

形態と遺伝情報を同時に保管する昆虫標本作製手法の開発

兵庫県立大学自然・環境科学研究所 講師 中濱 直之

■はじめに

昆虫の乾燥標本は、空気中の水分やくん蒸薬剤などにより DNA が急速に劣化してしまい、解析が困難となってしまう場合が非常に多い。そのため、昆虫の遺伝解析用サンプルは、DNA の劣化を防ぐために無水エタノールや冷凍庫で保管されることが多かった。しかしこれらの保管方法ではスペースの確保や維持経費の面でデメリットがあり、多数の遺伝解析用サンプルの保存が困難だった。

そこで、筆者らは形態と遺伝情報を同時に保管できる昆虫標本の作製手法の開発を行った (Nakahama *et al.*, 2019)。本稿では、その作製手法を紹介する。

■本手法の原理

本手法の注目すべき点は、無水エタノールではなくプロピレングリコール (PPG) を保存液に用いたことである。一般的な乾燥標本の作製手法のように常温で乾燥させた場合、乾燥の過程で DNA 分解酵素により急速に組織の分解が進んでしまう。そのため、DNA の劣化を防ぐために液浸で保存するのが望ましい。しかし、保存液に無水エタノールを使用した場合、蒸発速度が非常に大きいため短期間で蒸発し、サンプル中の DNA が劣化するおそれがある。一方、PPG の場合、エタノールと比べても極めて蒸発速度が小さい。そのため、保存液が長期間蒸発せず、サンプル中の DNA が劣化せずに維持される。

■作製手法

- (1) 酢酸エチルの蒸気、または冷凍庫で殺虫する。酢酸エチルによる殺虫の場合、酢酸エチルが DNA の断片化を促進するため、殺虫が完了した時点でできるだけ早く取り出す。
- (2) 殺虫を確認した後、昆虫の体から一部を切り取り、遺伝子解析用サンプルを確保する。この場合、消化中の別の生物由来の DNA によるコンタミネーションを防ぐため、脚部、胸筋などが望ましい。微小昆虫の場合、形態観察用標本とは別個体の体全体を遺伝子解析用サンプルとして用いるとよい。この際、使用するピンセットなどはサンプルごとに火炎滅菌または十分な洗浄を行っておく。
- (3) PCR 用 0.2ml チューブに PPG を 0.15ml 程度満たし、その中に切り取った虫体の一部を入れる。もし昆虫の組織が大きい場合は前処理として、99%エタノールなどに 5 分程度浸して脱水しておく、DNA の劣化がより抑制される。
- (4) PPG の液漏れや蒸発防止のため、PCR 用 0.2ml

チューブの蓋をパラフィルムで巻く。標本が光にさらされる場合は、プロピレングリコールの劣化を防ぐためにアルミホイルを巻いて遮光する。

- (5) 虫体を刺した昆虫針で、PCR 用 0.2ml チューブの蝶番を刺して、ドイツ箱などで保管する。常温による保管でよい。

※ DNA を抽出する際は、標本の筋肉組織を 1～2 度洗浄して PPG を除去する。洗浄は 99%エタノールに 10 分～1 時間ほど浸し、その後エタノールを除去する方法で行う。エタノールが蒸発した後は、通常の DNA 抽出に利用可能。



図 本手法に基づく標本作製例
PPG を入れた 0.2ml チューブに脚部を入れ、
チューブの蝶番に昆虫針を刺して固定している。

■本手法に期待される成果

本手法の開発にあたって、ヨーロッパイエコオロギを対象に、本手法と一般的な乾燥標本の作製手法による標本の DNA の残存程度を作製直後から 1 年後まで調べた。遺伝子の断片化の指標としてミトコンドリア DNA COI 領域の 1,555bp を標的に PCR を行った。その結果、乾燥標本では作製後半年経過すると PCR 増幅がほとんど確認されなかった一方で、本手法では、1 年経過しても供試したすべての標本で PCR 増幅が確認された。現在、標本作製後 3 年が経過しているが、保存液はほとんど蒸発することなく残存しており、保存液が残存している間は DNA の断片化が抑制されるものと考えられる。

本手法を活用すれば、保管スペースや維持のコストを抑えつつ、多数の遺伝解析用サンプルの保存が可能となる。また、組織片などから DNA 情報によって種を同定する DNA バーコーディングでは、一般的に約 650bp 程度の長さの DNA 領域が用いられるが、本手法ではこの長さ以上の DNA 断片を長期的に保存できる。このことから、DNA バーコーディングをはじめ様々な遺伝解析に広く利用されることが期待される。

引用文献：

Nakahama, N., Y. Isagi, M. Ito (2019) Methods for Retaining Well-Preserved DNA with Dried Specimens of Insects. *European Journal of Entomology*, 116: 486-491