

平成 18 年度水産学進歩賞

シオミズツボワムシの生理機能と仔魚への餌料効果に関する研究^a

萩原 篤志

長崎大学大学院生産科学研究科

Study on physiological function of the rotifer *Brachionus plicatilis* sp. complex
and its dietary effects for fish larvae

ATSUSHI HAGIWARA

Graduate School of Science and Technology, Nagasaki University, Nagasaki, Nagasaki 852-8521, Japan

シオミズツボワムシ（輪形動物門，以下ワムシと略）は，複数の種から構成される複合種（*Brachionus plicatilis* sp. complex）で，サイズが 0.1~0.3 mm，細胞数約 800 の汽水性動物プランクトンである。伊藤¹⁾の研究後，今や世界中で種苗生産用餌料生物として用いられている。餌料生物学は大きく二分され，一つは仔魚の栄養要求を満たすための研究で世界的にみてこれが餌料生物学の主流である。もう一つは餌料生物種が生活環の中で示す機能の解明を通じて，餌料としての性能向上を目的とするもので，筆者らは後者の立場から研究を行ってきた。本研究の底流をなすのは，増養殖の現場で活躍する人々との交流を通じて，実学的な問題点を抽出するプロセスである。飼育困難な海洋生物の飼育を実現するための技術開発に対し，基礎科学の立場から検討することを特に意識してきた。また，本種は飼育が容易なため，動物プランクトン研究のモデル生物としても重視されている。陸水生態学分野でワムシを中心に扱う研究者は国内に少ないが，この分野の欧米の研究者と連携してきたことが，研究の質と生産性を向上させる上で効果的であった。すなわち，生理学，生化学の手法を導入し，諸現象の機構を調べると共に，産業への応用を視野に入れて研究の展開を図ってきた。ワムシ等のマイクロな動物を対象とした研究技法には仔魚研究への応用が可能なケースもある。その経過をまとめる。

1. ワムシのサイズと仔魚への餌料効果

ワムシには大型で冷水性のいわゆる L 型ワムシ，小型で暖水性の S 型，SS 型ワムシが知られている。一般に，仔魚飼育では口径に応じた大きさのエサ給餌が必要

である。ワムシのサイズはワムシの型や株を選択することによって 100~300 μm の範囲を十分にカバーできる。研究室の共同研究者である阪倉らと，仔魚の成長ステージとワムシに対するサイズ選択性の関係を調べた結果，どの魚種でも成長にもなって大きなエサを選択的に摂餌し，摂餌数も増えたが，口径サイズの大きい魚種ほど大きなエサを選択的に摂餌するとは限らないことが明らかになった。たとえば，ホシガレイ，ブリ，ヨシノゴチを用いて，仔魚期のワムシサイズに対する摂餌選択性を調べた例では，ヨシノゴチは 3 魚種の中で最も口径が小さかったにもかかわらず，大きなワムシへの選択性が最も強かったが，ブリでは成長しても小型のワムシを専食した。以上のことは，仔魚のワムシサイズに対する選択性は単に口径のみに依存するのではなく，魚種に固有の選択性があることを示唆している。²⁾ また，最近のマハタを材料とした研究から，至適サイズのワムシを順次給餌することによって，仔魚の成長，生残を改善できることを見出している。³⁾ すなわち餌料生物としてのワムシ研究は，サイズや増殖特性，環境耐性など，遺伝的に規定される性状を把握して大量培養や仔魚飼育に役立てると共に，必要なワムシ株を必要量，安定的に供給するための技術開発を推進することが重要である。次にそれらについて述べる。

2. ワムシの分類と培養株の同定

自分の培養しているワムシが元々どこから来たものなのかは，種苗生産に携わる人々の共通の疑問であろう。餌料生物としてのワムシ培養技術は日本のオリジナルであり，その後，世界に普及する過程で多くのワムシが海

Tel./Fax : 81-95-819-2830. Email : hagiwara@nagasaki-u.ac.jp

^a 受賞題目：ワムシ類等餌料用動物プランクトンの生理機能と仔魚への餌料効果に関する研究

外へ運ばれた可能性も高い。ワムシの外部形態、生殖特性に大きな変異のあることは古くから知られてきたが、遺伝学的に最初にこれが明らかにされたのは、1990年前後のアロザイム分析⁴⁾と染色体核型分析⁵⁾を通じてであった。この研究により、本種が2種以上から構成される複合種であることがわかり、さらに形態的に区別できないワムシ株の間にも大きな遺伝的変異の存在が明らかになった。この問題に対し、筆者らはワムシ株間の生殖隔離の度合いを知ることがこの問題の本質的な答えを与えると考えた。概念上の種分類の決め手となるワムシ株間の生殖的隔離の有無は、寿命の短いワムシ(25°Cで7~10日)では容易に調べることができる。また、その頃米国のSnellらがワムシの性フェロモンが分子量29000の糖タンパクであることをつきとめていた。⁶⁾そこで研究室の大学院生だった小谷(現・福山大)と共に、雌雄の交尾頻度を株間で測定すると共に、雌の繊毛冠部に分布する性フェロモンを雄が認識して交尾を開始することを利用して、性フェロモンとその抗体を用いたアッセイ(例えば、特定株の性フェロモン抗体と他株の性フェロモンとの反応度測定、抗体を結合させた雌に対する雄の交尾頻度測定)を実施した。⁷⁾その結果、形態種として知られるいわゆるL, S, SS型の中で、L型ワムシはS, SS型ワムシと全く交尾をせず、両者を別種とみなすべきであること、S型とSS型の雌雄は交尾を行うが受精が起こらず、形態的にも大きな違いがあることから、これも別種として扱うべきであることをつきとめた。その後、ワムシの種分化について進化生態学の立場から検討してきたスペインのSerraとの共同研究へと展開し、L, S, SS型ワムシをそれぞれ*Brachionus plicatilis*, *B. ibericus*, *B. rotundiformis*に分類した。⁸⁾一方、Gomez⁹⁾はITS1(核リボソームRNAのスペーサー領域)やミトコンドリア遺伝子のCOIを用いた分子系統分類を行い、ワムシを12種に分類することを提唱している。このような、形態的な違いを認めたいワムシ株の間にも種レベルでの遺伝的変異があり、別種として位置づけていく方向性は、生物材料として本種を扱う研究者にとっては不都合なことである。筆者は、今後も本種の形態種としての考え方は残していくべきであり、シオミズツボワムシ*B. plicatilis* sp. complexのL型, S型, SS型等の表現で記すことを推奨したい。また、二つの部分的なDNA塩基配列のみを用いた解析結果がワムシの系統進化を論じる上でどの程度正確かについても、今後の検討が必要である。その意味で、ワムシの生殖的隔離に本質的に関わる、性フェロモン産生を支配する遺伝子を明らかにし、これを用いた系統分類への取組みが重要になるであろう。

3. ワムシの耐久卵形成と保存

ワムシは生活環の中で単性生殖のほかに、両性生殖という生殖様式を示す。両性生殖では最終産物として耐久卵を形成するが、その経過についての詳細は1980年代にはほとんど分かっていなかった。耐久卵の形成に至るまでには【amictic femaleによるmictic femaleの産出】→【mictic femaleによる雄の産出】→【雄と出生間もないmictic femaleとの交尾】→【受精】→【耐久卵の形成】という5つのステージがあり、個体群内ではこれらのステージは同時に進行する。このプロセスが完了するまでに要する期間は25°Cで4~5日である。前述のように各型のワムシが分布する水温域は異なっているが、ワムシの生育にとって良好な環境下で、単性生殖のみならず両性生殖も活発に誘導され、耐久卵の形成が起こるようになる。¹⁰⁾これは、エサ不足等の環境悪化が引き金になると言われているミジンコ類の場合の様式とは異なる。また、両性生殖誘導に好適な環境であっても、飼育水の交換を頻繁に行えば両性生殖は誘導されない。すなわちワムシの代謝産物の中に両性生殖を誘導する物質があり、これが水中に蓄積し、両性生殖が発現すると考えられている。我々は、無菌的にワムシを培養すると両性生殖が起こりにくくなること、いくつかの細菌株の添加によって誘導されること、さらにワムシの水溶性抽出物の添加によって無菌下でも両性生殖が起こることなどをつきとめた。¹¹⁾

両性生殖の誘導能力はワムシ株によって大きく異なり、このとき、個体群のスタートとなる耐久卵ステージが重要な意味をもつ。すなわち、耐久卵形成や休眠時の環境が、その耐久卵から生じるワムシの性状に大きな影響を与える。例えば低温下などで十分休眠させた耐久卵から生じるワムシ個体群の増殖は、休眠させなかった場合より約30%高くなる。¹²⁾また耐久卵孵化ワムシに飢餓を経験させたり、パン酵母など質的に劣る餌料を数世代にわたって与えた後、良質の餌料に切り替えたりすると、耐久卵形成を活発に行うようになる。¹³⁾したがって、天然下では越冬耐久卵から春先に孵化するワムシは個体群を活発に増殖させ、夏に作られた耐久卵が越冬せずに秋に孵化した場合には、活発な耐久卵形成を行って冬に備えるような生活環があるのかもしれない。

形成された耐久卵は、好適な環境下に置かれても孵化までに1,2週間を要するので、この期間は内因性休眠と呼ばれていた。筆者らは、水温と塩分を調節しながら、孵化までの期間を測定した結果、高水温、低塩分下ほどこの期間が短くなることがわかった。¹²⁾従って環境に応じた速度で卵内に変化が生じていることが推定され、組織学的な検討結果から、卵内の核数の増加と、二次卵膜が徐々に肥厚していく現象を確認した。¹⁴⁾以上より、このステージの耐久卵は、生命現象の停止を意味す

る休眠下ではなく、産卵後の後成熟 (post-maturation) 期にあると判断された。休眠卵の卵膜は生体の防御に機能するムコ多糖を多く含んでおり、これを肥厚させることによって、細菌による分解や物理的な外圧などのダメージ回避に役立っているものと推測される。

後成熟を終え、休眠状態にある卵は光の照射がトリガーとなって、眠りから覚め、孵化に至る。形成された休眠卵を暗黒下で十分保存したのち、光照射すると卵の孵化はほぼ同時に起こるが、卵形成直後から光照射した場合には、孵化は20日以上にわたって散発的に起こる。¹²⁾ 孵化のトリガーとなる光波長については、強いエネルギーをもった短波長光 (350~400 nm) の照射が有効であり、暗黒下におかれた耐久卵でも過酸化水素やプロスタグランジンの添加によって孵化が起こる。¹⁴⁾ 以上より、光化学的に活性酸素が海水中に生成し、これが卵内に含まれる高度不飽和脂肪酸を酸化してプロスタグランジンが生成され、孵化を誘起するというプロセスが推定された。耐久卵はワムシの生活環の中では最も悪環境に強いステージであるが、受精した雌によって産出されたばかりの耐久卵は、悪環境に対する耐性が大変低いことも最近の研究から分かってきた。¹⁵⁾ ワムシが正常に生活しているように見える場合にも、生活環は必ずしもスムーズに進行しているとは限らない。

ワムシが生息する汽水域の底泥中には耐久卵が沈積している。我々は底生生物による攪乱のないサンプルを採泥し、これを精査した結果、65年前 (²¹⁰Pb法) に形成された耐久卵の孵化を確認している。前述の交尾行動観察や性フェロモン抗体を用いたアッセイを実施したが、時間的に異なる時期に出現したワムシ個体群間には予想に反して生殖的隔離は全くみられず、長期にわたり遺伝的に均一な個体群を維持していることが分かった。¹⁶⁾

4. ワムシの生理機能と培養診断・治療技術への展開

ワムシの生殖にはどのような生理学的な機構があるのか、1990年代に至るまで皆無であったので、筆者らは高等動物のホルモンや神経伝達物質の投与によって、生活史にどのような変化が表れるか検討した。神経伝達物質やコイ脳下垂体をホモジナイズしたホルモン混合物を含めた15種類の脊椎・無脊椎動物ホルモンをワムシ飼育水に添加した結果、ブタ成長ホルモン (GH) とγアミノ酪酸 (GABA) がワムシの個体群増殖を促進させ、昆虫類の幼若ホルモン (JH) とセロトニン (5-HT) がワムシの両性生殖誘導頻度を増大させることを見出し、GABAとJHにはワムシの体サイズを5~10%程度大型化する作用が見つかった。¹⁷⁾ このときGHとGABA投与は産卵数に影響しないが、成熟を促進させると共に、卵の発生速度を速め、個体群増殖を促進する働きがあることが分かった。また、GABAによるワムシ個体群増

殖の促進や5-HTによる両性生殖の誘導は、餌不足や非解離アンモニアが高濃度の時など、ワムシにとってストレスの大きい環境下で顕著に現れた。これらの効果は、化学物質に曝したワムシ個体ばかりでなく、直接処理していないF₁やF₂世代にも保持されることが明らかとなった。

ワムシ培養の好不調を判断するためのパラメータとして、ワムシ1個体当たりの携卵数、いわゆる卵率が汎用されている。しかし、ワムシ個体の生理機能に変調が生じてから卵数の変化となって現れるまでには1,2日を要し、すでに培養不調に陥った後である場合が多い。そこで蛍光性の基質を用いた酵素活性測定を応用し、プランクトンを材料とした毒性評価試験の技法を用いた培養診断ができないか検討した。ワムシ飼育水中にアンモニア等を添加して、人為的なストレスを与え、数種の蛍光性基質を用い、ワムシの酵素活性を測定した。その結果、ストレス因子の変動下で、ワムシ消化管内のグルコシダーゼ活性が、ワムシの寿命、産仔数変化と極めて有意な相関を示し、ワムシの生理状態の鋭敏な指標となり得ることが明らかとなった。¹⁸⁾ この技法は、ヒラメ¹⁹⁾やカサゴ²⁰⁾仔魚の健康度判定に対しても効果的であった。

培養不調に陥ったワムシの状態は、前述のγアミノ酪酸の添加によって改善できる。また、人為的なストレスによって増殖不調になったワムシ飼育水へのγアミノ酪酸の添加や、飼育水塩分の低下により、ワムシの産仔が回復することが分かった。このとき、グルコシダーゼ活性も正常値に戻った。また、仔魚に給餌する前の栄養強化や低温下での保存の時にも、ワムシはストレスに曝されることが多いが、γアミノ酪酸を投与することによって、斃死個体の増加や遊泳力の低下を抑制できた。¹⁸⁾

5. 今後の展望と産業への展開

ワムシの耐久卵は乾燥や凍結にも耐える。最適化された条件のもとで実施した試験では、約2週間で100億以上の耐久卵を生産でき、現在、産官学の連携研究を通じて製品化の段階に至っている。

また、筆者の研究室では、世界最大規模の動物プランクトンのカルチャーコレクションを保有し、その中には世界各地の汽水域や塩湖から採集した約100株のワムシのほか、ミジンコ類、カイアシ類が含まれている。これらを活用した研究は、まだ始まったばかりで、基礎と応用にわたった研究の多様な展開が可能である。ワムシの形態の変異は大きく、増殖能力、両性生殖誘導能力等の生殖特性も大きく変化する。各種のストレス因子に対する耐性も、遺伝的に異なるワムシの株間で大きく異なり、²¹⁾ 適株を選択することによって培養不調を事前に防ぐことができる場合も多い。株間交雑も可能であり、この操作によって、サイズ、増殖能力、アンモニア耐性の

点で優れた株を作出できた例もある。²⁾ また、当研究室の博士研究員・菅との共同研究によって、ワムシの遺伝子解析を推進している。^{3,22)} 本種が生活環の中で示す多様な生物機能の分子機構を解明していくことも今後の魅力的な研究テーマである。

餌料生物学の歴史では、天然海域で仔魚の餌料となっているカイアシ類等の微小動物プランクトンの代替としてワムシ、アルテミア、微粒子飼料の系列を導入してきた。しかし有用魚種の中には、この餌料系列で飼育できないものや、飼育できても奇形や病気が頻繁に発現する例があることも事実である。ワムシとアルテミアの系列では、100 μm 以下のサイズと 300~500 μm サイズの餌料を仔魚に十分供給することが困難である。また、ワムシやアルテミアの遊泳行動や速度は、仔魚にとって摂餌しやすいものであるが、天然域で観察される動物プランクトンに比して、あまりにも摂餌しやすいものであることは、仔魚の質的な観点からすると、逆に気になることでもある。近年、水槽内の水流を変化させると、仔魚の性状にも変化が生じることが明らかになった。²³⁾ このように、海と飼育水槽の間の様々な環境のギャップを埋めていくことも当該分野の課題として重要であろう。

謝 辞

この研究を開始するきっかけと多くの励ましを頂いた平野礼次郎、日野明徳、平山和次の諸先生に感謝致します。本研究は長崎大学・水産増殖学研究室の総力として実施してきたもので、研究推進に御協力と御助言を頂いた内外の多くの皆様方に深謝申し上げます。そして今回の受賞は筆者のみならず、研究室として大きな自信、喜びとなりました。ここに御礼申し上げます。

文 献

- 1) 伊藤 隆, 輪虫の海水培養と保存について. 三重県立大学水産学部紀要 1960; **3**: 708-740.
- 2) Hagiwara A, Suga K, Akazawa A, Kotani T, Sakakura Y. Development of rotifer strains with useful traits for rearing fish larvae. *Aquaculture* (in press)
- 3) 田中由香里, 阪倉良孝, 中田 久, 萩原篤志, 安元進. マハタ仔魚のワムシサイズに対する摂餌選択性. 日本水産学会誌 2005; **71**: 911-916.
- 4) Fu Y, Hirayama K, Natsukari Y. Genetic divergence between S and L type strains of the rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. Muller. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1991; **151**: 43-56.
- 5) Rumengan IMF, Kayano H, Hirayama K. Karyotypes of S and L type rotifers *Brachionus plicatilis* O. F. Muller. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1991; **154**: 171-176.
- 6) Snell TW, Rico-Martinez R, Kelly LS, Battle TE. Identification of a sex pheromone from a rotifer. *Mar. Biol.* 1995; **123**: 347-353.
- 7) Kotani T, Hagiwara A, Snell TW. Genetic variations among marine rotifer strains and function of mate recognition pheromone (MRP). *Hydrobiologia* 1997; **358**: 105-112.
- 8) Kotani T, Hagiwara A, Snell TW, Serra M. Euryhaline *Brachionus* strains (Rotifera) from tropical habitats: morphology and allozyme patterns. *Hydrobiologia* 2005; **546**: 161-167.
- 9) Gomez, A. Molecular ecology of rotifers: from population differentiation to speciation. *Hydrobiologia* 2005; **546**: 83-99.
- 10) Hagiwara A, Hino A, Hirano R. Effects of temperature and chlorinity on resting egg formation in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1988; **54**: 569-575.
- 11) Hagiwara A, Hamada K, Hori S, Hirayama K. Increased sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera) with the addition of bacterial and rotifer extracts. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1994; **181**: 1-8.
- 12) Hagiwara A, Hino A. Effect of incubation and preservation on resting egg hatching and mixis in the derived clones of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 1989; **186/187**: 415-421.
- 13) Hagiwara A, Kadota Y, Hino A. Maternal effect by stem females in *Brachionus plicatilis*: effect of starvation on mixis induction in offspring. *Hydrobiologia* 2005; **546**: 275-279.
- 14) Hagiwara A, Hoshi N, Kawahara F, Tominaga K, Hirayama K. Resting eggs of the marine rotifer *Brachionus plicatilis* Muller: development and effect of irradiation on hatching. *Hydrobiologia* 1995; **313/314**: 223-229.
- 15) Marcial HS, Hagiwara A. Effect of diazinon on life stages and resting egg hatchability of rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* (in press).
- 16) Kotani T, Ozaki M, Matsuoka K, Snell TW, Hagiwara A. Reproductive isolation among geographically and temporally isolated marine *Brachionus* strains. *Hydrobiologia* 2001; **446/447**: 283-290.
- 17) Hagiwara A, Gallardo WG, Assavaaree M, Kotani T, de Araujo AB. Live food production in Japan: recent progress and future aspects. *Aquaculture* 2001; **200**: 111-127.
- 18) de Araujo AB, Hagiwara A, Snell TW. Effect of unionized ammonia, viscosity and protozoan contamination on reproduction and enzyme activity of the rotifer *Brachionus rotundiformis*. *Hydrobiologia* 2001; **446/447**: 363-368.
- 19) de Araujo AB, Gallardo WG, Snell TW, Hagiwara A. Enzyme activity as a tool for assessing the cultured condition of rotifers and fish larvae—a preliminary study. *Bull. Aquacult. Assoc. Canada.* 1998; **98**: 30-34.
- 20) Matsuo Y, Kasahara Y, Hagiwara A, Sakakura Y, Arakawa T. Evaluation of larval quality of viviparous scorpionfish *Sebastes marmoratus*. *Fish. Sci.* 2006; **72**: 948-954.
- 21) de Araujo AB, Hagiwara A. Screening methods for improving rotifer culture quality. *Hydrobiologia* 2005; **546**: 553-558.
- 22) Suga K, Tanaka Y, Sakakura Y, Hagiwara A. Inheritance of mitochondrial DNA in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* (in press).
- 23) 阪倉良孝, 萩原篤志, 塩谷茂明. 水槽内の流場制御によるマハタ仔魚飼育. 日水誌 2006; **72**: 267-270.