

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20780138
 研究課題名 (和文) エチゼンクラゲの再生産過程の生理生態学的解明と日本定着可能性の検証
 研究課題名 (英文) Ecophysiological investigation of sexual and asexual reproduction of the giant jellyfish *Nemopilema nomurai*.
 研究代表者
 池田 英樹 (IKEDA HIDEKI)
 広島大学・大学院生物圏科学研究科・研究員
 研究者番号：50452628

研究成果の概要 (和文)：エチゼンクラゲの生殖巣は 6 月頃から形成が開始され、7 月には卵あるいは精卵が出現し、日本に到着する 11 月には雌 1 個体あたりの孕卵数は数億個に達する。配偶子の成熟はクラゲが損傷を受けると急速に進行し、特殊な細胞が胃内の栄養を卵あるいは精卵へ供給し成熟を促進する。ポリプは休眠細胞の塊であるポドシストを作り無性的に増殖する。休眠細胞は糖質、タンパク質、脂質等を蓄積し、これらを消費して長期間休眠を維持する。

研究成果の概要 (英文)：The giant jellyfish *Nemopilema nomurai* reproduces through sexual and asexual processes. In the sexual reproduction, medusae began to develop gonads in their gastric cavity from late June. Oocytes or sperm follicles appeared in the gonads from late July, and the number of oocyte increased and attained several hundred million per a female in November. Maturation of oocytes and sperm follicles rapidly progresses after medusae are physically damaged and are supported by the specialized gonadal epithelial cells which transfer nutrients from the gastric cavity to oocyte and sperm follicle. Asexual reproduction is carried out via dormant podocyst formed by a polyp. Podocyst stores carbohydrates, proteins, and lipids to maintain its dormancy for several years.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：海洋動物生理生態学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：エチゼンクラゲ、大量発生、再生産、生殖巣、ポリプ、ポドシスト

1. 研究開始当初の背景

人間活動に伴う海洋の環境変化により世界各地でクラゲ類の大量発生が頻発し、漁網

への大量混入や発電所取水口の閉塞といった被害を引き起こしている。また大量発生したクラゲがプランクトン食性の魚類と餌競

合することで、魚類資源の減少を招くことが懸念されている。中でも傘径が 2 m、湿重量が 200 kg に達することもある世界最大の根クラゲであるエチゼンクラゲ (*Nemopilema nomurai*) は、2002 年以降ほぼ毎年日本周辺で大量発生を繰り返し、定置網等へ入り込んで漁獲物の損傷や網の破損、漁の遅延等を引き起こし日本沿岸の漁業に深刻な影響を与えてきた。

エチゼンクラゲは東シナ海・黄海で発生すると推測され、成長しながら対馬海流に乗って日本海を北上し、一部は津軽海峡を越えて太平洋沿岸にまで広がる。日本沿岸での本種の発生はこれまで確認されていないが、日本沿岸へ大量に到達するクラゲによって日本沿岸で新たなポリプの生息地が形成され、そこからクラゲが発生することが懸念されている。

エチゼンクラゲの再生産過程にはクラゲによる有性生殖と、ポリプによる無性生殖がある。多くのクラゲ大量発生においては無性生殖によるポリプの増加が重要だと考えられているが、エチゼンクラゲはその巨大なサイズから大量の卵を産むと予想され、有性生殖も大量発生に寄与している可能性がある。有性生殖の特徴としては、沖を遊泳する健全なクラゲは配偶子の発達が未熟であるのに対し、クラゲが損傷を受けると急速に生殖巣の発進が進み、放卵・放精可能となることが揚げられる。また、放卵・放精は野外で最も安定した環境因子である光によって誘導され、これにより両者のタイミングを同調させることで有性生殖の成功率を上げていると考えられる。しかしながら配偶子の急速な成熟や放卵・放精の機構についてはほとんどが不明であった。一方、無性生殖ではポドシストと呼ばれるキチン質の殻に覆われた休眠細胞の塊を形成し、そこから新たなポリプが出芽することで個体数が増加する。エチゼンクラゲポドシストの生理的特長（休眠の方法、出芽における変化、寿命など）については基礎的な知見がほとんどなく、また出芽を促進する環境因子については特定がなされていない。これらエチゼンクラゲの再生産過程における特徴を明らかにすることが大量発生機構の解明に繋がると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、エチゼンクラゲの有性生殖および無性生殖における生理生態学的解明と日本定着の可能性を検証することを目的として研究を行った。有性生殖については、日本へ漂流してくる個体の生殖巣の発達、配偶子の形成と成熟、放卵・放精の過程における生理的背景を解明するとともに、実際に日本沿岸での有性生殖が行われているかどうかを野外実験および実際に野外での受精卵

およびプラヌラの採集で解明することを主眼に調査を行った。また、無性生殖においては、ポドシストの内部形態と化学組成の解明、変態を誘導する環境因子の特定、形成後の時間経過に伴う組織変化、変態時の変化を調査することでポドシストの生理生態学的な特徴を解明することを目的に実験を行った。

3. 研究の方法

(1) エチゼンクラゲ生殖巣の発達過程の調査

2009 年 6 月における西海区水産研究所の陽光丸による調査、7 月における広島大学豊潮丸による調査、8 月、10 月、11 月における隠岐周辺調査でエチゼンクラゲを採集し、生殖巣を採取、固定後組織学的な調査を行った。11 月の隠岐調査ではメス個体の卵巣に含まれる卵を計数した。

(2) エチゼンクラゲの配偶子成熟過程

隠岐で採集したエチゼンクラゲを棧橋に設置した網（直径 1 m）で飼育し物理的なストレスを与えることで成熟を促進し、その間生殖巣を 1 日ごとに取り出し、光学および電子顕微鏡により卵細胞および精細胞の発達における組織学的な調査を行った。また、生殖巣の一部を恒温機内で培養して人為的に成熟を促進させ、成熟が完了したら暗所から明所へと移すことで放卵・放精を誘導し、その間の形態変化を光顕および電顕により観察した。

(3) ポドシストの形態と化学組成

ポドシストの形態については、形成 1–3 ヶ月のシストを光顕および電顕を用いて観察を行うとともに、形成から 2 年が経過したポドシストの内部形態の観察も行い、時間経過による休眠細胞の変化を観察した。また化学組成の調査については、特に代謝に関連した物質に着目し、ソロクローム・シアニン染色（タンパク質を検出）、PAS 染色（糖類を検出）、メチルグリーン・ピロニン染色（DNA、RNA を染色）、ナイルブルー染色（脂質を染色）、スダン黒染色（脂質を染色）、アルシアンブルー染色（ムコ多糖を染色）を実施した。

(4) ポドシストからポリプへの変態過程

ポドシストは殻を剥がすことで人為的にポリプへの変態を誘導可能で、これを利用して殻除去後のポドシストを時系列的にサンプリングし、変態時における組織変化を光学および電子顕微鏡により観察した。また、自然に出芽しているポドシストを採取し、内部で起きている変化を観察し、人為的な誘導による変態との相違点について調査した。

(5) 野外における繁殖の確認

島根県沿岸や隠岐の島のクラゲが集積している湾内でプランクトンネットを曳き、野外で実際に有性生殖が行われて受精卵あるいはプラヌラが発生しているかを調査した。

4. 研究成果

(1) 生殖巣の発達過程

①主な成果

2009年の東シナ海、対馬および隠岐周辺における調査では、6月下旬に採集された個体(傘径: 21-53 cm)は胃糸集積部付近にシート状の生殖巣を持つが、卵細胞や精胞はまだ形成されておらず、雌雄の判別は不可能であった(図1)。7月下旬に採集されたクラゲ(傘径: 26-74 cm)では、約半数の個体で卵細胞あるいは精胞の形成が見られた(図2A, B)。8月下旬以降に採集された個体は多数の卵細胞あるいは精胞を含む発達した生殖巣を有し(図2C, D)、11月には孕卵数が1.6億~6.9億個(クラゲの傘径: 73-102 cm)に達した(図3)。クラゲのサイズと孕卵数には明瞭な相関は見られなかった。11月に入っても沖を遊泳する損傷の少ない個体では卵細胞あるいは精胞は未成熟のままであった。採集されたクラゲを網の中に入れて飼育し生殖巣の成熟を促進させる実験では、8月下旬以降に採集された個体であれば放卵・放精が可能になるまで成熟を進行させることが出来た。

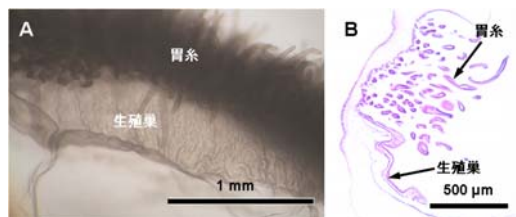


図1: 6月下旬に採集されたエチゼンクラゲの生殖巣 (A) 外観 (B) 横断面切片。

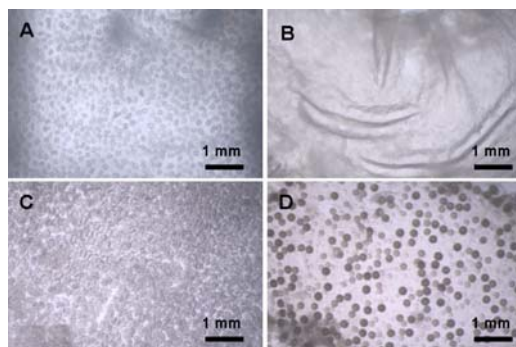


図2: 生殖巣の発達 (AB) 7月下旬に採集されたエチゼンクラゲの精巣(A)と卵巣(B) (C, D) 10月に採集された個体の精巣 (C)と卵巣 (D)。

②成果の位置づけ

日本へ漂流するエチゼンクラゲの生殖巣

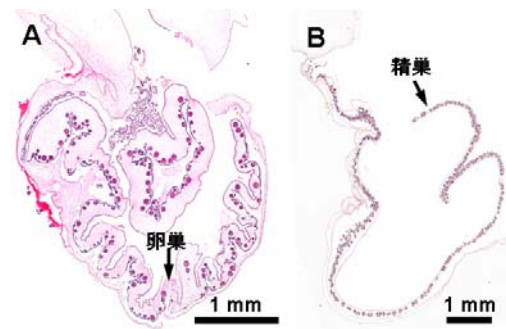


図3: 発達した生殖巣の横断面切片 (A) 卵巣 (B) 精巣。

の発達状況をモニター出来、少なくとも8月下旬以降であれば損傷を受けることにより有性生殖が可能となることを明らかにした。これまでの成熟調査では外側からの観察が主に行われていたためある程度成熟が進行していないと配偶子の形成が観察出来なかったが、組織学的な調査を加えることにより、エチゼンクラゲの成熟過程をより発達の初期から詳細に調査することが出来た。孕卵数の推定ではメス1個体当たり数億から十億個程度という大量の卵を有することが明らかとなり、エチゼンクラゲの個体数増加において有性生殖が大きく寄与した可能性が示唆された。

③今後の展望

孕卵数を継続的かつ詳細に調査することで、クラゲのサイズとの関連や時系列的な変化を追う日本周辺での有性生殖の実態を把握することが必要であると思われる。

(2) 配偶子の成熟過程

①主な成果

メデューサの拘束実験では、未熟固体を網に入れて4-5日後に成熟した配偶子が観察された。雌の場合、卵母細胞は卵成熟過程の初期から trophocyte と呼ばれる特殊化した上皮細胞と会合して発達する(図4)。Trophocyte は生殖腺下腔側に微柔毛を有し、細胞質内には多数の分泌顆粒が見られることや、卵成熟に伴い発達することから、栄養を胃腔から卵へと供給する役目を果たしていると考えられる。また、成熟が進んだ卵母細胞は細胞表面に微柔毛を持ち、卵巣の中からも栄養を摂取していると考えられる。卵巣上皮には卵母細胞の塊が散在し、成熟個体ではそこから新しい卵が次々に生産され、一つの卵巣にさまざまな発生ステージの卵母細胞が見られる。オスの未熟個体では精胞内に精子が見られないが、拘束すると精胞の細胞から精子が分化し、精胞内に精子が満たされる(図5)。精胞の成熟は精巣全体ではほぼ同時に起こり、精胞ごとの成熟段階の違いは見られない。

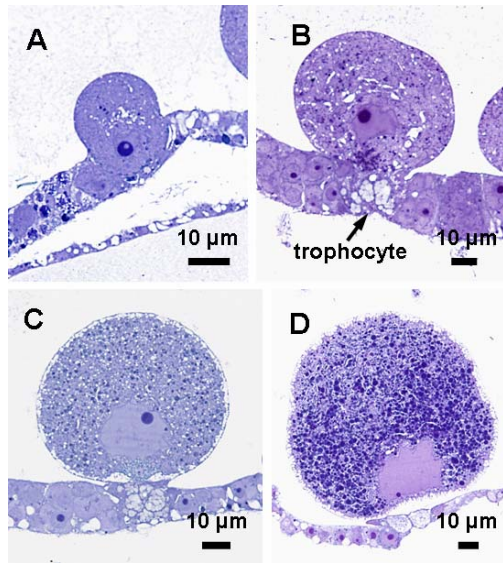


図4：卵細胞の発達過程 (A) 初期 (B) 中期 (C) 後期、(D) 終期。中期から trophocyte が発達し始める。

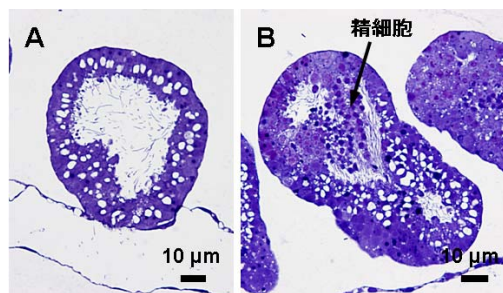


図5：精胞の発達過程 (A) 成熟前 (B) 成熟後。

放卵・放精過程はそれぞれの配偶子の形態的・生理的特徴を反映し、卵巣と精巣とで光照射に対する反応時間が異なった。卵巣では、光照射 70 分後に卵母細胞の卵核胞が崩壊して減数分裂が再開すると同時に、細胞の表面が波打ったように変化する。照射 80 分後には trophocyte の集積部中央が開口し始め、90 分後には卵母細胞が反胃腔間隙へと露出し、変形しながら生殖腺下腔へと脱出する。放出された卵細胞には極体が見られ、減数分裂が完了していることを示している。一方、精巣では光照射後わずか数分～10 数分後に、精胞が反胃腔間隙側の精巣上皮と接している部分で開口し、内部の精子が放出される。光照射後、精子は卵よりも早く放出されるが、放出直後はほとんど運動性を持たず、活性化までに時間を要する。野外では日の出が放卵・放精を引き起こすが、日の出後に早く放出された精子が、卵の遅い放出に合わせて活性化することで、効率のよい受精が行われていると考えられる。

②成果の位置づけ

エチゼンクラゲの生殖巣成熟、放卵・放精の詳細な過程を明らかにし、特に精巣の成熟や放精に生殖巣の上皮細胞が強く関わっていることを始めて明らかにした。

③今後の展望

個体損傷後やクラゲ本体から切除後の生殖巣が急速に発達する背後には複雑な促進/抑制機構があると推測される。また放卵・放精過程においても光受容から放卵に至るまでにはさまざまな情報伝達過程があることが推測される。これらを司る因子についてはいまだ不明であり、今後は生化学的な側面から調査する必要がある。

(3) ポドシストの形態と化学組成

①主な成果

エチゼンクラゲのポドシストは細胞内に多数の顆粒をもつ休眠細胞（大きさ：20~30 μm）の塊と、それを覆うキチン質の殻からなる（図6）。休眠細胞の核は小さく収縮し、タンパク質合成に関わる小胞体やゴルジ体はほとんど見られず、また呼吸を司るミトコンドリアは小型で数が少ないことから、ポドシストの代謝活性は非常に低いことが予想される。組織化学染色では、ソロクロム・シアニン染色（タンパク質）、PAS 染色（糖類を検出）、ナイル青染色およびスダン黒染色（脂質）のいずれも細胞塊全体に陽性反応を示した（図7）ことから、ポドシストはこれらの代謝基質を細胞内に蓄積し、それを徐々に消費することで長期間の休眠を維持していると考えられる。メチルグリーン・ピロニン染色では核 DNA は明瞭に染まるものの、RNA に対する染色が非常に弱く、休眠細胞内における転写活性が非常に低いことが示唆された。またアルシアンブルー染色では刺胞以外に染色は認められなかった。形成直後のポドシストでは細胞が隙間なく詰まっている一方、長期間休眠したポドシストでは細胞塊の内部に間隙が現れ、長期間の休眠により栄養を使い果たした細胞が消失することが示唆される。

②成果の位置づけ

エチゼンクラゲポドシストの休眠機構について明らかにするとともに、時間に伴い休眠細胞が減少することを始めて示した。細胞の減少はポドシストの休眠期間に限界があることを示唆しており、無性生殖によるポリプ増加が近年、比較的短期間で起きた可能性を示している。

③今後の展望

ポドシストによるポリプ個体群増加の詳細

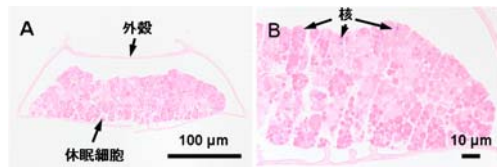


図6：エチゼンクラゲポドシストの横断面切片（ヘマトキシリン・エオシンにて染色）
（A）全体（B）休眠細胞を拡大、青い点が細胞核を示す。

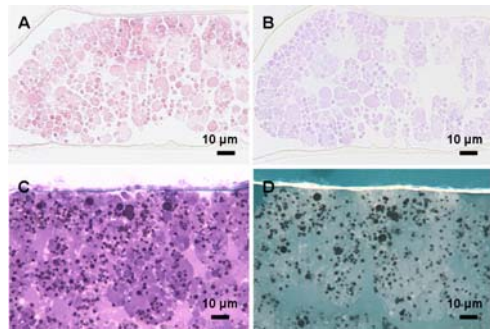


図7：組織化学染色によるポドシスト内の代謝関連物質の蓄積（A）ソロクローム・シアニン染色、赤い部分がタンパク質の分布を示す（B）PAS染色、赤紫の部分が糖類の分布を示す。（C）ナイル青染色、濃い青紫の部分が脂質の分布を示す（D）スダン黒染色、黒い部分が脂質を示す。

細な過程を推測するために、ポドシストの呼吸量を測定し炭素消費量を見積もるとともに炭素重量を測定し、両者によってポドシストの寿命を推測することが重要である。これにより、どのくらいの期間で無性生殖によるポリプの大量増殖が起きたのかを推定可能になると考えられる。

（4）ポドシストの変態過程

①主な成果

殻を除去されたポドシストは一部に損傷があっても3～4時間後には球形の細胞塊となり、細胞塊内部には刺胞が出現する。殻除去12～24時間後には細胞塊表面の一部が変化して外胚葉細胞が出現する。殻除去1～2日後には細胞塊の表面は完全に外胚葉細胞で覆われ、外表面には微柔毛が形成される。一方内部の内胚葉細胞は顆粒を保持し続け、形態的に大きな変化は起こらない。細胞塊は二層に分かれ、外胚葉と内胚葉との間は薄い中膠によって仕切られる。殻除去2～5日後には細胞塊は繊毛によって水中を遊泳することが可能となる。また、口と触手の原基が形成され、口器の反対側（将来足盤となる部分）には定着のための組織が出現する。同時に内胚葉細胞が口原基付近から変化し始め、腔腸を形成する。殻除去3～7日後には4本の触手を持つ完全なポリプへと変態する。殻を除去した際のポリプへの変態率は

形成直後のポドシストで95%、形成2年経過後で59%であった。胞塊が二分割された場合でも各小片はポリプへと変態可能であるが、この場合は触手や足盤などが欠けることが多く、休眠細胞は分化の全能性を有するものの変態直後の形態は休眠細胞の数に依存するというモザイク的な形態形成機構を持つと考えられる。また自然に出芽するポドシストでも、その過程で細胞塊の二層化等が起こることから、殻除去後の組織変化は正常な出芽における組織変化をトレースしていると考えられる。

②成果の位置づけ

エチゼンクラゲポドシストの変態について、外部からのみの観察では見ることの出来なかった内部の休眠細胞の変化を明らかにした。分割されたポドシストのポリプへの変態過程はポドシストが非常に強い再生力を持つことを示しており、無性生殖がポリプの個体群維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。

③今後の展望

本研究では明確にポドシストの出芽を促進する因子の特定には至らなかった。ポリプの大量発生機構を明らかにするためには、ポドシストの変態を促進させる環境因子の特定を行うことが必要である。

（5）野外における繁殖の確認

①主な成果

網内に拘束した個体では日の出後に放卵・放精することが確認された。しかしながらプランクトンネットによる採集では受精卵およびプラヌラとも発見することは出来なかった。また、海岸付近で座礁しているクラゲの胃腔内を観察したが、受精卵やプラヌラを保持している個体は見られなかった。

②成果の位置づけ

日本沿岸でも条件さえ整えば放卵・放精することが確認され、日本へと漂流するクラゲにより新たなポリプの個体群が形成可能であることが示唆された。しかし野外での調査においてクラゲが集積するような場所においても受精卵やプラヌラは確認されず、日本沿岸での有性生殖の成功率がそれほど高くない可能性が示唆された。

③今後の展望

これまでに日本沿岸でのポリプ定着あるいはエフィラの出現は確認されていない。受精、プラヌラの発生、基盤への着定のいずれかが日本沿岸で行われていないと推測されるがどれが原因なのかは分かっておらず、原因を突き止める調査を継続して行う必要が

ある。一方で今後も日本への大量漂着が続けば、日本沿岸への定着が起こる危険性は高まってくる。今後も引き続き調査を行う必要がある。

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

- ① 池田英樹、河原正人、大津浩三、上真一、エチゼンクラゲポドシストの構造と出芽に伴う形態変化、2009年日本プランクトン学会、日本ベントス学会合同大会(函館)2009年10月18日
- ② Ikeda, H., Ohtsu, K., and Uye, S., Sexual reproduction in the giant jellyfish *Nemopilema nomurai* (Rhizostomeae; Scyphozoa): a histo-ecological approach. ASLO Aquatic Sciences Meeting 2009, Nice, France 2009年1月27日
- ③ 池田英樹、大津浩三、上真一、エチゼンクラゲの生殖線構造と成熟・放卵・放精に伴う変化、2008年日本プランクトン学会、日本ベントス学会合同大会(熊本)2008年9月5日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田英樹 (IKEDA HIDEKI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・研究員

研究者番号: 50452628

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者