

D 会場

要 旨

9 月 29 日 (火曜日)

午前 課題講演

「ユスリカ科昆虫の多様性研究の進展
- 形態分類と DNA バーコーディングの
両輪 -」

コンビーナー：

高村健二 (国環研)

3D01 ~ 3D06

奥田しおり¹・*今藤夏子¹・大林夏湖^{1,2}・上野隆平¹・高村健二¹

(1. 国環研, 2. 東京大)

1. はじめに

ユスリカ科昆虫は世界に約3万種が知られており、その多くは幼虫世代を水の中で過ごす。多様な生息環境に分化していることから、水質の指標生物として有用である。しかし、体サイズが微小であることなどから、形態による分類は非常に難しい。我々は、性別や発生段階によらずにユスリカ種を同定することを目的とし、日本産ユスリカの標本と塩基配列のデータベースを作成し、2013年より公開してきた (<http://www.nies.go.jp/yusurika/index.html>)。

データベース作成に当たり、DNA抽出後も標本を形態同定に用いることを想定し、標本をできるだけ破壊せずにDNAを抽出する方法を採用した。DNA抽出キットの使用や精製、標本の保管状況が塩基配列取得に与える影響を調べ、その対処法について検討した。DNAの保存期間や標本数などの条件に合わせてDNA抽出法を使い分けられるように、時間や金銭的なコストについても検討した。

2. 材料と方法

日本産ユスリカ科昆虫を採集し、99.5%エタノール液浸標本もしくは自然乾燥標本として保存した。各方法でDNAを抽出し、ミトコンドリア遺伝子シトクローム・オキシダーゼ (COI) の部分塩基配列をダイレクトシーケンスによって調べた。

QIAGEN社のDNeasy Blood & Tissue Kit (以下、カラム精製)およびGentra Puregene Tissue Kit (非カラム精製)、溶解バッファーのみの粗抽出の3つの方法を検討した。全方法で、標本は全虫体を溶解バッファーに浸し、溶解終了時に取り出し、エタノール保存した。QIAGEN社の2つのキットについては、付属のマニュアルに従って精製までの抽出を行った。粗抽出では、溶解バッファー (Tris-HCl, EDTA, NaCl) とプロテイナーゼ K でDNAを溶出させ、その反応液を精製せずにPCRに用いた。DNAの溶出液量は、虫体サイズごとに50~400 µlとした。

粗抽出DNA溶液のうち、PCR増幅ができずに塩

基配列が得られなかったものについては、非カラム精製によりDNA溶液を精製した。

抽出DNAは、プライマーLCO1490とHCO2198 (Folmer et al. 1994)を用いてPCRし、産物 (658 bp) をダイレクトシーケンスした。塩基配列が得られなかったDNAについては、DNAの断片化が予想されたため、LCO1490をmICOintF (Leray et al. 2013) に代えてより短い領域をターゲットとしたPCRを行い、塩基配列 (313 bp) を解析した。

3. 結果

保存状態の良い液浸標本の塩基配列取得率は、カラム精製91.9% (147/160標本)、非カラム精製85.2% (260/305)、粗抽出87.2% (293/336)であった。乾燥標本では、カラム精製、非カラム精製では取得率は多少下がるものの、粗抽出では47.1% (193/410)に激減した。このうち塩基配列が得られなかった粗抽出DNAを非カラム精製により精製したところ、液浸標本では32% (14/43) について塩基配列が取得できたが、乾燥標本では全く取得できなかった (0/58)。一方、液浸と乾燥の両標本において粗抽出で塩基配列が得られなかったDNAについて、短い領域をターゲットとしたPCRを行った結果、それぞれ数標本ずつの配列が取得でき、種が判別できた。

4. 考察

カラム精製は、配列取得率とDNAの保存性の点で最良だが、1標本あたりDNA抽出のみで400円以上がかかった。最も廉価なのは、粗抽出 (約10円) だが、特に標本の保存状態が悪い場合は配列取得率が著しく低下した。非カラム精製は1標本100円以下で抽出できる上、配列取得率も良く、DNAの長期保存も可能なため、大量の標本数でも使いやすくと考えられた。なお、粗抽出DNAは、標本保存状態によらず、PCR増幅領域を短くすることで配列取得率が回復した。DNAの断片化が想定される場合は、PCR増幅領域の縮小が有効であると考えられた。

*上野隆平・高村健二・今藤夏子・奥田しおり・大林夏湖（国環研）

【

1. はじめに

ユスリカ科昆虫の幼虫は、あらゆる陸水環境において底生動物相の主要な構成員となる重要な生物群である。日本でのユスリカ分類学的研究は1930年代以降大きく進展し、現在までに日本国内から1200種ほどが記録されるに至っている。これほど多様なユスリカ類だが、ほとんどが雄成虫の記載しか無いため、幼虫が主体となる陸水生態の研究では種レベルの検討は困難であり十分に活用されない状態が続いてきた。しかし、近年のDNA解析技術の普及によりユスリカについても世界中でDNAバーコーディングが試みられ、種に固有の塩基配列情報がデータベース化されつつあり、幼虫・成虫を問わず種レベルの解析ができるようになることが期待される。

こうした研究では、形態同定の結果とDNA塩基配列で判定した結果の整合性が取れていることが非常に重要である。本講演では、国立環境研究所で進行中のユスリカDNAバーコーディングプロジェクトにおいて明らかになっている、形態同定とDNA塩基配列クレードの整合性について述べる。

2. 材料と方法

雄成虫のサンプルについて、サイズやサンプルの状態によって、①標本全体、②頭部・交尾器・翅など同定に必須な部分を除いた部分、③片側の脚一組のいずれかをDNA抽出用に用い、②③では残った部分、①では抽出後の標本を用いて形態から種を同定した。DNAの分析法については別の講演で述べられる。

形態同定で種名が確定し、かつ塩基配列情報が得られたものについて、整合性を評価した。すなわち、形態から同種と見なされた標本の塩基配列情報が一つのクレードを形成すると見なされた場合に、その種のDNA塩基配列情報が得られたものと評価した。

こうして、種名と塩基配列情報が関連づけられた

ものについてはデータベース化し、国立環境研究所のサイトで順次公開している。

3. 結果

約60種について形態同定から種名を確定し、それらのうち形態同定で1種としたものが2つ以上の塩基配列クレードに対応するケースが数例、形態同定で2種としたものが1個の塩基配列クレードに対応するケースが1例見られた。すなわち、数種に不整合が見られた以外は形態で種を確定したものの大部分について、DNAの塩基配列情報の解析結果と矛盾が無かった。ただし、不整合有りの数種にはウスイロユスリカ *Chironomus kiiensis*、カスリモンユスリカ *Tanypus kraatzi*、ヨドミツヤユスリカ *Cricotopus sylvestris* とその近縁種など、ごく普通に見られるユスリカであると同定されたものが含まれていた。

4. 考察と展望

形態による誤同定やDNAの解析エラーが無かったと仮定すると、形態同定とDNAクレードに不整合が生じた原因は、形態同定に用いているキーキャラクターの選択に問題があったか、そもそも識別可能な形態の差異が無い姉妹種だったかのいずれかであろう。たとえば、ウスイロユスリカやヨドミツヤユスリカと近縁種については、我々が検出したのと同様の問題が海外の研究者からも指摘されている。少なくともウスイロユスリカについては形態同定の見直しで解決できる可能性がある。

これまでに研究した種は日本産のものに限っても一部であり、今後も多くの不整合が見つかり、解決の努力が必要であろう。一方、形態学の研究者にとっては、形態同定の不備をあぶり出すためのチャンスであり、大きなメリットでもある。

主な種の大部分について形態同定と塩基配列に1対1の対応が付いた後は捕食性動物の餌選好性解析や環境DNAの研究などに広く応用されることが期待される。

*高村健二・上野隆平・今藤夏子・奥田しおり・大林夏湖（国環研）

1. はじめに

ユスリカ科昆虫の成虫は種特異的特徴に富んでいるが、幼虫はそれに乏しい。しかし、幼虫の成育期間は長く、一方で成虫の出現期間は短いため、採集が容易なのは幼虫である。ある水域に生息するユスリカ科昆虫の多様性を調べるには、この食違いが障害となり、ユスリカ多様性研究には一定の足枷がはめられてきた。

しかし、近年普及した DNA バーコーディングにより、幼虫標本であっても正確な種同定とそれによる多様性の評価が可能となる展望が開けてきた。DNA バーコーディングによる種同定が可能となれば、DNA バーコードを学名の代替として将来的にも参照可能な多様性資料を整えることができる。

本研究では、兵庫県南西部のため池におけるユスリカ多様性調査にあたって幼虫標本 DNA バーコードの分子系統樹から種数を求めている。同種・近縁種標本を多く含んだ分子系統樹においては枝末端に近づくほど分枝が短く密になる傾向が認められる。この分枝パターンの疎密に注目して統計学的に種間・種内に区分する複数の手法が近年提案されている。これらの手法を適用してため池毎に求めた種数を報告し、従来の止水域からの報告例と比較する。

2. 材料と方法

調査を行ったため池 20 面は、兵庫県加古川市・播磨町・小野市・加東市・加西市にわたる播磨平野に存在する。これらの池において初夏および初秋に底質および水草の採集を行い、それらの基質からユスリカ幼虫を肉眼にて拾い出した。拾い出した幼虫標本はエタノール中に保存し、タンパク分解酵素による DNA 抽出を施した。

抽出 DNA から DNA シークエンサー(ABI3730)により標本のミトコンドリア DNA CO1 領域の塩基配列を決定した。決定された塩基配列は重複分を除いた上で整列し、Mr. Bayes 等のソフトウェアを用いて分子系統樹を作成した。

分子系統樹から進化過程を考慮した上で種を区

分する手法は主に 2 つある。解析対象の系統樹において、根から全ての枝先までが等長であることを求める GMYC(General Mixed Yule Coalescence: Pons et al. 2006)と必ずしも等長を求めない PTP(Poisson Tree Process: Zhang et al. 2013)である。ここでは両手法を採用し、両方の結果を比較した上で、標本中のユスリカ種数を求めた。

3. 結果

初夏に採集された 766 標本から、ため池あたり 1~15 種（底質 1~11 種、水草 2~7 種）が区分された。全ての池で集計すると 62 種（底質 48 種、水草 40 種）であった。ただし、底質の場合、池 2 面では標本の塩基配列決定率が 50%をはるかに下回った。また水草が採集された池は 11 面に留まった。

区分された種のうち、既知の DNA バーコードとの BLAST 検索等により少なくとも属名まで確定したのは、33 種であった。したがって、半数近い種は DNA バーコーディングだけからでは詳しい分類群が判明しなかった。

4. 考察

本研究で調査された 20 面のため池からは 62 種の存在が確認された。ただし池によって確認種数が大きく変化する上、種類相の入れ替りも大きかった。池による種の入替りが大きいのは、池の環境・水生植物相・水生動物多様性に違いがあるためと考えられる。参考までに国内の湖から報告された種数を集計すると、およそ 2~38 種の範囲である。今回調査されたため池の総水面面積は 0.2 km²に満たない。参照した湖が最小でも 0.68 km²であるから、面積に比べて多様なため池生態系の特性が窺われる。また、本研究では幼虫標本 DNA バーコードの分子系統解析に基づいて種が区分された。一方、参照された湖では成虫標本の形態分類に基づいている。標本の DNA 配列決定が成功する限り、例え 1 個体でも信頼性の高い種区分が可能である本手法の特徴も報告種数の多さに反映されたと考えられる。

オオユスリカグループの分布

*平林公男・宮原裕一・花里孝幸(信州大)・今藤夏子・上野隆平・高村健二(国環研)

1. はじめに

近年、諏訪湖においては湖水の浄化に伴い、湖心付近におけるユスリカ類の幼虫分布やその密度に変化が予想される。本研究においては、その実態を明らかにすることを目的として、湖沖帯全域における底生動物群集の分布とその密度について調査を行った。また、沖帯における優占種の一つであるオオユスリカ *Chironomus plumosus* については、細胞遺伝学的なアプローチ(染色体地図)から、同一種内に複数のタイプが記載され、*Chironomus plumosus* group として、報告されている例がある(例えば Golygina et al. 2007)。本調査においては、諏訪湖におけるオオユスリカの同胞種の実態を明らかにすることも目的の一つとして位置づけた。

2. 材料と方法

2013年3月22日に、諏訪湖湖心を含む全17地点(水深2.7m~6.2m、平均水深5.3±1.0m; 沖帯)において、エクマン・バージ採泥器を用いて底泥サンプルを1地点で2~4回採取した。位置情報はGPSを利用した。採集したサンプルは、実体顕微鏡下で種毎に個体数を計測した。オオユスリカ幼虫については99.9%のメタノールに1個体ずつ保存した後、ミトコンドリアCOI(658bp)の塩基配列を解読した。環境要因としては、底泥表層の灼熱減量、底泥温、底泥直上水中のDO、EC、pH等を測定した。

3. 結果と考察

湖沖帯全域における全ユスリカ幼虫の平均密度は、1654.9±614.1匹/m²であった。種毎では、オオユスリカ幼虫は平均でおよそ600匹/m²、アカムシユスリカ幼虫は900匹/m²、ウスイロカユスリカ幼虫は、150匹/m²であった。過去における湖全域にわたる同時期の調査結果(Hirabayashi et al., 2003; 60地点、平均水深4.1±1.5m)と比較してみると、2001年3月23日のデータでは、オオユスリカ幼虫は平均でおよそ3匹/m²(0~60匹/m²の範囲)、アカムシユスリカ

幼虫は75匹/m²(0~200匹/m²の範囲)となっており、今回の結果は、オオユスリカで200倍、アカムシユスリカで12倍に増加している。平林ら(1987)によると、1986年3月の調査(57地点)では、アカムシユスリカ幼虫の個体数密度は湖全体で、0~9946匹/m²の範囲で、2500匹/m²以上の地点が全体の90%以上を占めていると報告されている。今回の結果と比較すると、現在は1985年当時の1/3以下であることが明らかとなった。オオユスリカ幼虫の場合には、ほぼ同程度と考えられる。以上のことから、現在のユスリカ類幼虫の生息密度は、1985年の密度には至っていないものの、湖の水質が大きく変わりはじめた2001年の状況よりもやや増加傾向にあると思われる。特にアカムシユスリカ幼虫については顕著であることが示唆される。湖心が代表値となるのか、水深4m以深の地点(水深2.7mの1地点を除く16地点中)のオオユスリカ幼虫、アカムシユスリカ幼虫の生息密度の低い順位で並べてみると、それぞれ上位から13番目(711.1匹/m²)、16番目(2444.4匹/m²)であった。平均が各々594.4±169.3匹/m²、902.8±611.7匹/m²であるので、アカムシユスリカ幼虫の場合、有意に湖心付近が高い傾向が示された。

オオユスリカ幼虫についてミトコンドリアCOI(658bp)の塩基配列を解読した結果、諏訪湖からは8つのハプロタイプが確認された。最も出現頻度が高かったものはLタイプで、調査した全25個体のうち、15個体がLタイプであった(全体の60.0%)。次いで高かったのはNタイプ(4個体、16.0%)であった。Lタイプは湖全体に分布し、1地点を除く全ての地点から捕獲された。水深別では、浅いところから深いところまで広く分布(水深2.7mから6.2m)していた。一方、Nタイプは湖中心部分(水深5.7~5.9m)に多い傾向が認められた。ハプロタイプの水深毎の出現数は、水深4m以浅では1タイプ、4m未満5m以下では2タイプ、5m未満6m以下では7タイプ、それよりも深部では1タイプであった。

*河合幸一郎, 阿武沢磨 (広島大)

1. はじめに

ユスリカ科は、極めて多くの属・種を擁し、河川産・湖沼産・海産・陸生等、様々な棲息域で多岐に亘る生活様式を有する種を含む双翅目昆虫の大グループであるが、これらの属・種がどのような過程で祖先から派生・分化してきたのかは推測の域を出ない。そこで、様々な水域に棲息する属を含むエリユスリカ亜科を対象とし、幼虫の最適棲息環境を推定すると同時に分子系統樹を作成し、これらの間の相関を調べることにより、生態と系統進化との関わりを考察した。

2. 材料と方法

河川では、種々のハビタットにおいて幼虫を含む底質材料を採取し実験室内で飼育して羽化成虫を集め、他の棲息域では主に灯火採集により成虫を集め、DNA を抽出した後、プレパラート標本として同定した。次に、各属・種について、緯度・標高・河川形態・水質等の環境要因をいくつかの範囲に分け、点数化し、各範囲での出現頻度から加重平均値を求めて各属・種の最適棲息環境を推定した。一方で、各種の成虫から抽出した DNA を鋳型として PCR 法で 28SrRNA あるいはミトコンドリア *COI* 領域を増幅し、その塩基配列に基いて作成した系統樹から各属・種の祖先からの派生順位を求めた。

3. 結果

計 36 属 80 種について、*COI* 領域塩基配列を決定することができた。このうち、33 属については属レベルでの最適棲息環境を推定し、属間分子系統樹を作成した。また、*Orthocladus*, *Cricotopus*, *Eukiefferiella* 属については、種レベルでの最適棲息環境を推定し、種間分子系統樹を作成した。

4. 考察

Orthocladus tamarutilus では、隠蔽種の存在が示唆された。また、本亜科では、湖沼産・海産・陸生種が、進化の過程で祖先種から複数回に亘って派生したことが推測された (図)。さらに、環境要因のうち、棲息域・水質・流速に関しては、これまでの知見に合致した結果が得られたが、緯度・標高・河川形態に関しては、これらに反し、低緯度から高緯度、中流から上流方向に分布域を拡大しながら属・種が派生してきたことが示唆された。

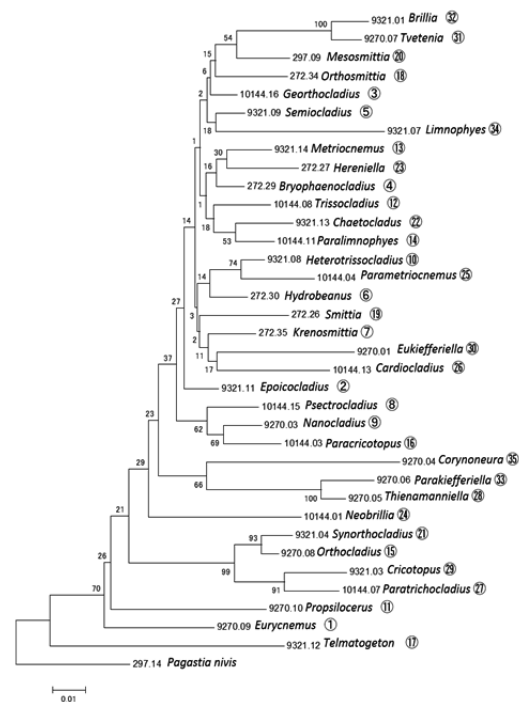


図 エリユスリカ亜科 33 属の分子系統樹

※ ○内の数字は派生年代順を示す

*山本 優 (下関市)

1. はじめに

日本のユスリカの研究は 1930 年代半ばから 1940 年代初頭にかけての徳永雅明博士の分類学的研究に始まる。約 40 年の空白を置いて 1977 年に静岡大学の橋本碩博士による雑誌、遺伝に「日本のキロノムス」「日本のアカムシ」が発表され、また同年国立公害研究所（現在国立環境研究所）の佐々学博士と九州大学在学中だった演者により、日本衛生動物学雑誌に「日本産ユスリカ科既知種の目録（英文）」が掲載された。これらが、医学、公衆衛生、環境、農業、分類を含めた現在に続く日本におけるユスリカ科の総合的研究のスタートの切っ掛けとなった。さらに、1983 から 1989 年にかけて、「Chironomidae of the Holarctic region」と題して *Entomologica Scandinavica* より幼虫、蛹、成虫の検索表と解説のシリーズが刊行され、分類学的研究が世界的に飛躍的に進展していくこととなった。

1977 年時点では日本のユスリカは 42 属、168 種が報告されていた。現在は 176 属 1206 種が知られている (Yamamoto & Yamamoto, 2014)。30 数年間で分類学的な知見は飛躍的に増大した。属の定義も大きく変容している。これには分岐分類学の普及が大きく関わっている。日本産ユスリカの知見増大には佐々学博士と共同研究者の功績が非常に大きい。

環境指標生物として、また、底生動物群集の主要な構成要素としてユスリカの果たす役割は大きく、無視することのできない状況にある。しかし、生活の主体となる幼生期の種の確定はわが国では、殆ど不可能な状態に置かれている。近年の DNA による解析がこの問題の解決に繋がるものと期待されている。ここでは分類学的な観点から今後の研究の方向性を考えて見たい。

2. 既知種の整理とフォウナの解明

1200 種を超える種の大半が佐々学博士と共同研究者によって記載報告されたものである。幸いにも、記載に使用された模式標本は国立科学博物館に保管されている。現在、これら模式標本を元に分類学的検討を開始している。この情報を元に 2014 年に

作成された種リストの補完も行う必要がある。今後数年間で完了したいと考えている。わが国におけるユスリカの解明度は、日本列島の自然環境の多様さとこれまでの演者自身の調査経験とから考えて 70% には達していないものと判断される。おそらく日本列島には 2000 を超える種が分布していると思われる。記載も継続的に行っていかなければならない。

3. 形態学的研究と Terminology に係わる研究

形態分類学にとって、対象生物が示す形態的な特性を正確に把握することは系統を論ずる上で最も重要な要件の一つである。残念ながら、一部の研究者を除いて形態の理解が十分であるとは言いがたい。記載分類に必要な Terminology も形態理解と深く係わってくる。ユスリカ記載に使われる Terminology は現在、Sæther (1980) が元となっている。しかし、この中のいくつかは Homology に問題があると考え、比較研究を進めている。

4. 幼生期の解明

ユスリカの環境指標生物としての価値の検証、底生生物群集の構成要素の一つとしての役割を理解するには幼虫・蛹の解明が必須条件である。しかし、この分野の研究は長い陸水学の伝統を持つヨーロッパに比べ大変遅れており、2001 年に佐々博士によって指摘された状況から全く進展していない。幼生期の解明には分類学者だけではなく、生態学者と協同研究が必要であるが、現状では困難な状態である。現在進められているユスリカの DNA バーコーディングの研究によって、今後飛躍的に解明が行なわれていくのではないかと期待している。

5. 今後の課題

現在、ユスリカのカテゴリ学的研究に従事しているか係わっている研究者は僅か数名である。一人を除いて、研究機関をリタイアまたは高齢に達している。今後の研究の発展のためには若手の育成が急務であるが、現状はかなり厳しい状況に置かれている。