

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—

彦坂－片山 智恵¹・彦坂 暁²

広島大学自然科学研究支援開発センター¹

広島大学大学院総合科学研究科²

Artificial rearing and oviposition of *Waminoa* sp. (Acoela, Acoelomorpha): Toward the development of a model system to study animal-algal symbiosis.

Tomoe Hikosaka-KATAYAMA¹ and Akira HIKOSAKA²

¹ Center for Gene Science, Hiroshima University

² Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

Abstract: *Waminoa* sp. is an acoelomorph worm that infests corals and harbors two species of dinoflagellates, *Amphidinium* sp. and *Symbiodinium* sp.. These symbiotic algae are inherited vertically from parent to offspring during oogenesis. In this study, we established a method for artificial breeding of *Waminoa* sp., as the first step toward using *Waminoa* sp. in the study of the mechanism underlying animal–algal symbiosis and the evolution of this symbiosis. We developed a system in which an aquarium circulated approximately 80 L of artificial seawater between an upper aquarium and a lower sump, each of which was 45 cm × 30 cm × 35 cm in size and contained 40 L of seawater. Water flowed into the upper aquarium from the sump alternately through a pipe outlet. The upper aquarium contained the hard coral *Symphyllia valenciennesii*, live rocks, and a layer of fine sand. A 150-W metal halide lamp was suspended over the aquarium to aid photosynthesis. The

system was maintained at a salinity of 32–33 ppt and a temperature of 23°C, on a 14-h light (17–50 μmol quanta m⁻²s⁻¹) : 10-h dark photoperiod. We succeeded in producing almost every stage of the life cycle of *Waminoa* sp., including the zygote, embryo, larva, juvenile, and adult stages, independent of seasons. In addition, we developed an artificial oviposition procedure that involved isolation from coral in the mature stage. The system developed in this study will serve as a foundation for future studies on acoel–algal symbiosis.

Key Words: Symbiosis, Acoelomorpha, *Symbiodinium*, *Amphidinium*, oogenesis, oviposition.

はじめに

サンゴ礁は海洋環境の中で最も生物多様性に富んだ生態系の一つである。サンゴ礁では光合成を

行う褐虫藻類がサンゴを初めとして、クラゲ、シヤコガイなどの様々な無脊椎動物と共生関係にあり、この共生関係がサンゴ礁生態系の基盤となっている。細胞内共生は生物の進化においてきわめて重要な役割を果たしており (Margulis, 1993), サンゴ礁でみられる動物 - 藻類の共生関係がどのような機構に基づいており、いかに進化してきたかは、進化学上の重要な問題である。

特にサンゴ礁に生息する無腸類 (無腸動物) は、様々な単細胞性藻類と多様な共生関係を進化させている点で興味深い動物群である。無腸類は、かつては扁形動物門に分類されていたが、左右相称 (三胚葉性) 動物の中で最も早期に分岐した動物群であることが分子系統学的解析により示唆されており (Katayama *et al.*, 1993, Baguña and Riutort, 2004), 最近では独立してAcoelomorphaという新しい門に分類されている。後生動物の初期進化を考える上でも重要な位置を占める動物である。無腸類はその名の通り上皮性の腸を持たない動物で、代わりに消化機能を担うシンシウム (合胞体) の組織が存在する。サンゴ礁域においては、プラシノ藻類のテトラセルミス属 (*Tetraselmis*) や渦鞭毛藻類のアンフィディニウム属 (*Amphidinium*) などの単細胞藻類と光共生の関係にある無腸類が多数報告されている (Yamasu, 1987)。無腸類は雌雄同体で交接により体内受精を行う (Hyman, 1951)。無腸類は通常、共生藻を含まない卵を産み、ふ化後に環境中から共生藻を取り込んで (水平伝搬) 成長する (Douglas, 1994)。

Waminoa 属の無腸類は紅海 (Barneah *et al.*, 2007a) やインドネシア周辺のサンゴ礁海域において、サンゴの体表で繁殖することが報告されている (Haapkylä *et al.*, 2009)。図1はインドネシアのあるダイビングスポットでの事例である。写真のように様々な種類のサンゴの表面で *Waminoa* spp. の繁殖の様子が観察される。また野外のみならず、水族館や個人で飼育されているサンゴにも大繁殖することがある (谷本, 2010)。 *Waminoa* は *Amphidinium* と *Symbiodinium* の2種類の共生藻を持つ (Winsor, 1990) という他に類を見ない興味深い特徴をもつ。さらに、最近、 *Waminoa* の一

種 *W. brickneri* の卵巣の卵母細胞内に共生藻が見いだされ、この動物が共生藻を含んだ卵を産むこと (垂直伝搬) が明らかになった (Barneah *et al.*, 2007b)。刺胞動物では垂直伝搬の例がいくつか報告されているが、左右相称動物において生殖細胞を介した藻類の垂直伝搬が確認されたのはこれが初めての事例である。この事実は、 *Waminoa* 属の系統において、共生藻を宿主の生殖システムに組み込んで次世代に伝えるように制御するメカニズムが進化し、藻類との共生関係がより緊密なものになっていることを意味する。 *Waminoa* 属において共生藻がどのようにして卵に取り込まれるのか、また、卵に取り込まれた共生藻が発生過程でどのように動物の体内に配置されていくのかは動物 - 藻類の細胞内共生の進化を理解する上で非常に興味深い問題であるが、その詳細は不明である。

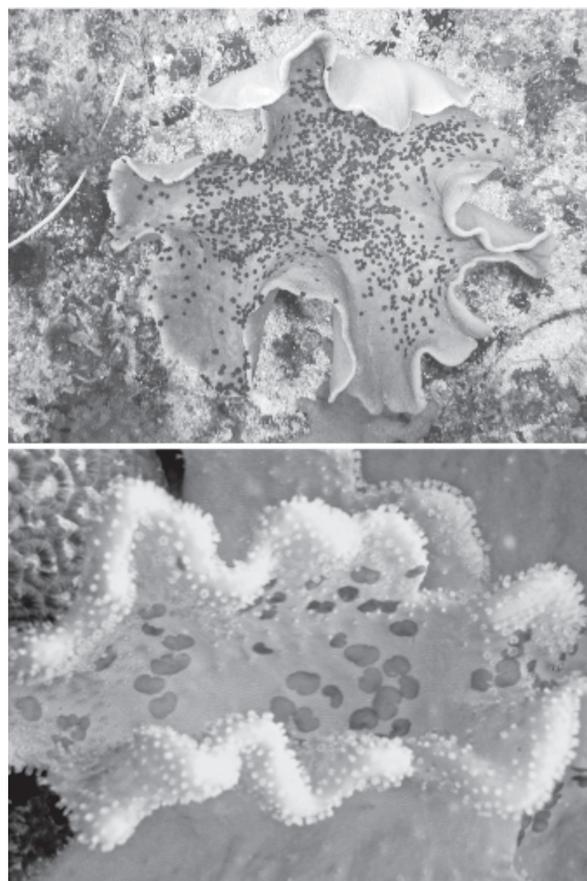


図1. サンゴ体表上の *Waminoa* spp.. インドネシア、イリアンジャヤ島北西部ラジャアンパット周辺で確認されたもの (撮影: 小池香苗氏)。サンゴ表面に見える茶色の丸い点々が *Waminoa* spp..

本研究では、このように複数種の共生渦鞭毛藻を制御し、より親密な共生関係を維持している *Waminoa* 属無腸類を、動物と藻類の共生メカニズムと進化を解明するための新しいモデル動物として開発することをめざし、人工飼育を試みた。その結果、室内水槽でサンゴと共に飼育することで、比較的簡便に動物を長期間維持することができた。さらにこのシステム下で飼育した動物の性成熟および産卵条件を見だし、産卵によって得られた初期胚の飼育を試みたところ、正常発生を経て幼個体に至るまでの飼育に成功したので、その知見もあわせて報告する。

材料と方法

飼育水槽の立ち上げと飼育条件

大量の *Waminoa* sp. が体表に付着しているハナガタサンゴ *Symphyllia valenciennesii* (インドネシア産) をペットショップ (オーシャンライフ, 呉市, 広島県) で購入した。サンゴ群体の直径は約20cm程度である。水槽の立ち上げについてはサンゴ室内飼育法に詳しい谷本 (Webサイト Room210) の方法に従った (谷本, 2010)。飼育にはアクリル3重管二槽式のオーバーフロー水槽 (45cm x 30 cm x 35 cm) を用いた。上槽に10kgのサンゴ砂 (ライブサンド) を敷き、下槽にポンプ (EHEIM, 20L) とクーラー (ゼンスイ, zc-500E), カルシウムリアクター (オーシャンライフ製) を設置したシステムを組んだ (図2, 3)。上部水槽に人工海水 (LiveSea salt, デルフィス) を満たしてライブロックを投入後、下部水槽にも人工海水を入れてポンプ (EHEIM) で循環させた。光源にメタルハライドランプ150W (岡村電産) を使用し、明/暗サイクルは14/10時間、光量17~50 $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ に調整した。カルシウムリアクターは3~5秒に1個程度の泡がカウントされるようにCO₂ポンベのレギュレーターで調整し、炭酸塩硬度が8~10程度に保たれるようにした。設置当初、水温は一般的なサンゴ飼育条件の25°Cで飼育した。冬季早朝には水温が20°Cを下回るため、石英ヒーターを投入した。サンゴには月一回程度乾燥アメエビなどを海水で戻して与えた。蒸



図2. 飼育水槽

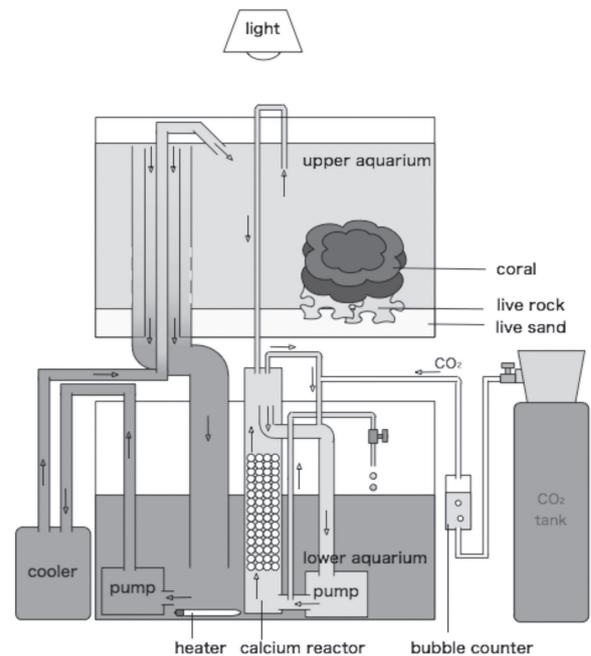


図3. 飼育水槽模式図

発したのと同量のイオン交換水を水槽に毎日補充した。月に一度、5L程度の海水をデトリタスごと下部水槽からホースで吸い上げて、同量の人工海水を足して換水した。

Waminoaの観察

サンゴの体表から駒込ピペットで吸い取るようにWaminoa 個体をはがし、50mlのガラスボウル(パイレックス)にとりわけて、実体顕微鏡(Leica MZFL III)で外見を観察した。写真撮影時には個体をスライドガラスにのせ、10% MgCl₂を滴下して麻酔した。

Waminoaの卵巣成熟条件の検討

25℃を起点に1週間おきに0.5℃ずつ水温を下げて飼育し、卵巣の発達が確認されるかどうかを肉眼及び実体顕微鏡で観察した。23℃で卵巣の発達した個体が恒常的に得られるようになったので、これ以降の飼育は23℃で行った。

採卵

卵巣がはっきりと1対の白点にまで発達した複数の個体を、飼育水槽の濾過海水を満たした50mlのガラスボウル容器に移し、透明なフィルムで覆った。明/暗サイクル14/10時間、光量35μmol quanta m⁻²s⁻¹、25℃に設定したエコノミー人工気象器(LH-40CCFL-TMCT, 日本医化器械製作所)に入れて定温放置した。

初期胚の飼育

容器に産みつけられた卵塊を人工海水の入った別のボウルに取り分けてフィルムで覆い、25℃の人工気象器内で発生させた。必要に応じて半換水を行った。観察には実体顕微鏡および正立型顕微鏡(Nikon LABOPHOTO-2)を使用した。

結果

Waminoa sp.成体の飼育と観察

Waminoa sp.を水槽内でハナガタサンゴと共存させることで長期間(18ヶ月)継続的に飼育することができた。水槽内でWaminoa sp.は常にサンゴの体表面に付着していた。水槽内のWaminoaの個体数はサンゴの1葉あたり約60匹で、飼育開始時点からほぼ一定に維持されていた。

麻酔したWaminoa sp.成体の体長は長径約2.5mm、短径約2mm、体型は逆ハート型で、正

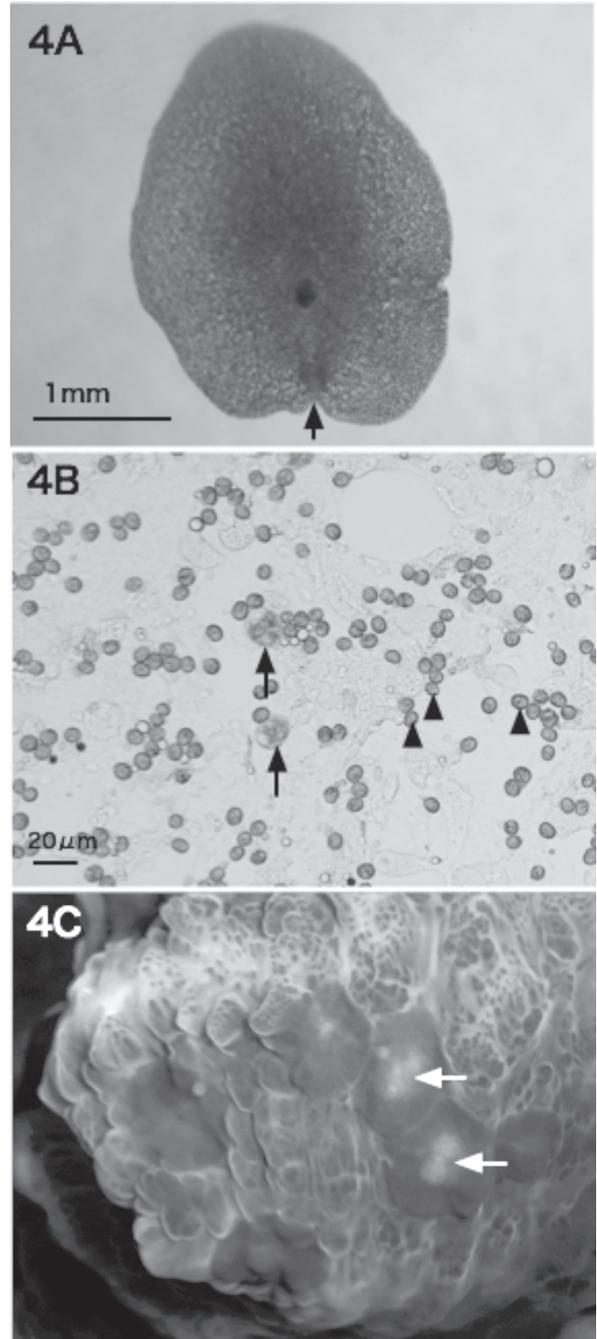


図4. (4A) *Waminoa* sp. 体の正中後端に切れ込み(矢印)がある。(4B) 体内の共生藻(押しつぶし標本)。大型の細胞は*Amphidinium* sp. (矢印)、それ以外の小型の細胞は*Symbiodinium* sp. (矢頭)。(4C) 飼育中のサンゴ表面に付着している*Waminoa* sp. 性成熟した個体では卵巣が白っぽく見える(矢印)。

中の尾部に切れ込みがあった(図4A矢印)。シナモンブラウンの体色は共生藻に由来する。体の周囲はやや透けていた(図4A)。外観は*Waminoa brickneri*に酷似するが、同種の特徴である白い斑点が認められなかった。

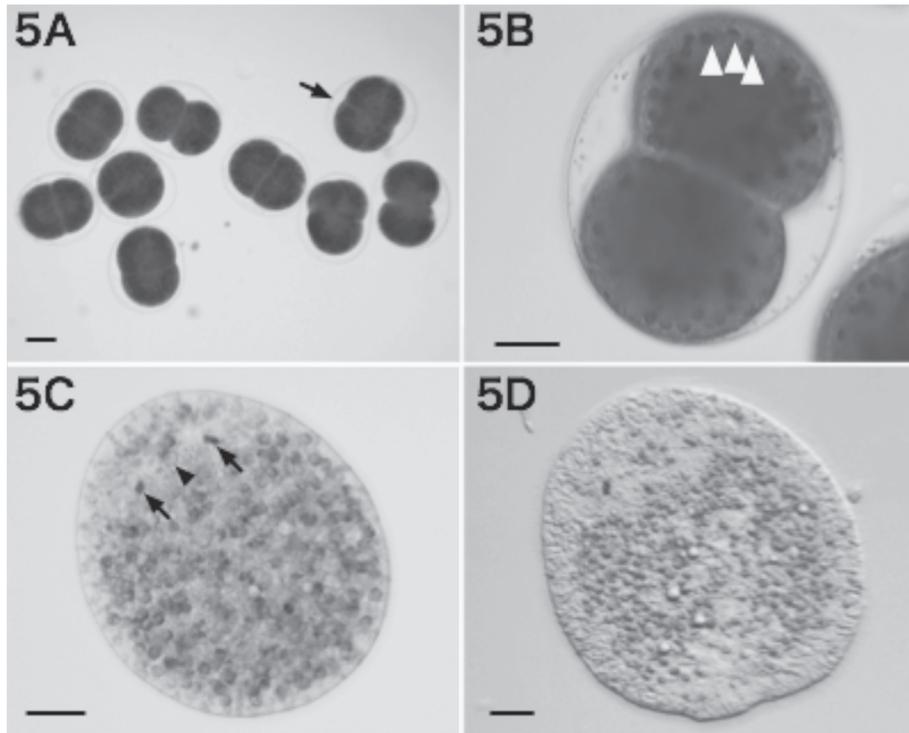


図5. (5A) 0日目初期胚. 胚は一個ずつ卵殻(矢印)に覆われている. (5B) 割球内の褐色の粒(矢頭)は *Symbiodinium* sp.. (5C) 5日目のふ化幼生. 平衡胞(矢頭)と眼点(矢印)を持つ. (5D) ふ化後約2ヶ月の幼若体. 平衡胞は消失している. スケールは50 μ m.

個体にカバーガラスをかけて平らにすると、半透明な体の構造が観察できる。体内には2種類の共生藻が認められた(図4B)。直径18~25 μ mの細胞が *Amphidinium* sp., 直径7~11 μ mで豊富に散らばっている細胞が *Symbiodinium* sp.である。

*Waminoa*性成熟と卵巣の発達

*Waminoa*をモデル動物として利用するためには水槽内で生殖巣の成熟—交配—産卵—胚発生—幼若体の成長、というライフサイクルを回せることが必要である。しかし水槽設置当初の25 $^{\circ}$ C飼育下においては雄性生殖器官の存在は認められたものの、卵巣が発達・成熟することはなかった。他科の無腸類 *Praesagittifera naikaiensis* では、卵を保有する性成熟個体を生息地における冬季水温で飼育すると、毎日産卵する状態をしばらく維持できる(西岡1997)ことから、*Waminoa* sp.においても低温で飼育することにより卵巣の発達が促される可能性があると考え、温度条件の検討をおこなった。

*Waminoa*を海水温23 $^{\circ}$ Cで飼育すると1ヶ月ほどで、卵形成の進行にともなう卵巣の発達により体

の中央が白っぽく見える個体が確認されるようになった(図4C)。様々な発達段階にある卵母細胞を持つ個体がサンゴ体表上に混在していた。

産卵・初期発生

肉眼ではっきりとした白点として卵巣が認められる複数の性成熟個体をサンゴからはがし、25 $^{\circ}$ Cに設定した人工気象器内で定温放置すると、数日以内に容器に卵塊が確認された。

卵は1個ずつ膜状の卵殻に覆われ、(図5A, 5B)、いくつかの卵殻がゼリー状の物質で覆われた卵塊として容器の内側に産みつけられていた。1つの卵塊に含まれる卵の数は1~15個程度であった。交尾行動はこれまでに一度も観察することができなかったが、卵塊をはがして経時観察すると、卵割が進行したので、受精卵であることがわかった。*Waminoa*も他科の無腸類同様に2つ組のらせん卵割(Henry *et al.* 2000)で発生が進んだ。卵内に色素顆粒は認められなかったが、共生藻が含まれていた(図5B)。胚は産卵後5日目にふ化し、遊泳幼生となった(図5C)。ただし、7日を過

ぎでも卵殻を出られずに崩壊する胚もあった。遊泳幼生を引き続き飼育すると、産卵後20日頃までには遊泳をやめて底面を這う幼若体になった(図5D)。

考察

本研究では共生藻を卵に取り込み垂直伝搬する無腸類 *Waminoa* sp. 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。卵巣の発達した動物をサンゴから単離して25℃で定温放置することで産卵を促し受精卵を得た。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。ふ化後の遊泳幼生を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。また水槽内においてもしばしば遊泳幼生が観察されたことから、水槽内でも有性生殖による個体の増殖が起きていることが示唆された。

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。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。無腸類全体では水平伝搬が一般的である(McCoy and Balzer, 2002)ことから、*Waminoa* は他の無腸類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は興味深い問題である。

共生藻が垂直伝搬するためには卵母細胞形成過程のいずれかの時点で細胞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卵形成の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たことは藻類の卵への移行を研究するための基盤となるものである。

また、無腸類は共生の研究のみならず、進化発生学の観点からも興味深い動物群である。無腸類は左右相称動物のなかでもっとも初期に分岐したグループであり、左右相称動物に普遍的な発生メカニズムを明らかにする鍵となる動物である。しかしこれまで、無腸類の発生の研究は十分に行われてきたとは言いがたい。本研究により実験室内で *Waminoa* sp. のライフサイクルを回し、人工的に採卵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。

謝辞

ROOM210の谷本豊氏とオーシャンライフの瀧野謙治氏には飼育水槽の立ち上げと *Waminoa* sp. の入手にご協力いただいた。広島大学生物圏科学研究科の小池一彦博士と水産総合研究センター西海区水産研究所の山下洋博士には渦鞭毛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) 遺伝子実験部門の山下一郎博士には飼育水槽の設営に関する支援を受けた。同部門の小池香苗氏には *Waminoa* の写真(図1, 図4C)を提供していただいた。また広島大学男女共同参画室(CAPWR)の諸氏にも支援を受けた。本研究は科学研究費補助金22924017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., LaJeunesse, T.C., Benayahu, Y. 2007a. Three party symbiosis: acoelomorph worms, corals and unicellular algal symbionts in Eilat (Red Sea). *Marine Biology*, **151**, 1215-1223.
- Barneah, O., Brickner, I., Hooge, M., Weis, V.M., Benayahu, Y. 2007b. 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.
- Douglas, A.E. 1994. *Symbiotic Interactions*. Oxford

- University Press. New York.
- Haapkylä, J., Seymour, A.S., Barneah, O., Brickner, I., Hennige, S., Suggett, D., Smith, D. 2009. Association of *Waminoa* sp. (Acoela) with corals in the Wakatobi Marine Park, South-East Sulawesi, Indonesia. *Marine Biology*, **156**, 1021-1027.
- 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.
- Hyman, L.H. 1951. *The Invertebrates: Platyhelminthes and Rhynchocoela; the Acoelomate Bilateria*. McGraw-Hill, New York: pp1-531.
- 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.
- 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., pp. 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.
- Ogunlana, M., Hooge, M., Tekle, Y.I., Benayahu, Y., Barneah, O., Tyler, S. 2005. *Waminoa brickneri* n. sp. (Acoela: Acoelomorpha) associated with corals in the Red Sea. *Zootaxa*, **1008**, 1-11.
- 谷本 豊 2010. Room210 (Web site). URL: <http://room210.cool.ne.jp/articles.html> (2010年5月26日現在).
- Winsor, L. 1990. Marine Turbellaria (Acoela) from North Queensland. *Memoirs of the Queensland Museum*, **28**, 785-800.
- Yamasu, T., Okazaki, A. 1987. Preliminary faunal list of acoel turbellarian species from the Ryukyu islands. *Garaxia*, **6**, 61-68.