

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18615

研究課題名(和文) 隠蔽色と警告色の適応進化：昆虫体色の多様化を引き起こす遺伝・発生基盤解明への挑戦

研究課題名(英文) The adaptive evolution of cryptic coloration and aposematic coloration: the genetic backgrounds causing the diversification of insect color

研究代表者

小沼 順二 (KONUMA, Junji)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：10613838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、体色の異なるマイマイカブリ間の雑種系統を用いてQTLマッピングを行った。One QTL scan法によるQTLマッピングの結果、緑体色と青体色に関してLODがピークとなる複数の遺伝領域を見つけることができた。また、Two QTL Scan法では、緑体色と青体色に関してエピスタシスな効果をもつ遺伝領域を見つけることができた。これらのQTLがマイマイカブリ体色の遺伝基盤となっている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we applied QTL mapping to the hybrids between *Carabus blaptoides* subspecies with a different body color. One QTL scan showed some LOD peaks in the green and blue colors on the linkage groups, which implied existences of the genetic regions associated with the beetle colors. Two QTL scan suggested that epistatic regions may exist in the linkage groups. These QTL may be the genetic background of the body color of *Carabus blaptoides*.

研究分野：進化生態学

キーワード：体色 QTL carabid beetles

## 1. 研究開始当初の背景

昆虫は100万種以上が存在する最も繁栄に成功した生物群であり、とりわけ、その色彩豊かな体色変異は、多くの生物学者を魅了してきた。特に、昆虫体色の多様化は、隠蔽色と警告色という相異なる適応的意義により進化したと考えられる。隠蔽色とは、ナナフシや蛾のように木枝にカモフラージュした体色をさし、捕食者から身を隠す効果をもつ。一方、警告色は、スズメバチの黄色・黒色のコントラストのように毒々しく目立つ体色を示し、外敵に対し威嚇の効果をもつ。後者は、ミューラー型やベイツ型など、擬態として適応進化したと考えられているが、その適応進化過程、及び遺伝基盤は、未解明な部分が多い。

体色の著しい変異は地表徘徊性昆虫であるオサムシにもひろくみられる。東日本に生息するアオオサムシは大部分が緑色の体色をもつ一方で、房総半島南部の集団は赤体色をもち通称アカオサとも呼ばれる。貝食性オサムシであるマイマイカブリにおいても地域間で緑、赤、青など体色の著しい変異がみられるが、その適応的意義は全くわかっていない。これらの甲虫の体色変異は多層膜構造とよばれる幾層もの膜の重なりに対し異なる波長の光が反射することで金属光沢のある体色が生じている。体色変異の適応進化を考える上でその遺伝基盤が必須であるが、交雑系統等を用いた遺伝基盤に関しては未だ報告例はない。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、オサムシ体色変異の遺伝基盤解明を目的に、はじめにアオオサムシを使って、オサムシ体色の定量化方法の確立を試みた。次に、マイマイカブリを材料に、体色の異なる亜種間交雑系統を利用した体色の量的遺伝解析・QTL マッピングを行った。また、体色変異の適応的意義を調べるために実験室内の行動観察と野外実験を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 体色定量化方法の確立

量的遺伝解析から体色の遺伝基盤を解明する上で、表現型値である体色の定量化を正確に行うことが重要といえる。体色の定量化方法として、分光測色法が一般的であるが、写真画像に基づいた RGB 値による定量化の方が簡便であり、分光測色法と同様の精度で体色が定量化できれば、大量サンプルを用いる量的遺伝解析において大きな意義があるといえる。そこで、著しい地域変異を示すアオオサムシを材料に、分光測色法と RGB 値による定量化法を比較した。

茨城県、千葉県、神奈川県にまたがる9地点においてアオオサムシを採集した。採集した個体の体表面を一定環境下で写真撮影し、獲得した画像上における前胸部の体色を

RGB 値として定量化した。また、分光測色法として、ファイバマルチチャンネル分光器 USB4000 を用いて、可視光線域の反射長を計測した。

定量化した RGB 値を使って主成分分析を行い、地域間における体色変異の主成分を解析した。また、分光測色法によって得られた体色値に関しても同様に地域個体群間の比較を行い、RGB 値と分光測色法に基づく体色値の結果を比較した。

### (2) 連鎖地図作製

体色の遺伝基盤を QTL マッピングで解析するために、アオマイマイカブリとサドマイマイカブリ間の戻し交雑系統を用いた連鎖地図作製を行った。

赤色体色をもつアオマイマイカブリと紺色体色をもつサドマイマイカブリを交雑させ F1 雑種個体を構築後、得られた F1 雑種個体をアオマイマイカブリ親個体に戻し交雑し、戻し交雑系統を獲得した。獲得した戻し交雑個体と両親個体のゲノム DNA を制限酵素で断片化後、断片両端 101 塩基をシーケンスした。

獲得したシーケンス断片を Trimomatic を用いてアダプター除去したのち、pstacks による断片ごとの stack 化、cstacks による親個体シーケンスに基づいたシーケンスのカタログ化、sstacks による分離世代個体の stack 化を行ったのち、ジェノタイプングを行った。

獲得した分子マーカーごとに分離比検定を行って有意に分離比と異なる遺伝分子マーカーを除去した。その後、得られた分子マーカーの中で同一の遺伝子型パターンを示す分子マーカーを除去したのち、連鎖パターンが近い分子マーカー同士を尤度比に基づいてまとめ、それらを連鎖群とした (Grouping)。

連鎖群ごとに互いに同様の連鎖パターンをもつ分子マーカーごとに順序付けを行い、Kosambi の地図関数を使って連鎖距離を計算した (Ordering)。

### (3) 体色の QTL マッピング

マイマイカブリの頭部と胸部を一定光源下で写真撮影した。頭部と胸部、共に同様の体色変異を示していたものの、胸部の方が鮮やかな体色を示していた。そこで、胸部、特に胸部下部に関し一定面積の四角形を定義し、その四角形内の平均 RGB 値を計測した。

得られた RGB 値をそれぞれ個体の赤体色値、緑体色値、青体色値として表現型値とし、One QTL scan 法から QTL 領域の探索を行

った。分子マーカーによっては欠損している遺伝子型が多かったため、Multiple imputation 法を用いて欠損している遺伝子型を推定したのち、Interval mapping を行った。連鎖地図上に相加遺伝効果をもつ QTL が 1 つ存在すると仮定したモデルの対数尤度と QTL が存在しないと仮定したモデルの対数尤度の差、すなわち LOD 値を求めた。

マイマイカブリの外部形態には著しい性差が存在しており、体色に関しても同様の性差が存在している可能性が考えられた。そこで、性差を共変量とするモデルを構築し、同様の Interval mapping を行った。また雄特異的、または雌特異的に発現する QTL の存在も考えられたため、性差と量的遺伝子座の交互作用を考えたモデルも構築し、同様に Interval mapping を行った。

連鎖地図上で 2 つの QTL が存在しているかどうか、さらに、それら QTL 間にエピスタシスが存在しているかを調べるため、Two QTL scan 法に基づき、連鎖地図を XY 軸にとった 2 次元平面上で Interval mapping を行った。

以上の解析から得られた結果に基づき複数 QTL を仮定した Multiple-QTL model を構築し、モデル選択を行って表現型形質に大きな有意な効果をもつ QTL を精査した。

#### (4) 体色の適応的意義

仮に体色が隠蔽色もしくは警告色として機能しているならば、そのような体色は陽の光が射す日中において外敵に有効に働くと考えられ、オサムシ自体も派手な個体ほど、昼行性である可能性が予想される。本仮説を検証するために、実験室内のインキュベータ内で一定温度・一定日長環境下においてマイマイカブリの行動を動画撮影し、体色間で行動に違いがあるかを検証した。

また、上記仮説を野外においても検証するために模型を使った野外実験を行った。マイマイカブリの模型を構築し、前胸部を黒体色に塗ったものと青体色に塗ったものを用意した。これら二つの標本を野外に置き、捕食者によってどちらが攻撃されるかを検証した。また、同時に動画を撮影し、どのような捕食者によって模型が攻撃されるかを調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 体色定量化方法の確立

RGB 値を用いて主成分分析を行った結果、アオオサムシには地域個体群間において、R 値に関する変異が高く、次に G 値に関する変異が高いことがわかった。実際、房総半島南部の集団は R 値が高い一方、それ以外の地域では G 値が高い傾向がみられた。房総半島南

部集団の R 値が高いアオオサムシは、一般的に呼ばれるアカオサ個体の特徴と一致する。

同様の傾向は、分光測色法によって得られた結果とも調和的だった。房総半島南部集団は 150nm ほどの反射長が計測された一方で、それ以外の地域では 125nm から 145nm ほどの反射長を示した。

以上の結果から、アオオサムシにおいて地域集団間に赤色から緑色に関する体色変異が存在することが明瞭となった。地表徘徊性昆虫であるオサムシは、分散距離が限られるため、体色変異が地域集団内に維持されている可能性が考えられる。

また、RGB 値による体色の定量化と分光測色法による体色法の二つの方法から甲虫体色の定量化を試みたが、両手法とも大部分において一致する結果が得られたことに大きな意義がある。一般的に、生物が外部の環境と関連させて色をどのように認識しているかを議論する上では、分光測色法による定量化による波長測定が非常に重要であるが、専用の分光器などを準備するためには資金的にも大きな負担となる上、膨大な標本サンプルを定量化する上では、労力も大きい。RGB 値では、画像写真を利用することができるため、画像解析技術により、定量化に関する大部分の自動化が可能となる。実際、この結果に基づき、以下のマイマイカブリの体色の定量化も大きく前進した。

### (2) 連鎖地図作製

連鎖地図をもとに分離世代個体ごとに乗り換え数を計算した結果、個体によって、極端に高い乗り換え数を示す連鎖群が見られた。また、連鎖地図上における遺伝子型パターンを観察すると、数センチモルガンの範囲で乗り換えが生じているケースが見られた。乗り換え干渉を考えれば、このような遺伝子型パターンは一般的に生じ難いと考えられたため、ジェノタイピングエラーの確率を計算し、エラーとみなすことができる分子マーカーに関しては、欠損値に置き換える処理を行ったところ、乗り換え数が必須キアズマ数よりもやや多いと考えられる妥当な値になった。

獲得した遺伝分子マーカーを Grouping した結果、大部分のマーカーが LOD=9 の値で 14 のグループに分かれた。マイマイカブリの染色体数は 14 と考えられているため、連鎖群数と染色体数が一致していると考えられる。また、14 連鎖群のうち最も多くの遺伝マーカーを含む連鎖群において、雄は全ての遺伝マーカーがホモ型の遺伝子型を示す一方で、雌はヘテロ型とホモ型が混在する遺伝子型を示した。先行研究からオサムシは、雄が XY 型、雌が XX 型の性染色体をもつと考えられており、雄は組み換えが生じる X 染色体を半数体としてのみもつことができるため、分離世代の雄の分子マーカーはヘテロ型にはなり得ない。従って、上記した雌雄で異な

る遺伝子型パターンをもつ連鎖群はX染色体の連鎖群と考えることができた。

### (3) 体色の QTL マッピング

One QTL scan 法による Interval mapping の結果、緑体色に関しては、第2連鎖群と第9連鎖群で LOD が高いピークとなっていた。また、青体色に関しては、第6連鎖群で LOD がピークとなっていた。これらの結果は、体色に関わる遺伝子は単一の多面発現的な遺伝子によって生じているわけではなく、複数の遺伝子によって生じている可能性を示唆している。また、Two QTL Scan 法に基づく解析では、緑体色に関して、第1連鎖群上の QTL と第3連鎖群上の QTL の間にエピスタシスな効果が示唆された。また、青体色に関しては、第9連鎖群上の QTL と第10連鎖群上の QTL の間にエピスタシスな効果が示唆された。以上の One QTL scan と Two QTL scan の結果に基づき、緑体色と青体色に関して Multiple-QTL model を構築しモデル選択したが、両体色に関して有意な QTL をもつモデルを構築することができなかった。

以上の結果になった原因の一つとして、体色値の定量化が十分正確にできていなかった可能性が考え得る。特に、用いた標本によっては、標本表面に油分が染み出し、黒ずんだ体色値を示していた。このような標本の体色が、本来、青や赤色であるべきところ、正しい RGB 値が測定できなかった可能性が考えられる。

そこで、今後の研究として、サンプル標本の体色値を再度正確に定量化して同様の QTL 解析を行う予定である。

### (4) 体色の適応的意義

インキュベータ内の一定温度・一定日長下の環境のもと、マイマイカブリの行動を観察した結果、黒い体色をもつマイマイカブリは夜行性である一方で、派手な体色をもつマイマイカブリは昼行性である傾向がみられた。この結果は、派手な体色が外的に対して何らかのシグナルとして機能しているものと考えられる。オサムシは外敵から攻撃されると腹部から刺激臭を含む分泌液を出し外敵に攻撃する。この分泌液で攻撃された捕食者は、派手な体色のオサムシは餌資源として避けるべきと学習するだろう。従って、オサムシにみられる派手な体色はミューラー型擬態として適応進化したのかもしれない。

上記の仮説をさらに裏付けるために、黒体色と派手な体色で塗り分けたマイマイカブリモデルを作製し、野外においてどちらが高い頻度で攻撃されるかを検証した。派手な体色が警告色となるならば、派手な体色のモデルは黒い体色のモデルより外敵に攻撃されないのではないかと予想した。実際、モデルを野外に設置し、動画撮影を行うと、大型哺乳類や鳥類がモデルに攻撃しているのを確認することができた。しかし、これらの捕食者が黒体色

モデルと派手な体色モデルに攻撃する頻度間には差がなかった。

以上の結果は、仮説を支持する結果とは言えず、派手な体色が大型哺乳類や鳥類などの捕食者に対し警告色となっていない可能性を示唆している。しかし、モデル自体は捕食者から餌資源として十分認知されていることが確認された。今後は、モデルの設置方法などを工夫することで、仮説を再度、検証する必要があるだろう。

## 5. 主な発表論文等

Konuma, J. 2016年9月27日. Morphological dimorphism in carabid beetles living on land snails. XXV International Congress of Entomology (Orland, USA).

小沼順二. 2016年4月17日. 貝食性オサムシにみられる適応的形態分化. 日本貝類学会 (千葉県・船橋市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小沼 順二 (KONUMA, Junji)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号: 10613838