

平成21年6月20日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570225

研究課題名（和文） イチジク属植物とイチジクコバチの共進化のメカニズムの解明

研究課題名（英文） Study on mechanism of co-evolution between figs and fig-wasps

研究代表者

蘇 智慧 (SU ZHI-HUI)

株式会社生命誌研究館・研究部門・研究員

研究者番号：40396221

研究成果の概要：イチジク属植物 *Ficus*（クワ科）とイチジクコバチとの間、子孫を残すという共通利益のもとで、「1種対1種」という極めて厳密な相利共生関係が成立している。日本産イチジク属植物とそのコバチの系統関係を複数の分子マーカーを用いて網羅的解析を行い、両者（植物とコバチ）の種間関係と種内の遺伝的変異（或いは地域的変異）を明らかにした。植物とコバチの各種がそれぞれ単系統を形成し、宿主の転換が見られず、「1種対1種」関係は極めて厳密に維持されていることが判明した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：進化生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：イチジク属、イチジクコバチ、共進化、分子系統、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) イチジク属植物 *Ficus* は、クワ科 (Moraceae) に属し、4 亜属 (*Ficus*, *Urostigma*, *Pharmacosycea*, *Sycomorus*) に分けられ、東南アジア、アフリカ、中南米など熱帯を中心に約 750 種が世界中に分布している。日本はイチジク属の分布域の北限にあたり、南西諸島を中心に 16 種いる。イチジク属植物は熱帯雨林の最も重要な構成メンバーの

1 つで、熱帯雨林のキーストンとも言われている。年間数回大量に結実し、1 本の木に数トンの果実を付ける種類もある。これらの果実を食糧にする多くの昆虫類、ほ乳類、鳥類などの動物がイチジクの木のもとに集まってくる。イチジク属植物は動物たちに豊富な食糧を提供するだけでなく、木そのものが生物たちの生息場所にもなっている。このように、1 本のイチジクの木によって様々な生物たち

が繋がり、大きなネットワークができ、複雑な生態系が形成されている。この生態系の中にいる生物たちは互いに適応し、競争・共生・寄生など様々な関係を維持しながら多様化（進化）している。

(2) イチジク属植物ともっとも密接な関係を有しているのはイチジクコバチという体長1~2mm程度の小さいコバチの一群である。イチジクコバチ無くしては、上述したイチジク属植物を中心とした生態系が崩壊してしまうのはもちろん、イチジク属植物は子孫を残すことさえできない。何故なのか、簡単に説明してみたい。イチジク属植物はイチジク状花序（隠頭花序）と呼ばれる花囊の内壁に小さい花をたくさん咲かせるが、外からそれを見ることはできない。また、花囊はほぼ閉鎖状態であり、先端部にある小さな開口部もたくさんの鱗片に覆われているため、花粉が自然に花囊を出入りすることはできない。そこで、イチジク属植物はイチジクコバチの力を借りて花粉を運ぶという特殊な受粉システムを発達させた。この受粉システムは、イチジクコバチにも利益を与えている。花粉運搬の一方、イチジクコバチは花囊に産卵し、幼虫は子房の一部を食べて育つ。両者の間には、子孫を残すという共通利益のもとで、切っても切れない相利共生関係が築かれたのである。さらに興味深いのは、この共生関係は極めて種特異的で「1種対1種」であると言われている。つまり、1種のイチジク属植物にただ1種のイチジクコバチが特異的にその花囊に入り送粉する（送粉コバチと言う）。ところが、殆どのイチジク属の種の花囊には、送粉コバチのほかに、産卵だけをして花粉を運ばない一群のコバチが見つかる。これらは非送粉コバチと呼ばれる。非送粉コバチの方は、1種のイチジク属植物に1種のこともあるが、多種寄生していることも少なくない。

(3) イチジク属植物と送粉コバチとの「1種対1種」の関係から、両者間の「共進化 (coevolution)」説と「協調的種分化 (cospeciation)」説が提唱され、これまで多くの研究がなされてきた。近年、分子系統解析手法の進歩で生物の系統関係を解明することは比較的容易になった。そこで植物とコバチの系統関係を比較することによって共進化と協調的種分化を明快に検証することができると考えられ、最近アフリカ産を中心に分子系統解析の研究が盛んに行われるようになった。これまでの報告を総合すると、イチジク属植物のセクション（亜属と種間の分類単位）と送粉コバチの属は、系統樹上大まかに対応することが示唆され、一応共進化と協

調的種分化説を支持している。しかし、植物のセクション間と各セクション内部の種間の関係、それから、コバチの属間と各属内の種間の関係は、まだほとんど明らかになっていない。また、これまで報告された系統解析において、2つ大きな問題点があると私たちは考えている。(1) イチジク属の各種がそれぞれ広い分布域を持っており、日本産の大部分の種も中国、東南アジア、オーストラリアまで広く分布している。これほど広い分布域をもつ生物種の系統関係を調べるには、分布域を網羅する複数地点からの材料を分析する必要がある。特に近縁種間の系統関係を解析する場合、1サンプルだけで種の系統的位置を決めるのはかなり危険で、異なった結論に導く可能性がある。また、「1種対1種」の関係を検証するためには、分布域を網羅する複数地点からの送粉コバチの材料を分析するのはなおさら重要である。しかし、これまでの報告を見ると、殆どの系統解析では1種ごとに1サンプルしか用いていない。(2) 系統解析の信頼度である。イチジク属植物の系統解析は殆ど核 ITS 配列を使っているが、解析精度が低い。結局、形態形質を加えて、分子情報と形態形質を結合した解析を行っている。コバチの系統解析も同様である。しかし、全く進化原理の異なる情報を混ぜて正しい系統樹ができるだろうかという疑問が生じる。イチジクコバチの系統解析にも同様な問題がある。

2. 研究の目的

上に述べた問題点を考慮したうえで、本研究は複数の分子情報を用いて、信頼度の高いイチジク属植物とイチジクコバチの系統樹を作成し、「1種対1種」関係、共進化説と同調的種分化説を徹底的に検証する。「1種対1種」の関係がどれほど厳密なのかを検証するには、日本産のイチジク属が格好な材料となる。南西諸島は多くの小さい島々によって構成されているからである。イチジクコバチはこれらの島々を越えるほどの飛翔力がないと思われ、イチジク属植物が島から島へと分布を拡大したときに（例えば、鳥などによる種子の散布）イチジクコバチがついていけず、別のコバチが送粉するようになる可能性が考えられる。もしそうなると、送粉コバチの宿主転換が起き、「1種対1種」のルールが崩壊するだろう。これまでの予備実験で、メキシコ産のイチジクコバチの分子系統を調べたところ、1種のイチジク属植物から得られた送粉コバチが独立した複数の系統に分かれたり、異なる種のイチジク属植物の送粉コバチが分子系統樹上、区別付かないほど近縁だったりして、「1種対

1種」ではないことを強く示唆した。本研究は日本産のイチジク属各種とその送粉コバチについて、それらの分布域を網羅する種内の遺伝的変異（植物とコバチ両方を含む）を厳密に調べ、予備実験で得られた知見を確認すると共に、「1種対1種」関係を検証する。それから、高次分類群間の系統関係を含むイチジク属の系統関係とそれらの送粉コバチの系統関係を解明し、両者の種分化の関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 研究材料の収集：各地域にあるイチジク属各種の木から花嚢を採集し、その花嚢の中から出てきたコバチを集めてアルコールに保存した。コバチを採集した木から葉のサンプルも同時に採集し、葉をハサミで細かく（約5mm程度の四方形）切り、小さいビニル袋に入れて、シリカゲルで乾燥させた後、DNA解析に用いた。また、植物のサンプルの同定のために、乾燥標本も作製した。最終的に、我々は15種のイチジク属植物から130サンプルを集めることができ、そのうちの12種からイチジク送粉コバチを採集することができた。

(2) DNA抽出、PCR、塩基配列の決定：植物のDNA解析に関しては、上記のようにシリカゲルで乾燥させた葉（約5mm程度の四方形）を2、3枚用いてDNAの抽出を行った。その後、この全DNAを鋳型にして複数のPCRプライマーセットを用いて、葉緑体DNAの6つのイントロン部分の断片並びに核ITS領域を増幅した。増幅した葉緑体DNAの断片は精製後、そのまま塩基配列の決定に用いたが、ITS領域は核ゲノム上に、複数コピーがあるので、クローニングして、1サンプルに対して5-10クローンを取って塩基配列の決定を行った。

コバチのDNA解析については、コバチは体長1-2mm程度しかない小型昆虫なので、DNA抽出には全個体を使用した。全個体を使うと、サンプルがなくなるため、再同定が必要になった場合を備えて、コバチの個体を潰す前に、個体全体と種の同定に重要な部分（触角、頭部、胸部、脚、尾部、産卵管、羽）の顕微鏡写真撮影を行った。得られた全DNAを鋳型にして、PCR法によってミトコンドリアCOI遺伝子と核28S rRNA遺伝子の増幅を行い、塩基配列を決定した。

(3) 系統解析：系統解析は研究を進める過程で、その都度行っていた。塩基配列のアライメントはMAFFTを使用した。系統解析は現在広く認められている最尤法（ML）、近隣結合法（NJ）と最大節約法を用いて、XCED、MOLPHY、或いはPAUPといった系統解析のソフトウェア

ア上で行った。

4. 研究成果

(1) 日本産イチジク属植物の系統関係：ITSの配列にはクローン間の違いが多少見られるが、種間関係を越えるほどのものではなく、各種が綺麗にまとまった（図1）。但し、小笠原諸島固有種のトキワイヌビワ *Ficus boninshimae* とオオトキワイヌビワ *F. nishimurae* および本州と南西諸島に分布するイヌビワ *F. erecta* の3種の間には、有意な違いが見られなかった。葉緑体DNAにおいても3種は全く同じ配列を示した。この結果から、これら3種は非常に近縁であることが示唆された。また、ヒメイタビ *F. thunbergii*

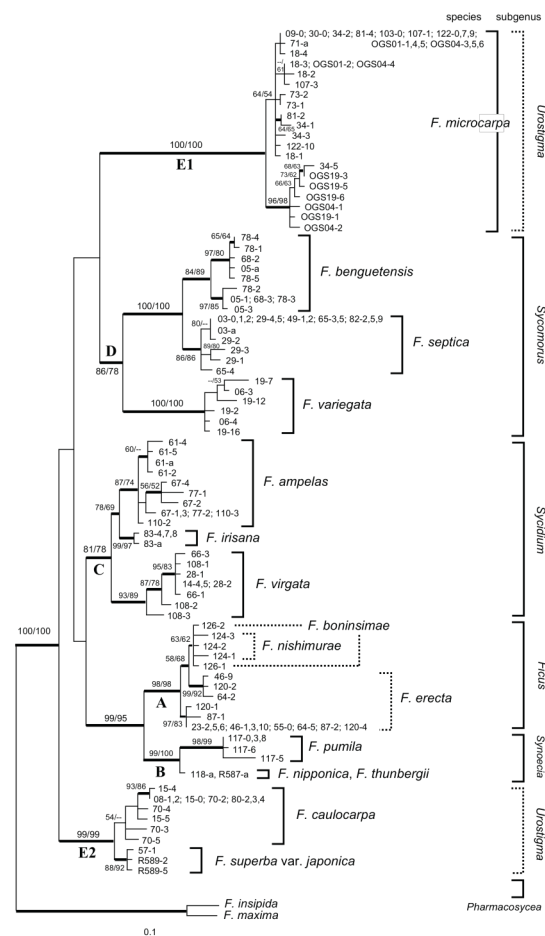


図1. ITSによる日本産イチジク属の系統樹。

とイタビカズラ *F. nipponica* 両種は、葉緑体DNAにおいても、ITS配列においても、同じ配列であり、この2種も極めて近縁であることが判明した。ITSの系統樹では、ガジュマル *F. microcarpa* とアコウ *F. superba* はそれぞれ独立した系統を形成したが、他の種類は3つのグループに綺麗にまとまり、グループ内の種間関係も明らかとなった。葉緑体DNAの

系統樹は、近縁種間の関係はあまり明瞭ではなかったが、上位群の系統関係は綺麗に判明した。特に雌雄同株のアコウとガジュマルはクラスターを形成することが分かった。

(2) 日本産イチジク属送粉コバチの系統関係：コバチの系統解析は、核 28S rRNA 遺伝子とミトコンドリア COI 遺伝子を用いて行った。両遺伝子の系統樹において共通して3つのグループが認められた。それは以下の通りである。①ガジュマルコバチ *Eupristina verticillata*/アコウコバチ *Platyscapa* sp. 1/オオバアコウコバチ *Platyscapa* sp. 2；②オオバイヌビワコバチ *Ceratosolen bisulcatus*/アカメイヌビワコバチ *C. cornutus*/ギランイヌビワコバチ *C. appendiculatus*；③ホソバムクイヌビワコバチ *Kradibia sumatrana*/ムクイヌビワコバチ *K. commuta*/ハマイヌビワコバチ *Liporrhopalum philippinensis*。これら3グループ内部の関係も一致していた。しかし、グループ間の系統関係は、どちらにおいても高い支持率が得られず、解明には至らなかった。これら上位群の関係を解明するためには他の遺伝子を使用する必要がある、今後の課題である(図2)。

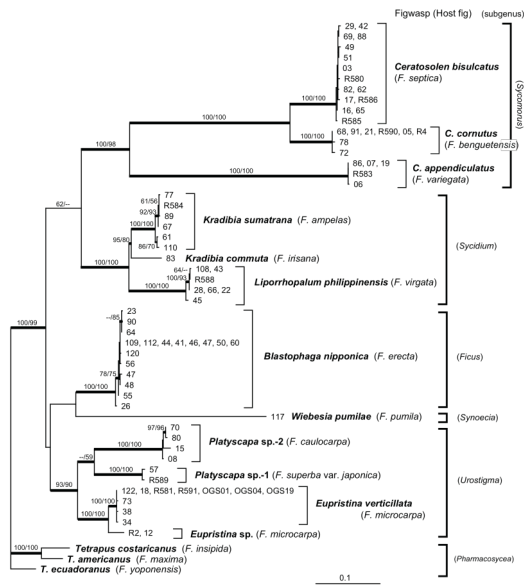


図2. ミトコンドリア COI 遺伝子による日本産イチジク属送粉コバチの系統樹。

(3) 「1種対1種」関係の厳密性と協調的種分化：本研究の結果によると、同種のイチジク属植物から採集された送粉コバチは、系統樹上乱れることなく、同じ配列を示すか、僅かな違いがあるにしても綺麗にまとまっていた。このことから、日本産イチジク属植物と送粉コバチの「1種対1種」関係は極めて厳

密に維持していることが判明した。また、植物とコバチの系統関係を比較すると、解明された部分は基本的に一致していることも判明し、協調的種分化を示唆した(図3)。しかし、

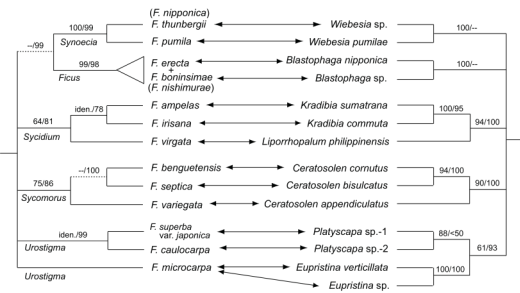


図3. 日本産イチジク属植物とその送粉コバチとの協調的種分化。

なぜメキシコ産のイチジク属植物とイチジクコバチの「1種対1種」関係が乱れているのか？興味深い問題である。ここでは1つのヒントを提示しておきたい。メキシコ産のイチジク属はすべて雌雄同株の種ばかりである。これに対して、日本産のイチジク属はアコウ、オオバアコウとガジュマルを除いて、全部雌雄異株の種である。雌雄同株の種の花柱の長さには相当のバリエーションがあると指摘されている。これは異なる種のコバチが花囊に入ってきて産卵できる可能性を示している。つまり、雌雄異株と比べ、雌雄同株の種はより柔軟にコバチを受け入れることが可能かもしれない。更なる研究を期待したい。

(4) 種内の地域的変異：南西諸島の島々を含め、多くの地域から採集したサンプルを解析したが、イチジク属植物とその送粉コバチのいずれに置いても種内の地域的変異は全く見られなかった。植物の葉緑体 DNA の場合、イヌビワ、アカメイヌビワとオオイタビ3種は僅かな個体変異を示したが、他の種類はすべてのサンプルで全く同じ配列であった。送粉コバチの28S rDNAを見ると、オオバアコウコバチとガジュマルコバチのほか、すべての種類に置いて塩基配列の違いは見られなかった。これらの結果から、日本産イチジク属植物とその送粉コバチの種内の遺伝的変異は極めて低いことが分かった。島々による隔離があるにもかかわらず、遺伝的変異が蓄積されていないことは、2つのことを示唆している。①日本列島へのイチジク属植物の進入が新しい；②送粉コバチは広い範囲にわたって分散し遺伝的交流が起きている。これを解明するには集団遺伝学的な解析が必要である。

(5) 小笠原諸島の固有種の起源と移入種：前にも述べたように、小笠原諸島には固有種3種(トキワイヌビワ、オオトキワイヌビワ

とオオヤマイチジク)と移入種1種(ガジュマル)が分布している。オオヤマイチジクを除いた他の3種の材料は採集することができた。解析の結果によると、トキワイヌビワとオオトキワイヌビワは全く区別がつかないほど近縁なものであり、それらの送粉コバチも同様差異はなかった。また、これら2種は、植物も送粉コバチも、それぞれ本州と南西諸島に広く分布しているイヌビワおよびその送粉コバチと近縁であることが分かった。以上のことから、小笠原諸島の固有種3種は、南西諸島(或いは本州)から進入したイヌビワが島内で種分化したものであると考えられる。但し、トキワイヌビワとオオトキワイヌビワは本当に2種にすべきか、再検討する必要がある。

移入種のガジュマルは明治初期に防風林として移入・栽培されたものである。長い間、結実していなかったが、近年実が付くようになったと言われている。換言すれば、ガジュマルは近年になってようやく受粉できるようになったことである。その送粉コバチの正体は興味深い。トキワイヌビワなど3固有種の送粉コバチがガジュマルにも送粉するようになったのか(宿主の転換)、或いは本来のガジュマルコバチが近年移入されたのかを調べたところ、小笠原のガジュマルコバチは南西諸島のものと同じであることが分かった。つまり、もし起きていれば面白いと思った宿主転換ではなく、ガジュマルコバチが近年になって移入されたと思われる。この事実からも、イチジクとイチジクコバチの「1種対1種」関係は非常に堅いものであるとわかる。

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 件)

- ① Azuma H., Harrison R.D., Nakamura K., Su Z.-H. Molecular phylogenetic analyses of figs and fig-pollinating wasps in the Ryukyu and Bonin (Ogasawara) islands, Japan. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2009, 査読有 (submitted).
- ② Su, Z.-H., Iino, H., Nakamura, K., Serrato-Diaz, A., Oyama, K. Breakdown of the one-to-one rule in Mexican fig-wasp associations inferred by molecular phylogenetic analysis. *Symbiosis*, 45: 73-81, 2008, 査読有.
- ③ Sasaki G., Katoh K., Hirose N., Suga H., Kuma K., Miyata T., Su Z.-H. Multiple

receptor-like kinase cDNAs from liverwort *Marchantia polymorpha* and two charophycean green algae, *Closterium ehrenbergii* and *Nitella axillaris*: Extensive gene duplications and gene shufflings in the early evolution of streptophytes. *Gene*, 401: 135-144, 2007, 査読有.

④ 蘇 智慧 分子系統からみたイチジク属とその送粉コバチの平行進化. 昆虫 DNA 研究会ニューズレター, No. 7: 8-9, 2007, 査読無.

[学会発表] (計 4 件)

- ① Su Z.-H., Iino H., Nakamura K., Serrato A., Oyama K. Breakdown of the one-to-one rule in Mexican fig-wasp associations inferred by molecular phylogenetic analysis. International Symposium On Fig and Fig-Wasp Biodiversity, 2008.09.04-06 (Taipei, Taiwan).
- ② Azuma H., Nakamura K., Su Z.-H. Molecular phylogenetic analyses of figs and fig-pollinating wasps in the Ryukyu and Bonin (Ogasawara) islands, Japan. International Symposium On Fig and Fig-Wasp Biodiversity, 2008.09.04-06 (Taipei, Taiwan).
- ③ 蘇 智慧, 東 浩司 イチジク属送粉コバチの宿主転換の可能性について. 日本進化学会第10回大会, 2008.08.22-24 (東京大学・東京)
- ④ 蘇 智慧 分子系統からみたイチジク属とその送粉コバチの平行進化. 昆虫 DNA 研究会第4回研究集会 2007.05.03 (信州大学・松本)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

○取得状況 (計 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.brh.co.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蘇 智慧 (SU ZHI-HUI)

株式会社生命誌研究館・研究部門・研究員
研究者番号: 40396221

(2) 研究分担者

東 浩司 (AZUMA HIROSHI)
京都大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：50362439

(3) 連携研究者
()

研究者番号：