

## ウスイタボヤの無性生殖相同調のメカニズムに関する研究\*

萱嶋泰成\*\*・種田保穂\*\*\*

### On the Regulation of Asexual Reproductive Phases in the Compound Ascidian, *Botryllus schlosseri*.\*

Yasunari KAYASHIMA\*\* and Yasuho TANEDA\*\*\*

summary : In some botryllid ascidians, it is well known that all zooids in the same colony has generated at the same time and developed at about the same speed. In order to analyze the mechanism of this synchronized development of the buds, we performed the following experiments. First series of experiments are isolation of a unit (a set of zooid, 1st buds and 2nd buds.) from the colony and removal of buds or zooids. Second series of experiments are fusion of two colonies in different phases of bud development. These results are as follows. 1. Buds grew up spontaneously to zooids, although these connective zooids had been removed. 2. The time when budding takes place was restricted in a given stage of the zooid development. 3. When two colonies in different phases of bud development were fused, these were synchronized after the mixture of blood. While, takeover or zooid death did not occur at the same time. 4. When a colony was fused with another one in different phase without both any zooids and any buds, its original phase was not affected. Therefore, it is suggested that functional zooids and or buds may play an important role in the progress of phases.

#### はじめに

イタボヤ科の群体ホヤの中には個体の寿命が短く、周期的に新しい個体に置き換わっているものが知られている。これらのホヤでは出芽が一斉に起こり、できた芽体は同じように成長して一斉に退化する。その際、個虫・子芽体・孫芽体の3世代が同居し、各世代ごとの発達は関連があり、相をなして進行する。(Watanabe, 1953)。

\* 横浜国立大学教育人間科学部理科教育実習施設業績53号

\*\* 横浜国立大学大学院教育学研究科 (Graduate School of Education, Yokohama National University)

\*\*\* 横浜国立大学教育人間科学部 (Faculty of Education and Human Sciences, Yokohama National University)

なぜ芽体の成長が同調しておこるのだろうか。Watanabe (1953) はミダレキクイタボヤを用いて無性生殖相のずれた2群体を癒合させ、1群体にすると相が同調することを発見した。このことは芽体の同調化が血液によっておこることを示唆している。イタボヤ科の群体ホヤでは、(1) 個体は無性生殖によって作られた個体(クローン)である為遺伝的に均一であること。(2) 出芽から退化まで個体の世代時間が約2週間と短いこと。(3) 相を同調させている、つまり芽体の成長をコントロールしている何らかの因子が血液中に存在していることが示唆されていること。などのような多くの利点を持っている。またホヤ類は脊椎動物の直接の先祖と考えられることから、脊椎動物との関連性も大いに期待できる。従ってイタボヤ科の群体ホヤに見られる無性生殖相同調化のメカニズムに関する研究は、個体の老化のしくみやなぜ個体には寿命があるのかといった問題を考える上で重要なヒントを与えてくれるであろうと期待している。以上の観点から、ウスイタボヤの無性生殖相同調のメカニズムを明らかにするために、個虫や芽体除去の影響について調べた。また、群体を癒合させて相の異なる2群体の間で同調が起こる際、個虫や芽体を除去した群体でも相を変化させることができるかどうか、言い換えると個虫や芽体を除去した群体の血液にも無性生殖相を変える因子が含まれているかどうかを調べた。

## 材料及び方法

### 材料及び飼育

材料にはウスイタボヤ *Botryllus schlosseri* (PALLAS) を用いた。ウスイタボヤは神奈川県足柄下郡真鶴町の真鶴港内にて採取することができる。プラスチック製のプレパラートボックス(イウチP-50)の蓋と底に穴をあけ、海水が流通するようにしてスライドケースとし、スライドガラスを並べた。このケースを複数作製し、大きな生け簀に入れて真鶴港内に停泊している横浜国立大学教育人間科学部理科教実習施設の調査船「たちばな」より海中に垂らし、スライドガラスに自然付着してきたものを使用した。

実習施設内で飼育する場合、容積100ℓの容器に真鶴港内よりくみ上げた海水を満たし、恒温装置にて温度を保ちエアレーションを施して飼育を行った。海水は週2~3回の割合で真鶴港より1回に40~80ℓずつ運び、交換した。容器は2つ用意し1つは海水温15℃~16℃、もう1つは海水温22℃~25℃とし、真鶴港での水温と差がつくよう使い分けた。

### 群体の癒合

付着してきたウスイタボヤのうち、無性生殖によって約2cm<sup>2</sup>以上まで広がっている群体1つを選抜し、他のウスイタボヤや付着動物をカミソリ等を用いて除去する。その後以下の手順を経て同一群体由来の相が異なる2つの群体を作り出す。

- 1 群体の一部をカミソリでそぎ取り、別のスライドガラスに移植する。
- 2 シャーレに海水を浸した濾紙を敷き、移植した群体のついたスライドガラスをいれる。
- 3 蓋をして約2時間ほど放置する。(スライドガラスに再付着させる)
- 4 移植した群体のついたスライドガラスは真鶴港の海水温よりも約5度程水温の低い室内水槽に入れ、もとの群体がついたスライドガラスは真鶴港の生け簀に戻し、自然環境下にて飼育する。

5 約一週間後、遺伝的に同一で相の異なった2群体ができあがる。

相の変化は群体の活動量で決まる。低温、室内（悪条件、悪環境）下で飼育して群体内の血液循環や呼吸など代謝を遅らせ、相を変化させる。

もう一つの方法として、スライドガラスを直列に並べられるプラスチックケースを作製し、真鶴港に設置した生け簀内にホヤが付着したスライドガラスと直列に密着させて新しいスライドガラスを入れた後、ケースを生け簀に入れて飼育する。群体の成長に伴い群体の成長端が隣りのスライドガラスに移り、群体が2枚のスライドガラスにわたって存在するようになる。スライドガラスを切り離し、片方を室内で飼育すると約一週間後には同一群体由来で相の異なった2群体が出来上がる。この方法は群体を傷つけることが少なくなる反面、目標の群体が必ずしもスライドガラス2枚にわたって広がるとは限らないので状況に応じて併用した。

作製された2つの群体は、室内にて飼育した群体の方が真鶴港にて飼育した群体よりも相の進行が遅く、相変化も緩やかになる。その後真鶴港の生け簀で飼育していた群体を室内に移すと、室内飼育群体とは相がずれたまま同じ速度で相が進行する。

#### 個虫・芽体の除去

個虫・芽体の除去は実体顕微鏡下にて行った。個虫の除去にはカミソリの刃を用いた微小メスで切断し、ピンセットで除去した。芽体の除去には加熱した亜硝酸ソーダに入れて先端を尖らせたタングステン針を使用した。

#### 観察・記録

実験処理を施したウスイタボヤは実体顕微鏡の台上に新鮮な海水を循環させることのできる透明なプラスチック製の箱を付け、付着しているスライドガラスごと中に置く。時間的変化の観察はCUDカメラを実体顕微鏡に取り付け、タイムラプスビデオにて録画し解析した。記録にはビデオでの画像をビデオプリンターにて撮影し、写真による撮影と併用した。

#### 実 験

無性生殖相の同調の仕組みを調べるために以下の実験を行った。実験は〔I〕群体から個虫や芽体を除去したとき相が変化するかどうかを調べる実験と、〔II〕群体を癒合させて血液を混合し、相が変化するかどうかをしらべる2群の実験を行った。

〔I〕群体から個虫単位（1個虫とその個虫より出芽した芽体）を分離するか芽体や個虫を除去する実験

実験1：群体から個虫単位を分離し、それぞれの成長段階を比較してみた（図1-(a)）。

実験2：群体内の一部の機能的個虫を除去したとき、その子芽体や孫芽体の発達は機能的個虫の残された子芽体や孫芽体の発達と比べ、変化が起こるのかを調べた。（図1-(b)）。

実験3：ウスイタボヤの出芽能力が一時的なものでないならば、出芽した孫芽体を除去後、再出芽した芽体は他の芽体と発達にずれが生ずるのではないかと考え、群体内の一部の孫芽体を除去する実験を行った（図1-(c)）。

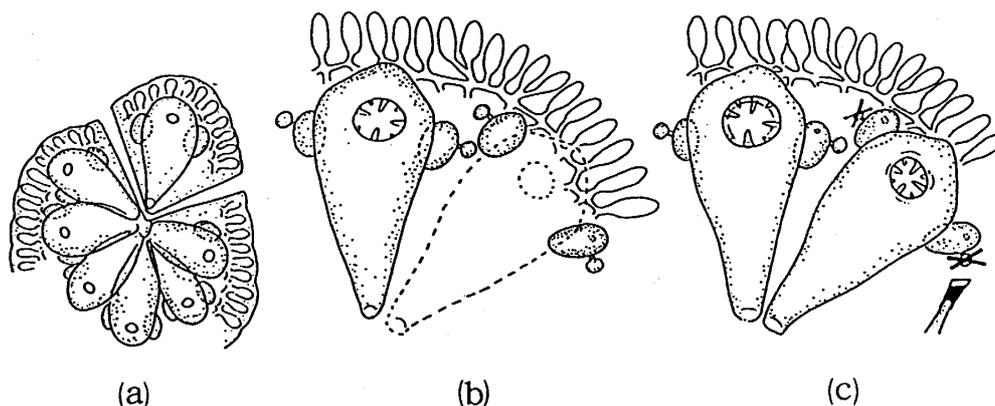


図1. [I]における3つの実験の模式図

- (a) 群体から個虫単位を分離する
- (b) 群体内の一部の個虫を除去する
- (c) 群体内の一部の孫芽体を除去する

#### [II] 相の異なる群体を癒合させる実験

実験4：イタボヤ類には脊椎動物の免疫機能に類似の現象（群体特異性）が存在し，2つの遺伝的に同一な群体が出会うとそれぞれの群体は癒合して1つになり，遺伝的に異なっている群体同士であれば拒絶する（Bancroft, 1903）。近年，この群体特異性の遺伝的なしくみも解析され，癒合性遺伝子と呼ばれる複対立遺伝子によって支配されていることが分かっている。その為，スライドガラスに自然付着してきたウスイタボヤ2群体が無作為に接触しても高い多型性をもつ癒合性遺伝子が同一でなければ群体同士は拒絶してしまう。よって，自然集団の群体間では癒合して血液が交換される可能性は非常に低い。さらにウスイタボヤでは2群体が癒合しても，一方の群体の個虫が退化し吸収されるか，癒合血管が切断し再び離れてしまう現象が報告されている。しかし，この現象は同一群体由来の2片が癒合した場合は決して起こらない（斎藤，1996）。癒合反応を確実に起こさせる為，「群体の癒合」に示した方法で相が異なった同一群体由来の2片を作為的に作り出すことが必要である。相を進ませた側より再びカミソリを用いて群体の1部分をそぎ取り，「群体の癒合」2，3の手順を用いて相の遅らせた群体が付着しているスライドガラスに移植し，相の遅らせた群体の隣りへ再付着させる（図2）。

実験5：芽体同調因子が血液中に存在していることが既に明らかになっているので，群体に相の異なった別の群体の個虫・芽体からの影響がおよんでいない，単純な血液のみを直接流入させ，相が同調するか観察する必要がある。血液を注射して相を変える生物検定法が考えられるが，きれいな血液を大量に採取し注射するには多くの問題点がある。そこで群体の癒合反応を利用し，「群体の癒合」に示した方法により作り出した2つの群体のうち相が進んでいる群体を一部切りだし，内部の個虫・芽体を全て除去して相の遅れている群体に隣接させ，癒合させた。相が進んでいる群体内で個虫・芽体が含まれておらず，被囊が大きく広がっている部分を切り出して癒合させることが理想であるが，このような箇所が存在する群体は実験で使用し得る群体ではない。つまり全体的に個虫・芽体が少なく，被囊が大きく広がっている群体もあるがそれは状態の良い群体とは言い難く，実験に

使用出来ない。そこでもう1つの方法として、相の進んでいる群体の一部の芽体を除去しておく。やがて個虫が退化し、群体内に被囊のみが大きく広がった箇所を作為的に作り出すことが出来る。この箇所を群体から切り離し、相の遅れている群体と癒合させる。この方法は先に示した方法よりも群体の損傷が少なく済む(図3)。

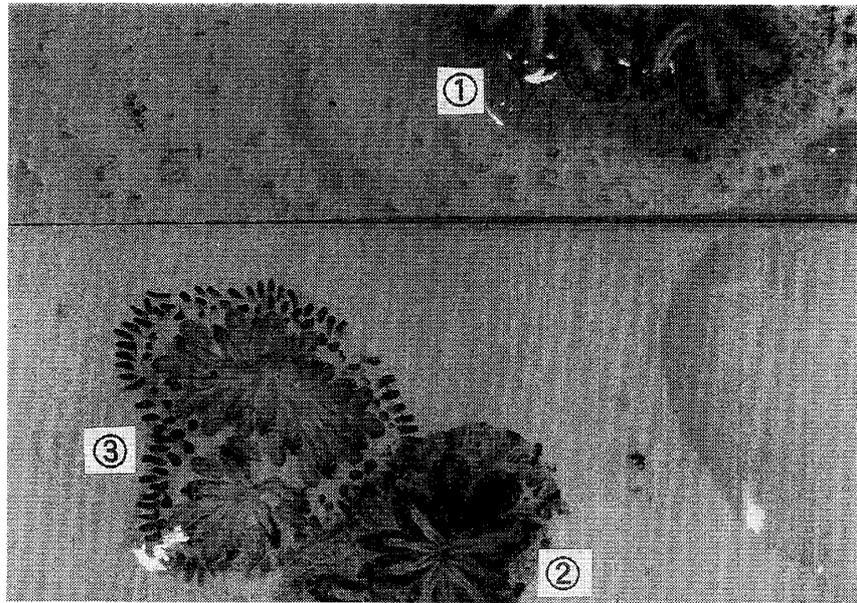


図2. 実験4・相の異なる2つの群体の癒合(下の2つの群体)

- ① 相の進んでいる群体(C相)
- ② ①より分離した相の進んでいる群体
- ③ 癒合させる相の遅れている群体(1世代前のD相)

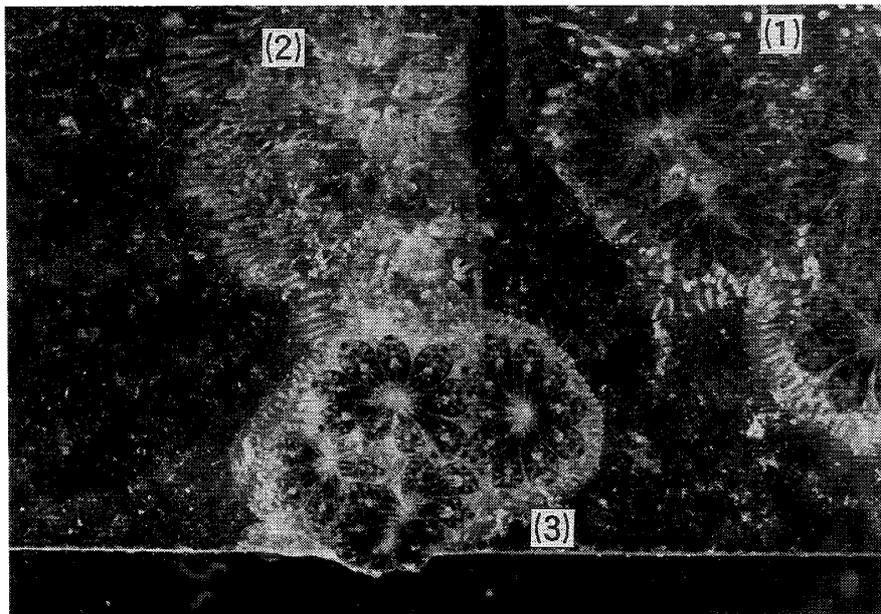


図3. 芽体を除去し、被囊のみが広がる箇所を作って行った実験5の開始

- (1) 相の進んでいる群体(A相)
- (2) (1)より分離した、被囊のみが広がる箇所. 内部には血管が残り、血液が流れている
- (3) 癒合させる相の遅れている群体(1世代前のC相)

## 結果と考察

実験1の結果、群体から分離された個虫単位には分離した群体とで相のずれが見られなかった。この時、分離された個虫単位は大量の血液が失われているので、芽体の同調に血液中の因子の絶対量が関係しているとは考えにくいと考えられる。

実験2の結果、除去された個虫より以前出芽した芽体と孫芽体、除去されていない個虫より以前出芽した芽体・孫芽体双方共発達に変化がなく、同調して成長しやがて退化した。この事より子芽体や孫芽体の発達は連結する個虫からの影響を受けず循環している血液に支配されていることが判明した。

実験3では、孫芽体を除去された子芽体はその後退化するまで再び出芽を行わず、群体内の相が変化することはなかった。出芽は子芽体の発達段階の特定の時期にのみ起こること、そのため群体内の個虫が減ることよりも相の同調が優先してしまうように見えるのではないかと、ということが考えられる。

以上3つの実験はウスイタボヤ1群体のみを用い、実験的手法によって群体内の無性生殖相をずらすことは出来ないのだろうかという試みであったが、相がずれることはなかった。しかし、分離させた個虫・芽体をその後もとの群体と同じ環境下におくことや個虫・芽体を除去しても血管がつながっていれば相はずれない、ということが判明した。

実験4では、隣接させた相の進んでいる群体と相の遅れている群体は、やがてお互いが接触して癒合し血液が交換された。Watanabe (1953) の実験によると、癒合した2群体は相の遅れている群体が相の進んでいる群体へと同調するという。本実験の結果でも芽体の発達に関してはミダレキクイタボヤと同様に同調するのが確認された。しかし個虫の退化時にミダレキクイタボヤとは大きな違いがあることが判明した。ミダレキクイタボヤでは癒合後、個虫の退化も同調して起こるがウスイタボヤの場合ばらつきがみられ、癒合箇所に近い場所にいる個虫が癒合箇所から離れている個虫よりも早く退化した(図4)。盛んな無性生殖によって大きく広がったウスイタボヤ群体では、時々個虫の退化が若干ずれて起こることがある。しかし実験4の結果に見られたような、完全に退化の終了した個虫と全く退化の起こっていない個虫が同一群体内に同居するようなことは絶対にない。ではなぜ癒合実験によってこのような退化のばらつきが生じたのであろうか。個虫の退化が同調していない標本を詳しく調べてみると、個虫の退化は癒合箇所に近いほど早く、遠ざかるに従って遅くなっている。それは退化を進める因子は血流によって容易に拡散するものではないことを示唆している。また退化因子には相の進んでいる群体からの断続的な働きかけが必要で、癒合箇所に近い個虫が特に影響をうけて退化が早くなってしまったのではないだろうか。一方、芽体に注目してみると相の遅れていた群体の芽体と相の進んでいた群体の芽体は個虫の状態に関係なく同調しており、群体内の全ての芽体の発達段階が同じであった。やがて全ての個虫の退化が終わると芽体は個虫へと一斉に成長した。個虫になってしまうと退化時まで大きさ・形共変わらない為個虫は発達をしているのか、停止してしまっているかも判別できなくなってしまう。しかし、退化時期を迎えると1世代前の個虫が退化するときに見られたのと同じような特徴で退化に大きなばらつきが生じていた。

今回の癒合実験の結果、群体内で一斉に起こっていた個虫の退化に大きな変化が見られ、芽体は同調していたことから、相の同調をおこす単一の因子が存在するのではなくて少な

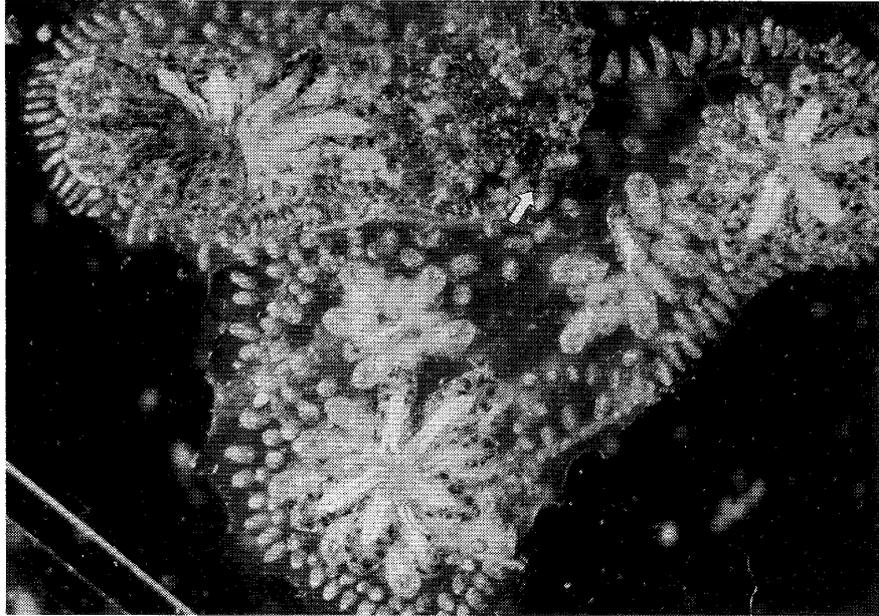


図4. 実験4・相の異なる2つの群体の癒合実験の結果. 図2より12日後.  
矢印は癒合箇所

くとも芽体の発達を促す因子と個虫の退化を促す因子の2種類が存在しているのではないかと考えられる。

実験5では、癒合した群体を個虫・芽体の含まれる相が進んでいる群体と比較し相がどのように変化してゆくのか観察した。結果相が進んでいる、個虫・芽体を除去された群体から血液のみを流入させた相の遅れている群体は相が進んでいる群体とは同調しなかった。つまり個虫・芽体を除去した群体の血液のみでは相の同調が起こらないことが分かった(図5)。

芽体同調因子が血液中に存在していることが示唆されている為、相が進んでいる群体より個虫・芽体を除去した群体と癒合した相の遅れている群体は個虫・芽体の含まれた相の進んでいる群体に同調していくことが期待された。結果より血液に含まれている芽体同調因子には、群体の相を記憶しているような機能は存在せず個虫・芽体からの断続的な何かしらの働きかけ～例えば現在個虫・芽体がどの成長段階にあるかを伝えるシグナル～がなければ作用しないのではないかと考えられる。同調は相対的なものであるから、一方の個虫・芽体が存在し現在どのような状態であるのかという情報を血液が伝達する、という仕組みなのではないだろうか。

しかしこの実験だけでは、個虫・芽体を除去された群体は相の変化を停止していて、癒合したときに相の遅れている群体が追いついてしまっているために相が同調しないのでは、という可能性が考えられ、個虫・芽体の除去された群体の血液は相を記憶している可能性がある。このことを確認するために1つの実験を行った(実験6)。先ず展翅針を上面より押しつけて1群体を2分し血液の流れを遮断させ、片側の芽体を全て除去する。2～3日後、芽体を除去した側は個虫退化の後、被囊のみに血液の流れる相の停止した状態が出来上がった。除去をしていない側は相変化し、個虫が世代交代された(図6)。次に遮断させていた展翅針を外し、再び血液を交換させた。このとき、芽体除去を行わなかった側をカミソリを用いて2分し、相の停止している側からの血液が流れてこない断片を作り出



図5. 芽体を除去し、被囊のみが広がる箇所を作って行った実験5の結果  
 図3より7日後。(3)'は(1)'と同調していない。  
 (1)'相の進んでいる群体(世代交代後のA相)  
 (2)'図3(1)より分離した、被囊のみが広がる箇所  
 (3)'(2)'と癒合した相の遅れている群体(世代交代後のC相)

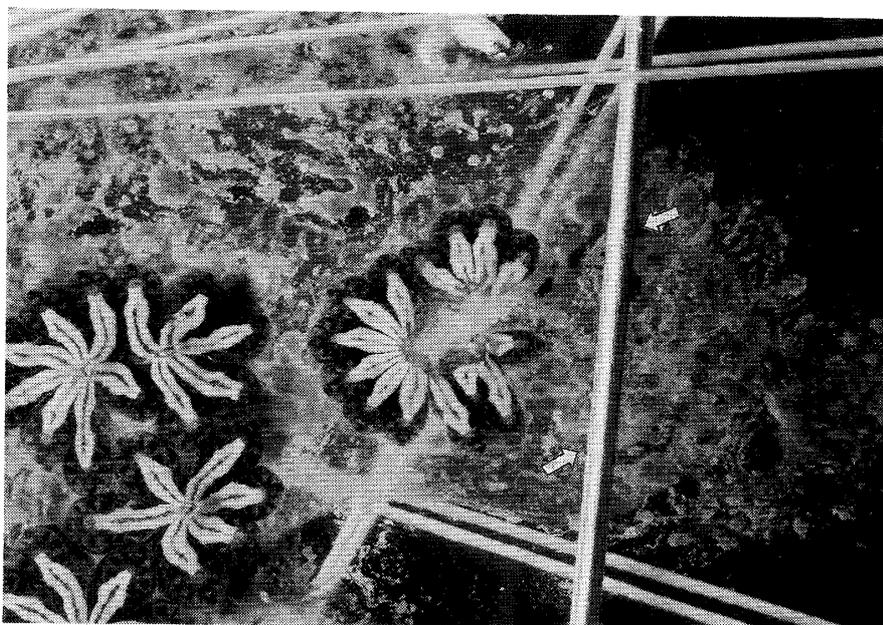


図6. 実験5の考察を確認するために行った実験6の開始より5日後  
 中央の展翅針(矢印)より右側は芽体を除去しており個虫が退化している  
 (芽体除去時はC相、個虫退化により図ではD相)。展翅針より左側(A相)  
 をカミソリで2分し、展翅針を外して左側の一部分に血液を流入させる。

し、交換の行われた断片と比較した。もし芽体除去された側が相の変化を記憶しながら停止していたならば、血液が流入された除去していない側の個虫・芽体の成長に何らかの変化が認められるはずである。しかし実験の結果、相を停止させた側より血液が流入した群体と、相を停止させた側より血液を流入させなかった群体では相変化に違いが認められなかった。この事より、血液中には相を記憶している仕組みがないことが示唆された。

もし血液中の芽体同調因子がどこかで生産されているならば、それはどこで生産されているのだろうか。実験5の結果から芽体同調因子が血管上皮や血球から作られているのは考えられない。個虫や芽体が存在しなければ芽体同調因子も生産されていないのだから、個虫や芽体から生産されていると考えられる。ではそれは個虫が生産しているのだろうか、それとも芽体が生産しているのだろうか。そのことを明らかにするためには相の進んでいる群体から個虫を除去して芽体と血液を残し、芽体だけを除去して個虫と血液を残した群体と癒合させ、相がずれるかを調べればよい。しかしウスイタボヤの相変化が早いこと、2つの群体が接触してから癒合して血液が交換されるまで2～3日かかることから、この実験は困難である。

個虫を除去して芽体と血液を残した群体を癒合させる実験は、癒合が完了したときは個虫を除去しなくても個虫退化の時期になってしまっている。つまり、個虫を除去しなくても癒合時には個虫は退化している。従って、実験結果が個虫除去による影響なのかどうかの判断が困難である。芽体を除去して個虫と血液を残した群体を相の遅れている群体と癒合させると、癒合完了時には個虫が退化してしまって個虫、芽体共存在しない群体になっており、実験5と変わらなくなってしまう。接触してから癒合するまでの正確な時間を調べ、実験を行うことが課題である。

またウスイタボヤでは群体内の全ての個虫・芽体を除去すると、血管出芽をして個虫を作り出すことが知られている。このとき出芽した芽体は出芽時期もばらばらで、芽体同士での同調は見られない(種田, 未発表)。このとき、癒合実験を行って芽体が同調している群体に血液を流入させるとどうなるか。

これらの問題について実験を行い、ウスイタボヤの芽体同調には血液の他に個虫が関わっているのか、芽体が関与しているのか、また本研究により与えられた個虫退化の同調因子は何であるのか更なる解析を行ってゆくことが必要であろう。

## 引用文献

- Berrill, N. J. 1941a. The development of the bud in *Botryllus*. *Biol. Bull.* 80 : 169–184.
- Berrill, N. J. 1941b. Size and morphogenesis in the bud of *Botryllus*. *Biol. Bull.* 80 : 185–193.
- Berrill, N. J. 1961. Growth, Development, and Pattern. Freeman, San Francisco,
- Chang, W.-T. and Lauzon, R. L. 1995. Isolation of Biologically Functional RNA During Programmed Death of a Colonial Ascidian. *Biol. Bull.* 188 : 23–31.
- 団 勝磨・石川 優・沼宮内隆晴, 1988. 現代発生生物学シリーズ3 海産無脊椎動物の

- 発生実験. 培風館 : 197-205.
- Milkman, R. 1967. Genetic and developmental studies of *Botryllus schlosseri*. *Biol. Bull.* 132 : 229-243.
- 中内光昭, 1977. UP BIOLOGY ホヤの生物学. 東京大学出版会.
- 斎藤康典, 1996. 群体特異性のしくみ. 遺伝, 50(12) : 35-40.
- 種田保穂・渡辺 浩, 1984. 複合ホヤにみられる群体特異性の出現機構. 遺伝, 38(7) : 62-68.
- 内田 亨・山田真弓編1986. 動物系統分類学 8(下). 中山書店 : 118-284.
- Watanabe, H. 1962. Further Studies on the Regulation in Fused Colonies in *Botryllus primigenus* (Ascidiae Compositae) .  
Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daigaku. Sec. B. 10 : 253-284.
- Watanabe, H. 1953. Studies on the regulation in fused colonies in *Botryllus primigenus* (Ascidiae Compositae) .  
Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daigaku. Sec. B. 7 : 183-198.
- Watanabe, H. 1970. Asexual Reproduction in Compound Ascidians(I). *Zoological Magazine* 79 : 131-143.