

瀬戸内海から採集されたドングリシャミセンガイ
(腕足動物門, 無関節綱, シャミセンガイ科) の分類学的再検討

倉持卓司・上野香菜子・厚井晶子・長沼 毅

葉山しおさい博物館
広島大学大学院生物圏科学研究科

瀬戸内海から採集されたドングリシャミセンガイ (腕足動物門, 無関節綱, シャミセンガイ科) の分類学的再検討

倉持卓司¹⁾・上野香菜子²⁾・厚井晶子²⁾・長沼 毅^{2)*}

¹⁾ 葉山しおさい博物館, 〒240-0111 神奈川県三浦郡葉山町一色2123-1

²⁾ 広島大学大学院生物圏科学研究科, 〒739-8528 広島県東広島市鏡山1-4-4

要 旨 日本の代表的な内海である瀬戸内海より得られたドングリシャミセンガイ *Lingula rostrum* (Shaw, 1798) の外部形態, および, 分子生物学的な比較検討を行った。試料は瀬戸内海の岡山県沖備瀬戸より得られたドングリシャミセンガイを用い, 倉持ら (2012) によるミドリシャミセンガイ *Lingula anatina* (奄美大島産) とウスバシャミセンガイ *Lingula reevii* (有明海産) の報告と比較した。ドングリシャミセンガイ (備讃瀬戸産) は, 殻の形態, および, 生時の肉茎の色彩により, 外部形態でミドリシャミセンガイ, ウスバシャミセンガイと区分される。

また, ドングリシャミセンガイ (備讃瀬戸産) の18S rRNA 遺伝子の塩基配列を, ミドリシャミセンガイ (奄美大島産) とウスバシャミセンガイ (有明海産) と比較したところ, ドングリシャミセンガイ (備讃瀬戸産) は, ミドリシャミセンガイ, および, ウスバシャミセンガイの両種とは異なるクレードに属することがわかり, 分子系統的にも離れた分類群として扱われるべきであることが示唆された。

キーワード: ウスバシャミセンガイ *Lingula reevii*, ドングリシャミセンガイ *Lingula rostrum*, ミドリシャミセンガイ *Lingula anatina*, 18S rRNA 遺伝子配列

諸 言

ドングリシャミセンガイ *Lingula rostrum* (Shaw, 1798) は, インドネシアの Ambon を模式産地として記載され, オーストラリア東岸から中国沿岸域までの太平洋に広く分布することが知られている (Cals and Emig, 1979; Emig, 1982)。日本列島周辺海域においては, これまでに瀬戸内海山口県門司, 高知県高松市庵治町沖, 相模湾江ノ島から記録されている (Adams, 1863; Hatai, 1940; 倉持ら, 2001; 明石ら, 2012)。これまで日本周辺海域からは, Emig (1982) の分類に準じた, 倉持ら (2001) の再検討の結果, ミドリシャミセンガイ *L. anatina* (Lamarck, 1801), ウスバシャミセンガイ *L. reevii* (Davidson, 1880), ドングリシャミセンガイ, オオシャミセンガイ *L. adamsi* (Dall, 1873) の4種が記録されている。しかし, その分類は未だに流動的であり, 分類学的な再検討の余地がある。

本報告では, 瀬戸内海より得られたドングリシャミセンガイ *Lingula rostrum* (Shaw, 1798) の試料をもとに外部形態, および, 分子系統学的な検討を行う。

材料と方法

本報告では, 岡山県沖備瀬戸で採集された試料を用いた。試料は, 生体の外部形態を観察後, 99% エタノール固定し, 試料の触手冠を遺伝子解析に用いた。

試料

ドングリシャミセンガイ *Lingula rostrum* (Shaw, 1798)

採集地 岡山県沖備讃瀬戸 水深24m 砂泥底 (2013年3月9日採集)

18S rRNA 遺伝子による分子系統解析について

1. DNA 抽出及び PCR 法による 18S rRNA 遺伝子の増幅

18S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づき予察的な分子系統解析を行った。まず、エタノール固定した試料の殻を開き、触手冠を0.3~0.5gほど切り取ってDNA抽出の材料とし、フェノール・クロロホルム法によりDNAを抽出した。抽出したDNAはNanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて260nmの紫外吸光度(A260)を測定してDNA濃度を算出し、その後の分子系統解析にたえる純度であることを確認した。

次に、得られたDNAを鋳型とし、酵素的遺伝子増幅法(PCR法)によりDNAの18S rRNA 遺伝子をコードする領域を増幅した。18S rRNA 領域の増幅には、真核生物に特異的なプライマーセットであるEukF(5'-AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT-3')とEukR(5'-TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC-3')を用い(Medlin *et al.* 1988), 濃度を1-3ng/μlに調整した鋳型DNA 1μlに対して, TaKaRa Ex Taq 0.05μl, 10× Ex Taq Buffer 1μl, dNTP Mixture (2.5mM) 0.8μl, Primer (10mM) 各0.2μl, 超純水 6.75μl, の全10μlのカクテルとして使用した。PCR反応は、熱変性94℃ 4分を1度行った後、熱変性94℃ 1分, アニールリング60℃ 1分, 伸長反応72℃ 1分のステップを30サイクル行い、最後に72℃ 10分ほど伸長反応させた。

得られたPCR産物5μlにExo SAP-IT (USB社)を2μl添加し、37℃ 15分, 80℃ 15分の反応を行って余分なプライマー, dNTPを酵素処理し, PCR産物の精製を行った。これをBigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems)によるシーケンス反応に用い, DNAシーケンサーABI 3130 Genetic analyzerにより塩基配列を決定した。シーケンスプライマーには, 18S rRNA 遺伝子の全長情報を取得するため, 前述のEuk F, Euk Rに加え, Euk516F (5'-ACC AGA CTT GCC CTC C-3') (Amann *et al.*, 1990)を使用した。シーケンス反応は5× Sequence Buffer 1.5μl, Seq. mix 1μl, Primer (10mM) 0.5μl, 超純水 6μl, Template DNA 1μlの全10μlで行った。反応は96℃ 1分の後, 96℃ 10秒, 50℃ 5秒, 60℃ 4分の3ステップを35サイクル行った。

得られた塩基配列は国際塩基配列データベースDDBJ/EMBL/GenBankに登録し, AB855774 (*Lingula rostrum*)のアクセッション・ナンバーが与えられた。

2. 分子系統樹の構築

得られた塩基配列について, 米国の国立生物工学情報センター(NCBI)が提供しているBLAST program ver 2.2.28を使用し, NCBIのnt-databaseを検索対象にして, BLASTN相同性検索(Altschul *et al.*, 1997)を行った。またデータベースに登録された既知の18S rRNA 遺伝子の配列との進化距離を比較するため, ClustalWを用いた多重整列(アラインメント)を行い, MEGA5.2を用いて分子系統樹を構築した(Tamura *et al.*, 2011)。分子系統樹には, 近隣結合法(neighbor-joining method, NJ法)を使用した(Saitou and Nei 1987)。また, 系統樹の分岐の信頼性を評価するため, 1000回の再試でbootstrap値を計算した。

外部形態

ドングリシャミセンガイ *Lingula rostrum* (Shaw, 1798) (Fig. 1, 1a, 1b)

記載

殻は小型で殻長15.8mm, 殻高4.8mm。殻は薄く, 前後に細長い卵形。殻側部は, ほぼ直線的。前縁部は, 直線的になる。殻幅に対する殻長は, 30%の長さになる。背腹殻ともにほぼ対象に弱く膨らむ。殻頂は殻後端部に位置し, 腹殻の後端部中央は足茎につながる嚙状の長い突起がある。殻表面は平滑で, 同心円状の弱い成長脈がみられる。殻はやや緑色を帯びた薄褐色。殻前縁の外套膜には黒色の色素沈着がみられる。肉茎は, 白色。本試料では, 肉茎が途中でちぎれてしまっており, 殻長に対する長さは不明。



Fig. 1. Upper row, dorsal (1a), ventral (1b), views of *Lingula rostrum* (Shaw, 1798) (locality, off Okayama, Kibiseto, Seto Inland Sea).

比較

ミドリシャミセンガイ *Lingula anatina* (Lamarck, 1801) は、本種に比べ、殻はやや厚く、殻色はエメラルドグリーン。殻幅に対する殻長は、43-53% (平均47%) の長さになる。肉茎は肌色から薄い褐色で、殻長のおよそ1.5倍になる。また、ウスバシャミセンガイ *Lingula reevii* (Davidson, 1880) は、本種に比べ殻は厚く、殻色は黄緑色。殻幅に対する殻長は、42-53% (平均46%) の長さになる。肉茎は白色で、殻長のおよそ2倍になることで、本種は区別される。

分子系統分類的な考察

ドングリシャミセンガイ *Lingula rostrum* (備讃瀬戸産) から得られた18S rRNA 遺伝子のほぼ全長 (1630 bp) の塩基配列と、遺伝子データベースに登録された既知の塩基配列を比較して分子系統樹を描いたところ、ミドリシャミセンガイ *Lingula anatina* (奄美大島産)、および、ウスバシャミセンガイ *Lingula reevii* (有明海産) とは異なるクレードに属することが明らかになった (Fig. 2)。この結果は、同属とはいえ両種は異なる分類群として扱われるべきであることを示唆している。

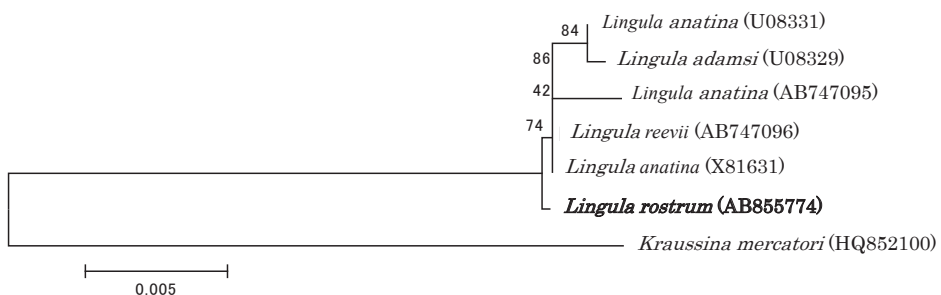


Fig. 2. Evolutionary relationships of taxa. Phylogenetic tree to indicate separation of three resembling species, *Lingula rostrum* from Kibiseto, Seto Inland Sea, *Lingula anatina* from Amami-oshima Island, and *Lingula reevii* from Ariake Sea, based on 18S rRNA gene sequences.

考 察

Emig (1982) は、外部形態と軟体部の解剖学的知見をもとに現生シャミセンガイ類の分類学的な再検討を行い、これまでに記載されていた25種類の現生種をミドリシャミセンガイ *Lingula anatina* (Lamarck, 1801), ドングリシャミセンガイ *Lingula rostrum* (Shaw, 1798), ウスバシャミセンガイ *Lingula reevii* (Davidson, 1880), *Lingula parva* (Smith, 1871), *Lingula translucida* (Dall, 1920), *Lingula tumidula* (Reeve, 1841), オオシャミセンガイ *Lingula adamsi* (Dall, 1873) の7種のみを認めた。このうち、日本周辺海域からは、ミドリシャミセンガイ, ウスバシャミセンガイ, ドングリシャミセンガイ, オオシャミセンガイの4種が記録されている(倉持ら, 2001)。また、瀬戸内海沿岸域からは、ミドリシャミセンガイ, ウスバシャミセンガイ, ドングリシャミセンガイの3種類がこれまでに記録されている(稲葉, 1983; 和田ら, 1996; 吉郷, 2004; 明石ら, 2012)。今回得られた標本の外部形態学的な観察結果から、本種はミドリシャミセンガイ, および, ウスバシャミセンガイとは、形態的に異なり区別される。

18S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づき分子系統解析を行った結果から、本種は、奄美大島産ミドリシャミセンガイとも、有明海産のウスバシャミセンガイとも分子系統的に異なるクレードに属することがわかった。

登録されているシャミセンガイ *Lingula* の18S rRNA 遺伝子の塩基配列を比較すると、1塩基から多くとも数塩基しか変異は見られず、その差はわずか1%にも満たない。しかし、わずか1塩基違うだけであっても、形態的には明確に区別できるほどの差異が見られる。今後、さらに遺伝的な差異を明確にするために、ミトコンドリア DNA について解析を行う予定である。

謝 辞

試料採集にあたりご協力いただいた広島大学生物生産学部付属練習船豊潮丸の船長中口和光氏をはじめ船員各位, NPO 法人プラントの吉原正敏氏, 田辺拓人氏, 九州大学大学院農学研究院唐津水産研究センターの長野直樹氏, 広島大学大学院生物圏科学研究科の柏原克彦氏, 池田正太氏, 広島大学生物生産学部の村瀬良太氏, 西脇 瞳氏に感謝申し上げます。

引用文献

- 明石英幹・滝川祐子・倉持卓司・吉松定昭・野村美加・多田邦尚. 2012. 瀬戸内海備讃瀬戸海域から得られたドングリシャミセンガイ *Lingula rostrum* (Shaw, 1897) の記録. 南紀生物. **45**: 19-21.
- Adams, A., 1863: On the genera and species of recent Brachiopods found in the seas of Japan. *Journal of Natural History Series*, **311**: 98-101.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**: 3389-3402.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., Stahl, D. A., 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol.*, **56**: 1919-1925.
- Cals, P., Emig, C. C., 1979. Lingules d'Amboine, *Lingula reevei* DAVIDSON et *Lingula rostrum* (SHAW), données écologiques et taxonomiques concernant les problèmes de spéciation et de répartition. Cahiers de l'Indo-Pacifique, Paris., **1**: 153-164.
- Darwin, C. R., 1859. On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life, John Murray, London: pp.502.
- Emig, C. C., 1982. Taxonomie du genre *Lingula* (Brachiopodes, Inarticulés). *Bulletin du Muséum national d'Histoire naturelle de Paris.*, **4**: 337-367.
- Hatai, K., 1940. The cenozoic Brachiopoda of Japan. *Science reports of the Tohoku Imperial University*. **2nd**

- series, Geology*, **20**: 1-413 + pl.I-XII.
- 稲葉明彦. 1983. 瀬戸内海の生物相 I (軟体動物). 広島大学理学部付属向島臨海実験所, 広島県: pp. 181.
- 倉持卓司・木村キワ・藤本和恵. 2001. 日本周辺海域産シャミセンガイ属の再検討. *南紀生物*. **43**: 112-116.
- 倉持卓司・厚井晶子・柏原克彦・長沼 毅. 2012. 日本産ミドリシャミセンガイとウスバシャミセンガイ(腕足動物門: 舌殻綱) の分類学的再検討. *生物圏科学*. **51**: 27-35.
- Medlin, L., Elwood, H. J., Stickel, S., Sogin, M. L., 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, **71**: 491-499.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The Neighbor-Joining Method—a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.*, **4**: 406-425.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.*, **28**: 2731-2739.
- 和田恵次・西平守孝・風呂田利夫・野島 哲・山西良平・西川輝昭・五嶋聖治・鈴木孝男・加藤 真・島村賢正・福田 宏. 1996. 日本における干潟海岸とそこに生息する底生生物の現状. *WWF Japan science report.*, **3**: 1-182.
- 吉郷英範. 2004. 広島県竹原市の河口干潟で確認されたウスバシャミセンガイ (腕足動物門). *比婆科学*. **214**: 1-5.

***Lingula rostrum* collected from the Seto Inland Sea
(Brachiopoda, Inarticulata, Lingulidae)**

Takashi KURAMOCHI¹⁾, Kanako UENO²⁾, Akiko KOI²⁾ and Takeshi NAGANUMA²⁾

¹⁾Hayama shiosai Museum, 2123-1 Isshiki, Hayama, Kanagawa, 240-0111, Japan

²⁾Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University 1-4-4 Kagamiyama,
Higashi-Hiroshima, 739-8528, Japan

Abstract The brachiopod *Lingula rostrum* (Shaw, 1798) collected from Japanese waters was compared morphologically and phylogenetically in terms of shell morphology with *L. anatina* and *L. reevii* (Kuramochi *et al.*, 2012). 18S rRNA gene sequences were also compared with other *Lingula* species. The specimens of *L. rostrum*, *L. anatina*, and *L. reevii* were collected from Seto Inland Sea (Off-Okayama, Bisanseto), Amami-Oshima Island, and Ariake Sea, respectively, and used for comparison. The shell of *L. rostrum* was distinguished from *L. anatina* and *L. reevii* by allometric morphology and fresh tissue coloration. Based on the 18S rRNA gene sequences of *L. rostrum* along with those from *L. anatina*, *L. reevii*, and other species registered in a DNA database, a phylogenetic tree was constructed. The brachiopod *L. rostrum* was placed in a separate clade from other *Lingula* species, which suggests that *L. rostrum* should be regarded as non-closely related species.

Key words: *Lingula anatina*, *Lingula reevei*, *Lingula rostrum*, 18S rRNA gene sequences