様 式 C－19、F－19－1、Z－19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：９４４０４
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2019
課題番号：１６Ｋ０７４７１

研究課題名（和文）ゲノム規模データによる節足動物の系統進化の解明

研究課題名（英文）Study on phylogeny and evolution of arthropods based on transcriptome sequence data

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・主任研究員

研究者番号：４０３９６２２１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000円

研究成果の概要（和文）：節足動物門は鋏角亜門、多足亜門、甲殻亜門と六脚亜門（昆虫類）を含む。本研究はゲノム規模な核タンパク遺伝子のアミノ酸配列を用いて、節足動物の系統関係の解明を行った。その結果、鋏角亜門が最初に分岐し、大顎類（多足亜門+甲殻亜門+六脚亜門）の単系統性が確認された。また、甲殻亜門と六脚亜門が近縁で、ムカデエビが六脚亜門に最も近縁な甲殻類であることが示された。ウミグモ綱を含めた鋏角亜門の単系統性が強く支持された。多足亜門においては、コムカデ綱とエダヒゲムシ綱、ヤスデ綱とムカデ綱がそれぞれ姉妹群である新知見が得られた。また、多足亜門の目レベルの系統関係が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究は節足動物の系統関係における多くの難問を明らかにした。その成果は節足動物の起源、陸上進出や様々な環境への適応などの形態的・機能的進化プロセスの理解に大きく寄与する。
　節足動物は地球上最も多様化した動物群である。その節足動物の系統進化に対する理解を深めることによって、節足動物がなぜ、どのようにしてこれほどの多様化を遂げてきたのか、その根本的な原因を見出すことが期待される。これは我々人間の進化や人間社会の発展に対する理解にもヒントを与えることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The phylum Arthropoda includes four subphyla, namely Chelicerata, Myripoda, Crustacea and Hexapoda (insects). In this study, the phylogenetic relationships of arthropods are analyzed using amino acid sequences of transcriptome sequence data. As a result, the Chelicerata is first branched, supporting the monophyly of the Mandibulata (Myripoda + Crustacea + Hexapod). The results also show that the Crustacea and Hexapod are closely related, and the class Remipedia is the closest crustacean to the Hexapod. The monophyly of Chelicerata including the sea spider (Pycnogonida) is supported. As for the four classes of the Myriapoda, the Symphyla and Pauropoda, the Chilopoda and Diplopoda are sister groups, respectively, and the monophyly of the Chilopoda and Diplopoda is supported. In addition, the phylogenetic relationships at the ordinal level in the Chilopoda and Diplopoda are clearly resolved.

研究分野：昆虫の系統進化・種分化および植物との共生・共進化

キーワード：節足動物　多足亜門　甲殻亜門　六脚亜門　トランスクリプトーム　分子系統　進化

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

節足動物門は、現在鋏角亜門、多足亜門、甲殻亜門と六脚亜門（広義の昆虫類）の４亜門に分類されている。従来、六脚類は多足類から分岐したとされてきたが、近年の分子系統学の研究で、六脚類と甲殻類との近縁関係が判明した。それによって、六脚類と多足類の陸上進出や、陸上生活に必要な気管系の獲得進化は、両群において独立に起きたことが明らかになった。しかし、節足動物の系統進化と形態・機能進化を理解するために、下記のようにまだ多くの問題の解明が待たれる。① 鋏角亜門が先に分岐するか、それとも鋏角亜門と多足亜門が姉妹群になるのか？ ②ウミグモは現生の節足動物の最も祖先的な系統なのか、それとも鋏角亜門は単系統を形成するのか？　③多足類の綱・目レベルの系統関係について不明な点が多いため、多足類の体節増加や変態様式の進化過程は明らかではない。④六脚類に最も近縁な甲殻類は鰓脚類か、ムカデエビか、それともカシラエビなのか？　⑤六脚類の初期進化（内顎類昆虫の系統関係）。⑥有翅昆虫類は本当に単一起源なのか？分子系統からの強い支持が得られていない。

生物の進化と多様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のは冒頭にも述べたが、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、これまでに六脚類と多足類の系統進化の研究を行ってきた。３つの核タンパク遺伝子（RPB1, RPB2, DPD1）を用いた六脚類の系統解析では、これまでに長く論争していたいくつかの難問を明らかにし、新しい事実も判明した。また、多足類の解析では、コムカデ綱が最初に分岐した多足類の系統で、その分岐はカンブリア紀の初期に遡ることを明らかにした。これらの成果をもとに、本研究は節足動物門全体の系統進化における様々な問題に取り組む。

我々がこれまでに使用してきた３つの核タンパク遺伝子は六脚類と多足類の系統進化の問題の解決に大きく貢献したが、完全解明には至らなかった。2014 年に大規模な遺伝子を用いた六脚類の系統解析の研究が報告され、六脚類の系統関係については、上記に述べた問題以外はほぼ明らかになった。しかし、六脚類以外の節足動物の系統進化に関しては、上記に述べた問題の他にもまだ不明なところが多い。

２．研究の目的

（１）節足動物は地球上最も多様化した動物群で、種数において全動物種の８割以上を占めている。これほど多様化した動物群の系統関係を解明するのは極めて困難な作業であり、これまでに多くの研究が行われてきたにもかかわらず、まだ不明なところが多い。主な理由は分子情報量の不足だと考えられる。本研究は、背景に述べた主要な問題を解決するために必要な分類群を用いて、公開された塩基配列データを活用しながら、必要に応じて自らトランスクリプトーム配列を決定し、ゲノム規模の大量の核タンパク遺伝子を用いて系統解析を行い、それらの分類群間の系統関係を明らかにする。

（２）節足動物は種の数が多いだけではなく、形態と機能的多様性にも富んでいる。系統関係が明らかになったことによって、形態・機能的進化の考察がはじめ可能である。本研究で明らかにした節足動物の系統関係に基づいて、節足動物の系統進化の過程において形態・機能の獲得と進化について考察を行う。

３．研究の方法

（１）研究材料の選定と収集：信頼性の高い系統樹を得るために、各必要な分類群から複数種のサンプルが望ましい。また、それら複数のサンプルはなるべく分類学的に離れているものがよい。このことを考慮したうえ、問題解決に必要な分類群を選んで研究を進めた。最終的に示した 53 種の節足動物を用いた。

（２）研究の方法：本研究を遂行するにあたって、まず公開された配列データの活用を考え、必要に応じて材料を収集し、そのトランスクリプトームの配列を決定した。RNA 抽出は全固体または一部の組織から Isogen (Nippon gene) を用いて行い、ライブラリーの作製は TruSeq RNA Library Prep Kit (Illumina) を用いた。塩基配列の決定は MiSeq を用いて行った。配列データのアセンブルは CLC Genomics Workbench (Filgen) を用い、オーソログ遺伝子の抽出は HaMStR を使用した。得られたオーソログ遺伝子ごとに MAFFT を使ってアライメントした後、Gblocks を使用して系統解析に不適な配列を除去した。その後、各遺伝子座のアライメントを連結し、スーパーアライメントを作成して最尤法とベーズ法で系統解析を行った。

4．研究成果

（1）配列データ情報：最終的に系統解析に使用した生物種は、鋏角亜門 5 種、多足亜門 18 種、甲殻亜門 13 種と六脚亜門 17 種で、外群 2 種を含めて合計 55 種であった。そのうち、本研究でトランスクリプトーム配列を決定したのは甲殻亜門 10 種、多足亜門 10 種、鋏角亜門 3 種である。そのほかはデータベースに公開された配列データをダウンロードしたもので、オオヒメグモの配列データは当研究施設の細胞・発生・進化研究室より頂いた。

ゲノム配列が決定された６種の生物種から作成されたオーソログ遺伝子のコアセット insecta_hmmer3_2 (1579 遺伝子座)を参考配列に HaMStR を用いて、本研究で得られた配列データのコーティング群に含まれるオーソログ遺伝子を検索した結果、各種から得られたオーソログ遺伝子数は以下の通りである。1248-1299 が 5 種、1302 と 1392 が 1 種ずつで、その他は全て 1400 以上であり、遺伝子のミッシングはその７種を除いて全部 10%以下であった。

系統解析を行うにあたって、3つのスーパーアライメントデータセットを作成した。それぞれは節足動物門の亜門と綱レベルの系統関係の解明に焦点を与えたもの（データセット１）、昆虫の起源と汎甲殻類の系統関係の解明を主要な目的としたもの（データセット２）と、多足亜門のヤスデ綱とムカデ綱の目レベルの系統関係を解明するためのもの（データセット３）である。３つのデータセットの遺伝子座数とアミノ酸サイト数は以下の通りである。データセット１：遺伝子座 1030-1369、アミノ酸サイト 148603-294715（以下同様）；データセット２：1236-1463、227444-345844；データセット３：1074-1383、162963-320883。

（2）節足動物の系統関係：すでに述べたように、節足動物の高次分類群間の系統関係は、これまでに多くの研究が行われてきたが、まだ多くの問題が残っている。最近の大量遺伝子情報による系統解析の研究は、系統進化の難問の解明に大きく貢献しているが、主な問題点としてデータセットに不適切な遺伝子が含まれることで、データセットによって異なる結果が得られることがある。本研究は、不適切な分子情報を除去したうえ、異なるサンプルによる複数のデータセットを作成し予備解析を行い、LBA をもたらす可能性がある配列データの除去を行い、大量遺伝子による系統解析の問題点の克服に努めた。このように作成したデータセットを用いて系統解析を行った結果、節足動物の系統関係については以下の成果が得られた（図１）。

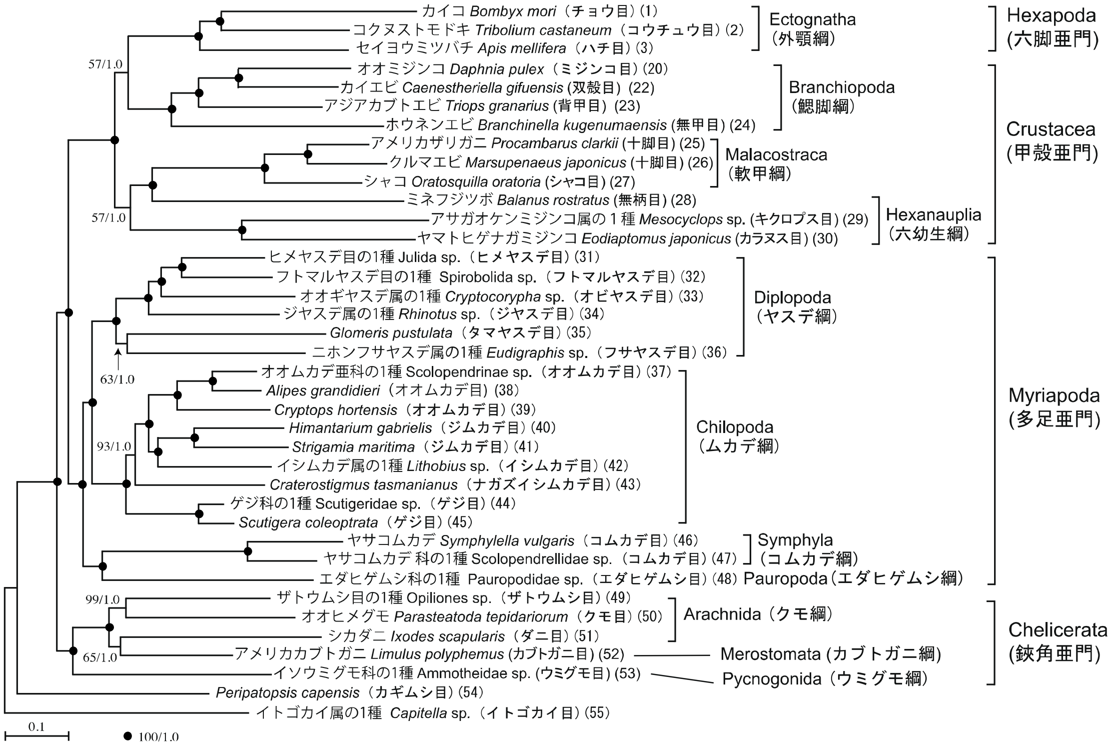

図１．データセット１を用いて作成した節足動物の系統樹。樹形は最尤法によるもの。分岐点に最尤法のブートストラップ値とベーズ解析の事後確率を示している。以降の系統樹は同様である。

① 鋏角亜門は単系統群である。これまでの研究では、ウミウモ綱の系統的位置について定説がなく、真鋏角類（カブトガニ綱+クモ綱）と姉妹群にならず、節足動物全体の外群に位置することも示唆されていた。しかし、本研究の結果では、鋏角亜門の単系統性が強く支

持された。一方、クモ綱は単系統性支持が得られず、カブトガニ綱に対して側系統であることが示唆された。② 鋏角亜門は節足動物において最初に分岐した。現世の節足動物の４亜門の関係について、従来多足類と甲殻類、六脚類が近縁と考え、大顎亜門に分類された。しかし、近年の分子系統の研究では、多くは従来の説を支持しているが、一部の研究結果は多足亜門と鋏角亜門の姉妹関係が示唆されていた。本研究では、従来の説を強く支持する結果が得られた。③ 鋏角亜門、多足亜門と汎甲殻類がそれぞれ単系統群であることが強く支持された。

（３）汎甲殻類の系統関係と昆虫の起源：近年の分子系統の研究によって、六脚類と甲殻類の近縁性が確認され、両群を汎甲殻類として分類された。また、甲殻類は側系統群であり、六脚類は単系統群であることも明らかになっている。本研究の結果もこれらのことを支持した。一方、六脚類に最も近縁な甲殻類が何かについては、主として３つの説が出されている。それは鰓脚類説、ムカデエビ類説、ムカデエビ類・カシラエビ類説である。大規模配列データによる解析では、主に後者の２説のどちらかを支持している。本研究の結果では、カシラエビの系統的位置は不安定であり、最尤系統樹では汎甲殻類全体の外群となり、ベーズ解析ではムカデエビと組んで（事後確率 1.00)、六脚類の姉妹群となる。一方、鰓脚類は軟甲類、六幼生類とグループを形成している（図２）。従って、本研究の結果からは、鰓脚類説が否定され、後者２説に対してまだ結論することはできないが、ムカデエビが六脚類に最も近縁であることは強く支持された。

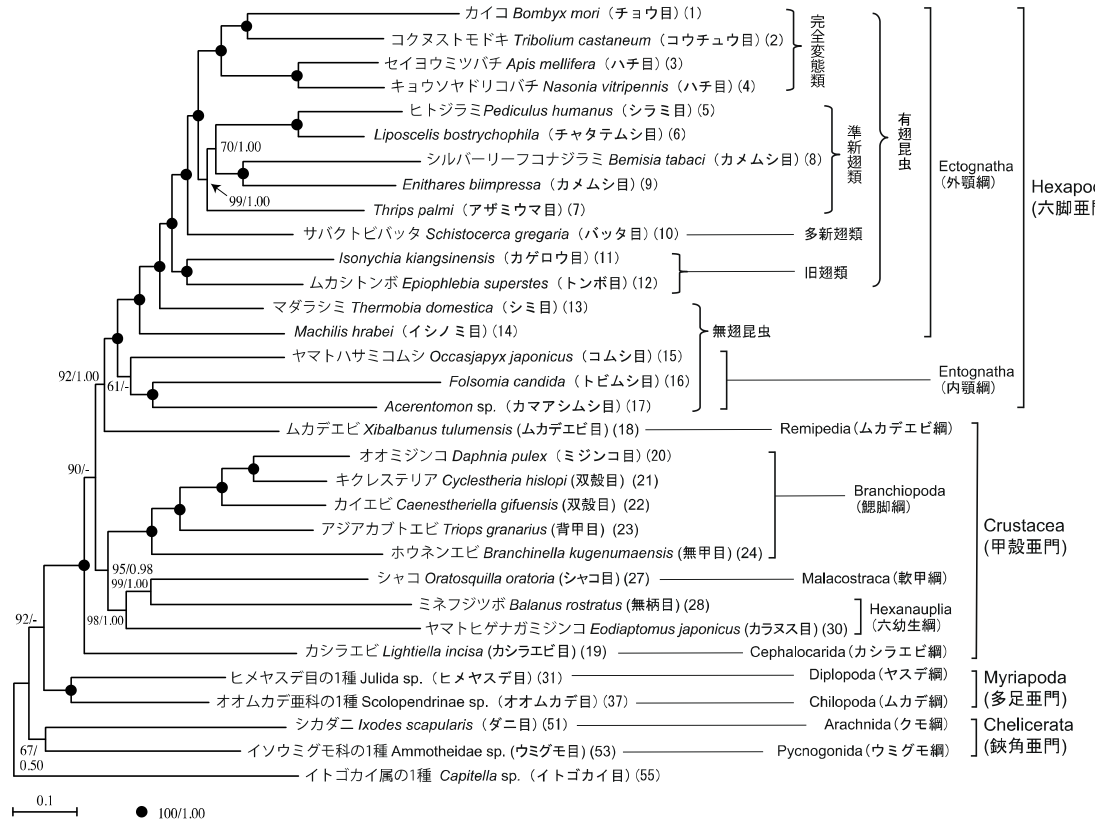

図２．データセット２を用いて作成した汎甲殻類の系統樹。ベーズ解析の樹形が異なる分岐点の事後確率は “–” で表示している。

（４）六脚亜門の系統関係：六脚類（昆虫類）は、節足動物門において最も多様化した分類群で、全動物においても７割ほどの種数を占めている。この顕著な種多様性が六脚類の系統関係の解明を困難にもしている。しかし、近年の大規模分子データによる研究は多くの難問を解明してきた。本研究の結果は基本的にこれまでの知見を支持しているが、カメムシなどの準新翅類が単系統群であることは、分子系統解析では初めて支持された（図２）。近年の研究では準新翅類は側系統群であり、完全変態類は準新翅類の一系統から発生したことが示唆されている。この結果によって、完全変態類の起源について見直す必要が出てきた。また、有翅昆虫類が単系統群であることが強く支持されたため、昆虫の翅の獲得進化は一回のみであることが明らかになった。内顎綱の系統関係については、コムシ目が外顎綱に近縁であることを示唆する研究は少なくない。本研究でもベーズ解析の結果はそれ

を支持しているが、事後確率は低い（0.5）。一方、最優系統樹では内顎綱の単系統性が示唆され、コムシ目の系統的位置は依然結論が待たれる。

（５）多足亜門の系統関係：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綱に分類されている。これらの４綱の系統関係については、これまでに主として３つの説が出されている。それは、①Progoneata-Dignatha 説（ムカデ綱,（コムカデ綱,（エダヒゲムシ綱, ヤスデ綱)））；②Trignatha-Dignaha 説（(ムカデ綱, コムカデ綱),（エダヒゲムシ綱, ヤスデ綱)）；③Progoneata-Edafopoda 説（ムカデ綱,（ヤスデ綱,（エダヒゲムシ綱, コムカデ綱)））である。本研究の結果では、ムカデ綱とヤスデ綱、コムカデ綱とエダヒゲムシ綱がそれぞれ姉妹群になることが強く支持される（図１）。この系統関係はこれまでに示唆されたことがなく、多足類の系統進化における新しい説として提唱したい。今後の課題としてはこの系統関係を支持する形態的知見を見出すことである。ムカデ綱とヤスデ綱に含まれる全ての目が本研究の解析に使用しており、両綱の単系統性の信頼性は高く、目レベルの系統関係も明らかになった（図１、図３）。

多足類の形態的特徴において特に注目したいのは変態様式である。その変態様式には増節変態と整形変態があり、増節変態はさらに半増節変態、真増節変態と完増節変態がある。ムカデ綱のジムカデ目とオオムカデ目は整形変態をするが、その他の多足類全ては増節変態を行う。しかし、本研究の結果では、そのジムカデ目とオオムカデ目が姉妹群を形成せず、整形変態という変態様式は単一起源ではなく、独立に進化した可能性が示唆された。多足類の変態様式の進化について、Miyazawa et al. (2014) は半増節変態が祖先的な変態様式であり、真増節変態が異なる系統で独立に進化したことを指摘している。

本研究の研究成果の一部である甲殻類の系統進化に関する論文は現在投稿中で、それ以外の成果も順次公表する予定である。

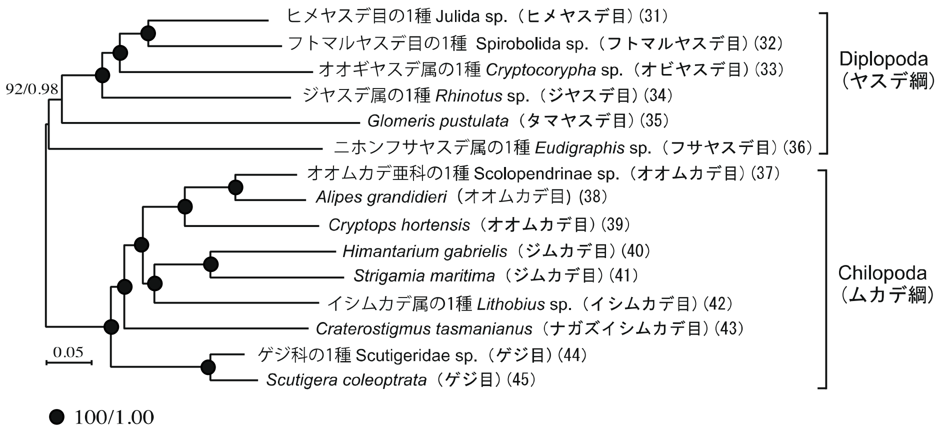

図３．データセット３を用いて作成したムカデ類とヤスデ類の系統樹。

＜引用文献＞

① Ishiwata K., Sasaki G., Ogawa G., Miyata T., Su Z.-H. Phylogenetic relationships among insect orders based on three nuclear protein-coding gene sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 58, 2011, 169–180.
② Sasaki, G., Ishiwata, K., Machida, R., Miyata, T., Su, Z.-H. Molecular phylogenetic analyses support the monophyly of Hexapoda and suggest the paraphyly of Entognatha. BMC Evol. Biol. 13, 2013, 236.
③ Miyazawa, H., Ueda, C., Yahata, K., Su, Z.-H. Molecular phylogeny of Myriapoda provides insights into evolutionary patterns of the mode in post-embryonic development. Sci. Rep. 4, 2014, 4127.
④ Giribet, G., Edgecombe, G. D. The Phylogeny and Evolutionary History of Arthropods. Curr. Biol. 29, 2019, R592-R602.
⑤ Fernández, R., Edgecombe, G. D., Giribet, G. Phylogenomics illuminates the backbone of the Myriapoda Tree of Life and reconciles morphological and molecular phylogenies. Sci. Rep. 8, 2018, 83.
⑥ Regier, J.C., Shultz, J.W., Zwick, A., Hussey, A., Ball, B., Wetzer, R., Martin, J.W., Cunningham, C.W. Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. Nature 463, 2010, 1079–1083.
⑦ Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R.S., Donath, A., Mayer, C., Frandsen, P.B., Ware, J., Flouri, T., Beutel, R.G., et al. Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. Science 346, 2014, 763–767.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　0件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名	４．巻
蘇　智慧	51
２．論文標題	５．発行年
３つの核タンパク遺伝子から解き明かした昆虫類の高次分類群間の系統関係	2016年
３．雑誌名	６．最初と最後の頁
昆虫と自然	22-24

掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
なし	無
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	－

〔学会発表〕　計3件（うち招待講演　2件／うち国際学会　1件）

１．発表者名
Miyazawa, H., Sasaki, G. and Su, Z.-H.
２．発表標題
Molecular phylogeny and evolution of two soil arthropod groups, Myriapoda and Apterygota (Hexapoda)
３．学会等名
The XVII International Colloquium on Soil Zoology（招待講演）（国際学会）
４．発表年
2016年

１．発表者名
和智仲是、南紘彰、蘇　智慧
２．発表標題
トランスクリプトーム情報を用いて推定した多足亜門の系統関係
３．学会等名
日本進化学会第18回大会
４．発表年
2016年

１．発表者名
蘇　智慧
２．発表標題
昆虫の進化と共生
３．学会等名
日本蚕糸学会第９０回大会（招待講演）
４．発表年
2020年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考