

平成30年6月17日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06934

研究課題名(和文) シルビアシジミを指標としたシバ型草地性絶滅危惧種の生活史と遺伝的多様性の解明

研究課題名(英文) Life history and genetic diversity of endangered glassland butterflies using *Zizina emelina* as an indicator

研究代表者

平井 規央 (Hirai, Norio)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：70305655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：シルビアシジミは、生息地や食草の衰退によってレッドリストの最も高いランクに入っている。本研究では、15座のマイクロサテライトマーカーを開発し、13個体群について遺伝的多様性を解析した。遺伝的多様性は伊丹空港個体群で最も高く、安定した個体数が長年維持されてきたと推定された。石川と栃木の個体群は遺伝的多様性が低く、生息地の分断や孤立が進行していると考えられた。Fstに基づいてPrincipal Coordinate Analysis (PCoA)を行ったところ、近畿・四国、千葉・島根・九州、栃木、石川の4つのグループに分かれた。遺伝的な変異が最も多い伊丹空港個体群は本種の保全上重要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Zizina emelina is one of the most endangered butterfly species listed in the Red Data Book published by the Ministry of the Environment, Japan, due to loss of its principal food plant and habitat. We developed 15 microsatellite loci and estimated the genetic diversity of this species using 213 individuals from 13 populations in Japan. The genetic diversity of the Itami-Airport population in the Kinki district was the highest, suggesting that the population was large and stable. Conversely, the genetic diversity of the Ishikawa and Tochigi populations was markedly lower than that observed elsewhere, suggesting that these populations were isolated and that their habitats were fragmented. The Itami-Airport population, which had the highest genetic diversity, is considered to be an important reservoir of genetic variation for maintaining genetic diversity in this species.

研究分野：昆虫生理・生態学

キーワード：遺伝的多様性 マイクロサテライト 草原性 チョウ類 昆虫 保全

1. 研究開始当初の背景

【研究の学術的背景】

近年、農耕地や放牧地の減少、河川や海浜の護岸等により草地が減少し、それにとともなう草地性の動植物の衰退が著しい。特に草丈の低い「シバ型草地」の減少は著しく、そこに生息する多くの生物が絶滅危惧種となっている。チョウ類では、約 90 の種や亜種が環境省の 2012 年版レッドリストに掲載されているが、そのうちの 50 種以上が草地性である。このような日本の草原性チョウ類を危機的な状況から保全するためには、モデルとなる種を選定し、生活史や遺伝的多様性の観点から保全策を検討する必要がある。

シルビアシジミ *Zizina emelina* は 2008 年にヒメシルビアシジミ *Z. otis* から独立した種で、関東～種子島と韓国の一部のみに分布する。本種は主としてシバ型草地に生息し、環境省のレッドリストで絶滅危惧 IB 類に選定されているほか、最近では環境省の生息域外保全のモデル種ともなっている。日本における本種の衰退は著しく、すでに 6 県で絶滅したと考えられている。一方で、大阪府、兵庫県、石川県、和歌山県などで絶滅したと考えられていた生息地において近年になって再発見される例や、新たな生息地が発見される例も知られている。申請者らの調査によって、本種が大阪府豊中市と兵庫県伊丹市にまたがる大阪国際空港とその周辺の緑地に高密度で生息することが明らかになった。本種の幼虫は主としてマメ科のミヤコグサ *Lotus japonicus* を寄主植物として利用することが知られているが、大阪国際空港周辺では、同じマメ科のシロツメクサ *Trifolium repens* を主に利用していた。また、この生息地で得られたメス成虫から採卵し、実験室内で幼虫を飼育したところ、複数のメス成虫において子世代がすべてメスとなる現象が認められた。申請者らは、昆虫類に性比異常を起こすことが知られる共生細菌ボルバキア (*Wolbachia*) の感染の可能性を考え、調査したところ、この性比異常は、ボルバキアによって引き起こされる「オス殺し」であることが明らかになった。さらに申請者らは、ミトコンドリア DNA と核 DNA の一部の配列を元に日本と韓国各地における本種の遺伝的な変異の調査を行った。その結果、ミトコンドリア DNA の解析では、本種の各地における遺伝的な変異は比較的小さく、地域によってハプロタイプ頻度は異なるものの、離れた生息地においても同一のハプロタイプが認められた。この背景にはボルバキアのオス殺しによる遺伝的多様性の低下も関与していることが判明しており、核 DNA の解析においても傾向は類似していたものの、さらに変異は少なかった。このような背景から、本種の各個体群における遺伝的多様性については、塩基配列の比較のみでは評価が難しく、保全単位の設定も困難となっている。

2. 研究の目的

近年、遺伝的集団構造の解析法として、新たにマイクロサテライトなどのマーカーが利用されるようになった。草原性のチョウであるヒョウモンモドキ類では、この方法を用いることによって、塩基配列の比較では明らかにできなかった、狭い地域の中の遺伝子流動や遺伝的多様性の比較を可能にしている。本研究ではこの技術を利用して、個体群ごとのより詳細な遺伝的多様性を明らかにすることを目的とした。

以上のような遺伝的な側面に加えて、各地の個体群の保全にはそれぞれの個体群の生活史特性を明らかにし、把握しておくことが不可欠である。まず、個体群の維持のためには、幼虫の寄主植物の確保が必要不可欠であるが、申請者らの調査により、本種にはミヤコグサのみを寄主植物とする単食性個体群とシロツメクサなども利用する広食性個体群の存在が明らかとなっている。本研究では、各地の個体群について産卵実験や幼虫の発育に関する飼育実験を行い(寄主植物選好性実験) 本種の食性を明らかにすることで、生息地における植生の管理状況や外来雑草の影響などについて考察する。また、本種の周年経過のうち、特に越冬期には生息地における草刈など人為的な管理の影響を強く受けることから、飼育実験により越冬に入る時期を正確に予測することが必要となっている。申請者らの予備実験により、本種は 20 程度で幼虫期に短日を受感すると休眠に入ることが判明している。一方、野外で本種成虫が見られる時期については、11 月までの生息地もあれば、9 月で姿を消す場所もあり、生息地によって本種が休眠に入る臨界日長が異なることが示唆されている。本研究では、緯度の異なる石川県、大阪府などの個体群についても休眠性を調査し、臨界日長を明らかにする。本種は、シバ型草原性の絶滅危惧種であるが、比較的多くの生息地が点在する地域がある一方で、地理的に隔離された個体群も存在する。したがって、遺伝的多様性の程度、寄主植物利用、ボルバキアの感染、休眠などの生活史形質が個体群ごとに異なることが予想される。本研究では、特に最近発見または再発見された生息地(石川県、和歌山県)や衰退が始まっていると考えられる生息地(千葉県、栃木県、大阪府、兵庫県)の本種の遺伝的多様性を明らかにするとともに、緯度や環境の異なる生息地における休眠性などの生活史の解明を行うが、得られた成果は生息地の維持管理をはじめとして、多くのシバ型草地性絶滅危惧種の保全に寄与するものとなり得る。

3. 研究の方法

大阪府の生息地で調査を行い、採集した個体から全 DNA を抽出した。次世代シーケンサーの解析結果により、マイクロサテライトマーカーの予備的な選定を行った。続いて、千葉

県、栃木県、石川県、兵庫県などでもシルビアシジミの個体から DNA を抽出し、これらのサンプルについて、キャピラリー・シーケンサー (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer) を用いて前述のマーカによる予備的な解析を行い、マイクロサテライトマーカについて、有効なプライマーを選抜した。開発・選定したプライマーを用いて、本研究で採集した個体や過去に採集された個体について解析を行った。解析は原則として1個体群につき10個体以上について行った。特に、最近発見・再発見された石川県などの孤立した個体群と、兵庫県や千葉県のように比較的広範囲に複数の個体群が点在するような地域について、遺伝的多様性を詳細に解析し、比較した。解析には新鮮な個体を用いることが望ましいが、過去に採集した既存のサンプルについても可能な範囲で解析を行った。

野外で採集した幼虫などを飼育し、寄生性天敵の調査を行った。寄生バチや寄生バエなどの天敵が脱出した場合は飼育を継続し、羽化後に同定した。

また、得られた幼虫を孵化後速やかに20のさまざまな日長条件下に置き、休眠性を明らかにする実験を行った。日長は、16L-8D(16時間日長)、15L-8D、14L-10D、13L-11D、12L-10Dなどをについて調査した。休眠の指標として、幼虫期の発育遅延や過剰脱皮(非休眠では4齢)などを記録した。

4. 研究成果

シルビアシジミとヒメシルビアシジミを生息地から採集し、DNA抽出を行った。大阪府の生息地で採集したシルビアシジミから抽出した全DNAを用いて次世代シーケンサーによる解析を行い、得られたデータからマイクロサテライトを含む配列の探索を行った。その結果、多数のマイクロサテライトを含む領域が確認された。さらに、解析に有効な100bp前後の短い領域を挟むプライマーの候補を抽出した。

開発したマイクロサテライトマーカを用いて、兵庫県、大阪府、石川県、徳島県、島根県、長崎県、宮崎県、鹿児島県、千葉県、栃木県で採集された本種について、実際の解析を行った。使用した15塩基座すべてで多型が確認され、確認されたアリル数は2~15であった。遺伝的多様性は兵庫県の伊丹空港周辺個体群で高く、栃木県や石川県では低かった。PCoA解析の結果では、石川県は他の個体群と遺伝的に大きく異なっていた。石川県の個体群を除いてPCoA解析を行った結果、本種個体群は遺伝的に離れた3つのグループ(近畿と徳島県のグループ、千葉県と島根県と九州のグループ、栃木県のグループ)に分かれた。さらに、伊丹空港周辺の生息地間での比較では、地理的距離と遺伝的距離の間に相関関係は見られなかった。以上の結果から、本種の一部の個体群では生息域の分断・孤立化がすすみ、遺伝的多様性の喪失が起こつて

いると考えられる。伊丹空港周辺では、本種個体が生息域間を頻りに移動・分散することで高い遺伝的多様性が保たれていると考えられる。

伊丹空港周辺では、定期的に詳細な野外調査を行い、成虫は5~10月に確認された。空港に隣接する生息地では、個体数密度が高く、離れた生息地では密度は低かった。

休眠性については、恒温器を用いて20のさまざまな日長条件下で卵から成虫の飼育実験を行った。日本での分布の北限である石川県産個体群と大阪府個体群を比較した結果、臨界日長が約1時間20分異なることを明らかにした。

石川県個体群では、寄生性天敵を複数発見した。これらの寄生性天敵は、いずれも越冬幼虫の飼育によって羽化が確認されたもので、コマユバチ科、ヒメバチ科、ヤドリバエ科にそれぞれ属していると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計15件)

平井規央(2018)都市の生物多様性地域戦略の課題と展望 - 戦略の策定と残された課題にどう向き合うか - .地域自然死と保全 40: 59-62. 査読有

鈴木真裕・平井規央・石井実(2018)大阪府の都市部に造成されたビオトープ池の大型無脊椎動物群集に及ぼす池干し効果. 環動昆 29: 1-12. 査読有

Matsuoka, H., N. Hirai and M. Ishii (2017) Reproduction, growth rate and dispersal of the dark chub, *Candidia sieboldii*, as estimated by using the mark-release-recapture method. Journal of Freshwater Ecology 32(1): 633-641. 査読有

Suzuki, M., N. Hirai and M. Ishii (2017) Early community assembly of aquatic insects in experimental ponds established across the forest margin of a Satoyama coppice. Environmental Entomology and Zoology 28: 133-142. 査読有

平井規央(2017)気づかない間に進行する在来種から近縁外来種への入れ替わり. 地域自然史と保全 39(1): 3-6. 査読有

Hirai, N., Y. Torii, H. Matsuoka and M. Ishii (2017) Genetic diversity and intrusion of alien populations of *Oryzias latipes* in Osaka Prefecture, central Japan. Japanese

- Journal of Environmental Entomology and Zoology 28: 47-54. 査読有
- 松岡悠・平井規央・石井実 (2017) カワムツ属 2 種とオイカワの交雑個体の形態比較およびミトコンドリア DNA 解析. 地域自然史と保全 39(1): 63-69. 査読有
- Yago, M. (2017) New northern limit for the distribution of *Melitaea scotosia* (Lepidoptera: Nymphalidae) in Japan. *Neo Zephyrus*, (1): 61-64. 査読有
- Inotsuka, A., N. Hirai, S. Aoyama and M. Ishii (2016) Genetic population structure of the fluvial eight-barbel loach *Lefua* sp. 1 in the three river systems in central Honshu, Japan, revealed by microsatellite DNA markers. *Ichthyological Research* 64(2), 232-239. 査読有
- Hirai, N., Y. Hirai and M. Ishii (2016) Differences in pupal cold hardiness and larval food consumption between overwintering and non-overwintering generations of the common yellow swallowtail, *Papilio machaon* (Lepidoptera: Papilionidae), from the Osaka population. *Entomological Science* 19: 180-187 査読有
- 平井規央 (2016) シルビアシジミのボルバキア感染と性比異常. *昆虫と自然* 51(1): 13-16. 査読無
- 吉村忠浩, 竹内剛, 森地重博, Anja Sliwa, 平井規央, 石井実 (2015) 大阪府北部の鴻応山周辺におけるギフチョウ個体群と食草群落の現状. *蝶と蛾* 66 (2): 62-67. 査読有
- Sakamoto, Y., N. Hirai, and M. Ishii (2015) Effects of photoperiod and temperature on the development and diapause of the endangered butterfly *Zizina emelina* (Lepidoptera: Lycaenidae). *J Insect Conserv* 19: 639-645. 査読有
- Sakamoto, Y., N. Hirai, T. Tanikawa, M. Yago and M. Ishii (2015) Population genetic structure and *Wolbachia* infection in an endangered butterfly, *Zizina emelina* (Lepidoptera, Lycaenidae), in Japan. *Bulletin of Entomological Research* 105(2): 152-165. 査読有
- Zhuang, H., Yago, M. and Wang, M. (2015) Theclini butterflies from Weixi, China, with description of two new species (Lepidoptera: Lycaenidae). *Zootaxa*, 3985 (1): 142-150. 査読有
- [学会発表] (計 15 件)
- Kamino, T., S. Ueda, Y. Yoshiyasu, N. Hirai. Host-parasitoid relationship between an aquatic moth, *Elophila turbata* and a braconid wasp, *Microgaster* sp. The 5th International Entomophagous Insects Conference. 2017年10月17日 都メッセ, 京都府・京都市.
- 佐藤大輔・中濱直之・伊津野彩子・井鷲裕司・矢後勝也・上田昇平・平井規央. シルビアシジミのマイクロサテライトマーカーの開発. 日本昆虫学会第77回大会. 2017年9月3日, 愛媛大学, 愛媛県松山市.
- Hirai, N., Y. Sakamoto, M. Yago, M. Ishii and C.-M. Lee. Population genetic structure and *Wolbachia* infection in an endangered butterfly, *Zizina emelina* (Lepidoptera: Lycaenidae). XXV International Congress of Entomology (ICE 2016). 2016年9月29日, Orange county convention center, フロリダ州・オーランド.
- Ishii, M., Y. Asai, Y. Nishinaka and N. Hirai (2016) Change in butterfly species diversity in Mt. Mikusa Zephyrus Coppice, Japan for 24 years: a struggle against the dwarf bamboo understory. XXV International Congress of Entomology (ICE 2016). 2016年9月29日, Orange county convention center, フロリダ州・オーランド.
- Suzuki, M., N. Yamamoto, N. Hirai and M. Ishii (2016) Metacommunity structure and diversity of aquatic insects in temporary and permanent waters. XXV International Congress of Entomology (ICE 2016). 2016年9月29日, Orange county convention center,

フロリダ州・オーランド。

平井規央・中村康弘・佐藤大輔・石井実。
ツシマウラボシシジミの人工飼料による
飼育と日長反応。日本鱗翅学会第63回大会。
2016年10月23日，日本大学，神奈川県・藤
沢市。

石井実・浅井悠太・西中康明・平井規央。
三草山ゼフィルスの森における24年間の
チョウ類群集の変化。日本鱗翅学会第63
回大会，2016年10月23日，日本大学，神奈
川県・藤沢市。

長谷川湧人・竹内剛・平井規央・上田昇
平。日長を感受する期間の違いがもたら
す不思議な生活史：緯度クラインを示さ
ないウラナミジャノメの化性変異，第 64
回日本生態学会大会，2017年3月15日，
早稲田大学，東京都・新宿区

吉田周・平井規央・上田昇平・石井実，
大阪および京都市周辺でのツマグロヒョ
ウモンの越冬。第 28 回日本環境動物昆虫
学会年次大会，2016年11月12日，信州
大学，長野県・上田。

矢後勝也・小田康弘，2016. イントロダ
クション：「日本産チョウ類の衰亡と保護
第7集」の出版にあたって。自然保護公
開シンポジウム「関東地区における絶滅
危惧チョウ類の最新の動向」- 日本鱗翅
学会版日本産蝶類レッドリスト(2015年
版)から -。日本鱗翅学会第 63 回大会，
2016年10月22日，日本大学，神奈川県・
藤沢市。

平井規央・坂本佳子・矢後勝也・石井実。
大阪府産と石川県産シルビアシジミの休
眠性の比較。日本鱗翅学会第 62 回大会，
2015年11月1日，とりぎん文化会館，鳥
取県・鳥取市。

石田麻衣子・平井規央・石井実。日本産
シロチョウ科成虫の紫外斑。日本鱗翅学
会第 62 回大会，2015年11月1日，とり
ぎん文化会館，鳥取県・鳥取市。

大津建大・平井規央・石井実・鈴木丈詞・
天野洋。日本列島におけるクロマダラソ
テツシジミの越冬可能性。日本鱗翅学会
第 62 回大会，2015年11月1日，とりぎ
ん文化会館，鳥取県・鳥取市。

吉村忠浩・竹内剛・森地重博・Anja Sliwa・
平井規央・石井実。大阪府北部鴻応山に
おけるギフチョウ個体群の現状と補強の
試み その 3。日本鱗翅学会第 62 回大会，
2015年11月1日，とりぎん文化会館，鳥
取県・鳥取市。

矢後勝也・ソナム ワンディ・カルマ ワ
ンディ・シェラブ・リンチェン ワンデ
ィ・サンゲイ デュクパ・原田基弘・青木
俊明・山口就平・斎藤基樹・五十嵐昌子・
渡辺康之・前川優・王敏。アゲハチョウ科
シボリアゲハ属の分子系統地理と進化史。
日本昆虫学会第 75 回大会。2015年9月
20日。九州大学，福岡県・福岡市。

〔図書〕(計4件)

矢後勝也・平井規央・神保宇嗣編(2016)
日本産チョウ類の衰亡と保護 第7集。
351pp. 日本鱗翅学会，東京。

平井規央(2016)クロマダラソテツシジ
ミの爆発的分布拡大。井上大成・石井実
編「チョウの分布拡大」北隆館，東京。
pp82-92.

平井規央(2016)アオタテハモドキの分
布拡大。井上大成・石井実編「チョウの
分布拡大」北隆館，東京。pp116-123.

平井規央(2016)人工飼料の作成と活用。
那須義次・広渡俊哉・吉安裕編「鱗翅類
学入門」pp 80-86。東海大学出版部，神
奈川。矢後勝也(2015)チョウにみる進
化と多様化。大場裕一他(編)。遺伝子か
ら解き明かす昆虫の不思議な世界。pp
251-310. 悠書館，東京。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 規央 (HIRAI Norio)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：90254440

(2)研究分担者

矢後 勝也 (YAGO Masaya)

東京大学・総合研究博物館・助教

研究者番号：70571230

石井 実 (ISHII Minoru)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：80176148