

名古屋市産淡水貝類のDNAバーコーディング

熊澤 慶伯⁽¹⁾ 松原 美恵子⁽¹⁾ 横山 悠理⁽¹⁾
寺本 匡寛⁽²⁾ 村瀬 幸雄⁽¹⁾ 那須 健一郎⁽³⁾
孫 垚⁽¹⁾ 森山 昭彦⁽¹⁾⁽⁴⁾ 川瀬 基弘⁽¹⁾⁽⁵⁾

- ⁽¹⁾ 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 〒467-8501 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町山の畑 1
⁽²⁾ なごや生物多様性センター 〒468-0066 愛知県名古屋市天白区元八事五丁目 230 番地
⁽³⁾ 名古屋市立大学医学部 〒467-8601 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄 1
⁽⁴⁾ 中部大学応用生物学部環境生物科学科 〒487-8501 愛知県春日井市松本町 1200 番地
⁽⁵⁾ 愛知みずほ大学人間科学部 〒467-0867 愛知県名古屋市瑞穂区春敲町 2-13

DNA barcoding of freshwater molluscs in Nagoya

Yoshinori KUMAZAWA⁽¹⁾ Mieko SUZUKI-MATSUBARA⁽¹⁾
Yuri YOKOYAMA⁽¹⁾ Tadahiro TERAMOTO⁽²⁾
Sachio MURASE⁽¹⁾ Kenichiro NASU⁽³⁾ Yao SUN⁽¹⁾
Akihiko MORIYAMA⁽¹⁾⁽⁴⁾ and Motohiro KAWASE⁽¹⁾⁽⁵⁾

- ⁽¹⁾ Research Center for Biological Diversity, Graduate School of Natural Sciences, Nagoya City University, 1 Yamanohata, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8501, Japan.
⁽²⁾ Nagoya Biodiversity Center, 5-230 Motoyagoto, Tempaku-ku, Nagoya, Aichi 468-0066, Japan.
⁽³⁾ Medical School, 1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8601, Japan.
⁽⁴⁾ Environmental Biology, College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University, 1200 Matsumoto-cho, Kasugai, Aichi 487-8501, Japan.
⁽⁵⁾ Department of Human Science, Aichi Mizuho College, 2-13 Shunko-cho, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-0867, Japan.

Correspondence:

Yoshinori KUMAZAWA E-mail: kuma@nsc.nagoya-cu.ac.jp

Motohiro KAWASE E-mail: kawase@mizuho-c.ac.jp

要旨

名古屋市内の44地点の淡水域から採集された11科18属22種の貝類129個体について、ミトコンドリアDNAのシトクロムオキシダーゼサブユニットI遺伝子の部分塩基配列を決定した。これらの塩基配列は、貝殻画像情報を含む関連データとともにBarcode of Life Data Systems (BOLD) データベースにDNA Barcoding of Freshwater Molluscs in Nagoya (DS-DBFMN) のデータセット名で登録し、DNAバーコードデータベースを作成した。腹足綱の13種と二枚貝綱の3種について、形態情報から認識可能な種とDNA塩基配列から系統解析によって認識されるクレードは明確に一致し、名古屋市産淡水貝類の多くがDNAバーコーディングによって種を識別可能であることを示した。しかし、カワニナとチリメンカワニナ、マシジミとタイワンシジミ、モノアラガイ属の一種Aとモノアラガイ属の一種Bでは、種境界における形態情報と分子情報の明確な一致が見られず、DNAバーコードによって相互に区別することが実際上困難であった。また、ヒメタニシ、スクミリングガイ、ヒメモノアラガイ、モノ

アラガイ属の一種A, サカマキガイ, ヒラマキミズマイマイ, ヌマガイ, ドブシジミの8種では, 種内に遺伝的に大きく隔たった複数の系統が存在していることも示された。

Abstract

Partial nucleotide sequences for the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene were determined for 129 molluscan individuals representing 22 species, 18 genera and 11 families, which were collected from 44 freshwater localities in Nagoya City, Japan. These nucleotide sequences and accompanying data including shell images were deposited to the Barcode of Life Data Systems (BOLD) database as a dataset named DNA Barcoding of Freshwater Molluscs in Nagoya (DS-DBFMN). Morphologically recognized species corresponded with molecularly specified clades for 13 gastropod species and 3 bivalve species, indicating that most freshwater molluscs in Nagoya could be identified for their species based on the DNA barcodes. However, the discrimination for *Semisulcospira libertina* vs. *Semisulcospira reiniana*, *Corbicula leana* vs. *Corbicula fluminea*, and *Radix* sp. A vs. *Radix* sp. B was not attained using the DNA barcode. Multiple lineages separated with large sequence distances were recognized in 8 species: *Sinotaia quadrata*, *Pomacea canaliculata*, *Austropeplea ollula*, *Radix* sp. A, *Physella acuta*, *Gyraulus chinensis*, *Sinanodonta lauta*, and *Sphaerium japonicum*.

序文

名古屋市においては, 都市開発と人口過密・物流などにより, 野生生物の生息環境が劣化している。市内において比較的まとまった面積で緑地が残るのは, 東山公園や小幡緑地など市営・県営の都市公園だけというのが現状である。市内には庄内川, 山崎川, 天白川などの水系から豊かな水が供給されており, 庄内川の河口には藤前干潟などの貴重な干潟も残されている。しかし, これらの水系の在来生態系は, 産業・生活排水による水質低下や外来生物の侵入などによって常に脅かされており, その保全のために企業・自治体や市民団体が多くの努力を傾注せざるをえない状況である。一方, 名古屋市内から水田が激減したことを受けて, 水田や水路に生息する淡水生物は大きな影響を受けている。これらの結果, 名古屋市では多くの在来野生生物が絶滅危惧種としてレッドデータブックに記載され, その保全の必要性が指摘されている(名古屋市環境局環境企画部環境活動推進課, 2015)。また, 進行中の環境劣化の急激さ・深刻さを踏まえれば, 現時点における生物多様性の把握作業をさらに加速させる必要がある。

本研究は, このような問題意識のもとで, 名古屋市内に生息する淡水産貝類の種の多様性をより深く把握する

目的で実施されたものである。名古屋市の淡水貝類を網羅的に扱った資料としては, 田中(1964)が汽水域まで分布するものを含めて28種を報告し, 市内全42地点におけるこれらの生息状況を記録している。その後は市内の淡水産貝類の種数がまとまった報告はなく, 名古屋市動植物実態調査検討会(2004), 名古屋市環境局環境企画部環境活動推進課(2015)および愛知県移入種データブック検討会(2012)などに, 希少種や外来種のみが掲載されているに過ぎなかった。しかし, 2017年度には, なごや生物多様性保全活動協議会主催の「なごや生きもの一斉調査2017淡水貝編」が実施され, この結果を受けて最近の名古屋市の淡水貝類の生息状況が報告された(川瀬, 2018; 川瀬ほか, 2018)。これらによれば名古屋市内に生息するまたは生息していた淡水産貝類は合計34種である。この中から絶滅したもの及び絶滅した可能性が高いものを除外すると, 現在市内で確実に生息が確認できるのは24種であると思われる(川瀬, 2018; 川瀬ほか, 2018)。なごや生きもの一斉調査2017淡水貝編では, このうちタガイ(*Sinanodonta japonica*)を除く23種が名古屋市内で発見された。

本研究では, DNAバーコーディングという手法を用いて, 名古屋市産淡水貝類の多様性の分析を行った。

DNAバーコーディングは、数百塩基対のDNA塩基配列 (DNAバーコード) における種特異性に基づき、生物標本の簡便な種同定を行うための技術である (Hebert et al, 2003). そのための信頼に足るデータベースを作成する目的で、国際的なコンソーシアムによる International Barcode of Life Project (iBOL) が2010年から進められ、世界中の全ての記載種をターゲットにした生物標本とDNAバーコードの対応付け作業が進行している. Barcode of Life Data Systems (BOLD) データベース (<http://www.boldsystems.org/>, 2018年8月31日確認) は、決定されたDNAバーコードのデータベースであるが、2018年8月時点で19万種を超える動物種を含む分類群から600万配列を超えるDNAバーコードが登録されている.

これらのデータの蓄積から判明した事実として、多くの動物分類群において、種内の複数個体間におけるDNA配列上の距離 (種内の遺伝的多様性) と最近縁の姉妹種との間の距離には明確な差 (Barcode Gap) が見られることが一般的である (Meyer and Paulay, 2005). さらに、分類学的研究が十分になされている様々な脊椎動物や昆虫を含む分類群において、DNAバーコード塩基配列における距離は種内の個体間でおおよそ2%以内であり、逆に種間の個体間で2%よりも大きな値を持つことが経験的に知られている (Hebert et al., 2003). Ratnasingham and Hebert (2013) は、塩基配列が類似したDNAバーコードどうしをクラスタリングした後に、各クラスター内の塩基配列の近縁関係に基づいてクラスタリングを微調整するような高度なアルゴリズムを用いて、生物学的な種に相当するDNAバーコードのグループ (Barcode index number: BIN) を同定する手法を提案した. 前述の脊椎動物や昆虫の例では、およそ89%の種において種の境界とBINとが合致する (Ratnasingham and Hebert, 2013). この方法を分類学研究があまり進んでいない分類群において適用するならば、種の候補をDNA塩基配列に基づいて提案することも原理的に可能である. 従って、DNAバーコーディングは、単に簡便な種同定支援システムを構築するにとどまらず、形態データに依存した分類学では認識できなかった種境界に関する新知見 (隠蔽種の示唆など) を提供するような意義もあわせ持っている.

本研究では、名古屋市という限定された地域内ではあるものの、そこに生息する淡水貝類の種同定を、分類学専門家による形態チェックなしでも簡便に行えるようなDNAバーコードデータベースの構築を試みた. 筆者が知る限り、日本産淡水貝類の分子系統は他に研究例がいくつかあるものの (例えばHirano et al., 2015; Sano et al., 2017), DNAバーコードデータベースの構築を主眼とした分子研究は、国産淡水貝類について報告されていない. このため、日本産淡水貝類の種とBINの関係なども過去にほとんど調べられておらず、本研究のデータを用いて分析し、考察を行った.

材料および方法

本研究で用いた淡水貝類の標本の多くは、2017年8月28日から9月21日に実施されたなごや生きもの一斉調査2017淡水貝編 (なごや生物多様性保全活動協議会主催) の際に、多数の市民と専門調査員によって名古屋市内の61地点から採集されたものである (川瀬, 2018). 採集された標本は、著者の一人である川瀬によって形態情報 (増田・内山, 2004) に基づき種同定され、各種ごとのあるいは各産地ごとの採集個体数等のデータが報告書にまとめられている (川瀬, 2018). これらの採集個体の一部は、DNAバーコーディング等の詳しい研究を行うために、なごや生物多様性保全活動協議会から名古屋市立大学システム自然科学研究科附属標本庫に寄贈され、軟体部 (エタノール液浸標本, 4℃保存) と殻部 (常温保存) に分けて保存されている. 極めて小型の貝類で軟体部と殻部の分離が難しいものについては、写真撮影を行なった後、標本全体をDNA抽出に用いたため、抽出されたDNA標本のみが標本庫に-30℃で保存されている. 本研究では、これらの標本に著者ら独自に採集を行った標本を補完的に加えて研究を行った. 全採集地点を図1に示す.

採集された貝類サンプルは、可能であれば生貝のうちに煮沸処理を行い、軟体部を殻部から分離した後、軟体部を99.5%エタノールに浸し4℃冷蔵保存した. 保存中に色素類が浸出してくるため、エタノールを数回置換した. 軟体部の足部筋肉組織からDNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて全DNAの抽出を行い、その10倍希釈液を用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った.

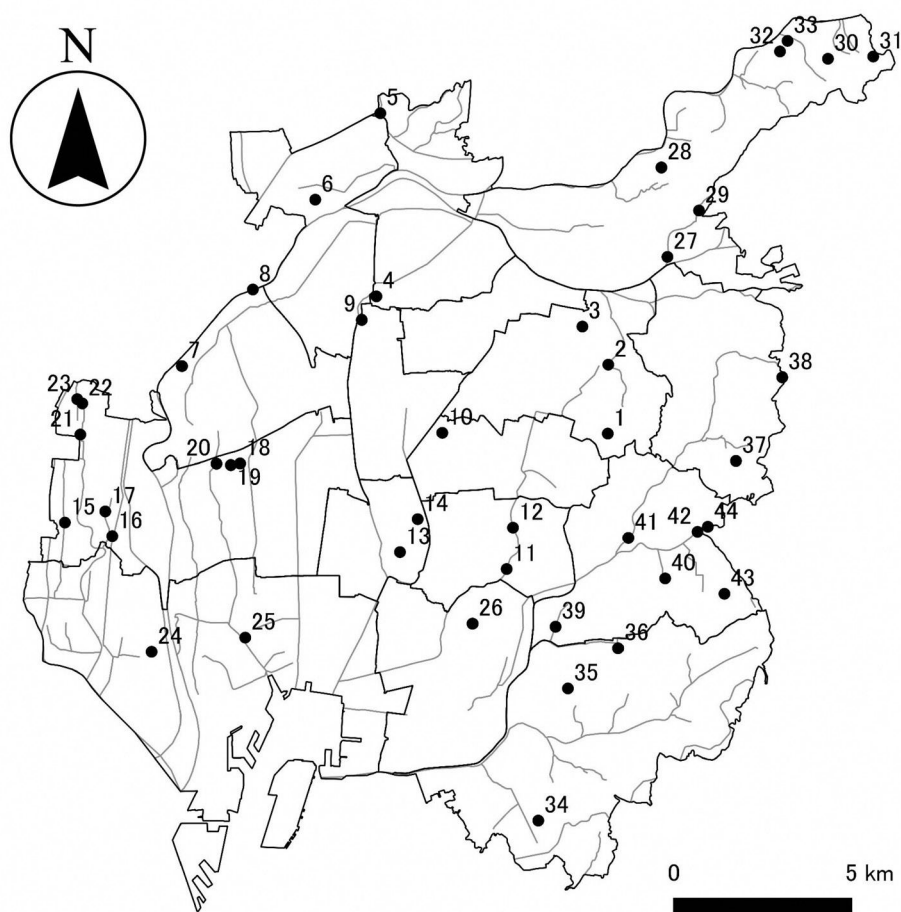


図1. DNAバーコーディングを行なった淡水貝類の採集地点。名古屋市の16区の境界線を濃い実線で、水系のネットワークを薄い実線で示す。採集地点の番号は、表1に示す採集地点の番号と対応する。

Fig. 1. Sampling localities for freshwater molluscs used for DNA barcoding. Thick lines denote ward boundaries and thin ones show drainage systems in Nagoya City. Numbers for sampling localities correspond to those in table 1.

PCRは、SpeedStar HS DNA polymerase (タカラバイオ) とPCR Thermal Cycler Dice (タカラバイオ) を用いて、 $10\mu\text{l}$ の反応液量で行った。タカラバイオが提供する標準的な反応液組成（ただし一部のサンプルからの増幅ではトレハロースを終濃度5%になるように加えた）で、 98°C 5秒、 55°C 15秒、 72°C 20秒のサイクルを30回行った。ミトコンドリアDNAにコードされるシトクロムオキシダーゼサブユニットI (COI) 遺伝子の一部（約660塩基対）を増幅するユニバーサルプライマーとして、LCO1490とHCO2198 (Folmer et al., 1994) を使用した。当該DNA領域の増幅を1%アガロースゲル電気泳動によって確認した後、ExoSAP-IT 試薬 (Affymetrix) によって処理したPCR反応液を用いて、サイクルシーケンシ

ング反応を行った。この反応にはBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) を用い、反応産物を3500 Genetic Analyzer (Life Technologies) に展開して、塩基配列の解読を行った。両方向から読んだ塩基配列をSequencher 4.8 (Gene Codes) を用いてアセンブルすることで、DNAバーコード領域の塩基配列をサンプルごとに確定した。

合計129個体の名古屋市産淡水貝類の標本（表1）について、DNAバーコード領域の塩基配列を決定し、標本採集地・採集日や分類などの付帯情報、標本全体あるいは殻部の写真画像、名古屋市立大学システム自然科学研究科附属標本庫 (SDNCU) の標本登録番号、DNAシーケンサーで分析されたときのエレクトロフェログラ

表1. DNAバーコードを取得した名古屋市産淡水貝類の概要
Table 1. Freshwater molluscs in Nagoya used for the DNA barcoding

学名	和名	名古屋市内 での希少性	個体数	採集地点 ¹ (複数個体数)	BIN ² (複数個体数)	種内の分子 距離の 平均値 (%)	種内の 分子距離の 最大値 (%)	最近縁種への 分子距離の 最小値 (%)
<i>Cipangopaludina chinensis</i>	マルタニシ	絶滅危惧IA類	9	1, 16(2), 21(3), 22(3)	ADM5181(9)	0.18	0.48	13.29
<i>Cipangopaludina japonica</i>	オオタニシ	絶滅危惧II類	4	26, 28, 40(2)	AAR9203(4)	0.1	0.15	9.61
<i>Sinotaia quadrata</i>	ヒメタニシ	—	9	2, 3, 6, 20, 24, 29, 35, 36, 37	AAW2867(7), ACV7566(2)	3.06	6.29	9.61
<i>Pomacea canaliculata</i>	スクミリンゴガイ	外来種	5	16, 17, 18, 19(2)	AAA3844(3), ACE7418(2)	2.95	4.91	20.28
<i>Melanooides tuberculata</i>	ヌノメカワニナ	外来種	2	20(2)	ADM4650(2)	0	0	21.01
<i>Semisulcospira libertina</i>	カワニナ	—	6	3, 20, 31, 38(3)	ADM4687(4), ADK2249, ADM6867	11.4	19.77	0
<i>Semisulcospira reiniana</i>	チリメンカワニナ	—	8	3, 10, 20(2), 31, 32(3)	AAH9819(4), ADK2249(2), ADM4687, ADM5672	12.27	19.15	0
<i>Austropeplea ollula</i>	ヒメモノアラガイ	—	9	2, 3(2), 7, 12, 17, 34, 36, 43	ACD2692(4), ADM3385(5)	2.11	3.46	16.33
<i>Pseudosuccinea columella</i>	ハブタエモノアラガイ	外来種	5	4, 10, 30, 36, 43	AAH7974(5)	0	0	16.33
<i>Radix</i> sp. A	モノアラガイ属の一種A	外来種	7	20, 25(4), 37(2)	ACH9751(4), ADM3973(3)	2.66	4.77	4.8
<i>Radix</i> sp. B	モノアラガイ属の一種B	外来種	1	25	ADM3972	N/A	N/A	4.8
<i>Physella acuta</i>	サカマキガイ	外来種	6	17, 24, 28, 33, 34, 40	AAB6433, AAZ1627(5)	1.58	2.97	21.43
<i>Gyraulus chinensis</i>	ヒラマキミズマイマイ	準絶滅危惧	8	4, 5, 7, 14, 17(2), 25, 33	ACO6724(2), ACO7407(4), ADL0925(2)	2.37	3.78	14.99
<i>Polyplitis hemisphaerula</i>	ヒラマキガイモドキ	準絶滅危惧	4	27(4)	ADM5573(4)	0.54	0.92	12.07
<i>Hipppeutis cantori</i>	クルマヒラマキ	外来種	5	12(5)	ACH4973(5)	0.74	1.86	12.07
<i>Menetus dilatatus</i>	ヒロマキミズマイマイ	外来種	3	11(2), 42	AAX4717(3)	0	0	14.06
<i>Laevapex nipponica</i>	カワコザラガイ	—	5	8, 9, 13, 39, 42	AAE6642(5)	0.31	0.77	14.08
<i>Sinanodonta lauta</i>	ヌマガイ	絶滅危惧IB類	15	3, 6, 8, 15(3), 23(5), 28(2), 40(2)	ACO6671(6), ACO6784(2), ACO6785(2), ACX1363(3), ADM4528(2)	13.97	23.97	30.5
<i>Corbicula leana</i>	マシジミ	絶滅危惧IA類	4	23(3), 28	ACF5867(4)	0.15	0.3	0
<i>Corbicula fluminea</i>	タイワンシジミ	外来種	7	15, 20, 23(3), 30, 41	AAC2296(4), ACF5867(3)	1.63	2.81	0
<i>Pisidium uejii</i>	ウエジマメシジミ	絶滅危惧IB類	1	44	ACO7847	N/A	N/A	17.32
<i>Sphaerium japonicum</i>	ドブシジミ	—	6	7(4), 12, 23	ACQ5557(2), ADN9479(4)	5.34	9.79	17.32

¹ 図1の採集地点の番号を示す

² BIN 番号の先頭にあるBOLD:の記述は省略する

研究者によっては、ヒメモノアラガイ、サカマキガイ、ヌマガイの学名を、それぞれ *Galba ollula*, *Physa acuta*, *Anodonta lauta* と示すこともある

¹ Locality numbers correspond to those shown in Fig. 1

² The common 'BOLD:' for all BIN numbers is omitted in this table

Genera *Galba*, *Physa* and *Anodonta* are occasionally used in place of *Austropeplea*, *Physella* and *Sinanodonta*, respectively

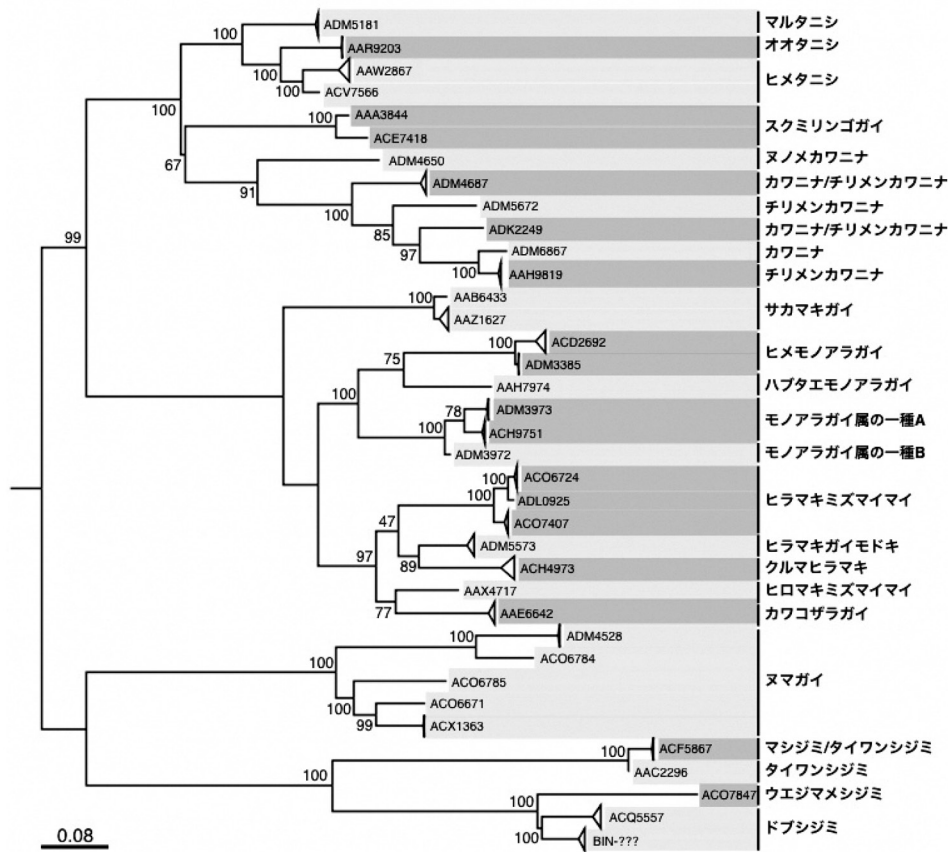


図2. DNAバーコード領域の塩基配列を用いて作成した名古屋市産淡水貝類の最尤系統樹。腹足類と二枚貝類を繋ぐ枝上の任意の地点に系統樹の根をおいて図示した。タクソンの表示は同一のBIN (表1参照) を持つものを統合して示した。BIN番号は、先頭のBOLD:の記述を省略して示す。1000回の試行から求めたブートストラップ確率 (%) をBIN間の結節点に示す。

Fig. 2. A maximum likelihood tree constructed using the DNA barcode sequences of freshwater molluscs in Nagoya City. This tree is illustrated by placing a root on an arbitrary position on a branch connecting Gastropoda and Bivalvia. Each taxon corresponds to BIN numbers shown without common 'BOLD:' (see table 1). Numbers at nodes represent bootstrap probabilities (%) from 1000 replications for relationships between BINs.

ムデータ (ベースコールに用いた波形データ) とともに、BOLDデータベースに、DNA Barcoding of Freshwater Molluscs in Nagoya (DS-DBFMN) のデータセット名で登録し、DNAバーコードデータベースを作成した。

DNAバーコード領域の塩基配列における距離の算出は、BOLDデータベースのBarcode Gap Analysisを参照して行った。距離モデルにはKimura 2-parameter modelを、アラインメントオプションにはMUSCLEを、ギャップサイトの取扱いにはPairwise Deletionのオプションを採用した。分子系統解析は最尤法を用い、MEGA7 (Kumar et al., 2016) を使って行った。距離モデルにはKimura 2-parameter modelを、ギャップサイトの取扱いにはPairwise Deletionのオプション

を、サイト間の分子進化速度の違いを表すモデルにはGamma+Invariantモデル (Gamma補正は5カテゴリー) を使用した。また、あわせて1000回のリサンプリングによるブートストラップ解析を行い、各結節点におけるブートストラップ確率を求めた。

結果

名古屋市内の44地点の淡水産地から採集された11科18属22種の淡水貝類129個体 (表1) について、COI遺伝子の部分塩基配列 (DNAバーコード) を決定した。そのほとんどの塩基は両方向からのシーケンシングに基づいて正確に読み取られており、未確定塩基 (N) は一つも含まれなかった。この塩基配列データは、標本情報

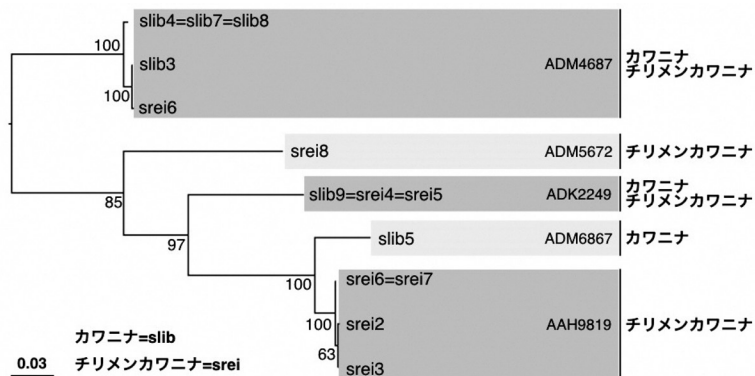


図3. カワニナ及びチリメンカワニナと同定された個体の系統関係。図2の最尤系統樹のうちカワニナとチリメンカワニナの個体のみを抜き出し、個体識別番号（例：チリメンカワニナの2個体目を *srei2* など）を付けて表示した。BIN 番号は、先頭のBOLD:の記述を省略して示す。

Fig. 3. Phylogenetic relationships of haplotypes from individuals identified as *Semisulcospira libertina* or *Semisulcospira reiniana*. This tree is a part of the tree shown in Fig. 2, and each label (e.g., srei2) represents a species name and individual number for the species.

とともに、BOLD データベースに DS-DBFMN のデータセット名で登録されており、世界中の誰からも無償で閲覧し、利用できる.

なごや生きものの一斉調査2017淡水貝編で採集された全23種の淡水貝類のうち、採集した標本からDNA塩基配列を正しく読み取れなかったヒメヒラマキミズマイマイを除いて、22種を網羅するDNAバーコードデータベースを構築できた。このうち7種は名古屋市において絶滅危惧種あるいは準絶滅危惧種に指定されている一方、他の9種は外来種である（表1）。絶滅危惧IA、IB類も含め名古屋市から現在見つかる可能性のある淡水貝類は24種であるが（川瀬，2018；川瀬ほか，2018），本データベースはその多くを含むものである。これら22種の淡水貝類のうち4種（ヒラマキガイモドキ，カワコザラガイ，ウエジマメシジミ，ドブシジミ）では，名古屋市に限らず世界中のどこからでも，これまでDNAバーコード領域の塩基配列が，BOLDやInternational Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC) などの公共データベースに登録されることがない。これらのDNAデータは学術上特に貴重なものである。

本研究で取得したDNAバーコード領域の塩基配列を用いて作成した最尤系統樹を図2に示す。本研究で用いた淡水貝類は腹足綱の17種と二枚貝綱の5種に二分され、タニシ科の3種（マルタニシ、オオタニシ、ヒメタニシ）と水棲有肺類の1グループ（ヒラマキミズマイマ

イ、ヒラマキガイモドキ、クルマヒラマキ、ヒロマキミズマイマイ、カワコザラガイ：水棲目とされることもある）がそれぞれ単系統群となるなど、この系統樹は構成種の分類学的位置付けや他の分子系統研究（例えば Klusmann-Kolb et al., 2008; Hirano et al., 2015）とおおむね整合的である。また、タニシ科の3種のうち、オオタニシとヒメタニシからなるクレードがマルタニシと姉妹関係にある点も、先行研究（Hirano et al., 2015）と合致する。

その一方で、カワニナと種同定された6個体とチリメンカワニナと種同定された8個体は、互いに単系統とならず、合計5つのBINに帰属される複雑なパターンを示した(図2)。このうち、BOLD:ADM6867にはカワニナのみが、BOLD:ADM5672とBOLD:AAH9819にはチリメンカワニナのみが帰属したが、残りのBOLD:ADM4687とBOLD:ADK2249には両種がともに帰属した。BOLD:ADM4687に帰属した5個体のうち4個体はカワニナであったが、1個体のチリメンカワニナ(個体番号srei6)も含まれていた(図3)。また、BOLD:ADK2249に帰属した3個体のうち2個体はチリメンカワニナであったのに対し、1個体(slib9)はカワニナであった(図3)。

同様に、マシジミと種同定された4個体とタイワンシジミと種同定された7個体もそれぞれ単系統群とならず、両種が混在した系統関係を示した(図2)。こ

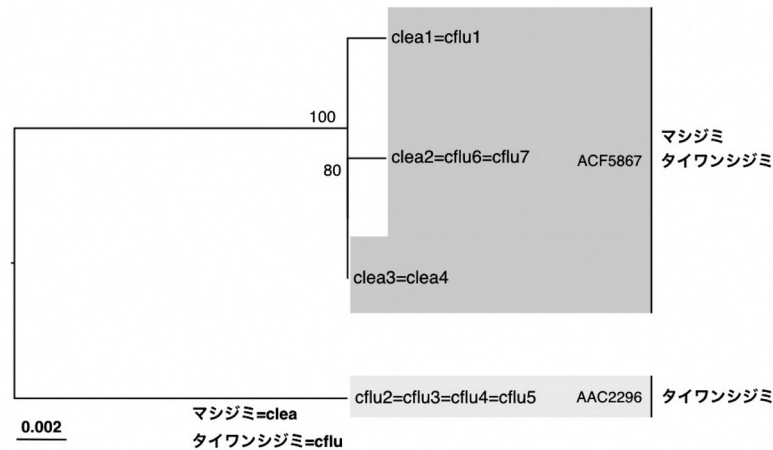


図4. マシジミ及びタイワンシジミと同定された個体の系統関係。図2の最尤系統樹のうちマシジミとタイワンシジミの個体のみを抜き出し、個体識別番号（例：マシジミの4個体目を clea4 など）を付けて表示した。BIN 番号は、先頭のBOLD:の記述を省略して示す。

Fig. 4. Phylogenetic relationships of haplotypes from individuals identified as *Corbicula leana* or *Corbicula fluminea*. This tree is a part of the tree shown in Fig. 2, and each label (e.g., clea4) represents a species name and individual number for the species.

れら11個体の淡水シジミ類は、BOLD:ACF5867とBOLD:AAC2296の2つのBINに分かれたが、マシジミと種同定された4個体は全て前者のBINに帰属した（図4）。すなわちBOLD:AAC2296はタイワンシジミと同定された個体のみから構成されたが、BOLD:ACF5867にはマシジミとタイワンシジミの両種が混在した。BOLD:AAC2296に帰属したタイワンシジミの4個体は、全て同一の塩基配列（ハプロタイプ）を持っていた。BOLD:ACF5867には比較的低い距離で隔たった3つのハプロタイプが認められたが、そのうち2つは両種によって共有されていた（図4）。

複数個体のDNAバーコードが得られた20種について、種内のDNA配列上の距離（横軸）に対し、最近縁種との間の距離（縦軸）をプロットした結果を図5に示す。この図において、斜めの破線よりも下にあり縦軸の値がゼロになっているものは、前述のカワニナ／チリメンカワニナ及びマシジミ／タイワンシジミのプロットである。これらを除いた場合は、全ての種で最近縁種への距離は種内の距離を上回った。ただし、モノアラガイ属の一種Aの種内における距離の最大値（4.77%）は、最近縁種であるモノアラガイ属の一種Bとの間の距離（4.80%）よりわずかに小さいもののほとんど変わらない値を示した。

一方、ヒメタニシ、スクミリンゴガイ、ヒメモノアラガイ、モノアラガイ属の一種A、サカマキガイ、ヒラマキミズマイマイ、ヌマガイ、ドブシジミの8種では、種内の最大距離が2%を上回っており（表1、図5）、BOLDデータベース上では種内に複数のBINの存在が示された（表1、図2）。これらの種では、形態的に認識される種の中に、遺伝的に大きく隔たる複数のBINが存在することになる。結果として名古屋市産淡水貝類のDNAバーコードでは、種とBINで1:1対応するMatch種の10種に加え、1つの種が複数のBINに別れるSplit種が8種も存在するという結果が得られた（図6）。

考察

本研究では、名古屋市内に生息する淡水貝類の一斉調査が行われた機会をとらえ、名古屋市産の淡水貝類のDNAバーコードデータベースの構築を試みた。名古屋市産淡水貝類22種のうち、カワニナ、チリメンカワニナ、マシジミ、タイワンシジミの4種を除く18種については、形態に基づいて種同定された個体が系統樹上で単系統群を形成していた（図2）。ただし、モノアラガイ属の一種Aとモノアラガイ属の一種Bの間では、種内の遺伝的多様性を明瞭に上回るDNA配列上の距離が観察されず、これら両種をCOI遺伝子領域の塩基配列に基づいて識別

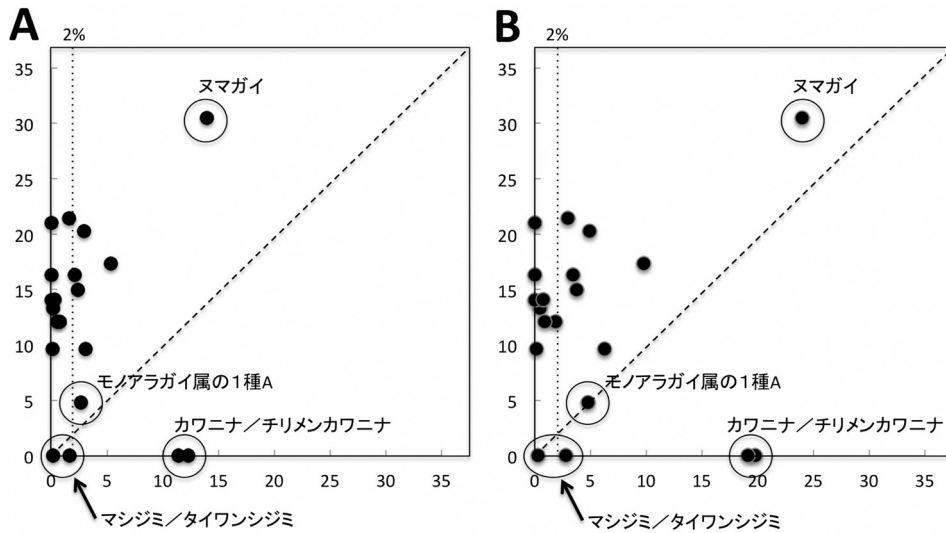


図5. 種内及び種間におけるDNA配列上の距離の関係。複数個体からDNAバーコードを取得した20種において、個体間のKimura 2-parameter距離の平均値（A）または最大値（B）を横軸に、それぞれの種から見た最も近縁な種（nearest neighbor）との最小距離を縦軸にプロットした。

Fig. 5. Intraspecific and interspecific sequence distances. For 20 species at which multiple individuals were sequenced, intraspecific Kimura 2-parameter distances on average (A) or at maximum (B) are plotted on the horizontal axis and interspecific nearest neighbor distances at minimum are plotted on the vertical axis.

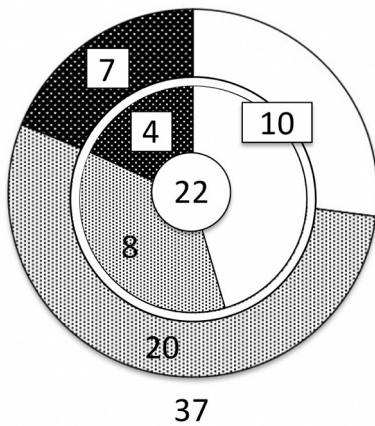


図6. 形態情報に基づく22種と分子情報に基づく37 BINの対応関係。図中の数字は、種とBINで1 : 1対応する（Match：白抜き）、1つの種が複数のBINに対応する（Split：薄い塗りつぶし）、1つのBINが複数の種に対応する（Merge：本研究では該当なし）、種とBINが複雑な対応関係を示す（Mixture：濃い塗りつぶし）のそれぞれのカテゴリについて、種数（内円）とBIN数（外円）を示す。

Fig. 6. A pie diagram for the correspondence between 22 species and 37 BINs. White areas show the 'Match' between the species and BIN. Thin-dotted areas show the 'Split' in which a species corresponds to multiple BINs. Thick-dotted areas show the 'Mixture' in which species and BINs do not correspond simply. In the present study, there is no case for the 'Merge' in which a BIN corresponds to multiple species.

することは有効と思われなかった。川瀬（2018）と川瀬ほか（2018）では、モノアラガイ属の一種Bを殻口の形態的な差異によりモノアラガイ属の一種Aと区別したが、モノアラガイ属の一種Bの形態を再確認したところ、体層に顕著な成長傷が見られ、それが原因で殻口が大きく広がった可能性が認められた。つまりモノアラガイ属の一種Bはモノアラガイ属の一種Aの殻口の奇形である可能性もあるため、両種をDNAバーコーディングによって識別する必要性は現時点で必ずしも明確でない。従って、以上の6種を除外した16種について、COI遺伝子の

塩基配列によって名古屋市産淡水貝類の種同定を容易に行える、実用的なDNAバーコードデータベースが構築できたと結論できる。

除外された6種のうち、カワニナとチリメンカワニナは系統樹上でそれぞれ単系統群を形成せず、両者をDNAバーコードによって区別することはできなかった。カワニナ類の種同定は成員の縦肋の有無が一つの重要な識別形質となり、縦肋が顕著な個体は概ねチリメンカワニナに帰属できるが、殻表が平滑で縦肋が現れない個体は必ずしもカワニナとは限らない（浦部，1992）。つま

りチリメンカワニナには縦肋の顕著なものだけでなく、縦肋のない平滑なものまで中間型を含めたパターンが存在する。軟体部に胎殻が残る標本は、それも精査して慎重に種同定を行ったが、胎殻における縦肋の有無については、成貝における縦肋の有無とは対応せず、遺伝子分析の結果とも対応しなかった。これについては、チリメンカワニナの成長した胎殻はほとんど縦肋型であるが、平滑な母貝の胎殻には3タイプ（胎殻の全てが縦肋をもつ「縦肋型」、全てが平滑な「平滑型」、縦肋のあるものと平滑なものが混在する「混合型」）全てが出現するという見解（浦部, 1992）とも合致する結果であった。系統樹が示す結果は、カワニナとチリメンカワニナ以外に複数種が存在する可能性も示唆しており、カワニナとチリメンカワニナ共に地域変異が著しく、複数種が含まれる可能性があるという増田・内山（2004）の見解とも一致する。すなわちカワニナとチリメンカワニナに関しては分類においてまだ混乱があり、その解決を行なったうえでDNAバーコーディングを再度実施すべきであると考え。なお、名古屋市内のカワニナとチリメンカワニナは、一時絶滅寸前まで激減したとされ、現在の生息個体はともに国内移入個体が定着したものではないかとの見解もある（川瀬, 2018）。

マシジミとタイワンシジミも系統樹上でそれぞれ単系統群を形成せず、両者をDNAバーコードによって区別することは困難であった。著者の森山と川瀬は、名古屋市の豊田市や岐阜市などから採集したマシジミとタイワンシジミについて、DNAバーコード領域の塩基配列を用いて系統解析を行なった。その結果も本研究と同様であり、両種の個体の塩基配列は、BOLD:ACF5867とBOLD:AAC2296の2つのBINに帰属する本研究の塩基配列と極めて近かった（森山・川瀬, 未発表データ；川瀬, 2016）。従って、両種に対して有効なDNAバーコードを取得できないという結果は、名古屋市内の個体に限ったことではない。他グループの分子解析でも、タイワンシジミとマシジミに共通するミトコンドリアDNAハプロタイプが認められ、両種を遺伝的に識別するのは困難であるとの結果が報告されている（山田ほか, 2010；Pigneur et al., 2014）。すなわち、タイワンシジミとマシジミがそれぞれ独立した種か否かについても分類学的な再検討が必要な状況であり、DNAバーコー

ドで両種を区別することを目指せる段階ではない。

名古屋市産淡水貝類22種のうち8種では、1つの種が複数のBINに別れるSplitのパターンを示した（図6）。この結果の解釈としては、1)これらの淡水貝類において、例外的に種の境界が他分類群よりも大きなDNA配列上の距離になっている、2)これらの種の中に、ほぼ別種とみなしてもよいほど大きく遺伝的に隔たった複数の系統がある、の2通りがありうる。ヒメタニシ（Hirano et al., 2015）、ヒラマキミズマイマイ（川瀬ほか, 2016）、ヌマガイ（Sano, et al., 2017）の種内において、DNA塩基配列の多様性が比較的高いことはすでに指摘されているが、種の境界とBINの関係は詳しく調べられていない。上記の8種のうちでは、ヌマガイの種内における遺伝的多様性が群を抜いて高くなっているが（表1, 図5）、これに関連して、ヌマガイを含む一部の二枚貝類で知られるミトコンドリアDNAの二重片親遺伝（Doubly uniparental inheritance）（Zouros, 2013; Gusman et al., 2016）が注目される。雄型と雌型という塩基配列が大きく異なるミトコンドリアDNAタイプが種内に共存し、それらが通常の母系遺伝とは異なった仕組みで遺伝するため、生殖腺が発達した時期をタイミングよくとらえてそれを注意深く分取するなどの特別な方法を用いない限り、両タイプを区別してシーケンスすることができない。本研究では、一律に足部筋肉組織からDNA分析用のサンプルを分取したが、この方法では両タイプのミトコンドリアDNAを厳密に区別できず、結果として種内に極めて高い塩基配列の多様性が観察された可能性がある。あるいは、二重片親遺伝のような特殊な遺伝様式を持つ本種において、ミトコンドリアDNA塩基配列の集団遺伝学的挙動が他種と大きく異なるであろうことが、この現象の背景にあるのかもしれない。

一方、外国産貝類に目を向けると、227種のカナダ産海水貝類についてDNAバーコーディングを実施した研究においては、種内の平均距離が2%を上回ったのは、複数個体を分析した147種のうち11種のみであり、これらの11種の中に隠蔽種が含まれる可能性が指摘されている（Layton et al., 2014）。淡水貝類については、例えばタイ産エゾマメタニシ科の10種についてのDNAバーコーディングが行われているが、種内の平均距離は2.3%であったと報告されている（Kulsantiwong et al.,

表2. BOLD データベースにおいて各BINを構成する個体の詳細

Table 2. Individuals currently affiliated in each BIN at the BOLD database

BIN ¹	本研究の標本の学名(個体数)	対応する和名	他の 個体数 ²	同一BINに属する他の個体の主な学名 (個体数)
ADM5181	<i>Cipangopaludina chinensis</i> (9)	マルタニシ	0	—
AAR9203	<i>Cipangopaludina japonica</i> (4)	オオタニシ	10	<i>Cipangopaludina japonica</i> (7), <i>Heterogen longispira</i> (3)
AAW2867	<i>Sinotaia quadrata</i> (7)	ヒメタニシ	234	<i>Bellamya aeruginosa</i> (86), <i>Bellamya purificata</i> (69), <i>Sinotaia quadrata</i> (19)
ACV7566	<i>Sinotaia quadrata</i> (2)	ヒメタニシ	4	<i>Bellamya aeruginosa</i> (2), <i>Bellamya lapillorum</i> (1), <i>Bellamya quadrata</i> (1)
AAA3844	<i>Pomacea canaliculata</i> (3)	スクミリンゴガイ	65	<i>Pomacea canaliculata</i> (65)
ACE7418	<i>Pomacea canaliculata</i> (2)	スクミリンゴガイ	14	<i>Pomacea canaliculata</i> (14)
ADM4650	<i>Melanoides tuberculata</i> (2)	スノメカワニナ	1	<i>Melanoides tuberculata</i> (1)
ADM4687	<i>Semisulcospira libertina</i> / <i>reiniana</i> (5)	カワニナ / チリメンカワニナ	0	—
ADK2249	<i>Semisulcospira libertina</i> / <i>reiniana</i> (3)	カワニナ / チリメンカワニナ	3	<i>Semisulcospira reiniana</i> (3)
ADM6867	<i>Semisulcospira libertina</i> (1)	カワニナ	1	<i>Semisulcospira reiniana</i> (1)
AAH9819	<i>Semisulcospira reiniana</i> (4)	チリメンカワニナ	7	<i>Semisulcospira libertina</i> (3), <i>Semisulcospira reiniana</i> (2), <i>Semisulcospira multigranosa</i> (1), <i>Semisulcospira nakasekoae</i> (1)
ADM5672	<i>Semisulcospira reiniana</i> (1)	チリメンカワニナ	0	—
ACD2692	<i>Austropeplea ollula</i> (4)	ヒメモノアラガイ	9	<i>Radix</i> sp. (6), <i>Austropeplea ollula</i> (2), <i>Galba pervia</i> (1)
ADM3385	<i>Austropeplea ollula</i> (5)	ヒメモノアラガイ	0	—
AAH7974	<i>Pseudosuccinea columella</i> (5)	ハブタエモノアラガイ	65	<i>Pseudosuccinea columella</i> (62)
ACH9751	<i>Radix</i> sp. A (4)	モノアラガイ属の一種A	2	<i>Radix</i> sp. (2)
ADM3973	<i>Radix</i> sp. A (3)	モノアラガイ属の一種A	0	—
ADM3972	<i>Radix</i> sp. B (1)	モノアラガイ属の一種B	0	—
AAB6433	<i>Physella acuta</i> (1)	サカマキガイ	12	<i>Physella acuta</i> (12)
AAZ1627	<i>Physella acuta</i> (5)	サカマキガイ	123	<i>Physella acuta</i> (94), <i>Physella anatina</i> (18), <i>Physella virgata</i> (2)
ACO6724	<i>Gyraulus chinensis</i> (2)	ヒラマキミズマイマイ	0	—
ACO7407	<i>Gyraulus chinensis</i> (4)	ヒラマキミズマイマイ	12	<i>Gyraulus chinensis</i> (5), <i>Gyraulus</i> sp. (7)
ADL0925	<i>Gyraulus chinensis</i> (2)	ヒラマキミズマイマイ	0	—
ADM5573	<i>Polypylis hemisphaerula</i> (4)	ヒラマキガイモドキ	0	—
ACH4973	<i>Hippeutis cantori</i> (5)	クルマヒラマキ	1	<i>Hippeutis cantori</i> (1)
AAX4717	<i>Menetus dilatatus</i> (3)	ヒロマキミズマイマイ	6	<i>Menetus dilatatus</i> (6)
AAE6642	<i>Laevapex nipponica</i> (5)	カワコザラガイ	15	<i>Ferrissia fragilis</i> (15)
ACO6671	<i>Sinanodonta lauta</i> (6)	ヌマガイ	0	—
ACO6784	<i>Sinanodonta lauta</i> (2)	ヌマガイ	0	—
ACO6785	<i>Sinanodonta lauta</i> (2)	ヌマガイ	0	—
ACX1363	<i>Sinanodonta lauta</i> (3)	ヌマガイ	13	<i>Sinanodonta woodiana</i> (13)
ADM4528	<i>Sinanodonta lauta</i> (2)	ヌマガイ	0	—
ACF5867	<i>Corbicula leana</i> / <i>fluminea</i> (7)	マシジミ / タイワンシジミ	116	<i>Corbicula fluminea</i> (37), <i>Corbicula leana</i> (28) <i>Corbicula</i> sp. (13), <i>Corbicula africana</i> (4)
AAC2296	<i>Corbicula fluminea</i> (4)	タイワンシジミ	559	<i>Corbicula fluminea</i> (41), <i>Corbicula leana</i> (8) <i>Corbicula largillierti</i> (2)
ACO7847	<i>Pisidium uejii</i> (1)	ウエジマメシジミ	0	—
ACQ5557	<i>Sphaerium japonicum</i> (2)	ドブシジミ	4	<i>Musculium kashmirensis</i> (4)
ADN9479	<i>Sphaerium japonicum</i> (4)	ドブシジミ	0	—

¹ BIN番号の先頭にあるBOLDの記述は省略する² BOLDデータベース上で同一のBINを構成する他の個体の数(公開データのみ)¹ The common 'BOLD' for all BIN numbers is omitted in this table² Number of other individuals sharing a BIN at the BOLD database

2013). ただし、個々の種を個別にみると種内の平均距離が2%を超えているのは10種中3種だけであり、淡水貝類において一律に種内の遺伝的多様性が増加していることを示唆するデータとは必ずしも解釈できない。これらの情報を総合すると、本研究でSplitのパターンを示した8種のなかに、種境界の距離において2%を超える種が含まれる可能性も否定できないが、形態的に区別できない未記載種を含む可能性も十分検討されるべきと思われる。

このような点を考察するために、本研究で分析した種の個体が属するBINに、BOLDデータベース上で他のどのような個体が登録されているかを調べた(表2)。ヒメタニシにはBOLD:AAW2867とBOLD:ACV7566の2つのBINが認識されたが、これらのBINには*Bellamya aeruginosa*や*Bellamya purificata*など中国や北ベトナムに分布するタニシ類の塩基配列が多く登録されていた。この結果は、ヒメタニシがこれらの大陸産種と同一種(シノニム)かあるいは極めて近縁な種であることを示唆するが、近過去に大陸と日本との間で移入があった可能性も含め、さらに深く検討することが必要である。スクミリングガイは南米から食用として導入された外来種と考えられているが、BOLD:AAA3844とBOLD:ACE7418のBINに別れた。両BINには、日本、中国、アルゼンチンから採集された個体の塩基配列が*Pomacea canaliculata*として登録されており、南米から両BINの系統が外来種として持ち込まれたものと推定される。

サカマキガイは欧米から帰化した外来種であると考えられているが、本研究ではBOLD:AAB6433とBOLD:AAZ1627の2つのBINに分かれた。BOLDデータベースにおいて、前者のBINには欧州(ギリシャ、マケドニア、フランス)や中東(イラン)に産する*Physella acuta*の塩基配列が登録され、後者のBINにはアメリカ(カリフォルニアやアリゾナ)産の*Physella acuta*, *Physella anatina*, *Physella virgata*の塩基配列が登録されていた(表2)。両BINの外国産個体の地理的分布に大きな偏りがあることから、両者は由来が異なる2系統である可能性も考えられる。本研究で分析したカワコザラガイはAAE6642の単一のBINに帰属したが、このBINには欧州(イタリア、ギリシャ、アルバニア、

ポーランド)や台湾、フィリピン由来のメリケンコザラ(*Ferrissia fragilis*)も帰属していた(表2)。これについては、過去に報告された国内のカワコザラガイの多くの記録が、外来種のメリケンコザラである可能性を指摘した報告もあり(沖縄県環境部自然保護課, 2017)、この点についての今後の詳しい研究が待たれる。同様に日本の在来種と考えられているドブシジミに対して与えられたBINの一つ(BOLD:ACQ5557)には、中国チベットの高地に産する*Musculium kashmirensis*が4個体属していた(表2)。ドブシジミと*M. kashmirensis*の関係についても今後の研究が期待される。

本研究では、名古屋市産の淡水貝類のDNAバーコーディングを行い、実用的なDNAバーコードデータベースを構築するとともに、名古屋市産淡水貝類の種多様性について考察を加えた。名古屋圏の動物を題材とした同様の研究は、貝類に限らず昆虫類(コメツキムシやゾウムシ)でも近年報告されている(Oba et al., 2015; 井上・熊澤, 2017)。このような取組みを通して、身近な生きものの知られざる多様性が明らかになり、その保全や持続的利用に生かされることを願っている。

謝辞

なごや生物多様性保全活動協議会及び名古屋市環境局なごや生物多様性センターには、淡水貝標本の収集において多大なご協力を賜り厚く御礼申し上げる。現地調査に御協力頂いた鶴飼普氏、採集した貝類標本の仕分けや同定の作業に御協力下さった酒井類氏、浅香智也氏、井上恵介氏を始めとする皆様に感謝申し上げます。本研究は、名古屋市立大学特別研究奨励費(地域貢献型共同研究の推進事業No. 15)による助成のもと、名古屋市立大学共用機器センターのDNAシーケンサー(3500 Genetic Analyzer)を用いて行った。

引用文献

- 愛知県移入種データブック検討会(編). 2012. 愛知県の移入動植物—ブルーデータブックあいち2012. 愛知県環境部自然環境課, 愛知. 225 pp.
- 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: 294-299.
- Gusman, A., S. Lecomte, D.T. Stewart, M. Passamonti, and S. Breton. 2016. Pursuing the quest for better understanding the taxonomic distribution of the system of doubly uniparental inheritance of mtDNA. *PeerJ*, 4: e2760.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball, and J.R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270: 313-321.
- Hirano, T., T. Saito, and S. Chiba. 2015. Phylogeny of freshwater viviparid snails in Japan. *Journal of Molluscan Studies*, 81: 435-441.
- 井上晶次・熊澤慶伯. 2017. 名古屋市を中心とした愛知県及び近隣県産ゾウムシ類のDNAバーコーディング. なごやの生物多様性. 4: 23-29.
- 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 (編). 豊田市生物調査報告書〈分冊その1〉. pp. 309-341. 口絵13-15. 豊田市.
- 川瀬基弘. 2018. なごや生きもの一斉調査・2017～なごやで探そう! 水の中の妖精～淡水貝編 報告書. なごや生物多様性保全活動協議会, 名古屋. 40 pp.
- 川瀬基弘・市原 俊・寺本匡寛・鶴飼 普. 2018. 名古屋市の淡水産貝類. なごやの生物多様性, 5: 33-45.
- 川瀬基弘・松原美恵子・森山昭彦. 2016. 愛知県西三河地域から採集されたヒラマキガイ属3種: 形態と遺伝子情報による解析. 陸の水, 74: 43-48.
- Klussmann-Kolb, A., A. Dinapoli, K. Kuhn, B. Streit, and C. Albrecht. 2008. From sea to land and beyond – new insights into the evolution of euthyneuran Gastropoda (Mollusca). *BMC Evolutionary Biology*, 8: 57.
- Kulsantiwong, J., S. Prasopdee, J. Ruangsittichai, W. Ruangjirachuporn, T. Boonmars, V. Viyanant, P. Pierossi, and P.D.N. Hebert. 2013. DNA barcode identification of freshwater snails in the family Bithyniidae from Thailand. *PLoS ONE*, 8: e79144.
- Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-1874.
- Layton, K.K.S., A.L. Martel, and P.D.N. Hebert. 2014. Patterns of DNA barcode variation in Canadian marine molluscs. *PLoS ONE*, 9: e95003.
- 増田 修・内山りゅう. 2004. 日本産淡水貝類図鑑②汽水域を含む全国の淡水貝類. ピーシーズ, 東京. 240 pp.
- Meyer, C.P., and G. Paulay. 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*, 3: e422.
- 名古屋市動植物実態調査検討会 (監). 2004. レッドデータブックなごや2004—動物編—. 名古屋市環境局環境都市推進部環境影響評価室, 名古屋. 368 pp.
- 名古屋市環境局環境企画部環境活動推進課. 2015. 名古屋市の絶滅のおそれのある野生生物 レッドデータブックなごや2015—動物編—. 名古屋市環境局環境企画部環境活動推進課, 名古屋. 504 pp.
- Oba, Y., H. Ôhira, Y. Murase, A. Moriyama, and Y. Kumazawa. 2015. DNA barcoding of Japanese click beetles (Coleoptera, Elateridae). *PLoS ONE*, 10: e0116612.
- 沖縄県環境部自然保護課 (編). 2017. 改訂・沖縄県の絶滅のおそれのある野生生物 第3版 (動物編)—レッドデータおきなわ—. 沖縄県環境部自然保護課, 那覇. 712pp.
- Pigneur, L.-M., E. Etoundi, D.C. Aldridge, J. Marescaux, N. Yasuda, and K. van Doninck. 2014. Genetic uniformity and long-distance clonal dispersal in the invasive androgenetic *Corbicula* clams. *Molecular Ecology*, 23: 5102-5116.
- Ratnasingham, S. and P.D.N. Hebert. 2013. A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) system. *PLoS ONE*, 8: e66213.
- Sano, I., A. Shirai, T. Kondo, and J.-I. Miyazaki. 2017. Phylogenetic relationships of Japanese Unionoida (Mollusca: Bivalvia) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Journal of Water Resource and Protection*, 9: 493-509.
- 田中守彦. 1964. 名古屋市産淡水貝類の研究 (謄写版). 20 pp.
- 浦部美佐子. 1992. 同一河川におけるカワニナ2種の判別

と形態比較. *Venus* 50: 270-286.

山田充哉・石橋亮・河村功一・古丸明. 2010. ミトコンドリア DNA のチトクローム *b* 塩基配列および形態から見た日本に分布するマシジミ, タイワンシジミの類縁関係. *日本水産学会誌*. 76: 926-932.

Zouros, E. 2013. Biparental inheritance through uniparental transmission: the doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Evolutionary Biology*, 40: 1-31.