

〔報文〕 竹材から得たフラスを用いて加害種を特定する 分子生物学的手法の確立

篠崎（矢花）聡子・小峰 幸夫*・島田 潤・佐藤 嘉則

1. 序論

竹はその洗練された美しい外観が私たちの視線に触れるという観賞的側面を有していることに加えて、乾燥した竹材の稈が強靱であるために強度が要求される構成材料として利用できる。また、竹材を細く薄く削ると弾力性に富み加工しやすくなるため、曲線を描くことが可能であるという特有の物理的性質を持ち合わせている。そのため古くから日本では身近な竹の審美性と特徴的な物理的性質の双方を有効に活用して、建造物や美術工芸品、古典芸能や民俗芸能に用いられる道具や楽器などに頻繁に竹を使用してきた。しかし強靱である竹材の稈も害虫による摂食被害を受けると、材質の強度が低下すると同時に竹特有の美観も損なわれ、結果として文化財の価値を大きく損なうことにつながる。竹が害虫に摂食されないように保存するには、実際に竹材を食害している害虫（竹材害虫）を早期に特定して、その害虫に特有の生態情報をもとに最適な防除方法を適用し、さらに将来的に竹材が食害されないように個々の状況に応じた保存対策を講じることが理想的である。

害虫種の同定は、成虫を捕獲して昆虫分類学の専門家が形態を観察して行われるのが一般的であるが、竹材害虫の場合は加害種の分散能力が高いことから生体や死骸が採取できないことが多い。そのため、成虫の脱出孔や「フラス」といった痕跡から加害種の特定ができれば非常に有効な調査手段となる。ここでフラスとは、植物食性昆虫が体内で消化しきれなかった植物性組織を含む細かい粒状の排泄物、または昆虫が材を穿孔する際に出る細かい粒状の木屑のことである。排泄物が消化管内を通過する際に害虫の消化管細胞がわずかに剥がれてフラスに含まれたり、材を口器でかみ砕く際に体液や体細胞の一部が付着したりすると考えられるため、フラスにはごくわずかな昆虫由来の生体痕跡、例えば DNA などが残されていると考えられる。これを特異的に検出するような分子生物学的手法を確立し害虫を特定することが可能になれば、その害虫に適した殺虫法や防御法を適用でき、竹材から構成される文化財の保存を効率的に行うことができるようになることが期待される。

しかし、竹材害虫は小型の種も多いために得られるフラスの粒子が細小であることに加えて、フラスにはチャタテムシやダニが混在していることが多い。細小なフラスに含まれている加害種の細胞数は極めて少量であると考えられる一方で、混在するチャタテムシやダニは個体レベルの大きさである。たとえ顕微鏡下で刷毛やピンセット等を使用して異物を除去したとしても、チャタテムシやダニの一部が全く混入していないフラスの試料を得ることは難しい。そのためフラス全体から DNA 抽出をした場合に混在するチャタテムシやダニなどの生物由来の DNA 量は対象とする竹材害虫由来の DNA 量に比較して圧倒的に多くなることが予想される。そして、種の同定に広く用いられる COI 遺伝子（ミトコンドリアのシトクローム C 酸化サブユニット I 遺伝子）を増幅させる PCR 用プライマーは、小峰らの報告¹⁾の際に使用したプラ

*奈良国立博物館

イマーセット (LCO1490, HCO2198) のように動物全般の COI 遺伝子を増幅させるプライマーセット²⁾であることが一般的であるため、フラスに複数種の DNA が含まれる場合には、DNA 量が多い生物の COI 遺伝子が選択的に PCR 増幅されることとなり、竹材害虫由来の COI 遺伝子を特異的に増幅させることは難しくなる。

そこで、本研究ではこれらの問題を解決するために、まず日本で竹を食害する主要な5種の害虫に着目し、それぞれの COI 遺伝子に特異的なプライマーの設計を行い、個々の害虫の COI 遺伝子のみが特異的かつ高感度に PCR 法によって増幅されるシステムの立ち上げを行った。さらに竹材害虫のフラスから DNA を抽出して、本研究にて設計したプライマーを用いてフラスから害虫の同定が可能となるか評価を行ったのでその成果を報告する。

2. 材料と方法

2-1. 竹材害虫の DNA 証拠標本の収集と塩基配列決定

日本で竹材を食害する主な昆虫として、本研究ではアフリカヒラタキクイムシ *Lyctus africanus*、アラゲヒラタキクイムシ *Lyctoxylon dentatum*、タケトラカミキリ *Chlorophorus annularis*、チビタケナガシンクイ *Dinoderus minutus*、ベニカミキリ *Purpuricenus temminckii* の5種を対象とした。アフリカヒラタキクイムシは京都大学生存圏研究所居住圏環境共生分野の故吉村剛博士より2016年に譲り受けて、京大式人工飼料 (デンブン50%, 酵母粉末24%, ラワン木粉またはセルロース粉末26%)³⁾を用い、25℃, 55% RH の恒温恒湿器内にて累代飼育している個体を使用した。アラゲヒラタキクイムシは京都府京都市の竹材店にある竹材から発生した個体を使用した。タケトラカミキリとチビタケナガシンクイは京都府京都市にて2019年9月と2018年6月にそれぞれ採取した。ベニカミキリは2018年5月に石川県白山市にて採取した個体を使用した。これらの個体は形態観察により同定し、体節の一部を採取した後 DNA 証拠標本として-30℃にて保存した。各標本からの DNA 抽出とタケトラカミキリ、アフリカヒラタキクイムシ、およびベニカミキリの PCR は一般に普及しているプライマーセットである LCO1490 と HCO2198 を使用し、既報の方法¹⁾に準じて行った。チビタケナガシンクイおよびアラゲヒラタキクイムシの PCR については、予備試験において既報の方法¹⁾では増幅産物が認められなかったため、KAPA HiFi DNA polymerase (KAPA Biosystems) を用いて、プライマーは LCO1490-JJ と HCO2198-JJ⁴⁾ を使用し、95℃にて3分間熱変性させた後、98℃にて20秒、55℃にて15秒、72℃にて60秒のサイクルを35サイクル繰り返した後に72℃にて5分間伸長反応を行う条件とした。PCR 増幅産物の塩基配列決定はすべてマクロジェンジャパンに委託した。

2-2. 竹材害虫 COI 遺伝子特異的プライマーの設計

フラスを試料として害虫の種を特定するシステムは、フラスに害虫の痕跡である DNA が存在する場合に陽性となり、他の昆虫では陰性となるシステムであり、本研究で対象とした竹材害虫の5種をそれぞれ特異的に検出できるシステムである。具体的には、PCR 法にて使用するプライマーで各々の COI 遺伝子のみを増幅し、他の生物の COI 遺伝子は増幅させないような特異的プライマーを設計して PCR を行えば、対象となる竹材害虫だけを簡易に特定することが可能になるというものである。そこでまず、本研究で決定した5種の竹材害虫の COI 遺伝子配列をもとに内部配列で特異的に増幅させるプライマーの設計を試みた。特異的プライマーの設計は Primer3Plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) を用いて行った。まず、本研究で得られた5種の竹材害虫の COI 遺伝子配列をもとに Primer3Plus の General

Settings の Primer Size をデフォルト値の Min: 18, Opt: 20, Max: 27 を使用してプライマーセットを検索し、候補プライマーとして挙げられた個々の配列について、NCBI (アメリカ国立生物工学情報センター) が提供している Blast 解析 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) によって同一配列や類似配列を網羅的に検索した。次に、候補プライマーの3' 末端残基を含む3' 側の完全一致の程度が低いまたは3' 末端残基付近に候補プライマー配列と一致しない残基が多く種の確認されると考えられるプライマーを少なくとも1本含むプライマーセットを選択するか、あるいはこの条件を満たすプライマー同士をペアとして選定した。Primer Size のデフォルト値では以上の条件を満たすプライマー選定が難しいと判断した場合には、Primer Size 値を Min: 18, Opt: 27, Max: 33 に設定して候補プライマーセットの再検索を行い、以降 Primer Size 値をデフォルト値で行った際と同一の手法によりプライマー選定を行った。この手法により特異的プライマーの候補プライマーを5種類の竹材害虫ごとに複数セット設計した。特異的プライマーおよび LCO1490, HCO2198 プライマーを用いた PCR は KAPA HiFi DNA polymerase を使用して 95 °C にて3分間熱変性させた後、98 °C にて20秒、60 °C にて15秒、72 °C にて60秒のサイクルを35サイクル繰り返した後に72 °C にて5分間伸長反応を行った。得られた増幅産物は2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、目的のサイズの DNA 増幅産物を確認した。

2-3. フラス試料の採取

2019年8月に、京都府京都市の竹材店から脱出孔が数か所開いている乾燥した竹材を10本程度譲り受けた。これらの竹材を飼育容器に入れ、蓋をして室温にて1年間静置した。1年後に観察したところ、入手した当初に比較して竹材表面に見いだされる脱出孔の数が増加し、飼育容器の底には多くの乾燥した粉状のフラスが落下していた (図1A)。また、2種類の昆虫 (チビタケナガシンクイとアラゲヒラタキクイムシ) が飼育容器の中に生息していることが確認された。したがって、この竹材には入手時点で少なくとも2種類の昆虫の卵あるいは幼虫が生息しており、成虫となって竹材内部から外に脱出してきたと考えられた。飼育容器は閉鎖していたため、容器内にみられたフラスは2種類の昆虫が竹材を摂食することによって生じたフラス (以下、竹材フラスと表記する) であると考えられる。また、研究室にて人工飼料を用いて飼育しているアフリカヒラタキクイムシの飼育容器の底からフラス (以下、飼育フラスと表記する) を回収し (図1B)、同じく実験に供した。

さらに、1600年代に建てられた東京都内の歴史的木造建造物の屋根付近に竹材が用いられており、そこに直径4 mm 程度の脱出孔があった (図1C)。その直下の横木に堆積していたフラスを滅菌チューブに回収し、試料とした (以下、屋外フラスと表記する)。

竹材フラスと飼育フラスは滅菌したスパーテルにてシャーレに回収し、実体顕微鏡下でフラス以外の異物を注意深く除去して、それぞれ30 mg と22 mg をエッペンドルフチューブに回収した。屋外フラスはクモの糸や塵埃などが混在する状態であったが実体顕微鏡下での異物除去は行わず、夾雑物が混入したままの状態を用いた (37 mg)。

いずれのフラスも DNA を抽出するまで -80 °C にて保存したのち、DNeasy Plant mini Kit (Qiagen) を用いて標準的なプロトコールにしたがって DNA 抽出を行った。抽出した DNA は先述した特異的プライマーを用いた PCR 法によって竹材害虫の特異的検出を試みた。

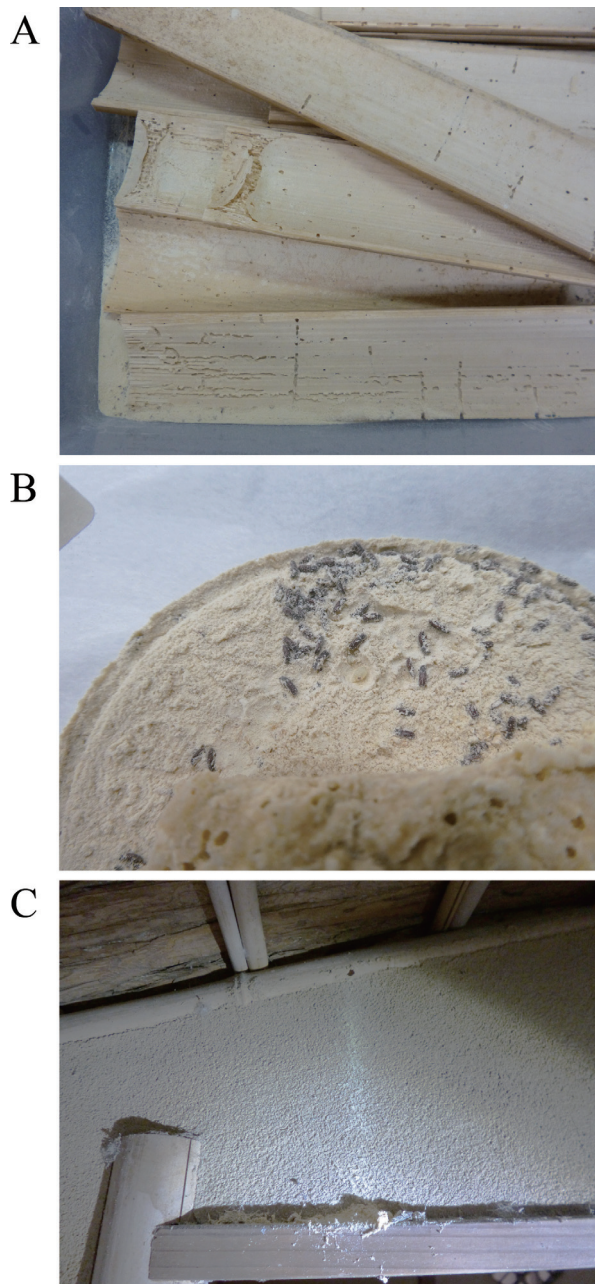


図1 竹材フラス (A), 飼育フラス (B) および屋外フラス (C) の採取箇所の写真

3. 結果

3-1. 竹材害虫の形態同定と COI 遺伝子配列の登録

日本にて竹材を食害する主な昆虫5種10個体の標本試料を入手し、実体顕微鏡を用いた形態同定を行い、それぞれチビタケナガシンクイ (個体番号: 19TBK-099), アラゲヒラタキクイムシ (21TBK-134, 21TBK-136), アフリカヒラタキクイムシ (18TBK-001, 18TBK-002,

18TBK-003, 18TBK-004), タケトラカミキリ (19TBK-053), ベニカミキリ (18TBK-006, 18TBK-007) であると同定した。各個体について COI 遺伝子配列を決定して DDBJ/EMBL/GenBank Databases に登録を行った。本研究において登録した COI 遺伝子塩基配列の DDBJ/EMBL/GenBank Databases における Accession Numbers は以下の通りである: LC655145 (チビタケナガシンクイ); LC646344, LC646345 (アラゲヒラタキクイムシ); LC481836, LC484437, LC484438, LC484439 (アフリカヒラタキクイムシ); LC492867 (タケトラカミキリ); LC484441, LC484442 (ベニカミキリ)。

3-2. 竹材害虫の COI 遺伝子特異的プライマーの選別

チビタケナガシンクイを標的として作成した3種類の候補プライマーのうち, ctn1F, ctn1R のプライマーセットでチビタケナガシンクイから抽出したゲノム DNA を鋳型とした PCR を行った結果, 予想される泳動度の核酸が効率的に増幅された (図2A, レーン1)。得られた増幅産物は確認のために塩基配列解析を行い, 相同性検索をするとチビタケナガシンクイの COI 遺伝子と同一であった。このとき, 同じプライマーセットでアラゲヒラタキクイムシ, アフリカヒラタキクイムシ, タケトラカミキリ, ベニカミキリから抽出したゲノム DNA と DNA を加えていないコントロールを用いて PCR を行ったが, いずれも増幅産物は認められなかった (図2A, レーン2, 3, 4, 5, 6)。したがってチビタケナガシンクイプライマー (ctn1F, ctn1R) はチビタケナガシンクイ COI 遺伝子を特異的に増幅させるプライマーであり, 他4種の竹材害虫のゲノム DNA が存在しても増幅させないことが明らかとなった。同様にして, 残りの4種の竹材害虫についても候補プライマーについて検討した結果, アラゲヒラタキクイムシの特異的プライマー (ar8F, ar8R) では増幅産物が確認できたが (図2A, レーン8), 他の4種とコントロールでは増幅産物が確認されなかった (図2A, レーン7, 9, 10, 11, 12)。次に, アフリカヒラタキクイムシの特異的プライマー (af2F, af2R) では増幅産物が確認できたが (図2A, レーン15), 他の4種とコントロールでは増幅産物が確認されなかった (図2A, レーン13, 14, 16, 17, 18)。さらにタケトラカミキリの特異的プライマー (tkf6F, tkf6R) では増幅産物が確認できたが (図2B, レーン4), 他の4種とコントロールでは増幅産物が確認されなかった (図2B, レーン1, 2, 3, 5, 6)。最後にベニカミキリの特異的プライマー (bn2F, bn2R) では増幅産物が確認できたが (図2B, レーン11), 他の4種とコントロールでは増幅産物が確認されず (図2B, レーン7, 8, 9, 10, 12), 竹材害虫5種それぞれの COI 遺伝子を特異的に増幅させるプライマーセットを決定した (表1)。なお, 得られたそれぞれの増幅産物については塩基配列解析と相同性検索を行って, それぞれ標的とする種の COI 遺伝子であることを確認した。

さらに, 既存のプライマーセット (LCO1490, HCO2198) との比較で, チビタケナガシンクイ, アラゲヒラタキクイムシ, アフリカヒラタキクイムシ, タケトラカミキリから抽出したゲノム DNA を鋳型として, 特異的プライマーと同条件で PCR を行うと, 増幅産物が確認できないことから (図3, レーン6, 7, 8, 9), 本研究にて設定した特異的プライマーは既存のプライマーと比べて増幅効率が非常に高いことが明らかとなった。ただし, ベニカミキリについては, 既存のプライマーと特異的プライマーが同程度の増幅効率であった (図3, レーン5, 10)。これは既存のプライマーセットが動物全般の COI 遺伝子を増幅するためのプライマーであり, 個々の COI 遺伝子に対して相補的でない塩基が存在することが原因となって一般に増幅効率は低くなるが, ベニカミキリについては LCO1490, HCO2198 プライマーセットと相補的でない塩基が PCR に影響しない程度であるために増幅効率が変わらなかったと考えられる。

表1 竹材害虫をPCRにて検出するための特異的プライマーセット

対象とする害虫	プライマー名	プライマー塩基配列	PCR 増幅産物のサイズ (bp)
チビタケナガシクイ	ctn1F	5'-AGCCCACGCCTTATTATAATTTTCTT-3'	525
	ctn1R	5'-AGGTGTTGATATAGAATTGGATCTCCC-3'	
アラゲヒラタキクイムシ	ar8F	5'-GGTCATTAATCGGTGATGATCAAATCT-3'	533
	ar8R	5'-GGGTCGAAGAATGATGTATTAAGTT-3'	
アフリカヒラタキクイムシ	af2F	5'-TTTGGGCATGAGCAGGAAT-3'	515
	af2R	5'-AGTGCTGTAATTGCAACGGA-3'	
タケトラカミキリ	tkf6F	5'-GAACCTCCCTTAGAGTATTAATTCGATCAG-3'	621
	tkf6R	5'-AAAAGAACAGGTGCTGATATAAAATTGGAT-3'	
ベニカミキリ	bn2F	5'-TTGGCGCATGAGCAGGAATA-3'	548
	bn2R	5'-TCCAGCTAGAACAGGTAGGAA-3'	

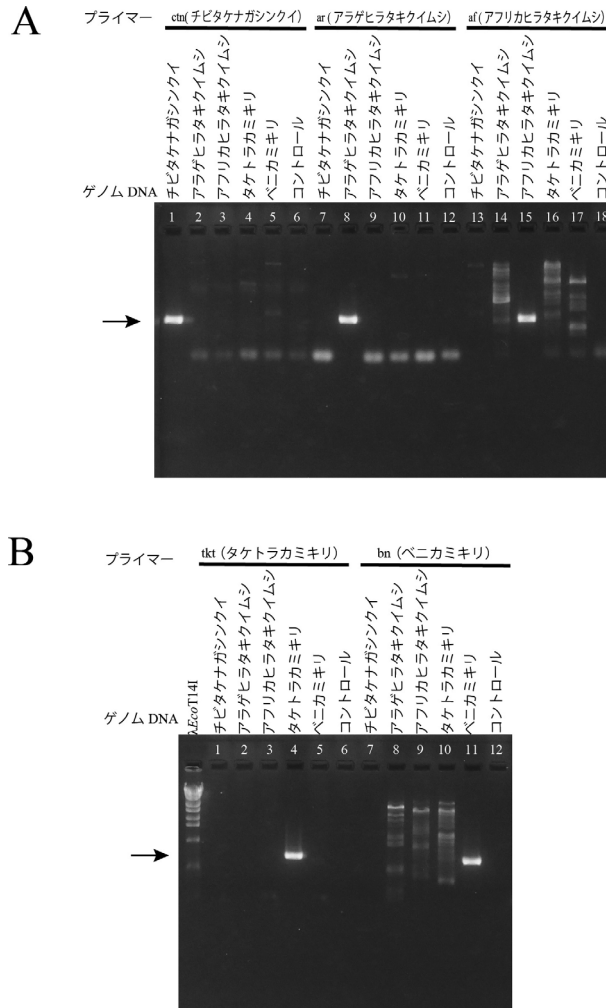


図2 5種の竹材害虫を特異的に検出するプライマーを用いたPCRの電気泳動写真

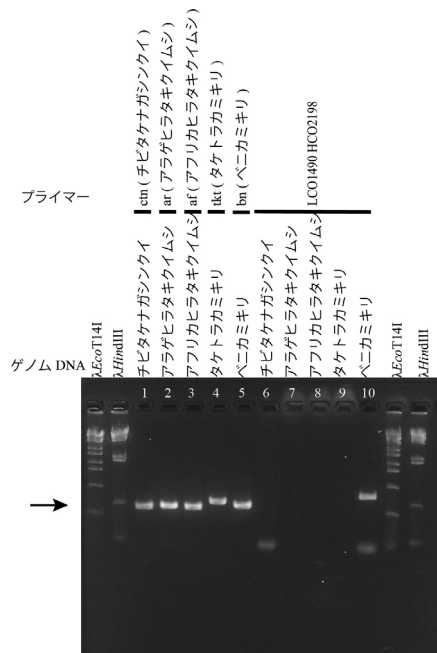


図3 特異的プライマーと既存のプライマーでの PCR の電気泳動写真

特異的プライマーを用いれば虫の体節のごく一部が得られる場合やフラスのみが得られる場合など、成虫を捕獲することができないような場合でも、高感度であることから容易に PCR 法による検出が可能になると考えられる。

3-3. 竹材害虫のフラスからの種の特定

Primer3Plus を使用して設計した特異的プライマーが、フラスから抽出した DNA を鋳型として標的遺伝子を検出できるかどうかについて検討した。まず方法で述べたように昆虫を含む他の生物由来の COI 遺伝子を増幅させないように *in silico* で相同性検索を行いプライマーの特異性が保証されていると予想されるプライマーを選択した。しかし、Blast 解析などの検索アルゴリズムでは漏れが生じる可能性があること、また Blast 解析を行うデータベース (DDBJ/EMBL/GenBank Databases) には多くの昆虫や動物の COI 遺伝子配列が未登録のため、他の生物由来の DNA と交差性を有するプライマーである可能性がある。したがって、実際にフラスを用いた実証試験を重ねることで評価する必要がある。そこで、まずは飼育された個体のフラスから昆虫の種を同定可能であるかどうかについて検討を行った。

2種のフラス (竹材フラス, 飼育フラス) から抽出したゲノム DNA を鋳型として、特異的プライマーを用いて PCR を行った結果を図4に示す。チビタケナガシンクイとアラゲヒラタキクイムシが確認された飼育容器からの竹材フラスでは、チビタケナガシンクイ特異的プライマー (ctn1F, ctn1R) と、アラゲヒラタキクイムシ特異的プライマー (ar8F, ar8R) を用いた PCR でそれぞれ増幅産物が確認できた (図4, レーン6, 7)。そして、飼育容器内に存在が確認されていないアフリカヒラタキクイムシ, タケトラカミキリ, ベニカミキリに特異的なプライマーでの PCR では増幅産物が確認されなかった (図4, レーン8, 9, 10)。チビタケナガシンクイ特異的プライマーとアラゲヒラタキクイムシ特異的プライマーから得られた増幅産物については DNA 塩基配列解析と相同性解析を行い、それぞれチビタケナガシンクイとアラゲ

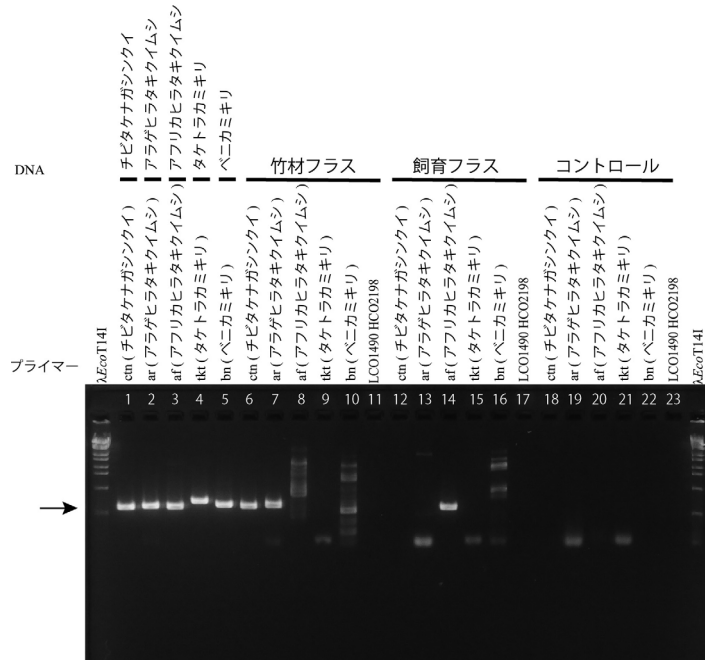


図4 竹材フラスと飼育フラスを用いた特異的プライマーでのPCRの電気泳動写真

ヒタラキクイムシのCOI遺伝子と同一であることを確認した。

また、飼育フラスで確認したところ、アフリカヒタラキクイムシ特異的プライマー (af2F, af2R) では増幅産物が確認できたが (図4, レーン14), それ以外のプライマーセットでは増幅産物が得られなかった (図4, レーン12, 13, 15, 16)。アフリカヒタラキクイムシ特異的プライマーから得られた増幅産物についてはDNA塩基配列解析と相同性解析を行い、アフリカヒタラキクイムシのCOI遺伝子と同一であることを確認した。また、既存のプライマーセット (LCO1490, HCO2198) を用いた場合には竹材フラス, 飼育フラス由来のDNAのいずれを鋳型としてもCOI遺伝子の増幅は確認できなかった (図4, レーン11, 17)。同じく, DNAを加えていないコントロールにおいても竹材フラス, 飼育フラス由来のDNAのいずれを鋳型としてもCOI遺伝子の増幅は確認できなかった (図4, レーン18, 19, 20, 21, 22, 23)。

次により実態に近い屋外にある建造物から得られたフラス (屋外フラス: 図1C) を試料として評価を行った結果を図5に示す。屋外フラスには様々な生物由来のDNAが混在していると考えられたが, タケトラカミキリ特異的プライマー (tkt6F, tkt6R) で増幅産物が確認でき (図5, レーン4), それ以外のプライマーセットでは有意な増幅産物は得られなかった (図5, レーン1, 2, 3, 5, 6)。この増幅産物についてDNA塩基配列解析と相同性検索を行ったところ, タケトラカミキリのCOI遺伝子配列と完全に一致することが確認された。

以上のことから, 本研究にて作成した特異的プライマーを用いれば, フラスを試料として原因となる竹材害虫の同定を行うことが可能であることが明らかとなった。

4. 考察

本研究では文化財を加害する木材害虫について, 特に竹材を摂食する害虫を対象として加害種特定に関する研究を行った。昆虫の体節の一部またはフラスを試料として昆虫の種を分子生

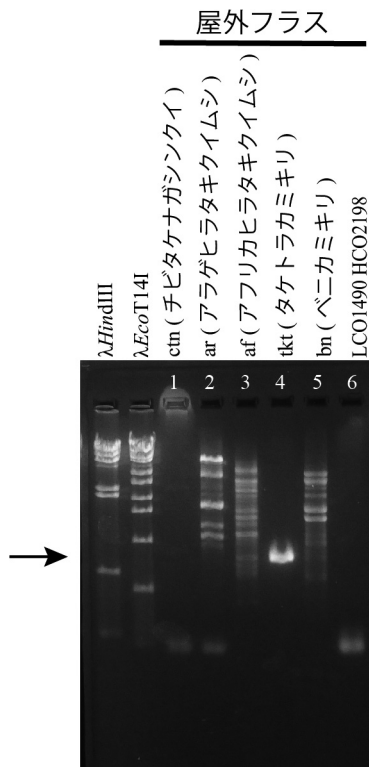


図5 屋外フラスを用いた特異的プライマーでの PCR の電気泳動写真

物学的手法によって特定することは絶滅危惧種などの希少な昆虫の生息状況⁵⁾や、農業・森林にて破壊的なダメージをもたらす害虫や特定外来生物の分布状況^{6,7,8,9)}を知るための分子生物学的なモニタリング方法として論文がいくつか発表されているが、文化財害虫についてフラスを試料として分子生物学的に種の特特定を行うことは未だ試みられていなかった。

本研究では文化財害虫の中でも、まずは日本で竹材を加害する主要な昆虫を5種選抜し、その5種の昆虫を収集して形態情報に基づいて同定し、COI 遺伝子配列を決定・登録した後で、それぞれの COI 遺伝子を増幅させる特異的プライマーを作成して、標的とする昆虫を特異的に検出するシステムの立ち上げを行った。そして生体でなくともフラスを試料として抽出した DNA から、種の特異的検出が可能であることを明らかにした。これまでも成虫の捕獲が困難であった文化財害虫の一部では、脱出口やフラスの形状・大きさによって種の推定を行うことが試みられてきたが、形態が類似したものが多いため種の推定は専門家でも困難な場合が多かった^{10,11,12)}。分子生物学的手法によりフラス試料から加害害虫を特定する技術を開発したことは、同定が困難であった竹材害虫の被害の実態を早期に把握することができ、対処を行う上で非常に重要な意義を持つことが考えられる。

本研究にて示した特異的プライマーは複数種由来のフラスが混ざっている場合にもそれぞれ特定が可能であり、対象とする種以外のチャタテムシやダニなども含めた他の混在する生物の COI 遺伝子が検出されることがなかった点は大きなメリットである。そして、屋外の歴史的木造建造物から得た夾雑物を含むフラスを試料としてタケトラカミキリの COI 遺伝子の特異的に検出することにも成功したことから、屋外で得た夾雑物や混入生物の多いフラスを試料と

した場合にも加害種を特定することができる有効な検査システムであると考えられる。竹材害虫の場合、竹材に直径1 mm程度の小さな脱出孔をつくる害虫は主にチビタケナガシクイ、アラゲヒラタキクイムシ、アフリカヒラタキクイムシであり、直径1 mmよりも大きな脱出孔をつくる害虫は主にタケトラカミキリ、ベニカミキリであると考えられるため、脱出孔の大きさの情報とフラスからの検出方法とを組み合わせることも効果的であると考えられる。今回、屋外フラスが得られた竹材では直径4 mmの脱出孔が確認されているため、両者を合わせて建造物に用いられている竹材がタケトラカミキリに加害されたと判断することができた。本研究では、ベニカミキリのフラスを入手することができなかったが、ベニカミキリ特異的プライマーを用いればフラスからベニカミキリを特定することが可能であると考えている。

今後は、屋外にある木造の文化財建造物等から得たフラスがどの程度古くても検出が可能か検討を進めることで、現在進行中の虫害か過去の被害痕跡かを判断することにもつながるのではないかと考えている。また、本研究の手法を基盤としてシバンムシ類などの特異的プライマーも構築しており、広く木材害虫やその他の文化財害虫の虫糞やフラスを試料とした種の特定方法についても検討を進めている。

謝辞

伝統的な管楽器と竹材に関する情報を頂きました東京文化財研究所無形文化遺産部の前原恵美氏に深く感謝いたします。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。また本研究は、公益財団法人花王芸術・科学財団「2019年度芸術文化助成(音楽の研究)」および公益財団法人ポーラ伝統文化振興財団の助成(2019年度)による成果の一部を含みます。以上、記して謝意を表します。

参考文献

- 1) 小峰幸夫、篠崎(矢花)聡子、佐藤嘉則、原田正彦、齊藤明子、木川りか、藤井義久: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、保存科学、60、19-26(2020)
- 2) 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)
- 3) 岩田隆太郎:ヒラタキクイムシの生態と飼育(2)飼育法、家屋害虫、14(1)、28-41(1992)
- 4) Jonas J.A., Peter E.S.: Phylogeny in cryptic weevils: molecules, morphology and new genera of western Palearctic Cryptorhynchinae (Coleoptera: Curculionidae), *Invertebrate Systematics*, 22, 503-522 (2008)
- 5) Nagarajan R.P., Goodbla A., Graves E., Baerwald M., Holyoak M., Schreier A.: Non-invasive genetic monitoring for the threatened valley elderberry longhorn beetle, *PLoS ONE*, 15(1), e0227333 (2020)
- 6) Ide T., Kanzaki N., Ohmura W., Okabe K.: Molecular identification of an invasive wood-boring insect *Lyctus brunneus* (Coleoptera: Bostrichidae: Lyctinae) using frass by loop-mediated isothermal amplification and nested PCR assays, *Journal of Economic Entomology*, 109(3), 1410-1414 (2016)

- 7) George K.P., Debbie G., Guoxing Q.: Development of a loop-mediated isothermal amplification assay as an early-warning tool for detecting emerald ash borer (Coleoptera: Buprestidae) Incursions, *Journal of Economic Entomology*, 113(5), 2480-2494 (2020)
- 8) Domenico R., Nicola L., Daniele D.L., Linda B., Francesco N., Giovanni C., Tommaso B., Chiara S., Rafaele V.G., Antonio P. G., Elisabetta R.: Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the identification of the invasive wood borer *Aromia bungii* (Coleoptera: Cerambycidae) from frass, *3 Biotech*, 11, 85 (2021)
- 9) Marga G.P., Bram C.: Detection of small hive beetle: frass as a source of DNA. *Journal of Apicultural Research*, 60(5), 683-685 (2021)
- 10) 森八郎、新井英夫、町田和江：斯道文庫など書庫内で採取された昆虫と書籍害虫のカタログならびにその代表的食痕・虫糞と防除法、*家屋害虫*、1(2)、57-76 (1979)
- 11) 山野勝次：文化財主要害虫の食痕と糞の特徴、*文化財の虫菌害*、46、39-49 (2003)
- 12) 小峰幸夫、木川りか、林美木子、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採取した虫糞調査：シバンムシ科甲虫各種間の虫糞形状比較、*保存科学*、51、191-199 (2012)

キーワード：竹材害虫 (bamboo wood boring beetles)；種同定 (species identification)；PCR 法 (PCR amplification)；特異的プライマー (specific primers)；フラス (frass)

Molecular Identification of Bamboo-Boring Beetles from Frass by PCR Amplification

SHINOZAKI-YABANA Satoko, KOMINE Yukio*,
SHIMADA Megumi and SATO Yoshinori

Bamboo has been utilized since ancient times as part of buildings, arts and crafts, tools for classical and folk performing arts, and musical instruments, and there are many Asian cultural properties made of bamboo. However, when bamboo used for a cultural property is damaged by bamboo-boring beetles, it is difficult to maintain it in good condition. An ideal measure would include identification of the bamboo-boring beetles that are actually feeding on bamboo, application of the best control methods based on the ecological information of the pests, and utilization of conservation methods appropriate to each situation to prevent damage by bamboo-boring beetles. The presence of bamboo-boring beetles can be inferred by visually observing the presence of escape holes in the material and the presence of frass in the vicinity. It would be a very effective identification system if the species of bamboo-boring beetles could be identified from their escape holes and frass.

In the present study, five major species of insects boring bamboo in Japan — *Lyctus africanus*, *Lyctoxylon dentatum*, *Chlorophorus annularis*, *Dinoderus minutus*, and *Purpuricenus temminckii* — were selected. The species of the insect samples were identified based on the morphological characteristics. Their COI gene sequences were determined and registered, and specific primers were selected to amplify each COI gene in PCR amplification in order to set up an effective system to specifically identify the target insects. It was found that it is possible to identify the species of bamboo-boring beetles using molecular biological methods by the DNA extraction from frass obtained at cultural property buildings and containing many unknown insects, substances, and contaminants. Finally, the development of the system to identify bamboo-boring beetles from frass made it possible to detect the species without capturing adult insects and is very important for grasping insect damage of cultural properties at an early stage.

*Nara National Museum