

ミトコンドリア DNA 全長配列に基づいた ペンギン目に関する系統解析

渡辺 麻衣子¹ · 岡田 典弘¹ · 長谷川 政美²

(受付 2007 年 7 月 27 日 ; 改訂 2007 年 12 月 12 日)

要 旨

本稿では、著者等自身によるミトコンドリア DNA 全長配列に基づく系統解析を主軸として、鳥類におけるペンギン目の系統学的位置を明らかにすることを目的とした分子系統学的研究について詳述する。これらの研究の結果、現生のペンギン類に最も近縁である種は何かということを知り、これを解明するための新たな課題が明らかとなったのでこれを考察する。

キーワード：分子系統樹推定、最尤法、ミトコンドリア DNA、ペンギン、コウノトリ。

1. はじめに

最近 15 年間ほどのあいだに、鳥類の系統解析の場においても徐々にミトコンドリア全長配列が用いられるようになってきた。ペンギン類に関しても、Slack らによって初めて *Eudyptes minor* (コガタペンギン) のミトコンドリア全長配列が決定、解析された (Slack et al., 2003)。しかしながら、過去の研究の中で解析に用いられているタクサもミズナギドリ目ミズナギドリ科、ミズナギドリ目アホウドリ科、アビ目、ならびにペリカン目ゲンカンドリ科といった現生のペンギン目と最も近縁である可能性の高い種を網羅的には含んでおらず、ペンギン類に最も近縁である種を明らかにすることができる解析とは言えない。そこで、本稿では、Watanabe et al. (2006) によって行われたミトコンドリア DNA 全長配列を用いたペンギン目およびこれと近縁な鳥類の包括的な分子系統樹推定に関する研究を主軸として、ペンギン目の鳥類における系統学的位置を解明することを目的とした研究について詳述する。また、当該研究の結果を通して、現生のペンギン目に最も近縁である種を解明するための新たな課題が明らかとなったのでこれを考察する。

2. ペンギン目の鳥類における系統学的位置に関する研究の背景

2.1 鳥類における分子系統学的手法に基づいた系統分類

近年、分子系統学的手法に基づいた系統分類の研究が進んでいる哺乳類においては、高次分類群の類縁関係はミトコンドリア全長配列に基づいた解析が当然のようになされており (Nikaido et al., 2000, 2001; Cao et al., 2000; Arnason et al., 2002; Lin et al., 2002)、数多くの種の全長配列が決定されている。またおよそ 10 kbp の核遺伝子データを用いて哺乳類の全系統樹を解析するなど、ミトコンドリアおよび核遺伝子両側面からの膨大な分子データを用いた系統学的情

¹ 東京工業大学大学院 生命理工学研究科：〒 228-0581 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259

² 復旦大学 生命科学学院：200433 中華人民共和国上海市邯鄲路 220

報が得られている (Novacek, 2001; Murphy et al., 2004).

しかしながら、鳥類のミトコンドリア全長配列においては、2007年7月現在、Watanabe et al. (2006)によって初めて決定された6種を含めて51種のデータベースへの配列登録があるものの、登録種は偏ったリネージに限られており、全ての目すらも網羅されてはいない。核遺伝子配列についても、これと同様のサンプリング状況であるか、もしくは短い配列情報のみに頼った系統解析しかなされてはいない。解析の進んでいる哺乳類の系統と比較すると目レベルの系統関係を解明するには至っていない現状である。最も網羅的なタクソンサンプリングによる分子系統樹として Sibley and Ahlquist (1990)によるものが現在でも広く参照されているものの、これは現在となつては古い手法と言わざるを得ない技術をもとに取られたデータに基づいており、現在ではところどころの系統関係に対して信頼度が低いとする見解が一般的である。

過去に主として形態学的研究により構築された系統関係と分類体系を、鳥類に関しても分子系統学的に再検証する必要性が声高に主張されている昨今ではあるが、上述のように、目レベルの系統関係を解明するには至っていない状況である。

2.2 ペンギン目の系統分類

現生のペンギン類は、ペンギン目ペンギン科一目一科に全ての種が含まれるという、現生鳥類の中でもとりわけ特化した形態をもつ生物群である。その特異的な外部形態に加えて、分布域は亜南極圏を中心として南半球の広範囲にわたっており、極地や海岸林など多様な環境に適応放散している。こうした特徴を持つペンギン類は、鳥類における分類学や生物の環境適応を探る上で大きな関心が寄せられており、これまで、形態学的、行動学的、分子系統学的など様々な方法および技術によって、系統分類体系についての再検討がなされてきた。古生物学的にみても、ペンギン類は鳥類の中で最も良い化石資料に恵まれた分類群のひとつであり、比較的古い時代の化石記録が知られている。最古の化石はニュージーランドの暁新世中期から始新世初期にかけての地層から発見されたもので、これによってペンギン類の歴史はおおよそ6200万年前までさかのぼることができる (Jones and Mannering, 1997)。それにもかかわらず、明白にペンギン類の起源を示す化石が未だに発掘されていないこともあって、現生ペンギン類の直接の祖先に関する統一した見解は未だに得られてはいない。

鳥類の系統分類学の場合において、初期の研究では、ペンギン類は同様に飛翔能力を持たない走鳥類と系統的に近縁な位置におかれ、これらは原始的な鳥類であるとされた。また、これらの共通祖先が分岐した後に、その他の鳥類のリネージにおいて飛翔能力の獲得が起こったとされていた (Lowe, 1939)。しかしその後の研究により、現在では、全ての現生鳥類の祖先は飛翔能力を持ち、ペンギン類と走鳥類は系統的に近縁ではなくそれぞれ独立に飛翔能力を失ったとする説がコンセンサスとなっている。後肢や頭蓋の骨格および筋の特徴などの形態学的な指標を基に提唱されている系統仮説によると、ペンギン目と最も近縁な現生の鳥類はミズナギドリ目 (Simpson, 1975; Livezey and Zusi, 2001)あるいはアビ目 (Olson, 1985)であるとされている。また、形態学的指標ならびに行動学的な指標に基づいた研究では、カイツブリ目/アビ目が単系統であり、これとペンギン目は最も近縁であるとされている (Cracraft, 1988; Cracraft et al., 2004)。しかしながら、水中という特殊な環境に適応した水鳥間の形態は互いに似通っており、形態比較しても収斂進化による影響を排除することが困難なため、比較形態学による系統関係の解明には限界があった。

そこで、近年になって分子系統学によるペンギン類の系統解析の報告が散見されるようになった。Ho et al. (1976)は免疫学的距離法により、ペンギン目、アビ目、カイツブリ目、ミズナギドリ目 (ミズナギドリ科、アホウドリ科)およびコウノトリ目 (コウノトリ科、サギ科、トキ科、フラミンゴ科、およびシュモクドリ科)といった水鳥は互いに近縁であることを示唆し

た。Sibley and Ahlquist (1990)は DNA-DNA ハイブリダイゼーション法を用いて現生の全ての科をほぼ網羅した包括的な系統解析を行い、ペンギン目、ミズナギドリ目、およびアビ目はそれぞれ単独で独立した目を形成するほどの遺伝的特異性を持つには至らないため、各々を科のレベルに降格し、さらにこれらはペリカン目グンカンドリ科と共に“ミズナギドリ上科”に分類されるとした。のちに van Tuinen et al. (2001)は新たな distance matrix を作成した上で DNA-DNA ハイブリダイゼーション法による系統解析を行い、これとミトコンドリア部分配列の解析結果を統合することによって、“ミズナギドリ上科”内部の系統関係について、ペンギン科はアビ科よりもむしろミズナギドリ科とより近縁であることを示した。さらに、上述したようにコガタペンギンのミトコンドリア DNA 全長配列が決定された後、哺乳類においての分子系統学的研究の流れと同様に、ミトコンドリア DNA 全長配列を指標とした鳥類の包括的な系統解析を目指して次々と配列が決定され、これらを解析した研究結果が複数発表された (Harrison et al., 2004; Slack et al., 2006, 2007; Watanabe et al., 2006; Gibb et al., 2007)。これらの研究結果からは、ペンギン目と最も近縁なのはコウノトリ目コウノトリ科、もしくはミズナギドリ目である可能性が示唆されている。しかしながら、これらの研究でなされているサンプリングに注目すると、現生のペンギン目と最も近縁な種の候補であるミズナギドリ目アホドリ科、ミズナギドリ目ミズナギドリ科、アビ目、カイツブリ目、ペリカン目グンカンドリ科といったタクサが網羅されているのは Watanabe et al. (2006)のみである。よって、現生のペンギン目と最も近縁である種を解明するという目的においては、Watanabe et al. (2006)は最も適したサンプリングを行った系統解析であると言える。

3. ペンギン目の鳥類における系統学的位置の解明に重点をおいた分子系統樹推定の実際

Watanabe et al. (2006)による研究では、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用いて、最尤法による系統解析が行われた。その具体的な解析方法を以下に示す。

3.1 ミトコンドリア DNA 全長配列データの取得

Watanabe et al. (2006)は、ペンギン目ペンギン科およびこれと近縁であると推測される科 5 科を選択し、それぞれの科につき主要な 1 種計 6 種について、ミトコンドリア DNA 全長配列を決定した。また、データベース上から鳥類のミトコンドリア DNA 全長配列データを取得し、上述の 6 種の配列データと合わせてこれらを解析した。解析に用いた種は以下のとおりである。

Rhea americana (ダチョウ目レア; database Accession No. NC0000846), *Struthio camelus* (ダチョウ目ダチョウ; NC002785), *Gallus gallus* (キジ目ニワトリ; NC001323), *Coturnix chinensis* (キジ目ヒメウズラ; NC004575), *Coturnix japonica* (キジ目ウズラ; NC003408), *Aythya americana* (カモ目アメリカヒドリ; NC000877), *Anser albifrons* (カモ目マガン; NC004539), *Corvus frugilegus* (スズメ目ミヤマガラス; NC002069), *Vidua chalybeata* (スズメ目シコンチョウ; NC000880), *Smithornis sharpei* (スズメ目ハイガシラアフリカヒロハシ; NC000879), *Ciconia ciconia* (コウノトリ目シュバシコウ; NC002197), *Ciconia boyciana* (コウノトリ目ニホンコウノトリ; NC002196), *Falco peregrinus* (タカ目ハヤブサ; NC000878), *Buteo buteo* (タカ目ノスリ; NC003128), *Haematopus ater* (チドリ目ミナミクロミヤコドリ; NC003713), *Arenaria interpres* (チドリ目キョウジョシギ; NC003712), *Eudyptula minor* (ペンギン目コガタペンギン; NC004538), *Eudyptes chrysolome* (ペンギン目イワトビペンギン; AP009189), *Diomedea chrysostoma* (ミズナギドリ目ハイガシラアホドリ; AP009193), *Procellaria cinerea* (ミズナギドリ目オオハイイロミズナギドリ; AP009191), *Fregate* sp. (ペリカン目グンカンドリ sp.;

AP009192), *Gavia pacifica* (アビ目シロエリオオハム; AP009190), *Podiceps cristatus* (カイツブリ目カンムリカイツブリ; AP009194).

3.2 最尤法による系統解析方法

Watanabe et al. (2006)による研究では、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について、塩基配列およびアミノ酸配列双方からの系統解析が行われた。L 鎖側にコードされている蛋白質遺伝子である ND6 については、その塩基組成とアミノ酸組成が他の 12 遺伝子とは異なること、また少量の系統学的情報しか含まれていないことなどから (Cao et al., 1998) 系統解析から除外した。配列のアライメントからは開始コドン及び終止コドン、ATPase6 と ATPase8 間、ならびに 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、さらにはギャップやアライメントが曖昧な部分を除外し解析を行った。

系統解析は最尤法 (Maximum likelihood method; ML 法) を用いて行われた (Felsenstein, 1981; Kishino et al., 1990)。Watanabe et al. (2006) では MOLPHY package ver. 2.3 (Adachi and Hasegawa, 1996a) の ProtML プログラム、および PAML package ver. 3.1 (Yang, 1997) の CodeML プログラムを用いた。また予備的解析として最尤法の簡便法である quartet puzzling (QP) 法による解析を行い、この際には TREE-PUZZLE プログラム (Strimmer and von Haeseler, 1996) を用いた。それぞれのプログラムによる解析を行う際に、mtDNA タンパク遺伝子のアミノ酸配列解析においては mtREV-F モデル (Adachi and Hasegawa, 1996b) を、塩基配列解析においてはコドン置換モデル (Goldman and Yang, 1994; Yang et al., 1998) を使用した。コドン置換モデルを使用する際には、Miyata et al. (1979) のアミノ酸距離を用いた。さらに、アミノ酸およびコドン座位間の進化速度の不均質性を考慮するために、離散化されたガンマ (Γ) 分布を取り入れたモデルを用いた (Yang, 1996)。ブートストラップ確率は 10,000 回繰り返しによる RELL (resampling of estimated log-likelihood) 法 (Kishino et al., 1990) で推定した。

ML 法で系統解析をする際には、存在しうる全てのトポロジー (樹型) について尤度を計算し、その中から最も尤度の大きなものを選び出す。ML 解析の場で発現するもっとも深刻な現象のひとつとして、数多い OTU に適用すると候補となるトポロジー数は莫大な数にのぼってしまい、しかもそれらのうちのほとんどは尤度が問題にならないほど低い、つまり実現性の低いトポロジーであるという問題が挙げられる。あまりにトポロジー数が多くなると膨大な計算量をこなさなければならず、コンピューターの過重負荷と莫大な時間の浪費を引き起こす。これを軽減させるために、主解析に先立って、単系統性が確実であるクレードを前もって選び出しこれを固定することによって OTU を減らし、候補となるトポロジー数を減らすことができる。Watanabe et al. (2006) では、ミトコンドリア DNA の 12 タンパクコード遺伝子を解析する手順の最初の段階として、QP 法による予備的解析を行っている。その結果高い QP 値に支持され、かつ過去の研究から生物学的に議論の余地なく単系統性が示されているクレードに関してそのクレードは固定し、以降の解析の場では一つの OTU として扱っている。しかしながら、この作業を行ってもなお主解析にとってトポロジー数が多すぎるため、アミノ酸配列データについて ProtML プログラムによる近似尤度法を用いたトポロジーの網羅的探索を行い、ここで近似尤度が上位 20,000 通りのトポロジーだけを残した。さらにこれら上位のトポロジーに対して簡単なモデル (mtREV) を用いて対数尤度の比較を行い、その中での最も尤度の高い樹形に対する対数尤度の差が一定の標準誤差以内におさまる樹形だけを残している。このような作業を経て、主解析に参加させる候補のトポロジー数は適切な解析に耐えうる数まで軽減した。Watanabe et al. (2006) の研究においては、上位 20,000 通りの近似的尤度を持つトポロジーのうち、塩基配列解析においては、簡便なモデル下での最も尤度の高い系統樹との対数尤度の差

が 1 SEs 以下, アミノ酸配列解析においては 2 SEs 以下のトポロジーを残している. これらの作業によって, 塩基配列解析では 638 通り, アミノ酸配列解析では 9,401 通りのトポロジーが選出され, それらを用いて CodeML による主解析を行った.

3.3 QP 法による予備的系統解析結果

上述したように, ML 法による解析は起こりうる各トポロジーの尤度推定を行うために, 23OTU による CodeML を使用した解析では, コンピューターに対しての負担が過度である. よって, Watanabe et al. (2006) は, 解析に参加する OTU を減らすための QP 法による予備的解析を行った.

鳥類の系統学において, 大きく分けて 4 つのグループに分類されることは, 形態学的研究および分子系統学的研究の両分野からみて確実であるとされている. すなわち, 古顎下綱(現生の鳥類のうちダチョウ目のみを含む), キジカモ小綱(カモ目・キジ目), スズメ目, ならびにスズメ目以外の neoavians (現生鳥類の中で古顎下綱以外をまとめた分類群である新顎下綱のうち, キジカモ小綱以外)といった分類群である. これら 4 つのグループ間の系統関係について, 現在, 最も信頼性が高いとされている仮説は, 現生の鳥類のうちで最も古くに分岐したグループは古顎下綱であるという説である. しかしながら, この系統仮説に反する解析結果を出した過去の研究が存在する. ミトコンドリア DNA 全長配列に基づいた研究の初期では, スズメ目が現生の鳥類のうちで最も古くに分岐したとする系統樹を提示した解析結果がいくつか出されている (Mindell, 1997; Harlid and Arnason, 1999; Mindell et al., 1999; Waddell et al., 1999). 鳥類の最も基底の分岐点についての解析は, 解析される対象となるグループと遠すぎる系統関係をもつアウトグループ, まばらで偏ったサンプリング, 各リネージによって異なる進化速度を持った遺伝子, あるいは適切でない解析モデルなどによって多大な影響を受ける, という報告がすでに複数ある. このうち Mindell et al. (1999) と Waddell et al. (1999) はそれぞれ, ミトコンドリア全長配列に基づいたスズメ目の系統学的位置について詳細に検討した結果, これらのデータを用いた解析ではスズメ目は鳥類の系統樹上で最も古い分岐をもつように見えるけれどもこれはアーティファクトであって, 今後問題点を解決した上で更なる解析が必要であるとの研究結果を報告した. さらに Harrison et al. (2004), Slack et al. (2006, 2007), ならびに Gibb et al. (2007) は, 過去の研究により提示された問題点を改善したミトコンドリア全長配列に基づいた系統解析によって, ダチョウ目が最も古くに分岐したという仮説を支持する結果を提示した. よって, 過去の, スズメ目を最も古くに分岐したグループであるとする異例ともいえる系統仮説は, 脆弱かつ信頼度の低い系統樹であるという見解が妥当である. 以上の考察により, Watanabe et al. (2006) は古顎下綱がその他の鳥類の外群となることは確実であるとみなし, QP 法による予備的系統解析ではダチョウならびにレアをアウトグループとして用い, 新顎下綱内部の系統関係を解析することとしている.

予備的系統解析の結果, 以下の系統関係が明らかとなった. (1) 新顎下綱の単系統性が 99% の QP 値で明確に支持された. (2) キジ目とカモ目の姉妹関係, すなわちキジカモ小綱の単系統性が 95% の QP 値で, 新顎下綱のうちでキジカモ小綱が最も古くに分岐したとする系統仮説が 84% でそれぞれ支持された. (3) ペンギン目, コウノトリ目コウノトリ科, チドリ目, ミズナギドリ目, ならびにスズメ目の単系統性が支持された. これらの単系統性を示すクレードはそれぞれ, ペンギン目・63%, コウノトリ科・89%, チドリ目・70%, ミズナギドリ目・87%, ならびにスズメ目・61% の QP 値で支持された. いくつかのクレードについては, Watanabe et al. (2006) の QP 法による予備的解析で必ずしも高い信頼性によって示されたとはいえないが, これら 5 分類群の単系統性は, 形態学的, 生態学的, 生物地理学的, ならびに分子系統学的などといった多岐にわたる生物学的研究の結果によっても支持されており, 確実であるとみなして

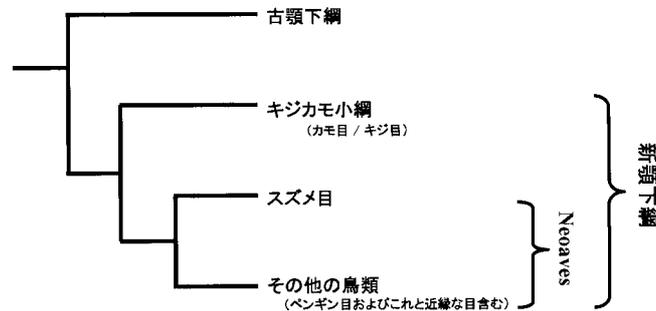


図1. 鳥類における主要4分類群の系統関係. 過去の研究の大多数および Watanabe et al. (2006) によって提示された鳥類の高次レベルの系統関係を示した.

いる (Sphenisciformes: Jouventin, 1981; O'Hara, 1989, Procellariiformes: van Tuinen et al., 2001, Charadriiformes: Sibley and Ahlquist, 1990; Paton et al., 2003; Sorenson et al., 2003; Harrison et al., 2004, Passeriformes: Raikow, 1982; Sibley and Ahlquist, 1990; Groth and Barrowclough, 1999; Mindell et al., 1999; Sorenson et al., 2003; Harrison et al., 2004). (4) タカ目の単系統性は支持されず, 独立した OTU として扱うこととした. Watanabe et al. (2006) が用いたタカ目の種はハヤブサ科ハヤブサならびにタカ科ノスリであるが, これら2種は単系統性を示さず, その他のクレードと共に多分岐となったためである.

鳥類の高次レベル系統関係について, 過去の研究および Watanabe et al. (2006) の QP 法による予備的解析結果を要約する (図1). 現生の鳥類において, 最も古い分岐は古顎下綱と新顎下綱の2つのグループ間で起こった. 次に, 新顎下綱の中で, キジカモ小綱のグループが分岐し, 残りの新顎下綱の鳥類は Neoaves と呼ばれるグループを形成する. Neoaves に属する鳥類の目レベルの系統関係については, 未だ統一見解は得られていない.

3.4 ML 法による解析結果

上述したように, Watanabe et al. (2006) によって行われた古顎下綱をアウトグループとした QP 法による予備的系統解析の結果, Neoaves (新顎下綱のうちキジカモ小綱を除いたグループ) の単系統性が示された. すなわち, 新顎下綱のうちでキジカモ小綱が最も古くに分岐したとする系統仮説が明確に支持された. 過去, いくつかの分子系統学的研究によってスズメ目がキジカモ小綱よりも古くに分岐したとする系統仮説が示された, 言い換えれば Neoaves の多系統性が示唆されたが, 上述したように, これは解析方法によるアーティファクトである可能性が非常に高い. よって, Watanabe et al. (2006) の QP 法による予備的系統解析で現れたスズメ目を含めた Neoaves の単系統性は, 過去の多くの研究結果と一致した確実な系統関係といってもよいであろう. これをふまえて, 以降の主解析では, 先のダチョウおよびレアに加えて, キジカモ小綱であるニワトリおよびアメリカヒドリもアウトグループとして扱っている. 解析の対象となるグループ, つまり内群に対して確実に外群に所属し, かつなるべく内群に近縁な種をアウトグループにすることは, 内群の確からしい系統関係を得るためには必要不可欠である. これにより, 主解析では Neoaves 内の系統関係を得ることができ, よりペンギン目に焦点をおいた系統解析が可能となっている.

Watanabe et al. (2006) の研究において主解析によって得られた系統樹が図2ならびに図3である. 主解析では, 異なる3パターンの ML 解析が行われた. まず1つ目は, 4種のアウトグループ (ダチョウ, レア, ニワトリ, ならびにアメリカヒドリ) を用いたミトコンドリア DNA

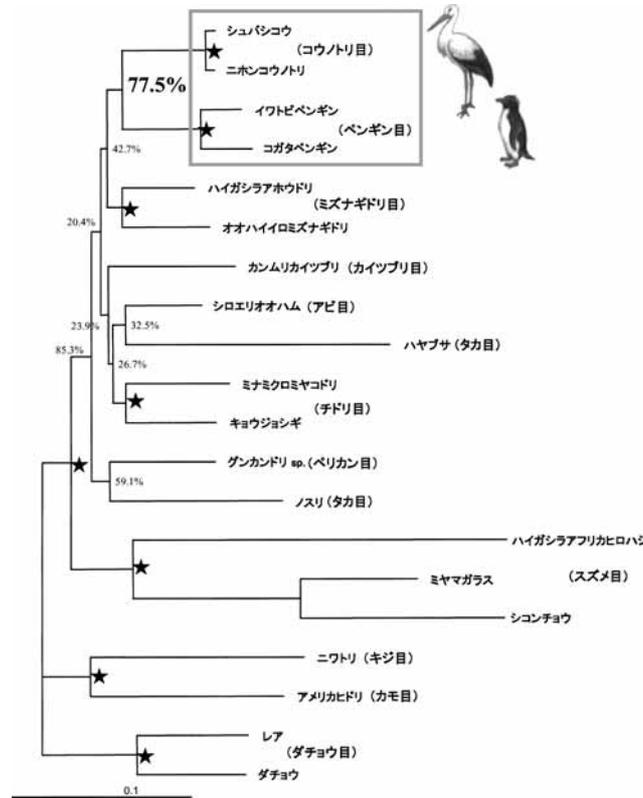


図 2. ミトコンドリア全長アミノ酸配列に基づいた ML 系統樹 1. 本解析では 4 種のアウトグループを使用した. 系統樹中の各ブランチの長さは, アミノ酸変異数の割合に基づいて算出した. クレード上の数値は BP 値を示す. 星印は QP 法による予備的解析によって単系統性が確実であるとみなされ固定されたクレードを表す.

全長アミノ酸配列による解析である. ここでは, ペンギン目はコウノトリ目コウノトリ科と姉妹群を形成する可能性が示唆された. この単系統群を含む系統樹は最尤系統樹となり(図 2), このクレードは 78% の BP 確率で支持された. また, さらに Watanabe et al. (2006) は, 上記のアウトグループ 4 種にカモキジ小綱に属する種 3 種を新たに加えた計 7 種(マガン, ウズラ, ならびにヒメウズラを加えた)を用いたミトコンドリア DNA 全長アミノ酸配列またはアミノ酸コード領域の塩基配列による解析を行った. アミノ酸配列による解析では, ペンギン目/コウノトリ目コウノトリ科単系統は 57% の BP 確率で支持されるにとどまったものの, これらの単系統クレードを含む系統樹はあいかわらず最尤系統樹となっていた(図 3). 塩基配列による解析では, ペンギン目/コウノトリ科単系統は 79% の BP 確率で支持された. 以上のことより, ペンギン目/コウノトリ科単系統は, 解析に使用するモデル, アウトグループの差違によらず, 常に再現される姉妹群であると言える.

4. おわりに

ペンギン目, ミズナギドリ目, アビ目, カイツブリ目, およびペリカン目ゲンカンドリ科の

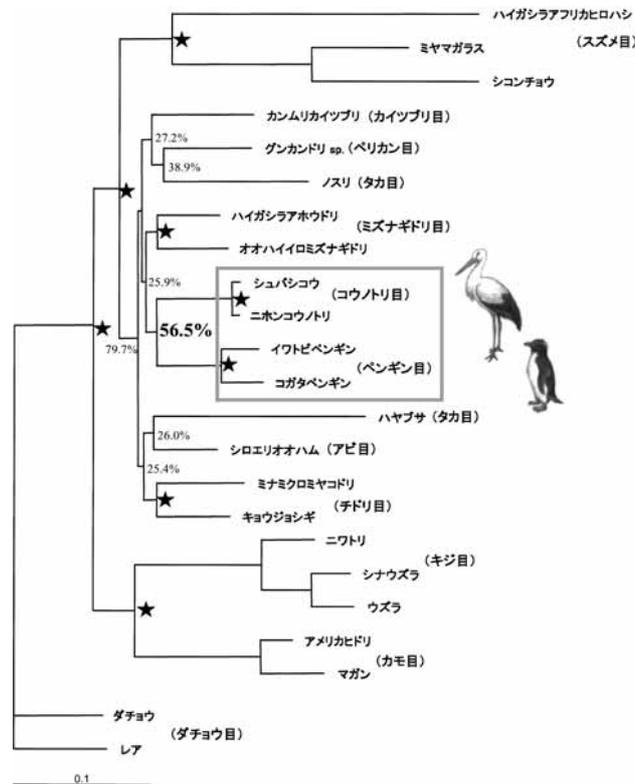


図3. ミトコンドリア全長アミノ酸配列に基づいたML系統樹2. 本解析では7種のアウトグループを使用した. 系統樹中の各ブランチの長さは, アミノ酸変異数の割合に基づいて算出した. クレード上の数値はBP値を示す. 星印はQP法による予備的解析によって単系統性が確実であるとみなされ固定されたクレードを表す.

間の近縁性は, 過去のいくつかの研究によってすでに示唆されていたものである. しかしながら, これらのうちのいったい何がペンギン目と最も近縁であると言えるのかについては激しい議論が交わされ, 統一結論はまったく得られていなかった. にもかかわらず, これまで, 上記のようなペンギン目と最も近縁である候補種がすべて含まれかつ十分な情報量を用いた包括的な系統解析はほとんど存在せず, 現在のゲノム配列による分子系統解析の主流となっているミトコンドリア全長配列解析でさえも, これら候補種の配列を網羅的に加えた系統解析はまったくなかった.

この問題点を解決するべく行われた, Watanabe et al. (2006)のML法を用いたミトコンドリア全長配列の系統解析結果によって, ペンギン目と最も近縁な現生の鳥類はコウノトリ目コウノトリ科である, という可能性が示唆された. これらの単系統性を示すクレードのBP確率は, 高い信頼性を示すのに十分であるとは言いがたく, コウノトリ科(もしくはコウノトリ目全体)が現生の鳥類の中でペンギン目と最も近縁な分類群であると結論付けることはできない. この問題に明確な結論を出すためには, 例えばペリカン目やコウノトリ目に属する科などさらなるサンプルの追加, 鳥類のミトコンドリアDNAにより適した進化モデルの使用など, いくつかの改善点を解決した上での解析が必要であろう. しかしながら, これまでの形態学的, 行動学的,

分子系統学的など多岐の分野にわたる研究から支持されてきた候補であるミズナギドリ目、アビ目、カイツブリ目、ならびにペリカン目グンカンドリ科を加えてもなお、コウノトリ科が最もペンギン目と近縁であるという結果を示したのは特筆すべきことであり、コウノトリ科(もしくはコウノトリ目全体)が最有力候補の1種として浮上してきたという事実は、非常に興味深い知見である。

謝 辞

本稿の系統樹上で使用しているイラストは、松原律子氏により提供されたものである。

参 考 文 献

- Adachi, J. and Hasegawa, M. (1996a). MOLPHY ver. 2.3: Programs for molecular phylogenetics based on maximum likelihood, *Computer Science Monographs*, No. 28, Institute of Statistical Mathematics, Tokyo.
- Adachi, J. and Hasegawa, M. (1996b). Model of amino acid substitution in proteins encoded by mitochondrial DNA, *Journal of Molecular Evolution*, **42**, 459–468.
- Arnason, U., Adegoke, J. A., Bodin, K., Born, E. W., Esa, Y. B., Gullberg, A., Nilsson, M., Short, R. V., Xu, X. and Janke, A. (2002). Mammalian mitogenomic relationships and the root of the eutherian tree, *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, **99**, 8151–8156.
- Cao, Y., Waddell, P. J., Okada, N. and Hasegawa, M. (1998). The complete mitochondrial DNA sequence of the shark *Mustelus manazo*: Resolving vertebrate phylogeny with mitochondrial genome sequences when all known methods fail completely, *Molecular Biology and Evolution*, **15**, 1637–1646.
- Cao, Y., Sorenson, M. D., Kumazawa, Y., Mindell, D. P. and Hasegawa, M. (2000). Phylogenetic position of turtles among amniotes: Evidence from mitochondrial and nuclear genes, *Gene*, **259**, 139–148.
- Cracraft, J. (1988). The major clades of birds, *The Phylogeny and Classification of the Tetrapods, Volume 1: Amphibians, Reptiles, Birds* (ed. M. J. Benton), 339–361, Clarendon Press, Oxford.
- Cracraft, J., Keith Barker, F., Braun, M. J., Harshman, J., Dyke, G., Feinstein, J., Stanley, S., Cibois, A., Schikler, P., Beresford, P., Garcia-Moreno, J., Sorenson, M. D., Yuri, T. and Mindell, D. P. (2004). Phylogenetic relationships among modern birds (Neornithes): Toward an avian tree of life, *Assembling the Tree of Life* (ed. M. J. Donoghue), 419–446, Oxford University Press, New York.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach, *Journal of Molecular Evolution*, **17**, 368–376.
- Gibb, G. C., Kardailsky, O., Kimball, R. T., Braun, E. L. and Penny, D. (2007). Mitochondrial genomes and avian phylogeny: Complex characters and resolvability without explosive radiations, *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 269–280.
- Goldman, N. and Yang, Z. (1994). A codon-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA sequences, *Molecular Biology and Evolution*, **11**, 725–736.
- Groth, J. G. and Barrowclough, G. F. (1999). Basal divergences in birds and the phylogenetic utility of the nuclear RAG-1 gene, *Molecular Phylogenetic and Evolution*, **12**, 115–123.
- Harlid, A. and Arnason, U. (1999). Analyses of mitochondrial DNA nest ratite birds within the Neognathae: Supporting a neotenus origin of ratite morphological characters, *Proceeding of*

- the Royal Society. Biological Sciences*, **266**, 305–309.
- Harrison, G. L., McLenachan, P. A., Phillips, M. J., Slack, K. E., Cooper, A. and Penny, D. (2004). Four new avian mitochondrial genomes help get to basic evolutionary questions in the late cretaceous, *Molecular Biology and Evolution*, **21**, 974–983.
- Ho, C. Y.-K., Prager, E. M., Wilson, A. C., Osuga, D. T. and Feeney, R. E. (1976). Penguin evolution: Protein comparisons demonstrate phylogenetic relationship to flying aquatic birds, *Journal of Molecular Evolution*, **8**, 271–282.
- Jones, C. M. and Mannering, A. (1997). New Paleocene fossil bird material from the Waipara Greensand, North Canterbury, New Zealand, *Geological Society of New Zealand Miscellaneous Publication*, **95A**, p. 88.
- Jouventin, P. (1981). *Visual and Vocal Signals in Penguins, Their Evolution and Adaptive Characters*, Paul Parey Scientific Publishers, Berlin.
- Kishino, H., Miyata, T. and Hasegawa, M. (1990). Maximum likelihood inference of protein phylogeny, and the origin of chloroplasts, *Journal of Molecular Evolution*, **31**, 151–160.
- Lin, Y.-H., McLenachan, P. A., Gore, A. R., Phillips, M. J., Ota, R., Hendy, M. D. and Penny, D. (2002). Four new mitochondrial genomes and the increased stability of evolutionary trees of mammals from improved taxon sampling, *Molecular Biology and Evolution*, **19**, 2060–2070.
- Livezey, B. C. and Zusi, R. L. (2001). Higher-order phylogenetics of modern aves based on comparative anatomy, *Netherlands Journal of Zoology*, **51**, 179–205.
- Lowe, P. R. (1939). Some additional notes on Miocene penguins in relation to their origin and systematics, *The Ibis*, **3**, 281–294.
- Mindell, D. P. (1997). Phylogenetic relationships among and within select avian orders based on mitochondrial DNA, *Avian Molecular Evolution and Systematics* (ed. D. P. Mindell), 213–247, Academic Press, San Diego.
- Mindell, D. P., Sorenson, M. D., Dimcheff, D. E., Hasegawa, M., Ast, J. C. and Yuri, T. (1999). Interordinal relationships of birds and other reptiles based on whole mitochondrial genomes, *Systematic Biology*, **48**, 138–152.
- Miyata, T., Miyazawa, S. and Yasunaga, T. (1979). Two types of amino acid substitutions in protein evolution, *Journal of Molecular Evolution*, **12**, 219–236.
- Murphy, W. J., Pevzner, P. A. and O'Brien, S. J. (2004). Mammalian phylogenomics comes of age, *Trends in Genetics*, **20**, 631–639.
- Nikaido, M., Harada, M., Cao, Y., Hasegawa, M. and Okada, N. (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*), *Journal of Molecular Evolution*, **51**, 318–328.
- Nikaido, M., Kawai, K., Cao, Y., Harada, M., Tomita, S., Okada, N. and Hasegawa, M. (2001). Maximum likelihood analysis of the complete mitochondrial genomes of eutherians and a reevaluation of the phylogeny of bats and insectivores, *Journal of Molecular Evolution*, **53**, 508–516.
- Novacek, M. J. (2001). Genes and supertrees, *Current Biology*, **11**, R573–R575.
- O'Hara, R. L. (1989). An estimate of the phylogeny of the living penguins, *American Zoologist*, **29**, p. 11A.
- Olson, S. L. (1985). The fossil record of birds, *Avian Biology*, (eds. J. K. D. S. Farner and K. C. Parkes), Academic Press, New York.
- Paton, T. A., Baker, A. J., Groth, J. G. and Barrowclough, G. F. (2003). RAG-1 sequences resolve phylogenetic relationships within Charadriiform birds, *Molecular Phylogenetic and Evolution*, **29**, 268–278.
- Raikow, R. J. (1982). Monophyly of the Passeriformes: Test of a phylogenetic hypothesis, *Auk*, **99**,

- 431–445.
- Sibley, C. G. and Ahlquist, J. E. (1990). A study in molecular evolution, *Phylogeny and Classification of Birds*, Yale University Press, New Haven.
- Simpson, G. G. (1975). Fossil penguins, *The Biology of Penguins* (ed. B. Stonhouse), 19–41, Macmillan, London.
- Slack, K. E., Janke, A., Penny, D. and Arnason, U. (2003). Two new avian mitochondrial genomes (penguin and goose) and a summary of bird and reptile mitogenomic features, *Gene*, **302**, 43–52.
- Slack, K. E., Jones, C. M., Ando, T., Harrison, G. L., Fordyce, R. E., Arnason, U. and Penny, D. (2006). Early penguin fossils, plus mitochondrial genomes, calibrate avian evolution, *Molecular Biology and Evolution*, **23**, 1144–1155.
- Slack, K. E., Delsuc, F., Mclenachan, P. A., Arnason, U. and Penny, D. (2007). Resolving the root of the avian mitogenomic tree by breaking up long branches, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **42**, 1–13.
- Sorenson, M. D., Oneal, E., Garcia-Moreno, J. and Mindell, D. P. (2003). More taxa, more characters: The hoatzin problem is still unresolved, *Molecular Biology and Evolution*, **20**, 1484–1498.
- Strimmer, K. and von Haeseler, A. (1996). Quartet puzzling: A quartet maximum-likelihood method for reconstructing tree topologies, *Molecular Biology and Evolution*, **13**, 964–969.
- van Tuinen, M. V., Butvill, D. B., Kirsch, J. A. W. and Hedges, S. B. (2001). Convergence and divergence in the evolution of aquatic birds, *Proceeding of the Royal Society. Biological Sciences*, **268**, 1345–1350.
- Waddell, P. J., Cao, Y., Hasegawa, M. and Mindell, D. P. (1999). Assessing the Cretaceous superordinal divergence times within birds and placental mammals by using whole mitochondrial protein sequences and an extended statistical framework, *Systematic Biology*, **48**, 119–137.
- Watanabe, M., Nikaido, M., Tsuda, T. T., Kobayashi, T., Mindell, D. P., Cao, Y., Okada, N. and Hasegawa, M. (2006). New candidate species most closely related to penguins, *Gene*, **378**, 65–73.
- Yang, Z. (1996). Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses, *Tree*, **11**, 367–372.
- Yang, Z. (1997). PAML: A program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood, *Computer Applications in the Biosciences*, **13**, 555–556.
- Yang, Z., Nielsen, R. and Hasegawa, M. (1998). Models of amino acid substitution and applications to mitochondrial protein evolution, *Molecular Biology and Evolution*, **15**, 1600–1611.

Phylogenetic Analysis Based on Complete Sequences of Mitochondrial DNA

Maiko Watanabe¹, Norihiro Okada¹ and Masami Hasegawa²

¹Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology

²School of Life Sciences, Fudan University

This article discusses the phylogenetic position of the order Sphenisciformes in Aves based on a recent maximum likelihood analysis based on mitochondrial genomes of penguins and penguin-relatives. This analysis suggests that ciconiiform birds constitute new candidates as the closest extant relatives of penguins (previously proposed candidates were either gaviiform, podicipediform, or procellariiform birds). In addition, we amplify the problem for phylogenetic analyses to elucidate the species that has the closest relationship with extant penguins.

Key words: Phylogenetic inference, maximum likelihood analysis, mitochondrial DNA, penguins, storks.