

特集：昆虫バイオ〔2〕

昆虫の分子系統樹作成の実際

東京大学農学部養蚕学研究室 ^{しま}嶋 ^だ田 ^{とおる}透

昆虫の系統解析は、分類や進化などの基礎的分野でも、害虫や益虫の同定などの応用的分野でも、重要な研究である。最近、分子データを用いて作成した昆虫の系統樹、すなわち分子系統樹が作成されることが多くなってきた。系統樹作成に用いられる分子マーカーには、アロザイム (PUTERKA et al., 1993) などのタンパク質多型、制限酵素切断断片長多型 (RFLP) (KAMBHAMPATI and RAI, 1991)、ランダム増幅多型 DNA (RAPD) (PUTERKA et al., 1993; CHAPCO et al., 1992, 全 DNA ハイブリダイゼーション (SIBLEY and AHLQUIST, 1984) など多数あるが、なかでも、DNA の塩基配列データが、得られる情報の量と質において勝るため、最も広く用いられている。特に、ポリメラーゼ連鎖反応 (以下、PCR) を利用して特定の遺伝子を増幅し、その配列を決定する方法が、迅速・簡便であるため、KOCHER et al. (1989) をはじめ多くの研究者に用いられ、昆虫でも LIU and BECKENBACH (1992)、CARMEAN et al. (1992)、HEY and KLIMAN (1993) らによって採用されている。昆虫は、他の動植物に比べて体が小さく、得られる DNA が少ないため、PCR 以外の方法では個体別の分析が困難な場合がある。本稿では、筆者らの研究室で進行中の研究内容を中心に、PCR に基づく配列決定と系統樹作成の方法を実例に即して紹介したい。RFLP などの他の方法については、既に本誌 (第 46 巻第 9 号, 1992) で村路や野村が紹介しているので参照されたい。また、分子進化学の手法に関する良い成書 (根井, 1990; 五条堀ら, 1993) もあり、一読の価値がある。

I PCR による塩基配列比較の方法

PCR を用いて遺伝子を増幅する場合には、プライマー DNA が必要であり、その設計が実験の鍵を握る場合が多い。プライマーの条件としては、次のようなことが挙げられる。

① 左右のプライマーがかならず目的の遺伝子にアニールすること。少なくともプライマーの 3' 末端の数塩基は一致しないとアニールできない。したがって、プライマーの配列は種を超えてよく保存されている場所から選ぶべきである。必要に応じて混合塩基を導入する。

② 増幅する領域には、適度な変異が存在すること。配列が似すぎていても、違いすぎても正しい系統関係を導けなくなる。

③ 増幅する領域のサイズが適度であること。通常の

シーケンシング技術で一回に解読できるのは 500 塩基程度であるので、完全に両方向のシーケンスを決定したい場合は 500 塩基対くらいの PCR 産物が望ましい。それ以上に長い配列では、完全な配列を得るために、サブクローニングや別のプライマーが必要となる。一方、短い PCR 産物では、得られる情報が減少し、系統樹の樹形や樹長の精度が下がることになる。

しかし、多くの昆虫群では、これらの条件を満たす配列を見いだすことが簡単ではない。ショウジョウバエやタバコスズメガなどの限られた材料では、DNA の塩基配列が多数決定されているが、他の多くの分類群では、DNA の情報はあまり多く得られていない。そのような昆虫を対象として分子系統学を始める場合には、進化上よく保存されている配列を用いざるを得ない。ただし、進化の遅い遺伝子を用いると、増幅領域の変化が乏しくなり、得られる情報が少なくなる。既に昆虫で用いられた PCR プライマーのリストがあるので参照するとよいだろう (DeSALLE et al., 1993; HEWITT et al., 1991)。

どのような塩基配列がすでに決定されているかを調べるために、既存の DNA データベースが利用できる (五条堀ら, 1993)。DDBJ (日本 DNA データバンク) やアメリカの GenBank などに登録されている既知の配列から、自分の興味のある生物種または近縁種の情報を検索し、その配列を元にしてプライマーをデザインする。塩基配列上の保守的部位の特定には、複数の配列を比較して Dotty Plot (開発者 DON GILBERT, Biology Dept., Indiana University, Bloomington, IN, USA) のようなプログラムでホモロジープロットを調べたり、CLUSTAL V (HIGGINS, 1992) などアラインメントを行うことが必要になる。プライマーの候補が PCR プライマーとして適切であるかどうかの検定は、Amplify (中村, 1993) などのプログラムを用いて行うことができる。

PCR 反応の条件、特にアニーリング温度と反復回数が結果に大きく影響するが、条件を何段階か設定して比較してみるとよい。実際に目的の配列が増幅されたかどうかは、PCR 産物のサイズ、制限酵素切断パターン、サブプロット解析などで判断できる。PCR 産物を、直接塩基配列の決定に用いることもできるが、混合プライマーによる PCR の場合は、クローニングを行ったほうがよい。筆者らは、T4 DNA ポリメラーゼを用いて PCR 産物の末端を平滑化した後、pBluescript II などのベクターの *Sma* I (または他の平滑末端生成酵素) 切断点に挿入し、自動蛍光シーケンサーを用いて配列決定している。

How to Draw Molecular Phylogenetic Trees of Insects.

By Toru SHIMADA

PCR産物から得られた配列を比較するためには、多重アラインメントを行わねばならない。筆者らはCLUSTAL V (前出) を用いている。整理させた配列から、PHYLIP (FELSENSTEIN, 1989) やPAUPなどの系統解析ソフトによって系統樹を得ることができる。系統樹の作成法には多数ある(根井, 1990)が、代表的なものは近隣結合法(SAITOU and NEI, 1987), 最大節約法(FITCH, 1977), 最尤法(FELSENSTEIN, 1981)などであろう。それぞれ基礎となる仮定が異なり、どの方法が最適であるかは一概にいえない。分類学者は最大節約法を好む傾向があるが、計算機シミュレーションでは、近隣結合法も良い結果を与えるらしい(SAITOU and IMANISHI, 1989)。最尤法は最も複雑な計算を行うので計算時間がかかるが、進化速度の一定性を仮定しなくてもよいという利点がある(FELSENSTEIN, 1981; 長谷川, 1989)。PHYLIPは、DNA塩基配列とタンパク質のアミノ酸配列のおおのについて、各作成法によって系統樹を作成するが、アミノ酸配列の最尤法だけは行うことができない。アミノ酸配列の最尤法については、PROTMLプログラム(ADACHI and HASEGAWA, 1992)が利用できる。

以下に、筆者らの分子系統樹作成の実例を二つ紹介する。

II アリルフォリン遺伝子からみたヤママユガ科・カイコガ科の系統関係

ヤママユガ科とカイコガ科は近縁の科であり、絹糸昆虫として重要である。筆者らは、この2科に属する昆虫を材料に体液タンパク質の種間比較を続けている(嶋田ら, 1992)。アリルフォリンは、幼虫の体液中に多量に含まれるタンパク質で、脱皮や変態の時期に必要なアミノ酸の貯蔵体と考えられている(TELFER et al., 1983)。アリルフォリンの遺伝子は、核に存在し、カイコではハプロイドゲノム当たり1コピーと推定されている(FUJII et al., 1989)。ここでは、アリルフォリン遺伝子の配列に基づいて、上記2科の昆虫の系統関係を検討した結果(SHIMADA et al., 投稿中)を述べる。

既知のカイコとタバコスズメガのアリルフォリン遺伝子の塩基配列をもとに、PCRプライマーを設計した。第3エクソンと第4エクソンのおおのから、塩基配列がよく保存されており、しかもコドンの縮退度が低いアミノ酸の配列をコードしている部分を選択し、2種類のプライマーとした。コドンの縮退を考慮して、一方は16通りの混合物、もう一方は8通りの混合物とした。11種類の野蚕からゲノムDNAを調製し、PCRを実行した結果、期待通り約500塩基対からなるPCR産物が得られた。前述の方法でPCR産物をクローン化し、塩基配列を決定した。

決定した配列からイントロンと推定される配列を除外した後、データをPHYLIPに入力し、近隣結合法を用いて系統樹を作成した。外群としてタバコスズメガの配列

を用いた。遺伝的距離の計算にはKIMURA (1980) の2パラメーター法を用い、トランジションはトランスバージョンの2倍の頻度で起きるものと仮定した。その結果、図1aに示す系統樹が得られた。100回のブートストラップ(FELSENSTEIN, 1985)の後に再度近隣結合法を適用し、合意系統樹(consensus tree)を求めたところ、樹形は同一であり、各分岐の支持される割合は57~100%であった。一方、エクソンの塩基配列からアミノ酸配列を推定し、近隣結合法で系統樹を作成したところ、図1bのようになった。ブートストラップによる合意系統樹も同じ樹形であり、各分岐の支持率は15~100%であった。

得られた系統樹を過去の分類学的研究(MICHENER, 1952; 井上, 1982; 宮田, 1970)に照らして考察すると、同属とされているすべての種が近縁であることが裏付けられ、別属だが近縁種とみなされているクスサンとヒメヤママユの類縁性も支持された。アリルフォリン遺伝子の配列が、野蚕種間の近縁性の検定に有力な手段となることが示された。カイコガ科とヤママユガ科の両科の単系統性も支持された。しかし、ヤママユガ科の属間の関係は、DNAからの系統樹とアミノ酸配列からの系統樹で差異があり、図には示さないが、最大節約法ではさらに異なる結果が得られた。ブートストラップ検定の結果も属間関係のあいまいさを示している。また、カイコとクワコの関係についても、配列の差異が少なすぎるためもあって、明確な結論を示すことができなかった。今のところ、これらの不確実な分岐関係を無理に表現するよりは、多分岐を許す樹形で系統樹を描くほうがよいかもしれない。今後、進化速度の異なる他の遺伝子でも塩基配列を比較できれば、さらに精度の高い系統樹が描けるはずである。

イントロン内部やコドンの第3塩基のみの比較を行ったところ、同属の種やクスサン/ヒメヤママユの間では相同性が高かったが、別属間では著しく低かったので、これらのサイトでは塩基置換が飽和している可能性も考えられる。また、トランジション/トランスバージョンの比が、同属内では1.8であるのに対し、属間では1.2、科間では1.0となったので、属以上のレベルの進化では複数回の塩基置換が起きていることがわかる(DeSALLE et al., 1987)。属間関係の分析にはアミノ酸配列の系統樹のほうが適しているかもしれないが、得られた配列は121アミノ酸残基と短いので、より長い配列を比較する必要がある。

III ミトコンドリアDNAからみたアゲハチョウの系統関係

アゲハチョウ科は、成虫の美しい姿に惹かれる愛好家が多く、鱗翅目昆虫の中では比較的分類上の知見の豊富な科である。最近、海外ではDNAレベルからも系統解析が試みられ始めている(SPERLING, 1993 a, b; MARTIN and PASHLEY, 1992)が、本邦産の種ではまだ行われていない。

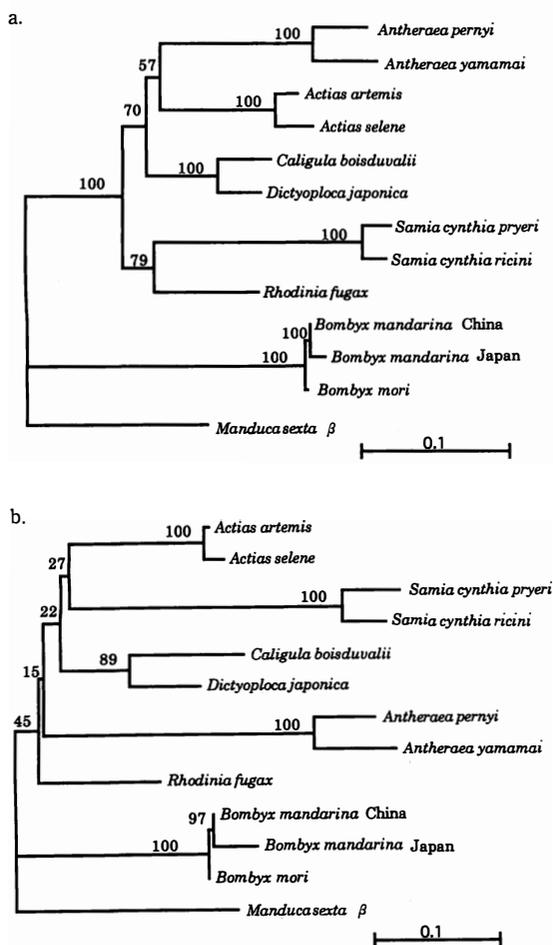


図-1 アリルフォリン遺伝子の塩基配列から推定したヤマモガ科・カイコガ科の系統樹

枝の長さは進化的距離に相当する。各枝の上の数字はブートストラップによる支持率(%)。a:塩基配列から近隣結合法で作成した系統樹。b:アミノ酸配列から近隣結合法で作成した系統樹。

学名は、*Bombyx mandarina* Japan 本邦産クワコ、*Bombyx mandarina* China 中国産クワコ、*Samia cynthia ricini* エリサン、*Samia cynthia pryeri* シンジュサン、*Antheraea yamamai* ヤママユガ、*Antheraea pernyi* サクサン、*Dictyoploca japonica* クスサン、*Caligula boisduvalii* ヒメヤマモ、*Actias artemis* オオミズアオ、*Actias selene* 台湾産オナガミズアオ、*Rhodinia fugax* ウスタビガ、*Bombyx mori* カイコ、*Manduca sexta* タバコスズメガ。

アゲハチョウ科の昆虫では、従来、分子生物学的研究があまり行われておらず、既知の遺伝子配列がほとんど存在しない。このような状況の下で分子系統学的研究を開始する場合、ミトコンドリアDNAは扱いやすい対象である。ミトコンドリアはすべての真核生物に存在し、コ

ピー数も多く、そのゲノムに含まれる遺伝子の種類もおよそ同じだからである。哺乳動物ではミトコンドリアDNAが核の遺伝子よりも速く進化するといわれているが、昆虫にはあてはまらない(PASHLEY and KE, 1992)。筆者らはミトコンドリアDNAの16SリボソームRNAコード領域に着目し、系統分析に着手した(嶋田ら、未発表)。この領域は、ミトコンドリアゲノムの中でも比較的進化速度の遅い領域であり、ショウジョウバエ、ヨコバイおよびブユの系統分析でも利用されている(DeSALLE et al., 1987; DeSALLE et al., 1992; FANG et al., 1993; XIONG and KOCHER, 1991)。筆者らは16S RNAの後半部分約580塩基対をPCRで増幅した。ショウジョウバエ、ヒトスジシマカ、マウスの配列を比較し、よく保存されている部分を用いてプライマーを設計した。3種で異なる部分は混合サイトとした。

4種のアゲハチョウで配列決定された塩基数は、524ないし529塩基対であった。AとTが非常に多く、あわせて約77%であった。AT含量が多いのは昆虫のミトコンドリアゲノムに共通に見られる特徴である。配列の整列は、以後の系統樹作成において外群として用いたヤガ科の*Spodoptera frugiperda*の配列と一緒にを行った。また、塩基の欠失や挿入を考慮しながら整列させた。その結果をPHYLIPに入力して、各種系統樹の作成を行った。遺伝的距離の計算では、アリルフォリン遺伝子と同様に、トランジションがトランスバージョンの2倍の頻度で起きるものとした。

図-2の系統樹は、最尤法で描いた。枝の長さは、進化的距離に比例する。*Spodoptera*を外群とみなすと、ルートの位置は系統樹の左端になる。つまり、アゲハチョウ科の共通祖先から、まずウスバシロチョウが、次にアオスジアゲハが、そして最後にナミアゲハとクロアゲハが分化したという分岐プロセスが推定される。100回のブートストラップの結果は、アオスジアゲハの分岐を78%の信頼性で、ナミアゲハとクロアゲハの分岐を98%の信頼性で支持した。この推定は、従来の分類学的知見(阿江, 1986)と一致する。最大節約法や近隣結合法による系統樹も、おおむね最尤法の結果に一致した。

おわりに

以上、二つの昆虫群での分子系統樹作成例を述べ、アリルフォリン遺伝子やミトコンドリアDNAが鱗翅目昆虫の近縁種間の系統解析に有用であることを指摘した。前者は核にコードされており、後者は細胞質に存在する。前者はタンパク質をコードしているが、後者はRNAをコードする。これらの差異が、系統解析の結果に違いを生ずる可能性があり、できれば同一の材料で複数の核の遺伝子、ミトコンドリアDNAを調べることが望ましい。現在のところ、核の遺伝子を用いた系統解析は、昆虫ではあまり多くなく、特に単一コピーの遺伝子は例が少ない。今後アリルフォリン遺伝子以外にも多くの遺伝

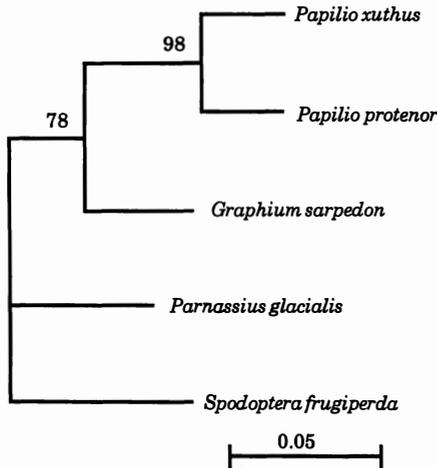


図-2 ミトコンドリアDNAの塩基配列から最尤法で推定したアゲハチョウ科の系統樹
枝の長さは進化的距離に比例する。各枝の上の数字はブートストラップによる支持率(%)。
学名は、*Papilio xuthus* ナミアゲハ、*Papilio protenor* クロアゲハ、*Graphium sarpedon* アオスジアゲハ、*Parnassius glacialis* ウスバシロチョウ、*Spodoptera frugiperda* ヤガ科の一種。

子で進化速度の推定がなされるようになれば、どのような遺伝子がどのような分類階級の系統解析に適しているのか、わかってくるだろう。ただし、DNAの系統樹は、あくまで遺伝子の系図であり、種や集団の系図ではない。特に近縁種においては、種内変異と種間差異の関係に注意しなければならない(HARRISON, 1991)。遺伝子にはコピー数が複数ある場合があり、コピー間に変異が見られる場合があること(TROSTER et al., 1990)も知っておく必要がある。

昆虫の分子系統学は、これからさらに盛んになると思うが、分子系統樹の作成は昆虫の進化と分化の機構を知るための第一歩にすぎない。系統樹を軸として、遺伝子の機能を追求する分子生物学と集団における遺伝子の動態を解析する集団遺伝学が連携し、適応進化や分岐進化などの未解決の問題を解明してゆくことになろう。本稿では、害虫管理や環境保護など応用面での分子系統学の役割を述べなかったが、関心のある方はPASKEWITZ and COLLINS (1990) やVOGLER et al. (1993)などを参照されたい。

なお、本稿で述べた研究結果は、栗本康行、笹部哲郎、望月淳、小林正彦の各位との共同研究の成果である。星崎杉彦氏からは貴重なコメントをいただいた。

引用文献

1) ADACHI, J. and M. HASEGAWA (1992) : Computer Science Monographs—A Publication of the Institute of Statistical Mathematics, No. 27 : 1~77.
2) 阿江 茂 (1986) : アゲハチョウの生物学, 勝美印刷, 118 pp.
3) CARMEAN, D. et al. (1992) : Mol. Phylogenet. Evol. 1 : 270~278.

4) CHAPCO, W. et al. (1992) : Genome 35 : 569~574.
5) DESALLE, R. et al. (1987) : J. Mol. Evol. 26 : 157~164.
6) ——— et al. (1992) : Mol. Phylogenet. Evol. 1 : 31~40.
7) ———, R. et al. (1993) : Methods in Enzymology 224 : 176~204.
8) FANG, Q. et al. (1993) : Mol. Phylogenet. Evol. 2 : 119~131.
9) FELSENSTEIN, J. (1981) : J. Mol. Evol. 17 : 368~376.
10) ——— (1985) : Evolution 39 : 783~791.
11) ——— (1989) : Cladistics 5 : 164~166.
12) FITCH, W. M. (1977) : Amer. Natur. 111 : 223~257.
13) Fujii, T. et al. (1989) : J. Biol. Chem. 264 : 11020~11025.
14) 五条堀孝ら (1993) : 新生化学実験講座 16, 分子進化実験法, 日本生化学会編, 東京化学同人, 511 pp.
15) 長谷川政美 (1989) : DNA からみた人類の起源と進化 [増補版], 海鳴社, 282 pp.
16) HEWITT, G. M. et al. (1991) : Molecular Techniques in Taxonomy (NATO ASI series ; ser. H. Cell biology ; v. 57), Springer-Verlag, Berlin, 410 pp.
17) HEY, J. and R. M. KLIMAN (1993) : Mol. Biol. Evol. 10 : 804~822.
18) HARRISON, R. G. (1991) : Ann. Rev. Ecol. Syst. 22 : 281~308.
19) HIGGINS, D. G. et al. (1992) : Comput. Appl. Biosci. 8 : 189~191.
20) HSU CHEN, C. C. et al. (1984) : Nucleic Acids Res. 12 : 7771~7785.
21) 井上 寛 (1982) 「Saturniidae ヤママユガ科」, 日本産蛾類大図鑑 (井上寛ら編, 第1巻 (解説編), 講談社, pp. 587~590.
22) KAMBHAMPATI, S. and K. S. RAI (1991) : Evoluiton 45 : 120~129.
23) Kimura, M. (1980) : J. Mol. Evol. 16 : 110~120.
24) KOCHER, T. D. et al. (1989) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86 : 6196~6200.
25) LIU, H. and A. T. BECKENBACH (1992) : Mol. Phylogenet. Evol. 1 : 41~52.
26) MARTIN, J. A. and D. P. PASHLEY (1992) : Ann. Entomol. Soc. Am. 85 : 127~139.
27) MICHENER, C. D. (1952) : Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 98 : 333~501.
28) 宮田 保 (1970) : Tinea 8 : 190~199.
29) 村路雅彦 (1992) : 植物防疫 46 : 20~23.
30) 中村史雄 (1993) : 細胞工学 12 : 225~228.
31) 根井正利 (五条堀孝・斎藤成也訳) (1990) : 分子進化遺伝学, 培風館, 434 pp.
32) 野村昌史 (1992) : 植物防疫 46 : 24~27.
33) PASHLEY, D. P. and L. D. KE (1992) Mol. Biol. Evol. 9 : 1061~1075.
34) PASKEWITZ, S. M. and F. H. COLLINS (1990) : Med. Vet. Entomol. 41 : 367~374.
35) Puterka, G. J. et al. (1993) : Heredity 70 : 604~618.
36) SAITOU, N. and M. NEI (1987) : Mol. Biol. Evol. 4 : 406~425.
37) SAITOU, N. and T. IMANISHI (1989) : Mol. Biol. Evol. 6 : 514~525.
38) 嶋田透ら (1992) : 応動昆. 36(2) : 119~126.
39) SIBLEY, C. G. and J. E. AHLQUIST (1984) : J. Mol. Evol. 20 : 2~15.
40) SPERLING, F. A. H. (1993 a) : Mem. Ent. Soc. Can. 165 : 233~242.
41) ——— (1993 b) : Heredity 71 : 227~233.
42) TELFER, W. H. et al. (1983) : Insect Biochem. 13 : 601~613.
43) TROSTER, H. et al. (1990) : J. Mol. Biol. 216 : 533~543.
44) VOGLER, A. P. et al. (1993) : Ann. Entomol. Soc. Am. 86 : 142~152.
45) XIONG, B. and T. D. KOCHER (1991) : Genome 34 : 306~311.