

学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 森 拓也
Name

学位論文題目： 遺伝的多様性および血清中総炭水化物含量を用いたアコヤガイ母貝育種
Title of Dissertation に関する研究

学位論文要約：
Dissertation Summary

第 1 章

我が国でのアコヤガイ真珠生産には 1970 年代までは天然貝を母貝として用いていたが、需要量の増大により人工的に生産された貝（人工貝）が普及した。生産技術が確立された後は、大珠の真珠作出のために大型に生育するように育種が進められた。

1994 年にアコヤガイ赤変病（以下、赤変病）がまん延し、従来の人工貝が大量へい死するようになってからは、赤変病に耐性があるとされる中国産アコヤガイと従来の日本産アコヤガイを交雑した貝（交雑貝）や、赤変病に耐病性のある貝の育種が進められた。これらによって、一定の品質を有した真珠を安定的に生産できるようになった。しかし、育種のために継代を進めると、生育不良や生残率の低下が顕在化するようになった。また、中国貝については、防疫や遺伝資源の持ち込み制限等により新たに大量に導入することが難しくなった。

そこで本研究では、大きく 3 つの課題について取り組むこととした。第一にマイクロサテライト DNA マーカーによるアコヤガイ集団の遺伝的多様性の評価、第二に継代による表現形質への影響評価、第三に天然集団からのアコヤガイ選抜育種である。

課題に対して、中国産アコヤガイ集団解析をおこなったマイクロサテライト DNA マーカーが、日本産アコヤガイ集団にて解析可能かどうか検証をおこなった（第 2 章）。次に、使用可能であることが判明したマーカーを用いて、遺伝的多様性が異なる集団を 8 集団作出して、それぞれの生育および真珠品質の検証をおこなった（第 3 章）。また、天然集団から選抜育種するために、優良な親貝を選抜するための手法について、血清中の総炭水化物含量（以下、血清中総炭水化物含量）の推移および選抜の可能性について検証をおこなった（第 4 章）。そして、開発した手法を用いて宇和海の天然貝から優良・劣悪な貝を選抜して、それぞれの次代を作出して生育の検証をおこなった。同時に、優良な集団は従来の選抜家系とともに真珠生産をおこない、真珠品質の検証をおこなった（第 5 章）。最後に、遺伝的多様性および血清中総炭水化物含量に着目しつつ、今後のアコヤガイ育種について総括をおこなった（第 6 章）。

第 2 章

本研究では、アコヤガイ種内の集団単位の解析のためにより検出感度の高いマイクロサテライト DNA 多型の探索を行い、信頼できる遺伝子座を用いて上記の諸問題を解決するための手法開発を試みた。すなわち、宇和海を中心とした愛媛県宇和島市 (KM) および愛南町 (AI)、高知県宿毛市 (SK) および土佐清水市 (TS)、日本海での分布の北限である石川県産 (IS) の天然アコヤガイ集団で、中国で開発されたマイクロサテライト DNA 増幅用プライマーを用いて集団解析用に使用できる遺伝子座の探索を試みた。

ナルアリル頻度が 0.2 以下のマーカー (HNUPM041 および HNUPM111) によるアリル頻度、観察ア

(様式 5) (Style5)

リル数、有効アレル数、ヘテロ接合体率、Hardy-Weinberg (HW) 平衡の検証結果、近交係数等を Table1 に示す。

Table 1 Allele frequencies and genetic variability for wild samples of *Pinctada fucata martensii*

| | IS (2010) | IS (2011) | IS (2013) | ST (2011) | KM (2011) | AI (2011) | AI (2013) | SK (2012) | TS (2012) |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| n | 32 | 32 | 35 | 23 | 24 | 33 | 33 | 31 | 33 |
| HNUPM041 | | | | | | | | | |
| 217 | 0.188 | 0.109 | 0.214 | 0.109 | 0.208 | 0.106 | 0.106 | 0.016 | 0.076 |
| 218 | 0.281 | 0.328 | 0.243 | 0.304 | 0.333 | 0.303 | 0.288 | 0.290 | 0.394 |
| 219 | 0.172 | 0.078 | 0.157 | 0.087 | 0.125 | 0.045 | 0.167 | 0.210 | 0.167 |
| 220 | 0.125 | 0.328 | 0.171 | 0.283 | 0.271 | 0.364 | 0.348 | 0.323 | 0.121 |
| 224 | 0.109 | 0.094 | 0.086 | 0.043 | 0.000 | 0.030 | 0.000 | 0.000 | 0.045 |
| 225 | 0.016 | 0.000 | 0.014 | 0.043 | 0.021 | 0.106 | 0.015 | 0.081 | 0.106 |
| Minor alleles | 0.109 | 0.063 | 0.115 | 0.131 | 0.042 | 0.046 | 0.076 | 0.080 | 0.091 |
| na | 9 | 8 | 10 | 9 | 6 | 9 | 8 | 7 | 10 |
| ar | 8.4 | 7.4 | 8.8 | 9.0 | 6.0 | 8.0 | 7.1 | 6.5 | 9.2 |
| ho | 0.656 | 0.563 | 0.857 | 0.435 | 0.458 | 0.576 | 0.636 | 0.645 | 0.727 |
| he | 0.823 | 0.756 | 0.829 | 0.798 | 0.754 | 0.750 | 0.754 | 0.757 | 0.781 |
| ho/he | 0.797 | 0.745 | 1.034 | 0.545 | 0.608 | 0.768 | 0.844 | 0.852 | 0.931 |
| Fis | 0.203 | 0.255 | -0.034 | 0.455 | 0.392 | 0.232 | 0.156 | 0.148 | 0.069 |
| HNUPM111 | | | | | | | | | |
| 332 | 0.000 | 0.031 | 0.029 | 0.043 | 0.021 | 0.047 | 0.015 | 0.161 | 0.045 |
| 336 | 0.063 | 0.016 | 0.000 | 0.022 | 0.146 | 0.078 | 0.076 | 0.048 | 0.030 |
| 340 | 0.063 | 0.094 | 0.100 | 0.022 | 0.042 | 0.047 | 0.000 | 0.016 | 0.045 |
| 344 | 0.172 | 0.188 | 0.143 | 0.022 | 0.063 | 0.016 | 0.030 | 0.048 | 0.045 |
| 348 | 0.094 | 0.063 | 0.114 | 0.087 | 0.167 | 0.141 | 0.106 | 0.081 | 0.091 |
| 352 | 0.031 | 0.094 | 0.129 | 0.152 | 0.063 | 0.063 | 0.076 | 0.032 | 0.030 |
| 356 | 0.063 | 0.047 | 0.071 | 0.043 | 0.021 | 0.141 | 0.030 | 0.097 | 0.030 |
| 360 | 0.047 | 0.047 | 0.043 | 0.087 | 0.104 | 0.078 | 0.121 | 0.145 | 0.136 |
| 364 | 0.031 | 0.078 | 0.100 | 0.000 | 0.083 | 0.016 | 0.061 | 0.000 | 0.000 |
| Minor alleles | 0.436 | 0.342 | 0.271 | 0.522 | 0.290 | 0.373 | 0.485 | 0.372 | 0.548 |
| na | 23 | 22 | 19 | 24 | 19 | 26 | 21 | 19 | 24 |
| ar | 19.8 | 19.1 | 16.2 | 24.0 | 18.6 | 21.5 | 19.0 | 17.5 | 20.9 |
| ho | 0.750 | 0.875 | 0.743 | 0.826 | 0.875 | 0.969 | 0.697 | 0.645 | 0.576 |
| he | 0.925 | 0.918 | 0.912 | 0.932 | 0.912 | 0.927 | 0.934 | 0.915 | 0.936 |
| ho/he | 0.811 | 0.953 | 0.815 | 0.886 | 0.959 | 1.045 | 0.746 | 0.705 | 0.615 |
| Fis | 0.189 | 0.047 | 0.185 | 0.114 | 0.041 | -0.045 | 0.254 | 0.295 | 0.385 |

See Table 1 for abbreviation of populations

n: number of individuals analyzed, na: number of different alleles, ar: allelic richness,

ho: heterozygosity observed, he: heterozygosity estimated, Fis: inbreeding coefficient,

Bold face in ho/he: departure from Hardy-Weinberg equilibrium; $P < 0.05$.

結果は多型性に富んでいたが、Hardy-Weinberg 平衡からいくつか逸脱がみられた。この平衡からの逸脱は、アロザイムによるアコヤガイ集団解析や、DNA 多型解析による海外のシロチョウガイやクロチョウガイのような真珠貝類を始め多くの二枚貝において同様の報告が得られているが、原因についてはいずれも不明となっている。本試験でも Hardy-Weinberg 平衡からの逸脱がみられたものの、他の二枚貝と同じような傾向が見られたことから、中国産アコヤガイで開発されたマーカーを用いた日本産アコヤガイのマイクロサテライト DNA 分析は集団の遺伝的多様性を把握できるものと考えられた。

第 3 章

本章では、遺伝的多様性と継代集団の生育に関係があるかどうかを検証することを試みた。

方法は、日本産アコヤガイ 2 系統 (A および B) から雄親を共通として 1 対 1 交配で、同系交配 (A1 ~A4)、異系交配 (B1~B4) を作出した。飼育管理をおこない、成長や生残率を調査した。また、中国産アコヤガイの集団解析から得られたマイクロサテライト DNA マーカーを用いて調査遺伝的多様性を評価し、成長との相関関係を検討した。また、作出したアコヤガイを母貝として用いて真珠生産をおこない、真珠品質にも遺伝的多様性の影響があるかを調査した。

家系別の成長と生残率を Fig.1 (a~c) に示す。

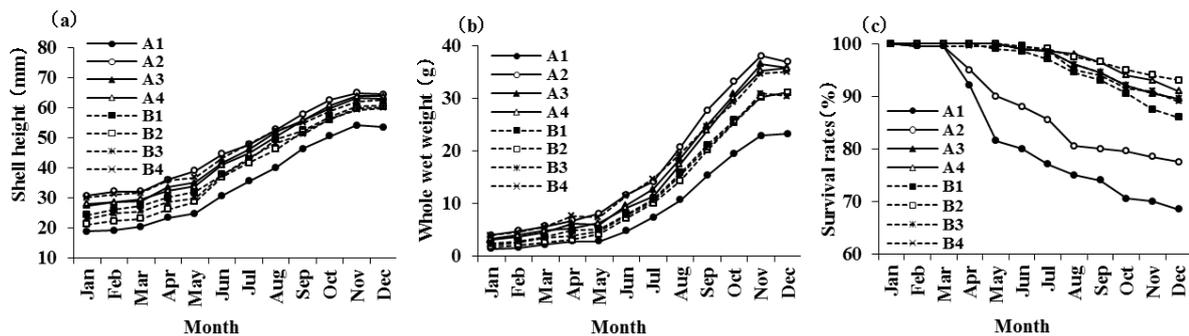


Fig. 1

殻高 (a) の成長は、家系別では家系 A1 の成長が最も低く、家系 A2 の成長が最も高かった。統計的な有意差は、家系 A1 に対して A2、A3、A4、B1、B3、B4、家系 A2 に対して B2、B3 間において測定終了時まで有意な差が引き続き確認された (Tukey-Kramer $p < 0.01$)。

全湿重量 (b) の成長は、殻高同様に家系 A1 の成長が最も低く、家系 A2 の成長が最も高かった。統計的な有意差は、家系 A1 に対して A2、A3、A4、B4、家系 A2 に対して B1、B2、B3 間において測定終了時まで有意な差が引き続き確認された ($p < 0.01$)。

生残率 (c) は、各家系別で最も低い生残率は家系 A1 で、4 月から 12 月には $68.5 \pm 0.7\%$ であり、最も高い生残率は家系 B2 で、7 月から低下し 12 月には $93.0 \pm 2.8\%$ であった。統計的な有意差は殻高、全湿重量のように引き続きは確認できなかった。

次に、8 家系の遺伝的多様性と測定した形質との関係をみてみると、最も顕著なものは、20 月齢の母貝の全湿重量の平均 (Fig.2) とヘテロ接合体率の期待値の関係であった。両者の相関係数を Pearson's correlation coefficient test から求めると $R^2 = 0.777$ であり、ヘテロ接合体率の期待値 (He) と全湿重量 (g) の間に正の相関があり、統計的に有意であることが確認された ($p < 0.01$)。

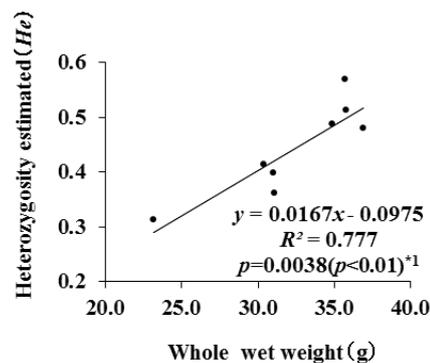


Fig. 2

真珠品質について、真珠採取率、全重量、巻き厚等を調査したが、家系間および産地間において、有意差を確認することができなかった。

これらから、親の選別によっては短時間の世代で近親交配の弊害が顕われる可能性が示された。また、本研究で用いた 4 座のマーカーの遺伝性を確認する試験から F1 集団の遺伝的多様性に相関がみられたことから、親集団のマイクロサテライト DNA マーカーによる親具管理によって、近親交配が要因の 1 つとして考えられる劣性形質の発現を回避できる可能性が示唆された。

第 4 章

本章では、遺伝的多様性を維持しつつ育種を続けるために、地先海域から栄養状態の優れた優良なアコヤガイを選抜することを目的とし、アコヤガイ血清中の炭水化物量（血清中総炭水化物含量）を、アンスロン法を用いて簡便に測定する手法の開発を試みた。

方法は、日本産アコヤガイおよび中国産アコヤガイの血清中の炭水化物含量およびグリコーゲン含量を周年に渡って評価した。次に、血清中総炭水化物含量と閉殻筋グリコーゲン含量との相関関係を評価した。最後に天然貝を用いて、血清中総炭水化物含量による選抜を試みた。

周年に渡っての結果を Fig.3 (a, b) に示す。

血清中総炭水化物含量 (a) においては、中国産アコヤガイが日本産アコヤガイより高く推移した。統計的有意差は、周年に渡って有意差は確認されなかったが、6 月から 8 月において有意な差が確認された。また、9 月から翌 2013 年の 2 月まで有意な差が確認されなかったものの、翌年 3 月および 4 月において有意な差が確認された (Welch's t-test $p < 0.05$)。

閉殻筋グリコーゲン含量 (b) においては、血清中総炭水化物含量同様に中国産アコヤガイが日本産アコヤガイより高く推移した。周年に渡って有意差は確認されなかったが、2013 年 4 月を除き 2012 年 6 月から翌 2013 年 5 月において有意差 ($p < 0.05$) が確認された。

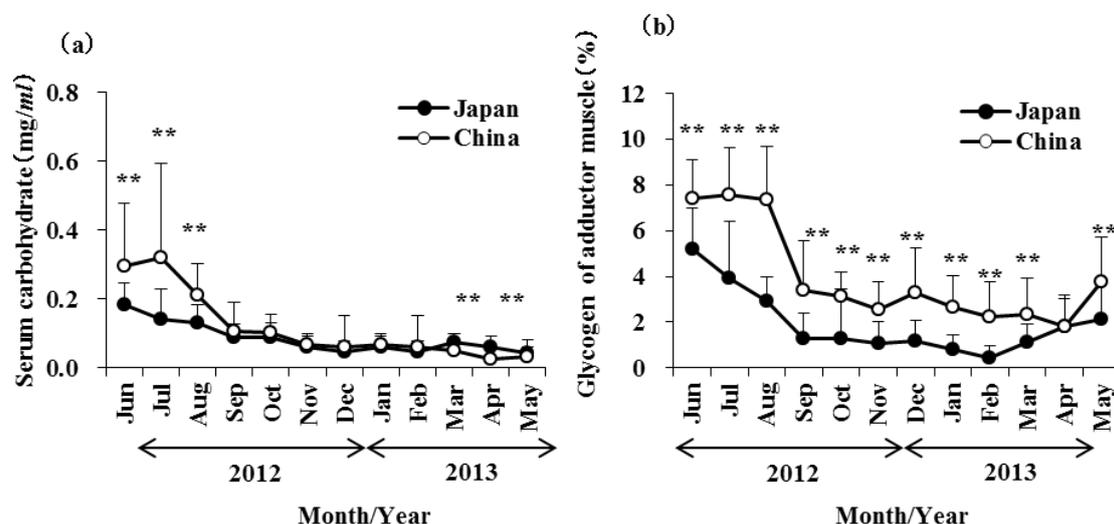


Fig. 3

血清中総炭水化物含量と閉殻筋グリコーゲン含量との関係を、両系統で季節変化を調べた全ての個体の測定値を用いて Spearman's correlation coefficient by rank test から相関係数を求めた結果を Fig. 4 に示す。

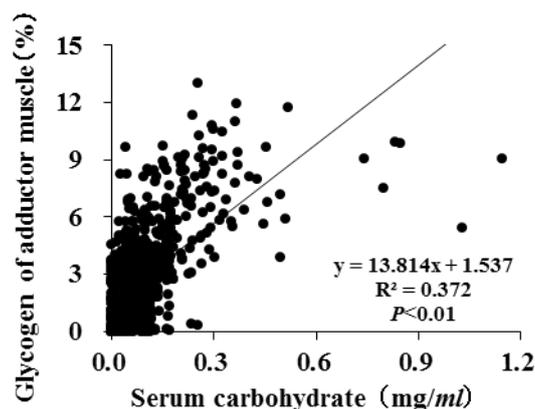


Fig. 4

血清中総炭水化物含量と閉殻筋グリコーゲン量の相関係数は $r=0.61$ であった。このことから、血清中総炭水化物含量と閉殻筋グリコーゲン含量間で相関関係が確認された ($p<0.01$)。

2012年9月と2013年1月の天然貝の血清中総炭水化物含量のヒストグラムを Fig. 5 に示す。2012年9月にはほぼ正規分布に近く平均値は 0.13 mg/ml であったが、2013年1月にはごく低い値を示す個体が多く偏った分布となり平均値は 0.06 mg/ml であった。含有量別の割合では、9月では $0.1\sim 0.15 \text{ mg/ml}$ 付近に全体の 38.9% にあたる 70 個体が分布していたが、翌年1月には $0\sim 0.05 \text{ mg/ml}$ 付近に全体の 48.3% にあたる 87 個体が分布していた。2012年9月時点で血清中総炭水化物含量の上位 10% を高含量群、下位 10% を低含量群として分け、両群の翌年1月時点の値を Table 2 に示す。高含量群は翌年1月時点においても、低含量群より血清中総炭水化物含量が有意に高い ($p<0.01$) 結果となった。

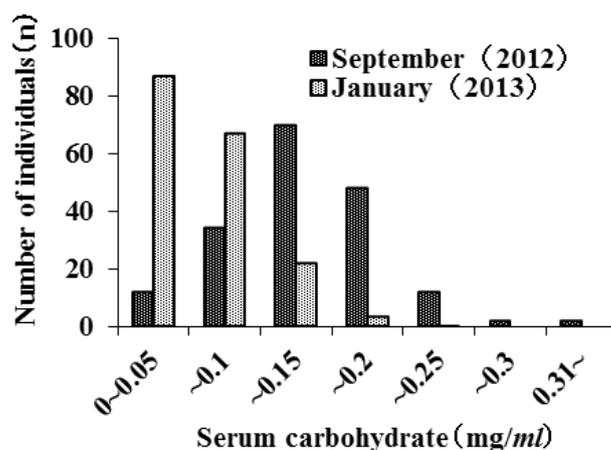


Fig. 5

Table 2 Comparison of mean and sd of serum carbohydrate and serum protein (mg/mL) in two carbohydrate groups (high and low) which were divided by the criteria of values of serum carbohydrate in September 2012.

| Date | Sep-12 | | | Jan-13 | | |
|---------------------|---------------------|----------------|----------------|---------------------|----------------|----------------|
| Group ^{*1} | High group | Low group | All | High group | Low group | All |
| Serum carbohydrate | $0.23\pm 0.04^{**}$ | 0.04 ± 0.02 | 0.13 ± 0.05 | $0.07\pm 0.04^{**}$ | 0.04 ± 0.04 | 0.06 ± 0.04 |
| Serum protein | $0.93\pm 0.29^{**}$ | 0.45 ± 0.21 | 0.65 ± 0.27 | $0.57\pm 0.25^{**}$ | 0.31 ± 0.16 | 0.43 ± 0.22 |

*1 The criteria for grouping of carbohydrate was higher and lower 10% individuals.

*2 Asteriskes (**) show significant differences between high and low groups in each month at $p < 0.01$

これらの結果からアンスロンを用いたアコヤガイの血清中総炭水化物含量は特定の糖質などの有機化合物を測定していないものの、生理状態の優れたアコヤガイを選抜する手法になりうると考えられた。

第 5 章

本章では、開発した選抜指標が次代に影響を与えるかどうかを検証するために、血清中総炭水化物含量を指標として親貝を選別し種苗生産した。種苗生産後は生育や生理状態を調査し、生育が優れていた家系については真珠生産の試験をおこない製品の評価をおこなった。

方法は、2013 年 1 月の血清中総炭水化物含量が上位 25%の値を示した貝を高含量区、下位 25%の値を示した貝を低含量区とし、高含量区から 2 家系 (High 1,2)、低含量区から 2 家系 (Low 1,2) を作出した。作出後は、生育および真珠品質の評価をおこなった。

2014 年 3 月から同年 12 月までの各月の 4 家系の平均殻高 (a) (mm±標準偏差) および平均全湿重量 (b) (g±標準偏差) を Fig.6 に示す。

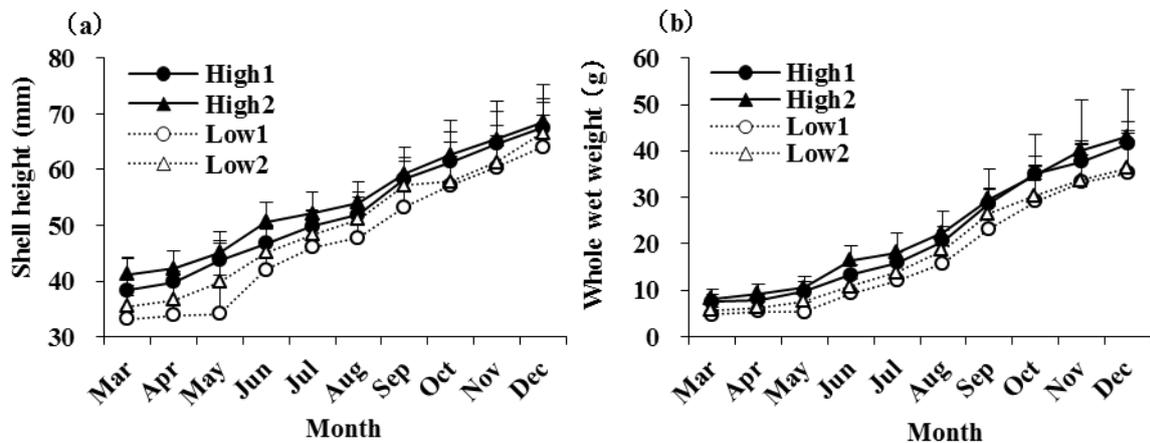


Fig. 6

殻高および全湿重量ともに、高含量区由来の家系が低含量区由来の家系に比べて高く成長した。家系別の成育では平均殻高同様、家系 High 2 が最も高く、家系 Low 1 が最も低く推移した。統計的有意差は、殻高では家系 High 2 と Low 1 間においては測定終了時まで有意な差が継続して確認された (Tukey-Kramer $p < 0.01$)。全湿重量では、家系 High 1 と Low 1 間、家系 High 2 と Low 1 間においては測定終了時まで有意な差が継続して確認された ($p < 0.01$)。

2014 年 7 月から同年 12 月までの各月の家系別の血清中総炭水化物含量 (mg/mL) および閉殻筋グリコーゲン含量 (%) を Fig.7 に示す。

血清中総炭水化物含量および閉殻筋グリコーゲン含量ともに、高含量区由来の家系が低含量区由来の家系に比べて高く推移した。

血清中総炭水化物含量家の家系別の評価は、家系 High 1 が最も高く、Low 1 および Low 2 が同程度の推移を示した。(Fig. 7 (a))。含量が減少した 10 月以降では、家系 High 1 と Low 1、Low 2 間、家系 High 2 と Low 1、Low 2 間においては 12 月の測定終了時まで有意な差が継続して確認された ($p < 0.01$)。

閉殻筋グリコーゲン含量の家系別の評価は、家系 High 2 が最も高く、家系 Low 1 が最も低く推移した (Fig. 7 (b))。減少が確認された 10 月以降、家系 High 2 と Low 1、Low 2 間においては 12 月の測定終了時まで有意な差が継続して確認された ($p < 0.01$)。

(様式 5) (Style5)

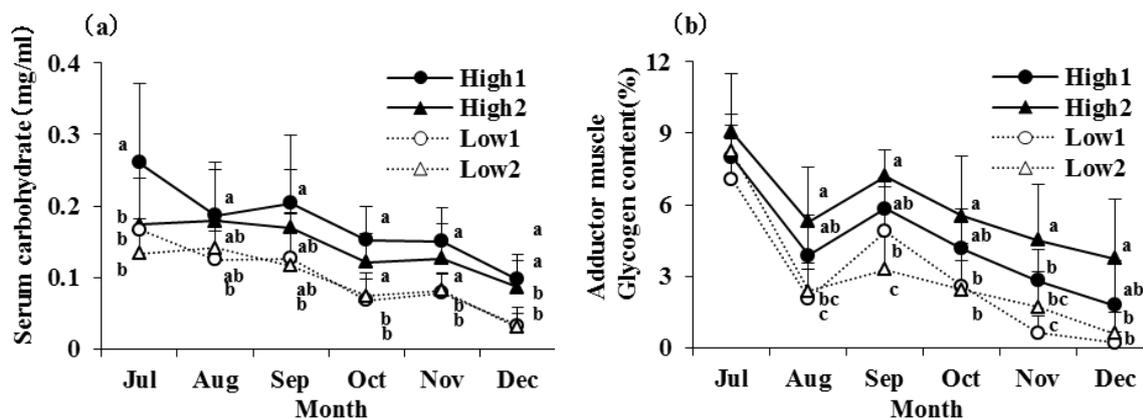


Fig.7

高含量由来の家系 (High 1) と継代された日本産アコヤガイ、中国産アコヤガイ由来の 2 家系を母貝に用い真珠生産試験をした結果を Table 3 に示す。高含量由来の家系は、生産された真珠のうち高品質な真珠が得られる割合が中国産アコヤガイより優れ、日本産アコヤガイに劣る結果であった。また、巻き厚については他の 2 家系に比べて高い傾向にあった。

Table 3 Quality of pearls harvested from three different families of pearl oyster

| Culture site | Family | Number of round pearls | Diameter ^{*1,2} (mm) | Weight of a pearl (g) | Thickness of the nacreous layer ^{*3} (mm) | High-quality pearl rate ^{*4} (%) |
|--------------|--------|------------------------|-------------------------------|-----------------------|--|---|
| Shimonada | High 1 | 67 | 8.32±0.30 (a) | 0.84±0.08 (a) | 1.21±0.30 (a) | 25.40 |
| | Japan | 57 | 8.15±0.25 (b) | 0.79±0.08 (b) | 1.04±0.25 (b) | 40.40 |
| | China | 6 | 8.26±0.29 (ab) | 0.82±0.08 (ab) | 1.15±0.29 (ab) | 0.00 |
| Uchiumi | High 1 | 81 | 8.14±0.23 | 0.80±0.06 | 1.02±0.23 | 38.30 |
| | Japan | 94 | 8.04±0.23 | 0.77±0.07 | 0.93±0.23 | 50.00 |
| | China | 40 | 8.09±0.19 | 0.78±0.06 | 0.97±0.19 | 27.50 |

*1 Mean ± SD

*2 Different alphabets in parentheses denote statistically significant difference ($p < 0.01$)

*3 Thickness of the nacreous layer = pearl diameter - nucleus diameter

*4 High-quality pearl = number of high-quality pearls × 100/ number of round pearls

この結果から血清中総炭水化物含量は、次代に遺伝する傾向があることが明らかになった。また、真珠品質が従来家系に劣らないことから、天然貝からの選抜が有効であると示唆された。

第 6 章

本章では、これらの 2~5 章の試験結果の総括をおこなった。また、得られた知見から、今後のアコヤガイ母貝育種についての考察をおこなった。