

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	分子系統学的手法による髭鯨亜目ならびに潜頸亜目の系統類縁関係の推定
Title(English)	
著者(和文)	佐々木剛
Author(English)	
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5643号, 授与年月日:2004年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第5643号, Conferred date:2004/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

平成 15 年度 博士論文

分子系統学的手法による髭鯨亜目ならびに潜頸亜目の
系統類縁関係の推定

東京工業大学 生命理工学研究科 生体システム専攻

分子進化学講座 岡田研究室

佐々木 剛

01D22040

指導教官 岡田典弘

目次

第 1 章 序論

I. 生物進化と系統分類学の変遷	5
II. 形態データと分子データ	6
III. 分子系統解析における注意点	7
IV. 本研究の内容	8-9
図表	10-11

第 2 章 ヒゲクジラ亜目の系統解析と分岐年代の推定

I. 序論	12-15
1. ヒゲクジラ類；分類とその歴史的背景	
2. ヒゲクジラ類の系統類縁関係について	
3. 遺伝子マーカーとしてのミトコンドリア DNA	
4. 本研究の目的	
II. 材料と方法	16-19
1. DNA の精製	
2. ミトコンドリア DNA の全長配列決定方法	
2-1 LA PCR	
2-2 ダイレクトシーケンスとプライマーウォーキング	
2-3 補足の塩基配列決定	
3. 系統解析	
4. Relaxed Molecular Clock による分岐年代の推定	
III. 結果と考察	20-27
1. ヒゲクジラ類ミトコンドリアゲノムの特徴	
2. ヒゲクジラ類全種の系統類縁関係	
3. 分岐年代の推定	
IV. 結論	28-30
図表	31-50

第3章 SINE 法による潜顎亜目（カメ目）系統類縁関係の推定

I. 序論 51-56
1. カメ目の系統分類	
1-1. 高次分類群の分類体系	
1-2. リクガメ上科系統分類の変遷	
1-3. バタグールガメ科系統分類の変遷	
2. SINE 法による系統解析	
2-1. SINE とは	
2-2. 系統推定における指標としての SINE の有用性	
2-3. SINE サブグループの特定	
3. 本研究の目的	
II. 材料と方法 57-62
1. DNA の精製	
2. SINE 挿入遺伝子座の単離	
2-1 ゲノムライブラリの作成	
2-2 メンブレンへのトランスファー	
2-3 プローブの作成	
2-4 ハイブリダイゼーション	
2-5 オートラジオグラフィ	
2-6 SINE-inserted クローン の単離	
3. PCR による SINE の増幅	
4. PCR によって得られた SINE 配列の決定	
5. Tortoise PolIII/SINE 配列のアライメント	
6. PCR による単一遺伝子座での SINE 挿入の有無の確認	
III. 結果 63-67
1. Tortoise polIII/SINEs のサブグループとタイプの同定	
2. リクガメ上科の SINE 法による系統解析	
IV. 考察 68-73
1. Tortoise polIII/SINE の 2 サブグループについて	
2. CryI/II サブグループと PsCR1 LINE 間の 3'末端領域における類似性	
3. バタグールガメ科を中心としたリクガメ上科の系統解析	
4. 潜顎亜目系統推定における SINE 法の有用性	
図表 74-103

第4章 総論 104-106
引用文献 107-118
謝辞 119

第1章 序論

I. 生物進化と系統分類学の変遷

地球上に存在する 100 万～2,000 万種とも言われる生物の多様性が進化の過程を経て生じた結果であるということは、現在では生物学者のみならず世間一般に認められるところである。進化論の登場以前から分類学 (taxonomy) は自然界における生物の多様性を認識し、それらを分類して体系的に把握しようと努力を続けてきた。リンネ式階層分類体系 (Linnean hierarchical classification system; Linné 1735) は現在もなお分類学の基本的概念であり、その意図は「多様性の中に弁別できる集合に名をつけ、それらを階層的に配列することによって多様性をパターン化しようとする」(馬渡 1996) ところにある。ダーウィン (Darwin, 1859) は「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」とする進化論を提示し、これは分類学者に大きな影響を与えた。それまで種の分類体系構築のよりどころとなっていた「形質の類似性」とはなんであるかという疑問に対し、進化論は「類似」が共通の祖先に由来する「相同」であることを説明した。さらに、多様性のパターンを表現してきた階層的な分類体系は、実は相同に基づいた生物の進化過程の再現であったことを知らしめたのである。その後、ヘッケル (Haeckel, 1866) は生物の進化に系統発生 (phylogeny, phylogenesis) という概念を提唱し、生物のたどってきた歴史を樹上図 (系統樹; phylogenetic tree) に表した。分類学は生物進化と系統発生の概念を受け入れ、分類体系構築を目標とする学問は系統分類学へと進展した。その礎を築いたのがヘニツヒ (Hennig; 1965) の提唱した分類体系構築法である。ヘニツヒは、「生物の分類は“形態的特徴の類似性”ではなく“系統関係を反映した体系”に基づいて行われるべきである」ことを提唱し、これに基づいた分類を系統分類学 (phylogenetic systematics) と呼んだ[ヘニツヒ理論に従った系統分類は現在、分岐分類学 (cladistics) と名を変えている]。分岐分類学はそれまで明確な基準を持たなかったリンネ式階層分類体系に生物の「系統関係」を「種分岐の順序」で示すといった明確な基準をもたらしたため、分類学者、進化学者に広く受け入れられた。そして分岐分類学的解析の結果に基づいて分類群の位置づけが見直されるようになった。つまり分類体系の再編が行

われるようになったのである。このように系統分類学とは、生物進化の歴史を解明することに加えて、生物の多様性を分類体系の構築によって理解することを目的としている。系統分類学の発展に伴い伝統的分類学は新たな時代を迎え、一つのカテゴリとしてまとめて解釈することが難しくなった。そこでマイア (Mayr, 1969) は分類学を以下の3つの段階に分けて解釈することを提唱した。

分類学 (taxonomy): 種を区別し、命名し、記載する。自然を構成する要素である種と呼ばれる個体集合を自然の中から見つけ出すこと。

分類学 (taxonomy): 生物間の関係を明らかにし、その関係に従って生物を整理すること。現在信じられている生物間の関係は進化であり、進化のパターンを解明することが目的となる。

分類学 (taxonomy): 分類学では種を分けられなかった場合、その理由探し種の本質を明らかにすること。種内変異および近縁種間の生物学的な関係を解析することで、種分化 (speciation) の機構を明らかにすること。

以上のように系統分類学はマイアの分類学的カテゴリーでいう分類学に相当する。本研究は分子系統学と題し、進化の道程 (進化のパターン) は系統樹の構築によって明らかにされる。さらに、系統樹構築によって見いだされた種の類縁関係と現在の分類体系におけるそれらの関係とを比較検討し、より自然な、すなわち進化を反映した体系構築を目指す。現在の分類体系は形態比較によって構築されたものがほとんどである。この形態分類学者の努力によって見いだされてきた形態形質が系統進化と照らしあわされたときに、生物が進化の過程でどのような形態的变化を受けて多様化してきたのかを検証する。

II. 形態データと分子データ

生物の進化系統樹の構築は過去に起きた現象を推定するため現在得ることができるデータを用いて行われる。それは進化の途中段階を示す化石記録が生物の系統すべてを解明するほど完全では無いことの裏返しでもある。これまで生物の系統関係は形態形質に基づいた比較形態学によるものがほとんどであった。このような形態形質の比較による系統推定には用いる形質の重み

付けが大きく影響し、同じ特徴でもその使われ方の比重が異なればそこには新しい系統の枝ができることになる。また、その重み付けは研究者によって見解が異なっているため、「人為的」系統樹が構築され、系統類縁関係の解釈に大きな混乱を生じることもしばしばおきた(Novacek 1992)。このような混乱は共通の祖先から伝わったものではない非相同同形(homoplasy)形質を共有派生形質(synapomorphy)と誤解することによって起こる(図1-1)。非相同同形は生物がよく似た環境への適応することによって生じる形態的な類似性であり、系統を異にする生物がそれぞれ機能的に類似した形質を独立に獲得することで説明される。進化論以後の生物系統構築の努力は比較形態学を中心に行われ、様々な仮説のもとで議論されてきたが、そこには客観的な形態比較による系統樹の構築といった重要な要素を欠いていたことは否めない。20世紀後半になるとDNAをはじめとする生体高分子を系統構築の際のデータとして用いた系統解析、すなわち分子系統解析が盛んに行われるようになった。木村(1983)は分子レベルの形質の進化(変異)は自然選択に中立であり、遺伝的浮動だけによる偶然的固定によって時間に比例しながら蓄積しているとす「分子進化の中立説(neutral theory of molecular evolution)」を提唱し、これは分子によって推定された系統樹がいかに客観的に系統関係を推定できるかという事実を説明している。近年、分子系統解析は形態比較にとってかわり系統分類学の主流として盛んに行われ様々な分類群における系統関係と分類体系の再検証に適用されている。しかし、分子系統解析で従来の化石記録や比較形態学的仮説と相反する結果が現れた場合などはより慎重に検討していく必要がある。それは分子系統解析が万能な系統解析法とは言えず、分子であるがゆえのいくつかの注意すべき点を含んでいることに他ならない。

III. 分子系統解析における注意点

分子系統解析には状況によって誤った結論を導く危険性があることも知られている。これは「間違っ系統推定をしてしまう場合」と「分子系統樹が生物種の系統関係を正しく反映していない場合」に分けられる(上島 2000)。

前者の例として最もよく知られているのは、進化速度が分類群によって大きく異なる場合である(Graur and Li 2000)。分子の進化速度は必ずしも一定ではなく同じ遺伝子であっても

ネージによって大きく異なっている場合がある。このようなデータを用いて系統解析を行うと誤った系統関係を導く恐れがあるが、膨大な分子データが蓄積された今日において進化速度の不均一性を考慮した分子進化モデルも提唱され、このモデルを適用した系統解析を行うなどして問題はある程度回避できる。

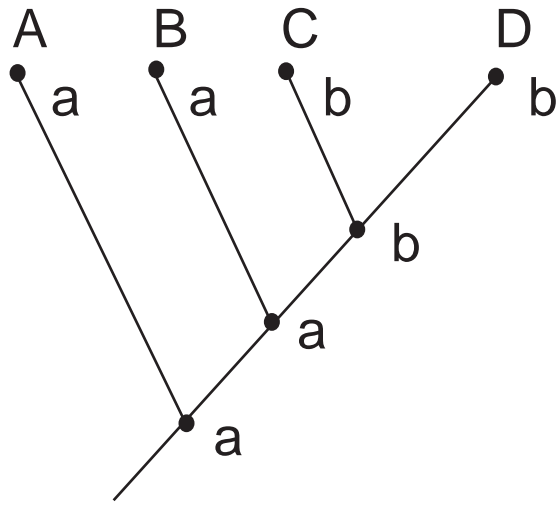
後者の例としては、分子から推定された系統樹（遺伝子の系統樹）が実際の種分岐の過程（種の系統樹）を必ずしも反映しないことである（長谷川・岸野 1996）。このような事例は特に、共通祖先に遺伝的多型（ancestral polymorphism）が存在した場合に見られ、種内の地域集団や近縁種間を対象とした系統解析で起こりやすい（図 1 - 2）。遺伝子の系統と種の系統が一致しないもうひとつの事例は、異種間交雑である。特にミトコンドリア DNA（mtDNA）は母性遺伝するため、浸透交雑によって流入した遺伝子が維持されやすく、一部の集団ではすべての個体の遺伝子が別種由来のものに置き換わってしまった例も報告されている（Marchant et al. 1988）。浸透交雑が問題となるのは、異種間交雑が可能な近縁種の場合に限られる。

これまでの分子系統解析は限られた遺伝子座の短い塩基配列もしくはアミノ酸配列によるものがほとんどであったため、上述したような問題が系統樹に大きく影響した。最近では系統解析法、塩基配列決定技術も飛躍的に進歩し、それに伴って DNA データバンクへの配列データの蓄積も増している。これからの分子系統解析はより多くの遺伝子座、より長い塩基配列、もしくはアミノ酸配列によって解析されることが望まれる。

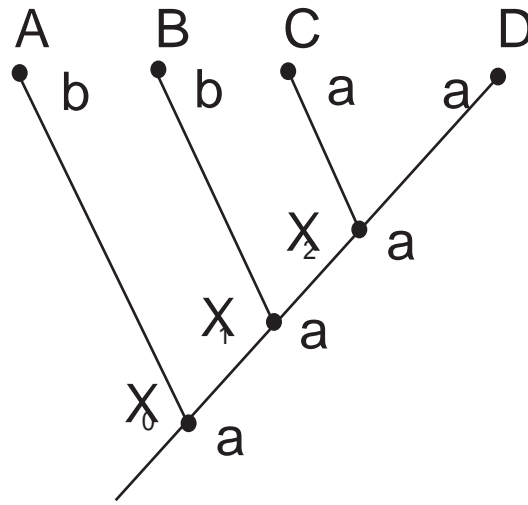
IV. 本研究の内容

本研究は脊椎動物の哺乳類クジラ目ヒゲクジラ亜目と爬虫類カメ目潜頸亜目を対象として分子系統解析を行った。これら両者は脊椎動物の中でも進化の過程において際立った形態的变化をとげた分類群であり、例えばヒゲクジラ亜目では後肢の退化、前肢の鱗化、そして鬚板の獲得（第 2 章参照）、カメ目では甲羅の獲得とそれに伴う肩帯要素の肋骨内への移動、頸の折りたたみ機構の獲得（第 3 章参照）などが挙げられる。これらの特徴はそれぞれの進化過程で水中生活への移行と防御機構の強化といった環境への適応が大きな要因であったと考えられる。そしてこのような形態的特徴に基づいた系統分類が行われると、比較に用いる形質が限られてくることや共

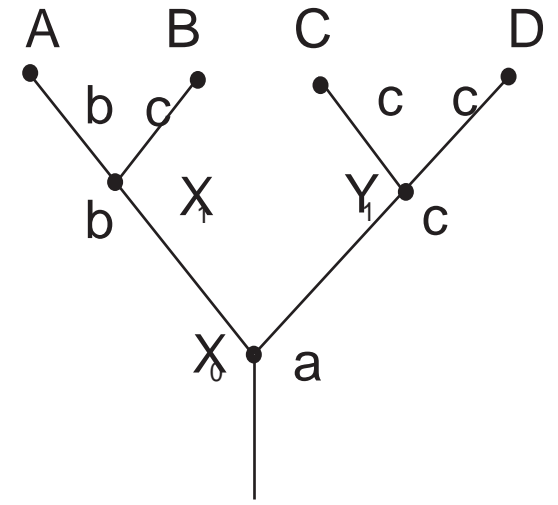
有派生形質と非相同同形形質の見極めが困難になることもあり、結果として分類体系と系統関係に著しい混乱を生じることが多い。本研究はこれまで系統分類に混乱を生じてきたこれら分類群の系統関係を分子系統学的方法によって再構築し、比較形態学的知見によって構築された系統分類との比較検討を行い、これら分類群がどのように分岐し形態を変化させ進化してきたのかについて解明することを目的とした。また、本研究の特徴は解析手法としてこれからの時代の分子系統解析にふさわしいと思われる遺伝子マーカーを用いていることも挙げられる。詳しくは各章で論ずるが、ヒゲクジラ亜目の系統類縁関係の推定にはミトコンドリア DNA (mtDNA) の全長配列を、潜頸亜目の系統類縁関係の推定には核ゲノムの散在性反復配列である SINE (short interspersed element) の挿入パターンを系統推定の指標として用いた。前者はヒゲクジラ亜目内といった比較的近縁な種間の系統関係を mtDNA ゲノム配列 (約 16kbp) といった膨大な配列データによって詳細に解析する試みである。後者は、これまで脊椎動物の魚類、哺乳類 (Murata et al. 1993; Shimamura et al. 1997, Nikaido et al. 2001a など) といった分類群で適用され成果をあげてきた SINE 法 (Shedlock and Okada 2000, Graur and Li 2000, Nei and Kumar 2000) が、初めて爬虫類を対象に行われる試みである。



1 相同



2 平行現象



3 収斂

図 1 - 1 . 相同(1)と非相同同形(2, 3) .

解説 ;

相同 : 一つの共通祖先に起源したことに基づく類似性 .

平行現象 : 相同のように見える形質が、異なる祖先 (2の X_0 X_1) の同じ形質 (2の a) から生じる現象 .

収斂 : 異なる起源 (3の X_1 Y_1) の異なる形質 (3の b, c) から相同と区別のつきにくい形質が生じる現象 .

(馬渡, 1996より改変)

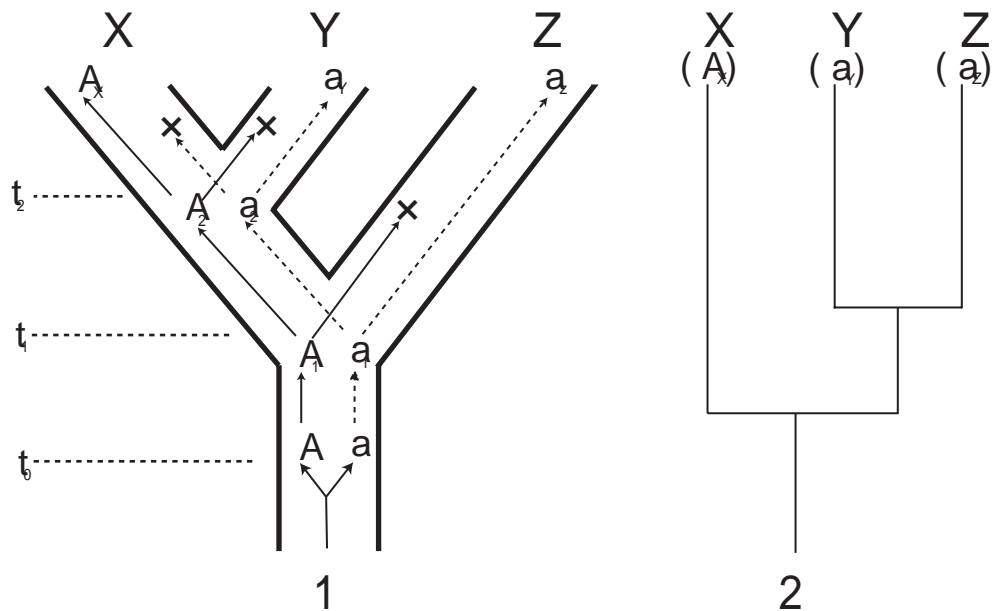


図1 - 2 . 種系統樹 (1) と遺伝子系統樹 (2) .

解説 :

図の1の太線で囲まれた部分は3種 (X , Y , Z) の正しい系統関係を示し、内部の細い矢印は遺伝子が伝わった過程を示す . ある遺伝子座において2種類の対立遺伝子 A と a が生じ、遺伝的多型が共通祖先では維持されていたとする . しかし、共通祖先から子孫種だけが進化する過程で遺伝的多型は失われ、種 X では対立遺伝子 A だけが、種 Y では対立遺伝子 a だけが伝わった . この場合の遺伝子の系統関係 (図の2) は、同じ対立遺伝子から由来する a と a が近縁となるので、生物種の系統関係 (種 X と Y が近縁) とは一致しない . また、種 X と Y の分岐点は t_1 であるが、対立遺伝子 A と a の分岐点は t_3 までさかのぼる . したがって、この遺伝子に基づいて分子系統解析を行うと、3種の系統関係および遺伝的距離を誤って推定することになる .

(上島 , 2000 より)

第 2 章 ミトコンドリア DNA 全長配列に基づくヒゲクジラ亜目の系統解析

I. 序論

1. ヒゲクジラ類の分類とその歴史的背景

ヒゲクジラ類はシロナガスクジラに代表されるように現在地球上に生息する動物の中で大型の種を数多く含んでいる。ヒゲクジラ亜目(Mysticeti)はクジラ目の 2 亜目の 1 亜目を構成し、現存種は 4 科 13 - 14 種に分類されている(セミクジラ科 Balaenidae; 3-4 種、コセミクジラ科 Neobalaenidae; 1 種、コククジラ科 Eschrichtiidae; 1 種、ナガスクジラ科 Balaenopteridae; 8-9 種)(参考図 1)。その分類群の名称に示されているとおり口蓋に発達したひげ板でプランクトンや魚を濾しとって捕食するといった行動は有名である。また、これらの 4 科の分類は捕食行動にも顕著な違いが現れている。セミクジラ科の鯨類では長いひげ板をいかしてプランクトンをトラップする捕食法("skim-feeding"と呼ばれる)が、コククジラでは海底の砂をさらい生物を濾しとって捕食する方法("bottom-ploughing"と呼ばれる)が、ナガスクジラ科の鯨類は下顎に発達した畝を拡げて海水ごとプランクトンや魚を飲み込み、ひげ板で濾しとる捕食法("gulp-feeding"と呼ばれる)がそれぞれの生態的、行動的特徴として認められる。ヒゲクジラ亜目の種はハクジラ亜目の種と比べてそのほとんどが大型の種であり、泳ぐ速度も小型のハクジラ類より遅い。そのため古くから食料として、また近代では鯨油の供給源の要素も加わり、2 世紀以上にわたって商業捕鯨の対象とされてきた。この苛烈な捕鯨は豊富な科学的データをもたらし、ヒゲクジラ類における α 分類学の発展に大きく貢献したが(Mayr 1969, LeDuc & Dizon 2002)、同時にいくつかの種を絶滅の危機にまで追い込む大きな要因ともなった。また、ごく最近のことであるが、ヒゲクジラ類で新種が記載された(ツノシマクジラ *Balaenoptera omurai*; Wada et al. 2003)。この種はナガスクジラ科の一種で、1970 年代の捕鯨で 8 個体が記録されていたのだが、新種とは認識されず小型のナガスクジラ(*Balaenoptera physalus*)と考えられていた。しかし、頭骨形態を詳細に解析し明確な違いを見いだすことで最近になってようやく新種記載された。この事実はヒゲクジラ亜目の比較形

態による分類の難しさを物語っているといえる。このようなヒゲクジラ類の高度に特殊化した形態形質は謎に満ちた進化過程を含んでおり系統分類者の大きな関心を寄せている。しかし、ヒゲクジラ類の分類学的な知見の蓄積にも関わらず、その進化的な系統類縁関係はわずかしき明らかにされていない。ヒゲクジラ類の系統類縁関係を解明することは、それらの生物学、生態学、生物保全、資源管理の更なる理解のために重要な礎となる。

2. ヒゲクジラ類の系統類縁関係について

これまでヒゲクジラ類に関する系統関係は比較形態学と古生物学、分子系統学的アプローチによって解析され、そこから様々な見解が示されてきた。現存種の形態と化石記録に基づいた解析 (Barnes and McLeod 1984; McLeod et al. 1994, Geisler & Luo 1996, Bisconti 2000, Lindow 2002, Sanders & Barnes 2002, Geisler & Sanders 2003) は、ヒゲクジラ亜目 4 科の系統関係について相反する系統仮説を提唱しているが、セミクジラ科が現存するヒゲクジラ類の中で最初に分岐したグループであるという知見については一致していた。また、ナガスクジラ科が 2 つの亜科、つまりナガスクジラ亜科 (Balaenopterinae; 1 属 6-7 種) と独特の形態を持ったザトウクジラ 1 属 1 種からなるザトウクジラ亜科 (Megapterinae) に分類されることも広く受け入れられている。しかし、未だにコセミクジラ科とコククジラ科の系統的位置とナガスクジラ科内部の系統関係に関しては議論の余地が残されている。海洋に生息し、体が巨大であり、水生適応によって多くの器官が特殊化していることがヒゲクジラ類の形態比較をいっそう困難にさせていると考えられる。そしてこのような実態を反映したためか、ヒゲクジラ亜目の分類体系と系統関係の構築において誤った見解が示されることもある (LeDuc & Dizon 2002)。

ヒゲクジラ亜目系統解析は、分子生物学的手法が系統解析に使われ始めた当初から行われていた。クジラ目に共通して存在する反復配列である DNA サテライト配列を用いた解析は、ヒゲクジラ亜目の中でセミクジラ科が最初に分岐することを確認したが、それまでセミクジラ科と単系統と考えられてきたコセミクジラ科がコククジラ科、ナガスクジラ科と単系統群を形成する可能性を示唆した (Arnason and Best, 1991; Arnason et al. 1991, 1992)。一方、ミトコンドリア DNA (mtDNA) 調節領域の配列に基づいた解析では、コククジラ科がナガスクジラ科単系統群の内部

系統に位置する可能性と、南北ミンククジラが独立した種とみなせるほどの遺伝的距離であることを明らかにした (図 2 - 1A; Arnason *et al.* 1993)。また、mtDNA cytochrome b 遺伝子配列に基づく解析は、同様にナガスクジラ科の側系統性を示唆したが、図 2 - 1B に点線で示した系統関係のようにコククジラ科とナガスクジラ科の内部の類縁関係について mtDNA 調節領域 (図 2 - 1A) の結果とは異なる見解を示した (Arnason and Gullberg, 1994)。

このように形態形質と分子データによる解析が行われながらも未だにヒゲクジラ類の系統関係を十分に明確にすることができていない。中でもヒゲクジラ亜目においてもっとも不明とされている系統関係はコククジラ科+ナガスクジラ科で構成されるクレイドの内部系統である。多くの相反する系統仮説がナガスクジラ科内で提唱され、それに加えて分子データでは一属一種からなるコククジラ科コククジラがナガスクジラ科の内部系統に位置するといった知見もあり、これは形態的に示唆されたナガスクジラ科の単系統性に異議を唱えるものである。ヒゲクジラ亜目の大半の種で構成されるこれらの系統類縁関係を解明することは、ヒゲクジラ亜目の進化を理解するうえで非常に重要な問題である。本研究は Arnason and Gullberg (1994) がヒゲクジラ類で最初に行った分子系統解析につづくヒゲクジラ亜目のほぼ全種を用いた系統解析であり、かつ解析に用いる mtDNA 配列データは過去のものよりも膨大なデータに基づいているため、より信頼性の高い系統関係を構築することが目的である。

3. 遺伝子マーカーとしてのミトコンドリア DNA

遺伝的マーカーとしての mtDNA は核 DNA に比べて進化速度が速いこと (Brown *et al.* 1979) から近縁な属間、種間、集団間におけるさまざまな遺伝的解析に広く用いられてきた。mtDNA の細胞内に存在するコピー数は数千ないし数万で核 DNA の 2 コピーに対して著しく多いことも系統解析における遺伝的マーカーとして重要な要素である。また、卵の細胞質を通じて組み換えなしに母系遺伝するので (Olivio *et al.* 1983) 母系系統を追跡するのに適切な分析対象となる。母系系統は通常は個体群全体ないし種全体の系統を代表していると思なすことができる。mtDNA はこのような特徴を有することから、その部分配列を用いた系統解析が様々な生物の系統分岐パターンを解明してきた。近年になり DNA シーケンサーの処理能力の向上にともなって、

mtDNA による分子系統解析は新たな時代を迎え、mtDNA の全ゲノム配列に基づいた解析が多く報告されるようになってきた (Nardi et al 2001, Grande et al 2002)。現在、哺乳類高次分類群の類縁関係は mtDNA 全長配列によって当然のように行われているが (Nikaido et al. 2000; Cao et al. 2000; Nikaido et al. 2001a; Arnason et al. 2002; Lin et al. 2002) 比較的近縁な分類群の系統類縁関係を同様のデータに基づいて解析した例は数少ない (Ingman et al. 2000; Kijas and Andersson 2001)。

4. 本研究の目的

本研究は 3 つの主要な目的で成り立っている。1) ヒゲクジラ亜目 10 種の mtDNA 全長配列を決定し、そのゲノムを詳細に調べること、2) mtDNA 全長配列データに基づきヒゲクジラ亜目の不確かな系統類縁関係を明らかにすること、そして 3) ヒゲクジラ亜目の現存種を導いたりネージの推定分岐年代を分子時計によって評価し、化石記録との比較検討を行うことである。これまでにもヒゲクジラ類の分岐年代推定が化石の証拠と、分子時計によって行われてきた (Wada and Numachi 1991, Arnason and Gullberg 1993)。しかし、化石記録が以前よりも増したことに加え、塩基配列データベースの蓄積に伴う分子時計の精度と解析技術の向上から考えても改めてヒゲクジラ類の分岐年代を推定する必要がある。本研究で構築された mtDNA における包括的なヒゲクジラ類系統関係と推定分岐年代を総合して評価することによりヒゲクジラ類の進化史に新たな知見が得られると期待される。

II. 材料と方法

1. DNA の精製

本研究で解析に用いたヒゲクジラ垂目の主要な 12 種とそのうち我々がミトコンドリア DNA 全長配列を決定した 10 種を表 2 - 1 に示す。全長配列決定は 1 種につき 1 個体で行われた。フェノール・クロロホルム抽出法 (Sambrook et al. 1989) に従い肝臓もしくは筋肉組織からトータルゲノム DNA を抽出し、4°C で保存した。ナガスクジラ (*Balaenoptera physalus*) とシロナガスクジラ (*Balaenoptera musculus*) の mtDNA 全長配列は DNA データバンクに登録されていた配列から引用した (Arnason et al. 1991, Arnason & Gullberg 1993)。解析に用いた種とその地域集団を同定するため比較的データベースに配列が蓄積された 4 種 (セミクジラ、ニタリクジラ、ミンククジラ、ザトウクジラ) を用いてデータベース登録配列とともに近隣結合法で系統解析を行った (図 2 - 2A, B, C, D)。

2. ミトコンドリア DNA の全長配列決定方法

ミトコンドリア DNA の全長配列決定は LA PCR 法とプライマーウォーキング法を組み合わせで行われた。

2.1 LA PCR

シーケンスの鑄型となるミトコンドリアゲノム約 16kbp を得るため LA-PCR を行った。図 2 - 3 に示すようにミトコンドリア DNA を 2 つの領域 [short fragment (A) と long fragment (B); 図 2 - 3] に分けて増幅した。Short fragment はおよそ 7kbp の増幅産物で long fragment はおよそ 9kbp の増幅産物となる。増幅に用いた 2 つのプライマーセットは Nikaido et al. (2000) がデザインしたプライマーを用いた。Short fragment を増幅するプライマーセットは 5'-GGT CTT AGG AAC CAA AAA ATT GGT GCA ACT C-3' と 5'-CTC CGG TCT GAA CTC AGA TCA CGT AGG ACT-3' で long fragment を増幅するプライマーセットは 5'-AGT CCT ACG TGA TCT GAG TTC AGA CCG GAG-3' と 5'-GAG TTG CAC CAA TTT TTT GGT TCC TAA GAC C-3' である。LA PCR 反応液の組成は 200ng 分のゲノム DNA、2.5 ユニットの TaKaRa LA Taq (Takara, Japan)、

5 μ l の 10 \times LA PCR buffer、dNTP mixture を 8 μ l、MgCl₂ (25mM) を 5 μ l、2 種類の 5pmol プライマーを 2 μ l ずつ入れ計 50 μ l になるように適宜滅菌水を加えて調整した。反応は 94 $^{\circ}$ C30 秒、68 $^{\circ}$ C15 分を 1 サイクルとし 30 サイクル行った。LA PCR 反応後、増幅の確認を行うため、反応液のうち 5 μ l を 1 μ l BPB ローディングバッファーと混ぜ 1%のアガロースゲル (LO3 agarose gel; Takara) で 1 \times TAE を緩衝液に用い電気泳動した。電気泳動後、ゲルは臭化エチヂウム溶液に 20 分浸し染色され、UV トランスイルミネーターを使用して増幅バンドの観察を行った。

2.2 ダイレクトシーケンスとプライマーウォーキング

LA PCR によって増幅した short fragment と long fragment の産物からの残存プライマーを除去するため、exonuclease I (Exo I; USB Corp.) と shrimp alkaline phosphatase (SAP; USB Corp.) で処理をした。PCR 後の反応液 50 μ l に対し、Exo I 溶液と SAP 溶液をそれぞれ 0.5 μ l 加える。温度条件は 37 $^{\circ}$ C15 分後 85 $^{\circ}$ C15 分である。この処理を行った溶液はそのままダイレクトシーケンスの鋳型として用いることができる。ミトコンドリア DNA 全長配列の決定にはプライマーウォーキング法を採用した。プライマーウォーキング法は長い未知の DNA 断片の一端にデザインされたプライマーで塩基配列決定し、その決定した配列に基づいてさらに下流の未知の配列を決定するプライマーを設計し再度塩基配列決定を行い、この作業を DNA 断片の末端まで行い最終的に全長配列を決定する (図 2 - 4, 図 2 - 5)。ミトコンドリア DNA 全長配列決定の最初の塩基配列決定には LA PCR で使用したプライマーとさらに Nikaido et al. (2000) が哺乳類ミトコンドリア DNA の保存的な領域にデザインした 17 種類のプライマーを用いて行った (表 2 - 2)。

2.3 補足の塩基配列決定

LA PCR で用いたプライマーがアニーリングする領域 [16S rRNA の下流領域と tRNA^{Leu}(CUN) 領域] の配列を決定するため、図 2 - 3 に示す 2 つの領域で PCR を行った (図 2 - 3、C と D)。図 2 - 3C にあたる ND 4 遺伝子中流から ND 5 遺伝子中流までの 2,113bp を増幅するプライマーセットは 5'-TGC AGC CGT ACT ACT AAA ACT TGG -3' と 5'-AGG GCT CAG GCG TTG GT -3' で増幅産物に tRNA^{Leu}(CUN) を含むようにデザインされている。図 2 - 3D にあたる 16S

rRNA 遺伝子から ND1 遺伝子中流までの 855bp を増幅するプライマーセットは 5'-AAC AGC GCA ATC CTA TTC -3' と 5'-AGG AGC CAT TTA TTA GGA GT -3' で増幅産物に 16S rRNA 遺伝子下流を含むようにデザインされている。これら 2 断片増幅のための PCR 温度条件は、94°C3 分の後、94°C30 秒、55°C45 秒、72°C1 分を 1 サイクルとして 30 サイクル行った。PCR 反応液の組成は、2.5 ユニット Ex Taq polymerase (Takara)、10×Ex Taq buffer を 5 μ l、2.5mM dNTPs を 4 μ l、10pM プライマーを 2 μ l ずつ、100ng 分の鋳型 DNA を加え最終濃度を 50 μ l とするよう滅菌水を適宜加えた。PCR 反応後の増幅断片の確認と反応産物の精製は上記 2.1 に従った。シーケンスによる塩基配列の決定は上記 2.2 の方法に従った。シーケンスに用いたプライマーは表 2 - 2 に示す。

3. 系統解析

本研究ではミトコンドリア DNA の H 鎖側にコードされた 12 個のタンパクコード遺伝子を系統解析に用いた。配列のアライメントは自ら注意深く確認し、ATPase6 と ATPase8 間、ND4 と ND4L 間で見られる遺伝子コード領域がオーバーラップした部分などはギャップやアライメントが曖昧な部分とともに解析から除外した。最終的に 3,602 のアミノ酸配列が解析に用いられた。

系統解析は最尤法 (Maximum likelihood method ; ML 法) で行われた (Felsenstein, 1981; Kishino, Miyata and Hasegawa, 1990)。我々は MOLPHY package ver. 2.3 (Adachi and Hasegawa 1996a) の ProtML プログラム、TREE-PUZZLE プログラム (Strimmer and von Haeseler, 1996)、さらに mtREV-F モデル (Adachi and Hasegawa 1996b) による mtDNA タンパク遺伝子のアミノ酸配列解析のために PAML package ver. 3.1 (Yang 1997) の CodeML プログラムを用いて解析を行った。CodeML ではアミノ酸座位間の進化速度の不均質性 (Yang, 1996) を考慮した離散化されたガンマ (Γ) 分布 (8 カテゴリー) が、同様に TREE-PUZZLE プログラムではガンマ (Γ) モデルの shape parameter (α) が適用された。ブートストラップ確率は 10,000 回繰り返しによる REEL (resampling of estimated log-likelihood) 法 (Kishino et al. 1990) で推定された。系統解析のアウトグループにはカバとマッコウクジラを用いた。

4. Relaxed Molecular Clock による分岐年代の推定

ミトコンドリア DNA タンパク遺伝子の配列から、我々はヒゲクジラ類で構築した系統樹の分岐年代を推定した。しかしながら、分子時計は図 2 - 6 におけるリネージ間の枝長の違いから明らかなようにミトコンドリア DNA タンパク遺伝子で正確に維持されていない。それゆえ、分子時計の割合の違いが分岐時間の評価において考慮されなければならない。Thorne らによる Bayesian 法 (Thorne et al. 1998; Kishino et al. 2001) (我々は Relaxed clock と呼ぶ) は、Nikaido ら (2001a, 2001b) によるクジラ目 SINE 近傍配列からの推定と Cao ら (2000) による哺乳類ミトコンドリア DNA タンパク遺伝子からの推定に適用された例にもあるように、この目的に即した方法である。よって我々は Bayesian 法をヒゲクジラのミトコンドリア DNA タンパク遺伝子に適用した。アウトグループにウシを用いることで、我々はカバとクジラ類の分岐年代で 55 ± 3 Myr B.P. (\pm : 1SD) を選択し時間の目盛りを合わせた (calibration)。また、最古のヒゲクジラ類の化石種 *Llanocetus denticrenatus* (歯の痕跡が見られる) の化石記録に基づいてヒゲクジラ類とハクジラ類の分岐年代を 34.2 Myr B.P よりも古い時代であるといった時間の目盛り合わせも行った (Fordyce, R. E. 1989; Mitchell, E. D. 1989; Dingle, R. V. & Lavelle, M. 1998)。

III. 結果と考察

1. ヒゲクジラ類ミトコンドリアゲノムの特徴

本研究で決定したヒゲクジラ亜目 10 種の mtDNA ゲノム全長配列は哺乳類ミトコンドリアゲノムの一般的な特徴と一致した。各種の mtDNA ゲノム全長とミトコンドリア DNA にコードされている各遺伝子の遺伝子の配置などとともに表 2 - 3 にその結果を示す。本研究で用いた北セミクジラサンプルは mtDNA 調節領域のハプロタイプから *Eubalaena* 属の第 3 の種と示唆されている *Eubalaena japonica* (Rosenbaum et al. 2000) と一致した。すべてのタンパクコード遺伝子のコドンは ATG もしくは ATA で始まり、TAA、TAG、AGA のどれかで終わっていた。本研究で用いた 10 種のうち 9 種は ND4L の開始コドンが GTG であったのに対し、ザトウクジラだけ ND4L の開始コドンが ATG であった。Arnason and Gullberg (1991) はナガスクジラの ND4L 開始コドンが ATG であることを報告しており、12 種のヒゲクジラ類の中でザトウクジラとナガスクジラが ND4L の開始コドンを ATG で共有していた。これは後述するこれら 2 種間の姉妹群関係の仮説を支持するものである。

2. ヒゲクジラ類全種の系統類縁関係

NJ 法 (近隣結合法)、TREE-PUZZLE、ProtML による予備的な系統解析で、南氷洋ミンククジラ / 北大西洋ミンククジラのクレイド (Lineage I) とイワシクジラ / ニタリクジラのクレイド、そして北セミクジラ / 南セミクジラのクレイドはすべて 100% の確率で支持されていたので、これらのクレイドはつづく ML 解析ではあらかじめ固定して解析が進められた。カバとマッコウクジラのアウトグループの要素を加え、ミンククジラクレイド、ナガスクジラ、ザトウクジラ、イワシ / ニタリクジラクレイド、シロナガスクジラ、コククジラ、コセミクジラ、セミクジラクレイド、ホッキョククジラの 10 要素間で可能な樹形は 2,027,025 通りとなる。これらの樹は ProtML の近似最尤法 (approximate likelihood) によって計算され、そのうちの上位 10,000 樹を ProtML による厳密な ML 解析に用いた。続いて我々はアミノ酸座位間の進化速度の不均質性 (Yang, 1996) を考慮にいれたガンマ (Γ) 分布による解析を CodeML で行った。しかし、このガンマ (Γ) 分布を用いて 10,000 樹すべてを解析すると計算にかかる負荷が増し、そのために時間

がかかりすぎる。そこでさらに我々は、10,000 樹のうち ProtML (ガンマ分布を適用していない)でもっとも高い値を示した最尤系統樹から対数尤度で 2 倍標準誤差内にあった 57 樹を選び出し、ガンマ (Γ) モデルを適用して CodeML で解析を行った。

mtDNA タンパク遺伝子の CodeML で構築された ML 系統樹を、ProtML と CodeML で算出されたブートストラップ確率とともに図 2 - 6 に示した。また、ミトコンドリア DNA の 12S rRNA 遺伝子と 16S rRNA 遺伝子を連結した配列データをもとに ML 法で構築した系統樹もタンパク遺伝子の解析と同様の結果を示した (図 2 - 7)。図 2 - 6 を系統の古い分岐から見ていくと、ヒゲクジラ類の系統関係はセミクジラ科、コセミクジラ科、コククジラ科、ナガスクジラ科の順であった。1 種以上の種からなる 2 つの科、すなわちセミクジラ科とナガスクジラ科は単系統であり、これらのグループをクレイドとした形態学的知見が本研究においても支持された。

ヒゲクジラ亜目におけるセミクジラ科の初期の分岐はこれまでの研究で報告されてきた系統関係である (Arnason et al. 1992, 1993; Adegoke et al. 1993, McLeod et al. 1993, Milinkovitch et al. 1994, Arnason and Gullberg 1994, 1996)。本研究の結果もこれらと同様にヒゲクジラ類におけるセミクジラ科の最初の分岐と残りのコセミクジラ科、コククジラ科、ナガスクジラ科で構成されるクレイドの存在を高いブートストラップ値で明確に示した[91.5% (ガンマ分布無し)と 96.5% (ガンマ分布適用)]。また、このコセミクジラ科、コククジラ科、ナガスクジラ科の単系統群はセミクジラ科を除くこれら 3 科で共有された DNA サテライトの存在からも示唆された系統関係である (Arnason and Best 1991, Arnason et al. 1992, Adegoke et al. 1993)。系統樹上では、セミクジラ科の分岐に続いてコセミクジラ科唯一の現存種であるコセミクジラが分岐した。この種はセミクジラ類に似て上顎がアーチ状を呈するが、ナガスクジラ類と同様に背鰭を持ち、また体が著しく小さい (体長約 6m) ことなどから他のヒゲクジラ類と形態的に非常に異なっている。また、生息域もオーストラリア南部、ニュージーランド近辺と限られた海域でしか確認されておらずその生態もよくわかっていない。いくつかの形態的特徴はセミクジラ類とコセミクジラで共通しているが (McLeod et al. 1993, Bisconti 2000 など) タンパク遺伝子アミノ酸配列解析はコセミクジラとコククジラ科+ナガスクジラ科の姉妹群関係を示唆した。しかしながら、現存種と化石記録の網羅的な形態比較による解析ではコセミクジラ科とセミクジラ科が姉妹群関係にあるという伝統的知見を

改めて支持する系統関係を示している (Bisconti 2000; Geisler and Sanders 2003)。このように形態学的知見と分子生物学的知見の間にはコセミクジラの不明な系統的位置に関して論争が続いている。mtDNA による最終的な結論ともいえる本研究の解析は明確にセミクジラ科を除く 3 科の単系統性とコセミクジラ科とコククジラ科 + ナガスクジラ科の姉妹群関係を示した。今後の核ゲノムによるコセミクジラの系統解析がこれら 2 つの系統仮説に関してどのような知見をもたらすかが注目される。

ヒゲクジラ亜目の系統関係でもっとも議論されているコククジラ科とナガスクジラ科に関して、我々の解析はこの 2 科の単系統性を強く支持した (図 2 - 6)。さらに、本研究はこの単系統群に存在する主要な 4 つのリネージを見いだした。リネージ I = ミンククジラ 2 種、リネージ II = ナガスクジラとザトウクジラ、リネージ III = イワシクジラ、ニタリクジラとシロナガスクジラ、リネージ IV = コククジラ (図 2 - 6)。リネージ II と III は本研究で初めて示された類縁関係である。ナガスクジラとザトウクジラの姉妹群関係 (リネージ II) は、ブートストラップ値が 90.4% (ガンマ分布無し) と 88.1% (ガンマ分布適用) で示されているように十分に支持された。リネージ III でもシロナガスクジラとイワシクジラ + ニタリクジラの単系統群が 94.5% (ガンマ分布無し)、96.5% (ガンマ分布適用) と高いブートストラップ値で支持された。本研究の結果はコククジラ科 + ナガスクジラ科のクレイドがこれら 4 つの独立したリネージで構成されていることを明確に示したが、各リネージの分岐順序についてはブートストラップ値も 70% 未満と低く解明することは困難であった。

ミンククジラの 2 種 (リネージ I) はかつて同一種の地域集団間レベルの形態的変異と考えられていた時代もあった。しかし、その後広範囲な地域から集められたミンククジラの標本を用いた形態比較からそこには少なくとも、広範囲な分布域をもつ北大西洋ミンククジラ (North Atlantic minke whale; *Balaenoptera acutorostrata*) と南半球に生息する南氷洋ミンククジラ (Antarctic minke whale; *Balaenoptera bonaerensis*) の 2 種存在することが明らかとなった (Arnold et al. 1987, Rice 1998)。加えて、分子データに基づくミンククジラの詳細な分析は、ミンククジラ 2 種間で見られる遺伝的距離が他のナガスクジラ科種間で見られるそれと同等、もしくはそれ以上といった極めて大きい遺伝的距離を示すという驚くべき事実を報告した (Wada and

Numachi 1991, Arnason et al. 1993)。本研究で示されたリネージ I は、ナガスクジラ科におけるミンククジラ 2 種の独立した進化史の証拠を改めて示した。

ザトウクジラはザトウクジラ属 (*Megaptera*) で唯一の現存種である。この属は生態的、形態的にナガスクジラ属 (*Balaenoptera*) と著しく異なっているため (Clapham & Mead 1989)、ナガスクジラ亜科 (1 属 6-7 種) の姉妹群、すなわちザトウクジラ亜科 (1 属 1 種) として扱われてきた (Rice 1998) (表 2 - 1)。しかし、過去に行われた分子系統解析では、ナガスクジラ科における 2 亜科の分類は系統を反映しないものであるということが示唆された。図 2 - 1A に示したように、mtDNA 調節領域 (D-loop) 配列に基づいて Arnason ら (1993) はザトウクジラがナガス / シロナガスクジラクレイドの姉妹群であることを示唆した。対照的に、図 2 - 1B では、mtDNA cytochrome *b* 遺伝子配列に基づく解析 (Arnason & Gullberg 1994) はザトウ / シロナガスクジラクレイドがイワシ / ニタリクジラ + ナガスクジラクレイドと姉妹群関係にあることを示唆した。これら 2 つの研究はザトウクジラ亜科がナガスクジラ亜科の内部系統に位置しているため、ナガスクジラ亜科が側系統であるという点で一致しているが、ザトウクジラの類縁関係については確率統計による検定の支持を欠いている (図 2 - 1A, B; ブートストラップ値参照)。本研究で示されたザトウクジラとナガスクジラ姉妹群関係は高いブートストラップ値で支持され、ナガスクジラ亜科の側系統性を改めて明確に示した。よってナガスクジラ科の種を形態的特徴から 2 つの亜科にした分類は系統進化を反映した分類ではないと考えられる。

リネージ III はシロナガスクジラがイワシ / ニタリクジラクレイドの姉妹群となって構成される。シロナガスクジラはナガスクジラと自然界で交雑していることが報告されており (Arnason et al 1991; Bérubé and Aguilar 1998)、これらが極めて近縁であることが示唆されていたが、本研究で示されたリネージ III は 2 種の近縁性を否定している。

リネージ IV はコククジラ単独で構成される。形態比較に基づく研究はコククジラ科の系統的位置に関して、ナガスクジラ科と単系統であるとする説 (Geisler & Luo 1996, Kimura & Ozawa 2002) とセミクジラ科 + コセミクジラ科クレイドと単系統であるとする説 (McLeod et al. 1993, Bisconti 2000) を提唱してきた。過去の mtDNA 部分配列や DNA サテライト配列に基づいた解析はコククジラ科がナガスクジラ科の内部、もしくはその姉妹群関係であることを示唆している (図

2 - 1A, B)。本研究の解析はコククジラ科がナガスクジラ科と姉妹群となる系統関係を示唆したが、統計的支持(ブートストラップ値)が低いことからコククジラ科+ナガスクジラ科各リネージの分岐順序について今回の結果から断定することはできない(図 2 - 6)。今後新たに核ゲノムの解析が行われれば、コククジラの系統的位置とナガスクジラ科との分岐パターンについて新たな見解が示されることだろう。

3. 分岐年代の推定

我々はヒゲクジラ亜目各種を導いたリネージの分岐年代を mtDNA12 タンパク遺伝子配列から推定した(図 2 - 8)。年代推定において図 2 - 6 に示したコククジラ科+ナガスクジラ科の 4 リネージの分岐は、それらの分岐を示す枝が短く詰まっておりブートストラップ値が比較的良かったことから多分岐として扱った。ヒゲクジラ類の進化過程を分岐年代と化石記録から考察する上で化石種や推定祖先種の存在を想定して系統を述べる必要がある。そこで我々はクラウングループ(crown-group)とステムグループ(stem-group)という概念を導入し、ヒゲクジラ類の進化について考察した(Craske and Jefferies 1989)。図 2 - 9 に示されているようにクラウングループは現存種のクレイドであり、それら現存種を導いた共通祖先とそのすべての子孫が含まれる。ステムグループはクラウングループに近縁な種で構成される。

ヒゲクジラ亜目現存種での最初の分岐はセミクジラ科を導いたリネージの分岐で、後期漸新世の 27.3 ± 1.9 Myr B.P. (Myr = Million year, B.P. = before present)と評価された。この推定年代は約 28 Myr B.P.というセミクジラ科の最も古いステムグループの化石記録に一致している(Fordyce 2002; 図 2 - 9 セミクジラ科ステムグループの†sb)。後期漸新世から中新世にかけてはセミクジラ類化石の長い空白期間であり、わずかに *Morenocetus parvus* (前期中新世、20-22 Myr B.P.)の化石や断片的な化石しか報告されていない。それゆえセミクジラ科の 2 属(ホッキョククジラ属とセミクジラ属)で推定された分子分岐年代(17 Myr B.P.)を明らかにするような化石記録は発見されていない。ホッキョククジラ属とセミクジラ属は互いによく類似した形態を持つことからかつて同属として分類されたこともあった。このような形態的類似性の高い属間で我々の推定した 17 Myr B.P.という分岐年代は古すぎるように思えるが、それはこれら 2 属の形態的進化

が比較的遅かったためではないか。また、Bisconti (2000) はホッキョククジラ属とセミクジラ属が *Morenocetus* 属出現よりも古い時代、すなわち 20-22 Myr B.P. より以前に分岐したことを示唆している。しかし、多くの古生物学による研究 (Barnes et al. 1985, McLeod et al. 1993, Fordyce & Barnes 1994) は *Morenocetus* がセミクジラ類の原始的な種であることを強く示唆し、最近まで *Morenocetus* はセミクジラ類最古の化石であった。このように古生物学的知見と我々の結果が一致することからもおそらく *Morenocetus* の分岐はセミクジラ属とホッキョククジラ属間に分岐よりも前に起きていたと考えられる。Bisconti (2000) の知見と我々の知見を図 2 - 9 に同時に示す。

コセミクジラ科は漸新世と中新世の境界にあたる 23.3 ± 2.5 Myr B.P. に分岐したと推定されたが、コセミクジラの化石は第四紀 (0-2 Myr B.P.) よりも古いものは報告されていない (Fordyce & Muizon 2001)。同様に、正確に同定された最も古いコククジラの化石は更新世の約 0.5 Myr B.P. (Barnes and McLeod 1984) であるが、これは我々の推定した 19.3 ± 2.9 Myr B.P. (前期中新世) というコククジラ科の分子分岐年代と極端にずれていた。コセミクジラとコククジラはヒゲクジラ亜目現存種の中でも独特な形態的、生態的特徴を多く示す。これら 2 種がヒゲクジラ亜目中ですpecializingしている理由として 2 つの可能性が考えられる。一つは、コセミクジラ科とコククジラ科は最近なって分岐したりネージであり、これらのリネージで急速な進化・形態形成の変化が生じたため他のヒゲクジラ類と著しい形態の違いを示したのではないか。もう一つの可能性として、コセミクジラ、コククジラのそれぞれの祖先はヒゲクジラ亜目進化の比較的初期の段階で分岐し、現在のこれらの種を導くまで長く系統的に独立した進化を経ており、この間にコセミクジラ、コククジラは特徴的な形態を獲得したのではないか。我々の解析は図 2 - 6 のこれら 2 科のリネージに見られる長い枝からも説明されるように後者の可能性を支持している。コセミクジラとコククジラではこのような進化過程を経てきたと推測されたことから、我々はこれら 2 グループの進化過程で絶滅したため現存しないゴーストリネージ (ghost lineage; Weishampel 1996) の存在 (コセミクジラ科とコククジラ科ステムグループ; 図 2 - 9) を考慮した。このゴーストリネージが分子分岐年代と化石記録間の見解の相違に影響しているのではないか。ゴーストリネージが化石として見いだされない理由には次の可能性が考えられる。コセミクジラ科ステムグループとコク

クジラ科ステムグループは化石としてすでに採取されているかもしれないが、それらのクラウングループの共有派生形質もしくは共有原始形質を認知することができないため同定されていないのかもしれない。もしくは、コセミクジラ科ステムグループとコククジラ科ステムグループが化石として残りにくい環境に生息していたため、これらの化石が未だに発見されていないのかもしれない (Arnason and Best1991)。

ナガスクジラ属とザトウクジラ属の信頼できる化石記録は鮮新世の5Myr以降 (Dathe 1983, Deméré 1986) である。これらの属でさらに古い化石となると7-12Myr B.P. (後期中新世) (Barnes 1977) となるが、化石が完全でないためはっきりとした同定は困難である。これよりふるい時代 (中新世前期、中期) となると、絶滅種の“ケトテリウム科 (Cetotheriidae) ” (中新世に繁栄したヒゲクジラ類の一科) という鯨類の化石が出土している。“ケトテリウム科”の鯨類は顎の筋肉の特徴や多くの血管が通っていた痕跡などから効率的な摂餌行動であったと示唆されており、おそらく鬚板を有してオキアミなどの海中プランクトンを餌にしていたのではないかと考えられている。当初ナガスクジラ科と推測された *Parabalaenoptera baulinensis* (図 2 - 9 † P; Zeigler et al. 1997) は、ナガスクジラ科とは祖先が異なると考えられ、現在ではケトテリウム科として分類されている。最近の系統学的知見によるとケトテリウム科とナガスクジラ科の近縁性は明らかでないとし、これらの類縁関係に慎重な対応が望まれている (図 2 - 9 ; *Cetotherium rathkii* 参照)。しかしながら、伝統的な分類に従えば“ケトテリウム科”は明らかなナガスクジラ科ステムグループ [例として、中新世前期から中期 (>14Myr B.P.) の *Aglanocetus* と *Cophocetus* (Kimura and Ozawa 2002)] を含んでいる。我々が推定したナガスクジラ科の分子分岐年代 19.3 ± 2.9 Myr B.P. はナガスクジラ科ステムグループの化石記録に一致している。

我々が推定した分子分岐年代によるとリネージ I, II, III の起源はナガスクジラ科、ナガスクジラ属の起源と同様に 19Myr B.P. と推定された。ナガスクジラとザトウクジラ間、シロナガスクジラとイワシ/ニタリクジラ間のリネージの分子分岐年代は中新世中期の初頭 (15Myr B.P.) であった。これまでの分子時計に基づく年代推定では、mtDNA 部分配列によってナガスクジラとシロナガスクジラ間で 5Myr B.P. (Arnason and Gullberg 1993)、またアロザイム解析によってミンククジラ類のナガスクジラ類からの分岐が 7Myr B.P. (Wada and Numachi 1991) と推定された。これら

の評価は本研究で推定された年代よりもずっと後にナガスクジラ類が分岐したことを示唆している。しかし、核 DNA 配列による分岐年代推定 (Nikaido et al. 2001b) では、ミンククジラリネージ (リネージ I) とナガス / ザトウクジラリネージ (リネージ II) の分岐が 20Myr B.P.、ナガスクジラとザトウクジラの分岐が 17Myr B.P. という結果が示されており、これは本研究で得られた推定とよく一致していた。本研究の mtDNA タンパク遺伝子アミノ酸配列に基づいた解析によると、ヒゲクジラ亜目現存種を導いた 12 リネージのうち 10 リネージが中新世前期 (23Myr B.P.) から中新世中期 (10Myr B.P.) 間で生じたことを示唆している。

19Myr B.P. と推定されたナガスクジラ科の起源は、現在知られている最古 (中新世後期) のナガスクジラ科化石よりもさらに古い同科の化石が発見される可能性を示唆している。しかし、中新世ヒゲクジラ類の膨大な化石標本からは中新世後期よりも古いナガスクジラ属とザトウクジラ属の化石の確かな証拠は得られていない。このことに関して、我々の共同研究者の一人であるニュージーランド、オタゴ大学の古生物学者 Ewan Fordyce 博士は、古生物学的見地からナガスクジラ属化石が現在の記録を更新してさらに古い時代の地層から発見されることは考えられないと述べている。また我々が推定した分岐年代を支持するような化石が発見されない原因として、化石が埋没する環境の違いによる化石標本の偏りや化石として残りやすいような過去の生息環境が原因とは考えられないと述べている。さらに、古生物学的知見によればナガスクジラ属とザトウクジラ属で確実に同定された種は鮮新世 (<5Myr B.P. ; Dathe 1983, Deméré 1986) までしか遡れず、ナガスクジラ属とナガスクジラ科クラウングループは中新世 / 鮮新世の境界 (約 5Myr B.P.) に起源を持つのではないかと述べている。

IV 結論

本研究ではヒゲクジラ亜目 10 種の mtDNA 全長配列を決定することができた。これらの mtDNA の長さや遺伝子組成と配置などは哺乳類一般で見られるそれと一致していた。さらにこのデータに基づいてヒゲクジラ亜目の主要な 12 種を用いた系統解析と分子時計による分岐年代の推定を行い、ヒゲクジラ類の進化についてこれまでにない様々な知見が得られた。

ヒゲクジラ亜目の共通祖先は漸新世後期（約 28Myr B.P.）に存在していたことが示唆された。化石記録と分子データは最初にセミクジラ科が漸新世 / 中新世の境界あたりで分岐し、このヒゲクジラ亜目リネージの現存種であるセミクジラ類とホッキョククジラを導いたことを示した。セミクジラ科の分岐に続いてコセミクジラを導いたリネージの分岐が起きたことを我々の結果は強く示唆していた。コセミクジラ科で推定された 23Myr B.P. という分岐年代から、コセミクジラの特徴的な形態はこのリネージの独立した長い進化過程で獲得されたものであることが示唆された。しかし、化石標本として報告されたコセミクジラは最古のものでも第四紀までである（0-2Myr B.P.）。分子による推定分岐年代と化石記録の間に見られた矛盾の原因は、コセミクジラ科リネージ化石は発掘されているのだが、それがこのリネージのステムグループであることが認識されていないためか、もしくは未だにコセミクジラの発見されていない化石が存在するためと考えられる。

分子データは残りの現存する属であるコククジラ属、ザトウクジラ属、ナガスクジラ属（リネージ I-IV）が中新世前期末の共通祖先から分岐したことを示唆したが、このクレイド内でリネージ間の系統分岐の順序を明らかにすることはできなかった。形態学的、分子生物学的証拠を考慮すると、コククジラ科（リネージ IV）はナガスクジラ科クレイドの姉妹群にあたると考えられる。コククジラ科はコセミクジラ科と同様に一属一種で構成され、分子系統樹（図 2 - 6）の結果からわかるように分岐後コククジラ科リネージとして独立した長い進化過程をもち、なおかつその形態的特徴と生態は姉妹群と考えられるナガスクジラ科の種とは大きく異なっている。しかし、コククジラの化石記録は更新世後期までしか報告されておらずコセミクジラとまったく同様の矛盾がこの系統の推定分岐年代には生じており、この矛盾にはコセミクジラと同じ原因が考えられる。今後コククジラの化石標本が多く同定され、また、核 DNA を用いた今までに無いアプロー

チの分子系統解析が行われればこのクレイドの進化がより明らかにされるのではないか。

ナガスクジラ科ステムグループの比較的豊富な化石記録から、分子データと古生物学的データは、ナガスクジラ科を導いたリネージが中新世前期末に起源を持つという点で一致した。しかし、ナガスクジラ科クラウングループの分岐時期に関して化石記録と分子データの見解に大きな違いが生じた。我々が推定したリネージ I, II, III での分岐年代は、現在得られている中新世の豊富なヒゲクジラ類化石記録に強い異議を唱えるかたちで、中新世中期におけるナガスクジラ属またはザトウクジラ属化石の出現を示唆するものであった。

分岐年代の問題に加えて、ナガスクジラ属+ザトウクジラ属(リネージ I, II, III)間の系統類縁関係も未だに不明な点を残している。このクレイドにおける系統分類学的研究はこれまで盛んに行われており、そこから考えられる系統樹はほぼすべて提唱されたといえる。我々の示した結果は、従来の比較形態学からは簡単に認知することができなかったミンククジラ(リネージ I)のナガスクジラ属内における独立したリネージを改めて明確に示した。本研究の mtDNA タンパク遺伝子解析はリネージ II(ザトウクジラ、ナガスクジラ)、リネージ III(シロナガスクジラ、ニタリクジラ+イワシクジラ)といったこれまでにない系統類縁関係を示し、さらにこれまでナガスクジラ科内で示唆された系統類縁関係とは違って高い統計的支持(ブートストラップ値)を得ていた。本研究の mtDNA による系統樹はナガスクジラ属の側系統性に加えて、ザトウクジラの形態的特殊性に基づいた 2 亜科の分類が系統進化を反映しない分類であることを強く示唆した。この分類はザトウクジラの生態的、行動的な特徴の進化を反映したものではないか。すなわち、ザトウクジラで見られる形態的特徴は固有派生形質であり、ナガスクジラ亜科の形態が祖先的形質を示していると考えられる。

ナガスクジラ科の推定分岐年代に関して分子系統と古生物学の間で重大な対立が見られたが、そこにはいくつかの説明がなされる。それは分子進化速度がナガスクジラ科リネージで速くなっているかもしれないこと、もしくはナガスクジラ科現存種間で分子進化速度に大きな差が生じているかもしれないことである。我々が推定した分岐年代ではリネージ間での進化速度の変動を考慮した統計的モデルが解析に用いられたため、このようなリネージ間に存在する変異率のバリエーションが分子と化石間の推定分岐年代に対立を生じさせたとは考えられない。

今回我々がヒゲクジラ亜目で推定した分岐年代は遺伝的マーカーに基づくものであり、それに対し化石記録による分岐年代は形態的に特徴を持つ種が生じた時期を示している。ここで我々が注意しなければいけないことは、遺伝子の分岐時期と種を生じる集団の分岐時期が祖先集団の状況によっては必ずしも一致しないことである(図 1 - 2)。もし祖先ナガスクジラ類集団の mtDNA で多型状態が激しかったならば、mtDNA ハプロタイプの分裂(我々がナガスクジラ科で分岐年代として推定した時期)はナガスクジラ科の種を生じさせる集団の分岐より先行して起きたと考えることができる。このような遺伝子系統樹と種系統樹分岐年代の不一致を生じさせる祖先多型の影響は、集団サイズ(N_e)が大きく世代時間が長くなるほどその影響は著しくなる。ヒゲクジラ類は体も大きく、長生きであり、海洋に広範囲に分布するといった特徴が見られる。このように海洋に生息し広い行動範囲を持った動物では、陸上動物と比べて集団が地理的に分断される機会も非常に少なくなるため N_e が非常に大きくなると思われる。祖先多型現象、大きな祖先集団 N_e 、そして長い世代時間といった複合的な要因がナガスクジラ類における分子分岐年代推定に強い影響を与えたのではないか。以上の要素がコククジラ科+ナガスクジラ科クレイドにおける系統解明を難しくさせたと考えられる。しかしながら、mtDNA は母方からしか伝わらない上に、半数性で見なせるので N_e は核ゲノムのたった 4 分の 1 となり、それゆえ mtDNA は正確に各分岐点間の短い枝を評価する能力を十分に持っていると考えられる (Moore 1995)。mtDNA を用いたヒゲクジラ亜目系統解析の最終的な結論ともいえる本研究は、中新世にナガスクジラ科とコククジラ科を導いた 4 リネージの祖先集団が繁栄していた可能性を示唆した。しかし、この我々の仮説に相対するものとして、ナガスクジラ科祖先の化石がより古い時代、つまり我々が推定した約 2,000 万年前の地層から発掘される可能性についても言及しておく必要がある。ナガスクジラ科祖先化石記録更新の可能性に関しては、現在の古生物学者の見解と対立するものであるが、今後のクジラ目における古生物学の発展によってはナガスクジラ科起源に関して新たな知見が示されるかもしれない。少なくとも今回我々は分子系統学、比較形態学、古生物学的知見を結集し、総合的にヒゲクジラ亜目の進化史を評価したところ、ナガスクジラ類祖先集団における遺伝的多型状態の予測にいたった。今後は多くの核遺伝子データに基づいた解析との比較検討がヒゲクジラ類系統関係と進化史の解明に向けて望まれる。

セミクジラ科



© National Science Museum, Tokyo. ホッキョククジラ *Balaena mysticetus*



セミクジラ *Eubalaena glacialis*
© National Science Museum, Tokyo.

コセミクジラ科



コセミクジラ *Caperca marginata*
© National Science Museum, Tokyo.

コククジラ科



© National Science Museum, Tokyo. コククジラ *Eschrichtius robustus*

ナガスクジラ科



© National Science Museum, Tokyo. ミンククジラ *Balaenoptera acutorostrata*



© National Science Museum, Tokyo. イワシクジラ *Balaenoptera borealis*



© National Science Museum, Tokyo. ニタリクジラ *Balaenoptera edeni*



© National Science Museum, Tokyo. シロナガスクジラ *Balaenoptera musculus*



ナガスクジラ *Balaenoptera physalus*

右側 Right side

© National Science Museum, Tokyo.

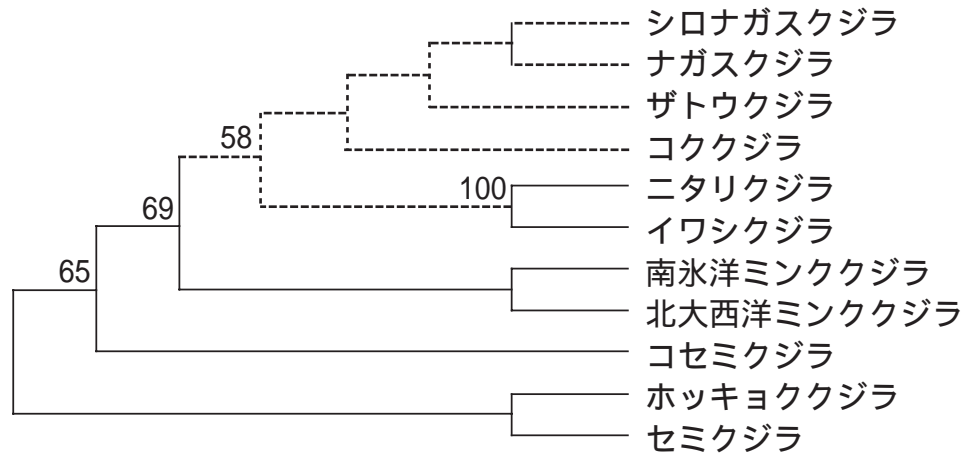
左側 Left side



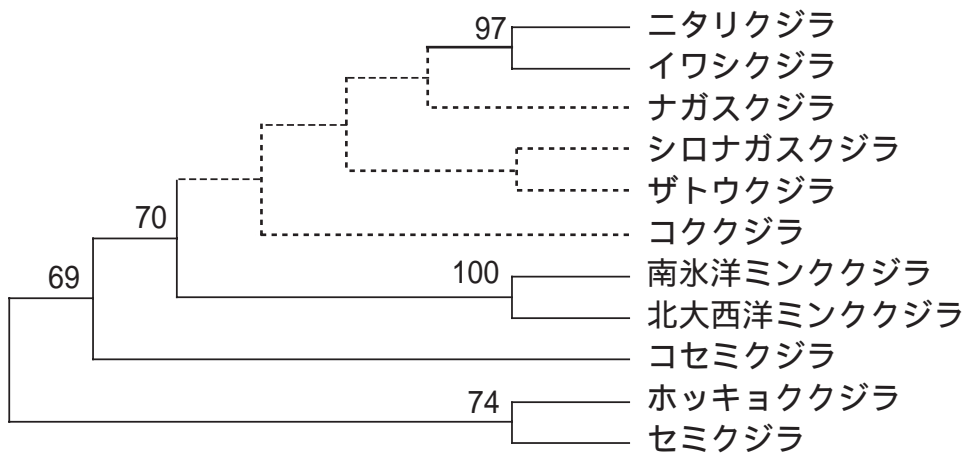
© National Science Museum, Tokyo.

ザトウクジラ *Megaptera novaeangliae*

参考図1. ヒゲクジラ亜目
国立科学博物館海棲哺乳類情報データベースより転載.



A. mtDNA調節領域配列によって推定されたヒゲクジラ亜目の系統関係 (Arnason et al. 1993)



B. mtDNA cytochrome b遺伝子配列に基づくヒゲクジラ亜目の系統関係 (Arnason and Gullberg 1994)

図2 - 1 . 分子データによって推定されたヒゲクジラ亜目の系統関係 . 分岐上の数値はブートストラップ値を示す .

A:セミクジラ

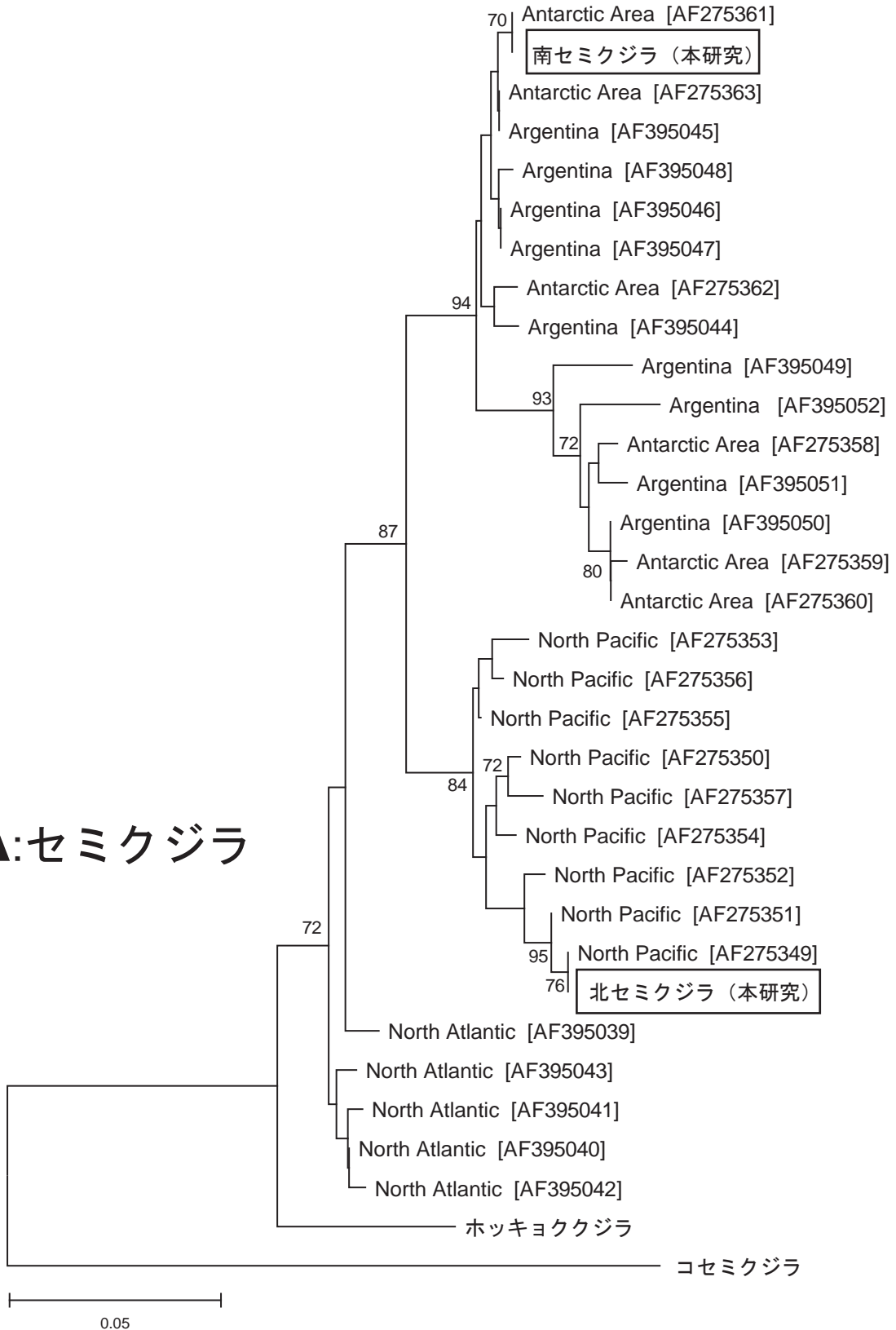
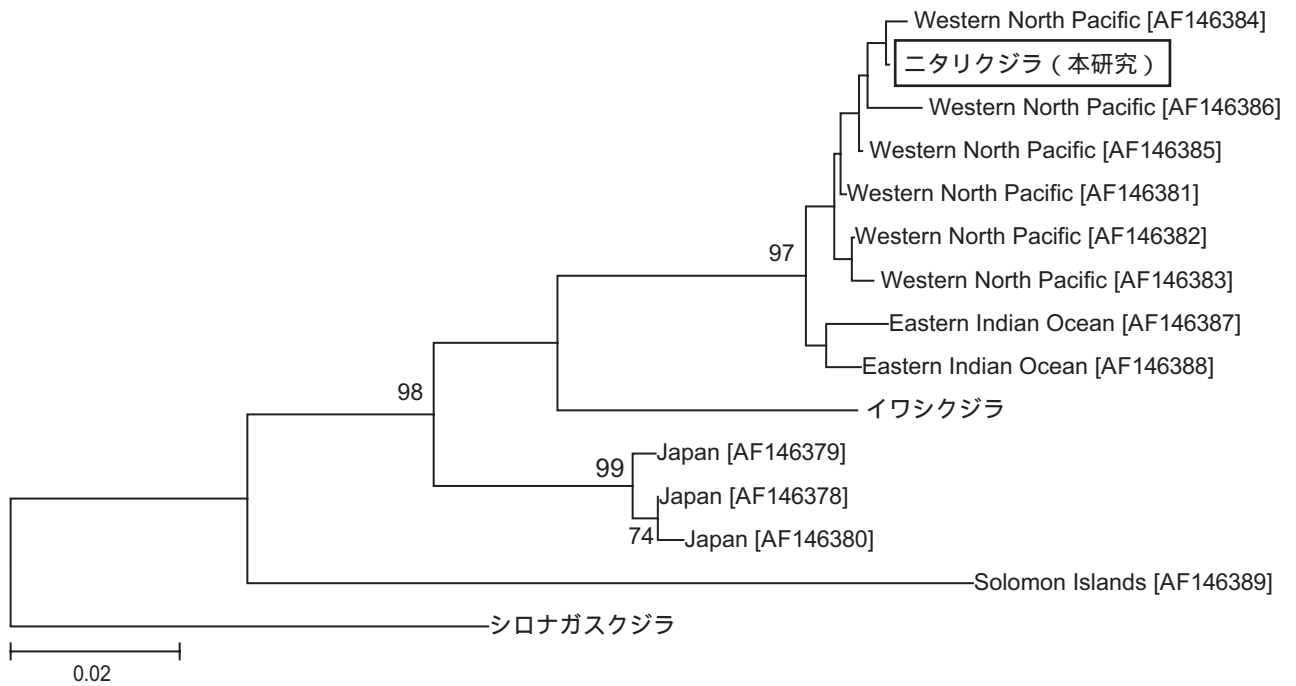


図2-2-1. 本研究で用いた標本の種と地域集団の同定.

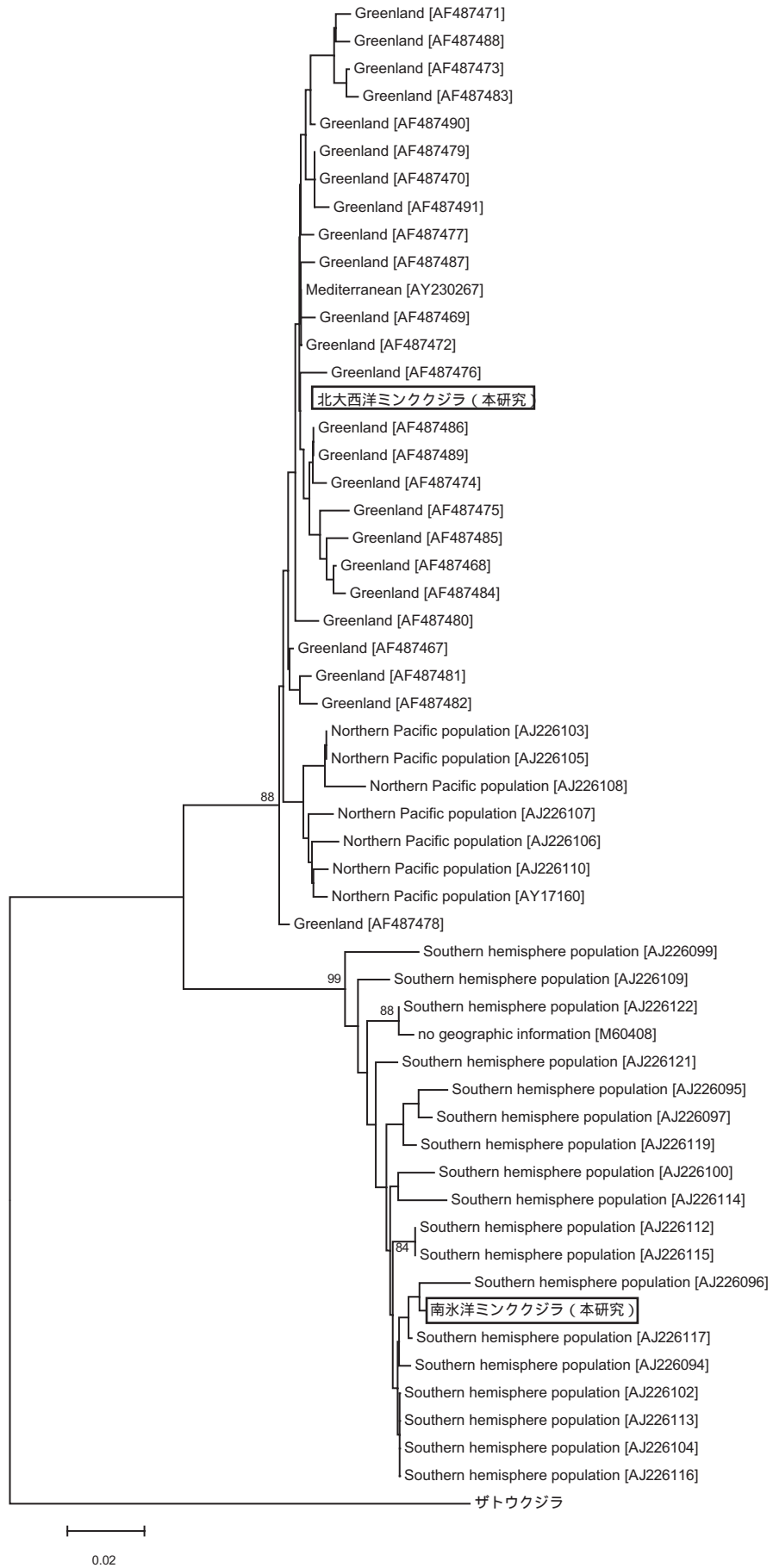
mtDNA調節領域の部分配列に基づいて近隣結合法により系統樹を構築した. 分岐上の数値は70%以上を示した1,000回復元のブートストラップ値. 本研究で用いた標本を四角で括る.

A:セミクジラ2種の系統樹. B:ニタリクジラの系統樹. C:ミンククジラ2種の系統樹. D:ザトウクジラの系統樹. 解析にはmtDNA調節領域配列をセミクジラで274bp, ニタリクジラで355bp, ミンククジラで279bp, ザトウクジラで149bp用いた.



B ニタリクジラ

図2 - 2 - 2 本研究で用いた標本の種と地域集団の同定 .

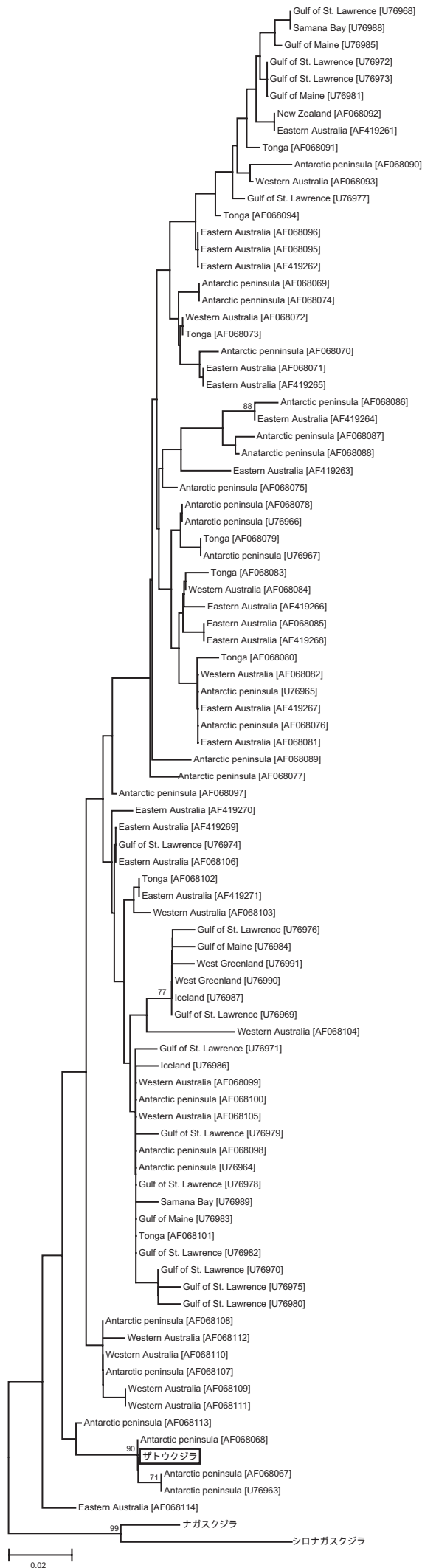


C : ミンククジラ

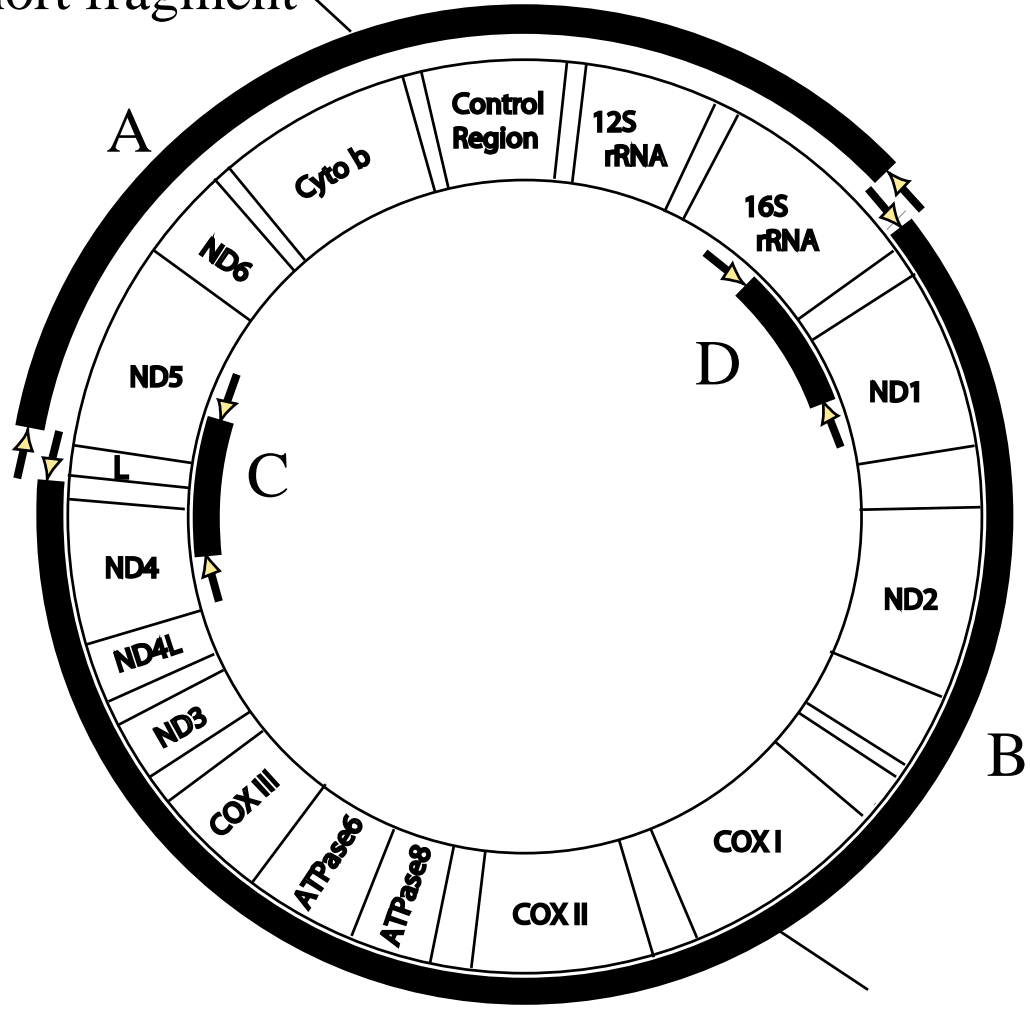
図2 - 2-3 . 本研究で用いた標本の種と地域集団の同定 .

D : ザトウクジラ

図2 - 2-4 . 本研究で用いた標本の種と地域集団の同定 .



Short fragment



Long fragment

図2 - 3 PCR法で増幅したmtDNAゲノムの断片.増幅した領域をA, B, C, Dで示す.

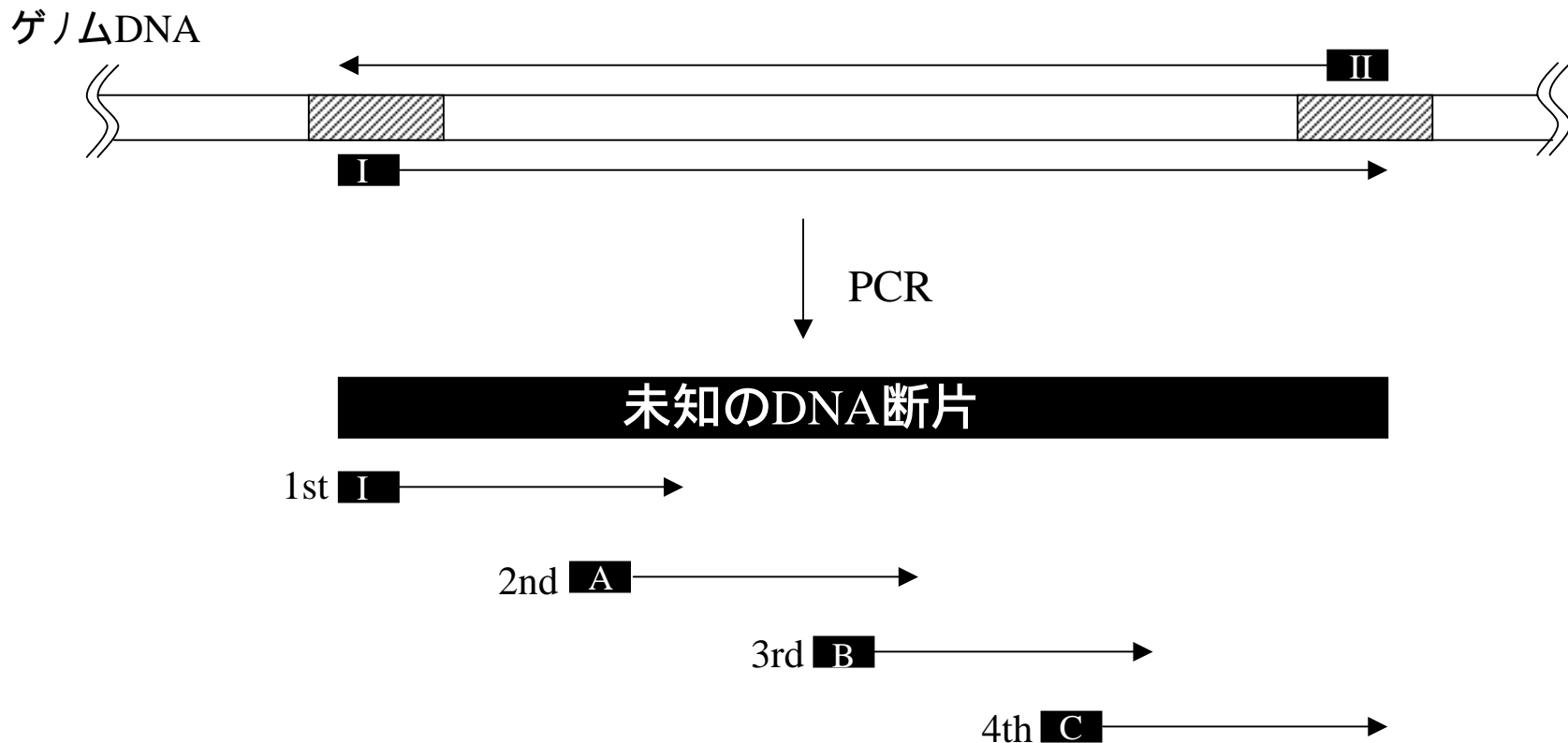


図2 - 4 Primer walking法の模式図.

ゲノムDNAの既知の配列(▨)にデザインした1セットのプライマー(IとII)でPCRを行い、未知の断片を増幅する。最初のシーケンス(1st)はPCRに用いたプライマー(I)で行う。プライマーIでシーケンスした配列をもとに、さらに先へ読み進むプライマー(A)をデザインし、シーケンスを行う(2nd)。未知のDNA断片が読み終わるまでこの作業を繰り返す(3rd, 4th)。

min2F3U

min020

170 H171 180 H181 H182 200 2F 2F2 2F3 2F4 010 H011 H012 020 H021 030

F	12S rRNA	V	16S rRNA	L	ND1	I	QM	ND2	W	A
----------	-----------------	----------	-----------------	----------	------------	----------	-----------	------------	----------	----------

2R4 2R3 2R2 2R

mtUNI01R

Ri062U

min034Umix

miRi036

min041U

Ri060

min062U

Ri080

Ri081

H031

H032

H033

H034

H035

H036

040

H041

060

H061

H062

080

H081

H082

N	C	Y	COX1	S	D	COX2	K	ATPase8	ATPase6	COX3
----------	----------	----------	-------------	----------	----------	-------------	----------	----------------	----------------	-------------

min091Umix

min083U

min084U

Ri091

min102U

110 min111U

min121

H083

H084

090

H091

H092

100

H101

H102

1F

H111

H112

H113

120

H121

H122

H123

G	ND3	R	ND4L	ND4	H	S	L	ND5	ND6
----------	------------	----------	-------------	------------	----------	----------	----------	------------	------------

1R

mtUNI12R

min151U

130

H131

140

H141

H142

150

H151

160

H161

E	Cytochrome <i>b</i>	T	P	Control Region
----------	----------------------------	----------	----------	-----------------------

図2 - 5. プライマーウオーキング法に用いたプライマーとそのアニーリングサイト.プライマー配列は表2 - 2に示す。

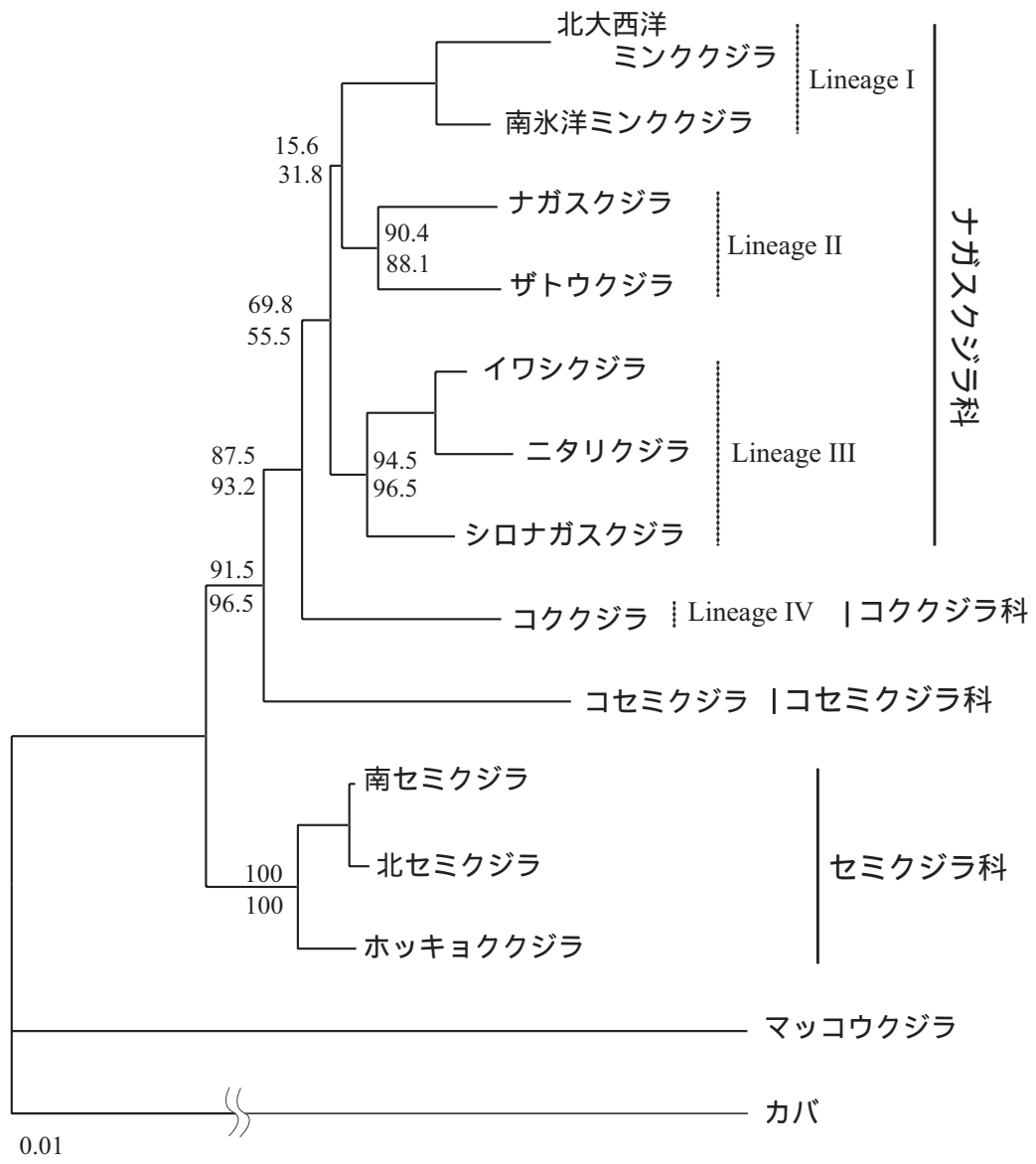


図2 - 6 mtDNA12タンパクコード遺伝子アミノ酸配列に基づいたヒゲクジラ亜目12種の最尤系統樹.分岐上の数値はブートストラップ値を表す(上段; 分布なし, 下段; 分布有り).バーはスケールを示す.

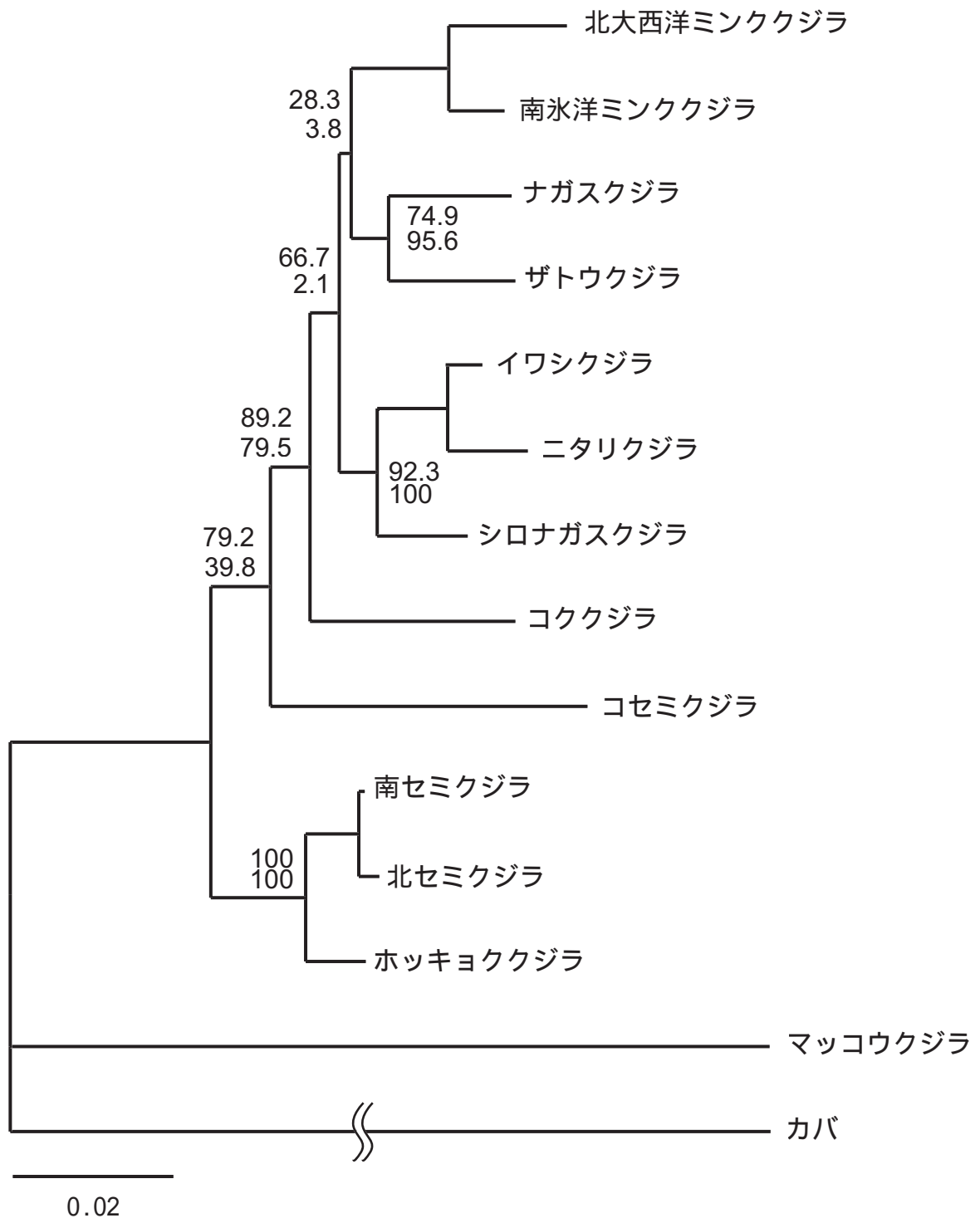


図2 - 7 . mtDNA 12Sと16S rRNAを連結した配列に基づくヒゲクジラ亜目の最尤系統樹 . 分岐上の数値はブートストラップ値を表す (上段 ; 分布なし、下段 ; 分布有り) . バーはスケールを示す .

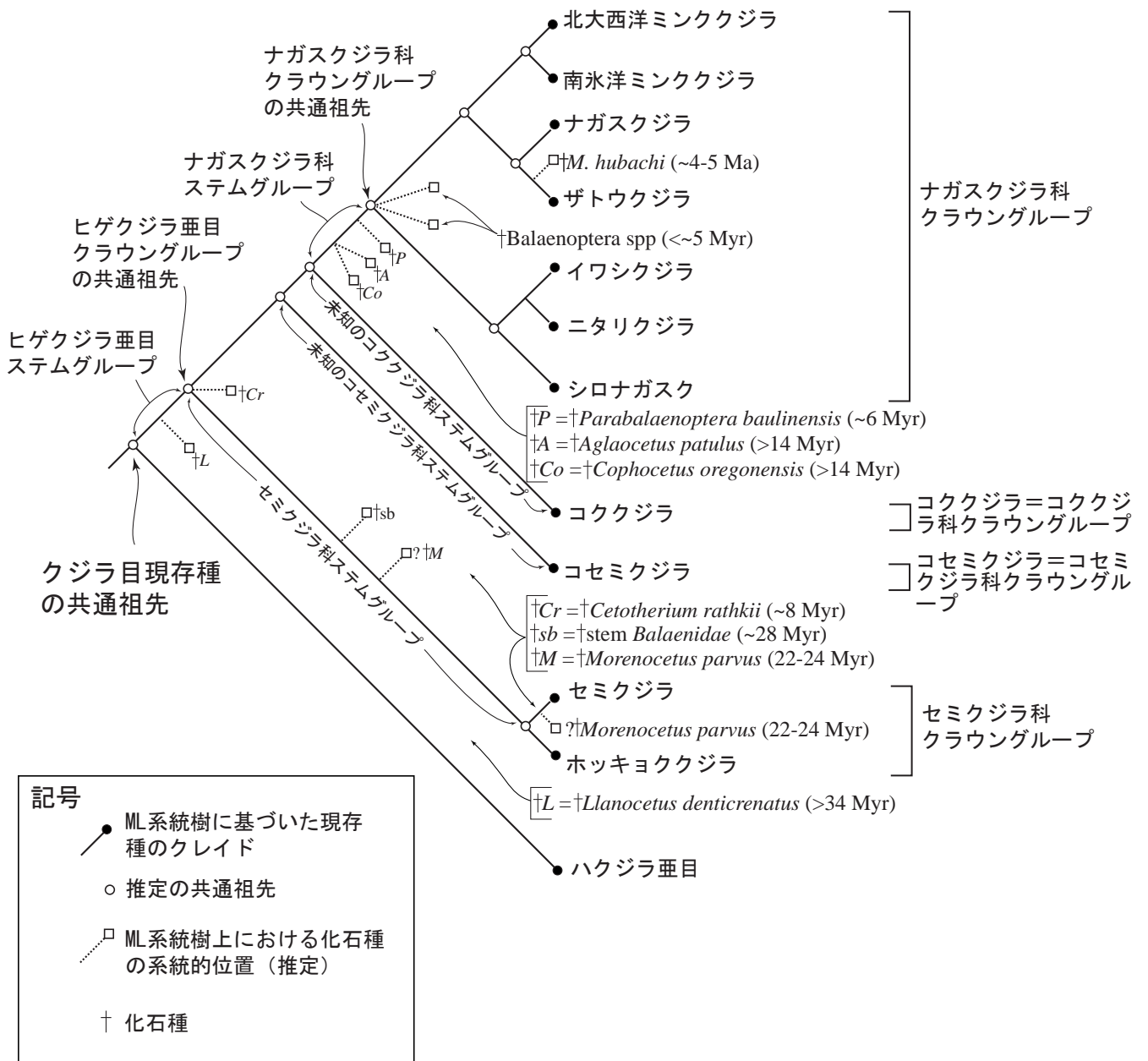


図2-9. ヒゲクジラ亜目の分子系統樹と化石記録の関係図。分子系統樹は図2-5に基づいた。†は化石種を表す。セミクジラ科ステムグループの†Morenocetus parvusは同時に2箇所に示す（本文参照）。

表2 - 1 解析に用いたヒゲクジラ亜目12種

科	亜科	種	和名	採集地	Accession No.
Balaenopteridae ナガスクジラ科	Balaenopterinae ナガスクジラ亜科	<i>Balaenoptera borealis</i>	イワシクジラ	Antarctic ocean	AP006471 (this study)
		<i>Balaenoptera brydei</i>	ニタリクジラ	Northwest Pacific ocean	AP006470 (this study)
		<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	北大西洋ミンククジラ	North Atlantic ocean	AP006468 (this study)
		<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	南氷洋ミンククジラ	Antarctic ocean	AP006466 (this study)
		<i>Balaenoptera physalus</i>	シロナガスクジラ	No geographic information reported	X72204 (Arnason et al. 1993)
		<i>Balaenoptera musculus</i>	ナガスクジラ	No geographic information reported	X61145 (Arnason and Gullberg, 1991)
	Megapterinae ザトウクジラ亜科	<i>Megaptera novaeangliae</i>	ザトウクジラ	Antarctic ocean	AP006467 (this study)
Eschrichtiidae コククジラ科		<i>Eschrichtius robustus</i>	コククジラ	Eastern North Pacific	AP006471 (this study)
Balaenidae セミクジラ科		<i>Balaena mysticetus</i>	ホッキョククジラ	Okhotsk Sea	AP006472 (this study)
		<i>Eubalaena australis</i>	南セミクジラ	Antarctic ocean	AP006473 (this study)
		<i>Eubalaena japonica</i>	北セミクジラ	Bering Sea	AP006474 (this study)
Neobalaenidae コセミクジラ科		<i>Caperea marginata</i>	コセミクジラ	New Zealand	AP006475 (this study)

表2 - 2 - 1 ヒゲクジラ類mtDNA全長配列決定に用いたプライマー

Name	Sequence	Annealing Position
010	AAGCTATCGGGCCCATAC	3896 - 3913
Hum 011	CCACAGAAGCTTCCACTAAA	4102 - 4121
Hum 012	CTTCGAAAAATCATAGCCTA	4470 - 4489
020	CCCAAATGAATAATTATCCAAGA	4731 - 4753
min 020	TGAATGATCATCCAAGAACT	4730 - 4749(AM)
Hum 021	CCCCTCACACCAATACTCTC	4959 - 4978
030	AGACCAAGGGCCTTCAAAGC	5009 - 5028
Hum 031	CTTCAATCTACTTCTCCCGC	5198 - 5217
Hum 032	GGCACACTAATCGGAGATGA	5507 - 5526
Hum 033	GCGTGTCTCAATCCTCGG	5835 - 5853
Hum 034	GGAATAGTCTGAGCCATGGT	6188 - 6207
min034Umix	GGR TTCYTAGGCTTTATCGT	6210 - 6229(AM)
Hum 035	GGCTTTGTCCACTGATTTTC	6548 - 6566
Hum 036	ATTTTCATCTATAGGCTCATTTAT	6731 - 6753
miRi 036	ATCTGAGAAGCATTGCATC	6783 - 6802(AM)
040	AAGAAAGGAAGGAATCGAACC	6922 - 6942
Hum 041	TAGCTCCTTAGTCTCTACATT	7166 - 7187
min 041U	CCCTCCCTCACTGTAAAAAC	7336 - 7355(AM)
060	CAATGCTCAGAAATCTGTGG	7647 - 7666
Ri 060	AAACTTTGAAAAATGATCTACA	7699 - 7720(Ri)
Hum 061	TGACTCCTTACCATCCTATCT	7845 - 7865
Hum 062	CCTAAAGGACAACTTGAGC	8168 - 8187
min 062U	AAACAAAAATATCCTTAGCACA	8336 - 8357
Ri 062U	CACAACTCTCAATAAATGTAGGA A	8252 - 8275

Name	Sequence	Annealing Position
080	GATAACACATAATGACCCACCAAAC	8651 - 8675
Ri 080	TAAACACATAATGACCCACCA	8637 - 8656(Ri)
Hum 081	TCCTATTTTTTCACAGGCTTC	8933 - 8952
Ri 081	AAATCCCCTAGAAGTTCCC	9017 - 9035(Ri)
Hum 082	TTTACAATCTCAGACGGAA	9216 - 9235
Hum 083	CGTATTCATCGCTTTCTGA	9566 - 9584
min 083U	AACAATAAACCTTCTACTAACACT	9508 - 9531(AM)
Hum 084	CACAACTACCAAATGACCTT	9920 - 9939
min 084U	TTCGACCCACTAGACTGTGA	9889 - 9908(AM)
090	GTACAAAGCCTCAACCTCCTCCAATGCT AA	10199 - 10228
Hum 091	ACCAATCCGAAAAAACTCT	10485 - 10504
min091Umix	AATCCTMTTTTACATYATATTTGAA	10562 - 10586
Ri 091	CACCGAACTAATTCTATTCTACA	10541 - 10563(Ri)
Hum 092	CCTGCATGATAGCTTTCTTA	10814 - 10833
100	TGCAGCCGTA C TACTAAA A C T T G G	10914 - 10937
Hum 101	CTCAGTCAGCCACATAGCAC	11088 - 11107
Hum 102	AATCACTGCTCTCTACACTCTAT	11424 - 11446
min 102U	CTAATCATAACACAACGTGGC	11448 - 11468(AM)
110	TGGTGCAACTCCAAATAAAAAGTA	11778 - 11800
Hum 111	CCCTTACATCAACCAATTTTT	12133 - 12153
min 111U	ATGATATATGCACTCCGACC	12113 - 12132(AM)
Hum 112	ATCAGCCCAATTCGGACT	12469 - 12486
Hum 113	CATCATCCATAACCTAAACAA	12835 - 12855
120	ACCAACGCCTGAGCCCT	13010 - 13026

表2 - 2 - 2 ヒゲクジラ類mtDNA全長配列決定に用いたプライマー

Name	Sequence	Annealing Position
Hum 121	CGAAATTAACCTTAACACACAAA	13306 - 13328
min 121	AAATTCTCCACCCTACTAGG	13359 - 13378(AM)
Hum 122	GACCAACCCGTAACAATCAC	13654 - 13673
Hum 123	ATTCSCCCCAAATAAAATC	13942 - 13959
130	TGACATGAAAAATCATCGTTG	14163 - 14183
Hum 131	CTACGCCTTCCGAGAAACAT	14523 - 14542
140	ACGAAACAGGATCCAACAACCC	14807 - 14828
Hum 141	AAACTAGGCGGAGTCTTAGC	15064 - 15083
Hum 142	TCCATCCTCTACTTCCTCTTA	15268 - 15288
150	CATCAGCACCCAAAGCTGA	15442 - 15460
Hum 151	GGTCCATCTAAATCAAATGATC	15748 - 15769
min 151	CCATTAGATCACGAGCTTA	15803 - 15821(AM)
160	CCCCTTAAATAAGACATCTCGATGG	15953 - 15977
Hum 161	CCCTTGCTTAGATATTCACC	16264 - 16284
170	AAAGCAAGACACTGAAAATG	24 - 43
Hum 171	AACATTAGCAGCTCACAAACG	196 - 215
180	GGGATTAGATACCCCACTAT	499 - 518
Hum 181	GGGAAGAAATGGGCTACAT	779 - 797
Hum 182	TAAGCATACCGGAAGGTGTG	1017 - 1036
200	AACAGCGCAATCCTATTC	2406 - 2423

Name	Sequence	Annealing Position
2F	AGTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGGA G	2522 - 2551
2F2	CAAACATCGTAGGCCACAT	2892 - 2911
2F3	ACTCCTAATAAAATGGCTCCT	3241 - 3260
min2F3U	TATCAACACTAGCCACAACA	3260 - 3279(AM)
2F4	GAATCGTACACAACAAACCT	3539 - 3558
2R	CTCCGGTCTGAACTCAGATCACGTAGGAC T	2551 ~ 2522
2R2	AATAGGATTGCGCTGTTATC	2422 ~ 2403
2R3	GAGGTCAATTTCACTGATTAA	2156 ~ 2136
2R4	TGGGTTTTATTTATTTGCTG	1864 ~ 1845
mtUNI12R	AGGGCTCAGGCGTTGGT	13024 ~ 13008
mtUNI01R	GTATGGGCCCGATAGCTT	3906 ~ 3889
1F	GGTCTTAGGAACCAAAAAAATTGGTGAAC TC	11758 - 11788
1R	GAGTTGCACCAATTTTTGGTTCCTAAGAC C	11788 ~ 11758

Note; F = forward primer, R = reverse primer, プライマーアニーリングポジションはAM(南氷洋ミンククジラ)とRi(南セミクジラ)以外はザトウクジラのmtDNAゲノムサイトで示した。

表2 - 3-1. ヒゲクジラ亜目10種mtDNAゲノムの構成

Gene	ザトウクジラ					ニタリクジラ					イワシクジラ				
	Length: 16398bp					Length: 16408bp					Length: 16410bp				
	Position		Size	Codon		Position		Size	Codon		Position		Size	Codon	
From	To	Start		Stop	From	To	Start		Stop	From	To	Start		Stop	
tRNA ^{Phe}	1	73	73			1	73	73			1	73	73		
12S rRNA	75	1047	973			75	1050	976			75	1050	976		
tRNA ^{Val}	1048	1114	67			1051	1117	67			1051	1117	67		
16S rRNA	1115	2705	1591			1118	2695	1578			1118	2696	1579		
tRNA ^{Leu} (UUR)	2706	2780	75			2696	2770	75			2697	2771	75		
ND1	2783	3739	957	ATG	TAA	2773	3729	957	ATG	TAA	2774	3730	957	ATG	TAA
tRNA ^{Ile}	3739	3807	69			3729	3798	70			3730	3799	70		
tRNA ^{Gln} (L)	3805	3877	73			3796	3868	73			3797	3869	73		
tRNA ^{Met}	3879	3947	69			3870	3938	69			3871	3939	69		
ND2	3948	4991	1044	ATA	TAG	3939	4982	1044	ATA	TAG	3940	4983	1044	ATA	TAG
tRNA ^{Trp}	4990	5058	69			4981	5049	69			4982	5050	69		
tRNA ^{Ala} (L)	5064	5132	69			5055	5123	69			5056	5124	69		
tRNA ^{Asn} (L)	5134	5207	74			5125	5199	75			5126	5200	75		
Or.L-strand repl.	5207	5243	35			5199	5235	37			5200	5236	37		
tRNA ^{Cys} (L)	5240	5307	68			5232	5299	68			5233	5300	68		
tRNA ^{Tyr} (L)	5308	5373	66			5300	5365	66			5301	5366	66		
CO I	5375	6925	1551	ATG	AGA	5367	6917	1551	ATG	AGA	5368	6918	1551	ATG	AGA
tRNA ^{Ser} (UCN)(L)	6921	6991	71			6913	6983	71			6914	6984	71		
tRNA ^{Asp}	6997	7064	68			6989	7056	68			6990	7057	68		
CO II	7065	7748	684	ATG	TAA	7057	7740	684	ATG	TAA	7058	7741	684	ATG	TAA
tRNA ^{Lys}	7752	7819	68			7744	7811	68			7745	7812	68		
ATPase8	7821	8012	192	ATG	TAA	7813	8004	192	ATG	TAA	7814	8005	192	ATG	TAA
ATPase6	7982	8662	681	ATG	TAA	7974	8654	681	ATG	TAA	7975	8655	681	ATG	TAA
CO III	8662	9447	786	ATG	TAG	8654	9439	786	ATG	TAG	8655	9440	786	ATG	TAG
tRNA ^{Gly}	9447	9515	69			9439	9507	69			9440	9508	69		
ND3	9516	9862	347	ATA	TA -	9508	9854	347	ATA	TA -	9509	9855	347	ATA	TA -
tRNA ^{Arg}	9863	9931	69			9855	9923	69			9856	9924	69		
ND4L	9932	10228	297	ATG	TAA	9924	10220	297	GTG	TAA	9925	10221	297	GTG	TAA
ND4	10222	11599	1378	ATG	T - -	10214	11591	1378	ATG	T - -	10215	11592	1378	ATG	T - -
tRNA ^{His}	11600	11668	69			11592	11660	69			11593	11661	69		
tRNA ^{Ser} (AGY)	11669	11729	61			11661	11721	61			11662	11722	61		
tRNA ^{Leu} (CUN)	11731	11800	70			11723	11792	70			11724	11793	70		
ND5	11801	13621	1821	ATA	TAA	11793	13613	1821	ATA	TAA	11794	13614	1821	ATA	TAA
ND6 (L)	13605	14132	528	ATG	TAA	13597	14124	528	ATG	TAA	13598	14125	528	ATG	TAA
tRNA ^{Glu} (L)	14133	14201	69			14125	14193	69			14126	14194	69		
Cytchrome b	14206	15345	1140	ATG	AGA	14198	15337	1140	ATG	AGA	14199	15338	1140	ATG	AGA
tRNA ^{Thr}	15346	15417	72			15338	15409	72			15339	15410	72		
tRNA ^{Pro} (L)	15417	15483	67			15409	15475	67			15410	15476	67		
Control region	15484	16398	915			15476	16408	933			15477	16410	934		

The genes of all species consisted of 13 protein-coding genes, 2 rRNAs and 22 tRNAs. The numbering of nucleotides starts at the beginning of the gene for tRNA^{Phe} and ended in the control region. Anticodons for the two tRNA^{Leu} and tRNA^{Ser} are given in parentheses.(L) denotes the light-strand sense.

表2 - 3-2. ヒゲクジラ亜目10種mtDNAゲノムの構成

Gene	北大西洋ミンククジラ Length: 16416bp					南氷洋ミンククジラ Length: 16421bp					コククジラ Length: 16413bp				
	Position		Size	Codon		Position		Size	Codon		Position		Size	Codon	
	From	To		Start	Stop	From	To		Start	Stop	From	To		Start	Stop
tRNA ^{Phe}	1	74	74			1	73	73			1	74	74		
12S rRNA	77	1054	978			76	1054	979			78	1054	977		
tRNA ^{Val}	1055	1121	67			1055	1121	67			1055	1121	67		
16S rRNA	1222	2698	1577			1122	2698	1577			1122	2702	1581		
tRNA ^{Leu} (UUR)	2699	2773	75			2699	2773	75			2703	2777	75		
ND1	2776	3732	957	ATG	TAA	2776	3732	957	ATG	TAA	2780	3736	957	ATG	TAA
tRNA ^{Ile}	3732	3801	70			3732	3800	69			3736	3805	70		
tRNA ^{Gln} (L)	3799	3871	73			3798	3870	73			3803	3875	73		
tRNA ^{Met}	3873	3941	69			3872	3940	69			3877	3945	69		
ND2	3942	4985	1044	ATA	TAG	3941	4984	1044	ATA	TAG	3946	4989	1044	ATT	TAG
tRNA ^{Trp}	4984	5054	71			4983	5053	71			4988	5055	68		
tRNA ^{Ala} (L)	5060	5128	69			5059	5127	69			5061	5129	69		
tRNA ^{Asn} (L)	5130	5203	74			5129	5202	74			5131	5204	74		
Or.L-strand repl.	5203	5239	37			5202	5238	37			5204	5240	37		
tRNA ^{Cys} (L)	5236	5303	68			5235	5302	68			5237	5304	68		
tRNA ^{Tyr} (L)	5304	5369	66			5303	5368	66			5305	5370	66		
CO I	5371	6921	1551	ATG	AGA	5370	6920	1551	ATG	AGA	5372	6922	1551	ATG	AGA
tRNA ^{Ser} (UCN)(L)	6917	6987	71			6916	6986	71			6918	6988	71		
tRNA ^{Asp}	6993	7060	68			6992	7059	68			6994	7061	68		
CO II	7061	7744	684	ATG	TAA	7060	7743	684	ATG	TAA	7062	7745	684	ATG	TAA
tRNA ^{Lys}	7748	7815	68			7747	7815	69			7749	7815	67		
ATPase8	7817	8008	192	ATG	TAA	7817	8008	192	ATG	TAA	7817	8008	192	ATG	TAA
ATPase6	7978	8658	681	ATG	TAA	7978	8658	681	ATG	TAA	7978	8658	681	ATG	TAA
CO III	8658	9443	786	ATG	TAG	8658	9443	786	ATG	TAG	8658	9443	786	ATG	TAG
tRNA ^{Gly}	9443	9511	69			9443	9511	69			9443	9511	69		
ND3	9512	9858	347	ATA	TA -	9512	9858	347	ATA	TA -	9512	9858	347	ATA	TA -
tRNA ^{Arg}	9859	9927	69			9859	9927	69			9859	9927	69		
ND4L	9928	10224	297	GTG	TAA	9928	10224	297	GTG	TAA	9928	10224	297	GTG	TAA
ND4	10218	11595	1378	ATG	T - -	10218	11595	1378	ATG	T - -	10218	11595	1378	ATG	T - -
tRNA ^{His}	11596	11665	70			11596	11665	70			11596	11664	69		
tRNA ^{Ser} (AGY)	11666	11726	61			11666	11726	61			11665	11725	61		
tRNA ^{Leu} (CUN)	11728	11797	70			11728	11798	71			11727	11796	70		
ND5	11798	13618	1821	ATA	TAA	11799	13619	1821	ATA	TAA	11797	13617	1821	ATA	TAA
ND6 (L)	13602	14129	528	ATG	TAA	13603	14130	528	ATG	TAA	13601	14128	528	ATG	TAA
tRNA ^{Glu} (L)	14130	14198	69			14131	14199	69			14129	14197	69		
Cytchrome b	14203	15342	1140	ATG	AGA	14204	15343	1140	ATG	AGA	14202	15341	1140	ATG	AGA
tRNA ^{Thr}	15343	15415	73			15344	15416	73			15342	15413	72		
tRNA ^{Pro} (L)	15415	15481	67			15416	15482	67			15413	15479	67		
Control region	15482	16416	935			15483	16421	939			15480	16413	934		

表2 - 3-3. ヒゲクジラ亜目10種mtDNAゲノムの構成

Gene	ホッキョククジラ					南セミンクジラ					北セミンクジラ				
	Length: 16389bp					Length: 16385bp					Length: 16386bp				
	Position		Size	Codon		Position		Size	Codon		Position		Size	Codon	
From	To	Start		Stop	From	To	Start		Stop	From	To	Start		Stop	
tRNA ^{Phe}	1	73	73			1	73	73			1	73	73		
12S rRNA	75	1048	974			75	1047	973			75	1047	973		
tRNA ^{Val}	1049	1115	67			1048	1114	67			1048	1114	67		
16S rRNA	1116	2689	1574			1115	2688	1574			1115	2690	1576		
tRNA ^{Leu} (UUR)	2690	2764	75			2689	2763	75			2691	2765	75		
ND1	2767	3723	957	ATG	TAA	2766	3722	957	ATG	TAA	2768	3724	957	ATG	TAA
tRNA ^{Ile}	3723	3791	69			3722	3790	69			3724	3792	69		
tRNA ^{Gln} (L)	3789	3861	73			3788	3860	73			3790	3862	73		
tRNA ^{Met}	3863	3931	69			3862	3930	69			3864	3932	69		
ND2	3923	4975	1044	ATA	TAG	3931	4974	1044	ATA	TAG	3933	4976	1044	ATA	TAG
tRNA ^{Trp}	4974	5042	69			4973	5041	69			4975	5043	69		
tRNA ^{Ala} (L)	5054	5122	69			5047	5115	69			5049	5117	69		
tRNA ^{Asn} (L)	5124	5197	74			5117	5190	74			5119	5192	74		
Or.L-strand repl.	5197	5233	37			5190	5226	37			5192	5228	37		
tRNA ^{Cys} (L)	5230	5297	68			5223	5290	68			5225	5292	68		
tRNA ^{Tyr} (L)	5298	5363	66			5291	5357	67			5293	5359	67		
CO I	5365	6915	1551	ATG	AGA	5359	6909	1551	ATG	AGA	5361	6911	1551	ATG	AGA
tRNA ^{Ser} (UCN)(L)	6911	6981	71			6905	6975	71			6907	6977	71		
tRNA ^{Asp}	6987	7054	68			6981	7048	68			6983	7050	68		
CO II	7055	7738	684	ATG	TAA	7049	7732	684	ATG	TAA	7051	7734	684	ATG	TAA
tRNA ^{Lys}	7742	7808	67			7736	7803	68			7738	7804	67		
ATPase8	7810	8001	192	ATG	TAG	7805	7996	192	ATG	TAA	7806	7997	192	ATG	TAG
ATPase6	7971	8651	681	ATG	TAA	7966	8646	681	ATG	TAA	7967	8648	681	ATG	TAA
CO III	8651	9436	786	ATG	TAG	8646	9431	786	ATG	TAG	8647	9432	786	ATG	TAG
tRNA ^{Gly}	9436	9504	69			9431	9499	69			9432	9500	69		
ND3	9505	9851	347	ATA	TA -	9500	9846	347	ATA	TA -	9501	9847	347	ATA	TA -
tRNA ^{Arg}	9852	9920	69			9847	9915	69			9848	9916	69		
ND4L	9921	10217	297	GTG	TAA	9916	10212	297	GTG	TAA	9917	10213	297	GTG	TAA
ND4	10211	11588	1378	ATG	T - -	10206	11583	1378	ATG	T - -	10207	11584	1378	ATG	T - -
tRNA ^{His}	11589	11657	69			11584	11651	68			11585	11653	69		
tRNA ^{Ser} (AGY)	11658	11718	61			11652	11712	61			11654	11714	61		
tRNA ^{Leu} (CUN)	11720	11789	70			11714	11783	70			11716	11785	70		
ND5	11790	13611	1821	ATA	TAA	11784	13604	1821	ATA	TAA	11786	13606	1821	ATA	TAA
ND6 (L)	13594	14121	528	ATG	TAA	13588	14115	528	ATG	TAA	13590	14117	528	ATG	TAA
tRNA ^{Glu} (L)	14122	14190	69			14116	14184	69			14118	14186	69		
Cytchrome b	14195	15334	1140	ATG	AGA	14189	15328	1140	ATG	AGA	14191	15330	1140	ATG	AGA
tRNA ^{Thr}	15335	15406	72			15329	15400	72			15331	15402	72		
tRNA ^{Pro} (L)	15406	15473	68			15400	15466	67			15402	15468	67		
Control region	15474	16389	916			15467	16385	919			15469	16386	918		

表2 - 3-4 . ヒゲクジラ亜目10種mtDNAゲノムの構成

コセミクジラ					
Length: 16384bp					
Gene	Position		Size	Codon	
	From	To		Start	Stop
tRNA ^{Phe}	1	73	73		
12S rRNA	76	1049	974		
tRNA ^{Val}	1050	1116	67		
16S rRNA	1117	2692	1576		
tRNA ^{Leu} (UUR)	2693	2767	75		
ND1	2770	3726	957	ATG	TAA
tRNA ^{Ile}	3726	3794	69		
tRNA ^{Gln} (L)	3792	3864	73		
tRNA ^{Met}	3866	3934	69		
ND2	3935	4978	1044	ATA	TAG
tRNA ^{Trp}	4977	5044	68		
tRNA ^{Ala} (L)	5050	5117	68		
tRNA ^{Asn} (L)	5119	5192	74		
Or.L-strand repl.	5192	5228	37		
tRNA ^{Cys} (L)	5225	5292	68		
tRNA ^{Tyr} (L)	5293	5358	66		
CO I	5360	6910	1551	ATG	AGA
tRNA ^{Ser} (UCN)(L)	6906	6976	71		
tRNA ^{Asp}	6982	7049	68		
CO II	7050	7733	684	ATG	TAA
tRNA ^{Lys}	7737	7804	68		
ATPase8	7806	7997	192	ATG	TAA
ATPase6	7967	8647	681	ATG	TAA
CO III	8647	9432	786	ATG	TAG
tRNA ^{Gly}	9432	9500	69		
ND3	9501	9847	347	ATA	TA -
tRNA ^{Arg}	9848	9916	69		
ND4L	9917	10213	297	GTG	TAA
ND4	10207	11584	1378	ATG	T - -
tRNA ^{His}	11585	11653	69		
tRNA ^{Ser} (AGY)	11654	11714	61		
tRNA ^{Leu} (CUN)	11716	11785	70		
ND5	11786	13606	1821	ATA	TAA
ND6 (L)	13590	14117	528	ATG	TAA
tRNA ^{Glu} (L)	14118	14186	69		
Cytchrome b	14191	15330	1140	ATG	AGA
tRNA ^{Thr}	15331	15402	72		
tRNA ^{Pro} (L)	15402	15468	67		
Control region	15469	16384	916		

第 3 章 SINE 法による潜顎亜目（カメ目）の系統類縁関係の推定

I. 序論

1. カメ目の系統分類

1 - 1 . 高次分類群の分類体系

カメ類は三畳紀に出現し、プロガノケリス (*Proganochelys* Baur, 1887) がもっとも古い化石とされている。現生種は約 300 種存在し、それらは潜顎亜目 (Cryptodira) と曲顎亜目 (Pleurodira) に大きく二分される (表 3 - 1)。潜顎亜目のカメ類は顎を垂直方向に折りたたんで、甲の中へ引っ込めることができるのがその名の由来であるが、実際はスッポン上科とリクガメ上科に属する種でしかこの特徴は現されない。曲顎亜目と潜顎亜目を分ける形態的特徴は、顎の筋肉の走行とそれに関連する頭骨の形状にある。図 3 - 1 に示すように顎を閉じる筋肉である下顎内転筋がカメ類では後方に突き出した上後頭骨に付着している。顎を上を持ち上げるため、後方に伸びた筋肉は途中で向きを変える必要があり、この筋肉の下面の靭帯が半月状軟骨となって、これが滑車の役割を果たして筋肉の向きを変えている。潜顎亜目と曲顎亜目では、この向きを変える位置が異なっている (足田 1988, 2003)。本研究が対象とした潜顎亜目の種は上述のような強固な共有派生形質によって一つのグループとしてまとめられ、さらに内部・外部形態の特徴からスッポン上科 (Trionychoidea)、カミツキガメ上科 (Chelydroidea)、ウミガメ上科 (Chelonioidea)、リクガメ上科 (Testudinoidea) の 4 上科に分類されている (Mlynarski 1969, Gaffney and Meylan 1988, Ernst, Altenburg and Barbour 2000)。

1 - 2 . リクガメ上科系統分類の変遷

現在のリクガメ上科は、かつて科のランクに分類されていた時代があり、その中に 2 亜科、つまり陸生のリクガメ亜科 (現在のリクガメ科) と半水生のヌマガメ亜科 (現在のヌマガメ科とバタゲールガメ科) が分類されていた。McDowell (1964) はヌマガメ亜科に含まれる種の頭骨

形態の比較を行ったところ、翼状骨と底後頭骨が分離したヌマガメ類共通に見られる特徴とそれらの骨が接したバタゲールガメ類共通に見られる特徴の明確な違いを見出し（図 3 - 2; A と B）、さらに上尾骨板と尾骨板の類似性からバタゲールガメ類が同亜科内のヌマガメ類よりも別亜科のリクガメ亜科により近縁であることを示唆した。しかし、その後潜頸亜目において網羅的な核型分析が行われ、リクガメ亜科と姉妹群関係にあるヌマガメ亜科（ヌマガメ類とバタゲールガメ類を含む）の単系統性が改めて示唆された（Bickham and John 1983）。また、リクガメ科（現在のリクガメ上科）の形態比較による系統解析では、McDowell（1964）の示唆したバタゲールガメ類とリクガメ亜科の近縁性が支持され、さらにリクガメ亜科はバタゲールガメ類の内部系統から生じた可能性、即ちバタゲールガメ類が単系統ではない可能性が示唆された（図 3 - 3; リクガメ科の系統的位罫, Hirayama 1984）。そして最近になってリクガメ科はリクガメ上科とされ、その中に独立した 3 科、すなわちリクガメ科（Testudinidae）、ヌマガメ科（Emydidae）、バタゲールガメ科（Bataguridae）が認められるようになった（Gaffney and Meylan 1988）。しかし、その後も Hiramaya（1984）が示したバタゲールガメ科の側系統性については異論があり、バタゲールガメ科の単系統性を示唆する共有派生形質が形態比較（i.e. 腰帯にある腸骨の前方外側に張り出す刃部の特徴など）から示され（Yasukawa, Hirayama and Hikida 2001）、さらに分子系統学（McCord et al. 2000, Honda et al. 2002）による解析においてもバタゲールガメ科の側系統性は否定され、単系統であることが示唆されている（図 3 - 4）。現在バタゲールガメ科は独立した科として広く受け入れられているが、リクガメ上科の 3 科の系統関係については議論の余地が残されており、形態と分子の両側面からの研究が盛んに行われている。

1 - 3 . バタゲールガメ科系統分類の変遷

バタゲールガメ科は 25 属およそ 60 種存在することが知られており、カメ目全体を通して最大の科である（Ernst, Altenburg and Barbour 2000, Yasukawa, Hirayama and Hikida 2001, Dalton 2003）。本科に属する種は南ヨーロッパ、北アフリカ、熱帯気候のアジア、中央アメリカ、北南アメリカと広い分布域を示す。バタゲールガメ科の種間の系統関係に関する研究は、形態学的（McDowell 1964, Bramble 1974, Hirayama 1984, Gaffney and Meylan 1988, Yasukawa,

Hirayama and Hikida 2001)にも分子系統学的(Sites et al. 1984, Wu, Zhou and Yang 1999, McCord et al. 2000, Honda et al. 2002)にも盛んに行われてきた。McDowell (1964)は主に頭骨の形質に基づきバタゲールガメ科で4つの形態的グループを定義した; 1) ”カンムリガメ属コンプレックス; *Hardella complex*” (カンムリガメ属, モレニアガメ属, ハミルトンガメ属)、2) ”バタゲールガメ属コンプレックス; *Batagur complex*” (バタゲールガメ属, カラゲールガメ属, クサガメ属, ヒジリガメ属, セタカガメ属, ニシクイガメ属, ハナガメ属)、3) ”カワガメ属コンプレックス; *Orlitia complex*” (カワガメ属, ホオジロクロガメ属)、4) ”オナガヤマガメ属コンプレックス *Geoemyda complex*” (ハコガメ属, マルガメ属, オナガヤマガメ属, アジヤヤマガメ属, イシガメ属, クロハラヤマガメ属, ムツイタガメ属, ヒラセガメ属, ヨツメガメ属, アメリカヤマガメ属) (図 3 - 3)。また、Bramble (1974)は、腹甲の可動メカニズムと骨格形態に基づき”オナガヤマガメ属コンプレックス”からさらに”アジヤヤマガメ属コンプレックス; *Heosemys complex*”(アジヤヤマガメ属, ハコガメ属, マルガメ属, ヒラセガメ属)を分離し、5 コンプレックスとした。Hirayama (1984)は、分岐分類学的立場からバタゲールガメ類の頭骨形態で共有派生形質と共有原始形質を分類し系統解析を行った。そこで得られた結果から二次口蓋(図 3 - 5; 前顎骨・上顎骨・鋤骨・口蓋骨・方形骨・上翼状骨・翼状骨など)の発達したグループ(図 3 - 3; バタゲールガメ亜科)と二次口蓋の発達していない原始的形質を維持したグループ(図 3 - 3; ヤマガメ亜科)の2つのグループを見出した。さらに彼は McDowell (1964)の”カンムリガメ属コンプレックス”と Bramble (1974)の”アジヤヤマガメ属コンプレックス”が系統を反映しない分類であることを示唆した(図 3 - 3)。Gaffney and Meylan (1988)は、Hirayama(1984)によって構築されたバタゲールガメ類の系統関係に基づいてバタゲールガメ科を2亜科とする分類を提唱し、”カンムリガメ属・バタゲールガメ属・カワガメ属コンプレックス”から成るバタゲールガメ亜科(*Batagurinae*)と”オナガヤマガメ属コンプレックス”から成るヤマガメ亜科(*Geoemydinae*)とした(図 3 - 3)。しかし近年の分子系統解析はバタゲールガメ亜科に属するいくつかの属がむしろヤマガメ亜科の種に近縁であることを示唆している(McCord et al. 2000, Honda, Yasukawa and Ota 2002, 図 3 - 4; Honda et al. 2002)。ミトコンドリア DNA 12S rRNA と 16S rRNA 遺伝子の部分配列に基づいた解析では、クサガメ属(バタゲールガメ属コンプレックス)とイシガメ属(オナガヤマガ

メ属コンプレックス)の近縁な関係が示唆されている (Honda, Yasukawa and Ota 2002, 図 3 - 4 ; Honda et al. 2002)。このようにパタグールガメ科内の系統類縁関係は形態と分子によって詳細な系統解析が行われているにもかかわらず現在もなお議論の余地を数多く残している。

2. SINE 法による系統解析

2 - 1 SINE とは

SINE (short interspersed element) は、レトロポゾン的一种で生物のゲノム中に散在する反復配列である。その長さは 200 ~ 600 塩基で、7 SL RNA を起源とするものと tRNA を起源とするものに分けられる。本研究で系統解析を行った潜頸亜目ゲノムは tRNA の Lys (リジン) を起源とする SINE が存在することで知られている (後述)。tRNA を起源とする SINE はほとんど例外なく tRNA 相同領域と tRNA 非相同領域と AT rich 領域の 3 つの領域から構成されており、その両端にはゲノムへの挿入の際にできると考えられている 5 ~ 20bp のゲノム由来の同方向繰り返し配列 (direct repeats) が存在する。SINE の 5'末端領域には内在性のプロモーター配列があり、RNA ポリメラーゼ III がこの配列を認識することによって RNA への転写が始まる。RNA へ転写された SINE は LINE (long interspersed element) にコードされている逆転写酵素を利用してゲノムの新たな場所へ逆転写されるといった機構が考えられている (Singer 1982; Weiner, Deininger and Efstratiadis 1986; Okada 1991a,b) (図 3 - 6)。最近になってこの SINE の LINE 逆転写酵素を利用した転移機構が実験的に示された (Kajikawa and Okada 2002)。

2 - 2. 系統推定における指標としての SINE の有用性

レトロポゾンである SINE は系統解析における指標として用いることができるいくつかの特徴を備えている。第一に、SINE は一度挿入された座位から正確に抜け落ちることはなく、いわばコンピューター用語で言う“コピー & ペースト”の形式で増えている。もし、偶然に deletion などによって SINE 配列がある座位から消失するとしてもその痕跡が必ず残るため見誤ることはないといってよい。第二に、異なる種のゲノム中でまったく同じ座位に SINE がそれぞれ独立に挿入される確率はゼロに等しい。そのターゲットサイトはランダムに選ばれている (Okada et al.

1997)。この SINE レトロポジションの特徴は、類縁的に遠い系統間でまったく同じサイトにそれぞれ独立に SINE が挿入することでおきる平行進化の可能性を排除している。このように SINE 配列が 2 つまたはそれ以上のリネージのオルソロガス遺伝子座で確認されたとき、それは共有派生形質(synapomorphy)の証拠と考えることができる(Cook and Tristem 1997, Miyamoto 1999, Shedlock, Milinkovitch and Okada 2000, Shedlock and Okada 2000, Rokas and Holland 2000, Graur and Li 2000, Nei and Kumar 2000)(図 3 - 7)。

2 - 3. SINE サブグループの特定

実際の実験として生物群の系統関係を SINE 法で決定したい場合に、あらかじめ系統解析の対象となる生物群に存在する SINE の性格付けがある程度なされている必要がある(岡田 1999)。性格付けとは、SINE のヌクレオチド配列の特徴(挿入、欠失、固定した塩基置換など)から SINE を複数のサブグループとして認識することができることを指している (Ohshima et al. 1993, Kido et al. 1994, Shimamura et al. 1999, Nikaido et al. 2001b, Nishihara, Terai and Okada 2002, Takahashi and Okada 2002 など)。一般的に、配列の特徴から性格づけのされた SINE のまとまりを“サブファミリー; subfamily”と呼ぶのだが、本研究では分類体系において“亜科”を指す用語の“サブファミリー; subfamily”と区別するため配列に類似性のある SINE のまとまりを“サブグループ; subgroup”と一貫して表現する。各々の SINE サブグループは進化の途中段階で出現し、その段階ごとに SINE サブグループ間で比較したレトロポジションの相対的な頻度は異なっている。それ故、SINE 法を系統解析に適用するとき、対象とするリネージで特に活性を持っていたと思われるサブグループを選択する必要がある (Kido et al. 1991; Shimamura et al. 1997)。なぜならそのような SINE サブグループはリネージの枝分かれの際にも活発に増殖していたと考えられ、これらが挿入された遺伝子座に焦点を当て SINE 法で系統解析を行えば効果的に系統関係が解明されていくと考えられるからである。潜頸亜目では tortoise polIII/SINE が潜頸亜目のゲノムに存在する SINE としてすでに知られている (Endoh and Okada 1986; Endoh, Nagahashi and Okada 1990; Ohshima et al. 1996)。しかし、これまでに tortoise polIII/SINE を潜頸亜目の様々な種から単離して詳細に SINE サブグループの性格付けをおこなった研究はなく、本研究は SINE 法で系統解析を行う前に tortoise

poIII/SINE のサブグループ分けから着手する必要がある。この SINE の分類（キャラクターゼーション）によって系統解析の対象となるリクガメ上科系統で盛んにレトロポジションをしていた SINE サブグループを絞込むことができ初めて SINE 法による系統解析が可能となる。

3. 本研究の目的

本研究では、tortoise poIII/SINE を潜頸亜目の 8 科の代表種から tortoise poIII/SINE 挿入遺伝子座を数多く単離し、包括的にその配列を解析し、SINE サブグループ構成を明らかにすることを第一の目標とした。第二に、そこで得られた情報をもとにリクガメ上科の系統推定に SINE 法が適用可能であるかをヌマガメ科 3 属 3 種、リクガメ科 4 属 6 種、バタゲールガメ科 19 属 21 種からの系統構築によって検証すると同時に、SINE 法で構築された系統樹からこれまでリクガメ上科で提唱されてきた系統関係や分類体系についての検証を行う。本研究は爬虫類の系統解析における初めての SINE 法の適用例である。

II. 材料と方法

1. DNA の精製

潜頸亜目の標本は表 3 - 2 に示した種を各種 1 個体ずつ用いた。この中でスッポンモドキ(スッポンモドキ科) ワニガメ(カミツキガメ科) ミシシッピーアカミミガメ(ヌマガメ科) ヨツユビリクガメ(リクガメ科) ホオジロクロガメ(バタゲールガメ科) スミスセタカガメ(バタゲールガメ科) ニシクイガメ(バタゲールガメ科) はペットショップから購入した。フロリダスッポン(スッポン科) クサガメ(バタゲールガメ科) は当研究室で以前から所持していた標本を用いた。残りの標本はすべて共同研究者である琉球大学熱帯生物園研究センターの安川雄一郎博士から提供していただいたサンプルを用いた。ボルネオカワガメを除くすべての標本の肝臓もしくは筋肉組織からフェノール・クロロホルム抽出法 (Sambrook et al. 1989) でトータルゲノム DNA を抽出し、4°C で保存した。ボルネオカワガメは血液から DNA を抽出し、PBS とプロテナー S K のバッファーで 2 時間処理した後、Dneasy Tissue Kit (QIAGEN) を用いて精製した。

2. SINE 挿入遺伝子座の単離

2.1 ゲノムライブラリの作成

スクリーニングに用いる種のゲノム DNA を *Hind*III 制限酵素で切断した。反応液の組成は、100 μ g 分のゲノム DNA、16 μ l *Hind*III (Takara, Japan) 20 μ l Buffer M (Takara, Japan) に計 200 μ l になるように適宜滅菌水を加え、37°C で 4 時間以上処理した。ゲノム DNA が制限酵素で完全に消化された後、15ml の超遠心分離用プラスチックチューブ (Centrifuge Tubes - 50 Ultra - Clear™ Tube 14 × 89mm, Order No. 344059: BECKMAN 社製) に 10 - 40% ショ糖勾配を作成し、最後に制限酵素で処理した DNA 溶液 200 μ l を加え、スイング式ローターに取り付け、超遠心分離機 (L8-70M, BECKMAN 社製) で遠心分離 (25,000rpm, 15°C, 15 時間) した。遠心後、ガラス管とシリコンチューブを用いて遠心管から 10 ~ 15 滴、分量にすると約 300 μ l ずつ 1.5ml マイクロチューブに分画を取り出し、その分画を 1% アガロースゲルで 1 × TAE 緩衝液を用いて電気泳動を行い、約 2 - 3kb に相当する長さの制限断片を含む分画を選別した。分画からエタノール沈殿によって DNA 断片のみを精製し、15 μ l の超純水を加えて使用するまで - 20°C で冷凍保

存した。精製した制限断片を pUC18/*Hind*III digested ベクターに DNA ligation kit ver. 1 (Takara, Japan)を用いて連結し、それを大腸菌 DH5 α 株に導入して形質転換を行った。形質転換した大腸菌は抗生物質（アンピシリン）を含む LB 培地（以後、L/amp プレートとする）で培養され、プラークハイブリダイゼーションの際のゲノムライブラリとして用いた。

2.2 メンブレンへのトランスファー

ゲノムライブラリのスクリーニングの際に用いる大腸菌プラーク DNA が転写されたメンブレンは以下の手順で作成した。ナイロンメンブレン (Colony/Plaque Screen NEF-978, PerkinElmer)をゲノムライブラリプレートの上に気泡が入らないように乗せ、37°C でオーバーナイト培養した。その後大腸菌プラークが吸着したメンブレンをはずし、アルカリ変性溶液（0.4M NaOH、0.6M NaCl）中で 3 分間変性させ、次に中和溶液 pH7.0（1M NaCl、0.5M Tris）中で 3 分間中和を行い、最後にメンブレンを乾燥させハイブリダイゼーションに用いた。

2.3 プロープの作成

ゲノムライブラリのスクリーニングは 2 つの目的で行われたため、それぞれ目的に応じた 2 種類のプロープがスクリーニングに用いられた。第一の目的は、潜顎亜目に広く分布する tortoise polIII/SINE の配列を詳細に調べることであり、プロープとして tortoise polIII/SINE サブグループに広く対応するオリゴヌクレオチドプロープの TEF1（5'-GGGAGGGATAGCTCAGTGGT-3'; Ohshima et al. 1996）を用いた。TEF1 は図 3 - 8 に示した tortoise polIII/SINE 配列アライメントの 1 ~ 20bp のポジションにハイブリダイズする。第二の目的は SINE 法でリクガメ上科の系統解析を行う際に用いる SINE 挿入遺伝子座を単離することである。このスクリーニングでは潜顎亜目における tortoise polIII/SINE サブグループの詳細な解析結果に基づいてリクガメ上科で頻繁に見られる特定のサブグループ/タイプに焦点を絞ったスクリーニングを行うため Cry1tC（5'-GGGGCAAAAATTGGTCCTGC-3'）プロープを用いた。Cry1tC プロープは図 3 - 8 に示した Cry IC cons 配列の 86 ~ 105bp のポジションに相当し、SINE サブグループの typeC に選択的にハイブリダイズする。プロープの作成は Oligo Nucleotide

(5 pmol/μl) 1μl、10 × T4 Polynucleotide Kinase Buffer 5μl (Takara, Japan)、T4 Polynucleotide Kinase 2μl (Takara, Japan)、[γ-³²p]dATP 5μl を計 50μl になるように適宜滅菌水を加えて、37°C で 1 時間反応させた。反応後、プローブ精製には QIAquick Nucleotide Removal Kit (QIAGEN)を用いて行った。

2.4 ハイブリダイゼーション

メンブレンをハイブリバックに入れ、そこに 50ml のハイブリダイゼーション緩衝液 (6 × SSC、1% SDS、2 × Denhardt's solution、100μg/ml herring sperm DNA) を加えてシーラーでパックし 42°C で 1 時間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、精製したプローブを加えて再度シーラーでパックし、ウオーターバスを用いて 42°C で振盪しながら終夜 (~ 15 時間程度) ハイブリダイゼーションを行った。メンブレンの洗浄は洗浄溶液 (2 × SSC、1% SDS) を用いて 35°C、20 分間振盪して行った。

2.5 オートラジオグラフィー

洗浄したメンブレンは液をできるだけ除いたあと台紙に乗せ汚染を防ぐために台紙ごとラップで覆った。暗室内で台紙+メンブレンの上に X 線フィルム、Intensifier の順でカセットにセットし、これを - 80°C のディープフリーザーに入れて一晩 ~ 二晩感光させた。カセットから X 線フィルムを取り出し、現像液、停止液、定着液の順に X 線フィルムを入れて現像した。

2.6 SINE-inserted クローンの単離

現像した X 線フィルムとライブラリプレートとを照らし合わせ、SINE が挿入されているクローンの位置をプレート上で確認した。シグナルの見られた大腸菌コロニーは液体培地で培養された後アルカリ-SDS 法によってプラスミド DNA として単離された。単離したプラスミド DNA に組み込まれている tortoise polIII/SINE 配列とその近傍領域の塩基配列を決定するため BigDye™ terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems)を用いてシーケンスを行った。反応液は精製したプラスミド DNA 2μl、プライマー 50ng、BigDye terminator premix 4μl を加え、計 10μl になるよう

に滅菌水を加えて作成した。96°C 30 秒、50°C 15 秒、60°C 1 分を 1 サイクルとして 25 サイクルの cycle sequencing を行った。塩基配列の決定は DNA sequencer ABI 3100 (Applied Biosystems)シーケンサーを用いて行った。最初の塩基配列決定は TEF1 をシーケンスプライマーとして用い、tortoise polIII/SINE の 3'側部分配列と 3'近傍配列を得た。次に SINE の 3'側近傍配列をもとに SINE の 5'側近傍配列に向かうプライマーをデザインしてシーケンスを行い tortoise polIII/SINE の全長配列と 5'側近傍配列を決定した。

3 . PCR による SINE の増幅

上記でゲノムから単離した SINE の配列データに加えてより多くの配列情報から tortoise polIII/SINE の特徴を分析するため、tortoise polIII/SINE を潜頸亜目 5 科 6 種のゲノムから PCR で直接増幅した(表 3 - 2)。この際、Cry I と Cry II サブグループをそれぞれ選択的に増幅する 2 種類のリバースプライマーをデザインし、TEF1 を共通のフォワードプライマーとし、別々に PCR を行った。Cry1R (5'-GATATACCAATCTCCTAGAA-3')は Cry I cons (図 3 - 8)の 170 ~ 189bp ポジションに結合し、Cry I サブグループを選択的に増幅するためのリバースプライマーである。Cry2R (5'-AATCATAGAATATCAGGGT-3')は Cry II cons (図 3 - 8)の 164 ~ 182bp ポジションに結合し、Cry II サブグループを選択的に増幅するためのリバースプライマーである。反応液はゲノム DNA を 200ng、各プライマーを 100ng、0.2mM dNTPs を 4 μ l、ExTaq™ buffer (Takara, Japan)を 5 μ l、1 unit の Takara ExTaq™ DNA polymerase を計 50 μ l になるように適宜滅菌水を加えた。PCR は 94°C 3 分の後、94°C 1 分、50°C 45 秒、72°C 45 秒を 1 サイクルとして 30 サイクル反応を行った。PCR 反応後、増幅の確認を行うため、反応液のうち 5 μ l を 1 μ l BPB ローディングバッファーと混ぜ 2%のアガロースゲル (LO3 agarose gel; Takara)で 0.5 × TBE を緩衝液として電気泳動した。電気泳動後、ゲルは臭化エチジウム溶液に 20 分浸し染色され、UV トランスイルミネーターを使用して増幅バンドの観察を行った。

4. PCR によって得られた SINE 配列の決定

ゲノムのあらゆる遺伝子座から同時に増幅された SINE 配列の個々の配列を決定するため増幅断片のクローニングを行った。PCR 産物は Takara Ligation kit ver.2 (Takara, Japan)を用いて pGEM-T (Promega)ベクターに連結された。ベクターは大腸菌 DH5- α 株コンピテントセルに導入後、L/amp 上で培養 (37°C、終夜) した。プレート上の大腸菌各コロニーに目的の DNA 断片を連結したベクターが導入されているか否かを調べるためコロニー-PCR を行った。培地プレート上の大腸菌の各コロニーを爪楊枝でつついて採集し、あらかじめコロニー毎に用意したトータル 20 μ l 計の PCR 反応液 (3 章 II-3 参照) に直接懸濁する。PCR に用いるプライマーはベクターのマルチクローニングサイトを挟み込むようにデザインされた 2 種類のプライマー、M13 primer M4 (5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3')と M13 primer RV (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3')、である。PCR 反応における熱変性の際に大腸菌の細胞膜が破壊され PCR の鋳型となるベクター DNA が反応液中に溶け出し PCR が可能となる。コロニー-PCR で目的断片 (SINE の PCR による増幅産物) の挿入が確認された増幅産物はそのまま塩基配列決定の鋳型として用いられた。コロニー-PCR 産物に 2 - プロパノールを 20 μ l、5M NaCl を 1 μ l 加え 20 分間室温放置し、14,000rpm で遠心後上清を捨て、70%エタノールを 50 μ l 加えリンスし、上清を捨てドライアップして精製した。精製した PCR 産物は 15 μ l の滅菌蒸留水に溶かし塩基配列決定の鋳型として用いた。配列決定に用いたプライマーは M13 primer M4 と RV である。配列決定方法は本章 II-2.6 における塩基配列決定法と同様の手順で行われた。

5. Tortoise PolIII/SINE 配列のアライメント

ゲノムライブラリのスクリーニングで単離した SINE 配列と PCR で増幅した SINE の配列決定によって潜頸亜目 8 科から計 382 個の tortoise polIII/SINE 配列を得た。これらは ATGC Ver.3.00 ソフト (Genetyx Corporation)でアライメントにかけられ、いくつかの特徴ある配列のグループに分けられた。グループごとに注意深く目で確認しながらアライメントを行い、各サブグループ/タイプのコンセンサス配列を得た。

6. PCR による単一遺伝子座での SINE 挿入の有無の確認

様々な種で相同遺伝子座に SINE の挿入があるか否かを調べるため、単離した SINE 挿入遺伝子座の配列に基づいて SINE 配列を挟む近傍領域（上流側および下流側）にプライマーを設計した。このプライマーセットを用いて様々な種のゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、その PCR 産物を電気泳動し、バンドの長さから SINE 挿入の有無が確認できる（図 3 - 7 参照）。プライマーは 20bp 前後の長さで T_m (Melting Temperature) 値は 55°C 前後になるように設計した。PCR 反応液の組成は本章 II-3 と同様であり、反応条件は 94°C3 分の後、94°C1 分、50 ~ 60°C1 分、72°C45 秒を 1 サイクルとして 30 サイクル行った。プライマーが鋳型 DNA に結合する温度は各遺伝子座に設計されたプライマーセットによって異なるため、それぞれのセットで最適なものを試行錯誤の上見出した。PCR 反応後の電気泳動、バンドパターンの確認方法は本章 II-3 と同様である。PCR 産物の塩基配列を調べる必要が生じた際には本章 II-4 に示した方法で増幅断片をクローニングし、配列決定を行った。

III 結果

1. Tortoise polIII/SINEs のサブグループとタイプの同定

本研究で計 382 個の tortoise polIII/SINE 配列が得られ、そのうち 190 個はゲノムライブラリから、192 個は SINE の PCR からであった。190 個の完全長 SINE 配列に基づいた解析は CryI と CryII といった 2 つのサブグループの存在を明らかにした (図 3 - 8, 図 3 - 9)。2 つのサブグループを特徴付けているヌクレオチドは SINE の 3'側領域にのみ存在した (図 3 - 8)。潜頸亜目リネージのゲノムにおいて各々のサブグループの頻度を比較するため、各科代表種のゲノムライブラリからランダムに単離された遺伝子座の数をサブグループならびに科ごとに比較した (表 3 - 3)。フロリダスッポン (スッポン科) とスッポンモドキ (スッポンモドキ科) からは CryI サブグループしか単離されてこなかったのに対し、アオウミガメ (ウミガメ科) からは CryII サブグループしか単離されてこなかった。残りの 5 リネージでは、頻度に違いは見られたものの、両サブグループが単離された。

さらに、SINE の PCR から得られた配列を加えてより詳細な 2 サブグループの解析を行ったところ、CryI と CryII はそれぞれ 4 タイプ (IA - ID) と 5 タイプ (IIA - IIE) に分けられることが明らかとなった。これらタイプは SINE 配列中央部分で見られる挿入 / 欠失の特徴から認識することができる (図 3 - 8)。潜頸亜目各リネージにおけるこれらのタイプの頻度をサブグループごとに調べ表 3 - 4、表 3 - 5、図 3 - 10 に示した。CryI サブグループでは、スッポン科が IA タイプのみ、スッポンモドキ科が ID タイプのみ、カミツキガメ科が IA タイプのみ、ヌマガメ科が IB のみと、それぞれ 1 つのタイプしか有していなかった。ドロガメ科、リクガメ科、バタゲールガメ科の種では 3 つのタイプ (IA, IB, IC) の共有が見られた。CryII サブグループにおける SINE のタイプもまた様々であった。IIB タイプはウミガメ科、カミツキガメ科の種で主要なタイプであり、また、これらの種でのみ観察されたタイプである。ドロガメ科の種は CryII サブグループの 3 タイプ (IIA, IID, IIE) を有していた。タイプ IIA はヌマガメ科、リクガメ科、バタゲールガメ科の種で共通して存在し、主要な CryII サブグループのタイプであったが、3 科の種で共通に認められた IIC タイプの頻度はごくわずかであった。

SINE サブグループとタイプの相対的な頻度は潜頸亜目(Cryptodira)の各リネージ間で大きく異なっていた(図3-10)。この大きな違いはリネージ間での各 SINE サブグループ・タイプのレトロポジション活性の相対的な違いが影響しているためと考えられる。しかしながらサブグループ・タイプの構成において明らかな傾向を見いだすこともできた。それはバタゲールガメ科、リクガメ科、ヌマガメ科の種に分布した IB タイプや IIA タイプのような主要なタイプの共有である。

2. リクガメ上科の SINE 法による系統解析

上記の解析によって得られた各リネージにおける SINE サブグループ・タイプ頻度の違いに基づくと、リクガメ上科では CryI サブグループの IB、IC タイプと CryII サブグループの IIA タイプが進化の過程で他のタイプよりも高いレトロポジション活性を示していたと推測することができる。バタゲールガメ科では特に IC タイプの頻度が目立っていた。そのため SINE 法による系統解析において IB タイプと IC タイプが挿入された遺伝子座に焦点を絞れば、バタゲールガメ科の様々なリネージの存在を示す SINE 挿入遺伝子座が数多く得られてくると考えられる。このような推定のもと我々は IB タイプと IC タイプの挿入遺伝子座に着目してバタゲールガメ科、リクガメ科、ヌマガメ科の系統解析を行った。挿入遺伝子座の単離はタイプ IC をバタゲールガメ科の種から選択的に単離するための Cry1tC プローブ(材料と方法 2.3 参照)を用いて行い、また、前述の SINE サブグループ・タイプの同定の際に TEF1 プローブでリクガメ上科 3 種から単離された IB タイプ、IC タイプ、IIA タイプの遺伝子座も解析に用いた。

EEo17 遺伝子座はヌマガメ科のヨーロッパヌマガメから単離された SINE 挿入遺伝子座である。PCR を行ったところ SINE が挿入されている時に現れる長い増幅断片はヌマガメ科 3 種のゲノムから増幅された(図3-11A1)。対照的に、バタゲールガメ科とリクガメ科に属する 27 種では SINE が挿入されていないため短いと思われる増幅バンドが得られた。この遺伝子座における SINE の挿入の有無(表3-6)は代表種のゲノムから増幅した産物をシーケンスして確認した(図3-12A-1)。EEo17 遺伝子座の結果からヌマガメ科を導いた祖先リネージにおいてこの遺伝子座へ SINE が挿入したと考えられ、ヌマガメ科の単系統性を示している。

EEo44 遺伝子座はヌマガメ科のヨーロッパヌマガメ (lane 28) とキボシシガメ (29) で SINE の挿入バンドが確認され、同じヌマガメ科のミシシッピーアカミミガメ (lane 30) では挿入が認められなかった (図 3 - 11A2, 図 3 - 12A2)。この遺伝子座における SINE 挿入はヌマガメ科のアミメガメ亜科 (ミシシッピーアカミミガメ) からヌマガメ亜科 (ヨーロッパヌマガメ、キボシシガメ) の祖先が分岐した後に起きたと考えられる。この遺伝子座ではホオジロクロガメ (lane 1)、カラゲールガメ (lane 3)、モリセオレガメ (lane 23)、ホームセオレガメ (lane 24)、ケヅメリクガメ (lane 25)、アカアシガメ (lane 26) で増幅産物が得られなかった。これはプライマーが結合するサイトに変異が生じていたためと考えられる。しかし、EEo17 遺伝子座でヌマガメ科の単系統性が示されたことから、これらの増幅産物が得られなかった種で SINE が挿入されている可能性は考えられない。

TTh26 遺伝子座はリクガメ科のヨツユビリクガメから単離された遺伝子座であり、リクガメ科とバタゲールガメ科の 25 種で SINE 挿入を示す長い PCR 断片が得られた (図 3 - 11B1)。それに対し、ヌマガメ科の 3 種では SINE が挿入されていないため短い増幅断片が確認された。同様な結果がバタゲールガメ科のクサガメから単離された遺伝子座である BCr06 と BCr01 においても得られた (図 3 - 11B2, 3)。しかし、TTh26 遺伝子座ではニシクイガメ (lane 5) とモリセオレガメ (lane 23) で、BCr06 遺伝子座ではヒジリガメ (lane 6) で、BCr01 遺伝子座ではシロアゴヤマガメ (lane 12)、ジャノメイシガメ (lane 14)、インドクロハラヤマガメ (lane 17)、セマルハコガメ (lane 20)、ヨツユビリクガメ (lane 22) で増幅バンドが得られなかった。後述する遺伝子座の解析結果 (図 3 - 11C) から TTh26 のニシクイガメで SINE が挿入されていない可能性は考えられないが、残りの 7 種ではそれぞれの遺伝子座において SINE が挿入されている可能性はまだ考えられる。TTh26, BCr06, BCr01 遺伝子座の結果から、ヌマガメ科の種を導いた祖先リネージからの分岐後にリクガメ科とバタゲールガメ科の種の共通祖先リネージでこれらの遺伝子座への SINE が挿入したと考えられ、バタゲールガメ科とリクガメ科の近縁性を強く示唆した。

BKs85 遺伝子座ではホオジロクロガメ (lane 1)、ボルネオカワガメ (lane 2)、カラゲールガメ (lane 3)、スミスセタカガメ (lane 4)、ニシクイガメ (lane 5) の 5 種で SINE の挿入を

示す長い PCR 断片が得られた (図 3 - 11C1, 図 3 - 12C1)。これはバタグールガメ科の中でこれら 5 種が単系統群を形成することを示し、同様に BKs11 遺伝子座 (図 3 - 11C2) でも上記 5 種の単系統性を示す SINE の挿入が認められた。BKs11 遺伝子座のボルネオカワガメ (lane 2) では著しく長い増幅断片が得られたが、これは SINE 挿入遺伝子座の 5'側上流近傍配列に二次的に長い断片が挿入されたことによって生じたことがシーケンスによって確認された (図 3 - 12C2)。BKs11 遺伝子座ではニホンイシガメ (lane 8) とシロアゴヤマガメ (lane 12) で増幅産物が得られなかった。この遺伝子座においてニホンイシガメは後述する結果 (図 3 - 11D1, 2) から SINE が挿入されている可能性は考えられないが、シロアゴヤマガメでは SINE 挿入の可能性はまだ残されている。

BKs36 遺伝子座 (図 3 - 11C3) と BKs52 遺伝子座 (図 3 - 11C4) の両遺伝子座では、さらに進んでボルネオカワガメ (lane 2)、カラグールガメ (lane 3)、スミスセタカガメ (lane 4)、ニシクイガメ (lane 5) の単系統性を明らかにした。BKs36 遺伝子座のヒジリガメ (lane 6) とクモノスガメ (lane 27) で増幅産物が得られなかったが、BKs85 と BKs11 遺伝子座の結果から、これらの種の遺伝子座において SINE が挿入されている可能性は考えられない。また、BKs52 遺伝子座で増幅産物が得られなかったアンボイナハコガメ (lane 19)、モリセオレガメ (lane 23)、クモノスガメ (lane 27)、ミシシッピーアカミミガメ (lane 30) についても同様のことが言える。

BCr61 遺伝子座 (図 3 - 11D1) と BMm105 遺伝子座 (図 3 - 11D2) では、クサガメ (lane 7)、ニホンイシガメ (lane 8)、ヤエヤマイシガメ (lane 9)、アンナンガメ (lane 10) の 4 種の両遺伝子座で共通した SINE の挿入が認められ、これら 4 種の単系統性が示された。BMm105 遺伝子座のクサガメでは SINE ユニットの挿入から予想される長さよりも長い増幅産物を生じたが、シーケンスを行ったところクサガメの SINE ユニット内に *tortoise polIII/SINE* とは無関係の 325bp からなる配列が挿入されていることが明らかになった (図 3 - 12D2)。BCr61 遺伝子座のシロアゴヤマガメ (lane 12)、ヒラセガメ (lane 18)、セマルハコガメ (lane 20)、ヨツユビリクガメ (lane 22) では明確な増幅産物が得られなかった。これらの種で BCr61 遺伝子座に SINE が挿入されている可能性はまだ残されている。また BMm105 遺伝子座ではスミスセタカガメ (lane 4)、シロアゴヤマガメ (lane 12)、ジャノメイシガメ (lane 14)、クモノスガメ (lane 27)

から明確な増幅産物が得られなかった。これらのうちスミスセタカガメは BKs85、BKs11、BKs36、BKs52 遺伝子座解析の結果から BMm105 遺伝子座において SINE が挿入されている可能性は考えられないが、残りの 3 種に関してははまだ SINE 挿入の可能性は残されている。

BMm85 遺伝子座 (図 3 - 11D3) と BMm74 遺伝子座 (図 3 - 11D4) では、上記の 2 遺伝子座 (BCr61 と BMm105) が示した系統関係からさらに進んでヤエヤマイシガメ (lane 9)、アンナンガメ (lane 10) の 2 種のみで共通の SINE 挿入を確認し、これらの単系統性を明らかにした。さらに BMm74 遺伝子座では、ボルネオカワガメ (lane 2)、カラグールガメ (lane 3)、スミスセタカガメ (lane 4)、ニシクイガメ (lane 5) の 4 種の増幅産物が他の種の SINE が挿入されていないバンドに比べて若干短かった (図 3 - 11D4, lane 2, 3, 4, 5)。これらの増幅産物をシーケンスして配列を確認したところ、4 種の 5'側 SINE 近傍配列の同じサイトに 46bp の欠失が確認された (図 3 - 12D4)。これはこれら 4 種の共通祖先の BMm74 遺伝子座で起きた欠失と考えられ、BKs36 遺伝子座、BKs52 遺伝子座で示唆されたの単系統性と一致する。BMm74 遺伝子座では、シロアゴヤマガメ (lane 12) とリクガメ科 6 種 (lane 22 - 27) で増幅産物が得られなかったが、BCr61 と BMm105 遺伝子座の結果からこの遺伝子座において SINE が挿入されている可能性はリクガメ科 6 種では考えられず、それに対しシロアゴヤマガメでは SINE 挿入の可能性はまだ残されている。

BCr04 遺伝子座はクサガメ (lane 7) でのみ、BKs31 遺伝子座ではスミスセタカガメ (lane 4) でのみ SINE の挿入パターンを示した (図 3 - 11E1, 2)。これらの遺伝子座における SINE の挿入は種特異的に起きた挿入であり、BCr04 遺伝子座ではクサガメが他の種から分岐した後、BKs31 遺伝子座ではスミスセタカガメが他の種から分岐した後にそれぞれの遺伝子座で独立に挿入が起きたことを示す。BKs31 遺伝子座では、ヒラセガメ (lane 18)、セマルハコガメ (lane 20)、ヨーロッパヌマガメ (lane 28)、キボシシガメ (lane 29)、ミシシッピーアカミミガメ (lane 30) で増幅産物が得られなかった。しかし、図 3 - 11C 得られた結果から、これら 5 種で BKs31 遺伝子座における SINE 挿入の可能性は考えられない。

これら 15 オルソロガス遺伝子座の PCR で得られた結果に基づきバタグールガメ科を中心としたリクガメ科、ヌマガメ科を含んだ系統関係を構築した (図 3 - 13)。

IV. 考察

1. Tortoise polIII/SINE の 2 サブグループについて

これまでに 4 つの tortoise polIII/SINE 配列 (TE3, TE5, TE6, TE9) がクサガメ (*Chinemys reevesii*) から報告されていた (Endoh, Nagahashi and Okada 1990)。我々が見出した tortoise polIII/SINE のサブグループ定義に従うと、これらのうち TE5, TE6, TE9 の 3 つは CryI サブグループに対応し、それに対して TE3 は CryII サブグループに対応した。TE3 は当時の研究で唯一単離された CryII サブグループであったため、独立した一つのサブグループであるという認識はされなかった。さらにその後 (Ohshima et al. 1996) tortoise polIII/SINE のいくつかのクローンがフロリダスッポンのゲノムライブラリから単離されたが、そこで単離された配列はすべて CryI サブグループであった。過去に示されたこの結果は、我々が今回フロリダスッポンのゲノムライブラリから単離した全 18 配列が CryI サブグループであった観察と一致する (表 3 - 3, 表 3 - 4)。このように我々は十分な数の配列と潜頸垂目の分類群を今回解析できたため、tortoise polIII/SINE の CryII サブグループの存在を初めて示すことができた。

2. CryI/II サブグループと PsCR1 LINE 間の 3'末端領域における類似性

2 つの tortoise polIII/SINE サブグループを特徴付けるヌクレオチドの違いは SINE の 3'側領域にのみ存在した (図 3 - 8)。この領域の配列はカメの PsCR1 LINE (long interspersed element) の 3'末端領域に相同である (Ohshima et al. 1996, Kajikawa, Ohshima and Okada 1997)。LINE は自身のレトロポジションを可能にする逆転写酵素をコードしており、それに対し SINE は何のタンパクもコードしていない。SINE と LINE の両 3'末端領域における類似性の発見 (Ohshima et al. 1996, Okada et al. 1997) に伴い、SINE レトロポジションは LINE のレトロポジションにおける酵素機構に依存して起きているという仮説が導かれた (図 3 - 6)。この仮説によると、SINE のレトロポジションでは、その 3'末端配列がパートナーとなる LINE にコードされている逆転写酵素によって認識されることが示されている (Ohshim et al. 1996, Okada et al. 1997, Weiner 2000)。最近になりこの仮説はウナギの UnaSINE1 がウナギの UnaL2 LINE にコードされてい

る逆転写酵素に認識されていることを実験的に証明された (Kajikawa and Okada 2002)。

本研究で同定された 2 つのサブグループ (CryI と CryII) で、CryII の 3'末端領域のコンセンサ配列は、かつて Ohshima ら (1996) が TE3 配列で示唆したように PsCR1 LINE の相同領域と 95% のホモロジーを示した (図 3 - 14)。このことから CryII SINE サブグループは PsCR1 LINE のレトロポジション機構を適用していると考えられる。一方、CryI SINE のコンセンサ配列の 3'末端領域は PsCR1 LINE にたった 75% のホモロジーしか示さなかった。この 75% はホモロジーとしては十分な値であるが、SINE の 3'末端配列はパートナーとなる LINE の逆転写酵素によって厳密に認識 ("stringently recognition") されることが示唆されている (Okada et al. 1997)。このように CryI SINE サブグループが存在するという事実は CryI SINE の 3'末端配列と高い相同性を示す未知の PsCR1 LINE サブグループの存在を示しているのかもしれない。この推定 PsCR1 LINE サブグループが CryI サブグループのレトロポジションに関わっているのではないか。

3. バタゲールガメ科を中心としたリクガメ上科の系統解析

SINE 法による系統解析からリクガメ上科の系統関係について新たな知見が得られるとともに比較形態学による系統分類の再考を促す結果が得られた。

ヌマガメ科のヨーロッパヌマガメから単離された 2 つの SINE 挿入遺伝子座の解析 (図 3 - 11A) では、EEo17 遺伝子座がヌマガメ科の単系統性を示した (図 3 - 13)。McDowell (1964) は頭骨の特徴 (図 3 - 2) からヌマガメ亜科とバタゲールガメ亜科を分類し、本研究の結果もこの形質によるヌマガメ科の単系統性を支持した。この翼状骨と底後頭骨の接合型と分離型はバタゲールガメ科とヌマガメ科の各系統を反映する形態的特徴であると思われるが、そのどちらが祖先的形質でどちらが派生的形質であるかははっきりしない。なぜなら、この接合と分離の特徴は潜頸亜目の他の系統でも頻繁に置き換わっている形質だからだ。また、EEo44 遺伝子座はヌマガメ科におけるヌマガメ亜科の単系統性を示唆した。しかし、本研究ではヌマガメ科 10 属 43 種のうちわずか 3 属 3 種を用いた解析であるため、標本数を増やしてこの遺伝子座で解析することによりさらに EEo44 遺伝子座における SINE 挿入時期が明らかにされるだろう。

リクガメ科とバタゲールガメ科の種から単離した TTh26、BCr06、BCr01 遺伝子座の解析結果はリクガメ上科におけるバタゲールガメ科とリクガメ科の近縁性を示唆した(図 3 - 13)。これら遺伝子座で得られた結果はこれまでに行われた比較形態学 (McDowell 1964; Hirayama 1984; Gaffney and Meylan 1988) とミトコンドリア DNA cytochrome *b* 遺伝子と 12S rRNA 遺伝子を解析した分子系統解析 (Shaffer, Meylan and McKnight 1997) で示された知見と一致した。過去にヌマガメ類とバタゲールガメ類が一つのグループとして認識された形態的根拠には、1) リクガメ科と比べると亀甲が扁平であること、2) 後眼窩骨がリクガメ科のそれよりも比較的広いこと、4) 前顎骨は鉤状を呈さないこと (ハコガメ属を除く) などがリクガメ類のそれと異なっていたからである (図 3 - 5 参照)。本研究の結果はこの形態形質がリクガメ上科の科間の系統関係を解明する上で有効な共有派生形質ではないことを示唆する。しかし、バタゲールガメ科とリクガメ科の単系統性を示すような頭骨形態の特徴は明確に示されていない。

本研究はバタゲールガメ科でこれまで示されたことのないいくつかの系統関係を解明した (図 3 - 13, クレイド A と B)。BKs85 と BKs11 遺伝子座で得られた結果は、バタゲールガメ属コンプレックス 3 種 (カラゲールガメ、スミスセタカガメ、ニシクイガメ) とカワガメ属コンプレックス (ボルネオカワガメ、ホオジロクロガメ) が単系統群を形成することを示した (図 3 - 13, クレイド A)。本研究で用いたバタゲールガメ属コンプレックス 5 種のうちクサガメとヒジリガメはこのクレイドに含まれなかった。バタゲールガメ属コンプレックスが単系統群でないことに関しては、比較形態学 (図 3 - 3; Hirayama 1984, Gaffney and Meylan 1988) の観点からもすでに示唆されていたことであり、本研究でもその可能性が改めて示唆された。また、Hirayama (1984) は頭骨形態の特徴 (表 3 - 7; VII, VIII, XI, XII) からバタゲールガメ亜科の中でクサガメとニシクイガメが単系統であることを示唆したが、本研究の結果はこれらが単系統ではないことを示した。図 3 - 3 の系統樹上に示した各系統で共通する形態形質のプロットを見るとクサガメとニシクイガメの単系統性を支持する 5 つの形態形質 (II, VII, VIII, XI, XII) のうち 4 つは異なる系統でも生じている形質であることが確認できる。クサガメとニシクイガメを単系統と評価する基となったこれらの形質が祖先的形質を残しているのか非相同同形質であるのかは判断が難しいところであるが、少なくとも共有派生形質であるとする知見は誤りであることが BKs85、

BKs11 遺伝子座の結果によって示された。

BKs36 と BKs52 遺伝子座における SINE の挿入、そして BMm74 遺伝子座における 46bp の欠失は、BKs85 と BKs11 によって示されたクレイドからホオジロクロガメを除く一群の単系統性を示した。カワガメ属コンプレックスの単系統性に関しては形態的に異論を唱えるような報告はされていない。McDowell (1964) と Hirayama(1984)がカワガメ属コンプレックスで示した類似性(表 3 - 6 ; IV, XI, 図 3 - 3)に加えて、核型分析で示されたカワガメ属コンプレックス 2 種の染色体数 $2n=50$ (バタグールガメ科では $2n=52$ の染色体数が大多数を占める ; Bickham and Carr 1983)はカワガメ属コンプレックスの単系統性を強く示唆していた。しかし、これらの単系統性を示唆する形態形質はいずれも別な系統でも生じている形質であり、本研究の結果からカワガメ属コンプレックスで示されていた形態形質は共有派生形質ではないことが示された。BKs85、BKs11、BKs36、BKs52、BMm74 の遺伝子座は Hirayama (1984) の示唆した多くの共有派生形質を否定したが、それに対し詳細に調べられた頭骨形態の中からこれらの遺伝子座が示す系統関係に合致した形質を見いだすことは困難であった。Hirayama(1984)は 47 に及ぶ頭骨形態形質を解析しており、形質の情報が不十分であるとは考えられないどころか新規の共有派生形質を頭骨形態から見いだすことは難しいと思われる。本研究で示されたクレイド A の関係を支持する共有派生形質が特定されない理由としては、今回の解析に用いたバタグールガメ亜科の種が一部であったことに加えて、おそらくこの亜科の系統推定における重要な形質となっている二次口蓋が様々な系統の進化の過程で二次的に退化したか、もしくは祖先形質を維持するなどしているためであると考えられる。このような現象が起きていたとすると最節約的な形質の進化を前提とした分岐分類学的解析では誤った系統を推定する可能性が高くなる。本研究の SINE の挿入パターンに基づいた解析では二次的な SINE の欠失や挿入による平行進化は考えられないため形態で仮定された複雑な進化の影響は受けないと考えられる。

BCr61 と BMm105 遺伝子座は、クサガメとイシガメ属 3 種(ニホンイシガメ、ヤエマイシガメ、アンナンガメ)の単系統性を示した(図 3 - 13, クレイド B)。これらの近縁性については過去に mtDNA の 12S と 16SrRNA 遺伝子に基づいた分子系統解析によっても示唆されており(Honda, Yasukawa and Ota 2002, Honda et al. 2002)、本研究でもこの系統関係が支

持された。クレイド B で示された系統関係は、バタグールガメ科における 2 亜科の単系統性を否定した。比較形態学によるとクサガメはバタグールガメ亜科に分類されるのに対し、イシガメ属はヤマガメ亜科に分類されている (Gaffney and Meylan 1988, Ernst, Altenburg and Barbour 2000; Yasukawa, Hirayama and Hikida 2001)。クサガメでは二次口蓋の発達程度が著しいことからバタグールガメ亜科に分類されていた。しかし、過去の分子系統解析と今回の結果から、クサガメにおける発達した二次口蓋の特徴はバタグールガメ亜科系統と無関係にヤマガメ亜科系統内で独立に獲得された形質ではないかと考えられる。つまり、クサガメの頭骨口蓋部発達はバタグールガメ亜科と類似した環境への適応による平行もしくは収斂進化の現われなのではないかと考えられる。バタグールガメ科の種では、環境の選択圧の影響を強く受けやすいことが知られており (Hirayama 1984, Yasukawa, Hirayama and Hikida 2001, Honda et al. 2002)。クサガメの二次口蓋は形態比較からは看破できない極度な収斂進化のあらわれと考えられる。

BMm85 と BMm74 遺伝子座はイシガメ属内におけるヤエヤマイシガメとアンナンガメの単系統性を示した。Honda ら (2002) はイシガメ属とクサガメ属の系統関係を mtDNA に基づいて詳細に解析を行ったが、アンナンガメがミナマイシガメ (ヤエヤマイシガメ) とニホンイシガメのどちらと姉妹群関係にあるのかを明確に示すことができていなかった。本研究の結果は 2 つの遺伝子座からヤエヤマイシガメとアンナンガメの単系統性が示されたことから、これら大陸に生息する 2 種が共通の祖先に由来する種であることを強く示唆する。

4. 潜頸亜目系統推定における SINE 法の有用性

本研究は爬虫類系統への SINE 法の初めての適用例であり、特に科間と属間の系統関係について解析を行った。本研究で同定された tortoise polIII/SINE サブグループ・タイプのうち 3 種類の SINE 挿入遺伝子座を用いて解析を行ったところ、系統樹上でこれらサブグループ・タイプの挿入が示す系統関係に一定の傾向が認められた。つまり、CryIB タイプの挿入はリクガメ科とバタグールガメ科の共通祖先がヌマガメ科から分岐した直後の比較的古い時代の分岐を示し、CryIC タイプの挿入は比較的新しい時期であるバタグールガメ科内部の系統関係を示した (図 3 - 13)。また、ヌマガメ科から単離された CryIIA タイプはヌマガメ科の共通祖先が分岐してから

の挿入を示した(図 3 - 13)。このような傾向はリクガメ上科の進化過程で SINE サブグループ・タイプ間の増殖頻度が変化してきたことを示しているものであり、SINE 法で系統解析を行う際、対象となる系統で最も活発に増殖していた SINE を用いれば効率的に系統樹が構築されることを示している。本研究では潜頸亜目の様々な系統から SINE を単離し、サブグループ・タイプの頻度分布を評価した。本研究で詳細に調べられたサブグループ・タイプ情報はバタゲールガメ科やリクガメ上科のみならず潜頸亜目の他の系統解析にも適用することができるだろう。また、BCr04 や BKs31 遺伝子座といった種特異的に挿入したと思われる遺伝子座も得られたが(図 3 - 11E)、これらは属レベル以下の系統解析、すなわち種間の系統解析に有効な可能性を残している。実際、BMm85 と BMm74 遺伝子座はイシガメ属内の系統関係を明らかにしている。

本研究は潜頸亜目に広く存在する tortoise polIII/SINE の詳細な解析を潜頸亜目の様々な系統の標本で行うことによって SINE 配列の特徴と分布頻度を見出し、その情報に基づいてリクガメ上科の系統関係をある程度解明することができた。今回の成果はこれから先の SINE 法を用いた潜頸亜目の系統解析に発展することが期待される。

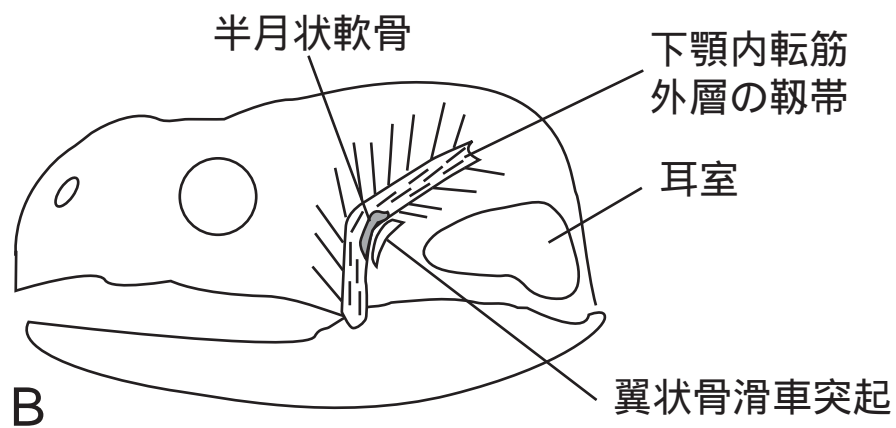
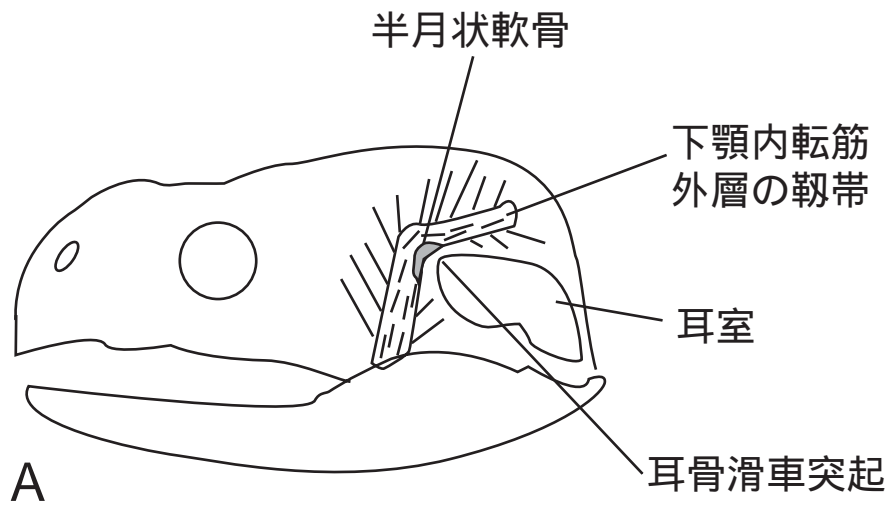


図3 - 1. 潜頸類と曲頸類の下顎内転筋 .

A: 潜頸類、 B 曲頸類

潜頸類では耳骨上面の耳骨滑車突起で方向を変えるが、曲頸類では、もっと前方の翼状骨滑車突起があり、ここで方向転換する .

(疋田2002より改変)

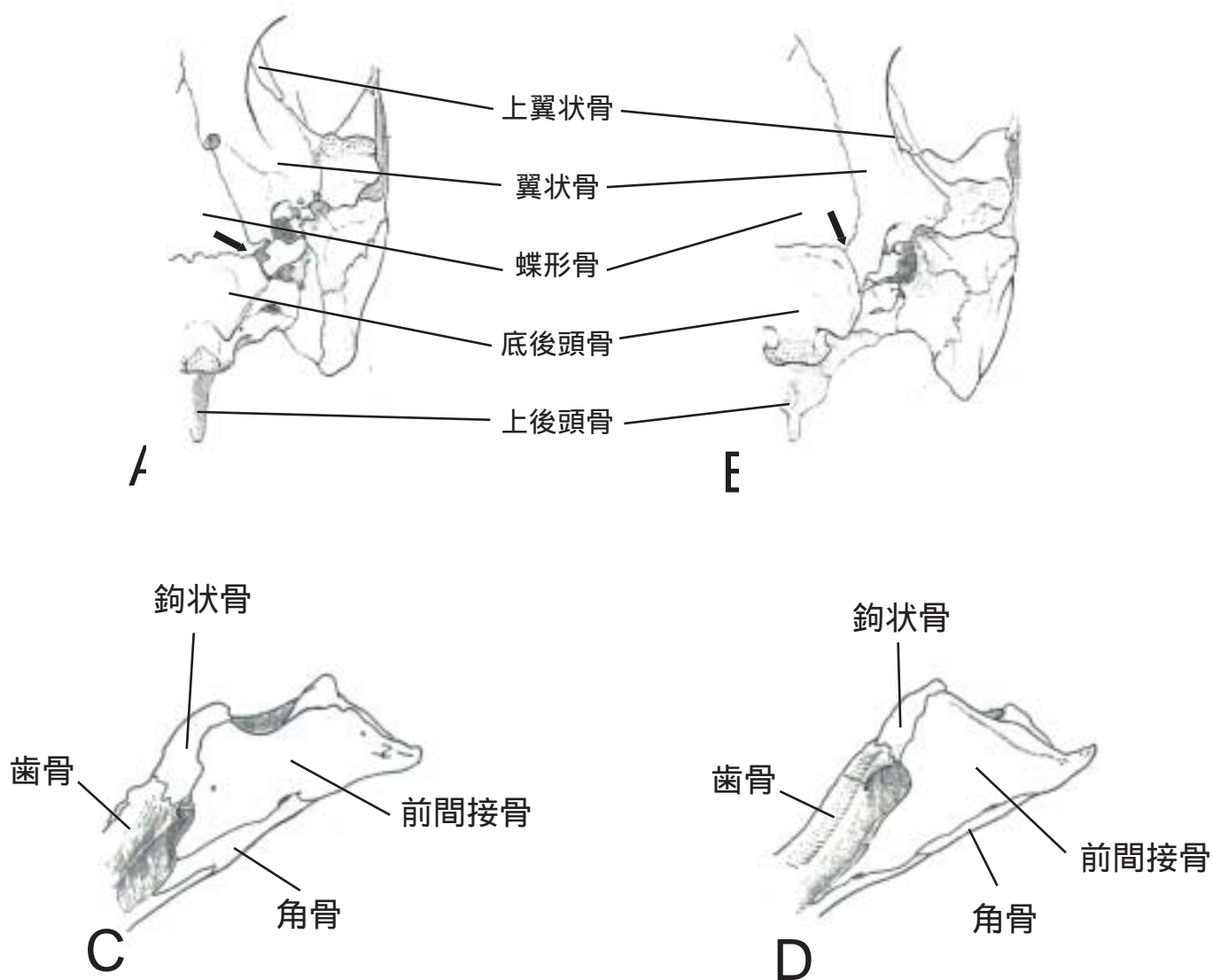


図3 - 2 . ヌマガメ科とバタグールガメ科の頭骨形態の違い .

A ヌマガメ科 (キボシイシガメ) の頭骨後方の腹面図 . B バタグールガメ科 (イシガメ属) の頭骨後方の腹面図 . C キボシイシガメの下顎後方の側面図 . D イシガメ属の下顎後方の側面図 .

形態的にヌマガメ科とバタグールガメ科で違いがみられる場所を矢印で示す .

(McDowell, 1964より改変)

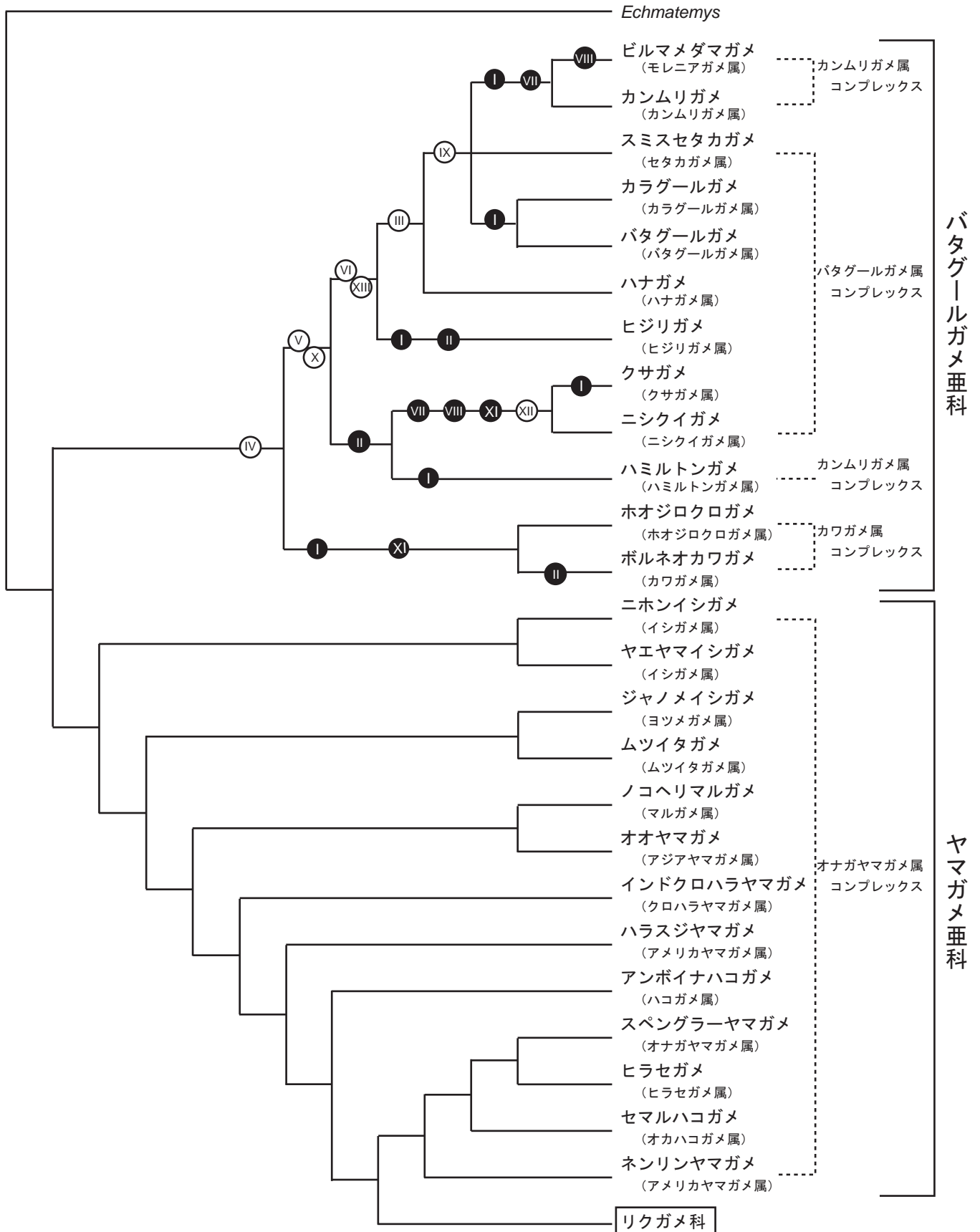


図3-3. 比較形態学 (Hirayama, 1984) によって構築されたバタゲールガメ科の系統関係. McDowell (1964) によるバタゲールガメ科4 complexを点線で樹上に示した. 枝上に系統を支持する形態形質を丸印でプロットした. 白丸は1回だけそのバタゲールガメ亜科で生じた形質. 黒丸は1回以上バタゲールガメ亜科で生じた形質. 丸の中に示した番号は表3-2の形質状態と対応する.

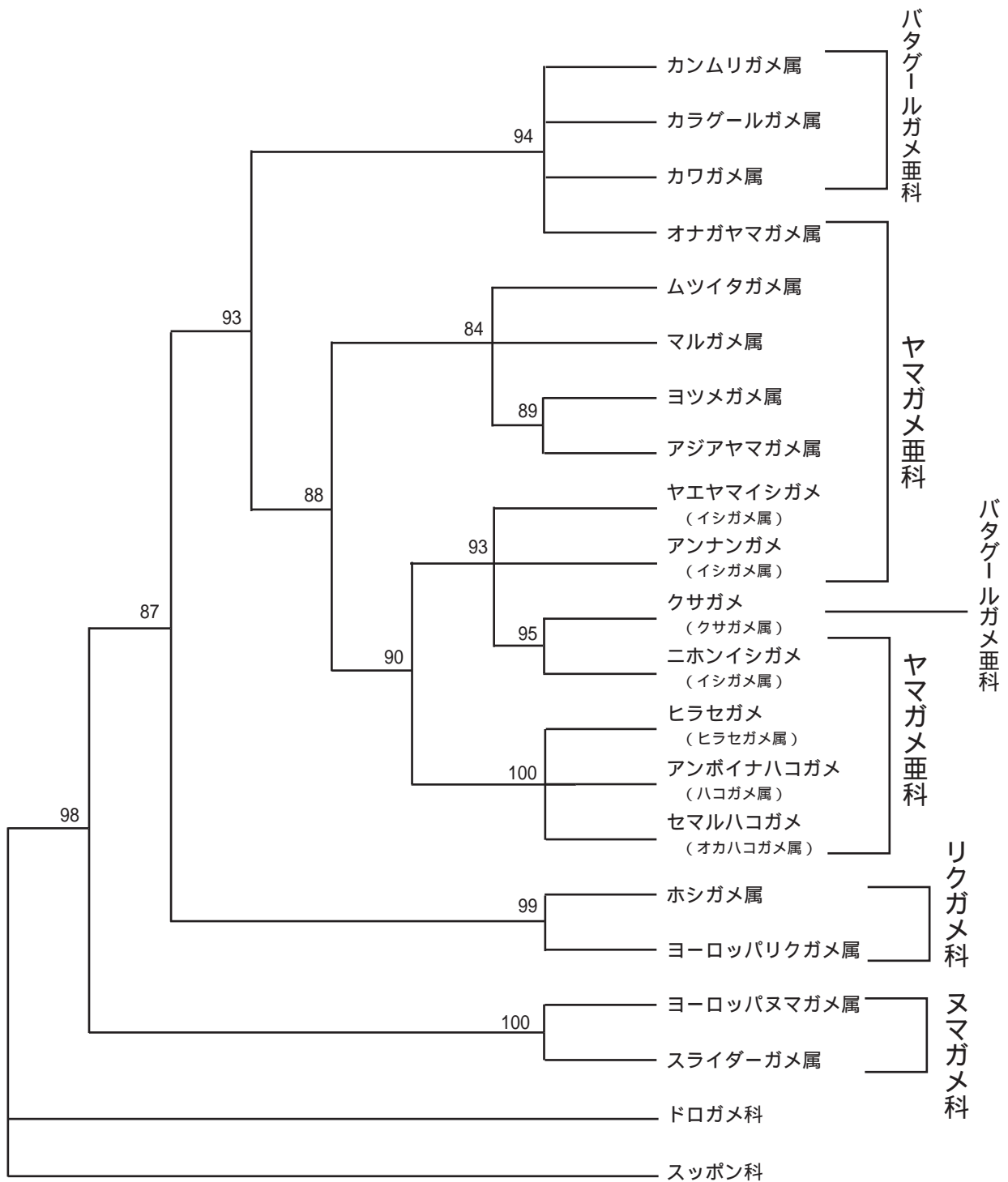


図3 - 4 . ミトコンドリアDNA12Sと16S rRNA部分配列に基づくリクガメ上科の近隣結合系統樹 (Honda et al. 2002より改変) . 70%以上のブートストラップ値で支持された分岐のみ採用して改変した . 分岐上の数値は2,000回復元のブートストラップ値を示す .

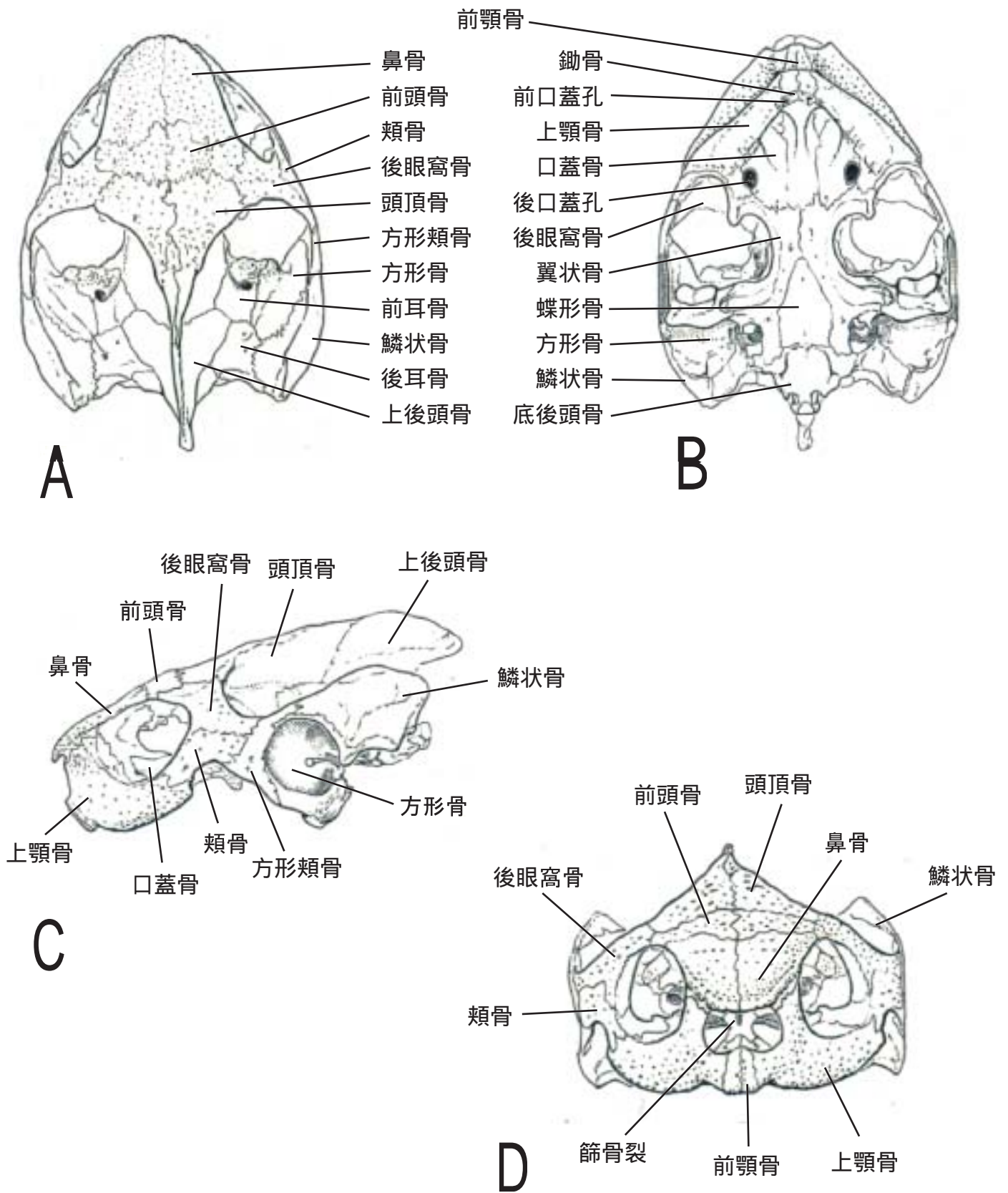


図3 - 5 . ホオジロクロガメの頭骨と各部の名称 .
 A:背側からの図 . B:腹側からの図 . C:側面からの図 . D:正面からの図 .
 (McDowell 1964より改変)

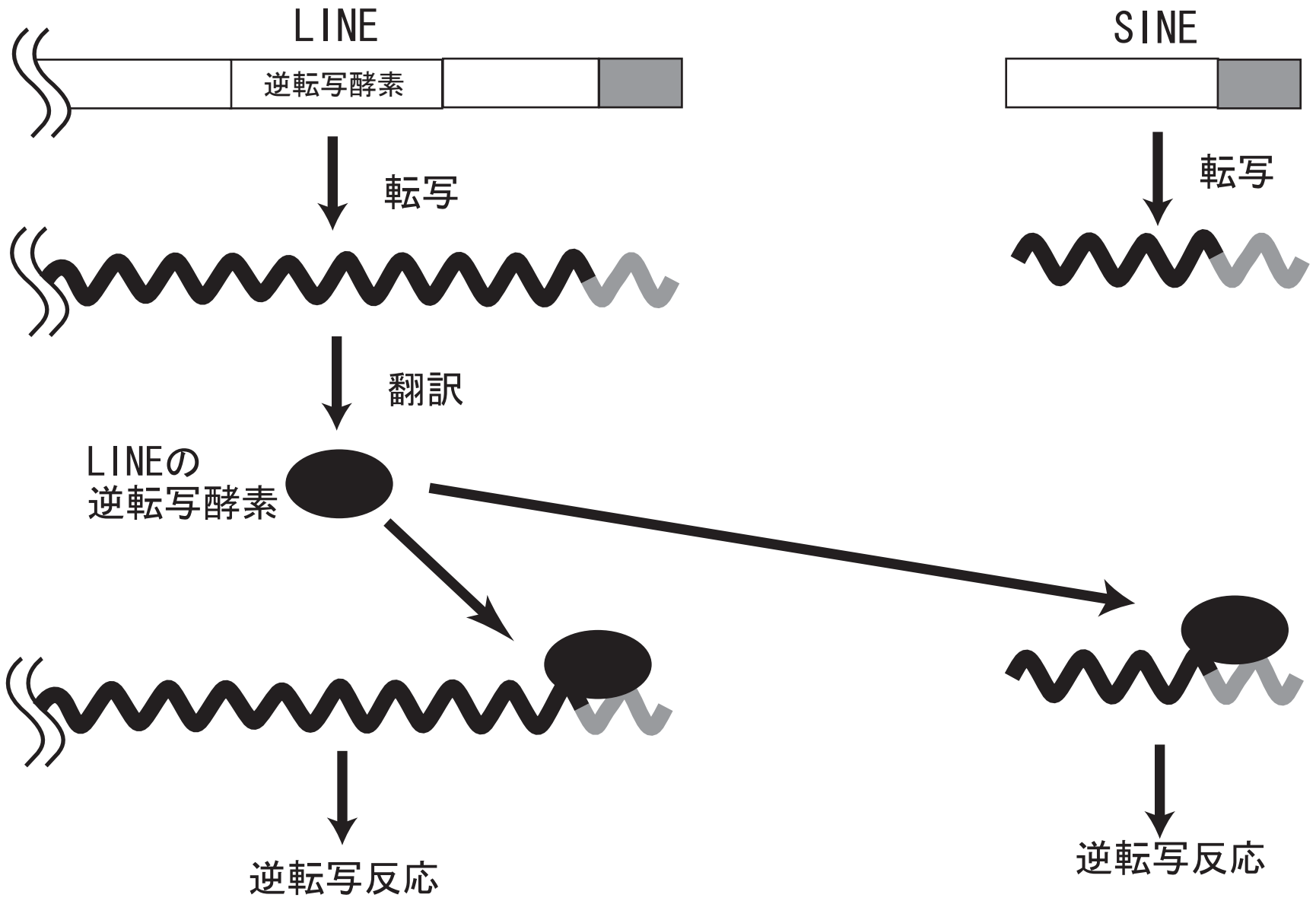
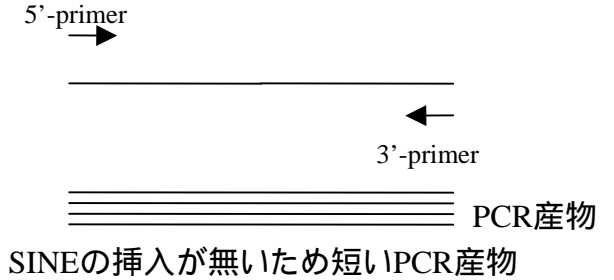
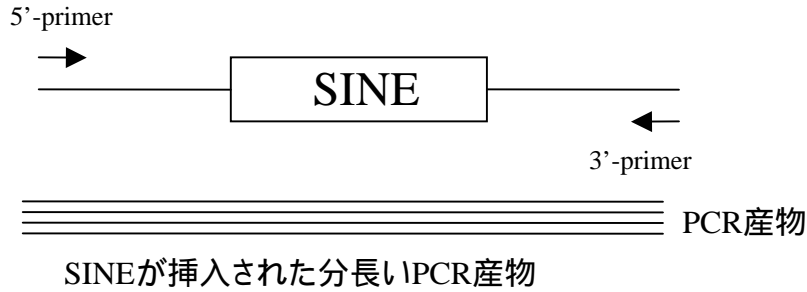
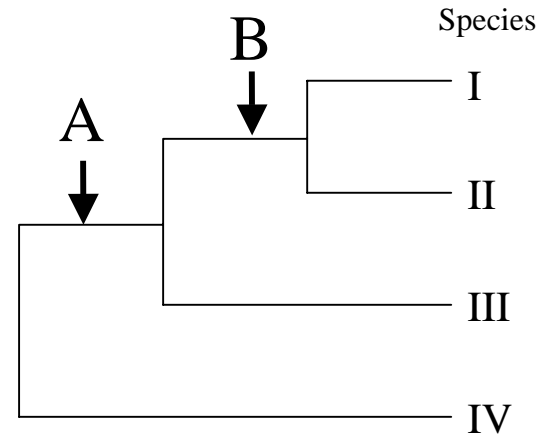
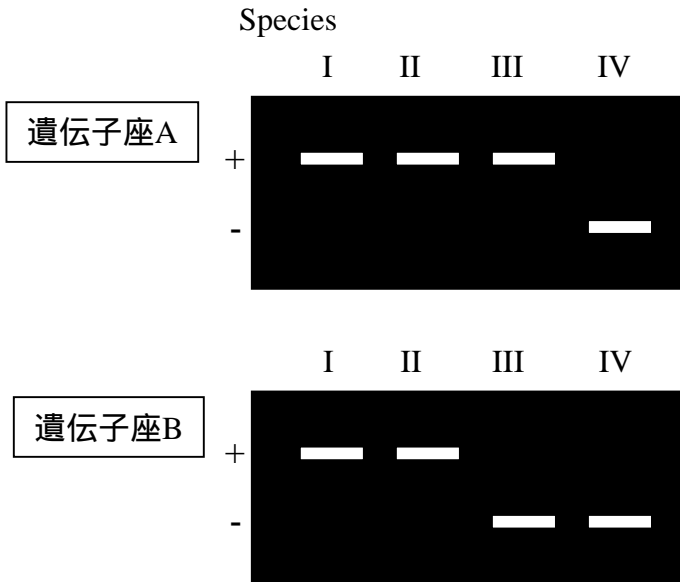


図3-6. SINEの転移機構

SINE挿入遺伝子座の近傍領域の配列からSINEを挟み込むようにプライマーを作成し、様々な種でオルソロガス遺伝子座のPCRを行う。



PCR産物を電気泳動し、その長さからSINE挿入の有無を確認する。



2つの遺伝子座AとBから4種(I, II, III, IV)の系統関係がSINEの挿入パターンによって明らかとなる。

図3 - 7 SINE挿入パターンによる系統関係推定法

		tRNA-related region		
CryI cons	1:	GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGTTCAAT		60
CryIA cons	1:		60
CryIB cons	1:		60
CryIC cons	1:		60
CryID cons	1:Y..R.		60
CryII cons	1:		60
CryIIA cons	1:		60
CryIIB cons	1:		60
CryIIC cons	1:		60
CryIID cons	1:		60
CryIIE cons	1:		60
CryI cons	61:	CCTTGAGGGGGCCAYTTAGGGATCTGGGGCAAAA	-----TGT-----	98
CryIA cons	61:R...T.....	-----TY.....	100
CryIB cons	61:C.....	-----	95
CryIC cons	61:C.....	-----	95
CryID cons	61:R...T.....R.....T.	GATTWAAAAAAAAA-----	112
CryII cons	61: T M	-----TC.....	100
CryIIA cons	61:T.....	-----TC.....	100
CryIIB cons	61:T.....	-----	95
CryIIC cons	61:	...V.....T..G.....	-----	83
CryIID cons	61:T.....A.....	-----TC...TGGATG	106
CryIIE cons	61:T.....A.....	-----	95
CryI cons	99:	-----CAGGG-ATGGTACTTGGTCTGCTAGTGAAGGCAGGGGRCTGGACTCRATGACC		151
CryIA cons	101:	-----R.....A.....Y.....		152
CryIB cons	96:	-----TCA.....G.....		143
CryIC cons	96:	-----G.....		136
CryID cons	113:	-----G.....Y.A..G.....A.....M.....		164
CryII cons	101:	-----YTT...G-----T...GT...AG...Y.		146
CryIIA cons	101:	-----T..G-----T...GT...AG.....		145
CryIIB cons	96:	-----TT...G-----T...GT...AG.....		140
CryIIC cons	84:	-----S..GT.R...AG.....		120
CryIID cons	107:	ATTTAATT...G-----T...GT...AG...T.		157
CryIIE cons	96:	-----T...A-----T...GT...AG...T.		138
CryI cons	152:	TTTCAAGGTCCCTTCCAGTTCTAGGAGATAGGTATATCTCCATTATTWA		201
CryIA cons	153:	.Y.....K.....Y.....M...T.		202
CryIB cons	144:R.....A		192
CryIC cons	137:T.....A...A		185
CryID cons	165:	.CYR.....Y...K...GT.....A...AT.		214
CryII cons	147:	CCTG.....ACC--..T..TC-...GAT..T..		186
CryIIA cons	146:	CCTG.....ACC--..T..TC-...GAT..T..A		185
CryIIB cons	141:	CCTR.....ACC--..T..TC-...GAT..T..		180
CryIIC cons	121:	CCTG.....ACC--..T..TC-...GAT..H..		160
CryIID cons	158:	CCTG.....ACC--..T..TC-...GAW..T..C		197
CryIIE cons	139:	CCTG.....ACY--..B..TC-...GAA..YT..		178

図3 - 8 . SINEサブグループとタイプのコンセンサ配列の比較 .
 実線でサブグループを分けている . 各サブグループのコンセンサ配列を太字で示す .
 CryIIサブグループの特徴的なヌクレオチドを白黒反転文字で示す . CryI consに一致する
 配列をドットで示し、ギャップはハイフンで示す . タイプ特異的な欠失または挿入領域
 を点線のボックスで囲む .

CryI typeA	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGTTCAAT	60
Taf04 locus	1:GGGAGGAATAGCTCTGTGGTTTTGAGCATTGGCCTCCT-----GGTTGTGAATTCAAT	52
Taf05 locus	1:-GGAGGGATATCTCAGTGGTTTTGAGCATTAGCCTGCTAAATCCAAGGTTGTGAGTTCAAGT	59
CMt02 locus	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAATCCCAGGGTTGTGAGTTCAAT	60
KSo28 locus	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGAGAGTTCAAT	60
BGs10 locus	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAATTCAAT	60
TTh06 locus	1:GGGAGGGACAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGACCTGCTAAACTTAGGGTTGTAAAGTTCAAGT	60
CryI typeB	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGTTCAAT	60
BGs02 locus	1:GAGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCTGCAGTTGTGAGTTCAAGC	60
KSo49 locus	1:GGGAGGCATAGCTCAGTGGTTTTGAGCACTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGGTCAAT	60
EEo32 locus	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGTTCAAT	60
TTh01 locus	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAATTTTAC	60
CryI typeC	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGTTCAAT	60
TTh23 locus	1:AGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAATCCAGGGCAGTGAGTTCAAT	60
BCr04 locus	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGTTCAAT	60
BCr21 locus	1:GGGAGGGATaGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCTAAGGTTATGAGTTCAAT	60
BCr61 locus	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGTTCAAT	60
KSo44 locus	1:-GGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGTTCAAT	59
CryI typeD	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGYTCART	60
CCi01 locus	1:GAGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTACTAAACCCAGGCTTGTGAGCTCACT	60
CCi09 locus	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGATAAACTTGGGGTTGTGAGCTCAGT	60
CCi32 locus	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGGTTTGGCATTAGCCTGTTAAGCCTGCCATTGTAAGCCCAAT	60
CCi19 locus	1:GCAAGGAATAGCTCAGTGGTTTTGAGCCCTAGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGCCCCAT	60
CCi34 locus	1:---AGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTAGCCTACTAAACCCAGGGTTGTAAAGTGAAAT	57
CryII typeA	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGTTCAAT	60
KSo48 locus	1:-GGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAGACCCAGGATTATGAGTTCAAT	59
EEo11 locus	1:GGGAGAGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCACTGGCCTGCTAAACCCAGGGTAGTGAGTTCAAT	60
TTh02 locus	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGATTGTGAGTTCAAGT	60
BCr09 locus	1:GGGAGGGATAGCTCAGGGATTTGAGCACTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTAAATTCAAT	60
CryII typeB	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGTTCAAT	60
CCm19 locus	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGTTCAAT	60
CCm27 locus	1:GAGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGAATTGTGAGTTCAAT	60
CCm52 locus	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGCTCAAT	60
CMt23 locus	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGTTCAAGT	60
CMt36 locus	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGTTCAAT	60
CMt38 locus	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGTTCAAT	60
CryII typeC	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGTTCAAT	60
TTh18 locus	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTTCTAAACCCATGGTTGTAAAGTTCAAT	60
BGs01 locus	1:AGAAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGTTCAAT	60
CryII typeD	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGTTCAAT	60
KSo13 locus	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTTTTGTGAGTTCAAGT	60
KSo06 locus	1:GGGACAGATAGCTCAGTGGTATGCACATTGGCCTGCTAAACCTAGGGTTGTGAGCTCAAT	60
KSo12 locus	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGTATTGGCCTACTAAACCCAGGGTTGCGAGTTCAAT	60
CCm10 locus	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGTTCAAT	60
BGs15 locus	1:GGGAGGGGTAGCTCAGTGGTTTTCTGCATTGGCTAGCTAAACCCAGGGTTGCAAGTTCAAT	60
CryII typeE	1:GGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGTTCAAT	60
KSo14 locus	1:GGGAGGGCTAGCTCAGTAGTTTTGATCATTGGCCTGCTAAAACCAGGGTTGTGAGTTCAAT	60
KSo24 locus	1:-GGAGGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATGGGCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGCTCAAT	59
KSo34 locus	1:GGGAGGGCTAGCTCAGTGGTTTTGCGCAGTGGCCTCCTAAACCCAGGATTATGCGTTCAAT	60
KSo35 locus	1:GGGAGGGATAGCTAAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAATCCAGGGTTGTGAATTCAAGT	60
KSo05 locus	1:GGGAAGGATAGCTCAGTGGTTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAATGTTGTGAGTTCAAT	60

図3 - 9-1 . tortoise polIII/SINEのアライメント .

各タイプのコセンサ配列を太字で示す . 実際に単離したSINE配列の内、各タイプの代表配列をここに示す . SINEが単離された種は各配列に付けられた名前の頭に3文字表記で示し、表3 - 2の略称と対応する . アライメントのギャップはハイフンで示す . CryIIサブグループに特徴的なヌクレオチドを白黒反転文字で示す . 矢印で示した塩基サイトはタイプ特異的な塩基置換である .

CryI typeA	61: CCTTGAGGRGG-CCATTTAGGGATCTGGGGCAAAAA-----TYTGT----	100
Taf04 locus	53: CCTTGTGGAGG-CCAT-----CTGCAGCAAAAA-----TTTGT----	84
Taf05 locus	60: CCTTGTGGAGG-CCATTT-----GGGGCAAAAG-----TTTGT----	91
Cmt02 locus	61: CCTTGAGGAGG-CCATTTAGGGATCTGGGGCAAAAA-----TCTGT----	101
KSo28 locus	61: CCTTGAGGGGG-CCATTTAGGGATCTGGGGCAACAAA-----TCTGT----	101
BGs10 locus	61: CCTTGAGGGAG-CCATTTAGGGAActGGGGCAAAAA-----TCTGT----	100
TTh06 locus	61: CCATAAGGGGG-CCATTTAGGGATCTGGGGCAAAAA-----TCTGT----	100
CryI typeB	61: CCTTGAGGGGG-CCACTTAGGGATCTGGGGCAAAAA-----	95
BGs02 locus	61: CCTTAAGGGGG-CCAGTTGGGGATATGGGGCAAAAA-----	95
KSo49 locus	61: CCTTGAGGGGG-CCACTTAGGGATCTGGGGCAAAAA-----	94
EEo32 locus	61: CCTTGAGCAGG-CCACTTAGGGATCTGGGGCCAAA-----	94
TTh01 locus	61: CATTAAAGGAGG-CCACTTAGGGATCTGGGGCAAAAA-----	95
CryI typeC	61: CCTTGAGGGGG-CCACTTAGGGATCTGGGGCAAAAA-----	95
TTh23 locus	61: CCTTGAGGGAG-CCACTTAGGGATCTGGGGCAAAAA-----	95
BCr04 locus	61: GCTTGAGGGGG-CCACTTAGGGATCTGGGGCAAAAA-----	95
BCr21 locus	61: CATTGAGGAGG-CCACCAGGAATCTGAGGCAAAAA-----	95
BCr61 locus	61: CCTTGAGGGGG-CCGCTTAGGGATCTGGGGCAAAAA-----	95
KSo44 locus	60: CCTTNNGGGGG-CCACTTAGGGANNTAGGGCAAAAA-----	94
CryI typeD	61: CCTTGAGGRGG-CCATTTAGGGRTCTGGGGCAAAATAGATTWAAAAAAAAA---TGT----	112
CCi01 locus	61: CCTTGAGGAGG-CCATTTAGGGAC-TGGGGCAAAATAGA-----TGT----	99
CCi09 locus	61: CCTTGAGGAGG-CCATTTAGGGAT-TGGGGCAAAATAGA-----TGT----	99
CCi32 locus	61: CCTTGGGGGAG-CTGTTTAGGGATCTGGGGCCAATAGGTTTAAAAAAAAA-----	109
CCi19 locus	61: CCTTGAGGAGC-CCATTTATGTGTCTGGGGCAAAATATTTTAAAAACAAA---TGT----	112
CCi34 locus	58: CCTTGAGGGGG-CCTCTTAAGGATCTAGGGCAAAATAAATTTAAAAGGAAAA-----	107
CryII typeA	61: CCTTGAGGGGG-CCATTTAGGGATCTGGGGCAAAAA-----TCTGT----	100
KSo48 locus	60: CCTTGAAGGGGGCCATTTAGGGATCTGGGGCAAAAAACAA-----TCTGT----	103
EEo11 locus	61: CCTTGAAGGGG-CCATTTAGGGATCTAGGGCAAAAA-----TCTGT----	100
TTh02 locus	61: CCTTGAGGGGG-CCATTTAGGGAActAGGGTAAAAA-----TCTGT----	100
BCr09 locus	61: CCTTAAGGGGGCCATTTAAGGATGTGGGACAAACA-----TCTAT----	101
CryII typeB	61: CCTTGAGGGGG-CCATTTAGGGATCTGGGGCAAAAA-----	95
CCm19 locus	61: CCTTGAGGGGG-CCATTTAGGGATCTGGGGCAAAAA-----	95
CCm27 locus	61: CCTTGAGGGGG-CCATTTAGGGATCTGGGGCAAAAA-----	95
CCm52 locus	61: CCTTGAGGGGG-CCATTT-GGAATCTGGGGCAAAAA-----	94
Cmt23 locus	61: CCTTGAGGGGG-CCATTTAGGGATCTGGGGCAAAAA-----	95
Cmt36 locus	61: CCTTGAGGGGG-CCATTTAGGGATCTGGGGCAAAAA-----	95
Cmt38 locus	61: CCTTGAGGGGGG-CATTTAGGGATCTGGGGCAAAAA-----	95
CryII typeC	61: CCTTVAGGGGG-CCATTTGGGGA-----	82
TTh18 locus	61: CCTCAAGGGGG-CCATTTGGGGA-----	82
BGs01 locus	61: CCTTGAGGGGG-CCATTTAGGGA-----	82
CryII typeD	61: CCTTGAGGGGG-CCATTTAGGGATAATGGGGCAAAAA-----TCTGTTGGA	104
KSo13 locus	61: CCTTGAGGGGG-CTATTTAGGGATAATGGTGAAAAA-----TATGATGGA	104
KSo06 locus	61: CCATGAGGGAA-CCATTTGTGGATAATGAGGCAAAAA-----TCTGTTGGA	104
KSo12 locus	61: CCTTGAGTGG-CCATTTAGGGATAATGAGGCAAAA-----TTTGTGTTGGA	102
CCm10 locus	61: CCTTGAGGGGG-CCATTTAGGGATAATGGGGCAAAAA-----TCAATTGGA	104
BGs15 locus	61: CCTTGAGAGGA-CCATTTAGGGATAAGGGGGCAAAAA-----TCAGTTGGA	104
CryII typeE	61: CCTTGAGGGGG-CCATTTAGGGATAATGGGGCAAAAA-----	95
KSo14 locus	61: CCCTAAGAGAG-CCATTTAGGGATAATGGGGCAAAAA-----	95
KSo24 locus	60: ACTTGAGAGGG-CCATTTAGGGATAATGGGGTAAAAA-----	94
KSo34 locus	61: CCTTGAGGGGG-CCCTTTAGGGATAATGGGGTAAAAA-----	95
KSo35 locus	61: CCTTGAGGGGG-CCATTTAGGGATAATGGGGCAAAAA-----	95
KSo05 locus	61: CCTTGAGGGGG-ACATTTAGGGATAATGGGGCAAAAA-----	95

図3 - 9-2 . tortoise polIII/SINEのアライメント . .

CryI typeA	101:	-----CAGGG-ATGGTACTTGGTCCTGCT-GTGARGGCAGGGG A C-TGGACTYRATG	149
TAf04 locus	85:	-----CAGGG-ATGGTATTTGGTCCTGCT-GTGTAGGCAGGGG A C-AGGACTTGATG	133
TAf05 locus	92:	-----CAGGG-ATGGTACATGGTCCTGCT-GTGAAGGCAGCAG A C-TGGACTTGATG	140
CMt02 locus	102:	-----CACGG-ACAGTACTTGGTCCTGCTAGTGAAGGCAGGGG A C-TGGACTTGATG	151
KSo28 locus	102:	-----CAGGGGACAGTACTCAATCCTGCTAGTGTAGGCAGGGG A C-TGGACTCGATG	152
BGs10 locus	101:	-----CAGGG-ACAGTACTTGGTCCTGCT-GTGAAGGCAGGGG A C-TAGATGCAATG	149
TTh06 locus	101:	-----GAAGG-ACAGTACTTGGTCCTGCTAGTGAAGACAGGAG A C-TGGATTCAATG	150
CryI typeB	96:	-----TCAGTACTTGGTCCTGCTAGTGAAGGCAGGGGG C -TGGACTCRATG	140
BGs02 locus	96:	-----TCAGTACATGGTCCTGCTAGTGAAGGCAGGGGG C -TGGACTTGATG	140
KSo49 locus	95:	-----TCAGTACTTGGTCCTGCTAGTGAAGGCAGGGGG T -TGGACTCAATG	139
EEo32 locus	95:	-----TCAGTACTTGGTCCTGCTAGTGAAGGCAGGGGG C -TGGACTCAATG	139
TTh01 locus	96:	-----TCAGTACATGGTCCCACTAGTGAAGACAGGG A AC-TGGACTTAATG	140
CryI typeC	96:	-----TTGGTCCTGCTAGTGAAGGCAGGGGG C -TGGACTCRATG	133
TTh23 locus	96:	-----TTGGTCCTGCTAGTGAAGGCAGGG-----TG	121
BCr04 locus	96:	-----TTGGTCCTGCTAGTGAAGGCAGGGGG C -TGGACTCAATG	133
BCr21 locus	96:	-----TTAGTCCTGCTAGTGAAGGCAGGGGG C -TGAATTGATG	133
BCr61 locus	96:	-----TTGGTCCTGCTAGTGAAGGCAGGGGG C CTGGACTCGATG	134
KSo44 locus	95:	-----TTGGTCTTGCTAGTGAAGGCAGGGGG C -TGGACTCAATG	132
CryI typeD	113:	-----CAGGG-ATGGTGCTTGGTCCTG CY - R AGAGGGCAGGGG A C-TGGACTMRATG	161
CCi01 locus	100:	-----CAGGG-ATGGTACATGGCCCTGCC-CAGAGGGCAGATG A C-TGGACTCATTG	148
CCi09 locus	100:	-----CAGGG-ATGGTGTTTGGCCCTGCC-AAGAGGGCAGGGG A C-TGGACTAGTTG	148
CCi32 locus	110:	-----TGTTCACTCCCACT-AAGTGGGCAGGGG A C-TGGACTCAAGT	149
CCi19 locus	113:	-----CAGGG-GTGGCGCTTGGGCCTACT-GAGAGGGCAGATG A C-TGTGCTTGATG	161
CCi34 locus	108:	-----AGGG-ATGGTTCCTTAGTCCTGCT-AAGAGAGCAGGGG A C-TGGACTCAGTG	155
CryII typeA	101:	-----CTGGGGA-----TTGGTCCTGCT T -TGAG--CAGGGGG T -TGGACTAGATG	142
KSo48 locus	104:	-----CTGGGGA-----TTGGTCCTGCT T -TGAG--CAGGGGG A T-TGGACTAGATG	145
EEo11 locus	101:	-----CTGGGAA-----TTGATCCTGCT T -TGAG--CAGGGGG T -TGGACTAGATG	142
TTh02 locus	101:	-----CTGGGGA-----TTGGTCCTGCT T -TGAG--CAGGGGG T -TGAAGTAGATG	142
BCr09 locus	102:	-----CTGGGGG-----TTGGTCCTGCT T -TGAG--CAGGGGG A T-TAGACTAGATG	143
CryII typeB	96:	-----TTGGGGA-----TTGGTCCTGCT T -TGAG--CAGGGGG T -TGGACTAGATG	137
CCm19 locus	96:	-----TTGGGGA-----TTAGTCCTGCT T -TGAG--CAGGGGG T -TGGACTAGATG	137
CCm27 locus	96:	-----CTGTGGA-----TTGGTCCTTCT T -TGAG--TAGGAGG T -TGGACTAGATG	137
CCm52 locus	95:	-----TTGGGGA-----TTGGCCCTGCT T -TGAG--CAGCAGG-----ACTAGATG	132
CMt23 locus	96:	-----TTGGGGA-----TTGGTCCTGCT T -TGAG--CAGCGGG T -TGGACTAGATG	137
CMt36 locus	96:	-----TTGGGGA-----TTGGTCCTGCT T -TGAG--CAGGGGG T -TGGACTAGATG	137
CMt38 locus	96:	-----TTGCGGA-----TTGGTCCTGCT T -TGAG--CAGGGGG T -TGGACTAGATG	137
CryII typeC	83:	-----TTGGTCCTGCT T -TGAG--CAGSGGG T -TRGACTAGATG	117
TTh18 locus	83:	-----TTGGTCCTGCT T -TGAG--CAGGGGG T -TAGACTAGATG	117
BGs01 locus	83:	-----TTGGTCCTGCT T -TGAG--CAGGGGG T -TGGACTAGATG	117
CryII typeD	105:	TGATTTAATTGGGGA-----TTGGTCCTGCT T -TGAG--CAGGGGG T -TGGACTAGATG	154
KSo13 locus	105:	TGATTTAATTGGGGA-----TTGGTCCTGCT C -TGAG--CAGGGGG T -TGGACTAGAT-	153
KSo06 locus	105:	TGATTTAACTAGGGA-----CTGGTCCCGCT T -TGAG--CAGGAGG C -TGGACAAGATG	154
KSo12 locus	103:	TGATTTAACTGGGGA-----TTGATCCTGCT T -TGAG--CAGGGGG T -TGGACTAGATG	152
CCm10 locus	105:	TGATTTAATTGGGGA-----TTAGTCCTGCT T -TGAG--TAGGGGG T -TGGACTAGATG	154
BGs15 locus	105:	GGATTTAATTGGCTA-----CTGGTCCCTGCT T -TGAG--CAGAGGG T -TGGACTAGATG	154
CryII typeE	96:	-----TGGGA-----TTGGTCCTGCT T -TGAG--CAGGGGG T -TGGACTAGATG	135
KSo14 locus	96:	-----TGGGA-----TTGGTCCTGCT T -TGAG--CAGCGGG T -TGGACTAGATG	135
KSo24 locus	95:	-----TAGGA-----CTGGTCTTGCT T -TGAG--CAGCGAG T -TGGATTAGATG	134
KSo34 locus	96:	-----TGGGA-----ATGGTCCTGCT T -TGAG--CAGTGGG T -TGAAGTAGATG	135
KSo35 locus	96:	-----TGGGG-----TTGGTCTTGCT T -TGAG--CATGTG C -TAGACTAGGTG	135
KSo05 locus	96:	-----TGGGA-----TTGGTCCTACT T -TGAG--CAGGGGG T -TGGACTAGATG	135

図3 - 9-3. tortoise polIII/SINEのアライメント .

CryI typeA	101:	-----CAGGG-ATGGTACTTGGTCCTGCT-GTGARGGCAGGGGAC-TGGACTYRATG	149
Taf04 locus	85:	-----CAGGG-ATGGTATTTGGTCCTGCT-GTGTAGGCAGGGGAC-AGGACTTGATG	133
Taf05 locus	92:	-----CAGGG-ATGGTACATGGTCCTGCT-GTGAAGGCAGCAGAC-TGGACTTGATG	140
CMt02 locus	102:	-----CACGG-ACAGTACTTGGTCCTGCTAGTGAAGGCAGGGGAC-TGGACTTGATG	151
KSo28 locus	102:	-----CAGGGGACAGTACTCAATCCTGCTAGTGTAGGCAGGGGAC-TGGACTCGATG	152
BGs10 locus	101:	-----CAGGG-ACAGTACTTGGTCCTGCT-GTGAAGGCAGGGGAC-TAGATGCAATG	149
TTh06 locus	101:	-----GAAGG-ACAGTACTTGGTCCTGCTAGTGAAGACAGGAGAC-TGGATTCAATG	150
CryI typeB	96:	-----TCAGTACTTGGTCCTGCTAGTGAAGGCAGGGGGC-TGGACTCRATG	140
BGs02 locus	96:	-----TCAGTACATGGTCCTGCTAGTGAAGGCAGGGGGC-TGGACTTGATG	140
KSo49 locus	95:	-----TCAGTACTTGGTCCTGCTAGTGAAGGCAGGGGGT-TGGACTCAATG	139
EEo32 locus	95:	-----TCAGTACTTGGTCCTGCTAGTGAAGGCAGGGGGC-TGGACTCAATG	139
TTh01 locus	96:	-----TCAGTACATGGTCCCACACTAGTGAAGACAGGGAAC-TGGACTTAATG	140
CryI typeC	96:	-----TTGGTCCTGCTAGTGAAGGCAGGGGGC-TGGACTCRATG	133
TTh23 locus	96:	-----TTGGTCCTGCTAGTGAAGGCAGGG-----TG	121
BCr04 locus	96:	-----TTGGTCCTGCTAGTGAAGGCAGGGGGC-TGGACTCAATG	133
BCr21 locus	96:	-----TTAGTCCTGCTAGTGAAGGCAGGGGGC-TGGAATTGATG	133
BCr61 locus	96:	-----TTGGTCCTGCTAGTGAAGGCAGGGGGCCTGGACTCGATG	134
KSo44 locus	95:	-----TTGGTCTTGCTAGTGAAGGCAGGGGGC-TGGACTCAATG	132
CryI typeD	113:	-----CAGGG-ATGGTGCTTGGTCCTGCT-RAGAGGGCAGGGGAC-TGGACTMRATG	161
CCi01 locus	100:	-----CAGGG-ATGGTACATGGCCCTGCC-CAGAGGGCAGATGAC-TGGACTCATTG	148
CCi09 locus	100:	-----CAGGG-ATGGTGTGGCCCTGCC-AAGAGGGCAGGGGAC-TGGACTAGTTG	148
CCi32 locus	110:	-----TGTTCACTCCCACT-AAGTGGGCAGGGGAC-TGGACTCAAGT	149
CCi19 locus	113:	-----CAGGG-GTGGCGCTTGGGCCCTACT-GAGAGGGCAGATGAC-TGTGCTTGATG	161
CCi34 locus	108:	-----AGGG-ATGGTCTTAGTCCTGCT-AAGAGAGCAGGGGAC-TGGACTCAGTG	155
CryII typeA	101:	-----CTGGGGA-----TTGGTCCTGCTT-TGAG--CAGGGGGT-TGGACTAGATG	142
KSo48 locus	104:	-----CTGGGGA-----TTGGTCCTGCTT-TGAG--CAGGGGAT-TGGACTAGATG	145
EEo11 locus	101:	-----CTGGGAA-----TTGATCCTGCTT-TGAG--CAGGGGGT-TGGACTAGATG	142
TTh02 locus	101:	-----CTGGGGA-----TTGGTCCTGCTT-TGAG--CAGGGGGT-TGAACTAGATG	142
BCr09 locus	102:	-----CTGGGGG-----TTGGTCCTGCTT-TGAG--CAGGGGAT-TAGACTAGATG	143
CryII typeB	96:	-----TTGGGGA-----TTGGTCCTGCTT-TGAG--CAGGGGGT-TGGACTAGATG	137
CCm19 locus	96:	-----TTGGGGA-----TTAGTCCTGCTT-TGAG--CAGGGGGT-TGGACTAGATG	137
CCm27 locus	96:	-----CTGTGGA-----TTGGTCCTTCTT-TGAG--TAGGAGGT-TGGACTAGATG	137
CCm52 locus	95:	-----TTGGGGA-----TTGGCCCTGCTT-TGAG--CAGCAGG----ACTAGATG	132
CMt23 locus	96:	-----TTGGGGA-----TTGGTCCTGCTT-TGAG--CAGCGGGT-TGGACTAGATG	137
CMt36 locus	96:	-----TTGGGGA-----TTGGTCCTGCTT-TGAG--CAGGGGGT-TGGACTAGATG	137
CMt38 locus	96:	-----TTGCGGA-----TTGGTCCTGCTT-TGAG--CAGGGGGT-TGGACTAGATG	137
CryII typeC	83:	-----TTGGTCCTGCTT-TGAG--CAGSGGGT-TRGACTAGATG	117
TTh18 locus	83:	-----TTGGTCCTGCTT-TGAG--CAGGGGGT-TAGACTAGATG	117
BGs01 locus	83:	-----TTGGTCCTGCTT-TGAG--CAGGGGGT-TGGACTAGATG	117
CryII typeD	105:	TGATTTAATTGGGGA-----TTGGTCCTGCTT-TGAG--CAGGGGGT-TGGACTAGATG	154
KSo13 locus	105:	TGATTTAATTGGGGA-----TTGGTCCTGCTT-TGAG--CAGGGGGT-TGGACTAGAT-	153
KSo06 locus	105:	TGATTTAACTAGGGA-----CTGGTCCCCTT-TGAG--CAGGAGGC-TGGACAAGATG	154
KSo12 locus	103:	TGATTTAACTGGGGA-----TTGATCCTGCTT-TGAG--CAGGGGGT-TGGACTAGATG	152
CCm10 locus	105:	TGATTTAATTGGGGA-----TTAGTCCTGCTT-TGAG--TAGGGGGT-TGGACTAGATG	154
BGs15 locus	105:	GGATTTAATTGGGCTA-----CTGGTCCTGCTT-TGAG--CAGAGGGT-TGGACTAGATG	154
CryII typeE	96:	-----TGGGA-----TTGGTCCTGCTT-TGAG--CAGGGGGT-TGGACTAGATG	135
KSo14 locus	96:	-----TGGGA-----TTGGTCCTGCTT-TGAG--CAGCGGGT-TGGACTAGATG	135
KSo24 locus	95:	-----TAGGA-----CTGGTCTTGCTT-TGAG--CAGCGAGT-TGGATTAGATG	134
KSo34 locus	96:	-----TGGGA-----ATGGTCCTGCTT-TGAG--CAGTGGGT-TGAACTAGATG	135
KSo35 locus	96:	-----TGGGG-----TTGGTCTGCTT-TGAG--CATGTGCT-TAGACTAGGTG	135
KSo05 locus	96:	-----TGGGA-----TTGGTCCTACTT-TGAG--CAGGGGGT-TGGACTAGATG	135

図3 - 9-4 . tortoise polIII/SINEのアライメント .

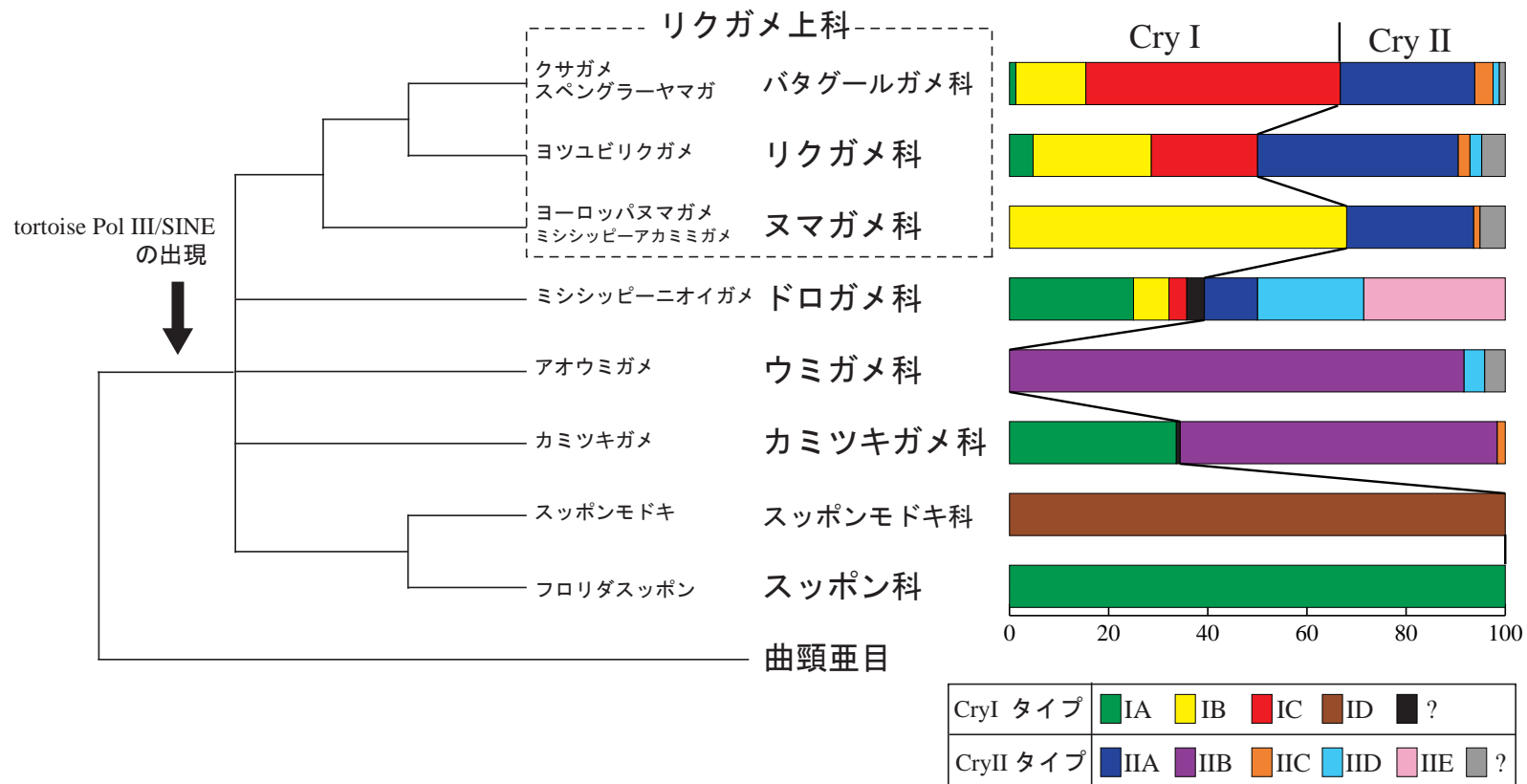


図3-10. tortoise polIII/SINEサブグループ／タイプの構成の比較.

実測値は表3-3, 4, 5を参照. スケールはパーセント (%)を示す. 系統樹を左側に示し, はGaffney and Meylan (1988)とShaffer, Meylan and McKnight (1997)による系統樹のコンセンサスで作られている. 推定tortoise polIII/SINEの出現時期 (Ohshima et al. 1996)を樹上に示す.

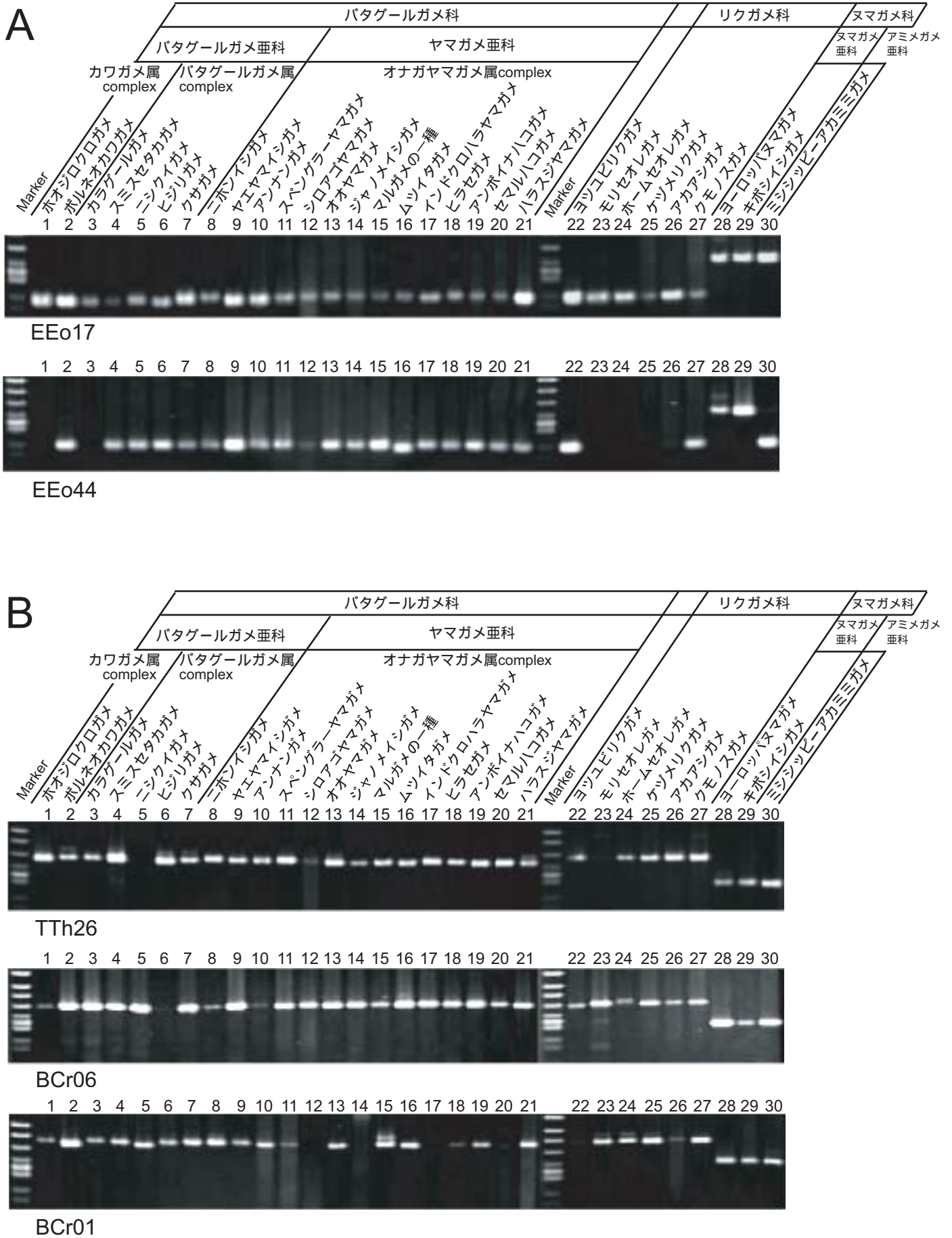


図3 - 11-1 . SINE挿入遺伝子座のPCR解析の結果 .

C

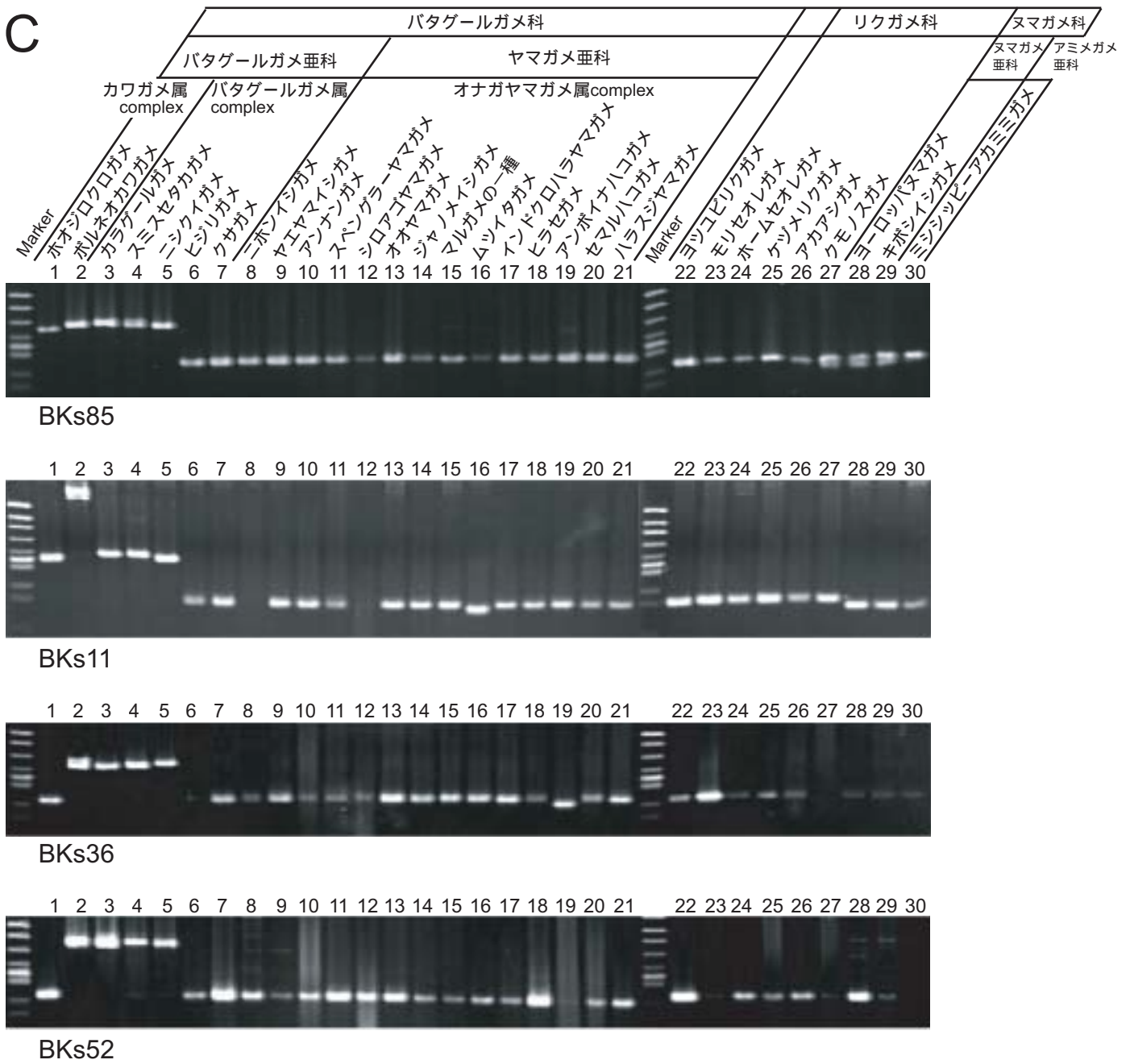


図3 - 11 - 2 . SINE挿入遺伝子座のPCR解析の結果 .

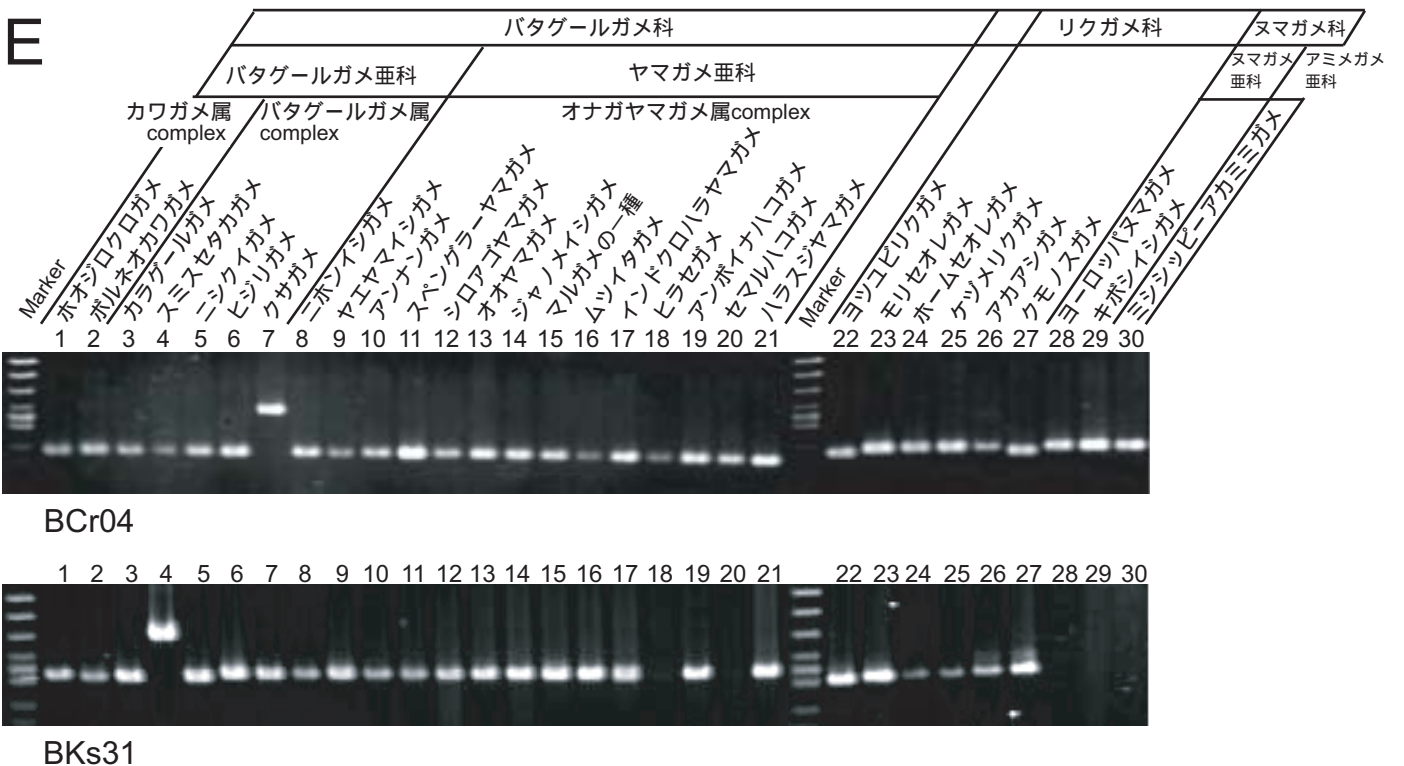
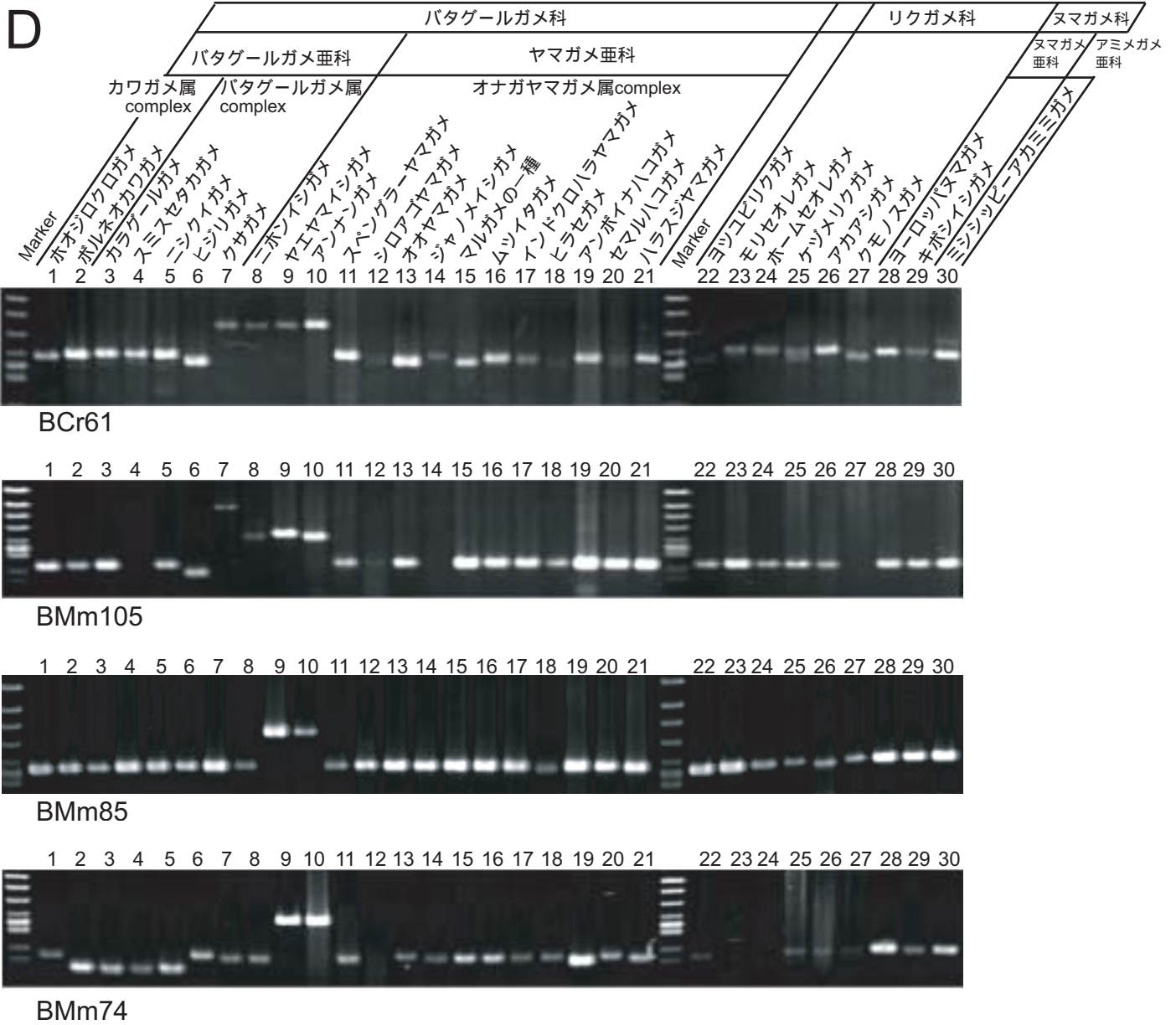


図3 - 11 - 3 . SINE挿入遺伝子座のPCR解析の結果 .

A- EEO17 locus

```

22 Testudo 1: TGGACACAGAGTTGATGGACCTTCCCAACCTGCTTTAGAACAGCAGTCTCTGCTTCAGCAGTGCAAGATCAACCTC----- 77
28 Emys 1: GGTCAGTACCAATATAGCCTC.....C.....C.....AAGACCTTTGAGGGGAGGGATAG 118
                *****

22 Testudo 77:----- 77
28 Emys 119:CTCAGTGGTTTGAGCATGGCCCTGCTAAATCCAGGGTTGTGAGTTCAATCCTTGAGGGGGCCATTAGGGATCTGGGTCAAAAATCTGTTTGGGATTTGGTCTGCTTTGAGCGGGAGGT 238

22 Testudo 78:-----AAGAGGTTTCTGCCTTGTCTCTCTGAATAAATCATCATAATTATTACTGGGCAAGACCAGTAGACC 145
28 Emys 239:TGGACTAGATGACCTCCTGAGGTCCCTTCCAACCTGATATTCTATGATTCT.....G.....T.....C.....ATG.....G 358
                *****

22 Testudo 146:TTCTTATAAATTA 158
28 Emys 359:.....GGCAGTAGTGTAGTCCATCA 391
                *****

```

A- EEO44 locus

```

09 M.mutica 1:-----CAAGAATAAGTGATATTTCAGTGCTGGTAATCAACTCTTTAAAATAGTGGTCTTCCCAGGGCAATGTCTGCAAGGACATGCCCGTCTGC----- 90
28 Emys 1:ACTACTTCCCAGAATGCATG.....G.....G.....A.A...ATGGGGAGGG 120
29 Clemys 1:-----G.....A.A...ATGGGGAGGG 100
30 Trachemys 1:-----G.....A.A...----- 89
                *****

09 M.mutica 90:----- 90
28 Emys 121:ATAGCTCAGTGGTTTCAGCATTGGCCCTGCTAAACCCAGGGTTGTGAGTTCAATCCTTGAGGGGGCCATTGGGGAACTGGGGTAAAATCTGTCTGGGATTTGGTCTGCTTTGAGCAG 240
29 Clemys 101:ATAGCTCAGTGGTTTGAGCATTGGCCCTGCTAAACCCAGAGTTGTGAGTTCAATCCTTGAGGGGGCCATTGAGGGAACGGGGTAAAATCTGTCTGGGATTTGGTCTGCTTTGAGCAG 220
30 Trachemys 89:----- 89

09 M.mutica 90:-----CTTCTGATCCCTTGATCCTCACAAACCAATGTAGCCTGGTGGAGGACTGGCTGGGGGG 149
28 Emys 241:GGGGTTGGACTAGATGACCTCCTGAGGTCCCTTCTAACCCCTGATATTCTATGATTCTATGC.....C.....C.....T..... 360
29 Clemys 221:GGGGTTGGACTAGATGACCTCCTGAGGTCCCTTCTAACCCCTGATATTCTATGATTCTATGC.....CC.....YC.....T..... 340
30 Trachemys 89:-----CC.....G.....C..... 148
                *****

09 M.mutica 150:--CATGCTTGAGATCCCAAA 167
28 Emys 361:--.....C.....TAGCTGAAGG-TGCTCTGGAAC 398
29 Clemys 341:--.....C..... 358
30 Trachemys 149:GG.....C..... 168
                *****

```

B- TTh26 locus

```

11 Geoemyda 1: TATTTTATTGTTTCTCCCACTTTTATTGTTTACAACCCATTGTAATCTTTTTTTAAATGTTAGTATAGTCTGTTGAGTCTGTGTTAAGGTAT 100
22 Testudo 1:TTTCATGATGTTTCACTACCC.....T.TTC-----G.....T.....T..... 108
28 Emys 1: T.N.T.T.T.C.....N.N.N.T.....A...TC.....T.C.....C 81
30 Trachemys 0: .....A...T.....T.C.....C 57
                *.* *****

11 Geoemyda 101:GGAGGGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTGAGCATTTGGCCCTACTAAACCCACRTTGTGAGTTTAAATCCCTGAGGGGCCATCTGGGGCAAAATCAGTACTTGGTCTGCTAGTGAAGACAGG 220
22 Testudo 109:.....GG..... 228
28 Emys 82:T..... 84
30 Trachemys 58:T..... 60
                **

11 Geoemyda 221:GGGCTGGACTTGATGACCTTTTAGGGTCCCTCCAGTTCTATGAGATAAAGTATATCTCCATATATATAACCATCAGGCATCCAGTGGACTGAGATAACCAAGTAGTTTCATCCCAT 340
22 Testudo 229:.....A.....G.....T.....T.....C.....T..... 348
28 Emys 84:-----T..... 135
30 Trachemys 60:-----T..... 111
                *****

11 Geoemyda 341:AGTATAAGAAGTTTGAATAACCCAAATTTATCCATCCTAGTTGACCCTTTGTGGGTAATTCATCTGGCTGAAATAACTTTGTTTCCAT 433
22 Testudo 349:.....G.....C.....A.....GGAGAAGCTTCATGGCATT 461
28 Emys 136:A.GC.....T.....N...CA..C.....T.....A..... 213
30 Trachemys 112:A.GC.....T.....C.....CA..C.....T.....C.....A..... 204
                *.* *****

```

B- BCr06 locus

```

05 Chinemys 1:GATTCTTCCCAGGATTTCTAGATTGGAATGCAGACTAACACATCTGTGTAGATAAATCCCTGTAATAATGCAAAACAGTTAACACAAGCATCATATGTTACTGGATAGCACCTCTTTTA 120
15 Trachemys 1:.....T.....GT.....C.....T.....A..... 98

05 Chinemys 121:TTTCAATTTTAAAGGGGAGGGATAGCTTAGTGGTTTGAGCATTGGCCCTAGTAAACCCAGAATATGAGTTCAATCCTTGAGGGGACCCTTAGGGATCTAGGGCAAAAATCAGTACTTGGT 240
15 Trachemys 99:----- 109

05 Chinemys 241:CTCAGTGTGAAAGCAGGGGCTGGACTCAATGACCTTTCCAGGTCCCTTCCAGTTCTATGAGAGAGGTATATCTCCATATATATATAAAAAGCTCTGTCAATGTATAAACAAT 360
15 Trachemys 109:-----N..... 135

05 Chinemys 361:GCTATTTTCCAGTGAATAATGCAGCAATGACAATTTGATACCAACACTTAAGGG-TTTAAAACTAATTATGACAATCTATCCACAACCTTGAACCTTTTGTAAACCCCTCAGTGAAAAAC 481
15 Trachemys 136:.....G...G...T.....T...C.....G..... 237

```

図3 - 12-1 . SINE挿入遺伝子座のアライメント .

各アライメントに示されたA- からE- は図3 - 10で各遺伝子座に与えられた記号番号と対応する。ドットは上の配列と一致することを意味する。ギャップはハイフンで示す。アンダーラインで各PCRに用いたプライマーを配列を示す。01 Siebenrockiella=ホオジロクロガメ、02 Orlitia=ボルネオカワガメ、03 Callagur=カラゲールガメ、04 Kachuga=スミスセタカガメ、05 Malayemys=ニシクイガメ、06 Hieremys=ヒジリガメ、07 Chinemys=クサガメ、09 M.mutica=ヤエヤマシシガメ、10 M.annam=アンナンガメ、13 Heosemys=オオヤマガメ、14 Sacalia=ジャノメシシガメ、16 Notochelys=ムツイタガメ、19 Cuora=アンボイナハコガメ、21 Rhinoclemys=ハラスジヤマガメ、22 Testudo=ヨツビリクガメ、23 Kinixys=モリセオレガメ、28 Emys=ヨーロッパヌマガメ、29 Clemys=キボシシシガメ、30 Trachemys=ミシシッピーアカミミガメ。

D- BCr61 locus

```

04 Kachuga      1:          GCCCAAACCATGCTCATGAGCCACATGTGGCTCTTTTACCATTAAGTGCOCGCTCAAAGAGTCCCCCACCCTCATTCTCTGCTATCAGCGTGGGGCAG 100
07 Chinemys    1: GCTCCTAATATGTGAGGGAT.....AG.....G.....GC.....A.....GG. 119
21 Rhinoclemmys 1:          .....AG.....G.....GCT.....A.....GT. 99
30 Trachemys   1:          .....CA.....A.....CA.....C-----A.....A.....GG. 94
                *****
04 Kachuga      101:GGGGTGTTTTGCTCAGGGCTTCTGACCTCAGGTTGGTGGTAGGGCTAGGG-CTTCTTCCACAGGAAGGGAGG----- 175
07 Chinemys    120:.....CA.....G.....T.G.....G.....GATAGCTCAGTGGTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCAGGGTTG 238
21 Rhinoclemmys 100:T.T.....C.....G.....G.....G..... 173
30 Trachemys   95:-----G.....G.....G.....G.....G.....G..... 164
                *****
04 Kachuga      175:----- 175
07 Chinemys    239:TGAGTTCAATCCTTGAGGGGGCCGCTTAGGGATCTGGGGCAAAAATTGGTCTGTAGTGAAGGCAGGGGGCTGGACTCGATGACCTTCAAGGTCCTCCAGTTCTAGGAGATTGGT 358
21 Rhinoclemmys 173:----- 173
30 Trachemys   164:----- 164

04 Kachuga      176:-----TGTGCTGCCAGGGCTCAGAGCTTCTGCTCTGCTGCTGAAGTCCCTAGCCCTGGCAGGTGCACCTCCCTCCTGCAGAGTTGAAG 263
07 Chinemys    359:ATAICTCCAATTATTACTACTACTTTTATT-----C.....C.....T.C..... 459
21 Rhinoclemmys 174:-----C.....C.....A.....C..... 261
30 Trachemys   165:-----C.....T.....C..... 252
                *****
04 Kachuga      264:CCCTAGCTCCAGCAGATAGCACCTCACCCACCCCACTCGCAAGGCTGAAGCCCTGAGCCCTGTGAGATGACCTGGCTTGAACCTC 355
07 Chinemys    460:.....C.....C.....C-----CAG.....TGAAAATTACTGTACGCAGC 565
21 Rhinoclemmys 262:.....C.....CT.CA---C.....A.....T.....C.....G..... 347
30 Trachemys   253:.....C.....G.....C.T.C---G.....T.....A..... 334
                *****

```

D- BMm105 locus

```

07 Chinemys    1:          CAAATGTTATTGGTTCTAAGTGTGACCCACAGGGTGATCAGATAGTAAATGTGAAAAATCAGGAACTTTTCAGGGTCCGGGAGTATAGTTGCCTTGC-- 98
09 M.mutica    1: TAGTGCCAGTGCAGGTAAT.....T.T.....C.....TGG 120
15 Cyclmemy   1:          .....C..... 98
                *****
07 Chinemys    99:-AGGGAGGGGTAGTGCAGTGGTTGAGGATTGGCTGCTAAACCAGGGTTGTGAGTTCACCTTGTAGGAGCCGCTTAGGGATCTGGGGCAAAAATTGGTCTGATAGAATCATAGAA 217
09 M.mutica    121:GG.....A.C.....C.....T.....A.A.....C..... 98
15 Cyclmemy   98:----- 98

07 Chinemys    218:TTCAAGATCAGAAGGACCATTATGATCATCTAGTCTGACCTCTGCAAGATGCAGGCCACATAAGCCGATCCACCCACTCCTTAGCAAGCGACCCCTGCCCATGCTTCGGAGGAAGGC 337
09 M.mutica    230:----- 230
15 Cyclmemy   98:----- 98

07 Chinemys    338:GAAAAACCTCCAGGGCCATTGCCAATCTCCCTGGAGGAAAATTCCTTCCCGACCCCAATATGGCGGTGAGTGAACCCCGAGCATACGGGCAAGACTCTCCAGCCAAACCCTCTGGAA 457
09 M.mutica    230:----- 230
15 Cyclmemy   98:----- 98

07 Chinemys    458:AAGATTATATCATCCCATTGTACTATTTACCAGTGTGGCACTTAATTGACCTATTGACTAAGCCCTATTGATAGCAAAAGGCAGGGGGCTGGACTAGATGACCTTTCAAGGTCCTTTCCAG 577
09 M.mutica    230:-----TG..... 276
15 Cyclmemy   98:----- 98

07 Chinemys    578:TTT--GGAGATTGGTATATCTCCTGTTATTACC-----AATATCAGGAAGTCTGGTCAACCTAGTACTCACATGCTGTTAATT 654
09 M.mutica    277:..CTA.....AA.....TTTTATTACCTATTATTACC-----T..... 376
15 Cyclmemy   99:-----ACATATAACACAAGCCCC.....T..... 164
                *****
07 Chinemys    655:CATTACATGCAGCCAGATTGTAA 677
09 M.mutica    377:.....C.....TCTGAATGGTGCAAAGTTCT 419
15 Cyclmemy   165:.....G.....C..... 187
                *****

```

D- BMm85 locus

```

07 Chinemys    1:-----CCTATGCATCTTTTGTAGTATATATGATAAGGCCAGGAGCCAGTTTCATCTACAGCA--AAGTGTCCAGACTGATCAGAGTGCATATGTTGGGTACT 98
09 M.mutica    1: GTTAGTAGATGGCCAGTGGT.....CAG..... 119
                *****
07 Chinemys    99:CTGGACAGCTATGGGATTACAGCACATCTCACCAGTCCTAAGGCAGTC----- 148
09 M.mutica    120:.....A.....TTTAGGGGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCAGGGTTGTGAGTTCAATCCT 239
                *****
07 Chinemys    148:----- 148
09 M.mutica    240:TGAGGGGGCTACTTAGGGATCTGGGGCAAAAAAATTGGTCTGTAGTGAAGGCAGGGGGCTGGACTCAATGACCTTCAAGGTCCTCCAGTTCTAGGAGATTGGTATATCTCCTTT 359

07 Chinemys    149:-----TCCACAGCATGATTTGTCAGTGTCACTATAAATAAATATGCAGGGATGCTTCTTGGAGCTGTGACACACCTTTACATAGCATTATTATTTAACATGTCCTCTAGCTCTGA 261
09 M.mutica    360:TATTACC.....A.....T.....A..... 479
                *****
07 Chinemys    262:TACTTAATTTGAAGGGTAATGTCTGTTCCGGTTACTGCATAGGGCA 310
09 M.mutica    480:.....CTGAGGGTACAAGAGCAGT 548
                *****

```

図3 - 12-4 . SINE挿入遺伝子座のアライメント .

D- BMm74 locus

```

01 Siebenrock 1: AT-----GTTTAACTTTGGTTTATATTGTAAATGTAGCTACCTGTTAATCGCTAGAGAATTACCGAGTGCATCAAGTGTGGGGCCCTGTAT 91
02 Orlitia 1: -----A-----A----- 91
03 Callagur 1: -----A----- 91
04 Kachuga 1: -----A----- 91
06 Hieremys 1: .ATAATATAT-----A-----A----- 100
09 M.mutica 1: CCATTCAGGTCAGCTAATAT-----T----- 111
10 M.annam 1: -----T-----A-----A-----T----- 91
13 Heosemys 1: .ATAATATAT-----A-----G-----A-----A----- 100
14 Sacalia 1: -----A----- 91
19 Cuora 1: -----A----- 76
30 Trachemys 1: C-----C-----T-----A-----A-----G-----T-----T-----C----- 91
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
01 Siebenrock 92: TAGAGAGAATGTAGGGGTCGGGGAGAGAGATAGAGTCTCGTTATACTAG----- 142
02 Orlitia 92: ----- 96
03 Callagur 92: ----- 96
04 Kachuga 92: ----- 96
06 Hieremys 101: -----T-----T----- 151
09 M.mutica 112: -----T-----T-----G-----C-----GAGGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTGAGCATTGGCCTGCTAAACCCAGCGTTTGAATTCAATCCTTGAG 231
10 M.annam 92: -----T-----T-----C-----GAGGGAGGGATAGTTCAGTGGTTTGAGCATTGGCCTGCTAAATCCGGCGTTTGAATTCAAACCTTGAG 211
13 Heosemys 101: -----T-----T-----G----- 151
14 Sacalia 92: -----T----- 142
19 Cuora 77: -----T-----A----- 127
30 Trachemys 92: -----T-----T-----C-----T-----A----- 142
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

01 Siebenrock 142: ----- 142
02 Orlitia 96: ----- 96
03 Callagur 96: ----- 96
04 Kachuga 96: ----- 96
06 Hieremys 151: ----- 151
09 M.mutica 232: AGGGCCACTTAGGGATCTGGGGCAAAAATGGTCTCTGCTAGTGAAGGCAGGGGGCTGGACTTGATGACCTTTCAAGGTCCTCCAGTCTAGGCGATTGGTATATCTCCAATTATAAAA 351
10 M.annam 212: AGGGCCACTTAGGGATCTGGGGCAAAAATGGTCTCTGCTAGTGAAGGCAGGGGGCTGGACTTGATGACCTTTCAAGGTCCTCCAGTCTAGGCGATTGGTATATCTCCAATTATAAAA 331
13 Heosemys 151: AGGGCCACTTAGGGATCTGGGGCAAAAATGGTCTCTGCTAGTGAAGGCAGGGGGCTGGACTTGATGACCTTTCAAGGTCCTCCAGTCTAGGCGATTGGTATATCTCCAATTATAAAA 151
14 Sacalia 142: ----- 142
19 Cuora 127: ----- 127
30 Trachemys 142: ----- 142

01 Siebenrock 143: ----- 161
02 Orlitia 97: ----- 115
03 Callagur 97: ----- 115
04 Kachuga 97: ----- 115
06 Hieremys 152: ----- 170
09 M.mutica 352: AAATAAAAAAAGATGTTTTCTTTTGAAGCT 382
10 M.annam 332: AAA-----G----- 354
13 Heosemys 152: ----- 170
14 Sacalia 143: ----- 161
19 Cuora 128: ----- 146
30 Trachemys 143: ----- 161

```

E- BCr04 locus

```

07 Chinemys 1: AGCTTTTCCCCAGATCACACTGTGCTTAGAGGCTTGGCTTTCTTTCTTATTTTGCCTTTGTCTGTGTTCTGCCTCCCTCACATATGCACATTATGGGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTG 120
23 Kinixys 1: -----T----- 76
28 Emys 1: ----- 76
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

07 Chinemys 121: AGCATTTGGCTCTAAACCCAGGTTGTGAGTTCATGCTTAGAGGGGCC-ACTTAGGATCTGGGGCAAAAATGGTCTCTGCTAGTGAAGGCAGGGGGCTGGACTCAATGACCTTTCAA 239
23 Kinixys 76: ----- 76
28 Emys 76: ----- 76

07 Chinemys 240: GGTCCCTCCAGTCTTAGGAGATTGGTGTATCTCCAATTATTACCACATTTACCAAAAACAATACTTAGTTGAACCTCTACCCACATGGT---CTAATTTCCAGACAGACTCCACTA 355
23 Kinixys 77: -----TT-----TT-----GG----- 142
28 Emys 77: -----T-----A-----G-----TAGG----- 146
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

07 Chinemys 356: GG--CTGTATTTTAGGTGTTGACCATTAAGTGT 386
23 Kinixys 143: ----- 153
28 Emys 147: AGTTA----- 159
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

```

E- BKs31 locus

```

04 Kachuga 1: GTGCATTTTACACATGGGTAATTA-TAAGCAGTAGTCAAACAGGATATAGATGTCAGCAATACTGTCTGCCCATAGCTACATGTCAGAAATAGGCTGGACTAATGTGAATGTTG 119
23 Kinixys 1: -----C-----A-----A-----C-----G-----G-----G-----T----- 100
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

04 Kachuga 120: GGGAAAGCACTTTGTTTCACTATAGGTACATCTTGAAGAGGAGGGAGGGATAGCTCAGTGGTTTGAGCGTTGGCCTGCTAAACCCAGGTTTGTGAGTTCAATCCTTGAGGGAGCCACTTAG 239
23 Kinixys 101: -----T----- 139
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

04 Kachuga 240: GAATCTGGGGCAAAAATGGTCTCTGCTAGTGAAGGCAGGGGGCTGGACTTGATGACCTTTCAAGGTCCTCCAGTCTTAGGAGATAGGTATATCTCCAATTATTACCTTTGATTAGCAC 359
23 Kinixys 139: ----- 142
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

04 Kachuga 360: CAAGTGTCTGTGCTGTAGTGGAGTGGCTCTCACACCATCCAGGGAGGAATATGCAATAGCTGATAAAGAATGATCCAGTTGGAGAGTATCTAGCAGAAAAATGGTTGCTTTTGTAT 479
23 Kinixys 143: -----A-----T-----C-----A-----A-----G-----C-----C----- 262
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

04 Kachuga 480: TGTGCCACTAAAGGAACAAA 499

```

図3 - 12-5 . SINE挿入遺伝子座のアライメント .

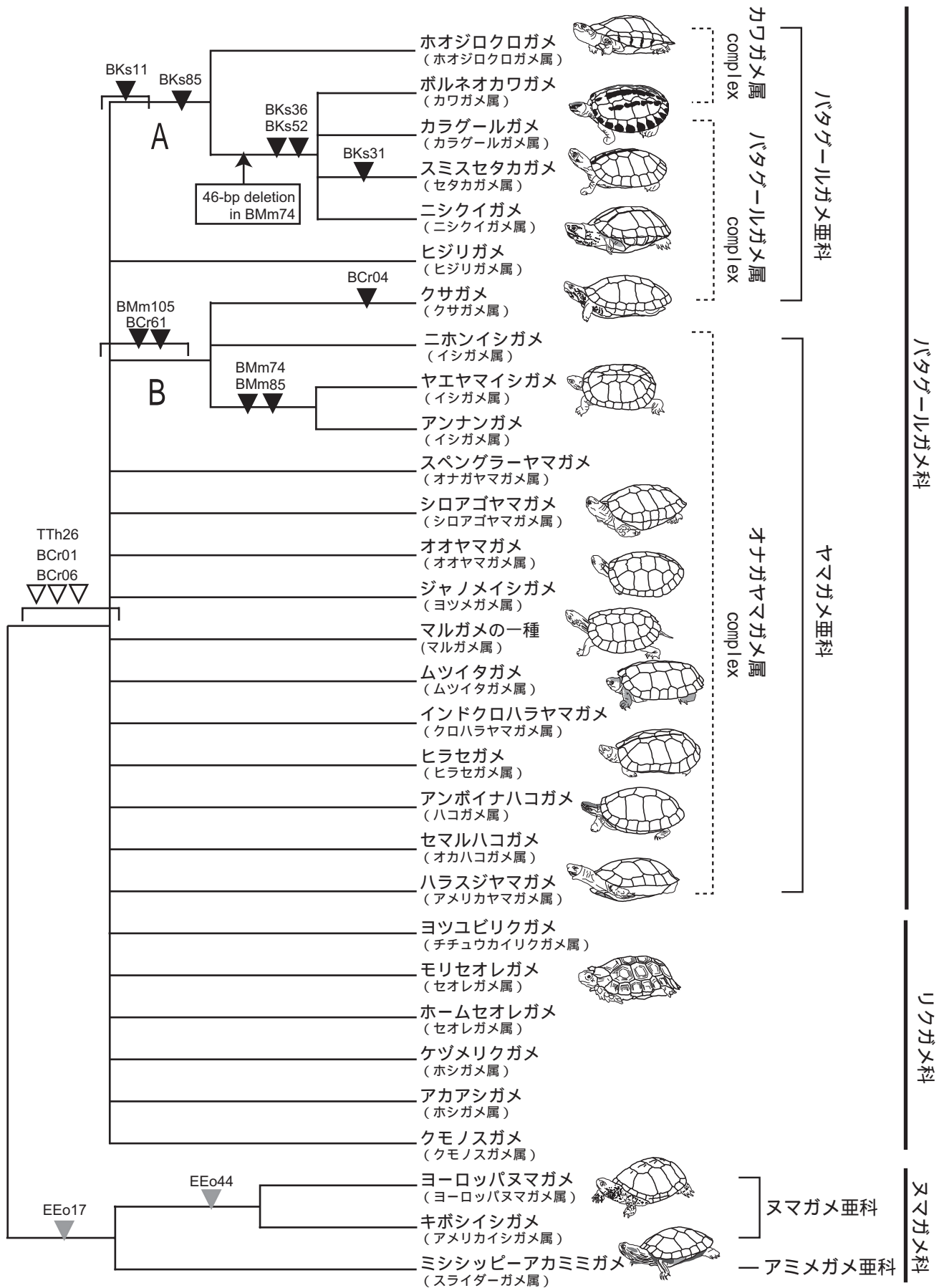


図3 - 13 . SINE挿入パターンに基づいて構築されたリクガメ上科の系統関係 . 各遺伝子座に挿入されたSINEサブグループ・タイプの違いを色分けして示す ; △ : CryIBタイプ、▲ : CryICタイプ、▼ : CryIIAタイプ

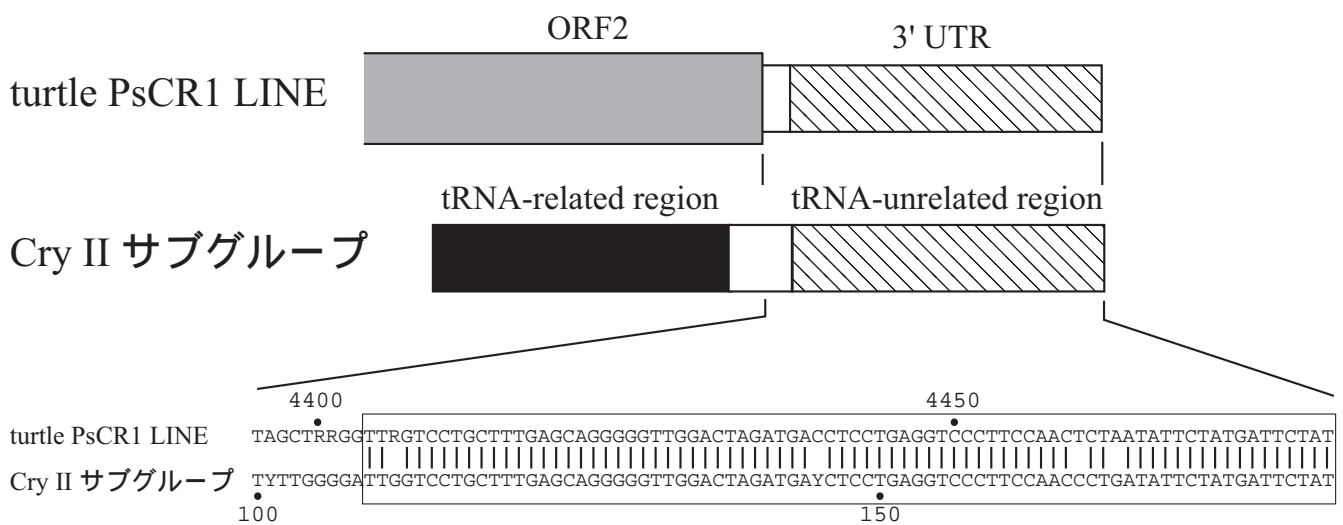


図3 - 14 . PsCR1 LINEとtortoise polIII/SINE CryIIサブグループの3'末端配列の比較 . 上段にPsCR1 LINEとCryIIサブグループの構造を模式的に示し、相同性のある領域を斜線で示す . 下段に末端配列のアライメントを示す . PsCR1 LINEのアクセッションナンバーはAB005891 .

表3 - 1. カメ類の分類体系

カメ目	Testudines Linnaeus, 1858
曲頸亜目	Pleurodira Cope, 1865
ヨコクビガメ科	Pelomedusidae Cope, 1868 (5属23種)
ヘビクビガメ科	Chelidae Gray, 1831 (10属48種)
潜頸亜目	Cryptodira Cope, 1865
カミツキガメ上科	Chelydroidea Agassiz, 1857
カミツキガメ科	Chelydridae Agassiz, 1857 (2属2種)
オオアタマガメ科	Platysternidae Gray, 1870 (1属1種)
ウミガメ上科	Chelonioidea Gray, 1825
オサガメ科	Dermochelyidae Gray, 1825 (1属1種)
ウミガメ科	Chelonidae Gray, 1825 (4属6種)
スッポン上科	Trionychoidea Bell, 1828
ドロガメ科	Kinosternidae Agassiz, 1857 (4属27種)
カワガメ科	Dermatemydidae Gray, 1870 (1属1種)
スッポンモドキ科	Carettochelyidae Boulenger, 1887 (1属1種)
スッポンモドキ科	Carettochelyidae Boulenger, 1888 (14属25種)
リクガメ上科	Testudinoidea Gray, 1825
ヌマガメ科	Emydidae Gray, 1825 (10属43種)
バタゲールガメ科	Bataguridae McDowell, 1964 (22属68種)
リクガメ科	Testudinidae Gray, 1825 (11属48種)

足田 (2002)より引用.

表3 - 2. 本研究で用いた潜頸亜目35種

Superfamily	上科	Family	科	Subfamily	亜科	Species	和名	略称							
Trionychoidea	スッポン上科	Trionychidae	スッポン科	Trionychinae	スッポン亜科	<i>Apalone ferox</i> 1, 3	フロリダスッポン	TAf							
		Carettochelyidae	スッポンモドキ科			<i>Carettochelys insculpta</i> 1	スッポンモドキ	CCi							
		Kinosternidae	ドロガメ科	Kinosterninae	ドロガメ亜科	<i>Sternotherus odoratus</i> 1	ミシシッピーニオイガメ	KSo							
Chelydroidea	カミツキガメ上科	Chelydridae	カミツキガメ科			<i>Macrolemys temminckii</i> 1, 3	ワニガメ	CMt							
Chelonioida	ウミガメ上科	Cheloniidae	ウミガメ科			<i>Chelonia mydas</i> 1	アオウミガメ	CCm							
Testudinoidea	リクガメ上科	Emydidae	ヌマガメ科	Deirochelyinae	アミメガメ亜科	<i>Trachemys scripta elegans</i> 3, 4	ミシシッピーアカミミガメ	EEo							
				Emydinae	ヌマガメ亜科	<i>Emys orbicularis</i> 1, 4	ヨーロッパヌマガメ								
						<i>Clemmys guttata</i> 4	キボシシシガメ								
		Testudinidae	リクガメ科					<i>Testudo horsfieldii</i> 1, 3	ヨツユビリクガメ	TTh					
								<i>Kinixys erosa</i> 4	モリセオレガメ						
								<i>Kinixys homeana</i> 4	ホームセオレガメ						
								<i>Geochelone sulcata</i> 4	ケツメリクガメ						
								<i>Geochelone carbonaria</i> 4	アカアシガメ						
								<i>Pyxis arachnoides</i> 4	クモノスガメ						
								Bataguridae	バタゲールガメ科		Batagurinae	バタゲールガメ亜科			<i>Siebenrockiella crassicolis</i> 4
<i>Orlitia borneensis</i> 4	ボルネオカワガメ														
<i>Callagur borneoensis</i> 4	カラゲールガメ														
<i>Kachuga smithii</i> 2, 4	スミスセタカガメ														
<i>Malayemys subtrijuga</i> 4	ニシクイガメ														
<i>Hieremys annandalii</i> 4	ヒジリガメ														
<i>Chinemys reevesii</i> 1, 3, 4	クサガメ	BCr													
Geoemydinae	ヤマガメ亜科					<i>Mauremys japonica</i> 4	ニホンイシガメ			BMm					
						<i>Mauremys mutica kami</i> 2, 4	ヤエヤマイシガメ								
						<i>Mauremys annamensis</i> 4	アンナンガメ								
						<i>Geoemyda spengleri</i> 1, 3]	スベングラヤマガメ	BGs							
						<i>Leucocephalon yuwonoi</i> 4	シロアゴヤマガメ								
						<i>Heosemys grandis</i> 4	オオヤマガメ								
						<i>Sacalia bealei</i> 4	ジャノメイシガメ								
						<i>Cyclemys sp.</i> 4	マルガメの一種								
						<i>Notochelys platynota</i> 4	ムツイタガメ								
						<i>Melanochelys trijuga</i> 4	インドクロハラヤマガメ								
						<i>Pyxidea mouhotii</i> 4	ヒラセガメ								
						<i>Cuora amboinensis</i> 4	アンボイナハコガメ								
						<i>Cistoclemys flavomarginata</i> 4	セマルハコガメ								
						<i>Rhinoclemmys funerea</i> 4	ハラスジヤマガメ								

Note: 1, TEF1プローブを用いたSINEのスクリーニングに用いた種. 2, Cry1typeC用プローブ(Cry1tC)を用いた SINEのスクリーニングに用いた種. 3, PCRによるCryIとCryIIサブファミリーのタイプ分けのために用いた種. 4, SINE法による系統解析に用いた種.

表3 - 3 . 単離されたCryIとCryII SINEサブグループ数の比較 .

科	種	Cry I	Cry II
スッポン科	フロリダスッポン	18	0
スッポンモドキ科	スッポンモドキ	20	0
カミツキガメ科	ワニガメ	11	21
ウミガメ科	アオウミガメ	0	23
ドロガメ科	ミシシッピーニオイガメ	11	17
ヌマガメ科	ヨーロッパヌマガメ	17	8
リクガメ科	ヨツユビリクガメ	10	10
バタゲールガメ科	クサガメ スベングラーママガメ	16	8

表3 - 4 . タイプごとに比較したCryIサブグループの数

科	種	Cry I				
		IA	IB	IC	ID	?
スッポン科	フロリダスッポン	52	0	0	0	0
スッポンモドキ科	スッポンモドキ	0	0	0	20	0
カミツキガメ科	ワニガメ	43	0	0	0	1
ウミガメ科	アオウミガメ	0	0	0	0	0
ドロガメ科	ミシシッピーニオイガメ	7	2	1	0	1
ヌマガメ科	ヨーロッパヌマガメ ミシシッピーアカミミガメ	0	29	0	0	0
リクガメ科	ヨツユビリクガメ	2	10	9	0	0
バタグールガメ科	クサガメ スペングラーヤマガメ	1	11	40	0	0

Note. ?: 分類不能

表3 - 5 . タイプごとに比較したCryIIサブグループの数

科	種	Cry II					
		IIA	IIB	IIC	IID	IIE	?
スッポン科	フロリダスッポン	0	0	0	0	0	0
スッポンモドキ科	スッポンモドキ	0	0	0	0	0	0
ワニガメ科	カミツキガメ	0	39	1	0	0	0
ウミガメ科	アオウミガメ	0	22	0	1	0	1
ドロガメ科	ミシシッピーニオイガメ	3	0	0	6	8	0
ヌマガメ科	ヨーロッパヌマガメ ミシシッピーアカミミガメ	20	0	1	0	0	4
リクガメ科	ヨツユビリクガメ	17	0	1	1	0	2
バタグールガメ科	クサガメ スペングラーヤマガメ	22	0	3	1	0	1

Note. ?: 分類不可能

表3 - 6. 各種・各遺伝子座におけるSINE挿入の有無

	EEo17	EEo44	TTh26	BCr06	BCr01	BKs85	BKs11	BKs36	BKs52	BCr61	BMm105	BMm85	BMm74	BCr04	BKs31
1.ホオジロクロガメ	-	?	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2.ボルネオカワガメ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3.カラゲールガメ	-	?	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
4.スミスセタカガメ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	?	-	-	-	+
5.ニシクイガメ	-	-	?	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
6.ヒジリガメ	-	-	+	?	+	-	-	?	-	-	-	-	-	-	-
7.クサガメ	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
8.ニホンイシガメ	-	-	+	+	+	-	?	-	-	+	+	-	-	-	-
9.ヤエヤマイシガメ	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
10.アンナンガメ	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
11.スペングラーヤマガメ	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.シロアゴヤマガメ	-	-	+	+	?	-	?	-	-	?	?	-	?	-	-
13.オオヤマガメ	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.ジャノメイシガメ	-	-	+	+	?	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-
15.マルガメの一種	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16.ムツイタガメ	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17.インドクロハラヤマガメ	-	-	+	+	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18.ヒラセガメ	-	-	+	+	+	-	-	-	-	?	-	-	-	-	?
19.アンボイナハコガメ	-	-	+	+	+	-	-	-	?	-	-	-	-	-	-
20.セマルハコガメ	-	-	+	+	?	-	-	-	-	?	-	-	-	-	?
21.ハラスジヤマガメ	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22.ヨツコビリクガメ	-	-	+	+	?	-	-	-	-	?	-	-	?	-	-
23.モリセオレガメ	-	?	?	+	+	-	-	-	?	-	-	-	?	-	-
24.ホームセオレガメ	-	?	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-
25.ケヅメリクガメ	-	?	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-
26.アカアシガメ	-	?	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-
27.クモノスガメ	-	-	+	+	+	-	-	?	?	-	?	-	?	-	-
28.ヨーロッパヌマガメ	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?
29.キボシイシガメ	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?
30.ミシシッピーアカミミガメ	+	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	?

Note:(+)はSINEの挿入があることを、(-)は挿入が無いことを意味する。(?)はunkwon.

表3 - 7. Hirayama (1984)がバタグールガメ亜科で提示した共有派生形質

		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
カワガメ 属 complex	1.ホオジロクロガメ 2.ボルネオカワガメ													
	3.カラグールガメ													
	4.スミスセタカガメ													
バタグールガメ属 complex	5.ニシクイガメ 6.ヒジリガメ 7.クサガメ													

I ~ XIIIは形質状態に割り当てた番号で表右にその形質状態をそれぞれ示す.

: 派生的形質

: 中間的形質

空欄: 原始的形質状態

形質状態(派生的な形質状態で記述)

I: 鼻骨下方の突起からなる篩骨裂が広い

II: 前頭骨が眼窩外縁に接していない

III: 口蓋の頬側隆起は鋸歯状である

IV: 後口蓋孔が小さい

V: 前顎骨が正中線に沿って伸び咀嚼面を形成する

VI: 前口蓋孔が二次口蓋によって覆われふさがっている

VII: 鋤骨が咀嚼面を形成している

VIII: 口蓋骨が咀嚼面を形成している

IX: 眼鼻孔が広い

X: 歯骨咀嚼面前方が拡大している

XI: 鉤状骨が歯骨よりも上方にある

XII: 方形頬骨の下方が前方に拡大し、内側部で上顎骨と接する

XIII: 小歯突起を伴う歯骨の舌側隆起が存在する

形態は図3 - 2、図3 - 5参照

第4章 総論

本研究は分子系統解析という手法を用いてヒゲクジラ亜目とリクガメ上科の系統進化の解明を試みた。ヒゲクジラ亜目では 12 個のタンパクコード遺伝子のアミノ酸配列を使った mtDNA による包括的な系統解析を行うと同時に分子分岐年代の推定も行った。これはヒゲクジラ亜目の系統関係と推定分岐年代に関する mtDNA の最終的な結論であり、その結果、ナガスクジラ科において新たな系統類縁関係を示唆し、またナガスクジラ類の進化史に関してこれまでにない新たな知見を示した。本研究の分子時計を用いた年代推定と化石記録を比較したところナガスクジラ類の分岐年代に関して両者の見解に大きな違いが認められた。化石記録は十分に得られており化石から推定されたナガスクジラ類の分岐年代はおそらく種の出現時期を示していると考えられる。このことから我々は遺伝子系統樹と種系統樹の違いである可能性を考慮し、その違いを生じさせたと思われるナガスクジラ類祖先集団における遺伝的多型状態を仮定した。祖先多型現象は場合によって分子系統樹に影響を与え、種の系統樹を解明しようとする目的の妨げとなるのだが、逆に本研究は化石記録と分子分岐年代の比較から過去のナガスクジラ類集団の実態に関して言及することができた。このようにヒゲクジラ類における系統解析では形態比較と分子系統解析が融合し理想的な形で進化史が評価されたといえる。また、爬虫類で初めて試みられた SINE 法による系統解析はこれからの潜頸亜目系統解析における SINE 法の有用性を十分に示した。潜頸亜目の広範囲な種で行われた網羅的な SINE の単離と分類は、*tortoise polIII/SINE* のさまざまなサブグループ・タイプを見いだすと同時に、潜頸亜目の各系統間で SINE の増殖頻度の違いを明確にした。サブグループ・タイプ分けの結果からリクガメ上科で頻度の高かった特定の SINE サブグループ・タイプに絞って SINE 法による系統解析を行ったところ、リクガメ上科の科間、属間の系統関係がある程度示された。SINE 法によって構築された系統樹は、比較形態学がこれまで共有派生形質と見なしてきた頭骨形態の一部を収斂進化による類似であると結論付けた。頭骨形態はより高等な動物になるにつれて複雑さを増す。そのため、比較形態学は進化と系統関係の評価において頭骨の形質を重要な形態ととらえ、これまで頭骨形態の解析から多くの共有派生形質を見いだしてきた。しかし、バタグループガメ亜科系統における頭骨形態の進化は、これまでの分岐分類

学的見地に基づいた形態比較による最節約的な進化よりも複雑な形態変化を伴って進化してきたのではないかと考えられる。その複雑な変化は環境への適応によって生じたと思われる。様々な系統で新規に獲得した形質が二次的に退化・消失したこともあれば、似たような環境へ侵入することで収斂的な形態を獲得したことも考えられる。このような過程を経てバタグールガメ亜科は現在見られるような多様性を獲得したのではないか。実際、バタグールガメ科はカメ目の他の種と比べて著しく広範囲な分布と形態的多様性を示している。今後さらにバタグールガメ科の系統関係が分子系統解析によって明らかにされ、比較形態学によってもたらされている形態情報と比較検討することでこの科の形態進化と多様化の過程が解明されることだろう。

近年、急速に発達した分子系統解析は比較形態学によって構築された伝統的分類体系に対して再考を促す結果を様々な系統で示してきた。このような形態形質に基づく系統分類が混乱した理由について次のことが一般的に考えられている。第一に、異なる系統に属する分類群が類似した環境へ適応することによって起きる形態の収斂進化である。例として、ハクジラ亜目の中でそれぞれ独立した系統で深海に生息域を広げたマッコウクジラとツチクジラの形態的類似性 (Nikaido ら 2001) や、オオコウモリ類と霊長類で高度に発達した視覚神経系 (Nikaido ら 2000) などがあげられる。第二に、共通の祖先に由来する形質が系統を異にする分類群の間で保持されている場合である。このような形質は共有原始形質 (symplesiomorphy) とも呼ばれる。分岐分類学では、共有原始形質は系統推定において系統的情報を与えないものとして考えられている。しかし、祖先的形質を正確に評価することが困難な系統、つまり化石記録が乏しい分類群や形態的進化、多様化の著しい分類群などでは共有原始形質を共有派生形質として認識してしまい、そこから系統分類に混乱が生じることもしばしば見受けられる。このような混乱の具体的な例として、ハクジラ亜目カワイルカ類における祖先的形質状態の維持がもたらした形態的類似性があげられる (Nikaido et al. 2001)。また、哺乳類翼手目 (コウモリ類) の小コウモリ類で共通に見られるエコロケーションもまた祖先的形質状態の維持であることが分子系統解析によって示唆されている (Teeling et al. 2000, Nikaido et al. 2000)。第三に、劇的な形態的進化と遂げた分類群では、系統分類のよりどころとする比較可能な形態が限られてしまうことが大きな理由として挙げられる。Nikaido ら (2000, 2001) はハクジラ亜目、翼手目を対象として系統関係の再検討を分

分子系統解析によって行い、多くの系統分類学的再考を促す結果を導いた。本研究が対象とした分類群であるヒゲクジラ亜目、潜頸亜目もまた進化の過程で劇的な形態的变化を遂げた分類群である。このように進化過程で特殊化した形態を獲得した分類群の系統関係には未だに明らかにされていない進化史が隠されているのかもしれない。そして、その可能性を導き出すことができるのは洗練された分子系統学的手法に他ならないことを本研究の成果は示したといえるのではないかな。

これまで系統分類学は進化の具体的な過程を探る手段として多様な形態を比較し、それらが進化上どのような道を通ってきたのかを系統樹に、そしてより自然な分類を分類体系にまとめようと努力してきた。しかし、形態比較では進化的に意義のある共有派生形質とそうでない非相同同形形質の判断を見誤ってしまうこともしばしば起きた。進化の謎に迫る上で真の系統樹を構築することは重要課題であり、本研究は形態比較による分類では真の系統や自然な分類体系に迫ることが難しいことを2つの分類群を用いて示すと同時に、分子系統解析によって真の系統関係把握に迫った成果をあげたといえる。分子系統解析によって真の系統関係が明らかになった後、進化の謎を解く鍵は再び形態に還元されるのではないかな。なぜなら形態こそが生物の種多様性を生み出した進化を認識する根拠となるからだ。形態の進化は、形態形成の諸過程がまず変化し、その結果変化した形態が環境の淘汰を受けて起きたと考えられる。本研究で系統関係の推定に用いた遺伝子は、生物の淘汰や種分化には関係のない中立的な進化を遂げた分子であった。この中立的な遺伝子は系統の推定にはもちろん重要な形質であることに変わりないが、進化の具体的な過程に迫るためにはさらに種を生じるもととなった形態とその発生に関わる遺伝子の進化の解明が次なる課題として残されている。分子系統学が比較形態学あるいは比較発生学と総合されることによって、生物の進化と多様化がいつそう明らかにされるであろう。

引用文献

[第 1 章 序論]

Darwin, C. 1859. On the origin of species: a facsimile of the first edition. [Reprinted 1964] Harvard University Press, Cambridge.

Graur, D., and W. H. Li. 2000. Fundamentals of molecular evolution *second edition*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.

Haeckel, E. 1866. Generelle Morphologie der Organismen: allgemeine Grundzüge der organischen Formen-Wissenschaft, mechanisch begründet durch die von Charles Darwin reformierte Dezendenz-Theorie. 2 volumes. Georg Reimer, Berlin.

Hennig, W. 1965. Phylogenetic systematics. *Ann. Rev. Ent.* 10: 97-116.

Kimura, M. 1983. The Neutral Theory of Molecular Evolution. Cambridge University Press, Cambridge.

Linné, C. von. 1735. *Systema naturae, sive regna tria naturae systematice proposita per classes, ordines, genera, & species*. Theodorum Haak, Leyden.

Marchant, A. D., Arnold, M. L. and Wilkinson, P. 1988. Gene flow across a chromosomal tension zone. I. Relicts of ancent hybridization. *Heredity*. 61: 321-328.

Mayr, E. 1969. Principles of Systematic Zoology. McGraw-Hill, New York, 428.

Murata, S., N. Takasaki, M. Saitoh, and N. Okada. 1993. Determination of the phylogenetic relationships among Pacific salmonids by using short interspersed elements (SINEs) as temporal landmarks of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:6995-6999.

Nei, M., and S. Kumar. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

Nikaido, M., F. Matsuno, H. Hamilton, R. L. Brownell, Jr., Y. Cao, W. Ding, Z. Zuoyan, A. M. Shedlock, R. E. Fordyce, M. Hasegawa and N. Okada. 2001a. Retroposon analysis of major cetacean lineages: The monophyly of toothed whales and the paraphyly of river dolphins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:7384-7389.

Novacek, M. J. 1992. Mammalian phylogeny: Shaking the tree. *Nature*. 356: 121-125.

Shedlock, A. M., and N. Okada. 2000. SINE insertions: powerful tools for molecular systematics. *BioEssays* **22**:148-160.

Shimamura, M., H. Yasue, K. Ohshima, H. Abe, H. Kato, T. Kishiro, M. Goto, I. Munechika, and N. Okada. 1997. Molecular evidence from retroposons that whales form a clade within even-toed ungulates. *Nature* **388**:666-670.

長谷川政美・岸野洋久 1996. 分子系統学 . 岩波書店

馬渡峻輔 1996. 動物分類学の論理 - 多様性を認識する方法 - . 東京大学出版会

上島 勲 2000. 分子系統学の現在と未来 . 青木淳一・田近謙一・森岡弘之編 『動物系統分類学 追補版』 中山書店 . Pp1-10.

[第2章 ミトコンドリア DNA 全長配列に基づくヒゲクジラ亜目の系統解析]

Adachi, J. & Hasegawa, M. (1996a) MOLPHY: Programs for Molecular phylogenetics ver. 2.3, Computer Science Monographs, No. 28. Institute of Statistical Mathematics, Tokyo.

Adachi, J. & Hasegawa, M. (1996b) *J. Mol. Evol.* 42, 459-468.

Adegoke, J. A., Arnason, U. & Widegren, B. (1993) *Chromosoma* **102**, 382-388.

Arnason, U. & Best, P. (1991) *Hereditas* **114**, 263-269.

Arnason, U., Spilliaert, R., Palsdottir, A. & Arnason, A. 1991. *Hereditas* **115**, 183-189.

Arnason, U., Gullberg, A. & Widegren, B. (1991) *J. Mol. Evol.* 33, 556-568.

Arnason, U., Gretarsdottir, S. & Widegren, B. (1992) *Mol. Biol. Evol.* **9**, 1018-1028.

Arnason, U., Gullberg, A. & Widegren, B. (1993) *Mol. Biol. Evol.* **10**, 960-970.

Arnason, U. & Gullberg, A. (1993) *J. Mol. Evol.* **37**, 312-322.

Arnason, U. & Gullberg, A. (1994) *Nature* **367**, 726-728.

Arnason, U. & Gullberg, A. (1996) *Mol. Biol. Evol.* **13**, 407-417.

Arnason, U., Adegoke, J., Bodin, K., Born, E., Esa, Y., Gullberg, A., Nilsson, M., Short, R., Xu, X. & Janke, A. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 8151-8156.

Arnold, P., Marsh, H. & Heinsohn, G. (1987) *Sci. Rep. Whales Res. Inst. Tokyo* **38**, 1-46.

Barnes, L. G. (1977) *Syst. Zool.* **25**, 321-343.

Barnes, L. G. & McLeod, S. A. (1984) in *The fossil record and phyletic relationships of the gray whale*, eds. Jones, M. L., Swartz, S. L. & Leatherwood, S. (Academic Press, New York), pp. 3-32.

Barns, L. G., Domning, D. P. & Ray, C. E. (1985) *Mar. Mamm. Sci.* **1**, 15-53.

Berube, M. & Aguilar, A. (1998) *Marine Mammal Science* **14**, 82-98.

Bisconti, M. (2000) *Palaeontographia Italica* **87**, 37-66.

Brower, A. V. Z., DeSalle, R., & Volger, A. (1996) *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **27**, 423-450.

Brown, W. M., George, M. & Wilson, A. C. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1967-1971.

Cao, Y., Fujiwara, M., Nikaido, M., Okada, N. & Hasegawa, M. (2000) *Gene* **259**, 149-158.

Clapham, P. J. & Mead, J. G. (1989) *Mammalian species* **604**, 1-9.

Craske, A. J. & Jefferies, R. P. S. (1989) *Palaeontology* **32**, 69-99.

Dathe, F. (1983) *Zeitschrift für Geologische Wissenschaften* **11**, 813-848.

Deméré, T. A. (1986) *Mar. mammal sci.* **2**, 277-298.

Fordyce, R. E. & Barnes, L. G. (1994) *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **22**, 419-455.

Fordyce, R. E. & Muizon, C. (2001) in *Secondary Adaptation of Tetrapods to Life in Water*, ed. J.-M.

Mazin & V. de Buffrenil pp.169-233

Fordyce, R. E. (2002) *Journal of vertebrate paleontology* **22** (3, supplement), 54a.

Geisler, J.H. & Luo, Z. (1996) *Journal of paleontology* **70**, 1045-1066.

Geisler, J.H. & Sanders, A. (2003) *J. Mamm. Evol.* **10**, 23-129.

Grande, C., Templado, J., Cervera, J.L. & Zardoya, R. (2002) *Mol. Biol. Evol.* **19**, 1672-1685.

Ingman, M., Kaessmann, H., Pääbo, S. & Gyllensten, U. (2000) *Nature* **408**, 708-713.

Kijas, J. M. H. & Andersson, L. (2001) *J. Mol. Evol.* **52**, 302-308.

Kimura, T. & Ozawa, T. (2002) *J. Vertebrate Paleontology* **22**, 684-702.

Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B. & Nei, M. (2001) *Bioinformatics* **17**, 1244-1245.

- LeDuc, R. & Dizon, A. E. (2002) in *Molecular and cell biology of marine mammals*, eds. C. J. & Nachtigall, P. E. (Krieger), pp.100-110.
- Lin, Y-H, McLenachan, P. A., Gore, A. R., Phillips, M. J., Ota, R., Hendy, M. D. & Penny, D. (2002) *Mol. Biol. Evol.* **19**, 2060-2070.
- Lindow, B. E. K. (2002) in *The internal relationships of the baleen whales - a preliminary analysis*, ed. Lindow, B. E. K. (Mitsønderjyllands Museum, Gram.) pp.12-19.
- Mayr, E. (1969) in *Principles of systematic zoology*, (McGraw-Hill, New York), pp428.
- McLeod, S. A., Whitmore, F. C. Jr. & Barnes, L. G. (1993) in *The Bowhead Whale*, eds. Burns, J. J., Montague, J. J. & Cowles, C. J. (Soc. Mar. Mamm. Spec. Publ. No.2), 45-70.
- Messenger, S. L. & McGuire, J. (1998) *Syst. Biol.* **47**, 90-124.
- Milinkovitch, M. C., Meyer, A. & Powell, J. R. (1994) *Mol. Biol. Evol.* **11**, 939-948.
- Moore, W.S. (1995) *Evolution* **49**, 718-726.
- Murata, Y., Nikaido, M., Sasaki, T., Cao, Y., Fukumoto, Y., Hasegawa, M. & Okada, N. (2003) *Mol. Phylo. Evol.* **28**, 253-260.
- Nardi, F., G. Spinsanti, J. L. Boore, A. Carapelli, R. Dallai & F. Frati (2003) *Science* **299**, 1887-1889.
- Nei, M. (1987) *Molecular Evolution Genetics* (Columbia University Press, New York)

Nei, M. & Kumar, S. (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*, (Oxford University Press, New York)

Nikaido, M., Harada, M., Cao, Y., Hasegawa, M. & Okada, N. (2000) *J. Mol. Evol.* **51**, 318-328.

Nikaido, M., Kawai, K., Cao, Y., Harada, M., Tomita, S., Okada, N. & Hasegawa, M. (2001) *J. Mol. Evol.* **53**, 508-516.

Nikaido, M., Matsuno, F., Hamilton, H., Brownell, Jr. R. L., Cao, Y., Ding, W., Zuoyan, Z., Shedlock, A. M., Fordyce, R. E., Hasegawa, M. & Okada, N. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7384-7389.

Olivio, P. D., Van De Walle, M. J., Laipis, P. J. & Hauswirth, W. W. (1983) *Nature* **306**, 400-402.

Rice, D. W. (1998) in *Marine Mammals of the World: Systematics and Distribution* (Soc. Mar. Mamm., Lawrence, Ks).

Saitou, N. & Nei, M. (1987) *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

Sanders, A. E. & Barnes, L. G. (2002) *Smithsonian contributions to paleobiology* **93**, 313-356.

Wada, S. & Numachi, K. (1991) *Rep. Int. Whal. Commn. Spec. Issue* **13**, 126-154.

Wada, S., Oishi, M. & Yamada, T. (2003) *Nature* **426**, 278-281.

Weishampel, D. B. (1996) *Journal of Vertebrate Paleontology* **16**, 191-197.

Zeigler, C. V., Chan, G. L. & Barnes, L. G. (1997) *Proc. California Acad. Sci.* **50**, 115-138.

[第3章 SINE法による潜頸亜目(カメ目)の系統類縁関係の推定]

Blin, N., and D. W. Stafford. 1976. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **3**:2303-2308.

Bickham, J. W. and Carr, J. L. 1983. Taxonomy and phylogeny of the higher categories of cryptodiran turtles based on a cladistic analysis of chromosomal data. *Copeia* **1983**: 918-932.

Bramble, D. M. 1974. Emydid shell kinesis: biomechanics and evolution. *Copeia* 1974:707-727.

Cook, J. M., and M. Tristem. 1997. 'SINEs of the times' – transposable elements as clade markers for their hosts. *Trends Ecol. Evol.* **12**:295-297.

Dalton, R. 2003. Mock Turtle. *Nature* **423**:219-220.

Endoh, H., and N. Okada. 1986. Total DNA transcription *in vitro*: A procedure to detect highly repetitive and transcribable sequences with tRNA-like structures. *Proc. Natl. Acad. USA* **83**:251-255.

Endoh, H., S. Nagahashi, and N. Okada. 1990. A highly repetitive and transcribable sequence in the tortoise genome is probably a retroposon. *Eur. J. Biochem.* **189**:25-31.

Ernst C. H., R. G. M. Altenburg, and R. W. Barbour. 2000. *Turtles of the World (CD-ROM)*. Macintosh version 1.2. Springer, Berlin: Editions ETI.

Gaffney, E. S., and P. A. Meylan. 1988. A phylogeny of turtles. Pp. 157-219 *in* M. J. Benton, eds. *The phylogeny and classification of the tetrapods, volume 1*. Oxford University Press, New York.

Graur, D., and W. H. Li. 2000. *Fundamentals of molecular evolution second edition*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.

Hirayama, R. 1984. Cladistic analysis of batagurine turtles (Batagurinae: Emydidae: Testudinoidea); a

preliminary results. Pp. 141-157 in F. de Broin and E. Jiménez-Fuentes, eds. *Studia geologica salamanticensia*, volume 1 especial 1, Ediciones Universidadde Salamanca.

Honda, M., Y. Yasukawa, and H. Ota. 2002. Phylogeny of the Eurasian freshwater turtles of the genus *Mauremys* Gray, 1869 (Testudines), with special reference to a close affinity of *M. japonica* with *Chinemys reevesii*. *J. Zool. Syst. Evol. Research* **40**:195-200.

Honda, M., Y. Yasukawa, R. Hirayama, and H. Ota. 2002. Phylogenetic relationships of the Asian box turtles of the genus *Cuora* sensu lato (Reptilia: Bataguridae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Zool. Sci.* **19**:1305-1312.

Kajikawa, M., K. Ohshima, and N. Okada. 1997. Determination of the entire sequence of turtle CR1: the first open reading frame of the turtle CR1 element encodes a protein with a novel zinc finger motif. *Mol. Biol. Evol.* **14**:1206-1217.

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

Kido, Y., M. Aono, T. Yamaki, K. Matsumoto, S. Murata, M. Saneyoshi, and N. Okada. 1991. Shaping and reshaping of salmonid genomes by amplification of tRNA-derived retroposons during evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:2326-2330.

Kido, Y., M. Himberg, N. Takasaki, and N. Okada. 1994. Amplification of distinct subfamilies of short interspersed elements during evolution of the Salmonidae. *J. Mol. Biol.* **241**:633-644.

McCord, W. P., J. B. Iverson, P. Q. Spinks, and H. B. Shaffer. 2000. A new genus of geoemydid turtle from Asia. *Hamadryad* **25**:86-90.

McDowell, S. B. 1964. Partition of the genus *Clemmys* and related problems in the taxonomy of the aquatic Testudinidae. *Proc. Zool. Soc. London* **143**:239-279.

Miyamoto, M. M. 1999. Perfect SINEs of evolutionary history? *Curr. Biol.* **9**:R816-R819.

Mlynarski, M. 1969. Fossile Schidkröten. A. Ziemsen Verlag, Wittenberg Lutherstadt.

Murata, S., N. Takasaki, M. Saitoh, and N. Okada. 1993. Determination of the phylogenetic relationships among Pacific salmonids by using short interspersed elements (SINEs) as temporal landmarks of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:6995-6999.

Nei, M., and S. Kumar. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

Nishihara, H., Y. Terai, and N. Okada. 2002. Characterization of novel Alu- and tRNA-related SINEs from the tree shrew and evolutionary implications of their origins. *Mol. Biol. Evol.* **19**:1964-1972.

Nikaido, M., F. Matsuno, H. Hamilton, R. L. Brownell, Jr., Y. Cao, W. Ding, Z. Zuoyan, A. M. Shedlock, R. E. Fordyce, M. Hasegawa and N. Okada. 2001*a*. Retroposon analysis of major cetacean lineages: The monophyly of toothed whales and the paraphyly of river dolphins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:7384-7389.

Nikaido, M., F. Matsuno, H. Abe, M. Shimamura, H. Hamilton, H. Matsubayashi, and N. Okada. 2001*b*. Evolution of CHR-2 SINEs in cetartiodactyl genomes: possible evidence for the monophyletic origin of toothed whales. *Mammal. Genome* **12**:909-915.

Ohshima, K., R. Koishi, M. Matsuo, and N. Okada. 1993. Several short interspersed repetitive elements (SINEs) in distant species may have originated from a common ancestral retrovirus: Characterization of a squid SINE and a possible mechanism for generation of tRNA-derived retroposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:6260-6264.

Ohshima, K., M. Hamada, Y. Terai, and N. Okada. 1996. The 3' ends of tRNA-derived short interspersed repetitive elements are derived from the 3' ends of long interspersed repetitive elements. *Mol. Cell. Biol.* **16**:3756-3764.

Okada, N. 1991*a*. SINEs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1**:498-504

Okada, N. 1991*b*. SINEs: short interspersed repeated elements of the eucaryotic genome. *Trends Ecol. Evol.* **6**:358-361.

Okada, N., M. Hamada, I. Ogiwara, and K. Ohshima. 1997. SINEs and LINEs share common 3' sequences: a review. *Gene* **205**:229-243.

Rokas, A., and P. W. Holland. 2000. Rare genomic changes as a tool for phylogenetics. *Trends Ecol. Evol.* **15**:454-459.

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

Shaffer, H. B., P. Meylan, and M. L. McKnight. 1997. Tests of turtle phylogeny: molecular, morphological, and paleontological approaches. *Syst. Biol.* **46**(2):235-268.

Shedlock, A. M., M. C. Milinkovitch, and N. Okada. 2000. SINE evolution, missing data, and the origin of whales. *Syst. Biol.* **49**:808-817.

Shedlock, A. M., and N. Okada. 2000. SINE insertions: powerful tools for molecular systematics. *BioEssays* **22**:148-160.

Shimamura, M., H. Yasue, K. Ohshima, H. Abe, H. Kato, T. Kishiro, M. Goto, I. Munechika, and N. Okada. 1997. Molecular evidence from retroposons that whales form a clade within even-toed ungulates. *Nature* **388**:666-670.

Shimamura, M., H. Abe, M. Nikaido, K. Ohshima, and N. Okada. 1999. Genealogy of families of SINEs in cetaceans and artiodactyls: the presence of a huge superfamily of tRNA^{Glu}-derived families of SINEs. *Mol. Biol. Evol.* **16**:1046-1060.

Singer, M. F. 1982. SINEs and LINEs: highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes. *Cell* **28**:433-434.

Sites, J. W. Jr., J. W. Bickman, B. A. Pytel, and I. F. Greenbaum. 1984. Biochemical characters and the reconstruction of the turtle phylogenies: relationships among batagurid genera. *Syst. Zool.* **33**:137-158.

Takahashi, K., Y. Terai, M. Nishida, and N. Okada. 2001. Phylogenetic relationships and ancient incomplete lineage sorting among cichlid fishes in lake Tanganyika as revealed by analysis of the insertion of retroposons. *Mol. Biol. Evol.* **18**:2057-2066.

Takahashi, K., and N. Okada. 2002. Mosaic structure and retropositional dynamics during evolution of subfamilies of short interspersed elements in African cichlids. *Mol. Biol. Evol.* **19**:1303-1312.

Weiner, A. M., P. L. Deininger, and A. Efstratiadis. 1986. Nonviral retroposons: genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. *Ann. Rev. Biochem.* **55**:631-661.

Weiner, A. M. 2000. Do all SINEs lead to LINEs? *Nat. Genet.* **24**:332-333.

Wu, P., K-Y. Zhou, and Q. Yang. 1999. Phylogeny of Asian freshwater and terrestrial turtles based on

sequence analysis of 12S rRNA gene fragment. *Acta. Zool. Sinica* **45**:260-267.

Yasukawa, Y., R. Hirayama, and T. Hikida. 2001. Phylogenetic relationships of geoemydine turtles (Reptilia: Bataguridae). *Cur. Herpetol.* **20**:105-133.

岡田典弘 1999. 分子進化 . 宮田隆編 『分子系統進化学』 共立出版 pp.70-87.

疋田努 2003. 爬虫類の進化 . 東京大学出版会

疋田努 1988. 動物系統分類学 9(下 B₁) 脊椎動物(IIb₁) 爬虫類 I 『第 2 部 系統と分類』 中山書店 pp.238-267.

[第 4 章 総論]

Nikaido, M., M. Harada, Y. Cao, M. Hasegawa and N. Okada. 2000. Monophyletic origin of the order chiroptera and its phylogenetic position among mammalia, as inferred from the complete sequence of the mitochondrial DNA of a Japanese megabat, the Ryukyu flying fox (*Pteropus dasymallus*). *J. Mol. Evol.* **51**:318-328.

Nikaido, M., F. Matsuno, H. Hamilton, R. L. Brownell, Jr., Y. Cao, W. Ding, Z. Zuoyan, A. M. Shedlock, R. E. Fordyce, M. Hasegawa and N. Okada. 2001a. Retroposon analysis of major cetacean lineages: The monophyly of toothed whales and the paraphyly of river dolphins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:7384-7389.

Teeling, E. C., M. Scally, D. J. Kao, M. L. Romagnoli, M. S. Springer and M. J. Stanhope. 2000. Molecular evidence regarding the origin of echolocation and flight in bats. *Nature* **403**:188-192.

謝辞

私の指導教官である岡田典弘教授には研究のご指導はもとより科学者を目指すものとしての心構えを日々の生活、言動から深く学ばせていただきました。この場を借りて深く感謝の意を申し上げます。

また、系統解析に関して多大なご協力とご指導を下さった統計数理学研究所の長谷川政美教授ならびに曹纓博士、貴重な動物の標本を提供して下さったカリフォルニア大学の Healy Hamilton 博士、日本鯨類研究所の後藤睦夫氏、Luis A. Pstene 氏、上田真久氏、ならびに琉球大学の安川雄一郎博士、古生物に関する知見を説いて下さったオタゴ大学の R. Ewan Fordyce 博士、基礎生物学研究所の高橋一彦博士、三浦誓子女史、そして私の実験、研究の現場でいつもご指導下さった東京工業大学の二階堂雅人博士、以上の共同研究者の方々には心より感謝の意を申し上げます。

東京工業大学生命理工学研究科岡田研究室のみなさまの支えがあったおかげで私の研究生活は充実したものになりました。よい仲間に出会えたことをうれしく思うと同時に感謝の念にたえません。ありがとうございました。

最後に、研究者の道へ進もうとする私を喜んで励まし支えて下さった私の両親と家族がいてくれたからこそ本研究を完了させることができました。我が両親と家族にこの場を借りて報告させていただくとともに深い感謝の意を申し上げます。