

二枚貝の染色体操作による育種研究の現状

古丸 明 (養殖研究所)

Process in Research on the Chromosome
Engineering in Bivalves

Akira KOMARU

National Research Institute of Aquaculture

緒言

近年魚介類では、育種を主目標として人為倍数体や雌性発生二倍体の研究が進められてきた。しかし、二枚貝の倍数体に関する知見は魚類に比べて乏しく、限られた種での三倍体に関する報告が見られるのみである。倍数化によって、量的形質や配偶子形成がどのような影響をうけるのか、また養殖を行う際の特性はどうか、といった点については知見が乏しい現状である。

二枚貝の垂下養殖において、不妊化により、産卵期の生残率や成長度を改善したり、成熟に伴う商品価値の低下を防止するという観点から、二枚貝でも1980年代になってから三倍体作出に関する研究が盛んに行われるようになった。ここでは二枚貝の三倍体に関する研究の現状について紹介していきたい。

1. 三倍体の作出について

二枚貝の卵は一般に体外に放出されるまでは第一減数分裂の途中でとどまっておき、受精がひきかねとなって減数分裂が完了する。すなわち、受精後に第一極体、ひき続いて第二極体が放出される。従って、図1に示したように、第一減数分裂阻害による三倍体、及び第二減数分裂阻害による三倍体、以上二通りの遺伝的に性質の異なる三倍

体を作成することが理論的には可能である。

Stanley ら¹⁾ は細胞分裂阻害剤の cytochalasin B (以下CBと略す) を受精直後のバージニアガキ *Crassostrea virginica* の卵に作用させ、極体放出を阻害して三倍体を作成し、稚貝にまで育成することに初めて成功した。二枚貝では表1に示したように、現在までに受精卵のCB処理によりマガキ *Crassostrea gigas*²⁻³⁾、ホンアメリカイタヤガイ *Argopecten irradians*⁴⁾、ヒオウギガイ *Chiamys nobilis*⁵⁻⁶⁾、ヨーロッパホタテガイ *Pecten maximus*⁷⁾、セイヨウオオノガイ *Mya arenaria*⁸⁾、アコヤガイ *Pinctada fucata*⁹⁻¹¹⁾ など三倍体を作成されている。CB処理以外に水圧処理⁵⁾¹²⁾、高水温、低水温処理¹⁰⁻¹⁵⁾ による三倍体作成も報告されている(表1)。

1) CB処理

二枚貝ではCBによる三倍体作成成功例が多い。現在までの知見では、CB処理法が他の方法よりも、能率良く三倍体を作成できるようなのである。ここでヒオウギガイを材料とした筆者らのCB処理法⁵⁾を紹介したい。CBをあらかじめ、0.1 mg/l あるいは0.5 mg/l の濃度となるように海水に溶解し、媒精15分後から15分間CB海水に受精卵を浸漬した。CB処理後、DMSOを含む海水でCBを洗い落とす操作を15分間行った。それ以降は通常の二枚貝の種苗生産技術により、幼生、稚貝の

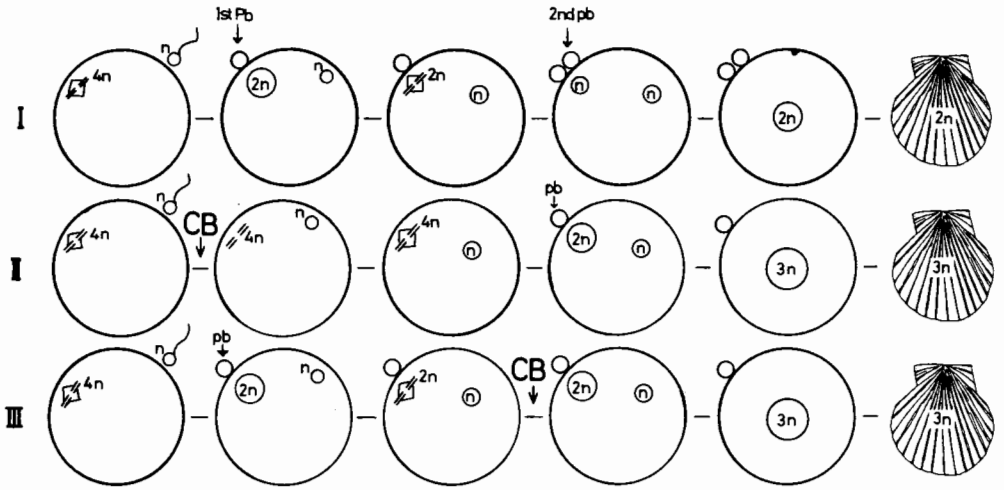


図1. 三倍体作出の原理 I : 二倍体 II : 第一極体放出阻害による三倍体 III : 第二極体放出阻害による三倍体

表 1. 二枚貝の三倍体作出に関する文献

学名	和名*	作出法と文献
<i>Mytilus edulis</i>	ムラサキイガイ	水温処理 ¹⁵⁾
<i>Pinctada fucata</i>	アコヤガイ	CB, 水温処理 ^{9) 10) 11)}
<i>Chlamys nobilis</i>	ヒオウギガイ	CB, 水圧処理 ^{5) 6)}
<i>Argopecten irradians</i>	ホンアメリカイタヤガイ	CB ⁴⁾
<i>Pecten maximus</i>	ヨーロッパホタテガイ	CB ⁷⁾
<i>Crassostrea gigas</i>	マガキ	CB ^{2) 3)} , 水温処理 ^{13) 14)} , 水圧処理 ¹²⁾
<i>Crassostrea virginica</i>	バージニアガキ	CB ^{1) 17)}
<i>Mya arenaria</i>	セイヨウオオノガイ	CB ³⁾

CB : Cytochalasin B 処理 *和名は世界海産貝類大図鑑(平凡社)による。

飼育を行った。

表2にCB処理を行ってから17時間後に幼生を検鏡し、正常なベリジャー幼生の比率を調査した結果を示した。対照区では正常な幼生の比率は70.7%であったが、CB処理区では47.2% (0.5 mg/l) 及び58.5% (0.1 mg/l) で、CB処理濃度が高くなるほど正常なベリジャー幼生の比率は低くなっていた。処理区で初期の生残率が低くなる傾向は水圧処理を行った場合にも観察された。セイヨウオオノガイ⁸⁾やホンアメリカイタヤガイ⁴⁾でも発生初期におけるCB処理群の

生残率は対照区に比較して低かったという。

処理を行ってから5カ月後にヒオウギガイ稚貝の倍数性を調査した。表3に示したようにCB 0.5 mg/l 処理区では66.1%が三倍体であったが、CB 0.1 mg/l 濃度で処理を行った区および対照区では分析した個体すべて二倍体であった。しかしホンアメリカイタヤガイ⁴⁾では0.05 mg/l の濃度のCB処理を20分行い三倍体誘起に成功しており、アコヤガイ^{10) 11)}では0.1 mg/l あるいは0.5 mg/l の濃度で媒精20分から30分間CB処理を行って三倍体を得ている。種によって適当な

CB処理濃度や処理条件は異なっていると考えられる。前述したように、CB処理濃度を高めると得られる正常なベリジャー幼生の比率が低くなり、形態の異常な幼生が多くなる傾向がみられるので、効率的に三倍体を作るためには種ごとに適当な処理方法、処理条件を探索することが重要な課題と考えられる。また形態の異常な幼生が出現するメカニズムについて、発生学、細胞学、あるいは遺伝学的な検討も行う必要がある。

2) 水圧処理

水圧処理による極体放出阻害法は二枚貝ではマガキとヒオウギガイの報告に限

られる。Chaiton and Allen¹²⁾ はマガキの卵に受精10分後から10分間、6000-8000 psi (約450-560 kg/cm²) の水圧をかけ、250-330 μmの浮遊幼生の段階で三倍体を確認している。ヒオウギガイ⁵⁾ では媒精20分後から10分間200 kg/cm²の水圧処理を行っている。満5ヶ月の稚貝の時点で倍数性を判定し(表3)、30個体分析して7個体の三倍体を確認している。

3) 水温処理

Quillet and Panelay¹³⁾ はマガキの卵に高水温処理(30-38℃)を施し、発生初期に染色体を観察して三倍体性の胚を確認している。また、山本ら¹⁴⁻¹⁵⁾ は水温処理がムラサキガイ、マガキの三倍体作出に効果があったとしている。内村ら⁹⁾ はアコヤガイの受精卵に媒精5分後から6-7℃

表2. ヒオウギガイの生残率におよぼす処理の影響
(受精後17時間)

	Control	CB(0.5mg/l)	CB(0.1mg/l)	Press
No. of zygotes	171	142	147	127
No. of veligers	122	67	86	37
Percent of veliger	70.7%	47.2%	58.5%	29.1%

Press: 200kg/cm²

表3. ヒオウギガイの倍数体におけるサイトカラシンBおよび圧力処理の効果

	Control	CB(0.5mg/l)	CB(0.1mg/l)	Press
No.	20	59	28	30
2 n	20	20	28	23
3 n	0	39	0	7
3 n %	(0%)	(66.1%)	(0%)	(23.3%)

Press: 200kg/cm²

で15分間低温処理を行い、幼生のDNA量を顕微蛍光測光法で経時的に測定し、発生初期には倍数体と思われる細胞が多く出現することをみている。しかし飼育日数の経過とともに三倍体性の細胞は減少し、付着直前には殆ど消失した。このアコヤガイでの結果は、処理により異常体などの生存力の弱い個体が出現した可能性、あるいは二倍体と三倍体の間に付着変態までの生残率に違いがあることを示唆していると考えられるが、今後さらに検討する必要があるとしている。しかし最近のアコヤガイでの知見では、6.5℃の低温処理を媒精5分後から10分間行い、3カ月後に三倍体稚貝を確認することができた。^{10) 11)} 現在までに低温処理で倍数体の作出に成功した例は少ないが、二枚貝でも低温処理により倍数体の作出は可能であろう。

これまで二枚貝の三倍体作出成功例の多くはCBによるものであった。今後はCB処理以外の水温処理、水圧処理あるいはそれ以外の方法でも、より確実に第一極体あるいは第二極体の放出を阻害し、三倍体を効率よく作り出すための条件を見いだしてゆく必要があろう。

2. 倍数体の判定法について

魚類では染色体の観察によるか、赤血球の大きさを測定することによって、倍数体を確認している例が多い。しかし多くの二枚貝は赤血球を持たず、また倍数性と細胞の大きさに関する知見も乏しい。二枚貝類では倍数性の判定を染色体の観察によるか、細胞核のDNA量を測定して行っている場合がほとんどである。ここでは二枚貝の倍数性の判定手法についてふれる。

1) 染色体観察法について

倍数体を確認する上で、染色体を観察するのが最も確実な方法である。二枚貝では初期胚あるいは成貝にコルヒチン処理を行い、押しつぶし法あるいは小刻法などにより染色体を観察している。図2にアコヤガイのトロコフォーラ幼生から得た細胞分裂中期像を示した。未処理区のアコヤガイ二倍体は28本の染色体を持っていたが、CB処理区では42本の染色体が多くの核板で認められ、この個体が三倍体であることは明らかである。このように染色体を観察して得られた判定結果は疑うべくもない。しかし、成貝では細胞分裂の頻度が低いいためか、明瞭な分裂像を多く得るには技術上の問題があり、多数の個体の倍数性判定には労力を必要とする。今後、細胞分裂の頻度を高めるような処理法を工夫するか、組織培養の技法を応用して、確実に成貝で染色体を分析できるように染色体観察技術の改良を行って行かねばならない。

2) フローサイトメトリー

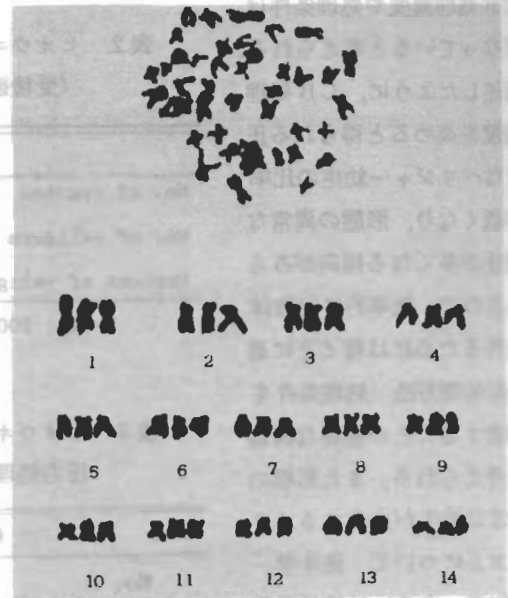


図2 サイトカラシンB処理したアコヤガイのトロコフォーラ幼生の細胞分裂中期と核型 (3N=42)

細胞核のDNAをPIやDAPI等の蛍光色素で染めて、蛍光強度を測定するという点ではフローサイトメトリー (以下FCMと略す) は原理的には次項で述べる顕微蛍光測光法と同じである。この方法はDNA量以外の情報も得ることができる。また短時間で多数の細胞を測定でき、しかも特定の性質をもった細胞の分離採取も可能であるという点で顕微蛍光測光法とは異なっている。

Allen¹⁶⁾は魚類の赤血球や貝類の血球、外套膜などから細胞浮遊液を調製し、PI染色後、FCMにより、DNA量を測定して倍数性の判定を行っている。図3, A, BにFCMによるヒオウギガイの精子核、二倍体、三倍体の血球核DNA量のヒストグラムを示した。DNA量の分布から図3Aは二倍体、図3Bは三倍体と判定された。これは血球を開殻筋から採取しCamoy液 (メチルアルコール3 : 酢酸1) で固定後、PIで染色しDNA量を分析したものである。⁶⁾

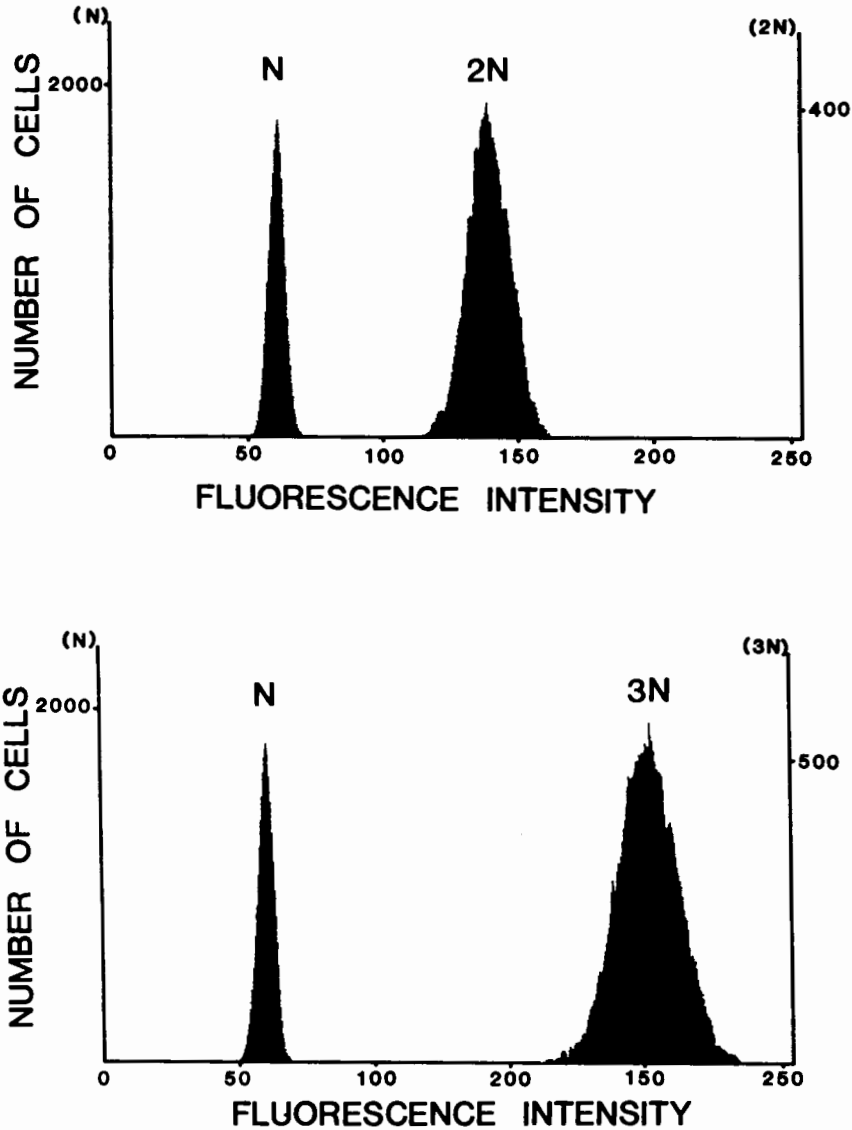


図3 フローサイトメトリーによるヒオウギガイ血球核の相対的DNA量を示すヒストグラム A) 二倍体 B) 三倍体

FCM法によれば短時間で精度の高いDNA, RNA等の定量が可能であるが、用いられるセルソーター、フローサイトメーターは高価な機器であり、その利用は限られている現状である。そこで我々はより簡便な方法について研究を行った。

3) 顕微蛍光測光法

Komaruら⁶⁾は顕微蛍光測光法により細胞核のDNA量を相対的に測定し、二枚貝の倍数性の判定を行っている。この手法は細胞核のDNAをDAPIという蛍光色素で特異的に染色し、紫外線域の波長をあてて励起し、得られた蛍光の強さ

を相対的 DNA 量としてとらえるものである。図 3 A, B にヒオウギガイの血球核の DNA 量の相対値のヒストグラムを示した。図 4 A に示した対照区の個体から得た細胞は精子核の 2 倍の DNA 量を持っており二倍体と判定され、図 4 B に示した CB 処理区の個体から得た細胞は精子核の約 3 倍の DNA 量を持っており、三倍体と判定された。この DAPI 染色により DNA を定量する方法は染色操作が簡単であり、しかも蛍光が安定で定量精度が高い等の特徴がある。この方法により、0.1 ml 程度のヘモリンパ液が採取できれば判定が十分可能で、サンプルを殺すことなく倍数性を知ることができた。またベリジャー幼生でも DNA 量を測定できるので、⁹⁾ 倍化処理の効果を早い時期に知ることが可能であった。

またこの方法は操作が簡単であり、精度の高い DNA 定量が可能である。また FCM と比較しても装置は安価であり、水産研究にも十分利用が可能であろう。

4) 細胞の大きさ

二枚貝では細胞の大きさにより倍数性を判定した例は報告されていないが著者ら¹⁸⁾はヒオウギガイとエゾアワビ三倍体の血球核の長径を二倍体と比較して有意差をみている。しかし固定や染色の条件によっては二倍体間で平均値の差が有意である例も観察され、今後、細胞の固定や染色法を検討する必要がある。倍数体の細胞学、組織学的知見は乏しく、簡便な判定法を確立するにはそれらの基礎研究が重要となろう。

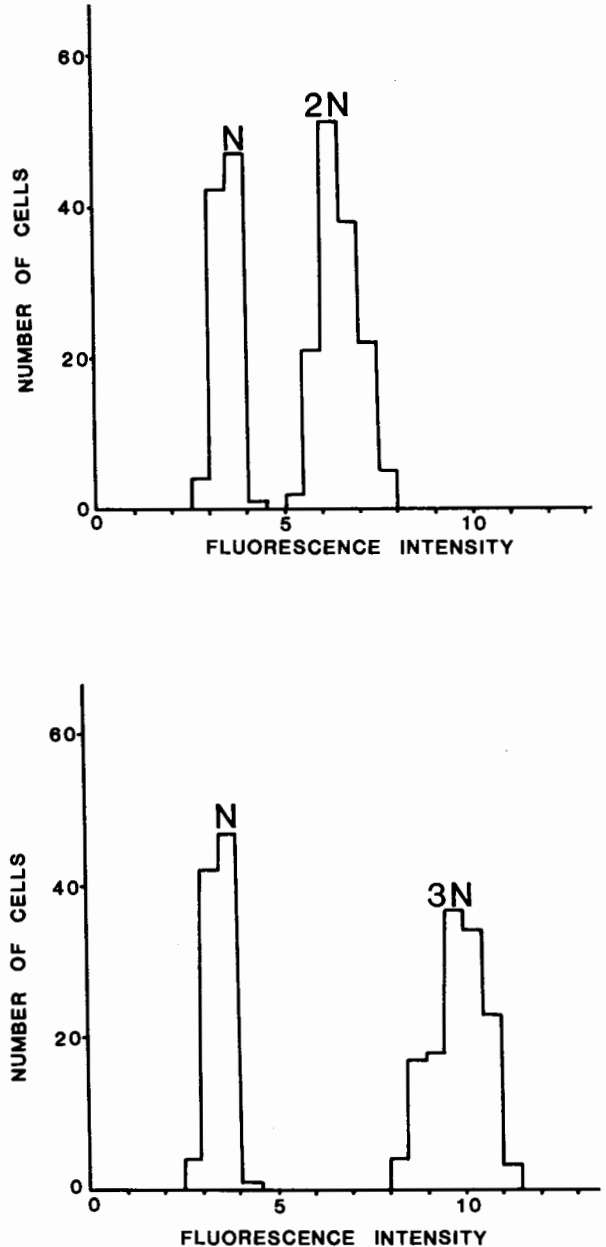


図 4 顕微蛍光測光法により得られたヒオウギガイ稚貝鮑細胞核相対的 DNA 量を示すヒストグラム A) 二倍体 B) 三倍体

顕微蛍光測光法や ECM は数多くの個体の DNA 量測定して倍数性を判定する際には威力を

発揮する。しかし異数体や染色体異常の検出は染色体の観察によらざるをえない。また倍化处理群に形態が異常な胚が認められる場合がある。異常胚が形成されるメカニズムを知り、倍数体を効率よく作出するためにも、倍化处理を行った胚の減数分裂時の染色体の動きや、分裂装置への倍化处理の影響などを解析しておく必要があるだろう。

3. 成長について

Stanley ら¹⁷⁾はバージニアガキで第一極体放出を阻害して作出した三倍体（以下1Pb3Nと略す）は二倍体よりも有意に殻高が大きかったが、第二減数分裂阻害による三倍体（以下2Pb3Nと略す）は二倍体と殻高に差がなかったことを見ている（表4）。彼らはアイソザイム分析の結果、1Pb3N群は2Pb3N群よりもヘテロザイゴシティー（異形接合性）が高く、成長度の改善は三倍体化したことによるよりも、むしろヘテロザイゴシティーが高まったためであろうと推論している。

またホンアメリカイタヤガイの三倍体では殻長、殻高には二倍体と差がなかったが、殻幅、軟体部重量、閉殻筋重量、などの形質で成長度の改善がみられたという⁴⁾（表5）。また、ヒオウギガイ三倍体では軟体部重量や閉殻筋重量は二倍体よりも大きかったが、生殖腺指数は二倍体の方が大きかった。¹⁹⁾ 三倍体化により生殖腺の発達が抑制され、生殖腺以外の軟体部の成長が二倍体より良くなったと考えられる。現在までに二枚貝の倍数体

の量的形質に関する文献は多くはないが、これまでの知見では三倍体化により、軟体部の成長の改良が期待できそうである。さらに多くの種で見聞の蓄積が望まれる。

4. 三倍体の配偶子形成について

セイヨウオオノガイの三倍体は産卵期にも成熟せず、生殖腺は未発達であったという。²⁰⁾ この研究では組織学的調査により三倍体の生殖腺を、①少数の卵母細胞をもつ個体77%、②卵母細胞を持たないが組織像から卵巣と思われる個体16%、③性の分化が起こっていない個体6%の3つの段階にわけている。

三倍体のマガキ、バージニアガキの組織学的分析結果²¹⁾では、配偶子形成がある程度進み、雄では精母細胞、精細胞を産生する個体が観察され、雌では卵母細胞を持つ個体が観察されている。しかし二倍体に比べると配偶子形成は抑制されている状態であったという。また産卵期にも三倍体マガキのグリコーゲン含量は低下することはなかったという結果は注目に値する。

産卵期におけるヒオウギガイの三倍体は、性的に未分化の生殖腺を持つ個体のほかに精母細胞を持つ個体（図5C）、卵母細胞を持つ個体が観察されたが（図5D）、精細胞、精子は認められなかった。²²⁾ 同時期に観察した二倍体は精子（図5A）あるいは卵母細胞（図5B）を持つものが多かった。また三倍体の生殖細胞は二倍体と比較してかなり少なく、濾胞の内部に空隙が認められる

表4. 二倍体および三倍体バージニアガキの成長（平均±95%信頼限界；n. s. = not significant）

（Stanley ら, 1984¹⁷⁾）

Time of CB treatment	Shell height (mm)		P
	Diploid	Triploid	
0-15 min	36.2±1.6 (No.= 53)	40.4±1.4 (No.= 82)	0.001
15-30 min	36.6±2.4 (No. = 35)	37.1±0.6 (No.= 92)	N.S.

表5. ホンアメリカイタヤガイの二倍体および三倍体の形質 (Tabarini, 1984⁴⁾)

	Diploid No.= 12		Triploid No.= 20	
Adductor muscle				
Wet weight	3.0 ± 0.56 g		5.2 ± 0.59 g ***	
Dry weight	0.56 ± 0.13		1.2 ± 0.15 g ***	
Gonad				
Wet weight	1.4 ± 0.23 g		1.8 ± 0.13 g **	
Dry weight	0.17 ± 0.04		0.17 ± 0.02 N.S.	
Total body tissue				
Wet weight	11 ± 1.5 g		15 ± 1.3 g ***	
Dry weight	1.7 ± 0.21		2.5 ± 0.26 ***	
Adductor muscle diameter	16.8 ± 1.43 mm		19.6 ± 0.97 mm **	
Shell inflation	25.9 ± 1.64 mm		28.4 ± 0.93 mm ***	

N.S.: No significant difference t test.

* Significant difference at 0.05 level t test.

** Significant difference at 0.01 level t test.

*** Significant difference at 0.001 level t test.

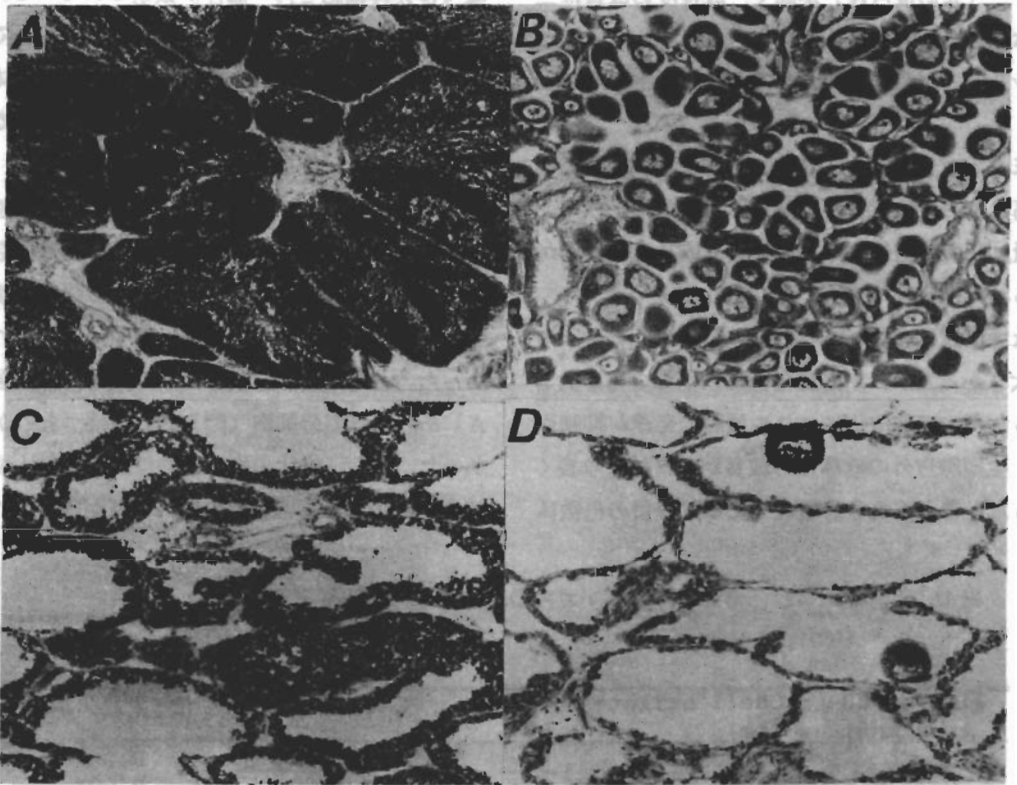


図5 ヒオウギガイの生殖腺組織像 (満11カ月)

A) 二倍体精巢 B) 二倍体卵巣 C), D) 三倍体

個体が多かった。

以上述べたように、種によって程度の差はあるが三倍体の配偶子形成は抑制されていると評価することができそうである。しかし最近の知見によれば、三倍体のマガキは1Nと1.5NのDNA量を持つ2つのタイプの精子を産生したという。²³⁾ 異数性の精子が放出された場合、天然集団に与える影響が懸念される。実際の育種に応用する前に、三倍体の配偶子形成がどの程度進むのかを十分把握しておく必要がある。

おわりに

二枚貝の垂下養殖において、大量斃死現象が問題になることがある。成熟産卵に伴って生理的活性が低下し、それが要因のひとつとなって斃死に至るのではないかという指摘がなされてきた。²⁴⁻²⁸⁾ 三倍体化によって成熟が抑制できれば、成熟産卵に伴う斃死を防止できる可能性が考えられる。一方、マガキでは成熟の進行に伴い、グリコーゲン含量が低下し商品価値が著しく下がってしまう。またアコヤガイを例にとると挿核手術を行う前に、強制的に精子や卵を放出させる「卵抜き」という操作を欠かす事ができない。不妊の個体を作り出

すことによって、より効率的に二枚貝養殖を行うことが可能になろう。不妊化の一つの手段として三倍体作出は将来欠かせない技術の一つになるものと予想される。

今まで述べてきたように、三倍体は程度の差はあるが成熟は抑えられている。しかしゲノム数が増えたことや、成熟が抑制されたことで、生野の特性や経済形質がどのような影響をうけるかということはほとんどわかっていない現状である。三倍体はDNA量の増加に伴い細胞一個一個が大きくなっており、そのことが浸透圧調節能力や酸素運搬能力などにどのように反映してくるかということはこれからの課題として残されている。今後、三倍体の能力をさまざまな角度から評価し、倍数体をどの様なかたちで実際の養殖に結び付けて行くかということを考えていく必要がある。また、たとえ三倍体が優れた特性を備えていても生産コストが高ければ育種に結びつかない。効率的な作出技術の研究も必要である。その意味では、四倍体を作り出し二倍体と交配させる方法を検討していく必要がある。また異種間の交雑による異質三倍体の作出も興味ある将来の課題である。²⁹⁾

引用文献

- 1) Stanley, J.G., S. K. Allen, Jr. and H. Hidu (1981) *Aquaculture*, **23**:1-10.
- 2) Downing, S.L. and S.K. Allen, Jr. (1987) *Aquaculture*, **61**:1-15.
- 3) 広島水試 昭和61年度地域バイオテク南西ブロック会議資料.
- 4) Tabarini, C. L. (1984) *Aquaculture*, **42**:151-160.
- 5) 古丸 明・和田克彦 (1987) 日本水産学会春季大会講演要旨集 pp. 56.
- 6) Komaru, A., Y. Uchimura, H. Ieyama, and K. T. Wada (1987) *Aquaculture* (In press).
- 7) Beaumont, A. R. (1986) *Aquaculture*, **57**:99-110.
- 8) Allen, S. K., P. S. Gagnon, and H. Hidu (1982) *J. Hered.*, **73**:421-428.
- 9) 内村祐之・古丸 明・和田克彦・家山博史・山木 勝・古田弘文 (1987) 水産育種 **12**:57-70.
- 10) 和田克彦・古丸 明・内村祐之・林崎孝志 (1987) 昭和62年度日本水産学会秋季大会講演要旨集

pp・148.

- 11) Wada, K.T., A. Komaru, and Y. Uchimura, (Unpublished)
- 12) Chaiton, J.A. and S.K. Allen Jr. (1985) *Aquaculture*, **48**: 35-43.
- 13) Quillet, E. and P. J. Panelay (1986) *Aquaculture*, **57**: 271-279.
- 14) 山本 敏・菅原義雄・野村 正・押野明夫 (1987) 昭和62年度日本学会春季大会講演要旨集 pp・54.
- 15) 山本 敏・菅原義雄 (1987) 昭和62年度日本水産学会春季大会講演要旨集 pp・54.
- 16) Allen, S.K., Jr. (1983) *Aquaculture*, **33**: 317-328.
- 17) Stanley, J.G., H. Hidu, and S.K. Allen Jr. (1984) *Aquaculture*, **37**: 147-155.
- 18) 古丸 明・和田克彦・林崎孝志 (未発表).
- 19) 古丸 明・和田克彦 (未発表).
- 20) Allen, S.K., Jr., H. Hidu, and J.G Stanley (1986) *Biol. Bull.* **170**: 198-210.
- 21) Allen, S.K., Jr. (1986) Gametogenesis in three species of triploid shellfish. EIFAC/FAO symposium on selection, hybridization and genetic engineering in aquaculture of fish and shellfish for consumption and stocking. Bordeaux (France), 27-30 May 1986.
- 22) 古丸 明・和田克彦・林崎孝志 (1987) 日本水産学会秋季大会講演要旨集 pp・147.
- 23) Allen, S.K., Jr., and S.L. Downing (1987) Reproductive sterility in triploid Pacific oysters: answers and questions. USA/Japan natural resources symposium on genetic resources on aquaculture (Abstract). Charleston (South Carolina), 19-20 October 1987.
- 24) 森 勝義・今井丈夫・豊島清明・臼杵 格 (1965) 東北水研報告第25号 49-63.
- 25) 玉手英夫・沼知健一・森 勝義・市川 収・今井丈夫 (1965) 東北水研研究報告 **25**: 89-104.
- 26) Mori, K. (1975) *Mar. Biol.*, **53**: 361-369.
- 27) Mori, K. (1979) *Bull. mar. Biol., Stn Asamushi XV*: 59-79.
- 28) 森 勝義・長内健治 (1977) *日水誌* **43**: 9-17.
- 29) 和田克彦 (1987) *水産の研究* **6**: 33-38.