

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02556

研究課題名（和文）左右反転の謎を解く：キラルな陸貝をモデルとして

研究課題名（英文）Evolution of chirality in a land snails shell

研究代表者

千葉 聡 (Chiba, Satoshi)

東北大学・東北アジア研究センター・教授

研究者番号：10236812

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：BradybaenaとEuhadraの全ゲノムデータを得てアセンブルを行った。前者の総塩基数は1.9Gbであり、さらに染色体レベルのアセンブルを行った。E. quaesitaの左巻き集団と右巻き集団の生殖的隔離の状態は、異なるレベルがあることが推定された。両者間で遺伝子流動に障壁がない場合、変異間の交雑のほか、遅滞遺伝の効果も大きいと考えられる。Aegistaでは韓国で右巻きから左巻きの系統が進化したことが示され、Bradybaenaは中国で左巻きが繰り返し独立に生じたことが推定された。E. quaesitaの左巻き個体と右巻き個体は、交雑しない場合、形とニッチ利用が分化していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、左巻き個体からなる陸貝種の祖先は、右巻き野生型との交配が困難で繁殖に不利な突然変異として右巻き集団中に出現したと考えられてきたが、左巻き種の祖先は右巻き野生型に対し、交配可能でほぼ中立な突然変異として集団中に出現し、二型として存続したのち右巻きとの交配が困難になったという独自のシナリオを提案することができた。またこれに生態学的な気候が関わることも示せた点で生態学的な意義も大きい。この仮説を裏付けるミクロの機構は、今回実証できなかったが、そのベースとなる全ゲノムのアセンブルに成功し、アノテーションが進んだため、今後この問題を解決し、生物学の幅広い領域にインパクトを及ぼすと期待できる。

研究成果の概要（英文）：We obtained and assembled the whole genome data of Bradybaena and Euhadra. The total genome size of the former was 1.9 Gb, and chromosome-level assembly and annotation were performed. It was estimated that the reproductive isolation between the sinistral and dextral populations of E. quaesita exists at different levels. When there are no barriers to gene flow between the two, in addition to hybridization between the variants, the effects of delayed inheritance are also considered significant. In Aegista, it was shown that the sinistral lineage evolved from the dextral lineage in Korea, and it is estimated that in Bradybaena, the inistral form repeatedly arose independently in China. If no hybridization occurs between the sinistral and dextral individuals of E. quaesita, their shape and niche utilization have diverged.

研究分野：生態学

キーワード：多様性 軟体動物 生態

1. 研究開始当初の背景

臓器の位置など体内の非対称な構造が左右反転し鏡像体となる内臓逆位は、動物の左右非対称性の形成機構を知るのに適し、発生学の重要な研究課題となってきた。巻貝は体の非対称性が殻の巻き方向の形で体外にも現れるユニークな性質を持つため、右巻き・左巻きのキラルな変異は内臓逆位研究のモデルとして注目されてきた。巻貝では胚の 8 細胞期の割球の配置に生じる捻じれの方向がシグナルとなり、以降の殻の巻き方向に反映される。また、淡水巻貝の *Lymnaea* では、巻き方向は単一遺伝子座の 2 つの対立遺伝子で支配され、右巻きが顕性で、形質発現が 1 世代遅れる遅滞遺伝をする。ただし *Lymnaea* の場合、右巻きが正常で左巻きは異常である(左巻き潜在ホモは正常に发育せず死亡する個体が多い)。実際、*L. stagnalis* の右巻きは、胚の 4 細胞期に右側への割球の捻じれた配置を持つのに対し、左巻きはその配置に捻じれがなく、8 細胞期になって左側への捻じれが現れる。一方、左巻きが正常個体である種の胚では、4 細胞期に左側へ割球の捻じれが起こる。

申請者は *L. stagnalis* で、この割球の配置と巻き方向を決めている遺伝子を見出した。胚の細胞骨格制御に関わるフォルミンをコードする *Ldia2* が、突然変異により機能を失いフォルミンが欠乏すると、4 細胞期の割球に捻じれが消え、左巻きが生じる。同様な巻き方向の変異は、陸貝でも知られている。例えば陸貝 *Bradybaena*、*Aegista*、*Euhadra*、*Satsuma* などで報告されている。これらは左巻き・右巻きをともに正常な形質としてもつ系統であるが、その遺伝様式や巻き方向を逆転させる遺伝子の正体は不明である。また *Satsuma* の一部の系統を除き、なぜ左右の巻き方向の分化が起きたのかは不明である。

2. 研究の目的

正常な左巻き・右巻きをスイッチのように切りかえている未知の遺伝子の正体を明らかにするために、左巻き・右巻きの鏡像体が別種として、または集団内に維持されている *Bradybaena* と *Euhadra* について、ゲノム解析の手法を用いて巻き方向を決めている遺伝子を推定する。そのために全ゲノム配列を決定し、アノテーションを行う。*Ldia2* 遺伝子のように細胞骨格の捻じれに関与するタンパク質の変異によるという仮説のもとに候補遺伝子を検討し、巻き方向に関与する遺伝子を推定する。

左巻き・右巻きの鏡像体が存在する *Euhadra*、*Bradybaena*、*Aegista* について、巻き方向の変化がどのように起きてきたかを系統推定によって明らかにする。また左巻き・右巻きの鏡像体の間で、遺伝的交流があるかどうかを推定する。これにより、巻き方向が変化と種分化の関係について推定する。

左巻き・右巻きの鏡像体の間で、遺伝的交流があるかどうかと表現型(殻の色彩多型、生殖器形態、生息場所)の関係を推定し、巻き方向以外に生殖的隔離に関与する生態的要因を推定する。また飼育実験により、巻き方向の違いと交尾率の関係を推定する。

3. 研究の方法

・ゲノム解析

ゲノムアセンブリ構築のため、試料から超高分子量 DNA を分離し、ゲノムのアセンブリは、Nanopore のロングリードと Illumina のショートリードのデータを求めて行った。得られたデータからゲノムアセンブリを行った。既存のトランスクリプトームデータを活用してアノテーションを行った。

・系統推定、集団構造の解析

左右の巻き方向のタイプをともに含む、*Euhadra*、*Bradybaena*、*Aegista* の集団について、Rad-seq および Mig-seq 解析を行い、系統関係の推定、および過去の有効集団サイズの変化を推定した。従来未解析の種や系統群については、mtDNA やいくつかの核遺伝子マーカーを使って系統を推定した。Mig-seq は、ライブラリの調製をおこなったのち、Illumina MiSeq を用いて行った。Rad-seq は制限酵素で全 DNA を消化したあと P1・P2 アダプターを連結し、精製後 200-400bp の断片を回収した。この断片を PCR 増幅後、精製して回収しライブラリを作成した。これを Illumina HiSeq X を使用して 150 bp で配列決定した。系統推定はパラログを除去し、最終フィルタリングを行った後、整列配列データセットを取得して IQ-TREE 2.0 による最尤法 (ML) と、PhyloNetwork を用いて行った。

・生態解析

右巻きと左巻きの集団が隣接している場合、あるいはそれらが多型として同じ集団に共存している場合、それらの住み場所の違いを、密度の推定と環境要因をスコア化することによって定

量化したのち分析した。これらのケースについて、色彩多型を個体ごとに記録し、それらの違いを分析した。

右巻き間、左巻き間の交尾成功度と、巻き方向の違う個体間の交尾成功度を、*E. quaesita* で集団ごとに実験を行って解析した。

生殖器管の形態解析を各集団、種ごとに生貝を解剖し、各部位の長さ、形態を測定することによって行った。

4. 研究成果

・ゲノム解析

Bradybaena について全ゲノムのデータを得て、アセンブルを行った。ゲノムの総塩基数は 1.9Gb であった。アセンブルは NextDenovo (NextPolish で polishing、Purge_Dups で冗長領域除去したのちコンタミチェック) と Hifiasm (HiFi リード + Nanopore リードを使用して Hifiasm でアセンブルしたのち、冗長領域を Purge_Dups を追加で実施して除去、コンタミチェック) で行った。BUSCO は 97.6% (Metazoa) となり、従来報告のあるマイマイ目 (*Stylommatophora*) ではもっとも高い値となった。Hi-C 解析による、染色体レベルのアセンブルも行った。これに基き、既存の既存のトランスクリプトームデータを用いてアノテーションを行っている途中の段階である。

E. quaesita は原因不明ながら当初ロングリードに難があり、ショートリードだけで対応を余儀なくされたため、ゲノムの決定が上手く行かなかった。しかしようやくロングリードのデータが得られたため、アセンブルを進めた段階である。こうした状況のため、巻き方向を決める遺伝子候補を決めることはできなかったが、*Bradybaena* の左巻き種と *E. quaesita* の左巻き、右巻きの F2 のリシーケンスを行って、これを決めることができる状況である。

・系統推定

東北地方の *Euhadra* では *E. quaesita* の左巻き集団と右巻き集団が、独立に分化していることが推定されたが、それら左巻きと右巻きの生殖的隔離の状態は、異なるレベルがあることが推定された。

東北地方北部の集団では、ほとんどが左巻き集団と右巻き集団の間で生殖的隔離が存在していた。両者の間で遺伝的交流があるように見える集団でも、それは過去に生じていた交雑を反映しており、現在は交雑が阻止されているケースが多いことがわかった。飼育実験下では交配しても、野外では交配が行われていない場合があると考えられる。

地域集団間の遺伝的交流は非常に乏しく、巻き方向の変化はごく限られた地域内で起きたと考えられる。巻き方向の変化が示す系統地理パターンは、隔離された小集団で変化が生じた可能性を示唆している。

一方、東北南部の集団を中心に、遺伝的に見ると左巻き個体と右巻き個体の間で、生殖的隔離が存在しない、あるいはランダム交配からの有意なずれが観察されない集団が認められた。これは実際に左巻き個体と右巻き個体の間で交配が行われている場合もあるが、それに引き続く遅滞遺伝による、世代ごとの巻き方向と遺伝子型のずれによって、遺伝子型が違って巻き方向の同じ個体が出現するために、左巻きと右巻きの遺伝子型間で遺伝的交流が続いているという要因もあると考えられる。

自然界でそのどちらのプロセスが大きいかを定めることは困難であった。いったん巻き方向の異なる鏡像個体同士で交雑すると、その頻度が低くても、遅滞遺伝によってほとんどランダム交配に近いような遺伝子流動が鏡像個体間で生じるためである。

以上の結果は、従来考えられていたより、生殖的隔離の成立に対する遅滞遺伝の影響が大きいことを示す。つまりわずかな鏡像個体間の交雑でも、十分な遺伝子流動が生じ、その結果、生殖的隔離に寄与していた巻き方向以外の形質の隔離機構が消失してしまう可能性があるからである。

広域的に行った *Euhadra* の系統推定の結果、*E. quaesita* は他の右巻きの種と過去にたびたび交雑してきた可能性が示された。この交雑は、*E. quaesita* の巻き方向が左巻きになる以前に起きた可能性はあるものの、巻き方向の違いは必ずしも強い隔離機構としては働かない可能性を示している。巻き方向の違いに連動して進化した、それ以外の仕組みがより強く関与している可能性がある。

Aegista の系統推定の結果、韓国で右巻きから左巻きの系統が進化したことが示された。この進化は日本と朝鮮半島が接続していた時期に起きたと考えられ、左巻きの種の姉妹種は日本本土の種であった。日本本土には左巻きの *Aegista* が分布せず、この種も分布が限定されていることから、韓国内で隔離された小集団に巻き方向の変化が起きた可能性が示唆される。

日本の *Bradybaena similaris* は中国から 3 万年前に渡来したと考えられ、*Bradybaena* の多様化の中心は中国と推定された。中国の左巻きの *Cathaica* は系統推定の結果、*Bradybaena* と近縁であり、繰り返し独立に巻き方向が変化してきたことが推定された。遺伝的にほぼ同じで、巻き方向の異なる鏡像体の変異も存在しており、これらの間で交雑が起きている可能性も示唆

された。

・生態、行動

東北地方では、*E. quaesita* の左巻き個体と右巻き個体は、交雑が認められる場合は共存しているが、それ以外は生息場所に違いがみられた。わずかな距離で両者の分布が区分されている場合が多く、出会うこと自体が阻止されていると思われる。それらの間で環境には差が認められず、競争によるものか、繁殖干渉によるものと推定された。また東北地方北部では、左巻き個体と右巻き個体は生活様式に差がみられ、前者が地上生なのに対し、後者は樹上性の傾向があった。またそれに対応して殻の形態と色彩に違いがあり、後者はより扁平で淡色になる傾向が見られた。一方、東北地方南部ではいずれも地上性で濃色になる傾向が認められた。

一般的に同じ隣接した場所に分布し、かつ同じ生活様式を取っている場合でも、生殖的隔離が認められる場合、左巻き個体と右巻き個体は殻の色彩や模様の違いが検出された。遺伝的浮動の影響の可能性はあるが、わずかな生息環境の違いを反映している可能性もある。

E. quaesita においては、巻き方向の違う鏡像体変異の間で、生殖的隔離が見られる集団と、両者が交雑してる集団で、交尾器形態に明確な差は認められなかった。ただし、中国の *Bradybaena* では、鏡像体変異が見られる集団や、頻繁に巻き方向が変わる系統では、それ以外の系統に比べて、交尾器が長い傾向が認められた。巻き方向が異なって交尾行動が困難になる状況を、交尾器の長さで緩和している可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kimura K, Chiba S, Pak JH	4. 巻 11
2. 論文標題 Molecular investigation on diversity of the land snail genus Aegista (Gastropoda, Camaenidae) in South Korea	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biodiversity Data Journal	6. 最初と最後の頁 e96800
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3897/BDJ.11.e96800	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaito Shibuya, Satoshi Chiba, Kazuki Kimura	4. 巻 225
2. 論文標題 Sexual inactivation induced by the mucus that covers love-darts of a land snail: Sexual selection and evolution of allohormones in hermaphrodites.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of experimental biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jeb.238782	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirano Takahiro, Yamazaki Daishi, Ito Shun, Sato Mitsuhiko P., Matsuo Ayumi, Saito Takumi, Nishi Hiroataka, Ye Bin, Dong Zhengzhong, Van Tu Do, Shau-Hwai Aileen Tan, Suyama Yoshihisa, Chiba Satoshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Reconsidering invasion history of common land snails in Japan through genome-wide analyses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological Invasions	6. 最初と最後の頁 3535 ~ 3549
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10530-023-03123-2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	平野 尚浩 (Hirano Takahiro)		
研究協力者	木村 一貴 (Kimura Kazuki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関