

共同研究報告書

C. ミサキマメイタボヤ *Polyandrocarpa misakiensis* の3系統における分子系統学的解析

研究代表者 角田恒雄 (神奈川県立理学部総合理学研究所)

共同研究者 粟津智子 (横浜国立大学教育学部)

【はじめに】

脊索動物に属するシロボヤ科は、群体を作る種と単体で棲息する種を共に含む興味深い科で、日本近海では約20種が知られている。ミサキマメイタボヤ *Polyandrocarpa misakiensis* は、群体性であるマメイタボヤ属 *Polyandrocarpa* の一種で、我が国では相模湾以南の大平洋岸に棲息する (Nishikawa 1991)。ミサキマメイタボヤには、各個虫の入水口と出水口の間に、不定の大きさの白色斑を一つもしくは左右一対現れる系統と、全く現れない系統があり、それぞれ White Spot (WS) と Spotless (SL) と呼ばれている (西川 1995)。最近この他にも WS と同様の位置に黄橙色を呈した斑をもつ系統が発見され、この系統は Orange Spot (OS) と呼ばれている。

本研究ではこのような色彩変異を持つミサキマメイタボヤ3系統間に、遺伝的変異がどの程度生じているかを推定するため、ミトコンドリアDNAにコードされているチトクローム *b* 遺伝子 (Cyt *b*) を指標とし、ミサキマメイタボヤ3系統間の遺伝的分化を検討した。

【実験試料と方法】

実験試料 ミサキマメイタボヤ *Polyandrocarpa misakiensis*: 3系統とも筑波大学下田臨海センターにおいて飼育保持され、横浜国立大学教育人間科学部附属理科教育実習施設、実習船「たちばな」に恵与されたものを使用した。

実験方法

「DNAの抽出」

液体窒素を用いて個虫を粉末状にし、Easy-DNA Kit を用い全DNAを抽出した。一つの群体を形成する個虫はクローン発生であるため、同じ群体の複数の個虫を用いた。

「PCR」 増幅反応は10~100ngのDNAに対し、ex Taq premix reagent 25 μ l (TAKARA Syuzo Co.)、プライマーは各50pgを使用し、反応溶液が全量で50 μ l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Cyt *b* 領域を比較し、保存性の高い領域を参考に設計した HCf3 5'-CCNACWTTTRANTCGNTTTTA-3' と HCf1、5'-GCRAANTRRAARTAYCAYTCNGG-3' を用いた。増幅は94°C 30秒、48~52°C (WS; 52°C, SL; 48°C, OS; 51°C) 30秒、72°C 1分、の条件で35サイクル行った。

「塩基配列の決定」

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を決定した。反応にはdRhodamine dye terminator sequencing Kit (ABI) を用い、96°C 10秒、48~52°C (WS; 52°C, SL; 48°C, OS; 51°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プライマーであるHCf3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い、3系統間で比較を行った。

【結果と考察】

ミサキマメイタボヤ3系統のCyt *b* の一部領域337塩基の配列を決定し、比較を行った結果、3系統間の塩基配列に違いは全く見られなかった。

misaki_WS	1	GGGTTTGGGGGGATTTTCTGTTGGTGCTCCTACATTAACCTCGCTTTTATACTTTTCACT	60
misaki_SL	1	60
misaki_OS	1	60

misaki_WS	61	TTTTGTTTCCTTTTTTATAATTGTGTTAAGTATTATTCATTAGTATTTTACATCGAA	120
misaki_SL	61	120
misaki_OS	61	120

misaki_WS	121	AGAGAAGTACTAACCCTTTAAAAATTTCTAGTTATTTAAAAATTAATTTTGGACCATATA	180
misaki_SL	121	180
misaki_OS	121	180

misaki_WS	181	GTAGAGTAAAGGATATTTAGGTTTCATGTTAGTGTTAACTTTTTTTTATTATTAGTT	240
misaki_SL	181	240
misaki_OS	181	240

misaki_WS	241	TTTTTACTCCTTTTGTATTTATAGATCCTGAGAATTTATAAATGCTAATCCAATAGTTA	300
misaki_SL	241	300
misaki_OS	241	300

misaki_WS	301	CTCCTATTCACATTAACCCGAATGACTTCCACCT	337
misaki_SL	301	337
misaki_OS	301	337

図1 ミサキマメイトボヤ3系統の mtDNA *Cytb* 一部領域の配列
WS、SL、OSは各系統を表す。*は各系統の配列で同じ塩基であることを示す。

mtDNAの進化速度は核DNAより5~10倍も速いことが報告されており (Brown et al 1979)、この進化速度の速さから、mtDNAの塩基配列の比較による解析は、近縁である考えられる様々な動物間に用いられている。今回のミサキマメイトボヤ3系統のmtDNA、*Cytb*一部領域の比較では、3系統間において全く違いは見られなかった。これは3系統が遺伝的に分化しておらず、水孔間の斑の有無は同種内での色彩変異である可能性が強いことを示唆すると考える。このことは、SL系統とWS系統間で断片癒合することにより、キメラ個虫が発生すること (種田 1987) から支持される。ミサキマメイトボヤには色彩変異だけでなく、胃壁のパターンや、個虫の体長、体幅などの形態的特徴に違いの見えるFatと呼ばれる系統も存在し、他系統とはかなり異なることが期待される。今後も詳細な形態観察とともに遺伝子解析を進めることで、ミサキマメイトボヤの変異のバリエーションと近縁種の関係が明らかになっていくと考える。

引用文献

- Brown WM, Geoge JrM, Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc natl acad sci USA* 76: 1967-1971
- Nishikawa T (1991) The ascidians of the Japan sea. II. *Publ Seto Mar Biol* 35: 25-170
- 西川輝昭 (1995) '寄索動物門' 原色検索 日本海岸動物図鑑II 西村三郎編著 保育社
- 種田保穂 (1987) 複合ボヤ *Polyandrocarpa misakiensis* の位置情報と咽嚥腔上皮 横浜国立大学教育学部 理科教育実習施設 研究報告
- 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