

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：10102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650494

研究課題名(和文) DNAバーコーディング法を応用した外来アリの簡易検出法の開発と環境教育への応用

研究課題名(英文) Establishment of simple detection method of invasive ant species applying DNA bar coding and application of environmental education

研究代表者

村上 貴弘 (Murakami, Takahiro)

北海道教育大学・教育学部・准教授

研究者番号：40374706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、簡易PCRマシンの開発に成功した。これまで最安値でも30万円のコストがかかっていたサーマルサークルを10万円以下(実質8万円)で完成させたことが、最も大きな成果である。また、この新たに開発したPCRマシンを使ってPCRを実際に行い、外来アリの検出に必要な特徴あるDNAバーコードを検出することができた。これは、これまで使われているシーケンスを元にしたDNAバーコーディングに比べはるかに簡易である。これらの成果を札幌大谷高校、北海道理科教育センター、千葉県立生浜高校の教員と協同で教育現場で実践し、環境教育のツールとして十分活用できることを確認した。

研究成果の概要(英文)：According to this research, we could establish a simple and useful PCR device. Until then, the cheapest thermal cycler is around 300,000 Japanese yen, but this new developed PCR device is only 100,000 (in fact 80,000 yen). This is the most valuable accomplishment in our study. Furthermore, this newly established device could detect unique DNA bar coding band patterns of invasive ant species derived from Central America. This is much easier than that of typical DNA bar coding using DNA sequencing process. We implemented to the Sapporo Ohtani high school, Hokkaido Science Educational Center, and Chiba Oihama high school with its teachers and it confirmed that this device and experimental procedure are fully effective against environmental education in high school curriculum.

研究分野：科学教育

科研費の分科・細目：科学教育

キーワード：DNA bar coding 簡易PCRマシン 外来アリ 環境教育 PCR 多様性

1. 研究開始当初の背景

近年、国を超えての経済的、人的な交流が盛んになっている。このことが、外来生物による生態系の攪乱という大きな問題を引き起こしている。このような国際的な状況を受け、文部科学省の学習指導要領に取り上げられる「環境教育」の重要性は年を追うごとに増している。

しかしながら、その内容は旧来の野外実習の域を出ていない。さらに、学習指導要領には、現代の生物研究の基礎ではあるが、これまで中、高等教育では扱っていない DNA 抽出、PCR、電気泳動法が新たに加えられている。この基本的で重要な研究手法が、実際にどのような場面で有効であるのかを解説している教科書や専門書は少なく、現場での導入に大きな障壁となっている。

DNA バーコーディングとは、一般的には対象とする生物の特定領域の塩基配列を決定し、その前後の配列をプライマーにすることで PCR のみで種判別を行う手法である。この手法では、一台 1 千万円を超えるシーケンサーが必須であり、初等教育への普及は困難である。

申請者が 1997 年に開発した CAP-PCR DNA fingerprinting 法を応用する。この手法の独創的な点はシーケンサーによる塩基配列の決定をしなくても、より簡便で安価な電気泳動像の解析のみで種、地域を判別することが可能な点にある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、環境教育に遺伝的な手法を導入し、研究者のみならず学生の手で環境問題の解決を図ることにある。研究対象種は、アリ類である。アリ類を選択した理由は普遍的に存在することと、外来アリが近年大きな問題になっているという 2 点からである。簡便に種の識別を可能にするために、DNA バーコーディング法を改良する。現在、種や地域個体を識別するのに用いられている DNA バーコーディング法は、数千万円の機材 (シーケンサー等) と 1 サンプル 3,000 円以上もかかる試薬を使って解析を行う必要がある。本研究では、アリ類の DNA 抽出、PCR、電気泳動、データ解析を簡易に、かつ安価に行えるシステムを開発し、環境教育教材として利用できるようにする。これにより中学、高校、大学初年度の授業や課外活動で使える先端技術を使った環境教育ソフトを提供するとともに、得られたデータを統合し、ネット

ワークを構築することで全国に張り巡らされた外来侵入アリ種監視システムをも構築する。最終的には国際的に汎用性のある環境教育ツールとして輸出できるものにまで高めていく。

3. 研究の方法

まず、最も重要な部分が簡易 PCR マシンの開発にある。これは、竹中工務店の宮田弘樹博士と共同で、(1)自動で温水槽を行き来するデバイスの開発、(2)それを制御する制御盤の調整、(3)温水槽の調整を行う。また、この新しい PCR マシンを使った DNA バーコーディング法として従来用いられている DNA の塩基配列を元にしたものではなく、申請者らが開発した CAP-PCR DNA fingerprinting 法という簡便な手法により PCR 産物を得、種特異的なバンドパターンを検出する。

4. 研究成果

図 1 に示すように簡易 PCR マシンの開発に成功した。

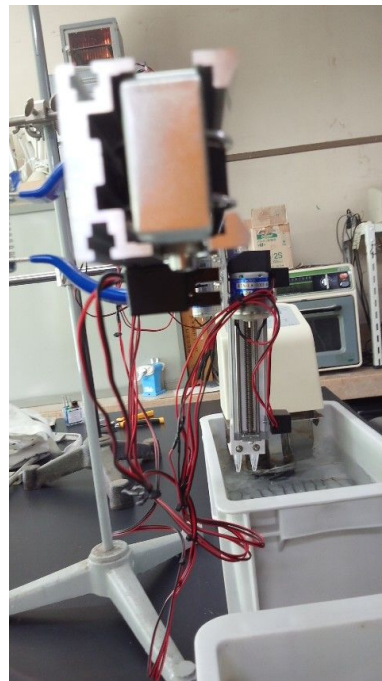


図 1. 新規開発に成功した簡易 PCR マシン

M 1 2 3 4

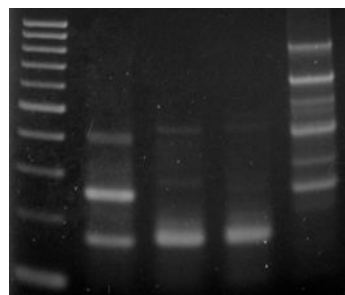


図 2. 各種アリ類の PCR 産物の電気泳動像。M: DNA marker, 1: ハキリアリ, 2: ヒアリ (Panama), 3: ヒアリ (Venezuela), 4: シワクシケアリ

恒温槽 3 つと、基盤、駆動部分からなるシンプルな構造である。原材料費は全て合わせて8万円と10万円を切ることに成功した。

この基盤へ記憶させるプログラムは Arduino というフリーソフトで、生物の教育だけではなく、情報科学のプログラミングや基盤に命令を書き込む情報工学の基礎も学習できることが明らかになった。

この簡易 PCR マシンを使って、世界各地から採集したアリ類 54 種類を用いて PCR、電気泳動を試験した。その結果、図 2 に示すように、すべてのアリ類において PCR 産物をえることができた。また、図 2 の 2, 3 に示したように、侵略的外来アリであるヒアリにおいて、種特異的なバンドパターンを検出することができた。このことから、環境教育に応用するための基礎的データの蓄積に成功した。

これらの成果を踏まえて、2013 年度、北海道理科教育センター（研究協力：米根洋一郎氏）、札幌大谷高校（研究協力：平田真規氏）、千葉県立生浜高校（研究協力：佐藤一樹氏）において、簡易 PCR マシンを使った実習を行った。高等学校の現場教員からの重要な意見を得ることができた。

このように、本研究の目的であった、環境教育、理科教育に加え、情報科学、工学においても有用な教材の開発、実用化を行えた。

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)

宮田弘樹、ポーラ美術館における虫害管理について、文化財の虫被害、査読なし、64 巻、2013、20-23

〔学会発表〕(計 8 件)

Iwashita K., and Murakami T. Isolation and invasion of Siberian chipmunks (*Tamias sibiricus*) in Mt. Hakodate, Hokkaido. (2014)第 61 回日本生態学会（広島県広島市、3 月 16 日）

Honda H., and Murakami T., Where have the *Cervus nippon* in Southern Hokkaido been coming from? - genetic structures, distributions, and conservation ecology- (2014) 第 61 回日本生態学会（広島県広島市、3 月 16 日）

宮田弘樹、防虫エンジニアリングによる異物混入防止対策（2013）

最新のフードセーフティ情報 東京都千代田区、6 月 21 日）

Sato K., Sakamoto H., Kobayashi M., Ozaki M., Higashi S., and Murakami T., The kin recognition behaviors and genetic structures of 8 Argentine ant (*Linepithema humile*) super colonies in western Japan. (2013) 第 60 回生態学会（静岡県静岡市、3 月 6 日）

佐藤一樹、宮田弘樹、村上貴弘、DNA バーコーディング法を応用したアリ種の簡易検出法の開発と生物教育への応用。(2012). 第 62 回理科教育学会（鹿児島県鹿児島市、8 月 11 日）

Sato K., Sakamoto H., Hirata M., Kamada S., Higashi S., and Murakami T., Kin recognition behaviors and genetic diversity of invasive ant, *Linepithema humile* in Japan and Argentina. (2012). Joint meeting of the 59th annual meeting of ESJ and the 5th EAFES international congress. 龍谷大学（滋賀県大津市、3 月 19 日）

宮田弘樹、伊勢紀、三輪隆、北野正人、三橋弘宗、伊東憲正、鈴木明子、種の多様性を規定する都市の景観構造。(2012). Joint meeting of the 59th annual meeting of ESJ and the 5th EAFES international congress. 龍谷大学（滋賀県大津市、3 月 18 日）

Murakami T., Unusual chromosome numbers and polyploidy in invasive fire ant populations. (2012). Joint meeting of the 59th annual meeting of ESJ and the 5th EAFES international congress. 龍谷大学（滋賀県大津市、3 月 18 日）

〔図書〕(計 2 件)

アリの生物学（2014）坂本洋典、村上貴弘編著、東海大学出版会、300 ページ

パワー・エコロジー（2013）佐藤宏明、村上貴弘編著、海游舎、480 ページ

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 貴弘 (MURAKAMI, Takahiro)
北海道教育大学・教育学部・准教授
研究者番号：40374706

(2) 研究分担者

宮田 弘樹 (MIYATA, Hiroki)
株式会社竹中工務店・技術研究所・研究員
研究者番号：90416628

(3) 連携研究者

()

研究者番号：