

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K03820

研究課題名(和文)大規模分岐年代推定 - 真核生物の誕生と進化を解き明かす!! -

研究課題名(英文)Phylogenomic approach to the early evolution of eukaryotes

研究代表者

石谷 佳之 (Ishitani, Yoshiyuki)

筑波大学・計算科学研究センター・研究員

研究者番号：60772043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：人類を含め地球上の生物の進化の根幹となる真核生物の誕生と初期進化は、これまで化石記録や生物が寄与したと考えられる環境要素(例：酸素濃度)の変化などから調べられてきた。しかし、真核生物の初期進化は数十億年以上前と予測され、得られる情報量が制限される。そこで本研究では、全生物がもつ遺伝子情報に基づく分岐年代推定法に着目した。真核生物の初生的な祖先は「単細胞」であると考えられ、実際に単細胞真核生物は複数の系統的に主要なグループを構成している。本研究では単細胞真核生物や化石となる生物の遺伝子情報を収集し、真核生物を明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により真核生物全体の大规模分岐年代推定用データセットを作成した。また、分岐年代推定方法の検定を行い、疑わしい化石記録の検出や高精度に推定する手法を見出した。このことから、分岐年代推定法がただの推定だけではなく、化石記録の妥当性の検証方法としても応用可能となった。また、今回得られた推定結果を事前確率として用いることで、生物群毎の分岐年代推定を高精度に行え、今後、分岐年代推定が多く行われることが期待される。

今回、得られたSARグループの分岐がカンブリア紀初期の所謂「カンブリア大爆発」の時期であったことは、生物多様化の理解や現生生物型の生態系がいつ整ったかを理解するのに大いに貢献した。

研究成果の概要(英文)：Early evolution of eukaryotes is basic question not only for the Earth science but also exciting human's curiosity. Such fundamental question has been addressed by fossils, chemical proxies, and earth environmental changes (e.g., oxygen concentration). However, sediments in the early evolution of eukaryotes (possibly back to billions years ago) are limited and the preservation of fossils and organic matter is getting weaker and weaker through earth history. In present study, we tackle this question with molecular clock analysis based on genetic information which can collect large data from recent organisms. In eukaryotes, most organisms are single cell, and single cell eukaryotes spread in diverse group of eukaryotes. In present study, we collect genetic information single cell eukaryotes and fossilized eukaryotes to reveal early evolution of eukaryotes.

研究分野：分子古生物学

キーワード：有孔虫 SAR 分岐年代推定 カンブリア紀

### 1. 研究開始当初の背景

人類を含め地球上の生物の進化の根幹となる真核生物の誕生と初期進化は、これまで化石記録や生物が寄与したと考えられる環境要素(例:酸素濃度)の変化などから調べられてきた。しかし、真核生物の初期進化は数十億年以上前と予測され、得られる情報量が制限される。そこで本研究では、全生物がもつ遺伝子情報に基づく分岐年代推定法に着目した。真核生物の初生的な祖先は「単細胞」であると考えられ、実際に単細胞真核生物は複数の系統的に主要なグループを構成している。特に、放散虫と有孔虫は、5億年前までの緻密な化石記録から本仮説を支持しており、それらの共通祖先がさらに時代を遡ることを示唆している。

真核生物が「いつ」誕生したのかを知る手法として、化石記録を遡る手法が挙げられるが、古い時代の化石は産出が限られ、単細胞で微小な祖先系が“真核”と認識するのが難しいなどの問題点がある。一方、タンパク質のアミノ酸置換率に基づき、系統分岐の時期を推定する分岐年代推定法という手法がある。この手法を用いた真核生物の誕生に関する研究は2000年代から始まり、大規模遺伝子データによる解析では22億年前(大酸化事件に相当)、それとは別に網羅的な分類群を含めた解析では11億年前に真核生物が誕生したと推定された。この11億年もの差は、なぜ生じたのか?高解像度の系統解析や分岐年代推定を行うには、3つの条件: 系統を代表する分類群を網羅的に含め[参考文献1]、大規模遺伝子データを得て[参考文献2]、信頼性の高い化石記録に基づく制約年代を用いること[参考文献3]が必要不可欠と世界的に認識されている。ところが、いずれの先行研究でも、どちらかの条件を満たせず、推定年代値の誤差を改善するには至らなかった。

近年、次世代シーケンサーの発達により遺伝子データ量は10年前の約35倍と飛躍的に増加しているが、放散虫と有孔虫の遺伝子情報は極端に乏しい(図1)。一方で、放散虫・有孔虫は複数遺伝子の解析から「姉妹系統」であることがわかっており(研究業績 )、カンブリア紀からの化石記録を踏まえると、共通祖先はより古い出現、真核生物の初期進化に相応すると予測される【研究業績】。さらにこれらの詳細かつ連続的な化石記録は、上述の制約年代に関する条件について、非常に大きな役割を果たすと考えられる。つまり、放散虫・有孔虫の遺伝子情報を拡充し、網羅的な分類群を含め、大規模遺伝子データによる、豊富な化石記録で十分に制御された高分解能の分岐年代推定から得た真核生物の誕生、分岐時期と古環境を比較し、正確な真核生物の進化史を検証する必要がある。

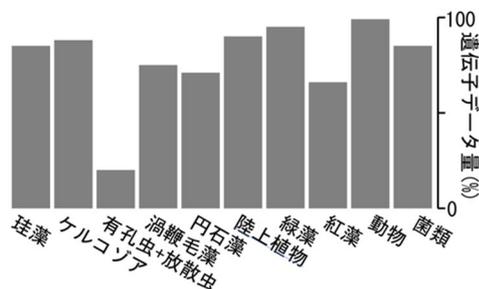


図1: 化石記録を持つ生物の遺伝子データの充足率 (158 遺伝子)

### 2. 研究の目的

本研究は、真核生物の初期進化に関わる共通祖先をもつと考えられる放散虫・有孔虫の大規模遺伝子解析と、それらの化石記録を活用した分岐年代推定を行い、地球史の中での真核生物全体の起源、初期進化を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

放散虫・有孔虫の代表的な系統を網羅するために、放散虫5系統(スプメラリア・ナセラリア・コロダリア・アカンサリア・タクソポディダ)・有孔虫5系統(ミリオリダ・スピリリダ・ロタリダ・テクスチャリダ・モノタラメア)から共生藻類を含まず、抗生物質処理に耐えうる種を選定し、採取した。一部の有孔虫は継代培養も試み、*Ammonia beccarii*, *Spirillina* sp., *Allogromia latticola*の3種の継代培養株作成に成功した。

継代培養株及び採取個体からRNA抽出を行い、cDNAライブラリを作成し、国立科学博物館所蔵のMiseq(Illumina)に供し、ショートリードを得ることができた。そして、得られたショートリードシーケンスをTrinity2.8.0でアセンブルし、大規模遺伝子データとの相同性検索から候補遺伝子を抽出し、大規模遺伝子データセットに加えた。その後、それぞれの単一遺伝子の遺伝子情報をMAFFT 7.427でアライメントし、進化速度の早い部分をtrimAl 1.2で除去し、FastTree 2.1で系統解析を行い、コンタミ・水平伝搬遺伝子の可能性を排除した系統関係を復元する配列の選定を行った。また、共同研究者から提供されたエンドミクサ1系統(SRT235株)のショートリード・シーケンスから上述の手法で候補配列の選定を行った(図2a)。

もともとの大規模遺伝子データセットの中でデータの充足率があまりよくないもの(6種)、化石生物で含まれていないもの(8種)に関して、NCBIですでに登録されているショートリードシーケンスか上述と同じ方法で大規模遺伝子データのさらなる充足を図った(図2b)。

遺伝子の充足率が50%以上のもので、真核生物の主要系統を網羅する157遺伝子・810TUの

データセット (Euk データセット) を用意し、真核生物の中で化石化生物となる系統を幅広く含む SAR 真核生物スーパーグループデータセット (SAR データセット、270TU) を用意した。また、SAR データセットにアウトグループを含めた SARO データセット (290TU)、ほとんどの系統に化石記録があり、最も古くまで遡れる有孔虫からなるデータセット (Foram データセット) を用意した。

それぞれのデータセットについて MAFFT 7.427 でアライメントし、進化速度の早い部分を trimAl 1.2 で除去し、ModelFinder により最適な進化モデルの選定を行った。その後、最適な進化モデルを用いて RAxML 7.2.8 で最尤法を用いた系統解析を行った。また、IQ-TREE 1.6.7 を用いて最適な進化モデルと mixture モデルで最尤法を用いた系統解析、PhyloBayes-MPI 1.7 でベイズ法を用いた mixture モデルでの系統解析を行った。ベイズ解析では4つの Mrakov Chain Monte Carlo (MCMC) を平行解析し、1/10 generation での maxdif が 0.3 以下になるまで解析し、初めの 1/10 generation を除外したものをまとめた。

それぞれのデータセットについて単一遺伝子でのデータセットに分け、MAFFT 7.427 でアライメントし、進化速度の早い部分を trimAl 1.2 で除去し、ModelFinder により最適な進化モデルの選定し、最適な進化モデルを用いて IQ-TREE 1.6.7 で最尤法を用いた系統解析も行った。

Foram, SAR, SARO データセットについて単一遺伝子解析の結果 (最適な進化モデル・系統樹) をもとに、化石記録による制約年代 (表 1) をかけ、BEAST 1.8.4 を用いて、uncorrelated lognormal relaxed (UCLR) と Taxa Specific Random local (TSRL) モデルで大規模分岐年代推定を行った。SAR/SARO/Euk データセットでは MCMC を  $1 \times 10^9$  世代回したが、effective sample size が 100 以上に達しなかったため、 $1 \times 10^9$  世代分を並行で3セット解析し、まとめた。また、複数遺伝子解析の結果をもとに、化石記録による制約年代 (表 1) を同様にかかけ、PhyloBayes 3.3 を用いて、UCLR モデルで大規模分岐年代推定を行った。2つの MCMC を平行解析し、1/10 generation での maxdif が 0.3 以下、effective sample size が 100 以上になるまで解析し、初めの 1/10 generation を除外したものをまとめた。

#### 4. 研究成果

Euk データセットの系統解析を行った結果 (図 3) 先行研究の系統関係を反映しており、より堅牢なサポートで系統関係を支持していた。SAR の単系統は強く支持されており、Alveolata と Stramenopiles が単系統となり、その外側に Rhizaria が組んでいた。SARO データセットの系統関係 (図 4) も先行研究の系統関係を反映しており、より堅牢なサポートで系統関係を支持していた (Sierra et al., 2015)。また、有孔虫内の系統関係はこれまであまりよくわかっていなかったが、Rotaliida と Textulariida の単系統性 (Globothalamea) や Milliolida と Spirillina の単系統性 (Tubothalamea) は強く支持され、Globothalamea と Tubothalamea が組み、その外側に Monothalamea が組む系統関係が強く支持された。この系統関係は SSU (small subunit) rRNA で復元された系統関係 (Pawlowski et al.,

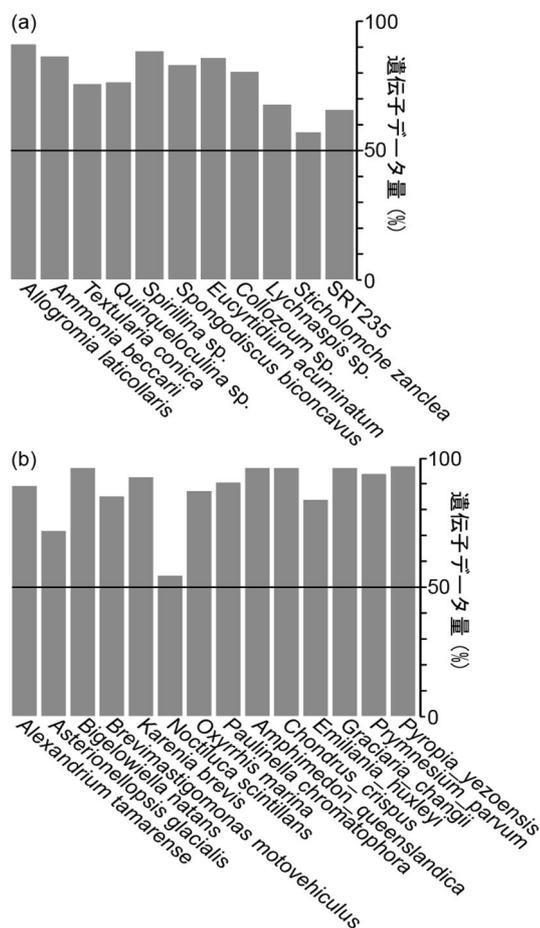


図 2: (a)新規に獲得した放散虫・有孔虫 (b) 大規模遺伝子データを追加した種 (左 6 種) と化石化生物で新規に加えた種 (右 8 種) の遺伝子データ量の充足率 (158 遺伝子)。

表 1: 化石記録による制約年代 (ノード番号は図 4 を参照)。

ノード番号	化石記録 (Ma)	化石イベント
1	250	Rotalida の初出化石
2	360	Texrullarida の初出化石
3	500	Millioilida の初出化石
5	33	Collodaria の初出化石
11	200	有殻渦鞭毛藻類の初出化石
12	240	クラウン渦鞭毛藻類の初出化石
21	50	縦溝羽状目珪藻の初出化石
22	115	円心目と羽状目珪藻が両方存在
23	185	珪藻の初出化石

2013)をより堅牢なサポートで支持するものであった。

真核生物全体で分岐年代推定を行う前に分岐年代推定で扱う制約年代の妥当性を検証した。化石記録には連続的で信頼性の高い化石記録と散在的で信頼性の低い化石記録がある。このような信頼性の低い化石記録の妥当性を検証するために UCRC モデルを用いて、制約年代の事前分布を化石記録より若い年代をカットオフする通常分布ではなく、化石記録より若い年代になることを考慮した log-normal 分布 (standard deviation=0.75) にして、解析を行った。信頼性の高い化石記録とそれに信頼性の低い化石記録である vase-shape morphology (VSMs) の化石記録をノード 9 にかけたものを比較した結果 (図 5) SAR データセットに VSMs の制約年代をかけた場合にノード 1 で制約年代よりも若くなってしまった。その際の各ノードの推定値の事後分布の standard deviation は 1.445 と高く、推定精度も高くなかった。このことから、UCRC モデルを用いて、制約年代の事前分布を化石記録より若い年代になることも考慮した log-normal 分布 (standard deviation=0.75) にすることで、不確かな化石記録の妥当性を検証できることがわかった。

次に、3つの分岐年代推定のモデルにどのような違いがあるかを検証した (図 5・6)。その結果、UCRC+separate モデルではノード 6,7 で SAR データセットと他のデータセットで推定値が大きく異なっており、UCRC+separate モデルは推定値がデータに依存することがわかった。実際、系統解析や分岐年代推定において、taxonomic sampling の重要性が示唆されている。UCRC+mixture モデルと TSLC+separate モデルではデータセットの違いによる推定値のズレは解消されているが、TSLC+separate モデルの方が推定値の誤差が小さくなっている。UCRC モデルは全ての系統樹上の枝の進化速度を log-normal 分布になるように進化速度を計算するが、TSLC モデルは進化速度の異なる枝毎に進化速度の計算を行い、最終的に全体の進化速度を線形回帰させる。このため、TSLC モデルは枝長の大きく違うノードが含まれる系統樹でも正確に推定することが可能である。今回の場合も放射虫・有孔虫のノードの枝長が長く、他のリザリアの系統の枝長が短い。この枝長の違いが推定値のばらつきに大きく寄与していると考えられる。つまり、推定値のばらつきが少なく、事後確率の分布が最も収斂している TSLC モデルが今回の解析では最も好ましい結果を出した。

次に TSLC+separate モデルに基づく解析結果が他の化石記録と妥当かを検証した。まず、triaromatic dinosteroids は有殻渦鞭毛藻類の存在を示す有機物化石として知られており、先カンブリア紀から存在し、石炭紀・ペルム紀には存在せずに、三畳紀から再度、産出するようになる。我々の推定した有殻渦鞭毛藻類の分岐時期は、triaromatic dinosteroids の 2 度目の産出時期と重なる。この triaromatic dinosteroids は珪藻 (ストラメノパイル) やプリムネ藻 (ハプト藻類) から検出されており (Volkman et al., 1990; 1993)、石炭紀以前の triaromatic dinosteroids は他の生物もしくは絶滅系統起源である可能性が考えられる。

珪藻の初出化石は 1.85 億年前であり、我々の推定はより古い時代であった。珪藻などの珪質微化石の痕跡化石と考えられる石英シルトの産出はデボン紀後期 (~3.7 億年前) であり、非常に古い。珪藻の近縁生物である褐藻類もケイ酸塩を代謝し、逆にその近縁生物である卵菌類はケイ酸塩によって植物への寄生が抑制される。このことから、ストラメノパイル内のケイ酸塩代謝に起源は珪藻 + 褐藻類と卵菌類の分岐するノードであると考えられ、石英シルトの産出時期と

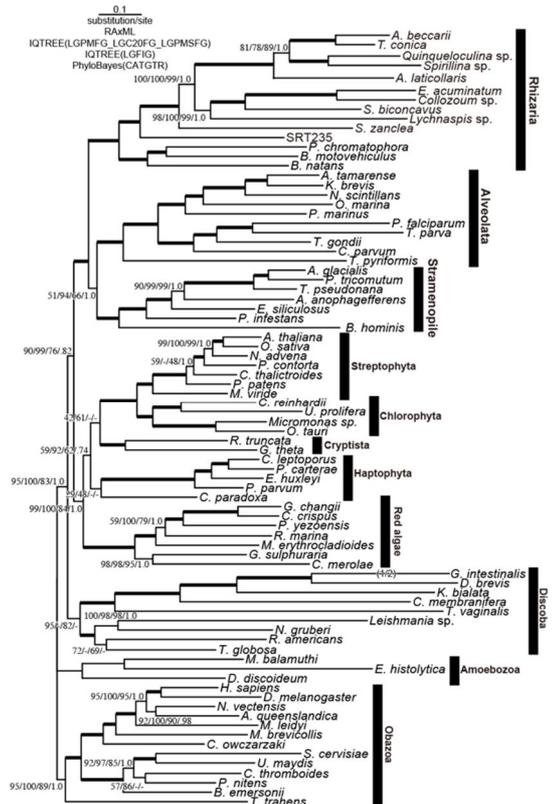


図 3: Euk データセットを用いた大規模 (158 遺伝子) 系統解析の結果。太線は 100/100/100/1.0 の支持を得た枝。

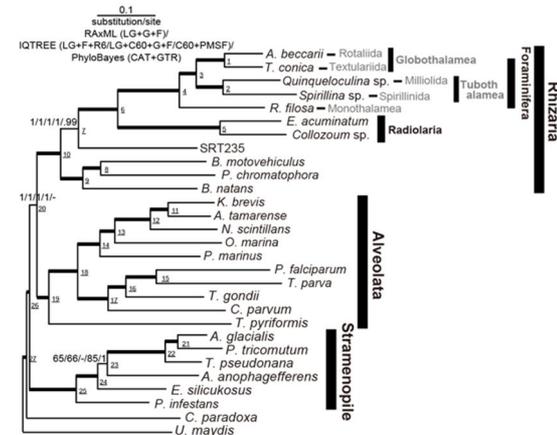


図 4: SAR0 データセットを用いた大規模 (158 遺伝子) 系統解析の結果。太線は図 3 と同じ。ノード番号が下線の入った数字。

は整合的であった。

有孔虫の初出は諸説あるが、最も古いものが有機物化石である 24-npc ステレンで、6.5 億年前である。この有機物化石については有孔虫では1種のみからしか検出されておらず、逆にペラゴ藻の多くの生物で検出されており、有孔虫の有機物化石というには難しい。次いで、5.4-5.5 億年前の大きな鉱物化した VSM (~2500 $\mu$ m) が有孔虫の初出化石であると示唆されているが、有機質セメントは鉱物化することもあり、大型の vase-shape は有孔虫と同じリザリア内の系統である Filosa でも見られる形質であることから、こちらも疑わしい。逆にカンブリア紀初期になると確実な有孔虫化石が産出する。有孔虫の分岐時期は放散虫との分岐であるノードと考えられるが、放散虫と有孔虫の共通祖先がどのような系統だったかはわかっていない。有孔虫の祖先系統が底生であり、放散虫はすべて浮遊性である。一方で、リザリア内の他

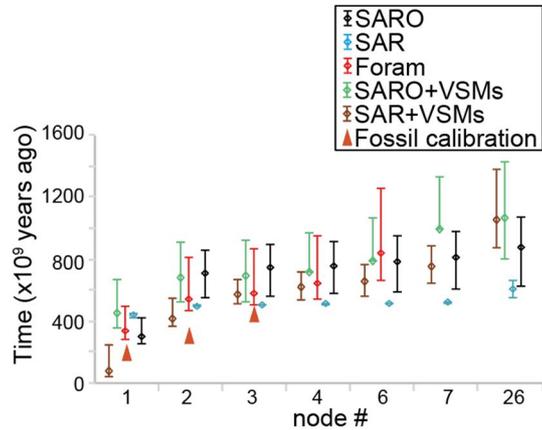


図5: 各データセットに信頼性の低いVSMsの制約年代をかけた場合のノード番号毎の推定値。推定はUCRC+separateモデルを使用

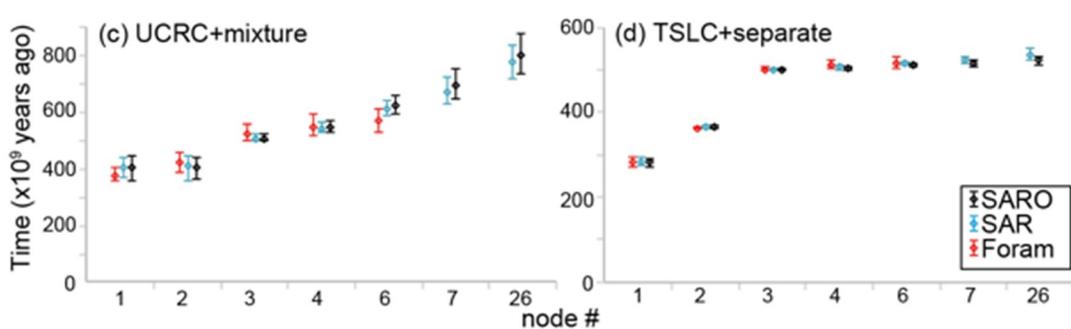


図6: 各データセットをUCRC+mixtureとTSLC+separateモデルで分岐年代推定した場合のノード番号毎の推定値。

の系統はほとんどが底生であることから放散虫・有孔虫の共通祖先は底生であると考えられる。放散虫・有孔虫の共通祖先が有孔虫の形質を多く残したものであると考え、有孔虫の特徴を持った化石は放散虫+有孔虫とエンドミクサの分岐するノードまで遡れる。この時期は確実な有孔虫化石の産出時期と同調的である。5.4-5.5 億年前の大きな鉱物化したVSMについては、リザリアの共通祖先であると考え、我々の推定した分岐時期は同調的だった。

有孔虫の殻を代謝する系統はその祖先系統の出現から非常に短い期間で多様化したことが示唆された。有孔虫の殻は炭酸カルシウムのものや膠着質(周辺の堆積物などを炭酸カルシウムでセメントしたもの)のものであり、これらが出現したことによって海洋の炭素は多く消費されたと考えられる。彼らが出現した時期の堆積物の炭素同位体比をしてみると、炭素同位体比のピークが複数あり、有孔虫の分岐がカンブリア紀初期の物質循環に関与したことが示唆された。

我々の解析ではSARグループも非常に短い期間に急速に分岐したことが示唆された。この時期は低緯度と高緯度温度差が大きくなり、海洋の熱塩循環が始まった時代であり、表層に深層の栄養が、深層に表層の酸素が供給され始めた時代である。このような環境変化がSARグループの多様化を促した可能性が示唆された。SARグループの祖先系はストラメノパイルの祖先系がバクテリア食者であり、SARに最も近縁な生物であるTelonemaがバクテリア食者であることから、バクテリア食者である可能性が高い。海洋の生産性が高まることで分解者であるバクテリアのバイオマスも増加したと考えられ、それによりバクテリア食者も多様化したと考えられる。このような従属栄養生物の多様化はそれより高次の従属栄養生物のバイオマスを増加させ、生態環境自体を豊かにすると考えられ、カンブリア紀の大型生物の大爆発にSARグループの多様化が貢献した可能性が示唆された。

本研究により分岐年代推定を使った化石記録の検証 多様な生物を含む分岐年代推定モデルとしてTSLC+separateモデルが適切なこと 真核生物スーパーグループSARの初期進化がわかった。真核生物全般を含めた分岐年代推定も行なったが、計算コストがかかり過ぎてしまい、十分な解析が行えなかった。今回、使用しているBEASTにはGPUを用いた計算プラットフォームも使用可能であり、GPUを用いた計算でより高速化し、実用的な解析ができることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ciacci Caterina, Grimmelont Margot V., Corsi Ilaria, Bergami Elisa, Curzi Davide, Burini Debora, Bouchet Vincent M. P., Ambrogini Patrizia, Gobbi Pietro, Ujiie Yurika, Ishitani Yoshiyuki, Coccioni Rodolfo, Bernhard Joan M., Frontalini Fabrizio	4. 巻 9
2. 論文標題 Nanoparticle-Biological Interactions in a Marine Benthic Foraminifer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56037-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石谷佳之・久米慶太郎・稲垣祐司
2. 発表標題 有孔虫Ammonia beccariiのミトコンドリアに局在するDNA分子群.
3. 学会等名 日本共生生物学会2019年度大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 石谷佳之・矢崎裕規・氏家由利香・稲垣祐司
2. 発表標題 有孔虫の大規模分岐年代推定
3. 学会等名 古生物学会2020年例会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 石谷佳之
2. 発表標題 有孔虫の大規模分岐年代推定
3. 学会等名 高知大学海洋コア総合研究センター共同利用共同研究成果発表会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Ishitani, Y., UjiiEe, Y., Yazaki, E., Toyofuku, T., Nagai, Y., Inagaki, Y.
2. 発表標題 Phylogenomic approach to the early evolution of Foraminifera.
3. 学会等名 Forams 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 永宗 喜三郎、島野 智之、矢吹 彬憲、丸山真一朗、八木田健司、福田康弘、中井裕、伊藤章、小林富美恵、野田悟子、平川泰久、白鳥峻志、廣岡裕史、雪吹直史、松崎素道、石谷佳之、土屋正史、神川龍馬、中山卓郎、菅裕	4. 発行年 2018年
2. 出版社 朝倉出版	5. 総ページ数 139
3. 書名 アメーバのはなし	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	氏家 由利香  (UjiiEe Yurika)  (20573041)	高知大学・教育研究部自然科学系理工学部門・准教授   (16401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------