

平成 31 年 4 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18612

研究課題名(和文)分光技術を用いた捕食寄生者による甲虫の体色進化の実証

研究課題名(英文) Empirical study on color evolution of carabid beetle by parasitoid insects using spectrometry

研究代表者

奥崎 穰 (OKUZAKI, Yutaka)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・学術研究員

研究者番号：40725785

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)：オオルリオサムシとアイヌキンオサムシは北海道内で体色とその多型頻度を変化させながら系統分岐を繰り返してきたことが分子系統解析から明らかとなった。体色進化の地理的パターンは2種間で異なっていたが、2種の体色は北海道北部でよく似た赤い色であることが分光計測によって確かめられた。またDNAバーコーディングの結果、オサムシの捕食寄生者3種が確認され、北海道北部にはそのうちの1種、ヤドリバエ科 *Zaira cinerea* のみが生息していた。2種のオサムシの赤い体色はこの寄生バエに対して隠蔽色として機能しているかもしれない。今後は *Z. cinerea* の成虫を捕獲して、オサムシの体色への選好性を調査していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オサムシは歩行によってのみ移動するため、その進化史から陸域環境の変化が生物の生息範囲と集団間の遺伝子流動に与えた影響を推測できる。オサムシ集団間に大きな遺伝的分化が見られた渡島半島と日高地域は、氷期における生物の待避地、あるいは長期的に生物の移動を妨げる地理的障壁であったと考えられる。またオサムシは高山環境にも多く生息しており、その寄生バエが訪花性昆虫であったことは、オサムシが高山植物に送粉者を供給していること示唆する。今後の調査でオサムシの寄生バエが高山植物の受粉に欠かせないという結果が得られれば、オサムシのように植物と直接関わりのない昆虫にも注目した環境保全指針を定めることが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Two Carabus species, *Acoptolabrus gehinii* and *Megodontus kolbei*, show geographic variations of dorsal color in Hokkaido region, Japan. The two species have phylogenetically diverged through changes in body color and its polymorphism. The geographic pattern of color divergence were different between the two species, but they had similar red dorsal color in northern Hokkaido. Three parasitoid species were confirmed in Carabus beetles occurring in Hokkaido, and only one of them, tachinid fly *Zaira cinerea*, occurred in northern Hokkaido. The red color of two Carabus species may function as cryptic coloration to avoid oviposition by *Zaira cinerea*. Tachinid adults are known as flower-visiting insects. In the future study, preference of *Z. cinerea* for dorsal color of Carabus beetle will be studied by using the adults caught in fly-pollinated plants.

研究分野：進化生態学

キーワード：体色進化 分光計測 分子系統解析 オサムシ 寄生バエ

1. 研究開始当初の背景

生物の色は他の生物に見られることで適応進化する。カエルやネズミなどの小動物の体色進化は視覚の発達した昼行性の脊椎動物、主に鳥類の捕食圧によって起こる (Vignieri et al. 2010 Evolution; Maan & Cummings 2012 Am. Nat.). 一部の植食性昆虫においても、食草と対応した隠蔽色の多様化が鳥類の捕食圧によって説明されている (Nosil & Crespi 2006 PNAS). しかし、堅い外骨格に覆われた甲虫は鳥類の餌としては不向きであるにも関わらず、多様な体色を進化させている。昆虫全体の体色多様化メカニズムを理解するには、鳥類に代わる「観察者」を特定する必要がある。

甲虫を含め多くの昆虫は、捕食寄生性の昆虫 (寄生バエ、寄生バチ) に宿主として利用される。これらの捕食寄生者も鳥類と同様に幅広い光の波長に刺激される視細胞を持っており (Spaethe & Briscoe 2004 Mol. Biol. Evol.), 視覚を頼りに対象に接近する (Caro et al. 2014 Nat. Commun.). したがって、**甲虫の体色は捕食寄生者に対して隠蔽効果を持っているかもしれない**。

ただし、昆虫の体色変異が適応進化だけから生じるとはかぎらない。昆虫にはしばしば集団内に不連続な体色変異 (多型) が見られる。体色が何らかの機能を持つのであれば、淘汰によってその変異は小さくなるはずである (Seehausen et al. 1997 Science). 逆に淘汰が弱い環境では、中立な遺伝的変異の蓄積によって体色の多様化 (非適応進化) が起こるかもしれない。したがって、**体色の多型頻度に地域差が見られる場合は、淘汰圧の地域差も考慮しなければならない**。ここで甲虫の体色への淘汰圧に地域差が生じる原因は 2 種類想定される。1 つは捕食寄生者群集 (種構成) の違い、もう 1 つは植生による光環境 (明るさ) の変化である。

こうした甲虫の体色進化メカニズムを検証するために、本研究では北海道のオサムシ属 (甲虫目オサムシ科) とその捕食寄生者に注目する。オサムシは生態 (生活史や食性) や形態 (体サイズや交尾器) だけでなく、体色 (背面の色) においても多様化を遂げた徘徊性の甲虫である。世界的に見ても多くの種の体色は黒や茶であるが、高緯度地域には多様な体色の種が現れ、日本列島でも北海道に分布するオオルリオサムシとアイヌキンオサムシは鮮やかな体色を持つ。

この系統的に離れた 2 種の体色は、北海道北部では赤色になるが、北海道南部では体色が異なり、地理的変異と集団内多型を示す (図 1)。それぞれの姉妹種は樺太に分布しており、それらの体色も似ている。また申請者の調査より、捕食者は夜行性で色覚の退化した哺乳類 (主にタヌキ) であり、体色は捕食圧に影響しないこと、そして成虫期に捕食寄生性昆虫の幼虫 (図 2) に寄生されることが明らかとなっている。

これらの情報から申請者は、「**北海道南部に分布した北方系オサムシの体色が捕食寄生者からの淘汰圧の減少により多様化した**」という仮説を着想した。

2. 研究の目的

上記の仮説を検証するために、まず分子系統解析と分光計測を行い、オオルリオサムシとアイヌキンオサムシの地理的分布・分子系統・体色変異の関係を明らかにした。つづいて、2 種の生息域において、捕食寄生者の群集構成と植生環境を評価した。

3. 研究の方法

(1) 野外採集

オオルリオサムシは渡島半島南部の低標高域を除き、北海道全域に分布する。アイヌキンオサムシの分布域はやや断続的であるが、北海道各地に存在する。これら 2 種の体色変異を把握するために、北海道大学総合博物館の所蔵標本の産地情報を参考にして、北海道各地で 2016 年と 2018 年の 4 月から 9 月にピットフォールトラップを用いて採集を行った。

(2) オサムシの分子系統解析

同種集団間の系統関係を調べるにはミトコンドリア DNA の塩基配列に基づく系統樹を作成する方法が一般的であるが、ミトコンドリア DNA ND5 遺伝子を用いた系統解析ではオオルリオサ

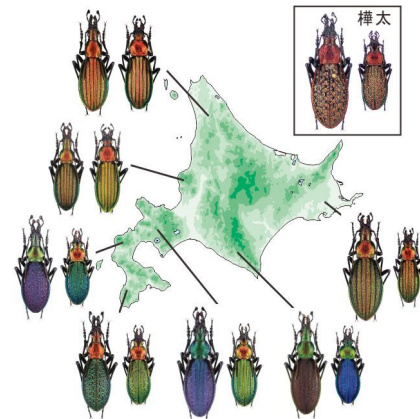


図1. オオルリオサムシ (左) とアイヌキンオサムシ (右) の体色の地理的変異 (井村, 水沢 2013). 樺太にはそれらの姉妹種カラフトクビナガオサムシ (左) とカラフトキンオサムシ (右) が分布する。



図2. オサムシの体表に産卵された寄生バエの卵 (上) とオサムシの体内で生活する寄生バエの幼虫 (下)。

ムシの集団間に遺伝的分化を十分に検出することができなかった(岡本 1999 昆虫と自然)。

そこで採集されたオサムシの生殖腺から高濃度 DNA 溶液を作成し、次世代シーケンサーを用いて非モデル生物のゲノム DNA (DNA 全体) から網羅的かつ大量に塩基配列を解読する Restriction-site Associated DNA Sequencing (RAD-seq) を行い、多数の遺伝的変異に基づく信頼性の高い系統樹を作成した。RAD-seq から得られる塩基配列情報は膨大であるため、通常のコンピューターでは個体間の系統関係を計算できない。そこで系統解析は専門家である京都大学大学院理学研究科の曾田貞滋教授に依頼した。

(3) オサムシの分光計測

色は物体からの反射光が視細胞(視物質)に吸収されたときに生じる刺激である。地球表面における光とは太陽からの日射であり、地球表面での日射は紫外域から赤外域まで幅広い波長(300–2500 nm)の電磁波から構成されている。人間が知覚できる電磁波が可視域(概ね 400–700 nm)に限定されているように、知覚できる波長帯は動物によって異なっており、一般に色覚の発達した分類群(多くの鳥類、一部の魚類、爬虫類、昆虫など)は紫外域から可視域までの電磁波を知覚できる。したがって、野生生物の色を評価する際はその生物の体表における紫外域から可視域までの電磁波の反射率を計測する分光機器が必要となる。

一般的な分光機器は試験管に入った溶液の反射率や透過率を計測するために設計されており、体長 2–3 cm のオサムシの反射率計測には不向きである。そこで本研究では、直径 2–3mm の範囲でのピンポイント計測が可能なファイバ式小型分光計を使用した。オサムシの体色変異は背面(頭部、胸部背面、上翅)にのみ見られ、それ以外の部分(側面、腹面、脚)はすべて黒色であるため、採集された 2 種のオサムシの上翅中央部の反射率を計測した。

(4) 生息地の植生・光環境調査

オサムシの生息地の植生は優占する植物のサイズ、形状によって大まかに区分した。生息地の明るさはファイバ式小型分光計を使用して放射照度(紫外域から可視域までの分光放射照度の総和)として評価するが、下記の 4. 研究成果に記すとおり、北海道全域での採集が完了したのちに行う予定である。

(5) 寄生者の DNA バーコーディング

捕食寄生性昆虫に限らず、昆虫の幼虫を形態から種同定するのは困難である。また寄生バエは宿主の体表に卵を付着させるが、その卵を形態から種同定するのはほぼ不可能である。そこで、分子系統解析のために解剖されたオサムシの体表と体内から捕食寄生者の卵と幼虫が得られた場合、その組織から DNA 抽出とサンガー法によるミトコンドリア DNA COI 遺伝子の塩基配列解読を行った。この分子実験は京都大学大学院理学研究科の曾田貞滋教授の研究室と北海道大学北方生物圏フィールド科学センターの齊藤隆教授の研究室で行った。つづいて、国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information: NCBI)のデータベースに登録されている既存の配列のなかで似たものがあるかどうかを調べた。COI 遺伝子領域は種間変異が大きく、また多くの生物分類群で解読されているため、記載情報の不足している分類群であっても配列の違いから種あるいは上位分類群(科など)の特定が可能となる。

4. 研究成果

(1) 野外採集

オオルリオサムシとアイヌキンオサムシの体色変異が大きい北海道南部(渡島半島、石狩低地帯、日高地域)と 2 種の体色が似る北海道北部(旭川以北)からオオルリオサムシ 649 個体、アイヌキンオサムシ 273 個体、その他のオサムシ属 2852 個体の標本(合計 50 地点 14 種 3774 個体)を採集・解剖した。しかし、当初想定していたよりも採集効率が悪く、100 個以上のトラップを 1 種間設置しても各種数個体しか採集されないような低密度な生息地が多かった。そのため 2 年間では北海道全域から 2 種を採集することは適わなかった。今回はこれまでに得られた標本に関する範囲で報告を行う。

(2) オサムシの分子系統解析

オオルリオサムシとアイヌキンオサムシの RAD-seq に基づく分子系統樹を作成したところ 2 種間で系統分岐の地理的パターンが異なっていた(図 3)。オオルリオサムシは渡島半島の太平洋を境界とする南北 2 つの系統に区別された。一方、アイヌキンオサムシは日高地域とそれ以外の系統に区別された。これらの大きな系統群のなかには地理的に離れた集団ほど系統的に離れる傾向(距離による隔離: Isolation by distance)が見られ、2 種は現在の分布域を形成する際に北海道内で一様に分布を拡大した可能性が高い。またオオルリオサムシはアイヌキンオサムシに比べて集団間の分岐が浅い(系統樹の枝の長さが短い)ことから、アイヌキンオサムシよりも後に北海道全域に分布を拡大したと考えられる。

(3) オサムシの分光計測

採集された 2 種の全個体で分光計測はまだ完了していないが、紫外線を反射する個体は確認

されていない。すなわち、例えば赤い個体と緑の個体がそれぞれ波長 660 nm 付近と 560 nm 付近の電磁波を最も反射していたように、いずれの個体も人間が知覚する色と一致する反射スペクトルを示した。

RAD-seq で得られた分子系統樹にその体色情報を加えると (図 3), オオルリオサムシ, アイヌキンオサムシともに分子系統群は体色ではなく, 地域によってまとまっており, その体色は各地域集団で独立に進化したものと考えられる。オオルリオサムシはアイヌキンオサムシよりも体色に大きな地理的変異を示すだけでなく, 体色の多型頻度も変化させながら系統分岐を繰り返していた。しかし, オオルリオサムシには北海道南部でも多型を示さない集団が確認され, 当初の仮説通りの結果は得られなかった。このことは体色への淘汰圧が南部であっても地域によって異なることを示唆している。一方, 先行研究どおり, 北海道北部では 2 種ともに体色は一樣に赤かった。つまり北部では 2 種の体色は収斂進化を起こしており, 体色への淘汰圧が存在する可能性が示唆された。

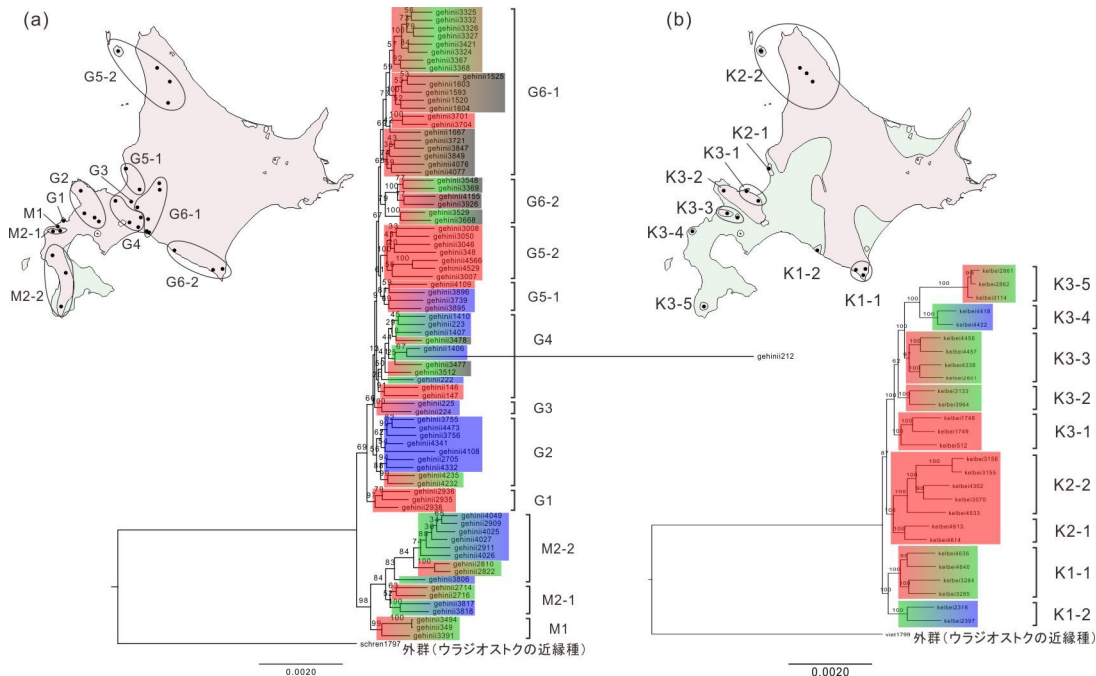


図3. (a) オオルリオサムシと (b) アイヌキンオサムシのRAD-seqに基づく分子系統樹と各単系統群 (M1など) の地理的分布。系統樹の先端の文字は分析に用いた個体の番号。その番号上の色はその個体が属する集団の体色を表しており, グラデーションはその集団が体色に多型を示すことを表す。地図上の塗りつぶしは潜在的分布域, 点はそれぞれの種の採集地であり

(4) 生息地の植生・光環境調査

オオルリオサムシとアイヌキンオサムシは幅広い植生環境に生息していた。生息地の多くは, 北海道南部ではナラ類やカンパ類が優占する落葉樹の森林, 北海道北部や高標高域では笹藪やハイマツ帯であった。やや特殊な生息環境としては, 渡島半島の海岸近くに形成されるイタドリなどの大型草本の群生地や森林限界を超えた高山植物群落が挙げられる。まだ採集を実施していない北海道中央部と東部では, 新たな植生帯での生息が確認されるかもしれない。

このように 2 種が生息する植生環境は当初想定していたよりも多様な構造を持っていた。放射照度は僅かな遮蔽物によっても変化するため, その計測は全ての生息地の植生構造を把握したのちに, いずれの生息地でも適用可能な方法 (地表面, 下層植生内, 林内などの計測位置) を定めようとして実施する。

ただし, 石狩低地帯の森林には下層植生がなく, 林床が明るいにもかかわらず, オオルリオサムシの体色には多型が見られた。逆に, 渡島半島の高山植物群落では草本が高密度で生い茂り, 地表面がかなり暗い環境であっても多型は見られなかった。そのため, 植生によって決定される明るさは, オサムシの体色進化には重要ではないかもしれない。

(5) 寄生者の DNA バーコーディング

79 個体のオサムシ属の体表と体内からそれぞれ寄生者の卵 113 個と幼虫 243 個体を手にした。これらの寄生者 356 個体のうち, 233 個体で COI 遺伝子の塩基配列解読に成功した。解読に失敗した個体の 73% は卵であり, おそらくそれらは幼虫が孵化した後の卵の殻だったと考えられる。解読に成功した 233 個体の配列 (14 種類のハプロタイプ) を NCBI のデータベースで検索したところ, 146 個体 (オサムシ 34 個体から得られたハプロタイプ 1-7) はハエ目ヤドリバエ科 *Zaira cinerea* の塩基配列と 99.5-99.7%, 19 個体 (オサムシ 16 個体から得られたハプロタイプ 8-9) はハエ目ハナバエ科 sp. (種不明) と 92.4-92.6%, 68 個体 (オサムシ 4 個体から得られたハプロタイプ 11-14) はハチ目シリボソクロバチ科 *Proctorupes* sp. (種不明) と 97.0-97.5% 一致した (図 4a)。

COI 遺伝子の配列は近縁種間では 5% 以上異なる (Hajibabaei et al. 2006 PNAS)。これを基

準にすると、ハプロタイプ 1-7 の寄生者は *Zaira cinerea* と判断して間違いのない *Zaira cinerea* による寄生は本州のオサムシ属でも確認されており (Shima 1999 Makunagi; Takami 2004 Coleopt. Bull.; Ohwaki and Nakamura 2010 Eontomol. Sci.), ***Zaira cinerea* が北海道においてもオサムシの主要な捕食寄生者であると考えられる**。ハプロタイプ 8-9 は近縁種の配列すら登録されておらず、未記載の寄生バエである可能性が高い。ハプロタイプ 11-14 は *Proctorupes* 属の 1 種と考えられる。この属はオサムシ科昆虫に産卵する寄生バチとして知られている (Thiele 1977 Carabid Beetles in Their Environments)。3 種の捕食寄生者はいずれも 2 種以上のオサムシを利用しており、宿主特異性は低いと言える (図 4b)。

これらのオサムシの捕食寄生者は北海道に広く分布しているが、ヤドリバエ科 *Zaira cinerea* は主に石狩低地帯より東で、ハナバエ科 sp. は西に分布していた (図 4b)。また、それらの寄生時期も種によって異なっており、*Zaira cinerea* による寄生は 8-9 月に、ハナバエ科 sp. による寄生は 5-6 月に多く確認された。収斂が起こるには、2 種の生物が同じ淘汰に晒される必要がある。オオルリオサムシとアイヌキンオサムシは異なる生活史を持っており、前者は 5-7 月、後者は主に 7-9 月に活動する (申請者未発表)。オサムシ属の生活史は生息地の気温の影響を受けやすく、寒い環境では越冬後の活動開始が遅くなる (Okuzaki and Sota 2017 Zool. Sci.)。したがって、北海道北部ではオオルリオサムシの活動開始が遅れ、アイヌキンオサムシとの活動時期が夏に重複し、同時に *Zaira cinerea* の宿主探索に晒されることで、オサムシ 2 種の体色収斂が生じているのかもしれない。

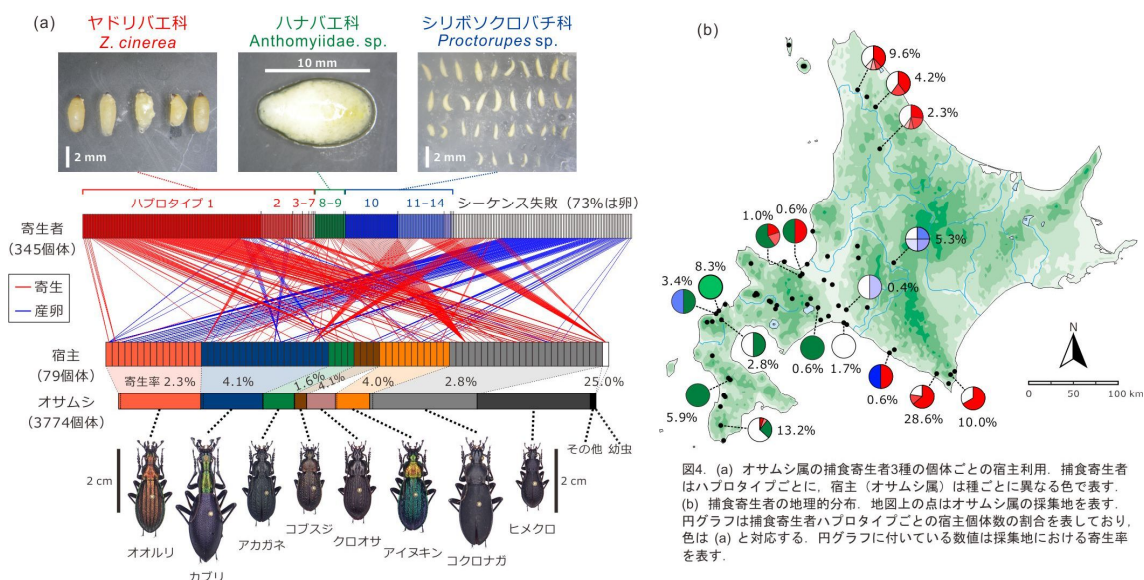


図4. (a) オサムシ属の捕食寄生者3種の個体ごとの宿主利用。捕食寄生者はハプロタイプごとに、宿主(オサムシ属)は種ごとに異なる色で表す。(b) 捕食寄生者の地理的分布。地図上の点はオサムシ属の採集地を表す。円グラフは捕食寄生者ハプロタイプごとの宿主個体数の割合を表しており、色は(a)と対応する。円グラフに付いている数値は採集地における寄生率を表す。

(6) 今後の展開

まだ北海道中央と東部でもオサムシ類の採集を行い、同様の分子系統解析と分光計測を行い、北海道全体でのオオルリオサムシとアイヌキンオサムシの進化史を解明する。

さらに寄生バエ成虫を採集し、オサムシの体色への選好性を評価する。これまで調査と並行して、野外で採集されたオサムシから寄生バエの生け捕りを試みてきたが、全て失敗に終わっている。飼育下で死亡したオサムシの体内に寄生バエの幼虫を確認できたこともあったが、そのオサムシの死体と寄生バエの幼虫をいっしょに保管しておく、しばらくして幼虫も死亡した。室内飼育による寄生バエ成虫の入手は困難と思われる。

しかし、今回の DNA バーコーディングの結果から、北海道北部におけるオサムシの寄生バエ成虫 *Zaira cinerea* の活動時期 (8-9 月) と上位分類群 (ヤドリバエ科) が明らかとなったのは大きな前進である。ヤドリバエ科は幼虫期に他の節足動物の体内で寄生生活を送る一方で、成虫は花粉や花蜜を餌とする訪花性昆虫である。8-9 月にハエ媒植物の花に来るハエ類を採集することで *Zaira cinerea* を捕獲できるのかもしれない。今後はそうして得られた *Zaira cinerea* 成虫でオサムシの体色への選好性を調査していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

奥崎穰, 持田浩治, 永井信, 中路達郎, 小熊宏之. 「生態学者のための分光計測」, 日本生態学会誌, 査読有, 67 巻, 2017, 41-56.

〔学会発表〕(計1件)

奥崎穰, 曾田貞滋. 「DNA バーコーディングによる北海道産オサムシ属の捕食性寄生者の種同定」, 第 66 回日本生態学会大会 (ポスター発表 P2-269), 2019 年.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：曾田 貞滋，齊藤 隆

ローマ字氏名：(SOTA, Teiji), (SAITOH, Takashi)

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。