

ノリ葉体のアイソザイムについて

三浦和歌子・藤尾芳久・須藤俊造

Isozymes from individual thallus of *Porphyra* species.

Wakako MIURA, Yoshihisa FUJIO and Shunzo SUTO

MIURA, W., Y. FUJIO and S. SUTO 1978. Isozymes from individual thallus of *Porphyra* species. Jap. J. Phycol. 26: 139-143.

In order to clarify the genetic characteristics of populations in *Porphyra*, the authors have been looked for the genetic variations of isozymes by starch gel electrophoretical technique. In this experiment, we employed an individual of *Porphyra* to each slot. *Porphyra* used in this work were *P. yezoensis*, *P. tenera*, *P. kuniedai*, *P. pseudolinearis*. The isozymes of CAT, SOD, POD, MDH, GDH, GPI, AAT and EST were detected. Genetic variations were found in CAT and SOD. Almost populations showed *B* gene in *Sod* locus but only *P. pseudolinearis* showed *A* gene. From the distribution of *Cat* gene, the populations were divided into two groups. One of them is *P. yezoensis* and *P. tenera*, showing high *A* gene frequency, and the other is *P. kuniedai* and *P. pseudolinearis*, the latter showed an additional *C* gene.

Wakako Miura, Yoshihisa Fujio and Shunzo Suto, Department of Fishery Science, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai, 980 Japan.

アイソザイムの研究は近年著しく進展し、個体、集団、種の遺伝的問題の解明に大きく貢献すると期待される。電気泳動によって、検出されるアイソザイムは、遺伝子型を推定できる利点をもっている。イネやコムギなどの高等植物における esterase, peroxidase, α -amylase などのアイソザイムは、種の起源、系統の特徴、系統の固定度等に関する研究に用いられている¹⁻⁶⁾。

ノリで検出されたアイソザイムとして、佐藤らによる glutamate dehydrogenase⁷⁾ や菊地らによる色素蛋白がある。これらの研究は、生化学的な目的で行なわれ、多数のノリ葉体をまとめて抽出して試料としている。

ノリ類では構造が単純すぎ、かつ、その環境変異が大きいため種、地方品種、養殖品種の判別が形態面だけからは容易でない。この判別にアイソザイムに基づく集団遺伝学的方法が役立つことが期待される。この場合ノリ葉体は半数体 (n) であるので、表現型、遺伝子頻度の推算が容易であるという利点がある。この目的のためにはノリの個体別にアイソザイムを検出することが必要である。

本研究は上記の判別に役立たせるため、まず、ノリ

葉体のアイソザイムを個体別に検出する方法を確立すると共にノリ類のもつ変異の概要を捉えることを目的とした。

材料および方法

材料のノリ葉体は各地の水産試験場から分与されたもので、採取後 -20°C に保存された。この温度ではノリ葉体は生存している。供試ノリの種類はスサビノリとその変種ナラワスサビリ、アサクサノリとその変種オオバアサクサノリ、スサビノリとオオバアサクサノリの交配種「右田ノリ」、マルバアサクサノリ、ウップルイノリである。

アイソザイム検出は水平式デンブングル泳動法によった。電極槽の緩衝液として 0.155M tris- 0.043M citrate (pH 7.0) を用いた。ゲルは電極槽の緩衝液を 1/10 の濃度に希釈したものに水解デンブン (コンノート製、カナダ) を 11% 加えて作成した。泳動条件を定電圧電流 200V 、泳動時間 5 時間とした。

アイソザイム検出に際しての染色法は主として SHAW and PRASAD⁸⁾ の処方参照した。染色は Table 1 に示す 15 酵素について行なった。

結果および考察

1. 泳動用サンプルの調製法

泳動用サンプルの調製にあたって、ノリは porphyrin 等の多糖を大量に含有することが原因と思われるが、少量の水を加えてホモジナイズする常法では泳動に適したサンプルが得られない。種々検討した結果、次の方法で一応泳動用サンプルの調製に成功した。

-20°C で保存しておいたノリ葉体を海水に浸してもどした後、ろ紙で水分を除き、50 mg 以上のものを実験に供する。一葉体ずつ、ガラスホモジナイザーに入れ、脱イオン水を葉重量の2倍加えて、氷冷しつつホモジナイズする。次に再び葉重量の2倍の水を加えて同様にホモジナイズしたものを、-20°C の冷凍庫に入れて凍結する。6~16時間後、室温で解凍し3,500 r. p. m. で10分間遠心分離し、上清液を泳動用サンプルに用いる。

4倍量の水を加えたホモジナイズと凍結操作とがノリのアイソザイム検出に不可欠な事と思われる。

ホモジナイズを行なう時、脱イオン水を4倍量以下で加えると粘りがでて抽出不可能になり、4倍量以上では酵素活性が弱くなる。また凍結操作を行なわなかった場合には遠沈して得られるサンプルは粘度の高い液で、その泳動像にはテーリングが生じアイソザイムバンドの検出が困難になる。

2. 酵素の検出

Table 1. に示すように検出を試みた15酵素のうち、活性が検出されたのはCAT, SOD, POD, MDH, LAP, GDH, GPI, AAT, EST の9酵素(酵素名は略語)

Table 1. Enzyme surveyed in *Porphyra thallus*

Enzyme	Activity	Variation
Catalase (CAT)	+	+
Superoxide dismutase (SOD)	+	+
Peroxidase (POD)	+	-
Malate dehydrogenase (MDH)	+	-
Leucine aminopeptidase (LAP)	+	-
Glutamate dehydrogenase (GDH)	+ or -	-
Glucosephosphate isomerase (GPI)	+ or -	-
Aspartate aminotransferase (AAT)	+ or -	-
Esterase (EST)	+ or -	-
Malic enzyme (ME)	-	-
Alcohol dehydrogenase (ADH)	-	-
Isocitrate dehydrogenase (IDH)	-	-
Lactate dehydrogenase (LDH)	-	-
Octanol dehydrogenase (ODH)	-	-
Phosphoglucomutase (PGM)	-	-

であった。

すべての葉体でCATは陽極側に1本のバンドを示した。このバンドには、Fig. 1 に示すように移動度が異なる3種類が識別された。移動度の遅い方からバンドA, バンドB, バンドCと名付けた。これらのバンドは1つのCat遺伝子座のA, B, Cの3対立遺伝子によって支配されていると推定される。

SODは以前には tetrazolium oxidase といわれたものである。この酵素の検出は次のようにして行なった。NBT 20 mg に対して10% octanol 1.5 ml, PMS 5 mg, 0.05 M tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) 100 ml を加えた溶液にゲルを浸漬し37°Cで30分保温した後、光(白色電球100W)にさらす。バックグラウンドは紫色に染色され、染色されない白いバンドとして、SODが検出された。すべての葉体で陽極側に1本のバンドが見られた。バンドは移動度の遅いバンドA, 速いバンドBを示し、少数の変異葉体はバンドAを示した。これらのバンドはそれぞれ1つのSod遺伝子座のA, Bの2対立遺伝子により支配されていると推定される。B遺伝子はすべての種類のノリ集団で観察された。A遺伝子は気仙沼のウップルイノリの集団で観察され、この集団のA遺伝子頻度は0.67と高率であった。

PODはCATの染色時ヨード反応があまり進まない段階で陽極側に青色に染まる1本のバンドとして観察された。また、o-dianisidin 染色で検出された。Fig. 1. に示すように、すべての葉体は1本のバンドを示し変異はみられなかった。

MDHは tetrazolium salt としてNBTを用いるよりはドータイト MTT を使用した方がより強く染色された。MDHはすべての葉体で陽極側に1本のバンドがみられ明らかな変異は認められなかった (Fig. 1)。しかし、このバンドの他により遅く移動した1本のバンドあるいは、より速く移動した1本のバンドをもつものがある集団の少数の葉体で観察された。これらは異なる遺伝子座の支配をうけているものと推定される。

LAPはすべての葉体で陽極側に1本のバンドが認められ変異はみられなかった。

GDHは tetrazolium salt に MTT を用い補酵素としてNADP⁺を使用した時、活性がみられた。NAD⁺を使用した時に動物あるいは高等植物では活性がみられるのに対し、ノリではGDHの活性が観察されなかった。GDHはすべての葉体で陽極側に1本のバンドを示し、変異はみられなかった (Fig. 1)。

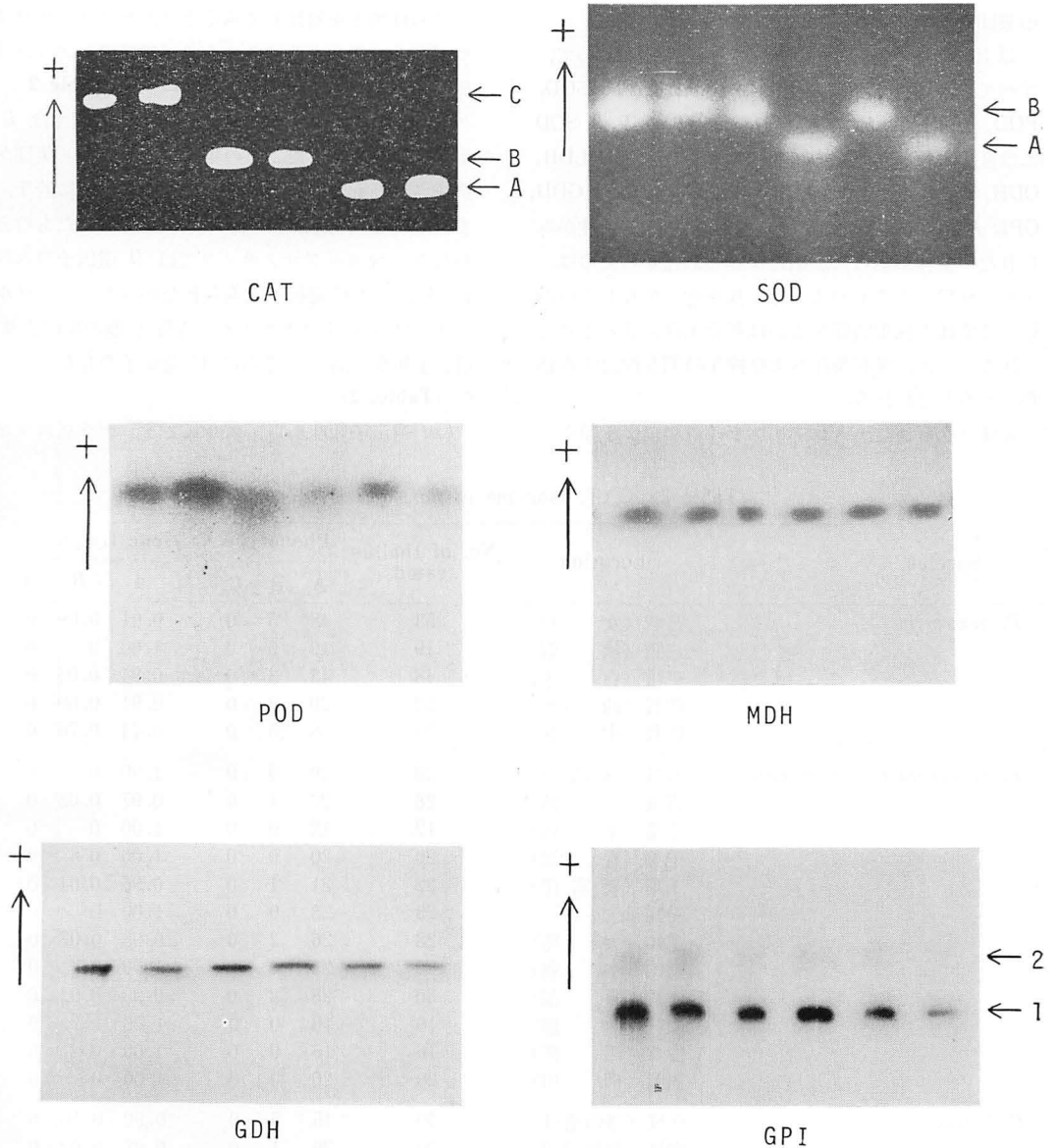


Fig. 1. Phenotype of CAT, SOD, POD, MDH, GDH and GPI isozymes from thallus of *Porphyra* in starch gel electrophoresis. Each slot represents an individual.

佐藤ら⁷⁾は多数のスナビノリ葉体をまとめてアクリルアミドゲル・ディスク電気泳動を行ないNADP⁺を補酵素として陽極側に1本のGDHのバンドを検出した。本実験の結果は彼らの結果と一致している。

GPIはglucose-6-phosphateとfructose-6-phosphateの相互転換を触媒する酵素ですべての集団で陽極側に移動度の遅いバンドと速いバンドとの2本のバンドを示した。前者のバンドは活性が強く、後者では弱かった (Fig. 1)。

AATはGlutamic oxalacetic transaminaseともいわれ染色には0.1 M phosphate緩衝液 (pH 7.0) 100 ml, 75 mg α -ketoglutaric acid, 275 mg L-aspartic acid, 500 mg PVP, 100 mg Fast garnet GBC saltの処方により活性が検出された。AATはすべての集団で陽極側に強くあらわれるバンドと弱くあらわれるバンドとの2本のバンドを示した。

ESTは α -naphthyl acetateを基質に用いて検出された。ESTは陽極側に1本のバンドを示した。少数

の集団で検出された。

以上の結果, -20°C に保存された葉体において, すべての葉体で活性が検出されたのは CAT, SOD, POD, MDH, LAP であった。この中 CAT と SOD には変異が認められた。一方, ME, ADH, IDH, LDH, ODH, PGM では活性が検出されなかった。また GDH, GPI, AAT, EST では, ある集団において活性がみられない葉体があった。活性がみられなかったのは, ノリの種類によるものではなく採集地に依存していた。従って葉体の採集時期あるいは保存条件によると思われる。今後, 保存条件および採集時期を検討する必要があると思われる。

変異のみられた CAT アイソザイムの遺伝子頻度と

ノリの種類とを対比してみるとスサビノリ, ナラワスサビノリ, アサクサノリ, オオバアサクサノリ, 「右田ノリ」で A 遺伝子頻度が高かった (Table 2)。スサビノリの中で佐賀県有明海中部産の集団では B 遺伝子頻度が高かった。この集団はスサビノリ集団から選抜されたものである。従ってスサビノリに若干, 含まれている B 遺伝子が特異的に選抜されたものと思われる。マルバアサクサノリでは B 遺伝子のみみられ A および C 遺伝子はみられなかった。ウップルイノリではマルバアサクサノリを除く他の集団より B 遺伝子頻度が高く, さらに C 遺伝子の存在がみられた (Table. 2)。

Cat 遺伝子頻度から, スサビノリ, ナラワスサビノ

Table 2. CAT. Isozyme in *Porphyra* thallus

Species	Location	No. of thallus tested	Phenotype			Gene frequency		
			A	B	C	A	B	C
<i>P. yezoensis</i>	宮城 (女 川)	53	48	5	0	0.91	0.09	0
	三重 (桃 取)	19	19	0	0	1.00	0	0
	三重 (白 子)	48	45	3	0	0.94	0.06	0
	佐賀 (西 部)	32	29	3	0	0.91	0.09	0
	佐賀 (中 部)	33	8	25	0	0.24	0.76	0
<i>F. yezoensis f. narawaensis</i>	宮城 (気 仙 沼)	20	20	0	0	1.00	0	0
	宮城 (松 島)	28	27	1	0	0.97	0.03	0
	千葉 (牛 込)	12	12	0	0	1.00	0	0
	千葉 (青 堀)	20	20	0	0	1.00	0	0
	千葉 (新 富 津)	22	21	1	0	0.96	0.04	0
	愛知-1	23	23	0	0	1.00	0	0
	愛知 (大 島)	28	26	2	0	0.93	0.07	0
	岡山 (牛 窓)	23	23	0	0	1.00	0	0
	佐賀 (東 部)	30	28	2	0	0.93	0.07	0
	佐賀 (中 部)	10	10	0	0	1.00	0	0
	佐賀 (西 部)	16	16	0	0	1.00	0	0
	福岡 (柳 川)	20	20	0	0	1.00	0	0
<i>P. tenera</i>	宮城 (気仙沼-1)	50	45	5	0	0.90	0.10	0
	宮城 (気仙沼-2)	30	29	1	0	0.97	0.03	0
	愛知 (寺 津)	45	44	1	0	0.98	0.02	0
	三重 (白 子)	15	15	0	0	1.00	0	0
	岡山 (牛 窓-1)	17	17	0	0	1.00	0	0
	岡山 (牛 窓-2)	13	13	0	0	1.00	0	0
<i>P. tenera f. tamatsuensis</i>	岡山 (牛 窓)	19	19	0	0	1.00	0	0
	福岡 (柳 川)	20	15	5	0	0.75	0.25	0
Cross*	愛知 (西 浦)	19	19	0	0	1.00	0	0
<i>P. kuniedai</i>	宮城 (気 仙 沼)	19	0	19	0	0	1.00	0
<i>P. pseudolinearis</i>	宮城 (気 仙 沼)	29	17	6	6	0.58	0.21	0.21
	宮城 (女 川)	46	21	25	0	0.46	0.54	0

* Origin of Fl. (*P. yezoensis* × *P. tenera f. tamatsuensis*)

リ, アサクサノリ, オオバアサクサノリ, 「右田ノリ」の群とマルバアサクサノリ, ウップルイノリの群とに分けられた。前者は近年選抜のすすめられているノリ群であり, 後者は選抜のあまり加えられていないノリ群である。このことが, *Cat* 遺伝子頻度の違いをもたらしたものと思われる。

細胞学の面からノリ葉体が半数体であることを鬼頭⁹⁾, 右田¹¹⁾らが示している。本実験でヘテロ型がみられなかったことにより, アイソザイムの面からもノリ葉体が半数体であることが支持された。

今後, 葉体の採集時期, 保存条件などを検討することにより活性のバラツキなどもなくし, より多くのアイソザイムを検出できるようにすればノリ類の遺伝の解明に又, 種, 地方品種, 養殖品種の判別に役立つ期待が得られた。

終わりに, ノリを分与していただいた各地の水産試験場の方々に感謝の意を表する。

引用文献

- 1) 中川原捷洋 (1976) 遺伝子の地理的分布からみた栽培イネの分化. 育種学最近の進歩 17: 35-44.
- 2) NAKAGAHRA, M., AKIHAMA, T. and HAYASHI K. (1975) Genetic variation and geographic cline of esterase isozymes in native rice varieties. Japan. J. Genetics 50: 373-382.
- 3) KATAYAMA, T. and CHERN, J.L. (1973) Zymographic studies on diploid *Oryza punctata* and its related species. Japan. J. Breed. 23: 329-333.
- 4) NISHIKAWA, K., FURUTA, Y. and GOSHIMA, H. (1975) Genetic studies of α -amylase isozymes in wheat. Japan. J. Genetics 50: 409-416.
- 5) PAI, C., ENDO, T. and OKA, H.L. (1973) Genic analysis for peroxidase isozymes and their organ specificity in *Oryza perennis* and *O. sativa*. Can. J. Genet. Cytol. 15: 845-853.
- 6) 常脇恒一郎 (1972) 高等植物における染色体工学, 化学と生物 10: 11-21.
- 7) 佐藤 実・佐藤美和・土屋靖彦 (1975) スサビノリのグルタミン酸脱水素酵素について. 日本誌. 41: 337-341.
- 8) SHAW, C.R. and PRASAD, R. (1970) Starch gel electrophoresis of Enzyme-A compilation of Recipes. Biochem. Genet. 4: 297-320.
- 9) 鬼頭 鈞 (1967) アマノリ属数種の細胞学的研究 II. 果胞子発芽体の細胞分裂. 北大水産学部彙報 18: 201-202.
- 10) —, (1974) アマノリ属の糸状体核分裂. 東北水研研究報告 (33) 101-108.
- 11) MIGHTA, S. (1967) Cytological studies on *Porphyra yezoensis* UEDA. Bull. Fac. Fish., Nagasaki Univ. 24: 55-64.

* 980 仙台市堤通兩宮町 1-1, 東北大学農学部水産育種学教室

賛助会員

社団法人北海道水産資源技術開発協会 060 札幌市中央区北3条西7-1 水産会館内
 海藻資源開発株式会社 160 東京都新宿区新宿1-29-8 財団法人公業衛生ビル内
 協和醸酵工業株式会社農水産開発室 100 東京都千代田区大手町1-6-1 大手町ビル
 全国海苔貝類漁業協同組合連合会 108 東京都港区高輪2-16-5
 K. K. 白寿保健科学研究所・原昭邦 173 東京都板橋区大山東町32-17
 浜野顕微鏡商店 113 東京都文京区本郷5-25-18
 株式会社ヤクルト本社研究所 189 東京都国立市谷保1796
 山本海苔研究所 143 東京都大田区大森東5-2-12
 弘学出版株式会社 森田悦郎 214 川崎市多摩区生田8580-61
 永田克己 410-21 田方都葦山町四日町227-1
 全漁連海苔海藻類養殖研究センター 440 豊橋市吉田町69-6
 神協産業株式会社 742-15 熊毛郡田布施町波野962-1