

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月11日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580061

研究課題名（和文）長期保存標本のDNA解析による昆虫の侵入と分布拡大機構の解析

研究課題名（英文）Detection and analysis of invasive insect populations based on mtDNA sequences of stored and newly collected specimens

研究代表者

村路 雅彦（MURAJI MASAHIKO）

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・上級研究員

研究者番号：20355746

研究成果の概要（和文）：

過去における昆虫の遺伝的攪乱や害虫化の機構を解明するための一環として、乾燥標本などとして保存されている試料から DNA 塩基配列を解析するための技術を確立し、現在と過去における昆虫集団の遺伝的構成を比較した。これにより昆虫の侵入や分布拡大の経緯、在来系統との遺伝的交流などのいわば昆虫の近現代史に関する実証的なデータの入手を試みた。主要な対象としては、国産昆虫で南西諸島等での遺伝的攪乱が疑われるゴマダラカミキリ他を使用した。

研究成果の概要（英文）：

Genetic variation of a Japanese longicorn beetle *Anoplophora* spp. was examined based on mitochondrial DNA sequences. Using stored specimens and newly collected samples obtained from 75 localities in the Japanese mainland, the Ryukyu Islands, and Taiwan, two fragments, a 1.2 kb-long fragment containing the cytochrome oxidase genes, and a 1.4 kb-long one containing rDNAs, were sequenced. In phylogenetic analyses based on the sequences, 294 individuals were divided into two major groups and then split into seven subgroups. In Group A, the closely related subgroups A1, A2, and A3 were mainly distributed on the Japanese mainland and were roughly separated among geographic areas, although the range of A3 spread from Kyushu to the Central Ryukyu Islands. The sequence of A4, detected from one individual collected in eastern Honshu, was the same as that of *Anoplophora* on the Chinese continent. In Group B, subgroups B1 and B2 were restricted to the Central and Southern Ryukyu Islands, respectively, while B3 was distributed widely in both regions. These results suggested that local populations of this beetle were disturbed by insect movements including those caused by human activities.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：昆虫分子進化・分子分類

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫、乾燥標本、DNA塩基配列、生物地理、分子系統解析

## 1. 研究開始当初の背景

近年における経済活動の活発化や地球温暖化などの影響により、様々な外来昆虫が日本列島に侵入しつつある。特に沖縄県を含む南西諸島には固有の種や系統が多く生息しており、外来昆虫による遺伝的汚染や競争的な排除などの悪影響が懸念されている。一方、在来昆虫でありながら、ここ数十年のうちに急速に害虫化したものも少なくない。その要因としては、作物の栽培方法の変化などのほか、周辺地域からの近縁系統の侵入やそれと在来系統との交雑が疑われる例もある。

侵入昆虫が在来のものの遺伝的攪乱や害虫化などに与える影響を明らかにするためには、それらの昆虫や遺伝子がいつどのように侵入・分布拡大し、また在来昆虫の遺伝子構成の変化にどう関わってきたのかなどを解明しなくてはならない。このような解析には DNA などの遺伝情報が必要となるが、侵入後ある程度以上の時間が経過したものである、侵入型と在来型の識別やそれらの地理的移動の方向性の判別が困難であり、実証的なデータが得られない場合が多い。このような問題を解決し、昆虫の近現代史にかかわる事象を具体的に解明するためには、過去の様々な時期に採集され長期間保存されている標本を用いることが有効である。

しかし今までのところ長期保存標本を積極的に活用した DNA 解析研究はほとんど例がない。その理由は、それらの試料では解析の基質となる昆虫 DNA が質的および量的に著しく劣化していることにある。このような試料を用いた PCR は、反応の特異性が低く、正確なデータが得られない事が多い。特にミトコンドリア DNA (mtDNA) を対象とする PCR では、核 DNA 中の多様な偽の mtDNA (Numts と呼ばれる) が増幅されるため、データの信頼性が低下する。これらの問題を解決できれば、過去における昆虫の動態解析が可能となり、保存標本の価値を一段と高めることが可能となる。

## 2. 研究の目的

このような状況をふまえ、本課題では数種の農業害虫等を対象に、長期保存試料の解析に適用できる DNA 抽出法と多型的領域の解析法について検討する。それらの方法を、近年における遺伝的特性の変化が疑われる数種の昆虫に適用し、昆虫系統の分布域の歴史の変遷と、在来および外来系統間の遺伝的交流の実態を明らかにする。

(1) 長期保存標本からの DNA 解析法の確立  
農業害虫や環境指標生物として注目されるものを中心とする昆虫について、乾燥標本や

液浸標本などの保存試料より純度の高い DNA を抽出し、塩基配列を解析するための手法を確立する。

## (2) 過去と現在における遺伝的構成の解析

上記の昆虫について、近年採集された集団と保存試料との間で DNA 塩基配列を比較し、過去と現在における遺伝子構成の違いを調べる。本研究では、南西諸島とその周辺地域におけるゴマダラカミキリ他の遺伝子構成の変遷を明らかにする。約数十年前から現在までの様々な時期に対応する多くの試料を使用し、侵入系統の侵入時期、分布拡大経路および在来集団との遺伝的交流に関する具体的なデータを得る。またそれらの結果と昆虫による被害拡大との関連性についても検討する。

## 3. 研究の方法

これまでに収集した多くの乾燥および新鮮試料にくわえ、研究期間中に収集する昆虫試料について、乾燥標本ほかの保存試料からの DNA 精製・濃縮法を確立し、新鮮・乾燥の両試料に適用可能な mtDNA マーカー等を開発する。これらを用いた解析によって、昆虫の過去と現在における遺伝子構成の変化を調べる。特に本アプローチの有用性を示す例として、ゴマダラカミキリなどの重要害虫について、由来の異なる昆虫系統の分布域の時間的変遷や在来集団との遺伝的交流など、侵入と分布拡大の実態を明らかにするとともに、それらと農業被害の拡大との関連性について検討する。具体的な研究方法は次のとおりである。

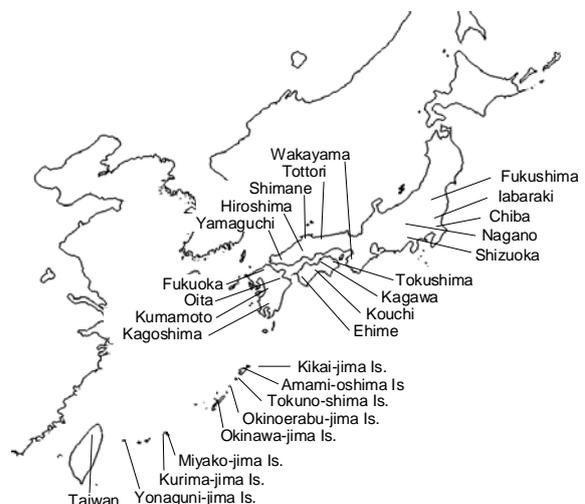


図1 ゴマダラカミキリの採集地点。全国19県75地域から約300個体を入手した。

#### (1) 昆虫試料の収集

ゴマダラカミキリやコメツキムシ類を中心に、本州、南西諸島および周辺地域に由来する多くの試料を収集する。特に過去に採集され各地に保存されている乾燥標本などの入手を試みる。

(2) 長期保存標本の DNA 抽出・精製法の検討  
上記標本について、カラムやガラスマトリックスを用いた方法など高純度 DNA を抽出する方法について検討する。

(3) 長期保存および新鮮試料に適用できる DNA マーカーの検討

ミトコンドリア DNA や核のリボゾーム DNA、各種遺伝子のイントロンなどの領域について PCR による DNA 増幅を行い塩基配列を比較する。乾燥試料由来の増幅産物はクローン化し、個々について新鮮試料由来のものとのホモロジー、塩基置換、挿入配列などの特性を調べ、両者に共通して使用可能なものを選出し、それらに特異的にかつネステッド PCR に使用可能なプライマーを作成する。

(4) 重要害虫等の遺伝的構成の時間・空間的変遷の解析

上記で得られた DNA マーカーを用いて、ゴマダラカミキリおよびコメツキムシ類等の害虫の DNA 塩基配列を調べる。得られたデータをもとに分子系統解析を実施し、遺伝的変異型を検出するとともに、それらの地理的分布状況を明らかにする。これらのデータをもとに、昆虫の移動分散や個体群攪乱の実態、その時期や経過等に関する情報を入手する。また多数の核 DNA マーカーを用いることで外来および在来集団間での遺伝的交流に関する証拠を得る

### 4. 研究成果

(1) ゴマダラカミキリ類の地理的多様性に関する解析では、本州から与那国島までの 75 地域に由来する 295 個体の遺伝的変異を調べた。個体毎にミトコンドリア DNA 内の COI、tRNA<sup>Leu</sup> および COII 遺伝子を含む約 1.2 kb のフラグメントと、16S および 12S rDNA の一部と tRNA<sup>Val</sup> 遺伝子を含む約 1.4 kb のフラグメントを増幅し、それらの塩基配列を確定し、それらデータにもとづく分子系統地理学的解析をおこなった。その結果、日本産集団は大きく二つのグループに分けられ、さらに 6 つのサブグループに分割される事が明らかとなった (グループ A に 4 サブグループ、グループ B に 3 サブグループ)。グループ A 内のサブグループのうち、3 つの分布域は概ね本州、四国および九州に分かれていた

が、九州サブグループは中琉球地方でも検出された。これ以外の 1 サブグループは、茨城県産の 1 個体より検出されたものだが、塩基配列の比較解析の結果、中国大陸で採集された個体の塩基配列としてデータベースに登録されているものと同じであることが分かった。また、茨城産の他の 1 個体は、南西諸島の一部や九州に分布する九州サブグループと同じ塩基配列を示した。グループ B の 2 サブグループはそれぞれ中琉球および南琉球地方に特異的であったが、他のサブグループは両地方から検出された。特に沖縄本島では、地域固有と考えられる DNA 型と九州からの侵入集団と考えられるサブグループが北部に限られた分布を示し、その他の地域は台湾からの侵入集団と考えられるサブグループで占められていた。これらの結果から、ゴマダラカミキリはもともと地理的に隔離され様々なサブグループへ進化したのであるが、近年大幅な攪乱が起き、分布域の拡大・縮小や重複などが起きつつあることがうかがわれた。特に南西諸島では、過去に九州と台湾からの少なくとも 2 回の侵入を受けて

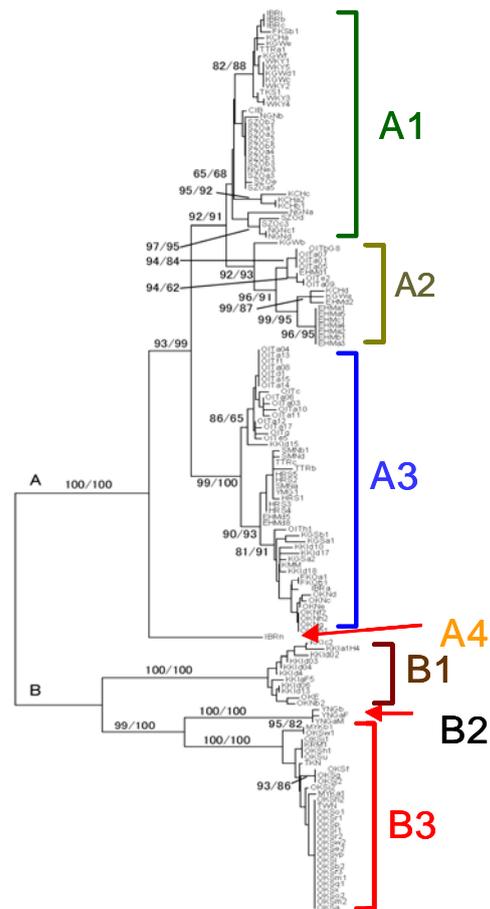


図 2 ゴマダラカミキリの分子系統樹

いると考えられた。また茨城県におけるごく少数の九州サブグループや中国大陸サブグループの存在は、現時点においても、人為的要因による群攪乱が進行しつつあることを示している。

(2) 乾燥標本については、南西諸島や台湾を中心に、1970年代から2000年頃までに採集された試料を約50点入手し、DNAの抽出と塩基配列の解析法について検討した。それらの解析は非常に困難で、ミトコンドリアDNAの増幅対象とするPCRによって、単一個体から塩基配列が類似した多数のDNAが増幅された。本研究では、それらの中から真正のミトコンドリアDNAに高度に特異的なプライマーを作り、またネステッドPCR法などを応用することで非特異的増幅の防止をはかった。得られた塩基配列を用いた解析では、沖縄地方のゴマダラカミキリは過去に大幅な攪乱を受けている事が示された。今日の沖縄本島では南琉球型・台湾サブグループが優先し、北部に少数の九州サブグループや中琉球サブグループが分布するにすぎないが、1970～1990年代には前者は限定的で、むしろ九州サブグループが広く優先するほか、現在では見られない本土型サブグループが認められた。さらに1970年代頃の試料では、今日いずれの地方にも存在しないDNA型が優先していた。以上より、沖縄本島では20世紀の後半に、まず本土・九州から、次いで

台湾方面(南琉球型)からの侵入を受け、本来のDNA型を失ったものと考えられた。このほか、ミトコンドリアDNA偽遺伝子を用いた塩基配列の解析では、琉球-高知-静岡等の集団間に、通常ミトコンドリアDNAの解析では検出されなかった遺伝的交流があることがわかった。これを確認するためには、他の核DNA塩基配列を用いた解析が必要で、現在rDNAとper遺伝子のシーケンシングを実施しているところである。

(3) 近縁な2種のコメツキムシ(O種とS種)についても同様な解析を実施した。まず、南西諸島64および66地点よりS種239個体、O種238個体入手しDNAを精製した。野外での本グループのコメツキの発生調査にはフェロモントラップを使うが、トラップ設置から回収までの期間や気象条件等々の要因のため試料の乾燥状態やDNA劣化の程度には大きなばらつきがある。このような品質の異なる試料を併用してDNA解析を行うと、不正な偽のDNAの混入などが起き、正確な結果が得られない事が多い。ここではそのような不正な塩基配列を詳しく解析し、コメツキの真正ミトコンドリアDNAと特異的に反応するプライマーを設計し、この問題をクリアした。これまでの解析で、155個体からCOI遺伝子等を含む1,357bp断片、124個体から2種類のrDNAを含む1,540bp断片の塩基配列を確定した。これらを用いた分子系統解析では、2つのメジャーグループが検出され、南西諸島北半部にO型、南半部にS型が認められた。しかし前者の分布は喜界島、奄美大島、徳之島と周辺離島を含む沖縄本島地方で、徳之島と沖縄本島との沖永良部島や与論島では、後者の型に置き換わっていた。マイナーグループの類縁関係から判断して、沖永良部と与論島のものは、それぞれ宮古地方と石垣・西表地方からの侵入者であると判断された。また両型が共存する地域集団も多く、近年における沖縄本島→与那国島、与論島→沖永良部島、沖縄本島北部→与論島と宮古島などの侵入が伺われた。これらの地域では、O種およびS種間での交雑の可能性があるため、今後も引き続き詳しい解析を進めることとしている。

表1 各地域のミトコンドリアDNA型の組成

地域	Haplotype	Group A				Group B			Total
		A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	
本州	福島	4							4
	茨城	15		1	1				17
	千葉	1							1
	静岡	16							16
	長野	9							9
	和歌山	5							5
	鳥取	2							4
	島根				2				5
	広島				5				5
	山口				3				3
四国	香川	9	2						11
	徳島	6							6
	愛媛		22	2					24
	高知	11	1						12
九州	福岡				10				10
	大分		9		35				44
	熊本				1				1
	鹿児島				13				13
南西諸島北部	喜界島				4	10			14
	奄美大島					4			4
	徳之島						2		2
	沖永良部島					1			1
	沖縄本島北部				9	2			11
	沖縄本島南部							57	57
南西諸島南部	米間島					2			2
	宮古島					9			9
	与那国島					3			3
	台湾							1	1
Total		78	34	90	1	17	3	71	294

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

① M. Muraji, N. Arakaki and S. Tanizaki, Evolutionary relationship between two firefly species, *Curtos costipennis* and *C. okinawanus* (Coleoptera, Lampyridae) in the Ryukyu Islands of Japan revealed by the mitochondrial and nuclear DNA

sequences. The Scientific World Journal、  
査読有、2012、2012、Article 653013  
DOI: 10.1100/2012/653013

② M. Muraji, S. Wakamura, H. Yasui, N. Arakaki, Y. Sadoyama, S. Ohno and K. Matsuhira、Genetic variation of the white-spotted longicorn beetle *Anoplophora* spp. (Coleoptera: Cerambycidae) in Japan detected by mitochondrial DNA sequence. Applied Entomology and Zoology、査読有、Vol. 46、2011、363-373  
DOI: 10.1007/s13355-011-0056-8

③ W. Mitsuhashila, H. Ikeda and M. Muraji、Fifty-year trend towards suppression of *Wolbachia*-induced male-killing by its butterfly host, *Hypolimnas bolina*. Journal of Insect Science、査読有、Vol. 11、2011、Article 92  
<http://www.insectscience.org/11.92/i1536-2442-11-92.pdf>

〔学会発表〕(計1件)

新垣則雄、外間康洋、永山敦士、安藤緑樹、谷崎樹生、村路雅彦、安居拓恵、若村定男、秋野順治、平井剛夫。石垣島において発生時期が異なるケブカアカチャコガネの分布と遺伝子解析。第56回日本応用動物昆虫学会大会。2012年3月28日。近畿大学農学部。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村路 雅彦 (Masahiko Muraji)

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫科学  
研究領域・上級研究員

研究者番号：20355746