

ニホンヤマビル(*Haemadipsa japonica*)の mtDNA 抽出法

佐藤 尚衛*¹, 長瀬 圭登*², 井内 勝哉*³, 久富 寿*⁴

mtDNA extraction method for Japanese mountain leech(*Haemadipsa japonica*)

Naoe SATO*¹, Keito NAGASE*², Katsuya IUCHI*³, Hisashi HISATOMI*⁴

(Received May 31, 2017)

1. 背景

ニホンヤマビル(*Haemadipsa japonica*)は Annelida Clitellata に属し、日本で最も一般的な陸生吸血ビルである(Fig.1)。日本におけるその分布は局地的であり、吸血する動物に依存する形で特異的に進化を遂げてきた背景がある。しかし、近年地球温暖化の影響もあり、その生息分布域が拡大傾向にある¹⁾。日本に分布するニホンヤマビルの個体群の違いをミトコンドリアDNA(mtDNA)の差異からアプローチ²⁾することで、増加する個体群の認識が可能となり、予防策がとりやすくなる。ニホンヤマビルの体組織は非常に固く、壊れにくい。さらに自己分解能が高いため、その組織抽出液をいかに得るかが鍵となる。今回、一般的なタンパク質分解酵素である Proteinase K 処理を行わないかたちで、より純粋な mtDNA 抽出法を確立したので報告する。



Fig.1 ニホンヤマビル(*Haemadipsa japonica*)

2. 材料と方法

ニホンヤマビルは神奈川県愛甲郡清川村(標高:370m, E139° 13', N35° 31')で採集した個体群を用いた。

ニホンヤマビルは体組織が非常に固いため、mtDNA抽出は組織切片をSDS溶液に入れ、Proteinase Kを添加し、50°CでインキュベートするProteinase K処理を行うことが多い。しかし、今回はProteinase K処理を行わない手法を用いた。あらかじめ、用いる器具(解剖用ハサミ・替刃用メス・ピンセット・ガラス板等)はフリーザーで冷却しておく。生きた個体を一時的にフリーザー(-70°C)で凍らせ、凍った個体の前・後吸盤を解剖用ハサミで取り除いた。胴体部分を3~4等分し、それをガラス板の上で替刃用メス(FUTABA)により細かく刻んだ。そこに Homogenate buffer(mtDNA Extractor CT Kit)1mlを加え、その切片をホモジナイザーで短時間ホモジナイズし、上澄みを組織抽出液として用いた。以上の作業は全て氷上で行った。

その後、mtDNA Extractor CT Kitの使用法に基づき、mtDNA抽出を行った。mtDNAの確認はNCBI GenBankの cytochrome c oxidase subunit(CO1)の塩基配列に基づいたプライマー³⁾により、ミトコンドリアのCO1領域をPCR(95°C20sec., 60°C20sec., 72°C1min., 35 cycles)で増幅させ、電気泳動に供した。

3. 結果

Proteinase Kで処理したmtDNAを用いたCOI PCR結果をFig.2 Aに示す。COI由来のPCR増幅産物(1299bp)に明瞭なバンドが形成されているが、その上部にスミアが確認される。しかし、今回の抽出法で得たサンプルを用いた場合にはスミアは出現せず(Fig.2 B), COIの領域由来PCR増幅産物のみ明瞭なバンドが得られた。

*1: 物質生命理工学科客員研究員

*2: 物質生命理工学科4年生

*3: 物質生命理工学科助教

*4: 物質生命理工学科教授(hisatomi@st.seikei.ac.jp)

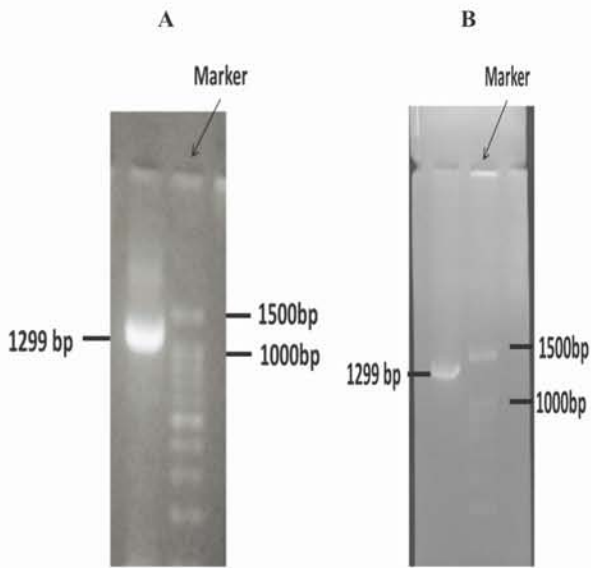


Fig.2 COI PCR結果

A, Proteinase K処理後のDNAをtemplateにしたPCR結果
 B, 開発した処理法で抽出されたDNAをtemplateにしたPCR結果

4. 考察

ニホンヤマビルは体組織が非常に固く、組織を破壊しづらい。また、自己分解能が高いため、DNAが破壊されやすい傾向がある。一般にProteinase K処理により組織を完全破壊し、組織抽出液を得るが、その抽出液を用いた場合、スミアが高頻度で出現する。おそらく核内DNAが大量に存在するため、純粋にmtDNAのみの抽出が困難である。しかし、今回の抽出法ではスミアが出現せず、より純粋に近い形でmtDNAのみの抽出が可能である。氷上において組織を一連の破碎過程を経れば、細胞を上手く破壊でき、mtDNAのみを効率的に抽出可能である。

5. 参考文献

- 1) 谷 重和(2005) 最近のヤマビルによる吸血被害の拡大と人獣共通感染症, バムサ会誌第 17 巻第 2 号:15-22
- 2) Yi-Te Lai, Takafumi Nakano, Jiun-Hong chen (2011) Three species of land leeches from Taiwan, *Haemadipsa rjukjuana* comb.n., a new record for *Haemadipsa picta* Moore, and an updated description of *Triterabdella taiwana* (Oka), Zookeys 139:1-22
- 3) Borda E, Oceguera-Figueroa A, Siddall ME (2008) On the classification, evolution and biogeography of terrestrial haemadipsoid leeches (Hirudinida: Arhynchobdellida:

Hirudiniformes) Molecular Phylogenetics and Evolution 46:142-154

- 4) Herbert PDN, Cywinski A, Ball SL, *et al.* (2003) Biological identifications through DNA barcodes. Proceeding of the Royal Society B:Biological Sciences 270:313-321
- 5) Borda E, Siddall ME (2011) Insights into the evolutionary history of Indo-Pacific bloodfeeding terrestrial leeches (Hirudinida:Arhynchobdellida:Haemadipsidae). Invertebrate Systematics 24: 456-472
- 6) Borda E, Siddall ME (2010) *Haemadipsa japonica japonica* isolate HAJA cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial GenBank:HQ203171
- 7) Sohyun Won, Bae Keun, *et al.* (2014) Molecular Identification *Haemadipsa rjukjuana* (Hirudiniformes:Haemadipsidae) in Gageo Island, Korea, The Korean Journal of Parasitology 52:169-175