

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14791

研究課題名(和文)動物プランクトンの標識による個体群動態の解析

研究課題名(英文)Analysis of population dynamics of zooplankton by tagging

研究代表者

萩原 篤志(HAGIWARA, Atsushi)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授

研究者番号：50208419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：動物プランクトンの標識技法の開発を目的とした。カイアシ類(*Tigriopus japonicus*)をコロイド状量子ドットに曝露すると、受精卵を通じて次世代の細胞質に移行する現象が約半数で観察された。これを用いた個体標識により、個体群の動態を検討する上で、遺伝子の発現解析と合わせて、詳細な情報が得られる。ワムシやミジンコでは処理した世代のみ標識が可能であった。

研究成果の概要(英文)：This study aims to develop techniques to label zooplankton. When *Tigriopus japonicus* was exposed to Quantum dot, the fluorescent nanno-particles were transferred to half of next generation through fertilized eggs. This technique allows detailed analyses on population dynamics. With rotifers and cladocerans, only exposed individuals were labelled.

研究分野：水産増殖学

キーワード：量子ドット 標識 体内蓄積 毒性 動物プランクトン カイアシ類 ミジンコ類 ワムシ類

1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループでは、魚類の種苗生産において欠かすことの出来ない動物プランクトンであるシオミズツボワムシ(以下、ワムシ)、ミジンコ類、カイアシ類を用いて基礎研究を行い、種苗生産技術開発や環境毒性評価のモデル生物としての応用を手がけている。一方、産業分野では、これら動物プランクトンを長期間安定して培養することが依然として困難であり、安定した種苗生産を行うために長期間安定した動物プランクトン培養技術の確立が望まれている。培養を不安定化させる環境因子については多くの知見があり、遊離アンモニアの除去や細菌相の制御を伴う技術が確立されている。しかし、培養崩壊に繋がる生物自体の内的要因については不明な点が多い。これに関連して、動物プランクトンを用いて個体群動態を解析する研究が行われてきたが、培養水に存在する全個体の動物プランクトンの動態を追跡することが出来なかったため、全体の増殖率や携卵率など限られた指標による成果しか得られていない。また、より詳細な個体レベルでの研究は、小さな培養容器に一個体ずつ収容した個体別培養で実施し、個体毎の寿命、産仔数などを計測していた。

これらの研究では、生物の個体数が爆発的に増殖した後に個体数を減らす、「個体群の爆発と崩壊」のメカニズムを解析するための詳細なデータを得ることが出来ず、培養全体の広く浅い個体群動態と1個体の狭く深い動態を合わせることで推定するのみである。また、これら研究成果の組み合わせでは、個体群を形成する個々の個体が相互に影響を与える密度依存的に形態や行動が変化する密度効果を含まない解析でしかない。本研究で使用する動物プランクトンのうち特にワムシは、これまでに水産分野を中心に研究が行われ、1960年に本種が海産仔魚の餌料生物として利用可能であることが報告された後、多くの生物学的な知見が蓄積されてきた。この過程で、「個体群の爆発と崩壊」における個体群動態を解析するのにワムシの世代時間の短さや培養のしやすさおよび、生物学的に多くの知見があることから、本研究のモデル生物としても適している。本研究の元となる基礎知見として次を得ている。

動物プランクトン・ライブラリー：各地から採取して培養を確立した動物プランクトンは、ワムシ類、ミジンコ類、カイアシ類を含む30種130株を保持している。

生活史に関わる生物機能情報：上記の多くの株について、形態、寿命、産仔数、遺伝子による種判別など生活史に関わる基本的情報を把握している。

遺伝子情報：ワムシの網羅的遺伝子解析を行い、ESTデータベース(約7,000遺伝子)の構築、ミトコンドリアDNAの全塩基配列と二重環構造の解析、両性生殖発現関連遺伝

子や耐久卵孵化に関連する遺伝子の特定等を行っている。

2. 研究の目的

内的要因を解明するには、異なる世代やステージ毎に個体の動態を解析するバイオロギング的な手法の確立が有用である。最近、コロイド状量子ドット(Quantum Dot、以下QD)をカイアシ類の *Tigriopus japonicus* に取り込ませると受精卵を通じて子へQDが伝わる現象を観察している。本研究では、その動態を明らかにすると共に、他の動物プランクトン(ワムシ類、ミジンコ類)についても同様の観察を行う。QDや染色色素が動物プランクトンに対して示す毒性を評価すると共に、これを用いた動物プランクトンの標識法を確立することを目的とする。これらの技法開発によって、動物プランクトン培養が崩壊する前後の個体群内の生活史特性の解析が実現し、特定遺伝子の発現量の解析と合わせ、従来不足している内部因子の作用について研究を行うことが可能になる。

3. 研究の方法

(1) QDの動物プランクトンへの毒性と個体標識の検討

本研究で採用した Qdot® ITK™ Carboxyl Quantum Dots は、粒径 10-20 nm の蛍光物質(波長 545 nm)で、ラベリングやトラッキングを目的として、生化学分野等で用いられている。中心部に半導体成分の CdSe を、それを覆う皮膜に ZnS を含むことから、重金属汚染の試験材料にもなる。ホウ酸 50 mM 中で保存されていることから、本研究では、QD が 8, 16, 40 nM の添加が動物プランクトンに与える影響と、ホウ酸濃度が動物プランクトンに与える毒性について検討した。

上記の結果をもとに、汽水産ワムシ (*Brachionus plicatilis*)、汽水産ミジンコ (*Diaphanosoma celebensis*)、海産カイアシ類 (*Tigriopus japonicus*) を QD に曝露し、個体内への取り込み状況と、QD を取り込んだ場合には、これが次世代まで維持されるかどうか観察した。例えばカイアシ類については、孵化直前の橙色の卵囊を持ったメスの *T. japonicus* 成体を、QD (0, 8, 16, 40 nM) に曝露し、卵囊から孵化したノープリウス幼生を新鮮な培養水に移し、粒子の蓄積状況を暗視野での蛍光観察で調べた。以上を通じ、動物プランクトンの培養条件は、25℃、塩分 22 とし、ワムシとミジンコには微細藻類の *Nannochloropsis oculata* を、カイアシ類には *Tetraselmis tetraethele* を給餌した。

(2) 各種染色色素による個体標識

次に、ワムシを用いて、染色色素として用いられるアルシアンブルー(AB)、アルシアングリーン(AG)、ニュートラルレッド(NR)、メチレンブルー(MB)、アリザリンレッド(AR)、ビスベンズイミド(BI)について同

様の操作を行い、毒性を求めると共に、標識が可能か調べた。

(3) ストレス下にあるワムシ個体の発現遺伝子解析

培養崩壊に繋がる高ストレス下での生体の基礎情報を得るため、個体群内の世代毎に特有な発現遺伝子を求める。このとき、ワムシ成体や単性生殖卵のステージを同調させることは容易ではない。本研究では、量産が可能で、光照射により休眠を終了させ、同調的な孵化を誘発できる耐久卵に着目した。すなわち、培養の根幹となるワムシ耐久卵の孵化を形成時の塩分を変動させた環境下で孵化させ、発現遺伝子の比較を行った。

4. 研究成果

(1) QDの動物プランクトンへの毒性と個体標識の検討

Tigriopus の場合、対照（海水のみ）と比較して、ホウ酸 50 μM では影響が見られなかったが、ホウ酸 100 μM とホウ酸 500 μM のとき産仔数が減少した ($P < 0.01$)。また、QD無添加の場合と比べ、QDs 8 nM (ホウ酸 50 μM) の産仔数は変わらなかったが、QDs 16 nM (ホウ酸 100 μM) と QDs 40 nM (ホウ酸 500 μM) では産仔数が減少した ($P < 0.05$)。親個体を QD に曝露後、1 腹目から 3 腹目の卵嚢から生じたノープリウス幼生を観察したところ、1 腹目の 50% の幼生から QD の蓄積が観察された。2 腹目では 16% にとどまり、QD の取り込みも 1 腹目に比べて少量に留まった。QD は親個体内で細胞膜をすり抜けて卵細胞内に取り込まれ、次世代個体の細胞質に伝播したと判断された。その後、QD 濃度が 8, 16 nM では、出生後 48 時間まで体内で粒子を保持した個体が 33% あったが、72 時間後には消失した。40 nM では 72 時間後まで 100% 保持した。(図 1, 2)

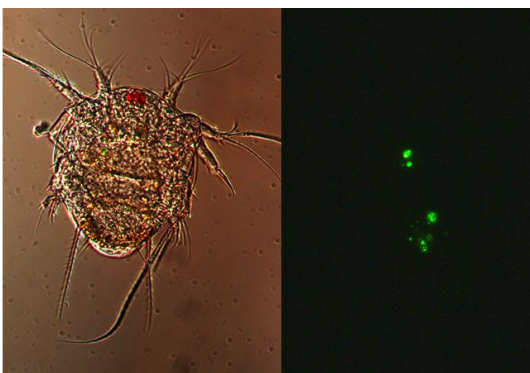


図1 QD濃度 8 nMに24時間曝露した親個体の1腹目に産まれたノープリウス幼生

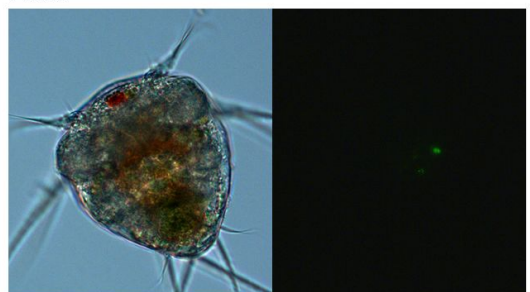


図2 QD濃度 8 nMに24時間曝露した親個体の2腹目に産まれたノープリウス幼生

汽水産ミジンコ *Diaphanosoma celebensis* に対し、0, 8, 16, 40 nM 曝露下での親個体の生残はそれぞれ、1 日後が 100, 100, 60, 20%, 2 日後では 100, 100, 0, 0% であった。また、0, 8, 16, 40 nM 曝露下で、親 1 個体あたりが生じた幼生の個体数は、それぞれ 1 日後に 0.8, 0.8, 0.4, 0.4 で、2 日後では 0.4, 0.2, 0, 0 であった。すなわち、16 nM 以上で QD の顕著な毒性が確認された。蛍光顕微鏡観察を通じて、最大濃度の 40 nM 曝露下で 1 日後に生き残った親個体の消化管内に量子ドットが観察されたが、他の実験区では消化管内に確認されず、体内への蓄積と幼生への伝播は全条件下で観察されなかった。

ワムシ *Brachionus plicatilis* については、耐久卵をインキュベートして孵化後 1 時間以内のワムシ（幹母虫）を 40 nM の QD に曝露した。微細藻類 *Nannochloropsis oculata* を 700 万細胞 / mL で給餌し、随時新鮮な培養海水に交換して胃内容物（微細藻類）を排出させた後、親ワムシ（幹母虫）とそれらが生じた仔ワムシを蛍光顕微鏡で観察した。その結果、孵化直後に曝露後 1 時間経過した幹母虫の全個体が QD を蓄積していたが、24 時間後にはそれらが消失した。これらから生じた次世代の仔ワムシの体内からも QD は検出されなかった。

以上より、ワムシとミジンコでは、消化管内への QD の取り込みが観察されたが、次世代に伝播する例はみられなかった。一方、*T. japonicus* では QD による産仔への影響が少なく、QD 曝露した親世代から子へ伝播される例が確認された。このとき、次世代への伝播と蛍光量は親個体の産卵を重ねる毎に低下し、3 世代以上にわたる伝播は全く見られず、通常 3~6 世代が共存する動物プランクトンの個体群内で世代毎の生活史解析に応用できるような技法開発に直接繋がる成果は得られなかった。一方、全個体でないが、曝露した親世代から数えて 2 世代にわたる標識が可能であることから、カイアシ類個体群内の世代間の相互作用や母性効果を調べる際などに、バイオマーカーとして適用できる可能性がある。

(2) 各種染色色素による個体標識

ワムシを生きのまま明瞭に染色できたのは、AB、AG、NR、BI のみで、前 3 者はワムシの被甲を、BI は咀嚼器を染色した。AB 100 mg/L で全てのワムシ個体を明瞭に染色できたが、ワムシの遊泳力を低下させる等の強い毒性もみられた。次世代に色素が伝わる例はみられなかった。

(3) ストレス下にあるワムシ個体の発現遺伝子解析

卵形成時と同じ塩分 17 でインキュベートした耐久卵では、後期胚発生蓄積タンパク質 (LEAs-1)、アミラーゼ、デアミナーゼなど、胚発生と細胞分化に関わる遺伝子発現が

多く、ワムシにとって高ストレスとなる高塩分（塩分 33）では、ストレス関連の AP2 転写因子や、ATP 分解に関わる ABC-TP、NAD⁺ synthase、CTP-ATPase の遺伝子発現が顕著で、高塩分下ではストレスに対抗するため、より多くのエネルギーを消費していると推察された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 1 件）

Chengyan Han, Hee-Jin Kim, Koushirou Suga, Mingyou Li, Atsushi Hagiwara: Comparison of resting egg gene expression with different hatchability related to salinity variations in the marine rotifer *Brachionus manjavacas*. Fisheries Science (印刷中) 査読有
<https://doi.org/10.1007/s12562-018-1213-6>

〔その他〕

ホームページ:

<http://www2.fish.nagasaki-u.ac.jp/FISH/KYOUKAN/hagiwara/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原篤志 (HAGIWARA, Atsushi)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科

(水産)・教授

研究者番号：50208419

(2) 連携研究者

菅 向志郎 (SUGA, Koushirou)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科

(水産)・准教授

研究者番号：60569185

(3) 研究協力者

李 在晟 (LEE, Jae-Seong)

韓国・成均館大学校・生物学科・教授