

令和元年6月20日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07522

研究課題名(和文) 琵琶湖固有カワナ類の系統解析：遺伝子浸透が系統樹および適応度に与える影響

研究課題名(英文) Molecular phylogeny of *Semisulcospira* endemic to Lake Biwa: the influence of genetic penetration on the phylogenetic tree and fitness

研究代表者

浦部 美佐子 (Urabe, Misako)

滋賀県立大学・環境科学部・教授

研究者番号：50263421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：琵琶湖固有カワナ類では分子系統樹と形態種との不一致が知られているが、その原因として種間交雑が考えられる。そこで、ddRAD解析により琵琶湖固有種の系統樹を作成し、また同所分布する2種のカワナ類について、核DNAのPKInt2領域とddRADによる系統樹の比較および構造解析を実施した。その結果、固有カワナ類は約40万年前以降に放散したと考えられた。PKInt2領域による2種の系統解析は従前の結果となったが、ddRADの系統樹では両種は完全に分かれ、構造解析の結果も種間交雑の存在を示さなかった。これら2種間には近年の種間交雑はなく、PKInt2塩基配列多型は祖先多型に由来すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、従来の少数の塩基対や酵素多型に基づくよりもはるかに高い解像度で琵琶湖固有カワナ類分子系統樹が示され、単一水系で多様に放散したこの属の特異な進化の概要が初めて高い信頼度で明らかにされた。分岐年代の推定により、固有種の放散は琵琶湖湖盆の拡大が引き鉄となったことが示唆された。また、分子系統樹と形態種との不一致の理由として従来考えられてきた種間交雑が否定され、祖先多型によるものと考えられた。従来の遺伝子解析ではnDNA、mDNAの両方で形態種との不一致が見出されたが、それがddRADの系統樹に全く反映されない理由は不明であり、その解明が今後の課題として提起された。

研究成果の概要(英文)：The traditional molecular phylogenies of *Semisulcospira* endemic to Lake Biwa based on several hundreds of bp of mDNA or nDNA does not coincide the morphological species, so the ddRAD analysis was carried out to construct a phylogenetic tree with high resolution. Moreover, two sympatric species were analyzed by both traditional and ddRAD phylogenetic analysis and the structure analysis. The comprehensive phylogenetic analysis showed that endemic species were radiated in the lake around 0.4 mya. The phylogenetic tree based on the PKInt2 region of nDNA did not separate two morphological species analyzed. However, in the phylogenetic tree by the ddRAD analysis, the two species were separated completely. The structure analysis showed no signs of hybridization between the species. These results indicate that the two species did not hybridize in recent years and suggest that the genetic variation in the PKInt2 region derived from an ancestral polymorphism.

研究分野：陸水生物学

キーワード：種分化 固有種 分子系統 構造解析 生物多様性 種間交雑 祖先多型

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

琵琶湖は日本唯一の古代湖として長い歴史を持ち、多くの固有種を有している。中でも、カワニナ類は15種におよぶ固有種を有し、湖内で唯一放散を遂げた生物群である。また、核型が軟体動物の中では例外的に多様であり、mtDNA (CO1 領域)の変異が極度に多型であるなど、特異な進化様式をもっている。しかし、その系統関係は調査した遺伝子マーカー (DNA 塩基配列または酵素多型)によって異なる結果となり、いまだ説明されていない。また、mtDNA、核DNA (ITS-1 領域)のいずれを用いても固有種・非固有種の入り交じった系統樹となることから、種間交雑の存在が強く疑われていた。

平成25年度基盤研究(C)では、シングルジーン遺伝子であるフォスファージェンキナーゼ (Pk) 遺伝子のイントロン領域 (Pk-Int2) の塩基配列解析を行い、従来用いていた rDNA の ITS-1 領域による解析結果を比較した。その結果、両者の分子系統樹はトポロジーが全く異なること、ITS-1 をホモ接合にもつ個体であっても、Pk-Int2 では非固有種カワニナ類に由来すると推定される塩基配列を高頻度でヘテロにもつことが明らかになった。このことから、rDNA では他の生物から知られている非中立な協調進化 (Koch, et al. 2003) が起こっており、分子系統解析および交雑のマーカーとして適切ではないことが明確となった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、琵琶湖固有カワニナ類についてより信頼性の高い分子系統樹を作成すること、および交雑の有無を判定し、遺伝子浸透の程度を定量化することである。

上記の目的を達成するため、次世代シーケンサーによる系統解析およびストラクチャー解析を行うこととした。次世代シーケンサーによる系統解析は、判読塩基数は比較的少ないがホモロジ配列を多く得られる double-digested RAD sequencing (Patterson et al. 2012) の手法によって行った。この解析によって、従来よりも解格段に解像度の高い系統樹が得られる。一方、種間交雑の存在が推定される場合、通常の系統解析では交雑の影響が排除できない。そこで、dd-RAD sequencing によるストラクチャー解析を実施し、種間交雑の有無を検討した。また、ストラクチャー解析の結果を Pk-Int2 による系統解析と比較し、従来の分子系統解析および交雑の遺伝子マーカーの適切性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーによる琵琶湖固有カワニナ類の系統解析

固有カワニナ類のサンプルは2014年に収集され、高知大学が保管しているものを用いた。これらのサンプルからライブラリを作成し、double-digested RAD sequencing による塩基配列解読を行い、系統樹を作成した。追加サンプルが必要な時は滋賀県立大学で採集を行った。

(2) カワニナ類の交雑を評価するためのストラクチャー解析の実施

二次交雑の程度を解析するため、同所的に分布するカワニナ類を用いてストラクチャー解析を実施した。ITS-1 の解析結果により、遺伝子浸透が疑われる個体群 (琵琶湖北湖のハベカワニナ *Semisulcospira (Biwamelania) habei* およびチリメンカワニナ *S. (Semisulcospira) reiniana*) から20個体程度をサンプリングし、dd-RAD 遺伝子座を用いてストラクチャー解析を行った。

(3) (2)の研究と同一のサンプルを用い、従来の遺伝子マーカーである Pk-Int2 領域を用いて系

統解析を行った。PK-Int2 領域には高頻度でヘテロ接合個体が見られるため、それらについては遺伝子のサブクローニングを行い、それぞれの塩基配列を明らかにした。

4. 研究成果

ddRAD により得られた約 60 万塩基対のデータを用いた系統樹が作成された (Figure 1)。その結果、琵琶湖固有種群の系統解析 (模式産地を中心とした標本による) は、固有種が 2 群からなるという従来の見解を支持した。また、個々の種の分岐年代を推定することができた。また、化石証拠および Extended Bayesian Skyline Plot analysis による過去の個体群サイズの推定により、固有カワニナ類の放散が生じたのは現在の琵琶湖盆が拡大した約 40 万年前以降であると考えられた。これらの結果は Miura et al. (2019) として公表された。また、この研究に関連した化石種のカワニナ類の記載論文が公表された (Matsuoka & Miura, 2019)。

また、同所分布するハベカワニナ (固有種) とチリメンカワニナ (非固有種) を対象とした PK-Int2 領域による系統解析の結果、両種が入り交じる系統樹が構築され、従来の知見通り形態的種と合致しない結果となった (Figure 2)。しかし、ddRAD 遺伝子座の塩基配列による系統樹では、ハベとチリメンは 2 つの群に完全に分かれた (Figure 3)。構造解析の結果でも両種は明確に分かれ、種間交雑の存在は示されなかった (Figure 4)。結論として、同所分布するハベおよびチリメンの間で近年の種間交雑は起きていないと考えられた。したがって、現在までに検討された遺伝子部位 (C01, ITS-1, PKInt2) はいずれもカワニナ類の種間関係を表すマーカーとしては不適切であり、これらの配列多型は祖先多型に由来すると考えられた。

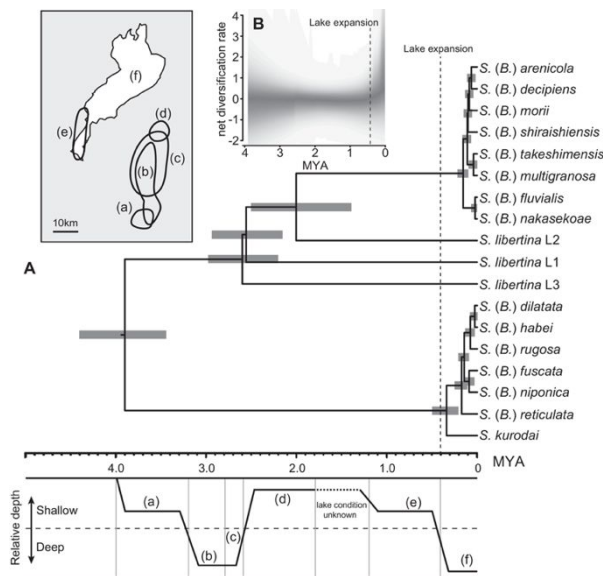


Figure 1. Phylogenetic evidence for the recent radiation of the subgenus *Biwamelania* (A). Divergence times were estimated for the *Biwamelania* species and related riverine species, under the multispecies coalescent model. Horizontal bars represent the upper and lower interval bounds for 95% of the highest posterior densities (HPDs). The geographical locations and relative depth of the past and current Lake Biwa are also shown (see details in Fig. 1). Plot of net diversification rate through time based on BAMM analysis (B). Shaded areas denote 90% Bayesian credibility intervals.



Figure 2. PKInt2 領域(487 bp) に基づく系統樹 (UPGMA 法:右に一部を拡大して示す). H はハベカワニナ, R はチリメンカワニナを示し、その後の数字はそれぞれの種の個体番号を示している。個体番号の後ろの数字は同一個体から得られたサブクローンの識別番号を、アルファベットはダブルピークが 1ヶ所のみであった個体の予測された配列を示している。

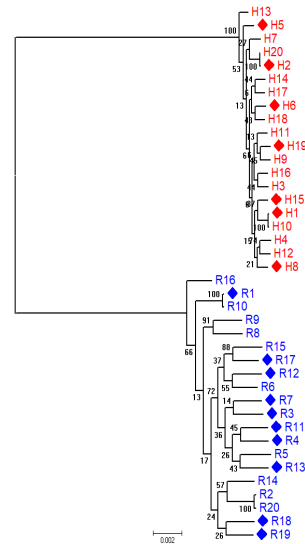


Figure 3. ddRAD 遺伝子座に基づく系統樹 (ML 法). H および はハベカワニナ, R および はチリメンカワニナを示し、その後の数字はそれぞれの種の個体番号を示している。



Figure 4. ddRAD 遺伝子座に基づく K=2 の STRUCTURE 解析。2つのクラスターがベイズ法によるクラスタリングによって識別され、2つの色で示されている。赤色が Cluster 1 を示し、青色が Cluster 2 を示している。各列は個々のカワニナ類個体を示しており、左側 20 列はハベカワニナ、右側 20 列はチリメンカワニナである。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Miura, O., Urabe, M., Nishimura, T., Nakai, K. & Chiba, S. Recent lake expansion triggered the adaptive radiation of freshwater snails in the ancient Lake Biwa.

Evolution Letters, 3: 43-54. (2019)

Matsuoka, K. & Miura, O. Four new species of the genus *Semisulcospira* (Mollusca: Caenogastropoda: Semisulcospiridae) from the Plio-Pleistocene Kobiwako Group, Mie and Shiga Prefectures, central Japan. Bulletin of the Mizunami Fossil Museum, 45: 87-94.

(2019)

〔学会発表〕(計 2 件)

坂本啓伍・三浦収・浦部美佐子・吾妻健 同所的に生息するカワニナ属 2 種における、遺伝構造と交雑の有無の解明。日本生態学会第 66 回全国大会。(2019)

坂本啓伍 カワニナ類における新規遺伝子マーカーの有効性の検討。日本陸水学会近畿支部会第 28 回研究発表会。(2017)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：三浦 収

ローマ字氏名：(MIURA, Osamu)

所属研究機関名：高知大学

部局名：教育研究部総合科学系複合領域科学部門

職名：准教授

研究者番号（8桁）：60610962

研究分担者氏名：吾妻 健

ローマ字氏名：(AGATSUMA, Takeshi)

所属研究機関名：高知大学

部局名：医学部

職名：特任教授

研究者番号（8桁）：40117031

(2)研究協力者

研究協力者氏名：坂本 啓伍

ローマ字氏名：(SAKAMOTO, Keigo)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。