

ナメクジウオの飼育と産卵

白井浩子*・渡部敏郎*

Laboratory culture and spawning of the Amphioxus, *Branchiostoma belcheri tsingtauense*

SHIRAI Hiroko and WATANABE Toshiro

要 旨

原索動物・頭索類・ナメクジウオの実験室飼育と産卵について解説する。中国科学院・海洋研究所の故・呉尚勤博士と共同で、1984年から3年間、中国・青島の海洋研究所にてナメクジウオの実験室飼育と産卵観察を行った。*Branchiostoma belcheri tsingtauense*は雌雄異体で、日没直後の産卵が知られている。人工的な早い日没では産卵が早まらず、遅い日没ではそれにつれて産卵が遅くなった。その他、関連の参考知見（GSS-MIS系）を簡略に記す。

1. はじめに

原索動物・頭索類・ナメクジウオは生きた化石ともみなされ、動物の中で重要な位置を占める。この動物についていろいろな方面の研究が進むことが願わしい。筆者は動物の卵成熟・産卵誘発を研究課題の一つにしており、その関係からこの動物の産卵について観察・実験を始めた（Shirai, 1992）。

2. 動物採集と飼育

6月初旬に、中国科学院・海洋研究所（青島）に近い港の水路において（水深、約10m）、ドレッジを行った。一回のドレッジで取れる砂はほぼ20ℓで、この中に数百個体のナメクジウオが入っていた。

個体のサイズなどを表1と図1に示した。生殖巣は体長にそって2列あり、発達すれば外部から卵・精子の区別が可能で雌雄の判定ができる。1個体のもつ卵数も記した。平均は、体長4.4cm、生鮮重量0.14g、卵巣あたりの卵数はおよそ200（個体の生殖巣は26～28個／列）であった。個体と同時に採取される砂粒は、直径数mmの粗さで貝殻を含み、細かい砂や泥は含まれず、海流がかなり速いことを示していた。

個体を含む砂をバケツに入れ、海水を補充することなく、採集現場から車で30分ばかりの海洋研究所に運んだ。飼育容器は、かつて日本で汲取り便所用の容器

として使用されていたような、半球状の素焼きの甕である（図2。人との比較に注意）。この中に砂を約15

表1. 成体ナメクジウオのサイズと卵数

体長(cm)	卵数 / 生殖巣	体長(cm)	卵数 / 生殖巣
4.4	—	4.7	—
4.2	—	4.8	225.
4.4	220.	4.7	—
4.1	240.	4.0	—
4.3	223.	4.8	—
4.3	214.	5.0	—
4.6	225.	4.4	255+多数
4.1	—	4.8	—
4.4	220.	4.6	170.
4.5	190.	4.5	170.+50.

—は、卵をもたず、放配終了の個体と判断できる。+は小サイズ卵の数を示す。



図1. ナメクジウオの成体
体長の平均：4.4cm、生鮮重量：0.14g、生殖巣が2列であることが分かる。生殖巣は26～28個／列。

2002年5月16日受付、2002年6月10日受理

* 〒701-4303 岡山県邑久郡牛窓町鹿忍130-17 岡山大学理学部付属臨海実験所



図2. 飼育用の素焼の半球状の甕。甕ごとにエアレーションを行う。ヒトとの比較で大きさが分かる。

cmの厚さに敷き、約1,000匹の動物を入れ、海水を数10～100ℓほど入れた。ナメクジウオはこの条件では砂中に潜る。要するに、砂は、多くのナメクジウオが互いに接しないように砂中に配位することを可能とする担体としての役割をもつ。卵も精子も同様に海中に放出される（合わせて放配とする）。

給餌・換水は次のように行った（Wu *et al.*, 1994）。海洋研究所は海岸（遠浅の海水浴場）に面しており、毎朝一回、そこでプランクトン・ネットを手で引き、適当量、餌として与えた。毎晩12時ごろ換水した。このとき海水を入れたまま手で米をとぐように砂をかきまわすと、遊泳力を停止したナメクジウオが、砂よりも密度が小さいため砂上に沈む。これを流さないように、容器を傾けて古い海水（餌の残骸や糞などは懸濁状）を捨てた。この場合、フィルターで懸濁物を集めると、卵や発生中の胚を採集できる。このような換水を1甕につき何回か繰り返して、もとのように海水を入れて換水作業を終了した。換水作業はおよそ30分ほどで、この間、点灯を続けるが、この点灯は翌日の放配に影響を与えなかった（後述）。海水は止水で、エアレーションを甕ごとに行った。容器は実験室の床に置かれ、窓から自然光が入る環境であった。温度もとりたてて制御せず自然に任せた。放配の継続は、飼育集団全体としては1ヶ月ほどであった。

3. 産卵時刻

以上のような飼育において、個体は昼間の室温が25℃を越えるまで放配を示さなかった。年の初めの放配は、1985年では6月25日、1986年では6月26日に認められた。春の植物プランクトンの増加・水温上昇につれて生殖巣の発達が起こる経過をたどると予想される。

放配の有無は、水面の泡の変化（泡の消えにくさ）によって肉眼で簡便に判定できた。水面は常時エアレ

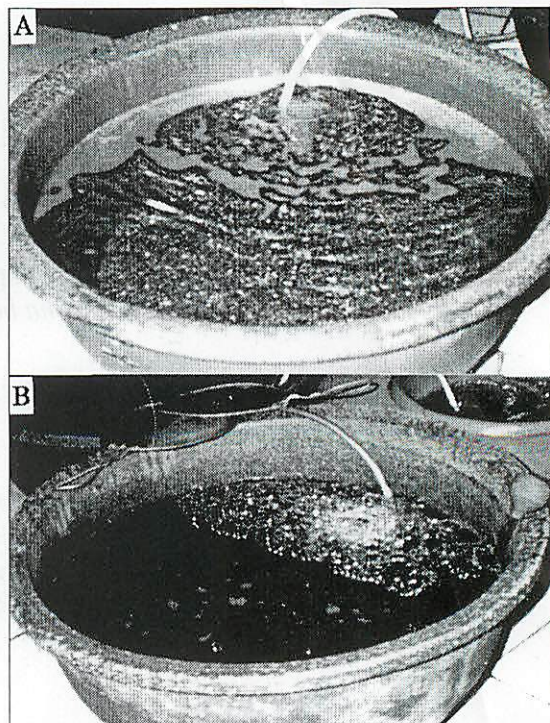


図3. 目視による放配の判定

- A：エアレーションにより、放配前には直ぐ消える細かい泡が形成される。
B：放配後は、主として精子の存在で泡が粘稠になる。

ーションのために泡立つが、もし放配があったら、この泡が消えにくくなるのである（図3）。放配された配偶子が含むタンパク質など高分子や精子そのものなどのために、海水が粘稠になるためと思われた。放配判定は、直接的に放配行動の目視観察と、放卵された卵をピペットで集めて検鏡することとによっても行った。放配された卵は、砂上近くに沈んでいることが多い。したがって、長いガラスのピペット（先端の径、約1cm）をニップルだけ持つようにして、先端を砂上に引きずらせつつ後ずさりさせ、この間に海水を吸い上げることで卵を集められる。

図4は、放配があった日の日照の変動と放配時刻を示したものである。日没後、直ちに放配が起こる。感覚的には日が暮れ、実験室で人の顔もかなり見えにくいほどになって放配が始まった。1個体の放配としては、突然、砂から泳ぎ出て水面で配偶子を撒き散らしながら泳ぎ回り、また砂中に潜るというものであった（全過程およそ3～5秒）。1甕のうち、1日に数個体から10数個体が放配した。1日の放配期間はおよそ1～2時間に渡った。

前述のように、夜中の換水時に個体を観察できるが、このとき生殖巣がところどころ、空になっている様子

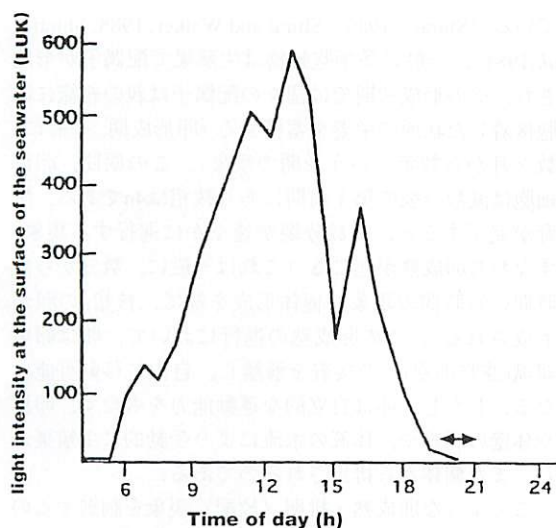


図4. 放配の起こった日の日照

縦軸：ルクス。横軸：時刻。15時近くの下向きの谷は、雲による陰り。20時近くの両頭矢印は曇りの中の放配を示す。

や、配偶子の充実度が減少している状態が観察できる(図1)。全ての生殖巣が空になった個体が、産卵期間の進行につれて多くなった。したがって、放配は或る1日の放配ですべての生殖巣の配偶子を放配するのではなく、1個体が放配期間中に何回か行おうと考えられる。なお、十分に生育した卵母細胞や受精卵の直径は $125\mu\text{m}$ であった。

4. 人工的な日没と放配時刻の変更

日没による放配誘発の機構を調べるために、早い日没、遅い日没を、人工的に与えて調べた(図5)。結果はくわしくはWatanabe *et al.* (1999)を参照して欲しい。約20ℓの容器におよそ500個体(雌雄はほぼ同数)を入れ、エアレーションを行い、黒シートで覆い、電球による点灯で、明暗を制御した。シート覆いなしの対照が19:00近傍に放配するところから、早い日没は16:00から17:00から黒シートで覆い以後点灯せず、遅い日没では同様に黒シートで覆った中で21:30まで点灯を続けた。結果は、早い日没では暗さにつれて放配が早まることはなく、対照と同じ時刻に至って放配が起こった。遅い日没では暗さが与えられるまで放配が抑制された(図6)。

このため、放配にいたるには2段階あり、暗さのみでは放配誘起にとって十分条件ではなく、暗さに感受性をもつには、先立つ別の条件が必要であり、それは明期に起こるものと考えられた。人工的な早い日没では放配は早まらなかったで、暗刺激に対する感受性

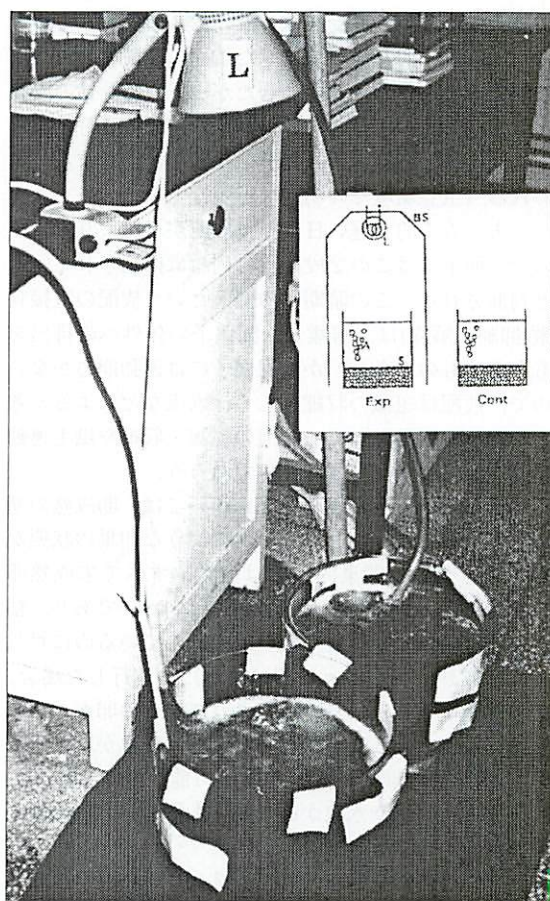


図5. 人工日没の工夫

写真に挿入した図のように、黒シート上に置いた飼育用のガラス容器を黒シートで覆い、エアレーションを行った。早い日没は、自然放配以前にシートで覆った。遅い日没は、シート内で自然放配時刻を越えるまで点灯した。L: 電灯, BS: 黒シート。

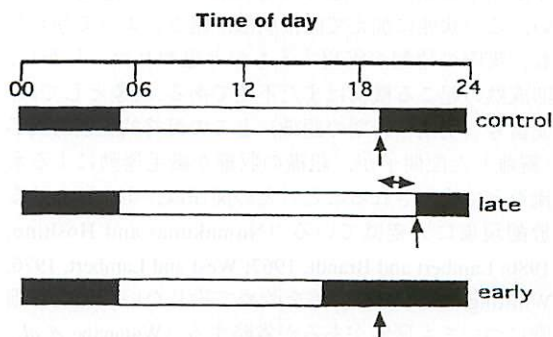


図6. 人工日没と放配の関係

数字は時刻。白域は明期、黒域は暗期。上向き矢印は放配の開始を示す。

control: 覆いなしの対照(自然日没)。

late: 遅い日没。21:30頃まで点灯した。横向きの両頭矢印は、放配の抑制を示す。

early: 早い日没。早く暗期に入られても放配は早まらず、対象と同じころに放配が認められた。

が成立していず、感受性は日没の少し前に成立すると考えられる。飼育の項で述べたように、前夜の点灯は放配に影響を及ぼさない。したがって、感受性の成立への進行の引きがねを引く信号は、前夜の点灯・消灯よりも以後と考えられ、当日の明期中に進行すると思われる（生息環境での明度は不明）。

一方、人工的な遅い日没では放配が対照より遅れたので、明下ではこの2段階目の刺激は抑制されていると判断される。この暗期への突入という放配の直接刺激（抑制の解除）は、解離した配偶子の体外への排出をもたらすものであり、かつ配偶子には運動能力がないので、放配は組織の収縮もしくは水流などによると考えられる。したがって、筋肉の弛緩・収縮や繊毛運動の活発化などが関与するものであろう。

暗さに対する感受性の成立については、卵成熟の進行が考えられる。なぜなら、次のような卵巣の状態から考察される。卵巣内の卵は通常、すべて未成熟卵（まだ卵母細胞の段階。核相としては $4n$ ）であり、粘調な濾胞組織に囲まれて互いに接着しているのに対して、卵成熟（核相が n の卵になる）が進行した場合、その接着が弱まったり、解放されて個々の卵がバラバラになっていることが観察された。卵成熟が起こる前は、接着により卵母細胞は遊離不可能なので、たとえ、卵の周囲に収縮や水流が起こっても配偶子の排出は実現できないと理解された。

卵成熟の進行を知るために、2～3日に渡って3時間おきに、その都度20～30個体をランダムに砂中から取り出し、直ちに解剖して生殖巣を解剖顕微鏡下で調べた。卵成熟は午後3時以降に観察された。2年とも傾向は同様であった。

以上から、暗さが始まるやや前に卵成熟が進行し、卵が卵巣組織から解離して暗刺激に対する感受性が整い、この状態に加えて直接刺激が暗さによって与えられ、実際の放配が実現するものと思われた。しかし、卵成熟の起こる機構はまだ不明である。現象としては、光信号（明期・暗期の認識）とこの最終的生理的反応（解離した配偶子が、組織の収縮か繊毛運動による水流などで排出されること）との関係は、ホヤにおける放配現象に大変似ている（Numakunai and Hoshino, 1980; Lambert and Brandt, 1967; West and Lambert, 1976; Whittingham, 1967）。稿を改めて論じたい。光受容細胞についても研究があるが省略する（Watanabe *et al.*, 1999参照）。

5. 関連の参考知見：GSS-MIS系

一般に、放配誘発に関しては、GSS-MIS系（生殖巣刺激物質—卵成熟誘起物質系）の知見が参考になろう。とくに、ヒトデの卵成熟・放配についてよく研究され

ている（Shirai, 1986; Shirai and Walker, 1988; Shirai *et al.*, 1981）。一般に多細胞動物は生殖巣で配偶子が形成され、その形成初期では個々の配偶子は親の組織に細胞接着した状態で栄養を蓄積する（卵形成期。一般に、数ヶ月から数年という長期の現象）。この期間、卵母細胞は減数分裂の第1前期にあり核相は $4n$ である。生育が完了すると、減数分裂が速やかに進行する現象、すなわち卵成熟が起こる（これは一般に、数分から数時間の短時間の現象。極体形成を経て、核相 n の卵が形成される）。この卵成熟の進行において、卵は卵巣組織（濾胞細胞）との接着を解離し、自由に移動可能となる。しかし、卵は自立的な運動能力をもたず、卵巣や体壁の収縮や、体液の水流により受動的に生殖巣から、また個体から排出されるのである。

このような卵成熟・排卵（放配）現象を制御するのが、GSS-MISという一連（2種類）の活性物質である。現在のところ、後口動物について以下の知見がある。GSS（もしくは脊椎動物ではゴナドトロピン）と総称される生理活性物質が1段目の刺激であって、これは神経組織に含まれるペプチド性のホルモンであり、生殖巣（濾胞細胞）を刺激して2段目の刺激となるMISの生合成に至らせる。MISは卵巣の濾胞細胞で合成されるホルモンであって非ペプチド性であり、卵母細胞に直接作用して卵成熟を起こさせるのである。

現在のところ、後口動物MISの化学構造は、ヒトデにおいて1-メチルアデニン（Kanatani *et al.*, 1969）、サカナにおいてジヒドロキシプロゲステロン（Nagahama and Adachi, 1985）、カエルにおいてプロゲステロン（Scueta and Glad, 1985）と同定されている。ちなみに、ナメクジウオの卵巣を、ヒトデMISの1-メチルアデニンや、エストラジオールを含む海水にインキュベートしても、卵成熟は起こらなかった。ナメクジウオにいろいろなステロイドが存在することが調べられている（Chang *et al.*, 1985）が、ナメクジウオ自身のMISの同定が望まれる。

なお、GSS活性もしくは卵成熟誘起の研究として、ナマコ（Maruyama, 1985）、ホヤ（Sakairi and Shirai, 1991）、腕足類（Freeman, 1994）がある。また、二枚貝においてセロトニンがMIS作用をもつことが知られている（Kadam and Koide, 1989）。腹足類において、神経節にGSS活性が知られているが、ペプチド性とは考えられない（白井ほか, 1987）。

6. おわりに

化石研究会の課題としては、動物のMISの化学構造と、動物の地球上での出現順位との間に想定される法則的關係を明らかにすることが望まれる。地球環境の一定方向への進行と、動物の定向進化（後口動物の出

現、上陸後の乾燥耐性の進行など)との関係がMISの化学構造にも反映する可能性を考察し、仮説を立てるのも益あることと思われる。例えば、環境の酸化度(酸素の増加)と、MISとして利用される物質の酸化度との関係の解明などである。GSSはなぜペプチド性か、MISがなぜ非ペプチド性であるか、また、脊椎動物ではMISはステロイド性であり、近年、哺乳類ではラノステロールなど、還元性を増した成分のMISとしての可能性が研究されている(Byskov *et al.*, 1995)。多くの動物におけるMISの化学構造解明が待たれる。

この研究は、故・呉尚勲博士との共同研究である。かつて著者の一人(H. S.)がアメリカのウッズホールにて出会い、意気統合して互いに本国は近いからと長期の共同研究を約した。1984~1986年に青島にて受けた様々な便宜に対して、故・呉尚勲博士に深く感謝する。思いもよらぬ呉尚勲博士の交通事故による逝去に深く哀悼の意を捧げる。

引用文献

- Byskov, A. G., Anderson, C. Y., Nordholm, L., Thøgersen, H., Guoliang, X., Wassmann, O., Anderson, J. V., Guddal, E. and Roed, T. (1995) Chemical structure of sterols that activates oocyte meiosis. *Nature*, 374, 559-562.
- Chang, C. Y., Liu, Y. H. and Zhu, H. H. (1985) Steroid hormones and their functional regulation in Amphioxus. In *Current Trends in Comparative Endocrinology*, Hong Kong University Press, 205-207.
- Freeman, G. (1994) The endocrine pathway responsible for oocyte maturation in the inarticulate brachiopod *Glottidia*. *Biol. Bull.*, 186, 263-270.
- Kadam, A. L. and Koide, S. S. (1989) Characterization of a factor with oocyte maturation inducing activity in *Spisula*. *Biol. Bull.*, 176, 8-13.
- Kanatani, H., Shirai, H., Nakanishi, K. and Kurokawa, T. (1969) Isolation and identification of meiosis inducing substance in starfish *Asterias amurensis*. *Nature*, 221, 273-274.
- Lambert, C. C. and Brandt, C. L. (1967) The effect of light on the spawning of *Ciona intestinalis*. *Biol. Bull.*, 132, 222-228.
- Maruyama, Y. K. (1985) Holothurian oocyte maturation induced by radial nerve. *Biol. Bull.*, 168, 249-262.
- Nagahama, Y. and Adachi, S. (1985) Identification and maturation-inducing steroid in a teleost, the Amago Salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Dev. Biol.*, 109, 428-435.
- Numakunai, T. and Hoshino, Z. (1980) Peropdic spawning of three types of the ascidian, *Halocynthia roretzi* (Drasche), under continuous light conditions. *J. Exp. Zool.*, 212, 381-387.
- Sakairi, K. and Shirai, H. (1991) Possible MIS Production by follicle cells in spontaneous oocyte maturation of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Dev. Growth and Differ.*, 33, 155-162.
- Scueta, A. W. and Glad, R. (1985) In-vitro production of meiosis -inducing substance (MIS) by isolated amphibian (*Rana pipiens*) follicle cells. *Dev. Growth and Differ.*, 109, 201-211.
- Shirai, H. (1986) Gonad-stimulating and maturation - inducing substance. In *Methods in Cell Biology*, vol. 27, Chapter 5 (ed. by T. E. Schroeder), Academic Press, New York, 73-88.
- Shirai, H. (1992) Effect of light on spawning time in the amphioxus, *Branchiostoma belcheri tsingtauense*. In *The first symposium on amphioxus biology Japan, 1992*. *Acta Anat Nippon*, 67, 802-804.
- 白井浩子, イザベラ・ネアン, ビエール・ガリエ (1987) 内在神経物質の濾胞細胞刺激によるパテラの卵成熟誘起. 日本発生学会第20回大会発表要旨, pp.73.
- Shirai, H. and Walker, C. W. (1988) Chemical control of asexual and sexual reproduction in echinoderms. In *Endocrinology of Selected Invertebrate Types*, Alan R. Liss, Inc., 453-476.
- Shirai, H., Yoshimoto, Y. and Kanatani, H. (1981) Mechanism of starfish spawning. IV. Tension generation in ovarian wall by 1- methyladenine at the time of spawning. *Biol. Bull.*, 161, 172-179.
- Watanabe, T., Yoshida, M. and Shirai, H. (1999) Effect of light on spawning time in the amphioxus, *Branchiostoma belcheri tsingtauense*. *Contributions from the Ushimado Marine Laboratory, Okayama University*, 37 (416), 1-7.
- West, A. B. and Lambert, C. C. (1976) Control of spawning in the tunicate *Styela plicata* by variations in a natural light regime. *J. Exp. Zool.*, 195, 263-270.
- Whittingham, D. G. (1967) Light-induction of spawning of gametes in *Ciona intestinalis* and *Molgula manhattensis*. *Biol. Bull.*, 132, 292-289.
- Wu, X-H., Zhang, S-C., Wang, Y-Y., Zhang, B-L., QU, Y-M. and Jiang, X-J. (1994) Laboratory observation on spawning, fecundity and larval development of amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*). *Chinese J. Oceanol. Limnol.*, 12, 289-294.