

ハリサンショウウニの継代飼育法の確立

柴田 大輔^a、小高 友実、谷口 俊介

筑波大学下田臨海実験センター

〒415-0025 静岡県下田市 5-10-1

概要

棘皮動物門に属するウニ類は、実験生物学的利点により古くから発生学・細胞学等のモデル生物として活用されてきた。しかしながら、バフンウニをはじめ、現在材料として使われている多くのウニ類は生殖期が年に1回であり、また卵から性成熟までに1年以上かかるため、継続的な実験を突き詰めることは極めて困難である。これまで、著者らはハリサンショウウニの継代飼育を試みており、本種が卵から性成熟に至るまでの期間が約半年であることを明らかにし、年中配偶子を保持させることにも成功した。このように非常に優れた生物材料になる可能性を持つ本種において、安定した継代飼育法を確立したため報告する。

キーワード：ハリサンショウウニ、継代飼育、変態、性成熟

1. はじめに

棘皮動物門に属するウニ類は、配偶子の得やすさ・幼生の透明さ等の実験生物学的利点により、古くから発生学・細胞学等のモデル生物として活用されてきた。また、中学校・高校等の教育機関においても、その扱いやすさから生物学教育の優れた材料として利用されてきた。一方、バフンウニをはじめ、現在材料になっている多くのウニ類は生殖期が年に1回であり、通年で研究・教育に利用することはほとんどの施設で困難である。さらに、卵から性成熟までに1年以上かかるため、他のモデル生物のように遺伝子のノックアウト系統を研究者個人が作製し、継続して実験を突き詰めることは極めて困難である。

海洋生物の研究・教育を行っている下田臨海実験センターでは、著者らが中心になりこれまでにハリサンショウウニ *Temnopleurus reevesii* の継代飼育を試みてきた。その結果、本種は卵から性成熟に要する期間が半年であり、他のウニ類に比べて非常に短いことが分かった。また、年中配偶子を保持させることにも成功した。これは、研究および教育の現場において、非常に優れた生物材料になる可能性を含んでいる。しかしながら、“安定して”そのライフサイクルを回すことは未だに困難である。

そこで、本研究ではハリサンショウウニをモデル生物化し、研究および教育に貢献するため、安定した継代飼育法を開発することを目的にする。

2. ハリサンショウウニ

ハリサンショウウニは北海道南部から九州、東シナ海に分布しており、成体は肉食性である(図1)。下

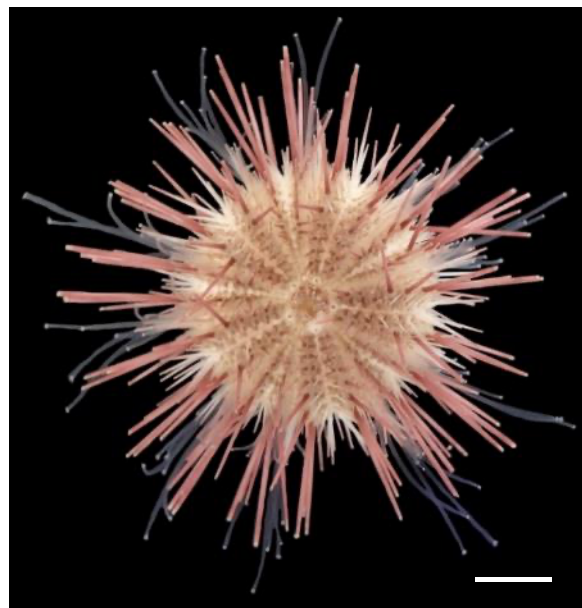


図1. ハリサンショウウニ成体. Scale bar = 10 mm.

田市周辺では野外で採集されることは稀であるが、2013年にセンター内の海水汲み上げシステムの一部である受水槽から採集された。これらの個体を用いて人工受精が行われ¹⁾、稚ウニから成体に至るまでの成長が速かったため、研究材料として適している可能性が示唆された。

一般的なウニ類の発生は、浮遊性のプルテウス幼生を経過し、摂食性の場合は単細胞藻類を与えることで飼育が可能である。幼生はその形態的特徴からプルテウス幼生と呼ばれ、2腕プルテウス、4腕プルテウス、6腕プルテウスを経て、8腕プルテウスへと成長する。8腕プルテウスで幼生の左側に成体の棘や水管系などの器官を含む成体原基が形成され、この成体原基が大きくなると変態して稚ウニになる(図2)。本種も同様の発生型であり、飼育条件にもよるが幼生期間は約1ヵ月である。

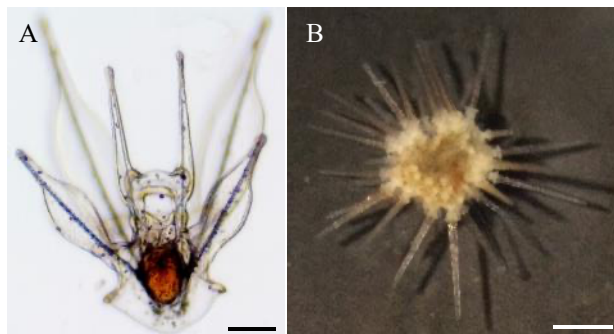


図2. 本種の6腕プルテウス幼生(A)、および稚ウニ(B). Scale bar = 300 μ m.

^a shibata@shimoda.tsukuba.ac.jp

3. これまでの問題点および改善方法

本種において、これまでに卵から性成熟した成体に至るまで飼育されており、継代飼育も可能である。しかしながら、幼生や稚ウニ、成体の飼育において問題点が残っており、それを改善することで“安定した”継代飼育が可能になると考えられる。

3.1 幼生飼育

ウニ類の幼生は、一般的にモーター(30 rpm)を用いて飼育海水を攪拌しながら飼育される(図3)。幼生の餌には単細胞藻類を用いるが、幼生の成長とともに体サイズが増大して餌量も増加する。そのため、幼生の成長には餌量の調整や幼生密度の調整が特に重要である。これまでの飼育結果から、幼生期では成長に伴って個体ごとの成長に差が出始め、形態的に異常な個体も生じる。この差は変態完了後の稚ウニの成長にも影響する。そのため、後期幼生期において成長の良い個体を選別することで、効率よく幼生を成長させることを目指した。幼生の形態を詳細に観察するために、簡易的に利用できる顕微鏡撮影システムを導入し、幼生の成長過程、変態時期の正確な判断、および継続した記録付けを行った。



図3. 幼生の飼育容器。

3.2 変態完了直後の稚ウニ

本種の変態完了直後の稚ウニは付着藻類を食べるため、これまでは天然海水をかけ流して35 Lの大きな水槽に藻類が付着したプラスチック板を入れて飼育していた(図4)。しかし、変態完了直後の稚ウニは殻径が0.5 mm程度であり、水槽内で個体を見失ってしまうため、目視サイズになるまでの間は管理ができていない。また、かけ流し水槽であるため、付着する藻類や混入する生物種が毎回異なっており、死亡する個体が増加するなど、実施ごとに成長する個体数に差が生じてしまい、成体に至るまでの個体数が安定しない。そのため、飼育方法を改良し、目視サイズに移行するまでの期間も観察できるように、変態を終えた稚ウニを小さい容器で飼育した。また、

日本中どこでも飼育可能なモデル生物化を目指すため、濾過海水を用いた止水環境下での飼育を試みた。

3.3 稚ウニから成体まで

本種の稚ウニは、ある程度の体サイズになると草食性から肉食性へと移行する。肉食性に移行すると、複数個体での飼育環境下では共食いが生じて個体数が減少するという大きな問題がある。単独での飼育であれば共食いを避けることはできるが(図5)、その場合限りある飼育スペースでは飼育できる個体数が減少する。複数個体での飼育が可能になれば、多くの個体数を飼育・維持することができ、多くの研究・教育の現場で使用できると考えられる。そのため、これまでの飼育条件や餌を見直し、それらを改善することにより複数個体で飼育できる方法を検討した。

4. 結果

4.1 幼生飼育

顕微鏡撮影システムを用いて(図6A)、幼生の形態、および体サイズを中心に定期的に幼生を観察した。その結果、6腕ブルテウス幼生期には明確に体サイズに差が生じ、正常な個体以外に成長が遅く体サイズの小さな個体が確認された。そこで、6腕ブルテ

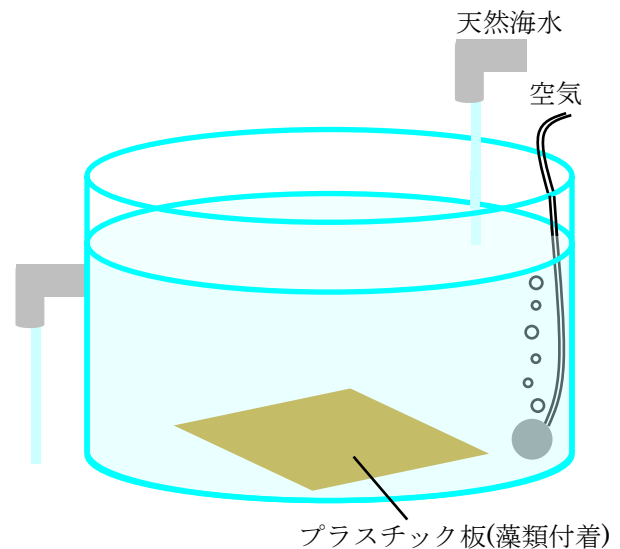


図4. これまでの稚ウニの飼育方法。



図5. 単独飼育された成体。

ウス幼生期までは 100 μm のメッシュでサイフォンによって換水していたが、体サイズに差が生じた時期に 315 μm のメッシュで換水を行い、体サイズの大きな個体のみが残るようにした。また、幼生の成長や密度によって必要な餌量は変化するため、6 腕プルテウス期以降の幼生密度は、3L、5L、および 10 L の飼育容器を用いて、1-15 個体/ml に調整した。特に、8 腕プルテウス幼生になると成体原基の形成とともに体サイズが増大する。そのため、顕微鏡によって毎回幼生の胃内を観察して十分な餌が胃に入っているかどうかを確認し(図 6B)、与える餌量を調整した。

また、幼生に与える餌は単細胞藻類(*Chaetoseros calcitrans*)であり、近年は高密度培養された *C. calcitrans* が市販されている。市販餌は密度が一定であり使用しやすいが、藻類の細胞同士が付着して塊ができるなど、餌の状態が時間経過とともに悪くなる場合がある。それらを餌として使用すると実際の餌量の減少や飼育海水の汚れなどが問題として生じ、幼生の個体数が減少することもあった。そのため、*C. calcitrans* の培養システムを立ち上げ安定した餌を供給できるようにした(図 7)。

これらの改善により、変態期まで発生段階が揃ったため同時期に幼生が変態して稚ウニが得られるようになった。また、顕微鏡撮影システムにより、発生段階の確認がスムーズになり、詳細な記録を残すことできた(図 6C、D)。

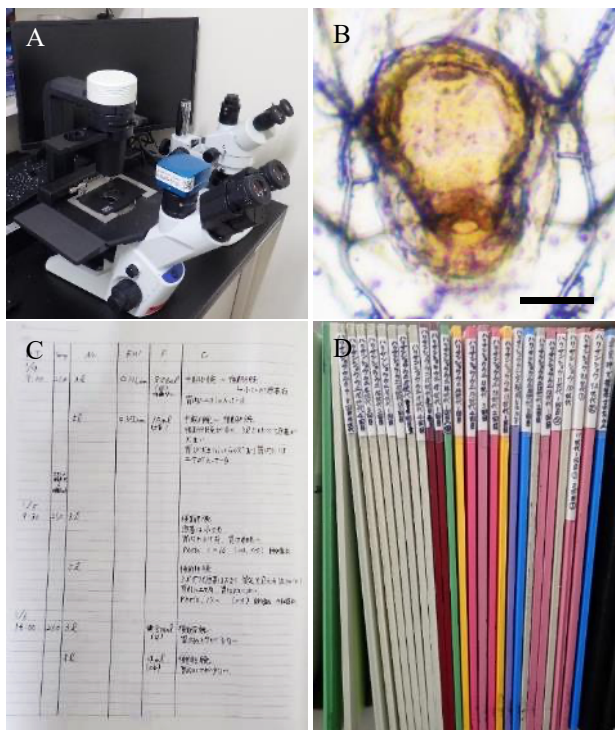


図 6. 顕微鏡撮影システムの導入。

A: 顕微鏡撮影システム. B: 幼生の胃. C: 飼育記録. D: これまでに記録されたノート.
Scale bar = 100 μm .

4.2 変態完了直後の稚ウニ

個体を管理して飼育できるように、1.5 L 容器に藻類が付着したプラスチック板を入れ、エアレーションを行いながら止水環境で飼育した(図 8A)。稚ウニ

は藻類が付着したプラスチック板に付着すると目視しづらくなるが、小さい容器では探しやすく比較的見つけることができる。換水は 3-5 日ごとに行い、稚ウニが流れていないことを確認しながら行った。止水環境で飼育したことで、かけ流し水槽のように不特定な生物や藻類の混入がなくなり、比較的安定して稚ウニを成長させることに成功した。しかしながら、プラスチック板にすでに付着している生物等が存在していたため、場合によって稚ウニの生存や成長に差が生じた。そのため、プラスチック板の影響を防ぐため、稚ウニの飼育が開始される前に、予め飼育容器に幼生用の餌を入れて容器内側表面に藻類を付着させた(図 8B)。この容器では稚ウニを目視することも容易であり、換水も行いやすかった。この方法により止水環境下でも安定的に稚ウニを成長させることに成功した。



図 7. 単細胞藻類の培養。

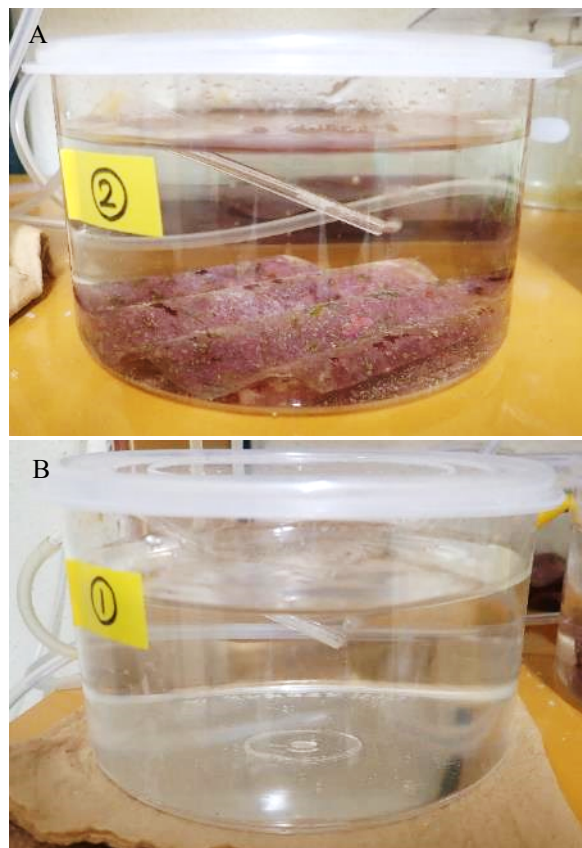


図 8. 稚ウニの飼育。

A: 藻類が付着したプラスチック板が入った容器. B: 藻類を直接付着させた容器.

4.3 稚ウニから成体まで

成体は、これまでかけ流し水槽内のカゴに入れて単独で飼育されていた。また、目視サイズになるまで管理できていなかったため不明であったが、殻径が2 mmから食性が肉食性へと移行し始め、これまでの飼育では殻径3 mm以上の個体は他の小さい個体を食べる共食いが確認された。そのため、まず飼育環境の改善を試みた。トリカルネットのみで囲まれた区画では稚ウニが隠れる場所がないため、カゴ内が立体的になるように構造物を入れることを検討した。ウニ類は固い歯を持っており種によっては基質ごと食べる場合があるため、構造物にはカルシウムが豊富なカキ殻を用い、少しでも栄養価が高くなるようにした(図9)。これにより、区画内に隠れるスペースが作られるとともに、表面積が増加したことで個体同士が接触しにくくなった。

一方、従来の飼育方法では肉食性に移行した個体には淡水魚用の餌が与えられていた。淡水魚用の餌は、海産生物には必要不可欠なEPAおよびDHAがほとんど含まれていないため、海産生物の飼育には奇形が生じるなどの理由から適していない。ハリサンショウウニでも淡水魚用の餌で成長させた個体は、殻が脆いなどの症状が生じていた。また、多くの個体を飼育・維持することから、EPA、DHA、カルシウムなどの栄養価以外にも、入手しやすさ、コスト、および与える餌の状態も考慮して餌を選定した。餌は、イカ、アサリ、カキ、イワシ、およびシラスを候補として挙げた(表1)。イカおよびイワシはサイズが大きいことから与える部位によっても栄養価に差が生じる可能性があった。また、乾燥されたシラスは加熱処理の影響を受けており、自然条件下ではないため採用を避けた。アサリおよびカキは解凍ではあるがより自然条件下に近く、栄養価は他に比べて劣る部分もあるが、それぞれの栄養価のバランスが良い。そのため、まずはサイズが小さく容易に手に入るアサリが餌として用いられた。殻径3 mmの個体には、なるべくアサリの様々な部位が入るようにスライスして餌として与えた。その後、殻径が大きくなるにつれて餌も大きくし、殻径30 mmの個体ではアサリ1個を与えた。これにより、性成熟した個体でも共食いは観察されず、複数個体での飼育が可能になった。これにより、省スペースでも多くの個体を飼育できるようになった。

アサリで安定して飼育することは可能であるが、現在はアサリ以外にもセンター周辺で容易に採集可能なケガキも餌として用いられている。ケガキはサイズがアサリと同サイズであるため与えやすく、栄養価はアサリよりも高い。しかしながら、殻を割るなどの作業もあるため、現在はアサリと併用して与えている。

5. まとめ

本研究により、これまでの継代飼育法で課題であった幼生、稚ウニの飼育法が改善されたことで、“安定した”継代飼育法が確立された。また、成体を複数個体で飼育できるため、個体数が多い場合でも対応することが可能になった。

稚ウニ飼育において、止水環境での藻類が付着したプラスチック板を用いた飼育法でも稚ウニの生存



図9. 成体の飼育.

表1. 成体用餌の比較.

	淡水魚用の餌	イカ	アサリ	カキ	イワシ	シラス
カルシウム	-	0.014	0.066	0.088	0.7	0.52
不飽和脂肪酸	-	0.34	0.05	0.5	6.61	0.95
タンパク質	30	12.8	6.0	6.6	19.8	40.5
脂質	4	1.2	0.3	1.4	13.9	3.5
サイズ	小	大	小	中	中	小
コスト	低	低	低	中	高	中
状態	加工	解凍	解凍	解凍	解凍	乾燥

(g/100g)

率は改善されたが、容器に直接藻類を付着させた方がより安定していた。藻類を付着させるまでに1ヵ月ほど要するが、現在はこの方法で飼育を行っている。しかしながら、止水環境では換水等の作業が必要であるため、過剰に稚ウニが得られた場合は、かけ流し水槽での飼育も併用している。

本研究により、肉食性に移行した個体にアサリやケガキを餌として与えたことで共食いを防ぐことができた。これは、栄養価の高い餌を与えたことで各個体の殻や棘の強度が上がり、割れにくくなったためであると考えられる。

成長した個体は、止水環境下あるいはかけ流し水槽で飼育している。止水環境下では通年で水温が一定であるが、定期的な換水が必要であるため、飼育する個体数の増加に伴い、作業時間が必要である。一方、かけ流し水槽での飼育では、季節的な水温変化に晒されるが、基本的には換水等の作業が必要ない。そのため、多くの個体を飼育・維持するためには、両方の方法を用いることが有効であると考えられる。飼育水温の変化によって成長に差が出ることが分かっており、特に水温が低下する冬期には摂餌量が減少し、個体が弱ることも観察されている。そのため、今後はかけ流し水槽でも冬期に水温を低下させないシステムを構築する必要がある。この方法

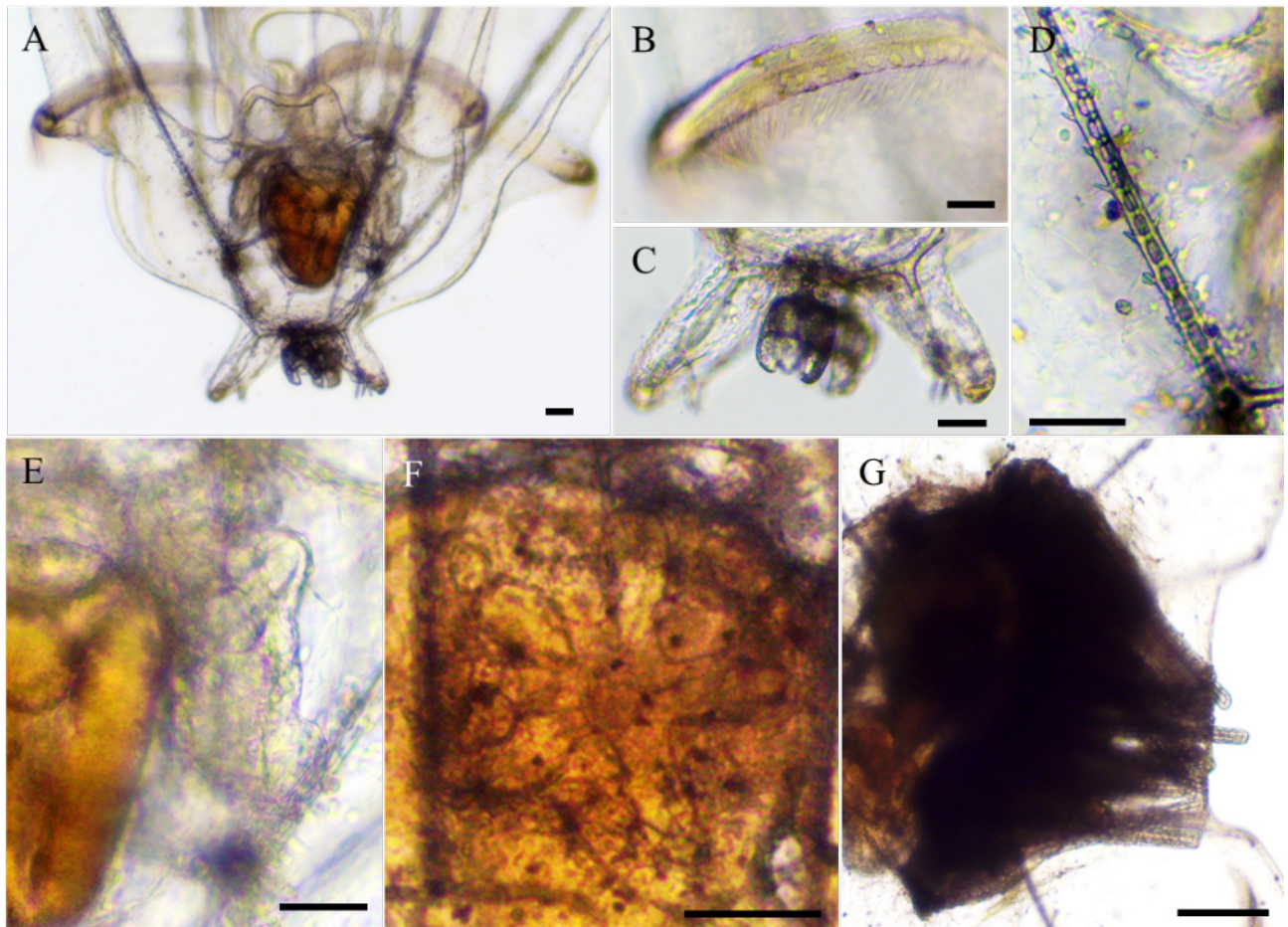


図 10. 顕微鏡撮影システムによる幼生の観察.

A: 8 腕プルテウス幼生. B: 繊毛帯. C: 叉棘. D: 骨片. E: 形成され始めた成体原基. F: 水管系が明確になった成体原基. G: 成体の棘などが形成された変態直前の成体原基. Scale bar = 100 μ m.

が確立できれば、研究・教育の使用目的に合わせて、より多くの個体を継続して飼育・維持することができるだろう。

これまでに 16 世代まで継代飼育することに成功しており、近年において実際に本種を利用した世界初のノックアウトウニ系統の作成が成功している^[2]。

本研究において、卵から成体に至るまで止水環境下で飼育することに成功しており、少ない海水でも飼育できる方法が確立された。さらに、顕微鏡撮影システムの導入により、幼生や稚ウニの詳細な記録を残すことが可能になった。これにより、これまで文字や図で幼生等の説明を行いながら飼育技術を教えていたが、現在は写真を用いて説明できるようになり(図 10)、簡単により詳細に飼育技術の引き継ぎが可能になった。これにより、海水が常に供給されない他の施設でも、飼育方法を引き継ぐことで本種を飼育することができるだろう。これは、今後の本種のモデル生物化に向けた大きな成果である。

謝辞

本研究の一部は、科学研究費補助金(21H04138、代表：柴田大輔)の助成を受けたものである。

参考文献

- [1] S. Yaguchi, A. Yamazaki, W. Wada, Y. Tsuchiya, T. Sato, H. Shinagawa, Y. Yamada, J. Yaguchi, Early development and neurogenesis of *Temnopleurus reevesii*, *Develop. Growth Differ.* 57 (2015) 242-250.
- [2] S. Yaguchi, J. Yaguchi, H. Suzuki, S. Kinjo, M. Kiyomoto, K. Ikeo, T. Yamamoto, Establishment of homozygous knock-out sea urchins, *Curr. Biol.* 30(10) (2020) 427-429.

Establishment of Successful Breeding and Rearing Methods for the Sea Urchin, *Temnopleurus reevesii* (Gray, 1855)

Daisuke Shibata, Tomomi Kodaka, Shunsuke Yaguchi

Shimoda Marine Research Center, University of Tsukuba,
5-10-1 Shimoda, Shizuoka, 415-0025 Japan

Sea urchins from the phylum Echinodermata have long been used as genetic model organisms for embryology and cytology. Conducting experiments on Echinoderms is difficult as they only have one reproductive season with time to sexual maturity taking more than one year. *Temnopleurus reevesii* is one species that has been shown to reach sexual maturity in only 6 months, with successful gamete retention observed throughout the year. As *T. reevesii* can be used as a genetic urchin model species, its importance in developmental biology requires replicability. Here, we report stable breeding and rearing methods for *T. reevesii*, which can be utilized for multiple developmental biological experiments, including trans-generational research.

Keywords: *Temnopleurus reevesii*, trans-generation, rearing, sexual maturity