

水生生物における比較系統地理学的研究と地史の関係究明

竹中將起

(基礎生物学研究所 進化発生研究部門, 室戸ジオパークパートナー研究者)

生物多様性とは、様々な生物が複雑に絡み合って地球上のそれぞれの地域においてそれぞれの生態系を築いており、その豊富な多様性を指し示す。生物多様性は、遺伝的な多様性、種の多様性、生態系の多様性に大きく3つのレベルに分けられ、3つのレベルの全てが重要であり、かつ密接に関連している。特に、本課題では遺伝的な多様性に着目している。同種内の地域集団や、形態的には区別できない隠蔽種（cryptic species）の理解・把握は、その地域の生物相を理解し、保全していく上で極めて重要である。日本列島は、世界的にも生物の種多様性・固有性が高く、その要因の一つとして活発な地殻変動の影響が挙げられる。さらに、複雑な地形だけでなく、南北 3,000km にも及ぶ長い弧状列島である日本列島は、亜熱帯気候から亜寒帯気候、高標高域には寒帯のような気候であるなど、様々な環境が存在して生態系の多様性が高く、それに関連して種多様性や遺伝的多様性も高い。室戸半島を含む四国南部は、「襲速紀（そはやき）」型要素と呼ばれ、主として植物分野において、中央構造線より南側の地域（九州南部・四国・紀伊）に古い系統群が残存するような植物地理学的要素の一つとして報告されてきた。さらに、山地率が高く、山地に富んだ特徴を持っている。太平洋に突出した室戸半島は、黒潮の影響を受けるため温暖で、降水量も多い。特に、本課題で注目している水生生物にとっては降水量の多さは、そのバイオマスに大きく影響する。本課題では 2018 年度室戸ユネスコ世界ジオパーク学術研究助成金における調査において、採集したものの 2018 年度の助成研究では用いなかった種の中から、日本広域の遺伝子解析から隠蔽種が多く検出されているナミトビイロカゲロウ *Paraleptophlebia japonica* と、前回の研究課題において隠蔽種の存在が示唆された甲殻類のサワガニ *Geothelphusa dehaani* を中心に着目し、遺伝的多様性の評価、および、系統学的位置づけについて追究した。さらに、近年注目されている、コップ一杯分の河川水からそこに生息する生物が把握できるという環境 DNA についても室戸半島のサンプルを用いて、プライマー開発にも着手した。

キーワード：生物多様性・生物系統地理・隠蔽種・遺伝的多様性

1. はじめに

生物多様性とは、様々な生物が複雑に絡み合っ地球上のそれぞれの地域においてそれぞれの生態系を気づいており、その豊富な多様性を指し示す。生物多様性は、遺伝的な多様性、種の多様性、生態系の多様性に大きく 3 つのレベルに分けられる（環境省 HP: <https://www.biodic.go.jp/biodiversity/about/about.html>）。これら 3 つのレベルも密接に関係している。例えば、多様な生態系には潜在的に多くの種が共存できる。また、ここ数十年で飛躍的に発展してきた遺伝子解析手法によって、より一層に遺伝的多様性の重要性も注目されている。生物多様性の理解とは、その地域にどのような生物、種、遺伝系統群が分布しているのかを把握することであり、その地域の特性だけでなく、生物の保護・保全を実施する際には不可欠な情報となる。また、教育的な観点からも環境教育にも応用できるため、その地域における様々なレベルの生物多様性を理解することは極めて重要である。さらに、形態（見た目）では全く（もしくはほとんど）区別できないものの、遺伝的には別種レベルに分化した集団を隠蔽種"Cryptic Species" (Struck et al., 2018) も注目されており、同種であるものの隠蔽種や、遺伝的な地域集団の理解・把握は、その生物種の進化史を解明するだけでなく、その地域の生物相を理解し、保全していく上で重要である。

日本列島は、世界的にも生物の種多様性・固有性が高く、その要因の一つとして活発な地殻変動の影響が挙げられる (Tojo et al., 2017)。現在の日本列島は世界に 10 数枚しかないプレートの 4 つがぶつかり合う地域に位置する世界的にも希有な立地にあり、地殻変動が活発で、複雑な形成史を有する。日本の形成史に関しては前回の報告書にて詳しく説明したのでここでは簡潔に説明する。約 2,100 万年前から東北日本と西南日本は異なる陸塊を起源とし、アジア大陸東縁辺部からそれぞれ独立に離裂し、現在の位置に移動してきたとして「観音開き型離裂説("double-door" opening model)」として提唱されている (Otofujii et al., 1985; Isozaki et al., 2011; Martin, 2011; 乙藤, 2017)。西南日本と東北日本は、場所もタイミングもそれぞれ独立して大陸からの回転運動を伴いながら離裂してきたことが明らかとなっている (Otofujii et al., 1985; Isozaki et al., 2011; Martin, 2011)。この大規模な大陸からの分離以降、1,000 万年にわたって日本列島のほとんど全域において静穏な時代であったとされている。約 500 万年前まで、西南日本と東北日本の間には、後にフォッサマグナ（ラテン語で「深い溝」という意味）と呼ばれる大きな地溝帯によって分断されていた。また、日本列島を南北に分断する本邦最大の構造線である中央構造線は、中新世と第四紀に入ってから活発に活動し、大規模な横ずれを伴う断層であった。このように日本列島は、長い間、西南日本と東北日本が海（フォッサマグナ）によって分断されてきたことや、フォッサマグナの西端周辺に形成された日本アルプスの存在も重なり、多くの分類群において日本列島の東西で遺伝的に分化していることが報告されている [カゲロウ類のオオシロカゲロウ *Ephoron shigae* (Sekiné et al., 2013); ガガンボカゲロウ *Dipteromimus* spp. (Takenaka and Tojo, 2019); オサムシ類のマイマイカブリ *Damaster blaptoides* (Su et al., 1998); 原始的な淡水魚類（無顎類）のスナヤツメ *Lethenteron* sp. (Yamazaki et al., 2003); 両生類のアカハライモリ

Cynops pyrrhogaster (Tominaga et al., 2013), など]. また, 中央構造線による生物への影響に関してもいくつかの生物で報告されている[カゲロウ類のガガンボカゲロウ *Dipteromimus tipuliformis* (Takenaka and Tojo, 2019); オサムシ類のシコククロナガオサムシ *Leptocarabus hiurai*; 両生類のオオダイガハラサンショウウオ *Hynobius boulengeri* や, オオイタサンショウウオ *Hynobius dunni* (Tominaga et al., 2005, Tominaga et al., 2006)]. 世界的にも激しい地殻変動を有する日本列島は, 複雑に形成史をもち, そのことが日本列島に現存する生物にも大きく影響してきた. 地殻変動や複雑な地形と生物との関係について調べる最適なフィールドである. さらに, 複雑な地形だけでなく, 南北 3,000km にも及ぶ長い弧状列島である日本列島は, 亜熱帯気候から亜寒帯気候, 高標高域には寒帯のような気候であるなど, 様々な環境が存在して生態系の多様性が高く, そして種多様性や遺伝的多様性も高い.

室戸半島を含む四国南部は, 「襲速紀 (そはやき)」型要素と呼ばれ, 主として植物分野において, 中央構造線より南側の地域 (九州南部・四国・紀伊) に古い系統群が残存するような植物地理学的要素の一つとして報告されてきた (Murata and Koyama, 1976). 室戸半島においても, 複雑な地形が山から海にかけて存在している. さらに, 室戸半島は四国山地によって他の地域から隔離されている興味深い地域である. 室戸半島の地理的特徴としては, 北側に四国山地が, 南側に太平洋が面しており, 東西方向には山と海に囲まれた弓形の地形をしている. また, 山地率が高く, 山地に富んだ特徴を持っている. 室戸岬は, 幾度の隆起をへてできた土地で, 山上部から海岸線にかけて段々に平坦な地形でできている. 太平洋に突出した室戸半島は, 黒潮の影響を受け温暖で, 降水量も多い. 特に, 本課題で注目している水生生物にとっては降水量の多さは, バイオマスに大きく影響する.

本研究課題では, 2018 年度室戸ユネスコ世界ジオパーク学術研究助成金における調査において, 採集したものの 2018 年度の助成研究では用いていなかった種の中から, 日本広域において遺伝子解析が実施されている①ナミトビイロカゲロウ *Paraleptophlebia japonica* の室戸半島集団の系統学的位置について調べた. また, 前回の助成課題で報告した②サワガニ *Geothelphusa dehaani* において, 室戸半島を含む四国の集団から遺伝的に別種レベルの分化を検出し, 隠蔽種の可能性が示唆された. しかし, ミトコンドリア遺伝子 (mtDNA) COI 領域の単一遺伝子を用いた解析結果であったため, mtDNA 16S rRNA, 核遺伝子 (nDNA) ITS 領域を追加した. さらに, 室戸半島を含む四国のサワガニと従来のサワガニ (本州集団) との間で形態を比較することで, 遺伝分化だけでなく, 形態観察からも室戸半島を含む四国のサワガニの正体について追究する.

最後に, 近年, コップ一杯の河川水からそこに生息する生物相がわかる環境 DNA が発展してきている (Miya et al. 2015). しかし, 魚類や哺乳類, 鳥類など研究が進んでいるものの, 昆虫類においては大きく遅れている. そこで, 環境 DNA に用いるためのプライマーを設計するために, 室戸半島のサンプルを用いて実施した. 環境 DNA は, 生物群集を把握するために強力なツールであり, 生物多様性の把握, モニタリングにおいて, 今後重要な技術となると考えられるため, そのプロジェクトに着手した.

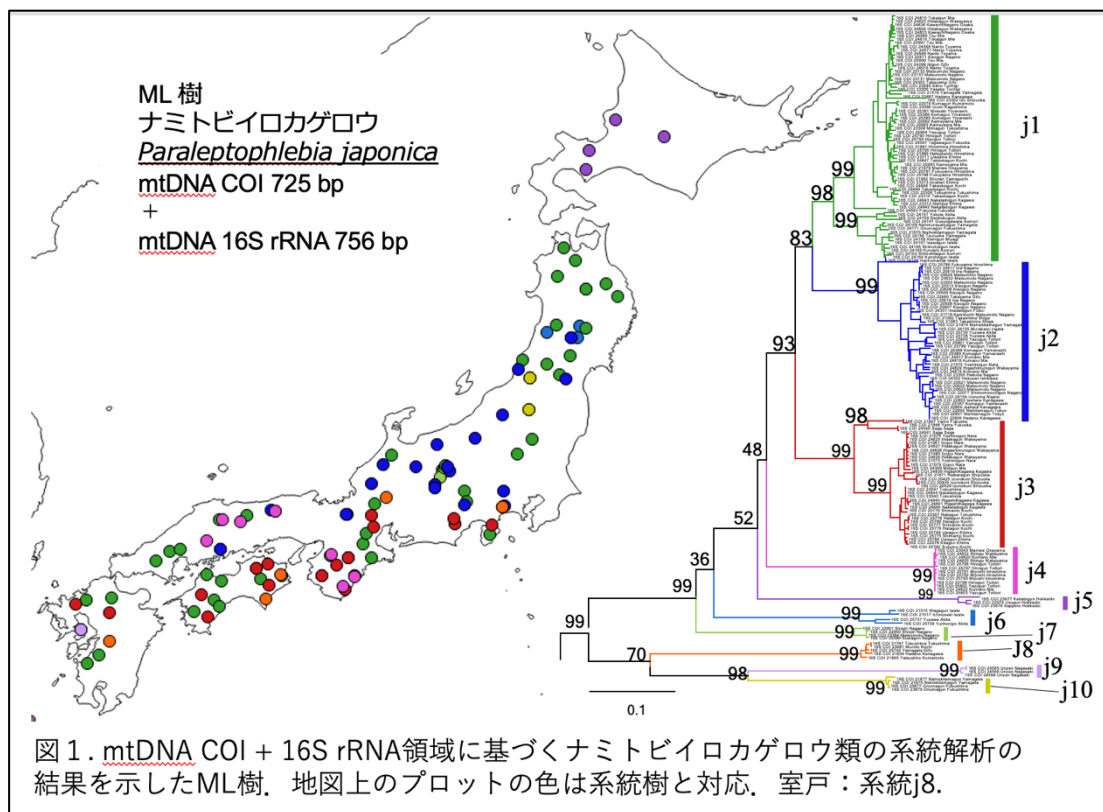
2. 方法

2018 年度室戸ユネスコ世界ジオパーク学術研究助成金の調査の際に採集したサンプルに関して、先行研究 (Takenaka et al., 2019) に準拠して遺伝子解析, および系統解析を実施した。また、形態観察に関しては、光学顕微鏡と走査型顕微鏡を用いて観察した。

3. 結果・考察

3-1. ナミトビイロカゲロウ

室戸半島で採集したナミトビイロカゲロウ *Paraleptophlebia japonica* (幼虫形態で同定) の mtDNA COI (725-bp) と 16S rRNA (756-bp) の遺伝子解析を行い、これまでに信州大学東城研究室において解析された塩基配列と合わせて、系統解析を実施した。従来の形態形質を用いた種同定ではナミトビイロカゲロウと同定されるサンプルの系統解析の結果, 10 系統が検出され, 室戸集団は系統 8 に位置付けられた (図 1)。mtDNA COI 領域に基づく, ナミトビイロカゲロウの遺伝系統群の遺伝的距離 (p -distance) は 0.127-0.205 だった。これらの遺伝的距離が種内レベルか, 別種レベルに相当するかを比較するために, GenBank に登録されている世界中のトビイロカゲロウの種間の遺伝的距離を算出した結果, 0.125-0.234 であ



った。そのため、日本列島に分布するナミトビイロカゲロウの中には、少なくとも 10 種の隠蔽種、もしくは別種が存在する可能性を示唆する。

これらの別種レベルに分化した 10 系統群において、オス成虫の交尾器形態に関して、系統間での差異を調べた。これまでに採集していた室戸半島のサ

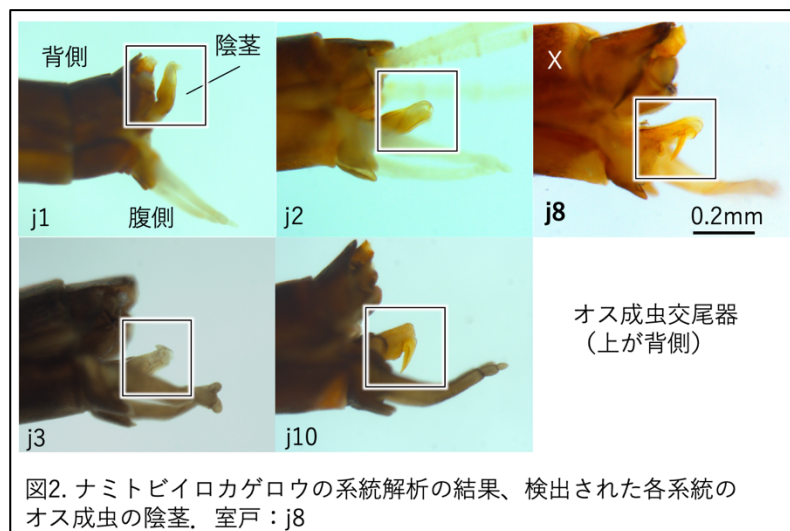
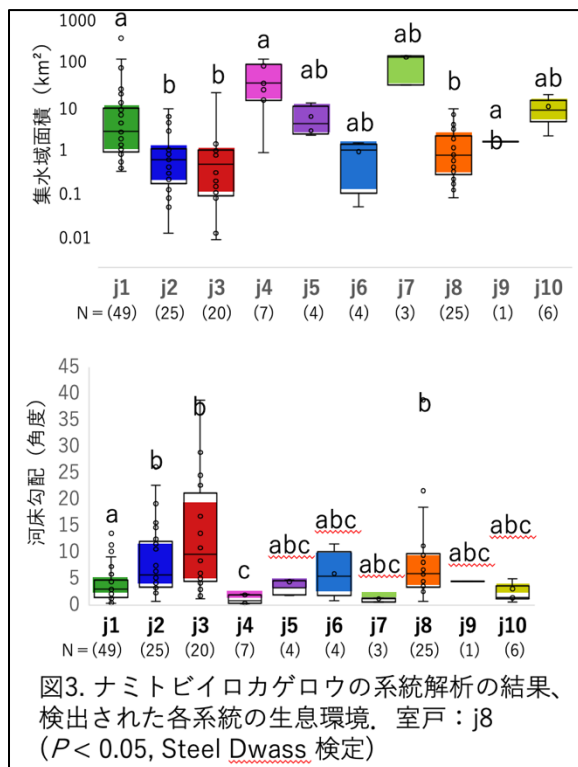


図2. ナミトビイロカゲロウの系統解析の結果、検出された各系統のオス成虫の陰茎。室戸：j8

ンプルは幼虫のみであったため、直接室戸のサンプルを精査することはできなかったが、オス成虫の採集されている同一遺伝系統の交尾器形態を比較したところ、室戸のサンプルから検出された系統 j8 のオス交尾器形態は他の遺伝系統のオス交尾器形態とは大きく異なり、また、ナミトビイロカゲロウのオス交尾器形態（石綿・竹門, 2005）とも大きく異なることが示された（図 2）。今後、室戸を含めた複数のオス成虫を採集し、形態を精査した上で種記載を進める必要があるが、明らかに別種として独立した種であることは間違いない。さらに、mtDNA COI 領域のみの分子系統解析の結果から、系統 j8 は本州・四国・九州の島間で遺伝分化することが示唆され、島間での遺伝子交流は制限されていると予想される。一方で、四国内（室戸市、徳島市、高岡郡など）において、遺伝的多型はほとんど検出されなかった。室戸半島の集団は、瀬戸内海の形成によって四国が本州と九州から分断されてから、四国内において独自に進化を繰り返す、その後は四国内においては比較的広く遺伝子交流が生じているものと考えられる。しかし、より近年の山岳形成以降に同程度の遺伝子交流が生じているかは、より鋭敏な分子マーカーを用いる必要があるだろう。

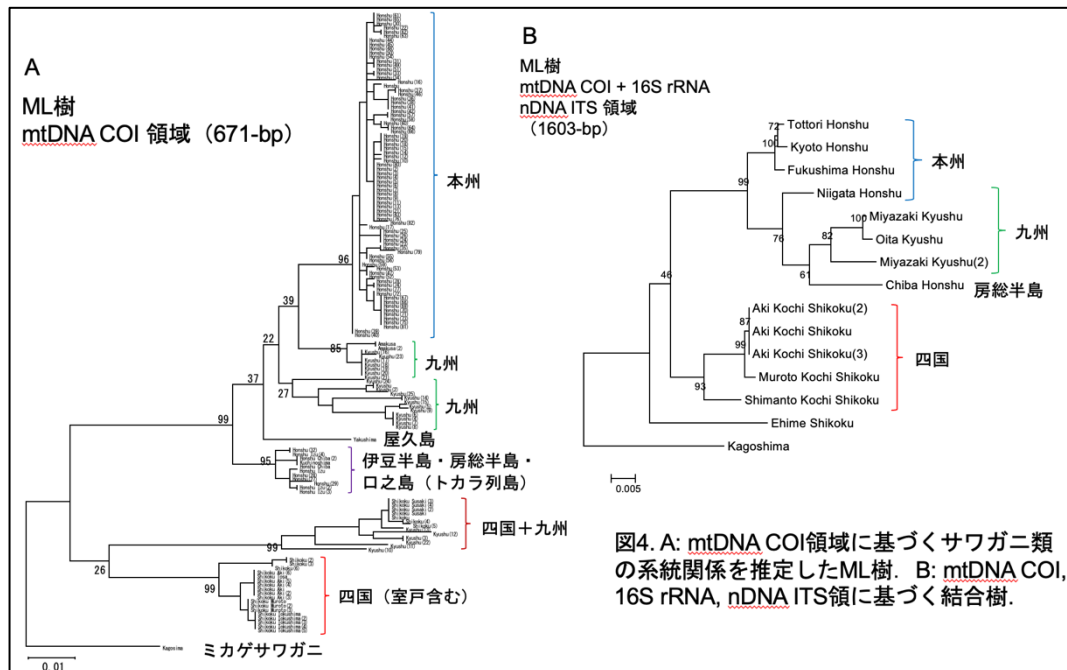
10 の遺伝系統に関して、地理的な分布傾向は検出されなかった（図 1）。つまり、各系統が種分化し、それぞれの系統が異所的に分布しているわけではなく、地域ごとには共存している。これらの結果は、種分化後（もしくは種分化のきっかけとなるイベント）にそれぞれ種が異なる環境に適応した結果、複数種が共存することになったと考えられる。この結果は、地球上において多種が共存することができるための、適応放散の結果であり、生物学における主要なテーマの一つである。ナミトビイロカゲロウは、適応放散のメカニズムを研究する上で適した種群であるといえる。カゲロウ類や水生昆虫の中には、河川内の上流から下流にかけて近縁種が流程にそった分布傾向が報告されている（例。ヒラタカゲロウ属：扇谷・中村, 2008；モンカゲロウ：Okamoto and Tojo, 2021）。そこで、各系統が採集できた地点の環境データを精査した。調べた環境は、調査地点の集水面積、河床勾配を各系統で比べた（河川規模を示す指標データ）。その結果、系統ごとに異なる環境に適応していることが

示唆された（つまり、生息する河川規模が異なる）。つまり、種分化後（もしくは系統分化後）に、それぞれの環境に適応した結果、系統間において同一地点や、河川内において流程分布している（共存している）。実際に同一地点から複数系統が検出される事例や、河川の上流と下流において、異なる系統が流程分布する例が観察された。室戸に関しては、1 地点のみの解析であるため、1 系統のみを検出している。室戸の河川は、様々な地形や、気候的環境が存在しているため、室戸内において複数の別種に相当する系統が検出する可能性は大いにある。特に、系統 j1, j3 に関しては四国内からも検出している。そして系統 1 と系統 8 は、有為に環境が異なっているため、流程にそった分布をしてもおかしくない。また、系統 5 は北海道の固有系統、系統 9 は長崎県の島原半島固有系統、系統 10 の固有系統と、それぞれの地域のみから検出される系統も発見されている。特に系統 9 は島原半島のみから検出されている。半島は、海で隔たれた島ほどではないものの、独立の特殊な生物相が分布する傾向が報告されている（Takenaka et al., 2019）。島原半島は、長崎県の南部に海に囲まれた火山性地域であり、特殊な生物相や遺伝系統が報告されることも多い。本研究課題のフィールドである室戸半島は、四国山地と太平洋で囲まれた地域であり、活発な地殻変動を有する室戸半島から固有系統（もしくは別種）が検出される可能性もあり得るだろう。次の課題としては、河川の上流域から下流域にかけての河川流程の沿った調査を実施することで、さらなる隠蔽種、もしくは別種が検出されると期待され、流程分布を詳細に調べることで、生物の適応放散に関わる興味深い事例が得られるだろう。



3-2. サワガニ *Geothelphusa dehaani*

サワガニは、河川上流域に適応する純淡水甲殻類であり、直達発生といい甲殻類では珍しく幼生期がプランクトン幼生ではなく、親と同じ姿で生まれるため、一生を通して海にくぐらない。そのため、島ごとに遺伝分化することが期待される。前回の成果において、島ごとに



遺伝分化するだけでなく、九州から少なくとも3系統（系統関係を示す支持率が低いいため明確なことはわからない）、四国内から2系統検出された。中でも、室戸半島を含む四国から採集されたサワガニは、本州から採集されたサワガニと別種レベルの遺伝分化が検出された（図4）。また、これまでの研究では単一遺伝子座のみの系統解析であり、正確にその遺伝子領域が系統関係を反映しているかわからないため、核領域を含めた2領域を加えた（3領域の全て領域を解析できたサンプルのみを用いたため解析サンプルは少なくなったが、各遺伝子を用いた系統解析の結果に大きな差異はなかった）。3領域を合わせて系統解析した結果においても、室戸半島を含む四国のサンプルは、本州や九州とは大きく遺伝分化する系統が検出された。これらのことから、室戸集団を含む系統は遺伝的には明らかに別種レベルの差異があると考えられる。

サワガニ *G. dehaani* のホロタイプ holotype (記載時に指定される種名をつけたのタイプ産地) は指定されておらず, Yamaguchi (1993)によってレクトタイプ lectotype を “Japan” と指定されている (Suzuki and Kawai, 2011). そのため, どの地域が真のサワガニ *G. dehaani* かを判断するには, ホロタイプの遺伝子, もしくは形態を調べる必要がある. そんな中でも, 本州と四国の集団間は遺伝的に別種レベルであると言える. そこで, サワガニ類で用いられる種識別の同定キーであり, 繁殖に関わる交接器として機能するオスの第一腹肢の形態を光学顕微鏡と走査型顕微鏡を用いて精査した. その結果, 現状では形態においては四国集団と本州集団との間に差異は観察できなかった. (光学顕微鏡: 図 5; 電子顕微鏡: 図 6). これらのことから本研究成果においては, これらの集団間は形態では区別

できないものの遺伝的には明らかに別種レベルに分化する隠蔽種 Cryptic species であると結論づける. 厳密に隠蔽種とは, 生殖的隔離の有無の確認が必要であるが, ミトコンドリア 遺伝子と核遺伝子の両方で遺伝分化していることから, 既に隔離している可能性が高い. 隠蔽種の発見や, その存在を把握することは, その種の進化史を解明することや, 種多様性だけでなく, 遺伝的多様性や, 遺伝的地域集団を解明することができ, 保全や, 環境教育に重要な知見を蓄積する.

サワガニは, 一生を淡水で過ごすため, 海水では生存できないものと報告されている. しかし, これまで遺伝子解析の結果から明らかに海流分散したことを示唆する結果が得られた (図 4). 鹿児島県の南に位置するトカラ列島の口之島と伊豆半島, 房総半島が遺伝的に極めて近縁であることが明らかになった. さらに, 海水と同程度, もしくはそれよりも濃い塩分濃度の海水を用いた海水耐性実験の結果, 2 週間の生存を確認した. 一方で, 基本的には島ごとに遺伝分化していることから頻繁に海流分散できたわけではなく, この 1 系統のみが海流分散によって分布域を拡大した可能性が

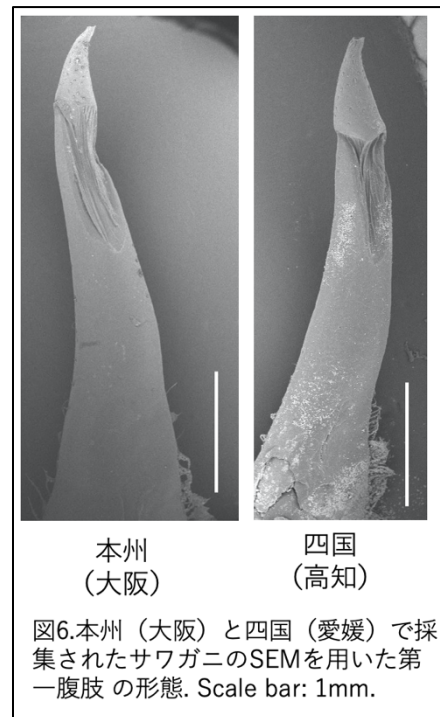


図6.本州（大阪）と四国（愛媛）で採集されたサワガニのSEMを用いた第一腹肢の形態. Scale bar: 1mm.



図5. 本州（大阪）と四国（愛媛）で採集されたサワガニと鹿児島で採集されたミカゲサワガニのオスの第一腹肢の形態. 絵は豊田 (2019) を参考に示した各種の第一腹肢.

示唆される。海流分散をしたと推定される系統に関して、これまでの観察から、海流分散した系統の全てのサンプルが青い体色をしていることが明らかになっており（例、伊豆半島・房総半島）、青いサワガニが海流分散したサワガニの特徴ではないかとの仮説を立てている。古屋・山岡（2017）は、四国内において青いサワガニを発見し、さらに四国内広域において青いサワガニと従来の赤いサワガニがどのような分布傾向を示すかを細かく調査している。しかし、その中では青いサワガニと赤いサワガニとの間に遺伝的な差異は検出されず、環境やその他の理由による影響ではないかと考えられる。さらに、私たちの研究結果からも四国からは海流分散と思われる系統は検出されていない。サワガニの体色は、潜在的に環境によって変化するものであるものの、海流分散した系統はその体色が固定しているのではないかという仮説を立てている。

これまでに海流分散したと推定される系統は、伊豆半島と房総半島から検出されている。これらの地域は、かつて本州とは独立した島であり、その後本州と接続した歴史をもつ。つまり、それぞれの島には陸続きになる以前までは、サワガニのニッチが空いていたと考えられる。海流分散したものの、本州などには既にサワガニが分布していれば、海流分散した系統が定着できる可能性は低い。サワガニが分布しない独立した島であれば、海流分散した後に定着できた可能性が高い。つまり、四国中央部に分布する青いサワガニは海流分散した系統と言うよりは、何かしらの環境による影響であると考えられる（圃場実験を実施する必要）。しかし、室戸半島や足摺岬などの太平洋に突き出た半島は、海流分散の着地点として有利で、さらに他の地域から孤立した地域であるため、海流分散した系統が定着した可能性は考えられる。古屋・山岡（2017）は四国西部ではほとんどが赤いサワガニが分布しているものの足摺岬から青いサワガニを発見している。一方で、先行研究において室戸半島のサワガニの体色の調査は実施していない。残念ながら、私たちの結果において室戸からそのような系統は検出できていないものの、数個体のみに解析にとどまっている。さらに、四国内において赤と青のサワガニが河川の上流と下流で分布することも示唆している。室戸半島において、遺伝子解析だけでなく、現地での調査などもより詳細な調査を実施する価値はあるだろう。

3-3. DNA barcoding

DNA バーコーディング

DNA バーコーディング法は、特定の生物の DNA の短い断片を使用することにより、迅速、正確、そして自動的に種を同定できる。これは、スーパーマーケットの製品コードである黒い縞模様をスキャナーで読み取る方法と似ていることから名付けられ（<http://www.ibol.org/phase1/about-us/background/>）、iBOLをはじめ、幾つものグループが DNA バーコーディングを登録、管理している。

一般的には、分類学者が形態的特徴か、鍵形質を利用して、種同定しますが、それには

高い専門性が必要である。また、標本が不完全であったり、未成熟個体である場合には、分類学者でも同定でない場合がある。そんな中、バーコードは、非専門家であっても、特定領域のシーケンス配列さえ解読することができれば、標本の種名が明らかにでき、正確で迅速かつ安価な種同定が可能となる。

そのため、長期的なモニタリングや、広範囲において同一質による手法による生物群集の理解が可能となるため、生物群集の理解や定期的なモニタリング、未だに把握できていない未記載種や隠蔽種の発見に関しても強力なツールである。しかし、昆虫、特に水生昆虫における DNA バーコーディングに関しては、そのデータベースだけでなく、バーコード領域も不確定であると言える。従来はミトコンドリア遺伝子の COI 領域が用いられてきたが、問題点も多く報告されている。そこで、私たちのグループは DNA バーコーディング領域を決定し、環境 DNA に関する技術を発展させることを目的とし、昆虫類（特に水生昆虫類）を対象に、以下に着目して理想的な汎用性 primer を設計する。まず、1) 昆虫類の全ての分類群（特に水生昆虫）で利用できる汎用性、2) 汎用性 primer に挟まれた領域が可変域であり、近縁種間を識別できるなどの条件に合う領域を探索する。私たちは、12S rRNA, 16S rRNA 領域に注目した。これらの領域は、mtDNA COI と同等の種の検出力があるとの報告もあり、かつ、COI ほど種内多型の少ない領域であり最適である。このプロジェクトにおいて室戸半島で採取したガガンボカゲロウ *Dipteromimus tipuliformis* やフタスジモンカゲロウ *Ephemera japonica*（カゲロウ目）、*Anisocentropus kawamurai*（トビケラ目）を用いて設計した primer の汎用性を調べながら、随時プロジェクトを進めている。

最後に、遺伝子解析の技術が発展し数十年が経ち、同種内の遺伝的地域集団や、形態で区別できない隠蔽種など、種多様性だけでなく、遺伝的多様性の重要性についても普及されつつある。普段見ている生物であるが、分子レベルで調べることで、より詳細な生物の変遷について解明できる。また、その地域の特殊性を保全するためにも本研究のような遺伝子解析を実施する意義は高い。生物や地域の特殊性を保全していくにあたり、その地域に住む市民の協力は欠かせない。そのため、本研究の研究成果を公表していくことで、市民の理解と意識を高めることは極めて重要である。特に、ジオパークに認定されている地域では、その地域の保全ももちろんだが、環境教育や生物多様性に関する知識を普及していく意味でも、本研究課題のような遺伝的多様性や種多様性、そして生態系の多様性など様々なレベルでの生物多様性を理解する意義は大きいと考えている。

謝辞

本調査・研究を進めるにあたり、信州大学の東城幸治教授にはご指導ならびに様々な議論をしていただいた。また、信州大学の富澤亮太氏と谷野宏樹博士には遺伝子解析などの解析において多大なるサポートをしていただいた。この他にも多くの皆様にご協力をいただきながら研究を実施させていただいた。ここにお礼申し上げる。

参考文献

- 古屋・山岡 (2017) サワガニ“青”の謎. 南の風社. 高知.
- Isozaki, Y., Maruyama, S., Nakama, T., Yamamoto, S., Yanai, S. (2011) Growth and shrinkage of an active continental margin: updated geotectonic history of the Japanese Islands. *Journal of Geography (Chigaku Zasshi)* 120, 65-99.
- 石綿進一・竹門康弘 (2005) 日本産カゲロウ類の和名 チェックリストおよび学名についてのノート. *陸水学雑誌* 66(1), 11-35.
- Martin, A.K. (2011) Double saloon door tectonics in the Japan Sea, Fossa Magna, and the Japanese Island Arc. *Tectonophysics* 498, 45-65.
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., ..., Iwasaki, W. (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society open science*, 2(7), 150088.
- Murata, G., Koyama, H. (1976) On the “Sohayaki element” defined by Dr. G. Koidzumi. *Memoirs of the National Science Museum*, 9, 111-121.
- 扇谷正樹・中村寛志 (2008) 天竜川支流小黒川におけるヒラタカゲロウ科幼虫の流程分布と季節変. *信州大学環境科学年報* 30, 57-66.
- Okamoto, S., Tojo, K. (2021). Distribution patterns and niche segregation of three closely related Japanese ephemeropterid mayflies: a re-examination of each species' habitat from “megadata” held in the “National Census on River Environments”. *Limnology*, 1-11.
- Otofujii, Y., Matsuda, T., Nohda, S. (1985) Opening mode of the Japan Sea inferred from the palaeomagnetism of the Japan Arc. *Nature* 317, 603-604.
- 乙藤洋一郎 (2017) 古地磁気語る日本列島・日本海の形成 (2016 年度 jGnet 地質学講座特集). *地質技術= Engineering geology of Japan* 7, 17-25.
- Sekiné, K., Hayashi, F., Tojo, K. (2013) Phylogeography of the East Asian polymitarcyid mayfly genus *Ephoron* (Ephemeroptera: Polymitarcyidae): a comparative analysis of molecular and ecological characteristics. *Biological Journal of the Linnean Society* 109, 181-202.
- Struck, T. H., Feder, J. L., Bendiksy, M., Birkeland, S., Cerca, J., Gusarov, V. I., ..., Dimitrov, D. (2018) Finding evolutionary processes hidden in cryptic species. *Trends in Ecology & Evolution* 33(3), 153-163.
- Su, Z. H., Tominaga, O., Okamoto, M., Osawa, S. (1998) Origin and diversification of hindwingless *Damaster* ground beetles within the Japanese islands as deduced from mitochondrial ND5 gene sequences (Coleoptera, Carabidae). *Molecular Biology and Evolution* 15, 1026- 1039.

- Suzuki, H., Kawai, T. (2011) Two new freshwater crabs of the genus *Geothelphusa* Stimpson, 1858 (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Potamidae) from islands of southern Kyushu, Japan. *Crustacean Research* 40, 21-31.
- Takenaka, M., Tojo, K. (2019) The ancient origin and large genetic differentiation across the geotectonic faults of a dipteromimid mayfly family endemic to the Japanese Islands. *Biological Journal of the Linnean Society* 126, 555–573.
- Takenaka, M., Tokiwa, T., Tojo, K. (2019) Concordance between molecular biogeography of *Dipteromimus tipuliformis* and geological history in the local fine scale (Ephemeroptera, Dipteromimidae). *Molecular phylogenetics and evolution* 139, 106547.
- Tojo, K., Sekiné, K., Takenaka, M., Isaka, Y., Komaki, S., Suzuki, T., Schoville, S.D., (2017) Species diversity of insects in Japan: Their origins and diversification processes. *Entomological Science*, 20, 357–381.
- Tominaga, A., Matsui, M., Nishikawa, K., Tanabe, S., Sato, S. I. (2005) Genetic differentiations of *Hynobius naevius* (Amphibia, Hynobiidae) as revealed by allozyme analysis. *Biochemical Systematics and Ecology* 33(9), 921-937.
- Tominaga, A., Matsui, M., Nishikawa, K., Tanabe, S. (2006) Phylogenetic relationships of *Hynobius naevius* (Amphibia: Caudata) as revealed by mitochondrial 12S and 16S rRNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38(3), 677-684.
- Tominaga, A., Matsui, M., Yoshikawa, N., Nishikawa, K., Hayashi, T., Misawa, Y., Tanabe, S., Ota, H. (2013) Phylogeny and historical demography of *Cynops pyrrhogaster* (Amphibia: Urodela): Taxonomic relationships and distributional changes associated with climatic oscillations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66, 654-667.
- Yamaguchi, T. (1993). The contributions of von Siebold and H. Burger to the natural history of Japanese Crustacea. Ph. F. von Siebold and Natural History of Japan. *Crustacea*, 15-598.
- Yamazaki, Y., Goto, A., Nishida, M. (2003) MtDNA sequence divergence between two cryptic species of *Lethenteron*, with reference to an improved identification technique. *Journal of Fish Biology* 62, 591-609.