

機関番号：13601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870012

研究課題名（和文）5者系の共進化：アリ植物をめぐる生物間相互作用がもたらした共生系の多様化

研究課題名（英文）Coevolution in a five-way interactions: Does intimate interactions in an ant-plant system promoted their own diversification?

研究代表者

上田昇平 (UEDA SHOUHEI)

信州大学・理学部・奨励研究員

研究者番号：30553028

研究成果の概要（和文）：東南アジア熱帯雨林のアリ植物オオバギ属はアリ，カイガラムシと緊密な共生関係を結ぶ。本研究では，この3者共生系に特異的に寄生するシジミチョウ類（ムラサキシジミ属）およびタマバエ類（タマバエ科）の分子系統樹を作成し，両者がいつオオバギ共生系に寄生したのかを明らかにした。分岐年代推定の結果，オオバギに寄生するシジミチョウおよびタマバエの起源年代はそれぞれ205万年前および1060万年前と推定された。これらの結果は，シジミチョウはすでに種分化した既存のオオバギ・アリ・カイガラムシ共生系に後から参入し，その一方で，タマバエは3者共生の起源より古くからオオバギ属植物に寄生していたことを示唆する。

研究成果の概要（英文）：In the Southeast Asian tropics, specific lycaenid butterflies (*Arhopala*) and gall midges (Cecidomyiidae) parasitize *Macaranga* ant-plants inhabited by mutualistic ants tending scale insects. To determine when the lycaenids and the gall midges first parasitized the *Macaranga* tripartite symbiosis, we constructed a molecular phylogeny of the both parasites and estimated their divergence times. The minimum age of the lycaenids and that of the gall midges were estimated to be 2.05 Myr and 10.6 Myr, respectively. These results suggest that the lycaenids associated with the pre-existing plant-ant-scale insect symbiosis, while the gall midges have associated with *Macaranga* plants before the tripartite symbiosis was formed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,040,000	312,000	1,352,000
2010年度	810,000	243,000	1,053,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,850,000	555,000	2,405,000

研究分野：分子系統進化学

科研費の分科，細目：基礎生物学，生態，環境

キーワード：東南アジア熱帯雨林，生物多様性，シジミチョウ，タマバエ，カイガラムシ，分子進化，分岐年代推定，寄主選好性

1. 研究開始当初の背景

(1) オオバギ, アリ, カイガラムシ 3者共生系の共進化

アリ植物オオバギ属の幹内には特殊化したアリ(シリアゲアリ属)とカイガラムシ(ヒラタカタカイガラムシ属)が共生しており, 緊密な相互依存関係を結んでいる(Fiala et al. 1989).

これまで申請者らは, 東南アジア熱帯雨林から網羅的に採集した共生カイガラムシの分子系統解析を行い, ①カイガラムシは, 植物・アリ共生に少し遅れて参加し, 3者絶対共生関係が確立したこと, ②カイガラムシが起源した800万年前以降は, 3者が同調して多様化(共多様化)してきたこと(Ueda et al. 2008, 上田&市野 2010), ③鮮新世から更新世にかけて, カイガラムシとアリは地理的にパラレルな遺伝分化を経てきたこと(Ueda et al. 2010), をそれぞれ明らかにしてきた。

これまでの研究成果は, 3者以上からなる緊密な共生系の起源が必ずしも一致せず, 逐次的に参入が起こる場合があることを明らかにしたもので, 生物間相互作用の起源や進化の研究に新たな洞察を与えた。

(2) オオバギ共生系に特殊化した寄生者

オオバギをめぐる共生系には, 共生者だけでなく複数の寄生者(シジミチョウ, タマバエなど)も存在する。これらの寄生者は, オオバギと共生アリに対し形態的, 行動的に特殊化しており, 寄主との共進化が指摘されてきた(Maschwitz et al. 1984, Megens et al. 2005, Okubo et al. 2009)。生物多様性を産み出す主要因としての「植物・昆虫間の共進化」を体系的に理解するためには, 共生者だけでなく寄生者を含めた群集の共進化の歴史を明らかにする必要がある。

そこで, 本研究ではアリ植物オオバギ属に寄生する寄生者の分子系統樹を作成し, 寄生者はいつオオバギ共生系に参入し多様化したのかを明らかにする。

2. 研究の目的

本研究の目的は, オオバギ共生系(オオバギ, アリ, カイガラムシ)とそれに適応した寄生者(シジミチョウ, タマバエ)間の共進化の歴史を分子系統解析から明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) サンプリング

シジミチョウの採集は, 東南アジアの3地点(マレーシア国サラワク州のランビル国立公園, クチンおよびマレーシア国トレンガヌ州ガナン・テブ)において16種のオオバギ属を網羅的に調査し, 7種のオオバギから5種のシジミチョウ(*A. amphimuta*, *A. dajagaka*, *A. major*, *A. moolaiana*, *A. zylda*)の35個体を採集した。

タマバエの採集は, マレーシア国サラワク州のランビル国立公園において15種のオオバギ属を網羅的に調査し, 8種のオオバギから37個体のタマバエを採集した。

(2) DNA抽出, PCR, シーケンス

シジミチョウとタマバエのDNA抽出はDNeasy Blood & Tissue Kit(キアゲン)を用いて行った。シジミチョウでは, ミトコンドリアDNA(mtDNA)のCOI遺伝子の一部と核DNAのWG遺伝子およびEF-1 α 遺伝子の一部をPCR法により増幅した。タマバエでは, mtDNAのCOI遺伝子の一部をPCR法により増幅した。PCR反応後の精製はExoSap-IT(GEヘルスケア)を用いて行い, ダイレクトシーケンス反応はBig Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit(アプライド, バイオシステムズ)を用いて行った。

(3) 分子系統解析

最尤系統樹はTreefinder(Jobb et al. 2004)を用いて推定した。塩基置換モデルの選択はKAKUSAN 3(Tanabe 2007)を用いておこない, Bayesian information criterion(BIC)に基づき, 遺伝子ごと, コドン位置ごとに最適モデルを選択した。系統樹の信頼性は, 最尤法を用いたブートストラップ確率(1000回反復), ベイズ法を用いた事後確率(500万世代), 最節約法を用いたブートストラップ確率(1000回反復)により評価した。

(4) ベイズ法を用いた分岐年代推定

節足動物のCOI遺伝子は塩基置換速度がほぼ一定であることが報告されており(Gaunt & Miles 2002), 昆虫類におけるCOI遺伝子の進化速度が約1.5%/100万年に集中していることが明らかになっている(Quek et al. 2004)。このCOI分子時計を使用した分岐年代推定法は, シジミチョウ科の様々な分類群, および, オオバギ共生系に参加する昆虫類(アリとカイガラムシ)に使用されている。本研究では, この進化速度をシジミチョウ最尤系統樹に当てはめ, 分岐年代の推定をNPRS法(Sanderson 1997)およびベイズ法(Yang 2007)を用いておこなった。

4. 研究成果

(1) アリ植物に寄生するシジミチョウ類の起源と多様化

我々は7種のオオバギから採取した5種35個体のシジミチョウを用いて、ミトコンドリアDNAのCOI遺伝子および核DNAのWG遺伝子とEF-1 α 遺伝子の分子系統樹を作成した。外群として、*A. pseudocentaurus* (オオバギを食樹とするシジミチョウ類の姉妹群) と *A. kinabala* (オオバギを食樹とするシジミチョウ類と比較的遠縁のグループ) の2種を使用した。

この分子系統樹において、オオバギに寄生するシジミチョウ類は高い支持率で単系統となった。また、内群は5つの系統に別れ、それぞれの系統には単一の種が対応した。これらの結果は、このシジミチョウグループがオオバギ属上のみで適応放散し種分化したことを示唆する。

COI 遺伝子は昆虫における進化速度が約 1.5%/100 万年と一定であることが解っている (Quek et al. 2004)。この COI 分子時計をシジミチョウにも当てはめ、分岐年代を推定した。その結果、オオバギに寄生するシジミチョウの起源年代は 205 万年前と推定された。つまり、シジミチョウは、オオバギ、アリ、カイガラムシ 3 者共生系にここ最近寄生した、後乗り型の寄生者であると考えられる。また、シジミチョウの多様化は更新世の初期 (205-168 万年前) に集中していることから、この時期に起こった氷期、間氷期サイクルによる地理的分断がシジミチョウの多様化を促進したと考えられる。

(2) アリ植物に寄生するタマバエ類の起源と多様化

我々は、8種のオオバギから37個体のタマバエを採集し、ミトコンドリアDNAのCOI遺伝子を用いた分子系統樹を作成した。オオバギに寄生するタマバエ類は6つの系統に分かれた。

この分子系統樹にCOI分子時計を当てはめタマバエの起源年代を推定した。その結果、オオバギに寄生するタマバエ類の起源年代は1060万年前と推定された。つまり、タマバエの起源年代は、すくなくともオオバギ、アリ、カイガラムシ3者共生系の起源年代(約800万年前)より古いことになる。

しかし、オオバギに寄生するタマバエ類の単系統性および起源年代に関してはさらなる解析が必要となる。なぜなら、このタマバエ類の形態的な分類が特定

されておらず、適切な外群の設定ができなかったからだ。適切な外群を検索するためには、オオバギに共生するタマバエだけではなく近隣の他の植物に寄生するタマバエも採集する必要があるだろう。

(3) 主な成果と今後の展望

本研究では、①緊密に共進化したと考えられる5者系の生物間相互作用が形成された過程を明らかにし、②寄生様式が異なる寄生者間で、寄主との軍拡共進化プロセスが異なる可能性を示した。得られた成果は、共進化する群集がどのように起源し、多様化してきたかを明らかにしたもので、共進化を介した生物多様性の創出プロセスについて新たな見地をもたらした。

しかし、本研究における寄生者の採集地点数は少なく、共生者と寄生者の地理的な遺伝分化が同調して起こっているか否かは明らかにすることができなかった。今後の展望は、熱帯アジア全域の複数地点から寄生者の採集を行い、「生物間相互作用が群集の多様化を促進した」という仮説を、地域集団間レベルで検証することである。

【参考文献】

- Fiala B., Maschwitz U., Pong T. Y. & Helbig A. J. (1989) Studies of a Southeast Asian ant-plant association: protection of *Macaranga* trees by *Crematogaster borneensis*. *Oecologia* **79**: 463-470.
- Gaunt M. W. & Miles M. A. (2002) An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with palaeontological and biogeographic landmarks. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 748-761.
- Jobb G., von Haeseler A. & Strimmer K. (2004) TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evol. Biol.* **4**: 18.
- Maschwitz U., Schroth M., Hänel H. & Pong T. Y. (1984) Lycaenids parasitizing symbiotic plant-ant partnerships. *Oecologia* **64**: 78-80.
- Megens H. J., De Jong R. & Fiedler K. (2005) Phylogenetic patterns in larval host plant and ant association of Indo-Australian Arhopalini butterflies (Lycaenidae: Theclinae). *Biol. J. Linn. Soc.* **84**: 225-241.
- Quek S. P., Davies S. J., Itino T. & Pierce N. E. (2004) Codiversification in an ant-plant mutualism: stem texture and the evolution of host use in *Crematogaster* (Formicidae: Myrmicinae) inhabitants of *Macaranga* (Euphorbiaceae). *Evolution* **58**: 554-570.

Sanderson M. J. (1997) A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. *Mol. Biol. Evol.* **14**: 1218-1231.

Tanabe A. S. (2007) KAKUSAN: a computer program to automate the selection of a nucleotide substitution model and the configuration of a mixed model on multilocus data. *Mol. Ecol. Notes* **7**: 962-964.

上田昇平 & 市野隆雄 (2010) オオバギ属植物の幹内に共生するアリとカイガラムシ. *生物科学* **61**: 219-226.

Ueda S., Quek S. P., Itioka T., Inamori K., Sato Y., Murase K. & Itino T. (2008) An ancient tripartite symbiosis of plants, ants and scale insects. *Proc. R. Soc. B* **275**: 2319-2326.

Ueda S., Quek S. P., Itioka T., Murase K. & Itino T. (2010) Phylogeography of the *Coccus* scale insects inhabiting myrmecophytic *Macaranga* plants in Southeast Asia. *Popul. Ecol.* **52**: 137-146.

Yang Z. H. (2007) PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1586-1591.

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 Usami S., Ueda S., Kataoka Y., Nishio S., Nakatani T., Itoh T. (in press) Haplotype analysis of Japanese alpine butterflies, *Oeneis norna asamana*, *O. norna sugitani*, and *O. melissa daisetsuzana*. *Butterflies*. (査読あり)

② Ueda S., Quek S.-P., Itioka T., Murase K., Itino T. (2010) Phylogeography of the *Coccus* scale insects inhabiting myrmecophytic *Macaranga* plants in Southeast Asia. *Popul. Ecol.* **52**: 137-146. (査読あり)

③ 上田昇平, 市野隆雄 (2010) オオバギ属植物の幹内に共生するアリとカイガラムシ. *生物科学*, **61**(4): 219-226. (査読あり)

④ 上田昇平 (2009) 植物-アリーカイガラムシ 3 者共生系の起源年代. *昆虫発見*, **8**: 10-12. (査読なし)

⑤ 上田昇平, Quek SP, 市岡孝朗, 村瀬香, 市野隆雄 (2009) アリ植物オオバギ属に共生するカイガラムシ類の分子系統地理解析. *昆虫 DNA ニュースレター*, **11**: 9-14. (査読なし)

⑥ 宇佐美真一, 上田昇平, 西尾信哉, 中谷貴壽, 伊藤建夫, 岩本吉也, 高橋真弓 (2009) タカネヒカゲ (*Oeneis*) 属の分子系統解析に関する最近の見知. *昆虫 DNA ニュースレター*, **10**: 22-27. (査読なし)

[学会発表] (計 6 件)

① 上田昇平, Quek S.-P., Gullan P., 近藤拓正, 市岡孝朗, 村瀬香, 市野隆雄, アリ植物オオバギ属の幹内に共生するカイガラムシ類の寄主選好性: 核 DNA 系統樹を用いた検証, 第 58 回日本生態学会大会, 2011 年 3 月 10 日, 札幌.

② 上田昇平, チョウが植物-アリーカイガラムシ共生に寄生したのはいつ?, 好蟻性昆虫勉強会, 2010 年 11 月 6 日, 牛久.

③ 上田昇平, Quek S.-P., 大久保忠浩, 清水加耶, 市岡孝朗, 市野隆雄, アリ植物をめぐる生物間相互作用の形成過程を探る, 日本昆虫学会第 70 回大会, 2010 年 9 月 19 日, 鶴岡. (招待講演)

④ 上田昇平, Quek S.-P., 大久保忠浩, 市岡孝朗, 市野隆雄, アリ植物をめぐる生物間相互作用の起源と多様化, 日本生態学会第 57 回大会, 2010 年 3 月 16 日, 東京大学. (招待講演)

⑤ 上田昇平, 大久保忠浩, 市岡孝朗, 矢後勝也, 市野隆雄, 東南アジアのアリ植物オオバギ属を食樹とするムラサキシジミ類の分子系統解析, 日本鱗翅学会第 56 回大会, 2009 年 11 月 8 日, 名城大学.

⑥ 上田昇平, Quek S.-P., 市岡孝朗, 村瀬香, 市野隆雄, アリ植物オオバギ属に共生するカイガラムシ類の分子系統地理解析, 昆虫 DNA 研究会第 6 回研究集会, 2009 年 5 月 17 日, 大阪府立大学.

[その他]

(1) ホームページ

http://web.mac.com/gsx250s.mini/iWeb/Ueda_Shouhei/

(2) 新聞掲載

「人づくりの志」, 信濃毎日新聞掲載, 2009 年 5 月 31 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 昇平 (UEDA SHOUHEI)

信州大学, 理学部, 奨励研究員

研究者番号: 30553028