

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07541

研究課題名(和文)陸水域環境評価に資する指標生物DNAタクソノミー情報基盤の確立

研究課題名(英文)Construction of reference database for DNA taxonomy of aquatic macroinvertebrates

研究代表者

加藤 幹男 (KATO, MIKIO)

大阪府立大学・高等教育推進機構・教授

研究者番号：30204499

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)：陸水域環境指標生物種のDNAタクソノミー情報基盤の確立を目的とし、実物標本の収集と種判別DNAマーカー配列情報の蓄積を進めた。日本産水生昆虫類4目(カゲロウ、トンボ、カワゲラ、トビケラ)を主たる対象とするとともに、環境DNA解析やメタゲノム解析に出現する水生生物類を含めて解析を行った。

生物種ごとに、可能な限り複数の標本を得てそれぞれの遺伝子解析を行った。それぞれの標本を形態に基づき同定し、分類上の特徴をよく表す画像データを取得するとともに、標的遺伝子の部分配列の解析を進めている。得られた結果(画像データおよびDNA配列)は、採集情報と合わせてインターネット上のウェブサイトで公開している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらの成果は、種判別が困難な標本をDNAタクソノミー情報に従って種判別したり、環境DNA解析やメタゲノム解析等によって得られる配列データを特定の生物種に比定したりするための重要な参照データを提供するものである。また、DNA配列間の比較により、隠蔽種が検出されたことや、未記載種のDNAタクソノミー情報を得たことは、分子進化系統解析のみならず、分子データに基づいた生物地理学的解析、生態学的解析に役立つものと期待されるほか、画像情報とDNAタクソノミー情報をインターネットを通じて公開することによって、分類学教育にも貢献する。

研究成果の概要(英文)：DNA information, associated with properly identified specimen databases, is mandatory for studies on species identification by DNA barcodes, metabarcoding of biota, and environmental DNA (eDNA) analyses. In addition, high-resolution digital images of well-characterized specimens are useful for morphology-based taxonomy. We have isolated the genomic DNA of Japanese aquatic macroinvertebrates that were stored at Riverine Metagenomics laboratory of Osaka Prefecture University, and determined the partial coding regions of 18S rRNA, histone H3, and mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) genes. Through this work, digital data (photographs and DNA sequences) of aquatic macroinvertebrates inhabiting Japan along with their collection data have been made available on the J-amir website ([http://www.b.s.osakafu-u.ac.jp/~mkato/J-amir\\_home.htm](http://www.b.s.osakafu-u.ac.jp/~mkato/J-amir_home.htm)). Our collection is offering the reference for species identification by DNA barcodes and quick image search of aquatic macroinvertebrates.

研究分野：遺伝子科学

キーワード：DNAタクソノミー DNAバーコード 水生昆虫 分子系統 種判別マーカー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

陸水域とは水域からそれに接する陸域を含んで構成される領域を指し、そこには肉眼では見えない微生物から大型の脊椎動物に至るまで多様な生物群集からなる生態系が成立している。陸水域生態系には、水域を中心として陸域とのつながり（例えばトンボ等の水生昆虫類）あるいは海域とのつながりに依存する特徴的な生物種群（例えばエビやカニ等の甲殻類や、サケ・マス・アユ等の両側回遊魚）が含まれる。生物がその生活史を全うするためには、それぞれに必要な環境要素があることから、生息する生物種群をその環境の評価指標として用いることができる。本研究で主たる対象とする水生昆虫類は、それぞれの種が棲み場所の微小環境に高い選好性をもっているため、種レベルの生息調査をすることによって得られる情報は河川環境の評価指標としてきわめて重要である。水生昆虫類の水域環境の指標生物としての有効性は、例えば環境省や国土交通省が全国的な調査対象に取り上げていたり、地域の環境教育に用いたりされていることから広く認識され活用されている。その一方で、水生昆虫類の形態に基づく種判別は高度な専門知識と熟練を要すること、および、正確な種判別が比較的容易な成虫個体が出現する時期は限られ、生活環の多くの期間を占める幼虫期は形態的特徴による判別がほぼ不可能なこと、さらに、形態的な差異は見いだされていないが別種であるものが存在し得ること（隠蔽種：例えば、同所的に生息していても繁殖期が異なり交雑できないグループなどに見られる）、などの問題が残されている。これらの問題点を解決するために、DNAタクソノミー情報の活用が極めて有効であると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、陸水域環境指標生物種のDNAタクソノミー情報基盤の確立を目的として進められた。すなわち、指標種として実績のある日本産水生昆虫類4目（カゲロウ、トンボ、カワゲラ、トビケラ）を中心に、河川性水生生物を広く対象とし、実物標本の収集とDNA配列情報の蓄積を進めることで、次世代シーケンサー（ハイスループット並列シーケンサー）を用いたメタゲノム解析や環境DNA分析（eDNA）を実施する際の参照データを提供するとともに、DNAタクソノミー情報と、そのソースとなる実物標本（専門の研究者による同定済み）を対応付けて収蔵することによって、日本の水生昆虫情報センターとなることを目指すものである。

### 3. 研究の方法

対象となる水生生物を採集し、形態に基づく分類の参考になる情報を含む画像データを取得した。採集標本に応じた適切な部位（翅筋肉、脚部筋肉、貯精囊、体液）を単離し、あるいは全体（きわめて小さい標本の場合）をすりつぶして、そこから全DNA抽出を行った。このDNAを鋳型にして、標的遺伝子領域をPCR増幅し、DNA配列を決定した。標的遺伝子には、DNAバーコードとして広く活用されているミトコンドリア遺伝子のチトクロムc酸化酵素サブユニット1、従来から広く分子系統解析に用いられてきた核ゲノムにコードされる18S rRNA 遺伝子、およびヒストンH3 遺伝子を選んだ。

### 4. 研究成果

生物種ごとに、可能な限り複数の標本を得てそれぞれの遺伝子解析を行った。2020年3月31日時点で、カゲロウ目12科75分類群（日本産として確認されているもの152種；国土交通省2019年河川水辺の国勢調査による。以下、同様）、トンボ目8科30分類群（日本産211種）、カワゲラ目5科11分類群（日本産203種）、トビケラ目15科30分類群（日本産484

種)について収集済である。また、他の水生生物として、カメムシ目2科3分類群(日本産142種)、ヘビトンボ目1科2分類群(日本産22種)、コウチュウ目3科4分類群(日本産478種)、ハエ目3科3分類群(日本産1871種)、ダニ目6科6分類群(河川水辺の国勢調査に種数の報告なし)等を得ている。日本産として報告されている種数に比して、数量としては小さいが、カゲロウ目、トンボ目に関しては一般種として見られるものの多くをカバーしている。それぞれの標本を形態に基づき同定し、分類上の特徴をよく表す画像データを取得するとともに、標的遺伝子の部分配列の解析を進めている。得られた結果(画像データおよびDNA配列)は、採集情報と合わせてウェブ上で公開している。DNA配列は、国際データベースに登録され、公開されている。

これらの成果は、損壊標本や若齢個体等の理由によって形態に基づく種判別が困難なものをDNA情報に従って判別したり、環境DNA解析やメタゲノム解析等によって得られる配列データを特定の生物種に比定したりするための重要な参照データを提供するものである。

本研究において、採集標本のうち、既知の種とは別種であると予想されるが分類学上は未記載のもの、および、形態に基づく種判別が困難であったものは、種小名の代わりにsp.と標記した。これら~sp.の標本から得られたDNA情報を問合せ配列とし、DNAデータベースを検索することで、カゲロウ目では種名不詳の132の標本のうち43(比定できなかった89標本に何種含まれるかは未解明;以下、他の分類群についても同様)、カワゲラ目では17のうち11、トビケラ目では57のうち28の標本について種名と対応付けることができた。このことは、構築された参照データベースの有効性を示しながらも、未収集(未解析)の生物種が残されていることを意味するものである。今後は、未記載種の分析を進めて分類論文として発表を目指すとともに、未収集種の採集努力もさらに必要と考える。一方、形態では明確には分別できないがDNAでは別種に相応な差異を示すものが、カゲロウ目で3分類群見出された(隠蔽種のおぶり出し)。今後、より詳細にこれらの標本を分析し、形態上の特徴を見出す努力を行うことで、種の記載と種間の系統関係を明らかにすることができると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>脇村圭, 加藤幹男                             |
| 2. 発表標題<br>実物標本・画像・DNA情報を統合する水生昆虫リファレンスデータベースの構築 |
| 3. 学会等名<br>日本動物学会年会                              |
| 4. 発表年<br>2018年                                  |

|                                   |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>稲井公二, 渡辺幸三, 加藤幹男       |
| 2. 発表標題<br>水生昆虫の種判別におけるDNAマーカ－の特徴 |
| 3. 学会等名<br>日本陸水学会第83回大会           |
| 4. 発表年<br>2018年                   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>稲井公二, 脇村圭, 渡辺幸三, 加藤幹男             |
| 2. 発表標題<br>次世代シーケンサーを用いた各種DNAマーカ－による水生昆虫の種判別 |
| 3. 学会等名<br>日本陸水学会第84回大会                      |
| 4. 発表年<br>2019年                              |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Kei Wakimura, Mikio Kato  |
| 2. 発表標題<br>A preliminary release of Japanese aquatic macroinvertebrate references (J-amir) on internet web |
| 3. 学会等名<br>The 7th Joint Symposium on Chemistry, Environment, Natural Sciences and Technologies (国際学会)     |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

J-amir home  
[http://www.b.s.osakafu-u.ac.jp/~mkato/J-amir\\_home.htm](http://www.b.s.osakafu-u.ac.jp/~mkato/J-amir_home.htm)

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|