

利尻島において採集された陸産ウズムシ類（扁形動物門：三岐腸目）の DNA バーコーディングを用いた同定の試み

森井悠太¹⁾・内田翔太²⁾

¹⁾ 〒 060-8589 札幌市北区北 9 条西 9 丁目 北海道大学院農学研究院

²⁾ 〒 980-8576 宮城県仙台市青葉区川内 41 東北大学大学院生命科学研究所

Species Identification Using DNA Barcoding of the Terrestrial Planarian (Platyhelminthes: Tricladida) from Rishiri Island, Northern Hokkaido, Japan

Yuta MORII¹⁾ and Shota UCHIDA²⁾

¹⁾ Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Kita-9, Nishi-9, Kita-ward, Sapporo, Hokkaido, 060-8589 Japan

²⁾ Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Kawauchi 41, Aoba-ward, Sendai, Miyagi, 980-8576 Japan

Abstract. DNA barcoding of the terrestrial planarian (Platyhelminthes: Tricladida) from Rishiri Island, Hokkaido, Japan, was conducted for species identification using a partial sequence of mitochondrial DNA (Cytochrome Oxidase subunit I (COI, 834bp)). It was classified as *Rhynchodemus* sp. (Geoplanidae: Rhynchodeminae: Tynchodemini) based on the DDBJ's BLAST search, that supports the identification based on morphological characters.

Keywords: Geoplanidae, Rhynchodeminae, Rhynchodemini, *Rhynchodemus*, Rishiri Island, Hokkaido.

はじめに

利尻島にはこれまで、2種の固有種（リシリウズムシ *Dendrocoelopsis ichikawai*, リシリオオウズムシ *Bdellocephala borealis*）を含む8種もの淡水産ウズムシ類（プラナリア）が生息することが知られており、多様なウズムシ類が生息していることが明らかにされている（石田, 2000; 石田ほか, 2011）。2014年には筆者の一人である森井によって、陸産ウズムシ類の生息も利尻島において初めて確認された（森井・内田, 2015）。陸産ウズムシ類は、扁形動物門、三岐腸目（ウズムシ目）に属するウズムシ類のうち、陸上に生息するものの総称であり、近年の分子系統学的な研究から、リクウズムシ科（Geoplanidae）の1科のみにまとめられている（Sluys *et al.*, 2009）。利尻島

において発見された陸産ウズムシ類は、一対の眼点があり、さらに前端が細長いことから、リクウズムシ科（Geoplanidae）、Rhynchodeminae 亜科、Rhynchodemini 族の一種であると判断された（Ogren & Kawakatsu, 1988; Sluys *et al.*, 2009; 久保田・川勝, 2010; 森井・内田, 2015）。

一方、2014年の調査では、発見した個体を採集しなかったため、画像から得られる情報以上の知見を得ることができず、今後の課題として残されていた。本研究では、利尻島の陸産ウズムシ類のより下位の分類を目指し、DNA分子形質を用いた同定（DNAバーコーディング）を試みた。

材料および方法

2014年に利尻島において初めて陸産ウズムシ



図1. A. 発見された陸産ウズムシ類. B. 採集地点の環境.

類が発見された地点である，利尻島北部の姫沼付近にあるノドットマリ川沿い (N45.22686°/E141.26077°; 森井・内田, 2015) において，2015年6月1日に，体長10mmほどの陸産ウズムシ類2個体を採集した(図1)．採集された個体はいずれも，2014年に撮影された個体と形態的特徴が酷似しており(森井・内田, 2015)，リクウズムシ科(Geoplanidae)，Rhynchodeminae 亜科，Rhynchodemini 族の一種であると判断された．

そのうちの1個体の後端の一部を用いて，NucleoSpin Tissue (タカラバイオ，大津) による全DNAの抽出を行った．全DNAを鋳型として，ミトコンドリアDNAのシトクロームオキシダーゼI (COI) 領域の834bpを BarS: 5' -GTTATGCCTGTAATGATTG-3' (Álvarez-Presas *et al.*, 2011) と COIR: 5' -CCWGTYARMCCHCCWAYAGTAAA-3' (Lázaro *et al.*, 2009) のプライマーセットを用いてPCR法によって増幅した．PCR法によるDNA増幅は，95°C 5分加熱後，94°C 50秒，43°C 45秒，68°C 50秒を30サイクル行った後，68°C 10分の条件で (Mateos *et al.*, 2013)，TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ，大津) を用いて行った．得られたPCR産物を Exo-SAP-IT (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) を用いて精製した上で，ABI 3130xl sequencer (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) を用いたダイレクトシーケンスにより，DNAの塩基配列を決定した．最後に，

DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の相同性検索プログラム (BLAST) を用いて，得られた塩基配列と既知の塩基配列とを比較することで，DNAバーコーディング法による分類群の同定を試みた．

結果および考察

利尻島から採集された個体のCOI領域の塩基配列を，既知の塩基配列と比較したところ，既知の塩基配列の中ではフランスとスペインから採集された3個体の *Rhynchodemus cf. sylvaticus* (Álvarez-Presas *et al.*, 2014; DDNJ Accession No. KJ659685, KJ659672, KJ659686) の塩基配列と最も高い一致率を示し，一致率は89%であった．この一致率は，同種と判断するには低いが，形態的特徴による分類 (Rhynchodeminae 亜科，Rhynchodemini 族の一種) を支持し，かつ *Rhynchodemus* 属の一種であることを示唆する．さらに日本に生息することが知られている *Rhynchodemus* 属の陸産ウズムシ類は，*Rhynchodemus ijimai* の一種のみであることから (Kaburaki, 1922)，本研究で用いた利尻島の陸産ウズムシ類が *R. ijimai* である可能性もあるが，一方で，*R. ijimai* のCOI領域の塩基配列は明らかにされていないため，国内では未知の種であることも十分に考えられる．同様に，利尻島における陸産ウズムシ類の分布が人為移入によるものかどうか，現時点では判断できない．今後は，利尻島外の *Rhynchodemus* 属の陸産ウズムシ類を含む広域

のサンプルを用いて、形態的特徴のより詳細な観察と、DNA の塩基配列を用いた系統関係の推定を行う必要があるだろう。

なお、本研究で新たに決定された COI 領域の塩基配列は、DDBJ から取得することができる (DDBJ Accession No. LC194235)。本研究で用いた標本の情報は下記の通りである。

Rhynchodemus sp.

標本情報：利尻島姫沼付近ノドットマリ川沿い。

2015 年 6 月 1 日。森井悠太，採集。

Specimen examined: Nodottomari, Rishiri Island, Hokkaido. 45.22686° N, 141.26077° E (WGS 84). June 1, 2015. coll. Y. Morii. Uchida Collection No. 501, No. 502.

謝辞

野外調査にあたり、佐藤雅彦学芸員 (利尻町立博物館) のご助力をいただいた。この場を借りて、厚く御礼申し上げます。

引用文献

Álvarez-Presas, M., F. Carbayo, J. Rozas & M. Riutort, 2011. Land planarians (Platyhelminthes) as a model organism for fine-scale phylogeographic studies: understanding patterns of biodiversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Journal of Evolutionary Biology*, 24: 887–896.

Álvarez-Presas, M., E. Mateos, À. Tudó, H. Jones & M. Riutort, 2014. Diversity of introduced terrestrial flatworms in the Iberian Peninsula: a cautionary tale. *PeerJ*, 2: e430.

石田幸子, 2000. 利尻島に生息するプラナリア (平成 10 年度利尻島調査研究事業報告). 利尻研究, (19): 45-49.

石田幸子・西谷信一郎・吉田 渉・K. D. Kuznedelov・

佐藤雅彦, 2011. 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 -. 利尻研究, (30): 75-82.

Kaburaki, T., 1922. On the terrestrial planarians from Japanese territories. *Journal of the College of Science, Tokyo Imperial University*, 44(4): 1-54.

久保田 信・川勝正治, 2010. 和歌山県産コウガイビル類 (扁形動物門, 三岐腸目, 結合三岐腸亜目, リクウズムシ科, コウガイビル亜科) の続報と本動物群の高次分類体系に関する注記. 南紀生物, (52): 97-101.

Lázaro, E. M., R. Sluys, M. Pala, G. A. Stocchino, J. Bagueña & M. Riutort, 2009. Molecular barcoding and phylogeography of sexual and asexual freshwater planarians of the genus *Dugesia* in the western Mediterranean (Platyhelminthes, Tricladida, DugesIIDae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52(3): 835–845.

Mateos, E., A. Tudó, M. Álvarez-Presas & M. Riutort, 2013. Planàries terrestres exòtiques a la Garrotxa. *Annals de la Delegació de la Garrotxa de la Institució Catalana d' Història Natural*, 6: 67-73.

森井悠太・内田翔太, 2015. 利尻島における陸産ウズムシ類 (扁形動物門: 三岐腸目) の初記録. 利尻研究, (34): 45-47.

Ogren, R. E. & M. Kawakatsu, 1988. Index to the species of the family Rhynchodemidae (Turbellaria, Tricladida, Terricola), Part I: Rhynchodeminae. *The Bulletin of Fuji Women's College, Ser. II*, 26: 39-91.

Sluys, R., M. Kawakatsu, M. Riutort & J. Bagunna, 2009. A new higher classification of planarian flatworms (Platyhelminthes, Tricladia). *Journal of Natural History*, 43(29-30): 1763-1777.