

# *Tetranychus* 属ハダニの分子分類の現状

## —我が国におけるカンザワハダニ種群の分子系統学的解析を例に—

独立行政法人農業生物資源研究所動物生命科学研究所 ひの  
もと  
のり  
ひで

京都大学大学院農学研究科生態情報開発学研究室 たか  
高  
ふじ  
藤  
あき  
晃  
お  
雄

### はじめに

ハダニは世界的に、重要な農業害虫を含むグループである。我が国で記載された種類は1999年時点で78種 (EIHARA, 1999) で、その後も日本未記載の種が発見されている。なかでも *Tetranychus* 属はカンザワハダニ、ナミハダニなど園芸作物の害虫種を含み、植物防疫の観点からも重要なグループである。しかし、種の同定には、雄成虫を真横に封入したスライド標本を作製して挿入器の形態を観察する必要がある、熟練を要する。ハダニの性比は一般に雌にかたよっており、作物に対する被害の大半は雌成虫によるものであるために、個体数の把握は主として雌成虫の数で行われる。したがって、ハダニの種の識別が雌成虫で行うことができれば、応用面で極めて有意義であろう。

これまで、分子生物学的手法によるマーカーを用いた簡易な識別法を開発するために、様々な研究が行われてきた。本稿では、最近の *Tetranychus* 属ハダニに関する分子生物学的手法による研究を概観した後、筆者らが最近行った我が国におけるカンザワハダニの分子系統学的解析の結果を紹介したいと思う。

### I ハダニの遺伝的マーカー

#### 1 アイソザイム・アロザイム

アイソザイムとは、同じ機能をもつがタンパク質が異なる酵素のことである。このうち、同一遺伝子座の対立遺伝子の関係にあるものをアロザイムという。これらは、ポリアクリルアミド電気泳動法により分離し、それぞれの活性に応じた基質を加えた染色液により染色し、移動度によって多型を検出する。安価で大量の個体数を扱うことができるため、1960年代から多くの生物種で遺伝的多型を検出するのに用いられてきた。

Molecular Phylogenetic Analysis on the Kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai*, in Japan. By Norihide HINOMOTO and Akio TAKAFUJI

(キーワード:カンザワハダニ, 分子系統樹, ITS, COI, 分子分類)

*Tetranychus* 属ハダニでの研究例は、榎原・天野 (1996) や GOKA and TAKAFUJI (1997) がある。前者は、エステラーゼのバンドパターンを用いて6種の、後者はPGI (グルコースリン酸異性化酵素) とMDH (リンゴ酸脱水素酵素) を組み合わせて7種の識別が可能なることを明らかにした。これらの方法は種の簡易同定を行うには適しているが、酵素が異なれば染色液の組成も異なること、1個体で得られる遺伝子座の数が限られていることなどから、多数の遺伝子座の解析を必要とする集団遺伝学的研究や、より精密な情報を必要とする進化系統学的研究には不相当であると考えられる。そこで、DNAを用いた多型検出方法が検討されるようになった。

#### 2 DNA マーカー

PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) によるDNAの増幅が可能になったことにより、微小な農業害虫でもDNA多型検出が可能になってきた。1990年代に入ってハダニでもDNA解析が行われるようになり、特に、重要な農業害虫を多く含む *Tetranychus* 属のハダニが主な研究対象となってきた。

PCRは、遺伝子特異的な一組の短い (20塩基程度) プライマーと呼ばれるポリヌクレオチド鎖を耐熱性のDNA合成酵素 (*Taq* ポリメラーゼが使われることが多い) と組み合わせ、DNAの変成・会合・伸張反応を繰り返すことによって目的の遺伝子のコピー数を短時間に増幅させて検出可能にする技術である。このプライマーの作成には、増幅しようとする遺伝子の塩基配列情報が必要なため、従来は利用できる分類群が限られていたが、様々な分類群での知見が蓄積してくるにつれ、広く利用されるようになってきた。

ハダニでDNA多型を解析した最初の例は、おそらく NAVAJAS et al. (1992) による *Tetranychus* 属と *Eotetranychus* 属のハダニ6種の研究例であろう。彼らは核ゲノム上のリボゾームRNA遺伝子 (リボゾームDNA) のITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) と呼ばれる領域の塩基配列を決定し、種間・属間で比較した。その結果、この領域が種の識別や系統推定に耐えられるであろうことを見いだしたのである。その後、

NAVAJAS et al. (1998) はナミハダニを用いて、ITS 領域が種内では多型が少ないことを実証した。また、NAVAJAS et al. (1996) は、ミトコンドリア上の COI (チトクローム脱水素酵素) 遺伝子の塩基配列を用いて、ハダニ 20 種の系統学的分析を行った。この研究では、形態、生活史と分子系統樹をあわせて考察することによって、ハダニ類の進化過程について考察している。

しかし、種の同定・識別のためにいちいち塩基配列を解析するのは、煩雑なうえに費用もかかる。そこで、他の昆虫種などで一般に利用されているのは PCR-RFLP という方法である。これは、PCR で増幅した DNA 断片を、特異的な配列を認識して切断する制限酵素で処理した後に電気泳動し、そのバンドパターンを解析するものである。制限酵素が認識する配列の有無でバンドの本数が変化するので、種間で配列に違いがあれば、種の違いはバンドパターンの違いとなってあらわれる。また、制限酵素はその種類により認識する配列が異なるので、その組合せを変えることにより、様々な塩基配列を比較することが可能である。

GOTOH et al. (1998) は、形態的に識別が困難なナミハダニとその同胞種ナミハダニモドキ *T. pueraricola* を、上述の ITS 2 領域の PCR-RFLP によって識別可能なことを示した。こうした研究の積み重ねによって、*Tetranychus* 属ハダニを一つの系ですべて識別しようという試みもなされており、圃場に発生する主な *Tetranychus* 属 4 種についての PCR-RFLP による識別法が開発されている (刑部ら, 未発表)。

## II カンザワハダニの二つの系統

カンザワハダニ *Tetranychus kanzawai* は、茨城大の後藤らのグループによる精力的な研究の結果、部分的不和合性のある T 系統と K 系統の 2 系統が見いだされた (GOMI and GOTOH, 1996; GOTOH et al., 1999)。これら 2 系統は、K 系統雌と T 系統雄が交尾した場合、その子世代で雌が出現しない。のちに EHARA (1999) によって、雄の交尾器に形態差が認められ、K 系統はニセカンザワハダニ *T. parakanzawai* と命名された。この詳しい経緯は後藤 (2000 a, b) を参照されたい。

この 2 系統を識別するには、ニセカンザワハダニが別種として記載される以前は、交配実験によるしかなかった。しかし、野外に発生する個体群の調査を行う際に、すべての個体を 1 個体ずつ飼育し、交配を行って識別することは非現実的である。我々は、これら 2 種を識別するためにの DNA マーカーを開発できないかと考えた。最終的には、上述の PCR-RFLP マーカーのような簡便

な手法を開発しなくてはならないが、まず塩基配列を解析する必要があると考え、詳細な解析を行った。

## III カンザワハダニの分子系統学的解析

我々は、全国から採集して室内でインゲンマメのリーフディスク上で維持していただくいくつかのカンザワハダニの地理的系統を用い、分子系統学的に二つの系統に分けられるかどうかを検証した (HINOMOTO and TAKAFUJI, 2001)。なお、我々の実験は EHARA (1999) 以前に行ったので、ここではニセカンザワハダニの名称は使用せず、T 系統 (カンザワハダニ)、K 系統 (ニセカンザワハダニ) で統一する。また、実験に用いた地理的「系統」との混乱を避けるため、今後この稿では両者を T タイプ、K タイプと呼ぶことにする。

各系統からランダムにサンプルしたハダニの雌成虫から 1 個体ずつ DNA を抽出し、PCR によってミトコンドリア上の COI および核ゲノム上の ITS 1 領域を増幅した。ミトコンドリアの場合、基本的に 1 個体に 1 種類の遺伝子型 (ハプロタイプ) しかないと考えて差し支えないので、PCR によって得られた DNA 断片を、そのままシーケンス反応に用いて塩基配列を決定した。一方、核ゲノム上の ITS 1 では、雌の場合父親由来と母親由来の 2 組のゲノムで遺伝子型が異なる可能性、さらには、ゲノム中の反復間での多型が存在する可能性が考えられる。したがって、そのまま塩基配列を決定することはできない。そこで、PCR 産物をプラスミドに組み込み、大腸菌に導入して 1 コピーずつ分離培養するというクローニング操作を行った。これにより、正確な塩基配列の解析ができる。

一方、各系統から選んだ雄成虫と K タイプの雌成虫を交配することによって、それぞれの系統がどちらのタイプに属するかを決定した。その結果、17 系統中 6 系統で T タイプと K タイプが混在することがわかった (図-1)。もちろん、飼育の過程で遺伝的浮動が起こるので、この比率がそのまま野外個体群での T/K 比を表すわけではないが、野外では普通にこれら 2 タイプが混在すると考えられる。一方、GOTOH et al. (1999) では、すべての個体群でいずれかのタイプに固定している結果が得られている。この違いは、多様性を意識した我々の飼育法では、飼育個体数が多いためと考えられる。

残念ながら、DNA を抽出した個体自体が T タイプか K タイプかを検証はできなかった。そこで、これら混在した系統は除いて、明らかな T タイプ、K タイプのみを用いて得られた DNA 塩基配列を用いて系統樹を構築した。その結果、COI 領域 (図-2) でも ITS 1 領域

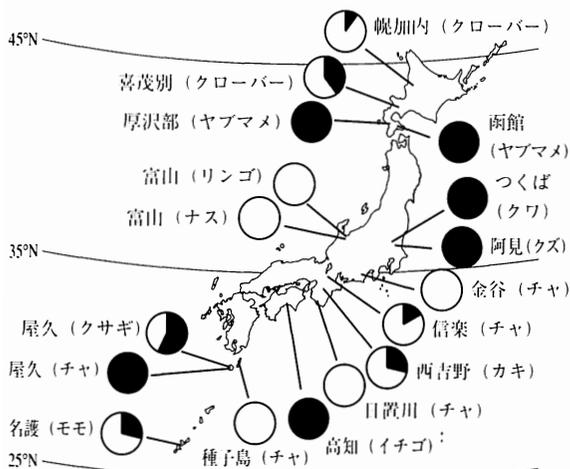


図-1 カンザワハダニ各系統中のKタイプ、Tタイプの割合  
 黒地はKタイプ、白地はTタイプを表す。系統名は採集地を表し、カッコ内は採集時の寄主植物を示す。

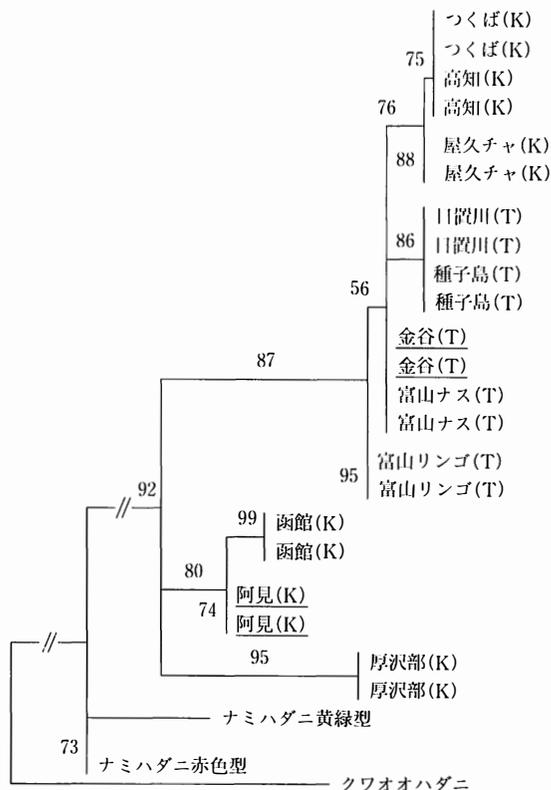


図-2 カンザワハダニのチトクローム脱水素酵素 (COI) の部分配列を用いて構築した系統樹  
 系統名の後の括弧内は、交配実験によって得られたタイプを示す。下線で示した2系統はそれぞれKタイプ、Tタイプの標準系統。

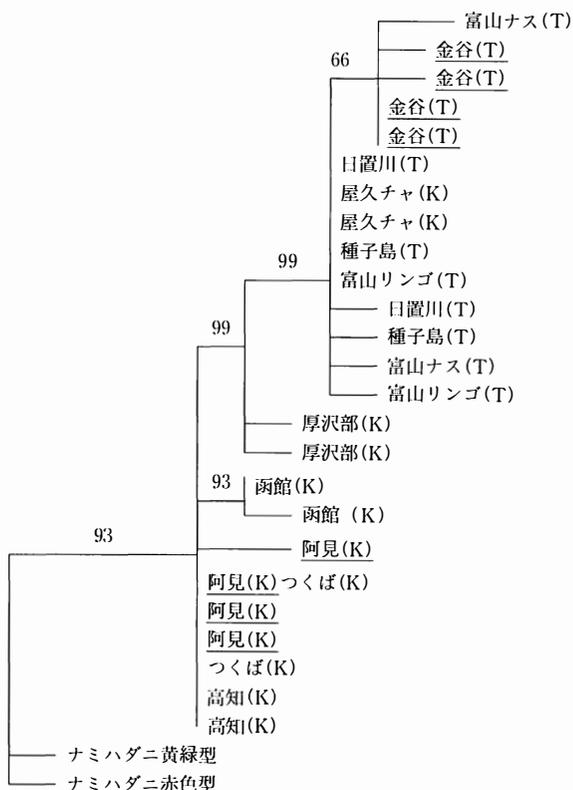


図-3 カンザワハダニの核ゲノム上のリボゾームDNA内のITS1領域を用いて構築した系統樹  
 系統名の後の括弧内は、交配実験によって得られたタイプを示す。下線で示した2系統はそれぞれKタイプ、Tタイプの標準系統。

(図-3)でも種内多型が認められたが、二つのタイプが独立した単系統を構成するわけではないことが明らかになったのである。どちらの系統樹においても、Kタイプが多系統を示し、その一部の系統の中にTタイプが混在している、という傾向が見られた。したがって、この結果を見ると、DNA塩基配列ではこれら2タイプを分離・識別できないことが明らかになった。また、TタイプはKタイプの一部が分化して出現したと考えられた。

もちろん、種分化の過程においては祖先集団内の多型を引き継ぐことがあり、必ずしも明確に遺伝子系統樹が分岐するわけではない。しかし、これら2タイプの場合、部分的ながら遺伝子交流が確認されており、生物学的種概念から言えば種分化を完了しているとは考えにくい。また、個体群動態や遺伝子交流を考えるうえでも、これら2タイプは同一の集団と考えたほうが扱いやすいのではないかと考えられる。

## おわりに

本稿では、*Tetranychus* 属ハダニにおける遺伝子マーカーを使った識別法について概観するとともに、カンザワハダニ・ニセカンザワハダニ種群の DNA 分析を行った我々の研究例を紹介した。この研究例のように、必ずしも遺伝的分析を種の同定に用いることができるとは限らないが、ある意味ではこれは当然のことなのである。つまり、種の識別に用いられている形態形質を支配する遺伝子と、系統樹や PCR-RFLP に用いられる遺伝子は、全く別の遺伝子である。形態による分類と遺伝子分類が完全に一致する完全な遺伝子診断法を開発するためには、形態形質の形成にかかわる遺伝子を解明する必要があるだろう。しかし、様々な害虫種でそれを行うのはまだまだ先の話である。当面は、汎用的に用いられる領域を用いて、照合していくほかないと考えられる。

反面、形態、寄主範囲、生殖不和合性、遺伝子の多型

などが複雑にからみあって分化しつつあるこのカンザワハダニ種群は、進化生物学、生態学の観点からも非常に興味深い分類群であると考えられ、今後、これらの領域を有機的に総合した研究の発展を期待したい。

## 主な引用文献

- 1) EHARA, S. (1999) : Species Diversity 4 : 63~141.
- 2) 榎原 郁・天野 洋 (1996) : 応動昆 40 : 311~315.
- 3) GOKA, K. and A. TAKAFUJI (1997) : Appl. Entomol. Zool. 32 : 127~134.
- 4) GOMI, K. and T. GOTOH (1996) : Appl. Entomol. Zool. 31 : 417~425.
- 5) GOTOH, T. et al. (1998) : Entomol. Sci. 1 : 55~57.
- 6) ——— (1999) : Appl. Entomol. Zool. 34 : 551~561.
- 7) 後藤新雄 (2000 a) : 植物防疫 54 : 400~406.
- 8) ——— (2000 b) : 同上 54 : 509~513.
- 9) NAVAJAS, M. et al. (1992) : Exp. Appl. Acarol. 15 : 211~218.
- 10) ——— (1996) : Bull. Entomol. Res. 86 : 407~417.
- 11) ——— (1998) : Heredity 80 : 742~752.
- 12) HINOMOTO and TAKAFUJI (2001) : Exp. Appl. Acarol. 25 : 355~370.

## 学 界 だ よ り

## ○第5回獣害対策学習会（芦屋大会）のご案内

■主催：獣害総合研究所

■日時：平成13年12月22日(土)~23日(日)

■場所：兵庫県芦屋市 総合研修センター六甲ハウス  
JR神戸線か阪神電気鉄道「芦屋駅」南口または阪急電鉄「阪急芦屋川駅」より阪急バス「有馬・山口営業所行」か「芦屋ハイランド行」で「奥池バス停」下車徒歩15分

■日程：12月22日

エクスカージョン：六甲山の野生イノシシ観察

基調講演：ニホンイノシシの生態（仮題）

口頭発表：（イノシシ関連：一般募集）

ミニシンポ：野生イノシシの被害管理（仮題）

口頭発表：（一般募集）

ミニシンポ：有害駆除と個体数調整（仮題）

ポスター発表（一般募集）および懇親会、ビデオ（獣害関係）

12月23日

ビデオ（野生動物捕獲の実際：仮題）

実演：捕獲器具の取扱い（仮題）

口頭発表：（調査技術関連：一般募集）

ミニシンポ：電波発信機における自己とその対策（仮題）

口頭発表：（防除技術関連：一般募集）

ミニシンポ：（一般募集）

口頭発表：（行政関連：一般募集）

意見交換

■申込み方法：氏名・所属・生年月日・性別・連絡先・電話番号・FAX番号・電子メールアドレス・発表の有無・エクスカージョンへの参加・会場への交通手段を事務局まで郵送かE-mailでお送り下さい。

■参加費：（発表）①~11/15 ②~12/21 ③当日

一般(有り) ① 10,000円, ② 13,000円, ③ 15,000円  
（無し）① 30,000円, ② 50,000円, ③ 参加不可

学生(有り) ① 7,500円, ② 8,500円, ③ 9,000円  
（無し）① 9,500円, ② 10,500円, ③ 参加不可

会場定員（105名）を超えた場合は、発表者を優先。

支払方法：郵便貯金 普通口座 14630-16972021

獣害対策学習会 代表 高木直樹

■連絡票の提出

口頭発表、ポスターでの発表を希望する方は、申込みとは別に連絡票を提出して下さい。

1.発表の種類, 2.タイトル, 3.カテゴリー（現状報告・調査技術・防除技術）, 4.発表内容の公開（許可・問い合わせ・禁止）, 5.共同発表者, 6.使用する機材（OHP・スライド・ビデオプロジェクター）, 7.必要な模造紙の枚数（縦120cm×横90cm）：ポスター発表, 送金額

■事務局：〒520-0244 滋賀県大津市衣川1-1-17 獣害総合研究所 FAX (077) 573-5422, E-mail: jyugai@f5.dion.ne.jp

実行委員（仲谷淳, 川道美枝子, 恩地実）