

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21340

研究課題名(和文) 仔魚の餌生物「ワムシ」：あらゆるワムシに耐久卵を作らせる

研究課題名(英文) Rotifers as live food for fish larvae: resting egg formation for various rotifer strains

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)・特定教授

研究者番号：50208419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：水産種苗生産の初期餌料に用いられるワムシは、乾燥や凍結下で長期間休眠する耐久卵を形成する。これはワムシの簡便な保存手段として活用できるが、生産現場で用いられているワムシ株の多くは耐久卵を作らない。本研究では「どんなワムシ株であっても耐久卵を形成させることができる」という仮説を立て、これを検証した。その結果、環境操作によって耐久卵を効率的に得ることが可能であることが分かった。一部のワムシ株は耐久卵形成の第一ステージである両性生殖の関連遺伝子を発現しなかったが、抗酸化ストレス耐性が他株より10倍以上高く、悪環境を回避する耐久卵を形成しない代わりに、強い環境耐性を備えていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

耐久卵は、凍結や乾燥下で長期間休眠状態を維持するので、水産養殖分野では、仔魚飼育のオフシーズンにワムシの簡便な保存手段として活用できる。一方、種苗生産の現場で餌料生物として培養されている優良形質を備えたワムシの多くは耐久卵を作らないことが多く、長年の懸案となってきた。本研究を通じて、耐久卵形成能を備えたワムシ株に対し、より効率的に耐久卵を得る方法が新たに示されると共に、低温処理後の昇温で耐久卵を確保可能なワムシ株が存在することを見出した。環境操作によっても耐久卵を作らない一部の有用株は、抗酸化ストレス耐性がきわめて高いことが分かり、成体や卵の形で長期保存できる可能性が新たに示唆された。

研究成果の概要(英文)：The rotifer used as an initial food source in aquatic seedling production forms resting eggs that stay dormant for long periods of time under dry or frozen conditions. This can be used as a simple means of preserving rotifers, but many of the rotifer strains used in aquaculture hatcheries do not produce resting eggs. In this study, we hypothesized that "any rotifer strain can form resting eggs and tested this hypothesis. As a result, it was found that it is possible to efficiently obtain resting eggs through environmental manipulation. Although some rotifer strains did not express genes related to mixis (the first stage of resting egg formation), their antioxidant stress tolerance was more than 10 times higher than that of other strains, indicating that they have strong environmental tolerance instead of forming resting eggs that avoid adverse environments.

研究分野：水産増殖学

キーワード：ワムシ類 休眠 耐久卵 カイアシ類 保存 遺伝子解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究で対象とするシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* (以下ワムシ)は輪虫動物門に分類される、大きさが0.2-0.3mmの汽水域に生息する動物プランクトンである。多くの魚類の幼生(仔魚)飼育には、生物餌料と呼ばれる、生きた動物プランクトンの給餌が必要で、日本で開発されたワムシを餌とする技術が、世界に普及している。

ワムシは雌が単独で雌を生じる単性生殖を行い、遺伝的に均一のクローン個体群を形成する。単性生殖を行う雌が生じる仔は全て雌であるが、その中に減数分裂を行う両性生殖雌が現れることがある。これが半数体の雄を生じ、交尾後に受精すると休眠能力をもつ耐久卵(受精卵)を形成する。耐久卵は、凍結や乾燥下でも長期にわたり休眠状態を維持するので、水産養殖分野では、仔魚飼育のオフシーズンにワムシの簡便な保存手段として活用できる。ワムシは遺伝的に異なる株の間で、大きさや増殖速度、悪環境への耐性が異なるので、仔魚飼育の現場では、魚種毎に異なる仔魚の口の大きさや、生産現場の気候等に適したワムシ株を培養している。ところが、これら優良形質を備えたワムシの培養では、両性生殖が起こらず、耐久卵を作らないことがほとんどで、養殖産業の懸案の一つとなっている。また、ワムシは生態学や遺伝学のモデル生物として広く使われており、学術の発展のためにも輸送手段としての耐久卵確保の意義は大きい。有用株を耐久卵の形で保存できれば、産業面と学術面で大きく貢献することが可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、乾燥や凍結下でも長期にわたり休眠状態を維持する耐久卵に着目した。過去に申請者らは、両性生殖の発現機構と耐久卵の休眠・孵化を研究し、特定のワムシ株に環境調節を行うことで、100億単位の耐久卵量産と商品化を実現した。一方、種苗生産施設で用いられるワムシの多くは、単性生殖のみを行い、耐久卵形成の機能を喪失したと理解されている。

そこで、「どんなワムシ株であっても耐久卵を形成させることができる」という仮説を立て、これを検証することを本研究の目的とする。さらに、この現象の生物学な裏付けをとるため、両性生殖の誘導機構を遺伝子レベルで解明することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 雌ワムシの加齢が子孫の両性生殖発現能に与える影響

大型でL型ワムシと呼ばれる温帯性の *B. plicatilis* と小型でSS型ワムシと称される熱帯性の *B. rotundiformis* を対象とし、*Nannochloropsis oculata* を餌料として個体別培養を4世代にわたって実施し、両性生殖個体の出現状況を求めた。

(2) 25℃下での両性生殖関連遺伝子の発現レベル

L-type ワムシ *B. plicatilis sensu stricto* の中から両性生殖能を有するNH1L株とNH17株のほか、両性生殖の観察例がない能登島株を用いた。*Tetraselmis tetraathele* を1日1回25万細胞/mlとなるよう給餌した。近年の研究で、ワムシの両性生殖能との関連が指摘されている遺伝子 *vasa*、*cdc42P*、*histone H2A* の発現パターンを調べた。

(3) 15℃で培養したのち25℃に昇温したときの両性生殖関連遺伝子の発現レベル

L型ワムシ *B. plicatilis* のうち、25℃下では両性生殖を発現しない4株(奄美、石川、静岡、小浜)を用い、長期の低水温馴致(15℃)の後に25℃に昇温したときの両性生殖個体の出現を調べると共に、関連遺伝子の発現を求めた。どの水温下でも両性生殖を発現するNH1L株を対照に使用した。

(4) 各種環境因子が両性生殖の誘導・抑制に与える影響

本研究と同時に実施した基盤研究B「海産ワムシ類の遊泳行動制御と仔魚用餌料としての性能評価」(課題番号20H03063)で、ワムシの遊泳行動に与える微量元素の影響を検討したが、このとき本課題に関連する両性生殖への影響についても求めた。すなわち、微量元素として生物の生存に必須であるが、水産種苗生産の現場では過剰投与になりがちな鉄(FeSO_4 0-96mg/L)、亜鉛(ZnCl_2 0-2mg/L)に加え、飼育水の水質の指標となる非解離アンモニア(0-29.3 mg/L)の影響を上記L型ワムシの *B. plicatilis* (NH1L株)とSS型ワムシ *B. rotundiformis* (Kochi株)を用いて検討した。

(5) 極小ワムシ *Proales similis* の単性生殖卵が示す休眠現象

水温25℃で *Nannochloropsis oculata* 350万細胞/mLを毎日給餌した場合と、初日のみ給餌して以後9日間無給餌とした場合で *P. similis* の個体群増殖率を求めた。このとき得られた単性生殖卵を25℃で孵化させた場合と、低水温(4℃)と高塩分(飼育水を5日にわたって蒸発)に置

いた場合について孵化率を求めた。

4. 研究成果

(1) 雌ワムシの加齢が子孫の両性生殖発現能に与える影響

親ワムシの加齢は、子世代と孫世代のワムシの寿命と産卵数に影響を与えず、母親が若いときほど、多くの両性生殖雌を生じた。一方、加齢の進んだ母親から生じた単性生殖雌は、より多くの両性生殖雌を生じた。すなわち、個々のワムシが本来備える生殖能力を十分に発揮できるような良好な環境下で両性生殖が活発になることが分かった。このことについては L 型ワムシの東京株について知られてきたが(萩原、博士論文)、今回他の L 型ワムシ株で再検討すると共に、新たに SS 型ワムシについても検討を行い、同様の傾向が認められたことから、この成果を国際学術誌に投稿した (Han and Hagiwara, *Hydrobiologia* 投稿中)。

(2) 25 下での両性生殖関連遺伝子の発現レベル

cdc42P のみワムシ株間で有意差がみられ、耐久卵を作らない能登島株が最も低く、NH1L 株は能登島株の約 2.8 倍だった ($P < 0.05$)。vasa の発現に株間で有意差はなかったが ($P = 0.063$)、Notojima 株で最も低くなる傾向がみられた。

(3) 15 で培養したのち 25 に昇温したときの両性生殖関連遺伝子の発現レベル

昇温後に 4 株のうち 3 株では両性生殖が発現し、両性生殖誘導率は 7.0-41.4% だったが、小浜株では両性生殖が全く起こらなかった。その分子機構を調べるため、ワムシの両性生殖調節遺伝子 (vasa, cdc42p, P300/CBP) 内分泌及びエネルギー代謝関連遺伝子 (ecdysone-induced 78C, estrogen receptor, α -glucosidase) 細胞ストレス耐性遺伝子 (heat shock protein 70, NADPH oxidase 5, catalase) の発現を求めた。その結果、25 で両性生殖をおこなわないワムシ株のうち小浜株以外の 3 株では 15 に置くことにより、上記全ての遺伝子発現が顕著に増加していることが明らかになった。一方、低温処理を行っても両性生殖を誘導しない小浜株では hsp70 の発現が極めて高く (他株の 10 倍以上) 環境ストレスに対する本株の高い耐性が両性生殖の発現を抑制している可能性が示唆された。

(4) 各種環境因子が両性生殖の誘導・抑制に与える影響

微量元素と非解離アンモニアの濃度上昇にともなって、L 型ワムシでは両性生殖の誘導と耐久卵形成が抑制されたが、SS 型ワムシでは抑制の度合いが小さく、逆に両性生殖が活発になる場合も観察された (表 1)。このとき、L 型ワムシでは体内の脂肪滴の量が減少し、SS 型ワムシでは増加した。鉄はフェントン反応を介して活性酸素 (ROS) の生成に直接関与し、その除去には、CYP、SOD、CAT などの抗酸化防御システムが働くが、これらの遺伝子発現は L 型ワムシでは抑制され、SS 型ワムシでは逆に強化されていることが明らかになった。同様の傾向が亜鉛と非解離アンモニアについてもみられ、SS 型ワムシは毒性物質の濃度増加に対し強い抵抗性を示すことが分かる。

表 1 各種環境因子の異なる濃度下 (mg/L) でのワムシ 2 種の両性生殖誘導率 (%)

	濃度 (mg/L, control)	Mixis (%)		耐久卵形成数/mL	
		<i>B. plicatilis</i>	<i>B. rotundiformis</i>	<i>B. plicatilis</i>	<i>B. rotundiformis</i>
FeSO ₄	0 (control)	22.3	38.5	10.4	29.6
	3-12	22.5	37.1	8	46.7
ZnCl ₂	0 (control)	21.2	23.4	1.9	32.1
	1-2	11.9	31.3	0.2	44.3
非解離アンモニア	0 (control)	4.8	10.5	4.7	25.8
	1.1	1.9	6.2	0.3	10.3

(5) 極小ワムシ *Proales similis* の単性生殖卵が示す休眠現象

P. similis の増殖率は制限給餌区の方が高く、多数の単性生殖卵を得られた。25 下では卵の孵化率には差がなかった。4 下で孵化率は 50.8% に低下したが (対照の 25 では 99.3%)、9 日保存後も孵化した。さらに高塩分処理を行い、4 で 7 日間保存後に 25 に移した時の孵化率は低くなったが (高塩分処理のみの対照区 33.4%、4 区 17.8%)、一部の卵は 7 日間保存可能であることがわかった。

水産増養殖の分野で有用なワムシ株の耐久卵を効率的に確保する方法が示されると共に、低温処理後の昇温で耐久卵を確保可能なワムシ株が存在すること、耐久卵形成が困難なワムシ株も存在することを確認した。このようなワムシ株では両性生殖誘導に關与する遺伝子がほとんど発現しないことから、耐久卵の確保は実質的に厳しいと考えられる。*P. similis* については世界中でも耐久卵の観察報告はなく、本研究を通じて成体および単性生殖卵の環境耐性がきわめて高いことが明らかになったことと合わせ、耐久卵の形で越冬を戦略として持つ必要がなかったのではないかと推察される。シオミズツボワムシにおいても耐久卵を作らない有用株は、抗酸化ストレス耐性が高いこと等が分かり、成体や卵の形で長期保存できる可能性が新たに示唆された。

以上(1)~(5)を通じて、水産増養殖の分野で有用なワムシ株の耐久卵を効率的に確保する方法が示されると共に、低温処理後の昇温で耐久卵を確保可能なワムシ株が存在すること、耐久卵形成が困難なワムシ株も存在することを確認した。このようなワムシ株では両性生殖誘導に關与する遺伝子がほとんど発現しないことから、耐久卵の確保は実質的に厳しいと考えられる。*P. similis* については世界中でも耐久卵の観察報告はなく、本研究を通じて成体および単性生殖卵の環境耐性がきわめて高いことが明らかになったことと合わせ、耐久卵の形で越冬を戦略として持つ必要がなかったのではないかと推察される。シオミズツボワムシにおいても耐久卵を作らない有用株は、抗酸化ストレス耐性が高いこと等が分かり、成体や卵の形で長期保存できる可能性が新たに示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Han Chengyan, Kim Hee-Jin, Sakakura Yoshitaka, Hagiwara Atsushi	4. 巻 550
2. 論文標題 Species-specific ammonia tolerance in the marine rotifers <i>Brachionus plicatilis</i> and <i>Brachionus rotundiformis</i> : Reproductive characteristics and its mechanisms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aquaculture	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aquaculture.2021.737837	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lee Min-Chul, Yoon Deok-Seo, Park Jun Chul, Choi Hyuntae, Shin Kyung-Hoon, Hagiwara Atsushi, Lee Jae-Seong, Park Heum Gi	4. 巻 546
2. 論文標題 Effects of salinity and temperature on reproductivity and fatty acid synthesis in the marine rotifer <i>Brachionus rotundiformis</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aquaculture	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aquaculture.2021.737282	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Han Chengyan, Kim Hee-Jin, Lee Jae-Seong, Sakakura Yoshitaka, Hagiwara Atsushi	4. 巻 277
2. 論文標題 Species-specific effects of iron on temperate and tropical marine rotifers in reproduction, lipid and ROS metabolisms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 130317 ~ 130317
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chemosphere.2021.130317	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Han Chengyan, Kim Hee-Jin, Sakakura Yoshitaka, Hagiwara Atsushi
2. 発表標題 Ammonia Effects on Reproductivity of the Marine Rotifer <i>Brachionus rotundiformis</i>
3. 学会等名 The 4th Environment and Natural Resources International Conference (ENRIC 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 C. Han, H.-J. Kim, A. Hagiwara
2. 発表標題 Effects of iron compounds on sexual and asexual reproduction in the marine rotifer <i>Brachionus plicatilis</i>
3. 学会等名 日本水産学会春季大会（国際セッション）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

水産増殖学研究室 萩原篤志 http://www2.fish.nagasaki-u.ac.jp/FISH/KYOUKAN/hagiwara/index.htm Laboratory of Aquaculture Biology http://www2.fish.nagasaki-u.ac.jp/FISH/KYOUKAN/hagiwara/index-e.html 水産増殖学研究室 萩原篤志 http://www2.fish.nagasaki-u.ac.jp/FISH/KYOUKAN/hagiwara/index.htm Laboratory of Aquaculture Biology http://www2.fish.nagasaki-u.ac.jp/FISH/KYOUKAN/hagiwara/index-e.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	金 禧珍 (Kim Heejin) (10823437)	長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・准教授 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------