

# マイルカ科鯨類の進化遺伝学的研究

2007年3月 海洋生命環境学分野 56711 小糸智子

指導教員 宮崎信之教授

キーワード；マイルカ科、ミトコンドリア DNA、系統関係、SWS 遺伝子

## I 背景と目的

鯨類は全世界に約 80 種存在している海棲哺乳類であり、ハクジラ亜目 10 科、ヒゲクジラ亜目 4 科に大別されている。

ハクジラ亜目マイルカ科は生態学的、形態学的に多様性に富んだグループであるにも関わらず系統関係は明らかになっていない。その主な原因として、(1) 網羅的な系統解析を行っている研究がほとんどなく、分子系統解析に用いている遺伝子領域が少ないことや、(2) 化石記録が乏しいだけでなく、約 1000 万年前に短期間のうちに分化したために遺伝的差異が小さいことが挙げられる。

本研究では、進化速度が異なると考えられるミトコンドリア DNA 制御領域、CO I 領域、16S rRNA 領域、偽遺伝子である SWS 遺伝子を解析し、マイルカ科鯨類の系統関係を明らかにすることを目的とした。さらに、これまでマイルカ科の系統関係が明らかにできなかった原因が (1)、(2) のどちらであるのか検証した。

## II 材料と方法

### (1) 標本

ミトコンドリア DNA の解析には、マイルカ科オキゴンドウ (*Pseudorca crassidens*)、ハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*)、カマイルカ (*Lagenorhynchus obliquidens*)、カズハゴンドウ (*Pepnocephala electra*)、ハナゴンドウ (*Grampus griseus*)、サラワクイルカ (*Lagenodelphis hosei*)、セミイルカ (*Lissodelphis borealis*)、ハセイルカ (*Delphinus capensis*)、マイルカ (*Delphinus delphis*)、シワハイルカ (*Steno bredanensis*)、ハシナギイルカ (*Stenella longirostris*)、スジイルカ (*Stenella coeruleoalba*)、マダライルカ (*Stenella attenuata*)、タイセイヨウマダライルカ (*Stenella frontalis Atlantic*)、シナウスイロイルカ (*Sousa chinensis*)、コビトイルカ (*Sotalia fluviatilis*)、コビレゴンドウ (*Globicephala macrorhynchus*) の、13 属 17 種を用いた。SWS 遺伝子解析では、マダライルカとハナゴンドウを除く 12 属 15 種を用いた。

### (2) 方法

脂皮、肝臓および筋肉組織を用いて自動抽出機により DNA を抽出した。PCR 法により、目的遺伝子を増幅した。得られたミトコンドリア DNA 断片はサブクローニングを行い、プラスミドベクターを再スクリーニングした。SWS 遺伝子および再スクリーニングしたミトコンドリア DNA 断片は、Exonuclease I(Exo I)、Shrimp alkali phosphatase(SAP)によって精製処理を行い、塩基配列解析を行った。得られた塩基配列は Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 3.1(MEGA)ソフトウェア内の Clustal W というプログラムによりデフォルトの設定で多重整列を行い、さらに整列後の結果を目視によって詳細に確認した。得られた多重整列データは、遺伝的関係を明らかにするため、近隣結

合法 (NJ 法)、最節約法 (MP 法)、最尤法 (ML 法) によって系統関係の推定を行った。

### III 結果および考察

本研究では、制御領域 593 塩基、CO I 領域 730 塩基、16S rRNA 領域 770 塩基、SWS 遺伝子 1063 塩基を解読した。得られた配列の遺伝距離から 100 万年あたりの塩基置換率を求めたところ、CO I 領域が最も高い 0.61% となり、次いで制御領域 0.53%、16S rRNA 領域 0.25%、SWS 遺伝子 0.03% となった。そこで、各領域から系統関係を推定したところ、置換率の高低に関係なく、信頼度が高い系統樹は得られなかったため、複数の領域を組み合わせる解析を行った。その結果、ミトコンドリア DNA の全ての領域を組み合わせた配列の信頼度が比較的高くなることが明らかとなった。その系統樹では、Delphinus 属、Stenella 属を中心とするクレード A、カマイルカ、セミイルカを中心とするクレード B、ゴンドウクジラ類のクレード C の 3 つのクレードに分かれた (図)。

さらに、偽遺伝子である SWS 遺伝子を解析したところ、サラクイルカ、ハシナギイルカ、マイルカ、スジイルカ、シナウスイロイルカにおいて 39 塩基の挿入が見られた。外群であるネズミイルカや、近縁であると考えられているコビトカバの配列と比較するとその部位が欠失していることから、挿入のあるグループは比較的新しく分化したグループであることが示唆された。

これらの結果より、ミトコンドリア DNA の塩基配列を長くし、情報量を増やすことで系統関係を明らかにするマーカーとして使用できるということが示唆された。また、分化してからの期間が約 1000 万年から数百万年であっても、系統解析を行うのに十分な遺伝的差異が生じるということが示唆された。そのため、これまで系統関係を明らかにできなかったのは、解析に使用した遺伝子領域がマーカーとして有益でなかった可能性が考えられる。

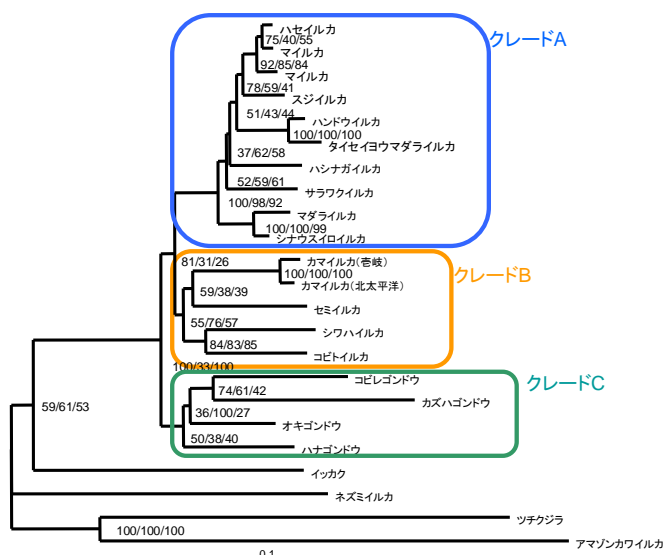


図 ミトコンドリア DNA の全ての領域を組み合わせた系統樹。図中の数値はそれぞれ、NJ 法、MP 法、ML 法によって得られたブートストラップ確率を示す。また、枝の長さは遺伝距離を反映している。外群としてイッカク、ネズミイルカ、ツチクジラ、アマゾンカワイルカの配列を用いた。

# Evolutionary genetics of Delphinidae

Mar. 2007, Marine life science and Environment, 56711 Tomoko KOITO

Supervisor; Professor Nobuyuki MIYAZAKI

Keywords: Delphinidae, mitochondrialDNA, phylogenetic rerationships, SWS gene

## I Introduction

Order Cetacea contains 80 species, which is classified broadly into 2 suborders, 10 Odontoceti and 4 Mysticeti.

Though Delphinidae is rich in diversity in terms of ecology and morphology, phylogenetic relationships of Delphinidae have not been revealed. Suggested reasons are: (1) exhaustive phylogenetic analysis is hardly, and some studies used few gene regions for molecular phylogeny. (2) fossil record is poor. In addition, Delphinidae diverged short term, that brought on low degree of genetic differentiation.

In this study, phylogenetic analyses have been performed by using mitochondrial DNA control region, CO I region, 16S rRNA region and SWS gene to resolve the phylogenetic relationships among Delphinidae. In addition, the evidence which factor leads to make resolve the phylogenetic relationships is validated.

## II Materials and Methods

### (1) Samples

The samples for mitochondrial DNA analyses obtained from 13 genera 17 species. Species names are follows; false killer whale (*Pseudorca crassidens*), bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*), melon-headed whale (*Peponocephala electra*), Risso's dolphin (*Grampus griseus*), Fraser's dolphin (*Lagenodelphis hosei*), northern right whale dolphin (*Lissodelphis borealis*), long-beaked common dolphin (*Delphinus capensis*), short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*), rough-toothed dolphin (*Steno bredanensis*), spinner dolphin (*Stenella longirostris*), striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*), pantropical spotted dolphin (*Stenella attenuata*), Atlantic spotted dolphin (*Stenella frontalis Atlantic*), Indo-Pacific humpback dolphin (*Sousa chinensis*), tucuxi (*Sotalia fluviatilis*), short-finned pilot whale (*Globicephala macrorhynchus*). SWS gene analysis used 12 genera 15 species, which excluded pantropical spotted dolphin and Risso's dolphin.

### (2) Methods

DNA extracted using auto extractor from blubber, liver and muscle tissue and amplified objective gene by PCR. Mitochondrial DNA fragment cloned for screening. SWS gene and mitochondrial DNA were purified with Exonuclease I (Exo I) and Shrimp alkali phosphatase(SAP) for sequencing. The sequences from the different reactions were compared and edited using Clustal W in Evolutionary Genetics

Analysis, Version 3.1 (MEGA) and phylogenetic analyses performed to reveal genetic relationships by Neighbor-joining method, Maximum parsimony method and Maximum likelihood method.

### III Results and Discussion

Control region 593 base, CO I region 730 base, 16S rRNA region 770 base and SWS gene 1063 base were identified. Substitution rate per million years were estimated based on genetic distance. In the result, individual region shows as follows: CO I region 0.61%, control region 0.53%, 16S rRNA region 0.25%, SWS gene 0.03%. Despite the substitution rate, phylogenetic trees showed low bootstrap value in each region. Then phylogenetic analysis were performed using combined regions. In the result, combined all mitochondrial regions showed comparatively high bootstrap value. This phylogenetic tree was divided into three clades. Clade A contains genus *Delphinus*, *Stenella*, Clade B contains Pacific white-sided dolphin and northern right whale dolphin and Clade C contains porpoises (Fig.).

In addition, SWS gene shows 39 base insertion in Fraser's dolphin, spinner dolphin, long-beaked common dolphin, short-beaked common dolphin, striped dolphin and Indo-Pacific humpback whale. Compare with harbor porpoise and considered to be closely related river hippopotamas, there were deletion in that region. This is suggested that this group with insertion diverged recently.

These result show that mitochondrial DNA could be used as a marker to resolve phylogenetic relationships by long sequences and suggested genetic differentiation would occur in several million years.

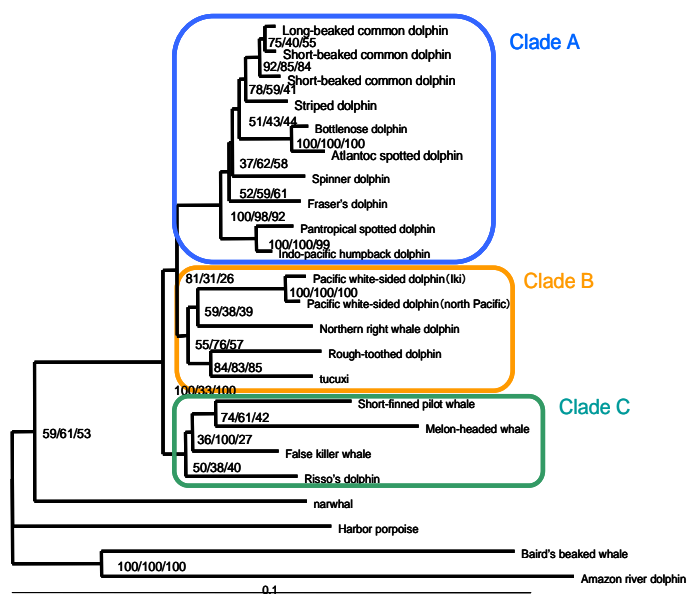


Fig. Phylogenetic tree of all mitochondrial region. Numbers show NJ method, MP method and ML method respectively. Branch length reflects genetic distance. Sequence of narwhal, harbor porpoise, Baird's beaked whale and Amazon river dolphin were used as out group.