

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19770060

研究課題名（和文） 食植性昆虫における食草変換の分子基盤の解明

研究課題名（英文） Genetic basis of host sifts in phytophagous insects

研究代表者

加藤 徹 (KATO TORU)

北海道大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：80374198

研究成果の概要（和文）：食草の違いだけで生殖的に隔離されていることが予想されているルイヨウマダラテントウおよびヤマトアザミテントウの2種(集団)について、マイクロサテライトマーカーを設定し、集団内多型および種間の遺伝的分化の解析を行なった。その結果、設定した8つのマイクロサテライト遺伝子座のうち、少なくとも3つの遺伝子座で多型が認められたが、何れもアレル多型の程度が非常に小さく、かつ集団間における顕著な遺伝分化は認められなかった。このことは、両集団がごく最近、極めて短時間のうちに分化を遂げたため、食草選択に関わる遺伝子の変異以外、ゲノム間の遺伝分化がほとんど生じてないことを示唆する。

研究成果の概要（英文）： Extent of genetic differentiation between two sympatric ladybird beetles, *Henosepilachna niponica* and *H. yasutomii*, which are thought to be reproductively isolated from each other by their host preferences alone, was assessed using microsatellite markers established in this project. The analyzed data revealed that the genetic variation both within and between species were very low. These results suggest that the speciation of two species would have occurred so recently with short time that there is little genetic differentiation between them, except for a number of genes associated with their host preferences.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,600,000 | 0 | 1,600,000 |
| 2008年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2009年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 480,000 | 3,680,000 |

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：種分化・食植性昆虫

1. 研究開始当初の背景

(1) 食植性昆虫は種数にして全世界の4分の1を占めるといわれている。従って、その種分化過程を解明することは、生物多様性の相当部分を説明することに他ならない。食植性昆虫の種分化に関しては、主に同所的種分化の可能性の有無をめぐる、数十年にわたり論争が続いてきたが、近年、理論面の研究が進展した結果、食植性昆虫においては「新しい食草へ適応した種内品種(ホストレース)の形成を経由する同所的種分化」が異所的種分化と同じように重要である、という考えが広く支持されるようになってきた。しかし、同所的種分化に合致する例はまれであり、それがどの程度頻繁に生じているかは不明である。

(2) マダラテントウ類は食植性のテントウムシで、一部の種についてはナス科、ウリ科、マメ科などの害虫として良く知られている。マダラテントウ類の多くの種は、比較的限られた種類の植物だけを利用し、非常に近縁な種間でも異なった植物を食い分けるといふ生態的特徴を持つ。このような特徴を持つ生物集団では、食草の違いが近縁種間の生殖隔離機構となりうるため、種分化の諸問題を解決するための格好の材料として注目される。実際、いくつかのマダラテントウ種においては、同所的な近縁種が食草の違いだけでより生殖的に隔離されていることが、これまでの研究によって明らかにされている。

(3) 従来は食性の変換が種分化の発端となり、その後様々な生殖隔離要因が進化して種分化が完了すると考えられてきたが、種を「生殖的に隔離された生物学的実体=生物学的種」と考える限り、上記の研究結果は、食草変換によってただちに完全な種分化が引き起こされると考えた方がよいことを示唆する。いいかえれば、「食草変換は種分化の発端ではなく、種分化そのものである」と解釈することができる。

(4) 遺伝学的観点から見た場合、上記の解釈はひとつの重要な示唆を与える。それは、食草変換によって完全な種分化が引き起こされるとすると、いくつかのマダラテントウ種においては、食草選択に関する遺伝子そのものが直接種分化に関わった遺伝子であると判断することが出来るという点である。

(5) 近年、分子生物学の発達にともない、種分化の分子機構の解明や種分化に関わる遺伝子の検出が、分子レベルで行われるようになった。しかしながら、このアプローチからの研究は、未だショウジョウバエを代表とする比較的少数のモデル生物について行なわれているにすぎない。

2. 研究の目的

(1) 食草の異なるいくつかの近縁なマダラテントウ種について、それぞれに特異的なマイクロサテライトマーカーを設定する。マイクロサテライトは、2-5塩基の反復単位が数個から数十個繰り返した反復配列で、その変異性が非常に高いことから、集団内および集団間の遺伝的変異を検出する、あるいは遺伝マッピングを行なうための高感度の分子マーカーとして広く用いられている。

(2) 設定したマイクロサテライトマーカーを用いて、種内多型および種間の遺伝的分化の程度を詳細に調査する。

(3) 十分な数のマイクロサテライトマーカーを得られた際には、相関解析やQTL解析などの遺伝統計学的手法に基づく解析を行い、最終的には食草選択に関わる遺伝子のマッピングを試みる。

3. 研究の方法

(1) 解析候補の選定：解析の候補として、日本に生息するヤマトアザミテントウ (*Henosepilachna niponica*) とルイヨウマダラテントウ (*H. yasutomii*) の地域個体群を選定した(図1)。これらは、食草選択の違いだけで生殖的に隔離されていることがすでに報告されている。



図1. ヤマトアザミテントウ (*Henosepilachna niponica*) とルイヨウマダラテントウ (*H. yasutomii*)

(2) 多型マイクロサテライトマーカーの設定：成虫個体より精製したゲノムDNAを制限酵素で切断し、市販のカセット配列を結合してPCR増幅を行なった。得られたPCR断片とビオチン標識したマイクロサテライト特有の繰り返し配列をハイブリダイゼーションさせ、磁石ビーズを用いてこれを選択的に回収した。得られた断片をさらにPCR増幅し、クローニングして目的配列を含むDNA領域の塩基配列を決定し、PCRプライマーを設計した。こうして得られたマーカーのそれぞれについて、野外サンプル個体のDNAを鋳型としてPCRを行ない、マーカーの多型判定を行った。

(3) 集団内多型と集団間の遺伝的分化の調査：対象とする野外集団個体についてDNA

を抽出し、マイクロサテライトマーカを用いた PCR 反応を行ない、フラグメント解析を行なった。得られた多型情報をもとに、集団内多型および種間の遺伝的分化の程度を推定した。

4. 研究成果

(1) マイクロサテライトマーカの新規設定
ルイヨウマダラテントウ成虫個体より精製したゲノム DNA を制限酵素で切断し、カセット配列を結合して PCR 増幅を行なった。得られた PCR 断片からマイクロサテライト特有の繰り返し配列を濃縮して再度 PCR 増幅を行なった後、TA ベクターに挿入してクローニングを行なった。その後、これまで合計約 1600 個のクローンについて、ビオチン標識をした 2 塩基および 4 塩基くり返し配列をプローブに用いて、ハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行なった。その結果、ポジティブと思われる 84 個のクローンが得られ、これらの DNA 塩基配列を決定した。こうして得られた塩基配列について phredPhrap によるアセンブルを行なったところ、14 の異なる繰り返し配列を含む領域が確認された。そこで、これらの配列のそれぞれについて、くりかえし配列領域を増幅するよう PCR プライマーを設計し、元の DNA を鋳型として PCR 増幅のテストを行なったところ、8 種類のプライマーについて増幅が確認された。こうして、本研究ではこれまで、マダラテントウを用いた多型解析の候補マーカとして、8 個のマイクロサテライトマーカを新たに設定した (表 1.)。

表 1. 本研究で新たに設定したマイクロサテライト 8 遺伝子座のプライマー配列.

| ID: | Primer pair |
|---------|---|
| 02_17F: | 5'-TGGATTTCCCGTTTCAGTA-3' 5'-AGAATGGCATCAAAGCAAC-3' |
| 13_71R: | 5'-ACATACCAGGCACTTAAGACAAG-3' 5'-CAAATCAGCATCTCAAACCAA-3' |
| 13_86R: | 5'-AAACAGTGAAGCCGAGGAAA-3' 5'-GCGATTTGGCTGTCTTCTC-3' |
| 13_91F: | 5'-CGTGTGTGCGAATCCAAGGT-3' 5'-TTTGTGAGGATTGGTTAGTGC-3' |
| 13_91R: | 5'-ACGAGCGTTTCAGTTCCAT-3' 5'-GCTCCGTCAGGATTTAACCA-3' |
| 14_01R: | 5'-CAAAATTTCCGGGCTTCATA-3' 5'-GGGTTAGTAGGAATCAATCTTCATC-3' |
| 14_06F: | 5'-AGGTATCGGCTCTGCTTG-3' 5'-AACTGGAAGCAGGCGTAGAA-3' |
| 15_07R: | 5'-TGTATGATTCGACGCTGGT-3' 5'-CTCCCTGGGGTTTTATTG-3' |

(2) マイクロサテライト多型および各集団の遺伝的多様性

設定した 8 つマイクロサテライト遺伝子座について、ヤマトアザミテントウおよびルイヨウマダラテントウの野外集団を対象に、蛍光プライマーを用いて PCR を行ない、ABI 3130 を用いたフラグメント解析により、アレルのサイズを推定した。その結果、8 つのマイクロサテライト遺伝子座のうち、多型が認められた遺伝子座は 13-71R、14-01R、および 15-07R の 3 つであった。そして、残り 5 つの遺伝子座についてはアレルが 1 つしか観察されず、多型が検出されなかった (表 1.)。

また、多型の認められた 3 つの遺伝子座において、今回観察されたアレルの数は何れも 2 つだった。そのうち、15-07R の遺伝子座における 1 つのアレルは、ルイヨウマダラテントウ集団にのみ固有に観察されたが、他の遺伝子座も含む残り全てのアレルについては、全て両集団で共通に観察された。

8 つのマイクロサテライト遺伝子座に基づく平均ヘテロ接合体率は両集団全体で 0.14 と算出された。そのうち、ヤマトアザミテントウ、およびルイヨウマダラテントウ集団の平均ヘテロ接合体率はそれぞれ 0.08 および 0.16 と算出された (表 2.)。

なお、通常、2~3 塩基繰り返しのマイクロサテライト遺伝子座においては、アレルが 5~10 個ほど観察され、ヘテロ接合体率が比較的高い値を示すことが多い。しかしながら、本研究では 2 塩基あるいは 3 塩基繰り返しのマイクロサテライト遺伝子座を設定したにもかかわらず、得られたアレル数、集団のヘテロ接合体率ともに低い値が示された。この結果は、両マダラテントウ集団におけるゲノムの遺伝的多様性そのものが非常に低いことを示唆する。

表 2. ヤマトアザミテントウ・ルイヨウマダラテントウ集団で観察された各マイクロサテライト遺伝子座のアレル数.

| Locus | HN | HY | Mean | s.d. | Total No. |
|--------|------|------|------|------|-----------|
| 2-17F | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 13-71R | 2 | 2 | 2 | 0 | 2 |
| 13-86R | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 13-91F | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 13-91R | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 14-01R | 2 | 2 | 2 | 0 | 2 |
| 14-06F | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 15-07R | 1 | 2 | 1.5 | 0.71 | 2 |
| Mean | 1.25 | 1.38 | 1.31 | 0.09 | 1.38 |
| s.d. | 0.46 | 0.52 | 0.49 | 0.04 | 0.52 |

HN: *H. niponica*
HY: *H. yasutomii*

表 3. ヤマトアザミテントウ・ルヨウマダラテントウ集団における各マイクロサテライト遺伝子座のヘテロ接合体率.

| Locus | HN | HY | Mean | s.d. | Total hetero. |
|--------|------|------|------|------|---------------|
| 2-17F | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13-71R | 0.26 | 0.48 | 0.37 | 0.15 | 0.41 |
| 13-86R | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13-91F | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13-91R | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14-01R | 0.36 | 0.52 | 0.44 | 0.11 | 0.49 |
| 14-06F | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15-07R | 0 | 0.30 | 0.15 | 0.22 | 0.21 |
| Mean | 0.08 | 0.16 | 0.12 | 0.06 | 0.14 |
| s.d. | 0.15 | 0.23 | 0.19 | 0.06 | 0.21 |

HN: *H. niponica*

HY: *H. yasutomii*

(2) 集団間の遺伝分化

設定した8マイクロサテライト遺伝子座におけるアリル分布を両集団で比較したところ、前項目でも述べたように、ほとんどのアリルが両集団で共有されており、アリル置換が生じている遺伝子座は認められなかった。

また、ARLEQUIN プログラムを用いて、両集団間の遺伝分化に関する調査を行なったところ、集団間の F_{st} は 0.103 と算出され、有意差は認められなかった ($p=0.07$)。

さらに、両集団のそれぞれの個体について、STRUCTURE プログラムを用いて、仮想集団数を2としてアサイメントテストを行なったところ、解析した個体は何れもどちらかの集団に分けられることなく、ほぼ0.5の確率で割り当てられた。このことは、両集団の個体がよく似た遺伝組成を持ち、明確な集団構造が認められなかったことを意味する(図2)。

なお、前項目で述べたように、両集団では集団内の遺伝的多様性そのものが低いことを考慮すると、これらの結果は、両集団ではごく最近、極めて短時間のうちに食草変換による種分化が生じたため、食草選択に関わる遺伝子の変異以外、ゲノム上の遺伝分化が現在においてもほとんど生じてない可能性を示唆する。

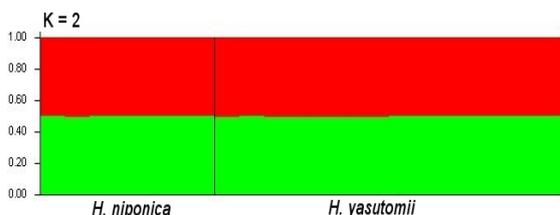


図 2. “STRUCTURE” プログラムによるアサイメントテストの結果.

(3) 結論および今後の展望

ヤマトアザミテントウおよびルヨウマダラテントウの地域集団間では、食草選択に関わる遺伝子以外の遺伝分化がほとんど生じてない可能性が示唆された。このことは、「食草変換は種分化の発端ではなく、種分化そのものである」という最近の仮説を強く支持する。また、これらの集団は、ノイズとなるバックグラウンドの遺伝分化が非常に少ないため、目的遺伝子のタイピングを行なうには格好の対象と言える。本研究を継続することで、食草選択に関わる遺伝子の特定が十分可能であると期待される。

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3件)

- ① Kuwajima M., Kobayashi N., Katoh T., Katakura H. (2010) Detection of ecological hybrid inviability in a pair of sympatric phytophagous ladybird beetles (*Henosepilachna* spp.). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 134: 280-286. 査読有.
- ② Kobayashi N., Ohta, T., Katoh T., Kahono S., Hartini S., Katakura H. (2009) Molecular phylogenetic analysis of three groups of Asian epilachnine ladybird beetles recognized by the female internal reproductive organs and sperm transfer. *Journal of Natural History* 43: 1637-1649. 査読有.
- ③ 加藤 徹・古川恒太・片倉晴雄 (2008) 反射出血を利用した昆虫類のDNA解析. *昆虫 (ニューシリーズ)* 11: 25-31. 査読有.

[学会発表] (計1件)

- ① 加藤 徹, 小林憲生, Sih Cahono, 片倉晴雄. マダラテントウ亜科の系統と食草利用の進化. 日本遺伝学会第81回大会. 2009年9月17日, 信州大学(長野県).

[その他]

ホームページ等

<http://www.sci.hokudai.ac.jp/~tkatoh/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 徹 (KATOH TORU)

北海道大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号: 80374198