

希少種ベッコウトンボのプライマーの設計

静岡県立掛川西高等学校

自然科学部 2 年 榛葉大翔 森下蓮 松村征弥

1 目的

ベッコウトンボは環境省第 4 次レッドリストでは絶滅危惧 I A 類に指定されている。自然科学部が保護活動に参加している桶ヶ谷沼は県内唯一の生息地である。ここでは 1994 年に 879 頭確認されたのをピークに減少し、近年では 100 頭以下となり目視の観察は年々難しくなっている。そこで、水中や空気中に放出される DNA を環境 DNA として検出し、トンボの生存、生息域、生息環境の調査に役立てられれば、ベッコウトンボの保護に寄与できると考えた。生態学的調査では水中のヤゴや、遠くを飛翔するトンボの判別を目的とする。しかし、ベッコウトンボを特異的に判別できるプライマーは未だ無いと、神戸大学源利文先生から助言を頂いたため、羽化期が重なり稀に交雑が見られる近縁のヨツボシトンボとベッコウトンボを対象にプライマーの設計を行い、その有効性を明らかにすることとした。

(図 1)ベッコウトンボ (図 2)ヨツボシトンボ



2 桶ヶ谷沼

桶ヶ谷沼は静岡県磐田市の北東部に位置する淡水性の沼地である。水鳥や魚類、昆虫等多様な生物の生息地として知られている。沼縁にはアシやマコモをはじめとする抽水植物が幅広く生え、周囲は落葉広葉樹、照葉樹林、草生地、農耕地など起伏の富んだ多様な環境に恵まれている。また、ベッコウトンボの県内唯一の生息地としても知られており、確認されたトンボは述べ 71 種を数える。1991 年には県内最多種のトンボの生息地として県の自然環境保全地域にも指定されている。現在では人工池を活用したベッコウトンボの保全活動が行われている。そのため全国的に個体数や産卵場所が減少する現在において桶ヶ谷沼は非常に貴重な環境である。さらに桶ヶ谷沼の北には東名高速道路、南には国道 1 号線が通り、主要道路に囲まれた区域となっている。沼地周辺が経済的好立地でありながら自然環境が維持されており、保全活動がされてきたという歴史を併せて考えても貴重な沼地である。

(図 3)桶ヶ谷



3 保全活動への参加

桶ヶ谷沼では NPO 法人「桶ヶ谷沼を考える会」や NPO 法人静岡県自然史博物館ネットワークの福井順治先生を中心にベッコウトンボの保護活動が行われてきた。神奈川トンボ調査・保全ネットワークも活動に参加しており、ベッコウトンボの生息地としての湿地環境の保全も行われている。本校自然科学部はそれらの保護活動に少しでも寄与したいと考え、2020 年から桶ヶ谷沼へ足を運び、活動に参加させていただいている。

(1) 抽水植物の浚渫

桶ヶ谷沼は沼縁がアシやマコモなどの抽水植物に覆われている。ベッコウトンボの産卵には植生遷移が進む途中段階の、開放水面がまばらに残る水面が必要である。桶ヶ谷沼ではベッコウトンボの産卵を促進するため抽水植物の浚渫作業による開放水面の確保が行われており、本校自然科学部は2021年4月3日に行われた活動に参加した。浚渫は水面を覆うアシやマコモなどの抽水植物の根を除去する作業のことで鎌を使って行った。抽水植物の根は30cm四方ずつに切り出して少しずつ除去していき、抽水植物で覆われていた場所に3㎡ほどの水面の見える部分を整備し、ベッコウトンボの産卵場所とした。作業から3か月後には神奈川トンボ調査・保全ネットワークの活動によってベッコウトンボの産卵が確認されている。さらにカキツバタが咲いている様子も確認でき、湿地環境における植生の変化も確認することができた。

(2) 人工池「甕塚の水辺」の整備

桶ヶ谷沼では2011年に「甕塚の水辺」という人工池が造成された。そこにはトンボのヤゴが産卵できるように水を張ったコンテナが150個並べられており、そのうち50個はベッコウトンボが産卵できるように整備されている。本校自然科学部は人工池での活動にも参加させていただき、産卵環境の整備を行った。コンテナ内の水を全て捨て、雨水を溜められるようにした。雨水を溜めた後は浚渫の際に切り出した抽水植物の根を再利用し産卵後にヤゴが生育できる環境を整備した。人工池は沼から離れており、また切り出した抽水植物の根は水分を含んでいて重く、産卵環境を整備することの大変さを実感した。

(3) 外来生物・対象種以外の種の防除

ベッコウトンボのヤゴを育成するためのコンテナを整備するとその環境の良さから他種のトンボも流入し、競合してしまう。そのためコンテナにネットをかけることで、多種のトンボとの競合による生息数の減少を防げるようにした。

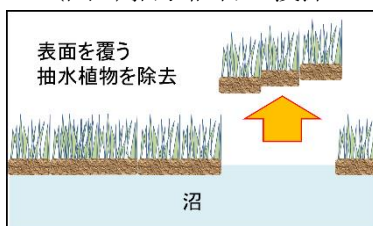
(4) 羽化の準備

人工池「甕塚の水辺」で生育したヤゴは羽化期を迎えた際、羽化のときにつかまる止まり木が必要になる。しかし「甕塚の水辺」はコンテナを並べて作られているので止まり木を人工的に用意する必要がある。本校自然科学部が活動に参加したときは桶ヶ谷沼に自生しているセイタカアワダチソウの枯れ枝を、1つのコンテナにつき3～5本程度立て、羽化できるようにした。

(5) ベッコウトンボの定量調査

人工池ではベッコウトンボのヤゴの定量調査が行われている。本校自然科学部は福井順治先生が中心に行っている定量調査に立ち会い、ベッコウトンボのヤゴを観察することができた。立ち会ったのは2021年10月17日の活動で、100匹以上の個体を確認することができた。

(図4) 抽水植物の浚渫



(図5) 羽化の準備



(図6) 産卵環境の整備



(6) トンボとの触れ合い

桶ヶ谷沼に定期的に通うことで多くのトンボと触れ合うことができた。本校自然科学部が活動に参加し、整備を行った人工池「甕塚の水辺」ではベッコウトンボとその近縁種ヨツボシトンボの羽化の様子を観察することができた。

4 プライマーの設計

プライマーとは DNA 複製の起点となる短鎖 DNA である。分離した二本鎖 DNA のそれぞれに対応した塩基と結合し、両プライマーに囲まれている領域がターゲット DNA となる。この領域は PCR 法を用いることで増幅することができる。

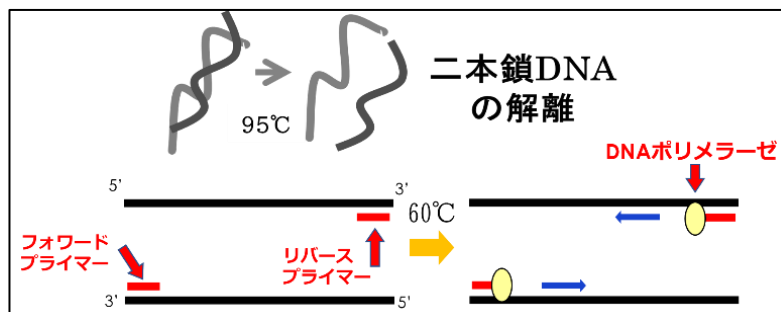
PCR 法 (ポリメラーゼ連鎖反応法)

は、少量の DNA から同じ DNA を大量に複製する方法であり、DNA の解析などには必要不可欠な手法である。原理は以下の通りである。

- (1) [変性] DNA 溶液を約 95℃ に加熱し、DNA を二本鎖に分離する。
 - (2) [アニーリング] 50~60℃ に下げて二本鎖に分かれた DNA にプライマーを結合させる。
 - (3) [伸長] 約 72℃ で DNA ポリメラーゼが働き、各ヌクレオチドを材料に DNA が複製される。
- この (1) ~ (3) の操作を繰り返すことで領域内の DNA が複製されていく。

この (2) の操作で、目的の種にのみ存在する種特異的な塩基配列と対応するプライマーを用いることで、PCR 法を用いて種の判別を行うことが可能となる。ベッコウトンボと、その近縁種であり羽化期が一致するヨツボシトンボのプライマーの設計を行った。NCBI に記載されており種の判別に適した COI 遺伝子領域 (シトクローム c オキシダーゼ・サブユニット I の遺伝子領域) の塩基配列を増幅することを目的とした。まず 2 種の塩基配列を比較して特異性がある箇所を検討し、その際に EXCEL を利用した。塩基配列を関数で文字列を 1 文字ごとと分解、条件付き書式で塩基ごとに着色することで相違箇所を可視化し (図 8)、一般的なプライマーの条件の GC 含量や Tm 値などの試行錯誤を重ね、2 ヶ月かけて最適なプライマーを検討した (図 12~15)。

(図 7) 産卵場所の整備



(図 8) 相違箇所の可視化

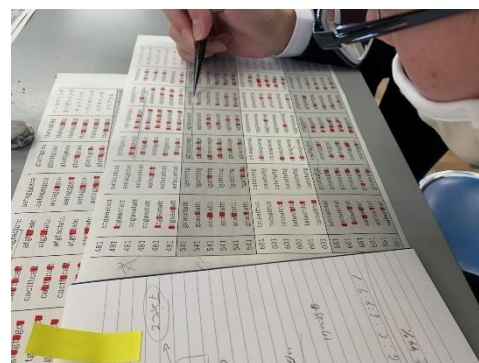
ルール (表示順で適用)	書式	適用先	条件を満たす場合は停止
セルの値 = "a"	Aa ああアア亜宇	= \$A\$1:\$A\$1:\$XFD\$1:\$2:\$1048576	☒
セルの値 = "c"	Aa ああアア亜宇	= \$A\$1:\$A\$1:\$XFD\$1:\$2:\$1048576	☐
セルの値 = "t"	Aa ああアア亜宇	= \$A\$1:\$A\$1:\$XFD\$1:\$2:\$1048576	☐
セルの値 = "g"	Aa ああアア亜宇	= \$A\$1:\$A\$1:\$XFD\$1:\$2:\$1048576	☐

(図 9) 設計に使用した塩基配列

※斜線太字は本研究でベッコウトンボのプライマーにした配列

ctcatatagc	c	t	c	a	t	a	t	a	g	c	c	c	t	c	c	t	t	a	c	t	a	t	g	g	c	t	c	t	870	ベッコウトンボ				
ctcatatagt	c	t	c	a	t	a	t	a	g	t	c	c	t	t	c	c	t	t	a	t	t	a	t	g	a	g	c	t	c	t	870	ヨツボシントン		
aggatttgta	a	g	g	a	t	t	g	t	g	t	a	t	t	t	a	c	a	a	t	t	g	a	g	a	g	a	g	a	g	a	g	900	ベッコウトンボ	
aggatttgta	a	g	g	a	t	t	c	g	t	a	t	t	c	t	t	a	c	a	a	t	t	g	a	g	a	g	a	g	a	g	a	g	900	ヨツボシントン
cttaacagg	c	t	t	a	a	c	a	g	a	g	a	g	t	a	g	t	a	c	t	a	g	c	a	a	a	t	t	c	c	t	c	930	ベッコウトンボ	
tttaacagg	t	t	a	a	c	a	g	a	g	a	g	t	a	g	t	a	t	t	a	g	c	a	a	a	t	t	c	c	t	c	c	930	ヨツボシントン	
aattgatatt	a	a	t	t	g	a	t	a	t	t	a	c	a	t	t	a	c	a	t	g	a	t	a	c	t	t	a	t	a	a	960	ベッコウトンボ		
aattgatatt	a	a	t	t	g	a	t	a	t	t	a	c	a	t	t	a	c	a	t	g	a	t	a	c	t	t	a	t	a	a	960	ヨツボシントン		
tgttgtgcc	t	g	t	t	g	t	t	g	c	c	a	c	t	t	c	a	c	t	a	t	g	t	f	a	c	t	a	t	c	990	ベッコウトンボ			
tgttgtgct	t	g	t	t	g	t	t	g	c	t	c	a	t	t	t	c	c	a	t	t	a	t	g	t	t	t	t	a	t	c	990	ヨツボシントン		
aataggggc	a	a	t	a	g	g	g	c	a	g	t	a	t	t	t	g	c	a	a	t	t	a	t	a	g	a	g	t	g	1020	ベッコウトンボ			
aataggggc	a	a	t	a	g	g	g	c	a	g	t	a	t	t	t	g	c	a	a	t	t	a	t	a	g	a	g	t	g	1020	ヨツボシントン			

(図 10) プライマーを設計する様子



研究で使用した一般的なプライマーの条件は以下の通りである。

- (1) プライマーの長さを18～30塩基以内にする。
- (2) FプライマーとRプライマーのT_m値の差を3℃以内にする。
- (3) アニール温度がF・Rプライマーのうち、T_m値の低い方より2～3℃低くする。
- (4) GC含量が40%～60%である。
- (5) プライマー内で4塩基以上の連続した同一塩基配列・反復配列を避ける。
- (6) プライマー間で3塩基以上の相補的結合を避ける。
- (7) ATリッチ構造とGCリッチ構造のバランスが取れている。

設計したベッコウトンボのプライマー(図11)の概要は以下の通りである。

- (1) Fプライマー、Rプライマーともに25塩基にした。
- (2) FプライマーとRプライマーのT_m値の差は3.3℃となった。
- (3) アニール温度はF・Rプライマーのうち、T_m値の高い方よりも0.5℃高くなった。
- (4) GC含量は、Fプライマーが40%、Rプライマーは32%となった。
- (5) 4塩基以上の連続した同一塩基配列・反復配列を避けることができた。
- (6) 3塩基の相補的結合が数カ所見られた。
- (7) ATリッチ構造とGCリッチ構造のバランスは取ることができた。

(図11) 設計したベッコウトンボのプライマー

【ベッコウトンボ】

Fプライマー	5' -CTATGGGCTCTAGGATTTGTATTTC-3'
860～884 (25mer)	GC含量：40% T _m 値：62.5℃
Rプライマー	5' -TATTGATAGTACATAGAGAAAGTGG-3'
970～994 (25mer)	GC含量：32% T _m 値：59.2℃ [増幅長：135bp]

設計したヨツボシトンボのプライマー(図12)の概要は以下の通りである。

- (1) プライマーは29塩基、Rプライマーは31塩基となった。
- (2) プライマーとRプライマーのT_m値の差は0.8℃となった。
- (3) アニール温度はF・Rプライマーのうち、T_m値の低い方よりも2.3℃低くなった。
- (4) GC含量は、Fプライマーが38%、Rプライマーは35%となった。
- (5) 4塩基以上の連続した同一塩基配列は2箇所見られた。
- (6) 3塩基の相補的結合が数カ所見られた。

(図12) 設計したヨツボシトンボのプライマー

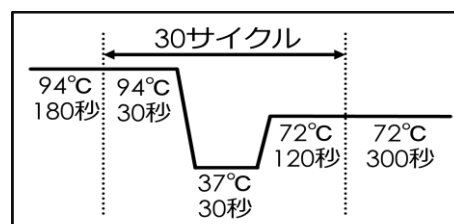
【ヨツボシトンボ】

Fプライマー	5' -CCTTATTATGAGCTCTAGGATTCGTATTTC-3'
855～883 (29mer)	GC含量：38% T _m 値：66.2℃
Rプライマー	5' -GCCCCATTGATAAACATAATGGAAATGAG-3'
969～999 (31mer)	GC含量：35% T _m 値：67.0℃ [増幅長：145bp]

5 プライマーの有効性の確認方法

設計したプライマーの有効性を確認するために、ベッコウトンボとヨツボシトンボの胸筋と飼育水から得た試料から、2種のプライマーが種に特異的に増幅し目的の塩基長のバンドが得られるかを確認した。DNA抽出液2 μ LにDNAポリメラーゼとしてKOD one Master Mix 25 μ L、本研究で設計したベッコウトンボ、またはヨツボシトンボのプライマーを2 μ L加え、蒸留滅菌水で50 μ Lに調製した。その後、2%アガロースゲルを用いて電気泳動法でDNAの増幅を確認した。胸筋については、保護活動の際に死骸を頂き用いた。ヨツボシトンボの飼育水は、2月に桶ヶ谷沼から本校に持ち帰ったヤゴの水槽に6月に羽化していない個体があったことから、ガラス繊維濾紙により吸引濾過し増幅のための試料を得た。

(図13) 本研究で使用した温度サイクル



(図14) ヨツボシの飼育水



(図15) 胸筋を採取する様子

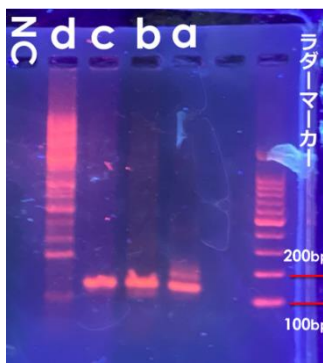


6 結果と考察

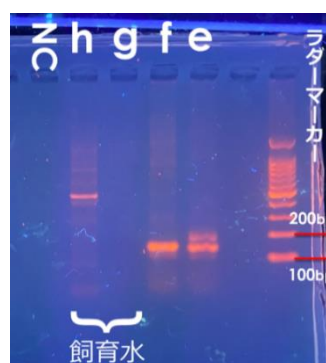
ベッコウトンボのプライマーを用いた増幅では、ベッコウトンボの胸筋から増幅長100bp~150bpの間にバンドが確認され(図16中のa)、近縁であるヨツボシトンボの胸筋からバンドは得られなかった(図16中のb)

ヨツボシトンボのプライマーを用いた増幅では、ヨツボシトンボの胸筋からさらに長い200bp以下のバンドが確認できた(図16中のc)が、ベッコウトンボの胸筋も増幅した(b)。ヨツボシトンボの飼育水については、ヨツボシトンボのプライマーを用いた混合液からバンドを確認することができず(図17中のe)、ベッコウトンボのプライマーからもバンドは確認されなかった(図17中のf)。ヨツボシトンボのプライマーはヨツボシトンボに対しては特異性を実証できなかったが、特異性が確認できたベッコウトンボのプライマーと併用することで2種の識別が可能となる。ヨツボシトンボのプライマーがベッコウトンボのDNAも増幅してしまった原因として、プライマーの

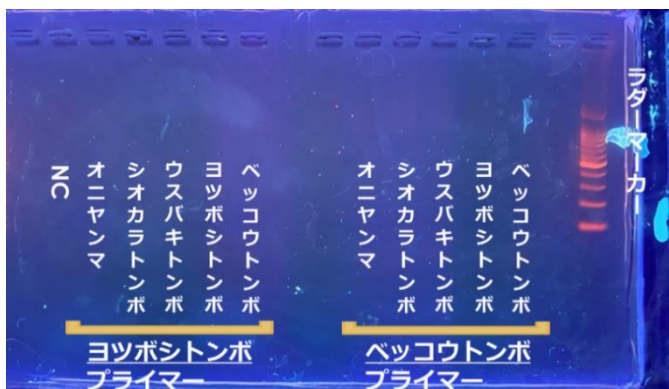
(図16) 胸筋 実験結果



(図17) 飼育水 実験結果



(図18) 各種胸筋 実験



GC含量の不足、同一塩基が4塩基連続しているなど設計上の問題点があった。NCBIに記載されているベッコウトンボ・ヨツボシトンボC01遺伝子領域や、他のデータベースが少なかったため、プライマー設計において一部の条件を妥協せざるを得なかった。また、本校付近で捕獲したショウジョウトンボ、シオカラトンボ、オニヤンマからも胸筋を採取し、設計したベッコウ・ヨツボシ両種のプライマーをそれぞれ用いて実験を行ったが、増幅はされていない。この実験でベッコウトンボやヨツボシトンボの胸筋から増幅を行えなかった原因は、前実験から長期間経過していたことによる死骸の劣化や、胸筋の可採部位が少なかったことが考えられる。

7 反省と課題

本実験でベッコウトンボの CO I 領域を増幅することが出来たが、判別の精度を上げるには他の領域を模索する必要がある。また、ベッコウトンボと生息環境が重なるヨツボシ以外のトンボの CO I 領域も、今回設計したプライマーを用いて増幅されないかどうかを確認する必要があり、それが確認できれば、羽化時期だけでなく、水中のヤゴにも有効である。現在は、桶ヶ谷沼の甕塚に設置されているコンテナで採水を行い、DNA の増幅が行えるか検討している。

本校では昨年度までに空中粒子採取装置が制作され、フクロウやマツタケの空中環境 DNA の検出にも成功している。現在ベッコウトンボの飛翔時間帯にあわせて稼働する装置の開発も行っており、そこでの活用がまだできていない。ベッコウトンボの空中環境 DNA を生息環境から検出できれば生息地の特定に繋がるため、希少種の保全のために研究を進めていきたい。

8 参考文献

- (1) 高橋 純一・福井 順治・椿 宜高

「静岡県桶ヶ谷沼地域における 絶滅危惧種ベッコウトンボ (*Libellula angelina*) の遺伝的多様性」
保全生態学研究 (Japanese Journal of Conservation Ecology) 14 : 73-79 (2009)

京都大学生態学研究センター・静岡県立磐田南高等学校

- (2) 福永健一・富田正章・澄田和歌子・歳弘克史・手島義人・片山淳

山口県環境保健研究センター「ヨツボシトンボの遺伝子解析から見たベッコウトンボの保護」

- (3) ThermoFisher SCIENTIFIC. 「PCR 反応条件における 6 つの注意点」.

<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html>

- (4) LATB Staff. ThermoFisher SCIENTIFIC. 「PCR 初心者必見！プライマーの設計で守るべき 10 のオキテ」 (2015/8/27)

<https://www.thermofisher.com/blog/learning-at-the-bench/10-tips-for-pcr-success/>

- (5) ThermoFisher SCIENTIFIC. 「Tm calculator」

<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/-calculator.html>

- (6) Clontech TaKaRa cellartis. 「リアルタイム PCR のプライマー設計について」

https://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100004242

- (7) 静岡県立掛川西高等学校自然科学部 「空中環境 DNA を使った鳥類調査法の確立を目指して」

<https://gakusyu.shizuoka-c.ed.jp/science/sonota/ronnbunshu/h30/183184.pdf>

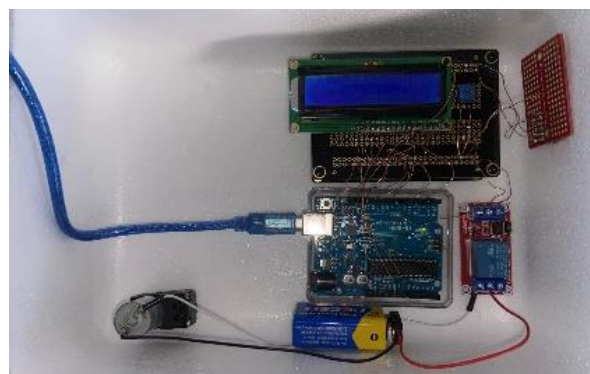
- (8) 株式会社生物技研 「環境 DNA の解析 FAQ」

<https://gikenbio.com/dnaanalysis/ngs/environment/>

(図 19) 採水を行った桶ヶ谷沼の「甕塚の水辺」



(図 20) 改良中の空中微粒子採取装置



(9) 「日本のトンボ 改訂版」尾園暁 川島逸郎 二橋亮 文一総合出版

