

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2013～2016

課題番号：25292034

研究課題名（和文）農林生態系における捕食者 - 被食者多種系の分子同定システムの開発と実証

研究課題名（英文）Development of molecular-based identification systems for multi-species predator-prey systems in agro-forest ecosystems

研究代表者

前藤 薫 (Maeto, Kaoru)

神戸大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：80346238

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,500,000円

研究成果の概要（和文）：農林生態系における植物食昆虫と天敵昆虫についてDNAバーコーディングを進めるとともに、次世代シーケンシングNGSによる捕食 - 被食分析システムを構築した。植物食昆虫はチョウ目とカメムシ目について、また天敵昆虫ではヒメバチ科上科を中心に分子情報を利用した種分類体系の再検討を行い、DNAバーコードの集積を進めた。また、トンボ目の同属近縁種を識別する種特異プライマーを設計する際の塩基配列情報としてミトコンドリアCOI領域と核ITS領域を比較し、後者の優位性を認めた。さらにNGSによる消化管内容物の同定システムを構築し、野菜温室における広食性捕食者であるタバコカスミカメを対象として有用性を実証した。

研究成果の概要（英文）：We have conducted DNA barcoding of insects in agro-forest ecosystems and established a NGS system for analysis of multi-species predator-prey systems. We found and solved many species-level taxonomic problems on Lepidoptera and Hemiptera as pest herbivores and on ichneumonoid parasitoids as natural enemies. For Odonata species, it was proved that nuclear ITS region is superior to mitochondrial COI region for designing specific primers to discriminate close congeners. Also, we demonstrated the usability of our improved NGS system for the multi-species prey analysis of a generalist predator bug *Nesidiocoris tenuis* in greenhouses.

研究分野：昆虫学

キーワード：生物的防除 昆虫分類学 DNAバーコーディング NGS 次世代シーケンシング 寄生蜂 植物保護 捕食 - 被食系

### 1. 研究開始当初の背景

生物の種同定に使うための比較的短い塩基配列を DNA バーコードと呼ぶ。大部分の動物では汎用プライマーを利用してミトコンドリア COI 遺伝子の部分領域(約 650 塩基対)を PCR 増幅することが出来る。その部分の塩基配列には通常数%以上の種間差があるので、これを動物の DNA バーコードとして利用するのが一般的である。DNA バーコーディングの普及にともない、個別分類群の形態や分類情報を熟知した専門家でなくても、成虫や幼体は勿論、組織片であっても、正確に生物種の同定を行なうことが可能になった(前藤 2014)。

しかし、こうした分子同定の手法を実際に農林生態系における捕食(寄生)者-被捕食者(寄主)関係の調査に利用するには、まだ問題点が多い。主要な捕食性天敵である寄生蜂は種間形態差が少ないために分子同定に対する期待が大きいが、近縁種(あるいは隠ぺい種)を識別できるのかどうか確かな知見は得られていない。害虫を含む植物食昆虫についても、アブラムシ類など一部の分類群を除けば、DNA バーコードの集積は不十分である。また、ミトコンドリア DNA では近縁種間の識別には不十分であり、昆虫についても真菌類では一般的とされている核 ITS 領域の塩基配列を DNA バーコードとして利用すべきという議論もある。

さらに、天敵捕食者の消化管内容物から DNA を抽出して餌分析を行う試みは、すでに一定の成果を上げているが、それらは特定の害虫種について種特異プライマーを作成して PCR を行うものであり、広食性捕食者の餌メニューを調査することは出来ない。土着天敵の多くが、通常は害虫でない餌生物に依存して個体群を維持していると予想されるが、その実態を捉えるには多種混合 DNA サンプルを同定できるシステムの確立が不可欠である。

### 2. 研究の目的

(1) 特に種間形態差が小さい寄生蜂類についてミトコンドリア COI 部分領域を利用した DNA バーコーディングの信頼性・有用性を検証する。

(2) 農林生態系に生息する植物食昆虫類について DNA バーコードの集積を進める。

(3) 種特異プライマーを設計して同属近縁種を識別する場合の DNA バーコードの有用性について、ミトコンドリア COI 領域と核 ITS 領域の両者を比較する。

(4) 広食性捕食者の消化管内容物の DNA 分析・同定のために次世代シーケンシング NGS を導入する。構築したシステムの実用性について、野外サンプルを用いた実証実験によって評価する。

### 3. 研究の方法

(1) 寄生蜂のなかでも種間形態差が小さく分類が混乱している 2 つの分類群、ケンオナガヒメバチ亜科 Acaenitinae とコマユバチ亜科 Braconinae について、既存の種分類体系をミトコンドリア COI 領域と核 28SrRNA 領域の塩基配列情報および詳細な形態比較によって再検討した。

(2) 植物食昆虫のうち特にチョウ目とカメムシ目について、DNA バーコード(ミトコンドリア COI 領域)の集積と解析を進めた。

(3) 動物における一般的な DNA バーコード配列であるミトコンドリア COI 領域とより種差が大きいとされる核 ITS 領域が合わせて解読されているトンボ目アカネ属について、同所的に生息する希少種ミヤマアカネと普通種数種の幼虫を識別する為の種特異 PCR プライマーおよび制限酵素セットの設計を行い、野外調査に応用することによって信頼性と有用性を評価した。

(4) 次世代シーケンサー-illumina MiSeq を利用して消化管内容物の DNA から餌生物のミトコンドリア COI 領域を解読して同定するシステムを試作し、広食性の捕食性天敵として知られるタバコカスミカメ成虫を対象として試行実験を繰り返した。ほぼ完成したシステムを、高知県内の園芸ハウスにおける本種の餌メニュー分析に応用して、実用性を評価し、さらなる課題を検討した。

### 4. 研究成果

(1) 分子情報と形態情報を相互参照することによって、材食性甲虫類の寄生蜂である日本産ケンオナガヒメバチ亜科 6 属 34 種の分類学的再検討を完成した。例えば、*Spilopteron* 属の「トサケンヒメバチ」と「ツマグロケンヒメバチ」は体色パターンの違いによって区別されてきたが、ミトコンドリアおよび核の DNA 情報を取得し、それに基づいて形態形質を精査したところ、真のトサケンヒメバチ *S. tosaense* は著しい地理的体色変異を有する種であり、真のツマグロケンヒメバチ *S. apicale* とは体色パターンではなく些細ではあるが明瞭な形態差によって識別できることが分った(図 1、2、Ito et al. 2015)。

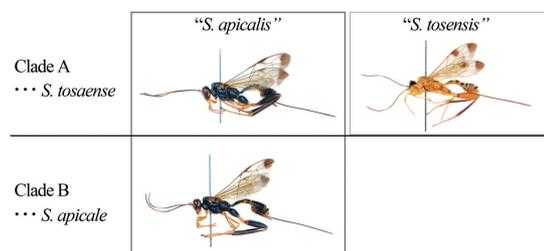


図 1. 分子情報の利用によって *Spilopteron* 属寄生蜂の分類学的混乱を解消した

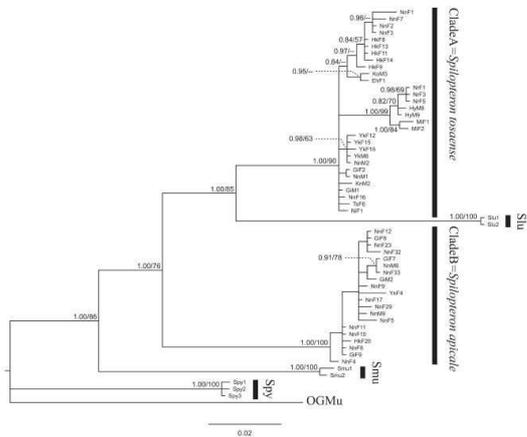


図2. *Spilopteron* 属5種の mtCOI に基づく分子系統

また、タマバ工科の寄生蜂であるコマユバチ亜科の *Bracon sunosei* は、ロシアの形態分類学者によって *B. asphondyliae* のシノニムとされていたが、ミトコンドリア DNA の解析結果から両者は明瞭に分化した独立種であることが判明した (Matsuo et al. 2016)。また、チョウ目害虫の有用な天敵寄生蜂として知られるコマユバチ亜科の *Habrobracon hebetor* と、そのシノニムとされてきた *H. brevicornis* が、ほとんど形態差のない独立種であることも明らかになった (Kittel & Maeto 2016)。

このように、分子情報の取得と比較は形態的種差の少ない寄生蜂の種分類には不可欠であり、とくに重要害虫の天敵寄生蜂類について再検討を急ぐ必要がある。その際には我々が開発した、標本を壊さずに DNA を抽出する手法が有用であろう (Miura et al. 2017)。

(2) チョウ目とカメムシ目の DNA バーコードを集積し、農業環境変動研究センターに証拠標本を整備した。その過程で重要害虫の種識別や遺伝的背景に関する新知見を得た。例えば、近年本邦にも侵入した害虫種アフリカシロナヨトウ (ヤガ科) にはアフリカ系統と日本産を含むアジア系統の間に相当な遺伝的分化のあることが明らかになった (図3、

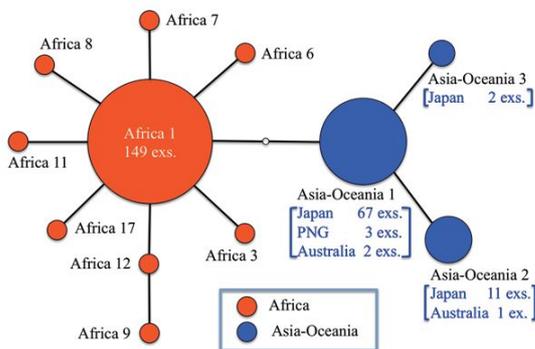


図3. アフリカシロナヨトウのミトコンドリア COI 領域のハプロタイプネットワーク

Yoshimatsu et al. 2014)。また、シイタケの新害虫ヨコハマセニジモンアツバ (ヤガ科) と既知のヤガ科害虫2種との DNA 識別法 (吉松・川島、2016) 及びアラゲキクラゲを食害する2種のヤガ科害虫種の DNA 識別法 (吉松ほか、2014) を開発した。害虫種を含む日本産マダラナガカメムシ科 *Nysius* 属の分類学的再検討を行い、形態情報に加えて DNA バーコード情報も利用して、1種と考えられていた種が実は2種であったことを明らかにし、また1新種を記載した (Nakatani 2015)。

農業環境変動研究センター (平成28年3月31日までは農業環境技術研究所) では、これまでにチョウ目約1,000件、カメムシ目約200件の DNA バーコードを取得した。それらを公開する昆虫インベントリーシステムはセキュリティ上の理由から現在休止中であるが、早々に再公開の予定である。

(3) 希少種ミヤマアカネと同属普通種の幼虫を識別する為に、COI 領域と ITS 領域の塩基配列をもとに種特異 PCR プライマーおよび制限酵素セットを設計した。その結果、ITS 領域についてはミヤマアカネを同属他種から確実に識別できるプライマーを作成できた (図4)、COI 領域については利用可能な種特異プライマーを作成することが出来なかった。COI 領域については、DNA 断片を種特異的に切断できる制限酵素セットを特定できたが特殊な制限酵素を用いるために実用的では無かった。得られた ITS 領域の種特異 PCR プライマーを利用して、同属種が混生する河川において希少種ミヤマアカネの幼虫の発育に伴う微細生息環境の嗜好性の推移を詳細に解明することに成功した (Higashikawa et al. 2016)。

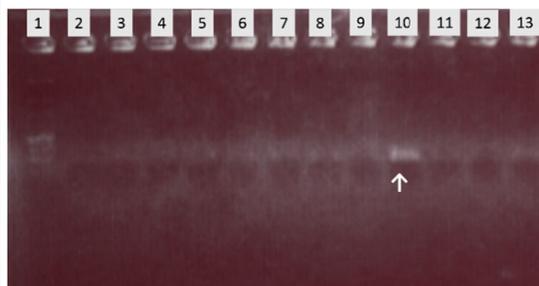


図4. ミヤマアカネの ITS 領域を標的にした PCR プライマーによるアカネ属13種の DNA 増幅の結果。10番目のミヤマアカネだけに特異的な増幅が見られる

このように、動物の DNA バーコードとして一般に普及しているミトコンドリア COI 領域の種間差は利用目的によっては十分ではなく、より進化速度の速い核 ITS 領域についても配列データを整備してゆく必要が示された。だが、トンボ目や小型寄生蜂など一部の分類群を除けば、多くの昆虫では ITS 領域の塩基配列をダイレクトシーケンス法によって解読することはきわめて困難であるこ

とが知られている。しかし NGS による配列解読が一般化すれば、その取得は容易になるだろう。ITS 領域は、例えば真菌類ではバーコード領域として広く利用されている信頼性の高い種識別領域である。動物全般に共通するユニバーサル PCR プライマーが知られており、昆虫を含む動物の DNA バーコードとして、その集積と利用を積極的に進めるべきであろう。

(4) 広食性捕食者の餌メニューを次世代シーケンシング NGS によって網羅的に同定する手法をほぼ確立した。これを野菜害虫の天敵であるタバコカスミカメ成虫の「野菜ハウス」と「天敵温存ハウス」における餌メニューの調査に応用して、その天敵調査研究への実用性を実証した。

サンプリング調査は高知県内の複数の野菜ハウスと天敵温存ハウスにおいて行った。それぞれのハウス内には、各種野菜類のほかタバコカスミカメの代替餌資源となるパンカー植物が植栽され、天敵温存ハウスでは殺虫剤の散布は極力抑えられていた。ハウス内においてタバコカスミカメ成虫を捕獲し、99%エタノールに浸けて持ち帰り、マイナス 25 の冷凍庫に保管した。その腹部を切り取り、外皮を除いて、消化器内容物から DNA を抽出した。それを動物の DNA バーコード領域(ミトコンドリア COI)のユニバーサルプライマーにより増幅し、塩基配列解読の精度を高めるためのフュージョンプライマー、サンプル識別のためのインデックス配列等を付加する複数回の PCR を行って得られたアンプリコンを、Illumina MiSeq によって解読した(図5)。その解読データを網羅的メタゲノミックバーコーディングシステム Claident (ver. 0.2.2016.07.05) によって解析・同定した。



図5 . NGS に供する PCR アンプリコンの基本構造

同定された消化管内容物には、タバコカスミカメ成虫による捕食標的として期待される害虫(コナジラミ科、アザミウマ科)を含む多種類の植物食性昆虫類(表1)のほかに、ヒメバチ科やコマユバチ科等の天敵寄生蜂(表2)が含まれており、おそらくは繭捕食による天敵間ギルド内捕食の状況が頻繁に生じているものと考えられた。また水域から飛来

表1 . タバコカスミカメの体内から同定された植物食性昆虫の科名。サイト2、4 - 6は天敵温存ハウス

	Sites	1	2	3	4	5	6	
ハエ目	ハモグリバエ科					○		害虫を含む
	ミギワバエ科				○			水域からの飛来虫?
カメムシ目	コナジラミ科					○		害虫を含む
チョウ目	ツガ科		○	○				害虫を含む
	シャクガ科		○				○	害虫を含む
	ヤガ科		○		○	○	○	害虫を含む
アザミウマ目	アザミウマ科					○		害虫を含む

表2 . タバコカスミカメ成虫の体内から同定された寄生蜂の科名。サイト2、4 - 6は天敵温存ハウス

	Sites	1	2	3	4	5	6	寄主
コマユバチ科			○	○	○	○	○	チョウ目など
ヒメコバチ科						○	○	ハエ目など
ヒメバチ科		○	○	○	○	○	○	チョウ目、ハエ目など
タマゴクロバチ科							○	昆虫、クモ類

するミギワバエ科なども捕食されており遺体食の可能性も示唆された。

雌雄成虫の餌リードの割合を比較すると雌における餌リードの検出率が圧倒的に高く(図6)、少なくとも成虫に限れば、雄よりも雌の方が活発に捕食活動を行い、動物餌に対する依存度合いが大きいことが示された。本種の野外における捕食行動の性差は、本手法を応用することによって初めて明らかになった。

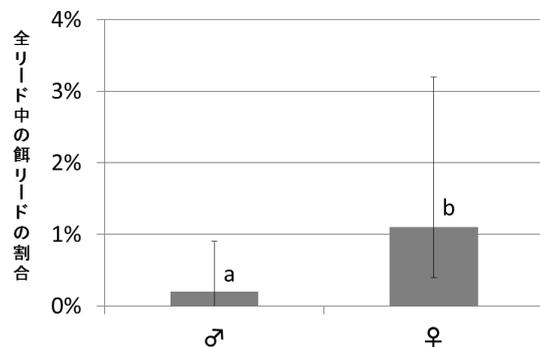


図6 . タバコカスミカメ成虫の体内から得られた全NGSリードに占める餌動物と同定されたリードの割合。なお、大部分のリードはカスミカメ自身のものであった

ここに至るまでに、消化管内容物からのDNA抽出や多数回の付加PCRの不安定さ、塩基配列に変異の少ないアンプリコンの正確な解読の難しさ、大量の捕食者自身のDNAの扱い、付加PCRによって大量に生じてしまうキメラ配列の除去など、多くの問題点について対処策を講じた(南部ら 2015、2016)。今回はミトコンドリアCOI領域を対象としているが、この領域のユニバーサルプライマーは動物の系統群によってPCR効率が異なるという問題点が指摘されている。より安定したPCR増幅が期待できる核ITS領域を対象とするシステムも、本研究におけるノウハウの蓄積によって構築は容易になった。

NGSを利用した本同定システムを調査現場に応用することによって、此れまでは困難であった農林生態系における捕食者-被捕食者系の詳細な解明と量的調査が容易になり、天敵類の活動実態について理解が深まるものと考えている。

### 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23件)

Miura K., Higashiura Y., Maeto K., Evaluation of easy, non-destructive methods of DNA extraction from minute insects, *Applied Entomology and Zoology*, 査読有, 52, 2017, 349-352  
DOI: 10.1007/s13355-017-0481-4

Higashikawa W., Yoshimura M., Yagi T., Maeto K., Microhabitat use by larvae of the endangered dragonfly *Sympetrum pedemontanum elatum* (Selys) in Japan, *Journal of Insect Conservation*, 査読有, 20, 2016, 407-416  
DOI: 10.1007/s10841-016-9874-x

Matsuo K., Uechi N., Tokuda M., Maeto K., Yukawa J., Host range of braconid species (Hymenoptera: Braconidae) that attack Asphondyliini (Diptera: Cecidomyiidae) in Japan, *Entomological Science*, 査読有, 19, 2016, 3-8  
DOI: 10.1111/ens.12167

Nakatani Y., Revision of the lygaeid genus *Nysius* (Heteroptera: Lygaeidae: Orsillinae) of Japan, with description of a new species, *Entomological Science*, 査読有, 18, 2015, 435-441  
DOI: 10.1111/ens.12141

Ito M., Watanabe K., Maeto K., Molecular evidence resolving the confusion of two species of *Spilopteron* (Hymenoptera: Ichneumonidae) caused by marked geographical colour variation, *European Journal of Entomology*, 査読有, 112, 2015, 543-556  
DOI: 10.14411/eje.2015.068

Yoshimatsu S., Watabiki D., Nishioka T., Nakamura H., Yamaguchi T., Takesaki K., Shimatani M., Uesato T., Additional information on DNA barcoding of the African armyworm, *Spodoptera exempta* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae) from Japan, *Lepidoptera Science*, 査読有, 65, 2014, 89-93

前藤 薫, DNA バーコーディング: 生物を同定するための新しい道具, 森林防疫, 査読無, 63, 2014, 74-79

Tsutsui Y., Maeto K., Hamaguchi K., Isaki Y., Takami Y., Naito T., Miura K., Apomictic parthenogenesis in a parasitoid wasp *Meteorus pulchricornis*, uncommon in the haplodiploid order Hymenoptera, *Bulletin of*

*Entomological Research*, 査読有, 104, 2014, 307-313  
DOI: 10.1017/S0007485314000017

[学会発表](計 31 件)

Maeto K., Fujie S., Umemoto H., Tsutsui, Y., Genetic structure of coexisting sexual and asexual populations of the parasitoid wasp *Meteorus pulchricornis* (Hymenoptera: Braconidae) that attacks lepidopteran larvae, XXV International Congress of Entomology, 2016.9.30, Orlando (USA)

Kittel R., Maeto K., Solving the *Habrobracon hebetor* species complex, XXV International Congress of Entomology, 2016.9.30, Orlando (USA)

南部隆宏、小川 遼、前藤 薫、三浦一芸、NGS を用いた捕食者餌メニュー分析手法の改善、日本昆虫学会第 76 回大会・第 60 回日本応用動物昆虫学会大会合同大会、2016.3.28、大阪府立大学(大阪府)

東川 航、吉村真由美、八木 剛、前藤 薫、里山の希少種ミヤマアカネの幼虫による微小生息地利用の分子生態学的解明、日本昆虫学会第 76 回大会・第 60 回日本応用動物昆虫学会大会合同大会、2016.3.27、大阪府立大学(大阪府)

山口恭太、前藤 薫、ギンケハラボソコムバチにおける寄主 DNA 残存の確認、日本昆虫学会近畿支部 2015 年度大会、2016.1.10、大阪府立大学 I-site なんば(大阪府)

南部隆宏、小川 遼、前藤 薫、三浦一芸、NGS を用いた捕食者餌メニュー分析の問題点、日本昆虫学会第 75 回大会、2015.9.20、九州大学(福岡県)

東川 航、吉村真由美、八木 剛、前藤 薫、外部形態および分子マーカーを用いたミヤマアカネ幼虫の同定手法の開発、日本昆虫学会近畿支部 2014 年度大会、2014.12.14、大阪市立自然史博物館(大阪府)

Ito M., Watanabe K., Maeto K., Molecular evidence resolves the confusion involving two ichneumonid species of *Spilopteron* (Hymenoptera) caused by marked geographical color variation, VIII International Congress of Hymenopterists, 2014.7.20-25, Cusco (Peru)

前藤 薫、捕食・被食系分析ツールとし

での DNA バーコーディングの可能性、日本学術会議公開シンポジウム「昆虫分類学の新たな挑戦」、2013.7.20、九州大学(福岡県)

東川 航 (HIGASHIKAWA Wataru)  
南部 隆宏 (NANBU Takahiro)  
山口 恭太 (YAMAGUCHI Kyota)  
KITTEL Rebecca

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前藤 薫 (MAETO, Kaoru)  
神戸大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：80346238

### (2) 研究分担者

吉松 慎一 (YOSHIMATSU Shin-ichi)  
独立行政法人農業環境技術研究所・上席研究員 (H28 から国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター・ユニット長)  
研究者番号：10354127

三浦 一芸 (MIURA Kazuki)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・近畿中国四国農業研究センター・主任研究員 (H28 から国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・西日本農業研究センター)  
研究者番号：10355133

小西 和彦 (KONISHI Kazuhiko)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・主任研究員 (H26 から愛媛大学・ミュージアム・教授)  
研究者番号：90414747

### (3) 連携研究者

吉村真由美 (YOSHIMURA Mayumi)  
独立行政法人森林総合研究所・関西支所・主任研究員  
研究者番号：40353916

中谷 至伸 (NAKATANI Yukinobu)  
独立行政法人農業環境技術研究所・主任研究員 (H28 から国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター・上級研究員)  
研究者番号：30354088

吉武 啓 (YOSHITAKE Hiraku)  
独立行政法人農業環境技術研究所・研究員 (H28 から国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター・主任研究員)  
研究者番号：50517662

### (4) 研究協力者

伊藤 誠人 (ITO Masato)  
小川 遼 (OGAWA Ryo)