

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5月31日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370034

研究課題名（和文）網羅的分子系統解析に基づく頭索動物亜門の種多様性と進化経路の解明

研究課題名（英文）Cephalochordate molecular phylogenetics covering most species unravels its species richness and detailed evolutionary pathway

研究代表者

西川 輝昭（NISHIKAWA TERUAKI）

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：50126885

研究成果の概要（和文）：

「ナメクジウオ系統研究プロジェクト」の最終段階として、本研究で新たに採集した試料とそれまでに入手し解析をすすめていたサンプルをあわせ、本動物群の3属すべてについて、ミトコンドリア DNA 全ゲノム配列データにもとづいて、頑健な系統樹をえがくことができた。さらに、supermatrix 法を駆使して解析をすすめた結果、隠蔽種9種を発見した。すなわち、全世界の約45個体群から、総計3属31種を分子系統学的に識別できたことになり、ナメクジウオ類全種の約8割を網羅していることになる。この膨大なデータを総合して分岐パターン解析することで、ナメクジウオ類全体の系統進化や多様化プロセスの解明が可能となり、本動物群の世界規模での種多様性把握にも大きく貢献することができる。

研究成果の概要（英文）：

As the final stage of our long-standing “cephalochordate phylogeny project”, the previous and present studies have given robust phylograms for each of the all 3 genera using the whole mitogenomes. Further, the supermatrix analysis has discovered 9 cryptic species. This means that our material of ca. 45 populations over the world contained 31 species of 3 genera in all in terms of molecular phylogenetics, attaining to 80 % of the cephalochordate species. Thus, we have got information enough for a total understanding of its evolutionary pathway and for a far better understanding of its species richness.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：生物学

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：ナメクジウオ、分子系統解析、supermatrix 法、隠蔽種、ナメクジウオ属、オナガナメクジウオ属、カタナメクジウオ属

1. 研究開始当初の背景

ナメクジウオは、脊索動物（頭索動物+尾

索動物+脊椎動物）や脊椎動物の起源と多様化を論じる上で不可欠の動物群として古く

から注目され、2008年6月にメディアが騒然としたPutnam *et al.* (2008)によるフロリダ産種の全ゲノム配列の解析結果によって、その重要性は一層明らかになった。即ち、現生ナメクジウオは脊索動物の最も新しい共通祖先の姿を髣髴させるとともに、ヒトを含む脊椎動物の原型としても位置づけられるのである。また、脊椎動物における分岐パターン解析が近年進められており（研究計画・方法を参照）、これらを統合して脊椎動物の進化を論じる上で、ナメクジウオにおける解析は、その系統的位相だけではなく形態的多様性が著しく低いという点からも重要となるに違いない。かくして、現生ナメクジウオは今後一層、多種多様な比較研究に使用されることになる。比較研究は対象種間の頑健な系統枠に基づかなければ、その意味が極めて希薄となる。この比較のための信頼性高い枠組が求められ期待される所以である。

代表者西川と分担者西田を中心にした研究グループは、ナメクジウオ（脊索動物門、頭索動物亜門）現生種を対象として1997年から「ナメクジウオ系統研究プロジェクト」を進めてきた。その成果は以下のようにまとめられる。

(1) データ信頼性の向上：我々自身が約30の現生既知種のうちの約20種38個体群におよぶ試料の殆どを採集・解析した結果、データベースに登録されている *Branchiostoma lanceolatum* のmtDNA配列データは誤りであり、材料の産地誤認に起因することが明らかとなった。

(2) 「ナメクジウオ」の正体解明：日本で「ナメクジウオ」とよばれていた種は、*B. belcheri*ではなく*B. japonicum*とすべきだと中国の研究グループの提案を分子系統学的に実証するとともに、フィリピンにおいて*B. belcheri*の隠蔽種（形態的区別が困難な“新種”）を発見し、オーストラリアで記載され*B. belcheri*の新参異名とされていた*B. minucauda*が*B. belcheri*とは別種であることを明らかにした。

(3) 「オナガナメクジウオ」の特異性と隠蔽種の発見：形態的にユニークな本種を、分子的にも他種と著しく異なることを示し、本種に対して *Asymmetron* (オナガナメクジウオ属) を復活させ、ナメクジウオ類を3属に分類する体系を提唱した。さらに、オナガナメクジウオ *A. lucayanum* の隠蔽種2種を発見した。

(4) ゲイコツナメクジウオの発見：嫌氣的環境の鯨骨群集から世界初の深海性種ゲイコツナメクジウオ *A. inferum* を新種記載し、分子

系統解析から、その特異な進化経路を復元するとともに、大規模なミトコンドリアDNAの遺伝子配置変動を発見・整理した。

(5) 古い系統分岐が明らかに：ナメクジウオ属数種の解析結果から、太平洋と大西洋における系統分岐が約1億年前というかなり古い時代にあったことを明らかにした。

(6) 緩慢な形態変化の実証：現生種間の形態的斉一性（体制の酷似）は最近の分化によるものか、それとも形態変化が緩慢なためか。上記(5)の成果からさらに解析対象を広げ、新たな手法を駆使した結果、現生種から見る限り、その基本的形態は少なくともジュラ紀以来変わっていないとの結論が得られた。「進化の停滞」として解釈することも可能な結果であり、進化発生学的研究への興味をも喚起させるものである。

2. 研究の目的

上述した「ナメクジウオ系統研究プロジェクト」の完了を目的とする。即ち、現生種の約8割（24種）を網羅した分子系統樹を完成させ、隠蔽種の発見と既知種の整理による種多様性の精確な把握を実現するとともに、分岐年代推定と分岐パターン解析によってナメクジウオ類の進化過程を解明することをめざす。さらに、この結果を現生既知約6万種といわれる脊椎動物各群の分岐パターンと比較し、両動物群における現生種多様性の極端な差の原因を考察する。成果としての「種多様性把握」、「系統枠獲得」および「分岐パターン解析」は我々脊椎動物の進化過程を浮き彫りにする役目を果たすと同時に、ナメクジウオ類を対象とした広範な研究の次の飛躍への確固たる基盤となる。

3. 研究の方法

(1) 標本採集：実際に現地へ赴き、研究者自身が採集することを原則とした。これは、過去に外国で、譲渡をうけた標本の産地誤認により誤同定された分子情報が流布して混乱が生じた苦い経験を踏まえたものである（申請者らはかつて、それを訂正した論文を出版した）。採集地点はこれまでの経験をふまえ、隠蔽種発見の可能性、生物地理学的重要性、および調査や滞在の安全性に留意して選定した。必要に応じて、標本の採集と持ち出しの許可を申請して取得した。現地では傭船の上、ドレッジないしSCUBA潜水によって海底の砂を採取し、そこからナメクジウオ類を選別した。

(2) 標本の同定と固定：種を分ける形態的特徴に乏しい生物を扱う本研究では、標本の同定が正確であるかどうか、きわめて重要である。また、現地では、採集後すぐに同定し、その結果により調査場所や方法を適切に補正することが必要である。このため、標本の同定は、簡便型の実体顕微鏡を日本から持参し、これを用いて採集直後に現地において慎重に行った。採集個体は純エタノールで固定して研究室に持ち帰った。十分な個体数が採集できた場合には、10%ホルマリン固定標本も作成し、詳細な形態解析に備えた。

(3) 分子系統学的解析

分子系統解析は3名の研究協力者（昆健志博士、山野上祐介博士、高田未来美博士）の協力により遂行した。

①隠蔽種の探索・発見：試料からDNAを抽出し、mtDNA上の16S rRNA遺伝子などの部分塩基配列で系統解析を実施した。新データはその時点における最新の系統樹に組み込んで再解析した。この際、種に相当する既存のクレードに新しく解析した個体が含まれなければ、隠蔽種と判断した。この作業を標本が入手されるたびに繰り返した。

②系統関係の決定：以上によって明らかにされた種をOTUとしてmtDNAの全塩基配列情報により系統解析を行った。まず抽出DNAからロングPCRによってmtDNAを2~3つの長い断片として増幅・精製し、それを鋳型に多数のナメクジウオ類ユニバーサルプライマーを用いたPCRで一気にmtDNAの全塩基配列を決定した。

(4) 分岐年代推定・分岐パターン解析：いつ頃、どの内部枝で多様化率(Diversification Rate)が変化したかを以下の①~④の手順で解析しつつある。

①系統樹の樹形とDNA塩基配列に基づき、Thorne and Kishino (2002)の方法を用いて分岐年代のベイズ推定を行った。これは分子時計を仮定しない方法であり、分子進化速度の変動に対してより頑健であるので、他の手法よりも格段に精度の高い推定値を得ることができる。

②この系統樹を基に、コンピュータソフトSymmeTREE (Chan and Moore, 2005)を用いて、どの内部枝で顕著な多様化率の変化が起こったかを分析中である。

③多様化率が劇的に上がった内部枝を検出し、その分岐年代に対応する時代の地球環境などの情報をもとに、多様化の要因を総合的に考察している。

④さらに、以上の結果を現生脊椎動物各群の分岐パターンと比較し、両動物群における現生種多様性の極端な差が何によってもたら

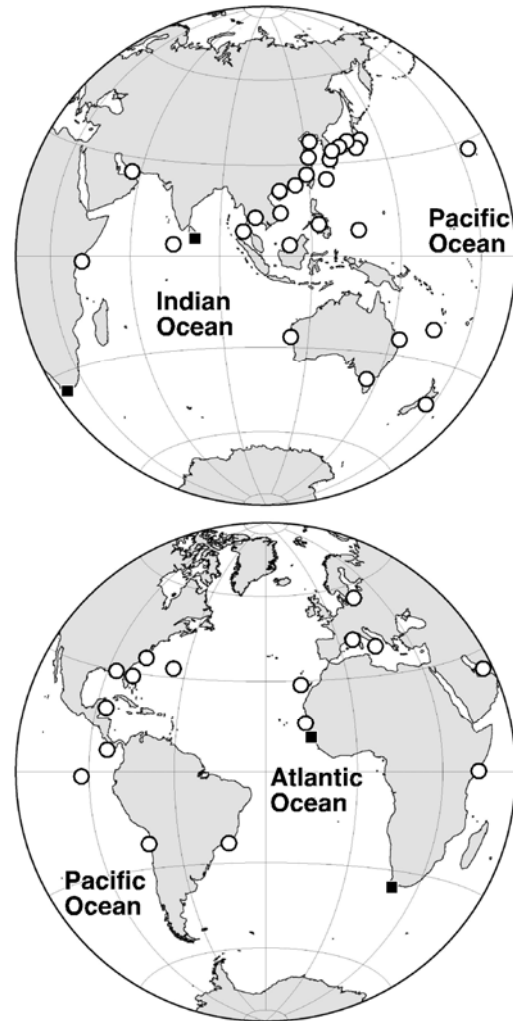


図1. 世界の分布域を網羅したナメクジウオ類の採集地点（寄贈標本の産地を含む）。○は採集成功を示し、■は失敗を示す。

されたのかを考察している。

4. 研究成果

(1) 標本の採集・入手

2009年度は5月にベトナム民主共和国ニャチャン、2010年2月にオーストラリアシャーク湾、およびパラオ共和国において、SCUBAによる潜水調査を実施した。前者では、*Asymmetron lucayanum*-species complex、*Epigonichthys maldivensis*(?)、および*Branchiostoma belcheri*、オーストラリアでは*E. cultellus*(?)と*B. sp. cf. belcheri*、そしてパラオでは*Asymmetron*の他、*E. cultellus*(?)と*B. malayanum*を採集することができた。

2010年度は、9月にカナリア諸島・テネリフェ島周辺およびセネガル共和国ダカール、11年3月にスリランカ共和国とガンビアで野外

調査を実施した。テネリフェでは傭船して悪天候の中をドレッジし、またスリランカとガンビアでは悪い海況のなかでSCUBA調査を強行したが、ともに標本は採集できなかった。他方ダカールでは、ナメクジウオ属の2種を採集することができたが、*B. senegalense*のタイプ産地（ダカール沖のゴレー島）が採集地に含まれていることは殊に意義深い。さらに、チリ共和国アントファガスタの現地研究者が予想外の好意で自ら標本採集を安価に請け負ってくれることになった。この結果、*Branchiostoma* sp. cf. *elongatum*の標本を入手することができた。

2011年度は、8月に、モルジブ共和国のハニマドゥ（ハー・ダール環礁）において、現地で傭船して潜水調査を行い、オナガナメクジウオ属の*A. orientale*の新規標本を多数採集することに成功した。この地点は本種のタイプ産地であるから、オナガナメクジウオ種群隠蔽種（我々のプロジェクトで発見）の学名決定が可能となった。なお、2010年9月に採集に失敗したテネリフェ島の当時傭船した会社から、たまたま採集できたとしてナメクジウオ属の標本が好意で送付された。さらに、カタナメクジウオ属の標本を沖縄島沿岸から新規に入手できた。

(2) 分子系統学的解析

2009年度は、*Branchiostoma*属の解析に重点を置いて実施した。一部の標本についてはミトコンドリアDNA (mtDNA) の全塩基配列を決定して頑健な系統樹を構築し、さらにそれをバックボーン制約として、多数の部分塩基配列 (DNAデータバンク登録データおよびに新規決定データ) を組み込んだ系統解析をした (Supermatrix法)。その結果、*B. belcheri*の正体が確度高く明らかになるとともに、本属に多数の隠蔽種が存在することがわかった。2010年度はカタナメクジウオ属に重点を置いて、手持ちの多数の未解析資料の分析をすすめた。既知6種のうち5種 (5地域個体群) について新たに決定したmtDNAの全塩基配列 (12,497塩基) による系統樹を作成した。上述した*Branchiostoma*属の解析と同様に、これを頑健なバックボーン制約とし、そこに他の地域個体群の新規決定した16SrRNA遺伝子部分塩基配列 (565塩基) を加えて、supermatrix法による系統解析を実施した。その結果、インド-西太平洋に広く分布する2種のクレードと、オセアニア海域にのみ分布する3種のクレードの2つに深く分岐すること、また、これらのいずれの枝にも属さない系統 (隠蔽種) が少なくとも3つあることが初めてわかった。

2011年度は、懸案のナメクジウオ属の系統解析結果を総まとめする論文について、カナリア諸島産新規標本、および既に解析した個体群についても可能な限り個体数を増やして

解析と系統地理学的議論をより精緻に行い、原稿をほぼ完成することができた。また、カタナメクジウオ属についても、supermatrix法を用いて昨年度に既にほぼ完成していた本属の網羅的な分子系統樹に上記沖縄産標本の分子データを加えて解析した結果、本標本は*E. cultellus*のクラスターに入った。すなわち、本種の日本沿岸初記録であることが示された。この結果、日本沿岸にはナメクジウオ類が全部で6種生息することがわかった。

本研究とこれまでの研究により、全世界の約45地域個体群を解析し、合計3属31種 (隠蔽種9種を含む)、すなわちナメクジウオ類全体の約8割を網羅することが出来た (図1参照)。この膨大なデータを分岐パターン解析することで、ナメクジウオ類全体の系統進化や多様化プロセスを解明しつつある。また、本動物群の世界規模での種多様性把握にも大きく貢献することができる。総じて、我々の「ナメクジウオ系統研究プロジェクト」の棹尾を飾るにふさわしい成果をえることができた。

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2件)

① 昆健志・西田睦・西川輝昭 カタナメクジウオ属 *Epigonichthys* (頭索動物亜門) の分子系統解析と琉球列島からの日本初記録種発見、In: “沖縄生物学会第48回大会”

(2011年6月4日~6日、琉球大学西原キャンパス、沖縄県、日本)

② Kon, T., Yamanoue, Y., Nishida, M., Nishikawa, T. Molecular phylogeny and diversity of the lancelet genus *Branchiostoma* based on the whole mitochondrial DNA sequencing and supermatrix analysis, In: “International Symposium of Marine Genomics” (16-17, Dec., 2009, Naha, Okinawa, Japan)

[その他]

ホームページ等

<http://www.lab.toho-u.ac.jp/sci/bio/tax/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 輝昭 (NISHIKAWA TERUAKI)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：50126885

(2)研究分担者

西田 睦 (NISHIDA MUTSUMI)
東京大学・大気海洋研究所・教授
研究者番号：90136896

(3)連携研究者

該当なし