

**Studies on Mechanism of Formation, Diapause and Hatching of Resting Eggs in the Euryhaline Rotifer *Brachionus plicatilis* Species Complex.**

(シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* 複合種の耐久卵形成、休眠および孵化機構に関する研究)

長崎大学大学院生産科学研究科  
金 禧珍

シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* 複合種 (以下、ワムシ) は、世界各地の汽水域に広く分布する動物プランクトンで、海産魚類の初期餌料生物としても汎用されている。本種は、他の単生殖巣垂綱のワムシ類と同様に単性生殖と両性生殖を行い、両性生殖では耐久卵が形成され、この耐久卵は植物の種子のように長期にわたり休眠する。ワムシの耐久卵形成と孵化には外部要因と内部要因の両者が作用する。本研究では、これらの要因を変化させてワムシ生活環の詳細を調べることにより、耐久卵形成、休眠および孵化機構の解明を目的とした。まず、材料としたワムシ 3 株の分子系統解析を行い、これらの類縁関係を明らかにした(第 2 章)。次に、外部要因として飼育水の塩分と光の波長がワムシの耐久卵形成と孵化に与える影響を検討した(第 3 章)。内部要因としては、受精した雌ワムシの加齢が耐久卵の形成と孵化に与える影響および、光の刺激による耐久卵孵化のメカニズムを遺伝子レベルで解析した(第 4 章)。

**【ワムシ株の選定と性状】**

世界各地から採集し、長崎大学水産増殖学研究室で保存している 110 のワムシ株の中から、本研究の遂行に適した、両性生殖を活発に誘導する 3 株 (オーストラリア株、高知株、イタリア株) を選定した。被甲の形状に基づく外部形態解析、およびミトコンドリア DNA 領域 (COI) と核 DNA 領域 (ITS1) の塩基配列に基づく分子系統解析によって、オーストラリア株は *Brachionus manjavacas*、高知株およびイタリア株は *Brachionus rotundiformis* と同定された。(第 2 章)。

**【塩分がワムシの生殖に与える影響】**

イタリア株を使用し、耐久卵が形成された時の塩分と孵化時の塩分条件のうち、耐久卵孵化と次世代の生殖に影響を与える塩分を調べた(第 3 章 第 1 節)。耐久卵形成時と同一塩分で孵化させた時、活発に耐久卵が孵化することが明らかになった。また、耐久卵が孵化する時の塩分は次世代の耐久卵形成に強く影響を与えることが分かった。

### 【光波長がワムシの生殖と耐久卵の孵化に与える影響】

ワムシは眼点を有し、走光性を示す。本研究では、光の波長がワムシの増殖、耐久卵形成および遊泳行動に与える影響を検討した（第3章 第2節）。オーストラリア株を用い、LED光波による白色（対照）、470（青）、525（緑）、660 nm（赤）の異なる4通りの光照射下で培養した。その結果、光波長は個体群増殖率に影響を与えなかったが、緑色光照射下で受精と耐久卵形成が活発になった。このとき、付着行動よりも遊泳行動を示す雌ワムシの割合が緑色光照射下で多くなった。耐久卵の孵化に与える光波長の実験では、暗黒下で形成された耐久卵は白色光と赤色光を照射したとき、他の光波長よりも高い孵化率を示した。

### 【耐久卵形成と孵化に与える加齢の影響】

本研究ではワムシの加齢が耐久卵形成と孵化に与える影響を調べた（第4章 第1節）。孵化後2時間以内のオーストラリア株の雄雌を交尾させ、受精を確認した後、得られた耐久卵を形態と細胞質の色で分類した。母ワムシの加齢と共に、産出される耐久卵に形態異常の卵が増加し、孵化率は低下した。

### 【耐久卵の孵化関連遺伝子の発現変化】

ワムシの耐久卵は悪環境に強く、最適な条件で培養した場合でも暗黒下では休眠状態を維持し、光刺激によって卵発生が誘導され孵化するが、これらの機構は不明である。そこで、オーストラリア株の耐久卵を用いて光による卵発生と孵化の機構を遺伝子レベルで調べた（第4章 2）。DDRT-PCR法を用い、光照射の時間に伴う遺伝子発現の変化を解析した結果、光照射前の休眠状態の耐久卵は細胞防御関連遺伝子と恒常性関連遺伝子の蓄積が見られた。外部形態の観察では、光照射開始から4時間まで卵割等の大きな変化は見られなかった。しかし、光照射30分後には活発な遺伝子発現が生じ、光の刺激と胚発生に関連する多数の重要な遺伝子（V-type H(+)-translocating pyrophosphatase、membrane-bound proton-translocating pyrophosphatase 等）が発現した。しかし、光照射4時間後にはこれらの遺伝子発現は停止し、細胞間物質輸送に関わる遺伝子群が発現していた。

本研究を通じて塩分や光波長といった環境要因は単性生殖よりも両性生殖に大きな影響を及ぼすことを明らかにした。さらに両性生殖には母ワムシの日齢のような内部因子も強く影響することも見出した。また、形成された耐久卵は光照射下で孵化するが、光照射直後は形態変化をとまらぬ胚発生は進行せず、この間に発現遺伝子群が大きく変化することを解明した。以上は、天然域でのワムシ個体群動態の研究分野や、餌料生物としてワムシ培養を安定的に実施する上で有用な基礎知見となる。