

利尻島における *Phagocata* 属プラナリア 2種の初記載  
—種の同定・核型分析・18S rDNA の部分配列の比較—

石田幸子<sup>1)</sup>・西谷信一郎<sup>2)</sup>・吉田 渉<sup>1)</sup>・  
Konstantin D. Kuznedelov<sup>3)\*</sup>・佐藤雅彦<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> 〒 036-8561 青森県弘前市文京町 3 弘前大学農学生命科学部

<sup>2)</sup> 〒 562-0025 大阪府箕面市栗生外院 5-4-63 大阪府立箕面東高等学校

<sup>3)</sup>Limnological Institute SD RAS, Irkutsk 664033, Russia

<sup>4)</sup> 〒 097-0311 北海道利尻郡利尻町仙法志字本町 利尻町立博物館

First Description on Two Species of the Genus *Phagocata* Planarians  
in Rishiri Island, Hokkaido, Japan

- Identification · Karyotype Analysis · Comparison of the Partial 18S rDNA Sequence -

Sachiko ISHIDA<sup>1)</sup>, Shin-ichiro NISHITANI<sup>2)</sup>, Wataru YOSHIDA<sup>1)</sup>,  
Konstantin D. KUZNEDELOV<sup>3)\*</sup> and Masahiko SATO<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University, Hirosaki, 036-8561 Japan

<sup>2)</sup>Minoohigashi High School, Minoo, Osaka, 562-0025 Japan

<sup>3)</sup>Limnological Institute SD RAS, Irkutsk 664033, Russia

<sup>4)</sup>Rishiri Town Museum, Senhoshi, Rishiri Island, Hokkaido, 097-0311 Japan

**Abstract.** When we researched freshwater planarians in Rishiri Island on August in 1998, we found one species of the genus *Phagocata* that hasn't found there so far, and named *Phagocata* sp. In 2010, one of the authors Mr. Satō found another species of the genus *Phagocata*. Then we examined the intra-structure and identified them as *Phagocata iwamai* and *P. albata*, respectively. We also examined them cytologically. The chromosome number of *P. iwamai* was  $2n=16$  ( $n=8$ ) which is different from that of any other species of Japanese *Phagocata* ever reported. *P. albata* obtained this time had the chromosome number  $2n=24$  and the karyotype was corresponded to that of the already reported Wakkanai specimens. Further, we compared the 18S rDNA sequences (544bp) among Japanese *Phagocata* species, and inferred that these two species of the genus *Phagocata* living in Rishiri Island are closely related species.

Keywords: freshwater planarians, identification, chromosome number, 18S rDNA sequence

はじめに

本邦産プラナリア科ホソウズムシ属 (*Phagocata*) プラナリアは9種2亜種が知られており (新村・他, 1998),

このうち北海道には4種が生息していると報告されているが (Ijima & Kaburaki, 1916 ; Ichikawa & Kawakatsu, 1962a ; Ichikawa & Kawakatsu, 1962b ; Ichikawa

\* Present affiliation: The Waksman Institute, Rutgers University, 190 Frelinghuysen Road, Piscataway, NJ 08854, USA.

& Kawakatsu, 1963), 利尻島では1998年までホソウズムシ属プラナリアは発見されていなかった。1998年に著者等は、利尻島北部に位置する姫沼で1種見出し、*Phagocata* sp.としていた(石田, 2000)。ところが2010年著者の1人、佐藤が利尻島西部の種富湿原で以前発見した種とは明らかに異なるホソウズムシ属プラナリアを更に1種発見したので、今回これら2種の同定を試み、染色体数を明らかにし核型分析も行った。また、これら2種の18S rRNA 遺伝子の部分配列を決定した。ついで、本邦産ホソウズムシ属他種3種及び海外産ホソウズムシ属2種の18S rRNA 遺伝子と比較し、分子系統樹解析を行った。

## 材料と方法

### 材料

利尻島姫沼から採集されたホソウズムシ属プラナリア (*Phagocata* sp.1) 及び、利尻島種富湿原から採集されたホソウズムシ属プラナリア (*Phagocata* sp.2) が種の同定、染色体観察、18S rRNA 遺伝子解析の為に用いられた。また、18S rRNA 遺伝子の塩基配列の比較の為に、青森県と福島県から採集されたミヤマウズムシ *Phagocata vivida* (Ijima et Kaburaki, 1916)、長野県から採集されたコガタウズムシ *Phagocata kawakatsui kawakatsui* Okugawa, 1956、長野県から採集されたナガノコガタウズムシ *Phagocata kawakatsui naganoensis*

Ni-imura, 1986、青森県から採集されたトウホクコガタウズムシ *Phagocata teshirogii* Ichikawa et Kawakatsu, 1962も用いられた。更に海外産ホソウズムシ属2種、バイカル湖に流れ込む2つの河川から採集された *P. sibirica* と、フスグル湖(モンゴル)から採集された *P. altaica* も用いられた。

### 方法

**種の同定** Bouin液で固定された試料を脱水・パラフィン包埋後8 $\mu$ mで薄切し、マイヤーのヘマトキシリン・エオシン染色を施し脱水透徹後 Nikon ECLIPSE 50iで検鏡撮影した。

**染色体観察** 染色体標本は、Imai *et al.* (1988)の空気乾燥法をプラナリア用に改変した方法(西谷, 1998)により作製し、5%ギムザ染色液(1/15Mリン酸緩衝液pH6.8)で染色した。染色体標本はオイキットで封かん後、検鏡撮影した。

**18S rDNA 塩基配列解析** 虫体からのゲノムDNAの抽出は、Vos & Dick (1988)の方法またはDNeasy Tissue Kit (QIAGEN Ltd.)を用いて行った。18S rDNAはPCR法により増幅した。反応組成は以下の通りである。各種プラナリアDNA 1~100ng, 1 $\times$  buffer, 0.2mM dNTPs, *Ex Taq* DNA polymerase (0.5U) (Takara, Japan), 0.4 $\mu$ M primer (Pr1:5'-TACCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3', Pr2:5'

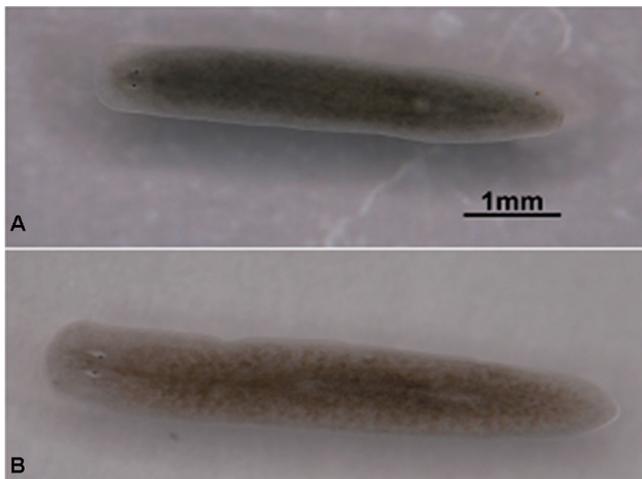


Figure 1. The photographs of 2 living specimens of the genus *Phagocata* collected from Rishiri Island. A, collected from Himenuma. B, collected from Tanetomi Wetland (Reddish intestine is visible with food).

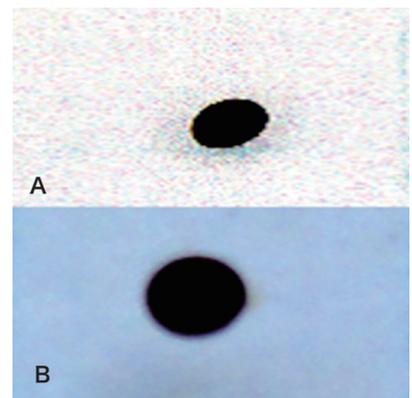


Figure 2. Spawned cocoons. A, *P. iwamai*. B, *P. albata*.

-ATTACCGCGGCTGGCACC-3' (Kuznedelov *et al.*, 1996)). PCR 条件は以下の通りである. 94°C, 3分, (94°C, 30秒, 55°C, 30秒, 72°C, 1分, 25サイクル), 72°C, 1分. 増幅した 18S rDNA 断片は, Wizard PCR preps DNA Purification system (Promega) で精製した. 精製した DNA はダイレクトシーケンシング法により, またはクローニングした後に塩基配列を決定した. 得られた 18S rDNA の塩基配列は Clustal W を用いて整理した. 分子系統樹の作成には MegAlign (DINASTAR Inc.) を用いた.

## 結果

### 種の同定

姫沼 で採集した *Phagocata* sp.1 体長は 5.6 ~ 8.5mm. 体色はやや黄色味を帯びた褐色 (Fig.1, A). トウホクコガタウズムシやコガタウズムシに似ているが, 頭部先端が山型にやや突出しているのでこの 2 種とは外部形態的に少し異なっている. 卵のうは暗褐色 (アズキ色), 球形から楕円形でトウホクコガタウズムシ, コガタウズムシ及びソウヤイドウズムシの卵のうと酷似している (Fig. 2, A). 交接器官の内部構造は, 報告されているエゾコガタウズムシ *Phagocata iwamai* の構造 (Ichikawa & Kawakatsu, 1962b) の内, 名寄から採集された個体の構造とほぼ同じであった (Fig. 3, 4). すなわち, 輸精管 (seminal duct) は別々に陰茎腔へ進入し, 共通輸精管にはならず (Fig. 3, A), 広い射精管 (ejaculatory

duct) を備えた円錐状の陰茎 (penis papilla) (Fig. 3, B), 筋肉の少ない陰茎基部 (penis bulb) (Fig. 3, C), かなり縦長の生殖腔上皮 (Fig. 3, D), 肥厚した短い交接のう柄 (Fig. 4) が観察されるが, 陰 (vagina) の上には他の *Phagocata* 属でみられる厚くて放射状の筋肉が欠除している (Fig. 4) というエゾコガタウズムシの特徴が観察されたので, この *Phagocata* sp. は, エゾコガタウズムシ *P. iwamai* と同定した.

種富湿原 から採集した *Phagocata* sp.2 体長は 3 ~ 7.5mm. 6mm 以上の個体は有性であった. 体色は薄い灰色で全くの白色ではない (Fig.1, B). 頭部先端は円みをおびているので, エゾコガタウズムシと同定された *Phagocata* sp.1 とはやや外形的に異なっている. 卵のうはエゾコガタウズムシ (Fig. 2, A) のそれと似ている (Fig. 2, B). 交接器官の内部構造を調べてみると, この種は, 輸精管は別々に陰茎腔へ進入し, 共通輸精管にはならず (Fig. 5), 中位の大きさの交接のう (Fig. 5, A, B), 細長い交接のう柄 (Fig. 5, A, B), 短い共通輸卵黄管 (Fig. 5, B), 比較的長い指状の相称的な陰茎を有していた (Fig. 5, C). この構造は, ソウヤイドウズムシの特徴 (Ichikawa & Kawakatsu, 1962a) と合致するので, 本種をソウヤイドウズムシ *Phagocata albata* と同定した.

### 染色体数・核型分析

姫沼 で採集したエゾコガタウズムシ エゾコガタウズムシ *Phagocata iwamai* は, 1962 年に種の記載がなされ

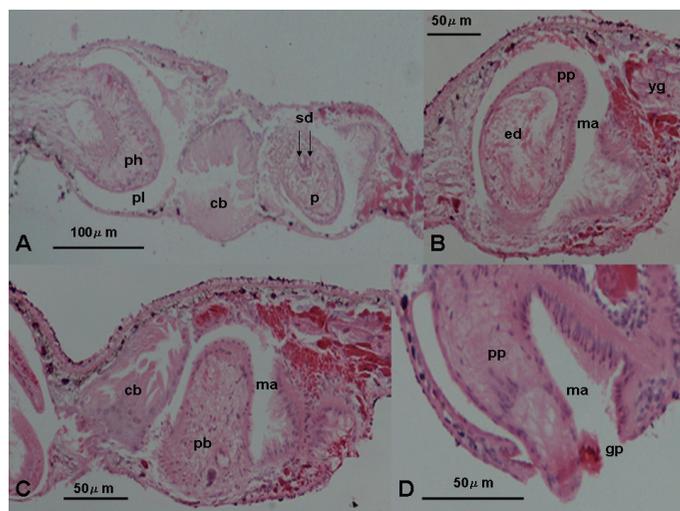


Figure 3. Sagittal sections of the copulatory apparatus of *P. iwamai*. A, section through copulatory bursa (cb) and seminal duct (sd). B, section through ejaculatory duct (ed). C, section through copulatory bursa (cb) and penis bulb (pb). D, section through penis papilla (pp) and genital pore (gp). B and C, from same specimen. ma, male antrum; p, penis; ph, pharynx; pl, pharynx lumen; yg, yolk gland.

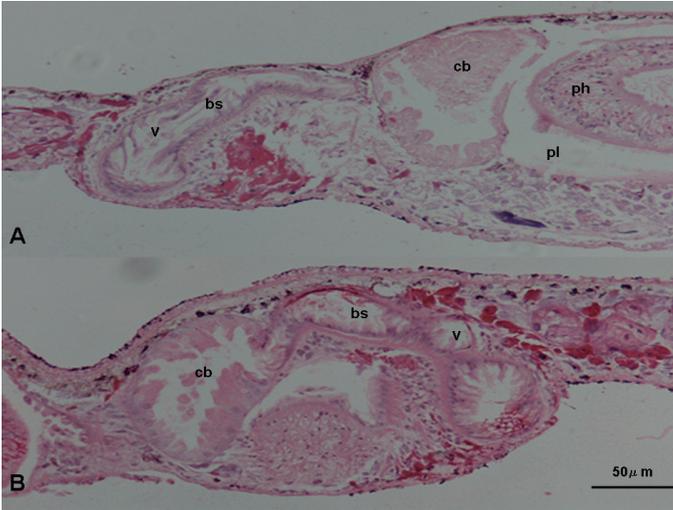


Figure 4. Sagittal sections of the copulatory bursa (cb) and bursa stalk (bs) in 2 specimens (A, B) of *P. iwamai*. ph, pharynx ; pl, pharynx lumen; v, vagina.

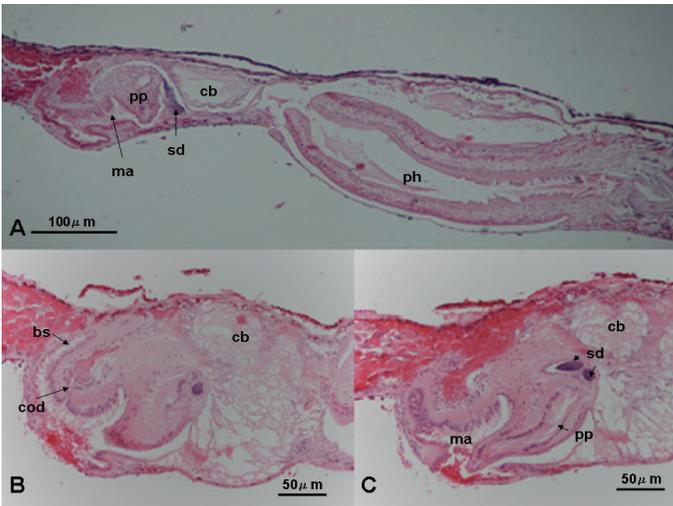


Figure 5. Sagittal sections of the copulatory apparatus and the pharynx (ph) of *P. albata*. A, low magnification figure. B, section through common ovovitelline duct (cod). C, section through finger-like penis papilla (pp) and 2 sperm ducts (sd). B and C, from same specimen. bs, bursa stalk; cb, copulatory bursa; ma, male antrum.

た。しかし、細胞学的研究はその後なされていなかったため、染色体数は不明であった。今回姫沼で採集した3個体(虫体番号 201, 205, 206)は、観察した35個の新生細胞(neoblast)全てで染色体数  $2n=16$  を示した(Table 1, Fig. 6, A)。また、精母細胞の減数分裂第一分裂中期では8つの二価染色体(8 II)が観察された(Table 2, Fig. 6, B)。染色体のよく広がった3細胞を

用いて核型分析を行った結果、エゾコガタウズムシの核型は、5対の中部着糸型染色体 metacentric chromosome (M) と2対の次中部着糸型染色体 submetacentric chromosome (SM) および1対の次端着糸型染色体 subtelocentric chromosome (ST) から構成されると判断した(Fig. 6, C)。5対の中部着糸型染色体 (M) のうち1対は大型で他の全ての染色体対と明確に区別された。

種富湿原から採集したソウヤイドウズムシ 種富湿原から採集したソウヤイドウズムシの染色体数は、調べた4個体全てで  $2n=24$  であった(Fig. 7)。ソウヤイドウズムシの染色体数 ( $2n=24$ ) 及びその核型は、2004年に稚内市で採集された個体ですでに報告されており(Nishitani *et al.*, 2006)、8対の中部着糸型染色体 (M)、2対の

Table 1. The somatic chromosome number of *Phagocata iwamai* at Himenuma pond (Rishiri island)

Specimen No.	No. of neoblasts observed	Chromosome number observed
		16
201	8	100.0
205	23	100.0
206	4	100.0
Total	35	100.0

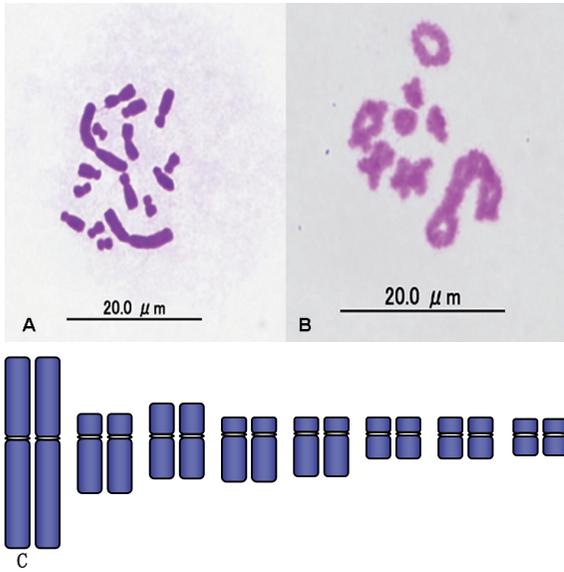


Figure 6. Chromosome figures and its idiogram of *P. iwamai*. A, metaphase plate of neoblast ( $2n=16$ ). B, 8 bivalents in spermatocyte (8 II). C, Idiogram (10M+4SM+2ST)

次中部着糸型染色体 (SM) 及び 2 対の次端部着糸型染色体 (ST) から成っている。この種の核型の特徴は、大型の次端部着糸型染色体 (ST) を 2 対有することで、他の同じ染色体数を有する本邦産ホソウズムシ属プラナリアとは異なっている。今回種富湿原から採集した個体においても、同様の特徴ある大型の次端部着糸型染色体 (ST) を 2 対有することが明らかとなった。

### 18S rDNA 塩基配列解析

Fig. 8 は、ホソウズムシ属における 18S rDNA の部分配列 (544 塩基対) の共通配列を示しており、Fig. 9 には、今回調べた 5 種 (コガタウズムシ 2 亜種、ミヤマウズムシの 2 地理的変異を含む) と海外産 2 種における塩基置換箇所を示している。コガタウズムシの 2 亜種間での塩基置換率は 0.7% であった。コガタウズムシとトウホクコガタウズムシの別種間の置換率は 0.7 ~ 1.1%、コガタウズムシとエゾコガタウズムシとの別種間における置

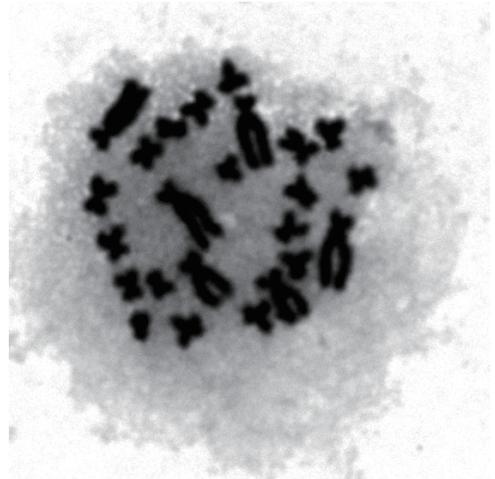


Figure 7. Somatic chromosomes of *P. albata* ( $2n=24$ ).

換率は 1.8 ~ 2.2% であった。また、トウホクコガタウズムシとエゾコガタウズムシは 1.5% であり、上記の 3 種の塩基置換率は概ね 1 ~ 2% である。同種間の変異が青森産と福島産のミヤマウズムシで確認され、その変異率 0.4% は、海外産のホソウズムシ属 2 種間 (*P. altaica* と *P. sibirica*) での変異率 0.2% と大きな違いはなかった。今回、新たに利尻島の種富湿原から採集されたソウヤイドウズムシの 18S rDNA 配列をもとに、国内産ホソウズムシ属他種との塩基置換率を調べると、エゾコガタウズムシとの置換率は 2.8% (15/544bp)、トウホクコガタウズムシとは 3.9% (21/544bp)、コガタウズムシ *P. k. kawakatsui* とは 4.2% (23/544bp)、福島産ミヤマウズムシとは 5.9% (32/544bp) であった。18S rDNA の部分配列を用いた分子系統解析の結果、ソウヤイドウズムシは今回調べられたホソウズムシ属 7 種の中では、エゾコガタウズムシに近縁な種であると推定される結果が得られた (Fig. 10)。

### 考察

利尻島における淡水棲プラナリアの調査は、市川 (1954) や川勝・他 (川勝, 1958; 川勝・山田, 1964; Kawakatsu *et al.*, 1977; Kawakatsu *et al.*,

Table 2. The chromosome pairing at MI in spermatocytes of *Phagocata iwamai* at Himenuma pond (Rishiri island)

Specimen No.	No. of spermatocytes observed	Chromosome pairing observed
		8 II
201	10	100.0



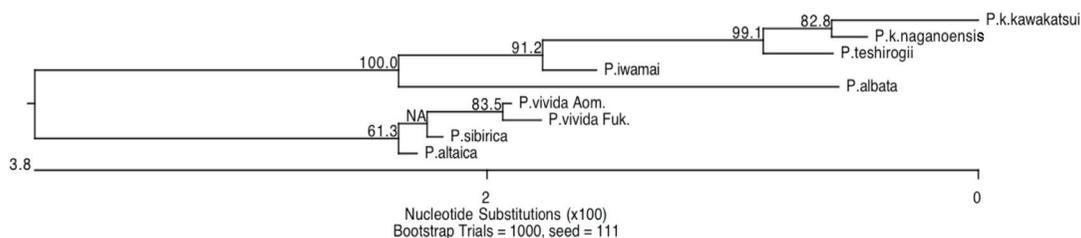


Figure 10. Evolutionary relationships predicted from the multiple sequence alignment. The length of each pair of branches represents the distance between sequence pairs, while the units at the bottom of the tree indicate the number of substitution events. Numbers at the nodes indicate bootstrapping estimates. The phylogenetic tree was simulated by MegAlign program (DNASTAR, Inc.).

を有することがその核型の特徴となっており (Nishitani *et al.*, 2006), 今回種富湿原から採集したソウヤイドウズムシも同じ2対の次端部着糸型染色体 (ST) を有していた。尚, 稚内市から採集されたソウヤイドウズムシは白色プラナリアであったが, 種富湿原からのプラナリアは全くの白色ではなく, 薄く着色されていた。本種は生息場所により着色の程度が異なると推測され, 交接器官の構造のみならず核型の特徴からも, 今回発見されたプラナリアはソウヤイドウズムシと同定された。

ホソウズムシ属の 18S rDNA (544bp) の種間塩基置換率は 1 ~ 6% の範囲であった。一方, オオウズムシ属における 18S rDNA (552bp) の種間塩基置換率は最大でも 1% (海外産 *Bdellocephala angarensis* とイヅミオオウズムシ *B. brunnea* 間) であり, また利尻島生息の別属 2 種リシリオオウズムシ *B. borealis* とリシリュズムシ *Dendrocoelopsis ichikawai* 間での属間塩基置換率は 0.9% (5/552bp) である (Kuznedelov *et al.*, 2000)。ホソウズムシ属の種間塩基置換率は, オオウズムシ属のそれと比較して高い。

分子系統樹から, ホソウズムシ属は 2 つのクラスターに分かれ, この属を形成している種は 2 つの系統に分化を遂げたことが示された。すなわち, ミヤマウズムシを含む系統と, エゾコガタウズムシやソウヤイドウズムシを含む系統である。この 2 系統は, 頭部の耳葉が発達しているか否かの形態的な違いで, ホソウズムシ属を 2 つのグループに分けた場合のその 2 グループに合致している。

国内におけるホソウズムシ属の地下水生種は他に 3 種報告されているが (Ijima & Kaburaki, 1916; Ichikawa & Kawakatsu, 1963; Kawakatsu & Murayama, 1974), そ

これらの採集事例は少なく, 同定された種の遺伝子解析の報告例は無い。今回発見されたソウヤイドウズムシは地下水生プラナリアの進化や系統, さらにはホソウズムシ属の系統類縁関係を知る上でも貴重な生物種である。

以上今回の組織学的, 細胞学的, 分子生物学的研究により, 北海道本土に生息している 2 種のホソウズムシ属プラナリアは, 利尻島にも生息していることが明らかとなり, 18S rDNA の解析結果からこの 2 種は近縁であること, また, エゾコガタウズムシは, 特異的な染色体数を有することが判明した。

## 謝辞

生前, 長野県産コガタウズムシとナガノコガタウズムシをお送り下さった故新村文男氏並びに福島県産ミヤマウズムシをお送り下さった桜井隆繁博士に, 心から御礼申し上げる。

## 引用文献

- 市川純彦, 1954. 北海道及び樺太産淡水棲三岐腸類 (Notes on the probursalian fauna of Hokkaido and Saghalien). 動物学雑誌, 63(3-4): 82.
- Ichikawa, A. & M. Kawakatsu, 1962a. *Phagocata albata*, a new probably subterranean freshwater planarian, from Hokkaido. *Annot. Zool. Japon.*, 35(1): 29-37.
- Ichikawa, A. & M. Kawakatsu, 1962b. *Phagocata iwamai*, a new freshwater planarian, from Hokkaido. *Annot. Zool. Japon.*, 35(1): 38-46.
- Ichikawa, A. & M. Kawakatsu, 1963. *Phagocata tenella*, a new freshwater planarian, from Hokkaido. *Annot. Zool. Japon.*, 36: 102-107.

- Ijima, I. & T. Kaburaki, 1916. Preliminary description of some Japanese triclads. *Annot. Zool. Japon.*, 9:153-171.
- Imai, H. T., Taylor, R. W., Crosland, M. W. J. & R. H. Crozier, 1988. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn. J. Genet.*, 63: 159-185.
- 石田幸子, 2000. 利尻島に生息するプラナリア. 利尻研究, (19): 45-49.
- 川勝正治, 1958. 淡水産プラナリアの垂直分布に関する資料 V. 利尻島及び礼文島. 京都学芸大学 学報 B, (12): 45-64.
- 川勝正治・山田達也 1966. プラナリア紀行 (6) 利尻島. 採集と飼育, 28(10): 375-379.
- Kawakatsu, M., Asai, E. & T. Yamada, 1977. *Dendrocoelopsis ichikawai* sp. nov., a new freshwater planarian from Rishiri Island in Hokkaido. *Bull. Natn. Sci. Mus.*, A(Zool), 3: 199-217.
- Kawakatsu, M., Asai, E. & T. Yamada, 1978. *Bdellocephala borealis* sp. nov., a new freshwater planarian from Rishiri and Okushiri Island off Hokkaido. *Bull. Natn. Sci. Mus.*, A(Zool), 4: 79-98.
- Kawakatsu, M., Murayama, H. & F. Nimura, 1974. *Phagocata suginoi* sp. nov., a new probably subterranean freshwater planarian from the Hokuuriku District in Honshu. *Annot. Zool. Japon.*, 47(3): 147-159.
- Kawakatsu, M., Sugino, H., Oki, I., Tamura, S. & I. Horikoshi, 1984. Redescription of *Phagocata papillifera* (Ijima et Kaburaki, 1916), a subterranean planarian from central Japan, with a comparative description of karyotypes of this species and another Japanese subterranean species *Phagocata suginoi* Kawakatsu, 1974 (Turbellaria, Tricladida, Paludicola). *Bull. Fuji Women's College*, (22) Ser. II: 79-104.
- Kuznedelov, K. D., Timoshkin, O. A. & V. P. Kuzmarev, 1996. Phylogenetic relationships of triclads (Turbellaria, Tricladida, Paludicola) of Lake Baikal deduced from 18S rRNA sequence data. *Mol. Biol.*, 30: 792-797.
- Kuznedelov, K. D., Ishida, S. & S. Nishitani, 2000. Genetic divergence of Japanese Turbellarians, studied by comparisons of partial 18S rRNA gene sequences I. On representatives of Dendrocoelidae (Platyhelminthes: Tricladida: Paludicola). *Zool. Sci.*, 17: 491-496.
- De Vos, T. & T. A. Dick, 1988. Differentiation between *Diphyllobotrium dendriticum* and *D. latum* using isozymes, restriction profiles and ribosomal gene probes. *Syst. Parasitol.*, 13: 161-166.
- 新村文男, 1986. 淡水生三岐腸類ホソウズムシ *Phagocata* 属数種の分類学的考察と新亜種ナガノコガタウズムシ *Phagocata kawakatsui naganoensis* の記載. 信濃路, (43): 12-21.
- 新村文男, 1994. 北海道のカズメウズムシ属の採集と飼育. 信濃生物学会誌, 51: 10-14.
- 新村文男・手代木 渉・西谷信一郎, 1998. 種類と分布. プラナリアの形態分化 —基礎から遺伝子まで— 手代木・渡辺編著 共立出版:1-13.
- 西谷信一郎, 1998. 染色体の観察法. プラナリアの形態分化 —基礎から遺伝子まで— 手代木・渡辺編著 共立出版: 288-289.
- Nishitani, S., Yoshida, W. & S. Ishida, 2006. Karyological studies of a freshwater planarian, *Phagocata albata*. *Chromosome Science*, 9: 27.
- Okugawa, K. I. 1956. A new fresh-water planaria *Phagocata kawakatsui* sp. nov. from Kyoto Prefecture. *Bull. Kyoto Gakugei Univ.*, B(8): 19-23.
- 杉野久雄・川勝正治・村山 均, 1976. ホクリクホソウズムシの採集記. 遺伝, 30: 70-73.
- 手代木 渉・佐々木俊一, 1977. 淡水産プラナリアの一種, トウホクコガタウズムシ *Phagocata teshirogii* の核型ならびに再生片の新生細胞における染色体変異. *Japan. J. Genetics*, 52(5): 387-396.
- Teshirogi, W., Ishida, S. & F. Nimura, 1979. Karyotype of a freshwater planarian, *Phagocata kawakatsui*, and chromosomal variations in neoblasts of regenerating pieces. *Annot. Zool. Japon.*, 52(3): 191-202.
- Teshirogi, W., Hasebe, K. & S. Ishida, 1980. Karyotype of a Japanese freshwater planarian, *Phagocata vivida*. *Japan. J. Genetics*, 55(1): 1-8.