

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：10102  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22570083  
 研究課題名（和文） 東アジア産カラスショウジョウバエ種群の系統分類学・進化遺伝学的研究  
 研究課題名（英文） Phylogenetic and evolutionary genetic studies on the *Drosophila melanica* species group (Diptera: Drosophilidae) in East Asia  
 研究代表者  
 渡部 英昭 (WATABE HIDEAKI)  
 北海道教育大学・教育学研究科・教授  
 研究者番号：10167190

研究成果の概要（和文）：ベトナムからカラスショウジョウバエ種群の新種を発見した。新種の染色体は  $2n=12$  (1V+4R+1D) と本種群のなかで最多であり、核型進化上、祖先種とみなされた。形態分析と交配実験から、シノニムとされてきた *D. pengi* は生物種、北部ミャンマー産の *D. longiserrata* は *D. afer* の新参シノニムとなった。カラスショウジョウバエ種群はアジア低緯度で発生し、東アジア緑地帯沿いに分布域を拡大し、その一部は地史的過去に存在していたベーリング陸橋を通して新大陸に渡り住んだ。

研究成果の概要（英文）：A new species of the *Drosophila melanica* species group is described from northern Vietnam. Its metaphase plates of larval ganglion cells showed  $2n = 12$  chromosomes, and this is the largest number of acrocentric chromosomes in the group. Based on karyotype analyses the new species has the most primitive chromosomal configuration in the *melanica* group. *Drosophila pengi* from central Japan, once regarded as a synonym of *D. tsigana* is resurrected as a member of the *melanica* group, based on the results of crossing experiments and close morphological examination. *Drosophila bisetata* from Myanmar and *D. longiserrata* from southern China are the new synonym of *D. pengi* and *D. afer*, respectively. The *melanica* group might have emerged in lower geographic latitudes of Asia, diversified along greenbelts of East Asia, and migrated to North America via Beringia.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

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：*Drosophila*, new species, speciation, karyotype, sexual isolation, Asia

## 1. 研究開始当初の背景

カラスショウジョウバエ種群 (*melanica* species group) は以前から欧米の進化遺伝学者によってその系統進化関係が詳細に研究されてきた分類群である。北米大陸に分布す

る種はどれもいわば進化系統の末端に位置するものであり、その祖先はアジア大陸の低緯度地帯に求められると考えられてきた。しかしながら本種群は自然度が高い山域に限って棲息することもあり東アジアから東南

アジアにおける本種群の情報は極めて乏しいものであった。最近、中国大陸（貴州省と雲南省）から旧北区に広域分布している“*Drosophila tsiwana*”と思われる種が得られているが、その腹部背板の黒帯模様はタイプ標本の地である欧州ピレネー山脈産と酷似している。他方、北日本を含む極東アジア湿潤冷温帯の”*Drosophila tsiwana* “集団には顕著な外部形態上の変異が報告されており、地理的亜種の可能も残されていた。さらにミャンマー北部から 1988 年に記録されている *Drosophila bisetata* Toda については *Drosophila tsiwana* の変異個体の可能性が示唆されていた。申請者等によるクロショウジョウバエ区(*Drosophila virilis* section)に関する核とミトコンドリア遺伝子配列比較から北東アジア冷温帯産の”*Drosophila tsiwana* “は南西アジア産の”*Drosophila tsiwana* “より *Drosophila longiserrata* の近くに位置する興味ある分子系統樹が得られていた。1949 年に南西中国から報告されている *Drosophila afer* Tan, Hue & Sheng に関しても核型上 *Drosophila longiserrata* Toda, 1988 と高い類似性を示しており、種の問題が依然として未解決のままであった。さらに北部ベトナムからカラスショウジョウバエ種群の疑問種が得られていた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的の一つは旧大陸のカラスショウジョウバエ種群に属する種の問題を解決することである。それらは北東アジア冷温帯の *Drosophila tsiwana* (= *Nesiodrosophila septentriata* Takada & Maekawa), 中央日本産の *Drosophila pengi*, ミャンマーから南西中国にかけて分布している *Drosophila longiserrata*, 南西中国産 *Drosophila tsiwana*, ミャンマー北部産 *Drosophila bisetata*, 及び原記載以来調べられていない *Drosophila afer* である。これらの問題の解決後、東アジアから東南アジアに棲息している種とそれらの分布域を整理し、最後にカラスショウジョウバエ種群の系統進化の歴史を再構成した。

## 3. 研究の方法

(1) 形態比較観察：種の問題の解決には可能な限り原記載で用いたタイプ標本を調べることとした。このためにタイプ標本が保管されている博物館や大学所属の標本室から借用した。タイプの保管が不明な種については、タイプ標本が採集された地域またはその近くで得られた標本を研究に供した。外部形態に関して腹部背板の黒帯体のパターン等の質的観察に加え、体長や翅指数等の 25 項目の量的形質 (BL, ThL, WL, WW, arb, FW/HW, ch/o, pror, rcorb, orbito, vb, pprnl,

dcl, dcp, sterno, m-sterno, sctl, sctlp, C, 4c, 4v, 5x, ac, M, C3) を分析した。生殖器の構造観察に際しては、本体から有柄針を用いて尾部を切り離し、80°C で 10% KOH 水溶液で処理し、その後グリセリンに包埋し、顕微鏡観察を行った。生殖器の構造の顕微鏡像はディノライトカメラ (DinoLite camera) で撮影し、電子データとし、ペンタブレット (a Wacom pen tablet) を用いて個々の構造の輪郭をトレースした。精密画作成には Adobe Illustrator (version 6.05) を使用した。

(2) 核型分析：野外で得られた交尾済みメスを 1 個体ずつショウジョウバエ用飼育培地 (成分: malt, yeast, sucrose, cornmeal, agar) が入ったガラス管瓶に入れ、単一雌系統 (iso-female line) を確立した。3 齢幼虫をショウジョウバエ用リンガー溶液中で解剖し、脳神経節を取出し、1% クエン酸ナトリウム溶液で低張液処理した。次に 30 分間 0.1 mg/ml コルヒチン溶液で処理し、2 時間カルノア液 (carbinol: acetic acid = 3:1) で固定した。その後 30 分から 45 分間 4% ギムザ液で染色した。染色体標本は空気乾燥法に依った。各々の種または系統について約 100 個体の核板を観察した。中期分裂像はアナログカメラ (Olympus PM-6) を用いて撮影し、フィルムスキャナー (Nikon APS IX240) を用いて電子データとし、パソコンにより画像分析した。

(3) 交配実験：交配前隔離については無選択法と雄選択法により調べた。無選択法においては雌 5 個体と同種または異種と思われる雄 5 個体を同一の交配瓶 (直径 30 mm : 高さ 100 mm) に入れて 48 時間維持した。その後、雌の腹部をリンガー液中で解剖し、貯精嚢を取出し、精子の有無を顕微鏡下で観察した。各々の交配で 50 個体以上 (通常 100 個体) の雌を調べた。交配前隔離指数は次式： $1 - (\% \text{ of 異系交配, i. e., } A \times B^L) / (\% \text{ of 同系交配, i. e., } A_1 \times A^L)$  で計算した (Coyne & Orr 1989)。二つの集団間で性的隔離が完全ならば 数値は +1 を示し、隔離がない場合は 0 を示す。雄選択法では 5 個体の雄を同種の雌 5 個体、異種の雌 5 個体と一緒に交配瓶に入れて、48 時間維持した。その後雌の腹部を解剖し、貯精嚢中の精子の有無を調べた。雄選択法の隔離指数 isolation index は次式  $(\% \text{ 同系交配} - \% \text{ 異系交配}) / (\% \text{ 同系交配} + \% \text{ 異系交配})$  で計算した (Stalker 1942)。隔離指数は選択が完全ならば +1、自由交配ならば 0 となる。交配後隔離について、雌 5 個体と異なった種または系統の雄 5 個体を同一の交配瓶に入れ、1 月間維持した。雑種が出現した場合、雑種の稔性を調べるために両親の雌との戻し交配を行った。

#### 4. 研究成果

表1は北海道・札幌産(SP)の“*Drosophila tsigana*” (以前に *Nesiodrosophila septentriata* として記載されていた), 関東・東京産(TK)の“*Drosophila tsigana*” (以前に *Drosophila pengi* として記載), およびベトナム・バビ自然保護区産(BV)の疑問種間の交配前隔離の結果を示している。

Table 1. Percentages of inseminated females in crosses among three culture strains (BV from Ba Vi, Vietnam; TK from Tokyo, Japan; SP from Sapporo, Japan) of the *Drosophila melanica* species group by the no-choice method.

♀	BV			TK			SP		
	%	(N)	Index*	%	(N)	Index	%	(N)	Index
BV	91.2	(114)		4.5	(89)	0.951	1.6	(127)	0.983
TK	0.0	(102)	1.000	90.6	(64)		47.6	(63)	0.475
SP	21.2	(128)	0.781	7.8	(64)	0.920	96.8	(94)	

同種交配ではどの種も 90%以上の雌が交尾していた。ベトナム産の疑問種は東京産 *Drosophila tsigana* とは正逆交配ともほとんど交尾しなく、隔離指数は 0.95 以上であった。ベトナム産疑問種と北海道産 *Drosophila tsigana* の交配前隔離はやや不完全で、ベトナム産雄 x 北海道産雌では約 20%の雌が交配した。これらの結果はベトナム産の疑問種が新種であるとの可能性を強く示唆した。興味あることに、ともに“*Drosophila tsigana*”とされている札幌産と東京産系統間の交配前隔離指数は0.475 から0.920 との高い値を示した。

表2は東京-札幌間での雄選択法による交配前隔離の強さを調べたものである。

Table 2. Female insemination status in crosses between TK and SP by the choice-by-male method.

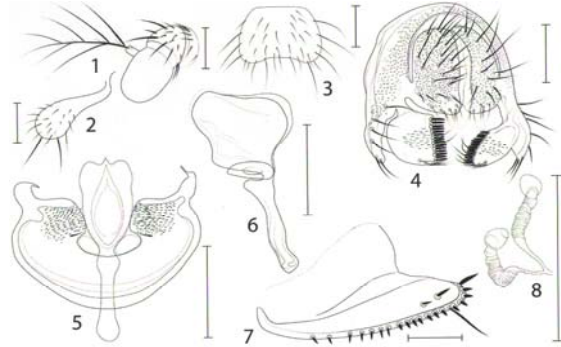
Cross	Homogamic				Heterogamic				I.I.*	
	Female	Male	+	(%)	-	(%)	+	(%)		-
TK+SP	TK	25	(78.1)	7	(21.9)	0	(0.0)	32	(100.0)	1.00
TK+SP	SP	31	(96.9)	1	(3.1)	14	(42.4)	19	(57.6)	0.39

東京系統を雄にした場合の隔離指数は 1.00 となり、東京系統雄は同種の雌を完全に選択していることを意味した。一方、札幌系統を雄にした場合の隔離指数は 0.39 となり、同系統雌を選択する傾向があるものの、選好性は不完全であることを示した。交配後隔離に関しての実験で、東京系統と札幌系統間の正逆交配とも雑種は生じなかった。南西中国・貴州省産の *Drosophila tsigana* とされている系統と東京系統間では自由交配が観察され、稔性を有する系統間雑種が多数得られたが、札幌産系統の間では強い交配前隔離が認められ、雑種は得られていない。

貴州省産 *Drosophila lengiserrata* と札幌産、東京産及び貴州省産 *Drosophila tsigana* との交配ではどれもほぼ完全な交配前隔離が確認され、稔性のある雑種は得られなかった。

図はベトナム・バビ自然保護区から得られた種の外部形態および雌雄の生殖器構造を示している (図中の 1 Antenna; 2 palpus; 3

male sternite V; 4 periphalllic organs (後方側面観); 5 phallic organs (腹面観); 6 aedeagus and paramere (側面観); 7 oviscapt; 8 spermathecae. Scale line = 0.1 mm) (参照: Suwito, Takamori, Harada, Toda & Watabe, 2013)。

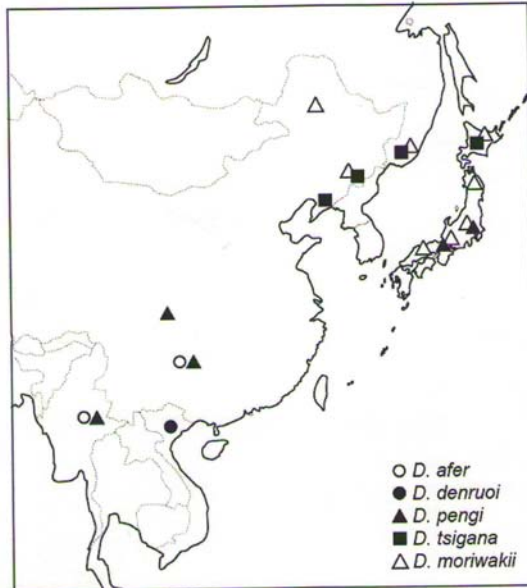


Aedeagus が短くその頭部が左右に広いこと、鋸歯状構造を欠くこと、雄第V腹板が左右に広いこと、oviscapt 側板に2本の感覚毛を持っていること、雌貯精嚢がキチン硬化していないこと等から、本種群の他のどの種とも形態でははっきり区別でき、*Drosophila denruoi* Suwito & Watabe として新種記載した。

東アジアから東南アジアにかけて分布している種について、タイプ標本等と形態比較を行った結果、i) 原記載地の東京・杉並から得られた *Drosophila pengi* Okada & Kurokawa, 1957 は明確な生物種で近畿地方や九州地方にも分布しており、南西中国の *Drosophila tsigana* Burla & Gloor, 1952, ミャンマー北部の *Drosophila bisetata* Toda, 1988 と同種である、ii) 北海道産 *Drosophila tsigana* は腹部背板にフランス産タイプ標本と異なる明瞭な地理的変異を有するが欧州からアジアにかけて広域分布している *Drosophila tsigana* そのものである、iii) 原記載地はミャンマーで南西中国にも分布が確認されている *Drosophila longiserrata* Toda, 1988 は形態と核型の特徴から *Drosophila afer* Tan, Hue & Sheng, 1949 と同種である、ことが明らかとなった。分類種として *Drosophila pengi* が復活した一方、*Drosophila longiserrata* と *Drosophila bisetata* が新参シノニムとなった。

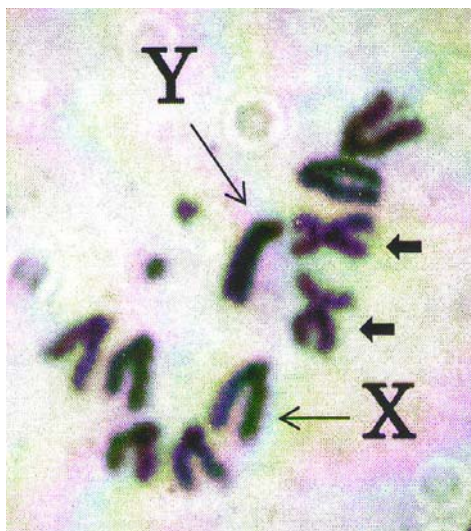
これらの結果をもとにしてカラスシヨウジョウバエ種群の東アジアから東南アジアにかけての地理分布を示したのが下図である。独立した種の *Drosophila moriwakii* Okada & Kurokawa, 1952 を含めて5種が分布している。地理分布に関して *Drosophila pengi* はインド・ネパールから南中国を經由して南日本に至る日華区型、*Drosophila tsigana* は旧北区型、*Drosophila moriwakii* は極東アジア湿潤冷温帯型である。





東南アジアから南西アジアにかけての山岳地帯におけるショウジョウバエの研究は開始されたばかりである。カラスショウジョウバエ種群の起源は東南アジア北部から中国雲貴高原に続く山岳地帯に求めることができ、そこでのさらなる調査が必要なることを示唆している。

下図は新種 *Drosophila denruoi* の核型を示している。2n=12 で 4 対の端部附着型染色体 (R 型), 1 対の中型の中部附着型染色体 (V 型), 1 対の微小染色体から構成されている。X 染色体は端部附着型, Y 染色体は異質染色質に富む次中部附着型と思われる。



カラスショウジョウバエ種群の旧世界に棲息している *Drosophila afer*, *Drosophila pengi*, *Drosophila tsigana*, *Drosophila moriwakii* 及び *Drosophila denruoi* はどれも端部附着型の X 染色体を有している。一方、ベーキングア経由でアジアから渡り住んだ北米種では唯一 *Drosophila micromelanica* Patterson in Sturtevant & Novitski, 1941 が棒状の X 染色体を有しており、残りの 5 種

はどれも大型の中部附着型 X 染色体である。唾液腺染色体の縞模様の比較分析から大型の中部附着型 X 染色体は端部附着型 X 染色体と端部附着型常染色体の動原体融合によって生じたと考えられている (Stalker 1972, 1976)。それ故カラスショウジョウバエ種群の核型進化において、端部附着型 X 染色体は祖先型、大型の中部附着型 X 染色体は派生型とみなされている (Stalker 1966, 1972; Levitan 1982; Clayton & Guest 1986; Flores et al. 2008)。旧大陸種の *Drosophila afer*, *Drosophila pengi* 及び *Drosophila tsigana* の染色体は 2n=10 で、どれも大型の中部附着型常染色体を有するが (Tan et al. 1949; Stalker 1966; Wang et al. 2006a), それらは *Drosophila denruoi* には見られない。*Drosophila denruoi* の 3 対の端部附着型常染色体はどれも大型の中部附着型常染色体の約半分の大きさである。*Drosophila denruoi* と他の近縁種との間の染色体構成の違いは *Drosophila denruoi* にみられる 2 対の端部附着型染色体同士の動原体融合か *Drosophila afer*, *Drosophila pengi* 及び *Drosophila tsigana* にみられる 1 対の大型中部附着型染色体の動原体分離によって説明が可能であろうが、ショウジョウバエ属の核型進化においては染色体の減少を意味する動原体融合が起こりやすいとされている (Clayton & Guest 1986)。以上のことから *Drosophila denruoi* が核型進化上、カラスショウジョウバエ種群の祖先種に最も近いことが示唆され、分子を用いた系統解析、アジア低緯度山岳地域における詳細な生態や分布に関する研究の必要性が示された。

##### 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 Suwito, A., Toda, M., Takamori, H., Harada, K. and Watabe, H. Revision of Asian species of the *Drosophila melanica* species group (Diptera: Drosophilidae), with a description of a new species from Vietnam. Entomological Science, 16: in press (2013) doi:10.1111/ens.12028 査読有
- ② Suwito, A., Watabe, H. and Toda, M. J. Review of the *Drosophila (Drosophila) quadrisetata* species group (Diptera: Drosophilidae), with descriptions of three new species from the Oriental Regions. Entomological Science 16: 66-82. (2013) doi:10.1111/j.1479-8298.2012.00530.x 査読有
- ③ Watabe, H. and Asaka, M. Chromosomal

variation of the leaf-mining *Liodrosophila castanea* (Diptera, Drosophilidae), with the results of crossing experiments. Low Temperature Science, 69: 33-38 (2011). 査読有

〔学会発表〕(計1件)

渡部英昭 野生ショウジョウバエの飼育. 日本遺伝学会ワークショップ. 札幌(北海道大学) 2010年9月23日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡部 英昭(WATABE HIDEAKI)  
北海道教育大学・教育学研究科・教授  
研究者番号: 10167190

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし