

難防除害虫ハスモンヨトウの日本およびアジアの分布地域における遺伝的差異の解明

日本大学生物資源科学部応用昆虫科学研究室 ^{はたけやま} 畠山 ^{よしのり} 吉則・^{にしもと} 西本 ^{なおこ} 直子・^{いわの} 岩野 ^{ひでとし} 秀俊

はじめに

ハスモンヨトウはチョウ目ヤガ科トウガ亜科の昆虫でありエサとなる植物は極めて多く、野菜類、花き類を食害する広食性の農業害虫でもある。ハスモンヨトウの耐寒性は低いため国内での越冬は温暖な地域を除き、難しいとされており（松浦ら, 1991）、毎年春先に海外や温暖な地域から日本各地に飛来し、12月近くまで、多くの被害をもたらしている。ハスモンヨトウの国内流入源については諸説があり、性フェロモントラップを用いた発消長の調査から、毎年南方から台風などにより日本国内へ飛来・流入していることが示唆されている（MURATA et al., 1998）。

ハスモンヨトウの分布域は、日本から東南アジアを中心として、西はインドからアフガニスタン、南はニューギニアからオーストラリア北東部等の多様な気候の地域に生息している（図-1）。ハスモンヨトウは日本本土で年間およそ5～6回発生し、年多化性を示す（井藤ら, 2007）。また、ハスモンヨトウは薬剤抵抗性を持つ個体が多く（宮園ら, 1991）、現在では化学農薬の選択肢が狭まってきている。仮に、特定の農薬に対して感受性の低いハスモンヨトウが国外から流入し、その地域のハスモンヨトウと国内で混在すれば、農薬を用いた防除効果に差が生じる可能性も考えられる。この問題を解明するためには、ハスモンヨトウ系統の地域差異と国内への流入経路を明確にする必要がある。現在、ハスモンヨトウは1種1系統とされており、亜種区分などの報告例はない。しかしながら、分布域が広く生息環境も異なるため、複数の系統に分類される可能性もある。そこで筆者らは、国内外より採集したハスモンヨトウ成虫を用いて、昆虫の系統解析に多く用いられているミトコンドリア電子伝達系の遺伝子であるチトクロームオキシダーゼI遺伝子（COI）の遺伝子配列解析と、ゲノム全体を簡易的

に解析する技術であるゲノムプロファイル法による系統解析を行った。

ゲノムプロファイル法は、特殊な遺伝子増幅方法であるランダムPCRと温度によってDNAの挙動を変化させる電気泳動法（ゲル温度勾配電気泳動）により得られた泳動図を比較することで、生物間のDNAの距離を簡易的に解析する手法である（NISHIGAKI et al., 1991）。既に昆虫病原細菌や昆虫病原糸状菌の系統解析でも高解像度で詳細な識別が可能であることを示唆している。本稿では二つの遺伝子解析手法によりハスモンヨトウの国内外にわたる分布地域間の遺伝子差異の調査を行ったものである。

I ハスモンヨトウの捕獲

ハスモンヨトウの発生時期は日本国内でも温暖な地域ほど早く、毎年流入後日本列島を北進する傾向が見られる。そのため、国内への流入経路を把握すれば、流入後の早い段階でハスモンヨトウの防除も可能となり、国内での被害も軽減することが可能となる。日本国内への流入経路を調査するためには国内以外にもアジア圏のハスモンヨトウを入手する必要がある。そこで筆者らは表-1に示した地域でハスモンヨトウを性フェロモンのフェロ

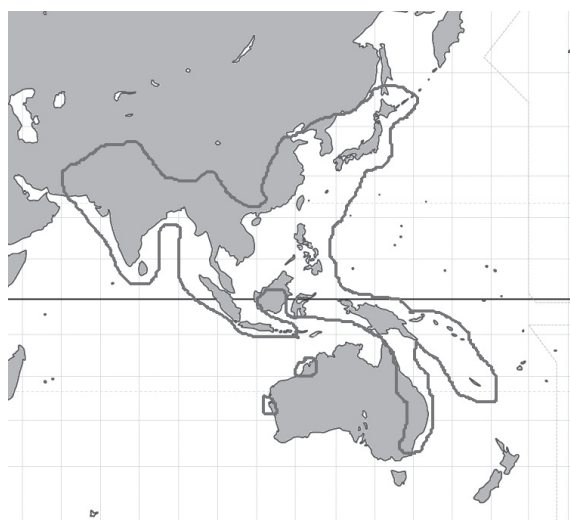


図-1 ハスモンヨトウの分布地域
MOCHIDA and OKADA, 1974 を参考に図示した。

Elucidation of Genetic Diversity of the Common Cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) between Indigenous Areas in Asia and the Islands of Japan. By Yoshinori HATAKEYAMA, Naoko NISHIMOTO and Hidetoshi IWANO

（キーワード：ハスモンヨトウ、国内流入経路、遺伝子解析）

表-1 本研究におけるハスモンヨトウの捕獲地域

	捕獲地域	サンプル名
南東アジア	インドネシアジョグジャカルタ	インドネシア-1 ~ 3
	タイ国チェンマイ	タイ-1 ~ 5
東アジア (日本を除く)	台湾台中市	台湾-1 ~ 5
	中国湖南省	中国-1 ~ 3
日本	沖縄県石垣市	石垣-1 ~ 5
	沖縄県中頭郡	沖縄-1 ~ 5
	東京都小笠原	小笠原-1 ~ 5
	鹿児島県鹿児島市郡元	鹿児島-1 ~ 5
	神奈川県藤沢市	神奈川-1 ~ 5
	茨城県稲敷市	茨城-1 ~ 5
	福島県相馬市	福島 I-1 ~ 5
	福島県伊達市	福島 II-1 ~ 5

ディン SL1 (住友化学) を装てんした住化式粘着トラップにより捕獲した。捕獲地域は表-1 の通りである。東南アジア 2 地域 (インドネシア共和国ジョグジャカルタ市, タイ王国チェンマイ県ムアンチエンマイ郡), 中国地域 (台湾共和国台北市, 中華人民共和国湖南省) および国内 8 地域 (沖縄県 2 地域, 東京都 (小笠原諸島), 鹿児島県, 神奈川県, 茨城県, 福島県 2 地域)。調査に使用したハスモンヨトウは雄成虫全 56 頭である (表-1)。

II ハスモンヨトウ DNA の抽出と COI 遺伝子増幅

昆虫からの DNA 抽出は一般的に脚を切断して行われる。しかしながらハスモンヨトウは個体が小さいため脚から DNA を抽出しても回収できる量は限られている。また全身を磨碎して DNA を抽出すると腸内細菌の影響を受けることになるため、筆者らは、ハスモンヨトウの頭部を切断して DNA を抽出した。COI 遺伝子断片の増幅には、*COI-45F* + SP6 (5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG TTC GAG CTG AAT TAG GRA CYC-3') (Y = C or T; R = A or G) および *COI-914R* + T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC WGA TGT YAA ATA WGC TCG WG-3') (W = A or T) を用いた。これらのプライマーは、NAGOSHI et al. (2011) が用いたプライマーの 5' 末端側に、配列解析用配列を付加したものである。このプライマー配列を用いて PCR により COI 遺伝子を増幅し配列解析を行った。解析された塩基配列は、配列連結ソフトを用いて連結処理した。次に DNA 配列のアライメントを行い、近隣結合法により系統樹を作成した。比較対象としてハスモンヨトウ (アクセッション番号 KF543065.1) を

用い、外群として、近縁種であるスポドプテラリトラリス (アクセッション番号 HM756074) とカイコ (アクセッション番号 EU141360) の COI 遺伝子配列を日本 DNA データバンク (DDBJ) から引用して用いた。

PCR により、国内外のハスモンヨトウ 53 頭の COI 遺伝子配列を増幅し、遺伝子配列解析を行った。その結果、COI 遺伝子全長 1,530 bp のうち 122 ~ 892 bp に位置する 771 bp の部分配列情報を得た。これらの配列を比較したところ、771 塩基のうち 768 塩基は完全に一致し、3 箇所の塩基に変異が確認された (データ未公表)。COI 遺伝子配列の相同性は、最大値 1.000, 最小値 0.996, 平均値 0.999 となり、相同性は極めて高かった (表-2)。また COI はタンパク質をコードする遺伝子であることから、得られた DNA 配列をもとにアミノ酸に変換したところ、すべて同じ配列となり、変異の認められた塩基はすべてアミノ酸置換には影響しないものであった。解析した COI 遺伝子配列を用いて近隣結合法により系統樹を作成した (図-2)。その結果、供試個体のうち 49 頭 (国内全個体, 台湾全個体, タイ-1 ~ 3・5) および比較対象として用いたハスモンヨトウ (アクセッション番号 KF543065.1) を含むクラスターと、東南アジア個体 (タイ-4, インドネシア-1 ~ 3) のみが収束したクラスターに大きく二分された。

III ゲノムプロファイル法による解析

ゲノムプロファイル法は通常の PCR のように遺伝子の両端を挟み込むのではなく、ゲノム中に存在するプライマーと相補的な配列にランダムな位置で張り付き増幅する方法である。従来同様の手法で用いられてきたラビッド PCR は温度条件によりプライマー配列が脱落するなど、同一のサンプルでありながら、再現性が乏しかった。ゲノムプロファイル法ではこの点を改良し、PCR による遺伝子増幅は 94℃ 15 秒間変成, 40℃ 30 秒間アニーリング, 50℃ 30 秒間伸長を 35 サイクル繰り返す。このように極めて低い温度で PCR (ランダム PCR) を行うことにより、プライマーの脱落を防止し、何度実験を繰り返しても再現性を得られるような条件で DNA 断片の増幅を可能にした。ランダム PCR に用いたプライマーは、Hunt (5'-TGC TGC TGC-3') (TAKASAKI et al., 2011), pfM12 (5'-AGA ACG CGC CTG-3'), pfM19 (5'-CAG GGC GCG TAC-3') (NISHIGAKI and SAKUMA., 1994) である。

ランダム PCR による増幅産物は、ゲル温度勾配電気泳動を行った。ゲル温度勾配電気泳動は左右に 15 ~ 55℃ の温度勾配をかけて電気泳動を行うことにより、通常の電気泳動では一本の線に見える DNA の断片を熱変

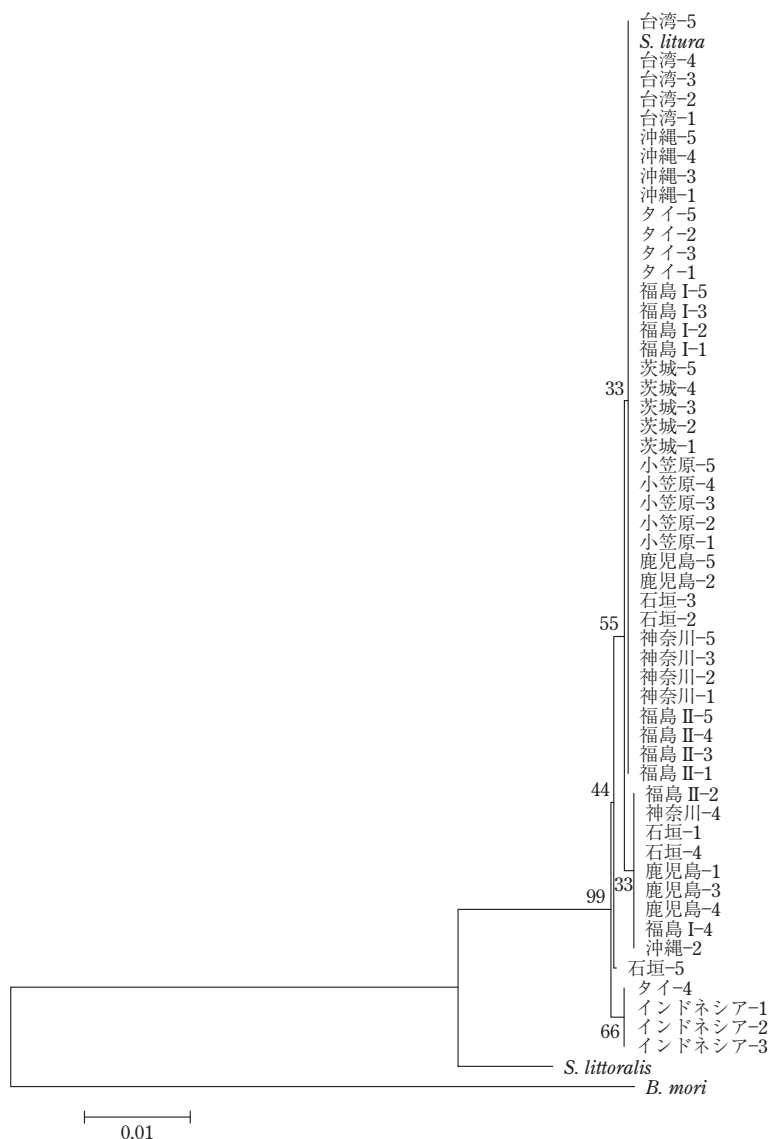


図-2 COI 遺伝子配列に基づくハスモンヨトウの系統樹

比較対象として DNA データベース上に掲載登録されているハスモンヨトウの配列はアクセッション番号 KF543065.1 を用いた。また外群として近縁種であるスボドプテラリトラリス (アクセッション番号: HM756074) とカイコ (アクセッション番号: EU141360) を用いた。それぞれの数字はブートストラップ値を示す。

性させる方法である。このゲル温度勾配電気泳動により、DNA の長さだけでなく、配列の情報により DNA を乖離させ、まるで筆で書いたような挙動を示すことができる (図-3)。温度勾配ゲル電気泳動には、尿素による変性 6% (W/V) アクリルアミドゲルを用いた。泳動試料は PCR 産物と DNA の大きさを測る分子マーカーを混和して作成した。泳動後に泳動図の撮影を行い、各サンプルを比較して、特徴点を調査し近似値を算出し

た。この近似値を比較することで系統樹を作成した。

ゲノムプロファイル法を用いて国内外のハスモンヨトウ 56 頭を解析した結果、全供試個体から電気泳動図が得られた。pfM12 のプライマーを用いて得られた個体特異的な特徴を示すゲル温度勾配電気泳動の泳動図を図-3 に示した。各電気泳動図からは、多くの個体に共通した点 (黒丸, 図-3), および個体特有の点 (白丸, 図-3) がそれぞれ確認できた。得られた電気泳動図から個体間の

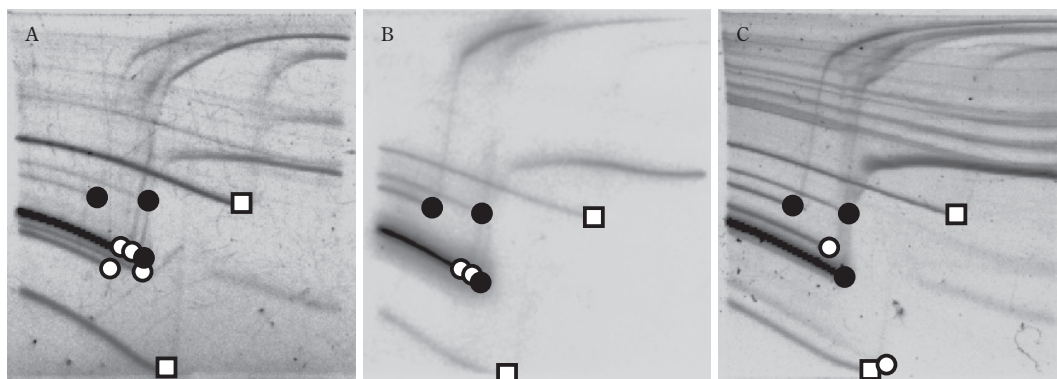


図-3 各ハスモンヨトウのゲル温度勾配電気泳動図
タイ-2 (A), 沖縄-3 (B), 鹿児島-2 (C) に共通する特徴点を黒丸で示す。白丸は各泳動図の特異的なものを、
白い四角はマーカーを示す。

表-2 COI 遺伝子とゲノムプロファイルによる相同性の比較

	COI	GP			
		Hunt	pfM12	pfM19	平均値
最大値	1.000	0.978	0.981	0.981	0.968
最小値	0.996	0.649	0.729	0.766	0.771
平均値	0.999	0.912	0.902	0.933	0.916

最大値, 最小値, 平均値はゲル間の近似値の値より算出した。最大値は 1.000 (100%) である。

相同性を示す近似値をプライマーごとに算出した。三つのプライマーそれぞれの最大値/最小値/平均値は, Hunt: 0.978/0.649/0.912, pfM12: 0.981/0.729/0.902, pfM19: 0.981/0.766/0.933 となった (表-2)。個体間のより正確な相同性を得るために, 三つのプライマーを用いて得られた近似値を平均した (データ未公表)。平均した近似値の最大値/最小値/平均値はそれぞれ, 0.968/0.771/0.916 となった (表-2)。

平均化した近似値を基に, UPGMA 法を用いて作成した系統樹を図-4 に示した。東南アジア個体と国内個体 3 頭 (鹿児島-3・4, 石垣-5) が収束したクラスター, 中国個体と台湾個体の全個体と国内個体 5 頭 (沖縄-1・3~5, 神奈川-3) が収束したクラスター, その他の国内個体 32 頭が収束したクラスターの 3 クラスターが形成された (図-4)。

IV 考 察

COI 遺伝子配列解析の結果, 771 塩基のうち 768 塩基が一致したことから, ハスモンヨトウの COI 遺伝子領域における変異は非常に少ないことが明らかとなった。COI 遺伝子は一般的に変異を生じやすいと言われてい

る。ハスモンヨトウはこれまで 1 種 1 系統とされており, COI 遺伝子配列の解析結果からはその差異はほとんど見いだせなかった。しかし, その一方で, 東南アジア個体のみが収束したクラスターが他のクラスターから離れて分岐した (図-2) ことから, 配列比較の結果, 東南アジア個体の塩基配列に見られた変異は特有のものであり, 東南アジア個体とその他の個体の間には明確な地域的遺伝子差異が存在していた。

次に, ゲノムプロファイル法で得られた近似値の最大値は 0.968 であり, 最小値は 0.771 であった (表-2)。過去の知見 (NAIMUDDIN et al., 2000) によると, ゲノムプロファイル法による解析で得られる近似値は, 0.986 ± 0.003 の値を超えると同一の生物と判定可能であることが示されている。つまりこの値 (0.986 ± 0.003) 以下であれば同一の生物ではないと認定されることから, 本研究で得られたデータからは解析したハスモンヨトウのうち同一生物とする条件を満たす個体は検出されなかった。最小値における相同性は, COI 遺伝子配列が 0.996 に対し, ゲノムプロファイル法では 0.771 であった (表-2)。このことから, ミトコンドリアの特定領域である COI 領域のみの遺伝子配列解析では見られなかった遺伝的変異

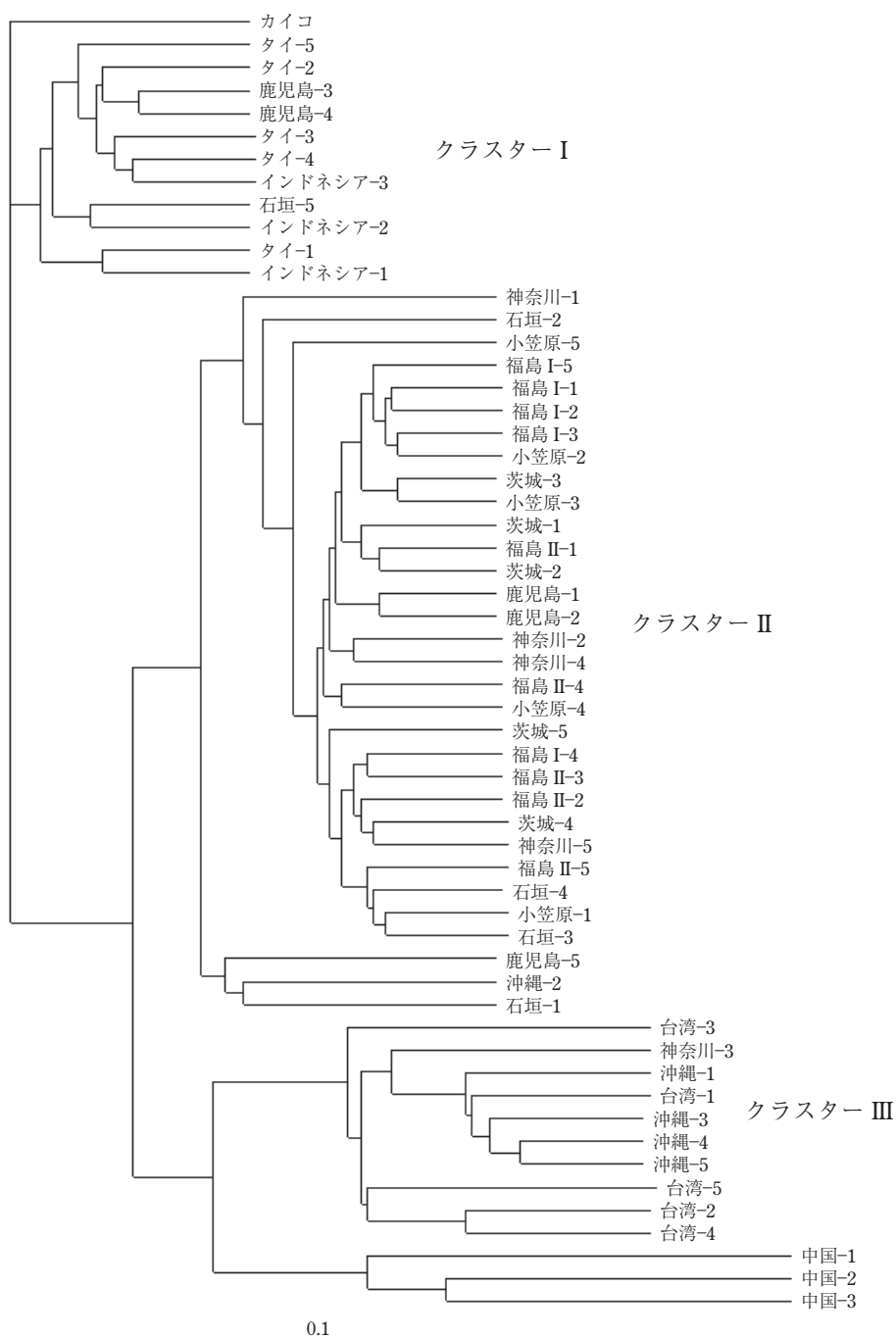


図-4 ゲノムプロファイル法に基づいたハスモンヨトウの系統樹
各系統樹は近似値を集計して導き出したものを UPGMA 法で示したものである。

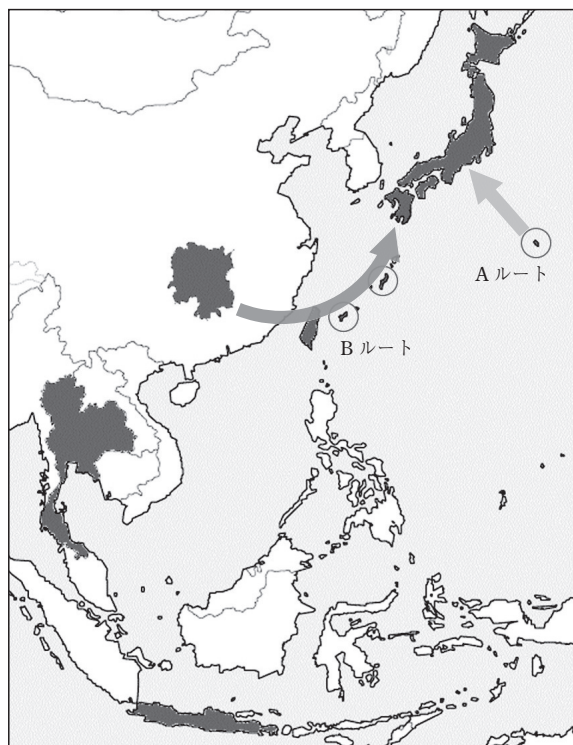


図-5 日本国内へのハスモンヨトウの流入経路

A ルートは小笠原を経由するものを、B ルートは台湾沖縄を経由するルートとそれぞれ示す。

が、ゲノムプロファイル法では生物個体の全ゲノムの簡易診断が可能であるため、検出可能となったと言える。ゲノムプロファイル法で作成した系統樹は、東南アジア個体がすべて一つのクラスターに収束した。これまで、ハスモンヨトウ成虫の形態に差異が見られたという報告例はなかったが、この結果からは、東南アジア個体とその他の個体間に明確な遺伝的差異があることを示すものである。また、東南アジア個体以外のは国内個体クラスターと、中国・台湾・沖縄個体クラスターに大別され、国内個体と中国・台湾・沖縄個体の間にも遺伝子差異が存在することが示唆された。

COI 遺伝子配列解析とゲノムプロファイル法による解析において、どちらの結果からも東南アジア個体とその他の個体の間に明確な遺伝子差異が存在するという考察が得られた。このことから、ハスモンヨトウはタイやインドネシア等の東南アジア地域では固有の個体群を形成していると考えられ、また同地域からは日本国内へは直接流入していないことを間接的に示す結果となった。一方で、ほとんどの国内個体が収束したクラスターが形成されたことから、国内に流入しているハスモンヨトウの

多くは同じ系統の個体であることが示唆された。また国内個体のクラスターには、ハスモンヨトウの通年発生が確認されている小笠原の個体が含まれていることから (SHIGANO et al., 2015), 小笠原から本土への流入ルート (A ルート) の可能性も示された (図-5)。また、これとは別に中国・台湾・沖縄個体为一个のクラスターを形成したことから、沖縄へのハスモンヨトウの流入は中国大陆から台湾を経由しているルート (B ルート) の可能性が強く示された (図-5)。Tojo et al. (2013) が行った性フェロモントラップを用いた実験によると、中国南部や台湾で周年発生しているハスモンヨトウは気流団などの影響によって日本国内へ飛来していることが示唆されている。筆者らの結果もほぼ同様であり、中国や台湾の通年発生地域から日本国内への流入は確実であろう。

お わ り に

ハスモンヨトウの日本国内への流入経路に関する研究はこれまでも多くの研究者によって行われてきた。しかしながらいずれも流入時期や特定地域での調査にとどまっており、国内外の広範な調査を実施した事例は数少ない。また DNA 情報に基づいた調査事例は極めて少なかった。筆者らはハスモンヨトウに対して二つのアプローチでハスモンヨトウの国内流入経路を調査した。その結果、日本国内への主なルートは小笠原諸島を経由する A ルートと台湾沖縄を経由する B ルートの少なくとも二つのルートの存在が明らかとなった。本来であれば韓国のサンプルを一緒に解析するべきであるが残念ながらサンプルを入手できず、今回の調査では韓国経由の第三のルートを実証することはできなかった。ハスモンヨトウの日本国内への流入には台風が大きな影響を与えている可能性があり、台風の多い年は風向きの関係でルートが異なる可能性もある。今後は台風との関係も考慮したうえで通年の調査を実施したい。

引 用 文 献

- 1) 井藤麻未ら (2007): 南太平洋研究 27: 73 ~ 82.
- 2) 松浦博一ら (1991): 応動昆 35: 39 ~ 44.
- 3) 宮園 稔ら (1991): 関西病虫研報 33: 123 ~ 124.
- 4) MOCHIDA, O. and T. OKADA (1974): Misc. Bull. Kyushu nat. agr. expt. Sta. 49: 1 ~ 110.
- 5) MURATA, M. et al. (1998): Appl. Entomol. Zool. 33: 419 ~ 427.
- 6) NAGOSHI, R. N. et al. (2011): J. Insect. Sci. 11: 1 ~ 11.
- 7) NAIMUDDIN, M. et al. (2000): Gene 261: 243 ~ 250.
- 8) NISHIGAKI, K. et al. (1991): Chem. Lett. 1097 ~ 1100.
- 9) ——— and Y. SAKUMA (1994): J. Chem. Software. 2: 96 ~ 107.
- 10) SHIGANO, T. et al. (2015): J. Seric. Sci. Jpn 84: 69 ~ 73.
- 11) TAKASAKA, T. et al. (2011): Leg. Med. 13: 265 ~ 267.
- 12) Tojo, S. et al. (2013): Appl. Entomol. Zool. 48: 131 ~ 140.