

## 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：10102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440203

研究課題名(和文)クロショウジョウバエ区の系統進化に関する包括的研究

研究課題名(英文)An inclusive study on the phylogenetic evolution of the *Drosophila virilis* section (Diptera: Drosophilidae)

研究代表者

渡部 英昭 (WATABE, Hideaki)

北海道教育大学・大学院教育学研究科・教授

研究者番号：10167190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：クロショウジョウバエ類は北半球に広域分布しているが、日本列島にはほとんどすべての種群が棲息しており、生物多様性が極めて高い。日本列島は北米大陸で適応放散した分類群の移住回廊であったと考えられる。本分類群のうち熱帯性の種の北限は奄美大島で、動物地理学上の東洋区と旧北区の境界である渡瀬線と一致する。オオクロショウジョウバエ種群の1種の北限は津軽海峡に横たわるブラキストン線である。

飼育が困難であった熱帯性種群の核型を明らかにした。分子系統的に祖先型に近いとされている分類群は何れも端部付着型のX染色体を有していた。

研究成果の概要(英文)：The *Drosophila virilis* section is widely distributed in the Northern Hemisphere, and the author has made extensive field studies in continuous greenbelts from Southeast Asia to East Siberia, throughout the Japanese Islands. Japan possesses all species groups of the *virilis* section, and keeps a high biodiversity of this taxonomic group. Japan was the migration route for the species, which had diversified in North America. The northern-most border of tropical members lies in the Watase Line of the zoogeography between Amami and Yakushima, and that of a warm temperate member of the *robusta* group does in the Blackiston Line in the Tsugaru Strait. Karyotypes of tropic *D. angor* and *D. fluvialis* were examined, and both species had the acrocentric X chromosome. This result supports their phylogenetic positions inferred from the molecular data.

研究分野：生物学

キーワード：ショウジョウバエ 系統進化 適応放散 地理的分布 東アジア 南西中国 染色体核型

## 1. 研究開始当初の背景

北半球に広域分布しているクロショウジョウバエ区 (the *Drosophila virilis* section) はショウジョウバエ属を構成する巨大な分類群である。Sturtevant (1942) によるカラスショウジョウバエ種群の設立以来、欧米の研究者によってその進化系統が詳細に調べられたきた (Levitin, 1982)。これまでの研究成果は進化遺伝学のテキストや生物学辞典にも取り上げられている。しかし、北アメリカ大陸と欧州に分布している種はどれもいわば系統樹の末端に位置している進化的派生種とみなされるもので、系統樹の完成には何よりも基部に位置する祖先種の発見が求められていた。また、系統樹には多くの仮想種が想定されていた。

筆者は外国の研究機関との共同研究で東南アジアから東シベリアに至る東アジア・グリーンベルト帯で、クロショウジョウバエ区の調査を行ってきた。1980年代から中国大陸ほぼ全域、1990年代から沿海州と東シベリア、および2000年代からインドネシアを主とした東南アジアで野外調査を行い、得られた種について外部形態と生殖器構造の比較検討、染色体核型の分析、核およびミトコンドリアDNAの塩基配列の比較、近縁種間と地理的系統間で生殖的隔離機構の研究を行ってきた。

残された課題は、日本列島から台湾に至る東アジア弧状列島におけるクロショウジョウバエ区の各分類群の分布域を正確に把握すること、既存のどの種群にも属さない疑問種の系統的位置を明らかにすること、外国の研究機関に保管されている未同定の標本を調べること、これらを総括して東アジア・グリーンベルト沿いで展開されたクロショウジョウバエ区の適応放散のプロセスを考察することであった。また、核型分析は種の類縁関係を考察するうえでしばしば有効な情報を提供してきたが、飼育が困難な種も多い。これらの種に適合する新たな飼育方法を考案し、染色体構成を明らかにすることも求められていた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、東アジアのクロショウジョウバエ区の地理分布を調べること、各分類群の系統関係を形態形質、核型分析、分子配列等から考察すること、以上の結果から北半球全域に分布しているクロショウジョウバエ区の適応放散の道筋を明らかにすることである。そのために、以下の具体的な研究目標を設定した。

### (1) 野外調査と種同定

これまでデータが不足していた北海道南部から本州東北地方にかけての冷温帯域、先島諸島の亜熱帯域でクロショウジョウバエ区の棲息調査を行った。また雲南大学、中国科学院昆明動物研究所、インドネシア科学院に保管されている多数の未同定標本を網羅

的に調べた。

### (2) 核型進化

クロショウジョウバエ類の多くは比較的冷涼な気候を好む。低緯度・高地で捕獲された種を生きた状態で実験室に持ち帰り、系統を確立することには困難が伴っていた。低緯度低地に棲息している種でも、通常の培地には産卵しないものも数多い。飼育を工夫し、分子系統樹の基部に位置する *angor* 種群と単独種 *Drosophila fluvialis* Toda & Peng の染色体構成を明らかにした。

### (3) 形質分析と分子分析

クロショウジョウバエ区には既存のどの種群にも所属しない数種が知られている。北日本に棲息し別属の the genus *Zaprionus* にまとめられている種と *D. calidata* Takada et al., 中国大陸内部で発見されている3種の合計5種について、形態形質の分析および核とミトコンドリアDNAの塩基配列を比較し、系統的位置を決定した。

### (4) そ嚢内容物の分析

いくつかの種群または種について、実験室系統が確立されていない。繁殖場所も不明である。そこで野外で捕獲した成虫のそ嚢内容物を培養し、得られたマイクロオルガニズムから食物資源を推定した。

### (5) 地理的分布

冷温帯・針広混交林が優占する北日本から亜熱帯・常緑樹の先島諸島に至る日本弧状列島の各気候帯・植生域におけるクロショウジョウバエ類の分布データをまとめた。中国大陸、東南アジア、欧州、および北米におけるクロショウジョウバエ区の分布と多様性を比較し、適応進化のプロセスを考察した。

## 3. 研究方法

(1) 野外生態調査：成虫の採集は発酵果実による誘引と昆虫網による捕獲により行っ



た。クロショウジョウバエ類は溪流沿いに棲息しており (図 A~C)、水面や水際から 50cm 以内に限って生活圏としている種も多い。野外調査では、溪流に倒木を設置し (B)、発酵ベイト類を塗り付け、集まってきたショウジョウバエを吸虫管と昆虫網により捕獲した (C)。気温が上がる日中には活動が不活発になる。そこで休息場所として利用している岩の隙間 (A) や溪流沿いのクリフシェルターとよばれる窪地から昆虫網により成虫を直接採集した。

クロショウジョウバエ類は総じて飼育が容易な分類群であるが、それでもいくつかの

種群では実験室飼育が成功していない。*quadrisetata* 種群もその一つである。摂食物質も明らかでない。成虫を休息場所から昆虫網により直接捕獲し、消化を遅らせるために低温で維持し、実験室に持ち帰った。体表を70%エタノールで消毒し、滅菌水中で成虫を解剖し、そ嚢(crop)内容物をポテトデキストロース寒天培地上に塗末した。18°Cで維持した恒温槽で数日間維持し、培地上に発生した微小生物のコロニーを分析した。

(2) 核型分析：飼育が容易でない種にはモルト培地を用いた。また産卵を促すために、培地にリンゴ片を置いた。低い温度を好むので、18°C飼育とした。2週間維持し、得られた3齢幼虫をリンガー液内で解剖し、脳神経節を取り出し、1%クエン酸水溶液による低調液処理およびコルヒチン処理を施した。次いで、45%酢酸処理、カルノア液による固定後、4%ギムザ液により染色し、最後に封乾した(空気乾燥法)。分裂像はフィルム撮影し、フィルムスキャナーでパソコンに取り込み、各染色体を分析した。

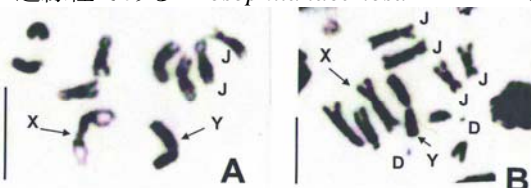
(3) 所属不明種の系統的位置の決定：既存のどの種群にも属さない5種、すなわち北海道と本州北部の冷温帯に棲息する2種(*D. calidata*, *Z. flavofasciatus*)、中国・雲南省横断山脈と甘粛省秦嶺山脈からの各1種(両種とも新種)について、頭部から腹部に至る約50の外部形態、雌雄生殖器の構造を調べた。量的形質はマイクロメーターで計測し、数量分析した。10%KOH水溶液で処理した生殖器標本をグリセリンに移し、顕微鏡画像をデジタルデータとしてパソコンに取り込んだ。クロシヨウジョウバエ区の各種群の識別形質と比較検討し、系統類縁関係を考察した。形態形質の分析に加え、雲南大学の高建軍博士との共同で *Adh*, *ND2*, *COI* 等の核およびミトコンドリアDNAの塩基配列を決定し、クロシヨウジョウバエ区の既存のどの分類群と近縁であるが、分子系統樹から推測した。

(4) 外国の研究機関に保管されている標本の鑑定：中国科学院昆明動物研究所、雲南大学生物系、インドネシア科学院生物学研究所で保管されているクロシヨウジョウバエ区標本を現地の研究者と共同して網羅的に調べた。多数の未同定標本の持ち出し、国外での新種の研究には手続き上の困難が伴うので現地での研究とした。

#### 4. 研究成果

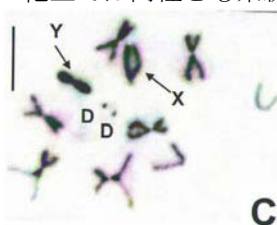
(1) 核型分析：クロシヨウジョウバエ区5種の染色体を明らかにした。下図は *robusta* 種群2種の染色体を示している。中国南西部から台湾島に分布している *Drosophila yunnanensis* Watabe et al. の染色体数は  $2n=10$  で、3対の中部附着型染色体(V)、1対の次中部附着型染色体(J)、及び1対の端部

附着型染色体(R)で構成されていた。X染色体は中部附着型であった(図A)。本種の核型は近縁種である *Drosophila lacertosa* Okada のそ



れと中部附着型が多いこと、微小な点状染色体(D)を欠いている点で似ていた(本種群のほとんどの種は点状染色体を有する)。図Bは貴州省から台湾島に分布している *D.*

*mediocostricta* Watabe et al. の核板である。本種の染色体数は  $2n=12$  ( $2V+2J+1J+1D$ ) で、X染色体は中部附着型であった。*robusta* 種群の核型進化では中部附着型が派生的(端部附着型が祖先的)と考えられているが、核型進化上では両種とも系統的に新しい種と思わ

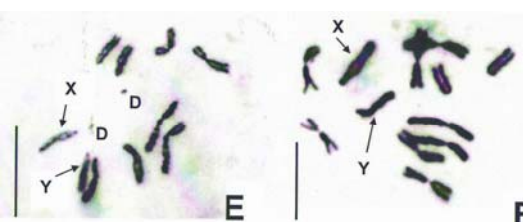


れる。図Cは東南アジアから日本に広く分布している

*polychaeta* 種群の *D. daruma* Okada の染色体である。本種の染色体は  $2n=12$

( $3V+2R+1D$ ) で、X染色

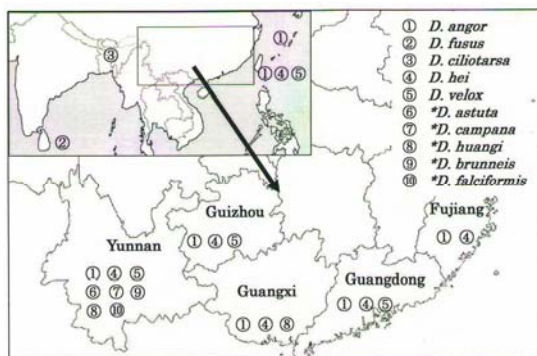
体は端部附着型であった。同じ *polychaeta* 種群の *Drosophila latifshahi* (南西諸島産) は *D. daruma* と同じの染色体構成であった。*polychaeta* 種群はクロシヨウジョウバエ区では古い種と考えられているが、X染色体がすべて端部附着型であり、この観察結果は分子系統樹と矛盾しない。図E・Fはそれぞれ



*Drosophila angor* と *D. fluvialis* の分裂像である。前者の染色体数は  $2n=12$  ( $2V+3R+1D$ ) で、後者のそれは  $2n=12$  ( $4V+2R$ ) であった。両種ともX染色体は端部附着型であった。飼育が困難であった *Drosophila angor* と *D. fluvialis* の核型を明らかにしたことは特筆すべきことである。クロシヨウジョウバエ区の分子系統樹でこれらはともに基部に位置している(Wang et al., 2007)。祖先的な端部附着型X染色体を有することは、分子系統樹での位置関係を支持している。

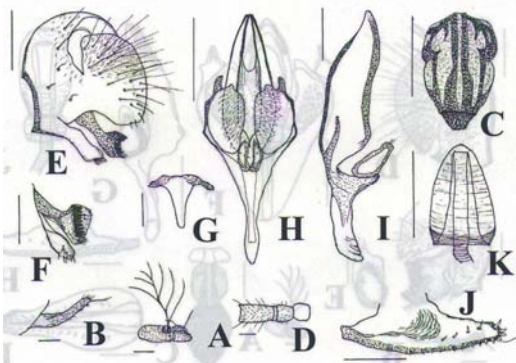
(2) 分類・同定：中国大陸とインドネシアで採集した標本を観察した結果、実に多くの新種と分布上の新知見が得られた。最も多くの新種が発見された *angor* 種群と所属が不明確であった数種について以下に報告する。

【the *angor* 種群】これまでアジアの熱帯と亜熱帯から5種が報告されていた。中国科学院に保管されていた標本と雲南省での野外調査から新たに5種が *angor* 種群に追加された。下図は中国大陸における各種の地理的分

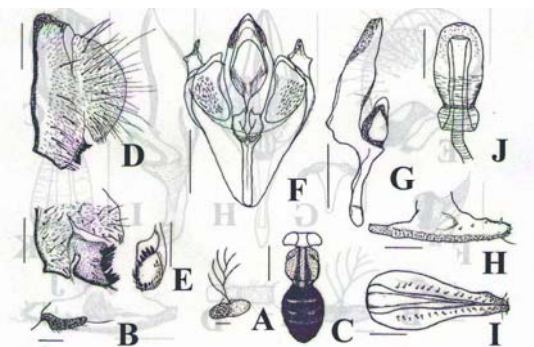


布を省ごとに示したものである(図中⑥から⑩が新種:学名は仮称)。雲南省には8種が棲息しており、多様性が最も高い。雲南省の北西部は氷河を抱いた山岳地帯、南東部は亜熱帯気候である。省内にはイラワジ河、長江、サルウィン河などの世界的大河がほぼ南北に流れており、河川は横断山脈で区切られている。*angor* 種群は熱帯アジアで出現したものと考えられるが、氷期・間氷期を繰り返した新生代第三紀から第四紀に雲南省の異なった気候帯・植生帯間で移動を繰り返し、その過程で種分化を遂げたものと考えられる。

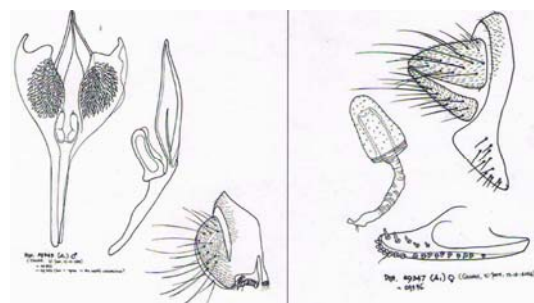
下図は新種 *Drosophila compans*(図中⑦)



の記載図であるが、*angor* 種群をクロシヨウジョウバエ区の他の種群と区別する形態的特徴は、aristaの分枝数が背面側3腹部側1であること(A)、palpusが細長く先端に1本の剛毛を有すること(B)、epandriumの腹部側に尾部方向に突き出す棍棒状突起を有すること(E)、aedeagusが直線的であること(H, I)、oviscaptが細長く側面に強い歯状突起を有すること(J)である。このなかでepandriumの特徴は他の分類群には見られない形質とされてきた。興味深いことに新種 *Drosophila astuta* の epandrium には棍棒状突起が無く(次図D)、クロシヨウジョウバエ区の他の分類群の epandrium とまったく同じ形状であった(次図A, B, G, H, Iの形質特徴において *angor* 種群であることは明確)。

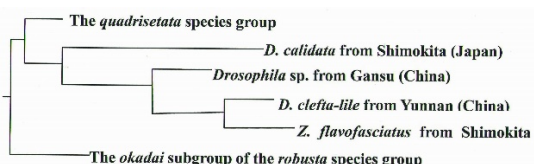


インドネシア科学院に保管されていたクロシヨウジョウバエ区の標本にも *angor* 種群に属する多数の新種が含まれていた。下図はジャワ島西部チボダス自然保護区で採集された新種の生殖器を示している。hypandriumに微毛が密生していること、spermathecaが釣鐘状であることなどから中国貴州省・雲南省から広東省を通り台湾島まで分布している *Drosophila hei* Watabe & Peng との類縁関係が示唆された。またインドネシア産の3新種について、胸部背面の dorsocentrals が3対存在する特異な形質が観察され(通常は2対)、研究が進むと *angor* 種群は少なくとも2つ以上の亜群に分かれることを示唆した。



【所属不明種】

*Zaprionus flavofasciatus* に関して、体長(約4mm)、arisaの分枝数(4/2)、翅指数(C=ca. 2.5, 5x=ca. 1.0, C3-fringe=ca. 0.8 Ac=ca. 2.0)、茶色の腹部背板などの外部形態、湾曲した aedeagus, 未発達の paramere, 多数の微毛を有する hypandrial plate などの生殖器の構造は、本種がシヨウジョウバエ属であることを明示した。雄生殖器の構造はクロシヨウジョウバエ区の *robusta* 種群・*okadai* 亜群および *quadrissetata* 種群のそれらと酷似していた。生態的にも本種は溪流性依存性が極めて高く、このことも *quadrissetata* 種群との近縁関係を示唆した。*Zaprionus flavofasciatus* と同様に、*Drosophila calidata* についても外部形態と生殖器の特徴、生態特性からクロシヨウジョウバエ区との類縁関係が示された。



中国科学院と雲南大学に保管されていた

ショウジョウバエ標本に *Z. flavofasciatus*, *D. calidata* と形態が類似する 3 種を発見した (2 種は雲南省横断山脈産, 1 種は甘肅省秦嶺山脈産で, 何れも新種)。上図はこれらの分子系統解析の結果を示している。

青森県下北半島産の *Z. flavofasciatus* は雲南省産種 (仮称 *clefta*-like) と結ばれ, この 2 種は甘肅省産の種と, さらにこれら 3 種は下北半島産の *D. calidata* と一つのクラスターを形成した。この群は既設の *quadrissetata* 種群と姉妹群を形成し, さらに *robusta* 種群 *okadai* 亜群と結びついた。これらには溪流依存性が特に強い生態が共通している。

所属不明とされてきた 5 種は中緯度地域では冷温帯域に, 低緯度地方では高山域 (雲南省では標高 2500m~3000m) に棲息している。日本列島は氷期に大陸と陸続きになったが, その時に *calidata*, *flavofasciatus* の祖先が中国大陸から渡ってきた。氷期には東アジアに比較的広く分布していたものの, その後の気温の上昇に伴い生活場所を高山域に求め, 現在の分断分布となったものと考えられる。

(3) そ囊内容物の培養: *Drosophila quadrissetata* (下図左), *Z. flavofasciatus*, および *D. calidata* (下図右) のそ囊内容物の培養は似たものであった。酵母菌のコロニーは極端に少なく, ほとんどがカビ類と細菌



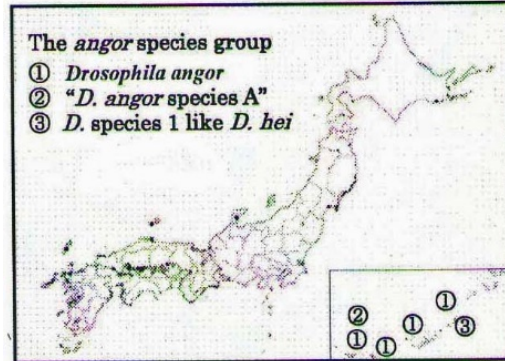
類であった (培地面積でカビ類が優占)。一般にショウジョウバエは酵母菌やその発酵産物を食物資源としていることが, 溪流に限定して棲息しているクロショウジョウバエ区の種々の食物資源は発酵とは全く異なったもの, 例えば岩の表面に発生するカビや細菌類を資源として利用していることを強く示唆した。

(4) 日本列島における地理分布: 北海道から西表島に至る各気候帯・植生帯におけるク



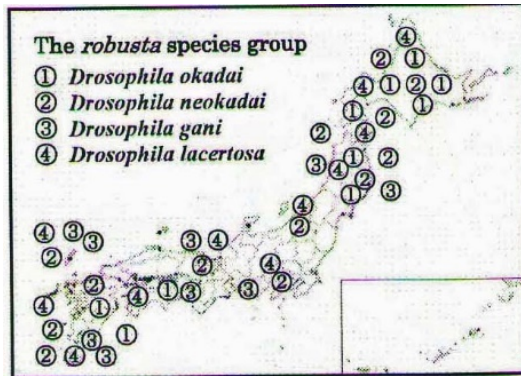
ロショウジョウバエ区のこれまでの採集記録をまとめた。図は 25 調査地 (北海道 9 地点, 本州 7 地点, 四国 1 地点, 九州 5 地点 (近隣の島を含む), 南西諸島 4 地点) を示している。

*angor* 種群は南西諸島に限って分布しており, その北限は奄美大島であった (下図)。



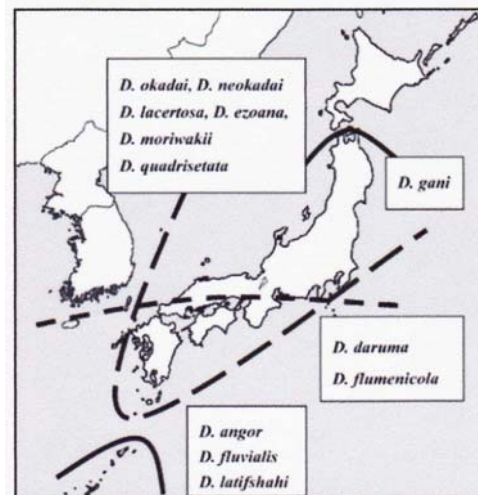
*Drosophila fluvialis* も同様の分布を示した。

これに対して *robusta* 種群は北海道から九州・屋久島まで広く分布しているが, 奄美大島以南の南西諸島には棲息していない (下図)。このような分布型は温帯性の *virilis* 種群, *melanica* 種群にもみられた。



*polychaeta* 種群では奄美大島を北限とする種と本州の常緑広葉樹林帯 (北限は伊豆半島) まで分布する種がみられた。

*quadrissetata* 種群は南西諸島から北海道まで広域分布しているが, どの地点でも優占種ではなかった。



台湾島には冷涼な気候を好む *robusta* 種群が棲息している。南西諸島は高い山域を欠くので氷期終了後の気温の上昇とともに姿を消したものと考えられた。

以上の日本におけるクロショウジョウバエ区の分布を動物地理学的に示したのが上図である。*angor* 種群の分布北限は奄美大島と屋久島間にあり東洋区と旧北区を分かつ渡瀬線、*robusta* 種群の *Drosophila gani* の北限は津軽海峡に横たわるブラキストン線であった。飛翔昆虫のショウジョウバエでは地理的境界が明瞭でない場合が多いが、本研究の渡瀬線、ブラキストン線は稀なケースである。

#### (5) 進化のプロセス

次表はインドネシア熱帯、中国大陸、日本、北アメリカ、欧州に分するクロショウジョウバエ区各分類群の地理分布と多様性を模式的に示したものである。

| taxonomic groups                          | Indonesia              | southern<br>China | Japan<br>Island | North<br>America | Europe |
|-------------------------------------------|------------------------|-------------------|-----------------|------------------|--------|
|                                           | the <i>angor</i> group | ◎*                | ◎               | ◎*               | absent |
| the <i>melanica</i> group                 | absent                 | ◎                 | ◎               | ◎                | ◎      |
| the <i>polychaeta</i> group**             | ◎                      | ◎                 | ◎               | absent           | absent |
| the <i>quadrisetata</i> group             | ◎                      | ◎                 | ◎               | absent           | absent |
| the <i>robusta</i> group                  | ◎                      | ◎                 | ◎               | ◎                | absent |
| the <i>virilis</i> group**                | absent                 | ◎                 | ◎               | ◎                | ◎      |
| <i>D. fluvialis</i> and its relatives     | ◎                      | ◎                 | ◎               | absent           | absent |
| <i>Z. flavofasciatus</i> and its relative | ◎                      | ◎                 | ◎               | absent           | absent |
| <i>Drosophila calidata</i>                | absent                 | absent            | ◎               | absent           | absent |

\*◎=abundant, ◎=present.

日本を含む東アジアは生物多様性が極めて高い。それは東南アジア・熱帯から東シベリア・寒帯までグリーンベルトが連続していることに他ならない。冷涼な気候を好む生物たちは氷期になり気温が低下すると低緯度地方では平地に棲息域を広げた。間氷期になり再び気温が上昇するとあるものは再び高山域に戻り、あるものは中緯度地方、高緯度地方に生活場所を移したと推測される。日本列島は南北移動の移住回廊であったと考えられ、森林が良く発達している山域を有するので、その後も生物多様性が維持され、今日に至っていると考えられる。

北アメリカ大陸にはベーリング陸橋を通して渡り、そこでさらに適応放散したのが *virilis* 種群と *melanica* 種群である。ユーラシア中央部にはタクラマカン砂漠やゴビ砂漠など大乾燥地帯が広がっているので、*melanica* 種群の欧州への分布は中国南西部からヒマラヤ山脈沿いを経由して、*virilis* 種群はシベリア経由をしたのであろう。水辺依存性が極めて高い *quadrisetata* 種群、*robusta* 種群の *okadai* 亜群と *lacertosa* 亜群は冷温帯林までは分布を広げることができたが、樹木が育たないツンドラ帯や針葉樹のみで構成されているタイガ帯では棲息できなかったものと思われる。

#### <引用文献>

①Levitan, N. 1982. The *robusta* and *melanica* group. In "The Genetics and Biology of *Drosophila*, vol. 3b", ed. by

Ashburner, M., Carson, H. L. and Thompson J. N., Academic Press, London, pp. 141-192.

#### 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 Watabe, H. and Takahashi, M. 2017. Geographic distributions of the *Drosophila virilis* section (Diptera, Drosophilidae) in the Japanese Islands. Journal of Hokkaido University of Education (Natural Sciences), 67 (2):11-22. 査読無.
- ② Watabe, H. 2016. A karyotype study on the *Drosophila virilis* section (Diptera, Drosophilidae). Journal of Hokkaido University of Education (Natural Sciences), 67 (1):19-24. 査読無.

[学会発表] (計4件)

- ① 神田侑奈・渡部英昭. オウトウショウジョウバエの生態. 2017年1月26日. 日本応用動物昆虫学会・日本昆虫学会北海道支部合同大会. 北海道大学・札幌
- ② 渡部英昭. クロショウジョウバエ類の系統進化. 2016年8月27日. 日本動物学会北海道支部第61回大会. 旭川医科大学・旭川.
- ③ 渡部英昭. 東アジアにおけるクロショウジョウバエ類の適応放散. 2016年3月26日~29日. 日本昆虫学会第76回大会. 大阪府立大学・堺市.
- ④ 渡部英昭. 東アジアの溪流性ショウジョウバエ. 日本ショウジョウバエ多様性研究会. 2015年9月26日~28日. 国立遺伝学研究所・三島市.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

渡部 英昭 (WATABE, Hideaki)  
北海道教育大学・教育学研究科・教授  
研究者番号: 10167190

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

##### (4) 研究協力者

( )