

令和元年6月6日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18606

研究課題名(和文) 中米沿岸に分布する吸虫類の姉妹性の検証と多様性の解明に向けて

研究課題名(英文) Elucidating the diversification pattern of trematodes in the Central American coasts

研究代表者

三浦 収 (Osamu, Miura)

高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・准教授

研究者番号：60610962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：中米沿岸に広く分布する巻貝とそれに感染する吸虫類の多様化のパターンを検討した。次世代シーケンズ解析を用いて巻貝と吸虫類のゲノムDNA情報を得て、その情報を基にした分子系統樹を作成した。その結果、巻貝と吸虫類の両方に、形態からは区別のつきにくい隠蔽種が含まれていることが明らかとなった。また、吸虫類の分子系統樹を精査したところ、中米地峡の形成による地理的隔離や宿主の種分化が吸虫類の多様化に与えた影響は限定的である可能性が示唆された。より確実な議論をするためには、さらなるデータの取得が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

何故、地球上にはこれほどまでに多様な生物がいるのであろうか？宿主と寄生虫の特殊な種間関係はこの謎を解く素晴らしい実験系である。何故なら、寄生虫は生存に必要な多くの資源を依存しているからである。本研究では、宿主である巻貝が多様化したときに、寄生虫がその変化にどのように適応するのかを遺伝学的な側面から検討した。このような研究を積み重ね、将来的に蓄積した情報を精査・統合していくことが生物多様化の謎を解くための大切なプロセスであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：I investigated the diversification pattern of the snails and their trematode parasites distributed along the Central American coasts. I determined their partial genome DNA sequences by a next generation sequencer and inferred their molecular phylogenies. I found that both the snails and trematodes include several cryptic species which are often hardly distinguished by morphological inspections. Further, the molecular phylogeny of trematodes suggests that there can be a limited contribution of the formation of the Central American Isthmus on the diversification of trematodes, though additional dataset and analyses are necessary to draw a firm conclusion.

研究分野：進化生態学

キーワード：巻貝 二生吸虫 共種分化 宿主転換 中米地峡

1. 研究開始当初の背景

寄生は生物界で最も成功している生活様式の一つである。自由生活型の生物の多くは、少なくとも1種類以上の生物に寄生されていることから、寄生生物は自由生活型の生物と同様か、それ以上に多様性が高いことが予想される。しかし、寄生生物がどのように多様化するのか、そのメカニズムはあまり分かっていない。

寄生生物は生存に不可欠な資源を宿主に依存している。そのため、寄生生物の多様化のメカニズム解明の糸口は、宿主との相互関係にあると言える。宿主の種分化は寄生生物にとっての資源の変化と捉えることができる。したがって、宿主が種分化した場合、寄生生物は生息環境の変化に晒されると考えられる。

中米地峡は、宿主と寄生生物の多様化の研究をするうえで理想的な場所である。約300万年前に完成した中米地峡は、北米大陸と南米大陸をつなぎ、それによって太平洋と大西洋は分断された。このような地球規模の地理的変化により、数多くの海の生物が太平洋と大西洋とに隔離され、そして異所的に種分化をしたことが知られている(Lessios 2008)。宿主の種分化は、寄生虫にどのような進化的変化を引き起こすのであろうか？本研究では、中米地峡によって隔てられた潮間帯巻貝とその寄生生物である吸虫類に着目し、中米地峡の形成及び巻貝の種分化が吸虫類の多様化にどのような影響を与えたのかを調査した。

2. 研究の目的

マングローブや干潟に生息する *Cerithideopsis* 属の巻貝は、中米地峡の形成により種分化をしたグループである。今までの研究により太平洋に分布する *Cerithideopsis californica* と大西洋に分布する *Cerithideopsis pliculosa* が中米地峡の形成により約300万年前に種分化したことが分かっている(Miura et al. 2010)。また、これらの *Cerithideopsis* 属の巻貝には寄生生物である吸虫類が18種も感染していることが知られている(Martin 1972)。しかし、これらの吸虫類が、宿主の種分化にどのように適応したのかについては、はっきりとは分かっていない。本研究の目的は、*Cerithideopsis* 属の巻貝に寄生する吸虫類の多様化の歴史を再構築し、地峡の形成や宿主の種分化が吸虫類の多様化に与えた影響を明らかにすることである。

これまでの報告により、吸虫類の形態種の多くは、形態からは区別のつきにくい隠蔽種を含んでいることが指摘されている(Miura et al. 2005)。隠蔽種の存在は宿主と吸虫類の多様化を調べる際の大きな障害となりうる。何故なら、多くの隠蔽種がいる場合、形態の比較からは吸虫類の多様化を判断することが困難になるからである。隠蔽種を考慮に入れながら吸虫類の多様化のメカニズムを把握するため、本研究では、吸虫類のゲノムDNA情報の網羅的な解析を取り入れた。ゲノムDNA情報を解析することにより、吸虫類の隠蔽種を把握すると共に、遺伝的に区別された隠蔽種が、宿主の種分化や地峡の形成による地理的隔離の影響をどの程度受けたかを検討した。

3. 研究の方法

中米のパナマ及び北米のカリフォルニアに滞在して、*C. californica* 及び *C. pliculosa* の採集を行った。採集した巻貝を実験室に持ち帰り、実顕顕微鏡下で解剖し、吸虫類の研究試料を収集した。集めた吸虫類は、エタノールで固定し分子遺伝学的解析に用いた。これらの研究試料に加えてこれまでに蓄積した中米各地の吸虫類の試料も解析に用いた。巻貝と吸虫類のDNAを抽出して、Double Digest Restriction Site Associated DNA sequence(ddRAD-seq)法によりDNAライブラリーを作成した。さらにillumina社の次世代シーケンサーを用いて巻貝と吸虫類のそれぞれのゲノムDNA配列を大量に決定した。

寄生生物のゲノム情報を扱う際に問題となるのは宿主のDNAの混入である。寄生生物は宿主の体内で生活するため、宿主のDNAの多少の混入は避けられない。したがって、吸虫類のゲノムDNA情報の解析を行う前に、宿主のDNAの除去が必要である。本研究では宿主である *Cerithideopsis* 属の巻貝のゲノムDNA情報もddRAD-seq法により集め、この宿主のゲノムDNA配列に吸虫類から取得したゲノムDNA配列をマッピングし、混入した宿主のDNAの除去を試みた。除去後のDNA配列を用いて吸虫類のゲノムDNA情報に基づく系統解析を行い、吸虫類の隠蔽種の存在や宿主や生息地域に対応した遺伝的分化の有無を検討した。

4. 研究成果

(1) 約100個体の巻貝からDNAを抽出してddRAD-seqライブラリーを作成した。次世代シーケンサーを用いてDNA配列の決定を行い、各個体から平均して340万リードのデータを得た。このデータを基に巻貝の系統関係や集団構造を推定したところ、*Cerithideopsis* 属の巻貝には複数種の隠蔽種が含まれていることが明らかとなった。したがって以降の解析では、吸虫類が、これらの巻貝の隠蔽種にどのような宿主特異性を示すかも検討した。また、巻貝のDNA配列は、吸虫類のゲノムDNAに混入した巻貝のゲノムDNAの除去の際にも活用した。

(2) 約 300 個体の吸虫類から DNA を抽出し、ddRAD-seq ライブラリーを作成した。次世代シーケンサーを使ってライブラリーを解析したところ、合計で約 5 億リードのデータが得られ、約 500 億 bp の DNA 配列情報を取得することができた。この配列を予め用意していた *Cerithideopsis* 属の巻貝の DNA 配列にマッピングしたところ、得られた DNA 配列の約 25-50% の配列が宿主からの混入であることが明らかとなった。巻貝の配列と一致した配列を除去し、一致しなかった配列のみを下流の解析に用いた。吸虫類の個体ごとに付加した index 配列を基にして個体ごとの配列に分けたところ、それぞれの個体で平均して約 140 万リードのデータが得られた(図 1)。

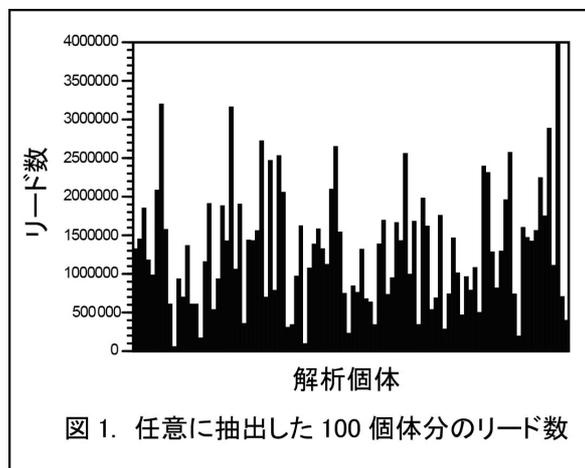


図 1. 任意に抽出した 100 個体分のリード数

(3) 宿主の DNA 配列を除去した吸虫類のゲノム DNA 配列情報を基に、分子系統樹を作成した。本研究では、*C. californica* 及び *C. pliculosa* から報告されている 18 種の吸虫類の形態種の中で、17 種について解析を行った。残りの 1 種については、北米太平洋側の一部の場所にしか出現しないため、宿主の種分化や地峡の形成が吸虫類の多様化に与えた影響を観察するには不適であったため、今回の解析からは除外した。分子系統樹を作る際には、それぞれの形態種ごとにデータを集めて解析を行った。その結果、形態では同じに見える個体でも、ゲノム DNA レベルで見ると大きな遺伝的分化が見られることが明らかとなった。例えば、吸虫類の 1 種では、3 つの大きく異なる系統が見られ、そのうち 2 つ (clade2 と clade3) は比較的近縁であるというパターンが観察された(図 2)。他の種でも同様に種内に大きく異なる系統が複数観察された。このことは、吸虫類には多くの隠蔽種がいるという過去の報告 (Miura et al. 2005) と一致する結果である。

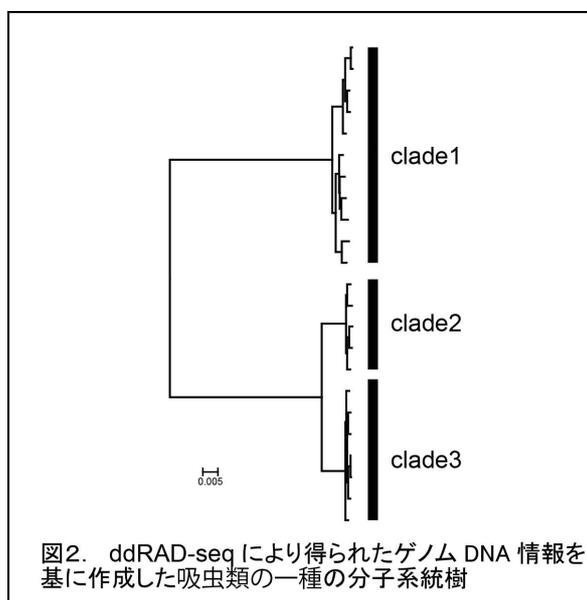


図 2. ddRAD-seq により得られたゲノム DNA 情報を基に作成した吸虫類の一種の分子系統樹

(4) 吸虫類の隠蔽種の出現パターンと宿主との関係性を調べたところ、吸虫類の隠蔽種が特定の宿主にのみ感染するといったパターンはあまり観察されず、逆に、多くの吸虫類は複数種の宿主に感染していた。ただし、各隠蔽種の感染の頻度は、宿主ごとに異なっていた。このことは、不完全ながらも特定の宿主に感染しやすいといった弱い宿主特異差異が進化している可能性を示唆している。しかしながら、確かな感染頻度の差を検出するためには十分な個体数を調べる必要があるため、感染頻度に関する議論をするには、さらに多くの試料を解析する必要があると考える。また、いくつかの吸虫類の隠蔽種は、太平洋と大西洋の両方に分布していた。このことは、吸虫類の一部が、太平洋と大西洋とを自由に行き来していることを示している。このような分布が見られたのは、鳥を終宿主とする吸虫類が、鳥に運ばれて太平洋と大西洋とを隔てる地峡を飛び越えたためだと考えられる。

< 引用文献 >

Lessios, H., The great American schism: divergence of marine organisms after the rise of the Central American Isthmus. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 39 巻 2008, 63-91.

Martin, W., An annotated key to the cercariae that develop in the snail *Cerithidea californica*. *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences*, 71 巻 1972, 39-43.

Miura, O., Kuris, A.M., Torchin, M.E., Hechinger, R.F., Dunham, E.J., Chiba, S., Molecular-genetic analyses reveal cryptic species of trematodes in the intertidal gastropod, *Batillaria cumingi* (Crosse). *International Journal for Parasitology*, 35 巻 2005, 793-801.

Miura, O., Torchin, M.E., Bermingham, E., Molecular phylogenetics reveals differential divergence of coastal snails separated by the Isthmus of Panama. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56 巻 2010, 40-48.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

Yamazaki, D., Hirano, T., Uchida, S., Miura, O., Chiba, S., Relationship between contrasting morphotypes and the phylogeny of the marine gastropoda genus *Tegula* in East Asia. *Journal of Molluscan Studies*, 査読有、85 巻、2019、24-34.

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*, 査読有、45 巻、2019、87-94.

金谷 弦、多留聖典、柚原 剛、海上 智央、三浦 収、中井 静子、伊藤 萌、鈴木 孝男、福島県いわき市鮫川干潟と茨城県日立市茂宮川干潟における大型底生動物の多様性 東日本大震災後の状況と復旧工事による影響 . *日本ベントス学会誌*、査読有、73 巻、2019、84-101.

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*, 査読有、3 巻、2019、43-54.

Makino, W., Miura, O., Kaiser, F., Geffray, M., Katsube, T., Urabe, J., Evidence of multiple introductions and genetic admixture of the Asian brush-clawed shore crab *Hemigrapsus takanoi* (Decapoda: Brachyura: Varunidae) along the Northern European coast. *Biological Invasions*, 査読有、20 巻、2018、825-842.

Matsuoka, K., Miura, O., Five new species of the genus *Semisulcospira* (Mollusca: Caenogastropoda: Semisulcospiridae) from the Pleistocene Katata Formation of the Kobiwako Group, Shiga Prefecture, central Japan. *Bulletin of the Mizunami Fossil Museum*, 査読有、44 巻、2018、59-67.

Miura, O., Kanaya, G., Impact of the 2011 Tohoku Earthquake Tsunami on marine and coastal organisms. *Biology International*, 査読有、S36 巻、2017、81-92.

Kanaya, G., Suzuki, T., Kinoshita, K., Matsumasa, M., Yamada, K., Seike, K., Okoshi, K., Miura, O., Nakai, S., Sato-Okoshi, W., Disaster-induced changes in coastal wetlands and soft-bottom habitats: an overview of the impacts of the 2011 tsunami and Great East Japan Earthquake. *Biology International*, 査読有、S36 巻、2017、62-80.

Keogh, C.L., Miura, O., Nishimura, T., Byers, J.E., The double edge to parasite escape: invasive host is less infected but more infectable. *Ecology*, 査読有、98 巻、2017、2241-2247.

Yamazaki, D., Miura, O., Ikeda, M., Kijima, A., Tu, D.V., Sasaki, T., Chiba, S., Genetic diversification of intertidal gastropoda in an archipelago: The effects of islands, oceanic currents and ecology. *Marine Biology*, 査読有、164 巻、2017、184.

Miura, O., Kanaya, G., Nakai, S., Itoh, H., Chiba, S., Makino, W., Nishimura, T., Kojima, S., Urabe, J., Ecological and genetic impact of the 2011 Tohoku Earthquake Tsunami on intertidal mud snails. *Scientific Reports*, 査読有、7 巻、2017、44375.

三浦 誠矢、森 小菊、福田 達哉、伊谷 行、中井 静子、三浦 収、四国の干潟における底生生物の多様性. *黒潮圏科学*、査読有、10 巻、2017、148-154.

Blakeslee, A.M., Kamakura, Y., Onufrey, J., Makino, W., Urabe, J., Park, S., Keogh, C.L., Miller, A.W., Minton, M.S., Carlton, J.T., Miura, O., Reconstructing the Invasion History of the Asian shorecrab, *Hemigrapsus sanguineus* (De Haan 1835) in the Western Atlantic. *Marine Biology*, 査読有、164 巻、2017、47.

Gérard, C., Miura, O., Lorda, J., Cribb, T.H., Nolan, M.J., Hechinger, R.F., A native-range source for a persistent trematode parasite of the exotic New Zealand mudsnail (*Potamopyrgus antipodarum*) in France. *Hydrobiologia*, 査読有、785 巻 2017、115-126.

〔学会発表〕(計 8 件)

三浦 収、地史・化石・ゲノム情報から琵琶湖固有カワニナ属の多様化の歴史を紐解く、第 65 回日

本生態学会大会、2018/3/15、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

山崎 大志、平野 尚浩、三浦 収、千葉 聡、東アジア産バテイラ科貝類の分子系統解析:同一系統内に生じる対照的な殻形態、第 65 回日本生態学会大会、2018/3/15、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

伊藤 萌、金谷 弦、三浦 収、中井 静子、ウミナ類の濾過能力比較、第 65 回日本生態学会大会 2018/3/16、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

三浦 収、琵琶湖固有カワナ属の多様化の歴史、国立環境研究所第 5 回琵琶湖セミナー、2017/9/20、国立環境研究所琵琶湖分室(滋賀県・草津市)

Yamazaki, D., Miura, O., Ikeda, M., Kijima, A., Tu, D.V., Sasaki, T., Chiba, S., Genetic diversification of intertidal gastropoda in an archipelago: the effect of islands, ocean currents, and ecology, The Third Asian Marine Biology Symposium, 2017/11/3-5、熊本県立大学(熊本県・熊本市)

三浦 収、熱帯アメリカを舞台に繰り上げられる潮間帯巻貝と寄生虫の多様化、えこえびワークショップ、2016/12/26、JR 博多シティ(福岡県・福岡市)

Miura, O., Kanaya, G., Nakai, S., Itoh, H., Ecological impact of tsunami: A ten-year field study of intertidal mud snails exposed to the 2011 Tohoku Earthquake Tsunami, 10th International Kuroshio Science Symposium, 2016/11/25, Patio de San Jose Resort and Convention Center (San Jose, Philippines)

三浦 収、中米のマングローブに転がる生物進化を解き明かす鍵、2016 年日本ベントス・日本プラクトン学会合同大会、2016/09/09、熊本県立大学(熊本県・熊本市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cc.kochi-u.ac.jp/~miurao/indin.html>

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。