

## DNA バーコーディング法を利用したツマアカスズメバチの食性解析の試み

高橋 稜<sup>1)</sup>・清 拓哉<sup>2)</sup>・高橋 純<sup>1)</sup>

An attempt to identify the diets of *Vespa velutina* using the DNA barcoding method

Ryoichi TAKAHASHI<sup>1)</sup>, Takuya KIYOSHI<sup>2)</sup> and Jun-ichi TAKAHASHI<sup>1)</sup>

スズメバチ亜科 (Vespinae) のグループは、主に昆虫やクモなどを捕食し、その場で筋肉部分のみを肉団子 (肉片) にして巣へ持ち帰り幼虫のタンパク源として分配する (松浦・山根, 1984)。これまでスズメバチ類の食性解析は、野外で捕食行動の観察や巣に持ち帰ってきた肉団子を顕微鏡で同定することにより行われてきた (Archer, 1977; Gambino, 1992; 松浦・山根, 1984)。松浦・山根 (1984) は、在来スズメバチ属 (*Vespa*) 5 種について約 2,000 個の肉団子から、被食昆虫を同定している。この結果から、8 目の昆虫類を捕食している広範囲捕食者 (generalist) であったキイロスズメバチ *Vespa simillima* や、特定のハチ類のみを餌とする専門食 (specialist) であるヒメスズメバチ *V. ducalis* など、種によって食性が異なることが明らかにされている。しかし、肉団子の形態学的手法による被食種の同定は、昆虫類の高度な同定能力が要求されることに加えて、肉団子はすでに咀嚼されているため、そもそも同定が困難である場合が多いことも問題である。例えば、ハワイで外来種として定着している *Vespula pensylvanica* の食性解析の例では、322 個のうち 57 個 (17.5%) しか被食種の同定に成功していない (Gambino, 1992)。

近年では、肉団子から単離した DNA を用いた DNA バーコーディング法によって、スズメ

バチ亜科の食性解析が行われている (Wilson *et al.*, 2009)。*V. pensylvanica* では、働き蜂が持ち帰ってきた 465 個の肉団子のうち 390 個 (約 84%) で科レベルまでの同定に成功している (Wilson *et al.*, 2009)。フタモンアシナガバチ *Polistes chinensis* では、肉団子の回収の手間を省くため、巣内にいる幼虫の胃の未消化内容物から DNA を単離し、299 個のうち 211 個 (70%) を内容物の DNA を同定することができた (Ward and Ramon-Laca, 2013)。

アジアの広域分布種であるツマアカスズメバチ *V. velutina* は、2003 年頃から韓国や欧州へ侵入し、分布拡大を続けている (Kim *et al.*, 2006; Haxaire *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2012; Rome *et al.*, 2013)。侵入地では、在来種の減少や養蜂被害に加えて、人への衛生被害が報告されており (Monceau *et al.*, 2014)、侵略的外来種として位置づけられている。日本では、2012 年 10 月に長崎県対馬市 (境・高橋, 2014) で、2015 年 9 月に福岡県北九州市 (Minoshima *et al.*, 2015) で発見されている。対馬市では、2013 年以降個体数が急激に増加し、生息範囲が拡大している。

外来生物による在来生物の捕食は、生物多様性の減少を引き起こす要因の一つとして位置づけられている (Clavero *et al.*, 2009)。スズメバチ属は、生態系において上位捕食者に位置するため、在来生態系へ大きな影響力を持っている

<sup>1)</sup>〒603 8047 京都市北区上賀茂本山 京都産業大学大学院生命科学研究科

<sup>2)</sup>〒305 0005 茨城県つくば市天久保 4 1 1 国立科学博物館動物研究部・陸生無脊椎動物研究グループ

と推測される．対馬島では，ツマアカスズメバチは，在来スズメバチより大きなコロニーを形成するため（高橋ら，2015），本種の帰化による在来生物への影響が懸念されている．

対馬島は，朝鮮半島と九州本土の中間に位置しており，大陸系の種や固有種や固有亜種などが生息している．本種の帰化による在来生物群集への影響を明らかにするために，本種の食性を明らかにする必要がある．侵入地のフランスでは，働き蜂が持ち帰ってきた肉団子（2 500 個）の形態観察から膜翅目（55%）と双翅目（34%）が主な捕食種であった（Villemant *et al.*, 2011）．しかし，従来の方法で問題点として挙げられていたように，形態での同定は困難であることから，肉団子の約30%は同定することができなかった．肉団子を利用した DNA バーコーディングを利用することで，同定精度は高くなると予測される．しかしツマアカスズメバチは高所に営巣する習性があることから（高橋ら，2015），巣へ接近することが困難である．そこで今回我われは，駆除された巣に残っている幼虫の未消化内容物を用いた DNA バーコーディング法による食性解析の検証実験を行った．

2015年9月25日に，長崎県対馬市豊玉町芦浦

で駆除されたツマアカスズメバチの巣から5 齢幼虫10個体を回収し，- 25℃で保存した．解剖時に幼虫の体液が腸内容物へ混入することを防ぐため，解剖3日前より99.5%エタノール液浸によって脱水を行った．解剖および腸内容物の回収は実体顕微鏡下で行った．まず，解剖バサミを用いて，幼虫の腹側の肛門から頭部にかけて切開した（図1 ①，②）．この時，腸を傷つけないよう，体の中心軸を避けて解剖した（図1 ③）．ピンセットを用いて腸全体を体内から取り出した（図1 ④）．幼虫の細胞のコンタミネーションを避けるため，解剖バサミを取り換え，口器付近を分断した（図1 ⑤）．新しいピンセットを用いて，宿主細胞を避けつつ口器側の断面から内容物（約1 mm四方）を回収した（図1 ⑥）．内容物をキムワイブにあててエタノールを吸収させ，1.5ml マイクロチューブへ入れた．蓋を開けたまま5 分間放置し，エタノールを完全に除去した．

DNA 抽出には，NucleoSpin Tissue（Takara）を使用した．PCR には，動物の一般的なバーコード領域である CO1 遺伝子の増幅に広く利用されているプライマー（LCO1490: 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'，HCO

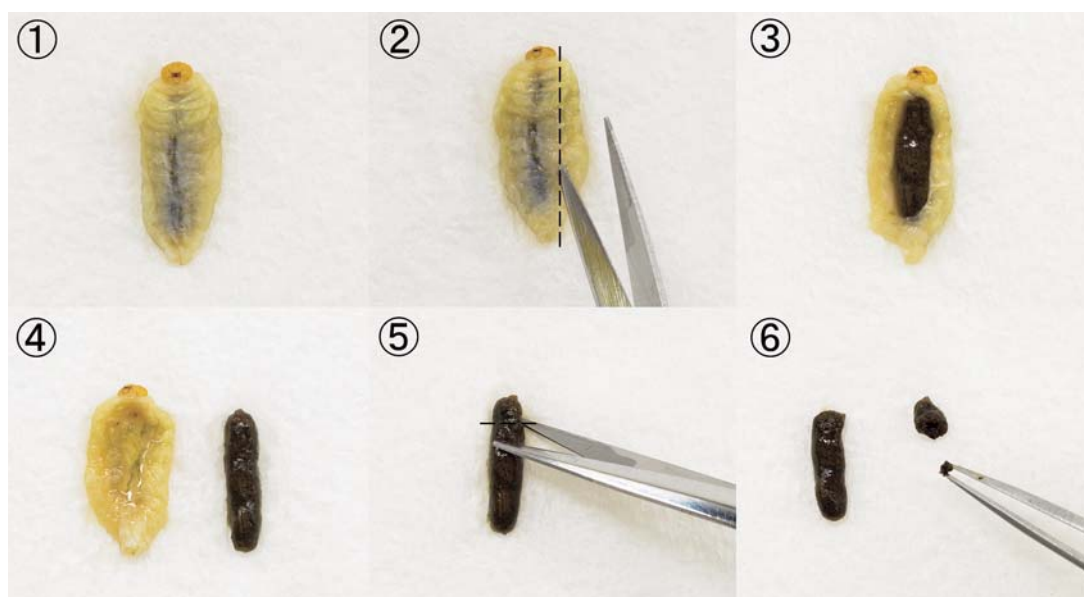


図1．ツマアカスズメバチの幼虫から腸内物を回収する工程  
（写真はツマグロスズメバチ *V. affinis* の5 齢幼虫）．

2198: 5 TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3 ) を使用した (Folmer *et al.*, 1994). PCR には Ex tag DNA polymerase (Takara) を使用し, 温度条件は, 98℃を 2 分の処理を行い, 98℃で10秒, 45℃で30秒, 72℃で 1 分を 5 サイクル, 続けて98℃で10秒, 50℃で30秒, 72℃で 1 分を30サイクル行った. 最後に72℃で 7 分の最終伸長反応を行った. PCR 産物は, 1.2% アガロースゲル電気泳動で増幅産物の有無を確認した.

PCR 産物には, 多種の被食者由来の CO 1 遺伝子が混在している状態にあるため, クローニングを経てシーケンスを行った. Ligation Mighty Mix (Takara) を使用し, PCR 産物をプラスミドベクター (T-Vector pMD20: Takara) に挿入した. 得られたプラスミドは, 大腸菌 (E. coli JM109 Competent Cells: Takara) に形質転換させた. 大腸菌を LA 培地に播種し, 37℃で16

時間培養した. 以上の操作は添付のプロトコルに従った. インサートが挿入されたプラスミドが形質転換された大腸菌コロニーを, 1 個の未消化内容物あたり 3 ~ 8 個回収し, 30μL の AE buffer (QIAGEN) に溶解した. 98℃で 3 分の加熱処理を行い, 4℃, 14,000rpm で 3 分間の遠心によりプラスミドを上清に回収し, 鋳型 DNA として PCR に使用した. PCR には, M13 Forward 20 (5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3') と, M13Reverse Primer (5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3') を使用した. 温度条件は, 98℃を 2 分の処理後, 98℃で10秒, 55℃で30秒, 72℃で 1 分を30サイクル, 72℃で 7 分の最終伸長を行った. PCR 産物は, ExoSAR (Affymetrix) により精製した. サイクルシーケンスには, M13Forward 20のみを使用し, BigDye Cycle sequencing kit ver3.1 (Life technology) より行い, Genetic Analyzer 3130x (Life technology) で解析

表1 ツマアカスズメバチ幼虫の未消化内容物の DNA バーコーディング法による被食種同定結果

幼虫の個体番号	分類群	N	アクセッション番号	一致率(%)
No.1	内翅上目 ( <i>Endopterygota</i> sp.)	1	KP420993	89.5
	オオアオカミキリ ( <i>Chloridolum thaliodes</i> )	2	AB457202	86.7 87.7
	ジョロウグモ ( <i>Nephila clavata</i> )	1	HQ441927, KP226138	90.5 99.8
	オオアオカミキリ ( <i>Chloridolum thaliodes</i> )	1	AB457202	85.7
	オニヤンマ科 ( <i>Cordyligaster</i> sp.)	1	KM987799	90.5
No.2	トゲグモ ( <i>Gasteracantha kuhlii</i> )	1	JN817164	99.5
	コガタコガネグモ ( <i>Argiope minuta</i> )	3	JN817159	99.2 99.5
	ツクツクボウシ ( <i>Meimuna opalifera</i> )	1	GQ527088	93.0
No.3	内翅上目 ( <i>Endopterygota</i> sp.)	3	KP420993	89.7 89.9
No.4	タカネイエバエ属 ( <i>Spilogona</i> sp.)	1	KC626328	82.8
	未記載種	2	-	-
No.5	ジョロウグモ ( <i>Nephila clavata</i> )	1	KP226138	99.7
	ツマアカスズメバチ ( <i>Vespa velutina</i> )	1	JQ780454	100
	ベッコウヒラタシデムシ ( <i>Calosilpha brunneicollis</i> )	1	HM180488	90.1
	ホソイエバエ属 ( <i>Helina</i> sp.)	1	KM627028	81.5
	オンブバッタ ( <i>Atractomorpha lata</i> )	1	HM180485	99.8
No.6	オニヤンマ科 ( <i>Cordyligaster</i> sp.)	2	KM987782	84.4 84.5
	タカネイエバエ属 ( <i>Spilogona</i> sp.)	1	HM891797	83.3
	未記載種	2	-	-
No.7	ホソイエバエ属 ( <i>Helina</i> sp.)	1	KM627028, KM972112	83.3 83.8
	イエバエ科 ( <i>Muscidae</i> sp.)	3	HQ979158	81.3 84.3
	未記載種	1	-	-
No.8	ツクツクボウシ ( <i>Meimuna opalifera</i> )	1	GQ527088	99.0
No.10	ツマアカスズメバチ ( <i>Vespa velutina</i> )	1	JQ780454	99.2
	内翅上目 ( <i>Endopterygota</i> sp.)	4	KP420993	89.6 89.8

No.9 は配列が得られなかった。

した。得られた配列は、GENETYX Ver.10 (ゼネティックス) で編集し、DDBJ の BLAST による相同性検索を行った。相同性の結果、最も一致率が高い種を被食種とした。

10個体の幼虫未消化内容物のうち、9個で被食種の塩基配列を得ることができた。相同性検索の結果、鞘翅目、蜻蛉目、半翅目、双翅目、直翅目、クモ目の合計6目が検出された(表1)。ツマアカスズメバチは、オニヤンマ科、鞘翅目昆虫、双翅目類を捕食する能力があり、近縁種と位置づけられているキロスズメバチやコガタスズメバチと食性が類似する広範囲捕食者であると考えられた。また、野外でニホンミツバチ *Apis cerana* の働き蜂成虫を捕食するところが観察されており、本種はさらに多様な昆虫類を捕食していると予測される。また、対馬には6目(蜻蛉、鞘翅、鱗翅、半翅、直翅、アミメカゲロウ)107種の絶滅危惧昆虫(長崎県レッドリストH22年度改訂)や、大陸系の固有亜種が生息している。今回、これらの種は検出されなかったが、解析したサンプル数が少ないこと、サンプルが秋に限定されていたこと、被食種全体から見た場合、相対的に少ないことなどが原因であると思われる。おそらく小型である種や被食量が少ない種ほど検出されにくいので、このような種を検出するための方法を改良する必要があると思われる。

口器側と肛門側の合計4か所から回収した内容物を用いたPCRでは、口器側から肛門側にかけてPCRの成功率が減少し、一部のサンプル(25%)は肛門付近の内容物からPCR増幅産物を得ることができなかった。スズメバチの幼虫は、蛹化直前に1度だけ糞を排出するため、肛門付近には消化物が堆積している。肛門付近の内容物は、DNAの断片化が進行しているため分析が困難であり、肛門より口器側の内容物は分析可能なDNAが多く残っていることが示唆された。そこで今回は、劣化の少ないDNAを得るため、口器側の内容物のみを解析に用いた。肛門側の比較的消化の進んだ内容物におけるPCR増幅効率の低下を解決するために、増幅断片長の短いプライマーペアの設計が必要に

なると思われる。ただし、短い配列情報では、相同性検索による餌生物種同定精度が低下するため、複数のプライマーを用いるなどの工夫が必要となることが予測される。

今回の食性解析では、6目の生物が検出されたが、これまでの形態観察とおおむね一致していた。さらにDNAバーコーディング法では、種類によって属や科や種まで同定することができた(表1)。この結果は、DNAバーコーディング法による食性解析がツマアカスズメバチにおいても有効である可能性を示唆する結果である。最近では、次世代シーケンサを用いた食性解析が利用されており、さまざまな動物類に対して短時間かつ効率的に被食種の塩基配列が得られるようになった(Ando *et al.*, 2013)。今後、次世代シーケンサを利用してハイスループット解析による網羅的な食性解析に対しても幼虫の未消化内容物を利用した手法が有効であると考えている。

今回の対馬におけるツマアカスズメバチの被食種同定の検証実験から、DNAバーコーディング法の部分で2つの課題点が見つかった。まず、双翅目でDNAバーコード領域の登録種数が少なく、種や属まで同定できる数が少ないことがあげられる。今回は81.3%から84.5%の一致率にとどまっており、同時に双翅目のDNAバーコーディング化を進める必要がある。さらに本種の環境リスクを評価するためには、種レベルでの同定精度が求められるが、対馬に生息する絶滅危惧昆虫の約半数は、ミトコンドリアDNAのCO1遺伝子の塩基配列情報が登録されていない。全ての種の配列情報を解析することは困難であるため、今後は絶滅危惧種や大陸系種などの希少種を優先的に、現存する標本を利用して遺伝子解析を行い、データベースを作成することが重要であると考えている。DNAバーコーディング法は、比較的短い塩基配列を解析するため、古い乾燥標本からでもDNA単離が可能であることから地元の自治体や研究者などと連携して解析を進めて行きたいと考えている。

今回の解析では、9個体のうち2個体の幼虫から、ツマアカスズメバチの配列が検出されて

いる(表1)。これは解剖時に本体由来のDNAが混入したためであると考えている。この問題の解決には、ブロッキング・プライマーの使用や次世代シーケンサを利用する場合はペプチド核酸によって、本体由来のDNAが混入することを抑えることができるかもしれない。

今回は、DNAバーコーディング法によるツマアカスズメバチの食性解析の検証を行ったところ、幼虫の未消化内容物からDNAが単離できること、DNAバーコーディング法によって分類群によっては種まで同定可能性あることがわかった。この方法を利用することで、ツマアカスズメバチの食性解析が可能であるため、在来生態系への捕食による影響調査に利用できることが示唆された。

## 謝 辞

本研究におけるツマアカスズメバチサンプルは、環境省九州地方環境事務所に提供いただいた。ここに厚くお礼申し上げる。本研究は、JSPS 科研費26440250と第25期プロナトゥーラ・ファンドの助成を受けたものである。

## 文 献

Ando, H. Suzuki, S. Horikoshi, K. Suzuki, H. Ume-hara, S. Inoue-Murayama, M. Isagi, Y. 2013. Diet analysis by next-generation sequencing indicates the frequent consumption of introduced plants by the critically endangered red-headed wood pigeon (*Columba janthina nitens*) in oceanic island habitats. *Ecology and Evolution* 12:4057-4069.

Archer, ME. 1977. The weights of forager loads of *Paravespula vulgaris* (LINN.) (Hymenoptera: Vespidae) and the relationship of load weight to forager size. *Insectes Sociaux* 24: 95-102.

Gambino, P. 1992. Yellowjacket (*Vespula pensylvanica*) predation at Hawaii Volcanoes and Haleakala National Paries: identity of prey items. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society* 31: 157-164.

Clavero, M. Brotons, L. Pons, P. Sol, D. 2009. Prominent role of invasive species in avian biodi-

versity loss. *Biological Conservation* 142: 2043-2049.

Folmer, O. Black, M. Hoeh, W. Lutz, R. Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5): 294-299.

Haxaire, J. Bouguet, JP. Tamisier, JP. 2006. *Vespa velutina* Lepeletier, 1836, une redoutable nouveauté pour la faune de France (Hym., Vespidae). *Bulletin de la Société Entomologique de France* 111: 194.

Kim, JK. Choi, M. Moon, TY. 2006. Occurrence of *Vespa velutina* Lepeletier from Korea, and a revised key for Korean *Vespa* species (Hymenoptera, Vespidae). *Entomologica Research* 36: 112-115.

松浦誠・山根正気 1984. スズメバチ類の比較行動学. 北海道図書刊行会 札幌.

Minoshima, YN. Yamane, S. Ueno, T. 2015. An invasive alien hornet, *Vespa velutina nigrithorax* du Buysson (Hymenoptera, Vespidae), found in Kitakyushu, Kyushu Island: a first record of the species from mainland Japan. *Japanese Journal of Systematic Entomology* 21(2): 259-261.

Monceau, K. Bonnard, O. Thiery, D. 2014. *Vespa velutina*: a new invasive predator of honeybees in Europe. *Journal Pest Science* 87: 1-16.

長崎県レッドリスト (H22年度改訂). 2014. <https://www.pref.nagasaki.jp/shared/uploads/2013/07/1373430365.pdf>.

Rome, Q. Dambrine, L. Onate, C. Muller, F. Ville-mant, C. Garcia-Perez, AL. Maia, M. Esteves, PC. Bruneau, E. 2013. Spread of the invasive hornet *Vespa velutina* Lepeletier, 1836, in Europe in 2012 (Hym., Vespidae). *Bulletin de la Societe Entomologique de France* 118(1): 15-21.

境良朗・高橋純一 2014. 対馬で発見・捕獲されたツマアカスズメバチ (*Vespa velutina*) の働き蜂について. *昆虫* 17(1): 32-36.

高橋純一・境良朗・山村辰美・清拓哉・高橋純一 2015. 対馬で初めて採集された外来種ツ

Villemant, C. Muller, F. Haubois, S. Perrard, A. Darrouzet, E. Rome, Q. 2011. Bilan des Travaux (MNHN et IRBI) sur l'invasion en France de *Vespa velutina*, le frelon asiatique prédateur d'abeilles. In: Barbançon J-M, L'Hostis, M. (ed) Journée Scientifique Apicole JSA, 3-12.

Ward, D.F. Ramon-Laca, A. 2013. Molecular identification of the prey range of the invasive Asian paper wasp. *Ecology and Evolution* 3(13): 4408-4414.

Wilson, EE. Mullen, LM. Holoway, DA. 2009. Life history plasticity magnifies the ecological effects of a soCial wasp invasion. ProC. Natl Acad. Sci. USA 106: 12809-12813.



中西弘樹氏による講演（第45回大会より）