様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ５ 月 ２９ 日現在

機関番号：１５４０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2013
課題番号：２３７７００８８
研究課題名（和文）ＳＩＮＥ法を用いたアカガエル類の系統関係の解明と大陸移動に関わる分岐年代の再推定

研究課題名（英文）Reconstruction of phylogenetic and biogeographic scenarios of ranoid frogs based on SINE and other molecular markers

研究代表者
倉林　敦（Kurabayashi, Atsushi）

広島大学・理学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：００３２７７０１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円、（間接経費）　　1,110,000円

研究成果の概要（和文）：アカガエル類(上科)は、大陸移動に伴い分布拡大と系統分岐を生じた分類群とされるが、従来の分子系統解析では解決できない系統額上の問題が数多く残っている。そこで従来法にはない利点を持つ、転移因子SINEの挿入に基づく系統解析によって、これらの問題を解決することを最終目的として研究を行った。これまでにアカガエル類が属するカエル亜目からはSINE配列が発見されていなかったが、本研究により、ツメガエル類で発見されていたSINE2-1XTホモログが、現生両生類の共通祖先で獲得され、多くの両生類ゲノムに現存していることが明らかとなり、アカガエル類において本SINEを用いた系統解析が初めて可能となった。

研究成果の概要（英文）：Superfamily Ranoides is a large anuran taxon nested in suborder Neobatrachia. It has been considered that lineage splits and distribution expansions of many ranoid groups were occurred in association with the segmentation and collisions of the Gondowanan landmasses. In this taxon, many phylogenetic and biogeographic issues remain unresolved by common molecular phylogenetic analyses based on DNA and/or protein sequence data. To resolve these problems, I aimed to perform phylogenetic analyses based on SINE - a nuclear transposable elements.- information. Although any SINEs had not been found in neobatrachians, we discovered SINE2-1XT homologues from many frog genomes including neobatrachian species. Also the same SINE elements were found from the urodelan and caecilian genomes, indicating that this SINE element had originated in a common ancestor of all living amphibians. These results enable applications of SINE phylogeny in not only ranoids but also many amphibian taxa.

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：転移因子　SINE　生物系統地理　系統解析　両生類　カエル亜目　ヒメアマガエル類　マダガスカルガエル類

１．研究開始当初の背景
アカガエル類(Ranoides)は、カエル亜目に含まれる巨大な分類群である。本分類群のサブグループ（科～亜科レベル）の多くは、大陸移動に伴い分布拡大と系統分岐を生じたとされる一方で、従来の分子系統解析では解決できない系統額上の問題が数多く残っており、正確な生物地理学的な考察が困難な状況であった。そこで、本研究では、従来法にはない利点を持つ、転移因子 SINE の挿入に基づく系統解析によって、これらの問題を解決することを最終目的として研究を行った。ただし、これまでにアカガエル類が属するカエル亜目からは SINE 配列が発見されていなかったため、SINE マーカーによる系統解析を実施するためには、まず、SINE を単離する必要があった。

また、ヒメアマガエル科やアフリカガエル類などについては、十分なサンプリングや塩基配列データが不足していることが原因で、系統学的な問題が解決できていない例があると考えられていた。

さらに、一部のカエルのミトゲノムで見られる遺伝子配置の変化が、SINE レトロトランスポゾン様の遺伝子転移機構で生じた可能性が示唆されていたが、その検証を行う必要があった。

２．研究の目的
本研究では、以下の点を目的として研究を行った。

(1)カエル亜目からの SINE レトロポゾンの単離。
(2)両生類における SINE の起源と系統的分布の解明。
(3)ゲノム内の SINE の存在比の解明と SINE 法実施可能性の検討。
(4)SINE 法による未解決系統関係の解決（特に、広義のアカガエル科内の問題について）
(5)ヒメアマガエル科・アフリカガエル類の系統学・系統地理学上の問題の解決。
(6)カエルミトゲノムにおいて配置変化が生じやすい遺伝子の周辺に、SINE/LINE で共通してみられる LINE 逆転写酵素蛋白質の認識配列が存在するかの検討。

３．研究の方法
本研究では、世界各地から 50 種以上のアカガエル類やその他の両生類分類群の組織サンプルを研究材料として収集し、分子生物学的実験に用いた。また、以下に主たる研究方法を示す。

(1)454 次世代シークエンサーによるランダムシークエンス。
(2)RepreatMasker および RepeatModeler プログラムによる NGS データからの SINE/LINE 配列の探索。
(3)ドットブロットハイブリダイゼーション（サザンハイブリゼーション）による、ゲノム内 SINE（および LINE）配列の確認。
(4)PCR 法による、SINE/LINE および、ミトコンドリア・核遺伝子の増幅とサブクローニング。
(5)サンガー法による PCR 産物およびサブクローンの DNA 塩基配列決定。
(6)最尤法・ベイズ法による分子系統解析。
(7)Relaxed Molecular 法による分岐年代推定。
(8)その他、Blast、Perl などのプログラムを使ったバイオインフォマティクス解析。

４．研究成果
(1)カエル亜目における SINE2-1XT ホモログの発見と、同 SINE の両生類における系統的分布と起源系統（目的 1-3）

両生類では、これまでムカシガエル亜目に属するピパ科のツメガエル属（*Xenopus*）のみで SINE の存在が知られており、カエル亜目では SINE の存在は知られていなかった。そこで、カエル亜目に属する、3 科 3 種のカエル - ニホンアカガエル（*Rana japonica*: アカガエル科）、セアカアデガエル（*Boophis goudotii*: マダガスカルガエル科）、アメフクラガエル（*Breviceps adspersus*:フクラガエル科）- のゲノムを、454 次世代シークエンサーを用いて、をランダムシークエンスした。

ここで得られた配列情報（それぞれ 48、59、68 メガベース）から、既知の SINE 配列を探索した。その結果、新規 SINE は発見できなかった。一方で、これら３種のゲノムには、ネッタイツメガエルで発見されていた 6 種の SINE のうち、SINE2-1XT と相同な SINE が存在することが明らかとなった。さらに、SINE2-1XT ホモログの配列がゲノムに占める割合（存在率）は分類群間で大きく異なっていた。具体的には、ニホンアカガエル・フクラガエルでの SINE2-1XT の存在率は、0.13・0.20%と低いが、*B. goudotii* では、全ゲノム配列（3.9Gbp）の 1.84%が SINE2-1XT ホモログであると推定された。（なお、全ゲノム情報が公開されているネッタイツメガエルゲノムにおける SINE2-1XT の存在率は、0.04%である）。この結果から、カエル亜目内でも SINE 法による系統解析が実施可能であることが初めて明らかとなった。一方で、SINE 法による系統解析の成功率は、SINE の増幅率と増幅時期が大きく影響する。このため、今回の結果は、SINE 法を適用しやすい分類群と適用が難しいグループがあることを示唆するものであった。

さらに、本研究によって、*B. goudotii* とニホンアカガエルとゲノムには、それぞれ典型的な SINE2-1XT とは異なる SINE 2-1 サブタイプが存在することが分かった。具体的には、*B. goudotii* には LINE 逆転写酵素認識部位を含むおよそ 70bp の領域が 2-5 コピー重複している SINE2-1 が存在し、さらに、ニホンアカガエルには、同認識部位が大きく変化した SINE2-1 が存在していた。SINE2-1XT

ホモログおよび、これらのSINE2-1サブタイプが生じた起源系統を明らかにするため、36種類の両生類についてドットブロットハイブリダイゼーションを行った。その結果、今回検査した全ての両生類種（有尾類・無足類を含む）において、SINE2-1XT ホモログは陽性であった。この結果は、同 SINE は全ての現生両生類の共通祖先系統に由来することを示している。また、ニホンアカガエルで見つかったSINE2-1サブタイプは、アカガエルかの中でも *Rana* 属の種にのみ存在することが示され、本サブタイプは本属の共通祖先（または *Rana* 一部系統の祖先）に由来すると考えられた。また、*Boophis* ゲノムに存在するリピートを持った SINE サブタイプ（*Boophis* サブタイプ）は、一部の Natatanura（広義アカガエル科）系統でのみ存在が確認された。さらに、*Boophis* サブタイプは、単系統 Natatanura の中で多系統的に存在していることが示された。このことは、以下 2 点の可能性を示唆している。(1)、*Boophis* サブタイプ SINE は、一部の Natatanura 系統の共通祖先で生じたが、その後、いくつかの系統ではゲノムから消失した。(2) 現在の Natatanura 内の系統仮説は正しくない（= *Boophis* サブタイプ SINE をもったグループが単系統である可能性）。どちらの仮説が正しいのかについては、更なる研究が必要であるが、(2) の仮説が正しい場合は、現行の Natatanura の系統仮説については、大きな改変が必要となる。

現在、上記の成果をまとめ、論文投稿準備中である。

(2) SINE 法による未解決系統関係へのアプローチ（目的4）

上記の研究により、カエル亜目の中でも、SINE 法による系統解析の実施が容易な分類群と、同法の適用が難しい分類群が存在することが示唆された。そこで、SINE 法の適用が容易と考えられるマダガスカルガエル科において、従来法では解決できない系統学上の問題点（1）マダガスカルガエル３亜科の類縁関係、(2) Tsingymantis 属の亜科帰属問題、（３）マダガスカルガエル亜科内の Spinomantis 属の系統的位置の解決を企図した。現在までに、マダガスカルガエル科の全３亜科全属についてのサンプルの収集に成功し、さらに、上記 Boophis に加え、Laliostoma, Mantella, Mantidactylus, Guibemantis, Spinomantis, Tsingymantis 属の代表各１種について、部分ゲノムシークエンスを行い、多数の SINE 座位を単離した。現在、これらの SINE 座位を増幅するプライマーを作製している。今後は、PCR 法によって、系統学的に情報のある座位を選別し、最終的に SINE 座位の挿入の有無を形質とした最節約法による系統解析を行い、上述の系統関係問題を解決する予定である。

(3)ヒメアマガエル類・アフリカガエル類の系統学・系統地理学上の問題の解決(目的5)

（3-1）ヒメアマガエル類

ヒメアマガエル科は、すべての無尾両生類の8%に相当する 487 種を含む巨大な分類群である。 ヒメアマガエル科は、11 の亜科に分類され、それぞれの亜科がゴンドワナ超大陸由来の陸地に分布している。また、アジアと南米には亜科の所属が不明な属が数多く残っている。これまでにヒメアマガエル亜科間の系統関係と大陸間分布の形成プロセスを明らかにすることを目的とした研究がいくつか行われてきているが、どちらについてもコンセンサスは得られていない。本研究では、（1）ヒメアマガエル類の亜科間の系統関係と各分岐年代を再推定すること、(2) 大陸間の分布がどのように成立したのかについてより詳細な知見を得ること、(3) 亜科所属不明のアジア産 2 属 *Gastrophrynoides* と *Phrynella* の系統学的位置を明らかにすることを目的とし、これまでで最大の分子データを用いて分子系統解析と分岐年代推定を行った（8 亜科 22 種、2 つのミトコンドリアコード遺伝子と 6 つの核遺伝子に基づく系統解析と分岐年代推定）。

解析の結果、アジア産の Microhylinae 亜科とマダガスカル産の Dyscophinae 亜科が単系統になり、オーストラリアとパプアニューギニアに分布する Asterophryninae 亜科がその姉妹群になることが明確になったが、それ以外の亜科間の系統関係は不明瞭であった。この原因は、ヒメアマガエルの亜科は、白亜紀後期から新生代初期（8500～6600 万年前）に素早く放散した結果、系統関係を示す塩基置座位が殆ど残っていないためと推定された。所属不明亜科のうち、*Phrynella* 属はアジア産亜科の Microhylinae に含まれるが、*Gastrophrynoides* 属は、Asterophryninae 亜科の最も初期に分岐したグループであることが本研究の結果明らかになった。これまでに、Asterophryninae 亜科は、オーストラリア-ニューギニアや一部の東南アジアの島からしか知られておらず、マレーシアに産する *Gastrophrynoides* は、本亜科のユーラシア大陸からの初の記録である。なお、これまでに Asterophryninae 亜科は、南極を渡ってオーストラリアに定着したと考えられていた。しかし、今回の研究では、*Gastrophrynoides* と他の Asterophryninae グループは、未だオーストラリアとユーラシアは離れ、かつ東南アジアの島々も形成されていない時期（およそ 5000 万年）に系統分岐したことが明らかになった。さらに、*Gasterphrynoides* 以外の

Asterophryninae の分類群は、比較的最近（2500万年前から）分岐し始めたことも分かった。この結果は、Asterophryninae 亜科の祖先は、南極を渡ってきたのではなく、アジア経由で比較的最近にオーストラリア-ニューギニア地域に分布を広げたことを強く示唆するものであった。

（3-2）**アフリカガエル類**

アフリカガエル類(Afrobatrachia)は、2006年に新設された、カエル亜目に属する分類群で、ヒメアマガエル類（Microhylidae）とアカガエル類（Natatanura）とともに、アカガエル上科（Ranoidae）を形成する３つの主要なグループの一つである。アフリカガエル類は、アナホリガエル科・フクラガエル科・サエズリガエル科・クサガエル科の４科を含み、その名の通り、アフリカ大陸にのみに分布する。これら４科の類縁関係は従来不明な点が多く議論が続いていた。最近の研究から、これらの科が単系統群である事が確かめられているが、アフリカガエル類を特徴づける共有派生形質はこれまでに発見されていない。アカガエル上科内でのアフリカガエル類の系統関係についてはコンセンサスが得られていない。

本研究では、ミトゲノムおよび９種の核遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列データに基づき分子系統解析を行った。その結果、どちらのデータでも、アフリカガエル類は単系統群となり、さらに、ヒメアマガエル類と姉妹群を形成した。アフリカガエル類とヒメアマガエル類の関係については、アミノ酸データを用いた場合のブートストラップ値は低かった（61%）ものの、塩基配列データでのブートストラップ値は比較的高く（76%）、どちらのデータでもベイズ事後確率については高い支持が得られた（100／99%）。これらの統計的信頼値に加え、本研究で用いた分子データがこれまでにアフリカガエル類の系統推定に用いられたものの中で最大であることを考慮すると、今回得られた仮説は信頼性の高いものであると考えられる。

また、アフリカガエル類を特徴づける共有派生形質はこれまでに見つかっていなかったが、今回解析したアフリカガエル類全種のミトゲノムにおいて、通常の WANCY-tRNAs という祖先的な遺伝子配置から変化した、WNACY-tRNAs という配置が共有されていた。この新たに発見された遺伝子配置は、アフリカガエル類の共有派生形質としてみなせると考えられた。

また、アフリカガエル類と他のアカガエル上科の分岐年代はおよそ１億年前と推定された。これは、ゴンドワナ大陸分断の最終局面のアフリカと南アフリカの分断時期に近い。この分岐年代は、本グループがアフリカ大陸のみに分布していることの原因であることが示唆された（つまり、アフリカが他の大陸と分断した時期か、それ以降に出現したので、他の大陸に分布しない）。

（4）カエル亜目ミトゲノムの遺伝子配置変化とレトロポゾン様転移機構

一般的に、ミトコンドリアゲノム上で遺伝子が並んでいる順序（遺伝子配置）は、多細胞動物では保守的で、あまり変化しない。しかし、カエル亜目のミトゲノムでは、特定の遺伝子部位（tRNA-His 遺伝子や nad5 遺伝子）の配置変化が多系統的に頻繁に生じることが分かっており、この配置変化は SINE/LINE などのレトロポゾン様の転移メカニズムが作用していることが示唆されていた。このため、本研究で発見した SINE2-1XT ホモログの逆転写酵素認識配列が、上記のミトゲノム遺伝子近傍に存在するかを検索した。その結果、この SINE の逆転写酵素認識部位類似配列は存在せず、カエル亜目のミトゲノム高頻度配置変化は、レトロポゾン様の遺伝子転移機構とは無関係か、SINE2-1XT ホモログとは全く別のレトロポゾンがミトゲノムの構造変化に関与していることが示唆された。

(5) 爬虫類からカエルへの遺伝子水平伝播

本研究の過程で、爬虫類からカエル類に水平伝播した転移因子を発見した。しかも、本研究で得られたデータから、水平伝播イベントは、異なった地域で、異なる爬虫類/両生類系統間で複数回生じたことが示唆された。そこで、現在世界各地から多くの爬虫類・無尾類サンプルを収集し、系統学的手法に基づき、この水平伝播の起源系統と、水平伝播イベントが生じた地域の特定についての研究を開始した。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　2　件）

1) Kurabayashi, A. & M. Sumida. Afrobatrachian mitochondrial genomes: genome reorganization, gene rearrangement mechanisms, and evolutionary trends of duplicated and rearranged genes. BMC Genomics 14: 633 (2013). 査読あり doi:10.1186/1471-2164-14-633

2) Kurabayashi, A., M. Matsui, M. B. Daicus, H.-S. Yong, N. Ahmad, A. Sudin, M. Kuramoto,

A. Hamidy & M. Sumida. From Antarctica or Asia? New colonization scenario for Australian-New Guinean narrow mouth toads suggested from the findings on a mysterious genus Gastrophrynoides. BMC Evol. Biol. 11: 175 (2011).査読有り
doi:10.1186/1471-2148-11-175

〔学会発表〕（計　4　件）

1) Kurabayashi, A., N. Furuno, M. Sumida, H. Mizuno, K. Ohshima, & M. Vences. "Discovery and phylogenetic distribution of a short interspersed nuclear element (SINE) subgroup in neobatrachian frogs". IABHU International symposium - Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing (March 27-28th 2014, Hiroshima, Japan).

2) 倉林 敦・古野伸明・住田正幸・水野英明・大島一彦・Miguel Vences「カエル亜目における SINE（short interspersed nuclear element）の発見と系統的分布」日本爬虫両棲類学会 第 52 回大会（11 月 2-3 日、2013 年、札幌）

3) Kurabayashi, A., Matsui, M., Daicus, M.B., ong, H.-S., Ahmad, N., Ahmad, S., Kuramoto, M., Hamidy,A., & Sumida, M. "From Antarctica or Asia? New colonization scenario for Australian‐New Guinean narrow mouth toads suggested from the findings on a mysterious genus Gastrophrynoides" 7th World Congress of Herpetlogy (August 8-14th 2012, Vancouver, Canada).

4) 倉林敦・松井正文・Amir Hamidy・Daicus M.Belabat・倉本満・住田正幸「オセアニアヒメアマガエル亜科はどこからきたのか？：亜科所属不明属 Gastrophrynoides の系統的位置に基づく推定」日本爬虫両棲類学会 第 50 回記念大会(10 月 8-10 日､2011 年､京都)

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0　件）
○取得状況（計　0　件）

〔その他〕
ホームページ等
広島大学　両生類研究施設 HP
http://home.hiroshima-u.ac.jp/amphibia/main/InstAmphBiol/homu.html

両生類研究施設　進化多様性・生命サイクル研究グループ HP
http://home.hiroshima-u.ac.jp/amphibia/sumida/

６．研究組織
(1)研究代表者
倉林 敦（KURABAYASHI ATSUSHI）
広島大学理学研究科・助教
研究者番号：00327701

(2)研究分担者
該当無し

(3)連携研究者
該当無し