特集：ユスリカ多様性研究を DNA バーコーディングにより進化させる

短 報 [Note]

日本産エリユスリカ亜科 33 属の遺伝的關係について

河合幸一郎 *・斉藤英俊 *・阿武沢磨 *

Genetic relationships of 33 genera of the subfamily Orthocladiinae in Japan

Koichiro KAWAI*, Hidetoshi SAITO* and Takuma ANNO*

Abstract

Orthocladiinae (Diptera: Chironomidae) comprises many genera, adapts to various environments, and has acquired various lifestyles. However, it is not clear how members of the subfamily have differentiated and enlarged their distribution areas. In this study, Orthocladiinae larvae and adults were collected throughout the Japanese Archipelagoes, a genetic tree was constructed for 33 genera, and morphological and genetic relationships were examined. Morphologically similar genera are also inclined to be genetically similar. However, in some cases, the genera within the same morphological groups are genetically quite distant, suggesting parallelism. On the other hand, this subfamily may have adapted to marine environments several times in its evolutionary history.

Keywords: chironomid, differentiation, Orthocladiinae, morphology, gene

摘 要

エリユスリカ亜科昆虫は多くの属からなり、様々な環境に適応し、多様な生活様式を獲得しているが、これらがどのような過程で分化し、生息域を拡大してきたのかは未だ明らかになっていない。そこで、本研究では、日本各地で採集したエリユスリカ亜科 33 属の遺伝子系統樹を作成し、形態的・遺伝的關係を考察した。その結果、形態的に近縁な属が遺伝的にも近い傾向が窺える一方、形態的に同じグループに属する属でも遺伝的には遠い場合もあり、これは平行進化による収斂が起こった可能性を示唆する。さらに、本亜科の海域への進出は一度ではなかったことが示唆された。

キーワード：分化、エリユスリカ亜科、形態、遺伝子、ユスリカ

(2016 年 4 月 12 日受付：2016 年 9 月 8 日受理)

* 広島大学大学院生物圏科学研究科 〒739-8528 東広島市鏡山 1-4-4 広島大学大学院生物圏科学研究科 Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, 1-4-4 Kagamiyama, Higashihiroshima-shi, Hiroshima 739-8528, Japan

はじめに

ユスリカ科昆虫は、日本だけでも約 2000 種が記録されており、河川や湖沼の底生動物群集では、種数・個体数いずれにおいても大きな割合を占め、陸水生態系において重要な役割を担っている（ユスリカ研究会、2010）。中でも、エリユスリカ亜科は 60 属以上を擁し、その幼虫の生息域は陸水・汽水・海水域のみならず、陸域にも及ぶ（Wiederholm, 1989）。また、幼虫の食性については、藻類食・デトリタス食・肉食性のものもあり、生活様式についても、自由生活をするもの、固着性の巢室を作るもの、寄生性のものまで存在し、多様である（Armitage et al., 1995）。しかし、これらの多様な属・種がどのような過程で生息域を拡げながら祖先種から分化してきたのかについては推測の域を出ていない。エリユスリカ亜科の属間、種間の系統関係については、形態的形質に基いた解析は古くから行われているが（Saether, 1977; Saether and Wang, 1996）、遺伝的形質に基いた解析については、未だ限られた属間の関係についての報告しか見られない（Cranston et al., 2010; Cranston et al., 2012）。

そこで、本研究では、日本産のエリユスリカ亜科について、日本各地の多様な棲息域から幼虫・成虫を採集し、リボソーム DNA の塩基配列に基いて 33 属間の遺伝子系統樹を作成し、形態的類縁性との関わりを考察した。

材料と方法

調査地点及び採集方法

北海道から沖縄県に至る日本各地の河川の上流から中流域において、早瀬・平瀬の石礫、岩盤上の付着物、淵・たまりの堆積物、水際の蘚苔類を D フレームネット（網目 0.25 mm）を用いて採集した。その後、これらの基質を現場の水とともにポリエチレン製袋に入れ、エアーレーションを施し、氷で適温を保つことにより、基質中の幼虫を生かしたまま研究室に運搬した。これと平行し、北海道から沖縄県に至る日本各地の河川・湖沼・海岸・陸域等において、蚊柱や建物等に静止している成虫や灯火等に飛来する成虫を採集した。正確な同定のため、採集した成虫のうち、雄のみを乾燥標本として保存し、分析に供した。

幼虫の飼育方法

幼虫を含む底質等のサンプルは、プラスチック容器

（W23 × D13 × H14 cm）に収容し、容器全体に効果的に酸素を供給し、流れを作るため、チューブ型エアーストン（コトブキ工業社製）にて強力にエアーレーションを施した。容器は 15℃（沖縄県サンプルでは 20℃）で、光周期 12L:12D（20 W 白色蛍光灯，20 W 相当 LED ランプ合わせて 120 W）で照明を施した人工気象器（パナソニック製）内に 1-2 ヶ月間設置し、1 日おきに羽化してくる雄成虫を回収した。

遺伝子系統樹の作成

DNA の抽出には、DNeasy™Tissue Kit（QIAGEN 社製）を用い、付属のマニュアルに従った。種の同定に必要な形態を残すため、予め同 Kit 中の Buffer ATL Tissue Lysis buffer と Proteinase K の混合液中で 56℃、1 日インキュベートし、虫体を取り出した後、この粗抽出液より上記 Kit を用いて DNA の精製を行った。取り出した虫体は種の同定に供した。なお、同属で複数種が得られた場合は代表的な 1 種のみ分析に供した。また、本研究では、属間の関係を推定するため、進化速度が比較的遅いと考えられるリボソーム DNA の塩基配列を利用した。精製した DNA を鋳型とし、Amplitaq Gold 360 Master Mix（Applied Biosystem 社製）により、プライマー S3660: 5'-GAGAGTTMAASAGTACGTGAAAC-3'（Morse and Normark, 2006）および A335: 5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3'（Whitnng et al., 1997）を用いて 28S rDNA 領域（約 650bp）を増幅した。増幅断片は、広島大学自然科学研究支援開発センター遺伝子実験部門において塩基配列を決定した。その後、解析ソフト MEGA 6.06 を用いて、多重アラインメントを行った後、遺伝的距離として Kimura-2-parameter（Kimura, 1980）を求め、最尤法により遺伝子系統樹を作成し、ブートストラップ値（試行回数 500 回）でクレードの信頼度を計算した。

種の同定

DNA 粗抽出液の調整後、雄成虫は、Sasa ら（1980）にしたがってプレパラート標本とした後、生物顕微鏡下で検鏡し、種の同定は Wiederholm（1989）、Sasa and Kikuchi（1995）、近藤ら（2001）および日本ユスリカ研究会（2010）によった。

結果と考察

エリユスリカ亜科 33 属が得られ、各属 1 種の遺伝子系統樹を図 1 に示す。外群として用いた 2 種を含む 35

Fig. 1 Genetic relationship between 33 genera in the subfamily Orthoclaudiinae based on 28S rDNA sequences. *Telmatogeton* (Telmatogetoninae) and *Pagastia* (Diamesinae) were used as outgroups. Each number at a node shows a bootstrap value.

図 1. 28S rDNA の塩基配列に基づくエリユスリカ亜科 33 属の遺伝子系統樹。 *Telmatogeton* (ウミユスリカ亜科) と *Pagastia* (ヤマユスリカ亜科) を外群として用いた。分岐点の数字はブートストラップ値を示す。

種の採集地点、28S rDNA 塩基配列等は DNA Databank of Japan (DDBJ) に登録した (表 1)。

Nanocladius と *Paracricotopus*, *Heterotrissocladius* と *Parametriocnemus*, *Cricotopus* と *Paratrachocladius* は、それぞれ分類上近縁で (Wiederholm, 1989), 多くの共有形質を持っている属の組み合わせであり、これらは遺

伝子系統樹においてもブートストラップ値 (Pb) = 61, 70, 72 の信頼度でクレードを形成した (ただし, *Nanocladius*・*Paracricotopus* は *Psectrocladius* も含めたクレード)。また, *Cricotopus* と *Paratrachocladius* は, Cranston et. al. (2012) の報告においても遺伝的に近いことが明らかになっている。さらに, *Heterotrissocladius*

Table 1. A list of 35 chironomid species used for analyses of 28S rDNA sequences and accession nos. in DDBJ.

表 1. 28S rDNA 塩基配列を分析したユスリカ 35 種とその DDBJ 登録番号.

Species	Prefecture	Basin	Accession No. in DDBJ
Orthocladiinae			
<i>Brillia japonica</i>	Ehime	Shigenobu R.	LC164753
<i>Bryophaenocladus subvernalis</i>	Kagoshima	Shinkawa R.	LC164754
<i>Cardiocladius fuscus</i>	Hokkaido	Rausu R.	LC164757
<i>Chaetocladius shouangulatus</i>	Hokkaido	Ishikari R.	LC164758
<i>Corynoneura lobata</i>	Kagoshima	Minato R.	LC164755
<i>Cricotopus metatibialis</i>	Ehime	Shigenobu R.	LC164756
<i>Epoicocladius chuzeundecimus</i>	Hokkaido	Ishikari R.	LC164759
<i>Eukiefferiella uemotoi</i>	Kagoshima	Minato R.	LC164761
<i>Eurycnemus nozakii</i>	Hyogo	Ibo R.	LC164760
<i>Georthocladius</i> sp.	Hiroshima	Ohta R.	LC164762
<i>Heleniella osarumaculata</i>	Hiroshima	Ohta R.	LC164764
<i>Heterotrissocladius shoukouzoensis</i>	Hiroshima	Ohmishima Is.	LC164763
<i>Krenosmittia</i> sp.	Nagano	Sinano R.	LC164766
<i>Limnophyes minimus</i>	Hiroshima	Ohmishima Is.	LC164767
<i>Metriocnemus togamirus</i>	Kagoshima	Sendai R.	LC164768
<i>Nanocladius tamabicolor</i>	Kagoshima	Minato R.	LC164769
<i>Neobrillia longistyla</i>	Ehime	Hijikawa R.	LC164770
<i>Orthocladius tamarutilus</i>	Ehime	Shigenobu R.	LC164771
<i>Paracricotopus irregularis</i>	Hokkaido	Saru R.	LC164780
<i>Parakiefferiella itachiquarta</i>	Hokkaido	Osaru R.	LC164773
<i>Paralimnophyes</i> sp.	Hokkaido	L. Saroma	LC164775
<i>Parametriocnemus stylatus</i>	Hokkaido	Saru R.	LC164776
<i>Paratrithocladius rufiventris</i>	Niigata	Nou R.	LC164777
<i>Prosilocerus akamusi</i>	Okayama	L. Kojima	LC164772
<i>Psectrocladius aquatronus</i>	Shiga	L. Biwa	LC164778
<i>Pseudorthocladius togakuroidus</i>	Shimane	Takatsu R.	LC164787
<i>Pseudosmittia topei</i>	Okinawa	Kuroshima Is.	LC164779
<i>Semiocladius endocladiae</i>	Hiroshima	Ohmishima Is.	LC164781
<i>Smittia aterria</i>	Hiroshima	Kurahashi Is.	LC164782
<i>Synorthocladius semivirens</i>	Ehime	Shigenobu R.	LC164783
<i>Thienemanniella vittata</i>	Kagoshima	Minato R.	LC164785
<i>Tokunagaia togaundecima</i>	Hyogo	Kakogawa R.	LC164765
<i>Tvetenia tamaflava</i>	Ehime	Shigenobu R.	LC164784
Telmatogetoninae			
<i>Telmatogeton japonicus</i>	Shimane	Mihonoseki	LC164786
Diamesinae			
<i>Pagastia nivis</i>	Hokkaido	Osaru R.	LC164774

と *Parametriocnemus* の遺伝的近縁性については本研究が初めての報告となる。すなわち、これらの属については、形態的分類はある程度系統進化を反映していると考えられる。

一方、*Eurycnemus*, *Neobrillia*, *Brillia* は、特に分類学上重要となる雄成虫交尾器の基本的構造において類似し (Wiederholm, 1989), 同じ *Brillia* グループに属している。しかし、*Brillia* は *Tvetenia* と同じクレード (Pb = 100) に配置され、ごく近縁であるが、*Eurycnemus*, *Neobrillia* とはごく近縁とはいえない。これらに対する説明としては、平行進化による収斂の可能性を含め、今後、検証する必要がある。たとえば、この 3 属に共通な翅の膜面上に大毛を有することも平行進化形質である可能性がある。しかし、分類学上これらに近縁な、*Euryhopsis*, *Tokyobrillia*, *Xylotopus* 等も加えて遺伝的關係を再検討する必要がある。実際に、翅膜面上の大毛は、密度・配列等の違いはあるものの *Tanypodinae*, *Orthocladinae*, *Chironominae* 等、異なる亜科に属する属間でも広く共通して現われる。また、我々のこれまでの研究では、Cranston (2000) によって提案された 19 の形態形質による系統樹で、エリユスリカ亜科海産の *Semiocladius* とこれとは遺伝的に遠いが同じく海産の *Clunio* がクレードを形成した (Sugimaru et al., 2010)。これも海産の属間で形態的収斂が広く起こったことを示唆する可能性がある。このような形態的収斂は、ユスリカ科の他の亜科、特にユスリカ亜科の *Polypedilum* の亜属間でも報告されている (Kawai et al., 2012)。また、逆に、*Parakiefferiella* (Metriocnemiini 族) と *Thienemanniella* (Corynoneurini 族) (Pb=99) のように、形態的分類では離れた属 (Sasa and Kikuchi, 1995) によって形成されるクレードも見られた。したがって、今後、遺伝子系統樹と形態的系統樹との詳細な比較によって、正確な系統關係を推定することが可能になり、どのような形質状態が収斂によるのかを明らかにすることができると考えられる。

次に、海産種に着目すると、ウミユスリカ亜科の *Telmatogeton* は、エリユスリカ亜科の海産属である *Semiocladius* や海産種を含む *Smittia* とは当然ながら、遺伝的に離れており、Cranston et al. (2012) の結果とも矛盾しない。一方、*Semiocladius* と *Smittia* はごく近縁であるとはいえず、同じように海産種を含む属とはいえ、必ずしも近縁であるとは限らないと考えられる。また、我々のこれまでの研究によれば、海産属であるか、海産種を含む属の *Thalassosmittia*, *Clunio*, *Smittia*, *Semiocladius*

は互いに等しく近縁であるとは言えない (Sugimaru et al., 2010)。これらのことは、エリユスリカ亜科における海域への進出が一度ではなかった可能性を示唆する。今後、ユスリカ科における海域への進出過程を明らかにするためには、ウミユスリカ亜科の他属 *Thalassomyia*, *Chironomus*, *Pontomyia*, *Tanytarsus* (ユスリカ亜科) 等、他の亜科に属する海産種についても系統關係を明らかにしてゆく必要がある。

また、本研究では、内部寄生性種を含む *Eurycnemus* と外部寄生性種を含む *Epoicocladus* や *Nanocladus* との遺伝的關係について結論を得ることはできなかった。一方、前者は主にトビケラ、後者はカゲロウ・カワゲラ・ヘビトンボ等、宿主が幅広いことから、これらの異なる寄生様式は、獲得したプロセスやメカニズムが異なる可能性があることが示唆される。今後、他領域の塩基配列に基くより信頼度の高い系統樹を得ることにより、これらの進化的關係が解明されることが望まれる。さらに、内部寄生性種として、ユスリカ亜科ではハモンユスリカ属の *Polypedilum* (*Cerobregma*) *kamotertium* が有名である。本種と *Eurycnemus nozakii* の蛹の形態に類似が見られることが報告されていることから (Sasa, 1989; Kobayashi, 1998), このような寄生生活に関連した平行進化の存在も示唆される。

なお、本研究では、日本産エリユスリカ亜科 33 属の各属からそれぞれ 1 種を選んで属の代表種として遺伝子系統樹を作成した。しかし、その 1 種が属における平均的な形質状態を有しているとは限らないため、属の中でどのような種を選定するかによって系統樹の形が大きく異なってくる可能性が残されている。したがって、系統樹の信頼性を高めるため、今後、今回材料が得られなかった約 20 属を含め、可能な限り多くの種について分析を追加する必要がある。このためには、採集地域・方法や幼虫の飼育方法の改善等が必要である。また、マイクロサテライトやミトコンドリア DNA 等の変異性の高い領域 (青木ら, 1997) についても分析し、遺伝形質を総合的に比較する必要がある。

謝 辞

本研究において、ユスリカサンプルの採集に多大なる御協力を頂いた広島大学生物生産学部水族生態学研究室の学生諸氏に深謝致します。

引用文献

- 青木宙・隆島史夫・平野哲也 (1997) : 魚類の DNA. 恒星社厚生閣, 467pp.
- Armitage, P. D., Cranston, P. S. and Pinder, L. C. V. (1995): *The Chironimidae Biology and ecology of non-biting midges*, Chapman & Hall, 572pp.
- Cranston, P. S. (2000): *Parapsectrocladius*: a new genus of Orthoclaadiinae, Chironomidae (Diptera) from Patagonia, the south Andes. *Insect Systematics and Evolution*, 31: 103-120.
- Cranston, P. S., Hardy, N. and Morse, G. (2012): A dated molecular phylogeny for the Chironomidae (Diptera). *Systematic Entomology*, 37, 172-188.
- Cranston, P. S., Hardy, N., Morse, G., Puslednik, L. and McCluen, S. R. (2010): When molecules and morphology concur: the 'Gondwanan' midges (Diptera: Chironomidae). *Systematic Entomology*, 35, 636-648.
- Kawai, K., Ohsugi, T., K., Goka, K. and Imabayashi, H. (2012): Genetic relationships among 22 Japanese species of the genus *Polypedilum* (Chironomidae, Diptera) *Medical Entomology and Zoology* 63: 313-317.
- Kimura, M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Kobayashi, T. (1998): *Eurycnemus nozakii* sp. nov. (Diptera: Chironomidae), the second named *Eurycnemus* species. *Entomological Science*, 1: 109-114.
- 近藤繁生・平林公男・岩熊敏夫・上野隆平 (2001) : ユスリカの世界. 培風館, 306pp.
- Morse, G. E. and Normark, B. B. (2006): A molecular phylogenetic study of armoured scale insects (Hemiptera: Diaspididae). *Systematic Entomology*, 31: 338-349.
- 日本ユスリカ研究会 (2010) : 図説日本のユスリカ. 文一総合出版, 353pp.
- Sasa, M. (1989): Chironomid midges of some rivers in western Japan. *Toyama Prefectural Environmental Pollution Research Center*, 1989: 96-110.
- Sasa, M., Yasuno, M., Ito, M. and Kikuchi, T. (1980): Studies on chironomid midges of the Tama River. Part 1. The distribution of chironomid species in a tributary in relation to the degree of pollution with sewage water. *Research Report from the National Institute for Environmental studies*, 13: 1-8.
- Sasa, M. and Kikuchi, M. (1995): Chironomidae (Diptera) of Japan. *University of Tokyo Press*, Tokyo.
- Saether, O. A. (1977): Female genitalia in Chironomidae and other Nematocera: morphology, phylogenies, keys. *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada* 197, 209pp.
- Saether, O. A. and Wang, X. (1996): Revision of the orthoclad genus *Prosilocerus* Kieffer (= *Tokunagayusurika* Sasa) (Diptera: Chironomidae). *Entomologica Scandinavica* 27: 441-479.
- Sugimaru, K., Kawai, K. and Imabayashi, H. (2010): Relationship between morphological and genetic trees of marine chironomid species. *Biosphere Science*, 49: 1-6.
- Whiting, M. F., Carpenter, J. C., Wheeler, Q. D. and Wheeler, W. C. (1997): The Strepsiptera problem: Phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology. *Systemic Biology*, 46: 1-68.
- Wiederholm, T. (1989): Chironomidae from the holarctic region-keys and diagnoses. *Entomologica Scandinavica*, Supplement 34, 532pp.