

研究ノート

# 「インドー太平洋に産する黒色ナガウニ (*Echinometra*) 個体群の DNA分析による種分化及び系統関係に関する研究」報告

新垣 裕治<sup>1)</sup>, 金城その子<sup>2)</sup>, 平塚 悠治<sup>3)</sup>, 池尾 一穂<sup>2)</sup>

## A Report on “DNA Analysis for Speciation and Phylogeny of Black *Echinometra* Population Distributed in the Indo-Pacific”

Yuji Arakaki<sup>1)</sup>, Sonoko Kinjo<sup>2)</sup>, Yuji Hiratsuka<sup>3)</sup>, Kazuho Ikeo<sup>2)</sup>

### 要 旨

形態比較及び交雑実験によりインドー太平洋に産するクロナガウニ (*E. oblonga*) は、複数種より構成される複合種であることが示唆されている。本研究ではミトコンドリアDNA全長配列の分析により、これらナガウニの種分化及び系統解析を行うものである。沖縄・グアム・ハワイに産するナガウニ類 (*Echinometra*) 及び外群として、パナマナガウニ (*E. vanbrunti*) とアメリカキタムラサキウニ (*Strongylocentrotus purpuratus*) のミトコンドリアDNAも得て系統解析を行った。沖縄・グアム及びハワイに産するクロナガウニでは、沖縄産とハワイ産の間で種分化が起こりつつあることが示唆された。また、交雑実験では沖縄産とグアム産の受精率が低く別種であることが示されることより、沖縄、グアム及びハワイに産するいずれのクロナガウニも別種であることが示唆される。

**キーワード:** クロナガウニ (*Echinometra oblonga*), ミトコンドリアDNA全長配列, 系統解析

### Abstract

It is suggested that *E. oblonga* distributed in the Indo-Pacific Ocean is composed of multiple species, a species complex. Phylogenetic analysis of these populations based on the whole mitochondrial DNA is conducted in the research. *Echinometra* species collected in Okinawa, Guam, and Hawaii, as well as mitochondrial DNA of *E. vanbrunti* and *Strongylocentrotus purpuratus* as outgroups, were used as samples for DNA analysis. Among the relation of *E. oblonga* from Okinawa, Guam, and Hawaii, it is suggested that Okinawan and Hawaiian are under speciation process. On the other hand, it is suggested that Okinawan and Guamanian are different species based on the low ratio of fertilization in the previous research. Therefore, it is supposed each of *E. oblonga* populations distributed in Okinawa, Guam, and Hawaii are different species.

**Keywords:** *Echinometra oblonga*, whole mitochondrial DNA, phylogenetic analysis

<sup>1)</sup> 名桜大学国際学群 〒905-8585 沖縄県名護市字為又1220-1 Faculty of International Studies, Meio University, 1220-1, Biimata, Nago, Okinawa 905-8585, Japan

<sup>2)</sup> 国立遺伝学研究所情報・システム研究機構 〒411-8540 静岡県三島市谷田1111 Research Organization of Information and Systems, National Institute of Genetics, 1111, Yata, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan

<sup>3)</sup> 沖縄開発 〒901-2131 沖縄県浦添市牧港4丁目11番3号 おきでん牧港ビル6階 Okidenkaiatsu Company Inc, 4-11-3, Makiminato, Urasoe, Okinawa, the 6th floor of Makiminato building, 901-2131 Japan

## はじめに

インドー太平洋の熱帯域から亜熱帯域の浅海に広く分布する一般的なウニ類としてナガウニ類を挙げることができる (Mortensen, 1943)。この種は従来ホンナガウニ (*Echinometra mathaei*) とクロナガウニ (*E. oblonga*) とされてきた (Mortensen, 1943)。一方、沖縄県における研究では、外部形態、サンゴ礁域における生態分布、管足及び生殖巣の骨片の形状、対孔数、核型により4タイプ (*E. mathaei* Type A, B, C, D) として認識され、別種であることが示唆された (Uehara and Shingaki, 1984; Uehara and Taira, 1987; Uehara et al., 1986, 1990)。しかし、その後の研究(タンパク質解析, DNA解析)により (Matsuoka and Hatanaka, 1991; Palumbi and Metz, 1991), 4種よりなる複合種であることが示された。4種については、ホンナガウニ (*E. mathaei*) の模式産地 (モーリシャス) に産するナガウニ類との比較 (外部形態, 生態分布, 管足及び生殖巣の骨片の形状, 対孔数, 交雑実験) により、沖縄に産するナガウニ類はホンナガウニ (*E. mathaei*), クロナガウニ (*E. oblonga*) 及び2種の未記載種とされた (Arakaki et al., 1998)。未記載種2種の記載については現在進行中である。

ナガウニ類の調査は、モーリシャス・インドネシア・小笠原・グアム・ハワイ・セーシェルでも行われ、地域により必ずしも4種が分布しないこと、また、黒色のナガウニ (沖縄ではクロナガウニとされる種) においては、比較研究 (外部形態, 対孔数, 骨片の形状, 精子の形態, 交雑実験) により、少なくとも3種 (沖縄, グアム, ハワイ) に分布する個体群がそれぞれ別種) であることが示唆されている (Arakaki and Uehara, 1999; Arakaki, 2001)。

本研究においては、これら形態レベル, 受精レベルの違いをDNAレベルでの比較を行うものである。これにより、形質あるいは受精レベルの違いがDNAの違いとして検出されることが期待できる。また、ナガウニ類の系統関係についても論じる。

## 方 法

### 採集場所

サンプルとしては、これまでグアム及びハワイで採取してきた黒色ナガウニをアルコール標本として保存しているのであるが、劣化によりDNAを殆ど採取することができなかった。それで、グアム及びハワイへ渡航しナガウニ類の採取を行い、DNAサンプルを得た。グアムでのサンプル採取は、2012年9月12日から15日の4日間グアムへ渡航し実施した。採集に関しては、グアム大

学臨海実験所の協力を得て行った。採集は、以前に採集を行ったグアム島中部東海岸のグアム水産試験場トレーニングセンター (Guam Aquaculture Development and Training Center) 近くの岩礁帯で行い (Arakaki and Uehara, 1999), クロナガウニ (*E. oblonga*) 3個体を得ることができた。ハワイでのサンプル採集は、2012年10月16日から22日の7日間ハワイへ渡航し実施した。採集地はこれまでオアフ島のナガウニ類の採集地としてきた北海岸のTurtle Bayで行い (Arakaki and Uehara, 1999), ホンナガウニ (*E. mathaei*) 及びクロナガウニ (*E. oblonga*) を採集することができた。沖縄でのサンプルは、2012年9月13日に瀬底島の南海岸の岬先端の岩礁地帯で行い、沖縄に産する4種のナガウニ類の全てを採集した。

### DNA抽出用組織サンプル

本研究でDNA抽出用サンプルとしたのは、生殖巣・筋肉 (口器を支える顎骨伸筋及び顎骨後引筋) 及び管足である。それぞれの部位の組織の適量をピンセットでちぎり取り、組織毎に80%アルコールを満たした1.5ccのスクリューキャップチューブ遠心管に入れ保存した。2, 3回アルコールを入れ替えることによりアルコール固定をし、常温または冷蔵で保存した。サンプルは、DNA抽出用組織サンプルとして国立遺伝学研究所 (静岡県三島市) へ送付し、その後の分析に備えた。

本研究では、外群用としてパナマの太平洋側に分布するパナマナガウニ (*E. vanbrunti*) のミトコンドリアDNAデータをSmithsonian Tropical Research Institute, Panama所属のHaris A. Lessios博士及びMonica Medina博士の協力で得ることができた。また、公共のデータベースよりアメリカキタムラサキウニ (*Strongylocentrotus purpuratus*) のミトコンドリアDNAも得て外群とした。

### DNAの抽出・精製

本研究では沖縄, ハワイ, グアムから採集したナガウニ類 (*Echinometra*) の32個体を解析に用いた。沖縄産ツマジロナガウニ (*Echinometra* sp. A) 5個体, 沖縄産ホンナガウニ (*E. mathaei*) 5個体及びハワイ産ホンナガウニ (*E. mathaei*) 5個体, 沖縄産リュウキュウナガウニ (*Echinometra* sp. C) 4個体, 沖縄産クロナガウニ (*E. oblonga*) 5個体, ハワイ産クロナガウニ (*E. oblonga*) 5個体, グアム産クロナガウニ (*E. oblonga*) 3個体である。各個体とも、約10mgの筋肉組織又は生殖巣組織から、フェノール・クロロフォルム法またはQIAGEN社のDNeasy Blood & Tissue Kitを用いてDNAを抽出・精製し、4℃で保存した。

## ミトコンドリアDNAの増幅

ミトコンドリアDNA上のND1・COI・ND5遺伝子内にプライマーを設計し、ミトコンドリアDNAを2つ(ND1-COI領域4.5k, COI-ND1領域11.5k bp) または3つ(ND1-COI領域4.5k, COI-ND5領域6.35k, ND5-ND1領域6.4k bp) の領域に分けて増幅した(図1)。用いたプライマーの配列は以下の通りである。ND1-COI領域(4.5k bp) の増幅にはD1\_Fw (5'-TAAAGCCTTCAACAGCATCCCC-3') I\_Rv (5'-TTTGAGCCTTGAAGGGTTGCC-3'), COI-ND1領域(11.5k bp) にはCOI\_Fw (5'-GGCTTTGGCATGATTTTCACACG-3') とND1\_Rv (5'-CTCATCCAGAGCCAAGAATGG-3'), COI-ND5領域(6.35k bp) にはCOI\_FwとND5\_Rv1 (5'-GCHGACTTHCCVGCKGCAGCTA-3'), ND5-ND1領域(6.4k bp) にはND5\_Fw (5'-CCTGCTAAGYCYAAAGRYTGC GG-3') とND1\_Rvを用いた。プライマーの設計は、公共のDNA配列データベースである日本DNAデータバンク(DDBJ)に登録されている棘皮動物ウニ類のND1・COI・ND5を取得し、保存されている領域の中からデザインした。増幅には、東洋紡社製のKOD-Plus-NeoまたはKOD-Fx-Neoを用い、同製品の取扱説明書に従って主に次の2つの条件で増幅した。2-ステップPCR: 94℃ 2分反応後, 98℃ 10秒・68℃ 6分を25~30サイクル, またはステップダウンPCR: 94℃ 2分反応後, 98℃ 10秒・74℃ 6分を5サイクル, 98℃ 10秒・72℃ 6分を5サイクル, 70℃ 6分を5サイクル, 98℃ 10秒・68℃ 6分を25~30サイクルした後, 68℃ 7分の最終伸長を行った。増幅したPCR産物は、アガロースゲルで電気泳動を行い、目的産物を含む部分を切り出し、QIAGEN社のMinElute Gel Extraction Kitを用いて精製した。精製されたPCR産物は、サンプルごとに等しいモル濃度で混合し、シーケン

スのためのライブラリ作成に用いた。

## DNAライブラリ作成および配列決定

ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン株式会社のNEBNext Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrentを用いてライブラリ作成を行った。この過程は、混合したPCR産物を制限酵素によって200 bp前後の短い断片に断片し、それぞれの断片にアダプター配列と呼ばれる共通の短いDNA配列を付加し、それを足がかりにして配列解読を行うためのものである。このライブラリ作成を32サンプルそれぞれについて行った。32サンプル分のDNA配列は、ライフテクノロジーズジャパン株式会社のIon PGM™ シーケンサを用いて解読した。

## 配列解析

得られたDNA断片の配列を、CLCバイオジャパン社のCLC Assembly Cellプログラムを用いて繋ぎ合わせ、サンプルごとに1本のミトコンドリアDNA全長配列をそれぞれ作成した(約15.7k bp)。

完全長ミトコンドリアDNAから、ミトコンドリアのコーディング領域であるATP6・ATP8・COI・COII・COIII・ND1・ND2・ND3・ND4・ND4L・ND5・ND6・Cytbの13遺伝子と、2つのリボソームRNA遺伝子12S rRNA・16S rRNAとを繋ぎ合わせたものを系統解析に用いた。得られた結合配列を欧州バイオインフォマティクス研究所(EBI)が提供しているClustal Xプログラムを用いて整列した。系統解析は、MEGA5.2.2(Tamura et al., 2011)を用いて近隣結合法により作成した。進化速度推定のためのモデルはMEGAのモデル選択テストの結果から、Tamura-Neiモデルを採用した。信頼度の推定には1000回繰り返しのブートストラップ法を用いた。

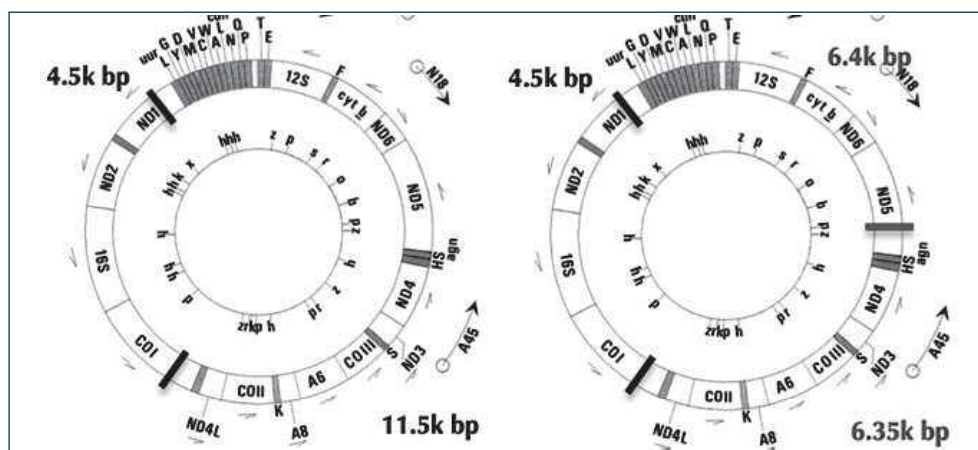


図1 ミトコンドリアDNAの増幅  
Fig. 1 Amplification of mitochondrial DNA

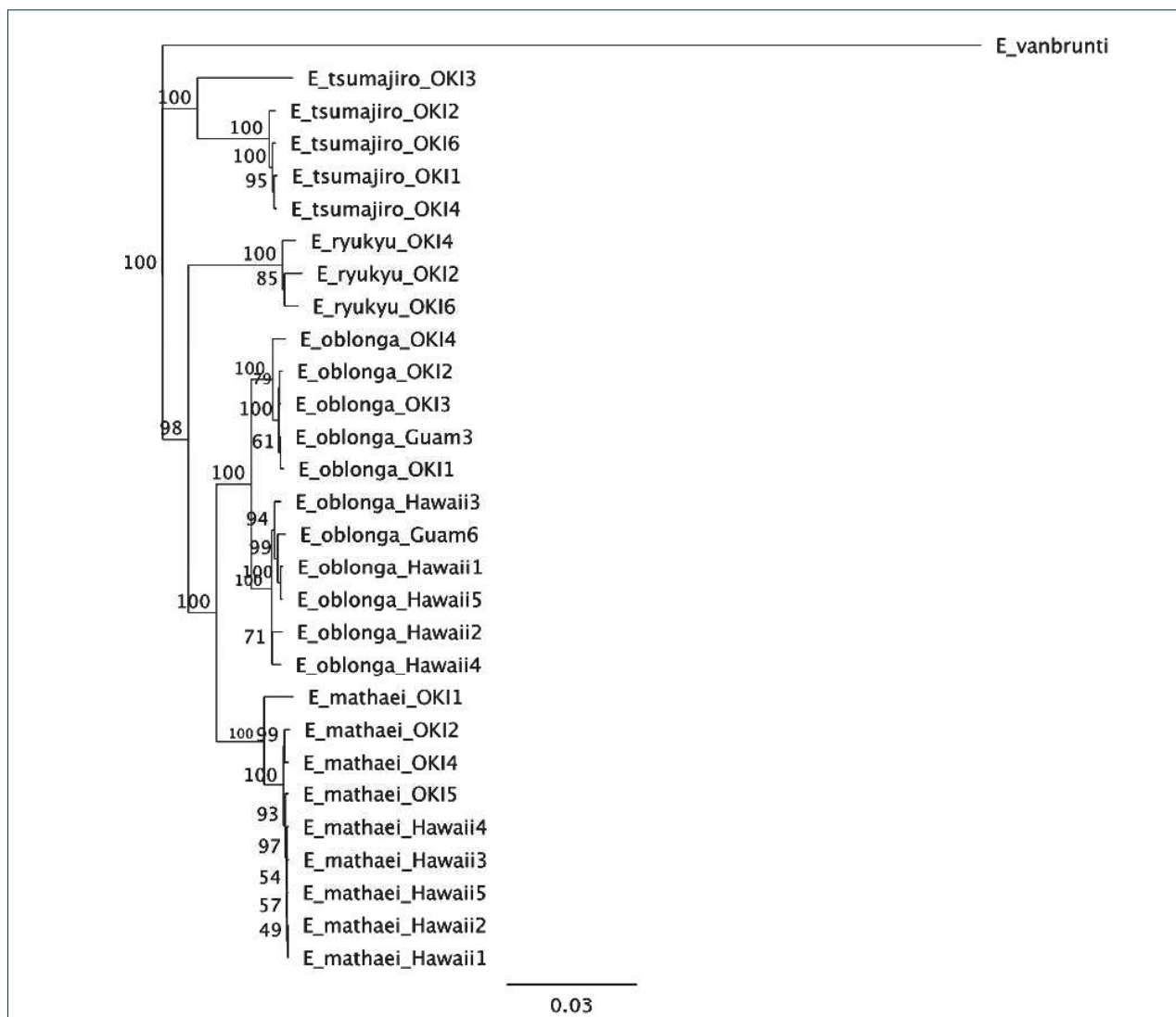


図2 ミトコンドリアDNA配列をもとにした系統樹

系統樹解析には、ミトコンドリアDNAの13遺伝子及び2つのrRNA領域に基づき行われた。図中のOK、Guam及びHawaiiはそれぞれ、沖縄、グアム及びハワイで採集したサンプルであることを示し、これら文字の後に付した数値はサンプル番号を示す。系統樹に付した数値はブートストラップ値を示す。E\_tsumajiro及びE\_ryukyuはそれぞれ *Echinometra* sp. A及びCを示す。

Fig. 2 Phylogenetic tree based on mitochondrial DNA sequences

13 genes of mitochondrial DNA and 2 rRNA areas were analyzed for phylogenetic tree. Letters, Ok, Guam and Hawaii, depict sit of sampling at Okinawa, Guam and Hawaii, respectively, and the number after these letters show sample number. The numeric value on the phylogenetic tree show bootstrap value. E\_tsumajiro and E\_ryukyu depict *Echinometra* sp. A and C, respectively.

## 結果・考察

32サンプルのうち28サンプルについて、完全長ミトコンドリアDNAを作成することが出来た。残り4サンプル（ホンナガウニ (*E. mathaei*) 沖縄産No.3, リュウキュウナガウニ (*Echinometra* sp. C) No.3, No.5, クロナガウニ (*E. oblonga*) グアム産No.4) については解読量が足りず完全に繋ぎ合わせる事が出来なかったため、今回の解析からは除外した。28サンプルのミトコンドリア

アDNA全長は15,687~15,708 bpで、平均長は15,694 bpであった（これは、公共のDNAデータベースに登録されているウニ類8種のミトコンドリアDNA全長とほぼ同じ長さである）。完全長ミトコンドリアDNAから、13のコーディング遺伝子と2つのリボソームRNA遺伝子を繋ぎ合わせたところ、13,874-13,880 bpとなった。これに、ナガウニ類の近縁種である *E. vanbrunti*を加えて系統樹作成を行った（図2）。

系統解析の結果、非常に信頼性の高い結果が得られた。



4姉妹種はそれぞれ、分岐の統計的な信頼性の指標となるブートストラップ値（同じ系統解析を1000回試行したうちの何回がこの分岐を支持したか）100%で単系統性が支持された。このことから、4姉妹種は遺伝的に分かれており、且つ交雑などの遺伝的交流は起こっていないと考えられる。

この結果に基づくと、ナガウニの4姉妹種のうち、最初に分岐したのはツマジロナガウニ (*Echinometra* sp. A) であり、次いで残り3種の中からリュウキュウナガウニ (*Echinometra* sp. C) が分化し、ホンナガウニ (*E. mathaei*) とクロナガウニ (*E. oblonga*) が最も近縁であることがわかった。

また、ハワイ・グアム・沖縄間の分化については、ホンナガウニ (*E. mathaei*) ではハワイ産と沖縄産は完全には分かれなかった。一方、クロナガウニ (*E. oblonga*) では、ハワイ産と沖縄産個体群は異なるクラスターを形成したが、グアム産の個体がそれぞれのクラスターの内群となり、3地域の個体群が遺伝的に完全には種分化していないことがわかった。ハワイと沖縄集団間ではグアム集団を介した遺伝的交流があるが、その機会はかなり限られていると考えられる。このことは、Landry et al., (2003) の研究でも支持されていることである。

沖縄産・グアム産及びハワイ産クロナガウニの交雑実験においては、沖縄産とグアム産の受精率は、45%（グアム産卵子×沖縄産精子）及び0%（沖縄産卵子×グアム産精子）であるが、グアム産とハワイ産の受精率はいずれの方向においても100%である（Arakaki, 2001）。このことは、沖縄産とグアム産が別種であることを示唆するものであり、本研究の結果と合わせると、沖縄産は、グアム・ハワイに産する両方のクロナガウニと別種であることが示唆されることとなる。

## 謝 辞

本研究のグアムでのサンプリングに関し、グアム大学臨海実験所のJohn W. Brown博士の協力に感謝を申し上げる。外群用の同属のDNAとして、*E. vanbrunti* のミトコンドリアDNAデータを提供して頂いた、Smithsonian Tropical Research Institute, Panama所属のHaris A. Lessios博士及びMonica Medina博士にも感謝を申し上げる。また、本原稿に適切な指摘及びコメントをして頂いた匿名査読者にも感謝を申し上げる。本研究は名桜大学総合研究所の一般研究（2012年度）の支援を得て行われた。

## 引用文献

- Arakaki Y (2001) The black *Echinometra* distributed in the Indo-West Pacific: A species complex. Proceedings of the 10<sup>th</sup> international conference, Echinoderms 2000, pp407-412.
- Arakaki Y and Uehara T (1999) Morphological Comparison of Black *Echinometra* Individuals among Those in the Indo-West Pacific. Zoological Science 16: 551-558
- Arakaki Y, Uehara T and Fagoonee I (1998) Comparative studies of the genus *Echinometra* from Okinawa and Mauritius. Zool. Sci., 15:159-168.
- Landry C, Geyer LB, Arakaki Y, Uehara U and Palumbi SR (2003) A recent speciation event in the Indo-West Pacific: rapid evolution of gamete recognition and sperm morphology in cryptic species of sea urchin. Biol. Sci., Vol.270 (1526) : 1839-1847
- Matsuoka N and Hatanaka T (1991) Molecular evidence for the existence of four sibling species within the sea-urchin, *Echinometra mathaei* in Japanese waters and their evolutionary relationships. Zool Sci 8: 121-133.
- Mortensen TH (1943) A monograph of Echinoida. Vol. III, 3.Camarodonta. Echinoidae, Strongylocentrotidae, Parasaleniididae, Echinometridae. CA Reitzel, Copenhagen, pp 277-439.
- Palumbi SR and Metz EC (1991) Strong reproductive isolation between closely related tropical sea urchins (genus *Echinometra*). Mol Biol Evo 8: 227-239
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M and Kumar S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28:2731-9.
- Uehara T, Asakura H and Arakaki Y (1990) Fertilization blockage and hybridization among species of sea urchins. In "Advances in Invertebrate Reproduction 5" Ed by M Hoshi and O Yamashita, Elsevier, Amsterdam, pp 305-310.
- Uehara T and Shingaki M (1984) Studies on the fertilization and development in two types of *Echinometra mathaei* from Okinawa. Zool. Sci., 1, 1008.
- Uehara T, Shingaki M and Tira K (1986) Taxonomic studies in the sea urchin, genus *Echinometra* from

Okinawa and Hawaii. Zool. Sci., 3: 1114.

Uehara T and Taira K (1987) Heteromorphic chromosomes in sea urchin, Type B of *Echinometra mathaei*, from Okinawa. Zool. Sci., 4: 1001.