

mtDNA によるゲンジボタルの分布境界域IV

静岡県立掛川西高等学校 自然科学部

チームルキオラ 1年 横井佑美 井上遥翔 杉山亮太
江崎梨香子 後藤竜弘 杉山慶
鈴木虹宇 中山敬斗 塚澤祐太
早川魁人 山下英紀 早津佑真

1 はじめに

ゲンジボタルは発光間隔の違いから、フォッサマグナ地帯を境に西日本型と東日本型に分かれるとされている。掛川西高校自然科学部では4年前からゲンジボタルのミトコンドリアND5 遺伝子のDNA 遺伝子解析を行い、解析結果から分布境界を探ろうとしてきた。昨年までの先輩たちの研究で神奈川県と静岡県の県境にあるとされていた分布境界を、より西の静岡県東部に存在することを突き止めている。私たちは境界域をさらに縮め、ゲンジボタルの分布や広がり方法が推定することを目標にして学校周辺のゲンジボタルについて解析した。

2 実験方法

(1) 採集場所と解析個体

2016年に採集	静岡県	袋井市	国本 (6個体)	5月
		掛川市	滝ノ谷(2個体)	6月, 入山瀬(3個体) 5月
		菊川市	沢水加(7個体)	5月
		御前崎市	新野 (5個体)	5月, 朝比奈(8個体) 5月
		牧之原市	菅ヶ谷(5個体)	5月
2015年に採集	静岡県	掛川市	倉真 (5個体)	6月
		菊川市	牛淵 (1個体)	6月
		静岡市	黒川 (4個体)	6月
2014年に採集	静岡県	伊豆市	土肥 (3個体)	6月

私たち自身で採集したものは静岡県掛川市入山瀬、滝ノ谷の2か所で、2015年、2014年の個体は全て先輩が採集したものである。

(2) 胸筋の取り出し

ミトコンドリアDNAは胸筋から取り出した。胸筋は以下の方法で採取している。他の個体のDNAの混入を防ぐため、ピンセットは洗浄、滅菌したものを1個体に2本使用した。

- ① エッペンドルフチューブに保存したゲンジボタルを取り出し、リン酸バッファーを入れたシャーレの中へ入れる。
- ② 双眼立体顕微鏡をのぞきながらゲンジボタルの頭部と脚を切り離し、胸部を覆う外骨格を取り除く。
- ③ 外骨格の内側に白っぽい繊維状の胸筋が見えるのでピンセットで取り出し、リン酸バッファーを入れた1.5mlのエッペンドルフチューブに入れて保存する。

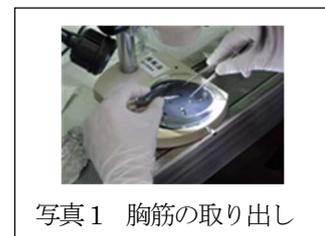


写真1 胸筋の取り出し

(3) DNAの抽出

2016年に発売されたYeastern Biotech Co. Ltd社のDNA抽出試液UniversAll™Extraction buffer IIを用いた。これによって昨年まで行っていたDNAの精製を行わずにDNA増幅の試料を作成することが可能となった。

- ① 1.5mlのエッペンドルフチューブに30 μ lのUniversAll™Extraction buffer IIを入れ、採取したゲンジボタルの胸筋を数本入れて、ボルテックスを行う。

- ② スピンドアウン後 95°Cで 10 分加熱する。
- ③ ボルテックス 5 秒の後もう一度スピンドアウンを 5 分間行う。
上澄み液の 1 μl を DNA 増幅の試料とした。

(4) DNA の増幅

PCR 用プライマーの選択

プライマーは参考文献と同じものとした。ゲンジボタルの mtND5 遺伝子増幅用で、塩基配列は次の通りである。

F-primer 5'-TAATTCGTTTTAATTTTTGTTTTAG-3'

R-primer 5'-AAAATAAAATAAACCTTTAAACTATTAT-3'

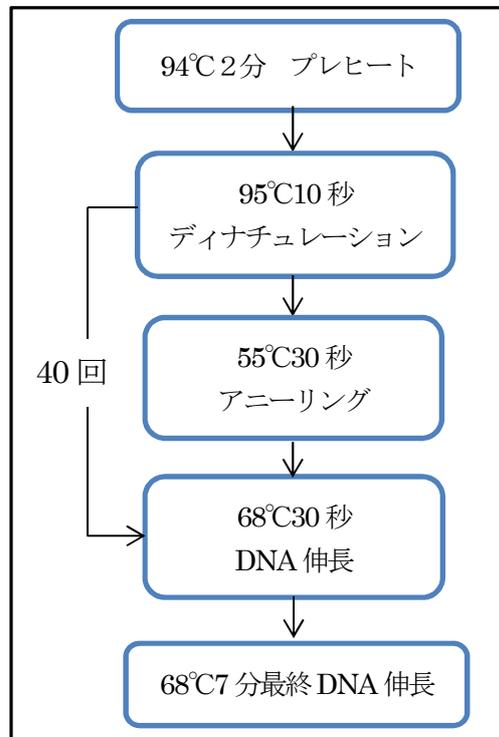
PCR 条件

T-heater 社 Personal サーマルサイクラーを使って、右下のようなサイクルで増幅を行った。PCR 酵素キットは高精度の TOYOBO 株式会社の KOD plus Neo を用いたかったが、うまく増幅しなかったため同じ会社の KOD Fx Neo を使っている。

PCR 反応液は表の組成で行った。

PCR 溶液に添加する溶液等	1 本あたりの組成
滅菌水	10 μl
2×PCR Buffer for KOD Fx Neo	25 μl
2mM dNTPs	10 μl
25mM MgSO ₄	2 μl
プライマー-F	1.5 μl
プライマー-R	1.5 μl
試料の DNA	1 μl
KOD Fx Neo	1 μl
合計	52 μl

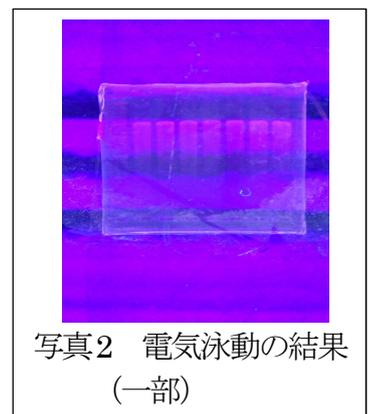
表 1 PCR 反応液の組成



(5) DNA 増幅の確認

目的の大きさの DNA が増幅できたことを確認するため増幅した DNA を電気泳動により分析した。具体的には次の方法で実施した。

- ① TAE バッファー 33ml にニッポンジーン社製のアガロースゲル S を 1 錠加えたものをオートクレーブ 105°C で 1 分加熱し、溶解して固め、ゲルを作る。
- ② TAE バッファーで満たした泳動槽の中に作製したゲルを入れ、ウェルの中に PCR で増幅した DNA 5 μl とラダーマーカー 1 μl を入れる。
- ③ 100V で 30 分間電気泳動をし、DNA 染色液ゲルレッドにより染色する。



DNA の増幅を電気泳動により確認できた物のみ、シーケンシングした。DNA のシーケンシングは macrogen 社に依頼した。

4 結果

DNA シーケンス結果から各個体の SNP (一塩基多型) のみ取り出したものを図 1 に示す。同じ塩基を持つゲンジボタルが多く存在したため、この中で最も多くの出現した SNP パターンを①, 次に多かったパターンを②と表した。今回調査した中で①か②のパターンを示した個体が 28 個体あり、この 2 パターンの個体で全体の 60% 近くを占めている。また、①、②以外のパターンは①または②から 2 つの塩基の違いの範囲内におさまる。また土肥のゲンジボタルの配列は大きく異なっていることがわかる。

採集年	塩基番号	1	2	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	6	6	6	
	+地点名+個体番号	8	2	1	1	2	4	1	5	9	0	4	8	1	7	0	5	7
2016	Asahina1	T	T	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	T	T	A	T	T
2016	Asahina2	C	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	T	T	T	A	T	T
2016	Asahina3	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	T	T
2016	Asahina4	T	T	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	T	T	A	T	T
2016	Asahina5	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	C	T	T	A	T	T
2016	Asahina6	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	T	T
2016	Asahina7	T	T	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	T	T	A	T	T
2016	Asahina8	C	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	T	T	T	A	T	T
2016	Sabaka1	T	T	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	T	T	A	T	T
2016	Sabaka3	T	T	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	T	T	A	T	T
2016	Sabaka4	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	T	T
2016	Sabaka5	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	C	T
2016	Sabaka6	T	T	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	T	T	A	T	T
2016	Sabaka7	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	C	T	T	A	T	C
2016	Sabaka9	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	T	C
2016	Kunimoto1	T	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	T	T	G	T	T
2016	Kunimoto2	T	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	T	T	G	T	T
2016	Kunimoto3	T	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	T	T	G	T	T
2016	Kunimoto4	T	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	T	T	G	T	T
2016	Kunimoto5	T	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	T	T	G	T	T
2016	Kunimoto6	T	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	T	T	G	T	T
2016	Takinoya1	T	T	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	T	T	A	T	T
2016	Takinoya2	C	C	G	T	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	T	T
2016	Iruyamase1	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	C	T	T	A	T	T
2016	Iruyamase2	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	C	T	T	A	T	T
2016	Iruyamase3	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	T	T
2016	Sugegaya1	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	T	T
2016	Sugegaya2	T	T	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	T	T	A	T	T
2016	Sugegaya3	T	T	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	T	T	A	T	T
2016	Sugegaya4	C	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	T	T	T	A	T	T
2016	Sugegaya5	T	T	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	T	T	A	T	T
2016	Niino1	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	T	T
2016	Niino2	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	T	T
2016	Niino3	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	T	T
2016	Niino4	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	T	T
2016	Niino5	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	T	T
2015	Kurami1	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	T	T
2015	Kurami2	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	T	T
2015	Kurami3	T	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	T	T	G	T	T
2015	Kurami4	C	C	G	T	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	T	T
2015	Kurami5	C	C	G	T	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	T	T
2015	Ushibuchi3	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	T	T
2015	Kurokawa1	T	T	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	T	T	A	T	T
2015	Kurokawa2	T	T	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	T	T	A	T	T
2015	Kurokawa3	T	T	G	C	C	G	C	T	G	C	T	C	T	T	A	T	T
2015	Kurokawa4	T	T	G	C	C	G	C	T	G	C	T	C	T	T	A	T	T
2014	Toi1	T	T	A	T	T	A	T	C	A	T	T	T	C	C	A	T	T

- ① 16/47
- ② 12/47

②-1 と示しているものは②から 1 塩基の違いが見られるということを示している。

図 1 シーケンシング結果から SNP のみ取り出したもの

5 考察

解析した塩基配列結果を地図上に示すと図2のようになった。①の塩基配列の個体を○、①との塩基の違いが3塩基以内の個体を●、②の塩基配列の個体を△、②との塩基の違いが3塩基以内の個体を▲とした。また各採集地の記号の数はそこで採集した個体数を表している。

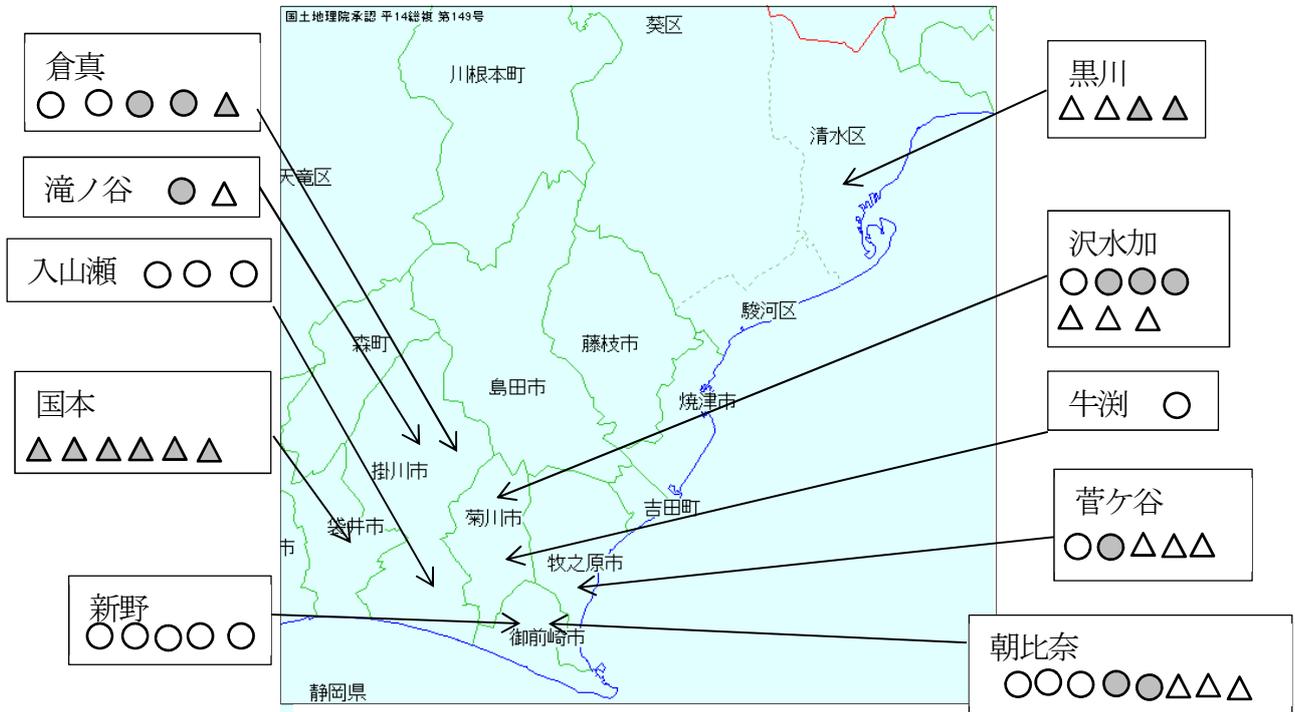


図2 解析データを加えたゲンジボタル採集場所

さらに図1のもとになった塩基配列から、MEGA7（系統解析ソフト）を使って系統樹を作成すると図4になった。

これらの結果から mtDNA による東日本型と西日本型ゲンジボタルの分布境界線は図3のようになっていることがわかった。

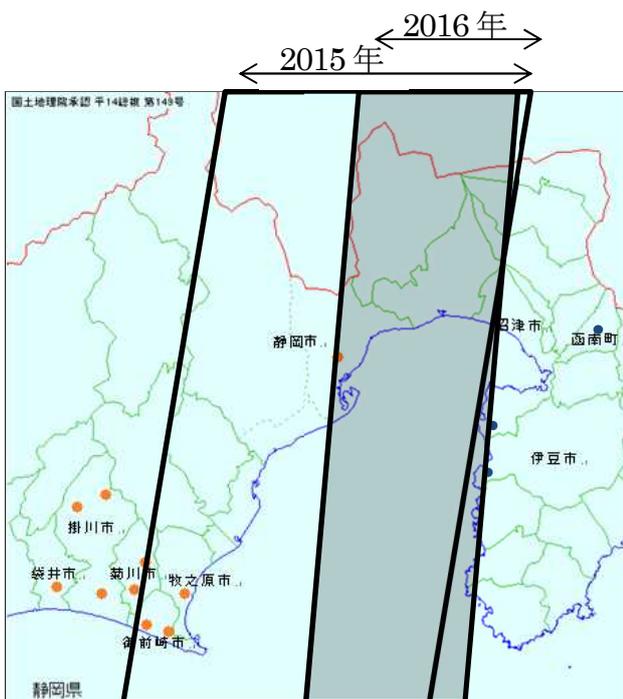


図3 推定される分布境界域の推移

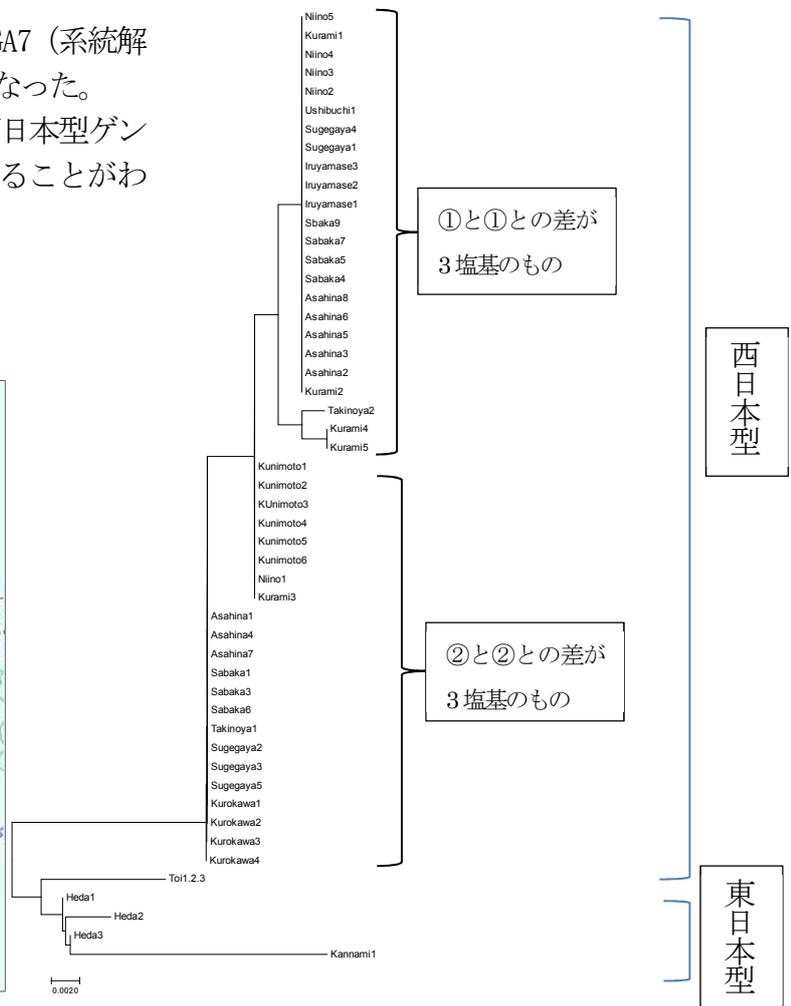


図4 ゲンジボタルの mtDNA による塩基配列の系統

さらにDDBJの相同性検索で一致する塩基配列を探し、地図に示したものが図5である。

- ①の塩基配列と全く同じまたは、違いが3塩基以内の塩基配列の個体がいる地域
 静岡県藤枝市岡部 愛知県設楽町津具 (757/757) 静岡県浜松市天竜区神沢 (755/757)
- ②の塩基配列と全く同じまたは、違いが3塩基以内の塩基配列の個体がいる地域
 山梨県笛吹 山梨県身延町(754/755) 新潟県南魚沼市塩沢 長野県長野市芋井(752/755)

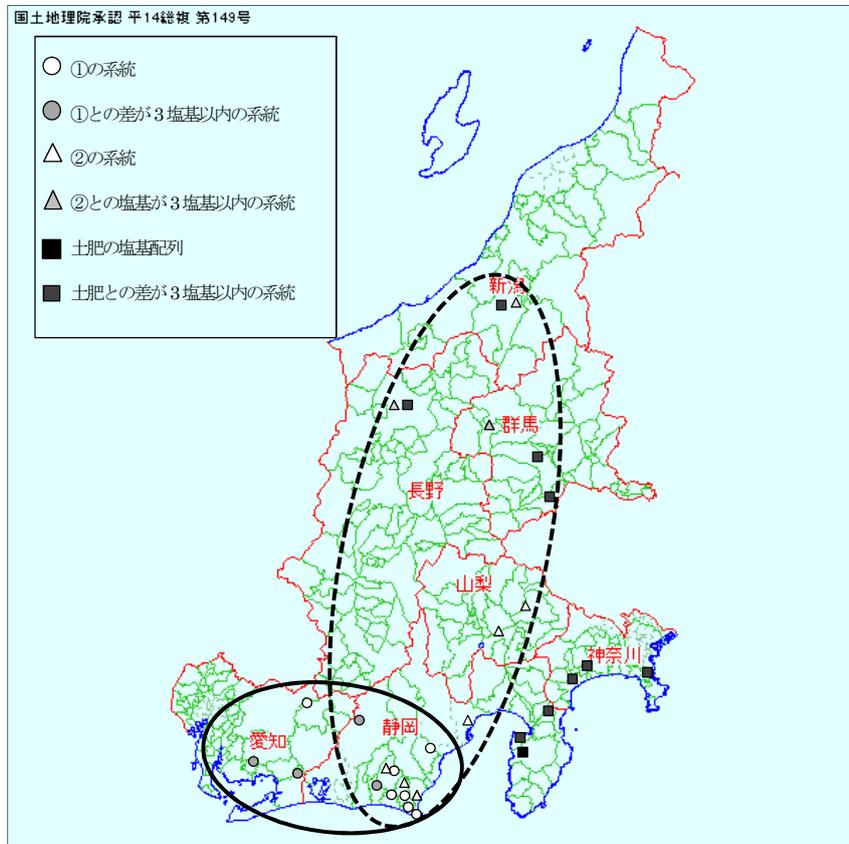


図5 DDBJを加味したゲンジボタルの分布図

①の系統は静岡中部から愛知県に見られる系統であり、②の系統は分布境界線付近に南北に長く広範囲に見られる系統であることがわかる。私たちの学校周辺のゲンジボタルはこの2種類の系統が入り混じって存在する場所であるといえる。伊豆市土肥のゲンジボタルと全く同じゲンジボタルは見つけられなかったが、違いを3塩基まで広げると②と同様に南北に存在し、②と隣接、重複している。このことから、②の系統は東日本型との境界を形成していることが予想されるため、DDBJに登録されたデータを参考にしながら研究を続けていきたい。

また、参考文献(2)からゲンジボタルの発光間隔による西日本型・東日本型ゲンジボタルの分布境界は愛知県の矢作川と長良川の間であることが分かっている。しかし、ミトコンドリアND5遺伝子による分布境界は今回の実験からも静岡県東部であり、発光間隔による分布とは全く違う結果が得られた。今後はゲンジボタル採集の際に発光間隔を測定し、発光間隔が違くとND5遺伝子にどのような違いが見られるのかを調べていきたい。そのためには、発光間隔による境界のある矢作川付近のゲンジボタルを採集・調査するとともに、沼津市や函南市などの境界域付近のゲンジボタルの調査がさらに必要であると考えられる。

6 参考文献

- (1) 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虫 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
- (2) ゲンジボタルの分布境界線を探るII 1995年 静岡県池新田高校 自然科学部