

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：82620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K01096

研究課題名(和文) DNA塩基配列情報に基づく文化財害虫の新規データベース構築

研究課題名(英文) Construction of a DNA barcode library for practical insect monitoring in museum

研究代表者

佐藤 嘉則 (SATO, Yoshinori)

独立行政法人国立文化財機構東京文化財研究所・保存科学研究センター・室長

研究者番号：50466645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：文化財の虫害を未然に防ぐ予防的保存の実践において、文化財害虫の発生を早期に把握することは重要である。本研究は、文化財害虫について形態的特徴による同定法では分類が困難な幼虫や脱皮殻あるいは排泄物から遺伝子(DNA)を抽出し、DNA情報に基づき文化財害虫を同定する手法を確立することを目的とした。当該研究期間を通して合計で69種133個体の文化財害虫を収集し、正確な形態同定を行った後、同定の指標にならない体節の一部を採取しDNA塩基配列解析と国際データベースへの登録作業を完了した。本研究により、形態同定が困難な文化財害虫の痕跡から、DNA塩基配列解析によって早期発見が可能となる基盤情報が構築された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

博物館や美術館で捕獲された虫が文化財を加害するか否かは、「文化財害虫事典」に代表される図鑑等で虫の形態を比較し判断される。しかし、文化財の害虫と形態が類似する虫も多く、専門家でない学芸員が判断するのは困難な状況にある。さらに、実際の現場では形態同定が困難な状態で捕獲されることが多いばかりでなく、脱皮殻や排泄物のみが見つかることも多く、これらでは害虫の同定を行うことが出来ないことが予防的な文化財保存を実践するための課題となっている。本研究では、形態ではなく遺伝子解析技術によって害虫同定を可能とする技術の基盤を作るため、幅広く収集した文化財害虫の遺伝子配列に基づくデータベースを構築した。

研究成果の概要(英文)：In the practice of preventive conservation of cultural properties in museum, it is important to detect the outbreak of museum pests at an early stage. The purpose of this research was to establish a method for identifying cultural property pests using molecular biological method by extracting DNA from larvae, molting shells and excreta of cultural property pests that are difficult to identify based on morphological characteristics. A total of 69 species of cultural property pests were collected throughout the research period. After morphological identification of them, DNAs were extracted from a part of their bodies, determined their sequences and registered in an international database. Through the research, basic database that enables early detection by molecular biological method from traces of cultural property pests was constructed.

研究分野：文化財保存科学

キーワード：生物劣化 文化財害虫 DNAバーコーディング

1. 研究開始当初の背景

(1) 文化財害虫対策の動向

文化財害虫によって文化財が食害を受けると、文化財の構成材料は不可逆的な変化を受ける。不可逆的な変化によって文化財から失われたものが、場合によってはその文化財の本質的な価値を損なうこともあるため被害は深刻である。1960年代頃から使用されてきた臭化メチル・酸化エチレンの混合ガスによる定期的な保存公開施設の燻蒸は、文化財害虫による被害を防ぐための方法として広く用いられてきた。しかし、日常の文化財害虫調査が行われておらず、生息状況が不明であるにも関わらず、定期的に燻蒸が行われる事例もあり、燻蒸によるリスクと効果が適切に評価されないまま過剰に実施されているという問題を内包していた。さらに、日本では2004年末をもって温室効果ガスである臭化メチルの生産・使用の全廃という社会情勢から、燻蒸のみに頼った文化財害虫対策の見直しが求められてきた。こうした背景から、文化財害虫対策のひとつの新しい概念として、文化財 IPM (Integrated Pest Management: 総合的有害生物管理) が提唱され、具体的な取り組みが行われている。

(2) 文化財 IPM とモニタリングの課題

文化財 IPM は、「博物館等の建物において考えられる、有効で適切な技術を合理的に組み合わせて使用し、展示室、収蔵庫、書庫などの資料のある場所では、害虫がいないこと、カビによる目に見える被害の無いことを目指して、建物内の有害生物を制御し、その水準を維持すること」と定義される(三浦、2012)。文化財 IPM の実践を概説すると、まず文化財害虫の生息状況の把握(モニタリング)のため、目視調査や粘着トラップ等で害虫を発見し形態的な特徴から同定を行い、害虫の種類と生息状況を把握した上で物理的防除対策(害虫の侵入経路の遮断など) 生物的防除対策(害虫の栄養源の除去など) 化学的防除対策(薬剤による忌避、殺虫など)を合理的に組み合わせて、保存公開施設内の害虫生息数をゼロに近づけるという取り組みである。文化財 IPM の実践においてモニタリングは特に重要な項目であるが、目視調査で得られる文化財害虫の存在痕跡が幼虫や歩脚や翅といった体節の一部、脱皮殻、排泄物である場合、形態的な特徴から同定を行うことは困難である(図1)。さらに、文化財害虫と類似した形態的特徴を持つ昆虫も存在し、専門家でないものが外部形態情報を基に文化財害虫を同定することが困難であり(図2)、これらがモニタリングのひとつの障壁となっている。

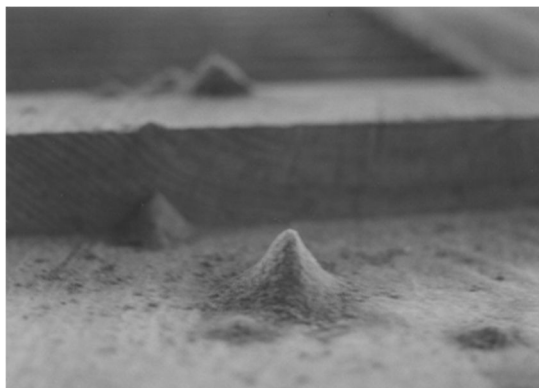


図1 木材を加害する文化財害虫の排泄物

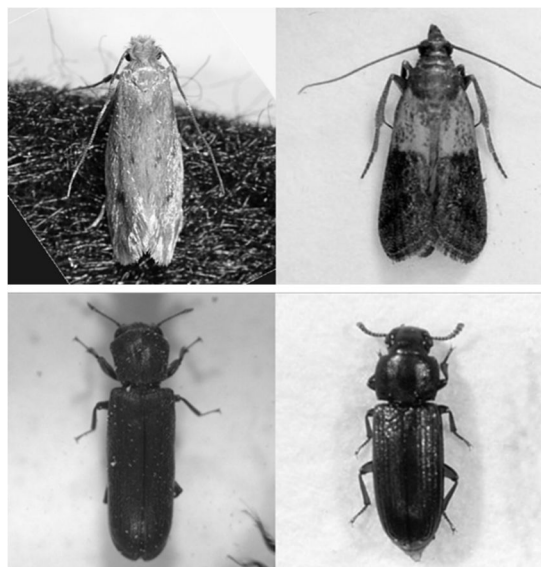


図2 文化財害虫(上下左)と類似する昆虫(上下右)

(3) DNA バーコーディングの応用

上述の課題を克服する技術として分子生物学的な手法を応用した DNA バーコーディングに着目した。DNA バーコーディングとは、あらゆる生物が固有する DNA 塩基配列を識別子として利用して種の同定を行う手法である。すなわち、未知試料の DNA 塩基配列を既知種の DNA 塩基配列を基に作成されたデータベースに照会して DNA 塩基配列が一致するものを見つけ出し、種の同定を行うという機序である(Hebert et al, 2003)。既知種の DNA 塩基配列データベースは、世界で多数の機関や組織が参画する国際プロジェクト(The International Barcode of Life Project: iBOL)によって年々拡充されており、現在約 26 万種類の既知種の DNA 塩基配列データが登録されている。DNA バーコーディングを応用すれば、形態的特徴による同定法では分類が困難な幼虫や脱皮殻あるいは排泄物から DNA を抽出し、DNA 塩基配列情報に基づき文化財害虫を同定することが可能となる。

2. 研究の目的

既知種のデータベースは年々拡充している一方で、文化財害虫については未だデータベースが構築されていない。その理由として、既知種の DNA 塩基配列データベースは目、科、属といった生物の分類群ごとに解析が進められており、「文化財害虫」といった虫の生態（食性）に基づくまとまりで分析対象が選別されていないことにある。つまり、紙、木材、絹、皮革など文化財の構成材料を食害する文化財害虫は多系統にまたがり、それを体系的に解析されることはこれまで無かったことに起因する。そこで本研究では、第 1 段階として文化財害虫というまとまりで DNA 塩基配列情報を基にした独自のデータベースを構築し、次にそれを基盤とした DNA バーコーディングによる文化財害虫の同定手法の確立を行うことを目的とする。最終的に、インターネット上で DNA 塩基配列情報に形態的特徴を付随させた文化財害虫データベースを広く公開し、文化財 IPM の実践における早期モニタリングの新規技術として文化財保存の分野で活用できるよう整備を進める計画である。さらに、そのデータベースを活用して形態的特徴による同定法では分類が困難な幼虫や脱皮殻あるいは排泄物から DNA を抽出し、DNA 情報に基づき文化財害虫を同定する手法の確立を目的とする。本研究によって、保存公開施設における文化財害虫の発生をより早期に把握出来るようになり、予防的保存の実践に大きく貢献することが期待される。

3. 研究の方法

(1) 文化財害虫の標本コレクションの整備

まず、日本国内で文化財への加害事例の多い昆虫の中から 8 目 20 科 52 種を主要な文化財害虫として選定した。次に該当する 52 種の文化財害虫を網羅的に収集し、DNA 塩基配列解析に供するための DNA 情報証拠標本（分類群名と DNA 情報との対応に誤りがある可能性が生じた際に検証を行うことが出来ることを目的とした標本）の作製・整備を行った。研究代表者が所属する機関では、国、地方公共団体、私立の美術館や博物館で起こる文化財害虫による被害相談への対応（年間平均で約 50 件）を業務の一部としており、新規に文化財害虫を入手する機会に恵まれているため、標本を入手する機会には恵まれている。さらに国内の美術館、博物館の学芸員との連絡網が構築されているため、それらを活用し文化財害虫の収集を行った。また、過去に収集し、未整理の状態にある文化財害虫の乾燥標本も多数保管しているため、これらを用いて DNA 情報証拠標本コレクションの網羅的な収集と整備を行った。

(2) 標本コレクションの形態同定

収集した文化財害虫（DNA 情報証拠標本）について、それぞれの文化財害虫が属する分類群ごとに特有の形態学的な特徴を記載し、種の同定を行う。種の同定とあわせて害虫の形態写真および生態学的情報（採取地、分布域、食性など）を記録・記載し、データベース構築の際の情報に付随させた。

(3) 標本コレクションの DNA 塩基配列解析

形態同定を終えた文化財害虫（DNA 情報証拠標本）の同一試料から、形態分類の指標とならない体節の一部を採取し DNA 抽出に供した。DNA 抽出は、すでに予備研究において条件検討を終えており、標準法を確立している。文化財害虫の DNA バーコーディングに用いる対象領域は、動物の標準的なバーコード領域であるミトコンドリアシトクローム C オキシダーゼサブユニット I（COI）遺伝子の 5' 末端側の約 650 塩基対とし、ポリメラーゼ連鎖反応に用いる酵素や反応条件については既存法を基にして標準法の確立を検討した。

(4) DNA 塩基配列情報の登録とデータベース構築

本研究で得られた DNA 塩基配列情報は、国際塩基配列データベースを協同運営する国立遺伝学研究所（DDBJ）に登録するとともに、日本バーコードオブライフ・イニシアチブが推奨する情報：採集データ（採集地、採集年月日、採集者名）、同定データ（分類群名、同定者名、同定年）、DDBJ 登録番号、各保管機関の証拠標本番号を基礎情報とした独自のデータベースを構築した。さらに、形態写真の情報も付随させ、DNA 塩基配列情報から文化財害虫の形態写真、生態情報、防除対策についても入手可能なデータベースとした。

(5) 脱皮殻・排泄物からの DNA 解析手法の確立

幼虫や歩脚や翅といった体節の一部および脱皮殻からの DNA 抽出は、試料が微量であるため、小スケールに改良した手法で検討を行った。排泄物からの DNA 抽出については、文化財害虫の食性ごとに最適な手法の検討を進めた。具体的には、木材を食害する害虫の排泄物からの DNA 抽出については既報（Ide et al, 2016）に準じて検討を行った。紙、絹、毛、皮革を食害する害虫の排泄物からの DNA 抽出については既往研究が無いため、Ide らの方法を基本としながら検討を進めた。

4. 研究成果

(1) 文化財害虫の標本コレクションの整備

先に選定した日本国内で文化財への加害事例の多い昆虫の網羅的な収集を行った。最終的に 69 種 133 個体を収集した。収集した文化財害虫は、形態同定に供した後、DNA 塩基配列解析を行うために同定の指標とならない体節の一部を採取し、DNA 情報証拠標本として個体ごとに記録を

行い、個体識別番号と共にエタノールで液浸した後-30℃で冷凍保存を行った。体節の一部は DNA 塩基配列解析に供した。

(2) 標本コレクションの形態同定

収集した文化財害虫 (DNA 情報証拠標本) について、それぞれの文化財害虫が属する分類群ごとに特有の形態学的な特徴を記載し、種の同定を行った。同定の正確さは本研究にとって非常に重要な要素であるため、文化財害虫の分類同定に長く携わっている研究者が担当した。種の同定とあわせて害虫の形態写真および生態学的情報を記録・記載し、データベース構築を進めた。

(3) 標本コレクションの DNA 塩基配列解析

形態同定を終えた文化財害虫 (DNA 情報証拠標本) の同一試料から、形態分類の指標とならない体節の一部を採取し DNA 抽出に供した。標準的な方法として、DNA 抽出は DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, CA, USA) を使用した。前処理として体節の一部を -80℃ にて 1 日から 2 日間凍結させ、ドライパドルルの先端にホモジナイザーペッスルを装着し、凍結したままの試料を破砕する操作を加えた。また、Protease K 処理は 56℃ にて 3 時間以上行った。PCR 反応は、EmeraldAmp PCR Master Mix (Takara Bio, Otsu, Japan) または TaKaRaEx Taq (Takara Bio) を使用し、プライマーセットは、ミトコンドリアのチトクロム C 酸化酵素サブユニット I (COI) 遺伝子の一部 (648 塩基) を増幅する LC01490 (5' - GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG - 3') と HC02198 (5' - TAAACTTCAGGTGACCAAAAAATCA - 3') (Folmer et al, 1994) とした。最終的には DNA 塩基配列解析が完了したのは 42 種 60 個体となった。標準的方法で DNA 塩基配列解析が出来なかった 27 種 73 個体についてはプライマーセットを改変するなどの検討を続けている。

(4) DNA 塩基配列情報の登録とデータベース構築

本研究で得られた 42 種 60 個体の DNA 塩基配列情報は、国立遺伝学研究所 (DDBJ) への登録を行った。また、国際的なバーコード・オブ・ライフ・イニシアチブ (BOLD) にも情報 (形態写真、採集データ (採集地、採集年月日、採集者名)、同定データ (分類群名、同定者名、同定年)、DDBJ 登録番号、東京文化財研究所での証拠標本番号) を登録し、世界中から検索が可能な基礎情報として登録を行い、公開活用が開始されている (図 3)。

(5) 文化財建造物の加害虫の DNA 塩基配列情報の登録

研究を進める過程で、日光の文化財建造物で被害を及ぼした 5 種類のシバンムシ科甲虫を入手する機会が得られた。上述の手法で DNA 塩基配列の決定と登録作業を行ったところ、3 種のシバンムシ科甲虫 (クロトサカシバンムシ、チビキノコシバンムシ、アカチャホソシバンムシ) がデータベースに登録されておらず、本研究で得られた情報を基に新規に登録を行った。今回登録した塩基配列情報を参照することで、歩脚や翅などといった体節の一部あるいは形態的特徴が乏しい卵や幼虫からでも本種の特定 (同定) を行うことが出来るようになると思われる (小峰ら, 2020)。

(6) 脱皮殻・排泄物からの DNA 解析手法の確立

排泄物 (フラス) は排泄した生物種の DNA を含んでいることからフラスからの排泄生物種の特定について検討を進めた。フラスからの DNA 抽出については、竹の害虫である 2 種の甲虫の混合飼育系から得られたフラスを用いて検討を行った。抽出した DNA を用いて先述したプライマーセット (LC01490 と HC02198) を用いて検討したが良好な結果を得ることが出来なかった。そこで 2 種類の甲虫についてそれぞれ種特異的なプライマーセットを構築した (篠崎ら、未発表)。それらを用いて人工飼育から得たフラスを使って評価したところ、高い精度で 2 種を特異的に検出することが出来た (篠崎ら、未発表)。種特異的プライマーのセットを他の文化財害虫でも設計することで他の未知のフラスから排泄した生物種の特定が可能になると期待される。

The screenshot shows the BOLD Systems Record Details page for COI: M520-20. The page is divided into several sections:

- IDENTIFIERS:** Sample ID: 20198-117, Museum ID: 0198-117, Field ID: 0198-117, Collection Code: Deposited In: Tokyo National Research Institute for Cultural Properties.
- TAXONOMY:** Phylum: Arthropoda, Subfamily: Anobiidae, Class: Insecta, Genus: Pheidolella, Order: Coleoptera, Species: Pheidolella japonica, Family: Pheidolellidae, Subspecies: BIN ID: BOLD:AC048173.
- SPECIMEN IMAGES:** A photograph of a small, dark, oval-shaped insect (likely a beetle) with a 2 mm scale bar.
- COLLECTION SITE:** N/A.
- SPECIMEN DETAILS:** Voucher Status, Reproduction, Tissue Descriptor, Sex, Brief Note, Life Stage, Detailed Notes.
- COLLECTION DETAILS:** Country: Japan, Date Collected: 2021.05.04, Province/State: Chiba, Collector(s): Akiko Saito, Region/Country, Sector, Exact Site, Latitude, Elevation, Longitude, Elev. Accuracy, Coord. Source, Depth, Coord. Accuracy, Depth Accuracy.
- SEQUENCE: COI-5P [Funding Source: N/A]**: Sequence ID: COI: M520-20.001.5P, GenBank Accession, Last Updated: 2021.05.10, GenBank: M520ch0101, Locus: Cytochrome oxidase subunit I, Region, Nucleotide: 658 bp.
- ATtribution:** Specimen Depository: Teigo National Research Institute for Cultural Properties, Provenance: Teigo National Research Institute for Cultural Properties, Collectors: Akiko Saito, Specimen Identification: Yuka Komine, Project Manager: Yoshitomi Saito, Sequencing Support.

図 3 国際データベースに登録した文化財害虫情報の一例

<引用文献>

三浦 定俊、文化財の生物被害の現状と対策[2] 文化財保存における IPM への取り組み、防菌防黴、40 巻、2012、343 - 350

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR, Biological identifications through DNA barcodes, Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 270, 2003, 313-321

Ide T, Kanzaki N, Ohmura W, Okabe K, Molecular identification of the western drywood termite (Isoptera: Kalotermitidae) by loop-mediated isothermal amplification of DNA from fecal pellets, Journal of Economic Entomology, 109, 2016, 2234-2237

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3, 1994, 294-299

小峰 幸夫、篠崎(矢花) 聡子、佐藤 嘉則、原田 正彦、斎藤 明子、木川 りか、藤井 義久、文化財建造物を加害したシバンムシ科甲虫の DNA バーコーディングに基づく同定法、保存科学、20 巻、2020、19 - 26

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 小峰幸夫、佐藤嘉則、原田正彦、北原博幸、木川りか、藤井義久	4. 巻 59
2. 論文標題 湿度制御温風処理における殺虫効果判定法の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 保存科学	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	小峰 幸夫 (Komine Yukio) (50791985)	独立行政法人国立文化財機構東京文化財研究所・保存科学 研究センター・アソシエイトフェロー (82620)	
研究分担者	斉藤 明子 (Saito Akiko) (90250141)	千葉県立中央博物館・その他部局等・研究員（移行） (82503)	
研究分担者	二神 葉子 (Futagami Yoko) (10321556)	独立行政法人国立文化財機構東京文化財研究所・文化財情報 資料部・室長 (82620)	
研究分担者	小山田 智寛 (Oyamada Tomohiro) (80827931)	独立行政法人国立文化財機構東京文化財研究所・文化財情報 資料部・研究員 (82620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------