

令和 2 年 7 月 5 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K18603

研究課題名（和文）セミの抜け殻から集団構造と大発生のメカニズムを探る

研究課題名（英文）Inference of cicada's population structure from exuviae

研究代表者

神戸 崇 (Kanbe, Takashi)

北海道大学・農学研究院・専門研究員

研究者番号：40648739

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：セミの集団構造や大発生のメカニズムを探るため、2種のセミについて、次世代シーケンシング技術を活用したマイクロサテライト・マーカーの開発と、抜け殻からのDNA抽出法およびPCR増幅法を開発を行った。エゾハルゼミの抜け殻の集団サンプルに適用したところ、1遺伝子座で70%以上の遺伝子型決定に成功し、十分なデータが得られることが示された。また、基礎的な情報として、幼虫の生息する地中の温度の記録と、年ごとのセミの発生量調査も行った。発生量は1地点では2種が同調した変動を示したが、地点間では同調性は低く、局所的に変動していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫類では、抜け殻をDNA試料として核遺伝子マーカーを用いて集団遺伝学的解析をした例はこれまでにない。本研究で開発した抜け殻を使用したDNA解析手法は捕獲の難しいセミ類のDNA試料を効率的に収集することを可能にし、セミの行動や集団構造などこれまであまり研究が進んでいなかった分野を進展させることになる。また、絶滅危惧種など、保全が必要なセミの種や集団の遺伝的多様性を非侵襲的に調査するのにも有効であり、保全施策の評価、改善に寄与する。

研究成果の概要（英文）：For inferring cicada's population structure using its exuviae, I isolated microsatellite markers for two species of cicadas using the next generation sequencing technology, and developed DNA extraction method from cicada's exuviae, and PCR method. Applying this method to population samples of a cicada, the genotyping success rate reached more than 70%, which means this method is useful for inferring population structure non-invasively. In a five-year survey in eight study sites, yearly abundances of the two species in a site fluctuated in synchrony. But no obvious synchronism was found among sites. This indicates that cicada's abundance fluctuates locally.

研究分野：昆虫学、進化生態学

キーワード：セミ 抜け殻 マイクロサテライト 集団遺伝学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本人にとってセミは風物詩の一つになるほど身近な昆虫であり、大発生したり、逆に鳴き声が少なかったりすると話題になる。古くから地道な観察や実験によってセミの生態が研究されてきたが、成虫の分散習性や幼虫期間のばらつきなどはほとんど分かっていない。解明が進まない要因の一つは、セミの幼虫は長い地中生活をし、成虫は飛翔し、樹上で生活するため、観察や飼育、捕獲による調査が難しいことである。近年、発展している遺伝子解析手法を適用して集団遺伝学的な解析をすることでいくつかの謎は解明されるかもしれない。しかし、それには多数の個体の DNA サンプルが必要となり、捕獲の労力やセミの集団や生態系への影響が問題となる。セミは羽化の際に丈夫な抜け殻を残す。この抜け殻から DNA を抽出できれば、手軽にサンプルが集まり、セミや生態系にも負荷をかけない。そこで、本研究ではセミの抜け殻から DNA を抽出し、集団遺伝学的解析をすることを試みた。

2. 研究の目的

本研究では、北海道に広く分布する 2 種のセミについて、抜け殻から抽出した DNA を使って、マイクロサテライト・マーカを用いた集団遺伝学的解析を行い、年次間、地域間、森林環境間の遺伝的分化の程度を調べ、成虫の分散習性や幼虫期間のばらつき、大発生のメカニズムを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 調査対象種

北海道に広く分布し、個体数の多いエゾハルゼミ *Yezoterpnosia nigricosta* とコエゾゼミ *Auritibicen bihamatus* を対象種とした。いずれも山地の森林に生息する種であり、エゾハルゼミは春に、コエゾゼミは夏に発生する。事前調査により、どちらの種も年によって発生量が変わり、ときどき大発生をすることが分かっている。

(2) 調査地

北海道札幌市とその近郊から 3 地点(砥石山、白旗山、野幌)を選定し、各地点でトドマツ人工林で構成される針葉樹林と、広葉樹を主体とする天然広葉樹林の調査サイトを設定した。地点間は 10~20 km 離れており、森林の無い住宅地等で分断されている。各地点の針葉樹サイトと広葉樹サイトは連続した森林で接続している。

(3) DNA 試料の収集

選定した調査地で、2 種のセミのそれぞれの羽化時期に抜け殻を収集した。抜け殻に残ったセミの DNA は徐々に分解されていくと考えられるため、羽化からあまり日数の経っていないと思われるものを選択した。

(4) 生息環境と発生量の調査

セミの幼虫が生息する地中の温度はその発生量と関係が強いと考えられる。そこで、データロガーを各調査サイトに 1 つ設置して地温を記録した。測定深度は地表下 20 cm とした。また、年ごとのセミの発生量の指標として、各調査サイトで 20 本の定点木を設定し、羽化シーズン終了後に樹上と根際から 50 cm の範囲の地表にあるセミの抜け殻を回収し、雌雄の個体数を記録した。

(5) 遺伝子マーカーの開発

研究対象とする 2 種のセミ、エゾハルゼミとコエゾゼミの遺伝的集団構造を調べるために、それぞれの種のマイクロサテライト・プライマーの開発を行った。多量のシーケンシング情報を得られる次世代シーケンサー (NGS) を利用して、ゲノム配列を取得し、そこからマイクロサテライト領域を探索する方法を採用した。具体的には、制限酵素認識配列の周辺のみをシーケンシングする RAD-seq を行い、得られた配列に対してアッセンブルプログラム Velvet version 1.2.10 (文献) を使ってゲノム配列の復元を行った。次に、QDD version 3.1 (文献) を使って、復元された配列からマイクロサテライト領域を抽出し、プライマーを設計した。セミの組織から抽出した DNA を用いて多型のある遺伝子座を選抜した。

(6) 抜け殻からの DNA 抽出法の開発

以下の 3 つの方法を試験した。

抜け殻のうち、形態学的情報が少なく、汚染の少ない部位のみを使用し、残りの部分は標本として保管した。DNA 抽出は Chelex100 (バイオラッド社) を用いた方法 (文献) で行った。

の方法で抽出した DNA に対して、全ゲノム増幅キット QIAGEN REPLI-g Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて全 DNA の増幅を試みた。

抜け殻全体を使用し、シリカメンブレン式 DNA 抽出キット NucleoSpin Tissue (マッハライ・ナーゲル社) で DNA を抽出した。

(7) PCR 増幅法の開発

上記の抽出 DNA に対して次の 3 通りの方法を試験した。ミトコンドリアと核の遺伝子を対象

とし、ミトコンドリアの COI 領域の約 400bp を増幅するユニバーサル・プライマー（文献 ）、
 ）と本研究で開発したマイクロサテライト・プライマーを使用した。

35 サイクルの PCR 反応を 1 回行った。

1 回目の PCR 産物を鋳型にして同じプライマーでもう一度 PCR を行った。

1 回目の PCR 産物を鋳型にしてインターナル・プライマーを使って PCR を行った（nested PCR）。

(8)PCR 産物の電気泳動

抜け殻から抽出した DNA には他の生物の DNA も混入しているため、しばしば非特異的な増幅が見られた。PCR で目的の領域が増幅されているかを確認するため、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を使ったヘテロ二本鎖分析（heteroduplex analysis）を行った（文献）。ポジティブ・コントロール（セミの筋組織から抽出した DNA）と同様のバンドパターンであれば成功とみなした。

(9)抜け殻サンプルによる集団解析

十分なサンプル数が得られたエゾハルゼミの抜け殻サンプルに対して、マイクロサテライトの増幅と遺伝子型（対立遺伝子）の同定、集団遺伝学的解析を行った。遺伝子型の同定はヘテロ二本鎖分析（heteroduplex analysis）で行った。解析には GenAlEx 6.5（文献）を使用した。

4. 研究成果

(1)発生量

2015 年から 2019 年の 2 種のセミの発生量を図 1 に示した。広葉樹林では抜け殻の回収率が低いため、今回の手法では過小評価であると思われる。野幌では台風による風倒発生のため、2018 年夏以降の調査ができなかった。砥石山のトドマツ林では 2 種のセミとも発生量が多く、発生量の変動が同調している傾向が見られた。他の調査地ではコエゾセミの発生量は非常に少なかった。発生量が前年の 2 倍以上あるいは半分以下になる例が観察されたが、そのようなことが起こる年は地点によって異なったことから、セミの大発生は気象等の要因で広範囲に生じるものではなく、局所的に生じている可能性がある。

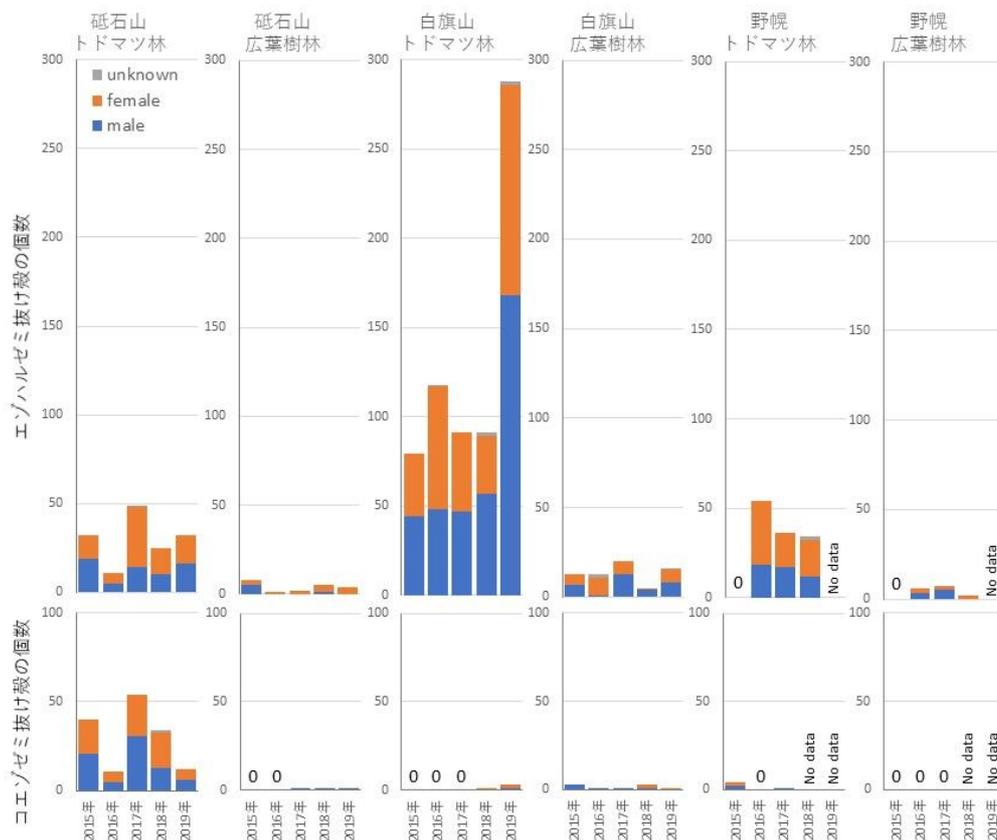


図 1 定点木 20 本から見つかった抜け殻の個数

(2)地温

積雪期の地表下 20 cmの温度は0~4 の間でほとんど変動が見られなかった。春になるとある時点を境に地温が急速に上昇し、気温と同調した変動を示すようになった。地温の上昇が始まる時期は場所や年によって異なり、雪解けに関係していると思われる。羽化時期の始まりを捉えられるような定期的な調査は行っていないが、エゾハルゼミでは地温上昇の開始時期が遅いと羽化開始時期が遅い傾向が見られた。図 2 参照。



図 2 地温（日平均）の推移

○はセミの抜け殻が確認できなかった調査日、▲はセミの抜け殻が確認できた最初の調査日を示す。赤はエゾハルゼミ、緑はコエゾゼミを表す。

(3)遺伝子マーカー

エゾハルゼミでは 51 のマイクロサテライト遺伝子座の候補をテストして、そのうち 17 遺伝子座で多型が確認された (Kanbe et al., under review)。コエゾゼミについては 10 の候補をテストして、8 遺伝子座で多型が確認された。種によって遺伝子の多様性の程度が異なることが示唆された。

(4)DNA 抽出法及び、PCR 増幅法

抜け殻の一部のみから DNA を抽出したサンプルでは、Nested PCR をすることでミトコンドリアの遺伝子を高い成功率（約 80%）で増幅することができた (Kanbe, in prep.)。一方、核 DNA であるマイクロサテライトの増幅成功率は Nested PCR 法を用いても非常に低かった。全ゲノム増幅法で DNA の増幅を試みたが、マイクロサテライトの PCR 増幅はうまく行かなかった。おそらく、サンプルに混入していたセミ以外の DNA も増幅されたためと考えられる。

抜け殻全体からシリカメンブレン式 DNA 抽出キットを使って DNA を抽出したサンプルでは、1 回の PCR ではほとんど増幅が見られなかったが、同じプライマーで 2 回目の PCR を行うと成功率は 80% ほどまで向上し、非特異的な増幅産物はほとんど見られなかった。解析にはこの手法を採用することにした。

(5) 抜け殻サンプルによる集団解析

集団解析には抜け殻全体から DNA を抽出する方法を採用した。2015、2016年のサンプルは抜け殻の一部のみを使うことを想定した方法でサンプリングしていたため、この解析には使用できなくなった。それで研究実施期間を1年延長し、2017～2019年の3年間、抜け殻全体のサンプルを収集した。コエゾゼミは十分なサンプル数が得られなかったこと、研究時間が限られていたことから、今回はエゾハルゼミの2地点(4サイト)3年分のサンプルの一部、合計160個体(8集団×20個体)についてマイクロサテライト1遺伝子座の解析を行った。116個体(72.5%)の遺伝子型決定に成功した。Fstを計算し、主座標分析を行ったところ、第1軸で63.4%、第2軸で36.6%が説明される図3のような関係が得られた。白旗山と砥石山の広葉樹林の集団は近い位置にまとまったが、針葉樹林の集団は明瞭なまとまりは認められなかった。集団間の関係を明らかにするには、今後、さらに多くのサンプルと遺伝子座を使って解析を進める必要があるが、抜け殻から十分なデータが得られることが示された。

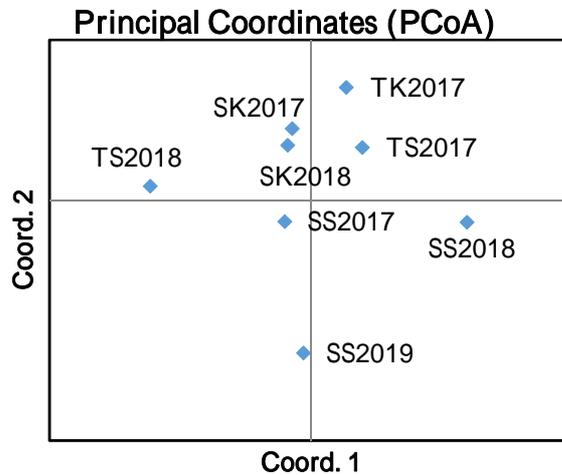


図3 主座標分析による集団間関係

TK: 砥石山・広葉樹林、TS: 砥石山・針葉樹林、SK: 白旗山・広葉樹林、SS: 白旗山針葉樹林

<引用文献>

Zerbino, D. R., and Birney, E. (2008) Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18(5), 821-829.

Megléczy, E., Pech, N., Gilles, A., Dubut, V., Hingamp, P., Trilles, A., Grenier, R., and Martin, JF. (2014) QDD version 3.1: A user friendly computer program for microsatellite selection and primer design revisited: experimental validation of variables determining genotyping success rate. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 1302-1313.

Kanbe, T., & Akimoto, S. (2009) Allelic and genotypic diversity in long-term asexual populations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* in comparison with sexual populations. *Molecular Ecology.* 18(5), 801-816.

Hafner, M. S., Sudman, P. D., Villablanca, F. X., Spradling, T. A., Demastes, J. W., & Nadler, S. A. (1994) Disparate rates of molecular evolution in cospeciating hosts and parasites. *Science.* 265, 1087-1090.

Yao, I., & Kanbe, T. (2012) Unique haplotypes in ant-attended aphids and widespread haplotypes in non-attended aphids. *Ecology and Evolution*, 2(9), 2315-2324.

Peakall, R. and Smouse P.E. (2012) GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics.* 28, 2537-2539.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神戸 崇
2. 発表標題 セミの脱皮殻を利用した非侵襲的なDNA採取法
3. 学会等名 環境DNA学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神戸 崇
2. 発表標題 セミの脱皮殻を利用した非侵襲的なDNA採取法
3. 学会等名 日本昆虫学会第78回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神戸 崇
2. 発表標題 次世代シーケンサーを利用したマイクロサテライトマーカーの開発 - セミ2種の例
3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会・日本昆虫学会共催北海道支部大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考