

岐阜県で再発見されたヨコハマシジラガイ *Inversiunio jokohamensis* の COI 遺伝子に基づく分子系統学的位置付け

Molecular phylogenetic characterization of *Inversiunio jokohamensis* individuals rediscovered in Gifu Prefecture, Japan

川瀬 基弘*・松原 和純**・横井 敦史***・市原 俊****・熊澤 慶伯***

* 愛知みずほ大学人間科学部

** 中部大学応用生物学部環境生物科学科

*** 名古屋市立大学大学院理学研究科

**** 名古屋文理大学短期大学部

KAWASE Motohiro*, MATSUBARA Kazumi**, YOKOI Atsushi***,

ICHIHARA Takashi****, and KUMAZAWA Yoshinori***

* Faculty of Human Sciences, Aichi Mizuho College

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

*** Graduate School of Science, Nagoya City University

**** College of Nagoya Bunri University

要旨

2024年に岐阜県の揖斐川本流から、岐阜県で絶滅危惧Ⅰ類に指定されているヨコハマシジラガイ *Inversiunio jokohamensis* が再発見された。ミトコンドリアDNAを解析し、同種内における地域間の系統的多様性を推定した。ミトコンドリアCOI遺伝子配列の解析により、岐阜県の個体は、青森県、山形県、茨城県、新潟県産個体とは異なる塩基配列を有し、地域ごとの高い遺伝的多様性が示唆された。

Abstract

Inversiunio jokohamensis, an endangered species in Gifu Prefecture, was rediscovered in 2024 in the main stream of the Ibi River. To assess the phylogenetic diversity of *I. jokohamensis* across local populations, mitochondrial DNA was analyzed. Analysis of the mitochondrial COI gene sequences revealed that individuals from Gifu differ genetically from those in Aomori, Yamagata, Ibaraki, and Niigata Prefectures, indicating high genetic diversity among regional populations.

キーワード: ヨコハマシジラガイ; オトコタテボシガイ属; オトコタテボシガイ; ニセマツカサガイ; ミトコンドリアCOI遺伝子

Key Word: *Inversiunio jokohamensis*; *Inversiunio*; *Inversiunio reinianus*; *Inversiunio yanagawensis*; mitochondrial COI gene

I. はじめに

ヨコハマシジラガイ *Inversiunio yokohamensis* (Ihering, 1893) (図 1-1~3) は、三重県以東の本州（日本海側は兵庫県以東）および北海道に棲息するイシガイ科オトコタテボシガイ属の日本固有種である¹⁾。国内に棲息する同属の近縁種には、本種の他に琵琶湖淀川水系に分布するオトコタテボシガイ *Inversiunio reinianus* (Kobelt, 1879) (図 1-6,7) および滋賀県以西の本州（日本海側は鳥取県以西）、四国、九州に分布するニセマツカサガイ *Inversiunio yanagawensis* (Kondo, 1982) (図 1-8) の 2 種が存在する¹⁾。これらはミトコンドリア COI 遺伝子によっても 3 種に識別できることが示されている²⁾。いずれも稀少種であり、環境省レッドリスト 2020 では、ヨコハマシジラガイは準絶滅危惧、オトコタテボシガイとニセマツカサガイは絶滅危惧Ⅱ類に選定されている³⁾。

ヨコハマシジラガイは、岐阜県では絶滅危惧Ⅰ類に指定されており⁴⁾、筆者の川瀬と横井による 2014~2023 年度の岐阜県レッドデータブック改訂調査では本種を発見することができなかった。2018 年および 2021 年に岐阜市内で発見され、殻形態によりヨコハマシジラガイに同定された個体については、その後の遺伝子分析の結果、全てマツカサガイ *Ponodularia japonensis* (Lea, 1834) の誤同定と判明した。その後、2024 年に揖斐川本流において、殻形態によりヨコハマシジラガイに同定できる個体が再発見された。本研究は、それらの個体について DNA 解析を行った結果を報告するものである。

木村⁵⁾と木村・中西⁶⁾による岐阜県のヨコハマシジラガイの記録は 4 地点あるが、発見当初から個体数は少なく、河川改修工事や自然環境の悪化により、今日ではいずれにおいても絶滅または絶滅寸前である。

このように岐阜県のヨコハマシジラガイは、絶滅危惧に選定されたイシガイ科二枚貝の中でも最も絶滅の危険性が高く、棲息記録自体が重要であるため、ミトコンドリア COI (ミトコンドリアチトクロム c オキシダーゼサブユニット I: mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I) 遺伝子分析を実施し、分子系統解析を行なった。

II. 材料および方法

岐阜県揖斐川におけるヨコハマシジラガイのサンプリングは、鋤簾およびタモ網による個体採取を中心に行った。調査及び採集は、岐阜県レッドデータブック調査の一環で 2024 年 8 月 7 日と 2025 年 4 月 30 日にそれぞれ 2 時間ずつ実施した。稀少種のため詳細な調査位置情報の言及を避けた。ヨコハマシジラガイ 5 個体を採取し、このうち 3 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斧足の一部（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 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 HCO2198⁷⁾を用いた。PCR 条件は初期変性 94℃1 分、次いで 98℃5 秒（変性）/50℃15 秒（アニーリング）/72℃10 秒（伸長）を 30 サイクル、最終伸長 72℃30 秒とした。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 11⁸⁾を用いて、最尤法により行なった。本研究用に分析した 3 個体のヨコハマシジラガイおよび Lopes-Lima et al.²⁾や Sano et al.⁹⁾に示された同種とその近縁種の塩基配列および筆者らがサンプリングし、新たに塩基配列を解読したオトコタテボシとニセマツカサガイの COI 遺伝子データにより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。外群には岐阜県岐阜市太郎丸で採集したイシガイ *Nodularia douglasiae* (Gray in Griffith & Pidgeon, 1833) を使用した。

III. 結果

本研究では、筆者らが採集した岐阜県揖斐川産ヨコハマシジラガイ 3 個体、滋賀県琵琶湖産オトコタテボシガイ 2 個体、岡山県岡山市産ニセマツカサガイ 1 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. 分析標本の採集地と登録番号

No.	DNA登録番号	和名・学名	採集地	図1
1	LC876685	オトコタテボシガイ <i>Inversiunio reinianus</i> (Kobelt, 1879)	滋賀県長浜市 [琵琶湖北湖]	6
2	LC876684			7
3	LC876683	ニセマツカサガイ <i>Inversiunio yanagawensis</i> (Kondo, 1982)	岡山県岡山市 [祇園用水]	10
4	LC876687			23
5	LC876688	ヨコハマシジラガイ <i>Inversiunio jokohamensis</i> (Ihering, 1893)	岐阜県海津市 [揖斐川]	24
6	LC876686			25
7	MW259993	イシガイ <i>Nodularia douglasiae</i> (J. E. Gray, 1833)	岐阜県岐阜市太郎丸	29

塩基配列の登録番号は、International Nucleotide Sequence Databases (INSD) のアクセッション番号を示す。

これらの新規に取得した塩基配列に Lopes-Lima et al.²⁾や Sano et al.⁹⁾に示されたオトコタテボシガイ属各種の塩基配列を含めて分子系統解析を行った (図 2)。

オトコタテボシガイ属各種は、大きく A, B, C, D の 4 つの系統 (群) に分かれた。A 系統群にはオトコタテボシガイに同定された 9 サンプルに対して 3 つのハプロタイプが見られた。B 系統群はニセマツカサガイに同定された 3 サンプルに対してハプロタイプ数は 1 つであった。C 系統群には韓国産の *I. verrucosus* コウライシジラガイに同定された 1 サンプルおよび福岡県産のニセマツカサガイに同定された 2 サンプルに対して 3 つのハプロタイプが見られた。D 系統群はヨコハマシジラガイに同定された 13 サンプルに対してハプロタイプ数は 10 であった。新たに塩基配列を解読した岐阜県海津市南濃町の no. 23~25 の 3 個体については全て同一配列であった。

IV. 考察

図 2 で D 系統群を構成するヨコハマシジラガイのうち新潟県産 5 個体、山形県産 2 個体、茨城県 (北浦湖) 産 1 個体、青森県 (姉沼) 産 1 個体は全て異なる塩基配列を示した。これに対して岐阜県海津市南濃町の no. 23~25 の塩基配列は異なる系統的位置を示し、最も近い塩基配列は no. 27 の青森県 (姉沼) および no. 28 の日本 (詳細非公開) であった。地理的に近い新潟県、茨城県、山形県よりも塩基配列が離れており、異なる地域ごとに固有の塩基配列が確認されたことから、地域集団間で遺伝的分化が生じている可能性があると考えられる。今回のデータの中では、岐阜県海津市南濃町のサンプルの塩基配列と同一の配列が他になかったことから、絶滅危惧種という視点に加えて遺伝子レベルでも固有の個体群であり、今後の保全の重要性を示唆するものと考ええる。なお、今回発見したヨコハマシジラガイの生息していた揖斐川の海津市南濃町

は、かつて木村・中西⁹⁾に記録のあった揖斐川支流津屋川 (南濃町津屋) の下流に位置する。そのため、今回発見した個体群はもともとこの場所に棲息していたか、或いは上流の個体群が分布を拡大した可能性があると考えられる。

ところで、岐阜県では絶滅危惧 II 類⁴⁾に指定されているマツカサガイ (図 1-11) が多産する場所においては、マツカサガイの個体変異が著しく、ドブガイ類、オバエボシガイやヨコハマシジラガイに類似するマツカサガイが発見されている (図 1-9, 10, 12)。図 9, 10 の岐阜市のマツカサガイは標準的な形態をもつ個体に比べて、膨らみが強く、殻長がやや短く、表面彫刻が不鮮明であり、殻形態のみで同定するとヨコハマシジラガイに同定される。実際に三重県の祓川に棲息するヨコハマシジラガイ (図 1-4, 5) と比較しても表面彫刻の不鮮明な点以外は極めてよく似ている。このため、2018 年および 2021 年に岐阜市内で発見されたヨコハマシジラガイ型のマツカサガイはヨコハマシジラガイに同定されていた。しかし、ミトコンドリア COI 遺伝子分析の結果は、マツカサガイの塩基配列に一致したため、マツカサガイの誤同定であることが明らかになった (図 3 の●印)。このように個体変異の多様性が大きい種には遺伝子分析による裏付けが重要であることが示された。特に稀少種に選定されている種同定については慎重な判断が必要である。

A 系統群を構成するオトコタテボシガイは滋賀県、京都府、大阪府に分布するが、今回のサンプルは 9 個体中 8 個体が滋賀県琵琶湖産であり、琵琶湖産個体のハプロタイプは 2 つであった (no. 8 については詳細な採集地情報が公開されていない)。オトコタテボシガイがヨコハマシジラガイのように塩基配列の多様性が大きくならなかったのは、琵琶湖という閉鎖性水域の限定的な空間に棲息するためと考える。

B 系統群を構成するニセマツカサガイについてはサ

ンプル地点数が少ないことにより、塩基配列の多様性が検出されなかったと考えられる。

C 系統群を構成する no. 13~15 については、韓国産のコウライシジラガイと福岡県産のニセマツカサガイで構成される興味深い結果となった。Lopes-Lima et al.²⁾ は、COI 分析の結果から、コウライシジラガイがオトコタテボシガイ、ニセマツカサガイ、ヨコハマシジラガイの塩基配列とは異なることを示しており、C 系統群のニセマツカサガイは、B 系統群のニセマツカサガイとは別種と判断するのが妥当である。この結果は、ニセマツカサガイの系統分類に、今後再検討が必要なことを示唆している。

V. 謝辞

本研究は、名古屋市立大学の共用機器である 3500 Genetic Analyzer（理学研究科設置）を用いて行われた。岐阜県での標本採取は、岐阜県レッドデータブック改訂事業として野外調査を実施し、岐阜県環境生活部環境生活政策課生物多様性係には調査許可等でお世話になった。松原美恵子氏には新たに解読した塩基配列を International Nucleotide Sequence Database (INSD) に登録していただいた。ここに記して御礼申し上げる。

引用文献

- 1) 近藤高貴. 日本産イシガイ目貝類図譜. 日本貝類学会特別出版物第 3 号. 日本貝類学会, 東京 (2008).
- 2) Lopes-Lima, M., Hattori A., Kondo T., et al. Freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae) from the rising sun (Far East Asia): Phylogeny, systematics, and distribution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 146, 106755. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106755> (2020).
- 3) 環境省, 環境省レッドリスト 2020. <http://www.env.go.jp/press/files/jp/114457.pdf> (2025.6.10 閲覧)
- 4) 岐阜県, 岐阜県の絶滅のおそれのある野生生物 (動物編) 改訂版 2010—岐阜県レッドデータブック (動物編) 改訂版—2010. https://www.pref.gifu.lg.jp/kurashi/kankyo/shizen_hogo/c11265/index_17185.html (2025.6.10 閲覧)
- 5) 木村昭一. 東海地方の淡水貝類相. 研究彙報 (全国高等学校水産教育研究会), 33, 14-34 (1994).
- 6) 木村昭一, 中西尚文. 東海地方に分布するオトコタテボシガイ属の一種. *ちりぼたん*, 27(2), 41-48 (1997).
- 7) Folmer, O., Black M., Hoeh W., et al. DNA primers

for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299 (1994).

- 8) Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027 (2021).
- 9) Sano, I., Saito T., Miyazaki J. et al. Evolutionary history and diversity of unionoid mussels (Mollusca: Bivalvia) in the Japanese archipelago. *Plankton and Benthos Research*, 15, 97-111 (2020).

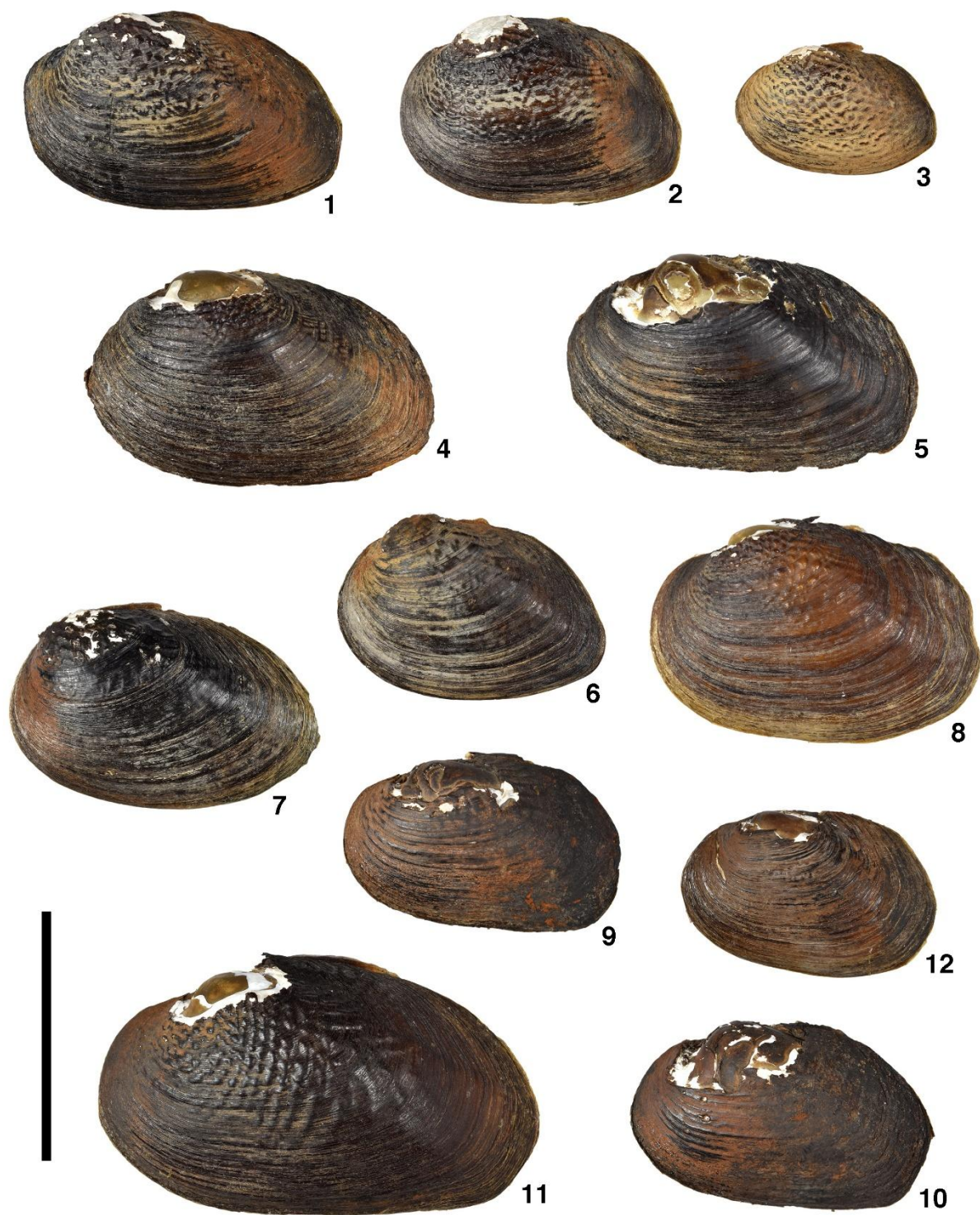


図 1. 標本各種

1-3. ヨコハマシジラガイ(揖斐川), 4, 5. ヨコハマシジラガイ(三重県明和町祓川下流), 6, 7. オトコタテボシガイ(琵琶湖北湖), 8. ニセマツカサガイ(岡山県岡山市), 9, 10. マツカサガイ[ヨコハマシジラガイ型](岐阜県岐阜市), 11. マツカサガイ(岐阜県岐阜市), 12. マツカサガイ[ドブガイ型](岐阜県岐阜市)

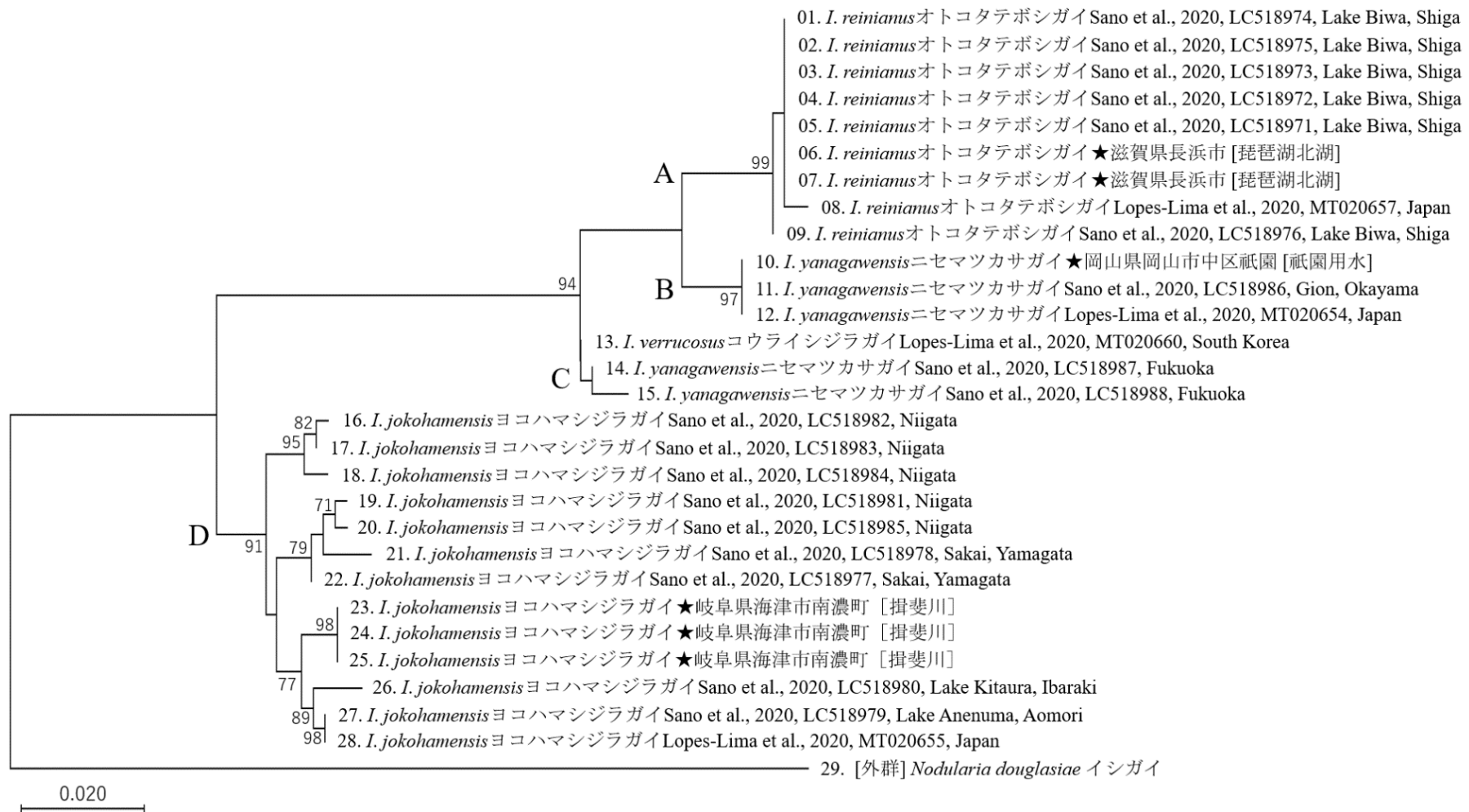


図 2. COI 遺伝子を用いて作成したオトコタテボシガイ属の最尤系統樹

★は本研究で分析したサンプルを示す. 各ノードの数値はブートストラップ確率 (70%以上について示す). 各ノードのアルファベットはクレード名 (クレード A~D)

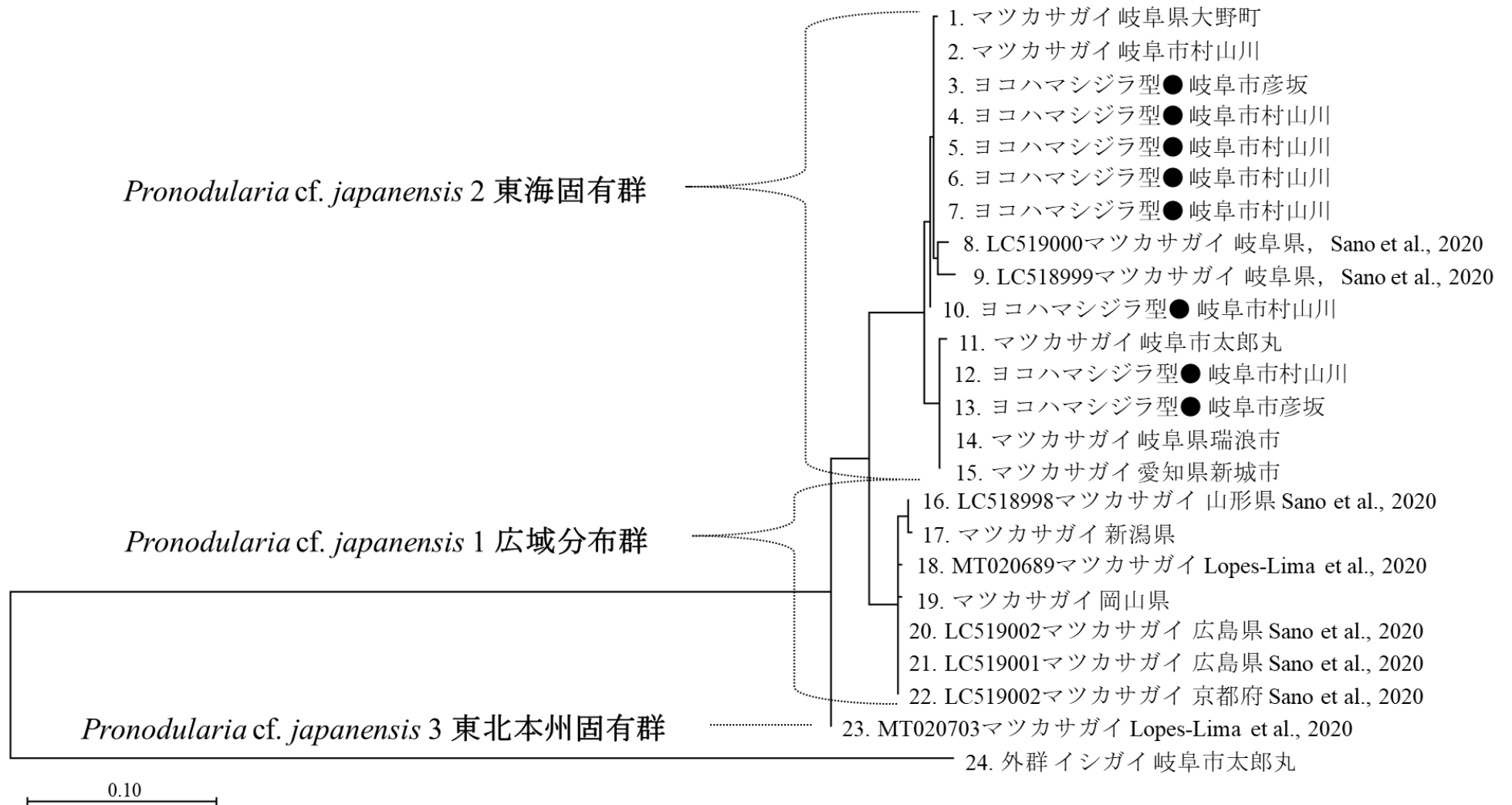


図 3. COI 遺伝子を用いて作成したマツカサガイの最尤系統樹

●は殻形態がヨコハマシジラガイの特徴を示すマツカサガイ。各ノードの数値はブートストラップ確率（70%以上について示す）。