

平成21年6月15日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18570095
 研究課題名(和文) アジア産ヒラタクワガタにおける形態形質変異の遺伝的基盤および種分化機構の解明
 研究課題名(英文) The study for genetic basis of morphological variation and speciation mechanisms in the Asian Hirata stag beetles, *Dorcus titanus*.
 研究代表者
 五箇 公一 (GOKA KOICHI)
 独立行政法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・主席研究員
 研究者番号：90300847

研究成果の概要：日本産およびアジア諸国産のヒラタクワガタ地域系統の系統関係がミトコンドリア DNA 分析によって明らかにされ、アジアの大陸分化プロセスにあわせてヒラタクワガタ地域系統の種分化が進行したことが示された。交雑実験により、ヒラタクワガタ系統間の交雑は遺伝的距離が大きいほど交雑和合性が高い傾向が示された。楕円フーリエ解析による大顎形態分析の結果、雑種個体雄成虫は親系統雄の形態とは異なる大顎形態を示すが、雌親系統の形態的特徴が強く示される傾向があることが示され、ヒラタクワガタの大顎形態には母性効果があることが判明した。生殖操作に関与する *Wolbachia* の感染は、調査した個体すべてから検出はされなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	660,000	4,160,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

日本およびアジア各地に生息するヒラタクワガタ地域系統の分子系統関係、系統間の生殖隔離の程度および機構、および形態形質変異の遺伝的基盤を明らかにし、ヒラタクワガタの遺伝的多様性および種分化プロセスの解明を目指す。ヒラタクワガタは、アジア域に広く分布するクワガタムシの一種で、地域ごとに体サイズや大アゴの形態が異なる様々な系統が生息し、これらの系統は亜種として分類されている。これまでにミトコンド

リア DNA 変異に基づく系統解析からもこれら地域系統(亜種)の間には深い遺伝的分化が存在することが示されており(Goka et al., 2004)、その分類体系の見直しも検討され始めている。また、交雑実験により遺伝的にも地理的にも遠く離れたインドネシア原産の系統と日本産系統の間で妊性の高い雑種が生じる一方で、遺伝的にも地理的にも相対的に近い東南アジアの系統間や、日本産の地域個体群間では雑種の成長率および妊性が低いなど部分的な生殖隔離の存在が認められ

ており、生殖隔離機構の進化の点からも興味深い現象が認められている。生殖隔離には1つの可能性として核型変異が関与していることが示唆されるが、クワガタムシにおける核型変異に関する知見はない。また、特に、昆虫の生殖隔離および種分化プロセスにおいて、宿主昆虫の生殖操作を行うボルバキアをはじめとした細胞内共生細菌が中心的な役割を担う場合があることが近年明らかになってきており、ヒラタクワガタの生殖隔離の進化においてもこうした微生物が関与している可能性もある。一方、我が国では、近年のクワガタムシ飼育ブームにより外国産ヒラタクワガタの大量輸入が続いており、原産地における乱獲および日本産固有個体群への遺伝的浸食など、日本産ヒラタクワガタの遺伝的多様性および固有性の崩壊が危惧されている。個体群の保全ユニットを確立する上でもヒラタクワガタの遺伝的分化の実態およびプロセスを明らかにすることは重要な意味を持つ。

2. 研究の目的

本研究では、ヒラタクワガタの核遺伝子 DNA 変異を調べて系統解析を行い、従来のミトコンドリア DNA 系統解析結果と照らし合わせて、地域集団間の系統関係を明らかにするとともに交雑実験により系統間の生殖隔離の程度を調べる。次に各系統の交尾器における形態変異の大きさを解析し、交配前生殖隔離の程度との関係を調べる。また、各系統共生微生物感染状況を調べ、生殖隔離との関係を調べる。さらに成虫の非交尾器形態に見られる変異について、交雑で得られた雑種の形態も含めて様々な系統について幾何学的測定を行い、形態測定学的手法を用いて定量評価を行うとともに、形質を支配する遺伝子座の数についての情報を量的遺伝学的に推定にする。以上の実験より、ヒラタクワガタの分子系統解析結果に生殖隔離発達レベル、細胞内共生微生物の関与および形態形質変異のデータを加味することで、ヒラタクワガタの種分化プロセスを総合的に解析する

3. 研究の方法

(1) ヒラタクワガタの分子系統解析

ミトコンドリア DNA による解析を進めるとともに核 DNA のマーカー遺伝子を探索する。DNA データバンクおよび文献情報より核 DNA の特定遺伝子領域を増幅するためのプライマーを設計し、現有のサーマルサイクラーを用いて PCR 法によりヒラタクワガタのトータル DNA サンプルを鋳型として、特定遺伝子領域を増幅を行う。増幅が認められた DNA 断片の塩基配列を現有のオートシーケンサーにより解析し、変異が認められた領域をマーカー遺伝子とする。

地球環境研究総合推進費課題で収集され、現有のフリーザーで冷凍保管されているヒラタクワガタの DNA サンプルについて、上記で得られたマーカー遺伝子領域の増幅を PCR 法により行い、現有のオートシーケンサーによりマーカー遺伝子領域の塩基配列変異データを収集する。

(2) ヒラタクワガタ系統間の交雑実験

現有のヒラタクワガタ各地域系統飼育サンプルを用いて、現有の飼育実験室において交雑実験を行う。交雑で得られた卵は、数、ふ化率、成長率、性比等の生活史形質や繁殖形質の記録をとりながら幼虫から成虫に至るまで飼育し、雑種個体の生存、および繁殖可能性について検証する。

(3) ヒラタクワガタの外部形態および交尾器形態の解析

現有するフリーザーで保管されているヒラタクワガタ成虫サンプルについて、体全体を乾燥後、各パーツに分解し重量を現有の電子天秤にて測定する。また各パーツの画像をデジタルカメラ(今回申請備品)で取り込み、現有の画像解析ソフトを利用し、形態標識点の数値化を行う。数値化された輪郭データを2次元空間に投影後、楕円フーリエ記述子を用いて近似する。算出されたフーリエ係数に対して標準化を行った後、主成分分析や正準変量分析等の多変量解析法を用いることで、各パーツで見られる種間の形態的距離の定量化、および種の判別率を計算する。また輪郭情報以外に明瞭な相同標識点を活用できるパーツに関しては、薄板スプライン法を適用することで、体サイズの影響を除去した非線形成分の種間比較を行い、種を明確に特徴づけている形状成分の抽出を試みる。

(4) ヒラタクワガタ細胞内共生微生物の検出

系統解析に用いたヒラタクワガタ地域系統の全 DNA サンプルについて、細胞内共生微生物の感染を探索する。まず、既に公表されている細菌の 16S rDNA 遺伝子に特異的なプライマーや、各共生細菌種に特異的な遺伝子を標的としたプライマーを用いて DNA サンプルごとに PCR を行う。細菌の遺伝子が増幅された場合には、それらの遺伝子の配列を決定し、細菌種を特定する。特にボルバキアでは、進化速度が比較的速い *wsp* 遺伝子に基づく分類がされており、異なるボルバキア系統間で宿主昆虫に対して異なる表現型を示すことが知られている。従って、ボルバキアが感染している場合には、ボルバキア系統の特定も行う。さらに、得られた塩基配列に基づくヒラタクワガタの共生細菌に特異的なプライマーを設計し、サンプル DNA について PCR に

より遺伝子の増幅が見られた場合を感染と判定する診断 PCR 法を確立する。これにより、次年度以降に予定している交雑実験に用いたサンプルの感染状態の判断を簡便に行うことができる。

4. 研究成果

(1) ヒラタクワガタの分子系統解析

① mtDNA の解析

産地が明確な中国産のサンプルを採集できたことで、本種が生息するアジア大陸および島嶼のほとんどすべての地域サンプルが揃った。これによりアジア地域の mtDNA 系統樹が完成した。それに基づけば日本列島のヒラタクワガタ個体群は中国を起源として約 150 万年かけて島ごとに分化を果たしたことが示された。セレベスヒラタの 2 型やマレーヒラタ、ヒペリオンヒラタ、パプワヒラタ、ウィックハムヒラタ、コクワガタなどを解析し、結果に加えた。その結果、セレベスヒラタの 2 型は同じ島に分布しているにも関わらず、北部と中部で異なるクラスターに分かれ、一方マレーヒラタはスマトラ島とは地理的に分断されているにも関わらず、スマトラヒラタのクレードに含まれることが分かった。またヒペリオンやパプワ、ウィックハムヒラタは、*D. titanus* ssp. とはかなり異なる系統であることが分かった。以上の結果から東南アジア地域における遺伝的分化プロセスも明らかとなり、スンダランド大陸が列島として分化した地史的順序も明らかとなった。

② 核 DNA マーカーの探索

核 DNA の変異を調べるため、一般的にミトコンドリア DNA と同等の進化速度をもつと考えられる Internal Transcribed Spacer 領域の増幅を試みた、その結果、500 万年以上分化した系統間でも、わずかに 1 塩基しか変異がないことが示された。

(2) ヒラタクワガタ系統間の交雑実験

日本列島産の本州ヒラタ、ツシマヒラタ、サキシマヒラタ、オキナワヒラタ、およびアマミヒラタと東南アジア産スマトラオオヒラタ（インドネシア）、パラワンオオヒラタ（フィリピン）、ミンダナオオオヒラタ（フィリピン）、およびセレベスオオヒラタ（インドネシア）間で交雑実験を昨年度に引き続き行った結果、高い交雑和合性が認められ、多くの雑種成虫が得られた。メス親が日本産系統の場合は体サイズの違いから交雑が成立しなかった。さらに同じ東南アジア産系統であるスマトラオオヒラタとダイオウヒラタの間でも交雑和合性が高く、多数の雑種を得ることができた。また同様に同じ日本列島産系統であるツシマヒラタと本州ヒラタの

間でも多数の座種が得られた。昨年度からの結果を総合すると分化して 100 万年以下の個体群同士の場合は交雑和合性が低く、100 年以上隔離され、リング種的な位置関係にある場合は交雑和合性が高くなる傾向が示され、通常、負相関関係を示す交雑和合性と遺伝的距離がクワガタの場合、正の相関を示すことが明らかとなった。また、ツシマヒラタと本州ヒラタは九州北部で同所的に生息しており、このエリアではハイブリッドゾーンが形成されている可能性が高い。上記のように核 DNA マーカーの開発には、時間が必要であるが、大顎の形態分析によって雑種化の解析に期待がかかる。

(3) ヒラタクワガタの外部形態および交尾器形態の解析

雑種の形態形質の解析手法を開発するために、室内飼育により、ヒラタクワガタの地域系統間の交雑実験を行い、F1 世代を作出した。親世代と F1 世代の大顎形状を比較するため、楕円フーリエ解析により、大顎の輪郭形状を数値化した。次に標準化フーリエ係数を基に多変量解析を行い、各種の大顎形状の特徴を抽出するとともに、サイズを標準化した際の親種の大顎平均形状と F1 世代の大顎形状を比較した。その結果、F1 雑種の大顎形状は、雌雄両親の形状とは異なるが、雌親系統の特徴が強く出る傾向があることが示された。この形状解析手法を用いれば、雌雄の親系統の推定が可能になると考えられた。

(4) ヒラタクワガタ細胞内共生微生物の検出

これまでミトコンドリア DNA 系統解析に使用した地域系統の DNA サンプルについて、共生細菌ボルバキア DNA 特異的プライマーを用いて PCR 法による DNA 増幅を試みたが、増幅産物は認められず、感染は確認されなかった。今後、さらに解析サンプルを増やすとともに、成虫個体を解剖して生殖器官の DNA 抽出を行い、感染の有無を確認する必要がある。

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 2 件)

- ① 五箇公一 (2006) 昆虫輸入にみる日本の外来生物問題. 関西自然保護機構会誌 28 : 34-37.
- ② Tatsuta, H. (2007) Distinctive developmental variability of genital parts in the sexually dimorphic beetle, *Prosopocoilus inclinatus* (Coleoptera: Lucanidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 90:

〔学会発表〕(計 11 件)

- ① 五箇公一・米田昌浩 (2006) Ecological risks caused by introduced insects-The case of European bumblebee and exotic stag beetles, 中国昆虫学会 2006 年学術年会. 中国長春市
- ② 五箇公一・米田昌浩・今藤夏子・国武陽子・岡部貴美子(2007)昆虫類の侵入と進化的重要単位, 第 54 回日本生態学会大会, 松山市
- ③ 五箇公一 (2006)The evolutionary history of mites: Co-speciation between stag beetles and parasitic mites, 12th International Congress of Acarology オランダ・アムステルダム市
- ④ 五箇公一・岡部貴美子・横山潤・小島啓史 (2008) クワガタが来た道、ダニが来た道. 第 63 回日本生物地理学会年次大会、東京
- ⑤ 五箇公一・岡部貴美子・横山潤・小島啓史 (2008) ヒラタクワガタおよびその寄生ダニの進化的重要単位. 日本昆虫学会第 68 回大会、高松市
- ⑥ Goka, K. (2008) Exotic Pet Animals Influencing Biodiversity in Japan. Control Strategy of Invasive Alien Mammals 2008 (CSIAM2008) Committee. 那覇市
- ⑦ 五箇公一 (2008) なぜ日本人はクワガタムシが好きなのか?—分子遺伝学で探る生物多様性の歴史と危機—. 第 48 回生命科学夏の学校(生化学若い研究者の会) 八王子市
- ⑧ 立田晴記・五箇公一・所諭史 (2009) アジア産ヒラタクワガタ種群における大顎形状の特徴. 日本応用動物昆虫学会
- ⑨ 所諭史・五箇公一 (2009) ヒラタクワガタ *Dorcus titanus* における系統地理学. 日本応用動物昆虫学会、札幌市
- ⑩ 立田晴記・五箇公一 (2008) 交雑で生じる形態変異: アジア産ヒラタクワガタ種群を例に. 日本昆虫学会第 68 回大会、高松市
- ⑪ 五箇公一 (2009) ヒラタクワガタおよびその寄生ダニの進化的重要単位. 日本昆虫学会第 68 回大会、高松市

〔図書〕(計 1 件)

- ① 五箇公一 (2008) クワガタムシ好きの日本人がクワガタムシを滅ぼす. *Imidas SPECIAL*. イミダス編集部編、集英社、東京、pp142-143.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五箇公一 (GOKA KOICHI)

独立行政法人国立環境研究所・環境リスク
研究センター・主席研究員
研究者番号: 90300847

(2) 研究分担者

立田晴記 (TATSUTA HARUKI)

独立行政法人国立環境研究所・環境リスク
研究センター・主任研究員
研究者番号: 50370268

今藤夏子 (KONDO NATSUKO)

独立行政法人国立環境研究所・生物圏環境研
究領域・NIES 特別研究員
研究者番号: 10414369
(従事期間: 2006. 4~2008. 3)

国武陽子

独立行政法人国立環境研究所・環境リスク
研究センター・NIES ポスドクフェロー
研究者番号: 90414367
(従事期間: 2006. 4~2008. 3)

(3) 連携研究者

該当なし