

ミバエ類の分子分類

独立行政法人農業生物資源研究所

農林水産省横浜植物防疫所

むら
なか
中じ
路
はら
原まさ
しげ
雅
重ひこ
ひと
彦
仁

はじめに

双翅目ミバエ科 (Tephritidae) には、500 属 4,500 種もの昆虫が知られ (HARDY and FOOTE, 1989 など), 国際的な植物検疫上の最重要害虫とされるものが多数含まれる。それらの害虫種の多くは、これまでに様々な地域に分布拡大したことが知られており、近年においても、ハワイ、スリナム、エジプトなどで新たな侵入・定着の事例が報告されている (BARGAS and NISHIDA, 1985; DREW and HANCOCK, 1994; TAIHAR, 1998)。日本でも、空港や港において手荷物を中心とする輸入農産物から頻繁にミバエ類が検出されており (城島, 1998), 国内農産物の保護のためには、確実なミバエ類の検出と同定、それに基づく迅速な対応が不可欠となっている。

しかしながら、ミバエ科昆虫には外部形態が酷似した近縁種のグループが多数含まれており、またメス成虫の形態的特性が不明なものも多いため、種の識別や同定が困難な場合が少なくない。さらに植物検疫の現場では、同定が困難な卵や幼虫などが検出されることも多い。一方、ミバエ科昆虫では、種や種レベル以上の分類区分そのものの不確実さについても指摘されている (DREW, 1989)。これまでに多くの同種異名や異種同名が報告されており、またそれぞれの種が所属する分類群が頻繁に変更されてきた経緯があるなど、外部形態に基づく分類研究の難しさを反映している。

これらの問題を解決するために、DNA レベルでの変異を利用した種の識別や系統解析などの研究が試みられている。最近では DNA における種内変異を検出し、移動分散などを解析するためのマーカーとして利用する試みもある。今のところ、植物検疫の現場で利用できるものは限られているが、基礎的な情報は徐々に蓄積されている。以下に、それらの研究の概要と問題点などを紹介する。

I 分子系統解析

ミバエ類を対象として DNA 中の特定領域の塩基配列

Molecular diagnostics of fruit flies (Diptera, Tephritidae).
By Masahiko MURAJI and Shigehito NAKAHARA

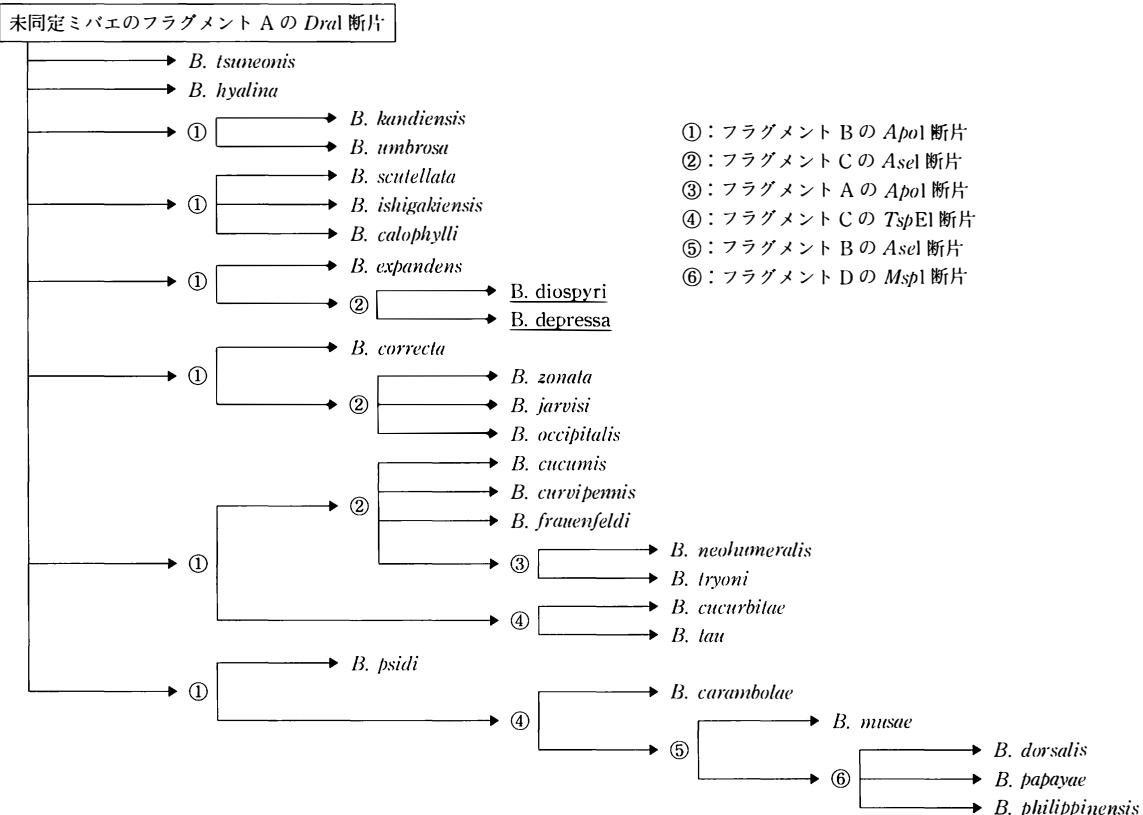
(キーワード: ミバエ, 分子分類, 分子系統解析, 種内変異)

を多数の種間で比較解析し、種や様々なグループ間の系統関係を推定する研究が実施されている。このような研究は、PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法による DNA の增幅とオートシーケンサーによる塩基配列読みとりの自動化によって、様々な分類群を対象に、急速に進行している。しかしながら、DNA の分子進化速度や塩基置換の特性は、DNA 領域によって大きく異なるため、解析の対象となる分類群や種の範囲に応じた適切な DNA 領域とデータ解析法を用いる必要がある。

PCR で增幅される DNA は、反応に使用する PCR プライマーによって決定される。これは 20~30 塩基の短い合成 DNA で、一般には、増幅する DNA の両端の塩基配列に対応する 2 種類を使用する。PCR プライマーの作成には様々な配慮を必要とするが (三橋, 1997), 広範な分類群を代表する種について相同性の高い塩基配列を選んで作成すれば、DNA 情報の得られていない種からも DNA を増幅できることが多い (SIMON et al., 1994)。これらを用いれば、様々な種の塩基配列を容易に決定できる。

ミバエ類の分子系統解析に用いられてきた DNA としては、核の 28 S rRNA 遺伝子 (rDNA), グルコース 6 リン酸脱水素酵素 (G 6 PDH) 遺伝子のエクソン (アミノ酸配列をコードする部分), ミトコンドリア DNA (mtDNA) のチトクロームオキシダーゼサブユニット II 遺伝子 (COII), 16 S rDNA, 16 S rDNA および 12 S rDNA を含む DNA 断片などがある。しかし、初期の研究では、対象となる分類群と解析する DNA 領域が必ずしも適合しているとは言えず、得られた結果と外部形態にもとづく分類区分との不一致が、技術的問題によるものか従来の分類法に問題があるのか判然としない例もある。

比較的高い分類レベルのグループ間の解析に適した DNA 領域として、G 6 PDH 遺伝子のエクソンが有望視されている。SOTO-ADAMES (1994) らは、リンゴミバエ類を中心とする様々な昆虫を用いた解析で、本遺伝子は、近縁種間の違いは検出できないが、属、科および目などの系統解析に適した分子進化特性をもつことを示している。筆者らの *Bactrocera* 属を用いた解析でも、亜属間の関係に関し信頼性の高い結果が得られている (村

図-1 ミトコンドリア DNA フラグメントの PCR-RFLP による *Bactrocera* 属ミバエ類の同定法

路ら, 2000)。

SMITH and BUSH (1997) は, mtDNA の COII の塩基配列を用いた解析で, リンゴミバエ属が単系統群でない可能性があることを示している。しかし, この解析では, 近縁種間の関係は高い信頼性を示したが, 属内の類縁の遠いグループ間の関係は正しく推定できなかった。

mtDNA の 16 S rDNA については, HO-YEON HAN らの研究により, 非常に幅広いミバエ類について塩基配列が得られている (HAN and MCPHERON, 2000 など)。比較的高いレベルの分類区分の有効性やグループ間関係の解析が行われているが, DNA 中の塩基組成のかたよりなど系統解析を行う上での問題点も指摘されている。筆者らの行った 16 S rDNA と 12 S rDNA の両方を含む約 1,400 塩基対の mtDNA 断片による *Bactrocera* 属の系統解析では, データ解析法の違いに関わらず, 再現性および信頼性の高い結果が得られている (MURAJI and NAKAIHARA, 2001)。しかし, *Bactrocera*, *Gymnodacus* および *Paratridacus* などの亜属の区分に関しては, 外部形態による従来の研究結果とは異なる部分が多く, 他の DNA 領域を用いた解析を併用することで, それらの分

類区分の有効性を検討する予定である。現在のところ, ミバエ類の分子系統解析は, 個々の研究者によって個別に行われておらず, 解析に適した DNA 領域などに関する合意は得られていない。今後は, 昆虫標本や DNA 試料の入手などを含め, 多くの研究者の連携が不可欠である。

II 分子分類

種間での DNA 塩基配列の違いを, ミバエの識別や同定に利用する方法としては, 塩基配列そのものを調べることのほか, 電気泳動によるバンドパターンの違いとして検出する様々な方法が用いられている。一般に, これらの方法は発育ステージや性に関わらず, 同一の基準を様々な試料に適用できる点で, 従来の方法にない優れた特性を備えている。最近では, 作業の簡便さから, 分子系統解析と同様に, PCR で增幅された DNA の一部を用いる方法が広く用いられている。これらは, 極めて微量の DNA を, 肉眼で観察可能な量にまで増幅できるため, 昆虫体のごく一部, 乾燥標本あるいは長期間放置された死体等を用いた解析に適用できる場合が多い。

最も簡便な手法は RAPD-PCR 法である。この方法では、任意の塩基配列をもった 10~15 塩基程度の短い PCR プライマーを 1 種類だけ使用する。特異性の低い条件下で DNA 増幅を行うことで、電気泳動によって多数のバンドからなる複雑なバンドパターンが検出される。ミバエでは、チチュウカイミバエなどの幼若ステージの識別に用いた例がある (SONVICO et al. 1996)。この方法は、PCR プライマーを使い分けることで、系統や個体間の変異を検出できる場合がある (SCHNELL et al. 1996)。しかし、結果の再現性を確保するには、あらかじめ好適な PCR プライマーを厳選しておく必要がある。

PCR-RFLP 法を利用した例としては、rDNA のスペーサー領域を用いた研究がある。この方法では、制限酵素で処理した PCR 増幅 DNA の電気泳動によるバンドパターンを調べる。制限酵素は DNA 中の特定の短い塩基配列を認識し DNA を切断するので、認識部位の塩基における種間差は DNA 断片の長さや数の違いとして検出される。ARMSTRONG et al. (1997) は、4 種類の制限酵素を用いることで、ニュージーランドへの侵入が危険視される多くのミバエ類の識別に成功している。

多数の種について DNA の塩基配列が明らかであれば、それらの比較から、様々な制限酵素の認識部位や種の識別に利用可能な酵素を推定できる。DDBJ (日本 DNA データバンク) 等の国際的な DNA 塩基配列のデータベースには、現在までに数百件を越えるミバエ類の塩基配列が登録されており、それらの目的に活用できる。図-1 は、PCR-RFLP による *Bactrocera* 属の分類法の模式図で、分子系統解析に用いた mtDNA の塩基配列 (MURAJI and NAKAHARA, 2001) などからバンドパターンを推定し作成したものである。ここでは約 1,400 塩基対の領域内の四つの部分について、必要な部分を PCR しバンドパターンを調べることで、それぞれの種を順次識別していく方法がとられている (村路・中原, 2001)。このような識別法の元となる塩基配列を、インターネットを通じて、データベースから入手すれば、個々の研究者の事情にあわせた方法にアレンジできる。また、別の種について新たに DNA 塩基配列が得られた場合にも、それらと比較解析することで、容易に新しい識別・同定法を再構築することができる。

III 種内変異の検出

ミバエ科害虫の大きな特徴として急速な分布域の拡大があげられる。種内での個体変異や集団に特異的な遺伝的変異が検出できれば、このような解析のための遺伝的

マークとして利用できる。これまでに検討されたものとしては、RAPD-PCR、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子やアクチン遺伝子、G 6 PDH 遺伝子などのイントロン (アミノ酸配列をコードしない部分)、mtDNA の PCR-RFLP、マイクロサテライト DNA の多型などがある。

GASPARICH et al. (1997) は、世界の 100 以上の個体群を用いた mtDNA の PCR-RFLP 解析で、アメリカへのチチュウカイミバエの侵入源についての詳細な検討を行っている。HE and HAYMER (1999) による G 6 PDH のイントロンを用いた同様の解析では、カリフォルニアへのチチュウカイミバエの侵入源としてグアテマラの可能性が高いことが示されている。

クイーンズランドミバエでは、マイクロサテライト DNA を用いた集団の遺伝子構成の解析が進められている (KINNEAR et al., 1998)。この DNA では数塩基程度の短い塩基配列が多数反復しており、その反復数に著しい個体変異が見られる。それらの変異は、電気泳動によって PCR 産物そのもののサイズの違いとして検出できる。YU et al. (2000) の予備的な解析では、オーストラリアの個体群は、いくつかのグループに分割されること、東海岸では遺伝子頻度に連続的な変異があることなどが明かとなっている。

かつて南西諸島と小笠原諸島に分布していたミカンコミバエは、18 年にわたる根絶事業の結果、1985 年に完全に我が国から根絶された。しかし、沖縄県の久米島などでは、その後の侵入警戒調査において、毎年のようにミカンコミバエと見られるミバエが発見されている (上野, 1998; 小橋川, 2000; 2001)。これらは、海外から飛来したものと考えられるが、その飛来源や経路などは明らかでない。筆者らの mtDNA の A+T リッチャージョンを用いた PCR-RFLP 解析では、久米島や石垣島でトラップされた集団の遺伝的組成は、台湾やインドシナなどの東南アジア、特にフィリピンのものとは大きく異なること、また集団の遺伝的多様性が著しく低いことなどが分かっている (中原ら, 2000; 2001 b)。今後は中国大陸の試料との詳細な比較が必要である。

IV ミカンコミバエ種群の同定

東南アジアに分布し、日本での植物検疫上の重要グループで、外部形態による識別が困難なものにミカンコミバエ種群がある。この種群には、少数種のみが知られていたが、DREW and HANCOCK (1994) などの新種記載の結果、今日では数十を越える種が認められるようになった。これらは同定が困難な場合が多く、寄主範囲なども

十分明かでないため、植物検疫の現場ではミカンコミバエ種群として取り扱っている。しかし、本グループで農業害虫とされているものはミカンコミバエほかの数種にすぎず、厳密な検疫のためには、種までの同定が望ましい。

筆者らの主要害虫種を用いた解析では、*B. occipitalis*, *B. carambolae* および *B. kandiensis* の同定は容易であるが、ミカンコミバエ、*B. philippinensis* および *B. papayae* では mtDNA の PCR-RFLP パターンが共通する個体がしばしば検出されている（中原ら、2000；村路ら、未発表）。この場合、*B. occipitalis* と *B. philippinensis* はフィリピン、*B. carambolae* と *B. papayae* はおもにインドネシアなどに分布するため、地域を限定した種の識別には支障はないものの、分布が重複する地域や新たに分布域が拡大したと思われる地域からのサンプルの同定は困難である。

ミカンコミバエ種群の種の識別や同定を困難にしている要因として、しばしば種間交雑が問題とされてきた。圃場や検疫現場では、異なった2種間の中間的な形態を示す個体が採集されているし、例えばミカンコミバエと *B. papayae*, *B. papayae* と *B. philippinensis* および *B. carambolae* などの間では、飼育条件下で容易に交尾や交雫が生じる（YONG, 1995; IWAIIZUMI et al., 1997）。筆者らの野外採集個体を用いた解析では、単一の個体でありますながら、mtDNA と核のDNA で異なった種に属する塩基配列をもつ場合があることが明らかとなっている。また核DNAのイントロンには複数の種に由来すると思われる塩基配列が交互に存在する場合があり、種間での交雫と遺伝的組み換えによって生じたものと考えられる（村路ら、2000）。これらの現象は野外での種間交雫を証拠づけるものであり、詳細な解析を実施することで、現行の種の区分法の妥当性を検証できると考えている。

おわりに

ミバエ科昆虫では、膨大な数の種が一部を除く全世界に分布する。分類等の研究において、個々の研究者が関連する全ての種の標本を収集し比較解析することは困難な場合が多かった。これに対し、DNAの塩基配列は、国際的なDNAデータベースに登録されるため、全世界の研究者がインターネットを通じて容易に入手でき、様々な方法による解析に利用することができる。今後さらに多くの種についてデータが蓄積されることにより、

ミバエ類の系統関係の全体像が解明されるだけでなく、これまで地域ごとに行われてきた分類研究の弊害を軽減し、同名異種や異名同種などの検出や防止に威力を發揮すると思われる。さらに、同じデータは、PCR-RFLPによる種の識別や同定法の開発にも利用でき、植物検疫や害虫防除技術の改善に大きく貢献するものと考えられる。

引用文献

- ARMSTRONG, K. F. et al. (1997) : Bull. Entomol. Res. 87 : pp. 111~118.
- DREW, R. A. I. (1989) : Memoirs of the Queensland Museum 26 : pp. 1~521.
- and D. L. Hancock (1994) : Bull. Entomol. Res. Suppl. 2 : pp. 1~68.
- GASPARICH, G. E. et al. (1997) : Ann. Entomol. Soc. Am. 90 : pp. 790~797.
- HAN, H. Y. and B. A. MCPHERON (2000) : Fruit Flies (Tephritidae) : Phylogeny and Evolution of Behavior. CRC Press, Florida, pp. 115~132.
- HARDY, D. E. and R. H. FOOTE (1989) : Catalog of the Diptera of the Australasian and Oceanian regions, Bishop Museum Press, Honolulu, pp. 502~531.
- HE, M. and D. S. HYMER (1997) : Ann. Entomol. Soc. Am. 90 : pp. 825~831.
- —— (1999) : Mol. Ecol. 8 : pp. 1247~1257.
- IWAIZUMI, R. et al. (1997) : Ann. Entomol. Soc. Am. 90 : pp. 664~666.
- 城島徳重 (1998) : 名古屋植物防疫月報 433 : p. 2.
- KINNEAR, M. W. et al. (1998) : Mol. Ecol. 7 : pp. 1489~1495.
- 小橋川嘉一 (2000) : 那覇植物防疫情報 117 : p. 574.
- (2001) : 同上 122 : p. 594.
- 三橋将人 (1997) : PCR法最前線—基礎技術から応用まで—, 共立出版, 東京, pp. 33~39.
- 村路雅彦ら (2000) : 応動昆講要 44 : p. 153.
- MURAJI, M. and S. NAKAHARA (2001) : Insect Mol. Biol. 印刷中.
- 中原重仁 (2001) : 同上 45 : p. 169.
- 中原重仁ら (2000) : 植防研報 36 : pp. 37~41.
- (2001 a) : 同上 37 : pp. 69~73.
- (2001 b) : 応動昆講要 44 : p. 153.
- SCHINELL, R. J. et al. (1996) : Ann. Entomol. Soc. Am. 89 : pp. 122~128.
- SIMON, C. et al. (1994) : Ann. Entomol. Soc. Am. 87 : pp. 651~701.
- SMITH, J. J. and G. L. BUSI (1997) : Mol. Phylogenetic Evol. p. 33~43.
- SONVICO, A. et al. (1996) : J. Economic Entomol. 89 : pp. 1208~1212.
- SOTO-ADAMES, F. N. et al. (1994) : Ann. Entomol. Soc. Am. 87 : pp. 723~736.
- TAIIAR, M. (1998) : Arab and Near East Plant Protection News Letter 27 : p. 30.
- 上野貴美恵 (1998) : 那覇植物防疫情報 110 : p. 542.
- VARGAS, R. I. and T. NISHIDA (1985) : J. Econ. Entomol. 78 : pp. 1311~1314.
- YONG, H. S. (1995) : Bull. Entomol. Res. 85 : pp. 431~435.
- YU, H. et al. (2000) : Area-wide control of fruit flies and other insect pests. Penerbit Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia, pp. 497~508.