

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2014

課題番号：22570019

研究課題名(和文) 草食獣 - 植物 - 植食性昆虫の三者系における局所的適応進化の実証的研究

研究課題名(英文) An experimental study of locally adaptive evolution in interaction system consisting of a herbivorous mammal, a plant and a herbivorous insect

研究代表者

佐藤 宏明 (SATO, HIROAKI)

奈良女子大学・自然科学系・准教授

研究者番号：20196265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：奈良公園に生育するイラクサは近隣地域のイラクサとくらべるとおびただしい数の刺毛を葉や茎に備えている。奈良公園では1200年にわたり多数のシカが保護されてきたことを念頭に、本研究は、(1)個体群間の刺毛の変異はシカの生息密度に依存している、(2)刺毛はシカに対する防御には役立つが植食性昆虫には役立たない、(3)奈良公園のイラクサ集団は他地域の集団とは遺伝的に相当異なる、という結果から、奈良公園に生育するイラクサの異常に多い刺毛はシカに対する防御形質として進化したと結論づけた。また、奈良公園のアカタテハは幼虫の成育に関して奈良公園のイラクサに局所適応をしていることを示した。

研究成果の概要(英文)：Nettles in Nara Park, where several hundred sika deer have been protected for 1200 years, have many stinging hairs on shoots. We found that (1) among-population variation in stinging hair density was dependent upon the density of sika deer, (2) stinging hairs served as defense against deer, but not herbivorous insects, and (3) the nettle population in the park obviously differed from other populations at the level of genome-wide structure. These findings suggest that hairy nettles in the park evolved through natural selection under intensive browsing by deer. Furthermore, we demonstrated that red admiral butterfly larvae from Nara Park and another location attained greater growth performance when reared on nettles of sympatric origins than when reared those of allopatric origins. This implies that butterflies in the park are locally adapted to hairy nettles of the park. Consequently, local adaptation of the butterfly to hairy nettles would have been driven by multispecies interactions.

研究分野：生態学、とくに植物と動物の相互作用

キーワード：イラクサ ニホンジカ 防御形質 アカタテハ 進化 自然淘汰 奈良公園 被食誘導応答

## 1. 研究開始当初の背景

進化生態学の中心課題のひとつは、生物間相互作用が個体数の量的変化や形質の可塑的变化のみならず、形質の遺伝的变化、すなわち進化を引き起こしていることを実証し、その過程を明らかにすることである。奈良公園はこの課題に取り組むまたとない場所を提供している。

奈良公園は1200年にわたりニホンジカが保護され、現在では6.6 km<sup>2</sup>の面積に1200頭ものシカが生息している。長期にわたり高密度に維持されたシカによる強い採食圧は植物にさまざまな影響を及ぼし、特異な生態系を成立させている(北川 2004)。たとえば、公園内の芝地は、人手を加えることなく、シカの採食によって保たれている特殊な草地である。

植物は動物の被食に対し様々な耐性・防御形質を進化させ、自身の生存と繁殖を図っている(Danell and Bergström 2002)。イラクサは茎や葉柄、葉に刺毛をそなえる多年性草本であり、これらの刺毛にはヒスタミン等を含んだ毒液が蓄えられている。イラクサの刺毛は草食獣に対する防御形質と考えられることから(Pollard and Briggs 1984)、我々は奈良公園のイラクサに着目し、2007年から研究を開始した。その結果、(1)奈良公園のイラクサはシカが生息していない他地域のイラクサと比較して、数十~数百倍も高い刺毛密度を有していること、(2)刺毛密度は遺伝的支配を受けていること、(3)高い刺毛密度には生存率を高めるという適応的意義があること、を明らかにした。これらの結果は、高い刺毛密度を有する奈良公園のイラクサ個体群はシカの強い採食圧の下、自然選択によって進化したことを示唆する(Kato et al. 2008)。

さらに、刺毛を高密度にそなえる奈良公園のイラクサと、奈良公園と同じく奈良盆地の東端に分布しながらシカの摂食をほとんど受けず刺毛密度が極めて低い高取城趾のイラクサとで、葉の含水量、窒素量、窒素・炭素比を予備的に比較したところ、いずれの値も奈良公園のイラクサで有意に低い値を示した。このことは、奈良公園のイラクサを食草とする昆虫の成長に何らかの影響を及ぼしている可能性を示唆する。

以上の研究から、ニホンジカの長期にわたる強い採食圧が植物の形質を遺伝的に変化させるだけでなく、植食性昆虫の生活史形質までも変えてしまうことが考えられる。これを実証することは、とりもなおさず冒頭に示した進化生態学の中心課題に取り組むことを物語る。

## 2. 研究の目的

本研究は奈良公園のニホンジカ-植物-植食性昆虫間における相互作用系において、シカの採食圧が引き起こす植物と植食性昆虫の局所的適応進化を進化遺伝学的手法によって実証し、その要因と機構を解明することを目

標とした。この目標を達成するために、イラクサとアカタテハを材料に以下の五点を明らかにすることを目的とした。

- 1) イラクサの刺毛密度の遺伝力
- 2) シカの採食による刺毛密度の誘導応答の有無
- 3) イラクサの刺毛密度に与える光と土壤肥沃度およびシカ個体群密度の影響
- 4) 奈良公園のイラクサ個体群の近隣個体群からの遺伝的分化の程度
- 5) 奈良公園におけるアカタテハの、刺毛を多数備えるイラクサ個体群への局所適応の可能性

## 3. 研究の方法

### (1) 刺毛密度の遺伝力

奈良公園と高取城趾の野生個体群から種子を採取し、発芽させた実生をビニールハウスで栽培した。9月に各個体から葉を2枚採集し刺毛数を数えた。また、次の組み合わせで交配を行い、種子を得た。

奈良公園雄×奈良公園雌 5組

奈良公園雄×高取城趾雌 7組

得られた種子を翌年発芽させ、同じ条件下で実生を栽培し、9月に葉の刺毛数を測定した。そして、両親の平均刺毛数に対する両親を同じくする子の平均刺毛数の回帰直線を求め、その傾きから遺伝率を算出した。

### (2) シカの採食による刺毛密度の誘導応答の有無

奈良公園から採取した実生をビニールハウスで育て、翌年、それらの個体を奈良女子大構内に移植した。8月にこれらの個体を以下の3群に分けて、切除を行なった。

地際から3節目で茎を切除 8個体

地際で茎を切除 7個体

切除せず(対照群) 11個体

その後11月、翌年の3、6、7、8、9、10月に各個体から葉4枚を採取し、刺毛数を数えた。

### (3) イラクサの刺毛密度に与える光強度、土壤肥沃度およびシカ個体群密度の影響

奈良公園内の12箇所、奈良女子大構内、櫻井市、高取町、明日香村、名張市、香落溪、嵐山にてそれぞれ32個体のイラクサから葉を2枚採取し、葉面積と刺毛数を記録した。また、各調査地にて相対光強度(光強度の指標)および土壤硝酸イオン濃度(土壤肥沃度の指標)を測定した。さらに、シカの糞粒密度を調査し(個体群密度の指標)した。これらのデータを二段抽出共分散構造モデルによって解析し、光強度、土壤栄養、シカ個体群密度が刺毛数に与える影響を評価した。

### (4) 植食性昆虫とシカに対する防御形質としての刺毛の役割

奈良公園のイラクサと高取城趾のイラクサを鉢植えて奈良女子大構内に置き、植食性昆虫による葉の被食度を比較した。さらに、

それらの鉢植え個体を奈良公園内に置き、シカによる葉の被食度を比較した。

#### (5) 奈良公園のイラクサ個体群の遺伝的分化

奈良公園の2箇所、奈良公園に隣接する2箇所、櫻井市、高取城趾、香落溪の計7箇所それぞれにおいてイラクサ30個体から葉を採取し、AFLP法による集団遺伝学的解析を行った。12通りのプライマーペアから合計546のAFLPマーカーが得られ、そのデータをもとに、個体群間の遺伝的多様度比較、個体群間の系統解析、および奈良公園の個体群に特異的な遺伝領域の検出を試みた。

#### (6) 奈良公園のアカタテハ個体群の局所適応

奈良公園と高取城趾からアカタテハの餌となるイラクサの葉を採取し、物理・化学的形質として、比葉重、含水率、窒素含有率、窒素／炭素比を測定した。

奈良公園と高取城趾から卵を採集し、孵化させた幼虫を奈良公園と高取城趾のイラクサを与えて育てた。そして、羽化率、孵化から蛹化までの発育日数、成虫乾燥重、相対成長速度、腹部乾燥重比を、個体群間とイラクサ間で比較した。その際、羽化率を除き、雌雄別々に比較した。

奈良公園のアカタテハ個体群が周辺の個体群から遺伝的に分化しているかどうかを明らかにするため、奈良公園、奈良女子大、櫻井、高取城趾、香落溪からそれぞれアカタテハの卵25個を採集し、孵化させた幼虫のミトコンドリアCOI領域のDNA塩基配列を調べた。

さらに、これらの個体群に奈良公園内の1箇所および奈良公園に隣接する1箇所の個体群を加えた計7箇所からアカタテハの卵22ないし27個を採取し、孵化させた幼虫を用いて、イラクサの場合と同様AFLPマーカーを用いた集団遺伝学的解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 刺毛密度の遺伝力

両親の平均刺毛数に対する子の平均刺毛数の回帰直線を求めたところ、有意な回帰直線が得られた(図1)。このことから、刺毛数は

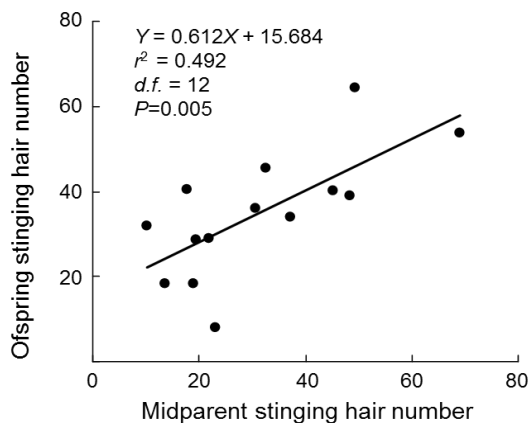


図1. 両親の刺毛数と子の刺毛数の関係

遺伝的支配を受け、その遺伝率は0.664と推定された。

#### (2) シカの採食による刺毛密度の誘導応答の有無

茎の切除前と切除後の刺毛数の変化を図2に示した。対照群も二つの処理群も切除後3月まで刺毛数は減少したが、その後増加に転じ、7ないし8月に最大になった。そして前年同様秋にかけ減少した。対照群と処理群の間に一貫した有意差は見られなかった。このことは、切除刺激がその後展開する葉の刺毛数に影響せず、シカの採食が刺毛数の即時誘導も遅延誘導も引き起こさないことを示唆している。

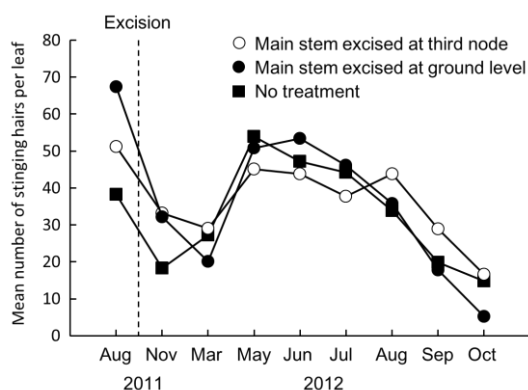


図2. 奈良公園のイラクサにおける主茎切除処理後の刺毛数の変化

#### (3) イラクサの刺毛数に与える光と土壌肥沃度およびシカ個体群密度の影響

二段抽出共分散構造モデルによって、葉面積と刺毛数の関係を個体レベルで解析した結果と、葉面積と刺毛数に与える光強度、土壌肥沃度、シカ個体群密度の影響を個体群レベルで解析した結果を図3に示す。葉面積と刺毛数の間には、個体レベルでは弱いながらも有意な正の相関が認められたが、個体群レベルでは有意な相関は認められなかった。個体群レベルで、光強度、土壌肥沃度、シカ個体群密度の葉面積と刺毛数に与える影響をみると、光強度は葉面積に負の影響を与えるが、刺毛数には有意な影響を与えていなかった。土壌肥沃度は葉面積、刺毛数のどちらにも有意な影響は与えていなかった。一方、シカ個

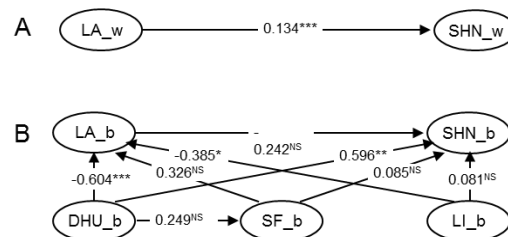


図3. 二段抽出共分散構造モデルによる環境要因が葉面積と刺毛数に与える影響の評価。A: 個体レベル。B: 個体群レベル LA: 葉面積, SHN: 刺毛数, DHU: シカ個体群密度, SF: 土壌肥沃度, LI: 光強度

体群密度は葉面積に負の影響を、刺毛数に正の影響を与えていた。以上の結果は、個体群レベルでみた刺毛数はシカの採食圧の影響を、直接受け、シカの密度が増えると、刺毛数が増える傾向にあることを示している。

(4) 植食性昆虫とシカに対する防御形質としての刺毛の役割

実験に使用したイラクサの刺毛数は、奈良公園が高取城址のおよそ 80 倍であった (図 4 左)。しかし、奈良公園のイラクサと高取城址のイラクサは同程度に昆虫による食害を受けていた。一方、シカに食べられた葉の割合は、奈良公園のイラクサで有意に低く、およそ 1/4 であった。したがって、刺毛は植食性昆虫に対する防御としては役に立たないが、シカに対する防御として役に立っていると言える。

しかし、刺毛数が多いとそれだけシカの採食を受けにくいというわけではない。図 4 左は奈良公園のイラクサ個体を置いた地点での潜在的シカ採食圧 (すなわち、高取城址の個体の被食率) と奈良公園個体の被食率の関係、図 4 右は奈良公園のイラクサの刺毛数と被食率の関係を示している。重回帰分析の結果、刺毛密度と被食率の間には有意な相関は検出されなかった。このことは、奈良公園のイラクサは必要以上に多くの刺毛を備えていることを示唆している。その理由として、奈良公園のイラクサは刺毛数に関して、淘汰限界に達している可能性が考えられる。

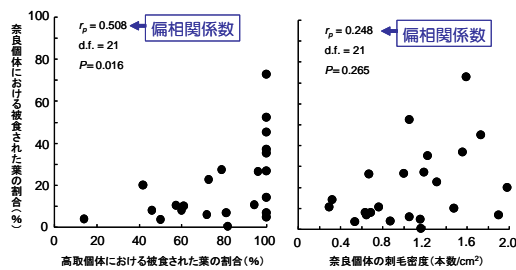


図 4. 奈良公園のイラクサの被食率に対する潜在的シカ採食圧 (=高取個体の被食率) と刺毛密度の重回帰分析。

(5) 奈良公園のイラクサ個体群の近隣個体群からの遺伝的分化の程度

546 個の AFLP マーカーにもとづき遺伝的多様度を 7 個体群間で比較したところ、奈良公園内の東大寺裏と能登川個体群は他の個体群と比較して多型遺伝子座数が約 1.5~2 倍あり、ヘテロ接合度も高いことがわかった (表 1)。その理由として、個体群サイズの違い、奈良公園個体群の祖先性、遺伝子流動の影響、適応遺伝子の重複などが考えられるが、想像の域を出ない。

次に、Fisher の遺伝的距離を用いて NJ 法によりイラクサ個体群間の系統関係をみてみると、奈良公園内の東大寺裏と能登川の個体群は独自のクラスターを形成した (図 5)。奈良公園の縁に位置する弘法寺の個体群は奈良

表 1. 546 個の AFLP マーカーにもとづくイラクサ 7 個体群の遺伝的多様度

Population	N	No. of loci	Polymorphic loci (%)	H <sub>d</sub>
1. 奈良公園	30	546	412 (76)	0.200
2. 能登川	30	546	366 (67)	0.195
3. 弘法寺	30	546	262 (48)	0.146
4. 奈良女	30	546	173 (32)	0.128
5. 桜井	30	546	294 (54)	0.175
6. 高取	30	546	200 (37)	0.155
7. 香落溪	30	546	270 (50)	0.167

注: ヘテロ接合度の期待値  $H_d$ , Neiの遺伝的多様度

女構内の集団に近かった。したがって、奈良公園のイラクサ個体群は近隣する個体群とは遺伝的に異なるといえる。このことは、奈良公園の個体群は近隣個体群からの遺伝子の移出入が制限されている可能性を示唆している。

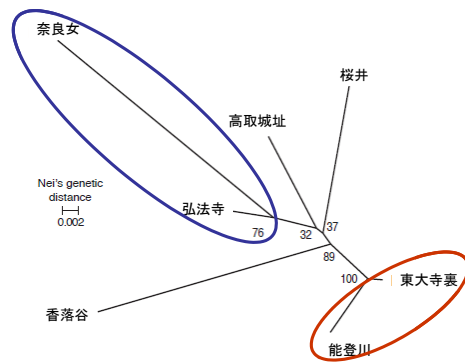


図 5. Fisher の遺伝的距離に基づき NJ 法によって得られた 7 個体群の系統樹

集団間で顕著な分化を示すアウトライアの検出を試みたところ、546 loci のうち 28 loci がアウトライアと判断された (図 6)。これらのアウトライアのうち 402, 425, 515 は奈良公園の 2 個体群に 50% 以上の頻度で出現していた。これらのアウトライアはシカの採食に関連する自然淘汰を受けている可能性がある。ひょっとすると刺毛の発現に関与する領域かもしれない。

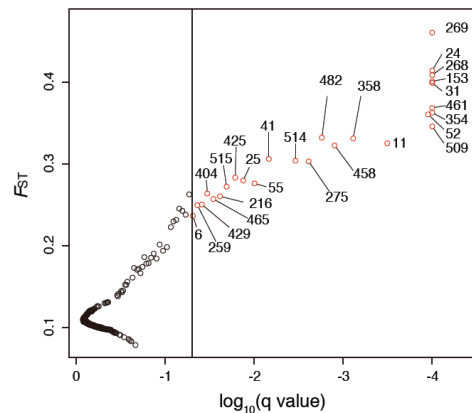


図 6. Outlier 解析。赤丸で示した 28 個の領域が個体群間で顕著な分化を示す outlier と判断された。

(6) 奈良公園におけるアカタテハの、刺毛を多数備えるイラクサ個体群への局所適応の可能性

奈良公園のイラクサの葉は高取城址の葉よりも、比葉重が重いことから葉は厚く、食葉性昆虫にとって摂食しにくい葉であることが示唆された(図7). さらに、含水率、窒素含有率、窒素/炭素比も低いことから、食葉性昆虫の餌として栄養的質も劣ると考えられた. このことから、アカタテハの幼虫を奈良公園の葉で飼育すると成長が悪くなるのではないかと予想された.

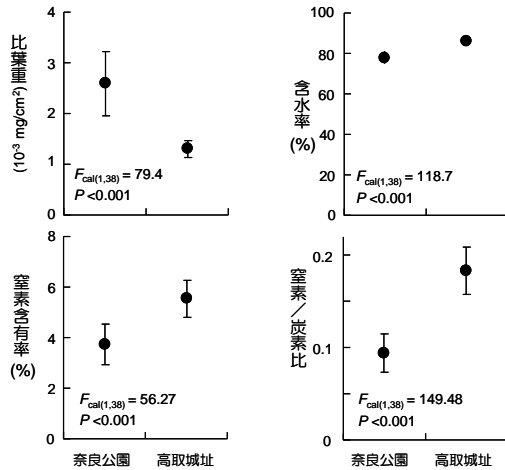


図7. 奈良公園と高取城址に生育するイラクサの葉の物理的・化学的性質の比較.

アカタテハの羽化率は、いずれの個体群においても、与えたイラクサの違いによる有意な差はみられなかった. 奈良公園のイラクサで育てると発育日数と相対成長速度は雌でわずかに長くなる傾向がみられた. 成虫乾燥重は高取城址のアカタテハでは雄雌ともに奈良公園のイラクサで飼育すると有意に減少したが、奈良公園の雌では逆に有意に増加した. 腹部乾燥重比は雌雄ともに、高取城址のアカタテハは奈良公園のイラクサで飼育すると有意に減少し、逆に奈良公園のアカタテハは奈良公園のイラクサで飼育すると有意に増加した

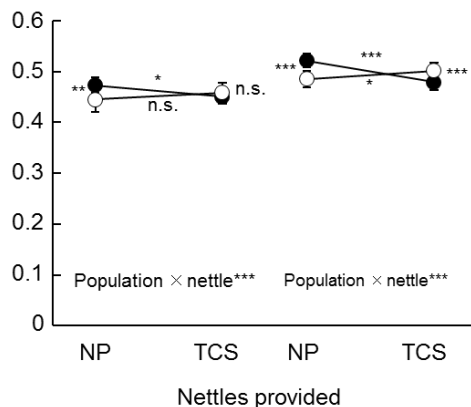


図8. 奈良公園(NP)と高取城址(TCS)に自生するイラクサの葉を与えて育てた奈良公園(●)と高取城址(○)のアカタテハ幼虫から羽化した成虫の腹部乾燥重比

(図8).

以上の結果は、食葉性昆虫の餌として質的に劣ると考えられる奈良公園のイラクサを与えると、高取城址のアカタテハは成長パフォーマンスが低下することはあっても、増加することはないこと、対照的に奈良公園のアカタテハは成長パフォーマンスがむしろ増加することを示している. とくに繁殖力の指標とみなされる腹部乾燥重比に着目すると、その傾向は雌雄ともに顕著であった. このことは、奈良公園のアカタテハは質的に劣る奈良公園のイラクサに局所適応している可能性を示唆する.

奈良公園の個体群を含む5個体群の幼虫のCOI領域302塩基を比較したところ、2つハプロタイプが検出された(図9). うちひとつは奈良公園の個体群特有であった. このことは、奈良公園の個体群と近隣個体群の間の遺伝子流動が或る程度は制限されていることを示唆している.

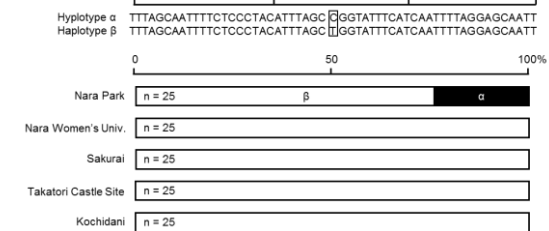


図9. COI領域の302塩基配列にみられた二つのハプロタイプの頻度

奈良公園の個体群を含む7個体群間でAFLPマーカーにもとづくFisherの遺伝的距離を求めた(表2). ほとんどの個体群間で有意差が認められたが、遺伝的距離は最大でも0.033であることから、個体群間の遺伝的分化はほとんど生じていないといえる.

表2. 466個のAFLPマーカーにもとづくアカタテハ7個体群の遺伝的多様度と遺伝的距離. 有意差( $P < 0.05$ )があった遺伝的距離は太字で示した.

Population	N	PL	$H_j$	Pairwise $F_{ST}$						
				Nara Park	Noto	Kohoboji	Nara Women's Univ.	Sakurai	Takatori Castle Site	
Nara Park	28	74.9	0.232							
Noto	20	74.7	0.213	<b>0.016</b>						
Kohoboji	20	78.8	0.220	<b>0.013</b>	<b>0.005</b>					
Nara Women's Univ.	27	73.2	0.229	<b>0.006</b>	<b>0.016</b>	<b>0.006</b>				
Sakurai	26	74.7	0.219	<b>0.032</b>	<b>0.018</b>	<b>0.019</b>	<b>0.031</b>			
Takatori Castle Site	25	66.5	0.211	<b>0.008</b>	<b>0.013</b>	<b>0.012</b>	<b>0.007</b>	<b>0.033</b>		
Kochidani	23	66.5	0.213	0.004	<b>0.016</b>	<b>0.014</b>	<b>0.010</b>	<b>0.027</b>	<b>0.005</b>	

(7) まとめ

- ① 奈良公園のイラクサはシカの高い採食圧下に1200年間さらされてきた結果、防御形質として高い刺毛密度を進化させた.
- ② 奈良公園のイラクサは周辺個体群から遺伝的に分化している.
- ③ 奈良公園のアカタテハは質的に劣る奈良公園のイラクサに局所適応している可能性を示唆する.

公園のイラクサ個体群に局所適応している。  
④ 局所適応は一般に個体群の遺伝的分化をもたらすが、奈良公園のアカタテハ個体群は周辺個体群から遺伝的に分化しているとまではいえない。  
⑤ しかし、奈良公園のアカタテハ個体群において特異的なハプロタイプが検出されたことから、奈良公園のアカタテハ個体群は定着性が高い可能性がある。

#### 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4件)

①Iwamoto M, Horikawa C, Shikata M, Wasaka N, Kato T, Sato H (2014) Stinging hairs on the Japanese nettle *Urtica thunbergiana* have a defensive function against mammalian but not insect herbivores. *Ecological Research*, 29, 455-462. 査読有.

DOI:10.1007/s11284-014-1137-2

②Shikata M, Kato T, Shibata E and Sato H. (2013) Among-population variation in resistance traits of a nettle and its relationship with deer habitat use frequency. *Ecological Research*, 28, 207-216. 査読有.

DOI 10.1007/s11284-012-1007-8

③Shinozaki Y, Yamamoto Y, Oishi M, and Sato H (2012) Early leaf abscission has little effect on larval mortality of *Ectoedemia cerviparadisicola* (Lepidoptera, Nepticulidae) associated with *Quercus gilva*. *Annals of Entomological Society of America*, 105, 572-578. 査読有.

DOI 10.1603/AN11185

④佐藤宏明(2012) 奈良公園におけるシカ-植物-昆虫の相互作用. *昆虫と自然*, 47: 4-7. 査読無.

[学会発表] (計4件)

①甲山哲生・堀川千佳・川合静・四方恵・佐藤宏明.「奈良公園におけるアカタテハの局所的適応進化」 第59回日本応用動物昆虫学会, 2015年3月27日, 山形市.

②岩元美咲・堀川千佳・川合静・佐藤宏明.「イラクサの刺毛はシカに対する防御には役立つが、昆虫に対しては役立たない」 第58回日本応用動物昆虫学会, 2014年3月27日, 高知市.

③佐藤宏明・甲山哲夫 「奈良公園においてシカの過剰な増加をもたらす植物と昆虫の特異な関係」 第70回日本昆虫学会大会, 2012年9月17日, 町田市

④平田里枝子・福岡恵子・大石理子・加藤禎孝・佐藤宏明.「イラクサ2集団におけるシカの有無で生じたと思われる形質の違い」 第

58回日本生態学会, 2011年3月10日.

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 宏明 (SATO, Hiroaki)

奈良女子大学・自然科学系・准教授

研究者番号: 20196265

(2)研究分担者

木村 正人 (KIMURA, Masahito)

北海道大学・地球環境科学研究科・教授

研究者番号: 30091440