

日本産ナメクジウオの飼育コロニーの確立

Establishing a laboratory colony of the Japanese lancelet (amphioxus)

安井 金也
Kinya Yasui広島大学大学院理学研究科生物科学専攻
Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Hiroshima University

Summary

Despite an interest of long standing in the origin and evolution of vertebrates, recent contribution of studies on lancelets (amphioxus), cephalochordates, to this field is not much. One of the major reasons for this is difficulties in applying effective molecular techniques to this animal. To establish a base of easy-use of lancelet materials, we are improving a laboratory culture system of lancelets and have obtained sufficient spawns for six years. We also performed stocking with about 14,000 young lancelets at the native habitat in the Ariake Sea, Japan. With embryos obtained from the culture system, we first transformed epidermal cells of late neurulae with EGFP expression vectors by electroporation method. Our culture system is releasing lancelet studies from constraint.

「ナメクジウオ」という名称は頭索動物亜門全体を指したり、それよりも下位の分類群を指したりする。日本近海に生息するナメクジウオ類は2属3種とされていたが、2004年にクジラの死体に生息する新種 *Asymmetron inferum* が発見されて (Nishikawa, 2004)、現在では3属4種類とされる。これらすべてのナメクジウオ類が、一般には「ナメクジウオ」と呼ばれる。ただし、特徴的な種については、カタナメクジウオ *Epigonichthys maladivensis* やオナガナメクジウオ *Asymmetron lucayanum*、ゲイコツナメクジウオ *Asymmetron inferum* の和名が使われることがある。発生学や解剖学で使われてきた種は、*Branchiostoma* 属の1種であるが、日本に生息するこの種は以前 *B. belcheri* とされていた。しかし、中国の廈門 (Xiamen) に生息する個体群が、種レベルで異なる2群からなっていることが明らかにされ (Xu et al., 2005)、それらは *B. belcheri* と *B. japonicum* に分類された (Zhang et al., 2006)。日本に生息する個体は Zhang et al. (2006) によると、*B. japonicum* になる。日本の *Branchiostoma* 属はそれまで、*B. belcheri* に分類されていたことから、この種に対してヒガシナメクジウオの和名を与えたが (安井・窪川, 2005)、*B. belcheri* と種レベルで異なることになれば、適切な和名がなくなることになる。

ナメクジウオ類は長い間、脊椎動物の起源解明にとって重要な動物として研究が進められてきた。しかし、ゲノム解読によって得られる膨大な情報から系統推定を行うゲノム系統学 (phylogenomics) で再検討された結果、ナメクジウオ類は形態学的に推定された脊椎動物の姉妹群から外され、頭索動物の中では最も分岐が深いと考えられるようになった (Putnam et al., 2008; Dunn et al., 2008; Philippe et al., 2011)。この結果が正しいとすると、Garstang (1928) が提唱した固着動物が幼形成熟をして、遊泳型の脊椎動物の祖先形をもたらしたとする仮説は否定されそうである。節約的に考えると、ナメクジウ

オ類と脊椎動物が示す遊泳型の形態は祖先形質になる。つまり、頭索動物の最後の共通祖先は移動に適した体つきをしていたと考えられる。ところが頭索動物に目を転ずると、このグループのすべての種は幼生期に左側に口が開いて、その口は変態期に正中の器官である縁膜になる。また、生殖腺は *Branchiostoma* 属では左右に発達するが、他の2属では右側にしか発達しない。ミトコンドリアゲノムの系統解析では、右側にだけ生殖腺ができる特徴が頭索動物内での祖先形質であることが支持されることから (Kon et al., 2007)、ナメクジウオ類の最後の共通祖先に脊椎動物型の遊泳型を期待するのは難しい。脊椎動物の進化史推定はゲノム系統学 (Delsuc et al., 2006; Putnam et al., 2008; Philippe et al., 2011) と比較分子発生学 (e. g., Yu et al., 2007; Onai et al., 2010; 安井・舒, 2004)、古生物学 (e. g., Chen et al., 1999; Shu et al., 2003; Mallatt and Chen, 2003) の主要な3分野の発展を受けて理解は深まったが、問題の解決以上に新たな問題が出現している状況である。

この研究に大きな障害となっている問題の1つが、ナメクジウオ類の研究材料である。これまでのほとんどの研究は、自然個体群から得られる材料に依存していた。ナメクジウオ類の代用になる動物が存在しないことから、現在要求されている精密な研究をナメクジウオ類で進める以外に方法はない。それはナメクジウオを実験動物化することである。

ナメクジウオをただ飼うことはそれほど難しいことではない。月に1回程度天然海水を入れ替えることができれば、餌無しで、生息地の砂を入れた水槽で半年から1年は飼うことができる。しかし、実験動物として飼うこと、しかも、そこから発生学的研究材料を得るとなると簡単ではない。実験室で発生学的材料を得る試みは1990代に入って、中国青島の個体群 (Wu et al., 1994) とアメリカフロリダ州の個体群 (Holland and Holland, 1993) で進められ、それ以降の研究材料のほとんどはこれら2群が利用されてきた。しかし、双方とも毎年産卵期に性

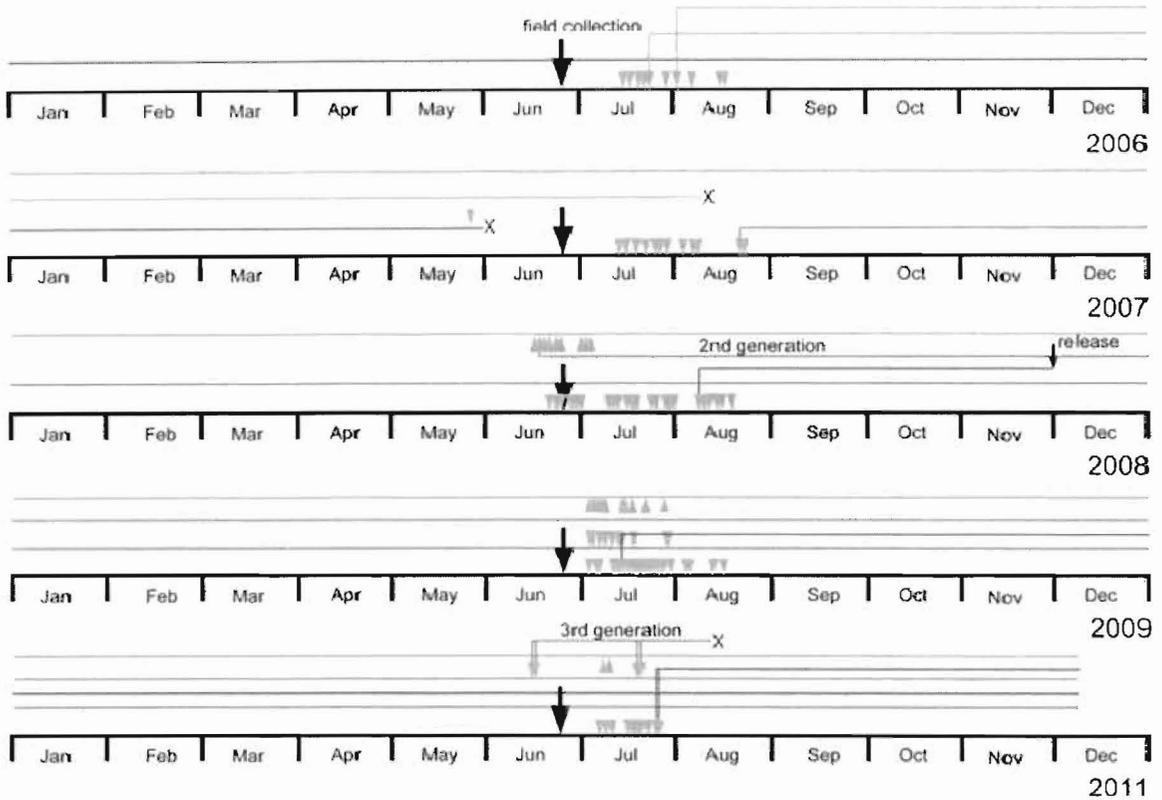


Fig. 1. Culture and spawning records of the system. Black arrows and dark yellow arrowheads denote field collection and spawning, respectively. Color lines indicate culture of progeny. Breeding season might start earlier than the first spawn and finish later than the last spawn in the figure every year.

成熟個体を自然個体群から採集して、一時的に実験室で飼うことにより受精卵を得る方法を採用しており、研究環境としては極めて脆弱な状況にあった。

著者は実験室個体群の確立による研究環境の向上をめざし、2005年から日本産ナメクジウオの大量飼育を開始した (Yasui et al., 2007). やや先行して、中国厦門 (Zhang et al., 2007) とフランス Banyls-sur-Mer (Fuentes et al., 2004) でそれぞれ、*B. belcheri*, *B. japonicum* とニシナメクジウオ *B. lanceolatum* の飼育が開始されている。前者では初めて実験室第2世代を得ることができ、後者では温度刺激による放卵誘発に成功している。ただし、後者の放卵誘発については、ニシナメクジウオだけに有効であることが判明し、他の種に普及しなかった。また、最近では内陸部での飼育も試みられるようになり、ニシナメクジウオを対象にした人工海水飼育下での産卵に成功している (Theodosiou et al., 2011). このように、現在、世界各国でナメクジウオ類の安定した飼育法の開発に努力しており、脊索動物の中で古くから注目されたにもかかわらず (Kowalevsky, 1867), 新しい研究技術導入の難しさが妨げになって、最後に残されたナメクジウオ類の研究基盤の改善が徐々に進んでいる。本稿では、著者が進めている日本産ナメクジウオの飼育について報告する。

飼育法の改善

現在使用しているゼブラフィッシュ飼育装置を応用した飼育装置下 (Hydense System ARA72, Aqua, Tokyo) での飼育・繁殖状況を Fig. 1 に示す。2010年を除き、毎年6月に産卵前の自然個体群 (熊本県上天草市の有明海, 2011年は長崎県島原市を追加) から 200-500匹ほど採集して飼育群に加えた。基本的な飼育法についてはすでに報告しているが (Urata et al., 2007; Yasui et al., 2007), その後、幾つかの点で改良を施した。餌は単細胞性珪藻 *Chaetoceros calcitrans* と *C. gracilis* の混合液を与えていたが、*C. gracilis* 単独で問題ないことが分かり、2009年から *C. gracilis* だけの給餌に切り替えている。また、当初観察の便宜と省力化の目的で砂を入れない水槽で飼育していたが、水槽の汚れと夏の高温期に感染症が頻発することから、産卵期 (6月-8月) 以外は水槽に 2-3 cm の深さで 3.5 mm メッシュの篩にかけた生息地の砂を入れている。これにより、繁殖期を終えた9月から、翌年の繁殖の準備を行う6月までの間のほぼ中間に1度だけの清掃で済む。また、感染症や原因不明の奇形が減り、生存率を大きく改善することができた。飼育下で生まれた個体群については、砂のない 45 cm ガラス水槽 (クリアステイングレー CS-104, Nisso, Japan) で飼い続けると生存率が悪く (数%程度)、生存個体も口部や脊索湾曲の

異常が目立つことから、体長が約 1 cm に達した時点で (11 月から 12 月)、成体と同じ飼育装置に移して飼育を行っている。これにより、生存率は数十%にまで改善されている。

生まれた個体の飼育は、受精後 24 時間から 36 時間で授精用容器 (500 ml 丸形プラスチック容器) から、エアレーションを施し、濾過海水で満たした 45 cm ガラス水槽に移して、給餌を毎日 1 回行い、週に 1 回の水替えと清掃を行う (Yasui et al., 2007)。飼育室は空調によって室温をほぼ 24°C に維持する。水替えは 1 cm 径ほどのシリコンチューブでサイフォン式に行い、ナメクジウオと水の分離は 50 μm ナイロンメッシュを通す。メッシュにはナメクジウオとともに、餌と糞などが残るので、それを実体顕微鏡下で選り分ける必要がある。これらの作業には手間とわずかの熟練が要求されるので、体長が 1 cm に達した時点で成体の飼育装置に移すことで、労力が大きく軽減できる。ナメクジウオを砂の中から選別するには、適度の海水が入っている小型水槽を揺すって攪拌し、海水とともにナメクジウオをメッシュで濾すことを数回繰り返すので、ナメクジウオが痛まないように、小さな個体用の砂は 2.5 mm メッシュで篩ったものを使う。使用する砂は飼育水槽の洗浄時および飼育終了時に水道水で良く洗ったあと、天日で十分に乾燥させて再使用または保存する。

これまでの飼育結果

2006 年以降、飼育装置を熊本大学沿岸域環境科学教育研究センター合津マリンステーションに移設した 2010 年を除きすべての年で、自然個体群から採集した性成熟個体と飼育下で性成熟した個体ともに、飼育装置内で放卵・放精が行われ、十分な次世代を得ることができた。飼育下での繁殖期は年ごとに若干の違いがあるが、ほぼ 6 月下旬から 8 月下旬の 2 ヶ月強である。これは生息地での繁殖期間にくらべて長い。放卵・放精は 21:00 ころから開始され、翌日の 1:00 ころまで続く。しかし、生殖腺を失う個体は繁殖期間中、配偶子もしくは接合子を採集した個体以上に多くなることから、上記の時間以外にも放精・放卵が起きているものと思われる。

最初のラボコロニー第 1 世代は、飼育装置導入前の 2005 年に得られ、2007 年にそれらの個体が第 2 世代を産んだが、産卵の発見が遅れ、水質悪化のため親仔ともに絶滅した。その後、ラボコロニー第 1 世代を毎年得ることができ、2008 年には 2006 年に生まれた個体が第 2 世代を産み、それら両個体群は現在も維持している。2011 年には 2008 年に生まれたラボコロニー第 2 世代から、数回の放卵・放精で世界で初めての第 3 世代を得たが、短期間の飼育で絶滅した (Fig. 2)。絶滅の原因は不明である。

生まれた個体が生殖腺を持ち始めるのは、体長が約 25 mm になってからで (Yasui et al., 2007)、その時期が生殖腺発達開始時期である 10 月から 11 月に同期しない場合、その生殖腺は最初の産卵期では使われない可能性がある。現在の飼育条件下では、生まれた仔が最初の配偶子放出をするまでに 23 ヶ月を要する。飼育下で生まれた

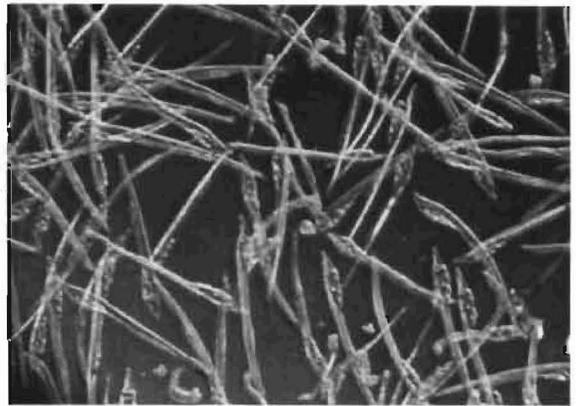


Fig. 2. Third generation of the laboratory colony bred in the system in 2011. Unfortunately, they survived for less than a month.

個体は、自然個体群にくらべて毎年繁殖開始が早いようで、繁殖期の初期に配偶子放出が集中する傾向にある。配偶子放出は飼育海水温が約 23°C 以上になると認められることから、繁殖時期を調節するには室温調節によって、海水温を 20°C 以下にすることが有効かも知れない。また、自然照明下では繁殖活動が深夜になることから、人間の活動周期にそぐわない。そのため、1 日の明暗を逆転させて放卵・放精を日中に持ってくる工夫もなされている (Yu, 私信)。

配偶子もしくは受精卵の採集

基本的に雌雄を別々の水槽で維持しているため、精子と卵を別々に得ることになる。しかし、生殖腺の特徴をもとにして完璧に性別判断をするのは困難であり、雌雄が混じる場合がある。また、新しく産まれた小さな個体は卵数が少なく、発生学的研究には不向きであり、放卵・放精がより確実に出現する雌雄混在で飼育する機会が多い。これらの場合は、放卵確認時はほぼすべての場合で受精しているため、受精卵を採集することになる。

放卵の確認と卵の採集を容易にするため、繁殖期には砂を除去する。また、給餌は通常、給水を止める 17:00 ころに行うが、配偶子採集期には 15:00 ころに早め、18:00 ころに卵密度を高めるために、普段約 2.5 L ほど入っている水槽の海水を水深 2 cm 程度になるまで排水し、エアレーションを外す。配偶子放出の確認は 20:00 から 1 時間ごとに 24:00 まで、もしくは 1:00 まで行う。放精もしくは放卵が確認された水槽は、1-2 mm メッシュを通して、ナメクジウオと精子もしくは卵を含む海水とを分離する。ナメクジウオは水槽に戻し、2 cm ほどの海水を張って次の放卵・放精を待つ。ナメクジウオの卵は直径 120-140 μm ほどであるが、受精膜が大きく膨らみ卵径の約 3 倍になるので、分離には比較的大きなメッシュを使う。配偶子放出の確認を終了した時点で、各水槽を海水で満たし、エアレーションをセットして、作業を終了



Fig. 3. Stocking in the native habitat with young lancelets bred in captivity. Animals in plastic bottles were brought onto the sea bottom by scuba diving in winter.

する。

濾した卵を含む海水は、直ちに実体顕微鏡下で受精の有無を確認する。すでに受精している場合は、受精卵が容器底に沈んだ時点で、50 ml シリンジで海水を吸引して可能な限り多くの海水を捨て、濾過海水に置換する。未受精卵の場合は、得られた精子を含む海水を適量注入して授精を行う。発生学的実験を行う場合は目的に応じて、大量の同期した胚を得るか、授精時間をずらして目的のステージを数回連続的に得られるようにする。大型の4-5 cm 程度のメスから得られる一腹仔は10,000 個体前後であり (Wu et al., 1994), 約300 ml の濾過海水で満たされた容器で、3 日程度問題なく飼うことができる。

繁殖を目的にした飼育では、雌雄混在で飼う方が効率的である。胚はできるだけ早く成体から分離した方が良いが、観察開始以前や作業終了後に繁殖が行われる場合があるので、繁殖期には飼育水槽の給水を開始する前に、各水槽から海水のサンプルを採り、顕微鏡下で胚の有無を確認した方が良い。孵化まで12 時間かかるので、それ以前は砂の表面もしくは容器の底面で見つかり、孵化後は海水中を繊毛で遊泳する。

生息地への放流

我々は飼育個体を熊本県天草市の有明海で採集しているが、近年この海域での生息個体の減少が目立つ。以前は1 回のドレッチングで100-200 個体を採集することかできたが、それが数十から数個体に減少している。実験室での飼育条件がほぼ確立したことにより、2008 年には大量のラボコロニー第1 世代を得ることかできた。そのうち、約半数の14,000 個体ほどを、ほとんどの個体が体長1 cm を越えた時点で、もとの生息地に放流することにした。水槽で育ったナメクジウオは砂を入れてもすぐには砂に潜り込めないため、放流1 週間ほど前に飼育水槽に砂を入れて、ナメクジウオが砂の中に潜伏するように

慣らした。放流は2008 年の12 月1 日に水深約20 m の地点で行った。ナメクジウオを含む砂を海水とともに1 L のプラスチックサンプルビンに入れて密閉し、スクーバダイビングにより海底までサンプルビンを選び、生息地と同質の砂の表層間近で、サンプルビンの蓋を開けて放流した。放流作業は水中カメラによるムービーと写真によって記録した (Fig. 3)。当初の予定では、定期的に定点採集をして DNA マーカーによる個体確認で着底の評価を行うことを計画したが、実行していない。現在維持している3,000-4,000 個体規模の飼育個体群からは、研究材料以外に10 万個体以上の仔世代を得ることができる。幼生飼育用の水槽を十分用意でき、その世話をする専門の人員が確保できれば、かなりの個体数を毎年放流することが可能である。

外来 DNA コンストラクトやモルフォリーノの導入

ナメクジウオ類の分子発生学的研究が、他の脊索動物であるホヤ類や脊椎動物の研究から大きく遅れた主要な原因の1 つは、遺伝子の機能解析実験が極めて制限されていたことである。これまで遺伝子発現阻害実験として、モルフォリーノ (Morpholino アンチセンスオリゴヌクレオチド) を注入した未受精卵を授精させて、その個体の発現形質を見る研究が報告されている (Onai et al., 2010)。未受精卵への核酸注入には、機材が整った実験室が要求され、しかも、注入卵を大量に得ることは不可能である。また、注入が成功しても精子が確保できない場合は、その注入卵は無駄になる。精子の受精能は数時間程度である。精子の凍結保存技術が報告されているが (Xu et al., 2009; Theodosiou et al., 2011), まだ十分な検証がなされていない。

我々は2011 年にエレクトロポレーター (NEPA21, NepaGene, Japan) を用いて、強制発現ベクター

Table 1. Setting of pulses in electroporation and transformation efficiency

Sample No.	Poring pulse		Transfer pulse		Tranformation ratio (% of indivs)
	Voltage (V)	Duration (msec)	Voltage (V)	Duration (msec)	
1	30	2.5	8	10	100
2	20	2.5	10	10	100
3	10	2.5	10	10	100
4	50	0.5	8	10	100
5	75	0.5	8	10	100



Fig. 4. Larva expressing EGFP induced by electroporation.

pCS2+eGFPの導入実験を行った。pCS2はサイトメガロウイルスのプロモーターであるsCMV IE94とサルウイルスのポリAサイトが組み込まれており、様々な動物細胞で発現することが確かめられているベクターである。導入ステージは受精後22時間幼生(初期ナイフ型ステージ)で、2mmギャップキュベットを使い、10-20個体ほどの幼生を含む200 μ lの海水に1 μ g/ μ lのプラスミドベクターを10 μ l混ぜ、Table 1の条件でパルスをかけた。実験個体は海水で11日間飼育し、その後蛍光顕微鏡下で生体を観察した。試みたすべての条件で、EGFPの発現が表皮細胞で認められた(Fig. 4)。

ナメクジウオ類に対するエレクトロポレーターによる核酸の導入は、本実験が最初の例であり、今後様々な発生ステージの細胞への導入の手がかりになる。エレクトロポレーターによる核酸の導入は、他の方法にくらべて極めて簡便であることから、遺伝子発現阻害や強制発現による遺伝子の機能解析、さらにはDNA組換え体コロニーの開発など、これまで、ナメクジウオ研究の足枷になっていた制限が取り払われ、今後、急速な研究の発展が期待される。

今後の課題

これまでの6年間の実績で、天然海水による飼育条件はほぼ確立したと考える。しかし、ナメクジウオが実験動物として一般化するには、まだ幾つかの課題が残されている。一つは繁殖期間をさらに長くすることと、放卵・放精メカニズムの解明である。実験動物に使われる主要な海産無脊椎動物はすべて配偶子放出技術が開発されている。ナメクジウオでも数多くの試みがなされたが、ニシナメクジウオに対する温度刺激(Fuentes et al., 2004)とフロリダナメクジウオ*B. floridae*に対する電気刺激(Holland and Yu, 2004)以外に、これまで成功した例がない。電気刺激の結果は自然産卵とどれだけの違いがあるのか分からないような効果である。今後、卵母細胞の成熟メカニズムと配偶子放出のメカニズムを解明して、欲しいときに受精卵を得ることができるようになることが求められる。また、熱帯域に生息するナメクジウオ類は生殖腺成熟が早いことと(Stokes, 1996)、生殖腺の成熟には餌と飼育温度が重要であることがこれまでの飼育経験から示唆される。したがって、飼育環境を調整することにより、繁殖期間を伸ばすことは可能であると考えられる。

もう一つの課題は、飼育施設の設置場所に関するものである。現在の飼育装置は天然海水を無制限に使用できる条件が必須である。この条件を満たす施

設は、臨海実験所や水産実験所を有する大学か、水産試験場や水族館等に限られる。また、DNA組換え体の作製や維持がこれから一般化することを考えると、自然界との隔離の問題で、海岸地域での個体群維持はリスクが大きくなる。多くの研究施設が内陸部にあることも考慮すると、海水の再利用や人工海水の利用による飼育が要求される。フランスではすでに、内陸部であるパリ近郊とリヨンで人工海水による飼育が行われ、温度刺激による配偶子放出がメスで80%、オスで70%の高率で認められるという、良好な結果を得ている(Theodosiou et al., 2011)。

謝辞

ナメクジウオの飼育実践と研究を紹介する機会を与えて下さった、岡山実験動物研究会に感謝いたします。ナメクジウオの飼育や研究には、これまで多くの方々のご協力があった。ナメクジウオの採集と飼育管理には熊本大学の逸見泰久教授・島崎英行氏・前中昭代氏・林田由佳里氏、餌の開発には広島大学の浦田慎博士、ナメクジウオの放流では野島崇氏(当時熊本大学大学院)と浦田慎博士にスクーバダイビングおよび水中撮影をお願いした。繁殖シーズンの研究材料の採集や実験では広島大学の梶豪雄博士・藤野重人氏(当時)・星野羊一氏に多大な協力を頂いた。ここに感謝いたします。また、飼育装置2号機の設置は、広島大学学長裁量経費によるものである。

引用文献

- Chen, Y. J. Y., Huang, D. Y., and Li, C. W. (1999) An Early Cambrian craniate-like chordate. *Nature*, 402: 518-522.
- Delsuc, F., Brinkmann, H., Chouhrouh, D., and Philippe H. (2006) Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature*, 439: 965-968.
- Dunn, C. W., Hejnol, A., Matus, D. Q., Pang, K., Browne, W. E., Smith, S. A., Seaver, E., Rouse, G. W., Obst, M., Edgecombe, G. D., et al. (2008) Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature*, 452: 745-749.
- Fuentes, M., Schubert, M., Dalfo, D., Candiani, S., Benito, E., Gardenyes, J., Godoy, L., Moret, F., Illas, M., Patten, I., et al. (2004) Preliminary observations on the spawning conditions of the European amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*) in captivity. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 302B: 384-391.
- Garstang, W. (1928) The morphology of the Tunicata, and its bearings on the phylogeny of the Chordata. *Quart. J. Microsc. Sci.*, 72: 51-187.
- Holland, L. Z. and Yu, Jr-K. (2004) Cephalochordate (amphioxus) embryos: procurement, culture, and basic methods. *Methods Cell Biol.*, 74: 195-215.

- Holland, N. D. and Holland, L. Z. (1993) Embryos and larvae of invertebrate deuterostomes. In: Essential Developmental Biology. A Practical Approach. (Eds. Stern, C. D. and Holland, P. W. H.), Oxford University Press, Oxford.
- Kon, T., Nohara, M., Yamanoue, Y., Fujiwara, Y., Nishida, M., and Nishikawa, T. (2007) Phylogenetic position of a whale-fall lancelet (Cephalochordata) inferred from whole mitochondrial genome sequences. *BMC Evol. Biol.*, 7: 127 (doi: 10.1186/1471-2148-7-127).
- Kowalevsky, A. O., (1867) Entwicklungsgeschichte des *Amphioxus*. *Mém. Acad. Imp. Sci. St-Petersbourg*, 7: 1-17.
- Mallatt, J. and Chen, J. Y. (2003) Fossil sister group of craniates: predicted and found. *J. Morphol.* 258: 1-31.
- Nishikawa, T. (2004) A new deep-water lancelet (Cephalochordata) from off Cape Nomamisaki, SW Japan, with a proposal of the revised system recovering the genus *Asymmetron*. *Zool. Sci.*, 21: 1131-1136.
- Onai, T., Yu, Jr-K., Blitz, I. L., Cho, K. W. Y., and Holland, L. Z. (2010) Opposing Nodal/Vg1 and BMP signals mediate axial patterning in embryos of the basal chordate amphioxus. *Dev. Biol.*, 344: 377-389.
- Philippe, H., Brinkmann, H., Copley, R. R., Moroz, L. L., Nakano, H., Poustka, A. J., Wallberg, A., Peterson, K. J., and Telford, M. J. (2011) Acoelomorph flatworms are deuterostomes related to *Xenoturbella*. *Nature*, 470: 255-258.
- Putnam, N. H., Butts, T., Ferrier, D. E., Furlong, R. F., Hellsten, U., Kawashima, T., Robinson-Rechavi, M., Shoguchi, E., Terry, A., Yu, J. K., et al. (2008) The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature*, 453: 1064-1071.
- Shu, D. G., Conway Morris, S., Zhang, Z. F., Liu, J. N., Han, J., Chen, L., Zhang, X. L., Yasui, K., and Li, Y. (2003) A new species of yunnanozoan with implications for deuterostome evolution. *Science*, 299: 1380-1384.
- Stokes, M. D. (1996) Larval settlement, post-settlement growth and secondary production of the Florida lancelet (= amphioxus) *Branchiostoma floridae*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 130: 71-84.
- Theodosiou, M., Colin, A., Schulz, J., Laudet, V., Peyrieras, N., Nicolas J-F., Schubert, M., and Hirsinger, E. (2011) Amphioxus spawning behavior in an artificial seawater facility. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 316: 263-275.
- Urata, M., Yamaguchi, N., Henmi, Y., and Yasui, K. (2007) Larval development of the oriental lancelet, *Branchiostoma belcheri*, in laboratory mass culture. *Zool. Sci.*, 24: 787-797.
- Wu, X. H., Zhang, S. C., Wang, Y. Y., Zhang, B. L., Qu, Y. M., and Jiang, X. J. (1994) Laboratory observation on spawning, fecundity & larval development of amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtaunese* [sic]). *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 12: 289-294.
- Xu, Q. S., Ma, F., and Wang, Y. Q. (2005) Morphological and 12S rRNA gene comparison of two *Branchiostoma* species in Xiamen waters. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 304B: 259-267.
- Yasui, K., Urata, M., Yamaguchi, N., Ueda, H., and Henmi, Y. (2007) Laboratory culture of the oriental lancelet *Branchiostoma belcheri*. *Zool. Sci.*, 24: 514-520.
- Yu, Jr-K., Satou, Y., Holland, N. D., Shin-I, T., Kohara, Y., Satoh, N., Bronner-Fraser, M., and Holland, L. Z. (2007) Axial patterning in cephalochordates and the evolution of the organizer. *Nature*, 445: 613-617.
- Zhang, Q. J., Sun, Y., Zhong, J., Li, G., Lu, X. M., and Wang, Y. Q. (2007) Continuous culture of two lancelets and production of the second filial generations in the laboratory. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 308B: 464-472.
- Zhang, Q. J., Zhong, J., Fang, S. H., and Wang, Y. Q. (2006) *Branchiostoma japonicum* and *B. belcheri* are distinct lancelets (Cephalochordata) in Xiamen waters in China. *Zool. Sci.* 23: 573-579.
- 安井金也・舒徳干 (2004) 脊索動物か、脊索を持った動物たちか - 古生物学と分子生物学の統合 - . 化石 76: 7-22.
- 安井金也・窪川かおる (2005) ナメクジウオ - 頭索動物の生物学 - , 東京大学出版会, pp.276.