

■原 著■ 2019 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ウニ類の各クレードに適した分子系統解析法の開発

若山典央^{1,3} 齋藤礼弥¹ 金沢謙一²

A Comparison of Effectiveness between Regions on Phylogenetic Analysis of Sea Urchins Using Mitochondrial Genomes

Norio Wakayama^{1,3}, Masaya Saitoh¹ and Ken'ichi Kanazawa²

¹ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: pt120120xc@jindai.jp

Abstract: Phylogenetic analyses were carried out using various reconstructed datasets to examine the quality and quantity of information for each region in the sea urchin mitochondrial genome. Smaller sized data produced no reliable results. As the data size increased, orders were organized into individual clades. An almost exact relationship between orders was acquired from an approximately 6500-bp dataset from the ND protein group, but it was not perfect. Probably, the entire mitochondrial genome or a larger dataset will be required to accurately determine phylogenetic relationships of sea urchins.

Keywords: sea urchin, molecular phylogeny, mitochondria, NGS

序論

初期のウニ類の分子系統解析は形態による系統解析を補助するにとどまり、小規模かつ限定的な解析が主であった^{1,2)}。しかし、主要な目を用いた分子系統解析³⁾により一定の系統学的成果は得られている。これらの解析はいくつかの遺伝子領域（ミトコンドリア COI、16Sr RNA、ゲノム 18Sr および 28Sr RNA など）を組み合わせて行われた。その結果は低ブートストラップ値がもたらす多分岐のために詳細な系統関係を読み取ることができないという問題を抱えていたため、系統関係から議論を展開することが難しかったと思われる。ここで問題となる精度の不足や樹形の不安定さは限定されたデータサイズや変異率が低い領域を用いたことに起因する情報量の不足により生じていたと思われる。これに対し近年の研究^{4,5)}ではトランスクリプトームやミトコンドリアゲノムを用いる事で系統解析に用いるデータサイズが大幅に拡大された。これらの解析で得られた樹形は大枠においては既知の知見を支持するものであったが、系統樹の信頼性や安定度が先行研究に比べて向上しており、より強い根拠をもって系統関係を論じることが可能になった。これはデータサイ

ズの拡大の重要性がうかがえる結果である。しかし、データの質という面ではまだまだ検討は進んでおらず、領域間のデータ傾向の差についてはいまだ不明である。

この報告ではウニ類 8 目のデータを用い、ミトコンドリアゲノムを含む 38 の領域を再構成して系統解析を行い、ミトコンドリアゲノム全体から求めた系統樹を基準にして、どの組み合わせならばそれに近い樹形を出しうるかという観点からウニ類の系統解析における情報量の分水嶺を探った。

材料と方法

西太平洋産ウニ類の生態と系統を解析するプロジェクト^{6,7)}において得たサンプルを用いた。本報告の中で新たに解析したのは次の 7 種である：*Asthenosoma ijimai*、*Calverisoma gracile*、*Hygrosoma hoplacantha*、*Phormosoma bursarium*、*Toxopneustes pileolus*、*Lissodiadema purpureum*、*Echinarachnius parma*。ミトコンドリアゲノムの抽出およびシーケンスは従前⁵⁾の方法に準じた。*Echinarachnius parma* を除いた 6 種については体

腔内組織をダウンス型ホジナイザで破碎し、細胞および核画分を遠心分離して除いてミトコンドリアを分画した。精製ミトコンドリアからフェノール・クロロホルム法により DNA を抽出し、IonPGM (Thermo Fisher Scientific) を用いてショットガンシーケンスを行った。*Echinarachnius parma* のみ体腔内組織から抽出した total DNA を用いてショットガンシーケンスした。

シーケンスデータのアセンブルは Geneious (Biomatters) と SeqMan NGen (DNASTAR) を用いて行い、両ソフトウェアの結果を照合することで整合性をチェックした。新たに得た配列に前記プロジェクトにおいて過去にシーケンスを行ったウニ 24 種のミトコンドリアゲノムと NCBI の GenBank より取得したミトコンドリアゲノム (ウニ 25 種、ナマコ 1 種) を加え、計 57 種を解析対象とした。ウニのミトコンドリアゲノムは網全体を通じて同様の

構成であり、38 の領域 (タンパク質 13 種、rRNA2 種、tRNA 22 種および D-loop) からなる。ミトコンドリアゲノム中からそれぞれの領域を切り出した後に MAFFT[®] でアライメントを行い、個別の領域の解析データとした。タンパク質コード領域についてはさらにコドンごとに分離し、種間の相同性を箱ひげ図としてまとめた。

従前⁵⁾と同様にタンパク質コード領域の 3rd コドンを除いた合成配列から得た系統樹を基準系統樹とした。検討対象の系統樹としてそれぞれの領域を個別に用いて系統解析を行った他、同系列の遺伝子をまとめた合成配列を用いた解析も行った。使用した合成配列は次のとおり: tRNA (tRNA22 種: 1604 bp)、rRNA 系 (12Sr、16Sr: 2841 bp)、CO 系 (COI、COII、COIII: 3030 bp)、ND 系 (ND1、ND2、ND3、ND4、ND4L、ND5、ND6: 6516 bp)、ATP 系 (ATP6、ATP8: 873bp)。解析対象の配列は領域

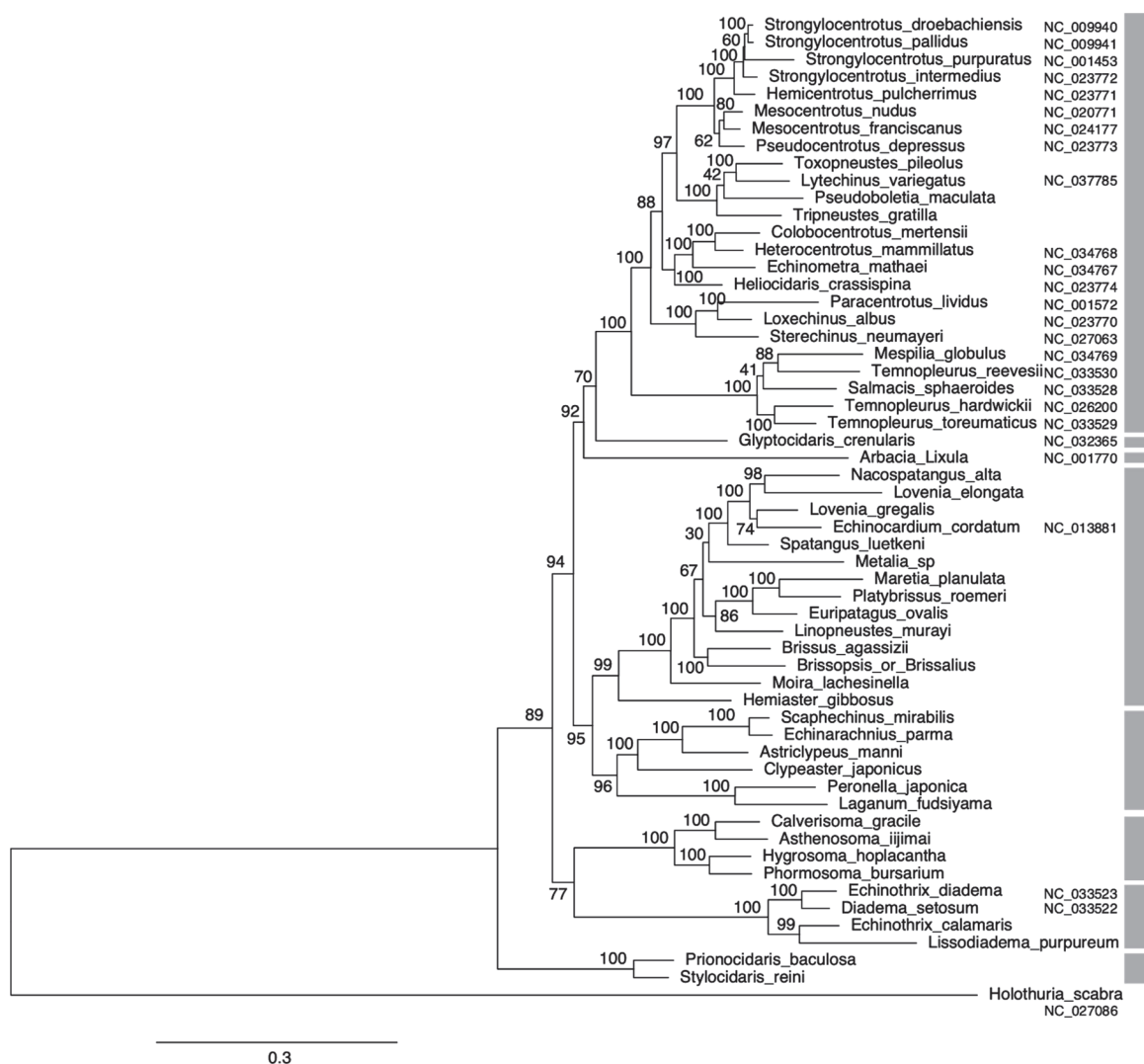


図 1. タンパク質コード領域の 3rd コドンを除いたデータから得た基準系統樹。右端のグレーのバーで示す 8 つの目が明確に識別できる。下端のスケールバーは進化距離を示す。

ごとにパーティションに分け、ModelTest-NG⁹⁾ で分子進化モデルを選択、RAxML-NG¹⁰⁾ によって最尤系統樹（ブートストラップ解析 1000 回試行）を求めた。

結果

タンパク質コード領域の 3rd コドンを除いた合成配列から得られた基準系統樹（図 1）では明確に目が識別されており、分岐関係も明瞭であった。ほとんどの分岐で良好なブートストラップ値が得られており信頼性も十分であった。各領域を単独で用いた場合に、基準系統樹と同様の樹形を算出した領域はなかった。ブートストラップ値も低く、検討に値しうる樹形は得られなかった。複数領域をまとめた合成配列を用いた場合、tRNA（合計 1604 bp）から求めた系統樹は限られた末端部を除いてはブートストラップ値が低かった。異なる目に含まれる種がしばしば入り混じっており、基準系統樹との類似性は非常に低かった。rRNA（合計 2841 bp）から求めた系統樹は目ごとのまとまりは得られているものの、目間の分岐においてはブートストラップ値は低く、分岐関係が基準系統樹とは大きく異なっていた。ATP 系（合計 873 bp）から求めた系統樹は目ごとのまとまりはおおむね得られているが、ガンガゼ目がブンブク目に含まれるなど、明確に基準系統樹とは異なっていた。また近縁な属間を除いてはおおむねブートストラップ値が低く、50 未満を多分岐として処理した場合にはほとんどの分岐関係が不明となった。CO 系（合計 3030 bp）から求めた系統樹は目ごとのまとまりはおおむね得られているが、目間関係すなわ

ち目の分岐順は基準系統樹とは大幅に異なり、目間の分岐のブートストラップ値は低かった。ND 系（合計 6516 bp）から求めた系統樹は Arbacioida を除いては全体の構成は基準系統樹に近く、ほとんどの分岐におけるブートストラップ値が 50 を超えていた。ただし、Arbacioida の分岐位置は基準系統樹と一致せず、ブートストラップ値が低かった。

討論

基準系統樹の評価

基準系統樹は過去に示した系統樹⁵⁾ にフクロウニ目を含む新たなデータを追加して拡大解析したものであるが、既知の樹形との共通部分には変化がみられない。形態から推定されてきた系統関係やトランスクリプトームの解析から得られた系統関係⁴⁾ と整合性があることから十分に説得力のある系統樹であるといえる。

ウニ類の系統解析における情報量の意義

今回の再構成データの中で最も基準系統樹に近い樹形を得られたのは ND 系列から求めた系統樹であった。ND 系列の樹形は Arbacioida の分岐位置を除いては基準系統樹と一致する。当該分岐のブートストラップ値が低いことから、これを多分岐とみなせばトポロジーとしては基準系統樹と同一とみなすことが可能となる。配列長の短い個別の領域からは、目レベルの系統関係すら求めることはできなかった。3000 bp 前後となる rRNA や CO 系列の合成配列では目レベルのまとまりはおおむね得られているが、不十分な信頼性や混乱した目間関係しか得られてい

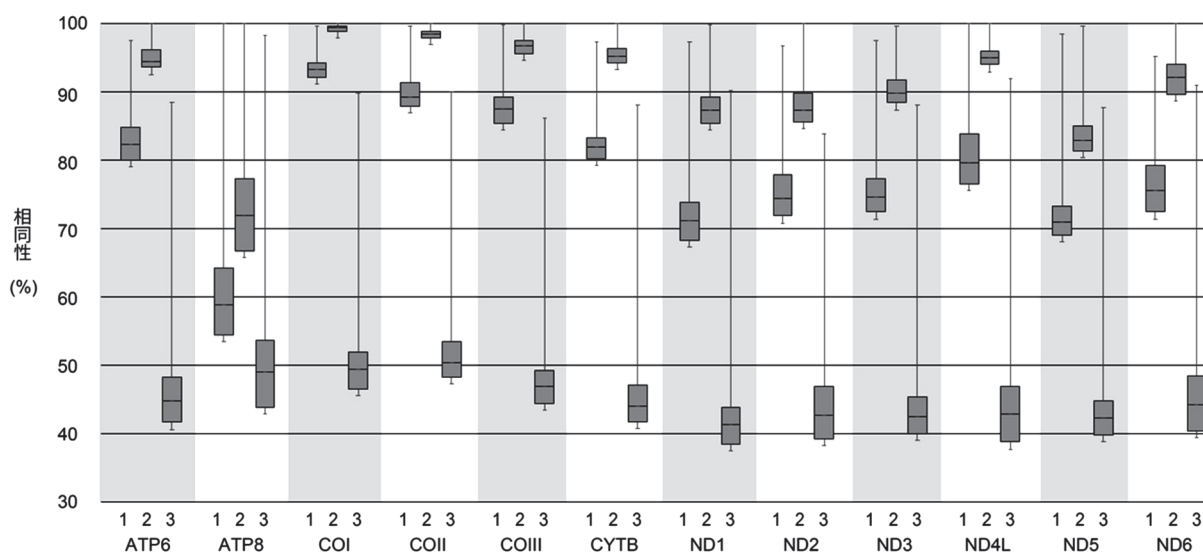


図 2. タンパク質コード領域の相同性の比較. 各領域を第 1-3 コドンに分けて相同性を箱ひげ図として示した. 使用した種の中に非常に近縁な 2 種が含まれたため, 最大値が大きく正方向に偏っている.

ない。唯一、6500 bp を超える ND 系列から求めた系統樹のみ基準系統樹に近い樹形が得られたという事実は、ウニ類の系統解析においては解析に用いる配列長、すなわち情報量が多いことが絶対的な必要条件であることを示しているであろう。

3rd コドンの評価

図2のコドンごとの相同性の違いから3rd コドンのみ明確に相同率が低いことがわかる。変異が飽和しているかどうかについては慎重な検討が必要だが、3rd コドンの変異率は領域を問わず40–50%程度で安定している。ウニの系統解析において3rd コドンを解析対象から外す事で樹形の安定性が高まる⁵⁾が、これは3rd コドンが他のコドンや領域とは大幅に異なる情報を持っている、すなわち突然変位の過剰な蓄積により系統情報をとどめていない可能性があるだろう。今回の再構成データでは基準系統樹を除いては3rd コドンを除いていないが3rd コドンがノイズとして働く可能性を考えると、これを除くことで解析精度が向上する可能性があるだろう。

過去の報告⁵⁾と本報告をもって、ウニの系統関係を推定する場合にミトコンドリアゲノム全体を再構築したデータを用いる事で検討に足る系統関係を得られることが明確になった。過去の研究において系統樹の信頼性が不十分であったため議論の展開が制限されていた事とあわせ、今後の研究において少数の遺伝子座の組み合わせから系統を求めることに意義を見出すことは難しいといって差し支えないであろう。今後のウニ類の系統解析においては、最低でもミトコンドリアゲノム全体、さらにはトランスクリプトームといったより規模の大きな解析手法が必要とされると思われる。

謝辞

本研究は2019年度年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成(RIIS201907)および神奈川大学共同研究奨励助成金による支援のもと行った。

文献

- 1) Littlewood DTJ and Smith AB (1995) A combined morphological and molecular phylogeny for sea urchins (Echinoidea: Echinodermata). *Philos. T Roy. Soc. B.* **347**: 213–234.
- 2) Stockley B, Smith AB, Littlewood DTJ, Lessios HA and Mackenzie-Dodds JA (2005) Phylogenetic relationships of spatangoid sea urchins (Echinoidea): taxon sampling density and congruence between morphological and molecular estimates. *Zool. Scr.* **34**: 447–468.
- 3) Smith AB, Pisani D, Mackenzie-Dodds JA, Stockley B, Webster BL and Littlewood DTJ (2006) Testing the molecular clock: molecular and paleontological estimates of divergence times in the echinoidea (Echinodermata). *Mol. Biol. Evol.* **23**: 1832–1851.
- 4) Mongiardino Koch N, Coppard SE, Lessios HA, Briggs DEG, Mooi R and Rouse GW (2018) A phylogenomic resolution of the sea urchin tree of life. *BMC Evol. Biol.* **18**: 189.
- 5) Wakayama N, Kiyono Y, Matsumono N, Saitoh M and Kanazawa K (2019) Effective DNA extraction methods for mitochondrial phylogenomics of the sea urchins. *Zoosymposia* **15**: 192–202.
- 6) Kanazawa K, Saitoh M, Wakayama N, Obuchi M, Nakachi S and Kroh A (2019) A project for analyzing the ecology and phylogeny of western Pacific echinoids. *Zoosymposia* **15**: 83–87.
- 7) Saitoh M, Kroh A, Bronstein O, Nakachi S, Obuchi M, Kiyono Y and Kanazawa K (2019) The echinoid fauna from middle and southern Japan: a preliminary report. *Zoosymposia* **15**: 123–128.
- 8) Katoh K and Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 772–780.
- 9) Darriba D, Posada D, Kozlov AM, Stamatakis A, Morel B and Flouri T (2019) ModelTest-NG: a new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models. *Mol. Biol. Evol.* **37**: 291–294.
- 10) Kozlov AM, Darriba D, Flouri T, Morel B and Stamatakis A (2019) RAXML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics* **35**: 4453–4455.