

## 日本産発光性貧毛類イソミミズ *Pontodrilus litoralis* の DNA バーコード解析

大場裕一<sup>1)</sup>・松田真紀子<sup>2)</sup>・藤森憲臣<sup>1)</sup>・池谷治義<sup>3)</sup>・川野敬介<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>名古屋大学大学院生命農学研究科, 〒464-8601 愛知県名古屋市中種区不老町

<sup>2)</sup>〒752-0984 山口県下関市長府宮崎町 6-23

<sup>3)</sup>桐蔭学園高等学校, 〒225-8502 神奈川県横浜市青葉区鉄町 1614

<sup>4)</sup>豊田ホタルの里ミュージアム, 〒750-0041 山口県下関市豊田町大字中村 50-3

### DNA barcoding of the luminous earthworm *Pontodrilus litoralis* in Japan

Yuichi OBA<sup>1)</sup>, Makiko MATSUDA<sup>2)</sup>, Noriomi FUJIMORI<sup>1)</sup>, Haruyoshi IKEYA<sup>3)</sup>, Keisuke KAWANO<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya, Aichi Pref. 464-8601, Japan

<sup>2)</sup>Miyazaki-cho 6-23, Chofu, Shimonoseki, Yamaguchi Pref. 752-0984, Japan

<sup>3)</sup>Toin Gakuen High School, Kurogane-cho 1614, Aoba-ku, Yokohama, Kanagawa Pref. 225-8502, Japan

<sup>4)</sup>The Firefly Museum of Toyota Town, Nakamura 50-3, Toyota, Shimonoseki, Yamaguchi Pref. 750-0441, Japan

**Abstract:** DNA barcoding analysis was performed for the luminous earthworm, *Pontodrilus litoralis*, collected from various beaches in Japan. The result showed that there are two distinct haplotype groups in Honshu main island; the members of each haplotype group are closely related (~1%), but these two groups are far distantly related (~10%). In contrast, the populations in Ryukyu Archipelago were highly diversified among islands, and formed a clade with one of the Honshu-haplotype group. These results suggested that one Honshu-haplotype group was originated from Ryukyu or far south and quickly dispersed to various areas of Honshu main island. On the other hand, the origin of another Honshu haplotype group is uncertain.

**Key words:** *Pontodrilus litoralis*, DNA barcoding, Bioluminescence

キーワード: イソミミズ, DNA バーコード, 生物発光

### はじめに

日本産のミミズ(狭義のミミズ類 Megadrilids, ヒメミミズ類 Microdrilids を除く)は現在までに 100 種類以上が明らかになっているが(石塚, 2014), そのうち発光性が知られているのはムカシフトミミズ科 Acanthodrilidae に含まれるホタルミミズ *Microscolex phosphoreus* とイソミミズ *Pontodrilus litoralis* のわずか 2 種にすぎない。日本に産するムカシフトミミズ科はこの 2 種のみであるが(Easton, 1980), 外国ではムカシフトミミズ科の他にフトミミズ科 Megascolecidae とフタツイミミズ科 Octochaetidae でも発光種が知られている(Rota, 2009)。また, イソミミズをフトミミズ科とする研究もある(Blakemore, 2003, 2007)。

発光ミミズの発光のしくみについては詳しいことはわかっていないが, 発光バクテリアの感染などではなく自発光であることが確かめられている(羽根田&熊谷, 1939)。北米産発光ミミズ *Diplocardia longa* に

においてルシフェリンの化学構造が報告されているが (Ohtsuka *et al.*, 1976), *D. longa* と他の発光ミミズとの間でルシフェリン-ルシフェラーゼの交差反応が認められることから (Jamieson and Wampler, 1979; Wampler and Jamieson, 1980; Wampler, 1982), 発光ミミズの発光反応はすべて共通のメカニズムであると考えられる。ミミズ類の系統関係はあまり明らかになっていないが、ミミズ類の中で発光形質がどのように進化したのかについては今後の興味深い研究課題である。ちなみに、発光性ヒメミミズ *Fridericia heliota* のルシフェリンの化学構造が最近明らかとなり (Petushkov *et al.*, 2014), ヒメミミズ類における発光反応はミミズ類とは異なっていることが証明されたため、発光ミミズの発光反応システムは、ミミズ類で独自に進化したものと考えられる。

ホタルミミズとイソミミズについては、これまでの国内観察記録が少なく、種内多様性と発光形質の関係について研究された例は殆どなかった。最近、ホタルミミズについてはDNA バーコード解析が行われ、見つかった全てのハプロタイプで発光性が認められたものの、その種内変異が最大で10%近くにも達することが示された (大場, 2012a)。DNA バーコード (Hebert *et al.*, 2003) で使われるシトクローム *c* オキシダーゼ I (*COI*) 領域は、一般にグループ間で3%以上の差がある場合 (Hebert *et al.*, 2003), もしくは、グループ間の平均遺伝的距離がグループ内の平均遺伝的距離より10倍以上ある場合 (“10 × rule”, Hebert *et al.*, 2004), 別種である可能性が高いと言われている。したがって、日本のホタルミミズが複数種からなる集合 (species complex) である可能性が示唆される。ただし、形態学的な検討は行われていない。

生物発光の研究においては、現在認識されている種が本当にひとつの種であるのか、また、どの遺伝的集団でも同様に発光性を有しているかどうかを知ることは、重要な基礎情報である。本研究では、これまで研究例のないイソミミズについて、日本各地からサンプリングを行い、そのDNA バーコード解析と発光性の確認を行ったので報告する。

イソミミズ (図 1-32) は日本からは宮城県松島を模式産地とする *P. matsushimensis* として記載され (Iizuka, 1898), これまでに本州から四国, 九州, 沖縄まで広く分布が確認されている (Yamaguchi, 1953; 大野, 2003)。現在は、世界的に分布するコスモポリタン種である *P. littoralis* のシノニムとして, *P. bermudensis* や *P. marionius* など20近くの旧学名が同一種として扱われている (Blakemore, 2003)。

海浜の砂の中や乾いたガラ藻の中などに生息し、通常、潮上帯 (高潮汀線) 付近の砂の表層から深さ30 cm くらいの間によく見つかる。堆積した海藻類・草類やそれに由来する砂の中の有機物を摂食していると考えられ、飼育下では、乾燥ワカメやアワビ養殖用人工飼料を食べているのが観察される。体長50 ~ 100 mm, 体幅約2 mm で、赤色をしている。このように塩分濃度の高い環境に適応したミミズは、日本ではイソミミズだけと考えられる。

日本国内での学術的な記録は少ないが、昔から釣りのエサとして使われていたらしく (羽根田, 1972; 大野, 2003), 一般には古くからその存在はよく知られていたと考えられる。しかし、発光性については、光が弱く、しかもかなり強く刺激しないと光らないことから、気づかれることは稀であったようだ (神田, 1938; 羽根田&熊谷, 1939; 羽根田, 1972)。実際、西表島でも、以前は岸からの小物釣りにはこのイソミミズが良いとされ好んで使われていたが、その発光能については地元民の間では知られていなかった。遺伝子解析については、福岡県福津市の個体 (Oba *et al.*, 2011) と愛知県日間賀島の個体 (大場, 2012b) でDNA バーコード領域が調べられたが、それ以外の国内種の報告はない。

発光色は黄緑色で、最大発光波長 ( $\lambda_{max}$ ) は540 nm と報告されている (Wampler and Jamieson, 1986)。物理的刺激により放出された体腔液が光るが、液が付いた紙を折ったりこすったりするとより強く光る (羽根田&熊谷, 1939)。これは、体腔液中の体腔細胞に発光物質 (ルシフェリン, ルシフェラーゼ, 蛍光物質) が含まれていて (Wampler and Jamieson, 1986), これが破裂することにより発光が強まるからだと考えられる。練りカラシや飽和食塩水を塗布しても発光を誘起できる (大場, 2013, 2014, 2015)。発光は、数分間持続する (図

1-33). 発光の強さは、暗順応しなくても十分に見える明るさで、発光ミミズの中でもっとも発光が強い種の一つであるホタルミミズ (Rota, 2009) のそれに匹敵するだろう。

発光ミミズの発光の意義は、捕食者を驚かせることだと考えられている (Rota, 2009)。イソミミズの生息する潮上帯の砂中には肉食性のハサミムシやハネカクシ類が同所的に分布するため、イソミミズの潜在的な捕食者であると想像されるが (Oba and Schultz, 2014)、上述のようにかなり強い刺激を与えなくては発光しない本種の発光がこれらの肉食昆虫を驚かせる効果があるかどうかは疑問である。

## 材料および方法

試料は、2010年から2014年にかけて日本および米国の海岸にて採取した (表1)。日中に海岸の砂を掘って生体を捕獲し、そのまま、もしくは発光を確認後に99.5%エタノールに浸け、遺伝子解析まで4°Cで保存した。いくつかの場所では、採集地点の砂も採取した。発光能の確認は、基本的に体を押しつぶして出た体腔液を指先で紙にこすりつけて、目視により行った。

遺伝子解析には、環帯よりうしろの体節から筋肉および表皮の一部を切除した断片 (約10×3mm) を用いた。その際には、あとから体節数が数えられるように切除した体節の片側は残した。残った個体はそのままエタノール中4°Cで保存した。

DNAは、QIAamp DNA mini kit (キアゲン社) を用いてプロトコル通りの方法で抽出した。PCRによるCOIバーコード領域 (658塩基) の増幅は、DNAバーコード標準プロトコルが推奨する条件 (Ivanova *et al.*, 2006) に従って行った。プライマーは、LCO1490とHCO2198 (Folmer *et al.*, 1994; Hebert *et al.*, 2003) を用いた (サンプルD008-23のみは、プライマーにLCO-M13-FとHCO-M13-Rを使用)。DNAポリメラーゼは、SpeedSTAR HS (タカラバイオ社) を用いた。得られたPCR産物は、BigDye Terminator kit v3.1 (アプライドバイオシステムズ社) とABI Prism 3130 (アプライドバイオシステムズ社) を用いたダイレクトシーケンス法により、すべて両側から解析した。得られた658塩基の配列データは、GenBankに登録した (表1)。

マルチプルアライメントは、Clustal W (デフォルトセッティング) を用いた。近隣結合法 (NJ法) による系統樹は、PAUP\* 4.0 を用いて解析した (Kimura-2-parameter)。その際に、バーコード領域658塩基のうち *P. bermudensis* (GenBank accession number AF003256) のデータ中の塩基の欠失 (-) 7塩基と不明 (N) 1塩基のサイトを削除し、残った650塩基のデータセットを解析に用いた。

## 結果と考察

調査の結果、日本各地の多くの地点でイソミミズを採取することができた。発光能については、Plit16を除く全てのハプロタイプで確認した。本種は、日本では宮城県から沖縄まで分布することが知られているので (大野, 2003)、今回は分布全体をほぼサンプリングできたと思われる。ただし、富山県魚津市の富山湾一帯や高知県の土佐湾一帯や八丈島では、調査したが見つけることはできなかった (大場の調査)。外海に面した砂浜の少ない場所や砂粒径のひじょうに荒い場所には、生息しないのかもしれない。ただし、琉球のサンゴ片と貝片で形成された粒の荒い浜では、砂の中ではなくガラ藻だまりの中からイソミミズが見つかった例もあり、分布と砂粒径が必ずしも関係がない場合もあるようである (藤森の調査)。下関市での詳しい調査記録は今回がはじめてであるが、複数の地点で容易に発見することができた。このことは、内海に複雑な海岸線が続く関門海峡の地形と関係していると考えられる。ただし、豊浦町小串石堂前の海岸では発見することはできなかった (松田の調査; 2014年9月17日)。この砂浜は漂着物が少なく、エサとなる有機物が少ないことが関係しているのかもしれない。同様のことは、愛知県蒲郡やフロリダ Cedar Key の

表 1 採集情報

Table 1. Specimens used in this study

個体 ID Specimen ID	採集地 Collection locality	採集日 Collection date	GenBank/ DDBJ ID	採集者 Collector
Plit1	福岡県福津市津屋崎 (Fig. 1-1)	2010 年 9 月 1 日	AB608782	大場裕一, 加藤慎一
Plit2	愛知県知多郡日間賀島西浜海水浴場 (Fig. 1-2)	2011 年 8 月 27 日	LC018715	大場裕一
Plit3	神奈川県横浜市野島公園 (Figs. 1-3 & 1-22)	2012 年 4 月 8 日	LC018716	池谷治義
Plit4	静岡県浜松市浜名湖弁天島 (Fig. 1-4)	2012 年 5 月 6 日	LC018717	大場由美子, 別所学
Plit5	三重県津市海浜公園	2012 年 5 月 12 日	LC018718	別所学
Plit6	広島県尾道市向島干汐海水浴場 (Fig. 1-5)	2012 年 5 月 24 日	LC018719	大場裕一, 蟹江秀星
Plit7	神奈川県三浦市荒井浜海水浴場 (Figs. 1-6 & 1-23)	2012 年 6 月 23 日	LC018720	池谷治義
Plit8	宮城県宮城郡松島海浜公園 (Fig. 1-7)	2012 年 8 月 4 日	LC018721	大場裕一, 大場玲子
Plit9	神奈川県三浦市和田長浜海岸 (Fig. 1-8)	2012 年 9 月 16 日	LC018722	池谷治義
Plit10	静岡県沼津市我入道海岸 (Fig. 1-9)	2012 年 9 月 25 日	LC018723	池谷治義
Plit11	神奈川県横須賀市走水海岸 (Figs. 1-10 & 1-24)	2012 年 10 月 7 日	LC018724	池谷治義
Plit12	神奈川県横須賀市走水海岸	2013 年 1 月 18 日	LC018725	池谷治義
Plit13	神奈川県三浦市荒井浜海水浴場	2013 年 2 月 10 日	LC018726	池谷治義
Plit14	アメリカ合衆国フロリダ州 Cedar Key (Figs. 1-11, 1-25 & 1-33)	2014 年 8 月 12 日	LC018727	大場裕一
Plit15	愛知県蒲郡市蒲郡竹島 (Figs. 1-12, 1-26 & 1-32)	2014 年 8 月 26 日	LC018728	大場裕一
Plit16	山口県下関市長府黒門町黒門海岸 (Figs. 1-13 & 1-27)	2014 年 6 月 23 日	LC018729	松田真紀子
Plit17	山口県下関市彦島竹の子島 (Figs. 1-14 & 1-28)	2014 年 6 月 26 日	LC018730	松田真紀子
Plit19	山口県下関市長府宮崎町三軒屋海岸 (Figs. 1-15 & 1-29)	2014 年 7 月 1 日	LC018731	松田真紀子
Plit20	山口県下関市長府黒門町黒門海岸	2014 年 9 月 12 日	LC018732	松田真紀子
Plit21	山口県下関市長府黒門町黒門海岸 (Figs. 1-13 & 1-27)	2014 年 6 月 23 日	LC018733	松田真紀子
D008-20	沖縄県名護市字仲尾次 (Fig. 1-16)	2013 年 10 月 14 日	LC018734	大場裕一, Darrin T. Schultz
D008-23*	神奈川県三浦市三戸海岸 (Fig. 1-17)	2013 年 7 月 21 日	LC018735	池谷治義
D009-22	沖縄県石垣島真栄里 (Fig. 1-18)	2013 年 12 月 31 日	LC018736	大場裕一
D009-23	沖縄県竹富島カイジ浜 (Fig. 1-19)	2013 年 12 月 31 日	LC018737	大場裕一
Plit22	沖縄県西表島野原 (Figs. 1-20 & 1-30)	2014 年 11 月 13 日	LC018739	藤森憲臣
Plit23	沖縄県波照間島大泊浜 (Figs. 1-21 & 1-31)	2014 年 11 月 13 日	LC018740	藤森憲臣

\*サンプル D008-23 のみ, PCR およびシーケンスのプライマーには LCO-M13-F (5'-CGCCAGGGTTTCCAGTCACGACGGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') と HCO-M13-R (5'-TCACACAGGAAACAGCTATGACTAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') を使用した。

海岸でも観察されており（大場の調査）、漂着物の少ない海岸では見つからないが、わずかに距離の離れた漂着物の多い海岸では見つかるということがあった。漂着物の少なかったこれらの場所については、地形によるのか海水浴場としてよく清掃されているためなのかははっきりしない。一方、神奈川県江の島海岸のように、海藻漂着物が多くても発見できなかった場所もある（池谷の調査；2013年9月24日）。この場所は、海水浴場に近接していたため、水質の影響が関係しているのかもしれない。そのほか、千葉県銚子マリーナ（池谷の調査；2012年5月23日）、青森県種差海岸蕪島（池谷の調査；2013年7月15日）でも、イソミミズは発見されなかった。西表島では、野原の海岸では発見できたが、船浮イダの浜、白浜赤崎の海岸、祖内の星立では見つからなかった（藤森の調査；2014年11月）。神奈川県三戸海岸では、2013年7月21日にはたくさん捕れたが、同じ場所で同年9月18日にはまったく捕れなかった（池谷の調査）。愛知県蒲郡竹島は、個体密度がひじょうに低かった（大場の調査；2014年8月26日）。今後、どのような場所においてどのような場所にいなかったのかの情報をさらに集めることで、イソミミズの生息環境がより明確になるかもしれない。同じ場所を定期的に調査すれば、出現の消長についてもより具体的なことがわかってくるだろう。

遺伝子解析の結果、Plit3, Plit5, Plit9, Plit12, Plit13, D008-23 の6産地6個体はバーコード領域658塩基が完全一致していた。また、Plit1, Plit8, Plit17, Plit19, Plit20, Plit21 の5産地6個体もバーコード領域658塩基が完全一致だった。Plit2, Plit4, Plit6, Plit7, Plit15 の5産地5個体もバーコード領域658塩基が完全一致だった。下関からは、3地点5個体（黒門海岸を3個体）解析したが、そのうち黒門海岸の1個体（Plit16）を除く4個体（Plit17, Plit19, Plit20, Plit21）は、福岡（Plit1）や宮城（Plit8）の個体と配列が完全一致だった。

分子系統解析を行った結果、本州-九州周辺の標本から大きく離れた2つのハプロタイプグループが見つかった。宮城から福岡まで広く分布が確認されている14タクサからなるグループ（下関を含む）をグループAとし、神奈川から広島まで分布が確認されている6タクサからなるグループをグループBとした場合（図2）、グループA内の遺伝的距離（*p*-distance）は0.00%～1.22%（平均0.39%）、グループB内の遺伝的距離は0.00%～0.61%（平均0.20%）とひじょうに低かった。グループ内の遺伝的多様性が低いこと、とくに宮城県の個体と福岡県の個体のCOIバーコード領域が完全に一致したことは、人為的な砂の運搬が関わっているかもしれない。本州-九州の広域にわたって遺伝的な多様性が著しく低いハプロタイプグループが分布する同様の例は、ホタルミミズでも観察されている（大場, 2012b）。同じ発光生物であるゲンジボタルやヘイケボタルとは異なり意図的にこれらの発光ミミズが遠隔地に運ばれたとは考えにくい。こうした現象は他のミミズや土壤動物においても今後観察されてくるかもしれない。あるいは、また、ホタルミミズ同様に（Gates, 1972）、イソミミズでも単為生殖の可能性が示唆されていることから（Edwards and Bohlen, 1972）、単為生殖型の土壤動物に特有の現象とも考えられる。

一方、グループAとグループBとの間の遺伝的距離は9.57%～9.88%（平均9.79%）とひじょうに高かった。両グループの分布は地理的に重なっており、とくに、神奈川県荒井浜や走水海岸では同じ場所から2グループの両方が見つかることから、両グループは別種の可能性も示唆される。他の地域でもさらに解析個体を増やせば同様に同じ場所から別系統の個体が見つかるかもしれない。荒井浜と走水海岸の場合、異なるシーズンに採った個体が違う系統に含まれていた（Plit12とPlit13は冬期、Plit7とPlit11は春～秋）、季節によって出現する系統が異なることで同所的な棲み分けが生じている可能性が示唆される。ただし、今のところ、両グループの形態的な違いや繁殖時期の違いなどについては精査されていない。また、生息場所によって砂の粒径に違いがあるが（図1-22～1-31）、ハプロタイプグループとの関係性はないように思われる。

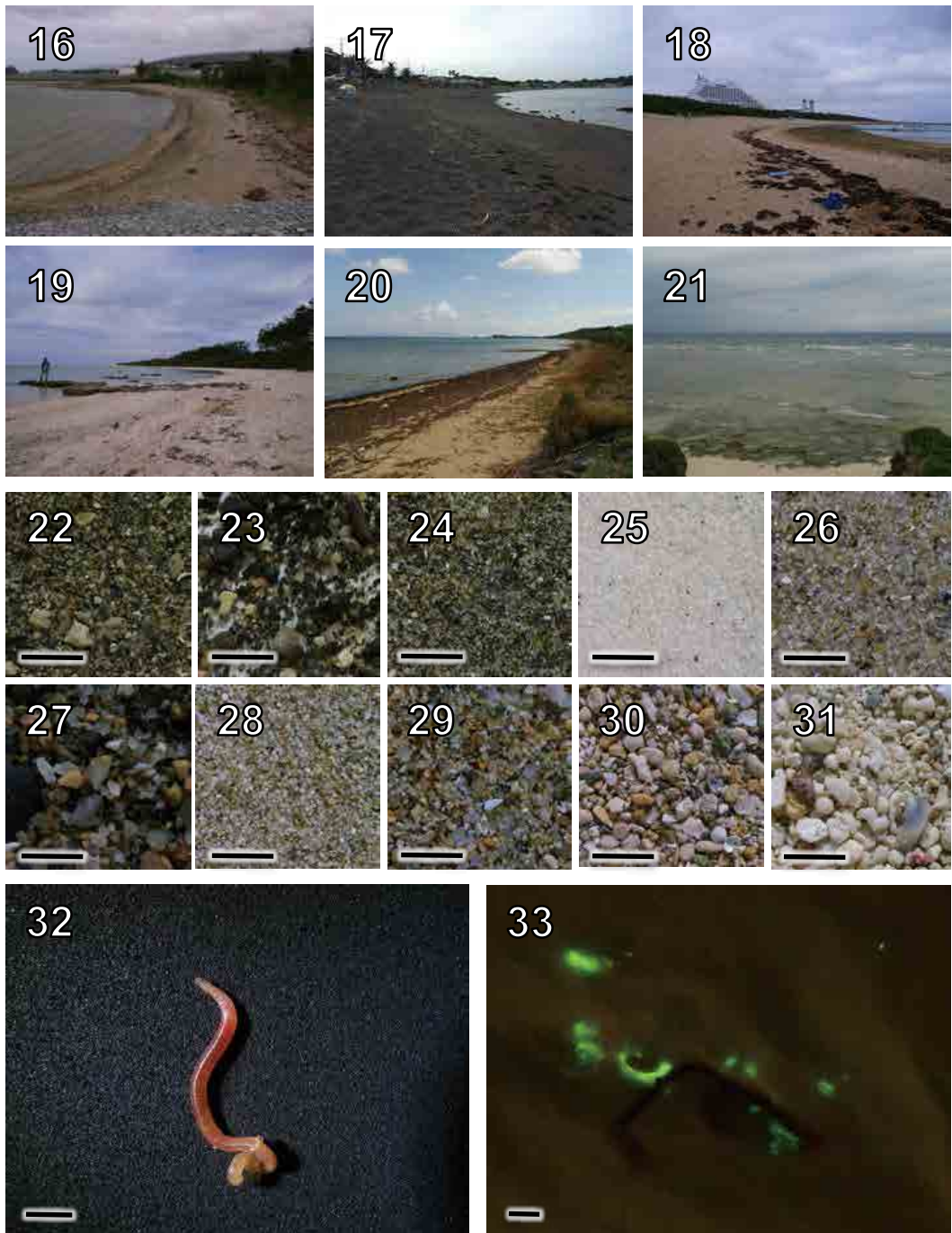
琉球諸島およびフロリダで採集した個体を調べてみたところ、本州-九州では見られなかった高い遺伝的多様性が認められた。石垣島（D009-22）、竹富島（D009-23）、波照間島（Plit23）、フロリダ（Plit14）、バミ



図 1: (Panels 1 ~ 21). 採集地の全景。写真は採集日に撮影 (ただし, Panel 14 のみ 2013 年 5 月 11 日の撮影)。 (Panels 22 ~ 31) 採集地の砂の拡大写真 (乾燥後)。スケールは 5 mm。 (Panel 32) 愛知県蒲郡竹島のイソミミズ。スケールは 10 mm。 (Panel 33) フロリダ産イソミミズの発光。露光時間 10 秒で撮影。スケールは 10 mm。

Figure 1: (Panels 1-21). Photographs of the collection localities taken at the same day as collection date, except for the Panel 14, which was taken at 11th May 2013. (Panels 22-31) Magnified photographs of the sand for collection localities (dried). Scale = 5 mm. (Panel 32) *P. littoralis* collected at Gamagori, Aichi, Japan. Scale = 10 mm. (Panel 33) Luminescence of *P. littoralis* collected at Cedar Key, Florida. Exposure = 10 sec. Scale = 10 mm.





ユーダ (GenBank accession number, AF003256) の 5 個体は、グループ B とクレードを作ったことから、本州に分布するグループ B は南方から入って来た可能性が示唆される。一方、沖縄本島 (D008-20) と西表島 (Pli22) の 2 個体はクレードを作ったが、このクレードがグループ A に付くのかグループ B に付くのかは、ブートストラップ値が低く判断できなかった。今後、外国産などを収集して解析することで、グループ A の由来がわかってくるかもしれない。

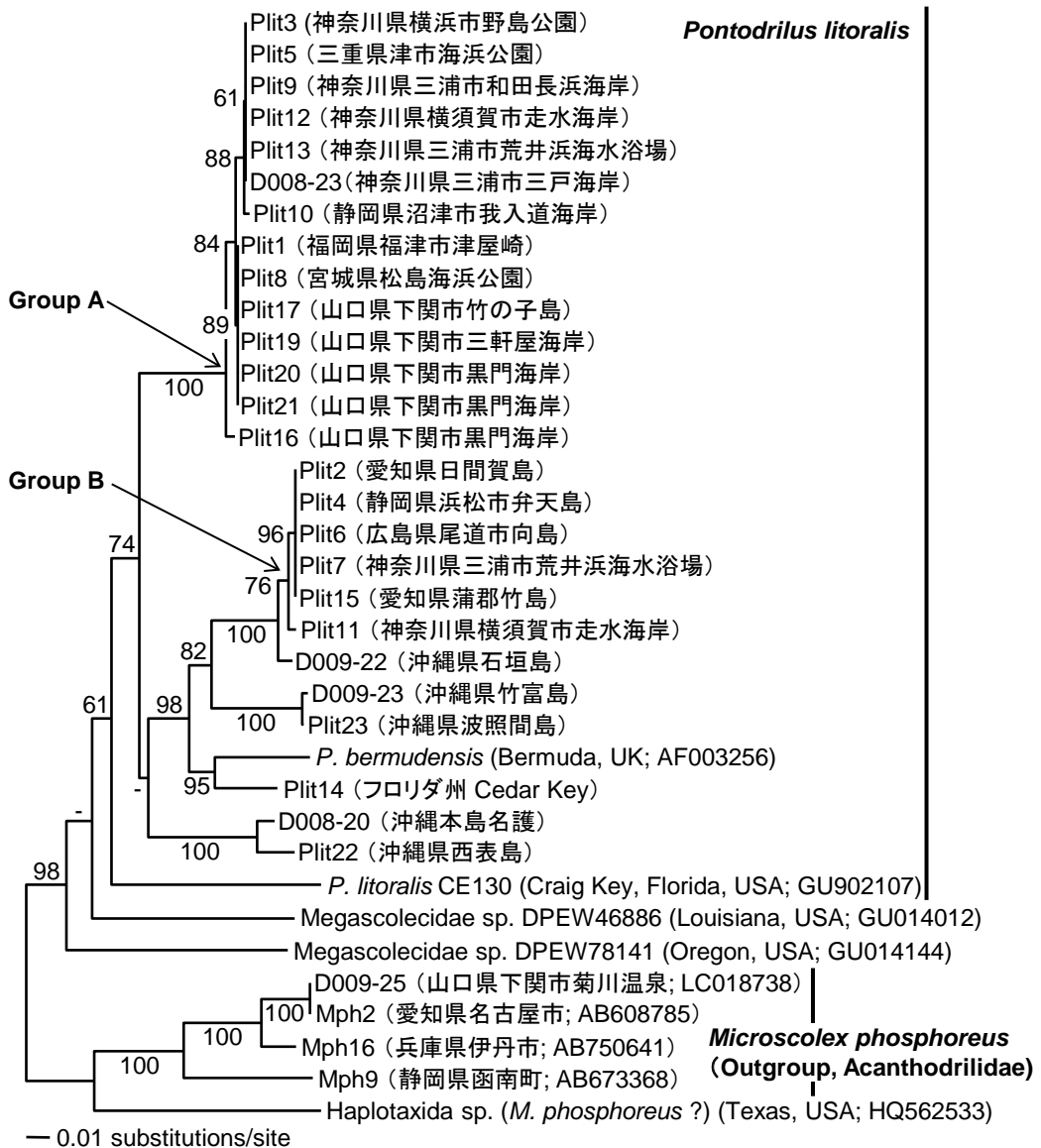


図 2. 近隣結合法によるイソミズの分子系統樹。

ノードの数字は、TBR 枝交換 1000 回の反復によるブートストラップ値 (%)。

Figure 2. Neighbor-joining phylogenetic tree of *Pontodrilus litoralis* based on the *COI* 'barcoding region'

(650 bp) using Clustal W 2.1 under default setting for multiple alignment and PAUP\* 4.0 with

kimura-2-parameter for tree reconstruction. The robustness of each branch (%) was determined by a

nonparametric bootstrap test with 1,000 replicates and a tree bisection-reconnection (TBR) branch swapping

algorithm.

## 謝 辞

イソミズの採集では、桐蔭学園高等学校の課題研究班の皆さま、別所学氏（名古屋大学大学院生命農学研究科）、蟹江秀星氏（名古屋大学大学院生命農学研究科）、大場由美子氏（名古屋大学大学院生命農学研究科）、NPO 八丈島観光レクリエーション研究会）、加藤慎一氏（九州大学水産実験所）の協力を得た。遺伝子解析では、Darrin T. Schultz 氏（名古屋大学大学院生命農学研究科）の協力を得た。ここに感謝の意を表



する。

## 引用文献

- Blakemore R.J. (2003) Japanese earthworms (Annelida: Oligochaeta): a review and checklist of species. *Org. Divers. Evol.* 3, Electr. Suppl. 11: 1-43.
- Blakemore R.J. (2007) Origin and means of dispersal of cosmopolitan *Pontodrilus litoralis* (Oligochaeta: Megascolecidae). *Eur. J. Soil Biol.* 43: S3-S8.
- Easton E.G. (1980) Japanese earthworms: a synopsis of the Megadrile species (Oligochaeta). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.)* 40: 33-65.
- Edwards C.A., Bohlen P.J. (1972) *Biology and Ecology of Earthworms*. Chapman & Hall, London.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3: 294-299.
- 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., Gywinski A., Ball S.L., deWaard J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 313-321.
- Hebert P.D.N., Stoeckle M.Y., Zemlak T.S., Francis C.M. (2004) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol.* 2: e312.
- Iizuka A. (1898) On a new species of littoral Oligochaeta (*Pontodrilus matsushimensis*). *Annot. Zool. Japon.* 2: 21-27.
- Ivanova N.V., deWaard J.R., Hajibabaei M., Hebert P.D.N. (2006) Protocols for High-Volume DNA Barcode Analysis. Barcode of Life website ([www.barcodeoflife.org](http://www.barcodeoflife.org)), 1-24.
- Jamieson B.G.M., Wampler J.E. (1979) Bioluminescent Australian earthworms II. Taxonomy and preliminary report of bioluminescence in the genera *Spenceriella*, *Fletcherodrilus* and *Pontodrilus* (Megascolecidae: Oligochaeta). *Aust. J. Zool.* 27: 637-669.
- Oba Y., Branham M.A., Fukatsu T. (2011) The terrestrial bioluminescent animals of Japan. *Zool. Sci.* 28: 771-789.
- Oba Y., Schultz D.T. (2014) Eco-Evo Bioluminescence on Land and in the Sea. In: Thouand G. and Marks R. (Eds.). *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology Vol. 1., Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 144. Springer, Heidelberg.
- Ohtsuka H., Rudie N.G., Wampler J.E. (1976) Structural identification and synthesis of luciferin from the bioluminescent earthworm, *Diplocardia longa*. *Biochemistry* 15: 1001-1004.
- Petushkov V.N., Dubinnyi M.A., Tsarkova A.S., Rodionova N.S., Baranov M.S., Kublitski V.S., Shimomura O., Yampolsky I.V. (2014) A novel type of luciferin from the Siberian luminous earthworm *Fridericia heliota*: structure elucidation by spectral studies and total synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53: 1-4.
- Rota E. (2009) Lights on the ground: a historical survey of light production in the Oligochaeta. In: Meyer-Rochow V.B. (ed.), *Bioluminescence in Focus – A Collection of Illuminating Essays*, Research Signpost, Kerala, India.
- Wampler J.E., Jamieson B.G.M. (1980) Earthworm bioluminescence: Comparative physiology and biochemistry. *Comp. Biochem. Physiol.* 66B: 43-50.
- Wampler J.E. (1982) The bioluminescence system of *Microscolex phosphoreus* and its similarities to those of other bioluminescent earthworms (Oligochaeta). *Comp. Biochem. Physiol.* 71A: 599-604.
- Wampler J.E., Jamieson B.G.M. (1986) Cell bound bioluminescence from *Pontodrilus bermudensis*, and its similarities to other earthworm bioluminescence. *Comp. Biochem. Physiol.* 84A 1: 81-87.

- Yamaguchi H. (1953) Studies on the aquatic Oligochaeta of Japan VI. A systematic report, with some remarks on the classification and phylogeny of the Oligochaeta. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI Zool.* 11: 277-342 + 1 plt.
- 石塚小太郎 (2014) ミミズ図鑑. 全国農村教育協会.
- 大野正男 (2003) 海辺で生きるウミミミズ. 千葉県立中央博物館友の会ニュース. 50: 4-5.
- 大場裕一 (2012a) 日間賀島のイソミミズの記録. 西三河野生生物研究会会報. 4: 61-62.
- 大場裕一 (2012b) 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 (2013) ホタルの光は, なぞだらけ. くもん出版.
- 大場裕一 (2014) 意外と身近な発光生物 (連載 未知するべ 6). GREEN AGE 12 月号, pp. 34-35.
- 大場裕一 (2015) 光るいきもの一陸のいきもの. くもん出版
- 神田左京 (1938) ヒカリウミミミズの発光について. 理學界 421: 625-631.
- 羽根田彌太, 熊谷信行 (1939) ウミミミズ *Pontodrilus matsushimensis* Izuka ノ發光物質ニ就テ. 日本生理学会雑誌 4: 328-333.
- 羽根田弥太 (1972) 発光生物の話. 北隆館.