

半索動物ヒメギボシムシの完全飼育と国内生息域調査

フィールド科学系部門 生物科学班

山口 信雄

1. 研究の背景と目的

半索動物ヒメギボシムシ(*Ptychodera flava*: 図1)は棘皮動物(ヒトデ, ナマコ, ウニ類)や脊索動物(脊椎動物, ホヤ, ナメクジウオ類)と共に新口動物群に属する動物であり, 脊索動物の起源や進化を知る上で重要な動物である. ギボシムシにはトルナリア幼生を経て変態する間接発生種と幼生を経ずに成体となる直接発生種があり, 本種は前者である. ヒメギボシムシは再生能力を持つことでも注目され, EST 解析やゲノム解析などが精力的に進められている.

ヒメギボシムシは研究材料として魅力的な動物で, 分子生物学的インフラも整いつつあるが, 生体の入手は容易ではない. 一般的に熱帯の浅瀬で, サンゴ砂の堆積した砂浜の限られた場所に生息している. 組織が軟弱なために採集には経験を要する. 成体がある程度維持することは可能であるが, 飼育して成長させる手法は確立されておらず, 遠隔地への輸送も容易ではない. 生殖シーズンは冬季であり, 人工的に生殖層を発達させる手法も開発されていない.

初期発生を研究するための手法¹⁾に関しては詳細が報告されている. しかしながら変態までの生育期間は自然環境下で6カ月~9カ月必要とされており²⁾, 長期培養の成功例はない. さらに変態は長期の生育期間に対して僅か数時間で行われ, 変態期を含めた後期発生の幼生サンプルは世界的に入手が困難である.

本研究ではヒメギボシムシを受精から変態まで実験室内で培養する完全飼育の手法を確立することを目的とした. 一般的に, 研究の発展は試料の入手・維持の容易さに比例する. 近年, 系統学的に近い位置にある海産動物のカタクウレイボヤの研究が飛躍的に発展したが, その理由の一つに, 入手困難であった生物を研究者が容易に取り扱える技術とシス



図1. ヒメギボシムシ(*P. flava*)の外観

テムを整えたことがあげられる. 本研究はヒメギボシムシ生体を取り扱う技術を開発し, 半索動物の研究のモデル動物としての道を拓くものである.

2. 生息地調査と採集

ヒメギボシムシはインド洋から太平洋の熱帯水域のサンゴ礁原の底砂表層中に広く分布する. 日本は生息域のほぼ北限に位置すると考えられ, 和歌山県の潮岬北西部に生息することが報告されている(図2). しかしこれまでの採集では, 生殖に適した雌が採集できなかった. そのため, 雌雄が混在する他の生息地の探索を行った.



図2. 和歌山県潮岬のヒメギボシムシ生息地

まず、和歌山県と同じくサンゴの北限である高知県を対象に調査した。現地の海岸に関する情報を集め、南西部の足摺岬以西を調査した。干潮時にシュノーケリングで砂を掘ってヒメギボシムシを探索し、土佐清水市竜串に近い千尋岬北西部に小規模の生息地を発見した(図 3)。これは四国地方で初めてのヒメギボシムシ生息の報告と考えられる。しかしその場所は狭く、大型の個体は見られなかった。砂の堆積量も少なく、貝砂及び砂利混じりの荒い砂質であり、生息に適していない可能性がある。さらに広範囲を探索し、より大規模な生息地を見つけることが今後の課題である。



図 3. 高知県土佐清水市のヒメギボシムシ生息地

沖縄県では本島中部の本部町備瀬(図 4)に規模の大きな生息地があり、産卵シーズンが 10 月中旬から 11 月中旬(海水温 22~24℃)であることを確認した。この生息地の個体は大型のものが多く、採集も他地域に比べて容易であることから、現時点で最も有力な採集地となっている。



図 4. 沖縄県本部町備瀬のヒメギボシムシ生息地

また、本島南部の南城市百名海岸(図 5)にもヒメギボシムシが生息していることを発見した。備瀬産よりサイズが劣るものの、十分に生殖層が発達したサンプルが得られる。産卵期は備瀬と同じであると考えられる。百名海岸にはやや白いハネナシギボシムシに似たギボシムシ(図 6)が混在する。新種の可能性があるため、さらなる調査が必要である。



図 5. 沖縄県南城市百名のヒメギボシムシ生息地



図 6. 沖縄県南城市百名の白いギボシムシ

3. 人工放卵・放精

採集後 2 週間以内に、生殖翼の発達したヒメギボシムシを暗中で温度刺激(+5℃)して放精・放卵させる(図 7)。空輸後は放卵・放精率が激減し、得られた配偶子も発生途中で止まってしまうものが多いため、採集後現地ですぐに配偶子を得ることが望ましい。ハワイ産、沖縄産のヒメギボシムシは雌雄の比がほぼ 1:1 であったのに対して、串本産ヒメギボシムシは 50 個体以上刺激しても雄しか確認できなかった。

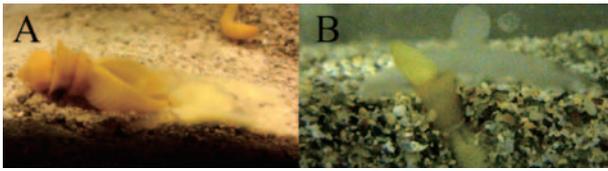


図 7. ヒメギボシムシの放卵(A)と放精(B)

4. 培養方法

(1) 受精からメチニコフ期

ヒメギボシムシの卵は0.45 μ m フィルターでろ過した25 $^{\circ}$ Cのストレプトマイシン海水(50mg/l)中で洗浄して粘液を除去した後に90mm シャーレ中で媒精した。余剰の精子は腐敗の原因となるため、卵を75 μ mのメッシュで1日1回ろ過してストレプトマイシン海水を交換する。培養は23~25 $^{\circ}$ Cで行う。2日後に孵化した幼生のみを集め、縦置きした1l培養フラスコ(IWAKI 225cm²/non-treated flask)に10~15個体/mlとなるように幼生を懸濁し、エアレーションによって攪拌した(図8のD)。5l水槽に入れて板状のプラスチック製のペラで攪拌してもよい(図8のE)。水槽は25 $^{\circ}$ Cのプールに入れて加温する。

餌は当初 *Chaetoceros calcitrance* の培養液であるサンカルチャー(日清マリンテック)を0.1%添加して

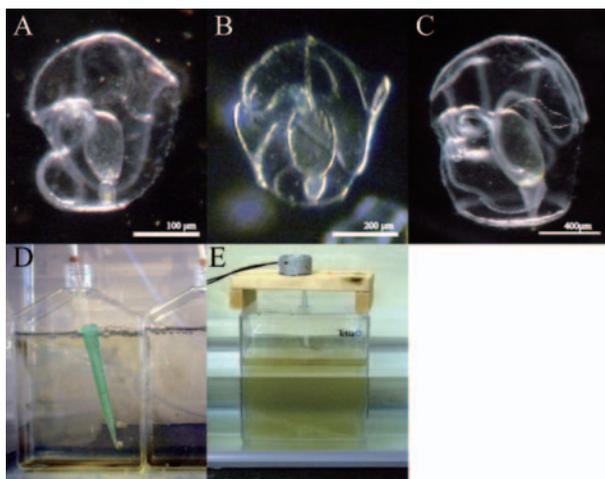


図 8. ヒメギボシムシ初期トルナリア幼生と培養方式
A: ミュラー期幼生(受精後9日),
B: ハイダー期幼生(受精後12日),
C: メチニコフ期幼生(受精後25日),
D: エアレーション培養の様子,
E: 5l水槽での培養

培養していたが、この条件ではステージが進まず、ハイダー期のまま死滅する。培養条件を検討したところ、*C. calcitrance*, *Isocrysis sp.*, *Rhodomonas sp.*の培養液を混合した餌を海水に対して2~10%添加することによって、メチニコフ期への誘導が可能となった。また、サプリメントとして0.1%マリンデラックス(H&S Co., Ltd., Germany)を添加した。余った餌や糞が腐敗すると幼生の状態が悪くなるため、週2回のストレプトマイシン海水の交換が必要である。

受精から約5日で繊毛帯のあるミュラー期(図8のA)になり、10日前後で幼生後部に繊毛管を形成してハイダー期(図8のB)となった。その後3週間かけて幼生表面に陥入が起こり、肛門が背部に移動してメチニコフ期(図8のC)のトルナリア幼生となった。

また、ハワイ産と沖縄産のヒメギボシムシを交配させると受精し、トルナリア幼生の孵化が確認されたことから、両者は同種であると考えられる。この結果は18S rRNAの塩基配列解析結果とも合致する。

(2) メチニコフ期からクローン期

約3週間でメチニコフ期に達した幼生は密度が10個体/ml未満にして5l水槽に入れ、板状のペラで攪拌する(回転数30rpm, 図9のI)。幼生が2mmを超える頃には密度を1~3個体/ml程度にする。餌の濃度は個体数を減らした場合は3~5%に調整する。

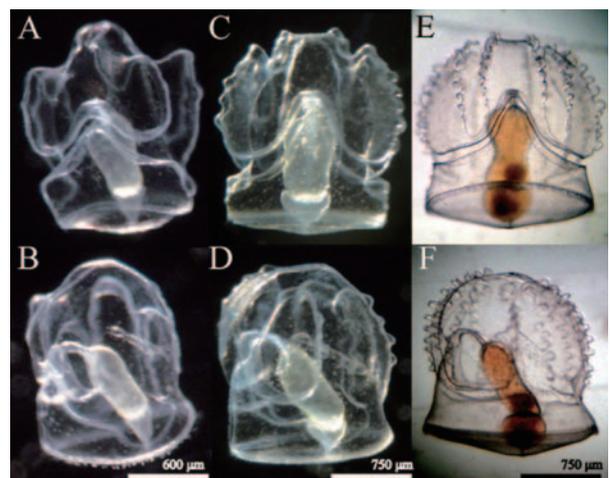


図 9. クローン期トルナリア幼生
初期クローン期(A: 正面, B: 側面),
中期クローン期(C: 正面, D: 側面),
後期クローン期(E: 正面, F: 側面)

約 6~7 週後に幼生表面に特徴のあるヒダ(二次葉)が形成され, 表面の陥入が深くなりクローン期幼生となる(図 9 の A~H). この手法により 22,800 匹の胚から 11,705 匹(51.3%)が生存し, 9,287 匹(40.7%)がクローン期へと誘導された.

(3) クローン期からアガシー期

その後 12 週まで二次葉が発達するが, 幼生の状態によっては二次葉が退行することがある. 背部から頭頂部直下にある吻体腔は線状から棒状に肥大化し, 吻体腔の先端は頭頂部に向けて突出する. この時期の吻体腔先端部の袋状の膨らみを指標としてシュペンゲル期へ移行したと判断した(図 10 の A, B). この時期に軀幹体腔および襟体腔が出現する.

シュペンゲル期からアガシー期, 変態までの過程は短時間で行われ, 僅か数時間で完了する. まず吻体腔が半球状に膨らみ, 筋肉索が表れる. この筋肉索の形成をもってアガシー期への移行とした(図 10 の C, D). 次に吻体腔以外の堆積が減少し, 二次葉が消失する(図 10 の E, F).

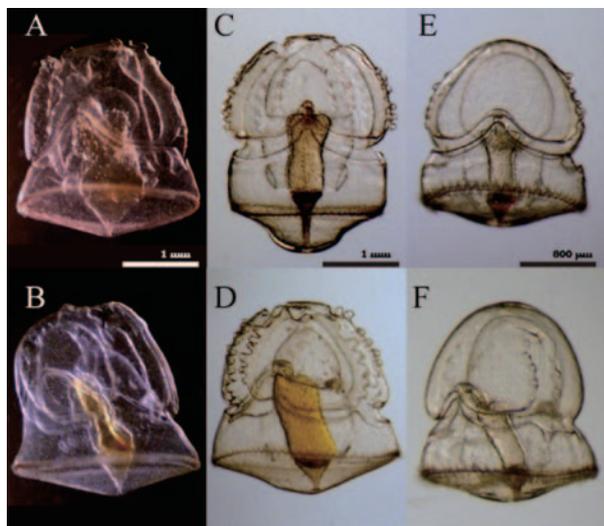


図 10. シュペンゲル期及びアガシー期幼生
シュペンゲル期(A: 正面, B: 側面),
初期アガシー期(C: 正面, D: 側面),
後期アガシー期(E: 正面, F: 側面)

(4) アガシー期から変態

アガシー期の幼生は変態期に入ると吻体腔を除く体部が収縮し(図 11 の A), 繊毛環を脱ぎ捨て遊泳を

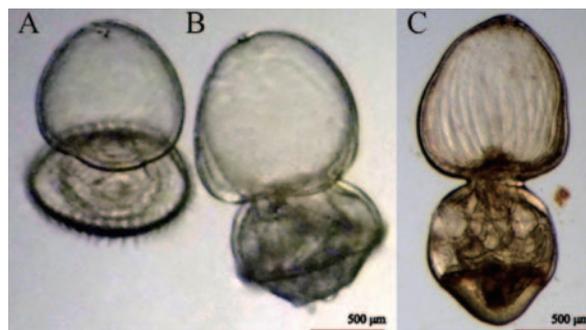


図 11. 変態期幼生

A: 変態中期, B: 変態後期,
C: 変態後(幼若成体)

やめる(図 11 の B). そして後部が伸長して変態した幼若体となり(図 11 の C, 図 12 の A, B)着底する. 着底後は鰓列を形成して胴部を伸ばし, 成体となる.

(5) 変態後

変態後, 幼若体は 0.5mm~1.0mm のサンゴ砂を薄く敷いたシャーレ中に移し, 経過を観察した. 変態した個体は吻部の運動により砂の中に潜る. この時期に 5l 水槽中で海水の攪拌を続けると, 吻部のみが容器に付着した状態となって胴部が水流で浮き上がり, 最終的には引きちぎられてしまう. この時期の欠損は再生したケースはなかった. そのため, 変態した個体は可能な限り速やかに取り出し, シャーレに移す必要がある.

変態後しばらくはシャーレ 1 枚当たり 5 匹程度を入れて培養し収縮時の体長が 5mm を超えたら 1, 2 匹程度にする. サンゴ砂は生息地のサンゴ砂を洗浄して使用した. 市販の粉状のサンゴ砂を使用することもできる. 人工的に砕いたサンゴ砂や有孔虫の殻などが混じった砂の場合は, 鋭利な部分でヒメギボシムシの消化管を傷つける恐れがあるため使用を避けた.

餌は変態と共に食性が懸濁物食から堆積物食に変わるが, 幼生時に与えていた珪藻混合液を継続して 5~10ml を各シャーレに週 2 回与えている. ストレプトマイシン海水はこの時に全て交換している.

このような飼育条件下で鰓裂や肝盲嚢は一月程で形成されたが(図 12 の D), 飼育を始めて最長で 28 カ月経った現在, 全長は収縮時で 3cm 程度である. 半年を過ぎると切断されても再生することができた.

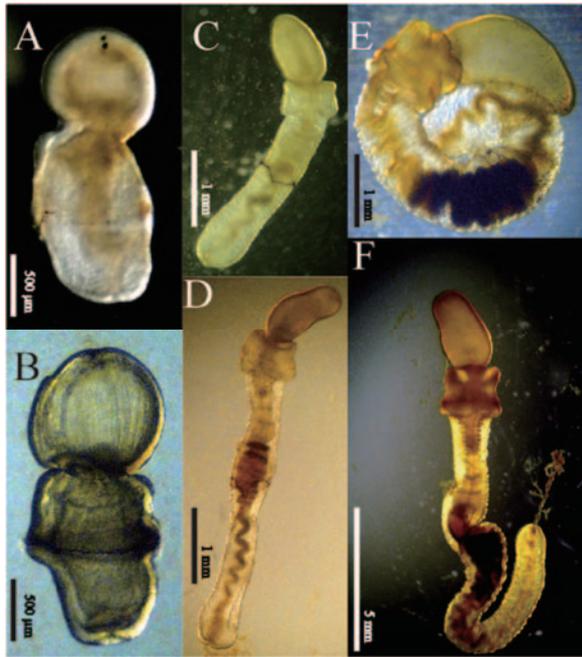


図 12. 着底した変態後の成体

- A, B: 変態後 1 日 ,
 C: 変態後 3 日 , D: 変態後 9 日 ,
 E: 変態後 3 週 , F: 変態後 1 年

(6) 奇形個体

長期間(10 カ月)培養した幼生から, 図 13 に示す個体が見られた. 発生初期からの異常か, ウニ幼生で稀に見られる出芽によるものかは判定できない.

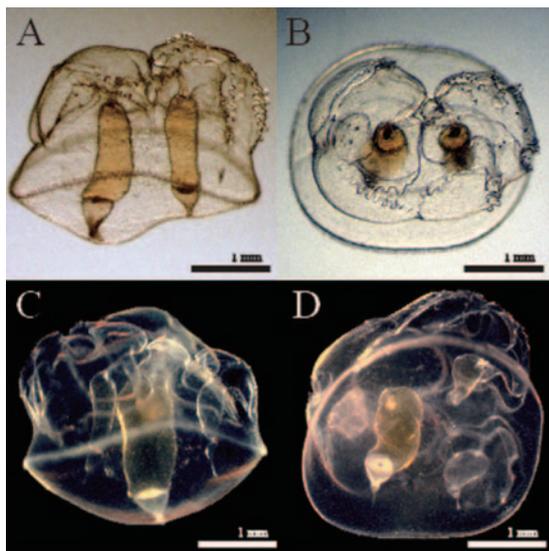


図 13. 長期培養中に得られた奇形個体
 結合双生(A: 側面, B: 上面),
 結合三生(C: 側面, D: 底面)

5. まとめ

本研究では日本国内で新たなヒメギボシムシ生息地を調査・発見した. さらに生殖期のヒメギボシムシから配偶子を採取し, 実験室内で受精から変態まで大量に培養して着底させることに世界で初めて成功した. トルナリア幼生の様々なステージの移行が困難であった問題は, 餌の工夫や培養方式の変更によって解決することができた. 変態までの期間はこれまでの説より短い3カ月に短縮することが可能となった. また, 培養を継続して 10 ヶ月後まで幼生を維持し, 変態させることもできた.

実験室内での大量培養法の確立により, 新口動物の進化・起源の研究や, 変態による器官や組織の再構築の研究等に貢献することが期待できる.

6. 今後の課題

シュペンゲル期以降のドラスティックな変化を詳細に迫るためには, 変態を誘導するトリガーの解明が必要である. 幼生の飼育法はほぼ確立したが, 成体を自然界同様に成長させる手法は未完成で, 堆積物食に適した餌の開発が必要である.

謝辞

本研究は理学研究科附属臨海実験所田川訓史准教授のご指導の下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. 同研究室の皆様にも様々なご協力を頂きました. また, 広島大学技術センター及び学術部の皆様よりご支援を頂いております. この場を借りて御礼申し上げます.

本研究は, 奨励研究(課題番号 20918016, 23924016)の助成を受けております.

参考文献

- 1) 動物系統分類学第 8 巻下, 中山書店
- 2) Tagawa K, Nishino A, Humphreys T, Satoh N (1998) The Spawning and Early Development of the Hawaiian Acorn Worm (Hemichordate), *Ptychodera flava*. *Zool Sci* 15: 85-91