

機関番号：17101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770024

研究課題名 (和文) ササラダニ類の性に関する研究—樹上と土壌の比較によるアプローチ—

研究課題名 (英文) Sex of oribatid mites (Acari: Oribatida) - approach to comparison between arboreal and soil habitats-

研究代表者

唐澤 重考 (KARASAWA SHIGENORI)

福岡教育大学・教育学部・准教授

研究者番号：30448592

研究成果の概要 (和文)：ササラダニ類において、証拠標本を保存したまま DNA を抽出する方法を確立した。また、土壌性種と樹上性種を含む系統樹を作成し、ササラダニ類は樹上環境に複数回進化したこと、および、土壌環境において、複数回単為生殖が進化したことを明らかにした。さらに、落葉分解初期段階には、単為生殖種が優占する傾向にあること、および、針葉樹の懸垂土壌には単為生殖種が生息可能であることも明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：A method of extracting DNA from oribatid mites that preserved the voucher specimen was established. Moreover, phylogenetic tree including arboreal and soil-living species suggests that arboreal life have evolved many times independently, and parthenogenesis have evolved many times in the soil environment. In addition, this study finds that parthenogenetic species tend to become dominant in early stage of leaf decomposition, and parthenogenetic species is able to live in suspended soils existing at arboreal habitats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：ササラダニ類, 土壌動物, 進化生態

1. 研究開始当初の背景

ササラダニ類は土壌生息性のダニ類で、腐植や微生物を摂食することで有機物分解・物質循環に影響を及ぼしている。また、環境の変化に敏感に反応し群集構造を変化させることから、これまで、林学的研究や指標生物

としての利用など応用生態学的な研究が盛んに行われてきた。一方、記載種は約1万種、実際には10万種程度とされるササラダニ類は、全種の約10%が単為生殖種であると推定され、その割合は他の動物の10～100倍以上高く、性の進化を考える上で非常

に興味深い動物である。また、ササラダニ類は土壌だけでなく樹上環境にも豊富に生息しているが、樹上と土壌では生息する種類相が大きく異なり、土壌には単為生殖種が多いのに対し、樹上には有性生殖種しかいないことが示唆されている。

したがって、土壌性と樹上性の種の特徴をより詳細に比較することで、性の進化に関する新しい知見が得られると期待される。

2. 研究の目的

これらを踏まえ、以下の3つを明らかにすることを目的として研究を行った。

(1) 近年、ササラダニ類において、DNAを用いた研究が頻繁に行われるようになった。しかし、体長が1 mm以下の動物であるササラダニ類では、大型昆虫などで行われるように脚などの付属肢からDNAを抽出するのは困難であり、多くの場合、1個体丸ごと潰してDNAの抽出を行っている。この方法では、種同定の証拠標本が保存できないため誤同定の可能性が残る。そこで、本研究では、証拠標本を残したままDNA抽出する方法を確立する。その後、本方法を用いて、土壌、および、樹上環境に生息するササラダニ類からDNAを抽出し系統樹を作成し、樹上性ササラダニ類が多系統群であり、それらの特性が収斂進化したこと、および、土壌性ササラダニ類の単為生殖もまた多系統群であり、土壌環境において何度も進化したことを明らかにする。

(2) 理論的には、単為生殖は両性生殖種と比べ、繁殖のコストが半分となり、短期的な時間スケールでは個体数を維持する上で適応的であり、新しく創出された環境では有利な戦略となりえる。一方、単為生殖は、遺伝的多様性を増加させることができないため、長期的な時間スケールでは非適応的であり、進化の歴史のなかで絶滅すると考えられている。これらを踏まえ、土壌において、ササラダニ類の単為生殖が何度も進化している仮説として、「常に新しく創出される新鮮落葉に生育する上で、単為生殖は適応的である」を考え、リターバック法による野外操作実験を行い、本仮説の検証を行う。

(3) 樹上環境において、腐植質のたまった環境が存在し、それらは懸垂土壌と呼ばれる。このような環境には、樹上環境に多い両性生殖種が生息するのか、それとも土壌環境に多い単為生殖種が多いのかは不明である。樹上環境にある土壌環境において、どちらの繁殖様式をもつ種が生息しているのかを明らかにすることは、生息環境と繁殖様式の間を調べる上で極めて有用な情報となる。針葉樹

であるスギは、枝葉が枯死した後も長期間、樹上環境に維持され懸垂土壌を形成する。これらを踏まえ、懸垂土壌のない広葉樹（スダジイ、アラカシ）と懸垂土壌の豊富な針葉樹（スギ）の樹上環境に生息するササラダニ類の繁殖様式を比較し、懸垂土壌に生息するササラダニ類の繁殖様式を解明する。

3. 研究の方法

(1) 系統学的に大きく異なる3種（*Atropacarus striculus*, *Heminothrus peltifer*, *Protoribates* sp.）を対象とし、DNA抽出に際して3処理（非破壊、体の一部を破壊、および、全体をすり潰す）を行い、それぞれから市販のDNA抽出キットを用いてDNA抽出を行った。DNA抽出後、非破壊と一部破壊については、標本を取り出し、プレパラート標本を作成した。抽出したDNAは、PCRを行った後、電気泳動によるバンド観察、および、塩基配列の決定を行った。DNA抽出による同定表徴に及ぼす影響を調べるため、DNA抽出を行わない標本を対照とし、胴感毛の形態や背毛などをDNA抽出後のプレパラート標本と形質の比較を行った。

樹上性種が多系統であるか、また、土壌性種の単為生殖が多系統であるのか、を明らかにするため、福岡教育大学構内の樹上と土壌で採集された約40種を対象にmtDNAの塩基配列を決定し、系統樹を作成した。加えて、既発表の核DNAに基づいても系統樹を作成した。

(2) 2008年2～4月に、福岡教育大学構内において、落下直後のスダジイとクスノキの落葉を採集し、室温で2ヶ月以上乾燥させた後、20 cm四方のナイロンメッシュの袋に封入してリターバックを作製した。落葉は、スダジイのみ、クスノキのみ、および、2樹種混合を準備した。リターバックは、2008年6月に福岡教育大学構内の二次林内に設置した後、1、3、6、12ヶ月後に回収し、ツルグレン装置を用いて、リターバック内のササラダニ類を抽出した。ササラダニ類は種レベルで同定し、産卵管の有無に基づき性別を判定した。雌のみが観察された種の繁殖様式を単為生殖と判断した。

(3) 福岡教育大学構内に生育する広葉樹（スダジイ、アラカシ）、および、針葉樹（スギ）、各3本を調査木として指定し、2009年11月、2010年2、4、8月に、地面から約3 mの高さの枝葉を先端から約1 m採集した。採集した枝葉は、現地で葉と枝に分け（スギは緑色部分と茶色部分）、別々のビニール袋に入れて研究室に持ち帰りササラダニ類を抽出した。ササラダニ類の抽出には洗浄法

を用いた。まず、水と少量の食器用洗剤を入れたバケツに採集した試料を一晩浸けた後、バケツ内で試料を激しくこすり合わせる。その後、バケツ内の水溶液を 35 μ m ナイロンメッシュで濾し取り、その残さを実体顕微鏡下で検鏡してササラダニ類を 1 個体ずつ採集した。プレパラート標本を作製し、種同定、および、繁殖様式の決定を行った。

4. 研究成果

(1) 3 種ともに非破壊 DNA 抽出においても PCR・塩基配列の決定を行える質・量の DNA を抽出することが出来た。また、非破壊 DNA 抽出後の標本と DNA 抽出を行っていない標本で分類形質の比較を行った結果、DNA 抽出は分類形質に影響を及ぼさないことが分かった。ただし、本方法を福岡教育大学構内で採集された約 40 種に試したところ幾つかの種では、PCR 後のバンド確認ができなかった。これらの種は、後退部を一部破壊して DNA 抽出すると問題なく塩基配列の決定できたことから、非破壊標本にて PCR が上手くいかない原因はアニーリング温度やプライマーの不一致など PCR 条件の問題ではないと考えられた。現時点では、種間で本手法の DNA 抽出効率に差が生じる直接の原因は不明であるが、体サイズ、外骨格の厚さ、間接部分の構造などが原因ではないかと考えている。

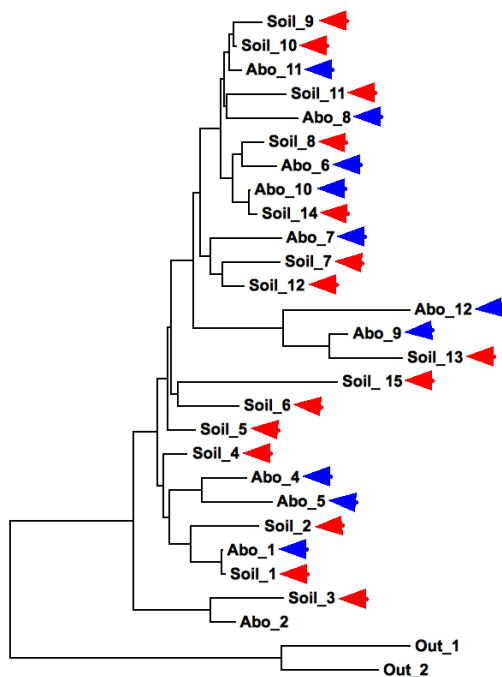


図. 樹上性ササラダニ類 (青矢印), および, 土壌性ササラダニ類 (赤矢印) の系統関係.

福岡教育大学構内で採集された約 40 種の mt DNA の COI 領域に基づく系統樹, および, 既発表データの核 DNA の 18S rRNA 領域に基づく系統樹を作成した結果, 樹上性ササラダニ類は多系統であること, 土壌性ササラダニ類において単為生殖種が複数回進化していることが明らかとなった。また, 樹上性種の特徴である丸い胴感毛は樹上環境に進出するのにともない進化した可能性が高い一方, 3 本爪や両性生殖は樹上環境への進出以前から進化しており, それらの特徴は前適応であると考えられた。

(2) リターバックから合計 76 種約 4000 個体のササラダニ類が採集された。クスノキはスダジイには含まれない昆虫に忌避効果のあるカンファーを含むため, 生物間相互作用が弱くなり, スダジイと比較して, 個体群成長の大きい種がより大きな割合を占めると考えたが, 樹種間でササラダニ類の群集構造に大きな違いは見られなかった。

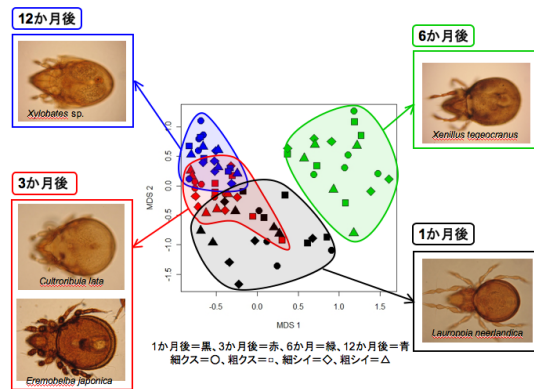


図. リターバック内のササラダニ類の種組成を類似度に基づいた NMS 法による座標付け.

一方, 設置後, 1, 3, 6, 12 ヶ月が経過したリターバック内のササラダニ類の群集構造は大きく異なり, 1 ヶ月後では *Lauroppia neerlandica*, 3 ヶ月後では *Cultroribula lata*, *Eremobelba japonica*, 6 ヶ月後では *Brachychthonius* spp., *Xenillus tegeocranus*, および, 12 ヶ月後では *Xylobates* sp., *Liochthonius* spp. が優占種となった。 *Brachychthonius* 属, および, *Liochthonius* 属は祖先的単為生殖系統と呼ばれ, 長い間 (1 億年以上), 単為生殖を維持したまま種分化を続けていると考えられている。これらの系統は, 前述した両性生殖と単為生殖の進化の仮説では説明できない。それ以外を対象とすると, 全ての種の繁殖様式を解明できてはいないが, 1 ヶ月, 3 ヶ月後には単為生殖種が多く, 6 ヶ月後, 12 ヶ月後と分解が進むにつれて両性生殖種が多くなる傾向が見られた。この結果は, 「常に新

しく創出される新鮮落葉に生育する上で、単為生殖は適応的である」という仮説を支持する。しかし、全期間を通して出現する単為生殖種もいることから、他の要因も検討する必要がある。今後は、繁殖相手の見つけやすさの観点から解明を行う予定である。

(3) アラカシの枝葉から7種、スダジイの枝葉から4種、および、スギの枝葉から11種の合計16種のササラダニ類が採集された。その内、*Oripoda* 属の2種、*Truncopes* 属の1種、および、*Scapheremaeus* 属の3種は日本未記録種、もしくは、未記載種であった。また、16種の内、13種は系統的に最も派生的と考えられる *Brachpylina* に所属し、3種はそれらよりも祖先的と考えられる *Desmonomata* に所属していた。



図. スダジイ (ス), アラカシ (ア), および、スギ (杉) の枝葉から採集されたササラダニ類. 矢印の種は単為生殖種と考えられる。

3 樹種に共通して出現したのは2種で、広葉樹と針葉樹の両方で確認できたのは合計で3種であった。一方、8種はスギのみで出

現し、その内の3種 (図の矢印) は単為生殖種であった。この3種は、*Camisia segnis*, *Trimalaconothrus nipponicus*, および、*Trhypochthonius nipponicus* で、林床の土壌にも出現する。本研究では、茶色の枝葉からのみ採集されており、樹上環境においては、懸垂土壌でのみ生息が可能であると考えられる。これらの結果は、樹上環境においては、両性生殖が不可欠であり、単為生殖は土壌環境でのみ生息可能であることを強く示唆している。詳細な系統解析は終了していないが、樹上環境の両性生殖種から懸垂土壌の単為生殖種が進化したのではなく、土壌環境に生息している個体群の一部が樹上環境に分散したと考えられる。調査数は少ないが樹皮などからこれらの種が発見されていないことから、土壌から樹幹を通して枝葉に移動するのではなく、風などにより、土壌から樹上に巻き上げられていると考えられる。

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)

[学会発表] (計2件)

① Ota A., Karasawa S., Shimano S., Harada H., Nakamura T. Nondestructive DNA extraction protocol for oribatid mites (Acari), XIII International Congress of Acarology, 2010年8月、Recife (Brazil)

② 太田藍乃、島野智之、唐沢重考、原田洋、中村達夫、形態情報を残すための、ササラダニ類の非破壊的 DNA 抽出法、第54回日本応用動物昆虫学会、2010年3月、千葉大学 (千葉市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

唐澤 重考 (KARASAWA SHIGENORI)
福岡教育大学・教育学部・准教授
研究者番号：30448592