

歯鯨亜目の単系統性に関するこれまでの研究と SINE 法によるその再検証

二階堂 雅人[†]・Oliver Piskurek[†]・岡田 典弘[†]

(受付 2007 年 8 月 29 日; 改訂 2007 年 11 月 12 日)

要 旨

歯鯨亜目の単系統性は形態学的にゆるぎないものと考えられてきた。しかし 1990 年半ばから台頭し始めた分子系統学的な解析では、歯鯨亜目は単系統群を形成しないとするものが大半であり、分子、形態による研究者間で激しい議論が続いていた。その中で我々のグループはこれまでにマッコウクジラやイルカなどが含まれるハクジラ類に共通な SINE 挿入遺伝子座を 3 座位単離し、歯鯨亜目の単系統性を DNA レベルで提唱してきた。しかし我々の研究以外に DNA レベルで歯鯨亜目の単系統性を十分な統計的な信頼度をもって支持しているものは未だになく、我々の SINE 研究における方法上のバイアスを指摘する声もあった。そこで我々は SINE 法の方法論的なバイアスの可能性を完全に排除して、再度歯鯨亜目の単系統性を検証した。その結果、歯鯨亜目の単系統性を示唆する遺伝子座がさらに 9 座位単離され、さらにはそれと相反するようなデータは得られなかった。この事より、DNA レベルにおいても歯鯨亜目の単系統性が強く示唆されるとともに、既存の配列比較による系統推定法によりこれらのグループの系統推定が非常に困難であることが示唆され、10 年以上続いた歯鯨亜目単系統議論に終止符をうつことができた。

キーワード：SINE, 歯鯨亜目, マッコウクジラ, ゲノムライブラリースクリーニング。

1. 序章

現生の鯨類は大きく 2 つの亜目、すなわち歯鯨亜目(反響定位をおこない、歯を持つ鯨類)と髯鯨亜目(プランクトンを濾しとる髯板をもつ鯨類)とに分類される(Heyning, 1989; de Muizon, 1991; Fordyce and Barnes, 1994; Rice, 1998)。この形態を指標とした分類は長く信じられてきた定説であったが、近年の分子系統学的な解析はこの伝統的な分類に疑問を投げかけるものであった。たとえば Milinkovitch et al. (1993) はミトコンドリア 12S および 16S リボゾーム遺伝子の配列解析によりマッコウクジラ類は他のハクジラ類よりもむしろヒゲクジラ類に近縁であるとの系統仮説を打ち出した。また Arnason and Gullberg (1994) はミトコンドリアアチクローム b 遺伝子の配列解析をおこない、今度はマッコウクジラ類が全クジラ類系統樹において一番根元に位置する、つまりヒゲクジラ類とイルカ類が近縁であるとの系統仮説を提唱した。このようにマッコウクジラ類のクジラ類内部における系統学的位置は、各研究者によって大きく異なる結果となったわけである。以上のイルカ類、マッコウクジラ類、ヒゲクジラ類の間における 3 つの系統仮説はそれぞれ、伝統的系統樹、Milinkovitch 系統樹、Arnason 系統樹と呼

[†] 東京工業大学大学院 生命理工学研究科：〒 226-8501 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259-B21

ばれ、激しい論争が始まった(Adachi and Hasegawa, 1995; 図 1A). この系統関係においてはこれまで 10 年以上も議論が続き多くの研究者がこの解決に乗り出したが、分子系統学的な方面から十分な統計的信頼度(ブートストラップ値)をもってマッコウクジラ類の系統的位置を決定することはできていない(Milinkovitch et al., 1994; Adachi and Hasegawa, 1995; Milinkovitch, 1995; Arnason and Gullberg, 1996; Smith et al., 1996; Cerchio and Tucker, 1998).

分子系統学的な解析方法として、既存の DNA 配列の比較に加えて近年は SINE (Short Interspersed Element) のゲノムへの挿入イベントが、新たなマーカーとして有用であることが認識され始めている(Shimamura et al., 1997; Nikaido et al., 1999, 2006; Salem et al., 2003; Roos et al., 2004; Nishihara et al., 2005, 2006; Ray et al., 2005, 2006; Xing et al., 2005; Piskurek et al., 2006; Sasaki et al., 2006a, 2006b). SINE とはレトロポゾン的一种でレトロポジションと呼ばれる RNA, DNA 中間体を経てゲノムの他の場所に再挿入する一連の過程を経て増幅することが知られている(Rogers, 1985; Weiner et al., 1986; Okada, 1991a, 1991b; Kazazian, 2000). また、この SINE の挿入は不可逆的であり、さらには SINE が同じ場所に独立に二度挿入する確率はほぼゼロに等しい。つまり SINE の挿入に関しては「なし」から「あり」へ一方向にしか進まない(Shedlock and Okada, 2000). SINE におけるこれらの特性は、生物の系統関係を推定する上で、homoplasy の無い理想的な共有派生形質であるといえる(Hillis, 1999; Miyamoto, 1999; Shedlock et al., 2000; Shedlock and Okada, 2000). ただ、あるクレードを示唆するためには、複数の遺伝子座における情報を統合することは不可欠である(Takahata, 1989; Avise, 2000). Nikaido et al. (2001a) は SINE 挿入を指標としたイルカ類、マッコウクジラ類、ヒゲクジラ類間における 3 者関係の系統解析をおこない、伝統的な系統樹、つまりイルカ類とマッコウクジラ類を含めたハクジラ類の単系統性を示唆する遺伝子座を独立に 3 座位単離することに成功した。これによりハクジラ類の単系統性に関する議論は落ち着いたかのように見えた。しかし、大規模な配列解析によるダイナミックな系統解析が可能となったごく最近になっても、SINE 法以外では歯鯨亜目の単系統性を明確に証明することに成功した研究はまだ無いのが現状である(Cassens et al., 2000; Nishida et al., 2003; Arnason et al., 2004; May-Collado and Agnarsson, 2006). 実際、近年におけるいくつかの研究では歯鯨亜目の単系統性を示唆はしているが、それを支持するブートストラップ値は非常に低くなる傾向にある。例えば Cassens et al. (2000) はいくつかの核遺伝子およびミトコンドリア部分配列を解析したがハクジラ類の単系統性を証明することはできなかった。つまり、最尤系統樹はハクジラ類単系統を示唆してはいるが、その他のトポロジーも尤度の差が誤差の範囲に収まっているのである。また Arnason et al. (2004) によるミトコンドリア全長配列を用いた鯨偶蹄類の包括的な系統解析でも、イルカ類とマッコウクジラ類を結ぶ枝長が非常に短く、これらの 3 者関係はミトコンドリア全長配列を使って解析しても不安定であった。さらにごく最近の May-Collado and Agnarsson (2006) による研究では、広範な哺乳類におけるミトコンドリアアチトクローム b 配列をベイズ法によってかなり包括的に解析し歯鯨亜目の単系統性を再現することに成功したが、やはりその後確率は 67 と非常に低い値であった。また Messenger and Mcguire (1998) は、分子データと形態データを合わせて系統解析し、歯鯨亜目の単系統性を再現したが、その結果は形態学的なデータの影響を非常に強く受けたものであり、解析の正当性には疑問が残っている。つまりこの論文の著者達は分子データのみで歯鯨亜目の単系統性を示唆できていないのである。論文中で Milinkovitch et al. (1994) の研究に言及し、DNA 配列のアラインメントに曖昧な点があり、それによって系統樹の根の位置が不安定となりハクジラ類の単系統性が揺らいだ、と指摘している。しかし、彼らの手によって手直しされたアラインメントを用いても、分子データのみではハクジラ類の単系統性を示唆することはできていないのである。上述のように、ハクジラ類の単系統性は未だに不安定であり、DNA 配列比較解析のみでは解決が難しい状態にある。この状況を見て我々は、

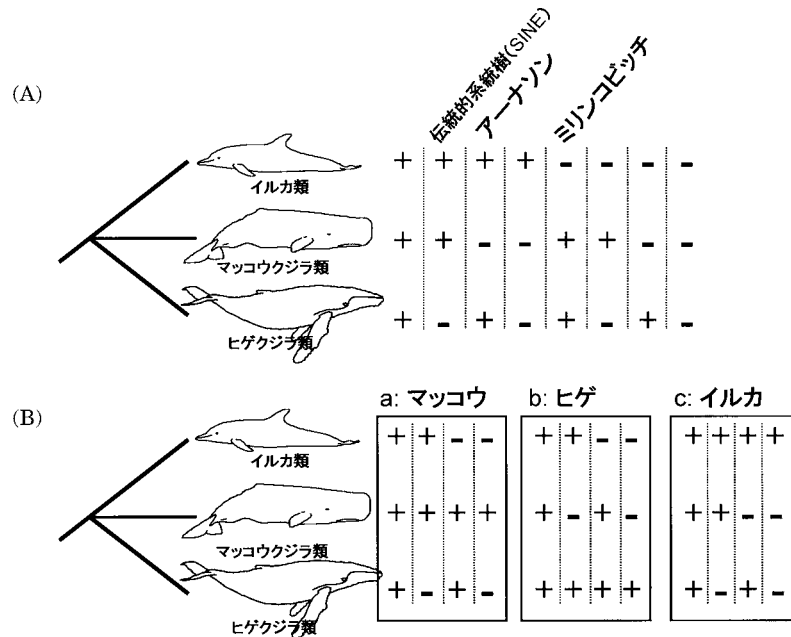


図 1. (A) SINE 挿入の有無に関する可能な全てのパターン。 (+) は SINE 挿入あり, (-) は SINE 挿入なしを表す。 ミリンコピッチ系統樹, アーナソン系統樹, 伝統的系統樹を示すパターンがそれぞれ図中に表されている。 (B) マッコウクジラ類 (a), ヒゲクジラ類 (b), イルカ類 (c) それぞれのゲノムライブラリーをスクリーニングした際に得られる可能な SINE 挿入パターン。 注目すべきところは, それぞれの場合で可能な SINE 挿入パターンが違うことである。

Nikaido et al. (2001a, 2001b) よりも広範なクジラ類において SINE 遺伝子座を大規模に解析して, ハクジラ類の単系統性を再検証しようと試みた。

齒鯨亜目のクレードが不安定な原因としてもっとも可能性が高いのは, 過去の急速な放散だと考えられる。もしイルカ類, マッコウクジラ類, ヒゲクジラ類の 3 者が非常に短期間に急速に分岐したとすると, 祖先集団のゲノム中に保持されていた遺伝的な多型が各グループに不均一に選択されて振り分けられ, incomplete lineage sorting という現象を引き起こすことになる。つまり各々の遺伝子座について SINE 挿入を指標とした系統樹を構築すると, それらが互いに矛盾する可能性が出てくるのである (Avice, 2000; Nei and Kumar, 2000; Shedlock et al., 2004; 図 2)。実際, このような各遺伝子系統樹間の矛盾という現象は, 近年におけるシクリッド (Takahashi et al., 2001; Terai et al., 2003), 霊長類 (Salem et al., 2003; Xing et al., 2005), カメ (Sasaki et al., 2006b), ヒゲクジラ類 (Nikaido et al., 2006) を対象にした SINE 研究で報告され始めている。近年の Nishihara et al. (2005) によるゾウ, ハイラックス, 海牛類の 3 者の系統関係に関する研究では, 伝統的なゾウ, 海牛類の近縁性を示唆する SINE 遺伝子座は単離されなかった。その論文中で著者らはこの矛盾する遺伝子座は上述の急速な放散イベントによる incomplete lineage sorting が主な原因であると言及している。

SINE 法を用いる場合に注意しなくてはならないもう 1 つの問題は ascertainment bias である。SINE 法には, SINE 挿入遺伝子座を単離するためにゲノムライブラリーのスクリーニングという過程があり (Deininger and Batzer, 2002; Okada et al., 2004; Ray et al., 2005), つまりそ

のゲノムライブラリーのスクリーニングによって単離された遺伝子座には当然、SINE 挿入があるわけである。つまり SINE をスクリーニングした種には必ず SINE が挿入していることになる。それゆえ、ある特定の 1 つの種のゲノムのみにおいて SINE をスクリーニングして、その SINE 挿入パターンによって系統関係を推定しようとする、その種において SINE の挿入の無い遺伝子座の情報がまったく考慮されなくなってしまう(図 1B 参照)。もし、系統関係を知りたい複数の種が過去に急速に放散しているとする、祖先多型状態が incomplete lineage sorting される事によって、それぞれの遺伝子座で可能な全てのトポロジーを示す SINE 挿入が観察されるはずであるが、もしこの ascertainment bias があると、そのうちの数パターンのみに着目して系統樹を作成してしまうことになる。そのような ascertainment bias の可能性を除外するためには、系統推定の対象となるすべての種もしくはグループにおいてゲノムライブラリーの構築とスクリーニングをおこなう必要がある。図 1A はイルカ類、マッコウクジラ類、ヒゲクジラ類の 3 グループ間の系統関係を調べる際に、可能な全ての SINE パターンを示したものである。プラス(+)は SINE の挿入有を示しマイナス(-)は挿入無を示している。たとえば、イルカ類(+), マッコウクジラ類(+), ヒゲクジラ類(-)は伝統的な歯鯨亜目単系統仮説を示し、他方でイルカ類(-), マッコウクジラ類(+), ヒゲクジラ類(+), ヒゲクジラ類(-)は Milinkovitch 系統樹を示す事になる。ツチクジラの系統学的位置に関しても議論が続いているが、問題を簡略化するために本研究では特にイルカ類、マッコウクジラ類、ヒゲクジラ類の 3 グループに注目することとする。可能な 8 通りの SINE パターンのうち、全てのグループで(+)や全てのグループで(-)、さらにはある 1 つのグループでのみ(+)の場合は、系統推定上の意味をもたない。図 1B では、ある 1 種のゲノムをスクリーニングした際に、そのスクリーニングによって単離されるはずの可能な SINE パターンを示している。つまりマッコウクジラ類(a), ヒゲクジラ類(b), イルカ類(c)のゲノム DNA をスクリーニングした場合の可能なパターンである。例えば、マッコウクジラ類のゲノムをスクリーニングした場合、Arnason 系統樹がもし正しい系統樹だったとしても、このトポロジーを示唆する SINE パターンは得られない事になる。同様にヒゲクジラ類もしくはイルカ類ゲノムがスクリーニングされた場合は、それぞれ伝統的系統樹、または Milinkovitch 系統樹を示唆する SINE パターンは得られない事になる。このように、ゲノムスクリーニングをおこなう種に偏りがあると真実の系統関係が得られない可能性が出てくる。この Ascertainment bias と呼ばれる影響は SINE 挿入パターンによる系統推定をする際の方法論的な問題として常に考慮しなくてはならないだろう(Deininger and Batzer, 2002)。

もしイルカ類、マッコウクジラ類、ヒゲクジラ類の 3 グループが進化的に非常に短い期間に放散したとすると、祖先多型の incomplete lineage sorting により真の系統樹とは違った互いに矛盾する系統関係を示唆する SINE パターンが得られる可能性がある(図 2)。放散が起きた時期に祖先集団ゲノム中に挿入した SINE は多型状態になっている可能性が高く、その多型状態の SINE 遺伝子座はその後にそれぞれのグループへと不完全に振り分けられるだろう。そのような状況になると、その後の SINE 挿入の有、無がそれぞれのグループの中で殆どランダムに固定していく事となり、SINE パターンが必ずしも種の系統樹を反映しないという事になるわけである(Okada et al., 2004; Shedlock et al., 2004)。よってたとえ種の系統樹を反映する SINE パターンがもっとも多く得られたとしても図 1A で示した可能な全ての SINE パターンが得られる可能性もあるわけである(Nikaido et al., 2006)。イルカ類、マッコウクジラ類、ヒゲクジラ類の 3 つのグループは急速に放散した可能性があることや Ascertainment bias が間違った系統関係を示唆してしまうことなどを考慮すると、最終的な結論を出すためには、これら 3 グループのゲノムライブラリーをより精力的にスクリーニングする必要がある。我々の以前の研究では、マッコウクジラ類のゲノムのみを SINE のスクリーニングに使用していたため(Nikaido et al., 2001a)、これでは Arnason 系統樹がもし種の系統樹だったとしても、それが再構築されな

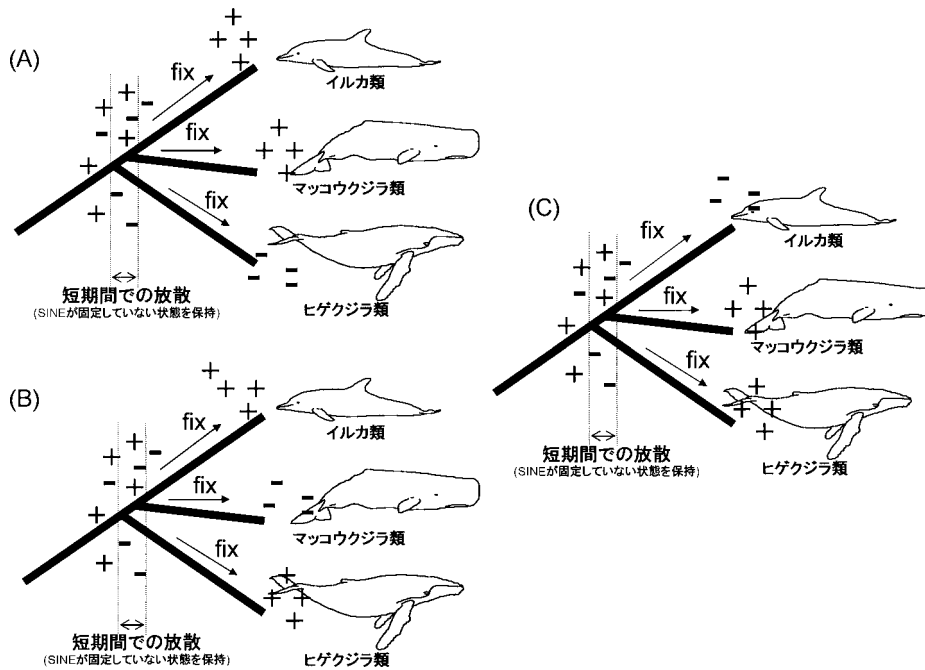


図 2. イルカ類, マッコウクジラ類, ヒゲクジラ類のゲノム中の, ある遺伝子座における可能な SINE 挿入パターン. もしある遺伝子座における SINE 挿入が急速な放散によって 3 グループの共通祖先内で固定していないと, その SINE 遺伝子座はその後の固定は SINE 挿入あり, もしくは SINE 挿入なしへほぼ偶然的に固定する. 例えば (A) の場合には偶然に固定した SINE が種の間を反映しているが, (B), (C) では偶然に固定した SINE がそれぞれアーナソン系統樹, ミリンコビッチ系統樹を示唆してしまう. このように特定の遺伝子座における遺伝子系統樹はかならずしも種の系統樹とは一致しないことがわかる.

いことになる (図 1B).

我々は過去に, ヒゲクジラ類の中でも特にナガスクジラ類(ザトウクジラ, ナガスクジラ, シロナガスクジラ, イワシクジラ, ニタリクジラ, ミンククジラ)及びコククジラ類を包含する 4 つの大きなグループにおいて SINE 挿入パターンが矛盾することを発見し, これらのグループが過去の進化の過程で急速な放散を遂げた可能性を提唱した (Nikaido et al., 2006). またこの研究とは別に, ミトコンドリア全長配列を用いたヒゲクジラ類の系統解析においても, 上述のグループに関しては分岐順序を決定することができず, このグループが急速な放散を遂げたことが示唆された (Sasaki et al., 2005). さらに Rychel et al. (2004) もミトコンドリア部分配列及び核遺伝子配列の解析をおこない, 同様の見解を示している. このミトコンドリア配列や核遺伝子配列の解析でヒゲクジラ類の系統推定がうまく解決できない状況は, マッコウクジラ類の系統的位の決定が困難である状況と非常に似ている. つまりマッコウクジラ類の系統的位に関しては, 系統推定に用いるプログラムや, 遺伝子配列, アウトグループなどによって非常に不安定なのである (Adachi and Hasegawa, 1995; Arnason and Gullberg, 1996; Smith et al., 1996; Cerchio and Tucker, 1998). ということは, ヒゲクジラ類の内部系統の場合と同様, マッコウクジラ類, イルカ類, ヒゲクジラ類の 3 者の間にも祖先多型の incomplete lineage sorting に伴う, SINE 挿入パターンの矛盾が生じる可能性が生じてくる. よって我々は本研究において,

矛盾する SINE 挿入パターンがマッコウクジラ類, イルカ類, ヒゲクジラ類の 3 グループにおいても確認されるか否かを調べるために, これらのグループのゲノムライブラリーを包括的にスクリーニングし, SINE 法の方法上の問題点であった ascertainment bias の可能性を取り除くことで, ハクジラ類の単系統性の再検証をおこなった.

2. 材料と方法

各種鯨類のゲノム DNA は Blin and Stafford (1976) に記載されたフェノールクロロホルム法により抽出し, 4°C にて保存した. 本研究に使用したクジラ類とその近縁グループは以下の通りである: *Tursiops truncatus* (ハンドウイルカ), *Stenella coeruleoalba* (スジイルカ), *Phocoenoides dalli* (イシイルカ), *Monodon monoceros* (イッカク), *Berardius bairdii* (ツチクジラ), *Physeter macrocephalus* (マッコウクジラ), *Megaptera novaeangliae* (ザトウクジラ), *Balaenoptera physalus* (ナガスクジラ), *Balaenoptera musculus* (シロナガスクジラ), *Balaenoptera borealis* (イワシクジラ), *Balaenoptera brydei* (ニタリクジラ), *Eschrichtius robustus* (コククジラ), *Balaenoptera acutorostrata* (北大西洋ミンククジラ), *Balaenoptera bonaerensis* (南氷洋ミンククジラ), *Caperea marginata* (コセミクジラ), *Eubalaena australis* (セミクジラ), *Balaena mysticetus* (ホッキョククジラ), *Hippopotamus amphibius* (カバ).

本研究では, マッコウクジラ, ハンドウイルカ, スジイルカ, シロナガスクジラ, ニタリクジラ, ナガスクジラ, コククジラ, ザトウクジラ, イワシクジラのゲノムライブラリーを作成した. これらのライブラリーはすべて SINE 遺伝子座を単離するためのスクリーニングに使用した. ゲノム DNA はまず制限酵素 HindIII による消化の後, その消化産物を HindIII にて消化し BAP 処理をした pUC18 プラスミドベクターに組み込むことでゲノムライブラリーの構築をおこなった. 次に作成したゲノムライブラリーを, CHR-2SINE (CD サブファミリー: CAAGAGAGGCCGCGATAGTGA) に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いてスクリーニングした. ゲノムライブラリーの平均インサート長はおよそ 2.5 kbp であり, それぞれのゲノムライブラリーにおいて約 5000 個のコロニーをスクリーニングした. サザンハイブリダイゼーションにより CHR-2SINE 陽性と判断されたコロニーについては, プラスミド DNA を抽出し, その後配列を決定し, SINE 挿入を確認し PCR プライマーの設計をおこなった. 次にマッコウクジラ類, イルカ類, ヒゲクジラ類, およびカバのゲノム DNA を鋳型にして, SINE 挿入の有無を確認できるように設計したプライマーによる PCR をおこなった. PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により分離された(長い PCR バンドは SINE 挿入有, 短い PCR 産物は SINE 挿入無を示す). その電気泳動のパターンにおいて, SINE 挿入の有無が判別しにくい PCR バンドに関しては, その PCR 産物の配列を決定することによりその SINE 挿入の有無を確認した. ここで言及すべきこととして, アガロースゲル電気泳動パターンにおいて, ある特定の種において PCR バンドが見えない場合は, 系統推定上「情報無し」として取り扱っている, ということである (Shedlock et al., 2000). この PCR バンドが見えないという事は PCR プライマーのアニールする領域への塩基置換か, もしくはその遺伝子座全体に大きな欠失もしくは何らかの挿入が起きている可能性を示している. 系統解析では SINE 挿入有は「1」, SINE 挿入無は「0」, そしてバンドが見えない場合は「?」として取り扱い, マトリクスを作成した. このマトリクスは PAUP* (ver. 4.0b10; Swofford, 1998) を用いて解析され最節約系統樹が構築された. この解析では “IRREV. UP” オプションを用い, 「0」を祖先形質として扱った. さらにハクジラ類の単系統性に関しては, Waddell et al. (2001) によって開発された尤度モデルに基づいて統計的有意度を推定した.

3. 結果と考察

本研究ではマッコウクジラ類, イルカ類 2 種, ヒゲクジラ類 6 種のゲノムライブラリーからも SINE 配列のスクリーニングをおこないそれぞれのゲノムライブラリーから数多くの SINE 遺伝子座を単離することに成功した. イルカ類, マッコウクジラ類, ヒゲクジラ類の系統関係を推定するために, スクリーニングで単離された各 SINE 遺伝子座における SINE 挿入の有無を, 歯鯨亜目 6 種, 髯鯨亜目 8 種, さらにはアウトグループとしてカバ(Nikaido et al., 1999)のゲノム DNA を鋳型とした PCR にて確認した. 図 3A はマッコウクジラ類およびイルカ類 2 種のゲノムスクリーニングによって得られた合計 9 座位の SINE 遺伝子座における PCR 電気泳動像を示しているものである. このデータによると, 9 座位すべてに関して, マッコウクジラ類を含めた全てのハクジラ類の共通祖先で SINE が挿入されており, 歯鯨亜目の単系統性を再確認したこととなる. 遺伝子座 TTR24 ではマッコウクジラ類の PCR バンドが少し長い事がわかる. これはマッコウクジラ類に特異的な CDO SINE の挿入によるものであった. この PCR バンドに関しては, 配列を決定しアラインメントすることで SINE の詳細な挿入位置を調べて, 矛盾の無い事を確認している(図 3B). 遺伝子座 Mac30 においてもハクジラ類に共通な SINE 挿入が確認できた. ただこの遺伝子座においては, ハクジラ類の進化の過程においてツチクジラの分岐後に SINE の一部を含んだ 192 bp の領域が欠失していることが, 配列を決定することによって明らかとなった(図 3B). また遺伝子座 Mac34 においても, ハクジラ類に共通な SINE 挿入が認められたが, イルカ, イシイルカ, ツチクジラの共通祖先における 78 bp の欠失によって PCR バンドが短くなっていることがわかる(図 3B). 最終的に 9 座位における SINE 挿入により伝統的系統仮説である歯鯨亜目の単系統性を再確認できた. ここで重要な事は, イルカ類のゲノム DNA を大規模にスクリーニングしても Arnason 系統樹を示唆するような SINE 遺伝子座が単離されていない, という点にある. 同様にマッコウクジラ類のゲノム DNA を大規模にスクリーニングしても, Milinkovitch 系統樹を示唆する SINE 遺伝子座が単離されなかった.

図 3C はヒゲクジラ類のゲノム DNA のスクリーニングにより単離された 10 座位の SINE 遺伝子座における PCR による SINE パターンである. すべての遺伝子座においてヒゲクジラ類の単系統性を示唆するデータとなっている. この実験では髯鯨亜目 11 種および歯鯨亜目 3 種を PCR の解析に加えている. ここで重要なのがヒゲクジラ類のゲノム DNA を大規模にスクリーニングしても, Arnason 系統樹や Milinkovitch 系統樹を示唆する SINE 遺伝子座が単離されない事である.

図 4 は, 今回および以前の研究により単離された SINE パターンをまとめたデータによって構築されたイルカ類, マッコウクジラ類, ヒゲクジラ類の系統樹を示している(Shimamura et al., 1997; Nikaido et al., 1999, 2001a). 伝統的な歯鯨亜目単系統仮説は以下の証拠により支持される: (1) 合計 12 座位の SINE 遺伝子座においてハクジラ類の共通祖先で SINE が挿入されていた, (2) 合計 15 座位の独立な SINE 遺伝子座でヒゲクジラ類の単系統性が示唆され, マッコウクジラ類はそのグループには含まれないことがわかった, (3) 合計 11 座位の遺伝子座においてイルカ類の単系統性が示唆され, さらにこれらの遺伝子座はイルカ類とヒゲクジラ類は単系統性を示唆していない, (4) マッコウクジラ類に特異的な SINE 挿入のある遺伝子座が多数単離されるが, その遺伝子座においては, ヒゲクジラ類に SINE の挿入は認められない(全てのデータはここに示していない). 我々は図 4 に示した SINE 挿入情報をマトリクスにまとめて, PAUP*を用いて最節約的な解析をした. その結果ハクジラ類の単系統性は 100%のブートストラップ値によって強く示唆された. さらには, ハクジラ類の単系統性が独立な 12 遺伝子座によって矛盾なく示されている事から, このクレードの統計的確からしさが尤度テストによって

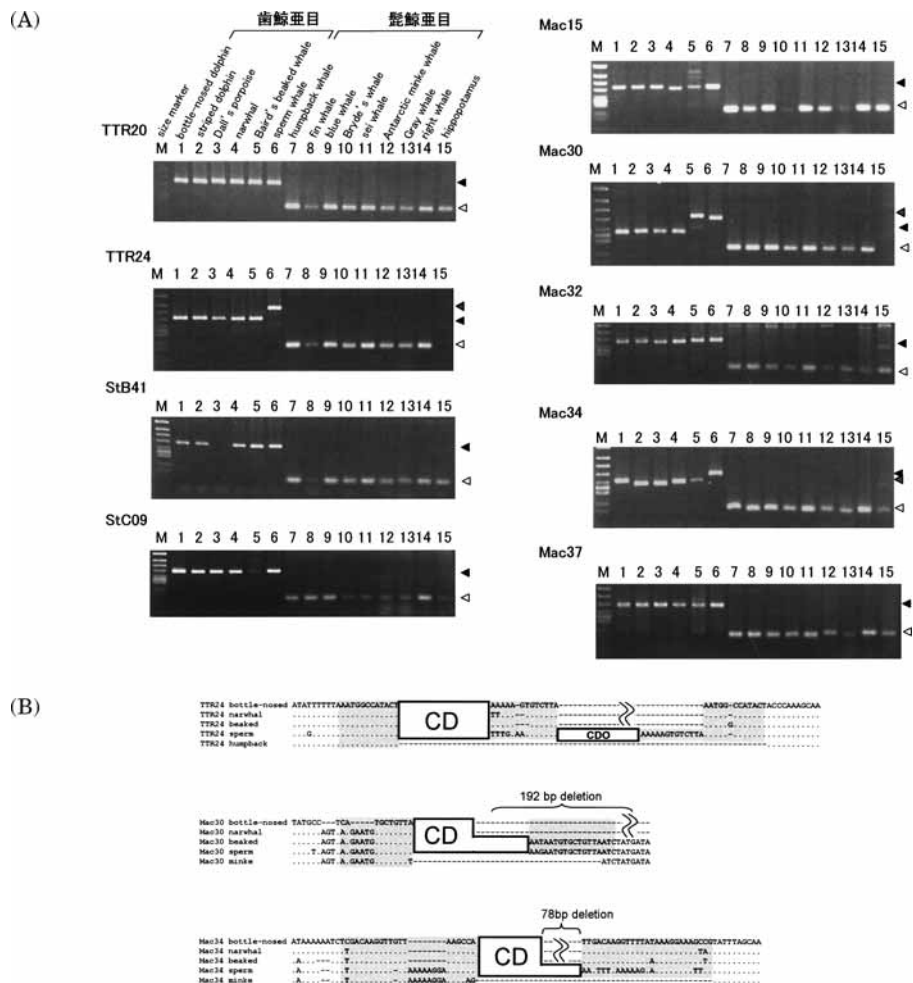


図 3. (A) 歯鯨亜目の単系統性を示すそれぞれの SINE 遺伝子座における PCR 産物の 3% アガロースゲル電気泳動の結果. 各レーン上に数字と種名が示されている. それぞれの遺伝子座名はゲノムライブラリーに使用した種の名前に由来する. 遺伝子座 TTR24, Mac30, Mac34 にはさらなる SINE 挿入が観察されている. (B) 遺伝子座 TTR24, Mac30, Mac34 の各鯨種における DNA 配列のアラインメント. このアラインメントは SINE 挿入の詳細な部位を確認するためにおこなった. 図 3 (A) にみられた不規則な PCR パターンは, さらなる SINE の挿入 (遺伝子座 TTR24) もしくは SINE 近傍配列における欠失 (遺伝子座 Mac30 および Mac34) に由来していた. SINE 挿入に伴って生じるダイレクトリPEATは影をつけた. (C) 髯鯨亜目の単系統性を示唆する遺伝子座の 3% アガロースゲル電気泳動の結果. 詳細は (A) と同様である.

非常に強く支持された ($P < 0.001$) (Waddell et al., 2001). このように全ての鯨種を包含した系統解析によって, Milinkovitch 系統樹も Arnason 系統樹も再現されなかった. DNA 配列の比較による上述の 3 グループの系統推定が困難である主要な原因は明らかにはなっていないが, おそらく複数の様々な因子が関わっている可能性があるだろう. まずアウトグループの数や種が不十分である事がこれら 3 グループの系統関係の解決を難しくさせる原因のひとつだと言われて

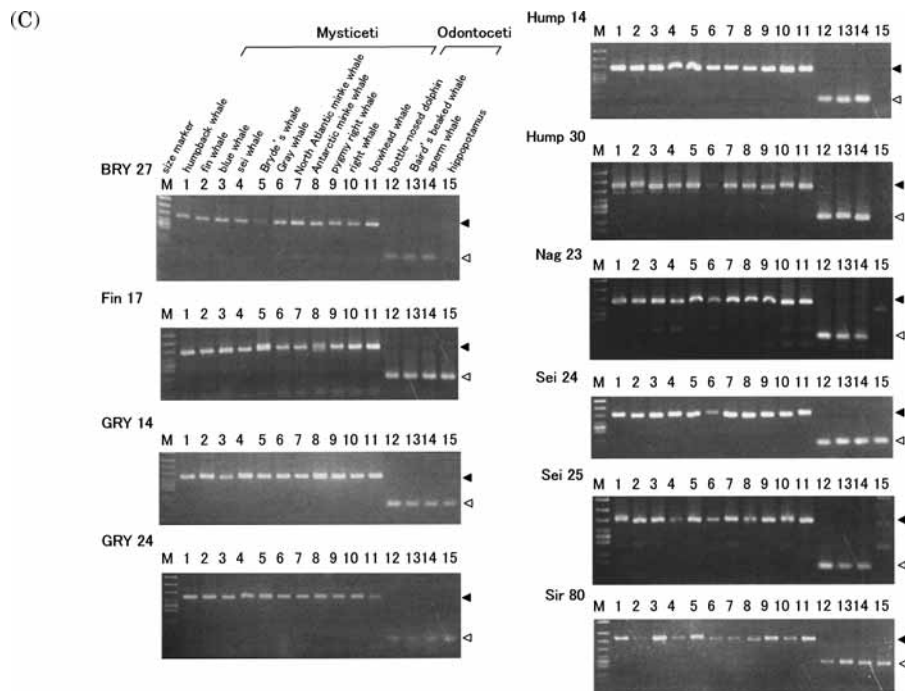


図 3. (つづき)

いる (Adachi and Hasegawa, 1995; Messenger and Mcguire, 1998). May-Collado and Agnarsson (2006) は、これまでの解析ではハクジラ類の単系統性を示唆することはなかったミトコンドリアアチトクローム b 領域の DNA 配列データを、鯨類を含めたそのアウトグループなどに関して包括的に集めた上で系統解析することで、この 3 グループの系統関係を明らかにしようと試みた。しかしながら、歯鯨亜目の単系統性を示唆するクレードは、同じ系統樹上の他のクレードに比べてしっかりと支持されなかった、つまりこれまでしばしば取り沙汰されていたアウトグループの問題以外にも、他の要因が関与している可能性が大きいと考えられる。その要因としてまず挙げられるのが、それぞれのグループごとの進化速度の違いであろう (Martin et al., 1992; Lum et al., 2000; Schmitz et al., 2002; Schmitz et al., 2005)。しかし、たとえ進化速度がグループごとに大きく異なっていたり、もしくはあるグループでのみ偏った進化パターンをしていたとしても、SINE 挿入パターンを用いた系統解析では、それらの影響を受けない。さらには、SINE 挿入による系統解析では、挿入の方向性が一方向に決まっているためにアウトグループによる影響を受けない。本研究は、少なくとも歯鯨亜目の単系統性の問題に関しては、DNA 配列の比較に比べると SINE 挿入データの方が方法的に有利であったことを示したのではないだろうか。

本研究でもっとも重要な点は、問題となっている 3 グループを代表する鯨種に関しては全てそれらのゲノムライブラリーをスクリーニングすることで、ascertainment bias の可能性を除外したところである。SINE 法においては、ゲノムライブラリーを SINE 配列のプロンプを用いてスクリーニングする過程が含まれていることにより、スクリーニングに用いた種では必ず SINE が挿入している状態の遺伝子座を単離してくることとなり、スクリーニングにどのような種を用いるかで大きなバイアスがかかってしまう可能性が大きい (Deiminger and Batzer,

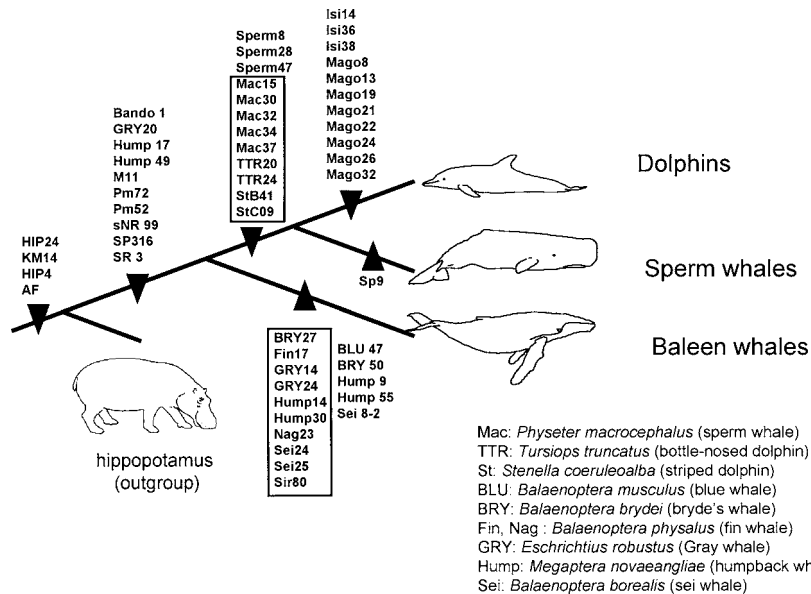


図4. イルカ類, マッコウクジラ類, ヒゲクジラ類の系統樹. これらの3者関係は独立な19座位を単離することによって確実なものとなった. 今回の研究で新たに単離された遺伝子座は四角で囲った. これらの遺伝子座はすべて伝統的な系統仮説である歯鯨亜目の単系統性を支持し, 矛盾しなかった. それぞれの遺伝子座の名称はゲノムライブラリーのスクリーニングに用いた種を表しており, それらの対応関係は図の右下に示した.

2002). 例えば, incomplete lineage sorting によって引き起こされるような, 種の系統樹とは一致しない, 非常に少数派であるはずの矛盾遺伝子座を, バイアスによってそればかり単離してしまう可能性が出てくる. そうすると間違えた系統樹を構築してしまうことになりかねない. この問題を解決するためには SINE 遺伝子座をあらゆる種において単離して SINE 挿入の比較をしなければならぬのである. 近年における Xing et al. (2005) や Ray et al. (2005) による霊長類の SINE 挿入に基づいた分子系統学的研究では, NIH (National Institute of Health: 米国国立衛生研究所) 内のシーケンスセンターからのデータを大々的に利用してこの問題を乗り越えている. しかしながら, 今回の研究対象である鯨類の公開されているゲノムデータはまだ非常に限られていることから, ゲノムライブラリーの構築, スクリーニングを広範な種においておこなわなくてはならないのである. 我々はこの方法をとることで, 扱いにくい鯨類系統関係の問題を矛盾なく解決できることを実証した.

これまでに単離されている遺伝子座(図4に示された53座位)は全てお互いに矛盾していない. この結果が示していることは, ハクジラ類の共通祖先での一連の分岐の際に incomplete lineage sorting された多型座位が, 現生のクジラ類のゲノム中には見つからないということである. この結果は, ヒゲクジラ類に含まれるナガスクジラ類とコククジラの間で, いくつかの矛盾する SINE 挿入パターンが見ついている事実と非常に対照的だと言える(Nikaido et al., 2006). この結果が示唆するのは, イルカ類, マッコウクジラ類, ヒゲクジラ類の3グループの分岐が, 少なくともナガスクジラ類とコククジラよりもゆっくりであったということである. 他の可能性としては初期のハクジラ類の集団がナガスクジラ類やコククジラに比べるとあまり小さくなく, そのために SINE 挿入のある対立遺伝子座が短時間で固定したことも考えら

れる。以前に我々が SINE 近傍領域の配列を用いて全鯨類の分岐年代推定をおこなったところ (Nikaido et al., 2001a), ハクジラ類とヒゲクジラ類の分岐年代が今から 3230 万年前, その後にはハクジラ類の共通祖先からマッコウクジラ類が分岐するのが 3000 万年前であると算出された。つまりマッコウクジラ類が含まれるグループは他のハクジラ類から 230 万年の間に分岐したことを示している。さらには Arnason et al. (2004) によるミトコンドリアゲノム全長配列を指標とした分岐年代推定ではマッコウクジラ類が原始的なハクジラ類から 290 万年の間に分岐したと結論付けている。一般的には, ハクジラ類の共通祖先において保持されていた SINE 多型がそのような進化的に短い時間で集団に固定するとは考えにくい。実際, 我々のミトコンドリア全長配列の解析で 400 万年の間に分岐したことが示唆されている (Sasaki et al., 2005) ナガスクジラ類とコククジラの間にはいくつかの矛盾する SINE 遺伝子座が単離されている。また Takahashi et al. (2001) によるシクリッドの分子系統学的解析では, タンガニカ湖産シクリッドの放散が起きた際, 500 年以上も祖先多型が集団に保持されていることが明らかになっている。さらには Salem et al. (2003) は, 220 から 240 万年の間に分岐したと推定されているヒト, チンパンジー, ゴリラの 3 グループの間にも祖先多型の incomplete lineage sorting を検出している。以上に挙げた放散イベントにおいてそのゲノム中に保持されていた祖先多型に関する 3 つの例を考慮すると, ハクジラ類の共通祖先においても祖先多型が保持されていてもおかしくない。しかし, ハクジラ類の系統に関する一連の SINE 研究では, イルカ類, マッコウクジラ類, ヒゲクジラ類の間に矛盾する SINE 遺伝子座が単離されなかったことから, ハクジラ類の共通祖先で祖先多型の incomplete lineage sorting は起きていないことを示している。このデータから我々は, 初期のハクジラ類の集団サイズが大分小さかったのではないかと考えている。现阶段では初期のハクジラ類の集団サイズを推定するのは難しいが, 既に絶滅した原始的なハクジラ類の化石記録などを調べて, そのグループがどれだけ繁栄していたのかをもう一度検証してみれば, この疑問に何らかのヒントの一部分が得られるかもしれない。

参 考 文 献

- Adachi, J. and Hasegawa, M. (1995). Phylogeny of whales: Dependence of the inference on species sampling, *Molecular Biology and Evolution*, **12**, 177–179.
- Arnason, U. and Gullberg, A. (1994). Relationship of baleen whales established by cytochrome b gene sequence comparison, *Nature*, **367**, 726–728.
- Arnason, U. and Gullberg, A. (1996). Cytochrome b nucleotide sequences and the identification of five primary lineages of extant cetaceans, *Molecular Biology and Evolution*, **13**, 407–417.
- Arnason, U., Gullberg, A. and Janke, A. (2004). Mitogenomic analyses provide new insights into cetacean origin and evolution, *Gene*, **333**, 27–34.
- Avise, J. C. (2000). *Phylogeography*, The history and formation of species, Harvard University Press, Massachusetts.
- Blin, N. and Stafford, D. W. (1976). A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes, *Nucleic Acids Research*, **3**, 2303–2308.
- Cassens, I., Vicario, S., Waddell, B., et al. (13 co-authors). (2000). Independent adaptation to riverine habitats allowed survival of ancient cetacean lineages, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 11343–11347.
- Cerchio, S. and Tucker, P. (1998). Influence of alignment on the mtDNA phylogeny of Cetacea: Questionable support for a Mysticeti/Physeteroidea clade, *Systematic Biology*, **47**, 336–344.
- de Muizon, C. (1991). A new Ziphiidae (Cetacea) from the early Miocene of Washington state (USA) and phylogenetic analysis of the major groups of odontocetes, *Bulletin du Museum National*

- d'Histoire Naturelle 4e Serie Section C*, **12**, 279–326.
- Deininger, P. L. and Batzer, M. A. (2002). Mammalian retroelements, *Genome Research*, **12**, 1455–1465.
- Fordyce, R. E. and Barnes, L. G. (1994). The evolutionary history of whales and dolphins, *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, **22**, 419–455.
- Heyning, J. E. (1989). Comparative facial anatomy of beaked whales (Ziphiidae) and a systematic revision of among the family of extant odontoceti, contribution in science, *National History Museum Los Angeles*, **405**, 1–64.
- Hillis, D. M. (1999). SINEs of the perfect character, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 9979–9981.
- Kazazian, H. H., Jr. (2000). Genetics. L1 retrotransposons shape the mammalian genome, *Science*, **289**, 1152–1153.
- Lum, J. K., Nikaido, M., Shimamura, M., Shimodaira, H., Shedlock, A. M., Okada, N. and Hasegawa, M. (2000). Consistency of SINE insertion topology and flanking sequence tree: Quantifying relationships among cetartiodactyls, *Molecular Biology and Evolution*, **17**, 1417–1424.
- Martin, A. P., Naylor G. J. and Palumbi, S. R. (1992). Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals, *Nature*, **357**, 153–155.
- May-Collado, L. and Agnarsson, I. (2006). Cytochrome b and Bayesian inference of whale phylogeny, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **38**, 344–354.
- Messenger, S. L. and Mcguire, J. A. (1998). Morphology, molecules, and the phylogenetics of cetaceans, *Systematic Biology*, **47**, 90–124.
- Milinkovitch, M. C. (1995). Molecular phylogeny of cetaceans prompts revision of morphological transformations, *Trends in Ecology and Evolution*, **10**, 328–334.
- Milinkovitch, M. C., Orti, G. and Meyer, A. (1993). Revised phylogeny of whales suggested by mitochondrial ribosomal DNA sequences, *Nature*, **361**, 346–348.
- Milinkovitch, M. C., Meyer, A. and Powell, J. R. (1994). Phylogeny of all major groups of cetaceans based on DNA sequences from three mitochondrial genes, *Molecular Biology and Evolution*, **11**, 939–948.
- Miyamoto, M. M. (1999). Molecular systematics: Perfect SINEs of evolutionary history?, *Current Biology*, **9**, R816–R819.
- Nei, M. and Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Press, New York.
- Nikaido, M., Rooney, A. P. and Okada, N. (1999). Phylogenetic relationships among cetartiodactyls based on insertions of short and long interspersed elements: Hippopotamuses are the closest extant relatives of whales, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 10261–10266.
- Nikaido, M., Matsuno, F., Hamilton, H., et al. (11 co-authors). (2001a). Retroposon analysis of major cetacean lineages: The monophyly of toothed whales and the paraphyly of river dolphins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 7384–7389.
- Nikaido, M., Matsuno, F., Abe, H., Shimamura, M., Hamilton, H., Matsubayashi, H. and Okada, N. (2001b). Evolution of CHR-2 SINEs in cetartiodactyl genomes: Possible evidence for the monophyletic origin of toothed whales, *Mammalian Genome*, **12**, 909–915.
- Nikaido, M., Hamilton, H., Makino, H., Sasaki, T., Takahashi, K., Goto, M., Kanda, N., Pastene, L. A. and Okada, N. (2006). Baleen whale phylogeny and a past extensive radiation event revealed by SINE insertion analysis, *Molecular Biology and Evolution*, **23**, 866–873.
- Nishida, S., Pastene, L. A., Goto, M. and Koike, H. (2003). SRY gene structure and phylogeny in

- the cetacean species, *Mammal Study*, **28**, 57–66.
- Nishihara, H., Satta, Y., Nikaido, M., Thewissen, J. G. M., Stanhope, M. J. and Okada, N. (2005). A retroposon analysis of Afrotherian phylogeny, *Molecular Biology and Evolution*, **22**, 1823–1833.
- Nishihara, H., Hasegawa, M. and Okada, N. (2006). Pegasoferae: A new mammalian clade revealed by tracking ancient retroposon insertions, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 9929–9934.
- Okada, N. (1991a). SINEs, *Current Opinion in Genetics and Development*, **1**, 498–504.
- Okada, N. (1991b). SINEs: Short interspersed repeated elements of the eukaryotic genome, *Trends in Ecology and Evolution*, **6**, 358–361.
- Okada, N., Shedlock, A. M. and Nikaido, M. (2004). Retroposon mapping in molecular systematics, *Mobile Genetic Elements* (eds. W. J. Miller and P. Capy), 189–226, Humana Press, New Jersey.
- Piskurek, O., Austin, C. C. and Okada, N. (2006). Sauria SINEs: Novel short interspersed retroposable elements that are widespread in reptile genomes, *Journal of Molecular Evolution*, **62**, 630–644.
- Ray, D. A., Xing, J., Hedges, D. J., et al. (13 co-authors). (2005). Alu insertion loci and platyrrhine primate phylogeny, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **35**, 117–126.
- Ray, D. A., Xing, J., Salem, A. H. and Batzer, M. A. (2006). SINEs of a nearly perfect character: Applications of the SINE method to phylogeny and population biology, *Systematic Biology*, **55**, 928–935.
- Rice, D. W. (1998). *Systematics and Distribution—Marine Mammals of the World—*, The Society of Marine Mammalogy, Lawrence, Kansas.
- Rogers, J. H. (1985). Origins of repeated DNA, *Nature*, **317**, 765–766.
- Roos, C., Schmitz, J. and Zischler, H. (2004). Primate jumping genes elucidate strepsirrhine phylogeny, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 10650–10654.
- Rychel, A. L., Reeder, T. W. and Berta, A. (2004). Phylogeny of mysticete whales based on mitochondrial and nuclear data, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **32**, 892–901.
- Salem, A. H., Ray, D. A., Xing, J., Callinan, P. A., Myers, J. S., Hedges, D. J., Garber, R. K., Witherspoon, D. J., Jorde, L. B. and Batzer, M. A. (2003). Alu elements and hominid phylogenetics, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 12787–12791.
- Sasaki, T., Nikaido, M., Hamilton, H., et al. (11 co-authors). (2005). Mitochondrial phylogenetics and evolution of mysticete whales, *Systematic Biology*, **54**, 77–90.
- Sasaki, T., Nikaido, M., Wada, S., Yamada, T. K., Cao, Y., Hasegawa, M. and Okada, N. (2006a). *Balaenoptera omurai* is a newly discovered baleen whale that represents an ancient evolutionary lineage, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **41**, 40–52.
- Sasaki, T., Yasukawa, Y., Takahashi, K., Miura, S., Shedlock, A. M. and Okada, N. (2006b). Extensive morphological convergence and rapid radiation in the evolutionary history of the family Geomydidae (old world pond turtles) revealed by SINE insertion analysis, *Systematic Biology*, **55**, 912–927.
- Schmitz, J., Ohme, M. and Zischler, H. (2002). The complete mitochondrial sequence of *Tarsius bancanus*: Evidence for an extensive nucleotide compositional plasticity of primate mitochondrial DNA, *Molecular Biology and Evolution*, **19**, 544–553.
- Schmitz, J., Piskurek, O. and Zischler, H. (2005). 40 million years of independent evolution: A mitochondrial gene and its corresponding nuclear pseudogene in primates, *Journal of Molecular Evolution*, **61**, 1–11.

- Shedlock, A. M. and Okada, N. (2000). SINE insertions: Powerful tools for molecular systematics, *BioEssays*, **22**, 148–160.
- Shedlock, A. M., Milinkovitch, M. C. and Okada, N. (2000). SINE evolution, missing data, and the origin of whales, *Systematic Biology*, **49**, 808–817.
- Shedlock, A. M., Takahashi, K. and Okada, N. (2004). SINEs of speciation: Tracking lineages with retroposons, *Trends in Ecology and Evolution*, **19**, 545–553.
- Shimamura, M., Yasue, H., Ohshima, K., Abe, H., Kato, H., Kishiro, T., Goto, M., Munechika, I. and Okada, N. (1997). Molecular evidence from retroposons that whales form a clade within even-toed ungulates, *Nature*, **388**, 666–670.
- Smith, M. R., Shivji, M. S., Waddell, V. G. and Stanhope, M. J. (1996). Phylogenetic evidence from the IRBP gene for the paraphyly of toothed whales, with mixed support for Cetacea as a suborder of Artiodactyla, *Molecular Biology and Evolution*, **13**, 918–922.
- Swofford, D. L. (1998). PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (Sinauer, Sunderland, MA), Version 4.0.
- Takahashi, K., Terai, Y., Nishida, M. and Okada, N. (2001). Phylogenetic relationships and ancient incomplete lineage sorting among cichlid fishes in Lake Tanganyika as revealed by analysis of the insertion of retroposons, *Molecular Biology and Evolution*, **18**, 2057–2066.
- Takahata, N. (1989). Gene genealogy in three related populations: Consistency probability between gene and population trees, *Genetics*, **122**, 957–966.
- Terai, Y., Takahashi, K., Nishida, M., Sato, T. and Okada, N. (2003). Using SINEs to probe ancient explosive speciation: “Hidden” radiation of African cichlids?, *Molecular Biology and Evolution*, **20**, 924–930.
- Waddell, P. J., Kishino, H. and Ota, R. (2001). A phylogenetic foundation for comparative mammalian genomics, *Genome Informatics Series*, **12**, 141–154.
- Weiner, A. M., Deininger, P. L. and Efstratiadis, A. (1986). Nonviral retroposons: Genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information, *Annual Review of Biochemistry*, **55**, 631–661.
- Xing, J., Wang, H., Han, K., Ray, D. A., Huang, C. H., Chemnick, L. G., Stewart, C.-B., Disotell, T. R., Ryder, O. A. and Batzer, M. A. (2005). A mobile element based phylogeny of Old World monkeys, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **37**, 872–880.

The Debates on Toothed Whales Monophyly: Reassessment of the Position of Sperm Whales by Using SINE Insertion Analysis

Masato Nikaido, Oliver Piskurek and Norihiro Okada

Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology

Morphological data have indicated that toothed whales form a monophyletic group. However, research published in the last several years has made the issue of the monophyly or paraphyly of toothed whales a subject of debate. Our group previously characterized three independent loci in which SINE insertions were shared among dolphins and sperm whales, thus supporting the traditional, morphologically based hypothesis of toothed whale monophyly. However, there are few additional molecular data supporting this topology. Thus, this issue is not yet definitively resolved. When the phylogeny of rapidly radiated taxa is examined using the SINE method, it is important to consider the ascertainment bias that arises when choosing a particular taxon for SINE loci screening. To overcome this methodological problem specific to the SINE method, we examined all possible topologies among sperm whales, dolphins and baleen whales by extensively screening SINE loci from species of all three lineages. We characterized nine independent SINE loci from the genomes of sperm whales and dolphins, all of which cluster sperm whales and dolphins but exclude baleen whales. Furthermore, we characterized ten independent loci from baleen whales, all of which were amplified in a common ancestor of these whales. From these observations, we conclude that toothed whales form a monophyletic group and that no ancestral SINE polymorphisms hinder their phylogenetic assignment despite the short divergence times of the major lineages of extant whales during evolution.