

博士論文内容の要旨

論文題目 : Studies on the explosive radiation in freshwater snails of the genus *Biwamelania*

(琵琶湖産カワナ類 *Biwamelania* 属の種分化に関する研究)

氏 名 : 野本 泰寛

琵琶湖産カワナ類 *Biwamelania* 属は形態的、生態的に著しい分化を遂げており、14種に分類されている。化石記録から、これらのカワナ類は琵琶湖という狭い水域の中で、比較的最近に爆発的な種分化を遂げたことが示唆されており、進化生物学的に非常に興味深い材料である。

一方、本属を特徴づけるもう一つの現象として、種間で核型に著しい分化が起きていることが知られている。一般に、染色体構造変化は雑種の減数分裂に支障を来すため、生殖的隔離の直接の原因となることがある。そのため、本属の種分化の機構を解明するためには、染色体構造変化の詳細な機構ならびに種間の遺伝的分化と染色体進化過程を明らかにする必要がある。そこで本研究では、まず、1) 染色体末端構造であるテロメアをハベカワナより単離し、それを用いて蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)法を行うことによって染色体の微細な構造変化を検出することを試みた。さらに、2) 複数の分子遺伝学的マーカーを用いて *Biwamelania* 属の系統関係、種間の遺伝的分化および遺伝子の流入について詳細な検討を行い、染色体の進化過程および種分化との関連を調べた。

1. テロメアの単離とFISH解析

テロメアは染色体の末端にある構造であり、染色体の安定化や細胞分裂の制御に関わっている。テロメアの配列は多くの生物で単離されている。その配列は保存的であり、これまで調べられた脊椎動物や下等真核生物では (TTAGGG) n 繰り返し反復配列であることが知られる。一方、近年テロメアは染色体構造変化を特定するマーカーとしても注目を集めている。染色体に構造変化がおきると本来末端にあるテロメアが染色体腕内に移行すると考えられるため、それらの配列をFISH法で検出することにより、染色体の融合点を特定出来る可能性がある。しかしながら、軟体動物ではテロメアの構造は研究されていない。そこでまず、ハベ

カワニナを材料にテロメアのをクローニングすることを試み、さらに得られた配列をプローブとしてFISH法を行った。

(TTNGGG)_n 反復配列をプローブとし、ハベカワニナのゲノミックDNAからスクリーニングを行った結果、3つの positive clone を得た。その内一つのクローンは多くの真核生物のテロメアに保存されている (TTAGGG)_n 反復配列であることが分かった。残りの二つは配列に変異はあるものの、(TTAGGG)_n様の配列が保存されていた。さらにBal31実験や、FISH法による解析から、この配列がハベカワニナのテロメアであることを明らかにした。この結果は軟体動物における初めてのテロメア配列の報告である。

一方、ハベカワニナの多くの個体において、染色体末端以外の領域よりテロメアのシグナルが観察された。このことは、ハベカワニナでは頻りに染色体構造変化が起きていることを示している。特に、ロバートソン型変異に関与していることが知られていた大型のメタ染色体からはその動原体付近からテロメアのシグナルが観察された。これは動原体融合が起きたことを示す直接的な証拠であり、ハベカワニナでもテロメアが染色体変化の方向性と融合点を特定する有効なマーカーになることが分かった。また、このシグナルは極めて強いことから、融合後にテロメア配列が増幅していると考えられた。さらに、動原体の近傍にもシグナルが見出され、これまで考えられた以上に複雑な構造変化が関与していることが分かった。

2. 分子系統解析

日本に生息するカワニナは *Semisulcospira* 属と *Biwamelania* 属の2属にわけられる。その内 *Semisulcospira* 属は広域分布種の3種を含むが、染色体数はいずれも $2n=36$ である。*Biwamelania* 属の進化過程を明らかにするため、*Biwamelania* 属の11種と、*Semisulcospira* 属3種および外群として韓国産の *S. gottschei* を含めた系統解析を行った。マーカーとしては、核DNAからEF-1 α イントロンとITS-1、そして mt DNA から12Sおよび16Sr DNAを用いた。

核DNAの系統解析からは、*Biwamelania* 属と *Semisulcospira* 属を明瞭に識別することができた。また、*Biwamelania* 属が単系統群になり、*Semisulcospira* 属がその側系統群になることが分かった。*Biwamelania* 属はさらに二つのクレイドにわかれ、その一方にハベカワニナ、ヤマトカワニナ、カゴメカワニナ、クロカワニナ、クロダカワニナの5種（以下ハベ種群）が含まれた。そしてもう一方には、タテヒダカワニナ、イボカワニナ、ナカセコカワニナ、モリカワニナ、シライシカワニナ、タケシマカワニナ、ホソマキカワニナの7種（タテヒダ種群）が含まれていた。両種群内には貝殻の形態や染色体の著しく異なる種が含まれていた。さらに、種群内には明瞭な遺伝的な分化はなく、貝殻の形態や生態、染色体の著しい多様化をともなう爆発的種分化が各種群で独立に起きたことが分かった。

また、従来染色体の特徴から *Semisulcospira* 属に分類されていたクロダカワニナは、*Biwamelania* 属のハベ種群であることが分かった。クロダカワニナは貝殻の形態が *Biwamelania* 属に似ている点や、その分布域が琵琶湖の地域と一致することは、今回の結果とを支持するものと考えられる。さらに、種群間や属間において交雑が確認された。興味深いことに、多景島では多くの個体で交雑による遺伝子の流入が確認された。

一方、mt DNA の系統樹は *Biwamelania* 属が単系統になり、*Semisulcospira* 属がその側系統群となる点では核DNAの系統樹と一致した。しかし、多くの例外的個体群もみつきり、核DNAに比べて頻りに遺伝子流入が起きていることが分かった。このことは、核と mt DNA で遺伝様式が異なることによるものと考えられる。

また、*Biwamelania* 属のクレイド内をみると、種のクラスターが存在しないだけでなく、核DNAで識別された二つの種群は単系統群にならなかった。しかし、興味深いことに、それぞれの種群を表すいくつかのクラスターが存在し、それらがモザイク状に分布していた。核DNAと結果が一致しない原因としては、過去に種群間で大規模な交雑が繰り返し起きたためであると考えられる。この様に、mt DNAは系統的な情報は含まぬものの、核と合わせることで過去の進化過程を明らかにすることが出来た。

さらに、核DNA系統樹から染色体の進化過程を推測すると次のような事が分かった。韓国産 *S. gottschei* も含め、*Semisulcospira* 属のカワニナ類はいずれも染色体数が $2n=36$ であり、*Biwamelania* 属は染色体数が $2n=17\sim 32$ と著しく少ないため、染色体の変化がまず *Biwamelania* 属の共通祖先で起きたと考えられていた。ところが、今回得られた分子系統解析の結果では、まず *Biwamelania* 属が二つの種群に分かれ、その一

方には従来染色体の特徴から *Semisulcospira* 属に分類されていたクロダカワニナが含まれていた。このことは染色体の変化は共通祖先で起きたのではなく、二つの種群で完全に独立に起きたことを示している。また、同じ種群内において核型の全く異なる種が含まれることから、その後に各種で独自の機構で急激に染色体の変化を遂げたと考えられる。

なお、本研究ではEF-1 α のalleleを親子で比較することで *Biwamelania* 属の生殖様式についても調べており、両性生殖を確認している。両性生殖を行う種における核型の急激な分化は、雑種の減数分裂に支障を来すため種分化の原因となった可能性が高い。

考察 *Biwamelania* 属の種分化

Biwamelania 属は二つの種群で独立に爆発的種分化を遂げたことが分かった。貝殻の形態や生態的分化をともなうこのような種分化は、タンガニーカ湖のカワズメやバイカル湖のヨコエビなどで知られる。

Biwamelania 属は、形態や生態の分化および遺伝的特徴に関してこれらの生き物と多くの共通点がある。しかし、*Biwamelania* 属のような種間、種内での染色体の分化は他にはなく、特筆すべき点である。

染色体構造変化は雑種の減数分裂に支障を来すため、種分化の引き金になった事も考えられる。特に、急速に核型進化が起きる場合に、生殖的隔離の原因となりやすいと言われ、*Biwamelania* 属はこれに良く当てはまる。特に、染色体種分化の例としては、多景島産ヤマトカワニナが挙げられる。この島ではこれまでに2つの核型の全く異なるcytotypeが見出されている。これらの間の雑種は見出されておらず、染色体の急激な変化による種分化が起きたと考えられている。

一方、興味深いことに、多景島産ヤマトカワニナは繰り返し別種と交雑を行っていることが分かった。染色体の劇的な変化と交雑が多景島産ヤマトカワニナにのみ見出された。これまで、多くの生物で交雑が染色体の劇的な変化を引き起こすことは報告されており、今回の結果と良く一致する。多景島産ヤマトカワニナでは、交雑が染色体の劇的な変化と種分化を引き起こしたのと考えられる。そして、もしこのメカニズムが *Biwamelania* 属の他の種にも当てはまるなら、過去に繰り返し起きた交雑が染色体の著しい分化と爆発的種分化に関与したと考えられる。