天敵昆虫などの研究におけるマルチプレックスPCRの利用

独立行政法人農業生物資源研究所 昆虫科学研究領域 村路雅彦（むらじまさひこ）

はじめに

マルチプレックスPCRは，一つのPCR反応に2組以上のプライマーセットを加えて行う，やや高度なPCRである。一度に複数の異なるPCRを実施でき労力や時間を節約できる。また二つ以上の研究目的を組合せた解析が可能で，1試料から多くの情報を得ることもできる。Chamberlain et al.（1988）の論文以来，本法を用いた研究は増加し集団遺伝学や親子鑑定，法医学，組換え体検出，分子分類等で不可欠の手法となっている（Daniela et al., 2012）。ただし，手法の確立には対象生物の塩基配列についての事前情報が必要で，高い再現性を得るための条件設定が難しく，ある生物グループの解析法を別グループに適用できない等の欠点もある。しかし，需要に即した手法を確立し，技術を標準化させれば，最低限の技術や機材で高度な解析をルーチンとして簡単に実施できるという利点がある。分野によっては，本法に基づく様々な解析キットが商品化されており，機器と組合せたシステムとして販売されているものもある。

今のところ，天敵や農業害虫のマルチプレックスPCRのほとんどは種同定に関するものであるが，技術をどのような試料に適用するかによって，単なる同定以上の情報が得られる。例えば，害虫体内の寄生蜂や捕食者体内の害虫を検出・同定したり，それらを種間比較すれば，捕食，寄生，種間競争等の生物間関係を解析できる。徐々にではあるが，そのような研究も増えてきている。本稿では，これまでの天敵昆虫などへの応用例と技術の概要，今後の展望等について紹介する。

I　解析対象のDNAと解析法

マルチプレックスPCRによる種の同定では，個々の種に特異的な塩基配列を持ち，種ごとに異なった長さのDNAを増幅できるプライマーを作成し，その混合物を用いて試料をPCRする。そして増幅されたDNAの長さから，どのプライマーが効いているかを判断し，試料の種を判定する（図-1）。本法では増幅DNA長が特異的であればよく，対象ごとに増幅するDNAが違っても構わない。また，ほとんどの場合，解析にPCRと電気泳動以外の操作を必要としない。

1　ミトコンドリアDNA（mtDNA）

昆虫の種同定に最も多用されるのはmtDNAである。このDNAには挿入や欠失等が少ないため，わずかな塩基置換に基づく種特異的プライマーが使われるが，目的外のDNAを増幅させない注意がいる。コモリグモ7種の同定では，COIの1～数塩基の置換に対応する7組

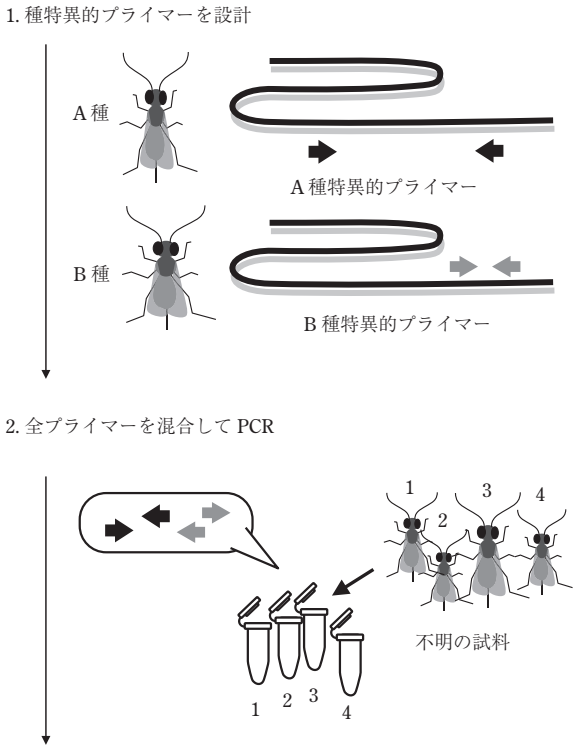

図-1　マルチプレックスPCRによる種の同定法

Multiplex PCR-based Methods for Assessing Insect Parasitism and Predation.　By Masahiko Muraji

（キーワード：マルチプレックスPCR，天敵昆虫，捕食性昆虫，寄生性昆虫，分子同定）

14 本の特異的プライマーが作られたが，非特異的な DNA 増幅が見られた（Hosseini et al., 2007）。*Pseudococcus* などカイガラムシでは，特異性の向上と反応の簡略化がはかられ，8 本のプライマーで 7 種が同定できた。ここでは，COI の 3 塩基以上の置換に対応する 7 本の種特異的プライマーと近隣の tRNA に位置する全種共通の 1 本の逆向プライマーが使われている（Daane et al., 2011）。このほか，オサムシ腸内の餌生物の解析のために，12 の分類群に特異的な 24 本ものプライマーを作製した例もある。その使用法はやや複雑で，感度や精度向上のために蛍光プライマーや DNA シークエンサー等が使われている（Harper et al., 2005）。

2　核のリボゾーマル DNA（rDNA）とスペーサー

核 rDNA の遺伝子と隣接するスペーサー（ITS1 と ITS2）を用いた方法が多用されている。多くの場合，変異が少ない遺伝子部分に全種共通のプライマーを設定し，変異が多いスペーサーに適当な長さの DNA 増幅が期待できる種特異的な逆側のプライマーを設定する（図-2）。この方法は北米産マキバカスミカメに寄生するコマユバチ *Peristenus* spp. の識別などに用いられている（Gariepy et al., 2005）。カタカイガラムシの天敵寄生蜂では，属識別用と属内の種識別用の数組のプライマーセットが作られ，3 属（*Microterys*，*Coccophagus*，*Metaphycus*）10 種ものコバチが同定されている（Rugman-Jones et al., 2011）。捕食性の *Orius* 属ヒメハナカメムシ 5 種の場合はやや変則的で，ITS1 両端の全種共通プライマーと一部の種に特異的な内部プライマーの合計 5 本が使われている（Hinomoto et al., 2004）。また *Cecidophyopsis* 属ダニでは，種特異的プライマーは使用せず，2 組 4 本の共通プライマーで ITS 内の 2 箇所の DNA 長を調べ，種の識別が試みられている（Kumar et al., 1999）。

3　昆虫体内の病原生物

ヨコバイ *Euscelidius variegates* などからのファイトプラズマ 2 種の検出と同定にはネステッドマルチプレックス PCR が用いられた（Clair et al., 2003）。この方法では，各ファイトプラズマに特異的な 2 組 4 本のプライマーを用いた 1 回目の PCR 産物を用いてもう一度 PCR をする。2 回目 PCR では，最初の増幅産物の内側にアニールする別の 2 組 4 本の特異的プライマーを使う（図-3 a）。昆虫試料から最終的にどちらの DNA が増幅されるかで，体内の微量ファイトプラズマを同定する。*Anopheles* 属の蚊のマラリア原虫では，セミネステッドマルチプレックス PCR が用いられた（Lardeux et al., 2008）。この場合は，1 回目 PCR では全種共通のプライマー 1 組を使い，その産物を用いた 2 回目 PCR でのみ種特異的プライマーを使用する（図-3 b）。このほかウイルスの検出・同定に RNA の逆転写物を用いる方法（マルチプレックス RT-PCR）などもある。

4　薬剤抵抗性に関与する遺伝子

数種昆虫では，マルチプレックス PCR でアセチルコリンエステラーゼ遺伝子とソディウムチャンネル遺伝子内のそれぞれ有機リン剤抵抗性とピレスロイド抵抗性に関与する 1 塩基置換の同時検出が行われている。家畜害虫ノサシバエ *Haematobia irritans* では，両遺伝子の抵抗性型の同時検出用と感受性型の同時検出用の 2 組のプライマーセットが作られ，個体ごとに 2 回 PCR することで多様な遺伝子型が検出されている（Foil et al., 2010）。この方法は，殺虫剤施用と抵抗性遺伝子頻度との関係を調査するのに利用できる。これを他の昆虫へ適用するには，抵抗性に関する詳しい解析が必要となる。

5　その他の領域

ゲノム中には数塩基のモチーフが縦列に反復する部位が多数ありマイクロサテライトと呼ばれる。各部位とも

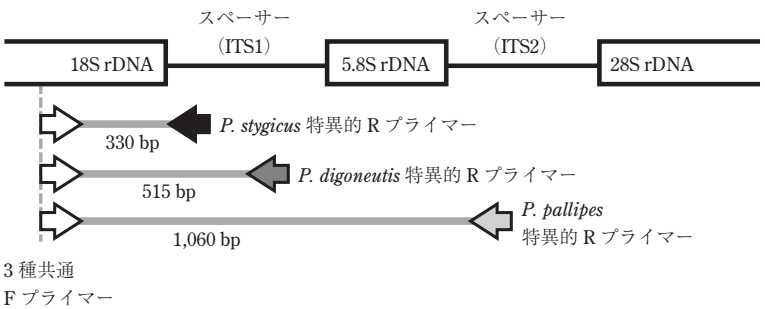

図-2　*Peristenus* 属寄生蜂 3 種を識別するために使用されたプライマーのアニール位置
Gariepy et al.（2005）より改変した．

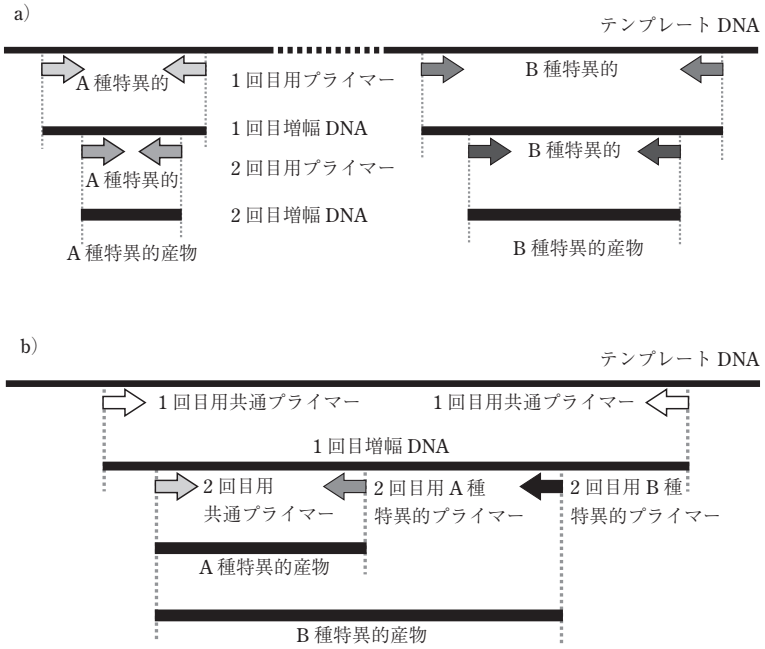

図-3　病原生物の検出と同定に使われた a）ネステッドおよび b）セミネステッドマルチプレックス PCR の模式図
2 種の識別のために，a）では 1 回目，2 回目 PCR とも各 4 本の合計 8 本，b）ではそれぞれ 2 本と 3 本の合計 5 本のプライマーを使用している．

反復数の変異が大きいため，DNA 鑑定や集団遺伝マーカーに適している。農業昆虫でも本 DNA が単離されているが（Hinomoto et al., 2006），ヒトのような多数部位の同時検出の例は少ない。今後は，次世代シークエンサーによる部分的ゲノムなどを活用することで本解析に適した多数の部位が得られると考えられる（Rasmussen and Noor, 2009）。ゲノム中に散在する多型的 DNA は，PCR の変法である RAPD–PCR（random amplified polymorphic DNA–PCR）でも得られる。南アジア産 ***Anopheles minimus*** 種群 5 種では，それらの塩基配列に基づく種同定が試みられている（Kengne et al., 2001）。

6　技術開発上の問題点

マルチプレックス PCR 成功のための最も重要な要素はプライマーである。既存のものを流用したり不適切なものを使うと，特異性や感度が低下し，正しい結果が得られない場合がある。プライマーの設計にあたっては，プライマー同士のアニールを防ぎ，増幅 DNA を識別しやすい長さにする等のほか様々な配慮が要る。近年では，様々な条件を満たしたプライマーセットを，市販のソフトやネット上で公開されているもので設計することもできる（Shen et al., 2010）。このほか，PCR 反応液の組成や酵素の種類も結果の良否に影響するが，これに配慮した多くの試薬キットが市販されており，条件の検討を簡略化できる。これにより実験結果が大幅に改善されることもある。

Ⅱ　天敵昆虫研究への応用例

1　捕食性天敵–害虫関係の解析

このような関係を調べるために腸内容物の分析が行われている。従来は餌生物の抗体を用いた方法が使われたが，現在では PCR 法が広く用いられている（Sheppard and Harwood, 2005 ; Gariepy et al., 2007）。この方法は，有害生物を捕食する天敵の探索などに利用できる。欧州に分布拡大したイベリア産ナメクジ ***Arion lusitanicus*** の捕食者の調査では，COI 塩基配列に基づくナメクジ識別用のプライマーセットを用いてオサムシの腸内 DNA が調べられている（Hatteland et al., 2011）。

広食性捕食者は，発生初期の農業害虫の個体群抑制に効果がある。その利用のためには，害虫発生以前から個体数を一定以上に保つ必要がある。そのための代替え餌の解析に本法が使われている。ナガゴミムシ ***Pterostichus melanarius*** では，mtDNA ベースのプライマーセットで，腸内のミミズ種とその利用のパターンが調べられ，種によらずミミズを増やす農法が天敵の増加に効果

があることが伺われた（King et al., 2010）。同様な解析はジョウカイボン *Cantharis* spp. やマルクビゴミムシ *Nebria brevicollis* の幼虫でも実施され，冬期のマルチやコンポスト施用等が腐植食生物の生存環境を改善し，それにより広食性天敵が増加することが伺われた（Eitzinger and Traugott, 2011）。このほか，同様な環境中の粘管目昆虫やダニ類が捕食した線虫類を調べた研究報告もある（Read et al., 2006）。

捕食者腸内の餌生物 DNA は時間とともに分解され，やがて検出不能となる。検出可能期間の目安は「半減期」などとして飼育実験から得られるが，餌種や増幅 DNA の長さで異なる。そのため野外での捕食者の餌選好性を正しく推定するには，DNA の検出頻度だけでなく，“半減期” データや，モデル等を用いた解析が必要となる。

2　寄生性天敵–害虫関係の解析

害虫の寄生者の同定には，寄主を飼育し天敵を羽化させる必要がある。しかし飼育中の要因のため正確な寄生率はわかりにくい。寄主を解剖すればよいが，摘出した天敵幼虫の同定は難しい。これらの問題は PCR の利用により大きく改善された（Greenstone, 2006）。今後はマルチプレックス PCR を利用することでより高度な解析が可能になると考えられる。Traugott et al.（2006）のマルチプレックス PCR は，コナガと 3 種の寄生蜂に特異的な DNA バンドが検出できるだけの単純なものだが，採集された若齢幼虫の種を確認しつつ，体内の寄生者の検出と同定ができる。本法は，圃場から採集された大量の試料について，放飼天敵の効果を調べる場合などに適している。

最近の研究では，寄生蜂成虫の腸内残渣から幼虫期の寄主 DNA が検出されている（Rougerie, 2011）。同じことが広く適用できれば，寄主を採集せずに寄生蜂–寄主関係を調べることが可能となる。今後はマルチプレックス PCR 法への適用が期待される。

3　天敵–天敵関係の解析

広食性捕食者は，生物防除のための重要な要因だが，寄生された害虫を捕食することで，次世代の寄生蜂の防除効果を阻害している可能性がある。このことはアトキリゴミムシ *Demetrias atricapillus* の調査で，腸内からアブラバチ *Lysiphlebus testaceipes* に寄生されたマメクロアブラムシ *Aphis fabae* が検出された例からも伺われる（Traugott and Symondson, 2008）。最近では，捕食者による寄生蜂成虫の直接捕食の影響も小さくないことが示されている（Traugott et al., 2012）。類似の状況は，既寄生害虫に 2 次寄生が起きたときにも生じうる。Gariepy and Messing（2012）は，COI と核 rDNA の D2 および ITS 域の塩基配列をもとに，ハワイ産アブラムシの 1 次寄生蜂 5 種と 2 次寄生蜂 2 種を識別できるマルチプレックス PCR 法を開発し，野外採集および室内飼育アブラムシに適用した。その結果，1 次寄生者間の競争が示唆されたほか，マミー化したアブラムシでは高い頻度で 2 次寄生が起きていることがわかった。

このほか種間での餌をめぐる競合の調査にも PCR を利用できる。オーストラリア在来のアシナガバチ *Polistes humilis* と外来クロスズメバチ *Vespula germanica* では，PCR による肉団子（咀嚼された餌生物）の mtDNA 塩基配列の解析から，餌メニューを比較した例がある（Kasper et al., 2004）。この場合は，極めて多様な生物が検出され，必ずしもマルチプレックス PCR に適した状況ではなかったが，特定グループの餌生物に絞り込むことで，多個体の解析に適したプライマーセットを設計できると思われる。

III　今後の研究などについて

今のところ天敵や農業害虫のマルチプレックス PCR は種の識別用のものが中心だが，衛生害虫などでは他の応用例も少なくない。例えば *Anopheles fluviatilis* 種群の蚊では，核 DNA の塩基配列に基づく種識別用の PCR に，ヒトとマラリア原虫のそれぞれに特異的なプライマーセットを加えたマルチプレックス PCR が考案されている（Mohanty et al., 2007）。これにより一度の PCR で，その蚊が問題の種群か，どの隠蔽種か，体内に原虫がいるか，ヒトの吸血経験があるか等，数回分の PCR に相当する結果が得られる（図–4）。農業昆虫でも種や寄主，寄生等を同時判定できれば，優れた診断法となりうる。このほか薬剤抵抗性や病原生物の保菌等，複合解析に取り入れるべき形質は多い。今後，各分野の研究の蓄積が必要である。

天敵昆虫などのマルチプレックス PCR を開発するうえで考慮すべき技術に，ネステッドマルチプレックス PCR や DNA ブロック法（PCR クランプ法も）がある。前者はごく微量の DNA を増幅させる方法，後者は微量 DNA を増幅させるために目的外の類似 DNA の増幅を防止する方法である。後者では，特定の DNA 型と強く結合する 3’ 末端修飾オリゴヌクレオチドや DNA アナログ（peptide nucleotide acid など）を PCR 反応に加えることで，その型の増幅を防ぐ。これまでに脊椎動物のほかオキアミやロブスター等の糞や腸内試料の解析に利用されている（O’Rorke et al., 2012）。昆虫でも，ユニバーサルプライマーを用いた昆虫の全 body DNA の PCR で，体内の多様な寄生者や被捕食者の DNA を増幅するため

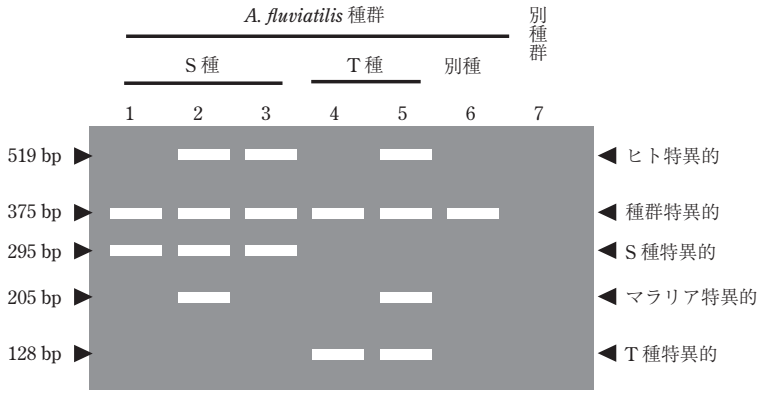

図-4　*Anopheles fluviatilis* 種群の種識別・ヒト加害・マラリア原虫保持の同時解析のためのマルチプレックス PCR の結果
蚊個体 7 匹分の電気泳動像の模式図.
Mohanty et al.（2007）をもとに作製した.

に利用できる。この解析に用いる修飾オリゴは比較的安価で受注生産されており容易に入手できる。早急に検討すべき技術である。

お わ り に

以上やや散漫ではあるが，天敵昆虫などにかかわるマルチプレックス PCR の応用例などを紹介した。本法の開発には手間がかかるとされるが，一度手法が確立されれば，多数試料を繰り返し解析する場合などに威力を発揮する。植物防疫の現場や圃場での調査など，それらを有効に活用できる場面は少なくない。今後は現場との連携のもとに，様々な場面で活用できるマルチプレックス PCR が開発されていくものと期待される。

引 用 文 献

1）Chamberlain, J. S. et al.（1988）: Nucleic Acids Res. **16** : 11141 ～ 11156.
2）Clair, D. et al.（2003）: Vitis **42** : 151 ～ 157.
3）Daane, K. M. et al.（2011）: Mol. Ecol. Evol. **40** : 1595 ～ 1603.
4）Daniela, S. et al.（2012）: Methods Ecol. Evol. **3** : 898 ～ 905.
5）Eitzinger, B. and M. Traugott（2011）: J. Appl. Ecol. **48** : 591 ～ 599.
6）Foil, L. D. et al.（2010）: J. Med. Entomol. **47** : 855 ～ 861.
7）Gariepy, T. D. et al.（2005）: Biocont. Sci. Technol. **15** : 481 ～ 495.
8）———— et al.（2007）: J. Appl. Entomol. **131** : 225 ～ 240.
9）———— and R. H. Messing（2012）: Biol. Control **60** : 26 ～ 38.
10）Greenstone, M. H.（2006）: Bull. Entomol. Res. **96** : 1 ～ 13.
11）Harper, G. L. et al.（2005）: Molecular Ecology **14** : 819 ～ 827.
12）Hatteland, B. A. et al.（2011）: Bull. Entomol. Res. **101** : 675 ～ 686.
13）Hinomoto, N. et al.（2004）: Biol. Control **31** : 276 ～ 279.
14）———— et al.（2006）: Appl. Entomol. Zool. **41** : 499 ～ 506.
15）Hosseini, R. et al.（2007）: Biol. Control **40** : 128 ～ 135.
16）Kasper, M. L. et al.（2004）: Mol. Ecol. **13** : 2037 ～ 2048.
17）Kengne, P. et al.（2001）: Insect Mol. Biol. **10** : 427 ～ 435.
18）King, R. A. et al.（2010）: Mol. Ecol. **19** : 1721 ～ 1732.
19）Kumar, P. L. et al.（1999）: Insect Mol. Biol. **8** : 347 ～ 357.
20）Lardeux, F. et al.（2008）: Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **102** : 485 ～ 492.
21）Mohanty, A. et al.（2007）: Am. J. Trop. Med. Hyg. **76** : 837 ～ 843.
22）O'Rorke, R. et al.（2012）: Mol. Ecol. Res. **12** : 5 ～ 17.
23）Rasmussen, D. and M. Noor（2009）: BMC Genomics **10** : 382.
24）Read, D. S. et al.（2006）: Mol. Ecol. **15** : 1963 ～ 1972.
25）Rougerie, R.（2011）: Mol. Ecol. **20** : 179 ～ 186.
26）Rugman-Jones, P. F. et al（2011）: BioControl **56** : 265 ～ 275.
27）Shen, Z. et al.（2010）: BMC Bioinformatics **11** : 143.
28）Sheppard, S. K. and J. D. Harwood（2005）: Functional Ecol. **19** : 751 ～ 762.
29）Traugott, M. et al.（2006）: Biol. Control **39** : 39 ～ 46.
30）———— and W. O. C. Symondson（2008）: Bull. Entomol. Res. **98** : 223 ～ 231.
31）———— et al.（2012）: Bull. Entomol. Res. **102** : 239 ～ 247.