

半索動物ヒメギボシムシのモデル動物化への試み

フィールド科学系部門 生物科学班
山口 信雄

YAMAGUCHI Nobuo: Marine Biological Laboratory, Hiroshima University Technical Center
Feeding methods for Hemichordate, *Ptychodera flava* larva

Summary: *Ptychodera flava*, hemichordate, occupy a key position in developmental biology. They exhibit both chordate and echinoderm-like feature in their developmental pattern and certain characteristics of their larval and adult body plans. Recently, the animal has been studied extensively at the genome analysis level. In contrast, there have been little investigations of feeding methods for larva and adult. This report shows an effort to solve the problems.

1. 目的

近年の海産無脊椎動物の分野では、凄まじい速さでゲノム解析やEST解析による研究が各種の非モデル動物でも行われている。しかしながら、非モデル動物ではその先の個別の遺伝子・タンパク質の解析や発生等と与える影響等の解析が十分に進められる状況にない。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ある。従って、効率よく研究を推進するためには、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）が緊急の課題となる。

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*, 図1) である。この動物を国内で研究する場合、現状では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。同種は和歌山県串本に生息すると30年前に報告されているが (Nishikawa, 1977), その後の状況は不明であった。

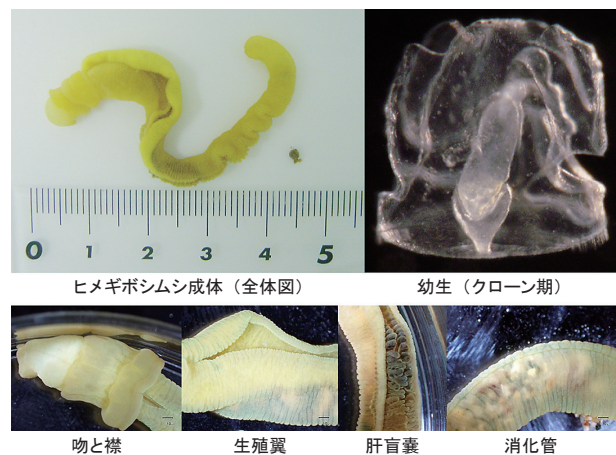


図1. ヒメギボシムシ成体 (全体像, 各部) と幼生

2. 方法

(1) 生息地調査と繁殖時期推定

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を月に一度調査した。

(2) 死亡率の少ない採集方法と輸送方法を検討した。

(3) 成体での濾過装置の必要性和餌の検討を行った。

(4) 串本産ヒメギボシムシの産卵法について検討した。

(5) 幼生飼育方法を飼育装置と餌の面から検討した。

3. 結果

(1) 生息地調査と繁殖時期推定

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、繁殖時期は生殖巣の状態から9月中旬～末にかけてと推定された。

(2) 採集方法と輸送

最干潮時に水深2m以浅の海底の砂を手で仰ぎ、少しずつ吹き飛ばしてヒメギボシムシが千切れないように全体を露出させる。引きずり出そうとすると容易に切断される。同時に、飼育のために生息地の砂を1ℓ程度の容器に1/3～1/2程入れ、現地で最低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状態を維持する事ができる。成体飼育用の海水は水深1m以下から採取した。

輸送中はエアクッション等を利用し、可能な限り衝撃を和らげた。さらに保冷剤を容器に直接保冷剤があたらないように入れて過度の温度上昇を防いだ。

実験室内では生息地の海水を水槽に入れて、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、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始めた。

(3) 成体飼育について

成体の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
- ・バブリングのみで良好に維持することができたが、濾過材等は使用すると、すぐにヒメギボシムシが痩せ細る現象が見られた。

(4) 産卵・放精手法について

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。

日本国内産のヒメギボシムシでの産卵実験はまだ誰も行った例が無く、ハワイ産ではヒートショック（+5℃）が有効であることが知られていた。当初、串本産はこの刺激で産卵せず、pH+2のショックのみが有効であったが、適切な輸送処置後一週間以内であればヒートショックでも産卵することを確認した。ギボシムシのみを温めた海水に入れると粘液を出すため、飼育に使用している小容器と砂ごと温水につけると粘液が海水に出にくいいため処理しやすくなる。日本産では何故か雄しか見られず（ハワイ産は性比半分）、現在50例以上の全てが雄であった。そのため、ハワイ産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・放精させて得た受精卵を用いて実験した。

0.45 μm ミリポアフィルターで濾過した海水に50 mg/l のストレプトマイシンを添加したもの（以下ミリポア海水）を用いて、卵は75 μm のメッシュでよく洗浄し、媒精させた。多精には強いため、ウニよりは少し多めに精子を入れる。1時間後に余剰の精子を除去するために卵を洗浄し、シャーレで静置した。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日後にはミユラー期の幼生になる。

(5) 幼生飼育法

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幼生飼育ではクローン期までしか前例がなく、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い。

この問題を解決するべく、数種類の幼生飼育装置にミユラー期の幼生を入れて飼育した。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もなる。海水が冷たいときは22～24℃に予熱した。

この海水をミリポア海水作製に使用した。温度はエアコンで水温が22~24℃程度になるよう調整した。光は自然光を利用した。

A 培養装置

コンセプトは研究のグローバル化を見据え、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。検討の結果、浮遊細胞培養用1ℓ~フラスコ (IWAKI 225cm²~ / non-treated flask) を縦置きしてバブリングする事で良好な結果を得ているが、まだ検討の余地は大きい。

B 餌について

餌には市販のサンカルチャー (高濃度 *C. calcitrance* 発売元 日清マリンテック) を1%になるよう与えていたが、それではハイダー期のままステージが進まずに死滅する。培養した *Isocrisys*, *Rhodomonas. sp* を餌に添加することでステージが移行することが確認された。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、これらを固定サンプルとしてだけでなく、生体の動きを動画として保存した。

4. 考察

本種でクローン期からシュペンゲル期、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。一般的にヒメギボシムシではアガシー期まで6ヶ月かかるとされる。また、定期的に100~1,000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、技術センター、相談室、サービスグループ、学術室の皆様にも深く感謝致します。

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