

オソノエラ洞穴地底湖に生息するプラナリアの遺伝学的系統

末永崇之¹・渡辺修二²・柳澤忠昭³・升屋勇人⁴

The genetic phylogeny of the planaria inhabiting in the underground lake of Osonoera-do cave.

Takayuki SUENAGA, Shuji WATANABE, Tadaaki YANAGISAWA, Hayato MASUYA

- 1 東北大学大学院生命科学研究所 980-0862 仙台市青葉区川内41 東北アジア研究センター. Graduate School of Life Science & Center for Northeast Asian Studies, Tohoku University, 41, Kawauchi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-0862, Japan.
- 2 岩手県立博物館 020-0102 盛岡市上田字松屋敷34. Iwate Prefectural Museum, Morioka 020-0102, Japan.
- 3 岩泉町歴史民俗資料館 028-5641 岩泉町門字町向9. Iwaizumi Town Folk Heritage Museum, Iwaizumi 028-5641, Japan.
- 4 国立研究開発法人森林研究・整備機構森林総合研究所東北支所 Tohoku Research Center of Forestry & Forest Products Research Institute.

Abstract

The planaria collected from the underground lake of Osonoera-do cave, Yamada town, Iwate prefecture, Japan had no eyes and its body color was white. Molecular phylogenetic analysis based on 18S rDNA gene sequence showed that this specimen is closely related to the genus *Dendrocoelopsis*. This population may be an endemic species of the water system connected to the underground lake of Osonoera-do cave.

はじめに

我々は、岩手県下閉伊郡山田町にあるオソノエラ洞穴 (N39.48431, E141.8357, H344) で生物調査を行った。その際に地底湖で採集したプラナリアは、眼がなく、体色が白色であった。これらの特徴を持つプラナリアはこれまで県内で報告されていない。また、日本産淡水プラナリアのなかで眼を持たないことが知られているのはヒメジメナシウズムシ *Sphalloplana* sp. of Himeji だけであり (Ichikawa & Kawakatsu 1967, 佐々木 2002), 極めてまれな特徴を持つ。我々は本個体群の1個体について、遺伝学的系統を核の18S rDNA 領域で分析し、キタオオウズムシ属 *Dendrocoelopsis* に近縁である結果を得たので報告する。

方法

試料保存 採集した試料は、形態観察用は70%エタノール、分子実験用は99.5%エタノールで満たしたガラス製スクリー管に保存した。

形態観察 実体顕微鏡を用い、外部形態を観察した。

核18S rDNA 領域の塩基配列決定 QuickGene

DNA tissue kit S (KURABO) と Nucleospin tissue (TaKaRa) のマニュアルに従ってDNA抽出を行った。抽出したDNAはT100 Thermal Cycler (BIO-RAD) を用いて、PCR反応、CS反応を行った。使用したプライマーセットは (5'-TACTGTTGATCCTGCCAGTA-3', 5'-ATTACCGCGGCTGCTGGCACC-3') である (吉田ほか 2005)。PCRは94℃で3分の後、熱変性を94℃で30秒、アニーリングを55℃で30秒、伸長反応を72℃で1分を1サイクルとして25サイクル行い、続いて反応停止を72℃で5分行い (吉田ほか 2005)、Exo-SAP-IT (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) を用いて精製した。続けて、CS反応はBigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用い、96℃で2分の後、96℃で10秒、50℃で5秒、60℃で36秒を1サイクルとして40サイクルの条件下で行い、得られたDNA産物をABI 3130xl sequencer (Applied Biosystems) を用いてダイレクト法にて両方向から塩基配列を決定した。

遺伝学的系統解析 本調査で得られた個体と他の

水生プラナリア種との系統関係を明らかにするために、最尤法 (ML) を用いて系統樹を得た。DNA サンプルは本調査で得られた個体 IOP (写真 1) に加え、Genbank または文献より引用した計 22 個体の配列を用いた (表 1)。得られた塩基配列を A plasmid Editor (v2.0.50) 及び CLUSTALW (Thompson et al. 1994) にて両方向の塩基配列を合わせ、MUSCLE v3.8 (Edgar, 2004) にて整列させ、trimAl 1.2 (Capella-Gutiérrez

et al. 2009) を用いて解析に最適な領域の選択を行った。Kakusan4-4.0.2011.05.28 (Tanabe 2011) にて分子進化モデルの選択を行った。続けて、選ばれた最適なモデルを用いて TreeFinder (Jobb 2008) および Phylogears2, v2.2.2012.02.13 (Tanabe 2012) にて ratchet search (Nixon 1999, Vos 2003) を 100 回反復した後、Bootstrap 解析を 1,000 回試行にて系統樹 (ML) を得た。

表 1 遺伝学的系統解析に用いた種名及び配列の出典

Genbank の配列を参照したものは引用に続けてアクセッション番号を記した。

種名等	出典
地下水生三岐腸蛭目 <i>Cavernicola</i>	
<i>Cavernicola</i> sp.	(Laumer & Giribet 2014) KC869823.1
結合三岐腸蛭目 <i>Continenticola</i>	
チジョウセイウムズムシ上科 <i>Geoplanoidea</i>	
サンカクアタマウズムシ科 <i>Dugesiidae</i>	
ナミウズムシ属 <i>Dugesia</i>	
ナミウズムシ <i>D. japonica</i>	(Katayama et al. 1995) D83382.1
ヒラタウズムシ上科 <i>Planarioidea</i>	
オオウズムシ科 <i>Dendrocoelidae</i>	
オオウズムシ属 <i>Bdellocephala</i>	
<i>B. baicalensis</i>	(Koroleva et al. 2013) JX476018.1
イズミオオウズムシ <i>B. brunnea</i> (青森県産)	(Kuznedelov et al. 2000) AB196934.1
同上 (福島県産)	同上 AB196935.1
キタオオウズムシ属 <i>Dendrocoelopsis</i>	
キタシロウズムシ <i>D. lactea</i>	(Katayama et al. 1996) D85087.1
ヒラタウズムシ科 <i>Planariidae</i>	
カズメウズムシ属 <i>Polycelis</i>	
<i>P. nigra</i>	(Carranza et al. 1998b) AF013151.1
<i>P. tenuis</i>	(Carranza et al. 1998a) Z99949.1
キタカズメウズムシ属 <i>Seidlia</i>	
カズメウズムシ <i>S. auriculata</i>	(吉田ほか 2005)
同上 (北海道アポイ岳産)	同上
キタカズメウズムシ <i>S. schmidti</i>	同上
ホソウズムシ属 <i>Phagocata</i>	
ソウヤイドウズムシ <i>P. albata</i>	(石田ほか 2011)
<i>P. altaica</i>	同上
エゾコガタウズムシ <i>P. iwamai</i>	同上
コガタウズムシ <i>P. kawakatsui kawakatsui</i>	同上
ナガノコガタウズムシ <i>P. kawakatsui naganoensis</i>	同上
<i>P. sibirica</i>	同上
トウホクコガタウズムシ <i>P. teshirogii</i>	同上
<i>P. ullala</i>	同上
<i>P. vitta</i>	同上
ミヤマウズムシ <i>P. vivida</i> (青森県産)	同上
同上 (福島県産)	同上

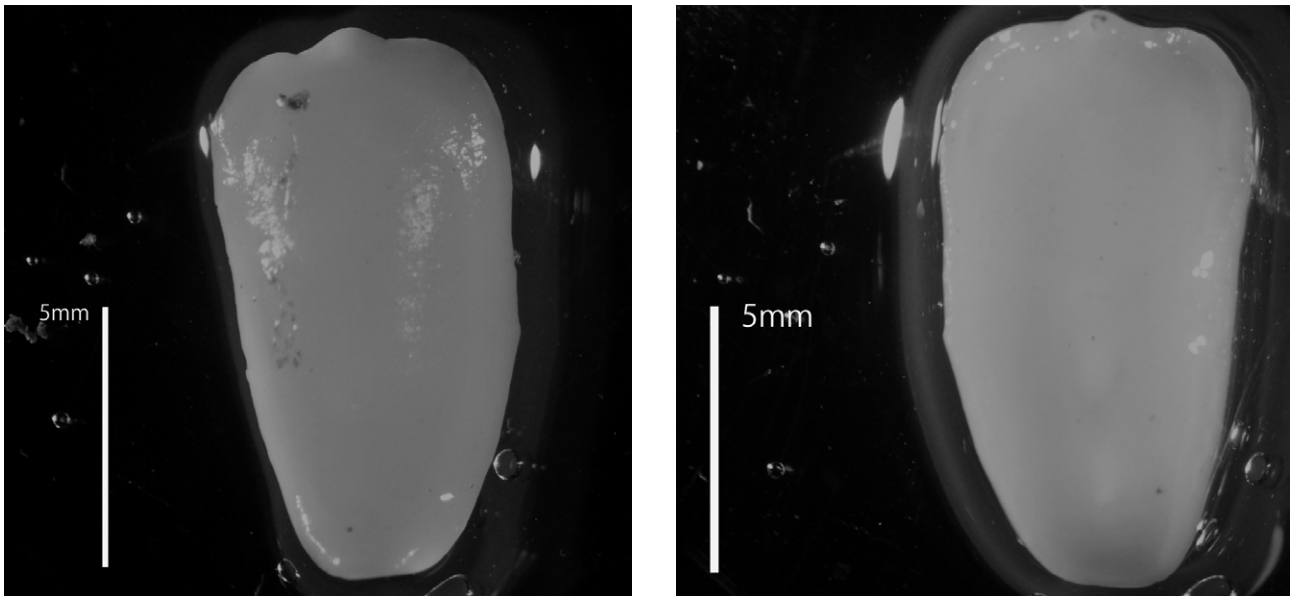


写真1 遺伝学的系統解析に用いた標本 (IOP)。(左) 背側, (右) 腹側.

```

TTACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTATCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTC 60
TAAGTACTCAGACCAGTACTCTGAAACCGCGGATGGCTCATTATAACAGCTATGATTTGA 120
GAGATTTAAACTTGCTACAGGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATATTTTTTCAAAAA 180
TGCCGTGACTCTTTGAAGCGGCGGATTTATTAGATCAAAATCAACCTACTGGCAACGGTG 240
GTTACTTGATGACTCTGGATAACTTTACTGATCGTACAACCTTTGTGTTGACGACATATC 300
TCTTGAAATGGCTGACCTATCAACTTTTCGATGGTAAGATCAAAGCTTACCATGGTTGTAA 360
CGGGTAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACAT 420
CCACGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATACCGGCTCGGTGAGGTAGTGACAATA 480
AATAACAATATGAGCCCTAGTGGTTTCATAATTGCAATGAGAACATTTTAAATACTTTAT 540
CAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGT 583
    
```

図1 オソノエラ洞地底湖のプラナリアから得られた核の18S rDNA領域の塩基配列

結果

オソノエラ洞穴地底湖で採集したプラナリアの体色は白色で、実体顕微鏡での観察では眼が確認されず、無眼であった。この特徴は、これまでに報告されている日本産淡水性プラナリアの中ではヒメジメナシウズムシ *Sphalloplana* sp. of Himeji に一致する (Ichikawa & Kawakatsu 1967, 佐々木 2002)。しかし、プラナリア類の同定のためには生殖器官の構造を調べる必要があるため、外部形態から本個体がヒメジメナシウズムシと同種あるいは近縁種であるか等は判断できなかった。

次に、遺伝学的系統解析を行った。本個体 (IOP) からDNAを抽出し、核の18S rDNA領域の塩基配列を決定した (図1)。この配列と、その他の水生プラナリアの配列を用い、最尤法により系統樹 (ML)

を得た (図2)。本個体を含む今回の解析に用いた配列は、地下水生三岐腸亜目 *Cavernicola* の外群となった。また、結合三岐腸亜目 *Continenticola* 内では、チジョウセイウズムシ上科 *Geoplanoidea* のナミウズムシ *Dugesia japonica* の外群となった。ヒラタウズムシ上科 *Planarioidea* 内では以下のとおり4個のcladeに分かれた。Clade A: オオウズムシ科 *Dendrocoelidae* のオオウズムシ属 *Bdellocephala* を含む群。Clade B: ヒラタウズムシ科 *Planariidae* のカズメウズムシ属 *Polycelis* とキタカズメウズムシ属 *Seidlia* を含む群。Clade C: オオウズムシ科のキタオオウズムシ属 *Dendrocoelopsis* と本個体を含む群。Clade D: ヒラタウズムシ科のホソウズムシ属 *Phagocata* を含む群。以上より、本個体はキタオオウズムシ属か、その近縁種であることが示された。

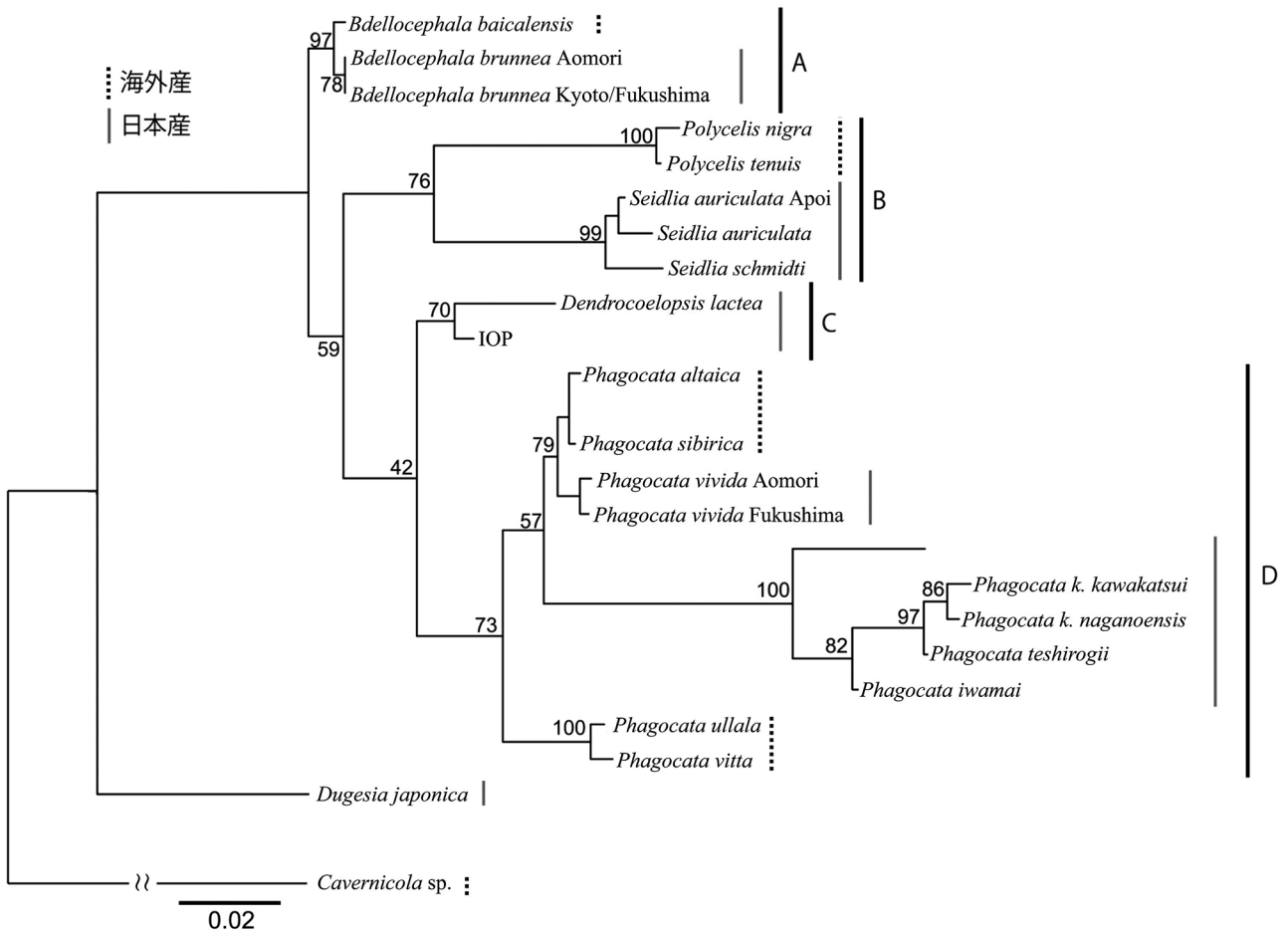


図2 最尤法による系統樹 (ML)

数値はbootstrap値. IOP: オソノエラ洞穴地底湖で採集されたプラナリア. 図中ではそれぞれの種を学名で表記し、一部は学名に採集地を続けて表記した. Aomori: 青森県産, Fukushima及びKyoto/Fukushima: 福島県産, Apoi: 北海道アポイ岳産.

考察

今回の遺伝学的系統解析で得られた系統樹において、各属は国内産・海外産を問わず各クレードにまとまっており、属ごとの分類をよく反映している。この系統樹においてヒラタウズムシ上科は、初めにオオウズムシ科オオウズムシ属が分岐した後、ヒラタウズムシ科のカズメウズムシ属とキタカズメウズムシ属が分岐し、次いで本個体とオオウズムシ科キタオオウズムシ属を含むclade Cと、ヒラタウズムシ科ホソウズムシ属が分岐する結果となった。従って、clade Cはヒラタウズムシ科に含まれると考えられる。

Clade Cに含まれるキタオオウズムシ属は、現在の分類ではオオウズムシ科とされているが (Sluys et al. 2009), 今回の結果ではヒラタウズムシ科に属することが示唆された。本属がどちらの科に含まれるか、他の遺伝子を用いた解析も行い検討する必要がある。

今回オソノエラ洞穴地底湖で採集したプラナリアも

clade Cに含まれることから、ヒラタウズムシ科に属し、キタオオウズムシ属と同属あるいは近縁種であると推察される。ブートストラップ値による支持率が70%と低く、断定はできないが別属であると考えられる。外部形態の特徴は、ホラアナウズムシ科Kenkiidaeホラアナウズムシ属 *Sphalloplana* のヒメジメナシウズムシと一致するが、これまでホラアナウズムシ属について遺伝学的系統関係が調べられていないため、今回の結果からは本個体が同種あるいは近縁種であるのか明らかにできない。正確な分類のためには、生殖器官の解剖学的・組織学的な構造を調べる必要がある。

オソノエラ洞穴の形成年代は明らかにされていないが、小岩 (1989) は当時得られていた北上山地の傾動速度等をもとに約35万年前と算出した。また、洞穴の前を流れるオソノエラ沢による下刻で河床面が低下し、洞内への流水供給が失われたのは約15万年前であり、それ以降、洞内へ供給される水は、周辺に降った

雨水を起源とする地下水に限られてきたと推定している。このように、オソノエラ洞穴の地底湖は、他の地下水系や外部の河川から長期間隔離された環境にある。

オソノエラ洞穴の地底湖には外部から持ち込まれた木材が放置されており、ここに生息する生物は、これらの木材と共に持ち込まれたものに由来する可能性がある。しかし、北上山地の各洞穴および岩手県内において、これまで本個体群と同様の形態を持つプラナリアは見つかっていないことから、今回発見されたプラナリアは人為移入したものではなく、オソノエラ洞穴の地底湖と、これに接続する地下水系だけに生息する固有種と考えられる。

オソノエラ洞穴地底湖の環境は安定しており、この湖に生息する本個体群の個体数は比較的多いため、現状が維持される限り個体群の生存に問題はないだろう。地底湖の水量及び水質を維持するため、洞穴の周辺では森林の皆伐など大規模な改変を避けて、本個体群の生息環境を保全すべきである。

引用文献

- Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez JM & Gabaldón T (2009) trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* 25: 1972-1973.
- Carranza S, Littlewood DTJ, Clough KA, Ruiz-Trillo I, Bagnà J & Riutort M (1998) A robust molecular phylogeny of the Tricladida (Platyhelminthes, Seriata) and a reassessment of morphological synapomorphies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265: 631-640.
- Carranza S, Ruiz-Trillo I, Littlewood DTJ, Riutort M & Bagnà J (1998) A reappraisal of the phylogenetic and taxonomic position of land planarians (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida) inferred from 18S rDNA sequences. *Pedobiologia*, 42: 433-440.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797.
- Ichikawa A & Kawakatsu M (1967) Records of two planarian species of the family Kenkiidae from Japanese subterranean waters. *Archiv für Hydrobiologie* 63: 512-519.
- 石田幸子・西谷信一郎・吉田渉・Kuznedelov KD・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.
- Jobb G. (2008) TREEFINDER version of October 2008 Available from <http://www.treefinder.de>.
- Katayama T, Wada H, Furuya H, Satoh N & Yamamoto M (1995) Phylogenetic position of the dicyemid mesozoa inferred from 18S rDNA sequences. *The Biological bulletin* 189: 81-90.
- Katayama T, Nishioka M & Yamamoto M (1996) Phylogenetic relationships among turbellarian orders inferred from 18S rDNA sequences. *Zoological science* 13: 747-756.
- 小岩清水 (1989) 生命力を伴う知識の要請をめざす地理的教育実践 (7) 岩手県北上山地東部「オソノエラ石灰岩洞穴」調査報告. 昭和63年度 第十号特集 紀要 (専修大学附属高等学校) 10: 3-46.
- Koroleva AG, Evtushenko EV, Timoshkin OA, Vershinin AV & Kirilchik SV (2013) Telomeric DNA length and phylogenetic relationship of Baikal and Siberian planarians (Turbellaria, Tricladida) . *Cell and Tissue Biology* 7: 369-374.
- Kuznedelov KD, Ishida S & Nishitani S. (2000) Genetic Divergence of Japanese Turbellarians, Studied by Comparisons of Partial 18S rRNA Gene Sequences. I. On Representatives of Dendrocoelidae (Platyhelminthes: Tricladida: Paludicola) . *Zoological Science* 17: 491-496.
- Laumer CE & Giribet G (2014) Inclusive taxon sampling suggests a single, stepwise origin of ectolecithality in Platyhelminthes. *Biological Journal of the Linnean Society* 111: 570-588.
- Nixon KC. 1999. The parsimony ratchet: a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* 15: 407-414.
- 佐々木玄祐 (2002) プラナリア原色図説 (川勝正治). http://www2u.biglobe.ne.jp/~gen-yu/plaj_list.html.
- Sluys R, Kawakatsu M, Riutort M & Bagnà, J (2009) A new higher classification of planarian flatworms (Platyhelminthes, Tricladida) . *Journal of Natural History* 43: 1763-1777.
- Tanabe AS (2011) Kakusan4 and Aminosan:

two programs for comparing nonpartitioned, proportional and separate models for combined molecular phylogenetic analyses of multilocus sequence data. *Molecular Ecology Resources* 11: 914-921.

Tanabe AS (2012) Phylogears version 2.2.2012.02.13. Available from <http://www.fifthdimension.jp/>.

Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

Vos RA (2003) Accelerated Likelihood Surface Exploration: The Likelihood Ratchet. *Systematic Biology* 52: 368-373.

吉田渉・西谷信一郎・石田幸子 (2005) 白神山地の淡水棲プラナリア III. 18S r RNA 遺伝子の部分配列から推測された3種 (プラナリア科: キタカズメウズムシ属・カズメウズムシ属) の分子系統類縁関係. 白神研究 2: 22-27.

要 旨

岩手県下閉伊郡山田町にあるオソノエラ洞穴の地底湖で採集したプラナリアは、眼がなく、体色が白色であった。本個体の遺伝学的系統を核の18S rDNA領域で分析し、キタオオウズムシ属 *Dendrocoelopsis* に近縁である結果を得た。本個体群はオソノエラ洞穴地底湖とこれに接続する地下水系の固有種の可能性がある。

キーワード：プラナリア, 遺伝学的系統, 18S rDNA, 洞穴生物