

令和元年6月20日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07515

研究課題名(和文) シグナル形質の進化要因としての種内競争と種間関係

研究課題名(英文) Signal selection under the influence of reproductive interference

研究代表者

椿 宜高 (Tsubaki, Yoshitaka)

京都大学・生態学研究センター・名誉教授

研究者番号：30108641

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)：Mnais属のカワトンボ2種(M. costalisとM. pruinosa)は同所的に生息する地域と異所的に生息する地域がある。両種とも異所的集団にはオスの翅色多型(橙色翅と透明翅)が見られるが、同所的集団では翅色多型が消失する(M. costalisは橙色翅、M. pruinosaは透明翅だけ)。オスの除去実験によってメスの種認識能を評価した。その結果、オスの翅色は性淘汰および種認識の兼用シグナルとして働き、その相対的な重要性が集団で異なると考えられた。mtDNA全ゲノムの解読を実施した結果、種間差がほとんど見られず、両種の遺伝的分化よりも行動的隔離の先行が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物の種分化メカニズム解明は生物進化の中心的課題である。最も一般性のある理論は地理的隔離説であるが、複数の近縁の動物種が同所的に生存する場合、いくつかの発展的課題が生まれる。ターゲットにする種群は(1)地理的障壁なしに生じた種分化ではないのか、(2)近縁種はどのようなシグナルによって同種と異種を区別するのか、(3)どのような行動を使って種間交尾を避けているのか、(4)間違っ交尾した場合、交雑個体の適応度はどうなるのか、などなど。このような問題の解決をめざし、近縁のMnais属カワトンボについて野外観察と実験、遺伝子解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Two Japanese damselflies, *M. costalis* and *M. pruinosa*, distribute in allopatry or in sympatry. In allopatric area, males of these species are polymorphic: territorial orange-winged and nonterritorial clear-winged males. In sympatric area, on the other hand, males lose polymorphism: *M. costalis* males are orange-winged while *M. pruinosa* males are clear-winged. Male removal experiments conducted in the field showed that wing-color functions as both sexual and species signals for females. Sexual signal may be a major function in allopatric populations, while species signal may be so in sympatric populations. Whole genomic analysis showed little difference between two species, which suggested that their behavioral isolation preceded appearance of genetic differentiation.

研究分野：動物生態学

キーワード：形質痴漢 種分化 シグナル 種認識 mtDNA 異所的 同所的 性淘汰

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

1. 研究開始当初の背景

翅色のようなシグナル形質の多型現象は多くの動植物に見ることができ、自然界の多様性維持機構を研究するための好個の対象として扱われてきた。中でも1つの集団内に見られる雄のシグナル多型においては、その進化における性淘汰の役割に注目が集まっている。雄のシグナル多型の維持メカニズムとして、いくつかの仮説が提案されている。たとえば、雄間競争における負の頻度依存淘汰(シクリッドフィッシュ)、頻度依存的な捕食(グッピー)、少数派の雄が好まれる雌による選択、時空間な異質性などである。しかし、異種との関係(たとえば、雄による異種雌への性的干渉)の有無がシグナル多型の維持に及ぼす影響については、ほとんど知られていなかった。

これまでの我々の研究で、*Mnais* 属カワトンボの同所的集団ではオスの翅色多型が消失することが分っている。つまり、*M. costalis* であれ *M. pruinosa* であれ、異所的集団では橙色翅と透明翅の2つのタイプが集団内に共存し、メス獲得に関して橙色翅オスは縄張り戦略、透明翅オスはスニーカー戦略をとる。しかし、同所的集団では *M. costalis* のオスは橙色翅の単型となり、*M. pruinosa* のオスは透明翅単型となる。そして、*M. costalis* のオス(橙色翅)は一貫して縄張り戦略をとり、*M. pruinosa* のオス(透明翅)は極めてフレキシブルに、ある時は縄張り戦略、またある時はメス探索戦略をとる。両種には、ある程度の棲み分けが見られ、*M. pruinosa* は影の多い林内の溪流を主な繁殖場所とし、*M. costalis* はそこから少し下流の開けた小川や農業用水路を繁殖場所とする傾向がある。*M. costalis* の体サイズは大型化し、*M. pruinosa* は小型化する傾向にあるが、これは生息場所の光熱環境と連動していると思われる。それぞれの種のメスは、オスの翅色と繁殖場所の特徴をよく認識しているようで、同種の縄張りには滅多に近づかないことがこれまでの観察結果から分かっている。

2. 研究の目的

オスの接近に対するメスの反応は、メスの交尾受容性に個体のバラツキが大きいため実験的な観察が難しい。上記のような観察を重ねることでメスの種認識が確認されたが、オスは常にメスの接近を待ち構えて、交尾しようとするので、実験による観察が容易である。この研究では、オスは同所的異種メスと異所的異種メスを識別できるかどうかを実験的に明らかにする。

これまではほとんど問題にされてこなかったが、実は *M. costalis* のメスには、翅色にはわずかな程度の地域変異が存在する。すなわち、同所的なメスは淡い橙色翅、異所的なメスは透明翅を持ち、その変異は不連続的のように思われる。ただし、*M. pruinosa* のメスには、肉眼でわかるような地域変異は見られない。しかし、地域変異を検出するために翅色を定量的に測定した例はこれまでにないので、集団内と集団間の変異の大きさを両種について調べ、翅色の地方変異が形質置換と呼べるような変異であるのか、それとも地理的クラインであるのかを明らかにする。また、オスがメスの翅色の微妙な違いをもとに種認識を行っているのかを、野外実験によってテストする。

同所的な近縁2種の繁殖形質に形質置換が見られることは次第に明らかになりつつあるが、これが遺伝的距離の分岐と連関しているのかを知ることが目的である。そのために、*Mnais* 属2種の全分布域の集団について、集団内、同所集団間、異所集団間、同所/異所集団間の遺伝的多様性の変異分析を行う。各種内の集団間遺伝変異に関しては、一般的によく用いられるミトコンドリアのCO₁ やCO₂ 遺伝子領域の変異が極めて少ないことが分っている。そこで、核ゲノム内の数塩基のリピートの回数の違いを利用したマイクロサテライトマーカーによる解析を進める。同所/異所集団間において遺伝的交流がどの程度行われているのか、集団間の遺伝的

分化の程度を表す指標である近交係数 (F_{st}) と集団間の地理的距離の間で評価する。また、同所的集団において、遺伝的多様性が2種の間でどのように違うかを解析する。多型の消失は遺伝的多様性の減少を、なんらかの形で伴うはずである。集団内、同所集団間、異所集団間、同所/異所集団間の4つの視点から遺伝的多様性の比較を行う。

3. 研究の方法

形質置換の生殖隔離における有効性を明らかにするために、配偶行動の野外実験を行う。これまでの研究でオスは同所的な異種メスとの交尾を避ける傾向があることが分かったが、これが形質置換の効果なのかどうかを確かめるため、形質置換を起こしていない異所的異種メスとの交尾を避けるかどうかを実験的に調べる。オスの接近に対するメスの反応は、メスの交尾受容性に個体のバラツキが大きいため実験的な観察が難しい。しかし、オスのほうは常にメスの接近を待ち構えて、交尾しようとするので、実験による観察が容易である。そこで、オスは同所的異種メスと異所的異種メスを識別できるかどうかを実験的に明らかにする。そのためにメスを糸でつなぎ、オスの目の前で飛ばしてオスの反応を見ることにした。同所的集団から異所的集団に、あるいは異所的集団から同所的集団に運ぶ(岡山と滋賀、和歌山と滋賀、茨城と滋賀の間など)ことで、一種のコモンガーデン実験を行い、種認識の地理的変異(同じ地域の異種メスと別地域の異種メスを区別するか)を明らかにする。

DNA塩基配列の多型を利用して集団遺伝解析を行い、同所的集団と異所的集団の遺伝的な分岐の程度を評価する。日本産 *Mnais* 属2種はそれぞれオスの翅色に多型が生じており、同所的な場合に多型が消失する。*Mnais* 属の2種が同所的に共存する理由にはふたつの可能性がある。ひとつは、異なった時期に東南アジアと台湾を経由して日本列島に上陸した *Mnais* 属2種が共存している可能性、もうひとつは日本列島を舞台として、同所的に種分化が起きた可能性である。日本産 *Mnais* 属はどのように多様化してきたのか、海外の同属種も含めて分子系統解析を行う。ミトコンドリアのCOI遺伝子等の塩基配列情報を決定し最尤法などを用いて分子系統解析を行い、系統樹を推定する。また、分岐年代の推定を行う。海外では東南アジアと台湾に同属の近縁種を産することが分かっているので、台湾の研究者と連絡をとって採集を試み、COI 遺伝子などの円位配列情報を用いて日本産2種との類縁関係等を明らかにする。

4. 研究成果

同じハピタットを繁殖場所として利用する近縁2種のカワトンボ (*M. costalis* と *M. pruinosa*) について、メスの種認識、オスの種認識に雌雄の種シグナル形質が有効に機能しているかを検証した。実験に用いたハピタットは滋賀県内にあり、ここでは *M. costalis* のオスは橙色翅単型、メスは透明翅と薄橙色翅の二型である。いっぽう、*M. pruinosa* のオスは透明翅単型、メスは透明翅単型である。このハピタットで2種類の野外実験を行った。実験1ではオスの除去によってメスの行動がどのように変化するかを調べた。実験2ではメスをオスの目前に提示してオスの反応を見る。実験1の結果、メスは、ハピタット選択とハピタット内の産卵場所選択の2段階で同種オスの選択を行なっていることがわかった。すなわち、産卵基質を含むハピタットに同種オスだけがいる場合は、そのハピタットを訪れる同種メス数が増加し、異種メス数は減少する。そして、同種メスは同種オスのナワバリに入って交尾・産卵を行う傾向があるが、異種メスはナワバリを避けて産卵する。まれにオスに見つかって交尾を挑まれるがその成功率は低い。この実験によって、これまで定性的にしか評価できなかったメスの種認識行動を定量的に評価することができた。実験2は、オスは自分のナワバリにメスが近づいた時点で、種認識を行なうことを前提にしてい

る。同種、異種のメスがナワバリに接近した場合、オスの種認識能力には種間差がみられた。すなわち、*M. costalis*オスは同種、異種に関わらずメスへの求愛ディスプレイを行うことが多いが、*M. pruinosa*オスは同種メスにしか交尾を挑むことはほとんどない。同所的集団において非対称な種認識の進化が生じていることが示唆された。また、2種間には翅色および体色の形質置換がみられるが、翅色をマーカーで着色した実験によって種識別に翅色がマーカーとして使われていることがわかった。

同所的集団の*M. costalis*メスを異所的集団のオスに提示することで、オスの種認識を調べた結果、薄橙色翅メスには関心を示さないことがわかった。そしてメスは両型のオスを同種と認識していると考えられた。いっぽう、同所的集団の*M. costalis*オスは透明翅メスと薄橙色翅メスの両方を交尾相手として認識するので、*M. pruinosa*との交雑の可能性がある。しかし、*M. costalis*メスも*M. pruinosa*メスも同種オスのナワバリだけを訪れるため、種間交尾はほとんど起きないことがわかった。

次世代シーケンサを用いたミトコンドリア全ゲノムの解読を一部実施した。実施できたのは、同所的*M. costalis*と異所的*M. costalis*、および同所的*M. pruinosa*である。その結果、同所的な*M. costalis*と*M. pruinosa*のDNA配列にはほとんど差が見られず、むしろ*M. costalis*の同所的、異所的集団間での差異が大きいことがわかった。このような現象はきわめて珍しく、交尾後隔離の強化として行動的な交尾前隔離が生じているのではなく、交尾前隔離の方が先行していることを示唆している。また、種間の遺伝子浸透、性選択による種分化など、様々な進化仮説を検証する基礎が得られた。

*Mnais*属カワトンボは東アジアに分布する。日本産*M. costalis*と*M. pruinosa*の系統的位置を明らかにするために、台湾特産種の*M. tenuis*の標本採集と行動観察をおこなった。採集した標本からDNAを抽出してmtDNA全ゲノムの解析を行い、*M. pruinosa*と*M. costalis*の同所的集団と異所的集団の標本を用いてのmtDNA全ゲノムの解析結果と比較した。その結果、*M. pruinosa*と*M. costalis*の遺伝的距離は*M. tenuis*との距離に比べると極めて小さいことがわかった。このことから、交尾後隔離の強化として行動的な交尾前隔離が生じているのではなく、交尾前隔離の方が先行していることが強く示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. 椿 宜高 (2019) 生物多様性の測り方。時の法令 2072, 2-3.
2. 椿 宜高 (2019) 「生物学的多様性」と「生物多様性」の違い。時の法令 2071, 2-3.
3. Kiyoshi T, Katatani N and Pham HT (2018) *Sundaeschna* gen. nov. with Descriptions of Two New Species from Vietnam and Myanmar (Odonata, Anisoptera, Aeshnidae). Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series A (Zoology) 44, 1-9. (査読あり)
4. Takahashi R, Okuyama H, Minoshima Y N and Takahashi J (2017) Complete mitochondrial DNA sequence of the alien hornet *Vespa velutina* (Insecta: Hymenoptera) invading Kyushu Island, Japan. Mitochondrial DNA Part B 3, 179-181. (査読あり)
DOI:10.1080/23802359.2018.1437823
5. Shinmura Y, Okuyama H, Kiyoshi T, Lin C P, Kadowaki T and Takahashi J (2017) The complete mitochondrial genome and genetic distinction of the Taiwanese honeybee, *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae). Conservation Genetics Resources 9, 1-6. (査読あり)
DOI:10.1007/s12686-017-0879-x

6. Okuyama H, Wakamiya T, Fujiwara A, Washitani I and Takahashi J (2017) Complete mitochondrial genome of the honeybee *Apis cerana* native to two remote islands in Japan. Conservation Genetics Resources 9, 557-560. (査読あり) DOI: 10.1007/s12686-017-0721-5
7. Okuyama H & Takahashi J (2017) The complete mitochondrial genome of *Mnais costalis* Selys (Odonata: Calopterygidae) assembled from next generation sequencing data. TOMBO 59, 47-53. (査読あり)
8. Okuyama H, Martin S J and Takahashi J (2017) Complete mitochondrial DNA sequence of the tropical hornet *Vespa affinis* (Insecta, Hymenoptera). Mitochondrial DNA Part B 2, 776-777. (査読あり) DOI:10.1080/23802359.2017.1398622
9. Tsubaki Y & Okuyama H (2016) Adaptive loss of color polymorphism and character displacement in sympatric *Mnais* damselflies. Evolutionary Ecology 30, 811-824. (査読あり) DOI:10.1007/s10682-015-9778-3
10. Lorenzo-Carballea MO, Tsubaki Y, Plaistow SJ, Watts CP (2016) The complete mitochondrial genome of the broad-winged damselfly *Mnais costalis* Selys (Odonata: Calopterygidae) obtained by next-generation sequencing. International Journal of Odonatology 19, 91-98. (査読あり) DOI:10.1080/13887890.2016.1234980

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Kiyoshi T & Aung MM (2018) A remarkable dragonfly genus, *Sundaeschna* Kiyoshi and Katatani, 2018, from Myanmar and Vietnam (Odonata, Anisoptera, Aeshnidae). International Symposium "Updating of Flora and Fauna of Myanmar", Nay Pyi Taw.
2. 清 拓哉 (2018) ミャンマー国チン州ビクトリア山 5 月のトンボ相。日本トンボ学会大会
3. Tsubaki Y, Kiyoshi T, Okuyama H & Lin C-P (2018) Bergmann's and Allen's rules operate in heliothermic damselflies. Annual meeting of Population Ecology
4. 清 拓哉・片谷直治 (2017) ベトナムおよびミャンマーからのヤンマ科の 1 新属 2 新種について。日本トンボ学会大会
5. 清 拓哉 (2017) ヤンマ科のサラサヤンマ属および一未記載属の東南アジアにおける多様性について。日本昆虫学会大会
6. Tsubaki Y (2017) Evolution of male preference for conspecific female traits in *Mnais* damselflies. Annual meeting of Population Ecology
7. 椿 宜高 (2016) カワトンボの翅色多型の地理変異：同所的近縁種の影響。個体群生態学会札幌大会

〔図書〕(計 1 件)

1. 椿 宜高 (2017) ギフチョウ卵塊産卵の謎、伊藤さんが論理矛盾に気づいた日(辻和希編 生態学者・伊藤嘉昭伝) 108-113 海游社

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：清 拓哉

ローマ字氏名：(KIYOSHI Takuya)

所属研究機関名：独立行政法人国立科学博物館

部局名：動物研究部
職名：研究員
研究者番号：40599495

研究分担者氏名：高橋 純一
ローマ字氏名：(TAKAHASHI Junichi)
所属研究機関名：京都産業大学
部局名：総合生命科学部
職名：准教授
研究者番号：40530027

(2)研究協力者

研究協力者氏名：奥山 永
ローマ字氏名：(Hisashi Okuyama)

研究協力者氏名：林 仲平
ローマ字氏名：(Lin Chung-Ping)

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。