

日本産蚊の分子生物学的種同定のための DNAバーコードの整備

前川芳秀* 小川浩平 駒形修 津田良夫 沢辺京子

国立感染症研究所昆虫医科学部（〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1）

(受領：2016年4月22日；登載決定：2016年8月21日)

DNA barcoding for molecular identification of Japanese mosquitoes

Yoshihide MAEKAWA*, Kohei OGAWA, Osamu KOMAGATA, Yoshio TSUDA and Kyoko SAWABE

*Corresponding author: maekawa@niid.go.jp

Department of Medical Entomology, National Institute of Infectious Disease,
1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

(Received: 22 April 2016; Accepted: 21 August 2016)

Abstract: A total of 512 mosquito specimens, collected in 2013 and 2014 from 18 study sites from Hokkaido to Kagoshima, Japan, were analyzed for DNA barcoding based on the nucleotide sequence of cytochrome c oxidase subunit I (COI) region, following which the gene sequences of 240 mosquitoes from 45 species in 11 genera were registered in GenBank. *Aedes* mosquitoes with black legs that belong to the *punctor*-subgroup, such as *Ae. punctor* and *Ae. communis*, found in northern Japan, were difficult to identify morphologically, but the specimens separated into two genetically distinct populations by COI gene sequence analysis. Morphological differences between the two populations were examined and the presence of postprocoxal scales was suggested as a key characteristic for identifying female specimens. The intraspecific divergence of nucleotide sequence was examined using Kimura two-parameter distance model for each species; 44 species showed an average sequence divergence at less than 2%, except for *Anopheles lindesayi japonicus*. Intraspecific variation in nucleotide sequence and neighbor-joining phylogenetic analyses indicated the existence of genetically heterogeneous populations in the following Japanese mosquito species: *An. lindesayi japonicus*, *Culex rubensis*, *Cx. hayashii hayashii*, *Cx. kyotoensis*, *Ae. esoensis*, and *Toxorhynchites towadensis*.

Key words: DNA barcoding, COI, molecular identification, nucleotide sequence divergence, Japanese mosquitoes

緒 言

我が国の広域を対象とした蚊相調査ならびに形態学的分類に関する研究は、Bohart and Ingram (1946) そして LaCasse and Yamaguti (1950) に始まり、琉球列島を含めたすべての日本産蚊に関する分類学的再検討は Tanaka et al. (1979) と Toma and Miyagi (1986) によって行われている。これらの研究以降、新たに発見・記録された種類を加えると、我が国には現時点で亜種を含めて 122 種が報告 (Taira et al., 2012) されており、いくつかの例外を除いて、日本産蚊はすべて成虫あるいは幼虫・蛹の形態的な特徴によって同定する事が可能とされている (田中, 2005)。

従来、昆虫類の形態分類においては、雄個体の外部生殖器の形態的特徴が重要とされているが、蚊の場合には吸血被害や蚊によって媒介される疾病的疫学的調査において問題とされ、採集されるのは雌成虫であり、そのため雌成虫の形態的特徴に基づいた種類同定が実際的で広く行われている。ところが日本産蚊の中には、雌成虫の形態では種同定が難しいとされるいくつかのグループが知られている (Tanaka et al., 1979): 例えばシナハマダラカ群 *Anopheles sinensis* group, クシヒゲカ亜属 *Culex* Subgenus *Culiciomyia*, アカイエカ群 *Cx. pipiens* gr., 北方系ヤブカ (特に *Aedes punctor*-subgroup に

属するチシマヤブカ *Ae. punctor* (Kirby) とトカラチヤブカ *Ae. communis* (De Geer)). これらのグループの中で、シナハマダラカ群と近縁の東南アジアの種類を含めた *An. hyrcanus* gr. に関しては分類学的な検討課題が残されており、分子生物学的な手法を用いた分類学的再検討が行われている (Gao et al., 2004; Hwang et al., 2004; Paredes-Esquivel et al., 2011; Wijit et al., 2013). また、雌個体を対象とした我が国のアカイエカ群の種同定に関しても、分子生物学的な手法が開発され、実際の調査でも用いられている (Kasai et al., 2008; 吉田ら, 2011; Ohashi et al., 2014).

雌成虫による種類同定が可能な種類であっても、実際に野外で採集された個体には、経日により鱗片や剛毛が欠落した個体、捕集器や捕虫網による採集の際に脚や翅の一部を欠くなどの損傷を受けた個体など、種同定を行う上で重要な部位が失われた個体が得られることは少なくない。例えば、2001 年から 2005 年に成田空港検疫所が実施した国際線航空機の機内調査では、航空機 26 機から 28 個体の蚊が採集されたが、その 46% に相当する 13 個体は損傷のために同定できなかつたと報告されている (長谷山ら, 2007). また、蚊媒介性病原体の感染サイクルの解明を目的として採集されたサンプルなどでは、特に病原体が検出されたサンプルの場合、どれほど損傷の激しい個体であってもその種類を確定することが必

要になる。このような場合を考慮して、分子生物学的手法によって蚊の種類を特定するための方法がいくつかの日本産蚊のグループに対して研究されている (Toma et al., 2000; Kasai et al., 2008; Higa et al., 2010)。

近年、分子生物学的研究の発達により生物の持つ特有のDNA情報に基づいて種同定を行う技術が開発・提唱され、種類が分からぬ個体に関して特定の遺伝子領域の塩基配列を調べ、既知の生物の遺伝子配列と照合して種を同定する事例が増えてきた。このような目的で生物の遺伝子情報を明らかにする作業はDNAバーコーディングと呼ばれ、そのための遺伝子領域としてミトコンドリアのチトクロムC酸化酵素サブユニットI (COI) 遺伝子を用いる方法が普及している (Folmer et al., 1994; Hebert et al., 2003)。この方法は、蚊の種同定にも応用でき、同胞種 (sibling species) や亜種、形態的種同定が難しい種、損傷の激しいサンプルの種同定に対しても有用である事が報告されている (Cywinski et al., 2006; Kumar et al., 2007; Taira et al., 2012)。日本産蚊のDNAバーコーディングによる種同定法の検討とCOI遺伝子情報は、琉球列島の島々に分布する3属37種 (Taira et al., 2012)、本州の4属13種 (Kuwata et al., 2012) について報告されているが、これは日本産蚊の半数に満たない。DNAバーコーディングによる種同定法は、形態学的種同定法と比べて特別な専門的知識を必要とせず汎用性が高く、さらに近縁種や未知の生物種なども特定できるという利点があるため、将来重要な種同定方法と考えられ、種々の生物群でCOI遺伝子情報の整備が急務となっている。

そこで本研究では、2013年と2014年に実施した日本産蚊の蚊相と分布調査 (前川ら, 2016) で得られた標本を用いてCOI遺伝子情報 (650 bp) の整備を行うとともに、塩基配列に見られる種内変異の大きさを明らかにした。さらに、雌成虫では形態学的な種同定が難しいとされていた分類群、特に北方系ヤブカの *Ae. punctor*-subgroupとクシヒゲカ亜属の種に関しては、DNAバーコーディングより得られた情報に基づいた分子系統解析に加えて、解析によって得られた複数の集団間での比較形態学的検討を行った。

材料と方法

1. サンプルの採取と種類の同定

DNAの抽出には、2013年および2014年に北海道、青森県、秋田県、福島県、東京都、静岡県、愛知県、岐阜県、和歌山県、岡山県、広島県、山口県、香川県、愛媛県、長崎県、熊本県、鹿児島県で実施した現地調査によって得られたサンプルを用いた。現地調査では成虫および幼虫を採集したが、幼虫は実験室に持ち帰り、成虫まで飼育した後に種類を同定し分析に用いた。サンプルの採取法の詳細は前川ら (2016) に示されている。

DNAバーコーディングに用いた種類とサンプル数及びサンプルが得られた場所をTable 1に示した。同一種が複数の調査地で採集されている場合、遺伝子配列にみられる種内変異の程度を調べ、種に固有の遺伝子配列を推測するために、地理的に離れた集団のそれぞれについて雌雄合わせて分析し、分析に用いたサンプルの数は最も少ない種では1、最も多い種では111、平均は11.4であった。

分析に用いた幼虫サンプルの種同定は、個体飼育した幼虫から得られた成虫サンプルで行い、原則として Tanaka et

al. (1979) の検索表を用いて成虫の外部形態の特徴によって分類した。雌成虫の形態による種同定が難しいグループ (クシヒゲカ亜属、シナハマダラカ群) では、個体飼育時に保存しておいた幼虫あるいは蛹の脱皮殻を用いて種同定を行った (田中, 2005)。アカイエカ群は Kasai et al. (2008) によって開発された分子分類法によって種同定を行った。

我国産の北方系ヤブカ類は、脚 (ふ節) に白斑を有する斑脚グループと白斑がない黒脚グループに分けられ、前者のグループに属する4種は雌個体での同定が可能とされている (Tanaka et al., 1979)。これに対して黒脚グループに属する8種類の雌成虫の種同定は困難で、特に *Ae. punctor*-subgroupに属する4種類は雄成虫でも確実に同定できないものがあり、現時点でも最も確実な種類同定には4令幼虫を用いる必要がある (Tanaka et al., 1979)。本研究では、黒脚グループの幼虫を採集して種類同定を行い、DNAバーコーディングのサンプルとする予定であったが、2シーズンの採集にもかかわらずこのグループの幼虫を採集することができなかった。そこで、黒脚グループの成虫 (19個体) はひとつのグループとして扱い、個体ごとにDNAを抽出しCOI遺伝子情報を得た。次に、GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) に登録されている近縁種の遺伝子情報と照合し、Kimura-two-parameter distance model (Kimura, 1980) によって遺伝的距離 (Nucleotide sequence divergences) を求め種の推定を行った。さらに、同一種類と推定された個体の形態的な特徴を精査し、ヨーロッパ産 *punctor* subgroupの検索キー (Becker et al., 2010) を参考にして、形態による種同定の可能性を検討した。

2. 標本作成とDNAバーコーディング

ドライアイストラップと捕虫網採集で捕集した成虫のうち、外部形態の損傷が少ない野外採集個体から乾燥ピン標本 (成虫標本) を作製した。幼虫は4令に達した後に個別飼育を行い、同一個体の幼虫と蛹の脱皮殻ならびに羽化成虫の標本を作製した。脱皮殻は99.5%エタノールに保存し、羽化成虫は3%砂糖水を与えて3日間飼育した後-20°Cの冷凍庫に保管した。COI遺伝子解析用試料は、原則として成虫標本の中脚一本を採取し、残りの虫体標本と同じ番号をつけた0.2 mLチューブに保存した。すぐに遺伝子解析実験を開始しない場合は-20°Cの冷凍庫で保管した。スジアシイエカ *Cx. vagans* Wiedemannは、中脚腿節に明瞭な特徴を有するため前脚あるいは後脚1本を使用し、試料の形態的特徴を損なわないように配慮した。DNA抽出に用いた成虫標本は、今後の形態観察に利用できるように標本箱に納め、国立感染症研究所昆虫医科学部の標本室および実験室に保管した。

試料からのDNA抽出にはMagExtractor®-Genome- (TOYOB0), あるいはRed Extract (Sigma-Aldrich) を用い、脚一本から抽出を行うため各試薬量は1/5量に減らした。抽出作業は、添付のマニュアルに従った。DNA增幅にはLCO1490とHCO2198プライマー (Folmer et al., 1994) とTaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (TaKaRa) を用いた。PCRでDNAが増えにくい傾向がみられたアカエゾヤブカ *Ae. yamadai* Sasa, Kano and Takahashiは、LCO1490とHCO2198プライマーの内側にspecific primer (565 bp, forward: 5'-CGG AAT AGT GGG AAC ATC CT-3', reverse: 5'-ATT GGG GGA GGA GAT CCA AT-3') を設計した。設計には、Primer 3 (Untergasser et al., 2012) とSequence

Table 1. The list of mosquito species, number of individuals, and collection sites that were used for DNA barcoding.

Species	Collection site code																		Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1 <i>Anopheles lindesayi japonicus</i>		2		2	4										2				10
2 <i>An. koreicus</i>														4			6		10
3 <i>An. sinensis</i>	18			3			1			2	1		3		1	71	11		111
4 <i>An. sinerooides</i>	2				11												4		17
5 <i>Culex vagans</i>	1				1					1									3
6 <i>Cx. pipiens pallens</i>	2																		2
7 <i>Cx. pipiens form molestus</i>		1																	1
8 <i>Cx. tritaeniorhynchus</i>		1			4			1	1		1		1		2	1	3	1	16
9 <i>Cx. pseudovishnui</i>											1				2	1	1		5
10 <i>Cx. mimeticus</i>											2								2
11 <i>Cx. orientalis</i>	3			2	3											3			11
12 <i>Cx. bitaeniorhynchus</i>				2											2		2	1	7
13 <i>Cx. rubensis</i>	2				4														6
14 <i>Cx. hayashii hayashii</i>			4					9			1				5	1			20
15 <i>Cx. infantulus</i>											5		1	1					7
16 <i>Cx. pallidothorax</i>									2		2	2	1		1		4		12
17 <i>Cx. kyotoensis</i>					10									5			2		17
18 <i>Cx. sasai</i>				10	2	4					2		1			3			22
19 <i>Aedes dorsalis</i>	1										1								2
20 <i>Ae. excrucians</i>	21																		21
21 <i>Ae. communis</i>	14																		14
22 <i>Ae. punctor</i>	1	4																	5
23 <i>Ae. japonicus japonicus</i>	3	1	1	2	4						2		1		1	1	3	1	21
24 <i>Ae. hatorii</i>															3				3
25 <i>Ae. togoi</i>														3	3				6
26 <i>Ae. nipponicus</i>	2			1	1						4								8
27 <i>Ae. oreophilus</i>	8			3	1														12
28 <i>Ae. watasei</i>															3				3
29 <i>Ae. riversi</i>										3					2				5
30 <i>Ae. galloisi</i>	3				1					1				1	1	1	3	1	4
31 <i>Ae. albopictus</i>			1					1		1				1	1	1	1		12
32 <i>Ae. flavopictus flavopictus</i>	1			1	1	1					3								6
33 <i>Ae. vexans nipponei</i>	2	1									2								5
34 <i>Ae. bekkui</i>	1																		1
35 <i>Ae. esoensis</i>	9	15																	24
36 <i>Ae. yamadai</i>	5	2																	7
37 <i>Ae. nobukonis</i>														1					1
38 <i>Culiseta nipponica</i>		13																	13
39 <i>Orthopodomyia anopheloides</i>									1	1	1		2			6			11
40 <i>Mansonia uniformis</i>																	1	1	
41 <i>Lutzia vorax</i>				4										1	3	1	3	6	18
42 <i>Armigeres subalbatus</i>														2	1				3
43 <i>Uranotaenia novoboscura</i>														1	5				6
44 <i>Tripteroides bambusa bambusa</i>				2	2					1						4			9
45 <i>Toxorhynchites towadensis</i>		5			2	2								1			2		12
Total	101	43	6	32	51	6	2	10	6	25	12	4	12	11	37	107	30	17	512

Collection site code: 1=Hokkaido, 2=Aomori, 3=Akita, 4=Fukushima, 5=Gifu, 6=Tokyo, 7=Aichi, 8=Shizuoka, 9=Okayama, 10=Nagasaki, 11=Hiroshima, 12=Yamaguchi, 13=Kagawa, 14=Ehime, 15=Wakayama, 16=Kumamoto, 17=Kagoshima, 18=Miyazaki.

Manipulation Suite (Stothard, 2000) を用いた。

PCR 条件は、各試薬量を添付マニュアルの 1/5 量とし、10 × PCR buffer 1.00 μL, 2.5 μM dNTP mixture 0.80 μL, 5 U/μL Ex Taq HS 0.05 μL, 2.5 μM プライマー各 0.50 μL, DDW 6.15 μL, DNA template 1.00 μL, 総量 10 μL とし、熱変性 95°C 2 分を 1 サイ

クル、熱変性 95°C 15 秒、アニーリング 50°C 30 秒、伸長反応 72°C 90 秒を 35 サイクル、伸長反応 72°C 2 分を 1 サイクル行った。PCR 産物は、MultiNA (SHIMADZU) と試薬キット DNA-12000 により確認した。得られた増幅物は、ExoSAP (Affymetrix) により精製し、BigDye Terminator ver1.1 (Life

Technologies) でシーケンシングサンプルを調整し, ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Life Technologies) を用いて塩基配列を解読し, ATGC-Win ver.7 (GENETYX) を用いて編集した。決定した塩基配列は GenBankへ登録した。ただし、同じ採集地で多数採集された同種の個体で、COIの塩基配列がまったく同じ場合は、すべての個体ではなく数個体の塩基配列のみを登録した。

3. 分子系統樹の作成と遺伝的距離に基づく種内変異の検討

分子系統樹の作成には、MEGA ver. 5.2 (Tamura et al., 2011) を使用し、Kimura-two-parameter distance model (Kimura, 1980) によって遺伝的距離を求め、Neighbor joining法 (Saitou and Nei, 1987) による分子系統樹を作成した。outgroupには *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae, GenBank accession no. HM137888) を用い、1,000回の繰り返しを行って Bootstrap 値によって樹形の信頼性を示した。更に

Table 2. The mean, standard deviation, and range of nucleotide sequence divergence with GenBank accession number of the sequence used for comparison.

Species	Number of		K2P divergence (%)			GenBank accession number
	Specimens	Site	Mean	SD	Range	
1 <i>Anopheles lindesayi japonicus</i>	10	4	3.1	4.0	0.0–8.5	AB690833
2 <i>An. koreicus</i>	10	2	0.0	0.1	0.0–0.2	None
3 <i>An. sinensis</i>	111	9	1.1	0.6	0.0–3.0	AY444351, KC797438, AB738198
4 <i>An. sinerooides</i>	17	3	0.6	0.3	0.0–1.6	None
5 <i>Culex vagans</i>	3	3	0.8	0.7	0.0–1.3	KC135933, JQ306321
6 <i>Cx. pipiens pallens</i>	2	1	0.0	—	—	AB690842
7 <i>Cx. pipiens form molestus</i>	1	1	—	—	—	None
8 <i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	16	10	1.0	0.6	0.0–2.2	AB738248, AB690852
9 <i>Cx. pseudovishnui</i>	5	4	1.0	0.6	0.3–1.8	AB738093, AB690844
10 <i>Cx. mimeticus</i>	2	1	0.2	—	—	AB738226
11 <i>Cx. orientalis</i>	11	4	0.3	0.2	0.0–0.8	AB690841
12 <i>Cx. bitaeniorhynchus</i>	7	4	0.2	0.2	0.0–0.3	AB738237
13 <i>Cx. rubensis</i>	6	2	1.9	1.4	0.0–3.2	None
14 <i>Cx. hayashii hayashii</i>	20	5	1.3	1.2	0.0–3.4	None
15 <i>Cx. infantulus</i>	7	3	0.4	0.2	0.2–0.8	AB738207, AB738315
16 <i>Cx. pallidothorax</i>	12	6	0.1	0.1	0.0–0.2	AB738106
17 <i>Cx. kyotoensis</i>	17	3	1.5	1.1	0.0–3.5	None
18 <i>Cx. sasai</i>	22	6	0.5	0.5	0.0–2.2	AB690843
19 <i>Aedes dorsalis</i>	2	2	0.5	—	—	JQ246392, KC855609
20 <i>Ae. excrucians</i>	21	1	0.1	0.1	0.0–0.5	KC855591, JX259594
21 <i>Ae. communis</i>	14	1	0.5	0.4	0.0–1.1	JX259577, JX259566, KC713606, KM258339
22 <i>Ae. punctor</i>	5	2	0.2	0.2	0.0–0.5	KF534997, JX259623, JX040508
23 <i>Ae. japonicus japonicus</i>	21	12	0.5	0.4	0.0–1.8	AB690836, GQ254798, AB738182
24 <i>Ae. hatorii</i>	3	1	0.0	0.0	0.0–0.0	None
25 <i>Ae. togoi</i>	6	2	1.1	1.2	0.0–2.7	KC510142, AB738284
26 <i>Ae. nipponicus</i>	8	4	0.6	0.3	0.0–1.1	None
27 <i>Ae. oreophilus</i>	12	3	0.4	0.3	0.0–0.9	None
28 <i>Ae. watasei</i>	3	1	0.1	0.1	0.0–0.2	AB738183, AB738229
29 <i>Ae. riversi</i>	5	2	0.4	0.1	0.2–0.6	AB738131
30 <i>Ae. galloisi</i>	4	2	0.4	0.3	0.0–0.6	None
31 <i>Ae. albopictus</i>	12	10	0.1	0.1	0.0–0.3	AB738241, AB690835
32 <i>Ae. flavopictus flavopictus</i>	6	4	0.8	0.3	0.3–1.3	None
33 <i>Ae. vexans nipponii</i>	5	3	1.2	0.2	0.9–1.8	AB738168, AB738099
34 <i>Ae. bekkui</i>	1	1	—	—	—	None
35 <i>Ae. esoensis</i>	24	2	1.9	0.8	0.0–3.3	None
36 <i>Ae. yamadai</i>	7	2	0.7	0.5	0.0–1.6	None
37 <i>Ae. nobukonis</i>	1	1	—	—	—	None
38 <i>Culiseta nipponica</i>	13	1	0.7	0.4	0.0–1.6	None
39 <i>Orthopodomyia anopheloides</i>	11	5	0.2	0.2	0.0–0.5	AY917200
40 <i>Mansonia uniformis</i>	1	1	—	—	—	HQ398880, GQ165799
41 <i>Lutzia vorax</i>	18	6	0.3	0.3	0.0–1.1	None
42 <i>Armigeres subalbatus</i>	3	2	0.0	0.0	0.0–0.0	AB690838, DQ279741
43 <i>Uranotaenia novobscura novobscura</i>	6	2	0.2	0.2	0.0–0.5	None
44 <i>Tripteroides bambusa bambusa</i>	9	4	0.8	0.5	0.0–1.6	EF647970
45 <i>Toxorhynchites towadensis</i>	12	5	0.9	1.0	0.0–2.5	None

GenBankに既に登録のある蚊種のCOI遺伝子配列（Table 2）と照合して種の確認を行った。また、種ごとに分析したすべての個体について2個体間の遺伝的距離を求め、その平均値によって種内変異の大きさを調べた。近年の研究では鱗翅目3%，蝶2.8%，鳥1.6%などの各生物種の平均遺伝的距離が報告されており、その値を閾値として種の分類が行われている（Hebert et al., 2003, 2004; Saitoh et al., 2015）。最近の蚊類の研究では、同一種内の遺伝的距離は平均2%未満であると報告されている（Kumar et al., 2007; Taira et al., 2012; Khrabrova et al., 2013）。また、Taira et al. (2012) は、琉球列島産蚊類の塩基配列の比較を行い、遺伝的距離が2%以上である集団の生態と分布は、琉球列島のgeological historyの影響を受けている可能性を示唆している。そこで、本研究では詳細な分析を行う際の目安として平均遺伝的距離2%を採用し、この値が2%以上の種および、遺伝的距離の最大値が2%以上の個体を含む種については、分子系統樹を作成して明確なクラスターが確認されるかどうかを調べた。同一種内に複数のクラスターが認められた場合、クラスター間の平均遺伝的距離を求めるとともに、採集地や発生水域、発生時期などの情報に基づいて、未知の亜種や種の可能性について考察を行った。

結果および考察

遺伝子解析を行った512個体について、種ごとに遺伝的距離の平均値、標準偏差、最小値および最大値を求めTable 2に示す。本研究で得られた45種のうち、ヤマトハマダラカ *An. lindesayi japonicus* Yamadaを除く、44種類の平均遺伝的距離は1.9%以下であった。Taira et al. (2012) は、琉球列島産蚊類の塩基配列の比較を行い、同一種内の遺伝的距離は平均2%未満であることを示しており、本研究でもほぼ同様の結果が得られた。

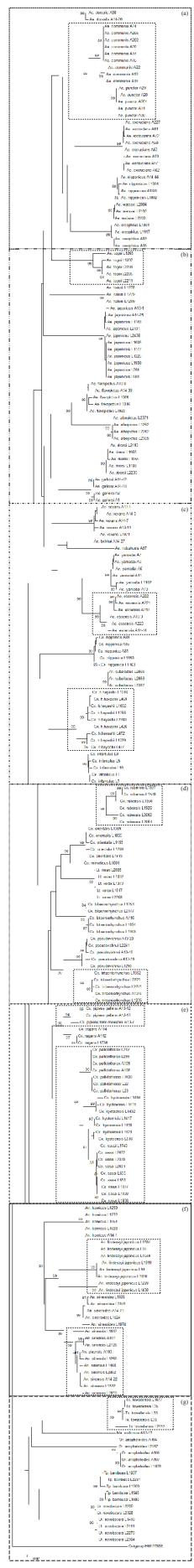
形態学的分類法によって雌成虫の種同定ができなかった北方系ヤブカ *Ae. punctor*-subgroupの19個体は、得られた塩基配列を既知の近縁種のそれと比較したところ、トカチヤブカとして登録されている4つの塩基配列（JX259577, JX259566, KC713606, KM258339）との平均遺伝的距離が0.5%（最小0.2、最大0.9）であるグループ（14個体）と、チシマヤブカとして登録されている3つの塩基配列（KF534997, JX259623, JX040508）との平均遺伝的距離が0.8%（最小0.8、最大1.0）のグループ（5個体）に分けられた。これら異なるグループに属する個体間で遺伝的距離を求めたところ、平均遺伝的距離は4.8%（最小4.4%、最大5.3%）で、2つのグループが遺伝的に大きく異なることが示唆された。Table 2には、これらのグループをそれぞれトカチヤブカ *Ae. communis*、チシマヤブカ *Ae. punctor*として示した。トカチヤブカに分類された個体間の平均遺伝的距離は0.5%，トカチヤブカの平均遺伝的距離は0.2%であり、遺伝的に均質であることが示された。Tanaka et al. (1979) によれば、チシマヤブカとトカチヤブカは、翅基上毛の色により分類できるとされているが、本研究で得られた成虫の翅基上毛は、色の変異が淡黄色から褐色まで連続的で2群に分けることができなかった。ヨーロッパのチシマヤブカとトカチヤブカは、Postprocoxal scalesの有無によって両種を区別できるとしており（Becker et al., 2010），塩基配列の違いによって分類した2つのクラスターに属する個体の外部形態を比較観察した。その結果、チシマヤブカ5個体中4個体にPostprocoxal scalesがあり、トカチヤ

ブカ14個体にはなかった。したがって日本産チシマヤブカとトカチヤブカを識別する上で、Postprocoxal scalesの有無が重要な形質であることが示唆された。

我が国には黒脚の北方系ヤブカとして、トカチヤブカ、カラフトヤブカ *Ae. sticticus* (Meigen), サッポロヤブカ *Ae. intrudens* Dyar, ヒサゴヌマヤブカ *Ae. dianaeus* Howard, Dyar and Knab, チシマヤブカの近縁種4種（チシマヤブカ、ハクサンヤブカ *Ae. hakusanensis* Yamaguti and Tamaboko, キタヤブカ *Ae. hexodontus hokkaidensis* Tanaka, Mizusawa and Saugstad, *Ae. sp.*）が北海道に生息しており、激しく人や動物を襲う事は知られているが、その生態などは未知な部分が多い（佐藤、富田, 1962; Tanaka et al., 1979）。チシマヤブカやトカチヤブカのような雪融け水の発生源から発生するヤブカ属の種は、ウエストナイルウイルスのbridge vectorである可能性やSnowshoe Hare virusとJamestown Canyon virusの重要な媒介蚊であるという報告もある（Medlock et al., 2005; Becker et al., 2010）。そのため、チシマヤブカとトカチヤブカ以外の北方系ヤブカについても、幼虫を含めた形態学的特徴の確認とDNAバーコードの整備、ならびにその生態を明らかにする必要がある。

GenBankに登録した240個体のCOI遺伝子配列を用いて分子系統解析を行った結果をFig. 1 (a-g) に示す。Table 2に示したようにヤマトハマダラカの平均遺伝的距離は3.1%で、最大値は8.5%であり、遺伝的に異質な集団が含まれていると予想された。分子系統解析の結果には2つのクラスターが認められた（Fig. 1f）。両クラスターの構成個体間の遺伝的距離を求めたところ最小8.3%，最大8.5%と非常に大きな値となり、遺伝的に大きく異なる集団であると推測された（Table 3）。小さいクラスターに属する2個体は和歌山県下鞆瀬の山間部の日陰にある河床のくぼみから幼虫で採集した。Miyagi et al. (1983) はヤマトハマダラカの翅脈の特徴について、翅脈Cu1とR4+5の先端部分の変異が大きいとし、先端に白色斑のない個体を報告している。和歌山県から採集した個体には、翅脈のCu1とR4+5の先端に白色斑があった。Kuwata et al. (2012) により登録されたヤマトハマダラカの塩基配列を加えて分子系統解析を行った結果、大きいクラスター側に属し、構成個体間の平均遺伝的距離は0.2%（最小0.0%，最大0.3%）であった。ヤマトハマダラカが属する *An. lindesayi* complexは3種から成り、南インドから日本まで広く分布し、ヤマトハマダラカは中国と韓国、日本に分布している（Harrison et al., 1990）。この種群は形態の変異が大きいため、現在亜種とされている集団が種に昇格される可能性が高く、分子系統学的な再検討が必要といわれている（Sames et al., 2008）。本研究の結果は、我国のヤマトハマダラカが少なくとも2つの集団に分けられることを示唆しており、琉球列島産の個体を含めた分類学的再検討が必要と思われる。

トカチヤブカとチシマヤブカなど12種のヤブカ類の分子系統解析の結果をFig. 1a, b, cに示す。Fig. 1a, b, cに示したトウゴウヤブカ *Ae. togoi* (Theobald) は、2調査地から得られた6個体を分析したが、その中の1個体（Specimen code: L1268）の遺伝的距離が平均2.7%（最小2.5%，最大2.7%）と2%よりも大きく、本州内において小さな変異が認められた。Taira et al. (2012) が登録した琉球列島産のトウゴウヤブカ16塩基配列と比較した結果、本州で採集した5個体の集団とは平均遺伝的距離5.2%（最小4.8%，最大5.6%），L1268とは平均遺伝



的距離5.4%（最小5.0%，最大5.7%）となり、大きく異なる事がわかった。トウゴウヤブカは、琉球列島の諸島単位での小さな変異（Taira et al., 2012）や、本州と琉球列島ではCOI遺伝子のハプロタイプが4系統に分類され、ハプロタイプとヌクレオチドの多様性は温帯地域が最も高く異なる（Sota et al., 2015）事が報告されていたが、本研究によっても地域による変異が認められた。我が国のトウゴウヤブカは、フィラリア症の媒介蚊として知られ北海道から琉球列島まで広く分布している（田中, 2005）事から、異なる遺伝的集団の分布を含めた再調査が必要である。

エゾヤブカ *Ae. esoensis* Yamadaの平均遺伝的距離は1.9%であるが、遺伝的距離の最大値は3.3%であり（Table 2）、分子系統解析によって2つのクラスターに分けられた（Fig. 1c）。これら2つのクラスターに属する個体間の平均遺伝的距離を求めたところ2.6%（最小1.6%，最大3.2%）であった（Table 4）。Specimen code: A217, A221, A222が含まれるクラスターは計8個体からなり、すべての個体が青森県五所川原にある飯詰ダム周辺で採集された。これに対して、もう一方のクラスターを構成する16個体中12個体は北海道と青森県の各地で採集され、残り4個体は飯詰ダムで採集されている。このように本研究で分析したエゾヤブカの集団は遺伝学的に大きく

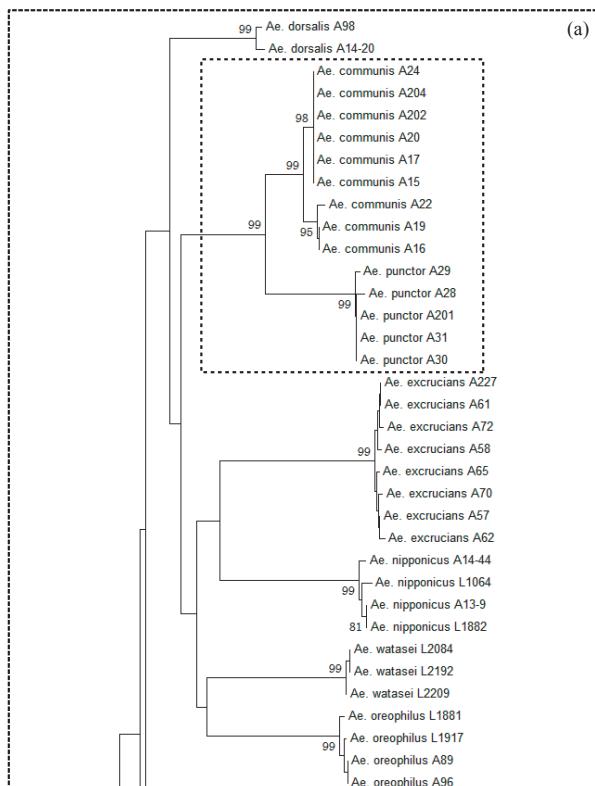
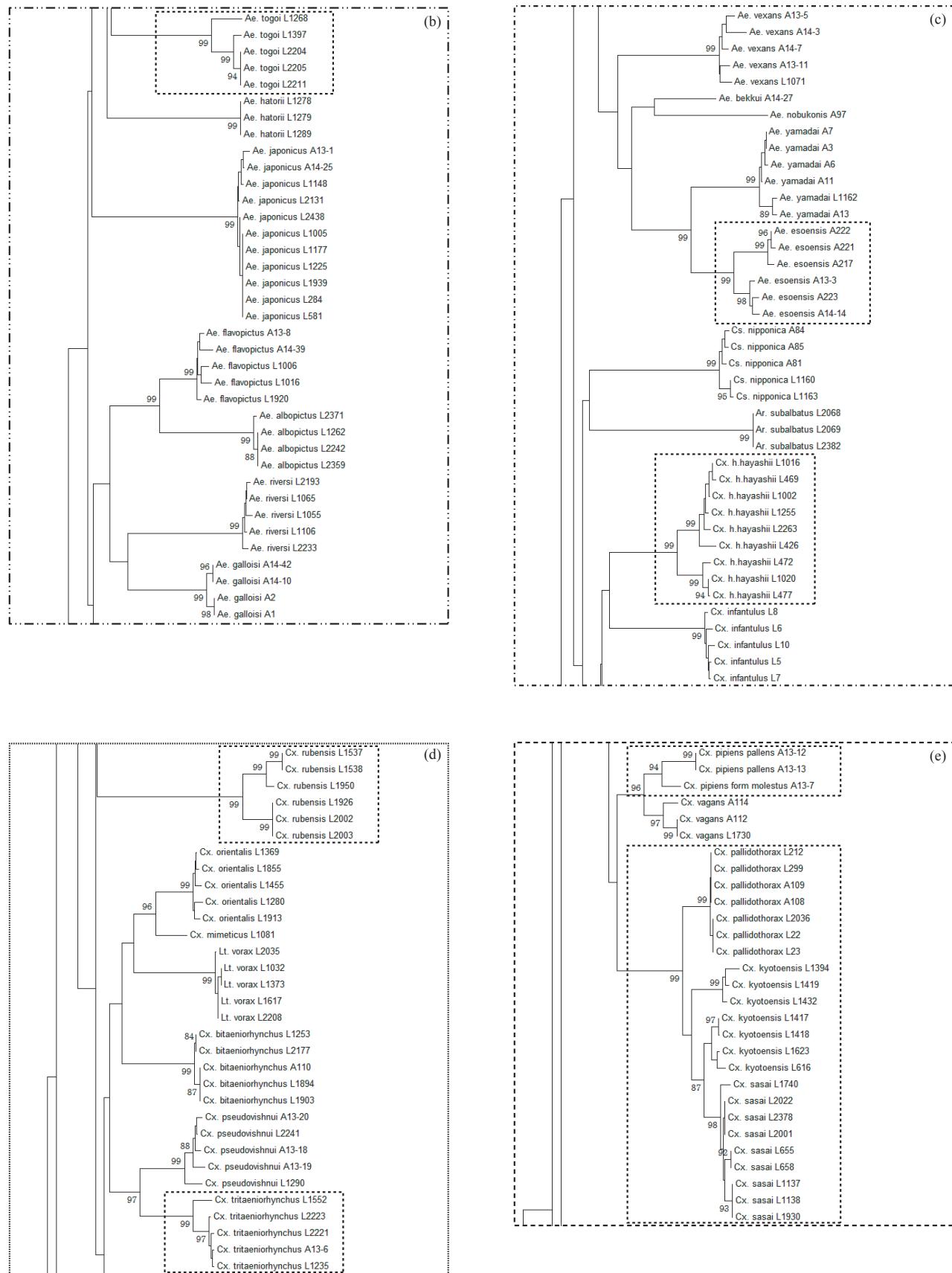


Fig. 1. A neighbor-joining tree with 1000 bootstrap replicates constructed using Kimura 2-parameter (K2P) calculated from COI sequences of 240 Japanese mosquitoes, and an outgroup, *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae). The sequence of the outgroup was obtained from GenBank. The specimens are labeled as species name, collection method and code number. A=Adult collection using a dry ice trap and/or a sweep net. L=Larval collection.

Fig. 1. *Continued.*

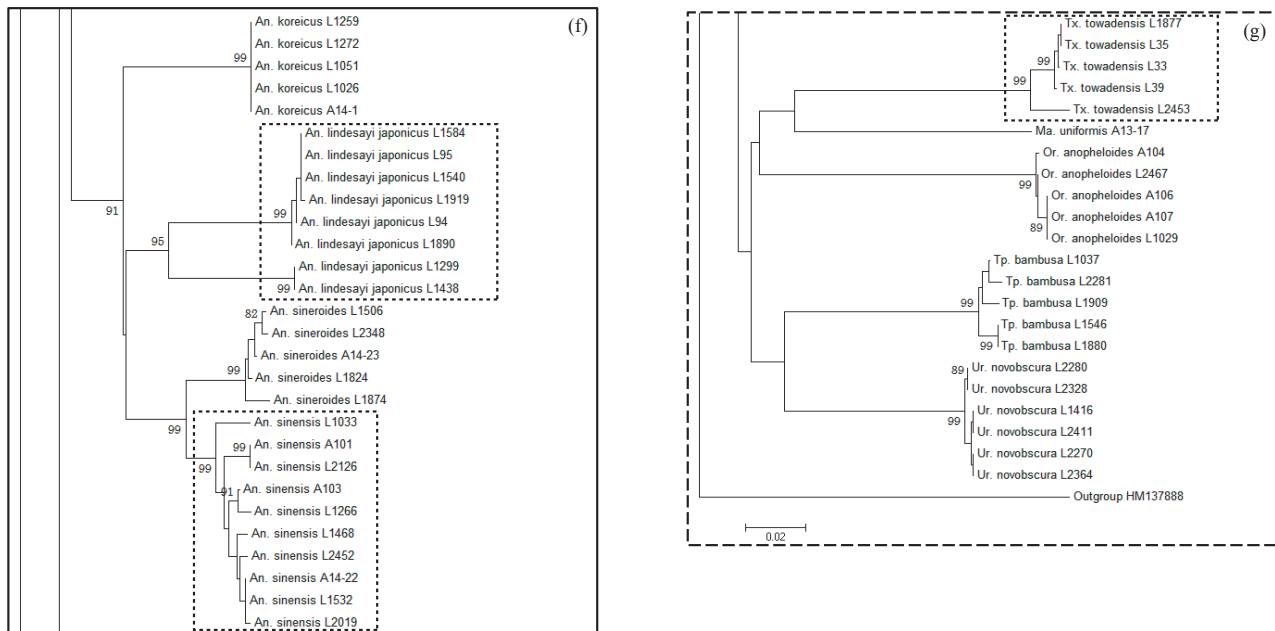


Fig. 1. Continued.

Table 3. Percent pairwise divergence among 10 *An. lindesayi japonicus* collected from four different sites, calculated using the Kimura 2-parameter (K2P) model.

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 <i>An. lindesayi japonicus</i> L94 (2)										
2 <i>An. lindesayi japonicus</i> L95 (2)	0.2									
3 <i>An. lindesayi japonicus</i> L1540 (5)	0.2	0.0								
4 <i>An. lindesayi japonicus</i> L1541 (5)	0.2	0.0	0.0							
5 <i>An. lindesayi japonicus</i> L1584 (5)	0.2	0.0	0.0	0.0						
6 <i>An. lindesayi japonicus</i> L1585 (5)	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0					
7 <i>An. lindesayi japonicus</i> L1890 (4)	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3				
8 <i>An. lindesayi japonicus</i> L1919 (4)	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5			
9 <i>An. lindesayi japonicus</i> L1299 (15)	8.3	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5		
10 <i>An. lindesayi japonicus</i> L1438 (15)	8.3	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	0.0	

The numbers in parentheses show the collection site codes of the specimens; refer to Table 1 for details of the collection site code.

異なる集団に2分されるが、同所的に生息する個体もあることから、分類学的再検討が必要であることが示唆された。

コガタクロウスカ *Cx. hayashi hayashii* Yamadaは、5採集地で得られた計20個体を分析したが、Fig. 1cに示される2つのクラスターに分かれた：ひとつはSpecimen code: L472, L477, L1020を含む4個体からなるクラスター、もうひとつは16個体からなるクラスターである。これら2つのクラスターに属する個体間の平均遺伝的距離は2.9%（最小2.5%，最大3.1%）であった（Table 5）。小さいクラスターの3個体（L472, L477, L1020）はいずれも静岡県浜松市の鶴が池で採集された。コガタクロウスカは、琉球列島に分布するリュウキュウクロウスカ *Cx. hayashii ryukyuuanus* Tanaka, Mizusawa and Saugstadと本州に分布するコガタクロウスカに分類されている（Tanaka et al., 1979）。最近行われたCOI遺伝子の解析によれば、リュウキュウクロウスカは、奄美・徳之島、沖縄本島、石垣・西表島で明らかに異なる3つのクラスターに分かれ、これらの地域に遺伝的に異なる集団が分布していることが報告されている（Taira et al., 2012）。そのため、Taira et al. (2012)によって登録されたリュウキュウクロウスカ10個体の塩基配列（奄

美、徳之島、沖縄本島、石垣島、西表島の各2配列）と本研究で得られたコガタクロウスカ20個体の塩基配列を比較したところ、平均遺伝的距離2.6%（最小2.5%，最大4.7%）であった。また、L472, L477, L1020との遺伝的距離は2.5%から4.1%離れていることから、リュウキュウクロウスカとも異なった。本研究で分析したコガタクロウスカに認められた2つのクラスターとTaira et al. (2012)が報告しているリュウキュウクロウスカの島間での変異も含め、コガタクロウスカを含むクロウスカ亜属での詳細な比較研究が必要と思われる。

エゾウスカ *Cx. rubensis* Sasa and Takahashiのサンプル6個体は、北海道長沼と福島県下郷で採集された。これら6個体の平均遺伝的距離は1.9%とやや大きく、最大遺伝的距離が3.2%を示す個体があった（Table 2）。分子系統解析の結果、これら6個体は3個体ずつ2つのクラスターに分けられた。一方のクラスターを構成する3個体（Specimen code: L1926, L2002, L2003）は、すべて福島県で採集された個体であり、2つのクラスターに属する個体間の平均遺伝的距離は3.0%（最小2.7%，最大3.2%）だった。分析した個体数が6個体と少な

Table 6. Percent pairwise divergence among 17 *Cx. kyotoensis* collected from three different sites, calculated using the K2P model.

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 <i>Cx. kyotoensis</i> L615 (18)																	
2 <i>Cx. kyotoensis</i> L1781 (5)	0.0																
3 <i>Cx. kyotoensis</i> L616 (18)	0.2	0.2															
4 <i>Cx. kyotoensis</i> L1787 (5)	0.2	0.2	0.3														
5 <i>Cx. kyotoensis</i> L1623 (5)	0.5	0.5	0.5	0.3													
6 <i>Cx. kyotoensis</i> L1624 (5)	0.5	0.5	0.5	0.3	0.0												
7 <i>Cx. kyotoensis</i> L1778 (5)	0.8	0.8	0.6	0.6	0.5	0.5	0.5										
8 <i>Cx. kyotoensis</i> L1779 (5)	0.8	0.8	0.6	0.6	0.5	0.5	0.0										
9 <i>Cx. kyotoensis</i> L1780 (5)	0.8	0.8	0.6	0.6	0.5	0.5	0.0	0.0									
10 <i>Cx. kyotoensis</i> L1784 (5)	0.8	0.8	0.6	0.6	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0								
11 <i>Cx. kyotoensis</i> L1417 (15)	0.8	0.8	0.9	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6					
12 <i>Cx. kyotoensis</i> L1418 (15)	0.8	0.8	0.9	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.0				
13 <i>Cx. kyotoensis</i> L1789 (5)	1.2	1.2	1.1	1.1	1.2	1.2	1.4	1.4	1.4	1.4	1.7	1.7					
14 <i>Cx. kyotoensis</i> L1788 (5)	2.5	2.5	2.4	2.4	2.5	2.5	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	1.2			
15 <i>Cx. kyotoensis</i> L1432 (15)	2.7	2.7	2.5	2.5	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.5	2.5	1.7	1.1			
16 <i>Cx. kyotoensis</i> L1419 (15)	3.0	3.0	2.8	2.8	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	2.8	2.8	2.0	1.1	0.3		
17 <i>Cx. kyotoensis</i> L1394 (15)	3.5	3.5	3.3	3.3	3.5	3.5	3.2	3.2	3.2	3.0	3.0	2.2	1.2	1.1	0.8		

The numbers in parentheses show the collection site codes of the specimens; refer to Table 1 for details of the collection site code.

Table 7. Percent pairwise divergence among 12 *Tx. towadensis* collected from five different sites, calculated using the K2P model.

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>Tx. towadensis</i> L1877 (5)												
2 <i>Tx. towadensis</i> L1879 (5)	0.0											
3 <i>Tx. towadensis</i> L35 (6)	0.0	0.0										
4 <i>Tx. towadensis</i> L33 (14)	0.2	0.2	0.2									
5 <i>Tx. towadensis</i> L39 (2)	0.3	0.3	0.3	0.2								
6 <i>Tx. towadensis</i> L34 (6)	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3							
7 <i>Tx. towadensis</i> L36 (2)	0.3	0.3	0.3	0.2	0.0	0.3						
8 <i>Tx. towadensis</i> L37 (2)	0.3	0.3	0.3	0.2	0.0	0.3	0.0					
9 <i>Tx. towadensis</i> L38 (2)	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3				
10 <i>Tx. towadensis</i> L40 (2)	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.0		
11 <i>Tx. towadensis</i> L2453 (17)	2.2	2.2	2.2	2.4	2.2	2.2	2.2	2.2	2.5	2.5		
12 <i>Tx. towadensis</i> L2454 (17)	2.2	2.2	2.2	2.4	2.2	2.2	2.2	2.2	2.5	2.5	0.3	

The numbers in parentheses show the collection site codes of the specimens; refer to Table 1 for details of the collection site code.

クシヒゲカ亜属の3種類の分子系統解析の結果をFig. 1eに示す。アカクシヒゲカ *Cx. pallidothorax* Theobaldは平均遺伝的距離が0.1%で最大遺伝的距離も0.2%と遺伝的変異が非常に小さかった。ヤマトクシヒゲカ *Cx. sasai* Kano, Nitahara and Awayaは分析した22個体の中に1個体だけ遺伝的距離がやや大きい個体が認められた（平均遺伝的距離1.9%，最小1.7%，最大2.2%）が、残りの21個体の平均遺伝的距離は0.4%（最小0.0%，最大1.1%）と遺伝的にかなり均一な集団であった。これに対して、キヨウトクシヒゲカ *Cx. kyotoensis* Yamaguti and LaCasseは、分析した17個体の平均遺伝的距離は1.5%（最小0.0%，最大3.5%）で、分子系統解析の結果4個体と13個体からなる2つのクラスターに分けられた。クラスターを構成する個体間の平均遺伝的距離は2.8%（最小1.2%，最大3.5%，Table 6）で遺伝的にかなり異質な集団であると推察された。小さいクラスターを構成する4個体のうち3個体は、同じ和歌山県の調査地で採集され、幼虫の脱皮殻の形態は、呼吸管中央は膨らまず細長く、偽関節がなく全体に微細な点状のものが散在し、呼吸管櫛歯は13あるいは14個、呼吸管毛は4対で1もしくは2分岐し呼吸管幅より短く、鞍板に湾

入はなかった。これらの特徴は、田中（2005）が報告しているキヨウトクシヒゲカ幼虫の特徴と一致している。以上の結果は、キヨウトクシヒゲカで認められた2つのクラスターが sibling species である可能性を示唆しており、さらに供試個体数を増やして詳細な形態学的、遺伝学的検討を行うことが必要と思われる。

シナハママダラカ群は9調査地から得られた111個体を分析した。このうち2個体を除いて、平均遺伝的距離は1.1%（最小0.0%，最大2.4%）で遺伝的に均一な集団と考えられ、遺伝的距離がやや大きかった2個体はどちらも対馬で採集された個体で、平均遺伝的距離が2.2%（最小1.7%，最大3.0%）だった。

トワダオオカ *Toxorhynchites towadensis* (Matsumura) は、5調査地から得られた12個体を分析したところ、鹿児島県霧島で採集された2個体と他の地域で得られた10個体からなる2つのクラスターに分けられた（Fig. 1g）。2つのクラスターに属する個体間の平均遺伝的距離は2.3%（最小2.2%，最大2.5%）であった（Table 7）。

本研究で新たに得られた19種と既に登録のある26種、合

計45種240個体のCOI遺伝子配列(650bp)をGenBankへ登録した(Appendix 1)。本研究とTaira et al. (2012), Kuwata et al. (2012)により登録されたCOI遺伝子配列と合わせると、日本産蚊122種中71種(58%)のDNAバーコードが整備された。今回登録された種類の中で、複数の調査地から10個体以上のサンプルが得られ、塩基配列の違いに基づく遺伝的距離と分子系統解析の結果、遺伝的に異なる2つの集団が示唆されたのは次にあげる5種類である; ヤマトハマダラカ、コガタクロウスカ、キヨウトクシヒゲカ、エゾヤブカ、トワダオオカ。DNAバーコーディングによって種同定を行う上で、遺伝的な変異が大きいこれらの種の代表的な配列を決めるることは難しい。遺伝的に見いだされた変異が形態や行動生態などの表現型にどのような違いをもたらしているかを、今後の研究によって明らかにすることが必要と思われる。

謝 辞

調査地の選定に協力していただいた星野啓太博士に感謝します。本研究の一部は厚生労働省科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業(H24-新興一般007)ならびに国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進事業および環境省地球環境研究総合推進費(S-8)によって行われた。

文 献

- Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C. and Kaiser, A. 2010. *Mosquitoes and Their Control*, 577 pp. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, London.
- Bohart, R. M. and Ingram, R. L. 1946. *Mosquitoes of Okinawa and Islands in the Central Pacific*. U.S. Navmed, 1055: 1–110.
- Cywinska, A., Hunter, F. F. and Hebert, P. D. N. 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Med. Vet. Entomol.*, 20: 413–424.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3: 294–299.
- Gao, Q., Beebe, N. W. and Cooper, R. D. 2004. Molecular identification of the malaria vectors *Anopheles anthropophagus* and *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) in central China using polymerase chain reaction and appraisal of their position within the Hycanus group. *J. Med. Entomol.*, 41: 5–11.
- Harrison, B. A., Rattanarithikul, R., Peyton, E. L. and Mongkolsanya, K. 1990. Taxonomic changes, revised occurrence records and notes on the Culicidae of Thailand and neighboring countries. *Mosq. Syst.*, 22: 196–227.
- 長谷山路夫, 飯塚信二, 大前比呂思, 津田良夫. 2007. 成田国際空港に到着する国際線航空機内ならびに空港区域における蚊の採集結果. 衛生動物, 58: 191–197.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L. and Waard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.*, 270: 313–321.
- Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H. and Hallwachs, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101: 14812–14817.
- Higa, Y., Toma, T., Tsuda, Y. and Miyagi, I. 2010. A multiplex PCR-based molecular identification of five morphologically related, medically important subgenus *Stegomyia* mosquitoes from the genus *Aedes* (Diptera: Culicidae) found in the Ryukyu Archipelago, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 63: 312–316.
- Hwang, U. W., Yong, T. S. and Ree, H. I. 2004. Molecular evidence for synonymy of *Anopheles yatsushiroensis* and *An. pullus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 20: 99–104.
- Kasai, S., Komagata, O., Tomita, T., Sawabe, K., Tsuda, Y., Kurahashi, H., Ishikawa, T., Motoki, M., Takahashi, T., Tanikawa, T., Yoshida, M., Shinjo, G., Hashimoto, T., Higa, Y. and Kobayashi, M. 2008. PCR-based identification of *Culex pipiens* complex collected in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 61: 184–191.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16: 111–120.
- Kumar, N. P., Rajavel, A. R., Natarajan, R. and Jambulingam, P. 2007. DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, 44: 1–7.
- Kuwata, R., Hoshino, K., Isawa, H., Tsuda, Y., Tajima, S., Sasaki, T., Takasaki, T., Kobayashi, M. and Sawabe, K. 2012. Establishment and characterization of a cell line from the mosquito *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 48: 369–376.
- La Casse, W. K. and Yamaguti, S. 1950. Mosquito fauna of Japan and Koreas, 268 p., App. I, The female terminalia of the Japanese mosquitoes, 7 p., App. II, Organization and function of malaria detachments, 213 p. Off. Surg., HQ. 8th Army APO 343 Japan.
- 前川芳秀, 津田良夫, 沢辺京子. 2016. 日本産蚊の国内分布に関する全国調査. 衛生動物, 67: 1–12.
- Medlock, J. M., Snow, K. R. and Leach, S. 2005. Potential transmission of West Nile virus in the British Isles: an ecological review of candidate mosquito bridge vectors. *Med. Vet. Entomol.*, 19: 2–21.
- Miyagi, I., Toma, T., Suzuki, H. and Okazawa, T. 1983. Mosquitoes of the Tokara Archipelago, Japan. *Mosquito Systematics*, 15: 18–27.
- Nga, P. T., del Carmen Parquet, M., Cuong, V. D., Ma, S. P., Hasebe, F., Inoue, S., Makino, Y., Takagi, M., Nam, V. S. and Morita, K. 2004. Shift in Japanese encephalitis virus (JEV) genotype circulating in northern Vietnam: implications for frequent introductions of JEV from southeast Asia to east Asia. *J. Gen. Virol.*, 85: 1625–1631.
- Nabeshima, T., Loan, H. T., Inoue, S., Sumiyoshi, M., Haruta, Y., Nga, P. T., Huoung, V. T., del Carmen Parquet, M., Hasebe, F. and Morita, K. 2009. Evidence of frequent introductions of Japanese encephalitis virus from south-east Asia and continental east Asia to Japan. *J. Gen. Virol.*, 90: 827–832.
- Ohashi, K., Tsuda, Y., Kasai, S., Kawada, H. and Takagi, M. 2014. Hybridization between sympatric populations of *Culex pipiens pallens* and *Culex pipiens* f. *molestus* (Diptera: Culicidae) in Nagasaki, Japan. *Med. Entomol. Zool.*, 65: 67–72.
- Paredes-Esquivel, C., Harbach, R. E. and Townson, H. 2011. Molecular taxonomy of members of the *Anopheles hyrcanus* group from Thailand and Indonesia. *Med. Vet. Entomol.*, 25: 348–352.
- Saitoh, T., Sugita, N., Someya, S., Iwami, Y., Kobayashi, S., Kamigaichi, H., Higuchi, A., Asai, S., Yamamoto, Y. and Nishiumi, I. 2015. DNA barcoding reveals 24 distinct lineages as cryptic bird species candidates in and around the Japanese Archipelago. *Mol. Ecol. Resour.*, 15: 177–186.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406–425.
- Sames, W. J., Kim, H. C., Chong, S. T., Harrison, B. A., Won-Ja, L., Rueda, L. M. and Klein, T. A. 2008. *Anopheles lindesayi japonicus* Yamada (Diptera: Culicidae) in Korea: comprehensive review, new collection records, and description of larval habitats. *J. Vector Ecol.*, 33: 99–106.
- 佐藤正三, 富田 征. 1962. 阿寒及び知床の蚊. 北海道教育大学紀要(第二部), 13: 146–159.
- Sota, T., Belton, P., Tseng, M., Yong, H. S. and Mogi, M. 2015.

- Phylogeography of the coastal mosquito *Aedes togoi* across climatic zones: Testing an anthropogenic dispersal hypothesis. *PLoS ONE*, 10: e0131230.
- Stothard, P. 2000. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, 28: 1102–1104, 1104.
- Taira, K., Toma, T., Tamashiro, M. and Miyagi, I. 2012. DNA barcoding for identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the Ryukyu Archipelago, Japan. *Med. Entomol. Zool.*, 63: 289–306.
- Tanaka, K., Mizusawa, K. and Saugstad, E. S. 1979. A revision of the adult and larval mosquitoes of Japan (including the Ryukyu Archipelago and the Ogasawara islands) and Korea (Diptera: Culicidae). *Contrib. Am. Entomol. Inst.*, 16: 1–987.
- 田中和夫. 2005. 力科Culicidae. 日本産水生昆虫. 科・属・種への検索 (川合禎次, 谷田一三編), pp. 757–1006. 東海大学出版, 日本.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 2731–2739.
- Toma, T. and Miyagi, I. 1986. The mosquito fauna of the Ryukyu archipelago with identification keys, pupal descriptions and notes on biology, medical importance and distribution. *Mosq. Syst.*, 15: 1–109.
- Toma, T., Miyagi, I., Crabtree, M. B. and Miller, B. R. 2000. Identification of *Culex vishnui* subgroup (Diptera: Culicidae) mosquitoes from the Ryukyu archipelago, Japan: development of a species-diagnostic polymerase chain reaction assay based on sequence variation in ribosomal DNA spacers. *J. Med. Entomol.*, 37: 554–558.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. and Rozen, S. G. 2012. Primer 3—New capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.*, 40: e115.
- Wijit, A., Saeung, A., Baimai, V., Otsuka, Y., Thongsahuan, S., Taai, K., Srisuka, W., Songsawatkiat, S., Sor-suwan, S., Hempolchom, C., Somboon, P. and Choochote, W. 2013. DNA barcoding for the identification of eight species members of the Thai Hyrcanus Group and investigation of their stenogamous behavior. *C. R. Biol.*, 336: 449–456.
- 吉田永祥, 松尾光子, 内野清子, 三好龍也, 西口智子, 田中智之. 2011. 分子生物学的分類による堺市におけるアカイエカ群の調査. 衛生動物, 62: 117–124.

Appendix 1. The mosquito specimens used in the study, with the details of their collection sites, specimen code, and GenBank accession number.

Serial no.	Species	Collection details of collection site				Specimen code	GenBank accession no.
		Prefecture	Area	GPS coordinates	Method/habitat		
1	<i>Anopheleslindesayi japonicus</i>	Aomori	Iwaki	40.6297 N 140.3381 E	LC/stagnant water	L94	LC04317
2	<i>An. lindesayi japonicus</i>	Aomori	Iwaki	40.6297 N 140.3381 E	LC/stagnant water	L95	LC04318
3	<i>An. lindesayi japonicus</i>	Wakayama	Kakiuchi	34.1964 N 135.4127 E	LC/swamp	L1438	LC04319
4	<i>An. lindesayi japonicus</i>	Gifu	Shirakawa	36.1468 N 136.8343 E	LC/stagnant water	L1540	LC054420
5	<i>An. lindesayi japonicus</i>	Gifu	Takane	36.0458 N 137.6215 E	LC/stagnant water	L1584	LC054421
6	<i>An. lindesayi japonicus</i>	Fukushima	Shimogo	37.3205 N 139.8645 E	LC/tree hole	L1890	LC054422
7	<i>An. lindesayi japonicus</i>	Fukushima	Shimogo	37.3204 N 139.8645 E	LC/swamp	L1919	LC054423
8	<i>An. lindesayi japonicus</i>	Wakayama	Shimotomobuchi	34.1961 N 135.4279 E	LC/rock pool	L1299	LC054424
9	<i>An. koreicus</i>	Wakayama	Shimotomobuchi	34.1961 N 135.4279 E	LC/rock pool	L1272	LC054415
10	<i>An. koreicus</i>	Nagasaki	Tsushima IslAMD	34.6445 N 129.3228 E	LC/stagnant water	L1051	LC054416
11	<i>An. koreicus</i>	Nagasaki	Tsushima IslAMD	34.5693 N 129.2951 E	SP/bush	A14-1	LC054417
12	<i>An. koreicus</i>	Wakayama	Shimotomobuchi	34.1964 N 135.4127 E	LC/rock pool	L1259	LC054418
13	<i>An. koreicus</i>	Nagasaki	Tsushima IslAMD	34.5693 N 129.2951 E	LC/rice field	L1026	LC054419
14	<i>An. sinensis</i>	Hokkaido	Atsuma	42.7000 N 141.8334 E	DT/bush	A14-22	LC054425
15	<i>An. sinensis</i>	Kumamoto	Misumi	32.5957 N 130.5013 E	LC/rice field	L2095	LC054426
16	<i>An. sinensis</i>	Kumamoto	Misumi	32.5957 N 130.5013 E	LC/rice field	L2126	LC054427
17	<i>An. sinensis</i>	Kagawa	Sanuki	34.3075 N 134.2122 E	DT/rice field	A101	LC054428
18	<i>An. sinensis</i>	Hiroshima	Mihara	34.3954 N 133.0288 E	DT/bush	A103	LC054429
19	<i>An. sinensis</i>	Wakayama	Kamitomita	33.7157 N 135.4735 E	LC/rice field	L1266	LC054430
20	<i>An. sinensis</i>	Hokkaido	Tomakomai	42.6401 N 141.7883 E	LC/swamp	L1468	LC054431
21	<i>An. sinensis</i>	Hokkaido	Naganuma	43.0685 N 141.7303 E	LC/rice field	L1532	LC054432
22	<i>An. sinensis</i>	Fukushima	Aizuwakamatsu	37.4528 N 140.0279 E	LC/pond	L2019	LC054433
23	<i>An. sinensis</i>	Nagasaki	Tsushima IslAMD	34.5693 N 129.2951 E	LC/rice field	L1033	LC054434
24	<i>An. sinensis</i>	Kagoshima	Izumi	32.1005 N 130.2634 E	LC/rice field	L2452	LC054435
25	<i>An. sinensis</i>	Kumamoto	Fukami	32.2386 N 130.0788 E	LC/rice field	L2202	LC054436
26	<i>An. sinensis</i>	Kumamoto	Fukami	32.2386 N 130.0788 E	LC/rice field	L2105	LC054437
27	<i>An. sinerooides</i>	Hokkaido	Naganuma	42.9717 N 141.7330 E	LC/pond	L1506	LC054438
28	<i>An. sinerooides</i>	Gifu	Kiyomi	36.0770 N 137.0672 E	LC/swamp	L1874	LC054439
29	<i>An. sinerooides</i>	Kagoshima	Imuta	31.8246 N 130.4813 E	LC/rice field	L2348	LC054440
30	<i>An. sinerooides</i>	Hokkaido	Atsuma	42.7002 N 141.8332 E	DT/bush	A14-23	LC054441
31	<i>An. sinerooides</i>	Gifu	Nyukawa	36.2130 N 137.2733 E	LC/rice field	L1824	LC054442
32	<i>Culiseta nipponica</i>	Hokkaido	Tomakomai	42.6323 N 141.7746 E	DT/bush	A81	LC054446
33	<i>Cs. nipponica</i>	Hokkaido	Ishikari river	43.2247 N 141.3560 E	DT/bush	A84	LC054447
34	<i>Cs. nipponica</i>	Hokkaido	Ishikari river	43.2251 N 141.3565 E	LC/ground pool	L1163	LC054448
35	<i>Cs. nipponica</i>	Hokkaido	Ishikari river	43.2255 N 141.3566 E	LC/ground pool	L1160	LC054449
36	<i>Cs. nipponica</i>	Hokkaido	Ishikari river	43.2247 N 141.3560 E	DT/bush	A85	LC054450
37	<i>Orthopodomyia anopheloides</i>	Kagawa	Sanuki	34.3075 N 134.2122 E	DT/forest	A104	LC054512
38	<i>Or. anopheloides</i>	Kumamoto	Ushibuka	32.2134 N 130.0770 E	LC/tree hole	L2467	LC054513
39	<i>Or. anopheloides</i>	Nagasaki	Tsushima IslAMD	34.6406 N 129.3231 E	LC/tree hole	L1029	LC054514
40	<i>Or. anopheloides</i>	Hiroshima	Onomichi	34.529 N 133.3555 E	DT/swamp	A106	LC054515
41	<i>Or. anopheloides</i>	Okayama	Ushimado	34.6468 N 134.1542 E	DT/bush	A107	LC054516
42	<i>Mansonia (Mansonioides) uniformis</i>	Miyazaki	Nichinan	31.4709 N 131.3571 E	DT/bush	A13-17	LC054511
43	<i>Culex vagans</i>	Nagasaki	Tsushima IslAMD	34.5714 N 129.2970 E	SP/bush	A112	LC054502
44	<i>Cx. vagans</i>	Hokkaido	Ishikari river	43.2225 N 141.3555 E	DT/bush	A114	LC054503
45	<i>Cx. vagans</i>	Gifu	Kiyomi	36.0770 N 137.0672 E	LC/swamp	L1730	LC054504
46	<i>Cx. pipiens pallens</i>	Hokkaido	Ishikari river	43.2247 N 141.3560 E	DT/bush	A13-12	LC054477
47	<i>Cx. pipiens pallens</i>	Hokkaido	Ishikari river	43.2247 N 141.3563 E	DT/bush	A13-13	LC054478
48	<i>Cx. pipiens form molestus</i>	Aomori	Hirosaki	40.5997 N 140.4809 E	SP/under ground	A13-7	LC054466
49	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	Aomori	Goshogawara	40.8844 N 140.4562 E	DT/rice field	A13-6	LC054496
50	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	Gifu	Nyukawa	36.2130 N 137.2733 E	LC/rice field	L1552	LC054497
51	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	Kagoshima	Izumi	32.1085 N 130.2778 E	LC/rice field	L2221	LC054498
52	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	Kagawa	Sanuki	34.2818 N 134.2253 E	LC/rice field	A13-21	LC054499
53	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	Wakayama	Kamitomita	33.7157 N 135.4735 E	LC/rice field	L1235	LC054500
54	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	Kumamoto	Misumi	32.5957 N 130.5013 E	LC/rice field	L2223	LC054501
55	<i>Cx. pseudovishnui</i>	Hiroshima	Mihara	34.3789 N 133.0135 E	DT/rice field	A13-18	LC054479
56	<i>Cx. pseudovishnui</i>	Ehime	Hijikawa	33.4698 N 132.7032 E	DT/rice field	A13-19	LC054480
57	<i>Cx. pseudovishnui</i>	Ehime	Hijikawa	33.4692 N 132.7124 E	DT/bush	A13-20	LC054481
58	<i>Cx. pseudovishnui</i>	Wakayama	Shimotomobuchi	34.2235 N 135.4702 E	LC/rice field	L1290	LC054482
59	<i>Cx. pseudovishnui</i>	Kumamoto	Fukami	32.2386 N 130.0788 E	LC/rice field	L2241	LC054483

Appendix 1. *Continued.*

Serial no.	Species	Collection details of collection site				Specimen code	GenBank accession no.
		Prefecture	Area	GPS coordinates	Method/habitat		
60	<i>Cx. mimeticus</i>	Nagasaki	Tsushima IslAMD	34.5693 N 129.2951 E	LC/rice field	L1081	LC054532
61	<i>Cx. orientalis</i>	Wakayama	Shimotomobuchi	34.2235 N 135.4702 E	LC/rice field	L1280	LC054467
62	<i>Cx. orientalis</i>	Wakayama	Shimotomobuchi	34.2235 N 135.4702 E	LC/rice field	L1369	LC054468
63	<i>Cx. orientalis</i>	Fukushima	Kitakata	37.6425 N 139.8934 E	LC/rice field	L1913	LC054469
64	<i>Cx. orientalis</i>	Hokkaido	Naganuma	42.9717 N 141.7330 E	LC/pond	L1455	LC054470
65	<i>Cx. orientalis</i>	Gifu	Kiyomi	36.0770 N 137.0672 E	LC/swamp	L1855	LC054471
66	<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>	Miyazaki	Nichinan	31.4709 N 131.3571 E	DT/bush	A110	LC054451
67	<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>	Fukushima	Yanagitsu	37.4727 N 139.6853 E	LC/rice field	L1903	LC054452
68	<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>	Kagoshima	Izumi	32.1085 N 130.2778 E	LC/rice field	L2177	LC054453
69	<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>	Fukushima	Minamiaizu	37.2846 N 139.4943 E	LC/rice field	L1894	LC054454
70	<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>	Wakayama	Shimotomobuchi	34.2235 N 135.4702 E	LC/rice field	L1253	LC054455
71	<i>Cx. rubensis</i>	Hokkaido	Naganuma	43.0030 N 141.7214 E	LC/swamp	L1537	LC054484
72	<i>Cx. rubensis</i>	Hokkaido	Naganuma	43.0030 N 141.7214 E	LC/swamp	L1538	LC054485
73	<i>Cx. rubensis</i>	Fukushima	Shimogou	37.3204 N 139.8645 E	LC/water container	L1926	LC054486
74	<i>Cx. rubensis</i>	Fukushima	Shimogou	37.3204 N 139.8645 E	LC/swamp	L1950	LC054487
75	<i>Cx. rubensis</i>	Fukushima	Shimogou	37.3204 N 139.8645 E	LC/water container	L2002	LC054488
76	<i>Cx. rubensis</i>	Fukushima	Shimogou	37.3204 N 139.8645 E	LC/water container	L2003	LC054489
77	<i>Cx. hayashii hayashii</i>	Hirosshima	Onomichi	34.5290 N 133.3555 E	LC/swamp	L426	LC104320
78	<i>Cx. hayashii hayashii</i>	Shizuoka	Iwata	34.7488 N 137.8820 E	LC/pond	L469	LC104321
79	<i>Cx. hayashii hayashii</i>	Shizuoka	Iwata	34.7488 N 137.8820 E	LC/pond	L472	LC104322
80	<i>Cx. hayashii hayashii</i>	Shizuoka	Iwata	34.7488 N 137.8820 E	LC/pond	L477	LC104323
81	<i>Cx. hayashii hayashii</i>	Shizuoka	Iwata	34.7488 N 137.8820 E	LC/pond	L1016	LC054456
82	<i>Cx. hayashii hayashii</i>	Shizuoka	Iwata	34.7488 N 137.8820 E	LC/pond	L1020	LC054457
83	<i>Cx. hayashii hayashii</i>	Kumamoto	Tanasoko	32.4148 N 130.3363 E	LC/pond	L2263	LC054458
84	<i>Cx. hayashii hayashii</i>	Akita	Oodate	40.3196 N 140.5788 E	LC/swamp	L1002	LC054459
85	<i>Cx. hayashii hayashii</i>	Wakayama	Kinokawa	34.1964 N 135.4127 E	LC/swamp	L1255	LC054460
86	<i>Cx. infantulus</i>	Hirosshima	Onomichi	34.529 N 133.3555 E	LC/swamp	L10	LC054461
87	<i>Cx. infantulus</i>	Kagawa	Sakaide	34.3245 N 133.9178 E	LC/swamp	L5	LC054462
88	<i>Cx. infantulus</i>	Ehime	Hijikawa	33.4698 N 132.7126 E	LC/swamp	L6	LC054463
89	<i>Cx. infantulus</i>	Hirosshima	Onomichi	34.529 N 133.3555 E	LC/swamp	L7	LC054464
90	<i>Cx. infantulus</i>	Hirosshima	Onomichi	34.529 N 133.3555 E	LC/swamp	L8	LC054465
91	<i>Cx. pallidothorax</i>	Okayama	Ushimado	34.6467 N 134.1538 E	DT/bush	A108	LC054472
92	<i>Cx. pallidothorax</i>	Okayama	Ushimado	34.6298 N 134.1476 E	DT/bush	A109	LC054473
93	<i>Cx. pallidothorax</i>	Kumamoto	Misumi	32.6244 N 130.5632 E	LC/water container	L2036	LC054474
94	<i>Cx. pallidothorax</i>	Miyazaki	Kushima	43.0843 N 140.8906 E	LC/water container	L22	LC054475
95	<i>Cx. pallidothorax</i>	Miyazaki	Kushima	43.0802 N 140.8846 E	LC/water container	L23	LC054476
96	<i>Cx. pallidothorax</i>	Kagawa	Sanuki	34.3566 N 134.2128 E	LC/drainage pit	L212	LC104328
97	<i>Cx. pallidothorax</i>	Ehime	Uchiko	33.4698 N 132.7126 E	LC/swamp	L299	LC104329
98	<i>Cx. sasai</i>	Gifu	Shirakawa	36.1526 N 136.8517 E	LC/tire	L1740	LC054491
99	<i>Cx. sasai</i>	Kagoshima	Kirishima	31.9010 N 130.8500 E	LC/well	L2378	LC054492
100	<i>Cx. sasai</i>	Fukushima	Minamiaizu	37.1852 N 139.6342 E	LC/tire	L2022	LC054493
101	<i>Cx. sasai</i>	Fukushima	Minamiaizu	37.2047 N 139.5952 E	LC/pole hole	L1930	LC054494
102	<i>Cx. sasai</i>	Tokyo	Okutama	35.8519 N 139.0396 E	LC/tire	L655	LC104331
103	<i>Cx. sasai</i>	Tokyo	Okutama	35.8519 N 139.0396 E	LC/tire	L658	LC104332
104	<i>Cx. sasai</i>	Yamaguchi	Kyowa mura	34.2822 N 131.2918 E	LC/tire	L1137	LC104333
105	<i>Cx. sasai</i>	Yamaguchi	Kyowa mura	34.2822 N 131.2918 E	LC/tire	L1138	LC104334
106	<i>Cx. sasai</i>	Fukushima	Minamiaizu	37.1852 N 139.6342 E	LC/tire	L2001	LC104336
107	<i>Cx. kyotoensis</i>	Miyazaki	Kushima	31.3900 N 131.3252 E	LC/bathtub	L616	LC104325
108	<i>Cx. kyotoensis</i>	Wakayama	Nodawara	34.1982 N 135.4067 E	LC/tire	L1417	LC104326
109	<i>Cx. kyotoensis</i>	Wakayama	Nodawara	34.1982 N 135.4067 E	LC/tire	L1418	LC104327
110	<i>Cx. kyotoensis</i>	Wakayama	Nodawara	34.1982 N 135.4067 E	LC/tire	L1419	LC104335
111	<i>Cx. kyotoensis</i>	Wakayama	Nodawara	34.1982 N 135.4067 E	LC/tire	L1432	LC104330
112	<i>Cx. kyotoensis</i>	Wakayama	Nodawara	34.1982 N 135.4067 E	LC/tire	L1394	LC054490
113	<i>Cx. kyotoensis</i>	Gifu	Takane	36.0333 N 137.5206 E	LC/water container	L1623	LC054495
114	<i>Lutzia vorax</i>	Ehime	Hijikawa	33.4712 N 132.7146 E	LC/rock pool	L1026	LC054505
115	<i>Lt. vorax</i>	Wakayama	Nodawara	34.1962 N 135.3975 E	LC/drum can	L1373	LC054506
116	<i>Lt. vorax</i>	Kumamoto	Kawaura	32.3619 N 130.0880 E	LC/stagnant water	L2208	LC054507
117	<i>Lt. vorax</i>	Gifu	Takane	36.0333 N 137.5206 E	LC/water container	L1617	LC054508
118	<i>Lt. vorax</i>	Kumamoto	Misumi	32.6244 N 130.5632 E	LC/water container	L2035	LC054509
119	<i>Lt. vorax</i>	Miyazaki	Kushima	31.3900 N 131.3252 E	LC/water container	L1032	LC054510

Appendix 1. *Continued.*

Serial no.	Species	Collection details of collection site				Specimen code	GenBank accession no.
		Prefecture	Area	GPS coordinates	Method/habitat		
120	<i>Aedes dorsalis</i>	Okayama	Ushimado	42.6402 N 141.7882 E	DT/bush	A14-20	LC054337
121	<i>Ae. dorsalis</i>	Hokkaido	Tomakomai	34.6463 N 134.1546 E	SP/forest	A98	LC054338
122	<i>Ae. excrucians</i>	Hokkaido	Tomakomai	42.6425 N 141.7837 E	DT/bush	A227	LC054347
123	<i>Ae. excrucians</i>	Hokkaido	Ishikari river	43.225 N 141.3555 E	DT/bush	A57	LC054348
124	<i>Ae. excrucians</i>	Hokkaido	Ishikari river	43.225 N 141.3555 E	DT/bush	A58	LC054349
125	<i>Ae. excrucians</i>	Hokkaido	Ishikari river	43.225 N 141.3555 E	DT/bush	A61	LC054350
126	<i>Ae. excrucians</i>	Hokkaido	Ishikari river	43.225 N 141.3555 E	DT/bush	A62	LC054351
127	<i>Ae. excrucians</i>	Hokkaido	Ishikari river	43.225 N 141.3555 E	DT/bush	A65	LC054352
128	<i>Ae. excrucians</i>	Hokkaido	Ochiai	43.0803 N 140.8848 E	DT/bush	A70	LC054353
129	<i>Ae. excrucians</i>	Hokkaido	Ochiai	43.0802 N 140.8846 E	DT/bush	A72	LC054354
130	<i>Ae. punctor</i>	Hokkaido	Ishikari river	43.2247 N 141.3560 E	DT/bush	A201	LC054385
131	<i>Ae. punctor</i>	Aomori	Mt. Iwaki	40.6189 N 140.3044 E	DT/forest	A28	LC054386
132	<i>Ae. punctor</i>	Aomori	Mt. Iwaki	40.628 N 140.2583 E	DT/forest	A29	LC054387
133	<i>Ae. punctor</i>	Aomori	Mt. Iwaki	40.628 N 140.2583 E	DT/forest	A30	LC054388
134	<i>Ae. punctor</i>	Aomori	Mt. Iwaki	40.628 N 140.2583 E	DT/forest	A31	LC054389
135	<i>Ae. communis</i>	Hokkaido	Ochiai	43.0880 N 140.8928 E	DT/bush	A15	LC054328
136	<i>Ae. communis</i>	Hokkaido	Ochiai	43.0880 N 140.8928 E	DT/bush	A16	LC054329
137	<i>Ae. communis</i>	Hokkaido	Ochiai	43.0880 N 140.8928 E	DT/bush	A17	LC054330
138	<i>Ae. communis</i>	Hokkaido	Ochiai	43.0880 N 140.8928 E	DT/bush	A204	LC054331
139	<i>Ae. communis</i>	Hokkaido	Ochiai	43.0880 N 140.8928 E	DT/bush	A19	LC054332
140	<i>Ae. communis</i>	Hokkaido	Ochiai	43.0880 N 140.8928 E	DT/bush	A20	LC054333
141	<i>Ae. communis</i>	Hokkaido	Ochiai	43.0880 N 140.8928 E	DT/bush	A202	LC054334
142	<i>Ae. communis</i>	Hokkaido	Ochiai	43.0880 N 140.8928 E	DT/bush	A22	LC054335
143	<i>Ae. communis</i>	Hokkaido	Ochiai	43.0880 N 140.8928 E	DT/bush	A24	LC054336
144	<i>Ae. japonicus japonicus</i>	Aomori	Kidukuriooyu	40.8728 N 140.3183 E	SP/forest	A13-1	LC054367
145	<i>Ae. japonicus japonicus</i>	Hokkaido	Tomakomai	42.6444 N 141.7858 E	SP/bush	A14-25	LC054368
146	<i>Ae. japonicus japonicus</i>	Nagasaki	Tsushima IslAMD	34.6412 N 129.3231 E	LC/drainage pit	L1005	LC054369
147	<i>Ae. japonicus japonicus</i>	Hokkaido	Toubetsu	43.1594 N 141.5068 E	LC/water container	L1177	LC054370
148	<i>Ae. japonicus japonicus</i>	Gifu	Takane	36.0333 N 137.5206 E	LC/water container	L1590	LC054371
149	<i>Ae. japonicus japonicus</i>	Fukushima	Lake Inawashiro	37.4540 N 140.0517 E	LC/boat	L1939	LC054372
150	<i>Ae. japonicus japonicus</i>	Kagoshima	Kirishima	31.8976 N 130.8345 E	LC/rock pool	L2438	LC054373
151	<i>Ae. japonicus japonicus</i>	Yamaguchi	Kyowa mura	34.2822 N 131.2918 E	LC/tire	L1148	LC104311
152	<i>Ae. japonicus japonicus</i>	Kumamoto	Ushibuka	32.2106 N 130.0616 E	LC/flag pole	L2131	LC104312
153	<i>Ae. japonicus japonicus</i>	Akita	Oodate	40.3151 N 140.4667 E	LC/tire	L12	LC104313
154	<i>Ae. japonicus japonicus</i>	Ehime	Uchiko	33.4353 N 132.6856 E	LC/water container	L284	LC104314
155	<i>Ae. japonicus japonicus</i>	Miyazaki	Kushima	31.3900 N 131.3252 E	LC/bathtub	L581	LC104315
156	<i>Ae. japonicus japonicus</i>	Wakayama	Nodawara	34.1982 N 135.4067 E	LC/tire	L1225	LC104316
157	<i>Ae. hatorii</i>	Wakayama	Shimotomobuchi	34.1961 N 135.4279 E	LC/rock pool	L1278	LC054364
158	<i>Ae. hatorii</i>	Wakayama	Shimotomobuchi	34.1961 N 135.4279 E	LC/rock pool	L1279	LC054365
159	<i>Ae. hatorii</i>	Wakayama	Shimotomobuchi	34.1961 N 135.4279 E	LC/rock pool	L1289	LC054366
160	<i>Ae. togoi</i>	Wakayama	Shirahama	33.6715 N 135.3312 E	LC/rock pool	L1268	LC054395
161	<i>Ae. togoi</i>	Wakayama	Shirahama	33.6715 N 135.3312 E	LC/rock pool	L1397	LC054396
162	<i>Ae. togoi</i>	Kumamoto	Ushibuka	32.2098 N 130.061 E	LC/rock pool	L2204	LC054397
163	<i>Ae. togoi</i>	Kumamoto	Ushibuka	32.2098 N 130.061 E	LC/rock pool	L2205	LC054398
164	<i>Ae. togoi</i>	Kumamoto	Ushibuka	32.2098 N 130.061 E	LC/rock pool	L2211	LC054399
165	<i>Ae. oreophilus</i>	Aomori	Mt. Iwaki	40.6296 N 140.3380 E	DT/forest	A89	LC054380
166	<i>Ae. oreophilus</i>	Aomori	Mt. Shirakami	40.5789 N 140.1319 E	DT/forest	A96	LC054381
167	<i>Ae. oreophilus</i>	Gifu	Shirakawa	36.1526 N 136.8517 E	LC/tire	L1841	LC054382
168	<i>Ae. oreophilus</i>	Fukushima	Minamiaizu	37.1004 N 139.6674 E	LC/tree hole	L1881	LC054383
169	<i>Ae. oreophilus</i>	Fukushima	Minamiaizu	37.2047 N 139.5952 E	LC/pole hole	L1917	LC054384
170	<i>Ae. nipponicus</i>	Aomori	Mt. Shirakami	40.5789 N 140.1319 E	SP/forest	A13-9	LC054374
171	<i>Ae. nipponicus</i>	Gifu	Kitani	36.1928 N 136.9033 E	SP/forest	A14-44	LC054375
172	<i>Ae. nipponicus</i>	Nagasaki	Tsushima IslAMD	34.6406 N 129.3231 E	LC/tree hole	L1054	LC054376
173	<i>Ae. nipponicus</i>	Nagasaki	Tsushima IslAMD	34.6406 N 129.3231 E	LC/tree hole	L1064	LC054377
174	<i>Ae. nipponicus</i>	Fukushima	Minamiaizu	37.1004 N 139.6674 E	LC/tree hole	L1882	LC054378
175	<i>Ae. watasei</i>	Kumamoto	Ushibuka	32.2134 N 130.0770 E	LC/tree hole	L2084	LC054405
176	<i>Ae. watasei</i>	Kumamoto	Ushibuka	32.2134 N 130.0770 E	LC/tree hole	L2192	LC054406
177	<i>Ae. watasei</i>	Kumamoto	Ushibuka	32.2134 N 130.0770 E	LC/tree hole	L2209	LC054407
178	<i>Ae. riversi</i>	Nagasaki	Tsushima IslAMD	34.6406 N 129.3231 E	LC/tree hole	L1055	LC054390
179	<i>Ae. riversi</i>	Nagasaki	Tsushima IslAMD	34.6412 N 129.3231 E	LC/water container	L1065	LC054391

Appendix 1. *Continued.*

Serial no.	Species	Collection details of collection site				Specimen code	GenBank accession no.
		Prefecture	Area	GPS coordinates	Method/habitat		
180	<i>Ae. riversi</i>	Nagasaki	Tsushima IslAMD	34.6406 N 129.3231 E	LC/tree hole	L1106	LC054392
181	<i>Ae. riversi</i>	Kumamoto	Ushibuka	32.2134 N 130.0770 E	LC/tree hole	L2193	LC054393
182	<i>Ae. riversi</i>	Kumamoto	Ushibuka	32.2134 N 130.0770 E	LC/tree hole	L2233	LC054394
183	<i>Ae. galloisi</i>	Hokkaido	Ochiai	43.0847 N 140.8906 E	DT/bush	A1	LC054360
184	<i>Ae. galloisi</i>	Hokkaido	Ishikari river	43.2255 N 141.3565 E	DT/bush	A14-10	LC054361
185	<i>Ae. galloisi</i>	Gifu	Kitani	36.1952 N 136.9032 E	SP/forest	A14-42	LC054362
186	<i>Ae. galloisi</i>	Hokkaido	Ochiai	43.0847 N 140.8906 E	DT/bush	A2	LC054363
187	<i>Ae. albopictus</i>	Wakayama	Nodawara	34.1962 N 135.3975 E	LC/drum can	L1262	LC054323
188	<i>Ae. albopictus</i>	Kumamoto	Ushibuka	32.2134 N 130.0770 E	LC/tree hole	L2242	LC054324
189	<i>Ae. albopictus</i>	Kumamoto	Ushibuka	32.2106 N 130.0616 E	LC/flag pole	L2359	LC054325
190	<i>Ae. albopictus</i>	Kumamoto	Ushibuka	32.2134 N 130.0770 E	LC/tree hole	L2371	LC054326
191	<i>Ae. flavopictus flavopictus</i>	Aomori	Goshogawara	40.8523 N 140.5310 E	SP/forest	A13-8	LC054355
192	<i>Ae. flavopictus flavopictus</i>	Gifu	Kitani	36.1952 N 136.9032 E	SP/forest	A14-39	LC054356
193	<i>Ae. flavopictus flavopictus</i>	Nagasaki	Tsushima IslAMD	34.6412 N 129.3231 E	LC/water container	L1006	LC054357
194	<i>Ae. flavopictus flavopictus</i>	Nagasaki	Tsushima IslAMD	34.6406 N 129.3231 E	LC/tree hole	L1016	LC054358
195	<i>Ae. flavopictus flavopictus</i>	Fukushima	Minamiaizu	37.1004 N 139.6674 E	LC/tree hole	L1920	LC054359
196	<i>Ae. vexans nipponii</i>	Hokkaido	Ishikari river	43.2234 N 141.3515 E	DT/bush	A13-11	LC054400
197	<i>Ae. vexans nipponii</i>	Aomori	Kidukuriooyu	40.8727 N 140.3182 E	DT/forest	A13-5	LC054401
198	<i>Ae. vexans nipponii</i>	Nagasaki	Tsushima IslAMD	34.5693 N 129.2951 E	SP/bush	A14-3	LC054402
199	<i>Ae. vexans nipponii</i>	Hokkaido	Aoyama	43.4058 N 141.5835 E	DT/forest	A14-7	LC054403
200	<i>Ae. vexans nipponii</i>	Nagasaki	Tsushima IslAMD	34.6112 N 129.3551 E	LC/rice field	L1071	LC054404
201	<i>Ae. bekkui</i>	Hokkaido	Atsuma	42.7000 N 141.8334 E	SP/bush	A14-27	LC054327
202	<i>Ae. esoensis</i>	Aomori	Kidukuriooyu	40.8728 N 140.3183 E	DT/forest	A13-3	LC054339
203	<i>Ae. esoensis</i>	Aomori	Kidukuriooyu	40.8648 N 140.2906 E	DT/bush	A13-4	LC054340
204	<i>Ae. esoensis</i>	Hokkaido	Aoyama	43.4060 N 141.5849 E	DT/forest	A14-14	LC054341
205	<i>Ae. esoensis</i>	Hokkaido	Atsuma	42.7002 N 141.8332 E	DT/bush	A14-24	LC054342
206	<i>Ae. esoensis</i>	Hokkaido	Naganuma	43.0029 N 141.7225 E	DT/bush	A14-37	LC054343
207	<i>Ae. esoensis</i>	Aomori	Mt. Shirakami	40.5789 N 140.1319 E	SP/forest	A223	LC054344
208	<i>Ae. esoensis</i>	Aomori	Mt. Iwaki	40.6187 N 140.3044 E	DT/forest	A33	LC054345
209	<i>Ae. esoensis</i>	Aomori	Goshogawara	40.8520 N 140.5311 E	DT/forest	A38	LC054346
210	<i>Ae. esoensis</i>	Aomori	Goshogawara	40.8520 N 140.5311 E	DT/forest	A35	LC144861
211	<i>Ae. esoensis</i>	Aomori	Goshogawara	40.8523 N 140.5310 E	DT/forest	A217	LC144862
212	<i>Ae. esoensis</i>	Aomori	Goshogawara	40.8523 N 140.5310 E	DT/forest	A221	LC144863
213	<i>Ae. esoensis</i>	Aomori	Goshogawara	40.8523 N 140.5310 E	DT/forest	A222	LC144864
214	<i>Ae. yamadai</i>	Hokkaido	Ishikari river	43.225 N 141.3555 E	DT/bush	A11	LC054408
215	<i>Ae. yamadai</i>	Aomori	Goshogawara	40.8609 N 140.4818 E	DT/bush	A13	LC054409
216	<i>Ae. yamadai</i>	Aomori	Goshogawara	40.8609 N 140.4818 E	DT/bush	A14	LC054410
217	<i>Ae. yamadai</i>	Hokkaido	Ishikari river	43.2247 N 141.3560 E	DT/bush	A3	LC054411
218	<i>Ae. yamadai</i>	Hokkaido	Tomakomai	42.6323 N 141.7746 E	DT/bush	A6	LC054412
219	<i>Ae. yamadai</i>	Hokkaido	Ishikari river	43.225 N 141.3555 E	DT/bush	A7	LC054413
220	<i>Ae. yamadai</i>	Hokkaido	Ishikari river	43.2246 N 141.3566 E	LC/ground pool	L1162	LC054414
221	<i>Ae. nobukonis</i>	Kagawa	Sanuki	34.3075 N 134.2122 E	DT/bush	A97	LC054379
222	<i>Armigeres subalbatus</i>	Kumamoto	Kawaura	32.3520 N 130.0885 E	LC/flower pot	L2068	LC054443
223	<i>Ar. subalbatus</i>	Kumamoto	Kawaura	32.3520 N 130.0885 E	LC/flower pot	L2069	LC054444
224	<i>Ar. subalbatus</i>	Kagoshima	Kirishima	31.8876 N 130.7941 E	LC/bamboo stump	L2382	LC054445
225	<i>Uranotaenia novoboscura novoboscura</i>	Wakayama	Nodawara	34.1982 N 135.4067 E	LC/tire	L1416	LC104324
226	<i>Ur. novoboscura novoboscura</i>	Kumamoto	Amakusa	32.4035 N 130.0797 E	LC/tire	L2270	LC054527
227	<i>Ur. novoboscura novoboscura</i>	Kumamoto	Kawaura	32.3520 N 130.0885 E	LC/flower pot	L2280	LC054528
228	<i>Ur. novoboscura novoboscura</i>	Kumamoto	Kawaura	32.3520 N 130.0885 E	LC/flower pot	L2328	LC054529
229	<i>Ur. novoboscura novoboscura</i>	Kumamoto	Amakusa	32.4035 N 130.0797 E	LC/tire	L2364	LC054530
230	<i>Ur. novoboscura novoboscura</i>	Kumamoto	Amakusa	32.4035 N 130.0797 E	LC/tire	L2411	LC054531
231	<i>Tripteroides bambusa bambusa</i>	Nagasaki	Tsushima IslAMD	34.6406 N 129.3231 E	LC/tree hole	L1037	LC054517
232	<i>Tr. bambusa bambusa</i>	Fukushima	Minamiaizu	37.1004 N 139.6674 E	LC/tree hole	L1880	LC054518
233	<i>Tr. bambusa bambusa</i>	Gifu	Shirakawa	36.1526 N 136.8517 E	LC/tire	L1546	LC054519
234	<i>Tr. bambusa bambusa</i>	Fukushima	Minamiaizu	37.2047 N 139.5952 E	LC/pole hole	L1909	LC054520
235	<i>Tr. bambusa bambusa</i>	Kumamoto	Ushibuka	32.2106 N 130.0616 E	LC/flag pole	L2281	LC054521
236	<i>Toxorhynchites towadensis</i>	Ehime	Hijikawa	33.4412 N 132.6377 E	LC/bamboo stump	L33	LC054522
237	<i>Tx. towadensis</i>	Tokyo	Okutama	35.8519 N 139.0396 E	LC/tire	L35	LC054523
238	<i>Tx. towadensis</i>	Aomori	Goshogawara	40.8516 N 140.5280 E	LC/tire	L39	LC054524
239	<i>Tx. towadensis</i>	Gifu	Shirakawa	36.1526 N 136.8517 E	LC/tire	L1877	LC054525
240	<i>Tx. towadensis</i>	Kagoshima	Kirishima	31.8876 N 130.7943 E	LC/bamboo stump	L2453	LC054526

DT: Dry ice trap collection, SP: Sweep net collection, LC: Larval collection