

エダアシクラゲの卵サイズの計測

星尚仁¹, 出口竜作²

¹宮城教育大学大学院 理科教育専修, ²宮城教育大学 理科教育講座

エダアシクラゲ (*Cladonema pacificum*) には、暗期から明期への移行(明刺激)によって卵や精子を放出する明タイプと、逆に明期から暗期への移行(暗刺激)によって放出する暗タイプが存在する。明タイプと暗タイプでは、雌の放出する卵のサイズが異なると考えられているが、詳しくは分かっていない。今回、画像解析ソフトである ImageJ を用いた卵サイズの計測方法について検討するとともに、両タイプの親および子から得られた卵のデータを解析した。

キーワード: 卵径、有性生殖、刺胞動物、種分化、生殖隔離

1. はじめに

有性生殖によって子孫を残す動物において、雌の親が作る卵のサイズは適応度(ある個体がある環境下でどれだけ多くの子を残せるかの尺度)を左右する[1, 2]。一般に、大きな卵を産めば生存率を高めることができるが、卵に投資できるエネルギーは限られているため、数を減らさなければならない。逆に、小さな卵を産めば子の数を増やせるが、生存率を下げることになる。したがって、地球上の多様な動物は、それぞれの生息環境に応じた最適な卵サイズを決め、適応度を高めていると考えられる。

卵サイズは、基本的には動物の種ごとに決まっている。例えば、硬骨魚類において、アユやクロマグロの卵の直径(卵径)はおおよそ 1 mm であるのに対し、サケ(シロザケ)の卵(いわゆるイクラ)は卵径 7 mm を超える[2, 3]。一方、同一種においても卵径は可塑的に変化することが知られている。例えば、クロマグロやカタクチイワシなどは、低い水温では比較的大きな卵、高い水温では比較的小きな卵を産む[2, 3]。低水温期には餌も捕食者も少ないのに対し、水温の上昇に伴ってこれらが増加してくることなどを考えると、適応度を高める上で理にかなった戦略であると思われる。季節による卵サイズの変化は、ヤドカリなどの無脊椎動物においても見られている[4]。

エダアシクラゲ(刺胞動物門ヒドロ虫綱)は、日本全国の沿岸の藻場に生息しており、採集や飼育が容易な種として知られている[5]。東北地方では、太平洋側、陸奥湾、日本海側の漁港などで生息が確認されている[5, 6, 未発表データ]。性的に成熟したクラゲは、雌であれば卵を、雄であれば精子を体外に放出し、受精卵を生じる。このようなエダアシクラゲの配偶子放出(放卵・放精)は、光変化によって誘起される。興味深いことに、陸奥湾や日本海側で採集された個体は、主に暗期から明期への移行(明刺激)に反応して放卵・放精を行う「明タイプ」であるのに対し、太平洋側で採集された個体は、主に明期から暗期への移行(暗刺激)に反応する「暗タイプ」である[6, 未発表データ]。明タイプどうしの交配は明タイプを、暗タイプどうしの交配は暗タイプを生じるため、この形質は環境ではなく、遺伝によって決定されることが考えられている[6]。

フィールドで採集されたエダアシクラゲの明タイプと暗タイプの間には、卵サイズにも違いが見られており、明タイプのほうが暗タイプよりも卵径がわずかに大きい傾向にある[未発表データ]。しかしながら、採集場所や採集時期が異なることや、同一個体が一回に放出する卵においてもサイズにばらつきが見られることなどから、卵サイズの違いが遺伝と環境の

どちらで決定されているのかは不明である。また、卵サイズの計測には、放出された卵とマイクロメーターの顕微鏡写真を撮り、それらの画像を同一縮尺でパソコンの画面に表示し、定規を用いて長さを計測して最終的に換算値を算出するという方法が一般に用いられてきたが、その信頼性や効率性について評価がなされたことはない。そこで、本研究では、定規を用いた方法に加え、フリーの画像解析ソフトである ImageJ を使用した卵サイズの計測方法について検討するとともに、明タイプと暗タイプの卵サイズの違いが遺伝形質と言えるかどうか比較解析を行った。

2. ライフサイクルの制御と交配

本研究では、研究室で維持している明タイプの系統（青森県青森市浅虫で採集された個体の子孫である雌の AC 系統と雄の AA 系統）と暗タイプの系統（宮城県塩竈市浦戸野々島で採集された個体の子孫である雌の NON5 系統と雄の UN2 系統）を親として用いた。また、出口と伊藤（2005）の方法にしたがって、飼育を含めたライフサイクルの制御を行った。

交配の際は、まず、性的に成熟したクラゲを雌雄および明暗タイプが混在しないようにそれぞれ 4 つの容器に分け、明タイプには明刺激、暗タイプには暗刺激を与えることでそれぞれの配偶子を得た。続いて、未受精卵の入った容器に同じタイプの精子を加えることで同じタイプどうしの交配を行った。このようにして得た受精卵は発生を進行し、翌日にはプラヌラ幼生へと発生した。その後、プラヌラ幼生は受精から 1 週間程度で自発的にポリプへと変態した。餌としてアルテミア (A&A Marine) の孵化直後の幼生を与えて飼育したところ、ポリプはストロンを伸長させ、無性的に新たなポリプを増やすようになった。ポリプが 2~4 本に増えた段階で、竹串を用いて 1 本のポリプを基部より切り取り、別の容器に個別に移植する

ことで、クローンの系統を確立した。これらの子のうち、雌のクラゲを生じるようになった明タイプの 2 系統 (LL3 と LL7) と暗タイプの 2 系統 (DD9 と DD11) を、親の AC 系統や NON5 系統とともに、以下の解析に使用した。

3. 卵サイズの計測方法の検討

卵サイズの計測方法を検討するために、まず、エダアシクラゲの卵に見立てた同じ大きさの黒丸（正円）を 10 個配置した 3840×2160 ピクセル (px) の画像を作成した（図 1）。次に、この画像ファイルを ImageJ で開き（比較のために、すべて 25% の倍率で画面に表示した）、黒丸のピクセル単位での直径を、以下に示す 4 つの方法でそれぞれ 3 回ずつ計測することにより、直径と所要時間の平均値や標準偏差を求めた。

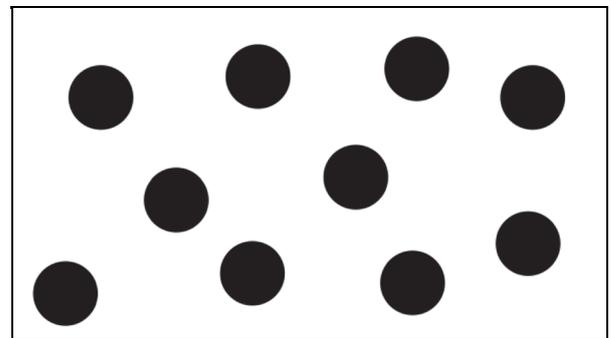


図 1 計測方法の比較のために作成した画像

3.1 画面上に定規を当てる方法（定規法）

パソコンのモニター上に定規を当てて、直径と判断した部分の長さを最小目盛の 1/10 (0.1 mm) まで読み取り、その長さを記録した。この操作を計 10 個の黒丸に対して繰り返した。その後、画面上の 1 cm が何ピクセルに相当するか計算し、読み取り値をピクセル数に換算したが、この操作に要した時間は所要時間には含めなかった。定規法については、画

面上の表示倍率が通常(25%)のとき(×1 定規法)とともに、2 倍に拡大して 50%にしたとき(×2 定規法)の結果も取得した。

3.2 ImageJ で線を引く方法 (直線法)

ImageJ の直線ツールを使用して、直径と判断した部分に線を引き、キーボードの M キーを押すことで、線の長さを計測した。この操作を計 10 個の黒丸に対して繰り返した後、Results ウィンドウに表示されている長さ(Length)の値をコピーし、表計算ソフトのシートに貼り付けた。

3.3 ImageJ で円を描く方法 (正円法)

ImageJ でフェレ径が計測できるように、事前に [Analyze] - [Set Measurements...]と選択し、Feret's diameter にチェックを入れて[OK]を選択した。この操作は、初回に行った後は必要がなくなるため、所要時間には含めなかった。次に、画像ファイルを開き、円ツールを使用して Shift キーを押しながら黒丸に重なるように正円を描画し、キーボードの M キーを押してフェレ径を計測した。直線法と同様に、この操作を繰り返し、結果を表計算ソフトのシートに貼り付けた。なお、正円の場合、最大フェレ径 (Feret)と最小フェレ径 (MinFeret)は理論上一致するはずであるが、わずかな(1 ピクセル程度の)値のずれが生じた。今回は、最小フェレ径の値を使用した。

3.4 ImageJ で自動計測する方法 (理論法)

[Image] - [Adjust] - [Threshold...]により、黒丸部分のみを選択し、[Analyze] - [Analyze particles...]によって自動的に(人の手で線や円を描画することなしに)計 10 個の黒丸の最小フェレ径(理論値)を求めた。

3.5 各計測方法の比較

各計測方法によって得られた直径の値(プロット: 平均値、エラーバー: 標準偏差)を図2に示す。×1 定規法では平均値において理論値と 5 ピクセル以上のずれが生じてしまったが、それ以外の方法では理論値と同程度の値を得ることができた。また、それぞれの計測方法の所要時間(10 個分の計測のために要した時間)は、定規法(特に×2 定規法)が最も長くなることが分かった(図3)。所要時間には含めていないが、定規法では、表計算ソフトに値を入力する時間も必要になる。

直線法や正円法の場合、上記の方法のほかに、[Analyze] - [Tools] - [ROI Manager]を選択して ROI Manager ダイアログを表示し、直線や円を描くごとにキーボードの T キーを押して値を登録していき、最後に Measure ボタンを押して一括して計測する方法もある。この方法の利点としては、対象物が多い場合に、どれを計測したか(していないか)を正確に把握できることなどが挙げられる。

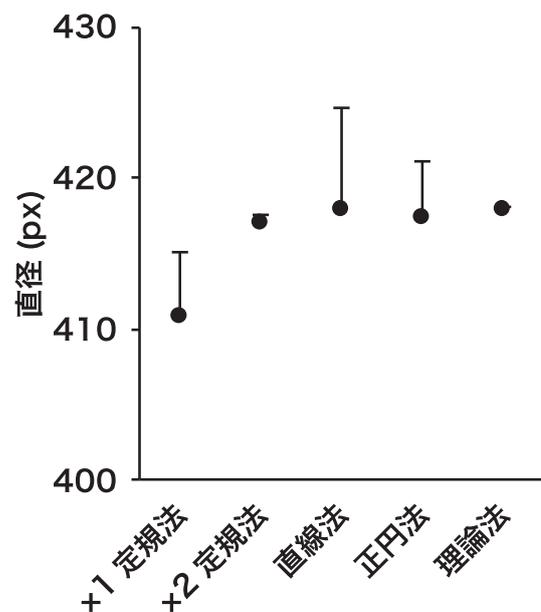


図2 各計測方法により求めた直径

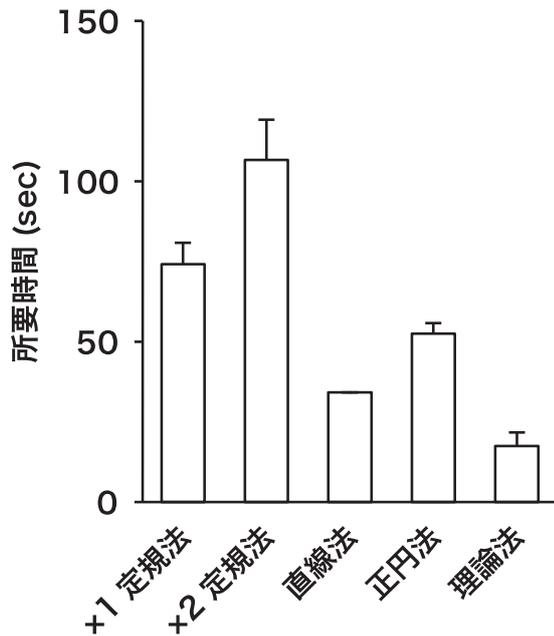


図3 各計測方法の所要時間

4. 明タイプと暗タイプの卵サイズの比較

エダアシクラゲの卵径を計測する際には、浸透圧を揃えるため、人工海水 SEALIFE (マリンテック) を 35 g/L の割合で脱イオン水に溶かした海水を使用した。それぞれ明刺激と暗刺激によって放出させた明タイプ (AC, LL3, LL7) と暗タイプ (NON5, DD9, DD11) の卵を、倒立顕微鏡 (TE300, Nikon) に取り付けたビデオカメラ (HDR-CX550V または HDR-XR520V, Sony) で撮影し、卵の透過光像 (図4) を得た。また、マイクロメーターも同倍率で撮影しておき、ImageJ で [Analyze] - [Set Scale...] により表示させたダイアログでスケール情報を設定した。また、このダイアログの Global にチェックを入れることで、他の画像にも同じスケール情報が適用されるようにした。

黒丸の計測においては、理論法が最も速かつ正確であったが、卵の透過光像はコントラストが弱く、バックグラウンドよりも卵のほうが色の薄い部分もあったことなどから、この方法を使用することはできなかった。そこで、本研究では正円法を採用し、各系統 6 個体から得られた 300 個の卵 (1 個体あたり 50 個の卵を無作為に選択) の卵径を計測した。その際、卵の輪郭が見えにくい場合には、[Image] - [Adjust] - [Brightness/Contrast...] によりコントラストを調整した。また、[Edit] - [Options] - [Colors...] により、描画する線の色を視認しやすい色に変更した。

図5と図6は、明タイプと暗タイプの親と子から得られた卵径のデータをヒストグラムで表したものである。親、子にかかわらず、明タイプのほうが暗タイプよりも卵径が大きいことが分かる。系統ごとの平均値と標準偏差は、明タイプの AC 系統が $88.3 \pm 3.1 \mu\text{m}$ 、LL3 系統が $91.7 \pm 3.9 \mu\text{m}$ 、LL7 系統が $88.1 \pm 3.8 \mu\text{m}$ 、暗タイプの NON5 系統が $82.5 \pm 3.3 \mu\text{m}$ 、DD9 系統が $81.7 \pm 1.9 \mu\text{m}$ 、DD11 系統が $81.3 \pm 3.7 \mu\text{m}$ となり、いずれの明タイプと暗タイプ間においても有意な差 ($P < 0.001$, Student's *t* test) が認められた。

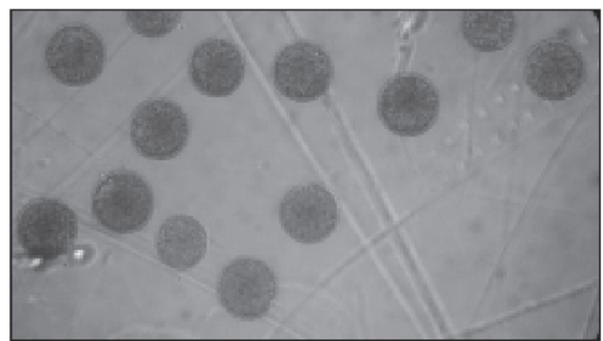


図4 LL7 系統より得られた卵の透過光像

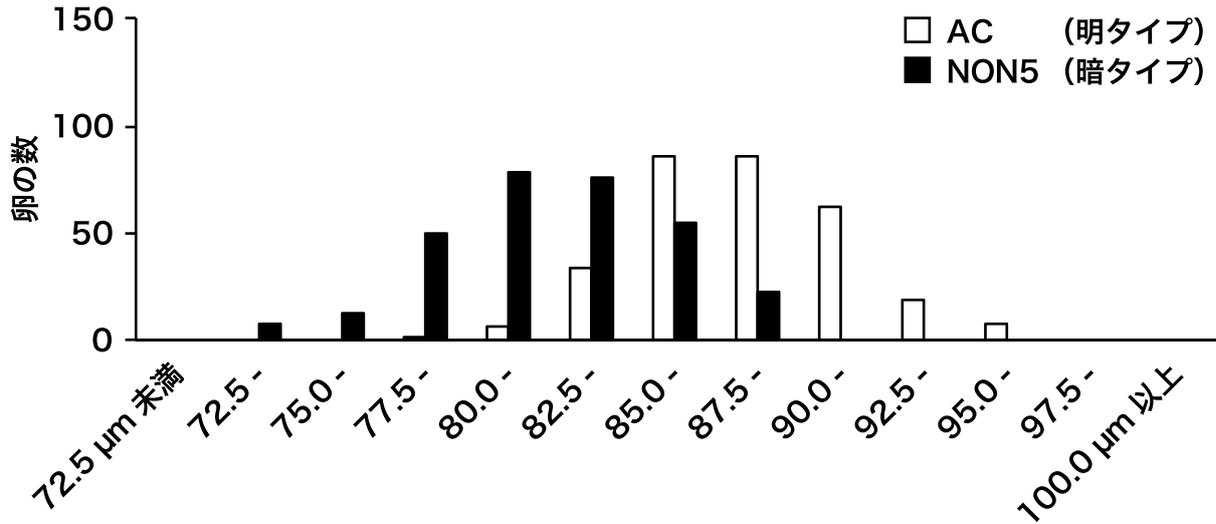


図5 明タイプと暗タイプの親における卵径のヒストグラム

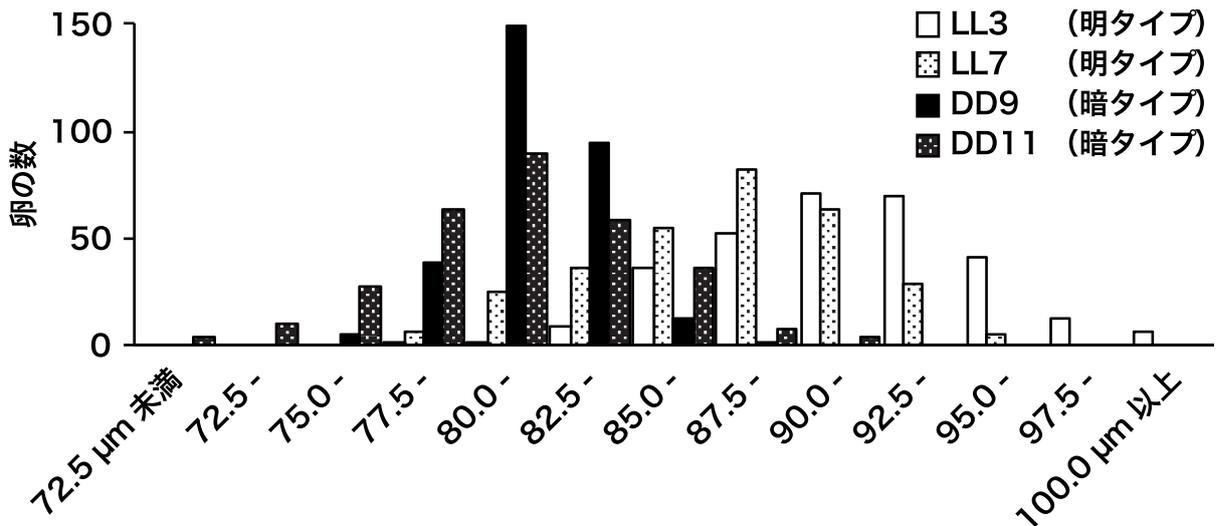


図6 明タイプと暗タイプの子における卵径のヒストグラム

5. おわりに

本研究により、従来からの卵径の計測方法(定規法)の妥当性が確認された。ただし、精度の高い計測のためにはパソコンの画面上で十分に拡大する必要があり、計測に時間がかかる点などを考慮すると、ImageJを用いた直線法や正円法のほうがより簡便であると考えられる。卵が小さいびつで、どの部分を直径とするか迷うような場合には、正円法

が有効かもしれない。主観を全く入れずに計測するためには、理論法のような自動的な方法が望ましいが、今回用いたような卵の透過光像には適用できなかった。顕微鏡写真の撮影条件を含め、今後の検討が必要である。

正円法により卵径を算出し、卵サイズを比較したところ、親と子のどちらにおいても、明タイプのほうが暗タイプよりも有意に大きいことが確認された。今回

用いた明タイプと暗タイプは基本的に同一条件下で飼育され、ライフサイクルの各段階が制御されていたことから、卵サイズには少なくとも遺伝的要因が関与していることは確かなのであろう。ただし、最初に述べたように、環境的要因によって卵サイズがさらに変化するという可能性は、エダアシクラゲでも残されている。

以前は単一種とされていた日本に生息するゴカイは、今ではヤマトカワゴカイ、ヒメヤマトカワゴカイ、アリアケカワゴカイの3種に分類されているが、これらの卵サイズには明確な差がある(それぞれの卵径の分布は、130~170 μm 、200~250 μm 、180~210 μm) [7]。ヤマトカワゴカイとヒメヤマトカワゴカイでは、生殖様式や初期発生のための好適塩分などが大きく異なることから、両種の間には完全な生殖隔離が成立していると考えられている[7, 8]。一方、ヤマトカワゴカイとアリアケカワゴカイでは、生殖様式や発生条件などが共通しており、室内実験のみならずフィールドにおいても交雑が生じている可能性が指摘されている[9]。エダアシクラゲの明タイプと暗タイプの間には、ゴカイほど明確な卵サイズの差はなかった。放卵・放精のタイミングの違いから、両者では生殖隔離が成立している可能性が高いが、別種と判断するにはまだまだ情報が乏しい。交配実験やミトコンドリアDNAを用いた分子系統解析などを含め、多方面からの検討が必要である。また、なぜ明タイプのほうが暗タイプよりも大きな卵を放出するのか、その生理的意義を明らかにすることも重要であろう。

参考文献

- [1] Smith, C. C., Fretwell, S. D.: The optimal balance between size and number of offspring, *Am. Nat.* Vol. 108, pp. 499-506 (1974).
- [2] 後藤晃, 井口恵一朗: 水生動物の卵サイズ—生活史の変異・種分化の生物学, 海游舎 (2001).
- [3] 升間主計, 手塚信弘, 小磯雅彦, 神保忠雄, 武部孝行, 山崎英樹, 尾花博幸, 井手健太郎, 二階堂英城, 今泉均: 養成クロマグロの産卵に及ぼす水温の影響, 水産総合研究センター研究報告 別冊4巻, pp. 157-171 (2006).
- [4] 中野玲子, 石原(安田)千晶, 古賀庸憲: ユビナガホンヤドカリ *Pagurus minutus* における同一繁殖期中の抱卵数と卵径の時間変動, 日本ベントス学会誌 71巻, pp. 32-36 (2016).
- [5] 出口竜作, 伊藤貴洋: エダアシクラゲの採集とライフサイクルの制御—モデル動物・教材動物としての確立をめざして—, 宮城教育大学紀要 40巻, pp. 107-119 (2005).
- [6] 出口竜作, 青木瞳, 松田聖, 佐藤英樹: エダアシクラゲの放卵・放精の光条件, 宮城教育大学紀要 43巻, pp. 89-95 (2008).
- [7] 佐藤正典: 多毛類の多様性と干潟環境: カワゴカイ同胞种群の研究, 化石 76巻, pp. 122-133 (2004).
- [8] Sato, M., Tsuchiya, M.: Reproductive behavior and salinity favorable for early development in two types of the brackish-water polychaete *Neanthes japonica* (Izuka), *Benthos Res. (Japan)* Vol. 31, pp. 29-42 (1987).
- [9] Tosuji, H., Sato, M.: Salinity favorable for early development and gamete compatibility in two sympatric estuarine species of the genus *Hediste* (Polychaeta: Nereididae) in the Ariake Sea, Japan, *Mar. Biol.* Vol. 148, pp. 529-539 (2006).