

민호두조개 (*Acila divaricata vigila*) 의 16S rRNA 유전자를 기초로 한 분자계통 분류학적 연구

김봉석¹, 강세원², 정지은², 박중연¹, 강정하¹, 한연수³, 고현숙⁴, 안철민¹, 이준상⁵, 이용석²

국립수산과학원 생명공학부¹, 인제대학교 의과대학 기생충학교실 및 UHRC², 전남대학교 농생명과학대학 농학과³, 신라대학교 생물과학과⁴, 강원대학교 환경연구소⁵

Molecular Phylogenetic study of *Acila divaricata vigila* based on the Partial Sequence of 16S rRNA Gene

Bong Seok Kim¹, Se Won Kang², Ji Eun Jeong², Jung-Yeon Park¹, Jung Ha Kang¹, Yeon Soo Han³, Hyun Sook Ko⁴, Chel-Min An¹, Jun Sang Lee⁵ and Yong Seok Lee²

¹Biotechnology Research Division, NFRDI, Busan 619-705, Korea

²Department of Parasitology, College of Medicine and UHRC, Inje University, Busan, 614-735, Korea

³Department of Agricultural Biology, College of Agriculture and life Science, Chonnam National University, Gwangju, 336-745, Korea

⁴Department of Biology, Silla University, Busan 617-736, Korea

⁵Institute of Environmental Research, Kangwon National University, Korea

ABSTRACT

Phylogenetic analyses on the Phylum Mollusks has so far been conducted by many researchers in the world. However, there was no report on taxonomic analysis on *Acila divaricata vigila* which is belonging to Class Bivalvia, Subclass Protobranchia. In this study, we performed molecular phylogenetic analysis on *Acila divaricata vigila* using 16S rRNA sequence through maximum likelihood method. As a result, it is clearly divided into the legion of mollusk classification unit (when you zoom in order) and represented to support the current classification in the Phylum Mollusca belong to Class Bivalvia, Subclass Protobranchia, Subclass Pteriomorphia, Subclass Paleoheterodonta, Subclass Heterodonta and Subclass Anomalodesmacea. To our knowledge, this is the first report of molecular phylogenetic analysis on *Acila divaricata vigila* using 16S rRNA gene and these data suggests that 16S rRNA gene will be useful for analyzing the phylogenetic relationship of Subclass Protobranchia.

Keywords: 16S rRNA, *Acila divaricata vigila*, Molecular Phylogenetic study

서론

연체동물문의 이매패강 (Class Bivalvia) 은 원새아강 (Subclass Protobranchia), 익형아강 (Subclass Pteriomorphia), 고이치아강 (Subclass Paleoheterodonta) 이치아강 (Subclass Heterodonta) 그리고 이인대아강 (Subclass Anomalodesmacea) 으로 분류된다 (Beesley *et al.*, 1998; Higo *et al.*, 1999). 이 중 원새아강의 이매패류는

아가미 구조가 간단하고 그 길이가 짧은 가장 원시적인 구조를 지닌 무리로 전 세계적으로 분포하며 주 서식처는 조하대의 진흙바닥으로 알려져 있다 (Beesley *et al.*, 1998).

민호두조개는 Kwon 등 (2001) 에 의하여 국내 서식이 확인된 원새아강에 속하는 종으로 패각의 크기는 각고 24 mm, 각장 32 mm 정도의 중소형 패류이며, 각정은 뒤로 치우치고 패각 뒤쪽에 각정에서 배면으로 굽은 홈이 나타나는 형태적 특징을 보인다. 국내에는 강원도 중남부와 경상북도에 이르는 동해안 연안의 수심 100-500m의 펄 바닥에 주로 서식한다 (Min *et al.*, 2004).

연체동물의 분자계통분류학적인 연구는 12S, 16S, 18S rRNA, CO-I (the first subunit of the cytochrome oxidase c genes) 및 ITS 등의 유전자를 중심으로 현재까지

Received: December 16, 2011 ; Accepted: December 27, 2011

Corresponding author: Yong Seok Lee
Tel: +82 (51) 890-6462 e-mail: yslee@inje.ac.kr
1225-3480/24418

전세계에서 많은 연구자들에 의해 이루어져 왔다 (Schneider, 2001; Pujolar *et al.*, 2010; Salvi *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2011). 또한 Adamkewicz 등 (1997) 은 복족강 2종, 다관강 3종 및 이매패강 28종은 18S rRNA를 이용하여 분류하였으며, Barucca 등 (2004) 은 16S 와 12S rRNA 유전자 서열을 이용하여 이매패강 16속 23종을 분류하였다. 1999년에 Canapa 등은 18S rRNA를 이용하여 백합과의 19종을 분류하였으며 2000년에는 16S rRNA를 이용하여 가리비류를, 그리고 2003년에는 16S rRNA를 대상으로 백합과의 10속 14종을 분류한 바 있다 (Canapa *et al.*, 1999; Canapa *et al.*, 2000; Canapa *et al.*, 2003).

또한, 담수산 석패과 패류를 대상으로 16S 유전자를 이용한 분류 논문 (Lydeard *et al.*, 1996) 및 석패과 13종의 16S rRNA 서열을 분석한 논문 등이 보고되었으며 (Huang *et al.*, 2002), 질병에 걸린 *Mytilus trossulus*의 16S rRNA 와 정상 개체에서의 16S rRNA를 비교하여 정리한 논문도 보고되었다 (Gee *et al.*, 1994). 한편, Ladoukakis 등 (2002) 은 지중해, 아틀란틱해, 흑해 등 3곳에서 채집되어진 *Mytilus galloprovincialis*의 미토콘드리아 게놈 서열 중 16S RNA gene 차이점을 분석하였고, Stepien 등 (1999) 은 북미지역 Corbiculoid를 대상으로 16S rRNA로 분류하는 등 전 세계에 걸쳐 16S RNA gene를 이용한 분류 논문이 보고되고 있다. 그 외에도 *Flexopecten glaber*와 *Flexopecten proteus* 2종에 관해 CO-I, 12S, 16S 등의 유전자를 이용하여 비교 분석한 보고 (Pujolar *et al.*, 2010) 가 있으며, 12S rRNA, 16S rRNA 및 Histone H3 유전자를 이용하여 이매패류 46종의 진화학적 관계를 분석한 논문과 Pectinidae 내에서 Chlamydiae와 Pallioline는 basal groups이라는 연구보고도 있다 (Puslednik and Serb, 2008). 또한, Roe 등 (2001) 은 멸종 위기에 놓여있는 *Lampsilis* 속의 담수 석패과 패류에 대한 분류를 mitochondrial 16S rRNA와 CO-I 유전자를 활용하여 수행하였다

하지만, 원새아강 (Protobranchia) 류는 Chase 등 (1998) 에 의하여 9종 89개체를 대상으로 16S rRNA를 이용하여 분류한 보고가 있으나, 현재 표준화 되어있는 16S rRNA 영역과 차이점이 있어 최근의 자료와 비교가 어렵다. 또한 민호두조개를 대상으로 이루어진 연구는 아직까지 보고된 바가 없어, 본 논문에서는 민호두조개의 16S rRNA 서열을 이용하여 분자계통 분류학적 위치를 파악하는데 그 목적을 두고 있다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 민호두조개 (*A. divaricata vigila*) 는

연체동물문 (Mollusks) 이매패강 (Bivalvia) 원새아강 (Subclass Protobranchia) 에호두조개목 (Order Nuculoida) 에호두조개과 (Nuculidae) 에 속하는 이매패류로 2010년 10월 구룡포 항구 인근에서 채집되었다.

2. PCR reaction을 이용한 16S rRNA 유전자 영역 증폭

채집된 샘플의 조직으로부터 16S rRNA 서열 분석을 위해 약 20 mg 조직을 떼어내어 lysis buffer에 넣고 proteinase K를 처리하여 하룻밤 동안 37°C에서 반응 후 Mag Extractor genome DNA purification kit (TOYOBO) 를 이용하여 고농도의 total genomic DNA를 추출하였다. DNA의 증폭을 위해 total 20 μ l (DNA 2 μ l, 10 \times buffer 2 μ l, dNTP mix 1.6 μ l, 10 pmol primer 0.4 μ l, polymerase 0.2 μ l) 조성으로, 각 반응은 pre-heating 95°C 10분 후 denaturation 95°C 1분, annealing 51°C 1분, extension 72°C 1분을 35 cycle 후 final extension 72°C에서 10분간 더 반응시켰다. PCR 과정이 끝난 뒤 1.5% agarose gel을 이용하여 전기영동을 수행하였다. Primer는 국제생물바코드 표준에 따른 universal primer (16sAR-L:CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT, 16sBR-H:CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T) 를 활용하였다.

3. 염기서열 분석

PCR로부터 얻어진 산물은 QIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN) 로 정제한 후, 3130XL 자동염기서열분석기 (Applied Biosystems) 를 사용하여 염기서열을 분석하였다. 얻어진 염기서열은 Phred 소프트웨어를 이용하여 base calling한 후 cross match 프로그램을 이용하여 벡터서열을 제거하였다 (Ewing and Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998).

4. BLAST search를 통한 관련서열의 확보 후 multiple align 및 phylogenetic tree 제작

다른 생물들의 16S rRNA 서열과 다중정렬 된 16S rRNA 서열을 비교분석하고 참고서열을 추출하기 위해 연체동물전용 BLAST (<http://blast.inje.ac.kr/~mollusks>) 서버 (Lee *et al.*, 2004) 를 이용하여 blastn을 통해 연체동물 문에 속하는 생물들에서 알려진 관련서열을 추출한 후 multi-fasta format으로 변환한 후 muscle 프로그램을 이용하여 multiple sequence align하였으며 (Edgar, 2004; Edgar, 2004), MEGA5를 이용한 Maximum Likelihood method 를 통해 phylogenetic tree를 도식화하였다 (Tamura and Nei, 1993; Tamura *et al.*, 2007)

```
>Acila divaricata vigila
TCCGGTCTGAACTCAGATCACSTAGGTTTTAAAGTCGAACAGACTTACTTTGGAAATT
      16sBR-H primer
TCTACTCTCCAAGAATCCCTTAATCCAACATCGAGGTCGCAATCTTCTCTTCGATTAG
AACTCTCAGAAAAAATTCAGCGTGTATCCCTATGGTAACTATATCTACTAATCATCAITTA
ATGGATCAATAACAATAATATGTCAATAACTTAAGGAAGTTAATTAAGTGTCCCTCGGTT
GCCCAACCAAAAACCTAAATATGTATACAAAATCTATTACACTACTATAGGACAATATATC
AATTAGATAAACACCATCAGCTAAAGCTCAATAGGGTCTTCTCGTCCCTTTATAAAATTT
AAGCTTCTTTACTTAAAAATTAATTTAAAAATTAATAAAGAGCAGTTAAGCTCTCGT
CAACCATTCATTCAGCTTTCAATTTATAAGCAAATGATTATGCTACCTTTGACGGGTC
AAGGTACCCGGGCTATTTAATCAATTTATCATTTGAGCAGGTACGACTCTTTATATGTTAT
TACAATAAAAACAAGAGCGGATGTTTTTG
```

Fig. 1. The 16s rRNA nucleotide sequences of *Acila divaricate vagila*. (arrowed underline = primer sequences).

결과 및 고찰

분석되어진 *A. divaricata vigila*의 16S rRNA 서열은 568 bp, GC 함량은 33% 이었으며 실험에 사용되어진 16sBR-H primer 사이트를 가지고 있었다. 연체동물전용 BLAST 서버에 blastn으로 검색한 결과 원새아강 (Protobranchia) 에 속하는 *Nucula proxima* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (AY377617) 와 91% (E-value 6e-67) 상동성을 보였다.

BLAST 결과를 토대로 선정되어진 34개의 서열은 두족류 9종의 16S rRNA 서열 *Argonauta nodosa* (AY545104.1), *Bathyteuthis abyssicola* (AJ000104.1), *Cirroteuthis muelleri* (AF487284.1), *Moroteuthis robsoni* (AJ223487.1), *Nautilus pompilius* (AJ416579.1), *Octopus bimaculoides* (AJ390321.1), *Onychoteuthis* sp. (AJ223481.1), *Opisthoteuthis* sp. (AJ315374.1), *Stauroteuthis syrtensis* (AJ252769.1), 복족류 15종 *Spondylus ictericus* (EU379477.1), *Cataegis* sp. (AY163407.1), *Chrysomallon squamiferum* (AY163398.1), *Cocculina messingi*

(AY377624.1), *Cocculina subcompressa* (AY163402.1), *Conus generalis* (AF160722.1), *Conus striatellus* (AF143994.1), *Depressigyra globulus* (AY163400.1), *Gammatricula fujianensis* (AF212896.1), *Hirtopelta hirta* (AY163397.1), *Jardinella tumorosa* (AY622385.1), *Nanocochlea* sp. (AY622401.1), *Phrantela* sp. (AY622386.1), *Pseudotalopia sakurai* (AY163409.1), *Semisulcospira trachea* (AY341256.1) 및 이매패류 10종의 16S rRNA 서열 *Aequipecten opercularis* (AJ245397.1), *Caribachlamys sentis* (GU953233.1), *Euvola ziczac* (EU379484.1), *Laevichlamys irregularis* (EU379483.1), *Mimachlamys varia* (EU379482.1), *Mirapecten spiceri* (EU379476.1), *Nodipecten subnodosus* (EU379481.1), *Nucula nucleus* (AY377617), *Pisidium lilljeborgi* (AY957881.1), *Placopecten septemradiatus* (EU379475.1) 이었다.

MEGA5 소프트웨어를 이용하여 *A. divaricata vigila*와 34개의 서열을 muscle 알고리즘을 이용하여 다중정렬 한 결과를 기초로 Maximum Likelihood method 방법으로 진화학적 분석을 실시한 결과 Fig. 3.과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

Bivalvia에서 형성된 9종 집괴 (*Pisidium* 제외) 는 모두 익형 아강 굴목의 패류이고, 하단의 2종 집괴 (민호두조개 포함) 는 원새아강의 애호두조개목 패류이다. 본 실험 결과, 연체동물의 아강 분류단위 (확대하면 목단위) 로 뚜렷이 구분되어 현재의 연체동물 문 이매패강을 원새아강 (Subclass Protobranchia), 익형아강 (Subclass Pteriomorphia), 고이치아강 (Subclass Paleoheterodonta) 이치아강 (Subclass Heterodonta) 그리고 이인대아강 (Subclass Anomalodesmacea) 으로 구분하는 분류

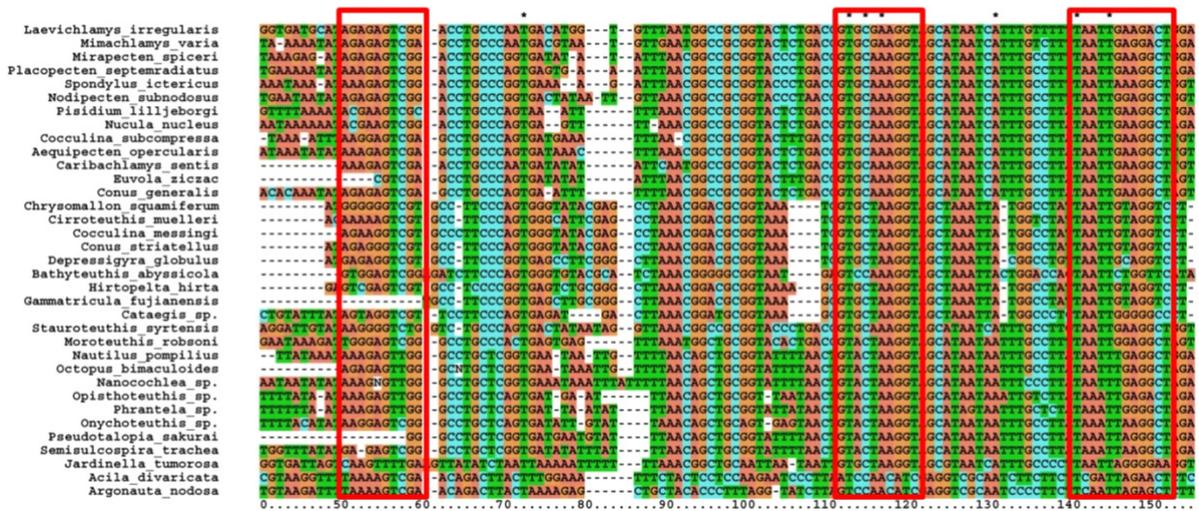


Fig. 2. Multiple sequence alignment results of *A. divaricata vigila* and 34 reference sequences.

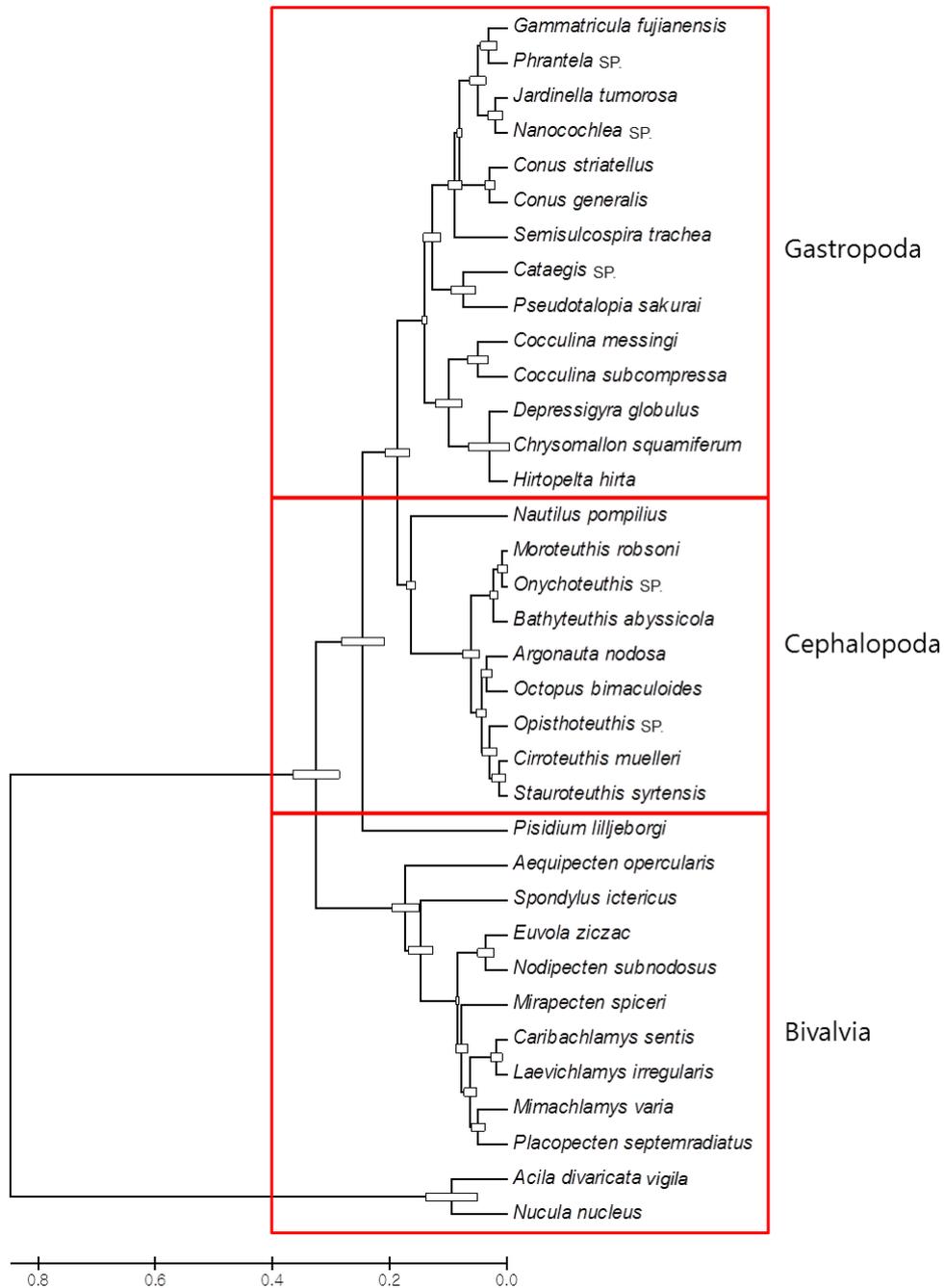


Fig. 3. Molecular phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method

체재를 지지하는 결과로 나타났다.

하지만 *Pisidium* (산골조개) 의 경우는 Bivalvia 집괴에 포함되지 않아 예외의 결과를 보여준다. 이러한 결과는 16S rRNA 등 한가지의 염기서열만 가지고는 완벽한 계통분석이 어려울 수 있음을 보여주는 사례가 될 수 있다. 그렇기 때문에 최근에는 28S, CO-I, ITS 등 여러 가지 마커를 동시에 사용

하거나 Metallothionein과 같이 완전히 새로운 유전자를 이용한 계통분류를 시도하는 경우도 있으며 (Lee *et al.*, 2008; Baek *et al.*, 2009), 16S, ITS2의 서열 등의 2차원 구조를 이용한 논문도 보고되었다 (Salvi *et al.*, 2010). 또한 이러한 서열들의 표준화 및 활용도를 높이기 위해 최근에 이매패류 8 종 63 개체에 대해 이매패류의 CO-I 및 16S rRNA 서열을

분석하고, 이를 바탕으로 바코딩화한 보고 (Feng *et al.*, 2011) 가 있으나, 원새아강류의 염기서열에 대한 정보가 매우 부족한 실정이다. 2011년 12월 현재 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 에 등록되어 있는 원새아강 (Protobranchia) 에 속하는 종은 110종으로 428개의 염기서열이 등록되어 있다. 등록되어 있는 428개의 염기서열의 종류는 주로 분류에 사용되는 16S rRNA가 61개, CO-I 유전자가 44개, 그리고 18S rRNA가 58개를 비롯하여 유전자발현 연구 시에 대조군용 유전자로 활용되는 Actin이 40개, Beta tubuline이 40개, Small Subunit Ribosomal Units 이 49개, Triose Phosphate Isomerase (TPI)가 8개, Calmodulin이 35개, 기타 84개의 유전자 서열이 등록되어 있을 뿐이다. 본 연구에 사용되어진 민호두조개를 포함한 원새아강의 유전자 서열에 대한 연구가 필요함을 알 수 있었으며 본 실험에서 사용된 16S rRNA 유전자는 연체동물의 원새아강의 계통분류 연구에 유용한 도구로 판단된다.

Acknowledgement

본 연구는 국립수산물학원의 수산시험연구과제 (RP-2011-BT-055) 연구비지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Adamkewicz, S.L., Harasewych, M.G., Blake, J., Saudek, D., and Bult, C.J. (1997) A molecular phylogeny of the bivalve mollusks. *Molecular Biology and Evolution*, **14**: 619-629.
- Baek, M.K., Lee, J.S., Kang, S.W., Lee, J.B., Kang, H.J., Jo, Y.-H., Noh, M.-Y., Han, Y.S., Choi, S.-H., Chae, S.-H., Park, H.-S., Lee, J.-S., and Lee, Y.S. (2009) Phylogenetic Analysis based on Metallothionein Gene Sequence of an Indigenous Species *Pisidium (Neopisidium) coreanum* in Korea. *The Korean Journal of Malacology*, **25**: 253-160.
- Barucca, M., Olmo, E., Schiaparelli, S., and Canapa, A. (2004) Molecular phylogeny of the family Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) based on mitochondrial 16S and 12S rRNA genes. *Mol. Phylogenet Evol.* **31**: 89-95.
- Beesley, P.L., Ross, G.J.B., and Wells, A. (1998) The Mollusca: The Southern Synthesis. Fauna of Australia. Vol.5. CSIRO Publishing, Melbourne, pp Part A xvi pp.563, Part B viii pp.565-1234
- Canapa, A., Barucca, M., Marinelli, A., and Olmo, E. (2000) Molecular Data from the 16S rRNA Gene for the Phylogeny of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia). *Journal of Molecular Evolution*, **50**: 93-97.
- Canapa, A., Marota, I., Rollo, F., and Olmo, E. (1999) The Small-Subunit rRNA Gene Sequences of Venerids and the Phylogeny of Bivalvia. *Journal of Molecular Evolution*, **48**: 463-468.
- Canapa, A., Schiaparelli, S., Marota, I., and Barucca, M. (2003) Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Veneridae (Mollusca: Bivalvia). *Marine Biology*, **142**: 1125-1130.
- Chase, M.R., Etter, R.J., Rex, M.A., and Quattro, J.M. (1998) Bathymetric patterns of genetic variation in a deep-sea protobranch bivalve, *Deminucula atacellana*. *Marine Biology*, **131**: 301-308.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, **5**: 113.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, **32**: 1792-1797.
- Ewing, B., and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res*, **8**: 186-194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*, **8**: 175-185.
- Feng, Y., Li, Q., Kong, L., and Zheng, X. (2011) DNA barcoding and phylogenetic analysis of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) based on mitochondrial COI and 16S rRNA genes. *Mol. Biol. Rep.*, **38**: 291-299.
- Gee, A., Specht, J.M., Kerk, D., Moore, J.D., Drum, A.S., and Elston, R.A. (1994) Disseminated neoplastic cells in *Mytilus trossulus*: verification of host species origin by (16S-like) rRNA sequence comparison. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **3**: 7-12.
- Higo, S., Callomon, P., and Goto, Y. (1999) Catalogue and Bibliography of the Marine Shell-Bearing Mollusca of Japan pp. 749. Elle Scientific Publication. Osaka
- Huang, Y., Liu, H., Wu, X., and Ouyang, S. (2002) Testing the relationships of chinese freshwater Unionidae (Bivalvia) based on analysis of partial Mitochondrial 16S rRNA sequences. *Journal of Molluscan Studies*, **68**: 359-363.
- Ladoukakis, E.D., Saavedra, C., Magoulas, A., and Zouros, E. (2002) Mitochondrial DNA variation in a species with two mitochondrial genomes: the case of *Mytilus galloprovincialis* from the Atlantic, the Mediterranean and the Black Sea. *Mol. Ecol.*, **11**: 755-769.
- Lee, J.S., Min, B.J., Kang, S.W., Lee, J.B., Baek, M.K., Hwang, S.Y., Kim, S.H., Kho, W.G., Choi, S.H., Chae, S.H., Park, H.S., Han, Y.S., Lee, J.S., Jeong, K.-H., and Lee, Y.S. (2008) Molecular Phylogenetic Study of *Nesiohelix samarangae* Based on Metallothionein Gene. *The Korean Journal of Malacology*, **24**: 73-80.
- Lee, Y.S., Jo, Y.H., Kim, D.S., Kim, D.W., Kim, M.Y., Choi, S.H., Yon, J.O., Byun, I.S., Kang, B.R., Jeong, K.H., and Park, H.S. (2004) Construction of BLAST Server for Mollusks. *Korean Journal of Malacology*, **20**: 165-169.
- Lydeard, C., Mulvey, M., and Davis, G.M. (1996) Molecular Systematics and Evolution of Reproductive Traits of North American Freshwater

- Unionacean Mussels (Mollusca: Bivalvia) as Inferred from 16S rRNA Gene Sequences. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **351**: 1593-1603.
- Min, D.K., Lee, J.S., Koh, D.B., and Je, J.K. (2004) Mollusks in Korea pp. Min Molluscan Research Institute. Seoul
- Pujolar, J.M., Marceta, T., Saavedra, C., Bressan, M., and Zane, L. (2010) Inferring the demographic history of the Adriatic *Flexopecten* complex. *Mol. Phylogenet Evol.*, **57**: 942-947.
- Puslednik, L., and Serb, J.M. (2008) Molecular phylogenetics of the Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) and effect of increased taxon sampling and outgroup selection on tree topology. *Mol. Phylogenet Evol.*, **48**: 1178-1188.
- Roe, K.J., Hartfield, P.D., and Lydeard, C. (2001) Phylogeographic analysis of the threatened and endangered superconglutinate-producing mussels of the genus *Lampsilis* (Bivalvia: Unionidae). *Mol. Ecol.*, **10**: 2225-2234.
- Salvi, D., Bellavia, G., Cervelli, M., and Mariottini, P. (2010) The analysis of rRNA sequence-structure in phylogenetics: An application to the family Pectinidae (Mollusca: Bivalvia). *Mol. Phylogenet Evol.*, **56**: 1059-1067.
- Schneider, J.A. (2001) Bivalve systematics during the 20th century. *Journal of Paleontology*, **75**: 1119-1127.
- Stepien, C.A., Hubers, A.N., and Skidmore, J.L. (1999) Diagnostic Genetic Markers and Evolutionary Relationships among Invasive Dreissenoid and Corbiculoid Bivalves in North America: Phylogenetic Signal from Mitochondrial 16S rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **13**: 31-49.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 1596-1599.
- Tamura, K., and Nei, M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, **10**: 512-526.