

マイマイ(柄眼目)の分類にはどの遺伝子領域が有効か？

～神戸を模式産地とする3種を中心とした分子系統樹の作成～

飛鳥未歩、桐谷茉那、桐谷有香、土田仁美、前田聖和
兵庫県立神戸高等学校 総合理学科 2 年

従来の表現型によるマイマイの分類は基準が厳密なものではないため、現在、分子系統学による見直しが行われている。遺伝子に基づいて系統解析を行う際、ミトコンドリア DNA の COI 領域を用いることが多いが、神戸市周辺のマイマイを対象とするミトコンドリア DNA の COI 領域を用いた系統解析 (Inoue et al.2013) において、形質の大きく異なる二種が近縁であると示された。このことから私達は、マイマイの属を超えた種間関係を分析するのにミトコンドリア DNA の COI 領域は適していないのではと考え、新たに 16s リボソーム RNA 領域を用いてマイマイの分子系統樹を作成した。さらに、それぞれの結果を比較することで各領域の信頼性について考察するとともに、神戸を模式産地とする 3 種のマイマイ (オオケマイマイ、コウベマイマイ、ハリママイマイ) の遺伝的な位置づけを明らかにした。

1. 序論

マイマイとは陸貝の腹足類(軟体動物門 腹足綱 柄眼目)であり、北海道から沖縄まで生息が確認されている。乾燥に弱く、移動能力が低いため、地理的隔離による種分化が進みやすい。従来の表現型(殻形質等の外部形態や軟体部形質)による分類(図1)は基準が厳密ではないため、現在、分子系統学による見直しが行われている。しかし、神戸市周辺のマイマイを対象とするミトコンドリア DNA の COI 領域(以下 COI)を用いた系統解析(Inoue et al.2013)において、外部形態の大きく異なる二種が近縁であると示された。この結果から、私たちは、マイマイの種間関係を調べるのに COI は適していないのではと考え、16s リボソーム RNA 領域(以下 16s)を用いることを試みた。16s はアミノ酸を指定していないという点で COI と異なる。本研究では COI と 16s の塩基配列を解析することで、神戸を模式産地とするオオケマイマイ、コウベマイマイ、ハリママイマイ(以下マイマイ省略)の 3 種を含む 7 種のマイマイの遺伝的な位置づけを明らかにするとともに、各領域の有効性について考察し、マイマイにおける種の系統解析の方法を提案する。

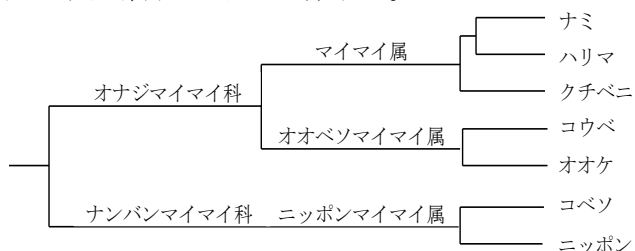


図1 予想系統樹

2. 実験方法

1. 個体の観察

採取した個体の殻の高さ、長径を測定し、軟体部の

色や模様、殻の模様等の観察を行った。

2. 腹足からの DNA 抽出

軟体部腹足から、DNA 鑑定用 DNA エキストラクター FM キット（和光純薬工業株式会社製）を用いて DNA を抽出，単離した。

3. PCR(Polymerase Chain Reaction)法による COI・16s の増幅

PCR法によりDNA断片(COI:581bp,16s: 750bp)の増幅を行った。COIのプライマーはFW2 (5'-ATT TCK ATT G GK GTD TTR GGT TTT-3') (Inoue.et.al.2013), RV1(5'-CTA TTC GTT GTA AGC GAA TT-3') (Hirotaka Nishi et al. 2005)、16sのプライマーはCS1 (5'-AAA CAT ACC TTT TGC ATA ATGG-3'), CS2 (5'-AGAAAC TGA CCT GGC TTA CG-3') (Satoshi Chiba.1999)を用いた。これらを用い、採取した5種全てのDNA断片の増幅に成功した。PCR反応は全量25 μ Lの反応系で行い、プライマー各0.25 μ L, dNTP5 μ L, 緩衝液12.5 μ L, DNAポリメラーゼ(KOD FX Neo: 東洋紡)0.25 μ L, 滅菌水(ddH₂O)5.75 μ L, DNA溶液1 μ Lを混合し94 $^{\circ}$ C2分間の熱変性を行った後、98 $^{\circ}$ C10秒、COI領域では53 $^{\circ}$ C、16s領域では55 $^{\circ}$ C30秒、68 $^{\circ}$ C45秒の反応を40サイクル行った。

4.塩基配列の同定

PCR 法により増幅した DNA 溶液 50 μ l をスピニングカラム High Pure PCR Product Purification Kit(Roche)で精製し、濃度を調整した後、北海道システムサイエンス社にシーケンスを依頼した。シーケンスプライマーは FW2.RV1, CS1.CS2 を用いた。

3. 結果

COIは採集した76個体(表1)のうち解析可能であった39個体と66回生の研究(Inoue et al. 2013)より引用した87個体について、遺伝子解析及び系統樹作成ソフトMEGAを用いてCOIの塩基配列581bpを解析し、Neighbor-joining(近隣結合)法により系統樹を作成した(図2)。外群には柄眼目コウラナメクジ科のチャコウラナメクジ(*Lehmannia valentiana*)を用いた。また、そのアミノ酸配列を比較した。16sは解析可能であった32個体とGenbankより引用したクチベニのサンプルについて遺伝子解析ソフトClustalXを用いて16sの塩基配列750bpを解析し、MEGAを用いてNeighbor-joining法により系統樹を作成した(図3)。外群には新生腹足上目ヤマタニシ科のアオミオカタニシ(*Leptopoma vitreum*)を用いた。この際、ニッポンとコウベのクレード位置において高いブートストラップ確率が得られなかったため、Maximum parsimony(最節約)法により系統樹を作成した(図4)。

クレードの分析

COIの塩基配列に基づいた系統樹では、大きくハリマ、ナミ、オオケ、クチベニの4つのクレードに分かれた。また、コウベとニッポンがナミのクレード内に、コベソがハリマのクレード内に位置した。しかし、これらの種はそれぞれ外部形態や恋矢と呼ばれる生殖に関わる器官の有無などの形質が大きく異なるため近縁種であるとは考えにくい。16sの塩基配列に基づいた系統樹では、大きくナミ、ハリマ、オオケ、コウベ、ニッポンの5つのクレードに分かれた。また、二つの系統樹で共通してハリマとナミは他のクレードに比べ近縁であると示された。

表1 マイマイの採集地と個体数(数値)

ナミ	須磨区高倉台	2
	鳥原貯水池	11
	三重県	1
ハリマ	箕岡公園	4
	須磨区高倉台	3
	鳥原貯水池	15
	大竜寺	2
オオケ	箕岡公園	1
	鳥原貯水池	2
	上野ダム近く	5
	大竜寺	5
	北区	3
コウベ	鳥原貯水池	6
	諏訪山ドライブウェイ	8
	北区	3

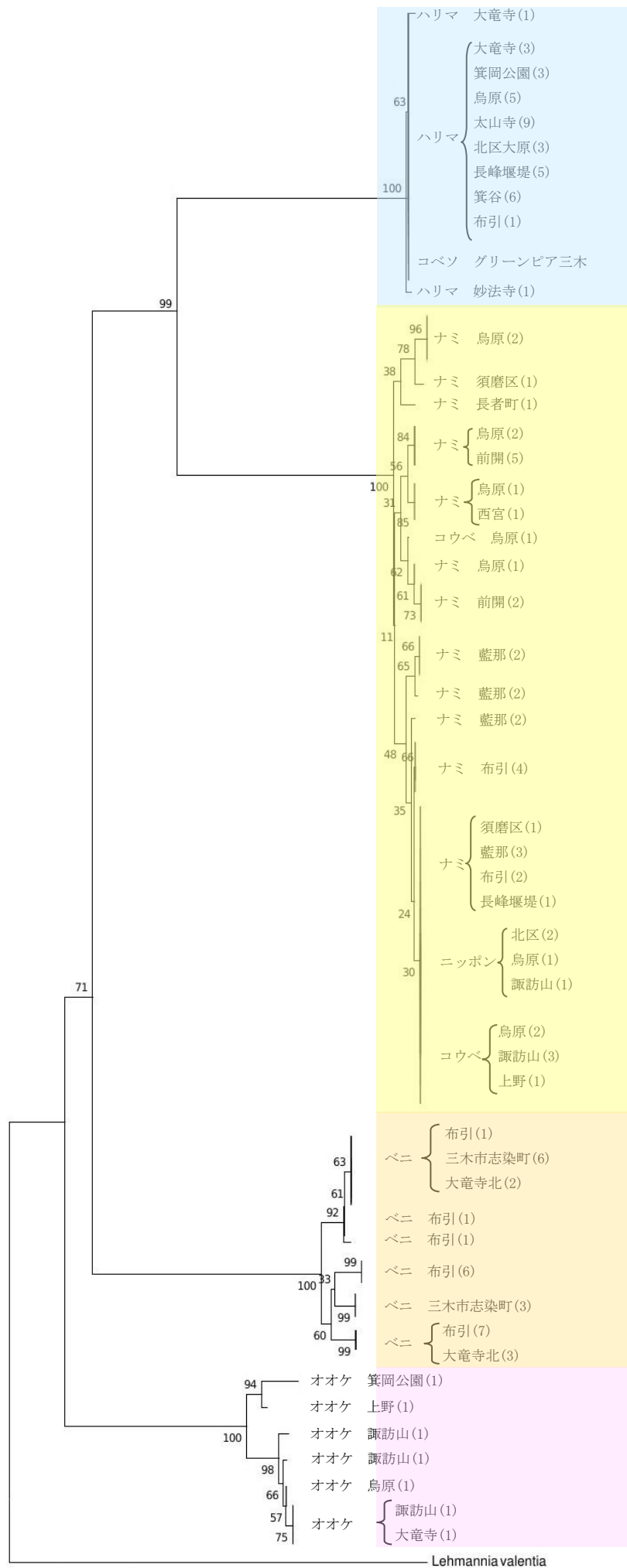


図2 COI 系統樹

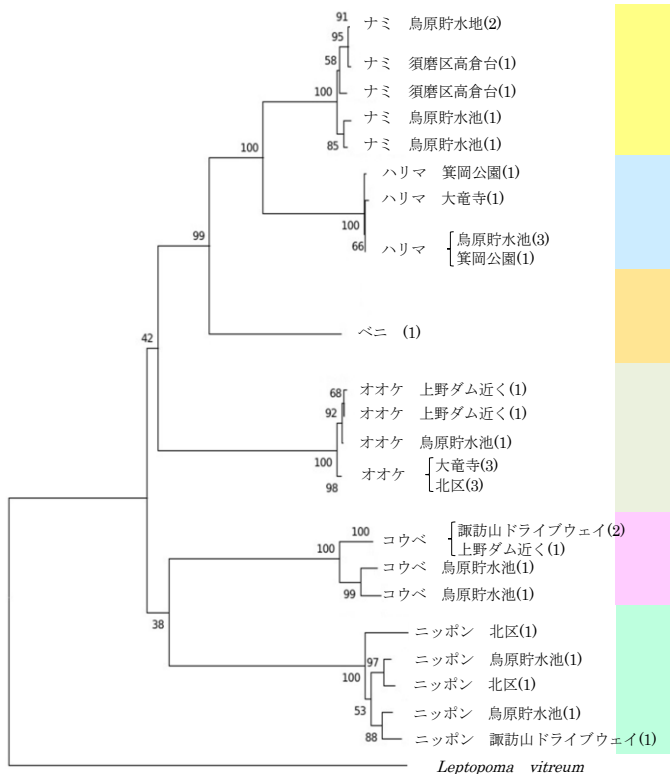


図3 16s 系統樹(NJ 法)

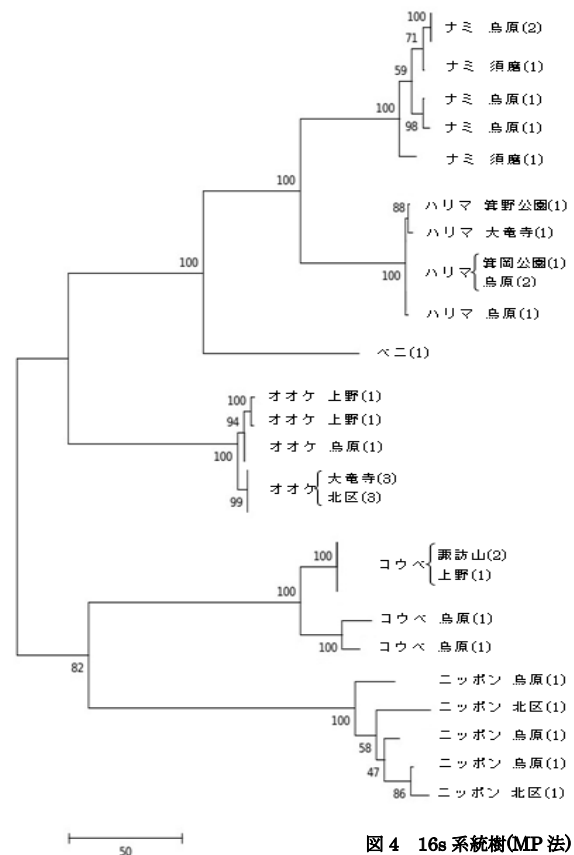


図4 16s 系統樹(MP 法)

表2 種内の置換数

	ハリマ	ナミ	ベニ	オオケ	コウベ	ニッポン
COI 塩基	2	2 2	2 5	4 6	1 1	6
COI アミノ酸	1	1	3	3	3	0
16s	6	2 9	—	1 3	5 0	7 4

表3 種間の COI におけるアミノ酸置換数(右上)と 16s における塩基置換数

	ハリマ	ナミ	ベニ	オオケ	コウベ	ニッポン
ハリマ		8	11	21	10	7
ナミ	112		9	20	4	1
ベニ	144	153		21	11	8
オオケ	194	199	186		21	19
コウベ	239	241	240	209		3
ニッポン	266	264	273	239	272	

4. 考察

塩基配列の置換数の分析

COI では、全てのサンプルにおいて、全体の約 67%にあたる 391 塩基が一致していた。これは、COI はミトコンドリアの好気性呼吸に関わる重要な領域であり、生命維持にかかわるアミノ酸配列を指定しているため、保存性が高いからであると考えられる。それに対し、16s は全体の約 36%にあたる

268 塩基のみが一致し、COI と比べると全サンプルで共通して保存されている領域の割合は約半分であった。これは、16s はリボソーム RNA の非転写領域であるため、COI よりも多くの範囲で置換が起きたことに加え、挿入、欠失による配列長の変化が起きたことが原因であると考えられる。

系統樹の信頼性の検討

COI の系統樹では、ハリマ、ナミ、クチベニの 3 種について 16s の系統樹と外部形態に基づく系統樹の予想図と類似した結果が出た一方、科や属の異なるナミ、コウベ、ニッポンの 3 種、ハリマ、コベソの 2 種がそれぞれ同じクレードに位置していた。このような結果になった原因として、COI の配列は変異の起きやすい範囲が限られているため、早い段階 (アミノ酸配列による系統解析では約 110Ma 以前) に分化した種は同一座位の多重置換によるノイズの影響が大きく、正確な解析ができない。本研究においては、研究対象であるマイマイの進化速度が地理的隔離により他種と比べて速くなっていると思われることから、種よりも上の分類段階である科や属の異なる種の比較では正確な結果が得られなかったのではないかと考えられる。このことから、COI の配列は、進化速度が速いと思われる種の場合、比較的最近分化したと考えられる種の系統解析には有効であるが、早い段階で分化した種の系統解析に不

適であると推察される。

16s の系統樹は、大きく形質の異なる種が同じクレードに位置することはなかった。これは、16s は COI の約 2 倍の範囲で遺伝子の変異が起きていたため変異が蓄積されやすかったからであると思われる。よって、マイマイにおいて 16s は COI に比べ進化の過程をより正確に表していると考えられる。

マイマイにおける正確な解析方法の確立

COI はアミノ酸配列による比較が可能であり、近縁な種であれば精度の高い系統解析が可能であるという利点があるが、科や属の異なる種間の系統解析では正確な結果が得られない可能性がある。また、16s は科や属の異なる種の系統解析において有効であるが、アミノ酸配列による比較は不可能である。よって、マイマイにおいて属を超えた種の系統解析を行う際は、COI、16s など異なる 2 つの領域の併用が必要である。

各種の遺伝的位置づけ

・コウベマイマイ(オオベソマイマイ属)

これまでコウベに関する遺伝情報は全く解明されておらず、本研究で初めて近縁関係が解明された。16s における系統樹で、マイマイ属やオオベソマイマイ属であるオオケと大きく離れたことから、オナジマイマイ科の中で最も早くに分化したか、他の地方からの移入が考えられる。これは、コウベがオナジマイマイ科の中でも殻が厚く、比較的小型であるというオナジマイマイ科の他の種と大きく異なった特徴を持つことから支持される。また、コウベは二か所で採集したが、16s の種内の塩基置換数(表 2)は 50 か所とオナジマイマイ科の中では最も多く、16s 系統樹においても採集地によって遺伝的距離が生じていたため、他の種と比べて移動能力が低く、地域ごとに分化が進んでいると考えられる。

・オオケマイマイ(オオベソマイマイ属)

16s における系統樹では、オオベソマイマイ属であるコウベと大きく離れた。また、16s の種間の塩基置換数(表 3)は、コウベと比較した場合よりマイマイ属と比較した場合のほうが少なかった。このことから、オオケは同属のコウベよりマイマイ属に遺伝的に近いと考えられる。

・ハリママイマイ、ナミマイマイ、クチベニマイマイ(マイマイ属)

16s・COI とともに系統樹ではクチベニはマイマイ属では最も早くに分化しており、ハリマとナミは近縁であると示された。このことは COI における種間

のアミノ酸置換数や 16s における種間の塩基置換数(表 3)にも支持される。また、ハリマは COI では最も多くのサンプルを使用したにも関わらず、種内のアミノ酸置換数は 1 か所のみであり、16s の種内の塩基置換数(表 2)も非常に少ないため、最近分化した種であると考えられる。このことはハリマの生息範囲が狭いことにも支持される。

・ニッポンマイマイ(ニッポンマイマイ属)

COI において、種内でのアミノ酸置換数(表 2)は 6 か所と少なかったが、これはサンプル数が 3 個体と明らかに不足していたことが原因であると考えられる。それに対し 16s の種内の塩基置換数は、遺伝子解析を行った 5 個体において 74 ヶ所であり、採取した 5 種の中で最も多かった。また、種間の塩基置換数(表 3)が、どの種においても最も多かった。これらのことから、ニッポンは、調査した 6 種内では最も早く分化した種であると思われる。

5. 謝辞

研究に際し、御助言をいただいた兵庫県立人と自然博物館鈴木武先生、西宮貝類館の高田良二先生、サンプルの提供にご協力くださった皆様に御礼申し上げます。そして、熱心にご指導いただいた本校教諭繁戸克彦先生に心からの感謝の意を表します。

6. 参考文献

- ・Inoue et al.2013「神戸周辺に生息するマイマイ属のミトコンドリア DNA 系統解析 いまだ知られざるカタツムリの近縁関係を解明する」
- ・Hiroataka Nishi and Teiji Sota et al. 2005 “Phylogeographic Study of the Land Snail *Euhadra* in Chugoku District Based on Analysis of Mitochondrial DNA Sequences”
- ・Satoshi Chiba et al. 1999 “Accelerated Evolution of land snail *mandarina* in the oceanic bonin islands evidence from mitochondrial DNA Sequences”
- ・Takahiro Hirano et al. 2013 “Substantial incongruence among the morphology of the land snails *Aegista*, *Landouria*, *Trishoplita*, and *Pseudobiliminus* (Pulmonata: Bradybaenidae) occurring in East Asia.”
- ・斎藤道子 1998「ミトコンドリア DNA(COI 領域)を指標とした腕足動物の進化と系統」
- ・宮田隆 2010 講談社 「新しい分化進化学入門」
- ・大河内宏 1997 築地書館 「カタツムリの生活」
- ・兵庫 2008-09 実行委員会 「カタツムリの見分け方のポイント」