

令和元年5月15日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07473

研究課題名(和文) 同所的に分布する近縁ショウジョウバエ2種の資源利用と遺伝分化

研究課題名(英文) Host utilization and genetic differentiation in a sympatric pair of sibling drosophilid species

研究代表者

加藤 徹 (Kato, Toru)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：80374198

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)：Lordiphosa collinellaは東アジアに広く分布するショウジョウバエで、ニリンソウなどの春植物を利用する。一方、北海道にはLordiphosa sp. aff. collinellaという近縁種がL. collinellaと同所的に分布するが、この種はフッキソウ群落で高頻度で採集される。そこで、野外での状況と産卵選好性を調査した結果、前者は複数の植物種を利用するが、後者はフッキソウに強い選好を示した。一方、ニリンソウとフッキソウに対する幼虫の利用能力を調べた結果、両種で顕著な違いは認められなかった。さらに、集団遺伝学的解析を行った結果、両種は比較的短時間で分化したと推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ショウジョウバエ科では比較的広食性の種が多いことから、食性の変化と種の多様化との間にそれほど顕著な相関がないと考えられている。しかしながら、本研究課題によって、L. collinellaとL. sp. aff. collinellaでは資源利用の変更に伴い、種分化が急速に生じたであろうことが示唆された。このことは、ショウジョウバエ科においても、食性の変更に伴う種分化が、種の多様化に貢献したことを意味する点で、注目に値する。

研究成果の概要(英文)：Lordiphosa collinella is a widely distributed species in East Asia. This species breeds on a number of ephemeral plants such as Anemone flaccida. On the other hand, Lordiphosa sp. aff. collinella is distributed symmetrically with L. collinella in Hokkaido Island, but it is dominantly collected from the vegetation of Pachysandra terminalis. In this study, their morphology, ecology, and the extent of genetic differentiation were examined. The examinations of microhabitat and oviposition preference indicated that L. collinella used a number of plant species, while that L. sp. aff. collinella preferred P. terminalis. On the other hand, the experiments of larval performance did not show the apparent difference between them. Thus, these results suggest that the oviposition preference would have played a major role in the establishment of ecological difference. In addition, population genetic analyses revealed that the speciation of two species would have occurred recently.

研究分野：分子系統学・集団遺伝学

キーワード：草食性ショウジョウバエ 遺伝分化 生態的種分化 生殖隔離 産卵選好性 ニリンソウ フッキソウ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 種分化とは、生殖隔離の発達を伴って既存の生物種から新しい生物種が形成される一連の過程を指す。従って、その機構を解明することは、生物多様性の成り立ちを理解する上で極めて重要である。これまで、種分化の機構を説明するためのいくつかの仮説(モデル)が提唱されているが、その中で、近年、分岐自然選択の効果により生殖隔離が生じるという生態的種分化の考えが、とりわけ適応放散に基づく種の多様化を説明する上で重要であると認識されるようになった()。一方、これとは別に、突然変異と遺伝的浮動の効果により、分岐自然選択の影響なしに生殖隔離が生じるという種分化の考えも存在する。しかしながら、両者のうち、自然界においてどちらがより一般的であるかは不明で、この問題を検証する研究が現在も盛んに行なわれている()。

(2) なお、種分化研究を行う際、種分化完了後に変異が蓄積した生物群では、上記の検証が困難になることから、種分化の途中あるいは種分化後間もない生物群を研究対象として選定することが最も重要である。また、分岐自然選択の作用の仕方は生物群によってさまざまであることから、種分化の研究を行なう際には、形態、生活史、食性、および遺伝分化といった生物学的特性を包括的に調査することが必要である。

(3) ショウジョウバエ科のハエは、これまでに 4,000 種以上が記載され、極地を除く世界各地に広く分布することが知られている()。また、その食性も、果実食、樹液食、草本食、あるいはキノコ食と非常に多岐に亘る。このような野生ショウジョウバエが持つ形質の多様性に注目し、これまでさまざまなショウジョウバエ種が、生物学の多岐に亘る分野において、研究対象として広く用いられている()。また、申請者らが所属する研究グループでは、分類学、生態学、分子系統学、および集団遺伝学的手法を駆使して、野生ショウジョウバエを対象とした種々の進化学的研究を行っている()。

(4) *Lordiphosa collinella* (サキグロショウジョウバエ) は、日本を含む東アジアに広く分布する草本食性のショウジョウバエで、他の草本食性ショウジョウバエと同様に、ニリンソウなどの春植物を主な繁殖資源として利用する()。一方、我々のこれまでの野外調査により、北海道内の複数地点においては、*Lordiphosa* sp. aff. *collinella* と呼ばれる近縁未記載種が同所的に存在することが確認されている。本種の外部形態は *L. collinella* に酷似し、外見上ほとんど見分けがつかないが、少なくとも雌の導卵突起と雄の生殖器の構造に違いが認められる。さらに、我々の最近の野外調査により、本種はニリンソウ群落からはほとんど採集されず、ツゲ科の常緑低木であるフッキソウの群落上で高頻度に採集されることが見出された。

(5) 従来、フッキソウは葉が硬いことから、多くの草本食性ショウジョウバエにとって繁殖資源としてあまり適当ではないと認識されていた。しかしながら、この植物はニリンソウと類似した環境に生息し、混生群落も多く形成している。また、常緑であることから植物体が年中存在し、春植物が枯れた後の季節でも潜在的に繁殖資源として利用可能な状態にある。従って、これらの観察事実をふまえると、*L. sp. aff. collinella* の祖先系統は、*L. collinella* の一部がニリンソウからフッキソウへと資源利用を変更したことで生じ、その後、資源利用の異なる個体群(集団)間に分岐自然選択が作用したことで、同所的に生殖隔離が発達したという仮説が予想される。そこで、これらのショウジョウバエについて、形態、生態、および集団遺伝学的手法を用いてこの仮説を検証すべく、本研究課題を着想するに至った。

2. 研究の目的

(1) 両種の外部形態と内部形態を観察し、相同形質をそれぞれ比較することで、形態的差異の詳細を明らかにする。

(2) 両種のそれぞれについて、野外における資源の利用状況を調査し、利用する植物の種類に違いがあるかどうかを評価する。

(3) 寄主植物と思われるニリンソウとフッキソウを別々に与えて飼育し、両植物に対する雌成虫の産卵選好性、および幼虫の資源利用能力を比較する。これにより、両種がどの程度、異なる餌資源を利用する方向に適応している段階であるかを明らかにする。

(4) 両種それぞれの地域集団を対象に、ミトコンドリア DNA および核 DNA の多型を指標とした集団遺伝学的解析を行なう。これにより、両種の遺伝分化が種内変異のレベルに過ぎないのか、それとも種間レベル相当の分化を遂げているかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 形態の比較: 採集後、70%あるいは100%エタノールに液浸保存した試料を用いた。雌雄のそれぞれについて、生殖器以外の外部形態の観察を行った。また、雌雄生殖器の外内部形態を観察する際には、腹部第9節以降の部分の有柄針で切取り、20%水酸化カリウム溶液に入れ

て加熱することで筋組織を溶解させ、生殖器のキチン質骨格のみを残した。そして、これをグリセリンを滴下したホールスライドガラス上に移し、光学顕微鏡下で形態の観察を行った。

(2) 野外調査：両種のそれぞれについて、野外における資源の利用状況を調査した。具体的には、ニリンソウ群落、フックソウ群落、およびこれらと他の植物種が混生する群落からそれぞれ植物体を採集して持ち帰り、そこから出現したショウジョウバエの種を同定し、その個体数を計上することで、両種がどのような植物種を繁殖資源として利用しているかを見積もった。

(3) 飼育実験：採集後、生きたまま実験室に持ち帰った個体、あるいはこれを継代飼育して系統化した個体を試料として用いた。両種それぞれの成虫にニリンソウ、およびフッキソウを別々に与えて雌成虫の産卵数を計測し、産卵選好性の指標とした。また、孵化した幼虫の生育状況を経時的に観察して成虫までの生存率をそれぞれ測定し、資源利用能力の指標とした。

(4) 集団遺伝学的解析：試料収集を行った地域集団を対象に、ミトコンドリアおよび核遺伝子の DNA 多型を指標とした集団遺伝学的解析を行なった。ミトコンドリア DNA の解析には、DNA バーコーディングで広く用いられている *COI* 遺伝子を用いた。また、核 DNA の解析には *Adh* 遺伝子のイントロン領域を用いた。得られた塩基配列情報をもとに、それぞれの遺伝子ごとに遺伝子系統樹（ハプロタイプネットワーク）を構築した。また、各集団について、ハプロタイプ多様度や塩基多様度といった集団内多様度の指標となる値を計算するとともに、集団間の遺伝的分化の指標となる *Fst* の値を算出した。さらに、IMa モデルを用いた解析を行うことで、遺伝子流動の方向と割合（移住率）を推定した。

4. 研究成果

(1) 両種の形態的特徴を詳細に観察した結果、両種では、雌の導卵突起および雄の陰茎の形状に違いがあること、*L. sp. aff. collinella* では雄の腹部にあるの腹板の側面が黒く滲んでいることが特徴的だった（図1）。従って、生殖器の形態形質のみならず、この形質が両種を判別する上で有用であることが確認された。

(2) 両種のそれぞれについて、野外における資源の利用状況を調査した結果、*L. collinella* については、ニリンソウの他、バイケイソウ、オオウバユリ、オオバナノエンレイソウといった植物上で出現が確認された。一方、*L. sp. aff. collinella* については、フッキソウ上でのみ出現が確認された。ここで、*L. collinella* の食性は他の *Lordiphosa* 属の種とそれほど変わらないことから、*L. collinella* で観察された資源の利用状況は、本属における祖先的形質であろうことが想定される。従って、この想定をふまえると、これらの結果は、*L. sp. aff. collinella* の系統においては、いろいろな植物を利用する「ジェネラリスト (generalist)」から、特定の植物を利用する「スペシャリスト (specialist)」へと、資源利用の様式に変換が生じたことを示唆する。

(3) 実験室でニリンソウとフッキソウを与えて雌成虫の産卵選好性を調べた結果、*L. collinella* においては、ニリンソウとフッキソウの両方を選びつつ、ニリンソウを好む傾向を示した。一方、*L. sp. aff. collinella* においては、フッキソウへの顕著な選好性を示した（図2）。そして、この結果は、野外における資源利用の調査結果と一致する。一方、両種間で幼虫の資源利用能

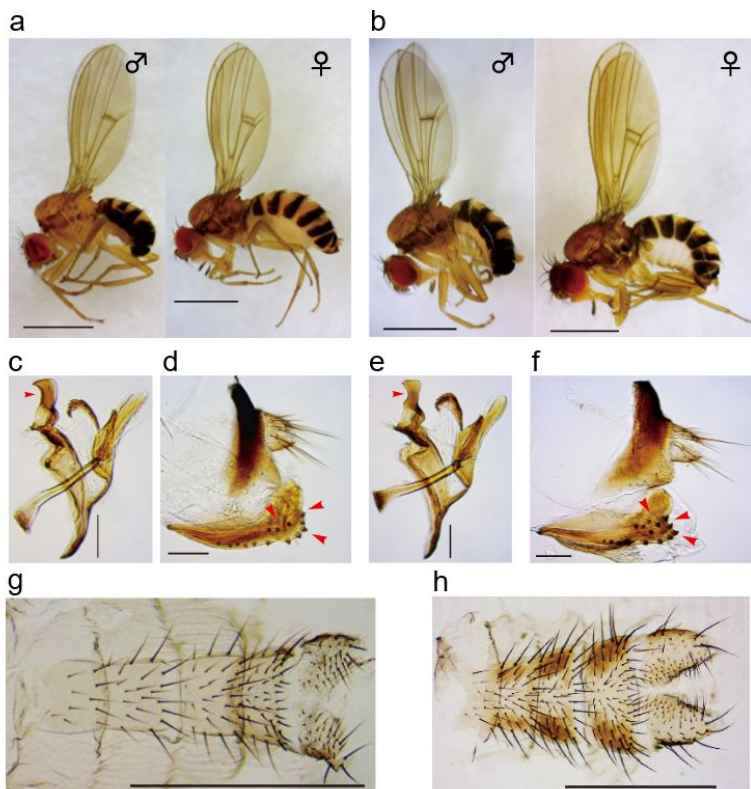


図1. *L. collinella*と*L. sp. aff. collinella*の形態的特徴. a: *L. collinella*の成虫個体. b: *L. sp. aff. collinella*の成虫個体. c: *L. collinella*雄の内部生殖器. d: *L. collinella*雌の導卵突起. e: *L. sp. aff. collinella*雄の内部生殖器. f: *L. sp. aff. collinella*雌の導卵突起. g: *L. collinella*雄の腹部. h: *L. sp. aff. collinella*雄の腹部.

力に違いがあること、*L. sp. aff. collinella* では雄の腹部にあるの腹板の側面が黒く滲んでいることが特徴的だった（図1）。従って、生殖器の形態形質のみならず、この形質が両種を判別する上で有用であることが確認された。

力に違いがあるかを検証するため、両種の幼虫にニリンソウとフッキソウをそれぞれ与えて飼育を行ったところ、どちらの幼虫も両食草で成虫まで発育し、生存率に顕著な違いは認められなかった。従って、これらの結果は、幼虫の資源利用能力よりも雌成虫の産卵選好性が両種の資源利用の違いに大きく関与していることを示唆する。

(4) また、両種の卵サイズと卵数の計測を行ったところ、*L. collinella* では卵サイズが小さく多産であり、*L. sp. aff. collinella* では卵サイズが大きく少産である傾向が認められた。このことは、両種では子に対する資源投資の様式にも違いが生じていることを意味する。

(5) 両種の遺伝分化の程度を把握することを目的に、両種の複数の地域集団を対象に、ミトコンドリアの *COI* 遺伝子、および核の *Adh* 遺伝子の塩基配列を決定して遺伝子系統樹(ハプロタイプネットワーク)を構築した(図3)。その結果、得られた遺伝子系統樹において、両種は複数のハプロタイプを共有し、それぞれの種で相互的単系統となるような樹形は示されなかった。一般に、種分化後の経過時間に伴い、遺伝子系統樹の樹形は多系統から側系統の状態を経て、相互的単系統へと至る。従って、この結果は、両種は分化して間もなく、相互的単系統になる樹形を示すほど DNA 変異が蓄積していない段階であることを示唆する。

(6) 一方、遺伝分化の指標となる *Fst* の値は、両種の異所的集団間のみならず、同所集団間においても有意な値を示した。この結果は、両種の生殖隔離が十分に発達していることを示唆する。また、IMa モデルを用いた解析において、種間の遺伝子流動は両方向で非常に制限されていると推定され、*Fst* の結果と矛盾しない。一方、両種の分岐年代は約 35 万年前と推定され、この値は種分化にかかる一般的な時間(約 220 万年)に比べて非常に短いものである。従って、これらの結果は、両種の分化は最近になって生じ、かつ生殖隔離が急速に発達したことを示唆する。

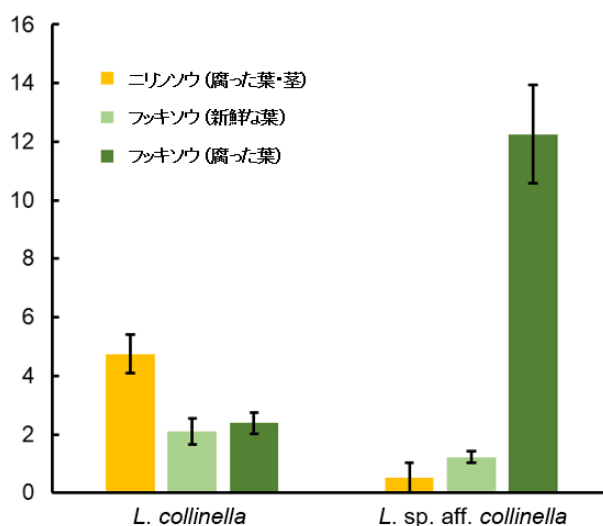


図2. ニリンソウとフッキソウに対する雌成虫の産卵選好性。縦軸は雌1個体あたりの平均産卵数を示す。

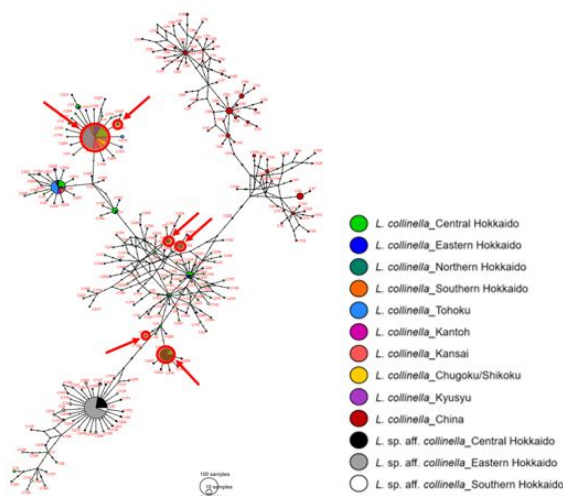


図3. COI遺伝子塩基配列のハプロタイプネットワーク。両種で共通に検出されたハプロタイプを矢印で示す。

< 引用文献 >

Schluter D (2000) The ecology of adaptive radiation. Oxford University Press.
 Nosil P (2012) Ecological speciation. Oxford University Press.
 Toda MJ (2006-2018) DrosWLD: Taxonomic Information Database for World Species of Drosophilidae. <<http://bioinfo.lowtem.hokudai.ac.jp/db/modules/stdb/>>.
 Powell J (1997) Progress and prospects in evolutionary biology. Oxford University Press.
 戸田正憲 (編) (2011) 生物進化研究のモデル生物群としてのショウジョウバエ. 低温科学 69 巻.
 Toda MJ, Kimura MT, Enomoto O (1984) Bionomics of Drosophilidae (Diptera) in Hokkaido. VI. Decayed herbage feeders, with special reference to their reproductive strategies. Japanese Journal of Ecology 34: 253-270.
 Yamada K, Watabe H (1995) Karyotypes of eight species of the genus *Lordiphosa* (Diptera, Drosophilidae) from Northern Japan. Japanese Journal of Entomology 63: 59-65.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

加藤徹, 三ツ橋圭, 泉谷洋之, 戸田正憲 (2019) 同所的に生息する近縁ショウジョウバエ 2 種の資源利用と遺伝分化. 昆虫と自然 54:30-33 . (査読なし)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.sci.hokudai.ac.jp/~tkatoh/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 戸田 正憲

ローマ字氏名: **Toda, Masanori**

所属研究機関名: 北海道大学

部局名: 総合博物館

職名: 資料部研究員

研究者番号 (8 桁): **40113592**

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。