

〔報文〕 文化財建造物を加害したシバンムシ科甲虫の DNA バーコーディングに基づく同定法

小峰 幸夫・篠崎（矢花）聡子・佐藤 嘉則・原田 正彦*¹・
齊藤 明子*²・木川 りか*³・藤井 義久*⁴

1. はじめに

文化財建造物の虫害対策では、加害種を特定することが重要である。なぜなら、数多く存在する昆虫の中で文化財建造物の主な構成材料である木材を加害する昆虫は一部であり、文化財建造物周辺で確認される数多くの昆虫の中から、特定の加害種を早期発見し、その生理・生態的特徴に基づいて防除対策を講じる必要があるからである。文化財建造物の害虫を同定する場合、図鑑や論文に記載されている種の記載情報（形態的情報、生態的情報）と比較する方法や専門家に同定を依頼する方法がある。しかし、形態的な特徴が類似する種も多く、昆虫分類の専門知識を持った者でも正確な同定が困難な場合や時間を要する場合もある。また、完全な形を保ったままの個体ではなく、形態が著しく損傷した個体、歩脚や翅などといった体節の一部しか得られない場合、形態的特徴が乏しい卵や幼虫のみしか得られない場合もあり、これらからでは形態的特徴を基に同定を行うことは困難であり、害虫被害の早期発見の課題となっている。

このような課題を克服する技術として分子生物学的な手法を利用した DNA バーコーディングによる同定法に着目した。DNA バーコーディングとは特定領域の DNA 塩基配列（DNA バーコード、DNA barcode）を種の情報を盛り込んでいる識別子として利用して、DNA 塩基配列の決定と既知種の DNA 塩基配列で構成されているデータベースとの照合から同定を行う手法である¹⁾。専門知識がなくても一定の分類学的情報が得られる有用なツールで一部の昆虫でもすでに行われている^{2,3)}。ただし、基盤となる情報は、専門家による形態同定とその標本の DNA 塩基配列のデータベースへの登録の上で成り立っているため、データベース上に既知種の DNA 塩基配列が登録されていなければ活用することができない。既知種の DNA 塩基配列データベースは、世界で多数の機関や組織が参画する国際プロジェクト（The International Barcode of Life Project: iBOL）によって年々拡充されているが、木材を加害するシバンムシ科甲虫では未登録の種も含まれている。そのため木材を加害するシバンムシの正確な形態同定を行い、その標本の DNA 塩基配列を決定し、国際的なデータベースに登録する必要がある。

そこで本研究は、木材を加害するシバンムシ科甲虫のうち、栃木県日光市の文化財建造物で実際に被害をおよぼしたことを確認した5種⁴⁾：オオナガシバンムシ *Priobium carpini*、クロトサカシバンムシ *Trichodesma japonica*、チビキノコシバンムシ *Sculptothea hilleri*、エゾマツシバンムシ *Hadrobregmus pertinax*、アカチャホソシバンムシ *Oligomeru japonicus* を対象とし、種の記載情報に基づき同定を行った後、DNA 部分塩基配列情報を決定し、それを国際的なデータベース（Barcode of Life <https://www.boldsystems.org/>）に登録することで、文化財建造物を加害したシバンムシ科甲虫の DNA バーコーディングによる同定法の確立を目的と

*¹日光社寺文化財保存会 *²千葉県立中央博物館 *³九州国立博物館 *⁴京都大学大学院

して研究を行った。

2. 調査方法

2-1. DNA 証拠標本の収集

オオナガシバンムシと考えられる2個体は、北海道虻田郡洞爺湖町の木造建築物に発生したもので、2020年7月に松橋雄大氏によって採集された個体を譲り受け、本研究に用いた。クロトサカシバンムシと考えられる2個体は、著者の一人齊藤が東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林千葉演習林において実施した研究により、2020年6月に演習林内の古い木造建築物から発生していると思われる個体を採集したものである。チビキノコシバンムシと考えられる1個体は栃木県日光市で2016年7月に採集した個体を用いた。エゾマツシバンムシと考えられる2個体とアカチャホソシバンムシと考えられる2個体はいずれも栃木県日光市で、それぞれ2018年7月と2019年7月に採集した個体を用いた。これらの個体は、実体顕微鏡下で形態的特徴を観察し、それぞれの種の情報(形態の情報、生態の情報)と比較し、同定作業を行った。また、必要に応じて、博物館の同定標本を借用し形態的特徴の比較を行い、同定作業を行った。

同定後に各個体に個体番号を付与し、形態同定の根拠とならない翅や歩脚のごく一部をDNA抽出用の試料とした。その後、各個体はろ紙片に記載した個体番号とともに純エタノールに液浸させて、DNA証拠標本として-30℃で保存した。

2-2. 試料からのDNA抽出と塩基配列の決定

滅菌済みの1.5 mL容マイクロチューブ(Watson, Tokyo, Japan)に試料(形態同定の指標とならない体節の一部)を入れて-80℃にて1日から2日間凍結させた。その後、充電式振動ドライバドリルHP458D(Makita, Anjo, Japan)の先端にホモジナイザーペッスル(Watson)を装着し、凍結したままの試料をインパクトドライバの最大出力で素早く破碎し、試料が微細化したことを目視にて確認し、DNA抽出の前処理とした。前処理後の試料は、DNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen, Hilden, Germany)の標準的なプロトコールに従ってDNA抽出を行った。ただし、Protease K処理は56℃にて3時間以上行った。抽出したDNAは紫外可視分光光度計DU640(Beckman Coulter, Brea, CA, USA)を用いて濃度を定量した。

PCR反応は、EmeraldAmp PCR Master Mix(Takara Bio, Kusatsu, Japan)またはTaKaRaEx Taq(Takara Bio)を使用して全量50 μLの反応系で行った。このとき抽出DNAは50-100 ngとなるよう反応系に加えた。プライマーは、動物のDNAバーコーディングで用いる一般的なプライマーセットであるミトコンドリアのチトクロムC酸化酵素サブユニットI(COI)遺伝子の一部(648塩基)を増幅するLCO1490(5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')とHCO2198(5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')⁵⁾を使用した。PCR増幅の反応条件は、98℃にて2分間の変性後、98℃(10秒)、55℃(30秒)、72℃(40秒)を30サイクルとした。ここで得られた増幅産物1 μLを鋳型DNAとして、同じ条件で2回目のPCR増幅を行った。また、TaKaRa Ex Taqを用いたPCR増幅の場合は、94℃にて3分間変性させた後、94℃(20秒)、50℃(20秒)、72℃(30秒)を39サイクル行い、最後に72℃で5分間伸長反応を行う条件とした。なお、PCR増幅は簡易な手法で行えることを目的に、EmeraldAmp PCR Master Mixを用いて行ったが、増幅産物が得られない場合にはTaKaRa Ex Taqを用いて行った。

PCR後に、Midori Green Advance(NipponGenetics, Tokyo, Japan)を添加したアガロースゲル電気泳動にて分離して、目的とする増幅産物の有無を確認した。増幅が確認された産物は、

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up キット (Macherey-Nagel, Düren, Germany) にて精製を行い、株式会社マクロジェン・ジャパンに委託して塩基配列を決定した。

3. 結果と考察

3-1. DNA 証拠標本の作製

形態同定の結果、それぞれ個体番号20TBK-129, 20TBK-132の2個体はオオナガシバンムシ、個体番号20TBK-117, 20TBK-118の2個体はクロトサカシバンムシ、個体番号19TBK-054の1個体はチビキノコシバンムシ、個体番号19TBK-044, 19TBK-046の2個体はエゾマツシバンムシ、個体番号19TBK-064, 19TBK-065の2個体はアカチャホソシバンムシと同定した(表1)。形態同定後の標本は、画像記録を行い(図1)、歩脚あるいは翅の一部を採取した後、個体番号とともに純エタノールに液浸した状態で-30℃で保存した。

3-2. DNA 塩基配列の決定と系統解析

個体番号20TBK-129, 20TBK-132の2個体のCOI遺伝子塩基配列を決定した。得られた塩基配列を、アメリカ国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information [NCBI])の提供するBLAST(Basic Local Alignment Search Tool: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)を用いて既知種のデータベースと照合した。その結果、データベースにある既知のオオナガシバンムシのCOI遺伝子部分配列と高い相同性(99%)を示した(表2)。また、同属の別種である*P. sericeum*とは低い相同性(88%)であった。

個体番号20TBK-117, 20TBK-118も同様に得られたCOI遺伝子塩基配列の相同性検索を行った(表3)。その結果、相同性の高い既知近縁種がデータベースには存在せず、最も近縁の既知種はマツノマダラカミキリ *Monochamus alternatus* やセスジダルマガムシ属の一種 *Ochthebius uniformis* であったが、いずれも低い相同性(86%)であった。今回得られたクロトサカシバンムシのCOI遺伝子塩基配列は、NCBIのデータベースに登録されていない新規の情報であると考えられる。国内においてクロトサカシバンムシの属する *Trichodesma* 属には、他にイシガキトサカシバンムシ *T. uruma*, ナミモントサカシバンムシ *T. kirishimana*, トサカシバンムシ *T. fascicularis*, チュウジョウトサカシバンムシ *T. michioi* の4種が記載されているが⁶⁾、いずれもNCBIのデータベースに塩基配列は登録されていない状況である。

個体番号19TBK-054もまた相同性の高い既知近縁種がデータベースには存在せず、最も近縁の既知種は *Sculptotheca puberula* であった(表4)。チビキノコシバンムシと同属ではあるが相同性は低く(89%)、今回得られたCOI遺伝子塩基配列は、NCBIのデータベースに登録されていない新規の情報であると考えられる。

表1 DNA バーコーディングに用いたシバンムシ科甲虫の同定

個体番号	採集地	採集年月日	採集者	標本作製日	和名	学名	DNA抽出使用部位(個数)
20TBK-129	北海道虻田郡洞爺湖町	2020.7.27	松橋雄大	2020.9.4	オオナガシバンムシ	<i>Priobium carpini</i>	前脚・中脚・後脚(各2本)
20TBK-132	北海道虻田郡洞爺湖町	2020.7.27	松橋雄大	2020.9.4	オオナガシバンムシ	<i>Priobium carpini</i>	前脚・中脚・後脚(各2本)
20TBK-117	千葉県鴨川市坂本	2020.6.4	斉藤明子	2020.6.25	クロトサカシバンムシ	<i>Trichodesma japonica</i>	前脚・中脚・後脚(各2本)
20TBK-118	千葉県鴨川市坂本	2020.6.4	斉藤明子	2020.6.25	クロトサカシバンムシ	<i>Trichodesma japonica</i>	前脚・中脚・後脚(各2本)
19TBK-054	栃木県日光市山内	2016.7.14	小峰幸夫	2019.5.28	チビキノコシバンムシ	<i>Sculptotheca hilleri</i>	前翅・後翅(各1枚)
19TBK-044	栃木県日光市中宮祠	2018.7.23	小峰幸夫	2020.7.8	エゾマツシバンムシ	<i>Hadrobregmus pertinax</i>	前脚(2本)
19TBK-046	栃木県日光市中宮祠	2018.7.23	小峰幸夫	2020.7.8	エゾマツシバンムシ	<i>Hadrobregmus pertinax</i>	前脚・中脚・後脚(各2本)
19TBK-064	栃木県日光市山内	2019.7.24	小峰幸夫	2019.7.26	アカチャホソシバンムシ	<i>Oligomerus japonicus</i>	前翅・後翅(各1枚)
19TBK-065	栃木県日光市山内	2019.7.24	小峰幸夫	2019.7.26	アカチャホソシバンムシ	<i>Oligomerus japonicus</i>	前翅・後翅(各1枚)

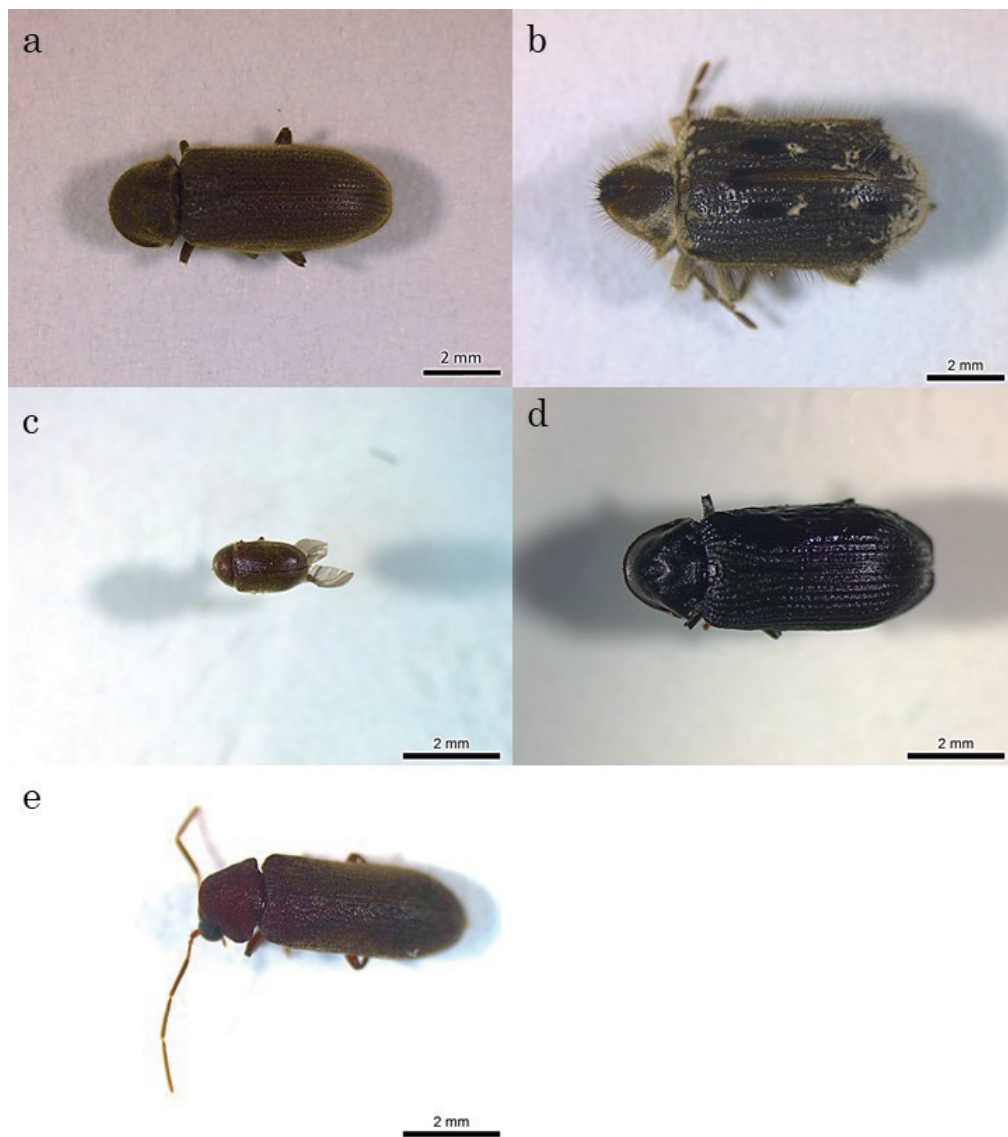


図1 シバンムシ科甲虫の形態写真 (a, オオナガシバンムシ20TBK-132; b, クロトサカシバンムシ20TBK-117; c, チビキノコシバンムシ19TBK-054; d, エゾマツシバンムシ19TBK-044; e, アカチャホソシバンムシ19TBK-065)

個体番号19TBK-044, 19TBK-046は相同性検索の結果, 既知のエゾマツシバンムシと比較的高い相同性 (96% - 97%) を示した (表5)。

個体番号19TBK-064, 19TBK-065は, 形態同定ではアカチャホソシバンムシと同定されたが, COI 遺伝子部分配列の相同性検索では同属の *Oligomerus brunneus* が最も近縁な既知種であった (表6)。その相同性は89%であったことから, アカチャホソシバンムシもまたNCBIのデータベースに登録されていない新規の情報であると考えられる。

本研究で得られたすべての個体の同定情報とバーコード情報は, 国際的なDNAバーコード

表2 個体番号20TBK-129, 20TBK-132と既知種の COI 遺伝子部分配列との相同性

学名	個体番号	アクセッション番号	相同性 (%)
<i>Priobium carpini</i>	ZFMK-TIS-2505281	KU916651	656/657 (99%)
<i>Priobium carpini</i>	FFOH00126_0101 K	U494206	656/657 (99%)
<i>Priobium carpini</i>	ZFMK-TIS-2535989	KU910595	656/657 (99%)
<i>Priobium carpini</i>	BC ZSM COL 01934	JF889649	656/657 (99%)
<i>Priobium carpini</i>	BFB_Col_FK_12693	KM444876	656/657 (99%)
<i>Priobium carpini</i>	ZFMK-TIS-2505280	KU912542	655/657 (99%)
<i>Priobium carpini</i>	ZFMK-TIS-2535988	KU916326	654/657 (99%)
<i>Priobium carpini</i>	ZFMK-TIS-2505725	KU919006	654/657 (99%)
<i>Priobium carpini</i>	BFB_Col_FK_12698	KM442427	640/641 (99%)
<i>Priobium sericeum</i>	BIOUG10059-H10	KR131355	525/600 (88%)

表3 個体番号20TBK-117, 20TBK-118と既知種の COI 遺伝子部分配列との相同性

学名	個体番号	アクセッション番号	相同性 (%)
<i>Monochamus alternatus</i>	not described	NC_050066	551/640 (86%)
<i>Monochamus alternatus</i>	ANYL 09010	GU003928	550/640 (86%)
<i>Ochthebius uniformis</i>	IBE-AN437	LT991392	538/623 (86%)
<i>Monochamus alternatus</i>	Cer0019	FJ559001	549/640 (86%)
<i>Monochamus alternatus</i>	CA12_3.01	KY357735	543/632 (86%)

表4 個体番号19TBK-054と既知種の COI 遺伝子部分配列との相同性

学名	個体番号	アクセッション番号	相同性 (%)
<i>Sculptotheca puberula</i>	BIOUG24399-E08	MG054316	508/574 (89%)
<i>Dyschirius dejeanii</i>	BIOUG <CAN> : 09CHUCOL-CV172	HQ983167	540/655 (82%)
<i>Dyschirius dejeanii</i>	BIOUG <CAN> : 05-CTATBI-0729	HM430211	540/655 (82%)
<i>Zelia wildermuthii</i>	BIOUG <CAN> : 09BBDIP-0053	GU804032	540/656 (82%)
<i>Ornixola caudulatella</i>	G10caud	HM392527	538/655 (82%)

塩基配列データベースである BOLD に登録を行った (表7)。

4. まとめ

従来からの形態的・生態的特徴の記載に基づき分類を行う同定方法の諸課題を解決するため、DNA 塩基配列情報に基づき同定を行う DNA バーコーディングを日光の文化財建造物で被害を及ぼした5種類のシバンムシ科甲虫の同定に適用するため検討を進めた。今回、3種類のシバンムシ科甲虫(クロトサカシバンムシ, チビキノコシバンムシ, アカチャホソシバンムシ)が国際データベースに塩基配列登録されていないことを確認し、本研究で得られた情報を基に新規登録を行った。DNA 抽出の試料としては、体節のごく一部のみで塩基配列を決定することが出来たことから、僅かな試料でも同定が可能であることを示すことが出来た。

これまでは文化財建造物の害虫被害において、形態同定が唯一の手法であったが、今回登録した情報によって今後は歩脚や翅などといった体節の一部、形態的特徴が乏しい卵や幼虫からでも種の同定を行うことが出来るようになり、虫害被害の早期発見に繋がることが期待される。

表5 個体番号19TBK-044, 19TBK-046と既知種の COI 遺伝子部分配列との相同性

学名	個体番号	アクセッション番号	相同性 (%)
<i>Hadrobregmus pertinax</i>	ZFMK-TIS-2515790	KU918973	636/657 (97%)
<i>Hadrobregmus pertinax</i>	ZFMK-TIS-2533768	KU915162	636/657 (97%)
<i>Hadrobregmus pertinax</i>	ZFMK-TIS-2533769	KU914402	636/657 (97%)
<i>Hadrobregmus pertinax</i>	ZFMK-TIS-2515783	KU916833	635/657 (97%)
<i>Hadrobregmus pertinax</i>	ZFMK-TIS-2524724	KU914613	635/657 (97%)
<i>Hadrobregmus pertinax</i>	ZFMK-TIS-16429	KU912628	635/657 (97%)
<i>Hadrobregmus pertinax</i>	ZFMK-TIS-2505581	KU906361	635/657 (97%)
<i>Hadrobregmus pertinax</i>	ZMUO <FIN> : 005391	KJ962127	628/657 (96%)
<i>Hadrobregmus pertinax</i>	BC-PNEF-PSFOR0576	KM286260	394/406 (97%)
<i>Hadrobregmus pertinax</i>	ZMUO <FIN> : 001847	KJ962879	393/406 (97%)

表6 個体番号19TBK-064, 19TBK-065と既知種の COI 遺伝子部分配列との相同性

学名	個体番号	アクセッション番号	相同性 (%)
<i>Oligomerus brunneus</i>	BC ZSM COL 02243	JF889815	585/658 (89%)
<i>Oligomerus brunneus</i>	ZFMK-TIS-2511579	KU908043	585/658 (89%)
<i>Oligomerus brunneus</i>	ZFMK-TIS-2511584	KU906696	585/658 (89%)
<i>Oligomerus brunneus</i>	BFB_Col_FK_12357	KM445802	584/658 (89%)
<i>Oligomerus brunneus</i>	ZFMK-TIS-2532282	KU919571	583/658 (89%)
<i>Oligomerus brunneus</i>	ZFMK-TIS-2509654	KU915436	583/658 (89%)
<i>Oligomerus brunneus</i>	ZFMK-TIS-2509644	KU915169	583/658 (89%)
<i>Oligomerus brunneus</i>	ZFMK-TIS-2509645	KU915081	583/658 (89%)
<i>Oligomerus brunneus</i>	ZFMK-TIS-2532304	KU913244	583/658 (89%)
<i>Oligomerus brunneus</i>	ZFMK-TIS-2509643	KU911824	583/658 (89%)

表7 DNA バーコーディングデータベースへの登録情報

個体番号	和名	学名	BOLD ID (Barcode Index Number)	COI 遺伝子部分配列 アクセッション番号
20TBK-129	オオナガシバムシ	<i>Priobium carpini</i>	CDBLM034-20	LC597546
20TBK-132	オオナガシバムシ	<i>Priobium carpini</i>	CDBLM037-20	LC597543
20TBK-117	クロトサカシバムシ	<i>Trichodesma japonica</i>	CDBLM032-20	LC597542
20TBK-118	クロトサカシバムシ	<i>Trichodesma japonica</i>	CDBLM033-20	LC598880
19TBK-054	チビキノコシバムシ	<i>Sculptotheca hilleri</i>	CDBLM018-19 (BOLD : ADY7718)	LC492871
19TBK-044	エゾマツシバムシ	<i>Hadrobregmus pertinax</i>	CDBLM028-20	LC597539
19TBK-046	エゾマツシバムシ	<i>Hadrobregmus pertinax</i>	CDBLM029-20	LC597538
19TBK-064	アカチャホソシバムシ	<i>Oligomerus japonicus</i>	CDBLM030-20	LC597540
19TBK-065	アカチャホソシバムシ	<i>Oligomerus japonicus</i>	CDBLM031-20	LC597541

さらに、卵、幼虫、虫糞のようなこれまで同定の試料になり難かったものでも、DNA を含む試料であれば種の同定が可能となる。文化財害虫の新しい同定方法として今後の研究の発展が期待される。

謝辞

本稿をまとめるにあたり、日光山輪王寺の関係者ならびに日光社寺文化財保存会の関係者には現地調査を始め、多大なるご協力を賜りました。松橋雄大氏には、環境文化創造研究所上席研究員の川越和四氏を通じて試料をご提供いただきました。また、片山葉子客員研究員には有益なご助言を賜りました。本研究は JSPS 科研費 18K01096 「DNA 塩基配列情報に基づく文化財害虫の新規データベース構築」(研究代表者：佐藤嘉則) の助成を受けたものです。以上、ここに記して感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 神保宇嗣、吉武啓、伊藤元己：DNA バーコーディングによる同定支援システムと JBOLI 構想、日本生態学会誌、58、123-130 (2008)
- 2) 井上晶次、熊澤慶伯：名古屋市を中心とした愛知県及び近隣県産ゾウムシ類の DNA バーコーディング、なごやの多様性、4、23-29 (2017)
- 3) 今藤夏子、奥田しおり、大林夏湖、上野隆平、高村健二：DNA バーコーディングを目的としたユスリカ DNA 抽出方法の比較、陸水学雑誌、78、13-36 (2017)
- 4) 小峰幸夫、林美木子、木川りか、原田正彦、三浦定俊、川野邊渉、石崎武志：日光の歴史的建造物で確認されたシバンムシ類の種類と生態について、保存科学、50、133-140 (2011)
- 5) Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R.: DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 5, 294-299 (1994)
- 6) Masahiro, S.: *Trichodesma michioi* (Coleoptera, Anobiidae, Anobiinae), a New Anobiid Species from the Ryukyus Japan, *Elytra*, 33, 1, 42-46 (2005)

キーワード：DNA バーコーディング (DNA barcoding)；データベース (database)；シバンムシ (death watch beetle)；ミトコンドリア DNA COI 領域 (mitochondrial DNA COI region)

An Identification Method Based on DNA Barcoding for Anobiidae Beetles in Cultural Property Buildings

KOMINE Yukio, SHINOZAKI-YABANA Satoko, SATO Yoshinori,
HARADA Masahiko^{*1}, SAITO Akiko^{*2},
KIGAWA Rika^{*3} and FUJII Yoshihisa^{*4}

In order to solve the problems of the identification method that classifies anobiidae beetles based on the description of morphological and ecological characteristics, DNA barcoding, which uses identification based on DNA sequences, was conducted.

Using the results from DNA barcoding, five types of Anobiidae beetles that caused damage in Nikko's cultural properties were successfully identified. After confirming that three species of the Anobiidae beetles were not registered in the database of the National Center for Biotechnology Information, USA, those beetles were newly registered based on the information obtained from this research. As DNA sequence was determined using only a small part of the segment, it has been indicated that identification is possible even with a small sample. This research has demonstrated that identification of species may be possible even with small segments, such as legs and wings, and even eggs and larvae that have poor morphological characteristics. Additionally, identification using DNA samples from excrements, such as exuvia and feces, may be possible and expected in the future.

*1 Association for the Preservation of the Nikko World Heritage Site and Temples

*2 Natural History Museum and Institute, Chiba

*3 Kyushu National Museum *4 Kyoto University