



Title	反射出血を利用した昆虫類のDNA解析
Author(s)	加藤, 徹; 古川, 恒太; 片倉, 晴雄
Citation	昆虫. ニューシリーズ, 11(1), 25-31
Issue Date	2008-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/43827
Type	journal article
File Information	kato.pdf



昆虫 (ニューシリーズ), 11(1): 25-31, 2008

反射出血を利用した昆虫類の DNA 解析

加藤 徹¹・古川 恒太²・片倉 晴雄¹

¹北海道大学大学院理学研究院 自然史科学部門

〒060-0810 札幌市北区北 10 条西 8 丁目

²北海道大学大学院理学院 自然史科学専攻

〒060-0810 札幌市北区北 10 条西 8 丁目

DNA analysis of insects using reflex bleeding

Toru KATO¹, Kota FURUKAWA² and Haruo KATAKURA¹

¹ Department of Natural History Sciences, Faculty of Science,
Hokkaido University, Sapporo, 060-0810 Japan

² Department of Natural Sciences, Graduate School of Science,
Hokkaido University, Sapporo, 060-0810 Japan

Jpn. J. Ent. (N.S.), 11(1): 25-31, 2008

Abstract. Reflex bleeding is characteristic for a number of insect species such as ladybeetles and leaf beetles. In this study, we assessed the utility of reflex bleeding as a noninvasive source for DNA analysis. By using the method based on the nucleotide-acid binding property of silica particles, we were able to extract DNA from the reflex bleeding exuded by some ladybeetles. In addition, using the extracted DNA, we were able to amplify and determine the nucleotide sequences of 28S region. These results suggest that the reflex bleeding will be a useful source for analyzing DNA in insects without killing them.

Key words: reflex bleeding, DNA extraction, PCR, DNA sequencing.

緒 言

近年の技術的な進展により、以前には不可能であったさまざまな生物学的現象の解明を DNA の解析を通して行うことが可能になった。

大型の動物では、解析に必要な DNA を対照となる動物を殺さずに抽出する手法が確立している。たとえば脊椎動物では、血液や微量の細胞組織を採取して分子情報を引き出すことが可能である。一方、種数において大多数を占める小型の無脊椎動物では、DNA 解析には殺したサンプルを用いることが一般的となっている。例えば、昆虫類の DNA 解析用の標本は、採集したその場でアルコールなどに保存される場合がほとんどである。しかし、アルコール標本は脱色する、標本が固化するといった欠点があり、分類学の標本としてはホルマリンなどを用いた固定標本や乾燥標本に比べて劣っている。これらの小型動物でも殺さずに調査することが可能になれば、大型動物と同じようにさまざまな研究に DNA 情報を用いることが可能になり、そのうえ研究計画の自由度も高まると予想される。例えば、近縁種間の遺伝子交流の有無や雑種解析、血縁関係の判定、行動圏や縄張りの推定など、生態学、集団遺伝学、行動学等の広範な生物学の分野における研究の進展に寄与すると期待される。そこで今回、テントウムシなど一部の昆虫が行う反射出血 (reflex bleeding) に注目し、対象生物を殺さずに DNA を抽出して解析する手法を確立しようと試みた。

テントウムシは外敵に襲われた場合、脚の脛節と腿節のジョイント部分から臭いのある黄色い液体を分泌する (図 1)。この液体はアルカロイド等の忌避物質を含み、捕食者に対する防御としての役割を果たすと考えられているが (Daloze *et al.*, 1994)、その主体は血液そのものであり、そのため反射出血と呼ばれている。この行動は解放血管系を持つ昆虫ならではの行動だが、血液である以上、そこには血球など DNA

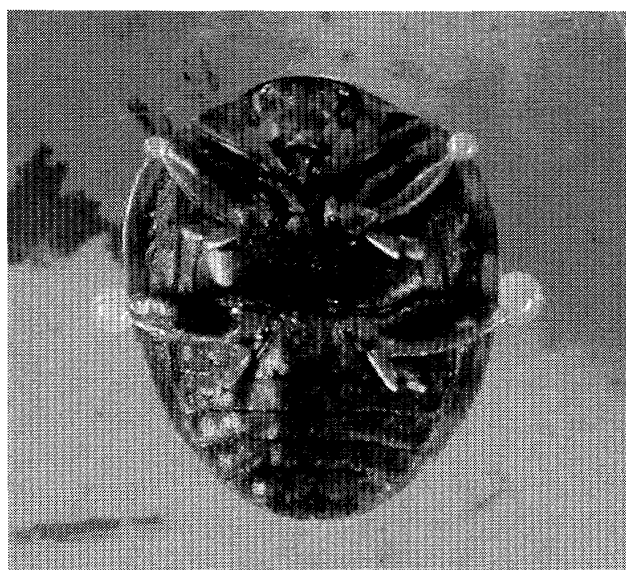


図 1. エゾアザミテントウ (*Henosepilachna pustulosa*) の反射出血. 中脚および後脚において, 脛節と腿節の接合部分から出血が認められる.

を持つ細胞体が含まれている. そして実際, テントウムシの反射出血を利用することで, 対象生物を殺さずにアイソザイム多型の解析を行った研究例も存在する (Kuboki, 1978). したがって, 反射出血を用いた DNA 解析が可能になれば, たった 1 個体しか得られないような貴重な標本でも, 同一個体から DNA 情報と分類学標本あるいは種々の学術情報を同時に引き出すことが可能になる.

そこで, 本研究ではいくつかのテントウムシ種を材料とし, 最初に, 反射出血によって分泌された血液を効率よく採取する方法について検討した. 次に, 採取した血液から DNA を抽出して PCR 反応を行い, 実際に反射出血を用いた DNA 解析が可能であるかどうかについて検証した.

材料・方法

本研究では, オオニジュウヤホシテントウ (*Henosepilachna vigintioctomaculata*) 6 個体, カメノコテントウ (*Aiolocaria hexaspilota*) 2 個体, ナナホシテントウ (*Coccinella septempunctata*) 2 個体, およびナミテントウ (*Harmonia axyridis*) 4 個体を解析に用いた (表 1). 反射出血によって昆虫が分泌した血液を採取し, そこから DNA を抽出した. 得られた抽出物を鋳型として, ミトコンドリア DNA あるいは核の一部領域をターゲットとして PCR 増幅を試みた.

反射出血の採取:

テントウムシの成虫個体を刺激し, 分泌された血液を採取した. ここで, 1 回の反射出血で分泌される血液量は非常に少ないため, 血液採取のための方法について, 以下の検討を行った.

- 1) 成虫個体に刺激を与え, 個体が反射出血した際, ガラスキャピラリーあるいは 10 μ l 用ピペットを

表 1. 解析種および PCR に用いた DNA 領域

解析種	解析個体数	解析領域
オオニジュウヤホシテントウ (<i>Henosepilachna vigintioctomaculata</i>)	6	ND2 (mtDNA)
カメノコテントウ (<i>Aiolocaria hexaspilota</i>)	2	28S (核 DNA)
ナナホシテントウ (<i>Coccinella septempunctata</i>)	2	28S (核 DNA)
ナミテントウ (<i>Harmonia axyridis</i>)	4	28S (核 DNA)

用いて分泌された血液を吸い取り、マイクロチューブに回収する。

- 2) 成虫個体を 1.5 ml チューブに入れてピペットチップでつつく等の刺激を与え、反射出血を起こさせた後に個体だけを取り除く。

DNA 抽出:

DNA は塩存在下でシリカゲルやガラスに特異的に吸着する。この性質を利用することにより、DNA を他の物質から分離精製することが可能である (Boom *et al.*, 1990)。この方法は、通常の DNA 抽出法とは異なり、エタノール沈殿の必要がないため、微量な DNA でも回収できるという利点がある。実際、ショウジョウバエを含むいくつかの昆虫においては、この原理を用いて組織から DNA を採取する方法がすでに確立しており、DNA 解析が行われてきた実績がある (Katoh *et al.*, 2007)。そこで、これらの事前情報をふまえ、本研究ではシリカゲルを用いた DNA 抽出方法を採用した。具体的な操作の手順は、以下のとおりである。

- 1) 血液を採取した後、これに Binding buffer (5 M チオシアン酸グアニジン; 100 mM Tris-HCl pH 7.0) を 100 μ l 加え、ボルテックスミキサーにより攪拌する (ホモジナイザーを用いて懸濁する必要はない)。
- 2) シリカゲル懸濁液 (ワコーシル 5 SIL [和光] に 0.01 N HCl 溶液を、目分量で 1 対 1 の割合で懸濁したもの) 3 μ l を溶液に加えてボルテックス。これにより、血液中のタンパク質を変性させた状態で DNA がシリカゲル分子に吸着した状態となる。室温下、12,000 rpm で 2 分遠心し、アスピレーションにより上清を取り除く。もう一度 Binding buffer を加え、同様の操作を行う。
- 3) Wash buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 100 mM NaCl : Ethanol = 1 : 4) を 150 μ l 加え、ボルテックス。室温下、12,000 rpm で 30 秒遠心した後、アスピレーションにより上清を取り除く。この操作により、DNA 以外の物質 (タンパク質等) が除去・洗浄される。もう一度 Wash buffer を加え、上記と同様の操作を行う。
- 4) チューブの蓋を開けたまま、チューブ底のシリカゲルが乾くまでしばらく放置する。滅菌水あるいは TE buffer を 10 μ l 加え、ボルテックスして溶液を懸濁した後、58°C で 3 分間インキュベートし、完全に DNA を溶出させる。その後、12,000 rpm で 30 秒遠心してシリカゲルをチューブ底に落とし、上清を新しいチューブに回収する。

PCR による DNA 増幅:

上記の方法で得られた抽出物を鋳型とし、ミトコンドリア DNA の ND2 領域、および核の 28S に特異的なプライマー (Wang *et al.*, 2006; Hillis and Dixon, 1991) をそれぞれ用いて PCR 反応を行った。一般に、ND2 領域は近縁種間の系統解析に有用であることが知られており、われわれの研究室でもオオニジュウヤホシテントウおよびその近縁種を用いた解析がすでに行なれている。そこで、オオニジュウヤホシテントウについてはこの領域を解析に用いた。一方、28S 領域は進化速度が遅く、ND2 領域に比べて配列の保存性が非常に高いことから、高次分類群間での系統解析に有用とされる。そこで、オオニジュウヤホシテントウとは別亜科に属し、系統的に互いに離れている残り 3 種のテントウムシについてはこちらを用いた。PCR 反応は、いずれも全量 10 μ l の反応系 (1X Takara Ex Taq buffer, 200 μ M each dNTP, 0.5 μ M each primer, 0.25 U Takara Ex Taq) で行い、上記方法で抽出した DNA 溶液のうち 1 μ l あるいは 2 μ l を鋳型とした。温度条件については、95°C で 3 分インキュベート後、95°C で 30 秒、45°C (ND2) あるいは 50°C (28S) で 90 秒、72°C で 90 秒のサイクルを 35 回行い、最後に 72°C で 7 分のステップを 1 回入れるというプログラムを用いた。反応終了後、反応液の一部を 0.7% アガロースゲルを用いて約 20 分電気泳動した。泳動終了後、ゲルをエチジウムブロマイド溶液で 15~20 分染色し、紫外線を照射して DNA 増幅の有無を確認した。

塩基配列の決定:

増幅が確認されもののうち、これまでわれわれが配列情報を持っていなかったカメノコテントウの 28S 領域について新たに塩基配列を決定した。そして、これを同種別個体の筋肉組織から得た塩基配列と比較することで、目的とする DNA 領域が増幅していたかどうかを塩基配列レベルで確認した。具体的には、PCR 産物を DNA 抽出と同様の方法を用いて精製し、余分なプライマーと dNTP を取り除いた。これをシーケンス反応の鋳型とし、ABI BigDye Terminator Ver. 3.1 キットを用いてシーケンス反応を行った。反応終了後、反応物をエタノール沈殿で精製した後、ABI 3100 Avant Genetic Analyzer にアプライし、塩基配列を決定した。

結 果

反射出血の採取:

最初に、テントウムシ成虫個体に直接手を触れる、あるいはピペットなどでつつくといった刺激を与え、個体が反射出血した際、ガラスキャピラリーあるいは 10 μ l 用ピペットを用いて分泌された血液を吸い取り、マイクロチューブに回収するという手法を用いた。しかしながら、この方法では、触れた際に反射出血した血液がピペットの外側の壁に付着しやすい、あるいは出血したすべての血液をピペットで吸い取る間に成虫個体が動き出してしまうといった場合が多かったため、効率的な回収が困難であった。

次に、テントウムシ成虫個体を 1.5 ml チューブに入れてピペットチップでつつく等の刺激を与え、反射出血を起こさせた後に個体だけを取り除くという手法を用いた。その結果、1 回の採集につき、オオニジュウヤホシテントウについては 1 個体当たり約 2~3 μ l、ナナホシテントウとナミテントウについては 1 個体当たり約 3 μ l、そしてカメノコテントウについては 1 個体当たり約 4 μ l の血液を得ることができた。ただし、上記で述べたように、採集できる血液量そのものが微量であったため、正確な定量は困難であった。

以上の結果から、反射出血した血液を採取する際には、ガラスキャピラリーやピペットといった道具を介さず、成虫個体を直接チューブに入れて刺激し、チューブ壁面に付着した血液をそのまま抽出に用いるという方法が有効であると判断された。

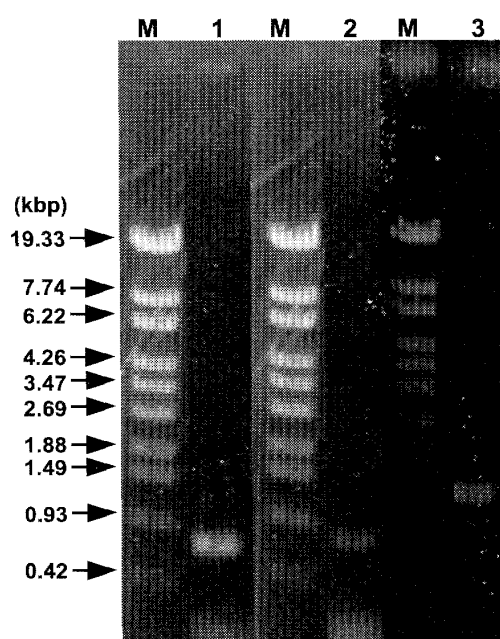


図 2. 反射出血を鋳型とした 28S 領域の PCR 産物の電気泳動像。M, サイズマーカー (λ /StyI digest); 1, ナミテントウ; 2, カメノコテントウ; 3, ナナホシテントウ。PCR 反応は何れも全量 10 μ l の系で行い、そのうち 1 μ l を電気泳動した。

Control	GGGAAAGAAGACCCCTGTTGAGCTTGACTCTAGTCTGGCACTGTAAGGAGACATGAGAGGT	60
Blood	GGGAAAGAAGACCCNGTTGAGCTTGACTCTAGTCTGGCACTGTAAGGAGACATGAGAGGT	60

Control	GTAGCATAAGTGGGAGACGGAACCGTCAAAATTGAAATACCACTACTTTCATCGTTTCTT	120
Blood	GTAGCATAAGTGGGAGACGGAACCGTCAAAATTGAAATACCACTACTTTCATCGTTTCTT	120

Control	TACTTACTCGGTAAAGCGGAACGCGTGCGTCGCGCGCCCTTCGCGGCCGCGGGCTGTCACG	180
Blood	TACTTACTCGGTAAAGCGGAACGCGTGCGTCGCGCGCCCTTCGCGGCCGCGGGCTGTCACG	180

Control	GTGTTCTCGAGCCAAACGCTAAGAGTGGCGCTCCCGCCCTCGGGCCGGTCTCGTCCCGGT	240
Blood	GTGTTCTCGAGCCAAACGCTAAGAGTGGCGCTCCCGCCCTCGGGCCGGTCTCGTCCCGGT	240

Control	GTCGTCGGTCGCTCGCGCGACCGCTTCGCGGGCCCGATCGCGTCTCCCGGGGTGTCGGGT	300
Blood	GTCGTCGGTCGCTCGCGCGACCGCTTCGCGGGCCCGATCGCGTCTCCCGGGGTGTCGGGT	300

Control	AGGTGCCGATAAACGCTCCCGCGTGATCCGATCCGAGGACACTGCCAGGCGGGGAGTTTG	360
Blood	AGGTGCCGATAAACGCTCCCGCGTGATCCGATCCGAGGACACTGCCAGGCGGGGAGTTTG	360

Control	ACTGGGGCGGTACATCTGTCAAAGAATAACGCAGGTGTCTTAAGGCCAGCTCAGCGAGGA	420
Blood	ACTGGGGCGGTACATCTGTCAAAGAATAACGCAGGTGTCTTAAGGCCAGCTCAGCGAGGA	420

Control	CAGAAACCTCGCGTAGAGCAAAAGGGCAAATGCTGGCTTGATCCCGATGTTTCAGTACGCA	480
Blood	CAGAAACCTCGCGTAGAGCAAAAGGGCAAATGCTGGCTTGATCCCGATGTTTCAGTACGCA	480

Control	TAGGGACTGCGAAAGCACGGCCTATCGATCCTTTTGGCTTGAAGAGTTTTTCAGCAAGAGG	540
Blood	TAGGGACTGCGAAAGCACGGCCTATCGATCCTTTTGGCTTGAAGAGTTTTTCAGCAAGAGG	540

Control	TGTCAGAAAAGTTACCACAGGGATAACTGGCTTGTTGGCGGCCAAGCGTTCATAGNGACGT	600
Blood	TGTCAGAAAAGTTACCACAGGGATAACTGGCTTGTTGGCGGCCAAGCGTTCATAGCGNNGT	600

Control	CGCTTTTTTGATCCTTCGATGTCGGC	625
Blood	CGCTTTTTTGATCCTTCGATGTCGGC	625

図3. カメノコテントウから抽出した total DNA を用いて決定された 28S 領域の塩基配列. Control, 反射出血の解析に用いたものと同種で別個体の筋肉組織から抽出した DNA をもとに決定された塩基配列; Blood, 反射出血から抽出した DNA をもとに決定された塩基配列.

PCR による DNA 増幅:

得られた血液から, シリカゲルを用いた抽出法(前述)により total DNA を抽出した. そして, これを鋳型として, ミトコンドリア DNA の ND2 領域, および核の 28S 領域に特異的なプライマーをそれぞれ用いて PCR 反応を行った. 反応終了後, 反応液の一部を電気泳動し, エチジウムブロマイド染色により確認した. その結果, オオニジュウヤホシテントウ 1 個体では十分な PCR 増幅が認められなかったものの, 残り 13 個体のすべてについては, 筋肉組織から抽出した DNA の場合と同様, 目的の領域に相当するサイズの DNA 断片が認められ, 非特異的な増幅はほとんど認められなかった(図2). よって, 少なくとも, ミトコンドリア DNA の ND2 あるいは核の 28S といったような, 系統解析に広く用いられている遺伝子座に関し

ては、反射出血から抽出した DNA を用いて PCR 反応を行うことが十分に可能であることが示された。

塩基配列の確認:

上記で得られた PCR 産物が実際に目的の DNA 領域であるかどうかをさらに確認するため、カメノコテントウの反射出血 DNA から 28S 領域を PCR 増幅し、両鎖をダイレクトシーケンスして塩基配列を決定した。そして、これを同種別個体の筋肉組織から得た 28S 塩基配列とアライメントし、両配列を比較した(図 3)。その結果、反射出血から得られた DNA 配列では比較した 625 bp 中 3 カ所で“N”が認められたが、残りすべての部分は曖昧なく決定され、いずれのサイトも筋肉組織から得られた DNA 配列と一致した(なお、筋肉組織から得られた DNA 配列では 625 bp 中 1 カ所で“N”が認められた)。したがって、反射出血 DNA を鋳型として PCR を行った場合でも、目的の DNA 領域が正確に増幅されていると判断された。これは、反射出血 DNA を用いて塩基配列レベルの遺伝子解析を行うことが、実際に可能であることを意味する。

考 察

本研究は、昆虫の反射出血を利用することで、試料を殺すことなく DNA を採取することが十分に可能であることを示した。また、少なくとも、ミトコンドリア DNA の ND2 や核の 28S といったような、系統解析に広く用いられている遺伝子座については、得られた DNA を用いて遺伝子解析を行うことが十分に可能であることを示した。実際、上記領域の解析に本手法を用いた場合、1 回の反射出血(約 2~4 μ l)から抽出した DNA を用いて、5~10 回の PCR が可能である。

ただし、従来の組織を用いた DNA 抽出に比べると、反射出血から得られる DNA 量はかなり少量であることから、今後、マイクロサテライト解析のような比較的多量の DNA を必要とされる解析を行いたい場合には、試料が不足する可能性が考えられる。また、今回、オオニジュウヤホシテントウ 1 個体では ND 2 領域の PCR 増幅が認められなかったが、同条件で他の同種 5 個体で増幅が認められたことを踏まえると、この結果は、個体の状態により、一度の採取では稀に PCR 増幅に必要な DNA 量を確保できない場合があることを示唆する。しかしながら、このような場合には、日を改めて同一個体から反射出血 DNA を複数回抽出し、それらをプールすれば、解析に十分な量の DNA が得られるであろう。あるいは、最近行なわれるようになってきた Whole Genome Amplification と呼ばれる手法を用いて、いったんゲノム全体を PCR 増幅してから以後の DNA 解析を行うといった方法を取るのも有効かもしれない(Barker *et al.*, 2004)。

本研究の手法は、反射出血を行なう昆虫全般に対して適用することが可能である。反射出血を行う昆虫の中には、オオニジュウヤホシテントウやハムシ類といった食植性の農業害虫が多く含まれる。これら害虫の伝搬経路の推定や簡易同定の手段として、今後、DNA 情報を用いた解析が不可欠であることから、本手法のさらなる発展および産業面への応用が期待される。

謝 辞

本研究を行うにあたり、首都大学東京の田村浩一郎博士からは DNA 抽出の方法に関する多くの有益な助言をいただいた。本研究の大部分は、ノーステック財団基盤的研究開発育成事業(若手研究補助金)からの助成により行われた(整理番号 [H18L-若-087])。

要 約

テントウムシなど一部の昆虫が行う反射出血(reflex bleeding)に注目し、対象生物を殺さずに DNA を

抽出して解析する手法の確立を試みた。最初に、反射出血によって分泌された血液から DNA を効率よく抽出する方法について検討した。次に、抽出 DNA を鋳型として PCR 反応を行い、塩基配列の決定を試みることによって、反射出血を用いた DNA 解析の可能性を検証した。その結果、シリカゲルを用いた抽出法により、反射出血から DNA を採取することができた。また、少なくとも、ミトコンドリア DNA の ND2 や核の 28S といったような、系統解析に広く用いられている遺伝子座については、反射出血 DNA を用いた遺伝子解析が実際に可能であることを示した。

引用文献

- Barker, D. L., Hansen, M. S., Faruqi, A. F., Giannola, D., Irsula, O. R., Lasken, R., S., Latterich, M., Makarov, V., Oliphant, A., Pinter, J. H., Shen, R., Sleptsova, I., Ziehler, W., & Lai, E., 2004. Two methods of whole-genome amplification enable accurate genotyping across a 2320-SNP linkage panel. *Genome Research*, **14**: 901–907.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., & van der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, **28**: 495–503.
- Daloze, D., Braekman, J. C., & Pasteels, J. M., 1994. Ladybird defence alkaloids: structural, chemotaxonomic and biosynthetic aspects (Col.: Coccinellidae). *Chemoecology*, **5**: 173–183.
- Hillis, D. M., & Dixon, M., T., 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*, **66**: 411–453.
- Katoh, T., Nakaya, D., Tamura, K., & Aotsuka, T., 2007. Phylogeny of the *Drosophila immigrans* species group (Diptera: Drosophilidae) based on *Adh* and *Gpdh* sequences. *Zoological Science*, **24**: 913–921.
- Kuboki, M., 1978. Studies on the phylogenetical relationship in the *Henosepilachna vigintioctomaculata* complex based on variation of isozymes (Coleoptera: Coccinellidae). *Applied Entomology and Zoology*, **13**: 250–259.
- Wang, B. C., Park, J., Watabe, H. A., Gao, J. J., Xiangyu, J. G., Aotsuka, T., Chen, H. W., & Zhang, Y., P., 2006. Molecular phylogeny of the *Drosophila virilis* section (Diptera: Drosophilidae) based on mitochondrial and nuclear sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **40**: 484–500.

(2007 年 7 月 18 日受領, 2008 年 2 月 6 日受理)

(Received July 18, 2007; Accepted February 6, 2008)