

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570270

研究課題名(和文) 分子遺伝学的手法による雄性発生シジミの起源と核ゲノムクローン性に関する研究

研究課題名(英文) The origin and possible role of male in hermaphrodite androgenetic Corbicula clam and its genetic diversity by molecular tools

研究代表者

古丸 明 (KOMARU, Akira)

三重大学・生物資源学研究科・教授

研究者番号：10293804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：1) 雄型はミトコンドリア解析の結果から、同体型から派生したと考えられる。しかし同所的に生息する雌雄同体個体から生じたものではなかった。2) 同体種は異体種から生じたと考えられるが、セタシジミが直接の起源であるかどうかは不明である。3) 雄型核遺伝子の遺伝的変異性は高かった。しかし、雄のマイクロサテライト7座の遺伝子型が一致する個体もあった。4) 雌雄同体型と雄型のミトコンドリアは一致していた個体において、核のMS, 28S rDNAは全く共有されていない個体が多く見いだされた。これらの結果は、核とミトコンドリアの系統の不整合が、雄性発生で生じている事、雄型は独立した系統である事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We tried to clarify the origin of males sympatrically distributed with hermaphrodite androgenetic Corbicula clams and reproductive possibility of male clams. Judging from mitochondrial Cyt ochrome b gene and nuclear microsatellite 7 markers, The male clams found in Shiga Prefecture not directly derived from hermaphrodite clams distributed in the same location. It is curious that mitochondrial DNA was shared by male and hermaphrodite, although nuclear 28SrDNA was completely different from male and hermaphrodite. These results suggested that the male might reproduce by fertilizing the eggs from hermaphrodite. In this case hermaphrodite clams may show androgenetic development. We also tried the cross experiment between males and hermaphrodites to get the evidence of replacement of nucleus during fertilization. Unfortunately we failed to obtain the active spermatozoa from males by spawning induction.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：進化生物学

キーワード：雌雄同体 雄性発生 系統類縁関係 クローン

### 1. 研究開始当初の背景

マシジミとタイワンシジミは雌雄同体であることが古くから知られている。マシジミは日本固有種とさえ、最近、海外からタイワンシジミが導入され、北海道以外の日本全域に広がったと考えられている。貝殻色彩や形態から、両者は別種という扱いになっている。本研究では、両者を別種として扱う。ただし、雌雄同体であること、後述するように、雄性発生をすること等共通点が多い。

これらの雌雄同体種においては、受精時に、卵由来の核を極体としてすべて放出し、精子核のみで発生することが申請者の研究により明らかになった。この発生様式は動物界でもまれであり、進化研究の材料として極めて興味深い。雄性発生シジミは雌雄同体で、精子と卵を同一個体が放出し、自家受精する。そのため両性生殖種と比べて遺伝的多様性が極めて低い。しかし、雄性発生種の起源や集団構造は、未解明である。単為生殖種では遺伝的変異性が低いことから、両性生殖種と比べ進化の可能性は低いと考えられてきた。この雄性発生の起源並びに集団構造、核ゲノム多様性を明らかにし、雄性発生による進化の可能性を検討することは意義が大きい。

雄性発生シジミは雌雄同体とされていたが、最近の研究で、まれに雄が集団内に生じる事がわかってきた。この雌雄同体種における雄の存在は Androdioecy とよばれ、魚類、甲殻類において知られている。Mangrove killifish (魚類)では、通常は雌雄同体魚が自家受精して発生するため、遺伝的変異性が乏しいが、まれに雄が集団に生じ、遺伝的変異性もたらされていることが明らかになっている。また、最近の著者らによる核遺伝子の予備的分析により、両性生殖種セタシジミでは、並列している数多くのリボソーム 28S rRNA 遺伝子が「協

調進化」により種内で塩基配列が均一であったのに対し、雄性発生シジミでは、単為発生する線虫と同様、均一になっておらず同一個体が数多くの変異遺伝子を持っていることがわかった。これらの研究結果をふまえて、申請者らは以下の仮説について検証をおこなった。

### 2. 研究の目的

(1) 雄性発生シジミと両性生殖種、琵琶湖産セタシジミ、中国太湖産シジミとの遺伝的類縁関係を調査し、雄性発生シジミの起源を分子生物学的手法で推定する。

(2) 雄性発生種雄型精子と雄性発生雌雄同体の卵とが受精し、卵の乗っ取り(核ゲノムの置換)が起こる可能性が示唆されている。もし、これが普遍的な現象ならば、核遺伝子による系統樹とミトコンドリア遺伝子系統樹との間での不整合が見られるはずである。ミトコンドリア遺伝子、核遺伝子を用いて系統樹を両者間で比較し、雄型精子による「核ゲノム置換」が生じている根拠を得る。さらに、交配実験を行い、親子間における核ゲノム置換の可能性について核マーカー遺伝子を用いて実験的に検証する。

(3) 核ゲノム全体の集団内クローン性、集団間変異性を明らかにするため、AFLP法で雄性発生集団におけるクローン性を検証する。精子形成時の減数分裂における、相同染色体間の乗換えの有無を明らかにする。

(4) 多重遺伝子族 rRNA 遺伝子(28S, 18S)の塩基配列解析を行い、雄性発生種においてリボソーム遺伝子ファミリーに協調進化がおきておらず、多様性が生じていることを明らかにする。

### 3. 研究の方法

雄性発生の起源解明のため、さらに雄型による核ゲノム置換仮説を実証するために、

ミトコンドリア cytochrome b 遺伝子、核遺伝子塩基配列を解析して、分子系統樹、ハプロタイプネットワークを描いた。また、雄性発生による核ゲノムクローン性の検証を行う。また、核リボソーム遺伝子の配列解析により、変異性の有無を明らかにする。以上の手法により、雄性発生シジミの集団内クローン性、集団間変異性、雄型の繁殖戦略、リボソーム遺伝子における多様性を明らかにする。

#### 雄性発生起源推定

雄性発生種の起源を探るために日本、中国から雄性発生シジミと近縁の異体種（琵琶湖セタシジミ等）を収集し、遺伝的系統類縁関係を明らかにする。雄性発生では、核ゲノムの置換が過去に起こった可能性があるため、ミトコンドリアと核遺伝子の解析も行い、両者の塩基配列から、系統類縁関係を推定する。ミトコンドリア cytochrome b 遺伝子、核遺伝子の解析を行い、系統樹を構築する。国内、国外採集地・標本数を採集して、雄性発生起源を明らかにする。

雄性発生による核ゲノム置換の可能性の検証 進化の過程で、雄性発生により核ゲノムの置換が起こっていることを明らかにするため、ミトコンドリア系統樹と核遺伝子系統樹を比較し、両者の樹形に不整合があるかどうか検証する。

また集団内、集団間のゲノム全体の変異性を比較するために、マイクロサテライト（核）7座を解析し、クローン性の推定を行った。

#### 4. 研究成果

(1)雄性発生起源の推定。28 SrDNA 領域を調査し、ハプロタイプネットワークを作成した。琵琶湖産セタシジミは雄性発生種マシジミと優占的に出現するハプロタイプを共有していた。また、NJ 図ではマシジミ雌雄同体、マシジミ雄型、セタシジミに

おいてはブートストラップ値が低く、遺伝的には近縁と判断された。またマシジミ雄型のハプロタイプとマシジミ雌雄同体型のハプロタイプは28 SrDNA 領域においては、まったく共有されていなかった。また雄型のハプロタイプは台湾シジミのハプロタイプと一部が一致していた。

これらの結果から、雄性発生種は淡水産雌雄異体種に起源を持つと判断されたが、セタシジミが直接の祖先種であるかどうかの確証は得られなかった。今後の大陸産の淡水産雌雄異体種の知見の収集が必要と考えられる。

(2)雄性発生による核ゲノム置換の可能性の検証

貝殻外観からはマシジミ雌雄同体、雄型の識別は困難であったが、28 S rDNA 領域は全く共有されていなかったことから、核遺伝子は全く異なっていることが明らかになった。このことから、台湾シジミの系統に由来する、遺伝的には異なる系統と考えるのが妥当と思われる。一方、ミトコンドリア cytochrome b 遺伝子においては、個体によってはハプロタイプが同体と雄型で完全に一致していた。また、マイクロサテライト解析の結果も、雄型と遺伝子型が共有される雌雄同体は同所的には見いだせなかった。マイクロサテライトにおいては、雄型には7座完全に一致する個体と、一致しない個体が検出された。これらの結果は、ミトコンドリアは完全に一致しているが、核遺伝子は異なっているということが明らかになった。また、雄型についても、同所的に生息する個体はクローンと判断される場合と、クローンでないと判断される場合が見いだされ、雄型の変異性が高い傾向がマイクロサテライトで認められた。また、28 SrDNA 領域においては同一個体から複数の異なるハプロタイプが検出された。雄型は欠失、挿入を伴うハプロ

タイプを持っている個体があり、そのため、変異性を示す指標ハプロタイプダイバーシティが同体型に比べて高い傾向が認められた。雌雄同体型においては変異性が高い集団と、クローンと判断される集団が見いだされた。元々日本に生息していたマシジミは外来種と考えられるタイワンシジミよりもマイクロサテライトにおいては多様性が低いと考えられた。

雄型を研究室に持ち帰り、水温を上昇させて、放精を促したが、精子を放出する個体は観察されなかった。そのため本研究期間中には交配実験を行うことができなかった。

以上の結果をまとめると、1) 雄型はミトコンドリア解析の結果から、同体型から派生したと考えられる。しかし同所的に生息する雌雄同体個体から生じたものではないことが明らかになった。2) 雌雄同体雄性発生種は雌雄異体種から進化の過程で生じたいと考えられるが、セタシジミが直接の起源であるかどうかは不明である。3) 雄型の方が核遺伝子の遺伝的変異性は高いと考えられる。しかし、雄においてもマイクロサテライト7座において、遺伝子型が一致しクローンと判断される個体も見いだされた。4) 雌雄同体型と雄型のミトコンドリアは一致していた個体において、核のMS,28S rDNA は全く共有されていない個体が多く見いだされた。

これらの結果は、核とミトコンドリアの系統の不整合が、雄性発生でしばしば生じていること、さらに雄型は独立した系統であることが示唆された。雄型は性の転換がおこらないとするならば、雌雄同体の卵を乗っ取って繁殖している、という仮説には今回の研究で得られた結果は矛盾しなかった。

#### 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5件)

1) Sakai H, Takahashi T & Komaru A (2014). Allozyme variability in Japanese *Corbicula leana* and exotic *C. fluminea*, and freshwater clam diversification. *Venus* (in press) 査読あり

2) Yamada M, Ishibashi R, Toyoda K, Kawamura K and Komaru A (2014). Phylogeography of the brackish water clam *Corbicula japonica* around the Japanese Archipelago inferred from mitochondrial COII gene Sequences. *Zoological Science*. 31, 168-179. 査読あり

3) Komaru A, Yamada M, Houki S (2013). Relationship between two androgenetic clam Species, *Corbicula leana* and *Corbicula fluminea*, inferred from mitochondrial Cytochrome b and nuclear 28S rRNA Markers. *Zoological Science* 30, 360-365. 査読あり

4) Komaru A, Houki S, Yamada M, Miyake T, Obata M, Kawamura K (2012). 28S rDNA haplotypes of males are distinct from those of androgenetic hermaphrodites in the clam *Corbicula leana*. *Development Genes & Evolution* 222, 181-187. 査読あり

5) Houki S, Yamada M, Honda T, Komaru A(2011). Origin and possible role of males in hermaphroditic androgenetic *Corbicula* clams. *Zoological Science* 28, 526-531. 査読あり

(学会発表)(計6件)

1) 古丸 明 雌雄同体シジミの雄性発生その起源と多様性 平成25年水産学会春季大会ミニシンポジウム 2013. 3.30 (東京)

2) 中国広東省珠江産タイワンシジミの遺伝的集団構造、山田充哉・唐雅頌・桶屋卓真・河村功一・古丸明・青木純哉、平成25年度日本水産学会秋季大会、口頭発表番号342 2013.9.21 (津市)

3) 日本列島周辺におけるヤマトシジミの系統地理学的研究、山田充哉・石橋亮・三宅琢也・豊田敬・河村功一・古丸明、第18回淡水貝類研究会、口頭発表番号5 2012.10.13 (大阪市)

4) 日本および朝鮮半島に分布するヤマトシジミの遺伝的集団構造、山田充哉・石橋亮・三宅琢也・河村功一・古丸明、平成24

年度日本水産学会春季大会、口頭発表番号  
1120 2012.3.27 (東京)

5) 中国広東省珠江水系で得られた淡水産  
シジミの遺伝的類縁関係、山田充哉・唐雅  
頌・古丸明、第 17 回淡水貝類研究会、口  
頭発表番号 5 2011.10.15 (大阪市)

6) 雄性発生シジミ、両性生殖シジミの  
28SrDNA 領域による類縁関係と多型性、  
古丸明・伯耆匠二・山田充哉・本多貴子・  
小幡麻友、日本動物学会第 82 回旭川大会、  
ポスター発表番号 2P011 2011.9.22 (旭川  
市)

〔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  
(業績一覧)

当該研究室ホームページ業績一覧  
<http://www.bio.mie-u.ac.jp/~kawa-k/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者  
古丸 明 (KOMARU, Akira)  
三重大学生物資源学研究科 教授)  
研究者番号：10293804

(2)研究分担者  
河村功一 (KAWAMURA, Kouichi)  
三重大学生物資源学研究科、准教授)

研究者番号：80372035

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：