

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2007 ～ 2009  
課題番号：19570077  
研究課題名（和文） クロシヨウジヨウバエ区の適応放散と多様性維持機構に関する包括的研究  
研究課題名（英文） A comprehensive study on the adaptive radiation and biodiversity of the *Drosophila virilis* section  
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

## 研究成果の概要（和文）：

東アジアグリーンベルトにおけるクロシヨウジヨウバエ区の適応放散について研究した。温帯域に生息するクロシヨウジヨウバエ区の多くは 1 年間に数回世代交代を繰り返し、9 月以降は生殖器官を発達させることなく、越冬に備えて休眠に入る。*Drosophila quadrisetata* は 2 世代を送っていることが分かったが、大きな分類群である *quadrisetata* 種群で初めて季節消長が明らかになったものである。溪流沿いのクリフシェルター（木の根やシダ植物で被われた窪地）が越冬場所である。*robusta* 種群の *Drosophila okadai* の生活史は特異的で、年 1 化であった。

卵期からいろいろな日長条件で飼育し、羽化後の卵巣発達速度を調べた。1 化性の *Drosophila okadai* でも 18C・短日条件下で生殖休眠が誘起された。このことは本種の生殖休眠も条件休眠であることを示している。一方、熱帯から亜熱帯に生息している *Drosophila daruma* の光周期反応を調べたが、短日条件で飼育した雌個体も羽化後 16 日目には卵巣を成熟させ、次世代を産出していた。

地方集団の遺伝的分化について調べたところ、*melanica* 種群の *Drosophila tsigana* の腹部背板の黒色模様に変異が観察された。すなわち、暖温帯型（東京産と京都産）では雄背板は黒色であるが、冷温帯型（北海道定山溪産）では第 I I から I V 背板の黒色模様が中央で大きく切れ込んでいる。生態も若干異なっており、暖温帯型は樹液に集まりトラップでは甚だ捕獲し難いが、冷温帯型では夏季以降はトラップに効率良く誘引される。一方、暖温帯型と冷温帯型では雌雄とも生殖器の構造上の違いは発見できなかった。無選択法によって隔離機構を調べたところ、不完全ではあるが交尾前隔離が確認された。

ミトコンドリア DNA 遺伝子 COI の塩基配列を調べたが、日本の *Drosophila tsigana* の暖温帯型はむしろ冷温帯型よりも中国貴州省産の *Drosophila tsigana* に近いという興味ある結果が得られた。

## 研究成果の概要（英文）：

The *Drosophila virilis* section was studied from an evolutionary point of view of adaptive radiation and biodiversity in green belts of East Asia. Most species of the *virilis* section living in the temperate region repeated generation alternation several times per year, and the females did not develop their ovaries from mid September and entered reproductive diapause for hibernation. Any species belonging to the large *quadrisetata* species group has not been known for seasonal changes of natural populations, and it is first known that *Drosophila quadrisetata* spends two generations per year. The *virilis* section flies used cliff-shelters covered by roots of trees or ferns along stream as hibernation sites. *Drosophila okadai* of the *robusta* group characteristically spent a single generation per year.

Several species were maintained under various photoperiodic conditions from the egg stage and studied for the development of ovaries. Reproductive diapause was induced under short daylength in *Drosophila okadai*, a uni-voltine species, and this has showed that diapause of *Drosophila okadai* is facultative and a single generation per year is due to the limited period suitable for the life of *Drosophila okadai*.

On the other hand, ovarian development proceeded without any delay even under short photoperiodic regimes in *Drosophila daruma*, a tropic or subtropical member of the *polychaeta* species group

Local populations of *Drosophila tsigana*, a member of the *melanica* species group, showed remarkable morphological variations for the band patterns on the abdominal tergites. The warm temperate form collected from Tokyo and Kyoto possessed entirely black tergites of males but the cool temperate one from central Hokkaido did black caudal bands interrupted largely at middle on tergites II to IV. Any discriminative character on the male genitalia was not been detected between these two forms.

Reproductive isolation was studied by no-choice method, and incomplete isolation was detected between the two forms of *Drosophila tsigana*. A mitochondrial gene of COI was analyzed, and the gene sequences were compared among local populations of *Drosophila tsigana*. The molecular phylogenetic tree showed that the warm temperate form of Japanese *Drosophila tsigana* was situated near to Chinese *Drosophila tsigana* collected from Guizhou, rather than the cool temperate form of Japanese *Drosophila tsigana*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：ショウジョウバエ，種分化，生殖的隔離

#### 1. 研究開始当初の背景

全北区に広域分布しているクロショウジョウバエ区はショウジョウバエ属の根幹を形成している大きな分類群である。類縁関係が極めて近い種が数多く含まれており、実験室飼育が比較的容易なことから、早くから欧米の進化遺伝研究者によってその系統進化

関係が詳細に調べられてきた(Sturtevant 1942; Throckmorton 1975, 1982; Levitan 1982)。研究が進むにつれ、欧米に分布するクロショウジョウバエ区の多くは系統樹で末端部に位置するいわば”派生種”であることが明らかになりつつある。

日本を含む東アジア弧状列島は中国南部

に起源を有し、東アジアグリーンベルト沿いに北上し、欧州やベーリング経由で北米に渡り住んだショウジョウバエの移住回廊にあたる。従って、日本はクロショウジョウバエ区の種分化機構とその後の多様性の維持機構を研究する上で極めて重要な位置を占めている。このような状況にあるが、本研究ではいろいろな植生帯・気候帯でクロショウジョウバエ区の野外調査を行ない、適応機構の解明を行うと共に、地方集団間で生じている遺伝的分化の程度をいろいろな観点から調べた。

## 2. 研究の目的

申請者等の最近の研究で、東アジア地域の本分類群の地理的分布、核型、分子系統、生殖隔離機構等に関する多くの知見が得られている。亜熱帯から寒帯にわたるクロショウジョウバエ区の適応と進化を解明する上で残された問題は、1) それぞれの気候帯、特に温帯における季節変化への適応戦略、2) 河川や湖沼という高湿度環境に偏在する自然集団間での遺伝的分化、である。本研究では主としてこれら2つの課題について取り組む。具体的には、1) クロショウジョウバエ区の自然集団の季節的変動、2) 光周期反応と生殖休眠機構の分析、3) カラスショウジョウバエ種群にみられる地方集団間の遺伝的分化を調べた。先行研究と以上の研究結果を統合して、本分類群をモデルとしたショウジョウバエの北半球温帯全域で起こったショウジョウバエ科の適応放散のシナリオを提示する。

## 3. 研究の方法

研究は自然集団を対象とした野外調査と地方集団を材料とした室内実験とに大別される。それぞれについて、以下に示す。

### (1). 自然集団の季節消長と越冬

- ・ *quadrissetata* 種群, *melanica* 種群, *okadai* 亜群の季節的变化を調べる
- ・ 4月下旬から10月下旬まで毎月3回の定期調査を行う
- ・ 捕獲した雌の卵巣発達状態と交尾率を記録する
- ・ 越冬場所の特定と越冬個体の生理状態を観察する

### (2). 光周期反応と生殖休眠機構の実験

- ・ 短日条件 (LD:10:14) と長日条件 (LD16:8) で卵期を維持する
- ・ 羽化後16日目に雌の卵巣の発育状態を観察する
- ・ 管状受精嚢と貯精嚢をリンガー溶液中で解剖し、精子の有無を記録する

### (3). 生殖的隔離機構の存在

- ・ 羽化後16日目の個体を使用し、無選択法と雄選択法で隔離の程度を調べる
- ・ 無選択法 (5A♀ x 5B♂), (5B♀ x 5A♂) →48時間後に雌生殖器官を検鏡する
- ・ (5A♀ + 5B♀) x 5A♂, (5A♀ + 5B♀) x 5B♂ →48時間後に雌生殖器官を検鏡する
- ・ Stalker と Orr の隔離指数を統計検定する
- ・ F<sub>1</sub> 雑種の稔性と生存力を調べ、交配後隔離の存在を調べる

### (4). そ嚢内容物の糖類

- ・ 樹液に集まるクロショウジョウバエ区を捕獲し、超純水中でそ嚢を取り出す
- ・ 1ml キヤピラリーに入れ、冷蔵保存し、実験室へ持ち帰る
- ・ 高速液体クロマトグラフィーで、そ嚢に含まれる糖類を分析する

### (5). 補完的な研究

- ・ 地方集団の変異をミトコンドリア遺伝子 (*ND2*, *COI*) の塩基配列から比較する
- ・ 地方集団の核型をギムザ染色により調べる

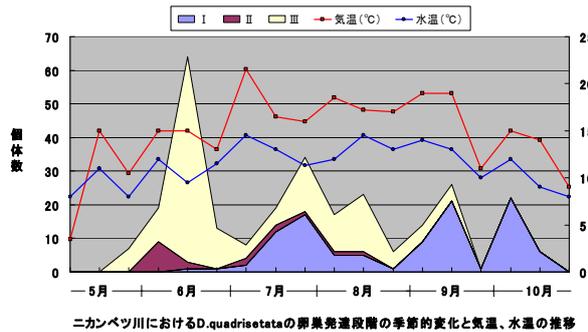
## 4. 研究成果

### (1) 自然集団の季節消長と越冬

クロショウジョウバエ区のなかで特異的に年1化性と予想されていたオオクロ種群の *Drosophila okadai* と *Drosophila neokadai* の季節消長を調べた。前者の成虫は早春から出現し、5月中旬から6月上旬に繁殖期を迎える。第1世代成虫は7月下旬から出現するが卵巣を発達させることはなく生殖休眠に入る。 *Drosophila neokadai* の成虫は *Drosophila okadai* よりもやや遅れて5月中旬頃から出現し、5月下旬から6月中旬にかけて繁殖を行う。第1世代成虫は7月下旬頃から出現し、多くの成虫は性成熟を進行させ、8月上旬に2回目の繁殖を迎える。両種とも生木の形成層に産卵する。幼虫と蛹には気管が発達しており、水に浸った樹木での繁殖に適応的と思われる。越冬場所は溪流沿いの窪地 (cliff-shelters) である。越冬中の成虫雌の卵巣には卵黄蓄積がみられない。精巣は淡いオレンジで、求愛行動はみられない。腹部には脂肪組織が発達していた。

クロショウジョウバエ区 (the *Drosophila virilis* section) のなかでヨツゲショウジョウバエ種群 (the *quadrissetata* species group) は溪流性で、最大の分類群であるが、これまで野外生態がまったく不明であった。南日高山系で通年調査を行い *Drosophila quadrissetata* の季節消長を明らかにすることができた。本種は5月上旬頃から出現し、6月中旬にかけて繁殖を行う。第1世代の成虫は7月中旬頃に出現し、生殖器官を発達させ、第2回目の繁殖に入る。第2世代成虫は8月下旬から羽化し始めるが、新生雌は卵巣

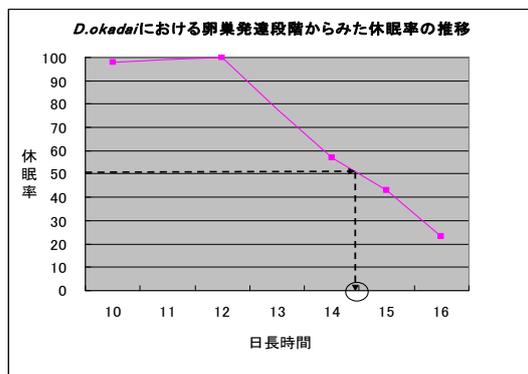
を発達させることなく、休眠状態に入る。越冬前の個体は脂肪組織が非常に発達している。これら秋集団の個体は9月下旬頃まで溪流沿いのクリフシェルターに留まっているが、10月下旬には越冬場所に向かう。これらの野外調査から、*Drosophila quadrisetata* は多化性の生活史を繰り返し、成虫で越冬することが分った(下図)。興味深いことに、本種的生活史はオオクロシヨウジョウバエ種群の *okadai* subgroup の種(特に *Drosophila okadai*) と非常に似ている。



### (2). 光周期反応と生殖休眠の研究

*Drosophila okadai*, *Drosophila neokadai* とも 18°C 短日条件 (LD 10:14) で飼育した雌個体の卵巣発育速度は長日条件 (LD 16:8) で飼育したものと比較すると著しく抑制された。このことから、両種とも短日条件下で生殖休眠が誘起されること、休眠は条件休眠であることが分った。従って冷温帯域における *Drosophila okadai* の 1 化性は限られた活動期間によるものであること推測できる。

暖温帯(おそらく伊豆半島)を北限とする亜熱帯種の *Drosophila daruma* の光周期反応を調べた。23°C 短日条件 (LD10:14) で卵巣発達が僅かに抑制されるものの、明確な生殖休眠は誘起されなかった。また、短日条件下で維持した個体にも脂肪組織の蓄積は観察されなかった。このことから、越冬のための休眠機構はもっておらず、このことが本種の冷温帯域の進出を妨げている要因の一つと考えられる。



### (3). 地方集団間に見られた生殖的隔離機構

カラスシヨウジョウバエ種群 (the *Drosophila melanica* species group) に属する *Drosophila tsigana* の地理的集団間の分化の程度を、外部形態比較、食性研究、生殖的隔離機構の存在から詳細に調べた。暖温帯型 (= 南日本型: 東京, 京都) と冷温帯型 (= 北日本型: 札幌) では腹部背板の黒色パターンに明瞭な違いが見られた。前者雄の第IIから第IV背板はほとんど黒色であるが、後者では中央に深い切れ込みが観察された。暖温帯型は樹液に集まるもののトラップにはほとんど誘引されないが、冷温帯型は発酵果実トラップ法で容易に捕獲できるなど、生態的にも違いがみられた。しかし、雌雄とも生殖器構造上の違いは検出できなかった。生殖的隔離機構を羽化後 16 日目の個体を用いて無選択法により調べた。暖温帯型雌と冷温帯型雄の交配率は 47.6%, 逆交配では 7.8% となり、統計的に明らかな有意差がみられた。次に、雄選択法によって生殖隔離の程度を調べた。冷温帯型を雄とした場合の隔離指数は 0.39 と不完全であったが、暖温帯型を雄とした場合の隔離指数は 1.00 となり、完全な選択性を示した。交配後の隔離機構について、雑種第一代雌雄間、および雑種第一代雄と両親系統雌間で交配させたが、子孫はほとんど得られなかった。このことから、暖温帯型と冷温帯型では遺伝的分化が著しく、その差は種レベルに達しているものと考えられた。

表 1. 東京産と札幌産の *Drosophila tsigana* 間の交配率 (%). 羽化後 16 日目の個体を 2 日間 18°C で交配した。無選択法で調べた

♀/♂	東京	札幌
東京	90.6 (32)	47.6 (63)
札幌	7.8 (64)	100.0 (31)

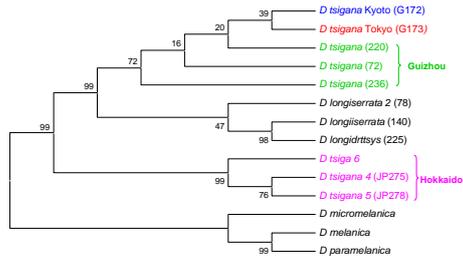
### (4). そ嚢内容物の糖類

コナラの樹液に集まっていた *Drosophila tsigana* を捕獲し、そ嚢を超純水液中で解剖し、その中含まれる糖類を高速ガスクロマトグラフィで分析した。グルコース、フルクトースが多く含まれていたが、興味あることにトレハロースが検出された。捕獲した時期が10月初旬であったことから、越冬に備えて体内に蓄積され始めているのか、またはコナラの樹液に含まれる糖が酵母菌の発酵作用によって変化したものか、どちらかの可能性が考えられた。なお、東京都武蔵村山で採集された個体はすべて暖温帯型であった。

### (5). 地方集団間の遺伝的変異

予備実験の結果ではあるが、*COI* 分子系統

樹(MP tree)から中国産 *Drosophila tsigana* は西日本の *Drosophila tsigana* と近縁で、次いで関東産 *Drosophila tsigana*, そしてこれらのクラスターに *Drosophila longiserrata* が結合するという興味ある結果が得られた。北海道産 *Drosophila tsigana* は最も離れて位置した。*COI* 遺伝子配列に関して、別な分析手法の系統樹でも、*Drosophila tsigana* の地方集団と *Drosophila longiserrata* は“いれこ”の関係となった(下図)。



MP tree based on ND2 sequences. Numbers below branches indicating the Bootstrap percentages (500 replicates).

## 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5件)

- ① Awit, S. and Watabe, H. (2010) Discovery of the *Drosophila* (*Drosophila*) *robusta* species group (Diptera, Drosophilidae) from Southeast Asian tropics, with the descriptions of six new species. Entomological Science, 査読有, 13 (Accepted).
- ② 渡部英昭・野坂幸司・森田みゆき(2010) ショウジョウバエの嚔囊から抽出された糖類に関する研究. 北海道教育大学紀要自然科学編, 査読有, 61 (印刷中).
- ③ Cheng, H., Watabe, H. and Zhang, W. (2008) A new subgenus *Parastegana* (*Allstegana*) (Diptera, Drosophilidae), with descriptions of two new species from South China. Journal of Natural History, 査読有, 41: 2403-2410.
- ④ Gao, J., Watabe, H. Aotsuka, T., Pang, J. and Zhang, Y. (2007) Molecular phylogeny of the *Drosophila obscura* species group, with emphasis on the Old World species. BMC Evolutionary Biology, 査読有, 7: 87-99.
- ⑤ He, L., Watabe, H., Xiangyu, J. Gao, J., Liang, X., Aotsuka, T. & Zhang, Y. (2007) Genetic differentiation and cryptic speciation in natural populations of

*Drosophila lacertosa*. 査読有, Molecular Phylogenetics and Evolution 43:24-31.

## 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: