

フジツボとフクロムシの比較研究プロジェクト

生物資源科学部 応用生物科学科

1年 山上 涼

1年 遠藤 圭紀

1年 尾崎 颯

1年 小林 利咲

指導教員 生物資源科学部 応用生物科学科

教授 岡野 桂樹

准教授 尾崎 紀昭

研究の目的

私たちは動物の発生に興味を持っている。ひとつの細胞である受精卵が、分裂と分化を繰り返して、人や犬や海洋生物になるのはとても不思議である。しかし、これまで、動物の発生をちゃんとみたことはなかった。そこで、フジツボの発生を調べることにした。フジツボには大きく分けて、富士山型をした通常のフジツボと、カニなどに寄生して生きる寄生性フジツボ（フクロムシ）があり、両者の親の形は全く異なっている（図1）。通常のフジツボとフクロムシの発生を比較することで、発生の仕組みについて、勉強したいと考えた。

実験方法

実験材料

研究には男鹿半島に生息する生物を用いた。通常のフジツボとして、アカフジツボ *Megabalanus rosa* (図 1A) を、寄生性フジツボとしてイソガニに寄生するイソガニフクロムシ *Polyascus polygena* (図 1B)を用いた。アカフジツボは男鹿双六の漁師菅原さんからいただいた。イソガニフクロムシは岡野研究室が男鹿半島弁天崎で採集したものを使用した。

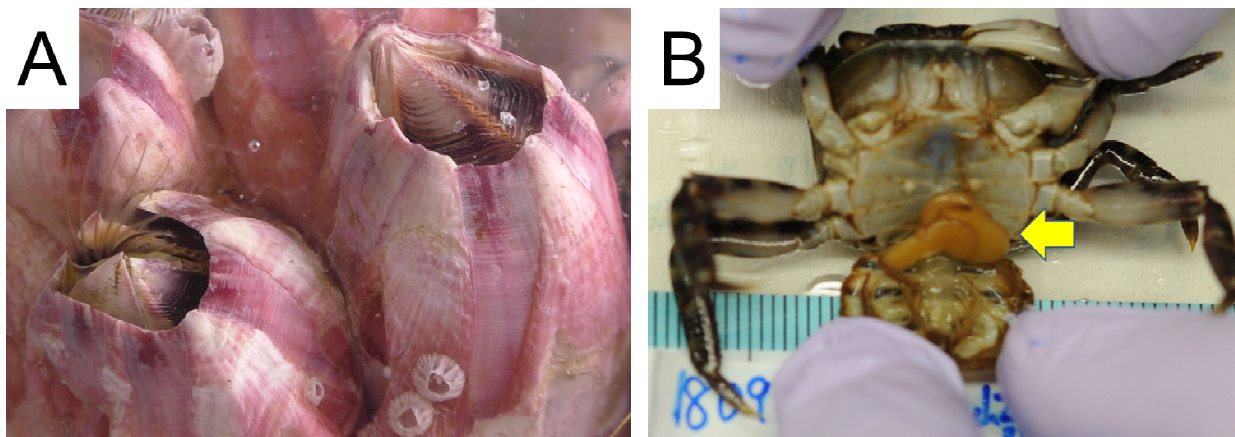


図 1. アカフジツボ(A)とイソガニフクロムシ(B)の成体(黄色矢印：エクステルナ)

飼育

飼育に使用した海水は、秋田県水産振興センターからいただいた天然海水を 3 枚重ねの濾紙でろ過した「ろ過天然海水」を用いた。イソガニフクロムシが寄生したイソガニは、1 個体ずつ小水槽に入れ、週 2 回の餌やり（乾燥した小エビと冷凍したスズキの切り身）を行った。餌を与えた翌日には海水を全交換した。

アカフジツボは 100L 水槽で飼育した。餌やりは小水槽で行い、孵化したブラインシュリンプを与えた。8 月から 12 月の間、週に 2 回ずつ行った。

胚の培養と固定

アカフジツボとイソガニフクロムシの卵塊は、ろ過自然海水を 0.2 μ フィルターでろ過した「フィルターろ過自然海水（滅菌海水）」を入れた 6 穴シャーレ中に細かく分けて入れ、20°C の人工気象器中で培養し、ノープリウス幼生になるまで、毎日 1.5 ml エッペンチューブにサンプリングした。サンプリングした胚は、CaMg 欠如人工海水（0Ca0Mg-SW）で洗浄したのち、4% パラフォルムアルデヒド溶液（4% PFA in 0Ca0Mg-SW）1ml を用いて、4°C で一晩固定した。固定した胚は、2 回 CaMg 欠如人工海水で洗浄後、さらに 2 回 PBS で洗浄し、防腐剤である ProClin150 (Sigma) を 1/1000 入れた PBS 中に、4°C で染色するまで保存した。

顕微鏡撮影

固定した胚は、マウントと染色を同時に行う試薬である Slowfade DIAMOND antifade mountant with DAPI (Thermo Fisher) を用いて、両面テープで厚さを調節したスライドガラス上にマウントし、その上をカバーガラスで覆った。顕微鏡観察と撮影には DP70 カメラを装着したオリンパス BX51 蛍光顕微鏡を用いた。

実験結果

1. 胚の採取

同じ海洋生物でも、ウニやヒトデと異なり、フジツボの受精卵の発生は外套腔内で起こる。人工授精のシステムも報告されていないため、外套腔内の卵塊を持つ個体を探索した。

寄生性フジツボ *Rhizocephala* sp. OGA については、ほぼ 2 週間ごとに定期的に、ノープリウス幼生の孵化が起こり、受精は 4~5 日目と推測されている（桑原、2017 修士論文）。そこで、イソガニフクロムシも同様と考え、孵化後 4~5 日目に解剖することで、外套腔内の受精卵（胚）を採取することができた。一方、アカフジツボでは、餌を十分与えた飼育環境下、受精・発生がある程度、定期的に起こると推測し、8 月 10 日に 18 個体、9 月 21 日に 30 個体、10 月 3 日に 8 個体、11 月 28 日に 28 個体解剖し、卵塊の有無を調べた。その結果、8 月 10 日に 2 個体、9 月 21 日に 1 個体のみで卵塊が見つかり、10 月以降は全く卵塊を見つけることができなかった。

2. イソガニフクロムシ（寄生性フジツボ）の発生

図 2 に受精直後の 2 細胞になる直前（0d）から毎日サンプリングした胚の発生の様子を示した。A は顕微鏡像（微分干渉像）で、B は核の分布（DAPI 染色像）である。2 細胞から 2 日経つと（2d）、胞胚となった。2 日目から 3 日目の間に原腸陥入が起こったと思われる。3 日目から 6 日目にかけて、核（細胞）の離合集散が劇的に起こるが、光学顕微鏡像は、4 日経ったところで見られる大型の細胞（脂肪細胞）が表面にも表れること以外には大きな変化は見られなかった。7 日目に眼の色素の沈着がはっきり見られるようになり、前部で、輪状の細胞集合体が現れると同時に、後部に核がほとんどみられない領域ができ、そこに大型の脂肪顆粒が集まった。また、前部の周辺部で胸脚の形成が見られた。8 日目には、ほぼ内側にダニのような形をしたノープリウス幼生が出来上がり、孵化を待つばかりとなった。9 日目にはノープリウス幼生となり、孵化し遊泳を開始した。したがって、20°C において、イソガニフクロムシの受精卵が、ノープリウス幼生になるには約 9 日から 10 日かかることが判明した。

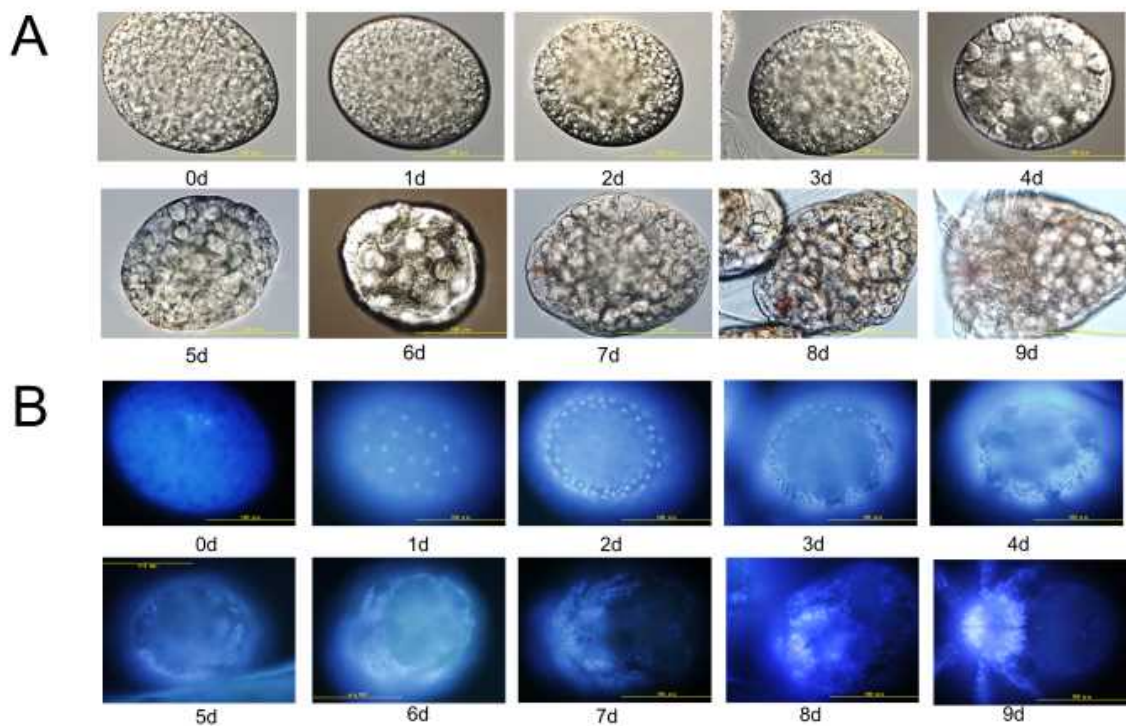


図 2. イソガニフクロムシの発生。A: 光学顕微鏡像（微分干渉像）。
B: 蛍光顕微鏡像（DAPI 染色による核の分布）

3. アカフジツボの発生

アカフジツボでは 84 個体解剖し、3 個体でしか卵塊が見られなかった。また、それらの卵塊中の胚は、受精直後ではなく原腸陥入後のものであった。そこで、イソガニフクロムシと比較しやすいノープリウス幼生になる直前の 3 日間の胚発生の様子を図 3 に示す。A は顕微鏡像（微分干渉像）で、B は核の分布（DAPI 染色像）である。9 月 21 日にサンプリングされた胚は、イソガニフクロムシと異なり、前部中央付近に脂肪顆粒が見られ、後部に胸肢の発達する空間を開けているように見える。9 月 22 日になると、周辺に長い脚がはっきり見えるようになり、9 月 23 日にはほぼノープリウス幼生の形態になった。9 月 24 日になると、遊泳していた。1 回目の脱皮は孵出数時間でおきると思われるため、9 月 24 日の写真はすでにノープリウス 2 期幼生と思われる。

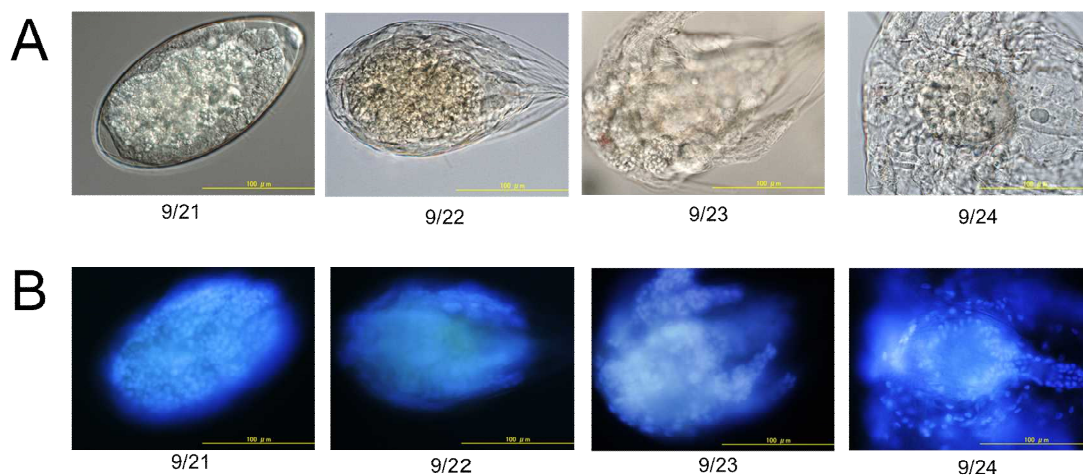


図 3. アカフジツボの発生（器官形成期からノープリウス幼生まで）。A: 光学顕微鏡像（微分干渉像）。B: 蛍光顕微鏡像（DAPI 染色による核の分布）

4. イソガニフクロムシとアカフジツボのノープリウス幼生の違い

図 4 にイソガニフクロムシ(A)とアカフジツボ(B)のノープリウス幼生の光学顕微鏡でみた形態(A1 と B1)、およびそれらの幼生の核の分布 (A2 と B2) を示す。アカフジツボのほうが、前後に伸び、胸肢が長い。光学顕微鏡でみるかぎり、節足動物に共通のよく似たいわゆるノープリウス幼生の形態を持っている。しかし、核の分布を一緒に考えると、その違いは明らかである。ひとつは大きな脂肪顆粒(卵黄)の位置、もうひとつは消化器の有無である。フクロムシでは卵黄は体の後部にまとまって存在する(A1の緑矢印)。一方、アカフジツボでは口の周辺に存在する(B1の緑矢印)。消化器系はフクロムシでは、完全に存在せず(A2の黄矢印)、アカフジツボでは消化管に沿って核が並んでいる(B2の黄矢印)のとは対照的である。

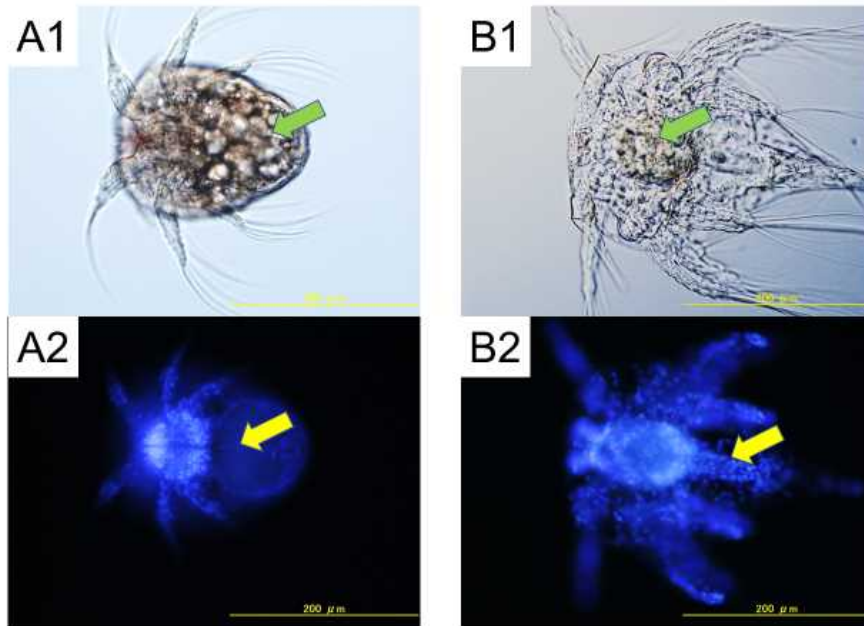


図 4. イソガニフクロムシのノープリウス幼生(A)とアカフジツボのノープリウス幼生の比較。1: 光学顕微鏡像(微分干渉像)。2: 蛍光顕微鏡像(DAPI染色による核の分布)。A1 と B1 における緑の矢印は卵黄(脂肪顆粒)の位置。A2 と B2 における黄色矢印は消化器系の有無。

結論と考察

本自主研究でわかったことは、以下の 3 点である。

- ①アカフジツボと寄生性フジツボの成体から単離した卵塊を、滅菌海水を入れた 6 孔シャーレ中に取り出して、培養装置(20°C)内で飼育することで、ノープリウス幼生まで飼育できること。
- ②毎日サンプリングし固定された胚を、DAPI 試薬を用いて核染色することで、体内受精し、一般的にはみることができないフジツボの胚発生の様子(細胞分裂の様子)を観察できること。
- ③アカフジツボと寄生性フジツボでは少なくとも器官形成期において、卵黄の分布、および消化器系の発生が大きく異なること、である。

本研究で残念だったことは、アカフジツボの初期発生(受精から原腸陥入に至る過程)の胚を得ることができなかったことである。始めた時期が遅かったため、繁殖時期をのがしたことが大きいと思う。餌を与えて、実験室内の水槽で受精、卵塊形成を試みたが、十分ではなかった。海洋生物では繁殖期と繁殖条件をよく考えて実験を行うことが重要であると感じた。