

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24370033

研究課題名(和文) ゲノムから1遺伝子まで網羅的DNA配列情報を使った分子系統解析法の確立

研究課題名(英文) Establishing a novel method of molecular phylogenetic analysis based on comprehensive sequence data from a single gene to the whole genome

研究代表者

戸田 正憲 (TODA, Masanori)

北海道大学・総合博物館・資料部研究員

研究者番号：40113592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：全ゲノム配列情報を「骨格」として、さまざまな部分配列情報を網羅的に利用可能にする、分子系統解析のための新しい方法論を考案し、モデル生物群としてのショウジョウバエ科の系統解析を行った。その結果、極めて高い解像度の系統樹が推定され、新しい方法論の有効性が実証されるとともに、これまで未解明の部分があった最大の属、ショウジョウバエ属について、いくつかの重要な新しい系統情報が得られた。これにより、ショウジョウバエ科の系統分類学および進化学的枠組みを大きく変える必要がある。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel method of molecular phylogenetic analysis that enables us to employ comprehensive data of DNA sequences of various genes in the skeleton framework of whole genome sequences, and applied it to the family Drosophilidae as a model group of organisms. The inferred phylogeny was highly resolved, corroborating the efficiency of the novel methodology. Especially, as to the largest genus *Drosophila* of which phylogeny has not fully been resolved, several important new findings have been brought, which will lead to fundamental changes in the framework of taxonomic and evolutionary studies on the Drosophilidae.

研究分野：昆虫分類・生態学

キーワード：系統推定法 ショウジョウバエ トランスクリプトーム ゲノム 網羅的分子系統樹 PCRプライマー
モデル生物 分類学

1. 研究開始当初の背景

(1) 次世代シーケンサーの普及に伴い、ゲノムベースでの比較研究が、生物進化研究の新しい扉を開きつつある。特定のモデル生物種に限らない、多くの野生種を対象にしたゲノムベースの実証的研究が可能となってきた。その時に必要になるのが、あらゆる比較研究の基盤情報となる、信頼性の高い系統仮説である。系統推定が DNA 塩基配列情報に基づいて行われるようになって久しいが、未だ、使われる遺伝子の種類、数に限りがあるのが一般的で、得られる系統仮説は、各遺伝子の特性によって左右され、議論がなかなか収束しない状態にあった。急速な勢いで蓄積しつつある全ゲノム配列情報を系統推定に使うことにより、この壁を突破できる可能性がある。

(2) ショウジョウバエ科はキイロショウジョウバエなどのモデル生物種を含むだけでなく、12 種の全ゲノム配列が解読・公開され []、比較ゲノム研究の好個のモデル生物群である。また、多くの系統学的研究が行われ、小数の遺伝子座だけでなく、ゲノム配列に基づく 12 種の系統樹 []、ミトコンドリアゲノム配列に基づく 10 属 134 種の系統樹 []、13 遺伝子座の配列を使ったスーパーマトリックス法による 12 属 176 種の系統樹 [] なども発表されていた。しかし、これらの研究で対象とされた分類群は、ショウジョウバエ科全 77 属約 4,000 種のほんの一部であり、ショウジョウバエ科を横断する比較ゲノム研究の基盤情報としては不十分な状態にあった。

2. 研究の目的

全ゲノム配列情報を「骨格」として、さまざまな部分配列情報を網羅的に利用可能にする、分子系統樹推定のための新しい方法論を確立するとともに、比較ゲノム解析のためのモデル生物群として系統情報が必須であるショウジョウバエ科について、包括的で精密な系統情報を得ることをめざした。

3. 研究の方法

ショウジョウバエ科の骨格系統群がそろっているアジア産ショウジョウバエを中心に、全ゲノム、cDNA、約 50~100 遺伝子、数~1 遺伝子という異なる長さの配列データを収集、解析して、系統樹の幹(全ゲノム)、大枝(cDNA)、中枝(50~100 遺伝子)、小枝(数~1 遺伝子)の樹形を決める新しい解析法を確立し、ショウジョウバエ科分子系統樹の決定版雛型(テンプレート)を提出することをめざして、以下の研究を行った。

(1) ショウジョウバエ科の骨格となる主な属・亜属およびショウジョウバエ属の主な種群を代表する種を候補として、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析

により、1000~5000 遺伝子についてコード領域の cDNA 配列を決定した。

(2) ゲノムおよび cDNA 配列データをもとに、種間で保存されている部分を同定し、30~60 遺伝子について PCR プライマーを設計し、ショウジョウバエ属を中心とする主な種群・種亜群について、塩基配列を決定した。

(3) 得られた塩基配列データを、公開されている全ゲノム配列(12 種)および GenBank などの配列データベースに蓄積されている数~1 遺伝子座の配列情報と合わせて、スーパーマトリックスを作成し、最尤法とペイズ法で系統樹推定を行った。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエ亜属の系統関係

ショウジョウバエ科の中で最大のショウジョウバエ属(1,166 種)は、3 つの大きな亜属を含む: ショウジョウバエ *Drosophila* 亜属(410 種)、シマショウジョウバエ *Sophophora* 亜属(338 種)、ミギワショウジョウバエ *Siphlodora* 亜属(290 種)。このうち、*Sophophora* 亜属は、モデル生物であるキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* を含み、9 種の全ゲノム配列をはじめとして遺伝子配列情報が充実している。また、*Siphlodora* 亜属も、第 2 のモデル生物クロショウジョウバエ *D. virilis* を含み、2 種の全ゲノム配列が解読されている。一方、最大の *Drosophila* 亜属については、ゲノムスケールの配列情報がなく、分子系統学的解析が進まず、その系統関係は未だ多くの謎に包まれている。

そこで、*Drosophila* 亜属の 16 種、および近縁属 2 種、外群 2 種(*Siphlodora* 亜属)について、トランスクリプトーム解析により大量の遺伝子配列を決定し、12 種の全ゲノム配列情報と合わせて分子系統解析を行い、以下の結果を得た(図 1)。

非常に高い解像度の系統樹が得られた: 2 本の枝を除き、全ての枝のブートストラップ値は 100%。

quinaria section を構成する主要な種群の系統関係

immigrans 種群が最も古くに分岐したことが明らかとなった。さらに、北米の種群(*tripunctata*, *guarani*, *cardini* 種群)が単系統となり、かつ、アジアの種群(*immigrans*, *histrion* 種群)が祖先的な位置にきていることから、北米の種群はアジアから移入した種から進化したことが示唆された。

immigrans 種群の単系統性について *immigrans* 種群に属す 6 種のうち、*D. immigrans*, *D. hypocausta*, *D. albicans* の 3 種は単系統群を形成し、*quinaria* section に

属したが *D. quadrilineata* は *quinaria* section の姉妹群と位置づけられた。さらに、*D. annulipes* や *D. curviceps* は、ハワイ諸島で爆発的な適応放散進化をしたハワイ産固有ショウジョウバエと近縁であるという、進化的に大変興味深い結果が得られた。これらのことから、*immigrans* 種群は多系統であり、分類学上の改訂が必要であることが示された。

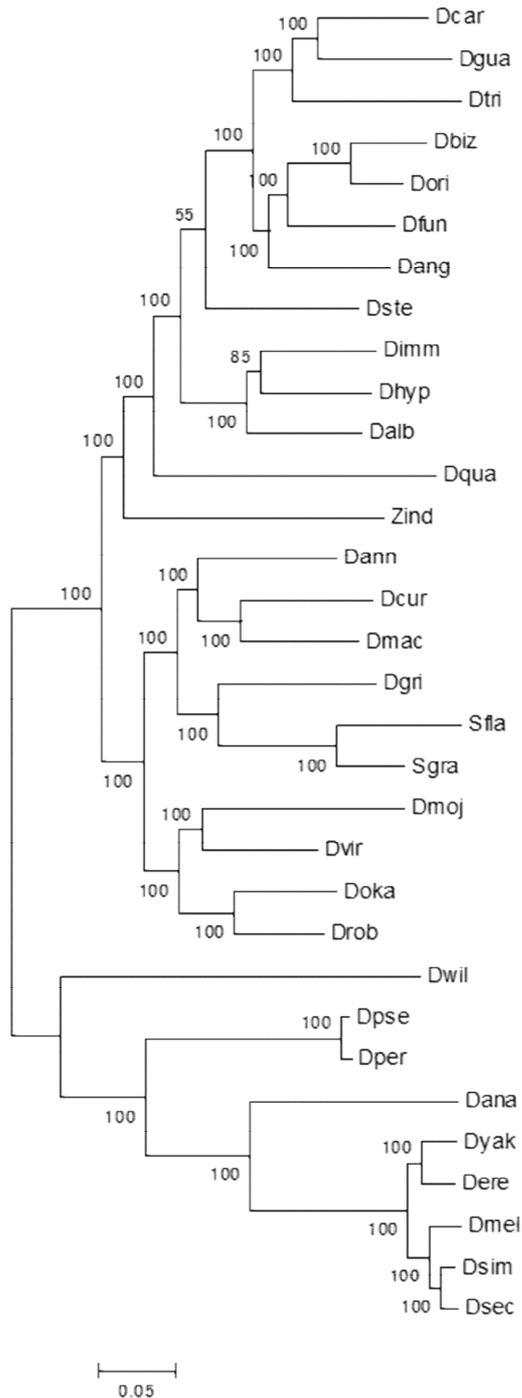


図1 最尤法によって推定されたショウジョウバエ属の分子系統樹。73 遺伝子 (93279 塩基) を用い、遺伝子ごとにパーティションに分け、GTR+Gamma モデルに基づいて系統推定を行った。各枝に示してある数値はブートストラップ値 (100 回試行)

(2) ショウジョウバエ亜属とその近縁属の系統関係

Drosophila 亜属とその近縁属の系統関係

Drosophila 属の多系統性は古くから指摘されてきた。特に、*Drosophila* 亜属内部の系統関係や、*Drosophila* 亜属と近縁属間の系統関係の詳細については明らかとなっていない。この系統関係の不明瞭さをもたらす要因の一つとして、信頼度の高い分子系統樹の構築に必要な塩基配列情報が不足していること、および過去の研究が一部の分類群に偏ったタクソンサンプリングを行っていたことが考えられる。前者の欠点を補うべく、我々は、トランスクリプトーム解析によって得られた大量の遺伝子配列情報を使った分子系統解析を行った (上述)。一方、後者の欠点を補うために、タクソンサンプリングを拡大して、*Drosophila* 亜属およびその近縁属の 107 種を対象として、8 遺伝子の塩基配列を用いた分子系統解析を行い、以下の結果を得た (図 2)。

Drosophila 亜属内の系統関係は、上述の大量の遺伝子配列情報を使った分子系統解析の結果 (図 1) と、おおよそ一致した。近縁属との関係では、*Drosophila* 亜属に最も近縁な属は、*Zaprionus* 属と *Samoia* 属で、これらは *Drosophila* 亜属に対して側系統群として位置づけられた。さらに、この *Drosophila* 亜属 + *Zaprionus* 属 + *Samoia* 属のクレードの外側に、*Hirtodrosophila* 属、*Mycodrosophila* 属、*Paramycodrosophila* 属、および *Zygothrica* 属を含むクレードが姉妹群として認識された。しかし、*Paramycodrosophila* 属を除く 3 属は、いずれも多系統である可能性が強く示唆された。

キノコ食の起源の推定

系統解析の対象とした現生種の食性情報 (自然界における成虫・幼虫の餌基質) に基づいて、祖先種の食性推定を RASP ver. 3.0.2 の BBM 法を用いて行った。また、祖先種の年代推定をベイズ法によって行った：基準として、*Sophophora* 亜属の祖先系統の分岐年代 (56.0 Mya)、*Siphlodora* 亜属の祖先系統の分岐年代 (35.9 Mya)、および *Drosophila* 亜属の祖先系統の分岐年代 (34.5 Mya) の 3 点を用いた。

その結果、*Hirtodrosophila* 属、*Mycodrosophila* 属および *Paramycodrosophila* 属を含む系統と、*Drosophila* 亜属の系統ではキノコ食の起源が異なり、前者では約 4,200 万年前に生じた共通祖先 (図 2: 枝 7) がキノコ食を獲得し、後者では約 2,800 万年前に生じた別の共通祖先 (枝 13) がキノコ食を獲得したと推定された。また、前者においては、過去に一度キノコ食形質を獲得した後、食性の変更を頻繁に起こすことはなかったが、後者ではキノコ食性の獲得と消失が複数回に渡って生じたことが示唆された。これらの推

定結果は、*Hirtodrosophila* 属や *Mycodrosophila* 属のほとんどがキノコのみを利用するスペシャリストであるのに対して、*Drosophila* 亜属ではキノコと併せて腐った果実などをジェネラリスト的に利用する種が多い、という生態的特性とよく合致する。

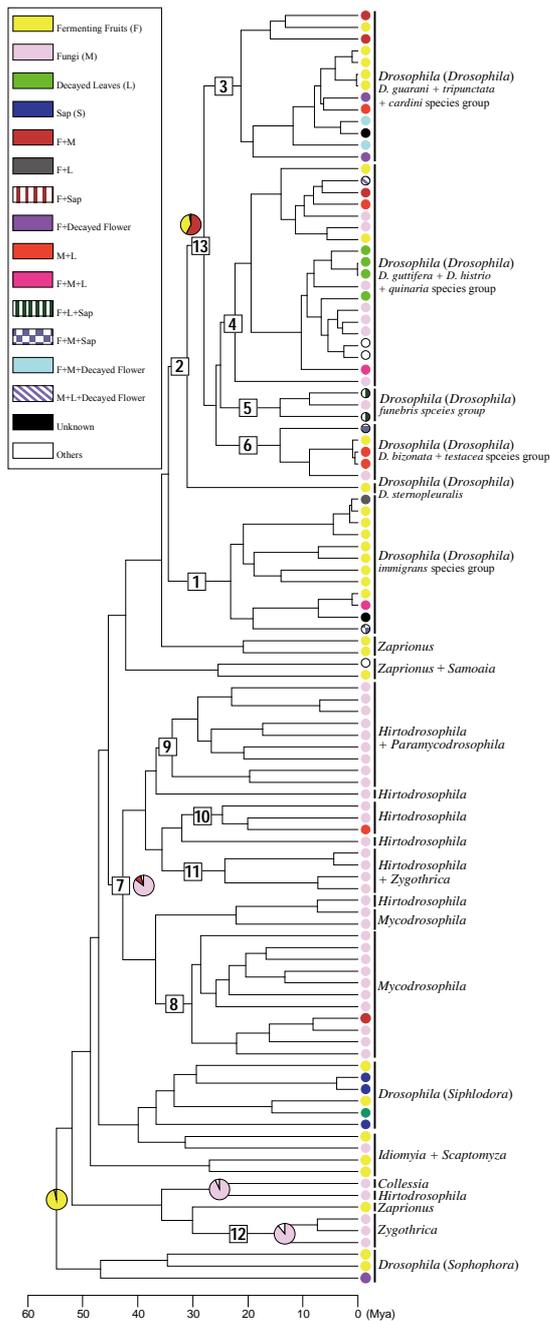


図2 ショウジョウバエ亜属とその近縁属の分子系統樹。分岐上の円グラフは、祖先種が取りうる食性の確率

(3) シマショウジョウバエ亜属の系統関係

Sophophora 亜属とその関連分類群の系統関係を、53 遺伝子座の塩基配列データを用いて解析した。解析対象とした種は、*Sophophora* 亜属から 47 種、*Lordiphosa* 属から 5 種、そして *Hirtodrosophila duncani* および 2 新種であり、外群として *Drosophila* 属の他の亜属から 5 種を用いた。

作成された分子系統樹は非常に高い事後確率およびブートストラップ値を示し、系統

関係を論じる上で十分な信頼性を示した(図3)。*Lordiphosa* 属は、*Sophophora* 亜属内に位置づけられ、新世界熱帯の *saltans* および *willistoni* 種群の姉妹群であることが再確認された〔 〕。*Hirtodrosophila duncani* は、*Sophophora* + *Lordiphosa* クレードの姉妹群として位置づけられ、外部生殖器の形態も *Sophophora* 亜属の特徴を有していることが判明した。2 種の新種は、*Sophophora* 亜属内で新たな種群に相当する系統として位置づけられ、新種群(仮名“*longicruca*”種群)の構成種として記載される(仮名 *Drosophila* “*longicruca*”と *D. “setiscutellata”*) *melanogaster* 種群においては、新たな種亜群として、*majtoi* 亜群および *unipectinata* 亜群の存在が示された。また、いくつかの種亜群の非単系統性を解消するために、種亜群分類体系の改訂が必要であることが示された。

本研究の結果は、*Sophophora* 亜属が、これまで別の属に含まれると考えられてきた系統群や新たに発見されたグループを含む、形態的に多様な大きな分類群であることを示し、分類学的な再検討が必要であると同時に、モデル生物であるキロショウジョウバエを含んで多様な生命現象の進化的研究材料として、ますますその価値が高まったことを意味している。

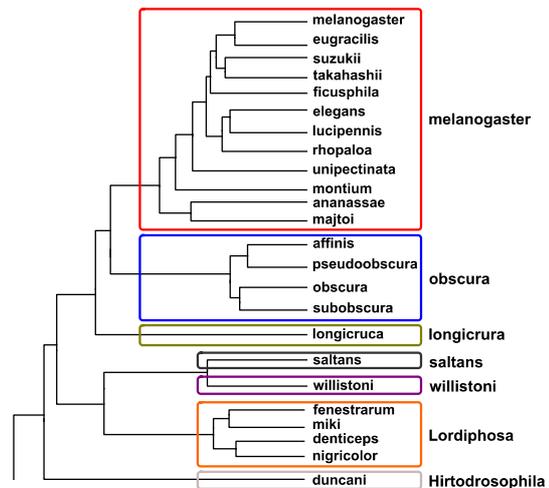


図3 シマショウジョウバエ亜属とその関連分類群の分子系統樹

< 引用文献 >

- Drosophila 12 Genomes Consortium (2007) Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature*, 450, 203–218.
- O’Grady, P. M. & DeSalle, R. (2008) Out of Hawaii: the origin and biogeography of the genus *Scaptomyza* (Diptera: Drosophilidae). *Biology Letters*, 4, 195–199.
- van der Linde, K., Houle, D., Spicer, G. S. & Stepan, S. J. (2010) A supermatrix-based molecular phylogeny of the family Drosophilidae. *Genetics Research*, Cambridge, 92, 25–38.

Gao, J.-j., Hu, Y.-g., Toda, M. J., Katoh, T. & Tamura, K. (2011) Phylogenetic relationships between *Sophophora* and *Lordiphosa*, with proposition of a hypothesis on the vicariant divergences of tropical lineages between the Old and New Worlds in the family Drosophilidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 60, 98-107.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計14件)

Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 査読有, (in press), DOI:10.1093/molbev/msw054

Fu, Z., Toda, M. J., Li, N.-n., Zhang, Y.-p. & Gao, J.-j. A new genus of anthophilous drosophilids, *Impatiophila* (Diptera, Drosophilidae): morphology, DNA barcoding and molecular phylogeny, with descriptions of thirty-nine new species. *Zootaxa*, 査読有, 2016, (in press).

戸田正憲 ゲノム配列を利用した網羅的系統解析とこれからの分類学. *Panmixia*, 査読無, 18号, 2015, pp.18-24.

Filipski, A., Tamura, K., Billing-Ross, P., Murillo, O. & Kumar, S. Phylogenetic placement of metagenomic reads using the minimum evolution principle. *BMC Genomics*, 査読有, Vol.16, 2015, S13, DOI:10.1186/1471-2164-16-S1-S13

Filipski, A., Murillo, O., Freydenzon, A., Tamura, K. & Kumar, S. Prospects for building large timetrees using molecular data with incomplete gene coverage among species. *Molecular Biology and Evolution*, 査読有, Vol.31, 2014, pp.2542-2550, DOI: 10.1093/molbev/msu200

Fartyal, R. S., Gao, J.-j., Toda, M. J., Hu, Y.-g., Takenaka Takano, K., Suwito, A., Katoh, T., Takigahira, T. & Yin, J.-t. *Colocasiomyia* (Diptera: Drosophilidae) revised phylogenetically, with a new species group having peculiar life cycles on monstroid (Araceae) host plants. *Systematic Entomology*, 査読有, Vol.38, 2013, pp.763-782, DOI:10.1111/syen.12027

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 査読有, Vol.30, 2013, pp.2725-2729, DOI:10.1093/molbev/mst197

Chen, C. C., Watada, M., Miyake, H., Katoh, T. K., Sun, Z., Li, Y. F., Ritchie, M. G. & Wen, S. Y. Courtship patterns in the *Drosophila montium* species subgroup: repeated loss of precopulatory courtship?

Zoological Science, 査読有, Vol.30, 2013, pp.1056-1062, DOI:10.2108/zsj.30.1056

Tamura, K., Battistuzzi, F. U., Billing-Ross, P., Murillo, O., Filipski, A. & Kumar, S. Estimating divergence times in large molecular phylogenies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 査読有, Vol.109, 2012, pp.19333-19338, DOI:10.1073/pnas.1213199109

〔学会発表〕(計26件)

加藤雄大, *Sophophora* 亜属およびその関連分類群における 50 遺伝子を用いた分子系統学的研究. 日本遺伝学会第 87 回大会, 2015 年 9 月 25 日, 東北大学(宮城県・仙台市)

田村浩一郎, 次世代データの系統解析 New Technology - プロローグ: 次世代系統解析の問題と課題 -. 日本進化学会第 17 回大会, 2015 年 8 月 23 日, 中央大学(東京都・文京区)

福田洋之, 菌食性ショウジョウバエの系統関係と菌食性の起源の推定. 日本進化学会第 17 回大会, 2015 年 8 月 20 日, 中央大学(東京都・文京区)

Seto, Y. Evolution of the *immigrans* species group revealed by using big sequence data. SMBE 2015, 13 July 2015, Vienna (Austria)

加藤徹, *Scaptomyza* 属ショウジョウバエの系統進化. 日本昆虫学会第 74 回大会, 2014 年 9 月 15 日, 広島大学(広島県・東広島市)

戸田正憲, ゲノム配列を利用した網羅的系統解析とこれからの分類学. 日本昆虫学会第 73 回大会, 2013 年 9 月 15 日, 北海道大学(北海道・札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸田 正憲 (TODA, Masanori)
北海道大学・総合博物館・資料部研究員
研究者番号: 4 0 1 1 3 5 9 2

(2) 研究分担者

和多田 正義 (WATADA, Masayoshi)
愛媛大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 0 0 2 1 0 8 8 1

田村 浩一郎 (TAMURA, Koichiro)
首都大学東京・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 0 0 2 5 4 1 4 4

加藤 徹 (KATOH, Toru)
北海道大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号: 8 0 3 7 4 1 9 8