

アワビ類初期生態解明のための種判別技術の開発

浜口昌巳^{*1}・佐々木美穂^{*1}・堀井豊充^{*2}・清本節夫^{*3}・大橋智志^{*4}・藤井明彦^{*4}
・滝口直之^{*5}・橋本加奈子^{*6}・竹内泰介^{*7}

Development of a discrimination methods by using molecular and monoclonal antibodies techniques for *Haliotis discus discus*, *H. madaka* and *H. gigantea* during their early life stages.

Masami HAMAGUCHI^{*1}, Miho SASAKI^{*1}, Toyomitsu HORII^{*2}, Setsuo KIYOMOTO^{*3}, Satoshi OHASHI^{*4}, Akihiko FUJII^{*4}, Naoyuki TAKIGUCHI^{*5}, Kanako HASHIMOTO^{*6} and Taisuke TAKENOUCI^{*7}

Abstract Three species of abalones, *Haliotis discus discus*, *H. madaka* and *H. gigantea*, are distributed along the southwest coast in Japan and are common and commercially important shellfish in the country. Survey records show a rapid decline in fisheries production of abalones in the last decade, however, few attempts have so far been made to study the early life stages of these species. One of the bottleneck problems in the study of early life stages of these species is the difficulty to discriminate between species since their morphological features are very similar. In addition, a hybrid variety of *H. discus discus*, and *H. madaka* had been reported and this fact has made the species identification problem more complex.

The purpose of this paper was to develop a discrimination method by using molecular and monoclonal antibodies techniques for *Haliotis discus discus*, *H. madaka* and *H. gigantea* during their early life stages.

Molecular (PCR) techniques

To discriminate between *Haliotis discus discus*, *H. madaka* and *H. gigantea*, we analyzed some mitochondrial, 16S rDNA, COI (cytochrome c oxidase subunit I), Cyt b (cytochrome b) and nuclear genes, 18S and 28S rDNA, ITS (internally transcribed spacer), ferritin, and calmodulin-introns and discovered that PCR products related to calmodulin-intron were very suitable for species discrimination. A PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphisms) method was developed using calmodulin-introns. Fertilized eggs and planktonic larvae were analyzed by using 2 step PCR method.

2006年1月19日受理 (Received: January 19, 2006)

^{*1} 瀬戸内海区水産研究所 〒739-0452 広島県廿日市市丸石2-17-5 (National Fisheries Research Institute of Seto Inland Sea, Fisheries Agency, Maruishi 2-17-5, Hatsukaichi, Horisima 739-0452, Japan.)

^{*2} 中央水産研究所 〒238-0316 神奈川県横須賀市長井6-31-1 (National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency, Nagai 6-31-1, Yokosuka, Kanagawa 236-0316, Japan.)

^{*3} 西海区水産研究所 〒851-2213 長崎市多良町1551-8 (Seikai National Fisheries Research Institute, Fisheries Agency, Taira 1551-8, Nagasaki, Nagasaki 851-2213, Japan.)

^{*4} 長崎県総合水産試験場 〒851-2213 長崎市多良町1551-4 (Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries, Taira 1551-4, Nagasaki, Nagasaki 851-2213, Japan.)

^{*5} 神奈川県水産技術センター 〒238-0237 三浦市三崎町城ヶ島養老子 (Kanagawa prefectural Fisheries Technology Center, Jogashima, Misaki, Miura, Kanagawa 238-0237, Japan.)

^{*6} 千葉県水産総合研究センター 〒295-0024 千葉県安房郡千倉町平磯2492 (Chiba Prefectural Fisheries Research Center, Hiraiso 2492, Chikura, Chiba 295-0024, Japan.)

^{*7} 三重県科学技術振興センター水産研究部 〒517-0404 志摩市浜島町浜島3564-3 (Fisheries research division, Mie prefectural Science and Technology Promotion Center, Hamashima 3564-3, Hamashima, Mie 517-0404, Japan.)

Monoclonal antibodies techniques

Initially, we prepared monoclonal antibodies using samples of *H. discus discus*, *H. madaka* and *H. gigantea* veliger larvae as antigens, and obtained *H. gigantea* specific monoclonal antibodies. However, we were not able to obtain monoclonal antibodies specific to *H. discus discus* and *H. madaka*. Hence, we performed a proteome analysis between *Haliotis discus discus* and *H. madaka* and discovered several species-specific antigens. Secondly, we prepared monoclonal antibodies by using these new antigens. Consequently, we obtained monoclonal antibodies specific to each abalone species. We then surveyed the immunological specificity of these antibodies by using field samples.

Future goals

Most *Haliotis* species have a planktonic larval stage. To date, little is known about the ecology of *Haliotis discus discus*, *H. madaka* and *H. gigantea* during their early life-history stages. Consequently, the influence of the planktonic larval stage on recruitment variability is not well understood. Fine scale spatial and temporal resolution in sampling coupled with an understanding of hydrodynamics would greatly improve our knowledge of the ecology of these larvae. However, their identification, which is traditionally based on the observation of the size of larval shells and the pattern of shell surface sculptures under light and scanning electron microscopes, as well as the processing of large numbers of samples, remains a major hindrance to the study of marine invertebrate larval ecology. Antibody technique offers a powerful tool to study planktonic larval populations for two reasons: samples can be analyzed quickly and the method makes species identification easy. However, the method has a serious problem such as cross-reactivity of other mollusk species. On the other hand, PCR identification technique, although the most accurate, is time consuming and is very expensive. Therefore, we suggest a hybrid discrimination system, by combining PCR and monoclonal antibodies techniques to identify *Haliotis* species in their early life stages.

Key words: *H. discus discus*, *H. madaka*, *H. gigantea*, species discrimination, PCR-RFLP, monoclonal antibodies

国内のアワビ類の初期生態は、エゾアワビ *Haliotis discus hannai* については詳細に調べられており (Sasaki and Shephard, 1995 ; 佐々木, 2001), 数多くの先達やプロジェクト研究により, その産卵から加入にいたる過程はほぼ解明されているとって過言ではない。しかし, 一方で, 暖流系アワビ類については初期生態がほとんど解明されていない。その原因のひとつとしてエゾアワビが生息する海域では, 近縁の *Haliotis* 属がほとんど生息しないため, 発生初期の浮遊幼生および着底稚貝の調査において形態等が酷似する近縁種間の種判別が必要ないのに対し, 黒潮や対馬暖流の影響が強い海域では, 市場で見られるものだけでもクロアワビ *H. discus discus*, マダカアワビ *H. madaka*, メガイアワビ *H. gigantea*, トコブシ *H.*

diversicolor aquatilis, フクトコブシ *H. diversicolor diversicolor*, イボアナゴ *H. varia*, の6種があり, また, 市場に出ない種でもミミガイ *H. asinine*, マアナゴ *H. ovina*, コビトアワビ *H. jacnensis*, チリメンアナゴ *H. crebrisculpta* など様々な種が生息しており, 互いに生息場や餌を巡る競合関係にあるためである。したがって, 後者の海域でそれぞれの種の増殖を図るためには, まず種に応じたきめ細かな調査・研究を行い, 着底場所の選択等の環境選択性や餌料環境を明らかにし, それぞれに見合った増殖策を施す必要がある。これらの種について成貝であれば貝殻の形態等で容易に識別できるため, 調査や研究は可能であるが, 貝殻形態が不明瞭でかつ互いに酷似する発生初期の段階で多種にわたる暖流性アワビ類を識別するのはきわめて困難である。

Hayashi (1983) は、トコブシと、エゾアワビ、クロアワビ、メガイアワビ、マダカアワビの浮遊幼生について走査電子顕微鏡による詳細な観察を行い、原殻のサイズ並びにその表面構造を観察することによってそれぞれ同定可能であることを見出した。しかし、この手法では、野外で採取した幼生を同定するために、特別な技術や多大な努力を要するため、このことが、暖流性アワビ類の初期生態を解明するための調査・研究の大きな隘路となってきた。

最近、風呂田 (2000) が提唱した幼生ネットワーク理論 (メタ個体群) に基づく海洋生物の保全、並びに持続的漁業生産をあげるための様々な方策 (浜口ら, 2005) を推進するために必要な幼生動態調査 (浜口ら, 2004) と、それによる母貝集団の特定 (日向, 戸簾, 2005) を実施するにあたって、この発生初期の同定法の問題が障害になっていると考えられる。例えば、暖流性アワビ類で浮遊幼生の出現傾向を2年間調査した例 (田中, 石田, 1983) では、卵やトロコフォア幼生を含む全卵・幼生数は年による差が小さかったものの、発育の進んだベリジャー期幼生は年による差が大きかったとしている。この原因のひとつとして、ベリジャー期に至る過程で移送 (時には無効分散) された可能性が高いと考えられるが、これを解明するためには、調査対象となる海域の海水流動、及び浮遊幼生の動態調査を行う必要がある。浮遊幼生の動態が明らかになれば、千葉県等 (柴田, 2002) で進められている母貝場の造成事業においても、“母貝をどこに配置すればよいか” が明らかとなり、効率よく再生産による資源量の増大を図ることが可能になると考えられる。

このように、暖流性アワビ類について、発育段階に応じた生活史完結型のきめ細かな資源回復策を講じるためには、発生初期の浮遊幼生並びに着底初期稚貝の迅速かつ簡便な同定法の開発が必須であるといえる。

そこで、本研究では、浜口ら (2004) が解説している発生初期の貝類の様々な種判別方法の中から、簡便で再現性の高い遺伝子解析とモノクローナル抗体を用いて同定手法を開発するとともに、完成した手法について、複数の地域で採取した幼生や稚貝を用いて分析を行い、実用化のための検証を行った。

生化学的手法による種判別技術の開発の経緯

今回の技術開発では、原 (1992) によって亜種レベル以下の関係とされているクロアワビ、マダカアワビ、メガイアワビ、(エゾアワビ) をどう識別するかが問題

となる。なかでも、クロアワビとマダカアワビ (およびエゾアワビ) については、これまでの研究 (原, 1992 ; 上島ら¹, 1993) により地方品種レベルとされ、場合によっては遺伝子交流の可能性が示唆されていることから、各遺伝子領域の差は小さいと考えられる。抗体を用いた判別方法は、対象となる生物の体成分に含まれる糖鎖やタンパク質の構造による差によって行い、一般に、これらの分子は遺伝子 (なかでもミトコンドリアDNA) と比較して、変異がかなり遅く比較したい対象間に差が無いことが予想されるので、前述した状況は、この手法の開発はきわめて困難であるということを意味している。

遺伝子解析による判別法の開発経緯

海洋生物でよく使われているミトコンドリアDNAの16S ribosomal RNA (以下16SrRNAとする) やcytochrome c oxidase subunit I (以下COIとする) の塩基配列を解析すると、クロアワビ、マダカアワビおよびエゾアワビの塩基置換はほとんど無く、また、適当な制限酵素サイトに塩基置換がないことから、この領域を使ってこれら3種を簡便に識別することは困難である。An *et al.* (2005) はこれら二つの領域を利用してアワビ類の系統関係を解析している。この領域を用いる限り、トコブシとクロアワビ等の関係は明らかであるが、クロアワビ、エゾアワビ、マダカアワビの関係を論じるには塩基置換数が少なく、解像度が低いので信頼性に欠けると考えられる。

そこで、本研究では、まずこれらの領域を最初に捨てて別の領域について探索を行った。しかし、アワビ類でそれら以外のミトコンドリアDNAの情報は、本プロジェクト開始時 (平成13年) にはなかった。しかし、核DNAに関しては当時でもHuang *et al.*, 1997; Metz *et al.*, 1998 ; Muchmore *et al.*, 1998 ; Evans *et al.*, 2000 ; Selvamani *et al.*, 2000 ; Sekino and Hara 2001等のミニ、マイクロサテライト (以下MSとする) の報告があり、集団解析あるいは種間比較が試みられており、これらの手法を用いると最も近縁とされるクロアワビとエゾアワビの識別も可能である (原・関野, 2002)。しかし、これらは集団マーカーであり、本研究の目指す初期生態解明のための種判別技術は個体レベルでの識別が必要となる。一方、MSによって識別が可能ということは、核DNAのジャンク領域などに種判別が可能となる領域があると考えられた。そこで、核DNA上にコードされ、ポリジーンであるカルモジュリ

¹上島勲, 瀬川京子, 小林敬典, 沼地健一, 1993 : ミトコンドリアDNAの制限酵素分析による*Nardotis*属の類縁関係. 平成5年度日本海類学会講演要旨.

ンのイントロン多型について、(Corte-Real *et al.*, 1994) で報告されている方法を基に、当研究室で改変した手法によりクロアワビ、マダカアワビ、メガイアワビ、エゾアワビで比較することにした。

このように解析方法は決まったが、そこで新たな問題が生じた。現在、国内の貝類を分類するために最も有用な日本近海産貝類図鑑(奥谷, 2000)等による形態分類では、クロアワビとメガイアワビは識別可能であったが、クロアワビとマダカアワビについては実際の各地でマダカアワビとされている個体を見ると形態には相当変異があり、また、研究者によって見解が異なるなど分類は困難であった。また、近年、各地でマダカアワビは減少しており、試料の入手も困難であった。そこで、本研究では、とりあえず神奈川県で形態的特徴を基に選抜され、維持されてきたマダカアワビ種苗を“マダカアワビ”として使用することにした。ただし、この種苗が本当にマダカアワビであるかどうかは、今後、さらに検討を要すると思われる。

さて、このようにして解析する試料が決まったので、早速前述のカルモジュリンイントロンの多型を調べた。その結果、クロアワビ・マダカアワビとメガイアワビについては明瞭な差が認められ、また、クロアワビとマダカアワビにも差が見られるバンドがいくつか検出された。それぞれについてクローニングを行い、塩基配列を決定したところ、クロアワビ、マダカアワビ、メガイアワビ、(エゾアワビ)でそれぞれ塩基置換があり、かつ、その置換の一部が制限酵素サイトとなっているものが発見された。その領域については、便宜上MDKS領域と呼ぶことにする。このMDKS領域はカルモジュリンのイントロンの一部であり、クロアワビ、マダカアワビ、メガイアワビ、(エゾアワビ)で多少の長さの差があるものの1158-1196bp程度である。クロアワビと比較してみると、エゾアワビにこのうち5塩基、マダカアワビに7塩基、メガイアワビに11塩基置換とこの種にのみ特異的な挿入・欠損領域があることが明らかとなった。さらに、これらの置換はそれぞれ、クロアワビには制限酵素MunI、マダカアワビにはClaI、メガイアワビにはAclI、(エゾアワビにはSmaI)の認識部位があり、かつ、その部位はMDKS領域のほぼ中央部に位置しており、制限酵素処理後のバンドが確認しやすい位置であった。また、MDKS領域を標的としたPCRでは、これらのアワビ類以外の小型アワビ(ミミガイ、マアナゴ、チリメンアナゴ、イボアナゴ、トコブシ、フクトコブシ)では産物が得られなかった。

そこで、まず、MDKS領域をPCRで増幅し、産物が得られた場合、上記酵素を用いた制限酵素断片長解析(RFLP)によってクロアワビ、マダカアワビ、メガイ

アワビの識別が可能となった(Fig. 1)。この方法を用いて、共同研究者並びに協力機関である和歌山県、大分県、佐賀県から試料を採取し、解析を行ったところ、各地のアワビ類でも適用可能であることが明らかとなった。また、野外試料の一部には、形態的にもクロアワビとマダカアワビの交雑種と思われる個体が多くあり、MDKS領域による判別結果でも同様の結果が得られた。この交雑が疑われる個体の出現割合は西に行くほど高くなる傾向を示した。また、特にマダカアワビの種苗生産用親貝にはクロアワビと思われる個体が混入しており、得られた幼生がほとんどハイブリッドであると思われる場合もあった。

マダカアワビとクロアワビの関係については、(原, 1992)によると地方品種レベルであるとされており、形態的にも差異があるのでまったく同一のものではないと考えられるが、(小池ら, 1988)は暖流性アワビ類の交雑種を使って実験しており、互いに交雑可能である。これら2種の分布域は重なっているため、何らかの隔離機構が無いと互いに交雑し、種(集団)の独立性は維持できない。一般に、マダカアワビは深いところに生息していると言われており、分布水深や産卵時期を変えることによってそれぞれの集団の独立性を保ってきた可能性がある。そのため、もし仮にこのような機構で両者が棲み分けてきたならば、両者の放流場所を明確に識別して放流しないと放流効果は期待できないと考えられる。また、交雑個体は本来の種とは異なる行動・生態的特性を持つので、例えば、クロアワビとマダカアワビの交雑種を放流した場合、両種の生息場所に進出し、さらに交雑を進めることで本来のクロアワビやマダカアワビの生息場所や集団の独立性を低下させることが予想される。そこで、このような問題を

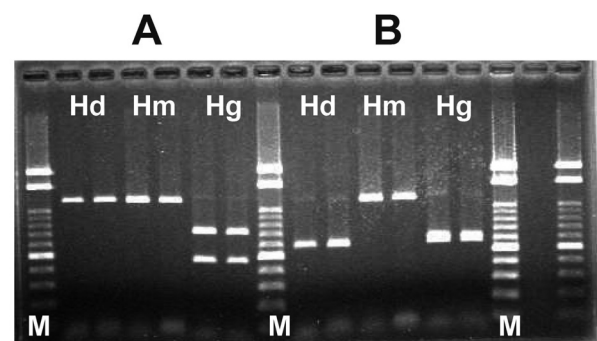


Fig. 1. Restriction fragment length polymorphisms revealed by digestion of MDKS region with restriction enzyme AclI (A) and MunI (B). Hd; *Haliotis discus discus*, Hm; *H. madaka*, Hg; *H. gigantea*, M; DNA marker (100-bp ladder).

解決するためには、親貝をしっかりと識別した後に種苗生産を行う必要があると考えた。

そこで、長崎県総合水産試験場で飼育中のクロアワビ、マダカアワビ親貝について生かしたままDNA試料を採取し、MDKS領域による識別を行った後、種苗生産を行うことが可能かどうかを検討した。すなわち、親個体について個体識別を行った後、親貝としての仕立てを行う前のクロアワビおよびマダカアワビから血リンパ球あるいは外套膜の一部を採取し、DNAを抽出してMDKS領域による識別を行い親個体とした。これらの親個体からは順調に種苗生産ができたことから、それぞれ便宜上ではあるが“純系”の幼生および稚貝を得ることが可能となった。

一方、この幼生および稚貝を用いてMDKS領域を用いた識別方法を検討したところ、浮遊幼生および着底初期稚貝では得られるDNA量が少なく、また、MDKS領域は核DNAの一部でありミトコンドリアDNAのようにコピー数が多くないことからsingle PCRでは判別が困難であることが明らかとなった。そこで、MDKS領域の検討に用いたカルモジュリンイントロンを標的としたPCRプライマーCAD-1とCAD-2を用いた2 step PCRを検討したところ、卵から着底初期稚貝までの判別が可能となり、本法は暖流性アワビ類について全生活史に適用可能な識別方法となった。

また、MDKS領域は核DNAであるために、交雑マーカーとしても機能することが期待されたが、上記の便宜上の“純系”を用いて交雑実験を行ったところ、次世代はすべてハイブリッド型、さらにその次世代はメンデルの法則とおりの出現比率となった。しかも、ク

ロアワビとマダカアワビの交雑実験を、MDKS領域を用いて識別した親貝を用いて2年間実施したところ、いずれの年も受精後の発生率が純系同士では90%を超えたのに対し、常に70%程度となりやや下がる傾向を示した。この原因については今後も検討を要するが、これらの種間の交雑は受精後の生残率を低下させる可能性があるのではないかと考えられた。アワビ類は多産型（r戦略）戦略をとるため、多くの卵や幼生を産出することが重要であるが、前述の結果から、両者の交雑もそれぞれの再生産を危うくする可能性があることが懸念される。

したがって、マダカアワビとクロアワビの生態的特徴、特に、両集団が何らかの隔離機構によって分離して成立してきたと考え、今後はその隔離機構（例えば深さによる棲み分けや産卵時期をずらす等）を解明し、それぞれに見合った場所への放流や増殖策を施す必要があると考えられる。そのためには、国内各地でクロアワビ、マダカアワビ、メガイアワビについて、浮遊幼生時期から3種を識別して調査を行い、それぞれの生態的特徴を明らかにする必要があると考えられる。そこで、MDKS領域による種苗生産用親貝の識別並びに幼生および着底稚貝の種判別マニュアルを添付するので、参照されたい（添付資料-1、添付資料-2）。

抗体による判別技術開発の経緯

前述のように、クロアワビ、マダカアワビ、メガイアワビの浮遊幼生や着底稚貝の種判別用の抗体の作成

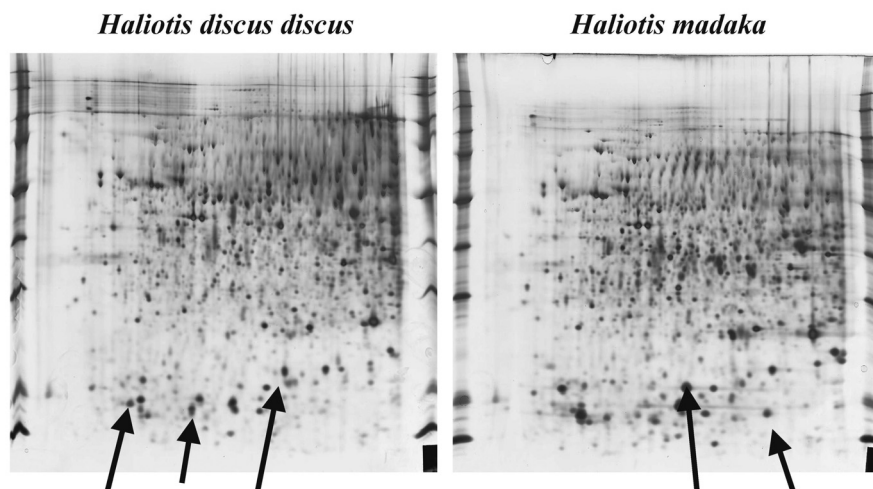


Fig. 2. Two-dementional electrophoretic patterns of veliger larvae of *Haliotis discus discus* and *H. madaka*. Arrows show the each species specific spots.

のうち、クロアワビとマダカアワビは互いに近縁であり、それぞれを識別できる抗体を作製することは困難である。したがって、今回は二次元電気泳動 (Fig. 2) を活用し、両者に特異的な抗原ならびに抗体の選別を行った。その結果、クロアワビおよびマダカアワビに特異的な抗体を作成するに至った。ただ、アワビ類幼生に抗体による識別方法を適用する場合には、幼殻の構造上の問題から、抗体を体内に浸透させるのが困難であり、二枚貝で使用されている方法をそのまま適用することはできない。この問題については第2期課題で検討しているため、第2期後には、野外で採取したアワビ類浮遊幼生の種判別を抗体で効率よく行うことが可能になる予定である。

今後の課題

MDKS領域による分析は、先にも述べたように核DNAであること、コピー数が少ないことなどから2 step PCRを余儀なくされている。この方法をより簡便にするためにはコピー数が多いミトコンドリアDNAの情報を活用すること等が考えられる。これまでに、*Haliotis*属では*H. rubra*でミトコンドリアDNAの全長解析が実施されるなど16SrRNAやCOI以外の領域の活用も可能となっている。現在、我々は、これまでに当研究室で確立した海産無脊椎動物のミトコンドリアDNA全長解析手法によって得た、ミトコンドリア全長解析結果による近縁種間の比較 (例えばYasuda *et al.*, 2006) を実施している。そこで本プロジェクト研究第2期課題では、この手法を用いてクロアワビ、マダカアワビ、メガアワビ、エゾアワビについてミトコンドリアDNAの全長解析を実施し、これによって得られる情報を活用してより簡便な浮遊幼生の種判別技術を開発すると共に、ミトコンドリアDNA中の高度変異領域を活用した新たな集団解析法の開発も進めている。また、ミトコンドリアDNA全長の情報による系統解析は、情報量が多いために信頼度が高まる。そこで、これまでにミトコンドリアの一部を利用した系統解析によっても明瞭な結論が出ていないクロアワビ、マダカアワビ、エゾアワビの関係について明らかにする予定である。

また、本課題で作成したモノクローナル抗体の一部は、アワビ類幼生の卵黄や体成分を認識するため、これを活用し、アワビ類幼生1個体の卵黄タンパク質や体成分の定量分析法を確立することが可能であり、この取り組みも第2期課題で東北区水産研究所の高見主任研究官を中心として検討されている。このように本課題の成果は、アワビ類幼生並びに着底稚貝の餌料環境を評価する手法としての応用が可能となるなど種判

別以外の研究にも役立っている。

本課題で開発した二つの種判別方法によって、これまでは困難であったクロアワビ、マダカアワビ、メガアワビの浮遊幼生が識別できるようになったことから、これらのアワビ類の産卵期に浮遊幼生の動態解明を行って、その分散・回帰機構を解明して、母貝の適正配置とその管理を行うなどの持続的生産のための戦略的な栽培漁業を行うことも可能となった。これまでアワビ類の栽培漁業は、放流種苗を採捕するという形で実施されてきたが、今後は産卵生態や初期生態に基づき、資源の再生産機構の再構築を目指す方向性で実施する必要があると考える。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり様々なご協力いただいた北海道、岩手県、宮城県、東京都、静岡県、和歌山県、大分県、愛媛県、福岡県の皆さんにお礼を申し上げます。また、貴重な試料を自ら採取していただいた沖縄県水産試験場八重山支場の久保弘文主任研究員並びに西海区水産研究所の西濱士郎主任研究官にお礼申し上げます。また、最後に本調査・研究に多大なる協力をいただいた小値賀町役場並びに小値賀漁業協同組合の諸氏には特に記して深く感謝する。

文 献

- An H. S., Jee Y. J., Min K. S., Kim B. L., and Han S. J., 2005: Phylogenetic analysis of six species of pacific abalone (*Haliotidae*) based on DNA sequences of 16s rRNA and cytochrome c oxidase subunit I mitochondrial genes. *Marine Biotechnol.*, **7**(4), 373-80.
- Evans B., White R. W., and Elliott N. G., 2000: Characterization of microsatellite loci in the Australian Blacklip abalone (*Haliotis rubra*, Leach). *Mol. Ecol.*, **9**(8), 1183-1184.
- 風呂田利夫, 2000: 内湾の貝類, 絶滅と保全—東京湾のウミナナ類衰退からの考察—. 月刊海洋号外, **20**, 74-82.
- 浜口昌巳, 佐々木美穂, 2002: 発生初期のアワビ類を判別する技術の開発. 月刊海洋, **34**(7), 517-521.
- 浜口昌巳, 粕谷智之, 日向博文, 2004b: 東京湾におけるアサリ浮遊幼生の分散. 海洋と生物, **26**, 242-250.
- 浜口昌巳, 長井敏, 安田仁奈, 2005: 新しい手法開発によるメタ個体群動態解明. 月刊海洋, **37**(2), 125-132.

- 浜口昌巳, 粕谷智之, 日向博文, 古川恵太, 2004a : 内湾・内海域におけるベントス幼生の分散・回帰 : 東京湾におけるアサリを例に. 日本プランクトン学会誌, **51(2)**, 120-125.
- 原素之, 1992 : アワビの育種—アワビにおける選抜・交雑育種—. 水産育種, **18**, 1-12.
- 原素之, 関野正志, 2002 : アワビ栽培漁業におけるマイクロサテライトDNA分析の応用. 月刊海洋, **34(7)**, 512-516.
- Hayashi I., 1983 : Larval shell morphology of some Japanese haliotids for the identification of their veliger larvae and early juveniles. *Venus*, **42(1)**, 49-58.
- Huang B., Chai Z., Hanna P. J., and Gough K. H., 1997: Molecular sequences of two minisatellites in blacklip abalone, *Haliotis rubra*. *Electrophoresis*, **18(9)**, 1653-1659.
- 日向博文, 戸簾幸嗣, 2005 : 東京湾におけるアサリ幼生の移流過程の数値計算. 水産総合研究センター研究報告別冊, **3**, 59-66.
- 小池康之, 孫 振興, 隆島史夫, 1988 : アワビ交雑種稚貝の摂餌と成長について. 水産増殖, **36(3)**, 231-235.
- Metz E. C., Robles-Sikisaka R., and Vacquier V. D., 1998 : Nonsynonymous substitution in abalone sperm fertilization genes exceeds substitution in introns and mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **95(18)**, 10676-81.
- Muchmore M. E., Moy G. W., Swanson W. J., and Vacquier V. D., 1998 : Direct sequencing of genomic DNA for characterization of a satellite DNA in five species of eastern Pacific abalone. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **7(1)**, 1-6.
- 奥谷喬司, 2001: 日本近海産貝類図鑑, 東海大学出版, 1173pp.
- 佐々木良, 2001 : エゾアワビの加入機構に関する生態学的研究. 宮城水産研報, **1**, 1-86.
- Sasaki R. and Shepherd S. A., 1995 : Larval dispersal and recruitment of *Haliotis discus hannai* and *Tegula* spp. On Miyagi coast, Japan. *Mar. Freshwater Res.*, **46**, 519-529.
- Sekino M. and Hara M., 2001 : Microsatellite DNA loci in Pacific abalone *Haliotis discus discus* (Mollusca, Gastropoda, Haliotidae). *Mol. Ecol. Notes*, **1**, 8-10.
- Selvamani M. J., Degnan S. M., Paetkau D., and Degnan B. M., 2000 : Highly polymorphic microsatellite loci in the Heron Reef population of the tropical abalone *Haliotis asinina*. *Mol. Ecol.*, **9(8)**, 1184-1186.
- 田中種雄, 石田修, 1983 : アワビ浮遊幼生の出現動向について. 千葉水試研報, **41**, 1-10.
- Yasuda N., Hamaguchi M., Sasaki M., Nagai S., Saba M., and Nadaoka K., 2006 : Complete mitochondrial genome sequences for crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* and *Acanthaster brevispinus*. BMC Genomics (In press)

添付資料－1 種苗生産に用いるアワビ親貝用の種判別マニュアル

用意するもの：1.5～3mLのシリンジ，滅菌したプラスチックチューブ（1.5mL），HotStar Taq DNA polymerase（Qiagen 203203等），DNeasy Tissue Kit（Qiagen 69504等），1.5mLのプラスチックチューブが架かる卓上遠心機，0.2mLPCRチューブ，サーマルサイクラー

腹足部からシリンジで血リンパ液を採取。外套膜縁辺部 5mm 程度でも良いが，種判別は血リンパ液の方が良好な結果が得られる

採集した血リンパ液を滅菌プラスチックチューブに入れ 3000rpm 程度で遠心操作を行い，上清を捨てる。外套膜縁辺部はこの操作は必要ない。

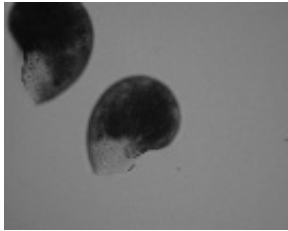
残存した細胞あるいは外套膜縁辺部から DNeasy Tissue Kitで DNA の抽出

PCR条件
95°C 15分間
95°C 30秒間
65°C 30秒間 35サイクル
72°C 45秒間
72°C 5分間
HotStart Taq
Primer MDKS-1 : TCAACGAGGTAGATGCTGATGGTGAGTGC
MDKS-1R : GTTGACGATATGTTGTTGCCAGCGTTTCGA

目的に応じて制限酵素（AclI;メガイアワビのみ切断，ClaI;マダカアワビのみ切断，MunI;クロアワビとメガイアワビ両種切断）を選択し，PCR産物に規定量を加え，それぞれの酵素に応じた温度と反応時間で処理する。その後，電気泳動を行い Fig.2 に示すバンドパターンを参照し，種判別を行う。クロアワビとマダカアワビの識別の際には，両者の交雑によって生じたと考えられる ClaI と MunI でともに切断される個体が出現するので注意を要する。

添付資料-2 アワビ類浮遊幼生および着底初期稚貝の種判別マニュアル

用意するもの：24穴マイクロプレートか滅菌したプラスチックチューブ（1.5mL）、ExTaq DNA polymerase (TaKaRa), HotStar Taq DNA polymerase (Qiagen 203203等), DNeasy Tissue Kit (Qiagen 69504等), 0.2mLPCRチューブ, サーマルサイクラー



野外で採取した試料からアワビ類幼生を取り出し、一個体ずつ24穴マイクロプレートか滅菌プラスチックチューブに入れる。



幼生および稚貝からDNeasy Tissue KitでDNAの抽出



PCR条件 (first step)

95°C 1分間
 95°C 30秒間
 55°C 30秒間 30サイクル
 72°C 45秒間
 72°C 5分間
 Ex Taq

Primer CAD-1 : CCGAATTCCAAGACATGATCAACGAGGT
 CAD-2 : CCGAATTCATCTTGCGGCCATCAT

PCR条件 (second step)

95°C 15分間
 95°C 30秒間
 65°C 30秒間 30サイクル
 72°C 45秒間
 72°C 5分間
 HotStart Taq

Primer MDKS-1 : TCAACGAGGTAGATGCTGATGGTGAGTGC
 MDKS-1R : GTTGACGATATGTTGTTGCCAGCGGTTTCGA



目的に応じて制限酵素 (AclI;メガイアワビのみ切断, ClaI;マダカアワビのみ切断, MunI;クロアワビとメガイアワビ両種切断) を選択し, PCR産物に規定量を加え, それぞれの酵素に応じた温度と反応時間で処理する。その後, 電気泳動を行いFig. 2に示すバンドパターンを参照し, 種判別を行う。クロアワビとマダカアワビの識別の際には, 両者の交雑によって生じたと考えられるClaIとMunIでともに切断される個体が出現するので注意を要する。