

平成21年 5月20日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570095
 研究課題名（和文） ミトコンドリアゲノムの分子系統解析に基づく尾索動物の進化経路の再検討
 研究課題名（英文） Reconsideration of evolutionary pathway of Urochordata (Tunicata) based on molecular phylogenetic analyses of mitochondrial genomes
 研究代表者
 横堀 伸一（YOKOBORI SHINICHI）
 東京薬科大学・生命科学部・講師
 研究者番号：40291702

研究成果の概要：

尾索動物の複数ミトコンドリアゲノムの全塩基配列の決定を行い、一次配列とそれ以外の高次情報に基づいて分子系統解析を行い、尾索動物の進化経路を明らかにすることを試みた。5種の尾索動物ミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決定し、そのゲノムの多様性（遺伝子構造、コードする遺伝子の種類等）を明らかにした。また、分子系統解析から、タリア綱とホヤ綱腸性目の近縁性を示唆した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学／生物多様性・分類

キーワード：尾索動物、ミトコンドリアゲノム、分子系統解析

1. 研究開始当初の背景

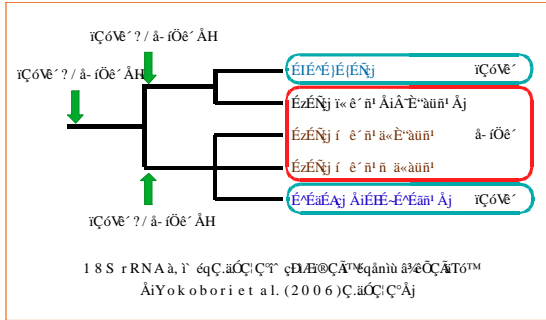
脊索動物門を構成する3亜門の系統関係は、（脊椎動物、頭索動物）、尾索動物）であるという考えが主流である。しかし、近年、脊椎動物と尾索動物の単系統性を支持する分子系統解析結果が報告されている（例：DeIstoc et al. (2006) Nature 439: 965-968）。このことは、尾索動物の祖先生物の生物学的な特徴を推定することが、脊椎動物の祖先生物がどのような生物であったのかを理解することに直結することを示している。

尾索動物は形態情報等に基づき、一生脊索を保持して浮遊生活をするオタマボヤ綱、浮

遊生活者で脊索は成体で消失するタリア綱、成体では脊索が消失して固着生活するホヤ綱の3綱に分類される。さらに、ホヤ綱はマボヤ *Halocynthia roretzi* 等を含む壁性目とカタユレイボヤ *Ciona intestinalis* 等を含む腸性目に大別される。

尾索動物の18S rRNA 遺伝子に基づく分子系統解析：近年の18S rRNA 遺伝子に基づく解析では、尾索動物はオタマボヤ綱、ホヤ綱壁性目、ホヤ綱腸性目+タリア綱の3グループに分けられる。初期の解析ではオタマボヤ綱が最も早く分岐したとされ、尾索動物の浮遊生活者起源説が支持された。申請者はこれまで

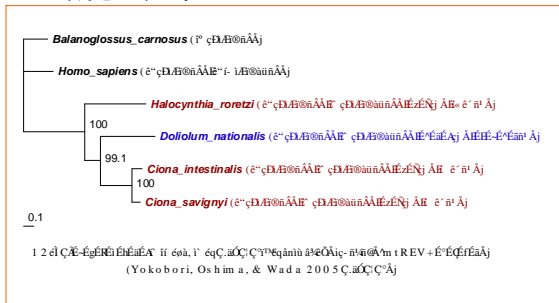
解析の無かった腸性目無管亜目を加えて 18S rRNA 遺伝子の分子系統解析を行い、オタマボヤ綱とホヤ綱壁性目の単系統性と、ホヤ綱腸性目が単系統群ではなくタリア綱がその内部系統群であることを示唆した(Yokobori et al. (2006)) (下図)。しかし、ホヤ綱腸性目無管亜目では 18S rRNA 遺伝子の進化速度が極端に早く、18S rRNA 遺伝子に基づく分子系統解析結果のみで尾索動物内の系統関係を議論することは容易ではない。



一方、ホヤ綱腸性目+タリア綱の内部の系統関係を明らかにすることができれば、たとえオタマボヤ綱とホヤ綱壁性目が単系統群であったとしても、尾索動物の共通祖先の特徴を推定するための有力な証拠を提供すると考えられる。そこで必要なのが、18S rRNA 遺伝子以外の分子系統解析ツールである。

尾索動物ミトコンドリア (mt) ゲノムに基づく分子系統解析: Mt ゲノムは広く後生動物の分子系統解析に用いられる。一般に後生動物 mt ゲノムは 15~18 kbp の環状 DNA であり、37 種の遺伝子をコードする。本課題の研究開始当初、マボヤ *H. roretzi* (Yokobori et al. (1999) Genet. 153: 1851-1862)、ユウレイボヤ *C. savignyi* (Yokobori et al. (2003))、カタユウレイボヤ *C. intestinalis* (Gissi & Pesole (2004) JME 58: 376-389)、ウミタル *Doliolum nationalis* (Yokobori et al. (2005)) の 4 種類の尾索動物の mt ゲノムがそれまでに報告されていた。Mt 蛋白質遺伝子の一次配列に基づく分子系統解析は、ホヤ綱腸性目がホヤ綱壁性目よりもタリア綱に近縁であることを支持した (下図)。また、これらの mt ゲノムの遺伝子構造は相互に大きく異なり、尾索動物の系統解析上の有力な系統マーカーとなると考えられた。しかし、mt ゲノムの配列情報に基づく尾索動物の分子系統解析を行うためには、オタマボヤ綱、ホヤ綱腸性目無管亜目をはじめとする、より多くの、かつより網羅的な mt ゲノムの塩基配列情報が必須であると考えられた。

2. 研究の目的



尾索動物全体の系統進化の理解の上で重要であるグループ (種) を選択し、mt ゲノムの全塩基配列の決定を行う。その一次配列とそれ以外の高次情報に基づいて分子系統解析を行い、尾索動物の進化経路を明らかにする。また、18S rRNA 遺伝子の分子系統解析結果等と比較検討し、総合的に考察する。

3. 研究の方法

(1) 尾索動物ミトコンドリア (mt) ゲノムの網羅的解析

a) 解析ターゲットの選択: 尾索動物 mt ゲノムの全塩基配列のターゲットとする種は、既に、ホヤ綱壁性目褶鰓亜目マボヤ科のマボヤ *H. roretzi*、腸性目管鰓亜目ユウレイボヤ科ユウレイボヤ亜科のユウレイボヤ *C. savignyi* とカタユウレイボヤ *C. intestinalis*、タリア綱ウミタル目のウミタル *D. nationalis* については、mt ゲノムの全塩基配列が報告されているため、オタマボヤ綱、タリア綱ヒカリボヤ目並びにサルパ目、ホヤ綱腸性目等から種類を選んだ。尾索動物の主要なグループから 18S rRNA 遺伝子に基づく分子系統解析結果 (Yokobori et al. (2006) 等) 等も参考にした。選んだ種類について、PCR による mt 遺伝子の部分配列の増幅を試みた。

b) ミトコンドリアゲノムの全塩基配列の決定: 尾索動物 mt ゲノムの塩基配列の進化速度は脊椎動物 mt ゲノム等に比べ早くなっていることと、種によって大きくゲノム構造が異なっていることがこれまでの解析から想定されるため、個々の mt ゲノムに対し、特異的な PCR プライマーを用意して、より確実性の高い mt ゲノムの全領域の PCR 増幅を試みた。まず、既知の尾索動物 mt ゲノムの塩基配列情報に基づき、一次配列の保存性の高い遺伝子について、縮重プライマーを設計する。これを用いて、各サンプルについて遺伝子の部分配列を増幅してクローニング、塩基配列決定を行った。この際の主たるターゲット遺伝子は *cox1* (チトクロム酸化酵素サブユニット I) および *cob* (チトクロム b) である。こうして得られた配列を元に種特異的プライマーを設計し、mt ゲノムの全領域を long PCR で増幅した。増幅された long PCR 断片についてその後、順次ショットガン・クローニングとプライマーウォーキングを併用し、全塩基配列決定の決定を行った。塩基配列の決定された mt ゲノムから順次、遺伝子の同定を行い、遺伝子組成・遺伝子配置などのゲノム構造を決定した。その他、各 mt ゲノムに見られる特徴を塩基配列の解析から検討した。

(2) Mt 蛋白質遺伝子の塩基配列 (とアミノ酸配列) に基づく分子系統解析 (分子系統解析は、基本的にミトコンドリアゲノムの全塩基配列決定が終了した種から、ある程度種数が

貯まった時点で、随時行うこととした)

Mt 蛋白質遺伝子は系統ごとに進化速度が大きく異なる可能性があるため、進化速度の系統間の差の影響が小さい手法を使用する必要がある。そのため、主として、進化速度の系統間での差があってもその影響を受けにくいとされる最尤法とベイズ法に基づく分子系統解析を行った。同様に、系統間の進化速度の差の解析結果への影響を小さくするため、 Γ 分布に基づく座位間の進化速度の差異についての補正モデル、さらには座位ごとの進化モデルの違いを許容する Mixture モデル、等を適用した。また、尾索動物 mt ゲノムでは、尾索動物 mt 特異的な遺伝暗号表を用いており、分子系統解析で広く使われている経験的なアミノ酸置換モデル (Dayhoff モデルなどの核コード蛋白質に基づくものや、mtREV モデルのような脊椎動物 mt 蛋白質遺伝子に基づくもの) を無批判に使用することはできない。そこで、様々な経験的なアミノ酸置換モデルや、コドンモデル (使用するコドン表の指定が可能)、アミノ酸配列ではなく塩基配列レベルでの様々な塩基置換モデルを用いて解析結果を検討した。

(3) Mt ゲノムにコードされている遺伝情報とその他の分子データを用いた尾索動物の系統発生の検討

a. Mt ゲノム構造 (遺伝子配置、遺伝子の種類) を系統マーカーとした尾索動物の系統解析を試みた (最大節約法等の複数の手法を試みた)。前述のように、遺伝子配置の変化を指標として進化を検討する場合、平行進化の可能性が非常に小さい利点がある。この解析で尾索動物全体の系統関係が解明できなくても、部分的な系統関係の推定ができれば、これは、一次配列に基づいて分子系統解析を行う場合の拘束条件の一つとして利用できると思った。

4. 研究成果

20種以上の尾索動物について、*cox1* 遺伝子、*cob* 遺伝子の PCR による増幅と塩基配列の決定を試みた。そのうち、8種の尾索動物について、mtゲノムの全領域の long PCR による増幅が見られ、順次塩基配列の決定を行った。Mtゲノムの全塩基配列が得られたものについては、配列の確認実験を進めた。

(1) ホヤ綱腸性目管鰓亜目ユウレイボヤ科ムネボヤ亜科に属する *Rhopalaea* sp. について、その mtゲノムの全塩基配列を決定した (投稿準備中)。その分子系統解析の結果、ムネボヤ亜科はユウレイボヤ科ユウレイボヤ亜科 (カタユウレイボヤ *Ciona intestinalis* 等を含む) と近縁ではなく、むしろ無管鰓目に分類されるべきであることが示唆された。ユウレイボヤ科もまた無管鰓目に分類する研究者もいるが、ユウレイボヤ科の2亜科が近縁である可能性は非常に低

いことが明らかになった。この結果は18S rRNA 遺伝子に基づく解析結果に対して整合的である。また、*Rhopalaea* sp. mtゲノムは尾索動物の標準的な遺伝子構成 (13蛋白質、2 rRNA、24 tRNA 遺伝子) を持つが、既知の mtゲノムの遺伝子構造とは大きく異なっていた。

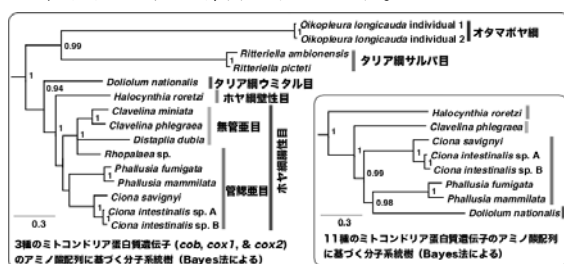
(2) タリア綱サルパ目のアンボイナサルパ *Ritteriella amboinensis* 並びに *R. picteti* の mtゲノムの全塩基配列を決定した (投稿準備中)。その結果、前者は14,055塩基対、後者は13,314塩基対の環状ゲノムであり、どちらも ATPase subunit 8 (*atp8*) 遺伝子を欠くことが明らかとなった。2者の mtゲノムの遺伝子配置は同属種間での比較でありながら、大きく異なっていた。また、*R. amboinensis* の mtゲノムでは、2種の tRNA 遺伝子が完全に、1種の tRNA 遺伝子の5'末端部分3分の1、が重複し、UGR コドン (R=A or G, トリプトファンに対応) を解読可能なアンチコドン配列を持つ tRNA 遺伝子 (候補) が2種見いだされた (相互の配列相同性は低い)。このような tRNA 遺伝子の過剰は *R. picteti* mtゲノムでは見られなかった。また、尾索動物 mtゲノムの中で *Ritteriella* 属の一次配列の進化速度が非常に速いことが明らかとなった。

(3) 2個体の *Oikopleura longicauda* (オタマボヤ綱) について、mtゲノムの塩基配列を決定した。両者のゲノム構造は一致しているが、非コード領域の配列は大きく異なっていた。また、環状ゲノムの配列として得られたのものにもかかわらず、得られた配列は10 kbp前後であり、標準的な後生動物 mtゲノムがコードする蛋白質並びに RNA 遺伝子を多数欠いている。得られていない遺伝子の所在の確認が重要である。そのため、*O. dioica* についても mtゲノムの解析を開始した。

(4) 得られた配列を用いて、順次分子系統解析を進めている。尾索動物の後口動物ないしは脊椎動物門内での系統学位置については、進化速度の不均一性を考慮した分子系統解析では、脊椎動物の姉妹群であることが示唆された。しかし、脊椎動物の単系統性は支持されない。尾索動物内での系統解析では、オタマボヤを除く既知の尾索動物 mt ゲノムに基づく分子系統解析では (本課題で決定したオタマボヤを除く3種を含む)、タリア綱と腸性目 (ただし古典的な分類での無管鰓目のデータは含まれない) が単系統群であることが示唆された。しかし、この解析に含まれるサルパ2種の進化速度は他の種に比べて進化速度が速く、解析手法によっては、サルパ類がウミタル (サルパ目とウミタル目はともにタリア綱) と単系統群とならず、尾索動物の基部から分岐したという結果も得られている。しかし、これは long branch attraction による artifact である可能性が大きい。ま

た、(1)で述べたように、ユウレイボヤ科の2亜科は系統樹上で単系統群としては出現せず、ユウレイボヤ亜科とムネボヤ亜科は系統的に離れた分類群であることが示唆された。

解析手法については、最尤法の枠組みのなかでアミノ酸置換モデルの違いによる解析結果の比較を行うと、尾索動物の分子系統解析では、脊椎動物ミトコンドリア蛋白質遺伝子のアミノ酸配列に基づく経験的なアミノ酸置換モデル mtREV よりも、節足動物ミトコンドリア蛋白質遺伝子のアミノ酸配列に基づく経験的なアミノ酸置換モデル mtART の方が、高い対数尤度を与えた。これは、前者では AGA/AGG コドンが終止コドンであるコドン表を使用する蛋白質遺伝子に基づくのに対し、後者は AGA/AGG コドンが Ser コドンであるコドン表を使用する蛋白質遺伝子に基づく。尾索動物ミトコンドリアでは AGA/AGG コドンはセンスコドンであり、結果として mtART の方が mtREV よりも尾索動物ミトコンドリア蛋白質遺伝子のアミノ酸置換パターンをよりよく説明している可能性がある。また、CAT model に基づくベイズ法による解析では、その周辺尤度を、直接他のモデルに基づく解析で得られた周辺尤度などと比較することはできないが、後口動物、脊椎動物のそれぞれの単系統性と脊椎動物と尾索動物の近縁性が示唆された。現在まで検討していない mixture model などのアミノ酸置換モデルや、近年使われるようになってきた進化過程でのアミノ酸 (塩基) 組成変化を組み込んだモデル等を使用することより、より確からしい分子系統解析を進めるとともに、より多くの尾索動物のミトコンドリアゲノムの解析を進め、尾索動物の進化のより詳細な経路の解明を進めることが、次の課題である。下に、予備的なミトコンドリア遺伝子に基づく尾索動物の系統解析の例を示す。



また、尾索動物ミトコンドリアゲノムの進化については、その脊椎動物ミトコンドリアとも頭索動物ミトコンドリアとも、また脊椎動物以外のすべてのミトコンドリアとも異なる遺伝暗号の使用を考慮することも必要である。そのため、その遺伝暗号進化を明らかにするため、ミトコンドリアゲノムの解析とともに、暗号解読に必要な tRNA ならびにアミノアシル tRNA 合成酵素についても、その特徴の解析を試みた。変則的な遺伝暗号に

関わるアミノアシル tRNA 合成酵素について、*Ciona intestinalis* の EST 解析並びに核ゲノム解析の情報をもとに、クローニングを行った。

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 3 件)

- 1) Hirose, M., S. Yokobori, & E. Hirose (2009) Potential speciation of morphotypes in the photosymbiotic ascidian *Didemnum molle* in the Ryukyu Archipelago, Japan. *Coral Reefs* 28: 119-126
- 2) Yokobori, S., T. Iseto, S. Asakawa, T. Sasaki, N. Shimizu, A. Yamagishi, T. Oshima, & E. Hirose (2008) Complete nucleotide sequences of mitochondrial genomes of two solitary entoprocts, *Loxocorone allax* and *Loxosomella aloxiata*: Implications for lophotrochozoan phylogeny. *Mol. Phylogen. Evol.* 47: 612-628
- 3) Yokobori, S., D. J. Lindsay, M. Yoshida, K. Tsuchiya, A. Yamagishi, T. Maruyama, & T. Oshima (2007) Mitochondrial genome structure and evolution in the living fossil vampire squid, *Vampyroteuthis infernalis*, and extant cephalopods. *Mol. Phylogen. Evol.* 44: 898-910

[学会発表] (計 7 件)

- 1) 横堀伸一、大曾根祐、倉林敦、西川淳、広瀬裕一、山岸明彦。尾索動物ミトコンドリアゲノムの多様性とミトコンドリア遺伝子に基づく尾索動物の分子系統解析。BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会)。神戸。(2008/12)
- 2) 東正希、谷山美保子、山岸明彦、横堀伸一。尾索動物ミトコンドリア特異的アミノアシルtRNA合成酵素の解析。第33回生命の起源および進化学会学術講演会。八王子。(2008/3)
- 3) 谷山美保子、別所義隆、横山茂之、山岸明彦、横堀伸一。尾索動物カタユウレイボヤグリシルtRNA合成酵素による変則的な遺伝暗号に対応するミトコンドリア tRNA^{Gly} の認識。第80回日本生化学会年会・第30回日本分子生物学会年会・合同年会。横浜。(2007/12)
- 4) Yokobori, S., A. Kurabayashi, J. Nishikawa, Y. Osone, A. Yamagishi, & E.

- Hirose. Molecular Phylogeny of Urochordata (Tunicata) inferred from 18S rRNA and mitochondrial gene sequences. The 5th Asia-Africa Evolution Meeting. Chiba, Japan (2007/12)
- 5) 横堀伸一、倉林敦、山岸明彦、広瀬裕一。ミトコンドリアゲノムに基づく腸性目ホヤ（尾索動物亜門ホヤ綱）の分子系統解析。第78回日本動物学会年会。弘前。(2007/9)
- 6) Yokobori, S. Molecular Phylogeny of Urochordata (Tunicata) inferred from 18S rRNA genes and mitochondrial genomes. The 4th International Tunicate Meeting. Villefranche-sur-Mer, France. (2007/6)
- 7) Yokobori, S. & E. Hirose. Molecular phylogeny of *Trididemnum* species (Didemnidae: Ascidiacea) hosting *Prochloron*, non-*Prochloron* cyanophytes, and no photosymbionts. PSC21, Ginowan, Okinawa, Japan (2007/6)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横堀 伸一 (YOKOBORI SHINICHI)
東京薬科大学・生命科学部・講師
研究者番号：40291702

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし