T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ
Science Tokyo Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	レトロポゾンの挿入比較に基づく水鳥類の系統解析
Title(English)	
著者(和文)	蔵本多恵
Author(English)	Tae Kuramoto
出典(和文)	学位:博士（理学）, 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10084号, 授与年月日:2016年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:梶川 正樹,木村 宏,本郷 裕一,田中 幹子,二階堂 雅人,岡田 典弘
Citation(English)	Degree:, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10084号, Conferred date:2016/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

Powered by T2R2 (Science Tokyo Research Repository)

平成 27 年度

博士論文

レトロポゾンの挿入比較に基づく水鳥類の系統解析

東京工業大学　生命理工学研究科

生体システム専攻

藏本多恵

指導教員　梶川正樹　講師

目次

序論　鳥類とその系統……4

第一章　系統解析……6-19

1-1. 系統学……6-8

1-1-1. 分類学 - 系統学以前 - ……6

1-1-2. 進化論の台頭と系統学の誕生……6-8

1-2. 系統解析の手法……8-12

1-2-1. 形態学……8-9

1-2-2. 分子系統解析……9-12

a) ミトコンドリアゲノム解析……11

b) 核遺伝子座解析……11-12

1-3. レトロポゾン法……12-19

1-3-1. レトロポゾンとは……12-14

1-3-2. レトロポゾン法の原理と実際……14-15

1-3-3. レトロポゾン法の特色……15-16

1-3-4. 系統ソーティング……17-18

1-3-5. レトロポゾン法の欠点を補う次世代シーケンサーの利用……18-19

第二章　水鳥類の系統解析……22-40

2-1. 鳥類の起原と系統……22-23

2-2. 鳥類の系統解析……23-27

2-2-1. 水鳥類の系統解析……23-25

2-2-2. コウノトリ科の系統的位置……25-27

2-3. 本研究の概要……27

2-4. 方法と材料……28-33

2-4-1. 解析に用いた種とゲノム抽出……28

2-4-2. NGS を活用した CR1 とその周辺配列の単離……28-30

2-4-3. flankingPCR……31-32

2-4-4. 先行研究のゲノムデータベースを利用した CR1 とその周辺配列の単離……32-33

2-5. 結果……34-40

2-5-1. NGS を活用した CR1 挿入解析……34-38

a) 水鳥類の単系統性を示す挿入……34-35

b) 水鳥類の内最初に分岐した系統群を示す挿入……35

c) コウノトリ科の系統的位置を解明する挿入……36-37

d) ペリカン科＋サギ科＋トキ科の単系統性を示唆する挿入……37

e) ミズナギドリ目＋ペンギン目単系統性を示唆する挿入……37-38

f) 矛盾した CR1 挿入……38

2-5-2. ゲノムスケールの CR1 挿入解析……39-40

a) ペリカン科、サギ科、トキ科、カツオドリ上科の内
最初に分岐した系統を示す挿入……39

b) ペリカン科、サギ科、トキ科の系統関係を示す挿入……40

第三章　水鳥類の進化史の解明および実験手法の評価……42-55

3-1. 考察……42-54

3-1-1. 矛盾した CR1 挿入が示唆する水鳥類における種分化の速度……42-43

3-1-2. レトロポゾン解析によって示唆された祖先集団における交雑の可能性……43-46

3-1-3. 系統解析への NGS 技術の役割……46-47

3-1-4. CR1 サブファミリーについて……47-48

3-1-5. 種特異的な挿入の系統解析への利用……49-50

3-1-6. レトロポゾン法による系統解析結果と先行研究との比較……50-52

3-1-7. レトロポゾン法により解明されたコウノトリ科の系統的位置と
形態学との比較から示唆される収斂および真の共有派生形質……52-55

3-2. 総説……56

図表……58-97

参考文献……99-108

謝辞……109

報文目録・講演目録……110

序論　鳥類とその系統

鳥類は恐竜類から分岐し、嘴や羽毛といった特徴を共有する、脊椎動物の 1 グループである(図 1)。白亜紀末に発生した大量絶滅の前後に大規模な種分化を果たし、今や地球の空を支配するに至った鳥類は現在約 10,000 種を数えると言われている。これは、同じく恐竜類に代わって陸上を席巻した脊椎動物である哺乳類の 2 倍近い種数である。走鳥類やペンギンのような「飛ばない鳥」を除いては、鳥類には飛行するという特異な動作からもたらされる制約が存在する。そのために、骨格や筋組織、全体的な外観、また、その大きさや重さといった形態的な多様性は乏しいと思われがちである。しかし実際には、祖先から受け継いだ制約を残しつつも、彼らは各生息環境に沿うように多種多様な進化を遂げている。その体形、翼や嘴の形状、さらに羽毛の色彩や行動などは非常に多彩であり、多くの研究者を惹き付けて止まない。本研究ではこのように魅力的な鳥類の世界を「系統」すなわち「進化」という観点から論じていきたいと考えている。

第一章では本研究の基本的概念である「系統学」についてその成り立ちから解説し、その方法論を紹介する。続いて第二章では現在知られている鳥類の進化の歴史について述べ、その系統解析の現在と課題について紹介し、本研究の主題と方法および結果を述べる。第三章では実験結果から考察される水鳥の進化史や形態学への提言、また、実験手法の評価について述べる。

第一章

系統解析

1-1. 系統学

1-1-1. 分類学 - 系統学以前 -

多種多様な生物群をある秩序に基づいて分類し、理解しようとする試みは、進化や系統という概念が存在する以前から行われてきた。古くは紀元前 4 世紀にアリストテレスが著した「動物誌（Historia Animalium）」が体系的な分類学の始まりとされているが、この中ですでに動物の外観や解剖学的類似性、生態に基づく分類と体系化がなされている。近代における分類学の基礎となったのは、リンネが「自然の体系(Systema Naturae)」(1735)で提案したリンネ式階層分類体系である。これは、多様な集団の中から類似するものの集団(クラスター)を作り、さらにそのクラスターを階層的に配置することで集団を体系づけるものである。このような概念は現在の分類学にも引き継がれている。

1-1-2. 進化論の台頭と系統学の誕生

18 世紀になると、リンネの階層的分類体系や比較解剖学、また、地質学や古生物学の発展により、生物種は不変ではなく、段階的に変化していくものであるとする考え方が幾人かの学者によって提唱され始めた(e. g. Erasmus Darwin 1794; Lamarck 1809)。そして 19 世紀半ば(1859)Charles Darwin によって「種の起源」が著され、進化論が提唱されると「進化」という概念が生物の多様性を理解するための強力な手段として取り入れられることになった。Darwin は生物進化を「変化を伴う由来」と定義し、また、「自然界の生物の多様性は進化によって秩序立てられている」と述べた。これはすなわち、全ての生物種は時間軸に沿って変化していくこと、さらには進化の歴史に沿った系統(lineage)で表すことができるということを示している。この概念により、今まで種や集団の類似性を基に構

築してきた分類体系が、実際には生物進化の過程、すなわち系統を再現したものであることが明らかとなった。体系と、それを生じさせた要因である進化が関連付けられたのである。こうして、進化論の登場以降、分類学は過去の歴史を復元する系統学に内包されることになった。

伝統的な分類学においては、重要と考えられる形質に重きを置いて、それを手掛かりとした分類が行われてきた。しかし、進化によって生じた系統を推定するには、系統を反映した形質について評価を行う必要がある。研究者によって重きを置く形質が異なり、しかもどの形質が系統を反映しているか判断できない以上、伝統分類は主観的過ぎる方法であると言わざるを得ない。このような問題点を解決し、正確な系統推定を目指す手法として分岐学的手法が提唱された(Hennig 1966)。

類似性に基づく伝統分類に対し、分岐分類は系統関係のみを基にした分類体系である。分岐分類法の原理は、その多くが 1966 年に Hennig が体系づけた系統推定に関する方法論に基づいている。Hennig は相同形質を二つの分類群の祖先に見られる原始的な形質(共有祖先形質: Symplesiomorphy)と、それから派生した子孫的な形質(共有派生形質: Synapomorphy)とに区別した。その上で、共有派生形質のみが系統的に再近縁な群(姉妹群)の証拠であり、系統推定に必要なのは共有派生形質のみであることを提示した。分岐学では、主観的な分析からではなく共有する派生形質という客観的で明確な基準を設けている点が特長である。そのため、現在は分岐学に基づいた生物の体系化および系統推定が主流となっている。

このように、系統推定は元々生物の体系化の方法論として派生し、分類のために行われる手法であった。分類学は長い間生物の多様性を理解するための基礎的学問として存在してきた。しかし、分類によって構築されてきた体系の正体が進化によって生じた生物の系

統関係である以上、現在において生物の多様性や進化を理解するための手段は系統推定すなわち系統学であると言える。系統学では、時間軸に沿って変化していく生物が蓄積してきた過去の情報を解読することで、それらの進化の歴史を推定することが可能である。また、系統解析によって得られた生物の系統関係は、現在の生物における現象の種間比較とその解釈に対して有用な情報源となる。例えば形態や生態の比較(Smith 2012; Felice and O'Connor 2014)、または遺伝子配列やタンパク質の機能比較 (Sugawara et al. 2002; Hunt et al. 2009)においても系統情報が比較基盤となって情報の評価や解釈が行われる。

1-2. 系統解析の手法

Hennig 以降の系統学においては、進化の結果生じる形質変化を基に、より正確な系統推定を目指して様々な系統解析法が用いられてきた。解析に関する方法論は割愛するが、以降、系統推定の手段として形態学および分子生物学的手法についてそれぞれの特徴を述べる。

1-2-1. 形態学

生物の形や構造といった形態的形質の比較によって系統推定を行う形態的手法は、1980年代に分子生物学的手法にとってかわられるまで、主流の系統解析法であった。この手法の利点は、化石種についても系統推定が可能な点である。例えば、後述する通り鳥類は恐竜の一グループから派生した系統であるとする説が現在では主流となっているが、この類縁関係は数々の化石記録と現生鳥類との比較から導き出されたものである(e. g. Huxley 1870, Ostrom 1975)。

しかし形態学においては、対象とする形質の相同性の評価が困難な場合があるという問

題がある。形態的形質は機能の現れとも言えるが、これは直接自然選択の対象となるため、類似した環境下では類似した形態が異なる系統で独立に進化(収斂進化)することがある(Livezey and Zusi 2007; Felice and O'Connor 2014)。このような収斂進化による類似と、共通祖先に由来する共有派生形質との区別は困難である。また、一度獲得された形質が祖先型に戻る逆転現象に関しても同様に系統推定の妨げとなる。このような共通祖先に由来しない類似をホモプラシーと呼ぶ。形態学的解析において数多くの形質を指標として評価すれば、共有派生形質の中に少量のホモプラシーが含まれていても系統推定に対しては影響を及ぼさない。しかし実際には収斂進化による形質は様々な系統群において多数知られており、ホモプラシーの存在は形態学的手法にとって大きな障害となっている。

また、化石種における古生物学的手法においては、全身骨格が化石として発掘される例が非常に少ないため、多数の形質を指標とすることでホモプラシーの悪影響を最小化することが難しい。しかも、化石として残りやすい部分は頭骨や歯の形態は特に環境の影響を受けやすく、その形質がホモプラシーか否かを見極めるのも非常に困難である。

1-2-2. 分子系統解析

分子生物学の概念や実験技術の発展により、1960 年代後半になると系統推定にも生体分子を用いた解析法が導入されるようになった。特に、DNA の塩基配列決定技術の進歩に伴い確立された塩基配列の解読による分子系統解析的手法は、現在の系統推定において重要である。

分子レベルでの変異のほとんどは自然選択に対して中立な現象であり、時間経過に比例して蓄積されると考えられる(中立説: Kimura 1968)。そのため、分子を用いた系統推定は形態比較による解析と比較すると極めて客観的に行うことができる。また、主観に影響されがちな形態学的手法とは異なり、実験による再現性が得られることも分子データの客観性

を高めている。このような理由から、分子系統解析は近年の系統推定法の主流となっている。

しかしながら、塩基配列においても形態と同様にホモプラシーが存在し、解析結果の相違を引き起こす重大な要因の一つとなっている。DNA はわずか 4 種の塩基から成り立っているため、別系統における相同サイトで独立に同じ塩基置換が起きることは頻繁に観察される。また、比較する種間の遺伝的距離が大きい、すなわち分岐後の経過時間が長い場合は、一度生じた塩基置換が再度元に戻ってしまう確率も高い。これが分子進化における収斂現象と逆転現象と言える。ただし、このような多重置換による影響はデータ量を増やしていくことで軽減できると考えられる。ゲノム中における遺伝子配列のデータ量は膨大であるため、たとえホモプラシーの頻度が高くてもその影響を軽減できる可能性は高い。それでもなお、同じデータを使用しても解析法によって異なる系統樹を推定してしまうことがある。ホモプラシーの影響によって誤った系統推定が起きる例として、特に種間において進化速度に大きな差がある場合が挙げられる。これは長枝誘因(long branch attraction)と呼ばれ、系統樹の中で進化速度の速い系統同士が、実際の系統関係に関わらず互いに近縁な位置におかれてしまう現象である。そのため、解析に用いるデータや種の選択、また解析法を十分に検討することが重要となる。

塩基配列を指標とした分子系統解析では、形態比較に基づく解析とは違い、遺伝子の系統関係を推定することで間接的に種の系統樹を構築する。そのため、真の種の系統関係を推定するには、第一に真の遺伝子の系統関係が推定できていることが重要であり、その上で遺伝子の系統関係が種の系統関係と同型(isomorphic)である必要がある(Pamilo and Nei 1988)。遺伝子座の系統樹と種の系統樹が一致しない場合、その原因としてホモプラシーの影響の他に不完全な系統ソーティング(incomplete lineage sorting: ILS)が挙げられる(Avise 1994)。詳しくは後述するが、これは通常の配列比較による系統解析では検出が困難な現象である。

このように、正確な遺伝子の系統関係を推定する際にホモプラシーの影響は重大である。また、正確な遺伝子の系統関係から種の系統関係を議論する際には ILS の存在が重要であ

る。これらの影響からもたらされる問題は、後述するレトロポゾン法のようにホモプラシーを考慮する必要が無い手法でない限り、根本的な解決は不可能であると言える。

現在分子系統学的指標とされているのは塩基配列であることは上述した通りだが、その中でも主に利用されるのはミトコンドリアゲノムと核遺伝子である。以下にこれら 2 つの特徴について述べる。

a) ミトコンドリアゲノム解析

ミトコンドリアゲノムの部分配列を用いた系統解析は、分子生物学的手法が取り入れられた比較的初期の段階から様々な生物種について行われてきた。また、近年においては機器の性能向上により全長配列を用いた解析が主流になりつつある。

ミトコンドリアは独自のゲノムを持っているが、このミトコンドリアゲノムでは核ゲノムと比較して進化速度が数倍～十倍以上であることが知られている(Pesole et al. 1999)。このような進化速度の速さから、ごく最近に分岐した系統の関係を解析するのに適している(Ingman et al. 2000)。ただし、分岐年代の古い系統の場合、例えば哺乳類の目間の系統解析では度重なるホモプラシーの蓄積が結果に大きく影響してしまうことがある(Corneli and Ward, 2000; Gibson et al. 2005)。ホモプラシーの影響は配列の情報量を増やすことで解消される可能性が高いが、ミトコンドリアゲノムは動物においては約 16kbp という短い環状ゲノムであるため、情報量そのものに限界がある。

b) 核遺伝子座解析

ミトコンドリアゲノム解析による結果の再評価という意味も含め、それ以外の配列デー

タ、すなわち核遺伝子の配列を含む膨大な分子データの解析が近年は盛んである。核ゲノムはミトコンドリアと比較すると多量の配列データを利用することができるため、ホモプラシーの影響を情報量で克服することが可能である。解析に用いることのできる公の配列データベースも近年充実してきており(e. g. NCBI Resource Coordinators 2015; Rosenbloom et al. 2015)、より信頼性の高い解析を行う環境も整ってきている。また、核遺伝子には遺伝子ごとに進化速度が大きく異なるという特徴がある。そのため、古くに分岐した系統関係の推定には進化速度の遅い遺伝子を、最近の分岐の場合には進化速度の速い遺伝子を選択して指標とすることで、より適切な解析結果を得ることができる。

ただし、核遺伝子座はゲノム中で重複している可能性があり、もし相同でない遺伝子を用いてしまった場合、遺伝子の系統樹すら誤って推定してしまう可能性がある。実際核遺伝子にはドメインを共有する遺伝子ファミリーや偽遺伝子の存在が知られており、正しく推定を行うためには比較する遺伝子が真に相同遺伝子であることを確認する必要がある。

分子系統解析において現在主に用いられている手法について述べてきたが、その長所を保ちながら短所を克服できる方法として、本研究で用いたレトロポゾンの挿入を指標とする系統解析法が存在する。以下にレトロポゾンおよびその性質を利用した解析法であるレトロポゾン法について述べる。

1-3. レトロポゾン法

1-3-1. レトロポゾンとは

真核生物のゲノムは高い割合で散在性反復配列に占められており、その多くが転移因子であることが知られている。転移因子の内、DNA を介して転移するものを DNA トランス

ポゾンと呼ぶが、それに対し RNA を介して転移するものをレトロポゾンと称する(Rogers, 1985; Weiner et al. 1986; Kazazian 2004)。レトロポゾンには主に LTR 型レトロポゾンと LINE、SINE の 3 種が存在する。SINE はこれまでに多くの系統解析に用いられ、系統学上の問題を解決してきたが(Nikaido et al. 1999; Nishihara et al. 2005)、後述するように鳥類のゲノム中にはほぼ存在しないため、本研究では利用しなかった。そのため、ここでは本研究で使用した LINE について、その転移機構を述べる(図 2)。LINE(Long Interspersed repetitive Element; Eickbush, 1994; Bao et al. 2015)は数 kbp の長さを持つ。ゲノム中の転移においては、第一段階として RNA polymerase II による配列全体の転写が起き、続いて内部の ORF にコードされている逆転写酵素とエンドヌクレアーゼが翻訳される。これらの酵素は自身の由来である mRNA の 3'末端を認識して結合し、エンドヌクレアーゼによってニックの入れられたゲノム上のランダムな位置に、逆転写反応によって合成された cDNA が挿入される(Kajikawa and Okada 2002)。レトロポゾンの詳細な転移機構にはまだ未解明な部分が残されているが、少なくとも自らのコピーをゲノム中に挿入していくという増幅形式は似通っていると考えられる(Deininger and Batzer2002)。そのため、後述するように、いずれのレトロポゾンも系統解析において有用であると考えられる。

ゲノム中に存在する主要な転移因子の種類は生物種によって異なることが知られている。例えばヒトゲノムで最も多く見られる転移因子は LINE1(L1)であり、転移因子全体の 38%を占めている(Lander et al. 2001)(図 3B)。鳥類ゲノムにおいては同じく LINE の一種である CR1(Chicken Repeat 1; Stumph et al. 1981; Burch et al. 1993; Suh et al. 2014)が最も活発な転移因子であり、ニワトリではゲノム中に存在する転移因子の約 74%、コピー数としては約 85%が CR1 に占められている(Hillier et al. 2004) (図 3A)。また、同じレトロポゾンである SINE は、ニワトリゲノム中には MIR ファミリーの痕跡的なものを除いて存在しないことが明らかとなっている(Hillier et al. 2004)。そのため、本研究のレトロポゾン挿入解析においては CR1 を利用した。CR1 の全長は約 5kb だが、ほとんどの場合それよりも

短い配列が見いだされる。これは挿入が 3'末端から開始された後、配列全てが挿入される前に反応が止まることで 5'末端が切り詰められるためであり(Vandergon et al.1994; Hillier et al. 2004)、ニワトリゲノムにおいては 90%以上の CR1 が 1kb 以下の長さである。

また、レトロポゾンには配列の類似によって分類されたサブファミリーが存在する(Hillier et al. 2004; Bao et al. 2015)(図 4)。これらサブファミリーは、各系統の進化において転移活性の高い時期や低い時期があることが知られている(Watanabe et al. 2006b; Kriegs et al. 2007; Liu et al. 2009)(図 5)。そのため、調べたい系統の祖先種において活発に転移していたサブファミリーを推定すれば、レトロポゾンはより効率的な系統解析の指標として利用することができる。

1-3-2. レトロポゾン法の原理と実際

レトロポゾンを系統的指標として扱い、その挿入に基づいて行う系統解析法をレトロポゾン法と呼ぶ。レトロポゾン法では、各生物種におけるレトロポゾンの挿入の有無を比較することで系統関係を推定する。例として種 A, B, C, D について系統推定を行う場合を示す(図 6)。遺伝子座 X において、種 A,B,C ではレトロポゾンの挿入が確認されるが種 D では見られない場合、遺伝子座 X におけるレトロポゾンの挿入は種 D の分岐後、種 A, B, C の共通祖先のゲノムで起きたと考えられ、種 A, B, C が単系統であることが示唆される。同様に、ほかの遺伝子座 Y で種 A, B にレトロポゾンが挿入され、種 C,D には挿入されていない場合は、種 A と B の単系統性が示される。このように遺伝子座 X と Y の結果を統合することで、これら内群 4 種について統計処理や外群比較の必要がない系統推定が可能となる。

公のゲノムデータベースを利用できる場合を除き、一般的には、レトロポゾンとその挿入遺伝子座の配列はハイブリダイゼーション法を用いたスクリーニングによって収集される。この手法では、まず対象とするいくつかの種のゲノム DNA ライブラリが作成され、サザン

ハイブリダイゼーション法によってレトロポゾンを含むクローンが選抜される。こうして得られたクローンのシーケンスを行うことで、レトロポゾンおよびその上流もしくは下流の配列情報が得られる。続いてレトロポゾンを挟み込むように上流および下流領域にプライマーを設計し、系統情報を得たい種のゲノム DNA をテンプレートとした PCR を行う。プライマーをレトロポゾンの両側面に設計することから、この PCR を flanking PCR と呼ぶ。こうして得られた PCR 産物を電気泳動し、バンドの長さからレトロポゾンの有無を確認する。一般的には近縁な系統群間のレトロポゾン挿入パターン比較は以上の PCR および電気泳動のみでも可能である。ただし、遠縁の系統群間の比較では他のレトロポゾンの挿入等によって PCR 産物の長さが変動する可能性があるため、シーケンスによる配列の確認が必須である。

1-3-3. レトロポゾン法の特色

上述したような転移機構によって、レトロポゾンの挿入は系統推定の指標としての有利な特徴を持つ(Shedlock and Okada 2000)。レトロポゾンの挿入は数百から数 kbp の DNA element の挿入というゲノム構造の大きな変化であり、各挿入に対する系統情報としての信憑性は、塩基置換の解析と比べても非常に高い。挿入された因子の有無を種間で比較する場合、種間や遺伝子間での塩基配列の偏りや進化速度の違いは結果に影響しない。これらは一般の分子系統解析では影響することがあるため、レトロポゾンの挿入はより信頼度の高い指標と言える。さらに、前述したように、一般的に近縁種間の比較の際には PCR と電気泳動のみでレトロポゾンの挿入の有無を確認できる。そのため、統計処理の必要な系統推定と比較すると検出と評価が容易である。

レトロポゾンの特徴として特筆すべきなのは、一般的にレトロポゾンはゲノム中のランダムな位置に挿入されることから、別種のゲノム中で全く同一の座位に独立に挿入が起き

る確率がほとんど無に等しいということである。また、挿入は不可逆的反応であり、一度挿入された座位からレトロポゾンが痕跡を残さず正確に抜け落ちるという現象は知られていない。これらの特徴により、それぞれ収斂および逆転現象、すなわちホモプラシーの可能性を除外することができる(Rokas and Holland 2000; Shedlock and Okada 2000)。

一般的に、形態学および現在広く行われている配列比較による分子系統解析ではホモプラシーの存在が検出される。そのため、ホモプラシーによる影響の軽減を目的として、解析ごとに異なる基準を設けた上で最も確からしい系統樹を構築することになる。解析法としては、基準として遺伝的距離の総和を用いる近接結合法や、全体のホモプラシーの頻度を節約的に推定する最節約法、観察されるパターンの実現確率が高い系統樹を選択する最尤法がある。加えて、形質や遺伝子の進化速度の違いを考慮して、適切なモデルによって重みづけを行う必要もある。しかし、レトロポゾン法ではこうした統計処理を行う必要が無い。ホモプラシーの存在を仮定しないということは、観察されたレトロポゾンの挿入パターンは遺伝子の系統関係を正確に反映しているということだからである。これにより、統計処理の際に生じる長枝誘因といった問題も克服される。系統樹構築の際に外群を設定する必要も無い。また、仮に遺伝子の系統樹が矛盾した場合は、その原因からホモプラシーの影響を除外できるため、後述する不完全な系統ソーティング(ILS)の検出が可能になる。

このように系統解析における多くの利点が挙げられるレトロポゾンだが、形態学や配列比較とは異なり、分岐年代の推定が不可能であるという欠点がある。レトロポゾン法はゲノム中に存在するレトロポゾンの挿入がどの生物種の共通祖先において起きたかを判定する解析法であるため、系統群の分岐順序推定への信頼度は高いものの、その分岐がいつ起きたのかについては言及できない。しかし、正確な分岐年代の算出には信頼度の高い系統樹が必須であるため、レトロポゾン法によって構築された系統樹に基づいて他の遺伝子配列を用いた年代測定を行なえば、より信頼度の高い分岐年代が得られると考えられる。

1-3-4. 系統ソーティング

前述したとおり、塩基配列に基づく系統樹は実際には種の系統そのものではなく、遺伝子の系統関係を表すものである。そのため、まずは遺伝子の系統を推定し、その上で種の系統関係を議論しなければならない。しかし、種の系統関係を議論するにあたって、遺伝子座毎に矛盾する系統関係が支持されることがある。理論上、遺伝子の系統樹が一致しない場合、その原因として種間交雑による遺伝子移入や、以下に説明する不完全な系統ソーティング(ILS)が挙げられる。

分子系統解析で用いられる塩基配列における特徴的な現象の一つに系統ソーティングがある。ある一つの対立遺伝子座において中立的な遺伝子変異が起きた場合、変異が集団内に固定されるにはある程度の期間が必要である(中立説: Kimura 1968)。この時間が十分であれば固定された変異はその後分岐した各系統に振り分けられ、種の系統樹と遺伝子の系統樹は一致する(図 7①)。このように遺伝子の変異パターンが正しく種の系統関係を反映しながら分岐していく状態を系統ソーティングと呼ぶ。しかし実際には固定のための十分な時間が経過しない場合も多い。特にごく短期間に複数回種分化が起きた場合、集団内多型が維持されたまま新たな系統ができる可能性がある。この時派生した各系統においてどちらの対立遺伝子座が固定されるかはランダムな遺伝的浮動によって決定される。そのため遺伝子の変異パターンに基づく系統推定が種の系統関係を反映しない状況が生じるのである(図 7②)。このような現象を不完全な系統ソーティング(incomplete lineage sorting: ILS)と呼ぶ。ILS はある系統において短期間の分岐が起きた場合に見られる現象であるため、系統推定の不一致が ILS によるものであることを証明できればその系統の分岐速度を推測することも可能である。しかし、通常の配列比較による系統推定ではホモプラシーの影響が存在するため、遺伝子の系統樹を正しく推定できている保証が無いことが多い。そのため、遺伝子と種の系統樹の不一致が遺伝子の系統推定の誤りによるものなのか、もしくは ILS や遺伝

子移入といった原因の内いずれによるものなのかを見極めることが困難である。一方で、レトロポゾンの挿入はホモプラシーを考慮する必要が無いため、遺伝子の系統関係を正確に推定することができる。したがって、推定された系統関係に矛盾が生じた場合、その原因はほとんどの場合 ILS によるものだと考えられる。上述した通り、ILS は短期間の分岐の結果生じるため、レトロポゾン法による系統解析において矛盾した挿入が観察された場合、それは急速な種分化の証拠にもなる(Terai et al. 2003; Shedlock et al. 2004; Nikaido et al. 2006; Nishihara et al. 2009)。

1-3-5. レトロポゾン法の欠点を補う次世代シーケンサーの利用

サザンハイブリダイゼーション法を用いたレトロポゾン法では、ゲノムライブラリの構築とスクリーニングを何度も行う必要があり(e. g. Watanabe et al. 2006b; Nishihara et al. 2008)、多大な手間と費用が必要である。最近では、CR1 挿入遺伝子座を PCR によって探索する、より費用のかからない手法(Suh et al. 2012)も提唱されている。また、PCR と磁性ビーズを用いてより広範囲に SINE を単離する手法も提唱されているが、これは未だ相当の実験的労力が必要とされる方法である(Platt II et al. 2015)。加えて、レトロポゾンは時間経過とともに配列に変異が蓄積するため、配列の類似性によって選別を行うサザンハイブリダイゼーション法では最近挿入されたものが単離されやすく、初期に起きた分岐を見出すのが難しいという問題点もある。

このような従来のハイブリダイゼーション法を基にした手法の不便さを克服するために、本研究では次世代シーケンサー(NGS)技術を活用した。現在の生命科学において、DNA および RNA の配列解読(シーケンシング)技術は必要不可欠なものとなっている。Sanger ら(1977)による塩基配列解読法の登場以降、塩基配列の解析によって様々な生命現象における疑問が解決されてきた。Sanger らによる技術を基に開発された従来型のシーケンサーは、

今なお生物の系統解析のみならず様々な研究に用いられている。また、2000 年代後半からのシーケンシング技術の更なる発展によって、従来型のシーケンサーでは難しかった解析も可能となった。このような後発で発展型のシーケンサーを次世代シーケンサー(NGS)と総称する。NGS にはいくつかの種類があり、それぞれ多様な用途への応用が可能だが、いずれも従来型と比較して非常に高い処理能力(スループット)を持つ。これにより大容量のデータを高速で得ることができる。

本研究では、従来のスクリーニング法における問題点の解決には大容量の配列情報を用いることが有効であると考え、NGS によって鳥類ゲノムの幅広い領域についてシーケンスを行った。そのデータを基にしてスクリーニングを行うことで、広範囲かつ低コストに CR1 を探索することが可能である。

第二章

水鳥類の系統解析

2-1. 鳥類の起原と系統

現生鳥類は、恐竜の中でも獣脚類と呼ばれる一群から進化したとする説が現在では主流である(Ostrom 1975; O'Connor and Calessens 2005; Lee et al. 2014)。現生鳥類と恐竜との関係について図 1 に示す(Organ et al. 2007)。最古の鳥類と考えられているのは始祖鳥(*Archaeopteryx lithographica*)である(Padian and Chiappe 1998)。その化石は 1860 年にドイツ・バイエルンで発見され、爬虫類と鳥類の間をつなぐ存在(ミッシング・リンク)として注目された(Huxley 1870)。この発見はダーウィンが「種の起源」を著した二年後であり、進化論を裏付ける好例ともなった。約 1 億 5000 万年前のジュラ紀に出現した始祖鳥以降、白亜紀後期には現生鳥類に直接つながる多くの系統が出現したことが分子系統解析から示唆されている(Cooper and Penny 1997)。さらに約 6600 万年前の K-Pg 境界、すなわち白亜紀と古第三紀の境界前後には鳥類の大規模な適応放散が起きたことが化石記録と分子生物学的解析の両方から支持されている(Feduccia 1995; Cracraft 2001; Dyke and Van Tuinen 2004; Jetz et al. 2012; Jarvis et al. 2014)。その時期については解析手法によって若干の食い違いがあるが、鳥類の内多くの系統群が比較的短期間に種分化したことは、おそらく事実と考えられる。このような急速な分岐のために、鳥類の系統解析は解析法による見解の相違が生じやすく、混乱を生じてきたと言える。

全ての現生鳥類が新鳥亜綱(新鳥類)に属することは広く受け入れられている。その中でも最も初期に分岐したのは、ダチョウやキーウィ等が含まれる古顎類とそれ以外の新鳥類全てを含む新顎類(Pycraft 1900)の 2 つの系統群である(Cracraft 1986; Livezey and Zusi 2007; van Tuinen 2000; Hackett et al. 2008)。さらに、新顎類は最初に分岐した Galloanserae(キジ目＋カモ目)に属する鳥類とそれ以外の Neoaves に大別される(sibley et al. 1990; Livezey and Zusi 2007; Jarvis et al. 2014) (図 8)。このように、Galloanserae 以前の新鳥類については大まかな分岐順序が解明されており、その結果も形態学に基づく解

析と分子に基づく解析両方から支持されている(e. g. Livezey and Zusi 2007; Jarvis et al. 2014)。しかし Neoaves の系統関係については今なお不明瞭な点が残されている。

2-2. 鳥類の系統解析

1960 年代からの分子生物学の勃興に伴い、鳥類の系統解析においても分子生物学的手法が用いられるようになった。その先駆けとなったのが Sibley と Ahlquist(1990)による DNA-DNA ハイブリダイゼーション法を用いた網羅的な解析である。ただし、それでもなお鳥類の系統解析や分類は、比較的近年に至るまで形態学的手法に基づいた解析結果が重視されていた(e. g. Huxley 1867; Wetmore 1960)。これは比較的早い段階で分子生物学的解析による網羅的な解析が行われてきた哺乳類とは対照的である。その理由として、鳥類の分子系統解析においてはミトコンドリアや核遺伝子座といった解析に用いる配列の種類および解析法によって結果に食い違いが生じる例が多く、混乱をきたしてきた経緯が大きな要因として考えられる。しかしながら、近年の鳥類の分子系統解析研究の積み重ねにより、ミトコンドリア全長配列やドラフトもしくは全長のゲノム配列といったデータは着々と蓄積されてきている(NCBI Resource Coordinators 2015; Rosenbloom et al. 2015)。こうした潮流や最近の核遺伝子を用いた網羅的な解析(Hackett et al. 2008; 図 9)を受け、国際的な鳥類の分類体系の見直しが行われた(Gill and Donsker, 2015)。核遺伝子による大規模な鳥類の系統解析はその後も行われ(Jarvis et al. 2014)(図 10)、鳥類の系統についての新たな知見も多数得られてきている。

2-2-1. 水鳥類の系統解析

最近のゲノムデータの充実によって、現生鳥類(新鳥類)の進化史への全般的な理解は大

幅に進展した(Jarvis et al. 2014)。それにもかかわらず、未だいくつかの問題は解決されていない。特に長年にわたって議論の的となっている疑問の一つに、水鳥類(Aequornithes; Mayr 2011)の系統関係がある。水鳥類にはミズナギドリ目、ペンギン目、アビ目、従来のコウノトリ目であるコウノトリ科、サギ科、トキ科、ハシビロコウ科、シュモクドリ科、および従来のペリカン目であるペリカン科、カツオドリ科、ウ科、ヘビウ科、グンカンドリ科が含まれる(表 1)。これらの科が進化的に近い関係にあることは形態学的および分子系統学的解析から支持されてきた(Sibley and Ahlquist 1990; Fain and Houde 2004; Ericson et al. 2006; Livezey and Zusi 2007; Hackett et al. 2008; Pacheco et al. 2011; Gibb et al. 2013)(図 9,10,11)。それにもかかわらず、水鳥類内部の系統関係の一部は未だ確立されていない。以下に形態学的および分子系統学的解析による先行研究の例を挙げる(図 11、表 2)。

Livezey と Zusi(2007)による形態学的解析では水鳥類を含む系統群はアビ目、カイツブリ目、ペンギン目、ミズナギドリ目からなる系統群と、その他の水鳥類を含む系統群に大別された(図 11B)。しかし、後者の系統群には水鳥類に加えてフラミンゴ科やネッタイチョウ科が含まれていた。

分子系統解析の内ミトコンドリア全長配列を用いた研究では、同じ種やデータを用いても解析法ごとに推定される系統関係が異なる場合が見られた。例えば Pacheco ら(2011)の場合外群に Galloanserae(キジ目＋カモ目)を設定した解析からはアビ目が水鳥類を含む系統群の中で最初に分岐したという結果が得られたが(図 11C①)、外郡を設定しない場合アビ目はミズナギドリ目と単系統群を成すという結果が導き出されるため(図 11C②)、明確な結論は得られなかった。また、Gibb ら(2013)の解析(図 11D)でも解析法によって結論が異なっていた。核遺伝子を用いた解析では、データ量の少なかった初期の研究では詳細な系統関係を推測することができなかった。例えば、1 遺伝子を用いた Fain と Houde(2004)(図 11E)や 5 遺伝子を用いた Ericson ら(2006) (図 11F)の解析では水鳥類が近縁であることは示されたものの、それらの細かい系統関係は示すことができなかった。同じく核遺伝子を用いて

おり、データ量が大幅に向上した Hackett ら(2008)(図 9)や Jarvis ら(2014)(図 10)による解析は多くの鳥類の系統関係を明らかにした。それでもなお、水鳥類の系統関係については未だ混乱が続いている。例えば Hackett ら(2008)の場合は水鳥類の系統関係を示すブートストラップ値の一部は高くなく、強い証拠は得られていなかった(図 11G)。さらに、Hackett ら(2008)の用いた 19 遺伝子に加えて計 50 の核遺伝子を用いた解析も行われたが(Kimball et al. 2013)、この研究ではミズナギドリ目とペンギン目からなる姉妹群が水鳥類の中では最初に分岐したことが示唆されており(図 11H)、これは一部同じデータセットを用いた Hackett ら(2008)や、 Jarvis ら(2014)の結果と異なっていた。

また、ミトコンドリアゲノムや核遺伝子を用いた分子系統解析の他にも、レトロポゾン法による鳥類の系統解析が行われている(Watanabe et al. 2006b; Kaiser et al. 2007; Suh et al. 2011; Suh et al. 2012; Haddarth et al. 2012)。しかし、水鳥類を用いた解析はほとんど無い。当研究室で以前行われたレトロポゾンの挿入に基づく解析(Watanabe et al. 2006b)では水鳥類に属する鳥類が用いられた。ただし、得られた遺伝子座数が少なかったためにこれらの系統関係を明確に示すには至らなかった。

このように系統関係が不明瞭な水鳥類の科の中でも、特にコウノトリ科の系統学的位置はいまだ確立されておらず、分子系統解析を持ってしても未解明のままである(Hackett et al. 2008; Gibb et al. 2013; Kimball et al. 2013)。

2-2-2. コウノトリ科の系統的位置

コウノトリ科は伝統的にトキ科等と共にコウノトリ目に分類されてきたが(e. g. Bonaparte 1854; Wetmore 1960)、その後コウノトリ目を構成していた科は各研究によって異なる系統的位置を示すようになった(Garrod 1874; Olson 1979)。以下に分子系統解析から提唱されたコウノトリ科の系統的位置の例を示す(表 3)。

初期の分子系統解析法である DNA-DNA ハイブリダイゼーションを用いた研究では、コウノトリ科にコンドルが内包され、さらにその姉妹群としてペリカン科が提唱された(Sibley and Ahlquist 1990)(図 11A)。その一方で、同じく DNA-DNA ハイブリダイゼーション法による解析ではコウノトリ科とミズナギドリ目＋ペンギン目の分岐群との姉妹関係も示唆された(van Tuinen et al. 2001)。また、ミトコンドリアゲノム全長配列解析からは、おそらく各解析に用いられた種の選択や解析法によって異なる結果が得られている(Watanabe et al. 2006a; Morgan-Richards et al. 2008; Pacheco et al. 2011; Gibb et al. 2013)。例えばある研究ではサギ科がコウノトリ科に最も近いことが提唱された(Gibb et al. 2013)(図 11D)一方で、別の研究ではコウノトリ科とペンギン目との間の姉妹関係も示唆された(Pacheco et al. 2011) (図 11C)。

近年の核遺伝子の解析は鳥類の系統における多くの疑問を解決した（Hackett et al. 2008; Jarvis et al. 2014）。それでもなおコウノトリ科の系統的位置について解明するには至っていない。例えば Hackett ら(2008)の解析では、コウノトリ科の系統的位置を示すノードのブートストラップ確率は 81 と十分に高いとは言えなかった(図 11G)。さらに、Kimball ら(2013)は Hackett ら(2008)の用いたデータセットに著者らの選択した 31 の遺伝子データを加えた 50 遺伝子による系統解析を行った。しかし、この解析では Hackett ら(2008)とは異なる結果が得られており、さらにコウノトリ科の系統的位置を示すノードのブートストラップ確率も 50 以下という低い値であった(図 11H)。そのため、両者ともにコウノトリ科の系統的位置を確定することはできなかった。また、Jarvis ら(2014)の研究ではコウノトリ科の鳥類自体が解析に用いられていなかった(図 10)。

このように、コウノトリ科の系統的位置は未だ決定されていない。しかしコウノトリ科周辺の系統関係については以下のような仮説が提唱されている。近年の核遺伝子解析からは伝統的なペリカン目とコウノトリ目が多系統であり、また、伝統的にコウノトリ目に分類さ

れてきたフラミンゴが水鳥類から除外されるべきであることが示唆された(Hackett et al. 2008; Kimball et al. 2013; Jarvis et al. 2014)。その結果として、最近の鳥類の分類ではペリカン科、サギ科、トキ科、ハシビロコウ科、シュモクドリ科をペリカン科とし、コウノトリ目はコウノトリ科のみを含むことが定義された(Gill and Donsker, 2015)。また、カツオドリ上科(カツオドリ科＋ウ科＋ヘビウ科; Cracraft 1985)とグンカンドリ科はペリカン目から除外されて、新設されたカツオドリ目に分類された(表 1)。

2-3. 本研究の概要

核遺伝子座を用いた解析をもってしても、鳥類の系統関係は未だ明確な解決を見ていない。本研究では、その中でも不明瞭である水鳥類の系統関係、特にコウノトリ科の系統的位置に着目した。また、他の分子生物学的手法とは異なった角度からの解明を目指し、レトロポゾン法による解析を行った。さらに、本研究におけるレトロポゾン法には新たな試みとして NGS 技術を活用し、解析の効率化を図った。この試みによりレトロポゾン法という手法の向上がなされ、系統解析におけるレトロポゾン法の有用性を示すことができると期待される。また、レトロポゾン法によって信頼性の高い水鳥類の系統樹を構築することで水鳥類の進化の道筋を解明すること、さらには形態および生態の進化についての新たな知見が得られると考えられる。

2-4. 方法と材料

2-4-1. 解析に用いた種とゲノム抽出

本研究に用いた鳥類を分類区分およびサンプル提供元と共に表に示す(表 4)。

前述したとおり、水鳥類には 5 目（IOC 分類では 6 目）17 科が含まれる(表 1)。本研究における CR1 挿入解析には水鳥類に属する鳥類の代表としてカッショクペリカン(ペリカン科)、コサギ(サギ科)、マダガスカルトキ(トキ科)、ケープシロカツオドリ(カツオドリ科)、スキハシコウ・コウノトリ、(コウノトリ科)、ノドジロクロミズナギドリ(ミズナギドリ科)、キングペンギン(ペンギン科)、アビ(アビ科)の 8 科 9 種の鳥類を使用した。これらは新分類の各目を網羅している。それに加えて、過去の研究において水鳥類に近縁である可能性が示された鳥類としてカグー、タンチョウ、カンムリカイツブリ、オオフラミンゴを用いた(Fain and Houde 2004; Ericson et al. 2006; Livezey and Zusi 2007; Hackett et al. 2008; Jarvis et al. 2014)。

DNA 抽出および精製はこれら鳥類の筋もしくは肝組織片から Sambrook ら(1989)に従って行った。

2-4-2. NGS を活用した CR1 とその周辺配列の単離

本研究では NGS を活用してノドジロクロミズナギドリ(Procellaria aequinoctialis)、コサギ(Egretta garzetta)、カッショクペリカン(Pelecanus occidentalis)のゲノムから CR1 挿入座位を収集した。この工程について図 12 に示す。

上記 3 種の筋または肝組織から抽出したゲノム DNA は断片化され、約 170bp の断片のみ精製された。これら約 170bp の断片からなるゲノムライブラリについて、Illumina

HiSeq2000 を使ったペアエンドシーケンス(断片の両端からのシーケンシング)が実施された(図 12: 1)。以上のゲノムライブラリ作成およびペアエンドシーケンシングは BGI(Beijing Genomics Institute)に委託した。その結果、ミズナギドリゲノムからは 5,939,158、サギゲノムからは 8,389,771、ペリカンゲノムからは 9,918,513 ペアの長さ 100 塩基の断片が得られた。通常 NGS のペアエンドシーケンスではペアをつなげないで短い配列のまま解析に用いる。しかし本解析ではある程度の長さの断片が必要となる。これは後述するプライマー設計に用いるためである。この時必要とされる塩基長は 80bp 以上だが、ペアの片側はそれぞれ 100bp であり、CR1 配列も含めると解析に十分な長さとは言えない。そのため、本研究においては得られたペアについて、15 塩基以上が一致した場合ペアをつないで断片の全長配列とした(図 12: 2)。この結果、ミズナギドリゲノムからは 5,768,938(97.15%)、サギゲノムからは 8,056,647(96%)、ペリカンゲノムからは 9,693,328(97.7%)の断片配列が得られた。

続いて、これらの断片配列から CR1 を探索することで、その周辺(flanking)配列との境界領域を含む断片を収集した。これは、p.15 で述べたように CR1 の周辺配列にプライマーを設計することで、各鳥類ゲノムにおける挿入の有無を判定するためである。CR1 配列の探索には Repeat Masker を用いた。Repeat Masker は、反復配列ライブラリと比較することで任意の配列にどのような反復配列が含まれるのかを探索するプログラムである。本解析では、得られた断片配列と鳥類の反復配列ライブラリ(ver. 20140131)との比較を行うことで CR1 の含まれる断片を収集した。また同時に、断片内の CR1 について長さ、位置、サブファミリーの種類といった情報も取得した。上述した通り、この時得られた CR1 について挿入解析を行うには CR1 の周辺配列が重要になる。そのため、断片内の CR1 の長さは問わないが、周辺配列は 80bp 以上の長さがあるものを選抜した(図 12: 3)。この選抜によって得られた CR1 を含む配列はミズナギドリゲノムにおいて 15,168、サギゲノムにおいて 62,781、ペリカンゲノムにおいて 65,853 配列であった。

周辺配列を基にプライマーを設計する際には、複数の鳥類ゲノムにおける相同遺伝子座

の情報が必要となる。そのため全ての CR1 周辺配列について BLAST 検索を行い、まずはゼブラフィンチゲノムと比較した(r = 2, G = 5, E = 2, E-value < 1×10^{-10}) (図 12: 4)。これは、現在 Neoaves の中では唯一完成されている鳥類ゲノムデータである。検索でヒットした配列が複数ある場合はパラログである可能性があるため解析からは除外し、ヒットした配列が一つだった場合のみ相同遺伝子座とみなした。この時、 2 種の遠縁の鳥類、すなわちニワトリとゼブラフィンチゲノムにおいては CR1 の挿入が起きていない座位を選別して用いた。ニワトリは Galloanserae に属するが、これらの系統は新鳥類の進化史における初期の段階に分岐したことが知られている。また、ゼブラフィンチはスズメ目に属するが、これらの鳥類も水鳥類の系統群とは比較的早い段階で分岐している。本研究では水鳥類の系統解析に主眼を置いているため、水鳥類とは系統的に離れた種における CR1 挿入を排除することで、より効率的に水鳥類の系統関係を示す挿入を得られると考えた。こうして結果的に得られたゼブラフィンチの相同遺伝子座は、ミズナギドリゲノムにおいて 4,098、サギゲノムにおいて 15,114、ペリカンゲノムにおいて 16,258 であった。続いて、ゼブラフィンチの相同遺伝子座の情報を元に、ゲノムデータが分かっている種であるガラパゴスフィンチ、セキセイインコ、ニワトリ、シチメンチョウにおいて類似する相同遺伝子座配列を UCSC データベースの multi-species alignment data から収集した(geoFor1.7way.maf)。また、セーカーハヤブサとハヤブサについては GenBank からドラフトゲノムを取得して解析に加えた (GenBank accession numbers: Falco peregrenus; AKMT00000000, F. cherrug; AKMU00000000)。これら 2 種における相同遺伝子座配列はゼブラフィンチの配列を用いて BLAST 検索によって取得した。

こうして収集された CR1 挿入座位の相同遺伝子座については MAFFT(Katoh and Standley 2013)を用いてアラインメントを行った。これを統合アラインメントとし(図 12: 5)、以下のプライマー設計に用いた。上記のように各系統群に渡る複数の鳥類ゲノムを利用することで、幅広い系統群のゲノムに利用できるプライマーの設計が可能であると考えた。

2-4-3. flankingPCR

上記の手順により得られた CR1 について、他の水鳥類および近縁と考えられる鳥類ゲノムにおける挿入の有無を確認するために、表 4 に示した鳥類ゲノムを用いて PCR を行った。

PCR 解析のためのプライマーは上述の統合アラインメントを参考とし、挿入された CR1 の周辺配列の比較的保存された領域に設計した。この時プライマーは上流と下流から CR1 を挟み込むように配置した。

最終的に、ミズナギドリゲノムから得られた CR1 挿入座位については 49 遺伝子座に対してランダムにプライマーを設計した。同様に、サギゲノムからは 119、ペリカンゲノムからは 96 遺伝子座に対してプライマーを設計した。このプライマーと各種鳥類ゲノムを用いて、P.15 で前述したように flanking PCR を行った。PCR 反応には Ex Taq™(TaKaRa Bio, Japan)を用い、そのプロトコルに従った。反応溶液の組成は、ゲノム溶液(200ng/μl)を 1μl 、10×Ex Taq buffer を 3μl、dNTP Mixture (2.5mM)を 2.4μl、一組のプライマー(100μM)を 0.05μl ずつ、Ex Taq™を 0.1μl 入れ、計 30μl になるように滅菌水を加えて調整した。反応条件は以下の通りである。Annealing や Extention の時間はプライマーの Tm 値や予想される反応産物の長さによって適時変更した。

反応条件

94℃（Pre-denature）	3 min.	
94℃（Denature）	1 min.	↑
50 or 55℃（Annealing）	30 sec.	35 cycle
72℃（Extention）	2~3 min.	
72℃（Full up Extention）	3~4 min.	

flanking PCR によって得られた PCR 産物についてはアガロース電気泳動を行い、バンドの長さから CR1 挿入の有無を確認した。バンドパターンから系統情報を持つ可能性があると判断された CR1 挿入遺伝子座については、PCR 産物の精製後その塩基配列を決定した。精製はイソプロパノール沈殿もしくはゲル切り出しによって行った。切り出しには QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA)を用い、そのプロトコルに従って操作した。

塩基配列の決定には BigDye™ terminator cycle sequencing Kit(Applied Biosystems, USA)を用いたシーケンス反応をプロトコルに従って行った。シーケンスは東工大技術部バイオ技術センターの協力により、3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)を用いて行われた。

シーケンスによって得られた CR1 挿入遺伝子座の各種ごとの相同配列は Genetix ver.6 (GENETIX, Japan)を用いて解析した。解析した配列は MEGA を用いてアラインメントを行い、RepeatMasker によって CR1 挿入を確認することで、真に系統情報を持つ CR1 挿入座位であることを確定した。また、ここで系統情報を持つことが確認された CR1 挿入座位の各鳥類における相同遺伝子座は、全て DDBJ (DNA Data Bank of Japan)に登録した (accession numbers: LC072269-LC072649)。

2-4-4. 先行研究のゲノムデータベースを利用した CR1 とその周辺配列の単離

さらに本研究ではカツオドリ上科、サギ科、トキ科、ペリカン科の系統関係を明らかにするため、Jarvis ら(2014)によって報告された配列情報を利用して上記鳥類のゲノムスケールの CR1 探索を行った。この探索により得られた CR1 挿入遺伝子座について、各鳥類ゲノムにおける挿入の有無を解析することで不完全だった系統情報を補完した。工程を図 13 に示す。

上に示した 4 つの系統群の代表として、カワウ(カツオドリ上科)、コサギ(サギ科)、トキ

(トキ科)、ニシハイイロペリカン(ペリカン科)のゲノムアセンブリデータを解析に用いた(表4)。これら 4 種のゲノムアセンブリ中の全 CR1 は、鳥類の反復配列ライブラリ(ver. 20140131)を用いて RepeatMasker によって同定した(図 13: 1)。その結果得られた CR1 の上流および下流の 2 つの周辺配列各 150bp について、両断片を独立に扱った上で他の 3 種のゲノムに対する BLAST 検索を行い、3 種における相同遺伝子座を探索した(図 13: 2)。この時、BLAST 検索でヒットした配列の内 5'側の best-hit と 3'側の best-hit が同じ向きで、なおかつその間が 2kbp 未満の配列を相同遺伝子座とみなした。また、上流と下流 2 つの配列についてそれぞれ 3 種の鳥類に対する BLAST 検索を行っているが、この 6 回の検索の内一回でも配列の該当が無かった場合は解析に用いなかった。

この手順で全ての CR1 挿入座位について 4 種における相同配列を取得し、MAFFT を用いてアラインメントを行った(図 13: 3)。これらの内重複したデータを除いた相同遺伝子座の総数は 28,114 であった。ここから種特異的もしくは 4 種全てに挿入が見られると判断された座位を除くと、系統情報を持つ可能性がある遺伝子座が 623 座位得られた。続いてこれらのアラインメントを参照し、目視および RepeatMasker によってそれぞれの遺伝子座における CR1 挿入の有無を判断した(図 13: 3)。さらに、系統情報を持つ全ての遺伝子座について、遠縁であるゼブラフィンチもしくはフルマカモメ(ミズナギドリ目)、アビ(アビ目)ゲノムにおける相同遺伝子座を検索し、CR1 の挿入が見られないことを確認した(図 13: 4)。最終的に、実際に系統情報を持つことが確認された CR1 挿入遺伝子座は計 97 であった。

2-5. 結果

2-5-1. NGS を活用した CR1 挿入解析

NGS を活用して 3 種の鳥類ゲノムから CR1 を探索した結果、ノドジロクロミズナギドリからは最終的に 4,098 の CR1 が単離された。その内 49 の配列をランダムに選択し、CR1 挿入箇所の上流と下流にプライマーを設計し、PCR を行った。同様に、コサギから単離された 15,114 の CR1 からは 119 か所、カッショクペリカンから得られた 16,258 の CR1 については 96 か所を選択して、各種鳥類における CR1 挿入の有無を確認した。この時、CR1 挿入が一種のみに見られる場合は種特異的な挿入とみなして本研究の系統推定には用いなかった。また、挿入が 2 種以上に見られ、なおかつ少なくとも一種以上に挿入が見られない遺伝子座を、系統情報を持つ CR1 挿入遺伝子座とした。

解析の結果、3 種の鳥類から見いだされた CR1 挿入座位の内ノドジロクロミズナギドリからは 10、コサギからは 12、カッショクペリカンからは 8 の遺伝子座が系統情報を持つことが確認された。各遺伝子座における各種鳥類の CR1 挿入の有無を表 5 に示し、また、これらの結果をまとめた系統樹を図 14 に示す。系統情報を持つ CR1 挿入遺伝子座を単離するのに用いたプライマーは全て表 6 に掲載する。また、CR1 挿入解析に用いた種と、プライマー設計に利用した鳥類種名を表 7 に示す。以下、図 14 に従って各グループの単系統性について説明する。

a) 水鳥類の単系統性を示す挿入

系統情報を持つと確認された 30 座位の内、5 つの CR1 挿入座位(Pet464、Pet791、Pet012、Pet649、LEg129)ではペリカンからアビまでの水鳥類 8 科のゲノムにおいてのみ CR1 の挿入が確認された(図 14: 枝❶)。この結果は水鳥類の単系統性を示唆するものである。また、

本研究ではこれら 5 つの CR1 挿入パターンと矛盾する CR1 は見出されなかった。このことから水鳥類の単系統性が統計的に有意に示された（p=0.0041, 尤度比検定; Waddell et al. 2001）。例としてこれら 5 座位の内 Pet012 の電気泳動像と配列のアラインメントの一部を図 15 に示す。また、他の遺伝子座の一部についてもアラインメントを図 16 に示す。Pet012 では水鳥 8 科の PCR 産物は約 560bp であり、それ以外の 4 科では約 160bp の短い PCR 産物が得られた。このことから当遺伝子座においては約 400bp の CR1 が挿入されたことが分かる。実際にシーケンシングによって配列を確認した所、8 科のゲノムにおいて種毎に特異的な変異によって長さは異なるものの、全長 390~420bp の CR1 が挿入されていた。

b）水鳥類の内最初に分岐した系統群を示す挿入

さらに、アビ目を除く水鳥類(ペリカン科、サギ科、トキ科、カツオドリ科、コウノトリ科、ミズナギドリ目、ペンギン目)ゲノムにのみ CR1 挿入が見られる遺伝子座も 8 座位見いだされた(Pet387、Pet600、Pet998、Pet296、LEg650、LEg796、LEg510、BPe020)。この結果により旧ペリカン目、旧コウノトリ目、ミズナギドリ目、ペンギン目の単系統性が強く支持され(p = 0.00015)、同時に水鳥類の内アビ目が最初に分岐したことも示唆された(図 14: 枝❷)。例としてこれら 8 座位の内 Pet600 の電気泳動像と配列のアラインメントの一部を図 17 に示す。また、他の遺伝子座の一部についてもアラインメントを図 18 に示す。Pet600 ではアビ目以外の水鳥類の PCR 産物は約 1380bp であり、それ以外の 5 種では約 230bp の短い PCR 産物が得られた。このことから当遺伝子座においては約 1150bp の CR1 が挿入されたことが分かる。実際にシーケンシングによって配列を確認した所、上記 7 科のゲノムにおいて種ごとに特異的な変異によって長さは異なるものの、930~1180bp の CR1 が挿入されていた。

c) コウノトリ科の系統的位置を示す挿入

本研究では、系統情報を持つ 30 遺伝子座の中でもコウノトリ科の系統的位置に関する情報を持つ CR1 挿入遺伝子座を計 12 座位見出した。これらの内、LEg443、BPe708、BPe507、BPe029、BPe263、BPe495、BPe376 の 7 座位は伝統的なコウノトリ目とペリカン目に含まれるペリカン科、サギ科、トキ科、カツオドリ科、コウノトリ科でのみ CR1 の挿入が認められたため、この系統群の単系統性が示された(図 14: 枝❸)。また、アビ目以外の水鳥類が単系統であるという結果を踏まえると、伝統的なコウノトリ目とペリカン目からなる系統群が Austrodyptornithes(ミズナギドリ目＋ペンギン目)と姉妹群であることも示唆された。例としてこれら 7 座位の内 BPe376 の電気泳動像と配列のアラインメントの一部を図 19 に示す。また、他の遺伝子座の一部についてもアラインメントを図 20 に示す。BPe376 では上記鳥類の PCR 産物は約 530bp であり、それ以外の 7 種では約 260bp の短い PCR 産物が得られた。このことから当遺伝子座においては約 270bp の CR1 が挿入されたことが分かる。実際にシーケンシングによって配列を確認した所、上記 5 科のゲノムにおいて種ごとに特異的な変異によって長さは異なるものの、240~280bp の CR1 が挿入されていた。

加えて、5 つの遺伝子座(LEg216、LEg908、LEg584、LEg772、BPe333)では、枝❸で示された単系統群(旧コウノトリ目＋旧ペリカン目)の内コウノトリ科以外でのみ CR1 挿入が確認された(図 14: 枝❹)。これにより、コウノトリ科が伝統的なコウノトリ目とペリカン目グループから最初に分岐したことが示唆された。この事は伝統的なコウノトリ目(コウノトリ科、トキ科、サギ科、シュモクドリ科、ハシビロコウ科、フラミンゴ科)が実際には単系統群を成さず、それぞれの科が系統樹上で散逸した系統的位置を占める(多系統)ことを示している。例としてこれらの内 LEg216 の電気泳動像と配列のアラインメントの一部を図 21 に示す。また、他の遺伝子座の一部についてもアラインメントを図 22 に示す。LEg216 では上記鳥類 4 科の PCR 産物は約 1180bp であり、それ以外の 8 科では約 280bp の短い

PCR 産物が得られた。このことから当遺伝子座においては約 900bp の CR1 が挿入されたことが分かる。実際にシーケンシングによって配列を確認した所、上記 4 科のゲノムにおいて種ごとに特異的な変異によって長さは異なるものの、840~900bp の CR1 が挿入されていた。また、LEg216 の CR1 には、レトロポゾン挿入時に見られる特徴である挿入箇所両末端の配列重複(Target Site Duplication: TSD)が見られた。

d) ペリカン科＋サギ科＋トキ科の単系統性を示唆する挿入

他の系統関係については、ペリカン科＋サギ科＋トキ科のみにみられる CR1 挿入を 1 遺伝子座発見した(BPe396)。決定的な証拠とはなり得ない数だが、上記 3 科の単系統性を示唆する結果と言える(図 14: 枝❺)。BPe396 の電気泳動像と配列のアラインメントの一部を図 23 に示す。BPe396 では上記 3 科の PCR 産物は約 350bp であり、それ以外の 9 科では約 280bp の短い PCR 産物が得られた。このことから当遺伝子座においては約 70bp の CR1 が挿入されたことが分かる。実際にシーケンシングによって配列を確認した所、上記 3 科のゲノムにおいて種ごとに特異的な変異によって長さは異なるものの、67~75bp の CR1 が挿入されていた。

e) ミズナギドリ目＋ペンギン目単系統性を示唆する挿入

加えて、2 つの遺伝子座、Pet557 と Pet970 における CR1 挿入がミズナギドリ目とペンギン目のみに観察された(図 14: 枝❻)。これらの内 Pet970 の電気泳動像と配列のアラインメントの一部を図 24 に示す。また、Pet557 のアラインメントを図 25 に示す。Pet970 ではミズナギドリ目とペンギン目の PCR 産物は約 2000bp であり、それ以外の 10 科では約 200bp の短い PCR 産物が得られた。このことから当遺伝子座においては約 1800bp の CR1

が挿入されたことが分かる。実際にシーケンシングによって配列を確認した所、ミズナギドリとペンギンゲノムにおいて少なくとも 500bp 以上の CR1 が挿入されていた。ただし、PCR 産物が長いため、CR1 の全長配列は得られなかった。また、Pet970 の挿入 CR1 には TSD が見られた。

f) 矛盾した CR1 挿入

系統情報を持つ 30 遺伝子座の内、他の 28 座位の示す結果とは矛盾する挿入パターンを持つ CR1 が 2 つ見出された(表 7)。そのうちの一つである遺伝子座 LEg811 では、アビとミズナギドリを除く全ての水鳥類で CR1 の挿入が見られた。この矛盾した挿入のために、枝❻で示されたミズナギドリ目＋ペンギン目(Austrodyptornithes)の単系統性は統計的に有意とは言えない(p=0.15)。ただし、Austrodyptornithes の単系統性は最近の核遺伝子の解析から提唱されているため(Hackett et al. 2008; Jarvis et al. 2014)、本研究の結果はこれらの補強となる。

もう一つの遺伝子座 LEg566 では、CR1 はアビとカツオドリを除く全ての水鳥類で観察された。これは枝❸で示された旧ペリカン目＋旧コウノトリ目の単系統性と、枝❹で示された旧ペリカン目＋旧コウノトリ目の中からコウノトリ科が最初に分岐した事と矛盾する挿入である。ただし、枝❸と❹で示された二つの系統群はそれぞれ統計的に有意に支持される(p=0.0014, p=0.0096)。したがって、本研究結果はコウノトリ目の系統的位置に関する決定的な証拠であると言える。

このような矛盾した CR1 挿入は、後述するゲノムスケールの CR1 挿入解析からも得られた。その原因は ILS であると考えられる。これらの考察については三章で詳しく述べる。

2-5-2. ゲノムスケールの CR1 挿入解析

a) ペリカン科、サギ科、トキ科、カツオドリ上科の内最初に分岐した系統を示す挿入

上記の NGS を活用した解析に加えて、本研究では Jarvis ら(2014) によって報告された大規模な配列を用いたゲノムスケールの CR1 挿入解析を行った。ゲノムデータの内、サギ科を代表する種としてコサギのデータを解析に用いた。同様に、トキ科の代表種としてトキ、ペリカン科の代表種としてニシハイイロペリカン、カツオドリ上科の代表種としてカワウの配列データを解析に用いた。これら 4 種のゲノムにおける全ての CR1 配列を探索し、それらの挿入パターンについて解析した結果を図 26 に示す。探索の結果、系統情報を持つ CR1 挿入遺伝子座が計 97 座位発見された。それらの内 63 座位における CR1 挿入はペリカン、サギ、トキゲノムのみで観察され、カツオドリ上科が最初に分岐したことを示していた(図 26A, B)。

加えて、上述の 63 座位と矛盾するパターンを示す CR1 挿入遺伝子座も 19 座位見出された(図 26B)。ただし、63 座位の示す系統関係は統計的に有意である（p<0.001、カイ二乗検定)。また、考察において詳しく述べるが、これらの矛盾は上記 3 科における急速な祖先の分岐を示唆しているものと考えられる。

なお、単離された CR1 の数は、サギゲノムからは 26、トキゲノムからは 19、ペリカンゲノムからは 23 であり、種による偏りは見られなかった(5 つは二種から単離された)。均等に CR1 が単離された事により、本解析の信頼性が補強される。すなわち、仮に 3 種の内ペリカンゲノムからのみ CR1 挿入が得られた場合を考えると、ペリカンとトキ、ペリカンとサギ、またはペリカンとウの系統関係を推測することはできるが、サギとトキ、ウの間の系統関係は示すことができない。このように、種間での偏りのない本結果からは 4 科の系統関係を正確に推測することができると考えられる。

b) ペリカン科、サギ科、トキ科の系統関係を示す挿入

ペリカン科、サギ科、トキ科の間の類縁関係に関して、最近の核遺伝子解析の内 Jarvis ら(2014)の解析からはペリカン科＋サギ科の単系統性が示唆されている。これらの単系統性を示すノードのブートストラップ確率は 100 であり、この結果は強く支持された(図 10)。一方で Hackett ら (2008)の解析ではサギ科＋トキ科の単系統性が示唆された。こちらの結果を示すブートストラップ確立は 72 と若干弱い支持であった(図 9, 11G)。

本研究におけるレトロポゾン解析では、上記 3 科の系統関係を示す CR1 挿入座位が計 15 座位見いだされた(図 26A,C)。これら 15 の CR1 は、サギゲノムから 7、トキゲノムから 4、ペリカンゲノムから 5 つとほぼ均等に単離された(一つは二種から見つかった)。この結果も上述した 4 科の系統関係を示す CR1 が均一に得られたのと同じく、本解析の信頼性を高めるものと考えられる。

15 座位の系統情報を持つ CR1 挿入遺伝子座の内、9 座位ではペリカンゲノムとサギゲノムのみにおいて挿入が確認された。一方で、6 座位ではサギゲノムとトキゲノムのみにおいて CR1 が挿入されていた。しかし、ペリカン科とトキ科が共有する CR1 挿入は見いだされなかった($p = 0.031$、KKSC significance test; Doronina et al. 2015) (図 26 A,C)。後述するように、ILS によって矛盾した挿入が見られる場合、各挿入パターンを支持する挿入は理論上同じ割合で観察される。このことから、上記三科における CR 1 挿入の矛盾(図 26C)は不完全な系統ソーティングでは説明できない。ではどのような要因で挿入の矛盾が生じたのかについては三章で詳しく述べる。

第三章

水鳥類の進化史の解明および実験手法の評価

3-1. 考察

3-1-1. 矛盾した CR1 挿入が示唆する水鳥類における種分化の速度

以前述べたとおり、塩基配列を用いた系統解析において解析に使用した遺伝子毎に系統推定の結果が異なる場合、それはホモプラシーの存在や ILS、もしくは稀ではあるが遺伝子移入に起因すると考えられる。それらの内どれが真の原因であるかは使用する配列数を増やしたとしても決定することが困難である。しかし、レトロポゾン法においてはホモプラシーの存在を考慮する必要が無いため、その影響は排除される。すなわち、これらの矛盾した挿入パターンのほとんどは祖先系統において CR1 の有無の多型の ILS が生じたことを示すものと考えられる(Shedlock et al. 2004)(図 7②)。ILS の原因としては、短期間に急激な種分化が起きたことで多型の固定が十分でないまま系統が分岐することが挙げられる。

鳥類の中でも Neoaves(図 8)の進化において、K-Pg 境界前後の急速な分岐が多くの先行研究から支持されているのは以前述べたとおりである（Feduccia 1995; Jetz et al. 2012; Jarvis et al. 2014）(図 8, 10)。Neoaves についてのレトロポゾン挿入解析では、矛盾した挿入パターンがいくつかの系統群において観察された(Suh et al. 2011; Matzke et al. 2012)。最近行われた解析でも、Neoaves の系統において急速な適応放散が起きていた時期(K-Pg 境界前後)に挿入されたと考えられるレトロポゾンの中に、矛盾するパターンを示すものが高い割合で含まれていた(Suh et al. 2015)。一例を挙げると、陸鳥類(Core landbirds)と水鳥類(Core waterbirds) (Jarvis et al. 2014; 図 9)の系統関係を示す挿入は 17 見いだされたが、それらの内推定される種の系統樹と矛盾する挿入は 16 であった。以上に述べたような矛盾は Neoaves の初期における急速な分岐によって生じたものと考えられている(Suh et al. 2011; Matzke et al. 2012; Suh et al. 2015)。一方で、キジ目（Kaiser et al. 2007; Kriegs et al. 2007）や古顎類(Haddrath and Baker 2012)、カイツブリ目内部(Suh et al. 2012)の分岐においては矛盾したレトロポゾンの挿入は報告されておらず、これらの進化においては急

激な放散が起きなかったことを示唆している。

本研究における NGS を利用した CR1 挿入遺伝子座の探索からは、矛盾する挿入パターンを示す CR1 が 2 つ見いだされた(表 7)。ただしこれらの数は全体の割合としては少なく、統計的に有意な数多くの CR1 挿入(2 つの枝で $p < 0.001$、3 つの枝で $p < 0.01$)によって水鳥類の系統関係を確立することができた。また、ゲノムデータベースを利用した探索では、ペリカン科、サギ科、トキ科の単系統性を示す 63 の CR1 が得られた一方で、それと矛盾したパターンを示す CR1 も 19 見いだされた(図 26B)。しかし、この場合も上記 3 科の単系統性は統計的に有意に支持された($p < 0.001$)。そのため、これらの矛盾した挿入は ILS によるものと考えられる。ただしここでも NGS を用いた解析と同じく、系統情報を持つ総 CR1 数からすると高い割合で矛盾した挿入が検出されたとは言えない。ここから、水鳥類の系統においては目および科が分岐する過程で、中程度の速さの放散が起きた可能性が示唆される。

このように、レトロポゾンの挿入を基にした系統解析からは種分化の速度のような鳥類の進化史における出来事を読み解くことも可能である。

3-1-2. レトロポゾン解析によって示唆された祖先集団における交雑の可能性

ゲノムデータベースを利用した解析では、3 科の系統関係を示す 15 座位の CR1 の内 9 座位がペリカン科とサギ科で共有され、6 座位ではサギ科とトキ科で共有されていた。その一方でペリカン科とトキ科に共通する CR1 挿入は見いだされなかった(図 26C)。ILS によって挿入パターンの矛盾が起きる場合、各パターンにおける挿入 CR1 数は理論上同数になるはずである。その理由は以下のように説明される。

ここで A, B, C 3 種の分岐前にレトロポゾンが挿入され、その後変異が固定される前に立て続けに複数の種分化が起きた場合を考える(図 27②)。この場合、挿入された相同遺伝子座

もしくは挿入されていない相同遺伝子座の内どちらが固定されるかは遺伝的浮動によりランダムに決定される。これらの内最初に分岐した種を C、次に分岐した種を B とする。この時 A と B から見ると C よりも互いの方が遺伝的距離が近いため、A と B の相同遺伝子座においてレトロポゾンの挿入を共有する確率は C と共有する確率よりも高い。そのため、挿入されたレトロポゾンを探索した際には A と B が共有するレトロポゾンの数が最も多くなる。しかし、C からの遺伝的距離は A, B 共に同等である。従って、仮に A もしくは B が互いに矛盾した挿入パターンを示した場合、これら A、B2 種の相同遺伝子座における挿入パターンの内 C がどちらと同じものを示すかは同率となる。

例を挙げると、本研究の NGS を利用した解析では、得られた 30 座位の内他の結果と矛盾した挿入が 2 つ見いだされた。その一つ LEg566 の場合は枝❸、❹と矛盾していた。ここで枝❸に注目すると、これを支持する挿入は 7 つであり、矛盾するのは LEg566 のみである。それ以外で、例えば旧ペリカン目＋旧コウノトリ目の中からトキ科やペリカン科が最初に分岐したことを示すような矛盾した挿入は全く見いだされなかった。統計的に考えると、1 もしくは 0 の矛盾した CR1 の数に差は無い。これは枝❹においても同様である。そのため、LEg566 が示した矛盾は ILS で説明できる。また、ゲノムデータベースを利用した探索では 63 の CR1 によってペリカン科、サギ科、トキ科が単系統であることが明示されたが、それと矛盾した系統関係を示唆する CR1 も 19 見いだされた。しかし、各々の矛盾した系統関係を支持する CR1 数は統計的に有意差が無かったため(図 26B)、これらの矛盾も ILS によるものと考えられる。

本解析における 3 科の系統関係を示す CR1 のように挿入パターンに偏りがある場合、最もあり得る仮説は種の分岐の後に種間交雑によって遺伝子移入が起きたということである(Doronina et al. 2015)。それを踏まえて 3 科の系統関係について考察する。本解析結果ではペリカン科とサギ科の単系統性を支持する CR1 挿入遺伝子座が最も多かった(図 26A,C)。

また、前述した通りこの系統関係は Jarvis ら(2014)による核遺伝子解析からも強く支持されている。そのためこの 2 科が単系統であると仮定される。加えてペリカン科とトキ科に共有される CR1 挿入遺伝子座が無かったという結果から、3 科すなわちトキ科、ペリカン科、サギ科の成立の後、サギ科とトキ科の祖先集団間で種間交雑による遺伝子移入が起きた可能性が考えられる。

遺伝子移入の過程としては、大別して三通りの仮説が考えられる(図 28)。一つは相互に移入が起きた可能性であるが(図 28C)、本解析結果においてはペリカン科とトキ科の共有する CR1 が発見されなかったことからこの仮説は考えにくい。それは以下のような理由による。ペリカン科とサギ科の共通祖先において CR1 が挿入し、CR1 挿入遺伝子座が固定されたと仮定する。その上で、ペリカン科とサギ科が分岐した後にサギ科とトキ科の祖先集団間で相互に遺伝子移入が起きた場合を考える。この時、サギ科から CR1 挿入遺伝子座がトキ科に移入され、逆にトキ科からは CR1 の挿入されていない相同遺伝子座がサギ科に移入されることでペリカン科とトキ科のみに CR1 が共有されるパターンが想定される。この状態は本研究からは得られていない。次にトキ科の祖先集団からの一方的な遺伝子移入(図 28A)、最後にサギ科の祖先集団からの一方的な遺伝子移入(図 28B)が考えられる。本解析結果から推定される種間交雑の過程はこれらの内どちらかの可能性が高い。ただし、移入がサギ科とトキ科のどちらからだったのかについては CR1 の挿入比較のみでは推定できない。

以上に述べたような種間交雑の可能性は他の鳥類の系統解析からは報告されておらず、本研究で初めて提唱されたものである。これは、一般的にホモプラシーの存在する指標から過去の交雑を推定するのは難しいためと考えられる。ただし、レトロポゾン挿入比較からはそれを示唆するような解析結果は他のグループから得られている。Jarvis ら(2014)は陸鳥類(Core Landbirds) (図 10)の系統関係を解明する目的で、ゲノムスケールの長末端反復(LTR)型レトロポゾンの挿入比較解析を行った。LTR 型レトロポゾンは本研究で用いた CR1 のような非 LTR 型レトロポゾンとは異なり、両末端に 100~5000bp 以上の反復配列を持つ

(Wicker et al. 2007)。LTR 型レトロポゾンもそれ以外のレトロポゾンと同じく自らのコピーをゲノム中に挿入していくという増幅形式を持つため、系統解析の指標として有用である。Jarvis ら(2014)はフクロウ目と Eucavitaves(オオブッポウソウやキツツキ等)の単系統性を示す 22 遺伝子座を発見したが、一方で他の 15 遺伝子座はフクロウ目とタカ上目(タカやコンドル等)の単系統性を示した。にもかかわらず、Eucavitaves とタカ上目の単系統性を示す挿入遺伝子座は報告されていない。Jarvis ら(2014)は種間交雑の可能性について結論付けてはいないが、この結果も本研究結果と同様に解釈することが可能である。すなわち、これらの矛盾は不完全な系統ソーティングによるものではなく、上記 3 つの系統群が分岐した後にフクロウ目とタカ上目との間で種間交雑が起きたと考えられるのである。

上述した種間交雑による遺伝子移入の可能性は、本質的にホモプラシーの存在を考慮する必要が無いレトロポゾン法の特長によって示されたものである。また、前述したように種の系統樹と矛盾する挿入の原因が ILS なのかそれとも種間交雑によるものかは矛盾する挿入の割合から判断する。この時、系統関係を示すレトロポゾンの総数が多い方が判断はより容易である。そのため、本研究のように数多くのレトロポゾンを利用することで、ILS だけでなく遺伝子移入による矛盾した挿入の検出も容易になることが期待される。

3-1-3. 系統解析への NGS 技術の役割

本研究は NGS を基にしたスクリーニング法をレトロポゾン法に初めて導入した。本手法の最大の利点は膨大な量のレトロポゾンを単離できることである。例えば、本研究の NGS を利用した探索では、ゲノムサイズ 1.4Gb と仮定される(Gregory et al. 2007)カッショクペリカンゲノムについての約 1×カバレージの解析から約 16,000 の CR1 を含む配列が得られた(図 12)。また、その相同遺伝子座もゼブラフィンチゲノムから発見することができた。一方で、一般的なハイブリダイゼーション法によるスクリーニングでは、1 種の鳥類ゲノム

における探索一回につき約数十から百程の配列しか得られない。それと比較すると、本研究ではNGSの利用によって非常に大きな情報量を得られたことになる。

NGSを利用することの第二の利点は、本質的に偏りの無いスクリーニングであるため、古い時期もしくは最近に挿入されたレトロポゾンの両方を単離することが可能であるということである。前述の通りハイブリダイゼーション法による探索では最近挿入されたものが単離されやすく、古い時期の分岐を推定するのが困難であった。そのため、NGSを利用することでより広範囲の系統群の系統解析が可能になると考えられる。

唯一の問題として、本手法ではPCR解析に用いるプライマー設計のために他の種のゲノム配列を参照することが必要な点が挙げられる(図 12; 5)。そのためには、調べたい系統群について公開されたゲノムデータが存在する必要がある。例えば、本研究ではCR1探索に用いた水鳥類ゲノムの他に、ゼブラフィンチ等 7 種の鳥類ゲノムを参考にした。このデータはUCSCもしくはGenBankのデータベースから取得したものである。このように鳥類においては複数種のゲノムデータがすでに公開されているため、本手法は問題なく活用することができた。ただし、ゲノムデータが公開されている種が少ない生物群の場合、プライマー設計が困難である可能性がある。しかし、この問題点は今後公に利用できる全ゲノムデータの数が増えることで克服されると考えられる。そのため、今回の試みが将来的にレトロポゾン挿入解析の標準的な手法となることが期待される。

3-1-4. CR1サブファミリーについて

以前述べた通り、レトロポゾンには似通った配列を持つサブファミリーと呼ばれるグループが存在する。鳥類ゲノムに存在するCR1では、現在までに43のサブファミリーが報告されている(Bao et al. 2015)。各サブファミリーは時代ごとに転移活性のピークを持つため(Watanabe et al. 2006b; Kriegs et al. 2007; Liu et al. 2009)、解析の対象とする系統群の

分岐が起きた時期に活発に転移していたサブファミリーを知ることは、今後のレトロポゾン法を用いた系統解析において重要である。

本研究では NGS を利用した探索によって 30 の系統情報を持つ CR1 が得られた(図 14、表 5)。これらがどのサブファミリーに属するか割合を調べたところ、CR1-E が 40%(12/30)と最も多く、次いで CR1-J2_Pass が 37%(11/30)を占めていた(表 5)。ただし、興味深いことに CR1-J2_Pass が水鳥類の系統関係を示す各 CR1 全体を通して広く見られるのに対し(図 14: 枝❶~❻)、CR1-E は水鳥類からアビ目が分岐する以前の系統関係を示す 5 つの CR1 には存在せず(図 14: 枝❶)、アビ目分岐以降の系統関係を示す 25 の CR1 のみで見いだされた(12/25, 48%)(図 14: 枝❷~❻)。NGS を利用した探索で得られた全ての CR1 の内 CR1-E と CR1-J2_Pass の割合はそれぞれ 12.1%と 19.6%であったことを考えると、上述した水鳥類の系統関係を示す CR1 におけるサブファミリーCR1-E と CR1-J2_Pass の割合は非常に高いと言える。このことから、おそらく CR1-J2_Pass は水鳥類の分岐過程におけるほとんどの時期に活発に転移していたのだろう。一方で CR1-E は水鳥類の最初期の分岐ではあまり活発でなく、アビ目が分岐した後に転移が活性化したと考えられる。このことから、CR1-E と CR1-J2_Pass は共にレトロポゾン法による水鳥類の系統解析に適した CR1 サブファミリーと言える。特に CR1-E は比較的後に分岐した系統群の関係を示す CR1 に多く見られたため、水鳥類の科間や種間の系統関係を調べる際に有用なのではないだろうか。また、本研究では NGS を利用することで大量の CR1 を探索することができた。一般的なハイブリダイゼーション法を用いたスクリーニングでは得られる CR1 のサブファミリーの割合にも偏りが出る可能性があるが、その問題点を解決し、サブファミリーの解析が容易になるのも NGS 利用の利点であると言える。今後 NGS を利用したスクリーニングによって各系統群における CR1 サブファミリーの活性を調べることで、それに続く鳥類の系統解析をより効率的に行えることが期待される。

3-1-5. 種特異的な挿入の系統解析への利用

NGS を利用した CR1 探索では、各種鳥類における CR1 挿入の有無について、まずは電気泳動のバンドパターンから目視によって判断した。この時 CR1 挿入が 1 種のみに見られる種特異的な挿入座位については系統解析に利用しなかった。ノドジロクロミズナギドリからは 49 の挿入座位について各種鳥類における CR1 挿入の有無を確認したが、それらの内種特異的な挿入と判断したのは 7 座位であった。同様にコサギにおいては 119 座位中 21 座位、カッショクペリカンにおいては 96 座位中 7 座位を種特異的な挿入と判断した。これらの座位についての配列決定は一部を除き行わなかったが、例として遺伝子座 LEg642 と BPe310 のアラインメントを示す(図 29)。LEg642 はコサギゲノムから単離されたコサギ特異的な CR1 挿入座位、BPe310 はカッショクペリカンゲノムから単離されたカッショクペリカン特異的な CR1 挿入座位である。

これら種特異的な挿入座位は、各系統群における内部の系統推定に利用できると考えられる。例えばノドジロクロミズナギドリから見出された種特異的な挿入座位の場合、本研究では用いなかった他のミズナギドリ目鳥類(アホウドリ科やウミツバメ科等)や、他のミズナギドリ科鳥類における CR1 挿入の有無を調べることで、ミズナギドリ目内部もしくはミズナギドリ科内部の系統関係を推定できる可能性がある。

特に、カッショクペリカンから見出された種特異的な挿入座位は重要である。ペリカン科は最近の核遺伝子解析からはハシビロコウ科やシュモクドリ科と近縁だと考えられている(Hackett et al. 2008; 図 11G)。しかし、その詳細な系統関係は未だ明らかにされていない。例えば Hackett ら(2008)の解析ではハシビロコウ科とシュモクドリ科が単系統であり、その姉妹群としてペリカン科が位置することが示唆された。しかし、ハシビロコウ科＋シュモクドリ科単系統を支持するブートストラップ確率は 68 であり、強い証拠とはならなかった。また、Jarvis ら(2014)のゲノムスケールの解析ではハシビロコウ科とシュモクドリ科は使

われていなかった。本研究ではハシビロコウ科やシュモクドリ科を解析に用いなかったが、今後これら 3 科の系統解析を行う場合、ペリカン特異的な挿入座位を活用して系統関係を解明できる可能性がある。

また前述したように、調べたい系統群において活発な転移活性を示した CR1 サブファミリーを知ることは、より効率的な CR1 挿入解析において重要である。すなわち、種特異的に挿入した CR1 のサブファミリーを調べれば、水鳥類の各科および種間の系統解析により有効なサブファミリーを知ることができると考えられる。

3-1-6. レトロポゾン法による系統解析結果と先行研究との比較

本研究では 5 つの CR1 挿入座位によって水鳥類の単系統性が支持された(図 14: 枝❶)。これらの鳥類が系統的に近縁であることは形態学的および分子系統学的解析からも示唆されていたが(Sibley and Ahlquist 1990; Fain and Houde 2004; Ericson et al. 2006; Livezey and Zusi 2007; Hackett et al. 2008; Pacheco et al. 2011; Gibb et al. 2013; Jarvis et al. 2014)、レトロポゾン法によって示されたのは今回が初の例である。また、先行研究においては水鳥類を含むクレード内にフラミンゴやカイツブリなどが含まれることがあったが(Cracraft 1981; Livezey and Zusi 2007)、これらが除外されることも明示された。形態学においてフラミンゴ科はコウノトリ科、カイツブリ目はアビ目に近縁だとする仮説が長い間支持されてきた(e. g. Cracraft 1981; Livezey and Zusi 2007)。しかし、本研究によってその系統関係が否定されたため、これらの系統群において共有派生形質とされていた形態的特徴は収斂によって獲得されたものである可能性が示唆された。上記の鳥類はその生態から似通った動作的制約を持つと考えられる。例えばフラミンゴとコウノトリは共に水辺を歩き回り、採餌する。アビとカイツブリは共に水中で採餌するが、魚類を主食とするため、比較的高速での潜水能力が必要となる。また、比較的高度に水中での生活に特化しているた

め、脚も他の鳥類に比べると後方に位置している。このような動作的制約は直接形態の変化につながる要因である。そのため、形態的特徴も収斂しやすかったのではないかと考えられる(Livezey and Zusi 2007; Felice and O'Connor 2014)。このような収斂的形質については後により詳しく考察する。

水鳥類の中で最初に分岐した系統群については、これまで行われてきた鳥類の系統解析からは明確な回答が得られていなかった(図 11)。しかし、本研究では水鳥類の中で最初に分岐したのがアビ目であるという強力な証拠が得られ(図 14: 枝❷)、これにより水鳥類の初期の分岐の歴史が明らかになった。

本研究と異なる結果を示した先行研究と比較すると、分子系統解析においては解析法やデータの量が大きな影響を与えるのではないかと考えられる。例えばミトコンドリアゲノムを用いた解析では、アウトグループの有無や系統樹の推定法の違いでトポロジーが変化していた(Pacheco et al. 2011; Gibb et al. 2013)(図 11C)。おそらくミトコンドリアゲノムは前述したように進化速度が比較的早いことが原因で、鳥類のように古い時期に急速な種分化を起こした系統群の系統解析には適さないのではないかと考えられる。このことは哺乳類の系統解析でも示されている。ただし、解析に用いる種の選定を密にすればある程度正しい系統推定が可能であることがわかってきた(Wu et al. 2014)。また核遺伝子を用いた解析では、特に初期に行われた 1 遺伝子や 5 遺伝子といった少量のデータからは明確な結果が得られていない(Fain and Houde 2004; Ericson et al. 2006)。しかし、本研究結果により構築された系統樹は Hackett ら(2008)や Jarvis ら(2014)、また最新の Prum ら(2015)による核遺伝子を用いた解析から得られたものと一致した(図 9, 10, 11G)。Jarvis ら(2014)や Prum ら(2015)の解析はゲノムスケールの大規模なものである。ここから、核遺伝子を用いた解析においては情報量の多さがより正確な系統推定のために必要であると考えられる。一方で、Hackett ら(2008) の用いた 19 遺伝子に加えて計 50 の核遺伝子を用いた Kimball

ら(2013)の解析では本研究と矛盾する結果が得られている(図 11H)。この解析では、手法は Hackett ら(2008)とほぼ同じものが使われた。ただし、用いた遺伝子数は増えたものの、鳥類の種は Hackett ら(2008)が 169 種(水鳥類は 18 種)を用いたのに対し、Kimball ら(2013)は 77 種(水鳥類は 7 種) と多くなかった。それが系統推定を誤らせた可能性がある。ここから、遺伝子数をただ増やしただけでは正しい結論は得られないことが示唆される。塩基配列比較による系統解析は、豊富なデータ量を確保すること、それに加えて解析に用いる種の選定や、解析手法の検討が重要であると考えられる。

さらに、本研究ではレトロポゾン法の特性によって、種間交雑に起因する遺伝子移入が示唆された。一方で、本研究と系統樹が一致した Hackett ら(2008)による 19 核遺伝子座解析、Jarvis ら(2014)によるゲノムスケールの核遺伝子座解析、および Prum ら(2015)による広範囲な鳥類種を用いたゲノムスケールの解析といった、塩基配列比較による系統解析からはその可能性は見出されなかった。ただし前述の通り、Jarvis ら(2014)によるレトロポゾン挿入比較からは種間交雑の可能性が示唆された。そのため、このような複雑な進化の過程を解明するにはレトロポゾン法は有効な手段であるといえる。

3-1-7. レトロポゾン法により解明されたコウノトリ科の系統的位置と形態学との比較から示唆される収斂および真の共有派生形質

本研究におけるレトロポゾン解析では 7 つの CR1 挿入遺伝子座が伝統的にペリカン目とコウノトリ目に分類されてきた科の単系統性を強く支持した(図 14: 枝❸)。興味深いことに、この系統群に属する鳥類の多くが半水生の環境に生息しており、一方それ以外の水鳥類であるアビ目やミズナギドリ目、ペンギン目はより水生生活に適応している。

コウノトリ科の系統的位置については、様々な鳥類、例えばコンドル科(Sibley and Ahlquist 1990)、ペンギン目(Pacheco et al. 2011)、サギ科(Fain and Houde 2004; Gibb et

al. 2013)、フラミンゴ科(Cracraft 1981; Livezey and Zusi 2007)が姉妹群として提案されてきた(表 3)。しかし本研究ではコウノトリ科が伝統的なペリカン目とコウノトリ目のグループから最初に分岐した決定的な証拠が示された(図 14: 枝❹)。これは Hackett ら(2008)の 19 の核遺伝子座解析の結果と一致するが、彼らの解析では上記の系統関係は強くは支持されなかった。そのため本研究のレトロポゾン挿入解析がコウノトリ科の系統的位置を確定させたと言える。このように確かな系統関係を構築することは、以下に述べるように形態的な収斂を検出するのにも有効だと考えられる。

形態学的手法を用いた解析ではコウノトリ科はサギ科、トキ科、シュモクドリ科、フラミンゴ科に近縁であるとされ、前述したとおり、特にフラミンゴ科とは類縁が近いと考えられていた。(Cracraft 1981; Livezey and Zusi 2007)。ここで、形態学的解析におけるコウノトリ科周辺の鳥類の共有派生形質の例を示す(図 30)。共有派生形質が見られるとされていた部位については図 31 に示す。Livezey と Zusi (2006)の分析ではコウノトリ上目(コウノトリ科、サギ目、トキ科、シュモクドリ科、フラミンゴ科)の共有派生形質として橈骨(図 31a)の形態的特徴が挙げられていた。橈骨は前腕部、すなわち鳥類においては翼を構成する骨である。加えて、胸骨(図 31b)の烏口骨(図 31c)との間接面や脛足根骨(図 31d)の形態も補助的な共有形質として示された。胸骨および烏口骨は飛行に、脛足根骨は歩行にそれぞれ関係する部位である。また Cracraft(1981)の分析では、特にコウノトリ科とフラミンゴ科において頭骨の基底部(図 31e)や耳(図 31f)の特徴が非常に類似していることが示された。このように、コウノトリ科はフラミンゴ科やそれ以外のコウノトリ上目の鳥類といくつかの派生形質を共有することが示唆されていた。しかし、それらの形質によってコウノトリ科に近いとされたトキ科とサギ科は、本解析ではペリカン科とカツオドリ上科に近縁であることが示された。同時にフラミンゴ科が水鳥類から除外されることも示唆されたが、これは他の分子系統解析(Hackett et al. 2008; Jarvis et al. 2014)と一致する結果である。そのため、上記の骨学的特徴はコウノトリ上目に属する鳥類で収斂的に進化した可能性がある(図 30)。

コウノトリ科を含む系統において、収斂進化によって形質が獲得されたと考えられる証拠は他にも挙げられる。Livezey と Zusi(2006)は胸骨(図 31b)の烏口骨(図 31c)との間接面の形態的特徴がコウノトリ上目およびペリカン上目(ペリカン科、カツオドリ上科、グンカンドリ科、ネッタイチョウ科、ハシビロコウ目)に共有されていることを示唆した(図 30)。この形質は上述した通りコウノトリ上目において特に顕著だが、ペリカン上目の鳥類にもみられる特徴である。一方で、本研究のレトロポゾン解析はフラミンゴ科を除くこれら全ての鳥類が単系統であることを立証した(図 14: 枝❸)。従って、この骨学的特徴はコウノトリ科とペリカン科の共通祖先で一度進化し、また、フラミンゴ科やネッタイチョウ科の系統でもそれぞれ独自に進化したものと考えられる(図 30)。

水鳥類の形態学において、生息環境や生態の類似性によって収斂進化が起きやすいと考えられる多くの形態学的特徴が示唆されている(Livezey and Zusi 2007; Smith 2012; Felice and O'Connor 2014)。本研究で解明された水鳥類の系統関係は、これら鳥類の進化を形態学および生態学的観点から議論するのに活用できると考えられる。すなわち上述したように、確立された系統関係と形態学的特徴から構築された系統関係を照らし合わせ、再検討することで、収斂しやすい形態学的形質や、真の共有派生形質を見出すことが可能なのではないだろうか。このような形質を把握することは、化石鳥類の系統を再検討するのにも役立つだろう。例えば最近新種の鳥類化石が発見された(Hospitaleche and Gelfo, 2015)。この化石鳥類の系統的位置は、Livezey と Zusi(2006)の提唱した形態学的特徴に基づいてアビ目に属することが示唆された(図 32)。しかし Livezey と Zusi(2006)による指標からはアビ目はカイツブリ目と単系統であるとされていた。アビ目が水鳥類に属しており、カイツブリ目とは類縁関係が近くないことは本研究および核遺伝子の解析(Hackett et al. 2008; Jarvis et al.)でも示されたとおりである(図 9, 10, 14)。そのため上述した化石鳥類の系統推定では、収斂による形態的類似に基づいて系統を決定している可能性が高い。真の系統的位置を知

るためには、アビ目とカイツブリ目において収斂的に進化した形質を見極め、化石鳥類の系統推定から除く必要がある。さらに、確実な系統樹からアビ目もしくはカイツブリ目と近縁な鳥類における真の共有派生形質を見出し、化石鳥類の特徴と照らし合わせることで正しい系統推定が可能なはずである。

化石種における系統推定は形態学的解析に頼らざるを得ない。しかし、確立された系統関係に基づいて真の共有派生形質を知ることができれば、これまでの全ての化石鳥類の系統関係を再検討することが可能になる。こうして再構築された系統関係からは、鳥類の進化史をより正確に理解することができるだろう。

3-2. 総論

系統関係を正確に知ることは、鳥類の進化史を解明する上で最も基本的かつ重要な課題である。本研究では、鳥類の中でも系統的位置の不明瞭だった水鳥類に着目し、これらの系統関係を解明するべく解析を行った。手法としてはレトロポゾン法を用い、さらに新たな試みとして NGS を利用したレトロポゾン探索法を導入した。その結果、水鳥類の系統関係を明確に示すことができた。特に、先行研究においても明示されなかったコウノトリ科の系統的位置が確定されたことで、形態学的手法についての再検討の可能性も提言された。さらに特筆すべきなのは、種間交雑という複雑な進化の過程が示唆されたことである。種間交雑は通常の塩基配列を用いた解析では検出することが難しい現象であるが、レトロポゾンが遺伝子(座)の系統を正しく反映する遺伝指標であるために見出すことができた。加えて、水鳥類の種分化の速度についても推定された。これらの結果は、従来のレトロポゾン探索法では得られなかった大量の配列を利用できたことでもたらされたものである。以上の結果から、レトロポゾン法を用いることが鳥類の進化史をより理解するのに有用であることが示された。今後、本研究のような多量のレトロポゾンを用いた解析によって鳥類の系統樹を構築することで、複雑な鳥類の進化が解き明かされることが期待される。

図表

表1：水鳥類に含まれる鳥類

目 (IOC 分類)	目(旧分類)	科
ペリカン目	ペリカン目	ペリカン科
ペリカン目	コウノトリ目	ハシビロコウ科
ペリカン目	コウノトリ目	シュモクドリ科
ペリカン目	コウノトリ目	サギ科
ペリカン目	コウノトリ目	トキ科
カツオドリ目	ペリカン目	カツオドリ科
カツオドリ目	ペリカン目	ウ科
カツオドリ目	ペリカン目	ヘビウ科
カツオドリ目	ペリカン目	グンカンドリ科
コウノトリ目	コウノトリ目	コウノトリ科
ミズナギドリ目	ミズナギドリ目	アホウドリ科
ミズナギドリ目	ミズナギドリ目	ミズナギドリ科
ミズナギドリ目	ミズナギドリ目	モグリウミツバメ科
ミズナギドリ目	ミズナギドリ目	ウミツバメ科
ミズナギドリ目	ミズナギドリ目	アシナガウミツバメ科
ペンギン目	ペンギン目	ペンギン科
アビ目	アビ目	アビ科

＝ペリカン目
＝コウノトリ目
＝カツオドリ目

水鳥類に含まれる鳥類について新旧の分類を示す。
新分類は国際鳥類学会(Gill and Donsker, 2015)によるものを参照した。
旧分類はWetmore(1960)によるものを参照した。

表2：各先行研究における水鳥類近縁の鳥類

著者および解析手法		水鳥類 (Aequornithes)															
		ペリカン科	ハシビロコウ科	シュモクドリ科	サギ科	トキ科	カツオドリ上科	グンカンドリ科	コウノトリ科	ミズナギドリ科	ペンギン目	アビ目	カイツブリ科	フラミンゴ科	ネッタイチョウ科	コンドル科	タチヨタカ科（ヨタカ目）
Livezey and Zusi (2007) 形態学的解析		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×
Sibley and Ahlquist (1990) DNA-DNAハイブリダイゼーション		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	×	○	×
Morgan-Richards et al. (2007) ミトコンドリア全長配列解析		○			○			○	○	○	○	○	×	×	×	×	
Pacheco et al. (2011) ミトコンドリア全長配列解析	外群無し	○			○	○			○	○	○	○	×	×			×
	外群有り	○			○	○			○	○	○	○	×	×			○
Gibb et al. (2013) ミトコンドリア全長配列解析		○	○		○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	×		×
Ericson et al. (2006) 核遺伝子解析 (5遺伝子)		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	×	×	×
Hackett et al. (2008) 核遺伝子解析 (19遺伝子)		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	×	×	×
Kimball et al. (2013) 核遺伝子解析 (50遺伝子)		○			○				○	○	○	○	×	×	×	×	×
Jarvis et al. (2014) 核遺伝子解析 (ゲノムスケール)		○			○	○	○			○	○	○	×	×	×	×	×

現在提唱されている水鳥類（Aequornithes）が先行研究においてどの鳥類と単系統群をなしていたか表にまとめた。○は水鳥類と同じグループに含まれる種、×は解析に使われているが、水鳥類と同じグループには含まれない種を表す。空欄は解析に用いられなかった種である。

表3：各先行研究におけるコウノトリ科の系統的位置

解析法			提唱者	コウノトリ科の系統的位置
形態学			Bonaparte (1854)	サギ科に近縁
			Cracraft (1981)	フラミンゴ科と単系統
			Livezey and Zusi (2007)	フラミンゴ科と単系統
分子生物学的手法	DNA-DNAハイブリダイゼーション法		Sibley and Ahlquist (1990)	コウノトリ科(内部にコンドルを含む)とペリカン科(内部にハシビロコウを含む)が単系統
	ミトコンドリアゲノム解析	部分配列解析	Avise et al. (1994)	コウノトリ科とコンドル科の一部の種が近縁
		全長配列解析	Morgan-Richards et al. (2007)	サギ科もしくはペンギン目と単系統
			Pacheco et al. (2011)	ペンギン目と単系統
			Gibb et al. (2013)	サギ科と単系統
	核遺伝子座解析	1遺伝子座解析	Fain and Houde (2004)	サギ科と単系統
		5遺伝子座解析	Ericson et al. (2006)	多系統
		19遺伝子座解析	Hackett et al. (2008)	コウノトリ科以外の旧コウノトリ目および旧ペリカン目からなる姉妹群と単系統
		50遺伝子座解析	Kimball et al. (2013)	サギ科＋ペリカン科＋ウ科＋アビ目と単系統

表4: 実験に使用した鳥類種

目 (IOC 分類)	目(旧分類)	科	学名	種名	サンプル提供元
ペリカン目	ペリカン目	ペリカン科	*Pelecanus occidentalis*	カッショクペリカン	上野動物園
ペリカン目	ペリカン目	ペリカン科	*Pelecanus crispus*	ニシハイイロペリカン*	
ペリカン目	コウノトリ目	サギ科	*Egretta garzetta*	コサギ(*)	上野動物園
ペリカン目	コウノトリ目	トキ科	*Lophotibis cristata*	マダガスカルトキ	上野動物園
ペリカン目	コウノトリ目	トキ科	*Nipponia nippon*	トキ*	
カツオドリ目	ペリカン目	カツオドリ科	*Morus capensis*	ケープシロカツオドリ	国際水産資源研究所
カツオドリ目	ペリカン目	ウ科	*Phalacrocorax carbo*	カワウ*	
コウノトリ目	コウノトリ目	コウノトリ科	*Anastomus oscitans*	スキハシコウ	上野動物園
コウノトリ目	コウノトリ目	コウノトリ科	*Ciconia boyciana*	コウノトリ	上野動物園
ミズナギドリ目	ミズナギドリ目	ミズナギドリ科	*Procellaria aequinoctialis*	ノドジロクロミズナギドリ	国際水産資源研究所
ペンギン目	ペンギン目	ペンギン科	*Aptenodytes patagonicus*	キングペンギン	水産庁養殖研究所
アビ目	アビ目	アビ科	*Gavia stellata*	アビ	国立環境研究所
ジャノメドリ目	ツル目	カグー科	*Rhynochetos jubatus*	カグー	ズーラシア
ツル目	ツル目	ツル科	*Grus japonensis*	タンチョウ	上野動物園
カイツブリ目	カイツブリ目	カイツブリ科	*Podiceps cristatus*	カンムリカイツブリ	国立環境研究所
フラミンゴ目	コウノトリ目	フラミンゴ科	*Phoenicopterus roseus*	オオフラミンゴ	上野動物園

解析に用いた鳥類種について現在の分類及びサンプル提供元を示す。
*はデータベース上からゲノム情報を得た種を表す。

表5：各種鳥類におけるCR1挿入の有無

遺伝子座名	ゼブラフィンチゲノム(taeGut2)における各遺伝子座の位置	CR1サブファミリー	カッショクペリカン	コサギ	マダガスカルトキ	ケープシロカツオドリ	スキハシコウ	コウノトリ	ノドジロクロミズナギドリ	キングペンギン	アビ	カグー	タンチョウ	カンムリカイツブリ	オオフラミンゴ
Pet464(14464)	chr2:38,252,696-38,252,980	CR1-J2_Pass	+		+	+		+	+	+	+	-	-	-	-
Pet791(14791)	chr1A:13,640,233-13,640,478	CR1-X3_Pass			+	+		+	+	+	+		-		-
Pet012(51012)	chr2:24,917,219-24,917,379	CR1-Z1_Pass	+	+	+	+		+	+	+	+	-	-	-	-
Pet649(15649)	chr2:151,330,746-151,330,900	CR1-J2_Pass	+	+	+	+		+	+	+	+	-	-	-	-
LEg129(6129)	chr1:103,915,428-103,915,596	CR1-D2_3end	+	+	+		+		+	+	+	-	-	-	-
Pet387(65387)	chr1:54,562,981-54,563,133	CR1-E	+		+	+		+	+	+	-	-	-	-	-
Pet600(82600)	chr2:21,840,696-21,840,925	CR1-J2_Pass	+	+	+	+		+	+	+	-	-	-	-	-
Pet998(70998)	chrUn_ABQF01092026:4,524-4,674	CR1-E	+	+	+			+	+	+	-	-	-	-	-
Pet296(58296)	chr1A:10,498,455-10,498,821	CR1-E	+	+	+	+		+	+	+	-		-	-	-
LEg650(4650)	chr5:30,448,480-30,448,772	CR1-E	+	+	+		+	+	+	+	-		-	-	-
LEg796(91796)	chr2:72,823,092-72,823,449	CR1-J2_Pass	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
LEg510(32510)	chr20:12,555,450-12,555,635	CR1-E	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
BPe020(36020)	chr1:96,061,713-96,459,222	CR1-E	+	+	+	+		+	+	+	-	-	-	-	-
LEg566(76566)	chr15:2,787,380-2,787,579	CR1-J2_Pass	+	+	+	-	+	+	+	+	-		-	-	-
LEg811(67811)	chr2:54,922,818-54,923,064	CR1-J2_Pass	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
LEg443(79443)	chr4:67,559,701-67,559,910	CR1-D2	+	+		+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
BPe708(90708)	chr2:153,903,574-153,903,771	CR1-J2_Pass	+				+	+	-	-	-	-	-	-	-
BPe507(38507)	chr1:24,071,637-24,071,868	CR1-E	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
BPe029(66029)	chr1:7,400,764-7,400,917	CR1-D2_3end	+	+	+	+		+	-	-	-	-	-	-	-
BPe263(78263)	chr9:20,628,973-20,629,132	CR1-J2_Pass	+	+		+		+	-	-	-	-	-	-	-
BPe495(18495)	chr8:11,883,376-11,883,597	CR1-E	+	+	+	+		+	-	-	-	-	-	-	-
BPe376(14376)	chr3:27,345,371-27,345,630	CR1-E	+	+	+	+		+	-	-	-	-	-	-	-
LEg216(22216)	chr2:18,548,225-18,548,498	CR1-E	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LEg908(61908)	chr2:149,589,899-149,590,161	CR1-E	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LEg584(81584)	chr4:26,061,410-26,061,588	CR1-J2_Pass	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LEg772(57772)	chr4:55,655,729-55,656,153	CR1-D2_3end	+	+		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BPe333(64333)	chr4:37,931,459-37,931,760	CR1-J2_Pass	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BPe396(75396)	chr1A:72,106,911-72,107,190	CR1-X2_Pass	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Pet557(70557)	chr4:56,469,942-56,470,296	CR1-E	-	-	-	-		-	+	+	-	-	-	-	-
Pet970(1970)	chr3:80,931,336-80,931,540	CR1-J2_Pass	-	-	-	-		-	+	+	-	-	-	-	-

NGSを利用した探索からは系統情報を持つCR1挿入遺伝子座が30座位単離された。
表にすべての遺伝子座名とそれらのゼブラフィンチゲノムにおける位置、挿入されたCR1のサブファミリーを示す。また、各鳥類におけるCR1挿入の有無を＋とーで表す。空欄は挿入の有無が未確認の種である。

表6：解析に使用したプライマー

遺伝子座名	primer-F	primer-F2	primer-R	primer-R2
Pet464(14464)	AGTTTYRYTAATTAACATCTACAGGGACAG	AAGTATTTCAAMATGTTTCTAGGTATCATT	AAGGTAGWTTCACTMACAAACTASCTTGTA	TTTCACATTACCACCTTCAATTTTGTGCAG
Pet791(14791)	GTYAGAGCTTYCTAAGTTAAGCAGGTCAAT		CACATTTCCACTCAGGKCAGSACTCAAGTG	
Pet012(51012)	AGAAAAGCAAACCTGCYCTAARTAGCTGAG		TAGTGACCACAGTGTTTGTTCTTCTGTGGA	
Pet649(15649)	GCGACTATTTCTGCATTCCAATTTCTGATG		AATGATCAGCAGACTCCTGCTAATTTTTAG	
LEg129(6129)	GCTAGAATTTCCTTAAAGCACATTAAGGAC	AGCACATTAAGGACATGCARCACTCAGCAG	GATKATTTCATTAGTTKCTCACTGAGCAAG	ATACAGTAGATTTTAAAAGGCTATCTGTAC
Pet387(65387)	TGTCAABAAAAGACTGTTGCYRGTGGGATT		ATCHGTTCTTTCTCTAAATCTGCCACCTCT	
Pet600(82600)	TGCAGTRYAAATKATACTGGTTCCATGAA		ACCAGGCAYCKAAAGTTCTCTGRAGATCTG	
Pet998(70998)	TGGGGATGATGAAGRCTCTTCCTGTCAGAC		ATCTATATGTCAATAAAAKAGCYGAATCAG	
Pet296(58296)	GCTAAGAAGACTCACATGCTATTTCTCATT		CCTAGTTTCAGTCCCAAGAAGGAATAGCCT	
LEg650(4650)	GTTTTTAAGTATGACTGTCTTTATTTGAGG	AAGATTATTGGCCCAAATTGTTTCAAATTG	TAAATTACTATGCCAAAATTGAAGCTGATT	TATAAATGGCAAAGTACTGAAACCTAGGAA
LEg796(91796)	CGACAACCAYAGTTCTAGATTGCAATTATG		CTAGTGATAAGTGTTTCTTCAGAGATTAAG	
LEg510(32510)	TTATATGATAGACCAATCCATAGACAACTG		CCTTRATYCTTCACCTTCCATGAATCAGAA	
BPe020(36020)	GGAATTTAGTCAACTGTGACATTCCTGTAT		CTGTAGGGAAGCCTTCCACTCTGTCACCAT	
LEg566(76566)	AAAGTTTAATTRTTTGACTAAAGGAATTAC		TGCTGCAGAAGAAAGAGATGCTAAGYTTCC	
LEg811(67811)	CAGTATAGTTGGTTCGAAGAAAGTGATAAG	CCTTGTCATGAAAACRTTCCTCAAGTACTC	AAACCTGACTAAGCAAAACTTGACAGAGCT	ACAGAKTAGYTGATCTGGGTGAGGGACTTA
LEg443(79443)	AGCACTCATTTTGATTAACCTRCATAACTC	GAGGRATTTTATCAGCACTCATTTTGATTA	TAAGTGTACTCTGTTCCAAAATATATGGCT	GTTTTGATAARCCTTTATCTGGAACAAAT
BPe708(90708)	TTGGTTTCTTGATTCCTTTTATTGCTGCAC	ATGTCCCTYTTAGTTCAGGAAAACTGCCAG	TTTTCTTCCAATGCATAAAGAAGATGCACA	GTATTGGGCATTCATTGGTTTGYACTCTTC
BPe507(38507)	AAAGCACCAGAATACAGCTGAGAAAATAAG	ACAGRGTGTTAATGCTATCCATCTTTAATG	TCAGCTCGTGTTCATAAAAGTGATTAAGTG	ATATAAACYTCTTGTGAATAAGATCCAATA
BPe029(66029)	TTCTCATTTGRYTTCTGSTTTCTGAGCAGT		GGCTTCTGCTCCCGGTGTCAGGGAGTAACT	
BPe263(78263)	GCTCTCTGTAGAAGACATATATGTTCATGA		ATTATTGTGAAAACTSTGTATGAAATGCCA	
BPe495(18495)	TTTCCCTGAGTTAGCACTGATGGACTTGAA		GAGCTGCTAAACACAATGGCTCACAAATCT	
BPe376(14376)	GTTCCCTGAAAAGGAAGGGYCTATTGATGC		GGGTATGTGAAAGACTTGGAATTCAAGGTT	
LEg216(22216)	GCTAAATTTTGAGCACTCTCACMTCATTCC		AGAAAATTTTATRGGATTTCACCTGCTTGG	
LEg908(61908)	GGAAACAAACTTGAGTAACTCTCATAAACA		AACAGGCTGAGCTAGCTGTGCTGGCAGTCA	
LEg584(81584)	CATCAGGGGCTTGTGCCARATACCTGTTGA		GCATRACTAATGTACCCAGAAGACCAAAGT	
LEg772(57772)	GACTSAGTCTTGTTTCTTACAGGAACTCTG	ATGTTAGAACATTTTTCTGCAAGAACATAA	CTTTTGTTCACCCATTTGGTCCAAATTATG	GACAATGTTAATAAAAYGCTGGAAATCCAT
BPe333(64333)	CAACATTTATCAAGGTGGATTCCTTTATAC		AGGCTCATTTTCCTTAYGACTTTACTTACA	
BPe396(75396)	GCATAGCTAATTATCCTGACTTAGCCCAGC		TCCTYTAGCCCRAGGATGGTTGCAGGTAAG	
Pet557(70557)	AGMCASRTGATTTGCAAAACTTTCTTCAGT	TTTTGAGTGGTAAGAKTTCTCAAAGCCAGA	AGTGCMTGAAAGTGTGARAAASTGCTGAGA	AAGTGGTTACTCCAGGTGCCYGYTTTTTCC
Pet970(1970)	TGAGCTCAGCACTAATATGTGATCAGCATT		GCTCCCATCTAATAAATTATGAGCTGTAAT	

NGSを利用した探索から得られた系統情報を持つCR1挿入遺伝子座の各鳥類ゲノムにおける挿入パターン解析に用いた全プライマーセットを表に示す。

表7：PCR及びアラインメントに使用した鳥類種

PCRに使用した水鳥類		PCRに使用した水鳥類以外の鳥類	
種名	英名	種名	英名
カッショクペリカン	Brown Pelican	カグー	Kagu
コサギ	Little Egret	タンチョウ	Red-crowned Crane
マダガスカルトキ	Madagascan Ibis	カンムリカイツブリ	Great Crested Grebe
ケープシロカツオドリ	Cape Gannet	オオフラミンゴ	Greater Flamingo
スキハシコウ	Asian Openbill		
コウノトリ	Oriental Stork		
ノドジロクロミズナギドリ	White-chinned Petrel		
キングペンギン	King Penguin		
アビ	Red-throated Loon		

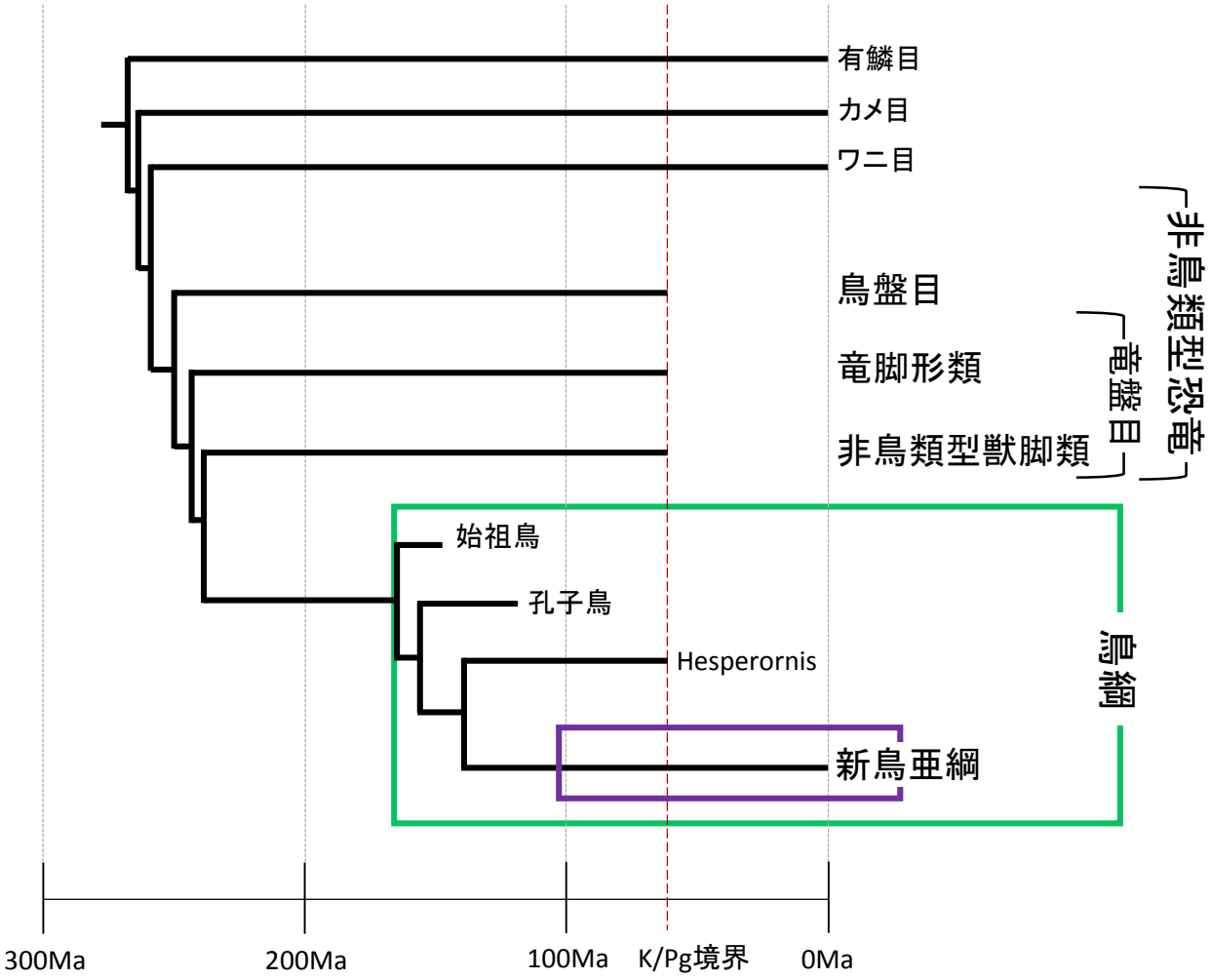
データベースから配列を得た鳥類	
種名	英名
ゼブラフィンチ	Zebra Finch
ガラパゴスフィンチ	Medium Ground Finch
セキセイインコ	Budgerigar
セーカーハヤブサ	Saker Falcon
ハヤブサ	Peregrine Falcon
シチメンチョウ	Wild Turkey
ニワトリ	Chicken

flankingPCRに用いた種と、プライマー設計のためにゲノムデータベースから配列を取得した鳥類の種名と英名を示す。

表8：水鳥類の系統関係における矛盾したCR1挿入パターン

	科・目名	ペリカン科	サギ科	トキ科	カツオドリ上科	コウノトリ科	ミズナギドリ目	ペンギン目	アビ目	カグー科	ツル科	カイツブリ科	フラミンゴ科
枝番号	❶	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	－	－
	❷	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	－	－	－
	❸	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	－	－	－	－	－
	❹	＋	＋	＋	＋	－	－	－	－	－	－	－	－
	❺	＋	＋	＋	－	－	－	－	－	－	－	－	－
	❻	－	－	－	－	－	＋	＋	－	－	－	－	－
遺伝子座名	LEg566	＋	＋	＋	－	＋	＋	＋	－	－	－	－	－
	LEg811	＋	＋	＋	＋	＋	－	＋	－	－	－	－	－

NGSを利用した探索からは、他のCR1の挿入パターンと矛盾するCR1挿入遺伝子座が2座位見出された。表には構築された系統樹の各枝におけるCR1挿入パターンおよび矛盾したCR1挿入パターンを示す。
＋はCR1挿入があり、－は無いことを表す。
LEg566は枝❸、❹と、LEg811は枝❻とそれぞれ矛盾している。



(Ma = 100万年前)

図1：現生鳥類の起原

鳥類は恐竜類の一部から派生した系統群である。
始祖鳥以降に派生したグループが鳥類 (鳥綱)と定義されている(Padian and Chiappe 1998)。

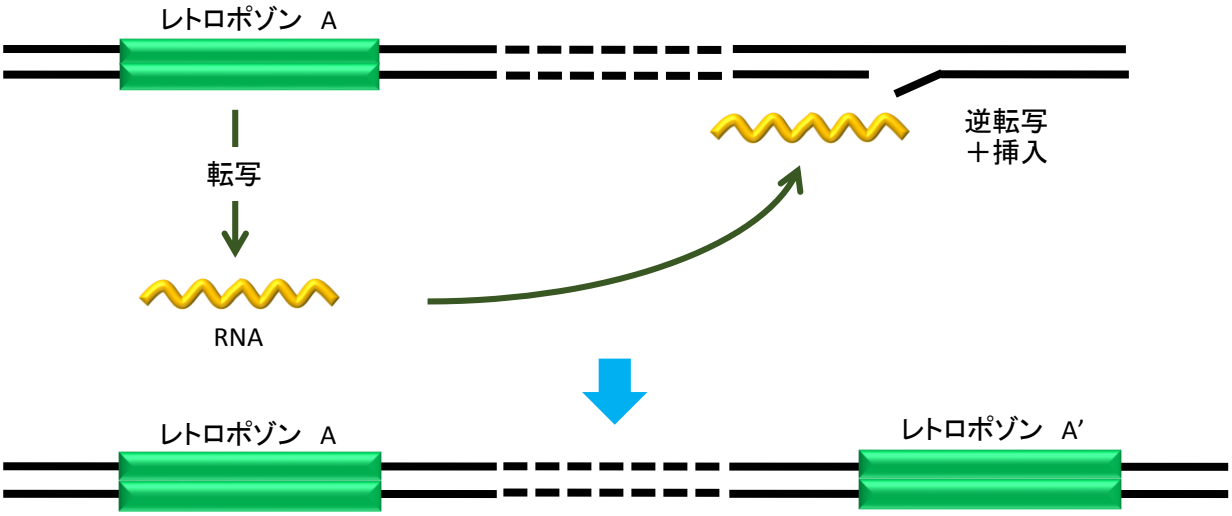
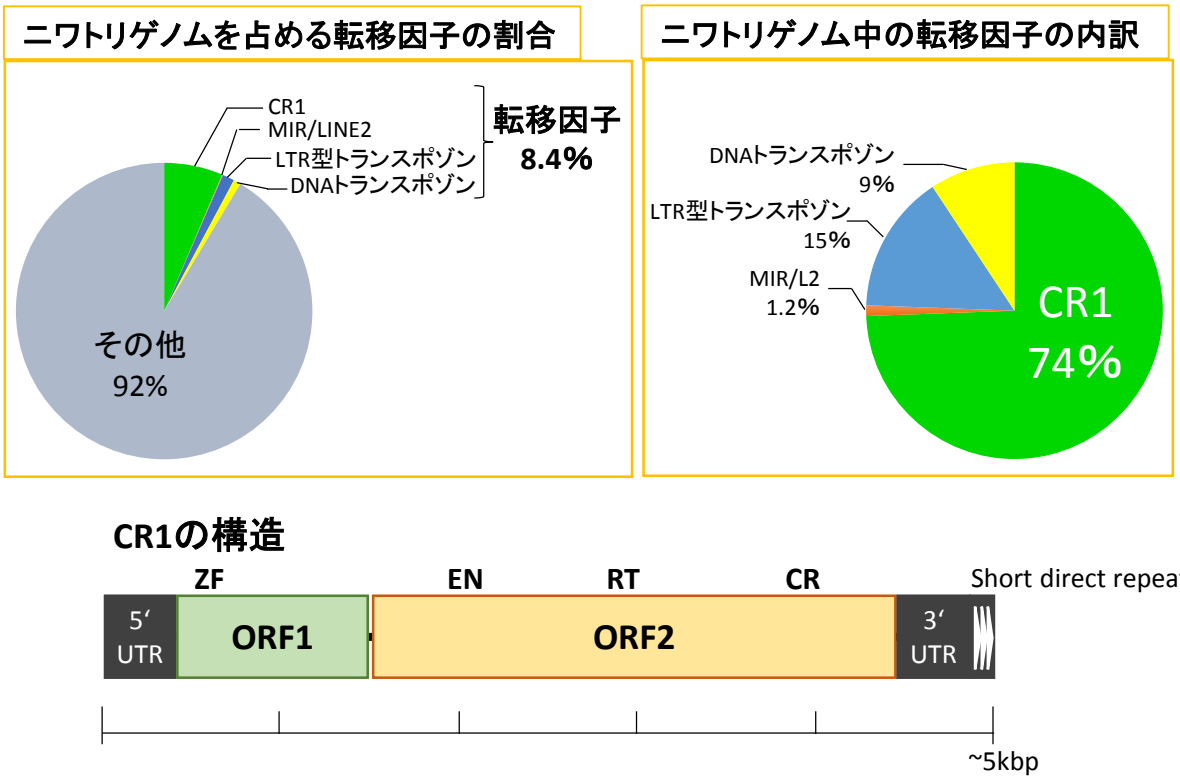


図2：レトロポゾンの転移に関する特徴

レトロポゾンの転移機構について以下の特徴が挙げられる。
・RNAを介して宿主ゲノム中で自らのコピー数を増幅させる
・別種のゲノム中で全く同一の座位に独立に挿入（収斂的挿入）が起きる確率はほとんど無に等しい
・一度挿入された座位からレトロポゾンが痕跡を残さず正確に抜け落ちる現象（逆転現象）は知られていない
これらの特徴から、レトロポゾンの挿入がどの生物の祖先において起こったかを指標とすれば
信頼性の高い系統樹を構築することが可能である。

A



B

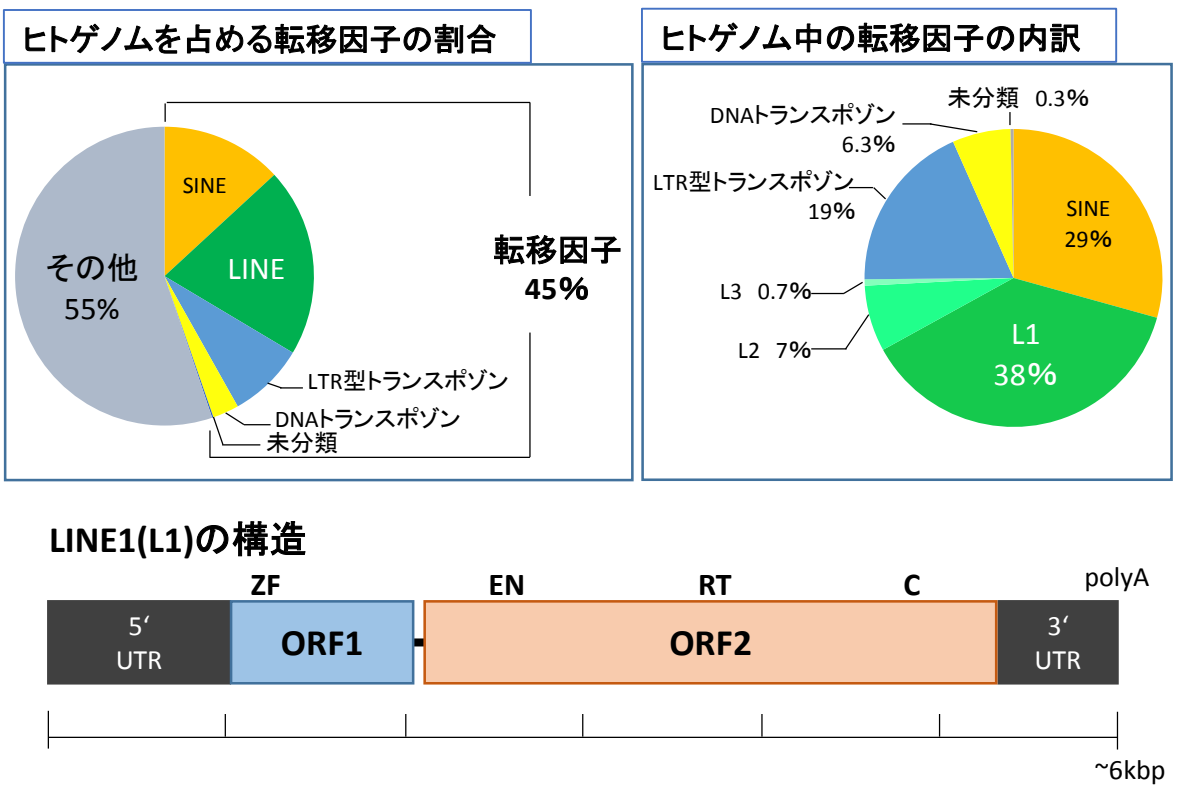


図3：各系統における主要な転移因子

ゲノム中に存在する主要な転移因子の種類は生物種によって異なることが知られている(Lander et al. 2001; Hillier et al. 2004)。
一例としてニワトリゲノムとヒトゲノムにおける転移因子を示す(Bao et al. 2015)。

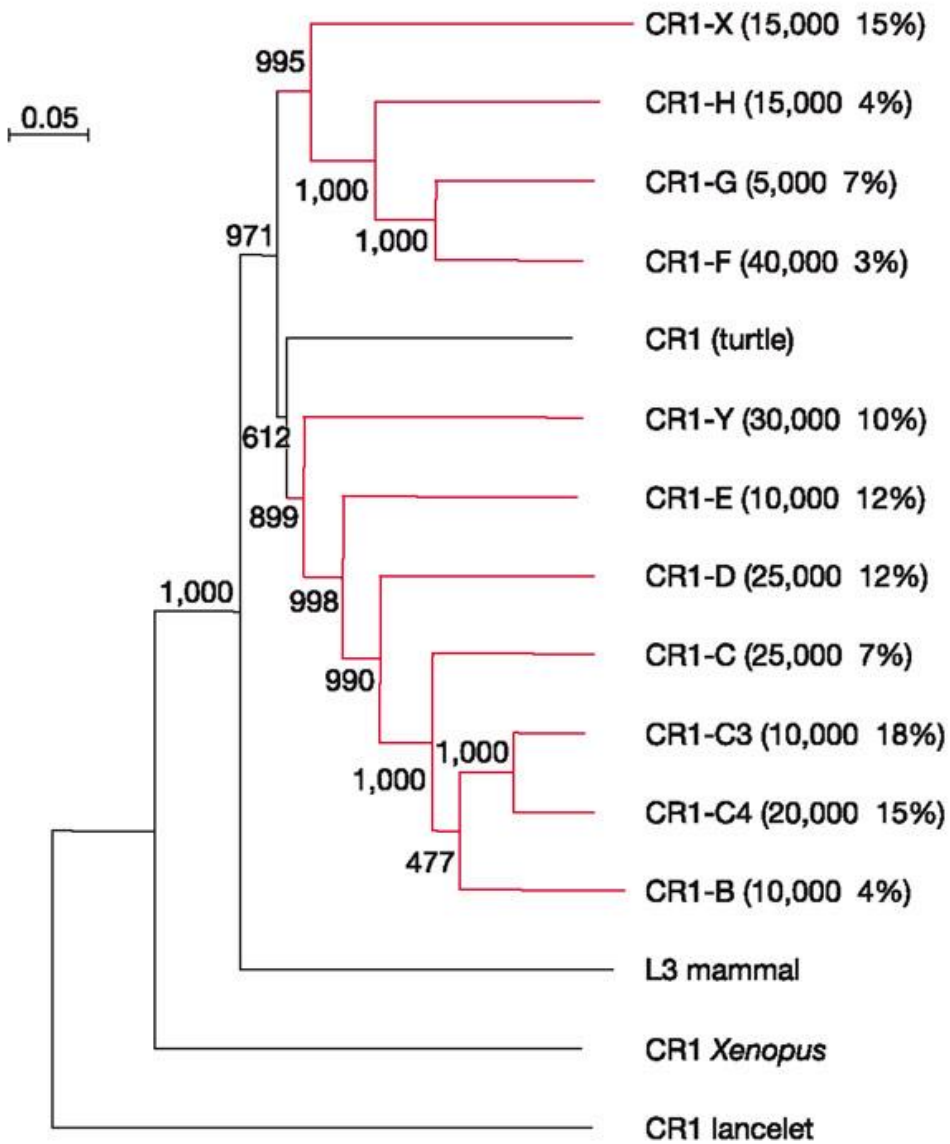


図4：CR1のサブファミリー

レトロポゾンには配列の類似によって分類されるサブファミリーが存在する。
鳥類ゲノム中にもっとも多く存在する転移因子であるCR1にもサブファミリーが知られている。
図にはCR1の主なサブファミリーの系統関係を示す(Hillier et al. 2007より引用)。
()内の数字は各サブファミリーのニワトリゲノム中におけるコピー数である。

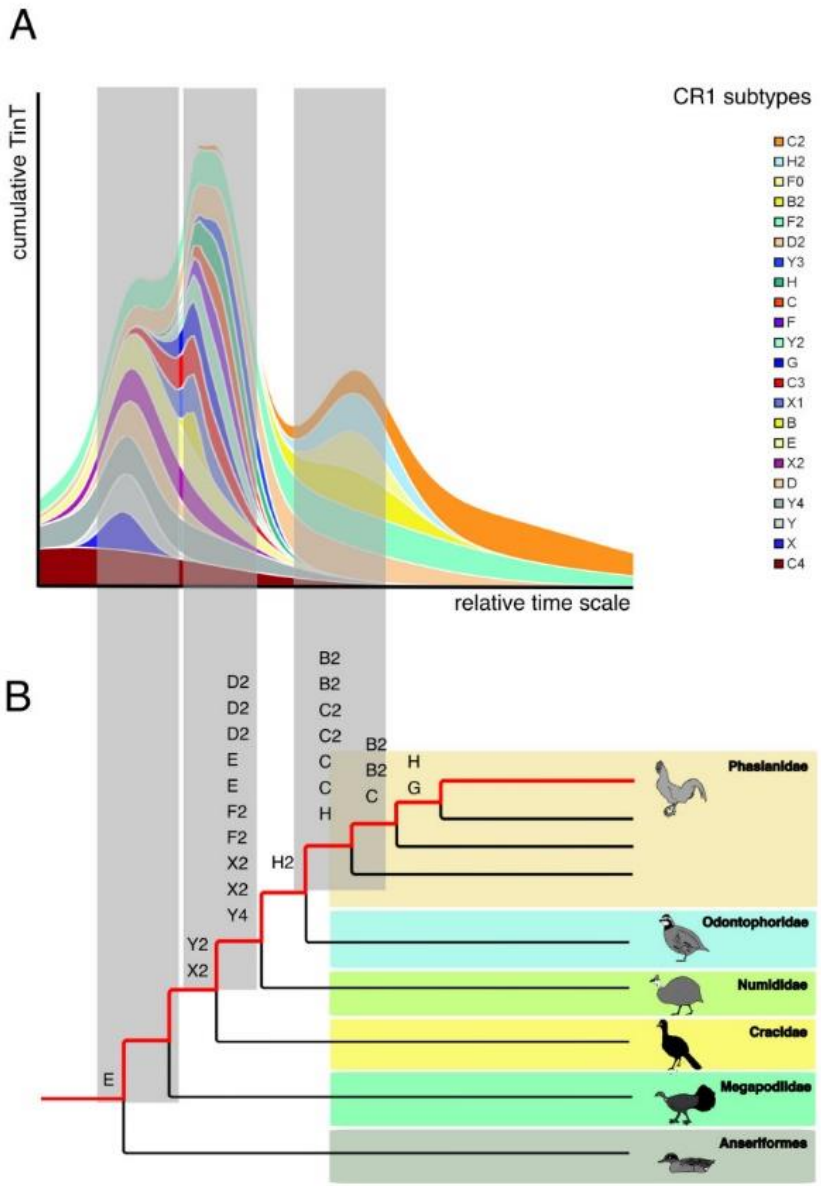


図5：キジ目における各CR1サブファミリーの活性

CR1配列の中にさらに別のCR1が挿入される現象をゲノム中で網羅的に探索することで、どのサブファミリーがいつ活発に転移していたか推測することができる(Krieg et al. 2007) 。Kriegら(2007)による図を引用する。

A) は各サブファミリーの活性のピークがどの時期に当たるのか示す。

B) はCR1挿入比較によって構築された系統樹である。各枝上に示されているのは各枝の系統関係を支持するCR1のサブファミリーである。

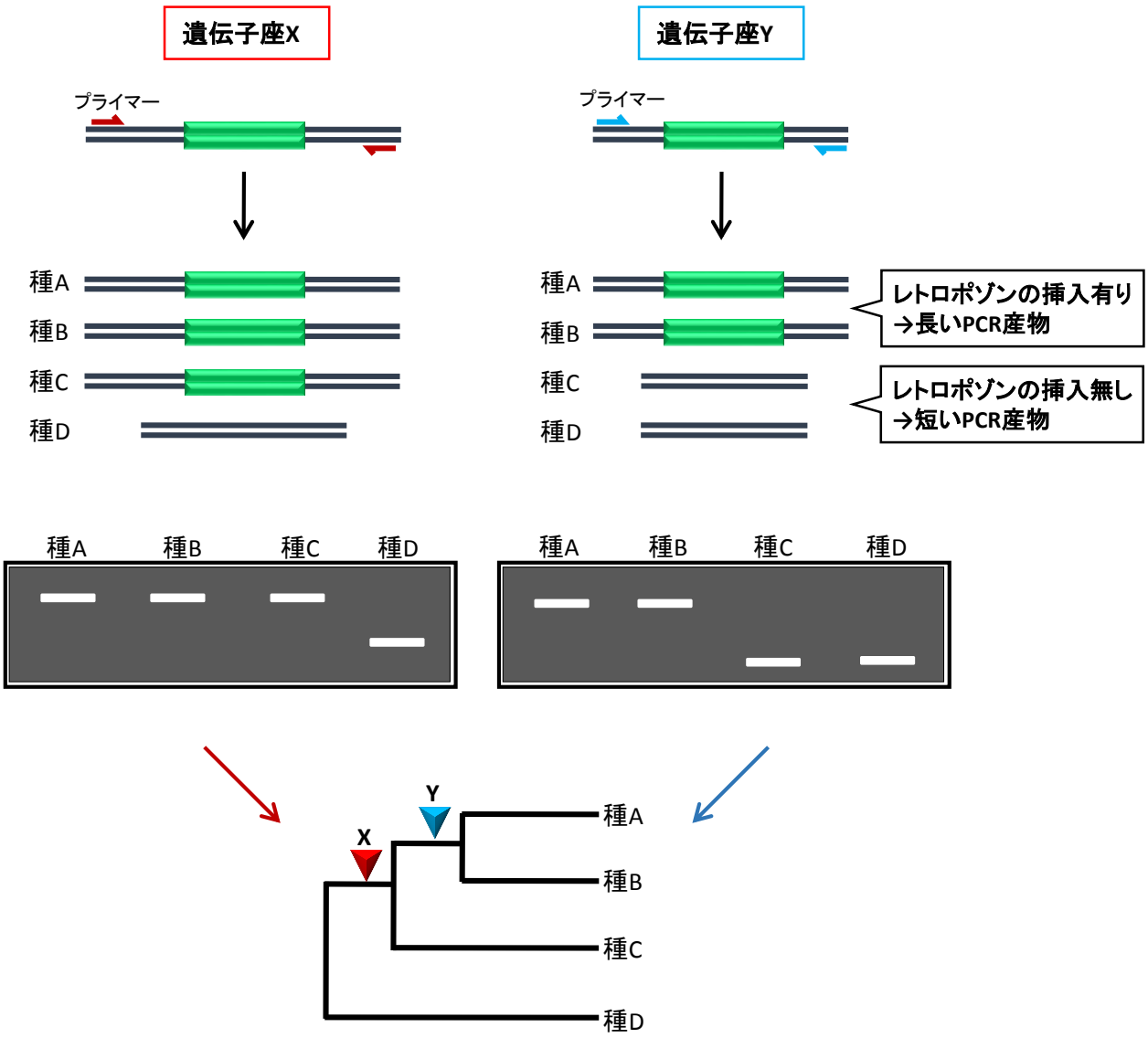


図6：レトロポゾン法の原理

レトロポゾン法では、各生物種におけるレトロポゾンの挿入の有無を比較することで、それらの系統関係を推定する。
具体的には各レトロポゾン挿入遺伝子座をPCRによって増幅し、反応産物の長さからレトロポゾンの有無を判別する。
図の例では遺伝子座Xの挿入パターンは種A・B・Cの単系統性を示し、
遺伝子座Yの挿入パターンは種AとBの単系統性を示す。

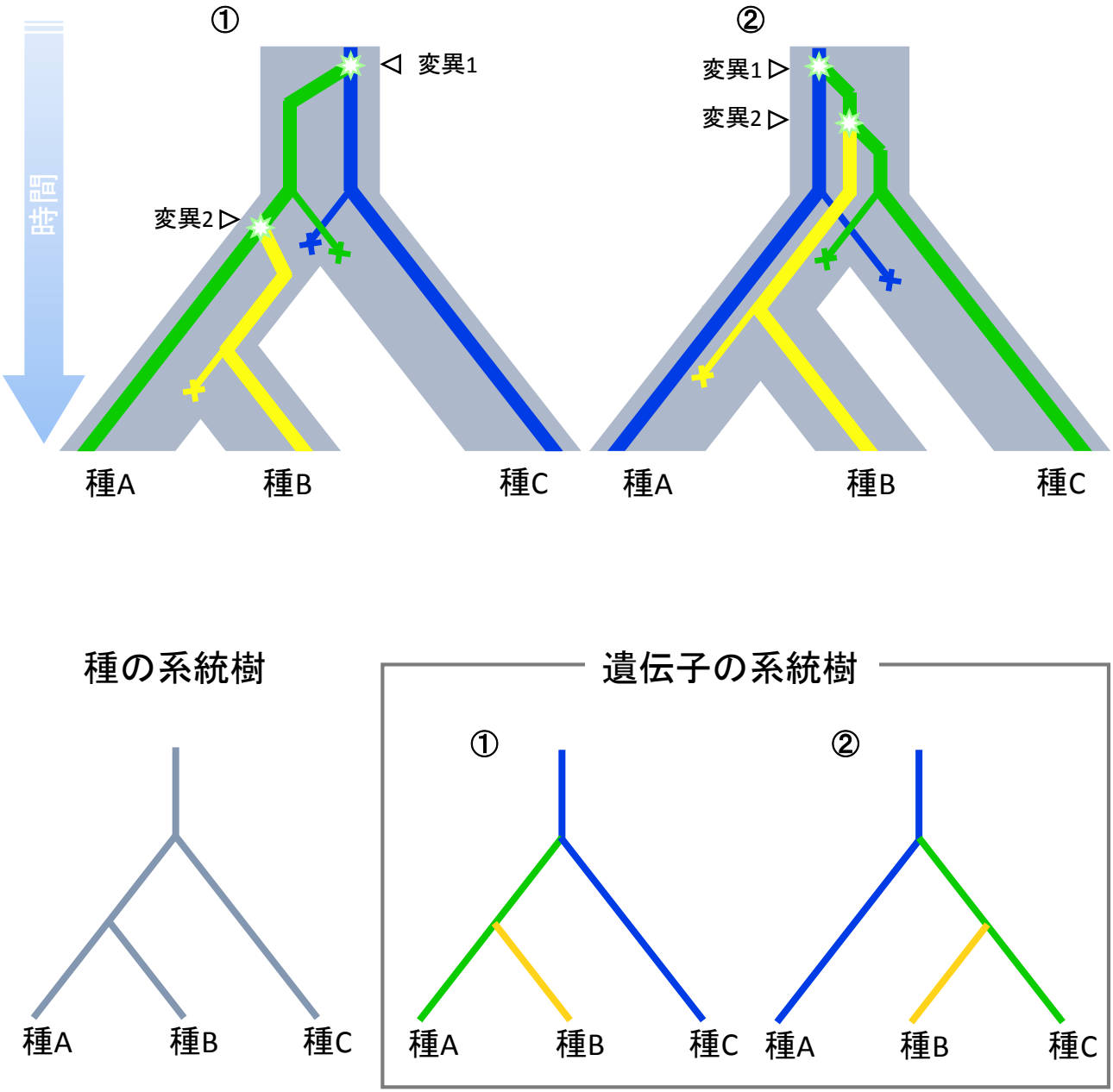


図7：種の系統樹と遺伝子の系統樹

①) 変異が集団内に固定されるにはある程度の期間が必要である。遺伝子に変異が起きてから集団が分岐するまでに十分な時間があれば、遺伝子の系統樹と種の系統樹は一致する。

②) しかし、固定のための十分な時間が経過する前に複数の分岐が起きると、遺伝子の系統樹が種の系統樹を反映しないことがある。
このような現象を不完全な系統ソーティング(incomplete lineage sorting；ILS)と呼ぶ。

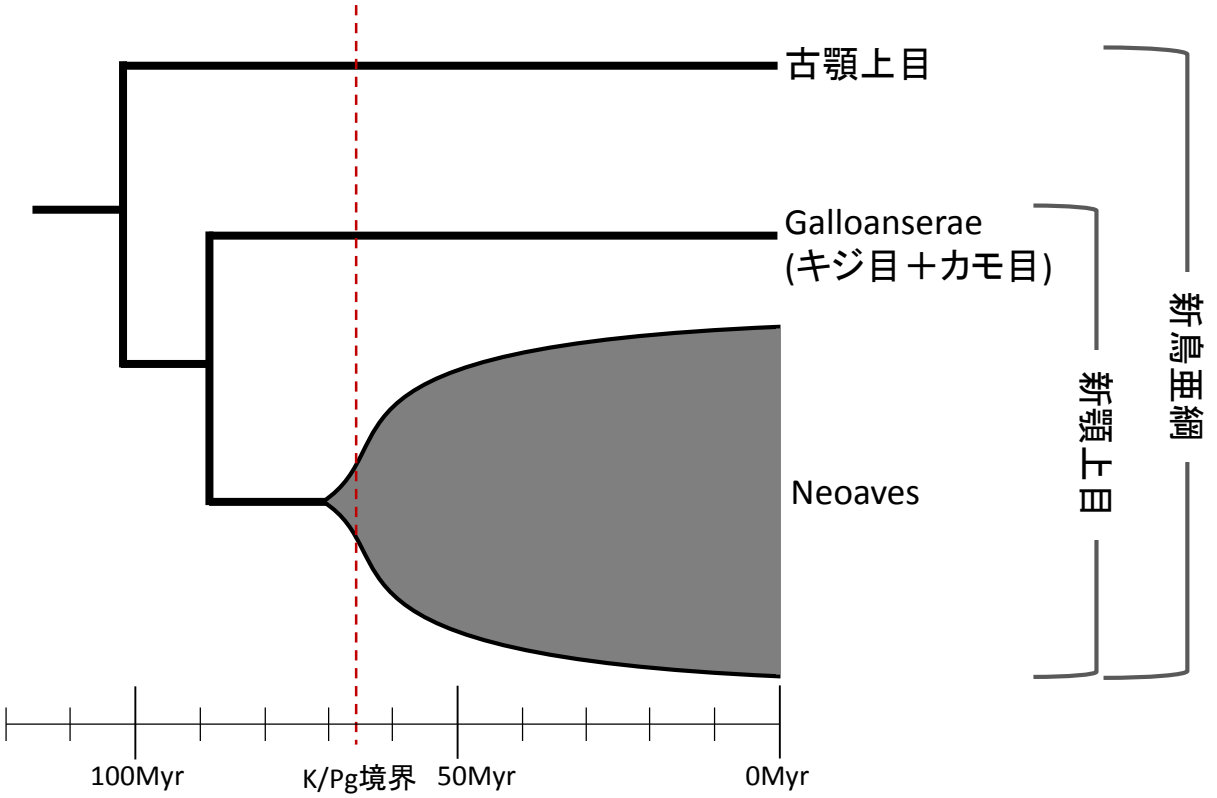


図8：現生鳥類の大まかな系統関係

全ての現生鳥類は新鳥類に属し、さらに古顎類と新顎類に大別される。
新顎類の内Neoavesの系統では約6600万年前のK-Pg境界前後に急速な種分化が起きたことが示唆されている。しかし、その系統関係については未だ解明されていない疑問が残されている。

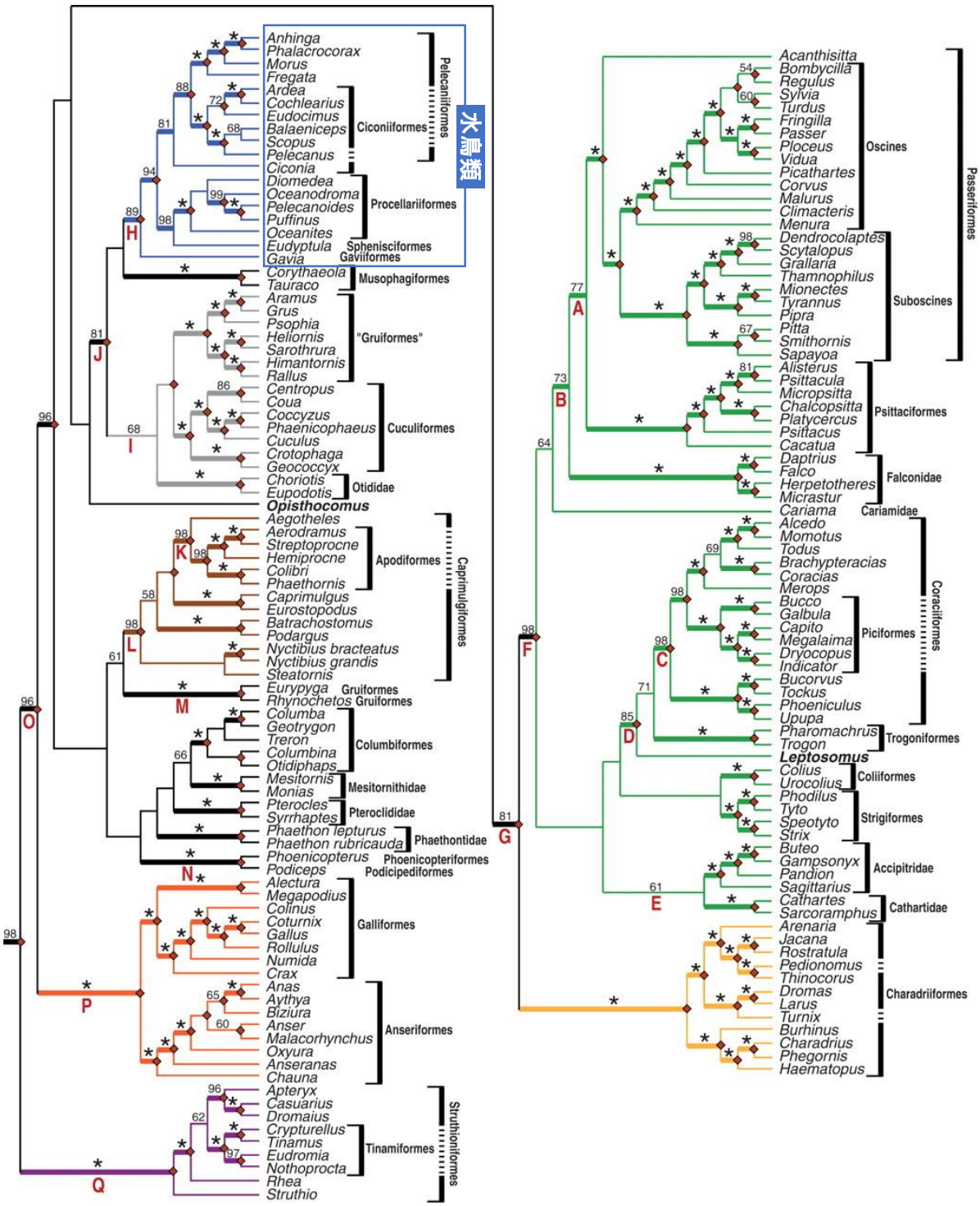


図9：近年の大規模な鳥類の分子系統解析

19の核遺伝子を用いた鳥類の系統樹。Hackettら(2008)から引用

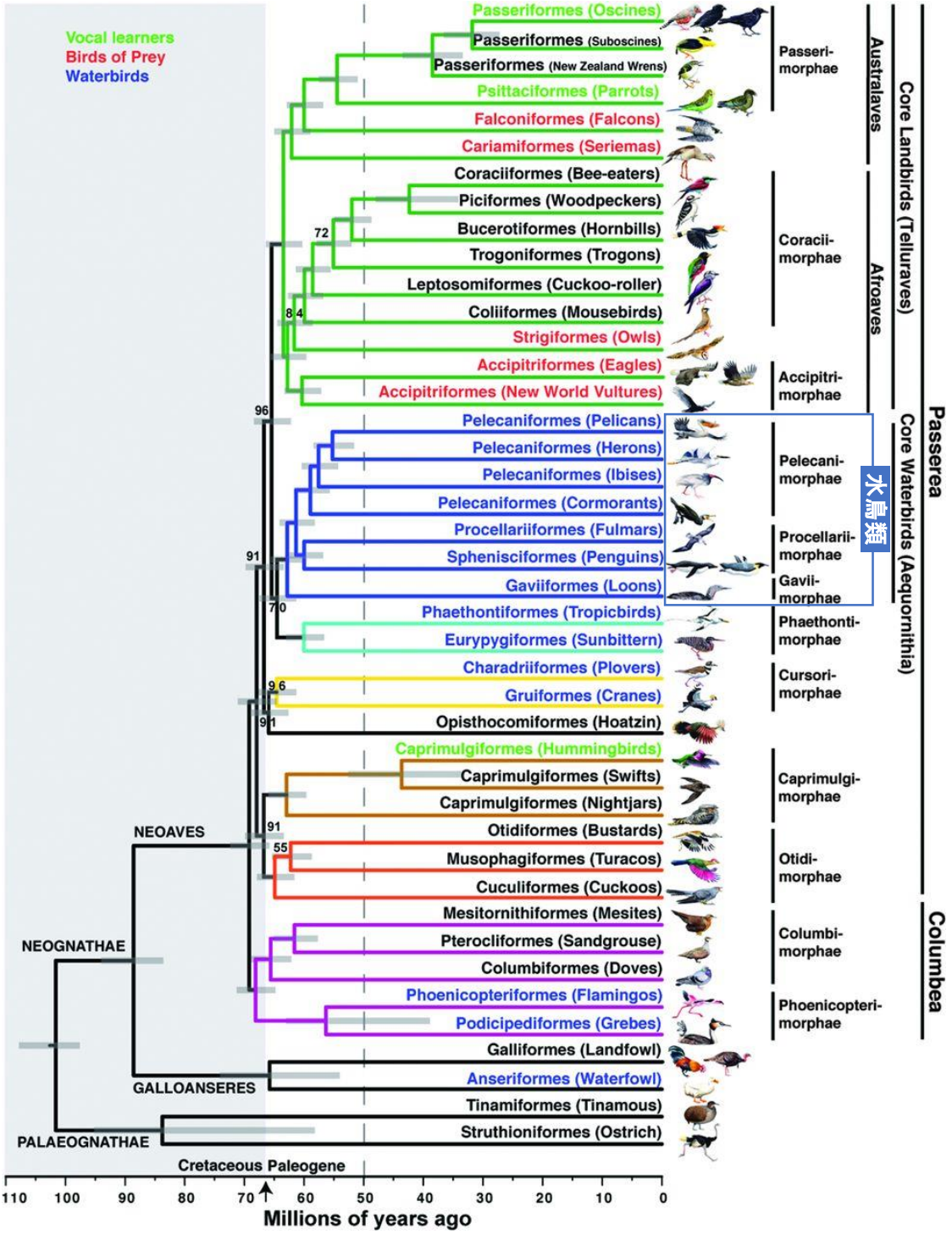


図10：近年の大規模な鳥類の分子系統解析

ゲノムスケール解析による鳥類の系統樹と分岐年代。Jarvisら(2014)から引用

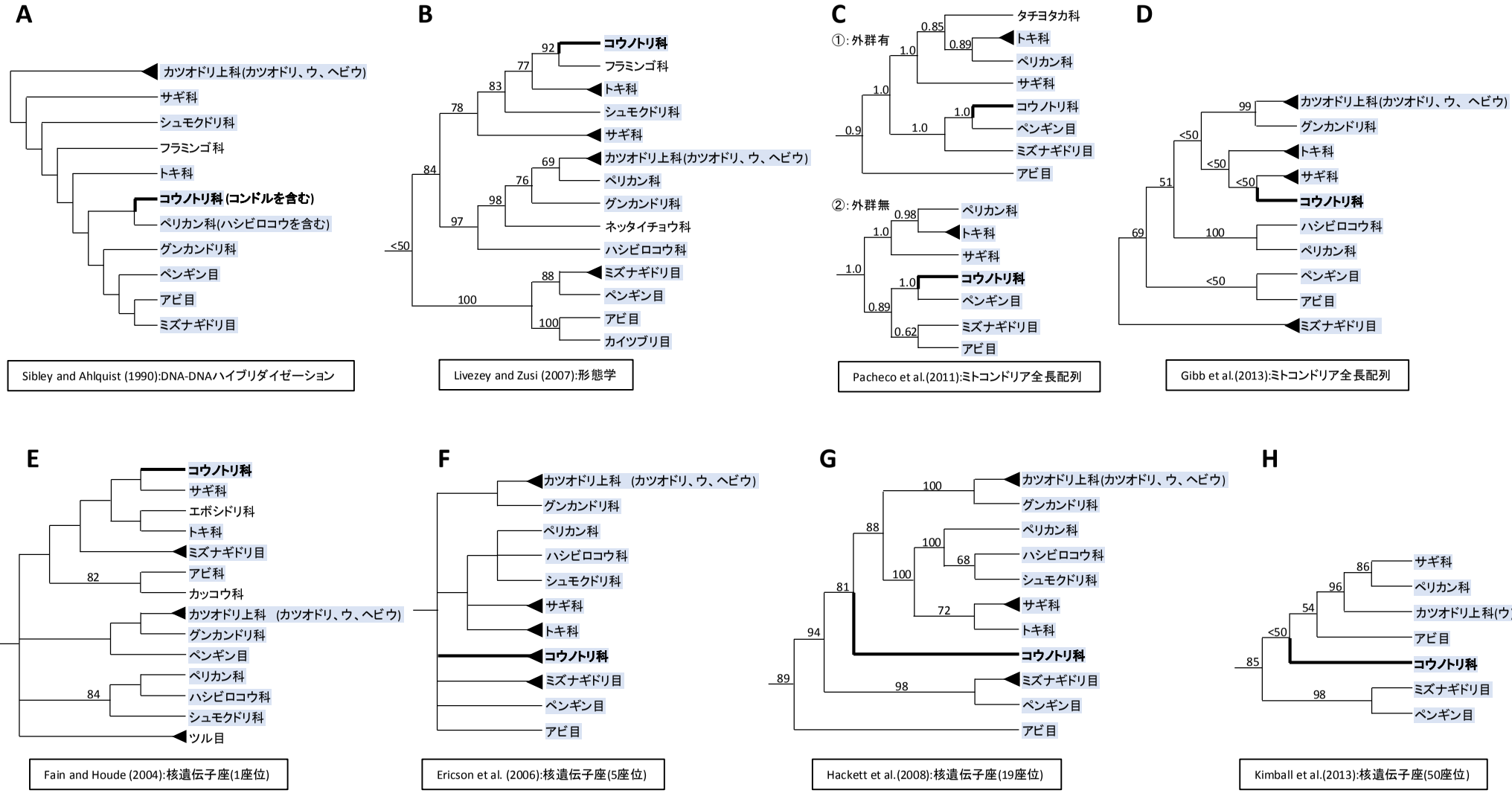
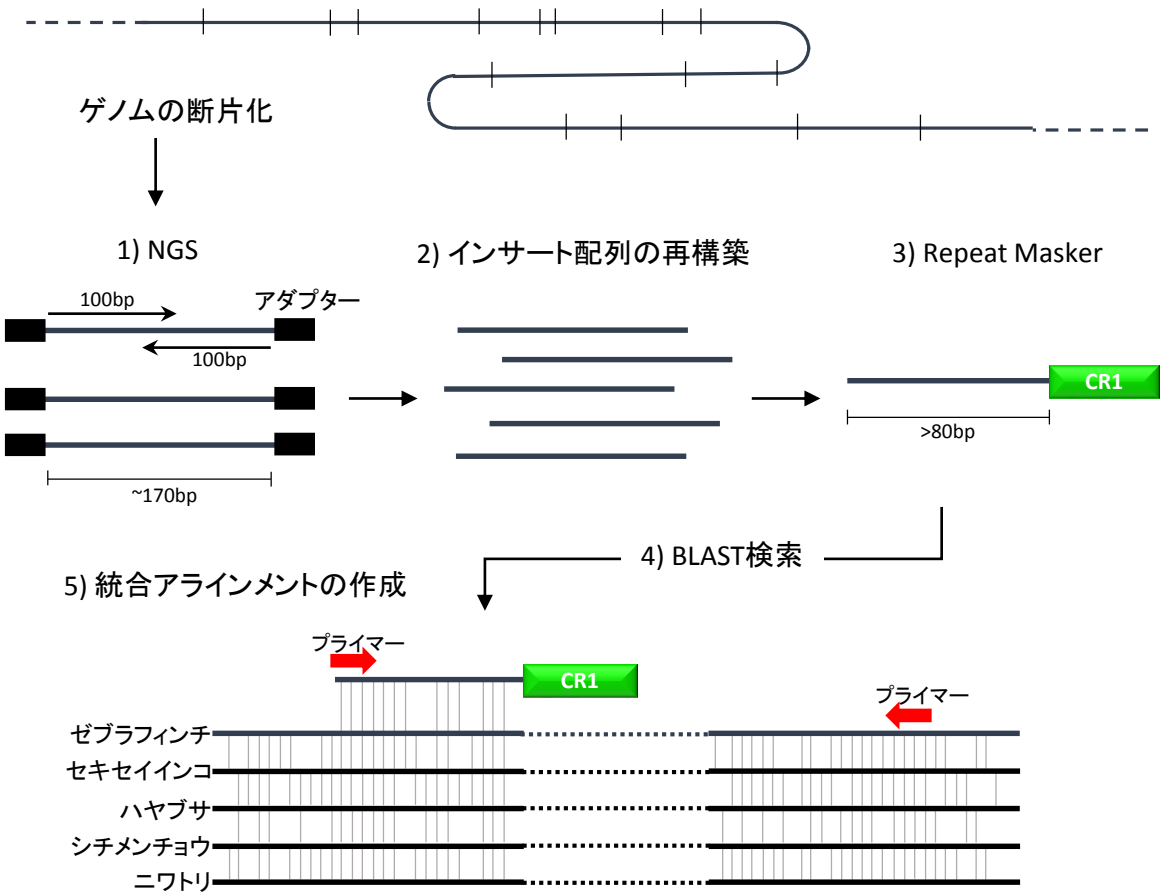


図11：各先行研究における水鳥類周辺の系統樹

は水鳥類 (Aequornithes)を示す。



種	各段階で得られたデータ量			
	1) 断片数(組)	2) 再構築された断片数	3) 得られたCR1数	4) ゼブラフィンチの相同遺伝子座数
ノドジロクロミズナギドリ	5,939,158	5,768,938	15,168	4,098
コサギ	8,389,771	8,056,647	62,781	15,114
カッショクペリカン	9,918,513	9,693,328	65,853	16,258

図12：NGSを利用したCR1挿入遺伝子座の探索

1) 断片化されたゲノムDNAについてNGSを用いたペアエンドシーケンシングを行った。

2) ペアエンドシーケンシングによって得られた配列一組をつないで断片の全長配列とした。

3) Repeat Maskerを用いて、得られた配列の中からCR1およびその周辺配列の含まれる断片を収集した。

4) BLAST検索によって全てのCR1周辺配列のゼブラフィンチゲノムにおける相同遺伝子座を取得した。

5) ゼブラフィンチの相同遺伝子座の情報を元に、複数種の鳥類ゲノムにおける相同遺伝子座配列を収集した。
収集された配列からは統合アラインメントを作成し、プライマー設計に用いた。

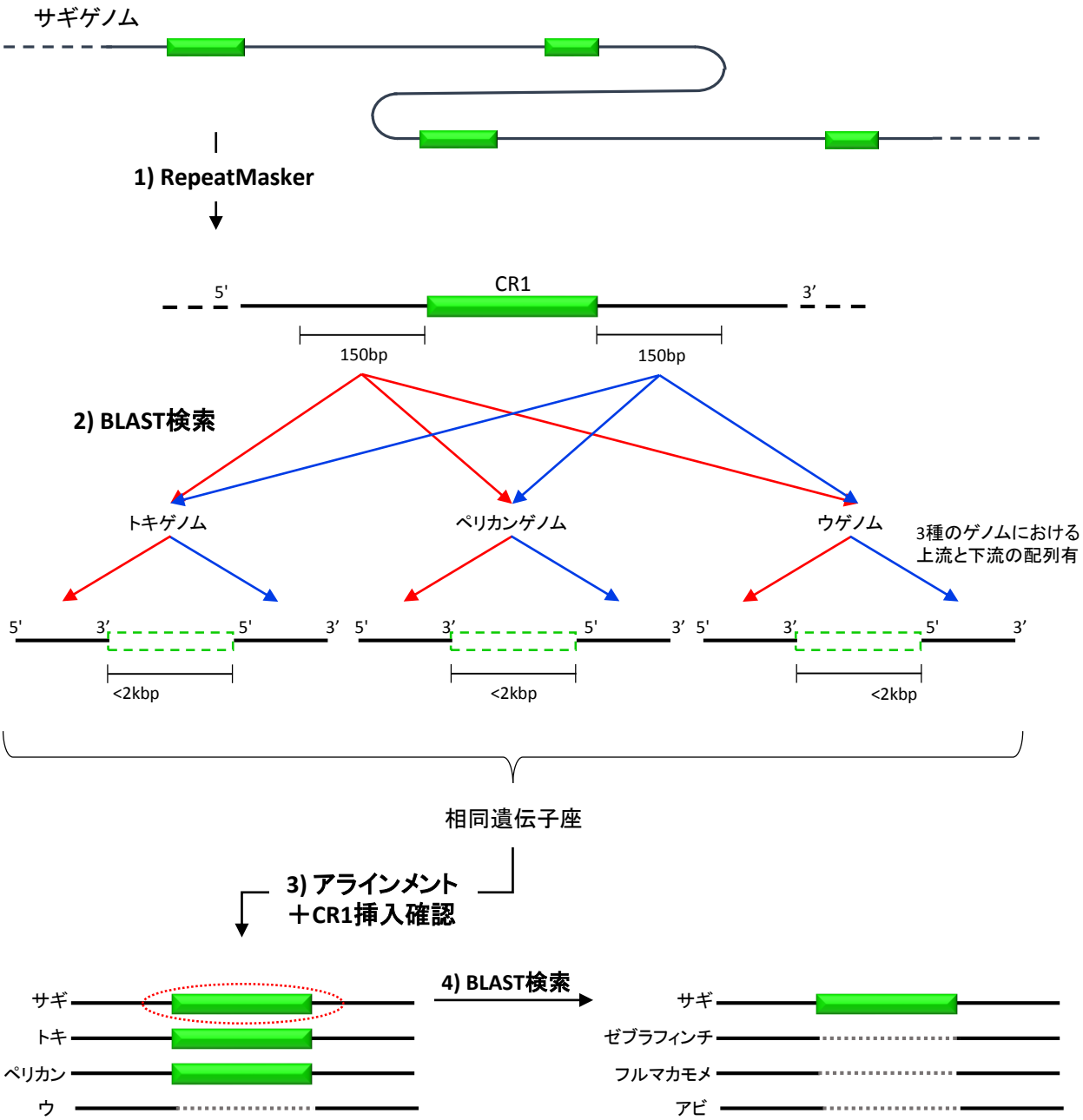


図13：ゲノムデータベースを利用したCR1挿入遺伝子座の探索

1) カワウ、コサギ、トキ、ニシハイイロペリカンのゲノム中の全CR1をRepeatMaskerによって同定した。

2) 得られたCR1の上流および下流の2つの周辺配列について、両断片を独立に扱った上で他の3種のゲノムに対するBLAST検索を行った。これにより全てのCR1挿入座位について4種の相同配列を取得した。

3) 4種の相同配列についてアラインメントを行い、それぞれの遺伝子座におけるCR1の挿入の有無を判断した。

4) 系統情報を持つ全ての遺伝子座について他の鳥類ゲノムにおける相同遺伝子座を検索し、CR1の挿入が見られないことを確認した。

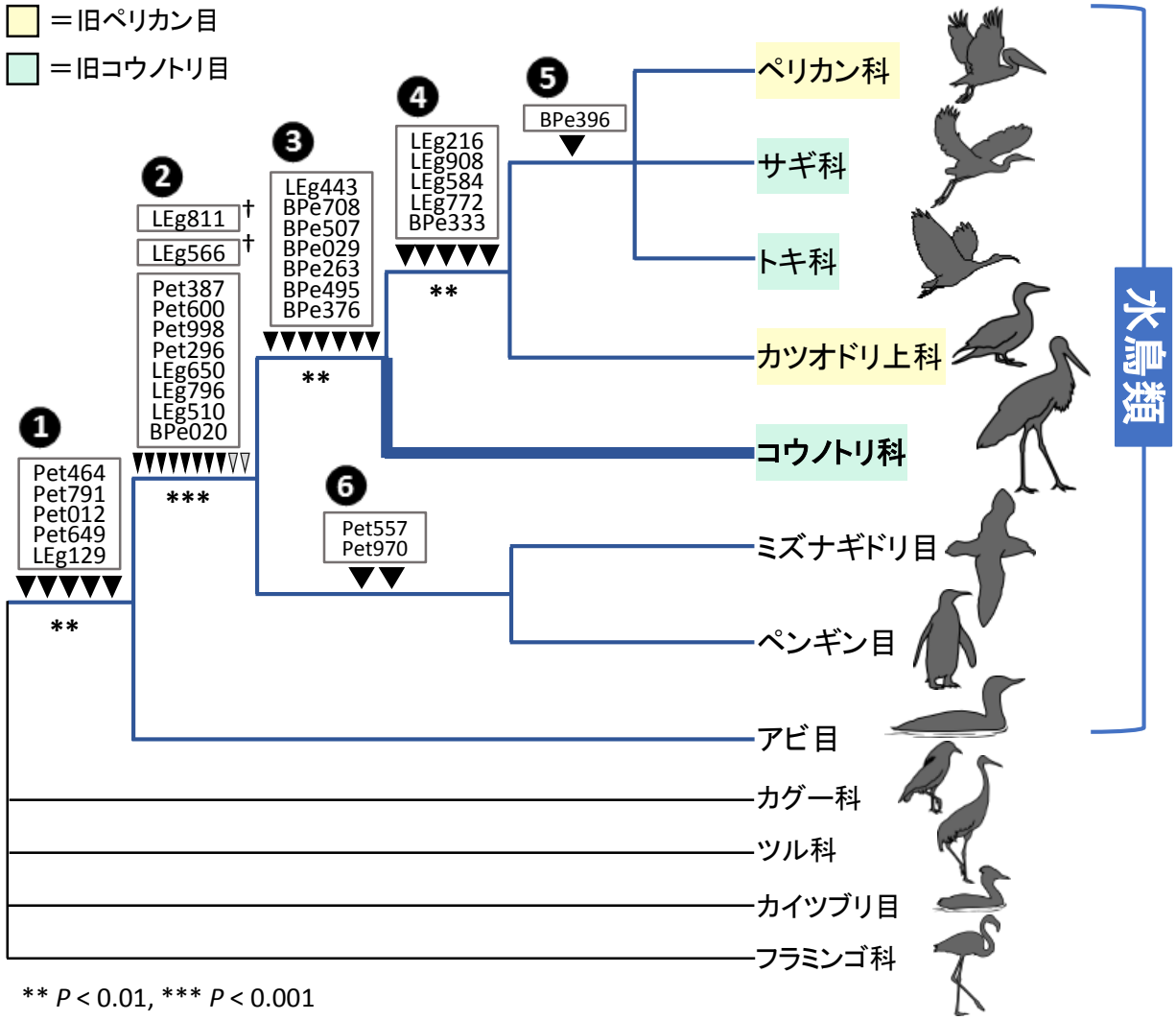
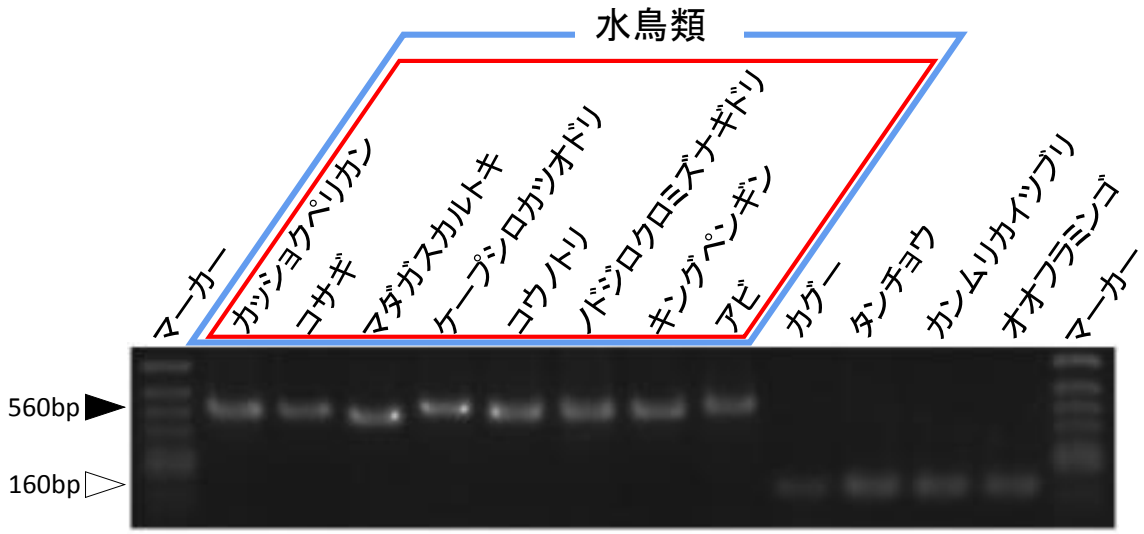


図14：CR1の挿入比較に基づいた水鳥類の系統樹

NGSを利用した探索で得られたCR1の挿入パターンから系統樹を構築した。
各枝におけるCR1挿入遺伝子座数は▼で、遺伝子座名と共に示した。
矛盾した挿入パターンを示した遺伝子座は▽と遺伝子座名横の†で表した。
*は各枝の統計的有意性を示す（** P<0.01, *** P<0.001）。



Pet012(51012) **CR1**

```
Brown Pelican          AGCCACAAT-GAAGTCAGCAACACTTCATAGAATCATCATAGAAT--------ACCAGGTT//TCTCAGCCTTGAGAAAAGAAGGCTTAGGGGAGATCAC-ATGCAAAGA-TGCAAAAATAAGTC
Little Egret           AGCCACAAT-GAAGTCAGCAACACTTCATAGAATTGCCATGGAAT--------ACCAGGTT//TCTCAGCTTTGAGAAAAGAAGGCTTAGGGGAGATCAC-ATACAAAAA-TAAG--------CC
Madagascan Ibis        -----CAAC-GAAGTCAGCAACACTTCATAGAATCATCATAGAAT--------ACCAGGTT//TCACAGCCTTGAGAAAAGAGGGCTTAGGGAAGATCAC-ATACAAAAA-TAAG--------CC
Cape Gannet            AGCCACAAC-GAAGCCAGCAACACTTCATAGACTCATTGTAGAATCACCGAATACCAGGTT//TCTCAGTCTTGAGAAAAGAAGGCTTAGGGGAGATCAC-ACACAAAAA-TGCAAAAATAAGCC
Oriental Stork         AGCCACAAT-GAAGTCAGCAACACTTCATAGAATCACCATAGAATCATAGAATACCAGGTT//TCTCAGCCTTCAGAAAAGAAGGCTTAGGGGAGACCACTATATGAAAA-TGCAAAAATAAGCC
White-chinned Petrel   AGCCACAAT-GAAGTCAGCAATACTTCATAGAATCATCATAGAAT--------ACCAGGTT//TCTCAGCCTTGAGAAAAGAAGGCTTAGGGGAGATCAC-ATACAAAAA-TAAG--------CC
King Penguin           AGCCACAAT-GAAGTCAGCAACACTTCACAGAATCATCATAGAAT--------ACCAGGTT//TCTCAGCCTTGAGAAAAGAAGGCTTAAGGGAGATCAC-ATACAAAAA-TGCAAAAGTAAGCC
Red-throated Loon      AGCCACAAT-GAAGTCAGCTACAATTCATAGAATCATCACAGAATCGTAGAATACCAGGTT//TCTCAGCCTTGAGAAAAGAAGGCTTAGGGGAGATCCC-ATTCAAAAA-TACAAAAATAAGCC
Kagu                   AGGCACAAC-GAAGTCA-CAACACTTC-CA------------------------------//------------------------------AGATCAC-ATACAAAAA-AGCAAAAATAAGCC
Red-crowned Crane      AGCCACAAT-GAAGTTAGCAACACTTC-TC------------------------------//------------------------------AGATCAC-ATACAAAAA-TGCAGAGATAAGCC
Great Crested Grebe    AGCCACAGT-GAAGTCAGCAACACTTC-TA------------------------------//------------------------------AGATCGC-ATACAAAAA-TGCAAAAATAAGCT
Greater Flamingo       AGCCACGAT-GATGTCAGCAACACTTC-TA------------------------------//------------------------------AGACCAC-ATACAAAAA-TGCAAAAATAAACC
Zebra Finch            AGCCACAGT-GAAGTCAACAACATTTC-TA------------------------------//------------------------------AGATCAC-ATAAAAAAACTGCAGAGACAAGCC
Medium Ground Finch    AGCCACAGT-GAAGTCAACAACACGTC-TA------------------------------//------------------------------AGATCAC-ATAAAAAAACTGCAGAGACAAGCC
Budgerigar             AGCCACAAT-GAAGTCAGTAACACTTC-TA------------------------------//------------------------------AGATCAC-ATACGAAAA-AGCAAAAATAAGCC
Saker Falcon           AGCCATAAT-GAACTCAGCAACCCTTG-TA------------------------------//------------------------------AGATCAC-ATACAAAAA-TAAC--------CC
Peregrine Falcon       AGCCATAAT-GAACTCAGCAACCCTTG-TA------------------------------//------------------------------AGATCAC-ATACAAAAA-TACAAAAATAACCC
Wild Turkey            AGCCACAATTAAAGTCAGCAGCTCTTC-TA------------------------------//------------------------------AAATCAC-ATGCAAATG-AGCAAGAGTAAGGT
Chicken                AGCCACAATTAAAGTCAGCAGCTCTTC-TA------------------------------//------------------------------AAATCGC-ATCCAAA-G-TGCAACAATAAGGC
```

図15：遺伝子座Pet012(51012)の電気泳動像とアラインメント

赤枠で示したのはCR1挿入が確認された種である。

▶はCR1の挿入されたPCR産物、▷はCR1の挿入されていないPCR産物を示す。

遺伝子座Pet012(51012)においては水鳥類8科でCR1の挿入が見られた。

Pet464(14464)

CR1

```
Brown Pelican         CCTGCAGCAAAATAAGCAACAACAATATGTTTCATAGAATCA--GAATCACAAAATGGTTT//AGCCATGAGCAGCAAGTTTCTCCAAGAGAGTGAAACAATTCTCTCTGATTTCTGGGTTCAA
Madagascan Ibis       CCTGCAGCAAAATAAGCAACAACAATATGTTTCATAGAATAATAGAATGGT--------TT//AGCCATAAGCCGCCAGTTTCTCCAGGAGAATGAAATACTTCTCTCTGATTTCTGGGTTCAG
Cape Gannet           TGTGCAGCAAACTAAGCGACAACAATATGATTCATAATGTCATAGAATCATAGAATCATTA//AGCCATGAGCAGCTAGTTTCTCCAGGAGAATGAAATACTTCTCTCTGATTTCTGGGTTCAG
Oliental Stork        CCTGCAGCAAAATAAGCAACAGCAATATGTTTCATAGAATCATAGAATCAT--------TA//AGCCATGAGCAGCCAGTTTCTCCAGGAGAATGAAATACTTCTCTCTGATTTCTGGGTTCAA
King Penguin          CCTGCAGCAAAATAGGTAACAACAATATGTTTCGTAGAATCACAGAATCATAGCATCATTT//AGCCATGAGCAGCCGGTTTCTCCAGGAGAATGAAATACTTCTCTCTGATTTCTGGGTTCAG
Red-crowned Crane     CCTGCAGCAAAATAAGCAACAATAATATGTT-----------------------------//-----------------------------TGAAATACTTCTCTCTGATTTCTGGGTTCAG
Great Crested Grebe   CCTGCAACAAAATAAGCAACAACAATAAGTT-----------------------------//-----------------------------TGAGATACT---CTCTGTTTTCTGTGTTCAG
Greater Flamingo      CCTGCAGCAAAATAAGCGACAACAATATGTT-----------------------------//-----------------------------TGAAATACTTCTCTCTGATTTCTGGGTTCAG
Zebra Finch           CCTGCAGCAAAATAAGCAACAACAATCTGTT-----------------------------//-----------------------------TGAAATAGTTGTCTCTGATTTCTGGGCTCAG
Medium Ground Finch   CCTGCAGCAAAATAAGCAACAACAATATGTT-----------------------------//-----------------------------TGAAACAGTTGTCTCTGATTTCTGGATTCCG
Budgerigar            CTTGCAGCAAAATAAGCAACAACAATACACT-----------------------------//-----------------------------CAAACTATTTCTCCTTGATTTCTGGGTTCAG
Saker Falcon          CCTGCAGCAAAATAAG-AACAACAATATGTT-----------------------------//-----------------------------TGAAATACTTCTCTCTGTTTTCTGGTTTCAT
Peregrine Falcon      CCTGCAGCAAAATAAG-AACAACAATATGTT-----------------------------//-----------------------------TGAAATACTTCTCTCTGTTTTCTGGTTTCAT
Wild Turkey           CATGCAACAAAACAATCAACAACAATATATT-----------------------------//-----------------------------AGAAA----TGTTTCTGATTTCTGGGTTCAG
Chicken               CGTGCAACAAAAAAATCAACAGCAATATACT-----------------------------//-----------------------------GGAAA----TGTTTCTGATTTCTAGGTTCAG
```

Pet649(15649)

CR1

```
Brown Pelican         CCAATGAGCTTCTCAGCACGGCAAGTTTAACGGTTGGACTTGATGATCTTAAAGGTCTTTTCCAACCTAAACAATTCTATGATTCTATGATTCTAAAGCACTTATGTCACCC-ACTACCAACGC
Little Egret          CTGACGAGCTTCTCAGCACGGCAAGTTTAATGGTTGGACTTGATGATCTTAAAGGTCTTTTCCAACCTAAACAATTCTATGATTCTATGATTCTAAAGCACTAATGTCACCC-ACTACCAACGC
Madagascan Ibis       CCGATGAGCTTCTCAGCACGACAAGTTTACCGGTTGGACTCGATGATCTCAAAGATCTTTTCCAACCTAACC--------GATCCTATGATTCTAAAACACTAATGTTACCC-ACTACCAACGC
Cape Gannet           CCGATGAGCTTCTCAGCACGGCAAGTTTAATGGTTGGACTTGATGATCTTAAAGGTCTTTTCCAATCTAAACAATTTTATGATTCTATGATTCTAAAGCACTAATATCACCC-ACTACTGACAC
Oriental Stork        CCGATGAGCTTCTCAGCATGGCAAGTTTAACAGTTGGACTTGATGATCTTAAAGGTCTTTTCCAACCTCAATGATTCTATGATTCTATGATTCTAAAGCACTAATGTCACTC-ACTACCAATGC
White-chinned Petrel  CCGACGAGCTTCTCAGCACGGCAAGTTTAATGGTTGGACTTGATGATGTTAAAGGTCTTTTCCGACCTAAAC--------GATCCTACGATTCTAAAGCACTGATGTCACCC-ACTACCAACAC
King Penguin          TCGATGAGCTTCTCAGCACGGCAAGTTTAACGGTTGGACTTGATCATCTTAAAGGTCTTTTCCAACCTAAACGATTCTATGTTTTTATGATTCTAAAGCACTAATGTCACAC-ACTACCAACGC
Red-throated Loon     CCGATGAGTTTCTCAGCACGGCAAGTTTAACGGTTGGACTTGATGATCTTAAARGTCTTTTCCAACCTAAAT--------GATTCTGTGATTCTAAAGCACTAATGTCACCC-ACTACCAACGC
Kagu                  CCAATGAGCTGCTCAGCACGGCAAGTTTAAT-----------------------------------------------------------------------AAAGCACTAATGTCACCC-ACTACCAACGC
Red-crowned Crane     CCGATGAGCTTCTCAGCACGGCAAGTTTAAT-----------------------------------------------------------------------AAAGCACTAATGTCACCC-ACTACCAACGC
Great Crested Grebe   CCGATGAGCTTCTCAGCACGGCAAGTTTAAT-----------------------------------------------------------------------AAAGCACTA-TGTCACCC-ACTACCAACGC
Greater Flamingo      CCGATGAGCTTCTCAGCACGGCAWGTATAAT-----------------------------------------------------------------------AAAGCACTAATGTCACCCCACTACCAACGC
Zebra Finch           CCAATCAGCTCCTCAGCACAGCAAGTTTAAT-----------------------------------------------------------------------AAAGCACTAATGTCACCC-ACTGCCAACAC
Medium Ground Finch   CCAATGAGCTCCTCAGCACAGCAAGTTTGAT-----------------------------------------------------------------------AAAGCACTAATGTCACCC-ACTACCAACAC
Budgerigar            CTGATGGGCTTCTCAGCATGGCAAGTTTAAT-----------------------------------------------------------------------AAAGCACTAATGTCACCA-ACTACCAACGC
Saker Falcon          CCGATGAGCTACTCAGCATGGCAAGTTTAAT-----------------------------------------------------------------------AAAGCAGTAATGTCACCC-ACTACCGACGC
Peregrine Falcon      CCGATGAGCTACTCAGCATGGCAAGTTTAAT-----------------------------------------------------------------------AAAGCAGTAATGTCACCC-ACTACCGACGC
Wild Turkey           CCAATGAGCTGCTTGGCACAGCAAGTTTAAT-----------------------------------------------------------------------AAAGCACTAATGTCACCC-ACTACCAGTGC
Chicken               CCAATGAGCTGCTTGGCACAGCAAGTTTAAT-----------------------------------------------------------------------AAAGCGCTAATGTCACCC-ACGACCAGTGC
```

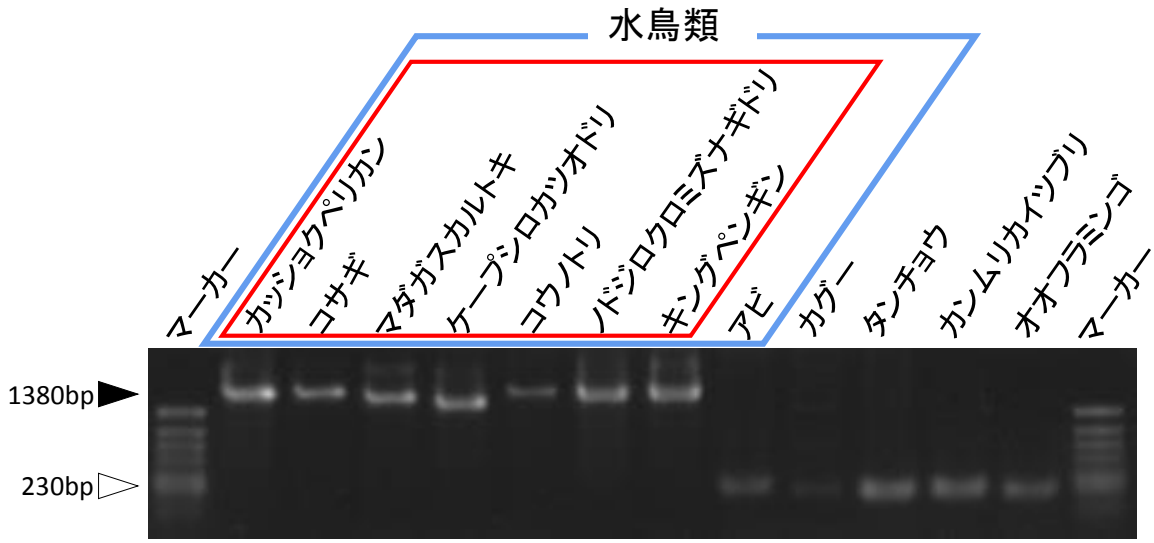
LEg129(6129)

CR1

```
Brown Pelican         GAAAAG------ATACACATTTGCCTAACCATGTCCCT-GCTCATTGCAGGGGGGGTGGGCTA//ACT--------ATTTTATGTTTCTATAACCAAAAGAAGCACCAAG----AGATTTTGCTT
Little Egret          GAAAAG------ATACACRTTTGCCTAACCACATCCCT-GCTCATTGCAGGGGGGTGGGACTA//ACT--------ATTCTATGATTCTATAACCAAAAGAAGCATTAAGGGAGAGATTTT-CTT
Madagascan Ibis       GAAAAG------ATACACATTTGCCTAACCATGTCCCT-GCTCATTGCAGGAGGGTTGAACTA//ACT--------ATTCTATGATTCTATAACCAAAAGAAGCATTAAG----AGATTTT-CTT
Asian Openbill        GAAAAG------ATACACATTTGCCTAACCATGTCCCTAGCTCATTGCAGGAGGGTTGGACTA//ACT--------ATTCTATGATTCTATAACCAAAAGGAGCATTAAG----AGATTTT-CTT
White-chinned Petrel  GAAAAG------ATACACATTTGCCTCACCATCTCCCT-GCTCATTGCAGGGGGGTTGGACTA//ATT--------ATTCTATGATTCTATAACCAAAAGAGGCATTAAG----AGATTTT-CTT
King Penguin          GAAAAG------ATACACATTTGCCTAACCACATCCCT-GCCCAYTGCAGGGGGGTTGGACTA//ACTATTTTACGATTCTATGATTCTATAACCAAAAGAAGCATTAAG----AAATTTT-CTT
Red-throated Loon     GAAAAG------ATACACATTTGCCTAACCATGTCCCT-GCTCATTGCAGGGGGGTTGGACTA//ACT--------ATTCCATGATTCTATAACCAAAAGAAGCATTAAG----AGATATT-CTT
Kagu                  GAAAAG------ATAAACATTTGCCTAACCA-----------------------------------//-----------------------------AAAGAAGAATTAAG----TGATTTT-CTT
Red-crowned Crane     GAAAAG------ATACACATTTGCCTAACCA-----------------------------------//-----------------------------AAAGAAACATTAAG----AGATTTT-CTT
Great Crested Grebe   GAAAAGGTGTCAGCACGCATTTGCCTAACCA-----------------------------------//-----------------------------AAGGAAGCATTAAG----AGATTTT-CTT
Greater Flamingo      GAAAAG------ATACACATTTGCCTAACCG-----------------------------------//-----------------------------AAAGAAGCATTAAG----AGATTTT-CTT
Zebra Finch           GAAAAAAAG---ATACACATTTGCCTAACCA-----------------------------------//-----------------------------AAAGAAGGATTAGG----AGATTTT-CTT
Medium Ground Finch   GGAAAG------ACACACATTTGCCTAACCA-----------------------------------//-----------------------------AAAGGAGGATTAAG----AGATTTT-CTT
Budgerigar            GAGAAG------ATACATACTTGCCTAACCA-----------------------------------//-----------------------------AAAGAAGCATTAAG----AGACTTT-CTT
Saker Falcon          GAAAAG------ATACACATTTGCCTAACCA-----------------------------------//-----------------------------AAAGAAGCATTAAG----AGATTTT-CTT
Peregrine Falcon      GAAAAG------ATACACATTTGCCTAACCA-----------------------------------//-----------------------------AAAGAAGCATTAAG----AGATTTT-CTT
Wild Turkey           GAAAAG------ATACACATTTGCCTAAGCA-----------------------------------//-----------------------------CAAGGAACATTAAG----AGATTTC-CTT
Chicken               GAAAAG------ATACACATTTGCCTAACCA-----------------------------------//-----------------------------CAAGGAACATTAAG----AGATTTC-CTT
```

図16：水鳥類単系統を支持する遺伝子座のアラインメント

水鳥類単系統を支持する遺伝子座のアラインメント例を示す。



Pet600(82600) **CR1**

```
Brown Pelican          ACTGCAGAGGCAGTCACATTGTTCAAGTGGATGAGCGAAAGGCTGTGGACAYTGTCTACCTG//TCTTTTCCAATCTAAACAATTCTACAATTCTATGATCTAACACCTAACAAGAAAAAGTGGT
Little Egret           ACTGGAGAGGCAGTCACATTGTTCGAGAGGATGAGGGAAACACTGTAGATGTTGTCTACCTG//TCTTTTTCAACCTAAATGATTCTATGATTCTACGGTCTAACACTTTACAAGAAAAAGTGGT
Madagascan Ibis        ACTATAGAGGCAGTCACATTGTTCGAGTGGATGAGGGAAAGGCTGTGAATGTTGTTTACCTG//TCTTTTCCAACCTAA--------ACAATTCTATGATCTAACACTTAACAAGAAGAAGTGGT
Cape Gannet            ACTCTAGAGGCAATCATATTTTTCAAGTGGATGAGGGAAAACCTGTGGATGTTGTCTACCTG//TCTTTTCCAACCTAAACAATTCCATGATCCTATGATCTAACACTTAGCAAGAAAAAGTGGT
Oriental Stork         ACTGTTGAGGCAGTCCCATTGTTCGAGTGGATGAGGGAAAGGCTGTGGACATTGTCCACCTA//TCTTTTCCAACATAA--------ATGATTCTATGATCCAACACTTAACAAGAAAAAGTGGT
White-chinned Petrel   AYTGTAGAGGCAATCACATTGTTCGAGTGGATGAGGAAAACGCTGTGGACGTTGTCTACCTA//TCTTTTCCAACCTAA--------ATGATTCTATGATCTAACACTTAACAATAAAAAGTGGT
King Penguin           ACTGTAAAGGCAGTCACATTGTTCAAGTGGATGAGGGAAAAGCTGTGGATGTTGTCTGCCTA//TCTTTTCCAACCTAACCAATTCTATGATTCTATGATCTAACACTTAACAAGAAAAAGTGGT
Red-throated Loon      ACTGTAGAGGCAGTCACATTGTTCGAGT----------//----------TATCTAACACTTAACAAGAAAAAGTGGT
Kagu                   ACTGTAGAGGCAGTCACGTAGCTCAAGT----------//----------TATCTAACACTTAA---GAAAAAGTGGT
Red-crowned crane      ACTGTAAAGGCAGTCACATTGTTCGAGT----------//----------TATCTAACGCTTAAGAAGAAAAAGCAGT
Greater Flamingo       ACTGTAGAGGCAGTCACATTGTTCGAGT----------//----------TACCTAACGCTTAACAAGAAAAAGTGGT
Zebra Finch            ACTGTAGAGGCAGTCACATTGCTCCAAT----------//----------TAGCTAAGGCTTAACAAGAAAAAGGGGT
Medium Ground Finch    ACTGTAGAGGCAGTCACATTGCCCCAAT----------//----------CAGCTAAGGCTTAACAAGAAAAAGGGGT
Budgerigar             ACTCCAGAGGCAGTCACATTGTTCAAGG----------//----------GATCTAACCCTTAACAAGAAAAAGTGGT
Saker Falcon           ACTGTAGAGGCAGTCACATTGTTCGAGT----------//----------TATCTAACACTTAACAAGAAAAAGTGGT
Peregrine Falcon       ACTGTAGAGGCAGTCACATTGTTCGAGT----------//----------TATCTAACACTTAACAAGAAAAAGTGGT
Wild Turkey            ACTGTAGAGGCAGTCACATCGATTGAGA----------//----------TTTCTAACATTTAACAAAGAAAAGAGGT
Chicken                ACTGTAGAAGCAGTCACATTGTTTGAGA----------//----------TTTCCACCACTTAACAAGGAAAAGAAGT
```

図17：遺伝子座Pet600(82600)の電気泳動像とアラインメント

赤枠で示したのはCR1挿入が確認された種である。

▶はCR1の挿入されたPCR産物、▷はCR1の挿入されていないPCR産物を示す。

遺伝子座Pet600(82600)においてはアビ科を除く水鳥類7科でCR1の挿入が見られた。

Pet998(70998)

CR1

```
Brown Pelican          TTACTTGAATCATGCAAACACAAAGATTGAATCATGGAATCATAGAATGGTTTAAATTG//TGAGGAATGCCACTCATCACTGGTCTCCACTTGGACACTGGTATAGTGTTGCTA---GGTAAGT
Madagascan Ibis        TTACTTGAATCATGCAAACACAAAGACTGAATTATAGAATCATAGAATGGTTTGGGTTG//TGAGGAATGCCACTCATCACTGGTCTCTACTTGGACATTAGTATAGTGTTGCTA---GGTGAGT
Oriental Stork         TTACTTGAATCATGCAAACACAAAGATAGGATCATAGAGTCATAGAATGGTTTGGGTTG//--------------------TGGTGTCCACTTGGACATTGATATAGTGTTGCTA---GGTAAGT
White-chinned Petrel   TTATTTGAATCATGCAAACACAAAGATGGAATCATAGAATCATAGTATGGTTTGGGTTG//TGAGGAACATCATTCATCACTGGTCTCCACTTGGACATTGGTATAGTGTTGCTATAAGGTAAGT
King Penguin           TTACTTGAATCATGCAAACACAAAGATTGAATCAMAGAATCATAGAATGGTTTGGATTA//TGAGGAACGCCACTTGTCACTGGTCTCCACTTGGACATTAGTATAGTGTTGCTA---GATAAGT
Red-throated Loon      TTACTTGAATGATGCAAACACAAAGA----------------------------------//--------------------------------TTGGTTGGTATAGTGTTGCTA---GGTAAGT
Kagu                   TTATTTGAATCATGCAAACACAAAGA----------------------------------//--------------------------------CTGATTGGTATATTGTTGCTA---GGTAAGT
Red-crowned Crane      TTACTTGAATCATGAAAACACANNGA----------------------------------//--------------------------------TTAATTGGTATAGCGTTGCTA---GGTAAAT
Great Crested Grebe    ----------------CACAAAAGA----------------------------------//--------------------------------TTCATTGGCATAGTGTTACTG---GGTAAGT
Greater Flamingo       TTACTTGAATCATGCAAACACAAAGA----------------------------------//--------------------------------TTGATGGGTATAGTGTTGCTA---GGTAAGT
Zebra Finch            TTATTTAGGTCCTGCCAGCACAAAGA----------------------------------//--------------------------------TTAATTTATGGAGTGTTGCTG---TGTAAGT
Medium Ground Finch    TTATTTGGGTCCTGCCAGCCCAAGGA----------------------------------//--------------------------------TTAATTTATGGAGTGTTGCTG---TGTAAGT
Budgerigar             TTGCTTGAATCATG-AAACACAAAAA----------------------------------//--------------------------------TTGATTGGTATAGTGTTGCTA---GGTAGAT
Saker Falcon           TTACTTGAATCATGCAAACACACAGA----------------------------------//--------------------------------CTGATTGCTATAGTGTTGCTA---GGTAAGT
Peregrine Falcon       TTACTTGAATCATGCAAACACACAGA----------------------------------//--------------------------------CTGATTGCTATAGTGTTGCTA---GGTAAGT
Wild Turkey            TCTTTTGAATCATATAAACATAAAGA----------------------------------//--------------------------------GTTACTGGTATATTCTCGTTA---GGTAAGC
Chicken                TCTTTTGAATCATATAAACACAAAGA----------------------------------//--------------------------------ATTACTGGTATAGTCTTGCTA---GATAAGT
```

LEg650(4650)

CR1

```
Brown Pelican          TAGCTTTAATTTTAACTGTTTTCATAGAATCA--------TAGAATGGTTTCAGTTGGAAGG//GGGCTGCAAGCGCACATTGCTGGGTAAAAAA--AGTAAACAAATATGTTGAGCTTTTTAAA
Little Egret           TTACTTCCATTTTAACCGTTTTTATAGAGTCA--------CAGAGTGGTTTGGGTTGGAAGG//GGGCTGCAAACGCACATTGCCGCATAAAAAAAAAGTAAACAAATATGTCGAGCTTTTTAAA
Madagascan Ibis        ------------AGATGGCTTTCATAGAATCA--------TAGAATGGTTTGAGTTGGAAGG//GGGCTGCAAGCGCACATTGCCGGGTAAAAAA--AGTAAACAAATATGTTGAGCTTTTTAAA
Asian Openbill         TGGCTTCAATTTTAACTGTTTTCATAGATTCA--------TAGAACGGTTTGGGTTGGAAGG//GGGCTGCAAGCGCACATTGCCGGGTAAAAAA--AGTAAACAAATATGTTGAGCTTTTTAAA
Oriental Stork         TGGCTTCAATTTTAACTGTTTTCATAGATTCA--------TAGAATGGTTTGGGTTGGAAGG//AGGCTGCAAGCGCACATTGCCGGGTAAAAAA--AGTAAACAAATATGTTGAGCTTTTTAAA
White-chinned Petrel   TGGCTTCAATTTTAACTGTTTTCATAGAATCA--------TAGAATGGTTTGGGTTGGAAGG//GGGCTGCGAGCGCACGTTGCTGAGTAAAAAA--AGTAAACAAATATGTTGAGCTTTTTAAA
King Penguin           TGGCTTCAATTTTAACTGTTTTCATAGAATCACAGAATCATAGAATGGTTTGGGTTGGAAGG//GAGATGCAAGCGCACATTACCGGGTAAAAAA--AGTAAACAAATCTGGTGAGCTTTTTAAA
Red-throated Loon      TGGCTTGAATTTTAACTGTTTTAAAAG----------------------------------//--------------------------------TAAACAAATATGTTGAGCTTTTTAAA
Red-crowned Crane      TGTCTTCAATTTTAACTGTTTTAAAAG----------------------------------//--------------------------------TAAACAAATATGTTGAGCTTTTTAAA
Great Crested Grebe    TGGCTTCAATTTTAACTGTTTTAAAAG----------------------------------//--------------------------------TAAACAAATATGTTGAGCTTTTTAAA
Greater Flamingo       TGGCTTCAATTTTAACTGTTTTAAAAG----------------------------------//--------------------------------TAAACAAATATGTTGAGCTTTTTAAA
Zebra Finch            TAACTTTGATTGTAACTGTTTTAAAAG----------------------------------//--------------------------------TAAACAAATATGTTAAGCTTTTTAAA
Medium Ground Finch    TAACTTTGATTTTAACTGTTTTGAAAG----------------------------------//--------------------------------TAAACAAATATGTTAAATTTTTTAAA
Budgerigar             TGGCTTCAATTTTAACTGTTTTAAAAG----------------------------------//--------------------------------TAAACAAATATGTTGAGCTTTTTAAA
Saker Falcon           TGGCTTCAATTTTAACTGTTTTAAAAG----------------------------------//--------------------------------TAAACAAATATGTTGAGCTTTTTAAA
Peregrine Falcon       TGGCTTCAATTTTAACTGTTTTAAAAG----------------------------------//--------------------------------TAAACAAATATGTTGAGCTTTTTAAA
Wild Turkey            TGGCTTCAATTTTAACTGCTTTAAAAG----------------------------------//--------------------------------TAAACAAATATGTTGAGCTTTTTAAA
Chicken                TGGCTTCAATTTTAACTGCTTTAAAAG----------------------------------//--------------------------------TAAACAAATATGTTGAGCTTTTTAAA
```

LEg510(32510)

TSD CR1 TSD

```
Brown Pelican          TCTTCTGTGCAAACATTTCAAAACTGAATCATGGAATCATAGAATCATAGAATGGTTTGGATT//AAATTAATGATTTACAATGATTAATGGATTAATTATTGATTAAAAACAGTTTAAGGAATAA
Little Egret           TCTTCTGTGCAAACATTTCAAAACTAAATCAT--------AGAATCATAGAATGGTTTGGGTT//AAATGAATGTTTTATAATGATTAATTGATTAATTATTGATTAAAAACAGTTCAAGGAATAA
Madagascan Ibis        TCTTCTGTGCAAACATTTCAAAACTAAATCAT--------AGAAGCATAGAATGGTTTGAGTT//AA-----TGATTTATAATGAGTAATTGATTAATTAATGATAAAAAACAGTTTAAGGAATAA
Cape Gannet            TCTTCTGTGCAGACATTTCAAAACTAAATCAT--------AGAATCATAGAATGGTTTGGGTT//AAATTAATGATTTTTAATGATTAATTGATTAATTATTGATTAAAAACAGTTTAAGGAATGA
Oriental Stork         TCTTCTGTACAAACATTTCAAAACTAATTCATGGAATCATAGAATCATAGAATGGTTTGGGTT//AAATTAATGATTTATAATGATTAATTGATTAATACTGATTAAAAACAGTGTAAGGAGTAA
Asian Openbill         TCTTCTGTGCAAACATTTCAAAACTAAATCATGGAATCATAGAATCATAGAATGGTTTGGGTT//AAATTAATGATTTATAATGATTAATTGATTAATACTGATTAAAAACAGTGTAAGGAGTAA
White-chinned Petrel   TCTTCTGTGCAAATATTTCATAACTAAATCAT--------AGAAACATAGAATGGTTTGGGTT//AA-----TGATTTATAATGATTAATTGATTAATTATTGATTAAAAACAGTTTAAGGAATAA
King Penguin           TCTTCTGTGCAAACATTTCAAAACTAAATCAT--------AGAATCATAGAATGGTTTGGGTT//AAATTAATGATTTATAATGATTACTTGATTAATTATTGATTTAAAACAGTTTAAGGAATAA
Red-throated Loon      TCCTCTGTGCAAATGTTTCAAAACTAAAT----------------------------------//--------------------------------ATTGATTAAAAACAGTTTAAGGAATAA
Kagu                   TCTTCTGTGCAAACATTTCTAAACTAAAT----------------------------------//--------------------------------ATTGATTGAAAACAGTTTAAGGGATAA
Red-crowned crane      TCTTCTGTGCAAACATTTCAAAACTAAAT----------------------------------//--------------------------------ATTGATTAAGAACAGTTTAAGGAATAA
Great Crested Grebe    TTTTCTGTGCAAACAGTTCAAAACTAAAT----------------------------------//--------------------------------ATTGATTAAAAACATTTTAAGGAATAA
Greater Flamingo       TCTTCTGTGCAAACATTTCAAAACTAAAT----------------------------------//--------------------------------ATTGATTAAAAACAGTTTAAGGAATAA
Zebra Finch            TCTTCTGTGCAAACATTTCCAAACTAAAT----------------------------------//--------------------------------ACTGATTAAAAACAGTTTGAGGAACAA
Medium Ground Finch    TCTTCTGTGCAAACATTTCCAAACTAAAT----------------------------------//--------------------------------ACTGATTAAAAACAGTTTGAGGATCAA
Budgerigar             TCTTCTGTGCAAACATTTCCAAACTAAAT----------------------------------//--------------------------------ATTGATTAAAACCAGTTTAAGGAATAA
Saker Falcon           TCTTCTGTGCAAACATTTCAAAACTAAAT----------------------------------//--------------------------------ATTTATTAAAAACATTTTAGGGGATAA
Peregrine Falcon       TCTTCTGTGCAAACATTTCAAAACTAAAT----------------------------------//--------------------------------ATTTATTAAAAACATTTTAGGGGATAA
Wild Turkey            TCTTCTGTGCAAACATCTCAAAACTAAAT----------------------------------//--------------------------------ATTGATTAAAAACAGTTTAAAGAATAA
Chicken                TCTTCTGTGCAAACATTTCAAAACTAAAT----------------------------------//--------------------------------ATTGATTAAAAGCAGTTTAAAGAATAA
```

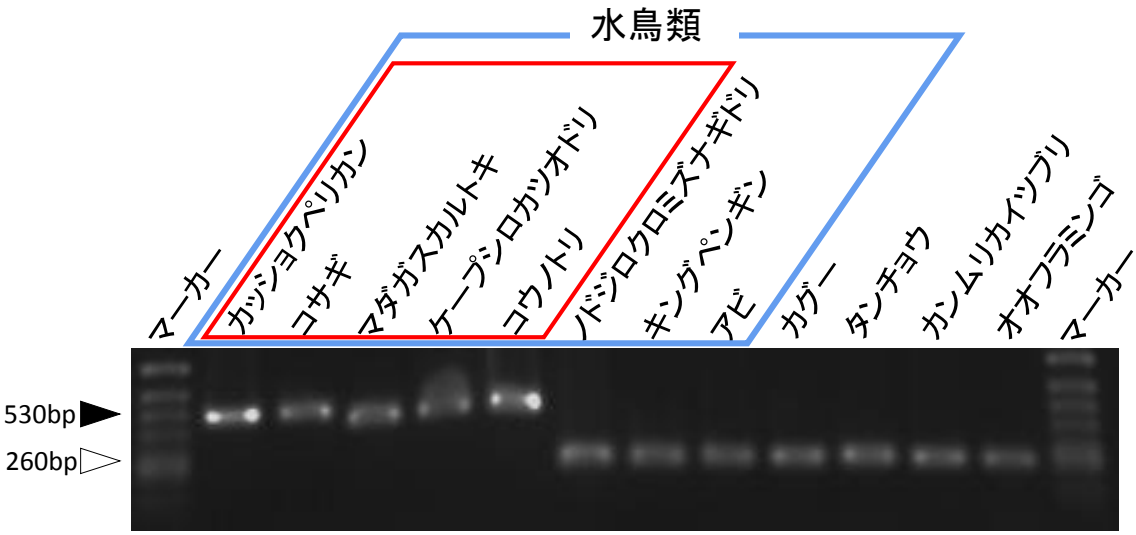
BPe020(36020)

CR1

```
Brown Pelican          TTAAAGTACAAGCCAGGATACCCATAGAATCTTAGAAT--------GGTTTGGGTTCGAAG//TTTCAAGGTCCCTCTGGGTGGCATCCCTTCCCTCCAGCATGTCTCAGCTGTAAAGTAGAGCT
Little Egret           TTAAAGTACAATCCAGAATATCCATAGAATCATAGGAT--------GGTTTGGGTTGGAAG//TGTCAAGGTCCCTCTGGATGGCATCCCTTCCCTCCAGCATATCTCAGCTGTAAAGTAGAGAT
Madagascan Ibis        TTAAAGTACAAGCCAGGATATCCATAGAATCATAGAATCACAGAATGGTTTGGGTTCGAAG//TGTCAGGGTCCCTCCAGAAGACATCCCTTCCCCGCAGCGTGTCTCAGCTGTAAAGCAGAGCT
Cape Gannet            TTAAAGTACAAGCCAGGATATCCATAGAATCACAGAAT--------GGTTTGGGTTAGAAG//TGTCAAGGTCCCTCTGGATGACATCCCTTCCCTCCAGTGTGTCTCAGCTGTAAAGTAGACTT
Oriental Stork         TTAAAGTACAAGCCAGGATATCCATAGAATCATAGAAW--------GGTTTGGGTTGGAAG//TGTCAAGGTCCCTCCAGATGGGAGCCCTTCCCTCCAGTGTGTCTCAGCTGTAAAGTAGAGCT
White-chinned Petrel   TTAAAGTACAAGCCAGGATATCCATAGAATCATAGAAC--------AGTTTGGGTTGAAAG//TGTTAAGGTCCCTCTGGATGGCATCYCTACCCTCCAGCATGTCTCAGCTGTAAAGTAGAGCT
King Penguin           TTAAAGTACAAGCCAGGATAGCCATAGAATCATAGAAT--------GGTTTGGGTTGGAAG//TGTCAAGGTCCCTCTGSATGGCATCCCTTCCATCCAGTGTGTCTCAGCTGTAAAGTAGAGCT
Red-throated Loon      TTAAAGTACAAGCCAGGATATCCAT----------------------------------//--------------------------------GTTGGTCTCAGCTGTAAAGTAGAGCT
Kagu                   TTAAAGTAAAAACGGGGATATCCAT----------------------------------//--------------------------------GGTGGTCTCAGCTGTAAAGTAGAGCT
Red-crowned Crane      TTAAAGTACAAGACAGGGTATCCAT----------------------------------//--------------------------------GTTGGTCTCAGCTGTAAAGTAGAGCT
Great Crested Grebe    TTAAAGTACAAGTCAAGATATCCAC----------------------------------//--------------------------------ATTGGTCTCAGCTGTAAAGTAGAGCT
Greater Flamingo       TTAAAGTACGAGTCAGGATATCCAC----------------------------------//--------------------------------GTTGGTCTCAGCTGTAAAGCAGAGCT
Zebra Finch            TTAAAGTACAAACCAGGGTATCCAT----------------------------------//--------------------------------GTTGATCTCAGCTGTAAAGTAGTGAT
Medium Ground Finch    TTAAAGTACAAACCAGGGTATCCAT----------------------------------//--------------------------------GTTGGTCTCAGCTGTAAAGTAGAGAT
Budgerigar             TTGAAGTACAAGCCAGGATATCCAT----------------------------------//--------------------------------GTTGGTCTCAGATATAAAGTACAGCT
Saker Falcon           TTCAAGTACGAGCCAGGATATCCAT----------------------------------//--------------------------------GTTGGTCTCAGCTGT-----AGACCT
Peregrine Falcon       TTCAGGTACGAGCCAGGATATCCAT----------------------------------//--------------------------------GTTGGTCTCAGCTGT-----AGACCT
Wild Turkey            TTAAAGTACAGACCAGGATATCCGT----------------------------------//--------------------------------TTTGGTCTTAGCTGTAAAGTAGGGCT
Chicken                TTAAAGTACAGACCAGGATATCCGT----------------------------------//--------------------------------TTTGGTCTTAGCTGTAAAGTAGGGCT
```

図18：水鳥類の内最初に分岐した系統群を示す遺伝子座のアラインメント

水鳥類の内最初に分岐した系統群を示す遺伝子座のアラインメント例を示す。



BPe376(14376) **CR1**

```
Brown Pelican          TATCAAATGAAAATGAAATTGAGAAGGGCATGTAGGGATAGGACAAGGGGTAATGGCTTTAAA//CTTCCAACCCAAACCATTCTA---TGATGATGATGATAATCCTCTATGTGAAATAAATTAC
Little Egret           TATCAAATGAAAATGAAATTGAGAAGGGCATGTAGTGATAG-ACAAGGGGTAATGGCTTTAAA//CTTCCAACCCAAACCATTCAA---TGATGATGACGAAAATCCTGTATGTGAAATAAATTAC
Madagascan Ibis        TATCAAATGAAAATGAAATTTCATGTAGTATGTAGTGATAGCACAAGGGGTAATGGCTTTAAA//CTTCCAACCCAAACCATTCAA---TGGTGATGATGATAATCCTGTATGTGAAATAAATTAC
Cape Gannet            TATCAAATGAAAATTAAACTGAGAAGGGCATCTAGTGATAGGGCAAGGGGTAATGGCTTTAAA//CTTCCAACCGGAACCATT------TGATGAAGATGATAATCCTGTATGTGAAATAAATTCC
Oriental Stork         TATCAAATGAAAATGAAATTGAGAATGGCATGTAGTGATAGGACAAGGGGCAATAGCTTTAAA//CTTCCAACCCAAACCATTCTGTGGTGGTGATGATGATAATCCTGTATGTGAGCTAAATTAC
White-chinned Petrel   TATCAAATGAAAATGAAATTGAGAAGGG----------//----------ATATAATCCTGTATGTGAAATAAATTAC
King Penguin           TATCAAATGAAAATGAAATTGAGAAGGG----------//----------ATATAATCCTGTATGTGAAATAAATTAC
Red-throated Loon      TATCAAATGAAAATGAAATTGAGAAGGG----------//----------ATATAATCCTGTATGTGAAATAAATTAC
Kagu                   TATCAAATGAAAATTAAATTGAGAAGGG----------//----------ATATAATCCTGTAAGTGAAATAATTTAC
Red-crowned Crane      TATCAAATGAAAATGAAATTGAGAAGGG----------//----------ATATAATCCTGTATGTGAAATAAATTAC
Great Crested Grebe    TATCAAATGAAAATGAAATTGAGGAGGG----------//----------ATATAATCCTGTACGTGAAATAAATTAC
Greater Flamingo       TATCAAATGAAAATGAAATTGAGAAGGG----------//----------ATATAATCCTGTATGTGAAATAAATTAC
Zebra Finch            TATCAAATTAAAATGAAATTGAGGAGGG----------//----------ATATAATCCTGGATATGAAATAAATTAT
Medium Ground Finch    TATCAAATGAAAATGAAATTGAGGAGGG----------//----------ATATAATCCTGGATGTGAAATAAATTCT
Budgerigar             TATCAAATGAACATGAAATTGAGAAGGG----------//----------ATGTAATCCTGTATGTGAAATAAATTAC
Saker Falcon           TATCAAACGAAAATGAAATTGAGAATGG----------//----------ATATAAACCTGTATGTGAAATAAATTAC
Peregrine Falcon       TATCAAACGAAAATGAAATTGAGAATGG----------//----------ATATAAACCTGTATGTGAAATAAATTAC
Wild Turkey            TATCAAATGAAAATGAAATTGAGAAGGG----------//----------ATATTATCCTGCACGTGAAATAAATTAC
Chicken                TATCAAATGAAAACGAAATTGAGAAGGG----------//----------ATATTATCCTGCACGTGAAATAAATTAC
```

図19：遺伝子座BPe376(14376)の電気泳動像とアラインメント

赤枠で示したのはCR1挿入が確認された種である。

▶はCR1の挿入されたPCR産物、▷はCR1の挿入されていないPCR産物を示す。

遺伝子座BPe376(14376)においては旧コウノトリ目と旧ペリカン目に属する5科でCR1の挿入が見られた。

LEg443(79443

CR1

```
Brown Pelican          GATAAATTTTTTATGTTACCACATAGAATCACAGAATCATGGAATAGTTTACGTTGGAAGGG//GGTTCCAGTACAGACCCCTGAGGGACACCACTTCAGCAGGTGGT---CCCTTTCTTGCACA
Little Egret           GATAAATYTTTTATATCACCACATAGAATCATAGAAT--------AGTTTGGGTTGGAAGGG//CGTCCCAGTACGGACCTCTGAGGGACACTGCATCATCAGGTAGC---CCCTTTCTTGCGCA
Cape Gannet            GATAAATTTTTTATGTTACCACACCGAATCATAGAAT--------AGTTTGGCTTGGAAGGG//GGTCCCAGTACAGACCCCTGAGGGACACTACATCATCAAGTAGT---CCCTTTCTTGCACA
Asian Openbill         GATAAATTTTTTATGTTACCACATAGAGTCATAGAAT--------AGTTTGGGTTGGAAGGG//GGTCCCAATACGTACCCCTGAGGAACAC-----CATCATGTAGT---CCCTTTCTTGCATA
Oriental Stork         GATAAATTTTTTATGTTACCACATAGAATCATAGAAA--------AGTTTGGGTTGGAAGGG//GGTCCCAGTACAGACCCCTGAGGGTCCC-----------ATGTAGT---CCCTTTCTTGCACA
White-chinned Petrel   GATAAATTTTT--TGTTACCACAT-------------------------------------//---------------------------------CACCAGGTAGT---CCCTTTCTTGCACA
King Penguin           GATAAATTTTTTATGTTACCACAT-------------------------------------//---------------------------------CATCAGGCAGT---CCCTTTCTTGCACA
Red-throated Loon      GATAAACTTTTWATGTTACCACAT-------------------------------------//---------------------------------CATCAGGTAGT---CCCTTTTTTGGACA
Kagu                   GATAAATTTTTTATGTTACCACAT-------------------------------------//---------------------------------CATCAGGTAGT---CCCTTTCTTGGACA
Red-crowned Crane      GATAAATTTTTTATGTTACCACAT-------------------------------------//---------------------------------CACCCAGCAGT---CCCCTTCTCGGACA
Great Crested Grebe    GATAAAATTTTTATGTTACCACAT-------------------------------------//---------------------------------CATCAGGCAGT---CCCTTTCTTGGACA
Greater Flamingo       GATAAATTTTTTGTGTTACCACAT-------------------------------------//---------------------------------CATCAGGTAGC---CCCTGTCTTGGAGA
Zebra Finch            GATAAATTTTTTATGTTACCACAT-------------------------------------//---------------------------------CATCAGGTAGT----CCCTTCATGGACA
Medium Ground Finch    GATAAATTTTT-ATGTTACCACAT-------------------------------------//---------------------------------CATCAGGTAGT----CCCTTCATGGACA
Budgerigar             GATAAATTTTTTATGTTACCATAT-------------------------------------//---------------------------------CATCAGGTAGT---CCCTTTCCTGGATA
Saker Falcon           GATAATTTTTTTATTTT---ATCA-------------------------------------//---------------------------------CATCATCAGGTAGTCCCTTTTTTGGACA
Wild Turkey            GATACATTTTTTATGTTACCACAT-------------------------------------//---------------------------------CAGCAG-TAGTAT---CTTTCTTGCACA
Chicken                GATAAACTTTTTACGTTATCACAT-------------------------------------//---------------------------------CATCAG-TAGT---CCCTTTCCTCGACA
```

BPe507(38507)

CR1

```
Brown Pelican          TTTATGAGGACTAAACCCTGTAAATACTAATGGACTTAATTCCCTCCTTCTGGAGGGAAGGGATGCCATCCA//ACCATTCTATCATTCTATGATTCT--GACTTCATAACTAAGTCAGCAGAGT
Little Egret           TTTATGAGGACTAA-CCCTGCAAATAATATTGGACTTAATTCCCTCCCTC--------------------CA//ACCATTCTATCATTCTATGATTGTATGACTTCATAACTAACTCAGCACAGT
Madagaskan Ibis        TTTATGAGGACTAAACCCTGCGAATAATATTGGACTTAATTCCCTCCCTCGGGAGGGAAGGGATGCCATCCA//ATCATTCTATCATTCTGTGATTCTATGCCTTCATAACTAAGTCAGCACAGT
Cape Gannet            TTTATGAGGACTAAACCCTGTGAATAATATTGGACTTAATTCCCTCCCTCTGGAGGGAAGGGATGCCATCCA//ACCATTCTATCATTCTATGATTCTGCAACTTCATAACTAAGTCAGCACAGT
Asian Openbill         TTTATGAGGACTAAACCCTGAGAATAATATTGGACTTAATTCCTGCCCTCTGGAGGGAAGGGATGCCATCCA//ACCATTTTATGATTCTATGATTCTATGACTTCATAACTAAGTCAGGAGAAT
Oriental Stork         TTTATGAGGACTAAACCCTGAGAATTATATTGGACTTAATTCCCGCCCTCTGGAGGGAAGGGACGCCATCCA//ACCATTCTATGAGTCTATGATTCTATGACTTCATAACTAAGTCAGCACAGT
White-chinned Petrel   TTTATGAGGACTAAACCCTGCGAATAATATTGGACTT-------------------------------------//---------------------------------CATAACTAAGTCAGCACAGT
King Penguin           TTTATGAGGACTAAACCCTGCAAATAATATTGGACTT-------------------------------------//---------------------------------CATAACTAAGTCAGCACAGT
Red-throated Loon      TTTATGAGGACTAAACCCTGCAAATAATATTGGACTT-------------------------------------//---------------------------------CATAACTAAGTCAGCACAGT
Kagu                   TTTATGAGAACTAAACCCTGCAAATAATATTGGACTT-------------------------------------//---------------------------------CATAACTAAGTCAGCACAGT
Red-crowned Crane      TTTATGAGGACTGAACCCTGCGAATAATATTGGACTT-------------------------------------//---------------------------------CATAACTAAGTCAGCACAGT
Great Crested Grebe    TTTATGAGGACTAAACCCTGCAAATAATATTGGACTT-------------------------------------//---------------------------------CATAACTAAGTCAGCACAGT
Greater Flamingo       TTTATGAGGACTAAACCCTGCGAATAATATTGGACTT-------------------------------------//---------------------------------CATAACTAAGTCAGCACAGT
Zebra Finch            TTTATGAAGACTAAACCCTGTGAATAATATTGGACTT-------------------------------------//---------------------------------CATAACTAAGTCAGCACAGT
Medium Ground Finch    TTTATGAAGACTAAACCCTGTGAATAATATTGGACTT-------------------------------------//---------------------------------CATAACTAAGTCAGCACAGT
Budgerigar             TT-----------------------------GGACTT-------------------------------------//---------------------------------CATAACTAAGTCAGGACAGT
Saker Falcon           TTTATGAGGACTAAACCCTGTGAATAATATTGGACTT-------------------------------------//---------------------------------CATAACTAAGTCAGCACAGT
Peregrine Falcon       TTTATGAGGACTAAACCCTGTGAATAATATTGGACTT-------------------------------------//---------------------------------CATAACTAAGTCAGCACAGT
Wild Turkey            TTTATGAAGACTAAACCCTGTGAATAATACTGAACTT-------------------------------------//---------------------------------CCTAACTAAATCAGCACAGC
Chicken                TTTATGAAGACTAAACCCTGTGAATAATACTGGACTT-------------------------------------//---------------------------------CCTAACTAAATCAGCACAGC
```

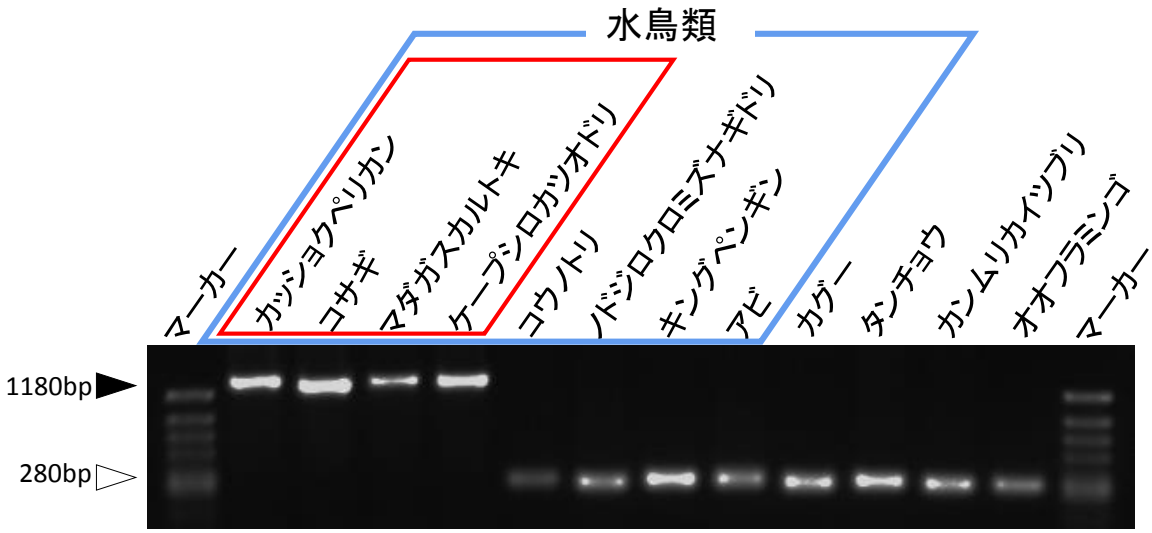
BPe495(18495)

CR1

```
Brown Pelican          TGGCAGTCATGTTATCTTCATTTTTCATAGAATCATAGAATGGTTTGGGTTGGAAGGGACC//ATCCACCAACGCTGTAACTTCATCATAGAAGGCCACC---ACAGTGGTAACAAATACTCTGA
Little Egret           TGGCAGTC--GTCATCTTCATTTTTCATAGAATCATAGAATGGGTTCGGTTGGAAGGGACC//ATCCACCA-CGCTGTAACCCCATCATAGAAGGCCACC---ACAGTGGTAACAAATACTCTGA
Madagascan Ibis        CAGCAGCTATGTTATCTTCATTTTTCATAGAATCATAGAATGGTTTGGGTTAGAAGGGACC//ATCCACCAATGCTGTAACCCCATCGTAGAAAGCCACC---ACAGTGGTAACAAATATTCTGA
Cape Gannet            TGGCAGTCATGTTACCTTCATTTTTCATAGAATCATTGGATGGTTTGGGTTGGAAGGGGCC//ATCCACCAACGCTGTAACCCTGTTGTAGAAGGCCATC---ACAGTGGTAACAAATACTCTGA
Oriental Stork         TGGCAGTCATGTTATCTTCATTTTTCATAGAATCATAGAATGGTTTGGGTTGGAAGGGACC//ATCCACCAACGCTGTAACTCCATCATAGAAGGCCACC---ACAGTGGTAACAAATACTTTGA
White-chinned Petrel   TGGCAGTCAT---ATCTTCATTTTTAGCATTTT-----------------------------//---------------------------------ACCTTCATTTTGGTAACAAATACTCTGA
King Penguin           TGGCAGTCATGTTATCTTCATTTTT-------------------------------------//---------------------------------ACC---ACGG-RGTAACAAATACTCTGA
Red-throated Loon      TGGCAGTCATGTTATCTTCATTTTT-------------------------------------//---------------------------------ACC---ACAGTTGTAACAAATACTCTGA
Kagu                   TGGCAGTCACGTTATCTTCATTTTT-------------------------------------//---------------------------------ACC---CCAGTGGTAACAAATACGCTGA
Red-crowned Crane      TGGCAGTCATATTATCTTCATTTGT-------------------------------------//---------------------------------ACC---ACAGTGGTAATAAATACCCTGA
Great Crested Grebe    TGGCAGTCATGTTATCTTCATTTTC-------------------------------------//---------------------------------ACC---ACTCTGGTA-CAAATACTCTGA
Greater Flamingo       TGGCAGTCATGTTATCTTCATTTTT-------------------------------------//---------------------------------ACC---ACAATGGTAACAAATACTCTGA
Zebra Finch            TGGCAGTCATGTTATCTTCTTTTTT-------------------------------------//---------------------------------ACC---ACCGTGGTAACAAATACTGTGA
Medium Ground Finch    TGGCAGTCACATTATCTTCTTTTTT-------------------------------------//---------------------------------ACC---ACAGTGGTAACAAATACTGTGA
Budgerigar             TGGCAGTCATGTTACCTTCATTTTT-------------------------------------//---------------------------------ACC---ACAGTGGTTACAAACCCTCTGG
Saker Falcon           TGGCACTCATGTTATCCTCATTTTT-------------------------------------//---------------------------------ACC---ACAGTAGTAACACTTACTTGGA
Peregrine Falcon       TGGCACTCATGTTATCCTCATTTTT-------------------------------------//---------------------------------ACC---ACAGTAGTAACACTTACTTGGA
Wild Turkey            TGGCAGT--TGTTAGTCTTTTTTTTTTTAA--------------------------------//---------------------------------ATC---ACAGTAGTAACAAATACTGTGA
Chicken                TGGCAGT--TGTTATCTTCCTTTAAAAAAAAAAAACAAAA----------------------//---------------------------------AAC---ACAGTACTAACAAATACTCTGA
```

図20：旧コウノトリ目+旧ペリカン目の単系統を支持する遺伝子座のアラインメント

旧コウノトリ目+旧ペリカン目の単系統を支持する遺伝子座のアラインメント例を示す。



LEg216(22216) **CR1**

TSD TSD

```
Brown Pelican          CACATCAAAGAATGACACGATTGTACGACACCAAGCTGAGTGGTGTGATTGACATGCCTG//GCA--------TTCTATGATTCTATGATTCTACTTGCCTCTCCTTTTTATTCTGGTA-CCTCC
Little Egret           CACATCGAAGACCAGCACAACTGTGTGACACCAAGCTGAATGGTGCAGGTGATACGCCCG//CCT----------------TTCTATGATTCTACTTGCCTCTCCTTTTTATTCTGGTA-CCTCC
Madagascan Ibis        CCCATCAACGAATGACACAACTGTATGACACCAAGCTGAGTGGTGTGGTTGACACGCCTG//CCA--------TTCTATGATTCTGTAATTCTACTTGCCTCTCCTTTTTATTCTGGTA-CCTCC
Cape Gannet            CACATCAAAGAATGACACAATTGTACAACACCAAGCTGAGTGGTGCAGTTGACACACCTG//CTATTCTATGGTTCTATGAGTCGATGATTCTGCTTGCCTCTCCTTTTTATTCTGGTA-CCTCC
Asian Openbill         CACATCAAAGAATGGCACAATTGTAC----------------------------------//----------------------------------TTGCCTCTCCCTTTTATTCTGGTA-CCTCC
Oriental Stork         CACATCAAAGAATGGCACAATTGTAC----------------------------------//----------------------------------TTGCCTCTCCCTTTTATTCTGGTA-CCTCC
White-chinned Petrel   ---ATCAAAGAATGACACAATTGTAC----------------------------------//----------------------------------TTGCTTCTCCTTTTTATTCTGATA-CCTCC
King Penguin           CATATCAAAGAATGACACAATTGTAC----------------------------------//----------------------------------TTGCCTCTCCTTTTTATTCTGGTA-CCTCC
Red-throated Loon      CACATCAAAGAATGACACAATTGTAC----------------------------------//----------------------------------TTGCCTCTCCCTTTTATTCTGGTA-CCTCC
Kagu                   CACATCAAAGAATGACACAATTGTAG----------------------------------//----------------------------------TTGCCTCTCCTCTTTATTCTACCT-CCTCG
Red-crowned Crane      CACGTCAAAGAATAACACAATTGTAC----------------------------------//----------------------------------TTCCCTCTCTTTTTTATTCTAGTA-GCTCC
Great Crested Grebe    CACAACAAAGAATGACACAATTGTAC----------------------------------//----------------------------------TTGCTTCTCCTTTTTATTCTGGTA-CCTCC
Greater Flamingo       CACATCAAAGAATGACACAATTGTAC----------------------------------//----------------------------------TTGCCTCTCCTTTTCATTCTAGTA-CCTTC
Zebra Finch            CACATGAAAGAATGACATGATTGTGC----------------------------------//----------------------------------TTGCCTCTTCTTTTTGTTGTGATATCCTCC
Medium Ground Finch    CACGTGAAAGAATGACATGATTGTGC----------------------------------//----------------------------------TTGCCTCTTCTTTTTTGT---GATACCCTCC
Budgerigar             CACATCAAAGAATGACACAATTGTAC----------------------------------//----------------------------------TCGCCTCTCCTTTTTATTCTGATATCCTCC
Saker Falcon           CACACCAAAGAACGACACAATTGTAT----------------------------------//----------------------------------TTGCCTCTCCTTTTTATTCTGACACCCTCC
Peregrine Falcon       CACACCAAAGAACGACACAATTGTAC----------------------------------//----------------------------------TTGCCTCTCCTTTTTATTCTGACACCCTCC
Wild Turkey            CAAATCAAAGAATGACA-AACTGTAC----------------------------------//----------------------------------TTGCCTCTCCTTTTCATTCTGGTA-CCTCC
Chicken                CAAATCAAAGAATGACACAACTGTAC----------------------------------//----------------------------------TTGCCTCCCCTTTTCATTCTGGTA-CCTCC
```

図21：遺伝子座LEg216(22216)の電気泳動像とアラインメント

赤枠で示したのはCR1挿入が確認された種である。

▶はCR1の挿入されたPCR産物、▷はCR1の挿入されていないPCR産物を示す。

遺伝子座LEg216(22216)においてはコウノトリ科を除く旧コウノトリ目と旧ペリカン目に属する4科でCR1の挿入が見られた。

LEg908(61908)

CR1

```
Little Egret          TGCAGGAGGACCAAGTATGGGCATAGGTCTACTTGGATTTATGCAAAGCATTTGACACTGTC//TCCAACCCAAAACA--------TTGTATGATTCTATGTTGGATGCTTAAAACAGGACGTCA
Madagascan Ibis       TGCAGGAGGACCGAGTACGAGCATAGATCTACCTGGGCTTGGGCAAAGCATTTGACACCATC//TCCAACCCAAACTA--------TTTTATGATTCTATGTTGGATGCTTAAAAGAGGACGTCA
Cape Gannet           TGCAGGATGACCAAGTACAGGCATAGATCCACCCGGACTTGTGCAAAATATTTGACGCTGTC//TCCAACCCAAACCAATCTCTGATTCTATGATTCCATGTTGGATGCTTAAAAGAGGACGTCA
Asian Openbill        TGCAGGAGGACCAAGTATGGGTATAGAT----------//----------GTTGGATGCTTAAAAGAGGACGTCA
Oriental Stork        TGCAGGAGGACCAAGTACGGGTATAGAT----------//----------GTTGGATGCTTAAAAGAGGACATCA
White-chinned Petrel  TGCAGGAGGACCAAGTACGGGCA---GT----------//----------GTTGGATGCTTAAAAGAGGACGTCA
King Penguin          TGCAGGAGGACCAAGTACGGGCATAGAC----------//----------GTTGGATGCTTAAAAGAGGACGTCA
Red-throated Loon     TGCAGGAGGACCAAGTACGGGCATAGAT----------//----------GCTGGATGCTTAAAAGAGAACGTCA
Kagu                  TGCAGGAGGACCAAGTACGGGCATAGAT----------//----------GTTGGAGGCTTAAAAGAGGACGTCA
Red-crowned Crane     TGCAGGAGGACCAAGTACGGGCATAGAT----------//----------GTTGGATGTTTAAAAGAGGACGTCA
Great Crested Grebe   TGCAGGAGGACCAAGTACGGGCATAGAT----------//----------GTTGGATGCTTATAAGAGAAYGTCA
Greater Flamingo      TGCAGGAGGCCCAAGTACGGGCATAGAT----------//----------GTTGGATGCTTATAAGAGGACGTCA
Zebra Finch           TGCAGGAGGACCAAGTGCAGGCAAAGAT----------//----------GTTGGATGTTTGAAAGAGGACGTCA
Medium Ground Finch   TGCAGGAGGACCAAGTACAGGCAAAGAT----------//----------GTTGGATGCTTGGAAGAGGACGTCA
Budgerigar            TGCAGGAGGGCCGAATACAGGCATGGAT----------//----------GTTGGATGCTTGAAAGAGGACGTCA
Saker Falcon          TGTAAGAGGACCAAGTACGGGCATGGAT----------//----------GTTAGATGCTTAAAAGAGGACGTCA
Peregrine Falcon      TGTAAGAGGACCAAGTACGGGCATGGAT----------//----------GTTAGATGCTTAAAAGAGGACGTCA
Wild Turkey           TACAGGAAGATCAAGTATGGGCATAGAT----------//----------GTTGGTTACTTAATAGAGGACGTCA
Chicken               TACAGGAAGATCAAGTATGGGCATAGAT----------//----------GTTGGTTGCTTAATAGAGGACGTCA
```

LEg584(81584)

CR1

```
Brown Pelican         ACTTGAGTACAGGAAGCTAGATATCTCCTTCTGATCTCCTGCTATGACAAGGTGACCT//AAGGTCTTTTCCATCCTAAA--------TGATTCTATGATTCTGTATGCTGTGCTCATGCACCCA
Little Egret          ACTCAAATCCAGGAAGCTAGATATCTCCT---GATCTCTTTCTATGACAAGGTGACCT//ACAGTCTTTTCCAGTCTAAA----------CGATTCTATGTGCTGTGCTCATGTACCCA
Madagascan Ibis       ACTTGAATACRGRAAGCTAGATATCTCCTGCTGATCTCCTTCTATGACAATGTGACCC//AAGGTCTCTTTCAACCTAAACAATTCCATGATTCTATGATTCTATATGCTGTGCTCATGCACCCA
Cape Gannet           ACTTGAATCCAGGAAGGTCGATATTTCCTTCTGATCTCCCTCTATGACAAGGTGACCT//AAAGTCTCTTCCAACCTAGA--------TGACACTATGATTCTATATGCTGTCTTCATGCACCCA
Asian Openbill        ACTTGAATCCAGGAAGCTAGATAT----------//----------GCTGTGCTCATGCACCCA
Oriental Stork        ACTTGAATCCAGGAAGCTAGATAT----------//----------GCTGTGCTCATGCACCAA
White-chinned Petrel  ACTTAAATCCAGGAAGCTAGATAT----------//----------GCTGTGCTCATGCTCCCA
King Penguin          ACTTGAATCCAGGAAGCTAGTTAT----------//----------GCTGTGCCCATGCACCCA
Red-throated Loon     ACTTGAATCCAGGAAGATAGATAG----------//----------ACTGTGCTCATG-ACCCA
Kagu                  ACTTGAATCCAGGAAGCCAGATAT----------//----------GCTGTGCTCGTGTACCCA
Red-crowned Crane     ACTTGAATCCAGGAAGCTAGATAT----------//----------GCTGTGCTCATGCACCCA
Great Crested Grebe   ACTTCAATCCAGGAAGCTAGATAC----------//----------GCTGTGCTTGTGTACCCA
Greater Flamingo      ACTTGAATCCAGGAAGCTAGATAC----------//----------GCTGTGCTTGTGCACCCA
Zebra Finch           ATTTGAATCCAGGAAGCTGTGTGT----------//----------GCTGTGCCTGTGTACCCA
Medium Ground Finch   ATTTGAATCCAGGAAGCTGTGGAT----------//----------GCTGTGCTTGTGTACCCA
Budgerigar            ATTTGAATCTAGGAAGCTAGATAC----------//----------ATTGTGCTCATGTGCCCA
Saker Falcon          ACTTGAATTCAGGAAACAAGATAG----------//----------GCTGTGGTCATGTACCCA
Peregrine Falcon      ACTTGAATTCAGGAAACAAGATAG----------//----------GCTGTGGTCATGTACCCA
```

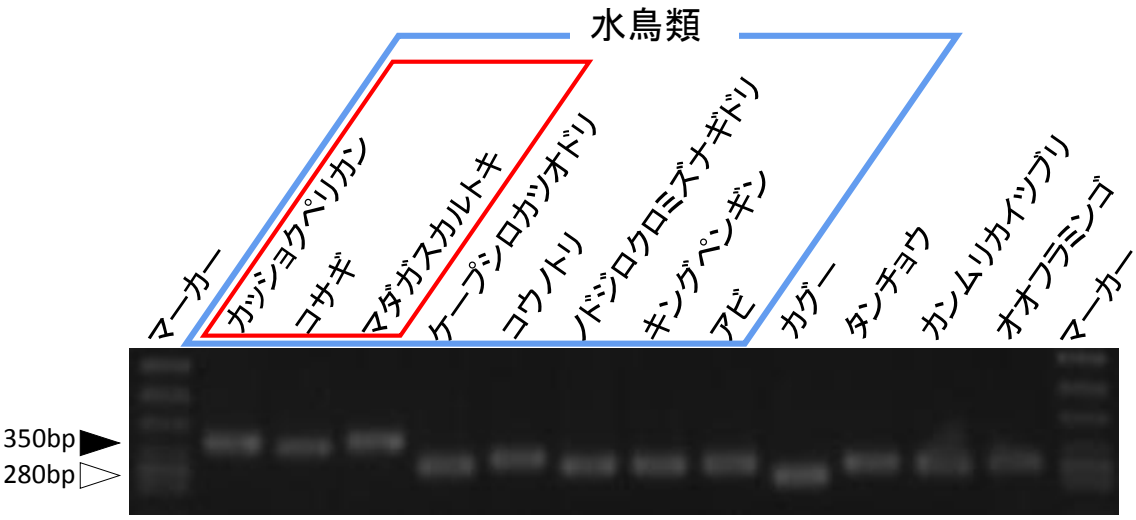
BPe333(64333)

CR1

```
Brown Pelican         ATTTAACATTTAGATTTTTT------CTCCCAAGTAACAAGAGATAGGACAAGAGGAAATGGC//AA-------ATGATTCTATGATTCTATTTTATTCTGAATAAACTGATGAGGAATGCTGGC
Little Egret          ATTTAACATGCAGATTTTTTT-----CTCCCAAGTAACAAGCGACAGGACAAGAGGAAATGGC//AACGATTCTATGATTCTACGA--CTGCTTTATCCTGAATAAACTGAAGAGGAATGCTGGA
Madagascan Ibis       ATTTAACATTTAGATTTTTT-----CTCCCAAGTAACAAGCGATAGGACAGGAAGAAATGGC//AA-------ATGATTCTATGATTCTATTTTATTCTGAATAAATGGATGAGGAATGCTGGC
Cape Gannet           ATTTAACATTTAGATTTTTT-----CTCCCAAGTAACAAACGATAGGACAAGAGGGAATCGC//AATGTTTCTATGATTCTATGATTTTATTTTATTCTGAATAAACTGATGAGGAATGCTGGC
Oriental Stork        ATTTAACATTTAGATTTTATT-----CT----------//----------GAATAAACTGATGAGGAATGCTGGC
Asian Openbill        ATTTAACATTTAGATTTTATT-----CT----------//----------GAATAAACTGATGAGGAATGCTGGC
White-chinned Petrel  ATTTAACATTTAGATTTTATT-----CT----------//----------GAATAAACTGATGAGGAATGCTGGC
King Penguin          ATTTAACATTTAGATTTTATT-----CT----------//----------GAATAAACTGATGAGGAATGCTGGC
Red-throated Loon     ATTTAACATTTAGATTTCATT-----CT----------//----------GAATAAACTGATAAGGAATGCTGGC
Kagu                  ATTTAACATTTAGATTTGATT-----CT----------//----------GAATGAACGGATGAGGGATGCTGGC
Red-crowned Crane     ATTTAACATTTAGATTTTATT-----CT----------//----------GAATAAACTGATGAGGAATGCTGGC
Great Crested Grebe   GTTTAACATTTAKATTTTATT-----CC----------//----------GAAAAAACTGATGAGGAATACTGGC
Greater Flamingo      ATTTAACATTTAGATTTTATT-----CT----------//----------GAAAAAACTGATGAGGAATGCTGGC
Zebra Finch           ATTTAACATTTAGATTTTATT-----CC----------//----------AAATAAATGGATGGGAAATGCTGGC
Medium Ground Finch   ATTTAACATTTAGATTTTATT-----CT----------//----------GAATAAATGAATGGGAAATACTGGC
Budgerigar            ATTTAACATTTAGATTTTATT-----CT----------//----------GAATAAACTGACGAGAAATGCTGGC
Saker Falcon          ATTTAACATTTAGATTTTATT-----CT----------//----------GAATAAACTGATGAGAAATGCTGGC
Peregrine Falcon      ATTTAACATTTAGATTTTATT-----CT----------//----------GAATAAACTGATGAGAAATGCTGGC
Wild Turkey           ATTTAACCTTTAGATTTTTTTTTTTCT----------//----------GAATAAAATGATGAGGAATACTGGC
Chicken               ATTTAACCTTTAGATTTTTGTT----CT----------//----------GAATAAAAGGATGAGGAATGCTGCC
```

図22：コウノトリ科の分岐を示す遺伝子座のアラインメント

旧コウノトリ目+旧ペリカン目の内コウノトリ科が最初に分岐した事を支持する遺伝子座のアラインメント例を示す。



BPe396(75396)

TSD CR1 TSD

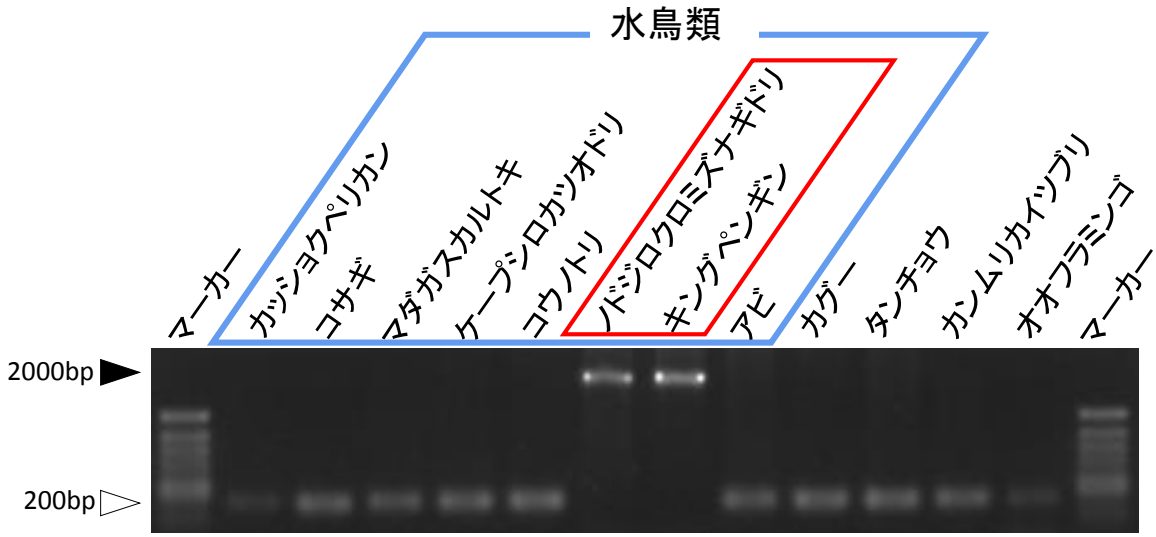
```
Brown Pelican          TCCTACATGTTCTCTGTATAATCTTTGGGAGTTGGACTCGATGATCCTTATGGGTCCCTTCCAACTTGAGATA--------TTCTATGATTCTATGATCTTTTTGCTCCTTGCCTTACTGAGGAGC
Little Egret           TCCTACCCATTCTC--TATAACCTCTGAGAGTTGGACTTGATGATCTTTATGAGCCCCTTCCAACTTGAGATA--------TTCTATGATTCTGTGATCTTTTTGCTCCCTGCCTTACTGAGGAGC
Madagascan Ibis        TCCTACACCTTCT--GTATAATCTTCGGGAGTTGGACTCGATGATCCTTATGGGTCCCTTCTAGCTGGAAATATTCTATGATTCTATGATTCTATGATCTCTTTGCTCCCTGCCTTACTGAGAGGC
Cape Gannet            TCCTACACATTCT--GTATAATCTTT----------------------------------------------------------------------------------TTGCTCCCTGCCTTACTGAGGAGC
Oriental Stork         TCCTACACGTTCT--GTATAATCTTT----------------------------------------------------------------------------------TTGCTCCCTGCCTTACTGAGGAGC
White-chinned Petrel   TCCCACACGTTCT--GTATAATCTTT----------------------------------------------------------------------------------TTGCTCCCTGCCTTGCTGAGGAGC
King Penguin           TCCTACACGTTCT--GTATAACCTTT----------------------------------------------------------------------------------TCGCTCCCTGCCTTACTGAGAAGC
Red-throated Loon      TCCTACGCGTTCT--GTATAATCTTT----------------------------------------------------------------------------------TTGCTCCCTGCCTTACTGAGGAGC
Kagu                   TCTTACACATTCT--GTATAATCTTT----------------------------------------------------------------------------------CTGCTCCCTGCCTTACTGAGGAGC
Red-crowned Crane      TCCTACACATTCT--GTACAATCTTT----------------------------------------------------------------------------------TTGCTCCCTGCCTTACCGAGGAGC
Great Crested Grebe    TCCTACACATTCC--GTATAATCTTT----------------------------------------------------------------------------------TTGCTCCCTGCCTTACTGAGGAGC
Greater Flamingo       TCCTACACRTTCT--GTATAATCTTT----------------------------------------------------------------------------------TTGCTCCCTGCCTTACTGAGGAGC
Zebra Finch            TCCTACATGTTCT--GTATAA--TTT----------------------------------------------------------------------------------TTTCTCCCTGCCTTAGTGAGGAGC
Medium Ground Finch    TCCTACGTGTTCT--GTGTAATC-TT----------------------------------------------------------------------------------TTTCTCCCTGCCTTAGTGAGGAGC
Budgerigar             TCCTACATGTTCT--GTATAATCTCT----------------------------------------------------------------------------------TTTCTCCCTGCCTTACTGAGGGGA
Saker Falcon           TCCTACAT-TTCT--GTATAATCTTT----------------------------------------------------------------------------------TTGCTCCCTGCCTTACTGAGGAGC
Peregrine Falcon       TCCTACAT-TTCT--GTATAATCTTT----------------------------------------------------------------------------------TTGCTCCCTGCCTTACTGAGGAGC
Wild Turkey            TCCTACATGCTCT--GTATAATCTTT----------------------------------------------------------------------------------TTACTCCTTGCCTTACTGAGGAGC
Chicken                TCCTACATGCTTC--GTATAATCTTT----------------------------------------------------------------------------------TTACTCCTTGCCTTACCGAGGAGC
```

図23：遺伝子座BPe396(75396)の電気泳動像とアラインメント

赤枠で示したのはCR1挿入が確認された種である。

▶はCR1の挿入されたPCR産物、▷はCR1の挿入されていないPCR産物を示す。

遺伝子座BPe396(75396)においてはペリカン科、サギ科、トキ科でCR1の挿入が見られた。



Pet970(1970)

TSD CR1 TSD

```
Brown Pelican          GATTTCTGAAGAATCCTTG--GTATGAT----------//----------TTATTATAATTTTATGTTAATAGTGA
Little Egret           GATTTCTGAAGGATCCTCA--GTATGAT----------//----------TTATTAKAKTTTTATGTTGATRGTGA
Madagascan Ibis        GATTTCTGAAGGATCCTTG--GTATGAT----------//----------TTATTATATTTTTATGTTAATAGTGA
Cape Gannet            GATTTCTGAAGGATCCTTG--GTATAAT----------//----------TTATTATATTTTTATGTTAATAGTGA
Oriental Stork         GATTTCTGAAGGATCCTTG--GTATGAT----------//----------TTATTATATTTTTATGTTAATAGTGA
White-chinned Petrel   GATTTCTGAAGGATCCTTG--GTATGATTTGAAGGTATGATTAAATTAGAAGGGCCAAASCCC//AACAATTTTATGATTCTATTCTATGACTCTATGATTTATTATATTTTTATGTTAATAGTGA
King Penguin           GATTTCTGAAGGATCCTTG--GTATGACTAGAAGGTATGATTAAATTAGAAGGGCCAAAGCCC//AACAATTCTATGATTGTATTCTATGATTCTATGATTTATTATATTTTTATGTTAATGGTGA
Red-throated Loon      GATTTCTGAAGGATCCTTG--GTATGAT----------//----------TTATTATATTTTTATGTTAATAGTGA
Kagu                   GATTTCTGAAGGATCTCTGAAGTACGAT----------//----------TTATTATCTTTTTATGATAATAGTGA
Red-crowned Crane      GCTTTCTGAAGGATCCCTG--CTATGAT----------//----------TTATTATATTTCTATGTAAATAGTGA
Great Crested Grebe    GATTTCTGAAGGATCCTTG--GTATAAT----------//----------TTATTATATTTTTATGTTAATAGTAA
Greater Flamingo       GATTTCTGAAGGGTCCTTG--GTATGAT----------//----------TTATTATATTTTTATGTTAATAGTGA
Zebra Finch            GATTTATGAAGGATCTTTA--GTATGAT----------//----------TTATTATATTTTTATGTTAATAGGGA
Medium Ground Finch    TATTTCTGAAGGATCTTTG--GTATGAT----------//----------TTATTATATTTTTATGTTAATAGGGA
Budgerigar             GATTTCTGAAGGATCCTTA--GTATGAT----------//----------TTATTAAATTTTTATGTTAATAGTGA
Saker Falcon           GATTTCTGAAGGATCTTTG--GTATGAT----------//----------TTATTATATTTTTATGTTAATAGTGA
Peregrine Falcon       GATTTCTGAAGGATCTTTG--GTATGAT----------//----------TTATTATATTTTTATGTTAATAGTGA
Wild Turkey            GATTTCTGAAGGATCCTTA--ATATGAT----------//----------TCTTTATATTTTTATGCTAACAGTGA
Chicken                GATTTCTGAAGGATCCTTA--GTATGAT----------//----------TCATTATATTTTTATGCTAATAGTGA
```

図24：遺伝子座Pet970(1970)の泳動像とアラインメント

赤枠で示したのはCR1挿入が確認された種である。

▶はCR1の挿入されたPCR産物、▷はCR1の挿入されていないPCR産物を示す。

遺伝子座Pet970(1970)においてはミズナギドリ目とペリカン目のみでCR1の挿入が見られた。

Pet557(70557)

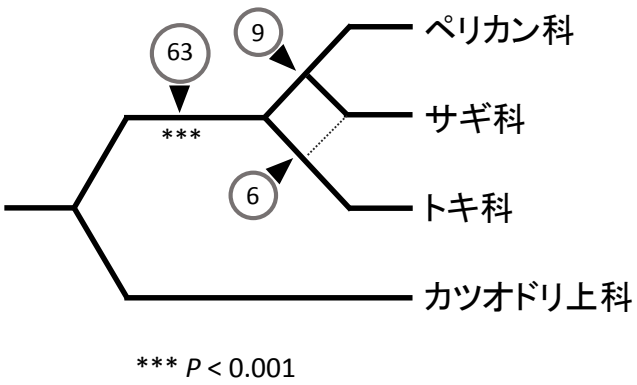
CR1

```
Little Egret          AGAACAGAACTAATGACCATGGCTCAT----------//----------GTGTTGGGCTGCTTTCTTCAAAGGACA
Madagascan Ibis       AGGACAGAACCAAYGACCATGGCTCAT----------//----------TTATTGGGCTTCTTTCTTAAAAGGACA
Cape Gannet           AGGACAGAATCAATGACCATGGCTCGT----------//----------TTATTGGGCTTCTTTCTTAAAAGGACA
Oriental Stork        AGGACAGAACCAATGACCATGGCTCAC----------//----------TTATTGGGCTTCCTTCTTAAAAGGACA
White-chinned Petrel  AGGACAAAACCAATGACCRTGGTTCATTTACAGAATCATAGAATCATCATAGAATCATAGAA//CCTTCAGGTTCCTTAGATGGTCTCGAACCTGATCTTTATTGGGCTTCTTTCTTAAAAGGACA
King Penguin          AGGACAGAACCAATGACCATGGTTCATTTATAGAATCATTGAATCAT---AGAATCATAGAA//CCTTCAGGTTTCTTAGATGGTCTCGAACCTGATCTTTATTGGGCTTCTTTCTTAAAAGGACA
Red-throated Loon     AGGACAGAGCCAATGACCATGGCTCAT----------//----------TCATAGGGCTTCTTTCTTAAAAGCACA
Kagu                  AATACAGAACTAATGACCAAGGGTCTT----------//----------TTATTTGGTTTCTTTCTTAAAATGACA
Red-crowned Crane     AAGACAGAACCAATGACCGTGGTTCAT----------//----------TTATTGGGTTTCTTTCTTAAAAGGACA
Great Crested Grebe   AGGACAGAACCAATGACCATGGCCCAT----------//----------TTATTTGGCTTCTTTCTTAAAAGGACA
Greater Flamingo      AGGACAGAACCAATGACCGTGGCTCAT----------//----------TTATTGGGCTTCTTTYTTAAAAAGACA
Zebra Finch           AGGACAGAATCAATGACCATAGCTCAT----------//----------TTATTGGATGTCTTTCTTAAAAGGACA
Medium Ground Finch   AGGACAGAATCAATGGCCATATCTCAT----------//----------TTATTGAATGTCTTTCTTAAAAGGACA
Budgerigar            AGGACAGAACCAACAGCCATGACTCAT----------//----------TTATTTGGCTTCTTACTTAAAAGGACG
Saker Falcon          AGGACAGAAACAATGACCATAGCCCAT----------//----------GTATTTGGCTTCTTTTTTAAAAGGACA
Peregrine Falcon      AGGACAGAAACAATGACCATAGCCCAT----------//----------GTATTTGGCTTCTTTTTTAAAAGGACA
Wild Turkey           AGGGTAGAACCTATGACTTTGGCTCAT----------//----------TTATTGGGTTTCTTTCTTGAAAGGACA
Chicken               AGGGTAGAACCTATGACTTTGGCTCAT----------//----------TTATCAGGTTTCTTTCTTGAAAGGACG
```

図25：ミズナギドリ目＋ペンギン目の単系統性を示唆する遺伝子座のアラインメント

ミズナギドリ目とペンギン目が単系統であることを示唆する遺伝子座Pet557のアラインメントを示す。

(A)



*** $P < 0.001$

(B)

+	+	-	+	+	-	-
+	+	+	-	-	-	+
+	-	+	+	-	+	-
-	+	+	+	+	+	+
63	6	3	2	4	3	1

(C)

+	-	+
+	+	-
-	+	+
-	-	-
9	6	0

図26：ゲノムデータベースから探索されたCR1の挿入パターン

Jarvisら(2014)によって報告された配列情報を利用してゲノムスケールのCR1挿入解析を行い、カツオドリ上科、サギ科、トキ科、ペリカン科の系統情報を補完した。

(A) 4科の系統関係を表した系統樹。円内の数字は各枝を支持するCR1挿入遺伝子座の数を表す。

(B) カツオドリ上科が最初に分岐した事を示すCR1およびそれと矛盾するCR1挿入遺伝子座の数。＋はCR1挿入が有り、－は無いことを表す。

(C) ペリカン科、サギ科、トキ科の系統関係を示すCR1挿入遺伝子座の数。

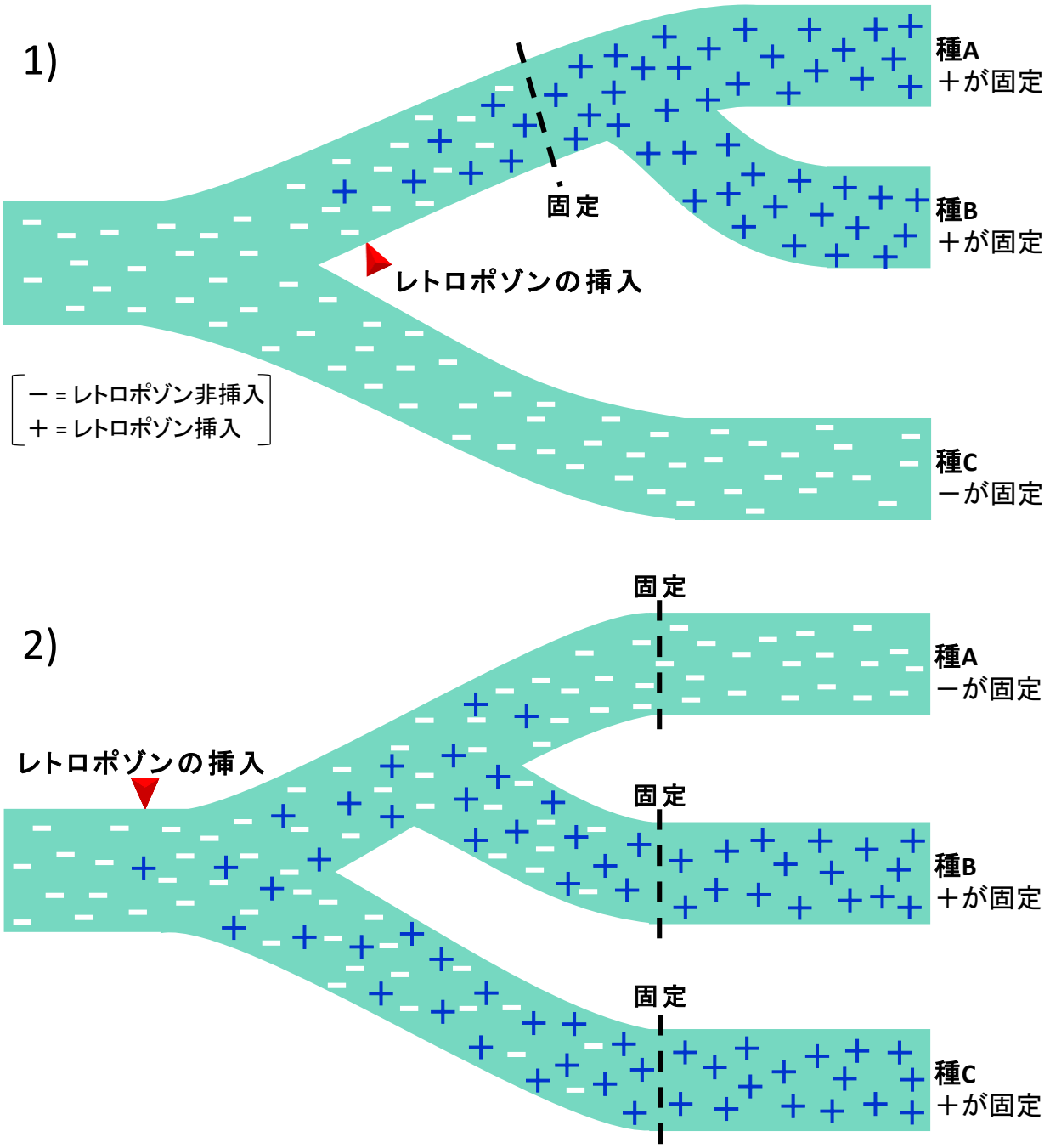


図27：レトロポゾン挿入における不完全な系統ソーティング

1) 共通祖先においてレトロポゾンが挿入されてから種が分岐するまでに十分な時間があれば、レトロポゾンの挿入パターンと種の系統樹は一致する。

2) 短期間に急激な種分化が複数回起きた場合、レトロポゾンが挿入された対立遺伝子座（＋）と挿入されなかった対立遺伝子座（－）が集団内多型を維持したまま新たな系統ができる可能性がある。この時派生した各系統においてどちらの対立遺伝子座が固定されるかはランダムな遺伝的浮動によって決定される。そのため、種の系統樹と矛盾する挿入パターンを支持するCR1はほぼ同数になる。

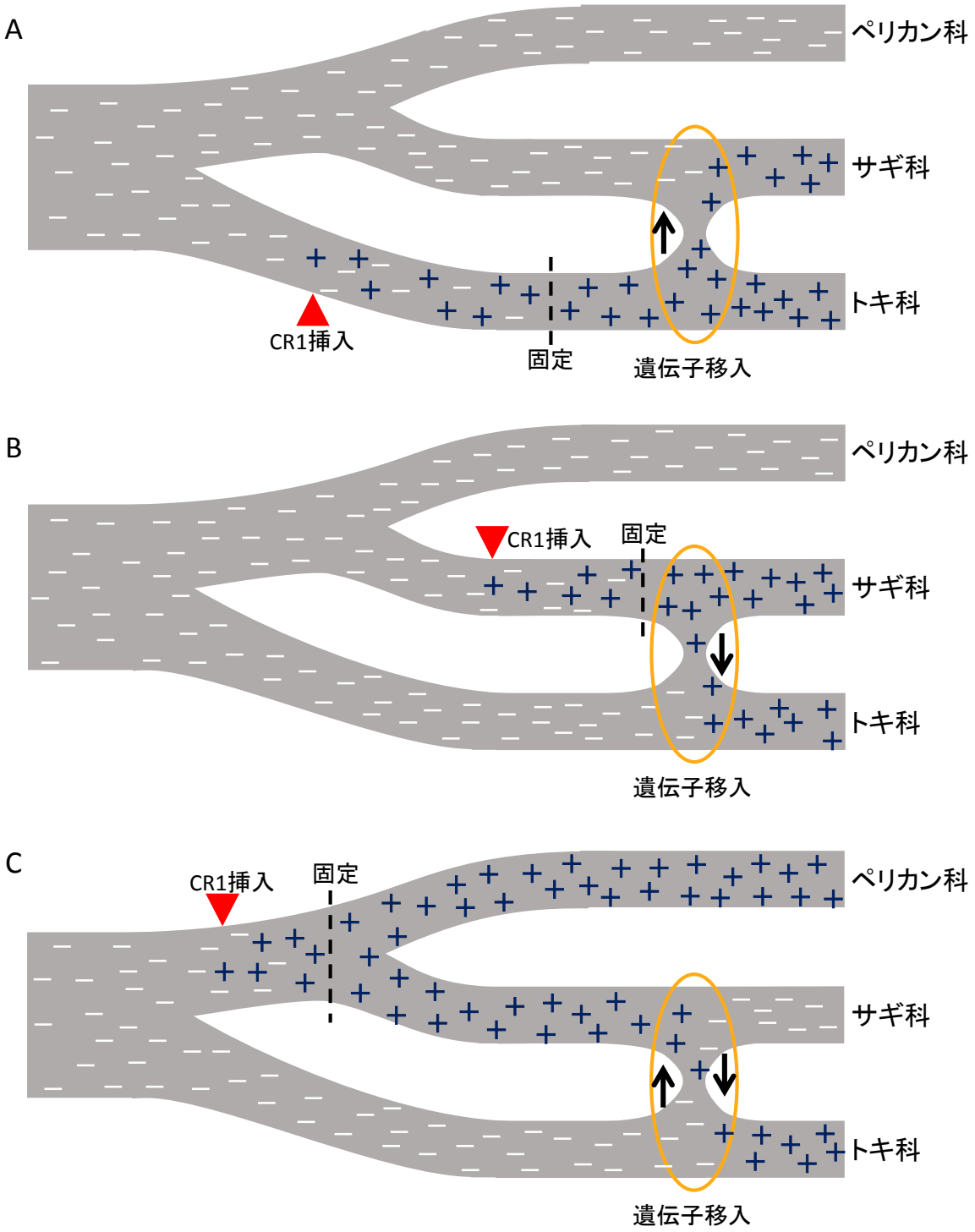


図28：CR1挿入解析によって示唆された種間交雑による遺伝子移入

ゲノムデータベースを利用したゲノムスケールのCR1挿入解析から
サギ科、トキ科、ペリカン科の進化の過程における種間交雑の可能性が示唆された。
種間交雑による遺伝子移入について、3通りの過程が考えられる。
(A) トキ科の祖先集団からサギ科の祖先集団への一方的な遺伝子移入
(B) サギ科の祖先集団からトキ科の祖先集団への一方的な遺伝子移入。
(C) トキ科の祖先集団とサギ科の祖先集団との間の相互的な遺伝子移入
本解析結果ではペリカン科とトキ科の共有するCR1が発見されなかったため（C）の仮説は考えにくい。

LEg642(45642)

CR1

```
Brown Pelican         CTTAGTAACTCTCAGTCTTAGTGCCTTATC----------------------------------//----------------------------------CTCCCTGCCTGAGCGAGCTTCTCAAATGC
Little Egret          CTTAGTAACTCTCAGTCTTAGTGCCTTATAGAGTGATCTTATAGGTGAGGCCACACCTTGAA//AAGGTCTTTTCCAATCAAATGGTTCTATGACACTCCCTGCTTGAAAGAGCTTCTTAAATAC
Madagascan Ibis       CTGAGTAACTCTCAGTCTTAGTGCTTTATA----------------------------------//----------------------------------CTCCCTACCTGAAAGAGCTTCTTAAATAC
Cape Gannet           CTTAGTAACTCTCAGTCTTAGTGCCTTATA----------------------------------//----------------------------------CTCCCTGCTTGAAAGAGCTTCTTAAATAC
Asian Openbill        CTTAGTAACTCTCAGTCTTAGTGCCTTATA----------------------------------//----------------------------------CTCCCTGCCTGAAAGAGCTTCTTAAATAC
White-chinned Petrel  CTTAGTAACTCTCAGACTTAGTGCCTTATA----------------------------------//----------------------------------CTCCCTGTCTGAAAGAGCTTCTTAAATAC
Red-throated Loon     CTTAGTAACTCTCACTCTTAGTGCCTTATA----------------------------------//----------------------------------CTCCCCGCCTGAAAGAGCTTCGTAAATCC
Great Crested Grebe   CTTAGTAGCTCTCGGTCCTAGTGCCTGGTA----------------------------------//----------------------------------CTCCCTGCCTGAAAGCGCTTCTTAAATAC
Zebra Finch           CTTAATAACTCA---------GTGCCTTTTA----------------------------------//----------------------------------CTCCCTGCCTGAAAGAGTTCTTTAAATAC
Medium Ground Finch   CTTAGCAACTC----------TCACTCTCA----------------------------------//----------------------------------GTGCCTGCCTGAAAGAGTTCCTTAAACAC
Budgerigar            CTTAGTAACACTCAGTCTTAGAGCCTTATA----------------------------------//----------------------------------CTGCTTGCCTGAAAAAGCTGCTTAAGTAC
Saker Falcon          TTTAGTAGTTCTCAGGCTTAGTGCCTTATA----------------------------------//----------------------------------CCCCCTGTCTGAAAGAGCTTCTTAAATAC
Peregrine Falcon      TTTAGTAGTTCTCAGGCTTAGTGCCTTATA----------------------------------//----------------------------------CCCCCTGTCTGAAAGAGCTTCTTAAATAC
Wild Turkey           TTTAGTAATTCTTAGGCCTAGCGCCTAACA----------------------------------//----------------------------------CTCCCTGCCTGAAAGAGCTTCTTAAAGAC
Chicken               TTTAGTAATTCTTAGACTCAGGGCCTAACA----------------------------------//----------------------------------CTTCCTGCCTGAAAGAGCTTCTTAAAGAC
```

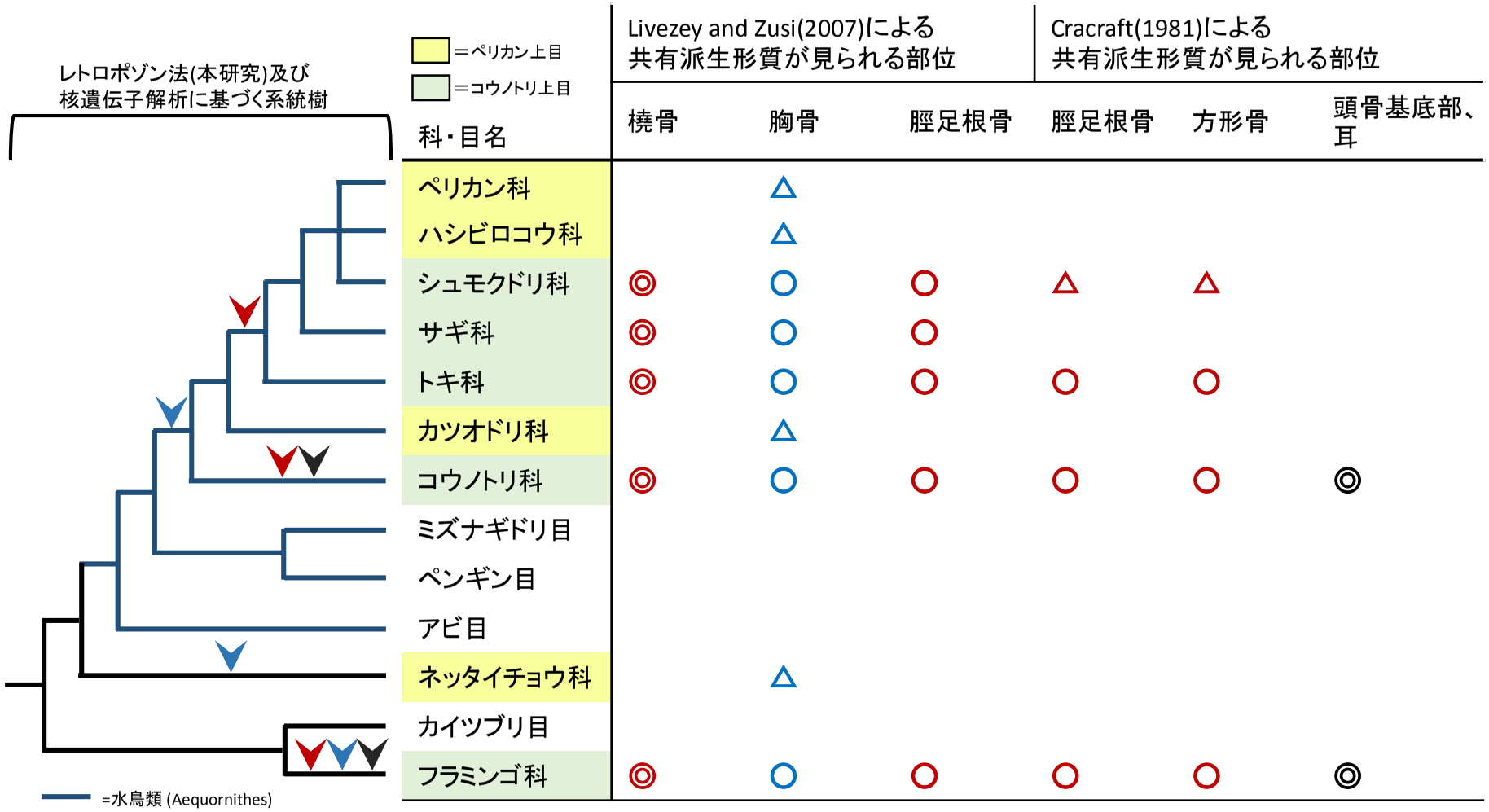
BPe310(88310)

CR1

```
Brown Pelican         TTTTCTAGTTTCTCAGATGAAATTCAGGAAATTTGGCCTGCCTGGCCGAAAAGGACCTGG//AGRTCTTTTCCAACCTAAACGATTCTATGATTCTATGATACATCAAGGATATATACATTTCTT
Little Egret          TTTTCTAGTTTCTCAGATTAAATTCAGA----------------------------------//----------------------------------ATAGATAAATCAAGGATGTATACATTTCTT
Madagascan Ibis       TTTTCTAGTTTCTCAGATGAAATTCAGG----------------------------------//----------------------------------ATAGATACATCAAGGATATATACATTTCTT
Cape Gannet           TTTTCTAGTTTCTCAGATGAAATTCAGG----------------------------------//----------------------------------GTAGATACATCAAGGATCTATACATTTCTT
Asian Openbill        TCTGTGATGTTCTCAGATGAAATTCGGG----------------------------------//----------------------------------ATAAATACATCAACGATACATACATTTCTT
White-chinned Petrel  TTTTCTAGTTTCTCAGATGAAATTCAGG----------------------------------//----------------------------------ATAGATACATCAAGGATATAAACATTTCTT
Red-throated Loon     TTTTCTAGTTTCTCAGATAAGATTCAGG----------------------------------//----------------------------------ATGCATACTTCAAGGATAGATACATTTCTT
Zebra Finch           ATTTCTAGTTTCTCAGATGAAATTCAGA----------------------------------//----------------------------------AAAGATACGTCAAGAATATATACATTTCCT
Medium Ground Finch   TTTTCTAGTTTCTCAGATGAAATTCAAA----------------------------------//----------------------------------AAAGATACATCAAGAATACATACATTTCTT
Budgerigar            TTTTCTAGTTTCTCAGATGAAATTGAAG----------------------------------//----------------------------------ATATATGCATTGAGGATATATCCATTTCTT
Saker Falcon          TTTTCTAGTTTCTCAGGTGAAATTCAGG----------------------------------//----------------------------------ATAGATGCATCGAGGATATATAGGTTTCTT
Peregrine Falcon      TTTTCTAGTTTCTCAGGTGAAATTCAGG----------------------------------//----------------------------------ATAGATGCATCGAGGATATATAGGTTTCTT
Wild Turkey           TTGTCTAGTGTTTCAGATGAGATTCATG----------------------------------//----------------------------------GTAGATGCATCAAAGATGCA------TCTT
Chicken               TTGTCTAGTTTTTCAGATGAGATTCAGG----------------------------------//----------------------------------ATAGATGCATCAAAGATGCA------TCTC
```

図29：種特異的なCR1挿入

本研究では種特異的にCR1挿入が起きたと思われる遺伝子座をミズナギドリゲノムから7座位、
サギゲノムから19座位、ペリカンゲノムから7座位見出した。
例としてコサギゲノムから単離されたコサギ特異的なCR1挿入座位(LEg642)と
カッショクペリカンゲノムから単離されたペリカン特異的なCR1挿入座位(BPe310)のアラインメントを示す。



科・目名	Livezey and Zusi(2007)による 共有派生形質が見られる部位			Cracraft(1981)による 共有派生形質が見られる部位		
	橈骨	胸骨	脛足根骨	脛足根骨	方形骨	頭骨基底部、耳
ペリカン科		△				
ハシビロコウ科		△				
シュモクドリ科	◎	○	○	△	△	
サギ科	◎	○	○			
トキ科	◎	○	○	○	○	
カツオドリ科		△				
コウノトリ科	◎	○	○	○	○	◎
ミズナギドリ目						
ペンギン目						
アビ目						
ネッタイチョウ科		△				
カイツブリ目						
フラミンゴ科	◎	○	○	○	○	◎

図30：比較形態学で示された水鳥類の共有派生形質

形態学的解析におけるコウノトリ上目とペリカン上目に属していた鳥類の共有派生形質を表にまとめる。
◎は特に類似の見られる共有派生形質、○は特徴的な共有派生形質、△は補助的な共有派生形質を表す。
左の系統樹は主にJarvisら(2014)による核遺伝子解析と本研究で行ったレトロポゾン挿入解析を基にした。
系統樹上の矢印はその枝において収斂が起きた可能性があることを示す。矢印の色は右に示した共有派生形質に対応している。



図31：鳥類の骨格

鳥類の骨格の例としてコウノトリの骨格を示す。
画像はhttp://opencage.info/pics/より引用した。

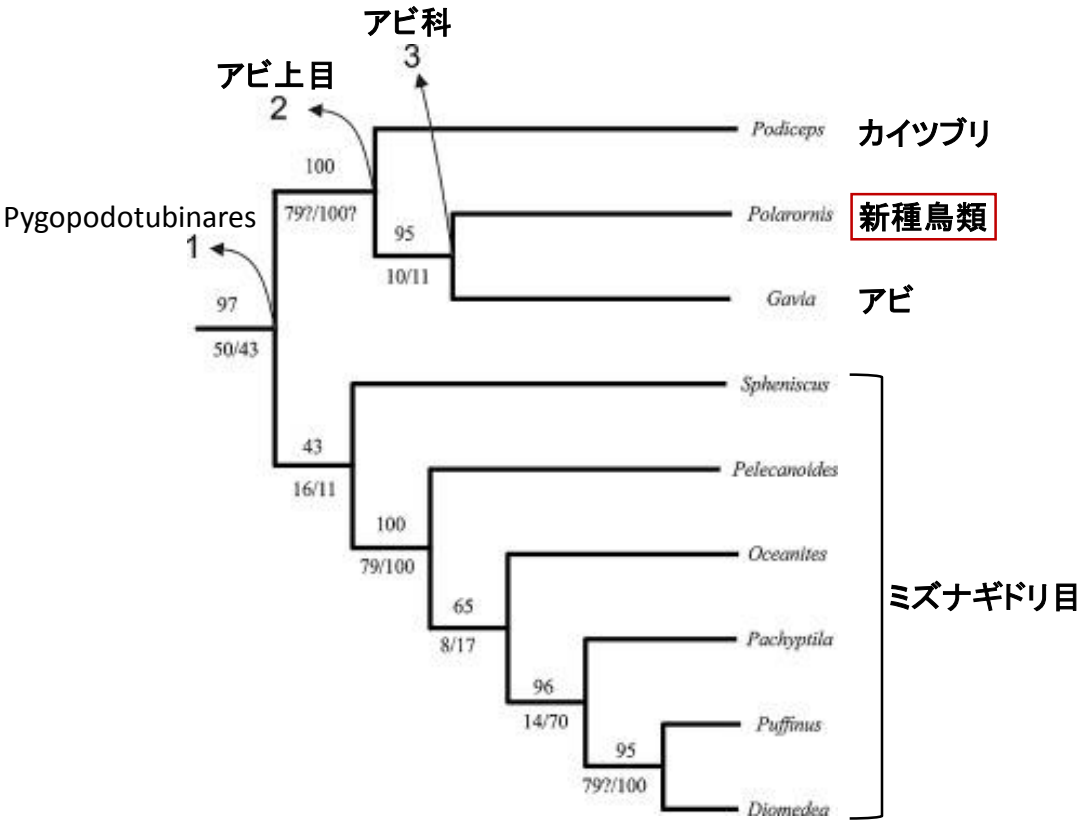


図32：化石鳥類の系統推定(Hospitaleche and Gelfo, 2015)

最近発見された新種の化石鳥類の系統的位置は、LivezeyとZusi(2007)の提唱した形態学的特徴に基づいてアビ目に属すると結論付けられた。

系統樹をHospitaleche and Gelfo, 2015から引用する。

しかし、この化石鳥類の系統推定では、収斂による形態的類似に基づいて系統を決定している可能性がある。

参考文献

Avise JC, Moritz C. 1994. Molecular Markers Natural History and Evolution. Chapman and Hall, New York: xiv+511 pp

Bao W, Kojima KK, Kohany O. 2015. Repbase Update, a database of repetitive elements in eukaryotic genomes. Mob DNA. 6:11

Bonaparte CL. 1854. Conspectus systematis ornithologiae. Ann Sci Nat Zool Ser 4. 1:1-48

Burch JB, Davis DL, Haas NB. 1993. Chicken repeat 1 elements contain a pol-like open reading frame and belong to the non-long terminal repeat class of retrotransposons. Proc Natl Acad Sci U S A. 90:8199-8203

Cooper A, Penny D. 1997. Mass survival of birds across the Cretaceous-Tertiary boundary: molecular evidence. Science 275:1109-1113

Corneli PS, Ward RH. 2000. Mitochondrial genes and mammalian phylogenies: increasing the reliability of branch length estimation. Mol Biol Evol. 17:224-234

Cracraft J. 1981. Toward a Phylogenetic Classification of the Recent Birds of the World (Class Aves). Auk 98:681-714

Cracraft J. 1986. The origin and early diversifivation of birds. Paleobiology 12:383-399

Cracraft J. 2001. Avian evolution, Gondwana biogeography and the Cretaceous-Tertiary mass extinction event. Proc Biol Sci. 268:459-469

Darwin CR. 1859. On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. London: John Murray

Darwin E. 1794. Zoonomia, Or, the Laws of Organic Life. London: J. Johnson

Deininger PL, Batzer MA. 2002. Mammalian retroelements. Genome Res. 12:1455-1465

Doronina L, Churakov G, Shi J, Brosius J, Baertsch R, et al. 2015. Exploring Massive Incomplete Lineage Sorting in Arctoids (Laurasiatheria, Carnivora). Mol Biol Evol. 32:3194-3204

Dyke GJ, Van Tuinen M. 2004. The evolutionary radiation of modern birds (Neornithes): reconciling molecules, morphology and the fossil record. Zool J Linn Soc. 141:153-177

Eickbush TH. 1994. Origin and evolutionary relationships of retroelements. The evolutionary biology of viruses. New York: Raven Press, 121-157

Ericson PG, Anderson CL, Britton T, Elzanowski A, Johansson US, et al. 2006. Diversification of Neoaves: integration of molecular sequence data and fossils. Biol Lett. 2:543-547

Fain MG, Houde P. 2004. Parallel radiations in the primary clades of birds. Evolution 58:2558-2573

Feduccia A. 1995. Explosive evolution in tertiary birds and mammals. Science 267: 637-638

Felice RN, O'Connor PM. 2014. Ecology and caudal skeletal morphology in birds: the convergent evolution of pygostyle shape in underwater foraging taxa. PLoS One 9:e89737

Garrod AH. 1874. On certain Muscles of Birds and their Value in Classification. Part II. Proc Zool Soc Lond. 42:111-123

Gibb GC, Kennedy M, Penny D. 2013. Beyond phylogeny: pelecaniform and

ciconiiform birds, and long-term niche stability. Mol Phylogenet Evol. 68:229-238

Gibson A, Gowri-Shankar V, Higgs PG, Rattray M. 2005. A comprehensive analysis of mammalian mitochondrial genome base composition and improved phylogenetic methods. Mol Biol Evol. 22:251-264

Gill F, Donsker D. 2015. IOC World Bird List (v. 5.2.), http://www.worldbirdnames.org/. doi:10.14344/IOC.ML.5.2.

Gregory TR, Nicol JA, Tamm H, Kullman B, Kullman K, et al. 2007. Eukaryotic genome size databases. Nucleic Acids Res. 35:D332-8

Hackett SJ, Kimball RT, Reddy S, Bowie RC, Braun EL, et al. 2008. A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. Science 320:1763-1768

Haddrath O, Baker AJ. 2012. Multiple nuclear genes and retroposons support vicariance and dispersal of the palaeognaths, and an Early Cretaceous origin of modern birds. Proc Biol Sci. 279:4617-4625

Hennig W. 1966. Phylogenetic systematics. Urbana: University of Ilinois Press.

Hillier LW. 2004. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. Nature 432:695-716

Hospitaleche CA, Gelfo JN. 2015. New Antarctic findings of Upper Cretaceous and lower Eocene loons (Aves: Gaviiformes). Annales de Paleontologie. Elsevier Masson 101:315-324

Hunt DM, Carvalho LS, Cowing JA, Davies WL. 2009. Evolution and spectral tuning of visual pigments in birds and mammals. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 364:2941-2955

Huxley TH. 1867. On the classification of birds; and on the taxonomic value of the modifications of certain of the cranial bones observable in that class. Zoological Society of London 415-472

Huxley TH. 1870. Further Evidence of the Affinity between the Dinosaurian Reptiles and Birds. Quarterly Journal of the Geological Society of London 26:12-31

Ingman M, Kaessmann H, Paabo S, Gyllensten U. 2000. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. Nature 408:708-713

Jarvis ED, Mirarab S, Aberer AJ, Li B, Houde P, et al. 2014. Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. Science 346:1320-1331

Jetz W, Thomas GH, Joy JB, Hartmann K, Mooers AO. 2012. The global diversity of birds in space and time. Nature 491:444-448

Kaiser VB, van Tuinen M, Ellegren H. 2007. Insertion events of CR1 retrotransposable elements elucidate the phylogenetic branching order in galliform birds. Mol Biol Evol. 24:338-347

Kajikawa M, Okada N. 2002. LINEs mobilize SINEs in the eel through a shared 3' sequence. Cell 111:433-444

Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol Biol Evol. 30:772-780

Kazazian HH, Jr. 2004. Mobile elements: drivers of genome evolution. Science 303:1626-1632

Kimball RT, Wang N, Heimer-McGinn V, Ferguson C, Braun EL. 2013. Identifying

localized biases in large datasets: a case study using the avian tree of life. Mol Phylogenet Evol. 69:1021-1032

Kimura M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. Nature 217:624-626

Kriegs JO, Matzke A, Churakov G, Kuritzin A, Mayr G, et al. 2007. Waves of genomic hitchhikers shed light on the evolution of gamebirds (Aves: Galliformes). BMC Evol Biol. 7:190

Lamarck JB. 1809. Philosophie zoologique ou exposition des considerations relatives a l'histoire naturelle des animaux. Museum d'Histoire Naturelle

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409:860-921

Lee MS, Cau A, Naish D, Dyke GJ. 2014. Dinosaur evolution. Sustained miniaturization and anatomical innovation in the dinosaurian ancestors of birds. Science 345:562-566

Liu GE, Jiang L, Tian F, Zhu B, Song J. 2009. Calibration of mutation rates reveals diverse subfamily structure of galliform CR1 repeats. Genome Biol Evol. 1:119-130

Livezey BC, Zusi RL. 2006. Phylogeny of Neornithes. Bull Carnegie Mus Nat Hist. 37:1-544

Livezey BC, Zusi RL. 2007. Higher-order phylogeny of modern birds (Theropoda, Aves: Neornithes) based on comparative anatomy. II. Analysis and discussion. Zool J Linn Soc. 149:1-95

Matzke A, Churakov G, Berkes P, Arms EM, Kelsey D, et al. 2012. Retroposon insertion patterns of neoavian birds: strong evidence for an extensive incomplete lineage sorting era. Mol Biol Evol. 29:1497-1501

Mayr G. 2011. Metaves, Mirandornithes, Strisores and other novelties - a critical review of the higher-level phylogeny of neornithine birds. J Zool Syst Evol. Res 49:58-76

Morgan-Richards M, Trewick SA, Bartosch-Harlid A, Kardailsky O, Phillips MJ, et al. 2008. Bird evolution: testing the Metaves clade with six new mitochondrial genomes. BMC Evol Biol. 8:20

NCBIResourceCoordinators. 2015. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res. 43:D6-17

Nikaido M, Hamilton H, Makino H, Sasaki T, Takahashi K, et al. 2006. Proceedings of the SMBE Tri-National Young Investigators' Workshop 2005. Baleen whale phylogeny and a past extensive radiation event revealed by SINE insertion analysis. Mol Biol Evol. 23: 866-873

Nikaido M, Rooney AP, Okada N. 1999. Phylogenetic relationships among cetartiodactyls based on insertions of short and long interpersed elements: hippopotamuses are the closest extant relatives of whales. Proc Natl Acad Sci U S A. 96:10261-10266

Nishihara H, Maruyama S, Okada N. 2009. Retroposon analysis and recent geological data suggest near-simultaneous divergence of the three superorders of mammals. Proc Natl Acad Sci. U S A. 106:5235-5240

Nishihara H, Okada N. 2008. Retroposons: genetic footprints on the evolutionary paths of life. Methods Mol Biol. 422:201-225

Nishihara H, Satta Y, Nikaido M, Thewissen JG, Stanhope MJ, Okada N. 2005. A retroposon analysis of Afrotherian phylogeny. Mol Biol Evol. 22:1823-1833

O'Connor PM, Claessens LP. 2005. Basic avian pulmonary design and flow-through

ventilation in non-avian theropod dinosaurs. Nature 436:253-256

Olson SL. 1979. Multiple origins of the Ciconiiformes. Proc Colonial Waterbird Group. 2:165-170

Organ CL, Shedlock AM, Meade A, Pagel M, Edwards SV. 2007. Origin of avian genome size and structure in non-avian dinosaurs. Nature 446:180-184

Ostrom JH. 1975. The Origin of Birds. Annual Review of Earth and Planetary Science 3:55-77

Pacheco MA, Battistuzzi FU, Lentino M, Aguilar RF, Kumar S, Escalante AA. 2011. Evolution of modern birds revealed by mitogenomics: timing the radiation and origin of major orders. Mol Biol Evol. 28:1927-1942

Padian K, Chiappe LM. 1998. The origin and early evolution of birds. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society 73:1-42

Pamilo P, Nei M. 1988. Relationships between gene trees and species trees. Mol Biol Evol. 5:568-583

Pesole G, Gissi C, De Chirico A, Saccone C. 1999. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. J Mol Evol. 48:427-434

Platt RN, 2nd, Zhang Y, Witherspoon DJ, Xing J, Suh A, et al. 2015. Targeted Capture of Phylogenetically Informative Ves SINE Insertions in Genus Myotis. Genome Biol Evol. 7:1664-1675

Prum RO, Berv JS, Dornburg A, Field DJ, Townsend JP, Lemmon EM, & Lemmon AR. 2015. A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. Nature 526:569-573

Pycraft WP. 1900. The morphology and phylogeny of the Palaeognathae (Ratitae and Crypturi) and the Neognathae (Carinatae). Trans Zool Soc London.

15:149-290.

Rogers JH. 1985. The origin and evolution of retroposons. Int Rev Cytol. 93:187-279

Rokas A, Holland WH. 2000. Rare genomic changes as a tool for phylogenetics. Trends in Ecology & Evolution 15:454-459

Rosenbloom KR, Armstrong J, Barber GP, Casper J, Clawson H, et al. 2015. The UCSC Genome Browser database: 2015 update. Nucleic Acids Res. 43:D670-81

Sambrook J, Fitsch EF, Maniatis T. 1989. Morecular Cloning: Laboratory Manual. 2nd ed. NewYork: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 74:5463-5467

Shedlock AM, Okada N. 2000. SINE insertions: powerful tools for molecular systematics. Bioessays 22:148-160

Shimamura M, Yasue H, Ohshima K, Abe H, Kato H, et al. 1997. Molecular evidence from retroposons that whales form a clade within even-toed ungulates. Nature 388:666-670

Sibley CG, Ahlquist, j. E. 1990. Phylogeny and Classification of Birds: a study in molecular evolution. New Haven (CT): Yale University Press

Smith ND. 2012. Body mass and foraging ecology predict evolutionary patterns of skeletal pneumaticity in the diverse "waterbird" clade. Evolution 66:1059-1078

Stumph WE, Kristo P, Tsai MJ, O'Malley BW. 1981. A chicken middle-repetitive DNA sequence which shares homology with mammalian ubiquitous repeats. Nucleic Acids Res. 9:5383-5397

Sugawara T, Terai Y, Okada N. 2002. Natural selection of the rhodopsin gene during the adaptive radiation of East African Great Lakes cichlid fishes. Mol Biol Evol. 19:1807-1811

Suh A, Churakov G, Ramakodi MP, Platt RN, 2nd, Jurka J, et al. 2014. Multiple lineages of ancient CR1 retroposons shaped the early genome evolution of amniotes. Genome Biol Evol. 7:205-217

Suh A, Kriegs JO, Donnellan S, Brosius J, Schmitz J. 2012. A universal method for the study of CR1 retroposons in nonmodel bird genomes. Mol Biol Evol. 29:2899-2903

Suh A, Paus M, Kiefmann M, Churakov G, Franke FA, et al. 2011. Mesozoic retroposons reveal parrots as the closest living relatives of passerine birds. Nat Commun. 2:443

Suh A, Smeds L, Ellegren H. 2015. The Dynamics of Incomplete Lineage Sorting across the Ancient Adaptive Radiation of Neoavian Birds. PLoS Biol. 13:e1002224

Terai Y, Takahashi K, Nishida M, Sato T, Okada N. 2003. Using SINEs to probe ancient explosive speciation: "hidden" radiation of African cichlids? Mol Biol Evol. 20:924-930

Van Tuinen M, Butvill DB, Kirsch JA, Hedges SB. 2001. Convergence and divergence in the evolution of aquatic birds. Proc Biol Sci. 268:1345-1350

Van Tuinen M, Sibley CG, Hedges SB. 2000. The early history of modern birds inferred from DNA sequences of nuclear and mitochondrial ribosomal genes. Mol Biol Evol. 17:451-457

Vandergon TL, Reitman M. 1994. Evolution of chicken repeat 1 (CR1) elements:

evidence for ancient subfamilies and multiple progenitors. Mol Biol Evol. 11:886-898

Waddell PJ, Kishino H, Ota R. 2001. A phylogenetic foundation for comparative mammalian genomics. Genome Inform. 12:141-154

Watanabe M, Nikaido M, Tsuda TT, Inoko H, Mindell DP, et al. 2006b. The rise and fall of the CR1 subfamily in the lineage leading to penguins. Gene 365:57-66

Watanabe M, Nikaido M, Tsuda TT, Kobayashi T, Mindell D, et al. 2006a. New candidate species most closely related to penguins. Gene 378:65-73

Weiner AM, Deininger PL, Efstratiadis A. 1986. Nonviral retroposons: genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. Annu Rev Biochem. 55:631-661

Wetmore A. 1960. A classification for the birds of the world. Smithsonian Miscellaneous Collection vol.139 Washington (DC): Smithsonian institution. p. 1-37

Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, et al. 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. Nat Rev Genet. 8:973-982

Wu J, Hasegawa M, Zhong Y, Yonezawa T. 2014. Importance of synonymous substitutions under dense taxon sampling and appropriate modeling in reconstructing the mitogenomic tree of Eutheria. Genes Genet Syst. 89:237-51

謝辞

本研究を進めるにあたって、研究室の皆様には手厚いご支援を賜りました。特に実験・研究環境を与えてくださった指導教官である梶川正樹講師、論文作成に当たってご指導頂いた岡田典弘教授、研究における助言や指導、配列解析の補助をして頂いた西原秀典助教に深く感謝の意を表します。また、本研究の原点となるペンギン目の系統解析を行い、先鞭をつけてくださった渡辺麻衣子博士にも特に感謝いたします。

加えて、実際の解析においては NGS による配列取得を委託した BGI(Beijing Genomics Institute)、シーケンシングを依頼した東工大技術部バイオ技術センターの甚大なご協力を頂きました。この場を借りてお礼を申し上げます。

さらに、鳥類組織サンプルを提供して頂いた上野動物園、国際水産資源研究所、国立環境研究所、水産庁養殖研究所、よこはま動物園ズーラシアの皆様にも厚くお礼を申し上げます。

最後に私事ながら、遠い郷里から未熟な私を精神面および経済面で支えてくれた父母に感謝を述べさせて頂きます。

報文目録

Kuramoto T, Nishihara H, Watanabe M, Okada N. 2015. Determining the Position of Storks on the Phylogenetic Tree of Waterbirds by Retroposon Insertion Analysis. Genome Biol Evol. 7(12):3180-3189

講演目録

藏本多恵、西原秀典、渡辺麻衣子、岡田典弘

‘レトロポゾンの挿入比較に基づく水鳥類の系統解析とコウノトリ科の系統的位置’

第 38 回日本分子生物学会大会　神戸　(2015.12.3)　ポスター発表