

岐阜市に棲息するナミギセルの分布と系統関係

Distribution and phylogenetic relationships of *Stereophaedusa japonica* found in Gifu City

川瀬 基弘*・横山 悠理**・松原 美恵子**

・横井 敦史*・森山 昭彦***・熊澤 慶伯**

* 愛知みずほ大学

**名古屋市立大学大学院理学研究科生物多様性研究センター

***中部大学応用生物学部環境生物科学科

Motohiro KAWASE *, Yuri YOKOYAMA **, Mieko SUZUKI-MATSUBARA **,

Atsushi YOKOI *, Akihiko MORIYAMA *** and Yoshinori KUMAZAWA **

* Faculty of Human Sciences Aichi Mizuho College.

** Research Center for Biological Diversity, Graduate School of Science, Nagoya City University.

*** Department of Environmental Biology College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University.

Abstract

Stereophaedusa japonica is distributed in three areas of Gifu City, Gifu Prefecture: Akisawa and Oku near the northwestern end of the city, Miwa near the northeastern end, and Mizuburodani near the center of the city. DNA analyses showed that individuals from Mizuburodani and Miwa were identical or nearly identical to each other, while these sequences were more distantly related to those from Akisawa and Oku, suggesting that Mizuburodani populations derived from Miwa populations by migration and settlement via rivers.

キーワード： ナミギセル; ミトコンドリア COI 遺伝子; 分布拡大; 岐阜市.

Keyword : *Stereophaedusa japonica*; mitochondrial COI gene; expansion of distribution; Gifu City.

1. はじめに

2009～2013 年にかけて岐阜県岐阜市の（陸産と淡水産）貝類調査（以下、「基礎調査」とする）が実施された。岐阜市は、基準地域メッシュ（三次メッシュ）の 1/2 地域メッシュにより全 910 メッシュに分割され

る（中外テクノス（2014）「岐阜市の自然情報」付図-1 参照）。基礎調査では陸貝の場合、ビル街のような表土の存在しないメッシュや、侵入が極めて困難な深山など物理的に調査ができない場所を除き、調査可能なメッシュについて概ね調査することができた。実際

には 850 地点以上の調査を実施した。これにより、岐阜市における陸貝の種ごとの分布状況を詳細に把握することができた。

基礎調査の結果、ナミギセル *Stereophaedusa japonica* (図 1) は、2012 年 5 月に市の北西端に近い秋沢 (北東林道) [4 個体] と奥 (龍峰寺西) [20 個体] で発見されただけであった (図 2)。稲葉 (1967) は、金華山とその周辺からナミギセルを報告しているが、基礎調査では金華山の山頂付近から山麓にかけて複数回にわたる陸貝調査を実施したもののナミギセルを発見することができなかった。その後、金華山山麓の水風呂谷 (図 2) にナミギセルが棲息しているとの情報が得られたため、2020 年 1 月に現地調査をしたところナミギセルの生貝を 15 個体程度発見できた。発見した周辺も連続的に調査したが、ナミギセルの棲息範囲は極めて局所的であった。基礎調査とあわせて判断すると、金華山においてナミギセルが棲息する場所は、水風呂谷の極めて狭い場所に限られることが分かった。なお、岐阜市レッドデータブックの改訂作業のため、基礎調査の見直し調査を 2018 年から 5 年計画で実施中である。これにより、2020 年 2 月には、市の北東端に近い三輪 (武儀川左岸) でナミギセルの大規模な個体群を発見した (図 2)。この場所は基礎調査においても調査しているが、その際にはナミギセルを発見で

きなかった。仮に基礎調査時にも 2020 年 2 月と同様な大規模な個体群であったなら、これだけ目につく大型のナミギセルを基礎調査で見落とししていた可能性は極めて低く、基礎調査後に侵入したか、或いはもともと個体数が極めて少なかったものが基礎調査後に爆発的に個体数を増やしたかのいずれかと判断した。

結果的に岐阜市のナミギセルは、市の北西端に近い秋沢 (北東林道) と奥 (龍峰寺西)、北東端に近い三輪 (武儀川左岸) および市の中央付近の水風呂谷 (金華山山麓) の 3 地域のみ飛び地的に分布している。この分布について、岐阜市全域に広域分布していたものが分断された結果によるものか、あるいは最近他所から移入された個体群が含まれているのかを、現地調査の状況やミトコンドリア COI 遺伝子分析などから検討した。

2. 分析方法

ナミギセルのサンプリングは、目視による個体採集で行った。各地点最大で 10 個体程度の採取をし、このうち 1~4 個体の遺伝子分析を行った。煮沸して殻部から取り出した軟体部の腹足の一部 (数 mg) を切り取り、Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN, PingTung) で全ゲノム DNA を抽出し、そこからポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により



図 1. 岐阜市内 4 地点のナミギセルの生態写真



図2. 岐阜市のナミギセルの採集地

COI 遺伝子の一部 (655bp) を増幅した。PCR には、LifeECO ver2.0 (Bioer Technology, Hangzhou) を用い、PCR 酵素には SpeedSTAR HS DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社, 滋賀) を使用した。遺伝子領域の増幅には、ユニバーサルプライマーである LCO1490 と HCO2198 (Folmer et al., 1994) を用いた。反応条件は、94°C1 分の加熱後、98°C5 秒/50°C15 秒/72°C10 秒を 30 サイクル、72°C30 秒で行った。PCR 産物を ExoSAP-IT (Affymetrix, CA) で処理した後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, MA) を用いて蛍光ラベルし、Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, MA) により塩基配列の解読を行った。

証拠標本 (エタノール漬けの軟体部と抽出 DNA) は、SDNCU (The Specimen Depository of the Graduate School of Science, Nagoya City University: 名古屋市立大学大学院理学研究科標本庫)

に収蔵されている。殻標本については、筆者の川瀬が所蔵している。

分子系統解析は、MEGA X (Kumar et al., 2018) を用いて、最尤法により行なった。分子系統樹については、筆者らによる先行研究 (川瀬他, 2018) に岐阜市各地の個体を追加する形で作成した。ただし、島根県隠岐郡西ノ島町美田 (隠岐諸島 西ノ島) のニシノシマギセルは、川瀬他 (2018) で別種の可能性が示されたため除外した。また、距離モデルには Kimura 2-parameter model を使用し、各ノードにおける系統関係の信頼性を評価するため、1,000 回の試行によるブートストラップ確率を求めた。外群にはナミギセルと同じキセルガイ科に属するナミコギセル *Tauphaedusa tau* (Böttger, 1877) を使用し、外群の枝は切断して表示した。ハプロタイプネットワーク図は、DnaSP によりハプロタイプを決定し、NETWORK 5.0.1.1 (Bandelt et al., 1999) 上で Median-joining 法により作成した。

表 1. 分析標本の採集地, ハプロタイプ, 登録番号

No	ハプロタイプ	和名(地域型)	採集地	登録番号
1	Hap_01		●岐阜県岐阜市秋沢(北東林道)	MW260068
2	Hap_02		●岐阜県岐阜市奥(龍峰寺西)	LC333958
3			岐阜県大垣市赤坂町	LC333956
4				LC335702
5			岐阜県揖斐郡池田町片山	LC335703
6	Hap_03			LC335704
7			岐阜県揖斐郡池田町市橋	LC333959
8			岐阜県大垣市赤坂町	LC333965
9			岐阜県揖斐郡大野町稲富	LC333966
10	Hap_04		福井県敦賀市杉簀	LC335698
11			滋賀県米原市小泉	LC333960
12			岐阜県養老郡養老町桜井	LC333957
13	Hap_05		滋賀県坂田郡伊吹町小泉	LC335701
14				LC335699
15			滋賀県米原市藤川	LC335700
16				LC335692
17			福井県大野市蕨生	LC335693
18	Hap_06	ナミギセル		LC335694
19			福井県大野市七板	LC335696
20				LC335697
21			福井県大野市蕨生	LC335695
22				MW260063
23	Hap_07		●岐阜県岐阜市水風呂谷(金華山山麓)	MW260051
24				MW260017
25			●岐阜県岐阜市三輪(武儀川左岸)	MW260031
26				MW260046
27	Hap_08		●岐阜県岐阜市水風呂谷(金華山山麓)	MW260053
28	Hap_09		●岐阜県岐阜市三輪(武儀川左岸)	MW260039
29				LC333967
30	Hap_10		愛知県名古屋市長久寺区松園町	LC333968
31				LC333969
32	Hap_11		大阪府柏原市片山町	LC335705
33	Hap_12		愛知県名古屋市長久寺区松園町	LC333970
34				LC333971
35	Hap_13	ナミギセル(イトカケギセル型)	和歌山県日高郡由良町大引	LC335861
36	Hap_14			LC335862
37	Hap_15	ナミギセル(シロナミギセル型)	兵庫県神戸市北区淡河町勝雄	LC335856
38	Hap_16			LC335859
39		ナミギセル(アワジウツミギセル型)	兵庫県洲本市(淡路島)	LC335860
40	Hap_17			LC335857
41	Hap_18			LC335858
42	Hap_19			LC335706
43	Hap_20		新潟県糸魚川市小滝	LC335707
44	Hap_21			LC335708
45	Hap_22	ナミギセル	山口県萩市椿	LC335851
46			愛知県名古屋市長久寺区矢田町寺畑	LC333961
47	Hap_23			LC333962
48			愛知県豊田市西中山町長根	LC333963
49				LC333964
50	Hap_24	ナミギセル(オボロナミギセル型)	福岡県北九州市小倉南区市丸	LC333972
51	Hap_25	ナミギセル(シロナミギセル型)	兵庫県美方郡新温泉町久谷	LC335843
52	Hap_26		新潟県五泉市小山田	LC335713
53	Hap_27		新潟県五泉市中川新	LC335714
54	Hap_28			LC335715
55	Hap_29	ナミギセル	新潟県五泉市小山田	LC335716
56	Hap_30			LC335710
57	Hap_31		新潟県岩船郡山北町間瀬	LC335709
58	Hap_32		新潟県岩船郡山北町基石	LC335711
59	Hap_33		新潟県五泉市小山田	LC335712
60	Hap_34			LC335852
61	Hap_35	ナミギセル(ユウグレナミギセル型)	島根県隠岐郡西ノ島町美田	LC335853
62	Hap_36			LC335854
63	Hap_37	ナミギセル	岡山県高梁市成羽町羽山	LC335855
64				LC335844
65				LC335863
66				LC335864
67	Hap_38	ナミギセル(タイシャクギセル型)	広島県比婆郡東城町	LC335865
68				LC335866
69				LC335867
70	Hap_39	ナミギセル(シロナミギセル型)	兵庫県美方郡新温泉町久谷	LC335845
71	Hap_40	ナミギセル	岡山県上房郡北房町上水田	LC335846
72	Hap_41			LC335848
73	Hap_42		岡山県真庭郡勝山町	LC335847
74	Hap_43	ナミギセル(オオナミギセル型)		LC335850
75	Hap_44		鳥取県日野郡江府町御机	LC335849
76	外群	ナミコギセル	愛知県名古屋市中区本丸(名城公園)	LC335870

登録番号は, International Nucleotide Sequence Databases (INSD) のアクセッション番号を示す.

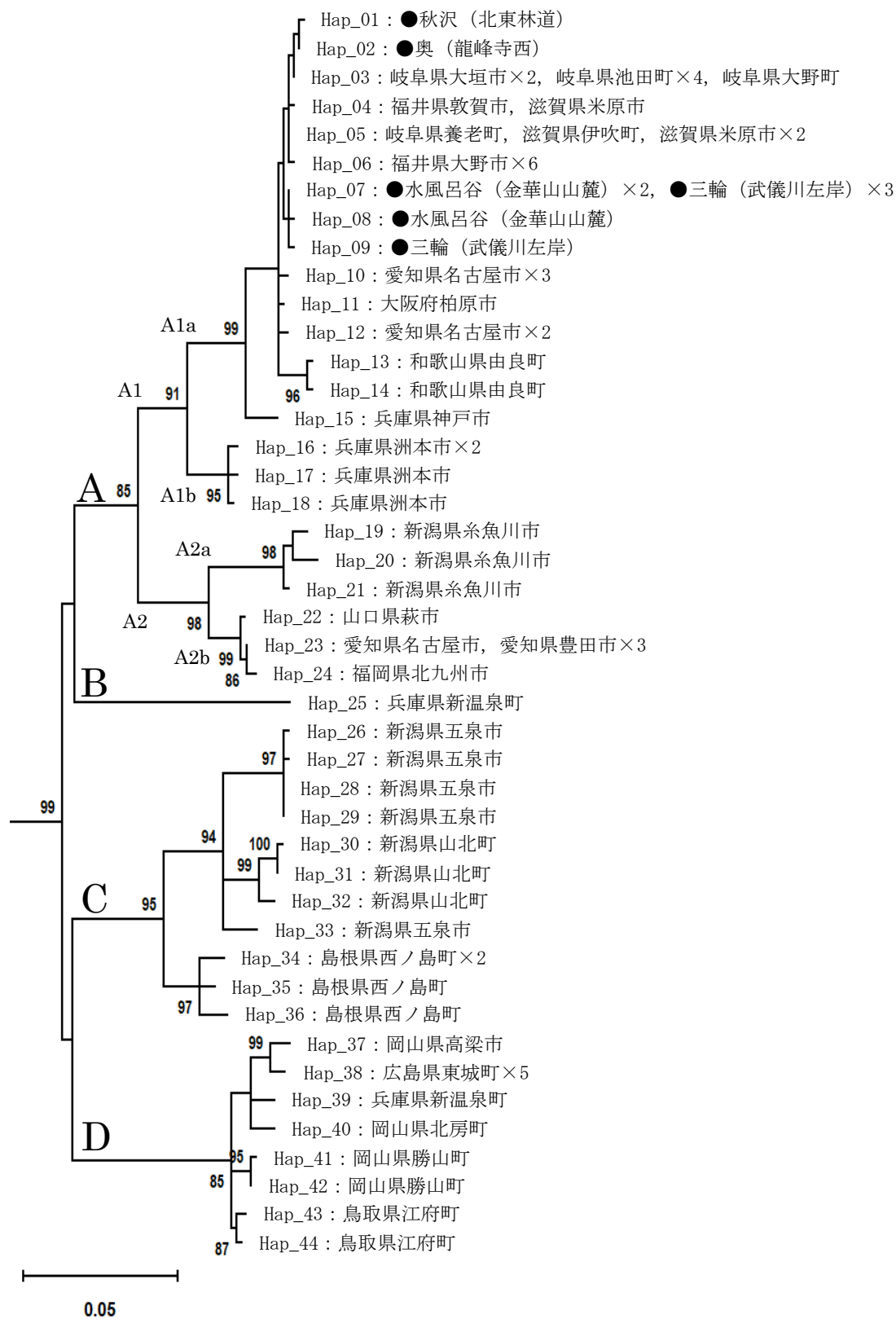


図 3. COI 遺伝子を用いて作成したナミギセルの分子系統樹
 名古屋市中区本丸産ナミコギセル *Euphaedusa tau* (Boettger, 1877) を外群として作成した。

3. 結果

本研究では、岐阜県岐阜市のナミギセル 8 個体の標本につき、新たに COI 遺伝子の塩基配列を解読した。これに、先行研究においてデータ数が最も充実している川瀬他 (2018) のニシノシマギセルを除く 66 個体の塩基配列と、川瀬他 (2018) の岐阜市奥 (龍峰寺西) の塩基配列をあわせて分子系統解析を行った (表 1)。なお、奥 (龍峰寺西) のナミギセル生息地を 2020 年に再調査したが本種を発見することはできなかった。

図 3 は COI 遺伝子を用いて作成したナミギセルの分子系統樹である。本州中部から西日本にかけてのナミギセルは、大きく A~D の 4 つの系統 (群) に分かれた。岐阜県岐阜市の 4 地点 9 サンプルは、A 系統が細分化されたクレード A1a に全て含まれた。クレード A1a のハプロタイプネットワーク図を図 4 に示した。

岐阜市の 9 サンプルのうち、3 サンプルを分析した水風呂谷 (金華山山麓) の塩基配列は 1 塩基が異なる 2 つの配列に分かれた。4 サンプルを分析した三輪 (武

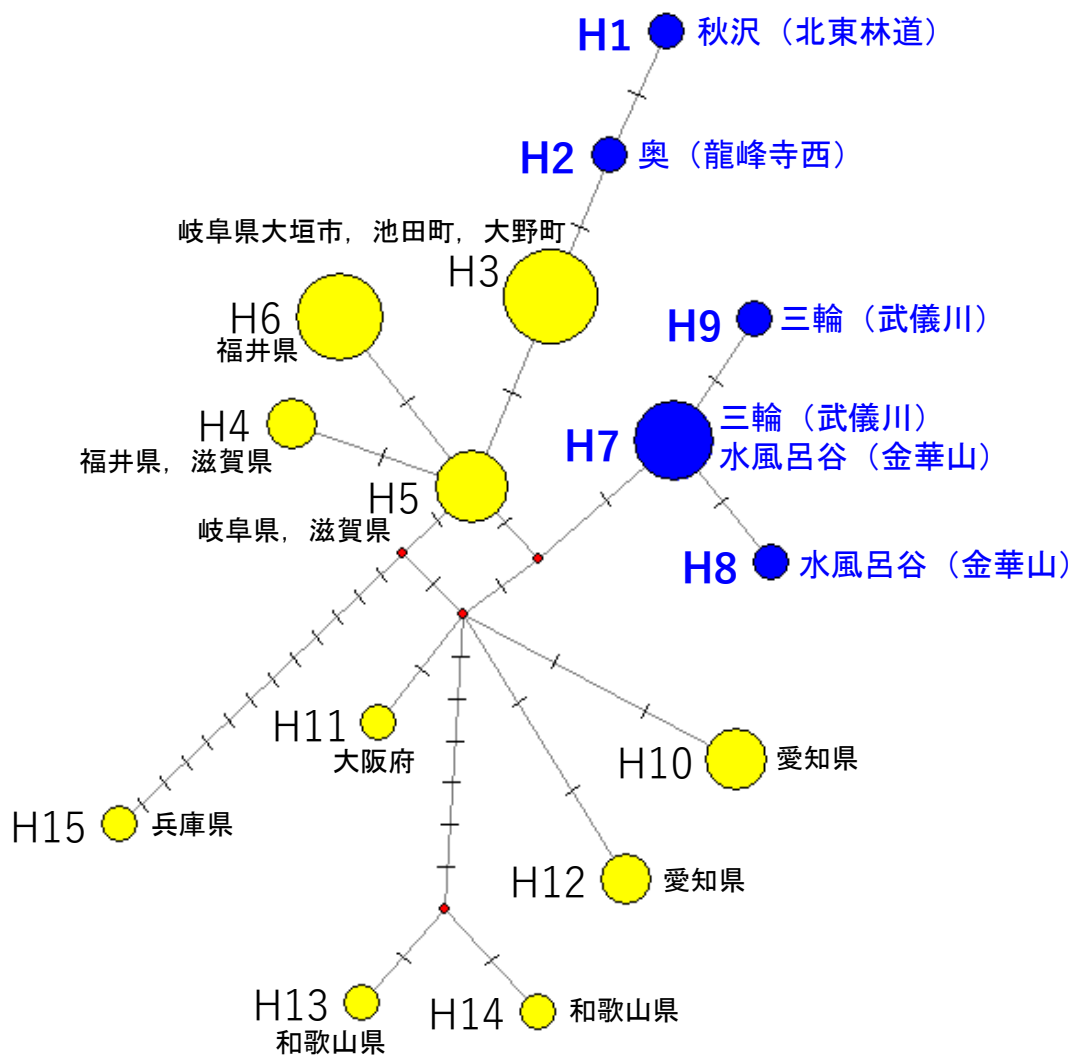


図 4. 岐阜市を含むクレードのハプロタイプネットワーク図 (図 3 の A1a に対応)

節における円の大きさはハプロタイプの相対頻度を表す。岐阜市内のサンプルを青、その他の地域のサンプルを黄で示す。各ハプロタイプをつなぐ線上の一区切りは、1 塩基置換を表し、赤丸は観測されたハプロタイプ間に欠けた推測されるハプロタイプを示す。

儀川左岸)の塩基配列も1塩基が異なる2つの配列に分かれ、水風呂谷の2サンプルと三輪の3サンプルは同一の配列であった。地理的に近接する秋沢(北東林道)と奥(龍峰寺西)はそれぞれ1サンプルの分析であったが塩基配列は1塩基が異なっていた。秋沢と奥に比べて地理的距離が離れる水風呂谷と三輪の塩基配列は同一または1塩基の違いであった。秋沢または奥と水風呂谷または三輪の塩基配列では4~6塩基の違いが見られた。

クレードA2, B, C, Dの結果と考察については、川瀬他(2018)で述べられているので割愛した。

4. 考察

岐阜市の9サンプルはすべてクレードA1(A1a)に含まれており、これに含まれる福井県、滋賀県、岐阜県、愛知県、大阪府、和歌山県、兵庫県の分布域には同一の祖先由来の個体群が分布していると考えられる。岐阜市の少なくとも現在ナミギセルが棲息している4地点を含む地域には、ナミギセルがかつて広域に分布していて、その後の環境変化や人為的改変によって分布が分断され、飛び地的な分布になったのではないかと考えられる。

特に、分析した三輪(武儀川左岸)の4サンプル中の3つが、3サンプルを分析した水風呂谷(金華山山麓)の2つに塩基配列が一致したことから次のように考える。三輪のナミギセルを採集した地点の環境は、武儀川左岸に位置し、竹林と雑木林で構成されており極めて多くの個体数が発見されている。増水時には竹林や雑木林の一部が水没し、陸産貝類は逃避できなかった個体が死滅するか、一部の個体は下流に流される可能性が高い。さらに武儀川は長良川に合流し、サンプリング地点である金華山山麓の水風呂谷が位置するため、上流の三輪由来の個体が水風呂谷に流されて定着した可能性がある。もともと両地域に同一塩基配列の個体群が棲息していた可能性も排除できないが、今後、さらに別の本種生息地が見つければ、さらに詳しい解析が可能になるであろう。そもそもなぜ岐阜市の限られた4地点にのみ本種が残存しているのかの理由も現時点では不明である。上流域から増水時などにナミギセルが河川を移動手段として下流側に分布を拡げた可能性についての事例は、山崎川川岸(愛知県名古屋市瑞穂区)でも報告されている(川瀬他, 2017)。また、カタマメマイマイでも矢作川川岸(愛知県豊田市)で同様の事例が知られている(川瀬, 2016)。

陸産貝類が殻から軟体を出して活動状態にある時に、殻の内部に空気が溜まっていると殻が浮きの代わりとなり水にしばらく浮かぶことは現地調査でも確認して

いる。ただし殻に軟体を収納した個体の多くは水に沈み、活動状態であっても水に沈むことがある。また、肺呼吸の陸産貝類(キセルガイ類)が、どの程度の時間を窒息に耐えて浮かんでいられるかなどの検証はしていない。このように受動的な手段ではあるが、本研究により、陸産貝類が河川を介して移動できる可能性が示唆された。

5. 謝辞

本報をまとめるにあたり、名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科生物多様性研究センターの村瀬幸雄氏(2015年退職)には、PCRならびにDNA塩基配列を決定するにあたり在職中に大変お世話になった。達目洞自然の会の大家英樹氏には岐阜市金華山に棲息するナミギセルの情報をご提供いただいた。岐阜市の自然情報調査調査員の村瀬文好氏、岐阜市役所環境保全課自然係の西本明弘氏、吉村卓也氏、諏佐康子氏、福井絢子氏には岐阜市の現地調査にご協力いただいた。同自然係の茅原田一氏には採集地点図を作成いただいた。以上の方々にこの場を借りてお礼申し上げます。

引用文献

- Bandelt, H. J., P. Forster and A. Röhl (1999) : Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37-48.
- 中外テクノス編(2014) : 岐阜市の自然情報~岐阜市自然環境基礎調査~。岐阜市役所 自然共生部 自然環境課。
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz and R. Vrijenhoek (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.
- 稲葉左馬吉(1967) : 金華山動物目録。岐阜大学教育学部研究報告, 自然科学, 4(1), 32-40.
- 川瀬基弘(2016) : VII 軟体動物。豊田市生物調査報告書作成委員会(著)。豊田市生物調査報告書(分冊その1), 309-341, 口絵13-15。豊田市。
- 川瀬基弘・鶴飼 普・大矢美紀(2017) : 山崎川川岸(名古屋市瑞穂区)で発見されたナミギセル。なごやの生物多様性, 4, 43-45.
- 川瀬基弘・西尾和久・松原美恵子・市原 俊・森山昭彦・熊澤慶伯(2018) : 遺伝子解析に基づく中部・西日本産ナミギセル *Stereophaedusa japonica* 個体群の種内多様性と名古屋市の個体群の系統的位置づけ。なごやの生物多様性, 5, 11-22.

原著

Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura (2018) : MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549.