

川や池の水を汲むだけで生息する水生昆虫相が判る時代に大きく前進!

世界的に希求されてきた昆虫類の DNA バーコーディング解析における
汎用性遺伝マーカーを開発 (環境 DNA 解析への応用も期待, 陸生昆虫にも適用可能!)

【研究成果のポイント】

- 近年, 川や池の水を汲むだけで, そこに生息する生物相を網羅的に究明する環境 DNA からのメタゲノム (群集) 解析は, 世界的にも大きな脚光を浴び, 需要が高まっている。
- 魚類や鳥類, 哺乳類, 甲殻類などでは汎用性の高い遺伝子マーカー (PCR プライマー) が開発されており, 環境 DNA 解析などに多用されている。
- 地球上で最も種多様性の高い生物群である昆虫では, 網羅的な群集解析の需要こそ大きいものの, 種多様性が高い分だけ遺伝的多様性も高いことから, 昆虫全般に適用可能な汎用性の高い遺伝子マーカー開発は困難視され, 他の動物群に比べて遅れをとってきた。しかし, 今回発表した論文のなかで公開した遺伝子マーカーは, 論文内の試行においても高い汎用性が示されており, 水生昆虫だけでなく昆虫類における群集解析が急激に加速することが期待される。
- 当該論文の投稿時には, プレプリント形式で新規開発したマーカー情報を公開しており, 論文公表前から先行して国内外の環境 DNA 解析にも使用され, マーカーの汎用性についても好評を得ている。環境 DNA 解析の業務を請負う企業のなかには, 既に当該論文の日本語解説を HP に掲載しているところもある。

<https://edna-blog.com/paper/insectprimer/>



図1 DNA バーコーディング・メタバーコーディングのイメージ

【研究成果の具体的ポイント】

- ① 地球上で最も種多様性の高い昆虫における新規 DNA バーコーディング領域の提案・汎用 PCR プライマーを設計した。
- ② 主要分類群をカバーする昆虫を対象に、新規開発プライマーでの PCR 増幅を試行し、汎用性を実証した。
 - 従来、昆虫類の DNA バーコーディングに用いられているミトコンドリア DNA (mtDNA) COI 領域での解析における問題点を指摘し、その課題を改善する新規 DNA バーコーディング領域を mtDNA 内の 16S rRNA 領域と 12S rRNA 領域内に提案し、新規 DNA バーコーディング領域を増幅する PCR プライマーを設計した。
 - 昆虫の主要分類群をカバーする、無翅昆虫類、有翅昆虫類（旧翅類、多新翅類、準新翅類、完全変態類）の合計 13 目 43 科 68 種を対象に、設計したプライマーを用いた PCR を実施し、これらの（陸生昆虫も含めた）幅広い昆虫類に適用できることを実証した。
 - 従来の DNA バーコーディングに用いられてきた mtDNA COI 領域（658 塩基）は長い配列であり、種内多型が多いことなどから、環境中に漂っているような分解（断片化）が進んだ DNA を解析するような環境 DNA 研究への応用には不向きであった。しかし、この研究で新規に開発した PCR プライマーは 200 塩基ほどの短い DNA（短鎖 DNA）断片を増幅するもので、なおかつ種識別が可能であることが特長である。
 - さらに、これらの短鎖 DNA を含み、より長鎖断片を解析するための PCR プライマーも併せて設計しているため、分子系統解析などを実施しながら、自ずと各種の DNA データベースの充実化を促進するような仕掛けにもなっている。

【背景と概要】

地球上には数多くの生物が生息しているが、その中で昆虫類は最大の種数となる約 100 万種が記載されている。一方で、数多くの未記載種（学名が付けられていない種）も生息しており、地球上の種多様性を把握することは重要な課題となっている。そのような背景下、絶滅に瀕している生物種も多く、環境保全や希少種の保全などが急務の課題となっている。効果的な保全対策を講じるためには、対象種や生息地の生物群集を把握する必要があるが、多大な労力と費用がかかる上に、採集した標本試料から種を識別・同定するためには、高い専門知識が必要である。

こうしたなかで、近年、注目されているのが「DNA バーコーディング」である（図 1）。DNA バーコーディングは、「標準化」された遺伝子領域 DNA 断片を使用してデータベースの登録配列を参照することで、迅速、正確、そして自動的に種を同定するような手法である。スーパーマーケットの製品コードである黒い縞模様（バーコード）をスキャナーで読み取る方法と似ていることから名付けられたもので、高い専門知識がなくても種同定が可能になるだけでなく、卵や幼虫、不完全な標本（体の一部分など）からも同定することができる。また、未記載種や隠蔽種（外見上、一つの種として扱われてきたものの、生物学的には種分化した独立種であることが判明するような関係にある複数種）の発見にも繋がり、分類学的にも強力な補助ツールとなり得る。さらに、葉の食痕に残された DNA から葉を摂食した動物種を特定したり、脱皮殻や排泄物、環境中からの DNA 解析であれ希少種に対する非侵襲的な遺伝子解析をも可能とするなど、非侵襲的な遺伝的多様性の評価をも可能とする。

昆虫類における、従来の一般的な DNA バーコーディングでは、mtDNA の COI 領域が対象とされてきた。しかし、この遺伝子領域を DNA バーコーディング領域として用いる場合には、いくつかの問題点が挙げられる。第一に、ミトコンドリア遺伝子 COI 領域は、種内多型が多すぎるため、種内変異と種間変異の区別が困難である。また、環境 DNA 解析などにおける短鎖 DNA を COI 領域内に設計するには、昆虫全般に適用できるような汎用性の高い PCR プライマーを設計する必要があるが、そのための保存領域を探索するのが困難である。実際に、今回の論文においてもその困難さを示すことができた。

表 1. 本研究で開発したプライマー情報

遺伝子	プライマー名	プライマー配列 (5'-3')	対象分類群	目的
mtDNA	MtInsects-16S_F	GGACGAGAAGACCCCTWAGA	All	DNA barcoding
16S rRNA	MtInsects-16S_R	ATCCAACATCGAGGTCGCAA	All	DNA barcoding
	AQdb-16S_F	TRACYGTRCAAAGGTAGC	All	Phylogeny and database
	AQdb-16S_R	CCGGTYTAACTCARATCATGT	All	Phylogeny and database
mtDNA	MtInsects-12S_HemHol_F	GTGCCAGCHDYGCGGTTA	Hemimetabola & Holometabola	DNA barcoding & Phylogeny and database
12S rRNA	MtInsects-12S_Hem_R	HATARDRGGGTMTCTAATCC	Hemimetabola	DNA barcoding
	MtInsects-12S_Hol_R	TARTAGGGTATCTAATCCTAG	Holometabola	DNA barcoding
	MtInsects-12S_cad_F	TTGKGCCAGCARTYGCGGTWA	Trichoptera	DNA barcoding
	MtInsects-12S_cad_R	WATARTRGRGTATCTAATYC	Trichoptera	DNA barcoding
	AQdb-12S_Hem_R	CTACTWTGTTACGACTTRT	Hemimetabola	Phylogeny and database
	AQdb-12S_Hol_R	TAMWYCTACTWTGTTACGACTT	Holometabola	Phylogeny and database
	AQdb-12S_cad_R	ARYGACGGGCAATATGTRC	Trichoptera	Phylogeny and database

DNA barcoding, 約200塩基を増幅するDNAバーコーディング用のプライマー；Phylogeny and database, 系統解析やDNAデータベース用の長鎖断片を増幅するプライマー

DNA バーコーディング, 特に環境 DNA を利用した群集解析における昆虫以外の先行研究では, mtDNA のリボソーム RNA (rRNA) 領域内に設計された PCR プライマーが用いられてきた。mtDNA 内の 16S rRNA や 12S rRNA は COI 領域よりも種内多型が少なく, 塩基配列が高く保存された領域が存在し, mtDNA COI 領域よりも非特異的に PCR 増幅される可能性は低い。また, 16S rRNA や 12S rRNA は, 種間変異の検出精度の観点で COI 領域にも匹敵することが報告されている。

DNA バーコーディング領域としての理想的な特性は, 種間変異が大きく全ての種を区別できる一方で, 種内変異は最小限であること, そして相同な特定領域をすべての対象種 (この場合は全ての昆虫グループ) において PCR 増幅することができることがあげられる。本研究では, これらの条件を満たすことに加えて, 環境 DNA 解析にも応用できるよう, 200 塩基程度の短鎖断片を PCR 増幅するように設計している。

さらに, DNA バーコーディングには各種の参照データが必要となるため, DNA 配列情報 (データベース) の充実化が不可欠であり, この作業には多大な労力と経費が必要となる。そこで, データベースの充実化を促進するため, バーコーディング時に参照するための短鎖断片を PCR 増幅する汎用プライマーだけでなく, バーコーディング領域を含み, さらに系統解析にも適用できる長鎖断片を PCR 増幅するための汎用プライマーについても併せて設計した。こうした長鎖断片を PCR 増幅するプライマーを用いることで分子系統解析を目的とした研究での利用を促進しつつ, 自ずと DNA バーコーディングのための参照データの蓄積にも寄与する仕掛けである。様々な目的の研究者にとっての利便性を高めることで, 積極的な利用と得られた遺伝情報のデータベース登録を促進させることにより, データベースの充実につながるものと考えている。

最後に, 新規に探索した DNA バーコーディング領域の遺伝情報を用いることで, 近縁種間での種識別が可能であるかどうか? 隠蔽種を検出できるのか? の 2 点についての検証を行った。水生昆虫では, 近縁種間でのニッチ分化が生じ, それぞれがやや異なる微生物環境 (マイクロハビタット) に適応しているような事例が知られている。ヒラタカゲロウ科 *Heptageniidae* のカゲロウ類は, 近縁種間でニッチ分化を示す典型的なグループであるため, この研究で新しく開発されたプライマーのテストにおいて好適である。分子マーカーを用いたこれまでの研究では, 広範囲や多様な環境に生息する種の系統解析の結果, 未記載種や隠蔽種を発見した事例が報告されている。そこで, 比較的広い範囲の河川流域に生息しており, かつ隠蔽種の存在も示唆されるキイロヒラタカゲロウ *Epeorus aesculus* を対象に, 新規開発した DNA バーコーディング・プライマーセットの検出能力と感度の評価・検証を試みた。

【結果・考察】

研究グループは、新規 DNA バーコーディング領域をミトコンドリア遺伝子 16S rRNA 領域に提案し、昆虫の全分類群に汎用できる PCR プライマー「MtInsects-16S」を設計した。また、この DNA バーコーディング領域を含み、より長い断片を増幅する「AQdb-16S」を設計した。ミトコンドリア遺伝子 12S rRNA に関しては、全ての分離群に汎用できるプライマーを設計することは困難であったため、不完全変態類、トビケラ目を除く完全変態類、そしてトビケラ目の3つの分類群に分けて、それぞれ設計した（表1, 図2）。



図2 本研究で開発したプライマー情報 (a: 16S rRNA 領域, b: 12S rRNA 領域)

汎用性の確認

設計したプライマーの汎用性を確認するため、多様な昆虫群を対象に PCR を実施した結果、mtDNA 16S rRNA 領域でも 12S rRNA 領域でも広く PCR での増幅確認に成功した（図3）。これらの分類群には、無翅昆虫類（シミ類）から有翅昆虫類の旧翅類（カゲロウ類、トンボ類）、新翅類（カワゲラ類、カメムシ類、バッタ類、カマキリ類など）、そして完全変態類（トビケラ類、チョウ類、コウチュウ類、ハエ類など）が含まれている。すなわち、昆虫類の主要な系統を網羅した分類群において汎用性が高いことを確認した。

新規 DNA バーコーディング領域の多型

本研究で開発した 16S rRNA 領域（短鎖断片）と 12S rRNA 領域（短鎖断片）のプライマーセットで増幅された塩基配列による種識別の成否については、従来のバーコーディング領域である mtDNA COI 領域を用いて、既に姉妹種や近縁種の解析を実施していた種群を対象に確認した。

対象種は限られるが、昆虫の主要系統の全てにおいて PCR 増幅することができ、かつ種を識別することができることを確認した。対象種は限られるが、昆虫の主要系統の全てにおいて PCR 増幅することができ、かつ種を識別することができることを確認した。水生昆虫の DNA バーコーディング

用のプライマーの設計を試みたいいくつかの先行研究でも、本研究と同様に mtDNA 16S rRNA 領域内にプライマーを設計しているが、COI 領域のプライマーセットよりも増幅効率が良好ではないことが報告されている。そのようななかで、本研究で設計した PCR プライマーは、幅広い分類群において増幅可能であることを確認した (図3)。

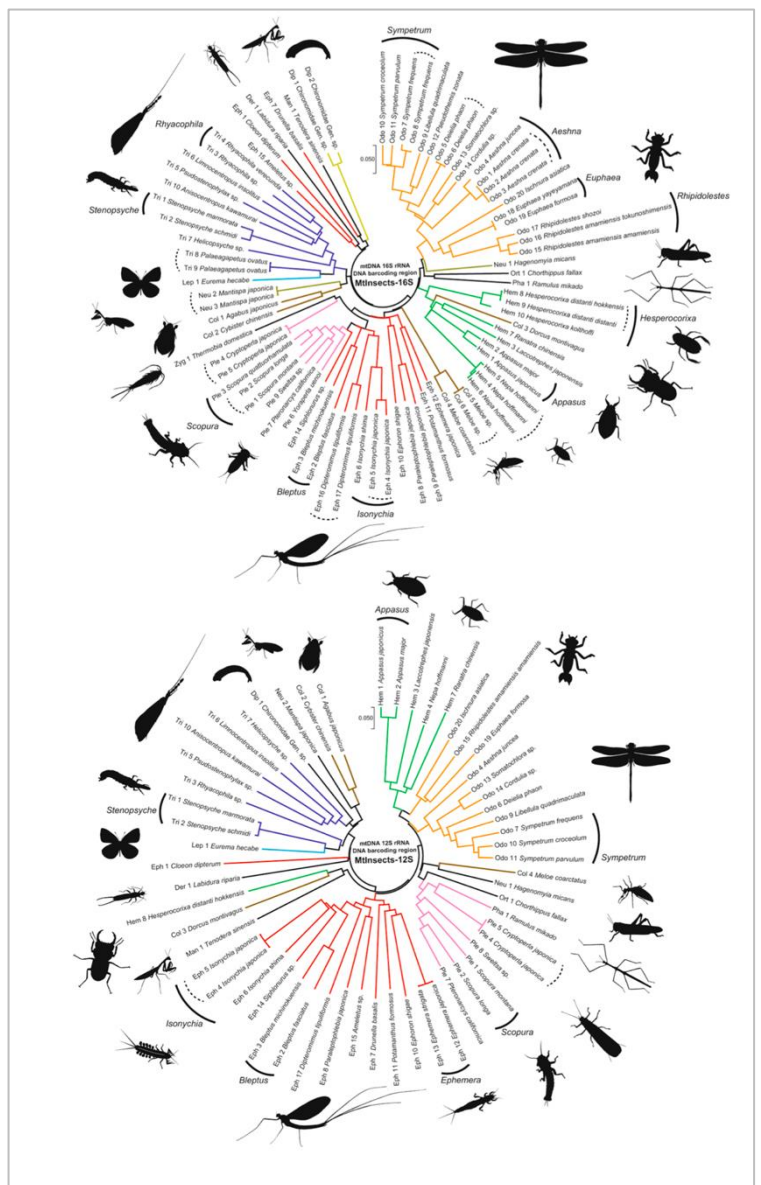


図3 本研究で開発したプライマー情報: 16S rRNA 領域, 12S rRNA 領域. mtDNA 16S rRNA 領域の DNA バーコーディング領域に関しては 14 目 43 科 68 種で (上段), ミトコンドリア遺伝子 12S rRNA 領域の DNA バーコーディング領域に関しては 13 目 42 科 66 種で (下段) PCR の成功を確認した

隠蔽種の検出

隠蔽種が含まれている可能性が示唆されるキイロヒラタカゲロウについて、長野県内の複数河川を対象に採集し、新規開発した PCR プライマーでの遺伝子解析を実施した。その結果、キイロヒラタカゲロウの新種記載におけるタイプ産地 (北アルプス・黒部五郎岳) から採集したサンプル (トポタイプ) とは大きく遺伝的に分化した系統が検出された。つまり、従来、一種として扱ってきたキイロヒラタカゲロウ種内に、別種レベルに相当するほど大きく遺伝的に分化した系統が検出された。これは、本研究で新規開発した汎用プライマーが、こうした隠蔽種も検出し得る程に高い感度であることも明らかとなった。

【波及効果・今後の予定】

本研究で、広汎な昆虫類に適用可能である DNA バーコーディング用のプライマーセットが開発されたことで、特定の環境下での昆虫相調査が大きく進展することとなる。生物多様性を評価するための長期的なモニタリングや、広範囲における同質的な手法による調査の簡便化が可能となる。これまで見落としていた、あるいは形態では識別が困難である未記載種や隠蔽種の新たな発見も期待される。加えて、直接的に人間が踏み入って調査を実施することが困難であるような地下水内の昆虫相の把握なども、採水さえ可能であれば実現可能となる。また、本研究で開発した汎用プライマーは陸生昆虫類にも適用できることから、土壌や空気中の環境 DNA 解析などへの展開も期待される。

さらに本研究では、バーコーディング領域を探索し、PCR プライマーを設計しただけでなく、バーコーディング領域の参照データを効率よく蓄積していくための仕組みづくりも視野に入れている。分子系統解析など、多様な用途での利用が、結果的には参照データベースの充実化に向けて大きく寄与

することが可能である。今後、これらのデータベースの充実が進むほど、環境 DNA 解析の需要も加速的に高まると予想される。そして環境 DNA からの群集解析は、生物の種多様性や遺伝的多様性を評価するための強力な手法となるものと考えている。

【用語解説】

PCR ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction) といい、対象とする遺伝子配列を増幅する手法。わずかな DNA 量のサンプルであっても、特定の配列だけを様々な解析に使用できるように増幅させる。新型コロナウイルスにおいても同じメカニズムを用いて、ウイルスの DNA が含まれていた際に、PCR によって特定の配列が増幅するかを調べることができる。

PCR プライマー PCR により特定の DNA 配列を増幅する際に、増幅する遺伝子配列の両端に結合し、DNA の増幅の開始点として機能する 20 塩基程度の短い遺伝子断片。DNA に結合した 2 つのプライマーが結合した箇所から、DNA が伸長することで、2 つのプライマーの内側の配列が増幅されていく。新型コロナウイルスの PCR 検査においては、ウイルス特異的なプライマーを設計することで、体内にウイルスが存在している時のみ PCR による特定遺伝子の増幅を確認する。

隠蔽種 実態としては複数種が含まれているにも関わらず (複数種の間で生殖的隔離が成立しているにも関わらず)、形態学的な区別がつかないために同一種として扱われてきた種のことをいう。

メタゲノム解析 ある環境中に生息する生物群集を、環境中から検出されるゲノム (遺伝子情報) を網羅的に解析することで把握しようとする解析。

【論文タイトルと著者等】

タイトル : Development of novel PCR primer sets for DNA barcoding of aquatic insects, and the discovery of some cryptic species

著 者 : Masaki TAKENAKA, Koki YANO, Tomoya SUZUKI, Koji TOJO

掲 載 誌 : Limnology

掲 載 日 : 2023 年 1 月 3 日

U R L : <https://link.springer.com/article/10.1007/s10201-022-00710-5#Sec11>

D O I : 10.1007/s10201-022-00710-5

Masaki TAKENAKA (信州大学, 筑波大学) 筆頭著者・責任著者

Koki YANO (自然科学研究機構・基礎生物学研究所)

Tomoya SUZUKI (京都大学)

Koji TOJO (信州大学) 責任著者

【参考情報】

本研究で開発された昆虫類の DNA バーコーディングにおける汎用性マーカを用いた DNA メタバーコード解析などの成果は、2023 年 1 月 21 日 (土) に信州大学松本キャンパスで開催される公開シンポジウム「水生昆虫における環境 DNA のいま」において講演予定である (オンライン配信のあるハブリッド形式のシンポジウム)。詳細は以下の URL 及び二次元バーコードに掲載。

<https://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/science/event/general/dna.html>

