

研究成果報告書（第27回学術研究助成）

2019年 3月 25日

公益財団法人 藤原ナチュラリストリー振興財団
理事長 野村 茂 樹 殿

所属機関名 (一財) 自然環境研究センター
職 名 研究員
氏 名 元陳 力昇

1. 研究課題

緊急に保護を要する好洞窟性キセルガイ科カタツムリの種内遺伝的多様性解明

2. 共同研究者

上島 励 (東京大学大学院理学系研究科 准教授 遺伝子実験の一部を担当)

3. 研究報告

I. 研究の目的

キセルガイ科は日本で最も種数の多い陸産貝類（カタツムリ）の一科で、約200種の固有種が知られる。また、他の陸産貝類同様、移動能力に乏しく、乾燥などの環境変化に弱いため、多くの種が絶滅の危機に瀕している。とりわけ石灰岩地からは多くの固有絶滅危惧種が知られ、乱獲や採掘等によって生息環境が破壊されてしまうと容易に絶滅してしまう。

絶滅危惧種のうち、最も危機的状況にあるのが好洞窟性キセルガイ類である。好洞窟性キセルガイ類とは石灰岩洞窟内やその周辺にのみ生息するキセルガイ類で、カザアナギセル、イシカワギセル、ケショウギセルの3種（いずれも絶滅危惧I類）が知られている。これらの種は九州中部の石灰岩地帯にのみ分布し、特にカザアナギセルおよびイシカワギセルについては、その希少性ゆえに収集家や販売業者等による乱獲により、近年著しく個体数を減少させている。したがって、好洞窟性キセルガイ類の保護対策は急務となっている。

絶滅危惧種の野生個体群の回復を図る場合、人工繁殖による野生復帰が第一に考えられる。しかし、一般に石灰岩地依存性の陸産貝類は飼育が困難であるため、現段階では他の生息地からの移植が現実的な保全対策となる。この場合、遺伝子汚染を防ぐために、あらかじめ移植元および移植先となる集団の遺伝的な差異を明らかにする必要がある。しかし、これまで好洞窟性キセルガイ類を対象にした分子系統学的な研究は一切無く、集団間の遺伝的な関係性は全く不明である。

本研究では進化速度が大きく、集団間の遺伝的差異を検出しやすいミトコンドリアDNAおよび核ITS領域を用いて、好洞窟性キセルガイ類の種内の遺伝的構造を明らかにし、異なる生息地間における移植の可否を評価することを目的とする。

II. 研究の方法

本研究では6地点（地点A～F）から得られたイシカワギセル、2地点（地点G～H）から得られたカザアナギセル、2地点（地点I～J）から得られたケショウギセルを解析することができた（絶滅危惧種の分布情報を含むため、具体的な地名は公開しない）。現地調査を行った時点（2019年11月）において、カザアナギセルおよびイシカワギセルは熊本県希少野生動植物種に指定されているため、採集に当たっては熊本県より許可を得た（指定希少野生動植物捕獲等許可証第1号）。

得られた個体の腹足からtotal DNAを抽出し、核ITS領域（約800 bp）およびミトコンドリア ND1-ND4L-Cytb領域（約1.3 kbp）を含む断片をPCR法にて増幅し、精製後、ダイレクトシーケンシングによって塩基配列を決定した。増幅に用いたプライマーや反応条件等は、Motochin *et al.*, 2017に従った。決定された塩基配列はアライメントした後、最尤法に基づく分子系統解析 (RAxML v8.2.10)、ハプロタイプネットワーク解析 (TCS 1.21)、系統ネットワーク解析 (SplitsTree4) を行った。

III. 研究結果

核ITS領域およびミトコンドリアDNAの結合データに基づく分子系統解析の結果、イシカワギセル、カザアナギセル、ケショウギセルはそれぞれ単系統群を形成した（図1）。また、イシカワギセルの一部の集団（図1、クレードA）を除いて、それぞれの種内における集団間の遺伝的距離は比較的大きく、生息地点ごとに遺伝的分化が生じていることが判明した（表1）。特に、イシカワギセ

ルの一部の集団間（例えば地点B-D、C-E間）の遺伝的距離は20%を越え、生物学的に別種であることが明らかな種間（比叡山で同所的に生息するツムガタギセルおよびハゲギセル間）の遺伝的距離である16.2%を大きく上回る結果となった（表1）。この結果から、これらの集団間では遺伝的に隔離された状態が長期に渡って続いたと考えられる。

一方で、イシカワギセルでは集団間で遺伝的にほとんど差が見られない例も認められたため、種内の遺伝的構造をより詳細に明らかにするためにネットワーク解析を行った（図2）。核ITS領域に基づくハプロタイプネットワーク解析の結果、核ITS領域では4つのハプロタイプが認められ、地点Bと地点Cの集団、および地点Dと地点Eの集団はそれぞれ同一の配列を示した（図2A）。ミトコンドリアDNAに基づく系統ネットワーク解析でもイシカワギセルは4つの遺伝的なグループに分けられ、その系統関係は核ITS領域の結果と概ね一致した（図2B）。

ミトコンドリアDNAは核DNAに比べて進化速度が速いにもかかわらず、地点Bと地点Cの集団は遺伝的にほとんど差が見られなかった。

地点Bの集団が、地理的に近い地点Aの集団ではなく、より遠い地点Cの集団と遺伝的に極めて近縁となったことは驚くべき結果であり、種内に見られる系統関係が、必ずしも地理的分布を反映するわけではないことが明らかとなった。

IV. 考察

本研究により好洞窟性キセルガイ類の生息地間における遺伝的な差が明らかとなり、今後の保全施策に資する基礎的なデータを得ることができた。

遺伝子解析の結果、イシカワギセル、カザアナギセル、ケショウギセルの種内における各集団は、生息地点ごとに遺伝的分化が生じていることが判明したため、イシカワギセルの一部の集団を除いて、現時点では異なる地点から移植を行うべきではないと判断される。以下、それぞれの種について行うべき保全施策について議論する。

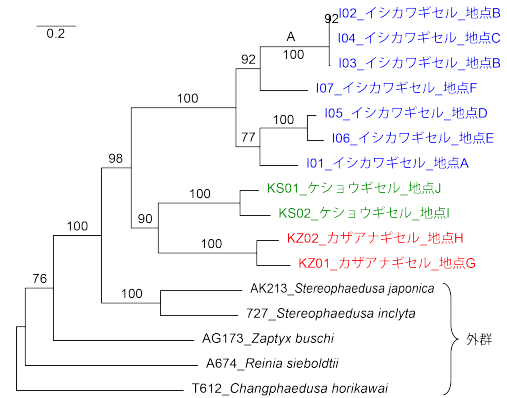


図1. 核ITS領域(857 bp)およびミトコンドリアND1-N D4L-Cytb領域(1263 bp)の結合データに基づく最尤系統樹。OTU名は、DNA番号_種名_生息地点を表す。枝上の数字は100回反復によるブートストラップ値を表す。

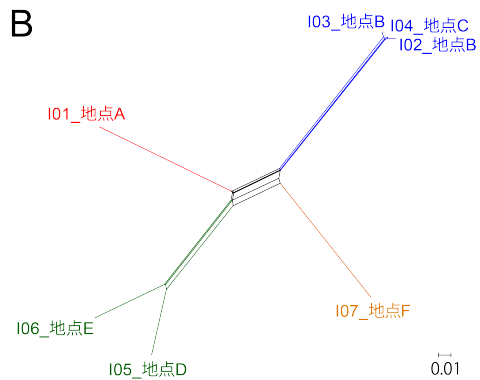
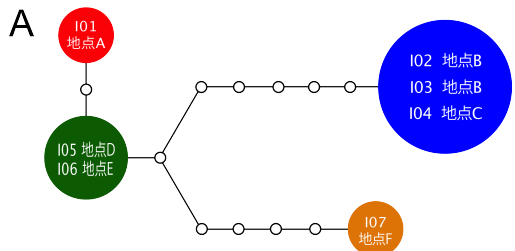


図2. イシカワギセル種内におけるネットワーク図。A: 核ITS領域に基づくハプロタイプネットワーク図。白丸は仮想ハプロタイプを表す。B: ミトコンドリアND1-ND4L-Cytb領域に基づく系統ネットワーク図。

表1. イシカワギセル、カザアナギセル、ケショウギセルの各集団間の遺伝的距離。太字は別種であることが立証されている種間の遺伝的距離を表す。下線はイシカワギセル種内において、別種間の遺伝的距離よりも大きい値を示す集団間を表す。

	I01_A	I02_B	I03_B	I04_C	I05_D	I06_E	I07_F	KZ01_G	KZ02_H	KS01_J	KS02_J	AK145	AK161
I01_イシカワギセル_地点A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I02_イシカワギセル_地点B	<u>0.187</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I03_イシカワギセル_地点B	<u>0.184</u>	0.008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I04_イシカワギセル_地点C	<u>0.181</u>	0.005	0.005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I05_イシカワギセル_地点D	<u>0.163</u>	<u>0.203</u>	<u>0.202</u>	<u>0.200</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I06_イシカワギセル_地点E	<u>0.167</u>	<u>0.208</u>	<u>0.208</u>	<u>0.204</u>	0.074	-	-	-	-	-	-	-	-
I07_イシカワギセル_地点F	<u>0.176</u>	<u>0.167</u>	<u>0.166</u>	<u>0.162</u>	<u>0.181</u>	<u>0.191</u>	-	-	-	-	-	-	-
KZ01_カザアナギセル_地点G	0.245	0.249	0.248	0.246	0.255	0.249	0.237	-	-	-	-	-	-
KZ02_カザアナギセル_地点H	0.250	0.251	0.251	0.247	0.244	0.249	0.238	0.112	-	-	-	-	-
KS01_ケショウギセル_地点I	0.246	0.248	0.249	0.243	0.244	0.251	0.233	0.220	0.223	-	-	-	-
KS02_ケショウギセル_地点J	0.203	0.204	0.204	0.198	0.202	0.202	0.198	0.175	0.183	0.085	-	-	-
AK145_ツムガタギセル_比叡山	0.242	0.255	0.253	0.252	0.247	0.248	0.237	0.230	0.242	0.233	0.195	-	-
AK161_ハゲギセル_比叡山	0.247	0.259	0.257	0.254	0.259	0.259	0.246	0.234	0.237	0.232	0.196	0.162	-

カザアナギセル

日本で最も希少な陸産貝類のひとつで、生息地の環境変化や愛好家による採集により近年個体数を激減させたキセルガイである。カザアナギセルについては本研究で解析した2ヶ所が現存する全ての産地であると考えられるため、生息地の保全を基本としつつ、生息域外保全を併用することで個体群の存続を図っていく必要がある。現地調査の結果、幸いなことに現存する生息地の環境は良好であったため、今後は開発行為や違法採集への対策が、生息域内保全として最も考慮しなければならない項目と考えられる。また、野生下における個体数が絶対的に少ないと考えられるため、繁殖技術の開発を早急に行うべきであり、野生下における個体数の増加を当面の目標とするべきである。

イシカワギセル

カザアナギセルに比べて生息地点数は多いものの、いずれの生息地でも個体数は少なく、生息環境が悪化している場所も少なくない。遺伝子解析の結果、生息地間で著しい遺伝的分化が見られた集団のペアがあった一方で、地点B-C間のように、遺伝的に極めて近縁である集団の存在も明らかになった。遺伝的に独立している集団については、カザアナギセル同様、生息域内保全を基本としつつ、生息域外保全技術の開発も併せて行っていく必要があると考えられる。一方で、地点B-C間の集団については、移植の可能性があることも示唆された。地点B-C間の遺伝的距離(0.5%)は、地点Bにおける個体間の遺伝的距離(0.8%)よりも小さかったことから、地点Bもしくは地点Cのどちらかの生息地で個体群が絶滅した場合、もう一方の個体群から移植することはありえるだろう。一方で、両集団が絶滅していない場合の移植については慎重に考える必要がある。地点B、Cの集団は、互いに遺伝的に極めて近縁であるものの、全く同一というわけではない。現状では異なる集団を導入することによって、国内外来生物を生み出すリスクがあるため、今後は地点B、Cの集団について、より詳細に遺伝的多様性を把握する必要がある。

ケショウギセル

本研究では地理的に近接した2地点からしか得ることができなかったが、遺伝子解析の結果、生息地点間で遺伝的分化が生じていることが判明した。この結果から、ケショウギセルについても、生息地が異なれば遺伝的分化が生じている可能性が高いことが示唆された。ケショウギセルはカザアナギセルやイシカワギセルに比べて危急性は低いものの、現在の生息環境を維持することが重要と考えられる。今後、生息地を網羅的にサンプリングすることにより、集団間の系統関係を明らかにする必要がある。

<引用文献>

Risho Motochin, Min Wang, Rei Ueshima. 2017. Molecular phylogeny, frequent parallel evolution and new system of Japanese clausiliid land snails (Gastropoda: Stylommatopoda). *Zoological Journal of the Linnean Society* **181**: 795-845.

V. 成果発表

本研究の成果については、学術雑誌(日本貝類学会誌)に投稿準備中である。

VI. 今後の課題

本研究ではイシカワギセルの一部の集団間(地点Bおよび地点C)において、移植の可能性が示唆された。今後は両集団が絶滅していない場合における移植の可否について知見を得るために、マイクロサテライト等により個体間の遺伝的独立性を評価する必要がある。

移植をすることができないと判断された集団については生息域外保全を検討する必要があり、特に野生下における個体数が少ないと考えられるカザアナギセルについては早急に繁殖技術の開発を要する。