環境変化に応じたミジンコの形態変化の分子機構

生物圏科学専攻　生態遺伝学講座
博士課程　1年　　今井　真木
（指導教官　三浦　徹）

1. 背景と目的

いかなる生物も環境との相互作用の中で生活を営んでおり、環境応答は生物の生存には非常に重要な性質である。中でも、環境に応じて表現型が不連続に変化する現象が知られており、表現型多型 polyphenism と呼ばれている。表現型多型は生物が適応度を上げる上で重要な役割を果たす。多くの湖沼に普通に見られる枝角類ミジンコ属 *Daphnia* においても、魚やフサカなどの捕食者が放出する匂い物質（カイロモン）に反応し、防御形態が捕食者の存在下で可塑的に構築されることが知られている。本研究では、ミジンコにおいて捕食者に誘導される表現型多型の発生制御機構を明らかにすることを目的として、環境シグナルを受けた個体の生理的変化から、形態形成に至る発生学的過程を詳細に解析する。特に、形態誘導の分子発生機構の解明に主眼を置く。

本年度はまず、ミジンコの防御形態（ネックティース）形成過程を発生段階を追って詳細に観察することにより、防御形態形成機構解明のための基礎データを提供することを目的とした。

2. 材料と方法

ミジンコ(*D. Pulex*)を用いた。捕食者として、フサカ（*Chaoborus flavicans*)の4齢幼虫を用いた。対照個体は曝気水（水道水を活性炭でろ過後3日以上エアレーションしたもの）、フサカカイロモン水として、フサカ飼育水（20 個体/2500ml 曝気水）を用いた。

発生過程の観察では、外部形態の観察には実体、光学、走査電子顕微鏡を用いた。また内部構造の観察には、核酸を染色する蛍光色素（ヘキスト、POP)を用いて蛍光染色を行い,共焦点顕微鏡で観察した。

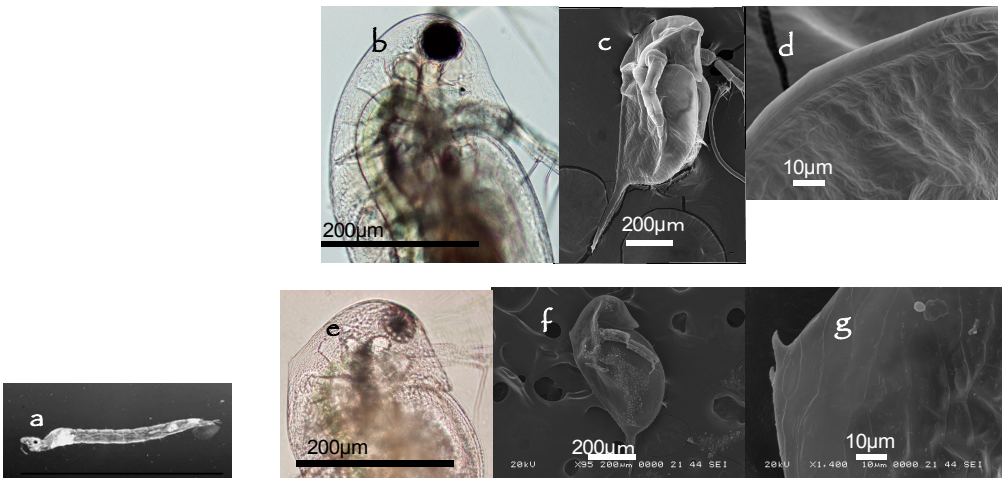


図1. 実験で用いた生物。a.フサカ4齢幼虫； b,c,d.　*D. Pulex* の対照個体; e,f,g. *D. pulex* のネックティース形成個体；d,g. *D. pulex* 後頭部（g はネックティース）。

3. 結果と考察

3－1　防御形態誘導系を確立した

解剖処理によって生存個体で高い防御形態誘導率を示した。1～3齢でネックティースを形成した。それ以降では形成されなかった。これはサイズ選択性を示す捕食者に適応的であり、4齢以降の個体は捕食者の口のサイズよりも体長が大きくなり食われにくくなるため、防御形態を形成する必要はなくなるためと考えられる。

3-2　後胚発生過程の観察

防御形態形成個体で1～4齢にかけて成長速度遅かった。これはネックティースを形成する時期と一致する。5齢で抱卵し成熟するころに体長は対照個体に追いついた。1～4齢では防御形態形成がコストになっており、成長速度を下げたと考えられる。また、ネックティースの他にもカイロモン曝露個体は殻刺を伸張させていた。抱卵数を測定すると、カイロモン曝露個体

で低くなった。防御形態は捕食回避に適応的であるとされるが、そのコストは大きいことがわかる。

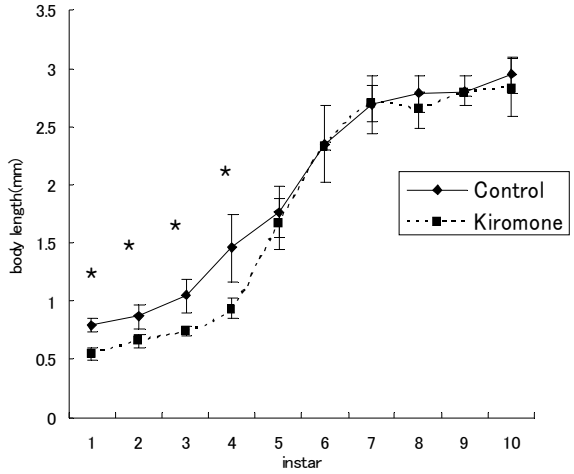


図２．齢ごとの体長の推移。実線.対照個体；破線，カイロモン曝露個体。（＊，repeated ANOVA,p<0.01)

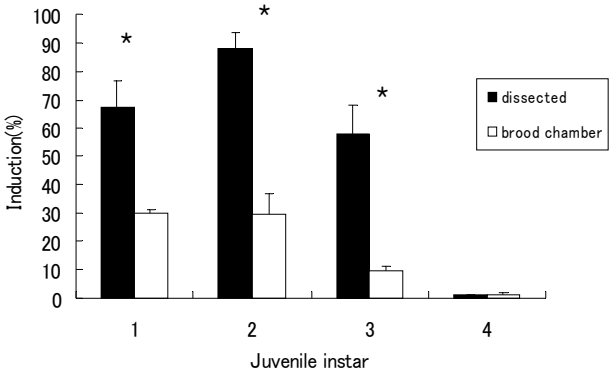


図３．齢ごとのネックティース誘導率。黒、解剖処理個体、白、親処理個体.(*, one-way ANOVA, p<0.01)

３－３胚発生過程の観察

１齢でネックティースを形成するが、カイロモン感受時期はそれ以前であると考えられる。またネックティース形成前にクレスト(隆起)がみられることが報告されているが、いつどのように防御形態は形成されていくのだろうか。胚発生過程を調べ、防御形態形成過程を観察した。まず胚発生過程におけるステージを決定した。体長測定と SEM による観察により齢決定を行った。Egg stage, stage1,2,3 の4ステージに分かれることが分かった(図4)。

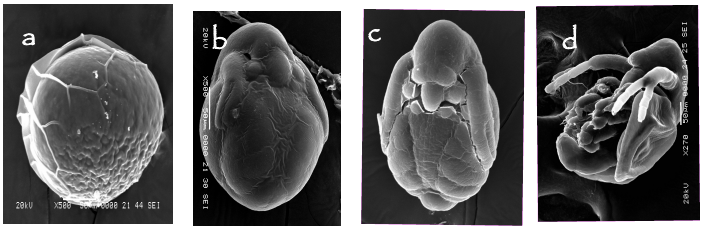


図 4. SEM による胚の写真。a.Egg stage, b. stage1, c. stage2, d.stage3

胚の時期の平均体サイズをステージごとにチンプロットすると stage2,3 のカイロモン曝露個体は対照個体よりも体サイズが小さかった(図5)。この時期にカイロモンを感受し形態を変化させはじめている可能性がある。

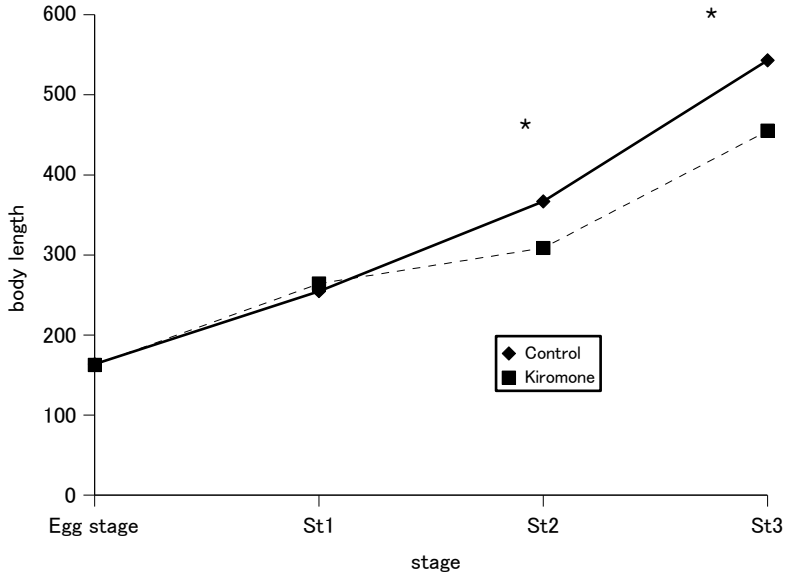


図 5. 胚の体長推移。横軸に胚のステージ(Egg stage, stage1,2,3)、縦軸は体長。実線は対照個体、破線はカイロモン曝露個体。(*, one-way ANOVA, p<0.01)

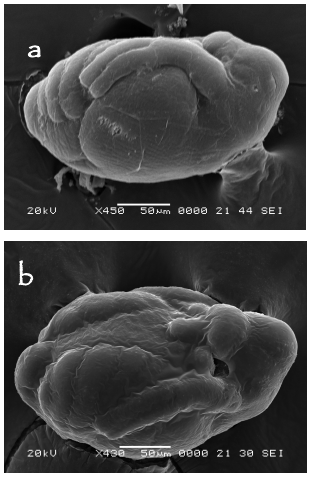


図 6. stage2 の胚。左側が頭部、右側が尾部。a.対照個体；b.カイロモン曝露個体。

stage2,3 で後頭部に隆起（クレスト）が見られた（図6）。蛍光染色によって隆起内部（肥厚）の観察を行ったところ、1齢ネックティース形成個体でネックティースの下に肥厚している細胞層がみられた（図7，8）。Stage3 の個体でもカイロモン曝露個体で対照個体に比べて、後頭部が肥厚していることが分かった。また、その肥厚部分は1齢で最も厚くなることが分かった。

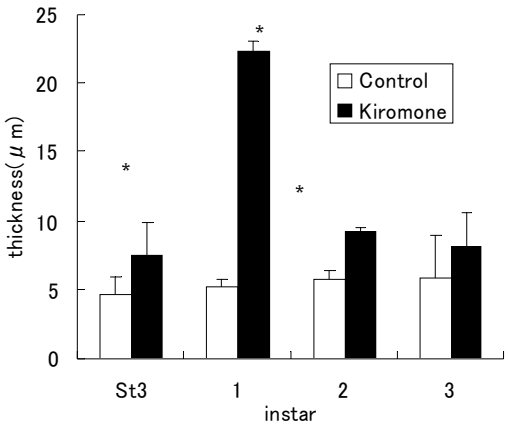


図 7. 後頭部の肥厚測定結果。胚stage3, 若齢1，2，3齢の個体で測定。白、対照個体； 黒、カイロモン曝露個体， （＊,oneway ANOVA, p<0.01）

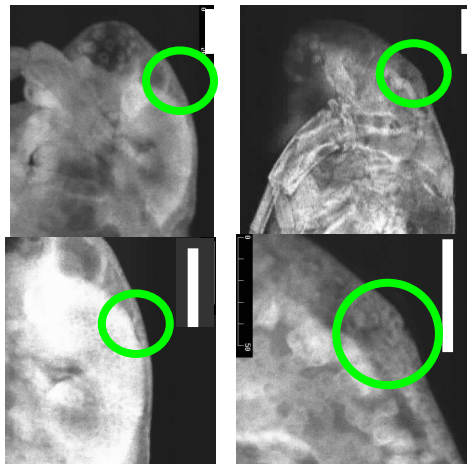
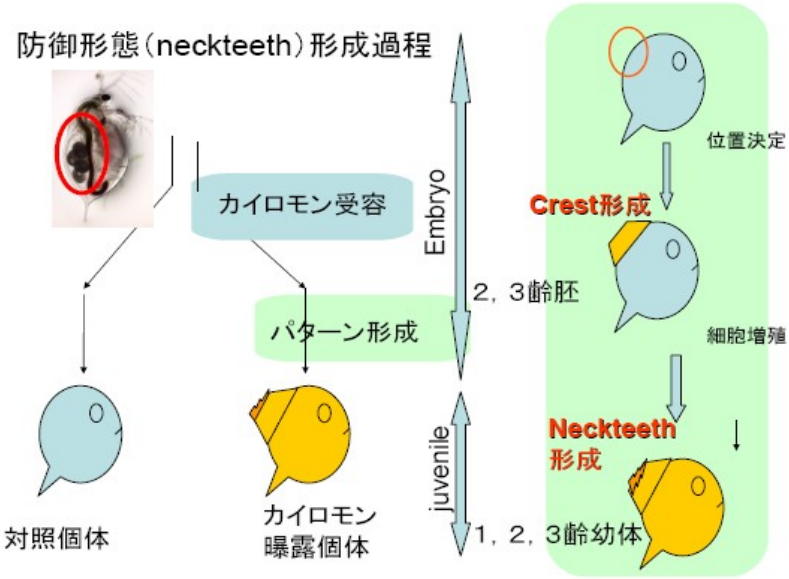


図 8. 共焦点顕微鏡による 1 齢個体の後頭部の写真。左、対照個体；右、カイロモン曝露個体。スケールバーは 50μm

3－4 防御形態形成過程

ネックティースの形成に先駆けて、特に胚発生後期または1齢で、後頭部の細胞層を肥厚させクレストを形成していることが分かった。このクレストは、ネックティースの基部として、防御に重要な役割を果たすと考えられる。

防御形態形成過程の模式図を下に示した。これに基づき、防御形態形成を担う遺伝子の探索を行う。



まとめ

これまでの研究で、環境シグナル（捕食者カイロモン）を受けた個体の形態形成に至る発生学的過程を詳細に解析した。育房外へ出た後、若齢個体でネックティースがみられることは報告されていたが、この防御形態の形成時期をより詳細に特定するため、胚発生過程を観察した。ネックティースは育房を出て1，2，3齢で形成された。ネックティース基部には、クレストが形成されている。クレスト形成に際しては、2，3齢胚で後頭部の細胞層を肥厚させていることが分かった。観察された胚発生過程での3回の脱皮を介してカイロモンを感受し、形態形成を開始していると考えられる。胚発生、後胚発生過程においてはカイロモン曝露個体でいずれも体サイズが減少していた。また抱卵数の低下も見られた。これは、防御形態の形成に対するコストであると考えられる。このようなコストはかかるものの、防御形態によって、フサカによって頭から飲み込まれる際に飲み込まれにくくなり、被食率を下げより大きなベネフィットとなるとき、防御形態は可塑的に構築される。このように、同じゲノムをもつ個体がカイロモンの有無で発生プロセスを可塑的に構築するによって、発生プロセスの多様化を産む。すなわち表現型の可塑性が形態の多様化の原動力となっているのではないか。ミジンコの生活史戦略と密接に関連した形態変化の発生過程、分子機構を探ることで、捕食者環境と表現型発現との相互作用が、水界生態系の多様性を支える上で果たした役割について理解を深めることを目標とする。

今後は、発生学的差異の生じると考えられる胚後期から1齢期にかけての個体を用いて、これらの時期に特異的に発現する遺伝子発現を、Differential display 法を用いて比較し、防御形態特異的遺伝子の同定を行う。