名古屋大学博物館報告
Bull. Nagoya Univ. Museum
No. 27, 13–16, 2011

名古屋大学キャンパス内で発見されたホタルミミズとそのDNAバーコード解析

The luminous earthworm, *Microscolex phosphoreus* (Dugès, 1837), found in Nagoya University campus, and its DNA barcoding

大場　裕一（OBA Yuichi）[1)]・柴田　康平（SHIBATA Kouhei）[2)]・
吉田　宏（YOSHIDA Hiroshi）[3)]

1）名古屋大学大学院生命農学研究科
Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya 464-8601, Japan
2）鎌倉市関谷
Sekiya, Kamakura 247-0075, Japan
3）奈良県立御所実業高校
Nara Prefectural Gose Technical and Industrial High School, Gose 639-2247, Japan

Abstract

We found the luminous earthworm, *Microscolex phosphoreus* (Dugès, 1837), in Nagoya University campus on Jan 2011. This is the first record of this species in Aichi Prefecture. The luminescent mucus was discharged from anus upon mechanical stimulus. The DNA 'barcode' sequences of a cytochrome oxidase I region were analysed and compared to those from other localities.

序　論

発光する貧毛類は，世界から16属が数えられている（Oba *et al.*, 2011 and references therein）．そのうち日本には，2属2種が分布する（Haneda, 1972; 羽根田 , 1985; Oba *et al.*, 2011）．その1種が，本論文で扱うホタルミミズ（*Microscolex phosphoreus*）である．ちなみに，もう1種はイソミミズ（*Pontodrilus litoralis*）で，日本各地の砂浜で発見されているが愛知県からの正式な報告例は今のところない．

ホタルミミズは，体長約40 mm直径約1.0 〜 1.5 mmの小型の貧毛類である．アメリカ，ヨーロッパ，アフリカなど世界中に広く分布が確認されている（Gates, 1972）．日本での最初の発見は，1934年の神奈川県大磯で（Yamaguchi, 1935），その後は本州，四国，九州などの各地からも報告がある（小林，1941; 島田，1956; 岡田，1965; 山口，1970; 羽根田，1985）．発光することから新聞記事などに採り上げられるケースも多いものの，これらを加えてもこれまでの報告例は20件程度に過ぎず，珍しい種類であると考えられている．ホタルミミズの生息環境は，主に有機物に富んだ黒ボク土や花崗岩が風化してできた真砂土のようなシルト質の土壌で，畑や山林など様々な場所で確認されている．乾燥や逆に過多に含水した土壌には生息していない．

最近，奈良県香芝市に住む著者の一人（吉田）が自宅の庭でホタルミミズを発見した（南谷ら , 2010）．発見場所は，関西で庭土によく利用されている真砂土と呼ばれる花崗岩由来の土で，落ち葉や雑草などはなかった．周囲には，家庭菜園や花壇があるが，これらの中からはほとんど発見されなかった．ホタルミミズが地上に排出した糞塊（earthworm cast）は同じ場所にいる他のミミズと異な

り粒が小さく粉質であるため見分けやすい．この糞塊の下を 20 mm ほど掘ると高い確率で捕獲できた．この糞塊は，冬場に多く見られ夏場はほとんど見られない．排糞量が最も多くなるのは 11 月末から 12 月末の間で，この時期は他のミミズがあまり活動しないため，糞塊を目印にすると簡単に捕獲することができることがわかっている（吉田＆柴田 , 2010）．同じ場所からはサクラミミズ（*Eisenia japonica*），ヘンイセイミミズ（*Phereteima heteropoda*），クソミミズ（*Pheretima hupeiensis*），フキソクミミズ（*Pheretima irregularis*）等も確認された．

結　果

2011 年 1 月 9 日，筆者のひとり（大場）は，農学部付近の自転車置き場（35°09'15.25"N, 136°58'16.64"E, alt. 54 m; Fig. 1A）に，リターなどの有機物を多く含むシルト質の湿った土壌を見つけ，ここをさらに詳しく観察したところミミズによる糞塊が認められた（Fig. 1B）．糞塊の周囲を何カ所かスコップで掘ってみたところ，合計 9 個体の小型のミミズが得られた（Fig. 1C）．体長は約 10 ～ 30 mm．小型のものは環帯が不明瞭であったことから幼体と考えられた．ピンセットで刺激を与えてみたところ，末節後端付近から明らかな発光液の分泌が確認され（大場 , 2011; Oba *et al.*, 2011），黄緑色の光が約 1 分間ぼんやりと持続した（Fig. 1D）．このときの調査では，同じ場所から

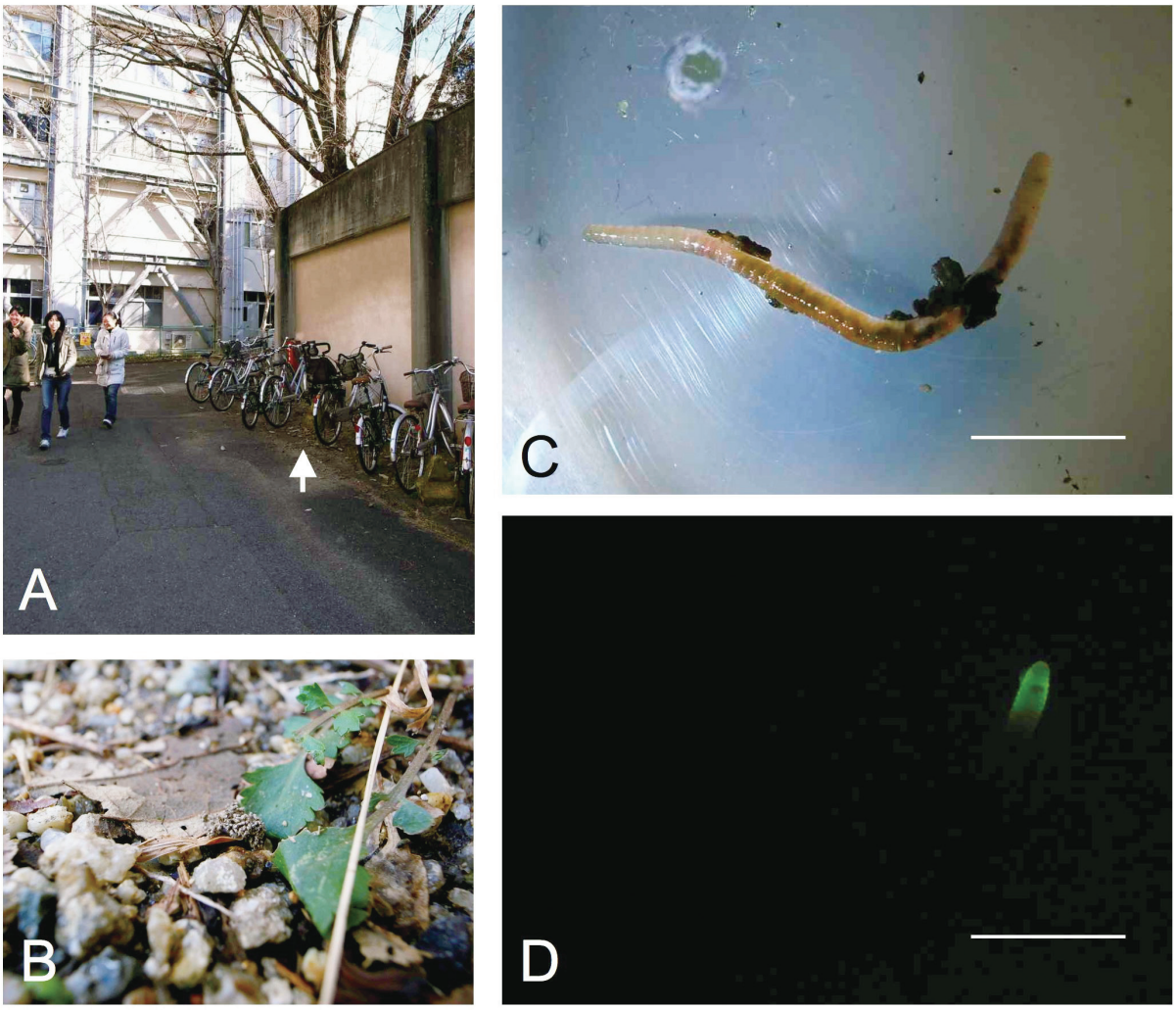


Fig. 1. Parking area for bicycles in Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University (A) and the earthworm cast (B). Arrow indicates the place where the luminous earthworms were found. *Microscolex phosphoreus* (C) and its luminescence by stimulation (D). Bars show 5 mm.

他種のミミズは見つからなかった．その後，1 月 10 日，1 月 13 日，3 月 17 日にも同じ場所で再調査したところ，同様にミミズが見つかり，これらについても刺激により発光することが確認された．検鏡の結果，剛毛の配列様式や背孔がないことなどから，刺激により発光することを勘案すると本種は，ホタルミミズであると考えられた．

採取した個体は，ただちに 99.5% エタノールに浸けるとともに，他の地域から採取されたホタルミミズも含めて遺伝子解析を試みた．これら他地域のホタルミミズは，予め形態学的にホタルミミズであることを確認している．遺伝子解析には，チトクロームオキシダーゼⅠ（COI）の部分配列を用いた．この配列は，遺伝子情報による種同定法として世界的に採用されつつある DNA バーコーディング（Hebert *et al.*, 2003）に用いられている領域である．

エタノール漬け試料から胴体の一部の組織を切除し，これを DNA 抽出用サンプルとした．DNA 抽出には，DNA 抽出試薬キット（QIAamp mini DNA kit; Qiagen, Hilden, Germany）を用い，操作はすべてプロトコルに従って行った．PCR 反応は，プライマーセット（LCO1490 and HCO2198; Hebert *et al.*, 2003）と DNA ポリメラーゼ AmpliTaq Gold（Applied Biosystems, Foster City, CA）を用いて，DNA バーコードの推奨するプログラム（Hebert *et al.*, 2003）に従って行った．得られた PCR 産物は，BigDye Terminator kit v3.1 (Applied Biosystems) と ABI Prism 3130 (Applied Biosystems) を用いてダイレクトシークエンス法により解析した．今回解析に用いた試料のリストを Table 1 に示した．

Table 1. 遺伝子解析に用いたホタルミミズ

採集地	採集日	Specimen ID	GenBank 登録番号
奈良県香芝市真美ヶ丘	2010 年 12 月 23 日	Mph1	AB608781
愛知県名古屋市千種区不老町	2011 年　1 月 10 日	Mph2	AB608785
大阪府茨木市下穂積	2011 年　2 月 12 日	Mph3	AB673364
愛知県名古屋市千種区不老町	2011 年　3 月 17 日	Mph4	AB673365
神奈川県鎌倉市関谷	2010 年 12 月　5 日	Mph7	AB673366
神奈川県三浦市小網代	2006 年 12 月 23 日	Mph8	AB673367
静岡県田方郡函南町桑原	2008 年　2 月 23 日	Mph9	AB673368
茨城県常総市坂手町	2010 年　1 月 11 日	Mph10	AB673369
神奈川県鎌倉市玉縄	2006 年 12 月　2 日	Mph12	AB673370
静岡県田方郡函南町桑原	2008 年　2 月 23 日	Mph13	AB673371

得られた 658 塩基の配列情報は，名古屋大学，神奈川県，茨城県，大阪府，奈良県の個体（Mph1, 2, 3, 4, 7, 8, 10 and 12）で完全に一致していた．ただし，静岡県函南町の個体（Mph9 and 13; 両者の配列は 100%一致）のみ配列がこれらと異なっており，その塩基配列相同性は 90.3%であった．配列情報は，採集情報とともに GenBank に登録した（Table 1）．ちなみに，GenBank にはホタルミミズの COI 配列情報は登録されていなかったが，BLAST サーチの結果これらの配列情報に最も近いものとして北米産 Haplotaxida sp.（ナガミミズ目の一種）がヒットした（GenBank no. HM400885）．ナガミミズ目は，ホタルミミズとイソミミズを含む貧毛類の中でも大きなグループである．

考　察

今回，名古屋大学東山キャンパス内の自転車置き場から，ホタルミミズの分布が確認された．愛知県からはこれが最初の記録となる．また，東海地方では 1948 年に三重県津市で見つかって以来（羽根田 , 1972），63 年ぶりの発見である．

これまでは，冬場の雨後などに地表で発光している個体が目撃されたケースが多かった．しかし，著者の一人（吉田）が糞塊を手掛かりに探す方法を発見し，今回もそれに倣うことで見つかったため，同様の調査法を使用すれば新たな分布を数多く確認できる可能性がある．通常ホタルミミズは冬場に発見されるが，2011 年 7 月 29 日（調査者：吉田，大場）と 8 月 3 日（調査者：柴田，大場）に名古屋大学で調査した際にも，やはりこれを見つけることはできなかった．夏期を卵の状態で越すか，あるいは異なった場所に移動しているのかも知れない．

静岡県函南町を除く関東から関西の広い地域でホタルミミズの COI 遺伝子に多様性が見られなかったことは，何らかの理由（外国から移入や単為生殖など）により急激な分布拡大があった可能性が示唆される．今後は，名古屋大学キャンパス内の生息地で観察を続けホタルミミズの生態を明らかにするとともに，日本全国および外国産のホタルミミズの DNA バーコード解析を行い，その多様性や分布拡大径路などを考察する予定である．

謝　辞

茨城県常総市のホタルミミズ試料を提供いただいた湯本勝洋氏（茨城県自然博物館）に感謝いたします．

文　献

岡田要（1965）新日本動物図鑑（上）．北隆館．

小林新二郎 (1941) 四國，中國，近畿及中部諸地方の陸棲貧毛類に就いて．動物學雜誌, **53**, 258-266.

Gates, G. E. (1972) Burmese earthworms. An introduction to the systematics and biology of megadrile oligochaetes with special reference to Southeast Asia. *Trans. Am. Phil. Soc.*, **62**, 1-326.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. and deWaard, J. R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **270**, 313-321.

南谷幸雄，田村芙美子，山中康彰，市川彩代子，花木佳代子，丸山健一郎，吉田宏，鳥居春己，前田喜四雄 (2010) 奈良県における大型陸生ミミズ相．奈良教育大学附属自然環境センター紀要. **11**, 1-7.

吉田宏，柴田康平 (2010) ホタルミミズの発光理由．第 33 回日本土壌動物学会口頭発表．

島田健一 (1956) 発光ミミズの分布と観察．採集と飼育. **18**, 213-215.

羽根田弥太 (1972) 発光生物の話．北隆館．

羽根田弥太 (1985) 発光生物．恒星社厚生閣．

Oba, Y., Branham, M. A. and Fukatsu, T. (2011) The terrestrial bioluminescent animals of Japan. *Zool. Sci.*, **28**, 771-789.

大場裕一 (2011) 名古屋大学東山キャンパス内のホタルミミズの記録．三河生物. **2**, 67.

山口英二 (1970) ミミズの話．北隆館．

Yamaguchi, H. (1935) Occurrence of the luminous oligochæte, *Microscolex phosphoreus* (Dug.) in Japan. *Annot. Zool. Japon.*, **15**, 200-202.

（2011 年 10 月 4 日受付）