HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	オニクマムシMilnesium tardigradumの樽化から復帰に至る過程で取り込まれた気泡の役割
Author(s)	伊勢, 昌宏; 中谷, 敏邦; 石原, 千晶
Citation	北海道大学水産科学研究彙報, 74(1), 1-11
Issue Date	2024-08-04
DOI	https://doi.org/10.14943/bull.fish.74.1.1
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92921
Type	departmental bulletin paper
File Information	bull.fish.74.1.1.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北 大 水 産 彙 報
74(1), 1–11, 2024.
DOI 10.14943/bull.fish.74.1.1

オニクマムシ *Milnesium tardigradum* の樽化から復帰に至る過程で取り込まれた気泡の役割

伊勢　昌宏[1)]・中谷　敏邦[1)]・石原　千晶[2)]

(2024 年 3 月 21 日受付，2024 年 4 月 3 日受理)

Function of Bubble for Recovery from Cryptobiosis in Tardigrade *Milnesium tardigradum*

Masahiro Ise[1)], Toshikuni Nakatani[1)] and Chiaki I. Yasuda[2)]

Abstract

Tardigrades enter a cryptobiotic state (barrel-shaped form) to persist in extreme environments, but there are few experimental observations to examine how complete recovery from this state occurs. Here, we directly observed the tardigrade *Milnesium tardigradum* in the cryptobiotic and active states under the microscope with a video system. Rates of complete recovery of cryptobiotic organisms with or without cover glasses were 71.4% and 73.3%, respectively, suggesting no effect of the cover glass on the recovery success in this species. More than 50% of organisms showed bubbles in the mouth canal during the recovery process regardless of the recovery success. Since these bubbles disappeared just before the recovery at the end of the mouth canal, but did not flow into the pharynx, bubbles might flow into the body cavity and regulate the intracorporeal pressure during recovery. Bubbles were also observed in the mouth canal of active organisms entering the cryptobiotic state. Bubbles therefore occurred in both cryptobiotic-to-recovery and active-to-cryptobiotic processes. The end of the mouth canal in *M. tardigradum* might function as a barrier between the external and internal environment and contribute to the regulation of hydrostatic pressure in the body cavity.

Key words : Tardigrade, *Milnesium tardigradum*, Cryptobiosis, Bubbles, Recovery

緒　　言

オニクマムシ *Milnesium tardigradum* は緩歩動物門に属し，世界中に広く分布するコスモポリタンな種である (Bertolani and Grimaldi, 2000)。本種を含むクマムシ類 (Tardigrades) は海洋底堆積物中から陸水域まで広く分布し (Greven, 1984)，主に水生生物として認識されている (Horikawa and Higashi, 2004 ; 堀川，2015a, 2015b)。Fig. 1A はオニクマムシの模式図である。本種において，摂取した餌は口管 (mouth canal) から咽頭内 (pharynx) を通過し，食道管 (esophageal canal) を経由して腸内 (intestinal tract) へ送られる。本種は骨格構造を持たない一方，体腔内は関節のない 4 対の肢を含めて体液で満たされ，体腔球 (body cavity sphere) が浮遊している (Fig. 1A, B)。このような動物の多くは，静水圧骨格と呼ばれる，水分に富んだ体組織によって体型を維持するが (Kier, 2012 ; 新山，2019)，クマムシ類もこれに合致するものと考えられる。

クマムシ類は自身の代謝を測定限界以下にまで低下させた「乾眠」状態 (cryptobiosis) へと移行し，乾燥環境に耐えることができる (矢木・加藤，2020)。一方，乾眠状態のクマムシ類は吸水によって代謝を再開できるため，彼らは自然環境下において活動状態と乾眠状態を繰り返しながら生活している。クマムシ類の乾眠に関与する分子や遺伝子については，これまで数多くの研究がなされている (鈴　木，2006, 2007 ; 國　枝，2018 ; Hibshman et al., 2020 ; Murai et al., 2021 ; 田中・荒川，2022 ; 矢木・加藤，2022)。しかし，活動状態から乾眠状態への移行や乾燥環境が改善されて以降の復帰過程について，形態および体腔内圧の経時的変化に関する研究は進んでいない。なお，乾眠状態に移行したクマムシは，その体型から「樽型 (barrel-shaped form)」と呼称されることがあり (Greven, 1984)，本稿でも乾眠状態へ移行中，あるいは乾眠状態の個体を「樽化」と記述する。

著者らは，クマムシ類の乾燥耐性について，樽化から復帰に至る過程を多くの動画記録として保存してきた。そのなかで，樽化から復帰中のオニクマムシの口管中に取り込まれた気泡が，復帰直前に体内に吸収されている様子を多数確認した。本研究では，取り込まれた気泡と

[1)] 京都先端科学大学付属高校
(*Kyoto University of Advance Science Junior-Senior High School*)
[2)] 北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物学分野
(*Laboratory of Marine Biology and Biodiversity*, *Faculty of Fisheries Sciences*, *Hokkaido University*)

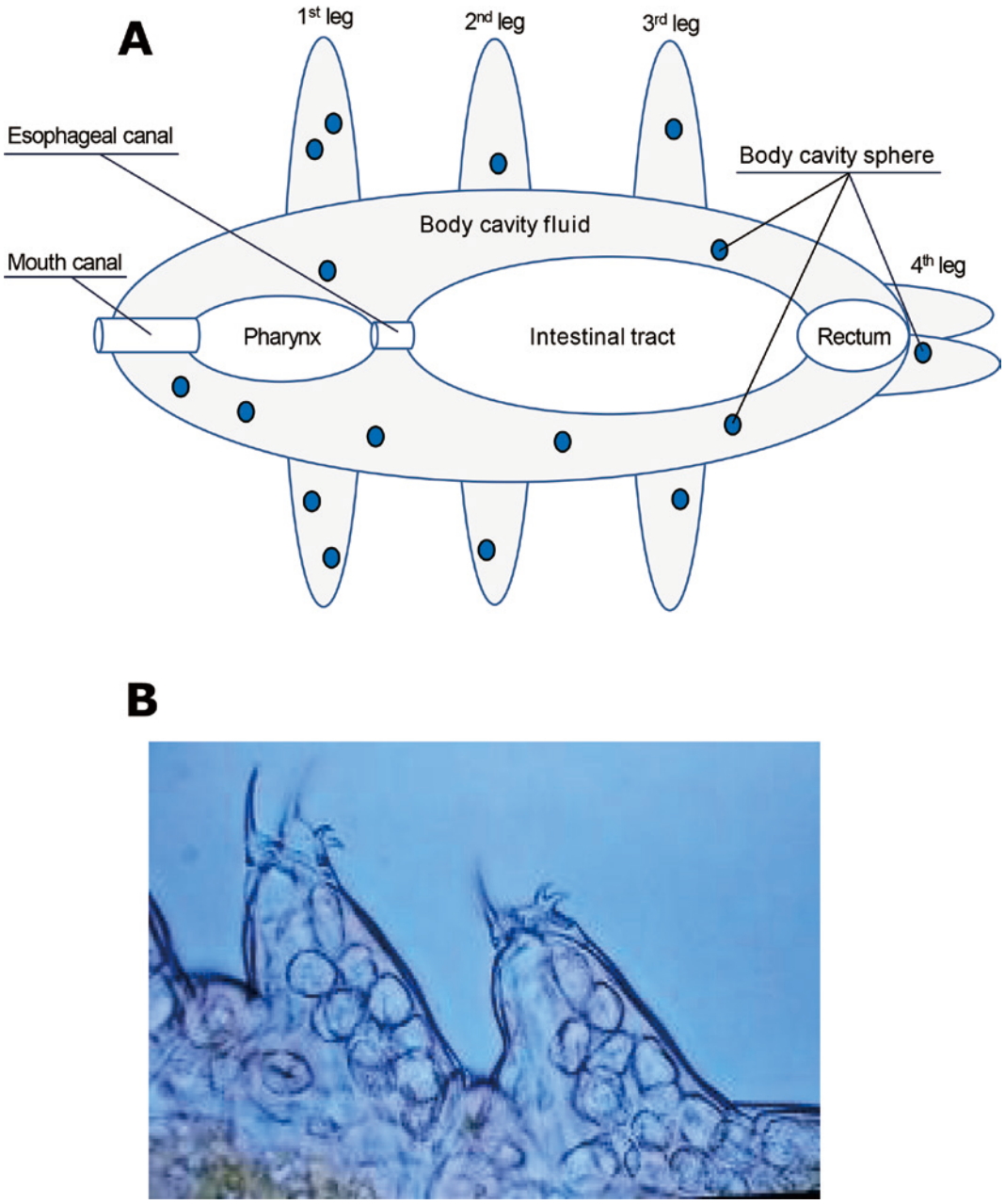

Fig. 1. An anatomical illustration of *Milnesium tardigradum* (A) and a microphotograph of the second and third legs of this species (B). In (B), small circles in the legs are body cavity spheres.

その消失過程を詳細に記載し，これらが樽化からの復帰に果たす役割を検討するとともに，通常の活動個体と樽化が進行中の個体に見られた気泡の吸気についても報告する。

材料および方法

2020 年から 2023 年にかけて，以下の実験を実施した。京都市内において乾燥状態のコケを実験室に持ち帰り，室温 22°C，湿度 46–49% に管理された実験室内で水道水を入れたシャーレに移して 24 時間静置した。翌日，シャーレ内のコケを解剖針で細かく砕き，ピペットにより水と共に適量を吸い取り，スライドグラスに滴下して，カバーグラスをかけた (以降「スライド上」と記す)。このスライド上標本を生物顕微鏡下で観察し，正常に活動しているオニクマムシを確認し，自然乾燥させて樽化を促進した。翌日，これらの標本のカバーグラス側面に水を滴下させて復帰を促すと同時に動画を撮影し，完全に活動を開始するまでの復帰過程を記録した。さらに，カバーグラスによる圧迫が復帰成功度に与える影響を検証するため，ピペットを用いて，活動中のオニクマムシをスライドグラス上に置いたフィルターペーパー上 (以降「フィル

ターペーパー上」と記す) に移したものについても，同方法により復帰個体を計数した。

撮影された映像から，各個体における気泡の咽頭内への流動や吐き戻しの有無を観察し，口管内 (Fig. 1A：mouth canal) の気泡の有無，目測により推定した口管内に占める気泡の割合 (以下「推定気泡占有率」と記す) の時間変化，および樽化個体の微動開始時間を記録した。本研究では，加水後 60 分以内に全身運動が確認された個体を「復帰」とし，付属肢のマヒ等によって移動が不可能だった個体は「復帰失敗」と判断した。

また，これらの復帰実験個体とは別個体について，接眼ミクロメーターによるサイズ測定を実施したところ，活動時の全長が 700 µm 以上の大型標本が 2 個体得られた。この 2 個体は観察が容易であったため，取り込まれた気泡の有無や口管内に占める気泡の割合，および微動の開始時間が同一個体内で変化するかどうかを明らかにするために，カバーガラス下で復帰させた後もカバーガラスをかけたスライドグラス上に静置したまま冷蔵庫 (5℃) で 1-3 日間保管し，「復帰失敗」と判断されるまで，自然乾燥と水の滴下を繰り返した。

最後に，湿らせたコケから水と共に抽出した通常の活動個体と，活動状態から乾燥により樽状態へと移行する過程の個体について，上述のスライド上個体と同様の顕微鏡観察と動画撮影を実施した。前者については口管内での気泡流動の様子を，後者では気泡が生じた個体について，口管内の推定気泡占有率の変化を記録した。

結 果 と 考 察

カバーグラスを用いてスライド上で樽化させたオニクマムシ標本 133 個体に水滴を加えた結果，95 個体が正常に復帰した (復帰率 71.4%)。同様に，カバーグラスを用いずにフィルターペーパー上で樽化から復帰させた標本 45 個体においても，33 個体が正常に復帰した (73.3%)。両処理の復帰率に有意差はなく (Fisher の正確確率検定；$P = 0.85$)，本種の復帰成功率にカバーガラスの影響はないものと考えられる。

スライド上で復帰した個体の吸排気

スライド上で復帰した 95 個体のうち，66 個体 (69.5%) の口管中に気泡が認められた (以下「吸気－復帰個体」と記す；Fig. 2)。映像記録からは，吸気－復帰個体において，咽頭側 (Fig. 2A 楕円部分) への気泡の流動，または気泡の吐き戻しは確認されなかった。口管内部に取り込まれた気泡は約 3 分後に口管内下部で消失した (Fig. 2A–F)。観察開始から約 2 分後までの画像では，気泡は咽頭上端部に接していたが (Fig. 2B, C 円部分)，時間経過とともに咽頭上端部から分離し，2 分 31 秒後の画像 (Fig. 2D) では，気泡は咽頭側から完全に分離し，口管下部を中心として円形に収束する様子が観察された。動画の画像から得られた推定気泡占有率は，加水直後では 70% (Fig. 2A) であったが，1 分 46 秒後にはおよそ 30% に減少し (Fig. 2C)，2 分 59 秒後に気泡は口管下部で消滅した (Fig. 2F)。

66 個体の吸気－復帰個体うち，3 個体 (4.5%) において復帰の際に口管内で気泡の吸排気が観察された (Fig. 3)。加水直後では，口管内の気泡は確認できなかったが (Fig. 3A)，その後に口管下部から気泡が発生した。加水から 2 分 30 秒後には口管内の推定気泡占有率がおよそ 60% になったが (Fig. 3C)，3 分 49 秒後に口管下部にて消滅した (Fig. 3F)。咽頭側または、口管先端部からの外気流入は確認できなかった。これは，体腔側から気泡が口管内に放出された後，気泡が体腔側へ戻されたことを意味する。この間，クマムシの体積は増大し続けた。

復帰に失敗した 38 個体においても，20 個体で口管内の気泡が確認された (以下「吸気－未復帰個体」と記す)。出現した気泡が消滅するまでの時間と付属肢等の微動開始時間を共に記録できた，吸気－復帰個体 65 個体と吸気－未復帰個体 20 個体について，これらのデータを比較したところ，吸気－復帰個体では，口管内での気泡消滅時間が 5.2 ± 5.8 (分，平均 ± SD)，微動開始までの時間が 8.2 ± 5.1 (分) であり，59 個体 (90.8%) が気泡の消滅後に微動を開始した (Fig. 4A)。一方，吸気－未復帰個体では，前者の時間が 8.3 ± 10.3 (分)，後者の時間が 7.4 ± 2.8 (分) であり，16 個体 (80.0%) が気泡の消滅後に微動を開始した (Fig. 4B)。復帰個体では気泡の消滅が付属肢等の微動開始より有意に早く起こったが (Wilcoxson の符号順位検定；$V = 123$, $P < 0.001$)，未復帰個体では両時間に有意差はなかった ($V = 50$, $P = 0.067$)。また，復帰・未復帰を問わず，すべての吸気個体において，口管内の気泡は咽頭部を経由することなく，口管内部で停留した後に口管下部で全て消失した。本研究における微動は個体の付属肢を含む突起物の収縮であるが，本種の肢に関節はなく，肢形状は体腔内液で満たされている。通常，このような静水圧で支持される突起物を収縮・伸長させるには，突起物内の水圧を高める必要がある (Kier, 2012)。よって，復帰に成功した吸気個体は，気泡の吸引を完了したタイミングで，体腔内液の内圧調整も完了していた可能性がある。

口管内の推定気泡占有率は多くの個体で加水直後に最大となり，吸気－復帰個体では 54 個体，吸気－未復帰個体では 20 個体において，復帰中の最大推定気泡占有率が記録された (復帰個体のうち 12 個体では，加水直後に気泡が急消滅したため，最大占有率を記録できなかった)。それぞれの最大占有率は復帰個体で 72.1 ± 33.3 (%，平均 ± SD)，未復帰個体で 68.0 ± 36.3 (%) であり，両者の間に有意差はなかった (Mann–Whitney の U 検定；$W = 541.5$, $P = 0.99$；Fig. 5)。

2 個体の大型個体を用いた反復実験では，いずれの個体も樽化からの復帰を複数回反復し，10 回目，あるいは 15 回目に復帰失敗と判断された (Fig. 6)。両個体とも吸気と無吸気の復帰試行があり，推定気泡占有率や微動開始時

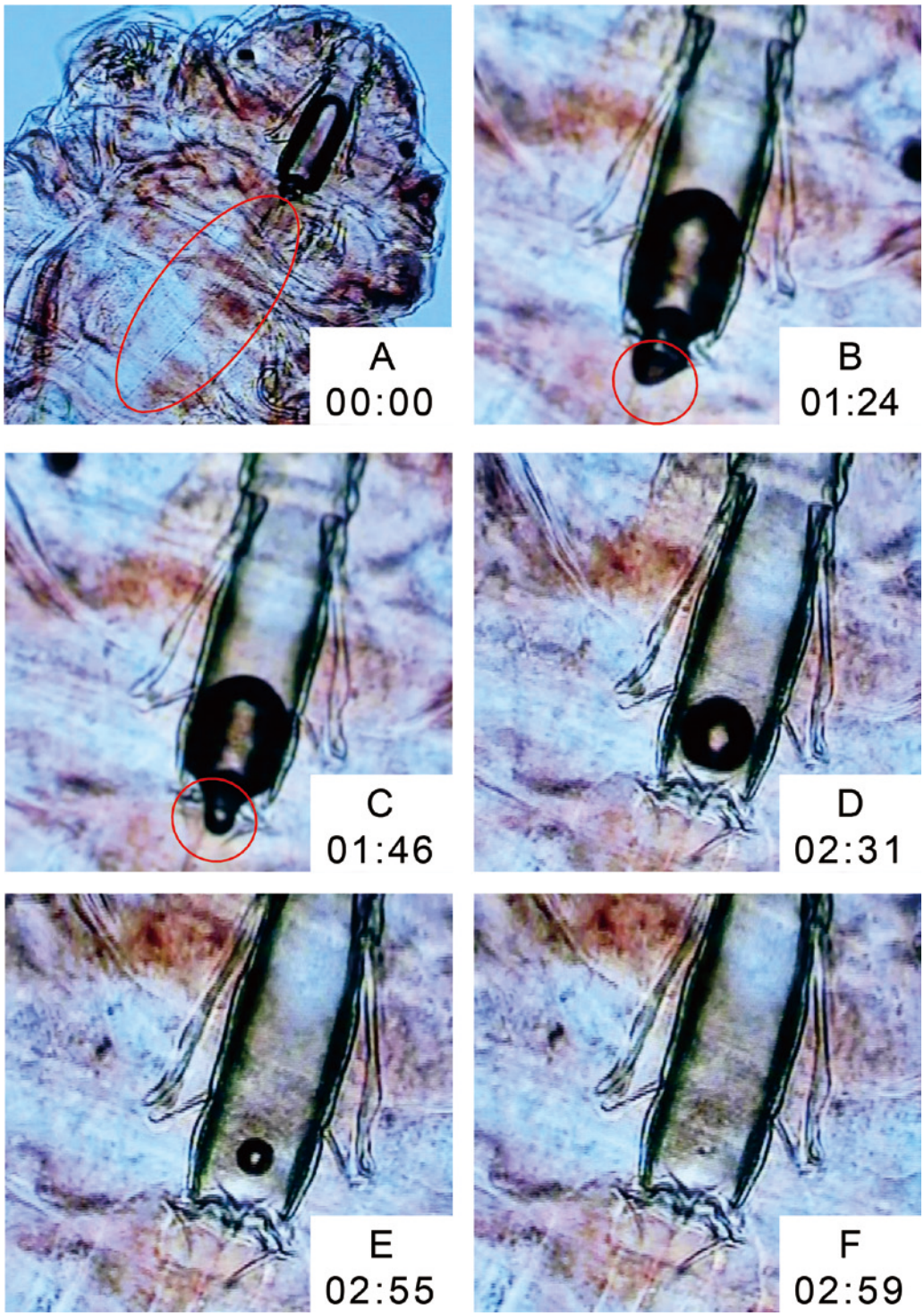

Fig. 2. Time series of micrographs of *Milnesium tardigradum* showing that, after water was dropped, a bubble occurred in the mouth canal disappeared in this part. The bubble did not reach inside of the pharynx. This individual was covered by a cover glass. Red circles indicate the pharynx (A) and end parts of the mouth canal (B, C). Number in each figure indicates the time in minutes and seconds after the observation started (magnification : A, ×400 ; B-F, ×1000).

間にばらつきがみられた (Fig. 6)。このことから，本種において口管内の気泡の有無は樽化からの復帰に至るために不可欠な条件ではなく，各々の復帰タイミングにおける体腔内液の静水圧に応じて，外気の利用量や吸収時間を調整している可能性が示唆される。

フィルターペーパー上で復帰した個体の吸排気

フィルターペーパー上で復帰させたオニクマムシの鮮

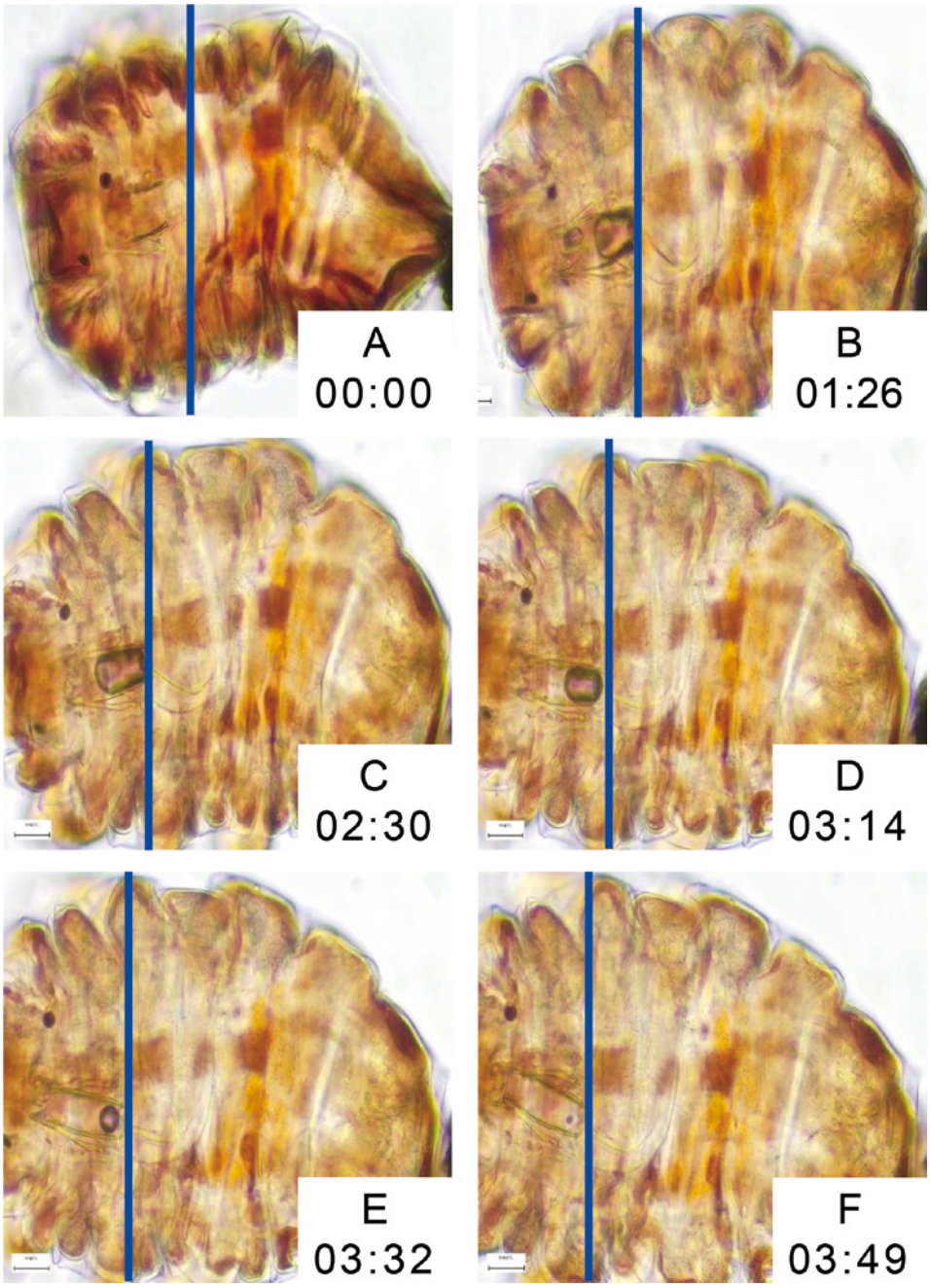

Fig. 3. Time series of micrographs of *Milnesium tardigradum* from the cryptobiotic state to the complete recovery with bubbles in the mouth canal. Photographs were obtained just after water was dropped beside the cover glass to the complete recovery. Number in each figure indicates the time from water being dropped to complete recovery (magnification : × 400). Blue lines indicate the end of the mouth canal in each figure.

明な記録映像を得ることは困難であったが，複数の個体で明確に気泡の存在が確認された。Fig. 7 は特徴的な吸排気を示した個体の画像である。本個体においては，口管内で確認された気泡が下方向に縮小し (Fig. 7A-C)，およそ 1 分で口管下部において消滅した。その後，消滅部位であった口管下部に気泡が再発生し (Fig. 7D 円部分)，上方に向かって伸長した。再発生した気泡は 2 分 8 秒後には再度口管全体に広がり (Fig. 7E)，2 分 36 秒後に口管下部において再度消失した (Fig. 7G)。この間，咽頭側への気泡の流動および外気の吸引は観察されなかった。

当初，本個体における口管内での推定気泡占有率は 80% であったが，この気泡は一度すべて体腔内液に吸収された後，再び体腔側から口管内での占有率が 90% に達するまで放出され，もう一度，体腔内液に吸収された。このように口管内と体腔内で気泡の吸排気を反復している間，本個体の体積は継続的に増大した。そのほかのフィ

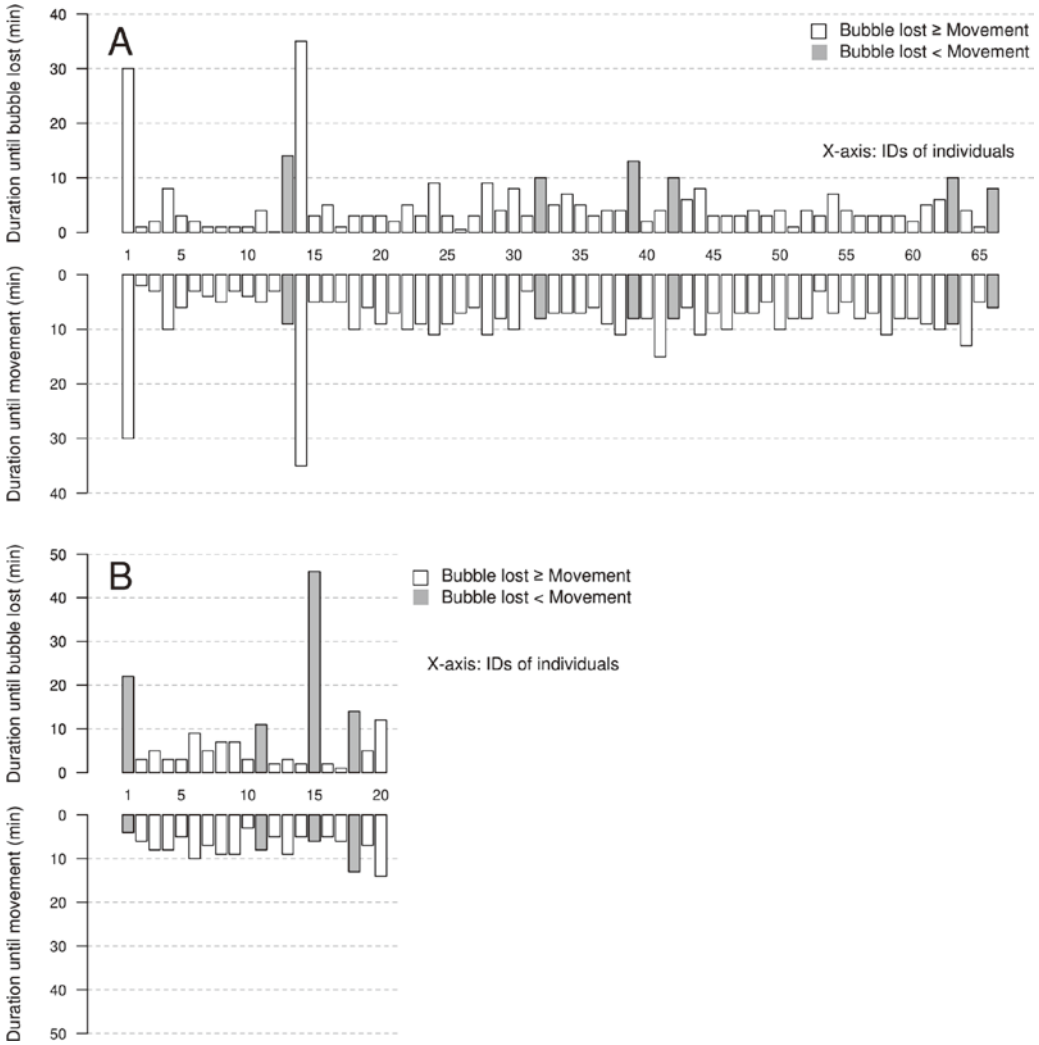

Fig. 4. Individual differences of durations until the bubble was lost and initial movement for recovered (A) and unrecovered samples (B). Most individuals moved after the bubble was lost (A, 90.8% ; B, 80.0%), and the duration until the bubble was lost was significantly earlier than that of initial moving in A but not in B.

ルターペーパー上個体においても気泡が確認されたこと，スライド上で復帰した個体の結果も合わせると，本種において，気泡の吸排気は体腔内の静水圧を増加させる機能があると考えられる。ただし，スライド上個体では消滅した気泡は再度出現せず，反復試行ではそもそも無吸気で復帰した例があったため，本種の復帰に際して，吸排気の反復も必要条件ではないと推察される。

通常活動中の個体における吸排気

水中にて通常活動中の個体においても，上述した復帰個体と同様に，外気の吸引と口管内の気泡の動きが確認された (Fig. 8)。通常個体において，観察開始時に口管内で観察された気泡 (Fig. 8A, B) は，0.55 秒後に咽頭側を経由して食道管に流入し (Fig. 8C)，1 分 31 秒後には中腸部にまで移動した (Fig. 8D)。一方，樽化から復帰中の個体では，気泡は咽頭側を経由せずに消失する様子が観察されており (Figs. 2, 3, 7)，通常時の気泡の移動経路とは明らかに異なる。このことから，復帰時に見られた気泡の吸引は，中腸ではなく，体腔内に流入していると判断できる。

樽化移行中の個体における吸排気

樽化に移行中の個体では，樽化の進行に応じて約 10 分間にわたり，口管からの吸引が継続し，気泡が口管先端から下方向に継続的に伸長した (口管内の推定気泡占有率は 0% から 100% に増加 ; Fig. 9A–E)。気泡が口管最下部に到達する直前の 5 分 19 秒後以降に (Fig. 9D)，クマムシの体積は急速に減少し，樽型に変形した。樽化移行中の個体では，復帰中の個体と同様に，咽頭内への気泡流入は観察されなかった。

オニクマムシが樽状態に移行する場合においても外気を吸引したことは，外気が口管下部から体腔側へ侵入する時点で，急速に体内の排水が進行し，個体が樽型に変形する可能性を示唆する。また，樽化・復帰を問わず口管内を気泡が行き来することから，本種においては，気

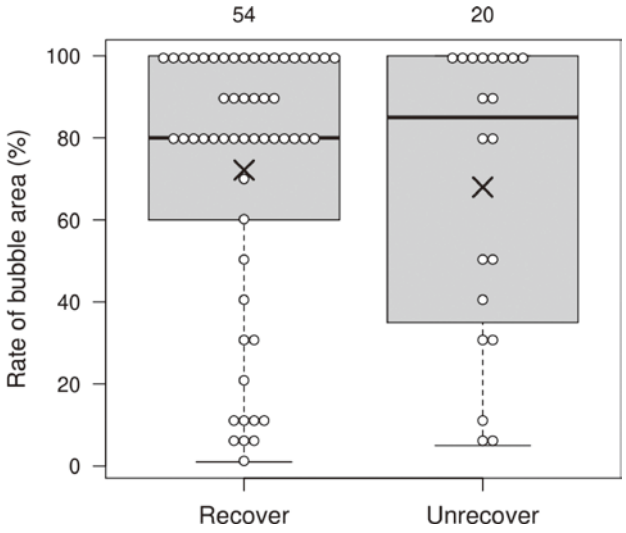

Fig. 5. Maximum rate (%) of bubble area in the mouth canal of recovered and unrecovered samples during the recovery process. There was no significant difference between samples ; thick horizontal lines indicate the median, large symbols are the mean, and small circles are each data. Numbers above each plot indicate the sample size.

泡の吸排気が体内の吸水 (すなわち，体腔内静水圧の増加) のみならず，排水 (体腔内静水圧の減少) にも関わっている可能性がある。つまり，外部環境と内部環境の境界が口管下部に存在し，体腔内静水圧を調節している可能性があり，今後さらなる観察が必要である。

今 後 の 展 望

クマムシ類の乾眠状態は，極度の高・低温や放射線など多様な極限環境に耐えうる，非常に特異的かつ重要な行動形質であり，本分類群が広く「最強」と呼ばれる所以でもある (國枝，2018；田中・荒川，2022；矢木・加藤，2022)。しかし，この特異性に対する研究アプローチは分子的手法に大きく偏っており，Horikawa and Higashi (2004) が指摘するように，本研究のような生物学的・生態学的視点は乏しい。本研究は生体を用いた詳細な行動観察から，口管内の気泡の吸排気という，クマムシ類の乾眠に迫る新たな糸口を見出した。

本研究の結果は，クマムシが体腔内静水圧を適時調整している可能性を示唆するとともに，従来体表のクチクラを通じた皮膚呼吸をおこなう (國枝，2018)，と推察されてきたクマムシ類の外呼吸についても，“口管” という新たな視点を提供する。気泡と外呼吸との関係を検討するためには，通常活動中の個体を用いた長時間の動画撮影・観察や，口管内の気泡の存在率，あるいは口管内占有率と樽化からの復帰成功率との関係を精査すると共に，消化管内の気泡の動きについてさらなる観察が必要であろう。引き続き，京都周辺に多数存在する大きな池や河川川床の堆積物内に生息するクマムシ類を調査・観察を行い，陸水堆積物動物群集の一員を成すクマムシ類の生態学的研究を継続したい。

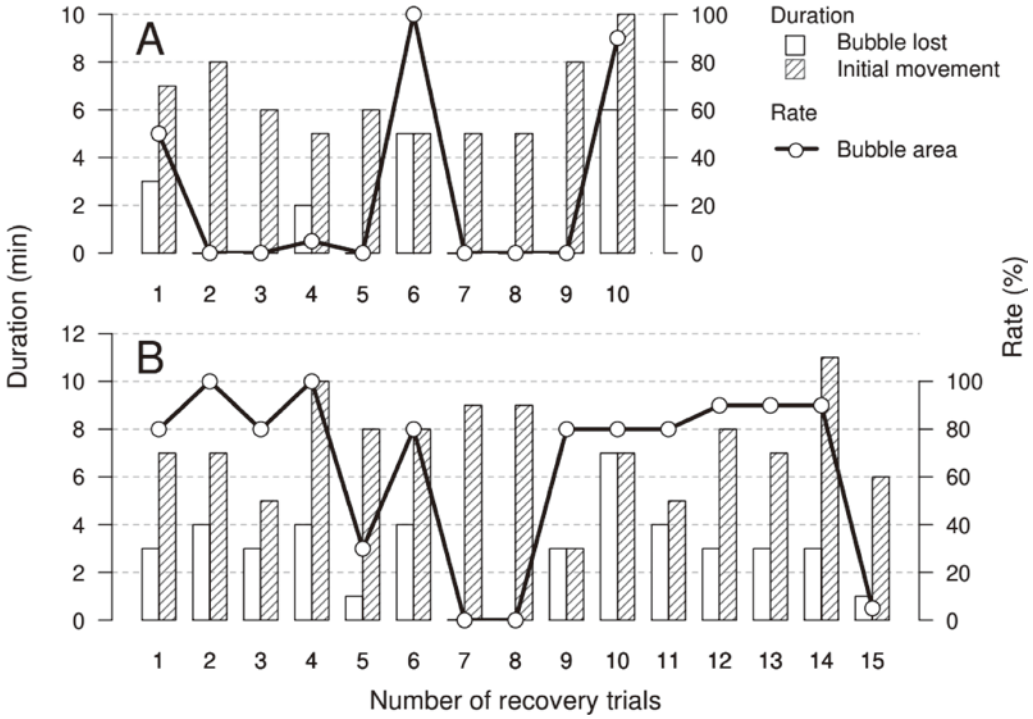

Fig. 6. Temporal variation of two *Milnesium tardigradum* with multipole recovery trials : durations (min) until bubble was lost and initial movement (min, left *y*-axis) and maximum rates (%) of bubble area in the mouth canal (right *y*-axis). Each figure shows the results of an individual that unrecovered for the 10th time (A) and that for the 15th time (B).

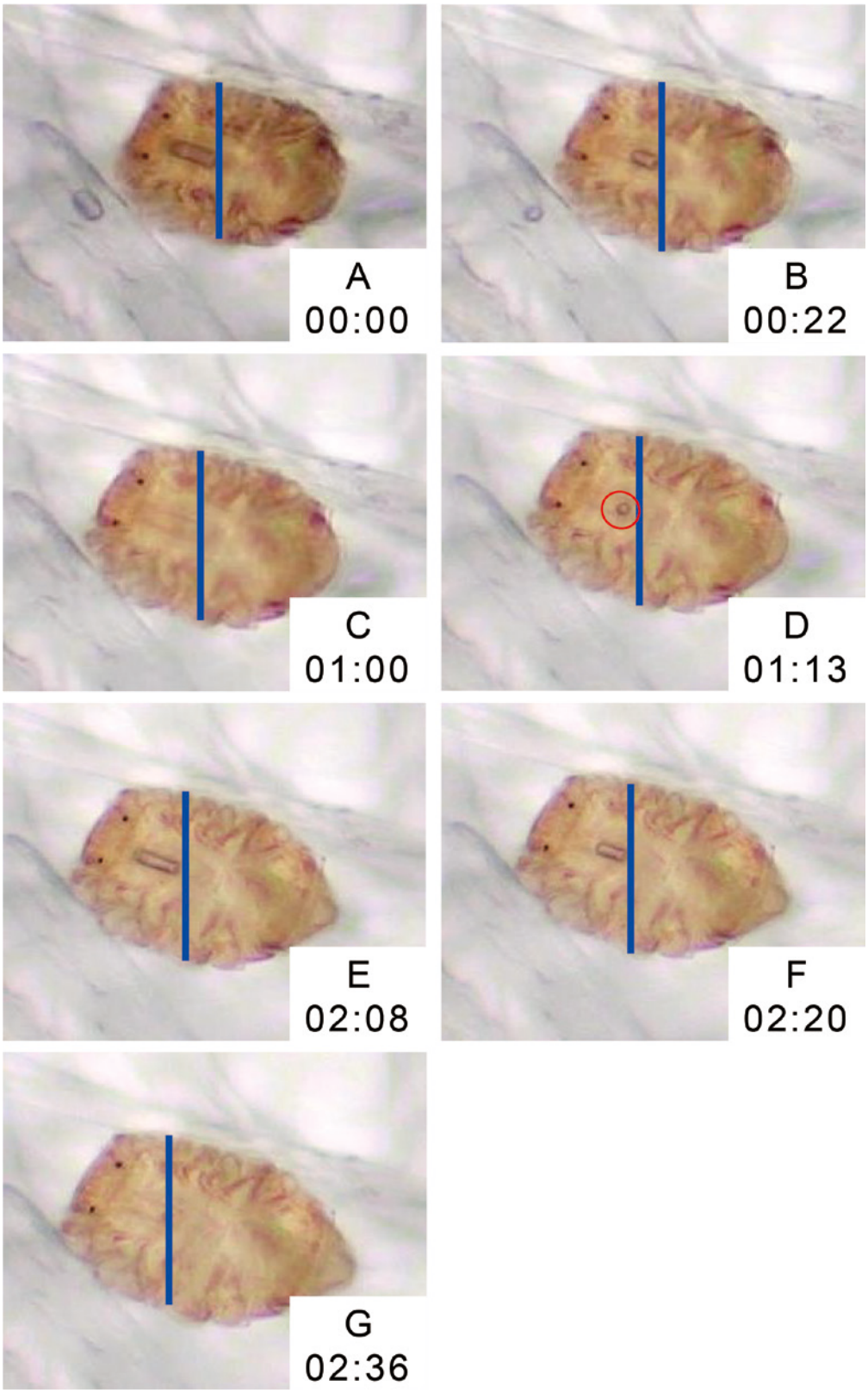

Fig. 7. A time series of micrographs of *Milnesium tardigradum* from the water dropping (cryptobiotic state) to complete recovery with bubbles in the mouth canal. This individual was on a slide glass with filter paper. Number in each figure indicates the time from water being dropped to complete recovery (magnification : × 100). Red circle in D and blue line in each figure indicate a re-emerged bubble and the end of the mouth canal, respectively.

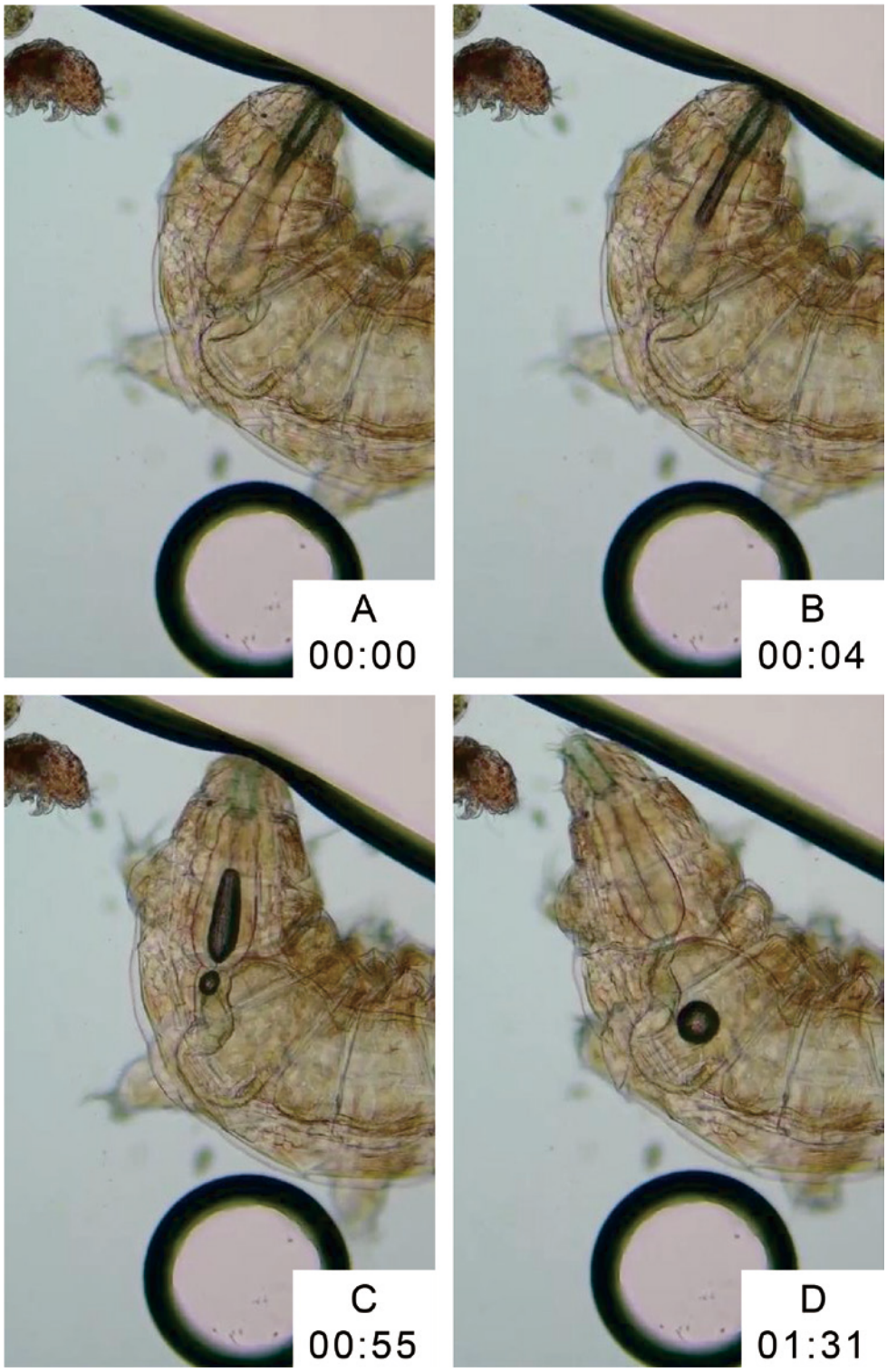

Fig. 8. A time series of micrographs of *Milnesium tardigradum* during the active state with a bubble in the mouth canal. Bubble entered the esophageal canal via the pharynx and then moved into the intestinal tract. Number in each figure indicates the time after the start of the observation (magnification ×100).

謝　　辞

この研究は 2019 年に日本動物学会において，高校生ポスター発表した内容であり，見学者の慶応大学教授鈴木忠先生の強いお勧めがあり，投稿した次第です。鈴木先生からはご指導ならびに多くのご助言を賜ったこと，お礼申し上げます。本校理科部クマムシ班は 6 年間クマムシ研究を継続しており，生徒たちの残してくれた膨大な

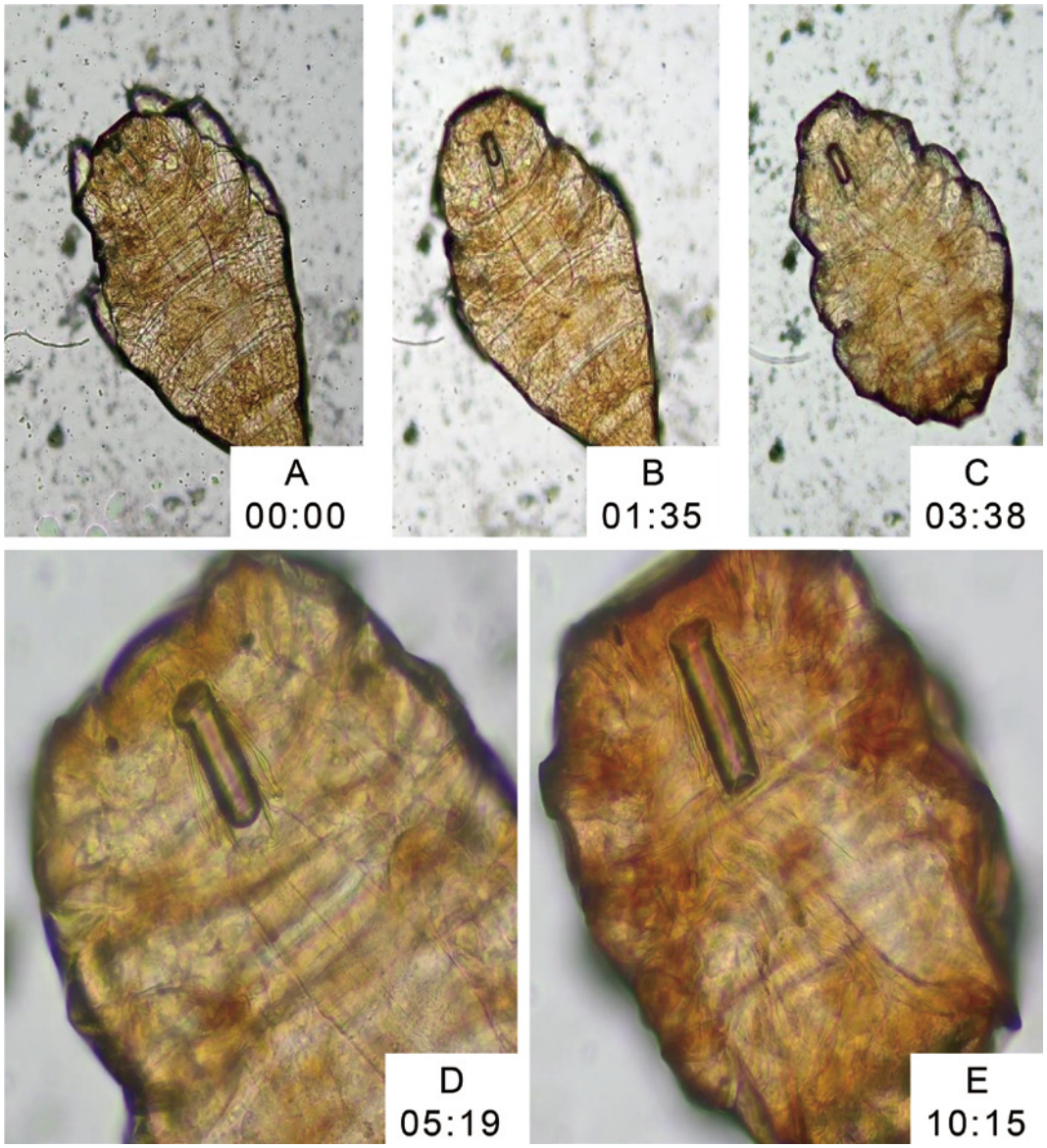

Fig. 9. A time series of micrographs of *Milnesium tardigradum* from active to cryptobiotic state with a bubble in the mouth canal. Number in each figure indicates the time after the start of the observation (magnification : A–C, ×100 ; D, E, ×400).

観察記録を分析し，一定の方向性をもって実験を積み重ねてこの論文が完成しました。本校理科部の生徒諸君に敬意を表します。

引 用 文 献

Bertolani, R., Grimaldi, D. (2000) A new Eutaridigrade (Tardigrada : Milnesiidae) in amber from the Upper Cretaceous (Turonian) of New Jersey. pp. 103–110, Grimaldi, D. (ed), *Studies on fossils in amber, with particular reference to the Cretaceous of New Jersey*, Backhuys, Leiden.

Greven, H. (1984) Tardigrada. pp.714–727, Bereiter-Hahn, J., Matoltsy, A.G., and Richards, K.S. (eds), *Biology of the integument : invertebrates*. Springer, Berlin.

Hibshman, J.D., Clegg, J.S. and Goldstein, B. (2020) Mechanisms of desiccation tolerance : themes and variations in brine shrimp, roundworms, and tardigrades. *Front. Physiol.*, **11**, 592016.

Horikawa D.D., Higashi S. (2004) Desiccation tolerance of the tardigrade *Milnesium tardigradum* collected in Sapporo, Japan, and Bogor, Indonesia. *Zool. Sci*., **21**, 813–816.

堀川大樹 (2015a) クマムシの乾眠と極限環境耐性．生物工学会誌，**93**, 193–195.

堀川大樹 (2015b) クマムシ研究日誌 : 地上最強生物に恋して．東海大学出版部，東京.

Kier, W.M. (2012) The diversity of hydrostatic skeletons. *J. Exp. Biol*., **215**, 1247–1257.

國枝武和 (2018) 最強とも呼ばれる愛らしい動物・クマムシ．生物工学会誌，**96**, 92–95.

Murai, Y., Yagi-Utsumi, M., Fujiwara, M., Tanaka, S., Tomita, M., Kato, K., and Arakawa K. (2021) Multiomics study of a heterotardigrade, *Echinisicus testudo*, suggests the possibility of

convergent evolution of abundant heat-soluble proteins in Tardigrada. *BMC Genomics*, **22**, 813.
新山龍馬 (2019) 変形・変化するロボットをめざして．システム／制御／情報, **63**, 493-498.
鈴木 忠 (2006) クマムシ?! 小さな怪物. 岩波書店, 東京.
鈴木 忠 (2007) クマムシ類のさまざまな生態と環境耐性．生物の科学, **61**, 11-15.
田中 冴・荒川和晴 (2022) 最強生物クマムシの乾眠メカニズムの解析．*Keio SFC Journal*, **22**, 178-190.
矢木真穂・加藤晃一 (2022) “地上最強生物” クマムシの乾眠の分子機構の解明に挑む．生化学, **94**, 888-891.