

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25650123

研究課題名(和文) ミジンコ類の有性生殖と個体群の多様性維持に関する研究

研究課題名(英文) Study on the sexual reproduction of Daphnids and the diversity in their populations

研究代表者

大森 克徳 (Omori, Katsunori)

亜細亜大学・経済学部・教授

研究者番号：20358534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：タマミジンコ飼育実験により、単為生殖においては世代内・世代間で産仔能力に有意な変化がないのに対し、有性生殖では、同一世代内に顕著な産仔能力の差が生じることが確かめられた。さらに、多産クローンと少産クローンについてそれぞれ休眠卵を作らせたが、両者由来の孵化個体は産仔能力において同様の傾向を示した。このことは、単為生殖では形質は維持され、有性生殖で顕著な多型性が作られること、およびそれらの多型性はゲノムの多型性を反映したものでないことを示唆する。想定外の結果のため計画変更し、1個体の休眠卵より抽出したゲノムDNAをエピジェネティクス解析する予定であったが、時間が足りず研究は途中で終わった。

研究成果の概要(英文)：In this study I investigated neonate production potential of *Moina macrocopa* females hatched from parthenogenetic eggs and resting eggs. There were no varieties between the fecundities of the females made by parthenogenesis within same generation and also across generations. However, the fecundities of the females hatched from resting eggs which were obtained from a clone population had significant variety within same generation. Moreover, the average value and the standard deviation of neonate production potential of resting egg-progenies derived from larger-reproductive population was same as resting egg-progenies derived from less-reproductive population. It was suggested that the phenotype is maintained across parthenogenetic reproduction, and polymorphism, which is not genetic polymorphism, is generated at resting egg production. Unexpected result changed investigate plans. I tried to carry out epigenetic analysis, but cannot completed in this investigation period.

研究分野：動物生理化学

キーワード：タマミジンコ 単為生殖 休眠卵 多型性

1. 研究開始当初の背景

ミジンコ類は鰓脚綱枝角目に属する甲殻類である。湖沼中のミジンコ類は季節的な個体群の消長を示す。春季に湖底の休眠卵が孵化し、以降雌だけで単為生殖によって個体数を増やし、環境悪化により雄が出現して有性生殖を行う。有性生殖では休眠卵が作られ、湖底に沈んで翌春の孵化を待つ。冬までに遊泳個体は姿を消し、ミジンコ類は休眠卵として冬を越す。

ミジンコ類の単為生殖は特殊な減数分裂でできた卵がそのまま発生するものであり、仔はクローンとなる。単為生殖による旺盛な増殖と貧弱な移動能力から、休眠卵を作る有性生殖はクローン内で起こり、個体群の遺伝的多様性増加に寄与しないと考えられる。

一方で湖沼の環境は安定したものではない。降雨のたびに水質は変動するし、上流域の降雪量の多寡により水質が変わって優占する植物プランクトンが異なるなど、毎日/毎年環境が変化する。つまり、ミジンコ類は多様な環境に適応する必要がありながら遺伝的多様性は低いことになり、個体群が全滅するリスクが高いと言える。

しかし、現実にはミジンコ類は最も優占する動物プランクトンとして広く繁栄していることから、個体群の多様性を維持し全滅を防ぐ何らかのメカニズムがあると予想される。

しかし、そのような観点でなされた研究はこれまでになく、この研究がその端緒を開くと考えられる。

2. 研究の目的

ミジンコ類は環境により単為生殖によるクローン生産と有性生殖による休眠卵生産の二つの生殖を使い分けている。しかし、有性生殖はほぼ同一クローン内で行われ遺伝的多様性増加への寄与は少ない。湖沼という環境変化が大きい環境で、遺伝的多様性の少ないミジンコ個体群が安定して繁栄し優占するのは不思議であり、集団内の多様性を維持する何らかのメカニズムが存在すると予想される。

今回は産仔能力多様性、あるいは薬剤反応性の多様性を指標として単為生殖と休眠卵生殖を比較し、実際にそのような多様性が生じているかを確認するとともに、ゲノム多型性の解析により実際にゲノムに多型性が生じているのかを確認し、どのような多型性がどの程度生じているのかに関する知見を得ることを目標とした。

3. 研究の方法

本研究では実験材料としてオオミジンコ *Daphnia magna* を用いる。数種のオオミジンコクローンの中から本研究に適したクローンを飼育実験により選定する。さらに効率的な休眠卵を作成する方法と、休眠卵を孵化させる環境条件を決定する。ただし、十分に休

眠卵を作成できない、あるいは休眠卵の孵化率が低かった場合にはタマミジンコ *Moina macrocopa* を用いる。

決定された条件による制御環境での飼育で産仔数と幼若ホルモン agonist に対する反応における多様性を調べる。それぞれについて、単為生殖で継代した個体(第1世代、第6世代、第11世代)間および休眠卵から孵化した個体が単為生殖で産んだ個体群間において多様性を比較する。

その後、ゲノム DNA を抽出し、SSR 解析によりゲノム多型性について分析する。SSR は DNA 上に、2~5 塩基を単位とした繰り返し配列を持つ構造の部分で、機能的制約を受けないため、生物の個体間で違いが生じやすく、近縁の個体間や同じ個体の細胞間にも多型がみられる。既にミジンコ類で SSR 解析がなされた例があり、この方法を適用する。

ただし、JH agonist への反応性に予想を上回る多型性が見られた場合のみ SSR 解析を中止し、アロザイム解析を行って、多型がみられた遺伝子についてゲノム解析を行うこととする。

それによりオオミジンコで観察された多型性がゲノムの変化によるものかを推定する。

4. 研究成果

オオミジンコクローンを3系統(NIES クローン、東京薬科大クローン、clone 5) 入手した。そのうち最も良く休眠卵を作成する clone 5 を実験材料として選定したが、効率的に休眠卵を作成することは困難であった。また得られた休眠卵も正常とは言えず、通常1つの鞘に2個の休眠卵が格納されているはずが、実際には2個あったのは全体の3.9%であり、以下1個が30.4%、0個が66.2%であった。環境条件を変更しても改善されなかったことから、材料をタマミジンコに変更した。

タマミジンコは国立環境研究所より分与されたクローンを用いた。飼育試験により水温25℃、明期14時間暗期10時間、餌としてクロレラ(クロレラ工業、クロレラV12)を3.7cells/mlの濃度となるよう与えることで良好な単為生殖を維持できることを確認した。また、水温を20℃、明期10時間暗期14時間と環境を変更することで効率的な休眠卵の作成に成功した。

タマミジンコの飼育実験により、1個体の単為生殖雌から個別飼育により単為生殖で継代して、その産仔能力を計測した。単為生殖の同腹仔間では産仔能力に差はなく、5系列を比較したが第1世代では1回あたりの産仔数は13.3個体から17.9個体、標準偏差1.94であり、各系列に有意差はなかった。世代を重ねても産仔能力は有意に変化せず、第6世代においても標準偏差1.68とばらつきが少なかった。第11世代まで継代できたのは4系列のみであったが、全て

の系列で第1, 6, 11世代間の産仔能力に有意な差はなく、また全ての世代で系列間の産仔能力に有意差は認められなかった(図1)。このことから単為生殖において産仔能力は世代を超えて維持されることが明らかとなった。

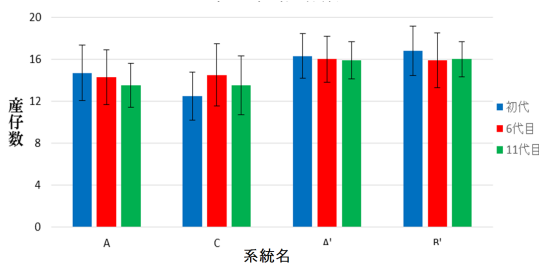


図1. 単為生殖による産仔数

続いて休眠卵を作る有性生殖における産仔能力の変化について同様の実験を行った。1回あたりの産仔数16.6個体(標準偏差2.24)の産仔能力を持つ個体群から休眠卵を作成し、8個の休眠卵について孵化個体が単為生殖で最初に産んだ子の産仔能力を比較した。同一休眠卵由来の単為生殖雌では産仔能力は同等であったが、異なる休眠卵由来の雌では産仔能力は有意に異なり、平均産仔数は11.0個体/回であったところ、最少が4.1個体/回、最多が19.1個体/回であった。標準偏差は5.60となり、単為生殖での実験と比較して有意にばらつきが大きくなった(図2)。

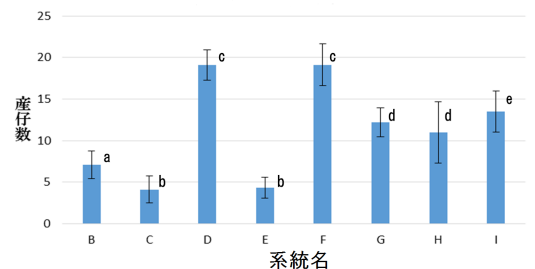


図2. 休眠卵生殖の産仔数

この実験で使用した休眠卵はクローン同士の有性生殖で作成されたものであり、このような大きな差異が生じるのは予想に反することであった。そこで JH agonist への反応性の実験を打ち切り、さらに精細な飼育実験をすることとした。すなわち、単一の休眠卵に由来する個体群から休眠卵を作り、その中の単一の休眠卵に由来する個体群を創出し、そこからさらに休眠卵を作成して孵化雌の産仔能力を比較検討することとした。単一の休眠卵から単為生殖で個体を増やしていけば、個体群の中の個体は同じ産仔能力を持つはずである。

そこで、休眠卵孵化個体の産仔能力を調べた際に得られた少産個体(4.1個体/回)と多産個体(19.1個体/回)をそれぞれ単為生殖で増殖させ、2つの個体群を作成した。

それぞれの個体群より休眠卵を作成し、同様の実験を行ったところ、少産個体群由来休

眠卵の実験では平均12.7個体/回(標準偏差5.20)(図3)、多産個体群由来休眠卵の実験では平均12.5個体/回(標準偏差4.81)(図4)という結果が得られた。両者に有意差はなく、親世代の産仔能力に関係なく、全く同程度の平均値と標準偏差となった。

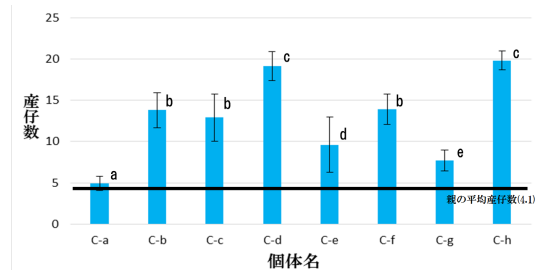


図3. 少産群休眠卵個体の産仔数

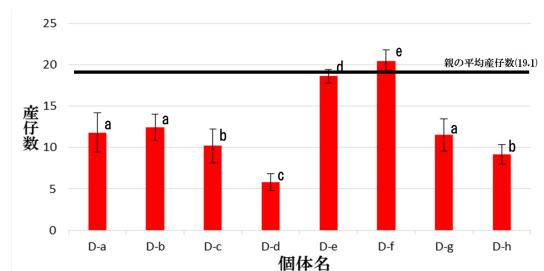


図4. 多産群休眠卵個体の産仔数

このことは、産仔能力という形質は単為生殖を超えて「遺伝」するが、休眠卵を作る有性生殖においては遺伝せずリセットされることを意味する。SSR解析をするまでもなく、これは遺伝的多様性を反映した現象でないことは明らかである。

再度、計画を変更し、エピジェネティクス解析を企図したが、過去の研究からヒストン修飾による多型性の創出の可能性は低いと考え、DNAメチル化の解析を実施した。予備実験により1個の休眠卵より500ng程度のDNA抽出に成功していたため、休眠卵より抽出したゲノムDNAをメチル化感受性制限酵素で切断し、断片の出現パターンをDNAフラグメントアナライザーで比較解析する計画を立案した。

休眠卵は微小であり、2個が1つの鞘にくるまれているため顕微鏡下での解剖が必要となる。抽出できるDNA量が安定しないため、解剖とDNA抽出の習熟を図ったが、抽出DNA量の不安定さから、作業中に餌や細菌のDNAが混入しやすいことが判明した。試行錯誤の結果、休眠卵を十分に乾燥させ、70%エタノール中で解剖することで混入を防止できたが、期間中にDNAフラグメント解析は行えなかった。

5. 主な発表論文等

上記の飼育試験に関する論文を執筆中だが想定外の結果であり、また、類似の現象も見当たらないことから発表には吟味が必要と考えられる。DNA解析で何らかの結果が出た後に投稿する予定である。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大森 克徳 (OMORI, Katsunori)

亜細亜大学・経済学部・教授

研究者番号：20358534