

神戸市近辺に生息するハナダカダンゴムシの DNA 解析

阿南梨紗，越智航，河合嘉亮，松原羽矢，野柳優記，柳口弥生
兵庫県立神戸高等学校 総合理学科2年

ハナダカダンゴムシは1998年に神戸市、横浜市で発見され、他に富山県、群馬県、大津市でしか発見されていない希少な種である。当時詳しく研究されなかったため侵入経路が判明していない。我々は神戸市とその周辺のダンゴムシを採集し、ハナダカダンゴムシの生息分布について調べた。また、ミトコンドリアDNAの16S領域についてオカダンゴムシでは地域ごとに違いが見られるので、ハナダカダンゴムシにも違いが見られるのではないかと考え、PCR法で増幅し、シーケンスによりその塩基配列の一部を明らかにするとともに、それらを遺伝子バンクにある世界のハナダカダンゴムシとオカダンゴムシの塩基配列と比較し近縁関係を示す分子系統樹を作成し、侵入したハナダカダンゴムシの系統上の位置を明らかにすることを試みる。

1. 序論

日本で一般に「ダンゴムシ」と呼ばれる種は欧州から侵入した外来種のオカダンゴムシ(*Armadillidium vulgare*)のことであり、明治時代以降に日本に侵入してきたため現在では日本全土に広がっている。

一方、ハナダカダンゴムシ(*Armadillidium nasatum*)は全長約2cmであり、触覚の間に明瞭な突起があるダンゴムシである。鼻が高いように見えるため、ハナダカという名前が付いている。日本では1998年に神戸市、横浜市で初めて発見された外来種で、これまでに富山県、群馬県、大津市でも発見されている。兵庫県では「兵庫県立人と自然博物館」の2013年5月の鈴木研究員の発表によると、北は三木市、西は明石市、東は神戸市東灘区まで生息が確認されている。しかし、限られた地域でしか発見されておらず、また発見されてから時間が経過していないため、現在でもほとんど研究されていない。そのため、いつ頃日本にどのような経路を経て侵入してきたかが判明していない。

ダンゴムシは主に落ち葉や雑草、動物の死骸などを食べ、コンクリートの表面を摂食してカルシウムなどの栄養を手に入れることができる。また、オカダンゴムシとハナダカダンゴムシは他の日本に生息する日本原産のダンゴムシ(コシビロダンゴムシ、ハマダンゴムシ)は乾燥に弱く森林でしか生息できないのとは比べ、乾燥にも強く、庭先、畑、民家周辺など様々な場所の落ち葉の下などの湿った場所に生息している。

神戸市周辺地域では、市街地などで発見されるダンゴムシは基本的にハナダカダンゴムシとオカダンゴムシの二種であるので、DNAを抽出する際にその二種類の判別を行い、ハナダカダンゴムシについての調査を行った。

本研究では、神戸市周辺地域でダンゴムシを採取し、ハナダカダンゴムシの生息分布について調べた。また、ミ

トコンドリアDNAの16S領域の塩基配列について、オカダンゴムシでは地域ごとに違いが見られるため、ハナダカダンゴムシの16S領域についても地域ごとに違いが見られるのではないかと考えた。しかし、現在ハナダカダンゴムシの塩基配列はフランスで採取されたハナダカダンゴムシ一件しかGenbankに報告されておらず、日本のものも、もちろん報告されていない。そこで、神戸市周辺地域のハナダカダンゴムシの塩基配列を確定することにした。それと同時に、フランスで報告されたハナダカダンゴムシの塩基配列やオーストラリア、アメリカ、フランス、ドイツ、韓国、日本で報告されているオカダンゴムシの塩基配列を使用し系統樹を作成し、それらのダンゴムシとの近縁関係やどの地域から神戸に侵入してきたかを明らかにすることを目的とした。

系統樹を作成するにあたって、ハナダカダンゴムシとオカダンゴムシのミトコンドリアDNAの16S領域の塩基配列についてはGenbankに公開されているものを使用した。ハナダカダンゴムシについてはフランス、オカダンゴムシについてはドイツ、ハンガリー、日本、オーストラリア、フランス、アメリカの塩基配列を使用した。またワラジムシの塩基配列と、外群としてオオグソクムシの塩基配列を使用した。

2. 実験方法

1. 個体の採取

神戸市内は灘区(神戸高校周辺、丸山公園、青谷)、中央区(北野神社)、長田区(高取山)、西区(永井谷、太山寺)、明石市(明石公園)、西宮市(甲山公園、巖島神社)、芦屋市(朝日ヶ丘公園)の地域でダンゴムシを採取した。

2. 種の同定及び雌雄の判別

ハナダカダンゴムシとオカダンゴムシの外見は非常に似ており区別が付きにくい。本研究では下記の相違点に注目し、それらに基づいて種を判別した。また、雌雄の判断については生殖器の有無を確認し判別した。

	オカダンゴムシ	ハナダカダンゴムシ
頭部中央尾突起の発達	していない	している 前方に突き出る
尾節	短い	長い
艶	有り	無し 白っぽい斑点を持つ
体	丸い	平べったい
丸まったとき	綺麗な球状	楕円形



ハナダカダンゴムシ



オカダンゴムシ

3. 足からの DNA の抽出

ダンゴムシを濃度 70% のアルコールで固定、洗浄した後、ただちに足から、DNA 鑑定用 DNA エキストラクター FM キット (和光純薬工業株式会社) を用いて DNA を抽出、単離した。

4. PCR (Polymerase Chain Reaction) 法による 16S 領域の増幅

PCR 法による 16S 領域の塩基数が 480 個で出来ている DNA 断片 (480bp) の増幅に 16SAR (CGCCTGTTTAACAAAACAT) と 16SBR (CCGGTCTGAACTCAGATCATGT) を用いて両方向から読むことを行った (図 1)。16SrRNA は約 1500bp であるが、本研究でこの領域を用いたのは、この領域のみでも種の同定ができ、その上 DNA シーケンスに用いられているダイレクトシーケンスでは一度に 500bp しか読むことができず、すべて読むには 3,4 回必要になり多くのコストがかかるためである。

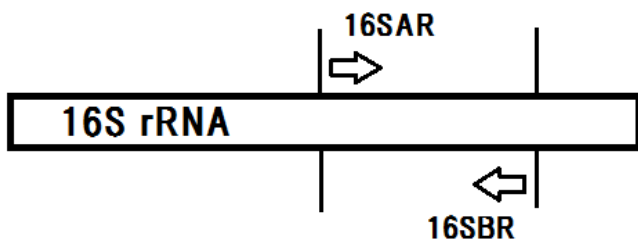


図 1. 16SrRNA の PCR 法の参考図

PCR 反応は全量 25 μ L の反応系で行い、プライマー (16SAR、16SBR) 各 0.25 μ L、PCR buffer 12.5 μ L、dNTP 5 μ L、ddH₂O 5.75 μ L、DNA ポリメラーゼ 0.25 μ L、DNA デンプレート 1 μ L を混合し、94°C 2 分間の熱変性を行った後、98°C 10 秒、59°C 30 秒、68°C 25 秒の反応を 40 サイクル行った。

5. 塩基配列の同定

PCR 法により増幅した DNA 溶液 1 μ L と Loading dye

1 μ L を混合し、アガロースゲル電気泳動 (寒天; 1.7% Agarose S/ニッポンジーン社製) した。紫外線露光により増幅した領域を確認したところ、オカダンゴムシ、ハナダカダンゴムシの両方で、増幅が成功していた。後に各採取地域から数個体ずつ選び DNA 溶液 25 μ L をスピニングカラム High Pure Purification Kit (Roche) で精製し、濃度を調整した後、北海道システムサイエンス社にシーケンスを依頼した。シーケンスプライマーは 16SAR、16SBR プライマーを用いた。

3. 結果

1. ハナダカダンゴムシの分布

今回我々は 9 地点でハナダカダンゴムシを発見した (図 2)。今までなされた報告において、兵庫県内では、ハナダカダンゴムシは神戸市東灘区以西にのみ生息しているとされていたが、今回の調査で、神戸市より東に位置する西宮市の甲山森林公園でもハナダカダンゴムシの採取に成功した (図 3)。

今回 DNA を抽出したハナダカダンゴムシ、オカダンゴムシを採取した地点と、その個体数は以下の表の通りである (図 4)。

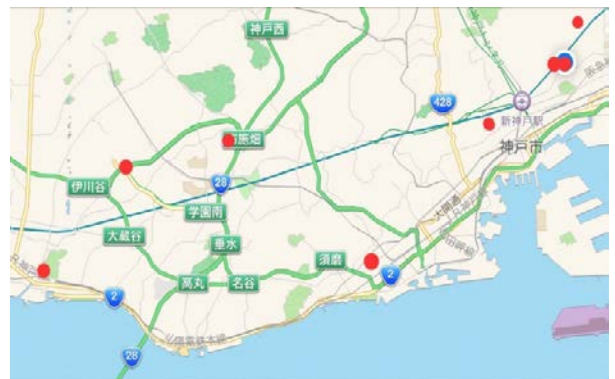


図 2. 採集に成功したハナダカダンゴムシの地点

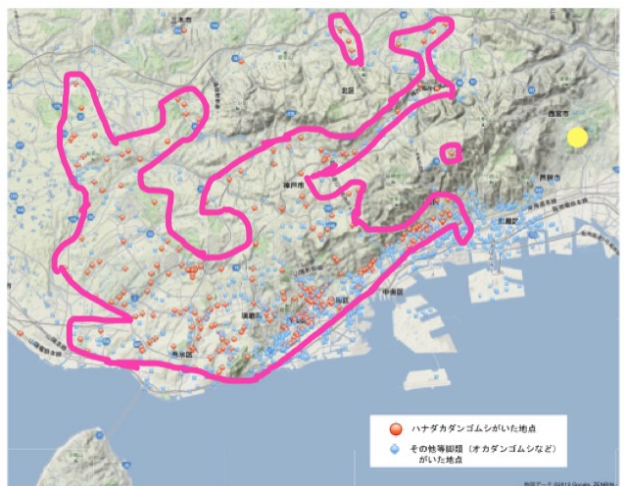


図 3. 採集したハナダカダンゴムシとオカダンゴムシの個体数

採集地		ハナダカ	オカ
灘区	神戸高校周辺	4	4
	丸山公園	4	5
	青谷	8	2
中央区	北野神社	3	3
長田区	長田高取山	1	
西区	永井谷	10	9
	太山寺	4	1
明石市	明石公園	1	3
西宮市	西宮甲山公園	7	8
	厳島神社	0	4
芦屋市	朝日ヶ丘公園	0	4
合計		42	43

図 4. これまでに報告された分布図との比較

2. 16Sの遺伝子解析

抽出した ハナダカダンゴムシのDNAが 16Sプライマーを使用したPCR法を用いることでオカダンゴムシと同様にDNAを増幅することができるか、DNA断片を電気泳動することによって確認した(図 5)。バンドの位置はハナダカダンゴムシとオカダンゴムシはどちらも 500bp付近の同じところに見られた。このことからハナダカダンゴムシの 16S領域もオカダンゴムシのプライマーで増幅することができたため、オカダンゴムシとハナダカダンゴムシは近縁であると分かった。

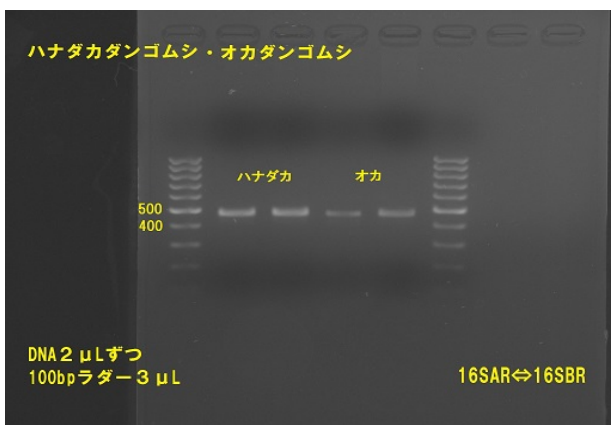


図 5. 電気泳動したDNA

3. DNAのシーケンスと系統樹の作成

PCR法によって増幅し、スピнкаラムで精製したハナダカダンゴムシのDNA断片のシーケンスを北海道システムサイエンス社に依頼した。依頼した個体はハナダダンゴムシの採取に成功した全地点の個体を用いた。シー

ケンスの結果、それら ハナダカダンゴムシ全ての塩基配列が一致した。それを遺伝子バンクの塩基配列と比較したところ、フランス(Poitiers)のハナダカダンゴムシの塩基配列と同一のものであると判明した。

上記の手順で解析したハナダカダンゴムシ(Armadillidium nasatum)の塩基配列とGenbankに報告されていたオカダンゴムシ(Armadillidium vulgare)、ワラジムシ(Porcellio scaber)の塩基配列、外群としてオオグソクムシ(Bathynomus doederleini)の塩基配列を使用して系統樹を作成した。系統樹は下記の通りである。

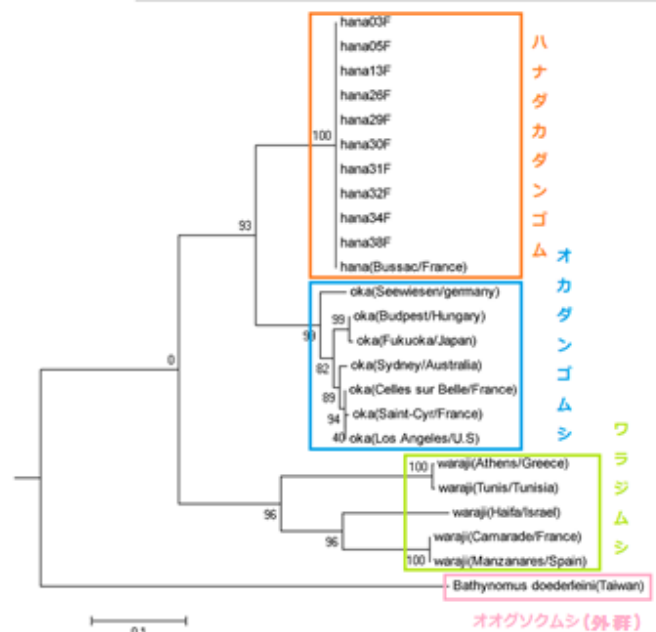


図 6. ミトコンドリアDNAの 16S領域のダンゴムシ系統樹

NJ(近隣結合)法で作成した系統樹より、今回我々が採取したハナダカダンゴムシの塩基配列は、現在報告されている限りにおいて同一であり、ハナダカダンゴムシはオカダンゴムシと近縁な種であると分かった。

4. 考察

今回、我々が確定したハナダカダンゴムシの塩基配列は全て一致した。そのことから神戸市近辺に生息するハナダカダンゴムシは同一集団であると考えられる。また、その塩基配列を報告されているフランスのハナダカダンゴムシの塩基配列と比較したところ 100%一致した。

ここで、全ての生物には下記のような現象が起こっている。ある集団内の生物一個体の塩基(AGTC)の一つが偶然に他の塩基に置換し、その置換が集団にとって不利でなければ、集団内の全ての個体にその塩基が定着することがあるというものである。これを塩基置換という。塩基置換は 16S 領域では約 2 万年に 1 塩基という確率で起こることが分かっている。よって、ある地域に生

息している生物種の一部が他の地域に移動し、その地域で十分に長い期間定着すると、それぞれの集団で塩基置換が起こり、地域ごとに異なる塩基配列を持つ同一種となる。つまり、集団がある地域に移住し、定住するとその集団は地域特有の塩基配列をもつようになるのである。オカダカダンゴムシとワラジムシの 16S 領域の塩基配列についても上記の通りの変化が起こり、生息している地域ごとに塩基配列が異なるという報告がされているが、ハナダカダンゴムシについてはフランスに生息している個体の 16S 領域の塩基配列についての報告があるのみで、アメリカ、カナダ、ニュージーランドなどの世界各地に生息している個体の 16S 領域の塩基配列についての報告はない(図 7)。そこで、我々は以下のような二つの前提を挙げ、ハナダカダンゴムシの神戸への侵入経路と分化の過程について考察した。



図 7.世界各地で発見されたハナダカダンゴムシ

前提 1.ハナダカダンゴムシの 16S 領域について、世界各地に生息している全ての集団で塩基配列が同一である場合。

前提 1 についての考察:それぞれの地域に広まってから塩基置換が起こるほど十分に時間が経過していないと考えられるので、最近、特定の地域に生息していたハナダカダンゴムシが世界中に急速に生息域を広げたと考察した。

前提 2.ハナダカダンゴムシの 16S 領域について、世界各地に生息している集団ごとに塩基配列が異なる場合。

前提 2 についての考察:ハナダカダンゴムシが、塩基配列の異なる集団が生息している世界各地から神戸に侵入していたとすると、神戸に複数種の塩基配列のハナダカダンゴムシが存在しているはずである。しかし、今回の結果ではハナダカダンゴムシの塩基配列は全て一致していた。そのことから、フランスや日本、それと同じ系統のハナダカダンゴムシが生息している地域のみから神戸に侵入してきたということと、神戸に侵入してから

それほど時間がたってないと考察した。

上記のように、前提 1、2 の場合について考察したが、前提 2 が正しいとすると、ハナダカダンゴムシはフランスや日本、フランスと同じ系統のダンゴムシが生息している地域からのみ神戸に侵入したことになる。しかし、日本への侵入経路は貿易などの人為的なものとは考えにくく、現在船や飛行機などの交通手段の発達により、国際的に交易が盛んになっており、神戸には神戸港という貿易港があるので、ある一定の地域以外から全く侵入していないということは考えにくい。よって、私たちは 1 の仮説が有力だと考えた。

ここで我々が作成した系統樹から、ハナダカダンゴムシはオカダカダンゴムシと近縁な種であると分かる。よって、我々は前提 1 に基づいて、ハナダカダンゴムシはオカダカダンゴムシから最近分化した種であり、一つの地域で留まった後、交通手段の発達のためにフランスと日本を含む世界中の各地域に急速に広まったのではないかと考察した。

本研究では、ハナダカダンゴムシの 16S 領域について、Genbank に唯一登録されていたフランスの一個体と我々が確定したハナダカダンゴムシの塩基配列を参考にして、ハナダカダンゴムシの神戸への侵入経路と分化の過程について考察したが、今後世界のより多くの地域で塩基配列が明らかになれば、ハナダカダンゴムシについてより詳しい事実が分かるようになるだろう。

6. 謝辞

本研究を進めるにあたって様々な助言をくださった「兵庫県立人と自然博物館」の鈴木武様に心からの感謝の意を表す。本研究担当教諭の繁戸克彦先生には全実験方法の指導など本研究を 1 年間支えていただいたことに深くお礼申し上げる。

7. 参考文献

1. Tang YW, Ellis NM, Hopkins MK, Smith DH, Dodge DE, Persing DH.: Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* ;36(12): 3674~3679, 1998
2. Hall L, Doerr KA, Wohlfel SL, Roberts GD.: Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol.* 41(4): 1447~1453, 2003.
3. 種生物学会 2010 「外来生物の生態学」
4. 宮田 隆 2010 新しい分子進化学入門