

■原 著■ 2021 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 扁形動物の微小管重合蛋白質遺伝子を同定する試み

越智拓海<sup>1,2</sup> 石田汐里<sup>1</sup> ニエンタンフォン<sup>1</sup> 橋 友理香<sup>2</sup> 筒井直昭<sup>3</sup>  
小谷 享<sup>1,2,4</sup>

Identification of Primitive Microtubule-Associated Protein Genes using  
the Marine Planarian, *Stylochoplana pusilla*

Takumi Oti<sup>1,2</sup>, Shiori Ishida<sup>1</sup>, Phuong Thanh Nghiem<sup>1</sup>, Yurika Hashi<sup>2</sup>,  
Naoaki Tsutsui<sup>3</sup>, Susumu Kotani<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> Department of Marine Bioresources, Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu City, Mie 514-8507, Japan.

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: kotani-bio@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Microtubule-associated proteins (MAPs) interact with microtubules and regulate cell division, cell morphogenesis, cell movement, spindle formation, and intracellular transport. Mammalian MAPs, MAP2, MAP4, and Tau, have a repeating site of the "AP (assembly-promoting) sequence" in the central part of the microtubule-associated site that directly binds to microtubules. Recently, genetic analysis revealed that molecules with repeated AP sequences exist throughout the animal kingdom, but it remains unclear whether these molecules function as MAPs. The purpose of this study was to identify the primordial MAP molecule using the marine planarian, *Stylochoplana pusilla*. First, we examined the breeding method to maintain *S. pusilla* in the laboratory. As a result of changing the diets, the *S. pusilla* chased and preyed on brine shrimp, and the body size and survival rate of the group that ate the brine shrimp were high. Furthermore, two *S. pusilla* MAP (SpMAP) molecules were identified based on RNA-seq data. The predicted amino acid sequences were analyzed based on the cloned sequences of SpMAP mRNA. As a result, the two types of SpMAPs had different numbers of AP sequence iterations, and there were SpMAP\_4R with 4 repeating AP sequences and SpMAP\_5R with 5 repeating AP sequences. SpMAP\_4R was missing the 4th AP sequence of SpMAP\_5R. Mammalian neural MAPs, MAP2 and  $\tau$ , lack the second AP sequence of systemic MAP4, so SpMAPs may also show differences in localization and function such as neuronal and systemic. In the future, we will analyze the functional conservation and localization of these SpMAPs and clarify the evolutionary conservation of the MAPs family.

**Keywords:** microtubule-associated proteins (MAPs), assembly-promoting (AP) sequence, *Stylochoplana pusilla*

### 序論

微小管は真核生物の細胞骨格の一種であり、細胞分裂、細胞内輸送、細胞の複雑な形態の維持などの重要な細胞機能の発現に寄与する。これらの機能を発現するためには、微小管が様々な微小管結合タンパク質 (MAPs) と相互作用する必要がある。中でも、

微小管の形成や微小管の束化、他の細胞骨格との架橋などの微小管の基本構造に関わる哺乳類の MAPs として MAP2/MAP4/Tau スーパーファミリーが知られている。MAP2、MAP4、Tau はいずれも N 末端側に突起部位 (Projection domain)、C 末端側に微

小管結合部位 (Microtubule-binding domain) をもち、微小管結合部位はプロリンに富む Pro-rich 領域、繰り返し領域、尾部 tail に分けられる (図 1)<sup>1)</sup>。繰り返し領域には、微小管結合活性をもつ 18 残基アミノ酸の基本構造 “Assembly-Promoting (AP) 配列” が複数個あり、選択的スプライシングにより AP 配列の繰り返し数に違いが生じる。哺乳類の MAP2 (AP 配列の繰り返し数; 3 個)、MAP4 (5 個)、Tau (4 個)の間では AP 配列の相同性が高く、分子進化の過程で、1 個の AP 配列をもつ祖先分子が重複し、繰り返しをもつ始原 MAP 分子が誕生し、その後、複数の分子に分岐したと考えられている<sup>1)</sup>。哺乳類においては、MAP2 や Tau は神経特異的に発現する一方で、MAP4 は神経系も含めた全身で発現する。これらのことから、まず動物細胞の形態・機能維持のための MAP4 が獲得され、中枢神経系が獲得された以降に MAP2-like 分子や Tau-like 分子に分岐したと考えられるが、哺乳類以外の生物種における MAPs 機能の普遍性や進化的関連についてはほとんど研究されていない。近年、哺乳類以外の動物種にも AP 配列の繰り返しを持つ遺伝子が存在することが明らかになってきたが、MAPs としての機能を持つかどうかは不明である。我々はこれまでに、哺乳類 MAP4 の AP 配列のアミノ酸配列情報を元にタンパク質データベースから相同性検索を行い、相同性が高い 581 種類のタンパク質を見出している<sup>2)</sup>。また、AP 配列に類似した領域をもち、哺乳類 MAPs と類似する MAPs 遺伝子が硬骨魚類のゼブラフィッシュ、両

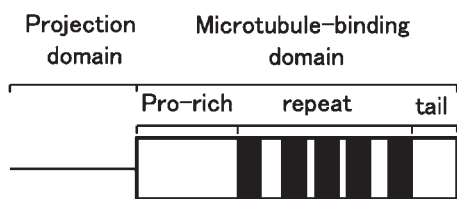


図 1. microtubule-associated protein (MAP) の基本構造。N 末端側に突起部位 (Projection domain)、C 末端側に微小管結合部位 (Microtubule-binding domain) をもち、Microtubule-binding domain はプロリンに富む (Pro-rich) 領域、微小管結合活性を持つ assembly-promoting 配列の繰り返し (repeat) 領域、尾部 (tail) 領域に分けられる。

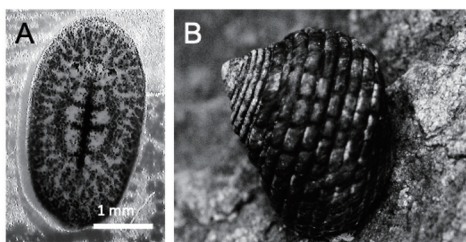


図 2. カイヤドリヒラムシ (*Stylochoplana pusilla*) (A) と宿主のイシダタミ (*Monodonta confusa*)。スケールバー: 1 mm。

生類のアフリカツメガエル、軟体動物のジャンボアメフラシ、線形動物の線虫など様々な生物種に存在することを明らかにしている。特に、線虫の MAPs 遺伝子 (Ptl-1) に関しては、Ptl-1 が試験管内で微小管を重合させることも明らかにした<sup>3)</sup>。新口動物、旧口動物で共通して MAP ファミリーが存在したことから、MAPs の祖先分子は新口動物、旧口動物に分岐する前に出現し、その基本的な分子構造と機能は進化的に保存されている可能性が高い。

扁形動物カイヤドリヒラムシ (*Stylochoplana pusilla*) は新口動物、旧口動物に分岐点近くに位置する最も原始的な左右相称動物で、中枢化された神経 (原型脳) をもち、カイヤドリヒラムシ (図 2A) は岩礁地帯に生息するイシダタミ (*Monodonta confusa*) (図 2B) に共生している。最近、左右相称動物に普遍的な下垂体後葉ホルモン (バソプレシン/オキシトシン) の祖先型ホルモンがヒラムシで発見された<sup>4)</sup>。そのため、左右相称動物に普遍的な分子の探索や中枢神経系のプロトタイプの研究に適していると考えられる。しかし、カイヤドリヒラムシの生態や食性には不明な点が多く、実験室での繁殖維持方法は確立されていない。そこで本研究では、扁形動物カイヤドリヒラムシの飼育系の確立と左右相称動物における始原 MAP の探索を試みた。

## 材料と方法

### 実験動物とサンプリング

神奈川県足柄郡真鶴町および神奈川県三浦郡葉山町芝崎海岸で採取したカイヤドリヒラムシ (*Stylochoplana pusilla*) を用いて飼育実験を行った。また、岡山県瀬戸内市牛窓町周辺で採取したカイヤドリヒラムシを用いて MAPs-like 遺伝子の同定を行った。カイヤドリヒラムシはイシダタミ (*Monodonta confusa*) に片利共生している。採取したイシダタミをハンマーで割り、殻の入り口から内部に生息するカイヤドリヒラムシを採取し、プラスチックシャーレに海水を入れ飼育した。通常の飼育は、30°C、恒暗条件下で行い、餌としてブラインシュリンプを 3 日に 1 度与えた。また、マリンアート Hi (Osakayakken, Osaka, Japan) を用いて人工海水を作製し、飼育水とした。水換えは餌を与えた次の日に行った。

### 飼育水の検討

飼育水の影響を解析するため、神奈川県平塚市袖ヶ浜で採取した海水、人工海水 2 種 [細谷ら (2019, Marine Environmental Research) の海水<sup>5)</sup>、マリンアート Hi] を用いて、恒暗条件、30°C で 14 日

間飼育した。1週間に1度、倒立顕微鏡 (CKX-41, Olympus, Tokyo, Japan) でヒラムシの写真を撮影し、ImageJ (ImageJ 1.44p) を用いてヒラムシの大きさ (面積) を測定した。

### 餌の検討

人工海水 (マリンアート) 中でブラインシュリンプ、アカムシ、シアノバクテリアの餌を与えて28日間、恒暗条件、30°Cで飼育した。ブラインシュリンプ (動物性の餌) は週に2度与え、シアノバクテリアはプレートにマット状になるよう培養し、14日目に1度交換した。1週間毎にカイヤドリヒラムシの写真を撮影し、ImageJを用いてヒラムシの大きさ (面積) を測定した。

### カイヤドリヒラムシ *Stylochoplana pusilla* MAP (SpMAP) 遺伝子の探索

カイヤドリヒラムシのRNAseqにより得られたトランスクリプトームの中から、他の動物のMAPファミリー遺伝子配列と相同性を持つものをBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) を用いて探索し、SpMAP候補遺伝子とした。これらの遺伝子の予測アミノ酸配列を用い、AP配列の繰り返しを持つ分子SpMAP (SpMAP 4R, SpMAP 5R) を同定した。

### SpMAP 遺伝子のクローニング

先行研究に従って遺伝子クローニングを行った<sup>6)</sup>。具体的には次のように行った。カイヤドリヒラムシのtotal RNAをNucleoSpin RNA Kit (Takara bio, Tokyo, Japan) を用いて抽出した。Total RNAの濃度はナノドロップ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて測定した。このTotal RNAからOmniscript Reverse Transcriptase (Qiagen, Strassel, Germany) を用いて、最終濃度10 ng/μLになるように一本鎖cDNAを合成した。Premix Taq™ (Ex Taq™ Version 2.0) (Takara bio, Tokyo, Japan) とSpMAP遺伝子に特異的なプライマー (Forward: 5' -GTGCGGCC GCAAGCTATGGAAACCGTTGTGACCA-3', Reverse: 5' -AAGGAGATATACATATCAACCACCGCCTGGC TT-3', 産物サイズ; SpMAP 4R 684 bp, SpMAP 5R 774 bp) を用いてPCRを行った。PCRを行ったサンプルは1.5%アガロースゲルで泳動し、Ez-Capture II (ATTO, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。泳動後、目的のバンドを切り出し、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nihon Genetics, Tokyo, Japan) を用いて、アガロースゲルからDNAを抽出した。抽出したDNAをp-GEM-T Easy Vector System (Promega,

WI, USA) を用いてp-GEM-T Easy Vectorに組み込んだ。このベクターを*E. coli* DH5 α Competent Cells (Takara bio) のプロトコルに従い、*E. coli* DH5 αに組み込んだ。目的インサートをもつベクターが組み込まれた*E. coli* DH5 αをLB培地で培養し、増幅した大腸菌からFastGene Plasmid Mini Kit (Nihon Genetics) を用いてプラスミドDNAを精製した。このプラスミドDNAのシーケンスを行い、塩基配列を決定した。

### 分子系統解析

既報<sup>2)</sup>を参照し、Gene Bankに登録されているMAPファミリー遺伝子とSpMAP遺伝子を用いて分子系統解析を行った。解析にはMEGA X (ver. 10.1.8) を用いた。

### 統計解析

カイヤドリヒラムシのサイズは平均±標準誤差で示した。GraphPad Prism8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用い、one-way analysis of variance (ANOVA) あるいはtwo-way ANOVAで有意差がみられたものはpost hoc Tukey's testを用いて多群比較を行った。

## 結果

### 海水の違いがカイヤドリヒラムシの体のサイズに与える影響

海水と2種の人工海水を用いて飼育水の違いによるカイヤドリヒラムシの大きさの変化を解析した。飼育7日間で海水飼育群、人工海水2種 (マリンアート群、細谷らの人工海水群) の体サイズに差はみられなかった (図3A)。一方で、飼育14日目では、人工海水2種に比べ、海水飼育群で体のサイズが大きくなった (図3A)。これらを定量的に解析した結果、海水飼育群は7日目にかけて体が大きくなり (1.3倍)、その後14日目までサイズが維持されていた (図3B)。一方で、人工海水で飼育した群では、飼育7日で体のサイズはおおきく変わらず、飼育14日で飼育0日目よりも体サイズが小さくなる (マリンアート; 0.9倍、細谷らの人工海水; 0.8倍) 傾向を示した (図3B)。

### 餌の違いがカイヤドリヒラムシの体のサイズに与える影響

カイヤドリヒラムシの食性と成長の関係を調べる目的で、ブラインシュリンプ (動物性の餌) を与えた群 (ブラインシュリンプ群)、シアノバクテリア (植物性の餌) を与えた群 (シアノバクテリア群)、ブラ



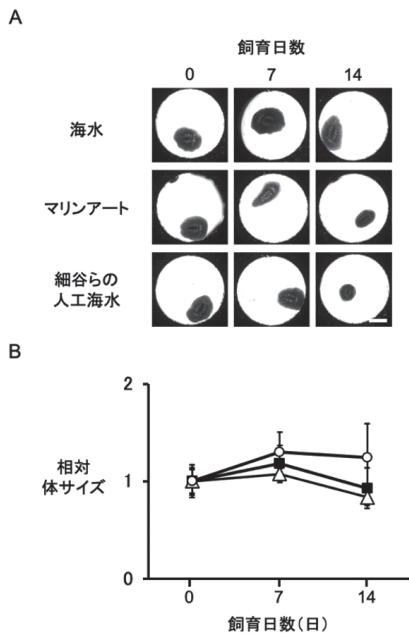


図3. 海水の違いがカイヤドリヒラムシの体のサイズに与える影響. (A) 異なる海水で2週間飼育した時のカイヤドリヒラムシ. 平塚市袖ヶ浜で採取した海水で飼育した群(上段)に比べて、マリンアート(中段)、細谷らの人工海水(下段)で飼育した群では飼育2週間で対サイズが小さくなった. スケールバー: 1 mm. (B) 飼育0日目の各群の平均体サイズを'1'とした時の相対体サイズ. ○は海水、■はマリンアート、△は細谷らの人工海水.

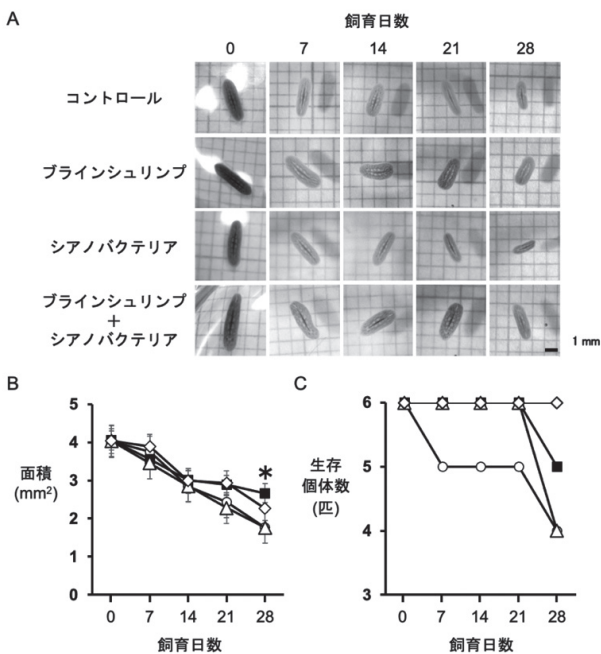


図4. 餌の違いがカイヤドリヒラムシの体のサイズに与える影響. (A) 異なる餌を用いて28日間飼育されたカイヤドリヒラムシ. 28日間絶食させた群(コントロール)とシアノバクテリア給餌群では、動物性の餌を与えたブラインシュリンプ群やブラインシュリンプ+シアノバクテリア群に比べて体サイズが小さくなった. スケールバー: 1 mm. (B) 体サイズの定量解析. \* $P < 0.05$ , vs ブラインシュリンプ. (C) 餌の違いによる生存個体数の違い. ○はコントロール、■はブラインシュリンプ、△はシアノバクテリア、◇はブラインシュリンプ+シアノバクテリア給餌群.

インシュリンプとシアノバクテリアを同時に与えた群(ブラインシュリンプ+シアノバクテリア群)を用い、コントロールとして絶食群を用いた(コントロール群)。飼育14日目までは群間でサイズの違いはみられなかったが、飼育21日目以降、コントロール群とシアノバクテリア群ではブラインシュリンプ群、ブラインシュリンプ+シアノバクテリア群に比べて、サイズが小さくなった(図4A)。これらを定量的に解析した結果、飼育21日目では、コントロール群とシアノバクテリア群はブラインシュリンプ群、ブラインシュリンプ+シアノバクテリア群と比べて、サイズが小さくなる傾向を示した(図4B)。また、飼育28日目では、コントロール群、シアノバクテリア群ではブラインシュリンプ群に比べてサイズが有意に小さくなった( $P < 0.05$ )(図4B)。さらに、飼育期間での生存個体数を解析した結果、ブラインシュリンプ+シアノバクテリア群は28日間で全個体が生存していたのに対し、ブラインシュリンプ群では5個体、コントロール群とシアノバクテリア群では4個体の生存に留まった(図4C)。

### カイヤドリヒラムシによるブラインシュリンプの捕食

カイヤドリヒラムシを飼育しているシャーレにブラインシュリンプを与え、カイヤドリヒラムシがブラインシュリンプを捕食する様子を観察した。カイヤドリヒラムシはブラインシュリンプへと近づき(図5A)、捕食を始める(図5B)。ブラインシュリンプから離れた場所にいたカイヤドリヒラムシがブラインシュリンプへと群がり捕食する様子が観察された(図5C)。

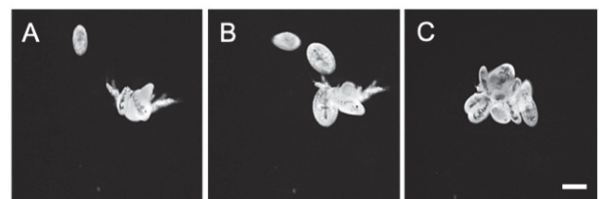


図5. カイヤドリヒラムシがブラインシュリンプを捕食する様子. カイヤドリヒラムシを入れたシャーレにブラインシュリンプを入れる(A)と、カイヤドリヒラムシがブラインシュリンプへと近づき(B)、群がって捕食する(C)様子が観察された. スケールバー: 200 μm.

### SpMAPの分子構造と系統樹解析

SpMAP遺伝子特異的なプライマーを用いてPCRを行った結果、700 bp付近にバンドが観察された(予想バンドサイズ: SpMAP 4R 684 bp, SpMAP 5R 774 bp)(図6A)。これらの塩基配列を解析し、既存のMAPファミリーのアミノ酸配列情報をもと

に SpMAP のアミノ酸配列を推定した (図 6B, C)。SpMAP 4R (図 6B)、SpMAP 5R (図 6C) とともにプロジェクトドメイン、プロリンリッチドメイン、AP 繰り返しドメインと想定される領域が確認された。SpMAP 4R では SpMAP 5R の 4 番目の AP 配列が欠落していた。次に、これら 2 つの SpMAP の予測アミノ酸配列と、既知の MAP ファミリーのアミノ酸配列を用いて系統樹解析を行った (図 7)。そ

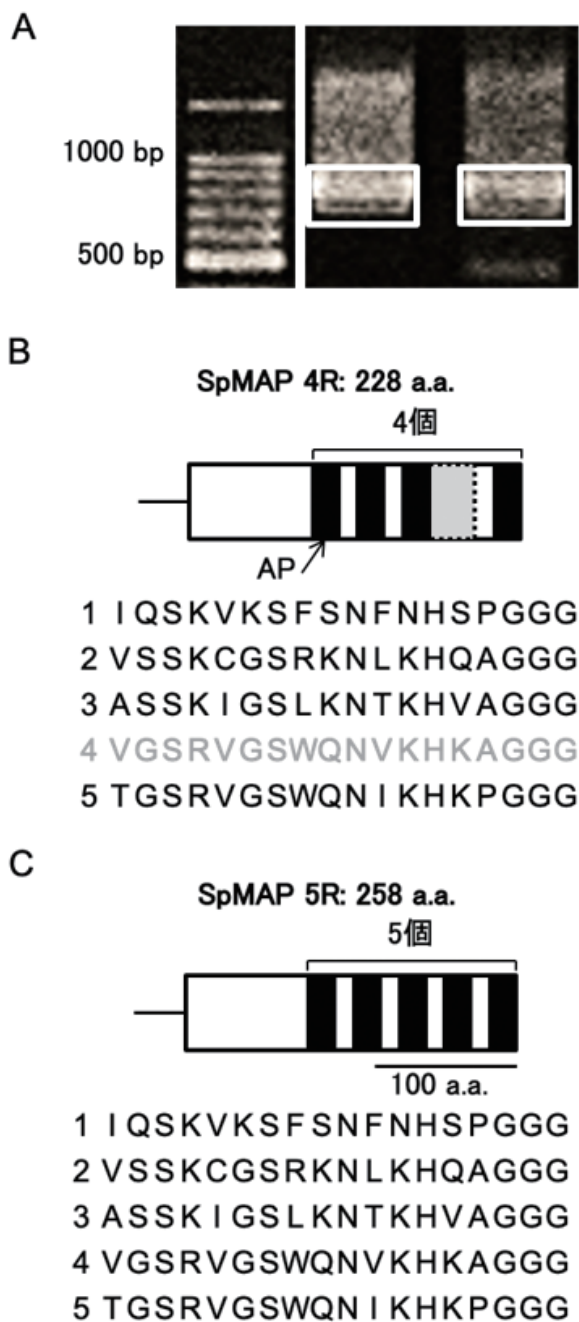


図 6. カイヤドリヒラムシ MAP-like 遺伝子 (SpMAP) のクローニングと AP 配列の予想アミノ酸配列. (A) SpMAP 特異的なプライマーを用いた RT-PCR により、800 bp 付近に 2 種のバンドが観察された. 左: マーカー、右: RT-PCR 産物. (B) SpMAP\_4R の AP 配列の予想アミノ酸配列. (C) SpMAP\_5R の AP 配列の予想アミノ酸配列.

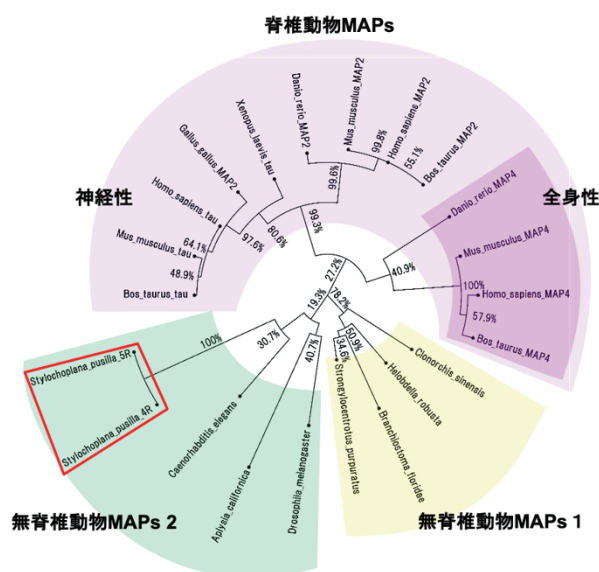


図 7. MAPs ファミリーの分子系統樹解析. 脊椎動物 MAPs ファミリー (紫) と 2 つの無脊椎動物 MAPs ファミリー (黄色、緑) に分かれた. 赤枠: SpMAP.

の結果、1 個の脊椎動物 MAPs のクレード (紫) と 2 個の無脊椎動物 MAP のクレード (黄色、緑) に分かれた。脊椎動物 MAPs ファミリーでは神経系特異的に発現する MAP2、tau のクレード (青) と全身性に発現する MAP4 のクレード (ピンク) があり、先行研究とも一致した。一方で、無脊椎動物 MAPs ファミリーでは線虫やカイヤドリヒラムシを含むクレード (緑) とアメリカムラサキウニや肝吸虫を含むクレード (黄色) に別れ、SpMAP\_4R と SpMAP\_5R のブートストラップ値は 100% であった (赤枠)。

## 討論

今回、カイヤドリヒラムシから AP 配列の数が異なる 2 種の MAP-like 遺伝子を同定した。SpMAP\_4R では 5 個の AP 配列の繰り返しを持つ SpMAP\_5R の 4 番目がなく、哺乳類における全身性 MAP (MAP4) と神経性 MAP (MAP2、Tau) の関係とよく似ていた。今後は、これらの SpMAP の機能的保存性や発現局在を解析し、MAP ファミリーの進化的保存性を明らかにしていく。

人工海水 2 種で飼育したカイヤドリヒラムシは平塚の海岸で汲んだ海水で飼育したカイヤドリヒラムシに比べ、体サイズが小さかった。人工海水は各種塩濃度と浸透圧が海水と等しくなるように作製されている。一方で汲み取った海水には微生物や有機物が含まれる。各群、ブラインシュリンプを餌として与えたにも関わらずカイヤドリヒラムシの体サイズに差が見られたことから、カイヤドリヒラムシはブ

ラインシュリンプだけでなく、海水中に含まれる微生物や有機物も餌として摂取している可能性がある。カイヤドリヒラムシにはフグ毒のテトロドトキシンが含まれることが知られており、餌によって体内に蓄積すると考えられている。そのため、ラインシュリンプ以外のテトロドトキシン含有プランクトンや藻類などを餌としているのかもしれない。宿主であるインダタミは微小藻類を削り取って食べていると考えられており、インダタミの糞を介して、カイヤドリヒラムシが藻類を摂取している可能性もある。板形動物センモウヒラムシの餌として知られるシアノバクテリアをラインシュリンプと混餌して与えるとラインシュリンプ単体給餌よりも4週間での生存個体数が多くなった。最近、カイヤドリヒラムシがインダタミの外に出て餌を食べることが報告された<sup>7)</sup>。また今回、カイヤドリヒラムシがラインシュリンプに近づき、群がって捕食する様子が観察された。カイヤドリヒラムシが餌(ラットの血)の匂いに誘引され、さらにその匂いを記憶することが報告されており<sup>4)</sup>、カイヤドリヒラムシはインダタミに依存せず、自由に選択的に餌を食べているのかもしれない。

ヒラムシやプラナリアといった扁形動物の組織学解析においては、固定前の1週間、絶食させるとS/N比(signal to noise ratio)が高くなることから、固定前に絶食させることが多い<sup>8)</sup>。今回、2週間絶食させてもカイヤドリヒラムシの体サイズは変わらなかったことから、恒常的に用いられる固定前1週間の絶食は実験結果にネガティブな影響を与えないと考えられる。

今回我々はカイヤドリヒラムシMAP(SpMAP)遺伝子を2種類同定した。推定アミノ酸配列を解析するとSpMAP\_4RはSpMAP\_5Rの4番目のAP配列がない構造をとっていた。哺乳類MAPファミリーでは各AP配列の相同性が高く、MAP4は5個のAP配列をもち、MAP2とTauは最大で4個のAP配列をもつ。哺乳類MAP2とTauはMAP4の2番目のAP配列がない構造をとる<sup>1)</sup>。中間のAP配列が失われた構造をとるという点では、哺乳類MAPファミリーとカイヤドリヒラムシのMAPファミリーには共通性がある。哺乳類MAP4は全身の細胞で発現する一方で、MAP2とTauは神経細胞特異的に発現し、MAP2は樹状突起マーカー、Tauは軸索マーカーとして知られている。扁形動物は中枢化された神経系を初めて獲得した動物と考えられており、今回同定したSpMAP\_5RとSpMAP\_4Rは系統樹解析でもブートストラップ値が100であったことから、SpMAP\_5RとSpMAP\_4Rは哺乳類の全身性MAP

と神経性MAPの原型とみなせるかもしれない。今後、これらのSpMAPの発現局在を解析し、全身性と神経性のような局在の違いを明らかにすることで、左右相称動物における始原MAPの機能と神経性、全身性の分化を明らかにしていきたい。

## 謝辞

本研究は、2021年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成を受けて行われた。カイヤドリヒラムシのMAP候補遺伝子の情報は岡山大学理学部附属臨海実験所濱田麻友子准教授より頂いた。シアノバクテリアの提供や飼育方法の確立には、神奈川大学理学部生物科学科教務技術職員の鶴岡慎也氏、北島正治氏にご助力いただいた。また、神奈川県におけるインダタミの採集場所、方法のアドバイスを神奈川大学理学部生物科学科教務技術職員の大和田正人氏より頂いた。記して感謝する。

## 文献

- 1) 小谷 享, 松島一幸, 久永眞市(2006) 微小管結合蛋白質の構造と機能. *蛋白質 核酸 酵素* **51**: 535-542.
- 2) Hashi Y, Kotani S and Tokuraku K (2015) Molecular evolution of a group of microtubule-associated proteins sharing partial similarities in their primary structures. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **26**: 1-6.
- 3) Hashi Y, Kotani S and Adachi T (2016) A nematode microtubule-associated protein, PTL-1, closely resembles its mammalian counterparts in overall molecular architecture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**: 1107-1113.
- 4) Kobayashi A, Hamada M, Yoshida MA, Kobayashi Y, Tsutsui N, Sekiguchi T, Matsukawa Y, Maejima S, Gingell JJ, Sekiguchi S, Hamamoto A, Hay DL, Morris JF, Sakamoto T and Sakamoto H (2022) Vasopressin-oxytocin-type signaling is ancient and has a conserved water homeostasis role in euryhaline marine planarians. *Sci. Adv.* **8**: eabk0331.
- 5) Hosoya N, Motomura K, Tagawa E, Nagano M, Ogiwara C and Hosoya H (2019) Effects of the fungicide ortho-phenylphenol (OPP) on the early development of sea urchin eggs. *Mar. Environ. Res.* **143**: 24-29.
- 6) Hirooka A, Hamada M, Fujiyama D, Takanami K, Kobayashi Y, Oti T, Katayama Y, Sakamoto T and Sakamoto H (2021) The gastrin-releasing peptide/bombesin system revisited by a reverse-evolutionary study considering *Xenopus*. *Sci. Rep.* **11**: 13315.
- 7) 藤原悠太(2015) *カイヤドリヒラムシ(扁形動物)の宿主利用と生活史特性* 博士(生命科学) thesis, 東北大学.
- 8) Hosoda K, Morimoto M, Motoishi M, Nishimura O, Agata K and Umesono Y (2016) Simple blood-feeding method for live imaging of gut tube remodeling in regenerating planarians. *Dev Growth Differ* **58**: 260-269.