

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2009
課題番号：19570019
研究課題名（和文） スクミリンゴガイの性比変動要因と性決定機構の解明
研究課題名（英文） Factors affecting sex-ratio variation and sex-determining mechanisms in the apple snail *Pomacea canaliculata*

研究代表者

遊佐 陽一（YUSA YOICHI）
奈良女子大学・理学部・准教授
研究者番号：60355641

研究成果の概要（和文）：淡水巻貝スクミリンゴガイにおける大きな性比の変動には、少数の性決定遺伝子が関与するという仮説を検証した。全きょうだいの関係にある姉妹の F1 を同一雄と掛け合わせて得られた F2 世代の性比は、いくつかの値に収束した。この結果は、姉妹の遺伝子型が少数であることを意味し、少数遺伝子関与の証拠となる。また、遺伝マーカーとしてマイクロサテライト部位を 40 以上見出した。このうちの一つは雌雄で頻度が異なり、性決定遺伝子座との連鎖が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The freshwater snail *Pomacea canaliculata* shows a large variation in offspring sex ratio. We investigated whether this variation is caused by a small number of sex-determining genes, with two series of experiments. First, we reared F2 offspring from several crosses involving full-sib sisters with the same male, and determined sex ratios of F2. The sex ratios of F2 converged into a few values, indicating that the sex-determining genotypes of the F1 full-sib sisters were also a few. This suggests that the sex in this snail is determined by a few genes rather than polygenes. Secondly, we developed genetic markers to study linkage with the putative sex-determining genes. We found >40 microsatellite loci, and developed four useful markers. These markers were repeatable in PCR, polymorphic and followed Mendelian segregation. We conducted fragment analyses in two populations (Kumamoto and Nara) with these markers. One of them showed significantly different frequencies between males and females in both populations; it may be in the same linkage group as a sex-determining locus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：生態学，進化，遺伝学，性決定，性比，軟体動物

1. 研究開始当初の背景

スクミリンゴガイは南米原産の淡水巻貝で、アジア各地で稲をはじめとする水生植物に大きな被害をもたらしている。現在ではフィリピンやタイ、ベトナムなどで稲の最重要有害動物とみなされ、淡水無脊椎動物で唯一、世界および日本の侵略的外来種ワースト 100 リストの両方に入っている。国内では、低コスト稲作技術の基幹となる直播栽培において、暖地における最大の阻害要因となっている。効果の高い個体群制御技術は未だ開発されておらず、繁殖をコントロールするなど新たな防除技術開発に資するため、基礎・応用両面からの研究の推進が望まれている。

この貝の繁殖生態の研究において、同一卵塊から孵化した最大 80 個体の性比（雄の割合）を多数の卵塊について調べたところ、全雄から全雌まで卵塊ごとに大きくばらつくことが発見された（Yusa & Suzuki, 2003）。卵塊性比は産卵ペアごとに決まっており、環境の影響を受けない（Yusa, 2004）。このことから、性比は遺伝的に決まると考えられている。このように極端な性比変動は他の動物ではほとんど知られていないため、その変動要因を精査することは、単にスクミリンゴガイの防除技術の開発に資するだけでなく、軟体動物における性比や性決定機構の進化、さらには動物全体における性に関する理解を深めることになる。

一般に、遺伝的な性比変動要因は、性比遺伝子、細胞質性因子、性決定遺伝子の三種類に区分できる。性比の親子回帰などの実験の結果、スクミリンゴガイの性比変動に関与するのは、複数の性決定遺伝子であることが示唆されている（Yusa, 2006; Yusa, 2007a）。XY 性決定のように性決定遺伝子が 2 つのみであれば、性比の期待値は 0.5 になり、大きな性比変動は基本的に生じない。しかし、性決定遺伝子が 3 つ以上であれば、産卵ペア間で卵塊性比の変動がみられる。スクミリンゴガイのような多様かつ極端な性比が生じるためには、4 つ以上の性決定遺伝子の関与が必要であると考えられる（Yusa, 2007a）。例えば、核ゲノムの 2 遺伝子座にそれぞれ 2 つの対立遺伝子があるとするモデルの一つでは、スクミリンゴガイの性比変動をかなりよく説明できる。逆に、遺伝子数が多い（ポリジーン性決定）と、全雄や全雌といった極端な性比が確率的に生じにくくなり、また父親-子間と母親-子間で性比の回帰係数が大きく異なるなどといった、スクミリンゴガイで得られた結果を説明できない（Yusa,

2006）。しかし、このような少数の遺伝子による性決定はほとんど研究例がなく、実際の生物で性比変動との関係は調べられていない。スクミリンゴガイについても、少数遺伝子による性決定が証明されたとは言いがたい。

少数遺伝子による性決定の研究例が少ないことは、それが重要でないことを意味しない。さまざまな利己的な遺伝因子が進化することによって、性決定機構は動的に変化すると考えられるため、同一種内や近縁種間で性決定機構が異なる例は多く知られている。たとえば、スクミリンゴガイと比較的近縁なタニシ科の *Viviparus* 属でも、XY 性決定と ZW 性決定が同じ属内から報告されている（Yusa, 2007b）。少数遺伝子による性決定は、そのように、あるひとつの性決定様式から別の性決定様式に進化する過渡期、あるいはさまざまな性に関する遺伝子間の対立の結果としてみられ、性決定様式の進化を握る重要な鍵であると考えられる。

（引用文献）

- Yusa, Y. 2004. Brood sex ratio in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) is determined genetically and not by environmental factors. *Journal of Molluscan Studies* 70: 269-275.
- Yusa, Y. 2006. Genetics of sex ratio variation inferred from parent-offspring regressions and sib correlations in the apple snail *Pomacea canaliculata*. *Heredity* 96: 100-105.
- Yusa, Y. 2007a. Nuclear sex-determining genes cause large sex-ratio variation in the apple snail *Pomacea canaliculata*. *Genetics* 175: 179-184.
- Yusa, Y. 2007b. Causes of variation in sex ratio and modes of sex determination in the Mollusca--an overview. *American Malacological Bulletin* 23: 89-98.
- Yusa, Y. and Suzuki, Y. 2003. A snail with unbiased population sex ratios but highly biased brood sex ratios. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 270: 283-288.

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、スクミリンゴガイで発見された著しい性比変動が、少数の性決定遺伝子によって生じているという仮説を検証し、その遺伝様式の推定を行うことである。そのために、(1) 掛け合わせ実験による少

数遺伝子関与の検証, および (2) 性決定遺伝子座特定のための遺伝マーカーの開発と連鎖解析という 2 つの具体的な目標を設定した。

3. 研究の方法

本研究課題は, サブテーマ 1 (掛け合わせ実験) とサブテーマ 2 (DNA マーカーの開発と連鎖解析) からなる。

(1) 掛け合わせ実験 (図 1)

掛け合わせ実験では, 全きょうだい (full sib) の関係にある複数の姉妹 (または兄弟) を同一の異性個体と交配させ, 生まれた子供の性比を調べた。まず, 熊本市沖新町のレンコン田およびその周辺水路から未成熟のスクミリングガイ 80 個体程度を採集し, 単独で飼育した (親 (P) 世代)。成熟後に雌雄のペアで飼育して交配させ, 卵塊がみられたら個別に孵化させた。卵塊の孵化後, 各卵塊から最大 40 個体の孵化貝を取り出し, 2 ヶ月以上飼育した (F1 世代)。その後, 解剖により雌雄を判定した。卵塊中の雄の割合を性比と定義し, 卵塊ごとの性比を決定した。

次に, F1 の性比が判明した約 30 家系から, 性比が雌に偏った家系, 雄に偏った家系, 偏りのない家系からそれぞれ 5 つ程度 (計 15 家系程度) 選び出し, 次 (F2) 世代の性比を調べた。選んだ各家系の F1 から 6 個体程度の雌 (全きょうだいの関係にある姉妹) を同一の雄 (同じ個体群から採集した個体であれば遺伝的背景は問わない) と交配させ, 個別に産卵させた。卵塊が孵化したら, F1 のときと同様に各姉妹の子供について性比を決定した。これにより, 母親が全きょうだいの関係にある F2 の貝の性比が判明する。

解析としては, まず F1 の性比と F2 の性比との比較を行った。この親子間で有意な相関があれば, 性比に遺伝的要素が関与することの新たな証拠となる。次に F2 の性比を F1 の姉妹間で比較した。性比が遺伝的に決まっている場合, 偶然によるランダムな変動を除けば, 父親が共通である子供の性比の違いは, 母親たち (F1 雌) のもつ遺伝子の違いに起因する。この母親たちは全きょうだいの関係にあるため, 母親たちの遺伝子の違いは, その両親がどのようにこの姉妹 (F1) に遺伝子を渡すか, つまり遺伝様式によって決まる。F2 の性比が連続的に分布すれば, 母親 (F1) の間の遺伝子の違いも量的, すなわちポリジーン性決定であると考えられる。一方, F2 の性比がいくつかの離散的な値をとれば, 少数遺伝子による性決定の証拠となる。さらに, 少数遺伝子の関与であれば, 家系によって性比のばらつき方が異なるはずである。例えば単一遺伝子座以外は遺伝子がホモで固定した

家系では, 家系内で交配させると性比がすべて 0.5 になる。

同様の掛け合わせ実験を, F1 世代で全きょうだいの関係にある雄同士 (= 兄弟) についても試みた。

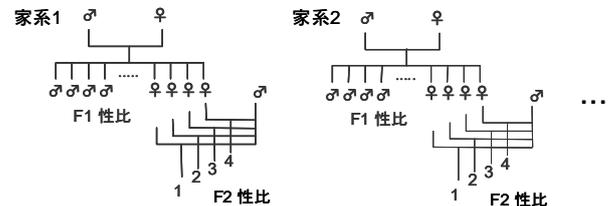


図 1. 掛け合わせ実験のデザイン (F1 姉妹の例)

(2) 遺伝マーカーの開発 (図 2) と連鎖解析 (図 3)

本サブテーマでは, まずマイクロサテライトマーカーの開発を行った。マイクロサテライトは, 1-数ヌクレオチドの配列が繰り返しているもので, ゲノム中に多数存在している。この繰り返し回数は高度に多型を示すことが知られているため, 個体の識別を行うことも可能である。さらに, マイクロサテライトの両側のユニークな配列をプライマーとして用いて PCR で増幅し, フラグメント解析と呼ばれる断片長の違いを検出する電気泳動を行うだけで, 容易に多型を検出できるという簡便さがある。そのために, まず多型性が高いと期待されるマイクロサテライト領域を単離し, その両側の配列を決定し PCR プライマーをデザインした。

スクミリングガイにおけるマイクロサテライトマーカーを開発するために, まず, スクミリングガイからゲノム DNA を抽出し, 制限酵素 Sau3AI 等の部分消化により 1-2 kb 断片を選別し, これらを含むプラスミド・ゲノム DNA ライブラリーを作製した。マイクロサテライト領域の繰り返し配列は, (CA)_n や (GT)_n といった 2 塩基の繰り返し配列をもつものが多いが, 今回は後のフラグメント解析の利便性を考え, 1 反復の違いの検出も容易な 3 塩基反復配列 (CAA, CAG) を主として用いた。それらをビオチンおよびマグネットで選択し, 作製したスクミリングガイのゲノム DNA ライブラリーからマイクロサテライトおよびその近傍を含むクローンを選別した (図 2)。そして, プラスミドの挿入断片の塩基配列を決定の後, PCR のプライマーをデザインした。なお, 近縁種ラブラタリングガイで開発されたマイクロサテライトについても, スクミリングガイで使用可能か確認し, 必要に応じてプライマーの再設計などを経て, 使用できるマーカーを選別した。

得られたプライマーは, 安定して増幅され, かつ個体間で多型を示すか調べた。スクミリングガイの染色体数は 2n=28 なので, 染色体セット全体をカバーするために, 多型を示す

マーカーを40個程度開発することを試みた。連鎖解析においては、上記のマーカーの一部について、雌雄で出現頻度の異なるものを探索した。性決定遺伝子座と同一の連鎖群（染色体に相当）に位置するマーカーは、雌雄で頻度が異なることが予想されるためである（図3）。

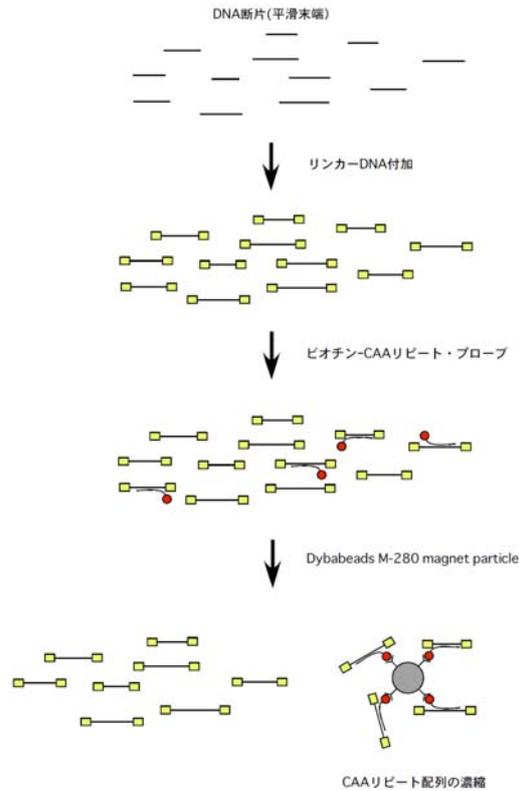


図2. マイクロサテライト部位の選別法

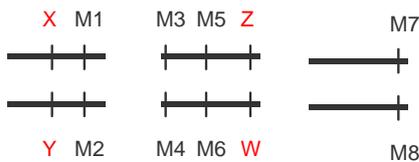


図3. 連鎖解析の概念図。M1からM8がマイクロサテライトで、X、Y、Z、Wが性決定遺伝子。M1からM6が性決定遺伝子座と連鎖しているため、雌雄で出現頻度が異なり、M7とM8は異なる。

4. 研究成果

(1) 掛け合わせ実験

野外で採集したスクミリングガイを交配させ、その子供(F1)の性比を調べたところ、統計的に有意に雄に偏っている家系から雌に偏っている家系まで、さまざまな性比をもった約30家系が得られた(図4)。これは多様な性比の出現という従来の結果を支持する。その後、各家系のF1の姉妹を成熟させ、

4-6個体程度を選んで同一の雄と交配・産卵させ、孵化貝を飼育して性比を決定した。

この結果、母親が全きょうだいの関係にあるF2の貝の性比は、いくつかの離散的な値をとった(図4)。いくつかの家系では、性比が0.5に収束し、大きな変動がみられなかった。またF1の性比とF2の性比との間に有意な正の相関がみられ、性比変動に遺伝要素が存在していることが確認された。これらの結果は、少数遺伝子による性決定を強く示唆する。

同様に、全きょうだいの関係にあるF1の雄同士を同一の雌に掛け合わせ、F2の性比を調べる実験も行った。熊本県熊本市のレンコン田からスクミリングガイを採集し、未成熟の個体からペアで飼育し、産卵させた。しかし、実験過程で飼育個体の大量死があり、初めから実験をやり直したため、現在までにF2を得るには至っていない。今後も飼育を継続する。

以上より、雌については少数遺伝子の関与という仮説が支持された。雄についてもこのことが支持されれば、動物で従来例のない、少数性決定遺伝子による性比変動が検証されたことになる。

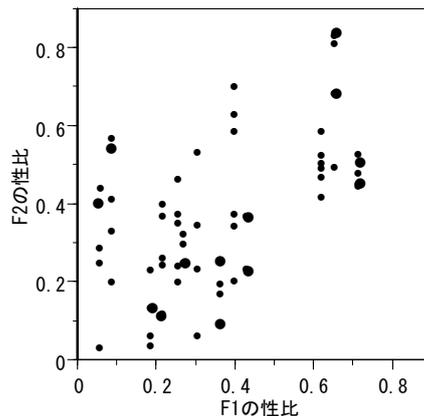


図4. F1世代の性比と、F1の姉妹を同一の雄と掛け合わせてできたF2の性比。大きな点は2つのデータが重なっていることを表す。縦方向にみるとF2性比がいくつかの値に収束していることが分かる。

(2) 遺伝マーカーの開発と連鎖解析

①遺伝マーカーの開発：スクミリングガイのゲノムDNAライブラリーを作成し、マイクロサテライト配列を含むクローンの選択を行った。効率的にマイクロサテライト領域を含むDNA断片をクローン化する方法を開発した。この方法により現在までに44のDNA断片を取得し、マイクロサテライト領域(CAA, CAGリピート)を増幅するプライマーのデザインを完了した。さらに、マイクロサテライト領域を含むDNA断片のクローン化を継続し、精度の向上を図る。

また、近縁種ラプラタリングガイで知られ

ているマイクロサテライト部位を参考に、スクミリンゴガイでマイクロサテライト領域の探索を行い、プライマーの再設計等を経て、4つのマイクロサテライトマーカーを開発できた。

これらのマーカーの一部については、蛍光プライマーの開発を行い、再現性や多型性、メンデル遺伝との整合性などを確認し、遺伝マーカーとしての実用性を確認した。なお、本プロジェクトで開発した方法は非常に簡便であるため、他の生物種についても応用が期待される。

②連鎖解析：蛍光プライマーを開発した4つのマーカーについて、熊本市と奈良市の個体群から雌雄のスクミリンゴガイを採集し、フラグメント解析を行った。その結果、1つのマーカー部位については、熊本・奈良共に雌雄で遺伝子型の出現頻度が異なっていた。したがってこのマーカーは、性決定遺伝子と連鎖している可能性が高いと考えられた。しかし、今回解析した個体は野外から採集した遺伝的背景が不明な個体であったため、今後は系譜の判明している家系で確認する必要がある。

蛍光プライマーの開発に至っていない他のマーカー領域についても、今後蛍光プライマーの開発と実用性を確認し、複数の家系において性比との連鎖を確認する予定である。

今後、連鎖解析を全てのマイクロサテライトマーカーについて行い、連鎖群を決定する。複数の性決定遺伝子座が異なる連鎖群に存在することが証明されれば、掛け合わせ実験とは独立の、少数遺伝子による性決定の検証となる。

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8件)

- ①Aizaki, K. and Yusa, Y. 2010. Learned predator recognition in a freshwater snail, *Pomacea canaliculata*. *Malacologia* 52: 21-29. 査読あり
- ②和田節, 松倉啓一郎, 吉田和弘, 山西陽子, 遊佐陽一. 2009. 西南暖地において水田から用水路に流出するスクミリンゴガイの個体数. 九州病害虫研究会報 55: 93-98. 査読あり
- ③Yoshida, K., Hoshikawa, K., Wada, T. and Yusa, Y. 2009. Life cycle of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae) inhabiting Japanese paddy fields. *Applied Entomology and Zoology* 44: 465-474. 査読あり

- ④岩口伸一, 鈴木孝仁, 松澤一幸, 清水浩美, 大橋正孝, 都築正男, 藤野千代. 2009. 奈良八重桜から分離した花酵母でつくった爽やかな旨味の清酒. *生物工程* 87: 356-357. 査読なし

- ⑤Aizaki, K. and Yusa, Y. 2009. Field observations of the alarm response to crushed conspecifics in the freshwater snail *Pomacea canaliculata*: effects of habitat, vegetation, and body size. *Journal of Ethology* 27: 175-180. 査読あり

- ⑥Iwaguchi, S., Suzuki, M., Sakai, N., Yokoyama, K. and Suzuki, T. 2008. The loss of parts of chromosome 7 followed by the insertion of URA cassette into RB2 on MRS in *Candida albicans* strain CAI-4. *Medical Mycology* 46: 655-663. 査読あり

- ⑦Yusa, Y. 2007. Causes of variation in sex ratio and modes of sex determination in the Mollusca--an overview. *American Malacological Bulletin* 23: 89-98. 査読あり

- ⑧Takeichi, M., Hirai, Y. and Yusa, Y. 2007. A water-borne sex pheromone and trail following in the apple snail, *Pomacea canaliculata*. *Journal of Molluscan Studies* 73: 275-278. 査読あり

[学会発表] (計8件)

- ①上島慧里子, 遊佐陽一. 捕食者種によるスクミリンゴガイの逃避行動の違い. 第57回日本生態学会大会. 2010年3月17日. 東京.
- ②遊佐陽一, 原明子, 吉田和弘. 生物的抵抗性を利用したスクミリンゴガイ広域的管理の可能性. 農研機構シンポジウム「水田農業の新たな展開と技術」. 2010年3月15日. 東京.
- ③Ozaki, Y., Iwaguchi, S. & Yusa, Y. Sperm competition among dwarf males of *Scalpellum stearnsii* (Cirripedia: Lepadomorpha) as revealed by microsatellite markers. The Crustacean Society Summer Meeting. 2009年9月22日. 東京.
- ④Iwaguchi, S., Takauechi, T., Kiuchi, M., Okubo, M., Hosokawa, Y., Matsutani, T., Hashimoto, Y., Yokoyama, K., Suzuki, T. Ecological roles of microbial volatile organic compounds (MVOCs) in

Aspergillus fumigatus. The 17th
Congress of International Society for
Human and Animal Mycology. 2009年5
月29日. 東京.

- ⑤尾崎有紀, 岩口伸一, 遊佐陽一. マイクロサテライトマーカーを用いたミョウガガイの矮雄間競争の解明. 第56回日本生態学会大会. 2009年3月19日. 盛岡.
- ⑥吉江春子, 遊佐陽一. 水田生態系におけるスクミリンゴガイを介した間接効果. 第55回日本生態学会大会. 2008年3月16日. 福岡.
- ⑦岩口伸一, 鈴木孝仁. 植物から得られた真菌の Internal transcribed spacer regions (ITS1, ITS2)による検出と同定. 第71回日本植物学会年会. 2007年9月7日. 千葉県野田市.
- ⑧Yusa, Y. Sexual selection and sex allocation in *Aplysia*: hermaphrodites with nonreciprocal mating. World Congress on Malacology. July 15-20, 2007. Antwerp, Belgium.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遊佐 陽一 (YUSA YOICHI)

奈良女子大学・理学部・准教授

研究者番号: 60355641

(2) 研究分担者

岩口 伸一 (IWAGUCHI SHIN-ICHI)

奈良女子大学・理学部・准教授

研究者番号: 40263420

(3) 連携研究者

なし