

## 自己評価報告書

平成 23 年 4 月 24 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

## 1. 研究計画の概要

ヤモリ下目は有鱗目トカゲ亜目の一系統で、1100種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。申請者らは、有鱗類ミトコンドリア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。本研究では、次世代シーケンシング技術を用いたミトコンドリアゲノミクスの研究手法を確立し、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。

## 2. 研究の進捗状況

マイヤーらがヒト mtDNA 既知配列の並列解読に用いた parallel tagged sequencing (PTS) 法を基礎にして、様々な条件検討を行い de novo mtDNA 塩基配列決定の手法として確立させることを目指した。

まず、ヤモリ類の標本から抽出した DNA を鋳型として、ミトコンドリアゲノムのほぼ全長に相当する配列の増幅を行うための系を確立した。続いて 10-20 種から得た Long PCR 産物を細断して末端修復後、種特異的なタグ配列を両末端に付与した。これらを正確に定量して等モルずつ混合し、Roche GS FLX 型次世代シーケンサを用いて、約 400bp の断片配列を 1 種あたり 1000 read 以上取得した。タグ配列ごとに得られた read をアセンブルさせ、mtDNA の全長配列を復元した。当初の Long PCR でカバーできなかった領域や、繰り返し配列のためにアセンブルができ

なかった領域は、短領域の PCR 増幅を別途行い配列決定した。

既に我々の研究室で mtDNA 全長配列を決定済みであった 4 種の爬虫類を用いて、この実験手法の妥当性を検証した。その結果、繰り返し配列のない領域では、ほぼ 100% の正確性で迅速に配列決定が行えることを確認した。ただし、1 種あたりの取得 read 数が 1000 read 以下の場合には、全体の配列が 1 つの contig に繋がらなかったり、エラーを拾ったりする可能性が高まることも分かった。

この実験系を用いて、様々なヤモリ類の系統の代表種から mtDNA 全長配列の決定を行い、これまでに 22 種の新規ミトゲノム配列についての情報を得た。この中にはコードされる遺伝子に配置変動や欠損が見られるケースもあった。予察的な分子系統解析を行った結果、ヤモリ類の中では、イシヤモリ類を含むヒレアシトカゲ科が最も初期に分岐し、続いてトカゲモドキ科が分岐したとの系統仮説が強く支持された。

## 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由) 最大の懸案であった PTS 法による de novo mtDNA 配列決定法について、実用レベルまで方法の改良を進められたこと。既に 22 種のヤモリ類について mtDNA 全長配列が得られたこと。

## 4. 今後の研究の推進方策

本法を用いてさらに多くのヤモリ類の代表種から配列決定を行うとともに、得られたデータの分子系統解析、生物地理解析を本格化させたい。

遺伝子の配置変動や欠損が示唆された種の近縁種から mtDNA 配列を決定し、配置変動の起きたタイミングや分子機構を探るとともに、ミトコンドリア内のタンパク質合成系の分子進化について考察したい。また、更に詳細な分子系統解析を行い、ヤモリ科内に Phyllodactylidae クレドが存在するとする最近の系統仮説の検証や、広義のヒレアシトカゲ科内の系統関係についての再検討を行いたい。さらには、ギャンベルらによる核遺伝子の塩基配列データと我々が得た mtDNA 塩基配列データを用いて、得られる系統関係や分岐年代の対比を行い、地学からの知見を併せて、総合的にヤモリ類の歴史生物地理を考察したい。

#### 5. 代表的な研究成果

(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 5 件)

①Okajima, Y. and Kumazawa, Y. Mitochondrial genomes of acrodont lizards: timing of gene rearrangements and phylogenetic and biogeographic implications. BMC Evolutionary Biology 10:141 (2010)有

②Okajima, Y. and Kumazawa, Y. Mitogenomic perspectives into iguanid phylogeny and biogeography: Gondwanan vicariance for the origin of Madagascan oplurines. Gene 441:28-35 (2009)有

③Amer, S.A.M., and Kumazawa, Y. Molecular affinity of Somali and Egyptian mastigures among the Afro-Arabian *Uromastix*. Egyptian Journal of Experimental Biology (Zoology) 5:1-7 (2009)有

④Amer, S.A.M., and Kumazawa, Y. Timing of a mtDNA gene rearrangement and intercontinental dispersal of varanid lizards. Genes and Genetic Systems 83:275-280 (2008)有

⑤Jonniaux, P. and Kumazawa, Y. Molecular phylogenetic and dating analyses using mitochondrial DNA sequences of eyelid geckos (Squamata: Eublepharidae). Gene 407:105-115 (2008)有

[学会発表] (計 5 件)

①熊澤慶伯、中-新生代の大陸移動と爬虫類の進化、第 12 回日本進化学会シンポジウム「大陸移動と動物の進化 2 億年」、2010 年 8

月 5 日、東京工業大学 (東京)

②Kumazawa, 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)

③熊澤慶伯、爬虫類の高次系統と生物地理、第 11 回日本進化学会ワークショップ「脊椎動物の高次系統と分子進化」、2009 年 9 月 3 日、北海道大学 (北海道)

④熊澤慶伯、生物多様性科学と DNA 解析、遺伝子実験施設シンポジウム「新たな DNA 解析-次世代 DNA 解析のすべてと DNA 解析の新分野への展開」、2008 年 12 月 17 日、名古屋大学 (名古屋)

⑤Jonniaux, P. and Kumazawa, Y. Molecular phylogenetic and dating analyses using mitochondrial DNA sequences of eyelid geckos. 第 10 回日本進化学会、2008 年 8 月 22 日、東京大学 (東京)

[図書] (計 3 件)

①熊澤慶伯、朝倉書店、生物の事典、2010、43-45, 47-49

②熊澤慶伯、朝倉書店、古生物学事典 第 2 版、2010、211, 338, 444-445, 476-477

③熊澤慶伯、東海大学出版会、海洋の生命史、2009、122-138

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ

[http://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/~kuma/lab\\_homepage/HOME.html](http://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/~kuma/lab_homepage/HOME.html)