

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292033

研究課題名(和文) 大容量塩基配列に基づくハダニ類の系統解析と近縁種の簡易識別法の開発

研究課題名(英文) Phylogenetic analysis and rapid identification of spider mites based on RNA-sequencing data

研究代表者

後藤 哲雄 (Gotoh, Tetsuo)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：60178449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：ハダニ類の分子系統解析は、ミトコンドリアDNAや核rRNAで行われてきたが、ブートストラップ値が低く、属間関係は不明瞭であった。本研究では、ハダニ類15属87種88系統について次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行い、88系統に共通するオーソログ遺伝子652個を得た。これらによる分子系統解析は、従来の系統樹と矛盾せず、かつほぼすべての分岐(67/70 nodes)が高いブートストラップ値で支持された。また15属中4属が単系統にならなかったため、ハダニ類の系統上の近縁性を反映した分類体系を構築するには、分類形質の再検討が必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Molecular information of spider mites is increasingly used to answer taxonomic and systematic questions. The COI gene and ITS2 region of nuclear ribosomal RNA have been used for phylogenetic reconstruction within the Tetranychidae, but these sequences have not consistently resolved genus-level phylogenetic relationships, because of low bootstrap values. So, we performed phylogenomics analysis for spider mites, derived from comparative RNA-Seq data for 88 strains of 87 species belonging to 15 genera. A phylogenetic tree using 652 orthologous protein-coding genes shared among taxa, was well-resolved and strongly supported for almost all nodes (67/70), allowing us to consider the phylogenetic relationships among genera of Tetranychidae. The topology presented here does not fully agree with the current taxonomic treatment, because the four genera were polyphyletic. These results indicate that the diagnostic morphological characters of the genera of Tetranychidae must be reconsidered.

研究分野：応用動物学

キーワード：ダニ・線虫管理 系統関係

## 1. 研究開始当初の背景

ハダニ類は体サイズが極小で(成虫でも 0.5mm)、形態的に酷似する種が多く存在する。それらを識別する唯一の形態差が雄成虫の挿入器サイズ(0.3~0.5 $\mu$ mの差を識別)であったり、種を識別する形態差である脚の毛の数に種内変異があったりして、他種との識別が非常に困難な場合が多い。そこで、形態的特徴に代わる種の識別法が 1990 年代初頭から模索されてきた。種間を識別するために、例えばフォスフォグルコムターゼアインソザイム (Gotoh et al., 2007)、核 rRNA 遺伝子の ITS 領域の制限酵素断片長多型(RFLP)を利用した研究 (Osakabe et al., 2008)、そして ITS 領域(約 450 bp)とミトコンドリア DNA の COI 領域(約 400 bp)による研究 (Navajas et al., 1998; Hinomoto & Takafuji, 2001)が行われたが、農業上重要な *Tetranychus* 属の種の識別はできなかった。申請者らは、COI 領域(約 900 bp)と ITS 領域(約 350 bp)、18S 領域(約 780 bp)を用いて、日本産 *Oligonychus* 属ハダニ全 18 種中 17 種を識別した (Matsuda et al., 2012)。また、COI 領域によって日本産 *Tetranychus* 属全種 13 種の識別に成功した (Matsuda et al., 2013)。しかし、これに海外産の *Tetranychus turkestanii* を加えると国産と海外産が混ざって識別できなくなった。これは、従来の COI 領域や ITS 領域といった一つの遺伝子領域だけを用いた種の識別法では、より広い地域のハダニやハダニ科全体の系統解析を行うことが不可能であることを示唆している。つまり、種間で塩基置換の蓄積が大きい新たな遺伝子を使った手法、あるいは全く新規の分類・識別指標を構築する必要がある。

実際に、一つの遺伝子領域を用いたハダニ科全体の系統解析はさらに困難であった。世界で約 1,200 種 (Bolland et al., 1998) が知られているうち、16 種~25 種(8~10 属)を選んで検討した先行研究がある。COI 領域と ITS 領域を用いて行われたこれらの研究では、系統樹の枝のブーツストラップ値が低く各属の単系統性が不明であったり (Navajas et al., 1996; Ros & Breeuwer, 2007)、各属の単系統性が支持されたものの、属間の系統関係は明らかにできなかった (Ben-David et al., 2007)。申請者らも、核 rRNA 遺伝子の 18S+28S 領域を用いて、

国内外の 15 属 87 種 88 系統を供試して系統解析を行ったが、分岐の信頼度が低いため、一部の属 (特に *Stigmaeopsis* 属と *Eotetranychus* 属) の系統的位置を明らかにすることはできなかった (Matsuda et al., 2014)。このように、ハダニ類の系統関係を少数の遺伝子領域による系統解析手法で解明することは困難である。

ところが近年、次世代シーケンサーによる大容量塩基配列を用いた分子系統解析によって、マラリアを媒介するカ科 *Anopheles* 属の 9 種間 (Hittinger et al., 2010) とザトウムシ目の 4 亜目間 (Hedin et al., 2012) の系統解析が行われ、数百~数千の遺伝子配列を用いる手法が、属間および種間の系統関係を解明するのに有効であることが報告された。

## 2. 研究の目的

本研究は、形態による同定が極めて困難であるハダニ類における発現遺伝子のトランスクリプトーム解析 (RNA-Seq) の結果に基づいて、属間および種間の系統関係を解明すると共に、種の簡易識別に利用可能な新規分子マーカーを探索するものである。この目的のために、(1) ハダニ科 15 属 79 種 86 系統について RNA-Seq を行う。そして、(2) ゲノム中に 1 コピーの遺伝子で互いにオーソローガスな関係の遺伝子を抽出し、ハダニ科の属間と種間の系統解析を行う。(3) 抽出した遺伝子の中から、種の簡易識別に有効な遺伝子を探索する。

## 3. 研究の方法

### (1) 次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析 (RNA-Seq)

ハダニ類の属間および種間の系統解析に有効な遺伝子情報を収集するために、次世代シーケンサー (HiSeq 2000, illumina 社) による RNA-Seq を行う。ハダニ 1 種につき、雌成虫約 100~300 個体から、RNeasy Micro Kit (Qiagen) を用いて、Total RNA を抽出する。illumina 社のプロトコルに従って、Total RNA から cDNA を合成し、アダプターを結合させてシーケンスする。

#### ① *de novo* アセンブル (短い DNA 断片配列からコンティグを作る)

次世代シーケンサーによる RNA-Seq で得られた 100bp 程度の断片配列は、互いをつなぎ合わせることによって有用な解析データとなる。本研究では *de novo*

アセンブルを行い、100 bp の配列を互いの配列情報に基づいてつなぎ合わせ、長い配列（コンティグ）を得る。

② コンティグの相同性解析 (BLAST 検索)

得られたコンティグを系統解析に用いるために、各コンティグの遺伝子領域を特定する必要がある。そこで、2011 年に公開されたナミハダニのタンパク質コード遺伝子のデータベースに対する相同性解析 (BLAST 検索) (Grbic et al., 2011) を行い、各コンティグの遺伝子領域を特定する。

③ コンティグのアライメントと分子系統樹の推定

遺伝子領域が特定されたコンティグをアライメントし、分子系統樹を推定する。分子系統樹は、最尤法 (ML 法) で推定する。得られた分子系統樹とアライメントを精査した結果から、明らかなパラログ配列を含む遺伝子が含まれていないことを確認する。

オーソログと判断した遺伝子 (数百～数千になると予想される) を用いて、ML 法で分子系統樹を推定する。塩基配列による系統樹とアミノ酸配列による系統樹を推定し、2 つの系統樹に大きな矛盾点のないことを確認する。

(2) 分子系統解析と形態的特徴に基づく分類体系の比較

本研究で得られた分子系統樹と形態に基づく系統樹を比較・検討し、形態に基づく系統樹で意見が分かれている *Schizotetranychus* 属と *Eotetranychus* 属および *Oligonychus* 属と *Tetranychus* 属の分岐関係に注目して、分岐の妥当性を両方の系統樹間で比較・考察する。

(3) 種の識別に有効な遺伝子の探索

これまでハダニの種の識別に用いられてきた領域 (ミトコンドリア DNA の COI 領域および核 rRNA の ITS 領域) で識別できなかったナミハダニ *Tetranychus urticae* と海外産の *Tetranychus turkestanii* を識別することを目的として、これら 2 種がそれぞれ種特異的な変異をもつ遺伝子領域を探索する。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析 (RNA-Seq)

ハダニ類 79 種 86 系統について、次世代シーケンサーによる大容量塩基配列解析 (RNA-Seq) を行った。種ごとに *de novo* アセンブリを行い、100 bp のショ

ートリードを繋ぎ合わせた長い配列 (コンティグ) を作成した。ハダニ 1 種につき 1 万～3 万本のコンティグが得られた。*de novo* アセンブリで作成したコンティグを用いて相同性解析 (BLAST 検索) を行い、86 系統に共通する遺伝子を抽出した。さらに、共通遺伝子それぞれについてマルチプルアライメントを作成し、分子系統樹を推定した。得られた分子系統樹とアライメントを精査した結果から、明らかなパラログ配列を含む遺伝子が含まれていないことを確認し、系統解析に用いることのできるオーソログ遺伝子 652 個を決定した。

(2) 分子系統解析と形態的特徴に基づく分類体系の比較

86 系統のハダニに共通するオーソログ遺伝子 652 個 (塩基配列: 790, 047 bp, アミノ酸配列: 264, 133 aa) を用いて、分子系統解析を行なった。その結果、従来の遺伝子領域 (ミトコンドリア DNA および核 rRNA 遺伝子) に基づく系統樹と矛盾せず、かつほぼすべての分岐 (67/70 nodes) が高いブートストラップ値で支持される系統樹が得られた。核 rRNA 遺伝子による系統樹で系統的位置を明らかにできなかった *Stigmaeopsis* 属と *Eotetranychus* 属を含むクレードについても、高いブートストラップ値で支持された。この系統樹では、供試した 15 属中 4 属 (*Schizotetranychus* 属、*Eotetranychus* 属、*Oligonychus* 属および *Tetranychus* 属) が単系統にならなかった (図 1)。したがって、ナミハダニ亜科の系統上の近縁性を反映した分類体系を構築するためには、分類形質の再検討が必要であることが示唆された。

(3) 種の識別に有効な遺伝子の探索

トランスクリプトーム解析で得られたオーソログ遺伝子 652 個のうち、系統樹上で近縁種が明確に分岐していて、かつ種間の塩基置換数が多い遺伝子を、種の識別に利用する候補遺伝子とした。さらに、これまでハダニの種の識別に用いられてきた領域 (ミトコンドリア DNA の COI 領域および核 rRNA の ITS 領域) で識別できなかったナミハダニと海外産の *Tetranychus turkestanii* を識別することを目的として、これら 2 種がそれぞれ種特異的な変異をもつ遺伝子領域を探索した。遺伝子領域 20 個について探索した結果、これまでハダニ類の種識別に用

いられたことがない、2つの遺伝子が有効に利用できることを明らかにした。

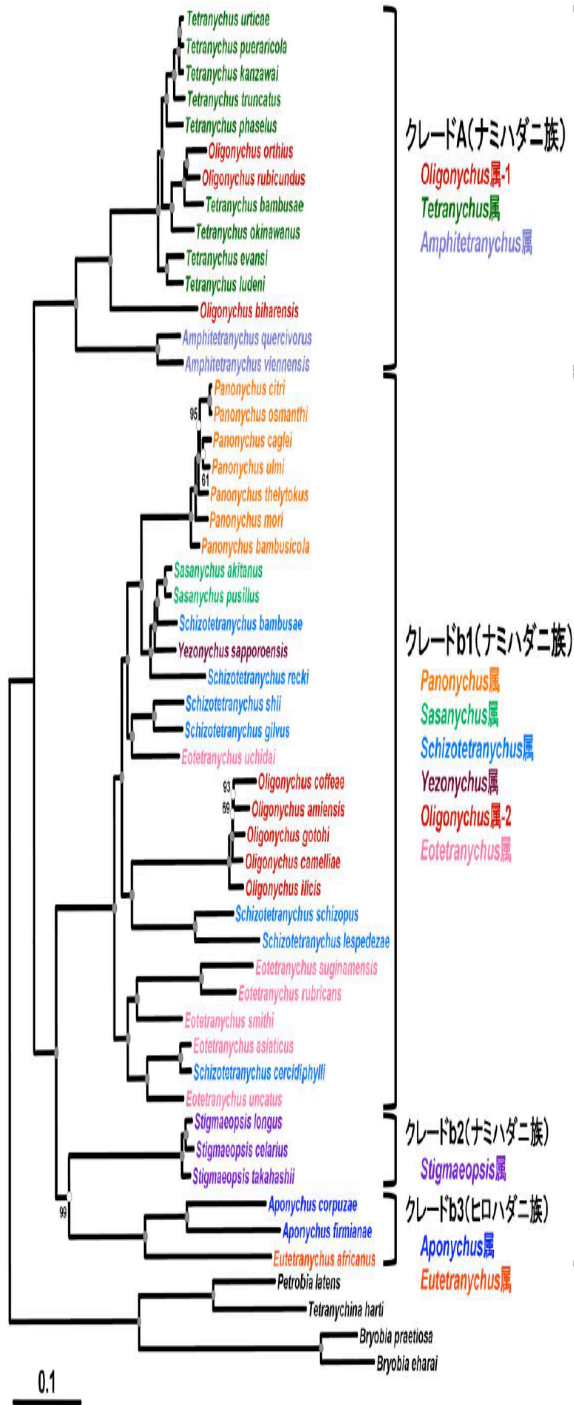


図 1. トランスクリプトーム解析で得られたタンパク質コード遺伝子 (183 個) の塩基配列に基づく系統樹. 本研究で供試した 15 属 79 種 86 系統のうち、15 属 52 種 52 系統を用いて推定した. ブートストラップ値が 100 の場合は灰色の丸, それ以外の場合は値と白い丸を分岐に示した. 異なる属の種が入れ子状態になっていることがわかる.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Sakamoto, H., T. Matsuda, R. Suzuki, Y. Saito, J.-Z. Lin, Y.-X. Zhang, Y. Sato and T. Gotoh, Molecular identification of seven species of the genus *Stigmaeopsis* (Acari: Tetranychidae) and preliminary attempts to establish their phylogenetic relationship, Syst. Appl. Acarol. 22, 91-101, 2017, 査読有
- ② Suzuki, M. M., T. Mori and N. Sato, The *Ciona intestinalis* cleavage clock is independent of DNA methylation, Genomics, 108, 168-176, 2016, 査読有
- ③ Matsuda, T., M. Morishita, N. Hinomoto and T. Gotoh, Phylogenetic analysis of the sub-family Tetranychinae (Acari: Tetranychidae) with a focus on the tribe Tetranychini indicates that several genera are polyphyletic based on the mitochondrial COI gene and the 18S and 5' end of 28S rRNA genes, PLoS ONE, 9(10):e108672, 1-12, 2014, 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- ① 坂本洋典・後藤哲雄、『direct PCR 技術の利用によるハダニ類の簡易同定の迅速化』、第 61 回日本応用動物昆虫学会大会、2017. 3. 28-29、東京農工大学(東京都・小金井市)
- ② 坂本洋典・後藤哲雄『ハダニ類の簡易同定をたやすくする直接的 PCR 手法の開発』、第 25 回日本ダニ学会大会、2016. 10. 16、北海道立道民活動センターかでの 2・7、(北海道・札幌市)
- ③ 後藤哲雄・坂本洋典、『ナミハダニのゲノム情報を生かした簡易同定用プライマーの再検討』、第 25 回日本ダニ学会大会、2016. 10. 16、北海道立道民活動センターかでの 2・7(北海道・札幌市)
- ④ Suzuki, M. M., 『The biological function of invertebrate DNA methylation in pre-mRNA processing』、2015. 12. 1、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市; 招待講演)
- ⑤ Gotoh, T. and T. Matsuda, 『Phylogenetic analysis of the spider mite sub-family Tetranychinae (Acari: Tetranychidae)』、The 3rd Asia-Pacific Conference on Life Science and Engineering、2015. 11. 19、Dusit D2 Chiang Mai Hotel (Chiang Mai, Thailand)
- ⑥ 松田朋子、『DNA 塩基配列に基づくハダニ類の種の識別と系統関係の推定』、第 59 回日本応用動物昆虫学会大会、2015. 3. 27、山形大学(山形県・山形市)

- ⑦ 鈴木玲子・松田朋子・北嶋康樹・後藤哲雄、『クリノツメハダニの *Wolbachia* および *Cardinium* 感染がミトコンドリア DNA の多様性に及ぼす影響』、第 59 回日本応用動物昆虫学会大会、2015. 3. 27-28、山形大学(山形県・山形市)
- ⑧ 鈴木ちとせ・松田朋子・森下真依子・後藤哲雄、『*Eotetranychus* 属と *Schizotetranychus* 属の DNA 塩基配列による種の識別』、第 59 回日本応用動物昆虫学会大会、2015. 3. 27-28、山形大学(山形県・山形市)
- ⑨ 松田朋子・X. -Y. Hong・T. Abramishvili・T. Arabuli・後藤哲雄、『*Panonychus* 属および *Sasanychus* 属ハダニの DNA による種の識別と系統関係』、第 22 回日本ダニ学会大会、2014. 10. 19、アイーナ(岩手県・盛岡市)
- ⑩ 松田朋子・鈴木美穂・野田博明・石井一夫・古崎利紀・後藤哲雄、『トランスクリプトームに基づくハダニ科の分子系統関係の推定』、第 58 回日本応用動物昆虫学会大会、2014. 3. 27-28、高知大学(高知県・高知市)
- ⑪ 鈴木玲子・松田朋子・J. -Z. Lin・J. Ji・Y. -X. Zhang・齋藤 裕・後藤哲雄、『*Stigmaeopsis* 属ハダニ 7 種の DNA 塩基配列による種の識別』、第 58 回日本応用動物昆虫学会大会、2014. 3. 27-28、高知大学(高知県・高知市)
- ⑫ 石井一夫・松田朋子・古崎利紀・後藤哲雄、『モンテカルロ法を用いた進化分岐図作成法』、第 96 回 MPS・第 36 回 BIO 合同研究発表会、2013. 12. 11-12. 12、東京工業大学(東京都)
- ⑬ 石井一夫・松田朋子・古崎利紀・後藤哲雄、『ビッグデータ解析を利用したモンテカルロ法による分子進化の分岐図作成最適化法』、科学研究費補助金によるシンポジウム「高次元データ解析の理論と方法論及び関連分野への応用」、2013. 11. 25、筑波大学(茨城県・つくば市)
- ⑭ Matsuda, T., M. Morishita, Y. Kitashima, N. Hinomoto and T. Gotoh、『Molecular phylogeny of spider mite (Acari: Tetranychidae) inferred from 18S and 28S ribosomal RNA sequences』、2nd Global Conference on Entomology、2013. 11. 10-11. 11、Four Point Kuchin (Kuchin・Malaysia)
- ⑮ 松田朋子・鈴木美穂・野田博明・石井一夫・古崎利紀・後藤哲雄、『トランスクリプトームの網羅的解析によるハダニ類の分子系統推定』、第 22 回日本ダニ学会大会、2013. 9. 28、静岡県総合研修所もくせい会館(静岡県・静岡市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

後藤 哲雄 (GOTOH TETSUO)  
茨城大学・農学部・教授  
研究者番号：60178449

### (2) 研究分担者

野田 博明 (NODA HIROAKI)  
独) 農業生物資源研究所・昆虫科学領域・  
特任上級研究員  
研究者番号：40343991

### (3) 研究分担者

鈴木 美穂 (SUZUKI M. MIHO)  
基礎生物学研究所・形態形成部門・特別研  
究員  
研究者番号：80548470

### (4) 研究協力者

なし