

カワトンボの系統解析

静岡県立掛川西高等学校
自然科学部 2年 杉山亮太 他5名

1 はじめに

カワトンボは北海道・本州・四国・九州に見られる昆虫で、橙色翅型や無色翅型などといった表現型が存在する。またカワトンボは以前から2種類が存在するとされてきた。時代によってカワトンボ、オオカワトンボ、あるいはニシカワトンボ、ヒガシカワトンボと分類された。しかし、それでも異論が多かったため、2004年に核DNAのITS1領域の塩基配列を使って分類が行われた。現在は、アサヒナカワトンボ (*M. puruinosa*) とニホンカワトンボ (*M. costalis*) の2種類に分類されている。更に参考文献によると伊豆半島型と呼ばれる別のDNA型を持っている個体や交雑種型も存在することが近年わかっている。

掛川西高校自然科学部は今年、学校周辺と伊豆半島に見られるカワトンボのDNAを分析してみようと考えた。5月から6月の発生時期に学校周辺と沼津市戸田で採集を行い、文献を参考にしながら外見とDNAの比較を行った。

ITSとはm-RNAがDNAから転写された後実際に使われず取り除かれる部分であり、ITS1、ITS2、ITS3がある。

実験に先立って我々は3つの仮説を立てた。

1. 掛川西高周辺にアサヒナカワトンボとニホンカワトンボが両方分布している。
2. 伊豆半島には伊豆半島型が混在する形で両方のカワトンボが存在する。
3. 橙色翅型が発生初期に、無色翅型は発生後期に多く見られる。

2 実験方法

①学校周辺、伊豆半島でカワトンボの採集をする

—捕獲したカワトンボはチャック付きの袋に入れ採集場所、日にち、番号を記し冷凍保存した。

②脚の付け根から第二関節までを採取する

③採取した脚からDNAを抽出する

—1.5 mLのエッペンドルフチューブに25 μ LのUniversAll™Extraction buffer II (DNA抽出液)を入れ、採取したカワトンボの脚を入れ、すり潰してホモジェナイズをし、以下の手順(図1)で抽出処理を行った。

④PCR法によってDNAを増幅する

—参考文献に従い作成したプライマー(図2)を用いて、図3に示すサイクルで増幅を行った。

⑤DNA増幅を電気泳動で確認する

—泳動で増幅が確認されたものをmacrogen社に依頼した。

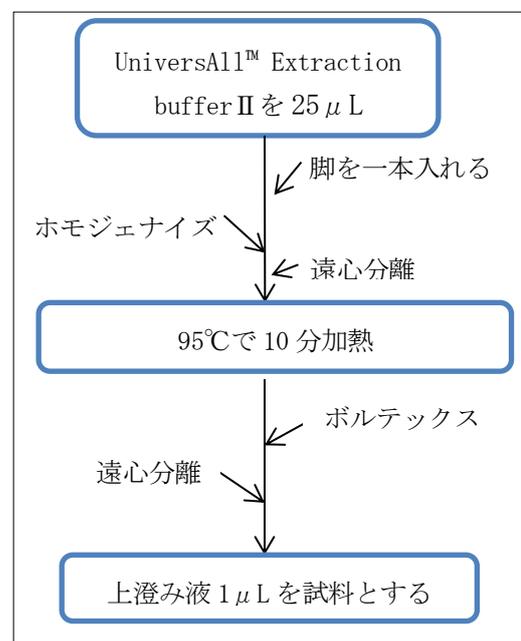


図1 DNA抽出

表 1 PCR 反応液の組成

PCR 溶液に添加する溶液等	1 本あたりの組成
滅菌水	22 μ l
Quick taq HS DyeMix	25 μ l
プライマー-F	1.0 μ l
プライマー-R	1.0 μ l
DNA 抽出液	1.0 μ l
合計	52 μ l

F-primer 5'-TAGAGGAAGTAAAAGTTCG-3'
R-primer 5'-GCTTAAATTCAGCGG-3'

図 2 プライマーの塩基配列

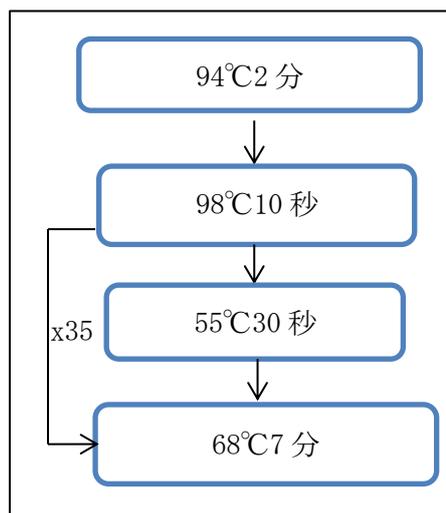


図 3 PCR サイクル

3 結果

図 4 は DNA の配列を読み取ることが出来た個体を示している。左から順に個体の採集日、採集地 (ローマ字表記)、番号、読み取れた配列の重要部分を示している。

例「5月4日採集、伊達方、番号 01」

採集年	採集地名	個体番号	配列
17	Datekata	01	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTCCCTTCGCACGAGAGTATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTG
17	Datekata	02	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTCCCTTCGCACGAGAGTATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTG
17	Sabaka	01	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTCCCTTCGCACGAGAGTATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTG
17	Sabaka	04	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTCCCTTCGCACGAGAGTATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTG
17	Sabaka	05	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTCCCTTCGCACGAGAGTATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTG
17	Kurami	06	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTCCCTTCGCACGAGAGTATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTG
17	Nishitomita	01	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTCCCTTCGCACGAGAGTATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTG
17	Nishitomita	02	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTCCCTTCGCACGAGAGTATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTG
17	Nishitomita	03	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTCCCTTCGCACGAGAGTATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTG
17	Heda	01	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTCCCTTCGCACGAGAGCATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTA
17	Heda	04	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTCCCTTCGCACGAGAGCATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTA
17	Heda	05	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTCCCTTCGCACGAGAGCATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTA
17	Heda	06	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTCCCTTCGCACGAGAGCATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTA
17	Heda	07	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTCCCTTCGCACGAGAGCATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTA
17	Heda	08	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTCCCTTCGCACGAGAGCATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTA
17	Heda	09	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTCCCTTCGCACGAGAGCATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTA
17	Heda	10	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTCCCTTCGCACGAGAGCATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTA
17	Heda	11	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTCCCTTCGCACGAGAGCATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTA

図 4 DNA の増幅に成功し、シーケンシング解析に成功したカワトンボの塩基配列

参考文献によると、カワトンボの塩基配列の 132 番目と 156 番目の塩基によってカワトンボの種類が特定できるとされている。SNP が左から TG となっているものがアサヒナカワトンボ、CA となっているものが伊豆個体群、我々が解析したものにはなかったが、TA となっているものがニホンカワトンボである。なお、参考文献にはこれらの塩基と相補的な配列が示されているが、ここではシーケンシング結果に従って示している。

[追加の実験]

DNA のシーケンシングを求められなかった個体の中に体長が 60mm 以上の個体が 8 個体見つかった。アサヒナカワトンボの体長は約 50mm なのに対してニホンカワトンボは約 60mm と少し大きめである。

そのためこれら 8 個体の中にニホンカワトンボが存在する可能性がある。これらが本当にニホンカワトンボであるか確かめるために p1～2 で示したものと同様の方法で再度実験を行った。ただし DNA 抽出のための試料は、過去にカワトンボの脚にある毛一本で実験に成功したため今回はこの方法を用いた。この方法を用いることでカワトンボを冷凍保存することなく、その場でサンプルの回収が出来るメリットがある。

今回の実験では、DNA の増幅には成功したが、ほとんどの個体においてシーケンシングには失敗した。そのため塩基配列を読み取ることが出来ず、カワトンボの種類を判別することが出来なかった。

4 考察

私たちの解析結果をまとめると、掛川西高周辺の採集地では、アサヒナカワトンボのみが確認され、伊豆半島の沼津市では参考文献と同様に伊豆個体群が確認できた。ニホンカワトンボを掛川西高校周辺及び伊豆半島で確認することはできなかった。よって、「仮説 1：掛川西高周辺にアサヒナカワトンボとニホンカワトンボが両方分布している。」と「仮説 2：伊豆半島には伊豆半島型が混在する形でアサヒナカワトンボとニホンカワトンボが存在する。」は否定されるだろう。

ここで我々は掛川西高周辺及び沼津市戸田にはニホンカワトンボがいないこと、そしてニホンカワトンボの可能性のある体長が約 60 mm の個体の実験をしていなかったことに気づき、先に示した通りニホンカワトンボが存在しているか確かめるために追加の実験を行った。

しかし実験では DNA の増幅には成功したが、塩基配列を読み取ることが出来なかった。これは体長の大きな個体を実験していないことに気づくのに遅れ、我々の採集し、冷凍保存した個体の DNA が分解し始めていたことが考えられる。これは来年度への課題である。

また、翅による比較も行った。我々が採集した掛川西高周辺の橙色翅型のカワトンボを 5/3 から 5/9 と 5/21 から 6/9 までの二つの時期に分けると下図のようになる。

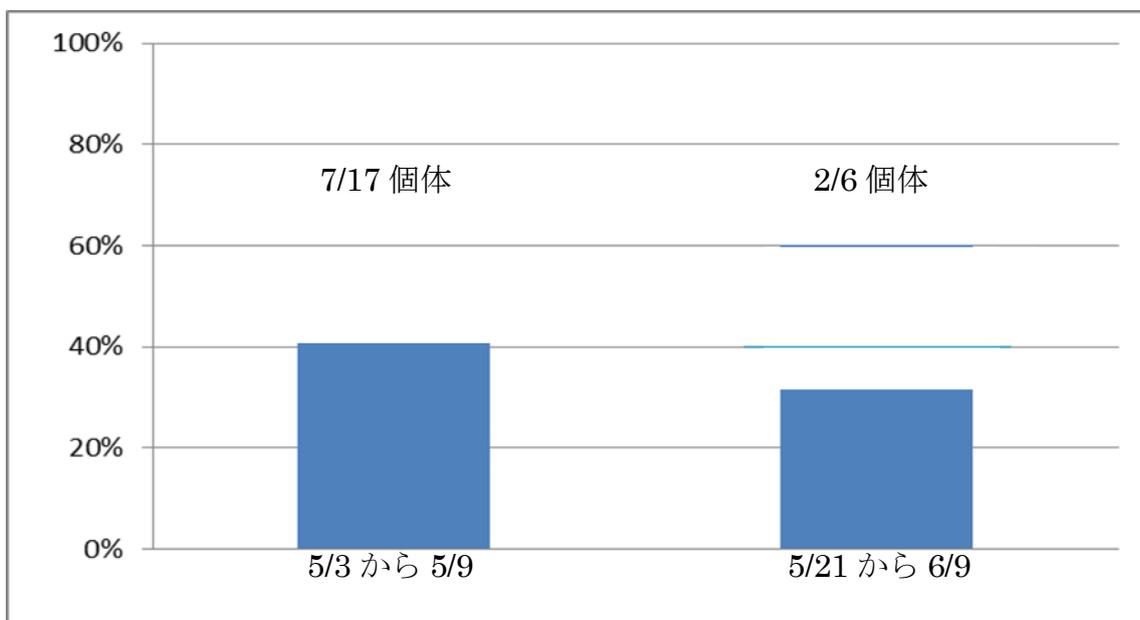


図 5 伊豆半島を除いた掛川西高周辺の橙色翅型のカワトンボの割合

我々は当初「カワトンボの発生初期には橙色翅型、発生後期には無色翅型のカワトンボが多く発生する。」という仮説3を立てた。しかし実際には発生初期の橙色翅型の割合と発生後期の無色翅型のカワトンボの割合にあまり変化は見られなかった。したがってカワトンボに時期的な翅の色の違いは見られないと考えられる。「仮説3：橙色翅型が発生初期に、無色翅型は発生後期に多く見られる。」は立証されなかった。

5 ミヤマカワトンボについて

カワトンボのデータをまとめていると、掛川西高周辺及び伊豆半島で採集した一部のカワトンボの中にミヤマカワトンボがいた。しかしDNA解析を行うとアサヒナカワトンボ、カワトンボ伊豆个体群の塩基配列を示す個体が存在することに気が付いた。その個体の外観の特徴を図6に、DNA解析結果を図7に示す。

	5/21 Kurami11♂	5/29 Heda02♀	5/29 Heda12♂	5/29 Heda13♀
全長	72mm	67mm	76mm	70mm
翅の色	赤褐色	赤褐色	赤褐色	赤褐色
体色	茶褐色	茶褐色	深緑色	茶褐色
尻尾が太いか	太くない	太くない	太くない	太い
縁紋	ない	ない	ない	白色
解析結果	アサヒナカワトンボに相当	伊豆个体群に相当	伊豆个体群に相当	伊豆个体群に相当

図6 外観がミヤマカワトンボであったカワトンボの特徴

		132	156
17Kurami11	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTTCCTTCGCACGAGAGCATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTG		
17Heda02	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTTCCTTCGCACGAGAGCATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTA		
17Heda12	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTTCCTTCGCACGAGAGCATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTA		
17Heda13	CGTTTCTCCGGAGGAGACCGACCGGGAAATTTTTCCTTCGCACGAGAGCATCGGAAACGGGCGAGAGGCATTA		

図7 外観がミヤマカワトンボであったカワトンボの塩基配列の一部

この結果をまとめると、次のようになった。

	5/21 Kurami11♂	5/29 Heda02♀	5/29 Heda12♂	5/29 Heda13♀
DNA解析	アサヒナカワトンボに相当	伊豆个体群に相当	伊豆个体群に相当	伊豆个体群に相当

ミヤマカワトンボは、他のカワトンボと同様に、北海道・本州・四国・九州に見られる、体長が62mm～78mmの大型のカワトンボである。図6に示したカワトンボはいずれも翅の色が赤褐色、体長が70mm前後であるなどミヤマカワトンボの条件を満たしているのにも関わらず、DNA解析を行うと、アサヒナカワトンボ、カワトンボ伊豆个体群の塩基配列を示した。

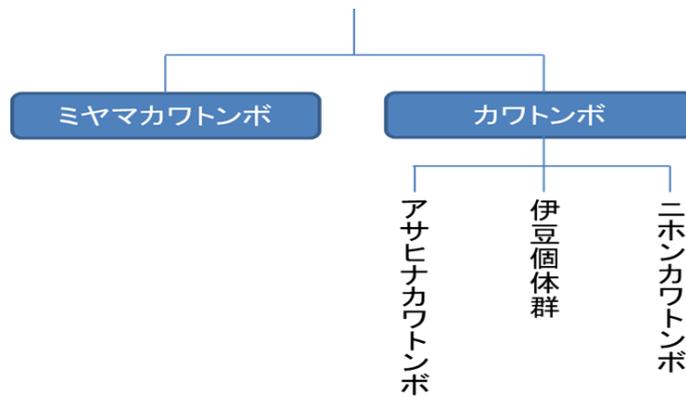


図8 本来あるべき分類

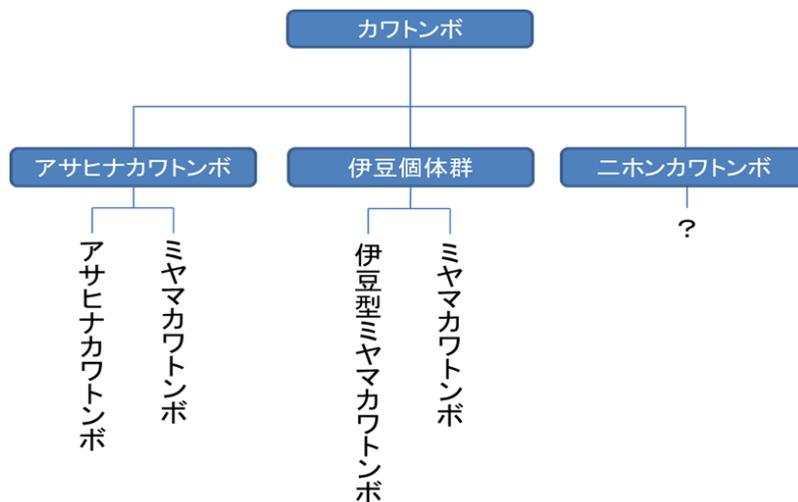


図9 結果に基づいた分類

図8のように、本来カワトンボとミヤマカワトンボは系統が分かれるはずである。カワトンボはさらにアサヒナカワトンボと伊豆個体群に分かれる。しかし今回私たちが得た結果では、図9のとおり、ミヤマカワトンボに、カワトンボ属のアサヒナカワトンボと伊豆個体群と全く同じ塩基に、同じ変異が起こっていたことになる。この変異を優先すると、ミヤマカワトンボはアサヒナカワトンボと伊豆個体群に含まれているということになる。これは本来あるべき分類とは異なる。現段階では明確にこの不一致を説明することは不可能であるが、この結果は非常に深く、来年度の課題となるだろう。

6 今後の展望

静岡県において、ニホンカワトンボが絶滅危惧種であることを後から知った。我々はカワトンボの脚の毛一本でDNAを増幅する技術を持っているので、来年度からはこの方法を用いて実験を行ってきたい。

参考文献

神奈川県を中心としたカワトンボ属の分布 著者：苅部治紀・守屋博文・林文男 Bull. Kanagawa prefct. Mus. (Nat. Sci) no. 39, pp. 25-34 Mar. 2010

