

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510331

研究課題名(和文) シルビアシジミの個体群存続に及ぼす共生細菌と近縁種の影響に関する研究

研究課題名(英文) Effects of Wolbachia infection and related species on a licaenid butterfly, *Zizina emelina*

研究代表者

平井 規央 (Hirai, Norio)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

研究者番号：70305655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：シルビアシジミの日本と韓国における各個体群の遺伝的多様性、ボルバキア感染、寄主植物利用、近縁種ヒメシルビアシジミとの種間関係を調査した。本種の寄主植物利用には、成虫の産卵選好性が関与していることが明らかになった。日本産本種のmtDNAの解析では、6ハプロタイプが確認され、韓国産は異なる2タイプが認められた。また、韓国個体群はボルバキアに高頻度で感染していた。ヒメシルビアシジミとの交配実験では、交尾が成立し、子世代が雄のみとなって両種の間隔的な形質を示したことから、ヒメシルビアシジミがシルビアシジミの分布域に侵入した場合、シルビアシジミが繁殖干渉を受ける可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The results of this study revealed that the original host plant of *Zizina emelina* is *L. japonicus*, and the host range was expanded to *T. repens* in some populations. Six haplotypes were found by analyses of combined ND5 and COI genes. Two mytotypes found in the Korea populations were different from any mytotypes in Japan and all individuals were infected with Tn1 or Ny1 Wolbachia. The mating behavior was observed when *Z. emelina* females and *Z. otis* males were put into net cages. *Zizina otis* males were strongly interested in *Z. emelina* females, leading to their mating success. These results suggested that *Z. emelina* was affected by reproductive interference if especially *Z. otis* is sympatric with *Z. emelina*.

研究分野：昆虫生理・生態学

キーワード：シルビアシジミ ヒメシルビアシジミ Wolbachia 繁殖干渉 遺伝的多様性

1. 研究開始当初の背景

シルビアシジミ *Zizina emelina* は、2008 年にヒメシルビアシジミ *Z. otis* から独立した種で独立した種で、日本の関東～種子島と韓国の一部のみに分布し、環境省レッドデータリストでは絶滅危惧 I 類にランクされている。本種の生息地は、農地の基盤整備や河川のコンクリート護岸化などによって減少し、すでに絶滅したと考えられる都府県も多い。ところが、申請者らの調査によって、本種が大阪府豊中市と兵庫県伊丹市にまたがる大阪国際空港とその周辺の緑地に高密度で生息することが明らかになった。本種の幼虫は主としてマメ科のミヤコグサを寄主植物として利用することが知られているが、大阪国際空港周辺では、同じマメ科のシロツメクサを主に利用していた。また、この生息地で得られたメス成虫から採卵し、実験室内で幼虫を飼育したところ、複数のメス成虫において子世代がすべてメスとなる現象が認められた。そこで申請者らは、昆虫類に性比異常を起こすことが知られる共生細菌ボルバキア (*Wolbachia*) の感染の可能性を考え、感染の有無を調査したところ、大阪国際空港周辺で採集された個体の多くでその感染が認められた。確認されたボルバキアは 2 系統あり、性比異常が認められた母蝶からは共通のボルバキア系統が確認された。このことから、この性比異常は、ボルバキアによって引き起こされる「オス殺し」であることが明らかになった。チョウ類におけるボルバキアによるオス殺しは、海外でホソチョウの仲間やリュウキュウムラサキで見ついているものの、報告例は非常に少ない。一方、もう 1 系統のボルバキアでは性比異常は確認されていないが、「細胞質不和合」などの寄主操作を行っている可能性が考えられる。兵庫県西部など近隣のミヤコグサに依存している個体群では、感染が認められず、昆虫の寄主植物利用の変化に体内の共生細菌が深くかかわっているという報告もあることから、本種においても細菌による寄主操作によってシロツメクサに寄主植物転換が行われた可能性がある。申請者らは、千葉県においてもシロツメクサに依存する個体群の存在を認めており、予備実験でボルバキアの感染と性比異常を確認している。また、韓国の個体群も遺伝的には日本の個体群と近縁であることが分かっているが、ボルバキア感染については全く調べられていない。本種の個体群存続に影響を与えると考えられるもう一つの重要な要因として近縁種のヒメシルビアシジミとの種間関係が挙げられる。ヒメシルビアシジミは熱帯から亜熱帯に広く分布し、以前はシルビアシジミと分布域は隔たっていたが、2008 年にシルビアシジミの分布の南限である鹿児島県種子島にごく近い屋久島で生息が確認された。日本における分布拡大の原因は分かっていないが、ニュージーランドでは固有のシルビアシジミ属が、ヒメシルビアシ

ジミの侵入によって絶滅の危機に晒されている例もあり、早急に両者の種間関係と種子島におけるヒメシルビアシジミの分布の有無を調査する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では以下の 3 点を解明することを主な目的とした。

シルビアシジミ各個体群のボルバキア感染および寄主植物利用の解明

本種のシロツメクサを利用する個体群について、寄主植物利用や遺伝的多様性とボルバキアとの関係を考察する。また、ミヤコグサのみを利用すると考えられている兵庫県西部の個体群とも比較を行う。

シルビアシジミ韓国個体群の遺伝的多様性およびボルバキア感染の解明

大陸での唯一の生息地と考えられている韓国の個体群については、ミヤコグサを利用すると考えられているものの、遺伝的多様性に関する研究はほとんどないため、DNA 解析とボルバキア感染の有無、現地での寄主植物利用の解明を行う。

ヒメシルビアシジミとの種間関係の解明

近年ヒメシルビアシジミが確認された鹿児島県屋久島と、隣接するシルビアシジミ南限の種子島において野外調査を実施し、両島の両島における分布や、遺伝的多様性、ボルバキアの感染の有無を解明する。また、交配実験によって、混生地におけるシルビアシジミ個体群の存続に関するリスク評価を行う。また、ヒメシルビアシジミが定着しており、個体数の安定している沖縄県西表島でもサンプリングによって飼育系統を確立し、ボルバキアの感染と遺伝的多様性を調査して交配実験を行う。

今後希少種の保全においては、衰亡の危機に瀕している個体群を生息域外で繁殖させ、再導入することが必要になってくると考えられている。これまでも遺伝的多様性の調査は重視されてきたが、共生微生物が遺伝的多様性や繁殖に与える影響という観点から調査が進められたことはほとんどなく、本研究は、他の昆虫種においても保全の際に考慮すべき新しい観点を提供するものである。ボルバキアは、これまでの申請者らの研究により遺伝子流動や繁殖力に影響を与えることが明らかになっており、本種の各地におけるボルバキアの感染状況を明らかにすることにより、生息地ごとに人工繁殖や植生管理を含めた適切な保全策を講じることが可能となり、他の個体群が侵入した際のリスク評価を行うこともできる。

3. 研究の方法

シルビアシジミ各個体群のボルバキア感染および寄主植物利用の解明

日本各地でシルビアシジミを採集し、DNA を抽出した。ボルバキア固有の配列をもとに作成されたプライマーを利用し、PCR 法によ

って感染の診断と配列の決定を行った。また、チョウ自体の遺伝的多様性を確認するため、ミトコンドリアのCOIとND5領域、核DNAのTpi領域などについて配列を決定した。メス成虫については、ミヤコグサまたはシロツメクサを用いて採卵を行い、孵化した幼虫に人工飼料を与えて飼育した。採卵後のメス成虫はオスと同様にボルバキアの感染と遺伝的多様性の解析を行った。産卵実験は、ミヤコグサまたはシロツメクサを用いてメス成虫に2種の寄主植物のうちの1つを提示し、それぞれへの産卵数を毎日記録する方法で行った。また、同じ容器内に2種の寄主植物を同時に入れ、選択させる実験も行った。幼虫の摂食実験についても、同様に寄主植物のうちの1種(生葉)を与え、摂食の有無、発育期間、体重などを記録した。

シルビアシジミ韓国個体群の遺伝的多様性およびボルバキア感染の解明

韓国本土ヨンドク郡などで成虫を採集し、遺伝的解析、ボルバキア感染などの調査を行った。調査方法はの日本産各個体群と同様に行った。

ヒメシルビアシジミとの種間関係の解明

ヒメシルビアシジミを沖縄県沖縄島、石垣島、西表島などで採集し、寄主植物利用、発育期間、配偶行動などの調査を行った。

ヒメシルビアシジミとの交配実験は、兵庫県産のシルビアシジミ雌成虫と石垣島産ヒメシルビアシジミとを行った。両種の交配を試み、得られた次世代の孵化率、性比、寄主植物選好性を調査した。

4. 研究成果

シルビアシジミ各個体群のボルバキア感染および寄主植物利用の解明

シルビアシジミの食草は主としてミヤコグサであるが、大阪府豊中市ではシロツメクサを利用することが知られている。本研究では、豊中個体群(以下、豊中)とミヤコグサを利用する兵庫県加東市の個体群(加東)間において交配実験を行い、両植物に対する幼虫の発育と雌成虫の産卵選好性を調べた。その結果、豊中純系と加東純系ともに各植物における幼虫の生存率に差はなかったが、蛹体重については、植物間、個体群間で有意差が見られた。羽化した雌成虫に2種の植物を同時に提示したところ、豊中純系ではミヤコ区が31%、シロツメ区が42%をシロツメクサに産卵したのに対し、加東純系はシロツメクサにはほとんど産卵しなかった。交雑個体の蛹体重と産卵選好性は各純系の中間値を示した。以上のことから、豊中は、加東よりもシロツメクサへの産卵選好性が強く、幼虫発育も良好であることが明らかになった。

シルビアシジミ韓国個体群の遺伝的多様性およびボルバキア感染の解明

2012年8月に韓国の東海岸沿いで採集した個体のボルバキア感染と遺伝的多様性について調査を行ったので報告する。日本産では、

3系統のボルバキアが確認されているが、韓国産はそのうちの2系統のどちらかに感染していた。日本産のmtDNAの解析では、ND5(832 bp)とCOI(621 bp)の2領域を合わせて6つのハプロタイプが確認されているが、韓国産からはそれらとは異なる2つのタイプが認められた。また、核DNAのTpi(355-360 bp)の解析では、日本産では6ハプロタイプが確認されていたが、韓国産はすべてそのうちのひとつと一致した。以上の結果から、韓国個体群はボルバキアに高頻度で感染しており、mtDNAハプロタイプとその頻度は日本産とは異なると考えられた。

ヒメシルビアシジミとの種間関係の解明

ヒメシルビアシジミは、熱帯から亜熱帯に広く分布し、国内ではシルビアシジミと分布域は隔たっていたが、2008年にシルビアの分布の南限である鹿児島県種子島にごく近い屋久島で生息が確認された(久保田, 2009)。本種の分布拡大の原因は明らかではないが、絶滅危惧種であるシルビアの分布域に進出した際の影響を事前に調査する必要がある。本研究では、2012年5月に沖縄県八重山諸島で採集した本種雌から採卵し、様々な温度日長条件下で飼育して、寄主植物の選好性や発育、配偶行動などを調査した。野外で採集した本種雌にシルビアシジミの主要な寄主植物であるミヤコグサを提示したところ、個体によっては多数の卵を産み付けたが、ふ化した幼虫にもミヤコグサを与えたところ、発育は遅延し、多くの個体が若齢期に死亡した。本種にコメツブウマゴヤシを与えて飼育したところ、25 長日では4齢を経過し、幼虫期間は15-18日でシルビアシジミとほぼ同様であった。ヒメシルビアシジミは飼育ケージ内で交尾が確認されたほか、シルビアシジミの雌に対しても求愛行動が観察された。

2012年7月に沖縄県石垣島で採集したヒメシルビアシジミ雄成虫と同年5月に大阪府豊中市で採集した雌から得た累代飼育の雌と1個体ずつ吹き流しに入れて配偶行動を観察した。その結果、ヒメシルビアシジミ雄はシルビア雌に対して求愛行動を示し、交尾が成立した。計2組の交尾を確認し、各雌から、それぞれ251、120卵が得られた。ふ化率は、それぞれ78、100%であった。ふ化した子世代幼虫のうち、それぞれ60個体を25 16時間日長でシロツメクサの乾燥粉末を入れた人工飼料を用いて飼育し、幼虫期間と蛹体重などを記録して、大阪府産のシルビアシジミ、沖縄県八重山産のヒメシルビアシジミと比較した。その結果、いずれの母チョウから得られた子世代(以下F1世代)も雄のみが羽化し、約半数のF1個体では幼虫期に発育が遅延し、ふ化後50日以上経過しても蛹化に至らなかった。平均幼虫期間はシルビアシジミ(18日)とヒメシルビアシジミ(19日)では差はなかったが、F1個体(16日)は両種よりも短かった。

成虫の斑紋については、シルビアシジミは

ヒメシルビアシジミよりも裏面各室の小黒斑が大きく、前後翅亜外縁の黒斑列が各室の小黒斑と同等に発達しているなどの点で異なるが、F1 個体では、各室の小黒斑はヒメシルビアシジミよりも大きく、亜外縁の黒斑列は個体によって程度は異なるもののシルビアよりも発達が弱い傾向が見られた。後翅表面外縁の黒斑列はシルビアでは波状に、ヒメシルビアシジミでは線状となる傾向が強いが、F1 個体では両方のパターンが見られた。以上のように、両種間での交尾が成立し、子世代が雄のみとなって両種の間隔的な形質を示したことから、ヒメシルビアシジミがシルビアシジミの分布域に侵入した場合、シルビアが繁殖干渉を受ける可能性が考えられた。

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 10 件)

Sakamoto, Y., N. Hirai, T. Tanikawa, M. Yago, and M. Ishii. 2015. Population genetic structure and *Wolbachia* infection in an endangered butterfly, *Zizina emelina* (Lepidoptera, Lycaenidae), in Japan. *Bulletin of Entomological Research* 105: 152-165. 査読有
Yoshiyasu, Y., M. Sakakibara, and N. Hirai. 2015. A new *Anania* species from Japan, a close relative of *A. crocealis* in Europe (Lepidoptera, Crambidae). *Lepidoptera Science* 65: 142-149. 査読有

中村康弘・永幡嘉之・久壽米木大五郎・西野雄一・深澤いづき・矢後勝也. 2015. ツシマウラボシシジミの現状と生息域外保全. *昆虫と自然* 50(2): 4-7. 査読無

Tanahashi, T. Mifune, N. Hirai and M. Ishii. 2014. Wing color change by sunlight irradiation in the spotless grass yellow butterfly, *Eurema laeta bethesba* (Lepidoptera, Pieridae). *Lepidoptera Science* 65: 45-49. 査読有

平井規央. 2014. 改訂版大阪府レッドデータリストにおける昆虫類掲載種 - 特に減少の著しい水田周辺の昆虫に注目して -. *地域自然史と保全* 36: 37-39. 査読有

Jeratthitikul, E., Yago, M. and Hikida, T. 2013. Sexual dimorphism and intraspecific variation in wing size and shape of *Tongeia fischeri*. *Entomological Science* 17: 342-353. 査読有

Saastamoinen, M., N. Hirai, S. van Nouhuys. 2012. Direct and trans-generational responses to food deprivation during development in the Glanville fritillary butterfly. *Oecologia* 171: 93-104. 査読有

蓑原茂・矢後勝也・田中和夫・森地重博・平井規央. 2012. 関東地方におけるクロマダラソテツシジミの一時発生と分布拡大について. *Butterflies (Teinopalpus)*(62): 40-56. 査読有

石井実. 2012. 温暖化にともなう南方系害虫の動向. *熱帯農業研究* 5(2):1-4. 査読有
Jeratthitikul, E., Hara, T., Yago, M., Itoh, T., Wang, M., Usami, S. and Hikida, T. 2012. Phylogeography of Fishcher's blue, *Tongeia fischeri*, in Japan: Evidence for introgressive hybridization. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66: 316-326. 査読有

[学会発表](計 9 件)

Hirai, N. and van Nouhuys S. Brood size and sex ratio regulation in the pupal ectoparasitoid, *Pteromalus apum* parasitizing the Glanville fritillary butterfly, *Melitaea cinxia*. 24th International Congress of Entomology. 2012 年 8 月 19 ~ 25 日. Exco (Daegu, Korea).

Sakamoto, Y., Hirai, N., Ishii, M. Difference in larval development and female oviposition preference in host plants between two populations utilizing different plants as larval hosts in an endangered lycaenid butterfly, *Zizina emelina*. 24th International Congress of Entomology. 2012 年 8 月 19 ~ 25 日. Exco (Daegu, Korea).

平井規央・矢後勝也・坂本佳子・石井実・ヒメシルビアシジミの生活史と温度・日長反応. 第 72 回日本昆虫学会大会. 2012 年 9 月 16 日. 玉川大(東京都・町田市).

坂本佳子・平井規央・石井実. 異なる寄主植物を利用するシルビアシジミ 2 個体群間の幼虫の発育と雌成虫の産卵選択性の比較. 第 72 回日本昆虫学会大会. 2012 年 9 月 17 日. 玉川大(東京都・町田市).

坂本佳子・平井規央・矢後勝也・石井実・李哲敏. 韓国産シルビアシジミの *Wolbachia* 感染と遺伝的多様性. 昆虫 DNA 研究会 第 10 回研究集会. 2013 年 5 月 25 日. 東大本郷キャンパス(東京都・文京区).

平井規央・坂本佳子・矢後勝也・李哲敏・石井実. 日本産と韓国産シルビアシジミの *Wolbachia* 感染と遺伝的多様性の比較. 日本昆虫学会大会第 73 回大会. 2013 年 9 月 14 日. 北海道大学(北海道・札幌市).

坂本佳子・平井規央・矢後勝也・谷川哲朗・李哲敏・石井実. 細胞内共生細菌 *Wolbachia* がシルビアシジミに与える影響. 日本鱗翅学会第 60 回大会(招待講演). 2013 年 11 月 9 日. 大阪府立大学(大阪府・堺市).

平井規央・坂本佳子・矢後勝也・石井実・石川県産シルビアシジミの遺伝的変異. 日本昆虫学会第 74 回大会. 2014 年 9 月 15 日. 広島大学(広島県・東広島市).

平井規央・坂本佳子・矢後勝也・石井実・石川県産シルビアシジミの生活史と遺伝的変異. 日本鱗翅学会第 61 回大会. 2014 年 10 月 25 ~ 26 日. 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市).

[図書](計 3 件)

矢後勝也・中村康弘・永幡嘉之・須田真一・

長谷川大 . 2012 . フィールドガイド日本のチ
ョウ . 328pp . 誠文堂新光社 . 東京 .

石井実 . 2013 . 里山のこれまでとこれから .
72pp . 文一総合出版 .

石井実 . 2014 . チョウたちと守る里山 . 「エ
コロジー講座7 里山のこれまでとこれから
(日本生態学会編)」pp. 42-55 . 文一総合出版 .

6 . 研究組織

(1)研究代表者

平井 規央 (HIRAI Norio)

大阪府立大学生命環境科学研究科・准教授

研究者番号 : 9 0 2 5 4 4 4 0

(2)研究分担者

矢後 勝也 (YAGO Masaya)

東京大学・総合研究博物館・助教

研究者番号 : 7 0 5 7 1 2 3 0

石井 実 (ISHII Minoru)

大阪府立大学生命環境科学研究科・教授

研究者番号 : 8 0 1 7 6 1 4 8