

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82617

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700939

研究課題名(和文) 標本から評価する絶滅危惧種が失った遺伝的多様性

研究課題名(英文) Inference on the genetic diversity decreasing process of endangered species based on old specimens

研究代表者

清 拓哉 (KIYOSHI, TAKUYA)

独立行政法人国立科学博物館・動物研究部・研究員

研究者番号：40599495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：トンボ目に属するベッコウトンボは日本国内において生息地が急激に減少し、数えるほどの沼地にしか安定的な個体群が維持されていない。絶滅の渦(Extinction Vortex)の概念から現在まで継続している個体群が遺伝的多様性をどの程度維持しているかは、非常に保全上重要な情報である。「種の保存法」で保護されているため、DNA抽出に用いる組織サンプルの入手が困難であったが、抜け殻内に残存する組織片を用いることによってPCRなどの実験に十分であることが判明した。また、静岡県内の地域集団についてミトコンドリアのハプロタイプを調べたところ、非常に良好なハプロタイプ多様度が維持されていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：A highly endangered dragonfly species, *Libellula angelina*, rapidly lost their habitats, and currently only a few ponds are known to be stable. From the viewpoint of conservation genetics, its genetic diversity is very important information on the conservation policy but the species is protected by the law of "Endangered Species Preservation Act" in Japan. To obtain tissues for DNA extraction is rather difficult but the tissues remained inside of the exuviae were appropriate for DNA extraction. On one of the populations of Shizuoka Prefecture, the estimation of mitochondrial haplotype diversity revealed that very good genetic diversity were kept in the population.

研究分野：博物館学

科研費の分科・細目：博物館資料論

キーワード：保全遺伝学 ベッコウトンボ

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) ベッコウトンボの現状

日本においては約200種のトンボ類が報告されているが、ベッコウトンボ (*Libellula angelina*) は日本国内において最も絶滅の危惧されるトンボ類である。レッドリストにおいては絶滅危惧 IA 類 (CR) に指定され、既に数えるほどの沼地 (保全上伏せる) にのみ安定的な集団が維持されておらず、速やかに個々の地域集団に対して保全政策をこうじることが必要な段階にまで達している。また、「絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に関する法律 (以後、種の保存法)」の制定時に、まず対象種として指定されたトンボ類である。当然のことながら、捕獲行為などは処罰の対象となっており、環境省などからの許可がなければ、ベッコウトンボの採集を行う事はできない。また、地方自治体などによって生息地等が保護されている場合も多く、現産地の地元ボランティアによる保全活動も活発であり、昆虫類などを専門とする職業研究者以外にも広く、本種が絶滅のおそれが非常に高いということが認識されつつある昆虫である。今後の保全活動の進展が期待される。

### (2) 生物が絶滅するのはなぜか

ベッコウトンボだけにかかわらず、生物種の絶滅というのは単一要因で簡単に説明できない場合が多く、様々な要因が複雑に絡まり合って引き起こされる場合が多いと考えられる。保全遺伝学的には「絶滅の渦 (Extinction vortex)」という概念を用いて説明されることが多い。渦に完全に飲み込まれてしまうと種が絶滅に至るといった仕組みである。その渦にひきこむ力はなにかというと生息環境の人為的破壊であったり、病気の蔓延であったり、外来種の捕食圧であったり様々な要因が考慮にいられる。そこで、絶滅の渦に飲み込まれつつある絶滅危惧種の地域集団について、現在の安定の度合いを推定するためには遺伝的多様性に関する様々な指標が重要となってくる。絶滅に瀕する地域個体群において、例えば、近親交雑の「過度」な進行等は、有害な遺伝子がホモ接合になるなどして、次世代にさらなる悪影響を与えるおそれがあるからである。それらの遺伝的多様性に関する指標の数値を実際に推定するためには絶滅危惧種からなんらかの組織片を採取し、DNA を抽出する必要がある。これは絶滅危惧種の個体を傷つけることになることが多く、慎重に行わなければならない。個体の適応度を下げないという観点からは、糞や抜け落ちた毛などを利用して DNA 抽出が行われることがのぞましい。

### (3) 「絶滅」を研究するのは難しい

生物種の絶滅について研究するという事は、その現象を解明するために必要な研究材料が消滅しつつあることを同時に意味する。つまり、「過去を推論」するという研究手法を取らざるを得なくなることが多い。特に抽出に際して組織サンプルを必要とする DNA などの遺伝情報を用いた検証に関しては困難を極める場合が多い。そこで手がかりとして活用すべきなのが博物館や大学の研究室などに保管されている「標本」であると考え。日本国内にはたくさんの博物館や大学が存在する。自然史関係の学問を扱うものも、もちろんたくさん設立されており、現在に至るまで昆虫標本が多数収集されてきている。これらの博物館には、数十年前に採集されたベッコウトンボ標本が所蔵されていることも珍しくなく、すでにその産地では集団が絶滅に至っていることが多い。これらの標本から DNA を抽出して遺伝的多様性の年次変動を追跡し、ベッコウトンボが絶滅を危惧されるに至った過程を紐解くことができれば、生息地の環境変動などと比較して、地域集団絶滅の理由に関してより良く議論でき、保全政策に関して有益な科学的推論を反映できるはずである。

## 2. 研究の目的

### (1) 組織片が必要

遺伝的多様性を調べるためには、なんらかの組織片が必要である。トンボ類から DNA を抽出するためには脚を切除して、外骨格に包まれた内部の筋肉組織を酵素処理して溶かした上で DNA 抽出することが多い。しかし、ベッコウトンボは絶滅危惧種であり、脚を切除するなどの行為によって、個体の生存能力を低下させることは好ましくない。また、「種の保存法」で指定されているため、傷つける行為そのものが、違法である。組織片採取に関して許可申請は可能であるとはいえ、安定的に地域集団内の遺伝的多様性をモニタリングするための手法を速やかに開発する必要がある。

### (2) 絶滅危惧に至るまでの過程

ベッコウトンボは既に地域集団の絶滅が極度に進行してしまった後の状態である。ここ数十年間の間に一気に地域集団が絶滅してしまったことが確認されている。日本国内の数少ない存続している地域集団から遺伝情報を抽出しただけでは、なぜベッコウトンボが現在の非常に危険な状態に至ったかは、少なくとも、遺伝的多様性の観点からは、他の環境要因とリンクしたプロセスの解析ができない。現存する集団以外からの遺伝情報以外、つまり、過去に存在した地域集団の遺伝情報が利用できるのであれば、積極的にもちいるべきである。博物館や大学の研究室に

収蔵されている標本が活用できるかどうか検討するべきである

### (3) 博物館の標本から DNA 抽出する際の問題点

前述の通り博物館には、既に絶滅した地域集団から採取された標本が保存されていることが多い。そのような標本から DNA 抽出を行う際に致命的な問題が主に 2 種類生じる(以下(a)および(b))。

#### (a) DNA の経年劣化

博物館では、従来、標本を収蔵する際に DNA サンプルの保存という観点を持っていなかった。乾燥された標本が形成され、標本箱に納まっているという状態である。DNA は、処置が施されなければ経年劣化を起こし、だんだんと断片化していく。つまり、もともと長かった DNA 鎖が、だんだんとばらばらになり、ついにはおどろくほど短い断片に分解されていく。PCR などの手法を用いて特定の遺伝子領域を増幅しようとしても、数十年前から収蔵されているものについては困難な場合が多い。これは日本国のみならず、世界中の博物館が抱えている問題である。

#### (b) 害虫駆除の薬剤による DNA への影響

生物に関する標本を収蔵する博物館のみならず、収蔵資料を食害する昆虫類は一般的に博物館において悩みの種である。薬剤を散布してこれらの害虫を駆除、または繁殖を防ぐことが、対象療法としてもちいられている。

ただ、それらの薬剤には生物資料の DNA を変性もしくは分解を促進するものが多く、博物館の研究者にとっては一大問題になっている。現在ではそれらを、比較的影響の少ないものに換えるなど、問題の大きさが認識されるに至り、改善がすすみつつある。

問題なのは過去数十年に収蔵された、すでに薬剤散布に曝露された標本類から DNA が抽出できるかどうかである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 生体以外からの組織片収集

トンボやセミなどは抜け殻(脱殻)が比較的、発見しやすい。また、生体ではなく、脱ぎ捨てられたものであるため、採取しても個体の生存能力に影響を与えるものではない。

近年、トンボの抜け殻に付着した組織から DNA を抽出することができるという研究成果が報告されており、ベッコウトンボでもできるのではないかと考えた。先述の通り、ベッコウトンボは「種の保存法」で保護されており、容易に成体から組織片を入手して DNA 抽出を行うことができず、地域集団の遺伝的

多様性に関して、長期的なモニタリング調査を行うことがむずかしい。生体を損傷しない、つまり、個体の生存能力を下げずにモニタリング調査を行うことがのぞましい。

#### (2) 博物館標本からの DNA 抽出

前述のとおり、博物館に収蔵されている標本からは DNA 抽出が困難であることが多い。劣化した DNA サンプルから PCR などの遺伝子増幅に適したものにするためには 2 つの方法が取られることが多い。DNA 抽出後の作業として、

(a) アガロースゲルなどによる長い DNA 断片の確保

(b) ゲノム増幅試薬による増幅

この 2 つの方法により、古い博物館標本からの DNA 抽出と遺伝情報の利用を試みる。

### 4. 研究成果

#### (1) 抜け殻からの DNA 抽出

遺伝的多様性は生物種保全の上で必要不可欠な情報であるが、DNA サンプルの採取のさいに個体を傷つけるおそれがある。

今回、抜け殻内部の組織片から DNA 抽出を行った際には、PCR を行って遺伝型を決定するに十分な純度の DNA 溶液を得ることができた。これは、生存個体を損傷し、個体の生存能力を下げること無く、遺伝情報を引き出すことができるという点で重要である。

#### (2) 博物館標本の利用について

前述の方法によって博物館に収蔵されている標本について DNA 情報の収集を試みたが、安定的な結果を残せなかった。同じ年代に収蔵された標本についても、個体によって PCR が成功したりしなかったりした。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

(査読有)

Takuya Kiyoshi, Motoharu Fukui, Kenichi

Fukunaga, Jun-ichi Takahashi and Yoshitaka

Tsubaki (2014) A preliminary report on the

genetic diversity of a highly endangered dragonfly,

*Libellula angelina* Selys, 1883, in the

Okegaya-numa Pond, Shizuoka, Japan. Tombo 56:

61-63.

〔学会発表〕(計 2 件)

清 拓哉, 2013. Erich Schmidt が記載したマダガスカル産イトトンボ類のタイプ標本とその原記載について. 日本動物分類学会第 49 回大会, 宮城教育大学, 仙台. 2013 年 6 月 8-9 日. 講演要旨集, p40.

清 拓哉・Wen-Chi Yeh・片谷直治, 2013. 中国雲南省およびラオス北部からのサラサヤンマ属の未記載種 2 種について. 2013 年度日本トンボ学会大会, 神奈川県立生命の星・地球博物館, 小田原. 2013 年 12 月 7-8 日. 講演要旨集, p18.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清 拓哉 (TAKUYA KIYOSHI)

国立科学博物館・動物研究部・研究員

研究者番号: 40599495