

低水温および高水温下でホタテガイ鰓繊毛運動に生じる異常

西野敦雄¹・渡部翔¹・小谷健二・森恭子・吉田達

目 的

冬季の低水温および夏季の高水温時がホタテガイの鰓繊毛運動に与える影響について検証した。

材料と方法

1. 低水温試験

材料は、水産総合研究所(以下、水総研と称す)にて平成27年2~3月にかけて実施したほたてがい冬季へい死対策事業に関する室内試験¹⁾で使用した各試験区(表1)の平成26年産ホタテガイ稚貝を用いた。また、本試験の試験区についても上記の室内試験で設定した試験区を踏襲した。稚貝は、平成27年3月4日に水温10℃、同3月6日に水温5℃、同3月9日に水温0℃から試験区毎に10個体を抽出した後、自記式水温計を入れたクーラーボックスに収容し、弘前大学農学生命科学部(以下、弘前大学と称す)へ移送した。移送した稚貝は、試験区毎に弘前大学内の低温室に設置した60ℓのガラス水槽へそれぞれ収容した後、移送当日から翌日にかけて全個体の鰓繊毛運動を記録した。この低温室内の水槽には人工海水(大阪薬研社、マリンアートBRおよびイワキ社、レイシーマリン)を満たし、海水循環用のポンプとともにホースを連結して前述の試験と同じ水温の調温海水を絶えず循環させた。また、低温室は稚貝が移送される前日に、各試験区の水温よりも1℃低い温度に設定して使用した。

鰓繊毛運動の観察は、平成27年3月4~10日に実施した。繊毛運動を観察するため、低温室内の水槽から稚貝を1個体抽出し、市販の金属製スプーンで貝殻から閉殻筋を剥離し、剥離した貝殻を除去した後、左右いずれかの鰓から鰓弁を切り出した。底面をシリコンゴム(DOW CORNING社、Sylgard 184)でコーティングした直径35mmのプラスチックシャーレ(以下、シリコンシャーレと称す)に調温された人工海水を注ぎ、そこへ切り出した鰓弁を入れた。鰓糸ができる限り重ならないように広げて虫ピンでシリコンシャーレに固定し、観察用サンプルとした。観察時の鰓繊毛運動の記録には、生物顕微鏡(Nikon社、ECLIPSE E600FN)、高速度カメラ(デジモ社、VCC-H1000)、アイスボックスに保冷剤と水(10℃)、氷水(5℃)、あるいは氷水と食塩(0℃)をそれぞれ満たした低温恒温槽、水流ポンプを組み合わせた記録装置を使用した(図1A)。また、生物顕微鏡のステージ上に直径60mmのガラスシャーレ(以下、保温シャーレと称す)を置き、サンプル毎に水総研の試験時に給水されていた海水と同温の調温海水を水流ポンプにより恒温槽から保温シャーレに給水し、サイフォンにより給水分の海水が保温シャーレから排水され、恒温槽に戻るよう調温海水を循環させた(図1B)。記録時は、観察用サンプルが入ったシリコンシャーレを保温シャーレに設置した後、ハロゲンランプの透過照明下で倍率40倍のノンカバー水浸レンズ(Nikon社、Fluor 40X/0.80W)を通し、1サンプル当たり無作為に2箇所を選出してそれぞれ1~2本の鰓糸を視野に収めながら高速度カメラにて500コマ/秒の速さで約1秒間撮影した。なお、記録前後に水温計を用いてシリコンシャーレ内の水温を記録し、水総研の試験時に給水されていた海水の水温から±1℃以上離れた場合、記録データから除外する予定であったが、

表1. ほたてがい冬季へい死対策事業に関する室内試験で設定した試験区

水温	生殖巣の成熟	給餌
2℃	未成熟	餌有 餌無
	成熟中	餌有 餌無
	成熟済	餌有 餌無
5℃	未成熟	餌有 餌無
	成熟中	餌有 餌無
	成熟済	餌有 餌無
10℃	未成熟	餌有 餌無
	成熟中	餌有 餌無

¹ 弘前大学農学生命科学部

除外しない場合でも結果に統計学的な違いが見られなかったことから、除外せずに考察を行った。

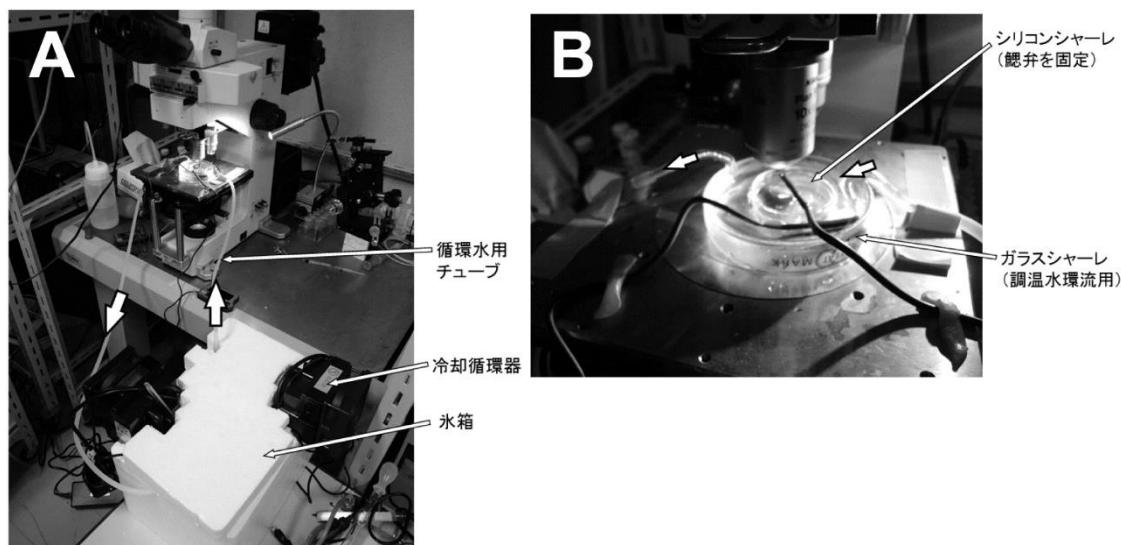


図1. 記録装置の全体図(A)と生物顕微鏡ステージ上の拡大図(B)(大きな白矢印は調温海水の流れを示す。)

鰓繊毛運動を試験区間で比較を行うため、定量化を行った。撮影した1秒間の動画のすべてもしくは一部分を512×232ピクセルのビットマップ形式のイメージ・シーケンスとして書き出し、一連のイメージ・シーケンスを画像処理ソフトImageJ(1.48v)を用いて分析した。その後、鰓繊毛が運動している場所の任意の点(ピクセル)における輝度(0-255の範囲で表される)の変化を時間軸に沿って定量的に表し(図2)、その輝度変化のPeak-to-peakの時間経過と変動周期数から、鰓繊毛打の頻度(以下、繊毛打頻度(単位:Hz)と称す)を表計算ソフトMicrosoft Excelを用いて計算した。なお、1つの観察用サンプルから2箇所動画データを得て、それぞれに対して1つずつの繊毛打頻度データを算出した。

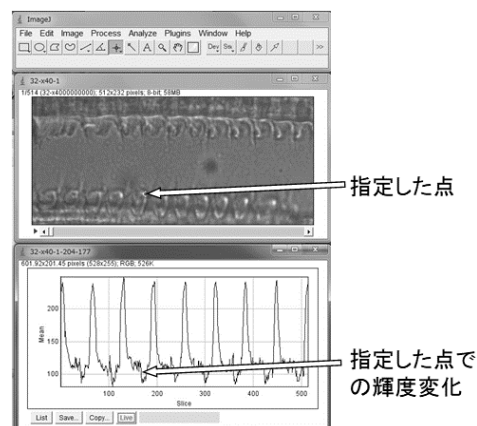


図2 繊毛運動活性の定量化と繊毛打頻度の算出

2. 高水温試験

材料として、平成28年7月29日に水総研の川内実験漁場に設置した延縄式ホタテガイ養殖施設から平成28年産ホタテガイ稚貝が付着した採苗器1袋回収した。稚貝は、回収した採苗器から流し網を取り出して網からふるい落としした後、目合2分および3分の篩を使って選別を行い、3分の篩に残った殻長12~13mmの稚貝を大サイズ、2分の篩に残った殻長6~7mmの稚貝を小サイズとし、濾過海水を掛け流しで給水した250ℓFRP水槽へサイズ別に収容して室内で蓄養した。平成28年8月4日に大サイズ約30個体、小サイズ約50個体を無作為に抽出してクーラーボックスへ収容し、併せて水槽内の海水を適量採取して弘前大学へ移送した。移送後は、気温20℃(±1.5℃)の部屋に設置した直径約30cmの円柱水槽に移送した濾過海水を入れて給気し、稚貝を収容した。

鰓繊毛運動の観察は平成28年8月5~7日に水温20℃と26℃の条件下で実施した。26℃条件下の個体は、観察の前日に、給気と共にヒーターを入れて水温を26℃に加温した同型の円柱水槽に収容し、収容後から1日のうちに鰓繊毛運動の観察を行った。なお、観察用サンプルは、低水温試験時と同様の手順で作成した。

観察時の鰓繊毛運動の記録には、恒温槽をウォーターバス(As-One社、TM-1)に変更し、それ以外については低水温試験時と同じ機材を組み合わせた記録装置を使用した(図1A)。また、記録時の設定条件や繊

毛打頻度データの算出(図2)についても低水温試験時と同様に行った。

結 果

1. 低水温試験

(1) 鰓繊毛運動の定性的な変化

鰓糸に存在する側繊毛に生じていた繊毛波について、水温10℃における様子を図3、水温5℃における様子を図4、水温0℃における様子を図5に示した。なお、定性的な観察では給餌の有無と生殖巣の成熟の違いによる鰓繊毛運動に明確な差異が認められなかったことから、水温条件のみを考慮した。

水温10℃では、鰓糸上に見られる繊毛の運動は繊毛波を形成し、その波は鰓糸に沿ってほぼ一定の速さで広く伝播していた。一本の鰓糸において、片側の繊毛波は反対側の繊毛波と逆方向に伝搬しており、また隣接する鰓糸の向かい合う側面においても反対方向に伝搬しているのが観察された(図3A)。この繊毛波の伝搬方向は一定であり、特定の部域で繊毛波が途切れることや(図3B矢印)、一部で繊毛運動が一瞬停止すること(図3B星印)はあっても、逆行することはなかった。これらの繊毛波は、相対的位置および過去の知見から、側繊毛において起きているものと考えられた²⁾。一部の個体では瞬間的な繊毛停止反応が頻繁に見られたものの、今回の解析ではその頻度の多寡を評価することはしなかった。

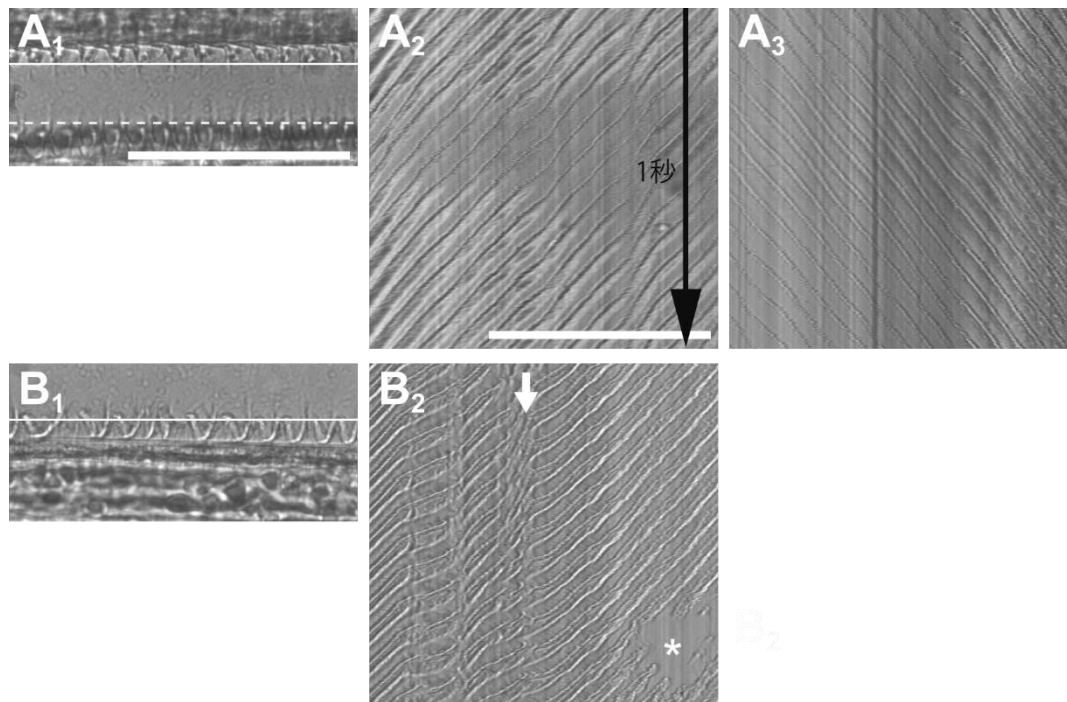


図3. 水温10℃における隣接する鰓糸の向かい合う面に存在する側繊毛が形成する繊毛波(A)および特定の部域で繊毛波が途切れた、もしくは繊毛停止反応が見られた別の鰓糸における側繊毛の繊毛波(B)の様子(スケールバーはいずれも100 μ m、白矢印は繊毛波が途切れた部域、*は繊毛停止反応箇所、A₂とA₃はそれぞれA₁の実線部と破線部、B₂はB₁の実線部における1秒間にわたる輝度の変化を、上から下方向に示す)

水温5℃では、水温10℃の場合と同様に繊毛波が鰓糸に沿って伝播する様子が観察されたが、少なくとも一部では鰓繊毛の運動を示す輝度の変化における傾き、すなわち斜線模様(図4A₂とB₂)の傾きが、水温10℃の個体よりも急になっていた。このことは、5℃の場合には繊毛波の伝播速度が水温10℃の場合よりも遅延することを示す(図4)。

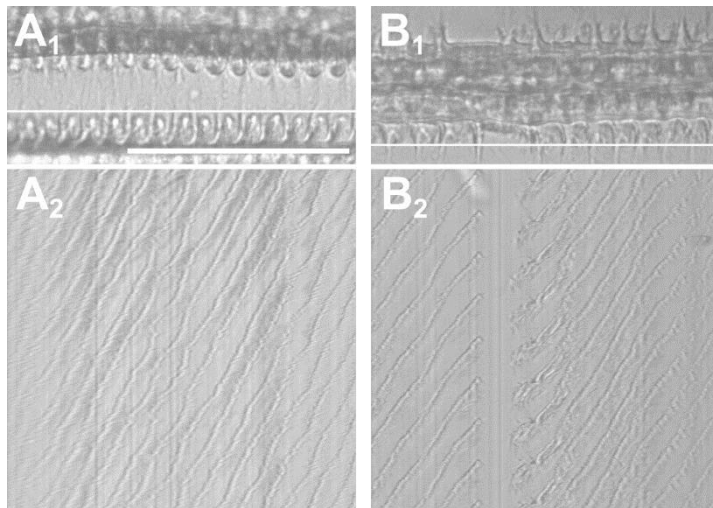


図4. 水温5°Cにおける隣接する鰓糸の向かい合う面の側繊毛が形成する繊毛波(A)および別の鰓糸における側繊毛の繊毛波(B)の様子(スケールバーは100 μ m、A₂とB₂はそれぞれA₁とB₁の実線部における1秒間にわたる輝度の変化を、上から下方向に示す)

水温0°Cでは、水温5°C、10°Cと大きく異なっていた。鰓糸上の側繊毛は多くの領域で運動しておらず、繊毛波が伝播して広がらず、局所に限定されていた(図5A、B)。また、運動している繊毛上に顆粒状の物体が付着している状態が頻繁に観察された(図5C、D)。

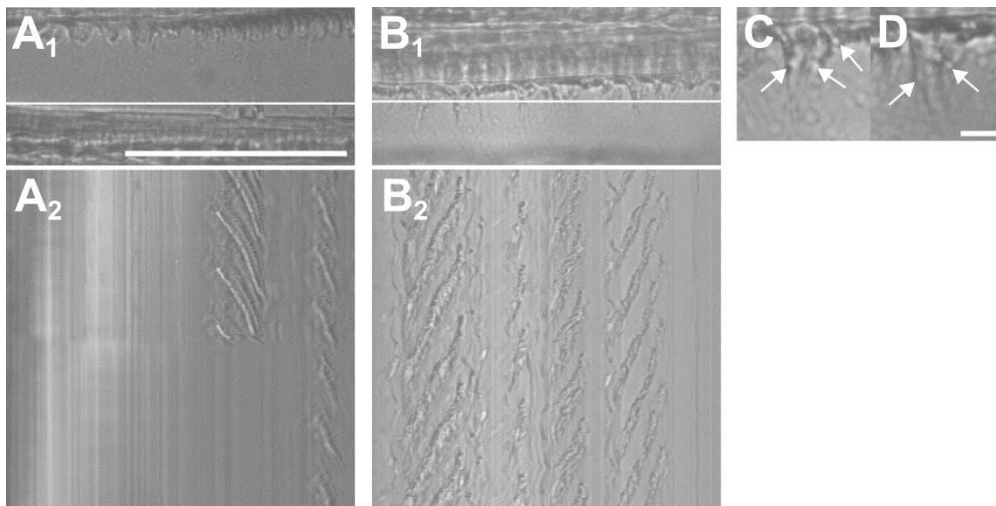


図5. 水温0°Cにおける隣接する鰓糸の向かい合う面の側繊毛が形成する繊毛波(A)、別の鰓糸における側繊毛の繊毛波(B)の様子および運動している2箇所の側繊毛領域の拡大図(C、D)(A₁のスケールバーは100 μ m、Dのスケールバーは10 μ m、A₂とB₂はそれぞれA₁とB₁の実線部における1秒間にわたる輝度の変化を、上から下方向に示す)

(2) 鰓繊毛運動の定量的な変化

10°C、5°C、0°Cの各水温における鰓繊毛運動の繊毛打頻度を図6、各試験区における鰓繊毛運動の繊毛打頻度を図7、水温10°C、未成熟、給餌無区を除く各試験区の移送当日と翌日の繊毛打頻度を図8に示した。給餌および生殖巣の成熟条件を考慮せず、水温条件のみで比較したところ、繊毛打頻度は水温10°Cで9.4Hz、5°Cで8.4Hz、0°Cでは5.9Hzと、温度が下がるにしたがって低下した(図6)。

また、同一水温内において各試験区の繊毛打頻度を比較したところ、他の温度では成熟度、給餌の有無に依存した繊毛打頻度の違いが見られなかったにもかかわらず、水温10°C、未成熟、給餌無区の繊毛打頻度が、同温度での他の試験区よりも低かった(図7)。この要因として、水温10°C、未成熟、給餌無区のみ水

総研から弘前大学へ稚魚を移送した翌日に全個体の鰓繊毛運動の記録を行い、水温0℃、5℃を含めた残りのすべての試験区については、いずれも移送した当日と翌日に稚魚を概ね同数ずつ用いて記録を行ったことが考えられた。実際、水温10℃、未成熟、給餌無区を除いた各試験区において移送当日と翌日に記録した繊毛打頻度を比較したところ、いずれの試験区においても翌日の繊毛打頻度が低かった(図8)。このことから、水温10℃、未成熟、給餌無区のサンプルのみ低い値を示したのは、この試験区のみすべて移送翌日に鰓繊毛運動の記録を行ったためと考えられた。

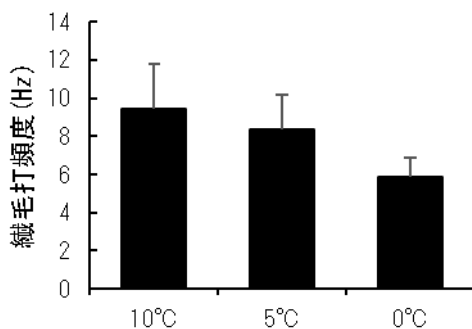


図6. 各水温における鰓繊毛の繊毛打頻度(バーは標準偏差、繊毛打頻度は0℃が117箇所、5℃が115箇所、10℃が78箇所の値の平均値)

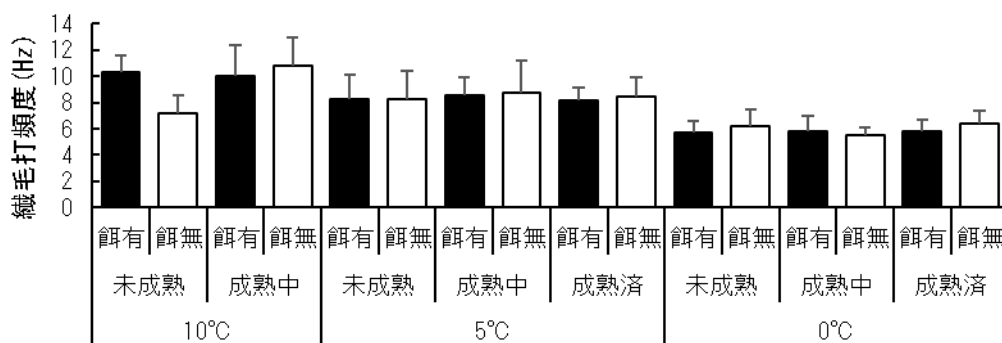


図7. 各試験区における鰓繊毛の繊毛打頻度(バーは標準偏差)

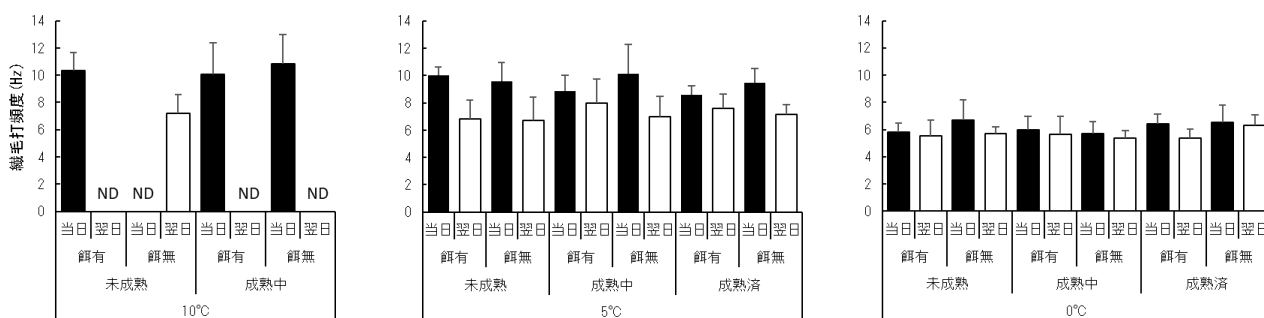


図8. 移送当日と翌日の繊毛打頻度(バーは標準偏差、NDはデータなし)

2. 高水温試験

(1) 鰓繊毛運動の定性的な変化

鰓糸に存在する側繊毛に生じていた繊毛波について、水温20℃における様子を図9、水温26℃における様子を図10に示した。なお、定性的な観察では稚魚のサイズによる明確な差異が認められなかったことから、水温条件のみを考慮した。

水温20℃では、低水温試験時の水温10℃と同様に、繊毛波は鰓糸に沿って一定の速さで広く伝播し、側繊毛の周囲で盛んに粒子が流されていた（図9）。

一方、水温26℃では、鰓糸上の側繊毛は多くの箇所では抜け落ちており、残っている側繊毛も周期的な運動を示すものの、周囲の側繊毛と同期した繊毛打を発したり、あるいは周囲とは独立した繊毛運動を示し、鰓糸に沿って伝播する繊毛波の形成が大きく攪乱されていた（図10）。また、側繊毛の個々の繊毛打も、十分にストロークしないままリカバリーの動きに入るといった不完全なものに見えた。なお、水温26℃で観察した稚貝は、やや大サイズの個体が鰓繊毛運動の記録当日内、小サイズの個体も鰓繊毛運動を記録した日から2日以内に全てへい死した。

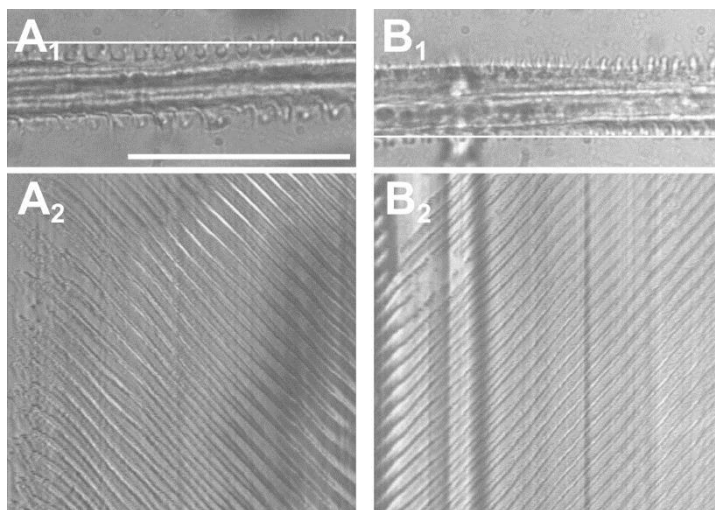


図 9. 温度 20℃における異なる 2 本の鰓糸上の側繊毛が形成する繊毛波（スケールバーは 100 μ m、 A_2 と B_2 はそれぞれ A_1 と B_1 の実線部における鰓繊毛運動の輝度の 1 秒間の変化を上から下方向に示す）

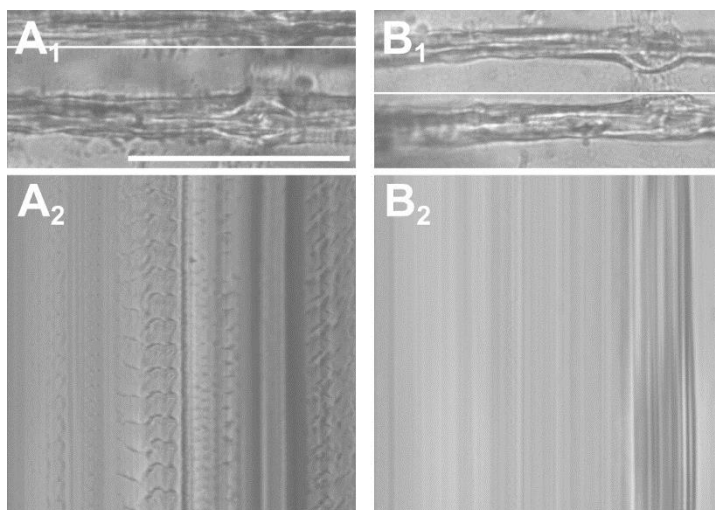


図 10. 温度 26℃における異なる 2 本の鰓糸上の側繊毛が形成する繊毛波（スケールバーは 100 μ m、 A_2 と B_2 はそれぞれ A_1 と B_1 の実線部における鰓繊毛運動の輝度の 1 秒間の変化を上から下方向に示す）

(2) 鰓繊毛運動の定量的な変化

20℃と26℃の各水温における鰓繊毛運動の繊毛打頻度を図11、水温・サイズ別における鰓繊毛運動の繊毛打頻度を図12に示した。サイズを考慮せず、水温条件のみで比較したところ、繊毛打頻度は水温20℃が14.5Hz、26℃が19.3Hzと、繊毛波が攪乱された状態であるにも関わらず、水温26℃の値が20℃よりも高かった。（図11）。また、サイズも考慮して比較したところ、繊毛打頻度は、水温20℃、26℃いずれもやや大サイズの個体の値が小サイズのものよりも高かった（図12）。

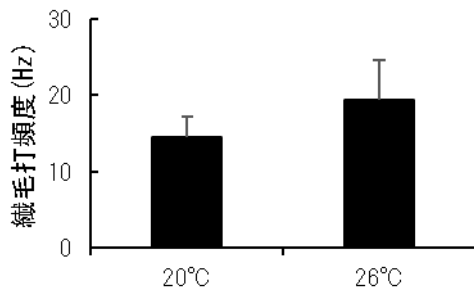


図11. 各水温における鰓繊毛の繊毛打頻度(バーは標準偏差、繊毛打頻度は20°Cが72箇所、10°Cが93箇所の値の平均値)

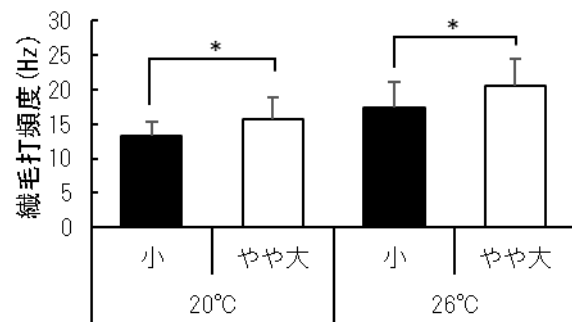


図12. 各試験区における鰓繊毛の繊毛打頻度(バーは標準偏差、*は同一水温内の小サイズと比べてp < 0.01で有意差あり)

考 察

本解析で採用した、高速度カメラを用いて鰓糸で起こる繊毛運動を直接観察する手法により、これまでに行われてきたような鰓糸の腹側縁のterminal cilia (末端繊毛) の動きの定性的な観察³⁾や、鰓弁上にプラスチック小片を置いてその移動度を計測する方法⁴⁾よりも、より細胞レベルの効果を直接的に観察することができたと考えられる。

今回の解析により、ホタテガイの鰓繊毛運動は少なくとも5°Cから20°Cの範囲では正常な繊毛波が形成されることが明らかになった。これを逸脱すると、0°Cでは多くの領域で繊毛運動が停止し、かつ繊毛波の伝播の著しい遅滞が見られた。26°Cでは一晩が経過する程度の中に多くの繊毛が脱落するとともに、繊毛波の形成が破綻することが明らかになった。ホタテガイの鰓繊毛運動は、温度が高まるのに応じて繊毛打頻度が上昇し、5°Cから20°Cの範囲においては温度係数 Q_{10} (温度が10度高まった場合に反応速度が何倍高まるかを示す係数) が1.44と見積もられた。この係数の値は、生物の反応プロセスとしては比較的低い温度感受性であるとみなすことができる。すなわちホタテガイの鰓繊毛運動が広い温度範囲の中でも確実に一定以上の動作を行うように、機能的な温度補償のしくみが備わっている可能性が考えられる。このことは、陸奥湾はじめホタテガイが生息する場所が、激しい水温の周年変化を示すことと関係があるかもしれない。

0°Cにおいては、繊毛打頻度が低くなることと共に、多くの領域で繊毛運動が停止し、また、局所で繊毛運動が生じてもそれ伝播しないことが観察された。これらにより、鰓による換水量の大幅な低下が引き起こされると考えられる。単位時間当たりの換水量は、単純に考えれば動作している繊毛数と繊毛打頻度の双方に (すなわちそれらの積に) 比例するものと思われる。その意味で、0°Cにおいては、繊毛打頻度が5 Hz程度に落ち込むこと以上に、運動停止をした繊毛の割合が高まることにより、さらに著しく換水量の低下を招くことになると考えられる。本研究の中では、0°Cになるとどの程度の範囲で繊毛停止が起こるのかについては、定量的な見積もりができなかった。今後の課題である。0°C近くの低温下で特に、広範囲に繊毛運動が停止する理由は今回の解析からは不明である。二枚貝の鰓繊毛の運動には内臓神経節に細胞体が存在する神経からのセロトニンによる刺激が促進因子として働くことが知られているので、低温によりこの繊毛運動の活性化のシステムが停止する可能性や、低温により活性化される抑制性の神経シグナルが存在する可能性、0°Cでは側繊毛細胞自体が静止膜電位を維持できない可能性などが考えられる。5°Cから0°Cになると、繊毛に顆粒状の構造が見えるようになり、また繊毛波の動きが“粘っこくなる”ように見て取れた。0°Cにおいて繊毛に顆粒構造が見えることについては、繊毛の形態維持に重要な役割を果たすことが近年明らかになった繊毛内の物質輸送が、低温下において滞り、繊毛内に“ダマ”ができた可能性などが考えられる。繊毛の動きが“粘る”理由に関しては、水の粘性自体が温度の低下によって高くなるという物理的な要因に関係があると思われる。

26℃の高温下では、多くの繊毛が脱落しているように見えた。これは平成13年に水産総合研究所で行われた観察結果に一致する⁵⁾。このことは、この26℃という温度でホタテガイの繊毛細胞にストレスが過剰に、不可逆的にかかっていることを示唆し、またそれはこの温度下で間もなくホタテガイがへい死したことから支持される。この26℃における状態は、鰓の構造自体は保たれながらいわば麻痺のような状態に陥り、温度そのものによって致死が起こるわけではないと考えられた0℃の状態とは大きく異なる。26℃においては、繊毛その他を構成するタンパク質の変性など、より一般的で不可逆的な状態変化が引き起こされたと推定される。しかしながら興味深いことに、このように多くの繊毛が脱落しているような状態であっても、26℃の条件下で繊毛打を行っている繊毛は、20℃よりも高い繊毛打頻度を示した。繊毛打を連続して生み出すプロセスはあくまで温度依存的であることがうかがえる。ただし、このとき生み出される繊毛打のパターンは十分な打角を示していないように見え、また繊毛波として伝播しなかった。繊毛を構造的に維持する因子や正確な繊毛波を形成するのに関わる因子より、繊毛打のリズムを生む因子に大きな熱耐性があることが推定される。

本研究では、冬に陸揚げされた個体を冬に、夏に陸揚げされた個体を夏に、それぞれ標本を作製して繊毛運動の観察と繊毛打頻度の計測を行った。これまでに、さまざまな二枚貝において季節の違いによって順応温度が変わり、それにより鰓繊毛の活性が大きく変化することが報告されている^{6,7)}。今回の我々の研究はそれぞれの季節での限界とその限界温度での繊毛運動の様子を示すことはできたが、それぞれの順応温度における温度変化への応答性を見ることができたわけではない。ホタテガイにおける温度補償作用のパターンがどのようなものであるかを理解するには、今後のさらなる解析を必要とする。

少なくとも冬季の実験結果からは、サイズの違いや給餌条件の違いによる繊毛運動への影響は明確には見て取れなかった。繊毛運動が、栄養条件などの“履歴”を反映するよりむしろ、その場の環境要因に素早く応答する性質を持つことを示していると思われる。どのような水生動物においても、鰓は一般に、その動物と外界との接触面積が最も大きい組織である。そのことを考えれば、環境の変化に対する影響が鰓で早く表れるのは妥当だろう。今回、低温条件で解析した実験において、弘前大学への移送後、二日目に記録した繊毛打頻度は移送された当日に記録された繊毛打頻度に比べて有意に低いという結果が得られた。これについては、弘前で用意した人工海水を循環させた水槽の環境が平内の水産総合研究所のものとは大きく異なったことによる可能性がある。弘前の水槽内におかれて一晩でその環境に順化したのかもしれない。給餌の有無によって、繊毛打頻度に有意な差がなかったため、弘前の水槽に餌がなかったことがこの原因とは考えにくい。他方で、二枚貝の鰓繊毛運動の活性はpHや酸素濃度によって影響を受けうることが報告されているので^{3,4)}、そのような因子が変わったことにより影響を受けた可能性がある。

夏季の実験では、20℃においても26℃においてもサイズが大きい個体の方が、繊毛打頻度がわずかに高い傾向が見られた。その差は統計的には有意ではあったが、理由についてはよくわからない。26℃条件下では大きい個体の方が今回は早くへい死したことを考えあわせると、夏季においては、大きい個体の方が基礎代謝が高く、鰓繊毛運動に大きなエネルギー投資を行う可能性が考えられる。しかし、今回の実験は比較した2群間でのサイズ差も小さく、比較の試行数も少ないので結論を述べることはできない。さらなる注意深い実験を要する。

0℃では広い範囲で繊毛運動が停止し、また繊毛に顆粒状の構造が現れるように見えた。また26℃では、繊毛波が形成されず、またそれぞれの繊毛打が不完全であるように見えた。これは横方向に繊毛間の連携を担う因子が他の繊毛構成タンパク質よりも変性しやすいことを示していると思われる。どのような機能的形態が0℃や26℃でおかしくなるのか、電子顕微鏡を用いた研究などを行うことでさらに深く理解していくことができると考えられる。

謝 辞

本実験においては、大塚玄航氏、西野純子氏、伊藤香澄氏はじめ多くの弘前大学の学生によってデータ取得への協力が行われました。この場を借りて感謝します。

文 献

- 1) 森恭子・吉田達・伊藤良博・小谷健二・川村要 (2017) ほたてがい冬季へい死対策事業. 平成27年度青森県産業技術センター水産総合研究所事業報告, 373-426.
- 2) Jørgensen, C. B. (1982) Fluid mechanics of the mussel gill: The lateral cilia. *Mar. Biol.*, 70, 275-281.
- 3) Nomura, S. (1932) Studies on the physiology of ciliary movement. I. Effect of hydrogen ion concentration upon the ciliary movement of the gill of *Pecten*. *Sci. Rep. Tohoku Imper. Univ.*, IV. Ser. (Biol.), 7, 15-42.
- 4) 山元憲一・田中実・曾我部知徳・渡辺英悦 (1994) マシジミの鰓の繊毛運動と酸素消費に及ぼす塩分濃度, 低酸素と水温の影響. *水産増殖*, 42(2), 329-334.
- 5) 吉田達・小坂善信・中西廣義・大水理晴・鹿内満晴 (2003) 平成13年度ホタテガイ新基準種苗養殖技術開発研究(ホタテガイの健康評価と養殖技術の改善に関する研究). 平成13年度青森県水産増殖センター事業報告, 165-186.
- 6) 山元憲一・半田岳志・河邊博 (2012) ハマグリの酸素摂取と鰓繊毛運動に及ぼす水温上昇の影響. *J. Natl. Fish. Univ.*, 60(2), 123-127.
- 7) 山元憲一・半田岳志 (2012) ムラサキイガイ, ミドリイガイとムラサキイコガイの鰓繊毛運動の温度補償. *J. Natl. Fish. Univ.*, 61(2), 75-78.