

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻
平成 12 年度博士課程 入学
氏名 山内 視嗣
指導教官 西田 睦

論文題目 ミトコンドリアゲノム分析に基づく十脚甲殻類の分子系統学的研究

十脚目 (Decapoda) は、その名の通り 5 対の胸脚をもつことによってまとめられた甲殻類 (Crustacea) の一分類群であり、エビやカニ、ヤドカリなど人間にとってなじみの深い動物から構成される。これらの動物は、食用として世界的に重要な地位を占めることは言うまでもなく、きわめて多様性に富んでおり、およそ 1,200 属に含まれる 10,000 種が確認されている。十脚類を構成する根鰓亜目 (クルマエビ類: Dendrobranchiata) と抱卵亜目 (Pleocyemata) の二亜目は、十脚類内の二大系統として多くの研究者に認められており、前者は根鰓をもち、ノープリウス幼生期に孵化すること、後者は卵を腹肢に付着させて保育し、ノープリウス幼生期より後期で孵化することなどが、それぞれの特徴としてあげられる。しかし、種数でも十脚類の 9 割以上を占める抱卵亜目内 8 下目の関係に目を移すと、形態形質に基づく様々な系統仮説が提唱されているのが現状で、これまで一致した見解は得られていない。十脚類全体の系統関係を把握するためには、幅広い分類群を対象として、DNA 塩基配列のような客観的なデータに基づく系統関係の構築が必要となってきた。

そこで、本研究ではミトコンドリア DNA (mtDNA) 全塩基配列分析に基づく分子系統学的手法を用い、十脚類の単系統性の検証や、十脚類内部の系統関係を明らかにすることを目的とした。これまで、十脚類ではウシエビ (*Penaeus monodon*) とホンヤドカリ属の一種 (*Pagurus longicarpus*) の 2 種で mtDNA 全塩基配列が決定されているが、従来のように塩基配列決定にクローニング技術を用いていたのでは、限られた時間の中で多くの種の mtDNA 全塩基配列を決定することができない。そのため、まず、1) 十脚類の mtDNA 全塩基配列を迅速に決定するための PCR を基本とした手法の確立を目指した。次に、2) その確立された手法を用いて、十脚類

全体を幅広く代表するように選んだ 33 種の甲殻類の mtDNA 全塩基配列を新たに決定した。そして、3)これらのデータに基づき十脚類ミトコンドリアゲノムの特徴を明らかにするとともに、十脚類の系統関係を解析した。

十脚類ミトコンドリアゲノム全塩基配列決定法の確立

現在までに多くの動物の mtDNA 全塩基配列が様々な手法により決定されてきたが、本研究では、ロング PCR 法と十脚類汎用プライマーを用いて、迅速かつ簡便に十脚類の mtDNA 全塩基配列を決定する手法を確立できた。まず、ロング PCR 法を用いて mtDNA 全周を 3-4 分割して増幅し、その産物を鋳型に両端からプライマーウォーキング法によって塩基配列を決定した。次いで、この方法で決定された十脚類 3 種を含む計 5 種の甲殻類 mtDNA 全塩基配列と、すでに発表されている他の甲殻類や昆虫類の mtDNA のデータをもとに、十脚類ミトコンドリアゲノムに対する約 80 個の汎用プライマーを作成した。そして、残りの 28 種に対しては、ロング PCR 法で増幅された mtDNA 全周分の産物を鋳型に、これらの十脚類汎用プライマーを使った PCR で mtDNA 全体を約 40 個の短い断片として増幅し、それらの PCR 産物を直接塩基配列決定法でシーケンスした。

十脚類ミトコンドリアゲノムの特徴

調べた十脚類ミトコンドリアゲノムは、全長が 15,271~17,119 bp の範囲にあり、後生動物一般にみられる 13 個のタンパク質遺伝子、22 個の tRNA 遺伝子、および 2 個の rRNA 遺伝子をもっていた。また、調べた 33 種のうち、甲殻類と昆虫類に共通する典型的な遺伝子配置と異なる特異な遺伝子配置をもつものが 18 種いた。これらの遺伝子配置変動は、縦列重複とそれに続く遺伝子の欠失という過程で説明できるものが多かったが、3 種では逆位型の配置変動がみられた。また、10 種にみられた tRNA^{Leu(CUN)} 遺伝子の逆位に関しては、反対の鎖にコードされる tRNA^{Leu(UUR)} 遺伝子が縦列重複することによって、そのどちらか一方が tRNA^{Leu(CUN)} 遺伝子の機能をもち、もとの tRNA^{Leu(CUN)} 遺伝子が欠失するといった過程を経て生じたと推察された。それらは、オキアミ目、オトヒメエビ下目、アナジャコ下目、ならびにヤドカリ下目それぞれで独立に獲得されたと考えられた。

ミトコンドリアゲノム全塩基配列に基づく十脚類の系統解析

本研究で対象となった 33 種は、過去の系統仮説や、各グループの単系統性を可能な限り検証できるように選定した種で、各亜目、各下目からは 2 種以上を選ぶことを基本とした。また上記の分析対象種には、十脚類の単系統性やその姉妹群を確かめるための外群(シャコ類 1 種と、オキアミ目 2 種、ならびにアンフィオニデス目 1 種)も含まれている。誤った系統関係を導くおそれのあったユメエビ (*Lucifer typus*) を除く上記の 32 種と、これまでに mtDNA 全塩基配列が決定されている 3 種を加えた全 35 種の mtDNA データから、13 個のタンパク質遺伝子(第三座位を除く)と 21 個の tRNA 遺伝子(tRNA^{Ser(AGN)} 遺伝子を除く)、そして 2 個の rRNA 遺伝子を抜き出し、計 9,172 塩基を解析に用いた。系統解析には、パラメーター数が多くより緻密な系統再構成が可能な GTR+I+ Γ モデルを用いた最尤法を採用し、系統樹の内部枝の信頼性はベイズ法から算出される事後確率で評価した。

アンフィオニデス目 Amphionidacea の系統学的位置: 透明なビニル袋のような変わった背甲をもつアンフィオ

ニデス *Amphionides reynaudii* は、以前からサクラエビ科やコエビ類に似た特徴が指摘されてきた。しかし、Williamson (1973) は、あまりにも十脚類と形態が異なるという理由から、これらの特徴は収斂進化の結果であるとして、十脚目やオキアミ目と独立した、*A. reynaudii* 1 種から成るアンフィオニデス目を創設した。

本研究で得られた最尤樹(図 1)では、このアンフィオニデスはホッコクアカエビ (*Pandalus eous*) の姉妹種となり、十脚類のなかのコエビ下目に含まれることが高い確率(93%)で支持された。アンフィオニデスが非十脚類であるという代替仮説は統計的に棄却された。このように形態的形質ではおよそ類縁関係の推定が困難な場合においても、mtDNA 塩基配列のような分子データを用いると、より客観的に系統関係を推定できることが示された。

十脚類の単系統性: 上記のアンフィオニデス目の問題を除くと、十脚類が非単系統群であるとする研究はほとんどない。しかし逆に、十脚類が単系統であることを明確な証拠に基づいて示した研究も少ない。これは、鰓が背甲に格納され、胸部付属肢 8 対のうち、後ろの 5 対が鉗脚あるいは歩脚として発達するといった形質が、他の甲殻類と区別するためには直観的にわかりやすい共有派生形質であったことに起因していると考えられる。本研究において、図 1 に示したように十脚類が単系統であることが初めて分子系統学的に高い確率(100%)で支持された。これによって、十脚類内部の各分類群間の系統関係を本格的に検討することが可能になったといえる。

十脚類内部の系統関係: 本研究の結果、これまで形態学的な証拠からその存在が認められてきた根鰓亜目(クルマエビ類)と抱卵亜目の二大系統は姉妹群であり、それぞれ単系統群であることが高い確率(100%)で支持された(図 1)。それに加えて根鰓亜目では、tRNA^{Ser(AGN)} 遺伝子のアンチコドンが他の十脚類やオキアミ類と異なっており、これがこの類が単系統群であることを示す共有派生形質となることも判明した。抱卵亜目内では、オトヒメエビ下目はコエビ下目と姉妹群を形成し、それらと歩行類が姉妹群となることが明らかとなった。また、歩行類や、その他のいくつかの下目もその単系統性が強く支持された。これまでイセエビ下目に含まれていたセンジュエビ (*Polycheles typholps*) は、本系統樹ではこれまでの系統仮説と異なりザリガニ下目に含まれた。

近年、提唱されたいくつかの系統仮説においても、十脚類の中ではクルマエビ類が最初に分岐するという認識は共通しており、この仮説は本研究でも支持された。一方、抱卵亜目内に関しては、これまでオトヒメエビ下目がどのグループと姉妹群を形成するかといった問題に集約されて議論されてきたが、本研究の結果は Burkenroad (1981) が提唱した系統仮説と一致した。しかし、その他の代替仮説と本研究で得られた系統関係間には、統計的な有意差はみられなかった。さらに本研究で扱うことができなかったプロカリス類は、形態学的にクルマエビ類やコエビ下目と類似し、その系統的な位置が問題となっている。今後、これらを含めた解析が望まれる。

歩行類の系統関係: 歩行類には 5 下目が含まれるが、それぞれのグループの単系統性が問題視されてきたため、これまでの研究では歩行類全体を対象として内部の系統関係を論じることは少なかった。本研究の結果

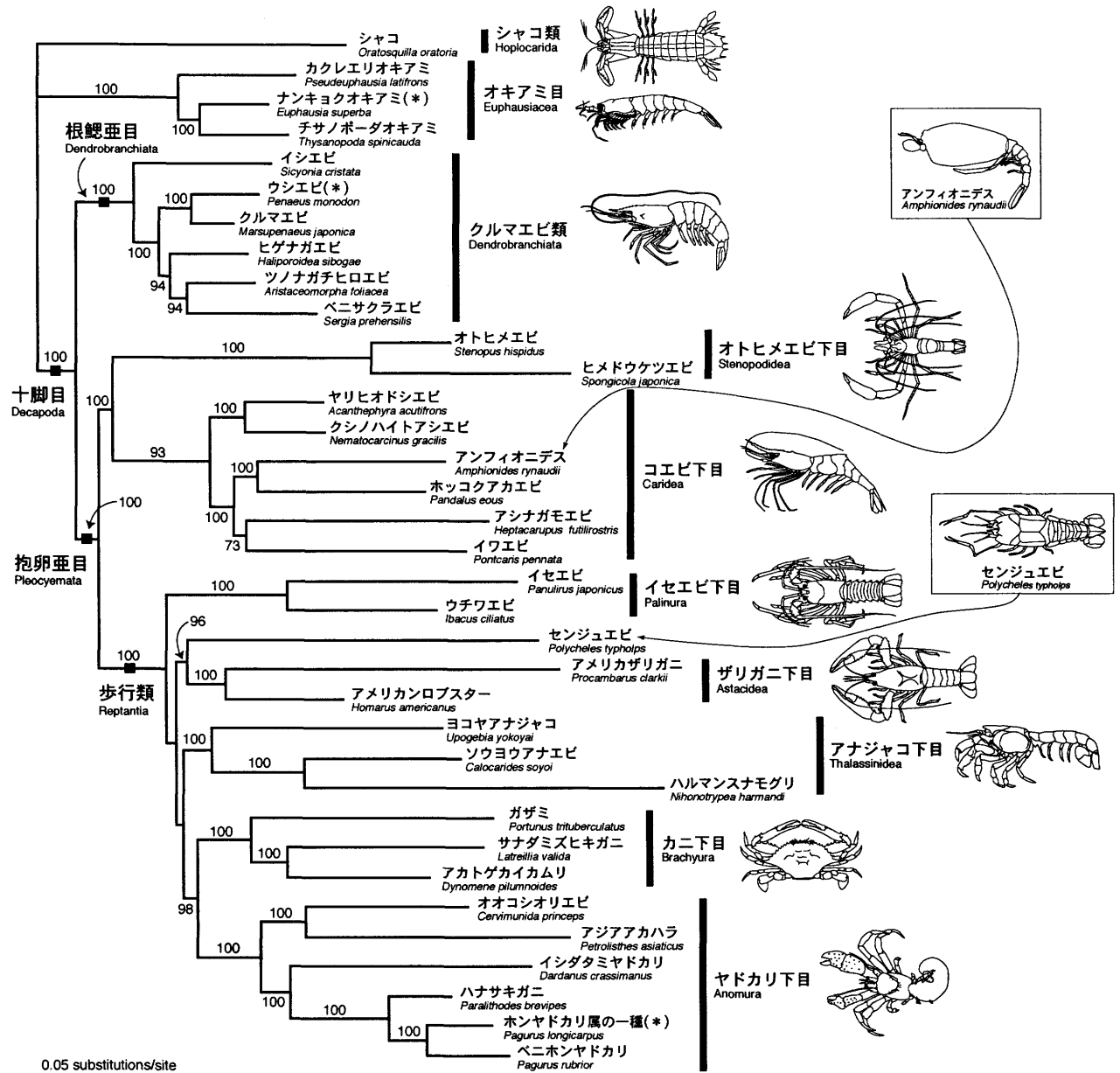


図1. ミトコンドリアゲノム全塩基配列データに基づいて推定された十脚類を中心とする甲殻類35種の系統関係。ミトコンドリアゲノムの13個のタンパク質遺伝子(第3座位を除く), 21個のtRNA遺伝子(tRNA^{Ser(AGN)}を除く), 2個のrRNA遺伝子から得られた9,172塩基を用い, GTR+I+Γモデルによって得られた最尤樹(-lnL=130,919.30)である。内部枝の数字はベイズ法で得られた事後確率(%)を示す。*を付した種のデータは国際DNAデータバンクから得た。

では, センジュエビがザリガニ下目に含まれたことを除くと, 各下目の単系統性は強く支持された。イセエビ下目は歩行類の中では早くに分岐した一群であり, 次いでザリガニ下目, アナジャコ下目と続いて分岐し, ヤドカリ下目とカニ下目が姉妹群の関係にあることが本研究から示唆された(図1)。特に, アナジャコ下目やカニ下目に関しては, これまでの研究ではヤドカリ下目との形態的な類縁性が数多く指摘され, それぞれの単系統性についても疑問がもたれてきた。しかしこれら3下目には, 塩基配列による系統解析の結果に加えて, 各下目に固有のミトコンドリア遺伝子配置も発見され, これらが単系統群であることがさらに強く支持された。本研究は, mtDNA全塩基配列データが, その塩基配列をもとにした系統解析に有効なだけでなく, 遺伝子配置情報という強力な系統推定の指標を提供しうることを示した。