

## PCR によるスクミリングガイ DNA 断片の増幅

遊佐 陽一・平八重 一之

(九州農業試験場)

**Amplification of DNA fragments of the golden apple snail *Pomacea canaliculata* (LAMARCK) using random primers.** Yoichi YUSA and Kazuyuki HIRAYAE (Kyushu National Agricultural Experiment Station, Nishigoshi, Kumamoto 861-1192)

Conditions in the extraction of DNA and amplification of DNA fragments were determined in the golden apple snail *Pomacea canaliculata* (LAMARCK) (Gastropoda: Ampulariidae). Using random primers of 10 nucleotides, DNA fragments were successfully amplified with template DNAs from both fresh and ethanol (99%)-preserved snails. A high interspecific variation was detected when the random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles of *P. canaliculata* were compared with those of the other ampulariid *Pila conica* (GRAY) and the vivipariid *Cipangopaludina japonica* (MARTENS). RAPD profiles were also different among populations of *P. canaliculata* collected from Kumamoto, Iriomote Island and Luzon Island and among individuals in the same populations. The techniques developed in this study are useful in elucidating phylogenetic relationships among apple snails and in analyzing their mating systems and population structures.

**Key words:** golden apple snail, PCR, *Pomacea canaliculata*, RAPD

スクミリングガイ *Pomacea canaliculata* (LAMARCK) は、南米ラプラタ川流域原産の巻貝である。1980年代にアジア各国に食用として導入されたが、その後各地で放棄されたものが野生化した(和田, 1997)。水稻の稚苗を盛んに食害するため、今ではアジアのほぼ全域にわたって、イネの最重要害虫の一つになっている。

リングガイ属の貝は、スクミリングガイを含む記録上8種がアジアに導入されている(和田, 1997)。このうち多くのは同物異名であると考えられるが、スクミリングガイ以外の貝が実際にアジアに生息している可能性は否定できない。また、リングガイ属の分類は、高い種内変異を示す殻の形態に主として基づいているため、現在でも種の同定が非常に困難である(COWIE, 1993; PERERA and WALLS, 1996)。

近年、ランダムプライマーを用いて増幅されたDNAの多型(RAPD)や塩基配列に基づく分子系統分類が貝でも行われるようになってきた(ROLLINSON et al., 1996; ARMBRUSTER, 1997; HARASEWYCH et al., 1997; REMIGIO and BLAIR, 1997; STOTHARD et al., 1997)。本研究では、リングガイ類における分子系統分類の手法を開発する目的で、スクミリングガイからのDNA抽出法を検討し、PCRによるDNA断片の増幅を試みた。

本研究を行うに当たってお世話になった九州農業試験場の和田 節、斎藤 彰、西 和文の各博士に厚くお礼申し上げる。

### 材料および方法

#### 1. 供試貝

スクミリングガイは、熊本県熊本市と沖縄県西表島、フィリピン・ルソン島中南部の国際稲研究所で採集したものをを用いた。また、リングガイ科に属する *Pila conica* (GRAY) およびリングガイ科と近縁なタニシ科に属するオオタニシ *Cipangopaludina japonica* (MARTENS) も比較のため供試した。*P. conica* はルソン島中南部の Calauan 近郊、オオタニシは熊本県七城町でそれぞれ採集した。*P. conica* は採集直後に99%エタノールで固定したが、その他の貝は、特に断らない限り、生体よりDNAの抽出を行った。

#### 2. DNAの抽出

貝に多く含まれるグリコーゲンなどの多糖類を取り除くため、DNAの抽出はCTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) 法(渡辺・杉浦, 1989)を改変して行った(Fig. 1)。抽出には足の筋肉のみを用いた。また、一部のサンプルについては、Fig. 1の方法により抽出

した DNA の 0.7% アガロースゲル (SEAKEM GTG, FMC) からの切り出しを行い、分子量の大きな DNA のみを回収した。

### 3. PCR

PCR 反応液は鋳型 DNA 約 25ng を含む 20  $\mu$ l とし、プライマー 0.8  $\mu$ M, dNTPs 各 100  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, rTaq DNA Polymerase (TOYOBO) 0.8U の濃度に調整した。プライマーとしては、CAATCGCCGT (1), GGGTAACGCC (2), GTGATCGCAG (3), AGTCAGCCAC (4) の 4 種のオリゴヌクレオチドのいずれかを用いた (CAETANO-ANOLLES et al., 1991)。

PCR 反応では、まず 94°C · 3 分で DNA を予備変性させ、94°C · 1 分, 36°C · 1 分, 72°C · 2 分の反応を 40 回繰り返す、最後に 72°C · 5 分の伸長反応を加えた。PCR 産物は、1.0% アガロースゲル上で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色によりバンドを検出した。

### 結果 および 考察

Fig. 1 に示した抽出法により、0.5 g 程度のスクミリ

Chop foot muscle (ca. 0.5 g) finely on ice.  
↓  
Wash twice in 1 ml of TBS buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.14 M NaCl, 5 mM KCl).  
↓  
Resuspend in 500  $\mu$ l of Lysis buffer (10  $\mu$ l of proteinase K (10 mg/ml), 0.15 M NaCl, 15 mM sodium acetate, 0.1 M EDTA (pH 8), 1% SDS). Incubate for 3 hrs at 50 °C.  
↓  
Extract twice with 1 vol of phenol / chloroform / isoamyl alcohol (25 : 24 : 1).  
↓  
Add 0.2 vol of 5 M NaCl and mix thoroughly.  
↓  
Add 0.16 vol of 10% CTAB / 0.7 M NaCl solution and mix. Incubate for 10 min at 60 °C.  
↓  
Extract with 1 vol of chloroform / isoamyl alcohol (24 : 1). Repeat  
↓  
Extract with 1 vol of phenol / chloroform / isoamyl alcohol.  
↓  
Precipitate DNA with 0.6 vol of isopropanol.  
↓  
Add 590  $\mu$ l of TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA) and 10  $\mu$ l of RNase A (10 mg/ml). Incubate for 1 hr at 37 °C.  
↓  
Extract with 1 vol of phenol / chloroform / isoamyl alcohol.  
↓  
Precipitate DNA with 0.6 vol of isopropanol.  
↓  
Resuspend the pellet in 100  $\mu$ l of 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8).

Fig. 1. Protocol for the extraction of DNA from the golden apple snail *Pomacea canaliculata*.

ンゴガイの筋肉片から 0.2-4.0  $\mu$ g の DNA が得られた。この DNA を鋳型にして PCR を行い、その産物の電気泳動を行うと、用いたプライマーの種類に関わらず複数のバンドが認められ、スクミリンゴガイ由来の DNA 断片が増幅されたことが確認された (Fig. 2)。これは、リンゴガイ科で PCR による DNA の増幅が成功した最初の報告例である。ただし、PCR を行っても DNA が増幅されなかった場合もあり、それら一部のサンプルについては PCR 阻害物質の存在や抽出の過程で DNA が切断されたことが推察された。そのような場合でも、抽出 DNA の電気泳動を行い、分子量の大きな DNA のみ

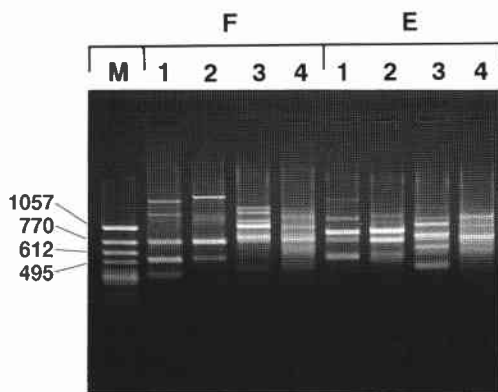


Fig. 2. RAPD profiles of fresh (F) and ethanol (99%) preserved (E) individuals of the golden apple snail *Pomacea canaliculata* using four primers: CAATCGCCGT (1), GGGTAACGCC (2), GTGATCGCAG (3) and AGTCAGCCAC (4). M: DNA size marker ( $\phi$ X174 DNA digested with *HincII*). Numerals on the left side indicate the number of base pairs of the bands of the size marker.

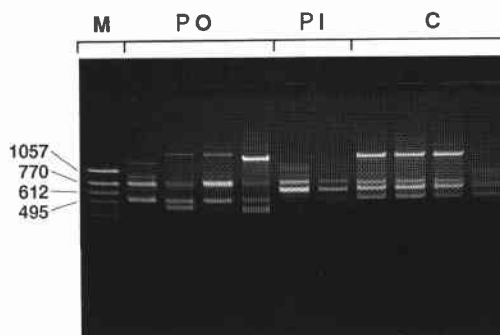


Fig. 3. RAPD profiles of the three species of snails: *Pomacea canaliculata* (PO), *Pila conica* (PI) and *Cipangopaludina japonica* (C) using the primer of CAATCGCCGT (1). M: DNA size marker ( $\phi$ X174 DNA digested with *HincII*). Numerals indicate the number of base pairs of the bands of the size marker.

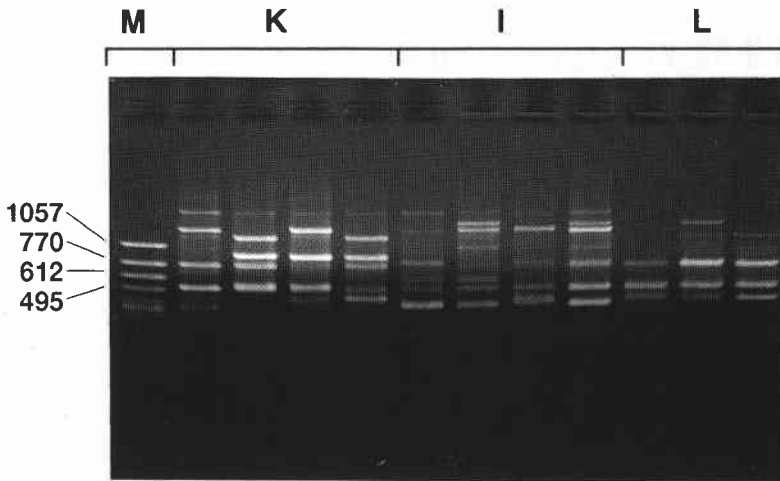


Fig. 4. RAPD profiles of the golden apples snail *Pomacea canaliculata* from three localities: Kumamoto (K), Iriomote Island (I) and Luzon Island (L) using the primer of CAATCGCCGT (1). M: DNA size marker ( $\phi$ X174 DNA digested with *HincII*). Numerals indicate the number of base pairs of the bands of the size marker.

を回収した後に PCR を行うと、試みた全てのサンプルについて DNA 断片の増幅が認められた。また、99%エタノールで固定した個体から抽出した DNA を鋳型とした場合 (Fig. 2, E) においても、PCR による断片の増幅が確認された。スクミリングガイの生貝は植物防疫法における輸入禁止品に指定されているが、PCR による DNA 増幅のためにはエタノール固定標本で充分であることが明らかになった。

スクミリングガイと *Pila conica*, オオタニシでは、ランダムプライマーを用いて増幅された DNA のバンドパターンが種間で大きく異なっており、例えばスクミリングガイにおける約520塩基対のバンドのように、種特異的と考えられるバンドも認められた (Fig. 3)。また、スクミリングガイの種内でも、種間の差ほど顕著ではないもののバンドパターンに差が認められた。とくに、産地 (熊本, 西表, フィリピン) が同じ場合には、互いに類似したバンドパターンをもつ傾向が認められた (Fig. 4)。以上のように、種内と個体群内のそれぞれのレベルで RAPD パターンがある程度の共通性を持つことは、これらのバンドが系統上有効な情報を持つことを示している。また、使用するプライマーの種類により、得られるバンドのパターンも変化した (Fig. 2) ことから、複数のプライマーを使用することによって、より多くの系統上の情報を得ることができるものと期待される。ただし、信頼性の高い系統樹を得るためにはバンドパターンの解析だけでは不十分であるとされており (BACKELJAU et al., 1995), 核やミトコンドリア DNA の塩基配列の

一部を決定するなど別の手法を併用することが必要であろう。

なお、同じ産地の中でも個体ごとにバンドパターンは異なっていた (Fig. 4)。このことは、今回の手法により、個体の識別が可能であることを示している。したがって、他の巻貝で行われているように (ROLLINSON et al., 1996), 配偶システムや集団構造の解析などリングガイ類の生態学・行動学上の問題にもこの手法を応用可能であると考えられる。

#### 引用文献

- 1) ARMBRUSTER, G. (1997) *J. Moll. Stud.* **63**: 379-388.
- 2) BACKELJAU, T., DE BRUYN, L., DE WOLF, H., JORDAENS, K., VAN DONGEN, S., VERHAGEN, R. and WINNEPENINCKX, B. (1995) *Cladistics* **11**: 119-130.
- 3) CAETANO-ANOLLES, G., BASSAM, B.J. and GRESSHOFF, P.M. (1991) *Biotechnology* **9**: 553-557.
- 4) COWIE, R.H. (1993) *J. Med. & Appl. Malacol.* **5**: 61-67.
- 5) HARASEWYCH, M.G., LAURA ADAMKEWICZ, S., BLAKE, J.A., SAUDEK, D., SPRIGGS, T. and BULT, C.J. (1997) *J. Moll. Stud.* **63**: 327-351.
- 6) PERERA, G. and WALLS, J.G. (1996) *Apple Snails in the Aquarium* T.F.H. Publications, New Jersey: 121p.
- 7) REMIGIO, E.A. and BLAIR, D. (1997) *J. Moll. Stud.* **63**: 173-185.
- 8) ROLLINSON, D., JONES, C.S. and NOBLE, L.R. (1996) *Slugs & Snail Pests in Agriculture* (BCPC Symposium Proceedings, No. 66) (HENDERSON, I.F. ed.) *British Crop Protection Council*: pp. 3-12.
- 9) STOTHARD, J.R., MGENI, A.F., ALAWI, K.S., SAVIOLI, L. and ROLLINSON, D. (1997) *J. Moll. Stud.* **63**: 489-503.
- 10) 和田 節 (1997) 植物防疫 **51**: 459-462.
- 11) 渡辺 格 (監修)・杉浦昌弘 (編集) (1989) クローニングとシークエンス 植物バイオテクノロジー実験マニュアル 農村文化社: pp. 252-261.

(1998年5月1日 受領)