

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291088

研究課題名(和文)短翅性バッタに見られる染色体変異の進化的起源と分布拡大過程の解明

研究課題名(英文)Studies on the evolutionary origin chromosomal differentiation and expansion process in a brachypterous grasshopper

研究代表者

立田 晴記(TATSUTA, Haruki)

琉球大学・農学部・教授

研究者番号：50370268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：染色体間で転座が生じ、性決定システムに違いが生じている短翅性のサッポロフキバッタを材料に、地域集団間に見られる遺伝的な違いの程度を定量化するプライマーを開発すると共に、一塩基多型情報を効率良く抽出する解析を実施した。また本種で不明であったゲノムサイズの定量化、また本種で初めて共生微生物の感染が認められたことから、変異体の種類と系統関係についても予備解析し、論文にまとめた。また交配実験から、集団間に見られる繁殖行動の違いを観察、定量化した。

研究成果の概要(英文)：To explore spatial genetic structures using molecular markers in a brachypterous grasshopper *Podisma sapporensis* in which a new sex determination system has been established by the process of translocation between an autosome and X chromosome, we have designed primers that amplify the flanking regions of tandem repeats using the next generation sequencer. We also estimated approximate genome size in this species. Furthermore, we found the infection of endosymbiont in *P. sapporensis*. Copulatory behavior and copulation duration were also recorded and compared between different chromosomal races.

研究分野：進化生物学

キーワード：種分化 バッタ

1. 研究開始当初の背景

では、オスが X 染色体を 1 本だけ持つ集団 (X0 集団: 北海道南西部, 北部) と, X 染色体が常染色体に転座を起こして生じた XY の性染色体を持つ集団 (XY 集団: 北海道東部) が存在する。また動原体を含んだ逆位 (inversion) を持つ個体が X0, XY 集団にそれぞれ存在しており (逆位型: 右下図), それぞれ地理的にまとまっている。XY 集団は X0 集団と比べると限局的であることから, 地理的分断によって隔離された X0 集団の一部が転座を引き起こし, 北海道東部で分布拡大したと考えられてきた。しかしミトコンドリア DNA 多型による解析では, XY 型は単系統群を形成せず, その一部は X0 集団とクラスターを形成した。ここから XY 型が少なくとも 2 回にわたって X0 型から派生した可能性のほか, 一部地域で X0 型と XY 型が 2 次的に接触し, 遺伝子の一部が集団中に浸透した可能性が考えられた。

2. 研究の目的

これまで実施された核型変異の発生・分布拡大に関する推定は母系遺伝するミトコンドリア DNA に基づくものであったため, 遺伝子浸透の実態を検証するには, 染色体と密に連鎖する核遺伝子の情報取得が必須である。また染色体変異が生じた集団が親集団に置き換わって分布を拡大するためには, 生殖隔離機構や, 親集団に対する競争力の高さを獲得する必要があると考えられる。そこで近年活用機会が増している次世代シーケンサーを用いた分子遺伝学的アプローチと, 興味深い知見が蓄積されつつある行動生態学的アプローチを組み合わせ, これまで提示された核型変異の発生から分布拡大に至る諸仮説をテストする。

3. 研究の方法

(1) 分子遺伝学的アプローチ

ミトコンドリア遺伝子に加え, 集団レベルの遺伝構造解析で用いられるマイクロサテライト, 特徴的な変異を示すリボソーム DNA (rDNA), 核内ミトコンドリア様配列 (Numts) という 3 つの核遺伝子に着目し, 系統解析と集団遺伝学的解析を合わせて実施することで, 染色体の転座や逆位を持つ集団の発生から拡大に至る進化的経緯を明らかにする。蛍光標識した繰り返しモチーフを使って候補配列の濃縮をおこなったのち, 塩基配列を解読する方法を活用し, マイクロサテライト遺伝子のような, 同じモチーフの反復配列を効率的に検出する。異なる核型集団が接触する地域に着目し, SSR の遺伝子型頻度のデータを用いることで, 分布境界における遺伝子浸透の規模や個体の移動距離, 選択圧を推定する。また近年急速な発展を遂げている地理情報 (GIS) データと遺伝子型情報を組み合わせた景観遺伝解析もおこない, 生息環境と集団が持つ遺伝構造の関連性も探る。ま

た巨大化しているといわれているバツタの遺伝子であるが, これまでに本種で解析された事例がない。そこでフローサイトメーターを用いて, 本種の遺伝子サイズを推定した。これらに加え, 本種で新たに発見された共生微生物 *Wolbachia* に関する予備的研究も追加して実施した。

(2) 行動生態学的アプローチ

一連の交配実験から, 本種の集団間にはオスの交尾能力とメスの交尾拒否力に大きな差異が存在し, これは集団内の個体密度に起因する淘汰圧の違いから生じた可能性が示された。交尾能力の高い集団のオスは拒否力の弱い集団のメスと交配しやすいことから, 繁殖能力の違いは一方向性の遺伝子浸透を生み出す。その後の実験から, 一部集団のメスには, 生殖器外部にオスの精包を付着させて受精コントロールする能力が備わっていることも明らかとなり, 他集団のオスの精子は受精に使われない頻度が高かった。核型の相違と繁殖能力とが連関する場合, こうした遺伝子浸透や生殖隔離機構の存在は, 集団中で新たに生じた核型の固定と増加を促進する原動力となるだろう。本研究では繁殖を巡る相互干渉が生じている可能性が高い, 異なる核型が隣接する地域の集団を用いて, 生殖隔離機構の強度, メスの繁殖コストの有無, 集団間に見られる交尾能力・拒否力の相違を定量化し, 比較する。

4. 研究成果

(1) マイクロサテライト DNA 増幅プライマーの設計・遺伝構造分析

磁気ビーズをもちいた濃縮法をもちいて GS Junior (Roche) でシーケンス解析を実施し, そこからマイクロサテライト配列を挟む領域にプライマーが設計可能なものだけを抽出した。抽出された配列に基づきプライマーを合成し, PCR で断片を増幅後, ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) 法によりバンドパターンを比較した。その結果, サッポロフキバツタでは 11 組の遺伝子座をうまく判読できた。現在判読できた対立遺伝子の情報を野生個体群から抽出しており, 集団遺伝学的解析, 景観遺伝学的解析を実施したのち, 集団間の系統関係, 異なる核型集団が隣接する地域での空間遺伝構造を推定していく。

また同じ集団を対象に, 次世代シーケンサーを用いた新たな集団解析法についても検討を進めた。これは DNA を制限酵素で断片化したのち, 両端にアダプターを接続し, それぞれ 100bp ずつ読むことで一塩基多型 (SNP) 情報を抽出するという方法である。マイクロサテライト解析と異なり, 一度に多くの多型情報を取得できるため, サッポロフキバツタのような参照ゲノム情報が無い生物には向いていると考えられる。現在従来のプロトコルを改良した簡便法による解読を進めており, SNP データを取得後, マイクロサテライ

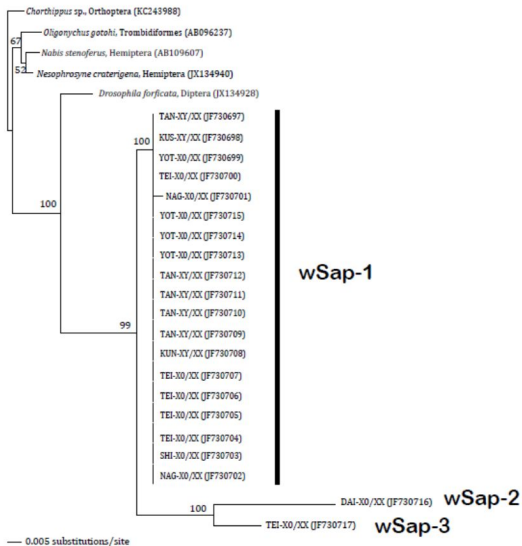
ト解析同様、集団遺伝学的解析を実施することで系統情報、空間遺伝構造を推定する予定である。

(2) DNA 含有量の推定

フローサイトメータを使ってサッポロフキバツタのゲノムサイズを推定したところ、通常オス(2n=23)では平均 10.5Gbp、転座が認められる集団のオス(2n=29+neoXY)では平均 10.2Gbp となり、若干ではあるが通常オスのゲノムサイズが大きかった。またメスでは転座の有無にかかわらず、11.1Gbp であった。雌雄の差が 0.6~0.9Gbp 見られるので、これが X 染色体の大凡の大きさと考えられる。フォイルゲン染色法による推定からは、近縁種の *P. pedestris* で 18.2Gbp あるとされており、本種でのゲノムサイズは近縁種よりも大凡 7Gbp 程度小さかった。

(3) 新たな共生微生物の発見

Wolbachia は昆虫の性を繰る共生微生物として知られ、しばしば生殖隔離の要因となる。サッポロフキバツタでも本共生微生物が感染しているか調べたところ、*Wolbachia* で特異的に見られる遺伝配列に少なくとも 3 タイプの変異体がバツタ集団に存在していることが判明した(図 1)。

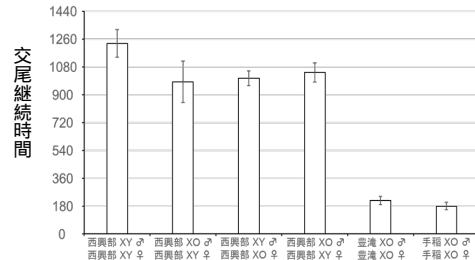


(図 1) サッポロフキバツタ集団で見つかった *Wolbachia* の系統樹。

特に隔離集団として知られる大千軒岳で固有の変異体が見つまっていることから、共生微生物が染色体変異の固定を促進させた可能性も考えられる。引き続き実施する集団解析においては、感染する *Wolbachia* の変異体タイプも考慮しなければならない。

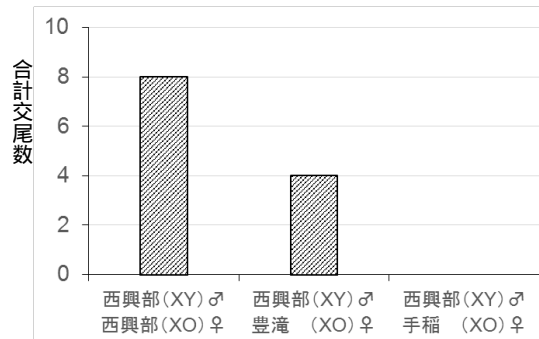
(4) 行動解析

交尾前のオスメス間の闘争は、集団内集団内交配、レース間交配共に、ほとんど観察されなかった。ほぼ全てのペアで 95 分~178 分で交尾成立が成立し、レース間に交配前隔離は存在しなかった。しかしながら、交尾継続時間は札幌近郊の地域集団と大きく異なった。これまでに明らかになっている札幌周辺の X0 レースの豊滝集団、手稲集団の交尾継続時間より、約 5.5 倍以上も長かった(図 2)。



(図 2) コンタクトゾーンに分布する地域集団間の交尾継続時間

XY レースの西興部集団の 6 頭のオスは、コンタクトゾーンで接する X0 レースの西興部集団のメスとは 1 日辺り約 2 頭の割合で交尾したが、札幌近郊の X0 レースの豊滝集団のメスとは 1 日辺り 1 頭の割合でしか交尾せず、手稲集団のメスとは 1 度の交尾も観察されなかった(図 3)。西興部集団(XY)のオスは、手稲集団のメスの交尾抵抗に対し対応できない行動が観察された。



(図 3) コンタクトゾーン周辺の染色体レース間、および距離が離れた染色体レース間での合計交尾数

サッポロフキバツタのほとんどの地域集団では、交尾前にオスメス間に激しい闘争が生じる。しかしながら、コンタクトゾーンに接するに西興部集団では、レース内交配でも、レース間交配でも、オスとメスはあまり争うことなく交尾に至った。しかし、これまでに交尾活性が極めて強い事が明らかになっている手稲集団のメスと、6 頭のオスが 6 時間 x 4 日間で一度も交尾出来なかった事から、コンタクトゾーンに接する西興部集団のオスが、メスをなだめる特別な求愛行動等を進化させている訳ではない事がわかる。コンタクトゾーンに接する両レース集団は交尾活性、特にメスの交尾抵抗力が大変弱いと考え

られる。一方で、レース内交配とレース間交配の両方で札幌近郊の集団より約5.5倍も長い交尾時間は、過去に両レースが接触し、適応度の低いレース間ハイブリッドを生じた過去を反映している可能性がある。非常に長い交尾時間は、自集団のオスの精子を使う為の、メス体内での厳密な精子選択を示しているのかも知れない。レースが異なる集団間で分布が重なった時、交尾に至る前にオスメス間で激しい争いをし、自集団のオスとの交尾の可能性を減らすより、交尾を受入れた後に何らかの方法で自集団のオスを識別し、自集団のオスの精子を利用するメカニズムを進化させたのかもしれない。

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 3 件)

Bugrov, A. G., Ilinsky, Y. Y., Strunov, A. A., Zhukova, M. V., Kiseleva, E. V., Akimoto, S., Tatsuta, H., First evidence of *Wolbachia* infection in populations of the grasshopper *Podisma sapporensis* Shiraki (Orthoptera, Acrididae), *Entomological Science*, 19, 2016, 296-300 査読有
DOI:10.1111/ens.12187

Ohba, S., Tatsuta, H., Young giant water nymphs prefer larger prey: Changes in foraging behavior with nymphal growth in *Kirkaldyia deyrolli*, *Biological Journal of the Linnean Society*, 117, 2016, 601-606 査読有
DOI: 10.1111/bij.12693

Shimizu, D., Sugano, Y. C., Tsuchiya-Suzuki, K., Ito, G., Akimoto, S., Dimorphism of right-left asymmetry in the female genitalia of the brachypterous grasshopper *Parapodisma mikado* (Orthoptera: Acrididae): Asymmetric female genitalia, *Entomological Science*, 19, 2016, 452-457 査読有
DOI: 10.1111/ens.12211

[学会発表](計 2 件)

Grzywacz, B., Tatsuta, H., Preliminary phylogeny of the tribe Podismini (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae) in Japan based on mitochondrial cytochrome c oxidase I gene sequences, 12th International Congress of Orthopterology (国際学会: ブラジル・イリエウス) 2016年11月1日

Bugrov, A., Ilinsky, Y., Akimoto, S., Tatsuta, H., First evidence of *Wolbachia* infection in populations of grasshopper *Podisma sapporensis* (Orthoptera: Acrididae), 12th International Congress of Orthopterology (国際学会: ブラジル・イリエウス) 2017年11月3日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 振動を用いた害虫の行動制御により植物を保護する方法

発明者: 高梨琢磨, 小池卓二, 松井康浩, 上地奈美, 立田晴記ら(他6名)

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許願 2016-244162

出願年月日: 平成 28 年 12 月 16 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/harukitatsuta>

6. 研究組織

(1)研究代表者

立田 晴記 (TATSUTA, Haruki)

琉球大学・農学部・教授

研究者番号: 50370268

(2)研究分担者

菅野 良一 (SUGANO, Yoshikazu)

北海道大学・農学部・専門研究員

研究者番号: 00648826

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

秋元 信一 (AKIMOTO, Shin-ichi): 北海道大学

BUGROV, Alexander: ロシア科学アカデミーシベリア支部

WARCZALOWSKA-SLIWA, Elzbieta: ポーランド科学アカデミー

GRZYWACZ, Beata: 日本学術振興会外国人特別研究員

