

アサリ種苗生産における繁殖有効親貝数を アロザイム対立遺伝子の多様性減少から推定する試み

酒井治己^{*1}・樋口順一^{*1}・渡辺智久^{*1}・鬼頭 鈞^{*1}・
松野 進^{*2}・岸岡正伸^{*2, *3}・中野義久^{*2}・高見東洋^{*2}

Effective Population Size Estimation from Reduced Allozyme Allelic Diversity in Seedlings of the Japanese Littleneck Clam, *Ruditapes philippinarum*

Harumi Sakai^{*1}, Jun-ichi Higuchi^{*1}, Tomohisa Watanabe^{*1}, Hitoshi Kito^{*1},
Susumu Matsuno^{*2}, Masanobu Kishioka^{*2, *3}, Yoshihisa Nakano^{*2},
and Toyo Takami^{*2}

Effective population size was calculated in several lots of seedlings of the Japanese littleneck clam, *Ruditapes philippinarum*, whose actual number of parents was fixed beforehand into four classes. The variance in allozyme allelic frequency in the seedlings compared with the frequency of the wild clams was utilized to calculate the effective size. The calculated sizes were similar to the actual parental sizes. The result suggests the usefulness of the allelic frequency variance to estimate the effective population size also in the practical seedlings for various sea-farming programs.

1 緒 言

水産資源の増殖をはかる上で、人工生産された放流種苗が野生資源の遺伝的多様性に与える影響が懸念されている¹⁾。古くから食卓になじみの深い二枚貝であるアサリ *Ruditapes philippinarum* においても、近年では各地で人工種苗生産と放流が試みられている。アサリの産卵誘発は、主に温度刺激と生殖腺内容物懸濁液の刺激によって行すが、個体によって時間的な反

応差がある²⁾。したがって、たとえ多くの親貝を用いても、交配時に実際に放卵放精する個体数が限られてしまう可能性があり、それは種苗における遺伝的単純化に結びつくことが考えられる。

実際に産卵に参加した親数が判っていたり、親子鑑別のできるような魚介類の場合では、繁殖有効親数 (Effective population size) は比較的容易かつ正確に測定できるであろう³⁾。一方、多くの個体に対して同時に産卵誘発し集団交配させるアサリ等では、有効

水産大学校研究業績 第1635号, 2000年7月3日受付。

Contribution from National Fisheries University, No. 1635. Received Jul. 3, 2000.

*1 水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University).

*2 山口県水産研究センター (Yamaguchi Prefectural Fisheries Research Center).

*3 現所属: 山口県栽培漁業センター (Yamaguchi Prefectural Sea Farming Center).

数の実測は難しい。そのような場合、種苗における遺伝的多様性の低下が繁殖有効親数の関数として起こる、すなわち、親数が少ないほど遺伝子頻度が大きく変動して多様性が低下することが予想されるため、逆に、種苗における遺伝子頻度の母集団からの分散を測定し、有効であったはずの親数を推算する方法が考案されている⁴⁻⁶⁾。

そこで、その方法の有効性を、産卵誘発であらかじめ反応したアサリのみを用いることによって、実際に繁殖した親貝数の明らかな種苗を何段階か作成し、それらにおけるアロザイム対立遺伝子頻度の分散から繁殖有効親貝数を推定し検討したので報告する。

2 材料と方法

本研究に使用した材料をTable 1 に示した。母集団(集団1)は、山口県小野田市沖の天然貝で、潜水漁によって捕獲されたものである。集団2および3は、同地からそれぞれ1995および1996年に捕獲された約1,000個体の貝を、山口県内海栽培漁業センターにおいて集団で産卵誘発し、そのまま交配させた種苗である。実験交配集団(集団4-12)では、岸岡ら⁷⁾の報告に従い、温度刺激と生殖腺懸濁液添加によって産卵誘発

し、反応の認められた個体をただちにに取り上げて洗浄、雌雄ごとに数を合わせて交配させた。交配親貝数は、250個体(有効個体数¹⁰⁾ 240個体)が1組、160個体(有効個体数¹⁰⁾ 157個体)が2組、20個体および10個体がそれぞれ3組である(Table 1)。受精卵と幼生の培養、および仔稚貝の飼育についても岸岡ら⁷⁾の方法に従った。種苗は、1年飼育の後、殻長約10mmに成長した段階でアロザイム分析実験に供した。

実験貝は、-70°Cで凍結保存し、適宜解凍してアロザイム分析を行った。分析は、常法のデンブングル電気泳動法とザイモグラム法によった⁸⁾。使用した緩衝液は、トリス-クエン酸緩衝液(T-C buffer, pH 8.0)である⁹⁾。調査した酵素および遺伝子座は、すべての標本に亘って比較的安定して検出できたAAT-1^{*}、IDHP^{*}、MDH-1^{*}、MDH-2^{*} およびPGDH^{*}の5遺伝子座である(Table 2)。対立遺伝子名については、より陽極側に泳動されたものから順にアルファベットを付した。

検出された遺伝子型から平均ヘテロ接合体率観察値(Ho)と遺伝子頻度を求め、さらに遺伝子座当りの平均対立遺伝子数および平均ヘテロ接合体率期待値(He)を計算した。また、野生集団(母集団, 集団1)におけるヘテロ接合体率観察値(How)と交配種苗集

Table 1. Bred populations of the Japanese littleneck clam, *Ruditapes philippinarum*, and number of their offspring individuals surveyed

Population No.	Bred month	Number of parents			Number of offsprings surveyed
		Female	Male	Total	
1*	Apr 1995**	-	-	-	213***
2	Apr 1995	-	-	1000****	100
3	Apr 1996	-	-	1000****	96
4	Oct 1995	100	150	240*****	88
5	Oct 1995	90	70	157*****	88
6	Oct 1995	90	70	157*****	88
7	Oct 1995	10	10	20	88
8	Oct 1995	10	10	20	88
9	Oct 1995	10	10	20	88
10	Oct 1995	5	5	10	88
11	Oct 1995	5	5	10	88
12	Oct 1995	5	5	10	88

*Wild clams from off Onoda City, Yamaguchi Prefecture, mother population of the other bred populations. **Collected month. ***Number of wild individuals surveyed.

****Approximate numbers. ***** $N = 4 N_{female}N_{male} / (N_{female} + N_{male})^{10}$.

Table 2. Enzymes, enzyme numbers, loci, tissues, and buffer system used

Enzyme	Enzyme number	Locus	Tissue	Buffer
Aspartate aminotransferase	2.6.1.1.	<i>AAT-1*</i>	AM	TC
Isocitrate dehydrogenase	1.1.1.42.	<i>IDHP*</i>	Mgg	TC
Malate dehydrogenase	1.1.1.37.	<i>MDH-1*</i>	Am	TC
		<i>MDH-2*</i>	Am	TC
Phosphogluconate dehydrogenase	1.1.1.44.	<i>PGDH*</i>	Am	TC

AM : Adductor muscle. Mgg : Mid gut gland. TC : Tris-citrate buffer (pH 8.0, diluted 1 : 9 for the gel), 4 mA/cm² for 4 hr.

団のそれ (Hob) との比較から、近交係数 ($F = 1 - \text{Hob}/\text{How}$)¹⁰⁾ を算出した。繁殖有効個体数 (N_e) は、以下の式に基づいて計算した⁴⁻⁶⁾。

種苗生産をくり返した世代数を t 、母集団および種苗集団の i 番目の対立遺伝子頻度をそれぞれ X_{wi} および X_{bi} 、両者の平均を \bar{X}_i 、母集団および種苗集団の調査個体数をそれぞれ S_w および S_b とすると、ある遺伝子座の遺伝子頻度分散 V は、対立遺伝子数 k が 2 の時、

$$V = \frac{\sum(X_{bi} - X_{wi})^2}{k(\bar{X}_i - X_{bi} \cdot X_{wi})}$$

k が 3 以上の時、

$$V = \frac{\sum 2(X_{bi} - X_{wi})^2}{(k-1)(X_{bi} + X_{wi})}$$

世代平均繁殖有効個体数 N_e は、

$$N_e = t \left[\bar{V} - \frac{\{\sum(k-1)(1/2S_w + 1/2S_b)\}}{\sum(k-1)} \right]^{-1} / 2$$

N_e の分散 V_{ne} は、

$$V_{ne} = \frac{8N_e^4}{t^2 \sum(k-1)^2} \cdot \frac{\{\sum(k-1)(t/2N_e + 1/2S_w - 1/2S_b)^2\}}{\sum(k-1)}$$

ただし、これらの数式で計算する場合、配偶子の接合が無作為であることや、接合体の適応度に差異が無いことなどの仮定があり、注意が必要である。種苗集団において、検出された遺伝子型頻度が期待値とほぼ

同様である、すなわちハーディ・ワインベルグの平衡状態から大きく逸脱していなければ、これらの仮定はとりあえず満たされたものと考えられる。

3 結果

調査した 5 遺伝子座における対立遺伝子頻度を Table 3 に示した。野生集団では合計 22 対立遺伝子が検出されたが、種苗集団では 8 ~ 18 対立遺伝子に減少しており、これは栽培漁業センターで集団交配させた種苗においても同様であった。

遺伝子座当りの対立遺伝子数 (Allele/locus) や平均ヘテロ接合体率 (H_o , H_e) においても、種苗においてかなりの低下が認められた (Table 4)。なお、ヘテロ接合体の観察値と期待値の比を求めた結果では、種苗集団において若干のヘテロ接合体過剰状態 ($H_o/H_e > 1$) を示すものが多く認められたが、どの集団もハーディ・ワインベルグの平衡状態から逸脱してはいなかった (カイ二乗検定, $p > 0.05$)。

近交係数 (F) では、特に 1995 年の栽培漁業センターの種苗や、交配親貝数の少ない種苗においてかなりの上昇が認められた。

それぞれの種苗集団について繁殖有効個体数 (N_e) を推定した結果、親貝数 240 区で 356.4、157 区で 110.5 ~ 120.6、20 区で 14.7 ~ 81.0、10 区で 8.5 ~ 18.4 で、親貝数が少ないほどやはり有効数も少なく推定された。栽培漁業センター産の種苗では、1995 年度で 32.6、1996 年度で 178.6 と、使用貝数 (約 1000 個体) に比較してかなり低い値が推定された。

Table 3. Allele frequencies at 5 loci in 12 populations of the Japanese littleneck clam, *Ruditapes philippinarum*, surveyed

Locus	Population											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>AAT-1*</i>												
a	.011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
b	.030	.025	-	.017	.006	.040	-	.006	.148	-	.073	-
c	.109	.065	.151	.090	.165	.182	.188	.108	.085	.142	.135	.041
d	.768	.890	.807	.837	.801	.722	.761	.875	.739	.841	.719	.847
e	.077	.020	.042	.045	.023	.051	.051	.011	-	.017	.073	.112
f	.002	-	-	.006	.006	.006	-	-	.028	-	-	-
g	.002	-	-	.006	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>IDHP*</i>												
a	.005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
b	.007	-	.016	.006	.018	.011	.056	-	.074	-	.080	-
c	.535	.730	.563	.563	.582	.631	.579	.852	.466	.795	.824	.869
d	.433	.270	.385	.420	.400	.358	.348	.148	.460	.205	.068	.131
e	.018	-	.036	.011	-	-	.017	-	-	-	.028	-
f	.002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>MDH-1*</i>												
a	.097	.070	.094	.085	.114	.063	-	.210	.080	.051	-	-
b	.900	.925	.906	.909	.886	.938	1.000	.790	.920	.949	1.000	1.000
c	.002	.005	-	.006	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>MDH-2*</i>												
a	.002	.045	-	.017	-	-	-	-	-	-	-	-
b	.985	.950	1.000	.983	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
c	.013	.005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>PGDH*</i>												
a	.018	.020	.031	.017	.011	.011	.034	.006	.068	.063	.057	-
b	.935	.960	.922	.955	.960	.920	.926	.977	.898	.925	.932	1.000
c	.047	.020	.047	.028	.028	.068	.040	.017	.034	.011	.011	-

Population numbers correspond to those of Table 1.

4 考 察

アサリ野生集団に比較して、種苗集団群では遺伝的多様性のかかなりの減少と近交係数の上昇が認められ、親貝数の少なさの影響が如実に表れていた。実際の親貝数を定めた種苗集団における野生集団からの遺伝子頻度の分散によって繁殖有効個体数を逆算した結果、親貝数と有効個体数の間に検定によって有意なほどの一致性は無かったものの、かなり近い値が算出され、少なくとも桁数の違う結果は出てこなかった。したがって、今回試算した方法¹⁻⁶⁾は、アサリのように繁殖に参加した個体数の把握し難い水産生物の場合、繁殖有効個体数を推定し、遺伝的多様性を考慮した種苗生産

ができたかどうかの目安をたてるのに非常に有効な方法であると考えられる。

ただし、計算式の性質上、調査遺伝子数と調査個体数が数値に大きく影響する。今回調査したアロザイム遺伝子の多型性は、必ずしも充分高いとは言えず、さらに、多くの個体数を処理する上でも時間とコストの面で優れているわけではない。今後、より正確で統計的処理に耐え得る推定を行うためには、より多型的でしかも簡便に多くの個体数を調査できる遺伝的マーカーを検索して行く必要がある。

今回の方法によって、栽培漁業センターにおいて生産された種苗では、使用した親貝数よりもかなり少数の繁殖有効個体数が推定された（場合によっては10%

Table 4. Allele per locus, mean observed (Ho) and expected (He) heterozygosity, inbreeding coefficient (F), calculated effective population size with standard deviation ($Ne \pm SD$) and actual number of parents (N) in 12 populations of the Japanese littleneck clam, *Ruditapes philippinarum*

Population	Allele/locus	Ho	He	Ho/He	F	$Ne \pm SD$		N
1	4.4	.245	.250	.980	-	-	-	-
2	3.0	.188	.182	1.033	.232	32.6	\pm 16.5	1000
3	2.6	.233	.235	.991	.049	178.6	\pm 216.6	1000
4	3.6	.231	.217	1.065	.057	356.4	\pm 821.7	240
5	2.8	.238	.222	1.072	.029	110.5	\pm 105.1	157
6	2.8	.227	.236	.962	.073	120.6	\pm 121.3	157
7	2.4	.237	.212	1.118	.033	81.0	\pm 63.9	20
8	2.4	.166	.170	.976	.306	14.7	\pm 6.2	20
9	2.6	.291	.265	1.098	.188	22.6	\pm 10.6	20
10	2.2	.171	.167	1.024	.302	18.4	\pm 8.8	10
11	2.4	.192	.178	1.079	.216	8.5	\pm 3.3	10
12	1.6	.093	.099	.939	.620	11.4	\pm 4.6	10

Population numbers correspond to those of Table 1.

以下)。この推定値は、産卵誘発に反応した個体のみを用いて交配し、たとえ数多くの貝を種苗生産に用いても、実際に仔貝を残せる個体数がかなり限られてしまう可能性を示している。同時に、交配のしかたを工夫すればこの状態がかなり改善できることも示していよう。種苗生産現場では、生産回数や使用する親貝数を増やす方策とともに、産卵誘発の同調性を高めるなどの工夫を模索して行くことが、今後生産種苗の遺伝的単純化を防ぐためには必要かも知れない。

謝 辞

栽培漁業センター産種苗入手の便宜をはかっていただいた山口県内海栽培漁業センターの角田信孝氏（当時）にお礼申し上げます。

文 献

- 1) 中前 明：水産振興，30 (10)，1-46 (1993) .
- 2) 鳥羽光晴・深山義文：水産増殖，40，303-311 (1992) .
- 3) 谷口順彦・ベレス-エンリケス・リカルド・松浦秀俊・山口光明：水産育種，26，63-72 (1998) .
- 4) M. Nei and F. Tajima： *Genetics*, 98, 625-640 (1981).
- 5) E. Pollak： *Genetics*, 104：531-548 (1983).
- 6) D. Hedgecoch and F. Sly： *Aquaculture*, 88, 21-38 (1990).
- 7) 岸岡正伸・立石 健・酒井治己・鬼頭 鈞・井出尾 寛・松野 進：水産育種，25，91-97 (1997).
- 8) R. W. Murphy, J. W. Sites, D. G. Buth and C. H. Haufler： in "Molecular Systematics" (ed. by D. M. Hillis and C. Moritz), Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1990, pp. 45-126.
- 9) C. R. Shaw and R. Prasad： *Biochem. Genet.*, 4, 297-320 (1970).
- 10) 向井輝美：集団遺伝学，講談社サイエンティフィック，東京，1980，pp. 274.