

C. ミトコンドリアDNAを指標としたイブリトゲクシエラボヤ *Boltenia echinata iburi* (Oka) の分子系統学的解析

神奈川県理学部総合理学研究所 角田恒雄

【はじめに】

尾索動物亜門、ホヤ綱に属するマボヤ科 Pyuridae は日本近海において8属が確認されている。マボヤ科の特徴として、(1) 単体で通常鰓褶は両側5枚以上、(2) 生殖腺は壁性、(3) 鰓口は直線的、(4) 触手は樹状に分岐している、ことなどがあげられる(西川 1986)。このマボヤ科のうちのひとつであるクシエラボヤ属 *Boltenia* は、外観やホヤ類の分類を行う上で重要な形質であると考えられる内臓の配置などが同科のマボヤ属 *Halocynthia* のいくつかの種と非常に似通っているが、鰓口が縦走血管と直交していることから(マボヤ属を含むおおくの属の鰓口は縦走血管と平行して位置する)他属との識別は容易であるとされている(西川 1995)。

日本近海においてクシエラボヤ属は2種が確認されており、これらのうちイブリトゲクシエラボヤ *Boltenia echinata iburi* (Oka) は、四国と九州の太平洋岸をのぞく日本各地に、その棲息が確認されている(Nishikawa 1991)。イブリトゲクシエラボヤは体表にマボヤ属のイガボヤ *H. hispida* とよく似た大小の棘突起をもち、小型の個体では外見からは判別が困難である。

本研究では形態的にマボヤ属と類似点をもつクシエラボヤ属の系統学的位置を推定するため、ミトコンドリアDNAを指標とし、分子遺伝学的の見地からマボヤ属とクシエラボヤ属の系統関係を検討した。

【実験試料と方法】

実験試料 イブリトゲクシエラボヤ *Boltenia echinata iburi* (Oka): 5個体、1999年8月2日、岩手県大槌湾水深10mより採集。採集した個体はただちに冷凍し、 -30°C で保存した。

実験方法

DNAの抽出には生殖巣、筋肉を液体窒素を用いて粉末状にし、Easy-DNA Kitを用い全DNAを抽出した。増幅反応は10~100ngのDNAに対し、ex Taq premix reagent 25 μl (TAKARA Syuzo Co.)、プライマーは各50pgを使用し、反応溶液が全量で50 μl となるように滅菌水を加えた。PCRプライマーはマボヤmtDNA全塩基配列(横堀 1994)と5種の動物のチトクロームb (Cyt b) 領域を比較し、保存性の高い領域を参考に設計した。プライマーの配列は、5'-CCNACWTTTRANTCGNTTTTA-3' (HCf3)、と5'-GCRAANTRRAARTAYCAYTCNGG-3' (HCr1)とした。増幅は 94°C 30秒、 52°C 30秒、 72°C 1分、の条件で35サイクル行った。増幅されたPCR産物はUltra clean Kit (Mo Bio Lab. Inc.)で精製を行い、PCR産物から直接塩基配列決定法で塩基配列の決定を行った。反応にはdRhodamine dye terminator sequencing Kit (ABI)を用い、 96°C 10秒、 50°C 5秒、 60°C 4分、の条件で25サイクル行った。塩基配列決定の際のプライマーには、forwardとreverseそれぞれHCf3とHCr1を用いた。

塩基配列のアライメントおよび分子系統解析

決定された塩基配列はclustal X (Thompson *et al* 1997)を用いてアライメントを行った。またアライメント行った塩基配列から近隣結合法(Saito and Nei, 1987)によって分子系統樹を作成した。系統樹の作成に際し、各分岐点における信頼度をブーツストラップ確率により示した。分子系統樹の作成、ブーツストラップ確率の算出にはclustal X (Thompson *et al* 1997)を用い、1000回の抽出を行った。配列の比較にはマボヤ属の4種(マボヤ *H. roretzi*、アカボヤ *H. aurantium*、イガボヤ *H. hispida*、リッテルボヤ *H. hilgendorfi*)とともに外群としてエボヤ *Styela clava*、マクワボヤ *Cnemidocarpa clara*を用いた。

【結果と考察】

イブリトゲクシエラボヤ5個体のCyt bの一部領域252塩基の配列を決定し、2種類のハプロタイプが検出された。図1に決定したイブリトゲクシエラボヤの塩基配列を示す。検出されたハプロタイプ間での変異は2塩基で、いずれも第三コドンに生じたものであった。一方、マボヤ属4種との比較では、63.1%から67.5%と相同性は低い値をとった。

```

iburi1 CATTTCCTTTCCCTTTATTCTAGTAGTTTGTCTATGTTGCATCTGGTTTTTTTACATGAGAACAGAAAGCAGTAATCCATTGAAAAGGACTAATAAT
iburi2 CATTTCCTTTCCCTTTATTCTGGTAGTTTGTCTATGTTGCATCTGGTTTTTTTACATGAGAACAGAAAGCAGTAATCCATTGAAAAGGACTAATAAT
*****
iburi1 AGCTTTAAGGTTTGATTTTGGCCTTATAATAGGGTAAAGGACATGTTTGGTTTGTTCGTTATATTGGTTTGTCTTTGGTTGTCTTTTTTCTCCTA
iburi2 AGCTTTAAGGTTTGATTTTGGCCTTATAATAGGGTAAAGGACATGTTTGGTTTGTTCGTTATATTGGTTTGTCTTTGGTTGTCTTTTTTCTCCTA
*****
iburi1 ATTTATTAAGTATCCAGAAAATTATATGTCTGCAAACCCCTTAGTGACACCA
iburi2 ATTTATTAAGTATCCAGAAAATTATATGTCTGCAAACCCCTTAGTGACACCA
*****

```

図1 イブリトゲクシエラボヤの mtDNA Cytb 一部領域の配列

1, 2 はハプロタイプを表す。*はハプロタイプ間で同じ配列であることを示す。

これら結果より分子系統樹を作成した(図2)。マボヤ属の同領域との相同性が低かったため、塩基配列をアミノ酸配列に変換し、近隣結合法により推定を行った。その結果、イブリトゲクシエラボヤはマボヤ属の中に入る形となり、イガボヤ、リッテルボヤとクレードをつくる樹形となった。各分岐点におけるブートストラップ値は729 から1000 と高い値を示した。

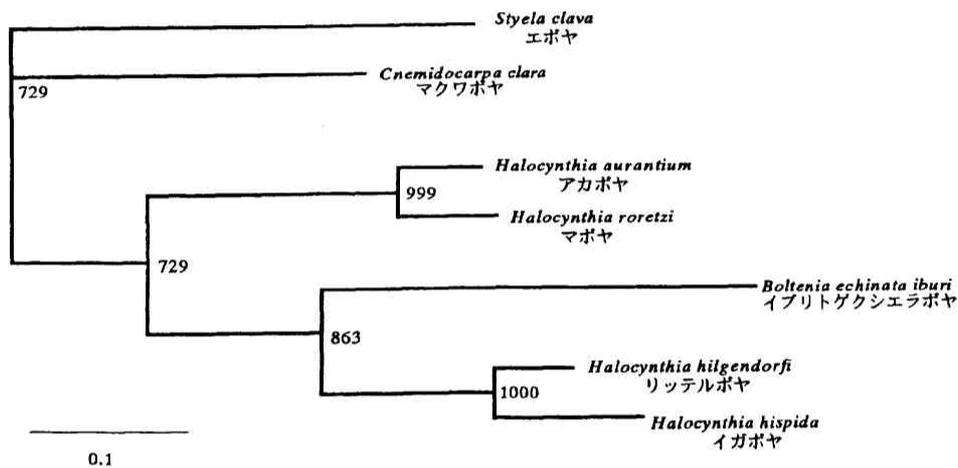


図2 mtDNA Cytb 一部領域のアミノ酸配列による系統樹

各分岐点における数値はブートストラップ確率の値を示す。

トゲクシエラボヤ属は前述のとおり、鰓口が縦走血管と直交して位置するという明らかな形態的特徴により他のホヤとの識別が容易である。しかし、それ以外の形質をみると、外観だけではなく、内蔵の配置などもマボヤ属のホヤ類と近いようにも考えられる。今回の結果から得られた系統樹ではイブリトゲクシエラボヤはマボヤ属のイガボヤ、リッテルボヤと近縁であるとの推定が得られており、各分岐点におけるブートストラップ値は高い値を示している。イガボヤは体表上にイブリトゲクシエラボヤとよく似た極突起を持つ種でもある。これら結果はホヤ類の分類の再検討を促す一つの指標であると考えられる。しかしながら、今回の解析では mtDNA をマーカーとして用いており、また解析を行ったのはそのうちの1領域のみである。mtDNA の他領域、核遺伝子などの分子生物学的解析に加え、形態の詳細観察など、今後の更なる解析により、トゲクシエラボヤ属の真の系統的位置が明確になってゆくのではないかと考える。

引用文献

- 西川輝昭(1986) 'ホヤ類' 付着生物研究法-種類査定・調査法- 付着生物研究会編 恒星社厚生閣
 Nishikawa T (1991) The ascidians of the Japan sea. II. Publ Seto Mar Biol 35: 25-170
 西川輝昭(1995) '脊索動物門' 原色検索 日本海岸動物図鑑II 西村三郎編著 保育社
 Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4: 406-425
 Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG (1997) The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 24: 4876-4882.
 横堀伸一(1994) 後生動物ミトコンドリア遺伝子の進化の研究 東京工業大学博士論文