

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2017

課題番号：23580219

研究課題名(和文)国内のカシノナガキクイムシに見られる遺伝的系統の簡易判別法の開発

研究課題名(英文)Development of simple methods for identification of genetic lineages of *Platypus quercivorus* in Japan

研究代表者

濱口 京子 (Hamaguchi, Keiko)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：60343795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：カシノナガキクイムシ(以下カシナガ)はナラ枯れの原因害虫である。申請者は先行研究で国内のカシナガに複数の遺伝的系統があることを報告したが、その識別においては分類学者に頼るかDNAシーケンサーで配列から検討するしか手立てがなかった。近年、被害の広がりにつれて複数の系統が被害に関与するようになりつつあることから、調査・研究や被害対策において、地域ごとの系統を速やかかつ容易に識別する必要が生じている。そこで本研究では核DNAとmtDNAを対象に、PCR-RFLP法と特異的プライマーによる簡便な系統判別法を開発した。また、DNA解析用のカシナガを野外で採取するのに適したトラップを選定した。

研究成果の概要(英文)：Platypus quercivorus is the vector insect of the Japanese oak wilt disease. There are several genetic lineages of the beetle in Japan, however, the classification of those lineages needs a taxonomist or a DNA sequencer. More simple and rapid methods for identification of the beetle lineages are required to promote the study of the beetle and the damage control based on the information of the lineages. In this study, we developed the simple methods for identification of the genetic lineages of the beetle by PCR-RFLP and PCR using specific primers. In addition, we selected the effective traps to collect the beetle specimens for DNA analyses in the field.

研究分野：森林昆虫

キーワード：ナラ枯れ カシノナガキクイムシ 遺伝的系統 PCR-RFLP 特異的プライマー

## 1. 研究開始当初の背景

カシノナガキクイムシ *Platypus quercivorus* (以下カシナガ) はナラ菌 *Raffaelea quercivora* を媒介することによってナラ枯れ(シイ・カシ・ナラ類の集団枯損)を引き起こす養菌性キクイムシの一種である。カシナガによるナラ枯れ被害は1980年代から激化しはじめ、防除を目的とした様々な研究、例えば基礎生態の研究、随伴菌の解明、フェロモンや薬剤を用いた防除法の開発などが多くの試験・研究機関で行われてきた。それらの中でもカシナガの遺伝的な地域変異の解明は急務の一つとされた。侵入種/土着種仮説の検証や被害拡大様式の解明の一助とするためである。

そこで申請者らは、先行研究においてリボソームDNAの28S部分領域の塩基配列を用いて、国内のカシナガの遺伝的変異を調べた。その結果、カシナガには複数の配列タイプ(タイプ1、タイプ2、タイプ3、タイプ4a~d)が存在し、これらの配列タイプは異所的に分布する傾向にあること、また、これらの配列タイプは別種に相当するほど遺伝的に隔たる2つのグループ; グループA(タイプ1、タイプ2)とグループB(タイプ3、タイプ4a~d); に分かれることを明らかにした(図1)(Hamaguchi & Goto, 2010)。なお、この二つのグループについては別種記載の準備が進められているが(後藤、準備中)、現状ではグループAは通称「日本海型」、グループBは通称「太平洋型」と呼んで区別されることが多い。

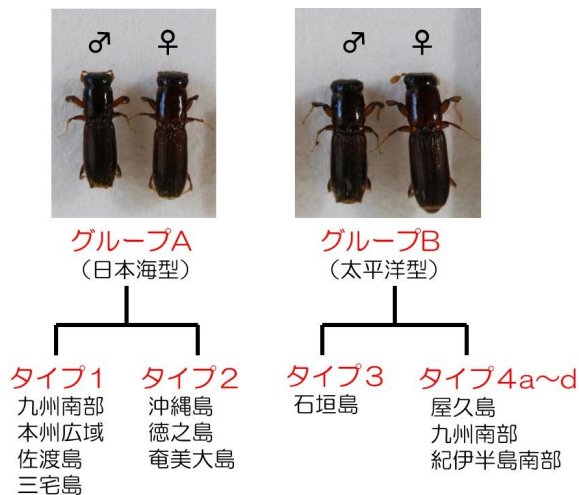


図1. カシナガの遺伝的系統とその分布域

複数の遺伝的系統の存在とその分布域が明らかになったことで、本州日本海側を中心に広がった近年までの被害のほとんどはグループA(日本海型)のタイプ1によるものであったことが判明した。これは、防除を目的として行われてきた研究のほとんども必然的にタイプ1のみを対象としてきたことを意味す

る。しかし2000年代以降は、島嶼部や本州・九州の太平洋沿岸など、タイプ1以外の系統の分布域や、どの系統が分布するか未解明の地域からも次々と被害が報告され始め、タイプ1以外の系統が被害に關与するケースも珍しくなくなった。枯損への關与がこれまでにまだ報告されていないのは石垣島に分布するタイプ3だけである。

このような状況下で、現在のナラ枯れ問題においては、遺伝的系統に留意して調査や防除を行うことが不可欠となっている。実際、グループA(日本海型)のタイプ1から同定された集合フェロモンを、グループB(太平洋型)のタイプ4a~dは持たないことが報告されており(所ら、2012)、系統間には他にも生態的な差異や随伴菌の差異などが存在する可能性が十分に予想される。これらを解明し、防除法やモニタリング法に反映させていくことが重要である。また、各遺伝的系統の分布域と被害との關係から被害発生メカニズムを解明することも急務である。これらの調査、研究、被害対策のために、被害地ごと、あるいは調査地ごとに速やかにカシナガの系統を判別する必要性が増している。

## 2. 研究の目的

カシナガの系統は、形態情報か塩基配列情報から判別するしか、これまでは手立てがなかった。形態による判別は、差異がごくわずかなため専門家以外には困難であり、塩基配列による判定も、DNAシーケンサーなどの機器を保有しない試験・研究機関では現実的ではない。そこで本課題では、被害地ごと、あるいは試験・研究機関ごとに必要に応じて速やかかつ容易に系統判別を行うことができるように、DNAシーケンサーを用いずに、より安価で簡便なDNA解析でカシナガの系統を判別する方法を開発することを目的とした。

開発にあたっては、PCR-RFLP法と特異的プライマーによる方法を試みた。また、核DNAとミトコンドリアDNAそれぞれについて判別法を開発することとした。系統間の交雑の可否ははっきりしておらず、別系統が近接分布する地域も見られる現状では、浸透交雑などを検証する必要も生じうるからである。また、トラップで捕獲された虫サンプルは、見た目は新鮮でもDNAが劣化し、解析上のネックとなることがしばしばある。そこで、DNA解析を目的としたサンプル採取に適したトラップについても合わせて検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 核DNAにもとづく判別法

28S-rDNAのD1-D2領域を対象にPCR-RFLP(制限酵素断片長多型)による判別法を開発した。

既報(Hamaguchi & Goto, 2010)で決定した同領域の配列をもとに各グループおよびタイプの判別に有効な制限酵素を検索した。こ

これらの制限酵素と各地から採集された塩基配列決定済みの虫サンプルを用いてPCR-RFLPを行い、各系統について正確かつ明瞭に判別を行えるかを確認した。

## (2) ミトコンドリアDNAにもとづく判別法

Cytb領域を対象とする特異的プライマーによる判別法を開発した。PCR-RFLPによらないのは、mtDNAは個体間変異が多く、制限酵素切断部位が系統内で保存されている保証がないからである。

まず、国内各地のカシナガのCytb領域の配列をダイレクトシーケンスによって決定し、rDNA-28S領域に基づく系統の分かれ方と矛盾がないかを調べた。その上でCytb配列の各系統に特異的な部位から候補となる特異的プライマーを複数設計した。これらのプライマーと各地から収集し塩基配列を決定した虫サンプルを用いてPCRを行い、目的とする系統のみを特異的に増幅できるプライマーの選抜とPCR条件の検討を行った。

## (3) DNA解析用のカシナガ採取法の検討

トラップ内におけるDNAの劣化を防ぐには、雨水の侵入による腐敗を防ぐことと、DNAが劣化しにくい保存液を使うことがもっとも重要である。それと同時になるべく多くの虫が得られなければならない。そこで、以下の3点について検討した。

### ① トラップによる雨水の侵入量の比較

カシナガ採集にしばしば使われる6種類のトラップを雨水の侵入の点から比較した。内訳は、市販のトラップ4種類；リンドグレンのファンネルトラップ（以下リンドグレン）、透明のファンネルトラップ（カシナガトラップKMC）、衝突板トラップ（サンケイ化学製の透明のもの）、タウンズ型マレーズトラップ（以下マレーズ）および自作のトラップ2種類；雨水を逃がすように回収部を改良した透明の衝突板トラップを地表に設置したもの（以下改良型地表）と、吊り下げたもの（以下改良型吊り）である。これらを森林総合研究所九州支所内に設置し、降雨時のトラップ回収容器内への雨水の浸入について比較調査した。

### ② トラップによる捕獲頭数の比較

と同様の6種類のトラップをカシナガ被害地（＝鹿児島県南九州市知覧町郡の知覧平和公園に隣接した林）に設置してカシナガの捕獲試験を行った。

### ③ 保存液によるDNA劣化程度の比較

7月のカシナガ飛翔シーズンに、水、70%エタノール、50%プロピレングリコールを入れたプラスチックカップそれぞれに、生きたカシナガを18～20頭ずつ入れ、野外の日陰に蓋をせずに設置した。3日後および1～4週間後に3頭ずつ虫を回収し、99.9%エタノールに保存した。DNeasy Blood & Tissueキット（Qiagen社）を用いてDNAを抽出し、核DNAの28SrDNA D1-D2領域およびmtDNAのCytb領域が増幅され

るかを確認した。

## 4. 研究成果

### (1) 核DNAを対象としたPCR-RFLPによる判別法

配列情報（Hamaguchi & Goto, 2010）から選出された制限酵素（表1）で、カシナガの遺伝的系統をグループレベルでもタイプレベルでも判別することができた。

識別対象	制限酵素
グループAとグループB	FokI
	Cac8
	HphI
	AseI
タイプ1とタイプ2	RsaI
タイプ3とタイプ4a～d	Fnu4HI

グループAとグループBについては、4つの酵素のいずれでも判別が可能であったが、バンドパターンの見分けやすさでは、FokI、HphIが良好であった（図2）。タイプレベルの判別については、特異的な制限酵素切断部位を持たないタイプがあるため、1ステップでの判別は不可能であったが、先にグループを判別した上で、タイプ1かタイプ2かを判別、あるいはタイプ3かタイプ4a～dかを判別するという2ステップにより判別可能であった。

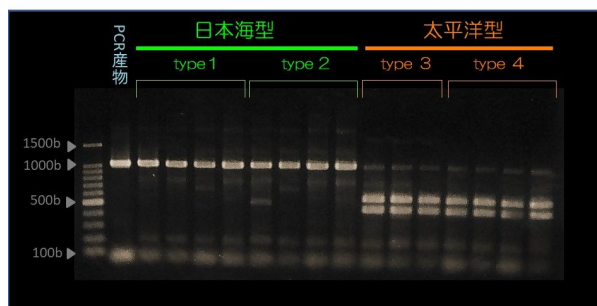


図2. PCR-RFLPによる系統判別例（HphIによるグループAとグループBの判別）

### (2) ミトコンドリアDNAを対象とした特異的プライマーによる判別法

Cytbの配列に見られた地域間多型は、核rDNA-28S領域にもとづく遺伝的系統の分かれ方と全く矛盾しなかった。よって、Cytbを対象とした特異的プライマーによる判別法は、交雑が起きないであろう状況下では核DNAと同様にタイプの判別に有効なほか、交雑帯においては核DNAとの併用で、浸透交雑の検証に利用できると考えられた。

Cytb領域の塩基配列から系統特異的な候補プライマーを合計28本設計し、目的とする系統のみを増幅できるプライマーの選抜

と PCR 条件の検討を行った。その結果、グループA(日本海型)とグループB(太平洋型)、タイプ1、タイプ2のそれぞれについては、特異的プライマーによる判別が可能となった。タイプ3とタイプ4については、明瞭に判別できるプライマーを作成することができなかった。判別結果の一例を図3に示す。

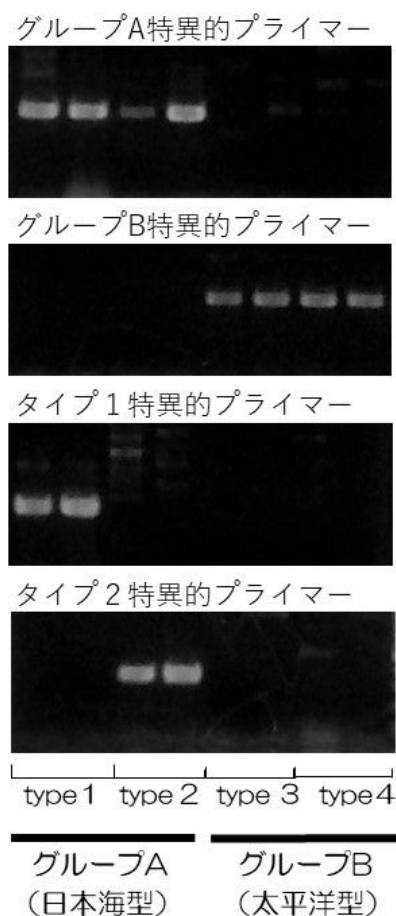


図3. 特異的プライマーによる増幅例

なお、この解析法を系統の判別に用いる場合は、バンドが出ないことではなく、バンドができることをもって判定すべきである。DNAが増幅されなかった場合に、目的とする系統でなかった場合だけでなく、DNAが劣化していた場合が含まれるためである。

### (3) DNA解析用のカシナガ採取法の検討 トラップによる雨水の侵入量の比較

降水量あたりの雨水の侵入量で比較すると、マレーズ、改良型地表、改良型吊り、透明ファンネルトラップ、リンドグレン、衝突板トラップの順に侵入が少なかった。特にはじめの3種は、降水量1mmあたりの回収容器への雨水の侵入総量が0.1ml未満と非常に少なかった。一方、透明ファンネルトラップ、リンドグレン、衝突板トラップはいずれも降水量1mmあたりの回収容器への雨水の侵入総量が1mlを大きく上回り、降水量が多い場合は容易に回収容器から水があふれたこ

とから、少なくとも長期設置には向かないと考えられた。

### ② トラップによる捕獲頭数の比較

すべてのトラップでカシナガが捕獲された。しかし捕獲数には大きな違いがあり、透明ファンネルトラップでもっとも多く捕獲され、このトラップと、捕獲頭数の少なかったリンドグレン、マレーズ、衝突板トラップの間にはトラップ当たりの捕獲数に有意な差があった( $p < 0.01$ )。透明ファンネルトラップに次いで多く捕獲されたのは改良型吊りであった。

### 保存液によるDNA劣化程度の比較

核 rDNA-28S 領域については50%プロピレングリコールに入れた虫は、野外で一か月放置しても問題なくDNAが増幅された。一方、水に入れたサンプルは3日~1週間後、70%エタノールに入れたサンプルは2週間後にはDNAが増幅されなくなった。mtDNA-Cytb領域については、全サンプルで増幅が悪く、再実験による確認が必要である。以上の結果から、数日以内に回収するような調査日程でない限り、DNA解析を目的としたサンプリングにはプロピレングリコールを用いることが適当と考えられた。

~の結果から、DNA解析用のサンプリングには保存液としてプロピレングリコールを用い、トラップは目的に応じて使い分けること、すなわち遠隔地などに長期設置する場合は改良型衝突板トラップをなるべく多く吊り下げて使い、短期間で回収する調査日程で、多個体のサンプルを得たいときは、透明ファンネルトラップを用いることが効果的と考えられた。

これらの知見は遠隔地での採集機会が多いカシナガでは特に有効で、DNA解析を目的とした調査において、回収の手間や、DNA劣化によるサンプルロスの軽減を期待できる。

本研究で開発した方法、すなわちPCR-RFLP法と特異的プライマーによる判別法は従来の方法ではあるが、被害地ごと、あるいは試験・研究機関ごとにDNAシーケンサーを使うことなく必要に応じて速やかかつ容易に系統判別を行うことができるようになるため、系統に留意した被害対策や調査・研究の進展に大きく寄与すると思われる。

### <引用文献>

Hamaguchi K, Goto H, Genetic variation among Japanese populations of *Platypus quercivorus* (Coleoptera: Platypodidae), an insect vector of Japanese oak wilt disease, based on partial sequence of the nuclear 28S rDNA, Appl Entomol Zool, 45, 2010, 319-328

所雅彦、衣浦晴生、後藤秀章、濱口京子、加賀谷悦子、新井一司、中村健一、竹内純、伊豆諸島のスダジイ被害とカシナガキクイムシについて(講演要旨)、日本

5. 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

濱口京子、後藤秀章、PCR-RFLP 法によるカシノナガキクイムシの系統識別、第 129 回日本森林学会大会、2018 年

②後藤秀章、上田明良、高畑義啓、九州で発生したミズナラのナラ枯れ被害について、第 73 回九州森林学会大会、2017 年

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

取得状況 ( 計 0 件 )

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱口 京子 ( Hamaguchi, Keiko )

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号： 6 0 3 4 3 7 9 5

(2) 研究分担者

後藤 秀章 ( Goto, Hideaki )

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号： 1 0 3 5 3 6 8 2