

## SINE/LINE の挿入と哺乳類の系統解析

DNA やタンパク質の置換を指標にして生物の系統を解析する学問分野は分子系統学と呼ばれている。最尤法を代表とする分子系統学の手法では、統計学の手法を用いて、その系統樹の信頼性を示すのが一般的である。すなわち、分子系統学から導かれる系統樹は確率的な証拠であり、決定的な証拠とはならない。この原因は、塩基置換やアミノ酸置換が、逆方向の置換が起こりうる現象であるからである。多重置換や復帰変異の可能性を否定出来ない以上、これらの手法で決定的な証拠を出すのは不可能である。多重置換も復帰変異も、取り得る状態が少ないことに起因している。逆に、非常に起こりにくい変異を用いれば、決定的な答えを出すことが出来る可能性がある。起こりにくい変異はもちろん、見つけにくい変異であるから、それを幅広く応用することは難しい。それでも、決定的な答えを出せる解析が魅力的であることも事実である。実際、そのような解析がなされている。

起こりにくい変異の一つは、ミトコンドリアゲノムでの遺伝子の並び順の変化である。かつて昆虫類は、同じ陸上に住む節足動物である多足類と近縁と考えられていた。しかし、他の動物では、コドン UUR (UUA, UUG) を認識するロイシン tRNA 遺伝子が CUN (CUA, CUG, CUU, CUC) を認識するロイシン tRNA と ND1 遺伝子との間にあるのに対して、昆虫類と甲殻類では、COI 遺伝子と COII 遺伝子の間に位置していることがわかった (Boore et al. 1998)。この遺伝子の並び順の変化が独立に起こるとは考えられないので、これは昆虫類と甲殻類が近縁である強い証拠となる。また、*engrailed* 遺伝子のイントロンの位置が、双翅目昆虫と鱗翅目昆虫でだけ一致することはこの2つが近縁であることを示している (Rokas et al. 1999)。このように逆方向の変化が起こらない変異を発見すれば系統を決定的に決めることが可能である。レトロトランスポゾンの挿入もそのような逆反応が起こらない変異である。

DNA トランスポゾン是一般に cut and paste 型の転移をするため、転移後には、挿入されていた配列が綺麗に取り除かれることが多い。一方、レトロトランスポゾンの転移は、copy and paste 型の転移をし、一度挿入されたコピーが綺麗に抜け落ちることは考えにくい。通常レトロトランスポゾンが除かれるときには周辺の配列と一緒に組み換えによって失われる。中でも SINE と呼ばれる非自立性のレトロトランスポゾンを利用した系統解析は、配列が短く、コピー数が多いこともあって、系統解析において大きな成果を挙げている。自立性のレトロトランスポゾンである LINE や LTR レトロトランスポゾンも同様に系統解析に利用できる。

### ＜クジラの系統的位置＞

SINE の挿入が哺乳類の系統を見事に示した例が、クジラとカバの単系統の証明である。クジラ類が偶蹄類と近縁であることは形態に基づいた系統解析からも示唆されていた。偶蹄類（偶蹄目）は伝統的に3つのグループ（亜目）に分けられる。一つは、反芻亜目 Ruminantia で牛、羊、鹿、キリン、ジャコウジカなどを含み、食べた草を胃から口に戻して咀嚼する反芻を行うのが特徴である。核脚亜目 Tylopoda はラクダ、猪豚亜目 Suiformes は豚、猪、ペッカリー、カバを含むグループである。Shimamura らはクジラ類と反芻類、カバに分布する SINE のグループを2つ発見し、9 座位について多数のクジラ類、偶蹄類で SINE の挿入の有無を調べた（Shimamura et al. 1997）。挿入の有無は、PCR と Southern hybridization、配列決定を併用して確認している。

この内、2つの座位では、クジラ類にのみ SINE の挿入があり、偶蹄類では挿入されていなかった。この結果はクジラ類が単系統であり、その共通祖先でこの2座位（\*1、\*2）の SINE が挿入されたことを示している。別の2座位（\*3、\*4）では、反芻類にのみ挿入があり、他の偶蹄類やクジラ類では挿入されていなかった。また、2座位（\*5、\*6）ではクジラ類、反芻類、そしてカバでだけ挿入が見られた。この2座位のうち片方では、周辺に別の2種類の SINE の挿入の有無が見られ、一方（\*7）は、ミンククジラとザトウクジラにのみ挿入されており、もう一方（\*8）は、牛、羊、鹿、キリンで挿入が確認された。また、豚でのみ SINE の挿入が確認された座位（\*9）もあった。

これらの結果をまとめると、以下のようなになる。偶蹄類とクジラ類の共通祖先から、まず、ラクダとイノシシの仲間が分岐した。その後、豚へ至る系統（イノシシ類）で\*9が挿入された。一方、反芻類、カバ、クジラ類の共通祖先で\*5、\*6が挿入された後、3つのグループに分かれた。一つはクジラの仲間です\*1、\*2が挿入された。反芻類の共通祖先では\*3、\*4が挿入され、その中で、牛、羊、鹿、キリンの共通祖先で\*8が挿入された。反芻類の内ジャコウジカ類が最初に分岐したことになる。最後の一つは、カバの仲間ですカバ特有の SINE 挿入は確認されていない。

この解析結果は、クジラ類が偶蹄類の内部から派生したことをはっきりと示している。そして、クジラの共通祖先は、カバか反芻類に近い動物だったことがわかる。そして、クジラに最も近い偶蹄類はカバであることが続く研究で明らかにされた（Nikaido et al. 1999）。

詳細は省くが、Nikaido らはクジラ類とカバ類でのみ共通する SINE の挿入座位を4カ所発見した。また、ラクダ以外の偶蹄類とクジラ類に共通する挿入も見つけた。Shimamura らの結果と合わせると、クジラ類はカバ類と姉妹群を形成し、偶蹄類の中ではラクダ類が最初に分岐したことになる。

クジラの例は SINE の挿入を指標にした系統解析の華々しい業績である。一方で、挿入位置周辺が保存されていなければ解析できないという問題点があるため、より古い分岐について調べるのは困難である。しかし、最近では、ゲノム配列の情報が豊富になったのを利用して哺乳類の高次の系統関係を明らかにすることに成功している。古い分岐を調べる場合には、SINE よりも LINE の挿入が良く用いられる。

#### <哺乳類の高次系統解析>

論文の紹介の前に簡単に哺乳類の系統について簡単に説明する。近年の分子系統解析では、胎盤を持つ哺乳類、真獣類は大きく 4 つのグループに分かれることが示されている。（注：厳密には有袋類も原始的な胎盤を持っている）4 つのグループとは、異節類 Xenarthra、アフリカ獣類 Afrotheria、ローラシア獣類 Laurasiatheria、そして、真主齧類 Euarchontoglires である。それぞれに主要な動物群を記すと、

異節類： ナマケモノ、アリクイ、アルマジロ  
 アフリカ獣類： ゾウ、ジュゴン、ツチブタ、ハイラックス、キンモグラ  
 ローラシア獣類： イヌ、クジラ、ウマ、ウシ、モグラ、コウモリ  
 真主齧類： ネズミ、リス、ウサギ、ヒト、ヒヨケザル、ツパイ

これら 4 グループ相互の関係、そして、内部の大きな系統関係を明らかにすることが現在の課題である。真獣類は、有袋類（コアラ、カンガルー、オポッサム）と姉妹群を形成し、更に以前に単孔類（カモノハシ、ハリモグラ）と分岐したと考えられている。

Nishihara らはアフリカ獣類の内部の系統関係を LINE/SINE の挿入を利用して解析した (Nishihara et al. 2005)。アフリカ獣類は長鼻目（ゾウ）、海牛目（ジュゴン、マナティー）、管歯目（ツチブタ）、岩狸目（ハイラックス）、長脚目（ハネジネズミ）、及び、以前は食虫類と考えられていたテンレック、キンモグラを含むアフリカトガリネズミ目を含む。Nishihara らは exon にプライマーを設計し、intron 全長を PCR によって増幅し、intron に挿入されている LINE/SINE の挿入の有無を調べる手法で、古い挿入を解析した。4 座位の挿入がアフリカ獣類の単系統を示し、5 座位の挿入が長鼻目、海牛目、岩狸目の単系統を、2 座位の挿入が管歯目とアフリカトガリネズミ目の単系統を示唆した。一方、管歯目とアフリカトガリネズミ目とハネジネズミ目、海牛目と岩狸目の単系統性がそれぞれ 1 座位の挿入から示唆された。これについて Nishihara らは、前者は他の手法による解析と一致しているため受け入れ、後者は受け入れないという態度を取っている。これは、後者では、他の解析が長鼻目と海牛目との単系統を示唆していること、そして、多型を残したまま短期間で種分岐する場合には、

SINE の挿入が間違っただけを示唆する可能性があることを理由として挙げている。シクリッドの解析では、SINE の挿入多型が種を超えて分布することが示されており、LINE/SINE の挿入による系統解析が必ずしも確定的な結論を出すわけではないことがわかる。しかし、塩基置換と異なり、挿入の頻度は高くないため、多数の挿入を調べることでこの問題も解決できるだろう。それはともかく、Nishihara らの結果からは、アフリカ獣類は 2 つの系統、近蹄類 Paenungulata（長鼻目、海牛目、岩狸目）とアフリカ食虫類 Afroinsectiphilia（管歯目、長脚目、アフリカトガリネズミ目）に最初に分岐したことが示唆される。

Kriegs らは真獣類の 4 大グループ間の相互関係について解析を行っている (Kriegs et al. 2006)。彼らは、LINE/SINE の古い挿入を用いるために、ヒト、マウス、イヌのゲノム配列から、周囲の配列が 75% 以上の相同性を持っている挿入のみを抽出した。これを基に、237 座位を PCR によって解析し、28 座位について有用な情報を得た。これらの座位では、挿入の際にできる両端の直列反復配列 (TSD) が確認でき、挿入前の配列も見ることができると保存されていた。彼らは真獣類の全ての目の代表に加えて、有袋類のオポッサムも解析している。まず、L1 (LINE1) の 4 座位の挿入については真獣類の共通祖先で挿入されたことがわかった。すなわち、真獣類では全て挿入が確認されたが、オポッサムでは挿入されていなかった。2 座位の L1 は、興味深いことに、アフリカ獣類、ローラシア獣類、真主齧類では挿入されていたが、異節類では挿入されていなかった。11 座位の L1 はローラシア獣類と真主齧類で存在が確認された。また、それぞれのグループの共通祖先で挿入されている LINE/SINE も見つかっている。以上の結果は、真獣類の内、異節類が最初に分岐し、その後アフリカ獣類、最後にローラシア獣類と真主齧類が分かれたことを示唆している。ちなみに、Kriegs らの論文では、真主齧類 Euarchontoglires は超霊長類 Supraprimates という表記を用いている。また、ローラシア獣類と真主齧類を合わせて、北方獣類 Boreotheria と呼ぶ。

続く Nishihara らの解析でも北方獣類の単系統性は 10 座位の挿入で支持された (Nishihara et al. 2006)。彼らの解析では、北方獣類とアフリカ獣類の単系統を支持する挿入は得られていないが、より細かい系統を支持する結果が得られている。それは、奇蹄類と食肉類に共通に挿入された 1 座位とそれに翼手類を加えたグループに共通する 4 座位の挿入である。そして、これらと鯨偶蹄類とに共通する挿入は 3 カ所得られている。分子系統解析から食肉類 (含鰭脚類) と最も近縁であることが示唆されている有鱗類のゲノムが入手できなかったらしく解析されていないのが残念だが、これを分子系統通り食肉類に最も近縁なグループとするならば、この 2 者に奇蹄類を加えたグループ、更に翼手類を加えたグループ、更に更に鯨偶蹄類を加えたグループがそれぞれ単系統となること

になる。Nishihara らは食肉類、有鱗類、奇蹄類、翼手類を含むグループを Pegasoferae と呼ぶことを提唱している。食肉類と有鱗類とのグループは Ferae と呼ばれており、これに有翼馬ペガサスの名前を加えることで奇蹄類と翼手類を表現している。ペガサスの翼は鳥の翼ではなく、コウモリの翼だったらしい。付録に SINE/LINE 法も含めた最新の分子系統解析結果をまとめてみたので参考にしてみたい。

以上のように、LINE/SINE（注：上述の論文では LTR レトロトランスポゾンも使用されている）の挿入を利用した系統解析は哺乳類で盛んに用いられている。これは、哺乳類が我々ヒトを含み、大型の動物が多いために一般に興味を惹かれる解析材料であることが一因ではあるが、同時に、目レベルの分岐年代が 1 億年未満と、比較的新しい時代に多様化したことも理由として上げられると思われる。例えば、昆虫の目レベルの分岐は 4～5 億年前と考えられており、そのような古い時代に挿入された LINE/SINE が周辺の配列と共に保存されていることは滅多にないだろう。新生代に入って多様化した生物群として次に適用されそうなのは鳥類、あるいは真骨魚類であろうか？

Boore JL, Lavrov DV, Brown WM.

Gene translocation links insects and crustaceans.

Nature. 1998 Apr 16;392(6677):667-668.

Rokas A, Kathirithamby J, Holland PW.

Intron insertion as a phylogenetic character: the engrailed homeobox of Strepsiptera does not indicate affinity with Diptera.

Insect Mol Biol. 1999 Nov;8(4):527-530.

Shimamura M, Yasue H, Ohshima K, Abe H, Kato H, Kishiro T, Goto M,

Munechika I, Okada N.

Molecular evidence from retroposons that whales form a clade within even-toed ungulates.

Nature. 1997 Aug 14;388(6643):666-670.

Nikaido M, Rooney AP, Okada N.

Phylogenetic relationships among cetartiodactyls based on insertions of short and long interspersed elements: hippopotamuses are the closest extant relatives of whales.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Aug 31;96(18):10261-10266.

Nishihara H, Satta Y, Nikaido M, Thewissen JG, Stanhope MJ, Okada N.

A retroposon analysis of Afrotherian phylogeny.

Mol Biol Evol. 2005 Sep;22(9):1823-1833.

Kriegs JO, Churakov G, Kiefmann M, Jordan U, Brosius J, Schmitz J.

Retroposed elements as archives for the evolutionary history of placental mammals.

PLoS Biol. 2006 Apr;4(4):e91.

Nishihara H, Hasegawa M, Okada N.

Pegasoferae, an unexpected mammalian clade revealed by tracking ancient retroposon insertions.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jun 27;103(26):9929-9934.

2006/06/02

加筆修正 2006/07/05

小島 健司 著

禁 無断複写転載