

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580350

研究課題名（和文） 病原体を媒介するブユを DNA 配列で同定するためのデータベース構築

研究課題名（英文） DNA database for identification of black fly of Japan

研究代表者

大塚 靖 (OTSUKA YASUSHI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：00244161

研究成果の概要（和文）：

吸血昆虫ブユは日本では人獣共通オンコセルカ症やライチョウのロイコチトゾーンを媒介する。しかし、ブユのメス成虫は形態で類似している種類があり媒介種の同定が困難な場合があった。そこで日本にいるブユを DNA で分類するために、50 種類のミトコンドリアのチトクローム c オキシダーゼ subunit 1 (CO1), subunit 2 (CO2), 16S リボソーム RNA 遺伝子 (16S rRNA) の一部の配列を決定した。16S rRNA では種間で差がない場合でも、CO1、CO2 では十分に違いが認められ、これらの配列で種の同定が可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

Black flies are blood sucking insects, and transmit a filarial parasite which cause zoonotic onchocerciasis and *Leucocytozoon lavati* of an endangered rock ptarmigan in Japan. But similarity in morphological characters of adult female made difficult to identify some species. To identify black fly species based on DNA sequences, sequences of mitochondrial genes (CO1, CO2 and 16S rRNA) were determined for 50 black fly species of Japan. Some species had similar sequences in 16S rRNA. But in CO1 and CO2 regions, all species have divergent sequences enough for species identification.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：人獣共通感染症

1. 研究開始当初の背景

吸血昆虫であるブユ (Diptera: Simuliidae) は日本で5属75種類が記録されており、我が国では哺乳類に寄生するオンコセルカやライチョウのロイコチトゾーンなどを媒介することが知られている。これまでブユなどの昆虫媒介性の寄生虫は、昆虫を解剖して寄生虫の形態より同定していた。近年、オンコセルカやロイコチトゾーンを含む多

くの寄生虫の DNA 配列が登録されるようになってきた。それらの配列は形態で分類困難な寄生虫を DNA 配列で分類すると共に、昆虫を解剖せずに寄生虫を持つかもしれない昆虫と共に DNA 抽出し PCR 法などによって感染の有無と寄生虫種が判定できるようになった。しかし、ベクターであるブユの DNA 配列は一部の種では登録されているものの、現状では多くのブユ種は DNA 配列からは同定できない。

またブユはメス成虫では形態で同定が困難なグループが存在する。その一つが、Nevermannia 亜属の vernum 種グループである。大分県でも vernum 種グループの Simulium uchidai からフィラリア幼虫が見いだされたが、近縁種である S. koshikiense との鑑別が問題となった。また岩手県ではダイセンヤマブユから牛寄生のオンコセルカ幼虫が見ついている。この S. daisense も S. malyschevi と成虫での分類が困難である。さらにオオブユの仲間もメス成虫での同定が困難である。Prosimulium yezoense は北海道から九州まで分布しているが、北日本に分布している近縁種との区別が難しい。このような種のメス成虫から病原体が見いだされた場合は、種の同定がきわめて困難であり、DNA 配列による媒介種の同定が望まれていた。

ブユが媒介する病原体を研究しようとすると、学術発表ではブユ種の同定が不可欠となる。ブユの形態分類は上記のような分類の難しい近縁種の存在などもあり、専門家以外の研究者にとっては難しい点が多い。つまりブユの分類が困難なことが、ブユが媒介する病原体を研究する障害となっていた。ブユを DNA 配列で分類できることとなれば、この障害が軽くなり研究が活性化されると期待出来る。

2. 研究の目的

(1) 日本産ブユの DNA データベース構築

日本産ブユを採集し、DNA を抽出し、ミトコンドリアのチトクローム c オキシダーゼ subunit 1 (CO1), subunit 2 (CO2), 16S リボソーム RNA 遺伝子 (16S rRNA) の配列を決定する。ミトコンドリアの配列はブユのみだけではなく、さまざまな昆虫種で種の鑑別や系統解析のために使われている。よってブユのミトコンドリアの配列をもとに、各種が同定できるデータベースを構築する。

(1) 日本産ブユの分類学的再検討

今回の調査で採集をするが、その際現在分類学的に問題となっている種に関して再検討を行う。Simulium konoi は以前ホソスネブユ亜属に属していたが、形態の再検討から Boreosimulium 亜属に移された。このように、亜属や種グループの系統関係を DNA 配列から再検討する。

3. 研究の方法

(1) ブユの採集

日本各地の河川よりブユの幼虫、蛹また、それら周辺で成虫を採集した。形態で同定可能な、または種の鑑別の特徴が明確なステージで同定を行った。蛹は研究室で成虫に羽化させたものもある。(Table 1)。

(2) ミトコンドリア遺伝子の塩基配列の決定 ブユの全 DNA を Qiagen DNeasy Blood &

Tissue Kit で抽出し、付属の Buffer AE に溶解させた。CO1 と CO2 については Simon et al. 1994 や Lunt et al. 1996 を参考に PCR の primer を設定した。また 16S rRNA は Xiong and Kocher 1991 の primer を使用した (Table 2)。適切な primer の組み合わせで CO1 と CO2 領域を増幅させた。増幅プログラムは 94°C 1 分の後、94°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 1 分を 35 サイクル行い、最後に 72°C 5 分をし、アガロースゲルで電気泳動を行った。増幅した PCR 産物は直接鋳型として、またはクローニングを行った後、ABI bigdye terminator kit ver3 と Genetic Analyzer 3130 を使って配列を決定した。

(3) 系統解析

CO1、CO2、16S rRNA それぞれについて配列を整理した。16S rRNA は gap を含むため、ClustalW を使って整理させた後手動で修正を行った。gap については以降の解析から省いた。遺伝距離は Kimura 2 parameter 法を使った。その距離を利用し MEGA5 を使って近隣接合法で系統樹を作成した。また bootstrap 法を使って樹形の確かさを検証した (1,000 replications)。さらにベイズ法を用いた系統樹も作成した。最適な置換モデルを MrModeltest を用いて選択した。選

Table 1 A list of black fly species used in this study

family	tribe	genus	subgenus	species-group	species		
Simuliidae	Prosimulini	Helodon			daisetsensis		
					kamui		
		Prosimulium			apoina		
					jezonicum		
					kiotoense		
					yezoense		
					cannibora		
					japonensis		
					konoi		
					tokachiense		
			erimoense				
			omutaense				
	Simuliini	Simulium	Boreosimulium			yaeyamaense	
						ogatai	
		Simulium	Eusimulium			okinawense	
						tokarense	
			Gomphostibia	batoense			shogakii
							chiharuae
				ceylonicum			kobayashii
							izuense
							mie
							morisonoi
	Helichiella	Montisimulium			saitoi		
					aureohirtum		
		Nevermannia	feuerborni			artum	
						babai	
			Simulium			fomtinale	
						ibarakiense	
						koshiense	
						rebunense	
						subcoastatum	
						uchidai	
	Stegopterna	Wallacellum			uemotoi		
					bidentatum		
		Wilhelmia	lineatum			japonicum	
						kawamurae	
			argentipes			daisense	
						kyushuense	
						sakishimaense	
						nikkoense	
					iwatense		
					quinquestriatum		
Stegopterna	Wilhelmia	lineatum			rufibasis		
					suzukii		
	argentipes			oitanum			
				arakawae			
				tobetsuense			
				yonakuniense			
				takahasii			
				torigonium			
				griseifrons			
				malyschevi			
		multistriatum					
		noelleri					
		ornatum					
		striatum					
		tuberosum					
		variegatum					
		venustum					

Table 2 PCR primers used in this study.

name	direction	sequence
TW-J-1301	forward	TAAACTAATAGCCTTCAAA
C1-N-1884a	reverse	TGAAGATAAAGGAGGATAAACTGTTC
C1-J-1751	forward	ATGGCCTTCCCTCGAATAAATAA
C1-N-2329	reverse	ACTGTAAATATATGATGAGCTCA
C1-J-2195	forward	TTGATTTTTGGTCATCCAGAAGT
TL2-N-3014	reverse	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA
C1-J-2797a	forward	CCTCGACGTTATTCAGATTATC
C2-N-3389b	reverse	TCATAAGTTCAATATCATTG
C2-J-3279a	forward	GGTCAACAATTGAAATTTATTGAAAC
TD-N-3862a	reverse	TTTAGTTTGACATACTAATGTTAT
16S-B	forward	CTCCGGTTTGAACCTCAGATC
16S-A	reverse	CGCCTGTTTATCAAAAACAT

採されたモデルは C01 と C02 は GTR+I+G、16S rRNA は GTR+G であった。MrBayes3.1 を用いて系統樹を作成した。使用した generation は 1,000,000。最初の 25% は Burnin で解析から省いた。系統樹の outgroup として *Drosophila yakuba* と *Anopheles gambiae* を使用した。

4. 研究成果

(1) ブユのミトコンドリア遺伝子配列

日本各地から 50 種類のブユを採集した (Table 1)。それらのブユのミトコンドリア C01、C02、16S rRNA を決定した (C01、C02 については全配列、16S rRNA については一部ののみ)。16S rRNA では *Nevermannia* 亜属 *vernum* 種グループでは差がなかったが、C01 と C02 の配列で「はほとんど」「の種間で」「十分な変異量か」「あった。しかしその *vernum* 種グループ」の *S. uchidai*、*S. ibarakiense*、*S. rebunense*、*S. uemotoi* については配列が「類似していた。これらの種に関しては種の再定義か」「必要になる可能性か」「ある。16S rRNA で類似していた *S. japonicum* と *S. kawamurae* も C01 と C02 では十分に違いがあった。今後、塩基配列で「の種の同定の精度を高めるには、各種について種内変異を調べ」「なければ」「ならない。今回使用した PCR プライマーセットの中で C01 のフ「ライマーセット (C1-J-2195 と TL2-N-3014) は全ての種において安定して PCR 増幅し塩基配列の決定か」「行なえることから、この領域は種内変異を調べ」「る領域として有効で「ある。また他の昆虫種のハ「ーコート「フ「ロシ「ェクトで「利用されているフ「ライマーセット (LC01490-HC02198) で「も同し「く有効で「あることを確認した。さらに、今回作成したテ「ータをもとに日本のフ「ユ種と海外の種の関係も明らかにしていく。

(2) 日本産ブユの系統関係

日本産ブユの系統関係を調べるため、近隣接合法とベイズ法で系統樹を作成した。3つの領域を合わせた配列で作成した近隣接合法の系統樹を Figure 1 に示した。ベイズ法

でも、近隣接合法のブートストラップの値が高い枝については、ベイズ法で作成した樹形も同様であった。今回複数の種がある亜属 (*Gomphostilbia*, *Nevermannia*, *Simulium*) が、亜属として単系統としてまとまるかを、各遺伝子の配列で系統樹を作成して検討した。

C01 と 16S rRNA では *Gomphostilbia*, *Simulium* 亜属が単系統になり、*Nevermannia* 亜属も種グループではまとまったが、C02 の配列による系統樹ではそれら亜属全てが単系統にはならなかった。このことは、これら亜属が本来単系統であるとするならば、亜属レベルでの分化を調べる場合は C02 より C01 または 16S rRNA の方が適していることを意味する。またこれら 3 亜属の関係は *Simulium* と *Nevermannia* 亜属が *Gomphostilbia* より近縁という結果になった。これは Phayhasena et al (2010) がタイのブユで行った結果と同じである。しかし Takaoka (2012) は形態の特

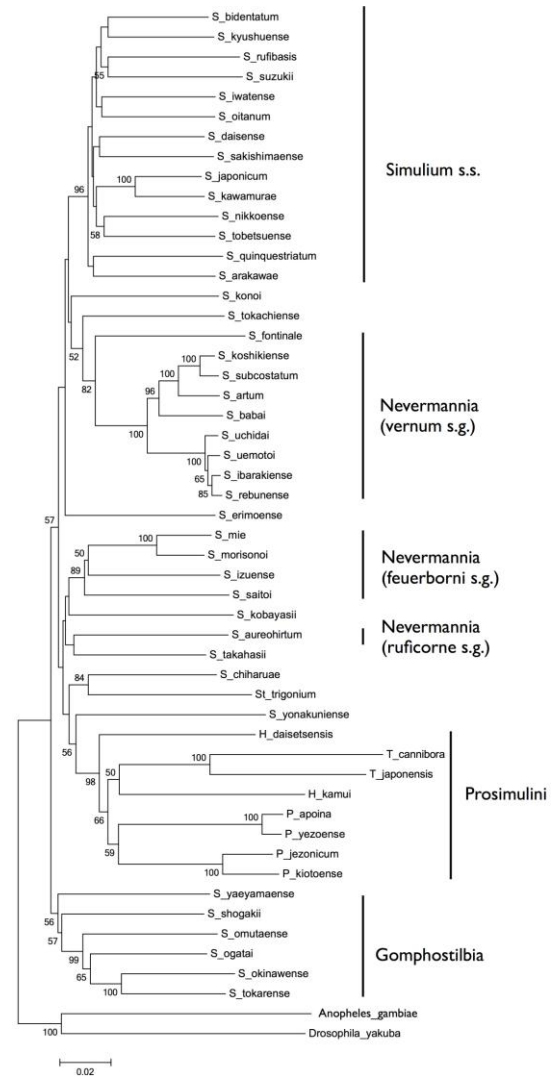


Figure 1 日本産ブユの 50 種のミトコンドリア C01, C02, 16S rRNA の塩基配列に基づく近隣接合法による系統樹。枝にある数字はブートストラップ値 (1,000replication)。Simulium 属の 3

つの亜属と Tribe Prosimulini を右側の線で示した。

徴から *Simulium* と *Gomphostilbia* 亜属が近縁としている。これらの関係をより正確に検証するには、亜属分化を調べるために適した遺伝子が必要となってくる。

Otsuka et al (2001) は *Nevermannia* 亜属内の種グループ間の関係を 16S rRNA で調べている。その結果では *ruficorne* 種グループは他のグループと大きくかけ離れていた。今回も 16S rRNA 領域では同様の結果が出たが、C01, C02 では大きく離れてはいなかった。しかし *Nevermannia* 亜属内の各種グループは全てがまとまることはなく、その亜属としての位置は明らかにできなかった。また、*S. konoii* は *Nevermannia* 亜属の種と近縁になることはなかった。同じ *Boreosimulium* 亜属の *S. tokachiense* も Figure 1 では近くに来るもののそれらには十分な違いがみられた。

さらに Tribe Prosimulini では *Helodon* 属の *H. daisetsensis* と *H. kamui* が単系とならなかった。また、*Prosimulium yezoense* と *P. apoina* は極めて近縁でその種の独立性が危ぶまれる。*P. yezoense* が日本に広く分布しているのに対して、*P. apoina* は北海道に限られた地域に生息している。他にも北海道には *P. karibaense* と *P. sarurensis* が限られた地域に生息している。これらの種の間も今後明らかにしていかなければならない。

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 4 件)

- ① Takaoka T, Fukuda M, Otsuka Y, Aoki C, Uni S, Bain O. Blackfly vectors of zoonotic onchocerciasis in Japan. *Medical and Veterinary Entomology*, 査読有, 26(4), 2012, 372-378
DOI:10.1111/j.1365-2915.2012.01023.x
- ② Takaoka H, Srisuka W, Saeung A, Otsuka Y, Choochote W. *Simulium (Nevermannia) chomthongense*, a new species of black fly (Diptera: Simuliidae) from Chiang Mai. *Tropical biomedicine*, 査読有, 29(3), 2012, 381-390
http://www.msptm.org/files/381_-_390_Takaoka_H.pdf
- ③ Takaoka H, Sofian-Azirun M, Hashim R, Otsuka Y, Belabut DM, Ean TP. Relationships of black-fly species of the *Simulium tuberosum* species-group (Diptera: Simuliidae) in Peninsular Malaysia, with keys to ten Malaysian species. *THE RAFFLES BULLETIN OF ZOOLOGY*, 査読有, 60(2). 2012. 533-538
<http://eprints.um.edu.my/5815/1/Relat>

ionships_of_black-fly_species_of_the_Simulium_tuberosum_Species-group_(Diptera_Simuliidae)_in_Peninsular_Malaysia,_with_keys_to_ten_Malaysian_species.pdf

- ④ Huang YT, Takaoka H, Otsuka Y, Aoki C. *Simulium (Gomphostilbia) taitungense*, a new species of black fly (Diptera: Simuliidae) from Taiwan, with description of the male of *Simulium (Gomphostilbia) tuenense*. *Tropical Biomedicine*, 査読有, 28(3), 2011, 577-588
http://www.msptm.org/files/577_-_588_Hiroyuki_Takaoka.pdf

[学会発表] (計 2 件)

- ① 大塚靖、高岡宏行、日本産ブユをミトコンドリア DNA 配列で同定するためのデータベース構築、第 62 回日本衛生動物学会南日本支部大会、2012 年 11 月 10 日、長崎市
- ② 大塚靖、高岡宏行、日本産ブユを DNA 配列で同定するためのデータベース構築、第 64 回日本衛生動物学会、2012 年 3 月 30 日、長野県上田市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 靖 (OTSUKA YASUSHI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：00244161