

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

倉持卓司¹⁾・厚井晶子²⁾・柏原克彦³⁾・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

³⁾ 広島大学生物生産学部 〒739-8528 広島県東広島市鏡山1-4-4

要 旨 日本周辺海域より得られたミドリシャミセンガイ *Lingula anatina* Lamarck, 1801, および、ウスバシャミセンガイ *Lingula reevii* Davidson, 1880の外部形態、殻構造、分子生物学的な比較検討を行った。試料は奄美大島より得られたミドリシャミセンガイ、および、有明海より得られたウスバシャミセンガイを用いた。これら2種類は、殻の形態および、生時の肉茎の色彩により外部形態で明瞭に区分される。

ミドリシャミセンガイの殻には、ウスバシャミセンガイの殻に比べ、硫黄 (S)、フッ素 (F)、鉄 (Fe) が多く含まれている。一方、ウスバシャミセンガイの殻には、リン (P)、カルシウム (Ca)、マンガン (Mn)、マグネシウム (Mg) が、ミドリシャミセンガイの殻よりも多く含まれていた。また、両種の殻に見られるリン酸カルシウム層の間の有機質部分に、特徴的に臭素 (Br) とヨウ素 (I) が検出され、それぞれ臭素 (Br) はウスバシャミセンガイに多く、ヨウ素 (I) はミドリシャミセンガイに多く検出された。

また、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) の18S rRNA 遺伝子の塩基配列を比較した両種は異なるクレードに属することがわかり、両種は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*, 臭素 (Br), ミドリシャミセンガイ *Lingula anatina*, ヨウ素 (I), EPMA, 18S rRNA 遺伝子配列

諸 言

シャミセンガイ類はカンブリア紀に起源をもつ腕足動物門の一群であり、出現以来、ほとんどその形態が変わらないことから、「生きている化石」とされていたが、Biernat and Emig (1993) は、これまで中生代の *Lingula* 属として記録されていた種類は、すべて別属の *Lingularia* 属に含められ、現生種を含む *Lingula* 属の出現は新生代以降であるとした。また、これまでに記載されていた現生種のシャミセンガイ類について Emig (1982) は、外部形態と筋肉痕を分類学的な再検討を行い7種にまとめた。このうち日本周辺海域からは、Emig (1982) の分類に準じ倉持ほか (2001) により4種が記録されているが、その分類は未だに流動的である。

本報告では、日本周辺海域より得られたミドリシャミセンガイ *Lingula anatina* Lamarck, 1801およびウスバシャミセンガイ *Lingula reevii* Davidson, 1880の2種の外部形態、殻の微細構造と成分分析の比較、遺伝子解析の結果をもとに分類学的な再検討を行う。

材料と方法

本報告に用いた資料は、鹿児島県奄美大島の干潟、および、佐賀県早津江川河口にて採集された試料を用いた。これらの試料は外部形態をもとに分類した。試料の殻長、殻幅、殻厚について計測し、種ごとに形態の統計学的比較に用いた。また、各試料の触手冠は遺伝子解析に用いた。

試料

ミドリシャミセンガイ *Lingula anatina* Lamarck, 1801

産地：鹿児島県奄美大島手花部

ウスバシャミセンガイ *Lingula reevii* Davidson, 1880

産地：佐賀県佐賀市早津江川河口

殻構造分析について

殻構造については、電子線プローブマイクロアナライザー（EPMA, JEOL LXA-8200）で電子像観察、及び定性分析を行った。さらに、標準試料を用いてシャミセンガイ属の殻構造について、その微小領域に存在する元素の検出、及び、定量分析を行った。作成した殻断面の薄片に真空蒸着装置（JEOL JEE-4X）で膜厚約20 nmの炭素蒸着を行った。炭素蒸着を行った試料を、EPMA装置（JEOL JXA-8200）を用いて電子像による形態観察、定性分析、元素分布マッピング、さらに、含有元素の定量分析を行った。定量分析の補正計算はZAF methodで行った（日本表面科学会, 1998）。定性分析および定量分析は、電子ビーム径1 μm 、加速電圧15 kV、照射電流 1×10^{-8} A、の条件で行った。また、元素マッピングは、電子ビーム径1 μm 、加速電圧15 kV、照射電流 5×10^{-8} A、Dwelltime（1ピクセル当たりの測定時間）20~200 ms、ピクセルサイズ $0.5 \times 0.5 \mu\text{m}$ の条件で行った。

18S rRNA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

両種の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。18S rRNA遺伝子の塩基配列の解析には、試料の殻を開き、内臓触手冠を0.3~0.5 gほど削り取り、DNA抽出の材料とした。削り取った内臓触手冠を100%エタノールで1度すすぎ、更に滅菌超純水で3度すすいだ。DNA抽出にはISOIL for Beads Beating（NIPPON GENE）を用いた。抽出方法は標準プロトコルに従った。抽出したDNAはNanoDrop 2000（Thermo Fisher Scientific）を用いて260 nmの紫外線吸光度（ A_{260} ）を測定した。更に、純度の目安として260 nmと280 nmの吸光度の比（ A_{260}/A_{280} ）がおおむね1~2の範囲にあること、すなわち、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。

得られたDNAを鋳型とし、分子系統解析に汎用される18S rRNA遺伝子について、そのほぼ全長を酵素的遺伝子増幅法（PCR法）により増幅し、増幅産物をその後の塩基配列決定に用いた。

このPCR反応では、真核生物の特異的なプライマーセットであるEuk-FとEuk-Rを用い、PCRサーマルサイクラー機器にはTaKaRa Thermal Cycler PERSONAL TP240、および、PCR酵素にはTaKaRa Ex Taq polymeraseを使用した。PCR反応は、熱変性；95°C（3分）を1サイクル行った後、熱変性；95°C（50秒）、アニーリング；60°C（50秒）、伸長；72°C（1.5分）を30サイクル行い、最後に伸長；72°C（15分）反応を行った。

得られた増幅産物は、TOPO TA cloning kit（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）を用いてクローニングし、*Escherichia coli* TOP10（Invitrogen）に形質転換した。形質転換体に挿入した18S rRNA遺伝子はDNAシーケンサー Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer（Applied Biosystems, Foster, USA）を用いて塩基配列を確定した。

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、AB747095 (*Lingula anatina*) および AB747096 (*Lingula reevii*) 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、米国の国立生物学情報センター（NCBI）が提供している BLAST program ver 2.2.26 を使用し、NCBI の nt-database を検索対象にして、BLASTN 相同性検索を行った。またデータベースに登録された既知の18S rRNA 遺伝子の配列と比較するため、ClustalW を用いた多重整列（アライメント）を行い、MEGA5.0 を用いて分子系統樹を構築した。分子系統樹には、近隣結合法（neighbor-joining method, NJ 法）を使用した。

外部形態の比較

ミドリシャミセンガイ *Lingula anatina* Lamarck, 1801 (Fig.1の1a, 1b, 1c)

記 載

殻はやや厚く、殻側部は直線的で扁平な長方形。殻表面は平滑で、同心円状の成長脈がみられる。殻色はエメラルドグリーン。殻幅に対する殻長は、43-53%（中央値47.4%）の長さになる（Fig.2）。殻前端部は直線的で老成化するに従い、殻前端部の中央付近が舌状に突出する。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嘴状の突起があるが、突起は短い。肉茎は肌色から薄い褐色で、殻長のおよそ1.5倍になる。

ウスバシャミセンガイ *Lingula reevii* Davidson, 1880 (Fig.1の2a, 2b, 2c)

記 載

殻は薄く、殻側部は曲線的で扁平な楕円形。殻表面は平滑で、同心円状の成長脈がみられる。殻色は黄緑色。殻幅に対する殻長は、42-53%（中央値46.7%）の長さになる（Fig.2）。殻前端部は直線的で老成化するに従い、殻前端部の中央付近が舌状に弱く突出する。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嘴状の突起があるが、突起は長い。肉茎は白色で、殻長のおよそ2倍になる。



Fig.1. Upper row, dorsal (1a), ventral (1b), and side (1c) views of *Lingula anatina* (locality, Amami-oshima Island); and, lower row, dorsal (2a), ventral (2b), and side (2c) views of *Lingula reevii* (locality, Ariake Sea). Scale, 10mm.

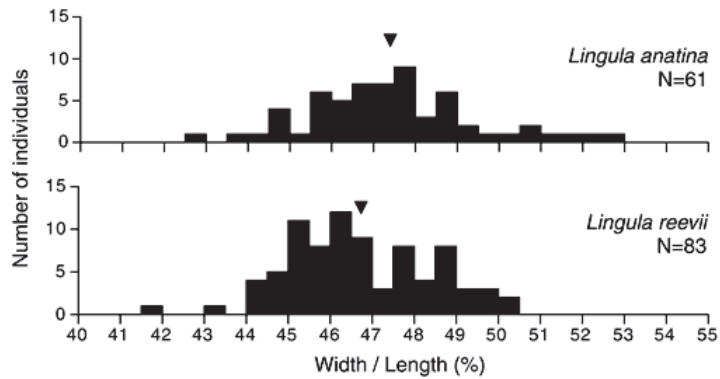


Fig.2. Frequency distribution of the shell width/length ratio (%) of *Lingula anatina* from Amami-oshima Island and *Lingula reevii* from Ariake Sea (▼, median).

殻形態の比較

試料の殻長、殻幅、殻厚を計測し、殻長に対する殻幅および殻厚の相対成長式、いわゆるアロメトリー式を求め、ミドリシャミセンガイおよびウスバシャミセンガイの殻形態の比較を行った (Fig.3)。ミドリシャミセンガイの殻長 (L) に対する殻幅 (W) の相対成長式は $L=1.66W^{1.09}$ となったのに対して、ウスバシャミセンガイは $L=1.90W^{1.05}$ となり、両種の殻長に対する殻幅の相対成長式には、有為な差は認められなかった。ミドリシャミセンガイの殻長 (L) に対する殻厚 (T) の相対成長式は、 $L=6.50T^{0.83}$ となったのに対して、ウスバシャミセンガイでは、 $L=9.11T^{0.69}$ となり、両種の殻幅に対する殻厚の相対成長式には有為な差が認められ、ミドリシャミセンガイに比べウスバシャミセンガイは、殻厚が薄くなる傾向が認められた。

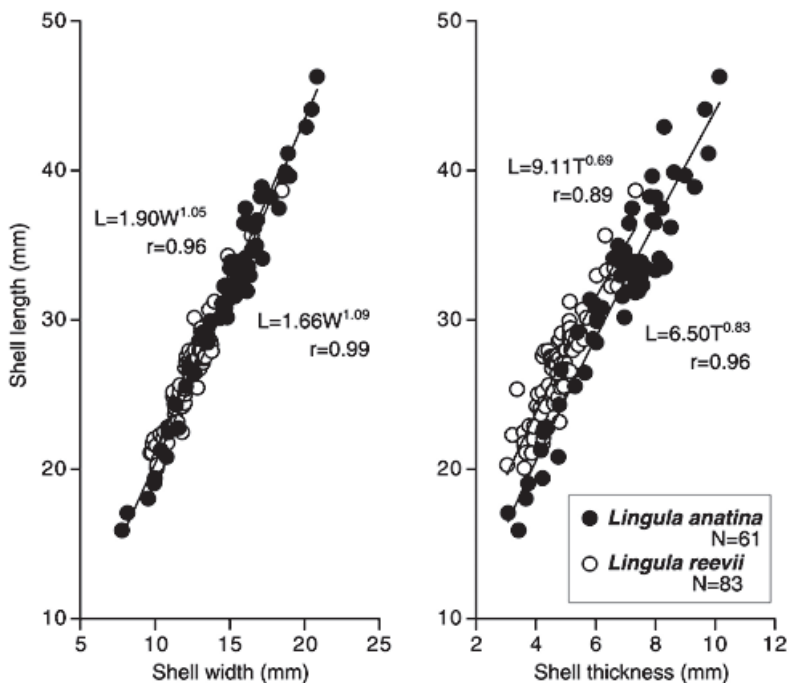


Fig.3. Allometric shell growth of *Lingula anatina* from Amami-oshima Island and *Lingula reevii* from Ariake Sea.

殻構造の比較

ミドリシャミセンガイとウスバシャミセンガイの両種の殻のEPMA元素定量分析から、ミドリシャミセンガイの殻のほうが硫黄(S)、フッ素(F)、鉄(Fe)を多く含み、また、塩素(Cl)、ケイ素(Si)、ニッケル(Ni)も上に準じて多く含まれていることがわかった。一方、リン(P)、カルシウム(Ca)、マンガン(Mn)、マグネシウム(Mg)は、ウスバシャミセンガイの殻のほうに多く含まれており、カリウム(K)、亜鉛(Zn)、ナトリウム(Na)もそれに準じて多く含まれていることがわかった。

また、EPMA定性分析の結果、両種の殻から、特徴的に臭素(Br)とヨウ素(I)が検出された(Fig.4)。臭素(Br)とヨウ素(I)は、両シャミセンガイ類の殻を形成する成分であるリン酸カルシウム層の間の有機質部分から検出され、リン酸カルシウム部分からは検出されなかった。ミドリシャミセンガイは、ウスバシャミセンガイに比べ、ヨウ素(I)の含有量が多く、逆にウスバシャミセンガイはミドリシャミセンガイに比べ、臭素(Br)の含有量が多いという結果が得られた。元素マッピングから、臭素(Br)、ヨウ素(I)は、リン酸カルシウム層の間に一様に検出されるが、特に殻表面を覆う有機質部分からは特に多く存在していることが示された(Fig.5)。

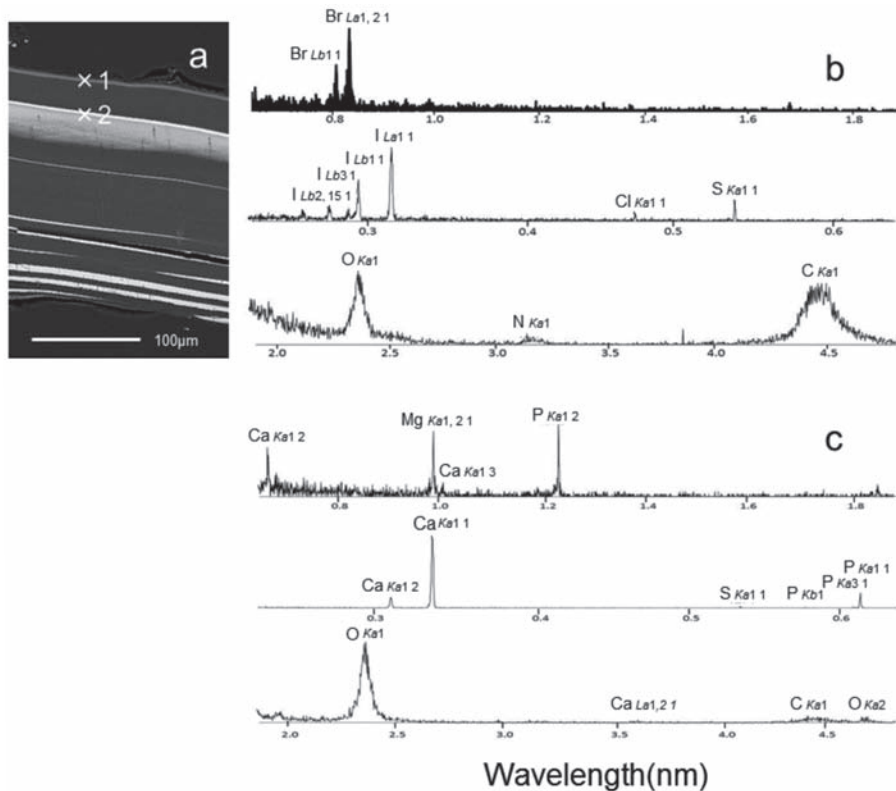


Fig.4. EPMA image and spectra of the *Lingula anatina* shell cross section: a, backscattered electron image (BEI); b, EPMA spectrum at the position 1 in the BEI; and, c, EPMA spectrum at the position 2.

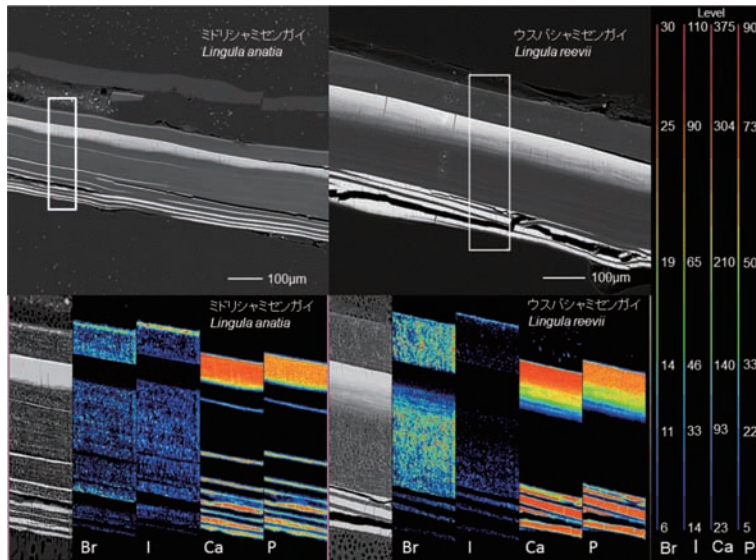


Fig. 5. EPMA images and elemental mappings of the *Lingula anatina* (left columns) and *L. reevii* shells (right columns) cross sections: black-and-white insets, backscattered electron images (BEI); and, multi-color insets, distributions and relative abundances of bromine (Br), iodine (I), calcium (Ca) and phosphorus (P). Multi-color scales at down-right of each inset combinations show relative intensities of elemental signals.

分子系統分類的な考察

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) から得られた18S rRNA 遺伝のほぼ全長 (1768 bp および1769 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、奄美大島産のミドリシャミセンガイ個体と有明海産のウスバシャミセンガイ個体は異なるクレードに属することが明らかになった (Fig.6)。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。

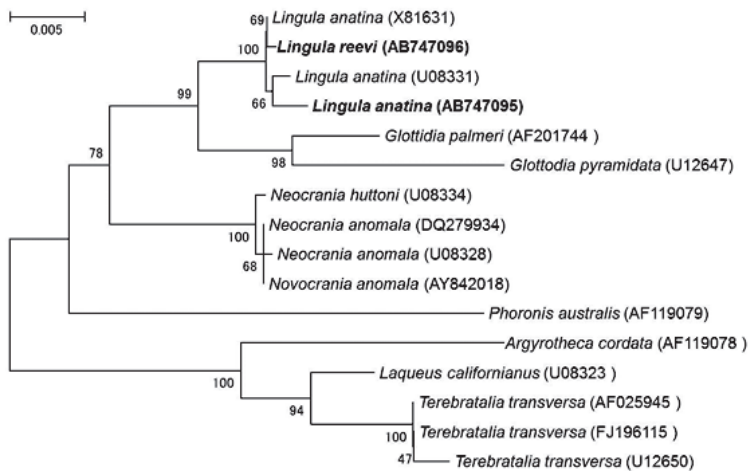


Fig.6. Phylogenetic tree to indicate separation of two resembling species, *Lingula anatina* from Amami-oshima Island and *Lingula reevii* from Ariake Sea, based on 18S rRNA gene sequences. The bootstrap value of 97 at the *Lingula reevii*-*Lingula anatina* branching confirms the separation.

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(倉持ほか, 2001)。本報告で検討した *Lingula* 属2種は、殻形態および肉茎の長さや色彩が異なり、それぞれ *Lingula anatina* と *L. reevii* に分類された(倉持ほか, 2001)。また、殻の計測値の相対成長式の比較から、ミドリシャミセンガイに比べ、ウスバシャミセンガイの殻厚は相対的に薄くなる傾向が認められた。

Reyment *et al.* (2007) は、日本周辺海域より得られた試料を用いてシャミセンガイ属のハプロタイプを解析し、陸奥湾産の個体群と有明海の個体群が一つのクレードを形成することを報告した。陸奥湾から採集されたシャミセンガイ属の種は Hayasaka (1932) によりムツシャミセンガイ *Lingula nipponica* Hayasaka, 1932として記載されているが、Emig (1981; 1984) は、Hayasaka (1932) の記載したムツシャミセンガイをミドリシャミセンガイのシノニムとした。しかし、これまでに記録されている陸奥湾より得られたムツシャミセンガイとされる個体の特徴は、筆者らの見解ではウスバシャミセンガイの特徴とほぼ一致する。また、この結果は、Reyment *et al.* (2007) による有明海と陸奥湾産の個体群が同一のクレードを形成する解析結果と一致することから、ムツシャミセンガイは、本報告において有明海から得られたウスバシャミセンガイと同一種の可能性が高いと考えられる。ウスバシャミセンガイは、Davidson (1880) によりハワイを模式産地として記載され、これまでにハワイ、日本、台湾、アンボイナから記録されており (Cals and Emig (1979); Emig (1982); Hayasaka (1940); 倉持ほか (2001), 吉郷 (2004)), 西太平洋地域に分布域をもつ種であると推測される。

2種の殻の定量分析結果から得られたミドリシャミセンガイとウスバシャミセンガイにおける含有元素の量的な差は、2種の生息する環境により左右されている可能性が高い。

一方、定性分析により両サンプルの殻から検出された臭素 (Br) とヨウ素 (I) について、ヨウ素 (I) は海藻など生物濃縮される元素である。ヨウ素 (I) は海水中におよそ0.05 ppm (0.000005%) 含まれており、一般に、シャミセンガイなどが生息する砂の中においては、その間隙水中のヨウ素の濃度は、深度とともに急増する (Fehn *et al.*, 2006)。臭素 (Br) もヨウ素 (I) に比べると弱いながらも、海洋有機物に取り込まれる性質がある (Price and Calvert, 1977; Harvet, 1980; Martin *et al.*, 1996; Gribble, 1998)。本研究結果から得られたヨウ素 (I) の含有量の差は、両サンプルの生息場所 (深度) に一致しない。つまり、ヨウ素 (I) がより多く検出されたミドリシャミセンガイの方が、一般的にヨウ素濃度が高いとされる深い場所に生息している (I/Cl と I/Br が大きいものほど深い試料にほぼ対応する) と予想されるが、本サンプルにおいては、ウスバシャミセンガイの方がミドリシャミセンガイより深い場所に生息している。このことから、単に生息する深度の影響によるヨウ素 (I) の含有量の差とは言えず、種によるヨウ素 (I) や臭素 (Br) の吸収・吸着力の差という可能性も考えられる。また、ヨウ素 (I)、臭素 (Br) が殻の色彩の違いや濃さの違いに影響を与えている可能性が考えられることから、今後、両サンプルの生息地の環境 (海水成分分析、土壌分析等) をさらに詳細に調査・分析し、検討する必要がある。

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は、奄美大島産ミドリシャミセンガイと有明海産のウスバシャミセンガイは分子系統的に異なるクレードに属することがわかった。この結果は、Reyment *et al.* (2007) の結果と一致する。

謝 辞

本報告にあたり、調査にご協力いただいた倉持敦子氏に感謝申し上げます。分析試料作製では広島大学技術センターの石佐古早実氏のご協力をいただいた。EPMA 分析は広島大学自然科学研究支援開発センター (N-BARD) において、広島大学技術センターの柴田恭宏氏のご協力をいただいた。合わせて感謝申し上げます。

引用文献

- Biernat G., Emig C. C., 1993. Anatomical distinctions of the Mesozoic lingulide brachiopods. *Acta Palaeontologica Polonica*, Warsaw. **38**: 1-20.
- Cals, P., C. C. Emig., 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.
- Cohen, B. L., Gawthrop, A., Cavalier-Smith, T. C., 1998. Molecular phylogeny of brachiopods and phoronids based on nuclear-encoded small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **353**: 2039-2061.
- Davidson, T., 1880. Report on the Brachiopoda dredged by the Challenger during the years 1873-1876. *Rep. Sci. Res. Voyage Challenger, Zool.* **1**: 1-67.
- Emig C. C., 1982. Taxonomie du genre *Lingula* (Brachiopodes, Inarticulés). *Bulletin du Muséum national d'Histoire naturelle de Paris.* **4**: 337-367.
- Emig C. C., 1984. *Lingula anatina* Lamarck from Mutsu Bay, Northern Japan. *Bull. mar. biol. St. Asamushi, Tôhoku Univ.* **17**: 171-176.
- Fehn, U., Lu, Z., Tomaru, H., 2006. Data report: 129I/I ratios and halogen concentrations in pore water of hydrate ridge and their relevance for the origin of gas hydrates: A progress report. in Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results edited by Trehu, A. M., Bohrmann, G., Torres, M. E. and Colwell, F. S., Ocean Drilling Program. College Station, Texas. **204**: 1-25.
- Gribble, G. W., 1998. Naturally occurring organohalogen compounds. *Accounts of Chemical Research.* **31**: 141-152.
- Harvey, G. R., 1980. A study of the chemistry of iodine and bromine in marine sediments. *Mar. Chem.* **8**: 327-332.
- Hayasaka I., 1940. On Some Recent Brachiopods from Taiwan. *Venus*, **10**: 41-45.
- Hayasaka I., 1932. Report of biological survey of Mutsu Bay. 22. Brachiopods of Mutsu Bay. *Science Reports of Tohoku University, 4th Series, Biology.* **7**: 1-13.
- 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.
- Mackey, L. Y., Winnepenninckx, B., DeWachter, R., Backeljau, T., Emschermann, P., Garey, J. R. 1996. 18S rRNA suggests that entoprocta are protostomes, unrelated to ectoprocta. *J. Molec. Evol.* **42**: 552-559.
- Martin, J. B., Kastner, M., Henry, P., le Pichon, X., Lallement, S., 1996. Chemical and isotopic evidence for sources of fluids in a mud volcano field seaward of the Barbados accretionary wedge. *J. Geophys. Res.* **101**: 20325-20345.
- 日本表面科学会. 1998. 「電子プローブ・マイクロアナライザー」(日本表面科学会編)丸善, 東京: 221.
- Price, N. B., Calvert, S. E., 1977. The contrasting geochemical behaviours of iodine and bromine in recent sediments from the Namibian shelf. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **41**: 1769-1775.
- Reyment, R. A., Endo K., Tsujimoto, Y., 2007. A note on heterogeneity in northern Pacific populations of the brachiopod species *Lingula anatina* Lamarck. *Earth Evolution Sciences.* **1**: 33-36.
- 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). *比婆化学.* **214**: 1-5.

Taxonomic revision of Japanese *Lingula anatina* with *L. reevii* (Brachiopoda : Lingulata)

Takashi KURAMOCHI¹⁾, Akiko KOI²⁾, Katsuhiko KASHIHARA³⁾ 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

³⁾ Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University 1-4-4 Kagamiyama,
Higashi-Hiroshima, 739-8528, Japan

Abstract Two brachiopod *Lingula* species, *L. anatina* Lamarck 1801 and *L. reevii* Davidson, 1880, collected from Japanese waters were compared morphologically and phylogenetically in terms of shell morphology, shell elemental compositions, and 18S rRNA gene sequences. Specimens of *L. anatina* and *L. reevii* were collected from Amami-Oshima Island and Ariake Sea, respectively, and used for comparison. Shells of these species were distinguished by allometric morphology and fresh tissue coloration.

Elemental compositions, as revealed by electron-probe microanalysis (EPMA), of the shells were distinct, too. Higher amounts of sulfur, fluorine and iron were found in the shells of *L. anatina*, while the *L. reevii* shells were more enriched with phosphorus, calcium, manganese and magnesium. Layers of calcium phosphate were commonly found in the shell cross-sections of both species, and bromine and iodine were specifically detected in the inter-layer organic matrix. More bromine were present in the *L. anatina* shells, while more iodine was found in the *L. reevii* shells.

Comparison of the 18S rRNA gene sequences of *L. anatina* and *L. reevii*, along with those from other species registered in a DNA database, resulted in construction of a phylogenetic tree. The two brachiopod *Lingula* species were placed in two separate clades, which suggests that they be regarded as not-closely related species.

Key words: bromine, EPMA, iodine, *Lingula anatina*, *Lingula reevii*, 18S rRNA gene sequences