

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006年度～2008年度
 課題番号：18370095
 研究課題名（和文）地質学情報と遺伝情報の比較解析に基づく生物進化史の解明
 研究課題名（英文）Estimation of species divergence times based on vicariant speciations
 研究代表者
 渡邊 日出海（WATANABE HIDEMI）
 北海道大学・大学院情報科学研究科・教授
 研究者番号：30322754

研究成果の概要：生物種の分岐年代を高精度で推定するために、従来広く利用されてきた化石試料には依存しない方法を新たに開発した。本方法では、生物学とは独立に年代が詳しく調べられている地殻変動イベントとそれによって引き起こされたと考えられる種分化を基準とする。これにより、化石試料に伴う大きな曖昧さを回避し、化石を得ることが困難な系統についても現生生物のDNAを用いて種分岐年代を正確に求めることができるようになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2007年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	8,600,000	2,580,000	11,180,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：比較ゲノム

1. 研究開始当初の背景

分子系統解析によって種分岐年代を推定するには、分子系統解析とは独立に得られる基準分岐年代情報が必要になる。例えば、図1の例で、基準分岐年代 td_0 の情報が与えられている場合に、種 S_{11} と S_{12} の間の種分岐年代 td_1 を推定するために、 td_0 と、種 S_{11} 、 S_{12} 、 S_2 および、図には無い適当な外群生物それぞれから得られる塩基配列またはアミノ酸配列の間の分子系統樹（枝長）を用いる。従来、この基準分岐年代 td_0 を得るために、主に、

化石試料に基づく情報が用いられてきた。例えば、特定の生物系統 L_2 を特徴づける形質 c_2 を有する化石生物 F が知られている場合、その化石生物 F は L_2 に属する祖先型生物であると推定される。また、化石生物 F やそれが得られた地層を基に F が存在した年代 (t_F) を推定し、 L_2 を特徴づける形質 c_2 の発生時期 tc_2 が t_F よりも前であることを知ることが出来る。

このような年代情報は、基準となる種分岐年代の情報としては不十分である。何故なら、

実際に知るべき年代は、 td_0 であって、 tc_2 ではないからである。 tc_2 が td_0 から十分に離れている場合は、この tc_2 は td_0 の推定にほとんど寄与し得ないが、 tc_2 が td_0 から

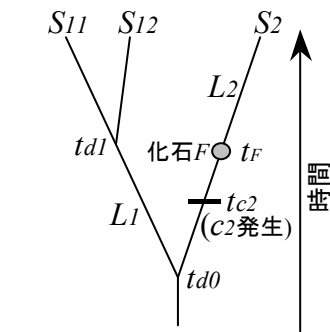


図 1. 種の系統関係とキャリブレーション

どの程度離れているかは、他の情報が得られない限り知りようが無い。これは、たとえ化石の年代推定自体が極めて高い精度を持っていても（実際には高精度での推定は難しい）、化石試料の分析に依存する基準分岐年代の情報には本質的に大きな曖昧さ・誤差が内在していることを意味する。

上では、化石 F が系統 L_2 を特徴づける形質 c_2 を有するとして説明したが、化石 F が持つ表現形質が c_2 に一致しているかどうかの判定にも誤りが伴う。また、 c_2 が L_2 のみで派生的に発生したものであり、過去のいかなる時点においても他の系統と共有していたことも無ければ、他の系統で一度も現れたことが無いことを完全に証明することは通常不可能である。したがって、化石の特徴を基にした解析自体にも大きな曖昧さが伴う。加えて、化石試料は特定の系統でしか得られておらず、また、化石が得られる年代も偏っている（不完全）という問題も存在する。

さらに、基準分岐年代はごく一部の系統（間）でしか推定されていないため、それらから離れた系統についての種分岐年代を推定する場合に、基準となる分岐年代からかなり離れた年代への外挿あるいは内挿を行わざるを得ない状況が生じる。そのような解析においては、基準となる年代自体に含まれている大きな曖昧さと誤差がさらに増幅し、大きな絶対誤差を与えてしまう場合がある。また、得られている特定の化石試料が少ない場合、基準分岐年代の推定値に大きな統計的ばらつきを伴うことになる。

このような様々な問題を伴ってはいるものの、他に利用できる情報源が無いために、化石試料に基づく基準分岐年代を用いた分子系統解析が広く行われている。しかし、基準分岐年代の誤差の大きさやそのような情報に頼る解析手法と解析結果の解釈に対する批判が根強くあり、解析結果の見直しや結果の妥当性などについての議論が絶えない。

2. 研究の目的

本研究課題では、従来用いられている基準分岐年代に伴う曖昧さの問題を解決することを目的として、化石試料に頼らない方法によって基準分岐年代を得ることを目指す。本研究課題の最大の特徴・独創的な点は、生物種分岐の直接的原因となった地殻変動に着目し、地質学的・地球物理学的手法によって推定された地殻変動の年代を種分岐年代とみなすことによって、正確な基準分岐年代を得る点にある。異なる系統において同じ時期に種分岐が起きていることを統計学的に示すことにより、それらの系統における種分岐が同じ地殻変動によって引き起こされたことを明らかにする点が方法論上の特徴となる。本方法を用いることにより、様々な系統に対して基準分岐年代を与えることができる。

3. 研究の方法

これまでに最も詳細に調べられている大規模地殻変動の一つであるアフリカ大陸と南アメリカ大陸の分離（ゴンドワナ大陸の分断）に着目した。この地殻変動の特徴として、(1)南大西洋中央海嶺におけるマグマの湧き出しと東西への地殻の移動という比較的単純で単一の原因によって引き起こされていると見做せること、(2)分断の境界が長く、かつ、単純な地形であり、分断後に連結しておらず、複雑な分断過程を仮定しなくていいこと、(3)地質学的調査によりアフリカと南アメリカの大西洋岸の間で分断前に同一地点であった場所同士の対応付けができていないこと、(4)他の地域と異なりゴンドワナ大陸の分断が始まった当時から現在に至るまで緯度がほとんど変わっておらず大きな環境変化を仮定する必要が無いこと、(5)分断が赤道近傍から高緯度にわたっているため、多様な生物系統での種分化にかかわっていると考えられること、(6)大西洋という陸域とは明確に異なる環境によって両大陸が隔てられていること、などを挙げる事ができる。

本研究においては、大陸の分断後に大陸間で行き来した可能性のある生物系統は解析対象から外す必要がある。たとえば、鳥類や種子植物の多くは長距離を移動する可能性が高く、また、爬虫類は耐乾燥性が高いものが多く、海流に乗って長距離を移動する可能性がある。同様に昆虫のような小動物も集団で流木などに乗って移動できる。実際、海底火山の活動によって大洋中に生じた島に植物、鳥類、爬虫類、昆虫が生息している場合が少なくない。

そこで、これまでの生態学的調査によって長距離を移動した歴史を持つことが明らかにされている非海洋性生物系統を収集したところ、両生類と淡水魚以外は長距離を移動する可能性があることがわかった。両生類については、これまでの研究により、単純な生物地理学的説明が困難な地理的分布を示すものが少なからず存在していることが指摘されている。

そこで、本研究においては、生物分類上、目または科のレベルまで第一次または第二次淡水魚で占められている分類群（カダヤシ、ハイギョ、アロワナ、シクリッド、カラシン、ナマズ）に属する魚類のうちから、アフリカ大陸と南アメリカ大陸の大西洋岸（特に本研究においては、ナイジェリア～ガーナにかけての地域とブラジル東部地域）に生息する在来・固有淡水魚の天然採集された生体から DNA を抽出し、塩基配列決定後に分子系統解析を行った。

分子系統解析の対象ゲノム領域は、これまでにゲノム配列が決められている 4 種の条鰭類、ゼブラフィッシュ、メダカ、イトヨ、フグ、および、ヒトのゲノムデータを調べ、いずれのゲノムでも重複が無く、かつ、連続した CDS 領域で 500bp 以上（短いイントロンを含む場合を含む）が 5 種間で十分に保存しており、分子系統関係が種の系統関係と矛盾しない遺伝子とした。それらの遺伝子は、条鰭類から四肢動物までを含む系統、すなわち、硬骨魚綱において PCR が可能な構造を持つ可能性が高いものである。さらに、対応領域の外群情報を得るために、同じプライマを用いてアカエイからの DNA 抽出と配列決定も試みた。

得られた非重複保存領域の塩基配列をアラインし、まず、同じ大陸分断による種分化が異なる系統で起きていることを統計学的に確認した。次に、University College London の Ziheng Yang が作成した PAML とノースカロライナ州立大学の Jeffrey L. Thorne が作った *multidivtime* を用いて分岐年代の推定を行った。

4. 研究成果

(1) 研究材料の収集とゲノム塩基配列の決定

研究期間中に計 69 種以上の西アフリカ産および新大陸産の天然採集在来・固有淡水魚の生体を収集した。貴重な種も少なからず含まれるため、生体を可能な限り研究室で飼育している。飼育環境などの情報は、FishBase という国際プロジェクトによって維持管理されているデータベースから取得している。

飼育環境は、主に札幌市内の熱帯魚屋から中古の水槽、砂、エアレーション装置、ふたなどを格安で入手し、不足する分を新規に購入してそろえた。死んだ個体は写真撮影の後に直ちに -80℃ で冷凍して保存している。

ほとんどの種では、背びれの一部を切除し DNA 抽出を行い、下記の領域について PCR とダイレクトシーケンシングで塩基配列決定を行った。本研究において新規に決定し、実際に研究に用いた塩基配列は、計 122 配列およそ 100kbp である。

(2) 四肢動物を含む硬骨魚類の分子系統解析のための遺伝子セットの構築

ゲノム解読の終了している硬骨魚 4 種（ゼブラフィッシュ、イトヨ、メダカ、トラフグ）およびヒトの核ゲノムの塩基配列に対する計算機上での比較ゲノム解析を通して、500 塩基以上の長さを持つコーディング（CDS）領域のうち、長いイントロンによって分断されず、5 生物種間で重複せずに存在している領域を探し、54 個の異なる遺伝子中に条件を満たす領域を見出した。核ゲノム内非重複領域を対象とすることで、複雑な進化過程を考慮する必要がなくなり、その結果、様々な生物系統での分子系統解析を曖昧さのない形で実施することが可能となる。

54 個の非重複保存 CDS 領域毎に上記 5 種間で塩基配列アラインメントを作成し、PCR 用プライマを設計し、実際に解析に用いる魚類で意図する領域が増幅するかどうかを確認し、1 領域のみが期待される長さで増幅することが確認できなかった場合は、改めて設計しなおすか、領域の使用をあきらめるかの選択を行った。

(3) 大陸分断に起因する種分化の同定

アフリカ、南アメリカ両大陸の最終分断地点（それぞれブラジル東部とナイジェリア～ガーナにかけての地域とされている）付近に生息している地域固有野生個体およびアウトグループとして軟骨魚類のアカエイ 1 種を用い、DNA 抽出と上記非重複保存 CDS 領域の配列決定を行い、得られた塩基配列を用いて分子系統解析を行った。まず実験により、上記魚体から DNA を抽出し、非重複保存 CDS 54 個のうちで最も保存度が高く、PCR プライマの設計に成功した 9 領域について塩基配列を独自に決定した。その中で下の解析に用いたものは、アフリカ大陸と南アメリカ大陸に生息する 3 科 14 種とアカエイから得られた配列データである（122 配列、計約 100kbp）。これらの配列を用いて分子系統解

析および統計解析を行った結果、シクリッド科とカダヤシ科の2科における種分化イベントの同時性が支持された。異なる系統における種分化イベントは一般に独立に、すなわち、異なる時期に起こることが期待されるため、この一致は、共通単一原因による種分化を強く示唆し、その原因としてゴンドワナ大陸の分断による地理的隔離がもっともらしいものと推定された。

(4)大陸分断の年代情報に基づく種分岐年代推定

上記の結果に基づき、シクリッド科とカダヤシ科における種分化イベントが、両大陸の完全な分断時期とされる 1.07~1.12 億年前 (Storey BC, *Nature*, 377:301-308, 1995) に起きたと仮定し、この年代をキャリブレーションとして用いることとした。

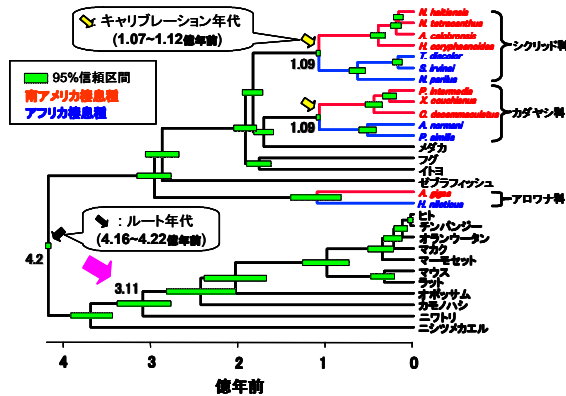


図 2. 脊椎動物間の推定種分岐年代

アカエイを外群として、脊椎動物 (計 29 種) 間の種分岐年代の推定を行った (図 2)。その結果、ヒトとニワトリの種分岐年代の推定値 (3.11 億年前、図中ピンクの矢印) が、本解析とは独立した情報に基づく推定値 (3.1 億年前) とよく一致することが確認できた。この年代は、S. Kumar と S.B. Hedges による研究 (*Nature*, 381:226-229, 1996; *Nature*, 392:917-920, 1998 等) をはじめとして、これまでに 500 編以上の論文においてキャリブレーションのために用いられており、その信頼性は極めて高いと考えられる。そのような推定値に本研究による推定値が一致したことは、化石記録の代わりに地殻変動イベントに着目して得られた本研究独自のキャリブレーションおよびそれを用いて推定された他の脊椎動物間の種分岐年代が、妥当なものであると考えることができる。

本研究によって開発された方法は、淡水魚以外の系統にも応用可能である。地理的隔離による種分化が異なる系統で同時に起きた

ことを統計的手法を用いて確認することにより、地殻変動イベントの年代をキャリブレーションに用いることを可能にする本方法は、様々な地殻変動イベントと生物種の選択を可能にし、多様な種分岐年代の推定精度を向上させることができる。

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)

[学会発表] (計 4 件)

①竹下和貴、小柳香奈子、渡邊日出海. 「地理的隔離を引き起こした大陸分断の年代情報に基づく種分岐年代の推定」日本進化学会第 10 回大会、OP3-02、東京大学、2008 年 8 月 22 日

②Hidemi Watanabe & Kazutaka Takeshita. Estimation of Species Divergence Times Based on Vicariant Speciations. The International Symposium on The Origin and Evolution of Natural Diversity, Sapporo, October 3, 2007.

③竹下和貴、小柳香奈子、渡邊日出海. 「地球科学的情報を用いた種分岐年代の推定」日本進化学会第 9 回大会、B14、京都、2007 年 9 月 1 日

④渡邊日出海、小柳香奈子、竹下和貴. 「地理的隔離による種分化に着目した基準分岐年代の取得」日本進化学会第 9 回大会、B14、京都、2007 年 8 月 31 日

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 日出海 (WATANABE HIDEMI)

北海道大学・大学院情報科学研究科・教授

研究者番号：30322754

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし