

# 熊本県南部に生息するカワニナ属の系統地理学的解析

吉永 圭介<sup>1,\*</sup> 山口 理絵<sup>1</sup> 林田 ことの<sup>1</sup> 竹下 亜佑<sup>1</sup> 元山 葉月<sup>1</sup>

## Phylogeographic Study of *Semisulcospira* in southern Kumamoto Prefecture, Japan

Keisuke Yoshinaga<sup>1,\*</sup>, Rie Yamaguchi<sup>1</sup>, Kotono Hayashida<sup>1</sup>, Ayu Takeshita<sup>1</sup>, Hadzuki Motoyama<sup>1</sup>

*Semisulcospira libertina* is a black snail and lives in clean rivers throughout Japan. This snail is known as a food for larvae of the firefly, release of snail to protect fireflies has been done. Genetic pollutions caused by release of foreign snail are concerned. To obtain informations useful for maintenance of genetic diversity, we investigated the genetic population and geographic relationships of *Semisulcospira libertina* sampled from 50 points including Kumagawa river system, Hikawa river system, and Midorikawa river system in southern Kumamoto Prefecture, Japan.

A novel method for readily extract mitochondrial DNA from foot tissue has been developed. For this assay, mitochondrial COI gene was not suitable, because it shows heteroplasmy in some individuals. On the other hand, mitochondrial 16S rRNA genes are homoplasmic. Total 189 of mitochondrial 16S rRNA sequences were compared by clustalw multiple alignments and resolved into lineages by generating phylogenetic trees. However, most of clones were distributed over several regions, a few clones show region specific localization. Such region specific clones are useful for phylogeographic investigations and maintenance of genetic diversity.

キーワード：カワニナ、遺伝集団、系統地理学、ミトコンドリア 16S rRNA

Keywords : *Semisulcospira libertina*, Genetic Population, Phylogeography, Mitochondrial 16S rRNA

### 1. 背景と目的

近年、環境保護活動や地域おこしの一環としてホテルの保護や再生の取り組みが多くみられる。そのなかには、他の生息地由来のホテルを養殖、放流するケースもあり、遺伝的多様性の保全の観点から問題視されている。ホテル幼虫の餌料生物であるカワニナ (*Semisulcospira libertina*) についても同様の問題が懸念され、遺伝的多様性の保全や、そのための啓蒙活動が求められている。とくに陸棲貝類であるカワニナは、移動速度が遅く水系間の移動が困難なため地域固有性が高いと考えられる。

本研究では、遺伝マーカーを利用して 1：各地点のカワニナを判別し遺伝的多様性の保全に活用する、2：各地点の遺伝集団の関係性からカワニナの系統地理学的知見を得る、ことを目的に熊本県南部の球磨川水系、氷川水系、緑川水系を中心にカワニナの遺伝集団を調査したので報告する。

### 2. 方法

#### 2.1 カワニナ検体の採集

採集地点 (表 1 および図 1) ごとに 6 個体を採集した (n=6)。採集後すぐに脚部を 95%エタノールに浸けた<sup>(1)</sup>。研究室に戻り 95%エタノールを交換し、4℃で解析まで保存した。検体には地点番号(1-50)と個体記号 (A-F) からなる検体名を付けた。分水界近辺では支流が複雑に入り組んでおり、水系の間違いを避けるため採集地点は GPS で位置情報を記録した (表 1)。

#### 2.2 mtDNA の抽出とマーカー遺伝子断片の増幅

検体の筋肉組織より 1 mm<sup>3</sup> ほどを切り出し、解剖ハサミでさらに細かく切り刻み、50 μl の TE buffer の入った PCR チューブに移した。サーマルサイクラーを用いて 98℃ 10 min 加熱し mtDNA を簡易抽出した。余った検体および抽出液はそれぞれ -20℃ で保管した。抽出液 5 μl を鋳型とし、各遺伝子に特異的なプライマーセット (表 2) と、fidelity の高い KOD DNA Polymerase (KOD-Plus-Neo: TOYOBO) を用いた PCR により 35 サイクル増幅した。電気泳動で増幅されたバンドを確認後、PCR 産物をスピんカラム (InnuPREP PCR pure Kit: Analytik jena) で精製した。

<sup>1</sup> 生物化学システム工学科  
〒866-8501 熊本県八代市平山新町 2627  
Dept. of Biological and Chemical Systems Engineering,  
2627 Hirayama-Shinmachi, Yatsushiro-shi, Kumamoto, Japan  
866-8501

\* Corresponding author:  
E-mail address: yoshinaga@kumamoto-nct.ac.jp (K. Yoshinaga).

表1 カワニナ採集地点の水系と位置

地点番号	地点名	水系	河口	位置
1	ギロッチョ池 (氷川町宮原)	氷川水系	八代海	32° 33'26"N, 130° 40'58"E
2	和小路公園の池 (氷川ダム A)	氷川水系	八代海	32° 34'30"N, 130° 47'26"E
3	筒井橋下流 (東陽町、氷川下流)	氷川水系	八代海	32° 33'03"N, 130° 43'21"E
4	笠松橋 (東陽町、河俣川)	氷川水系	八代海	32° 31'02"N, 130° 45'00"E
5	下石場バス停付近 (美里町、釈迦院川)	緑川水系	有明海	32° 34'59"N, 130° 48'30"E
6	大小市野橋 (美里町、熊取川)	緑川水系	有明海	32° 36'55"N, 130° 47'27"E
7	畑中橋 (宇城市小川町、畑中川)	砂川水系	八代海	32° 35'26"N, 130° 45'14"E
8	宇城市小川町永迫	砂川水系	八代海	32° 34'23"N, 130° 43'34"E
9	八代市東陽町北 (白谷川)	氷川水系	八代海	32° 33'14"N, 130° 43'51"E
10	泉町白岩戸 (氷川ダム上流)	氷川水系	八代海	32° 33'31"N, 130° 48'09"E
11	泉町栗木 (栗木川)	氷川水系	八代海	32° 32'15"N, 130° 48'35"E
12	東陽町重見 (小浦川)	氷川水系	八代海	32° 31'47"N, 130° 42'19"E
13	八代市妙見町 (水無川)	水無川水系	八代海	32° 29'37"N, 130° 38'35"E
14	氷川ダム B	氷川水系	八代海	32° 34'21"N, 130° 47'30"E
15	氷川ダム C	氷川水系	八代海	32° 34'21"N, 130° 47'30"E
16	東陽町 笠松橋 (河俣川)	氷川水系	八代海	32° 31'02"N, 130° 45'00"E
17	東陽町 河俣 美生 (美生川)	氷川水系	八代海	32° 30'46"N, 130° 44'01"E
18	五木村 白滝公園 (五木小川)	球磨川水系	八代海	32° 26'41"N, 130° 46'35"E
19	坂本町 西部 (袈裟堂川)	球磨川水系	八代海	32° 28'10"N, 130° 38'57"E
20	坂本町 下深水 (深水分川)	球磨川水系	八代海	32° 28'15"N, 130° 40'48"E
21	坂本町 上深水 第一またえ橋 (深水分川)	球磨川水系	八代海	32° 28'27"N, 130° 42'08"E
22	坂本町 古屋敷 かたぶち橋 (油谷川)	球磨川水系	八代海	32° 26'05"N, 130° 41'11"E
23	坂本町 馬廻 (中谷川)	球磨川水系	八代海	32° 26'42"N, 130° 39'51"E
24	坂本町 中畑 (百済来川)	球磨川水系	八代海	32° 24'11"N, 130° 36'58"E
25	豊野町 段鶴橋 (砂川)	砂川水系	八代海	32° 36'22"N, 130° 45'03"E
26	豊野町 新新田橋 (小熊野川)	緑川水系	有明海	32° 37'57"N, 130° 44'49"E
27	美里町 小筵 二俣橋 (都留川)	緑川水系	有明海	32° 37'24"N, 130° 48'57"E
28	美里町 権現前橋 (谷子川)	緑川水系	有明海	32° 38'10"N, 130° 51'40"E
29	美里町 筒川 (筒川)	緑川水系	有明海	32° 38'26"N, 130° 52'28"E
30	山都町 轟橋 (瀬峰川)	緑川水系	有明海	32° 40'21"N, 130° 55'39"E
31	美里町 河鹿橋 (都留川)	緑川水系	有明海	32° 36'43"N, 130° 52'48"E
32	屋久島 湯泊橋 (湯川)	湯川水系	東シナ海	30° 14'07"N, 130° 28'44"E
33	屋久島 安房 (安房川)	安房川水系	東シナ海	30° 18'45"N, 130° 39'09"E
34	下白木公民館前 (天月川)	球磨川水系	八代海	32° 17'56"N, 130° 34'35"E
35	平沢津多目的研修館前 (漆川内川)	球磨川水系	八代海	32° 16'35"N, 130° 35'45"E
36	吉尾 (吉尾川)	球磨川水系	八代海	32° 19'57"N, 130° 35'35"E
37	大尼田 (大尼田川)	球磨川水系	八代海	32° 19'25"N, 130° 33'10"E
38	大岩 (吉尾川)	球磨川水系	八代海	32° 20'45"N, 130° 34'46"E
39	横居木 (山神川)	球磨川水系	八代海	32° 21'35"N, 130° 32'44"E
40	公園前バス停 (佐敷川)	佐敷川水系	八代海	32° 13'52"N, 130° 33'59"E
41	門口眼鏡橋 (田浦川)	田浦川水系	八代海	32° 21'31"N, 130° 31'00"E
42	白石ヶ迫橋 (宮浦川)	宮浦川水系	八代海	32° 20'43"N, 130° 30'49"E
43	城迫橋(米田川)	湯浦川水系	八代海	32° 15'15"N, 130° 31'26"E
44	久野川橋(田川川)	佐敷川水系	八代海	32° 14'44"N, 130° 32'00"E
45	古田橋(湯浦川) 用水路	湯浦川水系	八代海	32° 13'00"N, 130° 30'44"E
46	古田橋(湯浦川) 川	湯浦川水系	八代海	32° 13'00"N, 130° 30'44"E
47	千代川	津奈木川水系	八代海	32° 14'26"N, 130° 28'23"E
48	染竹川	津奈木川水系	八代海	32° 13'26"N, 130° 27'25"E
49	田ノ大橋(津奈木川)	津奈木川水系	八代海	32° 14'07"N, 130° 28'33"E
50	阿村川	阿村川水系	八代海	32° 30'43"N, 130° 26'45"E

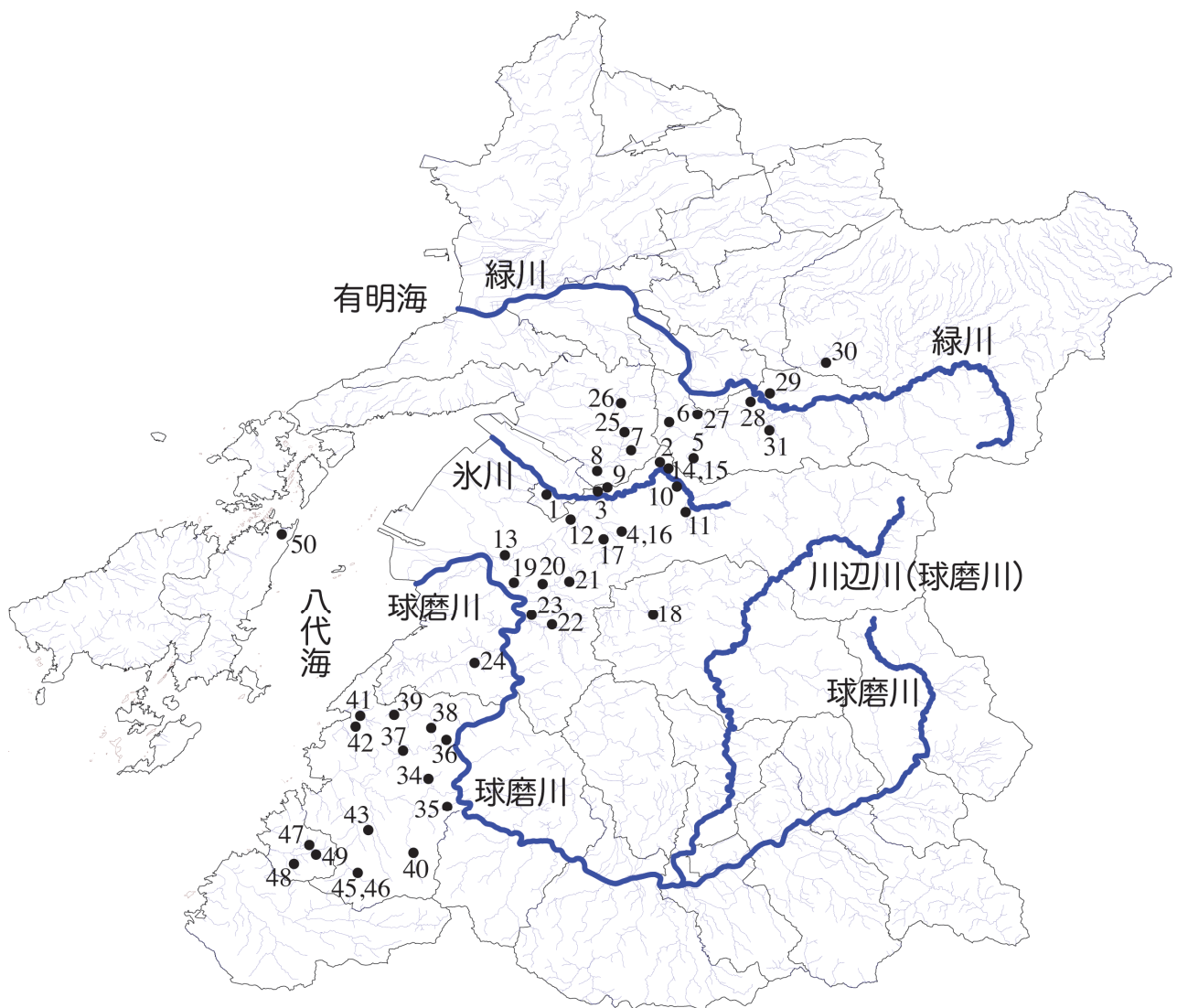


図1 カワニナ採集位置の分布

各採集地点を●と地点番号で示す。緑川、氷川、球磨川、川辺川の本流は太線で、支流やその他の河川は極細線で示す。本図は国土交通省国土政策局「国土数値情報（河川データ）」をもとに吉永が編集・加工したものである。

### 2.3 塩基配列の解読と解析

PCR産物は、増幅に使用したプライマーのうち片方と Big Dye Terminator ver. 3.1 (Applied Biosystems) を用いてダイレクトシーケンシングをおこなった。シーケンシング反応物はエタノール沈殿後 Hi-Di formamide 20  $\mu$ l に溶解し、DNA シーケンサー (ABI 3500 Genetic Analyzer: Applied Biosystems) で配列を解読した。解読した配列のうち個体差の激しい領域 (約 80 bp) について、clustalw によるアライメントと系統樹作成をおこなった。

## 3. 結果と考察

### 3.1 採集地点の選定

熊本県南部の球磨川水系、氷川水系、緑川水系を中心に採集地点を選定した。水系間の遺伝集団の関連を調べ

るため、分水界周辺を重点的に選定した (図1)。平野部は農業用の水路が張り巡らされカワニナの移動が容易であることから遺伝集団が混ざっていると考え、平野部での採集は避けた。また、河川の上流部ではカワニナが生息しておらず採集できないことがあった。

### 3.2 ミトコンドリアゲノム DNA 抽出法の検討

通常、動物試料から mtDNA を単離する場合、ゲノム DNA 抽出キットを使用することが多い。処理に時間を要すること、検体数が多いと手間とコストがかかること、実際に使用して mtDNA の収量が悪く解析できなかったことから、より簡便な方法を独自に開発することにした。ゲノム DNA に比べ mtDNA のサイズ (カワニナでは 15,432 bp<sup>(2)</sup>) が十分に小さいため、大腸菌からのプラス

表2 本研究で使用したプライマー

プライマー名	塩基配列	ターゲット	向き	備考
LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATGG-3'	COI	F	文献(3)
HCO2198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	COI	R	文献(3)
kawaCOIu	5'-TTTCTACAAACCATAAAGATATTGG-3'	COI	F	LCO1490 をカワニナ用に最適化
kawaCOId	5'-TACTTCTGGGTGACCAAAAAATCA-3'	COI	R	HCO2198 をカワニナ用に最適化
16sar-L	5'-CGCCTGTTTATCAAAAAACAT-3'	16S rRNA	F	文献(4)
16sbr-H	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'	16S rRNA	R	文献(4)
Kawanina F	5'-TACTCTGACCGTGCAAAGGT-3'	16S rRNA	F	文献(5)
Kawanina R	5'-TCTAGTCCAACATCGAGGTC-3'	16S rRNA	R	文献(5)

ミド DNA の簡易抽出法に着想を得て、試料を緩衝液中で茹で、滲み出た mtDNA を利用することとした。本法では PCR の鋳型として十分量の mtDNA をワンステップで抽出することができた。本法は他の生物種の解析においても有効であると考えられる。

### 3.3 塩基配列解読法の検討

DNA 断片の塩基配列解読はクローニングベクターにクローニングしてからおこなうことが多い。今回は検体数が多く、それぞれをクローニングすると手間とコストがかかることから、クローニングせずに PCR 産物をそのまま鋳型としてシーケンシングするダイレクトシーケンシングをおこなうことにした。また、1つの細胞内には多コピーの mtDNA が存在しており、それらが複数種類の配列に多様化したヘテロプラスミーである場合を見逃さないためにもクローニングは実施しなかった。

### 3.4 遺伝マーカーの選定

生物の遺伝集団の解析には、近年マイクロサテライトマーカーの解析がよくおこなわれている。しかしカワニナ属についてマイクロサテライトマーカーに関する知見がないため、マーカー遺伝子を設定しその塩基配列によって遺伝集団を解析することとした。遺伝集団の解析では、母系遺伝することで解析が容易なミトコンドリアゲノム中の COI (Cytochrome c oxidase subunit I) 遺伝子や 16S rRNA 遺伝子がマーカー遺伝子としてよく使われている。両者について特異的プライマー<sup>(3-5)</sup>をそれぞれ設計し、PCR による遺伝子断片の増幅、塩基配列の解読をおこなった。遺伝子断片の増幅には fidelity が高く増幅時に変異が生じにくい KOD DNA Polymerase を使用した。

COI 遺伝子について塩基配列を解析したところ、いくつかの検体においては同一検体から複数種類の配列が検出され、ヘテロプラスミーになっていることが判明した(図2)。塩基配列は多様化していたがミトコンドリアゲノムの遺伝暗号表と照らし合わせたところ、アミノ酸配列の変化は生じていなかった(図2)。ヘテロプラスミーでは検体間の塩基配列の比較が困難なため、COI 遺伝子

はマーカー遺伝子として本研究では使用しないこととした。台湾においてカワニナ COI 遺伝子をマーカーに系統地理学的解析をおこなっている例があるが<sup>(6,7)</sup>、ヘテロプラスミーになるかどうかは、個体やその生育環境によって異なると考えられる。実際、今回の検体においてもヘテロプラスミーを生じていないものも一部であるが存在した。

16S rRNA 遺伝子について今回の検体群では、同一検体では1つの配列しか検出されずヘテロプラスミーは確認できなかった。よって本研究では 16S rRNA 遺伝子をマーカーとして使用することとした。

COI 遺伝子はヘテロプラスミーになり 16S rRNA がそうでなかった理由として、COI 遺伝子はタンパク質をコードしておりアミノ酸配列が変化しない限りは変異を許容できたが、16S rRNA 遺伝子は塩基配列が直接 rRNA の構造に結びつくことから変異を許容できなかったのではないかと考えられた。

今回、遺伝子によってはヘテロプラスミーが存在することが判明した。PCR 産物をベクターにクローニングする過程を入れると、どちらか1つの配列のみに偏る危険性がある。ミトコンドリアや葉緑体のゲノム上の遺伝子マーカーを用いて遺伝集団を解析する場合は、クローニングを避け、複数の配列をまとめて解読するダイレクトシーケンシング法をとるべきである。

16S rRNA 遺伝子についてはユニバーサルプライマーセット<sup>(4)</sup>(16sar-L, 16sbr-H)では遺伝子断片を増幅できない個体が生じた。そのため、カワニナ属専用プライマーセット<sup>(5)</sup>(Kawanina F, Kawanina R)を使用した。

### 3.5 検体間の 16S rRNA 配列の比較

塩基配列の解読ができた 189 検体について、塩基配列の解読状況が良好で個体差が激しい領域(約 80 bp)を選定し、個体間で配列の比較をおこなった(図3)。

採集地点と配列(クローン)の関係は 1:1 の関係ではなく、1つの地点に複数のクローンが存在しており、また1つのクローンは複数の地点にまたがり分布してい

(a) ATG CGT TGA TTT TTT TCT ACA AAC CAT AAA GAT ATT GGC ACA CTT TAT ATT TTA TTT GGG  
Met Arg **Trp** Phe Phe Ser Thr Asn His Lys Asp Ile Gly Thr Leu Tyr Ile Leu Phe Gly

act gct tta agc ctt tta att cgt gca gaa tta ggg caa  
ATA TGA TCT GGG TTA GTT GGA ACT GCT TTA AGC CTT TTA ATT CGT GCA GAA TTA GGA CAA  
**Met Trp** Ser Gly Leu Val Gly Thr Ala Leu Ser Leu Leu Ile Arg Ala Glu Leu Gly Gln

cca gga gct tta ctt gga gat gat caa tta tac aat gta att gtt aca gcc cat gct ttt  
CCA GGA GCT TTA CTC GGA GAT GAT CAA TTA TAT AAT GTA ATT GTT ACG GCT CAT GCT TTT  
Pro Gly Ala Leu Leu Gly Asp Asp Gln Leu Tyr Asn Val Ile Val Thr Ala His Ala Phe

ggt ata att ttt ttc tta gtt atg cct ata ata att gga ggg ttt ggt aat tga tta atc  
GTT ATA ATT TTT TTT CTG GTT ATG CCT ATA ATA ATT GGA GGT TTT GGT AAT TGA TTA ATT  
Val **Met** Ile Phe Phe Leu Val Met Pro **Met Met** Ile Gly Gly Phe Gly Asn **Trp** Leu Ile

ccc tta atg ctt ggg gca cca gat atg gct ttc ccc cgc tta aat aat atg agt ttt tga  
CCT TTA ATA CTT GGA GCA **CCA GAT ATA GCT TTC CCA CGT TTA AAT AAT** ATA AGT TTT TGG  
Pro Leu **Met** Leu Gly Ala Pro Asp **Met** Ala Phe Pro Arg Leu Asn Asn **Met** Ser Phe **Trp**

ctt tta cct ccg gca ttg cta ctc tta ctt tct tcc gct gct gtt gaa aga ggt gtc gga  
CTT TTA CCC CCA GCA CTA CTA CTT TTA CTC TCT TCT GCC GCT GTT GAA AGG GGC GCA GGA  
Leu Leu Pro Pro Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ser Ala Ala Val Glu **Ser** Gly Ala Gly

aca gga tga act gtc tac cct cct tta tog gga aat ctg gct cat gct gga ggt tct gtc  
ACA GGG TGA ACT GTT TAC CCT CCT CTA TCG GGG AAT CTT GCT CAC GCC GGA GGC TCT GTA  
Thr Gly **Trp** Thr Val Tyr Pro Pro Leu Ser Gly Asn Leu Ala His Ala Gly Gly Ser Val

gat tta gca att ttt tcg cta cat tta gcg ggt gct tct tcc att cta ggt gct gta aac  
GAT TTA GCT ATT TTT TCA CTT CAT TTA GCA GGT GCC TCC TCT ATT TTA GGC GCC GTA AAC  
Asp Leu Ala Ile Phe Ser Leu His Leu Ala Gly Ala Ser Ser Ile Leu Gly Ala Val Asn

ttt atc act act att aat ata cga tga tct gga ata cag att gaa cga ctt cct tta  
TTC ATT ACA ACT ATT ATC AAC ATA CGA TGA CGT GGA ATA CAA TTT GAA CGA CTT CCT TTA  
Phe Ile Thr Thr Ile Ile Asn **Met** Arg **Trp** Arg Gly **Met** Gln Phe Glu Arg Leu Pro Leu

ttt gtt tga tct gta aaa att act gct att ctt ctc cta ctt tct ttg cct gtt ttg gca  
TTT GTT TGG TCT GTA AAA ATC ACC GCC ATT CTT CTC TTG CTT TCC CTG CCC GTT TTA GCA  
Phe Val **Trp** Ser Val Lys Ile Thr Ala Ile Leu Leu Leu Ser Leu Pro Val Leu Ala

gga gct att act ata tta cta aca gat cga aat ttt aat acg gct ttt ttt gac cca gct  
GGA GCC ATT ACC ATA TTA TTA ACA GAC CGG AAT TTT AAC ACG GCT TTT TTT GAT CCG GCA  
Gly Ala Ile Thr **Met** Leu Leu Thr Asp Arg Asn Phe Asn Thr Ala Phe Phe Asp Pro Ala

gga gga gga gac cct att ctt tat can cac  
GGC GGC GGG GAT CCT ATT CTT TAT CAG CAT CTT TTT TGA TTT TTT GGT CAC CCA GAA GTG  
Gly Gly Gly Asp Pro Ile Leu Tyr Gln His Leu Phe **Trp** Phe Phe Gly His Pro Glu Val

TAT ATT CTA ATT CTT CCT GGG TTT GGA ATA ATC TCT CAC ATT GTT AGT CAT TAT TCC TCA  
Tyr Ile Leu Ile Leu Pro Gly Phe Gly **Met** Ile Ser His Ile Val Ser His Tyr Ser Ser

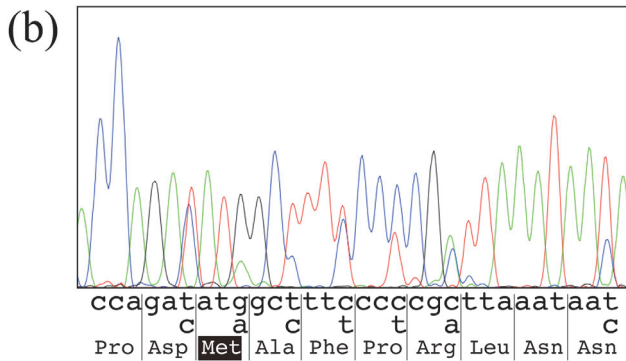


図2 カワニナ COI 遺伝子の配列

(a)：検体 50A における COI 遺伝子の塩基配列。文献(1)に基づく塩基配列は大文字で示し、下段にミトコンドリア遺伝暗号表から想定されるアミノ酸配列を示す。検体 50A の塩基配列を小文字で示したが、複数の配列が存在する箇所は上段に追記した。下線はプライマー結合部位。ミトコンドリア特有のコードンを有するアミノ酸は黒で網掛けした。

(b)：図 2 (a) のグレーで網掛けした部位のクロマトグラム。複数の配列が存在するためピークが重なっている。

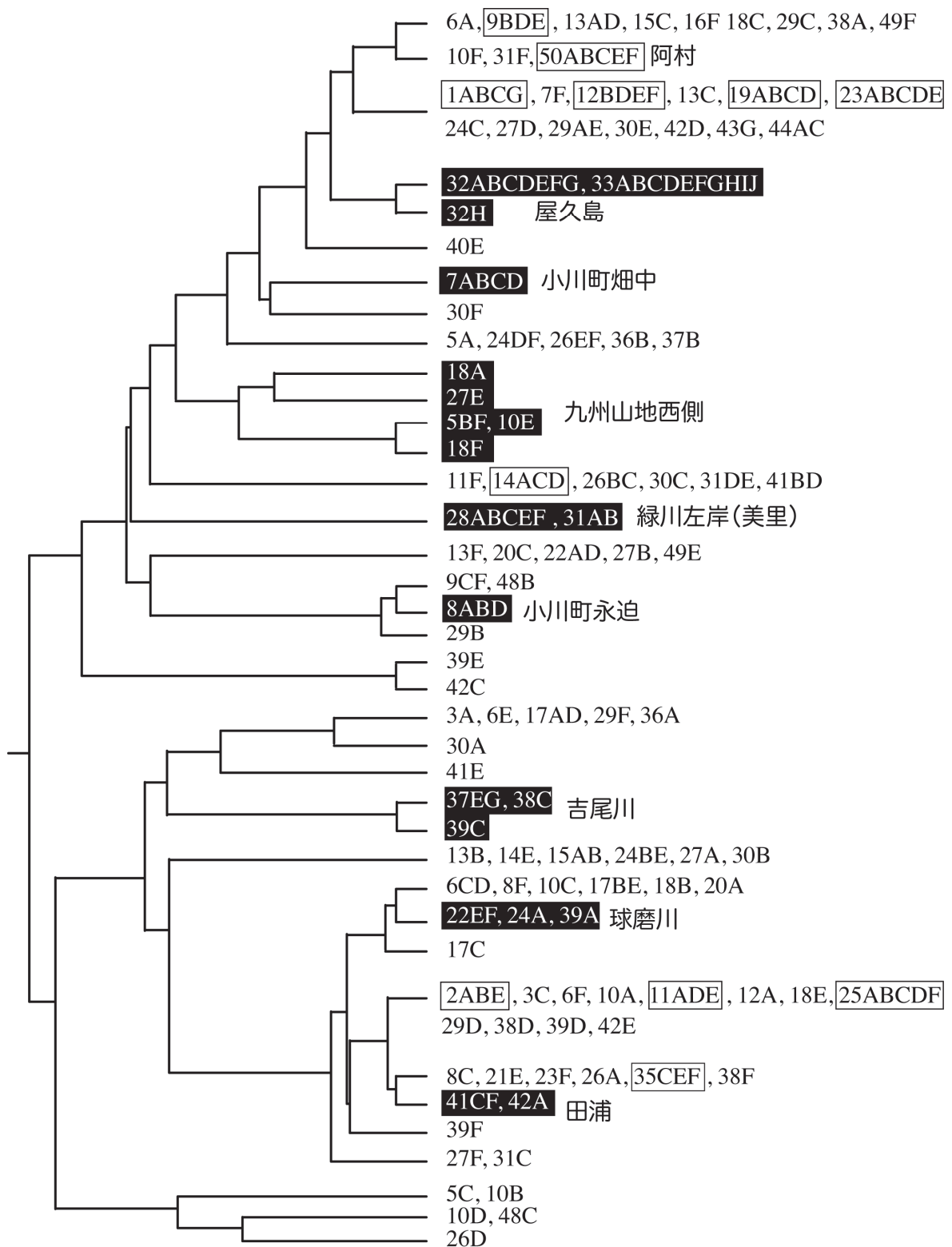


図3 16S rDNA 配列の比較

189 検体について clustalw により配列を比較し樹形図を作成した。各検体は地域番号と個体記号の組み合わせで表記した。枝の長さは配列の類似性を反映している。特定のクローンまたはごく近縁のクローンが特定の地域に局在し高い地域固有性が見られたクローンは黒のボックスで囲み地域を付記した。地域固有性は高くないがある地点で主要なクローンは白のボックスで囲んだ。

ることがわかった。クローンによっては地域固有性が高いものが見られ、1つのクローンあるいは近縁のクローンがごく限られた地域に局在していた(図3の黒のボックスで囲んだクローン)。

このようなクローンや地域の組み合わせにおいては、遺伝子配列を遺伝的多様性の保全に活用することや、地点間の遺伝子配列の関係性からカワニナの分布に関する系統地理学的知見を得ることが可能である。

多くのクローンが、複数の地点にまたがって広く分布し、分布に水系や地域との関連がみられなかった。分布後にそれぞれの地点で独立して変異した可能性は必ずしも否定はできないが、予想以上に遺伝集団が攪拌されていることが示唆された。小さな稚貝の水流による移動のしやすさ、農業、土木工事などこれまでの人間の生産活動による土や水の移動が原因ではないかと考えられる。

#### 4. まとめ

本研究は、緑川、氷川、球磨川をはじめとする熊本県南部の水系に生息するカワニナについて遺伝子マーカーを利用して遺伝集団を解析したものである。以下に得られた結果をまとめる。

- (1) ミトコンドリア DNA の簡易抽出法を確立した。
- (2) COI 遺伝子はヘテロプラスミーがみられ解析には適していなかった。
- (3) ヘテロプラスミーがみられなかった 16S rRNA 遺伝子が解析に適していた。
- (4) 採集地点と配列(クローン)の関係は1:1の関係ではなく、遺伝集団は予想以上に攪拌されていると考えられた。
- (5) ごく一部で地域固有性が高いクローンが存在し、遺伝的多様性の保全や、系統地理学的知見の取得に利用できると考えられる。

より地域固有性の高いマーカー遺伝子およびその解読領域を設定することが今後の課題である。さらに、離島や僻地での採集を試み、地域固有性が高いクローンのみを比較することで、より広い範囲(例えば九州全域)でどのようにカワニナが分布していったのかといった系統地理学的知見の取得に挑戦したい。

#### 謝辞

屋久島におけるカワニナ検体採集は熊本高専生物化学システム工学科の木原久美子准教授の協力によるものである。県内での採集では研究室の学生(平成26-29年度在籍)に協力していただいた。この場を借りて感謝する。

(平成30年9月25日受付)

(平成30年12月5日受理)

#### 参考文献

- (1) O Miura *et al.*: "Rare, divergent Korean *Semisulcospira* Spp. mitochondrial haplotypes have Japanese sister lineages", *Journal of Molluscan Studies*, Vol.79, No.1, pp.86-89 (2013).
- (2) Zeng T *et al.*: "Complete mitochondrial genome of a freshwater snail, *Semisulcospira libertina* (Cerithioidea: Semisulcospiridae)", *Mitochondrial DNA*, Vol.26, No.6, pp.897-898 (2015).
- (3) Folmer O *et al.*: "DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates", *Mol Mar Biol Biotechnol*, Vol.3, No.5, pp.294-299 (1994).
- (4) Palumbi S. R *et al.*: "The simple fool's guide to PCR, version 2.0", University of Hawaii, Honolulu (2002).
- (5) 増本育子, 北村徹, 若尾拓志, 川野敬介: 「豊田町に生息するカワニナ属の集団遺伝学的解析」, 豊田ホテルの里ミュージアム研究報告書, 第2号, pp.29-38(2009).
- (6) Kui-Ching Hsu *et al.*: "Mitochondrial DNA phylogeography of *Semisulcospira libertina* (Gastropoda: Cerithioidea: Pleuroceridae): implications the history of landform changes in Taiwan", *Molecular Biology Reports*, Vol.41, No.6, pp.3733-3743 (2014).
- (7) Chiu YW *et al.*: "Origins of *Semisulcospira libertina* (gastropoda: semisulcospiridae) in Taiwan", *Mitochondrial DNA. Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, Vol.28, No.4, pp.518-525 (2008).