

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010-2012

課題番号：22570025

研究課題名（和文） 琵琶湖固有カワニナ類の系統進化および二次交雑が吸虫感染耐性に与える影響

研究課題名（英文） Effects of phylogenetics and hybridization of *Semisulcospira* snails endemic to Lake Biwa on tolerance for trematodes

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

研究成果の概要（和文）：

カワニナ類を第一中間宿主とする吸虫 *Genarchopsis* 属の分子系統学的研究により、琵琶湖型 (*G. gigi*) は本邦の同種群の中でもっとも古く分岐した固有種であることが明らかになり、*G. gigi* は琵琶湖固有のカワニナ類に、*G. goppo* は非固有種に適応した種である可能性が高くなった。琵琶湖産カワニナ類の分子系統解析のための新たなDNA部位として、フォスファージェンキナーゼ (Pk) 遺伝子のイントロンを開発した。また、ITS-1領域の塩基配列でタテヒダカワニナ (*G. goppo* 感受性がある) との交雑個体の可能性が高いと思われた北湖産ハベカワニナ (通常は *G. gigi* のみ感染し、*G. goppo* 感受性がない) 2個体に寄生虫 2種の感染実験を行ったところ、どちらの寄生虫も感染可能であることがわかり、交雑が寄生虫への感染耐性に影響を与えていることが示唆された。しかし、得られたデータ数はまだ少なく、さらなるデータの積み重ねが必要である。

研究成果の概要（英文）：

Some species of trematodes genus *Genarchopsis*, which uses *Semisulcospira* snails as the first intermediate hosts, were analyzed phylogenetically. The result showed that a strain of *Genarchopsis* (*G. gigi*) is endemic to Lake Biwa and diverged from other clades in relatively earlier era. This suggests that *G. gigi* adapts to some endemic snail species in Lake Biwa, and other species including *G. goppo* adapts to non-endemic species. We also developed a new molecular marker (the introns of phosphogenkinase 1 gene) for the phylogenetic analysis of host snails. Two individuals of *Semisulcospira habei* (usually tolerant to *G. goppo* and susceptible to *G. gigi*), which were suggested as hybrids of *S. decipiens* (susceptible to *G. goppo*) by the analysis of the ITS-1, were susceptible both to *G. gigi* and *G. goppo*. Our result suggests that interspecific hybridization affects trematode susceptibility of snails, but more data need to be compiled to demonstrate it.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	800,000	240,000	1040,000
2012年度	800,000	240,000	1040,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2860,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学／生態・環境

キーワード：寄生，宿主特異性，地理的分化，分子系統

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。現在までに、核型が軟体動物の中では例外的に多様であることや、mtDNA (CO1 領域) の変異が極度に多型で、しかも形態種や地理的距離と一致しない(吾妻ら, 2003 年貝類学会)ことなど、特異な進化様式をもっていることが判っている。

カワナ類に寄生する吸虫類は、宿主の生殖能力をうばうことによって、宿主の適応進化に重大な影響をあたえたと考えられる。琵琶湖固有カワナ類とそれに寄生する吸虫 *Genarchopsis* との系についてみると、琵琶湖内のカワナ類は一般に吸虫相が貧弱だが (Urabe, 2003), *G. goppo* は、湖内のカワナ類に広く感染し、適応進化への影響も大きいと考えられる。研究代表者らの過去の研究により、*Genarchopsis goppo* には、当初想定されていなかった隠蔽種が存在することが判明し、これらの隠蔽種はそれぞれ異なる宿主範囲を持つことがわかった (以下、*G. goppo* 隠蔽種群と称する)。2つの隠蔽種のうち、琵琶湖内に生息する種は、琵琶湖固有カワナ類にのみ感染できることが判明し、この寄生虫もまた琵琶湖固有種であることが示唆された。河川に生息する隠蔽種は、同じ河川から採取したカワナと、琵琶湖固有種のうちタテヒダカワナ種群に属する種に感染性を示した。

また、琵琶湖固有カワナ類においては、地域個体群間で感受性の差は見られなかった。これらの結果から、琵琶湖における *G. goppo* 隠蔽種群とカワナ類の宿主-寄生者関係は基本的には両者の種分化メカニズムに付随する問題として捉えられ、個体群レベルでの共進化は考慮する必要がないことがわかった。しかし、*G. goppo* 隠蔽種群およびカワナ類の両方も、現在までに系統関係は明らかになっていないため、現在の宿主-寄生者関係がどのような経路をたどって形成されたかは不明である。

現在までに、ただ一つ系統解析に有用な情報を含む核の rDNA (ITS-1 領域) で、ヤマトカワナ種群および非固有種カワナ類に

おいて、宿主に挿入・欠失変異を伴うヘテロ接合体が多々みられることが判明した。また、この中には、交雑個体と推定される個体も含まれていた。しかし、この結果はダイレクトシーケンスにおいて特定の部位からダブルピークになるという結果からの推測であり、DNA 単鎖鎖の解読によるヘテロ接合および種間交雑の証明は未着手である。予備的な解析の結果では、個体群内の遺伝的変異の大部分は交雑に由来することが推定されている。交雑による新規遺伝子の獲得は、寄生虫への耐性を獲得するという点では、基本的に有利であると考えられる。そのため、果たして種間交雑が、系統による宿主-寄生者関係の構築へ影響を与えているかどうか検討する必要がある。

なお、理想的には貝類の寄生虫耐性に関与する遺伝子の多型を直接検討することが望ましいが、もっとも研究の進んでいる住血吸虫類でも、耐性遺伝子は候補がいくつか見出されてきた段階であり、まだ特定されていない。そのため、本研究では、すでに多くのデータが蓄積されている遺伝子部位をマーカーとして、交雑の指標とする。

2. 研究の目的

(1) 琵琶湖産 *G. goppo* 隠蔽種が真に琵琶湖固有種かどうか、および各地の河川産 *G. goppo* 隠蔽種群とどのような系統関係にあるかを明白にする。全国各地の *G. goppo* 隠蔽種群の遺伝的・形態的変異の研究を行う。また、同時に、自然感染宿主 (広域分布するカワナ類) も採集し、(2) の系統解析に用いる。

(2) 琵琶湖産カワナ類をふくむ各地域のカワナ類の系統関係を明らかにする。

琵琶湖固有カワナ類については、他の研究者による予備的研究で、2つの大きなクレード (ハベカワナ群とタテヒダカワナ群) に分けられることが示唆されており、本研究結果もこれを支持するが、この2つのクレードが単系統かどうか、またどの群と姉妹関係にあるかは、調査した遺伝子座によって異なる結果が得られている。そのため、今後より多くの遺伝子座を検討する必要に迫られている。また、今まで用いてきたITS-1領域は交雑後の concerted evolution の存在により、分

子進化の中立性が疑わしく、マーカーとして必ずしも適切ではないことも判明した。この点からも、新たな分子マーカーの開発が必要である。

(3)琵琶湖産カワナ類の種内多型において、交雑による遺伝子浸透がどの程度寄与しているかを明らかにする。

同所分布する琵琶湖産カワナ類において、種間交雑が起きていることを証明し、またどの種間で交雑が見られるのか明らかにするため、交雑由来と推定される個体のサブクローニングを行い、単独のDNA鎖の配列を解読する。

また、交雑由来と思われる子貝が得られたら、その同腹兄弟を用いて、本年度と同様に感染実験を行い、寄生虫への感受性を定量する。

3. 研究の方法

(1) *Genarchopsis goppo* 隠蔽種群の遺伝的・形態的研究、およびその宿主調査

広域で主要河川・湖沼で、第一中間宿主であるカワナ類を採取し、*G. goppo* 幼生をサンプリングする。カワナ類と *G. goppo* の両方とも、遺伝子解析を行う。

また、できる限り同所で終宿主のハゼ科魚類を採集し、*G. goppo* 成虫を採取して、形態観察および計測をおこない、隠蔽種間に形態的な差異が見られるかどうか調査する。

(2) 琵琶湖産カワナ類の分子系統学的研究

核遺伝子 ITS-1 領域によって、琵琶湖固有カワナ類は、2つの大きなクレード（ハベカワナ群とタテヒダカワナ群）に分けられ、タテヒダカワナ群は非固有種カワナ類と姉妹群を形成する（すなわち、琵琶湖固有カワナ類は多系統である）ことが予測されている。lsrDNA, SsrDNA, ITS-2, ミトコンドリアのCO1 領域では、系統に関する情報は得られなかった。しかし、別の遺伝子を調査した他の研究者による予備的研究を合わせると、この2つのクレードがどの群と姉妹関係にあるかは、調査した遺伝子座によって異なっており、まだ統一的な見解は得られていない。そのため、今後より多くの遺伝子座を検討するとともに、遺伝子による進化速度の違いを慎重に考慮した進化モデルの選択をおこなう。

(3) 琵琶湖産カワナ類の雑種由来個体の抽出とサブクローニング

調査個体群は、本年までの研究で雑種個体の存在が推定された琵琶湖北部産ハベカワナ、タテヒダカワナ、カワナ、チリメンカワナとする。

野外から得られた母貝を飼育し、得られた子貝の一部を標本として、PCR-RFLP またはダイレクトシーケンスによって雑種と推定される sibling を見つけ出し、サブクローニングによって雑種（すなわち、異なる種に由来する配列をヘテロに持つ個体、または形態種と異なる配列をホモに持ち、戻し交雑と考えられる個体）を確定する。雑種 sibling が得られたら、その同腹兄弟を用いて、*G. goppo*（琵琶湖産隠蔽種）の感受性調査をおこなう。

4. 研究成果

(1) 滋賀県外 14 地点、滋賀県（琵琶湖水系）内 6 箇所の魚類およびカワナ類から得られた *Genarchopsis* 属について遺伝子解析を行い、全国の *Genarchopsis goppo* は、同属種の *Genarchopsis fellicola* の側系統群であり、少なくとも3つの単系統群（琵琶湖型、中部～近畿河川型、中国～四国河川型）であることがわかった。このうち、琵琶湖型はもっとも古くに分岐しており、琵琶湖内で早くから固有進化を遂げた固有種と見做すことが適当であると考えられた。琵琶湖型は過去に *Genarchopsis gigi*（現在は *G. goppo* のシノニム）として記載された経緯があり、本学名が有効名として復帰することとなる。

終宿主の魚類は、*G. goppo*, *G. fellicola* を含めて特異性が低く、どれも複数種の魚類を利用していた。中国～四国河川型の成虫はドンコのみから得られたが他の魚種の検査数が少なかったためであると思われ、文献記録等より、これも複数種の魚類に感染すると考えられた。従って、*G. goppo* の種分化に、終宿主の特異性は関与しておらず、第一中間宿主のみを考慮すれば十分であると思われた。

(2) 系統解析のための新たなDNA部位として、フォスファーゲンキナーゼ (Pk) 遺伝子のイントロンを調べた。Pk遺伝子のcDNAをクローニングし、その塩基配列を決定した。そして、その配列をもとにプライマーを設計し、ジェノミックDNAの解析を行ない、イントロンの位置と配列をしらべたところ、これまで2つのイントロン (Int 1, Int 4) を見出した。軟体動物ではこれまで5つのイントロンが知られている。イントロン2からは800 bp、イントロン4からは300bpと800bpの2種類のバンドが観察された。今後、これらのバンドの塩基配列を調べ、集団遺伝学的に解析する予定で

ある。

(3) 北湖産チリメンカワニナ8個体について核遺伝子ITS-1領域のサブクローニングを行い、1本鎖DNAの塩基配列の決定を行った。その結果、全部で9つのハプロタイプが検出され、その中にはカワニナと同一配列のものも存在したが、さまざまなタイプの間中型配列も出現した。このことから、琵琶湖内のカワニナ類には遺伝子浸透がみられ、さらに交雑後に組換え・変異等が生じている可能性が高いことがわかった。

さらに、通常のPCRでタテヒダカワニナ (*G. goppo*感受性がある) との交雑個体の可能性が高いと思われた北湖産ハベカワニナ (*G. goppo*感受性がない) 2個体に寄生虫2種の感染実験を行ったところ、どちらの寄生虫も感染可能であることがわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Urabe, M., Nishimura, T. and Shimazu, T. (2012) Taxonomic revision of three species of the genus *Genarchopsis* (Digenea: Hemiuroidea: Derogenidae) in Japan by molecular phylogenetic analyses. *Parasitology International* 61: 554-560

[学会発表] (計3件)

- ① 浦部美佐子。琵琶湖固有カワニナ類の遺伝的分化と吸虫感染耐性。第58回日本生態学会(2011年3月9日)
- ② 西村龍彦・浦部美佐子・嶋津武 日本における魚類寄生虫 *Genarchopsis goppo* の地理的分化と宿主特異性。第58回日本生態学会(2011年3月11日)
- ③ 浦部美佐子・西村龍彦・佐谷友貴・嶋津武 日本産 *Genarchopsis* 属の分子系統と地理的変異。第81回日本寄生虫学会。2012年3月24日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

吾妻 健 (AGATSUMA TAKESHI)
高知大学医学部 教授
研究者番号：40117031

(3) 連携研究者

()
研究者番号：