

名古屋市に棲息するオオケマイマイ *Aegista vulgivaga* の CO I 遺伝子からみた分子系統学的位置付け

川瀬 基弘⁽¹⁾ 西尾 和久⁽²⁾ 松原 美恵子⁽³⁾
市原 俊⁽⁴⁾ 森山 昭彦⁽⁵⁾ 熊澤 慶伯⁽⁶⁾

⁽¹⁾ 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

⁽²⁾ I F F 東海 〒496-0013 愛知県津島市神尾町東之割7-3

⁽³⁾ 名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科 〒467-8501 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町山の畑1

⁽⁴⁾ 名古屋文理大学短期大学部 〒451-0077 愛知県名古屋市西区笹塚町2-1

⁽⁵⁾ 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

⁽⁶⁾ 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

Molecular phylogenetic characterization of *Aegista vulgivaga* individuals found in Nagoya City

Motohiro KAWASE⁽¹⁾ Kazuhisa NISHIO⁽²⁾
Mieko SUZUKI-MATSUBARA⁽³⁾ Takashi ICHIHARA⁽⁴⁾
Akihiko MORIYAMA⁽⁵⁾ Yoshinori KUMAZAWA⁽⁶⁾

⁽¹⁾ Department of Human Science, Aichi Mizuho College, 2-13 Shunko-cho, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-0867, Japan.

⁽²⁾ IFF Tokai, 7-3 Higashinowari, Kanno-cho, Tsushima, Aichi 496-0013, Japan.

⁽³⁾ Graduate School of Natural Sciences, Nagoya City University, 1 Yamanohata, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8501, Japan.

⁽⁴⁾ College of Nagoya Bunri University, 2-1 Sasatsuka-cho, Nishi-ku, Nagoya, Aichi 451-0077, Japan.

⁽⁵⁾ Department of Environmental Biology College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University, 1200 Matsumoto-cho, Kasugai, Aichi 487-8501, Japan.

⁽⁶⁾ Research Center for Biological Diversity, Graduate School of Natural Sciences, Nagoya City University, 1 Yamanohata, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8501, Japan.

Correspondence:

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

要旨

新潟県、埼玉県から広島県にかけての各地で採取されたオオケマイマイ *Aegista vulgivaga* (Schmacker & Boettger, 1890) のミトコンドリアDNAを分析し、種内の系統関係を調べた。その結果、各地のオオケマイマイ個体群は8系統に分かれた。名古屋市守山区と中区または瑞穂区で確認したオオケマイマイの個体間では、平均23塩基(3.5%)の違いが認められたため、両地点のオオケマイマイは異なる系統のものと判断された。

序文

オオケマイマイ *Aegista vulgivaga* (Schmacker & Boettger, 1890) は (図1), オオベソマイマイ属 *Aegista* ケマイマイ亜属 *Plectotropis* の偏平なレンズ形の陸貝で, 周縁には殻皮毛 (鱗片状の剛毛) が放射状に列生している (東, 1995). 殻皮毛は幼貝や若貝では顕著に現れるが, 老成貝では摩耗等により, ほとんど確認できなくなる. 本州 (関東・越後・佐渡以南, 中部, 近畿, 中国), 四国地方に分布し (湊, 1988; 肥後・後藤, 1993; 東, 1995), 比較的自然度の高い林内や石灰岩地帯に多く棲息する. 岐阜県岐阜市の環境を, 山地, 山麓~平地, 平地の3つに区分した調査では, オオケマイマイが山地に優占することが示されている (川瀬ほか, 2012).

名古屋市では, 上述したような環境は少なく, 生息地, 個体数ともに減少していると思われ, 準絶滅危惧 (NT) に選定されている (名古屋市環境局環境企画部環境活動推進課, 2015). 名古屋市では, 中区 (三の丸1丁目付近; 護国神社~名古屋城外堀), 守山区 (竜泉寺1丁目付近; 竜泉寺ウォーターパーク跡地付近および周辺の河畔林), 瑞穂区 (村上町村上神社及び周辺民家の庭など) の三ヶ所で飛び地的に確認されている (名古屋市環境局環境企画部環境活動推進課, 2015).

おそらく高度経済成長期以前の自然がよく残っていた時期には, オオケマイマイが名古屋市の広範囲に分布していたと考えられる. しかし, 開発が進み生息域が分断された結果, 現在は上述した三ヶ所 (中区, 守山区, 瑞

穂区) に飛び地的に生き残った可能性が考えられる. もしそうであれば, 三ヶ所の個体群は互いに遺伝的に極めて近いと推定される. これを検証するために全国の分布域の個体におけるシトクロムオキシダーゼサブユニット I (COI) 遺伝子の塩基配列をあわせて分析し, 名古屋市個体群の系統的位置付けを推定した.

材料および方法

新潟県, 埼玉県から広島県にかけてのオオケマイマイの各地でのサンプリングは, 目視による個体採取を中心に行った (表1, 図2). 標本の採取許可が必要な場合は各自治体の許可を得て調査および採取を行った. 各地点最大で5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, DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden) 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 COI 遺伝子の一部 (655bp) を増幅した. PCR には, TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (タカラバイオ株式会社, 滋賀) 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℃ 1分の加熱後, 98℃ 5秒 / 50℃ 15秒 / 72℃ 10秒を 30 サイクル, 72℃ 30秒で行った. PCR 産物を ExoSAP-IT (Affymetrix, CA) で処



図1. オオケマイマイの生態写真

左: 老成して殻皮毛が擦り切れた個体 (名古屋市瑞穂区), 右: 殻皮毛が十分に残っている個体 (静岡県浜松市北区)

表1. サンプル採集地点およびDNA塩基配列の登録番号

地点No.	採集地点	INSD登録番号	地点No.	採集地点	INSD登録番号
1	新潟県糸魚川市小滝 (明星山)	LC514074	22	愛知県豊川市千両町上千両	LC514081
2	* 新潟県糸魚川市 (明星山)	AB852685	23	* 愛知県豊橋市石巻町	AB852694
3	埼玉県秩父市上影森 (武甲山)	LC514093	24	滋賀県米原市藤川	LC514095
4	* 石川県白山市白峰	AB852686	25	滋賀県米原市醒井	LC514071
5	福井県大野市西勝原 a	LC514070	26	* 滋賀県犬上郡多賀町	AB852688
	福井県大野市西勝原 b	LC514083	27	三重県いなべ市藤原町篠立 a	LC514086
6	* 長野県飯田市	AB852696		三重県いなべ市藤原町篠立 b	LC514087
7	岐阜県中津川市駒場 a	LC514101		三重県いなべ市藤原町篠立 c	LC514088
	岐阜県中津川市駒場 b	LC514102	28	* 三重県いなべ市 (藤原岳)	AB852687
	岐阜県中津川市駒場 c	LC514103	29	三重県鳥羽市河内町奥河内	LC514089
	岐阜県中津川市駒場 d	LC514104	30	三重県多気郡大台町大杉	LC514073
8	岐阜県恵那市大井町丸池	LC514105	31	* 京都府京都市左京区	AB852689
9	岐阜県岐阜市三輪	LC514069	32	大阪府柏原市峠 a	LC514091
10	岐阜県揖斐郡揖斐川町春日川合 (伊吹山)	LC514094		大阪府柏原市峠 b	LC514092
11	岐阜県不破郡垂井町岩手	LC514085	33	* 大阪府河内長野市滝畑	AB852693
12	静岡県伊豆市湯ヶ島	LC514106	34	兵庫県洲本市五色町上堺 (淡路島) a	LC514077
13	静岡県浜松市北区引佐町兎荷 a	LC514099		兵庫県洲本市五色町上堺 (淡路島) b	LC514078
	静岡県浜松市北区引佐町兎荷 b	LC514100	35	* 和歌山県新宮市	AB852692
14	静岡県浜松市北区引佐町田畑 a	LC514079	36	* 和歌山県東牟婁郡那智勝浦町 (那智山)	AB852691
	静岡県浜松市北区引佐町田畑 b	LC514080	37	和歌山県東牟婁郡古座川町川口 a	LC514096
15	* 静岡県浜松市北区引佐町	AB852695		和歌山県東牟婁郡古座川町川口 b	LC514097
16	愛知県春日井市大留町1丁目	LC514090	38	和歌山県東牟婁郡古座川町明神	LC514072
17	名古屋市守山区竜泉寺1丁目 a	LC514109	39	鳥取県西伯郡大山町大山 (大山)	LC514084
	名古屋市守山区竜泉寺1丁目 b	LC514110	40	岡山県真庭市神庭	LC514075
18	名古屋市中区三の丸1丁目 (護国神社) a	LC514107	41	* 岡山県高梁市成羽町	AB852690
	名古屋市中区三の丸1丁目 (護国神社) b	LC514108	42	広島県庄原市東城町帝釈宇山	LC514076
19	名古屋市瑞穂区村上町2丁目 (村上神社) a	LC514111	43	* オオケマイマイ 宮城県仙台市青葉区 (青葉山)	AB852681
	名古屋市瑞穂区村上町2丁目 (村上神社) b	LC514112	44	* ウニケマイマイ 山形県鶴岡市湯野浜	AB852669
20	愛知県新城市有海	LC514098	45	* コウニケマイマイ 山形県酒田市 (飛鳥)	AB852666
21	愛知県新城市徳定	LC514082			

地点No. は採集地点 (図2) に対応する。採集地点に*を付したものはHirano *et al.* (2014) のデータを使用したことを示す。登録番号はINSD (International Nucleotide Sequence Database) のアクセッション番号を示す。

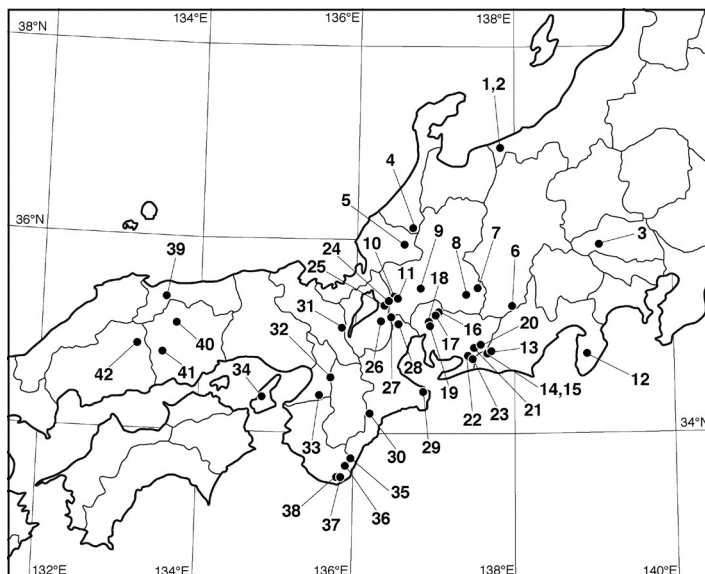


図2. オオケマイマイの採集地点
番号は表1の地点No.に対応する。

理した後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA) を用いて蛍光ラベルし、Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA) により塩基配列の解読を行った。

決定した塩基配列は、表1に記すアクセッション番号で国際塩基配列データベース (International Nucleotide Sequence Database; INSD) に登録した。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 Natural Sciences, Nagoya City University: 名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科標本庫) に収蔵されている。殻標本については、筆者の西尾と川瀬が所蔵している。

分子系統解析は、MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) を用いて、近隣結合法により行なった。本研究用にサンプリングした44個体のオオケマイマイおよびHirano *et al.* (2014) の研究に用いられたオオケマイマイ12個体のCOI遺伝子データをあわせて分子系統樹を作成した。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、Hirano *et al.* (2014) の *Aegista* (*Plectotropis*) *deflexa* コウニケマイマイ, *A. (P.) horrida* ウニケマイマイ, *A. (P.) pannosa* オオケマイマイを使用した。

結果

本研究では、オオケマイマイ1種44個体の標本について、COI遺伝子の塩基配列を解読した (表1)。これらの新規に取得した塩基配列データに加えてHirano *et al.* (2014) のオオケマイマイ12個体のデータをあわせて分子系統解析を行った (図3)。

新潟県、埼玉県から広島県にかけてのオオケマイマイは、大きくA~Hの8つの系統 (群) に分かれた。A系統群には、福井県と岐阜県の個体が含まれ、福井県大野市の2個体には塩基配列に多少の差異が見られ、岐阜県中津川市の4個体の塩基配列は一致した。B系統群には、静岡県、岐阜県、長野県、愛知県の個体が含まれた。静岡県浜松市北区引佐町兎荷と引佐町田畑の2個体ずつの塩基配列はそれぞれ一致した。愛知県新城市有海と新城市徳定とは直線距離で6 km程度離れているが塩基配

列が一致した。名古屋市守山区の2個体には塩基配列に6塩基の違いが見られた。C系統群には、岐阜県、滋賀県、三重県の個体が含まれ、三重県いなべ市藤原町の3個体の塩基配列は一致した。D系統群には、新潟県、埼玉県、静岡県、愛知県、大阪府、三重県の個体が含まれた。名古屋市中区と名古屋市瑞穂区の2個体ずつの塩基配列はそれぞれ一致したが、中区と瑞穂区の塩基配列の間では2塩基の違いが見られた。大阪府柏原市の2個体は塩基配列が異なりD系統群とE系統群に分かれた。E系統群には、大阪府、和歌山県、兵庫県の個体が含まれた。和歌山県古座川町川口の2個体には塩基配列に多少の差異が見られた。兵庫県洲本市の2個体の塩基配列は一致した。F系統群には、石川県、和歌山県、岡山県の個体が含まれた。それぞれの枝長は極めて長く、他の系統群の全ての個体の塩基配列との間で大きな差異がみられた。G系統群には、滋賀県と京都府の個体が含まれた。H系統群には、鳥取県、岡山県、広島県の個体が含まれ、広島県庄原市東城町帝釈宇山と鳥取県西伯郡大山町大山 (大山) とは直線距離で65 km程度離れているが塩基配列が一致した。D系統群とF系統群を除く6つの系統群 (A, B, C, E, G, H系統群) には地域的なまとまりがみられ、隣接する2~4府県内に分布していた。なお、名古屋市の個体間における塩基配列の差異は、中区または瑞穂区と守山区の個体間で22/654塩基と24/654塩基、中区と瑞穂区で2/654塩基、守山区の2個体間で6/654塩基であった。

考察

今回分析した30地点44個体のサンプルは、殻皮毛 (鱗片状の剛毛) の疎密や殻の大小に多少の変異はあるものの、形態的に全てオオケマイマイに同定できた。

F系統群の石川県白山市白峰、和歌山県東牟婁郡那智勝浦町 (那智山)、岡山県高梁市成羽町の各個体については、それぞれ塩基配列が大きく異なったが、その原因は現時点で不明である。いずれも1個体のみの分析であるため、同一地点におけるサンプル数を増やしても同様の結果になるか否かの検証が必要であろう。

コウニケマイマイ、ウニケマイマイ、オオケマイマイの外群3種からなるクレードは、オオケマイマイの姉妹群であるが (Hirano *et al.*, 2014)、これらの3種は東

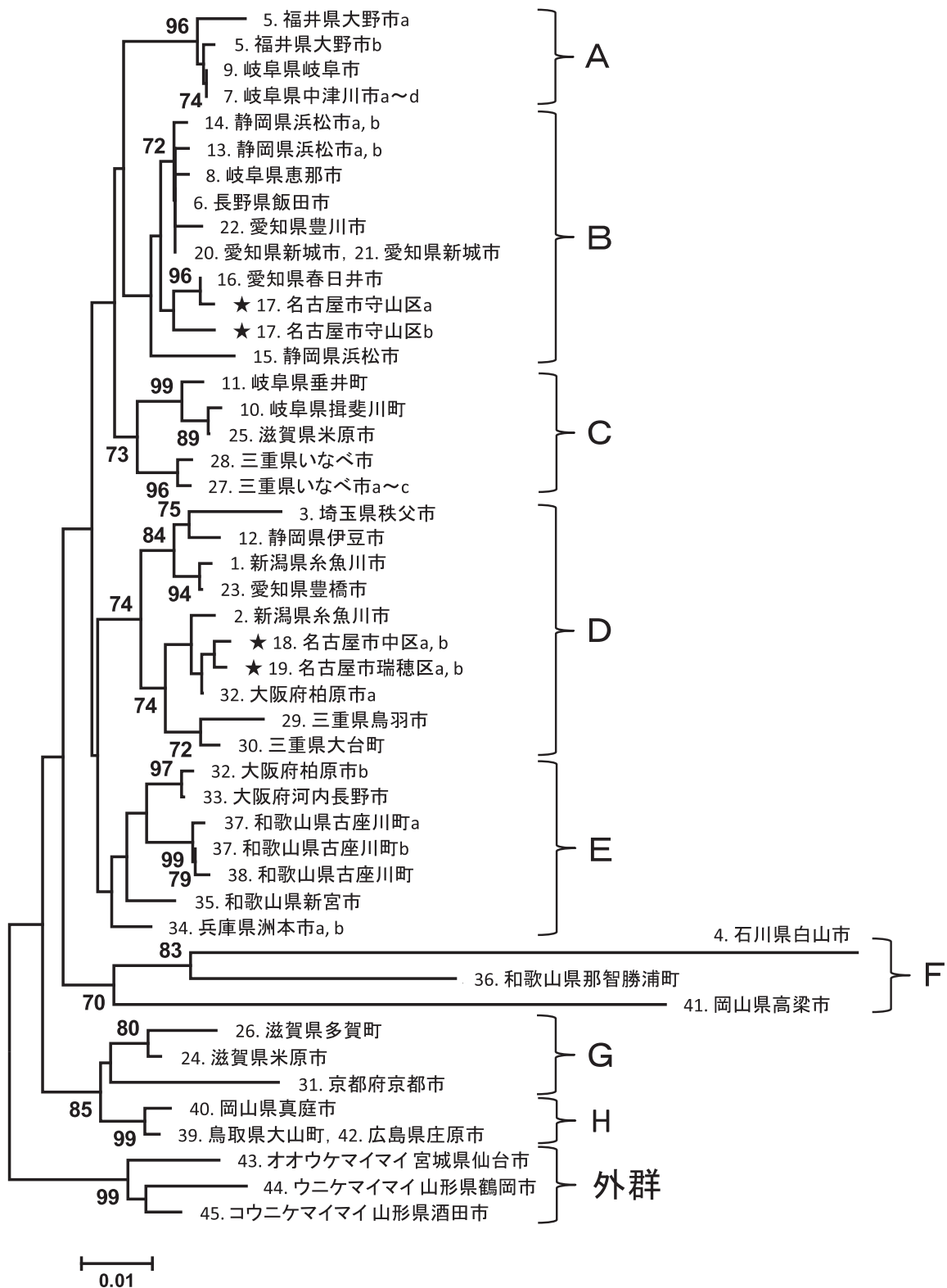


図3. COI 遺伝子塩基配列を用いて作成したオオケマイマイの近隣結合系統樹
各結節点に示した数字は、ブートストラップ確率を示す。外群にはコウニケマイマイ、ウニケマイマイ、オオウケマイマイ（INSD; International Nucleotide Sequence Database: AB852666; AB852669; AB852681）を用いた。

北地方を中心とした分布域を持っている。オオケマイマイの共通祖先は、これら3種と東日本で系統分岐したのち、分布を西に拡大し、その結果、関東、甲信越～近畿地方のやや広域に分布する個体群 (D系統群) および隣接する2～4都府県にまたがる程度の地域個体群 (A, B, C, E, G, H系統群) が形成された可能性も考えられる。

名古屋市のオオケマイマイ個体群は、守山区、中区、瑞穂区の3地域に棲息し、守山区の2個体の塩基配列には多少の差異がみられたが、1個体は愛知県春日井市の塩基配列に近い結果を示し、B系統群に包含された。名古屋市守山区の個体群を含むB系統群は、静岡県西部、岐阜県東濃地域、長野県南部および愛知県の個体群で構成され、広域分布を示すD系統群に属する名古屋市中区と瑞穂区の個体群とは系統が異なる結果が示された。

ここで名古屋市のオオケマイマイ個体群の起源に関して3つの可能性を考える。1つめは、名古屋市の広域に分布していた同一集団が、近年の開発等で分断された結果、系統の異なる小分集団に別れた可能性、2つめは、名古屋市にもともと系統の大きく異なる複数の独立した個体群があり、これらが別々の小集団に分配された可能性、3つめは、守山区、瑞穂区、中区のいずれかの個体群が最近の国内移入であるという可能性である。ここで、守山区2個体と中区／瑞穂区の個体間の塩基配列の平均相違度は $23/654 \text{塩基} \times 100 = 3.5\%$ である。22-24塩基 (平均3.5%) の違いは、数百年程度の短い期間に形成される変異量ではなく、多くの種の内部で見られる相違度 (2%以内; Hebert *et al.* 2003) よりも大きいため、一見すると上記の1つめの可能性と整合しないようにも思われる。ただし貝類の多くの種では、脊椎動物や昆虫などと比べて、種内の個体間に包含される遺伝的多様性が比較的大きいことを示唆する研究結果が報告されている (例えば川瀬ほか2014, 2016, 2017, 2018; 熊澤ほか, 2018)。従って、1つめの可能性も完全に否定されるものではないと考える。

これらの状況証拠を最も素直に解釈すれば、3つめの可能性が最有力であると考えられる。B系統群の分布域に比べて、D系統群の方が広域分布を示すため、名古屋市の3区の個体群に移入の可能性があるとするれば、D系統群に属する中区や瑞穂区の個体群が移入された可能性が高いであろう。ただしもともと系統の異なる2つ以上

の独立個体群が名古屋市に分布をひろげていて、これらが開発等によって別々の個体群に分配され現存するという2つめの可能性も否定されるものではない。図3の系統樹において、滋賀県米原市の近接した2地点 (24と25) から採集された個体の遺伝子は、別々のグループ (それぞれGとC) に位置付けられた。同様に、大阪府柏原市の32番の地点から採集された2個体の遺伝子は、異なるグループ (DとE) に位置している。これらの結果は、同一の市町村に複数の大きく隔たった遺伝子系統が共存しうることの他の実例であり、名古屋市の事例同様にその起源が興味深い。

名古屋市中区と名古屋市瑞穂区のサンプルは、それぞれ2個体ずつ分析したところ、それぞれ塩基配列が一致するとともに両区の塩基配列は最も近い値を示した。しかし、名古屋市守山区竜泉寺の分析した2サンプルの塩基配列には多少の差異があり、1つのサンプルは愛知県春日井市大留町と塩基配列に近い結果となった。このためさらにサンプル数が増えると異なる塩基配列の個体が増える可能性があるため、今後は名古屋市のサンプルをもう少し追加分析することが望まれる。また、分布域内で十分なサンプルが得られていない関東、甲信越地方、奈良県、兵庫県 (本土)、四国地方などのサンプリングと分析も必要である。

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。「あいちの海」グリーンマップの大矢美紀氏には名古屋市瑞穂区のオオケマイマイを、岐阜市自然環境基礎調査調査員の村瀬文好氏には滋賀県米原市醒井のオオケマイマイをご提供いただいた。また、本研究は、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。以上の方々および機関にこの場を借りてお礼申し上げる。

引用文献

東 正雄. 1995. 原色日本陸産貝類図鑑 増補改訂版. 保育社, 大阪. 343 pp.

- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. 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.
- 肥後俊一・後藤芳央. 1993. 日本及び周辺地域産軟体動物総目録. エル貝類出版局, 八尾. 693 pp.
- 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. Yuichi Kameda, Kazuki Kimura, Satoshi Chiba. 2014. Substantial incongruence among the morphology, taxonomy, and molecular phylogeny of the land snails *Aegista*, *Landouria*, *Trishoplita*, and *Pseudobuliminus* (Pulmonata: Bradybaenidae) occurring in East Asia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 70, 171-181.
- 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.
- 川瀬基弘・村瀬文好・早瀬善正・市原俊・吉村卓也・山内貴司・横山貴則. 2012. 岐阜市に生息する陸産貝類. *瀬木学園紀要*, 6: 19-36.
- 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.
- 川瀬基弘・西尾和久・松原美恵子・森山昭彦. 2017. 西尾市のミカワギセルについて—愛知県指定天然記念物(西尾市のミカワギセル生息地)および模式産地(三ヶ根山)を調査して—. *新編西尾市史研究*, 3: 86-94.
- 川瀬基弘・西尾和久・森山昭彦・市原俊. 2014. 新城市のヒラマイマイ. *鳳来寺山自然科学博物館館報*, 43: 99-100.
- 熊澤慶伯・松原美恵子・横山悠理・寺本匡寛・村瀬幸雄・那須健一郎・孫 壺・森山明彦・川瀬基弘. 2019. 名古屋市産淡水貝類のDNAバーコーディング. *なごやの生物多様性*, 6: 1-14.
- 湊 宏. 1988. 日本陸産貝類総目録. 日本陸産貝類総目録刊行会, 白浜. 294 pp., 7 pls.
- 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. 504pp.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725-2729.