

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440243

研究課題名(和文)琵琶湖固有力ワニナ類における遺伝子浸透の解明と吸虫感染耐性への影響

研究課題名(英文) Genetic introgression between *Semisulcospira* species endemic to Lake Biwa, and its effects on the susceptibility to trematode parasites

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：琵琶湖沿岸におけるカワニナ類の遺伝子浸透を調べることを目的として、新たな遺伝子マーカーであるPk-Int2領域の解析を行った。その結果、固有種3種とカワニナ(広域分布種)の系統は明瞭に分かれたが、チリメンカワニナ(広域分布種)では、配列の変異が非常に大きかった。また、タテヒダカワニナとハベカワニナ(固有種)では、Pk-Int2領域は、従来の遺伝子マーカーであるITS-1領域と比べて、ヘテロ接合率が顕著に高かった。これらの結果から、カワニナ類の遺伝子浸透は予想以上に激しく、各種のマーカーとなる部位を発見するにはより多数の標本と多くの遺伝子座の調査が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Genetic introgression between *Semisulcospira* snails in Lake Biwa was investigated using a new nuclear genetic marker (PkInt-2). Three species endemic to Lake Biwa and one non-endemic (*S. libertina*) formed different clades, but the other non-endemic (*S. reiniana*) showed a great intraspecific variation in its sequences. The Pk-Int2 showed greater heterozygosity than another common genetic marker (ITS-1) both in *S. habei* and *S. decipiens*. These results suggest that genetic introgression between *Semisulcospira* species is greater than expected, and more samples and loci are needed to identify genetic markers characteristic of each species.

研究分野：寄生虫学、生態学、陸水生物学

キーワード：種分化 二次交雑 遺伝子浸透 固有種 共進化

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、カワニナ類は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。

カワニ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らる。申請者はこれまでの研究によって、琵琶湖周辺のカワニナ類に広く感染する*Genarchopsis*属吸虫は、琵琶湖固有カワニナ類の一系統である八ベカワニナ種群(Kamiya et al. 2011)の種に適合性の高い種と、固有種のもう一つの系統であるタテヒダカワニナ種群、および非固有種カワニナ類に特異的で八ベカワニナ種群には感染できない種の2つに分化していることを明らかにした(*G. gigi*および*G. goppo*; Urabe et al. 2012)。これら2種は、利用する終宿主の種類および感染部位は共通である。従って、22種の分化は、第一中間宿主の系統分化に追従したものであることが明らかとなった(佐谷・浦部, 投稿準備中)。寄生虫の種分化は、地理的隔離のほか、終宿主の種特異性または感染部位の違いによる生殖隔離によって生じることが多いと考えられているが(Brooks and McLennan, 1993), *Genarchopsis*は、第一中間宿主の系統分化にのみ追従して種分化したことが示されたまれな例である。

平成22年度基盤研究(C)での研究により、琵琶湖固有カワニナ類の一種である八ベカワニナは*G. gigi*にのみ感受性を示し、*G. goppo*に対しては感染耐性をもっていることが判明した。また、交雑の影響が明らかな個体(核

のrRNA遺伝子ITS-1領域の配列が非固有種およびタテヒダカワニナ種群と共通である個体)は、*G. goppo*と*G. gigi*の両方に感受性を示すことが示唆された(交雑個体の例数が少ないため、現在も実験を継続中である)。今まで得られた結果からは、八ベカワニナ種群の種はその他の系統と交雑することにより、2種の*Genarchopsis*の両方に感受性を持つことになり、したがって繁殖に不利となる可能性が示唆されている。この推測が正しいとすると、琵琶湖固有カワニナ類においては、交雑個体の適応度は低くなり、その結果として2つの系統が完全には交じり合わずに維持されると予測される。

しかし、現在までの結果には大きな問題点が含まれることもまた明らかになった。今まで遺伝的マーカーとして主に使用してきた核rRNA遺伝子のITS-1領域は、交雑がある場合、雑種個体内において速やかに母種のどちらか片方の配列に収束する(concerted evolution)ことが知られている(Koch, et al. 2003)。すなわち、交雑個体においては分子系統解析の前提である中立性が保たれないため、マーカーとしては適当ではなく、新たなマーカーの開発が必要となった。そこで、本申請の共同研究者は、これまでにフォスファージェンキナーゼ(Pk)遺伝子のイントロンを新たなマーカーとして開発してきた。Pk遺伝子はrRNA遺伝子のような繰り返し構造を持たないため、concerted evolutionが起こらず、遺伝子浸透の程度についてより客観的に示すことができると考えられる。このマーカーを用いて遺伝子浸透の程度を示すとともに、ITS-1領域との比較により、従来のマーカーによる交雑個体の検出力についても検討する。

2. 研究の目的

琵琶湖の中で多数の種に分化したカワニナ類において、これらが同所的に生息し、交雑を繰り返しながらも複数の系統が維持されて

いる機構の一つとして、寄生虫が交雑個体の適応度を与える影響を調べる。具体的には、固有カワニナ類、特に早期に分化したと推測されるハベカワニナ種群と、集水域をおもな生息場所とする非固有カワニナ類の間における遺伝子浸透の程度を明らかにする。また、交雑個体に対して、ハベカワニナ種群と適合性の高い寄生虫 *Genarchopsis gigi* およびハベカワニナ種群以外の種に特異的な *G. goppo* (ともに宿主の寄生去勢をもたらす) の感染力を調査する。

3. 研究の方法

(1) フォスファーゲンキナーゼ (Pk) 遺伝子のイントロン2領域 (Pk-Int2) による系統解析およびヘテロ接合度の判定

核遺伝子である Pk-Int2 領域の配列解読およびサブクローニングにより、固有カワニナ類におけるヘテロ接合の度合いを明らかにし、concerted evolutionのみられる ITS-1 領域との比較を行った。

(2) *G. gigi* のタテヒダカワニナへの感受性調査

固有種群のうち、タテヒダカワニナおよびその近縁種については、*G. gigi* にたいする感受性がまだ不明であった。そこで、実験室内で生まれたタテヒダカワニナの稚貝に *Genarchopsis* の卵を摂食させ、感染が成立した場合、その虫体を遺伝子同定し、どちらの種が感染したかを確認した。

(3) 飼育下における交雑個体の実験的作成

野外から未熟なハベカワニナとカワニナ (*G. gigi* への感受性が異なる) を採取し、2 個体ずつペアリングして飼育し、稚貝が生まれるかどうかを確かめた。

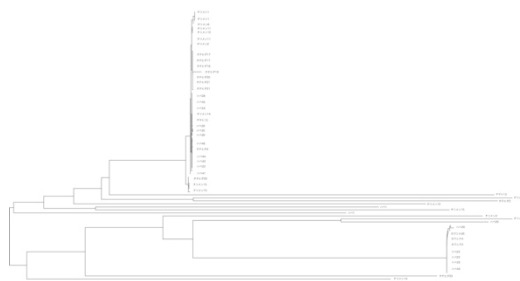
4. 研究成果

(1) フォスファーゲンキナーゼ (Pk) 遺伝子

のイントロン 2 領域 (Pk-Int2) による系統解析およびヘテロ接合度の判定

カワニナ・チリメンカワニナ (以上非固有種)・タテヒダカワニナ・ハベカワニナ・ヤマトカワニナ (以上固有種) の 5 種について、Pk-Int2 領域の解析を行った。約 440bp の塩基配列に基づく系統解析の結果、3 つの固有種とカワニナの系統は明瞭に分かれた。また、非固有種のカワニナと同一あるいは類似した配列がハベカワニナからも得られ、異種間の遺伝子浸透が強く示唆された。しかし、非固有種のチリメンカワニナにおいては、Pk-Int2 領域の配列の変異が非常に大きいことが判明した。チリメンカワニナにおいては、固有種群の多数が属するクレードと同一の配列を持っている個体もいたが、独自の配列を有する個体も多く、チリメンカワニナの種の核をなす配列群を特定することができなかった。また、タテヒダカワニナでは、ITS-1 領域では解析した全個体 (n=11) がホモ接合であったのに対して、PK1-Int2 では全個体がヘテロ接合であった。また、ハベカワニナでは、ITS-1 領域では 14 個体がホモ接合、6 個体がヘテロ接合であったが、PK1-Int2 では 2 個体がホモ接合、18 個体がヘテロ接合であった。

これらの結果から、琵琶湖沿岸におけるカワニナ類の遺伝子浸透は予想以上に激しく、より多数の標本および多くの遺伝子座を調査しない限り、各種のマーカとなる部位を発見することは困難と考えられた。



図：琵琶湖産カワニナ類の PK-Int 2 (440bp) ハプロタイプの系統樹。

(2) *G. gigi*のタテヒダカワニナへの感受性調査

感染実験の結果、タテヒダカワニナは、八ベカワニナ種群には劣るが *G. gigi* への感受性を有することが判明した。従って、*G. gigi* は系統的に異なる2つの固有種群両方に感染力を持つことがわかった。

(3) 飼育下における交雑個体の実験的作成
カワニナと八ベカワニナの異種ペア22組を2年間に渡って飼育し、そのうち3ペアから稚貝を得たが、遺伝子解析の結果、これらはすべてカワニナであり、採集時に既に交尾済みだったメスから生まれたと考えられた。従って、飼育下で雑種個体を得ることはできなかった。交雑個体を得られれば、*G. gigi*および*G. goppo*の感受性を実験的に調べる予定であったが、この目的は達成できなかった。

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 2 件)

①Jarilla B. R., Uda, K., Suzuki T., Acosta, L. P., Urabe, M. and Agatsuma, T. (2014) Characterization of arginine kinase from the Caenogastropod *Semisulcospira libertina*, an intermediate host of *Paragonimus westermani*. J. Moll. Stud. 1-8.

②Urabe, M. (2016) Experimental infection of the digeneans to some congeneric snail species radiated in a single water system: Relative importance of local evolution and phylogenetic constraint. Parasitology International 65: 221-226

[学会発表](計 件)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 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・環境生態学
科・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・看護学科・特任教授

研究者番号: 40117031

(3)連携研究者

()

研究者番号: