

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：18001

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14787

研究課題名（和文）ウミウシに見出された特異なミトコンドリアゲノムの由来と進化の探索

研究課題名（英文）Investigating origin and evolution of unique mitochondrial genome found in sea slugs

研究代表者

依藤 実樹子（Yorifuji, Makiko）

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・ポスドク研究員

研究者番号：10646467

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000 円

研究成果の概要（和文）：軟体動物ウミウシ類には、核遺伝子とミトコンドリア遺伝子の示す系統進化関係が著しく異なる種が存在する。属内でこの変異パターンを示すムカデミノウミウシ属を用い、進化過程の解明に向けた基礎情報を得ることとした。特異なミトゲノムには偽遺伝子である可能性があったが、遺伝子発現および核ではなく細胞質内に局在することが確認され、偽遺伝子である可能性は低いことが証明できた。系統解析方法の再考とともに、一部分類群のミトゲノムに生じている系統進化関係の齟齬は、主にタンパク質遺伝子の加速進化によるものと考えられ、その起源は科・属といった低次分類群ではなく、それよりも高次の分類群が分岐した時期に遡るものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟体動物のうち巻貝類の内部の系統進化関係は未解明で、その分類体系は長く混乱している。特にウミウシ類の属する異鰓亜綱はその筆頭にあり、近年この分類群の分子系統学的解析が進められているが、全ての分類群を網羅した解析例は未だにない。一般向け図鑑の需要が高まる中、確たる情報が一般還元されていない状況である。本申請研究は、異鰓亜綱のうち特にウミウシ類におけるミトゲノムの進化に関する知見をもたらし、異鰓亜綱の系統進化関係解明の糸口となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Some species of nudibranch mollusks, commonly known as sea slugs, show different phylogenetic relationships when they analyzed by nuclear genomes or by mitochondrial genomes. Here we use the aeolid nudibranch genus Pteraeolidia, which showed such diversity within the genus, and tried to obtain basic information to further investigate their unique evolutionary history. We had to aware that their unique mitochondrial genome was derived from pseudogene; thus, their gene expression and localization in cytoplasm (not in nuclear) were confirmed. We also considered genes and algorithm to use in phylogenetic analyses. So far, we concluded that highly diverged mitochondrial lineages were derived from accelerated evolution occurred in mitochondrial protein genes, and this acceleration occurred in higher taxon, not in lower taxon of family or genus.

研究分野：海洋生物学、分子系統学、生態学

キーワード：ミトコンドリアゲノム ウミウシ 加速進化 集団遺伝 遺伝暗号

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは軟体動物ウミウシ類の一部の系統関係が、核遺伝子とミトコンドリア遺伝子で解析した場合に著しく異なり、それらの種のミトコンドリアゲノムに目レベルに相当する極端な塩基配列の違いが生じていることを見出した。本研究は、特に属内で際立った変異パターンを示すムカデミノウミウシ属の種を対象とする。本属は単型属と考えられてきたが、申請者らの調査・解析により少なくとも4種が存在することを見出した。それら4種は、核遺伝子ではP距離で約5%と同属別種レベルの違いであったが、ミトコンドリア遺伝子では30-50%異なり、同遺伝子に基づく分子系統解析ではムカデミノウミウシ属が多系統になり、属内に目レベルで異なる種が混在する結果となった。一部のムカデミノウミウシについてミトゲノム全長配列を得たところ、遺伝子配置は既知のウミウシ類と同一で、塩基配列はウミウシ類と最も相同性が高く、タンパク質遺伝子は全てアミノ酸配列に翻訳可能であることが確認された。また、一部の個体では、1個体が2種類以上のミトゲノムを持つ、ヘテロプラスミーの可能性を示唆する結果が得られ、そのような個体は複数種が同所的に生息する地点から多く見つかる傾向があった。これらの結果は種分化に伴うゲノムの変化過程や通常の種間交雑にともなう遺伝子浸透では説明が難しく、その背景には、もっと奇異な生物間相互作用によるゲノムの水平転移などが介在しているものと予測される。核とミトコンドリアの遺伝子が示す系統樹が著しく異なる例は別属のウミウシ類でも確認されたが、それを示している既往研究はWollscheid & Wägele (1999)のみで、その後の分子系統学的研究では、解析上の困難を避けるためにデータの一部が解析から除外されているようである。

2. 研究の目的

本研究では、同属内にミトゲノムの著しい違いが見出されたムカデミノウミウシ属を対象に、1)集団遺伝学的解析による当該ゲノムの変異性の把握、2)組織学的解析を通じた細胞内でのゲノムの局在性の確認による偽遺伝子の可能性の検討、3)飼育実験による餌動物からのミトゲノム取り込みの可能性を検証し、本グループのミトゲノムの伝播過程と進化過程の解明を目指す。ムカデミノウミウシ属をモデル生物群として、ミトゲノムと核ゲノムの比較による状況整理の上で、ミトゲノムの種差をもたらずと考えられる種々の仮説検証を行い、ウミウシ類の持つ「ミトゲノム」の実態解明を目指す。さらに、異鰓亜綱や巻貝類の系統枠内におけるムカデミノウミウシ各種の位置を調べ、ミトゲノムの由来と進化を探る。

3. 研究の方法

(1) **核遺伝子とミトコンドリア遺伝子の対応関係の調査 (集団遺伝学的解析)**: ムカデミノウミウシ属の核遺伝子の遺伝型に基づく遺伝的集団構造を調べ、次いでミトゲノムのCOIや16S rRNA 遺伝子の遺伝型との対応関係を調べる。

(2) **ムカデミノウミウシ属のミトゲノム比較**: ミトゲノム進化過程の詳細を追うために、ムカデミノウミウシ属のミトゲノム全長配列を決定し、それらの特徴を比較する。参照できる近縁種の遺伝子情報が少ないことから、プライマーウォーキングなどの従来法と、次世代シーケンサーによるショットガンシーケンスなど複数の手法を組み合わせる。

(3) **“ミトゲノム”の局在と遺伝子発現の確認**: 全長配列解読済のムカデミノウミウシ2種のミトゲノムはいずれも環状DNAで、全てのタンパク質遺伝子がアミノ酸配列に翻訳可能であることが確認されている。しかし、著しい塩基配列の違いが偽遺伝子であることに起因する可能性が依然としてあるため、細胞内における局在と遺伝子の発現から確認する。各隠蔽種について、*in situ* ハイブリダイゼーション (以下、ISH) により「ミトゲノム」が実際

にミトコンドリアに存在するかを調べる。ISH 用プローブは、上記により得られた「ミトゲノム」配列を基に作成する。次いで、RNA 抽出物の逆転写 PCR により、COI など主要な遺伝子が実際に発現しているのかを調べる。

(4) 遺伝暗号の確認：既に解読したムカデミノウミウシのミトコンドリアタンパク質遺伝子は、全て通常の無脊椎動物の遺伝暗号によりアミノ酸配列に翻訳可能であったが、著しい塩基配列の違いは、遺伝暗号の変化により生じた可能性がある。そこでムカデミノウミウシ各種について、ミトコンドリア画分よりタンパク質を抽出しアミノ酸配列を解読、ミトゲノムコードのものについて、相当する塩基配列と比較し、遺伝暗号を調べ、通常の無脊椎動物の暗号との差異の有無を調べる。

(5) ヘテロプラスミーに関する検証：2 種類以上のミトゲノムを持つ可能性が示唆された個体について、以下の解析によりヘテロプラスミーの可能性を精査する。これまでに検出された「ミトゲノム」配列は、いずれも既知のウミウシ遺伝子と相同性が高く、ウミウシ類に由来する可能性が高いと考えられた。ウミウシ類には、餌生物の細胞小器官を消化せずに自身の細胞内に取り込み、利用する現象が知られている。ウミウシを捕食するウミウシも知られ、他種や同種他個体のミトコンドリアを獲得し、利用している可能性が考えられる。そこで、核とミトゲノムの遺伝型が明らかなムカデミノウミウシ属の同種および他種、および近縁のミノウミウシを人為的に捕食させ、半月～ひと月飼育したのちにミトゲノムの遺伝型を再度調べ、後天的なミトコンドリア獲得の有無を調べる。獲得の可能性が示唆された場合は、ISH によりミトコンドリア(ゲノム)の局在を調べる。

(6) 異鰓亜綱の分子系統解析：上記項目により得られたムカデミノウミウシ属の情報と、DNA データベースより取得した異鰓亜綱を中心とする軟体動物のそれらの情報を合わせて分子系統学的解析を行い、異鰓亜綱内でのムカデミノウミウシ種群の系統的位置を調べる。特異なミトゲノムを持つ可能性のある別属のウミウシ類についても、ムカデミノウミウシとの系統関係や異鰓亜綱内部での系統的位置を調べ、その由来と進化を考察する。

4. 研究成果

(1) 核遺伝子とミトコンドリア遺伝子の対応関係の調査(集団遺伝学的解析)

調査域を拡大し、核遺伝子に基づくムカデミノウミウシ属の遺伝的集団構造を調べたところ、新たに 1 種が見出され、本属には少なくとも 5 種が存在することが明らかになった(図 1)。種の記載に関しては、過去の文献との対応を取るため形態形質の確認を進めており、これが完了次第行う予定であるが、5 種は便宜的に発見順に A～E 種と呼んでいる。なお D 種は、オーストラリア・シドニー近海に生息する個体に基づく近年の記載変更(Wilson and Burghardt 2015)により、*Pteraeolidia ianthina* と確認されている。

核遺伝子の遺伝型に基づく種判別を経て、ミトゲノムの COI 遺伝子の遺伝型との対応関係を調べたところ、系統樹上では概ね種ごとのクレードが形成されるものの、種 B のクレード内に種 A・C の一部が入り込む系統関係が示唆された(図 2)。これらには long branch

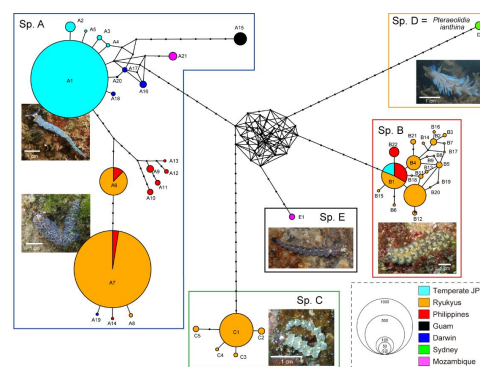


図 1. 核リボソーム遺伝子内部転写調節領域 1 (nrITS1) に基づくムカデミノウミウシ属の遺伝的集団構造。

attraction により本来の系統関係に依らない箇所に位置している可能性はあるが、加速進化が起きている可能性も考えられる。種 C の一部個体には、種 C に由来する 2 クレードに属する 2 つの遺伝型がいずれも検出されるヘテロプラスミーの可能性が考えられるものがあった。モザンビーク産の種 A については、ゲノム抽出物の状態が悪く、PCR・シーケンスが不調であったため、他の遺伝型が検出される可能性があるものと考えている。

(2) ムカデミノウミウシ属内のミトゲノム比較

種 A・B のミトゲノム全長配列は既に得られているが、他種についても解読を試みた。次世代シーケンサーを用いたショットガンシーケンスを初めて試みたが、ゲノム抽出物の状態により、全長の 1/3 程度と思われる配列しか得ることができなかった。得られた塩基配列に基づいてプライマーウォーキングも試みたが、PCR 増幅が上手く得られなかったことから、再度の NGS シーケンスを引き続き試みている。

一方、既にミトゲノム全長配列の得られている種 A・B については、同じく全長配列の得られている巻貝類とともに、遺伝子ごとに系統進化関係を調べたところ、16S および 12S リボソーム遺伝子においては核遺伝子に基づく系統進化関係に類似したものが示されるのに対し、タンパク質遺伝子においては、本研究の当初見出されていたと同様に、種 A・B の間に目レベルに相当する違いが示されることがわかった。従って、ミトゲノムにおける属内の顕著な違いは、タンパク質遺伝子によるものであり、遺伝暗号の進化探索などが今後の鍵となると考えられた。

(3) “ミトゲノム”の局在と遺伝子発現の確認

全長配列解読済のムカデミノウミウシ A・B2 種のミトゲノムはいずれも環状 DNA で、全てのタンパク質遺伝子がアミノ酸配列に翻訳可能であることが確認されている。しかし、著しい塩基配列の違いが偽遺伝子であることに起因する可能性が依然としてあるため、細胞内における局在と遺伝子の発現から確認する。各隠蔽種について ISH により「ミトゲノム」が実際にミトコンドリアに存在するかを調べた。特に、近縁ウミウシとは異なる系統進化関係が示される A 種について、COI 遺伝子の部分配列をプローブとする ISH を行った。解析過程で、ムカデミノウミウシ組織は自家蛍光を示すこと、また成体は渦鞭毛藻類を体内に共生することからこの葉緑素の自家蛍光へも対処を要し、最終的に、共生藻を獲得する前の幼生を対象にホルマウント ISH を行い、当該「ミトゲノム」が核に存在するものではなく、

高率で真正ミトゲノムと考えられることが示された(図 3)。この自家蛍光の問題により、項目 5 において当初計画していた、親子間でミトゲノムの遺伝を調べることは、現段階では断念せざるを得ないと判断した。また、RNA 抽出物

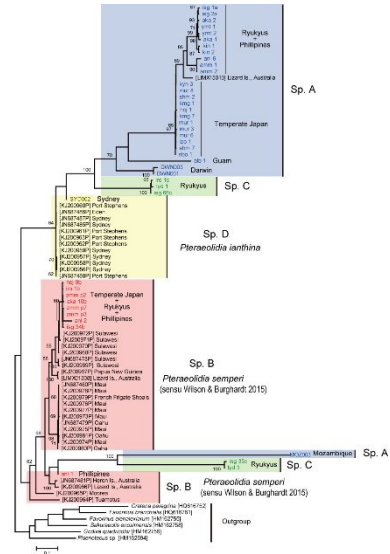


図 2 .ミトコンドリア COI 遺伝子に基づくムカデミノウミウシ属の系統関係 .種判別は核遺伝子 (nrITS1) に基づく .外群は近縁のミノウミウシ類 .

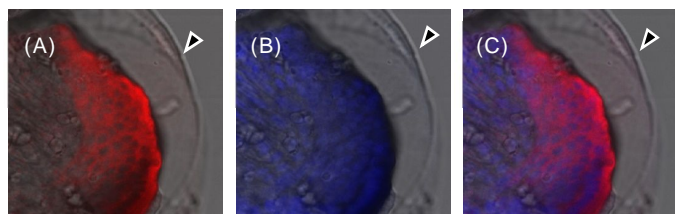


図 3 . ムカデミノウミウシ A 種幼生を用いた WISH 像 . (A)Fast Red によるミトゲノムプローブの標識、(B)TO-PRO3 による核・染色体の標識、(C)合成画像 . 染色されているのは幼生の腹足、矢印は幼生の貝殻を示す .

の逆転写 PCR によっても、COI 遺伝子の発現が確認された。

(4) 遺伝暗号の確認

上記項目 2 により、ミトコンドリアタンパク質遺伝子を解析し、遺伝暗号の変化の可能性を精査する必要が考えられたが、他項目に時間を要したため、タンパク質抽出を試みて必要な組織量を見積もるところまでしか実施できなかった。大型個体が得られた場合にしか解析できない可能性が考えられたが、今後遂行する予定である。

(5) ヘテロプラスミーに関する検証

事前の解析結果に加えて、本研究項目 1 の過程においても 2 種類以上のミトゲノムを持つ可能性が考えられる個体が見出された。まずは、本邦に生息する種 A・B・C が全て採集できた際に、種間の捕食が起こるかを総当たりで調べたが、生体および組織片のいずれについても捕食が誘引されることはなかった。申請者は過去にムカデミノウミウシ属において共喰いを観察したことがあるが、非常に稀な現象であり、今回の観察でもそれが裏付けられたことと、「ヘテロプラスミー」個体より見出されている遺伝型と各種の生息場所の組み合わせを考慮すると、現世でゲノムが水平転移している可能性はかなり低いものと考えられた。

(6) 異鰓亜綱の分子系統解析

ミトゲノム全長配列が得られている種 A・B を中心に、DNA データベースより取得した異鰓亜綱を中心とする軟体動物のそれらの情報を合わせて分子系統学的解析を行い、異鰓亜綱内でのムカデミノウミウシ種群の系統的位置を調べた。解析アルゴリズムによる影響も考慮し、これまで主に用いてきた最尤法だけでなくベイズ法を用いた。最尤法では種 B が近縁ウミウシとクレードを形成し、種 A が別目のクレードに位置する結果となり、種 A が long branch attraction の影響を受けている可能性が否定できなかったが(図 4 左)、ベイズ法では種 A・B と同じクレードに位置し、種 A の枝長が長いという結果になり、long branch attraction の影響を防ぐことができたと考えられた(図 4 右)。この結果から、種 A のミトゲノムにおいて加速進化が起こっていると考えられる。

本研究遂行中に、別に着手していた別上科メリベウミウシ属の解析においても、1 個体から複数のミトコンドリア遺伝子様塩基配列が得られた。このことも併せて、ヘテロプラスミーおよび一部分類群のミトゲノムに生じている加速進化は、やはり現世ウミウシ間の捕食に起因する可能性は低く、その起源は科・属といった低次分類群ではなく、それよりも高次の分類群が分岐した時期に遡るものと考えられた。

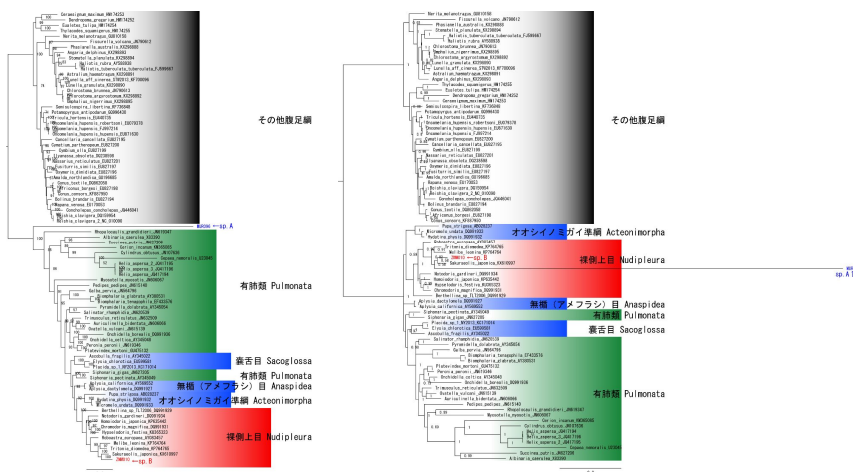


図 4. ミトコンドリア全遺伝子に基づく腹足綱の系統関係。左：最尤樹、右：ベイズ樹。ムカデミノウミウシ種 A・B はそれぞれ青字と赤字で示す。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 Yorifuji, M., Hirano, Y.M., Takeshima, H., Mabuchi, K., Harii, S., Nishida, M.
2 . 発表標題 Genetic and ecological diversity of aeolid nudibranchs of the genus Pteraeolidia Bergh, 1875
3 . 学会等名 Joint events of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of Zoological Society of Japan (国際学会)
4 . 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----