

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26891003

研究課題名(和文)血縁者間の競争が対立行動の進化に与える影響

研究課題名(英文)Effects of kin competition on spite behavior evolution

研究代表者

佐藤 幸恵 (SATO, Yukie)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：60414629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、雄同士の攻撃性に地理的変異の見られるススキスゴモリハダニの遺伝的集団構造を解析し、近年の血縁選択理論の検証を目的としている。南琉球と中琉球にて、雄同士の攻撃性が中間的な個体群と強い個体群を2個体群ずつ、九州にて攻撃性が強い個体群と弱い個体群を1個体群ずつ、巣、ススキの株、ススキ野原の単位で採集した。これら計6個体群から個体毎にDNAを抽出し(N=192)、東京農業大学生物資源ゲノム解析センターの協力の下、Illumina HiSeq 2500を用いてRAD-seqを行った。現在、そのシーケンスデータを用いて集団構造を解析しているところである。

研究成果の概要(英文)：This study investigated recent kin selection theory considering kin competition, by the analysis of kin structure in populations of the social spider mite, *Stigmaeopsis miscanthi* (Saito), which infests Japanese pampas grass (*Miscanthus sinensis* Anderson) leaves and shows geographic variation in male-male aggressiveness. I collected mites from six populations with high, low and intermediate male-male aggressiveness from the southern and central Ryukyu regions and the Kyushu region. Mites from each population were sampled from three different units: nest of the mite, root and stand of the host plant. DNA was then extracted from each individual (N=192) and RAD-seq carried out using Illumina HiSeq 2500, with the cooperation of the Nodai Genome Research Center. At present, sequence data is being analyzed to assess kin structure.

研究分野：行動生態学

キーワード：血縁選択説 雄の殺し合い行動 進化 血縁度 社会性 ハダニ

1. 研究開始当初の背景

「自身が被るコスト(C)が、受け手が得るベネフィット(B)に、自身からみた受け手の血縁度(R)で重みづけしたものを下回る場合、すなわち  $C < (B \times R)$  の時、協力(利他的)行動は進化しうる」とした血縁選択説(=ハミルトンの法則)<sup>1</sup>は、それまで困難であった協利行動の進化の説明に大いに貢献し、広く受け入れられている。この法則から、コストとベネフィットが変わらない限り、受け手との血縁度が高くなるに従って協利行動が進化しやすく、受け手が不利益を被るような対立行動は進化しにくくなると考えられている(図1の )。しかしその一方で、これまで多くの実証的研究が、個体間の血縁度と協力および対立行動の相関関係を見出すことに失敗してきた<sup>2,3</sup>。その要因の一つとして、血縁選択説の提案者であるハミルトンは受け手との血縁度を高めるメカニズムとして「血縁認識による受け手の選択」と「限られた分散による受け手となる近隣個体との血縁度の上昇」の二つを想定したが、後者に関しては、資源をめぐる局所的競争がある場合、

競争する相手が血縁者となるため、効果が相殺されることが指摘されている<sup>2,3</sup>。

では、分散性が低い故に、血縁

者間で競争が起こる集団では、対立(いやがらせ)行動と集団の平均血縁度の関係はどのようになるのだろうか?この疑問に対して、「イチジクコバチのオス同士の殺し合い行動」や「微生物のバクテリオシン(近縁の細菌に有毒な蛋白質や抗生物質)の生産」を想定した理論的研究は、対立行動と集団の平均血縁度の関係は、非線形(ドーム型)になることを示した(図1の )<sup>4,5</sup>。しかしそれを実証する研究は未だ乏しく、微生物を対象とした研究しか知られていない<sup>6,7,8</sup>。

申請者がこれまで対象としてきたススキゴモリハダニは、ススキに寄生し、集団で共同営巣する社会性のハダニである(図2)。本種では、(メスを含む)巣をめぐるオス同士が殺し合い(共食い)をし、ハーレムを形成する(図3)。この殺し合いの頻度(以後、攻撃性)は個体群間で異なり、寒冷な地域では攻撃性は低いが、温暖な地域では攻撃性は高くなり、さらに温暖な地域になると再び攻撃性は弱くなるといった、冬の気温と攻撃性の間には、非線形(ドーム型)の関係があることが、近年の研究により明らかになっている<sup>9</sup>。このドーム型の関係は、次の理由により、「イチジクコバチのオス同士の殺し合い行動」や「微生物のバクテリオシンの生

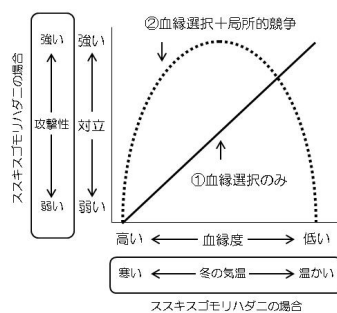


図1. 個体間の血縁度対立行動の関係

産」と同様、血縁者間の競争を考慮した血縁選択理論により説明可能であると考えられている。

(1)本種はススキの葉の主脈沿いに、規則的に糸をはって巣網をつくる(図2)。巣内にて、採餌、繁殖、子育て、排泄等を行い、生活の大半を巣内で過ごす。環境が劣化した場合には、新たに巣を造るよりも、まずは巣の増築を行うため<sup>10</sup>、移動・分散性は極めて低い。また、性比が極めてメスに歪んでいるため(メス比0.8-0.9)、メスをめぐる競争は局所的であり、兄弟間でメスをめぐる競争(局所的配偶者競争)が起こっていると考えられている<sup>11</sup>。

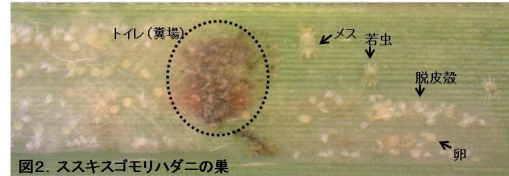


図2. ススキゴモリハダニの巣

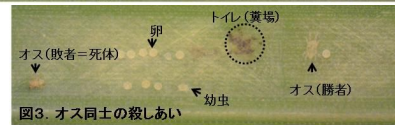


図3. オス同士の殺しあい

(2)本種では、メス成虫のみが休眠に入り越冬するが、冬の暖かい地域では休眠性をもたないオス成虫も冬を越すことが知られている<sup>12</sup>。寒冷な地域では、未交尾で越冬したメスは母子交配(本種は単数倍数体であり、2nの雌は未交尾の場合、nの雄を産んで交配することにより2nの雌を産むことができる)によりコロニーを創設し、既交尾で越冬した場合であっても、次世代は娘・息子間の交配によりコロニーを設立することになる。しかし温暖な地域では、春先に越冬オスが居るため、母子交配や娘・息子間交配といった近親交配をすることなく、コロニーを設立することができる。そのため、オスの越冬確率が低い寒冷な地域では集団の平均血縁度が高く、オスの越冬確率が高い温暖な地域では集団の平均血縁度は低くなると考えられる<sup>9,12</sup>。従って、冬の気温は集団内の平均血縁度の指標となることが期待されている。

<引用文献>

<sup>1</sup>Hamilton (1964) *Theor Biol* 7:1-52.  
<sup>2</sup>Queller (1992) *Trends Ecol Evol* 7: 322-324.  
<sup>3</sup>West et al. (2001) *Nature* 409: 510-513.  
<sup>4</sup>Reinhold (2003) *Proc R Soc Lond B* 270: 1171-1175. <sup>5</sup>Gardner & West (2004) *J Evol Biol* 17: 1195-1203. <sup>6</sup>Gardner et al. (2004) *Proc R Soc Lond B* 271:1529-1535. <sup>7</sup>Inglis et al. (2009) *Proc Natl Acad Sci* 106:5703-5707. <sup>8</sup>Inglis et al. (2011) *Am Nat* 178: 276-285. <sup>9</sup>Sato et al. (2013) *Ecol Evol* 3: 2661-2669. <sup>10</sup>Saito (1995) *J Acarol Soc Jap* 4: 55-67. <sup>11</sup>Sato & Saito (2007) *Ecol Entomol* 32: 397-602. <sup>12</sup>Saito (1995) *Evolution* 49: 413-417.

## 2. 研究の目的

上記の通り、ススキスゴモリハダニにおけるオス同士の攻撃性と冬の気温のドーム型の関係は、本種の移動分散性が低く、資源をめぐる局所的競争が十分に期待され、冬の気温が集団内の平均血縁度の指標となりうることから、血縁者間の競争を考慮した血縁選択理論により説明可能だと考えられる。しかし、集団の平均血縁度は実際には調べられておらず、冬の気温が本当に血縁度の指標となるのかは調査する必要がある。そこで本研究では、DNA マーカーを用いて本種の遺伝的集団構造を解析し、生息地の冬の寒さと集団の近交係数の関係を明らかにするとともに、集団の平均血縁度を測定し、近年の血縁選択理論を検証することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### < 採集地 >

琉球エリアでは、中間的な攻撃性を示す個体群として、沖縄県石垣島から2か所（名倉ダムとはんな岳近辺）、強い攻撃性を示す個体群として、沖縄県本島から2か所（八重瀬町と金城ダム近辺）にて本種採集を行った。九州エリアでは、強い攻撃性を示す個体群と弱い攻撃性を示す個体群として、島原市と雲仙普賢岳近辺にて1か所ずつ本種採集を行った（計6か所；図4）。

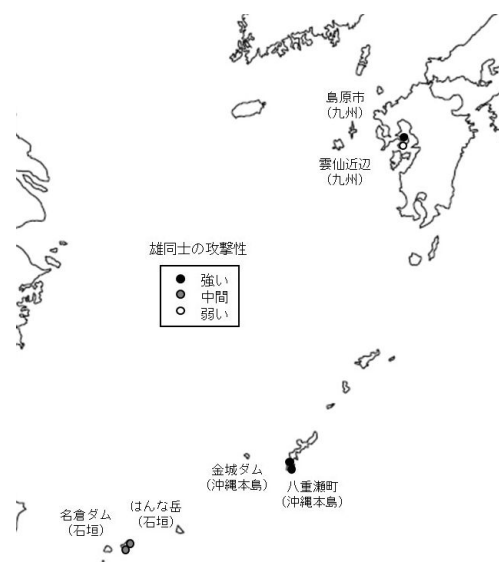


図4. 採集した個体群と雄同士の攻撃性

### < 採集方法 >

本種の巣、(本種の寄主植物である)ススキ株、ススキ野原(半径3m以内)の単位で遺伝的集団解析を行うため、4個体/巣、2~5巣/ススキ株、2~3株/ススキ野原、100m以上離れたススキ野原2~3か所からを目安に、本種採集を行った。その結果、計192個体を遺伝解析に解析にまわした。

### < 攻撃性の推定 >

雄同士の攻撃性の強さは、殺し合いの際に

使われる、雄の第1脚の相対的な長さとの強い相関関係にあり、この第1脚の相対長は攻撃性の強さの安定した指標となる。そこで、血縁度測定に用いられなかった個体を各個体群毎に飼育し、その飼育個体群からオス15-20個体を抽出し、スライド標本を作成した。位相差顕微鏡にカメラを付属してコンピューターにスライド標本の画像を取り込み、画像計測のソフト(ImageJ)により、左右両脚における第1脚と第3脚のtarsus、tibia、genu、femurの長さを計測した。個体毎に第1脚の相対長(第1脚/第3脚)を計算し、個体群の平均値をだし、その平均値でもって、採集した個体群の雄同士の攻撃性の強さを評価した。

### < 遺伝的集団構造の解析と血縁度の測定 >

集団構造の解析用に採集されたサンプルを、アセトンで固定し保存した。本アセトン標本から、個体ごとにDNAを抽出した。予備調査により、抽出されたDNAの濃度が次世代シーケンサーにかける上で不十分であることがわかったため、できるだけ抽出効率が高くなるよう、抽出の際にはビーズと細胞破砕機を使ってホモジナイズするだけでなく、液体窒素処理を行った。

遺伝マーカーとしては、Single Nucleotide Polymorphism (SNP) を用い、所属機関(筑波大学菅平高原実験センター)が所有する次世代シーケンサー(ION PGM™)にて、全対象サンプルを一挙にRestriction Site Associated DNA Sequence (RAD-Seq)解析することで、SNP検出とSNPジェノタイピングを同時におこなう計画であった。しかし、ION PGM™はRAD-Seqするうえで少々力不足であること、平成27年度は国際会議での研究発表とRAD-Seq解析を計画しており、両方も遂行する上で予算が十分ではなかったこと、研究代表者の知識と技術が十分でなかったことから、「平成27年度(後期)東京農業大学 生物資源ゲノム解析拠点 共同研究」に、研究課題名「ハダニ類における母子交配と血縁構造の解明」(研究代表者:佐藤幸恵、研究分担者:足達太郎(東京農業大学・国際食料情報学部)、内山博允(東京農業大学・生物資源ゲノム解析センター)、津田吉晃(筑波大学・生命環境系))で応募し、その結果、東京農業大学生物資源ゲノムセンターが所有する高性能の次世代シーケンサー(HiSeq2500)の利用許可と、専門家の協力を得ることができた。

## 4. 研究成果

雄の形態計測の結果、当初の計画通り、沖縄県石垣島の2個体群は中間的な攻撃性を示すこと、沖縄本島の2個体群は強い攻撃性を示すこと、九州の個体群は強いおよび弱い攻撃性を示すことを確認した。その上で、各個体群32個体(4個体/巣、2巣/株、2株

ノ野原、2野原ノ地域)からDNAを抽出し(計192個体)解析にまわした。

本研究で重要となるRAD-Seq解析であるが、現在苦戦している状態にある。東京農業大学・生物資源ゲノム解析センターの内山博允博士研究員の協力の下、ezRADの方法にてRAD-Seqライブラリを作成し、計192サンプルをシーケンシングした(HiSeq2500、Paired-End100×2、2レーン)。得られたリードデータからアダプター配列の除去を行い(TagDust version 1.13)、Rainbowによりクラスタリングとアセンブルを行った。マッピングは当初、CLC Genomics Workbenchで行う予定であったが、解析数が多く、時間がかかるため、BWA(ver0.712)を用いた。なお、マッピング用のリードは、クオリティトリミングを行っている(CLC Genomics Workbench)。途中、マッピングでできたファイル(SAM形式)のサイズが予想以上に大きくなり、ディスクの容量がオーバーし、解析が止まり、やり直しをするなど多くの時間を費やしている。

現在、マッピングにより得られたSAM形式ファイルをsamtoolsでBAM形式ファイルに変換し、samtoolsでソーティングと、ローカルリアライメントを行い、VarScanでSNPを抽出、VCFtoolsでSNPのフィルタリングを行っている。この変異抽出結果によっては、いくつかのサンプルの読み足しが必要になる可能性もある。この変異抽出が終わり次第、筑波大学・生命環境系の津田吉晃准教授の協力のもと、変異データにより、巣、ススキ株、ススキ野原の単位でもって、分集団での近交係数(FIS)、分集団間の親縁係数(FST)、集団全体の近交係数(FIT)を計算し、集団の平均血縁度の推定も行う予定である。その結果をもって、雄同士の間での攻撃性の強さと平均血縁度の関係を明らかにし、本種における血縁者間の競争が対立(いやがらせ)行動の進化に与えた影響を考察したい。

初年度は、交付決定時期(10月)がハダニの休眠が始まる時期であったことから、インキュベーターや顕微鏡の設置や、本種の寄主植物であるススキ株の育成など、本研究を遂行する上で必要な設備や環境を整えることに専念した。また、関連研究の論文執筆に取り組んだ。初年度の最後の1か月(3月)からようやく本種採集を開始することができ、その後、予定通りに採集をこなしたが、RAD-Seq解析が難航し、結果がまだ得られていない。しかし、本研究を遂行する上で資金を必要とする部分はほぼ終わることができ、近い将来、確実に結果をえる見通しがある。また、着任時は研究代表者の所属先ではハダニ類の飼育もままならない環境であったが、本研究活動スタート支援により環境を整えることができた。その他、今回得られたシーケンシングデータは、SNP検出とSNPジェノタイプングだけでなく、今後の研究用にマイクロサテライト(SSR)DNAマーカーの開発にも

利用する考えであり、本研究活動スタート支援で得られた成果は大きいと考える。

## 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)

Yukie Sato, Heike Staudacher, Maurice W. Sabelis (2016) Why do males choose heterospecific females in the red spider mite? *Experimental and Applied Acarology* 68: 21-31. DOI: 10.1007/s10493-015-9985-1. 査読有

Yukie Sato, Johannes A. J. Breeuwer, Martijn Egas, Maurice W. Sabelis (2015) Incomplete premating and postmating reproductive barriers between two parapatric populations of a social spider mite. *Experimental and Applied Acarology* 65: 277-291. DOI: 10.1007/s10493-015-9878-3. 査読有

[学会発表](計4件)

佐藤幸恵・Peter Rühr・Helmut Schmitz・Martijn Egas・Alexander Blanke. ハダニのオス間闘争における代替戦略の進化. 第36回菅平動物学セミナー. 2015年12月5日、筑波大学菅平高原実験センター、上田市、長野県

Yukie Sato, Johannes A. J. Breeuwer, Martijn Egas and Maurice W. Sabelis. Incomplete premating and postmating reproductive barriers between two parapatric populations of a social spider mite. 2015年度JALPS年次報告会. 2015年11月28-29日、筑波大学菅平高原実験センター、上田市、長野県

Yukie Sato, Martijn Egas and Maurice W. Sabelis (2015) Male-male aggression peaks at intermediate relatedness in a social spider mite. 2015年度JALPS年次報告会. 2015年11月28-29日、筑波大学菅平高原実験センター、上田市、長野県

Yukie Sato, Martijn Egas and Maurice W. Sabelis. Kin selection and kin competition: geographic variation in male-male lethal fight in the social spider mite. XVth European Society for Evolutionary Biology Meeting, August 10-14<sup>th</sup>, 2015, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

佐藤 幸恵 (SATO, Yukie)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号： 60414629