

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月16日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770072

研究課題名（和文）食性に関わる遺伝子群の探索と分子進化：キノコ食ショウジョウバエを中心に

研究課題名（英文）Evolutionary genetics of mycophagy in Drosophilidae

研究代表者

加藤 徹 (KATO TORU)

北海道大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：80374198

研究成果の概要（和文）：キノコ食という特殊な食性を持つショウジョウバエ群に注目し、分子系統樹を構築して食性の進化パターンを推定した。その結果、キノコ食の形質は単系統ではなく、複数回独立に生じた可能性が示唆された。次に、キノコ食ショウジョウバエに特異的な遺伝的変異を検出することを目的に、食性に関わると思われる遺伝子について PCR プライマーを設計し、キノコ食の複数種の DNA を鋳型に PCR を行なった。その結果、いくつかの遺伝子で増幅が確認されたが、これらの塩基配列を比較したところキノコ食に特異的な変異は検出されず、今後もさらなる検討が必要とされた。

研究成果の概要（英文）：In order to study the evolution of mycophagy in Drosophilidae, I reconstructed the phylogenetic tree for several mycophagous and non-mycophagous species of Drosophilidae. In the phylogenetic tree, mycophagous species did not regarded as a monophyletic group. This result suggests that the mycophagous character occurred several times independently. Next, in order to identify the genetic basis of mycophagy, I compared the nucleotide sequences of some candidate genes between the mycophagous and non-mycophagous species in Drosophilidae. However, I fail to detect any variant specific to mycophagy. Therefore, more analyses will be required to solve this problem.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、生物多様性・分類

キーワード：遺伝的多様性

1. 研究開始当初の背景

(1) 昆虫は、既知の生物種全体の半分以上の割合を占める多様な動物群である。昆虫が多様である理由についてはさまざまな説明が与えられているが、その一つに、彼らの食

性が非常に多様化したことが挙げられる。食性とは、ある動物がどのような種類の食物を、どのように利用するかという性質を指す。そして、動物にとって食性は他の生物との相互作用を規定し、その動物の生態的位置を決め

るための重要な条件となる。従って、昆虫における食性の多様化および進化の過程を解明することは、生物多様性の成り立ちの相当部分について理解を深めることに繋がる。

(2) ショウジョウバエは、ショウジョウバエ科に属する双翅目昆虫の総称で、目が赤いこと、アルコールに誘引される種が存在することから、顔が赤くて酒好きの妖怪「猩々」にちなんで名付けられたとされる。ショウジョウバエ科の多様性は非常に高く、現在までに全世界から約 3,500 種が知られており、森林をはじめ、いろいろな環境に適応放散しているそして、その食性は、果物食、樹液食、草本食、キノコ食、肉食（ブユの幼虫を食べる）など、非常に多岐に渡っている。

(3) ショウジョウバエは、生物学において最も優れた研究材料の一つとしても知られており、これまで遺伝学をはじめ、発生学、系統分類学、行動学など、生物学の多くの分野での研究成果が蓄積されている。そして、2007 年には、12 種のショウジョウバエについて全ゲノム配列が公表されており、今後、それら種間の比較ゲノム解析による成果が期待されている。

(4) 一般に、果実や樹液を利用するショウジョウバエは比較的広食性であるのに対し、いくつかのキノコ食のショウジョウバエは専らキノコ食に特化し、キノコ以外の資源を利用することがほとんどない。この特性は、広食性と単食性の生物種における食性の進化を研究する上で、非常に都合がよい。さらに、他のショウジョウバエに比べ、キノコ食のショウジョウバエはその起源や系統関係について不明な点が多く、このことは、彼らの系統的位置の解明それ自体が、ショウジョウバエの食性の進化を考える上で、非常に興味深い話題を与えることを示唆する。

2. 研究の目的

(1) キノコ食ショウジョウバエの系統進化に関する基礎情報を得るため、ショウジョウバエの系統学研究で一般的に使われている遺伝子を用いて分子系統樹を新たに構築し、これをもとにキノコ食ショウジョウバエにおける食性の進化パターンを推定する。

(2) これまでの研究で蓄積されてきたショウジョウバエの遺伝情報を基に、キノコ食のショウジョウバエで特異的な変異が含まれると期待される遺伝子群を探索し、複数のキノコ食ショウジョウバエについて、これらの塩基配列を新たに決定する。

(3) 得られた塩基配列情報を他のショウジ

ョウバエ種の情報と比較することで、キノコ食ショウジョウバエに特異的な分子進化のパターンが存在するかどうか検証する。

3. 研究の方法

(1) 解析種の選定：キノコ食のショウジョウバエとして有名な分類群として、*Hirtodrosophila* 属、*Mycodrosophila* 属、および *Drosophila* 属の *quinaria* 種群および *testacea* 種群に属するショウジョウバエ種が挙げられる。そのうち、*Hirtodrosophila* 属と *Mycodrosophila* 属の多くは専ら新鮮なキノコに集まり、*quinaria* 種群のショウジョウバエは腐ったキノコに集まる傾向が認められる。本研究ではこれらのショウジョウバエ種を野外で採集し、解析対象とした。

(2) 分子系統解析：試料から全 DNA を抽出し、核遺伝子およびミトコンドリア DNA の一部領域を PCR 増幅し、塩基配列を決定した。得られた配列データに既知の塩基配列を合わせてアライメントを行ない、距離行列法および最尤法を用いて分子系統樹を構築した。そして、ブートストラップ法により系統樹の各枝の信頼性を評価した。そして、ショウジョウバエのゲノムデータを用いて推定されている既知の塩基置換速度を基に、各枝の分岐年代を推定した。

(3) キノコ食に関連した遺伝子の探索：ショウジョウバエのゲノムのデータベースから、食性の進化に関わると予想される遺伝子を探索し、これらの配列をもとに PCR プライマーをそれぞれ設計した。そして、キノコ食ショウジョウバエ各種の DNA を鋳型に PCR 増幅を行ない、増幅が認められたものについてはクローニングをして、それぞれ塩基配列を決定した。

(4) 塩基配列の分子進化的解析：キノコ食のショウジョウバエ各種から決定された塩基配列を、キノコ食以外のショウジョウバエの相同配列とアライメントし、種間および系統間における塩基置換数およびアミノ酸置換数を推定した。そして、同義置換と非同義置換の割合を評価することで、自然選択の方向性を検証した。

4. 研究成果

(1) 分子系統樹の構築

食性関連因子の分子進化的解析の基盤となる系統学的情報の収集を目的に、ショウジョウバエの系統学研究で一般的に使われている遺伝子を用いて分子系統樹を構築した。具体的には、キノコ食として知られるショウジョウバエのうち、*Drosophila* 属の *quinaria* 種群、および *testacea* 種群に加え、

Hirtodrosophila 属、および *Mycodrosophila* 属のショウジョウバエについて、28S、COII、Adh、Gpdh の塩基配列をそれぞれ新たに決定した。さらに、これまでの分子系統学研究の結果から、上記のキノコ食ショウジョウバエに近縁であると考えられている、*Drosophila* 属の *immigrans* 種群、*histrion* 種群、*bizonata* 種群、*tripunctata* 種群、および *funebri* 種群に属するいくつかのショウジョウバエについても塩基配列を新たに決定し、これに既知の塩基配列を併せて分子系統樹を構築した (図 1)。

その結果、得られた系統樹において、アウトグループとして用いた *D. virilis*、*D. annulipes*、および *Scaptomyza* 属 6 種からなるクレードを除き、4 つの主要なクレードが認識された。1 つ目は *Hirtodrosophila* 1 種と *Mycodrosophila* 2 種からなるクレード、2 つ目は、*D. quadrilineata* と *Samoaia leonensis* からなるクレード、三つ目は *D. immigrans* を含む、*Drosophila* 亜属の *immigrans* 種群 9 種からなるクレード、そして 4 つ目は *Drosophila* 亜属の *quinaria* 種群、*histrion* 種群、*funebri* 種群、*tripunctata* 種群、*bizonata* 種群、および *testacea* 種群からなる大きなクレードである。これらの結果は、これまでの分子系統学研究から得られてきた結果とも矛盾しない。

そして、これら 4 つの主なクレードのうち、*Hirtodrosophila* と *Mycodrosophila* からなるクレードが最初に根元で分岐し、その後、*quinaria* 種群や *funebri* 種群のショウジョウバエを含む大きなクレードが分岐し、*D. quadrilineata* と *S. leonensis* からなるクレードと *immigrans* 種群 9 種からなるクレードが姉妹群となるような樹形を示した。ただし、これらの関係を示す枝のブートストラップ値は何れも低いことから、これら 4 つのクレードの分岐関係を推定するにはさらなる検証が必要である。

上記クレードのうち、*quinaria* 種群や *funebri* 種群のショウジョウバエを含む大きなクレード内において、各種群はそれぞれ単系統的にまとまったが、各種群間をつなぐ内部枝の長さが非常に短かく、分岐順序が不明瞭であるという特徴が認められた。このことは、このクレードに含まれる 6 種群が、ある特定の時期に比較的短時間で分化した可能性を示唆する。

そこで、ショウジョウバエゲノムに基づく既知の塩基置換速度に用いて、系統樹における各枝の分岐年代を推定した。その結果、上記クレードの根元における分岐年代は平均して約 850 万年前と推定された (図 1: 青い矢印)。地質年代区分として、この時期は第 3 紀後半の寒冷化が始まった時期に相当する。従って、上記クレードに含まれる種群は、寒

冷化に伴う環境変動が何らかの引き金となって急速に分化した可能性が示唆される。

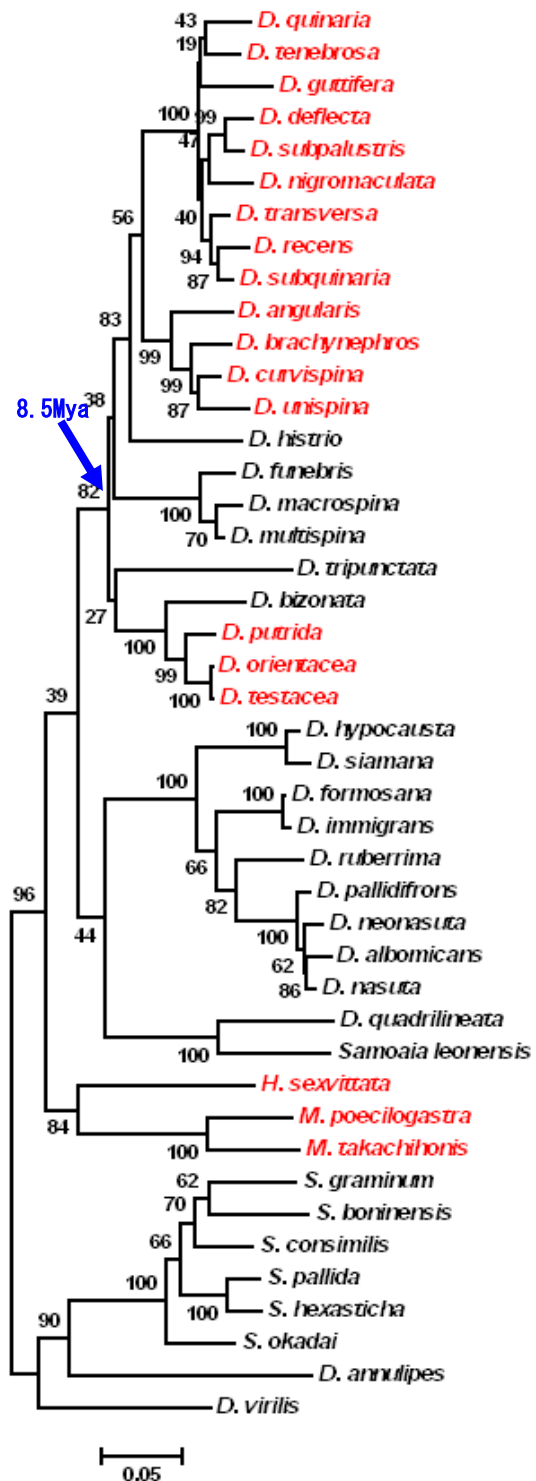


図 1. 28S、COII、Adh、および Gpdh の塩基配列に基づくショウジョウバエ 44 種の分子系統樹 (*D.* : *Drosophila*, *H.* : *Hirtodrosophila*, *M.* : *Mycodrosophila*, *S.* : *Scaptomyza*)。キノコ食の種を赤字で示す。系統樹の枝上にある値は、1000 回のブートストラップテストに基づく各枝の出現頻度 (%) を示す。

(2) キノコ食形質の進化

本研究では、キノコ食のショウジョウバエとして、*Hirtodrosophila* 属、*Mycodrosophila* 属、*Drosophila* 属の *quinaria* 種群、および *Drosophila* 属の *testacea* 種群に属するショウジョウバエ種をそれぞれ解析に用いた(図1)。これらのうち、*Hirtodrosophila* 属、および *Mycodrosophila* 属のショウジョウバエは単系統となったが、*Drosophila* 属の *quinaria* 種群および *testacea* 種群の両者は最も近縁な姉妹群にならず、前者は *D. histrio* に、後者は *D. bizonata* に最も近縁であるという関係が、高いブーストラップ値で示された。従って、得られた系統樹の樹形から、キノコ食の形質は単系統ではなく、ショウジョウバエ科の系統進化の過程で、少なくとも3回独立して生じた可能性が示唆される(図2)。

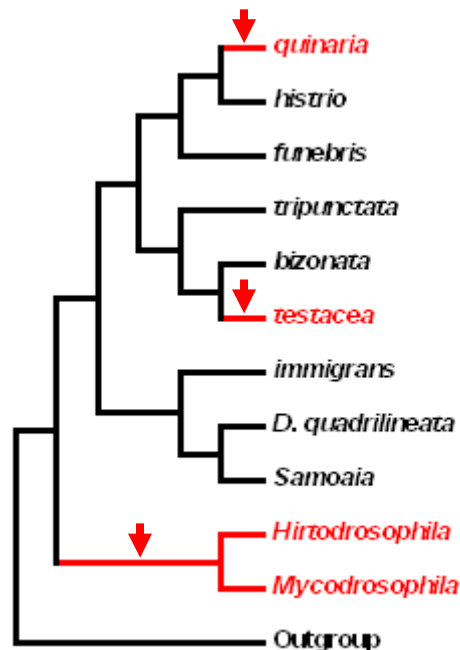


図2. 本研究で得られた系統樹(図1)をもとに、キノコ食形質の進化過程を最節約的に復元した模式図。赤の矢印で示すそれぞれの枝において、キノコ食の形質が独立に生じたことを示唆する。

(3) キノコ食関連遺伝子の探索

キノコ食ショウジョウバエに特異的な遺伝的変異を検出することを目的に、ショウジョウバエ12ゲノムのデータベースから、食性に関わると予想される遺伝子を検索し、得られた配列をもとにPCRプライマーをそれぞれ設計した。そして、キノコ食ショウジョウバエ数種のDNAを鋳型にPCRを行なったところ、AmyおよびOr83b遺伝子においてDNA増幅が確認された。そこで、これらの遺伝子について塩基配列を決定し、キノコ食とそうで

ない系統との間で複数の塩基置換モデルを用いて塩基置換数を推定し、同義置換と非同義置換の割合を比較した。しかし、これらの遺伝子において、キノコ食ショウジョウバエで特異的に認められるようなコーディング領域の遺伝的変異は検出されなかった。従って、この問題については今後もさらなる遺伝子の探索が必要である。

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 Gao JJ, Hu YG, Toda MJ, Katoh T, Tamura K (2011) Phylogenetic relationships between *Sophophora* and *Lordiphosa*, with proposition of a hypothesis on the vicariant divergences of tropical lineages between the Old and New Worlds in the family Drosophilidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 60: 98-107. 査読有.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2011.04.012>
- ② 加藤 徹 (2011) ショウジョウバエ分子系統学研究の最前線. *低温科学* 69:1-9. 査読有.
<http://hdl.handle.net/2115/45183>

[学会発表] (計3件)

- ① 福田洋之, 加藤 徹 (2011) *immigrans*-*tripunctata* 系統に含まれるショウジョウバエの系統関係. 日本昆虫学会第71回大会. 2011年9月19日. 信州大学(松本).
- ② 戸田正憲, 屋富祖昌子, 加藤 徹 (2011) 同じ寄生植物(クワズイモ)の花を利用するタロイモショウジョウバエ2種系統と3種系統における行動・繁殖生態の比較. 日本昆虫学会第71回大会. 2011年9月18日. 信州大学(松本).
- ③ 加藤 徹 (2010) ショウジョウバエ分子系統学の歴史. 北海道大学低温科学研究所共同研究集会(遺伝学会札幌談話会協賛). 2010年9月23日. 北海道大学(札幌).

④ [図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]
ホームページ等
<http://www.sci.hokudai.ac.jp/~tkatoh/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 徹 (KATOH TORU)
北海道大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号：80374198