

本州産ガムシ属の DNA バーコード領域*

林 成多¹⁾・相馬 理央²⁾・岩田 泰幸³⁾・富樫 和孝⁴⁾・上手 雄貴⁵⁾

- ¹⁾ ホシザキグリーン財団, 〒691-0076 島根県出雲市園町 1664-2 ホシザキ野生生物研究所
²⁾ いであ株式会社 環境創造研究所, 〒421-0212 静岡県焼津市利右衛門 1334-5
³⁾ 公益財団法人文化財虫菌害研究所, 〒160-0022 東京都新宿区新宿 2-1-8
⁴⁾ 北杜市オオムラサキセンター, 〒408-0024 山梨県北杜市長坂町富岡 2812
⁵⁾ 名古屋市衛生研究所, 〒463-8585 愛知県名古屋市守山区大字下志段味字穴ヶ洞 2266-132

DNA barcodes of *Hydrophilus* (Coleoptera: Hydrophilidae) of Honshu, Japan

Masakazu HAYASHI¹⁾, Rio SOUMA²⁾, Yasuyuki IWATA³⁾,
Kazutaka TOGASHI⁴⁾ and Yuuki KAMITE⁵⁾

- ¹⁾ Hoshizaki Green Foundation, Sono 1664-2, Izumo, Shimane Pref., 691-0076
Japan
²⁾ Institute of Environmental Ecology, IDEA Consultants, Inc., 1334-5, Riemon,
Yaizu, Shizuoka Pref., 421-0212 Japan
³⁾ Japan Institute of Insect and Fungal Damage to Cultural Properties, 2-1-8,
Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo, 160-0022 Japan
⁴⁾ Hokuto City Oomurasaki Center, 2812, Tomioka, Nagasaka-cho, Hokuto,
Yamanashi Pref., 408-0024 Japan
⁵⁾ Nagoya City Public Health Research Institute, Anagahora 2266-132, Shimoshidami,
Moriyama-ku, Nagoya, Aichi Pref., 463-8585 Japan

Abstract DNA barcodes of *Hydrophilus bilineatus caschmirensis* and *Hydrophilus acuminatus* were studied based on the sequence data of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I that collected from Honshu, Japan. We obtained the sequences from 18 specimens and registered them with DNA Data Bank of Japan (DDBJ), the accession number is LC659978 to LC659995.

Key words : aquatic beetles, COI gene, water scavenger beetles

キーワード : 水生甲虫, COI 遺伝子, ガムシ

はじめに

ガムシ属 *Hydrophilus* は, ガムシ科の大型種を含む水生甲虫類である。幼虫の大アゴが顕著な左右不对称形で, 水生巻貝の捕食に適応した

形態であることが判明している (Inoda *et al.*, 2003, 2015; Minoshima and Hayashi, 2011; Hayashi and Sugiura, 2020)。このうち本州にはガムシ *Hydrophilus acuminatus* Motschulsky, 1854 とコガタガムシ *Hydrophilus bilineatus caschmirensis* Kollar et Redtenbacher, 1844 の 2 種が分布し, ガ

*ホシザキグリーン財団研究業績 第 372 号

ムシが広域に分布するのに対して、コガタガムシは局地的な分布をしている。いずれも環境省のレッドデータブックの掲載種であるが、遺伝的な変異については知見がほとんどなく、保全するための地域個体群の検討を行うための材料がない状況である。ガムシ、コガタガムシの成虫はともに夏季に灯火に飛来し、水域のない場所でも見られることから、広域に分散している可能性が高い。また、本州のコガタガムシについては、1990年代にはほぼ絶滅に近い状況であったと見られるが、再発見されている地域もある(岩田ほか, 2019; 上手・上手, 2020)。本論文は、この2種についてミトコンドリアDNAのCOIバーコード領域について分析を行った結果を報告する。

材料と方法

サンプリング

本州産の成虫および幼虫の合計18個体を分析した。コガタガムシ3個体とガムシ15個体である。

DNA分析方法

DNA抽出用に選定した標本から、市販の抽出キットを用いてDNAを抽出した。抽出したDNAは、PCR法によりミトコンドリアDNAのCOI遺伝子領域の一部約658bpを増幅した後、DNAシーケンサーを用いて塩基配列を取得した。

DNA抽出

標本からのDNA抽出は、DNeasy blood & tissue Kit (QIAGEN社)を用いて実施した。分析対象に選定した水生昆虫類の各標本は、超純水で固定用のエタノールを洗い流した後、清浄なプラスチック製シャーレ上に移し、実体顕微鏡下で

脚部または胸部から筋肉組織をピンセットで採取した。体サイズの小さな標本については、筋肉組織のみを採取することが困難であったため、脚部をそのまま抽出に使用した。

採取した組織は、DNA抽出キットに添付されているATL緩衝液180 μ Lを予め分注しておいたプラスチック製マイクロチューブに入れ、それをDNA抽出用サンプルとした。以降の操作は、キット付属の取扱説明書に従って作業を行い、最終的なDNAの溶出量のみ50 μ Lに変更した。抽出したDNAサンプルは、-30 $^{\circ}$ Cに設定された冷凍庫内で保管した。凍結融解の繰り返しによるDNAの劣化を避けるため、遺伝子解析を実施している期間のみ、4 $^{\circ}$ Cに設定された冷蔵庫内で一時的に保管した。

PCR条件

解析対象領域は、昆虫等動物の標準的なバーコード領域として用いられるミトコンドリアDNAのCOI遺伝子領域の一部とした。COI遺伝子の増幅には、LCO1490及びHCO2198 (Folmer *et al.*, 1994)のプライマーセットと、リバース側プライマーとしてHCOoutout (Yano *et al.*, 2020)を使用した。

PCR増幅に使用したプライマーの情報を表1に示した。本分析には、各プライマーの5'末端側にM13プライマー配列を付加したものを使用した。PCR増幅はまず、「LCO1490, HCOoutout」のプライマーセットを用いて実施し、目的とするCOI遺伝子の増幅産物が得られなかったサンプルについては、「LCO1490, HCO2198」のセットでもPCRを実施した。

DNAポリメラーゼにはTakara Ex Taq Hot

表1 解析に使用したプライマーセット

対象分類群	領域	プライマー名	プライマーの塩基配列 (5'末端 \rightarrow 3'末端)	文献	増幅断片長
真核生物	COI	M13F_LCO1490	(M13F) GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	1	658bp
		M13R_HCO2198	(M13R) TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	1	又は
		M13R_HCOoutout	(M13R) GTAAATATATGRTGDGCTC	2	815bp

注) 各プライマーの5'末端側には、それぞれ以下の配列を付加した。

M13F: TGTAACGACGCGCCAGT

M13R: CAGGAAACAGCTATGAC

文献1: Folmer *et al.* (1994); 文献2: Yano *et al.* (2020).

Start Version (タカラバイオ社) を使用した。PCR 反応液の組成は、ポリメラーゼに添付された製品マニュアルに記載された標準的なプロトコルに従い、総量 20 μ L スケールで調整した。PCR の温度条件は、熱変性ステップが 98°C 10 秒、アニーリングステップが 49°C 30 秒、伸長ステップが 72°C 30 秒を 1 サイクルとして 35 回繰り返した。温度の制御を行うサーマルサイクラーには Applied Biosystems 社製 Veriti サーマルサイクラーを使用した。

塩基配列の決定

得られた PCR 産物は、磁気ビーズ精製製薬 SPRIselect (ベックマン・コールター社) により精製し、それを鋳型として DNA シークエンス反応キット BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社) によりサイクルシークエンス反応を行った。シークエンス反応時のプライマーには、それぞれ M13F、M13R を使用した。

反応終了後、DNA シークエンサー ABI3130 (Applied Biosystems 社) により塩基配列を決定した。

配列が取得できなかったサンプルについては、再度、標本から DNA を抽出し、再分析を実施した。また、再分析の対象となった一部のサンプルについては、標本の体サイズが小さく、再抽出に必要な組織が得られなかったため、代替となる標本を追加選定し、分析した。

日本 DNA データバンク (DDBJ) への配列情報の登録

本分析で取得した塩基配列は、日本 DNA データバンク (DDBJ) に登録申請を行い、アクセッション番号を取得した。

系統解析

MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021) を用いて最尤法による系統解析を行った。ブートストラップを 100 回行い、その確率を示した。外群にはコエンマムシの配列 (KU188489) をデータベースより利用した。

結果と考察

DNA 分析結果を表 2 に示した。日本 DNA データバンク (DDBJ) の登録時に各サンプルに対して登録した情報及び各サンプルのアクセッション番号についても同表に併記した。DDBJ から発行されたアクセッション番号は、LC659978 ~ LC659995 である。

DNA 分析の結果、すべての検体から COI 遺伝子領域の配列が取得できた。ガムシ及びコガタガムシの分子系統樹を図 1 に示した。ガムシとコガタガムシの 2 種は、明瞭に 2 つのクレードに分かれ、形態による同定の結果とも一致していた。

ガムシは、青森県や栃木県、島根県産の 15 個体の配列を取得できたが、分析を行った領域については変異が少ないことが判明し、13 個体が同一の配列で、残りの 2 個体が 1 塩基対のみが変異した、それぞれ別の配列であった (全部で 3 個のハプロタイプ)。出雲市産の 8 個体については、ホシザキ野生生物研究所に設置した灯火採集で得た成虫で、1 個体のみ異なるハプロタイプが確認された。同研究所は出雲平野の東部、宍道湖の西岸部に位置し、隣接する水田などの水域でガムシは繁殖していない。そのため、すべて周辺地域からのランダムな飛来と考えられる。また、出雲市に隣接する大田市や雲南市の個体も出雲市と同じ配列であった。この配列は栃木県産の個体にも認められた。本研究で扱ったガムシの個体数は多くないが、本州産のガムシについては、バーコード領域の遺伝的な変異がさほど大きくない可能性を示唆する結果となった。しかしながら、本州におけるガムシの遺伝的な変異を議論するにはデータが少なすぎるため、今回の結果を比較材料とした上で、さらなる検討が必要である。同時に本州以外の産地についても検討できれば、本州のガムシの特徴が判明するかもしれない。

コガタガムシについては、分析した個体が少ないが、山梨県と岐阜県の個体の配列が同じであった。本州におけるコガタガムシは局地的に増加している可能性があるため、同じ個体群に由来する場合も考えられる。今後、琉球列島産も含めてより詳しく検討されることが望まれる。

表2 分析試料一覧.

GMS006 は採集後に孵化した幼虫を分析した, 採集地や採集日などのデータは親個体を示している.

番号	和名	DDBJ への登録情報					
		organism	country	collection_date	lat_lon	collected_by	Accession No.
GMS001	コガタガムシ*	<i>Hydrophilus bilineatus</i>	Japan: Yamanashi: Nirasaki	2019-06-24	35.70 N 138.44 E	K. Togashi	LC659978
GMS002	コガタガムシ*	<i>Hydrophilus bilineatus</i>	Japan: Yamanashi: Nirasaki	2019-06-24	35.70 N 138.44 E	K. Togashi	LC659979
GMS003	ガムシ	<i>Hydrophilus acuminatus</i>	Japan: Tochigi: Motegi	2019-06-29	36.58 N 140.15 E	Y. Iwata	LC659980
GMS004	ガムシ	<i>Hydrophilus acuminatus</i>	Japan: Tochigi: Motegi	2019-06-29	36.58 N 140.15 E	Y. Iwata	LC659981
GMS005	ガムシ	<i>Hydrophilus acuminatus</i>	Japan: Tochigi: Motegi	2019-06-29	36.58 N 140.15 E	Y. Iwata	LC659982
GMS006	コガタガムシ*	<i>Hydrophilus bilineatus</i>	Japan: Gifu: Kaizu	2019-07-06	35.17 N 136.66 E	Y. Kamite, N. Kamite	LC659983
GMS007	ガムシ	<i>Hydrophilus acuminatus</i>	Japan: Aomori: Hirosaki	2019-09-13	40.57 N 140.42 E	M. Hayashi	LC659984
GMS008	ガムシ	<i>Hydrophilus acuminatus</i>	Japan: Shimane: Unnan	2019-06-01	35.32 N 132.92 E	M. Hayashi	LC659985
GMS009	ガムシ	<i>Hydrophilus acuminatus</i>	Japan: Shimane: Unnan	2019-06-01	35.32 N 132.92 E	M. Hayashi	LC659986
GMS010	ガムシ	<i>Hydrophilus acuminatus</i>	Japan: Shimane: Oda	2019-06-20	35.05 N 132.43 E	M. Hayashi	LC659987
GMS011	ガムシ	<i>Hydrophilus acuminatus</i>	Japan: Shimane: Izumo	2020-08-13	35.447 N 132.866 E	M. Hayashi	LC659988
GMS012	ガムシ	<i>Hydrophilus acuminatus</i>	Japan: Shimane: Izumo	2020-08-13	35.447 N 132.866 E	M. Hayashi	LC659989
GMS013	ガムシ	<i>Hydrophilus acuminatus</i>	Japan: Shimane: Izumo	2020-08-13	35.447 N 132.866 E	M. Hayashi	LC659990
GMS014	ガムシ	<i>Hydrophilus acuminatus</i>	Japan: Shimane: Izumo	2020-08-13	35.447 N 132.866 E	M. Hayashi	LC659991
GMS015	ガムシ	<i>Hydrophilus acuminatus</i>	Japan: Shimane: Izumo	2020-08-13	35.447 N 132.866 E	M. Hayashi	LC659992
GMS016	ガムシ	<i>Hydrophilus acuminatus</i>	Japan: Shimane: Izumo	2020-08-13	35.447 N 132.866 E	M. Hayashi	LC659993
GMS017	ガムシ	<i>Hydrophilus acuminatus</i>	Japan: Shimane: Izumo	2020-08-13	35.447 N 132.866 E	M. Hayashi	LC659994
GMS018	ガムシ	<i>Hydrophilus acuminatus</i>	Japan: Shimane: Izumo	2020-08-13	35.447 N 132.866 E	M. Hayashi	LC659995

*日本産のコガタガムシは亜種 *caschmirensis* とされるが, DDBJ では種名で登録している.

謝 辞

青森県での調査において吉富博之博士に, 山梨県および栃木県での調査において高野雄一氏(埼玉県三芳町)に, 岐阜県での調査において第5著者の妻, 奈美にご協力をいただいた, 記してお礼申し上げます.

文 献

- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vriegenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**: 294-299.
- Hayashi, M. and Sugiura, S. (2020) Climbing

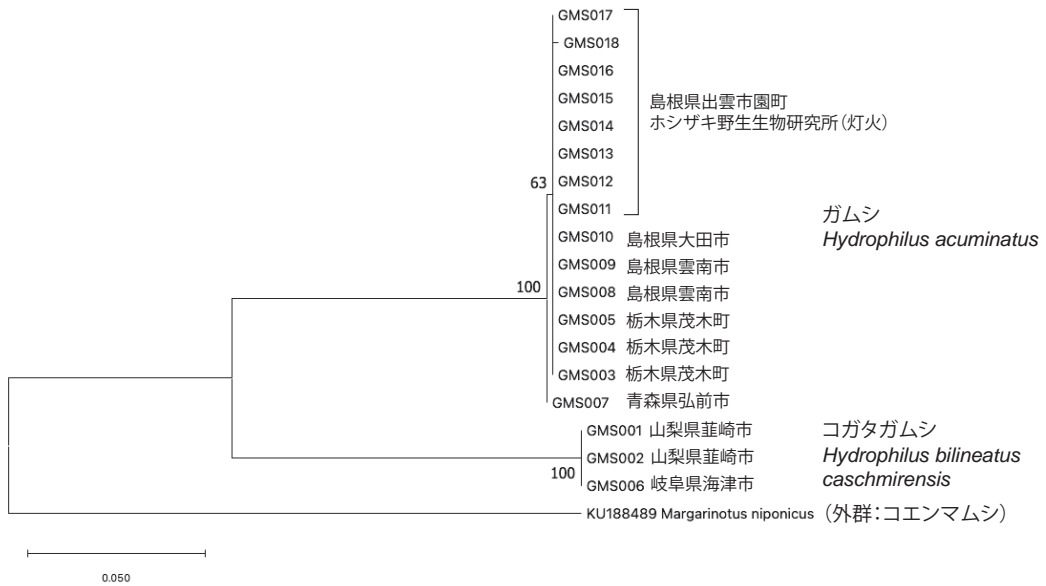


図1 最尤法による分子系統樹. コエンマムシ (エンマムシ科) を外群とした.

rice plants above the waterline: escape of freshwater snails from underwater predation by snail-eating specialists. *Biological Journal of the Linnean Society*, **130**: 751–755.

Inoda, T., Hirata, Y., and Kamimura, S. (2003) Asymmetric mandibles of water-scavenger larvae improve feeding effectiveness on right-handed snails. *The American Naturalist*, **162**: 811–814.

Inoda, T., Inoda, Y. and Rullan, J. K. (2015) Larvae of the water scavenger beetle, *Hydrophilus acuminatus* (Coleoptera: Hydrophilidae) are specialist predators of snails. *European Journal of Entomology*, **112**: 145–150.

岩田泰幸・富樫和孝・中村 涼・高野雄一・岩田朋文 (2019) 山梨県におけるコガタガムシの生息状況. さやばね ニューシリーズ, (33): 35–38.

上手雄貴・上手奈美 (2020) 岐阜県におけるコガ

タガムシの記録および繁殖について. さやばねニューシリーズ, (37): 39–43.

Minoshima, Y., and Hayashi, M. (2011) Larval morphology of the Japanese species of the tribes Acidocerini, Hydrobiusini and Hydrophilini (Coleoptera: Hydrophilidae). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae*, **51** (suppl.): 1–118.

Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S. (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, **38**: 3022–3027.

Yano, K., Takenaka, M., Mitamura, T. and Tojo, K. (2020) Identifying a “pseudogene” for the mitochondrial DNA COI region of the corixid aquatic insect, *Hesperocorixa distanti* (Heteroptera, Corixidae). *Limnology*, **21** (3): 319–325.

