

反射出血を利用した昆虫類のDNA解析

加藤 徹 [北海道大学大学院理学研究院自然史科学部門 / 博士研究員]

背景・目的

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、昆虫など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である。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様々な研究にDNA情報を用いることが出来る。そこで、本研究ではテントウムシなど一部の昆虫が行う反射出血に注目し、これらの昆虫を殺さずにDNAを採取・解析する手法を確立することを目的とする。

内容・方法

テントウムシは外敵に襲われた場合に脚の脛節と腿節のジョイント部分から体液を分泌する。この液は防御用の物質を含むと考えられているが、その主体は血液そのものであり、そのために反射出血と呼ばれている。本研究ではテントウムシを材料とし、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、ヨコンドリアDNAの一部領域をターゲットとしてPCR増幅を試みた。

1 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検討を行った。

2 DNA抽出

本研究ではシリカゲルを用いたDNA抽出法を試みた。この方法は操作が簡単・迅速であるのに加え、微量のDNAでも回収できるという利点がある。

3 PCRによるDNA増幅の確認

ヨコンドリアおよび核DNAの一部領域についてPCR反応を行ない、目的の領域が十分に増幅されるかどうか検証した。

結果・成果

・反射出血の採取

手始めとして、オオニジュウヤホシテントウの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、ガラスキャビラリーあるいは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、あるいは出血した全ての血

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。

そこで、今度は、成虫個体を1.5mlチューブにそのまま入れて外部から刺激を与え、反射出血を起こさせた後に個体を取り除くという手法を用いた。その結果、反射出血した血液はチューブの壁面に付着し、そのほとんどをチューブに回収することができた。従って、血液を採取する際には、ガラスキャビ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、放出した血液を採取するという方法が非常に効率的であることが示された。

・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できる。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。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。

具体的には、5Mチオシアノ酸アニジン、100mM Tris-HCl (pH7.0) からなるbufferからなるbufferに採取した血液を入れて攪拌する。その後、シリカゲル懸濁液を溶液に加え、タンパク質等を変性した状態でDNAをシリカゲル分子に吸着させる。そして、洗浄用buffer (10mM Tris-HCl pH7.5; 100mM NaCl : Ethanol = 1:4) によりDNA以外の物質を除去・洗浄した後、TE bufferでDNAを溶出し、回収する。

そして、こうして得られたサンプルを鋳型にPCR反応を行なったところ、実際に増幅することが確認された(以下)。

・PCRによるDNA増幅の確認

上記の方法で得られた抽出物を鋳型とし、ヨコンドリア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、EtBr染色により確認したところ、目的の領域に相当するサイズのDNA断片が認められた。そのうち、一部のものについては塩基配列まで決定し、目的とするDNA領域が増幅していたことを分子レベル確認した。

今後の展望

本研究では、昆虫の反射出血を利用して試料を殺すことなくDNAを採取し、得られたDNAを用いて遺伝子解析が可能であることを示した。ただし、この方法で得られるDNAは比較的小量であるため、より多くのDNAを必要とする解析を行なう場合には、今後さらなる検討が必要である。なお、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、本研究のさらなる発展および産業面への応用が期待される。