

令和元年9月8日現在

機関番号：82503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06940

研究課題名(和文) 絶滅危惧種水生昆虫の遺伝的多様性の評価に基づく再導入・系統保存策の確立

研究課題名(英文) Establishing reintroduction and phylogenetic conservation measures based on the genetic diversity evaluation of the endangered aquatic insect

研究代表者

倉西 良一 (KURANISHI, Ryoichi)

千葉県立中央博物館・その他部局等・研究員(移行)

研究者番号：10250143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：絶滅危惧種昆虫の保全の目的として、遺伝子情報をもとにして系統保存、再導入の方法を検討する研究を行った。遺伝子情報は、キガシークエンサーを使用しマイクロサテライトマーカーを開発した。このマイクロサテライトマーカーを用いて地域個体群の遺伝的多様性・連続性・独自性の検討を行った。これらの結果をふまえ、系統保存個体群を野外に再導入する計画が立てられ、実施された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本の水生生物は生息環境の悪化や消失によって急速に集団サイズを減少させつつある。遺伝的多様性情報の欠落、集団遺伝学的データの活用法が確立されていないことが保全実務への大きな障壁となっていた。本研究では絶滅危惧水生昆虫について、遺伝的多様性の維持を柱の一つに組み込んだ保全策を検討し、保全方法論の標準化を試みることを目的とした。特に絶滅危惧種シャープゲンゴロウモドキを対象に核DNAの遺伝的多様性に基づく地域個体群の健全性の評価、地域個体群間の遺伝的接続性と保全単位の解明を行った。これらの結果を統合し、地域個体群としての遺伝的独自性が失われない系統保存計画、飼育系統の野外への再導入計画を策定した。

研究成果の概要(英文)：For the conservation of an endangered insect species, we examined the method of phylogenetic preservation and reintroduction based on genetic information. For obtaining genetic information, we developed microsatellite markers using giga sequencer platforms. We examined the genetic diversity, continuity, and uniqueness of regional populations using these microsatellite markers. On the basis of these results, a plan was implemented to reintroduce phylogenetically conserved populations in the field.

研究分野：保全生物学・系統分類学・分子系統地理

キーワード：絶滅危惧種 保全生物学 マイクロサテライト 遺伝的多様性 再導入 系統保存

1. 研究開始当初の背景

日本の水生生物は生息環境の悪化や消失によって近年急速に集団サイズを減少させつつある。2012年の環境省第4次レッドリストでは、掲載昆虫のうち2割以上を水生昆虫類が占めるに至っており、その中には生息地の保全だけではもはや回復が望めないほどの危機的水準に達してしまった種も多い。そこで飼育による系統保存やそれらの野外への再導入が喫緊の課題である。このような計画の策定に対して大きな障壁となっているのが対象となる水生昆虫の既存の遺伝的多様性情報がほとんどないこと、そして保全実務への集団遺伝学的データの活用法が確立されていないことである。保全計画は個体群の遺伝的多様性を健全なレベルに保つことと、地域ごとの遺伝的独自性を破壊しないという一見すると相反する二つの条件を満たすことが必須である。系統保存や飼育個体群の野外への再導入へは、この難解な問題に直面するため保全遺伝学の理論に基づいた方法論の確立が必要である。

本研究では、減少傾向が特に著しい大型水生甲虫のシャープゲンゴロウモドキ（コウチュウ目：ゲンゴロウ科）を対象に、遺伝的多様性と独自性の維持を組み込んだ絶滅回避の具体的計画を策定し、それをモデルケースとして水生昆虫・昆虫全般にも適用可能なワークフローを確立することに主眼を置く。

2. 研究の目的

(1) ギガシークエンサーを使った解析に使用可能な純度の高い遺伝子サンプル抽出法の確立。

(2) 野生個体を傷つけずに遺伝子を抽出する技術の開発。シャープゲンゴロウモドキは種の保存法でいう『国内希少野生動植物種』に指定されている種で、残存する個体数も少なく、野外個体群からは殺傷を伴わず SSR 解析用の全遺伝子の抽出を行う必要がある。Suzuki et al. *Entomological Science* 2012は、非致死的に遺伝子サンプルをシャープゲンゴロウモドキより得る方法を報告している。しかしこの方法は生体の触角を切除するもので野外個体群での運用には大きな問題がある。この問題を解決するために生体に影響を与えないと考えられる、i) 卵殻、ii) 幼虫の脱皮殻、iii) 成虫の嘔吐物、iv) 成虫の排泄物、vi) 成虫の防御用分泌物、vii) 成虫が羽化した時に出す排泄物などを使って遺伝子を抽出する方法を開発する。

(3) 次世代シークエンサーにより核 DNA 中の単純反復配列 (SSR) を含む配列を多数得る。SSR を数十個特定し、集団的遺伝学的情報収集に役立つ分子マーカーを特定する。従来から核 DNA 中の SSR は集団的遺伝構造の解析に有用であることが指摘されていたが、その特定は非常に時間と経費のかかる作業であった。本研究では進展著しい次世代型シークエンサーを使うことにより効率よく作業を進めることが期待される。

(4) 地理的に隔離された野外集団間の個体の移動を遺伝子流動から推定する。集団遺伝構造の検討から保全単位の認識、消滅した場所へ自然分散による再定着の可能性について解析を行う。

(5) 得られた遺伝子情報をもとに系統保存個体群と野生個体群の遺伝型の比較を行う。この結果を用いて系統保存方法（産地間や血統）の維持方針を決定する。また系統保存個体の（野外絶滅個体群）生息地への再導入の妥当性の判断を行う。

(6) 得られた遺伝子情報をもとにアレル多様度、ヘテロ接合度の解析、有効集団サイズの推定を行う。絶滅確率の客観的評価を行う。また危機管理のために集団存続可能性解析ソフトを使ったシミュレーションを試みる。

(7) 絶滅危惧水生昆虫の遺伝子情報の集積を行う。生息地が分断され激減傾向が著しい水生昆虫類のミサキツノトビケラ、ヒゲナガカワトビケラやオオナガレトビケラなどの組織・遺伝子を抽出し、遺伝的な多様性を中心とした遺伝子情報を集積し危機管理に備える。

3. 研究の方法

(1) 絶滅危惧種シャープゲンゴロウモドキの遺伝的多様性の解明

① ギガシークエンサーを使った遺伝子解析に使用可能な純度の高い遺伝子サンプルの抽出法の確立。

② 野生個体を傷つけずに遺伝子を抽出する技術の開発。

シャープゲンゴロウモドキの生体を傷つけずに遺伝子を抽出する技術を確立する。具体的には i) 卵殻、ii) 幼虫の脱皮殻、iii) 成虫の嘔吐物、iv) 成虫の排泄物、v) 成虫の防御用分泌物、vi) 成虫が羽化した時に出す排泄物などである。非殺傷的な方法による遺伝子抽出は、絶滅危惧種昆虫の遺伝子解析では避けて通れない問題で、これまで飼育中の系統保存個体を使って予備実験を行って来た。幼虫の脱皮殻や排泄物など条件によって多少のばらつきはあるものの抽出対象によっては十分な手応えがあった。仮に非殺傷的なサンプルから十分な遺伝子が抽出できなかった場

合も、時間をかけて探索すれば野外で死亡する若齢個体は必ず存在するので、野外死亡個体からの遺伝子抽出で充分フォローが可能である。非殺傷的な方法をさらに高めるために成虫や幼虫を飼育した水槽の水から環境 DNA として遺伝子を抽出、解析する手法にも挑戦したい。

③ マイクロサテライトマーカーの開発

ギガシークエンサーを使ってシャープゲンゴロウモドキの核 DNA 遺伝子を解析し、マイクロサテライト候補領域を数十個特定して、プライマーを設計する。少数個体（20 程度）について遺伝子型を決定し、集団内の遺伝的多様性の解析に適した十分な変異性を持つものを選抜する。マイクロサテライトマーカーの開発は、琉球大学熱帯生物圏研究センターに設置されている次世代型シークエンサー (Roche454 Junior) の使用が計画され、すでに先方からの共同利用の内諾も受けている。遺伝子サンプルや試薬の調整はすでに爬虫類や昆虫の解析で実績 (Kurita et al. 2014, *Applied Entomology and Zoology*) のあるプロトコルが出来ているので確実な成果が期待できる。ギガシークエンサーによる解析も遺伝子を読んでみなければ、どれだけ使えるマイクロサテライトマーカーが抽出できるかは分からない。もし仮に琉球大学の器材で読める範囲が少ないと判断された場合は、千葉県立中央博物館に設置されているギガシークエンサー (Miseq) による解析を試みる。

④ マイクロサテライト領域を使った解析

野生に現存する個体群の遺伝的分化の程度をマイクロサテライト領域のヘテロ接合度や分化指数から求め、各地域個体群が独立した集団なのか単一のものなのかを確認、保全単位の設定を行う。野外個体群と系統保存個体群の遺伝的多様性を推定し、それぞれに十分な遺伝的多様性が維持されているか、野外に系統保存個体群を再導入した場合に遺伝的健全性の改善と地域独自性の維持が両立するかの予測を得る。さらに有効集団サイズの推定、絶滅の確率の客観的評価のために集団存続可能性解析ソフトを使ったシミュレーションを行う。この結果をもって今後の野外個体群の危機管理、系統保存（交配）の方針、飼育個体群の野外への再導入の基礎資料とする。

⑤ シャープゲンゴロウモドキ関西亜種との遺伝的多様性の比較検討

これまで亜種レベルの違いとされていた、新潟、富山、福井の各県に生息するシャープゲンゴロウモドキの遺伝子を千葉県の関東亜種と比較をする。地域間分化の実態、特に亜種というタクソンの妥当性を検討する。

(2) 他の絶滅危惧種昆虫への応用

① 集団遺伝構造の解明を現実の保全策に応用するための指針の作成

シャープゲンゴロウモドキと類似した状況にある他の昆虫類の保全に役立つように、これまでの生息地の保全を含めた活動と集団遺伝子構造の解析を含めた保全生態学的な研究の一般化を目指す。

絶滅危惧種の分布の実態調査と標本情報の整理

生息地が分断され激減傾向が著しい水生昆虫類のヒゲナガカワトビケラやオオナガレトビケラなどの組織・遺伝子を抽出し、遺伝的な多様性を中心とした遺伝子情報を集積し今後の危機管理に備える。

4. 研究成果

(1) ギガシークエンサーを使った解析に使用可能な純度の高い遺伝子サンプル抽出法の確立については、数年を経過した古いサンプルでは、遺伝子の分断化等の影響で十分な結果が得られなかったことから、今回新規採集による新鮮な個体の筋肉を使った。従来、よく使われて来た胸部の脚の筋肉ではなく、幼虫の頭部の筋肉を使う事で純度の高い、ギガシークエンサーの解析に耐える遺伝子サンプルとなることが分かった。

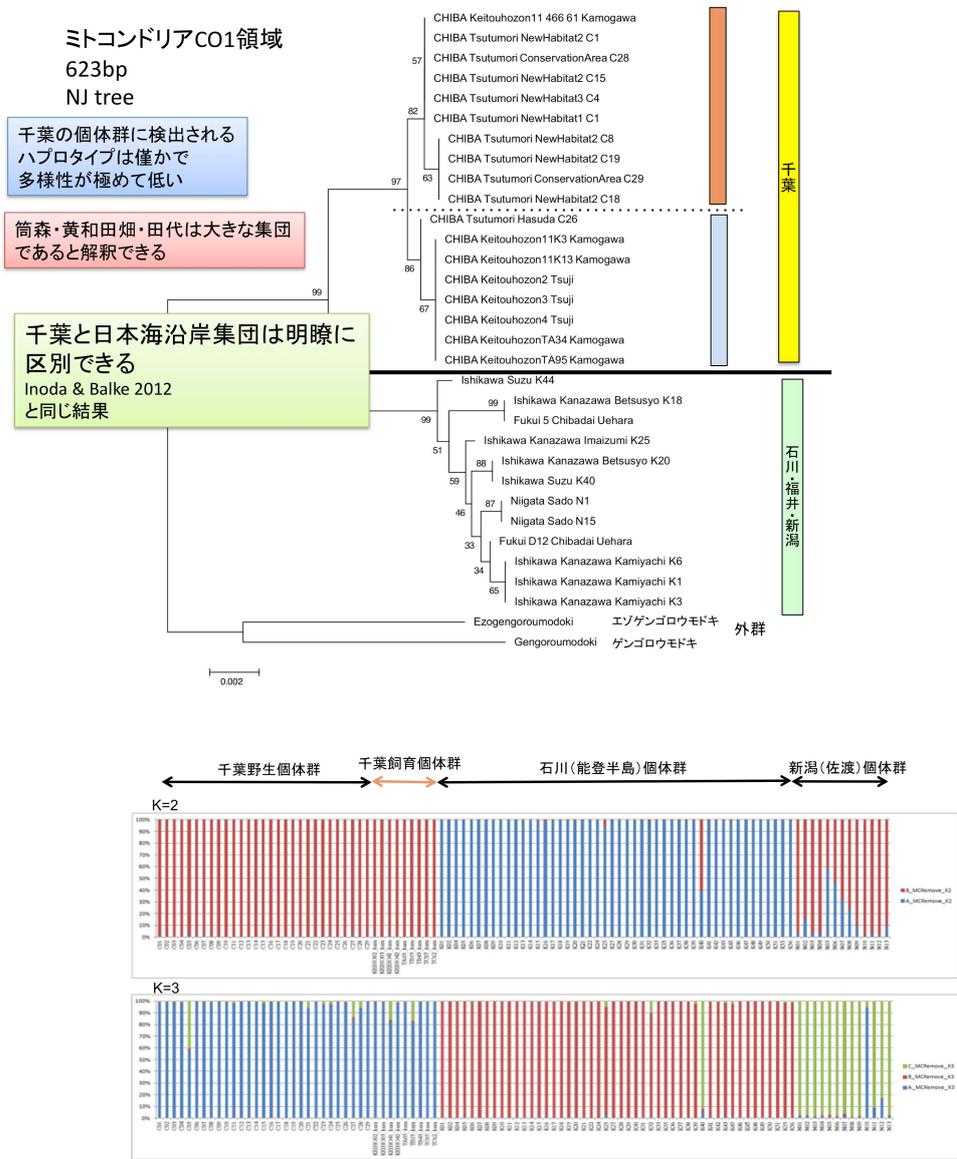
(2) 野生個体を傷つけずに遺伝子を抽出する技術の開発については、卵殻、幼虫の脱皮殻、成虫の嘔吐物、成虫の排泄物、成虫の防御用分泌物、成虫が羽化した時に出す排泄物などを使って遺伝子を抽出する方法の開発を試みた。ゲンゴロウを用いた成虫が羽化した時に出す排泄物については、良好な結果を得る事ができたが、卵殻、成虫の嘔吐物、成虫の排泄物、成虫の防御用分泌物からは遺伝子を抽出することはできなかった。幼虫の脱皮殻については、条件によっては遺伝子の抽出に成功する事もあったが、安定した結果を得る事ができなかった。多くの原因はシャープゲンゴロウモドキの幼虫の体表には多くの付着微生物 (ツリガネムシやワムシ) が原因となっていることが明らかとなった。

(3) シャープゲンゴロウモドキの集団遺伝構造を明らかにするために、核DNA遺伝子マーカー (マイクロサテライトマーカー) を開発した。ギガシークエンサーを使って約100万から180万の塩基配列を読み込んだ。この塩基配列を解析し136対のマイクロサテライトマーカー候補領域を選定、分子生物学的実験解析の結果、27対のマイクロサテライトマーカーを開発に成功した。今回新たに開発できたマイクロサテライトマーカーは地域の個体群内の遺伝的多様性の把握や地域個体群の

連続性や独自性の解析に重要なものである。

これらの分析結果を使い、現存する集団の遺伝的多様性、集団内の遺伝子構成を集団遺伝学的解析ソフトを用いて解析した。絶滅危惧種シャープゲンゴロウモドキについて千葉、千葉保存系統、石川の個体群について、生の波形データからピークの位置（PCR増幅産物の長さ）を決定・数値化する作業をすべてやり直し、ピーク位置に間違いが見つかった箇所を訂正した。また新規個体群（許認可済）のデータ起こしをして、新たに解析に加えた。本研究では解析に異なるシーケンサーを使ったため、DNA分子の泳動に機材の個体差が出てくる。そこで、ピークの位置の補正のためにのりしろとなる個体を作って、機材間でピークの位置のずれを検討した。今回の解析では厳密に座位ごとに補正值を求めた。

今回の解析では生データセット（27座位）から2つのデータを作成した。ひとつは3つ以上のピークを示す座位を抜いた23座位のデータ（TripleRemove）ともうひとつはTripleRemoveにMicroCheckerというソフトを使ってヌルアリル（PCRで増えない対立遺伝子）の存在が疑わしい座位を抜いた11座位のデータ（MCheckerRemove）である。これらのことから保存系統が異なる遺伝子プールの混合状態ではなく、かつての生息地への回復に道が開けた。また千葉の野外個体群と保存系統の間に遺伝的差異が生じていることなどが明らかとなった。



遺伝子構造解析の結果
縦棒が一個体を表し、一個体が持つ各遺伝子クラスターに由来する対立遺伝子の割合を異なる色で表している。

千葉産飼育個体群は異なる遺伝子プールの混合ではない。

集団間の遺伝的差異の検定結果

GenAlEx により算出

Pop1	Pop2	G''st	P(rand >= data)
千葉	保存系統	0.311	0.001
千葉	石川	0.790	0.001
千葉	新潟	0.383	0.001
保存系統	石川	0.794	0.001
保存系統	新潟	0.464	0.001
石川	新潟	0.568	0.001

G''stは、0から1の間の数値をとる。

0で分化なし、1で完全に分化

Pでは有意に0から離れているか検定

いずれの組み合わせも $p < 0.001$ となり遺伝的差異がある

千葉のシャープゲンゴロウモドキ個体群は、2017年の春期（越冬雌成虫の産卵時期）の降水量の少なさから個体数が減少し、危機的な状況となった。従来系統保存個体として、千葉県下より採集された個体が存在していたが、西日本個体群の遺伝子が混入したことが否定できず、このことが再導入の大きな障壁となっていた。

今回のマイクロサテライトマーカーを用いた解析の結果、千葉県産の系統保存飼育個体群は異なる遺伝子プールの混合ではないことを明瞭に証明することができた。本件研究成果を基に（旧生息地への）千葉県環境生活部生物多様性センター・シャープゲンゴロウモドキ保全研究会・市民ボランティアらとともに2019年の春、系統保存個体群の野外再導入を実施することができた。これは官民一体となった絶滅危惧種保全活動の大きな前進であるといえる

千葉県のシャープゲンゴロウモドキの捕獲については環境省関東地方環境事務所から『環関地野許第1504106』・『環関地野許第1604191』、石川県のシャープゲンゴロウモドキについては中部地方環境事務所から『環中地野許第1505071』石川県環境部から指定希少野生動植物種捕獲等許可『第27-9』を得た。

止水域に生息する絶滅危惧種ミサキツノトビケラの生息状況を調査しその遺伝子情報、幼虫・蛹・成虫の形態を記載した。絶滅危惧種オオナガレトビケラについて生息域全域からサンプルを収集し形態・遺伝子の解析をすすめた。その結果従来日本産は1種とされていたが複数の種が含まれることが明らかとなった。日本列島全域から東アジアのヒゲナガカワトビケラの遺伝子構造を検討した。東アジア産のムラサキトビケラ科の昆虫の形態・遺伝子解析を含めた研究を行い、長らく不明種だった種を再発見した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

Kuranishi, R. B. and L. P. Hsu

Discovery of *Eubasilissa signata* Wiggins, 1998. (Trichoptera, Phryganeidae) from Taiwan. Zoosymposia 査読あり, 2019, 14:103-107. <http://dx.doi.org/10.11646/zoosymposia.14.1.13>

Saito, R., S. Kato, R. B. Kuranishi, T. Nozaki, T. Fujino and K. Tojo

Phylogeographic analyses of the *Stenopsyche* caddisflies (Trichoptera: Stenopsychidae) of the Asian Region. Freshwater Science. 査読あり 2018, 37(3):562-572. DOI: 10.1086/699364.

Katsuma, N., R. B. Kuranishi

Redescription of *Triplectides misakianus* (Matsumura, 1931) (Trichoptera, Leptoceridae) in Japan with notes on their habitat. *Zoosymposia* 査読あり, 10: 234-242. 2016

〔学会発表〕 (計 10 件)

Kuranishi, R. B.

On *Eubasilissa maclachlani* (White, 1862) and its closely related species. 16th International Symposium on Trichoptera Prince of Songkla University, Surat Thani Campus, Thailand. 2018

倉西 良一

謎に包まれたムラサキトビケラ属の一種 *Eubasilissa signata* Wiggins 1998 の再発見
日本昆虫学会 第 75 回大会, 九州大学, 福岡, 2015

倉西 良一

シャープゲンゴロウモドキの遺伝子構造解析(2) シャープゲンゴロウモドキ保全協議会, 大多喜町基幹集落センター, 2017

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉西 良一 (KURANISHI, B. Ryoichi)

千葉県立中央博物館・その他部局等・研究員 (移行)
研究者番号: 10250143

(2) 研究分担者

栗田 隆気 (KURITA, Takaki)

千葉県立中央博物館・その他部局等・研究員 (移行)
研究者番号: 00738841

(3) 連携研究者

西原 昇吾 (NISHIHARA, Syogo)

東京大学, 大学院農学生命科学研究科(農学部), 特任研究員
研究者番号: 90569625

(4) 研究協力者

新里 尚也 (SHINZATO, Naoya)

琉球大学, 熱帯生物圏研究センター, 准教授

堀口 智博 (HORIGUCHI, Tomohiro)

千葉大学, 園芸学部, 大学院生

小野 知樹 (ONO, Tomoki)

千葉県環境生活部自然保護課生物多様性センター, 主幹

佐土 哲也 (SADO, Tetsuya)

千葉県立中央博物館, 共同研究員