

論文要旨

論文題目 琉球列島における蚊の種同定のための DNA バーコーディング

氏名 平良勝也

要旨

琉球列島の主要な 9 島で医学上重要な *Anopheles* 属 6 種, *Aedes* 属 14 種および *Culex* 属 17 種, 合計 37 種 (亜種を含む) 228 個体の蚊を採集し, 各種蚊のミトコンドリア DNA チトクロームオキシダーゼ I (COI) 遺伝子のバーコード領域が、蚊の種同定に有効であるかを調べた。全ての個体の COI 遺伝子 (658bp) の塩基配列が決定し, 配列間における Kimura2 パラメータ (K2P) モデルを用いた遺伝的距離計算および近隣結合法 (NJ) 法による系統解析を行った。その結果, K2P を用いて計算した種内変異率は 35 種で 2%以下を示し, *Aedes aureostriatus okinawanus* Bohart と *Culex hayashii ryukyuanus* Tanaka et al. の 2 種で 2%以上を示した。また, この 2 種は, それぞれ異なる島間で遺伝的距離に違いがあることが明らかになった。調査した 37 種のすべての蚊は, NJ 法による系統樹解析により異なるクラスターを形成し, それぞれの種が区別された。この結果から, 蚊の COI 遺伝子のバーコード領域は, 種同定に対して有効であることが明らかになった

Abstract

T i t l e DNA barcoding for identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the Ryukyu Archipelago, Japan

N a m e Katsuya Taira

Abstract

The utility of cytochrome c oxidase subunit I (COI) DNA barcoding for the identification of 37 mosquito species belonging to the genera *Anopheles* (6 spp.), *Aedes* (14 spp.) and *Culex* (17 spp.) including subspecies from nine islands of the Ryukyu Archipelago, Japan was examined. A 658bp fragment of the COI gene was sequenced from 228 specimens. Nucleotide sequence divergences were calculated using the Kimura-two parameter (K2P) distance model and a neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree analysis was performed to provide a graphic display of the patterns in divergence among species. The mean intraspecific variations of 35 species including the medically important vector species showed a less than 2% range with 0 – 1.5% divergences, but higher divergences of more than 2% were detected in *Ae. aureostriatus okinawanus* Bohart (2.2%) and *Cx. hayashii ryukyuanus* Tanaka et al. (3.3%). They showed differences in divergence between specimens from different islands. All 37 species were discriminated as distinct clusters in the NJ tree. The results in this study prove the utility of DNA barcoding for identification of mosquitoes from the Ryukyu Archipelago, Japan.

(様式第5-2号)

平成25年 1月 29日

琉球大学大学院

保健学研究科後期課程委員会 殿

論文審査委員

主査 氏 名 垣花 シゲ

副査 氏 名 渡部 久実

副査 氏 名 津田 良夫



学位（博士）論文審査及び最終試験の終了報告書

学位（博士）の申請に対し、学位論文の審査及び最終試験を終了したので、下記のとおり報告します。

記

申請者	専攻名 保健学	氏名 平良 勝也	学籍番号 108852B
指導教員名	當間孝子		
成績評価	学位論文	合格	不合格
		最終試験	合格
			不合格
論文題目	DNA barcoding for identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the Ryukyu Archipelago, Japan		
1. 研究の背景と目的			
<p>蚊は、世界において 3,000 種類を超えて分類されている。日本では 112 種類（亜種を含む）の蚊が報告されており、このうち琉球列島には 77 種類（63%）が生息している。蚊の分類同定は、一般的に形態学的特徴に基づき行われるが、高い専門的な知識が必要とされる上、形態が損傷すると分類同定が困難となる。最近、様々な DNA の遺伝子配列を用いた分類も行われるようになり、その一つとして“DNA バーコーディング”が注目されている。DNA バーコーディングは、ミトコンドリア DNA チトクロームオキシダーゼ I (COI) 遺伝子の塩基配列 (658bp) を利用した種を同定する技術の一つであり、近年多くの動物を種レベルで識別できることが報告されている (Hebert et al., 2003)。しかし、蚊においてはカナダ (Cywinska et al., 2006) やインド (Kumar et al., 2006) の報告があるのみで、国内の報告はない。本研究では、琉球列島に生息する蚊について DNA バーコーディングが種の同定に有用であるか検討したものである。</p>			

2. 研究内容

1996～2012年に琉球列島の主要な9島（奄美大島、徳之島、沖縄本島、久米島、南大東島、宮古島、石垣島、西表島、与那国島）で採集された医学上重要な *Anopheles* 属6種、*Aedes* 属14種および *Culex* 属17種、合計37種（亜種を含む）228個体の蚊について、各種蚊のCOI遺伝子のバーコード領域が、蚊の種同定に有効であるかを調べた。全ての個体のCOI遺伝子の塩基配列（658bp）が決定され、配列間におけるKimura2パラメータ（K2P）モデルを用いて遺伝的距離を計算し、近隣結合法（NJ）法による系統解析を行った。その結果、K2Pを用いて計算した種内変異率は35種で2%以下を示し、*Aedes aureostriatus okinawanus* Bohart と *Culex hayashii ryukyuanus* Tanaka et al.の2種で2%以上を示した。また、この2種は、それぞれ異なる島間で遺伝的距離に違いがあることが明らかになった。分析した37種のすべての蚊は、NJ法による系統樹解析により異なるクラスターを形成し、それぞれの種が区別された。このように、DNAバーコーディングは形態分類と符合し、医学上重要なベクター種も正確に識別することができた。この結果から、今回用いた琉球列島産蚊のCOI遺伝子のバーコード領域は、種同定に対して有効であることが明らかになった。また、本研究で得られたDNAの塩基配列情報は全てGenBankに登録されており、DNAデータベースとして利用可能となった。

3. 研究成果の意義と学術水準

本研究は近年、医学・生物学の研究分野において広く用いられるようになった分子生物学的手法であるDNAシーケンス解析により、ミトコンドリアDNAのCOI遺伝子のバーコード領域が、琉球列島の蚊の種同定に有用であることを明らかにした。これまで、DNAを用いた蚊の分類学的な研究報告はあるが、近縁種や形態分類が困難な種類に限られていた。しかし、本研究のように、全ての動物が共通して持っているミトコンドリアDNAのCOI遺伝子を用い、多くの蚊について横断的に種同定を行う研究は世界でも極めて少なく、国内では今回が初めての報告となる。また、琉球列島の島々の各個体間において、遺伝子レベルで比較した研究報告はこれまでに例がなく、大変貴重なデータである。今回得られたDNA情報はすべてGenBankに登録され、DNAデータベースとしてWeb上での照合や系統樹解析のための利用が可能になった。これにより、構築したDNAデータベースは、形態分類と合わせて使用することで蚊の種同定をより確実にするための強力なツールになることが期待される。特に、形態の破損により同定が困難な場合は有用である。また、蚊媒介感染症が流行した場合、ベクター種が正確に同定できれば、その生態情報（繁殖場所、飛翔距離、休息場所、薬剤耐性）を得ることができ、具体的な対策や迅速な対応に役立つと考えられる。したがって、本研究は蚊媒介感染症対策にとって極めて重要な研究である。よって、これらの研究成果の学術的な水準は極めて高い。

以上の結果から、平良勝也氏から学位申請された本論文は学位授与に十分に値するものであると判断した。