

半索動物ヒメギボシムシの生態

技術センター

ありません．その理由として最も大きいのが，個体の採集や飼育法すらも手探りの状態が続いているためです．従って，整えられた分子生物学的インフラを活用して効率よく研究を推進するためには，様々な非モデル動物の発生ステージの試料確保や飼育・維持等のためのインフラ整備（モデル動物化）が緊急の課題となっています．

現在このインフラを最も必要としている動物は半索動物ギボシムシであり，その中で分子生物学的解析が進んでいる種はヒメギボシムシ (*Ptychodera flava*) です．この動物を国内で研究する場合，現時点では国外であるハワイにまで採集に行く必要があり，しかも生体を持ち出す（輸送する）ことが難しいという大きなデメリットが存在します．国内では同種が和歌山県串本に生息すると30年前に報告されていますが（Nishikawa, 1977），その後の状況は不明でした．一昨年度に行われた事前調査では，少数ながら生息地における生存を確認出来たため，平成20年度奨励研究（海産新口動物幼生飼育装置の開発：課題番号20918016）を申請，獲得して採集や飼育のインフラ整備の基礎データ収集を試みました．

3．研究方法と内容

A：生息地調査と繁殖時期推定

まず，生息地特定と繁殖時期を知るために6月から10月にかけて和歌山県東牟婁郡串本町潮岬に続く海岸の西側（図4白抜楕円位置）を月に一度調査した．その結果，Nishikawa, 1977の論文よりもさらに南の方に多数生息している事が判明し，生殖時期は9月中旬～末にかけてと推定された．



図4 ヒメギボシムシ生息域

B：採集方法と輸送

最干潮時に水深2m程度より上部の砂を，手で仰いでヒメギボシムシが千切れないように少しずつ吹き飛ばして全体を露出させる（図5，6）．引きずり出そうとすると容易に切断される．同時に，生息地の海水を80～100ほど水深1m以下から採取しておく．

採集したヒメギボシムシは生息地の砂を1



図5 採集地全景と採集風景



図6 採集中のヒメギボシムシ

程度の容器に1/3～1/2程入れ、生息地の海水で最低5回はよく振って洗浄した。その後、20匹を目処に回収した個体を入れると良好な結果が得られた。輸送までの処置としては、宿泊地では海水温に近い温度の所に置いてバブリングした。放精等を確認した場合は、海水交換を行って良好な状態を維持した。

輸送中の処置はエアクッション等を利用し、可能な限り運転中も衝撃を和らげた。また保冷剤をいれて過度の温度上昇を防いだが、容器に直接保冷剤があたらないようにした。

実験所に到着後は、ヒメギボシムシの入った容器をバケツに入れた生息地の海水中に沈め、ゆっくりと回転させながら中の砂をギボシムシごとバケツに移した。穏やかにやらなければギボシムシが千切れるので注意が必要であった。また、海水が紫色になっていたボトルや、精子を噴いたボトルは隔離した。千切れた個体も隔離して経過を観察した。

それぞれの個体を写真等で記録した後、生息地の海水を水槽に入れてバブリングした。濾過材等は一切使用しない方が良好に維持することができた。そして500 ml ビーカーに再度洗浄した生息地の砂を300 ml ほど入れ、生息地の海水で満たし、ギボシムシを1～5体程入れる。これらのビーカーを水槽にゆっくり沈めて飼育を開始した(図7)。



図7 実験室で飼育中のヒメギボシムシ(右ビーカー右下に潜っている様子が見える)

C: 飼育について

飼育方法については、未だに最良と言える方法は確立できていない。現在までに判っていることは以下の通り。

市販の沈降性魚類用餌(顆粒状)は食わず、それらから逃げる様な行動をとる

砂に混ぜると砂ごと腐って死ぬ

珪藻(沈降性珪藻)も砂が腐る

濾過剤を使用すると、ヒメギボシムシが痩せ細る。バブリングだけならあまり痩せず9ヶ月維持可能。生殖巣が発達した個体も光を当て続けるとその状態を4ヶ月維持可能

約1ヶ月で自切し、その後再生してクローンとして個体数が増える

今後は日長さと温度の厳密なコントロール、珊瑚用の餌の使用や、沈降性珪藻の種類や適切な濃度の検討が必要になると考え、次のシーズンに向けて準備している。

D: 分裂と再生について

ギボシムシは自切して再生することが知られているが、ヒメギボシムシはその能力が非常に高く、飼育中にも自然に1個体から2,3個体に分裂した。再生には約1ヶ月を要した。これは人為的に切断しても同じであった。

再生期間中に砂の上に出てしまうと、吻が再生されていない個体は潜れず、吻が再生されると再び潜れるようになることから吻、もしくは襟が潜る行動に必要な部位であると考えられた。

再生期間が早く、しかも容易であるということは、我々ヒトを含めた新口動物の再生機構解明と再生医学に応用できる可能性を秘めていると言える。

E: 産卵・放精について

ギボシムシは襟の下部分に生殖翼と呼ばれる部位(図8)があり、その部分に配偶子を形成する。雌雄異体とはいえ、外見での判断は非常に難しく、非生殖時期には判別は不可能であ

る．産卵時期は生殖場所によって変わると考えられ，串本産ヒメギボシムシは9月中旬～末，ハワイ産ヒメギボシムシは11月～12月である．また，ギボシムシ類の発生は孵化後にトルナリアという浮遊幼生ステージを経て間接発生するタイプと，直接発生するタイプがあるが，ヒメギボシムシは前者である．



図8 ヒメギボシムシ生殖翼
生殖巣()が若干発達している

人工的に配偶子(卵，精子)を放出させるには水交換による+5のヒートショックが有効であるとされてきた．しかしながらこの方法では串本産ヒメギボシムシでは配偶子の放出が見られず，pH±2のショックで配偶子の放出が見られた．この例は世界でも初めての報告となる．この方法で得られた精子は活動性が十分にあり，受精に使用できるものと考えられた．

しかしながら，何故か串本産ヒメギボシムシはしか発見されず，産卵を行わせることができなかった．この様な性比の極端な偏りは別の研究者からも各地で報告されており(Rao, 1954., Pitter and Davis, 1904)，本例もこれに相当するものと考えられる．産卵方法の再現性だけでなく，性比や採集地点による偏りの違いも次シーズンの課題となった．

12月には田川准教授がハワイより輸送したヒメギボシムシの成体を譲り受け，ヒートショックにより産卵・放精させた．この種では国内初の試みであり，産卵時に砂が不要であることもわかった(図9)．

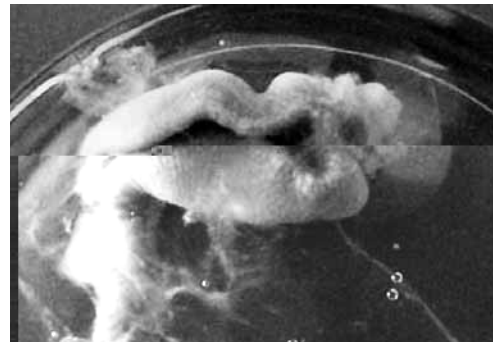
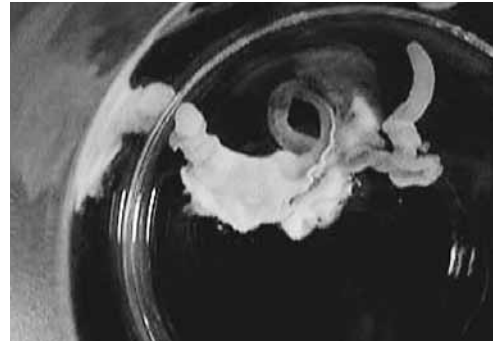


図9 ヒメギボシムシの配偶子の放出の様子
(上：雌産卵，下：雄放精)

得られた卵は75 μmのメッシュを用いて0.45 μm ミリポアフィルターで濾過した海水(以下ミリポア海水)でよく洗浄し，媒精させた．多精には強めなので，ウニよりは少し多めに精子を入れた．1時間後に余剰の精子を除去するために卵を洗浄し，シャーレで一静置した．なお，この時に採取した精子のDNAを用いた18S rRNAの配列解析結果から，本種がハワイ産と同種のヒメギボシムシであることがほぼ確定的となった．

F：幼生飼育法

発生が順調に進んでいることを確認したため，飼育装置に移した．前述のように孵化後のヒメギボシムシ類の幼生はトルナリア幼生と総称されるが，幾つかのステージがあり，ミユラー期 ハイダー期 メチニコフ期 クローン期 シュペンゲル期 アガシー期を経て成体へと変態する．これまでのヒメギボシムシの試行ではクローン期までしか飼育の前例がなく，国内ではその前々段階であるハイダー期までしか飼育

に成功していなかった。今回、ハワイ産ヒメギボシムシを国内で受精，発生させて室内でのライフサイクル確立を試み，そのための飼育装置の開発を行った。

種によって発生の速度は異なるが，ヒメギボシムシでは孵化して一晩後にはミユラー期の幼生になる。これをFに記す飼育装置を使用して飼育した。なお，海水は微量元素等がバクテリア等で消費されていない，汲んだ直後の海水を使用した。溜置きはバクテリアが繁殖し，フィルターの目詰まりを起こす原因となる。海水が冷たいときは20℃に予熱してフィルター濾過した。さらに海水には50 mg/lの抗生物質ストレプトマイシンを添加した。温度は冬期のためエアコンで26℃に設定し，水温は20℃程度になった。光は自然光を利用した。

餌には市販のサンカルチャー（高濃度キートセラスカルシトランス発売元 日清マリンテック（TEL 0070-800-258000）を1%与えた。

G：培養装置

以下の図10～の装置を考案し，それぞれの装置の特色を検討した。コンセプトは研究のグローバル化を目指し，従来のオーダーメイド装置ではなく市販品の組み合わせで誰もが容易に飼育できることとした。



図10 従来式（1 ビーカー羽回し）

利点：強い水流を作ることができる

欠点：配線が多くなる

幼生が傷つきやすい？（要再検証中）

食べ残しの餌が容易に固まり，除去しにくい

大量の餌と海水が必要となる

この従来式の弱点を克服すべく，以下の手法を検討した。



図11 エアレーション式 A（浮遊細胞培養用1 フラスコ縦置き）IWAKI 225cm²/non-treated flask（1143-225）をリサイクルして使用

利点：幼生が傷つきにくい？（要再検証）

食べ残しの餌は下に溜まり除去しやすい

欠点：エアポンプが止まると，1日で相当量が死亡



図12 エアレーション式 B（植物細胞培養用バッグ：アズワンテドラーバッグ2つ口キャップ付き1 ，リサイクル可能）

利点：最も幼生が傷つきにくい？（要検証）

食べ残しの餌は除去しやすい

欠点：高価（2500円/枚）

姿勢が安定せず水換えが難しい

エアポンプが止まると，1日で相当量が死亡

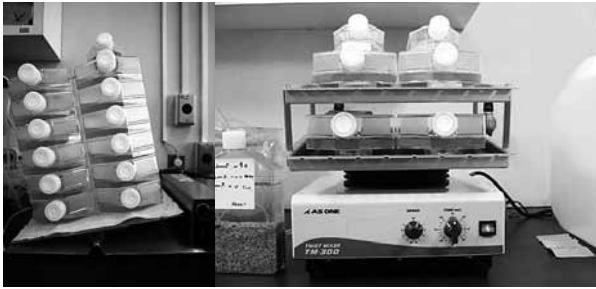


図13 震盪式（左：シーソー震盪，右：波動式）

- 利点：幼生が傷つきにくい
 食べ残しの餌は固まるので除去しやすい
 （羽回し式よりも塊は出にくい）
 震盪が止まっても1日程度は問題無し
 海水量が少なくすむ
 そのまま顕微鏡で観察できる
- 欠点：中央に胚が集中しやすい
 （シーソー型は中央ライン付近に，
 波動式は中央にスポット状に集まる）

これらの方法を検討した結果，初期には大量飼育に適したエアレーション式 A と安全な震盪式を平行して行い，個体数が減ってきたら震盪式に統一することが望ましいと考えられた．今後も，様々なアイデアを検討したい．

H：現在までの進捗状況（2008～2009年）

- 12/12 3匹産卵
 12/13 1匹産卵
 12/14 2日目の晩に0.5%のサンカルチャーを添加（ミュラー期）
 ゾウリムシの様なコンタミが現れる．
 中1日で海水交換（異常がなければ中2日）
 当初は2/3量の海水交換だったが，コンタミがひどいために全交換に変更
- 1/ 7 イソクリシス，ロードモナスを一部の状態の良いハイダー期のサンプルに与える
 250ml フラスコに100ml の海水を入れて下記の餌使用
 0.5% イソクリシスのみ 100個体
 1% ロードモナスのみ 100個体

- 0.5%イソクリシス1%ロードモナス
 0.5%カルシトランス100個体
 1/13 産卵後1ヶ月でハイダー期9389匹生存（図14）



図14 ハイダー期トルナリア幼生

- 1/21 3779匹（ハイダー期）
 餌を変えたフラスコにはメチニコフ期（図15）の幼生が現れる
 0.5% イソクリシスのみ 5個体
 1% ロードモナスのみ 1個体
 0.5%イソクリシス1%ロードモナス
 0.5%カルシトランス 7個体
 よって，餌にイソクリシス，ロードモナスを添加（濃度は上記通り）
 A：カルシトランス+イソクリシス
 B：カルシトランス+ロードモナス
 C：カルシトランス+イソクリシス+ロードモナス
 エアレーションしていたサンプルはポンプ不調のためにほぼ壊滅．以降全て震盪式に切り替え
- 1/26 メチニコフになりかけ1個体出現
 2/ 2 同3個体出現．波動式シェイカーを導入し，半数をそちらに移動
 餌は全て3種混合に切り替え
- 2/ 4 メチニコフ期45個体出現
 2/ 9 メチニコフ650個体出現
 2/16 クローン期になりかけ？（図15出現）

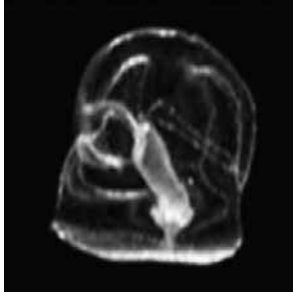


図15 クローン期?のトルナリア幼生

2/23 水交換中3日でも可能と判明

3/31 奨励研究終了報告

現在、クローン期に入った様な感じが続くが、特徴的なヒダヒダが少し見られはじめたかと思うと、また丸くなったりしている。外部構造が不安定ではあるが、内部構造的にはシュペンゲル期に移行しつつあるように見える。

国内ではメチニコフ期、クローン期への変態は初めて観察された。ハイダー期からメチニコフ期への変態には餌の変化が必要であり、定期的に受精後1ヶ月のハイダー期トルナリア幼生にロードモナス、イソクリシスといった珪藻を加えることで、変態が誘導される。この操作が無い場合、メチニコフ期への変態は誘導されなかった。

シュペンゲル期とアガシー期への変態を連続的に観察した例は世界的にもなく、今後の推移が期待される。一般的にはヒメギボシムシではアガシー期までは6ヶ月かかるとされている。また、定期的に10~20個体ずつ固定しており、写真撮影及び遺伝子発現解析にも対応できるように準備を整えている。

謝辞

この研究は附属臨海実験所田川訓史准教授のご指導の元で行われた事を銘記し、この場を借りて厚く御礼を申し上げます。また、同研究室の学生の皆様にも御礼申し上げます。本研究遂行には多くの障害が発生し、技術センター、ハラスメント相談室、学術室の存在無しには行うことができませんでした。ここに改めて感謝の気持ちを表したいと思います。

本研究は平成20年度奨励研究（海産新口動物幼生飼育装置の開発：課題番号20918016）によって行うことができました。御礼申し上げます。

参考文献

1) 動物系統分類学第8巻下、中山書店