

農業環境技術研究所・標本シリーズ5：昆虫・クモ類のDNAバーコーディングに  
関連する標本コレクションおよびデータベースの構築

NIAES Collection Series 5: Construction of Specimen Collections and Databases  
for DNA Barcoding of Insects and Spiders

吉武 啓\*・馬場友希\*・栗原 隆\*・吉松慎一\*・中谷至伸\*

Hiraku Yoshitake, Yuki Baba, Takashi Kurihara, Shin-ichi Yoshimatsu and Yukinobu Nakatani

1. はじめに

近年の動物分類研究においては、形態および分子、生態、分布情報に基づく複合的アプローチによって信頼性の高い結論を導き出し、分類体系を構築することが強く求められるようになった。とくに、分子情報は、その有無によって研究の質が評価されるという点で、今や形態情報に並ぶ最重要項目になったと言っても過言ではない。分子情報の中でも、生物名を特定する際に役立つ簡便なマーカーとして、DNA バーコード（ミトコンドリア COI 遺伝子前半部）およびそれに基づく生物同定手法である DNA バーコーディングが大変注目されている (Hebert *et al.*, 2003 ; 伊藤ら, 2007)。DNA バーコードは、一義的には生物同定に資する短い塩基配列に過ぎないが、ATGC という 4 文字のみで構成される情報の単純さや、一对のユニバーサルプライマーによって簡単かつ安価に生産される情報を専門的知識なしでも扱える利便性の高さから、次世代の生物多様性情報システムにおいては、多様な生物情報を引き出す際のキーワードとしての役割を果たすようになって考えられており、国内外で盛んに関連研究やプロジェクトが進められている (神保ら, 2008 ; 前藤, 2009)。が進められている (神保ら, 2008 ; 前藤, 2009)。DNA バーコードに基づくデータシステムの構築には、正確に同定された標本から決定された DNA バーコードを網羅的に集積し、情報の質と量を兼ね備えたデータベースが必要不可欠な基盤となるが、農業生態系の重要な構成要素である昆虫・クモ類を対象とする DNA バーコードデータベースの構築は未だ開始されたばかりで、関連研究も甚だ不十分と言わざるを得ないのが現状である。このような背景から、農業環境技術研究所・昆虫標本館（以下、農環研）は、総合的な昆虫インベントリーシステムを構築する中で、昆虫類とクモ類の DNA バーコーディングに関連する標本コレクションとデータベース作成に 2009 年から重点的に取り組んでいる。本稿では、我々の取り組みの概要を説明した上で、今後の標本のコレクション管理とその利活用の展望について述べたい。

---

\*農業環境インベントリーセンター  
Natural Resources Inventory Center  
インベントリー, 第 8 号, p44-47 (2010)

標本番号	和名	属名	種名	命名者名	記載年	ステージ	採集国	採集地1	採集地2	採集年月日	採集者	寄主植物
NIAES-CURC0000530	クロホシクチフトゾウムシ	<i>Pelenomus</i>	<i>canaliculatus</i>	Fuhrhaus	1843	adult	Japan	Honshu, Ibaraki	Kasumigaura Kamo	4.VI.2009	T. Kurihara & H. Yoshitake	オオフサモ
NIAES-CURC0000531	クロホシクチフトゾウムシ	<i>Pelenomus</i>	<i>canaliculatus</i>	Fuhrhaus	1843	adult	Japan	Honshu, Ibaraki	Kasumigaura Kamo	4.VI.2009	T. Kurihara & H. Yoshitake	オオフサモ
NIAES-CURC0000532	クロホシクチフトゾウムシ	<i>Pelenomus</i>	<i>canaliculatus</i>	Fuhrhaus	1843	adult	Japan	Honshu, Ibaraki	Kasumigaura Kamo	4.VI.2009	T. Kurihara & H. Yoshitake	オオフサモ
NIAES-CURC0000533	クロホシクチフトゾウムシ	<i>Pelenomus</i>	<i>canaliculatus</i>	Fuhrhaus	1843	adult	Japan	Honshu, Ibaraki	Kasumigaura Kamo	4.VI.2009	T. Kurihara & H. Yoshitake	オオフサモ
NIAES-CURC0000534	クロホシクチフトゾウムシ	<i>Pelenomus</i>	<i>canaliculatus</i>	Fuhrhaus	1843	adult	Japan	Honshu, Ibaraki	Kasumigaura Kamo	4.VI.2009	T. Kurihara & H. Yoshitake	オオフサモ
NIAES-CURC0000543	クロホシクチフトゾウムシ	<i>Pelenomus</i>	<i>canaliculatus</i>	Fuhrhaus	1843	adult	Japan	Honshu, Ibaraki	Iinashi, Utsunomiya	6.IX.2009	H. Yoshitake	オオフサモ
NIAES-CURC0000544	クロホシクチフトゾウムシ	<i>Pelenomus</i>	<i>canaliculatus</i>	Fuhrhaus	1843	adult	Japan	Honshu, Ibaraki	Iinashi, Utsunomiya	6.IX.2009	H. Yoshitake	オオフサモ
NIAES-CURC0000545	クロホシクチフトゾウムシ	<i>Pelenomus</i>	<i>canaliculatus</i>	Fuhrhaus	1843	adult	Japan	Honshu, Ibaraki	Iinashi, Utsunomiya	6.IX.2009	H. Yoshitake	オオフサモ
NIAES-CURC0000546	クロホシクチフトゾウムシ	<i>Pelenomus</i>	<i>canaliculatus</i>	Fuhrhaus	1843	adult	Japan	Honshu, Ibaraki	Iinashi, Utsunomiya	6.IX.2009	H. Yoshitake	オオフサモ
NIAES-CURC0000547	クロホシクチフトゾウムシ	<i>Pelenomus</i>	<i>canaliculatus</i>	Fuhrhaus	1843	adult	Japan	Honshu, Ibaraki	Iinashi, Utsunomiya	6.IX.2009	H. Yoshitake	オオフサモ
NIAES-CURC0000555	クロホシクチフトゾウムシ	<i>Pelenomus</i>	<i>canaliculatus</i>	Fuhrhaus	1843	adult	Japan	Honshu, Ibaraki	Tsachara, Otsuonuma	16.VIII.2009	H. Yoshitake	オオフサモ
NIAES-CURC0000550	クロホシクチフトゾウムシ	<i>Pelenomus</i>	<i>canaliculatus</i>	Fuhrhaus	1843	adult	Japan	Honshu, Ibaraki	Tsachara, Otsuonuma	16.VIII.2009	H. Yoshitake	オオフサモ

図1 DNA分析用標本データベースの一部

## 2. 標本コレクションとデータベースの概要

現在、農環研では、1) DNA分析用標本の収集・データベース化、2) 抽出DNAおよび証拠標本コレクションの構築・データベース化、3) DNAバーコード領域の塩基配列決定・データベース化、4) DNAバーコードデータを用いたケーススタディーの実施に取り組んでいる。ここでいうDNA分析用標本とは99%エタノール液浸標本のことである。これまでに主として農地に生息する昆虫・クモ類の99%エタノール液浸標本約2,500点を収集し、1点ずつ固有の標本番号を付け、正確な種名を特定した上で分類群情報や採集情報などの標本情報をデータベース化した(図1)。なお、その内訳はコウチュウ類1,000点、クモ類1,400点、ガ類70点、カメムシ類21点である。DNA分析用標本は、基本的に個別にサンプル管に収めた上でサンプルボックスに収納し、-30℃設定のフリーザー内で保管している(図2)。2009年は、そのうち328点のDNAを抽出し、DNA量や吸光度比など、抽出DNAのクオリティーに関するデータを計測した上で、標準的なDNAバーコード領域(COI遺伝子前半部)の塩基配列を決定し、抽出DNA情報のデータベース化とDNAバーコード領域の塩基配列情報データベース化を行った(図3)。抽出DNA情報DNA分析用標本番号に対応した作業番号によって個々の標本情報とリンクさせた上で、抽出DNAコレクションとして-30℃設定のフリーザー内で保管している。個々のDNAバーコード情報についても標本情報と対応させる形でデータベース化している。なお、バーコード化が済んだDNA分析用標本は、将来的に塩基配列情報に結び付いた種名に疑問が生じた場合の検証可能性を担保するために「種同定の証拠標本」という位置づけで恒久的に保管されることになる。



図2 標本の保管状況

また、バーコード化と並行して、甲虫類やクモ類のDNAバーコードデータを用いたケーススタディーを行い、インベントリー研究におけるその有用性を検証している。例えば、北関東の平野部に生息するハエトリグモ類は、未成熟期の形態的特徴が不明であるために同定できず、調査・研究時に大きな障壁となっていた。しかし、DNAバーコーディングによる成体-幼体の対応付けに成功し、一部の種の未成熟期の形態的特徴が明らかになったことで、形態情報に基づく幼体の同定が可能になった(馬場ら、未発表;図4)。

標本番号	作業番号	検体量: μl	OD 260nm (核酸)	OD 280nm (タンパク質)	λ=260/2-280	λ=260/2-230	OD 230nm (多糖類)
NIAES-CURC0000530	Pe1	14.65	0.293	0.14	2.09	0.95	0.307
NIAES-CURC0000531	Pe2	26.61	0.532	0.236	2.26	1.29	0.413
NIAES-CURC0000532	Pe3	27.34	0.547	0.254	2.15	1.09	0.503
NIAES-CURC0000533	Pe4	28.23	0.565	0.243	2.32	1.18	0.48
NIAES-CURC0000534	Pe5	55.18	1.104	0.509	2.17	1.52	0.728
NIAES-CURC0000543	Pe6	36.98	0.74	0.349	2.12	1.21	0.611
NIAES-CURC0000544	Pe7	37.55	0.751	0.346	2.17	1.26	0.594
NIAES-CURC0000545	Pe8	27.78	0.556	0.267	2.08	1.19	0.468
NIAES-CURC0000546	Pe9	25.83	0.517	0.251	2.06	1.18	0.437
NIAES-CURC0000547	Pe10	29.52	0.59	0.263	2.24	1.22	0.482
NIAES-CURC0000555	Pe11	50.32	1.006	0.456	2.21	1.42	0.708
NIAES-CURC0000556	Pe12	48.31	0.966	0.451	2.14	1.25	0.771

図3. 抽出DNAデータベースの一部

### 3. 今後のコレクション管理と関連情報の利活用について

膨大な種数を誇る昆虫・クモ類について、全分類群の DNA バーコードデータベース構築を一機関でカバーすることは到底不可能であるため、他機関との連携において分散型のデータベースシステムを形成するのが現実的である。農環研では、多くの農林業害虫が含まれる植食性甲虫やガ類、カメムシ類、農業に有用な生物多様性指標候補種が多数含まれるオサムシ科甲虫やクモ類など、農業環境研究分野における重要性が高い分類群を対象を絞ってデータベースの構築に取り組んでゆく方針である。DNA バーコードデータベース構築の基盤となる DNA 分析用標本コレクションについては、まだその内容が不十分であるため、今後も DNA 分析用標本の収集を継続し、コレクション内容の拡充を図る必要がある。また、標本収集と並行して、同定を進め、データベース化が済んだ標本から順次 DNA を抽出し、そのクオリティーデータを取得した上で、バーコード化を進めて行く予定である。その一方、DNA 分析用標本情報および抽出 DNA 情報、塩基配列情報の登録・検索・閲覧に関わるフレームと機能を、農環研で構築中の昆虫インベントリーシステム（所蔵標本情報を主体とするデータベースシステム）に付与するために鋭意作業を進めており、2010 年度末までに既存のデータの登録を済ませ、一般の昆虫標本情報と共に一般に公開する予定である。

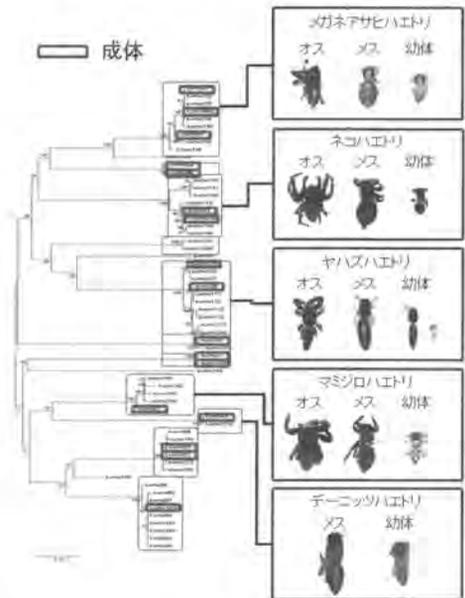


図4 DNA バーコーディングによるハエトリグモ類の成体-幼体の対応付け

なお、DNA 分析用標本や抽出 DNA は、主として形態観察に供される一般昆虫標本（乾燥標本やプレパラート標本など）と異なり、使用するに従ってなくなる消耗型試料であるため、基本的に外部への貸与はせず、農環研の研究職員やその共同研究者らの使用に留める必要があると考えている。ただし、農環研の標本コレクションに含まれない昆虫・クモ種の DNA 分析用標本や抽出 DNA との交換など、コレクション内容の拡充に資する場合には外部の研究者・標本保管機関とのやり取りにも柔軟に対応したい。また、DNA 分析関連の標本コレクションの保管体制が整った機関は日本国内ではごく少数であるため、他機関で実施された分子生物学的研究（DNA バーコーディング関連研究に限定しない）に使用された証拠標本や抽出 DNA もニーズに応じて受け入れて保管する必要があると考えている。DNA バーコードなどの塩基配列情報については、個々の研究者の未発表業績に抵触するケ

ースが想定されるため、その取扱いには十分に配慮するつもりである。

農環研の昆虫インベントリーシステムでは、昆虫標本館所蔵の DNA 分析用標本情報および抽出 DNA 情報、そして、そこから派生した塩基配列情報と証拠標本情報に関わる情報サービスを提供する。

一方、国際的な DNA バーコーディングプロジェクトを推進している Consortium for the Barcode of Life (CBOL; <http://www.barcoding.si.edu/>)と国内の DNA バーコーディング関連活動を推進している日本バーコードオブライフ・イニシアティブ(JBOLI; <http://www.jboli.org/>)では、プロジェクトの管理・データベース管理・登録を司るシステムおよび DNA バーコードに基づくオンライン同定支援システム、他のシステムへのデータ提供などを司るシステムをそれぞれ英語(BOLD; <http://www.boldsystems.org/views/login.php>)と日本語(JBOLI-DS)で提供している。中でも、DNA バーコードに基づくオンライン同定支援システムは、未同定の生物試料から決定した DNA バーコードを入力することにより、既存のデータベース内で最も類似した配列を示す種名とその分類群情報を知ることができるもので、DNA バーコーディング関連データシステムの中核として極めて重要である。したがって、農環研で集積された DNA バーコードデータの利活用を促進するためには、DNA バーコーディングに関連する高次データシステムを有するこれらの組織との連携を図る必要がある。

「DNA 分析用標本コレクションー抽出 DNA コレクションーDNA 情報の証拠標本コレクションーDNA バーコードデータベース」ラインは、将来的に農業生物資源管理上のコアとして発展する可能性が高いため、非常に重要な取り組みであると考えている。また、昆虫・クモ類の DNA バーコードデータベースを充実させ、様々な解析ツールを伴う高次のデータシステムとの連携を図ることで、将来的に遺伝子を含む様々なレベルでの農業生態系における生物多様性解析手法・技術の開発が可能になると期待される。

## 引用文献

- 1)Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & DeWaard, J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society London B*, 270, 313–321.
- 2)伊藤元己・神保宇嗣・吉武 啓 (2007) DNA バーコーディングー新たな生物多様性研究手法. *生物の科学 遺伝* (61): 42-47.
- 3)神保宇嗣・吉武 啓・伊藤元己 (2008) DNA バーコーディングによる同定支援システムと JBOLI 構想. *日本生態学会誌* 58: 123-130.
- 4)前藤薫, 2009. 昆虫の検索・同定と情報集積のための新しいツール. *昆虫と自然*, 44 (3): 2-3.

## 問い合わせ先

農業環境インベントリーセンター 吉武 啓

電話：029-838-8348, E-mail：zoumushi@niaes.affrc.go.jp