

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：82617

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25871181

研究課題名(和文)ユーラシアに広域分布する小型蛾類の分類学的再検討とその遺伝的多様性

研究課題名(英文)Taxonomic study of Eurasian smaller moths with reference to the genetic diversity

研究代表者

神保 宇嗣(Jinbo, Utsugi)

独立行政法人国立科学博物館・動物研究部・研究主幹

研究者番号：10568281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：DNAを活用して生物の名前を調べる手法であるDNAバーコーディングを実用化するには、名前をできるだけ正確に調べるための情報が必要である。本研究では、小型の蛾類であるハマキガ科のユーラシア大陸に広く分布する種に注目し、日本産種のDNAバーコード塩基配列と形態情報をもとに分類学的な再検討を行った。その結果、ヨーロッパ個体群と日本個体群で遺伝的にこれまで見過ごされてきた違いがある種の存在や、分類学的な新たな問題点が浮き彫りになった。分類学的な新しい知見を反映した情報を追加し既存の情報の誤りを修正していくことで、DNAバーコーディングの同定精度を向上させその実用化にも寄与できると考える。

研究成果の概要(英文)：DNA barcoding is a method for species identification using DNA sequences. Towards the practical use of DNA barcoding, various information for accurate species identification is indispensable. This study is focused on the tortricid moths, a group of smaller moths, especially species widely distributed in Eurasian region. Each species was taxonomically reviewed based on DNA barcode sequences and morphological characters. As a result, this study revealed the presence of overlooked genetic differences between European and Asian populations in some species, which lead to new taxonomic studies. Taxonomists can contribute the accurate identification and practical use of DNA barcoding, providing new knowledge on taxonomic studies and corrections of errors in the DNA barcode library.

研究分野：昆虫分類学、生物多様性情報学

キーワード：昆虫分類学 DNAバーコード

## 1. 研究開始当初の背景

ある生物の名前を特定する作業、すなわち同定は、生物を扱う様々な活動に不可欠である。同定は、一般的に形態の詳細な観察比較によって行われるが、最近では DNA 情報も利用されるようになった。DNA 情報を用いた同定技術でもっともよく使われるのが、DNA バーコードと名付けられた、ある決められた短い塩基配列を用いて同定を行う「DNA バーコーディング」である。昆虫においても、様々な分類群で基礎研究から応用まで様々な分野で利用が進められている。一方、同定手法としての実用化の一つとして、同定精度があげられる。DNA バーコードの同定精度は、同定の典拠となる DNA バーコード塩基配列ライブラリの精度に依存する。ライブラリの精度は、1) 登録されている塩基配列を特定した標本の同定の精度、2) 種内の変異幅の網羅性、3) 分類学的研究の完成度、などによって決定される。

本研究ではこのうち、広域分布する種、具体的には、鱗翅類(チョウとガの仲間)のうち、ユーラシア広域に広く分布する種に注目する。鱗翅類は世界から 16 万種以上、日本からも 6,300 種以上が知られる昆虫類の大きなグループで、未記載種(潜在的な新種)を含め約 8 万種がすでにライブラリ化されていた(数字は申請当時)。日本本土の鱗翅類相はユーラシア大陸と深い関係があり、大部分の属や多くの種は大陸と共通して分布している。その中には、ヨーロッパから日本まで広く分布する旧北区の広分布域種も多く含まれている。日本産が亜種や大陸産に近縁な姉妹種に分割されるものもあるが、遺伝的な多様性をヨーロッパ産と比較されたことはほとんどなかった。ハマキガ科は世界から 1 万種以上が、日本からも約 800 種が知られており、果樹・茶・林業樹種などの害虫を多く含む。この中にはアジア産とヨーロッパ産との間で、看過された多様性の存在が浮き彫りとなってきた。これらを分子情報である DNA バーコードライブラリにより網羅的に比較することで、潜在的な遺伝的多様性がどの程度あるのかを把握し、かつライブラリの精度を向上させることにより、本手法による同定精度の向上を促し、実用化へ有用なインプットができると考えた。

## 2. 研究の目的

以上のような背景に基づき、日本産ハマキガ科カクモンハマキガ族に含まれる、特にユーラシア広域に分布する種に注目し、1) 形態と分子情報を組み合わせた統合的な分類学的再検討を行うとともに、2) 広域分布種の遺伝的多様性の傾向を明らかにし、DNA バーコードによる同定の精度を検証することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象とする分類群

対象分類群は、ハマキガ科ハマキガ亜科カクモンハマキガ族のユーラシア広域分布種およびその近縁種とする。また、広域分布種には含まれない日本産カクモンハマキガ族の他種のデータも比較のために用いた。

### (2) サンプル収集および検討した標本

分子実験で用いるサンプルの採集は、各地での野外調査を行ったほか、各地の研究者等に収集を依頼した。野外調査を北海道、東北地方および中部地方で実施し、昼間の見つけ採り、幼虫採集、および夜間の灯火採集によりサンプルを収集した。各地の各種について数個体の片側の脚を切除し、無水エタノールに保存して DNA 用のサンプルとした。形態を検討するサンプルは、上記野外調査等で得られた個体のほか、国立科学博物館・大阪府立大学ほか博物館・大学や他の研究者の所蔵標本も用いた。また、ロンドン自然史博物館に所蔵されているアジア産カクモンハマキガ族標本の検討も行った。この中には多くのホロタイプも含まれる。

### (3) カクモンハマキガ類の分類学的再検討

上記のサンプルから、対象となる種類の DNA バーコード塩基配列を決定する。決定した塩基配列情報は、標本情報とともに、DNA バーコード塩基配列情報の公式リポジトリである Barcode of Life Data Systems (BOLD) に登録した。登録した情報は、これまでに BOLD に登録されているユーラシア各地産の標本とともに DNA バーコード塩基配列を基にクラスタリングされ、Barcode Index Number (BIN) が付加される。一般的に、明確な分集団に分かれる場合には別々の BIN が、不明確な場合には同じ BIN がひも付けられる(以下では、BIN の付与されたグループを「BIN クラスタ」と呼ぶ)。また、各個体について、外部生殖器官を含む外部形態を比較観察するとともに、文献情報、各博物館のタイプ標本の情報を追加し、学名および分類の再検討を行った。

### (4) DNA バーコードを利用した遺伝的多様性の解析とその有用性

種内の遺伝的多様性のありかたを明らかにするため、BIN を尺度として、ある種が複数の BIN からなる、あるいは複数の種が単一の BIN に含まれる、といった、分子と形態の結果に齟齬があるケースを詳細に検討した。また、種内に複数の BIN が含まれる場合には、それらのユーラシアにおける分布地域を確認し、東アジア産あるいは日本産が異なるクラスタになる場合など、種内の遺伝的多様性に地理的構造が無いかどうかを確認するとともに、日本産種の情報を追加することによる同定精度向上への寄与をまとめた。

#### 4. 研究成果

本研究により、日本に産するユーラシア広域分布種 24 種のうち、17 種 70 個体の DNA バーコード領域の塩基配列を特定した。そのうち、約 6 割にあたる 10 種ではヨーロッパ産の種と BIN を共有し、残りの 4 割にあたる 7 種では BIN を共有していなかった。

(1) DNA バーコードによる遺伝的多様性の把握とカクモンハマキガ類の分類学的再検討

まず、本研究で明らかになったユーラシア広域分布種の遺伝的多様性と分類学的な問題について示す。

*Pseudeulia* 属は、日本産からはヨーロッパと共通種のおおハイジロハマキ *Pseudeulia asinana* とアジア大陸から日本にかけて分布するハイジロハマキ *P. vermicularis* の 2 種が既知の小属である(図 1)。日本産 2 種については、分類の混乱があり再検討が必要であった。今回、ヨーロッパ及び *P. vermicularis* のホロタイプを含むアジア大陸の標本と、DNA バーコード情報とを検討した結果、両者は外部形態・交尾器等、形態的に区別でき、また *P. vermicularis* の日本産とアジア大陸産の個体は交尾器形態がほぼ一致する一方、DNA バーコード塩基配列では、日本産 2 種が区別できず、ヨーロッパ産個体群とは異なる BIN クラスタに属することが明らかになった。この 2 種は、本州中部では同所的に分布しかつ同時に発生していることなどから、浸透交雑をしている可能性が考えられる。今後、核の遺伝子等母性遺伝ではないマーカーでの比較が必要である。



図 1 日本産 *Pseudeulia* 属の 2 種

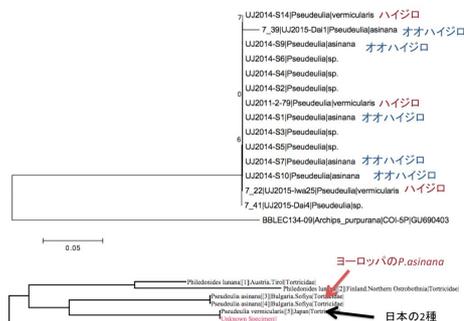


図 2 DNA バーコードによる日本産 2 種の関係性およびヨーロッパ個体群との比較



*P. cerasana* (ヨーロッパ) *P. monticolana* (日本) ヤマトビハマキ

図 3 *Pandemis* 属の近縁 2 種

このほかの種における分類学的な新しい知見をまとめて示す。*Archips xylosteana* カクモンハマキでは、ヨーロッパ個体群と日本個体群で 3~4%と種内としては大きな変異がみられた。ヨーロッパ個体群は総当たりでのクラスター内の変異が最大 1.4%であり、日本産は明らかに別のクラスターに属する。また、アジア大陸から、日本産と同一 BIN を形成する個体が得られている。これら大陸産の標本を含め、形態比較は不十分であり、今後の検討が必要である。同様の傾向は *Ptycholomoides aeriferana* カラマツイトヒキハマキでもみられた。一方、アジアに分布する *Pandemis monticolana* ヤマトビハマキは、ユーラシア大陸に広く分布する近縁種 *P. cerasana* と 2% 程度の差異しか無かった(図 3)。今後、これらの関係、特に *P. monticolana* と *P. cerasana* が両方記録されているアジア大陸地域のサンプルを増やして検討する必要がある。逆に、アジア個体群が別亜種にされることもある *Archips oporana* マツアトキハマキや、*Ptycholoma lecheana* オオギンスジハマキでは、日本個体群はヨーロッパ個体群と単一の BIN で DNA バーコード塩基配列レベルではヨーロッパとアジアでの分集団は検出できなかった。

(2) Barcode Index Number で認識されたクラスタの傾向と同定精度に関わる問題点

Barcode Index Number (BIN) は、個体同士の類似度を尺度に、あるアルゴリズムに従って自動認識されたクラスタに番号を付与したものである。日本産のユーラシア広域分布種が含まれる BIN クラスタの中で複数種が含まれたものは 3 つ見つかった。これらのデータを精査したところ、すべて誤同定の個体が混入していたことが原因であった。このほかの日本産種では、同種の異名あるいは異なる属との組み合わせの場合のほか、BIN レベルでは区別できない同胞種が含まれる場合、新たな分類学的な問題が検出された場合もあった。一種が複数の BIN クラスタから構成される場合にも、誤同定などライブラリの精度の問題がある。たとえば、*Adoxophyes orana* リンゴコカクモンハマキの場合、3 個の BIN クラスタとして認識されているが、一つは *A. paraorana*、一つは *A.*

*privatana* ないし *A. fasciculana* の誤同定であると考えられた。

(3) ユーラシア広域分布種の遺伝的多様性  
解明と今後

以上のように、ユーラシアに広域分布するハマキガの中には、ヨーロッパ個体群からアジア個体群まで同一種の単一 BIN クラスタから構成されるものから、両個体群が異なる BIN クラスタに分離されるもの、さらに多くのクラスタになるものまで様々なパターンが存在した。アジア個体群が分離される場合、その情報を加えることで、より高精度な同定に寄与できると考えられる。一方、公的ライブラリに登録されているデータの品質も大きな問題で、誤同定や異なる学名の扱いなどが多く検出されている。誤同定の修正、種名の違いを統一することも、BIN を利用した同定精度向上に役立つと考えられる。BIN のクラスタとして認識されたグループは、既存の亜種区分と合致しない場合、亜種区分は無かったが明らかに別クラスタとして認識される場合など、形態によるグルーピングとは異なる部分があり、ユーラシア広域分布種の遺伝的多様性の把握と今後の分類学的研究に寄与するものである。このような情報を様々なグループで蓄積することができれば、同定精度の向上だけでなく、分類学・生物地理学的に重要なユーラシア広域分布種のもつ分類群横断的な傾向などが明らかになると考える。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 神保宇嗣, DNA バーコードから再検討するカクモンハマキガ類 (ハマキガ科) の広域分布種. 日本昆虫学会第 76 回大会・第 60 回日本応用動物昆虫学会大会合同大会小集会「鱗翅類研究の最前線 第 69 回レピドプテリストゼミナール」, 2016 年 3 月 28 日, 大阪府立大学中百舌鳥キャンパス (大阪府・堺市).

2. Jinbo U. and A. T. Ota, DNA barcoding of the tribe Archipini (Lepidoptera, Tortricidae, Tortricinae) in Japan, with notes on the geographic variations of widely distributed species. The 6th International Barcode of Life Conference, 2015 年 8 月 19 日, Guelph (Canada).

〔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〕

学会発表 2 のアブストラクトは、下記のように学術雑誌に掲載されている。

In: Scientific abstracts from the 6th International Barcode of Life Conference. *Genome* **58** (5): 232.  
doi: 10.1139/gen-2015-0087

ホームページ等

特定したハマキガ類の DNA バーコード情報については、BOLD ウェブサイトより公開する方向で準備中である。

ロンドン自然史博物館で撮影したタイプ標本情報については、撮影した写真が上記博物館のデータポータルより公開されている。  
(<http://data.nhm.ac.uk/>)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

神保 宇嗣 (JINBO, Utsugi)

国立科学博物館・動物研究部・研究主幹

研究者番号: 10568281