

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 6 月 20 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（B）（一般）

研究期間：2008～2011

課題番号：20370033

研究課題名（和文）次世代ミトコンドリアゲノミクスによるヤモリ類の系統解析

研究課題名（英文）Molecular phylogeny of geckos using new mitogenomic approaches

研究代表者

熊澤 慶伯（KUMAZAWA YOSHINORI）

名古屋市立大学・大学院システム自然科学研究科・教授

研究者番号：60221941

研究成果の概要（和文）：次世代シーケンサーを用いたハイスループットなミトコンドリアゲノミクスの手法の開発を行った。まずミトゲノム配列既知の個体を用いて、この方法の効率性と正確性を証明し、ヤモリ下目の様々な系統を代表する約40種から新たにミトゲノム全塩基配列を決定した。遺伝子配置の変動の事例を4例発見するとともに、ヤモリ下目の7科間の系統関係等について従来の形態データに基づく仮説とは異なる結果を示した。

研究成果の概要（英文）：We established a method to sequence multiple complete mitochondrial genomes in parallel with the high-throughput sequencer. The efficiency and accuracy in the sequencing was confirmed using several reptilian individuals that had been sequenced for their mitogenomes manually. We have obtained dozens of complete or nearly complete mitogenomes to find new examples of gene rearrangements, as well as phylogenetic relationships of geckos.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：系統進化学

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：爬虫類・ヤモリ・ミトコンドリア・分子系統・次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

ヤモリ下目は有鱗目トカゲ亜目の一系統であり、1100種（100属）余り

の現生種を含む大きなグループである。ヤモリ下目の科レベルあるいは科内の亜科・属レベルの系統関係は、形態情報を用

いて精力的に研究されてきたが、まだ不明な点が多く、各グループが持つ形態的特徴の進化過程がよく解明されていない。形態情報から独立した分子系統学のアプローチが期待されているが、ミトコンドリアゲノム（ミトゲノム）や核ゲノムにコードされる1個ないしは数個の遺伝子を用いた過去の分子研究は、いくつかの属内における系統関係の構築には寄与したものの、主要な属を網羅してヤモリ類の系統関係の全体を見渡そうとするような試みにおいては、その解像力の不足を示した。

申請者らは、有鱗類ミトゲノムの構造決定とそれに基づく分子系統解析（ミトコンドリアゲノミクス）に、世界に先駆けて取り組んできた。これまで約50種の有鱗類からミトゲノムの完全長又はほぼ完全長の塩基配列を決定し、その分子進化様式を解明するとともに、ミトゲノムから得られる大量の分子情報に基づいて、有鱗類の高次系統関係と歴史生物地理の解明を進めてきた。今後は極めて多様性に富んだグループ（例えばヤモリ類）の中位分類群（亜科や属程度）以下の系統問題にどのようにアプローチするかが焦点となっており、ミトコンドリアゲノミクスの実験・解析手法の更なるハイスループット（高速大量処理）化が求められている。

次世代シーケンシング技術は、従来のサンガー法（ジデオキシ塩基を用いた伸長鎖停止法）を用いずに、大量の塩基配列を並列的に解読する新技術である。最近急速に技術開発が進み、製品化されたゲノムシーケンサーはメガ塩基対からギガ塩基対といった巨大ゲノムのショットガンシーケンシングに利用され始めている。脊椎動物のミトゲノムサイズは約17キロ塩基対であり、次世代シーケンシング技術を効果的に適用するには短すぎると一般に考えられてきた。しかし最近になって、サンプルの種類ごとに（本研究では種ごとに）異なるタグ配列をサンプルDNAの末端に付加することで、多検体の解析を並列的に実施できるマルチプレックス化の技術が開発された。申請者は、この方法を応用すれば、複数のミトゲノム塩基配列を参照塩基配列なしで並列解読できる可能性が高いと考えたため、本研究を提案した。

2. 研究の目的

本研究では、次世代シーケンシング技術を用いたハイスループットなミトゲノム全塩基配列決定法を確立し、ヤモリ類の主要なグループからサンプリングした代表種について、そのミトゲノム全塩基配列を決定する。ヤモリ類ミトゲノムの構造的特徴（遺伝子配置の変動、tRNA 遺伝子の構造異常など）を明らかにするとともに、大量の分子情報を用いてヤモリ類全体を見渡せるような信頼できる系統的枠組みを構築する。それに基づきヤモリ類の分類の再検討、形態形質の進化の過程の解明、歴史生物地理に関する仮説の提案などを行う。

3. 研究の方法

ヤモリ下目は、最新の分類によれば、ヤモリ科（Gekkonidae）、カワリオヤモリ科（Carphodactylidae）、イシヤモリ科（Diplodactylidae）、トカゲモドキ科（Eublepharidae）、ユビワレヤモリ科（Phyllodactylidae）、チビヤモリ科（Sphaerodactylidae）、ヒレアシトカゲ科（Pygopodidae）の7科を包含する。かつてはメクラトカゲ科（Dibamidae）もヤモリ類と近縁であるとの見解があったが、現在は別グループであると考えられている。本研究では、これらの科を代表する種の標本を多数収集した。国内外での採集活動に加え、ペットショップ等からの生体の購入や死体の寄贈などにより標本を集めた。本研究でミトゲノム解読に用いた個体は、原則として証拠標本を手元に残し、論文発表されたものから名古屋市立大学システム自然科学研究科標本庫に順次預け入れる予定である。

ミトゲノム全塩基配列の決定の手順を図1に示す。各標本からDNAを抽出し、Long PCR によって、ミトゲノムのほぼ全長をカバーする領域の増幅を行った。このPCR産物を超音波によって平均800bp程度のサイズに細断し、末端修復を行った後、回文構造を持つ20bpの識別タグ配列を両末端に付加した。この産物を正確に定量後、種ごとに等モル比で混合し、タグ配列の中央を制限酵素 SrfI で切断した。10-40種のサンプルを混合して、この段階で1μg以上の収量が得られるように実験系を組んだ。

このDNA標品から出発し、図1の手

順により、次世代シーケンサー解析を行った。平均断片長約 350bp の read を、Roche GS FLX Titanium 型ゲノムシーケンサーによって大量取得し、識別タグ配列に基づいて read を仕分けしたのち、GS de novo assembler による read のアセンブルを行った。塩基配列のギャップは、当該領域をまたぐ PCR 増幅を行い、この PCR 産物をマニュアルで塩基配列決定して埋めた。

得られたミトゲノム全塩基配列において、コードされる遺伝子のアノテーションを行い、各遺伝子ごとにアラインメントを作成した。この作業には DOGMA 等の公開されたソフトウェアに加え、研究協力者の Pierre Jonniaux によって独自に開発された Getmitogenome (仮称) という Script を用いた。アノテーションとアラインメントの作業を半自動化することで、ミトゲノム全塩基配列を用いた迅速かつ正確な系統解析が可能となった。ミトゲノムにコードされる 37 遺伝子の塩基配列 (タンパク質遺伝子のコドン 3 文字目を除く) を用いて、ベイズ法などで分子系統樹を作成した。

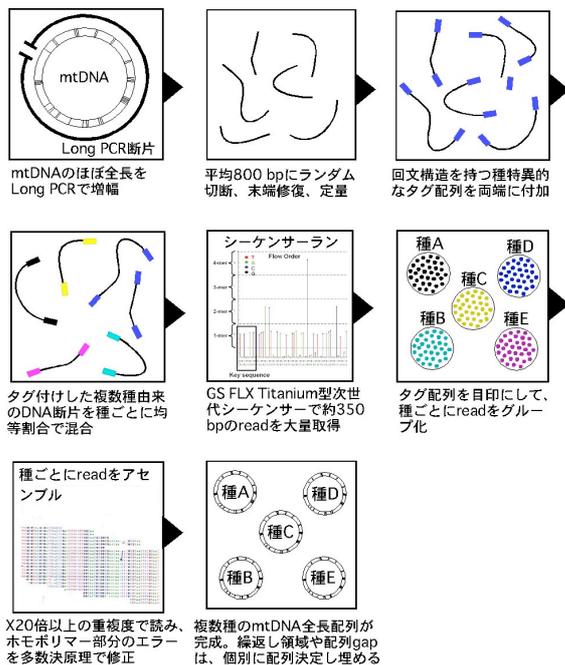


図1 ミトゲノム全塩基配列の並列解読の手順

4. 研究成果

(1) ミトゲノム配列決定の正確性と効率性
 科研費の期間中にヤモリ類を主体とする様々な爬虫類のミトゲノム全塩基配列を次世代シーケンサーを用いて決定した。ま

ず最初に、図1の手法によって正確なミトゲノム全塩基配列の決定が行えることを確認するために、既に従来法によって当研究室で配列を決定済みのミトゲノム配列を数例用いて再現実験を行った。その結果、1000 reads 程度以上の contig から復元されたミトゲノム配列は、ほぼエラーなしの正確な塩基配列であることが示された。この条件は、1サイトあたりを平均 X20 reads 以上の冗長度でカバーすることに概ね相当する。ただし、いろいろ検証を進めていく過程で、X10 程度の冗長度しか得られないデータであっても、カバー率の低い領域を個別にマニュアルシーケンスしてチェックすれば、ミトゲノム全塩基配列の解読に十分利用できることも示された。

表1に、この方法を用いて10種のヤモリ類のミトゲノム全塩基配列を並列解読したときのデータを示す。この実験例のように、丁寧にサンプル調製と濃度の定量を行えば、得られた read 数は各々の種にほぼ均等に振り分けられ、結果的に全ての種のミトゲノム全塩基配列を効率的に決定できることが示された。以後、並列解読の種数を増して何度か実験を繰り返し、結果的に約40種のヤモリ類についてミトゲノム配列を取得することができた。

従来、我々は爬虫類指向性共通プライマー (Kumazawa and Endo, 2004) を用いた PCR 増幅とマニュアルシーケンスによって爬虫類のミトゲノミクスを研究していたが、この共通プライマーのマッチングが悪い種では、ミトゲノムの配列決定に手間取る例も見られた。次世代シーケンスを導入することで、この問題点は解決され、種特異的プライマーの合成による Primer Walking の必要性が大幅に低下した。従来よりも安価かつ迅速に爬虫類のミトコンドリアゲノミクスを行えるようになった。

表1 10種のヤモリ類ミトコンドリアゲノムの並列解読の一例

No.	タクソン名	mtDNAサイズ(bp)	全read数	総読み取り塩基数	平均カバーレージ
1	ニシアフリカトカゲモドキ	17043	1247	447,812	29
2	ギガシラソメワケヤモリ	16830	1084	393,441	24
3	マソベササクレヤモリ	18197*	1487	510,899	30
4	バンドカゲモドキ	17110	1304	477,889	29
5	ナミビア産フトユビヤモリ	17475	1674	594,604	36
6	エレガンスチビヤモリ	17500	1613	581,405	36
7	ロブスタババイゲッコウ	17271	844	303,307	18
8	ササメスキクヤモリ	16995	1064	386,141	21
9	パーキングゲッコウ	17319*	1379	495,629	30
10	ヘリトリホソユビヤモリ	17594	946	310,566	19

*制御領域の反復部分を配列決定できなかった部分ゲノム配列のサイズ

ができた。マイヤーら(2007)が報告したミトゲノムの **resequencing** ではなく、新規ミトゲノムの並列解読を参照配列なしで実現できることを示したのは、将来的に意義深い。

最近、タグ付けを行わずに複数種のミトゲノムを混合して並列解読できたとの論文も報告された。しかし近縁種のミトゲノムをタグなしで混合した場合に DNA 塩基配列のコンタミネーションが起きる危険は合理的に排除されておらず、まだ実用性が低い手法であると考えられる。我々は今後も本研究の手法をさらに改良し、系統解析の成果を発信していきたいと考える。

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 14 件)

- ① Jonniaux P and Kumazawa Y (2012) Mitochondrial genomes of two African geckos of genus *Hemitheconyx* (Squamata: Eublepharidae). Mitochondrial DNA、印刷中、査読有
DOI: 10.3109/19401736.2012.668898
- ② Dehara Y, Hashiguchi Y, Matsubara K, Yanai T, Kubo M and Kumazawa Y (2012) Characterization of squamate olfactory receptor genes and their transcripts by the high-throughput sequencing approach. *Genome Biology and Evolution* 4(4): 602-616、査読有
DOI: 10.1093/gbe/evs041
- ③ Amer SAM, Mohamed MA, Wilms TM, Shobrak M and Kumazawa Y (2012) Mitochondrial DNA variability within *Uromastix ornata philbyi* (Agamidae: Squamata) from southwestern Saudi Arabia. Comparative and Functional Genomics 2012: 851379、査読有
DOI: 10.1155/2012/851379
- ④ Amer SAM, Montaser MM and Kumazawa Y (2011) Preliminary molecular variability within *Uromastix aegyptia microlepis* (Reptilia: Agamidae) inhabiting Saudi Arabia. World Applied Sciences Journal 12: 1955-1961、査読有
- ⑤ Okajima Y and Kumazawa Y (2010) Mitochondrial genomes of acrodont lizards: timing of gene rearrangements and phylogenetic and biogeographic implications. BMC Evolutionary Biology 10: 141、査読有
DOI: 10.1186/1471-2148-10-141

⑥ Okajima Y and Kumazawa Y (2009) Mitogenomic perspectives into iguanid phylogeny and biogeography: Gondwanan vicariance for the origin of Madagascan oplurines. *Gene* 441: 28-35、査読有
DOI: 10.1016/j.gene.2008.06.011

⑦ Jonniaux P and Kumazawa Y (2008) Molecular phylogenetic and dating analyses using mitochondrial DNA sequences of eyelid geckos (Squamata: Eublepharidae). *Gene* 407: 105-115、査読有
DOI: 10.1016/j.gene.2007.09.023

[学会発表] (計 25 件)

- ① 熊澤慶伯. 次世代シーケンシングによる新規ミトコンドリアゲノム配列決定の効率性と正確性. 日本進化学会第 13 回大会、2011 年 8 月 30 日、京都大学 (京都市)
- ② 熊澤慶伯、三浦沙綾、ピエールジョニオ、山田知江美、橋口康之. ヤモリ類の系統関係とミトコンドリアゲノムの遺伝子配置の変動. 日本進化学会第 13 回大会、2011 年 8 月 30 日、京都大学 (京都市)
- ③ 山田知江美、柴田弘紀、熊澤慶伯. カメ類のミトコンドリアゲノムにおける分子進化速度の不均一性. 日本進化学会第 13 回大会、2011 年 8 月 30 日、京都大学 (京都市)
- ④ 熊澤慶伯. 中-新生代の大陸移動と爬虫類の進化. 日本進化学会第 12 回大会「大陸移動と動物の進化 2 億年」シンポジウム、2010 年 8 月 5 日、東京工業大学 (東京都)
- ⑤ Kumazawa Y and Okajima Y. Molecular phylogeny and biogeography of lizards. The International Symposium on Biodiversity Sciences 2010 "Genome, Evolution and Environment", 2010 年 8 月 1 日、ルブラ王山ホテル (名古屋市)
- ⑥ 熊澤慶伯. 爬虫類の高次系統と生物地理. 日本進化学会第 11 回大会「脊椎動物の高次系統と分子進化」ワークショップ、2009 年 9 月 3 日、北海道大学 (札幌市)
- ⑦ Kumazawa Y. Reptilian phylogenetics using mitochondrial genomes. The first international symposium of the Korean Tree of Life (KTOL) research group "Genomics and Phylogenetics". 2008 年 12 月 5 日、Korea University, Seoul, Korea
- ⑧ 岡島泰久、熊澤慶伯. カメレオン類ミトコンドリアゲノムの構造的特徴と系統解析. 日本進化学会第 10 回大会、2008 年 8 月 22 日、東京大学 (東京都)
- ⑨ Pierre Jonniaux and Yoshinori Kumazawa. Molecular phylogenetic and dating analyses using mitochondrial DNA sequences of eyelid geckos. 日本進化学会

第10回大会、2008年8月22日、東京大学
(東京都)

⑩ Kumazawa Y. Molecular evolution of mitochondrial genomes and phylogenetics in reptiles. Symposium "Innovations in Immunologicals and Animal Toxins". 2008年8月1日、Instituto Butantan, San Paulo, Brazil

[図書] (計3件)

①熊澤慶伯、第2版 古生物学事典、日本古生物学会編、朝倉書店、2010、pp. 211, 338, 444-445, 476-477 (総ページ数 584)

②熊澤慶伯、第1版 生物の事典、石原勝敏・末光隆志編、朝倉書店、2010、pp. 43-45, 47-49 (総ページ数 560)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/~kuma/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊澤 慶伯 (KUMAZAWA YOSHINORI)

名古屋市立大学・大学院システム自然科学
研究科・教授

研究者番号：60221941

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

橋口 康之 (HASHIGUCHI YASUYUKI)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：70436517

山田 知江美 (YAMADA CHIEMI)

名古屋市立大学・大学院システム自然科学
研究科・研究員

ジョニオ ピエール (JONNIAUX PIERRE)

名古屋市立大学・大学院システム自然科学
研究科・研究員