

# ゲンジボタルミトコンドリアゲノムの全塩基配列

## Complete mitochondrial genome sequence of *Luciola cruciata*

天野 仁司・松井 美樹・五十嵐 美里・田中 美帆・エフィヤンティ サフリザル  
福島工業高等専門学校物質工学科

Hitoshi Amano, Miki Matsui, Misato Igarashi, Miho Tanaka and Eviyanti Safrizal

Fukushima National College of Technology, Department of Chemistry and Biochemistry

(2013年9月17日受理)

The complete mitochondrial genome sequence of the genji firefly, *Luciola cruciata* was determined using long PCR and primer walking methods. It was circular molecule of 15,989 bp in length (accession no.: AB849456) and contains 13 protein-coding genes, 2 ribosomal RNA genes, 22 transfer RNA genes, and a non-coding AT-rich region. The overall base compositions of the heavy strand are 43.2% A, 32.5% T, 14.9% C, and 9.3% G, with high A + T content (75.7%). The mitochondrial gene arrangement of *L. cruciata* was identical to that of bioluminescent insects *Rhagophthalmus lufengensis* and *Pyrocoelia rufa*, except for the presence of the 58 bp long intergenic spacer sequence between tRNA(Trp) and tRNA(Cys). This spacer sequence region can be drawn to form two putative types of clover-leaf structures.

**Key words:** mitochondrial genome, genji firefly, *Luciola cruciata*,

### 1. はじめに

ゲンジボタルは清流に生息する昆虫である。水質の汚染や河川の護岸整備、そして都市化による光害のため、日本の各地で個体数の減少が見られる。その対策として、一部で生息地の異なる個体の放流が行われたことから、遺伝子移入による遺伝的多様性の喪失が危惧されている。

ゲンジボタルの遺伝的多様性の研究は、ミトコンドリアDNA (mtDNA)の16S rRNA (1rRNA)遺伝子<sup>1)</sup>、シトクロムオキシダーゼII (COII)遺伝子<sup>2)</sup>、そして NADHデヒドロゲナーゼサブユニット5 (ND5)遺伝子<sup>3)</sup>を用いて行われてきた。COII遺伝子の解析例では、ゲンジボタルの生息する本州、四国、九州を、3系統、7グループの地域に分類している<sup>2)</sup>。しかし、これらの分類は広域であり、ゲンジボタルが生息する河川の毎の遺伝的多様性を見出すためには、mtDNAの特定の遺伝子ではなく全塩基配列の解析が必要であると考えた。

本研究では、福島県いわき市三和地区に生息するゲンジボタルのmtDNAの全塩基配列を決定し、日本DNAデータベース(DDBJ)に登録して、アクセッションナンバーAB849456を取得した。これまでにmtDNAの全塩基配列が解読されているホタル科(Lampyridae)の昆虫は、マドボタル属(*Pyrocoelia*)の*P. rufa* (アキマドボタル)<sup>4)</sup>、

イリオモテボタル属(*Rhagophthalmus*)の *R. ohbai* (イリオモテボタル) および*R. lufengensis* (和名なし)<sup>5)</sup>の3種のみであり、ゲンジボタル属(*Luciola*)の昆虫でmtDNAの全塩基配列を解読した報告は、本研究の*Luciola cruciata* (ゲンジボタル) が初めてである。

### 2. 試薬と実験方法

#### 2.1 ゲンジボタルの採取と保存

福島県いわき市三和地区に生息するゲンジボタルの成虫を捕虫網で採取した。採取したホタルは速やかに99.5% エタノールに浸漬して固定した。固定した個体は、DNAの抽出実験まで-60℃のディープフリーザーで保存した。

#### 2.2 DNAの抽出

固定したゲンジボタルの翅鞘と後翅を取り除き、胸部から約15 mgの筋肉組織を取り出した。この筋肉組織からのDNAの抽出には、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN社)を説明書にしたがって使用した。

#### 2.3 mtDNAの増幅

mtDNAは、末端部分で重複するA, Bの2つの領域(Fig. 1)に分け、それぞれをlong PCR法対応のDNA合成酵素を用いて増幅した。

約5.8 kbpの領域Aの増幅には、他の地域のゲンジボタ

ルの塩基配列として報告されていたND5遺伝子の配列とlrRNA遺伝子内の配列からそれぞれ製作した2つのプライマー、5'-ACCGAATATCCTGGCAGTTCAT-3'と5'-TTGGTTGGGGTGACTGAAAGAT-3'を使用し、反応は、KOD-Plus-Neo (東洋紡株式会社) を用いて、94 °C 2分変性後、98 °C 10秒変性 68 °C 3分伸長を1サイクルとして30回繰り返すtwo-step PCR methodで行った。

約10.8 kbpの領域Bの増幅には、領域A内の解読した配列からそれぞれ製作した2つのプライマー、5'-CCAACCTGGCTCACGCCGATTTAAACTCAGATC-3'と5'-TTGCCGGCTGCAATATCTGCCCAACTC-3'を使用し、反応は、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社) を用いて、98 °C 10秒変性 60 °C 15秒間アニーリング 68 °C 6分伸長を1サイクルとして30回繰り返すthree-step PCR methodで行った。

これらのPCRには、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社) を使用した。

#### 2.4 塩基配列の決定と遺伝子の予測

サイクルシーケンス反応にはBigDye Terminator v1.1 kitを用い、塩基配列の決定はprimer walking法にしたがって ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems社) で行った。反応に用いた鋳型DNAには、PCR産物を直接使用した。プライマーは、最初のみmtDNAの増幅反応に用いたものを使用し、その後は順次解読した配列から製作ものを使用した。

遺伝子の予測は、トランスファーRNA配列データベースtRNADB-CEでの予測と*P. rufa*のmtDNA配列<sup>4)</sup>との比較で行った。

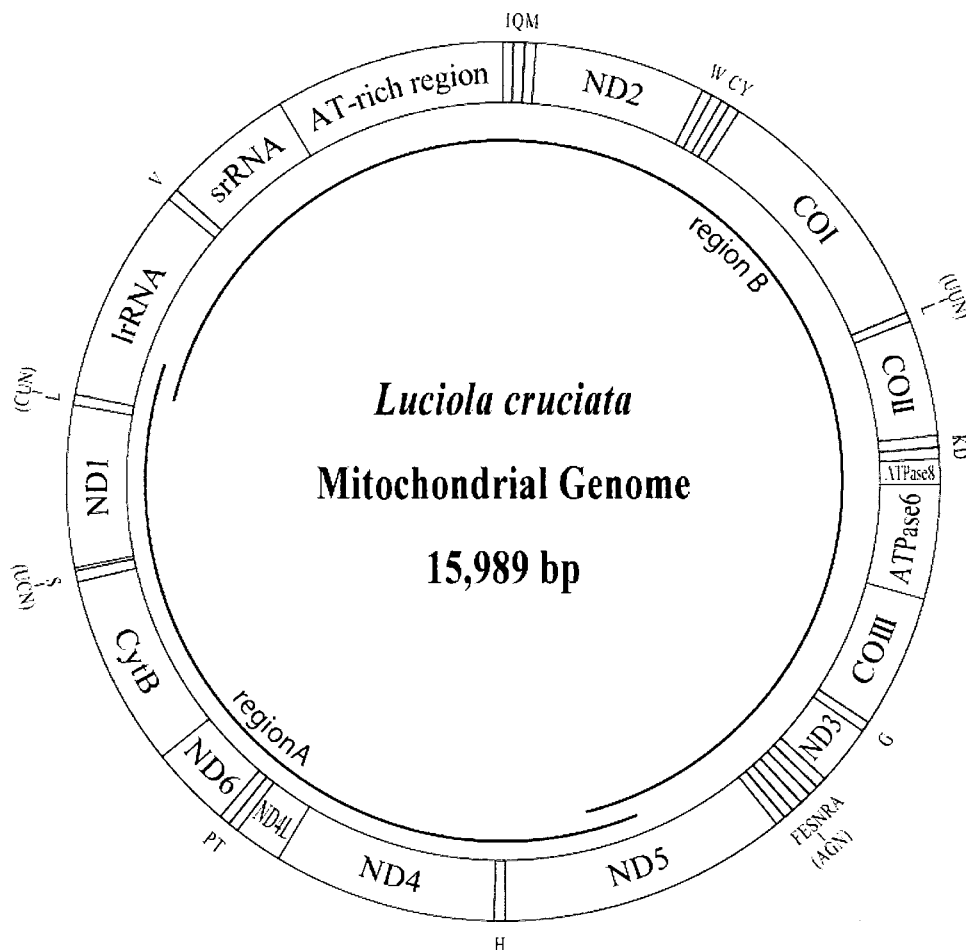


Fig. 1 Map of the mitochondrial genome of *Luciola cruciata*. COI, COII, and COIII refer to the cytochrome oxidase subunits, CytB refers to cytochrome b, and ND1–ND6 refer to NADH dehydrogenase subunits. tRNAs are shown by the shaded blocks and are labeled according to the single letter amino acid codes. Overlapping lines (region A and region B) within the circle indicate two PCR fragments amplified for sequencing.

3. 結果と考察

3.1 ゲンジボタルmtDNAの塩基配列

ゲンジボタルmtDNAは15,989 bp の環状分子で、13個のタンパク質遺伝子、2個のリボソームRNA遺伝子、22個のトランスファーRNA遺伝子、そしてAT-rich領域が存在した(Fig. 1, Table 1)。これらの遺伝要素とその配列は、これまでにmtDNAの全塩基配列が解読されているホタル科(*Lampyridae*)の昆虫3種<sup>4), 5)</sup>のうち*R. ohbai*を除く2種、および昆虫のモデル生物であるキイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)のmtDNA<sup>6)</sup>と同一であった。重鎖の塩基組成は、アデニン43.2%、チミ

ン32.5%、シトシン14.9%、そしてグアニン9.3%で、A+T含量は、75.7%である。このA+T含量は、ホタル科の昆虫3種のものと比較して最も低い値であるが、AT-rich領域のみでは88.6%であり、これは、他のホタル科の昆虫3種のものと比較して最も高い値である(Table 2)。

mtDNAの構造の特徴としては、ゲンジボタルmtDNAには、tRNA(Trp)とtRNA(Cys)の間に、他のホタル科の昆虫3種のmtDNAには見られない58 bpの遺伝子間のスペーサー配列が存在したことがあげられる(Fig. 1, Fig. 2)。

Table 1 Organization of *L. cruciata* mitochondrial genome

Gene	Direction	Begins	Ends	Length	Start codon	Stop codon	Anticodon
tRNA Ile	F	1	64	64			CAT
tRNA Gln	R	62	130	69			TTG
tRNA Met	F	130	195	66			CAT
ND2	F	196	1209	1014	ATA	TAA	
tRNA Trp	F	1209	1273	65			TCA
tRNA Cys	R	1394	1332	63			GCA
tRNA Tyr	R	1456	1394	63			GTA
COI	F	1449	2993	1545	ATT	TAA	
tRNA Leu(UUR)	F	2989	3052	64			TAA
COII	F	3052	3733	682	ATA	T+tRNA	
tRNA Lys	F	3734	3804	71			CTT
tRNA Asp	F	3804	3869	66			GTC
ATPase8	F	3870	4025	156	ATT	TAA	
ATPase6	F	4019	4693	675	ATG	TAA	
COIII	F	4693	5476	784	ATG	T+tRNA	
tRNA Gly	F	5477	5540	64			TCC
ND3	F	5541	5892	352	ATT	T+tRNA	
tRNA Ala	F	5893	5956	64			TGC
tRNA Arg	F	5956	6020	65			TCG
tRNA Asn	F	6020	6084	65			GTT
tRNA Ser(AGN)	F	6085	6151	67			TCT
tRNA Glu	F	6152	6214	63			TTC
tRNA Phe	R	6275	6213	63			GAA
ND5	R	7983	6276	1708	ATT	T+tRNA	
tRNA His	R	8046	7984	63			GTG
ND4	R	9373	8047	1327	ATG	T+tRNA	
ND4L	R	9657	9367	291	ATG	TAA	
tRNA Thr	F	9659	9721	63			TGT
tRNA Pro	R	9786	9722	65			TGG
ND6	F	9788	10276	489	ATA	TAA	
CytB	F	10276	11407	1132	ATG	T+tRNA	
tRNA Ser(UCN)	F	11408	11474	67			TGA
ND1	R	12441	11491	951	TTG	TAG	
tRNA Leu(CUN)	R	12504	12443	62			TAG
lrRNA	R	13770	12505	1266			
tRNA Val	R	13840	13771	70			TAC
srRNA	R	14621	13840	782			
AT-rich region	-	14622	15985	1364			

For abbreviations see legend for Fig.1.

Table 2 Percentage of A + T content

	<i>L.cruciata</i>	<i>R.ohbai</i>	<i>R.lufengensis</i>	<i>P.rufa</i>
Total region	75.7	79.1	79.6	77.4
AT rich region	88.6	85.3	86.9	87.6

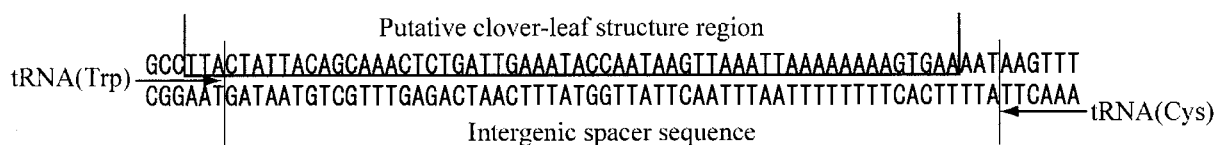


Fig. 2 Intergenic spacer sequence region between tRNA(Trp) and tRNA(Cys)

### 3.2 遺伝子間のスペーサー配列の特徴

ゲンジボタルmtDNAのtRNA(Trp)とtRNA(Cys)の間に存在した58 bpの遺伝子間のスペーサー配列およびこの両端に隣接する数塩基対を含む配列を、二次構造予測ソフトウェアmfoldで解析したところ、トランスファーRNAの特徴的な立体構造であるクローバーリーフ構造のアクセプターステム、D-ループ、そしてアンチコドンループに相当する二次構造が予測された。一方、TΨC-ループは予測されなかったが、2 bpではあるがTΨC-ループを形成するためのステム部分を形成させると、大きな可変ループおよび小さなTΨC-ループを持つクローバーリーフ構造と、小さな可変ループおよび大きなTΨC-ループを持つクローバーリーフ構造が推定できた (Fig. 3)。

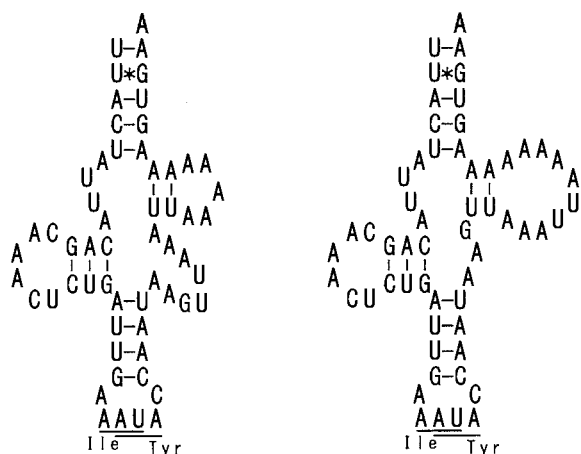


Fig. 3 Putative clover-leaf structures of the intergenic spacer sequence region

これらの構造から予想されるアンチコドン配列は、AAUまたはAUAであり、The Invertebrate Mitochondrial

Code (table 5)<sup>7)</sup>に従うと、これらはそれぞれイソロイシン(Ile)およびチロシン(Tyr)のアンチコドンに相当する。

このスペーサー配列から推定される構造は、トランスファーRNAとしては不完全であり、この配列はシュードジーン (偽遺伝子) の可能性がある。また、この配列が他のホタル科の昆虫3種のmtDNAに存在しないことから、これがゲンジボタルまたはゲンジボタル属のホタルに特有なものであると推定できる。これを確かめるためには、ヘイケボタルなどの、他のゲンジボタル属ホタルmtDNAの解析が必要である。

### 謝 辞

ゲンジボタルの採取で、ご助言とご協力をいただきました本校建設環境工学科の原田正光教授に深く感謝申し上げます。

### 参 考 文 献

- 1) H. Suzuki: Tokyo Metropolitan University Bulletin of National History, 3, 1-53 (1997).
- 2) H. Suzuki, Y. Sato, and N. Ohba: Mol. Phylogenet. Evol., 22, 193-205 (2002).
- 3) T. Yoshikawa, K. Ide, Y. Kubota, Y. Nakamura, H. Takebe, and H. Kusaoka: Jpn. J. Ent., 4 117-127 (2001).
- 4) J.S. Bae, I. Kim, H.D. Sohn, and B.R. Jin: Mol. Phylogenet. Evol., 32, 978-985 (2004).
- 5) X. Li, K. Ogoh, N. Ohba, X. Liang, and Y. Ohmiya: Gene, 392, 196-205 (2007).
- 6) D.L. Lewis, C.L. Farr, and L.S. Kaguni: Insect Mol. Biol., 4, 263-278 (1995).
- 7) S. Osawa, T.H. Jukes, K. Watanabe, and A. Muto: Microbiol. Rev., 56 229-264 (1992)