

平成21年6月8日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19770014

研究課題名（和文） 生殖隔離形質の種間差に関するゲノム領域の探索

研究課題名（英文） Analyses of genome regions for reproductive isolation traits

研究代表者

高見 泰興（TAKAMI YASUOKI）

神戸大学・大学院人間発達環境学研究科・准教授

研究者番号：60432358

研究成果の概要： 昆虫の近縁種間に生殖隔離をもたらすことが知られている交尾器形態の多様性について、オオオサムシ類を材料として、形態の違いをもたらしているゲノム領域の探索と、その背景にある進化機構の解明を目指して研究を行った。その結果、交尾器形態の種間差は比較的少数の遺伝子座によって支配されている；交尾器形態の差異は種間の遺伝子流動を制限する要因となる；交尾器形態の急速な多様化は性淘汰によることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目： 基礎生物学・生態・環境

キーワード： 進化生態，QTL解析，性淘汰，種分化，オサムシ

1. 研究開始当初の背景

地球上に見られる生物多様性は、祖先種が種分化を繰り返すことで生み出された。すなわち、生物多様性の起源は、種分化のしくみを解明することによってはじめて理解される。

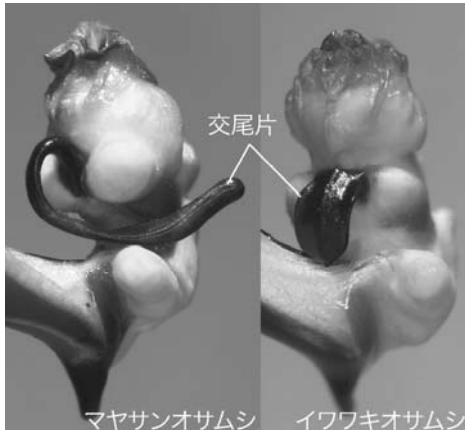
種分化はしばしば、集団間の交配可能性を決める鍵形質の進化によって引き起こされる。鍵形質には、動物では雄の装飾や鳴声と、それに対する雌の選好性などがあり、植物では花の色や形態と、それに対する送粉者の選好性などが知られている。そして、それらの

進化には自然淘汰や性淘汰が関与していることが、多くの研究例で実証されている。一方、鍵形質の遺伝的背景の解明については、野生生物における研究はまだ緒に付いたばかりである。種分化や適応放散といった、進化生物学における興味深い現象を理解する上で、鍵形質の遺伝的背景の解明は必須の研究課題である。

ゲノム研究時代の幕開けと共に、野生生物の生殖隔離に関与する遺伝子の探索は、多くの材料について同時並行的に進められつつある。先駆的な研究としては、植物、魚類、

昆虫などがあるが、限られた生物群でのみ結果が得られているのが現状である。野生生物において形質の遺伝的背景の解明が遅れている主な原因は、実験交配の困難さにある。しかし、近年の解析手法の発展は、野外における自然交雑帯集団を直接解析することを可能としており、実験交配の困難は克服されつつある。さらに、自然交雑帯を解析することにより、野外で実際に働いている自然淘汰と生殖隔離の実態を把握することが可能になるという利点がある。

昆虫類における種分化の鍵形質として、交尾器の形態がある。「錠と鍵」という言葉で例えられるように、雌雄の交尾器形態は種特異的な対応を示すことが多い。種特異的な交尾器形態が、生殖隔離機構として働くことが実験的に示されている生物として、オサムシ類がある（甲虫目オサムシ科オサムシ属）。マヤサンオサムシとイワキオサムシは、雄交尾器にある「交尾片（下図）」と、交尾片



の受容器である雌の「膈盲囊」の形態が異なるため、種間交尾が妨げられる。しかし、一度交尾が成立すると、妊性のある子孫を残す。両種は野外で側所的に分布し、幅の狭い交雑帯を形成している。よって、両種は交尾器形態の不一致によって、生殖的に隔離されていると考えられる。しかし、野外の自然交雑帯において、このような仕組みがどれほど機能しているかは不明である。オサムシ類は、種分化や種間交雑に関する知見が数多く蓄積されており、生殖隔離機構の遺伝的背景の解明を目指す本研究にとって、最適な材料である。

2. 研究の目的

本研究は、野生生物において、生殖隔離を支配する鍵形質の遺伝的、進化的背景を解明することを目的とする。生殖隔離形質であるオオオサムシ類の交尾器形態に注目し、以下の点について明らかにする。

(1) 自然交雑帯で生じる交尾器形態への自然淘汰を測定し、自然条件下で、交尾器形態が生殖隔離機構としてどのように働いているかを解明する。

(2) 自然交雑帯によって生じるモザイク状のゲノム構成を、分子遺伝マーカーを用いて解析し、雌雄の交尾器形態に種間差をもたらす遺伝子がゲノム上にどのように配置しているかを解明する。

(3) 交尾器形態の種間差をもたらす進化的要因について、種内で生じる性淘汰に注目し、分子遺伝マーカーを用いた配偶様式の解析と分子系統樹を用いた種間比較解析によってその実態を解明する。

3. 研究の方法

(1) 中部山岳地帯を挟んで側所的に分布し、交雑帯を形成するヤマトオサムシとクロオサムシについて、両者の間の生殖隔離とそのメカニズムを明らかにするため、交雑実験を行った。実験には、越冬前の未交尾個体を利用し、正逆各 10 ペアとコントロールとなる同種核 10 ペアを 1 ヶ月間自由に交配させ、雌の生存、産卵率、ふ化率、性比などを測定した。

クロオサムシからヤマトオサムシへの一方向的なミトコンドリアの浸透が観察されているため、両者の間の生殖隔離は非対称であるという仮説を立て、生殖隔離指数を算出する事によりこれを検証した。

(2) 三重県鈴鹿市にあるマヤサンオサムシとイワキオサムシの自然交雑帯の周辺地点において、ピットフォールとラップによる採集調査を行った。得られたサンプルは個体ごとに -20°C で冷凍保存し、後の解析に備えた。サンプルは適宜解凍し、DNA 抽出用の組織を 99%エタノールに保存後、交尾器を解剖し、交尾片と膈盲囊の長さを測定した。残りの外骨格はピン刺しにして乾燥標本とし、体長を測定した。

エタノールづけ組織から DNA を抽出し、マイクロサテライトと AFLP 遺伝子座（マーカー遺伝子座）のジェノタイプングを行った。形態とマーカー遺伝子座のデータを地図上に投影し、交雑帯における移行状態（クライン）を Tension zone model に基づいて解析した。交尾器形態の種間差に関与する遺伝子座の近傍にあるマーカー遺伝子座のクラインは、交尾器形態のクラインと位置や幅が良く一致すると期待される。また、これらのクラインはそれ以外の形質や遺伝子座に比べ、交雑帯でより強い負の自然淘汰を受けるので、クラインの幅はより狭くなると期待される。このような条件を元にマーカー遺伝子座

を絞り込み、雌雄の交尾器形態の種間差をもたらすゲノム領域の特定を目指した。

上の作業と並行して、マヤサンオサムシとイワキオサムシの交雑実験を実施し、F1世代と戻し交雑 B1 世代のサンプルを得た。これらを元に、量的遺伝学的手法に基づく遺伝モデルの特定 (Joint-scaling test) と遺伝子座数の推定 (Castle-Wright-Lande analysis) を行った。

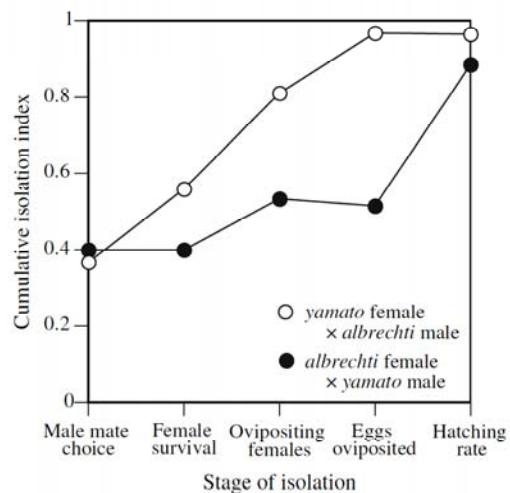
(3) 交尾片が (種間交雑ではなく) 種内の交尾においてどのような機能を果たしているのかを明らかにするため、アオオサムシを用いた連続交尾実験を行った。交尾後に雌を解剖して精包をとりだし、マイクロサテライトを用いてその「送り主」の雄を特定した。さらに、交尾後の雌に産卵させ、得られた幼虫の父性をマイクロサテライトで特定した。これらを通じて、交配後に生じる性淘汰 (精子競争) のメカニズムを解明しようと試みた。性淘汰が交尾器形態の多様化をもたらしているならば、交尾行動に関する形質の間で関連した進化が生じているだろうと期待される。そこで、オオオサムシ亜属 15 種と形態分化の著しい亜種を含む全 22 分類群について、交尾片の長さ、精巣サイズ、精包サイズ、交尾時間、交尾後ガード時間を測定し、それらの間の相関関係を検討した。種間比較の基礎となる系統樹は、5 つの核遺伝子座に基づく分子系統樹を作成して用いた。さらに、12 分類群については精子と精子束のサイズについても測定し、比較を行った。

交尾片が進化した初期の状態を知るために、交尾片をもたないクロナガオサムシの交尾行動を解析した。上のアオオサムシの場合と同様に連続交尾実験を行い、精包の送り主をマイクロサテライトで判別した。さらに、雌の生理的反応が、2 番目の雄の交尾成功におよぼす影響に注目し、未交尾雌への精液物質の注射とメスの交尾拒否行動、雄の交尾成功との関連を検討した。

4. 研究成果

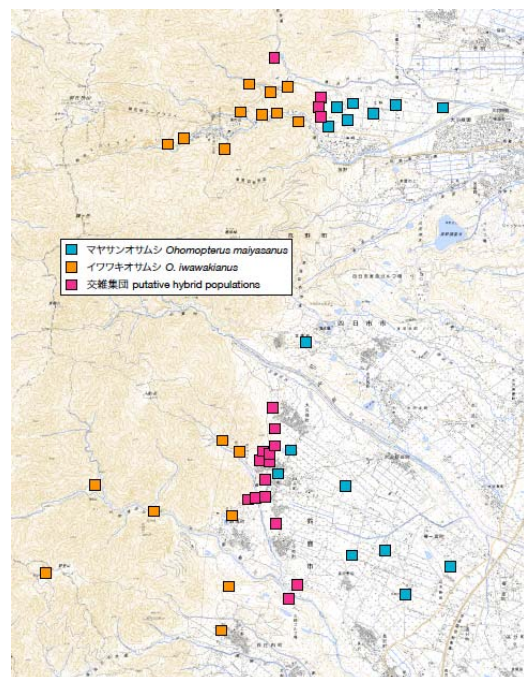
(1) ヤマトオサムシとクロオサムシの雄は、配偶者選好実験においてそれぞれ 70% 程度の率で自種の雌を選択したが、期待される非対称性は検出されなかった。一方、交配後隔離については、雌の産卵率がヤマト雌×クロ雄の時に著しく低下し、これは予測される非対称性と合致していた。しかし、ふ化率は逆の方向性を示したため、総生殖隔離指数はどちらの方向も 0.9 前後となり、非対称性は見いだせなかった (右上図)。

以上の結果から、まず両種間の生殖隔離指数は 0.9 程度と高いが完全 (=1.0) ではない事が明らかになった。このような隔離の程



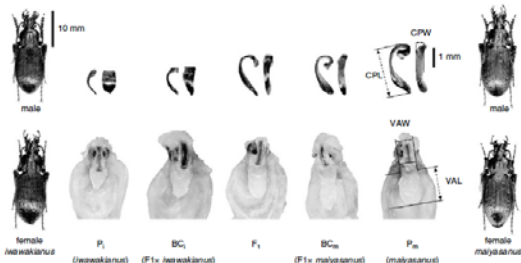
度は、交雑はするものの種の融合には至らず、側所的分布を維持する要因となっていると考えられる。また、生殖隔離指数の非対称性が確認された雌の産卵率は、雌雄交尾器の不一致によって雌が傷つく事によって低下すると考えられ、交尾器形態が種間の生殖隔離をもたらす重要な要因である事が示唆された。さらに、雌が別種の雄と多回交尾する状況を考えると、雌交尾器の損傷はより著しくなる一方、ふ化率の低下は必ずしも悪化しないと考えられる。よって、実際の野外では多回交尾を通じて生殖隔離の非対称性が生じている可能性がある事を指摘した (雑誌論文 2)。

(2) マヤサンオサムシとイワキオサムシの交雑帯周辺の 60 地点から、総計 1642 個体のサンプルを得た。形態解析の結果、交雑帯の空間配置が明らかになった (下図)。DNA 解析を逐次進めていたが、研究計画 2 年度目に



研究代表者が移動となり、研究環境が変化したために解析完了までには至らず、今後課題を残した。今後も順次解析を進めてなるべく早い時期に計画を完了したいと考えている（学会発表2）。

マヤサンオサムシとイワキオサムシの実験交配から得られた交雑世代を用いて、量的遺伝解析を行った（下図）。

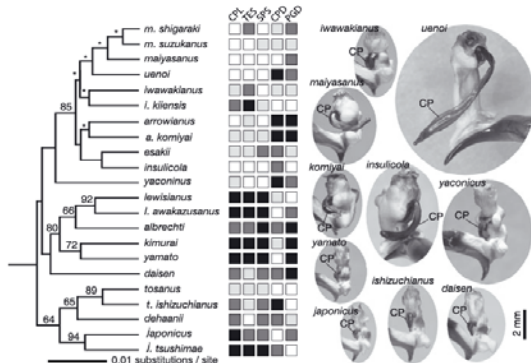


Joint-scaling-test によると、雌雄交尾器形態は共に量的遺伝形質である事が判明し、種間差の90%以上が相加遺伝効果によって説明できる事が明らかとなった。これは、次に行う遺伝子座数の推定の仮定がよく満たされることを示す結果であった。

Castle-Wright-Lande 法による遺伝子座数の推定では、交尾片長には約4つ、膈盲嚢長には約2つの遺伝子座が関与している事が判明し、比較的少数の遺伝子における変化が交尾器形態の多様性を生み出している事が明らかとなった（雑誌論文3）。

(3) アオオサムシを用いた連続交尾実験の結果、最初に交尾した雄の精包は、次に交尾した雄によって除去され、置きかえられる事が明らかとなった。また、この「精包置換」は父性の獲得にも有利であった。ライバル雄の精包を操作できる器官は、解剖学的見地から交尾片以外には考えにくいから、交尾片は種内の精子競争における父性の獲得を有利にするための道具として進化したと考えられた（雑誌論文5）。

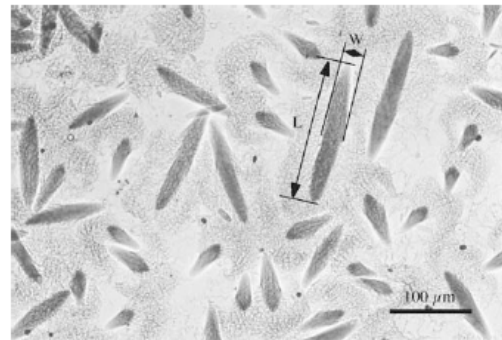
オオオサムシ亜属各種の交尾器形態と交尾行動を分子系統樹上で比較した結果（下図）、交尾器形態は体長などに比べて約3倍の率で進化している事が判明した。また、交尾片の長さや精包の大きさは正に相関していた。これはライバル雄による雌の防御のた



めの「交尾栓」としての精包と、それを操作するための攻撃手段としての交尾片の間で生じた拮抗的共進化の結果であると考えられた。

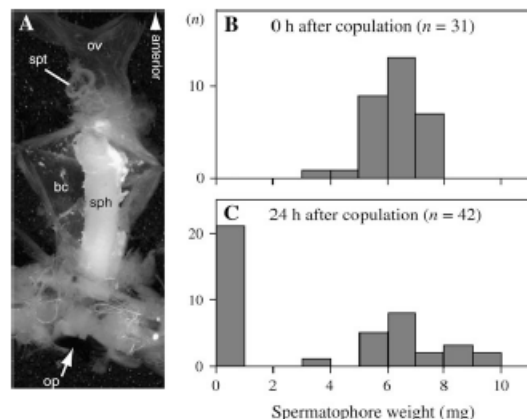
また、交尾片の長さは交尾時間や交尾後ガード時間と負に相関していた。これは長時間交尾をして防御を専門にする戦略と、短時間交尾で精包置換を専門にする戦略への分化が、交尾片の多様化をもたらした背景である事を示唆するものである（雑誌論文4, 学会発表3, 4, 5）。

精子と精子束のサイズを種間で比較したところ、オオオサムシ類の精子束には個体内で二型があることと（下図）、大型精子束は



交尾片の長さやと相関して進化している事が明らかとなった。これは、精包置換の激しい種において、より大きな精子束が（例えば遊泳速度などの点で）有利である事を示唆するものである（雑誌論文6）。

クロナガオサムシを用いた連続交尾実験の結果、本種の雄は交尾片をもたないため、2番目に交尾しようとする雄は高い確率で失敗する事が明らかになった。その要因としては、オオオサムシ亜属に比べて非常に大きな精包を形成するため、これが強力な交尾栓として働くことが明らかになった。しかし、精包は交尾後24時間以内に雌によって排出されてしまうことも同時に観察された（下図）。



興味深い事に、精包を排出した雌は高い率で交尾拒否行動を示すようになり、これが原因で2番目の雄は交尾に失敗していた。また、注射実験によって、メスの交尾拒否行動は、雄の精液物質によって誘導される事も明らか

かとなった。つまり、交尾片が進化する前段階における雄の配偶戦略は、交尾栓と雌の生理的操作という2重のしくみによって雌の再交尾を防ぐ、きわめて防御的な戦略であった事が明らかとなった(雑誌論文1, 学会発表1)。

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6件)

- ① Takami, Y., Sasabe, M., Nagata, N. and Sota, T. 2008. Dual function of seminal substances for mate guarding in a ground beetle. *Behavioral Ecology*, 19: 1173-1178. 査読あり
- ② Takami, Y., Nagata, N., Sasabe, M. and Sota, T. 2007. Asymmetry in reproductive isolation and its effect on directional mitochondrial introgression between the parapatric ground beetles *Carabus yamato* and *C. albrechti*. *Population Ecology*, 49: 337-346. 査読あり
- ③ Sasabe, M., Takami, Y. and Sota, T. 2007. The genetic basis of interspecific differences in genital morphology of closely related carabid beetles. *Heredity*, 98: 385-391. 査読あり
- ④ Takami, Y. and Sota, T. 2007. Rapid diversification of male genitalia and mating strategies in *Ohomopterus* ground beetles. *Journal of Evolutionary Biology*, 20: 1385-1395. 査読あり
- ⑤ Takami, Y. 2007. Spermatophore displacement and male fertilization success in the ground beetle *Carabus insulicola*. *Behavioral Ecology*, 18: 628-634. 査読あり
- ⑥ Takami, Y. and Sota, T. 2007. Sperm competition promotes diversity of sperm bundles in *Ohomopterus* ground beetles. *Naturwissenschaften*, 94: 543-550. 査読あり

[学会発表] (計5件)

- ① 高見泰興. 性的対立が精液物質の複雑な機能を進化させる. 日本進化学会第10回大会. 2008.8.26-29. 東京.
- ② Takami, Y., Sasabe, M. and Sota, T. Genomic Analyses of Reproductive Isolation Traits. The 1st International Symposium of the Global COE project "from Genome to Ecosystem". 2008.3.19-20. Kyoto.

③ 高見泰興. オサムシの交尾行動: 攻めと守りの多様性. 日本生態学会第55回大会シンポジウム. 2008.3.14-17. 福岡.

④ 高見泰興, 曾田貞滋. 性淘汰による交尾器形態の多様化は種分化を促進する. 日本進化学会第9回大会. 2007.8.31-9.2. 京都.

⑤ Takami, Y. and Sota, T. Rapid diversification of male genitalia and mating strategies in *Ohomopterus* ground beetles. Society for the Study of Evolution, Evolution 2007 Joint Meeting. 2007.6.16-20. Christchurch.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高見 泰興 (TAKAMI YASUOKI)

神戸大学・大学院人間発達環境学研究科・准教授

研究者番号: 60432358