

乾眠(*cryptobiosis*)する生物の特性を調べる

稲吉瑞歩 鎌田紘輝 神村遥登 小牧一希 椿野泰生 山口颯太 吉田智昭
兵庫県立神戸高等学校 総合理学科 2年

乾眠と呼ばれる特殊な休眠状態を取るヨコヅナクマムシ *Ramazzottius varieornatus*, ネムリユスリカ *Polypedilum vanderplanki* を用いて乾眠を経て記憶を保持するかを調べるため実験を行った。主に光刺激に対する反応を調べた。またその結果からネムリユスリカで連合学習を試みたが、期待した結果は得られなかった。

1. 緒言

1.1. 研究の背景

乾眠とは体内の水分を減らし代謝を止める休眠状態のことで、水が与えられると休眠状態から復活する。乾眠する生物が学習するかといった先行研究もほとんど行われていない。

1.2. 実験仮説と目的

乾眠する生物は記憶が乾眠を通して維持されると仮定し実験を行った。

本実験は *Ramazzottius varieornatus* (以下, ヨコヅナクマムシ), *Polypedilum vanderplanki* (以下, ネムリユスリカ), *Hypsibius dujardini* (以下, ドウジャルダンヤクマムシ) が受容する刺激を調べることを主目的とする。

2. ヨコヅナクマムシを用いた実験

2.1. ヨコヅナクマムシについて

学名 *Ramazzottius varieornatus* で緩歩動物門に属する緩歩動物の一種。交尾を行うことなく一匹で生殖をすることができる。陸生であり、緩歩動物の中では最も高い乾燥耐性を持つ。乾眠するときは体を収縮させ、“タン(樽)状態”になる。また、眼点を持たないという特徴もある。なお、緩歩動物の専門家の数が極めて少ないためヨコヅナクマムシは受容する刺激など基本的な情報について文献によって記述が異なるなどわかっていないことが多い。ヨコヅナクマムシは緩歩動物の中でも食性が判明している数少ない種である上、寒天培地上で培養することができ他の緩歩動物よりも飼育が容易である。そのため本実験ではヨコヅナクマムシを被験生物として選定した。ヨコヅナクマムシは本実験では埼玉県立川越高等学校生物班から提供されたヨコヅナクマムシを使用する。

2.2. 飼育環境

22℃でインキュベーター内に設置した直径 50 mm, 深さ 15mm のシャーレにまいた寒天培地の中で飼育した。餌は緑藻類の *Chlorella vulgaris* (生クロレラ V12, クロレラ工業株式会社) を水 (Volvic™, ソシエテ・デ・ゾー・ド・ボルヴィック社, フランス) で 0.2% に薄めて

使用した。寒天培地は 8:00~17:00 の間, 白色蛍光灯を当てる。水が多いと個体が浮くため, 水深 1mm 程度に保った。

2.3. 乾眠への導入実験

目的

乾眠状態になることを確認し, 導入するために必要な条件を決定する。川越高校の実験を追試する。

方法

直径 50mm 程度のろ紙, 時計皿, 30 mm の正方形に切った 5 μm ナイロンメッシュを用意する。急激に水分が減らないよう, ろ紙を湿らせ時計皿に張り付けその上にナイロンメッシュを引く。その中心部にヨコヅナクマムシを 5 匹ほど配置し湿度を保つため時計皿ごとタッパーに入れて密閉する。3 時間程度, 直射日光の当たらない所に放置し, 双眼実体顕微鏡で樽状態になっているか確認し, そのまま一日放置した。ろ紙を完全に乾燥させ, 数日間放置した。水でろ紙を湿らせ, 再び動き出す様子を確認した。

結果

10 匹中 8 匹が乾眠から復活した。

2.4. 平常時の行動を調査する実験

目的

飼育している環境での行動の特性を調べる。

方法

450 lx の場所に 8 匹のクマムシが中心付近にいる直径 25cm, 深さ 15mm のシャーレを置く。15 分間ヨコヅナクマムシの様子を動画で撮影し, クマムシが移動した軌跡を kinovea (<https://www.kinovea.org/>) により解析する。

結果

特徴的な行動は観察されなかった。また, 10 秒間の移動距離の最大値は 7 mm を超えていた。1 個体は撮影する範囲から出てしまったため 7 匹分の軌跡を分析した。

考察

移動距離の長さから, 光が一様に当たっている場合でも活発に動いていたことがわかり, 餌がない場合でも餌となるものを探すために動き回っていると考えら

れる。また、明らかに行動がワンパターンであるとは観察できず、目的を持って動いていないように見受けられる。強い光が当たると行先に明確な目的を持ち動くようになるなどの行動の変化がみられるかもしれない。

2.5. 磁場への反応を調査する実験

目的

磁場があるときのクマムシの行動の変化を調べる。

方法

高さ 20 mm, 直径 10 mm の円柱型ネオジム磁石を直径 6 mm のシャーレ中央に横倒しにして置きその上から寒天培地を磁石が 1 mm 程度沈むようにまいた。その寒天培地の上にヨコヅナクマムシ 30 匹を全体的にまばらに置いた。そして 10 分おきに真上から写真を撮影し、個体の位置を kinovea により座標に変換し記録した。

結果

行動の変化はみられなかった。

2.6. 光への反応を調査する実験

目的

ヨコヅナクマムシの明るさの嗜好の有無を調べる。さらに、絶食状態・非絶食状態における明るさの走性への影響を調べる。

(1) 直径 5 mm の寒天培地を用いた実験

方法

直径 50 mm, 深さ 15 mm の寒天培地に真上から 3000 lx の白色光を当て、半面の半円の分だけ黒画用紙で遮光した。中央部にそれぞれ前日から暗所で餌なしで飼育したヨコヅナクマムシ(絶食状態)を置いた。最初にいる位置と 1 時間後の位置を記録し分析する。前日か

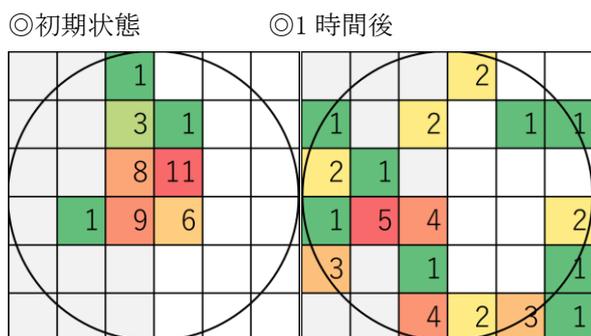


fig. 1

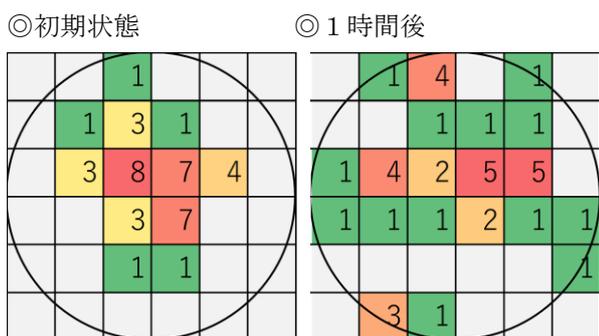


fig. 3

ら暗所で餌を与えて飼育したヨコヅナクマムシ(非絶食状態)を用いても同じように実験した。また対照実験として全面を暗くし、同様に実験することで対照実験とした。以下、光が当たっている半円の部分を明所、当たっていない場所を暗所とした。

結果

非絶食状態・fig.1/絶食状態・fig.2で示している(左3列を暗所,右3列を明所としている)。全面遮光した対照実験の結果は非絶食状態・fig.3/絶食状態/fig.4で示した。また、マスには個体数に比例して色をつけた。

明所にいるヨコヅナクマムシはフチの近くによって一方で暗所にいるヨコヅナクマムシ偏りなく分布していた。なお、絶食状態でも非絶食状態であっても同じような特徴を示した。対照実験では個体は全体に偏りなく分布した。

考察

暗所にいる個体はランダムに移動しているが、明所で移動に偏りがみられたことからクマムシは光により行動に何らかの影響を受けていると思われる。学習に有用な光の走性がある可能性が示唆された。また、明所にいる個体は培地の端付近に集まったのは暗所がどこにあるかを察知できなかったためであると仮定し、次に示す、直径 20 mm の寒天培地を用いた実験を行った。

(2) 直径 20 mm 寒天培地を用いた実験

目的

暗所にとどまる性質があるという仮定から行動範囲を狭めるため、より小さいシャーレで実験を行い、暗所

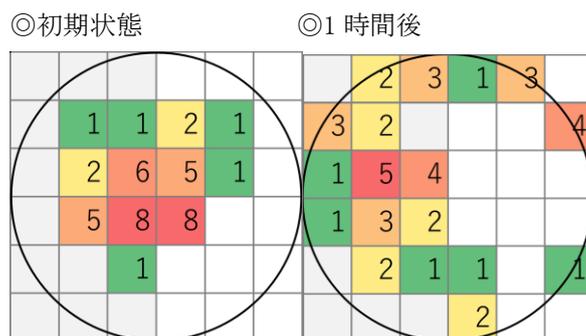


fig. 2



fig. 4

time	0	10	20	30	40	50	60
明所	10	10	11	10	9	9	9
暗所	8	8	7	8	9	9	9

fig. 5

と明所の個体数の違いが生まれるかを観察する。

方法

直径 20mm の寒天培地に 3000 lx の白色光を当て、実験 2.6(1) 同様に寒天培地の半面を暗くする。中心部に非絶食個体 6 匹を配置し、10 分ごとにその位置を記録する。これを 3 回実施する。

結果

fig. 5(※三回分の合計個体数を記載している。)

明所、暗所において差は見られない。明所にいる個体は明所と暗所の境界付近から、明所の中央部にかけて分布していた。

考察

この実験結果においては、分布の特徴が実験 2.6(1) とは大きく異なっており、クマムシに明るさの嗜好は見られなかった。このことの原因として、光が真上から当たっていても、寒天培地が入っているシャーレや寒天培地からの反射、光源の角度などの影響により明所の中でも明るさに差が生まれていたことなどが考えられる。しかし、これらの 2.6 の実験で光の有無により行動に差がみられることからクマムシは何らかの形で光の刺激を受容していることが示唆される。

2.7. 結論

2.5 から磁場に反応することはない可能性が高いとわかった。また、光への反応を調べる実験 2.6 では、その実験方法だと別の原因により行動が変化してしまった可能性があるものの、光刺激により何らかの行動の変化を引き起こす可能性があることが示唆された。

2.8. ネムリユスリカについて

ナイジェリアなどアフリカの半乾燥地帯に生息している昆虫である。幼生の時期に乾眠することで知られており、体長は 1mm 程度と観察しやすい。本実験では理化学ショップドットコムで購入した幼生を使用した。

2.9. 飼育方法

180mm 四方の水槽をヒーターで 20°C に保つ。ポンプによりエアレーションをした。エサは金魚の餌(テトラフィンカラー)を与えた。

2.10. 電気、光刺激への反応を調査する実験

(1) 電気を流しその時の反応をみる。

方法

28°C 脱塩水と塩化ナトリウムをビーカーに入れ、そこにネムリユスリカを入れる。そこに電圧 15 V の電気を電流 40 mA~450 mA に変化させて流し、反応を見る。

仮説

電気を流すことによって激しく運動するなどの強い忌避反応を示す。

結果

ネムリユスリカの動きが鈍くなったように見えたが、痙攣等、顕著な運動の変化は認められなかった。

(2) 光刺激に対する反応を調べる

方法

まず、直径 150 mm、深さ 20 mm のシャーレに、寒天培地を 5mm 敷き、28°C 脱塩水を入れる。

シャーレを半分に分けて、光を当てている領域を A、光が当たっていない領域を B とする。A に 3000 lx の光を光源装置で当てて、中心線上にユスリカを置いた。光を当ててから 30 分後、体の個体を用いて A に行ったユスリカの個体数と、B に行ったユスリカの個体数の比を調べた。

同様の実験を 10000, 15000, 30000, 35000, 40000 lx でも行った。なお、A に偏った場合、光に対して誘引(正の走性を持つ)と判定し、逆に B に偏った場合、忌避(負の走性を持つ)と判定し、ほとんど移動が見られなかった場合は中立(走性を持たない)と判定した。

また、3000 lx を主に調べるため 50 匹で実験、他の明るさでは 10 匹で実験した。

結果

A : B の個体数の比は約 9 : 1 になった。

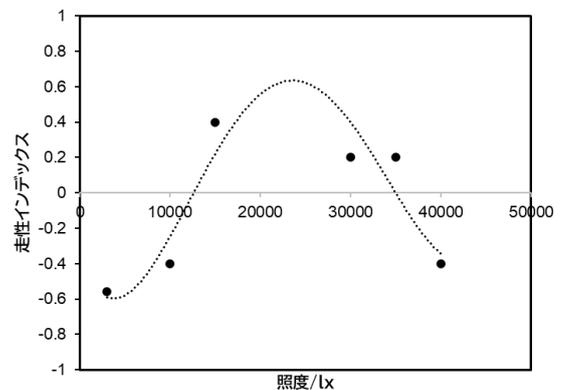


fig. 6

※縦軸は走性インデックス(後述)。横軸は lx。また、近似曲線は以下に示す 4 次の多項式関数。

$$y = 8 \times 10^{-18}x^4 - 8 \times 10^{-13}x^3 + 2 \times 10^{-8}x^2 - 10^{-4}x - 0.3828$$

fig. 6 に示すグラフは誘引された個体と忌避した個体の数を以下に示すとおりに計算しプロットしたものである。走性の評価には、その刺激に対してどれほど誘引されるかを示す、走性インデックスという値を利用することにした。(誘引個体数-忌避個体数)/(実験個体数)で求められる。(広津崇亮, 生物そのものを利用したバ

イオセンサー-線虫嗅覚によるがん診断-, 2018 より)

考察

fig. 6 よりネムリユスリカは, 3000~10000, 4000 1x ~において負の光走性があるものの, 20000~25000 1x においては正の光走性があると考えられる。

光走性はある生物種において、正か負か固定されているのではなく、変化することがわかった。

fig. 6 グラフのような形になることがわかった。

2.11. バニリンに対する反応を調べる

目的

ネムリユスリカの記憶が乾眠を経ても引き継がれることを調べるために、ネムリユスリカにバニラエッセンスに対する走性があるかどうかを確かめた。

方法

直径 150 mm のシャーレを、直径を境目に 2 分割し、片方を A、もう一方を B とする。境目にユスリカを配置し、A の中央部にバニラエッセンスを数滴落として、30 分後の A にいる個体数と B にいる個体数の比を調べる。

結果

ネムリユスリカのバニリンに対する反応は見られなかった。誘引個体:中立個体:忌避個体=3:3:4

考察

以上の結果からネムリユスリカはバニリンに対して走性を持たない、もしくはバニリンを受容しないということが考えられる。

2.12. 刺激を用いた学習ができる可能性を調べる

目的

負の光走性とバニリン(バニラエッセンス)を用いてネムリユスリカに連合学習させる。そして、本来中立、もしくは受容しないはずのバニリンに対して、負の光走性を持たせるといふ学習を行う。

方法

直径 90 mm の時計皿を 10 ml の水で満たし、ネムリユスリカを置き、バニラエッセンスを 0.050 ml 滴下し、同時に光源装置で 3000 lx の光を一時間照射した。その後ネムリユスリカを脱塩水で満たしたビーカーに移した。

以上の作業を数回繰り返したのち、その操作を経たネムリユスリカを用いて 3.4 の実験と同様の操作を行い、バニリンに対する反応を観察した。

結果

連合学習をしたネムリユスリカはバニリンに対して忌避をはじめとする何らかの反応を示すということはなかった。

誘引個体 : 中立個体 : 忌避個体 = 0 : 12 : 2

2.13. 結論

光の強さと走性インデックスには相関があるとわかった。一部の個体が忌避ということになっているのもランダムに個体が移動したと考えられる。他にもエサとバニリンを用いて連合学習を試みたが、ネムリユスリカがエサに誘引されなかった。連合学習は別の刺激や物質を用いて行う必要があることが分かった。

3. ドウジャルダンヤマクマムシを用いた実験

3.1. ドウジャルダンヤマクマムシについて

体長 1 mm 以下の微小生物で池に生息する。乾眠することができるが、乾眠耐性は弱い。SCIENTO (<http://www.sciento.co.uk/>, イギリス)から購入した。飼育時、餌にはクロロコキウムを使用した。

3.2. 実験概要

ドウジャルダンヤマクマムシは無色であるため、肉眼で観察することができず、ヨコヅナクマムシと同じ実験方法で実験を進めることができず、光走性などを調べる実験を行うことができなかった。

4. おわりに

埼玉県立川越高等学校にはヨコヅナヨコヅナクマムシの提供、飼育法や多くの助言をいただきました。国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構の黄川田隆洋教授にはネムリユスリカについて研究の進め方などの有益な助言をいただきました。実験を監修して下さった片山貴夫先生、繁人克彦先生、そしてサイエンスアドバイザーの方から助言や指摘をいただきました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

[参考文献・参考 URL]

クマムシトリビア総集編

[HTTP://HORIKAWAD.HATENADIARY.COM/ENTRY/20111219/1324250765](http://horikawad.hatenadiary.com/entry/20111219/1324250765)

クマムシ研究日誌 堀川大樹 2015 東海大学出版

クマムシ?! 小さな怪物 鈴木忠

クマムシ博士の「最強生物」学講座 堀川大樹 2013 新潮社
黄川田隆洋, ネムリユスリカの不思議な世界, ヴェッジ選書, 2014

十亀陽一郎, 黄川田隆洋, ネムリユスリカの極限的な乾燥耐性のしくみ なぜ干からびても死なないのか, 2016

黄川田隆洋, どこまでネムリユスリカの乾燥耐性の秘密は解明されたのか, 2017

「世界初! クマムシの新クリプトバイオシスの発見!」

[HTTPS://WWW.SHIZECON.NET/AWARD/DETAIL.HTML?ID=323](https://www.shizecon.net/award/detail.html?id=323)

広津崇亮, 生物そのものを利用したバイオセンサー-線虫嗅覚によるがん診断-, 2018

SLEEPING CHIRONOMID * ネムリユスリカって?

[HTTPS://WWW.NARO.AFFRC.GO.JP/ARCHIVE/NIAS/ANHTDROBIOSIS/SLEEPING%20CHIRONOMID/ABOUT-YUSURIKA.HTML](https://www.naro.affrc.go.jp/archive/nias/anhtdrobiosis/sleeping%20chironomid/about-yusurika.html)