

# DNA から紐解く昆虫の種間関係

岸本 圭子

Keiko KISHIMOTO-YAMADA

先端理工学部環境生態工学課程 准教授

Associate Professor, Ecology and Environmental Engineering Course



## 1. はじめに

地球上に生息する昆虫やクモなどを含む節足動物門の多様性は卓越しており、全生物種の半数以上を占める。地球上の生物のさまざまな営みは節足動物とのつながりを通じて支えられているといっても過言ではない。例えば、自ら移動できない植物においては、多くの昆虫がそれらの繁殖を助けている。また、昆虫を餌とする哺乳動物・鳥類も多く、食物網の根幹をなす。このように生態系の基盤をなす昆虫であるが、それらが関係する種間関係についてはわかっていないことが多い。昨今生態学の分野では、対象とする生物に残された他の生物の DNA の痕跡から種間関係や食物網の解明を目指した研究が急速に増えている。本解説では、主に昆虫やクモなど節足動物が関わる種間関係を紐解くツールとしての DNA バーコーディング（メタバーコーディング）について、筆者の研究活動を含めて、紹介する。

## 2. DNA バーコーディング

DNA バーコーディングは、2003 年に Hebert 博士らによって提唱された生物の同定支援手法である (Hebert et al. 2003)。商品についてのバーコードデータを読み込んで情報を得るように、DNA の特定の

塩基配列からその持ち主の種名を特定する手法である。バーコードは、種を識別する程度の変異を持つ特定部位の短い塩基配列を指し、生物群によって領域は異なる。昆虫はミトコンドリア COI の前半部分 600 bp 程度の領域を標準バーコードとする。身元不明のサンプルから DNA バーコード領域を決定し、既知種の DNA バーコード情報が登録された参照データベース（ライブラリと呼ばれる）の情報と照合することで、種名がわかる（図 1）。ライブラリに当該種のバーコード情報が登録されていない場合は、類似性の高い塩基配列をもつ近縁の種やゲ

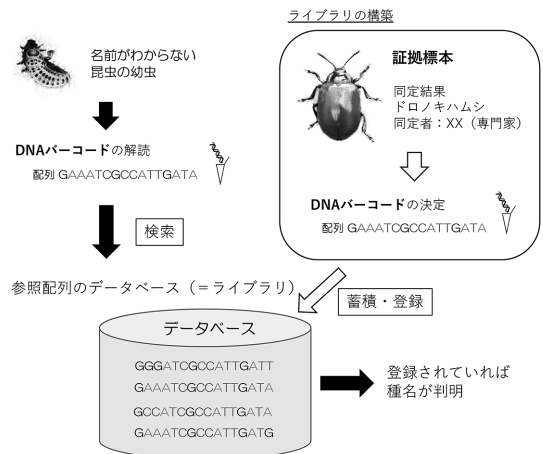


図 1

ループ（科や目）が種候補として導き出される。

さて、生物の名前を調べるとき、皆さんはどのように行うだろうか。市販の図鑑の写真と見比べて種名を決める方法が最も慣れ親しんだ方法であろう。今はインターネットでも専門家や専門機関が掲載している写真図鑑があるので、それらを利用することもできる。私が担当する実習では、より専門的な図鑑・資料を使って受講生が龍谷の森などキャンパス付近で採集してきた昆虫を自分で同定する学習項目がある。同定とは種名を決める行為のことである。受講生は顕微鏡下で昆虫の外部形態の特徴、例えば、触覚の節の数や上翅の毛の密度などを調べ、図鑑の情報と見比べながら同定する。外部形態の特徴は相対的な情報をもとに書かれていることが多く、例えば、“より小さい”とか、“より毛の密度が濃い”など、これまでたくさんの個体を見てきた者にしかわからない表現も多い。経験と知識のない者にとって、昆虫の同定は一筋縄ではいかない難しい行為である。さらに厄介なのは、昆虫の成長段階で形態的特徴が異なることである。日本に生息する昆虫は約4万種、それらの記載は成虫をもとにされるのが基本で、卵や幼虫、蛹など成虫以外の成長段階は把握されていないことも多い。また、外部形態の異なる雌雄も存在し、同種であることの対応づけができていない種もいる。チョウやガの幼虫のように“イモムシ”として広く一般に愛されるグループや、幼虫が農業害虫として重要視されるグループなどを除いて、成虫以外の段階の外部形態をもとに同定ができる図鑑や資料はほとんどない。

そうした状況で、理論的には、非専門家でも基本的なDNA解析技術さえあればDNAバーコーディングによって同定ができるのである。また、同定だけでなく、各成長段階や雌雄の対応づけ、隠蔽種の発見にもつながっている。しかし、この手法が提唱されてから約20年が経過している現在においても、日本では昆虫のライブラリが充実していないため（4を参照）、DNAバーコーディングによる精度の高い同定は実用的でないのが現実である。

### 3. DNAメタバーコーディングによる種間関係の解明

DNAバーコーディングの考え方を基軸に、昨今は大量のDNA配列を高速で解読する次世代シーケンサーを用いて、複数の生物種のDNAが混じっているサンプルから生物種を同時に同定することが可能になった。その手法はDNAメタバーコーディングと呼ばれ、食物網解析や群集解析に用いられる。例えば、昆虫を食べる鳥類は一般的には一度に複数の昆虫を採食し、餌となった昆虫類は鳥類の体内で消化され、糞として排出される（図2）。糞の中には複数の餌生物由来のDNA断片が残されるため、糞サンプルからそれらのDNAを抽出する（図2）。同定に使うバーコード領域は、昆虫を含む広範囲の無脊椎動物で増幅可能なユニバーサルプライマーを用いて、COI領域の150~300bp程度の短い配列を解読することが多い（Ando et al. 2019）。それら餌生物のバーコード配列と、ライブラリのデータとを照合し、高い類似性の配列をもつ餌候補生物を絞り込む（図2）。鳥類や哺乳動物の食性解析は従来採餌行動の観察や、糞や胃の中に残った消化中の昆虫破片をもとに行われていたが、ここ数年で糞サンプルを使ったDNAメタバーコーディングによる研究が飛躍的に増えている（Ando et al. 2019）。DNAメタバーコーディングによる調査が、従来の調査方法に比べて特に有利性があるのは、1) 希少な生物や、

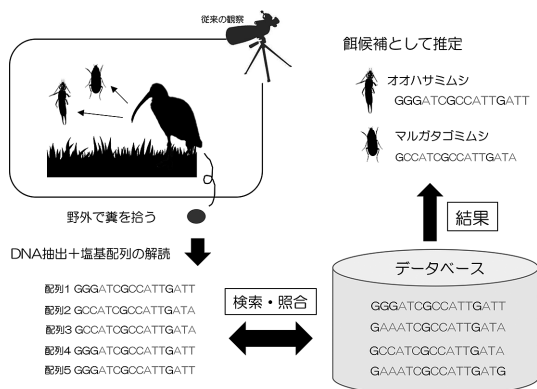


図2

2) 直接観察が難しい系, 3) 特殊な消化方法をもつ生物など, これらを対象とする研究においてである (岸本・伊藤 2015).

希少な生物とは, ここでは絶滅危惧種など保全の対象となる生物を指す. これらの餌生物の情報は, 保全計画を立てる上で必須である. こうした種はすでに個体群サイズが小さくなっていることが予想され, 直接観察によって十分なデータを得るのが難しい. また, 調査者が対象動物を追跡する行為が, それらの採餌行動にストレスなど負の影響を与える可能性も予想される. かつて野生絶滅した鳥類のトキは, 種の保存法の国内希少野生動植物種に指定され, 環境省主導の野生復帰事業が進められている. それらの餌生物はこれまで, 採餌行動の直接観察 (Endo et al. 2003) や死亡個体の胃内容の直接観察 (大脇ら 2015, 岸本 2019) によって明らかにされている. 前者はトキの採餌行動に影響を与えないように, 100 m 以上離れた位置からフィールドスコープを用いて観察した. その結果, トキは特定の季節に昆虫を含む小型の動物を高頻度で採食することが解明されたものの, 望遠レンズを使っても小型の動物の種類まで特定できたケースは限られた (Endo et al. 2003). 後者の胃内容の直接観察は, 前者より多くの小型の動物, 特に昆虫類の利用が明らかにされたが (大脇ら 2015), 死亡個体が回収されたときのみ調査が実行可能なのでそもそもサンプル数が限られている. 最近では, DNA メタバーコーディングによるトキの食性調査が行われ, トキにストレスを与えることなく, 約 500 の糞サンプルを回収し, 従来の方法よりはるかに多種多様な餌生物の利用を明らかにした (向井・関島ら 未発表). 生物に影響を与えることなく大量のサンプルを確保できることや, 従来の方法より迅速に行うことができるため, 今後さまざまな保全の現場で本手法による調査が増えることが期待される.

地面の下の土壤中や熱帯雨林の林冠部 (地上から 30~60 m 部分を指す) など, 直接観察するのが難しい生態系に生息する生物群を対象にした研究にお

いても, DNA メタバーコーディングは有効であると考えられる. これらの生態系は, 深海と合わせて, 生物多様性解明への最後のフロンティアと表されるように (Lowman & Wittman 1995 など), 未知な種が存在するだけでなく, 種間関係についてもわかっていないことが多い. 筆者らはかつて, 東南アジア熱帯雨林の林冠部に生息する植食性昆虫と植物との相互作用網について研究を行った (Kishimoto-Yamada et al. 2013). 熱帯では古くから植食者は寄主植物に特異的であるとの通説があり, 1 種の昆虫が利用する植物種は 1~数種の限られた植物しか利用しないと考えられていた. しかし, 実際にはアクセスが難しい林冠部での調査はほとんど行われてこなかった. 筆者らの研究サイトにも, 林冠部の調査のために, はしごや吊り橋, 研究用クレーンが設備されていたが, 前者ではアクセス可能な樹種が限られていた. 後者の研究用クレーンは, アクセス可能な樹種は増えるが安全上の観点から, 対象昆虫が採餌を行う夜間の調査ができなかった. そうした理由から, 林冠部の植食性昆虫の寄主植物を調べるためには労力と時間がかかっていた. そうした困難を打破するため, 筆者らは対象昆虫が灯火に集まる性質を利用して, 灯火による定量的な採集を行い, それらの胃内容に残された植物 DNA 断片から寄主植物を科レベルで同定した (Kishimoto-Yamada et al. 2013)\*. その結果, 対象種の多くで複数の科を餌として利用する広食性であることが示唆され, 従来熱帯で広く信じられてきた植食性昆虫の高い寄主特異性に関する仮説を覆すものとなった. また, 本結果では多数の種類を利用しているだけでなく, 利用植物の生育場所は広範囲に渡っていることも明らかにされた. このことから対象昆虫は比較的高い移動能力をもち, 広範囲で採餌をしていると推測された. 移動性の高い昆虫の採餌行動の追跡は本来難しく, 対象生物の移動範囲の広さも直接観察が難しい系に当てはまるだろう. こうした有利性を鑑みて, 筆者らはここ数年, 移動範囲の広い哺乳動物の糞を餌として利用する糞虫類の胃内容分析に挑戦している.

また、節足動物の中には、消化液を口から出し溶かして、その液を吸い取る“体外消化”を行うものがある。クモも体外消化を行う。体外消化をする動物の食性は、胃内容の餌生物の断片を直接調べることはできないので、採餌行動の観察が主である。一般にクモは広く何でも食べるジェネラリストと考えられてきたが、実際にはクモの餌生物についてはわかっていないことも多い (Kennedy et al. 2020)。クモは昆虫や他個体のクモなどを餌とする捕食者で、農耕地では害虫の天敵としても知られている。それらの餌内容を明らかにすることは生物多様性を活かした農法の確立や、多様性を表す環境指標としても重要であり、クモを対象にした DNA メタバーコーディングによる食性解析が注目されている。これまでの研究では、DNA メタバーコーディングによって、クモの生活型（造網性や自由生活者など）や微小な行動場所の違いで餌生物が異なるといった傾向が明らかになっている (Kennedy et al. 2020 など)。一方で、クモのように同種を含め同じ節足動物門の動物を餌としている捕食者の場合は、これら節足動物群の広範囲で増幅可能なユニバーサルプライマーを使うと、相対的に多く消化の影響も受けていない捕食者自身の DNA が被食者より増幅されやすくなるといった問題も知られている。そのため、捕食者自身の DNA を増やさないためのブロッキングプライマーを使うなどの工夫がされている (Ortiz et al. 2022 など)。ブロッキングプライマーを使うことで同種他個体や近縁種の利用は検出されなくなるため、クモの場合は最終的には観察結果と合わせた評価が必要かもしれない。また、体外消化だけでなく、鳥類で見られる、砂嚢（消化器官の一種）で餌を粉砕するような場合にも、DNA メタバーコーディングが有効であることが示されている (安藤 2019)。

#### 4. 日本産昆虫ライブラリの充実に向けて

これまで紹介してきた DNA メタバーコーディングによる研究は極端に言えば、ライブラリが整備さ

れていなくても十分な成果が得られる場合が多い。国際的には、様々な生物を対象とした網羅的な DNA バーコードライブラリを構築するためのバーコードオブライフプロジェクトが立ち上げられ、巨大なライブラリが構築されつつある。そのため、日本産昆虫のライブラリが整備されていなくても、国外の種のバーコード情報が登録されていれば、目や科レベルの同定は可能である。一方で、昆虫の中には、同じ科内や属内でも種間で生態的特性が異なる場合がある。また、環境に対する反応が種間で異なる場合も知られ、保全の現場では種レベルの同定がより詳細な保全計画や順応的管理の構築につながると考えられる。さらに、筆者らが関わっている地域が中心となって進めている保全の現場では、種名（特に和名）を伝えることで初めて生きた情報になることも実感している。そのためにはライブラリを充実させ、同定の精度を高める必要がある。例えば、DNA バーコード登録のためのデータベース Barcode of Life Data Systems (BOLD) には、日本産昆虫の既知種約 4 万種のうち、バーコード配列が登録されている種はわずか 10 分の 1 程度で、ほとんどの分類群で登録カバー率 10% 以下の低い値が示されている (岸本ほか 2022)。そもそも、日本産昆虫のライブラリ構築は、網羅的に昆虫を収集し、分類学的知識を有する専門家が種の同定をした個体（証拠標本）とその個体から決定されたバーコード領域が収集される必要がある。そして、それらの情報が公開されたデータベースに登録されてはじめて利用者の実用性が高まる (図 1)。日本では、バーコードオブライフのような、昆虫のバーコード情報を包括的に集約する動きは停滞しており、個人の研究者や個々の研究機関レベルでライブラリ作成が進められている。筆者らはライブラリ充実のため、研究者間の情報共有のためのプラットフォーム作りなどを進めているものの (岸本ほか 2022)、現状の進め方では、残り 3 万 5 千種程度のバーコード情報が登録され、実用的な同定が可能になるまでには相当な時間がかかるものと考えている。

DNA メタバーコーディングによる種間関係の研究で精度の高い同定を担保するためには、自作の参照ライブラリ（ローカルライブラリ）を作成するのが一つの解決法である。ローカルライブラリは、既存のライブラリを対象生物用にカスタマイズする手法のほか（Vesterinen et al. 2013）、対象となる地域や分類群など範囲を限定して実際に生物を採集し作成する方法がある。筆者らの研究では、コウチュウ目オサムシ科のローカルライブラリを作成し、トキの糞から解読されオサムシ科と絞り込まれた配列の8割について、確からしい種推定を可能にした（未発表）。本結果から、ローカルライブラリを作成することが同定の精度を高めることに有効であると考えられるものの、種数も生活様式も多様な昆虫を対象にローカルライブラリを作成するのは極めて困難で研究例はまだ限られている。

## 5. おわりに

筆者はトキの胃内容から直接餌生物の断片を観察する手法も行っており、その断片からトキの巣の中の新しい種間関係を発見した（岸本 2019）。実際に目で断片を確認し、ジグソーパズルのように断片をつなぎ合わせ分類・同定するのは時間のかかる大変な作業だが、種を特定できたとき、特に意外な種を発見した時は格別に嬉しい。一方、DNA メタバーコーディングによる調査では同じ興奮を味合うことはできない。しかし、直接観察では“あり得ない”発見の連続で驚きの幅が広がった。例えば、熱帯で植食性昆虫の広食性を示した研究では、同じ昆虫種が被子植物内の複数の科を利用しているだけでなく、系統的に離れた裸子植物やシダ植物までも採食していることが示唆された（Kishimoto-Yamada et al. 2013）。熱帯の植食性昆虫の採餌様式でここまで広い食性を示した研究はなく、従来の方法であればここまで系統的に離れた樹種を調査対象とすることもない。こうした驚きを実感すると同時に、“あり得ない”ことがありそうなことであることを検証する難しさにも直面している。サンプル採集から解析

まで様々な段階で無関係のDNAのコンタミネーションが発生する恐れがあるため、得られた配列の妥当性を決めるのは知識や経験、工夫が必要とされる。今後も従来の調査方法や実証実験などうまく組み合わせて、少しでも多くの昆虫の種間関係を紐解いていきたい。

\*本研究を実施した時は次世代シーケンサーを使える環境はほとんどなく、別の手法を用いて複数の被食者DNAを分離している。

## 引用文献

- [1] Ando, H., Mukai, H., Komura, T., Dewi, T., Ando, M., Isagi, Y. (2020) Methodological trends and perspectives of animal dietary studies by noninvasive fecal DNA metabarcoding. *Environmental DNA*, 2(4), 391-406.
- [2] 安藤温子 (2019) DNA メタバーコーディングで探る絶滅危惧種の食物. *森林科学*, 87, 5-7.
- [3] Endo, C., Nagata, H. (2013) Seasonal changes of foraging habitats and prey species in the Japanese Crested Ibis *Nipponia nippon* reintroduced on Sado Island, Japan. *Bird Conservation International*, 23(4), 445-453.
- [4] Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., DeWaard, J. R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- [5] 岸本圭子, 伊藤元己 (2015) DNA バーコーディングを活用した昆虫の種間相互作用網の解明. *日本生態学会誌*, 65(3), 255-266.
- [6] Kishimoto-Yamada, K., Kamiya, K., Meleng, P., Diway, B., Kiang, H., Chong, L., Itioka, T., Sakai, S., Ito, M. (2013) Wide host ranges of herbivorous beetles? Insights from DNA barcoding. *PLoS One*, 8(9), e74426.
- [7] 岸本圭子 (2019) トキの巣内雛の胃内容物から検出されたアカマダラハナムグリの成虫. *昆蟲*. ニューシリーズ, 22(4), 155-158.
- [8] 岸本圭子, 神保宇嗣, 中濱直之 (2022) 日本産昆虫のDNA バーコーディングの現状. *昆虫と自然*, 57(14), 2-6.
- [9] Lowman, M. D., Wittman, P. K. (1995) The last biological frontier? Advancements in research on forest canopies. *Endeavour*, 19(4), 161-165.

- [10] 大脇淳, 高橋雅雄, 本間穂積, 金子良則, 柴田直之, 永田尚志 (2015) 野外で死亡したトキの胃内容物. *Strix*, 31, 193-200.
- [11] Ortiz, D., Petráková Dušátková, L., Pekár, S. (2022) Gut content metabarcoding of three widespread Iberian ant-eating spiders reveals specialisation on the same abundant harvester ants. *Ecological Entomology*, 47, 305-313.
- [12] Sakai, S., Momose, K., Yumoto, T., Kato, M., Inoue, T. (1999) Beetle pollination of *Shorea parvifolia* (section *Mutica*, Dipterocarpaceae) in a general flowering period in Sarawak, Malaysia. *American Journal of Botany*, 86(1), 62-69.
- [13] Vesterinen, E. J., Lilley, T., Laine, V. N., Wahlberg, N. (2013) Next generation sequencing of fecal DNA reveals the dietary diversity of the widespread insectivorous predator Daubenton's bat (*Myotis daubentonii*) in Southwestern Finland. *Plos One*, 8, e82168.