海洋生物の適応戦略
－新規技術・現象からの新展開－

円口類ヌタウナギと ヤツメウナギの分子進化学

工　樂　樹　洋

Molecular Evolutionary Studies on Cyclostomes

Shigehiro Kuraku

くらく しげひろ：特定国立研究開発法人理化学研究所
ライフサイエンス技術基盤研究センター

脊椎動物のなかで我々哺乳類からみて最も遠い関係にある円口類は，その独特の系統的な位置ゆえに，脊椎動物の祖先がどのような生物だったのかを探るうえで非常に重要な生物群である．ここでは，遺伝子やゲノムの解析から見えてきた円口類の特徴と，それを解釈するうえでの難点を紹介し，今後への期待を展望する．

1. はじめに：円口類は「原始的」か？

円口類の魅力は，やはり脊椎動物のなかで最も古い時期に分岐した系統であることであろう．だが，実は，この表現は正確ではない．まず，円口類は，かつて存在した多様な無顎類のうち現存のヌタウナギ類とヤツメウナギ類をまとめた分類群にすぎず，円口類の出現以前にも脊椎動物は存在したとされている（図 1）．さらに,「最も古い時期に分岐した」というのは，あくまでも，我々ヒトの立場からの見方にすぎない（図 2A）．種の選定次第では系統樹の見え方は変わってくるのだが，図 2C においてヒトが原始的といえないのと同様に，短絡的にヤツメウナギが原始的と考えるのは危険である．この危険を指摘するのに primitive lineage fallacy というフレーズが使われることもある（Omland *et al*., 2008）．

円口類は，小脳をはじめ中枢神経系が発達していないこと（Sugahara *et al*., 2016）や，いわゆる対鰭をもたないことなど，脊椎動物のなかで原始的と思われる形質（図 1 のパターン A）を示しがちである．だが，実際には，現存の脊椎動物の共通祖先（図 1 の分岐点 a）の時点での形質が円口類型だったのか，あるいは有顎類型だったのかは容易に判断のつくことではない．こういった場合には，外群（アウトグループ）を比較に加えて，どちらが妥当なのかを判定するのが通常の手続きであるが，外群すべてが対象となる形質を持っていない場合はアウトグループの情報はその判定の助けにならない．いわゆる最節約原理に従えば，有顎類の系統でこれらの形質（前出の小脳や対鰭）が発達あるいは獲得されたと考えるのが妥当かもしれない．だが，ヌタウナギが脊椎骨や眼のレンズ

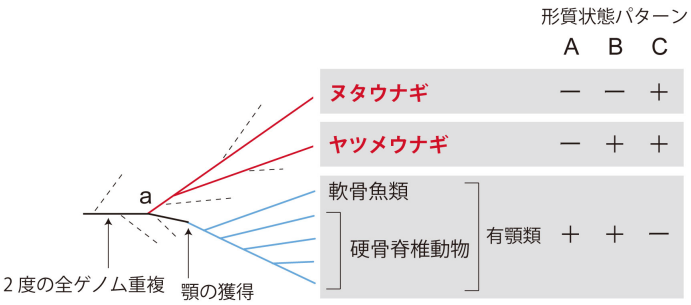

図 1　円口類と他の脊椎動物の系統関係. 赤字は円口類の系統を, また, 青字は有顎類の系統を示す. 点線は絶滅した脊椎動物の系統を示している. 無顎類と呼ばれているのは, 点線で示した系統の化石種と円口類をあわせたものすべて, すなわち有顎類以外すべてであり, 単系統群ではないことに注意が必要である. 2 度の全ゲノム重複の時期はKuraku *et al*., 2009bに従った. 右の形質状態パターンについては本文を参照のこと.

などの形質を二次的に縮退させたこと（Ota *et al*., 2014; Janvier 2007; 図 1 のパターン B）を鑑みると，ヌタウナギとヤツメウナギの共通祖先が二次的に失った形質が存在した可能性も想定できる．したがって，安易に最節約原理で片付けるのは危険である．基本的なことではありながら意外と軽視されているのは，円口類は，現存の種数は 100 程度と多様性は明らかに低いものの，その祖先が分岐したあと，有顎類と同じ時間をかけて進化してきたということであり，これを言い換えると，現在の円口類の形質状態がそのまま図 1 の分岐点 a での状態であったわけではないということである．表現型の進化を考える際だけでなく，ゲノムや遺伝子など分子レベルの進化を考える際にもこの点をしっかり認識しておく必要がある．

2. ヌタウナギとヤツメウナギはどのくらい「近い」のか？

有顎類に対して，円口類のヌタウナギとヤツメウナギが互いに近縁であるということ，すなわち，円口類が単系統群であることは，さまざまな遺伝子を用いた分子系統解析によって示されてきた（総説は Kuraku, 2008 を見よ）．全ゲノム重複など，後述する様々な理由により，この手の解析に

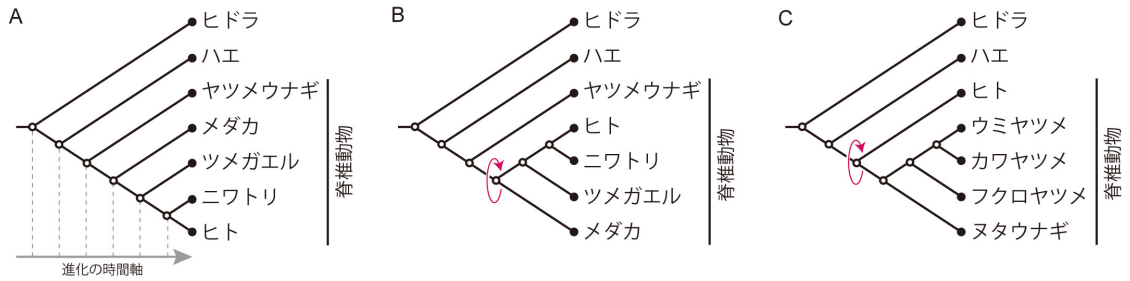

図 2　見せ方によって印象が大きく変わりうる系統樹. Kuraku *et al*., 2016 より改変.
A. 最下段にヒトを含めた系統樹. 系統樹の端点, すなわち現存の生物を黒丸で, そして過去の分岐点を白丸で表した. 白丸で示した分岐点を経てヒトの系統につながったのであり, ヤツメウナギなどの生物 (黒丸) がヒトの祖先ではない.
B. Aの系統樹の中のひとつの分岐点で枝を回転し, その分岐点以下の生物種の順序を入れ替えたもの. 見た目は変化しているが, トポロジー, すなわち, 本質的な意味での樹形は同じである.
C. Bからさらに脊椎動物において最も古い分岐点で回転したうえで, 生物群を新たに選びなおし, 円口類の種数を増やしたもの. ヒトの系統的位置づけが大きく変わったような印象を与えるかもしれないが, 実質的には変わってはおらず, この直感的な印象だけに基づいて「ヒトは原始的」と考えるのは妥当ではないし, 多くの人はそのようには考えないであろう. これと同様に, AやBを見て即座に「ヤツメウナギは原始的」とするのは妥当ではない. 要は，水平方向の進化の時間軸や含まれる生物種の顔ぶれが問題なのであって，上下方向の生物種の並び順は何らかの印象を与えることはあっても，原始的かどうかの判断を与えるものではない.

どういった遺伝子を用いるかは慎重に吟味する必要がある．円口類の単系統性は，今後，ゲノムワイドな配列情報に由来する多数遺伝子に基づいた分子系統解析（「phylogenomics 解析」と呼ばれる）によって確認されるであろう．

では，単系統群と考えられる円口類の 2 群，ヌタウナギとヤツメウナギの間の進化的距離はどのくらいなのか？これは，分岐年代推定の方法上，円口類と有顎類の系統の分岐年代をどう仮定するかに大きく左右される．この点を考慮したうえで，これまでの解析をまとめると，ヌタウナギとヤツメウナギの分岐はおよそ 4 億 5 千年～ 4 億年前に起きたと考えてよいだろう（Kuraku *et al*., 2009a）．これは，有顎類の系統に置き換えると，現存の軟骨魚類の祖先が硬骨脊椎動物の系統と分岐したくらいの時期に対応する．ひとつの単系統群に括られるとはいえ，この時期にすでにヤツメウナギの祖先とヌタウナギの祖先は分岐していたと考えられるのである．

ヌタウナギとヤツメウナギの間の分岐がこれだけ古いと聞くと，表現型が大きく異なっていても驚きは少ないのではないか．その二者の形質のどちらが円口類の祖先状態か，ということは置いておくとして，脊椎骨，レンズ，内耳の半規管の形状など 2 群のあいだで異なる形質は多い（Janvier, 2007; 2011; 2013）．同様に，遺伝子やゲノムのレベルでも，これら 2 群のあいだで大きな違いがあっても驚きではないのである．これまでに報告された分子レベルの特徴としては，有顎類の Ig（免疫グロブリン）型とは異なる獲得免疫系を司る抗原受容体（variable lymphocyte receptor; Boehm *et al*., 2012）や，体細胞におけるゲノム再構成（後藤と久保田，2015; Smith *et al*., 2009）など，ヌタウナギとヤツメウナギのあいだで共有されているとおぼしき特徴（図 1 のパターン C）が目につくかもしれない．だが，えてして，全ゲノム情報が揃って「裏取り」ができるようになるまでは，相違点よりも共通点のほうが見つけやすい．ヌタウナギとヤツメウナギの分子レベルでの相違点はこれからゲノム情報が整うにつれてはっきり見えてくるであろう．

3. 円口類遺伝子の分子系統の難しさ

DNA やタンパク質の配列情報を取得することが以前より格段に容易になった結果，その進化上の由来，すなわち，分子系統（molecular phylogeny）を調べる重要性は高まり続けている．一般に，分子系統を調べるモチベーションはいくつかに分けられる．種の系統的位置を知りたい場合，特定の遺伝子ファミリーについて遺伝子の種間での対応関係を探りたい場合，そして，全ゲノム重複などの大規模な現象を検出したい場合などである．円口類の遺伝子を含む分子系統樹は往々にして，これらすべてを巻き込んだ悩ましい問いを我々に投げかけてくる．

例として図 3A に示したのは，KCNA と呼ばれる電位依存性カリウムチャネル A サブファミリー（KCNA）の分子系統樹であり，筆者らが軟骨魚類ゾウギンザメと円口類ウミヤツメのゲノム情報が整う以前に推定したものである（Qiu *et al*., 2011）．KCNA 遺伝子に注目したのは，その分子機能への興味からではなく，コード領域がたった 1 つのエキソンに納まるために，ゲノム情報が不完全でもタンパク質のアミノ酸配列のアライメントを整えやすいという目算があったからである．解析の結果，円口類ウミヤツメと軟骨魚類ゾウギンザメとでは，遺伝子の系統樹上の位置に対称的なパターンが見られた．両者から 6 つの遺伝子が同定された点では同じだったが，ゾウギンザメの各遺伝子が KCNA4 と KCNA7 以外のすべてのサブタイプそれぞれに寄り添うように位置するのに対して，ウミヤツメの遺伝子はそれら同士で固まってしまい，1 対 1 のオーソロジーがまったく確認できなかった（図 3A）．実は，ウミヤツメの遺伝子を 1 本ずつ系統樹に加えると状況は変わり，どれか特定のサブタイプに近縁であることが示されることもあった．要は，ウミヤツメの遺伝子同士が系統樹上で誘引しあっていたのである．

筆者らはさらにウミヤツメのコード配列の特徴を探り，GC 含量，コドン使用頻度，そしてアミノ酸組成が特徴的であることを示した（Qiu *et al*.,

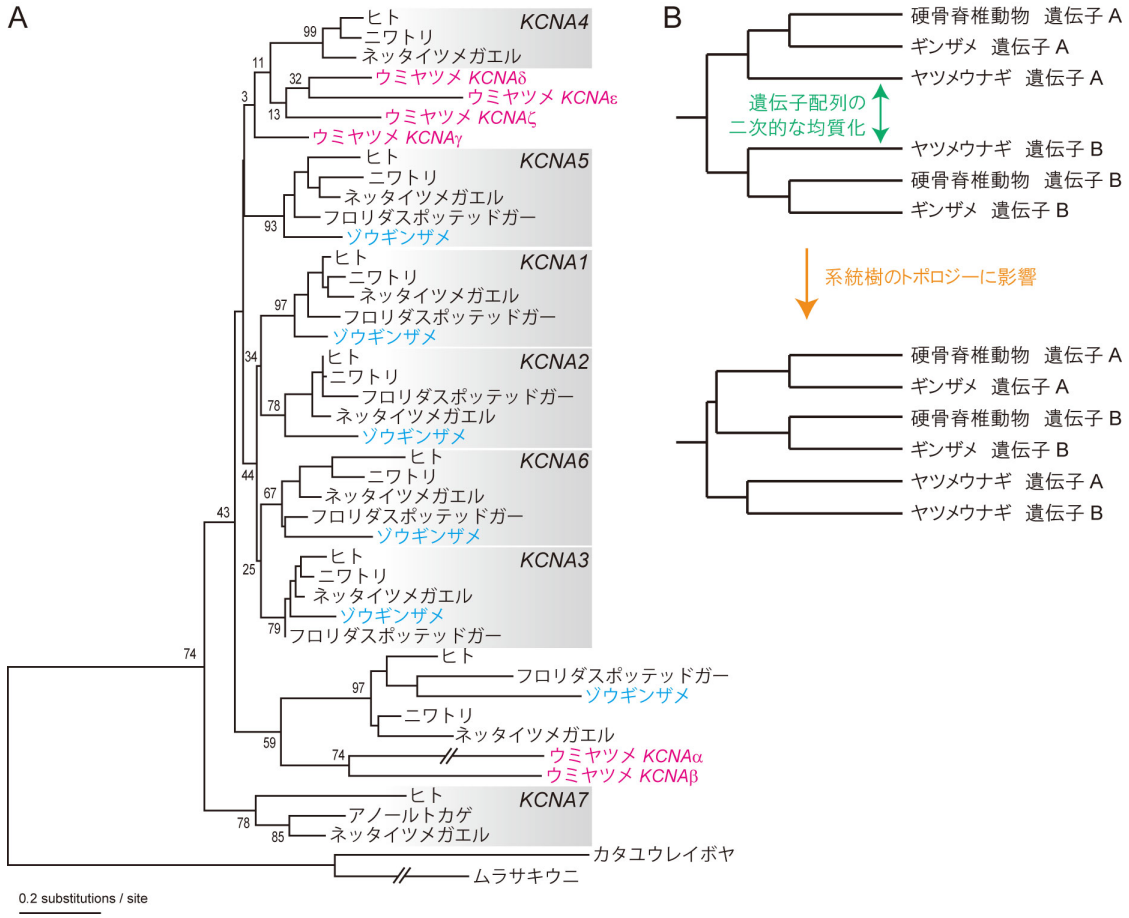

図 3　円口類遺伝子の分子系統解析の難しさ. A. KCNA遺伝子ファミリーの分子系統樹. 最尤法において推定されたQiu *et al.* 2011 らによる分子系統樹の体裁を一部改変. ブートストラップ確率は文脈上重要と考えられる分岐点のみに付した. B. 二次的な遺伝子配列の均質化が分子系統に与えうる影響を示した模式図.

2011; Smith *et al*., 2013). さらに，ヤツメウナギの遺伝子産物には，ヒトやゼブラフィッシュと比べて有意に高い頻度で，単一アミノ酸リピート（homopolymeric amino acid tracts）が含まれることも明らかにした（Noro *et al*., 2015). これらヤツメウナギ遺伝子に共通するコード領域の「方言」（筆者は「lamprey dialect」と呼んでいる）が分子系統樹の推定に影響すると，もともと遠い関係にある別々のサブタイプであるにもかかわらず，系統樹上でヤツメウナギの遺伝子同士が塊をつくるということが起きうる（図 3B; Manousaki *et al*., 2016). 図3Aの系統樹におけるウミヤツメの遺伝子の塊はまさにこの現象のあらわれであろう. 言い換えると，もし仮にこの「方言」がなければ，ウミヤツメの遺伝子は，ゾウギンザメの遺伝子のように，それぞれのサブタイプに寄り添うように位置するのではないか，つまり，ウミヤツメの遺伝子は有顎類の遺伝子と 1 対 1 のオーソロジーを示すのではないか，と想像される. だが，これはあくまでも想像である.

上述したのは北半球産のヤツメウナギの遺伝子配列の特徴についてであり，ヌタウナギや南半球

産ヤツメウナギの遺伝子配列を使えば問題を回避できるのではないか，と考えたくなる．しかし，現在得つつあるデータによると，ヌタウナギについても独自の配列の特徴がありそうなため，他種に置き換えれば簡単に解決できるという問題ではなさそうである．

4. シンテニー情報への期待，そしてその限界

「シンテニー」という言葉が広まってもう久しい．この言葉はもともと 2 つ以上の遺伝子が同じ染色体上に存在する状態を形容するものであったが（Lenwick, 1971），現在では，遺伝子の並びがゲノム内の異なる領域の間で，あるいは，ゲノム間で共通にみられる状態を表すことが多い．シンテニーもまた，いくつかの別の目的で調べられてきた．ひとつの典型的な目的は，個々の遺伝子の進化の歴史（オーソロジーや遺伝子重複の時期）を調べたいというものである．こういった場合，通常は，対象となる遺伝子の分子系統樹を推定すればよいのだが，その遺伝子が短いために十分な情報が得られないということもあり得る．また，系統特異的な遺伝子の欠失が起きていた場合，系統樹が単純に解釈できずはっきりとした結論が得られない．こういった事態を回避するために，挙動をともにしてきたと考えられる近傍の遺伝子の進化の歴史を調べることにより，その結果を興味の対象となっている遺伝子に拡張しようというアプローチである．

最近筆者が手掛けたものとして，真骨魚特有の心臓の構造である動脈球（bulbus arteriosus）の進化に関わったと考えられる細胞外マトリックスのひとつである線維状タンパク質エラスチン（elastin）の例（Moriyama *et al*., 2016）をここに挙げる．エラスチンをコードする遺伝子はもともと 1 つであったが，遺伝子重複を経て，多くの真骨魚のゲノム中には 2 つの遺伝子（エラスチン a と b）が存在する．だが，この遺伝子重複が，具体的にどの時期に起きたか知られていなかった．この遺伝子は多くのエキソンに分かれており，公共データベースにおける遺伝子アノテーションが多くの間違いを含んでいるうえ，コードするアミノ酸配列は単純配列を多く含む．配列収集における困難を感じつつエラスチン自体の分子系統樹を推定した．だが，信頼性の高い結果が得られないため，真骨魚のゲノム上でエラスチン a とエラスチン b それぞれのすぐ隣に存在する LIM ドメインキナーゼ（limk）1a と limk1b に注目した．この遺伝子の分子系統樹は非常に扱いやすく，limk1a と 1b を生んだ遺伝子重複は，条鰭類の系統において，ガーが分岐した後，真骨魚類の多様化の前に起きたことが示唆されたのである．これは，3R 全ゲノム重複と同じタイミングであり，もともと存在したエラスチン―Limk1 の並びが，3R 全ゲノム重複によって，エラスチン a―limk1a とエラスチン b―limk1b という 2 つに分かれたと考えると納得がいく．このようにして，エラスチンが a と b に重複したのは，真骨魚の出現，つまり，おそらく動脈球の獲得の時期と一致することがわかったのである．これは，3R 全ゲノム重複が起きたという前提で，近接した遺伝子のあいだで進化の歴史が共有されているという論法で成り立った解析である．

上のエラスチンの例によって，個々の遺伝子の進化の歴史を解き明かす助けとしてシンテニー情報が利用できることを示した．その一方で，シンテニー情報は，ゲノム全体の進化の歴史を解き明かす重要な役割も果たしてきた．動物の進化の過程で全ゲノム重複が何度か起きたことはすでに広く知られているが，それが確固たる知識として定着するまでの過程を振り返ってみると，シンテニー情報が果たしうる役割が明確に把握できる．もっとも古くから受け入れられていた全ゲノム重複である，いわゆる脊椎動物の 1R そして 2R ゲノム重複が分子レベルのデータを証拠に最初に提唱された際には，すでにヒトやマウスのゲノム情報がある程度参照できる状態にあり，即座に受け入れられやすかった（Lundin, 1993; Kasahara *et al*., 1996; Spring, 1997）．いっぽう，前述した 3R 全ゲノム重複については，ゼブラフィッシュを中心と

する真骨魚が，他の脊椎動物よりも多くの遺伝子を持つということだけが最初に明るみに出ていて，ゲノム情報はまだ参照できる状態になかった．このことが，全ゲノム規模の重複ではなく単なる高頻度の小規模遺伝子重複による結果であるとの反論を招くことになったのである（Robinson-Rechavi *et al*., 2001a; 2001b; Taylor *et al*., 2001 も見よ）．そして，この論争は，真骨魚の中でもっとも早い時期に完遂されたフグのゲノムプロジェクトによりゲノム内のシンテニーが広範に示され，晴れて収束するに至ったのである（Aparicio *et al*., 2002; Jaillon *et al*., 2004）．

ここで話題を円口類に戻す．まず，シンテニーを円口類遺伝子のオーソロジー解決に利用するのには限界があるかもしれないと指摘しておこう．上述の通り，有顎類の遺伝子とのオーソロジーが明確でない場合には，近傍の遺伝子のオーソロジーを頼りにするというのが常套手段である．だが，円口類の独特の系統的位置自体が明確なオーソロジー判定の妨げになっているため，その影響は全ゲノム規模で生じるはずである．そうなると，近傍の遺伝子も同様にオーソロジー判定が難しい状況に置かれており，その糸口を近傍の遺伝子に転嫁するという試みは堂々巡りになってしまうのである（詳細は Kuraku, 2013 を見よ）．

図 3A の KCNA 遺伝子の分子系統樹に見られたように，あたかも円口類の系統において遺伝子重複が起きたように思えるケースは，個々の遺伝子の分子系統解析について以前から見うけられていた（Fried *et al*., 2003; Stadler *et al*., 2004; Tank *et al*., 2009）．さらに，カワヤツメの大規模配列データを用いた解析において，円口類系統のある特定の時期に遺伝子重複が起きたことを示すデータが得られたことを理由に，円口類の祖先が他の系統と分岐した後，ヤツメウナギに至る系統で独自の全ゲノム重複が起きた可能性が示唆された（Mehta *et al*., 2013）．しかし，これだけでは上述の 3R 全ゲノム重複についてまだ反論が起きていた段階と同じなのである．今後，シンテニー情報を加味したうえで，これを精査していく必要があるだろう．

5. 円口類ゲノム情報整備の現状

円口類のなかで大規模遺伝子配列情報が最も早く整備されたのは，北米や欧州近海に生息するウミヤツメ *Petromyzon marinus* についてであった．この生物種のゲノムプロジェクトは，ミシガン州立大の Weiming Li 教授らによって立ち上げられたあと，途中頓挫したように見えながら，5 年以上かけて 2013 年に出版に至った経緯がある（Smith *et al*., 2013）．いっぽう，Venkatesh らのグループによって，2013 年にカワヤツメ *Lethenteron camtschaticum* の全ゲノム配列が公表された（Mehta *et al*., 2013）．同グループは，ゾウギンザメ *Callorhinchus milii* についてもゲノムプロジェクトを進め，2007 年に低カバー度ゲノム配列を公表したのに続き，2014 年に同種の全ゲノム配列を公表した（Venkatesh *et al*., 2014）．筆者は上述のウミヤツメのプロジェクトに途中から関わることとなり，プロジェクトの方向性など重要な判断が下されるプロセスを垣間見ることとなったが，こういったプロジェクトが関係者の限られた時間と予算の中で最大限のパフォーマンスを目指して最先端の技術を駆使して行われてきたこと，なかでも，ごく限られた数のコアメンバーの情熱によってそれが支えられていたことは，ここにしっかり記しておきたい．技術がどれだけ進んでも，こういった面が今後も重要であり続けることには変わりがないはずである．

関係者がどれだけ時間と情熱をつぎ込んだとしても，そもそもの対象が難しいものであれば高質な結果が得られないということが，円口類ゲノムプロジェクトによって如実に示されたといってよいかもしれない．ゲノムサイズはたかだか 1Gbp 程度（他の多くの脊椎動物はこのサイズを優に超える，という意味で）であるのだが，多くの真骨魚類など同程度のゲノムサイズの生物種について公表されているゲノムアセンブリの仕上がり具合には及ばなかった（表 1）．ゲノムアセンブリの仕上がりを評価する際，配列の長さに基づいた N50 スキャフォルド長などの指標以外に，種を超えて

表 1　ヤツメウナギ 2 種のゲノムアセンブリの概要と完全性評価.

種名	総塩基数 (Gbp)	スキャフォルド配列数	N50 スキャフォルド長(Kbp)	未決定塩基 (N) で占められる割合（%）	最大スキャフォルド長(Kbp)	最小スキャフォルド長(Kbp)	復元された参照遺伝子の割合（%）			
							CEGMA＋CEG		CEGMA＋CVG	
							Complete のみ	Partial を含む	Complete のみ	Partial を含む
ウミヤツメ *Petromyzon marinus*	0.886	25,006	79.7	26.8	3,631	0.201	56	69	72	93
カワヤツメ *Lethenteron camtschaticum*	1.031	86,125	923.6	17.2	11,640	0.867	57	80	86	97

CEGMA プログラムは参照遺伝子の復元度が完全（Complete）か部分的（Partial）かを判別してスコアを出力する（詳細は Parra *et al*., 2009 参照）.
CEG は CEGMA に元々付随している参照遺伝子セット．CVG は筆者の研究室からリリースした脊椎動物に最適化した参照遺伝子セット.

存在するはずの参照遺伝子を予め多数選び，それがどのくらいの割合で復元されているかを調べる方法がある（完全性評価 completeness assessment；総説は原，2016 を見よ）．完全性評価には，プログラム CEGMA（Parra *et al*., 2008）や BUSCO（Simao *et al*., 2015）がよく用いられる．これらを円口類や軟骨魚類のゲノムに対して使用する際には，独特の「方言」などの影響で，遺伝子の検出精度が上がらず過小評価となる傾向があるため，筆者の研究室では，独自に円口類や軟骨魚類を含む脊椎動物用の参照遺伝子セット CVG をリリースし（Hara *et al*., 2015），これを簡便に利用できるウェブサーバ gVolante（「ジーボランチ」と発音：西村ら，投稿準備中）を立ち上げた（https://gvolante.riken.jp）．公表されている 2 種のヤツメウナギのゲノム情報に話を戻すと，それらの完全性のスコアは，評価方法を最適化することにより，検出漏れが減り，結果的にスコアは上昇する（表 1）．CVG を用いることにより，より妥当なスコアに近づいていると考えられるものの，90% を超えることはなかった．ゲノム規模で見たときにも，アセンブリが全体の 10% ほどが捕捉されていない可能性がある.

多くの研究者にとって役に立つ情報は，ゲノム配列そのものではなくてタンパク質をコードする遺伝子の配列である．ウミヤツメについてはゲノムプロジェクトの一環としてタンパク質コード遺伝子の推定が行われ，現在，UCSC ゲノムブラウザ（https://genome.ucsc.edu/）において閲覧・取得可能である．いっぽう，カワヤツメについては，同様の遺伝子推定結果が公表されておらず，プロジェクトページ（http://jlampreygenome.imcb.a-star.edu.sg/）にて BLAST 検索ができるのみである．これをうけて，筆者の研究室では，さまざまな組織について RNA-seq を行ったうえで，Augustus というプログラム（Stanke *et al*., 2003）を用いて，転写産物と他生物のホモログの情報に基づいた遺伝子推定を独自に行った（原ら，投稿準備中）．その結果得られた推定遺伝子セット（「GRAS-LJ」と命名）は，GFF3 形式のファイルとして研究室のホームページ（http://www.clst.riken.jp/phylo/genemodels.html）で公開しており，配列情報についても独自で運営しているウェブサーバ aLeaves（http://transcriptome.riken. jp/aleaves/）にて検索および取得が可能である.

6. まとめ：円口類の遺伝子・ゲノム情報とどう向き合えばよいのか？

ヤツメウナギのゲノムアセンブリに改善の余地があること，そして，ヌタウナギについては全ゲノム情報がまだ公表されていないことから，円口類のゲノム情報整備とゲノム構造の比較解析はこれからの進展が待たれる．オーソロジー判定をはじめ，個々の遺伝子の進化の歴史を調べる際には，現時点で入手できる最大限の配列情報を検索したうえで，系統間の分子進化パターンのばらつきに対してできるだけ頑健な方法を用いて分子系統樹推定を行う必要がある．配列収集が不十分な

場合には，パラロガスなのにオーソロガスと判断してしまう直系誤認（hidden paralogy）という現象を引き起こしてしまう可能性が高まる（総説はKuraku, 2010を見よ）のでとくに注意が必要である．脊椎動物の遺伝子レパートリを語るうえでの中心議題であり続ける2R全ゲノム重複について，それがいつ起きたのかに関する筆者の理解では，かつては少なくとも1度の全ゲノム重複が有顎類で起きたとする説が優勢であった．だが，この説や，円口類系統で全ゲノム重複が起きたとする説は，本稿で紹介したlamprey dialectなどによってアーティファクトと示される可能性がある．いっぽう，円口類の系統と有顎類の系統が分岐する前に2度の全ゲノム重複が起きたとする説（Kuraku *et al.*, 2009b）については，否定する証拠が見当たらない．知られている最古の全ゲノム重複が絡んだ脊椎動物出現前後のゲノム進化の様相を解き明かすのは当然容易ではない．有顎類のゲノム進化のシナリオは，数十種の生物のゲノム情報を総動員してやっと見えつつある．現存種の非常に少ない円口類ではあるが，こちらについても，できるだけ多くの種のゲノム情報が整備され，先入観のない比較によってベールが剥がされていくことが期待される．

参考文献

[1] 後藤友二, 久保田宗一郎. 2015. ヌタウナギ：二つのゲノムの謎. 生物工学会誌 93(1), 45-49.

[2] 原 雄一郎. 2016. どのアセンブリを使うか?: 分子系統学的観点に基づくアセンブリの評価. 日本進化学会ニュース 17(1): 23-29. http://bit.ly/2jhJWIx

[3] Aparicio, S., Chapman, J., Stupka, E., Putnam, N., Chia, J.M., Dehal, P., Christoffels, A., Rash, S., Hoon, S., Smit, A., Gelpke, M. D., Roach, J., Oh, T., Ho, I.Y., Wong, M., Detter, C., Verhoef, F., Predki, P., Tay, A., Lucas, S., Richardson, P., Smith, S. F., Clark, M. S., Edwards, Y. J., Doggett, N., Zharkikh, A., Tavtigian, S. V., Pruss, D., Barnstead, M., Evans, C., Baden, H., Powell, J., Glusman, G., Rowen, L., Hood, L., Tan, Y.H., Elgar, G., Hawkins, T., Venkatesh, B., Rokhsar, D., Brenner, S., 2002. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of Fugu rubripes. Science 297, 1301-1310.

[4] Boehm, T., McCurley, N., Sutoh, Y., Schorpp, M., Kasahara, M., Cooper, M. D., 2012. VLR-based adaptive immunity. Annu. Rev. Immunol. 30, 203-220.

[5] Fried, C., Prohaska, S. J., Stadler, P. F., 2003. Independent Hox-cluster duplications in lampreys. J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol. 299, 18-25.

[6] Hara, Y., Tatsumi, K., Yoshida, M., Kajikawa, E., Kiyonari, H., Kuraku, S., 2015. Optimizing and benchmarking *de novo* transcriptome sequencing: from library preparation to assembly evaluation. BMC Genomics 16, 977.

[7] Jaillon, O., Aury, J. M., Brunet, F., Petit, J. L., Stange-Thomann, N., Mauceli, E., Bouneau, L., Fischer, C., Ozouf-Costaz, C., Bernot, A., Nicaud, S., Jaffe, D., Fisher, S., Lutfalla, G., Dossat, C., Segurens, B., Dasilva, C., Salanoubat, M., Levy, M., Boudet, N., Castellano, S., Anthouard, V., Jubin, C., Castelli, V., Katinka, M., Vacherie, B., Biemont, C., Skalli, Z., Cattolico, L., Poulain, J., De Berardinis, V., Cruaud, C., Duprat, S., Brottier, P., Coutanceau, J.P., Gouzy, J., Parra, G., Lardier, G., Chapple, C., McKernan, K.J., McEwan, P., Bosak, S., Kellis, M., Volff, J. N., Guigo, R., Zody, M. C., Mesirov, J., Lindblad-Toh, K., Birren, B., Nusbaum, C., Kahn, D., Robinson-Rechavi, M., Laudet, V., Schachter, V., Quetier, F., Saurin, W., Scarpelli, C., Wincker, P., Lander, E.S., Weissenbach, J., Roest Crollius, H., 2004. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. Nature 431, 946-957.

[8] Janvier, P., 2007. Evolutionary biology: born-again hagfishes. Nature 446, 622-623.

[9] Janvier, P., 2011. Comparative anatomy: all vertebrates do have vertebrae. Curr. Biol. 21, R661-663.

[10] Janvier, P., 2013. Developmental biology: Led by the nose. Nature 493, 169-170.

[11] Kasahara, M., Hayashi, M., Tanaka, K., Inoko, H., Sugaya, K., Ikemura, T., Ishibashi, T., 1996. Chromosomal localization of the proteasome Z subunit gene reveals an ancient chromosomal duplication involving the major histocompatibility complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9096-9101.

[12] Kuraku, S., 2008. Insights into cyclostome phylogenomics: pre-2R or post-2R. Zool. Sci. 25, 960-968.

[13] Kuraku, S., 2010. Palaeophylogenomics of the vertebrate ancestor--impact of hidden paralogy on hagfish and lamprey gene phylogeny. Integr. Comp. Biol. 50, 124-129.

[14] Kuraku, S., 2013. Impact of asymmetric gene repertoire between cyclostomes and gnathostomes. Sem. Cell Dev. Biol. 24, 119-127.

[15] Kuraku, S., Ota, K.G., Kuratani, S., 2009a. Cyclostomata, in: Kumar, S., Hedges, B. (Eds.), Timetree of Life. Oxford Univ. Press.

[16] Kuraku, S., Meyer, A., Kuratani, S., 2009b. Timing of genome duplications relative to the origin of the vertebrates: did cyclostomes diverge before or after? Mol. Biol. Evol. 26, 47-59.

[17] Kuraku, S., Feiner, N., Keeley, S.D., Hara, Y., 2016.

Incorporating tree-thinking and evolutionary time scale into developmental biology. Dev. Growth Diff. 58, 131-142.
[18] Lundin, L.G., 1993. Evolution of the vertebrate genome as reflected in paralogous chromosomal regions in man and the house mouse. Genomics 16, 1-19.
[19] Manousaki, T. et al. Molecular evolution in the lamprey genomes and its relevance to the timing of whole genome duplications. in Jawless Fishes of the World, Vol. 1 (eds. Orlov, A. & Beamish, R.) 2-16 (Cambridge Scholars Publishing, 2016).
[20] Mehta, T.K., Ravi, V., Yamasaki, S., Lee, A.P., Lian, M.M., Tay, B.H., Tohari, S., Yanai, S., Tay, A., Brenner, S., Venkatesh, B., 2013. Evidence for at least six Hox clusters in the Japanese lamprey (*Lethenteron japonicum*). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110, 16044-16049.
[21] Moriyama, Y., Ito, F., Takeda, H., Yano, T., Okabe, M., Kuraku, S., Keeley, F.W., Koshiba-Takeuchi, K., 2016. Evolution of the fish heart by sub/neofunctionalization of an elastin gene. Nature Comm. 7, 10397.
[22] Noro, M., Sugahara, F., Kuraku, S., 2015. Reevaluating Emx gene phylogeny: homopolymeric amino acid tracts as a potential factor obscuring orthology signals in cyclostome genes. BMC Evol. Biol. 15, 78.
[23] Omland, K. E., Cook, L. G., Crisp, M. D., 2008. Tree thinking for all biology: the problem with reading phylogenies as ladders of progress. BioEssays 30, 854-867.
[24] Ota, K. G., Oisi, Y., Fujimoto, S., Kuratani, S., 2014. The origin of developmental mechanisms underlying vertebral elements: implications from hagfish evo-devo. Zoology (Jena) 117, 77-80.
[25] Parra, G., Bradnam, K., Ning, Z., Keane, T., Korf, I., 2009. Assessing the gene space in draft genomes. Nuc. Acids Res. 37, 289-297.
[26] Qiu, H., Hildebrand, F., Kuraku, S., Meyer, A., 2011. Unresolved orthology and peculiar coding sequence properties of lamprey genes: the KCNA gene family as test case. BMC Genomics 12, 325.
[27] Renwick, J.H., 1971. The mapping of human chromosomes. Annu. Rev. Genet. 5, 81-120.
[28] Robinson-Rechavi, M., Marchand, O., Escriva, H., Bardet, P.L., Zelus, D., Hughes, S., Laudet, V., 2001a. Euteleost fish genomes are characterized by expansion of gene families. Genome Res. 11, 781-788.
[29] Robinson-Rechavi, M., Marchand, O., Escriva, H., Laudet, V., 2001b. An ancestral whole-genome duplication may not have been responsible for the abundance of duplicated fish genes. Curr. Biol. 11, R458-459.
[30] Simao, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E.V., Zdobnov, E.M., 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. Bioinformatics 31, 3210-3212.
[31] Smith, J. J., Antonacci, F., Eichler, E. E., Amemiya, C. T., 2009. Programmed loss of millions of base pairs from a vertebrate genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 11212-11217.
[32] Smith, J.J., Kuraku, S., Holt, C., Sauka-Spengler, T., Jiang, N., Campbell, M. S., Yandell, M. D., Manousaki, T., Meyer, A., Bloom, O. E., Morgan, J. R., Buxbaum, J. D., Sachidanandam, R., Sims, C., Garruss, A.S., Cook, M., Krumlauf, R., Wiedemann, L. M., Sower, S. A., Decatur, W. A., Hall, J. A., Amemiya, C.T., Saha, N. R., Buckley, K. M., Rast, J. P., Das, S., Hirano, M., McCurley, N., Guo, P., Rohner, N., Tabin, C.J., Piccinelli, P., Elgar, G., Ruffier, M., Aken, B. L., Searle, S. M., Muffato, M., Pignatelli, M., Herrero, J., Jones, M., Brown, C. T., Chung-Davidson, Y. W., Nanlohy, K. G., Libants, S. V., Yeh, C. Y., McCauley, D. W., Langeland, J. A., Pancer, Z., Fritzsch, B., de Jong, P. J., Zhu, B., Fulton, L. L., Theising, B., Flicek, P., Bronner, M. E., Warren, W. C., Clifton, S. W., Wilson, R. K., Li, W., 2013. Sequencing of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) genome provides insights into vertebrate evolution. Nature Genet. 45, 415-421, 421e411-412.
[33] Spring, J., 1997. Vertebrate evolution by interspecific hybridisation--are we polyploid? FEBS Letters 400, 2-8.
[34] Stadler, P. F., Fried, C., Prohaska, S. J., Bailey, W. J., Misof, B. Y., Ruddle, F. H., Wagner, G. P., 2004. Evidence for independent Hox gene duplications in the hagfish lineage: a PCR-based gene inventory of Eptatretus stoutii. Mol. Phylogenet. Evol. 32, 686-694.
[35] Stanke, M., Waack, S., 2003. Gene prediction with a hidden Markov model and a new intron submodel. Bioinformatics 19 Suppl 2, ii215-225.
[36] Sugahara, F., Pascual-Anaya, J., Oisi, Y., Kuraku, S., Aota, S., Adachi, N., Takagi, W., Hirai, T., Sato, N., Murakami, Y., and Kuratani, S., 2016. Evidence from cyclostomes for complex regionalization of the ancestral vertebrate brain. Nature 531, 97-100.
[37] Tank, E.M., Dekker, R.G., Beauchamp, K., Wilson, K.A., Boehmke, A.E., Langeland, J.A., 2009. Patterns and consequences of vertebrate Emx gene duplications. Evol. Dev. 11, 343-353.
[38] Taylor, J. S., Van de Peer, Y., Braasch, I., Meyer, A., 2001. Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish. Philos. Trans. Royal Soc. Lond. Ser. B, Biol. Sci. 356, 1661-1679.
[39] Venkatesh, B., Lee, A. P., Ravi, V., Maurya, A. K., Lian, M. M., Swann, J. B., Ohta, Y., Flajnik, M. F., Sutoh, Y., Kasahara, M., Hoon, S., Gangu, V., Roy, S. W., Irimia, M., Korzh, V., Kondrychyn, I., Lim, Z. W., Tay, B. H., Tohari, S., Kong, K. W., Ho, S., Lorente-Galdos, B., Quilez, J., Marques-Bonet, T., Raney, B. J., Ingham, P. W., Tay, A., Hillier, L. W., Minx, P., Boehm, T., Wilson, R. K., Brenner, S., Warren, W. C., 2014. Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution. Nature 505, 174-179.