

青森県初記録ならびに国内分布北限記録更新の発光性貧毛類 ホタルミミズ *Microscolex phosphoreus*

南條完知¹⁾・伊木思海²⁾・別所 - 上原 学^{1,3)}・大場裕一⁴⁾

¹⁾ 東北大学大学院生命科学研究科, 〒 980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3

²⁾ 株式会社島津アクセス, 〒 451-0046 名古屋市西区牛島町 2 番 5 号トミタビル 8F

³⁾ 東北大学学際科学フロンティア研究所, 〒 980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3

⁴⁾ 中部大学応用生物学部, 〒 487-8501 春日井市松本町 1200

The Northernmost distribution and the first record from Aomori Prefecture of the luminous earthworm, *Microscolex phosphoreus*, in Japan

Kanchi NANJO¹⁾・Kotomi IKI²⁾・Manabu BESSHO-UEHARA^{1,3)}・Yuichi OBA⁴⁾

¹⁾ Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 6-3, Aramaki Aza-Aoba, Aoba-ku, Sendai 980-8578 Japan

²⁾ Shimadzu Access Corporation, Tomita Building 8F, 2-5, Ushijima-cho, Nishi-ku, Nagoya 451-0046 Japan

³⁾ Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University, 6-3, Aramaki Aza-Aoba, Aoba-ku, Sendai 980-8578 Japan

⁴⁾ Department of Environmental Biology, Chubu University, 1200, Matsumoto-cho, Kasugai 487-8501 Japan

Abstract : We found a luminous earthworm, *Microscolex phosphoreus*, in Aomori Prefecture of Japan, in November 2024. This discovery is the first record from Aomori and the northernmost distribution record of Japan. All specimens' mitochondrial *COI* barcoding sequences were identical to those reported previously in Yamagata, Akita Prefectures, and other various localities in Japan.

キーワード : ホタルミミズ, 北限分布, 生物発光, DNA バーコーディング, 青森県

Key words: *Microscolex phosphoreus*, Northernmost distribution, Bioluminescence, DNA barcoding, Aomori Prefecture

はじめに

ホタルミミズ *Microscolex phosphoreus* (Dugès, 1837) は世界中に分布する発光ミミズであり, 南極大陸を除くすべての大陸に分布するコスモポリタン種である (Gates, 1972; Rota *et al.*, 2018). 日本では秋田県から鹿児島県まで広く分布することがわかっている (Easton, 1981; Seesamut *et al.*, 2019; 上平, 2015; 吾妻, 2004; 大場ほか, 2011; 小林, 1941; 山口, 1935; 岡田, 1965; 横田, 1941; 羽根田, 1985). 冬から春先は糞塊を手がかりに学校や公園などで見つけやすいが, 気温の上昇に伴い数を減らし, 夏にはほとんど見られなくなる (大場ほか, 2011). しかし, 夏でも気温の低い山間部からは報告例がある (伊木ほか, 2023).

ミトコンドリア DNA の *COI* (シトクロームオキシダーゼ I) 部分配列を用いた分子系統解析によるとホタ

ルミミズは日本に5つのハプロタイプが認められている(大場, 2012). いずれも生物発光を示すが, ハプロタイプ間の種内変異が10%に達することから複合種からなる集団 (species complex) が示唆されている(大場ほか, 2015).

日本における北限記録は2016年に山形県(北緯38°13')と宮城県(北緯38°16')から報告され(大場ほか, 2016), 2019年には秋田県(北緯39°43')より報告された(Seesamut *et al.*, 2019). 東北地方は積雪量が多いため, 糞塊を手がかりに採集を行うことが困難である. 採集可能なシーズンが他の地方よりも短いことが報告例の少なさに繋がっているかもしれないが, 今回我々は青森県(北緯40°53')にてホタルミミズを発見し, 最北限記録を更新したのでここに報告する.

材料と方法

採集は2024年11月13日13時ごろに青森県営浅虫水族館(青森県青森市, 図1, 40°53'49.5"N 140°51'43.0"E)付近にて地表の糞塊を手がかりに行った. スコップを用いて糞塊ごと4 cm 下を掘り起こし, ホタルミミズを探索した. 天気は晴れで気温は12°Cであった. 採集地は積雪や凍結が見られず, 所々にコケが見られる湿った土壌が露出している環境であった(図2A-D). 発見したミミズは生きたまま東北大学大学院生命科学研究科附属浅虫海洋生物学研究センターの暗室に持ち帰り, ピンセットを用いて尾端を圧迫することで生物発光を確認し, 高感度カメラ (SONY $\alpha 7SII$) によって記録した. 発光が確認された個体を99.5%エタノールに漬けて外部形態観察及び遺伝子解析まで保存した.

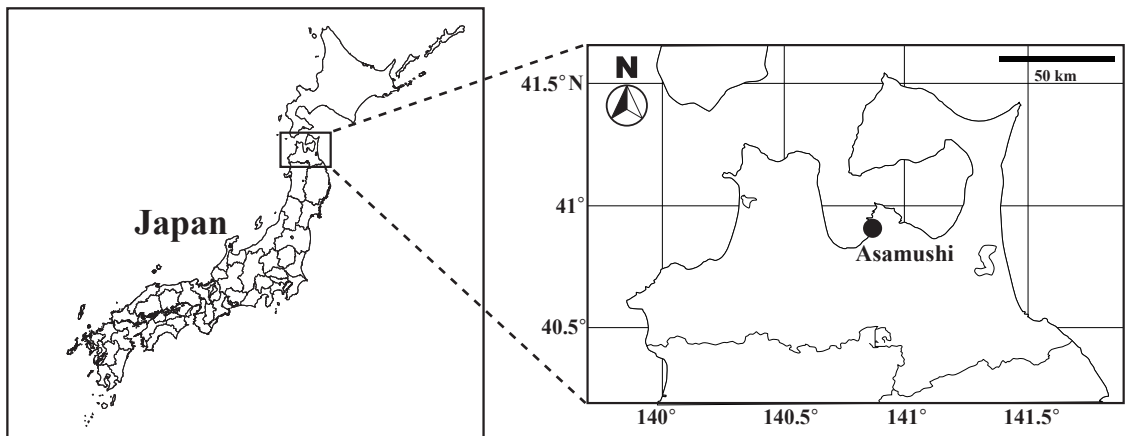


図1. ホタルミミズ *Microsculex phosphoreus* の採集地(青森県青森市浅虫)
Figure 1. Collection site of *Microsculex phosphoreus* (Asamushi, Aomori-city, Aomori Prefecture)

保存したエタノール浸漬標本は, ルーペを用いて外部形態の観察を行った. 標本時の体長, 剛毛の配列, 環帯の位置や厚み, 雌性孔や受精嚢孔の有無から種同定を行い, 成熟段階を確認した. 個体の体長は, 水に浸漬した個体を直線になるように形を整え定規で計測した.

エタノール浸漬標本から尾端2 mm を切断し遺伝子解析に用いた. 切断した尾端はエタノールを揮発させ, ピンセットを用いて付着した土壌を可能な限り取り除いてからDNA抽出を行った. DNA抽出にはDNA抽出キットDNeasy Blood & Tissue (QIAGEN, Germany) を用い, 実験操作はプロトコルに従った. 抽出したDNAは使用するまで-20°Cで保存した. PCRは以下の手順で行った. PCRはミトコンドリアDNAのCOIバーコーディング領域(658 bp)を対象に, プライマーセットはLCO1980 (forward) とHCO2198 (reverse) を用いた (Folmer *et al.*, 1994). DNAポリメラーゼKOD FX Neo (TOYOBO, Japan) が推奨する反応条件に従い, PCRサイ

クルは 94°C で 2 分間加熱した後, 変性 98°C10 秒, アニール 45°C15 秒, 伸長 68°C30 秒を 40 サイクル行い, 68°C で 2 分間伸長し, 4°C でインキュベートした. 電気泳動によって目的増幅長を確認した後, 株式会社マクロジェン・ジャパンにダイレクトシーケンシングサービスを外注して塩基配列を取得した. 得られた配列は MEGA version 7.0.26 (Kumar *et al.*, 2016) でアライメントし, NCBI (National Center for Biotechnology Information) Nucleotide Blast 検索により相同性の高い登録配列と照合した. 分子系統解析には日本から見つかった 5

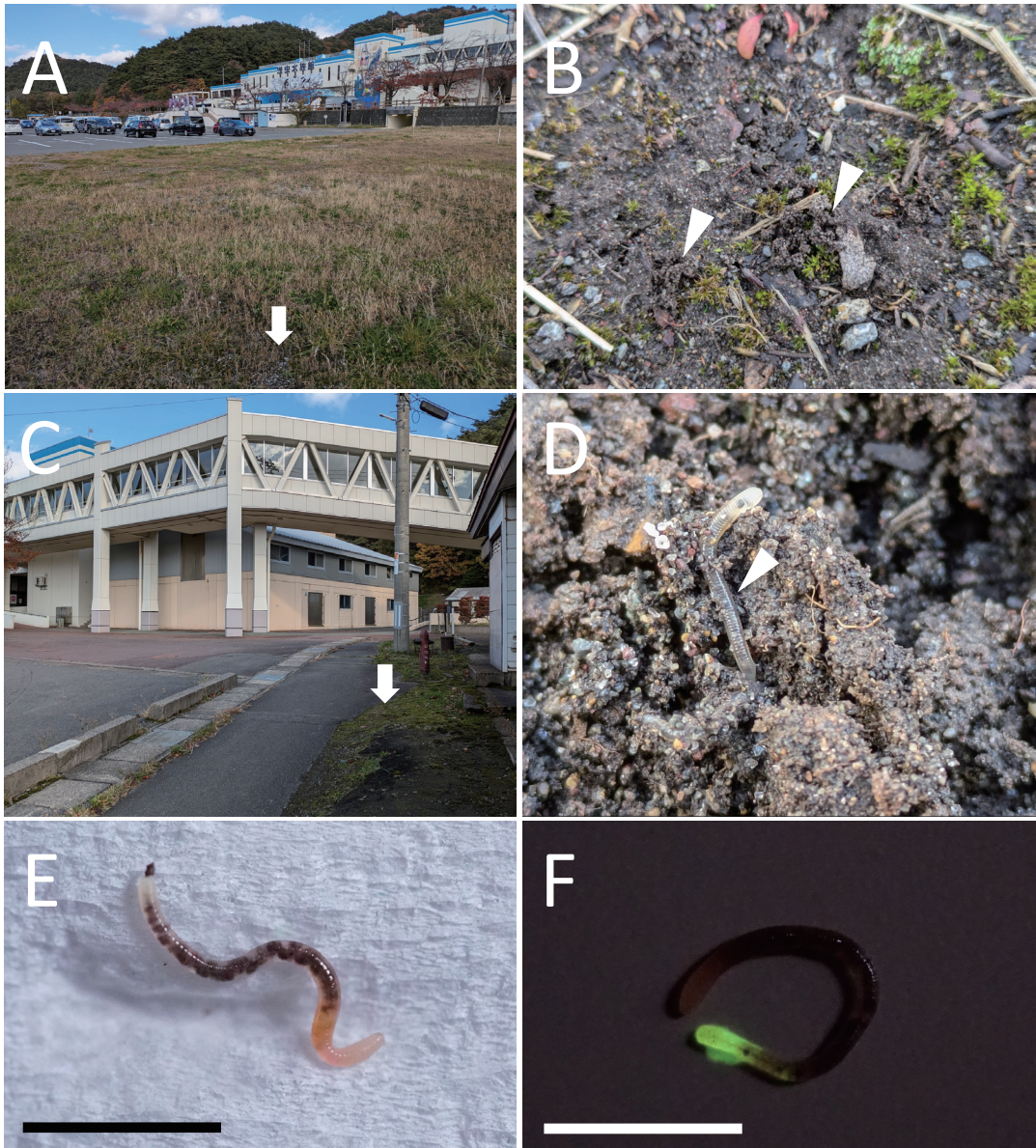


図2. (A) 駐車場横 (矢印周辺で採集). (B) 駐車場横で見られたホタルミミズの糞塊 (矢頭). (C) 建物わき (矢印周辺で採集). (D) 掘り起こされたホタルミミズ (矢頭). (E) ホタルミミズの全身. (F) ホタルミミズの生物発光. E, Fのスケールバーは1 cm.

Figure 2. (A) Parking side, collection landscape (collected around arrow). (B) Earthworm faeces (white arrowhead). (C) Aquarium side, collection landscape (collected around arrow). (D) *M. phosphoreus*, in situ (white arrowhead). (E) *M. phosphoreus* (whole body). (F) Bioluminescence of *M. phosphoreus*. The scale bar: 1 cm (E, F).

つのハプロタイプを含め, MEGA version 7.0.26 を用いて分子系統樹を作成した. また, 得られた塩基配列は DDBJ/GenBank に登録した (LC860681-LC860686).

結 果

浅虫水族館の駐車場横 (図2A) と建物わき (図2C) にてミミズの糞塊を多数発見した (図2B). スコップで糞塊ごと掘り起こしたところ, これら 2 地点から 4 個体ずつ計 8 個体採集された (図2D, E). 採集された 8 個体は標本時の体長が 10 ~ 16 mm であり環帯が確認できない, あるいは厚みがないといったことから性成熟していないと判定された. 採集された 8 個体はいずれも, ピンセットによる尾端への刺激によって黄緑色の発光粘液を出し, 数分間にわたって光り続ける様子を確認した (図2F). 採集された個体は明瞭な生物発光を示すということに加え, 形態的特徴の観察と DNA バーコーディングの結果によりホタルミミズと同定された.

2 地点から 3 個体ずつ遺伝子解析を行い, 得られた 6 個体分 (個体 ID, Mph137-142) の塩基配列 (658 bp) をア

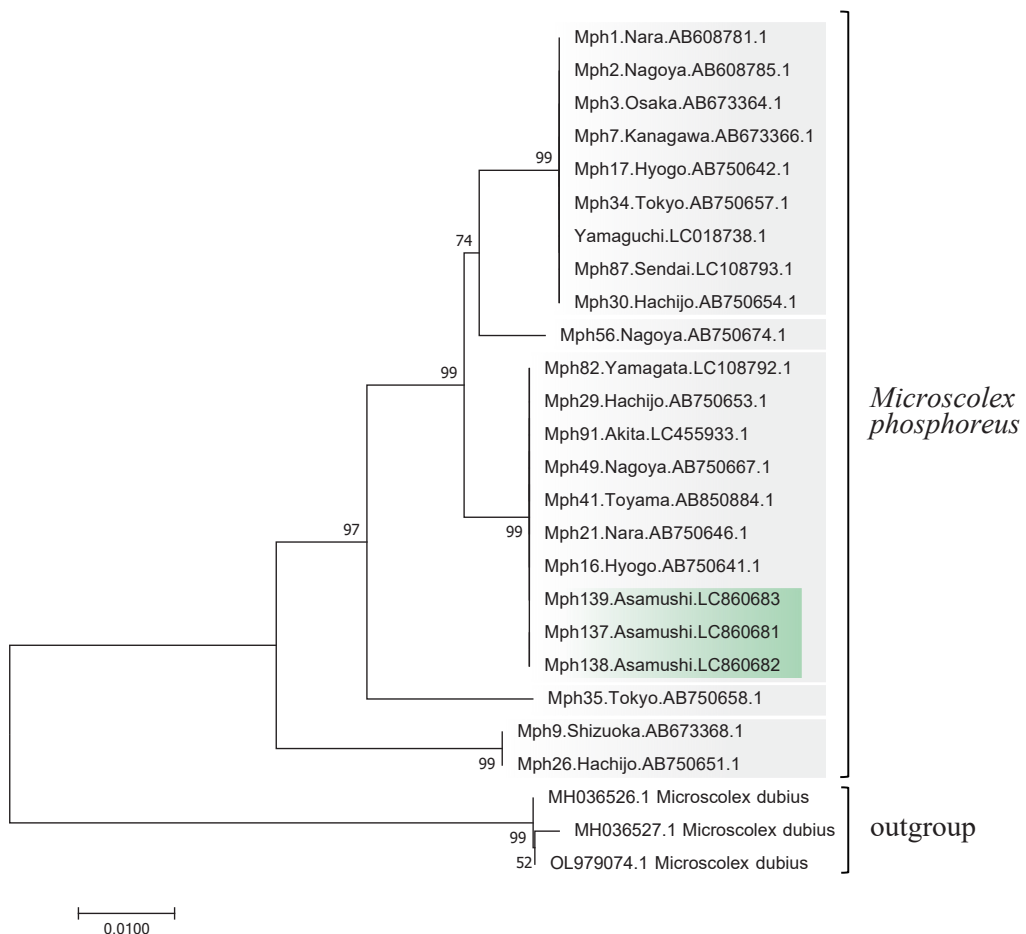


図3. ミトコンドリアCOI (658 bp) による日本産ホタルミミズの系統樹. 灰色枠はこれまで日本から見つかっているハプロタイプ. 緑枠は本研究で得られた青森県の個体を示す.

Figure 3. Phylogenetic tree of *M. phosphoreus* mitochondrial COI barcoding region (658 bp) collected from Japan. The tree was reconstructed under MEGA version 7.0.26 with the default setting using the Neighbor-joining method. Numbers of the node indicate bootstrap values (%) from 1,000 replicates.

Grey and green frames indicate haplotypes from Japan and Aomori specimens from this study, respectively.

ライメントしたところ、全個体の配列は完全一致であった。得られた 658 bp の塩基配列を GenBank に登録された個体と照合したところ、過去に秋田県 (Mph91) や山形県 (Mph82)、富山県 (Mph41)、愛知県 (Mph49) などで報告されている個体と完全に一致していた。ホタルミミズには世界で 8 つのハプロタイプが見つっているが、今回見つかった系統は日本固有で最も優占的なハプロタイプのひとつである (図3) (大場, 2012)。

考 察

本研究では青森県青森市浅虫 (図1) でホタルミミズを発見した。これは日本における最北限記録である。東北地方ではホタルミミズが豊富に採集できる冬から春先に積雪が多く糞塊を手がかりに採集を行うことが難しいため、他地方に比べて報告が少ない。実際に本研究の採集地も多いときには 12 月上旬から 3 月上旬は積雪が見られるという (浅虫水族館 櫛引氏による私信)。これは他地域でホタルミミズが見られる時期 (11 月下旬～3 月下旬) のほとんどである。冬のみミズとはいえ、積雪の極めて多い地域ではどのような生活史なのだろうか、東北地方のホタルミミズの生態に興味をもたれるところである。秋田県での報告 (Seesamut *et al.*, 2019) によると、11 月時点ですでに成体に成熟している個体が多いことから東北地方での成熟は他の地域に比べると早い可能性が考えられたが、青森県で成熟している個体は見られなかった。積雪の多い青森県でホタルミミズがいつ性成熟していき何月ごろまで見られるのか、今後の青森県での年間を通じたホタルミミズの経時的な観察が望まれる。

東北地方においてホタルミミズの生息が明らかになっていないのは、岩手県のみであるため、今後の調査で生息が明らかになることを期待したい。また、北海道において著者のひとり (大場) が札幌と室蘭で冬季に調査した際には見つけれなかったが、函館市などの南端には見られるかもしれない。なお、世界北限記録はロシアのバイカル湖周辺 (北緯 51°54') であるが、園芸用の温室でしか見つからないということから、園芸用の土に混ざって運ばれてきたと考えられる (Rota *et al.*, 2018)。温室の外からは見つからないため、ホタルミミズはシベリアの厳しい冬 (-25.5°～-15.5 °C) を越せないのかもしれない。シベリアの例のように北海道においても温室であれば生息しているかもしれない。また南限記録に関しては鹿児島県であり (上平, 2015)、沖縄県からは見つかっていない。沖縄県においても著者のふたり (大場, 伊木) が冬季に個別に調査した際に見つけれなかった。しかし、ホタルミミズは台湾にも分布する (Shen & Fang, 2020) ことから今後の研究で見つかることを期待したい。

遺伝子解析に関しては、国内最北限の記録であることから新たなハプロタイプ系統の可能性が予想されたが、全国的に見られる日本固有の系統であることがわかった。ホタルミミズは複数のハプロタイプが同所的に見られる (大場, 2012; 杉山ほか, 2019) ことから、園芸や施工の際の土壌移入によって繰り返し分布を広げていると考えられている。そのため、青森県のホタルミミズも水族館や併設駐車場の施工や工事の際に移入した可能性が考えられる。実際、採集地 (図2A) はレストランと売店の跡地であり、2008 年 9 月に取り壊され更地になった際に土壌を搬入した可能性がある (浅虫水族館 櫛引氏による私信)。その後も何度かあった水族館の改修工事の際にも建設業者の仮設事務所を設置したことから土壌を運搬した可能性がある。このような度重なる人為的な搬入によってホタルミミズが青森県浅虫に移入した可能性は十分に考えられる。

青森県のミミズ相を報告した例はいくつかあるが、いずれもホタルミミズは見つかっていなかった (Hatai, 1930; 上平, 2001; 南谷ほか, 2015)。南谷氏による研究では 9 月に採集を行ったために見つからなかったと思われる。他 2 例は具体的な採集時期が不明確なため、同様にホタルミミズが現れる季節に採集していない可能性もあるが、ホタルミミズが定着する前だったからかもしれない。なお、東北大学大学院生命科学研究科付属浅虫海洋生物学教育センター (当時: 理学部附属浅虫臨海実験所) の初代所長でもあった畑井新喜司 (1876-1963) は浅虫からミミズの新種記載をしている (Hatai, 1930)。畑井は幼少期からミミズ好き少年で地面を

掘り返して持ち帰ったり、仙台での大学教授時代もたびたび捕まえたミミズを背広のポケットに入れて研究室に持ち帰っていたりしていた（蝦名, 1995）が、ホタルミミズについて一切言及していない。やはり持ち込まれたのが最近であるか、当時は個体数が少なかったり分布域が限られていたりしていたからかもしれない。

謝 辞

青森県県営浅虫水族館の敷地内での採集は許可を得て行った。採集場所の過去や冬季の状況などの有益な情報を提供して下さった浅虫水族館の櫛引俊彦氏に感謝申し上げる。また本研究は東北大学大学院生命科学研究所付属浅虫海洋生物学教育センターを利用して行われた。センター長の熊野岳教授をはじめ職員の皆さまに感謝申し上げる。本研究は、JST 創発的研究支援事業 (JPMJFR20X) の支援を受けたものである。

引用文献

- Dugès A. (1837) Nouvelles observations sur la zoologie et l'anatomie des Annelides embranches sétigères. *Annales Des Sciences Naturelles. Zoologie*, **2**(8): 15-35.
- Easton E. G. (1981) Japanese earthworms: synopsis Megadrile species (Oligochaeta). *Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology series*, **40**: 33-65.
- Folmer O., Black M. B., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**(5): 294-299.
- Gates G. E. (1972) Burmese earthworms. introduction systematics biology megadrile oligochaetes special reference Southeast Asia. *Transactions of the American Philosophical Society*, **62**: 1-326.
- Hatai S. (1930) Note on *Pheretima agrestis* (Goto and Hatai), together with the description of four new species of the genus *Pheretima*. *Science Reports of the Tohoku Imperial University, Fourth Series (Biology)*, **5**(4): 651-667.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, **33**(7): 1870-1874.
- Rota E., Martinsson S., Erséus C., Petushkov V. N., Rodionova N. S., Omodeo P. (2018) Green light to an integrative view of *Microscolex phosphoreus* (Dugès, 1837) (Annelida: Clitellata: Acanthodrilidae). *Zootaxa*, **4496**(1): 175-189.
- Seesamut T., Kin I., Panha S., Oba Y. (2019) Update on northernmost distribution of the luminous earthworm *Microscolex phosphoreus* (Dugès, 1837) in Japan, and their DNA and size variations. *Bulletin of the Firefly Museum of Toyota Town*, **11**: 1-7.
- Shen H.P., & Fang H.T. (2020) Occurrence of the luminous earthworm *Microscolex phosphoreus* (Dugès, 1837) in Taiwan. *Taiwan Journal of Biodiversity*, **22**: 307-317.
- 上平幸好 (2001) 九州地方における陸生貧毛類の調査報告 I - 青森県で採集された種類と分布 -. 函館大学論究, **32**: 61-72.
- 上平幸好 (2015) 九州地方における陸生貧毛類の調査報告 VI. - 鹿児島県で採集された種類と分布 -. 函館短期大学紀要, **41**: 49-60.
- 伊木思海・藤森憲臣・柴田康平・稲津賢和・平田秀彦・吉田宏・大場裕一 (2023) 夏季に採集されたホタルミミズ *Microscolex phosphoreus* について . 豊田ホタルの里ミュージアム研究報告書, **15**: 69-78.
- 南谷幸雄・池田紘士・金子信博 (2015) 青森県の陸生大型貧毛類 (ミミズ) 相 . 青森自然誌研究, **20**: 81-90.
- 吾妻正樹 (2004) 茨城県山方町でホタルミミズを確認 . 茨城生物, **24**: 38-41.

- 大場裕一 (2012) 名古屋大学東山キャンパス内の 14 地点でホタルミミズを確認. 名古屋大学博物館報告, **28**: 77-83.
- 大場裕一・小宮山亮磨・内藤将志・金郁彦・柴田康平 (2016) 発光性貧毛類ホタルミミズ *Microscolex phosphoreus* の日本における北限分布記録. 豊田ホタルの里ミュージアム研究報告書, **8**: 1-4.
- 大場裕一・松田真紀子・藤森憲臣・池谷治義・川野敬介 (2015) 日本産発光性貧毛類イソミミズ *Pontodrilus littoralis* の DNA バーコード解析. 豊田ホタルの里ミュージアム研究報告書, **7**: 1-10.
- 大場裕一・柴田康平・吉田宏 (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. 名古屋大学博物館報告, **27**: 13-16.
- 小林新二郎 (1941) 四国, 中国, 近畿及中部諸地方の陸棲貧毛類に就て. 動物学雑誌, **53**: 258-266.
- 山口英二 (1935) 発光する蚯蚓. 植物及動物, **3**: 115-116.
- 岡田要 (1965) 「新日本動物図鑑 [上]」: pp. 548. 北隆館. 埼玉.
- 杉山久美子・伊藤苑良・内藤将志・矢野大地・大場裕一 (2019) 大府東高校敷地内におけるホタルミミズのハプロタイプ解析. 三河生物, **11**: 41-46.
- 横田萬里夫 (1941) 発光ミミズ新潟縣にも産す. 採集と飼育, **3**: 377.
- 羽根田弥太 (1985) 「発光生物」: pp. 76-78. 恒星社厚生閣. 東京.
- 蝦名賢造 (1995) 「畑井新喜司の生涯: 日本近代生物学のパイオニア」: pp334. 西田書店. 東京.