

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：32102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03775

研究課題名(和文) ハダニ類の大容量塩基配列解析によって得られた領域に基づいた超高速簡易識別法の確立

研究課題名(英文) Establishment of ultra-rapid identification of spider mite species based on RNA-sequencing

研究代表者

後藤 哲雄 (Gotoh, Tetsuo)

流通経済大学・経済学部・教授

研究者番号：60178449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：形態的特徴による種同定が極めて困難なハダニの超高速識別法確立のため、1. RNA-Seq(全転写産物解析)を用い、網羅的に種特異的配列を抽出。2. 1で設計したプライマーでPCRを行い、種特異的な増幅を確認。その際、マルチプレックスPCRを念頭に、PCR増幅産物長が種ごとに異なるプライマーセットを設計。3. プライマーセットを混合したマルチプレックスPCRの条件を検討し、1本のPCRチューブで最大6種の識別が可能な条件を確立。4. DNA抽出に要する時間削減のため、生きたダニ1匹から直接、又はすり潰した液によるPCR条件を設定。最終的にハダニ11種12系統を約1.5時間で同定可能な手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多数の農業害虫を含むハダニにおける害虫種の簡易識別は、農業や検疫の現場で広く望まれる。本研究の成果は、特別な機器を必要とせず、PCR法の応用により、1.5時間という短時間で害虫種のハダニの識別に成功し、普及しやすい識別技術として社会の要請に応えるものである。また本研究では、RNA-Seq(全転写産物解析)により得られた大規模データから種特異的配列を得る手法を開発し、学術的にも大きく貢献した。

研究成果の概要(英文)：Spider mite species are extremely difficult to identify only by morphology. In this study, a molecular method was established for ultra-rapid identification of spider mites: (1) Species-specific primer sequences were extracted by comprehensive analysis of RNA-Seq data. (2) PCR was performed using the candidate primers to confirm species-specific amplification. For multiplex PCR to identify species, primer sets were designed resulting in PCR amplification products differing among species. (3) Multiplex PCR conditions were examined using mixtures of primer sets, and it was confirmed that up to six species can be identified with one PCR tube. (4) To speed up DNA extraction, we arranged PCR conditions using either an individual mite directly or a mixture of homogenized mite body as template. Finally, we tested our method to correctly identify 12 strains of 11 spider mite species within 1.5 h using multiplex PCR.

研究分野：農学

キーワード：ダニ・線虫管理 系統関係 ゲノム

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。それらの識別に用いる形態的特徴は雄成虫の挿入器サイズ(0.3~0.5 μ m の差を識別)や脚の毛の数であるが、毛の数には種内変異があり、同定には熟練を要する。そこで、形態的特徴に代わる種の簡易識別法が1990年代初頭から模索されてきた。例えばフォスフォグルコムターゼアイソザイム (Gotoh et al., 2007)、核rRNA遺伝子のITS領域の制限酵素断片長多型(PCR-RFLP)を利用した研究 (Osakabe et al., 2008)、そしてITS領域とミトコンドリアDNAのCOI領域(約400 bp)による研究(Navajas et al., 1998; Hinomoto & Takafuji, 2001)などであるが、農業上重要な害虫を多く含む*Tetranychus*属の種の識別はできなかった。我々は、COI領域(約900 bp)とITS領域、28S領域を用いて、日本産*Oligonychus*属ハダニ全18種中17種(Matsuda et al., 2012)およびCOI領域によって日本産*Tetranychus*属ハダニ全13種の識別に成功した(Matsuda et al., 2013)。しかし、海外産の*T. turkestanii*と国産のナミハダニ*T. urticae*は識別できなかった。これらの結果は、従来試みられてきた少数の遺伝子領域だけによる種の識別法では、ハダニ科全体や世界各地に分布する同属の種を対象とした種の識別を行うことが不可能であることを示唆している。つまり、近縁種間で塩基置換の蓄積が大きい新たな遺伝子を探索して用いるか、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。そこで我々は、ハダニ類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(トランスクリプトーム解析; RNA-Seq)を行い、解析した79種86系統に共通する652遺伝子を抽出し、これらの大規模遺伝子情報を利用した分子系統解析を行って属間および種間の系統関係の解明を進めると共に、種の簡易識別に有効な遺伝子の探索を進めた。その結果、652遺伝子のうち、20遺伝子について72種の識別を試みたところ、*legumain* 遺伝子(核)と*ribosomal protein L39* 遺伝子(ミトコンドリア)について、全種の識別が可能であるばかりでなく、COI遺伝子では識別できなかったナミハダニと*T. turkestanii*を識別できることが分かった。

また現場への普及には、高額な機器・試薬や時間を要するDNAシーケンスは不適であり、PCR装置と電気泳動によるバンドパターンのみで識別できる手法が必要不可欠であることを再認識した。近年、Real Time PCRを用いた簡易識別法も提唱されているが、高額な機器・試薬や時間を要するという同様の難点を抱えている(Li et al., 2015)。加えて、従来の識別法で良く行われている制限酵素を用いたPCR-RFLP法では、切断する配列部位に変異があると、バンドが検出されなくなるため、地理的変異の検討が必要不可欠であるが、その点は全く検討されていない(Osakabe et al., 2008; Arimoto et al., 2013)。しかし我々は、これまで多くのハダニ種を全国から採集し(Gotoh et al., 1999a, b)、100系統以上を維持している他、凍結保存している系統が多数あるので、有効な簡易識別法を開発した場合は、直ちに地理的変異を考慮したプライマーの改良に着手できる状況が整っていた。

近年、マルチプレックスPCRが安価で効率的な簡易識別の手法として注目され、魚類(Higashi et al., 2016)や病原微生物(Padley et al., 2013)など広い分類群の種識別に活用されている。しかし、マルチプレックスPCRで多数の種を識別する際の最大の問題点は種特異性が低く近縁種も増幅してしまうプライマーの混在であるが、本研究では膨大な数の候補から種特異性が高いプライマーを選択的に設計できるため、この危険性をほぼ完全に回避できる可能性が高いことが分かった。

2. 研究の目的

ハダニでは害虫種の形態が互いに酷似しており、植物検疫や農業現場では種の同定が非常に困難なため、簡易識別法の開発が切望されている。我々は、大容量塩基配列解析(RNA-Seq)により 79 種 86 系統のハダニに共通する 652 遺伝子を既に抽出している。そこで本研究では、これらの RNA-Seq データに基づいて識別用プライマーセットを作製し、サンプリングから種同定までを現在の 9 時間から 1 時間以内でできるアッセイ系(超高速簡易識別法)を構築する。具体的には、増幅されるバンドの長さを対象種ごとに変えた種特異的プライマーを設計し、複数のプライマーを組合せて識別用プライマーセットとしてマルチプレックス PCR を行う。電気泳動によるバンドの確認だけで種の簡易識別が可能な本法は、従来法より信頼性と速度を飛躍的に向上させるものと期待される。

本研究では、(1) RNA-Seq のデータに基づいて、識別対象種(常時利用可能な 42 種を想定)のすべてについて、対象種のみでバンドが増幅される種特異的プライマーを 1 組ずつ設計する。プライマーを設計する遺伝子は、全種に共通する 652 遺伝子を網羅的に検討し、種特異性の高い遺伝子を対象種ごとに複数抽出する。(2) 簡易識別に要する時間を短縮して、1 時間以内に識別するため、バンドの長さを 100 bp 毎に異なるよう設計した種特異的プライマー 6 組を 1 チューブに入れてマルチプレックス PCR を行い、6 種を同時に識別する(100~600 bp で 6 種)。

3. 研究の方法

(1) RNA-Seq データの取得とプライマー候補配列の抽出

簡易同定に利用可能な種特異的な塩基配列を分離するために、ハダニ各種について各 100~200 個体を供試して、RNA-Seq を実施する。RNA-Seq により取得した reads は、Trinity (k-mer=25) を用いてアセンブルを行い、コンティグと呼ばれる長い配列を得る。コンティグは、種ごとに k-mer と呼ばれる短い連続塩基に分解して他種と相互に比較し、各種に特異的な配列のみをプライマー候補とする。

(2) プライマーの設計および PCR 条件の検討

(1) で得られた候補配列から設計したプライマーを用いて PCR を行い、種特異的な増幅が確認できるかどうかを検討する。具体的には、① プライマー候補配列が含まれる遺伝子配列をアライメントして、種特異的プライマーと対になるプライマー配列を設計する。その際、これらのプライマーを用いたマルチプレックス PCR を検討するため、PCR 増幅産物の長さが種ごとに 100bp 単位で異なるプライマーセットを設計する。② ①で設計したプライマーセットを用いて、解析対象となるハダニをテンプレートとした PCR を行う。③ PCR 増幅産物を電気泳動で分析し、増幅されるはずの種のみで、想定される断片長のバンドが得られることを確認する。想定される増幅断片長のバンドが得られなかった場合、あるいは、複数の系統でバンドが得られた場合、PCR に用いたプライマーセットは種特異的プライマーとして使用できないものと判定する。①~③は、種特異的プライマーが得られるまで繰り返す。

(3) マルチプレックス PCR 条件の最適化

(2) において作成した種特異的プライマーセットを識別に用いる場合、識別したいハダニ

に対して解析対象種と同数のプライマーを用いた PCR を実施する必要がある。また、識別したいハダニの数が多い場合や解析対象種が追加された場合には、さらに反応の数が増えることになるため、大変な手間がかかり、現実的ではない。そこで、複数の種特異的プライマーセットを 1 つのチューブに混合し、増幅断片長に基づいて種の識別が可能であるマルチプレックス PCR を行う。マルチプレックス PCR では、プライマー間の相互作用によって起こる誤った増幅や非特異的な塩基配列の増幅や複数のプライマーが結合してしまうことによる PCR 効率の低下を避けなければならない。そこで、設計したプライマーを用いて、マルチプレックス PCR のプライマーの組み合わせ、および反応条件の最適化を行う。

(4) DNA 抽出条件の簡易化

ダニの識別に要す時間を大幅に減らすため、DNA 抽出に要する時間を削減する必要がある。そのため、生きたダニ 1 個体を直接 PCR 反応のテンプレートとする direct-PCR 法およびダニ 1 個体をホモジェナイズした簡易抽出法の技術開発を行い、マルチプレックス PCR と組み合わせることで識別に要する時間を削減する。

4. 研究成果

(1) RNA-Seq データの取得とプライマー候補配列の抽出

ハダニ各種について、RNA-Seq を実施した。QIAGEN 社の RNeasy Micro Kit を用いて、1 種につき 100~200 個体から Total RNA を抽出した。RNA の品質確認および定量を行った後、illumina 社の TruSeq RNA Library Prep Kit または TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit を用いて、シーケン斯拉イブラリを調整した。ライブラリは、illumina 社の HiSeq 2000 または NextSeq 500 でシーケンスした。さらに、Trinity (k-mer=25) を用いてシーケンスリードを種ごとにアセンブルし、コンティグを得た。RNA-Seq およびアセンブルは、ハダニ類 7 属 36 種 37 系統(ナミハダニ属 (*Tetranychus* 属) 13 種 14 系統、マルハダニ属 (*Panonychus* 属) 4 種、ツメハダニ属 (*Oligonychus* 属) 7 種、マタハダニ属 (*Schizotetranychus* 属) 2 種、アケハダニ属 (*Eotetranychus* 属) 5 種、クダハダニ属 (*Amphitetranychus* 属) 2 種、ヒラタハダニ属 (*Aponychus* 属) 1 種)について実施した。コンティグを種ごとに k-mer に分解して他種と相互に比較し、1 種につき 10~6,226 本の種特異的プライマー候補配列を得た。

(2) プライマーの設計および PCR 条件の検討

(1)で得られたプライマー候補配列が含まれる遺伝子配列のアライメントデータを用いて、候補配列と対になるプライマーを設計した。RNA-Seq データをアセンブルしてできたコンティグにはイントロンが含まれないため、ゲノム DNA を用いて行う PCR において塩基配列の長さに齟齬が生じる可能性がある。したがって、プライマーは、主にイントロンレスの遺伝子のアライメントデータを用いて設計した。次に、各種に特異的なプライマーセットを用いた PCR を行った。PCR 増幅産物の電気泳動において、増幅されるはずの種のみで、想定される断片長のバンドが得られることを確認した。想定される増幅断片長のバンドが得られなかった場合、あるいは、複数の系統でバンドが得られた場合、PCR に用いたプライマーセットは種特異的プライマーとして使用できないものと判定した。プライマー設計と PCR 反応を繰り返し行い、22 種 23 系統について種特異的プライマーセットを得た。これら

に加えて、12 系統のプライマー候補配列が得られているため、同様の方法でプライマーセットを作成できる状態にある。

(3) マルチプレックス PCR 条件の最適化

(2)で設計した 22 種 23 系統のプライマーセットを用いて、マルチプレックス PCR 法の最適化を行った。プライマー数が増えると、非特異的なバンドが増えるため、1つのチューブで 6 種類のプライマーに絞り込み、1つのチューブにおいて、100bp~600bp 間の最大 6 種のマルチプレックス PCR による識別が可能であることを確認した (図 1)。

(4) DNA 抽出条件の簡易化

(3)で確立したマルチプレックス PCR 条件において、生きたダニ 1 個体を直接 PCR 反応のテンプレートとする direct-PCR 法およびダニ 1 個体をホモジェナイズした簡易抽出法を試みた。マルチプレックス PCR 条件においては、簡易抽出法で得られたテンプレートを用い、11 種 12 系統のハダニを、1.5 時間で識別することに成功した。

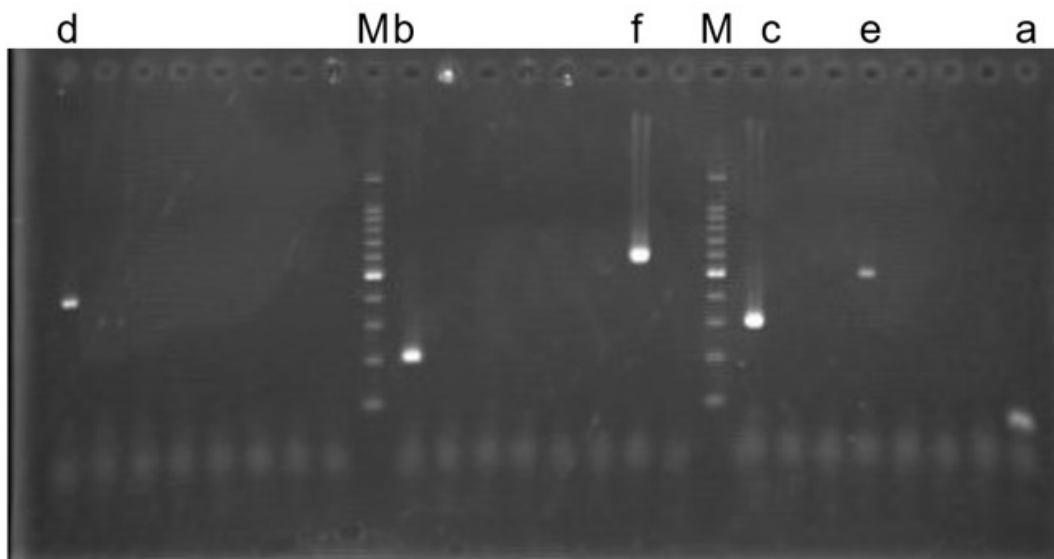


図1. マルチプレックスPCR結果

22種23系統のダニから、識別対象種6種のみが単一のバンド.
種番号はバンドサイズ順 (100~600bp) に配置.各100bp刻み.

a, *Tetranychus piercei*; b, *Oligonychus ilicis*; c, *Tetranychus turkestanii*,

d, *Panonychus citri*; e, *Tetranychus merganser*; f, *Tetranychus urticae* (Red Form),

M, Marker

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Negm, M. W., T. Matsuda, T. Kayukawa, C.-C. Ho, Y.-Y. Hsu, M. Kongchuensin, P. Konvipasruang and T. Gotoh	4. 巻 61
2. 論文標題 Morphological ontogeny and molecular analyses of geographic strains of two closely related Neoseiulus species (Acari: Phytoseiidae)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acarologia	6. 最初と最後の頁 432-452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24349/acarologia/20214440	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 該当する
1. 著者名 Arakawa, K., M. Mori, N. Kono, T. Suzuki, T. Gotoh and S. Shimano	4. 巻 239
2. 論文標題 Proteomic evidence for the silk fibroin genes of spider mites (Order Trombidiformes: Family Tetranychidae)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Proteomics	6. 最初と最後の頁 104195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jprot.2021.104195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Arabuli, T., T. Matsuda, M. W. Negm and T. Gotoh	4. 巻 4881
2. 論文標題 Complementary description of Panonychus caricae Hatzinikolis, 1984, with the resurrection of the genus Sasanychus Ehara, 1978 (Acari, Prostigmata, Tetranychidae)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Zootaxa	6. 最初と最後の頁 515-531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11646/zootaxa.4884.3.5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 松田朋子・後藤哲雄	4. 巻 74
2. 論文標題 DNA塩基配列を用いたハダニ類の種の識別と系統関係の推定	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 植物防疫	6. 最初と最後の頁 131-136
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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arabuli, T., M. W. Negm, T. Matsuda, Y. Kitashima, T. Abramishvili, I. A. Akimov, O. V. Zhovnerchuk, S. Ya. Popov and T. Gotoh	4. 巻 14
2. 論文標題 Morphological identification of Amphitetranychus species (Acari: Tetranychidae) with crossbreeding, esterase zymograms and DNA barcode data	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 1~22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0221951	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 該当する

1. 著者名 Sakamoto, H., R. Suzuki, N. Nishizawa, T. Matsuda and T. Gotoh	4. 巻 112
2. 論文標題 Effects of Wolbachia/Cardinium infection on the mitochondrial phylogeny of Oligonychus castaneae (Acari: Tetranychidae)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Economic Entomology	6. 最初と最後の頁 883~893
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jee/toy354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato, Y., Y. Tsuda, H. Sakamoto, M. Egas, T. Gotoh, Y. Saito, Y.-X. Zhang, J.-Z. Lin, J.-T. Chao and A. Mochizuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Phylogeography of lethal male fighting in a social spider mite	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 1590~1602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ece3.4770	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Gotoh, T. and T. Arabuli	4. 巻 4555
2. 論文標題 New species of the genus Eotetranychus (Acari, Prostigmata, Tetranychidae) from Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Zootaxa	6. 最初と最後の頁 1-27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11646/zootaxa.4555.1.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsuda, T., T. Kozaki, K. Ishii and T. Gotoh	4. 巻 13(9):e0203136
2. 論文標題 Phylogeny of the spider mite sub-family Tetranychinae (Acari: Tetranychidae) inferred from RNA-Seq data	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0203136	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 -

1. 著者名 Sakamoto, H. and T. Gotoh	4. 巻 52
2. 論文標題 Non-destructive direct polymerase chain reaction (direct PCR) greatly facilitates molecular identification of spider mites (Acari: Tetranychidae)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Appl. Entomol. Zool.	6. 最初と最後の頁 661-665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13355-017-0512-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 後藤哲雄・M. W. Negm・松田朋子
2. 発表標題 Panonychus属ハダニの分類の現状と問題点
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会、Online
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤幸恵・藤原 聡・Martijn Egas・松田朋子・後藤哲雄
2. 発表標題 オウトウハダニにおける生殖隔離と遺伝距離
3. 学会等名 第68回日本生態学会大会、Online Meeting 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤哲雄
2. 発表標題 シノニムの判定には膨大な時間と労力がかかる
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤幸恵・坂本洋典・後藤哲雄・齋藤 裕・J.-T. Chao・M. Egas・望月 淳
2. 発表標題 雄同士の攻撃性の異なるススキスゴモリハダニ3型における生殖隔離と遺伝距離
3. 学会等名 第63回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsuda, T., T. Kozaki, K. Ishii and T. Gotoh
2. 発表標題 Phylogeny of the spider mite Sub-Family Tetranychinae (Acari: Tetranychidae) by RNA-Seq
3. 学会等名 XVI AZRA International Conference on Applied Zoological Research for Sustainable Agriculture & Food Security (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂本洋典・松田朋子・粥川琢巳・古崎利紀・後藤哲雄
2. 発表標題 ハダニ類の分子同定に有効に利用できる遺伝子のRNA-seqを用いた探索
3. 学会等名 第62回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2018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
研究 分担者	北嶋 康樹 (Kitashima Yasuki) (00431651)	茨城大学・農学部・准教授 (12101)	
研究 分担者	坂本 洋典 (Sakamoto Hironori) (70573624)	国立研究開発法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・研究員 (82101)	
研究 分担者	粥川 琢巳 (Kayukawa Takumi) (70580463)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主任研究員 (82111)	

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