

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009 年

課題番号：19770064

研究課題名（和文）アカガエル上科の分子系統地理学的研究： Gondwana 超大陸の分断と無尾類分岐の相関

研究課題名（英文）Molecular phylogeographic studies on ranoid frogs: Correlation between Gondwana braking-up and anuran divergence

研究代表者

倉林 敦 (KURABAYASHI ATSUSHI)

広島大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：00327701

研究成果の概要（和文）：太古の Gondwana 大陸の分断とカエル類の現在の分布と系統分岐が相関するかを DNA データから検証する為に研究を行い、以下の成果を挙げた。(1) カエル類のミトゲノムを簡便に増幅できるプライマーを作成した。(2) 分岐年代解析にはアミノ酸配列を用いることが望ましいことを示した。(3) アジアのヒメアマガエル類の一部は、オーストラリア産のグループと近縁で、大陸分断プロセスとは一致しない可能性があることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To assess possible correlations between Gondwana braking-up and anuran divergence, mitochondrial (mt) genomes and nuclear genes were analyzed. The main results are the followings. 1) PCR primers that can amplify the whole mt genome of wide frog taxa were designed. 2) It was suggested that the amino acid data of mt genes should be used in divergence analyses for frog taxa. 3) An Asian microhylid shows close relationship with the Australian group, suggesting that the branching pattern of this taxon could not match the continent vicariance process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	600,000	3,900,000

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：Gondwana 大陸・分子系統地理・分岐年代解析・アカガエル科・ヒメアマガエル科・ミトゲノム・遺伝子配置・分子進化

1. 研究開始当初の背景

(1) Gondwana 超大陸に由来する大陸に分

布を示す「アカガエル上科」は、アフリカのみ分布するサエズリガエル類と、複数の大陸に跨がって分布するヒメアマガエル類・ア

カガエル類から構成される。これらのグループの系統分岐と分布パタンの形成は、超大陸が様々な大陸に分断されていくのに伴って生じた可能性が高い。しかし、本研究開始当初では、これらのグループ内の系統関係にはコンセンサスが得られておらず、系統地理学的に大陸移動とカエル類の系統分岐の相関を実証しようと試みた研究は僅かであった。

(2) ミトゲノムの遺伝子は動物の系統マーカーとしてよく用いられるが、アカガエル上科のミトゲノム遺伝子は、進化速度が極端に速いこと、遺伝子の並び順（遺伝子配置）が変化しやすいことから、解析が比較的困難であった。

2. 研究の目的

(1) アカガエル上科におけるミトゲノムの解析を容易にすること、さらに本グループのミトゲノム構造の多様性を明らかにし、本分類群におけるミトゲノムの分子進化プロセスを推定することを目的とした。

(2) アカガエル上科、特にアフリカ・マダガスカル・アジアに分布する科・亜科レベルの分類群を対象とし、分子系統学的手法を用いて、現生無尾類の系統分岐および地理的分布パターンとゴンドワナ超大陸の分断イベントとの相関を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アカガエル上科各分類群から代表となる種、およそ 50 種の組織サンプルを収集し、DNA 解析用の資料とした。

(2) カエル類のミトゲノム遺伝子について、塩基配列保存性の高い部位にプライマーを作成し、カエル類のミトゲノムを効率よく増幅する条件を検討した。

(3) ニホンヒキガエル、ニホンアマガエル、ヒメアマガエルについて、ミトゲノムの全塩基配列を決定し、分岐年代解析に有用な方法を検討した。

(4) ミトゲノムの遺伝子配置変化が著しいマダガスカルガエル科・全 12 属 17 種についてミトゲノムの遺伝子配置を調査した。また、塩基配列データに基づき、系統解析と分岐年代解析を行った。

(5) (2) で作成したプライマーを用い、イロカエクサガエル・ケガエル・フクラガエル・マダラアナホリガエルのミトゲノムの全長を増幅し、塩基配列を決定した。

(6) 狭義のアカガエル科の 7 属について、ミトゲノムの部分塩基配列を決定し、系統解

析および遺伝子配置の分子進化プロセスの推定を行った。

(7) アカガエル上科およそ 40 種について、6 つの核遺伝子 (*Rag-1*, *Rag-2*, *Tyrosinase*, *BDNF*, *CRCX4*, *NCX1*) と 2 つのミトゲノム遺伝子 (*16SrRNA*, *Cox1*) の部分塩基配列を決定し、系統解析を行った。

なお、上記の方法について、系統解析方法は、最尤法・ベイズ法・最節約法を用い、分岐年代解析は、ベイズ推定法を用いた。

4. 研究成果

(1) サンプル収集：およそ 50 種のアカガエル上科の組織サンプルを、アフリカ・南米・北米・ユーラシア・オーストラリア各地域から収集した。京都大学・松井正文教授の協力によって、東南アジア産のヒメアマガエル類 *Phrynella* と *Gastrophrynoidea* 属も得られた。これらは分子系統学的研究に用いられたことが無く、亜科レベルの所属が不明な、非常に重要なサンプルであった。

(2) mtDNA の全塩基配列情報から、19 種類の縮重プライマーを作成した。プライマーは、mtDNA の全領域を 10-15 程度の領域 (1-5 kbp) に分けて増幅できる様にデザインした。本プライマーを用い、無尾類 6 科 (クサガエル・サエズリガエル・スキアシヒメガエル・アベコベガエル・ヤドクガエル・ユビナガガエル) について、LA-PCR を行った所、全科において mtDNA のほぼ全領域の増幅が確認できた。また、本プライマーセットの利点として、nested-PCR を必要とせず、さらにアニーリング温度の検討が不要であることが挙げられる。カエル類の中でも、カエル亜目と呼ばれるグループは、ミトゲノムの全長解析が比較的困難であった。しかし、本研究でデザインされたプライマーと PCR 条件によって、この解析が非常に容易に行えるようになった。なお、ミトコンドリア遺伝子は、系統解析や集団解析に用いられることが多いため、このプライマーと PCR 条件については、公表雑誌にアクセスできない海外の研究者から多数の問い合わせを受けており、その有用性と注目度の高さが伺える。

(3) 従来の情報に、ニホンヒキガエル、ニホンアマガエル、ヒメアマガエルのミトゲノムの配列を加え、ミトゲノム情報を用いてカエル類の分岐年代解析を行う上での問題点と改善点の検討を行った。その結果、塩基配列を用いるよりも、アミノ酸配列を用いる方が、安定した結果が得られること、さらに、古い分岐年代だけを解析の指標とすると、推定値が実際よりも古く算出される可能性が高いことを示した。この研究により、今後カエル類の分岐年代推定を行う際に、方法の選択が

容易になり、かつ、より実際に即した推定が行えるようになると期待される。

(4) マダガスカルガエル科・全 12 属 17 種についてミトゲノムの Cytb 遺伝子から tRNA-Asn 遺伝子までの領域の塩基配列を決定し、遺伝子配置を明らかにした。その結果、*Boophis*・*Aglyptodactylus*・*Laliostoma*・*Tsingymantis*・*Boehmantis*・*Gephyromantis*・*Mantidactylus* 属については、アオガエル類と同じ原始的な遺伝子配置を持っていたが、*Spinomantis*・*Blommersia*・*Guibemantis*・*Mantella*・*Wakea* 属については、原始的な状態から大きく変化したものであることが明らかになった。この観察および、系統解析と分岐年代解析の結果、マダガスカルガエル科では、*Spinomantis* 属と止水に産卵するグループの共通祖先が存在したおよそ 3600～3300 万年前の短い期間にミトゲノムの構造が大きく変化したことが分かった。さらに、マダガスカルガエル類のミトゲノム情報から、以下の点を明らかにした。

①ミトゲノムの中でも、コントロール領域は組換え頻度が非常に高い可能性を示した。

②コントロール領域の協調進化メカニズムは、一般的に信じられていた重複-欠失型ではなく、相同組換え型でなければ説明できないことを示すと同時に、ミトゲノムに組換え機構があることを再検証した。

③動物ミトゲノムの複製様式は、Leading-Lagging 鎖タイプであり、しかも、コントロール領域には複製阻害点が存在する可能性が高いことを示唆した。

これらの中でも、②の結果は、ここ 20 年ほど不明であった協調進化のメカニズムに回答を与えるものであり、③については、30 年来のミトゲノム複製の常識を覆す新たなモデルを補強する発見であった。これらの成果は、国際的に注目度の高い *Molecular Biology and Evolution* 誌に掲載され、現在までに 7 回引用されている。

(5) クサガエル類 (クサガエル・サエズリガエル・アナホリガエル科) の代表種について、ミトゲノムの全塩基配列を決定した。これらのカエル類のミトゲノムには、tRNA-Ala 遺伝子と L 鎖複製起点-tRNA-Asn 遺伝子の位置が置き換わっているという特異な遺伝子配置パターンが共通してみられた。また、系統学的位置に問題があるフクラガエルのミトゲノムを解析したところ、本種は脊椎動物で最も長いミトゲノム (28,757 bp) を持っていた。また、クサガエル類に見られた特異な遺伝子配置は、フクラガエルにも見られた。このため、フクラガエルは、従来認識されていたヒメアマガエル科のメンバーではなく、むしろサエズリガエル科に含めることが妥当である

と結論できた。この結果は、最近になり提案された「アフロボトラキア」という分類群が単系統群であることを裏付けるものであった。また、サエズリガエル類は、アフリカのみ分布するため、このグループの起源はゴンドワナ大陸であるが、その後の大陸移動イベントにはほとんど関与していないことが示唆された。

(6) アカガエル科 10 種についてミトゲノムの全長、あるいは、部分塩基配列を決定したところ、原始的な遺伝子配置を残しているアカガエル類はわずか 3 属 (*Rana*・*Lithobates*・*Pelophylax*)、他の属の種は、全て遺伝子配置が変化していた。これまでに、アカガエル科は、カエル亜目の中では珍しく、ミトゲノムの遺伝子配置が保守的であり、あまり変化しないと考えられていたため、今回得られた結果は意外なものであった。また、アカガエル類のミトゲノムの中でも、特に遺伝子配置が変化しやすい領域が発見された。さらに、アカガエル類で観察された遺伝子配置変化は、これまでに提唱されている分子進化モデルでは説明しにくいことが多かった。このため、アカガエル類のミトゲノムでは、レトロポゾン様の遺伝子転移システムが働いている可能性が高いことが示唆された。なお、アカガエル科の属間の系統関係には問題が多く残っており、これに付随して、属の命名に関して国際的に問題になっている。このため、アカガエルの属間レベルの系統関係について、12S および 16SrRNA 遺伝子の塩基配列情報に基づき解析した。この結果、これらの遺伝子情報では、解像度の高い系統樹を構築することが難しいことが分かった。むしろ、上述のミトゲノムの遺伝子配置変化の多くが共有派生形質として見なせる可能性が高く、これらの変化がアカガエル属間の系統マーカーとして役立つことが示唆された。

(7) ①ヒメアマガエル科とアカガエル科の各亜科のミトゲノム部分領域を解析した。まず、ヒメアマガエル科のいくつかの種で、遺伝子配置に変化が生じていることを発見したが、その多くは、その種のみで見られる固有派生形質であり、系統解析のマーカーとして利用できないことが分かった。また、アカガエル科の多くの亜科でも遺伝子配置に変化がみられた。これらの変化の多くは、現時点では固有派生形質か、共有派生形質か不明であるが、少なくとも一部の配置変化は、亜科間の系統マーカーとして利用できることが分かった。

②ヒメアマガエル科・8 亜科から 25 種と、アカガエル上科の 3 科・5 種について、6 つの核遺伝子およそ 5.7 kbp のシークエンスを行った。このデータから、これまでに系統学的位置が不明であった *Phrynellia* 属 (マレーシ

ア産)は、アジア産のヒメアマガエル亜科に属することがわかった。同じく系統学的位置が決まっていなかった *Gastrophrynoidea* 属 (マレーシア産) については、オーストラリアヒメアマガエル亜科に含まれることが分かった。これまでに、両亜科は、インド亜大陸とオーストラリア大陸の地理的分断に伴って、およそ 8000 万年前に系統分岐したと考えられていたが、本属の存在によって、この仮説は改変を求められる可能性が出てきた。今後、核遺伝子データに基づく詳細な系統解析と分岐年代推定を実施し、ヒメアマガエル類の地理的分布と大陸移動の関わりをより詳細に調べる予定である。

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 4 件)

① 倉林 敦、吉川 夏彦、佐藤 直樹、林 陽子、大海 昌平、藤井 保、住田 正幸
Complete mitochondrial DNA sequence of the endangered frog *Odorrana ishikawae* (family Ranidae) and unexpected diversity of mt gene arrangement in ranids.
Mol. Phylogenet. Evol. 査読有 56 巻 2010 年 543-553 ページ

② 倉林 敦、住田 正幸
PCR Primers for the neobatrachian mitochondrial genome.
Current Herpetology 査読有 28 巻 2009 年 1-11 ページ

③ 倉林 敦、住田 正幸、米川 博道、Frank Glaw、Miguel Vences、長谷川 政美
Phylogeny, recombination, and mechanisms of stepwise mitochondrial genome reorganization in mantellid frogs from Madagascar.
Mol. Biol. Evol. 査読有 25 巻 2008 年 847-891 ページ

④ 井川 武、倉林 敦、臼杵 知佐子、藤井 保、住田 正幸
Complete mitochondrial genomes of three neobatrachian anurans: A case study of divergence time estimation using different data and calibration settings.
Gene 査読有 407 巻 2008 年 116-129 ページ

[学会発表] (計 5 件)

① 倉林 敦
無尾両生類の系統学の現在：高次系統・系統地理・DNA バーコーディング・ミトゲノムの進化
第 11 回日本進化学会 (ワークショップ・脊椎動物の高次系統と分子進化) 2009 年 9 月

2-4 日 札幌市

② 倉林 敦 (他 5 名)
動物ミトゲノムの分子進化メカニズム：マダガスカルガエル科で観察された大規模なゲノム再編成に基づく新たなモデルの提唱
第 11 回日本進化学会 (一般発表) 2009 年 9 月 2-4 日 札幌市

③ 倉林 敦、住田 正幸
Primers for neobatrachian mtDNAs, mt genomic structures in afrobatrachians, and ranoid phylogeny.
6th World Congress of Herpetology 2008 年 8 月 17-22 日 マナウス、ブラジル

④ 倉林 敦、住田 正幸
Primers for neobatrachian frog mtDNA and unique mt genomic structures found in arthroleptoid families.
Asia-Africa Evolutionary Meeting 2007 年 12 月 4-6 日 千葉

⑤ 井川 武、倉林 敦、臼杵 知佐子、藤井 保、住田 正幸
Complete mitochondrial genomes of three neobatrachian anurans: A case study of divergence time estimation using different data and calibration settings.
Asia-Africa Evolutionary Meeting 2007 年 12 月 4-6 日 千葉

[その他]
ホームページ等
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/~amphibia/sumida/>

6. 研究組織 neobatrachian anurans: A case study of divergence time estimation using different data and calibration settings.

(1) 研究代表者
倉林 敦 (KURABAYASHI ATSUSHI)
広島大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：00327701

(2) 研究分担者 (なし)

(3) 連携研究者 (なし)