

源流河川のトビケラ目昆虫 - ヌタノ沢で採集されたアミメシマトビケラ科 とナガレトビケラ科の形態と遺伝子情報 -

倉西良一*

Caddisfly species of headwaters.
Morphology and genome profile of the arctopsygid and rhyacophilid species,
collected in Nuta-no-zawa, Tanzawa, Kanagawa

Ryoichi B. KURANISHI*

要 旨

ヌタノ沢に生息する源流性のトビケラ4種（アミメシマトビケラ科1種とナガレトビケラ科3種）の形態と遺伝子情報を検討した。遺伝子はアミメシマトビケラ科ではミトコンドリア 001 領域、ナガレトビケラ科ではミトコンドリア 16S 領域の解析を行った。シロフツヤトビケラ属では、検討した成虫と幼虫の遺伝子に極めて高い相同性が認められ、同一種と推定された。

キーワード：分子同定、ミトコンドリアゲノム、001、16S

I はじめに

源流部に生息する水生昆虫相は、源流を取り巻く森林環境を強く反映すると考えられる。源流部の周辺の森林が貧弱で源流の流水が途絶えたり、降雨の折りに源流で大量の土砂が動いたりする場合、その場所には健全な源流部の生物相が構成されないと想定される。このような視点に立つと源流部流域のモニタリング対象生物として源流に生息する底生動物は非常に有効であると考えられる。モニタリングには生物種の同定が不可欠であるが、源流部に生息するトビケラ目昆虫の幼虫（底生動物）の同定は大きな困難を伴う。この状況は幼虫と成虫の整合性が不十分なことによるもので、すなわち成虫形態は新種で記載される折りに論文中で定義されるが、その幼虫は不明なまま放置されることによる。

従来、成虫と幼虫の関係は形態を精査した幼虫を飼育することによって一致させる方法や成虫の生息

種を完全に調べた上で幼虫を網羅的に採集し消去法で推定する方法などがあった。しかしナガレトビケラ科やカワトビケラ科のように、一つの地点に同属（幼虫間の形態的な差が少ない）の複数種が生息すると考えられる場合、幼虫と成虫を一致させることは極めて困難であった。この状況を解決する方法として、遺伝子情報を使った方法が考えられる。この方法の原理は、細胞中のミトコンドリアの遺伝子を成虫と幼虫で（蛹や雌雄間においても）比較すれば、同一種であればほとんど同じ遺伝子構造となると考えられることによる。このように遺伝子をつかった成虫と幼虫など種内や種間の関係推定は理論的には明瞭であり、欧米ではこの手法をもとにトビケラ目昆虫の成虫と幼虫の一致が試みられている（Johanson, 2007）。

本稿では、ヌタノ沢の源流部に生息するトビケラの幼虫の同定をより正確なものとするを目的に幼虫や成虫の遺伝子を解析し比較もしくは形態デー

* 千葉県立中央博物館（〒260-8682 千葉市中央区青葉955-2） Eメール：kuranishi@chiba-muse.or.jp

タに加えた。これらの情報は、今後の客観的な種の同定に貢献するものと考えられる。

II 材料と方法

今回検討したトビケラ目昆虫は、神奈川県山北町中川ヌタノ沢 (北緯 35° 46; 東経 139° 06。標高 560 m から 616 m) で 2011 年と 2012 年に採集されたものである。成虫は源流溪流の灌木に静止している個体を掬い取りで採集した。幼虫は水がしたたる岩盤上での見つけ採り採集や一般の底生動物などと一緒小型の D- フレームネットで採集した。採集した成虫や幼虫は 95% エチルアルコールに固定して研究室に持ち帰り、一日後に新しい 95% エチルアルコールと入れ替え冷蔵で保存して、形態や遺伝子解析の材料とした。

形態解析のための写真は、実体顕微鏡 (OLYMPUS SZX16) に装着した写真撮影装置 (DP20) を使用し、被写体深度を大きくする場合には画像合成ソフト (Helicon Focus) を利用した。遺伝子の抽出には、成虫・幼虫ともに右の後脚組織を使用し、幼虫が小型個体の場合は組織量を増やすために前脚・中脚も使用した。組織は 1.5 ml のエッフェンドルフチューブに入れた状態でペッスルを使い粉碎した。遺伝子の抽出は Qiagen 社の遺伝子抽出キット (DNeasy Blood and Tissue Kit) を使用した。PCR 反応は、Takara の Z-taq を使用し、ミトコンドリアのチトクロームオキシターゼサブユニット (CO1) ではプライマー Jerry (F: 5'-CAA CATT TTT TGA TTT TTT GG- 3') と Pat (R: 5'-TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A- 3') 16S 領域は、16sARL (F: 5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT- 3') と 16sBRH (F: 5'-CCG CTG TTT ATC AAA AAC AT- 3') を使用した。PCR の温度と時間条件は、初めに 94°C まで加熱し、その状態を 2 分間保った後、二本鎖 DNA を熱変成で解離させるため 98°C を 1 秒間、プライマーが一本鎖 DNA とアニーリング (結合) するために 50°C を 5 秒間、DNA を伸長させるために 72°C を 15 秒間保つという「熱変成 - アニーリング (結合) - 伸長」のサイクルを 30 回繰り返した。PCR 反応を行う器材としては、ASTECH 社製 GeneAmp 322 を使用した。PCR 産物は、ExoSAP-IT (GE Healthcare UK, Buckinghamshire)

を使用して精製しシーケンス反応のテンプレートとして使用した。シーケンス反応には、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, California) を使用し、ABI 3130xl 全自動シーケンサー (Perkin Elmer/Applied Biosystems, California) で解析した。塩基配列データは、CLC Workbench software (CLC bio, Aarhus) を使って整列させ、塩基データの整合性は MEGA v5 (Tamura et al. 2011) を使って検討した。

検討標本は個体の令期や性、採集地点、採集日、採集者、標本番号、Total DNA 番号. の順に記載した。

III 結果と考察

Family Arctopsychidae アミメシマトビケラ科

1 *Parapsyche* sp. シロフツヤトビケラ属の一種

【検討標本】雌成虫，ヌタノ沢 B 沢，2012-IX-10，司村宜祥，RBK-11248，R539.

【形態】図 1. 頭部は黄色がかかった茶色。頭部の隆起や前胸は暗黄色。前翅の斑紋は、Ulmer (1907) の記載と一致する。

【注釈】本標本が雌個体であること、また日本産のシロフツヤトビケラ属の分類には混乱がみられることから現状では種名の確定ができない。

【遺伝子情報 (CO1)】CTCCGGATAGCTCTAAAAAGAATCA
TTTGAAGACTTAGAATAATTTATGCAATAATCTCAATTGGTCTT
TTAGGATTCGTAGTTTGGAGTCATCATATTTACAGTAGGAATA
GACGTTGACACTCGCGCTATTATACATCTATTACTATAATTATT
GCTATTCCTACAGGAATTAATAATTTTCAGTTGACTTGCTAATTT
AAATGGAACCCCTCTCGTATTTAACCCCTCTATTATGAACCT
TCGGATTCATCTTTTATTTACAATTGGAGGACTAACCGGAATC
ATCTTATCTAATTCTTCTATTGACACTGTCCTTCACGACACCTAT
TATGTAGTTGCTCATTTTCATTATGTCCTATCTATAGGGCAGTA
TTTGCCATCATAGCAGGAATACTTCATTGATACNCCCTATTTTAC
AGGATTAATATTAACAAAAAATACTTATAATTCAATTTTTTTTC
CATATTTTTAGGTGTAATTTAACTTTTTTCCCCAACACTTTC
TCGGCCTTGCTGGTATACCTCGACGTTATTANANTACACAGA

2 *Parapsyche* sp. シロフツヤトビケラ属の一種

【検討標本】幼虫，ヌタノ沢 B 沢岩盤，2011-VII-25，司村宜祥，RBK-11246，R538.

【形態】図 2. 頭部背面には明瞭な斑紋はない。頭部

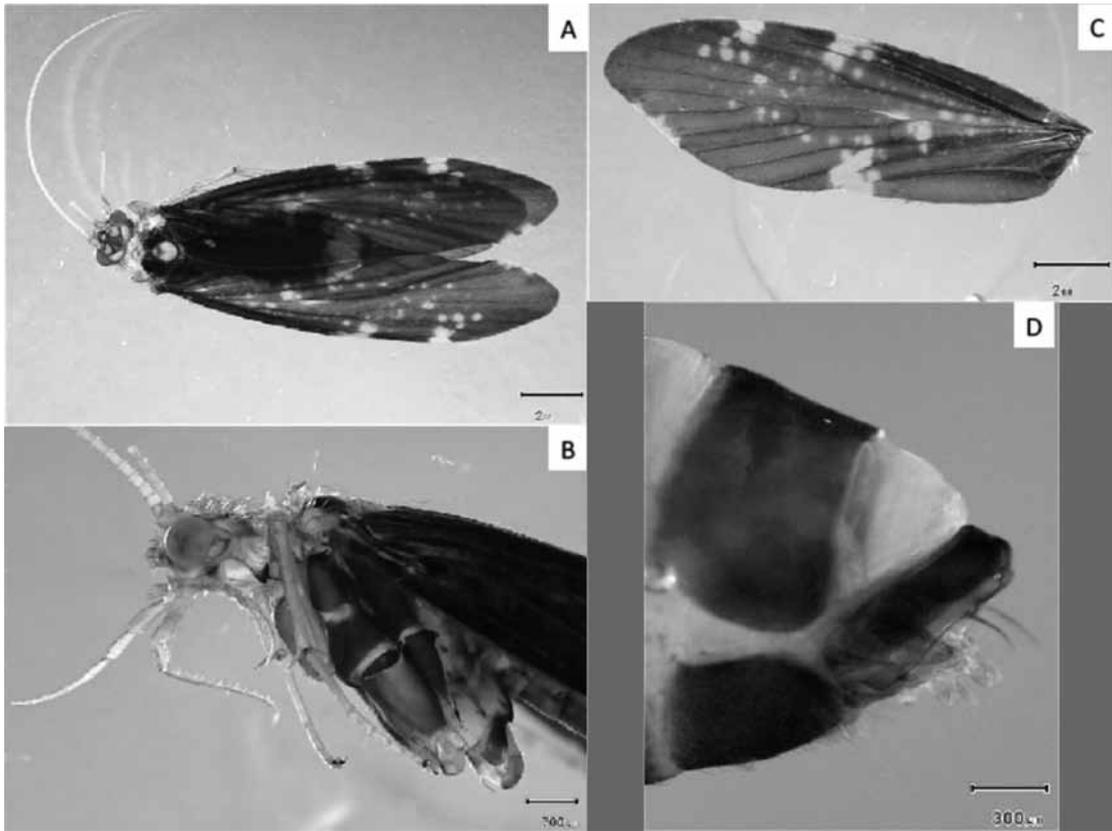


図 1. シロフツヤトビケラ属の一種の成虫 .RBK-11248
A: 雌成虫全形, B: 頭部・胸部側面, C: 前翅, D: 腹部末端

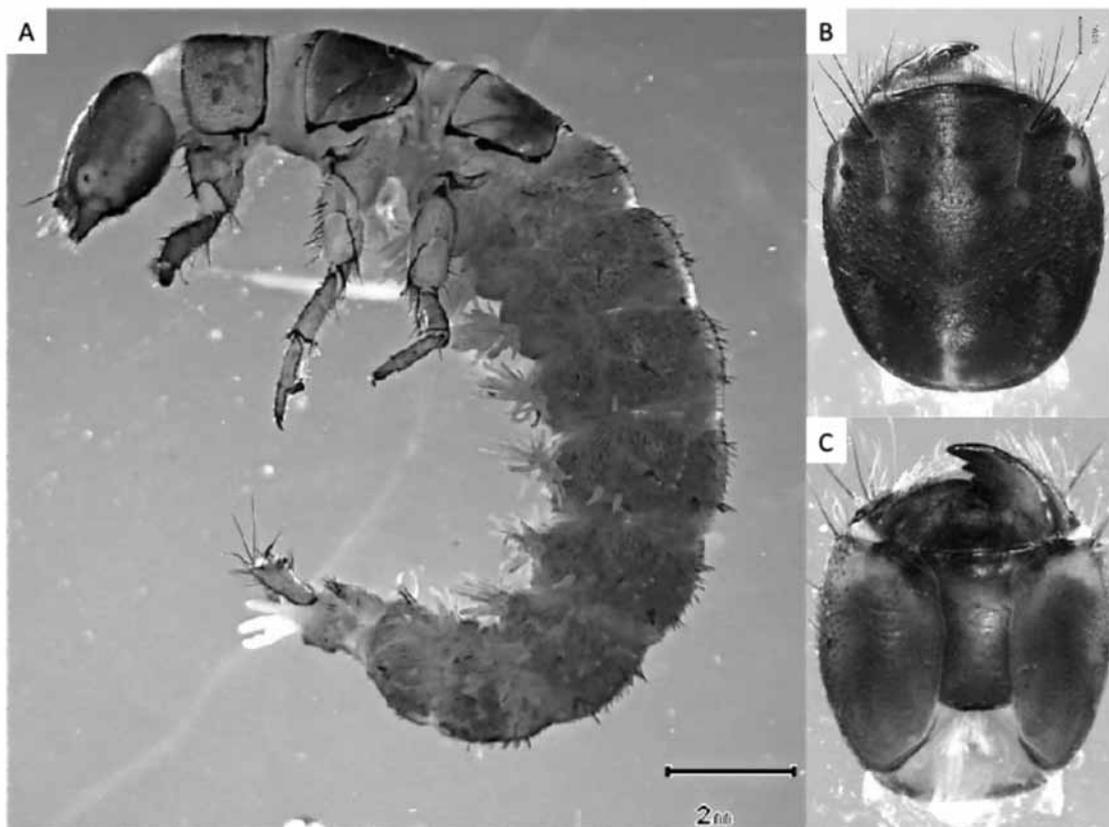


図 2. シロフツヤトビケラ属の一種の幼虫 .RBK-11246
A: 幼虫全形 (側面), B: 頭部背面, C: 頭部腹面 . B・C は同じスケール

背面の咽頭板はほぼ長方形。腹部は櫛状刺毛で被われる。腹部側面の気管鰓はすべて単一棒状。

【注釈】上記の雌成虫個体 (RBK-11248) との C01 遺伝子の相同部分を比較した所、533 塩基中異なるのは 5 塩基であり、99.1% の塩基配列の一致から 2 個体は同一種であると判断することができた。幼虫で遺伝子が解析できた (RBK-11252) もほぼ同じ遺伝子構造であった。

【遺伝子情報 (C01)】

TTGGAAGACTTAGAATAATTTATGCAATAATCTCAATTGGTCTT
TTAGGATTCGTAGTTGAGGTCATCATATATTTACAGTAGGAATA
GACGTTGACACTCGCGCCTATTATACATCTATTACTATAATTATT
GCTATTCTACAGGAATTAATAATTTTCAGTTGACTTGCTAATTTA
AATGGAACCCCTCTCGTATTTAACCCCTCTATTATGAACCTC
GGATTCATCTTTTTATTACAATTGGAGGACTAACTGGAATCATC
TTATCTAATCTCTTATTGACACTGTCCTTCACGACACCTATTAT
GTAGTTGCTCATTTTCATTATGTCCTATCTATGGGGCAGTATTT
GCCATCATAGCAGGAATACTTCATTGATACCCCTATTACAGG
ATTAATATTAACAACAAAAAATACTTATAATTCAATTTTTTCCA
TATTTTTAGGTGTAATTTAACTTTTTCCCAACACTTTCTCG
GTCTTGCTGGTATACCTCGACGTTATTGAGATTACCCAGATTCTT
TTTTATCCTGAAATGTAGTATCTCCCTGGGATCAATAATCTCTA
TTATTAGAATTATAATCCTAATCTATATCATTGAGAAAGAATAA
TTAATAAAAAATTAATTATTTTTACCACTAATACTACCCCATCAA
NGAAGGCTTCATTTACCCCTCC

Family Rhyacophilidae ナガレトビケラ科

3 *Rhyacophila* sp.1. ナガレトビケラ属の一種

【検討標本】幼虫, ヌタノ沢 B 沢, 2011-I-26, 司村宜祥, RBK-11255, R594.

【形態】図 3. 頭部は赤みがかかった茶褐色で顕著な斑紋はない。頭部は細長く (頭長 HL/ 最大幅 HW)=1.52。頭幅の最大幅は後半にある。前脚腿節の内側に顕著な突起があり、その先端には刺毛が生ずる。気管鰓はない。尾肢鉤爪は無歯、副爪はない。

【注釈】典型的な崖湿地の生息種である。湿った岩盤に貼り付くようにしている状態で採集されることが多い。服部 (2005) では、*Rhyacophila* sp. RM? と扱われている。成虫は未知である。他のナガレトビケラ幼虫にはない前脚腿節の内側に顕著な突起があることから、新種群のナガレトビケラである可能性が高い。今後遺伝子情報での成虫との一致が望

まれる。

【遺伝子情報 (16S)】

CGCCTGTTTATCAAAAACATGGCTTTTTGAATATAATTTGAGGTC
TGACCTGCCACTGAGGATTTAAATGGCCGCGGTATTTGACCGT
GCTAAGGTAGCATAATCATTAGTTTTTTAATTGAAAGCTGGAATG
AAGGGTTGGATGAAAAAGGGACTGCTCTTGAATATTTTGAAAGA
ATTTTATTTTTAAGTAAAAAGCTTAAATTTTTTTAAAGACGAG
AAGACCCTATAGAGTTTTATATAAGATAAATATTTATCTTTAAGT
ATTTTTAACTAAGTGTATTTTGTATTTGATTGGGGTACTAAA
AAATTTGTAGAACTTTTTTATTTTAGACCATTATTTATGAAAAA
TTGATCCATAGTTAGTGATTAAGAAAAAATACCTTAGGGAT
AACAGCGTAATTTTTTTAAGAGTTCAAATCGAAAAAAGATT
GCGACCTCGATGTCGGAATAAAGTGANTCATTGGAGTTGTCAGTG
GCAGTTCA

【遺伝子情報に関する注釈】

今回検討したナガレトビケラ科の種に関しては、ミトコンドリア C01 領域での遺伝子検討ができなかった。これは使用したユニバーサルプライマーがあてはまるナガレトビケラの塩基配列に変異があり、プライマーが機能しなかったと推定される。このためナガレトビケラ科ではミトコンドリアの 16S 領域を解析した。ミトコンドリアの 16S も C01 と同様に種間や個体群間において変異が認められる領域で、成虫と幼虫との関係を検討するには有効であると考えられる。

4 *Rhyacophila* sp.2. ナガレトビケラ属の一種

【検討標本】幼虫, ヌタノ沢 A 沢細流, 2012-VII-9, 司村宜祥, RBK-11262, R597.

【形態】図 4. 頭部は黄色がかかった茶褐色で斑紋はない。頭部は細長い (頭長 HL/ 最大幅 HW)=1.83。頭幅は前半と後半ではほとんど変わらない。前脚腿節末端腹面の刺毛は刺状。気管鰓はない。尾肢鉤爪は二歯、末端の一歯は大きい、もう一歯は小さい。尾肢に副爪はない。

【注釈】細流の生息種。服部 (2005) の検索表では、*Rhyacophila shikotsuensis* シコツナガレトビケラに該当する。本種はシコツナガレトビケラである可能性が極めて高いが種名の確定には遺伝子情報での成虫との一致を待ちたい。

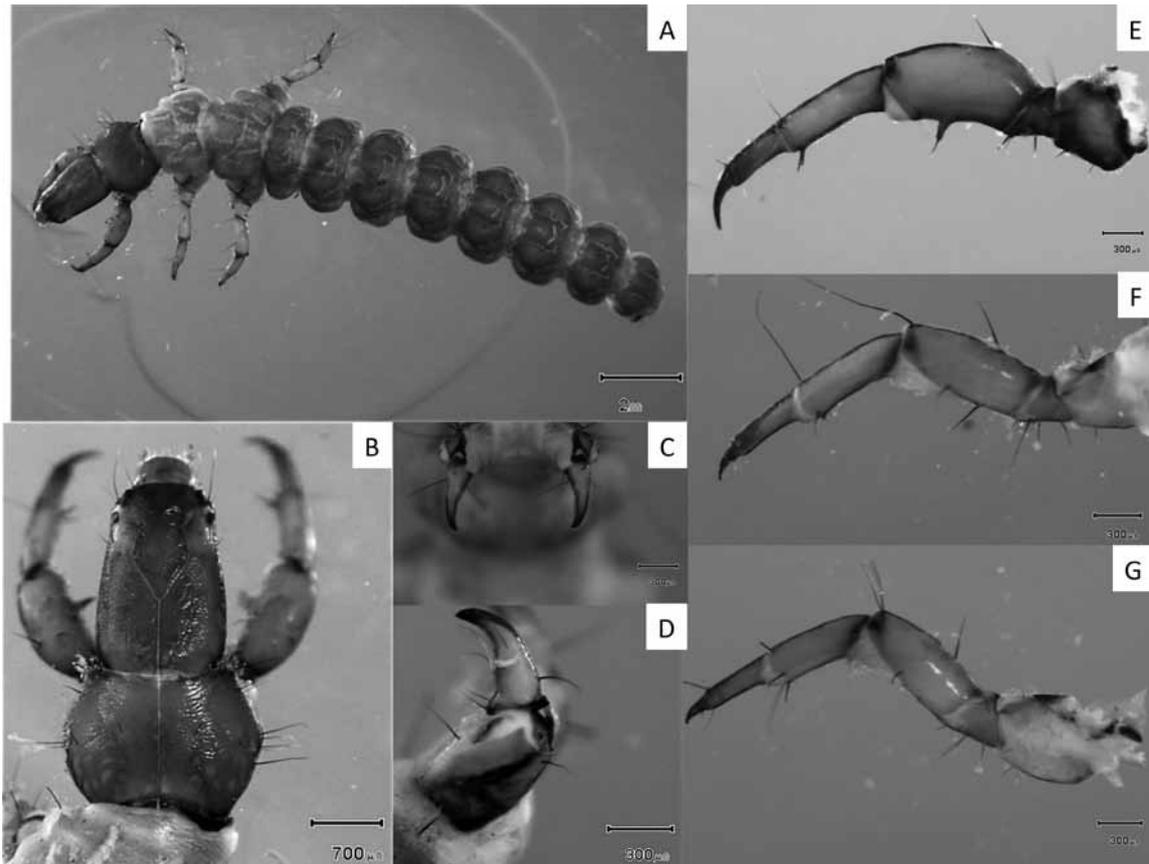


図 3. ナガレトビケラ属の一種の幼虫 (*Rhyacophila* sp.1).RBK-11255

A: 幼虫全形 (背面), B: 頭部・前胸部背面, C: 腹部末端後面, D: 腹部末端尾肢側面, E: 前脚後面, F: 中脚後面, G: 後脚後面

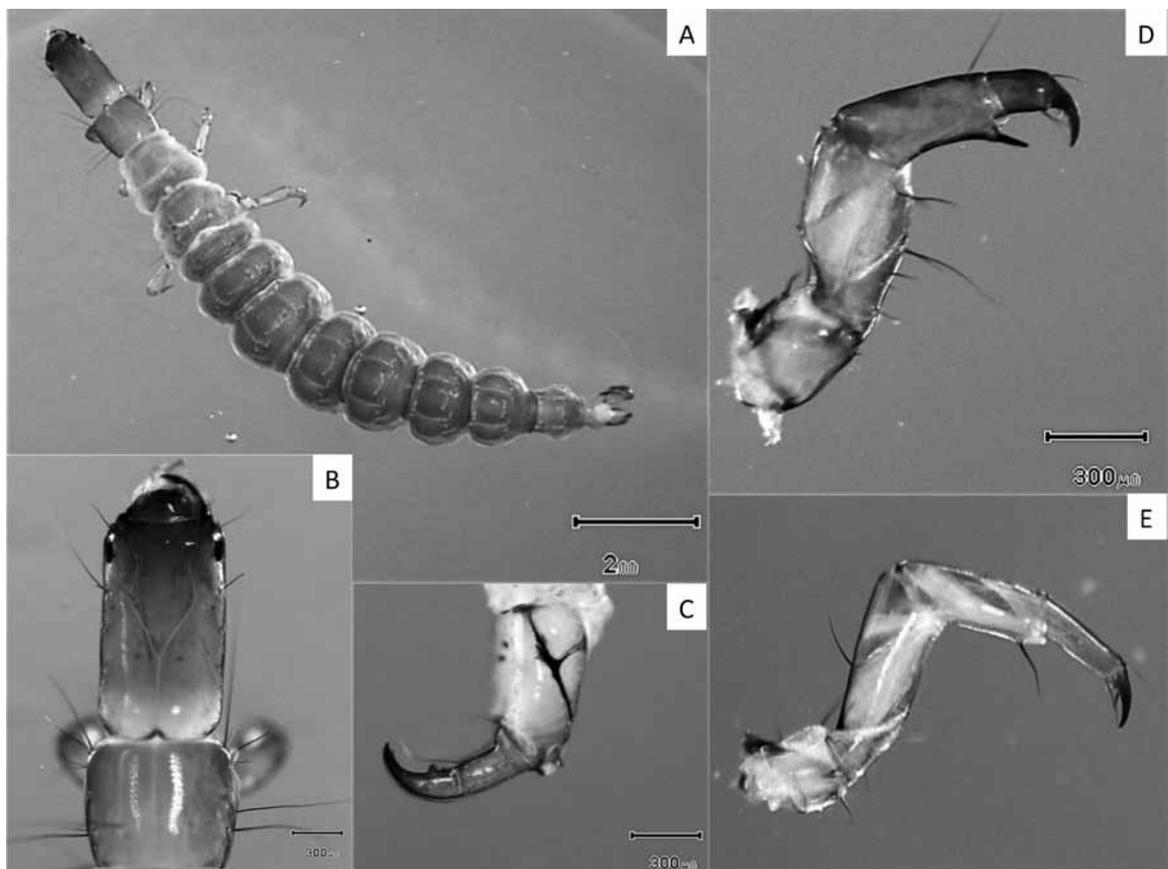


図 4. ナガレトビケラ属の一種の幼虫 (*Rhyacophila* sp.2).RBK-11262

A: 幼虫全形 (背面), B: 頭部・前胸部背面, C: 腹部末端尾肢側面, D: 前脚後面, E: 中脚後面. D・E は同じスケール

【遺伝子情報 (16S)】 AACATGGAGGTGGCAATCTTAAATTT
 CAATAAGAACTTAAAATTTAAATTACGCTGTTATCCCTAAGGTAA
 CTTAATCTATTAATCAGTATTACAGGATCAATAAACTCAAAAATT
 TTTGTTAAATTTTATAAAAAGTTCAATTAATTTTAAATCACCCC
 AATTCAATTAATAAGCTATAAAAATTGTAATCTTATAAACTTA
 AATAATAAGATCTATAGGGTCTTCTCGTCTTTTATAACTATTT
 TAGCTTTTTAACTAAAAAATTAATTTCTATATTATTAATtTGAA
 ACAGTTATTATCTCGTCCAATCATTCCAGTCTTTAATTTAAA
 AGACTATTTATTATGCTACCTTCGCACAGTCAAAATACTGCAGCC
 CTTCAAATTTAATTTAGTGGGAGATTAGACTTAAAATTATTA
 TCAATAAGACATGTTTTTGATAAACAGGCG

5 *Rhyacophila* sp.3. ナガレトビケラ属の一種

【検討標本】 幼虫，ヌタノ沢 B 沢，2012-IX-10，司村宜祥，RBK-11266，R599.

【形態】 図 5. 頭部の地色は、黄色がかった茶褐色であるが頭部前方には顕著な黒色部があり、頭部全体

に複雑な黒い小斑紋がある。頭部は細長くない（頭長 HL/ 最大幅 HW)=1.04、頭幅はほぼ中央で最大幅となる。前・中・後脚の爪の基部には顕著な刺がある。前脚脛節末端後面の刺毛は刺状。気管鰓はない。尾肢鉤爪は二歯。尾肢に副爪はない。尾肢側板の腹面基部は鉤爪状となって突出する。基部キチン板との間は弱くキチン化する。

【注釈】 服部 (2005) の検索表では、*Rhyacophila nakagawai* ナカガワナガレトビケラに該当する。ヌタノ沢では、ナカガワナガレトビケラの成虫がこれまで採集されていないことから種名の確定には遺伝子情報での成虫との一致を待ちたい。

【遺伝子情報 (16S)】

GGTCGCAAACCTTAAATTTTCNTAAGAACTTAAAATTTAAATTACGC
 TGTTATCCCTAAGGTAACCTAATCTAATAATCTATAATATAGGAT
 CAATAACTCAAAAATTTTGTTAATAAAATTCAAAAAGTtTGATAA
 ATTTTTAATCACCCCAATTAATATTTAAAAATTTAATTTATT
 AATAAATTTAAAATTTAAATATAAAGATCTAAGGGTCTTCTCGTC

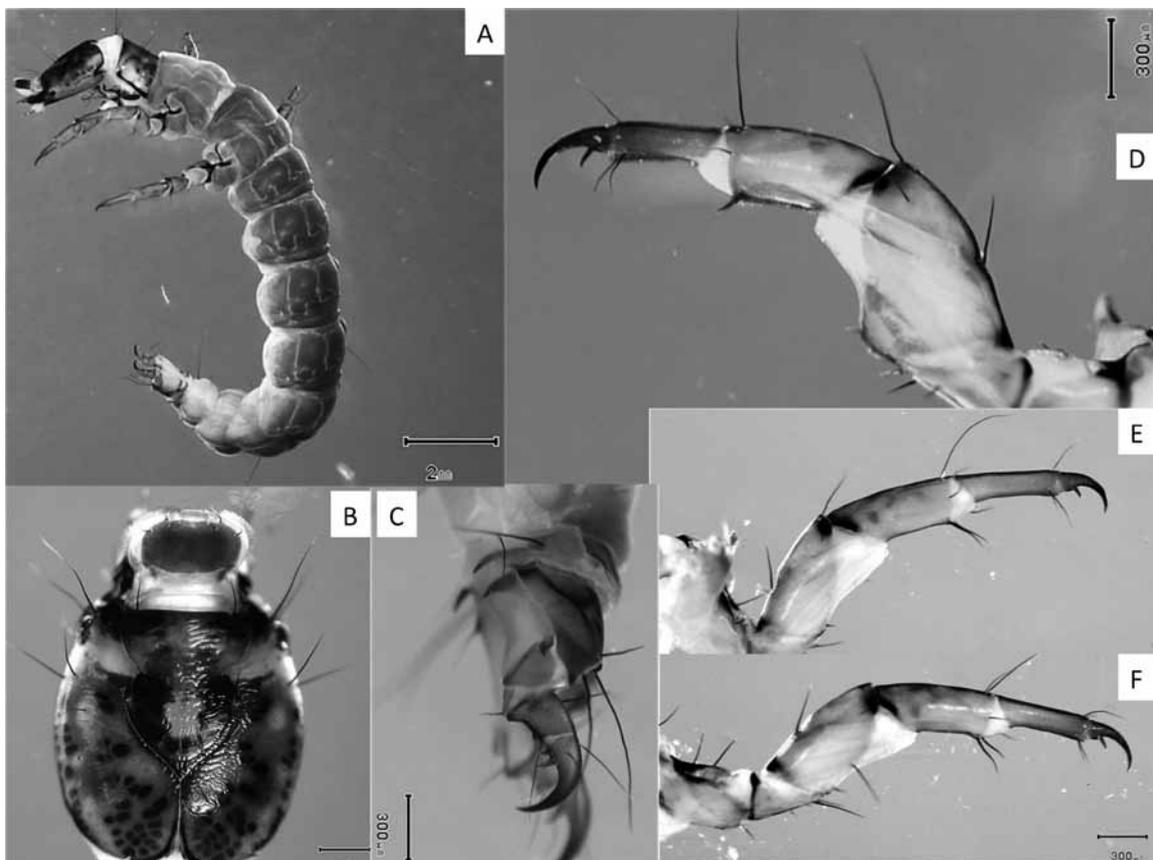


図 5. ナガレトビケラ属の一種の幼虫 (*Rhyacophila* sp.3).RBK-11255

A: 幼虫全形 (斜め背面), B: 頭部背面, C: 腹部末端側面, D: 前脚後面, E: 中脚後面, F: 後脚後面. E・F は同じスケール

TTTTATAAATATTTAAACTTtTTAATTTAAAAATTAATTCATT
 TAAATAAATgTGAGACAGTTTTTATTTTCGTCCAATCATTCAACC
 AGTCTCAATTAAGACTATTTATTATGCTACCTTCGCACAGTC
 AAAATACTGCAGCCCTTTAAATTTAATTTTCAGTGGGCAGATTA
 CTTTAAATTATTAATCAAAAAGACATGTTTTTGATAAA

IV 謝 辞

ヌタノ沢の現地調査では、石綿進一さん、司村宜祥さんに大変お世話になった。アミメシマトビケラ科、ナガレトビケラ科の分類学的な問題に関しては、野崎隆夫さん、服部壽夫さんから助言をいただいた。東城幸治さん、佐土哲也さんには遺伝子解析に関する手法について教示いただいた。自然環境保全センターの元研究連携課課長山根正伸氏、主任研究員内山佳美氏から調査の協力や貴重な情報をいただいた。ここに記して感謝いたします。

本研究の一部は、公益財団法人とうきゅう環境財団 2012 年度多摩川およびその流域の環境浄化に関する調査・試験研究助成金の助成を受けて行われた。

V 引用文献

- 服部壽夫．（2005）ナガレトビケラ科． 415-437．
 日本産水生昆虫 科・属・種への検索。川合禎次・谷田一三（共編）1342pp, 東海大学出版会, 神奈川。
- Johanson, K, A. (2007). Association and description of males, females and larvae of two New Caledonian *Xanthochorema* species (Trichoptera: Hydrobiosidae) based on mitochondrial 16S and COI sequences. *Entomological Science*. 10: 179-199.
- Tamura, K, Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetic analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28:2731-2739.
- 谷田一三．（2005）アミメシマトビケラ科． 478-481． 日本産水生昆虫 科・属・種への検索。川合禎次・谷田一三（共編）1342pp, 東海大学出版会, 神奈川。
- Ulmer, G. (1907) Trichopteren. Part.1. Collection of Zoologiques de Baron edm, de Selys Longchamps, Fasc, 6, 1-102.

