

瀬戸内海産無腸動物*Praesagittifera naikaiensis*の飼育システム

彦坂-片山 智恵¹⁾・彦坂 暁²⁾

¹⁾ 広島大学自然科学研究支援開発センター

²⁾ 広島大学大学院総合科学研究科

Artificial Rearing System for *Praesagittifera naikaiensis* (Acoela, Acoelomorpha)

Tomoe HIKOSAKA-KATAYAMA¹⁾ and Akira HIKOSAKA²⁾

1) Natural Science Center for Basic Research and Development, Gene Science Division, Hiroshima University

2) Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

Abstract: *Praesagittifera naikaiensis* is an acoelomorph worm native to the seashore of the Seto Inland Sea. *P. naikaiensis* harbors a species of prasinophytes, *Tetraselmis* sp., as a symbiont. The symbiotic algae are acquired horizontally from the environment during the larval stage. In this study, we established a method for the rearing of adult *P. naikaiensis* as a first step toward using the animal in the study of development, evolution, and the symbiotic mechanism. We kept the animals in aquaria with closed seawater circulations. The bottom of the aquarium was half covered with sand collected from the seashore of the Seto Inland Sea. An LED light was suspended over the aquarium to aid photosynthesis. The system was maintained at a salinity of 32–33 ppt and a temperature of 14°C, on a 14-h light (35–80 $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$)/10-h dark photoperiod. We succeeded in constantly producing sexually mature animals, independent of season. The system developed here will serve as a foundation for future studies on acoel evolution and development.

Keywords: Acoelomorpha, *Praesagittifera naikaiensis*, Sex maturation, Development, Symbiosis, Evo-Devo.

はじめに

生物が異種の生命体を体内に取り込んで馴致し共生関係を成立させること（共生体の「家畜化」）は、環境への適応力を増すと同時に、共生体の病原性に抵抗する重要な手段でもある。家畜化の進化は①世代毎に共生体を環境から取り込む（水平伝搬）段階から、②共生体との関係がより緊密になり、親から子へ共生体を伝搬する（垂直伝搬）段階を経て、③宿主と共生体が完全に一体化する（オルガネラ化）段階へ進むと考えられる。微細藻類を取り込み家畜化している無腸動物には段階①の種と段階②の種がどちらも含まれ、動物と藻類の共生進化を解明する上で理想的な動物群である。

動物界における無腸動物の系統的位置はまだまだ明らかではない。かつては扁形動物門渦虫綱無腸目に属していたが（Hyman, 1951）、分子系統学

的解析により基盤的な左右相称動物であるとされて、無腸動物 (Acoelomorpha) という独立の門が新設された (Katayama et al., 1993, Ruiz-Trillo et al., 1999, Bagnà and Riutort, 2004)。しかしその後、無腸動物は珍渦虫とともに新口動物と近縁であるとする異説が出され (Philippe et al., 2011)、議論が続いている。無腸動物の系統的位は動物の進化の全体像に関わる問題であり、この点でも興味ぶかい動物群である。

本論文で使用した無腸動物 *Praesagittifera naikaiensis* (Yamasu, 1982) (新称: ナイカイムチョウウズムシ) (図1A) は *Convoluta naikaiensis* として原記載された (Yamasu, 1982)。後にサギティフェラ科に移され、属称が変更された (Kostenko and Mamkaev, 1990)。さらに近年、無腸綱 (Acoela) 内の系統及び分類群が、リボゾーム遺伝子、ミトコンドリア遺伝子、形態形質に基づいて総合的に再検討され、その結果、現在はコンボルータ科プレサギティフェラ属に分類されている (Jondelius et al., 2011)。

P. naikaiensis を含め、ほとんどの無腸動物は雌雄同体で体内受精を行ない、共生藻を持たない卵を産む (McCoy and Balzer, 2002)。次世代の胚はふ化した後、環境中から共生藻を取り込んで (水平伝搬) 成長するので、前記の①の段階にある。一方で、*Waminoa litus* (ワミノアムチョウウズムシ) は親の卵巣内で共生藻を受け継いで (垂

直伝播) 産卵された当初から共生藻を内包した胚となり、個体発生を開始する (Barneah et al., 2007, Hikosaka-Katayama et al., 2012, 彦坂-片山ら, 2014)。ワミノア属の系統においては共生藻と宿主の関係がより緊密になり、共生藻をオルガネラのように次世代に伝える②のシステムが進化したと考えられる (図1B)。

我々は共生藻家畜化の進化を理解するために、これらの無腸動物を比較研究する事をめざし、まず垂直伝搬型の共生藻獲得様式を持つ *W. litus* の飼育系を立ち上げ (彦坂-片山ら, 2010)、共生藻を卵に取り込むメカニズムを解明した (Hikosaka-Katayama et al., 2012)。本論文では水平伝搬型の共生藻獲得様式を持つ *P. naikaiensis* について、性成熟した個体を恒常的に得ることができる飼育方法を確立したので、その知見を報告する。

材料と方法

動物の棲息地と採集法

材料の *P. naikaiensis* (Yamasu, 1982) (図1A) は広島県尾道市向島町立花の海岸 (図2Aの3の地点、34°36'12" N, 133°20'9" E) で採集した。本種は瀬戸内海のカस्प状海岸 (谷川, 2004) (図2B) に棲息している。岡山県玉野市産の本種が原記載された後、これまでに棲息が確認できた地点を図2Aに示した。

本種は5月から梅雨明けにかけて爆発的に増殖する。6~7月にその個体数は最大に達し、海水温の上昇とともに成体の死滅がはじまり、自然環境では7月下旬から11月上旬にかけて成熟個体の採集は困難になる。

動物が棲んでいるのは小潮レベルの波打ち際から0.5~1 m程度沖へ入った砂地で、干潮時には粒の大きい粗い砂利の下から細かい花崗岩質の砂が露出する (図2B)。潮が大きく引くとカスピの凹面から海へ向かって地下水がしみ出し、小さな流れを作る (図2C)。動物はカスピの凹みの湿っている場所に集積しており、その付近は他と比べて砂の表面が黒っぽく見える。6~7月の大潮の最干潮時には棲息場所の砂をひとつかみ揃うだけで大量の *P. naikaiensis* を捕獲できる。

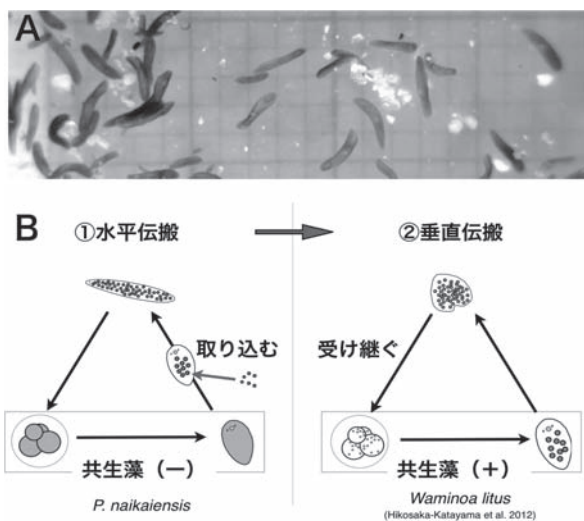


図1. A: *P. naikaiensis*. 背景は1 mmの方眼. B: 藻類獲得様式の進化の模式図.

飼育水槽の立ち上げと飼育条件

まず珪藻の培養システム（山口, 2012）を参考にしてフラスコによる培養を試みた。しかし培養液の濁りや、動物に奇形が観察されるなどの問題点が発生した（彦坂ら, 2014）ため、循環式的水槽による飼育を検討した。RG-20水槽（テトラ）に外掛式フィルター AT-20（テトラ）、テトラバイオパックを装着し、人工海水ライブシーソルト（デルフィス）と生息地の海水を1:1の比率で満たして循環させた。動物が棲息する間隙を作る

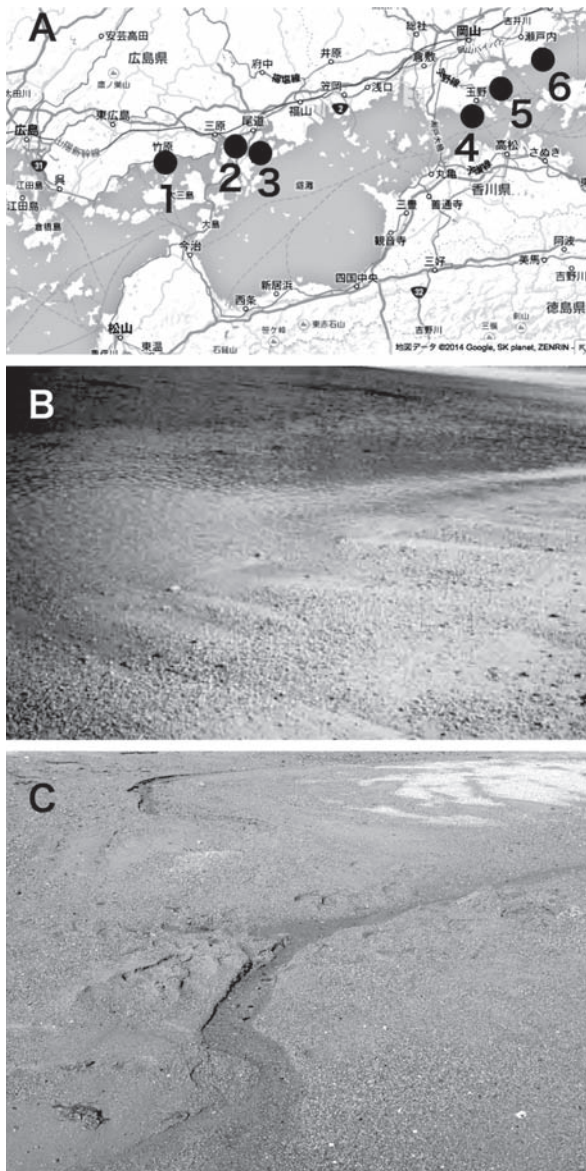


図2. A: 本種の棲息が確認できた地点。1. 広島県竹原市の向島町立花。2. 広島県尾道市向島町布刈鼻。3. 広島県尾道市向島町立花。4. 岡山県玉野市波川。5. 岡山県玉野市出崎。6. 岡山県瀬戸内市牛窓町鹿忍。B: 岡山県玉野市出崎（採集地5）のビーチカスプ。C: 採集地の砂浜。干潮時にはカスプの間に小さな流れができる。

ために、生息地の砂を滅菌して水槽の底面の半分程度に敷き詰めた。共生藻の生育を促すため、藻類培養液KW21（第一製鋼株式会社）を4000倍の濃度になるよう添加した。この水槽を低温恒温器 LTI-1000ED（EYELA）内に設置し飼育条件を検討した（図3A）。1ヶ月毎に飼育水の半分を人工海水に交換した。また、水槽の壁に付着した藻類を適宜掃除し、除去した。

卵巣成熟条件の検討

3月に採集した動物を水槽に入れ、実験室で飼育した。水温が8℃、10℃、12℃、14℃、18℃、20℃、22℃に上昇するまで各ステージで動物を取り出し、卵巣の成熟過程を肉眼及び実体顕微鏡（Leica MZ16 A）で観察した。検鏡はスライドガラス上に動物をのせて、海水と等張のMgCl₂液を滴下して麻酔し、動物の動きが止まったところにカバーガラスをかけて行った。

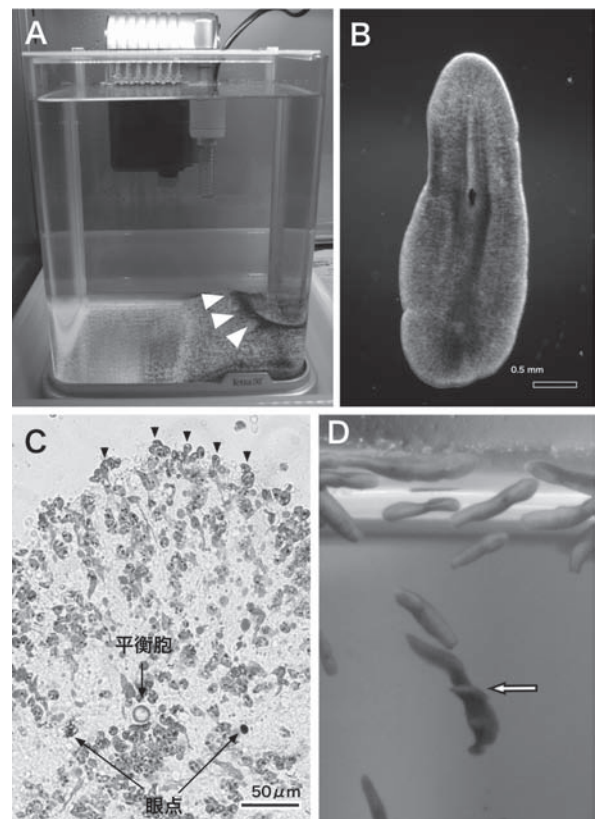


図3. A: 飼育水槽。白の矢頭が *P. naikaiensis*。B: *P. naikaiensis* 9月に採集した未成熟個体。C: 押しつぶし標本。矢頭で示した顆粒状の細胞が体内の共生藻 *Tetraselmis* sp. D: 交接中のペア（矢印）。

採卵

動物の体長が2 mm以上になり、卵巣が成熟すると、体の中央に黄色の卵巣が観察されるようになる。濾過滅菌した飼育海水を満たした50 mlのガラスボウル容器に卵巣の発達した複数の個体を移し、透明なフィルムで覆った。動物の入った容器を22～25℃の実験室に移し、直射日光の当たらない窓際（光量20～50 $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ）に静置した。

初期胚の飼育

容器の壁面に産みつけられた卵塊を人工海水の入った別のガラスボウルに取り分けてフィルムで覆い、室温22～25℃の実験室で発生させた。必要に応じて半換水を行った。観察には実体顕微鏡（Leica MZ16A）および正立型顕微鏡（Nikon LABOPHOT-2）を使用した。

結果

成体の飼育と観察

麻酔した成体の体長は長径約2.5 mm、短径約1 mm、体型はヘチマのような形で、前部がやや細く後端が丸みを帯びる（図3B）。体色は共生藻に由来し、原記載では深緑色を呈す（Yamasu, 1982）とあるが、近年は栄養塩濃度が低下している（多田ら, 2010）ためか、低水温期に自然環境中で採集した動物は濃褐色だった。

本飼育システムにより、およそ10ヶ月間継続的に飼育することができた。水槽内の動物のほとんどは常に水槽の底面で好みの光量を得られる場所に静止していた（図3A）。実験水槽で1週間程度飼育すると動物は本来の色と思われる深緑色を呈するようになった。動物を押しつぶして生物顕微鏡で動物を観察すると、体内に多数の共生藻 *Tetraselmis* sp.の細胞が認められた（図3C）。

性成熟と卵巣の発達

無腸動物は交接や皮下受精（hypodermic impregnation）により体内受精を行なう（Hyman, 1937, 1951）。*P. naikaiensis*の交接行動は本飼育水槽においても観察された。循環している水流を止

めて10分を経過する頃から水槽の底面や壁面で交接を行なうペアが認められた（図3D）。また性成熟した動物を選別してガラスボウルに入れた個体群においても交接行動が観察された。

*P. naikaiensis*の性成熟個体を、生息地における冬期水温で維持すると採卵可能な状態をしばらく維持できる事が知られていた（西岡, 1997）が、未成熟個体を成熟させる最適な条件についての検討はなされていなかった。今回、本種を水温14℃、光量35～80 $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ （明期：14時間、暗期：10時間）で飼育すると、1ヶ月程度で卵形成の進行に伴う卵巣の発達により体の中央に山吹色の卵巣が認められる個体を確認できるようになった（図4C）。*W. litus*において、卵巣の発達はI期（無卵巣期）、II期（卵黄形成初期）、III期（卵黄形成後期）に分けられる（Hikosaka-Katayama et al., 2012）。*P. naikaiensis*においても、*W. litus*同様に3つのステージが認められた（図4A-C）。

産卵・初期発生

動物の体の中央に肉眼ではっきりと卵巣が認められる性成熟個体を選別し、室温25℃の実験室に放置すると、数日以内に容器の壁面および底面に

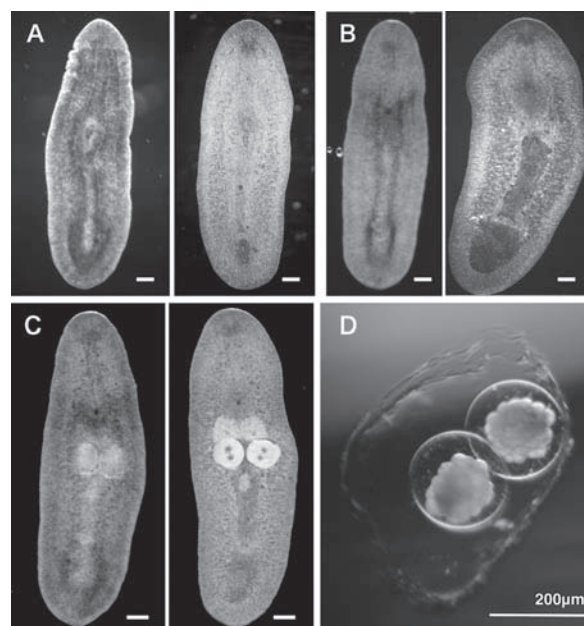


図4. A～C：*P. naikaiensis*の性成熟過程。左：軽く押さえた実体顕微鏡像、右：強く押さえて体内構造を撮影した像。A：無卵巣期（I期）。B：卵黄形成初期（II期）。C：卵黄形成後期（III期）。卵巣が山吹色になる。D：*P. naikaiensis*の卵塊。スケールは200 μm 。

卵塊を産出した。

共生藻を含まない卵は山吹色を呈し、1個ずつ透明な卵殻に覆われ、さらに1～3個の卵殻がゼリー状のセメント物質でボウルの壁に産みつけられていた(図4D)。

無腸動物は2つ組のらせん卵割(Bresslau, 1909, Henry et al., 2000)という独特の様式で発生が進む。本種においても、同様に発生が進み、産卵後3日目には胚は幼生として正常にふ化し、遊泳幼生になった。遊泳幼生を親とともに飼育すると、幼生は共生藻を体内に取り込んで緑化し、底面を這う幼若体になった(図5)。

考察

本研究では水平伝搬型の共生藻獲得様式を持つ無腸動物*P. naikaiensis*のモデル動物化に向けて、動物の飼育方法を確立し、卵巣が発達する条件を明らかにした(図3)。卵巣の発達した動物を25℃に置くことで産卵を促し受精卵を得た(図4)。卵塊あたりの卵数は1～3個であったが、Yamasu(1982)は、1匹あたりの産卵数は10個以下と報告している。産卵数を最大にするためにはまだ条件検討の余地があるようだ。

さらに産卵後の胚を経過観察したところ、正常発生を経てふ化した(図5)。ふ化後の遊泳幼生を成体とともに引き続き飼育することにより幼若体にまで発生させることができた(図5)。幼生はふ化後遊泳しながら容器の底や卵塊の残骸の上で間欠的に摂餌行動と思われる屈曲運動を行う。この際に有機物に混じって共生藻が取り込まれるのか

もしれない。

水槽内において交接行動や緑化した幼若体が観察されたことから、人工飼育下でも有性生殖により*P. naikaiensis*が増殖したことが分かる。

共生藻と宿主動物の共生が成立するためには体内に藻類が取り込まれ、維持される必要がある。従ってそのプロセスおよびメカニズムを知るためには、共生藻の取り込みから体内に定着する過程を詳細に観察することが必要になる。本研究で卵巣の発達する飼育条件を明らかにし、人工飼育下で産卵させた卵の正常発生を確認したことは共生成立過程を研究するための基盤となるものである。

微細藻類と宿主生物との細胞内共生関係は様々な系統で独立に何度も進化し、地球生命の進化にきわめて大きな役割を果たしてきた(Margulis, 1993)。この共生関係はいくつものステップを経て進化してきたと考えられるが、水平伝搬型から垂直伝搬型への進化は藻類と宿主との相互依存関係をより緊密なものにするという意味できわめて重要な進化的ステップである。無腸動物全体では水平伝搬が一般的である(McCoy and Balzer, 2002)ことから、*Waminoa*は他の無腸動物から分岐した後に垂直伝搬機構を進化させてきたと考えられる。この進化がいかにして可能になったのかを明らかにするためには、垂直伝搬型と水平伝搬型の卵形成過程を比較する事が鍵となる。この点で、本研究により両タイプの無腸動物を実験に用いることが可能になったことには大きな意義がある。

また、無腸動物は共生の研究のみならず、進化発生学(Evo-Devo)の観点からも興味深い動物群である。無腸動物は左右相称動物のなかでもっとも初期に分岐した動物群であるとされる一方で、新口動物と類縁関係があるともいわれ、論争が続いている。無腸動物の発生メカニズムを明らかにすることは、これらの論争を終らせる一助となると期待される。にもかかわらず、無腸動物の発生の研究は十分に行われてきたとはいいがたい。本研究により実験室内で*P. naikaiensis*のライフサイクルを回し、人工的に飼育する方法が開発されたことで、今後、この興味深い生き物の研究が進展することが期待される。

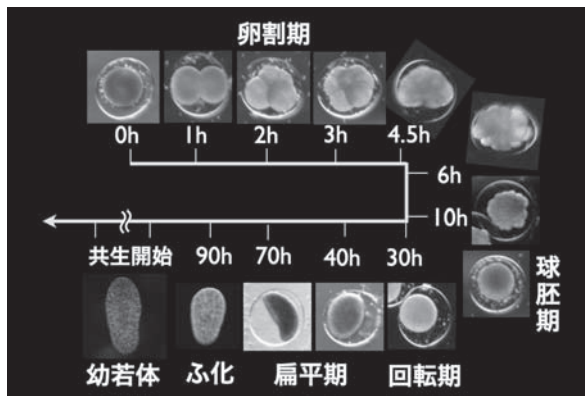


図5. *P. naikaiensis* の発生過程. 25℃飼育の場合。

謝辞

広島大学生物圏科学研究科の小池一彦博士には共生藻に関する助言をいただいた。広島大学自然科学研究開発センター (NBARD) 遺伝子実験部門の諸氏には研究環境の提供を受けた。広島大学向島臨海実験所の田川訓史博士と植木龍也博士には動物の採集に、山口信雄博士には飼育に、それぞれ助言と助力を頂いた。岡山大学牛窓臨海実験所の牛堂和一郎氏には岡山県での採集にご協力いただいた。また広島大学教育学研究科の富川光博士には和名の提唱について助言を頂いた。本研究は科学研究費補助金26924012の助成を受けた。ここに記して心より感謝する。

参考文献

- Baguña, J., Riutort, M. 2004. Molecular phylogeny of the Platyhelminthes. *Canadian Journal of Zoology*, **82**, 168-193.
- Barneah, O., Brickner, I., Hooge, M., Weis, V. M., Benayahu, Y. 2007. First evidence of maternal transmission of algal endosymbionts at an oocyte stage in a triploblastic host, with observations on reproduction in *Waminoa brickneri* (Acoelomorpha). *Invertebrate Biology*, **126**, 113-119.
- Bresslau, E. 1909. Die Entwicklung der Acoelen. *Verhandlungen der Deutschen zoologischen Gesellschaft*, **19**, 314-324.
- Henry, J. Q., Martindale, M. Q., Boyer, B. C. 2000. The unique developmental program of the Acoel flatworm, *Neochildia fusca*. *Developmental Biology*, **220**, 285-295.
- 彦坂-片山智恵、彦坂暁 2010. 無腸動物 *Waminoa* sp. の人工飼育と産卵法 -動物-藻類共生研究のモデル系開発に向けて. 広島大学総合科学研究科紀要 I 人間科学研究, **5**, 39-45.
- Hikosaka-Katayama, T., Koike, K., Yamashita, H., Hikosaka, A., Koike, K. 2012. Mechanisms of maternal inheritance of Dinoflagellate symbionts in the Acoelomorph worm *Waminoa litus*. *Zoological Science*, **29**, 559-567.
- 彦坂智恵、山口信雄、田川訓史、植木龍也、彦坂暁 2014. 瀬戸内海産無腸動物 *Praesagittifera naikaiensis* の飼育システムの開発. (社) 日本動物学会中国四国支部会報, 第**66**号, 18.
- 彦坂-片山智恵、彦坂暁 2014. ワミノアムチョウズムシに共生している渦鞭毛藻の母系遺伝のメカニズム (Web site) . URL: http://www.zoology.or.jp/news/index.asp?patten_cd=12&page_no=775 (2015年9月25日現在).
- Hyman, L. H. 1937. Reproductive system and copulation in *Amphiscolops langerhansi* (Turbellaria Acoela). *Biological Bulletin*, **72**, 319-326.
- Hyman, L. H. 1951. "The Invertebrates: Platyhelminthes and Rhynchocoela; the Acoelomate Bilateria." McGraw-Hill, New York, USA.
- Jondelius, U., Wallberg, A., Hooge, M., Raikova, O. I. 2011. How the worm got its pharynx: phylogeny, classification and bayesian assessment of character evolution in Acoela. *Systematic Biology*, **60**, 845-871.
- Katayama, T., Yamamoto, M., Wada, H., Satoh, N. 1993. Phylogenetic position of acoel turbellarians inferred from partial 18S rDNA sequences. *Zoological Science*, **10**, 529-536.
- Kostenko, A. G., Mamkaev, Y. V. 1990. The position of "green convoluts" in the system of acoel turbellarians (Turbellaria, Acoela).1. *Simsagittifera* gen. n. *Zoologicheskij Zhurnal*, **69**, 11-21.
- Margulis, L. 1993. *Symbiosis in Cell Evolution* 2nd ed., 永井進訳 2002. 『細胞の共生進化 第2版』、学会出版センター .
- McCoy, A.M., Balzer, I. 2002. Algal symbiosis in flatworms. In: "Symbiosis: Mechanisms and Model Systems." Seckbach J., ed., 561-574. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- 西岡恵 1997. 扁形動物渦虫綱無腸目の発生における筋肉・表皮複合構造の形成過程. 岡山大学理学部修士論文.
- Philippe H., Brinkmann H., Copley R. R., Moroz L. L., Nakano H., Poustka A. J., Wallberg A., Peterson K. J., Terford M. 2011. Acoelomorph flatworms are deuterostomes related to *Xenoturbella* *Nature*, **470**, 255-258.
- Ruiz-Trillo I., Riutort M., Littlewood D. T. J., Herniou E., Baguna J. 1999. Acoel flatworms: earliest extant

- bilaterian metazoans, not members of Platyhelminthes. *Science*, **283**, 1919-1923.
- 多田邦尚、藤原宗弘、本城凡夫 2010. 瀬戸内海の水質環境とノリ養殖. *分析化学*. **59**, 945-955.
- 谷川麻子、泉典洋、田中仁 2004. 汀線に直角に入射する波によって形成されるビーチカスプ. *応用力学論文集*, **7**, 1005-1012.
- 山口信雄 2012. ヒメギボシムシの実験室内飼育成功：卵から幼生変態まで. *生物学技術研究会報告* 第**23**号, 20.
- Yamasu, T. 1982. Five new species of acoel flat worms from Japan. *Garaxia*, **1**, 29-43.