

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06334

研究課題名（和文）ミトコンドリアDNAのホットスポットに着目した貯穀害虫の地理的多型性解明

研究課題名（英文）Clarification of geographical polymorphism in storage pests by focusing on mitochondrial DNA hotspots.

研究代表者

古井 聡 (Furui, Satoshi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員

研究者番号：70391191

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：日本国内におけるノシメダラメイガのDNA多型を明らかにするため、34地点で得られた成虫を採集した。これらのシトクロムcオキシダーゼサブユニットI遺伝子及び16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列情報を比較したところ、それぞれの標的に特徴的な変異が見出された。

ミトコンドリアDNA(mtDNA)の効率的な単離法を開発するために、総DNAをアガロースゲルによる電気泳動で分離した。分子量マーカーを指標として、mtDNAを含むゲルを切り出し、市販のキットで回収・精製した。本法は、分子生物学実験の基本実験に沿ったルーチン操作で実施可能で、得られたmtDNAは収量が良好、かつ高純度に調製可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代表的な食品害虫として知られるノシメダラメイガは飛翔性が低く、移動が抑制された状態で住み続けることで、ミトコンドリアDNA(mtDNA)に地域に特有な遺伝的な変異が生じている。この独自性を活用すれば、ごく微量の昆虫片から生息地域判定が可能となる。

本研究では、国内34箇所におけるノシメダラメイガを採集後、DNA配列を比較し、生息地域によるDNAの地域差を明らかにした。また、mtDNAのシンプルかつ効率的な調製法を開発した。本研究成果は、他の昆虫やmtDNA全域の配列データの蓄積と比較を進めることで、食品に混入した昆虫から混入地点を特定する、迅速で精度の高い分析手法の開発に応用できる。

研究成果の概要（英文）：Total DNA was prepared from adult Indian meal moths collected from 34 sites to determine the DNA polymorphism of these moths in Japan. Sequence information of the cytochrome c oxidase subunit I gene and the 16S ribosomal RNA gene were compared, and characteristic mutations were found in each target.

To develop an efficient isolation method for mitochondrial DNA, total DNA was separated by agarose gel electrophoresis. Using molecular weight markers as indicators, parts of the gel containing mitochondrial DNA (mtDNA) were collected and purified using a commercially available kit. This method can be performed routinely according to basic molecular biology experiments, and the mtDNA obtained could be prepared with good yield and high purity.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリアDNA 地理的多型性解明 食品害虫 ノシメダラメイガ 異物混入

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 生物の種間において DNA に変異があることはミトコンドリア DNA のシトクロム c オキシダーゼ I 遺伝子 (cytochrome c oxidase I : COI)等の塩基配列を基に作成した進化系統樹の研究から明らかである。一般に、生育環境の違いは代謝物質およびタンパク質に反映されるが、昆虫においては、オサムシの例で地域差により同一種内にも若干の DNA 変異が認められるとの報告がある。しかし、これに注目して生息地域の想定を試みた例はない。また、同一種の昆虫について、グローバルな“生息地域の違い”を見いだすことに着目して開発された DNA 分析手法については、由来が確実な DNA を得ての研究が必須となることもあり、スケールが大きくほとんど研究はなされていない。

(2) ノシメマダラメイガ (*Plodia interpunctella* (Hubner)) はアジアを中心にカナダ、アメリカ合衆国、オーストラリアなど環太平洋地域で最も広く分布している食品害虫であり、同一種間におけるミトコンドリア DNA の国際間比較を行う目的に最も適している。本研究で食品害虫の生息地域特定が可能であることを示すことにより、成果を食品に混入する可能性のある他の昆虫種への分析法開発に応用し、水平展開できる。その結果、食品の輸出入に際して、混入地の特定が可能になり、国際間の食品流通における品質保証に貢献しうる。

## 2. 研究の目的

食品に昆虫が混入する事故が発生した場合には、食品関連の事業者は、まず異物が何であるかを特定し、混入ルートおよび原因を解明後、再発防止を目的とした混入防止体制の確立に努める。この際に、食品害虫の混入場所の特定は対策を立てる上で重要な要素であるが、混入事例が最も多い貯穀害虫は、同一の種が世界中に存在する、いわゆるコスモポリタンな昆虫であり、目視による形態的な判定では地域差による特徴が認められにくく、混入場所の特定は困難を極める。

しかし、貯穀害虫はアフリカ大陸を飛蝗するバッタ類、南北アメリカ大陸間を縦断するオオカバマダラのような蝶や、海を超えて我が国に飛来して病虫害をもたらすウンカ類等の国際的に大移動する昆虫種とは異なり、生息地を自ら大幅に移動せず、それぞれの生息地域に住み着いている。これは即ち、飛翔性が低い昆虫は移動が抑制された状態で住み続けながら何らかの遺伝的な変異が生じているはずであり、この独自性を有効活用して生息地域を明確にできれば、新たな食品害虫の混入地域の特定手法を開発しうる。

## 3. 研究の方法

(1) ノシメマダラメイガは、研究計画時には数カ国 (日本及びタイ、中国、オーストラリア、アメリカ等の計 5 カ国を予定) から死亡個体、またはトータル DNA を入手し、次世代シーケンサーで全ミトコンドリア DNA の配列を解読すると共に、アライメント解析を行って生息地域特徴的な塩基の変異箇所を見いだすことを目的としていた。しかし、研究の全期間に渡って世界的に大流行したコロナウイルスが沈静することがなく、海外からノシメマダラメイガを入手することは最終年度においても叶わなかった。そこで、日本国内の 34 地点で採集したノシメマダラメイガを用いて、メスの性フェロモンによるトラップで採集した。その後、シトクロム c オキシダーゼサブユニット I (COI) 遺伝子および 16S リボソーム RNA (16S) 遺伝子の配列をそれぞれ解読し、塩基配列情報を比較してアライメント解析を行った。

(2) 研究期間内にコロナウイルスが終焉した際に備えて、ノシメマダラメイガから次世代シーケンサーに供するための大量、かつ高純度なミトコンドリア DNA の調製方法を検討した。具体的には、まず、市販のミトコンドリア DNA 抽出キットを応用して、より効率的な抽出法として抽出手法の最適化を試みた。しかし、本法では十分な結果が得られなかったため、先に市販のキットでミトコンドリア DNA を Total DNA として大量調製した後に、アガロースゲル電気泳動を活用することで、更に安定的、かつ効率的なミトコンドリア DNA の入手法を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 研究材料であるノシメマダラメイガを 5 カ国で採集することは、コロナウイルスの全世界的な蔓延により断念せざるを得なかった。そこで、国内におけるノシメマダラメイガの DNA 多型を明らかにするため、日本各地での採集を試みた。具体的には、北海・東北



図1 フェロモントラップによるノシメマダラメイガの採集地点

地方で1地点（北海道1）、関東地方で8地点（茨城県1、千葉県1、群馬県1、栃木県1、埼玉県1、神奈川県3）、北信越地方で5地点（長野県1、新潟県1、山梨県3）、中部地方で6地点（静岡県1、愛知県2、三重県2、福井県1）、関西地方で6地点（京都府1、奈良県1、大阪府1、兵庫県1、和歌山県1）、中国・四国地方で4地点（香川県1、高知県1、愛媛県1、徳島県1）、九州・沖縄地方で4地点（福岡県1、佐賀県1、長崎県1、熊本県1）の計34地点とした（図1）。採集には、ノシメマダラメイガを確実に、かつ効率的に入手するため、メスの性フェロモンによるトラップを用いた。これら34地点で得られたノシメマダラメイガ成虫からTotal DNAを回収したが、次世代シーケンサーに供する量には及ばなかった。そこで、DNAによる種判別で世界的に用いられているチトクロムcオキシダーゼサブユニットI(COI)遺伝子および16SリボソームRNA(16S)遺伝子をPCRで増幅後、それぞれの配列を解読し、塩基配列情報を比較した。解析の結果、COIおよび16S遺伝子においてそれぞれ特徴的な変異が見出されているが、取り纏めに際しては採集地点毎の標本数を増やす等、データの信頼性向上を目的とした追加検証を行う必要があると考えている。

(2)ノシメマダラメイガ組織からの効率的なミトコンドリア(mt)DNAの単離方法開発を目的として検討した。均一な性状を特徴とする動物培養細胞においては、細胞から細胞小器官であるミトコンドリアを分離・回収した後にmtDNAを抽出する2ステップ法が一般的であり、既にキットが市販されている。しかし、多様に分化した細胞の集塊物である組織は、ゲノムDNAの混入を防ぎつつ純度の高いmtDNAを安定的に単離することは極めて困難である。そこで、抽出対象には、成虫よりも組織の均質性が高くmtDNAの単離が容易かつ安定的に実施できるとの考えから、まずは検体として幼虫(全体)を選んだ。また、供試昆虫は、幼虫の形状であれば種が異なっても同様の試験傾向が得られるという判断と、ODで評価しづらいmtDNAの量的な評価を行うため、リアルタイムPCRによる検出手法が既に開発済みであったことから、ヒメアカカツオブシムシの幼虫を用いた。2ステップ法による市販のmtDNA抽出キットを用いてコントロール実験を行ったところ、mtDNAはほとんど得られなかった。原因としては、摩砕操作の不安定性による組織細胞からのミトコンドリアの分離不良、およびミトコンドリア外膜の損傷によるmtDNAの流失等が考えられた。そこで、プラスミドDNA単離用の市販キットを用いる手法が動物培養細胞からのmtDNAの単離に使用可能で、かつ1ステップで簡便であるとの報告を参考に、動物組織への適用を試みた。幼虫の摩砕条件を緩やかに行ったところ、単離されたDNAの濃度は、念入りに行った試料よりも少なかった。反面、OD260nmから調製した一定量のDNAに含まれるmtDNAのコピー数をリアルタイムPCRによって定量的に比較したところ、緩やかに摩砕を行った試料は、念入りに行った試料よりも約4倍のmtDNAを含むことが確認されたが、明らかにゲノムDNAのコンタミネーションが多く、抽出条件の工夫・検討ではこれ以上の改良は困難であると判断した。

次いで、Total DNA抽出時に純度にバラツキが生じても精製可能な手段を考えた。検討にあたり、DNA抽出時に回収されるTotal DNAは核由来のゲノムDNAと、細胞小器官由来のDNAに大別されることに着目し、ノシメマダラメイガ成虫からTotal DNAを抽出後、さらに電気泳動による分離とmtDNAを含むゲル部分の回収を試みた。mtDNA量の評価は、リアルタイムPCRによるノシメマダラメイガmtDNA検出法を開発して用いた。電気泳動装置は、泳動距離5cmのアガロースゲルを選択した。具体的には、ノシメマダラメイガ成虫から摩砕を緩やかにを行い、市販のキットでTotal DNAを抽出し、0.5%のアガロースゲル電気泳動に供した。ゲノムDNA用のマーカーと共に泳動したところ、ノシメマダラメイガのゲノムDNAは約21.1 kbpでバンドを形成し、バンドからゲルの下方にかけて薄いスミアなバンドが得られた。そこで、20-30kbp、10-20 kbp、7-10 kbpの位置でアガロースゲルをそれぞれ切り出し、市販のアガロースゲルからのDNA抽出キットを用いて精製後、各画分から同量の溶出液をノシメマダラメイガのCOIを標的とするリアルタイムPCRに供した。その結果、電気泳動の際にバンドが見えない画分である10-20 kbpにおいて多量のゲノムDNAを含む20-30kbpの画分よりも極めて良好なCt値が得られたことから、DNA量あたりのmtDNAが多く、高純度であることが示された(図2)。本法は、分子生物学実験の基本実験に沿ったルーチン操作で実施でき、得られたmtDNAは収量も良く、高純度であることから大量調製は容易と考えられた。

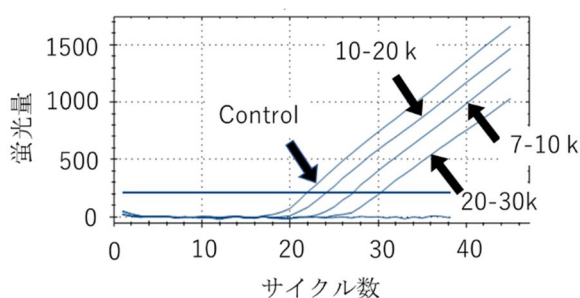


図2 リアルタイムPCRによるノシメマダラメイガ mt DNA 量の評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------