

### 3. 昆虫と植物の共生・共進化機構および節足動物の系統進化

蘇智慧（主任研究員）、有本晃一（奨励研究員）、  
佐々木綾子（研究補助員）、星野朱音、呉恵子（大阪大学大学院生）

#### はじめに

地球上には、数千万種の生物が存在していると言われている。バクテリア、菌類、植物、動物、一見して何の関係もない生物だが、起源を探ってみるとただ1つの共通祖先に辿り着く。これほど多種多様な生物はどのようにして同じ祖先から多様化してきたのだろうか。生物学の最も基本的なこの問題を理解するには、時間軸における生物の進化過程と空間軸における生物種間の相互作用を理解するのが鍵となる。そこで、我々は以下に述べるように「昆虫と植物の共生関係」と「節足動物の系統進化」に焦点を当てて研究を進めてきた。

#### 3-1. 昆虫と植物の共生・共進化

様々な生物種から構成される地球生態系のなかでの生物同士あるいは生物と環境との相互作用は、生物の多様性を生み出す大きな原動力と考えられる。昆虫と被子植物はそれぞれ陸上で最も多様化した生物群で、その多様化は互いに相互適応的な関係を築くことによって促されてきたように見える。その顕著な例がイチジク属植物（Genus *Ficus*；以下、イチジク）とイチジクコバチ（以下、送粉コバチ）の共生関係であり、生態学的・進化学的な研究が多くなされてきた共進化のモデル系である。

イチジクは、東南アジア・アフリカ・中南米など熱帯を中心に約750種が分布している。日本はイチジクの分布域の北限にあたり、南西諸島を中心に16種が生育している。イチジクは花囊とよばれる袋状の閉じた花序をつけ、その内側に多数の花を咲かせる。送粉コバチは、この花囊に入り花粉を媒介するだけでなく同時に花に産卵する。ふ化した幼虫は虫こぶ（昆虫が改変した植物の組織）の中で成長する。やがて次世代の送粉コバチが花囊内で羽化・交配し、雌成虫が花粉を持って他の花囊へと移動することで次の受粉が成立する。このようにイチジクと送粉コバチは、繁殖において相互を必須とする絶対的な共生関係を構築している。

イチジクと送粉コバチとの共生関係は、「1種対1種」という種特異性が極めて高いものと言われている。この「1種対1種」関係を維持しながら種分化が起きるとしたら、同調した種分化や系統分化が起こることが予想される。これまで分子系統学的解析を用いてこの仮説を検証する研究が行われてきた。その結果、高次分類群（植物の節 section と送粉コバチの属 genus）レベルでは、系統関係がおおまかに一致し、仮説が支持されている<sup>1)</sup>。しかし種間・種内レベルでの系統関係の矛盾のほか、イチジクコバチの隠蔽種や1種のイチジク属植物に複数種の送粉コバチ（あるいはその逆）が共生するなど、不明瞭な点が残っている<sup>1-3)</sup>。我々のこれまでの研究によって、日本産のイチジク属植物とイチジクコバチでは「1種対1種」関係の厳密性が見られ、同調的系統分化が示唆された<sup>4)</sup>。一方でメキシコ産のイチジク属植物とイチジクコバチでは、近縁種間で「1種対1種」関係の乱れが見られた<sup>2)</sup>。また、小笠原諸島産のイチジク属植物の進化・種分化の過程においては異種間交雑が起きていたことが示唆され、雑種形成がイチジク属植物の種分化をもたらす要因の1つであると考えられた<sup>5)</sup>。さらに、イヌビロとその近縁種間の遺伝的比較解析からコバチの寄主転換による、複数の植物が1種のコバチを共有することが示唆された<sup>6)</sup>。

一方、送粉コバチの他に様々な動物がイチジクの果実や花囊に依存して生活していること

が知られている。そのため、イチジクが熱帯森のキーストン keystone であるとも指摘されている<sup>7)</sup>。その中で昆虫類に限って言えば、送粉を担わないゴール形成者や送粉コバチの寄生者・盗食寄生者、寄生者の高次寄生者を含む「非送粉コバチ相」<sup>8)</sup>があり、また、送粉コバチのメスを捕食するクロツヤバエ<sup>9)</sup>や、送粉コバチや非送粉コバチを捕食するアリ類もいる<sup>10)</sup>。このように、イチジクは実に多くの昆虫類と相互作用「網」を形成している。しかし、この相互作用網に対する総合的理解があまり進んでいない。特に日本国内におけるイチジクと関連のある非送粉コバチとアリ類を調べた研究例は少ない。このような状況は、イチジクや送粉コバチ、その他の生物との相互作用によって形成される生態系の実態や共進化機構への理解を妨げる。

以上に述べた背景のもとに、本研究では、イチジクと送粉コバチとの共生関係の構築過程と維持機構および種分化機構などについて研究を行っている。また、イチジクを中心とした相互作用網の包括的な理解に向け、イチジクと関係を持つ非送粉コバチ相とアリ相の解明にも焦点をあてた。

### 3-2. 節足動物の系統進化

記載種数において動物界最大の分類群である現生の節足動物門は、鋏角亜門 (Chelicerata; 以下、鋏角類)・多足亜門 (Myriapoda; 以下、多足類)・甲殻亜門 (Crustacea; 以下、甲殻類)と六脚亜門 (Hexapoda; 以下、六脚類) の 4 亜門に分類される。この節足動物門に属する生物は、地球上の至る所に分布しており人類にとっても身近なものが多い。しかし、節足動物の進化と多様化を理解するために最も必要となる、節足動物門の系統関係について多くの点が未だ明確になっていない。多足類の系統的位相については多足類と鋏脚類が姉妹群を形成する Myriochelata 説と多足類が汎甲殻類 (甲殻類+六脚類) と姉妹群を作る Mandibulata (大顎類) 説が提唱されている。近年の分子系統学的研究では大顎類説がより支持されている。しかし、その多くが信頼性の低い樹形から得られた結論のため、検討の余地が残されている。

我々はこれまでに複数の核タンパク遺伝子を用いて、六脚類と多足類の目レベルの系統関係を明らかにしてきた<sup>11)-13)</sup>。しかし、これらの遺伝子を用いても、節足動物 4 亜門の系統関係を明らかにするのは困難であった。そこで、本研究はより多くの遺伝子情報 (トランスクリプトーム配列データ) を用いて節足動物の系統関係の解明を試みている。

## 結果と考察

### 1) 送粉コバチの寄主転換の検証

イヌビワ (*Ficus erecta*) は関東以西から琉球、台湾、中国南部にかけて広く分布している。また台湾にはイヌビワに近縁な3種 *F. formosana*, *F. tannoensis* と *F. vaccinioides* が生育している。これら4種の近縁な植物種に対して、それぞれ種特異的に共生関係にあるイチジクコバチ (*Blastophaga nipponica*, *B. taiwanensis*, *B. tannoensis* と *B. yeni*) が知られている。植物種は形態的・遺伝的に明確に区別ができる。しかし、*F. vaccinioides* を寄主とする *B. yeni* を除くイチジクコバチ3種は、形態的にも遺伝的にも明確に識別が困難であり、3種の植物が1種のコバチを利用していることが示唆された<sup>7)</sup>。これはイヌビワコバチが他2種の植物に寄主転換した結果であると我々が考えている。このことを検証するために、今年度は中国大陸に分布するイヌビワと *F. formosana* およびそれらのコバチを採集し解析を行った。その結果、大陸産のイヌビワは、2つの遺伝的系統に分かれ、1つは馬祖列島のものと同じであり (福建)、もう1つは独立した系統 (広東) であることがわかった (図1)。 *F. formosana* については、大陸産のもの (広東と香港) は台湾産のものと同様に遺伝的区別が付かない (図1)。一方、イヌビ

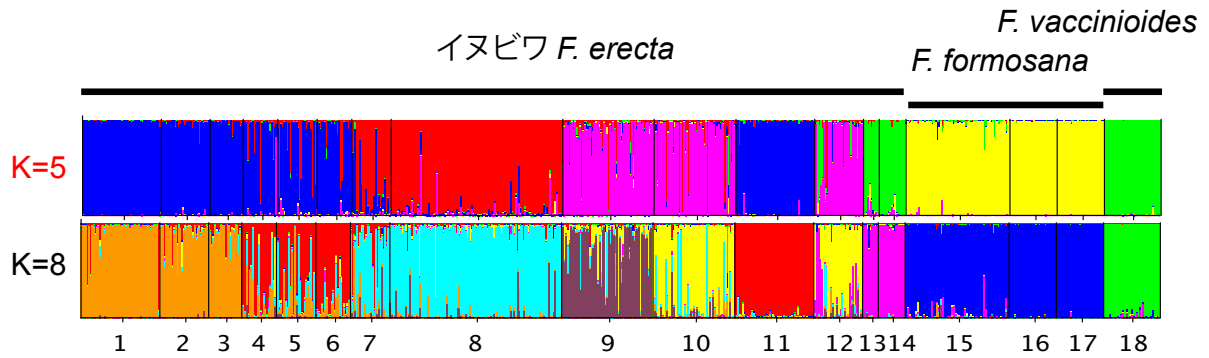


図1. イヌビワと *F. formosana*、*F. vaccinioides* の遺伝的関係。9つのマイクロサテライトマーカーによる集団遺伝構造の解析 (K=5 は最適である)。*F. erecta*: 1, 伊豆; 2, 関西; 3, 和歌山; 4, 5, 九州; 6, 対馬; 7, 沖縄; 8, 八重山; 9, 台湾; 10, 馬祖列島; 11, 濟州島; 12, 福建; 13, 14, 広東。*F. formosana*: 15, 台湾; 16, 広州; 17, 香港。*F. vaccinioides*: 18. 台湾。

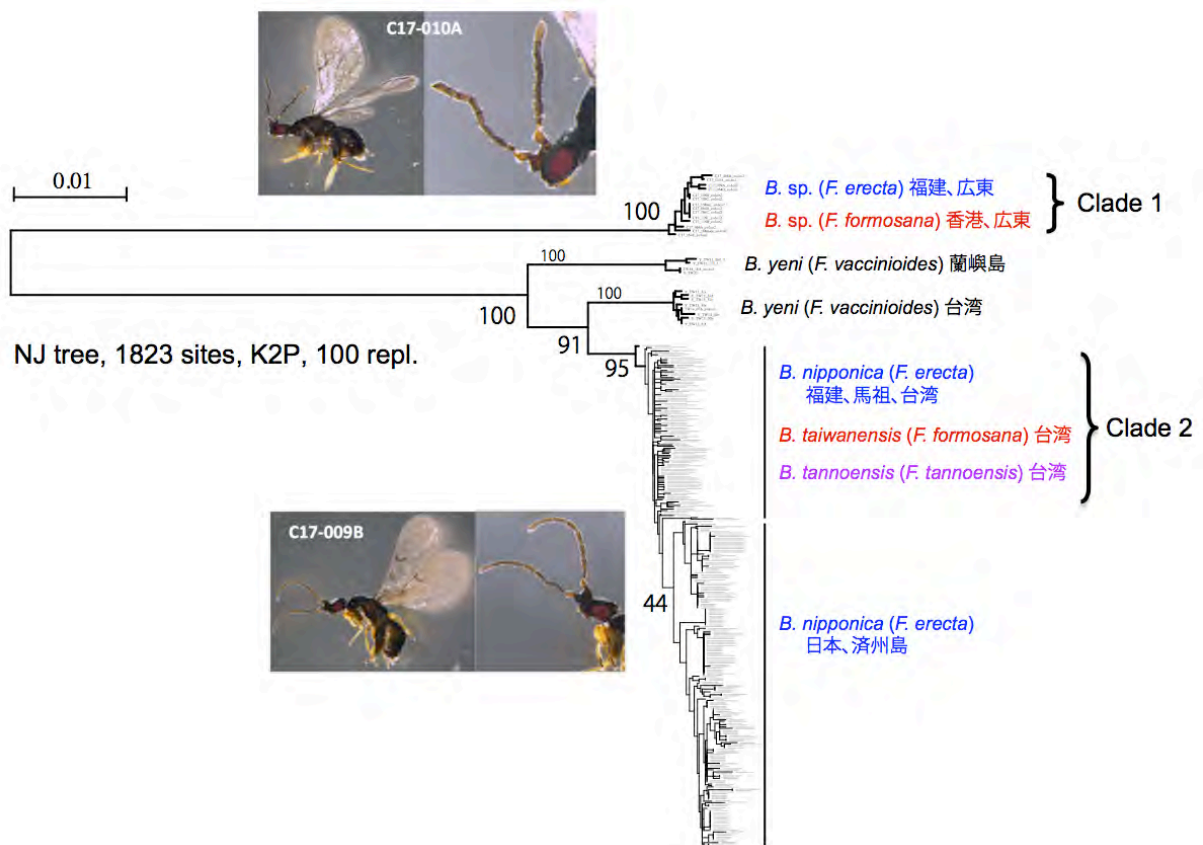


図2. ミトコンドリア遺伝子 (COI, COII, CytB) によるイヌビワとその近縁種の送粉コバチの系統関係。

ワ送粉コバチは、遺伝的大きく異なる2つの系統が存在していることが判明した (図2)。1つは独立した系統 (図2、Clade 1) であり、もう1つは台湾・馬祖列島のものと同一系統に入った (図2、Clade 2)。この2つの系統の送粉コバチは、触角と頭部における複眼の相対的位置と割合において顕著な形態的な違いが見られた (図2)。しかし、興味深いこと

にこの2系統の送粉コバチは、植物との遺伝的分化と一致しない。遺伝的に同一集団である福建のイヌビワ（同一個体にも）には2つの系統の送粉コバチが同時に存在していることが検出された

（図2）。つまり、遺伝的に大きく異なる送粉コバチが全く同一遺伝的集団または同一個体のイチジクの花嚢を認識し、そこで授粉と産卵することができ、次世代送粉コバチも育てられることが明らかになった。一方、*F. formosana* の送粉コバチについては、大陸のものが台湾のものと異なり、大陸のイヌビワ送粉コバチの Clade 1 と遺伝的に同一集団であることが分かった（図2）。この結果は、台湾でイヌビワと *F. formosana* の間に送粉コバチの寄主転換が起きていたことを強く支持し、また大陸でも同様な寄主転換が起きていることを示唆した。今後、大陸の送粉コバチの試料を追加して解析を行い、最終的な結論を出したい。

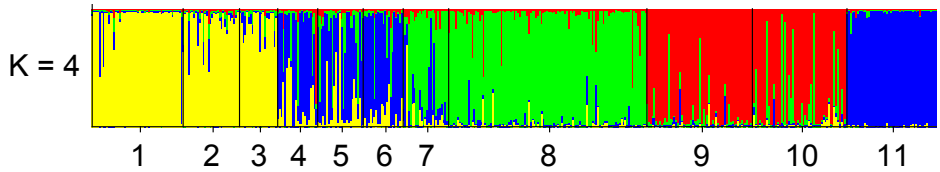


図3. イヌビワの集団遺伝構造。最適 K 値の結果を表示している。地域番号は表1と同様である。

表1. イヌビワの地域集団間の遺伝的分化 ( $F_{ST}$ )。

	静岡	和歌山	関西	福岡	鹿児島	対馬	沖縄	八重山	台湾	馬祖	濟州島
1静岡		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
2和歌山	0.060		0.021	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
3関西	0.052	0.018		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
4福岡	0.135	0.071	0.069		0.015	0.182	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
5鹿児島	0.126	0.070	0.079	0.018		0.017	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
6対馬	0.130	0.063	0.072	0.005	0.015		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
7沖縄	0.201	0.125	0.134	0.080	0.056	0.062		0.001	0.001	0.001	0.001
8八重山	0.177	0.120	0.141	0.097	0.085	0.091	0.055		0.001	0.001	0.001
9台湾	0.222	0.150	0.171	0.102	0.098	0.102	0.082	0.063		0.001	0.001
10馬祖	0.209	0.142	0.154	0.112	0.098	0.106	0.099	0.085	0.054		0.001
11濟州島	0.302	0.218	0.246	0.124	0.138	0.106	0.194	0.197	0.205	0.241	

左下:  $F_{ST}$  値; 右上: 統計検定の  $P$  値。赤塗: 有意ではない (危険率 1%)。

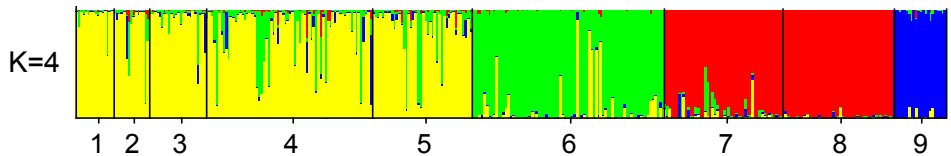


図4. イヌビワ送粉コバチの集団遺伝構造。最適 K 値の結果を表示している。地域番号は表2と同様である。

表2. イヌビワ送粉コバチの地域集団間の遺伝的分化 ( $F_{ST}$ )。

	伊豆	和歌山	関西	九州	沖縄	八重山	台湾	馬祖	濟州島
1伊豆		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
2和歌山	0.082		0.093	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
3関西	0.101	0.007		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
4九州	0.136	0.021	0.024		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
5沖縄	0.149	0.051	0.053	0.018		0.001	0.001	0.001	0.001
6八重山	0.157	0.069	0.076	0.041	0.074		0.001	0.001	0.001
7台湾	0.227	0.147	0.177	0.156	0.155	0.201		0.001	0.001
8馬祖	0.340	0.253	0.277	0.231	0.232	0.297	0.109		0.001
9濟州島	0.373	0.264	0.242	0.185	0.178	0.255	0.329	0.393	

左下:  $F_{ST}$  値; 右上: 統計検定の  $P$  値。赤塗: 有意ではない (危険率 1%)。

## 2) イヌビワとその送粉コバチの同調的遺伝分化

イチジクと送粉コバチの共進化・同調的種分化のプロセスを理解するために、近縁種間や集団レベルの解析が重要である。上に述べたように、イヌビワは日本、台湾、中国南部に分布しており、その分布域は海によって島々に隔離されている。これは異所的集団分化の解析に恰好な条件を提供している。昨年度は伊豆、関西、九州、沖縄、八重山、台湾、馬祖列島と済州島のイヌビワの地域集団の遺伝的構造解析の結果（図3と表1）を報告したが、本年度はそれらの送粉コバチの解析と、両者の地域集団間の遺伝的分化の同調性についても解析を行った。

15個のマイクロサテライトマーカーを用いて、伊豆、和歌山、関西、九州、沖縄、八重山、台湾、馬祖と済州島、計9地域集団のサンプルの解析を行った。Structure ver2.3.4 を用いて遺伝構造解析を行った結果、最適K=4の場合、4つの遺伝的集団が確認され、それらは伊豆・和歌山・関西・九州・沖縄、八重山、台湾・馬祖と済州島であった（図4）。一方、集団間の遺伝的分化の解析結果では、和歌山と関西の間を除き、全ての地域集団間の遺伝的分化が有意にあることが分かった（表2）。その遺伝的分化の度合いと地理的距離との関係において、寄主植物のイヌビワほどではないが、緩やかな相関が見られた（data not shown）。また、イヌビワとその送粉コバチの地域集団間の遺伝的分化の関係を調べたところ、両者間に強い相関関係が見られた（図5）。

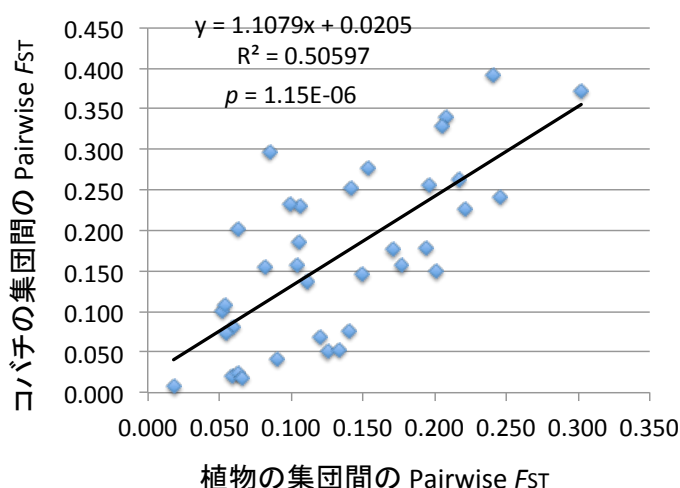


図5. イヌビワと送粉コバチの地域集団間の遺伝的分化の相関関係。

### 3) イチジクおよび送粉コバチの集団遺伝構造とイチジクの花囊の位置の関係

「はじめに」で述べたように、イチジクの花囊の中で成長したコバチは、産まれた花囊の花粉を身に纏いながら、産卵するために次の花囊へと飛び立って行く。その後は産卵可能な花囊が発するにおいを感知するまで、コバチは風に乗って漂っていることが先行研究で示唆されている<sup>14)</sup>。風は一般的に標高が高いほど強くなり、また森の中を飛ぶよりも樹冠の上を飛ぶ方が障害物も少なくなると考えられるため、高い位置から飛び立つコバチほどより遠くまで飛んで行けると推測される。実際樹高の高いイチジクを宿主としているコバチほど地表から高い位置を飛んでいて、飛び立った場所から遠くはなれた場所でも確認されることが報告されている<sup>15), 16)</sup>。これらのことから、イチジクの花囊の位置や高さに応じてコバチやイチジクの花粉の分散に違いがでることが考えられる。すなわち、花囊を低い位置につけるイチジクとその送粉コバチほど、地域集団間での遺伝子流動が制限されており、遺伝的分化が大きくなるのではないかと推測できる。

この仮説を証明するために、花囊の位置が違うイチジク4種とその送粉コバチの遺伝的分化の実態を明らかにして、それぞれの植物でイチジクの花粉やコバチがどのように分散しているかを検証している。調査対象とした植物は、花囊を木の幹や根元につけるアカメイヌビワ *F. benguetensis* (アカメイヌビワコバチ *Ceratosolen cornutus*) と、太い枝を含む枝全体につけ

るアコウ *F. superba* (アコウコバチ *Platyscapa ishiana*)、枝先のみにつけるハマイヌビワ *F. virgata* (ハマイヌビワコバチ *Kradibia philippinensis*)、ガジュマル *F. microcarpum* (ガジュマルコバチ *Eupristina verticillata*) を選んだ (表 3)。ハマイヌビワとガジュマルはどちらも枝先だけに花囊をつけるが、ハマイヌビワは低木～小高木なのに対し、ガジュマルは 10～20 m にもなる高木であるため、各々のコバチの飛ぶ環境は異なると考えられる。また、調査地はこれらの植物が多く分布しており、かつ海による地理的隔離が起こっていると考えられる台湾や南西諸島を選んだ。

表 3. 解析に使用したサンプル

	アカメイヌビワ	アカメイヌビワコバチ	ハマイヌビワ	ガジュマル	アコウ
沖縄本島	24	23 (11)	46	25	25
石垣島	25	22 (10)	20	31	25
西表島	20	11 (6)	26	20	17
与那国島	22	16 (4)	20	20	11
台湾	63	21 (12)	27	32	29
中国				26	19

コバチに関しては、コバチがとれた花囊の数を表しており、( )内は花囊がとれた木の株数を表す。また、アカメイヌビワコバチ以外はまだ解析されていないため、表に表示していない。

**3-1. アカメイヌビワとアカメイヌビワコバチ**：母性遺伝する葉緑体 DNA の遺伝子間領域 (*atpB-rbcL*) を種子分散のマーカーとしてハプロタイプ解析を行ったところ、アカメイヌビワでは 2 つのハプロタイプ (h1 と h2) が確認された (図 6)。南西諸島では、沖縄と石垣の集団が h1、西表と与那国の集団が h2 で、西表の一地点でのみハプロタイプが混在していた。また、台湾の個体は大山脈や大河を境に 2 つのハプロタイプに分かれることも確認された。これらの結果から、アカメイヌビワでは石垣島と西表島の距離 (約 10 km) では多少の移動はあるものの、種子が島間を移動することは少ないことが示唆された。

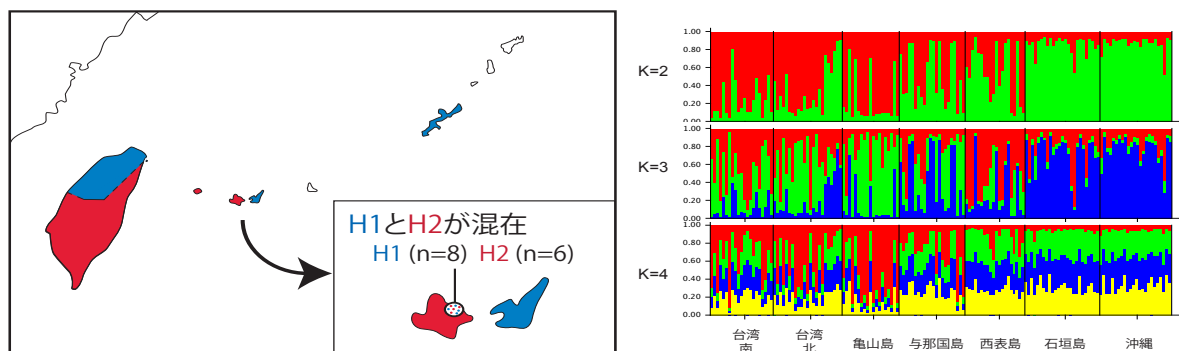


図 6. アカメイヌビワの葉緑体 DNA のハプロタイプの分布 (左) とマイクロサテライトマーカー (7 遺伝子座) による集団遺伝構造 (右)。K=3 は最適である。

さらにマイクロサテライトマーカーを使用して、遺伝的集団構造を見る解析も行った。基本的には地理的距離が大きくなるほど地域集団間の遺伝的分化 ( $F_{ST}$ ) が大きくなっていることがわかったが、石垣島と西表島との間に距離から想定される以

表 4. アカメイヌビワの地域集団間の遺伝的分化 ( $F_{ST}$ )

	台湾南	台湾北	亀山島	与那国島	西表島	石垣島	沖縄
台湾南		0.001	0.011	0.001	0.001	0.001	0.001
台湾北	0.045		0.050	0.053	0.001	0.001	0.001
亀山島	0.036	0.021		0.001	0.001	0.001	0.001
与那国島	0.113	0.022	0.081		0.001	0.001	0.002
西表島	0.071	0.073	0.129	0.096		0.001	0.001
石垣島	0.160	0.103	0.201	0.084	0.078		0.221
沖縄	0.170	0.094	0.200	0.070	0.094	0.007	

左下:  $F_{ST}$  値; 右上: 統計検定の P 値; 赤塗: 有意ではない (危険率 1%)。



上の明らかな違いがあること、また石垣島と沖縄本島との間に遺伝的分化が見られないことの2点に疑問が残った(表4)。

一方コバチ側は、ミトコンドリアCytB配列の解析を終え、NJ法で系統樹を作成した結果、遺伝的に大きく異なる2つのCladeが存在していることがわかった(図7)。Clade 1は台湾と与那国島のサンプル、Clade 2は全地域のサンプルから検出された。つまり、台湾と与那国では、2つのCladeが共に存在しているのである。また、ハプロタイプのネットワーク解析を行ったところ、Clade 1には5つ、Clade 2には16個のハプロタイプが含まれていることが判明した(図8)。島ごとのハプロタイプの分布を見ると、全ての島が共通にもつハプロタイプや、4つの島、3つの島、2つの島がそれぞれ共通に持つハプロタイプが存在していることが分かった(図8)。

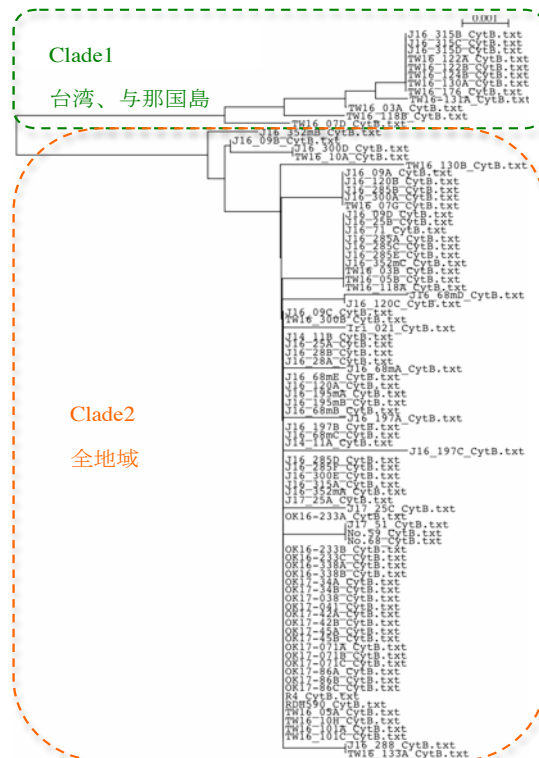


図7. アカメイヌビワコバチ CytB の系統樹。

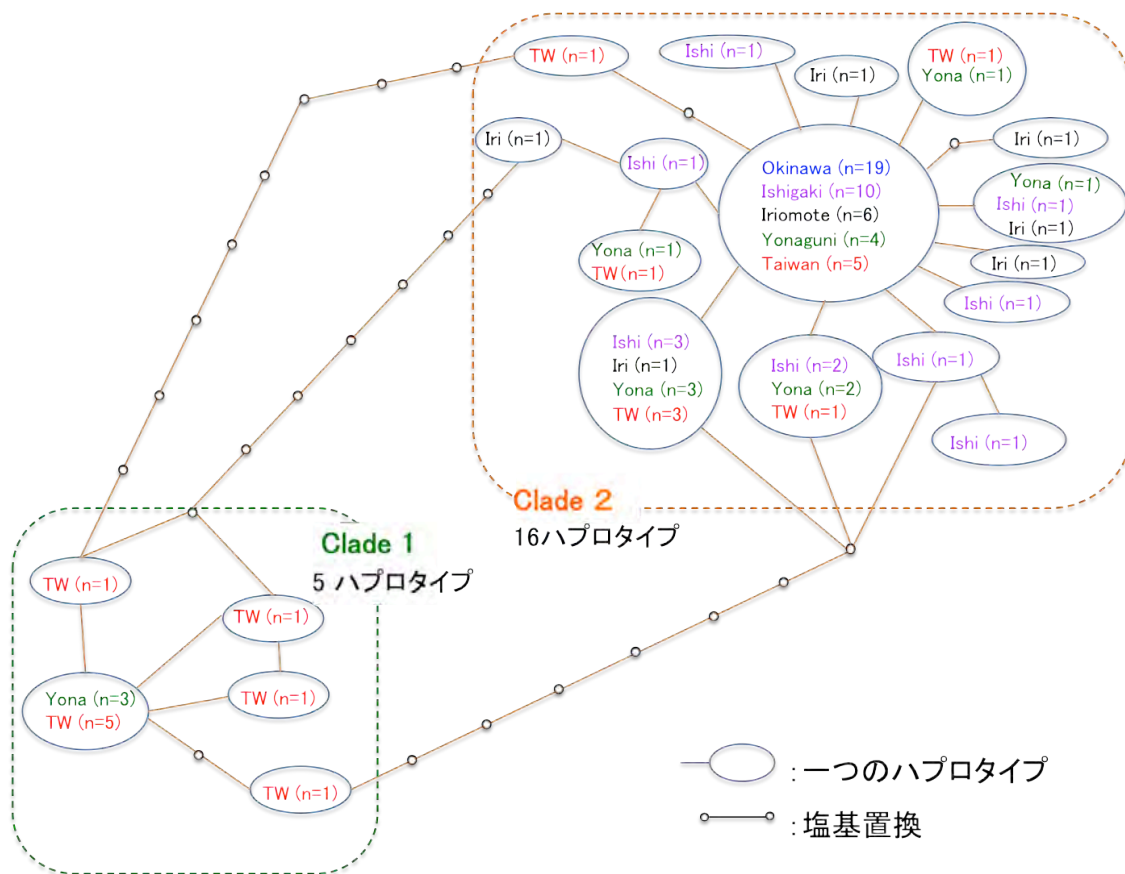


図8. 島ごとのCytBのハプロタイプの分布。

このことから、島間でのコバチの移動による遺伝子流動が起きていることが示唆された。一方、島ごとのハプロタイプの構成が異なっており、沖縄と与那国を除いて他の島には固有のハプロタイプが検出されていることから、島間の遺伝的分化も起きていることが示唆された。この結果は植物の解析結果を支持するものである。石垣島と西表島では、固有のハプロタイプが多く検出されているため、島間のコバチの移動が比較的制限されていると考えられる。この結果も植物の解析結果と一致するが、なぜ地理的距離が近い両島間のコバチの移動が少ないのかは今後の課題である。沖縄本島では一つのハプロタイプしか検出されていない。このハプロタイプを持つ祖先集団が石垣島から沖縄本島に侵入し、広がったと考えられる。この結果も植物の解析結果と矛盾しない。今後、ミトコンドリアC01, C02と核DNAのマイクロサテライトマーカーを加えた解析を行い、アカメイヌビワコバチの集団遺伝構造を明らかにする予定である。

**3-2. その他の植物とコバチについて：**アカメイヌビワとアカメイヌビワコバチ以外の試料に関しては、植物（ハマイヌビワ、ガジュマル、アコウ）の集団遺伝学的解析を行ったところである。

葉緑体 DNA (*atpB-rbcL*) のハプロタイプ解析で、ハマイヌビワは沖縄から台湾にかけてのすべての地域で同一ハプロタイプを保有していることがわかった (図 9)。ガジュマルも基本的には全地域同一ハプロタイプだったが、11 個体だけ別のハプロタイプを持つものが確認され、これらは台湾 (全 33 個体) に点在していた (図 10)。アコウは八重山地域 (石垣島、西表島、与那国島) で他と異なるハプロタイプが確認された (図 11)。ハマイヌビワやガジュマルの結果からは種子の移動が頻繁に起きているために均一なのか、すべて同じハプロタイプだから種子の移動が検出できていないのかはわからない。しかし、花囊の色や大きさがほぼ同じであるアコウでは、台湾 / 八重山 / 沖縄にハプロタイプの境界が見えたので、その間では種子の移動が起きている可能性が考えられる。

マイクロサテライトマーカーを用いた集団遺伝構造の解析も行った。台湾と南西諸島に焦点を当てると、ハマイヌビワでは沖縄とその他の地域、ガジュマルでは台湾とその他、アコウでは葉緑体 DNA の結果と同じく台湾 / 八重山 / 沖縄の間に小さいながらも違いが見られた (表 5-7)。なお、ガジュマルとアコウの 2 種で加えた中国大陆のサンプルは、台湾までの地域との間に大きな遺伝的分化が見られ、特にガジュマルでその違いが大きかった。イヌビワ (表 1 参照) やアカメイヌビワ (表 4) のように顕著な地域間の遺伝的分化は 3 種ともに見られなかったが、同じイチジク属植物でも種ごとに分化の境界が違うことがわかった。

今後は 3 種の送粉コバチ (アコウコバチ、ハマイヌビワコバチ、ガジュマルコバチ) に関しても、ミトコンドリア遺伝子のハプロタイプ解析やマイクロサテライト解析を行って集団遺伝構造を明らかにし、植物側の結果と合わせてその全容を解明して行く予定である。そしてそれらの結果を比較することで、花囊の位置が植物とコバチの遺伝的分化にどの程度効いているのかを明らかにしていきたい。

表 5. ハマイヌビワの地域集団間の遺伝的分化 ( $F_{ST}$ )

	台湾	与那国	西表	石垣	沖縄南	沖縄北
台湾		0.448	0.015	0.073	0.003	0.001
与那国	0.000		0.377	0.439	0.042	0.011
西表	0.014	0.001		0.189	0.022	0.012
石垣	0.010	0.000	0.005		0.007	0.001
沖縄南	0.022	0.013	0.014	0.023		0.066
沖縄北	0.029	0.019	0.014	0.033	0.011	

左下:  $F_{ST}$  値; 右上: 統計検定の  $P$  値; 赤塗: 有意ではない (危険率 1%)。



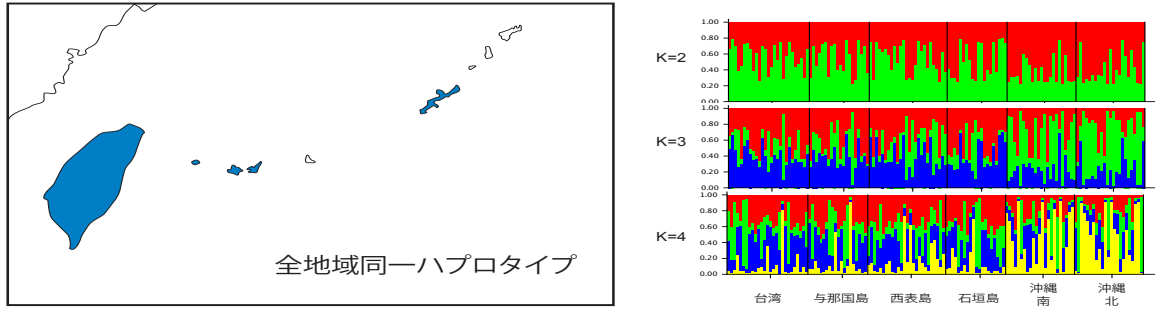


図 9. ハマイヌビワの葉緑体 DNA のハプロタイプ分布 (左) とマイクロサテライトマーカー (9 遺伝子座) による集団遺伝構造 (右)。K=3 は最適である。

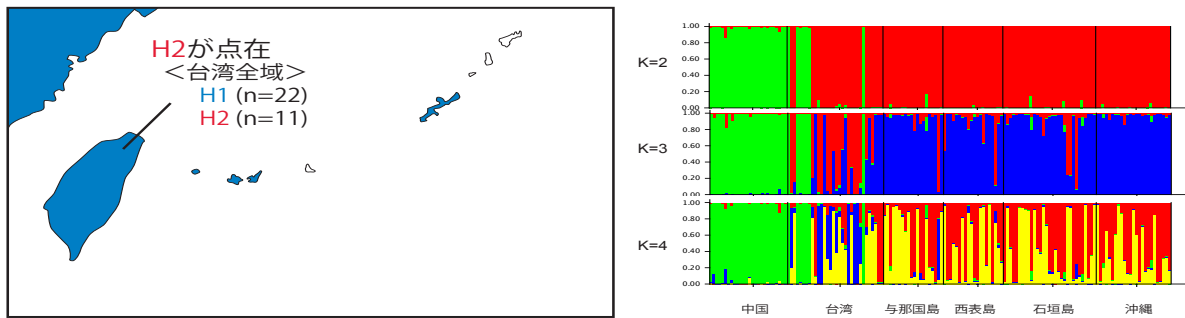


図 10. ガジュマルの葉緑体 DNA のハプロタイプ分布 (左) とマイクロサテライトマーカー (9 遺伝子座) による集団遺伝構造 (右)。K=3 は最適である。

表 6. ガジュマルの集団間の遺伝的分化 ( $F_{ST}$ )

	中国	台湾	与那国	西表	石垣	沖縄
中国		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
台湾	0.135		0.001	0.001	0.001	0.001
与那国	0.262	0.059		0.013	0.001	0.011
西表	0.271	0.060	0.020		0.005	0.028
石垣	0.249	0.069	0.032	0.023		0.096
沖縄	0.243	0.060	0.018	0.016	0.007	

左下:  $F_{ST}$  値; 右上: 統計検定の P 値; 赤塗: 有意ではない(危険率1%)。

表 7. アコウの集団間の遺伝的分化 ( $F_{ST}$ )

	中国	台湾	与那国島	西表島	石垣島	沖縄
中国		0.001	0.013	0.001	0.001	0.001
台湾	0.033		0.462	0.003	0.001	0.006
与那国島	0.032	0.000		0.435	0.314	0.058
西表島	0.059	0.025	0.001		0.170	0.001
石垣島	0.059	0.039	0.004	0.008		0.001
沖縄	0.047	0.021	0.019	0.064	0.057	

左下:  $F_{ST}$  値; 右上: 統計検定の P 値; 赤塗: 有意ではない(危険率1%)。

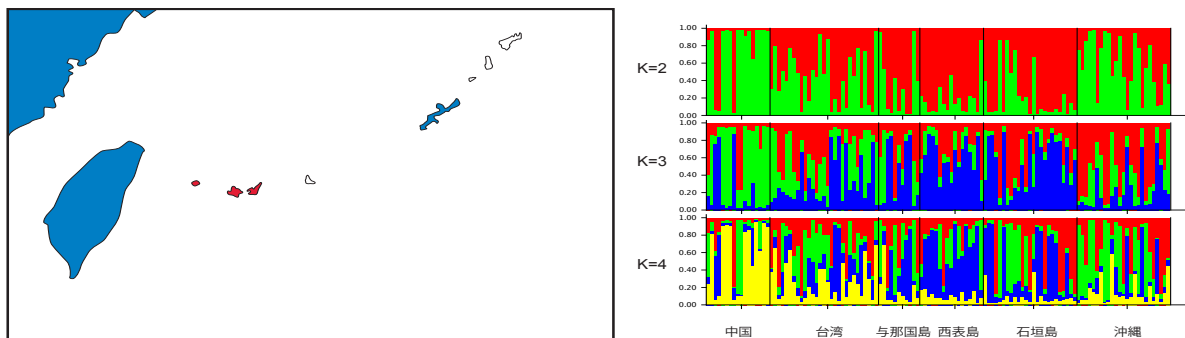


図 11. アコウの葉緑体 DNA のハプロタイプ分布 (左) とマイクロサテライトマーカー (7 遺伝子座) による集団遺伝構造 (右)。K=3 は最適である。

#### 4) 送粉コバチの寄主植物認識遺伝子の探索

送粉コバチはそれぞれ特異的なイチジクを利用するために形態的にも生態的にも適応しているように見える。そして、寄主植物種を認識するには嗅覚情報を利用していると考えられている。しかし、コバチにおいて、寄主植物認識にどのような遺伝子が重要な役割を担っているかという分子メカニズムは不明である。この寄主植物認識遺伝子を明らかにすることができれば、送粉コバチがどのようにして寄主植物を認識し、どうやって適応してきたかという共生の進化についての重要な知見が得られることが期待される。

4種の送粉コバチ（イヌビワコバチ、アカメイヌビワコバチ、オオバイヌビワコバチ、ギランイヌビワコバチ）の雌の頭部（触角を含む）で発現している遺伝子群を網羅的に比較することにより、主に嗅覚情報の認識に関与している可能性のある遺伝子の探索を試みた。生体頭部からRNAを抽出し、cDNAを合成した。合成したcDNAをライブラリー化し、次世代シーケンサ（Miseq）で配列の決定を行った。得られた配列データをアセンブルし、7つのデータベースによる遺伝子のアノテーションと種間の遺伝子発現の差異の解析を行った。その結果、4種のコバチの頭部で発現している遺伝子から、計257個のコンテイングがodorant関連遺伝子であることが示された。これらの遺伝子の種間での発現差異を調べたところ（図12）、ギランイヌビワコバチと他3種との間に、発現差異が検出された遺伝子の数が61-64個で最も多かった。最も少なかったのはオオバイヌビワコバチとアカメイヌビワコバチの間で、44個であった。また、ベン図解析の結果、イヌビワコバチと他種とのペアは、より多くのペア特有の差異発現遺伝子を持っていることが分かった（data not shown）。今後、これらの遺伝子について、より詳細な解析を行う予定である。

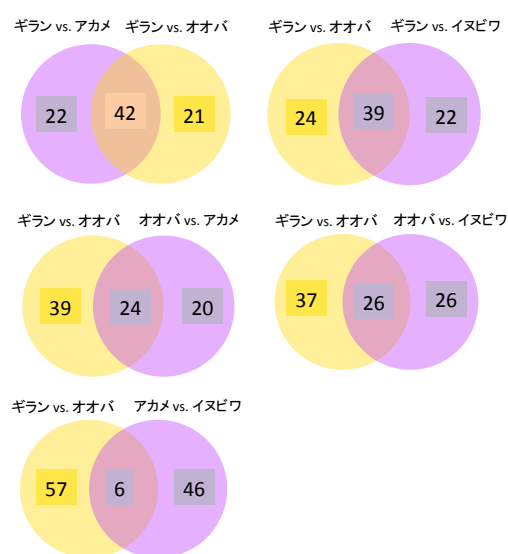


図 12. 送粉コバチの頭部で発現している odorant 関連遺伝子の種間比較。

#### 5) イチジクと関連のある非送粉コバチ相

**5-1. 既知情報のまとめ：**日本からは16種のイチジクとそれに1種対1種で対応する送粉コバチが分布している。ただし、トキワイヌビワ *F. boninsimae* とオオトキワイヌビワ *F. nishimurae* の送粉コバチは同種の可能性が疑われているが<sup>4)</sup>、まだ十分に調べられていないため、結論が出ていない。よって、日本産送粉コバチは15種もしくは16種とする。日本産非送粉コバチは26種が判明していた<sup>17)</sup>。

**5-2. 非送粉コバチ相の再調査：**実体顕微鏡を用いて、我々が収集した試料を検したところ、ハマイヌビワから記録されていた *Sycoscapter* sp. は *Sycoscapteridea* 属の種として扱うのが適切であると判明した。*Sycoscapteridea* 属は日本から初めて記録される。また、19種の非送粉コバチが新たに見つかり、既知種と合わせ45種が確認されることとなった。

新記録種の中には、イヌビワから得られた *Sycoscapteridea* 属の種も含まれていた（キバラコバチ *Sycoscapteridea* sp. 1）。野外観察によって、キバラコバチはイヌビワの花嚢壁に産卵管を突き刺す産卵行動を示すことがわかり、イヌビワコバチ *Blastophaga nipponica*（送粉コバチ）

の一次寄生者の可能性が高いと示唆された (図 13)。イヌビワコバチの一次寄生者としてはイヌビワオナガコバチ *Sycosapter inubiae* が既に知られており、キバラコバチが一次寄生者である場合、両寄生コバチは餌資源をめぐって競争関係にあることになる。イヌビワオナガコバチの分布域はイヌビワの分布域とほぼ同じで、関東地方から南西諸島にかけて広く分布している。一方、キバラコバチは沖縄島と南大東島、薩摩半島、紀伊半島南部から見つかっており、それらの地域ではイヌビワオナガコバチと同所的に生息している (図 14)。沖縄島では両種が同じ花囊に集まっている場面を観察しており (図 15)、沖縄島と南大東島、薩摩半島では同じ花囊内から両種が羽化することを確認しているため、両種は微環境においても全くの同所的な競争相手である。

次に、イヌビワオナガコバチとキバラコバチの系統的な位置関係を知るため、28SrDNA 約 800bp を用いて、最尤法により系統解析を行なった。解析に用いた塩基配列情報は、Sycoryctini 族



図 15. イヌビワの花囊に集まる寄生コバチ。黒矢印がキバラコバチを示し、白矢印がイヌビワオナガコバチを示す。

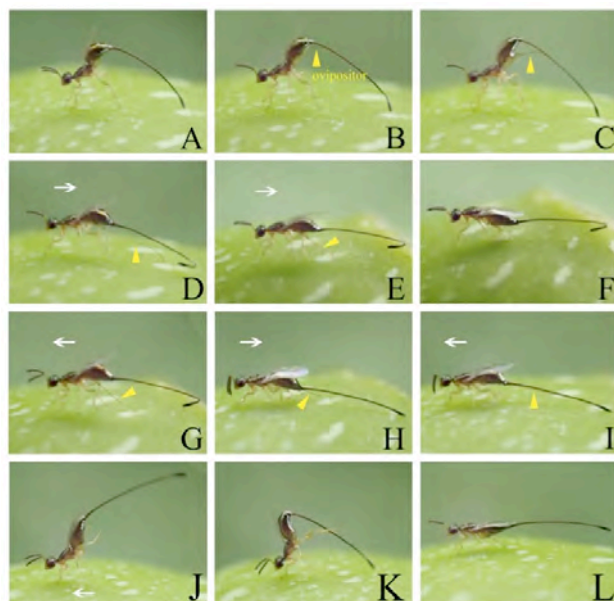


図 13. キバラコバチの産卵行動。アルファベット順に時間が経過している。白矢印はコバチの体の動き、黄色矢印は産卵管を示している。

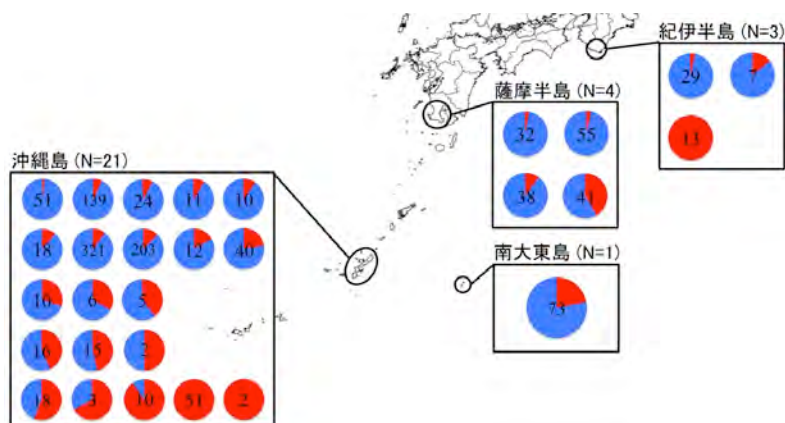


図 14. 野外調査で得られたイヌビワオナガコバチとキバラコバチの比率。各円グラフは、イヌビワ 1 株(花囊 3-5 個)から得た寄生コバチ 2 種の個体数の比率を表している。N は各採集場所で調査した株の数を示す。円グラフ中心の数字は寄生コバチ 2 種を合わせた総個体数、青色はイヌビワオナガコバチの比率、赤色はキバラコバチの比率を表している。

の 66OTU で、その内 23OTU は本研究室で保管している日本産種であり、43OTU は海外産種のデータを Gene Bank より取得したものである。系統解析の結果、両者は Sycoryctini 族の異なる系統群に含まれること判明した (図 16)。また、キバラコバチは系統的に派生的な位置にあるため、東南アジアから北上してきた祖先グループが東アジア地域において種分化し、現在のファウナが形成された可能性が示唆された。

ファウナの調査では、多くの株でキバラコバチよりイヌビワオナガコバチの個体数が多かったため、キバラコバチが派生的なグループであるとする、イヌビワオナガコバチが単独で利用していたイヌビワに後からキバラコバチが適応して割り込み、少しずつ分布域を拡大してきている途中にあると考えられる。

今後は、系統解析に用いる分類群や塩基配列数を増やし、非送粉コバチ全体の系統関係を把握することで、イチジクと非送粉コバチ、および送粉コバチと非送粉コバチの相互作用の進化を解明していきたい。

#### 6) イチジクと関連のあるアリ科昆虫

日本からは、イチジクとアリの相互作用に焦点をあてた研究はない。しかし、隣り合う台湾からは多くの研究例が報告されている<sup>10)</sup>。そのため、日本の、特に南西諸島のイチジクとアリの関係が解明されれば、生物地理学的観点も含めて、相互作用の進化を深く考察できるようになるだろう。

今回は、イチジク-コバチ系に深く関連のあるアリを調べるため、イチジクの花囊の中に侵入しているアリや花囊の入り口付近にいるアリを重点的に調査した。そのため、概してアリはD期の入り口の開いた花囊から得たものであり、アリが見られた株全体としてはC期からD期の間にあるものを調査対象としている。収集した試料は実体顕微鏡下で検鏡し、種名を特定した。

沖縄島での調査の結果、6種のイチジクから2亜科7属11種のアリを確認した。イチジク6種のうち、2種からは初めてアリが確認された。アリ7属は、東洋区においてはすでに記録のある属である。

#### 7) 節足動物の系統関係の解析

本研究の目的は主として節足動物門の4亜門（鋏角亜門、多足亜門、甲殻亜門と六脚亜門）の系統関係を明らかにすることである。手法としては、各亜門から代表的な種を選んで、生体試料からRNAを抽出し、cDNAライブラリーを作成した後、次世代シーケンサーを用いて配列を決定し、そこからオーソログ遺伝子を抽出して系統解析を行う。我々は14年度からトランスクリプトーム情報を用いて多足類の系統関係の解明に取り組んでいるので、多足類の配列データはすでに揃っている。また、六脚類については、必要な種の配列情報はすでに他の研究者から公表されているため、データベースから入手可能である。従って、本研究を遂行するにあつ

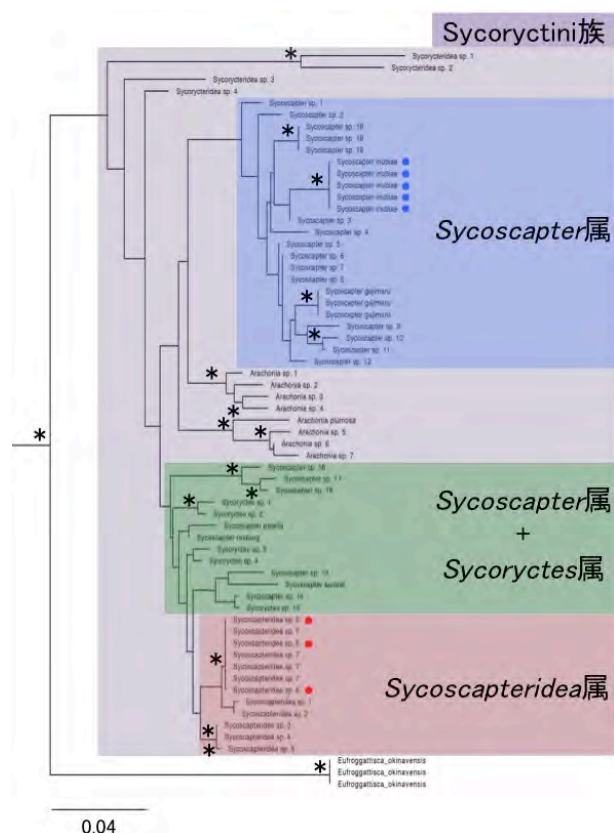


図 16. Sycoryctini 族内の系統関係。RAxML による最尤法で推定された分子系統樹。\*は Bootstrap 値>90 を表す。青丸はイヌビワオナガコバチ、赤丸はキバラコバチの位置を示す。

て、我々が配列データの決定を行う必要があるものは缺角亜門と甲殻亜門の試料である。本年度は下記の試料からトランスクリプトーム配列を決定した。缺角亜門のウミグモ綱とカブトガニ綱から1種ずつ、甲殻亜門については、鰓脚綱の無甲目、背甲目、双殻目から1種ずつ、顎脚綱のカラヌス目、キクロプス目、無柄目から1種ずつ、軟甲綱の根鰓亜目（十脚目）、エビ亜目（十脚目）、コノハエビ目、シャコ目から1種ずつ、計12種であった。それぞれの試料から約1500~3600万リードの配列データが得られた。アSEMBLを行った結果、コンティグ数は種によって異なるが、およそ9万~40万得られた。今後、短い配列（500塩基対以下）のコンティグを除いたあと、それぞれのコンティグ配列をアミノ酸配列に翻訳する。複数の節足動物（全ゲノム配列が分かっているもの）に共通して存在する単一コピーの相同遺伝子（オーソログ遺伝子）を参考配列として、類似性の高いコンティグ配列を検索し集め、系統解析に使用するための候補配列を得たうえ、系統解析を行う予定である。

#### おわりに

イチジクと送粉コバチとの共生・共進化・共種分化機構を解明するために、これまで主として分子系統解析・集団遺伝解析・花の匂いの化学成分の解析・遺伝子発現の解析を通して研究を行ってきた。今年度は、さらにイチジクと昆虫類との相互作用の進化を統括的に理解するために、非送粉コバチ類とアリ類の収集・行動観察、形態分類と系統解析を行い、多くの未記載種と未記録種を発見した。昨年度に引き続き行ったイヌビワとその近縁種およびそれぞれのイチジクコバチの種間・種内の関係解明では、遺伝的に大きく異なる送粉コバチが同一寄主植物を利用することを発見し、また、大陸と台湾で同様な送粉コバチの寄主転換が起きていることを示唆した。また、イヌビワとその送粉コバチの間では、地域集団間の同調的遺伝分化が確認された一方、その地域集団間の遺伝的分化は種によって異なるパターンも示された。送粉コバチの雌頭部の発現遺伝子の解析では、odorant 関連の遺伝子が得られ、種間の発現差異も見られたのは大きな成果の1つであろう。今年度得られた研究成果は、どれの重要な知見ではあるが、まだ初期段階のものが多く、今後、試料とデータを追加し、様々な解析を行い、それぞれに対して結論を出したい。より将来的な目標としては、イチジクと相互作用のある送粉コバチを始め、他の昆虫類も含めて、イチジク-昆虫類共生系の共進化・共種分化のプロセスとメカニズムを統括的に理解するのに向けて、研究を進めていきたい。

#### 引用文献

- 1) Cruaud, A. et al. (2012) An extreme case of plant-insect codiversification: figs and fig-Pollinating wasps. *Syst. Biol.* 61: 1029-1047.
- 2) Su Z.-H., Iino H., Nakamura K. Serrato A. and Oyama K. (2008) Breakdown of the one-to-one rule in Mexican fig-wasp associations inferred by molecular phylogenetic analysis. *Symbiosis* 45: 73-81.
- 3) Cornille, A., Underhill, J.G., Gruaud, A., Hossaert-McKey, M., Johnson, S.D., Tolley, K.A., Kjellberg, F., von Noort, S. and Proffitt, M. (2012) Floral volatiles, pollinator sharing and diversification in the fig-wasp mutualism: insights from *Ficus natalensis*, and its two wasp pollinators (South Africa). *Proc. R. Soc. B* 279: 1731-1739.
- 4) Azuma H., Harrison R.D., Nakamura K. and Su Z.-H. (2010) Molecular phylogenies of figs and fig-pollinating wasps in the Ryukyu and Bonin (Ogasawara) islands, Japan. *Genes*

- Genet. Syst. 85: 177–192.
- 5) Kusumi, J., Azuma, H., Tzeng, H.-Y., Chou, L.-S., Peng, Y.-Q., Nakamura, K., and Su, Z.-H. (2012) Phylogenetic analyses suggest a hybrid origin of the figs (Moraceae: *Ficus*) that are endemic to the Ogasawara (Bonin) Islands, Japan. *Mol. Phylogenet. Evol.* 63: 168–179.
  - 6) Wachi, N., Kusumi, J., Tzeng, H.-Y., and Su, Z.-H. (2016) Genome-wide sequence data suggest the possibility of pollinator sharing by host shift in dioecious figs (Moraceae, *Ficus*). *Mol. Ecol.* 29: 5732–5746.
  - 7) Shanahan, M., So, S., Compton, S. and Corlett, R. (2001) Fig-eating by vertebrate frugivores: a global review. *Biological Reviews*, 76: 529–572.
  - 8) Bain, A., Tzeng, H-Y., Wu W-J. and Chou, L-S. (2015) *Ficus* (Moraceae) and fig wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea) in Taiwan. *Botanical studies*, 56:11.
  - 9) Okamoto, T., Macgowan, I. and Su, Z-H. (2012) Predation on the pollinating fig wasp of *Ficus erecta* by larvae of *Silba* sp. (Diptera: Lonchaeidea). *Entomological science*, 15: 288–293.
  - 10) Bain, A., Harrison, R.D. & Schatz, B. (2014) How to be an ant on figs. *Acta Oecologica*, 57: 97–108.
  - 11) Sasaki, G., Ishiwata, K., Machida, R., Miyata, T. and Su, Z.-H. (2013) Molecular phylogenetic analyses support the monophyly of Hexapoda and suggest the paraphyly of Entognatha. *BMC Evol. Biol.* 13:236.
  - 12) Ishiwata K., Sasaki G., Ogawa G., Miyata T. and Su Z.-H. (2011) Phylogenetic relationships among insect orders based on three nuclear protein-coding gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 58: 169–180.
  - 13) Miyazawa, H., Ueda, C., Yahata, K., and Su, Z.-H. (2014) Molecular phylogeny of Myriapoda provides insights into evolutionary patterns of the mode in post-embryonic development. *Scientific Reports* 4:4127.
  - 14) Compton, S.G., Ellwood, M.D.F., Davis, A.J., and Welch, K. (2000) The Flight Heights of Chalcid Wasps (Hymenoptera, Chalcidoidea) in a Lowland Bornean Rain Forest: Fig Wasps are the High Fliers. *Biotropica*, 32: 515–522.
  - 15) Harrison, R.D. (2003) Fig wasp dispersal and the stability of a keystone plant resource in Borneo. *Proceedings of The Royal Society London Series*, B270:S76–S79.
  - 16) Harrison, R.D., and Rasplus, J.-Y. (2006) Dispersal of fig pollinators in Asian tropical rain forests. *Journal of Tropical Ecology*, 22:631–639.
  - 17) Yokoyama, J. and Iwatsuki, K. (1998) A faunal survey of fig-wasps (Chalcidoidea: Hymenoptera) distributed in Japan and their associations with figs (*Ficus*: Moraceae). *Entomological science*, 1: 37–46.
  - 18) Lupo, A. and Galil, J. (1985) Nesting habits of *Cardiocondyla wroughtoni* Forel (1890) (Hymenoptera: Formicidae). *Israel Journal of Entomology*, 19: 119–125.
  - 19) Wang, R.W., Dunn, D.W. and Sun, B.F. (2014) Discriminative host sanctions in a fig-wasp mutualism. *Ecology*, 95: 1384–1393.



科学のコンサートホール

BRH JT 生命誌研究館

系統進化研究室

(DNAから進化を探るラボ)

2017年度 活動報告書 V. 研究活動報告より

問い合わせ先：

JT 生命誌研究館 〒569-1125 大阪府高槻市紫町 1-1

072-681-9750 (代表)