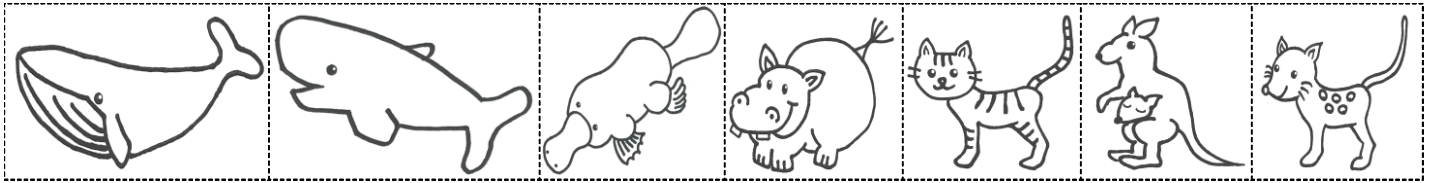


分子系統樹実習 クジラはどの哺乳類に最も近い？－分子系統樹の樹形から探る



●はじめに

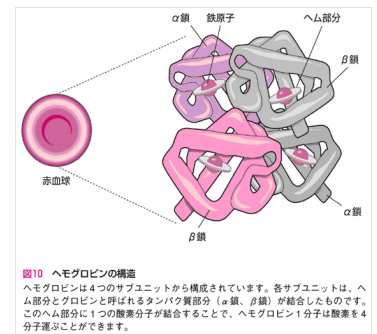
タンパク質のアミノ酸配列や DNA の塩基配列の違いを利用して系統樹（分子系統樹）を描くことができる。今回は、研究者も利用しているフリーソフト MEGA を使い、哺乳類の分子系統樹を描くことで、クジラはどの哺乳類に系統的に最も近いのか調べてみよう。また、クジラはその哺乳類から何年前に種分化したかを分子時計を利用して計算してみよう。

●目的

生物分類体系・学名の付け方に加えて、分子系統樹の原理と作成法を学ぶ。
また、分子時計を利用して分岐年代の推定法の基礎についても学ぶ。

●利用する分子

ヘモグロビンの α 鎖（ α グロビン, HBA）のアミノ酸配列



<http://www.senkensoi.net/ssnet/mechatronics/071102.html>

●方法

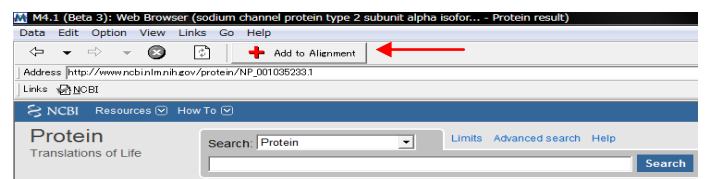
1. 仮説を立てる

クジラ（ミンククジラ・マッコウクジラ）は今回比較する哺乳類 5 種（カモノハシ・カバ・イエネコ・オオカンガルー・フクロネコ）の中でどの種に最も近縁かを外部形態を基に仮説を立てよう。またその他にも、哺乳類 7 種の中で近縁と思われるのはどの種とどの種かを考えてみよう。

2. 分子データをダウンロードし分子系統樹を描く

①インターネット上から塩基配列を取り出す

1. MEGA を開く。
2. Alignment メニューから Query Databanks を選択する。すると NCBI のホームページが開く。
3. NCBI ホームページ上部の Search の隣にあるリストを Nucleotide から Protein に変える。
4. for の横の空欄バーにタンパク質名、学名（下記参照）の順に入力し、Go をクリック。
例) HBA Homo sapiens ※ α グロビンは略称である「HBA」と入力する
5. 表示されたタンパク質の名称をクリックする。
注 1) aa (amino acid の略、つまりアミノ酸) が 140 以上のものを選ぶこと
注 2) タンパク質の情報が 1 つしか登録されていない場合、「5」の画面が出ず「4」から「6」の画面に飛ぶ。
6. タンパク質の情報が表示されたページが開いたら、ページ最上部の Add to Alignment のボタンをクリックする。
7. ポップアップウィンドウが開き、塩基配列が MEGA に無事追加されたことを確認するメッセージが出る。
8. 4～7 の過程を繰り返す。
9. すべての種のアミノ酸配列の登録が終了したら NCBI のホームページを閉じる。



19. メインウィンドウから Distances→Compute Pairwise を選択し、Analysis Preference ダイアログが開いたら、Model→Amino Acid→No. of Differences を選択し、Compute をクリックする。すると、全てのアミノ酸配列間のアミノ酸の差異数が表示される。後でこの数字を利用するため、このウィンドウは閉じなくてよい。

Option

Data Type

Analysis

→Compute

Include Sites

→Gaps/Missing Data

Substitution Model

→Model

→Substitutions to Include

→Pattern among Lineages

→Rates among sites

Selection

Amino acid

Pairwise distance calculation

Distances only

Complete Deletion

Amino: Number of differences

All

Same (Homogeneous)

Uniform rates

No. of Differences

p-distance

Poisson Correction

Equal Input

PAM Matrix (Dayhoff)

JTT Matrix (Jones-Taylor-Thornton)

Nucleotide

Syn-Nonsynonymous

Amino Acid

④分子系統樹を描く

20. 再びメインウィンドウを開く。
21. メニューPhylogeny から Construct Phylogeny → Maximum Parsimony (MP)（最節約法）を選択する。
- 参考 最節約法とは、過去に起こったと考えられる塩基置換を系統樹上で復元し、その回数が最も少なくなるような樹形を選択する方法である。系統樹の構築法には最大節約法以外にも複数の方法がある。
22. 新しいウィンドウが開いたら、上部にある Test of phylogeny のタブをクリックする。
23. Bootstrap を選択し、「赤いチェック」 ボタンをクリックする。
24. ウィンドウの下部にある compute をクリックする。数秒後、系統樹が完成し、新しいウィンドウが開く。

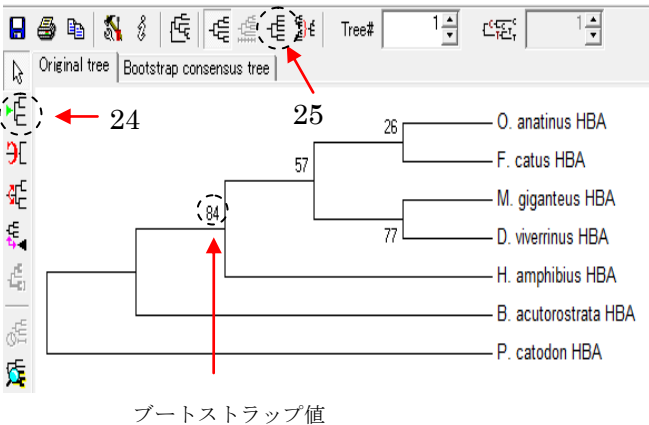
25. 系統樹の単孔類（カモノハシ *O.anatinus*）の枝をクリックし、右図の 24 のボタンをクリックする。この作業により、単孔類が系統樹の基部に移動する。

参考 系統樹によって進化の道筋を表すには、どちら向きに進化が起こったのかが分からなくてはならない。つまり、扱う種の中で祖先に当たると考えられている種を基準に考える。

26. 右図の 25 のボタンをクリックし、ウィンドウが開いたら、OK をクリックする。この作業によりブートストラップ値が 50 以下の分岐はまとめられる。

参考 ブートストラップ値が高いほどその分岐は信頼性がある。

27. 出来上がった系統樹の樹形を「分類シート」に描き写す。
種名は学名ではなく和名を書くこと。同じ目に属する種は近い位置にあることを確認しよう。系統樹の種名の横の欄に、実験書上部にある哺乳類の写真をのりで貼り付ける。



⑤分子時計を利用して分岐年代を推定する

28. 「19」で計算させた表（右図は例）から「ミンククジラとマッコウクジラ」、「クジラに最も近かった哺乳類とミンククジラ」、「クジラに最も近かった哺乳類とマッコウクジラ」の HBA 分子におけるアミノ酸数の違いを読み取る。

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. M. musculus Paxneb protein								
2. R. norvegicus LOC687694 protein	18,000							
3. B. taurus Crossbred x Angus elongation p	39,000	42,000						
4. P. troglodytes Yerkes chimp pedigree C04	37,000	37,000	27,000					
5. H. sapiens elongation protein 4 homolog+	37,000	37,000	27,000	1,000				
6. M. domestica hypothetical protein+LOC100	63,000	63,000	56,000	57,000	57,000			
7. O. anatinus Glennie hypothetical protein	66,000	67,000	62,000	60,000	60,000	52,000		
8. G. gallus inbred line UC0001 hypothetical	81,000	80,000	80,000	75,000	75,000	71,000	71,000	

29. 「分類シート」の指示に従って、分岐年代を計算する。

計算式 (アミノ酸 1 個が変化するのにかかる時間) × (種間のアミノ酸配列の違い÷2)

3. 分類体系を調べる

インターネット **Wikipedia** を利用して、哺乳類 7 種（ミンククジラ・マッコウクジラ・カモノハシ・カバ・イエネコ・オオカンガルー・フクロネコ）の分類体系（界・門・綱・目・科・属・種）を調べ、分類シートに記入する。また有胎盤類・有袋類・単孔類のどれに該当するかも調べて記入する。