

イタリアアルプス自然河川のトビケラ群集の DNA 種分類法を用いた種多様性の解明

愛媛大学大学院 学生会員 ○近藤俊介

ライプニッツ淡水生態学・内水漁業研究所 正会員 八重樫咲子 非会員 Michael T. Monaghan

京都大学防災研究所 非会員 竹門康弘

愛媛大学大学院 正会員 渡辺幸三

1. 背景

タリメント川はイタリア北東部から地中海に流れるアルプス自然河川である。この河川は、人為的影響が少なく、原始的な洪水氾濫原と河川生態系を有している（図 1）。このため、タリメント川はヨーロッパ温帯地域における河川生態系の自然再生モデル生態系として位置付けられている¹⁾。



図 1 タリメント川の洪水氾濫原

現在、水生昆虫群の種多様性の評価は種数を軸に評価されているが、技術的な問題点のために正確な種数評価ができない。従来の種多様性評価は、実体顕微鏡を用いて、生物の形態学的特徴から種を同定している。しかし、この手法は、同定基準が複雑で、誤同定を避けるためには熟練したスキルが必要となる。さらに時間や労力もかかる。そして水生昆虫群には同定キーが整備されていない未記載種が多く、正確な種多様性の評価ができない。これらの問題点を解決するために、新たな種多様性評価技術が求められる。

近年、この形態学的手法に代わる手法として DNA 塩基配列情報を用いた方法が注目されている。この手法では、形態学的同定のスキルを必要とせず、DNA 情報のみを用いて種の同定を行う。ここではまず塩基配列を読み取り、DNA バーコーディングを行う。続いて、GenBank などの世界的な遺伝子データベース管理機関で世界中の生物の遺伝子データを利用し、類似した遺伝配列を検索し、短時間で種の同定を行う。しかし、この手法による種同定の性格さはデータベースの充足レベルに左右される。現在、DNA データベースへの塩基配列の登録数は 26 万種程度で、形態同定において記載された数と比べても少ない。さらに検索の結果、相同性の高い別種が示唆されることもある。このため、DNA バーコーディングのみでは種多様性評価をすることができない。

この問題を解決する手段として、種名の同定を行わず、DNA の多様性のみに基づいて種数を決定する DNA 種分類法があげられる。この DNA 種分類法の一つとして Poisson Tree Processes (PTP) モデルが知られている。このモデルでは塩基配列情報を使用して作成される進化系統樹に基づいて種分化と種内進化の境界を決定する。このモデルを用いることで、種レベルで形態同定できない分類群でも迅速に種数を定量化できる²⁾。

本研究では、タリメント川のトビケラ群集を PTP モデルで DNA 種分類を行い、ヨーロッパ温帯河川のモデル生態系の真の種多様性を解明することを目的とした。トビケラ目は水中の底生動物群集の中でも高い多様性を示す分類群であるが、種分類キーの整備が遅れており、種を同定できない分類群が多く残されている。そのため、トビケラ目の生物多様性を把握することは困難であることから、本研究で対象とした。

2. 方法

調査地点は、地点間の生物群集構造の違いと環境異質性が最大化されることが期待される 20 地点を選定した。サンプリングは 2009 年 7 月 13 日から 9 月 10 日までと 2010 年 3 月に実施し、同時に河川底生動物の採取と生息場の環境調査を行った。各調査地点に出現した 8 つの生息場区分（早瀬、平瀬、淵、ワンド、ア

クティブプール、テラスプール、小滝、サブチャネル) それぞれで3箇所以上をランダムに選択し、D フレームネットを使って定性的にキックネット法を用いてサンプリングを行った。また、同様に河床、倒流木及び水草からも別々に底生動物のサンプリングを行った。サンプルは採取直後に99.5%エタノールで固定し、実験室に持ち帰った。その後、サンプル瓶の保存液を新たな99.5%エタノールに入れ替え、その後4℃下で長期保存した。

採取した597個体のトビケラサンプルを形態学的特徴から科まで同定した後、DNAをDNeasy 96 Blood & Tissue Kits (QIAGEN)を用いてDNAを抽出した。その後、LCO/HCOプライマーを用いてミトコンドリアDNA(mtDNA)のCytochrome Oxidase Subunit I(CO I)領域をPCR増幅した。CodonCode Aligner 4.2.5(CodonCode Corporation)でシーケンシングデータのアライメントを行い、Cleancollapseで597個体から236個のハプロタイプを検出した。その後、Basic Local Alignment Search Tool(BLAST検索)を用いてDNAデータベース上で種の特特定を行った。また、BLAST検索とは別に236個のハプロタイプからPhyML3.0を使用し、進化系統樹を作成した。その後、進化系統樹を基にPTPモデルを用いて種分類を行った。

3. 結果と考察

236個のハプロタイプから、図2に示す進化系統樹が得られた。形態同定では11の分類群(11科)、DNAバーコーディングで56の分類群、DNA種分類では82の分類群(82種)がそれぞれ得られた(図3)。DNAバーコーディングでは56の分類群から44種が確認され、そのうちの3種はユスリカ、ブユ、ジョウカイボンと同定された。トビケラとして種同定されなかった3個体の形態データを遺伝子データベース上で検索したがヒットするものがなかった。

DNA種分類とDNAバーコーディングで得られた種数を比較すると、約2倍差が見られた。これは、DNAデータベースの情報不足、分類群を正しく同定できなかったためである。一方でDNA種分類法では登録されていないDNA種も明らかにできたために、DNAバーコーディングと比べて多数の種を検出できたと考えられる。また、DNA種分類と形態分類群数を比較すると、約8倍差が見られた。DNA種分類とDNAバーコーディングは形態同定できない分類群も種分類できたが、DNA種分類の方が未記載種の種数の推定に有効であることが確認された。

4. おわりに

DNA種分類法により、タリメント川に生息するトビケラ群集が82種であることが解明された。また、DNAバーコーディングよりDNA種分類の方が多様な種分類を行うことができた。このデータを元に、種多様性への生息場環境の影響が解明されることが期待される。

参考文献

- 1) Arscott, D. B. *et al* (2002). *Ecosystems*, 5(8), 802-814.
- 2) Jiajie Zhang *Bioinformatics* (Oxford, England)(2013), 29 (22): 2869-2876

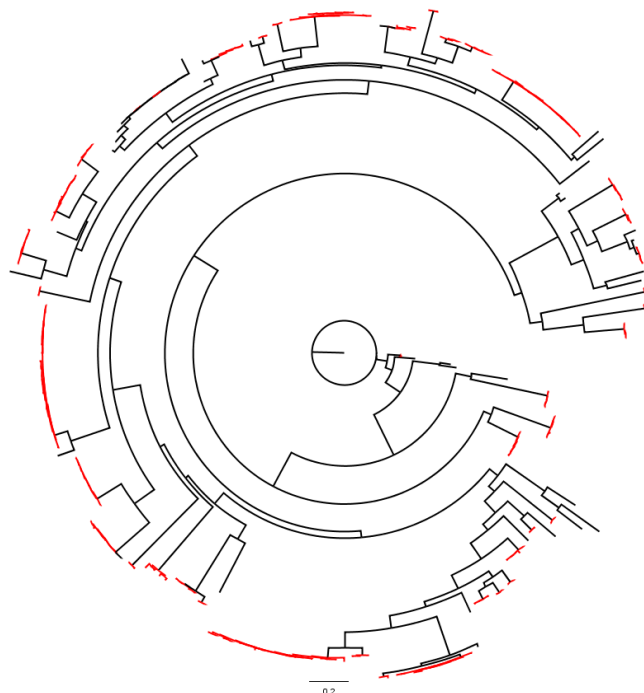


図2 PTPモデルにより種分類された進化系統樹

赤線はPTPモデルによって、同じ種であると分類されたことを示す。

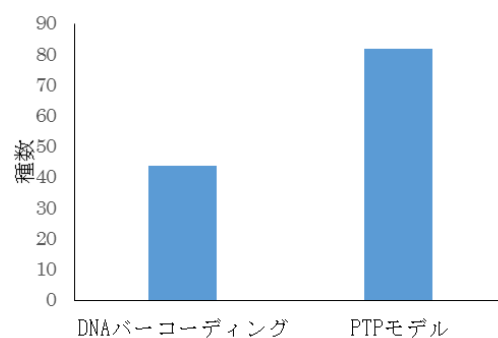


図3 2つの種分類の方法による種数の違い