

平成21年 4月24日現在

研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2005~2008
 課題番号： 18380118
 研究課題名 (和文) 海産ワムシ類の生物機能制御と優良品種育成への展開
 研究課題名 (英文) Regulation of biological function of marine rotifers and its application to breed useful strains.
 研究代表者
 萩原 篤志 (HAGIWARA ATSUSHI)
 長崎大学・大学院生産科学研究科・教授
 研究者番号： 50208419

研究成果の概要：

海産ワムシ類 *Brachionus plicatilis* は9~15種よりなる複合種である。本研究により、ワムシのサイズと増殖特性はワムシ株で異なるのみならず、悪環境におかれた場合の耐性も株間で異なることを見出し、株間の交雑を通じて増殖特性や環境耐性に優れた新品種作出に成功した。また、遺伝子マーカーによる個々のワムシ株の同定技法を確立した。新品種のワムシを用いた、実際のヒラメ仔魚飼育を行い、仔魚用餌料としても使用可能であることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：増養殖、餌料生物、シオミズツボワムシ、生物機能、品種改良、種苗生産、株間交雑、両性生殖

1. 研究開始当初の背景

シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* complex (少なくとも8種以上から構成される複合種、以下ワムシと略) は外部形態、生殖特性および遺伝的特性に大きな変異を示す汽水性の動物プランクトンである。本種は、水産動物の初期幼生飼育に用いられる代表的な餌料プランクトンで、その大量培養技術の進歩のもと、海産魚介類の種苗生産技術は飛躍的に発展した。

それにもかかわらず、ワムシを安定的に培養し、給餌に必要な量を毎日確保することは

容易でなく、依然として大きな問題点である。申請代表者の最近の調査では、西日本の民間種苗生産会社のうち約5割がシーズン中にワムシの培養不調を1回以上経験し、他機関からワムシを搬入することによって、急場を凌いでいる実態がある。また、海産仔魚は魚種や成長ステージによってワムシに対する選択性が異なり、至適サイズのワムシを給餌することによって、仔魚の成長、生残を改善できるが、これを生かした種苗生産実施例はほとんどない。一方、種苗生産機関側からの要望として、口径の小さな魚種に対する超小

型ワムシの導入、配合飼料に餌付けにくい魚種の仔稚魚用餌料として有用な、大型ワムシの導入が懸案となっている。

上記の実態の背景には、基礎研究分野では、ワムシが示す生物現象の機構解明に力点がおかれてきた。一方、生産現場では、個々のワムシ株が有する特徴(サイズ、増殖特性等)についての数値情報など、種苗生産システムの構築に有用となる具体的な数値データを重視する傾向があるという実情がある。すなわち、過去のワムシ研究を通じて、多くの知見が得られてきたにもかかわらず、生産現場で活用できる詳細な生物機能情報は十分得られているとは言い難い。それに加え、生産現場で有用となる優良品種のワムシを人為的に育成できることを示すような観察例がいくつかあるにもかかわらず、具体的証拠が不十分である上、餌料生物として、より適した新品種のワムシを育成していくための方法論が確立していないことも大きな問題点である。

ワムシの生物機能の中で、餌料生物学的に重要なのは、仔魚用餌料としての性能に関わる特性値である被甲サイズと栄養価、およびワムシ培養の量産と安定性に関わる特性値である増殖能力とストレス耐性である。これらのパラメータの多くは遺伝的な差異に基づくワムシ株に固有の値であるが、具体的データが得られているのは、被甲サイズと増殖能(個体レベルの培養で求める内的自然増殖率)に限られている。しかもこれらの基礎データは、特定の培養環境下でのみ測定された、言わば静的なデータのレベルにとどまっておき、刻々と変化する環境下やストレスの存在下でどのような生物機能を示すのかといった動的な観点から捉えた例はほとんどない。

2. 研究の目的

以上の背景をもとに、本研究では、L型ワムシと呼称される大型のワムシ株群を材料とし、次の4つの目的を設定し、研究を行った。

(1) 環境条件(水温、塩分、餌料種)の変化や化学物質の投与にともなうワムシの外部形態の可塑性(特に被甲長と被甲幅)、増殖能力、悪環境に対する耐性を具体的な数値データとして求めると共に、これらの特性値の株間での違いを明らかにする。

(2) ワムシ株間の交雑を通じて得られる新品種の形態、増殖、耐性について検討し、新品種の育成に対する交雑の有効性を実証する。

(3) 交雑による新品種の作出にあたっては、両性生殖能力を有するワムシ株を多数確保し、これらを混合培養して、自由交配させ、形成される耐久卵の孵化によって新たなワ

ムシ株を得ていく操作が有効となる。交雑によって得られたワムシ株の母方と父方のワムシ株を特定できるようにするため、遺伝子マーカーを用いたワムシ株の簡易同定技法を開発する。

(4) 増殖や環境耐性に優れたワムシ株を用いた仔魚飼育を15日令まで実施し、飼育水槽内でのワムシの分布と遊泳行動を調べるとともに、仔魚の仔魚の成長、生残と空中露出試験を用いた健康度判定を行い、餌料価値を総合的に捉える。

3. 研究の方法

(1) 環境変化によるワムシの形態変化と環境耐性

①形態変化

平均被甲長が221.5~283.3 μ mのロシア、東京、能登島、静岡のワムシ4株を、水温5段階(10~30 $^{\circ}$ C)、塩分3段階(11~22 ppt)のもと、植物プランクトン(*Nannochloropsis*, *Tetraselmis*, *Chlorella*)を給餌して10日間バッチ培養し、生物学的最小形となったワムシの被甲サイズを測定した。また海産無脊椎動物の倍数体誘導に用いられるサイトカラシンB(0~10 mg/Lに6段階)とカフェイン(0~10³ mg/Lに5段階)で、ふ化後0~6時間以内(3段階)の静岡株の仔ワムシを0~60分間処理(3段階)し、被甲サイズを求めた。

②環境耐性

ワムシ7株(NHIL, 奄美, 牧島, 静岡, ドイツ, オーストラリア, ロシア)を水温20 $^{\circ}$ C、塩分17で予備培養した。これらを、終始20 $^{\circ}$ Cで培養した対照区、20 $^{\circ}$ Cから10 $^{\circ}$ Cへ直接移行した非馴致区、20 $^{\circ}$ Cから15 $^{\circ}$ Cへ14日間馴致後10 $^{\circ}$ Cへ移行させた馴致区の3群を設定した。各々1個体/mLでバッチ培養を開始し、14日間の増殖率を水温条件と株間で比較した。

(2) 株間交雑による新品種の性状

NHIL株とオーストラリア株の2株を用い、各株の雌雄を組み合わせる光周期24L:0D(6000 lux)と0L:24D下で交雑させた。得られた交雑株と親株の計3株の体サイズ(被甲長、被甲幅)を調べた。また6段階のアンモニア濃度(2.2~18.8 mg/L)に、各々30個体のワムシを曝露して24時間後の死亡数を調べた。

また、ドイツと東京との交雑株、NHILとオーストラリアとの交雑株を用い、(1)②に示した方法と同様の操作を行い、低温耐性を求めた。

(3) ワムシ株の同定技法開発

①ワムシ株判定

世界各地から採集した、14株のワムシを用

いた。これらの株より、プロテイナーゼ K を用いて全 DNA を精製し、下記のプライマーを用いてミトコンドリア DNA (mtDNA) を PCR で増幅した。増幅した mtDNA は制限酵素 BglIII と SalI もしくは EcoRI と XbaI の混合で消化し、電気泳動で消化断片パターンを解析した。

[プライマー配列]

1. CGATAAATATATCTACTACCTCGATGTTGG
2. GATTTCATAATTAAGAAAACAAGAATCACGCTACC

②交雑株の母系ワムシ株の判別

実験 2 で作出した交雑株の全 DNA を精製し、RAPD 解析および PCR による増幅 mtDNA 断片による RFLP 解析 (前述) により、交雑の有無、および交雑株の母親の履歴同定を遺伝子レベルで実施した。

③交雑株の父系ワムシ株の同定法

NHIL 株の雄と雌のみをそれぞれ使用し、cDNA ライブラリーを作製した。これら 2 つの cDNA ライブラリーから合わせて約 8400 クローンの塩基配列を決定した。この配列データより、BLAST 検索で明確な遺伝子機能が推定出来かつ雄に特異的な遺伝子クローンの解析を行った。

(4) 実験 4 : 選抜株を用いた仔魚飼育実験

①ワムシ株と培養

種苗生産の現場で実際に使用されている長崎牧島株と、本研究で作出した交雑株 (オーストラリア株の雄×ドイツ株の雌) の 2 株を選出し、各々を 50L アルテミアふ化槽でバッチ培養した。餌料には市販の淡水クロレラを用い、塩分 17、水温 25℃とした。

②仔魚飼育実験

小規模 (30L 水槽) で海産仔魚飼育の出来る飼育システムを構築することが出来た。この飼育システムで、実験魚にヒラメを用い、一般的な種苗生産でワムシからアルテミアに給餌を切り替える発育段階 (24 日令) までの仔魚飼育を実施した。水槽 6 面に開口したヒラメ仔魚を 450 尾ずつ収容した。これらを 2 群に分け、長崎牧島株と交雑株とを各々給餌した。ワムシ給餌は 1 日 2 回、飼育水槽内のワムシ密度が 10 個体/mL となるよう調節した。飼育水温は 18℃、塩分 33、明暗周期 10L:14D で飼育した。定期的に仔魚をサンプリングして摂餌状況と成長を調べ、飼育最終日に生残個体をタモ網で取り上げて計数するとともに、タモ網の干出による仔魚の活力を見た。

4. 研究成果

(1) 環境変化によるワムシの形態変化と環境耐性

①形態変化

ワムシの体サイズは基本的に、低水温、低塩分、*Tetraselmis* 給餌の時に大型化し、高水温、高塩分、*Chlorella* 給餌の時に小型化した。環境制御に対する体サイズの変化はワムシ株間で異なった。静岡株は他の 3 株より体サイズが大きく、特に水温 15℃、塩分 22 ppt、*Tetraselmis* 給餌で、被甲長 (平均±標準偏差) は $324.5 \pm 23.6 \mu\text{m}$ で、その中には $404.7 \mu\text{m}$ の個体も出現した。また、ふ化後 0~2 時間のワムシをサイトカラシン B 10 mg/L で処理すると非処理区より平均 5.4% 体サイズが大型化し、ふ化後 2~4 時間のワムシをカフェイン 1 mg/L で処理すると平均 8.8% 小型化することがわかった。

②環境耐性

対照区では全ての株が増殖した ($r=0.029-0.222$)。馴致区では、静岡株がほぼ全滅したが、ドイツ株は、どの条件でも同様の増殖を示した ($r=0.015-0.044$)。ほかの 5 株の増殖率 ($r=0.025-0.082$) は対照と比較すると低かったが、非馴致区より高かった ($r=-0.088-0.037$)。

(2) 株間交雑による新品種の性状

暗所下では株間の交雑は確認されなかったが、連続照明下では NHIL 株♀×オーストラリア株♂の交雑で耐久卵が 1 つ得られ、ふ化も確認された。交雑株では被甲長と被甲幅共に、親株の中間のサイズとなり (交雑株被甲長: $308.0 \mu\text{m}$, 被甲幅: $231.7 \mu\text{m}$)、非解離アンモニアに対する耐性は、交雑株が最も高く、次いでオーストラリア株、NHIL 株の順であった。また、NHIL とオーストラリアとの交雑株は 10℃でも良く増殖し、実験 1 ②に用いたワムシ株を含めて、最も増殖率が高かった ($r=0.082$)。

本実験の経過で、ドイツ株とオーストラリア株の交雑によって得られた 11 株のうち 9 株で、耐久卵の形成と孵化が確認され、交雑株の F2 を得ることができた。F2 の株群は遺伝的変異に富むことが予想され、新品種作出の材料として今後活用する計画である。

(3) ワムシ株の同定技法開発

①ワムシ株判定

PCR で増幅した mtDNA の RFLP 解析の結果、使用した 14 株すべてで RFLP フィンガープリントのパターンが異なっていた (図 1)。よって、本手法を用いることでワムシ株の識別が可能であることを見出した。

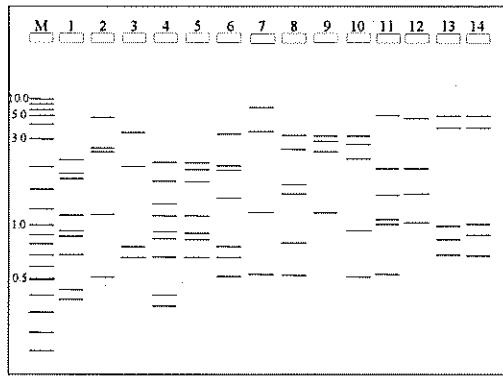


図1. RFLP解析によるワムシ株 mtDNA の DNA フィンガープリントパターン。

M, DNA マーカー; 1, NH1L; 2, ドイツ; 3, 小浜; 4, 静岡; 5, 奄美; 6, 能登島; 7, YS; 8, Oton; 9, Sing; 10, インドネシア; 11, JS; 12, 甌島; 13, タイ; 14, フィジー

②交雑株の母系ワムシ株の判別

RAPD 解析により、作出した交雑株は雌雄株の遺伝子が混じり合っており、遺伝子レベルで交雑していることを明らかにした。また、mtDNA を用いた RFLP 解析の結果、交雑株の mtDNA は雌株と同じ切断パターンを示したことから、本方法により交雑株の母系ワムシ株が判別可能である。

③交雑株の父系ワムシ株の同定法

ワムシの雄に特異的な 8 個の遺伝子 (Sperm associated antigen 16、Granulin、Vertebrate male sterility domain、Testis specific、Vertebrate male sterility domain2、Testis-specific serine kinase、Sperm associated antigen 17、Spermatogenesis associated 17) を見出した。これらの配列を解析し、変異性の高い遺伝子をスクリーニングすることにより、交雑株の父系ワムシ株を同定するための技術開発を実現可能である。

(4) 選抜株を用いた仔魚飼育実験

①仔魚飼育水槽に移槽したワムシの行動

両株ともバッチ培養で良好な増殖を示した。水温 25°C・塩分 17 の培養環境から、水温 18°C・塩分 33 のヒラメ飼育水槽に移槽した場合に、ワムシの行動に株による大きな差が見られた。交雑株はヒラメ飼育水槽の壁面に脚で付着している個体が非常に多いのに対し、長崎牧島株ではそのような行動を示す個体はほとんど出現しなかった (表 1)。

表 1. ヒラメ飼育水槽壁面に付着していたワムシの密度 (個体数/cm²)

場所	長崎牧島株	交雑株
表層 (水深 1 cm)	0.9±1.4	49.3±32.5*
中層 (水深 14 cm)	0.9±1.3	39.0±23.5*
底層 (水深 27 cm)	0.7±1.4	34.8±24.4*

*, t-test, p<0.05

ワムシはコンディションの良い状態で新規環境に晒されると付着行動を示す。したがって、低水温・高塩分である仔魚飼育水槽に移槽されたときに付着行動の多かった交雑株は、コンディションが良くストレス耐性の強いことが示唆された。

②ヒラメ仔魚の生残・成長・活力

異なる株のワムシで 24 日令まで飼育したヒラメ仔魚の成長と生残の結果を表 2 に示した。

表 2. 異なるワムシ株を給餌した 24 日令のヒラメ仔魚の成長 (n=10) と生残 (n=3)

ワムシ株	全長 (mm)	生残率 (%)
長崎牧島	7.2±0.8	59.1±9.6
交雑	7.2±0.8	49.9±6.8

成長・生残ともに、ワムシ株による有意差は検出されず、交雑株を給餌することで、従来と遜色のない飼育成績を達成できることが明らかになった。

また、取り上げ時のタモ網による仔魚の干出耐性についても、給餌したワムシ株による差は見られず、仔魚の状態は良好であったと判断された。

交雑株は仔魚飼育水槽内で水槽壁面に多く付着するため、一見すると仔魚の摂餌行動に対して不利な印象を受けるが、逆にワムシのコンディションの良いことと、活発なワムシを少量でも摂餌していくことは、却って仔魚の質を高くする要因になると推察する。

(5) 研究成果の国内外における位置づけとインパクト

ワムシの培養不調は魚介類種苗生産機関が共通に抱える問題であるが、本研究を通じて、ワムシ株の品種改良による有用品種の育成が可能であることを世界に先駆けて明らかにし、2005 年 9 月にベルギー王国ゲント大学に於いて開催された仔魚飼育国際学会の招待講演と、国際学術誌 Aquaculture (IF=2.081) の論文掲載 (Hagiwara ら, 2007) に繋がった。

また、本研究の一環として、分子生物学的

なアプローチが過去にほとんどなかったワムシ類を対象とした研究を進展させ、ワムシ内で機能している遺伝子情報を蓄積したデータベースを世界で初めて構築すると共に、本種のミトコンドリア DNA が、通常の生物とは異なり、2つの環状構造からなることを明らかにし、国際的なインパクトを与える研究成果となった (Suga ら, Mol. Biol. Evol., 2008; IF=6.438)。

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 8 件)

- ① Hagiwara, A.: Rotifer study and application to fish larval rearing. Proceedings of International Symposium on the recent trends in aquaculture and marine biotechnology. Marine Biology Center for Education and Research, Kangnung National University, Korea, pp. 31-36. (2008) 査読無し
- ② Suga, K., Welch, D. B. M., Tanaka, Y., Sakakura, Y. & Hagiwara, A. (2008) Two circular chromosomes of unequal copy number make up the mitochondrial genome of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Molecular Biology and Evolution Vol.25, pp.1129-1137 (2008) 査読有り
- ③ Hagiwara, A., Suga, K., Akazawa, A., Kotani, T. & Sakakura, Y.: Development of rotifer strains with useful traits for rearing fish larvae. Aquaculture 268(1-4) 44-52. (2007) 査読有り
- ④ Suga, K., Tanaka, Y., Sakakura, Y. & Hagiwara, A.: Inheritance of mitochondrial DNA in the rotifer *Brachionus plicatilis*. Hydrobiologia 593: 167-173. (2007) 査読有り
- ⑤ Suga, K., Welch, D. M., Tanaka, Y., Sakakura, Y. & Hagiwara, A.: Analysis of expressed sequence tags of the cyclically parthenogenetic rotifer *Brachionus plicatilis*. PLoS ONE (8) e671, 1-7. (2007) 査読有り
- ⑥ Alver, M.O. & A. Hagiwara: An individual-based population model for the prediction of rotifer population dynamics and resting egg production. Hydrobiologia 593: 19-26. (2007) 査読有り
- ⑦ 萩原篤志: 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. 日本水産学会誌 73(3): 433-436. (2007) 査読無し
- ⑧ Kotani, T., Ihara, K. & Hagiwara, A.: Cross-mating of euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* strains as a means to develop useful strains for larval fish food. Aquaculture 261, 495-500. (2006) 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

- ① Hagiwara, A. & Suga, K.: Resting Egg

Formation, Diapause and Hatching of the Rotifer *Brachionus plicatilis*. Workshop: Sleeping Beauties - Dormancy and resistance in harsh environments - Molecular, proteomic and metabolomic aspects, May 18-20, 2008, Max Plank Institute, Berlin, Germany.

② Hagiwara, A.: Rotifer study and application to fish larval rearing, April 21-22, 2008, Kangnung National University, Kangnung, Korea.

③ 萩原篤志, 柴戸洋輝, 阪倉良孝: シオミズツボワムシ耐久卵の休眠時の条件が孵化及び孵化ストレインの個体群増殖に与える影響. 平成 20 年度日本水産学会春季大会, 平成 20 年 3 月 28 日 東海大学 (静岡市)

④ Hagiwara, A.: Recent progress of live food research in Japan. NOAA-HIMB workshop, Mar. 20, 2008, Univ. Hawaii, Honolulu, HI, USA.

⑤ 管向志郎・田中由香里・阪倉良孝・萩原篤志: シオミズツボワムシの雄の EST 解析. 平成 19 年度日本水産学会秋季大会, 平成 19 年 9 月 25-28 日 北海道大学

⑥ 堀江麻紀子, 阪倉良孝, 萩原篤志: シオミズツボワムシと捕食者の間にケミカルシグナルは存在するのか? 平成 19 年度日本水産学会秋季大会, 平成 19 年 9 月 25-28 日 北海道大学 (函館市)

⑦ 柿野耕平, 阪倉良孝, 萩原篤志: 培養環境が雄ワムシの精子数に与える影響. 平成 19 年度日本水産学会秋季大会, 平成 19 年 9 月 25-28 日 北海道大学 (函館市)

⑧ 管向志郎・田中由香里・阪倉良孝・萩原篤志: シオミズツボワムシのミトコンドリア DNA の解析. 平成 19 年度日本水産学会春季大会, 平成 19 年 3 月 27-31 日 東京海洋大学

⑨ 田中由香里・管向志郎・阪倉良孝・萩原篤志: シオミズツボワムシのミトコンドリア DNA の遺伝形式. 平成 19 年度日本水産学会春季大会, 平成 19 年 3 月 27-31 日 東京海洋大学

⑩ 上田広大・萩原篤志・植木史織・阪倉良孝: シオミズツボワムシの株間交雑と交雑株の性状. 平成 19 年度日本水産学会春季大会, 平成 19 年 3 月 27-31 日 東京海洋大学

⑪ Hagiwara, A.: Culturing of zooplankton and application to industry. May 23, 2006, Univ. Milan, Italy.

⑫ Hagiwara, A.: Zooplankton Study and Application to Rearing Marine Fish Larvae. April 18, 2006, Univ. Las Palmas, Spain.

⑬ 押山夏樹・萩原篤志・田中由香里・阪倉良孝・丸山功・耕田隆彦: シオミズツボワムシ耐久卵形成のための適株の作出. 日本水産学会, 2006 年 4 月 東京

[図書] (計 1 件)

萩原篤志 (2008) 養殖の餌と水一陰の主役た

ち、仔魚の餌料生物としての動物プランクトン。 恒星社厚生閣 pp. 59-99.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：「ワムシの耐久卵の製造方法、ワムシの耐久卵形成能力の抑制方法、ワムシ株の判定方法および新規なワムシ株」

発明者：萩原 篤志・菅 向志郎・阪倉 良孝

権利者：(独) 科学技術振興機構

種類：特許権

番号：特願 2007-065642、特開 2008-035855

出願年月日：2007 年 3 月 14 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

〔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・大学院生産科学研究科・教授

研究者番号：50208419

(2) 研究分担者

阪倉 良孝 (SAKAKURA YOSHITAKA)

長崎大学・水産学部・教授

研究者番号：20325682

(3) 連携研究者

小谷 知也 (KOTANI TOMONARI)

福山大学・生命工学部・准教授

研究者番号：30389069