

半索動物門腸鰓綱ミサキギボシムシBalanoglossus misakiensisの発生

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16631

氏名	浦田 慎
生年月日	
本籍	石川県
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第622号
学位授与の日付	平成16年3月25日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	半索動物門腸鰓綱ミサキギボシムシ <i>Balanoglossus misakiensis</i> の発生
論文審査委員(主査)	山口 正晃(自然科学研究科・助教授)
論文審査委員(副査)	櫻井 勝(理学部・教授) 笹山 雄一(自然計測応用研究センター・教授) 岩見 雅史(学際科学実験センター・助教授) 東 浩(理学部・助教授)

学位論文要旨

Abstract

The complete larval development of *Balanoglossus misakiensis* is described for the first time and illustrated with photographs of living material in laboratory culture. The breeding area and season were estimated and the spawning was induced by shift of temperature. The egg, about 200 μm in diameter, was enclosed nonmucilaginous egg membrane consisting of two layers, which was not captured by adult mucus and readily dispersed. First cleavage completed in about 100 min after fertilization and following cleavages occurred at about 20 minute intervals. The embryo was opaque but became transparent gradually after the gastrulation and hatched at about 24 h after fertilization to become a typical feeding tornaria. However, it lacked Müller-stage and developed telotroch before hatching. The larval period was relatively short and lacked a character of Krohn-stage, the longitudinal ciliary band with secondary lobe and saddle. Metamorphosis occurred at 7 to 10 day after fertilization, although the telotroch remained in the trunk region of juvenile even after the second pair of gill slit was present. The juvenile grew up to 4 mm in length with three pairs of gill slits at about 1 week after settlement to sand. These characteristics may show heterochronical diversification on the evolution of larval development and the potential of *B. misakiensis* as a new model organism of indirect developing enteropneust.

序論

カンブリア紀に爆発的に増加した後生動物の多様性は、様々な動物門の基本的な形態、すなわちボディプランという形で今日まで引き継がれている。このそれぞれのボディプランが、どのような祖先動物から、どのような進化の過程を経て形づくられたのかは、大きな謎である。

古くから関心を持たれているボディプランの進化の最も顕著な例として、後口動物の三門、特に半索動物門と棘皮動物門をあげることができる。両者は、系統学的には姉妹群をつくるにもかかわらず、半索動物の成体には棘皮動物との共有派生形質がほとんど認められず、むしろ、鰓裂などの脊索動物との類似点が存在する点から、後口動物の祖先的形態と見なされている。また、その他の動物門と比較しても、半索動物の成体のボディプランは単純で、中枢神経系を始めとする多くの器官が未発達であるため、後生動物全体としてもかなり祖先的な形態を保持しているグループである可能性が指摘されている。

このように、系統進化上興味深いにもかかわらず、半索動物の研究は大きく立ち後れており、分子生物学的研究もまだ進んでいない。それは第一に実験的に扱える種がほとんどないことによる。従って、いわゆるモデル生物を半索動物で確立することが、まずは解決されるべき課題となっている。

ミサキギボシ *Balanoglossus misakiensis* は半索動物門腸鰓綱ギボシ科に属し、1902年に桑野により新種として記載された。本邦固有種とされ、日本では広く分布の知られている代表種であるが、太平洋岸の生息地の多くは失われているという。近年、のと海洋ふれあいセンターの調査により、能登半島の増穂浦（ますほがうら）において新たな生息地が確認された。これを契機として、本種を半索動物のモデル生物として確立することを意図し、本種の発生過程の解明に取り組むこととした。野外調査の結果、繁殖時期と場所が確認され、2000年に閉鎖循環水槽による通年飼育と、人為的放卵誘発に成功し、2001年には初期メチニコフ期幼生までの観察、2002年には全発生過程の観察に成功した。ここにその概要と特徴、そしてモデル生物としての可能性を示す。

材料

本研究に用いた *B. misakiensis* 成体は、石川県羽咋郡富来町増穂浦の水深 3m 付近砂底中から採集した。飼育は研究室内の循環水層（水温 23℃）で行った。放卵、放精の人為的誘発は、水温を 23℃から 28℃に上昇させることにより行った。胚は 23℃から 25℃の人工海水中で飼育した。飼育海水は隔日で交換した。幼生の餌として、珪藻 *Chaetoceros gracilis*、緑藻 *Dunaliella* sp.、ハプト藻 *Isochrysis galbana* 及び *Pavlova luteri* を与えた。変態後の子虫は砂と共に静置して飼育した。

結果

成体の飼育と放卵・放精の誘発

日本海沿岸での本種の棲息環境、生殖時期については報告がなく、まずその確認を行った。増穂浦の水深2から10mまでの広い範囲に棲息が確認されたが、成熟個体の分布は水深3m付近に限定されていた。また、スキューバ潜水を行い、砂底をあおぐようにして砂を巻き上げる採集法により、虫体を傷つけることなく全長を得ることが可能であった。本種の飼育法についても報告がなく、とりあえず市販の機材を用いた小型の閉鎖循環水槽と生息地の砂を用意して飼育を試みた。幸いにもこのシステムで1年以上生存させることが可能で、2か月は生殖腺の退縮が起きず、その間随時卵と精子を得ることができた。

人為的放卵誘発と受精

一般的にギボシムシの卵は自発的に放卵したものでないと受精能がなく、また自然環境下での放卵刺激が不明であるため、実験的技法として成功を見た例は2つのみで、いずれも飼育水温を変化させる温度刺激によるものである。本種に対して同様の刺激を試みた結果、飼育海水温を23℃から28℃に上昇させることによって、ほぼ全ての個体で放卵及び放精を引き起こすことに成功した。要する時間は温度刺激を与えはじめてから通常3から4時間程度であり、雌雄は別々の容器中で独立に放卵、放精を誘発することが可能である。

♀の生殖翼はやや赤みがかった灰褐色の卵に満たされており、その背側から卵を放出する。卵は不透明で、直径約200 μ mの球形である。放出された卵は2層よりなる卵膜(卵被鞘)に包まれており、その外層はすぐにはがれ、内層は膨潤して厚さ100 μ mになる。卵膜は粘性を示さず、親の強い粘液に捕われることなく海水中へとすみやかに拡散する。

♂の生殖翼には長さ約1mmの黄白色の精包が多数含まれており、これを数個取り出せば十分な量の精子が得られる。この方法では1つの個体を何回も実験に用いることができる。

卵割及び初期発生

受精とともに受精膜(f)がわずかに卵表面から持ち上がり、第一極体、第二極体(pb)が放出される(図A)。受精後約100分で2細胞、20分間隔で4細胞、8細胞となる(図B,C,D)。それ以降は卵割が不規則な不等割になり、同調も徐々に不正確となるため、卵割様式の把握は困難になる(図E)。その後、全体として球形を維持したまま、割球数が増加し、胞胚となる。

受精後9時間目頃に、卵膜内層(mi)に包まれた胞胚の一端がへこみ(原口,bp)、原腸が形成され始める(図F)。その後、胚の外形は再びほぼ球形になるが、19時間頃にはやや逆洋なし型になってゆっくり回転する様子が確認でき、徐々に透明化して内部の構造が明らかとなってくる。22時間目にはやや分化した原腸、口盤(op)、胞胚腔(bc)、そして頂板(ap)(図G)。約24時間目に孵化が起こる。孵化前の段階ですでに繊毛環(t)と口陥(std)が確認される。孵化時には卵膜(mi)は4層に分かれ、外側から徐々に脱落する場合もあるが(図H及びI)、多くの例では繊毛環の繊毛を活発に動かし、ドリルのように受精膜と卵膜に穴をあけて肛門側から外に泳ぎ出す(図J-L)。後方に向かって泳ぎ出した幼生はいったん繊毛環の活動を停止した後にその繊毛の向きを変えて、前方への遊泳を開始する(図M)。幼生はこの段階で頂毛(at)を持つ。

前進的幼生発生

孵化後、幼生は急激に体積を増やし、36時間目頃には縦繊毛帯(点線)が明瞭になってハイダ一期に至る(図N)。この頃には前体腔(pc)から吻口(pp)が背側中軸上に開口しているのが確認できるようになる。また、口(mo)も開口し、胃(s)、腸(i)の区分もより明瞭になる。しばらく後に肛門(an)が開口し、摂餌が開始される。受精3日後頃には体長約950 μ m、体幅約500 μ mに達し、縦繊毛帯は湾曲して一次葉を形成し、メチニコフ期に至る(図O)。体全体は著しく透明となり、頂綱(as)が長く伸び、外胚葉に暗色と明色の2種の色素細胞が出現し始める。

その後も幼生は摂餌を続けて成長し、受精後5日目頃の最も成長した幼生は長さ1.5mm幅1.1mmに達する(図P)。成長した幼生では中体腔(後の襟体腔)及び後体腔(後の軀幹体腔)が形成される。両者は腸壁からの一対の膨出として出現し、それが前方に伸びて中体腔(msc)

と後体腔(mtc)のくびれが生じる(図Q参)。暗色と明色の色素細胞(pgd,pgl)は、それぞれ繊毛環及び縦繊毛帯(■)に沿って列を作るようになる。この後、幼生の縦繊毛帯は変態に至るまで一次葉のみ有し(dg,背溝;dlg,側背溝;lg,側溝;tg,横断溝;vlg,腹背溝)二次葉を形成せず、メチニコフ期の次の段階であるクローン期を欠いている。すなわち後期メチニコフ期の幼生はその外部形態を大きく変えることなく、変態直前のシュベンゲル期と見なしうる段階に至る。

後退的幼生発生及び変態

受精後7日目から、アガシー期への移行が開始され、幼生は急激に収縮して長さは約1mmになる(図Q)。移行開始にあたっては、まず前体腔と頂板を繋いでいた頂網が消失し、前体腔が丸く変形し拡張する(矢尻)。ついで口より前の部分が収縮し、それにつれて縦繊毛帯と眼(e)も徐々に退化する。最終的に体の前方部分は涙滴型となり、後方はそろばん玉様になる。またこの頃に一对の鰓裂(gs1)が形成され、吻胞(pv)も成長する。このアガシー期幼生は、繊毛環を使って活発に泳ぎ回る一方、時に粘液を出して容器の底に付着するようになる。砂を加えてやると、幼生は着底して砂粒中を這い回り、粘液で砂粒を固めて小さな巣を作る。この際幼生の後部はやや細長くなって襟部と躯幹部の境界(cgp)が明らかとなり、前方の吻部分はやや平たくなって蠕動運動を行う(図R)。この着底後の段階でも幼生は繊毛環を持ち、時には再び元の遊泳形態に戻って泳ぎ回る。繊毛環は襟(co)が明確となり鰓裂が2対になった段階でも残り(図S)、光を当てると砂から出てある程度泳ぐことが可能であるが、多くの場合着底後1日内外で繊毛環はなくなる。着底後1週間で子虫の体長は約4mmに達する(図T)。鰓裂は3対(gs1-3)となり、躯幹部には肝域(hr)が区別されてくる。繊毛環の位置に痕跡に残っていた暗色色素細胞の列はこの頃消失する。着底後2週間で子虫の体長は約7mmに達し、鰓裂は6対となり、数個の肝盲嚢が形成される。

非投餌飼育個体の発生

50 個体以上の幼生を、餌を与えない状態で飼育した。これらの幼生は体長約 1mm まで成長したメチニコフ期の状態で 2 ヶ月間ほど生存したが、それ以降の発生は進行しなかった。その後幼生は退縮し始め、3 ヶ月以上は生きなかった。

論議

本種の卵膜構造は粘液性を持たない 2 層よりなり、放卵後外層がはがれるが、この特徴は *B. clavigerus* と類似している一方、粘液性の卵膜を持つ既知の多くの種とは大きく異なっている。これは、放卵後親の粘液に捕われることなくすみやかに拡散する本種の卵の特徴と関係付けられる。

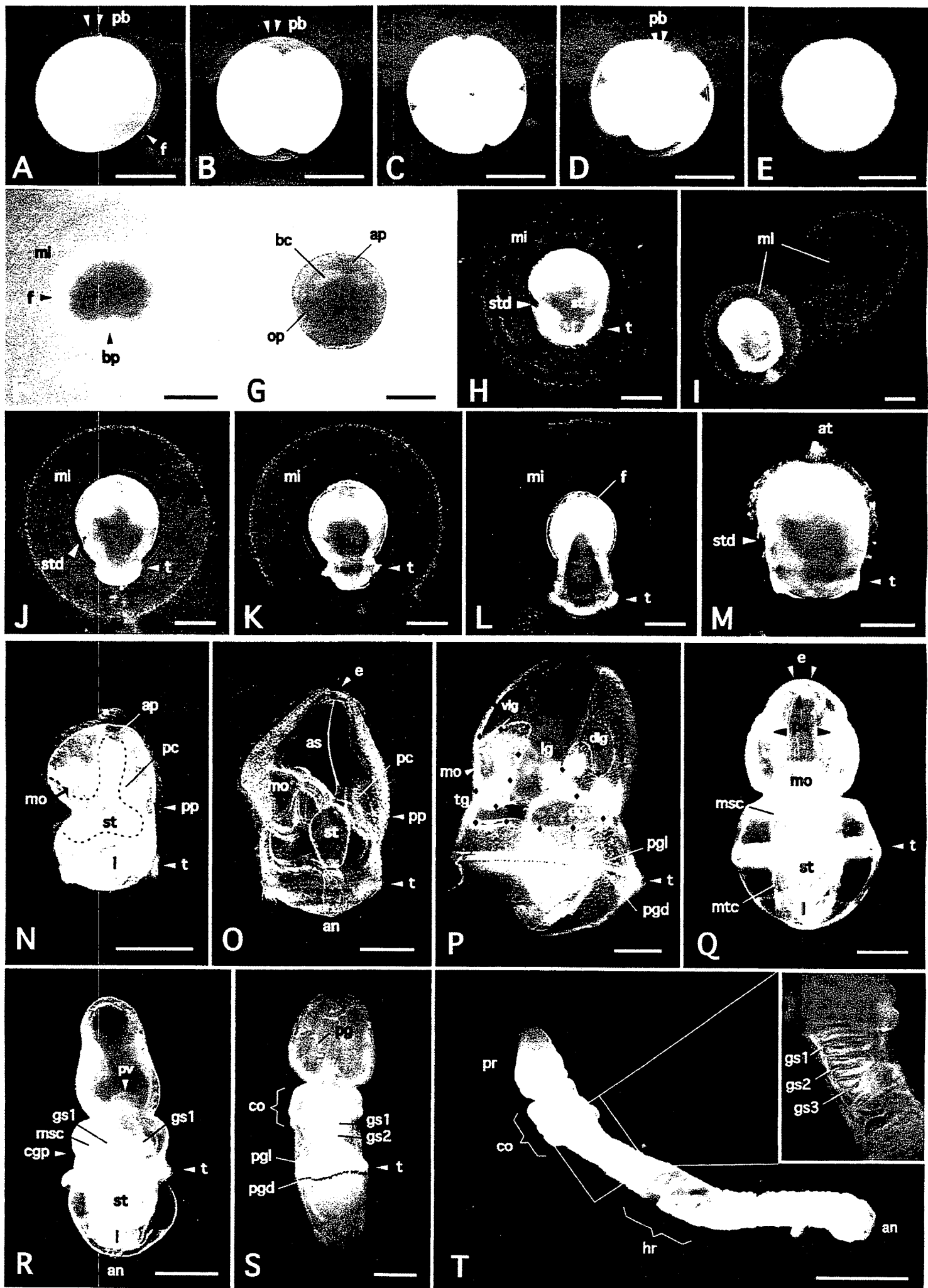
初期発生は、これまでに報告のある間接発生型ギボシムシと類似しているが、より不透明である。孵化は特徴的で、本種は孵化時に既に繊毛帯が完成しており、すでに幼生の第二段階であるハイダー期への移行が始まっているが、これはこれまで全く報告のない発生様式である。また、縦繊毛帯を持たず繊毛環のみを持つ宮下期と呼ばれる段階を経る点でも、普通の間接発

生型ギボシムシとは異なっている。孵化とそれに続く縦毛帯の発達を基準にすれば、縦毛環の出現が最も遅いのがミユラー期を経るタイプ、より早くに出現するのが宮下期を経るタイプ、最も早いのが本種のタイプと言え、縦毛環出現の異時性(heterochrony)を示す証拠と考えられる。

特異な孵化前後の発生様式から一転して、本種のハイダー期及びメチニコフ期の形態は既知の間接発生種と同様であるが、これ以降変態に至るまで二次葉を全く形成せず、したがってクロン期を欠いているが、これはこれまで全く知られていなかった発生様式である。他種で見られる二次葉の形態的多様性は、長期間の摂餌に適応した独自の進化を反映していると考えられ、本種のクロン期を経ない発生過程は、特殊なものと言うより、むしろ基本的なものである可能性がある。なお、本種の卵は間接発生種としては比較的大きいため、条件的摂餌型発生を行う可能性が考えられたが、非投餌飼育の結果からこれは否定された。

つづく変態期の観察から、遊泳形態から着底形態への移行が、一方的ではなく可逆的であることが初めて明らかとなった。これは、アガシー期以降、2 鰓裂となり縦毛環が失われるまでの間に、一定の「移行期」と呼べる期間が存在することを示し、これまでの半索動物の「変態期」の定義に再考を促すものと言える。おそらく自然環境では、この時期に砂への出入りを繰り返し、着底に適した場所を探すのであろう。

本種は完全な間接発生型であり、かつ短期間で変態する。またその遊泳幼生の飼育は容易で、孵化した幼生はほぼ 100%変態させることが可能である。従って、特に変態期の、成体のボディプラン形成メカニズムの研究に有用であろうと考えられる。今後さらに安定した実験系への改良を行い、インジェクションや in situ ハイブリダイゼーションの技法を確立して、分子生物学的解析を可能にすることにより、こういった研究が可能になり、モデル生物としての有用性が高まると期待される。また、成体の全長が比較的容易に得られ、飼育が簡便である点は、未知の領域が多い半索動物について、さまざまな分野の研究を行う際にも本種が有用であろうことを示している。しかしながら、実験室内での継代飼育は不可能であり、野外での安定した成体の確保がモデル生物として利用する上で不可欠の条件である。今後、増穂浦を始めとする本種の限られた生息環境が保護され、節度ある採集により本種の継続的な研究が行われ、半索動物と動物進化の謎が解明されることを期待したいと思う。



図：ミサキギボシムシ *Balanoglossus misakiensis* の発生各段階
 scale bar = 100 μ m(A-M), 250 μ m(N-S), 1mm(T)

学位論文審査結果の要旨

浦田慎氏から提出された学位論文について、上記5名の審査委員による査読の後に平成16年2月5日に口頭発表会が行われた。同日に最終の審査委員会が開かれ、審議の結果、以下のとおり判定した。

本論文は、半索動物ミサキギボシムシの発生過程を初めて報告するものである。半索動物は脊索動物と棘皮動物とともに後口動物を構成している。その成体の構造は単純であるが、鰓裂など脊索動物と類似点があることから、後口動物の祖先的形態をとどめていると考えられている。半索動物は脊索動物の進化を理解するうえで重要な位置をしめているにもかかわらず、その発生研究は他の二門にくらべて大きくおこなわれていない。とくに間接発生型のギボシムシは摂餌幼生期間が長いので、受精から変態までの全発生過程を実験室環境下で観察された例はこれまでない。

ミサキギボシムシは1902年に同定された日本固有種であるが、その発生は不明であった。1997年にこの種の新たな集団が能登半島で発見されたことを機に、浦田氏は①まずその生息地での繁殖期と成熟個体の分布を明らかにし、②研究室内での飼育条件を確立したうえで、③人為的放卵誘発法をみつけ、④人工受精によって得た受精卵を飼育し、⑤4種の藻類を餌として与えることによってその幼生を子虫へと変態させることに成功した。その観察結果は、他の間接発生型ギボシムシとの相違点をあきらかにしただけでなく、この種が半索動物の発生、とくに変態期における成体のボディープラン形成機構、を研究するためのモデル生物となる可能性を示した。本論文はすでに古典といえるような美しさと風格をただよわせている。浦田氏の学識をふくめて、学位論文に値すると結論した。