

魚の粘液が誘発するプルテウス幼生のクローニングの再現

須賀 文香 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 谷口 俊介 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

生物の生存戦略の一つである個体や器官の再生が、プラナリアやイモリ、ベニクラゲといった数々の生物種で報告されている。ヒトデやクモヒトデなどの棘皮動物の成体もまた、高い再生能力をもつ生物として多くの研究が行われてきた。一方、棘皮動物の幼生も高い再生能力を持っており、それは“クローニング”という現象として報告されている。一般的に、クローニングは遺伝子の単離を指す分子生物学用語であるが、ここでは自分と遺伝的に同一な個体、すなわちクローンが形成される無性生殖の様式を示す言葉として用いる。棘皮動物の幼生において広く行われるクローニングでは、幼生の体から出芽のように新しい細胞塊が形成される。通常、発生初期の段階ではクローニングは観察されないが、幼生の成長に適した水温やエサ条件下で促進されることが示されている。近年、幼生の捕食者となる魚の粘液もまた、クローニングの促進要因となりうるということが、ウニの仲間であるアメリカハスノカシパンを用いた実験によって報告されている。受精後4日目のプルテウス幼生にろ過海水で希釈した0.01~1.0 mg/ml程度の粘液を暴露すると、24時間以内にクローニングが観察されたとのことである。魚の粘液によるクローニングの促進報告はこれまでアメリカハスノカシパンのみであり、自然条件下での誘発例もアメリカムラサキウニのみとなっている。つまり、我が国で実験材料として広く用いられているバフンウニにおける例はまだ報告されていない。

よって、今回は、魚の粘液が誘発するプルテウス幼生のクローニングをバフンウニにおいて再現することを目的に実験を行った。

【方法】

・魚の粘液の採取

タモ網で魚(シタビラメおよびヒラメ)を採取し、網から滴る粘液を採取した。0.45 µm フィルターにてゴミなどを除去した後、その粘液を1ml チューブに分注し、-20°Cで冷凍保存した。

・粘液の重さ算出

使用直前に冷凍保存した粘液チューブを解凍し、ボルテックスで攪拌後遠心した。粘液入りエッペンチューブと空のエッペンチューブの重さを比較することで重さを測定し、粘液1mlあたりの重さを算出した。

・バフンウニ幼生への粘液暴露

解凍した粘液を高、中、低濃度(5.0、1.0、0.1 mg/ml)になるようにろ過海水で希釈し、24穴シャーレに2mlずつ分注した。コントロールとしてはろ過海水を使用した。

実験1: 受精後3日目及び4日目の幼生を各濃度1穴につき5匹ずつ分注し、15°Cのインキュベーターで保存した。24時間ごとに9日間幼生の様子を観察した。

実験2: 受精後2日目及び3日目の胚を各濃度1穴につき、1、5、10匹ずつになるように分注した。15°Cのインキュベーターで保存し、24時間ごとに14日間観察を行った。

※両実験とも3日ごとに水替え及びえさやり(Chaetoceros calcitrans)を行った。

【結果】

・実験1(シタビラメの粘液を使用)

各粘液濃度及びコントロール共に、3日目及び4日目幼生ではクローニングは観察されなかった。

・実験2(シタビラメおよびヒラメの粘液を使用)

受精後3日目から中濃度のヒラメ粘液に暴露した、サンプル1匹において、クローニングと思われる細胞塊が幼生の肛門付近から出芽している様子が確認できた。経過観察を行うために同じ粘液条件下で個別飼育を行ったところ、出芽した細胞塊が本体から分離して遊泳している様子が観察できた。分離した細胞塊を詳細に観察したところ、繊毛と思われる構造物と共に僅かに個体が動く様子が確認できた。しかしながら、その後のハンドリングにミスをしたため、十分な経過観察ができなかった。



クローニングにより本体から出芽したと思われる細胞塊(矢印)

【考察・今後の展望】

実験2の結果より、バフンウニにおいてもクローニングが誘発されること及び魚の粘液がクローニングの促進剤となりうる可能性が示唆された。今回、シタビラメの粘液からヒラメの粘液に切替えて暴露した後にクローニングが観察されたことから、魚種の違いによってクローニングの誘発が左右されるのかが今後の検討事項である。しかしながら、実験で得られたクローニング個体はこれまで1匹のみであり、その後同じ粘液条件下で行った実験ではまだクローニングは観察されていないため、魚種の違いを論じる段階にない。そこで、まずはクローニングの再現性を高めるための条件検討を行い、その過程で魚種の違いによる粘液条件を検討事項に加えていく。