

機関番号：14501
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2010
 課題番号：19380036
 研究課題名（和文） DNA バーコードと形態画像を統合した寄生蜂の網羅的情報集積・同定システムの構築
 研究課題名（英文） System construction for the identification of parasitoid Hymenoptera with the combination of DNA barcodes and morphological images
 研究代表者
 前藤 薫 (MAETO KAORU)
 神戸大学・大学院農学研究科・教授
 研究者番号：80346238

研究成果の概要（和文）：

本研究によって、ミトコンドリア *COI* 遺伝子にある標準 DNA バーコード領域が寄生蜂を含む膜翅目類の種識別指標として有効であることを確かめ、微小寄生蜂であっても形態形質を大きく損なうことなく非破壊的に DNA を抽出する技術を開発し、日本産の既知種情報を整備し、同定支援システムのインターフェイスを設計して、寄生蜂の DNA バーコーディングを推進するための技術的基盤を確立した。

研究成果の概要（英文）：

We have confirmed the validity of standard DNA barcoding region in the mitochondrial *COI* gene for species determination in parasitic wasps, developed protocols to extract DNA from a whole body of minute parasitic wasps without critical damages to external morphology as a voucher specimen, collected species records in Japan, designed the interface of supporting system for species identification, and thus established a technical base for DNA barcoding of parasitic wasps.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
総計	15,900,000	4,770,000	20,670,000

研究分野：昆虫学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：天敵昆虫、DNA バーコーディング、寄生蜂、生物多様性情報

1. 研究開始当初の背景

天敵生物の探索と生態系における動態の解明は、総合的害虫管理(IPM)を展開するための基盤である。ところが、天敵のなかでも、とりわけ寄生蜂類は、きわめて多数の未記載種と同定困難種を抱えており、専門的な分類学者であっても属レベルまでしか同定できないことが多い。また、形態だけにに基づく伝統的な分類同定システムでは未成熟個体や組織片による同定はほぼ不可能であった。種

レベルの変異をもつ遺伝子領域の部分配列を利用して標本の同定と登録、情報集積を行う DNA バーコーディングは、こうした現状を打開する切り札として期待されている (Hebert et al. 2003; Jinbo et al. 2011)。

2. 研究の目的

本課題では、寄生蜂の DNA バーコーディングと形態画像情報をリンクして、広く一般に利用できる分類・同定・情報集積システムの

構築を目指して、以下のとおり基礎的研究を行った。

- (1) DNA バーコードと形態画像データを統合管理するプレシステム的设计
- (2) 少量試料・乾燥標本からの DNA 抽出技術の確立とプロトコルの作成
- (3) ケーススタディー 1 野菜のハモグリバエ類の寄生蜂群
- (4) ケーススタディー 2 *Meteorus* 属コマユバチ (当初計画の *Cotesia* 属から変更)
- (5) 準網羅的なデータ集積実験による問題点の発見と解決
- (6) CBOL とリンクした網羅的情報集積・同定システムの構築

3. 研究の方法

(1) Hebert ら(2003)が標準バーコード領域として提唱したミトコンドリア *COI* 領域を、寄生蜂のバーコード領域として採用して良いかどうか判断するため、既存の関連研究を整理するとともに、同じハチ目の *Macrophya* 属ハバチのきわめて酷似した同胞種群を対象として種識別指標としての有効性を検証した。そのうえで、(3)以降で試行する DNA バーコードと形態画像を組み合わせたデータ集積システムを設計した。

(2) DNA バーコーディングでは DNA を抽出した標本を、再同定のために保管することが定められている。比較的大型の寄生蜂については、中脚をもぎ取って DNA を抽出し、虫体はそのまま保管することが出来る(後述のように脆弱さの問題は残る)。しかし、微小な寄生蜂ではそれは困難であり、虫体全体から形態形質を損なうことなく必要量の DNA を抽出する技術が必要である。

ツヤコバチ科の微小な寄生蜂 *Encarsia formosa* の成虫(体長約 0.6mm)から、Chelex 法、PrepMan Ultra Reagent 法、DNeasy Blood & Tissue Kit 法による DNA の非破壊抽出を行い、DNA バーコーディング標準領域の定法による PCR 結果を抽出手法間で比較するとともに、形態分類に用いられる形態形質の損傷程度を評価した。

また、伝統分類に用いられた古い乾燥標本から DNA を抽出する技術も検討しなければいけない。そこで、既存の DNA 抽出用キットを利用して DNA の抽出技術の検討を行った。利用した乾燥標本は 1985 年~2005 年の間で採集された寄生蜂とハモグリバエであった。なお、ハモグリバエは北海道立中央農業試験場の岩崎暁生氏から分譲していただいた。抽出はキアゲン社の DNeasy Blood & Tissue キットを用いて行った。基本的には DNeasy Blood & Tissue のプロトコル通りであるが、一部改良した。すなわち、proteinase K とともに 56°C で 48 時間ボイルした。また、proteinase K は 2 回 30 μl ずつ追加した

(3) 野菜を加害するマメハモグリバエ、トマトハモグリバエ、アシグロハモグリバエ、ナモグリバエ、ネギハモグリバエの寄生蜂について、証拠標本として保管する新鮮個体の中脚をもぎ取り、Chelex 法によって DNA を抽出し、DNA バーコード標準領域(ミトコンドリア *COI* 遺伝子の 648bp、プライマーセット LCO1490 / HCO2198)を解読し、類似種間で比較した。また、DNA バーコードとリンクした同定システムの構築のため成虫の形態画像を集積した。

(4) *Meteorus* 属コマユバチの近縁種群、とくに両性系統と単性系統が混じり系統関係が不明瞭な *M. pulchricornis* 複合種について、ミトコンドリア *COI* 領域の変異解析を行った。また、同複合種のより詳細な系統間遺伝解析を行うため、単性系統雌個体からビーズ法(Fischer & Bachmann 1998; Hale et al. 2001)によってマイクロサテライト座を探索し、多型検出のためのプライマーを設計した。

(5) 国内産寄生蜂類の網羅的な DNA バーコーディングを開始するに際して、国内で記録のある種の分布・寄主などの記録を整理し、とくに分類学的再検討が必要なグループについてはそれを行った。また、DNA バーコードの網羅的集積を試行するなかで、明らかになった問題点を整理した。

(6) 日本バーコードオブライフ・イニシアティブ(東大)が開発した日本語による DNA バーコード情報システム JBOLI-DS を利用して、寄生蜂 DNA バーコーディングのためのインターフェイスを作成した。

4. 研究成果

(1) 成虫形態による種識別が極めて困難であるため、近年日本列島で種分化した疑いのあった *Macrophya apicalis* と *M. infumata* についてミトコンドリア *COI* 領域を比較し

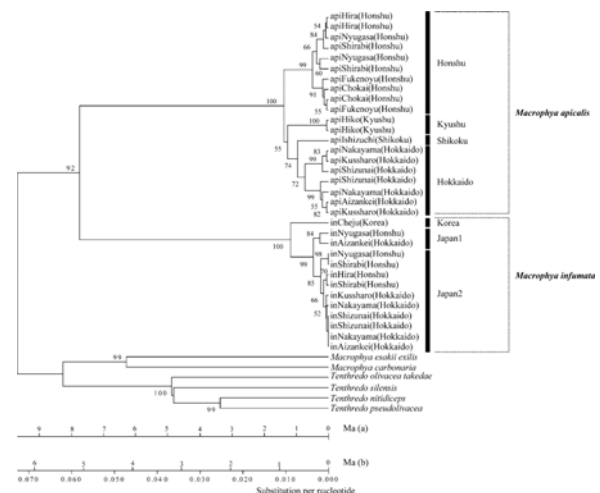


図1 *Macrophya* 属ハバチの同胞種 2 種の mt *COI* による NJ 樹。極めて酷似した種であるが明瞭に識別され、地域系統の分化過程も推測できた。

たところ、その分化程度は大きく、恐らくは大陸で種分化したものが、氷河期の陸橋形成時に日本列島に移住し、短期間で地域個体群に分化したものと推察できた(図1、Sakurai et al. 2009)。ミトコンドリア *COI* 領域は、ハチ目昆虫の種・系統レベルの識別指標として有効であることが裏付けられた。さらに、これまでにハチ目を対象として利用されてきた各種の分子的種識別指標について検討を行い、ミトコンドリア *COI* 領域の有効性と利便性を確認した。これと証拠標本の形態画像を組み合わせて登録すれば、相当な種識別情報を集積できるものと結論した。

(2) 微小寄生蜂の虫体を Chelex 樹脂と proteinase K に 24 時間浸漬する処理方法によって、ほぼ安定的に十分量の DNA を抽出することに成功した(図2)。また、シーケンスによってバーコード標準領域の増幅を確認した(図3)。同法による浸漬後の個体は、(重要な分類形質は少ない)腹部の潰れが顕著であったものの、(重要な分類形質が多い)頭部、触角、翅、脚に大きな損傷や変形はなく、証拠標本として問題のない状態であった(図4)。しかし、他の方法では DNA 抽出率が低く、抽出後の標本は触角や翅の損傷が著しく、DNA バーコーディングの証拠標本として良好な状態ではなかった(投稿準備中)。

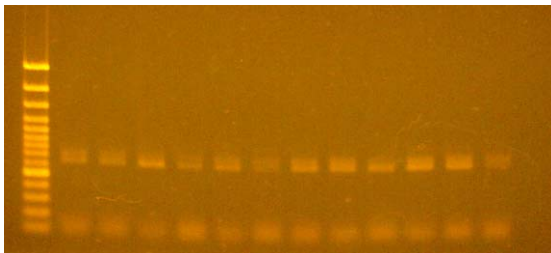


図2 Chelex 法によって *Encarsia formosa* 成虫から 24 時間浸漬抽出した DNA の泳動像(12 個体)。

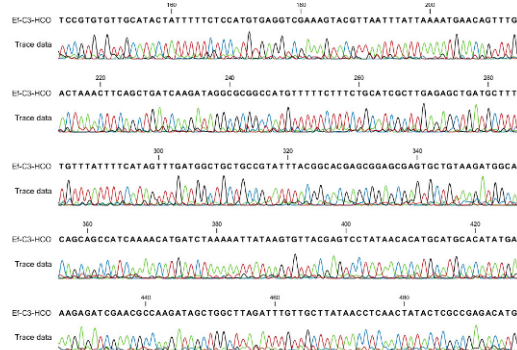


図3 Chelex 法によって *E. formosa* 成虫から抽出した mt*COI* のシーケンス例。



図4 Chelex 法による処理後の *E. formosa* 成虫の標本。腹部の潰れのほかに顕著な損傷はない。

また、DNeasy Blood & Tissue キットを利用して若干の改良を行ったプロトコルによって、保管期間 20 年間程度の乾燥標本からも少量ではあるがバーコード領域の DNA を抽出できた。

以上の研究成果を取りまとめて、小型昆虫およびダニ類の DNA 抽出法とシーケンス手順について簡便かつ実用的なプロトコルを作成し、普及雑誌に公開した(三浦 2010, 2011)。

(3) ハモグリバエ科野菜害虫の寄生蜂のうち日本産の主要 3 科 18 種について DNA 抽出のための試料を収集して標準バーコード領域を解読し、DNA 抽出個体(証拠標本)の形態画像データとあわせて集積を進めた。

その結果、これまで外部形態による同定が困難であった *Dacnusa sibirica* (導入天敵種)と *D. nipponica* (土着天敵種)(図5)、*Chrysocharis pentheus* と *C. pubicornis* などの近似種(図6)、あるいは *Neochrysocharis formosa* のように従来は単一種とされていた複合種(この場合は両性種と単性種)を、DNA バーコードによって簡便かつ確実に同定することが可能になった。

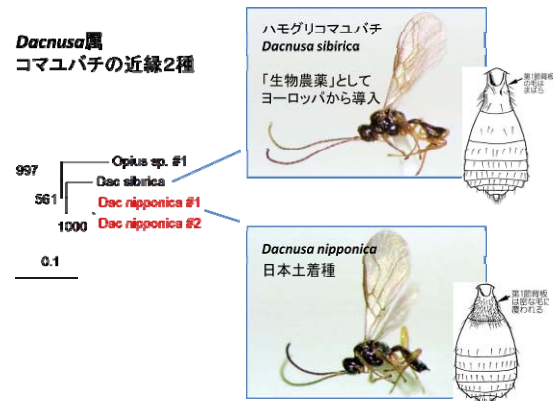


図5 ハモグリバエ科野菜害虫に寄生する *Dacnusa* 属コマユバの近縁 2 種の外部形態と

mtCOIにもとづく NJ 樹. 数値は 1000 回のブートストラップ値.

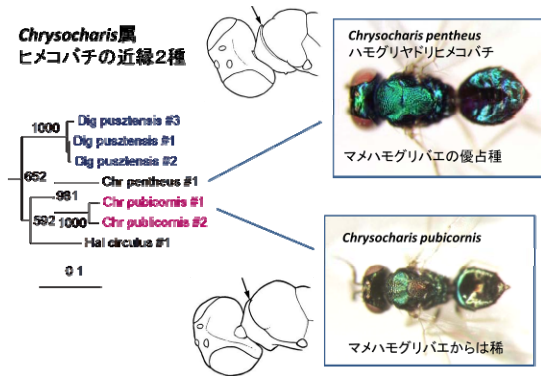


図 6 ハモグリバエ科野菜害虫に寄生する *Chrysocharis* 属ヒメコバチの近縁 2 種の外部形態と mtCOI にもとづく NJ 樹.

本研究成果は、さらに対象種と個体変異のデータを充実させ、形態形質を用いた検索サイトや文献データベース(小西 2010)とリンクした同定支援システムとして公開予定である。

(4) ミトコンドリア COI 領域の解析によって、これまで単一種として扱われてきた東アジア地域のコマユバチ *Meteorus pulchricornis* 複合種には、両性種(ミトコンドリア遺伝子は側系統)と独立した一回起源の単性種が含まれていることが判明した(図 7、投稿準備中)。両者の標準バーコード領域の差異は僅かであるが、安定しているため、制限酵素による分子検索を模索中である。

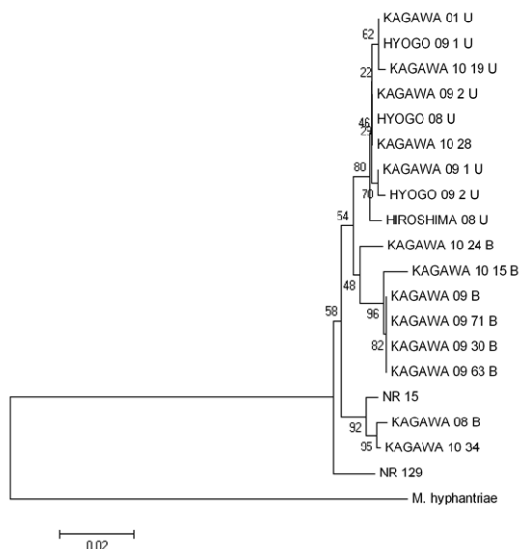


図 7 *Meteorus pulchricornis* 複合種の両性系統(B)と単性系統(U)の mtCOI にもとづく NJ 樹. 末尾 28 と 34 の生殖モードは不明. NR は、両性

系統と考えられるヨーロッパ産個体. *M. hyphantriae* は近縁な外群種.

さらに両者の系統間の遺伝的変異をさらに詳細に解析、検証するため、ビーズ法によって *M. pulchricornis* 複合種の単性系統から 26 遺伝子座のマイクロサテライトを探索し、プライマーを設計した(プライマー間配列長 126~312bp、2 塩基配列の繰返し数 9~45 回)。そのうち 14 組のプライマーについて PCR 増幅条件が整い、両性系統を含めた複合種内の系統について遺伝解析を行うことが可能になった。マイクロサテライト・マーカーについては、anchored PCR を用いた簡便な探索手法(Fisher et al. 1996)も開発されており、今後、複雑な生殖様式あるいは遺伝的構造をもつ複合種・系統の識別に利用できるものと考えられる。

(5) 国内で記録のあるヒメバチ科とコマユバチ科について、日本産種の全種目録を作成した(日本昆虫学会編の日本産昆虫目録として公開の予定)。また、食材性甲虫類の寄生蜂として重要なグループであるにも関わらず分類学的検討が遅れていた Doryctinae 亜科コマユバチについて、日本列島から 31 属 182 種を認めてレビジョンを完成させた(Belokobylskij & Maeto 2009)。

DNA バーコーディング用のサンプルとして、200 種以上のヒメバチ上科コレクションを作成した。しかし、多くの既知種について新鮮標本を採集することは予想以上に困難であった。博物館所蔵の古い乾燥標本を利用できれば集積は飛躍的に進む。また、一旦高濃度エタノールに保存された標本は脆くなっており、証拠標本として管理する際に細心の注意を要することも大きな問題として浮上した。新鮮標本あるいは数年以内の乾燥標本を用いればその点は解消できるが、前者は野外標本では難しく、後者ではとくに微小寄生蜂の場合は DNA 抽出効率が低下する。脆くなった標本を破損させることなく保存するための新技術が必要と考えられる。さらに、野外標本の収集、DNA 分析、画像撮影、データベース登録などは、いずれも専門的かつ時間的負担の大きな作業であり、データベースの本格的な充実には、人的資源の集中的な投入が不可欠である。

(6) DNA バーコーディングのための日本語による汎用システムとして開発された JBOLI-DS (Jinbo et al. 2011)を利用して、寄生蜂の同定支援・情報集積インターフェイスを試作した(図 8、9)。今後、これにハモグリバエ科害虫の寄生蜂データベース、里山天敵寄生蜂データベースなどを加えて内容を充実させる。

- ② 三浦一芸、分子を利用すれば害虫と天敵の同定は簡単、日本昆虫学会第70回大会、2010年9月18日、山形大学(鶴岡市)
- ③ 小西和彦、前藤 薫、DNAバーコーディングによるハモグリバエ科害虫の寄生蜂同定支援システムの構築、日本昆虫学会第70回大会、2010年9月20日、山形大学(鶴岡市)
- ④ 小西和彦、北海道におけるアシグロハモグリバエの寄生蜂相、日本昆虫学会第70回大会、2010年9月20日、山形大学(鶴岡市)
- ⑤ 阿部陽介、前藤 薫、Phenotypic plasticity and genetic variation of body color in uniparental strains of a parasitic wasp *Meteorus pulchricornis* (Hymenoptera, Braconidae)、Japan-Netherlands Seminar on Parasitoid Biology、2010年8月23-25日ポスター、東京大学(東京都)
- ⑥ 小西和彦、Konishi K (2010) Taxonomy of the genus *Eurypterna* with biological notes on *E. cremieri* (Ichneumonidae, Hybrizontinae). Seventh International Congress of Hymenopterists, 2010年6月20-26日ポスター、Koszeg, Hungary
- ⑦ 三浦一芸、日本産昆虫類のDNAバーコーディング：寄生蜂への応用を中心に、第57回日本生態学会、2010年3月18日、東京大学(東京都)
- ⑧ 前藤 薫、天敵昆虫分類学の役割と今後の展望、第53回日本応用動物昆虫学会大会シンポジウム、2009年3月30日、北海道大学(札幌市)
- ⑨ 古江 翔、前藤 薫、ギンケハラボソコマユバチの産雌性単為生殖のメカニズムと遺伝様式、第53回日本応用動物昆虫学会大会、2009年3月30日、北海道大学(札幌市)
- ⑩ 三浦一芸、前藤 薫、DNAバーコードの生態学・害虫管理への応用、日本昆虫学会第68回大会、2008年9月15日、香川大学(高松市)
- ⑪ 三浦一芸、前藤 薫、害虫防除におけるDNAバーコーディングの利用、第55回日本生態学会大会企画集会T04、2008年3月14日、福岡国際会議場(福岡市)

[図書] (計2件)

- ① 小西和彦 (分担執筆)、北隆館、ハモグリバエ科野菜・花卉害虫の寄生蜂群集、広渡編「絵かき虫の生物学」、2010、144-154頁
- ② Belokobylskij SA, Maeto K, Warshawska Drukarnia Naukowa, Doryctinae (Hymenoptera, Braconidae) of Japan, 2009, pp. 806

[その他]

- ① 朝日新聞 2010年4月27日朝刊「種名別別 DNAで簡単に」(三浦一芸へのインタビューを含む)
- ② 朝日新聞 2009年3月23日朝刊「DNAバーコード、進む登録 食偽装や害虫調査に活用」(前藤 薫へのインタビューを含む)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前藤 薫 (MAETO KAORU)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：80346238

(2) 研究分担者

三浦 一芸 (MIURA KAZUKI)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・近畿中国四国農業研究センター・総合的害虫管理研究チーム・特命チーム員
研究者番号：10355133

小西 和彦 (KONISHI KAZUHIKO)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・主任研究員
研究者番号：90414747

濱口 京子 (HAMAGUCHI KEIKO)
独立行政法人森林総合研究所・関西支所・主任研究員
研究者番号：60343795

(3) 連携研究者

なし

(4) 協力研究者

Sergey A. Belokobylskij
ロシア科学アカデミー動物学研究所・上席研究員

櫻井厚志
神戸大学・大学院農学研究科・研究員

東浦祥光
山口県農林総合技術センター・研究員