたもので¹⁷⁾、ミトコンドリアDNA・COI領域の下流部分、約450塩基対を増幅することができる。

反応終了後、少量 (3 μl程度) をミューピッド電気

泳動装置 (Advance社) で泳動し、産物の量を確認する。

③ シークエンス

PCR産物を鋳型として、Sequenase PCR product sequencing kit (United State Chemical社) を用いて、シークエンス反応をおこなう。産物は、放射性元素³²Pで標識し、アクリルアミドゲル (Longranger, AT Biochem社) で、電気泳動した後、オートラジオグラフィでバンドを検出する。

④ RFLP分析

PCR産物を制限酵素Hinf IまたはTspE Iで、37℃で3時間消化した後、ミューピッド電気泳動装置またはサブマリン型電気泳動装置 (関東理化学) で泳動し、切断の有無を確認する。

結 果

福島県産の親貝を用いたエゾアワビ種苗 (以下福島産エゾアワビ種苗とする。) と長崎県産の親貝を用いたクロアワビ種苗 (以下長崎産クロアワビ種苗とする。) 各10個体からミトコンドリアDNAを抽出し、PCR法でCOI領域下流部の増幅をおこなった。最小サイズの種苗からも、この操作に十分な量の試料が得られた。

各PCR産物の塩基配列を決定したところ、他の無脊椎動物のCOI遺伝子とよく一致することからPCR産物が、正しく該当領域を増幅した物であることが、また、配列は一通りに決まることから、他個体のDNAによって汚染されていないことが示された。

個体間の変異は、全てアミノ酸配列を変えないタイプのも (同義的塩基置換) で、大きく2つのグループに分かれた (図18)。福島産エゾアワビ種苗個体は、全て同じグループ (以下E型と呼ぶ) に属し、一方、長崎産クロアワビ種苗では、2個体のみが福島産の個体と同じタイプのミトコンドリアDNAを持っていたのを除き、別のグループ (以下K型とする) に分類された。

図18に見られる様に、K型とE型は、3カ所 (図18の1~3) で完全に異なる塩基に固定している。うち2カ所は、制限酵素Hinf I (配列GANTCを認識) 及びTspE I (配列AATTを認識) のサイト中に存在した。制限酵素は、特定の短い塩基配列の部分認識、切断する性質を持つ酵素である。したがってK型の配列では、Hinf Iにより図18の下線aの部分 (GAATC) で、またTspE Iにより下線bの部分 (AATT) で、PCR産物が切断されるのに対し、E型ではこの部分の配列がそれぞれGGATC

とAACTに変わっており、制限酵素により切断されない(表21)。切断の有無は電気泳動により確認することができる。

制限酵素による切断の有無で遺伝的差異を検出する方法を、制限酵素多型(RFLP)分析といい、塩基配列を直接決定するより、はるかに短時間、安価にデータを得ることが出来る。今回の例では、2つの異なる制限酵素を併用することにより、たとえ片方の制限サイトに新たな変異が生じた個体があっても、遺伝子型を誤って判定する危険を避けることが出来る。特定の2カ所で同時に変異が生じる可能性は無視し得る程小さいので、2種類の制限酵素による結果が一致しない場合にのみ、塩基配列の決定をおこない、遺伝子型の確認をおこなえばよいのである。実際、今回解析をおこなった258個体の全てで、2つの制限酵素の切断パターンは一致していた。

RFLP分析により、クロアワビ集団とエゾアワビ集団について、上記の方法で遺伝子型の判別をおこなった(表22)。

クロアワビ集団では、一般にエゾアワビ集団に比べ、K型頻度が高い(K型頻度41.9%)。特に、長崎産種苗

では、25個体中23個体がK型で、この傾向が突出している。しかし、これを除いてもK型頻度は28.3%で、エゾアワビの8.1%に比べ高めである。逆に山口産のクロアワビ種苗では、全個体がE型で、他のクロアワビ集団とも大きく異なっている。今回分析した種苗の由来ははっきりしないが、山口県の天然クロアワビ集団にK型個体が出現していることから考えると、種苗生産に使用した母貝の遺伝的組成が偶然E型に偏っていたことに起因するアーティファクトである可能性も考えられ、由来の分かる種苗による追試が必要である。

エゾアワビ集団では、大部分の個体(91.9%)が、E型のミトコンドリアを持っている。福岡県で使用されている三陸産エゾアワビ種苗(表22の福島産種苗を含む)は、2年にわたり、全ての個体がE型であった。山口県で今年度使用された種苗や宮城県の天然集団には、1割程度のK型個体が含まれていた。福岡県の種苗再捕獲集団では、さらに若干多め(17.6%)のK型個体が検出された。福岡県のクロアワビ集団では、逆にE型個体が若干多めで、両者間に雑種が形成され、天然集団中に存在している可能性も考えられる。

考 察

表21 E型個体およびK型個体由来するPCR産物における、制限酵素Hinf IおよびTspEIの制限サイトの有無

遺伝子型	制限酵素	
	Hinf I	Tsp EI
E 型	ない(切れない)	ない(切れない)
K 型	ある(切れる)	ある(切れる)

今回の解析により以下のことが、明らかになった。

- ・クロアワビ・エゾアワビ集団は、遺伝的に異なる2つのグループ(K型・E型)から構成されている。
- ・クロアワビ集団では、一般にエゾアワビ集団に比べ、K型個体の頻度が高い。

```

K型 GCT GCA ACT ATG ATT ATT GCG GTA CCA ACC GGA ATT AAA ATT TTC AGT TGA CTC GCC ACA ATC CAC GGT GCC
E型 GCT GCA ACT ATG ATT ATT GCR GTA CCA ACC GGA ATT AAA ATT TTY AGT TGA CTC GCC ACA ATC CAY GGT GCC

                                1                                2
CGA ATA AAA TAT GAA GCC TCA ATG CTA TGA GCC CTC GGG TTC ATT TTC TTA TTT ACA GTT GGG GGA CTA ACT GGA ATC
CGA ATA AAA TAT GAA GCC TCA ATA YTA TGR GCC CTC GGG TTC ATT TTC TTA TTT ACA GTT GGG GGA CTA ACT GGG ATC
                                                                a

                                3
GTC TTA TCA AAT TCA TCC TTA GAC ATT ATG CTC CAC GAC ACA TAC TAC GTA GTA GCC CAT TTC CAT TAC GTC CTA TCA
GTC TTA TCA AAC TCA TCC TTA GAC ATT ATG CTC CAC GAC ACA TAC TAC GTA GTA GCC CAT TTC CAT TAC GTC CTA TCA
                                                                b

ATG GGA GCC GTA TTC GCC CTA TTC GCC GCC TTC AAC CAT TGG TAC CCC TTA TTT ACT GGG CTT ACC CTA CAC GCC CGA
ATR GGA GCY GTA TTC GCC YTA TTY GCC GCC TTC AAC CAT TGG TAC CCC YTA TTT ACT GGR CTT ACC CTA CAC GCC CGA

TGA ACA AAA GCA CAC TTC TTC ATC ATG TTT ATC GGA GTT AAT GTA ACA TTC TTC CCT CAA CAT TTT
TGA ACA AAA GCA CAY TTC TTC ATC ATG TTT ATC GGA GTT AAT GTA ACA TTC TTC CCT CAA CAT TTT

```

図18 クロアワビK型個体、E型個体のミトコンドリアDNA・COI領域の塩基配列

表22 各集団のK型個体およびE型個体の出現頻度。種苗の場合の地域名は、母貝の産地。ただし、福岡96年エゾアワビ種苗と山口96年エゾアワビ種苗は、母貝産地不明。

種類	産地	K型個体数 (頻度)	E型個体数 (頻度)	
クロアワビ	福岡	天然個体	6 (28.6%)	15 (71.4%)
		種苗 (95年)	9 (45.0%)	11 (55.0%)
		種苗 (96年)	8 (40.0%)	12 (60.0%)
		96年種苗再捕獲	0 (0.0%)	1 (100%)
	山口	天然個体	3 (30.0%)	7 (70.0%)
		種苗 (96年)	0 (0.0%)	20 (100%)
	長崎	種苗 (95年)	23 (92.0%)	2 (8.0%)
エゾアワビ	福岡	種苗再捕獲個体	6 (17.6%)	28 (82.4%)
		種苗 (96年)	0 (0.0%)	22 (100%)
		96年種苗再捕獲	2 (10.0%)	18 (90.0%)
	山口	種苗 (96年)	2 (10.0%)	18 (90.0%)
	福島	種苗 (95年)	0 (0.0%)	28 (100%)
	宮城	天然個体	3 (12.5%)	21 (87.5%)

・種苗の、K型・E型比は、その由来により大きく変動する。

解析結果 (表22) をサザエの場合 (図17) と比較すると、日本海の外側の九州西岸と太平洋岸で、異なる遺伝子型の個体がほぼ独占的に出現する点が一致している。最終氷期の最盛期 (3万年-2万年前) の日本海は、還元化が進み、多くの海産底生生物が絶滅したと考えられている¹⁸⁾、現在、九州西岸や三陸海岸に生息する集団は、それぞれ日本海の外で氷河期を生き延びた集団の子孫であり、異なる遺伝子型 (九州西岸はK型、太平洋岸はE型) の個体に、ほぼ固定したと考えられる。最終氷期の後、サザエが対馬暖流により対馬海峡経由でのみ日本海に再侵入したのに対し、クロアワビは、南からのルートに加え、親潮によって北からも侵入したことが想定される。ここで注意したいのは、今回の研究で、西九州の唯一のデータが、種苗を試料としていることである。一般に種苗は、少数個体の親貝から作られることが多いため、母貝の遺伝的組成に偏りがあると、天然集団と組成が大きく異なる危険がある。したがって、この件について、最終的に結論する前に、西九州の天然集団のデータを得る必要がある。

サザエの場合、日本海集団には、太平洋岸と共通する遺伝子型の個体が、1割程度出現するが、大部分は九州西岸の集団と共通する遺伝子型の個体である。これに対し、クロアワビでは形態がクロアワビ型かエゾアワビ型かによらず、九州西岸との共通型 (K型) がむしろ少数派である。これは、放流による人為的な攪乱の結果である可能性はある。別の可能性として、「最終氷期後の日本海へ、津軽海峡経由のE型個体と対馬海峡経由のK型

個体が再侵入し、交雑した結果である」とも考えることもできる。この仮説の検証のためには、北日本海のエゾアワビ、太平洋のクロアワビ、九州西岸のクロアワビを始めとして、より多くの天然地方集団の解析が必要であろう。

今回の結果に基づき、今後の水産研究での応用として以下のことが考えられる。

① 漁業者による種苗放流の追跡調査

本研究で明らかになった様に、種苗は、その亜種や由来によって異なるK型・E型比を持っている。これを利用して、漁業者により放流される種苗について、あらかじめ遺伝的組成を解析するか、放流後のランダムサンプリングにより放流時の遺伝的組成を調べる。その後、一定期間毎にサンプリングをおこない、遺伝的組成の変化から、異なる由来を持つ種苗の生残率や成長率等を推定する。将来的には、あらかじめ遺伝子型を揃えた種苗を放流することで、より正確な放流効果の推定や資源管理をおこなうことが可能である。

② 亜種間雑種の形成や稔性の検証

個体の遺伝子型は、微少な組織片から判定可能なので、成体の場合、殺さず調べることができる。そこで、あらかじめ遺伝子型を調べ、K型のミトコンドリアDNAを持つクロアワビとE型のエゾアワビといった様に遺伝子型を揃えた雌雄の集団を作り、様々な割合で混合飼育し、屋内で放精、放卵、受精をおこなわせ、雑種の形成率や成長、成熟が純血個体と差がないかを調べることができる。また野外にアワビを除去したハビタットを設置し、遺伝子型のわかったアワビを長期飼育することで、雑種個体の稔性や雑種第2代目以降の動態を追跡することも

考えられる。

なおミトコンドリアDNAは、母系遺伝因子であるので、子供のデータから母親についての情報しか得ることができない。父親側の情報を持つ核遺伝子上のマーカースとの併用により、さらに精密な解析が可能になろう。

2) エゾアワビ、クロアワビ混合集団の遺伝的構造の解明 (9年度実施)

8年度の委託研究では、こうした遺伝的攪乱を定量化するために、亜種に固有な遺伝的形質の検索を目的に、全国の集団について、ミトコンドリアDNAの塩基配列に基づいて解析をおこなった。その結果、クロアワビにおいても、サザエで示された様な、遺伝的に異なる2つのグループから集団が構成されていることが示された。しかし、サザエでは、2つのグループの分布域が、基本的に黒潮流域と対馬暖流流域に対応しているのに対して、クロアワビでは、明確な地理的構造が見られなかった。これは、サザエが、暖流域にのみ生息するため、個体の移動が一方であるのに対し、クロアワビでは、暖流と寒流の両方により輸送されるため、過去の氷期・間氷期サイクルの間に、両グループの個体が混じり合い、複雑な集団構造を形成してきたのに加え、長年の放流等の人為的攪乱により、地理的構造が失われているためと考えられる。

生物集団の遺伝的構造を、さらに詳細に解析するためには、ミトコンドリアDNAとは、独立な遺伝様式を持つ核DNA上に、遺伝子マーカーを確立し、その解析から得られた情報と、ミトコンドリアDNAによる情報を比較・検討することが、有効である。本研究では、そうした研究の基礎として、こうした目的に有用な核DNA上の分子マーカーの検索を行い、エロンゲーションファクター-1 α 遺伝子のイントロン領域の塩基配列が、集団内に十分な遺伝的変異を持ち、クロアワビ集団の遺伝的構造の解析に有効なマーカーとして利用できることを明らかにした。

方 法

① トータルDNAサンプルの調製

以下の操作により、PCR反応等を阻害する多糖類をほとんど含まない高純度のトータルDNA(核DNA+ミトコンドリアDNA)を抽出・精製することができる(瀬川 私信)。全ての操作は、個体毎にエッペンドルフチューブ(1.5 ml)中でおこなう。また、他の個体の

DNAによる汚染を防ぐため、乾熱滅菌(180℃, 2時間)した金属製器具か使い捨てプラスチック製品のみを用いる。

- a. アワビの筋肉を緩衝液(100mM EDTA (pH8), 10mM Tris (pH8), 150mM NaCl) 0.5ml 中ですりつぶす。
- b. 20%SDS 15 μ lを加え、緩やかに10分間攪拌する。
- c. 5M NaCl 60 μ lを加える。
- d. 水和フェノール、クロロフォルム 各300 μ lを加える。
- e. 10分間攪拌する。
- f. 12000rpmで10分間遠心する。
- g. 上清を、500 μ lの100%エチルアルコールの入ったチューブに移す。
- h. 緩やかに攪拌する。
- i. 析出したファイバー状のDNAを1ml 70%エチルアルコールの入ったチューブに移す。
- j. 12000rpmで5分間遠心する。
- k. 沈澱を乾燥し、100 μ l滅菌蒸留水に溶かす。
- l. i.でファイバーが析出しないときは、12000rpmで10分間遠心し、沈澱を70%エチルアルコールで洗浄する。
- m. 得られたサンプルは、-20℃で凍結保存する。

② cDNAサンプルの調整

以下の操作により、アワビの組織からRNAを抽出し、逆転写反応によりcDNAサンプルを調製する。全ての操作は、個体毎にエッペンドルフチューブ(1.5 ml)中でおこない、乾熱滅菌(180℃, 2時間)した金属製器具か使い捨てプラスチック製品のみを用いる。また、蒸留水は、DEPC(ジエチルピロカーボネート)処理した後、オートクレーブにかけて使用する。

- a. アワビの筋肉をすりつぶす。
- b. ISOGEN(ニッポンジーン) 1mlを加え、攪拌する。
- c. 室温で5分間おく。
- d. 0.2mlのクロロフォルムを加え、15秒間激しく攪拌した後、室温で2~3分おく。
- e. 15000rpm 4℃で15分遠心する。
- f. 液相(上層)を別のチューブに移す。
- g. 0.5mlのイソプロパノールを加え、室温で5~10分おく。
- h. 15000rpm 4℃で10分間遠心する。
- i. 沈澱を1mlの75%エチルアルコールで洗浄し、軽

く乾燥する。

- j. 10~100 μ l の蒸留水に溶解し, 55~60°Cで, 10~15分間保温する。
- k. サンプル1 μ l に蒸留水99 μ l を加え, 分光光度計で吸光を測定し, RNA濃度を計算する。
- l. RNA1~5 μ g を鋳型として, Super script (Life Technologies社) による逆転写反応をおこない, cDNAサンプルを調製する。

③ PCR

a エクソン領域

cDNAサンプルを鋳型として, 以下のプライマー(表23) の組み合わせで反応をおこなう。

断片1	EF-1S	EF-G r
断片2	EF-F	EF-B
断片3	EF-3	EF-A
断片4	EF-5V	EF-6VR

反応条件は, 94°C 1分
92°C 40秒 }
50°C 1分 } を 30サイクル
72°C 90秒 }

b. イントロン領域

トータルDNAサンプルを鋳型として, プライマー EF-H と EF-B を用いて, 以下の条件でPCR反応をおこなう。

94°C 1分
92°C 40秒 }
45°C 1分 } を 40サイクル
72°C 3分 }

上記のPCR産物を鋳型として, プライマー EF-F と EF-C r を用いて, 以下の条件でPCR反応をおこなう。

94°C 1分
92°C 40秒 }
45°C 1分 } を 30サイクル
72°C 2分 }

④ シークエンス

③で得られた, PCR産物を鋳型として, Sequenase PCR product sequencing kit (US Biochem社) を使用し, 以下のプライマーを用いて, 塩基配列を決定する。

(注参照)

エクソン領域

断片1	EF-1S, EF-G r
断片2	EF-F, EF-B

断片3 EF-C, EF-A

断片4 EF-5V, EF-6VR

イントロン領域 EF-F, ABAL-1, ABAL-2
EF-Cr, ABALR-1, ABALR-2

(注) 複相 (2n) の生物の核遺伝子は, 2本の相同染色体上に相異なる2種類の配列のものが, 存在している。したがって, 核遺伝子のPCR産物を本研究の様に, ダイレクトシークエンスした場合に得られる塩基配列は, それらの2つの配列を合成したものとなる。下の図は, 6個体のアワビについて, EF-1 α 遺伝子のイントロン領域3' 端付近をシークエンスしたオートラジオグラフ像である。矢印の部分に多型サイト (図19) があるが, 個体2, 4, 5, 6では, このサイトの塩基が, 2つの相同染色体上の遺伝子のいずれでもAであるため, バンドは一本だけである。一方, 個体1と3では, 片方の遺伝子がAで, もう一方の遺伝子がTであるため同じ位置に2本のバンド (像では, 横につながって見える) が出現する。

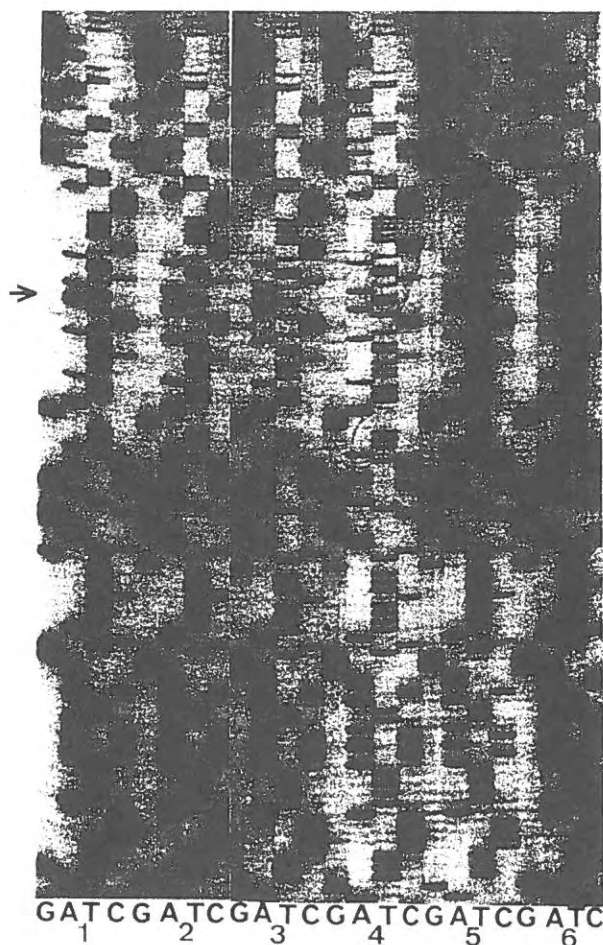


図19 EF-1 α 遺伝子のイントロン領域3' 端付近をシークエンスしたオートラジオグラフ像

結果及び考察

① EF-1 α 遺伝子エクソン部の塩基配列と個体間変異

8年度の委託研究においてミトコンドリアDNAの解析により対称象的な遺伝的組成を持つことが示された、福島産エゾアワビ種苗及び長崎産クロアワビ種苗から、ミトコンドリアDNA遺伝子型が解っている各1個体を選び、エロンゲーションファクター1 α (EF-1 α) 遺伝子エクソン部分のほぼ全領域について塩基配列を決定した。得られた配列から推定されるアミノ酸配列は、同じ腹足類のサザエの配列¹⁹⁾とよく一致し、アミノ酸配列がサザエと異なる場所は、いずれも動物群間で高頻度に変異が見られるサイトであった。このことから、今回得られた配列が、アワビの該当遺伝子のものであることは確実である。エゾアワビの塩基配列とクロアワビの配列は、1ヶ所を除き完全に一致した(図20)。この一ヶ所の変異サイト(図20の*印)の塩基は、クロアワビではTであるのに対し、エゾアワビではTとCのヘテロ(2本の相同染色体上の遺伝子が異なる配列を持つ)であった。この変異は、コードするアミノ酸を変えない同義的塩基置換によるピリミジン塩基間の変異という、最も起こり易いタイプのものである。この様な、比較的容易に生じる変異さえ、1215塩基中に1ヶ所(0.0008%)しか存在しないことから、エゾアワビとクロアワビが、遺伝的に極めて近いことが示唆される。以上のことから、この遺伝子のエクソン領域は、エゾアワビ/クロアワビの集団構造解析のための遺伝子マーカーとして不相当であると考えられる。そこで次に、エクソン領域に比べ、自然選択の影響を受けにくい、より進化速度が速く、多くの変異を持つことが期待されるイントロン領域²⁰⁾について、遺伝子マーカーの検索をおこなった。

表23 本研究で使用したプライマーの塩基配列

Name	Sequence
EF-1S	5'-ATHGGNCAYGTNGAYTCNGGNAARTC-3'
EF-Gr	5'-GTCTGACCATTCTTTGADATNCCNGCYTC-3'
EF-H	5'-GATATTGCTCTGTGGAARTTYGARAC-3'
EF-B	5'-CCNCCDATYTTTRTANACRTCYTG-3'
EF-C	5'-TAYATHAARAARTTNGGNTAYAYCC-3'
EF-A	5'-CCNGGRTGRTTNRDADATNAC-3'
EF-5V	5'-CCNGGNGAYAYGTNGGNTTYAAYGT-3'
EF-6VR	5'-ACNGCNACNGTYTGCKCATRTC-3'
EF-F	5'-GCTTTCACCTTNGGNGTNAARCA-3'
EF-Cr	5'-GGATTATAACCGATYTYTTDATRTA-3'
ABAL-1	5'-GGTTGATGATATCATCGATCCC-3'
ABAL-2	5'-CTGAGTGGACAAGTAGTTGG-3'
ABALR-1	5'-TAGTGAACAATGGATGACTAGCAGC-3'
ABALR-2	5'-CAAGTCTGGACCATAATCC-3'

② イントロンの位置の特定とプライマー作成, PCR条件設定

腹足類の核遺伝子のイントロンに関する報告は、これまでに皆無であるので、①でエクソン領域の塩基配列が明らかになったEF-1 α について、イントロン領域の検索を行った。①と同じ個体から調製したトータルDNAを鋳型に、同じプライマーの組み合わせでPCR反応をおこないイントロンを含む領域を検索した(2つのプライマーに対応する領域の間にイントロンがある場合、cDNAを鋳型とした時より長いPCR産物が得られる)。その結果、プライマーEF-CとEF-Hの間にイントロンが存在することが明らかになった。トータルDNAを鋳型としたPCR断片のシーケンスにより得られた塩基配列をcDNA配列と比較し、イントロンの位置を特定した(図20)。イントロンをはさむ位置に1組のプライマー、EF-FとEF-Crを作成し、PCRの最適条件を検討した結果、「方法」の項で述べた様に、さらに外側のEF-H~EF-B間でPCR反応をおこない、得られた産物を鋳型として、EF-F~EF-Cr間のセカンドPCRをおこなうことにより、好適なPCR産物が得られることがわかった。

③ EF-1 α 遺伝子イントロン領域の塩基配列と個体間変異

②で位置が特定されたイントロン領域を両方向から完全にシーケンスするため、さらに正逆各2つのプライマー(ABAL-1, ABAL-2, ABALR-1, ABALR-2)を設計・合成した。福島産エゾアワビ種苗及び長崎産クロアワビ種苗から、各8個体について、このイントロン領域のシーケンスをおこなった。なおミトコンドリアDNAの遺伝子型は、福島の個体がすべてE型、長崎の個体は、2個体がE型で残りはK型であった。イントロン領域の長さは、840~843塩基対で、1ヶ所に3塩基の挿入/欠失が見られた(図21の下線部)。領域中の7ヶ所で、塩基の個体変異が見られた(図21)。解析した個体の遺伝子型を表24にまとめた。今回の解析は、個体数が少ないので、統計解析はおこなっていないが、サイト6や挿入部に福島-長崎間で遺伝子頻度の差がみられた。また長崎のE型ミトコンドリアをもつ2個体は、核については福島のE型個体より長崎K型個体に近い傾向があり、ミトコンドリアDNAと核DNAの間の不一致が示唆される。これは、雑種形成によるクロアワビ集団へのエゾアワビ由来のミトコンドリアの取り込みによるものである可能性がある。今回決定したEF-1 α 遺伝子イントロン領域は、クロアワビ/エゾアワビの集団構

Nd ACT ACC ACT GGT CAT CTT ATT TAC AAG TGC GGT GGT ATC GAT GAG AGA ACT

Nd ATC CAG AAG TTC GAG AAG GAG GCT CAG GAA ATG GGC AAA GGT TCC TTT AAA TAT GCC TGG GTG TTG GAC AAA CTG
Tc AAG TTC GAG AAG GAA GCC CAG GAA ATG GGC AAA GGT TCC TTC AAA TAT GCC TGG GTG TTG GAC AAA CTG

EF-H ----->

Nd AAG GCC GAG CGT GAA CGT GGT ATC ACC ATT GAC ATT GCT CTC TGG AAG TTT GAG ACC GCC AAA TAT TAC ATC ACC
Tc AAG GCA GAG CGT GAA CGT GGT ATC ACC ATT GAC ATT GCC CTG TGG AAG TTT GAA ACC TCC AAG TAC TAC ATT ACC

Nd ATC ATT GAT GCC CCA GGT CAT CGT GAT TTC ATC AAG AAC ATG ATC ACA GGA ACA TCT CAG GCT GAT TGT GCT GTT
Tc ATC ATT GAT GCC CCT GGC CAC CGA GAT TTC ATC AAG AAC ATG ATC ACT GGA ACA TCC CAG GCT GAC TGT GCT GTG

<-----EF-Gr

Nd CTG ATC GTT GCC TCT GGT GTT GGT GAG TTT GAA GCT GGT ATC TCG AAG GAG GGT CAA ACC CGA GAA CAT GCC CTG
Tc CTG ATT GTT GCT TCT GGT GTT GGA GAA TTT GAG GCT GGT ATC TCC AAG GAT GGT CAG ACC CGT GAG CAC GCC CTG

EF-F ----->

Nd CTG GCT TAC ACC CTT GGT GTG AAG CAA CTC ATC ATT GGA ATC AAC AAG ATG GAC AGC ACT GCT CCA CCA TAC TCT
Tc CTG GCC TAC ACC CTT GGT GTG AAG CAG CTC ATC ATT GGC CTC AAC AAA ATG GAC AGT ACT GCA CCT CCA TAC TCT

EF-C ----->

↓ INTRON

<-----EF-Cr

Nd GAG GCA CGA TTT GAC GAA ATT GTG AAG GAA GTG TCT GGC TAC ATC AAG AAG ATT GGA TAC AAC CCC AAG GCT GTT
Tc GAG GCC CGT TAC AAT GAA ATT GTC AAG GAA GTA TCT GGC TAC ATC AAG AAG ATT GGT TAC AAC CCA AAG GCT GTT

*

Nd GCA TTY GTG CCA ATC TCT GGC TTC CAT GGT GAC AAC ATG CTT GAT CCT TCT GGC AAG ATG GGC TGG TTC AAG GGC
Tc GCG TTT GTA CCC ATC TCA GGT TTC CAT GGT GAC AAT ATG ATT GAA CCA TCC ACT AAT ATG CCC TGG TTC AAG GGT

Nd TGG TCT GTA GAG AGG AAG GAG GGC AAT GCC AGT GGC AAG ACC CTG TAT GAT GCT CTT GAC AGC ATC CTC CCC CCA
Tc TGG GCT ATT GAG AGG AAG GAA GGC AGT GCT AAT GGA AAA ACC TTG TTT GAA GCT CTG GAC AGC ATC TTG CCC CCT

<-----EF-B

Nd CAA AGA CCC ACA GAC AAG GCC CTG CGT CTC CCC CTG CAG GAT GTC TAC AAG ATT GGC GGT ATT GGA ACT GTG CCT
Tc ACC AGG CCC ACT GAA AAA GCC CTT CGT CTT CCT CTT CAG GAT GTT TAC AAG ATT GGA GGT ATT GGA ACT GTG CCA

Nd GTT GGA CGA GTT GAA ACT GGT ATC CTT AAG CCT GGT ATG ATC GTC ACC TTT GCC CCA TCT GCA CTC ACA ACT GAG
Tc GTT GGC AGA GTC GAG ACA GGT ATT CTG AAG CCT GGT ACG CTC GTC ACC TTT GCT CCC AGC GGA CTT ACT ACT GAG

EF-5V -----

Nd GTG AAG TCC GTT GAA ATG CAC CAC GAG TCC CTC CCC GAG GCT CTG CCT GGC GAC AAT GTT GGC TTT AAT GTG AAG
Tc GTG AAA TCT GTA GAG ATG CAT CAC GAA GCT CTT ACA GAG GCT CTG CCT GGA GAC AAC GTT GGC TTC AAC GTG AAG

----->

Nd AAC GTG TCC GTC AAG GAA CTT CGT CGT GGC TTT GTC GCT GGT GAC AGC AAG AAT GAT GCT CCC AAG GAG TGT GCT
Tc AAC GTC TCT GTG AAG GAA CTC CGT CGT GGG TTT GTT GCT GGT GAT AAC AAG AAT GAC CCT CCA AAG GAG TGT GCA

<-----EF-A

Nd AGC TTC TAT GCT CAG GTT ATC ATC TTG AAC CAC CCC GGC GAG ATC AAG AAT GGT TAT TCC CCA GTT TTG GAC TGC
Tc AGC TTT TAT GCC CAG GTC ATC ATC TTG AAC CAC CCA GGT GAA ATC AAG AAT GGA TAT TCC CCA GTT CTG GAC TGT

Nd CAC ACA GCC CAT ATT GCT GTG AAA TTC AGC GAG ATC AAA GAA AAG TGT GAT CGT CGT TCT GGC AAG AAG CTG GAG
Tc CAC ACA GCC CAC ATT GCT GTC AAA TTC AGT GAA ATC AAG GAG AAG TGT GAC CGT CGA TCT GGC AAG AAA CTT GAG

Nd GAA AAC CCC AAA AGT GTC AAG TCT GGT GAT GCA GCC ATG ATT GTC TGC CTT CCC AGC AAG CCC ATG TGT GTG GAG
Tc GAC AAT CCT AAG TTT GTA AAG TCA GGT GAT GCT GCT ATG GTC ACT TGC ATT CCC AGC AAG CCC ATG TGT GTG GAG

Nd GCT TTC TCC TCA TAC CCA CCA CTG GGA CGT TTC GCC GTC
Tc GCT TTC TCC GAC TAC CAG CCA CTC GGA CGT TTT GCT GTC

図20 クロアワビ (Nd) 及びサザエ (Tc) のEF-1 α 遺伝子のエクソン部の塩基配列。
本研究で使用したプライマーの位置を図中に示す。矢印は、クロアワビのイントロンの位置を示す。
*はクロアワビにおける多型サイト。

<-- EXON INTRON -->

CCA CCA TAC TCT GAG GTAAGTGGCAATTC TATTACACCTCTTACAGCATGCAGAACCAGATGTTTCATGGATCTAACCTATGCAAGCGTCTGGACAT
TTGTACTGTAGATAGACATCAACAATGTTTCTGTGTGGTGGTCAAGTCTAATCTTAGCTCACCACCCGTAAGATTCCAGGGTAGAATAGGTCTTCAGCTACCC
ATGCTTGCATAAAAGCGWCTAAACAGGTTCCGGTGGTCAAGGCTCACTGACTTGGTTGATGCATATCATCGATCCCAATTGCGTGGATCGATGTTTCATGATATCA
<----- ABALR-2 -----> ABAL-1 ----->

GTCACCTGGATTGTATGGTCCAGACTTGATTATTTACAGACCGCCATCGTATAGCTATAATATTGCTGAGTGCAGCATTAAACAACAACCAATTCTTAGCCAMC
ATGATGCCAAGTAATTTTGTAGACAAAATAGCAGAACGTTATGGCACTTCCCAAATMATGTAATCGGGTTAATTTTCATGAATACAAAACATTGAGTGTGAAA
TGTTTTCAACTTGAATTAGTAGAATTACGAAACCTGTCCTAATTTTGTAAATTTTCTGAGTGGACAAGTAGTTGGTAACAATGCTGCTWGTATCCATTGTTCA
56
CTWVTTAGCTTAATTGTGGACCCCTTGTCTTCACTTCCACTGCCAATGTTAACTTTTCAAGCAAGTGTATTAACTCTGCATCTTTAATTATTGTTGGGATAGT
ACTAGCCAGGGCTAGTCAAGTTTCCCATTTTACACATTACAAGGTCATTTTCTTGTCAAGGCTAGCAACTATTTGGAATTTATTTCTTATCTAHTATCTTATC
<---INTRON --->

CTTTTTCCCATTTAGGCA CGA TTT GAC GAA

図21 アワビのEF-1 α 遺伝子のイントロン部の塩基配列。数字は多型サイト。下線は、3塩基の挿入を示す。本研究で使用したプライマーの位置を図中で示す。

表24 イントロン領域における多型サイトの遺伝子型組成

集団	福島	長	崎
ミトコンドリアDNA遺伝子型	E型	E型	K型
塩基置換			
サイト	遺伝子型		
1	AA	5	2
	AT	3	0
2	AA	4	1
	AC	4	1
3	CC	5	1
	AC	3	1
4	AA	5	1
	AT	2	1
5	AA	6	2
	AT	1	0
6	AA	4	2
	AG	2	0
	AC	1	0
7	TT	5	2
	TA	3	0
挿入(+)/欠失(-)			
	++	1	2
	+-	6	0
	--	1	0

造を解析するのに十分な変異を持っており、今後多くの集団について、核遺伝子型の組成とミトコンドリア遺伝子型の組成の比較をおこなうことで、各集団の遺伝的特性や履歴を明らかにできるものと期待される。

3) 核DNA及びミトコンドリアDNAに基づく、クロアワビ集団の遺伝的特性の解明（平成10年度実施）

8年度の委託研究では、こうした遺伝的攪乱を定量化するために、亜種に固有な遺伝的形質の検索を目的に、全国の集団について、ミトコンドリアDNAの塩基配列に基づいて解析をおこなった。その結果、クロアワビに

においても、サザエで示された様な、遺伝的に異なる2つのグループから集団が構成されていることが示された。しかし、サザエでは、2つのグループの分布域が、基本的に黒潮流域と対馬暖流流域に対応しているのに対して、クロアワビでは、明確な地理的構造が見られなかった。これは、サザエが、暖流域にのみ生息するため、個体の移動が一方向であるのに対し、クロアワビでは、暖流と寒流の両方により輸送されるため、過去の氷期・間氷期サイクルの間に、両グループの個体が混じり合い、複雑な集団構造を形成してきたのに加え、長年の放流等の人為的攪乱により、地理的構造が失われているためと考えた。

9年度の委託研究では、クロアワビ集団の遺伝的構造を、さらに詳細に解析するためには、ミトコンドリアDNAとは、独立な遺伝様式を持つ核DNA上に、遺伝子マーカーを確立することを目的に、核DNA上の分子マーカーの検索を行い、EF-1 α 遺伝子のイントロン領域の塩基配列が、集団内に十分な遺伝的変異を持ち、クロアワビ集団の遺伝的構造の解析に有効なマーカーとして利用できることを明らかにした。

10年度は、昨年度開発した遺伝子マーカーを用いて核DNAの遺伝子型組成が、地方集団間やクロアワビとエゾアワビ間、天然個体と種苗の間で違いがあるかを解析した。さらに同一個体について、核DNAとミトコンドリアDNAの双方に基づく解析をおこない、ミトコンドリアDNAによる遺伝子型と核DNA遺伝子型の集団内組成パターンが一致するかどうかを検定することによ

り、集団内の遺伝的変異の存在が生殖的隔離を伴うか否かを検証した。また、交配実験などに際し、核DNA上の遺伝的変異をより簡便に検出する方法について検討した。

方 法

① トータルDNAサンプルの調製、PCR及びシーケンス

2)のエゾアワビ、クロアワビ混合集団の遺伝的構造の解明と同様の手順

結果及び考察

① EF-1 α 遺伝子イントロン領域の塩基配列と個体間変異

表25に示すミトコンドリアDNA遺伝子型が既知のクロアワビ及びエゾアワビ、各34個体について、EF-1 α 遺伝子のイントロン部分の塩基配列を決定した。その過程で、昨年度報告した5'側の3塩基対の挿入/欠失変異の他に、新たに3'側に7塩基対の配列の挿入/欠失変異が見つかった(図22)。図23に、新たに発見された3'側の挿入配列を持つ遺伝子を両親から受け継いだ個体(個体1, 遺伝型+/+), 片親のみから受け継いだ個体(個体2, 同+/-), 挿入のない遺伝子を両親から受け継いだ個体(個体3, 同-/-)について得られるシーケンス結果を示す。挿入サイト(矢印)までは、どの個体も同じバンドパターンを示すが、その後(図の上側), 個体1と個体3では異なるパターンを示し、

個体2は両者を合わせたパターンを示す。個体1では、個体3のサイト直後のパターンが、バンド7個を隔てた後に出現している。

② 核遺伝子型の集団間変異

今回解析対象とした個体の7つの塩基置換サイト(図22)及び2つの挿入/欠失サイトの形質を表26, 27にまとめた。このデータに基づき、各サイトに関する遺伝子型組成について、クロアワビとエゾアワビ間及び地方集団間、天然個体と種苗の間で遺伝子型組成の違いがあるかをRoff and Bentzen (1989)の方法²¹⁾により解析した。

まず福岡県沖で採集された、天然クロアワビとエゾアワビ種苗採捕員の間、核DNA遺伝子型組成に有意な差異があるかどうかをサイト毎に、K型とE型を別にした場合、それらを合わせてひとつのグループとした場合について検定した(表28)。サイトaのE型及びサイト

表25 本研究で解析したサンプル

種 類	ミトコンドリア	サンプル
産 地	DNA遺伝子型	数
クロアワビ		
福岡	天然個体	K型 7
	ク	E型 7
長崎	人工種苗	K型 8
	ク	E型 2
山口	天然個体	K型 2
	ク	E型 8
エゾアワビ		
福岡	放流個体	K型 6
	ク	E型 8
福島	人工種苗	K型 10
	宮城	天然個体
ク		E型 7

```

<-- EXON INTRON -->
CCA CCA TAC TCT GAG GTAAGTGGCAATTC TATTACACCCTCTTACAGCATGCAGAACCCAGATGTTTCATGGATCTAACCTATGCAAGCGTGCTGGACAT
TTTGTACTGTAGATAGACATCAACAATGTTTCTGTGTGGTTCAGTCTAATTCCTAGCTACCACCCGTGAAGATTCCAGGGTAGAATAGGCTTCAGCTACCC
ATGCTTGCCATAAAAGCGCWTAAACAGGTTTCGGGTGGTCAGGCTCACTGACTTGGTGTATGCATATCATCGATCCCAATTCGCTGGATCGATGTTTCATGATATCA
<----- ABALR-2 ----->
GTCACCTGGATTGTATGGTCCAGACTTGATTATTTACAGACCGCCATCGTATAGCTATAATATTGCTGAGTGCGGCATTAAAAACAACAAACCAATTCCTAGCCCAMC
ATGATGCCAAGTAATTTTGTAGACAAATAGCAGAAGCTTATGGCACTTCCCAAATMATGTA3AAATCGGGTAAATTTTTCATGAATACCAAAACATTGAGTGCTGAAA
TGTTTACAACCTGAATTAGTAGAATTACGAAACCTGTCCTAATATTTGTAATATTTCTGAGTGGACAAGTAGTTGTAACAATGCTGCTGTCATCCATTGTTCA
56
CTWVTTAGCTTAATTGTGGACCCCTTGCTTCATTCACTGCAATGTTAACTTTAGCAAGATGTTAATCCTGCATCTTTAATATTGTTGGGATAGT
ACTGACACTAGCCAGGGCTAGTTCAGTTTCCCATTTTACACATTACAAGGTCATTTTCTTGTCAAGGCTAGCAACTATTTGGAATTTATTTCTTATCCTAHTA
7
TCTTATCCTTTTCCCAATTTAGGCA CGA TTT GAC GAA
<----INTRON ----->

```

図22 クロアワビのEF-1 α 遺伝子のイントロン部の塩基配列。数字は多型サイト。下線は、挿入/欠失サイト。本研究で使用したプライマーの位置を図中に示す。

表26 イントロン領域における多型サイトの遺伝子型組成 (クロアワビ)

集 団		福 岡		長 崎		山 口	
ミトコンドリア DNA型		K型	E型	K型	E型	K型	E型
塩基置換							
サイト	遺伝子型						
1	AA	5	3	5	2	1	5
	AT	2	3	3	0	1	3
	TT	0	1	0	0	0	0
2	AA	1	1	5	1	0	1
	AC	5	4	3	1	1	4
	CC	1	2	0	0	1	3
3	AA	0	0	1	0	0	1
	AC	2	1	3	1	0	2
	CC	5	6	4	1	2	5
4	AA	6	4	8	1	1	7
	AT	0	0	0	1	0	0
5	AA	7	5	8	2	2	7
	AT	0	0	0	0	0	0
6	AA	7	4	5	2	2	7
	AG	0	0	0	0	0	0
	AC	0	1	3	0	0	0
7	AA	0	2	0	0	0	0
	TA	3	2	3	0	1	2
	TT	2	2	5	2	1	1
挿入(+)/欠失(-)							
a	++	3	5	6	2	2	6
	+-	4	1	2	0	0	2
	--	0	1	0	0	0	0
b	++	0	1	0	0	1	0
	+-	3	1	0	1	0	5
	--	4	4	8	1	1	3

表28 福岡におけるクロアワビ-エゾアワビ間の核DNA遺伝子型組成の差の有意性の検定結果。
*及び**は、それぞれ5%水準、1%水準で有意差があることを、NSは有意差がないことを表す。

ミトコンドリア DNA型	変異サイト									
	1	2	3	4	5	6	7	a	b	
K型のみ	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
E型のみ	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	*	NS	
全 個 体	*	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	

1の全個体について5%レベルの有意差が検出された。前者はエゾアワビの-遺伝子頻度がやや高いこと、後者はクロアワビのT遺伝子頻度がやや高いためであるが、こうした特徴は他集団では見られず、クロアワビ-エゾアワビ間に固有の差とは考えにくい。E型及び全個体のサイト6での1%レベルの差は、クロアワビのE型個体のみがC遺伝子を持つためであるが、同じ変異が福島のエゾアワビ種苗からも検出されており、やはり亜種特異的な変異とは考えにくい。以上の様に、今回の解析からは、クロアワビとエゾアワビを明確に区別する変異は発見されなかった。

表27 イントロン領域における多型サイトの遺伝子型組成 (エゾアワビ)

集 団		福 岡		福 島		宮 城	
ミトコンドリア DNA型		K型	E型	E型	E型	K型	
塩基置換							
サイト	遺伝子型						
1	AA	5	5	6	2	4	
	AT	1	1	4	1	1	
	TT	0	0	0	0	1	
2	AA	1	2	5	1	0	
	AC	5	5	5	0	4	
	CC	0	1	0	2	3	
3	AA	0	0	0	0	0	
	AC	3	2	3	0	1	
	CC	3	6	7	3	6	
4	AA	3	6	7	3	6	
	AT	0	0	2	0	0	
5	AA	4	8	8	3	6	
	AT	0	0	1	0	0	
6	AA	4	8	6	3	6	
	AG	0	0	2	0	0	
	AC	0	0	1	0	0	
7	AA	0	0	0	0	1	
	TA	2	3	3	1	0	
	TT	1	2	6	2	2	
挿入(+)/欠失(-)							
a	++	2	2	2	1	4	
	+-	4	4	6	1	3	
	--	0	2	2	1	0	
b	++	0	0	0	1	1	
	+-	3	2	1	0	3	
	--	3	6	9	2	3	

表29 クロアワビ地方集団間における核DNA遺伝子型組成の差の有意性の検定結果。
*及び**は、それぞれ5%水準、1%水準で有意差があることを、NSは有意差がないことを表す。

ミトコンドリア DNA型	変異サイト									
	1	2	3	4	5	6	7	a	b	
クロアワビ 福岡vs山口										
K型のみ	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	
E型のみ	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	
全 個 体	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	
エゾアワビ 福岡vs宮城										
K型のみ	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
E型のみ	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	*	*	
全 個 体	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	

次に福岡の天然クロアワビ及びエゾアワビ種苗採捕員集団について、それぞれ山口、宮城の天然個体集団との間に遺伝的差があるかどうかの検定をおこなった(表29)。クロアワビの福岡集団と山口集団の間には、K型個体についてサイトbに、E型及び全個体にサイト6に1%水準で有意な違いが検出された。前者は山口のK型個体の-遺伝子が少ないためであるが、E型ではそうし

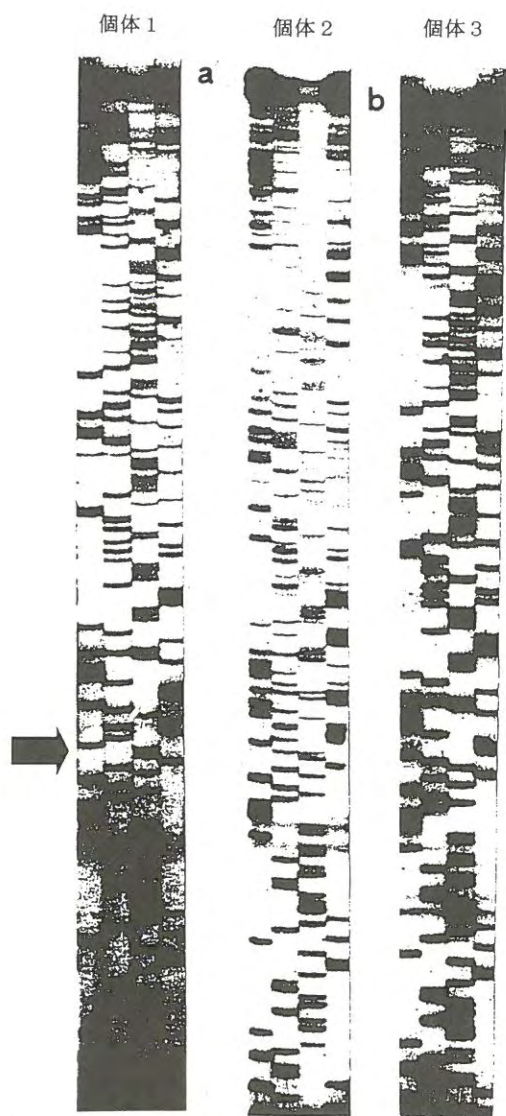


図23 3'側の挿入/欠失サイト変異によるシーケンスバンドパターンの違い

たパターンは見られず、K型のサンプル数が少ないことからアーティファクトの可能性が高く、さらに多くのサンプルに基づく解析が必要であろう。後者は福岡のE型の1個体が持つC遺伝子のため、サンプルサイズを考えると、距離的に近い福岡-山口間でも遺伝子交流の制限されている可能性を示唆する。エゾアワビの場合には、サイト2について、E型個体に5%レベルの、全個体で1%レベルの有意な違いが検出された。これは、福岡集団でAの遺伝子頻度がC遺伝子の頻度より高いのに対し、宮城集団では逆であるため、K型個体についても、統計的に有意ではないが同様の傾向が見られる。福岡集団と宮城集団間の遺伝的差異を反映しているものと考えられる。

長崎産クロアワビ種苗及び福島産エゾアワビ種苗について、同じ亜種の天然集団との遺伝的差異を検討した

表30 クロアワビ天然個体と種苗の間の核DNA遺伝子型組成の差の有意性の検定結果。
*及び**は、それぞれ5%水準、1%水準で有意差があることを、NSは有意差がないことを表す。

ミトコンドリア DNA型	変異サイト									
	1	2	3	4	5	6	7	a	b	
クロアワビ vs 福岡										
K型のみ	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**
E型のみ	*	NS	NS	**	NS	NS	**	NS	NS	
全個体	NS	*	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS	*
クロアワビ vs 山口										
K型のみ	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**
E型のみ	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS
全個体	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**
クロアワビ vs 福岡+山口										
K型のみ	NS	*	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	**
E型のみ	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS
全個体	NS	**	NS	**	NS	*	NS	NS	NS	*
エゾアワビ vs 福岡										
K型のみ	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*
エゾアワビ vs 宮城										
K型のみ	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**
エゾアワビ vs 福岡+宮城										
K型のみ	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*

(表30)。長崎産クロアワビ種苗は、サイト2のC遺伝子頻度がA遺伝子頻度より低い、サイト6にC遺伝子を持つ個体を含む、サイトbに+遺伝子がないなど、他集団に見られない特徴を持ち、福岡及び山口の天然集団との間に複数のサイトで統計的に有意な差異が検出された。長崎産種苗の親目の由来する天然集団のデータがないため、この差が地方集団間の遺伝的分化によるものである可能性も否定できないが、種苗を限られた個体数の親目から生産する場合や継代飼育した個体を用いる場合、親が偶然持っていた天然では稀な遺伝的特徴を、多くの種苗が持つことも予想される。エゾアワビ種苗については、クロアワビに比べて差が小さいもののサイトbの-遺伝子頻度が極めて高い点特徴的である。種苗に特有の遺伝的特徴は、それらを天然に放流した後の生残や成長を追跡調査する際のマーカーとして利用できるかもしれない。

③ 核DNA遺伝子型とミトコンドリアDNA遺伝子型の比較

1)のRFLP法によるエゾアワビ、クロアワビ判別手法開発の試みで報告したミトコンドリアDNAの遺伝子型(K型とE型)の違いと核DNA遺伝子型の集団内組成パターンが一致するかどうかを検定した(表31)。K型とE型間で各変異サイトの核遺伝子型を比較したところ、

6通りの組み合わせで有意な差が検出されたが、このうち5例は、1個体のみが持つ低頻度の遺伝子によるものである。またエゾアワビ全個体のサイト6の有意差は、福島の種苗のみから検出されているG遺伝子によるものである。この様に検出された有意な差は、ミトコンドリアDNAの遺伝子型による核遺伝子の差異を反映するものではなく、地方集団の遺伝的特性によるものと考えられる。このことは、遺伝的に異なるミトコンドリアDNAをもつ2グループが、遺伝的な隔離を伴わない種内変異であることを示唆する。かつて地理的に隔離された地方集団で分化したグループが、氷期後の分布域拡大と人為的拡散により混合している過程にあると思われる。

④ 核DNA上の遺伝的変異の簡便な検出

2)のエゾアワビ、クロアワビ混合集団の遺伝的構造の解明で報告した核DNA上の遺伝的変異は、個体間の塩基配列の違いに基づくものであり、その検出には煩雑なシーケンシング作業を必要とする。そのため、多数の個体から特定の遺伝子型のものを選び出す、スクリーニングの作業には適さない。この点、挿入/欠失変異によるPCR産物の長さの差に着目すると、より簡便に個体の遺伝的性質の特定をおこなうことができる。

先に記した図23の各サンプルのシーケンス結果で、上側の太い4レーンに共通するバンド (a及びb)は、シーケンスプライマーからPCR産物の片方の端までの断片で、PCR産物の長さが長い程、上側に現れる。ここでは、aは7塩基の挿入がある産物に、bはない産物に対応している。同様のことが、5'側の3塩基の挿

入/欠失サイトに関しても成立するので、これら2ヶ所のサイトの変異から、アワビ個体を9種類の遺伝子型に分類することができる。

こうした塩基配列の挿入/欠失による遺伝子の長さの差は、PCR産物を電気泳動した時の移動度の差を利用して、以下の手順で、より簡便に検出できる。

a. 各アワビ個体から調製した、トータルDNAサンプルを鋳型として、プライマーEF-HとEF-Bを用いて、以下の条件でPCR反応をおこなう。

94℃ 1分
92℃ 40秒
45℃ 1分
72℃ 3分

} を 40サイクル

b. このPCR産物を鋳型として、プライマー EF-FとABALR-1及びABAL-2とEF-Crを用いて、以下の条件でPCR反応をおこなう。

94℃ 1分
92℃ 40秒
45℃ 1分
72℃ 2分

} を 30~40サイクル

c. PCR産物を、遺伝子型が既知の個体によるPCR産物とともに、アクリルアミドゲルまたはアガロースゲル上で泳動し、バンドの長さを判定する。

挿入/欠失型の変異は、塩基置換型の変異に比べ発生する頻度が低く同じ変異が独立に複数回生じる可能性は無視できる大きさである。また一度生じた変異は、長期間安定に保存される。イントロン上の変異は進化的に中立であるから、自然選択による生存率への影響を考慮する必要がない。したがって、イントロン領域の挿入/欠失による長さの変異は、複数世代に渡る現象を追跡するための優れた分子マーカーである。

この手法と1)のRFLP法によるエゾアワビ、クロアワビ判別手法開発の試みで報告したPCR-RFLP法によるミトコンドリアDNA上の遺伝的変異の簡便な判定法を組み合わせることにより、親の組み合わせによる受精効率の違いを定量的に評価することが可能となる。例えば、クロアワビ及びエゾアワビの配偶子(精子または卵)が、同じ亜種の配偶子と受精しやすい性質があるかどうかを検証するには、あらかじめ成体の遺伝子型を調べ、核DNA遺伝子型(+/+), ミトコンドリアDNA遺伝子型E型のクロアワビの雌雄個体と(-/-)・K型のエゾアワビ雌雄個体から配偶子を採取し、同一容器中で交配させ、生まれた幼生の遺伝子型を調べればよい。(+/-)の核DNA遺伝子型を持つものは、亜種間雑種

表31 ミトコンドリアDNA遺伝子型による核DNA遺伝子型組成の差の有意性の検定結果。
*及び**は、それぞれ5%水準、1%水準で有意差があることを、NSは有意差がないことを表す。

		変異サイト							a	b
		1	2	3	4	5	6	7		
クロアワビ	福岡	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS
	長崎	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	**
	山口	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	福岡+山口	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	全個体	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS
エゾアワビ	福岡	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	宮城	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	福岡+宮城	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	全個体	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS
福岡全個体	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
全個体	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS	

であり、両親の組み合わせは、母親の型と一致するミトコンドリアDNAの遺伝子型により判定できる。また幼生の成長に伴う遺伝子型組成の変化の追跡により、雑種個体とそうでない個体の間に生存率の差があるかどうかとも明らかにすることができる。同様にして、亜種間雑種個体の繁殖成功度の評価も可能である。

4) 分子マーカーによるクロアワビ集団の地理的構造の解析 (平成11年度実施)

筆者は、8年度より福岡県からの委託研究として、遺伝子マーカーに基づく日本産クロアワビの集団構造に関する基礎研究を行ってきた。8年度にはミトコンドリアDNAのCO I 領域についてPCR法で増幅した断片のRFLP分析を行い、国産クロアワビが遺伝的に異なる2つのグループから成っているが、その別れ方が亜種の区別とは一致しないことを明らかにした。9年度には、核DNA上のEF-1 α 遺伝子イントロン領域の塩基配列に見られる個体変異が、集団構造解析の指標として有効であることを報告し、10年度にこれを用いて日本各地の天然集団及び種苗の解析を行い、核DNA上の進化的に中立な遺伝的変異が、ミトコンドリアDNAと形態のいずれとも挙動が一致しないことを示した。今年度は、クロアワビの天然集団のさらに詳細な遺伝的集団構造を明らかにすることを目的に、5集団97個体の天然クロアワビについてミトコンドリアDNA・CO I 領域の塩基配列678塩基対を決定し、集団構造を解析した。

方 法

① 全DNAサンプルの調整

昨年度までに解析を行った個体を中心とする天然クロアワビ97個体 (表32) 及び千葉県小湊産トコブシ1個体から個体毎に、以下の方法で全DNAサンプルを調整した。

- 筋肉組織をエッペンドルフチューブ内でミンスする。
- 緩衝液 (100mM EDTA (ph8), 10mM Tris (ph8), 150mM NaCl) 0.5ml中ですり潰す。
- 20% SDS 15 μ lを加え、穏やかに10分間攪拌する。
- 5M NaCl 60 μ lを加える。
- 水和フェノール、クロロフォルム 各300 μ lを加える。
- 10分間攪拌する。
- 12000rpmで10分間遠心する。

- 上清を、500 μ lの100% EtOHが入ったチューブに移す。
- 穏やかに転倒攪拌する。
- 析出したファイバー状のDNAを、1mlの70% EtOHの入ったチューブに移す。
- 12000rpmで5分間遠心する。
- ファイバーの析出しない時は、12000rpmで10分間遠心し、沈澱を70% EtOHで洗浄する。
- 沈澱を乾燥し、100 μ l滅菌蒸留水に溶解する。
- 得られたサンプルは、-20 $^{\circ}$ Cで凍結保存する。

② PCR

①で得られた全DNAサンプルを鋳型として、プライマーCO I-B及びCO I-6 (表33) を用いて、以下の条件でPCR法によりミトコンドリアDNA・CO I 領域の一部 (約1000塩基対) 増幅を行った。

94 $^{\circ}$ C 1分
 92 $^{\circ}$ C 40秒
 50 $^{\circ}$ C 1分
 72 $^{\circ}$ C 90秒

} を 40サイクル

③ シークエンス

②で増幅したPCR産物を鋳型として、ThermoSequenaseTM Cycle Sequencing Kit (島津製作所) を使用し、蛍光ラベルしたシークエンスプライマーAbalocoi (正方向) 及びGastro-4 (逆方向) (表33) を用いて、シークエンス反応をおこない、シークエンサー (島津製作所 DSQ-2000L) によりPCR産物の塩基配列を両方向から決定した。

表32 本研究で解析した天然クロアワビ個体

亜種	採集場所	N
クロアワビ	福岡沖	24
	山口沖	20
エゾアワビ	福岡沖	23
	北海道 (奥尻島) 宮城沖	10 20

表33 本研究で使用したプライマー

名称	塩基配列
COI-B	5' -GGATGAACNGTNTAYCCNCC-3'
COI-6	5' -GGRTARTCNSWRATANCGNCGNGGYAT-3'
Abalocoi	5' -GCAATTTTCTCCCTACACCTAGCCCG-3'
Gastro-4	5' -ATAATAAARAARTGNTTNGTYCA-3'

結果と考察

① クロアワビ個体間の遺伝的変異

5集団97個体の天然クロアワビについてミトコンドリアDNA・COI領域の塩基配列、678塩基対を決定した(図24)。70ヵ所でアミノ酸配列を変えない同義的塩基置換が見出され、計56種類の異なる塩基配列を持つハプロタイプが得られた(図25)。各集団のハプロタイプ組成を表34に示す。

② ハプロタイプ間の系統関係

①で得られた全ハプロタイプについて近縁な物どうしを繋げ、遺伝子ネットワークを作成した(図26)ところ、解析したクロアワビ97個体は大きく3つのグループ(図のI, II, III)に分かれた。また、3個体以上出現したハプロタイプについてトコブシを外群として近隣結合法により系統関係を解析した結果(図27)も、同じ3つのグループの存在を示した。

3グループ間の分岐の順序は、ブートストラップ確率が小さいため不確実であるが、ほぼ同時期と考えられる。主要なハプロタイプ間の遺伝的距離(表35)に基づき、中央アメリカ産テッポウエビ類のCOI領域で報告されている進化速度²²⁾である100万年当たり1.4%を適用すると、3つのグループの分岐年代は約100万年前と推定

された。この値は、COI領域塩基配列から推定された日本産サザエの遺伝的に異なる2グループ(黒潮タイプと対馬暖流タイプ)間の分岐年代の推定値である約110万年前(Kojima et al. 投稿中)に極めて近く、クロアワビ及びサザエの種内に見られる遺伝的分化現象が、共通の原因により同じ時期に生じた可能性を示唆する。

1)のRFLP法によるエゾアワビ、クロアワビ判別手法開発の試みで報告したRFLPによる解析では、国産クロアワビが、遺伝的にK型とE型の2グループに分けられることが示されたが、今回の解析から示された3グループのうちK型に対応するのは、図26及び図27のグループIであり今回得られたハプロタイプ56種類中7種類、97個体中22個体を含むにすぎない。これに対し、従来E型として一括して認識されていた個体群は、K型個体群に比べ遥かに大きい遺伝的多様性を持ち全ハプロタイプの8割以上、全個体の7割以上を含むことが明らかになった。

最も多くの個体に見られたハプロタイプ(No.1)は、RFLPではK型に分類される。K型個体は、長崎産稚苗に圧倒的に優占し、福岡や山口の天然クロアワビ集団で出現頻度が高く、逆にエゾアワビでは、どの集団でも頻度が低い。今回明らかになった遺伝的多様性の低さと明確な星型ネットワーク構造を形成する(図26)ことから考えて、K型個体群は、過去に西方海域に地理的に隔

N	GCR	CAA	CCY	CTA	GAA	CGA	ATA	CCA	TTA	TTY	GTT	TGA	TCA	GTR	AAA	ATY	ACT	GCC	ATC	TTR	YTA	CTY	TTA	TCA	YTY
S	**C	***	**T	T**	**G	***	**G	**T	***	**T	***	***	***	**A	***	**C	**A	**T	***	C*A	C**	**A	C*T	***	C*A
N	CCT	GTY	CTA	GCA	GGT	GCT	ATY	ACA	ATA	CTC	YTA	ACC	GAC	CGT	AAT	TTC	AAY	ACA	TCA	TTC	TTY	GAC	CCR	GCC	GGA
S	**A	**T	**T	**T	**C	**A	**C	**C	**A	C**	***	***	***	***	***	**T	**T	***	***	***	**T	***	**T	***	***
N	GGA	GGR	GAY	CCY	ATT	CTT	TAC	CAA	CAY	TTA	TTC	TGA	TTC	TTY	GGT	CAY	CCA	GAR	GTT	TAC	ATY	CTA	ATT	CTA	CCT
S	***	**G	**C	**T	**C	**C	***	***	**C	C**	***	***	***	**T	**C	**C	***	**A	***	**T	**T	***	**C	**T	***
N	GGA	TTT	GGY	ATR	ATC	TCA	CAT	GTA	GTR	ATR	CAY	TAT	GCC	ATA	AAA	AAA	GAM	ACT	TTY	GGR	ACC	TTA	GGR	ATA	ATC
S	***	***	**T	**A	***	***	***	***	**A	**G	**C	**C	***	**G	***	***	**A	***	**T	**T	***	C*T	**G	***	**T
N	TAY	GCM	ATA	TTA	GCR	ATT	GGT	ATC	TTA	GGR	TTC	ATY	GTC	TGA	GCY	CAT	CAY	ATG	TTC	ACT	GTT	GGR	ATR	GAT	GTR
S	**T	**A	***	C**	**A	***	***	**T	C*C	***	**C	**C	**A	**G	**C	**C	**C	***	***	**C	**C	**A	**A	***	**A
N	GAC	ACY	CGT	GCT	TAT	TTC	ACC	GCT	GCR	ACT	ATR	ATT	ATT	GCR	GTR	CCA	ACC	GGR	ATT	AAA	ATT	TTY	AGY	TGA	CTC
S	***	**A	**G	**C	***	**T	**T	**C	**A	**A	**A	**C	**C	**C	**A	***	**A	**T	**C	***	**C	**T	**T	***	**T
N	GCC	ACA	ATC	CAY	GGY	GCC	CGR	ATA	AAA	TAT	GAA	GCC	TCA	ATR	YTR	TGA	GCC	CTC	GGR	TTC	ATT	TTC	TTA	TTT	ACA
S	***	**G	***	**C	**A	***	**A	***	***	***	***	***	**C	**A	C*C	***	***	**A	**A	**T	***	**T	G*G	***	**G
N	GTT	GGG	GGR	CTA	ACT	GGR	ATC	GTC	TTA	TCA	AAY	TCA	TCC	TTA	GAC	ATT	ATR	CTM	CAC	GAC	ACA	TAC	TAC	GTA	GTA
S	**C	**A	**C	***	***	**G	**T	**T	C*T	***	**T	***	**A	***	***	***	**A	**T	**T	***	***	***	***	**C	***
N	GCY	CAT	TTC	CAT	TAC	GTC	CTA	TCR	66	GGA	GCC	GTA	TTC	GCC	YTA	TTC	GCC	GCY	TTC	AAY	CAT	TGR	TAC	CCC	TTA
S	**C	***	***	***	***	***	**C	**A	**G	**T	**A	**T	***	***	T**	**T	***	**A	***	**T	**C	**A	***	**A	***
N	TTT																								
S	**C																								

図24 クロアワビ(N)およびトコブシ(S)のミトコンドリアDNA・COI領域の塩基配列。数字はクロアワビ個体間で塩基置換がみられたサイトを示す。また*は、上段と同じ塩基であることを示す。

うち1カ所に1%水準で、1カ所に5%水準で有意な差異が検出されたものの、全般的に2亜種を識別する様な変異は見出されなかったことも、両亜種間の交雑の存在を支持する。

④ 集団間の遺伝的差異

本研究において、ミトコンドリアDNAの塩基配列を決

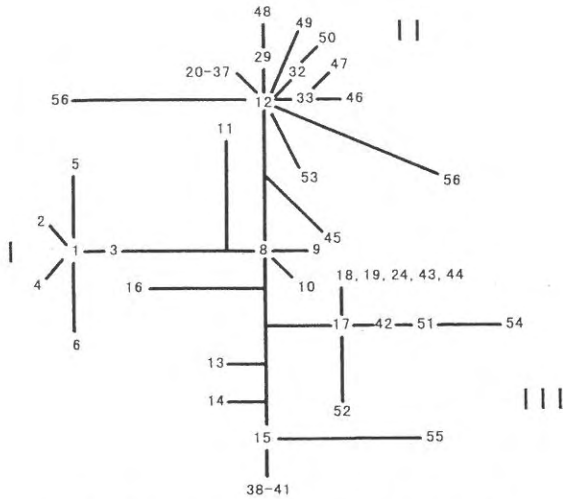


図26 クロアワビハプロタイプ間の系統関係を示す遺伝子ネットワーク

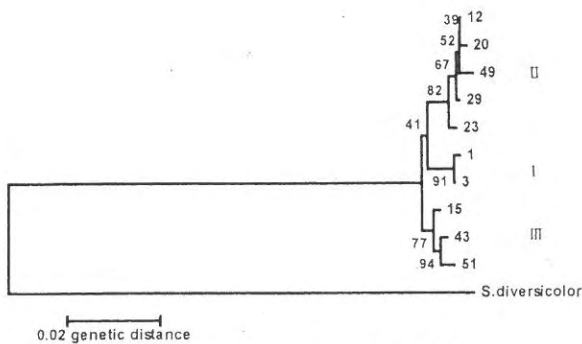


図27 近隣結合法により解析したクロアワビの優占ハプロタイプ間の系統関係

定したクロアワビ2集団及びエゾアワビ3集団間のハプロタイプ組成の差異の有意性をRoff and Bentzen (1989)の方法により検定した(表36)。③で述べた福岡のクロアワビ・エゾアワビ間の有意な差異の他に、福岡のエゾアワビと山口のクロアワビの間にのみ5%水準で有意な差異が検出された(p=0.035)。このことから、福岡で見られた亜種間の有意な違いは、福岡のクロアワビの特殊性ではなく少なくとも西部日本海産クロアワビに共通する性質によるものであることが示唆される。

⑤ 核遺伝子型との比較

10年度の委託研究では、クロアワビ類の核DNAにコードされているEF-1 α 遺伝子イントロン領域に、9カ所の種内変異サイトを報告した。これらの変異のうち、今回解析した個体間で多型となっていた6サイトについて、今年度の研究で判明したミトコンドリアDNAに基づいて分けられた3つのグループに変異が均等に分布しているか否かを、Roff and Bentzen (1989)の方法により検定した(表37)。その結果、核DNA上の変異に関して、ミトコンドリアDNAの系統に有意な偏りは生じていないことが示された。

⑥ クロアワビ類2亜種の分類学的位置付け

今回のミトコンドリアDNAの塩基配列解析を含め、これまで行った研究によりミトコンドリアDNA及び核DNAのいずれの場合にも、日本海西部のエゾアワビと

表36 Roff and Bentzen (1989)の方法による集団間の遺伝的差異の検定結果

集団	山口	福岡(エゾ)	北海道	宮城
福岡(クロ)	p>0.050	p=0.021	p>0.050	p>0.050
山口		p=0.035	p>0.050	p>0.050
福岡(エゾ)			p>0.050	p>0.050
北海道				p>0.050

表35 主要なハプロタイプ間の遺伝的距離

No.	3	12	15	20	23	29	43	49	51
1	0.0015	0.0135	0.0135	0.0150	0.0150	0.0150	0.0150	0.0165	0.0165
3		0.0119	0.0135	0.0135	0.0135	0.0135	0.0150	0.0150	
12			0.0119	0.0015	0.0044	0.0015	0.0135	0.0030	0.0150
15				0.0135	0.0104	0.0135	0.0044	0.0150	0.0059
20					0.0059	0.0030	0.0150	0.0044	0.0165
23						0.0030	0.0119	0.0074	0.0135
29							0.0150	0.0044	0.0165
43								0.0165	0.0044
49									0.0180

表37 Roff and Bentzen (1989) の方法による、ミトコンドリアDNAに基づく3グループ間の核DNA型組成の差異の検定結果。変異サイトの記号は小島 (1999) と同じ。

変異サイト	1		2		3		7		A		B	
	A	T	A	C	A	C	A	T	+	-	+	-
I	32	5	17	19	5	31	7	19	25	11	10	26
II	17	3	13	11	5	19	4	4	16	8	5	21
III	20	7	7	21	7	21	7	13	24	8	15	17
検定結果	p>0.05		p>0.05		p>0.05		p>0.05		p>0.05		p>0.05	

クロアワビの間に統計的に有意な遺伝的差異があることが示されている。宮城県や北海道産のエゾアワビが、福岡産のクロアワビと有意な差異を示さないことから、これはエゾアワビ全体の特徴ではなく西部日本海に固有の現象であると考えられる。西部日本海のエゾアワビが、特徴的な遺伝形質を持った種苗放流に由来し、この海域に元々生息していたクロアワビとの間での遺伝的均質化が、放流・定着からの時間が十分でないため十分進んでいない結果と考えられるが、生息場所や行動の違い等による、2亜種間の何らかの隔離が均質化を妨げている可能性もある。

⑤で述べた様に、核遺伝子とミトコンドリアDNAの挙動が一致せず独立していることから、西部日本海で見られる亜種間の有意な遺伝的差異が生殖的隔離により維持されているのではなく、過去の地理的隔離により形成された、遺伝的に分化した集団が、交雑により差異を減少させつつある段階にあると考えられる。また長崎産クロアワビなどに見られる独特な遺伝的特徴を持った集団から生産した種苗の放流により、エゾアワビとの差が維持、拡大している可能性もある。

本研究により日本産クロアワビ集団は、これまで考えられていた以上に大きな遺伝的多様性を持つことが示唆された。これは従来のRFLP分析では十分評価できなかったもので、より詳細に集団の遺伝的構造を把握するためには、塩基配列レベルの解析が不可欠であることを示唆している。

今回の研究から、現生クロアワビの多様化の時期は最終氷期を遥かに越え、現在まで長期にわたって多様性が維持されて来たことが示された。2亜種間に見られる形態や行動の差もこうした過程で環境や個体間相互作用を介した選択により、各地方集団に固定してきたものと考えられる。しかし、クロアワビは未だ生殖的隔離機構の獲得には至っておらず、全体としてひとつの自由交配集団であるため、人為的な移動による攪乱等で遺伝的に異なる集団の二次的な接触を生じると、元の集団の遺伝的

特性が容易く失われる可能性がある。100万年の時間に渡る進化過程で獲得された地方集団や亜種の特徴、生息地の環境に適した特性を今後も維持するため、種苗放流などによる増殖計画には、遺伝的特性への影響を最小限とする慎重な配慮が必要であろう。

⑦ まとめ

平成8年度から4年間に渡り、クロアワビの2つの亜種であるクロアワビ及びエゾアワビについて、資源管理上有用な知見を得ることを目的に、ミトコンドリアDNA及び核DNA上の遺伝子マーカーに基づく研究をおこなった。遺伝子マーカーとして用いたミトコンドリアDNA・COI領域、核DNAのEF-1 α イントロン領域の双方から、集団レベルの遺伝的構造解析に十分な量の個体変異が検出された。特にミトコンドリアDNAの塩基配列には極めて多くの変異があり、100万年以上の時をかけて遺伝的多様性が蓄積されたことが示唆された。にも関わらず2亜種間の遺伝的差異は比較的小さく、両者を完全に弁別する様な形質は見出されなかった。このことは、クロアワビとエゾアワビを同一種の亜種とする標準的な見解を支持する。

太平洋岸の天然エゾアワビ集団と九州西岸のクロアワビ種苗の間でミトコンドリアDNA及び核DNAのいずれについても、統計的に有意な差異が検出されているが、個体毎に見ると2つの遺伝子マーカーの結果は一致していなかった。もし、両者が生殖的に隔離された別種であれば、2つの遺伝子の挙動が一致することが期待されるので、検出された遺伝的差異は、別種間の違いではなく、多くの海洋生物の地方集団間に見られる差異に対応するものである。実際、クロアワビの場合と同様に亜種とされる太平洋岸のパテイラと日本海岸のオオコシダカガンガラの間のCOI領域塩基配列に基づく比較でも、クロアワビと同様な結果が得られている (Kojima et al., in preparation)。また福岡沖の天然クロアワビ集団とエゾアワビ集団の間にも、ミトコンドリアDNA及び核DNAのいずれについても、統計的に有意な差異が検出

されているが、ここでも2つの遺伝子マーカーの挙動は一致していなかった。日本海西部のエゾアワビ集団は、放流された種苗が成長した個体群に由来すると考えられるので、種苗の生産元の集団の持つ特徴的な遺伝的形質が、放流・定着からの時間が短いため、地場のクロアワビとの交配により失われることなく残されているものと考えられる。

以上のように、クロアワビとエゾアワビは未だ生殖的隔離を獲得していない、亜種の間にあると考えられる。現在では一部の海域で同所的に生息しているため、今後異なる種に分化する可能性は低い。しかし両者は、異なる歴史的背景を持ち、元来の生息域の環境に適応した遺伝的性質を蓄積しているものと考えられる。したがって海域を越えた移植には、十分な注意が必要である。

付表 解析したアワビ個体の遺伝子型 (クロアワビ)

	1	塩基置換					挿入/欠失				
		2	3	4	5	6	7	A	B		
福岡 (K型)	1	AA	AA	CC		AA	AA	TT	+-	--	
	2	AA	AC	CC	AA	AA	AA	TT	+-	+-	
	3	AT	AC	CC	AA	AA	AA	AT	++	--	
	4	AT	CC	AC	AA	AA	AA	AT	+-	--	
	5	AA	AC	CC	AA	AA	AA	AT	++	--	
	6	AA	AC	AC	AA	AA	AA		++	+-	
	7	AA	AC	CC	AA	AA	AA		+-	+-	
(E型)	1	AA	AA	CC	AA	AA	AA	TT	--	--	
	2	AT	AC	CC	AA	AA	AA	AT	++		
	3	AA	CC	CC			TT	++	++		
	4	AT	AC	CC	AA	AA	AA	AT	+-	--	
	5	AA	AC	CC				++	+-		
	6	AT	AC	AC	AA	AA	AC	AA	++	--	
	7	TT	CC	CC		AA	AA	AA	++	--	
長崎 (K型)	1	AT	AC	CC	AA	AA	AA	AT	++	--	
	2	AA	AA	AC	AA	AA	AA	TT	++	--	
	3	AT	AC	CC	AA	AA	AA	AT	+-	--	
	4	AA	AA	CC	AA	AA	AA	TT	++	--	
	5	AA	AA	CC	AA	AA	AA	TT	++	--	
	6	AA	AA	AC	AA	AA	AC	TT	+-	--	
	7	AT	AC	AC	AA	AA	AC	AT	++	--	
	8	AA	AA	AA	AA	AA	AC	TT	++	--	
(E型)	1	AA	AC	CC	AA	AA	AA	TT	++	+-	
	2	AA	AA	AC	AT	AA	AA	TT	++	--	
山口 (K型)	1	AA	CC	CC	AA	AA	AA	TT	++	++	
	2	AT	AC	CC		AA	AA	AT	++	--	
	(E型)	1	AA	AA	AA	AA	AA	AA	TT	++	--
		2	AT	CC	CC	AA	AA	AA		++	+-
	3	AT	CC	CC	AA	AA	AA		++	+-	
	4	AA	AC	AC	AA	AA	AA		++	+-	
	5	AA	AC	CC				AT	+-	--	
	6	AA	AC	AC	AA	AA	AA		++	+-	
7	AA	AC	CC	AA	AA	AA	AT	+-	--		
8	AT	CC	CC	AA	AA	AA		++	+-		

付表 解析したアワビ個体の遺伝子型 (エゾアワビ)

		塩基置換					挿入/欠失		A	B	
		1	2	3	4	5	6	7			
福岡 (K型)	1	AA	AC	CC	AA	AA	AA		+-	+-	
	2	AT	AC	AC	AA	AA	AA	AT	+-	--	
	3	AA	AA	AC				TT	+-	--	
	4	AA	AC	AC	AA	AA	AA		++	+-	
	5	AA	AC	CC		AA	AA	AT	++	--	
	6	AA	AC	CC				+-	+-		
	(E型)	1		AC	CC	AA	AA	AA		--	+-
		2	AT	CC	CC	AA	AA	AA	AT	++	+-
3		AA	AA	CC	AA	AA	AA		+-	--	
4			AC	CC	AA	AA	AA	TT	+-	--	
5		AA	AA	CC	AA	AA		+-	--		
6		AA	AC	AC	AA	AA	AA	AT	++	--	
7		AA	AC	AC		AA	AA	TT	--	--	
8		AA	AC	CC	AA	AA	AA	AT	+-	--	
福島 (E型)	1	AA	AA	CC	AA	AA	AG	TT	+-	--	
	2	AA	AA	AC	AA	AT	AA	TT	+-	--	
	3	AT	AC	CC	AT	AA	AA	AT	+-	--	
	4	AA	AA	CC	AT	AA	AA	TT	--	--	
	5	AA	AC	CC				TT	+-	+-	
	6	AT	AC	AC	AA	AA	AG	AT	++	--	
	7	AT	AC	CC	AA	AA	AA	AT	+-	--	
	8	AA	AA	AC	AA	AA	AC	TT	+-	--	
	9	AT	AC	CC	AA	AA	AA	++	--		
宮城 (K型)	1 0	AA	AA	CC	AA	AA	AA	TT	--	--	
	1	AA	CC	CC	AA	AA	AA	TT	++	++	
	2	AT	CC	CC	AA	AA	AA	AT	+-	--	
	3	AA	AA	CC	AA	AA	AA	TT	--	--	
	(E型)	1	AT	CC	CC	AA	AA	AA		++	+-
		2		AC	AC	AA	AA	AA		++	--
		3	AA	CC	CC	AA	AA	AA	TT	++	++
		4	AA	AC	CC	AA	AA	AA	TT	+-	--
		5	TT	CC	CC	AA	AA	AA	AA	++	--
		6	AA	AC	CC	AA	AA	AA		+-	+-
7		AA	AC	CC					+-	+-	

参考文献

- 1) 深川敦平・伊藤輝昭：筑前海域におけるエゾアワビの成長について，福岡県福岡水産試験場研究報告，18，47～52.(1992)
- 2) 干川 裕・元谷 怜：造成漁場におけるエゾアワビ放流貝の表面からの発見数と裏側の生息数について，北海道水産試験場研究報告，第43号，45-48(1993)
- 3) 岩手県：平成3年度放流技術開発事業報告書（放流漁場高度利用技術開発事業あわび類），1-34(1992)
- 4) 野中 忠・中川征章 他：静岡県沿岸の磯根資源に関する研究－I アワビの分布と漁場の形状，静岡県水産試験場研究報告 第2号，19-26(1969)
- 5) 野中 忠・佐々木正・翠川忠康：静岡県沿岸の磯根資源に関する研究－II アワビの住み場，静岡県水産試験場研究報告 第2号，27-30(1969)
- 6) 野中 忠・翠川忠康・佐々木正：静岡県沿岸の磯根資源に関する研究－III 住み場に関するアワビの行動，静岡県水産試験場研究報告 第2号，31-36(1969)
- 7) 太刀山 透・二島賢二：筑前海におけるアワビの種苗放流効果，福岡県水産海洋技術センター研究報告，第1号，129-136，1992.
- 8) 岩手県：平成5年度放流技術開発事業報告書（放流漁場高度利用技術開発事業 あわび・うに類），9-10
- 9) 伊藤輝昭 他：アワビ，サザエ，ウニ類のすみ場選択性について，福岡県福岡水産試験場研究報告，18，53-58(1992)
- 10) 二島賢二・伊藤輝明・恵崎摂：有用磯動物の栽培漁業化に関する研究－I クロアワビ・サザエ・アカウニの生残と成長，福岡県福岡水産試験場 研究報告，第14号，29-39 (1991)
- 11) 太刀山透・的場達人・柴田利治：栽培漁業技術推進事業 (1)エゾアワビの放流技術開発試験，福岡県水産海洋技術センター事業報告，43～46.(1994)
- 12) 門間春博：V 貝類種苗培養技術開発試験 1. エゾアワビ，北海道立栽培漁業総合センター事業報告書，27～29.(1989)
- 13) 谷口順彦・高木基裕：DNA多型と魚類集団の多様性解析，「魚類のDNA」（青木宙・隆島史夫・平野哲也編），恒星社厚生閣，東京，1997，pp.117-137.
- 14) 朝日田卓・高田秀輝・河村知彦・山田潤一・斎藤和敬・山下 洋（1996）秋田県産天然アワビと放流エゾアワビのミトコンドリアDNA塩基配列比較．平成8年度日本水産学会秋季大会
- 15) 清水節夫・水上 譲・梅沢 敏・小林正裕・藤吉英次・皆川 恵（1996）アワビ核DNAのフィンガープリント．平成8年度日本水産学会秋季大会
- 16) Kojima, S., R. Segawa and I. Hayashi (1997) Genetic differentiation among populations of the Japanese turban shell *Turbo (Batillus) cornutus* corresponding to warm current. Mar. Ecol. Prog. Ser. 150, 149-155.
- 17) 渡辺公綱・横堀伸一（1993）ミトコンドリア遺伝子の進化．日本生化学会編「新生化学実験講座 16. 分子進化実験法」化学同人 241-259.
- 18) 佐藤任弘（1987）氷河時代の日本海．「日本列島をめぐる海」岩波書店 237-247. 渡辺公綱・横堀伸一（1993）ミトコンドリア遺伝子の進化．日本生化学会編「新生化学実験講座 16. 分子進化実験法」化学同人 241-259.
- 19) Kojima, S (1998) Paraphyletic status of Polycheta suggested by phylogenetic analysis based on the amino acid sequences of Elongation factor-1 α . Mol. Phylogenetic. Evol. 9, 255-261.
- 20) 小島茂明，藤倉克則，橋本 惇，太田 秀（1997）シロウリガイ (*Calyptogena soyoeae*) 種群の分布と遺伝的構造. J AMSTEC 深海研究 13, 691-696
- 21) Raff, D. A. and P. Bentzen (1989) The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms and the problem of small samples. Molecular Biology and Evolution, 6: 539-545.
- 22) Knowlton, N. and L. A. Weigt (1998) New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. Proc. R. Soc. Lond. B265, 2257-2263.
- 23) Raymond, M. and F. Rousset (1995) An exact test for population differentiation. Evolution, 49, 1280-1283.