

研究成果報告書（第27回学術研究助成）

2020年 4月 6日

公益財団法人 藤原ナチュラルヒストリー振興財団

理事長 野村 茂樹 殿

所属機関名 金沢大学総合技術部環境安全部門

職 名 主任技術職員

氏 名 小木曾 正造

1. 研究課題

マシコヒゲムシ幼生の口の形成及び閉鎖時期の解明と消化管形成に関する研究

2. 共同研究者

金沢大学環日本海域環境研究センター

鈴木信雄・関口俊男・笹山雄一・浦田慎

3. 研究報告

I. 研究の目的

ヒゲムシはハオリムシやホネクイハナムシと同じ環形動物門多毛綱ケヤリムシ目シボグリヌム科に分類されており、大部分が海底に埋まった細長い棲管を作り、その中で生活している。ヒゲムシの成体は口や腸、肛門などの消化器系を持たず、体内に化学合成細菌を共生させ、細菌から栄養を得る特殊化した生活様式を送る。一方、幼生期には口や消化器官が形成されることが知られており、この時期に将来共生するための細菌を取り込んでいる可能性がある。この場合、消化器系の消失は生存に必要な栄養を得るため、共生関係成立後に起こることが予想される。しかしながら、いつどのようにしてこの共生関係が成立し、消化器系が消失するのかが明らかになっていない。ヒゲムシの胚発生及び幼生の成長過程を明らかにすることは、共生関係の成立という特殊化の過程を解明するための大きな手掛かりとなる。そこで本研究では、能登半島の九十九湾に生息するマシコヒゲムシ *Oligobrachia mashikoi* を用いて、その発生と成長の過程を明らかにするため、消化器系の形成過程に着目して観察を行った。

II. 研究の方法

九十九湾にある金沢大学臨海実験施設前の海底で、スキューバダイビングを用いてマシコヒゲムシを採集した。棲管から取り出した後、体内に卵を持つ個体を切ってろ過海水中に卵を取り出し、23℃でインキュベートした。卵を取り出してから48時間後まで、2時間おきに胚を10～15個体ずつ4%パラホルムアルデヒドで固定した。48時間以降は、14日目まで24時間おきに幼生を15個体ずつ同様に固定した。幼生が泥へ着底した後の成長を調べるため、6日齢の幼生60個体を泥の入った容器に移し、23℃でインキュベートして、14日齢に泥から取り出して同様に固定した。これらの胚と幼生は、固定の6～24時間後にPBSで洗浄して脱色処理（6%過酸化水素水・0.1%TritonX in PBSで2時間）を施し、洗浄後に染色保存液（0.28 μMフェロイジン・0.01%TritonX in PBS）に入れて冷蔵保存した。これらの標本にDAPI染色を行った後、イソプロパノール系列を用いて脱水して透明化处理（ベンジルアルコール/安息香酸ベンジル法）を行い、共焦点レーザー顕微鏡による撮影を行った。

一方、生息地において新規に加入した個体を見つけるため、海底2カ所にデジタルカメラを設置し、1時間間隔で撮影した。3～4日間隔でカメラを交換し、2020年1月9日から2月14

日まで連続して撮影を行った。

III. 研究結果

体内に卵を持ったマシコヒゲムシ43個体を採集し、この中の39個体から取り出した卵で発生が見られ、胚と幼生を合計660個体固定した。卵を親の体から取り出した約2時間後に最初の卵割が起こり、発生が進んだ。10時間後には胚の内部に卵割腔が見られ、12時間後には繊毛による回転運動をしており、胞胚期に達していた。16時間後には胚の中央へ伸びる内胚葉性細胞塊が確認でき、囊胚の形成が見られた(図1)。24時間後には自家蛍光を持つ繊毛帯が生じ、回転しながら一定方向に進む様子が確認できた。32時間後には体が伸長し始め、その後、徐々に体後方が伸長し、前方、中央、後方の繊毛帯が明瞭となった(図2)。3日目以降は体の後方がわずかに伸長するものの、外見上の大きな変化は見られなくなり、次第に遊泳する個体が減り、シャーレの底や壁でじっとしている個体が増えていった。一方、6日齢で泥の入った容器に移した個体では、14日齢では棲管を作ってその中で生活していた。棲管から取り出すと、体は大きく伸長していて、体前方には1本の長い触手が形成されていた。大きく成長していたため体全体を共焦点レーザー顕微鏡で撮影することはできなかったが、体内中央に管状の空間が体の前方から後方まで続いていた。

新規加入個体を探すために海底2か所に設置したカメラでは、6個体と3個体の計9個体のマシコヒゲムシを撮影でき、865時間連続で撮影することに成功した。

IV. 考察

ヒゲムシ類において初めて、一連の発生過程における胚の内部構造を蛍光顕微鏡による鮮明な画像で撮影することに成功した。これによりマシコヒゲムシの各発生ステージとその経過時間を明らかにすることができた。すなわち、発生開始2時間後に第一卵割が始まり、10時間後には卵割腔が形成され、12時間後には胞胚となり、16時間前後で囊胚の形成が起こる。24時間後には繊毛帯が形成され、32時間後にトロコフォア幼生となった。海水のみを入れた容器では3日目以降は体がやや伸長していくものの、形態に大きな変化は見られなくなった。囊胚の形成では、胚表面の明確な陥入は見られず、内胚葉性の細胞塊が胚の中央にある卵割腔へ入り込んで大きくなった。この時に原腸の形成が起こっていると考えられるが、撮影した画像では原腸腔は確認できなかった。

マシコヒゲムシの胚において、10時間後には卵割腔が形成され、この体腔は胚の体積の大きな割合を占めるようになり、トロコフォア幼生となって体が伸長すると、体の約半分の空間を体腔が占めていることが判明した(図3)。

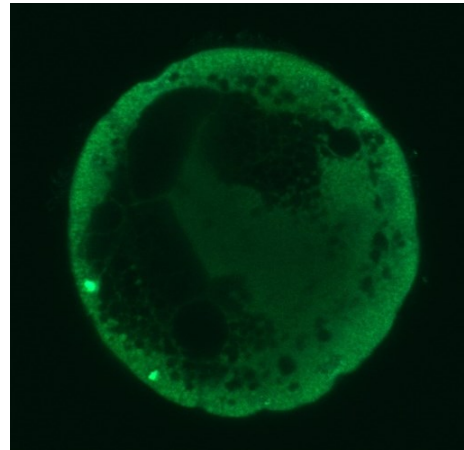


図1 発生16時間後の囊胚
胚の右下から中央に向かって内胚葉性細胞塊が伸長している。

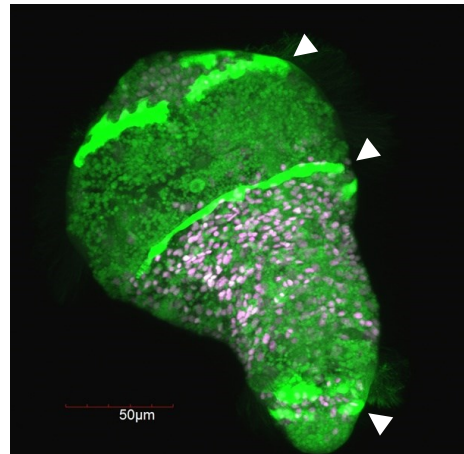


図2 発生48時間後の幼生
ファロイジン染色が緑色、DAPI染色がマゼンタ色で、繊毛帯(矢印)は自家蛍光による緑色。

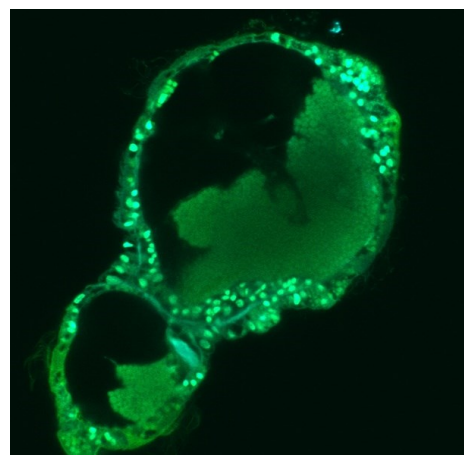


図3 発生4日後の幼生の断面
体腔(体内の黒い部分)が約半分の面積を占めている。

泥を入れた容器では海水のみの容器では見られなかった急激な成長が見られ、泥への着底が引き金となりその後の成長が引き起こされると考えられる。この方法を用いることにより、幼生から幼体への成長過程を観察することが可能となった。成長した幼体で観察された体内の管状の空間は、体前方の触手から体後方まで見られたことから、体腔であると考えられる。

海底で撮影した9個体のマシコヒゲムシの触手は、水槽内で幼生から2年間育てた個体の触手に比べて太く長いことから、新規加入個体ではないと考えられる。

V. 成果発表

学会や研究会での発表を検討している。

VI. 今後の課題

本研究により、発生開始16時間後に囊胚に達することが明らかとなり、今後この時期を中心に観察することによって、原腸の形成を詳細に調べ、原腸腔や口の開口部を確認することができるようになると考えられる。本研究において、着底後に成長して大きくなった幼体の詳細な内部構造を共焦点レーザー顕微鏡で観察することが難しかったのは、体が厚くなりレーザーが内部まで届かないことと、非常に細長い棲管から個体を取り出すのが困難だったため、今後は、棲管ごとパラフィン切片を作成することにより幼体の内部構造を観察する必要がある。これにより、消化器系が消失するまでの標本作製し、その時期を明らかとしたい。マシコヒゲムシ体内における化学合成細菌の量をqPCRを用いて定量化することにより、細菌の取り込み時期及び共生関係の成立時期を明らかとし、消化器系の消失と共生関係の成立の関連を明らかにしたい。