

## 無腸動物 *Praesagittifera naikaiensis* における細胞骨格要素

Cytoskeletal elements in an acoelomorph worm, *Praesagittifera naikaiensis*

池田 理佐<sup>1,2</sup>・藤原 稚穂<sup>1</sup>・濱田麻友子<sup>3</sup>・坂本 竜哉<sup>3</sup>・齋藤 昇<sup>2</sup>・  
安藤 元紀<sup>1,2</sup>

Risa Ikeda, Chiho Fujiwara, Mayuko Hamada, Tatsuya Sakamoto, Noboru Saito, Motonori Ando

<sup>1</sup>岡山大学大学院教育学研究科・理科教育講座・細胞生理学研究室

<sup>2</sup>岡山大学大学院環境生命科学研究科・動物機能開発講座・動物生理学研究室

<sup>3</sup>岡山大学・理学部附属臨海実験所

<sup>1</sup>Laboratory of Cell Physiology, Department of Science Education, Graduate School of Education, Okayama University

<sup>2</sup>Laboratory of Animal Physiology and Pharmacology, Department of Animal Science, Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University

<sup>3</sup>Ushimado Marine Institute, Faculty of Science, Okayama University

### Summary

Acoel flatworms can move in a variety of ways such as muscular and ciliary movements via cytoskeletal elements and their neural regulations. However, those locomotive mechanisms have not yet been fully elucidated. In this study, we examined the distribution of cytoskeletal elements including filamentous actin (F-actin) and tubulin, and the neuroanatomical organization in an acoelomorph worm, *Praesagittifera naikaiensis* (*P. naikaiensis*). Video microscopy revealed the elongation/contraction and the bending/rotation processes, and the ciliary gliding movement of *P. naikaiensis*. Histochemical and morphological analysis demonstrated that F-actin networks of inner longitudinal and outer circular muscle fibers were positioned along the entire surface of the body, and that the average distance between the circular muscle fibers in the contracted organism was decreased in the anterior region compared with that in the elongated organism. Electron microscopy showed dense bodies on the muscle cells of *P. naikaiensis*, which indicates that those muscle cells have the appearance of vertebrate smooth muscle cells. Immunohistochemical analysis revealed that  $\alpha$ -tubulin-positive signals on the ciliary microtubules had close contact with the F-actin network, and that neurite bundles labelled with anti dSap47 antibody as a neuronal marker run along the anterior-posterior body axis. These results indicate that the well-organized cytoskeletal elements and their neural control systems are preserved in *P. naikaiensis*, and that their mechanisms involved in those regulation systems are similar to those vertebrate systems. Further studies are needed to clarify the physiological mechanisms underlying the muscular and ciliary movements in *P. naikaiensis*.

### 1. はじめに

無腸動物は海洋に棲息する雌雄同体の生物で、肛門や原腎管といった排泄器を持たず、脳や神経節がない散在神経系を有する極めて原始的な多細胞生物である (Bailly et al, 2013; Bagaña and Riutort, 2004; Hejnol and Mviartindale, 2008)。無腸動物は、これまでプランナリアなどと同様に、旧口動物と近縁であると考えられていたが、分子系統学的解析から珍渦虫とともに新口動物と近縁であるとの報告がなされた (Philippe et al, 2007; Philippe et al, 2011)。近年、新たに発見された珍渦虫を含めた系統発生解析から、本類が左右相称動物の中で最も初期に分岐した動物群であることが示唆されており、後生動物の進化を考える上で重要な生物種として注目されている (Cannon et al, 2016; Rouse et al, 2016)。

本研究で用いた *Praesagittifera naikaiensis* (*P. naikaiensis*) は、コンボルータ科プレサギティフェラ属に分類される瀬戸内海沿岸に棲息している日本固有の無腸類の一種であり、生体内に共生藻を有する (Jondelius et al., 2011; Hikosaka-Katayama and Katayama, 2015)。本種については、運動時に傾きを感受する平衡胞や光感受に寄与する眼点、色素細胞や感覚細胞の記載がある (Yamasu, 1991)。また、その体表には極めて密な繊毛列が配向しており基底面に対して滑走するように移動すること、生体は長軸・短軸の両方向に自在に変形すること等、極めて活発な運動能力を有する。こうした運動様式は近縁種である *Convoluta pulchra* (*C. pulchra*) で同様の報告がなされている (Tyler and Rieger, 1999)。

このように無腸動物は本種を含めて原始的

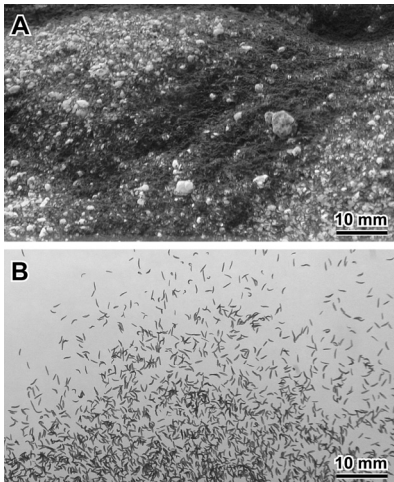
な動物でありながら、その運動能力は哺乳類を含めた高等動物のそれと遜色なく、動物の普遍的な運動機構を解析する優れたモデル動物と考えられる。しかしながら *P. naikaiensis* においてその形態および分類学的研究は散見されるものの、生体変形能や繊毛列による運動能、およびそれらの制御機構については不明である。

本研究では、*P. naikaiensis* の運動制御機構を明らかにするために、細胞骨格要素であるアクチン系および微小管系に着目した解析、および神経特異的なマーカー用いた神経系の解剖学的解析、を行うこととした。本研究の遂行により、*P. naikaiensis* に関する基礎生物学的な新知見が得られることに加えて、本種が哺乳類を含めた動物の普遍的な運動制御機構を解明するためのモデル動物としての有用性についても議論する。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 実験動物

岡山県瀬戸内市自然海岸にて *P. naikaiensis* の採集を行った。採集後の動物については、実験室に持ち帰り、ガラス製の円形水槽（直径 14 cm、深さ 6.5 cm）に薄く海砂を敷いて濾過海水中に分散させた。一週間に 2 回の割合で濾過海水を入れ替え、自然光の当たる場所におき、室温で飼養した（Fig. 1A）。



**Fig. 1.** *P. naikaiensis* in intertidal sand grains (high density, **A**), and attaching on the wall of an experimental glass tank (low density, **B**). The organisms are dark green in color due to the presence of large numbers of symbiotic algal cells.

### 2-2. ビデオ顕微鏡法

*P. naikaiensis* の培養液である濾過海水を人工海水に置き換え、ガラスボトムシャーレに入れて観察を行った。*P. naikaiensis* の動きを抑制して行動観察を行うために、74 M (7.14%) 塩化

マグネシウムを滴下した (Tyler and Rieger, 1999)。ビデオ顕微鏡にて画像を記録した (IX71 equipped with DP21, Olympus)。その後、個々の生体の行動様式についてビデオレートでの解析に供した。

### 2-3. 蛍光免疫組織化学法

試料は 4% paraformaldehyde で固定後、常法に従い免疫組織化学に供した。一次抗体は抗 tubulin 抗体 (clone DM1A, Thermo Fisher)、抗 dSap 抗体 (DSAP47-1, DSHB)、二次抗体は Alexa 488 (A11001, Thermo Fisher) を用いた。F-actin および核標識のために、Alexa 546 Phalloidin (A22283, Life Technologies Japan) および DAPI (10236276001, Roche) をそれぞれ用いた。共焦点レーザー顕微鏡システムで観察した (FV1200, Olympus)。

### 2-4. 透過型電子顕微鏡法

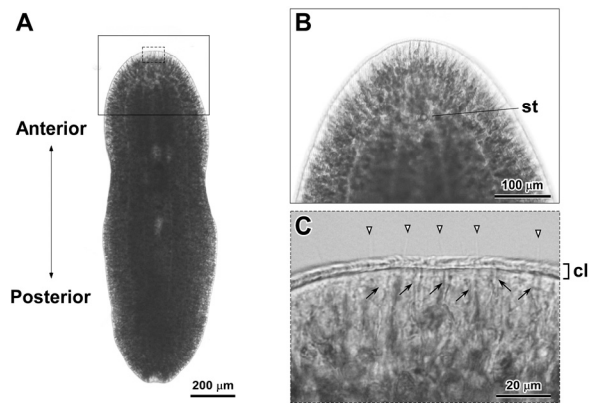
試料を前固定 (2.5% glutaraldehyde)、および後固定 (1% OsO<sub>4</sub>) を行い、常法に従い Spurr 樹脂に包埋した。超薄切片を作製し、電子染色により透過型電子顕微鏡観察を行った (H-7650, Hitachi)。

## 3. 結果

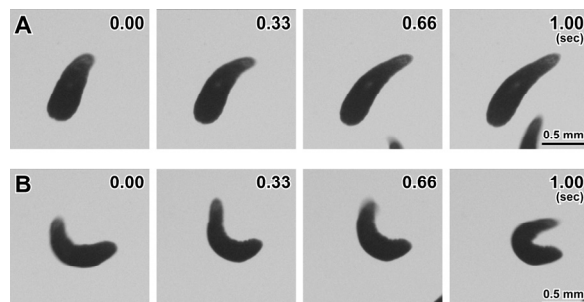
### 3-1. 生体の形態及び動態観察

ガラス水槽に張り付いた *P. naikaiensis* の生体の形態計測を行った (Fig. 1B)。楕円に近似した場合の長軸および短軸の平均長 (mean ± SD, mm) (n = 293) はそれぞれ  $1.37 \pm 0.31$  および  $0.34 \pm 0.10$  であった (particle analysis, Image J)。個体の透過像の一例を示す (Fig. 2)。体全体が濃い緑を呈し、個体の長軸方向に走行している数本の筋が認められた (Fig. 2A)。この筋が観察された場所では共生藻が配置できないことを意味している。頭部先端には平衡胞 (statocyst) が観察された (Fig. 2B)。体表を拡大すると表皮細胞層の頂端膜側に極めて密な繊毛列が層を形成していること、また数は少ないが繊毛の 2 倍以上の長さの微繊毛の存在が認められた (Fig. 2C, arrowheads)。加えて、体内から赤色あるいは橙色の色素を有する突起状の構造が観察された。表皮細胞層あるいは繊毛列の直下まで、その突起状構造を伸ばしていることが確認された (Fig. 2C, arrows)。

ビデオ解析から *P. naikaiensis* は頭部を前方に伸長し、その後基底面に対して滑るように前進する運動を示した (Fig. 3A)。また、頭部を片方の腹部側に湾曲させ、進行方向を変えて旋回する運動が確認された (Fig. 3B)。



**Fig. 2.** Transmission light micrographs of *P. naikaiensis* in viable condition. A whole body showing dark-green color due to symbiotic algal cells (A). Magnification of rectangular areas with solid line (B) and with dashed line (C) in A. *st*, statocyst. *cl*, ciliary layer. *Arrows*, protrusions, including pigments, extended toward the ciliated epidermal cells. *Arrowheads*, microvilli.



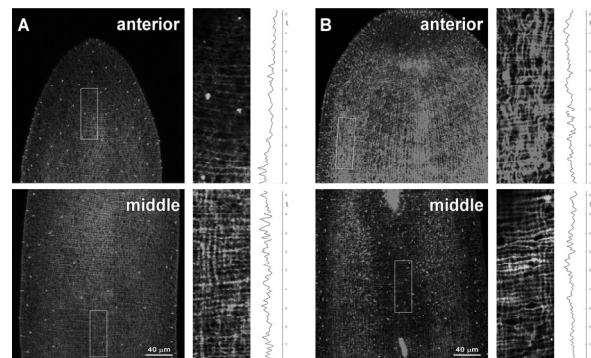
**Fig. 3.** Sequential video frames during elongation (A) and bending/rotation (B) processes of *P. naikaiensis*. Pickup frames were collected at 0.33 sec intervals from a video-recording system.

### 3-2. 細胞骨格要素および神経系の観察

免疫組織化学法により細胞骨格要素について個体の伸長時と収縮時の分布を比較した。共焦点画像の投影図から、伸長した個体では F-actin と核が体全体に配向し均一に分布しているのに対して (Fig. 4A), 収縮した個体では体表面にそれらの強いシグナルが部分的に集積していることが分かった (Fig. 4B)。また、個体の長軸方向と短軸方向に配向する F-actin 束が交差する形で網目状のネットワークを形成していることがわかった (Fig. 5)。前端部および中央部について短軸方向の F-actin 束の繰り返し間隔を計測した結果、体前端部の F-actin 束どうしの間隔 (平均値) が、伸長時 4.0  $\mu\text{m}$  から収縮時 2.2  $\mu\text{m}$  と短くなっていた一方で、体中央部では F-actin 束どうしの間隔に大きな変化は認められなかった (Fig. 5)。

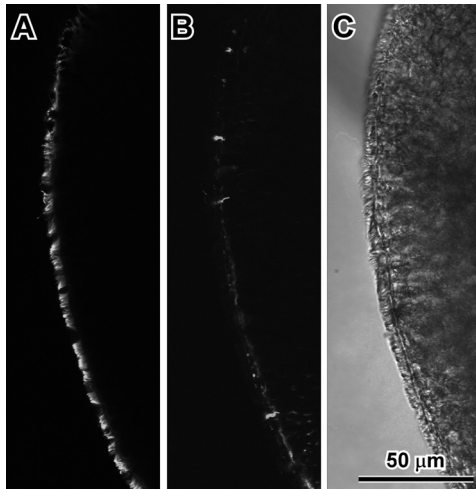


**Fig. 4.** Distribution of actin filaments in *P. naikaiensis*. Organisms in the elongated (A) and contracted (B) conditions. Each panel consists of maximum projection images of confocal microscopy stack of specimens stained with phalloidin (left) and DAPI (right). Note the high accumulation of both actin filaments and nuclei in the contracted organisms.



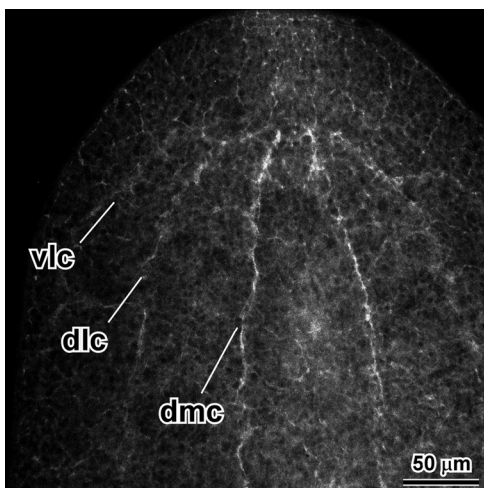
**Fig. 5.** Muscular organization of *P. naikaiensis*. Organisms in the elongated (A) and contracted (B) conditions. Maximum projection images of confocal microscopy stack of specimens stained with phalloidin. Each panel indicates confocal projection images consisting of anterior and middle regions (left column), enlarged rectangular areas in those projection images showing representative single optical sections with gray scale range (middle column), and density plot profiles generated from those gray images by using NIH Image/ImageJ software (right column), respectively. Mean value of peak to peak distance ( $\mu\text{m}$ ): 4.0 (anterior/elongated), 2.2 (anterior/contracted), 2.7 (middle/elongated), 2.6 (middle/contracted). Note the musculature consisted of a grid of circular and longitudinal crossover.

抗  $\alpha$ -tubulin 抗体による微小管の分布を調べた。表皮細胞の繊毛列の微小管層直下には同時二重染色した F-actin ネットワークが配向していること、および F-actin の周期的な強い陽性シグナルが認められた (Fig. 6)。



**Fig. 6.** Distribution of microtubules and F-actin in the surface region of *P. naikaiensis*. This panel consists of optical sections of confocal microscopy (A, B) and the DIC image of the same visual field (C). Double-labelling for  $\alpha$ -tubulin (A) and phalloidin (B). Note the  $\alpha$ -tubulin-positive signals on the ciliary microtubules and the underneath layer formed by actin filaments.

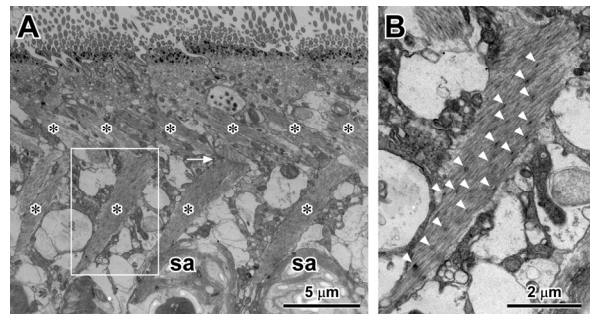
神経系の分布様式を明らかにするために、抗 dSap47 抗体による免疫染色を行った。頭部平衡胞 (statocyst) 付近を起点として左右三対の神経束が個体の長軸方向に走行しており、腹側に腹外側神経索 (vlc), 中間に背外側神経索 (dlc), 背側に背内側神経索 (dmc) が配向していることが確認され、散在神経系を有していることがわかった (Fig. 7)。



**Fig. 7.** Nervous system in the anterior region of *P. naikaiensis*. A maximum projection image of confocal microscopy stack of a specimen stained with anti-dSap47 antibody. Neurite bundles run along the anterior-posterior body axis. Note the lateral nerve cords interconnected by commissures. *dmc*, dorsomedial nerve cord. *dlc*, dorsolateral nerve cord. *vlc*, ventrolateral nerve cord.

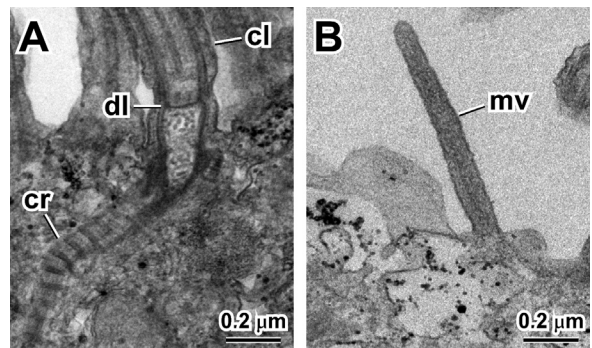
### 3-3. 体表の超微形態学的観察

電子顕微鏡法により解析を行った。表皮細胞層直下において、筋繊維束の走行が、より体表側では個体の短軸方向に、その直下 (体内側) では個体の長軸方向に配向しており、二方向性の筋繊維束が互いに交差していることがわかった (Fig. 8A)。また、筋細胞群が走行している隙間に共生藻が位置していることが確認された (Fig. 8A)。筋細胞の一部を拡大すると、筋繊維束上に周期的なドット状の高電子密度の構造が観察された (Fig. 8B)。



**Fig. 8.** Muscular organization in *P. naikaiensis*. Tangential sections were made from the dorsal surface of an organism. Low magnification image showing the musculature consisted of a grid of latitudinal and longitudinal crossover (A). Note the orderly array of those muscle cells. Enlarged rectangular area in A showing smooth-muscle cells characterized with dense bodies (B). Asterisks, muscle cells. An arrow, the interdigitation between muscle cells. *sa*, symbiotic algal cells. Arrowheads, dense bodies.

表皮細胞の繊毛基底小体に付随し横紋を呈する線維束 (ciliary rootlet) が認められた (Fig. 9A)。表皮細胞表面には光学顕微鏡で観察された微絨毛と考えられる構造体が認められた (Fig. 9B)。



**Fig. 9.** Ciliary and microvillus structures of *P. naikaiensis*. Longitudinal sections of a ciliary base with its attached striated rootlet (A) and of a microvillus (B). *cr*, ciliary rootlet. *dl*, dense layer. *cl*, cilium. *mv*, microvillus.

## 4. 考察

### 4-1. *P. naikaiensis* の形態学的特徴

自然環境下における *P. naikaiensis* の体長（長軸）、体幅（短軸）の平均値がそれぞれ 1.37, 0.34 mm と計測された。近縁種の *S. roscoffensis* は体長 2~5 mm, 体幅が 0.35~0.5 mm とされ (Semmler et al., 2008), *P. naikaiensis* は *S. roscoffensis* のそれに比べて長軸方向では 50% 以下で小型であることが分かった。

*P. naikaiensis* の体表面において極めて密な繊毛列が観察された。近縁種の *C. pulchra* においては繊毛が方向性を感じ取る機能を持つと考えられている (Bendini et al., 1973; Pfistermüller and Tyler, 2002)。 *P. naikaiensis* の滑走運動・旋回運動の様式は、 *C. pulchra* のそれと類似していた (Tyler and Rieger, 1999)。すなわち *P. naikaiensis* の運動様式は Convolutidae 科に特徴的な運動様式であり、繊毛運動による滑走運動と筋収縮による個体変形運動からなることがわかった。無腸類の運動制御機構に関しては、近縁種である *S. roscoffensis* において報告があり、それによると頭部を一部断頭し神経伝達経路を遮断することによって正の光走性が失われることが確認されている (Sprecher et al., 2015)。 *P. naikaiensis* においても同様の反応が認められるかどうか、解析を行う必要がある。

*P. naikaiensis* で観察された statocyst は *S. roscoffensis* のそれと類似していた (Bailly et al., 2014)。無腸動物において statocyst は重力知覚のための感覚構造であることが示唆されている (Ferrero and Bedini, 1991)。また、statocyst を起点として体軸に対してその長軸方向に左右三対の筋状のラインが観察された。これはこの部分に共生藻が配置できないことを意味しており、他の細胞構造が配向しているものと推測される。

### 4-2. *P. naikaiensis* の細胞骨格と神経系の分布

*P. naikaiensis* における F-actin 束の配向は、体軸の長軸方向に対して並行に配向する筋繊維束と体軸の短軸方向に配向する筋繊維束が観察され、 *S. roscoffensis* のそれと類似していることがわかった (Semmler et al., 2008)。無腸動物の筋繊維の分布様式は種によって異なるとさ

れ、 *S. roscoffensis* の筋繊維の配向は Convolutidae タイプに属している (Hooge, 2001)。 *P. naikaiensis* のそれは Convolutidae タイプと類似していることが確認された。個体の収縮前後の F-actin 束の配向について解析した結果、収縮時は主に体の前端部を使っていることが分かった。 *P. naikaiensis* の頭部の制御が個体全体の運動能力において重要な役割を担っていることが示唆された。近縁種である *C. pulchra* においても頭部を屈曲させることで方向転換や旋回運動を行うことが報告されている (Tyler and Rieger, 1999)。これらのことから *P. naikaiensis* が属する Convolutidae 科において神経支配による部位特異的な運動制御が示唆される。

神経系に関しては、 *S. roscoffensis* では左右 3 対の神経索を有し、頭部における感覚受容器官で外部環境の変化を受容し、神経系を介して行動を制御しているとされる (Sprecher et al., 2015)。 *P. naikaiensis* においても頭部の statocyst 付近から配向した左右 3 対の神経索が確認されたことから、 *S. roscoffensis* と類似した神経支配がなされているものと推察された。光学顕微鏡レベルで観察された筋状のラインは神経索の配向に一致しているものと考えられた。今後、神経系および細胞骨格系を標的とした阻害剤に対する生体運動機能への影響を調べる必要がある。

### 4-3. *P. naikaiensis* 体表の超微形態学的特徴

*P. naikaiensis* の筋繊維束上に周期的な高電子密度構造が認められ、哺乳動物の平滑筋細胞に特徴的な濃密体 (dense body) であると示唆された。近年、扁形動物門に属する *Schistosoma mansoni* の筋細胞の特性が、平滑筋と横紋筋のハイブリッドであるとの報告がなされている (Sulbarán et al., 2015)。今後、 *P. naikaiensis* の筋繊維系の詳細な解析を進め、哺乳類を含めた高等動物の平滑筋の制御機構の知見と合わせて、その運動機構の解明を進めていく必要がある。

表皮細胞において ciliary rootlet が観察された。動物種によって異なる構造を示すことが分

かっており、無腸動物においてはその特徴として基底体の最下端が狭く、繊毛の有効打の方向に湾曲して位置しているとされる (Lundin, 1997)。Ciliary rootlet は、主に rootletin と呼ばれるタンパク質によって構成されること、機械刺激の受容に関与することが示唆されている (Styczynska-Soczka and Jarman, 2015)。今後、*P. naikaiensis* に発現している Ciliary rootlet 構造の構成タンパク質を解明していく必要がある。

## 5. おわりに

本研究では瀬戸内海沿岸に棲息する *P. naikaiensis* の運動機構の解明を目指し、細胞骨格要素に着目した解析を行った。その運動様式、筋繊維束と微小管の配向、神経系の分布様式、体表付近の超微構造、が明らかとなった。近縁種である *S. roscoffensis* や *C. pulchra* 等と類似した行動様式、細胞骨格要素の分布、繊毛付近の構造を有することが示唆された。一方で、本研究で新たに発見された細胞構造、および神経支配を含めた生体運動の制御機構、の解明に向けて解剖学的・生理学的実験による詳細な解析を進めていく必要がある。

本研究の結果から、*P. naikaiensis* は原始的な動物でありながら、哺乳類を含む広く動物一般に備わっている普遍的な生体運動能を有していることが判明した。*P. naikaiensis* は運動制御機構の解明に向けた優れたモデル生物となりうる。

## 6. 謝辞

動物の採集にあたりご協力いただきました本学理学部附属牛窓臨海実験所の牛堂 和一郎氏、齊藤 和裕 氏に感謝いたします。

## 7. 参考文献

- Baguña J, Riutort M (2004). Molecular phylogeny of the Platyhelminthes. *Can J Zool*, 82, 168-193.
- Bailly X, Reichert H, Hartenstein V (2013). The urbilaterian brain revisited: novel insights into old questions from new flatworm clades. *Dev Genes Evol*, 223, 149-157.
- Bailly X, Laguerre L, Correc G, Dupont S, Kurth T, Pfannkuchen, A, Garet-Delmas MJ (2014). The chimerical and multifaceted marine coel
- Symsagittifera roscoffensis*: from photosymbiosis to brain regeneration. *Front Microbiol*, 5, 498.
- Bedini C, Ferrero E, Lanfranchi A (1973). The ultrastructure of ciliary sensory cells in two Turbellaria Acoela. *Tissue Cell*, 5, 359-372.
- Cannon JT, Vellutini BC, Smith J, Ronquist F (2016). Xenacoelomorpha is the sister group to Nephrozoa. *Nature*, 530, 89-93.
- Ferrero EA, Bedini C (1991). Ultrastructural aspects of nervous-system and statocyst morphogenesis during embryonic development of Convoluta psammophila (Turbellaria, Acoela). *Hydrobiologia*, 227, 131-137.
- Hejnal A, Martindale MQ (2008). Acoel development supports a simple planula-like urbilaterian. *Phil Trans R Soc B*, 363, 1493-1501.
- Hikosaka-Katayama T, Hikosaka A (2015). Artificial rearing system for *Praesagittifera naikaiensis* (Acoela, Acoelomorpha). *Bull Grad Sch Integrated Arts Sci Hiroshima Univ I*, 10, 17-23.
- Hooge MD (2001). Evolution of body-wall musculature in the Platyhelminthes (Acoelomorpha, Catenulida, Rhabditophora). *J Morph*, 249, 171-194.
- Jondelius U, Wallberg A, Hooge M., Raikova OI (2011). How the worm got its pharynx: phylogeny, classification and bayesian assessment of character evolution in Acoela. *Syst Biol*, 60, 845-871.
- Lundin K (1997). Comparative ultrastructure of the epidermal ciliary rootlets and associated structures in species of the Nemertodermatida and Acoela (Plathelminthes). *Zoomorphology*, 117, 81-92.
- Pfistermüller R, Tyler S (2002). Correlation of fluorescence and electron microscopy of F - actin - containing sensory cells in the epidermis of Convoluta pulchra (Platyhelminthes: Acoela). *Acta Zoolog*, 83, 15-24.
- Philippe H, Brinkmann H, Copley RR, Moroz L, Nakano H, Poustka AJ, Wallberg A, Kevin J. Peterson KJ, Telford MJ (2011). Acoelomorpha flatworms are deuterostomes related to Xenoturbella. *Nature*, 470, 255-258.
- Philippe H, Brinkmann H, Martinez P, Riutort M, Bagun J (2007). Acoel flatworms are not platyhelminthes: evidence from phylogenomics. *PLoS ONE*, 2(8): e717.
- Rouse GW, Wilson NG, Carvajal JI, Vrijenhoek RC (2016). New deep-sea species of Xenoturbella and the position of Xenacoelomorpha. *Nature*, 530, 94-97.
- Semmler H, Bailly X, Wanninger A (2008). Myogenesis in the basal bilaterian

- Symsagittifera roscoffensis (Acoela). *Front Zool*, 5, 14.
- Sprecher SG, Bernardo-Garcia FJ, van Giesen L, Hartenstein V, Reichert H, Neves R, Brauchle M (2015). Functional brain regeneration in the acoel worm *Symsagittifera roscoffensis*. *BiO*, bio-014266.
- Styczynska-Soczka K, Jarman AP (2015). The *Drosophila* homologue of Rootletin is required for mechanosensory function and ciliary rootlet formation in chordotonal sensory neurons. *Cilia*, 4, 9.
- Sulbarán G, Alamo L, Pinto A, Márquez G, Méndez F, Padrón R, Craig R (2015). An invertebrate smooth muscle with striated muscle myosin filaments. *PNAS*, 112, E5660-E5668.
- Tyler S, Rieger RM (1999). Functional morphology of musculature in the acoelomate worm, *Convoluta pulchra* (Plathelminthes). *Zoomorphology*, 119, 127-142.
- Yamasu T (1991). Fine structure and function of ocelli and sagittocysts of acoel flatworms. *Hydrobiologia*, 227, 273-282.