

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24年5月30日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770080

研究課題名（和文） レトロポゾン指標とした鳥類スズメ目、猛禽類、ツル目の系統的起源の解明

研究課題名（英文） Phylogenetic origin of Passeriformes, Falconiformes and Gruiformes based on retroposon insertions

研究代表者

西原 秀典（NISHIHARA HIDENORI）

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：10450727

研究成果の概要（和文）：

本研究ではスズメ目ゼブラフィンチの全ゲノムおよびコンドルの BAC 配列データに基づいたレトロポゾンの挿入比較により、猛禽類の多系統性を明らかにし、さらに Neoaves の共通祖先から目レベルの系統への分岐が短期間に急速に起こったことを示した。ツル目についてもコアグループ 5 科の単系統性を示唆する 5 つのレトロポゾン挿入遺伝子座を発見した。このように鳥類の系統学において難問とされている課題に関して重要な示唆を与える結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：

Retroposon insertion analysis was performed to reveal the phylogenetic relationships in Aves by using the whole genomic data of zebrafinch (*Taeniopygia guttata*) and the BAC sequence of condor. This study found that Raptores are polyphyletic and that divergence of Neoaves ancestor into higher-order lineages occurred in a short period of time. In addition, the phylogenetic analysis of Gruiformes identified a monophyletic clade called "core-group" with five retroposon insertion loci. This study revealed a complicated evolutionary history of Neoaves.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：系統

1. 研究開始当初の背景

近年は鳥類でも様々な遺伝子配列情報に基づいた分子系統学が発達したが、その中で最も大規模な研究は 19 遺伝子配列を 169 種について解析した Hackett et al. [Science 320:1763-8, 2008] である。この論文の解析

対象は鳥類のほぼ全ての科を網羅しており、科間の系統関係に関してはほぼ全貌を明らかにしたという点で非常に価値が高い。しかしながら、目レベルの系統関係については解決されない点が数多く残された。特に Hackett らはエキソンとイントロン配列が混

在したデータセットを解析に用いているが、イントロン配列を除くと単系統性が支持されなくなる場合が多々見られる。このような現在の鳥類系統学の中で特に激しい論争の的となっているのは、(1)スズメ目、(2)猛禽類、(3)ツル目の系統的起源である。

(1)スズメ目は鳥類全体の種の半数以上(約5,400種)を含む最大の目であり、形態的多様性が非常に高い。形態学的にはスズメ目が古くに分岐したと考えられてきたが、分子系統学的には比較的最近に放散した可能性が指摘されている。しかしながらスズメ目周辺の系統関係が未だ解明されておらず、その多様化がいつどのような祖先から生じたのかに関して世界的に注目されている。

(2)猛禽類は、コンドル科、タカ科、ハヤブサ科、フクロウ目から成るグループであるが、分子系統解析からはその単系統性を支持する報告がこれまでに無い。すなわち猛禽類が多系統である可能性が高いと考えられるが、各科がどの鳥類に近縁なのかは全く不明である。特にコンドル科は90年代の分子系統解析の影響で2006年までコウノトリ目に分類されていたが、最近ではタカ科との近縁性が再認識されるなど系統学的混乱の元凶となっている。

(3)ツル目はツル科を代表とする12科を含むが、そもそもツル目は分類困難な鳥類を一括りにしたグループと呼ばれ、その単系統性は常に疑問視されてきた。近年になってそのうち5科(ツル科、ツルモドキ科、ヒレアシ科、クイナ科、ラッパチョウ科)が真のツル目「コアグループ」に属することが提唱されている。しかしコアグループがどの鳥類に近縁なのか、またそれ以外の科の系統的位​​置に関しては解明されていない。

2. 研究の目的

上記3点の問題は、いずれも現在まで鳥類の系統学が混乱してきた原因となっており、鳥類全体の系統関係を解明するための最重要課題と言える。本研究の目的は、レトロポゾンの挿入パターンを指標として下記の点を明らかにすることである。

(1)スズメ目：鳥類最大の目であるスズメ目の系統的位​​置を解明し、鳥類多様性の成立過程を明らかにする。

(2)猛禽類：①コンドル科がタカ科に近縁なのかコウノトリ目に属するのか、②ハヤブサ科がタカ科に近縁か否か、③フクロウ目が猛禽類に属するのか他の鳥類に近縁なのかを解明する。

(3)ツル目：①コアグループ内部の系統関係、②コアグループに近縁な鳥類は何か、③コアグループ以外の科が系統樹上でどこに位置するのか、を解明する。

3. 研究の方法

鳥類ゲノムにはCR1と呼ばれるレトロポゾンが多数存在することが知られており、本研究ではCR1の挿入遺伝子座を指標とする。本研究では二種類の研究戦略を取り入れる。第一の手法はゲノムデータベースからCR1配列情報を網羅的に探索するものである。具体的にはスズメ目ゼブラフィンチの全ゲノムデータ、猛禽類カリフォルニアコンドルのBAC配列データから短いイントロンの内部に挿入されたCR1配列情報を探索する。その後、各イントロンの上下流に位置するエクソンの内部にPCR用プライマーを設計することで、どの鳥類ゲノムからも相同イントロンを容易に単離できる。このアイデアは研究代表者が哺乳類の系統解析で成功させたものがあるため技術的な問題は無く、その有効性は証明済みである。第二の手法として、コンドル以外の猛禽類3種およびツル目5種に関しては、ゲノムライブラリを作製してスクリーニングによってCR1配列を単離する(図4)。その際、CR1近傍領域の配列を用いてニワトリ・ゼブラフィンチのゲノムデータベースから相同遺伝子座を探索する。これらの種間で保存された配列内にプライマーを設計することで、他の鳥類ゲノムからもPCRによる相同遺伝子座の単離が容易になる。この手法は鳥類では極めて有効であることが予備研究で既に分かっており、本研究で初めて導入するものである。

4. 研究成果

(1)スズメ目の系統解析

ニワトリに次いで、2008年にゼブラフィンチ(*Taeniopygia guttata*;スズメ目)の全ゲノム配列が解読され公開されている。これはNeoaves内部の系統関係を明らかにする上で最も重要なデータソースとなる。本研究の代表者は以前、イントロン内に挿入されたレトロポゾンの挿入比較によって哺乳類の系統関係を明らかにしてきた経緯がある。本研究ではこれと同様の手法をゼブラフィンチゲノムに対して用い、2kbp以下のイントロンに挿入されているCR1配列をすべて単離した。それを用いて各CR1の5'および3'側に存在するエクソン配列内にプライマーを設計し、様々な鳥類種のゲノムDNAを鋳型としてPCRおよびシーケンスをおこなった。この研究内容に関しては現在のところ論文として出版するに至っていないが、スズメ目周辺の系統関係を明らかにする上で十分なレトロポゾン挿入遺伝子座の情報を収集することに成功した。今後、この情報を基盤として鳥類の系統関係を次々と明らかに出来ると期待される。

(2) 猛禽類

GenBank データベースにはカリフォルニアコンドル (*Gymnogyps californianus*) の BAC 配列データが登録されている。本研究で用いたコンドルの配列データは合計 1.6Mbp であったが、これは研究開始当時としては新顎上目の中でニワトリ、七面鳥、ゼブラフィンチに次いで多いデータ量であった。コンドルのデータから RepeatMasker を用いてレトロポゾン的一种である CR1 と呼ばれる LINE を探索した結果、総計 181 遺伝子座を発見した。これは平均 8.8kbp に 1 コピーの CR1 が存在することになり、ニワトリと同様にコンドルのゲノム中でも CR1 が高い密度で散在していることが分かった。次にこれらのオーソログ配列をニワトリおよびゼブラフィンチゲノム中から UCSC Genome Browser および Fasta 検索を用いて単離し、CR1 の有無を調べた。ニワトリ (キジカモ小綱) は新顎上目の中で最も古くに分岐したことが知られているため、ニワトリにも CR1 が挿入されていた場合は本研究の目的となる Neoaves 内部の系統関係を示す遺伝子座は理論的に発見できない。また仮にニワトリで CR1 が挿入されていない場合としてもゼブラフィンチに挿入されていた場合は Neoaves の単系統性を示す可能性が高いことが経験的に分かっている。そのため Neoaves 内部の関係を示す遺伝子座を発見するためにニワトリとゼブラフィンチに CR1 の挿入が見られない遺伝子座を探索したところ、18 遺伝子座が発見された。それらすべての遺伝子座に関して CR1 配列の上流・下流にプライマーを設計し PCR およびシーケンスをおこなった。PCR に用いたサンプルは猛禽類に含まれるタカ科 (タカ、ノスリ)、コンドル、ハヤブサ、フクロウをはじめアビ目、コウノトリ目、カイツブリ目、チドリ目、ツル目、ハト目、ブッポウソウ目、フラミンゴ目、ペンギン目、キジ目から計 20 種を選択した。その結果、1 つの遺伝子座 (kon4 遺伝子座) ではコンドル、ツル、カイツブリ、フラミンゴに CR1 が挿入されそれ以外の種では挿入されていなかった。一方で、コンドル、ツル、ペンギン、コウノトリ、タカ、ハヤブサ、ゼブラフィンチのみに CR1 の挿入が見られた遺伝子座も見つかっている。これら 2 つの遺伝子座間では CR1 の有無のパターンに矛盾が見られるが、これは Neoaves の祖先において起こった incomplete lineage sorting の結果であると考えられる。すなわち Neoaves の共通祖先において CR1 が挿入された後、それぞれの目レベルで急速な種分化を起こした証拠となる。またいずれの遺伝子座においても猛禽類の単系統性は否定されており、コンドルはタカ目とは近縁ではないことを示す証拠が得られた。以上のように、本研究におけるコンドルゲノムデータを基盤

とした CR1 挿入の種間比較では、猛禽類が明らかに多系統であること、また Neoaves の祖先で急速な種分化が起こったことの 2 点が明らかとなった。

(3) ツル目

ツル目に関しては CR1 挿入遺伝子座をゲノムライブラリからのスクリーニングによって単離した。具体的には、まずツル目に含まれるツル科のタンチョウ、クイナ科のヒメクイナ、カグー科のカグーに関して複数の CR1 コピーの 3' 末端配列を決定し、ニワトリで知られる他の CR1 配列と共に系統樹を作成した。その結果、ツル目 3 種の CR1 はごく最近においても活発に転移していることが確認されたとともに、ニワトリゲノムの CR1 と同様に B タイプと F タイプの 2 種類に大別されることが明らかとなった。次にこれらツル目 3 種に関してゲノム DNA ライブラリを作成し、ラベリングした CR1 配列をプローブとしてスクリーニングをおこなった。その結果、これら 3 種から総計約 300 遺伝子座の CR1 挿入遺伝子座を単離することに成功した。その中でニワトリにおいて CR1 が挿入されていない遺伝子座に関して Flanking PCR をおこなった。この PCR では鳥類の Neoaves を中心とした新顎上目 29 種のゲノム DNA を鋳型としておこない、各遺伝子座における CR1 挿入の有無はシーケンスにより確認した。その結果、まずツル目コアグループに含まれるツル科 (タンチョウ・オグロヅル)、ツルモドキ科、ラッパチョウ科 (ラッパチョウ・アオバネラッパチョウ)、クイナ科 (ヒメクイナ) の単系統性を支持する遺伝子座を 5 つ発見することに成功した。さらにツル科とツルモドキ科の単系統性を支持する遺伝子座も得ることができた。またツル目以外についても副次的にミユビシギとナンベイレンカクに共通して見られた DNA 配列の欠失が見られた。さらに Neoaves の単系統性を支持する遺伝子座も少なくとも 3 つ発見した。以上のように本研究のレトロポゾンを用いたツル目の系統解析では、Neoaves の単系統性、ツル目コアグループの単系統性、ツル科とツルモドキ科の単系統性の 3 点を明らかにすることができた。

以上の 3 つの観点から、レトロポゾンの挿入比較を用いて鳥類の系統関係に関して重要な成果を上げることができた。すなわち猛禽類が多系統であることを複数のレトロポゾン挿入遺伝子座によって明らかにし、またツル目の中でもコアグループと名付けられた単系統群の存在をレトロポゾンで支持することができた。これらの結果は、今後ゲノム解析が次々と進むであろう鳥類の進化学において、重要な情報基盤となると期待される。

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 6 件)

- ①Yuzawa, Y., Nishihara, H., Haraguchi, T., Masuda, S., Shimojima, M., Shimoyama, A., Yuasa, H., Okada, N., and Ohta, H. (2012) Phylogeny of galactolipid synthase homologs together with their enzymatic analyses revealed a possible origin and divergence time for photosynthetic Membrane biogenesis. DNA Res 19, 91-102. (査読有り)
- ②Yoshida, K., Terai, Y., Mizoiri, S., Aibara, M., Nishihara, H., Watanabe, M., Kuroiwa, A., Hirai, H., Hirai, Y., Matsuda, Y., and Okada, N. (2011) B chromosomes have a functional effect on female sex determination in Lake Victoria cichlid fishes. PLoS Genet 7, e1002203. (査読有り)
- ③Tashiro, K., Teissier, A., Kobayashi, N., Nakanishi, A., Sasaki, T., Yan, K., Tarabykin, V., Vigier, L., Sumiyama, K., Hirakawa, M., Nishihara, H., Pierani, A., and Okada, N. (2011) A Mammalian Conserved Element Derived from SINE Displays Enhancer Properties Recapitulating Satb2 Expression in Early-Born Callosal Projection Neurons. PLoS ONE 6(12): e28497. (査読有り)
- ④Nagai, H., Terai, Y., Sugawara, T., Imai, H., Nishihara, H., Hori, M., and Okada, N. (2011) Reverse evolution in RH1 for adaptation of cichlids to water depth in Lake Tanganyika. Mol Biol Evol 28, 1769-1776. (査読有り)
- ⑤Okada, N., Sasaki, T., Shimogori, T., and Nishihara, H. (2010) Emergence of mammals by emergency: exaptation. Genes Cells 15, 801-812. (査読有り)
- ⑥Akasaki, T., Nikaido, M., Nishihara, H., Tsuchiya, K., Segawa, S., and Okada, N. (2010) Characterization of a novel SINE superfamily from invertebrates: "Ceph-SINEs" from the genomes of squids and cuttlefish. Gene 454, 8-19. (査読有り)

[学会発表] (計 1 件)

蔵本多恵、西原秀典、岡田典弘 「レトロポゾンの挿入パターンを指標としたツル目の系統解析」 日本分子生物学会年会 (2009 年

12 月 12 日、横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西原 秀典 (NISHIHARA HIDENORI)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
助教
研究者番号 : 10450727

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :