

多摩川流域に生息する蝶類の遺伝的 多様性とその保護に関する研究

「Genetic diversity and conservation of butterflies found
in the basin of the Tama River」

1 9 9 9 年

代表研究者：小 原 嘉 明 (OBARA Yoshiaki)
東京農工大学農学部教授

共同研究者：大 脇 真 (OHWAKI Makoto)
佐 藤 俊 幸 (SATOH Toshiyuki)

目 次

序	2
第1部 オオムラサキの遺伝的多様性と個体群間の類縁関係	
1. はじめに	4
2. 方 法	5
(1) 資料の採取	5
(2) DNAの抽出	5
(3) PCR法によるミトコンドリアDNAのDループの増幅	7
(4) 塩基配列の解析	8
3. 結果と考察	8
(1) オオムラサキのミトコンドリアDNAのDループのサイズ	8
(2) オオムラサキのミトコンドリアDNAのDループの塩基配列	8
(3) 遺伝的多型の解析	10
(4) ハプロタイプの類縁関係	10
(5) 地域個体群のハプロタイプ構成	12
(6) 地域個体群の類似度	13
第2部 モンシロチョウの遺伝的多様性	
1. はじめに	14
2. 方法	14
(1) 試料の採取	14
(2) DNAの抽出	15
(3) PCR法によるミトコンドリアDNAのDループの増幅	16
(4) 塩基配列の解析	17
3. 結果と考察	17
ま と め	21
引用文献	23

「多摩川流域に生息する蝶類の遺伝的多様性と その保護に関する研究」

要 約：

西多摩3地区より採集したオオムラサキとモンシロチョウからDNAを抽出し、ミトコンドリアDNAのDループ領域をPCR法で増幅し、その塩基配列の確定作業を行った。

西多摩のオオムラサキには12のハプロタイプ（ミトコンドリアDNAの遺伝子型）がみられた。ハプロタイプを共有する個体の割合が、平井と青梅では、宮崎、岐阜、静岡のような遠隔地と比べてずっと高かった。一方、西多摩のモンシロチョウには68のハプロタイプが区別された。最も頻度の高いハプロタイプは、3地区のどこでも最優占していたが（14～29%）、それ以外のハプロタイプは地区固有で頻度の低いものが多かった。

以上のことから、西多摩のモンシロチョウは遺伝的な共通性を保ちつつも、オオムラサキに比べかなり遺伝的に多様であることが示唆された。オオムラサキは遺伝的多様性の観点からも、より絶滅の危険性の高い種かもしれない。

“Genetic diversity and conservation of butterflies found in the basin of the Tama River”

Summary :

Total DNA was individually extracted from the butterflies, *Sasakia charonda* and *Pieris rapae crucivora*, which were collected from three areas in west Tama. D-loop region of the mitochondrial DNA was amplified by PCR, and the sequence was determined.

For *S. charonda* from west Tama, 12 haplotypes (genotypes of mitochondrial DNA) were discriminated. The proportion of individuals which shared the same haplotypes was very high between Hirai and Oume areas compared to those among more distant areas, such as Miyazaki, Gifu and Shizuoka prefecture. On the other hand, 68 haplotypes were discriminated for *P. rapae* in west Tama. The most frequent haplotype was always most dominant in all three areas (14～29%), and other haplotypes were often local-specific and relatively rare within total area.

In west Tama, it was suggested that *P. rapae* retained genetic similarity at a certain level between local populations, but also had higher genetic diversity compared to *S. charonda*. *S. charonda* might be more endangered species from the view point of genetic diversity.

キーワード key words :

- | | |
|-------------|-------------------------------|
| 1. 遺伝的交流 | genetic relationship |
| 2. 遺伝的多様性 | genetic diversity |
| 3. 移動・分散 | migration・dispersal |
| 4. オオムラサキ | <i>Sasakia charonda</i> |
| 5. 環境保全 | environmental protection |
| 6. 生物保護 | biological conservation |
| 7. 多摩川流域 | the basin of the Tama River |
| 8. DNA多型 | DNA polymorphism |
| 9. 繁殖戦略 | reproductive strategy |
| 10. モンシロチョウ | <i>Pieris rapae crucivora</i> |

序

モンシロチョウとオオムラサキは多摩川流域に生息する代表的な蝶類であるが、前者は開放草性地で広範に分布するのに対し、後者は森林性で局所的に分布する。本研究は、対照的な2種の蝶それぞれにおいて、地域個体群内の遺伝的多様性と、地域個体群間の遺伝的交流を明らかにする。そのような研究は学術的に興味深いばかりでなく、多摩川流域の自然環境の保全と、そこに生息する生物の保護のあり方を考える上でも重要であると考えられる。なぜなら、遺伝的に単調で閉鎖的な地域個体群は、遺伝的に多様で開放的な地域個体群に比べ、たとえ繁栄しているように見えても、近親交配、流行病、環境の変化・攪乱等の要因により突然衰退し滅亡する危険性が高いからである。フィンランドにおけるHanskiらのグループによる研究では、フィヨルド地形による大小さまざまな島に生息するタテハチョウ科のヒョウモンモドキの一種、*Melitaea cinxia* の地域個体群は、遺伝的多様性が小さいほど近親交配による有害遺伝子の蓄積により絶滅する確率が高いことが示された (Saccheri, I., et al. 1998)。また、地域個体群間の遺伝的交流関係が明らかになれば、多摩川流域における蝶類の分散のしかたや、現在の分布が成立した歴史について重要な知見が得られ、それらの保護・回復に大きく寄与しうる。

本研究は、これまでにとぅきゅう環境浄化財団の助成を受けた以下の研究と関連が深い。多摩川流域の昆虫類の分布・生息状況、その保護等を扱う点において、学術研究では、(9) 多摩川流域における陸上動物（昆虫・両生・爬虫・哺乳類）の生態学的研究〔自然を評価する指標を求めて〕、(29) 多摩川流域の蝶類保護に関する生態学的研究〔ウスバアゲハを例として〕、(176) 多摩川流域における陸上動物（昆虫・両生・爬虫・哺乳類）の生態学的研究（Ⅱ）－自然指標としての昆虫類（蝶・蛾、甲虫、アリ類）－、一般研究では、(109) 多摩川中流域の丘陵部における里山昆虫の研究と関連がある。本研究の特色は、これまでの生態学的な研究の成果をふまえつつ、地域個体群の遺伝的多様性・遺伝的交流という違った観点から自然環境の保全と蝶類の保護のあり方を考える点にある。

最近、保全生物学において、小さな地域個体群どうしの交流によって形成される、より大きなメタ個体群と呼ばれる集団の概念が注目されている。メタ個体群が形成されていれば、その地域全体である種が絶滅する確率は低いと考えられている。本研究により、地域個体群間の遺伝的交流について情報が得られれば、これらのチョウが多摩川流域においてメタ個体群を形成しているかどうか明らかになるものと期待される。それと同時に、多摩川流域におけるこれらのチョウの分散や定着のパターンも明らかになるだろう。得られた知見をもとに、そのようなパターンと環境・地史的要因との関連が分析されれば、多摩川流域の自然環境の保全とそこに生息する生物の保護・回復のあり方に重要な示唆が得られるものと期待される。対照的な両種で得られた結果の比較は、モンシロチョウに比べ生息地が限られ、個体数も少ないオオムラサキの保護に、大いに貢献するであろう。ミトコンドリアのDNAは染色体DNAに比べると変異の速度が速く、種間あるいは種内の系統関係や種内の遺伝的多型性の程度などを調べるのに用いられている。特に、Dループと呼ばれる領域は蛋白質に翻訳されない配列で、変異が溜まりやすい領域であるといわれている。従って、種内の変異を検出するのに適している領域であると考えられた。そこで、今回この領域の遺伝的多型性を検出し、調査地区個体群の遺伝的多様性と類似性を検討した。

第1部 オオムラサキの遺伝的多様性と個体群間の類縁関係

1. はじめに

モンシロチョウとオオムラサキは多摩川流域に生息する代表的な蝶類であるが、前者は開放草地性で広範に分布するのに対し、後者は森林性で局所的に分布する。本研究は、対照的な2種の蝶それぞれにおいて、地域個体群内の遺伝的多様性と、地域個体群間の遺伝的交流を明らかにする。そのような研究は学術的に興味深いばかりでなく、多摩川流域の自然環境の保全と、そこに生息する生物の保護のあり方を考える上でも重要であると考えられる。なぜなら、遺伝的に単調で閉鎖的な地域個体群は、遺伝的に多様で開放的な地域個体群に比べ、たとえ繁栄しているように見えても、近親交配、流行病、環境の変化・攪乱等の要因により突然衰退し滅亡する危険性が高いからである。また、地域個体群間の遺伝的交流関係が明らかになれば、多摩川流域における蝶類の分散のしかたや、現在の分布が成立した歴史について重要な知見が得られ、それらの保護・回復に大きく寄与しうる。

本研究は、これまでにとうきゅう環境浄化財団の助成を受けた以下の研究と関連が深い。多摩川流域の昆虫類の分布・生息状況、その保護等を扱う点において、学術研究では、(9) 多摩川流域における陸上動物(昆虫・両生・爬虫・哺乳類)の生態学的研究[自然を評価する指標を求めて]、(29) 多摩川流域の蝶類保護に関する生態学的研究[ウスバアゲハを例として]、(176) 多摩川流域における陸上動物(昆虫・両生・爬虫・哺乳類)の生態学的研究(Ⅱ)―自然指標としての昆虫類(蝶・蛾・甲虫、アリ類)―、一般研究では、(109) 多摩川中流域の丘陵部における里山昆虫の研究と関連がある。本研究の特色は、これまでの生態学的な研究の成果をふまえて、地域個体群の遺伝的多様性・遺伝的交流という違った観点から自然環境の保全と蝶類の保護のあり方を考える点にある。最近、保全生物学において、小さな地域個体群どうしの交流によって形成される、より大きなメタ個体群と呼ばれる集団の概念が注目されている。メタ個体群が形成されていれば、その地域全体である種が絶滅する確率は低いと考えられている。本研究により、地域個体群間の遺伝的交流について情報が得られれば、これらのチョウが多摩川流域においてメタ個体群を形成しているかどうか明らかになるものと期待される。それと同時に、多摩川流域におけるこれらのチョウの分散や定着のパターンも明らかになるだろう。得られた知見をもとに、そのようなパターンと環境・地史的要因との関連が分析されれば、多摩川流域の自然環境の保全とそこに生息する生物の保護・回復のあり方に重要な示唆が得られるものと期待される。対照的な両種で得られた結果の比較は、モ

ンシロチョウに比べ生息地が限られ、個体数も少ないオオムラサキの保護に、大いに貢献するであろう。

ミトコンドリアのDNAは染色体DNAに比べると変異の速度が速く、種間あるいは種内の系統関係や種内の遺伝的多型性の程度などを調べるのに用いられている。特に、Dループと呼ばれる領域は蛋白質に翻訳されない配列で、変異が溜まりやすい領域であるといわれている。従って、種内の変異を検出するのに適している領域であると考えられた。そこで、今回この領域の遺伝的多型性を検出し、調査地区個体群間の関係を推定することを試みた。

2. 方法

(1) 試料の採取

東京都内で現在もオオムラサキの生息が認められている西多摩の3地区、即ち青梅市長淵、西多摩郡日の出町平井およびあきる野市横沢入を選び、1994年から1997年の冬期に越冬幼虫を採取した(図1)。越冬幼虫の採集はオオムラサキの食樹である榎一本から一頭ずつ行った。比較のための東京都以外の生息地の個体は高崎浩一朗博士(宮崎県えびの市産)と加藤義臣博士(岐阜県大野郡清見村産、および静岡県御殿場市産)より供与を受けた。幼虫は、核酸の調製を行うまで -80°C の冷凍庫に保存した。また、一部の幼虫は成虫になるまで飼育し、幼虫と同様に -80°C で保存した。

(2) DNAの抽出

凍結個体(幼虫は個体全体、成虫は触角と口吻を除いた頭部)から、Proteinase Kを用いる常法でDNAの抽出を行った。即ち、1.5mlのエッペンドルフチューブに5%クエン酸を500 μl 注入し、水中にさしておく。これに凍結個体を入れ、ハサミで大きな片が見えなくなるまで切り刻む。軽く攪拌した後 4°C 、6000rpmで5分間遠心する。沈殿した組織を乱さないように上澄み液をピペットで吸い出し、新たに5%クエン酸を500 μl 注入し、再びミキサーで攪拌後、 4°C 、5分間6000rpmで遠心する。この操作を上澄み液がクリアになるまで繰り返す。通常2回繰り返せばよい。沈殿した組織にTail液(50mM Tris-HCl, pH8.0, 100mM EDTA, pH8.0, 100mM NaCl, 1%SDS)を600 μl 、PK液(10mg/ml Proteinase K, 100mM Tris-HCl pH7.5, 12.5mM EDTA, 150mM NaCl, 1%SDS)を100 μl 加え、穏やかに攪拌後、 56°C で30分、 37°C で一夜インキュベートする。10mg/mlのRNase A溶液を10 μl 加えて更に1時間 37°C でインキュベートした後、700 μl のフェノール液を加え、エマルジョン様になるまで攪

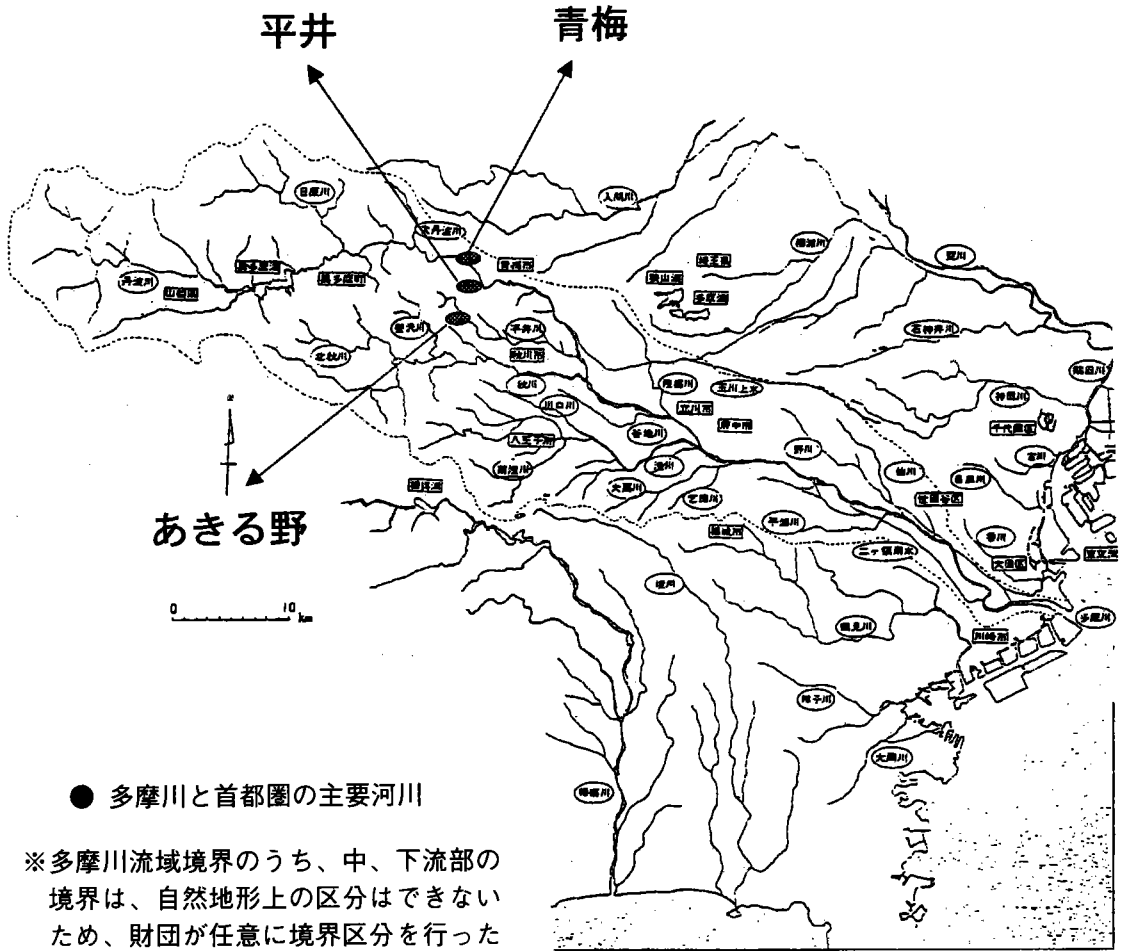


図1 調査地

拌した後、10分間インバーターミキサーで軽く攪拌する。15000 rpmで10分間遠心した後、フェノール層を吸わないように上の水層を吸って別のエッペンドルフチューブに移す。この操作を2回行う。フェノールクロロホルムを700 μ l加え、10分間インバーターミキサーで軽く攪拌後、15000rpmで5分間遠心する。水層を吸って別のチューブに移す。この操作も2回行う。クロロホルムを700 μ l加え。10分間攪拌後、15000rpmで5分間遠心する。下層のクロロホルム液を吸い出し捨てる。イソプロパノールを700 μ l加え、穏やかに攪拌し、15分ほど室温に放置した後、15000rpmで15分間遠心し、DNAの沈殿を固める。上澄み液を捨て、80%エタノールを500 μ l注入し、DNAの沈殿をすすぐ。5分間遠心した後、上澄み液を捨て、

吸引乾燥によりDNAの沈殿を乾燥させ、最後に100 μ lのTE (10mM Tris-HCl pH7.6, 1 mM EDTA pH8.0) に溶かして使用するまで -80°C で保存する。得られたDNAサンプルは1.5%アガロースゲルの電気泳動により高分子DNAの存在とRNAの混入が無いことを確認した。

(3) PCR法によるミトコンドリアDNAのDループの増幅

ショウジョウバエ (*Drosophila yakuba*) のミトコンドリアDNAのDループの塩基配列のデータをもとに合成したプライマーを用いて、オオムラサキのミトコンドリアDNAのDループをPCR法で増幅することを試みた。種々の条件を検討した結果、以下に記す条件で安定的に再現性よく増幅できることが分かった。

PCRの条件

プライマー

primer 1 : 5'TAGGGTATCTAATCCTAGTT3'

primer 2 : 5'TGGGGTATGAACCCAGTAGC3'

反応液の組成:

10 x <i>Taq</i> buffer	2 μ l
10mM dNTP	0.2 μ l
2.5 μ M primer 1	2 μ l
2.5 μ M primer 2	2 μ l
25mM MgCl ₂	1.6 μ l
Distilled water	7 μ l
Template DNA *	5 μ l
<i>Taq</i> Polymerase	0.2 μ l
Total	20 μ l

* : 反応液に入れるサンプルの鋳型DNAの量は1 ng程度がよく、通常ストックのDNA溶液を蒸留水で100倍に希釈した液を使えばよい。

反応条件:

- (1) 94°C 4分
- (2) 94°C 50秒、 45°C 2分、 72°C 1分30秒、以上のステップを35回繰り返す。
- (3) 72°C 5分

(4) 塩基配列の解析

1.5%アガロースゲル上に流したPCR産物のバンドを切り出し、ガラスビーズを用いたDNA精製用キット (Genecreen, Bio 101 Inc.) で精製した。精製したDNAの塩基配列をDNA Sequencing Kit (Applied Biosystem Inc. Dye terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Part No.402079) を用いて5'側 (primer 1) および3'側 (primer 2) の両側から解析した。SequencerにはABI 373Aを使用した。

3. 結果と考察

(1) オオムラサキのミトコンドリアDNAのDループのサイズ

得られたPCR産物を1.5%アガロース電気泳動に流し、大まかなサイズを調べたところ、図2に示したように、いずれの個体のPCR産物も(750bp (base pair))の大きさに、ショウジョウバエで報告されているような個体間の大きなサイズの違いは認められなかった。

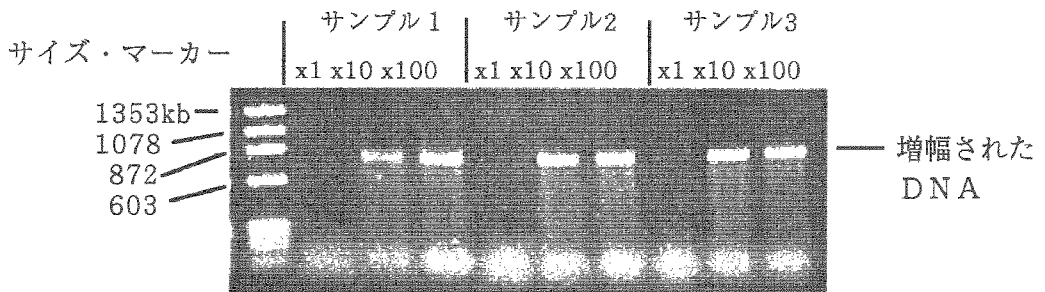


図2 ミトコンドリアDNA・DループのPCR
x1, x10, x100はそれぞれDNA濃度の希釈率

(2) オオムラサキのミトコンドリアDNAのDループの塩基配列

西多摩3地区の41個体(西多摩郡日の出町平井:19個体、青梅市長淵:16個体、あきる野市横沢入:6個体)および東京都以外の3地区の27個体(いずれも9個体ずつ)、計68個体のオオムラサキのミトコンドリアDNAのDループの塩基配列を決定した。全塩基配列の一例を図3に示した。ミトコンドリアDNAのDループは“AT-rich region”ともいわれ、アデニン(A)とチミン(T)に極めて富む領域である。今回決定した塩基配列をみても、ATの割合が89%以上になり、この部位がDループであることを示している。Dループの正確なサイズは個体によって違いがあり、758bp、759bp、および760bpの個体が観察された。データは

示さないが、オオムラサキと同時に採集した2個体のゴマダラチョウについてもオオムラサキと同様の塩基配列の解析を行った。5'側160番目付近のGCに富む領域の塩基配列はゴマダラチョウやモンシロチョウにも認められ、チョウ類に共通に保存されている部位であると考えられた。

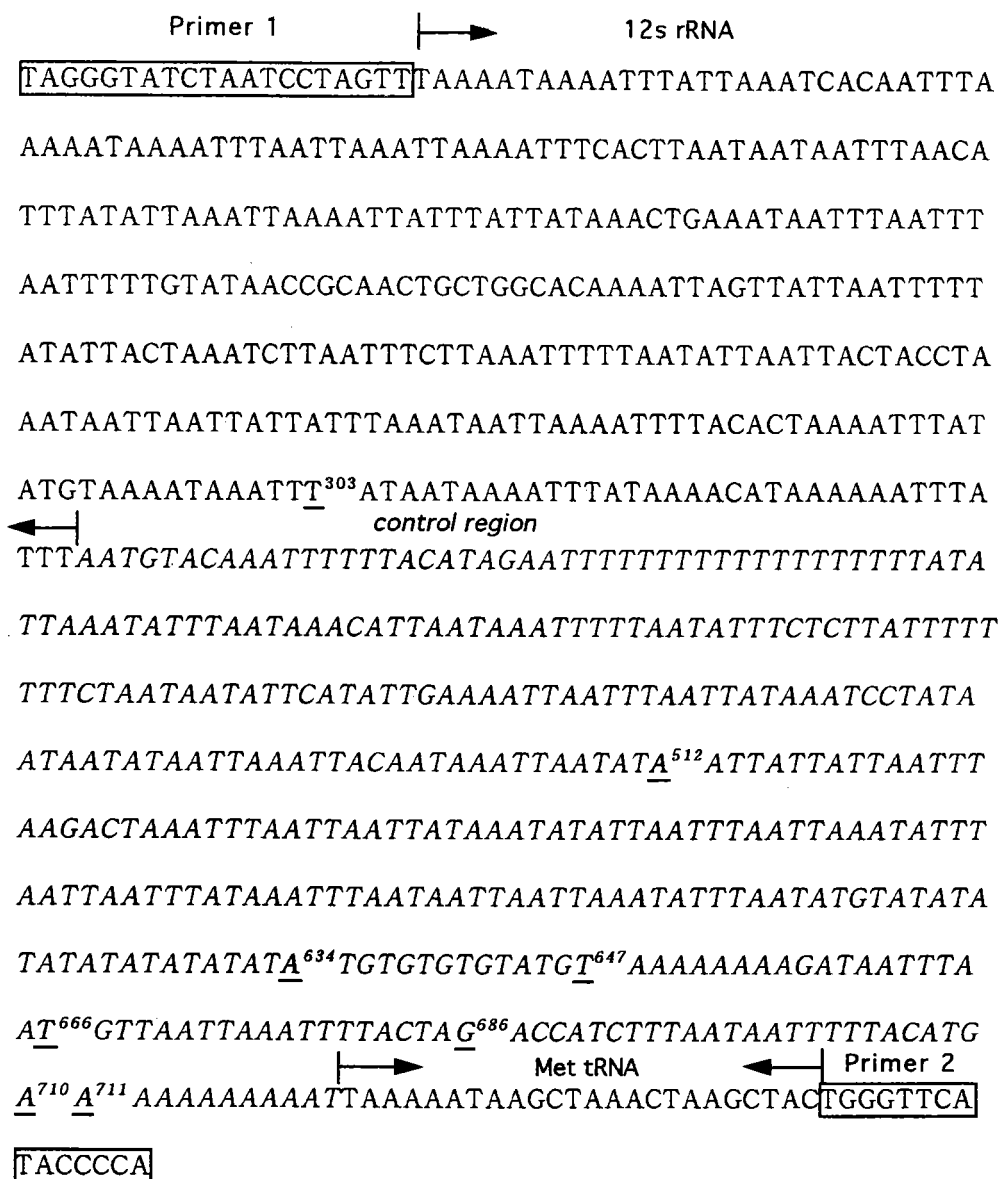


図3 オオムラサキのミトコンドリアDNA・Dループ(control region)の塩基配列の1例(斜字体がcontrol region)。A,T,G,Cはそれぞれアデニン、チミン、グアニン、シトシン。太字・下線は個体変異がみられる塩基。肩文字は先頭からの番号。

(3) 遺伝的多型の解析

調べた68個体の塩基配列には12ヶ所の部位で点突然変異および欠失が認められたが、変異はいずれもプリンどうしあるいはピリミジンどうしの変異 (Transition) で、プリンからピリミジンあるいはその逆の変異 (Transversion) は認められなかった。変異あるいは欠失の認められる塩基を示した12個のハプロタイプを図4に示す。Dループは蛋白質に翻訳されない領域で、最も変異の多い部分であるといわれている。南米産毒チョウ (*Heliconius erato*) の研究報告では、種内変異が多すぎて、系統関係の解析には不向きであるといわれている。しかしながら、オオムラサキの場合は変異の程度は非常に低く、最大5回の変異内に入り(0.9%)、全て同一種として判定されるものであった。

	99	303	512	634	635	636	647	648	667	686	711	712
A	T	T	G	G	T	G	T		T	G		A
B	T	T	G	G	T	G	T		T	G	A	A
C	T	C	G	G	T	G	T		T	G		
D	T	T	G	G	T	G	C		T	G		
E	T	T	G	G	T	G	T		C	G	A	A
F	T	T	A	G	T	G	T		T	G		
G	T	T	A	G	T	G	T		T	G		A
H	T	T	A	A	T	G	T		T	G	A	A
I	T	T	A	G	T	G	T		T	G		A
J	C	T	A	G	T	G	T		T	A		A
K	T	T	A	G			T	A	T	G	A	A
L	T	T	A	G	T	G	T		T	A		

図4 オオムラサキのミトコンドリアDNA Dループの塩基配列に見られた多型性 (数字は5'側からの塩基番号)

オオムラサキの12個のハプロタイプ、ゴマダラチョウおよびモンシロチョウの塩基配列のデータをもとに多重配列解析を行い、作成した系統樹が図5である。タテハチョウ科のオオムラサキとゴマダラチョウはシロチョウ科のモンシロチョウに比べるとより近い関係を示している。

(4) ハプロタイプの類縁関係

一般にDNA塩基の置換や挿入、欠失の頻度はTransversion < Transition < Deletionであるといわれている。従って、今回観察されたオオムラサキの12個のハプロタイプ間の類縁関係を類推するにあたって、それぞれの変異を対等に扱うのは不適であると考えられた。そこで、A (T)、AT (TA)あるいはGT (CA)の繰り返し

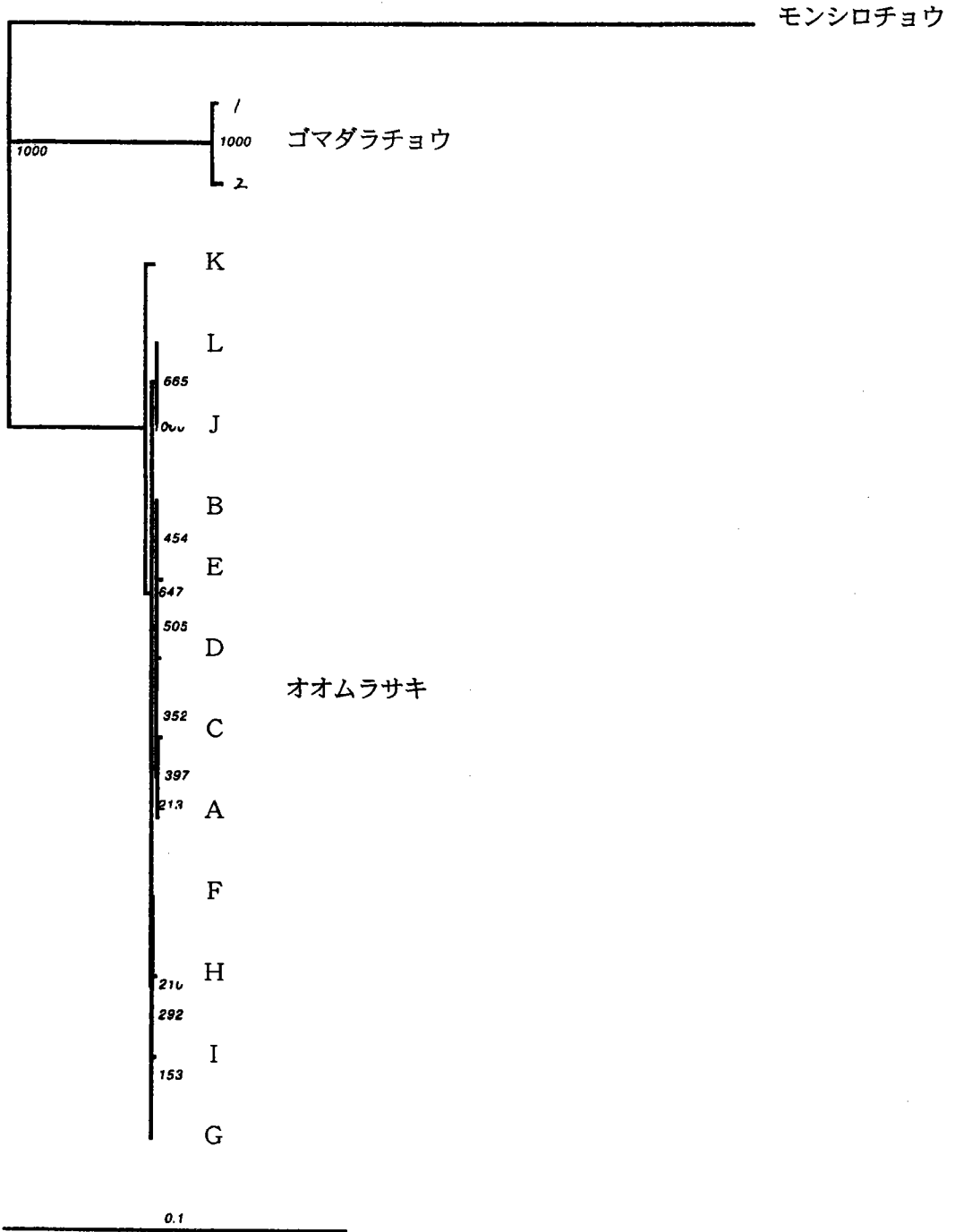


図5 ミトコンドリアDNA・Dループの塩基配列をもとに推定されたオオムラサキ、ゴマダラチョウ、モンシロチョウの系統関係

返しの数の違いのみの差を示すハプロタイプどうしはA (G)、あるいはT (C)の置換が起こっているハプロタイプどうしに比べてずっと近いと考えて、各ハプロタイプの類縁関係を推定したものが図6である。

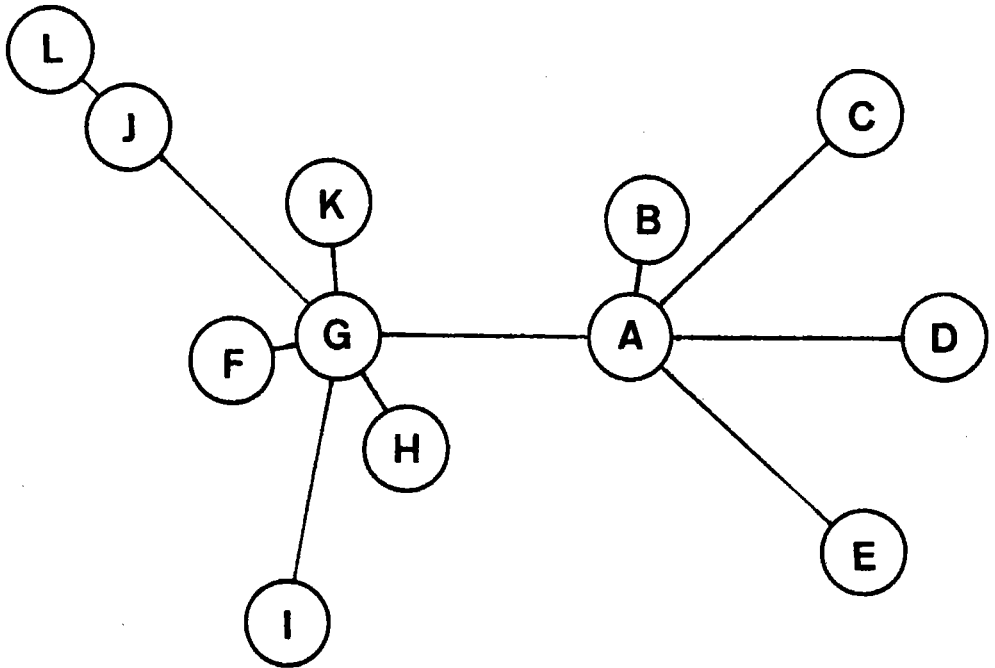


図6 オオムラサキのミトコンドリアDNAハプロタイプの類縁関係

(5) 地域個体群のハプロタイプ構成

塩基配列が明らかになった個体全てをハプロタイプごとに分類し、それぞれの地区のハプロタイプ構成およびそのハプロタイプに属する個体数を調べた(表1)。西多摩3地区のオオムラサキには日の出町 (TH) と青梅市 (TO) で4つのハプロタイプ、あきる野市 (TA) では3つのハプロタイプが観察された。また東京都以外の地区でも宮崎県えびの市 (ME)、岐阜県大野郡清見村 (GK)、および静岡県御殿場市 (SG) でそれぞれ4、5、4個のハプロタイプが観察された。ミトコンドリアは母系遺伝をするので、各地区には少なくとも3~5以上の母系が存在すると考えられる。東京都あきる野市の個体群で観察されたハプロタイプの数は3個で最も少なかったが、この地区では越冬幼虫が採集できる榎の数が少ないことと越冬幼虫の総数も非常に少ない(10~100個)ため、保護の観点から

調べる個体数を増やすことが出来なかった。更に多くの個体を調べれば、より多くのハプロタイプが発見されることも考えられる。表1より明らかのように、調べた地区全てに共通なハプロタイプ (A)、4地区に共通なハプロタイプ (G, J)、2地区に共通なハプロタイプ (I)、1地区のみにみられるハプロタイプ (B、C、D、E、F、H、K、L) が存在した。九州から東京までの、人為的な移動が無ければお互いの交流はないと思われる地区の間でも共通なハプロタイプが観察されることと、観察されたハプロタイプの数少なく遺伝的な多型性が少ないことは、オオムラサキが日本に定着してから余り時間が経っていないか、あるいは Bottleneck 現象を経験していることを示唆していると思われる。

(6) 地域個体群の類似度

西多摩3地区の個体群間交流の有無を類推する目的で、各地区間の類似度を、Kimotoの個体数による重みづけを行った重複度指数の計算式を用いて計量化したものが表2である。この表から単純に系統樹を書くと図7aのようになるが、それぞれの個体群について同様の計算を行い最も近い個体群どうしを結び付けながら系統樹を書いていくと図7bのようになる。それぞれの地区で調べた個体数が異なり、東京都あきるの市の個体数が6個体と少ないことから、図7bではTAとMEが最も近い関係にあるというような誤っていると思われる結果も出ているが、THとTOは極めて近い関係にあり、遺伝的な交流の存在を示唆していると考えられた。

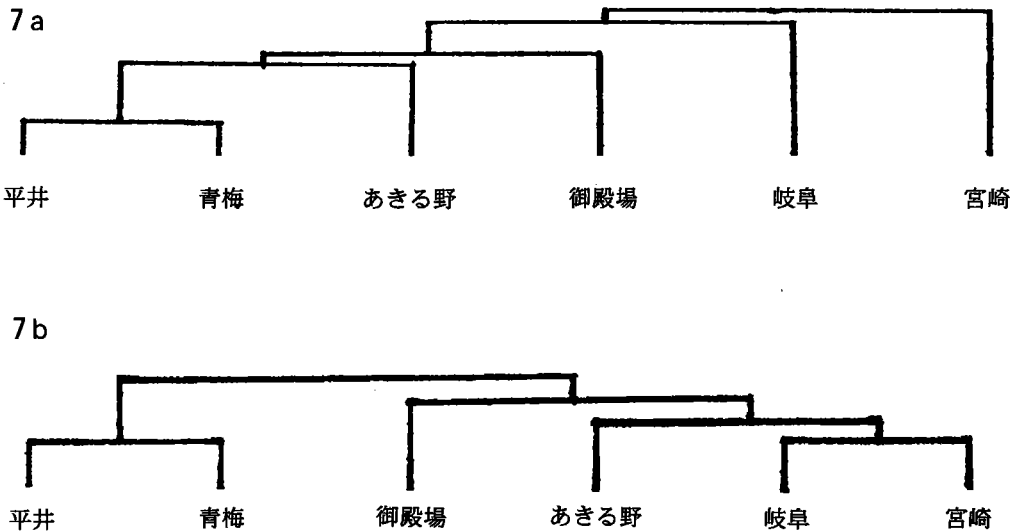


図7 類似度指数によるオオムラサキ地域個体群の系統樹

第2部 モンシロチョウの遺伝的多様性

1. はじめに

モンシロチョウは開放草地性で、森林性で局所的に分布するオオムラサキと対照的に、多摩川流域にごく普通にみられる。最近、保全生物学において、小さな地域個体群どうしの交流によって形成される、より大きなメタ個体群と呼ばれる集団の概念が注目されている。メタ個体群が形成されていれば、その地域全体である種が絶滅する確率は低いと考えられている。モンシロチョウは、開けた日当たりの良い草地に生息するが、そのような生息地は多摩川流域に散在しながらも広範にみられるので、多摩川流域においてメタ個体群を形成している可能性が高い。また、東京ではモンシロチョウは1年間に7世代は繁殖するので、年1化のオオムラサキと比べ遺伝的変異が生じ、蓄積しやすいと予想される。そこで、オオムラサキ同様、変異の速度が速く、種間あるいは種内の系統関係や種内の遺伝的多型性の程度などを調べるのに適したミトコンドリアDNAのDループ領域の塩基配列を決定し、遺伝的多型の解析を試みた。

2. 方法

(1) 試料の採取

オオムラサキの幼虫を採集したのと同じ3つの地域、青梅市長淵、西多摩郡日の出町平井及びあきる野市横沢入の開けた草地で、1997年の10月に飛翔している成虫を採取した(表1)。成虫は、DNAの抽出を行うまで-80℃の冷凍庫に保存した。

表1. 採集したモンシロチョウの内訳

10月4日(金)

		♂	♀	計
調査地1)	A	0	1	1
	B	3	1	4
	C	9	5	14
	D	2	0	2
計		14	7	21
調査地2)	A	14	3	17
	B	10	3	13
		24	6	30
調査地3)	A	2	0	2

10月6日 (日)

		♂	♀	計
調査地 1)	C	1 1	2	1 3
	D	4	1	5
計		1 5	3	1 8
調査地 2)	A	1 5	1 3	2 8
		2 4	6	3 0
調査地 3)	A	9	7	1 6
	A'	1 7	1 1	2 8
計		2 6	1 8	4 4

10月10日 (木)

		♂	♀	計
調査地 1)	D	2 0	5	2 5
調査地 2)	B	1 4	3	1 7

(2) DNAの抽出

凍結した成虫の頭部から、オオムラサキ同様Proteinase Kを用いる常法でDNAの抽出を行った。即ち、1.5mlのエッペンドルフチューブに5%クエン酸を500 μ l注入し、水中にさしておく。これに凍結個体を入れ、ハサミで大きな片が見えなくなるまで切り刻む。軽く攪拌した後4 $^{\circ}$ C、6000rpmで5分間遠心する。沈殿した組織を乱さないように上澄み液をピペットで吸い出し、新たに5%クエン酸を500 μ l注入し、再びミキサーで攪拌後、4 $^{\circ}$ C、5分間6000rpmで遠心する。この操作を上澄み液がクリアーになるまで繰り返す。通常2回繰り返せばよい。沈殿した組織にTail液 (50mM Tris-HCl, pH8.0, 100mM EDTA, pH8.0, 100mM NaCl, 1%SDS) を600 μ l、PK液 (10mg/ml Proteinase K, 100mM Tris-HCl pH7.5, 12.5mM EDTA, 150mM NaCl, 1%SDS) を100 μ l加え、穏やかに攪拌後、56 $^{\circ}$ Cで30分、37 $^{\circ}$ Cで一夜インキュベートする。10mg/mlのRNase

A溶液を10 μ l加えて更に1時間37°Cでインキュベートした後、700 μ lのフェノール液を加え、エマルジョン様になるまで攪拌した後、10分間インバーターミキサーで軽く攪拌する。15000rpmで10分間遠心した後、フェノール層を吸わないように上の水層を吸って別のエッペンドルフチューブに移す。この操作を2回行う。フェノールクロロホルムを700 μ l加え、10分間インバーターミキサーで軽く攪拌後、15000rpmで5分間遠心する。水層を吸って別のチューブに移す。この操作も2回行う。クロロホルムを700 μ l加え。10分間攪拌後、15000rpmで5分間遠心する。下層のクロロホルム液を吸い出し捨てる。イソプロパノールを700 μ l加え、穏やかに攪拌し、15分ほど室温に放置した後、15000rpmで15分間遠心し、DNAの沈殿を固める。上澄み液を捨て、80%エタノールを500 μ l注入し、DNAの沈殿をすすぐ。5分間遠心した後、上澄み液を捨て、吸引乾燥によりDNAの沈殿を乾燥させ、最後に100 μ lのTE (10mM Tris-HCl pH7.6, 1 mM EDTA pH8.0) に溶かして使用するまで-80°Cで-保存する。得られたDNAサンプルは1%アガロースゲルの電気泳動により高分子DNAの存在とRNAの混入が無いことを確認した。

(3) PCR法によるミトコンドリアDNAのDループの増幅

オオムラサキ同様、ショウジョウバエ (*Drosophila yakuba*) のミトコンドリアDNAのDループの塩基配列のデータをもとに合成したプライマーを用いて、ミトコンドリアDNAのDループをPCR法で増幅することを試みた。種々の条件を検討した結果、以下に記す条件で安定的に再現性よく増幅できることが分かった。

PCRの条件

プライマー

primer 1 : 5'TAGGGTATCTAATCCTAGTT3'

primer 2 : 5'TGGGGTATGAACCCAGTAGC3'

反応液の組成:

10×Taq buffer	2 μ l
10mM dNTP	0.2 μ l
2.5 μ M primer 1	2 μ l
2.5 μ M primer 2	2 μ l
25mM MgCl ₂	1.6 μ l

Distilled water	7 μ l
Template DNA *	5 μ l
<i>Taq</i> Polymerase	0.2 μ l
Total	20 μ l

* : 反応液に入れるサンプルの鋳型DNAの量は1 ng程度がよく、通常ストックのDNA溶液を蒸留水で100倍に希釈した液を使えばよい。

反応条件 :

- (1) 94°C 4分
- (2) 94°C 50秒、45°C 2分、72°C 1分30秒、以上のステップを35回繰り返す。
- (3) 72°C 5分

(4) 塩基配列の解析

1%アガロースゲル上に流したPCR産物のバンドを切り出し、DNA精製用キット (Takara, Easy Trap) で精製した。精製したDNAの塩基配列をDNA Sequencing Kit (Applied Biosystem Inc. Dye terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Part No. 402079) を用いて 5'側 (primer 1) および 3'側 (primer 2) の両側から解析した。SequencerにはABI 377を使用した。

3. 結果と考察

モンシロチョウでもオオムラサキと同じ西多摩3地区より採集した185個体のうち、109個体について同様の方法によりミトコンドリアDNAのDループ領域の塩基配列を決定することができた。全体で68のハプロタイプが区別された (表2)。全体の24%を占めた最も頻度の高いハプロタイプは、3地区のどこでも最も優占していた (14~29%)。それ以外のハプロタイプは、地区固有で頻度の低いものがほとんどであった (表2、図1)。ハプロタイプ多様度は0.88から0.94と高く、地域間のハプロタイプ類似度は0.494~0.592で、地理的に最も離れた青梅-あきる野間で最も低かった (図1)。塩基配列の類似度からみたハプロタイプ間の類縁関係と地域個体群を対応させると、類縁関係の近い系列が一つの地域に限定される場合と、別々の地域に分散してみられる場合と、両方あった (図2)。以上のことから、西多摩3地区のモンシロチョウ個体群は、互いに遺伝的な共通性を持ちつつも、かなり遺伝的に多様化していることが示唆された。

遺伝的に単調で閉鎖的な地域個体群は、遺伝的に多様で開放的な地域個体群に比べ、たとえ繁栄しているように見えても、近親交配、流行病、環境の変化・攪乱等

の要因により突然衰退し滅亡する危険性が高いと考えられる。モンシロチョウはオムラサキに比べ、遺伝的多様性の観点からも、より絶滅の危険性の低い種かもしれない。

表2 モンシロチョウ・ハプロタイプ組成

ハプロタイプ	齊梅				平井				あきる野			
	オス	メス	合計	頻度	オス	メス	合計	頻度	オス	メス	合計	頻度
1		1	1	0.024			0	0			0	0
2	1		1	0.024			0	0			0	0
3	1		1	0.024			0	0			0	0
4			0	0	5		5	0.109			0	0
5			0	0	1		1	0.022			0	0
6			0	0	1		1	0.022			0	0
7			0	0	2		2	0.043			0	0
8			0	0	1		1	0.022			0	0
9			0	0	1		1	0.022			0	0
10			0	0	1		1	0.022			0	0
11			0	0	1		1	0.022			0	0
12			0	0	1		1	0.022			0	0
13			0	0	1		1	0.022			0	0
15			0	0	1		1	0.022			0	0
16			0	0	1		1	0.022			0	0
17		1	1	0.024			0	0			0	0
18			0	0			0	0	1	1	0.0455	
19			0	0			0	0	2	2	0.0909	
20			0	0			0	0	1	1	0.0455	
21			0	0			0	0	1	1	0.0455	
22			0	0			0	0	1	1	0.0455	
23			0	0	1		1	0.022			0	0
24		1	1	0.024		1	1	0.022			0	0
25			0	0			0	0	1	1	0.0455	
26			0	0			0	0	1	1	0.0455	
27			0	0			0	0	1	1	0.0455	
28			0	0			0	0	1	1	0.0455	
29	1		1	0.024			0	0			0	0
30			0	0	1		1	0.022			0	0
31	1		1	0.024			0	0			0	0
32	1		1	0.024			0	0			0	0
33	1		1	0.024			0	0			0	0
34			0	0	1		1	0.022			0	0
35			0	0	1		1	0.022			0	0
36	4		4	0.098			0	0			0	0
37			0	0	1		1	0.022			0	0
38	1		1	0.024			0	0			0	0
39	2		2	0.049			0	0			0	0
40	1		1	0.024			0	0			0	0
41	1		1	0.024			0	0			0	0
42	1		1	0.024			0	0			0	0
43			0	0		2	2	0.043	1	1	0.0455	
44			0	0		1	1	0.022			0	0
45			0	0		1	1	0.022			0	0
46			0	0	1		1	0.022			0	0
47			0	0	1		1	0.022			0	0
48		3	3	0.073			0	0			0	0
49			0	0			0	0	1	1	0.0455	
50			0	0			0	0	1	1	0.0455	
51			0	0	1		1	0.022			0	0
52			0	0	1		1	0.022			0	0
53	1		1	0.024			0	0			0	0
54			0	0		1	1	0.022			0	0
55			0	0			0	0	1	1	0.0455	
56	1		1	0.024			0	0			0	0
57	3		3	0.073			0	0	1	1	0.0455	
58	1		1	0.024			0	0			0	0
59	1		1	0.024			0	0			0	0
60	1		1	0.024			0	0			0	0
61	1		1	0.024			0	0			0	0
62	5	2	7	0.171	9	5	14	0.304	3	1	4	0.1818
63	1		1	0.024			0	0			0	0
64	1		1	0.024			0	0			0	0
65			0	0			0	0	1	1	0.0455	
66			0	0			0	0	1	1	0.0455	
67			0	0			0	0	1	1	0.0455	
68		1	1	0.024			0	0			0	0
合計	32	9	41	1	35	11	46	1	14	8	22	1

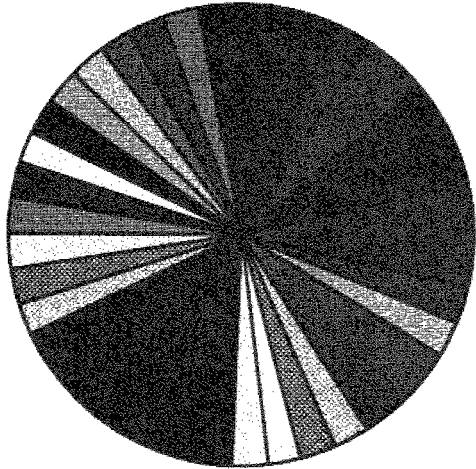
ハプロタイプ多様度

青梅	平井	あきる野	全体
0.94	0.88	0.93	0.94

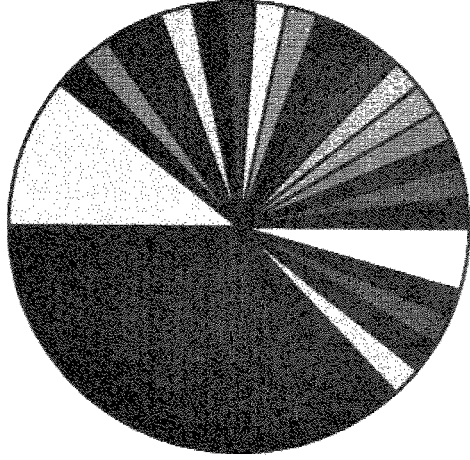
ハプロタイプ類似度

	平井	あきる野
青梅	0.571	0.494
平井		0.592

青梅 (n=41)



平井 (n=46)



あきる野 (n=22)

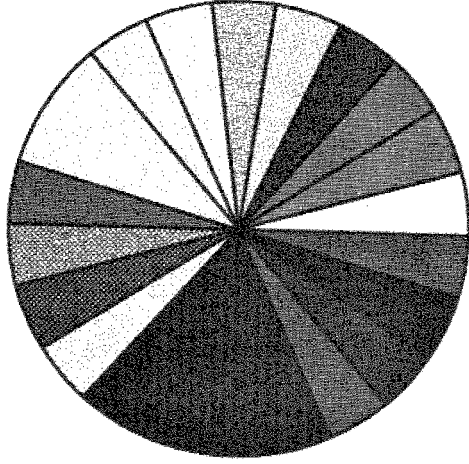


図1 モンシロチヨウ・ミトコンドリアDループ領域のハプロタイプ多様度と地域間の類縁関係

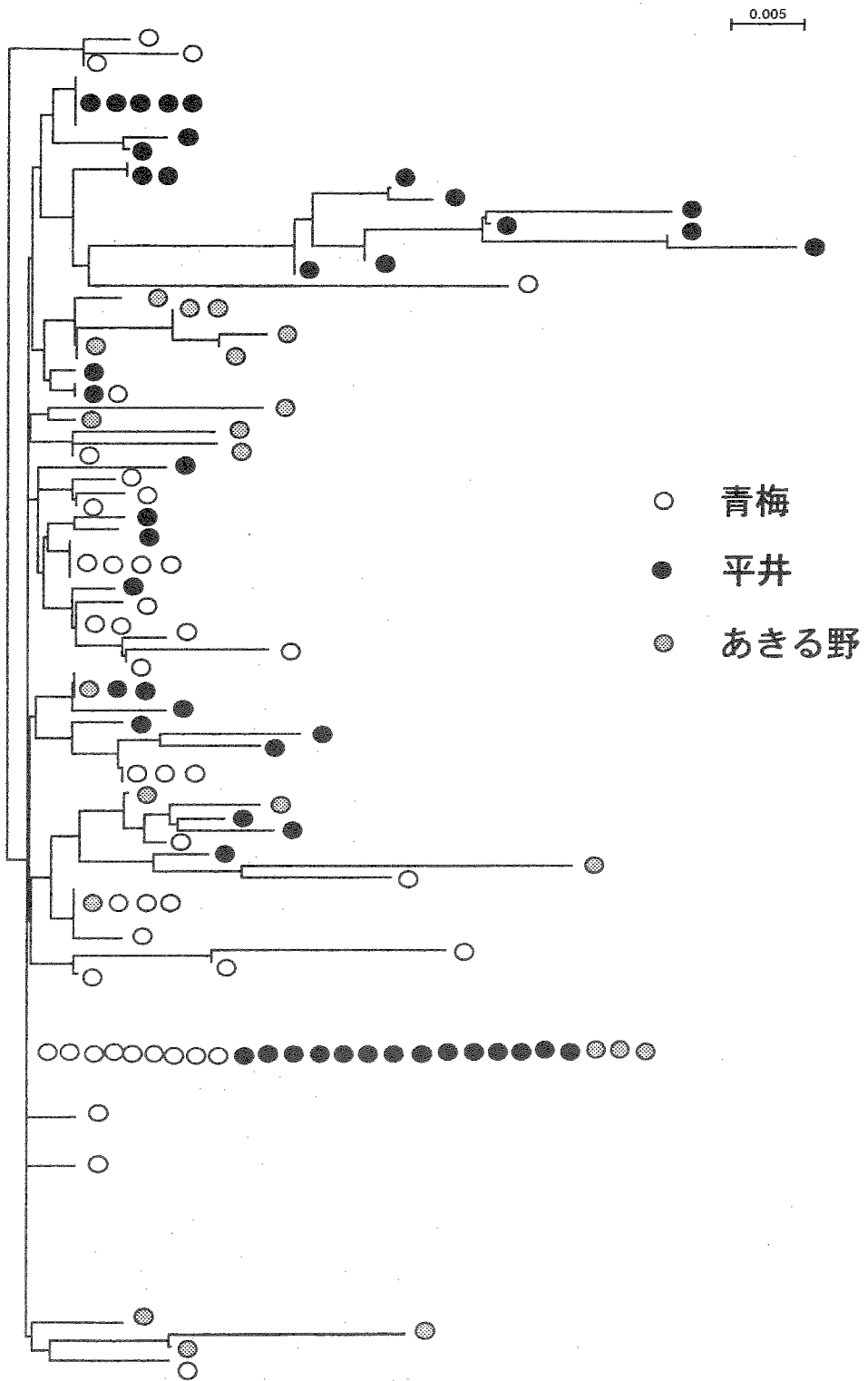


図2 モンシロチョウ・各ハプロタイプ間の類縁関係組成

ま と め

多摩川流域は都心に比べ自然は残っているものの、都市化により一般に野生動植物の生息地の分断化、孤立化が進んでいると考えられる。オムラサキの生息地は雑木林、食草はエノキの葉であるが、過去何十年も都市化に伴いそういった生息地は減少、孤立化、縮小化する傾向にあったと考えられる。一方、モンシロチョウは人間の交易活動によりヨーロッパから移入したといわれているが、キャベツなどアブラナ科の草本を食草とし開けた草地に生息するため、近年の都市近郊型農業の発達によりむしろ好適な生息地は増えている可能性がある。

フィンランドのHanskiらは、フィヨルド地形に特徴的な大小さまざまな島に生息するタテハチョウ科のヒョウモンモドキの一種、*Melitaea cinxia* の地域個体群で、遺伝的多様性が低い島ほど近親交配による有害遺伝子の蓄積により個体群が絶滅する確率が高いことを示した (Saccheri, I., et.al. 1998)。今回、オオムラサキは日本全体でみても遺伝的多様性がそれほど高くないことが示唆された。一方で多摩川流域では隣接した個体群間で遺伝的交流が保たれ、日本全体と比較しても多摩川流域での遺伝的多様性は必ずしも低くないことが示唆された。蝶類の研究者間ではオオムラサキの飛翔力は比較的高いといわれているが、以上の結果はオオムラサキの移動力の高さ、年1化であること、比較的最近大陸から移動してきて分布を広げたか、あるいは一度個体数が減少した後再びしだいに遺伝的に多様化しつつ分布を広げた、といったことを想定すれば説明できるが、さらに研究が必要である。遺伝的多様性の観点からは、オオムラサキ地域個体群の絶滅可能性は日本全体でのそれとさほど変わらないと推測される。しかしながら、これ以上生息地を減らさず、また生息地間を移動しやすい地形、すなわちメタ個体群構造を保つことが重要と考えられる。今後、飛翔力が劣るといわれる蝶類、例えば、ジャコウアゲハ、ウスバシロチョウなどでも同様の調査をする必要があろう。

対照的にモンシロチョウは移入種といわれているにも関わらず、ミトコンドリアDNA D-ループ領域でみた遺伝的多様性は高かった。それには、モンシロチョウが東京では年7回繁殖できることが関与しているかもしれない。しかしながら、ミトコンドリアDNAのような中立な遺伝マーカーの多様性が果たしてどの程度ゲノムDNAの実際に遺伝情報を持った領域の多様性と相関しているのか、現在はっきりしていないし、また、オオムラサキのそれと単純に比較はできないだろう。今後日本のモンシロチョウの由来、すなわち、いつどこから来たのか、何度か別の場所からも入ってきたのか、といったことも明らかにする必要がある。それは、詳細なDNAの比較解析をヨーロッパと日本のモンシロチョウで行えば可能であろう。いずれにせよ、モンシ

チョウは遺伝的多様性の観点からも、非常に絶滅しにくい昆虫の代表といえるかもしれない。以上、2種類の対照的な生態的、歴史的特徴を持った蝶類の遺伝的多様性の研究を通じ、著者の1人（佐藤）は1研究者、1市民として以下のことがらを再認識できた。つまり、人間の影響が自然を改変する以前の、多摩川流域に古くから存在する地理的特徴、自然環境を保全し、メタ個体群構造を維持すること、言い換えれば河川沿いに連なる里山の自然環境を孤立化、縮小化せずに保全し、失った自然環境をできるだけ復活させ、後代に継承していくこと、それこそが21世紀になって果たすべき身近な最重要課題であるということである。そういった活動を、研究者と市民、行政、企業との話し合いにより推進することは、現在むしろまれている精神・肉体的健康の維持、教育の荒廃の防止など、真の人間の幸福につながるものと確信する。

引用文献

- 1) Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994 : Clustal W improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680
- 2) Clary, D. O. and Wolstenholme, D. R. 1985 : The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila ykuba*: Nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *J. Mol. Evol.* 22, 252-271
- 3) Taylor, M. F. J., McKechnie, S. W., Pierce, N. and Kreitman, M. 1993 : The lepidopteran mitochondrial control region: Structure and evolution. *Mol. Biol. Evol.* 10(6), 1259-1272
- 4) Brower, A. V. Z. 1994 : Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6491-6495
- 5) Saccheri, I., Kuussaari, M., Kankare, M., Vikman, P., Fortelius, W., and Hanski, I, 1998 : Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392, 491-494
- 6) Adachi, J., and Hasegawa, M. 1996 : Tempo and mode of synonymous substitutions in mitochondrial DNA of primates. *Mol. Biol. Evol.* 13, 200-208

「た ま がわ り ゆ き せ い そ く ち ょ う る い
多摩川流域に生息する蝶類の

い で ん て き た よ う せ い ほ こ か ん け ん き ゅ う
遺伝的多様性とその保護に関する研究」

(研究助成・学術研究VOL. 28-No.205)

著 者 お ぼ ら よ し あ き
小 原 嘉 明

発行日 2000年3月31日

発 行 財団法人 とうきゅう環境浄化財団

〒150-0002

渋谷区渋谷1-16-14 (渋谷地下鉄ビル内)

TEL (03)3400-9142

FAX (03)3400-9141
