

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 23 年 5 月 29 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年～2011 年

課題番号：21570101

研究課題名（和文）ミトコンドリアゲノムの構造多様性と分子系統解析に基づく尾索動物の進化の研究

研究課題名（英文）Study on the urochordate (tunicate) evolution based on the diversity of mitochondrial genome structures and molecular phylogenetic analysis based on mitochondrial genes

研究代表者

横堀 伸一（YOKOBORI SHIN-ICHI）

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（和文）：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。特に、ヒカリボヤ *Pyrosoma atlanticum* のミトコンドリアゲノム配列の情報を加え、尾索動物の分子系統解析を行うと、タリア綱は腸性目の群内群となり、腸性目ホヤ（管鰓亜目と無管鰓目）が側系統群である可能性が示唆された。特に、ユウレイボヤ科ユウレイボヤ亜科が無管鰓目の姉妹群に、またユウレイボヤ科ムネボヤ亜科が無管鰓目の内群である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：By determination of complete nucleotide sequences of urochordate mitochondrial genomes, we analyzed urochordate phylogeny based on the primary sequences and higher information. We analyzed urochordate phylogeny based on mitochondrial protein gene sequences including a pyrosomatid *Pyrosoma atlanticum*. The analysis suggested that the Thaliacea is a subgroup of Enterogona — Entrogona (Stolidobranchia and Aplousobranchia) seems to be paraphyletic group. In particular, Cioninae of Cionidae, Stolidobranchia is suggested to be sister group of Aplousobranchia, and Diazoninae of Cioninae is suggested to be the in-group of Aplousobranchia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：ミトコンドリアゲノム、分子系統解析、尾索動物

1. 研究開始当初の背景

後生動物ミトコンドリア(mt)ゲノムは一般に15~18 キロ塩基対(kbp)の環状 DNA であり、37 種の遺伝子をコードする。これまで、広く分子系

統解析に使われ、2008 年 10 月 1 日現在、約 1,400 の全塩基配列が genbank に登録されている。脊椎動物や節足動物では、mt 遺伝子の数、mt ゲノムの構造はよく保存されている。例えば、

脊椎動物では、無顎類から哺乳類までよく mt ゲノム構造が保存されている。一方、軟体動物や線形動物等では mt ゲノム構造が種間で大きく異なる。また、刺胞動物の一部で直鎖状 mt ゲノムが、輪形動物等で複数の mt ゲノム染色体が存在することが報告されている。後生動物の進化初期に他のグループと考えられる平板動物 mt ゲノムや海綿動物 mt ゲノムは、後生動物 mt ゲノムの標準的な 37 遺伝子の他リボソーム蛋白質遺伝子などをコードし、遺伝子間の非遺伝子領域に富むなど、原生動物 mt ゲノムの特徴を残している。このように、後生動物 mt ゲノムは、そのゲノム構成(遺伝子の種類、数、遺伝子の配置、ゲノム DNA の物理的構造)は多岐にわたる。

(1) 尾索動物ミトコンドリアゲノムの多様性: 我々は、初めて尾索動物 mt ゲノムの全塩基配列を報告し(Yokobori et al. 1999, Genetics 153: 1851-1862)、引き続き、mt ゲノムの全塩基配列や 18S rRNA 遺伝子配列に基づいた分子系統解析を進めてきた(Yokobori et al. 2003, JME 57: 574-587; 2005, MPE 34: 273-283; 2006, MPE 40: 8-19)。2008 年 10 月までに 7 種類の尾索動物の mt ゲノムが報告されているが、ウミタル *Doliolum nationalis* mt ゲノムがこれらの中で最も基本的な遺伝子セットを持っており、13 蛋白質遺伝子、2 rRNA 遺伝子、24 tRNA 遺伝子をコードしている。尾索動物 mt ゲノムを比較すると、下記の様な特徴が挙げられる。

- ① ナツメボヤ科の *Phallusia* spp. mt ゲノム上に tRNA^{Asp} 遺伝子が見いだされていない。よって、tRNA の mt 外からの移入や tRNA 編集等による tRNA^{Asp} の生成機構を検討する必要がある。
- ② 様々な mt ゲノムで同一アンチコドンを持つ tRNA 遺伝子が複数存在する例が見いだされる。tRNA 遺伝子が過剰な mt ゲノムでは、幾つかの tRNA 遺伝子と同定されたものが偽遺伝子である可能性もあるが、その発現や機能解析はほとんどされていない。tRNA 遺伝子や tRNA 様構造は、mt ゲノムの遺伝子配置変化の際のホットスポットであり、複製や転写開始に重要な機能を果たしている場合があり、それらの tRNA 遺伝子の機能を明らかにすることは、mt ゲノムの進化を考える上で重要である。
- ③ Mt ゲノムのコードする遺伝子の数が種間で大きく異なる。また、決定された尾索動物 mt ゲノム間で、同属別種間の比較も含め、すべての組み合わせの比較で mt ゲノムの遺伝子配置が異なっている。これは、他の複数種の mt ゲノムの遺伝子配置が報告されている(Ⅱ)門と比べて、極めて特徴的である。

このように尾索動物は脊索動物門の一亜門でありながら、他の後生動物の(Ⅱ)門には類を見

ないほどそのゲノム構成が多様である。よって尾索動物 mt ゲノムは、後生動物 mt ゲノムの多様性と進化を研究する上でよい研究対象である。

(2) 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 遺伝子は広く後生動物の分子系統解析に用いられる。尾索動物 mt 蛋白質遺伝子の一次配列の進化速度は、他の脊索動物に比較して早い。Mt 蛋白質遺伝子に基づく分子系統解析では、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が示唆される。

2. 研究の目的

尾索動物の進化の枠組みの中で、どのように mt ゲノムの構造が多様化が生じたのか、またその可塑性の分子的基盤を明らかにすることを目的とする。尾索動物 mt ゲノムの全塩基配列を新規に決定し、既知の配列とともに比較検討し、分子系統解析に供することでその進化パターンを明らかにする。さらに、そのようなゲノム構造変化の影響を受けやすく、ゲノム構造変化の基点となり得る tRNA 遺伝子に注目して、その発現等の解析を行い、その上でその進化的な位置づけを行う。

3. 研究の方法

本研究では概略を述べるように下記の課題について解析を行う。その上で、それらの解析結果を総合することで、尾索動物の mt ゲノムの多様性の起源と多様化についての制限要因について、考察を行う。

- (1) オタマボヤ mt ゲノムの配列決定と mt 遺伝子の全セットの同定: 核ゲノムの解析されている *Oikopleura dioica* の mt ゲノムの全塩基配列の決定を行う。 *O. longicauda* 同様の rRNA 遺伝子などの遺伝子が mt ゲノム上に見いだされない場合、2 番目の mt ゲノムの存在等の可能性を検討し、*Oikopleura* 属の mt 遺伝情報系が機能していることを明らかにする。
- (2) オタマボヤを除く尾索動物の mt ゲノムの比較ゲノム解析とゲノム構造の多様化の経路の解明: 既報の *Phallusia* spp. mt ゲノムは tRNA^{Asp} 遺伝子を欠くと報告されている。一方、マボヤ *Halocynthia roretzi* やアンボイナサルバ *Ritteriella amboinensis* では、同一アンチコドンを持つ tRNA 遺伝子が複数存在する。それらの遺伝子の数の異同は尾索動物 mt ゲノムのゲノム構造の多様化の過程で生じたものである。そこで、mt ゲノムの遺伝子構造変化の経路を明らかにすることを目標として、下に挙げるような分類群に属する尾索動物について複数種の mt

ゲノムの全塩基配列を決定し、それらのゲノム構造と遺伝子の数・種類について、分子系統解析に基づく進化経路を考慮しつつ、比較検討する。

- ① タリア綱(サルパ目、ヒカリボヤ目)
- ② ホヤ綱腸性目無管亜目(ヘンゲボヤ科、マンジュウボヤ科、ジデムニ科)
- ③ ホヤ綱腸性目管鰓亜目(ナツメボヤ科、オオグチボヤ科等)

- (3) 尾索動物 mt ゲノムに見られる過剰な tRNA 遺伝子の発現解析と、mt コドン表の完全な解読に必要な tRNA(遺伝子)セットの探索: 同一アンチコドンを持つ tRNA 遺伝子が複数存在することが報告されている mt ゲノム(マボヤ *H. roretzi* 等)やコードされた tRNA 遺伝子が全コドンのカバーするには足りない mt ゲノム(例: *Phallusia* spp.)について、tRNA 遺伝子の発現の有無や、tRNA 編集等の可能性を検討し、mt 遺伝情報系で使われている tRNA 遺伝子とその転写産物のセットを明らかにする。その上で、それらと mt ゲノム全体の構造や進化との関連を検討する。

4. 研究成果

(1) 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。順次、全領域の long PCR による増幅が見られた mt ゲノムについて、塩基配列の決定を行った。

① タリア綱ヒカリボヤ目のヒカリボヤ *Pyrosoma atlanticum* の mt ゲノムの全塩基配列(14,225 塩基対)を決定した(投稿準備中)。*P. atlanticum* mt ゲノムは、ウミタル (*Doliolum nationalis*) 同様、13 蛋白質遺伝子、2 rRNA 遺伝子、24 tRNA 遺伝子をコードしており、ATPase 8 遺伝子を欠く 2 種のサルパ (*Ritteriella* spp.) mt ゲノムとは異なっていた。タリア綱に属する 4 種類の mt ゲノムの構造を比較すると、*P. atlanticum* と *D. nationalis* の mt ゲノムの間の方が、両者とサルパの mt ゲノムの間よりも、共通する遺伝子配置が多い。これは、サルパ mt ゲノムの遺伝子配置の進化がヒカリボヤやウミタルの mt ゲノムの遺伝子配置の進化に比べて早いことが考えられる。

② さらに、ホヤ綱腸性目とタリア綱に注目し、mt ゲノムの全塩基配列の解析を進めている。腸性目については、ヘンゲボヤ科の *Polycitor proliferus* (ヘンゲボヤ)、*Eudistoma parvum*、ウスボヤ科の *Diplosoma virens*、ドロボヤ科の *Corella* sp.、マメボヤ科の *Perophora* sp.、ナツメボヤ科の *Phallusia nigra*、オオグチボヤ科の *Megalodicopia hians* の mt ゲノムの部分配列

の決定を行った。そのうち、*D. virens*、*Corella* sp.、*Perophora* sp.、*E. parvum*、*M. hians* については、long PCR を行い、その mtDNA の全領域に相当する PCR 産物を得た。順次、配列決定を進めている。

(2) 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索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、脊索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、タリア綱と腸性目(ただし古典的な分類での無管亜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並びにヒカリボヤ(サルパ目、ウミタル目、ヒカリボヤ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。

サルパ目、オタマボヤ綱を除いて、17 種の尾索動物 mt 蛋白質遺伝子に基づく分子系統解析(最尤法ならびにベイズ法)を行うと、つぎのような系統関係が示唆された。

① ホヤ綱の壁性目と腸性目は単系統群ではない。腸性目はタリア綱と単系統群を作る。

② *Rhopalaea* sp. (腸性目管鰓亜目ユウレイボヤ科ムネボヤ亜科)は、腸性目無管亜目の群内群となり、ユウレイボヤ科ユウレイボヤ亜科 (*Ciona* spp.) とは単系統群とは成らない。

③ 最尤系統樹、ベイズ法による事後確率コンセンサス系統樹によると、ユウレイボヤ科ユウレイボヤ亜科は無管亜目の姉妹群となる。ユウレイボヤ科ユウレイボヤ亜科を無管亜目に置く見解もある。

④ 同様に、最尤系統樹、ベイズ法による事後確率コンセンサス系統樹によると、タリア綱(ウミタル目+ヒカリボヤ目)は、ナツメボヤ科の姉妹群となった。この解析が正しければ、腸性目もまた、多系統群ないしは側系統群であることが示唆される。ただし、サルパ目の配列の進化速度が極めて早いため、サルパ目を解析に含んでいないため、タリア綱の間関係(加えてタリア綱が単系統群か否か)については議論できない。また、腸性目管鰓亜目のうち 2 科(ナツメボヤ科とユウレイボヤ科)しか解析に含まれていない。マメボヤ科、ドロボヤ科などの他の管鰓亜目のメンバーのデータが、より詳細な尾索動物の系統解析には重要である。

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った。すると、尾索動物の分子系統解

析では、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 が、最も高い対数尤度を与えた。これは、脊椎動物 mt 遺伝暗号表では AGA/AGG コドンが終止コドンであるのに対し、節足動物 mt 遺伝暗号表は AGA/AGG コドンはセンスコドン (Ser コドン) である。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 (ただし Gly コドン) であり、結果として mtART は AGA/AGG コドンがセンスコドンであるという点において、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く説明している可能性がある。

(3) 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が必要である。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 7 件)

- (1) **Okada, K., Y. Yamazaki, S. Yokobori, & H. Wada** (2010) Repetitive sequences in the lamprey mitochondrial DNA control region and speciation of *Lethenteron*. *Gene* 465: 45-52.
 - (2) **Ito, A., M. Aoki, S. Yokobori, & H. Wada** (2010) The complete mitochondrial genome of *Caprella scaura* (Caprellidea) with a note on a unique gene order pattern and duplicated control region. *Mitochondrial DNA* 21: 183-190
 - (3) **Higashiura, Y., H. Yamaguchi, M. Ishihara, N. Ono, H. Tsukagoshi, S. Yokobori, S. Tokishita, H. Yamagata, & T. Fukatsu** (2011) Male death resulting from hybridisation between subspecies of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Heredity* 106:603-613.
 - (4) **Suzuki, T., K. Miyauchi, T. Suzuki, S. Yokobori, N. Shigi, A. Kondow, N. Takeuchi, A. Yamagishi, & K. Watanabe** (2011) Taurine-containing uridine modifications in tRNA anticodons are required to decipher non-universal genetic codes in ascidian mitochondria. *J. Biol. Chem.* 286: 35494-35498.
 - (5) **Yokobori, S., T. Ueda, & K. Watanabe** (2010) Evolution of genetic code (April 2010). In: *Encyclopedia of Life Science* 2010. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester. <http://www.els.net/> [DOI: 10.1002/9780470015902.a0000548.pub2].
 - (6) **Watanabe, K. & S. Yokobori** (2011) tRNA modification and genetic code variations in animal mitochondria. *J. Nucleic Acids.* Article ID 623095, doi:10.4061/2011/623095.
 - (7) **Watanabe, K. & S. Yokobori** (2011) Genetic code: introduction (Version 2). In: *Encyclopedia of Life Science*. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000809.pub 2
- [学会発表] (計 13 件)
- (1) **Yokobori, S., A. Kurabayashi, J. Nishikawa, Y. Ohson, A. Yamagishi, & E. Hirose.** Molecular phylogeny of Urochordata (Tunicata) based on complete mitochondrial genome sequences and 18S rRNA gene sequences. The 5th International Tunicate Meeting. Okinawa. (2009/6)
 - (2) **Ohson, Y., H. Wada, J. Nishikawa, A. Kurabayashi, E. Hirose, A. Yamagishi, & S. Yokobori,** Complete nucleotide sequences of mitochondrial genomes of two salps *Ritteriella amboinensis* and *R. picteti*. The 5th International Tunicate Meeting. Okinawa. (2009/6)
 - (3) **Suzuki, T., K. Miyauchi, N. Shigi, A. Kondoh, N. Takeuchi, T. Suzuki, A. Yamagishi, S. Yokobori, & K. Watanabe.** Unique characteristics of ascidian mitochondrial tRNAs: Existence of 5-taurinometylyridine-containing tRNAs involved in deciphering the non-universal genetic codes and an initiator tRNA corresponding to AUG codon. RNA2011. Kyoto. (2011/06)
 - (4) **Watanabe, K., S. Yokobori, & T. Suzuki.** An approach to the origin of the genetic code table by inferring from variations in the extant genetic codes of animal mitochondria. Symposium on behalf of prof. Tom RajBhandary, 2011/12, Bangalore, India. (2011/12)
 - (5) **横堀伸一、大曾根祐、倉林敦、西川淳、広瀬裕一、山岸明彦。** ミトコンドリアゲノムに基づく尾索動物の分子系統解析。第80回日本動物学会年会。静岡。(2009/9)
 - (6) **大曾根祐、倉持祐吾、和田洋、倉林敦、広瀬裕一、西川淳、山岸明彦、横堀伸一。**

- 尾索動物ミトコンドリア構造多様性の進化。第81回動物学会年会。駒場。(2010/9)
- (7) **横堀伸一**。遺伝暗号の進化：ミトコンドリア遺伝情報系をモデルとして。第3回アストロバイオロジーネットワーク・ワークショップ。多摩。(2010/10)
- (8) **横堀伸一、山岸明彦、渡辺公綱**。尾索動物ミトコンドリア遺伝暗号の進化。日本進化学会第13回年会。京都。(2011/7)
- (9) **大曾根祐、廣瀬裕一、和田洋、西川淳、倉林敦、山岸明彦、横堀伸一**。ミトコンドリアゲノムに基づく尾索動物の分子系統解析。動物学会。旭川、北海道。(2011/9)
- (10) **横堀伸一**。tRNAから見た遺伝暗号の進化。第4回アストロバイオロジーネットワークワークショップ。神戸。(2011/11)
- (11) **小澤元希、島村繁、高木善弘、横堀伸一、丸山正、吉田尊雄**。深海性二枚貝シロウリガイ類のミトコンドリアゲノム解析。第34回日本分子生物学会年会。横浜。(2011/12)
- (12) **小澤元希、島村繁、高木善弘、横堀伸一、前田太郎、丸山正、吉田尊雄**。シロウリガイ類のミトコンドリアゲノム解析。ブルーアース2012。東京。(2012/02)
- (13) **横堀伸一、山岸明彦、渡辺公綱**。ミトコンドリアtRNAの解析から見た遺伝暗号の進化。第37回生命の起原と進化学会学術講演会。高槻。(2012/03)

6. 研究組織

(1)研究代表者

横堀 伸一 (Yokobori, Shin-ichi)

東京薬科大学・生命科学部・講師

研究者番号:40291702