

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03308

研究課題名(和文) 多様な繁殖システムの進化と汎世界的な広域分布獲得の関連性追究

研究課題名(英文) An investigation into the relationship between the evolution of diverse reproductive systems and their corresponding degree of distribution attained globally

研究代表者

東城 幸治 (Tojo, Koji)

信州大学・学術研究院理学系・教授

研究者番号：30377618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：フタバカゲロウは南極を除く大陸に生息し、自然の止水環境のほか、学校プールや防火水槽などの人工池にも生息する。こうしたハビタットジェネラリストの特徴は、ユニークな繁殖生態と深く関わっている。欧州の先行研究では、胚発生が母体内で進行する卵胎生で、孵化直前の卵が産下されると報じられたが、遺伝的に大きく分化した日本列島や朝鮮半島の系統では、孵化前の卵ではなく、母体内で孵化した幼虫が産下されることを明示した。加えて組織化学的研究から、胚発生初期には卵黄蛋白が卵内に存在せず、母体から卵内への栄養物質の供給を究明した。すなわち、本種は卵胎生ではなく、胎生であることを強く示唆する極めて重要な知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物の繁殖様式として、「卵生、卵胎生、胎生」は広く一般的にも理解されている。著しく種多様性の高い昆虫類種では、卵生が大多数であり、卵胎生は多くの昆虫目(内)において平行的に獲得されている一方で、胎生となると極めて僅かな事例が知られるのみである。

こうした中、原始的昆虫の一つであるカゲロウ目昆虫において、新規の胎生システムが進化していたことを究明したことのインパクトは甚大である。従来、卵胎生とされてきた欧州での研究に問題があったのか、はたまた、同一種内に、卵胎生(欧州)と胎生(東アジア系統)の系統が混在するのか、本種における胎生の進化を巡る議論は、さらに深い学術的な興味へと発展するものである。

研究成果の概要(英文)：A mayfly, Cloeon dipterum, is found on every continent except Antarctica, and inhabits natural lentic water environments as well as artificial ponds. These habitat generalist characteristics are closely related to their unique reproductive ecology. European studies have demonstrated that this species is ovoviviparous, with most of the embryonic development taking place inside the mother's body, and that eggs are laid just before hatching. However, this study clearly demonstrated that at least the lineages in Japan and South Korea constitute a genetically highly differentiated lineage even within the species, and that larvae hatched inside the mother's body are laid. In addition, histochemical study revealed that yolk proteins are not present in the egg during stages of embryonic development, and that nutrients are supplied to the egg from the mother directly. In other words, this is an important finding, suggesting that the animals are viviparous, rather than ovoviviparous.

研究分野：進化生物学

キーワード：昆虫 カゲロウ 胚発生 卵胎生 胎生 繁殖生態 遺伝系統 卵黄タンパク

1. 研究開始当初の背景

フタバカゲロウ *Cloeon dipterum* は南極を除く全ての大陸に生息し、自然の止水環境に加えて、屋外の学校プールや防火水槽などのような人工的な池にも生息している。また、屋外においた大きなバケツに貯まった水の中でも生息することがある。こうしたハビタットジェネラリスト的な特徴は、そのユニークな繁殖生態と密接に関係している。

欧州での研究では、本種は卵胎生であること、胚発生の大部分は母体内で進行し、孵化直前の卵が産下され、産卵後すぐに孵化が始まるとされてきた(実際にそのような動画画像もインターネット上にアップロードされていることから確実な情報である)。

しかしながら、我々のこれまでの研究では、少なくとも日本や朝鮮半島の系統は、種内においても遺伝的に大きく分化した系統を構成していることに加えて、母体内で孵化した幼虫が産下されることを明示していた。また、断片的ではあるが、胚発生の中期ステージ(S字胚ステージ)における樹脂包埋法による組織化学的観察からは、一般的な昆虫の胚発生において不可欠であるとされる卵黄タンパク質が観察されず、卵内には胚発生を進行させるために必須となる栄養源が見当たらない状況であることから、卵胎生ではなく、母体から栄養供給を受ける胎生である可能性も示唆された。

2. 研究の目的

上記のような状況から、種多様性が著しく高く、多様な繁殖システムが進化してきたことで知られる昆虫類においても、フタバカゲロウが極めて特殊な繁殖システムを有する可能性が高く、この解明に向けた研究に着手した。汎世界的に分布することから、これらを可能な限り網羅するような地域個体群を対象とする分子系統解析を実施することで、欧州や日本列島産フタバカゲロウの系統進化的位置づけを明確化し、胚発生の知見がどの系統を対象としたものであるのかを確実に紐付けした上で、胚発生に関する詳細な知見を蓄積することから、フタバカゲロウにおけるユニークな繁殖システムの実態解明、並びにその系統進化史を明確化することを目的とした。

また、本研究は、社会性ゴキブリ類や社会性アブラムシ類、寄生性ツツエバエ類など、特殊な生態を有する昆虫類において、ごくわずかに知られている胎生システムのいずれのタイプとも異なる胎生システムである可能性が高く、こうした胎生の類型化についても詳細な議論を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

フタバカゲロウの系統解析を詳細に実施し、卵胎生として報告されてきた欧州の先行研究における系統や日本列島や朝鮮半島などの東アジア系統の位置づけをより確実に評価できるよう、ミトコンドリアDNAと核DNAそれぞれ複数の遺伝子領域を対象とした分子系統解析を実施した。

また、フタバカゲロウを実験室内で継代飼育できる環境を整備し、年間を通して成虫が得られるような研究基盤を整備した。加えて、飼育下で羽化させたオス・メスを用いてハンドペアリングを実施し、任意のタイミングで受精卵を得ることができるようにした。

これらの受精卵を用いて胚発生を(母体内で)進行させるとともに、母体内から摘出した受精卵の生理食塩水中での発生を施工した。母体内で発生を進行させることは容易であることから、ハンドペアリングのタイミングと、その後の受精卵を抱えたメス成虫の飼育(インキュベーション)温度条件などから、胚発生のステージ進行を予測し、胚発生の観察・研究に必要なステージの胚を母体から摘出することで、発生学的な試料とした。

卵内における卵黄タンパク質の有無については、組織化学的手法(樹脂切片作成、組織染色法)により追究し、加えてタンパク質以外の栄養物質として脂質の存在などを脂質特異的な色素染色などで観察した。さらに、卵黄タンパク質の前駆物質であるビテロジェニン遺伝子の発現解析を実施した。

さらに、母体からの卵内への栄養供給に関しては、透過型電子顕微鏡による観察を実施し、母体の組織と初期胚発生ステージの卵膜の間での物質の伝搬の可能性についても検討した。

こうしたフタバカゲロウにおける様々なアプローチを総合的に議論することで、本種の特殊な繁殖システムに関する知見を蓄積させるとともに、「卵胎生ではなく、胎生ではないのか?」という本研究課題の本丸に迫った。

4. 研究成果

GenBank 登録配列なども活用し、全世界的なフタバカゲロウ地域個体群を可能な限り盛り込んだ系統解析を実施した。結果、種としての単系統性は支持され、欧州のフタバカゲロウは遺伝的に分化した複数系統から構成されることが明らかとなった。先行研究において卵胎生と評価された系統が、いずれに相当するものであるかを特定することはできなかったが、少なくとも我々が観察している日本列島の個体群については、朝鮮半島の個体群と共に欧州や北米・南米・アフリカなどの個体群で構成される系統群からは大きく分化していることが明確となった。日本列島や朝鮮半島のフタバカゲロウ個体群が欧州のいずれの系統群とも大きく遺伝的に分化した種内系統であることを基盤情報として把握した上で、特殊な繁殖システムの進化について考察する。

まず、継代飼育とハンドペアリングに成功し、年間を通して必要なタイミングで、安定的に受精卵を得ることに成功した。加えて、胚発生の初期ステージから孵化に至るまでの全ステージを通して、卵内に卵黄タンパク質を観察することはできなかった。一方、卵形成ステージから胚発生の初期ステージにかけて、卵内に脂質が存在し、胚発生の進行とともに脂質が（消費されて）減少する様子が観察された。すなわち、胚発生における栄養物質として機能している可能性が示唆された。しかしながら、胚の形態形成において、タンパク質性の栄養物質は不可欠であることから、卵形成ステージも含めた母体における卵黄タンパク質の前駆物質であるピテロジェニン遺伝子の発現について、他のカゲロウ種との対照的な解析を実施したところ、フタバカゲロウでは、卵形成のタイミングではなく、受精卵を抱え、母体内において胚発生が進行する段階において、母体におけるピテロジェニン遺伝子の発現が確認された。

また、母体からの卵内への栄養供給に関する透過型電子顕微鏡による観察からは、母体の組織と初期胚発生ステージの卵膜の間における物質の伝搬が強く示唆されるよう、多数の微絨毛が発達し、それらの間を電子密度の高い（栄養物質である可能性が高い）構造が観察された。

以上のような、様々なアプローチにおける研究結果を総合的に評価すると、フタバカゲロウの特殊な繁殖システムは、「卵胎生ではなく、胎生である」可能性を強く示唆するものである。また、受精卵をメス体内でインキュベーションすることは可能であっても、受精卵をメス体外の生理食塩水などでインキュベーションすることは困難であることから、母体内での胚への栄養供給が強く示唆された。

これらは極めてインパクトの大きな成果であるため、これまでの研究中途な段階での発表などは極力控えてきたが、今後は、このユニークかつ重要な成果を論文公表する方向で準備を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yano K, Niimi T, Tojo K
2. 発表標題 Nutrition supply and undeveloped egg absorption occurred in the Japanese populations of mayfly Cloeon dipterum
3. 学会等名 International Symposium of the 5th Benthological Society of Asia, Chiang Mai (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷野宏樹・東城幸治・新美輝幸
2. 発表標題 昆虫の特殊な繁殖システム「胎生」
3. 学会等名 日本昆虫学会 第82回松本大会 公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yano K and Tojo K
2. 発表標題 Proposal and descriptions for a new type of insect viviparity discovered in Ephemeroptera
3. 学会等名 23rd International Congress of Zoology (ICZ) 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tojo K, Sekine K, Takenaka M and Suzuki T
2. 発表標題 Species diversity of Japan: Their origins and diversification processes
3. 学会等名 23rd International Congress of Zoology (ICZ) 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yano K, Niimi T, Tojo K
2. 発表標題 Nutrition supply and undeveloped egg absorption occurred in the Japanese populations of mayfly Cloeon dipterum
3. 学会等名 International Symposium of the 5th Benthological Society of Asia, Chiang Mai(国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷野宏樹・東城幸治・新美輝幸
2. 発表標題 昆虫の特殊な繁殖システム「胎生」
3. 学会等名 日本昆虫学会 第82回松本大会 公開シンポジウム(招待講演) (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	新美 輝幸 (Niimi Teruyuki) (00293712)	基礎生物学研究所・進化発生研究部門・教授 (63904)	
研究分担者	竹中 將起 (Takenaka Masaki) (00854465)	信州大学・理学部・特任助教 (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------