

平成21年5月25日現在

研究種目：基盤研究（B）（海外学術調査）

研究期間：2006～2008

課題番号：18405008

研究課題名（和文） モンシロチョウにおける視覚機能および翅色の地理的変異と進化

研究課題名（英文） Geographical variation and evolution of the visual function and wing color in the Small White butterfly, *Pieris rapae*

研究代表者

蟻川 謙太郎（ARIKAWA KENTARO）

総合研究大学院大学・葉山高等研究センター・教授

研究者番号：20167232

研究成果の概要：

シロチョウ類における視覚依存的生殖行動とその進化に関する研究を行った。紫外線を反射する日本産亜種モンシロチョウと紫外線を反射しない欧州産亜種の間にはゆるやかな生殖隔離があることが分った。分子系統解析の結果、日本産亜種は欧州産亜種がユーラシア大陸を移動するのに伴って進化したものと推定された。両亜種の間ゆるやかな生殖隔離は特徴的で、これが翅色の進化を押し進めた原動力のひとつと考えら得る。一方モンシロチョウ視覚系における性的二型の起源を探るため、シロチョウ科における色覚系進化の解明に着手し、モンキチョウ複眼の細胞構成を分子レベルで解明した。モンキチョウ複眼にもモンシロチョウと同様に青視物質の重複が見られる点では一致したが、青視物質群内での多様性および視物質での発現状況には著しい違いがあり、より多くの種を対象にした解析的研究の必要性が浮かび上がった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2007年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生態・環境

キーワード：昆虫、進化、視覚系、配偶行動、紫外線

1. 研究開始当初の背景

本研究は、動物の生態と感覚機能の会計を解明する研究、Sensory Ecology（感覚生態学）のモデルケースとして位置づけられる。具体的にはモンシロチョウの視覚系に関する調査を、主としてユーラシア地域で行い、行動開発における鍵刺激と信号受容

系のマッチングが進化するメカニズムを解明することを目的とした。

雌のモンシロチョウは紫外線をよく反射し、雄はその紫外線反射を視覚的に識別して雌を探索する。しかし、雌の紫外線反射は日本産亜種では顕著だが、欧州産亜種には見られない。欧州と日本の間に横たわる

ユーラシア大陸では両者が混生する。この違いは配偶行動にも関係している。すなわち、日本産の雄は日本産の雌を、欧州産の雄は欧州産の雌を好む傾向が強い。これは両亜種がある程度生殖的に隔離されている可能性を示している。

モンシロチョウには視覚系にも興味深い特徴がある。日本産亜種では雌雄の複眼に著しい違いがある。雄の複眼には紫の励起光の下で強い蛍光を発する個眼＝蛍光個眼＝が存在する。これらの個眼に含まれる蛍光物質は視細胞に対して色フィルターとしてはたらき、視細胞の分光感度に性差を作り出している。紫吸収型視物質を含む視細胞が、雌では単純な紫受容細胞であるのに対し、雄では二峰性青受容細胞になっている。

更に不思議なことに、欧州産の雄には蛍光個眼が無いという予備実験の観察があった。いわゆる「鍵刺激進化の感覚便乗仮説」によれば、雌の紫外線反射が雄の紫外線受容系を効果的に刺激したために紫外線反射が鍵刺激として進化したということになる。しかしもし、雄の視覚系にも変化があるとすると、雌が雄の感覚に単に便乗したのではなく、雄は雄で雌の紫外線反射を効果的に検出する機構を進化させた可能性が出て来る。

以上のような背景のもと、本研究では当初、モンシロチョウ雄の複眼に地理的変異があるかどうかという点を軸に、1) 欧州産雄の複眼機能、2) 両型雌の混生地域での雄複眼形質、3) 配偶行動の解析、4) 分子系統解析の4項目に関して焦点を絞った調査と実験を行うことを計画した。特に初年度には欧州亜種の雄について、複眼を生理光学的に調べる実験に主力を傾注した。その結果、雄複眼の機能に明瞭な地域差は認められなかった。予備的観察で認められていた地域差は、個体差あるいは実験誤差の範囲内に収まるものと判断された。そのために研究計画を若干変更した。

2. 研究の目的

モンシロチョウの生殖行動に関わる現象として、翅色の性差、地理的変異、視覚的認知、視覚系の性差という特徴がある。これらの一連の現象は、視覚と生殖行動の進化に関する非常に興味深い研究対象である。

また進化を考える上では、シロチョウ科というグループを対象とした研究を進める必要がある。これらの諸点を考慮し、本研究では、①モンシロチョウ日本産および欧州産亜種間の生殖隔離、②モンシロチョウの分子系統進化、③シロチョウ科視覚系の進化の3項目について実験的な研究を進め、モンシロチョウの視覚依存的生殖行動に関する情報を蓄積し、そのメカニズムに関する理解を格段に深めることを目的とした。

3. 研究の方法

①モンシロチョウ日本産および欧州産亜種間の生殖隔離

さまざまな光条件下での行動実験を基礎として、両亜種間あるいは近縁種間における交尾成功率を測定した。また翅色による視覚刺激を定量化するために、両亜種あるいは交雑個体の翅の分光反射率を、光学的に測定した。

さらにユーラシア大陸の広い範囲で野外個体の調査を行い、両亜種がどのような分布状況にあるかを明らかにした。

②モンシロチョウの分子系統進化

ユーラシア大陸 21 地点から採集した 68 個体のモンシロチョウからミトコンドリア DNA を抽出、ND5 領域 877 塩基の塩基配列を決定した。個体群間の系統関係やハプロタイプ (ND5 領域の遺伝子型) 間の類縁関係を明らかにするため、UPGMA 系統樹・ハプロタイプネットワークを作成した。個体群の遺伝的多様性、遺伝的分化の程度を明らかにするため、塩基多様度の計算と、AMOVA による解析を行った。加えて、9 個体群、186 個体のモンシロチョウの核 DNA の多型を、AFLP (増幅断片長多型) 法を用いて検出し、その情報をもとに Nei's genetic distance を計算し、両性遺伝する核 DNA を用いた系統樹も作成した。

③シロチョウ科視覚系の進化

モンシロチョウ複眼では青受容型視物質が重複して、独特な紫受容細胞系ができています。この性質がモンシロチョウに特異的なものか、シロチョウ科に共通するものなのかどうかを調べる一環として、モンキチョウ (*Colias erate*) の複眼視物質および複

眼構造を、分子生物学および解剖学の方法で調べた。視物質は、複眼から抽出した poly-A RNA を鋳型にしてオプシン cDNA を増幅するのに適した縮重プライマーを用いて RT-PCR を行って同定した。同定した mRNA の複眼内での局在は、DIG でラベルした RNA プローブを作成、複眼のパラフィン切片で *in situ* hybridization を行って同定した。複眼の構造は光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて詳細に調べた。

4. 研究成果

①モンシロチョウ日本産および欧州産亜種間の生殖隔離

日本亜種と欧州亜種の雄が、雌が紫外線をほとんど反射しない欧州亜種の雌と、紫外線を反射する日本亜種の雌を配偶者として認知するかどうかを、両亜種の雌ダミーを 15 cm 間隔で並置し、それに対する雄の配偶行動を観察することによって調べた。その結果、両亜種の雄はそれぞれ自分と同亜種の雌を有意に選好した。しかし両亜種の雄はそれぞれ他亜種の雌にも、低頻度ながらも配偶行動を示した。また、両亜種の雌雄を野外ケージ内に放して異亜種間の交尾が起こるかどうかを調べた結果、どちらの雄も他亜種の雌と交尾した。さらに同じケージ内にスジグロシロチョウの雌とモンシロチョウの雄を放して配偶行動を観察した効果、モンシロチョウ雄はスジグロシロチョウ雌に対しても活発に配偶行動を示した。これらの結果は、モンシロチョウの雄の配偶者認知が、従来考えられていたより不正確であることを示す。不正確な配偶者認知は、同種の雌以外に異亜種あるいは異種の雌との交尾を可能にし、場合によっては適応度を高める適応的なメカニズムとして進化してきた可能性がある。

その他、日本産亜種と欧州産亜種の交雑個体では、雌の紫外線反射が両者の中間程度になることなども分った。

②モンシロチョウの分子系統進化

ミトコンドリア DNA と核 DNA に基づいた系統樹はいずれも同様の傾向を示したので、ここでは後者を示す (図 1)。

系統樹から、モンシロチョウの祖先系は欧州の紫外線を反射しないタイプであること、欧州個体群はユーラシア大陸の各地に

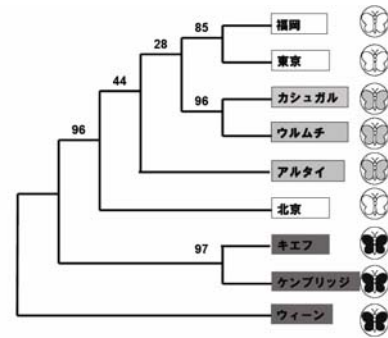


図 1. モンシロチョウの系統。個体群名は、黒が欧州、灰が中央アジア、白が東アジア。雌の紫外線反射は欧州が弱く、東アジアは強い。中央アジアは中間的。各分岐の上の数字はブートストラップ値。

分布を拡大して来たこと、そのうち大陸の東部あるいは中国東部において紫外線を反射する亜種が生じたことが分った。

また東アジアで塩基多様度が著しく低いので、ここへは比較的最近に少数の個体がボトルネックを経て侵入し、個体群が確立した可能性が高い。侵入はおそらく人為的な取引によるものだろう。

③シロチョウ科視覚系の進化

モンキチョウ複眼に発現する視物質オプシンを探索した結果、紫外受容型 1 つ、青受容型 2 つ、長波長受容型 1 つが見つかった。モンシロチョウでも青受容型が重複してそれぞれが青 (PrB) と紫 (PrV) 型に機能分化しているので、その意味ではモンキチョウも同じ結果になった。しかしモンキチョウで見つかった青受容型はいずれもモンシロチョウ PrV のオーソログで、PrB に対応する分子は見つからなかった。そこでモンキチョウの青受容型はそれぞれ CeV1、CeV2 と名付けた。アミノ酸配列の相同性は約 70% と、オプシンとしてはかなり低い値を示した。

さらに不思議なことに、CeV1 と CeV2 は常に同一の視細胞に重複して発現していた。仮に CeV1 と CeV2 の分光吸収特性がほとんど変わらないとすると、アミノ酸配列がかなり異なること、同一視細胞に発現することおよびその進化的意義が、現時点では全く説明できない。視細胞分光感度を測定すると同時に、CeV1 と CeV2 を培養細胞系で発現させてその分光吸収特性を決定する必要がある。

その実験を行うには、培養細胞系における昆虫視物質の発現系を確立することが必須である。その試みは長く続けられてきて

いるが、非常に困難で成功例は極めて少なかった。しかし我々は、大阪市立大学の寺北教授のグループと共同で、モンシロチョウの PrB と PrV の培養細胞における発現を成功させた。これはそれ自体で重要な成果であると同時に、モンキチョウ CeV1 と CeV2 の特性解明に繋がる大きな一歩である。

モンキチョウ複眼の解剖学的研究からは、個眼には感桿周囲色素の配列から同定できる3タイプがあること、感桿の中央付近に著しい狭帯があつて、これが感桿周囲色素のフィルター効果を高めていること、3タイプの個眼にはそれぞれ異なる組合せで視物質オプシン mRNA が発現していることなどが確かめられた。

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 23 件)

1. Arikawa K, Pirih P, Stavenga DG (2009) Rhabdom constriction enhances filtering by the red screening pigment in the eye of the Eastern Pale Clouded Yellow butterfly, *Colias erate* (Pieridae). *Journal of Experimental Biology*, in press (査読有)
2. Awata H, Wakakuwa M, Arikawa K (2009) Evolution of color vision in pierid butterflies: Blue opsin duplication, ommatidial heterogeneity and eye regionalization in *Colias erate*. *Journal of Comparative Physiology A*, 195:401-408 (査読有)
3. Obara Y and Majerus MEN (2009) Inaccurate mate recognition as a mating strategy of a 'pioneer male'. *Proceedings of Japan Academy*, in press (査読有)
4. Obara Y, Koshitaka H, Arikawa K (2008) Better mate in the shade: Enhancement of male mating behaviour in the cabbage butterfly, *Pieris rapae crucivora*, in UV-rich environment. *Journal of Experimental Biology*, 211:3698-3702 (査読有)
5. Obara Y, Ozawa G, Fukano Y., Watanabe K, Satoh T (2008) Mate preference in male cabbage butterflies, *Pieris rapae crucivora*, changes seasonally with the change in female UV colour. *Zoological Science* 25: 1-5 (査読有)
6. Obara Y, Ozawa G, Fukano Y (2008) Geographic variation in the ultraviolet reflectance of the wings of the female cabbage butterfly, *Pieris rapae*. *Zoological Science* 25:1106-1110 (査読有)
7. Koyama S, Fujita S, Hirota T, Satoh T, Obara Y, Hoshino H, Wada A, Burkanov V, Wada K (2008) Genetic structure of Steller sea lion (*Eumetopias Jubatus*) rookeries in the Sea of Okhotsk. *Zoological Studies* 47:781-787 (査読有)
8. Lau TFS, Ohba N, Arikawa K, Meyer-Rochow VB (2007) Sexual dimorphism in the compound eye of *Rhagophthalmus ohbai* (Coleoptera: Rhagophthalmidae): II. Physiology and function of the eye of the male. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 10: 27-31 (査読有)
9. Wakakuwa M, Stavenga DG, Arikawa K (2007) Spectral organization of ommatidia in flower-visiting insects. *Photochemistry and Photobiology*, 83:27-34 (査読有)
10. Fujii T, Yokoyama T, Ninagi O, Kakehashi K, Obara Y, Neno M, Ishikawa K, Mita K, Shimada T, & Abe H. (2007) Isolation and characterization of sex chromosome rearrangements generating male muscle dystrophy and female abnormal oogenesis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genetica* 130: 267-280 (査読有)
11. Nishide Y, Satoh T, Hiraoka T, Obara Y, Iwabuchi K (2007) Clonal structure affects the assembling behavior in the Japanese queenless ant *Pristomyrmex punctata*. *Naturwissenschaften* 94: 865-869 (査読有)
12. Koyama S, Harano K, Hirota T, Satoh T, Obara Y (2007) Rearing of candidate queens by honeybee, *Apis mellifera*, workers (Hymenoptera; Apidae) is independent of genetic relatedness. *Applied*

Entomology and Zoology, 42: 541-547 (査読有)

13. Hori S, Takeuchi H, Arikawa K, Kinoshita M, Ichikawa N, Sasaki M, Kubo T (2006) Associative visual learning, color discrimination, and chromatic adaptation in the harnessed honeybee *Apis mellifera* L. *Journal of Comparative Physiology A*, 192:691-700 (査読有)
14. Kawada H, Tatsuta H, Arikawa K, Takagi M (2006) Comparative study on the relationship between photoperiodic host-seeking behavioral pattern and the eye parameter of mosquitoes *Journal of Insect Physiology*, 52:67-75 (査読有)
15. Sanada-Morimura S, Satoh T, Obara Y (2006) Territorial behavior and temperature preference for nesting sites in a pavement ant, *Tetramorium tsushimae*. *Insectes Sociaux*, 53:141-148 (査読有)

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 若桑基博, 小柳光正, 寺北明久, 七田芳則, 蟻川謙太郎: モンシロチョウ短波長受容型視物質 2 種の試験管内再構成. 日本動物学会第 79 回大会 2008 年 9 月, 福岡大学 福岡
2. 栗田ひろ子, 若桑基博, 蟻川謙太郎: モンキチョウ複眼におけるオプシンと個眼多様性. 日本動物学会第 79 回大会 2008 年 9 月, 福岡大学 福岡
3. Pirih P, Arikawa K, Stavenga DG: Eye Regionalisation in the Pale Clouded Yellow, *Colias erate*. International Conference on Invertebrate Vision, August 2008, Baekaskog Castle, Sweden. (最優秀発表賞受賞)
4. Arikawa K, Nakatani Y, Wakakuwa M, Kinoshita M: Color vision and compound eye of the small white butterfly, *Pieris rapae crucivora*. International Conference on Invertebrate Vision, August 2008, Baekaskog Castle, Sweden.
5. 深野祐也, 渡辺賢太, 小澤岳, 佐々木謙, 小原嘉明: モンシロチョウの交尾

拒否を引き起こす生体アミン. 日本応用動物昆虫学会第 52 回大会 2008 年 3 月, 宇都宮大学, 宇都宮

6. 大宮祐男, 若桑基博, 蟻川謙太郎: モンシロチョウ複眼背側における個眼の構造. 日本動物学会第 78 回大会 2007 年 9 月, 弘前大学 弘前
7. 仲谷嘉洋, 蟻川謙太郎: モンシロチョウ色覚の行動学的証明. 日本動物学会第 78 回大会 2007 年 9 月, 弘前大学 弘前
8. Obara Y: Male mating adjustment in response to a varying UV environment. The 5th International conference on the Biology of Butterflies, July 2007, Rome Italy
9. Obara Y: An inaccurate mate recognition as a mating strategy of a 'pioneer male'. EFES, Behavioral Ecology and Social Evolution, From Individual to Population, May 2007, Ewha Woman's University, Seoul Korea

〔図書〕(計 21 件)

1. 蟻川謙太郎: 紫外線を見る—昆虫の色覚. いろいろな動物の感覚 (江口英輔・蟻川謙太郎編) 学会出版センター, 印刷中
2. 蟻川謙太郎: チョウ類における視物質重複と色覚の進化. 科学, 岩波書店, 印刷中
3. 蟻川謙太郎 (2008) チョウ類複眼の構造と機能. 昆虫ミメティクスとナノマテリアル (下村政・下澤楯夫編) NTS 出版, 164-178
4. 小原嘉明 (2008) 「まぼろし色」のモンシロチョウの来た道. 昆虫DNA研究会ニュースレター
5. 小原嘉明 (2008) モンシロチョウ: 色変わりする「まぼろし色」の花嫁衣装. Butterflies
6. 蟻川謙太郎 (2007) 動物の見る世界を探る. 生命を見る・観る・診る—生命の教養学III. 慶応義塾大学出版会. 73-95

7. 蟻川謙太郎 (2007) 昆虫の見る世界. 21世紀の動物科学 第8巻 行動とコミュニケーション (岡良隆・蟻川謙太郎編) 培風館, 70-98.
8. 蟻川謙太郎 (2007) 視細胞の分光感度. 生物物理学ハンドブック (石渡他編) 朝倉書店, 433-435.
9. 阿部広明、藤井告、鈴木文、佐藤俊幸、岩淵喜久男、小原嘉明 (2006) 昆虫の雌に引き起こされる雄の交尾行動: カブトムシ、カミキリムシ、カイコなどの例. 日本性科学会雑誌、24:7-16

〔新聞報道〕(計4件)

1. チョウの目に迫る. 生き物とともに. 朝日新聞 2007.1.17
2. アゲハチョウの見る世界. かがく Café. 日本経済新聞 2007.8.12
3. アゲハの色覚 4原色. 日本経済新聞 2008.1.30
4. アゲハチョウ 色覚は4原色. 読売新聞 2008.2.4.

〔招待講演(研究代表者分、国際会議のみ)〕
(計21件)

1. The color vision system in butterflies. IBRO-ANS Advanced Neuroscience School, January 2009, Australian National University Kioloa Campus, NSW, Australia.
2. Retinal organization and color vision in a butterfly, *Papilio xuthus*. "Symposium: Senses and Behavior" International Conference on Sensors and Sensing in Biology and Engineering. October, 2008, Cetraro (Calabria) Italy
3. International Seminar: Evolutionary Studies in Behavioral Neuroscience. June 2008, Shonan Village Center, Hayama, Japan
4. Color and polarization vision of a swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. Polarization Conference: New directions in research on polarization of light. June

2006, Heron Island, Australia

5. Retinal properties underlying butterfly color vision. "Symposium: Visual ecology" The 5th International conference on the Biology of Butterflies, July 2007, Rome Italy
6. Visual system of *Papilio* butterfly. "Symposium: *Drosophila* and beyond: New dimension of insect biology" The 8th Meeting of Japan *Drosophila* Research Conference, July 2007, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo.
7. Color vision and eye organization in butterflies. Interdisciplinary Sensory Systems Workshop "Invertebrate Color Vision" October 2006, University of Virginia, Charlottesville, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蟻川謙太郎 (総合研究大学院大学・葉山高
等研究センター・教授)

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小原嘉明 (東京農工大学・名誉教授)

佐藤俊幸 (東京農工大学・獣医学部・講師)

(4) 海外研究協力者

Doekele Stavenga (オランダ・フロンゲン
ン大学教授)