

昆虫標本への燻蒸ガスの影響について

—PCR 法による DNA 増幅の阻害—

斉藤 明子

千葉県立中央博物館

〒260-8682 千葉市中央区青葉町 955-2

E-mail: saitoa@chiba-muse.or.jp

要 旨 昆虫の乾燥標本を用いた DNA 解析を想定して、標本に対する燻蒸ガスの影響の有無を知るための予備的な実験を PCR 法により行った。甲虫類の一種であるシロスジカミキリから胸部筋肉を取り出し、エキボンと臭化メチルを用いて燻蒸した。これらの筋肉からゲノム DNA を抽出し、PCR 法でミトコンドリア DNA の ND5 遺伝子領域約 1100 塩基対の DNA 断片を増幅した。電気泳動ゲル上のバンドの太さを比較した結果、燻蒸しないサンプルに比べエキボン処理されたサンプルではバンドが大幅に細く、臭化メチル処理ではやや細かった。このことから、燻蒸ガスが DNA の化学構造に何らかの影響を及ぼす可能性、あるいは PCR 反応の酵素反応を阻害する可能性があることが示唆され、その結果として PCR 反応による DNA の増幅効率が低下したと推察された。

キーワード: 昆虫標本, シロスジカミキリ, 燻蒸, エキボン, 臭化メチル, PCR 法, ミトコンドリア DNA, ND5.

自然史資料を保管している博物館では、害虫やカビによる資料の劣化を防ぐため、文化財と同様にガスをを用いた燻蒸がごく一般的に行われてきた。夏期に高温多湿の我が国で資料を安全に保管するためには、定期的に収蔵庫ごと燻蒸することがもっとも信頼できる方法であるからである。

一方で、PCR 法の普及により DNA 情報を生物群の系統解析などに利用することが一般的になってきた。昆虫の場合、DNA 解析に使用する標本は 99.5% エチルアルコール中で低温保存することが普通である。しかし、大量の保存には設備面で現実的ではなく、形態の比較観察には液浸標本は扱いづらい。さらに、DNA 解析用として新たに多くの標本を収集し直すには大きな労力と長い時間が必要となる。また、複数個体を得ることが困難な分類群の場合など、博物館の収蔵庫に保管されている乾燥標本を DNA の解析に用いたいことも多い。乾燥標本の場合、死亡させる際に使われる薬剤、その後の処理の仕方、保存環境、時間経過、燻蒸など、DNA の化学構造に影響を及ぼすと考えられる要素は多い。この中で、燻蒸ガスの影響の有無を明らかにする目的で、中央博物館の収蔵庫燻蒸の機会を利用して予備的な実験を行ったのでその結果を報告し、若干の考察を加える。

材料と方法

実験にはコウチュウ目カミキリ目シロスジカミキリ *Batocera lineolata* Chevrolat 雌個体 (千葉県千葉市緑区大野台 2001 年 8 月 8 日採集) を用いた。採

集後、生体のまま -25°C の冷凍庫に入れ死亡させ、そのまま筋肉組織を採取するまでの約 1 ヶ月間、 -25°C で保管した。同一種内であってもミトコンドリア DNA の塩基配列に多型が見られることが知られており、複数個体を使った場合、プライマーの不適合により PCR の結果に違いが出ることも考えられる。これを避けるため、この実験で用いた DNA はすべて同一個体から抽出した。

冷凍保存された個体を解凍し、99.5% エチルアルコールに約 1 時間浸した後、胸部の筋肉組織を取り出した。甲虫の乾燥標本は通常数時間から半日程度酢酸エチルの毒ビンに入れた後、自然乾燥させて針刺し標本または台紙に糊付け標本として保存する。しかし、この実験では DNA の化学構造に影響をおよぼすことが予想される他の要素をできる限り排除するために冷凍保存の方法を用いた。エチルアルコールに浸したのは、生の状態の筋肉が扱いにくいことと、自然乾燥させた場合の腐敗の進行による DNA の損傷の影響を考慮したためである。

取り出した胸部の筋肉組織を乾燥重量で 25 mg づつ 1.5 ml マイクロチューブに 9 本分量り取り、そのまま -25°C で 2 日間保管した。この 9 サンプルについてそれぞれ下記の条件で処理した後、DNA を抽出した。なお、冷凍保存期間以外はマイクロチューブの蓋はすべて解放した。

サンプル番号 1~3: 千葉県立中央博物館第 2 収蔵庫内で臭化メチル (投薬量 40 g/m^3) で 36 時間燻蒸、その後 6 日間そのまま放置した (室温 $24^{\circ}\text{C}\sim 26^{\circ}\text{C}$ 、湿

度 58%~65%)。

サンプル番号 4~6: 同博物館恒温高湿収蔵庫内でエキボン (臭化メチル 86wt.% と酸化エチレン 14wt.% の混合ガス) (投薬量 100 g/m³) で 36 時間燻蒸, その後 6 日間そのまま放置した (室温 21°C~27°C, 湿度 54%~66%)。

サンプル番号 7~9: 燻蒸ガスのない室内 (同博物館学芸前室) に 8 日間放置した (室温 22°C~27°C, 湿度 51%~76%)。

その後, サンプルチューブ内の筋肉組織を DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) を用いて 200 μ l のゲノム DNA 抽出液とし, 冷凍庫 (-25°C) に保存した。

カミキリムシと同じコウチュウ目に属するオサムシ類において, すでに実績のあるプライマー (5'-CCTGTTTCTGCTTTAGTTCA-3', 5'-GTCATAC-TCTAAATATAAGCTA-3')(Su *et al.*, 1996) を用いて PCR 法でミトコンドリア DNA の NADH 脱水素酵素サブユニット 5 (NADH dehydrogenase subunit 5: ND5) 遺伝子領域約 1100 塩基対の DNA 断片を増幅した。PCR 反応は, Perkin-Elmer Model 2400 サーマルサイクラーを用いて, 滅菌蒸留水 9.75 μ l, 10 $\times$ PCR バッファー (Takara) 1.5 μ l, dNTP (4 mM) 1.2 μ l, 各プライマー (5 μ M) 0.75 μ l, Taq DNA ポリメラーゼ (Z Taq, Takara) 0.15 μ l, ゲノム DNA 溶液 0.9 μ l の合計 15 μ l の反応液を作り, 熱変性 98°C 1 秒, アニリング 47°C 5 秒, 伸長反応 72°C 20 秒, 40 サイクルで行った。PCR 産物 6 μ l に 1 μ l のローディングバッファーを加えて 1%L 03 アガロースゲルに電気泳動したのち, ゲルをエチジウムブロマイド溶液で染色し UV トランスイルミネーター上で写真を撮影して, 上記の 3 つの条件下での DNA 断片の増幅の程度を定性的に比較した。

結 果

電気泳動のゲルに現れたバンドの状態を図 1 に示す。DNA 断片の増幅程度をバンドの太さにより比較すると, ガス処理をしないサンプル (No. 7~9) と比べて, 臭化メチル処理されたサンプル (No. 1~3) では, やや増幅の程度が悪く, エキボン処理されたサンプル (No. 4~6) では明らかに増幅の程度が悪くなっていた。

考 察

これまでにカミキリムシ類の多数の種について同様の DNA 抽出方法, PCR 反応条件でミトコンドリア DNA の同じ領域を増幅をさせた (齊藤, 未発表)。これと比較すると, No. 7~9 のサンプルではこの反応条件による最大程度に増幅されており, オートシーケンサーを用いた直接塩基配列決定には十分な増幅を示している。しかし, No. 4~6 では増幅の程度が悪かつ

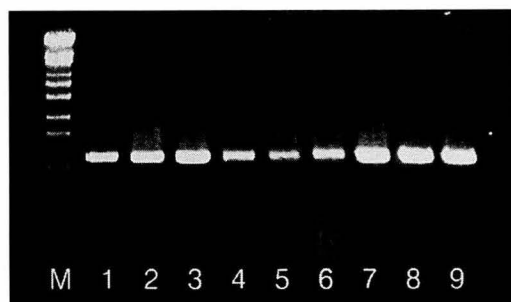


図 1. アガロースゲル上の泳動結果. 1-3, 臭化メチル処理されたサンプル; 4-6, エキボン処理されたサンプル; 7-9, 未燻蒸のサンプル; M, 分子量マーカー (λ -EcoT14 I digest, Takara).

Fig. 1. Results of the electrophoresis of the PCR products on agarose gel. 1-3, samples fumigated by methyl bromide; 4-6, samples fumigated by "EKIBON"; 7-9, non fumigated samples; M, DNA marker (λ -EcoT14 I digest, Takara).

た。そこで, PCR 産物の吸光度の測定値から DNA 濃度を計算し増幅程度の差の定量化を試みたが, 期待される値の差が得られなかった。その原因としては, 吸光度の測定値に PCR 産物中に存在するプライマーや夾雑物がすべて含まれていたことが可能性としてあげられる。しかしながら, 泳動画面に現れる目的のバンドの太さを目視により比較する限りは, 増幅された DNA の濃度の差は明らかであると推測された。つまり, エキボンにより燻蒸したことにより PCR 反応による増幅が阻害されたことが示唆された。また, 臭化メチル処理の場合, 増幅の程度の減少は少ないが影響が出ていると思われる。今回の燻蒸条件では, エキボンで燻蒸した場合の臭化メチルの投薬量は 86 g/m³ であり, 臭化メチルを単体で用いた場合の投薬量は 40 g/m³ である。このことからエキボンの影響がより大きかった原因として, 臭化メチルが高濃度であることによる影響, 酸化エチレンの影響, 酸化エチレンと臭化メチルを混合することによる影響, の 3 つが想定される。いずれにしても, 一回の燻蒸で PCR 反応の結果に明らかな差が現れたことから, エキボンで繰り返し燻蒸することによる影響は甚大であると予想される。

今回の実験は通常の収蔵庫燻蒸の機会を利用した予備的な実験であるので, ガス濃度を一定にすることが出来なかった。また, バンドの太さと明瞭さという定性的な判断であったが, 少なくとも燻蒸することで PCR 法による DNA の増幅が阻害されることが明らかとなった。その理由としては, 燻蒸ガスが DNA の化学構造に何らかの影響を及ぼした, あるいは筋肉中に残留した燻蒸ガスの影響で Taq DNA ポリメラーゼ

の活性阻害が起きたことが考えられる。

DNA 解析のための資料は、現状ではディープフリーザーを用いた超低温保存 (-80°C 以下) が最も良いとされている。しかし、現状の博物館ですべての資料を超低温で保存することは、DNA 解析以外の利用に支障を来し、設備的、予算的にも不可能である。そのため、DNA 解析用資料には収蔵庫に保存されている資料の利用が望まれる。燻蒸に一般的に使用されてきた臭化メチルはオゾン層を破壊する物質に指定され、2005 年には全廃されることとなった。現在、臭化メチルに替わる薬剤が開発されているところであるが、それぞれについての比較実験を行い、DNA 解析への影響がより少ない燻蒸ガスを選定することが必要である。

謝 辞

本研究を進めるにあたって東京文化財研究所の木川りか博士には実験方法についていろいろとご教示いただいた。木川博士、ならびに千葉県立中央博物館の宮正樹、須之部友基両博士には原稿を校閲していただき、貴重なご意見をいただいた。また、JT 生命誌研究館の蘇智慧博士、千葉市の伊藤和道、千葉県立中央博物館の尾崎煙雄の各氏にご協力いただいた。これらの方々に御礼申し上げる。

引用文献

Su, Z.-H., T. Ohama, T. S. Okada, K. Nakamura, R. Ishikawa and S. Osawa. 1996. Phylogenetic relationships and evolution of the Japanese Carabinae ground beetles based on mitochondrial ND5 gene sequences. *J. Mol. Evol.* 42: 124-129.

(2002 年 2 月 19 日受理)

Influence of Fumigation Gas on Insect Specimens —Inhibiting PCR amplification of DNA—

Akiko Saito

Natural History Museum and Institute, Chiba
955-2 Aoba-cho, Chuo-ku, Chiba 260-8682, Japan
E-mail: saitoa@chiba-muse.or.jp

A preliminary test using the polymerase chain reaction (PCR) was done in order to evaluate the influence of fumigation gas on DNA extracted from dried insect specimens. Thorax muscle was dissected from a female specimen of *Batocera lineolata* (Coleoptera: Cerambycidae), and fumigated by methyl bromide and "EKIBON", the latter is a mixture of methyl bromide (86 wt %) and ethylene oxide (14wt%). The total DNA was extracted, and about 1100-bp containing a majority of the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) gene was amplified by the PCR. After electrophoresis of the PCR products on agarose gel, the width and thickness of bands were compared. In the case of the samples fumigated by "EKIBON", the degree of amplification was clearly reduced than non fumigated samples, while in the case of methyl bromide, it was less reduced. It was suggested that the fumigation gas might influence chemical structure of DNA or inhibit the enzyme for PCR, resulting reduced degree of amplification of the PCR products.