

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2016

課題番号：26304016

研究課題名(和文) マメゾウムシ類の適応的多様化：種子毒耐性と乾燥種子利用によるジェネラリストの進化

研究課題名(英文) Adaptation of the bruchine seed beetles to chemical substances of the leguminosae: genetic diversity in detoxication and dry seed utilization

## 研究代表者

嶋田 正和 (SHIMADA, Masakazu)

東京大学・総合文化研究科・教授

研究者番号：40178950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：嶋田・加藤・伊藤はメキシコ産マメゾウムシ類を系統解析し、ジャケツイバラ亜科利用とネムノキ亜科利用が系統樹基部に来て、マメ亜科利用が派生するパターンを平行進化的に見出した。毒物質カナバニン耐性のマメゾウムシ類は近縁群に固まった。藤井はイラン、中国雲南省、ロシア・コーカサス地方などでマメ科の毒物質を調査した。津田と徳永は、西部アフリカ原産であるヨツモンマメゾウムシで、系統分化の由来を分子分散分析AMOVAにより調べた。遺伝的分化は、地理的隔離を伴う異所的分化、異なる寄主植物を利用する同所的分化、さらに貯穀害虫では貿易に伴う人為的長距離移動も分化要因となる。これらの相対的重要性を地域ごとに解析した。

研究成果の概要(英文)：M. Shimada, T. Kato and M. Ito conducted molecular phylogenetic analyses of Mexican bruchine seed beetles. The pattern of tree showed that beetles infesting Caesalpinioidea and Mimosoidea were located on the base and beetles infesting Papilioidea were at descendent positions. Seed beetles that are tolerant and utilize seeds with a poisonous substance canavanine are located in clumped clades. Y. Fujii investigated poisonous substances and effects in many legume plants extensively in Iran, Yunnan Province in China, Caucasus in Russia, and so on. M. Tuda and Y. Toquenaga carried out AMOVA to determine origin and processes of clade diversity of *Callosobruchus maculatus*, whose place of origin is the western Africa. Factors of genetic diversification are due to allopatric, sympatric and anthropogenic migration through trades. They analyzed statistically relative importance of the three factors of *C. maculatus* in each continent.

研究分野：生物学

キーワード：マメ毒物質 マメゾウムシ類 適応的分化 分子系統解析 遺伝的分化 乾燥豆利用 多化性

### 1. 研究開始当初の背景

植食性昆虫の多様性の高さについて、Ehrlich & Raven (1964)は「軍拡競争的共進化スペシャリスト化モデル」を提唱した。この過程では植物の新規の毒物質に対する解毒能力の獲得を鍵として、新規植物を利用できるようになった昆虫が新しい適応帯に入ることによって多様化する適応的多様化(adaptive diversification)が起こることが期待される。マメ科植物の毒物質は遊離アミノ酸・アルカロイドなど多岐にわたる(Doyle 1981)。個々のマメゾウムシ種は広汎な毒物質に対抗する解毒機構を持っていないので、よく似た毒物質をもつ近縁なマメ種群に特化し、軍拡競争によるスペシャリスト化と適応的多様化が進行すると言われてきた(Janzen 1969)。

### 2. 研究の目的

寄主種子の毒物質の解毒機構を持つことは、その種子を寄主範囲に含める必要条件であり、乾燥種子利用は多化性をもたらすので、マメ種利用を高める十分条件といえる。

この2条件を基準として、マメゾウムシ亜科の生活史の生態情報(乾燥種子の利用、寄主植物のフェノロジー)、分子系統樹、毒物質の情報を統合して解析し、マメゾウムシ亜科の寄主植物利用を介した多様化がどのように起こったかを総合的に解明する。そのため、以下の観点から研究を進める。

- (1) 海外調査にてマメ科植物とマメゾウムシ亜科の採集、寄主植物および昆虫の生態的特性の観察
- (2) マメ科種子毒物質の同定
- (3) マメゾウムシ亜科の分子系統樹上に利用植物とその種子毒の情報を配置(図1はその一部)
- (4) 毒物質の潜在的解毒能力を把握するため摂食実験と人為選抜実験
- (5) 広域分布するマメゾウムシを対象に地域毎の個体群の性質やサヤ利用法(産卵習性など)の違いを野外観察と飼育実験によって把握し、種分化が起こる過程を解明する。

### 3. 研究の方法

- (1) 寄主植物とマメゾウムシ類の食う-食われるの分子系統解析およびベイズ推定による祖先形質復元法を実施する(嶋田・加藤・伊藤)。また、嶋田・大林・中野は野生種でありながら系統の離れた多様なマメ科種子を摂食し発育できるサイカチマメゾウムシを対象に、次世代シーケンサーを利用してマイクロサテライトマーカーのプライマー作成を試みた。1個体の全RNAを抽出し、これを北京のBGIに外注した。
- (2) 世界各地で集めたマメ科サンプルから、マメ科植物毒物質を化学分析する(藤井)
- (3) 世界各地46個体群のヨツモンマメゾウムシを対象とした分子分散分析(AMOVA)による統計解析(津田・徳永)。これにより異所

的・同所的遺伝的分化と人為的長距離遺伝的流動の影響を、貯蔵マメ害虫ヨツモンマメゾウムシにおいて検証する。

### 4. 研究成果

嶋田・加藤・伊藤は新大陸のマメゾウムシ類の中で最も多様性が高い *Acanthoscelides* (ミツバマメゾウムシ) 属について分子系統解析を実施し、それに基づく寄主利用の祖先形質復元を試みた。その結果、従来単一の属とされてきたミツバマメゾウムシ属は、(1) 大きく4つの異なるグループから成る多系統群であること、(2) 各グループはそれぞれマメ科の同じ亜科、あるいはマメ科以外でも類似した植物を利用する傾向があること、(3) 各グループが類似した植物を利用する近縁属と単系統群を形成することが明らかとなった(図1)。これらの結果はミツバマメゾウムシ属を含むアメリカ大陸産のマメゾウムシにおいて寄主植物利用が保存されたまま多様化が進行した可能性を示唆している。その一方、マメ科植物の持つ代表的な毒性物質である L-カナバニンを含むマメ科植物を利用する系統はミツバマメゾウムシ属とその近縁属の中で独立に2回進化している可能性が示された。マメゾウムシにおける L-カナバニンの解毒機構については、ミツバマメゾウムシ属の近縁属である *Caryedes* 属において研究が進められてきたが(Rosenthal et al. 1977 他)、異なる系統で複数回解毒機構が進化している可能性が示されたことで、既知の L-カナバニン解毒メカニズムと異なる新規メカニズムの発見や、植食性昆虫における寄主植物利用、多様化に対して分子的な収斂進化が果たす役割について明らかにできる可能性が示された。

嶋田・大林・中野の結果は、次世代シーケンサーの膨大な情報からマイクロサテライト領域のプライマーを96ペア検出し、そこから多型になっている領域を19選んだ。これを用いて、各地域個体群の遺伝的構造を知るための  $F_{ST}$  分析と配偶行動に関する父性解析を進めた。

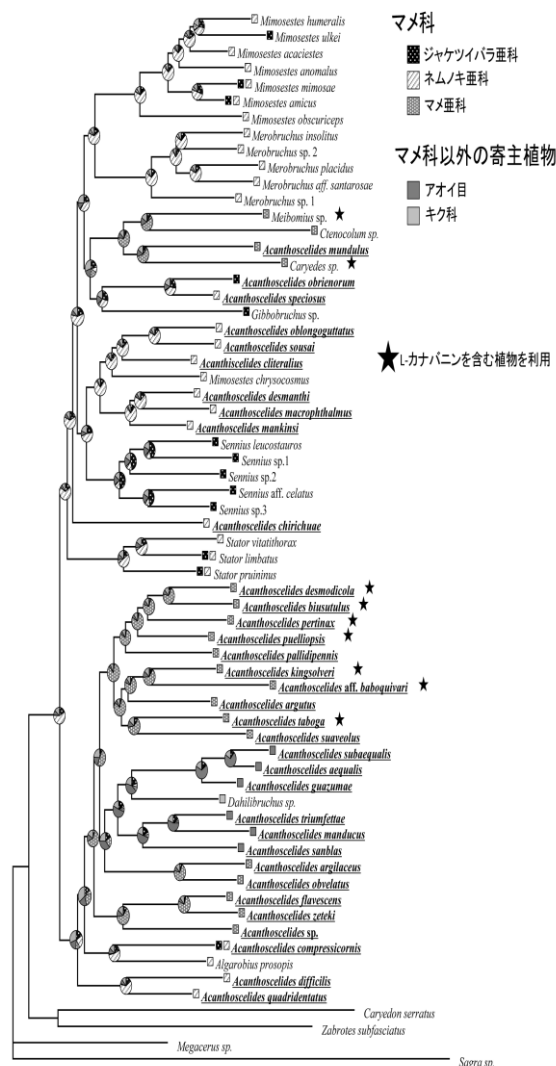
藤井の結果は、ソラマメ属植物、アカシア属植物およびナタマメ属植物に含まれる L-カナバニンに強い植物生育阻害活性を見出した。L-カナバニンの作用についてはトランスクリプトーム解析やプロトプラスト共培養-画像解析法を用いた細胞への影響を調べた。カナバニンの作用は、プロトプラスト法でより強い活性が認められた。異種アミノ酸である、L-アガリチン、L-シスタチオニンにも強い植物生育阻害活性を見出した。また、ケニアで行った探索でマメ科の樹木 *Castanospermum australe* に強い活性を認め、作用成分を分析し全活性法で評価した結果、活性本体はアルカロイドのカスタノスペルミン(castanospermine)であり、1.8ppmの低濃度で生育を阻害する強い阻害活性があった。カスタノスペルミンはこの植物の種子

に乾物あたり約1%含まれていた。

津田・徳永班の結果は、ミトコンドリア遺伝子については大陸間では弱い遺伝的分散しかなかった。世界レベルおよびアフリカ内では地域間で大きな遺伝的分散があったがアジア内ではなかった。これはアジアへの複数回導入とアジア内での遺伝的混合がこのようなパターンになったと考える。世界レベルとアジア内では利用寄主植物間で有意な遺伝的分散があったがアフリカ内ではなかった。距離による隔離仮説は世界レベルや大陸レベルで支持されたが、利用寄主をササゲに絞ると支持されなかった。

核遺伝子については、世界レベルおよびアフリカおよびササゲ利用集団において、最近の過去の人口学的増加が示唆された。総合すると、遺伝的分化はアフリカでは主に地理的隔離によるが、アジアでは異なるアリの侵入後、アジアのマメ作物への寄主シフトによると考えられる。大陸間やアジア地域間の遺伝的分化が小さいのは、作物の貿易・交易が頻繁なためと推察される。

下図 新大陸マメゾウムシ類の分子系統樹と祖先形質



## 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 24 件)

- ① Kebe K., Alvarez N., Tuda M., Arnqvist G., Fox CW., Sembene M., Espindola A. (2017) Global phylogeography of the insect pest *Callosobruchus maculatus* L (Coleoptera: Bruchinae) relates to the history of its main host, *Vigna unguiculata* L., *Journal of Biogeography*, 印刷中, 査読有
- ② Yuan K., Miwa H., Iizuka M., Yokoyama T., Fujii Y. Okazaki S. (2016) Genetic diversity and symbiotic phenotype of hairy vetch rhizobia in Japan, *Microbes and Environment*, 31: 121-126, 査読有  
DOI: 10.1264/jsme2.ME15184
- ③ Downey MH., Searle R., Bellur S., Geiger A., Maitner BS., Ohm JR., Tuda M., Miller TEX (2015) A comparative approach to testing hypotheses for the evolution of sex-biased dispersal in bean beetles, *Ecology and Evolution*, 5: 4819-4828, 査読有  
DOI: 10.1002/ece3.1753.
- ④ Inoue A., Mori D., Minagawa R., Fujii Y. and Sasamoto H. (2015) Allelopathy in a Leguminous Mangrove Plant, *Derris indica*: Protoplast Co-culture Bioassay and Rotenone Effect, *Natural Product Communications*, 10: 747-750, 査読有
- ⑤ Maninang J. S., Okazaki S. and Fujii Y. (2015) Cyanamide phytotoxicity in soybean (*Glycine max*) seedlings involves aldehyde dehydrogenase inhibition and oxidative stress, *Natural Product Communications*, 10: 743-746, 査読有
- ⑥ Okazaki S., Yuan K., Iizuka M., Yasuda M., Oikawa Y., Bellingrath-Kimura S.D. and Fujii Y. (2015) Microbiological and soil analysis of the growth-promotion effect of hairy vetch on velvet bean, *Advances in Applied Agricultural Sciences*, 3: 1-10, 査読有
- ⑦ Tuda M., Kagoshima K., Toquenaga Y., Arnqvist G. (2014) Global genetic differentiation in a cosmopolitan pest of stored beans: effects of geography, host-plant usage and anthropogenic factors. *PLoS ONE*, 9: e106268, 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0106268.

[学会発表] (計 36 件)

- ① Tuda M., Aung T.L., Lwin T.H., Kagoshima K., Mori K., Tashiro K. Effect of atmospheric CO<sub>2</sub> rise on population size, development and gene expression is different between populations of a seed beetle, XXV International Congress of Entomology, 2016年9月25日～30日, オランダ(アメリカ合衆国)
- ② Fujii Y. Evaluation of Allelopathic Activity of 3,000 Plant Species in the Pacific Region by Specific Bioassay and Identification of Allelochemicals in Action, The 23rd Pacific Science Congress, 2016年6月14日, 台北市(台湾)
- ③ Numajiri Y. and Toquenaga Y. Does Wolbachia alter egg-laying behavior of host species? 第63回日本生態学会, 2016年3月22日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)
- ④ Tuda M., Tani S., Iwase S., Saeki Y., Mori K., Tashiro K. Host-plant and genetic effects on herbivore's fitness and gene expression, 第31回個体群生態学会, 2015年10月11日, 滋賀県立大学(滋賀県彦根市)
- ⑤ Tuda M. Host-plant change and its mechanism in invasive pest beetles, Symposium on invasive insects: current trends and future directions in research, 2015年2月8日, 九州大学(福岡県福岡市)

[その他]

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/shimada-lab/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

嶋田 正和 (SHIMADA, Masakazu)  
東京大学・大学院総合文化研究科・教授  
研究者番号：40178950

### (2) 研究分担者

藤井 義晴 (FUJII, Yoshiharu)  
東京農工大学・農学研究科・教授  
研究者番号：10354101

徳永 幸彦 (TOQUENAGA, Yukihiko)  
筑波大学・生命環境科学研究科・准教授  
研究者番号：90237074

津田 みどり (TSUDA, Midori)  
九州大学・農学研究科・准教授  
研究者番号：20294910

中野 伸一 (NAKANO, Shin-ichi)

京都大学・生態学研究センター・教授  
研究者番号：50270723

### (3) 連携研究者

大林 夏湖 (OHBAYASHI, Kako)  
京都大学・生態学研究センター・研究員  
研究者番号：20448202

加藤 俊英 (KATO, Toshihide)  
東京大学・大学院総合文化研究科・特任研究員  
研究者番号：90727950