

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：94404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570121

研究課題名(和文) 多足類の系統進化と変態様式の進化パターンの解明

研究課題名(英文) Study on molecular phylogeny and evolutionary patterns of the mode in post-embryonic development of myriapods

研究代表者

蘇 智慧 (Su, Zhi-Hui)

株式会社生命誌研究館・その他部局等・研究員

研究者番号：40396221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：多足類動物は、分類学上多足亜門(節足動物門)として、ムカデ綱、ヤスデ綱、エダヒゲムシ綱とコムカデ綱の4綱を含む。本研究は3つの核タンパク遺伝子を用いて、多足亜門の綱・目レベルの系統関係の解明および分岐年代と祖先形質の推定を行った。その結果、コムカデ綱が最初に分岐し、その分岐はカンブリア紀初期に遡ることが示唆された。この結果は多足類の初期の分岐は海で行い、複数の系統が独立に陸上進出を果たしたことを示した。ヤスデ綱とムカデ綱内の目間の関係については従来の仮説と一致した。祖先形質の推定の結果、多足類の祖先は半増節変態を行っていたことが示され、体節数と足の数と比較的少なかったことを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Myriapoda, a subphylum of Arthropoda, comprises four classes, Chilopoda, Diplopoda, Pauropoda, and Symphyla. Here we report the results of phylogenetic analyses and estimations of divergence time and ancestral state of myriapods. Phylogenetic analyses were performed based on three nuclear protein-coding genes determined from 19 myriapods representing the four classes (17 orders) and 11 outgroup species. The results revealed that Symphyla whose phylogenetic position has long been debated is the sister lineage to all other myriapods, and that the interordinal relationships within classes were consistent with traditional classifications. Ancestral state estimation based on the tree topology suggests that myriapods evolved from an ancestral state that was characterized by a hemianamorphic mode of post-embryonic development and had a relatively low number of body segments and legs.

研究分野：分子系統進化学

キーワード：多足亜門 分子系統 進化 分岐年代 変態様式

1. 研究開始当初の背景

(1) 多足類動物は、分類学では多足亜門(ムカデ・ヤスデなど)として、六脚亜門(広義の昆虫類)、甲殻亜門(エビ・ミジンコなど)と鋏角亜門(サソリ・クモなど)とともに節足動物門を構成している。形態特徴から従来多足類が昆虫類と近縁であるとされてきたが、近年の分子系統学の研究で、昆虫類と甲殻類との近縁性が明らかになり、両者をあわせて「汎甲殻類」と名付けられた。しかし、多足類の系統進化的位置は、汎甲殻類と姉妹群を形成するか、鋏脚類と姉妹群を形成するかは結論に至っていない。その意味で、多足類は節足動物の系統進化を探る上で極めて重要な一群である。多足亜門は、ムカデ綱、ヤスデ綱、コムカデ綱とエダヒゲムシ綱の4綱に分けられ、またムカデ綱は5目、ヤスデ綱は15目、コムカデ綱は1目、エダヒゲムシ綱は2目にそれぞれ分類されている。これら綱レベルと目レベルの系統関係は、多足類動物の進化を理解するために、必要不可欠な基礎情報である。

(2) 一方、多足類は非常に興味深い変態様式を有している。それは整形変態と増節変態である。増節変態は、さらに真増節変態、完増節変態と半増節変態という3つの様式に分けられる(図1)。これらの変態様式はどのように進化・多様化してきたのか? 多足類動物の祖先はどのような変態をしていたのか? 同じ変態様式をもつものは単一起源に由来しているのか? それとも同一変態様式は異なる系統群で独立に進化したのか? 多くの興味深い問題の解明が待たれる。これらの問題すなわち多足類の変態様式の進化・多様化の過程を明らかにするには、まず多足類の系統関係を解明しなければならない。

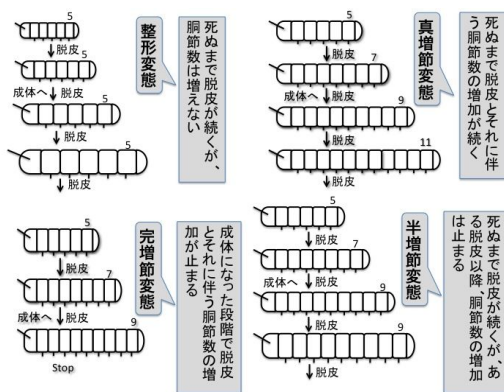


図1. 多足類動物の変態様式。「多足類読本」田辺力著(2001)より改変。

2. 研究の目的

(1) 多足亜門の綱・目レベルの系統関係について、これまでに形態情報と分子情報を用

いて多くの研究が行われてきたが、解明に至っていない。分子系統解析においては、これまでミトコンドリア遺伝子や核 rRNA 遺伝子、EF1- α 遺伝子、RNA Polymerase 遺伝子などによる解析が行われていた (Regier *et al.*, MPE, 2005)。しかし、各綱の単系統性は比較的強く支持されているものの、4つの綱間の系統関係と、ヤスデ綱とムカデ綱の各目間の系統関係はほとんど解明されていない(図2)。

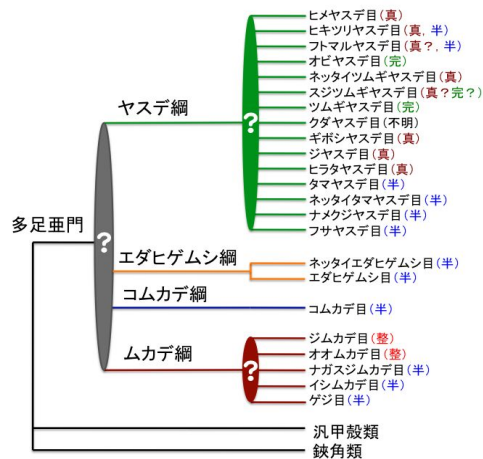


図2. 多足類の系統関係の問題点。多足類動物の変態様式は目名の後に示す。整：整形変態；真：真増節変態；完：完増節変態；半：半増節変態。

(2) 本研究の目的は、適切な分子情報を用いて多足亜門の綱レベルと目レベルの系統関係を解明し、多足類の変態様式の進化・多様化の過程を明らかにすることである。生物の進化を理解するために、系統関係は極めて重要な基礎情報である。しかし、不確実な系統関係に基づいて考案した進化仮説は、弱い基礎に建てられた高層ビルのようなもので、いつでも崩れる危険性が秘められる。我々は信頼性の高い系統樹構築をスタンスとして、これまでに昆虫類の系統進化の研究を行ってきた。特に3種の核タンパク遺伝子を用いた昆虫類の目間の系統解析では、これまで長く論争していた、いくつかの難問を明らかにした (Ishiwata *et al.*, 2011; Sasaki *et al.*, 2013)。これをもとに、現在節足動物門の系統進化における様々な問題に取り組んでいるが、本研究は多足類の変態様式の進化過程の解明に注目した。

3. 研究の方法

(1) 系統解析に用いる分子情報：これまでの我々の研究から、核 DNA にコードされた3種の RNA と DNA 合成酵素タンパク質遺伝子 RNA polymerase II largest subunit (RPB1), RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) と DNA polymerase δ catalytic subunit (DPD1) が昆虫類の高次分類群(綱・目)レベルの系統

解析において、非常に有効であることが判明した。本研究はまずこれら3つの遺伝子を用いて多足類の系統解析を行い、解明に至らなかったところは、さらに遺伝子情報を増やして解析を行うことにした。

(2) 研究材料の収集：日本に分布する多足亜門の各目から1種ずつのサンプルを収集した。体サイズが大きいものは、森の落ち葉の下や朽ち木の中を探して採集を行ったが、体サイズが小さいものは、落ち葉を含めた土を研究室に持ち帰り、ツルグレン装置を用いて採集した。RNA抽出・cDNA合成・PCR・塩基配列の決定：得られたサンプルは生きたままRNA抽出に用いた。体サイズが大きいものは、足や触覚など一部の組織を使用したが、コムカデやエダヒゲムシなど体サイズが小さいものは全個体を用いてRNA抽出を行った。得られたRNAを用いて、逆転写酵素を使ってcDNA合成を行った。その後、cDNAを鋳型にしてPCR法によって上に述べた3種の目的遺伝子の増幅を行った。得られた遺伝子のDNA断片(PCR産物)の塩基配列の決定は、DNA塩基配列自動決定装置(ジェネティックアナライザーABIPRISM)によって行った。系統解析：得られた塩基配列をもとに、アミノ酸配列を推定した。各生物種から得られたそれぞれの遺伝子のアミノ酸配列に対して、MAFFTというソフトウェアを使ってアライメント(各生物種から得られた同じ遺伝子のDNA塩基配列またはアミノ酸配列を並べること。配列の類似性をもっとも高くなるように並べるために配列にギャップを入れてずらす場合もある)を行ったあと、系統解析に適さない配列領域をGblocksというソフトウェアで除去した。最終に得られたアミノ酸配列のアライメントデータを用いて最尤法とベイズ法で系統樹の作成を行った。分岐年代の推定：系統樹上の各枝の分岐年代について、4つの化石のデータを用いてBEASTというソフトウェアにより推定した。化石の矯正点はそれぞれ以下のとおりである。1) 鰓脚類(ミジンコとカブトエビの分岐)：4億9000万年前；2) ヤスデ綱の前雄類の最初の分岐：4億3000万年前；3) ムカデ綱の最初の分岐：4億1800万年前；4) ジムカデ目とオオムカデ目の分岐：3億600万年前。多足類動物の変態様式の祖先形質の推定：現生の多足類動物の変態様式と系統関係をもとに、Mesquiteというソフトウェアを使って多足類動物の祖先種の変態様式を推定した。

4. 研究成果

(1) 多足類動物の系統関係。日本に分布しているムカデ綱とヤスデ綱の全ての目から1種ずつ、コムカデ綱コムカデ目の2科とエダヒゲムシ綱エダヒゲムシ目の2科の各科から1種ずつ、計19種を用いて上記に述べた3遺伝子(RPB1, RPB2, DPD1)の塩基配列

を決定した。得られた配列情報をもとに推定されたアミノ酸配列を用いて、最尤法とベイズ法による系統解析を行った。その結果、綱レベルの系統関係についてはコムカデ綱が最初に分岐し残り3綱(ムカデ綱・ヤスデ綱・エダヒゲムシ綱)が単系統群(同一祖先に由来した一群)であることが示された。(図3)。この結果はこれまでに提唱されてきた多くの説と異なっているが、コムカデ綱が六脚類に近縁でありムカデ綱・ヤスデ綱・エダヒゲムシ綱の3綱が単系統群をなすこと(Monomalata説)を顎の構造に基づいて1960年代にSharovが唯一示唆している。コムカデ綱と六脚類との近縁性を支持しない点でSharovの考え方と完全には一致しないが、本研究の結果はMonomalata説とは矛盾しない。逆に言うと、本研究の結果は顎の構造からも支持されていることになる。ムカデ綱とヤスデ綱内の目レベルの系統関係については形態に基づくこれまでの仮説と矛盾しない結果になった。ヤスデ綱内では唇顎類(Chilognatha)・前雄類(Helminthomorpha)・畸顎類(Colobognatha)の3分類群の単系統性が強く支持される結果が得られた(図3)。

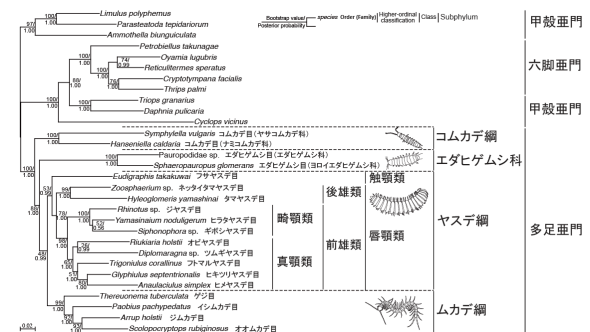


図3. 3つの核タンパク遺伝子(RPB1, RPB2, DPD1)により推定された多足類の系統関係。枝の分岐点にある数値は信頼度を表すブートストラップ値と事後確率である。

(2) 多足類の分岐年代。従来、多足類の最初の分岐(ムカデ綱とその他の多足類の分岐)はシルル紀中期かそれ以前であると考えられている。一方、近年の分子系統解析に基づく推定ではその分岐がより古いカンブリア紀後期に遡ることが示唆されている。しかし、本研究の系統解析の結果では、最初に分岐した多足類はムカデ綱ではなくコムカデ綱である可能性が高いことが示唆された(図3)。この結果は、実はカンブリア紀後期よりもさらに古い時代に多足類の分岐が始まっていたことを示唆している。そこでBEASTを用いて、4つの化石情報と系統解析に使用した配列情報に基づいた多足類の分岐年代推定を行った。その結果、多足類の綱間の分岐が起きたのはカンブリア紀初期からオルドビス紀初期と推定された(図4)。この結果は、

多足類の最初の分岐(コムカデ綱とその他の多足類との分岐)がカンブリア紀初期に遡ることを意味している。カンブリア紀には土も陸上生物も存在していなかったと考えられている。本研究の結果は、節足動物門においてこれまで考えているよりもっと多くの系統群が陸上への適応を独立に果たした可能性があることを示唆している。

各綱内では、ムカデ綱の目レベルの分岐はデボン紀からペルム紀初期までの間に起きたことが示唆された。一方ヤスデ綱の目レベルでは分岐年代の幅がより大きかった。最初の分岐はオルドビス紀にまで遡り、最も近縁な2目の分岐は中世代の中期であると推定された(図4)。コムカデ綱2科の分岐が少なくとも古生代にまで遡り、ムカデ綱とヤスデ綱の一部の目間の分岐よりも古いことが示唆された(図4)。興味深いことに、コムカデ綱は多足類において最初に分岐したにもかかわらず、形態分類学的には1目2科しか認められていない。つまりコムカデ綱の形態の多様化は他の多足類と比べると相当低いことになる。これらのことから、コムカデ綱は数億年(少なくとも2億5千万年、図4参照)の間にあまり形態変化を起こしていない可能性が考えられる。

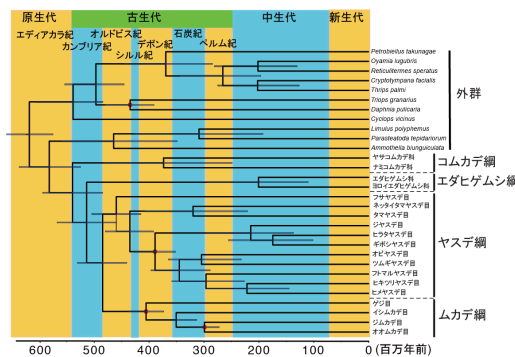


図4. 多足類の分岐年代の推定。赤丸は化石データの矯正点。

(3) 多足類の変態様式の多様化。多足類は、その名前からも分かるように脚の多い動物で、多い場合は数百対もの脚をもつ。また、多足類の脚は各体節に付いているので、脚が多いことは体節数も多いことを意味する(ちなみに、ヤスデ綱には各体節に2対の脚があるのに対してその他の多足類は各体節に1対の脚だけがある)。

大部分の多足類は孵化した後成長しながら体節(と脚)を増やしていく(増節)(図1参照)。このような変態様式は脱皮と増節の起こり方によって4つの様式(真増節変態・半増節変態・完増節変態・整形変態)に分けられている。真増節変態では一生にわたって脱皮に伴い増節が起こる。半増節変態では、脱皮は一生にわたって起こるが脱皮に伴った増節はある時期(成虫になった時期?)に

達した時に起こらなくなる。完増節変態では脱皮に伴った増節がある時期(成虫になった時期?)まで起こり、その後脱皮も増節も起こらなくなる。一方、整形変態では、脱皮は起こるものの増節は全く起こらない。

では、多足類の祖先種はどんな変態様式をしていたのだろうか。Mesquiteを用いた多足類の系統樹に基づく祖先形質の復元推定を行った。その結果、多足類の祖先種は半増節変態であったことが示唆された(図5黄丸)。また、半増節変態(図5黄丸)の現生の多足類の多くは体節数が少ない(図5)ことから、多足類の祖先種は体節数と脚の数が比較的少なかったと考えられた。また多足類において真増節変態(図5緑丸)と完増節変態(図5赤丸)は前雄類で進化したことが明らかになった。これらの解析の結果から2つの対立的な進化仮説を立てることができる。一つは真増節変態と完増節変態が独立的に(真増節変態は複数回)半増節変態から進化した仮説である。もう一つは前雄類の共通祖先種の時点で半増節変態から真増節変態に変わり、その後前雄類のある系統では完増節変態が進化し、ある系統で再び半増節変態に先祖返りした仮説である(図5)。

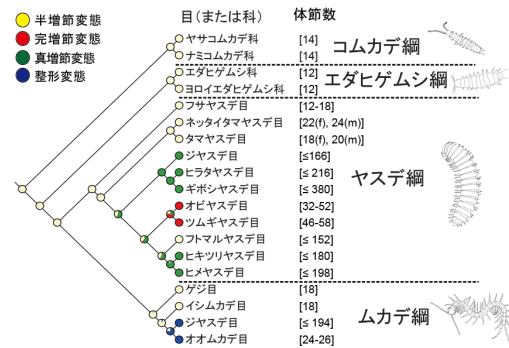


図5. 多足類の祖先形質(変態様式)の推定。系統樹の分岐点()の色は変態様式の割合を示す。

(4) ゲノム系統学的解析(Phylogenomics)。3遺伝子(RPB1, RPB2, DPD1)による多足類の系統解析の結果、コムカデ綱が最初に分岐したこと、ムカデ綱の目レベルの系統関係を、ヤスデ綱の目レベルの一部の系統関係を明らかにした。しかし、図3の系統樹が示してあるように、一部の支持率が低いいためまだ解明に至っていないところもある。残っている主な問題点は、ムカデ綱、ヤスデ綱とエダヒゲムシ綱の3綱の関係、フサヤスデ目の系統的位置、ヤスデ綱の畸顎類と真顎類内の目レベルの系統関係である。原因の1つとして、解析に使用される分子情報の不足であると考えられる。そこで、本研究の最終年度から次世代シーケンサーを活用した大量の核タンパク遺伝子情報(トランスクリプトーム)を用いたゲノム系統学的解析に取

り組んできた。まだ最終的な結果が得られていないが、暫定的結果によると、ムカデ綱、ヤスデ綱とエダヒゲムシ綱の3綱の関係については、ヤスデ綱とエダヒゲムシ綱が姉妹関係になることが示唆された。フサヤスデ目の系統的位相については、ヤスデ綱のほかの目とともに単系統群を形成すること、ヤスデ綱内において最初に分岐した系統であることが示された。これは3遺伝子による結果と同じだが、支持率が非常に高くなった。真顎類の目間の系統関係についても強い支持率で3遺伝子による樹形を支持した。これらの結果から、ゲノム系統学的解析は多足類の系統関係の解明に有効であることが示された。

(5) 本研究の今後について。本研究から得られた結果の大きな意義の1つは、多足類においてコムカデ綱が最初に分岐することを初めて示していることである。これまで、多足類の綱レベルの系統関係についてさまざまな議論がなされており多くの仮説が提唱されてきた。しかし、決定的な証拠が得られておらず結論には至っていない。本研究の結果はこの状況に一石を投じるに違いない。今後、必要なサンプルのトランスクリプトームの配列を決定し、ゲノムレベルの大量の遺伝子情報による系統解析を行い、多足類の系統関係に残った問題点を解明する予定である。

<引用文献>

Ishiwata K., Sasaki G., Ogawa G., Miyata T. and Su Z.-H. (2011) Phylogenetic relationships among insect orders based on three nuclear protein-coding gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 58: 169-180.

Minelli, A. (ed.) *The Myriapoda. Treatise on Zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology.* Vol. 1, Brill, Leiden • Boston, 2011.

Miyazawa, H., Ueda, C., Yahata, K., and Su, Z.-H. (2014) Molecular phylogeny of Myriapoda provides insights into evolutionary patterns of the mode in post-embryonic development. *Scientific Reports* 4:4127.

Regier, J. C., Wilson, H. M. & Shultz, J. W. (2005) Phylogenetic analysis of Myriapoda using three nuclear protein-coding genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34:147-158.

Sasaki, G., Ishiwata, K., Machida, R., Miyata, T. and Su, Z.-H. (2013) Molecular phylogenetic analyses support the monophyly of Hexapoda and suggest the paraphyly of Entognatha. *BMC Evol. Biol.* 13:236.

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)

Miyazawa, H., Ueda, C., Yahata, K., and Su, Z.-H. (2014) Molecular phylogeny of

Myriapoda provides insights into evolutionary patterns of the mode in post-embryonic development. *Scientific Reports* 4:4127. 査読無.

DOI: 10.1038/srep04217

宮澤秀幸, 蘇 智慧 (2013) 複数の核遺伝子による多足亜門の系統解析および分岐年代の推定. *昆虫 DNA 研究会ニュースレター*, No. 19: 37-40. 査読無.

宮澤秀幸, 蘇 智慧 (2013) 多足亜門の分子系統解析 –多足類の綱間・目間の系統関係–. *昆虫 DNA 研究会ニュースレター*, No. 18: 45-47. 査読無.

宮澤秀幸, 蘇 智慧 (2012) 多足亜門の分子系統解析. *昆虫 DNA 研究会ニュースレター*, No. 16: 32-36. 査読無.

[学会発表](計5件)

Su, Z.-H., Sasaki, G., Ishiwata, K., Miyazawa, H. Molecular phylogeny and evolution of arthropods, especially myriapods and hexapods. Symposium “Understanding of diversity and evolution of arthropods”. 16th Annual Meeting of the Society of Evolutionary Studies, Japan, 2014.08.21-24, Takatsuki Gendaigekijo, Osaka.

Miyazawa, H., Su, Z.-H. Myriapoda phylogeny based on nuclear protein-coding genes. The 50th Annual Meeting of the Arthropodan Embryological Society of Japan, 2014.07.03-04, Fuchu, Tokyo.

宮澤秀幸, 蘇 智慧 複数の核遺伝子による多足亜門の系統解析. 日本進化学会第15回大会, 2013.08.28-31, 筑波大学・つくば.

宮澤秀幸, 蘇 智慧 複数の核遺伝子による多足亜門の系統解析. 昆虫 DNA 研究会第10回研究集会, 2013.05.25-26, 東京大学・東京.

宮澤秀幸, 蘇 智慧 複数の核遺伝子による多足亜門の系統解析. 日本進化学会第14回大会, 2012.08.21-24, 首都大学・東京.

[その他]

ホームページ等

<http://www.brh.co.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蘇 智慧 (Su Zhi-Hui)

株式会社生命誌研究館・研究部門・研究員
研究者番号: 40396221

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

八畑 謙介 (YAHATA Kensuke)
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・講
師
研究者番号：70302370