

天敵利用における DNA マーカーの活用と将来展望

農業生物資源研究所 ^{ひの}日 ^{もと}本 ^{のり}典 ^{ひで}秀

はじめに

天敵を利用した、害虫の生物的防除による作物の栽培面積は年々拡大しており、天敵の使用量もそれに伴って増大している。1995年に販売開始されたチリカブリダニとオンシツツヤコバチを皮切りに、次々と新たな天敵が生物農薬として登録され、現在では16種の天敵昆虫・ダニ類が利用できるようになっている。また、これまでに登録された多くの生物農薬は海外からの導入種であるが、近年はタイリクヒメハナカメムシやアリガタシマアザミウマといった国産の天敵も登録されるようになった。

しかし、天敵利用による害虫防除はすべての場面において成功を収めているわけではない。その理由は、天敵放飼のタイミングを誤ったり、放飼した環境が必ずしも天敵に適したものではなかったりといったことが考えられる。作物-害虫-天敵という生物3種の相互作用に気象要因など様々な要因が重なりあった天敵利用は不安定な要因が多く、成功・失敗の原因を探ることは難しい。こうした天敵利用における不安定要因の中には、遺伝的な問題も多く含まれている。DNAマーカーを用いれば、そうした問題を解決できるのではなからうか。本稿では、天敵利用におけるDNAマーカーの利用の現状と可能性について論じたい。

I DNAマーカーの種類

天敵として有用な形質は、DNA上にコードされている遺伝子によって決定されている。これまでも形態形質をマーカーとしたりアロザイムなどのマーカーを用いる研究はあったが、形態形質は環境要因による変動が大きく、タンパク質であるアロザイムは解析のための試料の保存が難しい。また、これらの方法は、1個体で解析できる遺伝子座の数が限られているし、遺伝子座ごとに分析方法が異なっているため煩雑である。一方DNAマーカーは、いったん試料を調整すれば長期保存も可能であり、理論的には1個体から数百以上の遺伝子座を解析することができるため、遺伝的マーカーとしては最も望ま

しいと考えられる。

では、DNAマーカーには、どのようなものがあるだろうか。微小な昆虫種では、PCR (Polymerase Chain Reaction; ポリメラーゼ連鎖反応) という方法が必須である。これは、ある遺伝子特異的に設計されたDNA塩基配列を元にした20塩基程度の短い長さのDNA配列 (primer; プライマー) を起点として伸長反応を行うことによって、微量なDNAを指数関数的に増幅させる技術である。これによって、微小な昆虫種でも電気泳動などの一般的な方法でDNA多型を解析することが可能になった。広範な昆虫種で利用可能なプライマー情報が提供されたこともあり (SIMON et al., 1994), 昆虫の分野でもPCR法は一気に普及した。ここでは、そうした方法の一部を紹介する。

1 PCR-RFLP

制限酵素 (Restriction Enzyme) と呼ばれるDNA切断酵素がある。これは、あるDNA塩基配列を認識して切断するものであり、認識する部位によって様々な種類の酵素が知られている。ある遺伝子領域を制限酵素で切断した場合、その認識部位に種や系統によって違いがあれば、ある系統では切断され、ある系統では切断されないという差が現れる。これをRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; 制限酵素断片長多型) という。PCR-RFLPは、PCRによって増幅した遺伝子領域を制限酵素で切断後、電気泳動してその差を検出する技術である。これによって、簡便に種や系統の違いを見分けることができる。

2 マルチプレックスPCR

通常のPCRは1組2本のプライマーを用いて、一つの領域だけを増幅する。マルチプレックスPCRでは3本以上のプライマーを同時に用いてPCRを行い、複数の領域を増幅する。同時に複数のPCR反応が起こるので反応同士が競合してうまく増幅しないこともあるため条件設定が難しいが、条件を確定させることができれば、一度に複数の領域をチェックでき、非常に有効な方法である。天敵での利用例はまだ少ないが、我が国におけるヒメハナカメムシ類の識別で有効に利用されている (図-1)。

3 シークエンス

これは文字通りDNA塩基配列そのものを解読することで、近年のオートシーケンサーの普及によって技術

Application of DNA Markers in Biological Control of Arthropods.
By Norihide Hino moto

(キーワード: 天敵, DNAマーカー, 種の同定, 系統識別, 品質管理, モニタリング)

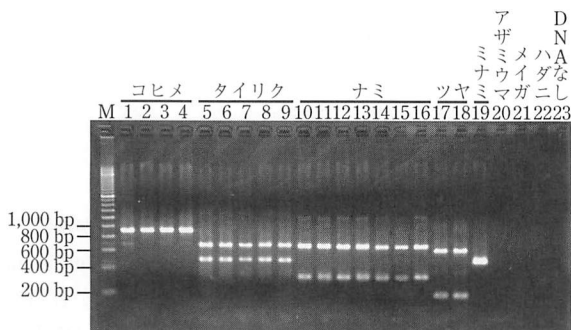


図-1 日本産ヒメハナカメムシ5種のマルチプレックスPCRによる識別

M：分子量マーカー（200 bp ラダー）、1～4：コヒメハナカメムシ、5～9：タイリクヒメハナカメムシ、10～16：ナミヒメハナカメムシ、17～18：ツヤヒメハナカメムシ、19：ミナミヒメハナカメムシ、20：ミナミキイロアザミウマ、21：スジコナダラメイガ、22：カンザワハダニ、23：ネガティブ・コントロール。各レーンは雌成虫1個体による。ヒメハナカメムシ類はそれぞれのレーンで異なる地理的系統を用いた。ヒメハナカメムシ類5種を明確に識別できるとともに、被捕食者は検出されなかったことから、確実に捕食者であるヒメハナカメムシ類の結果であることがわかる。HINOMOTO et al., 2004 より改変。

的にはさほど困難ではなくなってきた。上述のRFLPは制限酵素認識部位の多型しか検出できないが、この方法ではどの塩基に多型があっても検出可能で、最も多型検出能力が高いといえる。しかしコスト（手間と費用）がかかるため、多くの個体数を扱うには向いている方法とはいえない。しかし、系統関係を推定したり、新たなマーカーを作出するには必須の方法である。

4 マイクロサテライト

マイクロサテライトとは、単純なDNA塩基配列が繰り返し現れる領域（例えば、ACACAC…やACCACACC…など）である。この繰り返しの回数は種内で高頻度で多型が見られ、個体群レベルや個体レベルでの解析に非常に適している。マイクロサテライトマーカーの作成は手間がかかるが、近年は比較的作成が簡便になってきており（ZANE et al., 2002）、天敵での報告例も増えてきた（例えば、BAKER et al., 2003；HUFBAUER et al., 2004）。今後、野外個体群の調査を行うには威力を発揮するだろう。

II 種の同定

天敵・害虫とも、野外や圃場には形態的に酷似した近縁種が分布していることが多い。そして、それら近縁種は生態的特性が異なることが多く、正確に同定しなくて

表-1 PCR-RFLPを用いた天敵の種の識別・同定法の研究例

属	遺伝子領域	文献
<i>Trichogramma</i> (寄生バチ)	核 ITS2	SILVA et al. (1999)
<i>Trichogramma</i> (寄生バチ)	ミトコンドリア CO2	BORGHUIS et al. (2004)
<i>Peristenus</i> (寄生バチ)	ミトコンドリア CO1	TILMON et al. (2004)
<i>Diadegma</i> (寄生バチ)	核 ITS2	WAGENER et al. (2004)
<i>Macrolophus</i> (カスミカメムシ)	ミトコンドリア 16S	PERDIKIS et al. (2003)
<i>Orius</i> (ヒメハナカメムシ)	核 ITS1, ミトコンドリア CO1	MURAJI et al. (2004)

は適切な害虫防除を行うことはできない。また同定に用いる性やステージが限られていることも多い。本来は形態学的に同定することが不可欠であるが、種特異的なDNAマーカーを利用することで多数個体を簡便に識別することが可能となる。PCR法の普及により、かつては困難だった微小な昆虫種でもDNA多型の検出が可能となり、多くの天敵種の同定のためのマーカーが主としてPCR-RFLPによって開発されるようになった(表-1)。

III 寄主の検出

寄生バチなど寄生者、特に内部寄生する天敵の、野外での寄生率調査は困難なことが多い。通常は実験室内に持ち帰り寄主を解剖したり、飼育して寄生者の羽化を待つ。寄生者では検出可能であるが寄主では検出されない寄生者特異的マーカーがあれば、寄主をまるごとDNA解析に用いることによって、寄生の有無を調査することができる（ZHU and WILLIAMS, 2002）。

IV 被捕食者の検出

広食性の捕食者の餌種に対する選好性は、実験室内の選好性実験で調査されることが多い。しかし、実際に多種の餌種が存在する群集環境下で、どの種を捕食しているかを知ることは困難である。また、特定の害虫種をどの天敵が主に捕食しているかを調査することも困難である。これまでもELISAなどの手法を用いて捕食者体内から被捕食者を検出する試みはあったが（例えば、HAGLER and DURAND, 1994）、DNAマーカーを用いて検出することも可能になってきた（AGUSTI et al., 2000；SYMONDSON, 2002；HARPER et al., 2005）。

V 品質管理

天敵を生物農薬という「商品」として販売するとなる

と、その品質の安定性が求められる。こうした品質管理に重要な 4 要素 (BIGLER, 1989) の一つとして集団の遺伝的組成があげられる。飼育集団に限られた野外集団から創設されること、飼育中にびん首効果や遺伝的浮動の影響が起ること、飼育条件に適した遺伝子型が予期せずに選抜されてしまうこと、そして近親交配の影響が起ることなどによって、遺伝的組成が変化したり多様性が減少したりする。このような状況では、飼育集団の遺伝的組成が野外集団とかけ離れたものになり、野外に放飼しても期待通り害虫防除を行えなくなる可能性がある。

遺伝的マーカーなしに品質管理をするには、飼育集団から適宜サンプリングを行い、天敵として有用な形質を測定しなくてはならない。しかし、通常そのような形質は捕食量・寄生率、増殖能力、移動分散能力、休眠性など、測定に手間と時間がかかるものが多い。特定の形質、例えば非休眠性や薬剤抵抗性などに対応した遺伝的マーカーが得られれば、定期的に飼育集団からサンプリングを行い、マーカーの有無を調べればその遺伝子がきちんと飼育集団中に保持されているか検証可能である。また、有用形質をもった系統を育種するという観点からすれば、煩雑な形質測定実験を毎世代繰り返さなくとも、そのマーカーを有する個体の後代だけ飼育していけば簡便に有用系統の選抜が可能となる。

ただし、実際に有用形質をつかさどる遺伝子そのものを単離することは、分子生物学的解析がほとんど進んでいない天敵では、すぐには難しい。当面は、遺伝的にリンクした他のマーカーや、育種され確立された系統に特異的なマーカーを用いて検証していくことになるだろう。

また、昆虫類の飼育を長期間続けていると増殖が悪くなる現象はよく知られており (van LENTEREN and WOETS, 1988)、びん首効果や遺伝的浮動により、飼育集団中の遺伝的多様性が減少することに伴い近交弱勢によって増殖が悪くなるのではないかと考えられる。生物農薬として天敵を増殖する過程では通常限られた個体数から増殖を開始するため、こうした懸念は十分ありうることである。これまでそれを証明する術はなかったが、DNA マーカーを用いることで遺伝的なバックグラウンドを明らかにすることができるようになり、確実に近交弱勢を防止できるような飼育方法をとることができるようになる。

VI 系統識別

1 放飼後のモニタリング

近年は外来種が国内の生態系に及ぼす影響が懸念され、在来種のほうが好まれる傾向にある。特定外来生物法の制定もあり、今後在来天敵の利用はますます増加するであろう。一般に生物的防除の成否はその天敵種の放

飼後の個体数で調査することが多い。しかし、在来種による生物農薬では、その防除後に残存する個体が生物農薬由来のものなのか野外にいる個体の移入によるものなのかを明らかにすることはできない。DNA マーカーを用いて生物農薬に特異的なマーカーの有無を調査すれば、その個体が生物農薬由来かどうかを明らかにすることが可能である。これによって、天敵農薬放飼の効果の有無を定量的に評価することが可能となる。実際に、遺伝子組換えカブリダニの放飼実験で DNA マーカーを用いたモニタリングが行われたが (WHITTEN and HOY, 1999)、こうした取り組みは一般の生物農薬でも有効であろう。

2 品質管理への応用

今後は有用形質を選抜した優良系統の育成も行われると考えられるが、生物である天敵農薬は入手した者が増殖することも可能である。しかし育成にかけたコストの面から、メーカーの立場としてはそれは避けたい。遺伝的マーカーを用いればメーカー特異的な「商品タグ」としても機能し、他者がその天敵を増殖して販売することに対する防衛策ともなりえるであろう。

VII 野外生態系への影響

在来天敵といえども、ある地域で採集された遺伝的に均質な系統を人為的に大量に放飼するのであるから、野外集団に及ぼす遺伝的影響が皆無とはいきれない。また、2004 年改正農薬取締法で使用可能となった特定農薬としての天敵の利用 (採集した外来天敵の農家による放飼) が同一都道府県内に限定されているのも、こうした懸念に配慮してのものと考えられる。

しかし、天敵農薬・特定農薬の放飼が、同種野外個体群の遺伝的組成に及ぼす影響を定量的に検証した例はない。生物農薬の放飼が、野外個体群に及ぼす遺伝的影響を、DNA マーカーを用いてモニタリングしていくことは今後求められるであろう。

おわりに

天敵利用における DNA マーカーの利用は、まだまだ始まったばかりである。本稿でも、既知の成果よりも将来へつなげる技術を中心に記述した。しかし、今までできなかったことが、数年のうちに慣用の手法になる時代である。今後、こうした新技術を利用しながら、ますます天敵利用が普及していくことを願ってやまない。

引用文献

- 1) AGUSTI, N. et al. (2000): *Ins. Molecul. Biol.* 9: 263 ~ 268.
- 2) BAKER, D. A. et al. (2003): *Molecul. Ecol.* 12: 3303 ~ 3311.
- 3) BIGLER, F. (1989): *J. Appl. Entomol.* 108: 390 ~ 400.
- 4) HAGLER, J. R. and C. M. DURAND (1994): *Entomophaga* 39: 257

~ 265.

- 5) HARPER, G. et al. (2005): *Molecul. Ecol.* 14: 819 ~ 827.
 6) HUFBAUER, R. A. et al. (2004): *ibid.* 13: 337 ~ 348.
 7) van LENTEREN, J. C. and J. WOETS (1988): *Ann. Rev. Entomol.* 33: 239 ~ 269.
 8) SIMON, C. et al. (1994): *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 651 ~ 701.
 9) SYMONDSON, W. O. C. (2002): *Molecul. Ecol.* 11: 627 ~ 641.

- 10) ZANE, L. et al. (2002): *ibid.* 11: 1 ~ 16.
 11) ZHU, Y. C. and L. WILLIAMS, III (2002): *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95: 359 ~ 365.
 12) WHITTEN, M. J. and M. A. HOY (1999): *Handbook of Biological Control*, Academic Press, San Diego, p. 271 ~ 296.

新しく登録された農薬 (4 ページからの続き)

●アセフェート水和剤

21519: 家庭園芸用オルトラン水和剤 (アリスタ ライフサイエンス) 2005/06/22

アセフェート: 50.0%

なす: アブラムシ類, アザミウマ類, ハスモンヨトウ, オオタバコガ, キャベツ: ヨトウムシ, ハスモンヨトウ, タマナギンウワバ, アオムシ, コナガ, アブラムシ類: 収穫 7 日前まで, はくさい: カブラハバチ, ヨトウムシ, ハスモンヨトウ, アオムシ, コナガ, アブラムシ類, レタス: ヨトウムシ, オオタバコガ: 収穫 14 日前まで, 非結球レタス: ヨトウムシ, オオタバコガ: 収穫 21 日前まで, ブロッコリー: ヨトウムシ: 収穫 14 日前まで, だいこん, はつかだいこん: ヨトウムシ, カブラハバチ, ダイコンシンクイムシ, アオムシ, コナガ, アブラムシ類: 収穫 14 日前まで, ばれいしょ: ヨトウムシ, テントウムシダマシ幼虫, アブラムシ類, ジャガイモガ: 収穫 7 日前まで, トマト: アブラムシ類, マメハモグリバエ: 収穫前日まで, ミニトマト: アブラムシ類: 収穫 14 日前まで, ダイズ: ハスモンヨトウ, ジャガイモヒゲナガアブラムシ: 収穫 60 日前まで, えだまめ: ハスモンヨトウ, ジャガイモヒゲナガアブラムシ, たまねぎ: ネギアザミウマ: 収穫 21 日前まで, にんにく: ネギコガ, アブラムシ類, オクラ: アブラムシ類, ミドリヒメヨコバイ: 収穫 7 日前まで, いんげん: アブラムシ類: 収穫 14 日前まで, ショウガ: アワノメイガ: 収穫 45 日前まで, とうもろこし: アブラムシ類: 収穫 7 日前まで, ぶどう: チャノキイロアザミウマ, フタテンヒメヨコバイ: 収穫 30 日前まで, かき: カキクダアザミウマ, カキノヘタムシガ, チャノキイロアザミウマ, カキノヒメヨコバイ: 収穫 45 日前まで, かんきつ: コカクモンハマキ, シャクトリムシ類, ヤノネカイガラムシ第 1 世代, ツノロウムシ, ルビーロウムシ, ミカンキイロアザミウマ, ネギアザミウマ, ゴボウノミドリヒメヨコバイ, アブラムシ類, ケシキスイ類, コアオハナムグリ, アザミウマ類, ミカントゲコナジラミ: 収穫 30 日前まで, つつじ: ツツジゲンバイ, つばき: チャドクガ, さくら: アメリカシロヒトリ, モンクローシヤチホコ, 花き類: 観葉植物: アザミウマ類, アブラムシ類, アオムシ, ヨトウムシ類: 発生初期, きく: マメハモグリバエ, オオタバコガ, グラジオラス: アザミウマ類, ストック: コナガ, ハイマダラノメイガ, 宿根アスター: ヨメナスジハモグリバエ, オンシジウム: カイガラムシ類, カーネーション: コナガ, ひまわり: タバコガ, 斑入りアマドコロ: ハマキムシ類, リアトリス: ハマキムシ類, 樹木類: アザミウマ類, 芝: スジキリヨトウ, シバツツガ, タマナヤガ, ケラ, シバオサゾウムシ成虫, アカフツツリガ: 発生初期

●アセフェート粒剤

21520: 家庭園芸用オルトラン粒剤 (アリスタ ライフサイエンス) 2005/06/22

アセフェート: 5.0%

キャベツ, はくさい: アオムシ, コナガ, ヨトウムシ, アブ

ラムシ類: 定植時及び収穫 21 日前までの生育期, トマト: アブラムシ類, オンシツコナジラミ: 定植時及び収穫前日までの生育期, ミニトマト: アブラムシ類, オンシツコナジラミ: 定植時, きゅうり, なす: アブラムシ類, アザミウマ類, オンシツコナジラミ, ピーマン: アブラムシ類: 定植時及び収穫前日までの生育期, ブロッコリー: ヨトウムシ: 定植時及び収穫 14 日前までの生育期, だいこん, はつかだいこん: アオムシ, コナガ, アブラムシ類: は種前, カブ: アブラムシ類: 収穫 14 日前まで, ばれいしょ: アブラムシ類: 植付時, 花き類: 観葉植物: アザミウマ類, アブラムシ類, ヨトウムシ類, きく: ネキリムシ, ハモグリバエ類, 宿根スターチス: コガネムシ類幼虫, カーネーション: コナガ, アリウム: ネギコガ, 芝: スジキリヨトウ, シバツツガ, タマナヤガ: 発生初期

「殺菌剤」

●イミノクタジン酢酸塩・有機銅水和剤

21514: 日曹ベフキノン水和剤 (日本曹達) 2005/06/22

イミノクタジン酢酸塩: 7.0%, 有機銅水和剤: 50.0%

りんご: 斑点落葉病, 輪紋病, すず点病, すず斑病, 褐斑病, 炭疽病: 収穫 21 日前まで, みかん: 灰色かび病, そうか病, 黒点病: 収穫 30 日前まで, なし: 黒斑病, 黒星病, 輪紋病: 収穫 45 日前まで, 麦類: 雪腐小粒菌核病, 紅色雪腐病: 根雪前

「殺虫殺菌剤」

●イミダクロプリド・スピノサド・チアジニル粒剤

21508: ブイゲットアドマイヤースピノ箱粒剤 (バイエルクロップ サイエンス) 2005/06/01

21509: DAS ブイゲットアドマイヤースピノ箱粒剤 (ダウケミカル) 2005/06/01

21510: 日農ブイゲットアドマイヤースピノ箱粒剤 (日本農薬) 2005/06/01

イミダクロプリド: 2.0%, スピノサド: 0.75%, チアジニル: 12.0%

稲 (箱育苗): いもち病, イネミズゾウムシ, イネドロオウムシ, ツマグロヨコバイ, ウンカ類, ニカメイチュウ, コブノメイガ: 育苗箱 (30 × 60 × 3 cm, 使用土壌約 5 l) 1 箱当り 50 g: 移植 2 日前 ~ 移植当日: 育苗箱の上から均一に散布する

「除草剤」

●シアナジン・DCBN・DCMU 粒剤

21515: GF 草退治 H 粒剤 (住化タケダ園芸) 2005/06/22

シアナジン: 2.0%, DCBN: 3.0%, DCMU: 6.0%
 樹木等: 家の周り: 一年生雑草, 多年生広葉雑草, スギナ

●シアナジン・DCBN・DCMU 粒剤

21516: GF 草退治粒剤 (住化タケダ園芸) 2005/06/22

シアナジン: 1.0%, DCBN: 1.5%, DCMU: 3.0%
 樹木等: 家の周り: 一年生雑草, 多年生広葉雑草, スギナ