

〈第 31 回 山崎賞〉

12. mtDNA におけるゲンジボタル地域差

静岡県立掛川西高等学校
二年 良知亜里紗 他 6 名

1 動機

近年、ゲンジボタルについて DNA の塩基配列による分類がなされるようになった。ゲンジボタルの遺伝子は西日本側と東日本側で異なることが分かっており、その境界は神奈川県と静岡県の間にあることが知られている。私たちは静岡県東部地域にゲンジボタルの分布の境界があるのではないかと考え、ミトコンドリア ND5 遺伝子配列を用いて静岡県内のゲンジボタル分布調査を進めることにした。

2 実験内容

(1) 概略

研究は 2 年にわたり行っている。昨年は静岡県掛川市倉真、菊川市西富田、函南町の 3 ヶ所でゲンジボタルを採集し、静岡大学徳元教授のご指導の下、DNA の採取・精製・増幅を行い、DNA 解析を行った。

今年度は新たに伊豆市土肥、沼津市戸田、沼津市西浦のゲンジボタルの採集を試みた。残念ながら西浦では風が強く、ホタルの発光は見られたが採集することは出来なかった。DNA の採取・精製・増幅は全て高校内で行い、DNA 実験プロトコルを確立した。

(2) ゲンジボタルの採集

2 日間の採集により沼津市戸田（6 月 2 日）から 12 個体、伊豆市土肥（6 月 2 日）から 9 個体を採集できた。沼津市西浦（6 月 14 日）ではホタルの発光は見られたが、足場が悪い事と、風が強くホタルがほとんど飛ばなかったことから、採集ができなかった。採集したゲンジボタルはエッペンドルフチューブに入れ、アルコール保存をした。またゲンジボタルの保護と、交尾による DNA の混入を防ぐため、産卵にかかわるメスは避けオスのみを採集した。

(3) ゲンジボタル胸筋の採取

DNA 解析にはゲンジボタルの胸筋を使用し、胸筋は以下の方法で取り出した。余分な DNA の混入を防ぐため、ゲンジボタルの個体は 1 匹ずつ無菌状態で解剖した。使用した器具・試薬も、すべて滅菌して使用している。

- ① ゲンジボタルをリン酸バッファーで満たしたシャーレに入れる。
- ② ゲンジボタルの頭部を切り離し、脚をすべて取り除いた後、腹部から胸部の外骨格を取り除く。この段階で白っぽい繊維状の胸筋が確認できる。
- ③ 胸筋を回収し、あらかじめリン酸バッファーを入れておいたエッペンドルフチューブに入れ保存する。

(4) DNA 精製

具体的な精製方法を以下に示す。また実験の後半にはホモジェナイズは必要ないこともわかったため、その過程を省いている場合もある。

- ① バイオマッシャーに採集した筋肉の半分ほどを入れ、以下の溶液を 1 本あたり 60 μ l 入れ、バイオマッシャーのスティックでホモジェナイズした。(ホモジェナイズ用バッファー組成 Tris-HCl 10mM、NaCl 150mM、EDTA 10mM)
- ② ホモジェナイズ後、以下の組成の溶液を 1 本あたり 120 μ l 加え、さらにプロテアーゼ K を 1 本あたり 25 μ l ずつ加え、55°C で 12 時間以上インキュベートした。(プロテアーゼ K 用バッファー組成 Tris-HCl 10mM、NaCl 150mM、EDTA 10mM、SDS 0.75%)
- ③ フェノールクロロホルム溶液を 1 本あたり 200 μ l 加え、タンパク質とフェノールクロロホルムをよく触れさせるために繰り返しボルテックスをして攪拌した。この後、-20°C で 5 分間冷却し、-10°C、14,000rpm で、1 分間冷却遠心分離機にかけ、上澄みの DNA を含む水層 100 μ l をマイクロピペットで吸い出し、新しい 1.5mL エッペンドルフチューブに移した。この操作を最低 2 回繰り返した。タンパク質層が明らかに残っている場合、この操作をさらに繰り返した。
- ④ 5.0M・NaCl 溶液を 1 本あたり 50 μ l 加え、同時に 100%エタノールを 400 μ l 加えた。よく攪拌し、冷却遠心機を使って 9,000rpm で 5 分間 DNA を沈殿させた。上部の溶液を吸い取って捨て、沈殿だけを残し、ここに冷却した 80%エタノール 200 μ l を加え、軽く攪拌した。その後、再度 9,000rpm で 5 分間 DNA を沈殿させて、上澄みを吸い取り捨て室温で 5 分ほど乾燥させた。エタノールが飛んでしまったら、Tris-HCl 10mM (pH 8.0) をそれぞれのチューブに 100 μ l 加え、DNA を溶解させた。

(5) DNA 増幅

ア PCR 条件

DNA 増幅には PCR 法を用いた。GINGKO 社のサーマルサイクラーを使い、94°Cで5分間のアニーリング、55°Cで30秒間のプライマー結合、72°Cで1分間のDNA伸長反応を40回繰り返した。PCR法に用いた溶液は以下の通りである。

| PCR溶液に添加する溶液等 | 1検体あたり |
|-------------------------|--------|
| PCR Buffer KOD-Plus | 5 |
| 2mM dNTPs | 5 |
| 25 mM MgSO ₄ | 2 |
| プライマー1 | 0.15 |
| プライマー2 | 0.15 |
| 精製したDNA | 5 |
| KOD-Plus | 1 |
| 水 | 31.7 |
| 合計 | 50 |

表1 PCR法に用いた溶液

イ DNA 増幅の確認

目的の大きさのDNA（今回は909塩基対）が増幅できたかを確認するため、増幅したDNAを電気泳動で分析した。具体的には以下の方法で行った。

- ① アガロースゲルSをTAE（Tris-HCl、酢酸、EDTA）バッファーを使って1.5%の濃度で作製し、電気泳動用のゲルとした。
- ② TAEバッファーで満たした泳動槽に作製したゲルを入れ、ウェル（穴）の中に増幅したDNAサンプルを入れた。DNAサンプルは増幅したDNAからそれぞれ増幅したDNA10 μ lとし、DNA染色蛍光試薬であるミドリグリーンダイレクトを2 μ lずつ加え、ウェルにはこの中から2 μ lを入れた。この際、同じ泳動条件でDNAの移動度を確認するため、DNAの分子量マーカー（ラダーマーカー）を同時に入れた。
- ③ 100Vで30分間電気泳動をした。
- ④ 泳動したゲルを取り出し、570nmのブルーライトで蛍光を確認した。

(6) DNA 解析

DNAのシーケンス解析は、静岡大学の徳元研究室にお願いしている。分析方法はダイ-ターミネーター法である。

3 結果

倉真のゲンジボタルの塩基配列（5 個体分）、西富田のゲンジボタルの塩基配列（2 個体分）、土肥のゲンジボタルの塩基配列（6 個体分）、戸田の塩基配列（3 個体分）の DNA シーケンサの結果を論文に示した。2014 年解析の個体は、共通して 1～748 塩基まで読むことができています。例として倉真 1 個体と戸田 1 個体の結果のみを以下に示す。塩基配列の色分けは、東日本によくみられる塩基パターンを青、西日本によくみられる塩基パターンを緑で表している。

```
( Kurami2013 ) 201409-ND5f-4 2013 年採集・2014 年解析
211 280
ATATCATAATTTAATGAACGTCAGGATATTCGTATATAGGTTCTTAATTAATTTATGCCITTA
281 350
CTTGACTTTTTTAATATTTCTAATTTTTCTTTATGGGTTGCCITTTTTAGCTGGGTTTTATTCTAA
351 420
GGATTTAATTTAGAAATTTTTCTATGAATTATATAAATATATTTATTAATTTATTTTATATTCA
421 490
ATTGGGTTAACGTCAGGATACCTTCGTTTATGTTATTATTCAATTTACAGGGTATAAATTTTATA
491 560
TATTAATAATTTAAGAGCAAGGTAATAATTAATAAGGGAATAAGGGGCTATTTATTAGTTAT
561 630
TTTTGGAGGTAGAACTTTCTTGAATAATTTTCTACACCTATTTTATTGTTACCGTTAAGTTTA
631 700
AAGATAATAGTTATTTTTGTATTATATTTGTTTATGGGTAGGATATGAATTTCTAATTTTGGATATA
701 748
ATCATGATCTAAATCAATAAATTTATTGGTTATTAGTTATTTTTTT
```

図 1 倉真 1 個体の結果

```
( Neda2014 ) 201409-ND5f-2 2014 年採集・2014 年解析
211 280
ATATCATAATTTAATGAACGTCAGGATATTCGTATATAGGTTCTTAATTAATTTATGCCITTA
281 350
CTTGACTTTTTTAATATTTCTAATTTTTCTTTATGGGTTGCCITTTTTAGCTGGGTTTTATTCTAA
351 420
GGATTTAATTTAGAAATTTTTCTATGAATTATATAAATATATTTATTAATTTATTTTATATTCA
421 490
ATTGGGTTAACGTCAGGATACCTTCGTTTATGTTATTATTCAATTTACAGGGTATAAATTTTATA
491 560
TATTAATAATTTAAGAGCAAGGTAATAATTAATAAGGGAATAAGGGGCTATTTATTAGTTAT
561 630
TTTTGGAGGTAGAACTTTCTTGAATAATTTTCTACACCTATTTTATTGTTACCGTTAAGTTTA
631 700
AAGATAATAGTTATTTTTGTATTATATTTGTTTATGGGTAGGATATGAATTTCTAATTTTGGATATA
701 748
ATCATGATCTAAATCAATAAATTTATTGGTTATTAGTTATTTTTTT
```

図 2 戸田 1 個体の結果

DNA シーケンサの結果から分類すると次の表のようになる。

| | | |
|------|---------|----------|
| 東日本型 | 土肥 6 個体 | 戸田 3 個体 |
| | 田代 1 個体 | 西富田 1 個体 |
| 西日本型 | 倉真 4 個体 | 西富田 2 個体 |

表 2 分類

4 考察

土肥 6 個体、戸田 3 個体はいずれも函南町のゲンジボタルの DNA の塩基配列に近いので、土肥・戸田のゲンジボタルは東日本型の遺伝子を持つと考えられる。昨年からの分析を総合して、伊豆半島のゲンジボタルは東日本型の遺伝子を持つだろうと考えられている。



図3 結果を地図上に示したもの

また、昨年の実験で西富田は西日本型の遺伝子をもつという結果が出ていた。今年の DNA 解析では西日本型と東日本型の特徴を持つ個体が両方現れた。これが、私たちが実験過程で操作を誤ったからなのか、実際に西富田に東日本型の遺伝子を持つゲンジボタルが存在しているからなのかはわかっていない。

5 今後の課題

富士、沼津、静岡のゲンジボタルを採集し、塩基配列がどちら側に属しているのかを調べてみたい。また、東日本型が見られた西富田のゲンジボタルについて再調査したい。

6 謝辞・参考文献

実験に様々な助言、助力をしていただいた静岡大学徳元教授に心よりお礼申し上げます。この実験は科学技術振興機関・中高生の科学部活動振興プログラムの助成を得て実施しています。

戸田でのゲンジボタル採集に協力していただいた現地の長倉建治さんにも深く感謝いたします。

ミトコンドリア ND5 遺伝子の塩基配列から推定されたゲンジボタルの種内変異と分子系統

昆蟲.ニューシリーズ 4 (4) ,117-127,2001-12-25

吉川 貴浩・井出 幸介・窪田 康男・中村 好宏・武部 寛・草桶 秀夫