

学 位 論 文 題 名

Molecular population genetic analyses
of the phytophagous ladybird beetles,
the *Epilachna vigintioctomaculata* species complex
(Coleoptera : Coccinellidae)

(オオニジュウヤホシテントウ種群の分子集団遺伝学的解析)

学位論文内容の要旨

一般に、植物を餌とする昆虫の多くは特定の植物のみを加害し、交配も食草上で行う。そのような食植性昆虫において、一部の個体が新しい食草を加害し、その食草上で交配を行うように変化した場合、新しい食草を選んだ個体と古い食草を選び続ける個体の交配の機会が著しく減少する可能性がある。もしもこのようにして生態的隔離が生じるならば、それは種分化の重要なメカニズムとなるだろう。食植性昆虫が非食植性昆虫と比べて種が多様であることも、食草変更が種分化を促進させるという考えと矛盾しない。

近年、進化研究に分子マーカーを用いる手法が盛んに取り入れられているが、この手法は食草変換を伴う種分化を研究する上でも有効である。即ち、分子マーカーに基づいて構築された種や集団の系統樹を、食草選択の情報と比較することによって、進化的な時間の中で生じた食草変更の回数や方向を推定することが可能となる。更に、適切な分子マーカーを選ぶことによって、同じ地域に住む近縁な集団間の遺伝子流動の程度を評価することも出来る。本研究では、形態と食性が変化に富むオオニジュウヤホシテントウ種群を材料として、食草変更に要した進化的時間の推定と、食草の違いの生態的隔離要因としての効果を検証し、本種群の進化史の再構築を行った。

材料に用いたオオニジュウヤホシテントウ種群は2グループ4種から成る。グループAは、オオニジュウヤホシテントウ（以下オオニジュウ）。グループBは、エゾアザミテントウ（以下エゾ）とヤマトアザミテントウ（以下ヤマト）、そしてルイヨウマダラテントウ（以下ルイヨウ）である。このうち、ヤマトとルイヨウは同所的に生息し、食草選択の違いのみによって生態的に隔離されており、食草選択が直接種分化に結びついたと考えられている。本研究では、形態及び食草選択に関する既知の変異を網羅するように27集団を選び、各集団につき10個体を採集し、PCR法を用いてミトコンドリアDNAチトクロームCオキシダーゼ・サブユニットI遺伝子の一部(985bp)の塩基配列を決定した。合計270個体から、58のハプロタイプ(塩基配列型)が識別された。58ハプロタイプの遺伝子系統樹、及び27集団の集団系統樹を作成すると共に、遺伝子分化係数(*Nst*)を用いて、グループ間、種間、集団間の分化の程度を評価した。

遺伝子系統樹では、ハプロタイプは2つのクラスターに大別された。これらは、主に形態に基づいて識別されている2つのグループ、即ち上述のグループA、Bと厳密に対応した。集団系統樹でもグループAとBは、それぞれが明瞭なクラスターを形成した。また、グループ間の*Nst*値も高く、大きな遺伝的分化が認められた。グループ内では、グループAの地域集団に対応する幾つかのサブクラスターが遺伝子系統樹に認められ、集団系統樹でも地域分化が確認された。*Nst*の値も著しい地域分化の存在を示した。一方、グループBでは、遺伝子系統樹には顕著なサブクラスターは見いだされず、集団系統樹でもBに含まれる3種はいずれも単系統群にはならなかった。3種が種毎に単系統群を形成しな

った理由として、過去或いは現在に至るまでに遺伝子流動が存在することや、種分化してから時間が短いため、種分化する前の種内多型の影響が大きく、種分化後の変化の評価が出来なかったことが考えられる。また、グループBの3種間では Nst 値も極めて低く、これらの3種が殆ど遺伝的分化していないことが改めて示唆された。以上の事実は、グループBは種分化の初期段階にあることを示している。なお、グループBの3種の種内集団間では、遺伝子系統樹、集団系統樹共に顕著な分化は認められなかった。しかし、ヤマトとルイヨウの地域集団間の Nst 値は高く、遺伝的分化の絶対量は僅かであるものの、相対的には顕著な地域分化と僅かな集団内分化が存在することが明らかになった。エゾは他の2種より低い Nst の値を示したが、これは本種の集団内変異が大きいことによると思われる。

得られた集団系統樹に基づき、食草選択の進化について考察を行った。グループABは単系統群であり、グループAとその外群であるニジュウヤホシテントウはナス科を食草とする。グループBはキク科のアザミやメギ科のルイヨウボタン、ウコギ科のトチバニンジン、ケシ科のヤマブキソウ等を食草とする。これらの事実は、グループBにおいてナス科から他の植物への食草の変換が起きたことを示している。集団系統樹でグループBの集団間に殆ど遺伝的分化が認められなかったために、グループB内の食草変換の方向は決定できなかったが、地史的なレベルでは極く短期間にグループ内で食草選択が変化したと思われる。同様に、グループB内に見られる様々な翅鞘形態も極めて短期間に進化したと推定された。

次に、集団間のハプロタイプの比較から、生殖的隔離に関する考察を行った。グループAとBは単独では完全な隔離効果を持たない複数の要因によって生殖的に隔離されており、稀に繁殖力のある雑種を生じることが知られている。しかし、今回の研究ではグループ間で共有されるハプロタイプは1例も認められなかった。このことは、生殖的隔離が見かけ上弱いにも関わらず、実際にはグループAとBの間で遺伝子流動が極めて強く制限されていることを示している。また、同所的に生息し、食草選択の違いが唯一の隔離であることが判明しているヤマトとルイヨウは、幾つかのハプロタイプを共有していたが、近接した地域から採集された両者がハプロタイプを共有する例は確認されなかった。この結果は、ヤマトとルイヨウの間の遺伝子流動もグループAとBの間と同様に良く制限されていることを示唆する。

最後に、今回得られた結果と現在知られている地史に関する知見を総合し、オオニジュウヤホシテントウ種群の進化史を以下のように推定した。集団系統樹によれば、まずグループAとBが分化し、次いでグループA内の地域集団間の分化が生じ、最後にグループB内の種分化、地域集団間分化が進んだことになる。グループA（オオニジュウ）は大陸、本州、北海道の集団へと分化しており、これはグループAの分化が朝鮮海峡、津軽海峡の最終的な成立の後に進行したと考えてもっとも矛盾が無い。しかし、津軽海峡を挟んでグループBのメンバー（ヤマト、ルイヨウ）が分布しているために、グループBの分化は津軽海峡が最終的に成立する以前であったことはほぼ確実である。従って、グループAの分化も、津軽海峡の成立する以前であったと思われる。また、利尻島は本州と地理的に離れているにも関わらず、利尻と本州のオオニジュウの集団間にはミトコンドリアDNAの遺伝的分化が認められない。このことは、利尻集団が極めて最近侵入した本州集団の子孫であることを示唆しており、利尻集団が人為分布である可能性もある。以上の仮説は、形態や核型の分析に基づくオオニジュウヤホシテントウ種群の進化史に関する従来の仮説とは、A、B 2グループの分化が最も大きいとする点で一致するが、グループAの地域集団の分化がグループBの分化より古いと推定した点、及び利尻に生息するオオニジュウが極めて最近に恐らくは人為的に分布すると考える点で異なっており、その可否については、今後の研究が必要である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 片 倉 晴 雄

副 査 教 授 馬 渡 駿 介

副 査 教 授 木 村 正 人 (地球環境科学研究科)

副 査 助 教 授 青 塚 正 志 (東京都立大学大学院理学研究科)

学 位 論 文 題 名

Molecular population genetic analyses of the phytophagous ladybird beetles, the *Epilachna vigintioctomaculata* species complex (Coleoptera : Coccinellidae)

(オオニジュウヤホシテントウ種群の分子集団遺伝学的解析)

食植性昆虫が非食植性昆虫に比べて多様であることについて、食草の変更が生殖的隔離（生態的隔離）を導き、それによって種分化が促進されるという説明が提出されている。この仮説はまた、同所的種分化のモデルとして関心を集めている。しかし、食草の変更にどれだけの遺伝的分化が伴うか？食草の変更にどれだけの時間が必要か？食草を異にするグループ間で真に遺伝子流動が制限されているか等について成された研究は未だに多くはない。本研究は、*E. vigintioctomaculata* 種群を対象に、これまでに蓄積されてきた膨大な形態学的、生態学的、細胞学的研究結果を基盤にしながら、分子系統学・集団遺伝学的手法による上記の問題について解明と、本種群の進化史の再構築を目指したものである。

本研究は *E. vigintioctomaculata* complex のすべての種、種内で認識される型を網羅する韓国 1 集団、日本 26 集団から各 10 個体、合計 270 個体について mtDNA COI 遺伝子領域 985bp を決定・比較した。その結果を基盤に、それぞれの種の集団内多様性、集団間分化、種間の分化量を推定するとともに、遺伝子系統樹、集団系統樹を構築した。塩基配列決定を比較的簡単に行うことが出来るようになった現在でも、種内多様性についての十分な知見を基に種間、集団間の遺伝的分化、系統関係を論じた研究は多くはない。本研究はその意味において高く評価できる。決定した DNA 領域は約 1Kbp であり、情報量も十分である。得られた塩基配列を基に、種内、種間の遺伝的多様性を論じているが、そのための集団遺伝学的解析手法の選択は適切であり、遺伝子系統樹、集団系統樹の構築手法も妥当である。

結果の主たる部分は以下のように要約される。

① *E. vigintioctomaculata* 種群は遺伝的に明瞭に分化した 2 つのグループに分け

られ、各々がこれまでに形態、食草によって識別されていた A 群と B 群に対応した。

②A 群 (*E. vigintioctomaculata*) では更に地域集団による分化が認められた。一方、残りの 3 種からなる B 群では、種間および種内集団間の遺伝的分化はきわめて小さく、系統樹上でそれぞれの種あるいは集団で検出された遺伝子配列型は単系統的なまとまりを見せなかった。B 群を構成する 3 種は形態、食草が異なるが、種間の mtDNA 遺伝子の塩基配列差異は種内地域集団間と同程度であることから、これらの変異は極めて短い進化的時間で生じたものであり、また、それぞれの種は現在もお祖先集団の多型性を引き継いでいると判断された。

③食草の違いが有効な種間の生殖的隔離機構として機能しているか否かを検討するために、同所的にあるいは、地理的に非常に近接して生息し、かつ食草を異にする 2 種間いくつかの組み合わせでの遺伝子流動を、mtDNA COI ハプロタイプを指標に検討した。その結果、すべての場合について、ハプロタイプの共有は認められず、食草の違いが、遺伝子流動を妨げる非常に強い障壁になっていることが示唆された。

④分子系統樹、遺伝的分化量から、A 群の地域集団分化は、B 群の種間、地域集団間の分化より早い時期に生じたことが示唆された。A 群で、形態の差異によって北海道型、本州型から識別される利尻型は mtDNA 配列の比較から、人間の活動に伴って移住した本州型が起源であることが示唆された。

得られたこれらの結果のうち②、③は、食草の変化に関連した種分化の遺伝的基盤について知見を与えるもので、特に重要である。

本研究は結論が得られないまま残されてきた *E. vigintioctomaculata* 種群の系統関係を、mtDNA 遺伝子の塩基配列から推定し、種群を構成する種を識別する形態、食草の違いが獲得されてきた過程を論議した。また、mtDNA 多型性を尺度に、自然集団において食草の違いが有効な生殖的隔離として機能しているか否かについて検討を加えた。その結果、前述のように多くの新知見を得た。

本研究が十分に練られた計画と、相当の採集努力の上に立って行われたことは高く評価できる。とりわけ可能な限り多くの集団と、個体数について分析し、十分な集団内、種内多様性の把握の上に本群の進化過程を検討した点は特筆される。食草、形態の変化が短時間に生じた、という得られた結果はこれまでの他生物種群についての研究でも示唆されているとはいえ、規模、詳細さにおいて本研究はすぐれたものといえる。本群の進化史の解明には更に多くの研究努力が必要と思われるが、本研究はそれらを導く基盤、あるいは今後の研究結果を考察する際の重要な指針になるとわれ、学位論文として十分な質、内容を持つと判定される。よって、審査員一同は、申請者が北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格のあるものと認めた。