

信州大学審査学位論文

コオイムシ類における系統進化・発生・生態学的研究

2014年3月

信州大学大学院総合工学系研究科

山岳地域環境科学専攻

11ST402G 鈴木 智也

## 目次

緒言	6
図	11
<b>第 I 章 コオイムシおよびオオコオイムシの系統・分類</b>	<b>13</b>
I-1. 背景	14
I-2. 材料と方法	16
I-2-1. サンプリング	16
I-2-2. 遺伝子解析	16
I-2-3. 系統樹作成	17
I-2-4. 形態学的解析	18
I-3. 結果	20
I-3-1. 分子系統解析	20
I-3-2. 形態比較	21
I-4. 考察	23
I-4-1. 分子系統解析によるコオイムシおよびオオコオイムシの分類学的再検討	23
I-4-2. 両種間の形態比較	25
表	28
図	46
<b>第 II 章 コオイムシおよびオオコオイムシの系統地理</b>	<b>56</b>
II-1. 背景	57
II-2. 材料と方法	59

II-2-1. サンプルング	59
II-2-2. 遺伝子解析	59
II-2-3. 系統樹作成	59
II-2-4. 分岐年代推定	60
II-2-5. AIS によるレフュジアの推定	61
II-3. 結果	61
II-3-1. 遺伝子解析および分岐年代推定	61
II-3-1-a. コオイムシ種内の分子系統地理	61
II-3-1-b. オオコオイムシ種内の分子系統地理	62
II-3-2. 各クレード内の解析結果	63
II-4. 考察	65
II-4-1. 両種における分断パターンと生物地理学的障壁およびレフュジアの比較	65
II-4-2. 両種における遺伝的構造の比較	68
表	71
図	77
<b>第 III 章 コオイムシの胚発生</b>	<b>85</b>
III-1. 背景	86
III-2. 材料と方法	89
III-2-1. サンプルング	89
III-2-2. 光学実体顕微鏡による胚の外部形態観察	89
III-2-3. 走査型電子顕微鏡による胚の外部形態観察	90
III-2-4. 胚の組織切片の作成・染色および観察	90
III-2-5. DAPI 染色法	92

III-3. 結果	93
III-3-1. コオイムシの胚発生	93
III-3-1-a. コオイムシの卵形態	93
III-3-1-b. コオイムシの胚発生ステージ	93
III-3-2. コオイムシの口器形成	101
III-4. 考察	103
III-4-1. 胚運動 blastokinesis	103
III-4-2. 腹部形態形成	105
III-4-3. 頭部の複眼原基と正中線の間に分化する小隆起	109
III-4-4. 口器形成	110
図	117
<b>第IV章 コオイムシにおける繁殖システム</b>	<b>138</b>
IV-1. 背景	139
IV-2. 材料と方法	141
IV-2-1. サンプルング	141
IV-2-2. 卵塊剥離実験	141
IV-2-3. 室内飼育実験による繁殖システム観察	142
IV-2-4. オスの背負う卵数と体サイズの比較	142
IV-2-5. 成虫メスの卵巣内における成熟卵数	143
IV-3. 結果	143
IV-3-1. 卵塊剥離実験結果	143
IV-3-2. 室内飼育実験による繁殖システム観察結果	143
IV-3-3. 成虫メスの卵巣内における成熟卵数	144

IV-4. 考察	144
IV-4-1. 父育の必要不可欠性	144
IV-4-2. コオイムシ類における繁殖システム	145
表	148
図	149
総合考察	153
謝辞	160
引用文献	162

## 緒言

## 緒言

およそ 38 億年とされる地球上の生命史において、単一起源とされる原始生命体に由来する多様な生物種群が進化し、今日では約 180 万種にも及ぶ生物相が成立し、このうちの半数以上を多細胞動物 Metazoa が占めている (Grimaldi & Engel, 2005; 東城, 2014)。このように極めて種多様性の高い動物界では、様々な生態学的形質が進化してきた。動物界における多様な生態は、棲息するハビタットの環境や、種間ないし種内での餌資源・ハビタット・配偶相手をめぐる競争などの要因が複雑に絡み合い、形態や行動が変化して創られ、また、自然選択されてきたものと考えられる。そのため、ある生物がいかにして現在のような生態を獲得したのかを明らかにするためには、「エコ (生態 ecology) -エボ (系統進化 evolution) -デボ (発生 development)」といったような分野を統合した多角的なアプローチが必要となり、このようなアプローチは近年になって注目を集めている。一方で、このような多角的なアプローチは、系統進化、発生、および生態のそれぞれについての基礎的な知見の上に成立するものであり、すなわち基礎的知見の蓄積が必要不可欠であると言える。筆者は本研究で、多様な動物種の中でも種多様性といった観点から考えた際、全記載生物種の約半数を占めるなど、最も繁栄したグループであると言える昆虫類に注目した。中でも父親のみが卵 (仔) の世話をする「父育 paternal care」という、たいへんユニークな繁殖様式を進化させたコオイムシ類 (半翅目, コオイムシ科; 図 i-1A) に焦点を当てることとした。

動物界において、親による仔への直接的投資形態には、両親が共に仔の世話をを行う「両親育 biparental care」、メス親のみが世話をを行う「母育 maternal care」、オス親のみが世話をを行う「父育」の 3 つのスタイルがある。そもそも動物界では、直接的な世話自体が希少事例であり、さらにこれらのうち、オス親のみが仔の世話をする「父育」は、極めて稀な行動であると言える (Smith, 1996; Tallamy, 2001)。とくに、産卵後、親が卵 (卵塊) を放置するケースが圧倒的多数を占める節足動物において、父育を行う種はたいへん少なく、父育

は 17 分類群において独立・平行的に獲得されたとされている (Tallamy, 2000, 2001; Nazareth & Machado, 2010)。現在、記載されている種数が 100 万種を超え、全生物種数の 5 割以上を占める昆虫類においても、父育を行う種は 150 種未満である (0.015% 未満)。さらに、このように数少ない父育を行う昆虫の全てが狭義の半翅目 Heteroptera (異翅亜目) 昆虫からの報告であり、その 90% 以上がコオイムシ科 Belostomatidae 昆虫からの報告であることはたいへん興味深い (Smith, 1997)。

コオイムシ科の中でも、コオイムシ亜科 Belostomatinae グループにおいては、オス親の背にメス親が産卵し、この卵塊をオス親が背負いながら世話をするという、たいへんユニークな父育の様式を進化させた究極の父育スタイルであると言える (図 i-1B)。コオイムシ亜科昆虫は、その繁殖様式がたいへんユニークであることから、繁殖生態に関する研究が多くなされてきた。その一方で、コオイムシ亜科昆虫においては、胚発生中に腹部第 1 節の付属肢として分化し、胚発生期間に限定される器官である「側脚 pleuropodia」がオス親の繁殖適応度の向上に深く関係していることも、断片的ではあるが明らかになりつつある (谷澤, 2007a, b)。このように、コオイムシ亜科昆虫は系統進化・発生・生態が深く関わっており、まさに「エコ-エボ-デボ」といった多角的なアプローチを行うことで、そのユニークな繁殖様式 (生態) がいかにして進化したのかを明らかにすることが可能となると考えられる。しかしながら、コオイムシ亜科昆虫に関する発生学的知見はたいへん少なく、本研究の研究材料である日本産コオイムシ亜科昆虫 2 種における系統進化的知見も皆無である。そこで本研究では、今後、コオイムシ亜科昆虫を用いて「エコ-エボ-デボ」といった多角的なアプローチからコオイムシ類の父育システムがいかにして進化してきたかを解明する前段階として、系統分類、系統進化および胚発生の基礎的な知見を蓄積した。次に各章の内容について述べていく。

第 I 章では、本邦に分布するコオイムシ亜科昆虫 2 種の分類学的問題の解決を目的として、分子系統解析および形態学的解析を行った。本邦にはコオイムシ *Appasus japonicus* お

よびオオコオイムシ *Appasus major* という 2 種類のコオイムシ亜科昆虫が棲息しており、両種を識別する単独の形態形質がないことから、これら 2 種間における系統分類学的問題は未だに混沌としている。さらにこれらのコオイムシ・オオコオイムシの 2 種は、本邦以外にも朝鮮半島・中国北部などで分布域が広くオーバーラップしており、混棲地も認められていることから (堀, 2001)、種間交雑の可能性も示唆されてきた (星川, 2001)。このことから、日本産コオイムシ類における系統・分類学的再検討を行う必要がある。

次に第 II 章では、コオイムシおよびオオコオイムシの個体群構造を明らかにし、両種がいつ種分化して、どのように分布を拡大していったのかを目的として、系統地理学的解析を行った。近縁種では一般的に、その分布域が側所的になるか、分布域がオーバーラップしている場合は、餌資源やマイクロハビタットによる棲み分けが生じると考えられている (Nagata *et al.*, 2007; Gröning & Hochkirch, 2008; Komaki *et al.*, 2012)。しかしながら、コオイムシおよびオオコオイムシは、前述のように分布域が広くオーバーラップしており、混棲地も認められているにも関わらず、明確な棲み分けがなされていない。また、両種は若干の生態的な違いがあるとされており [e.g., オオコオイムシの方が冷水環境に適応している; コオイムシは低地の開放水域、オオコオイムシは丘陵地の閉鎖的水域を好む (Okada & Nakasuji, 1993a)], このような 2 種の遺伝的構造を比較することにより、両種の生態と絡めた考察が可能となると考えられ、たいへん興味深い。

続く第 III 章ではコオイムシにおける胚発生の基礎生物学的知見を蓄積し、さらに、コオイムシ類が属する半翅目 Hemiptera の特徴である吸収型口器が、いかにして進化したのかを明らかにすることを目的とし、比較発生学的アプローチを行った。140 科 7 万種からなる広義の半翅目は不完全変態類の中で最大のグループであり (昆虫綱全体の中でも 5 番目に大きなグループであり)、以下の 4 亜目に大別される (図 i-2) (1) 腹吻亜目 Sternorrhyncha (アブラムシ類、コナジラミ類、カイガラムシ類)、(2) 頸吻亜目 Auchenorrhyncha (セミ類、ウンカ類、ヨコバイ類)、(3) オーストラリア、ニュージーランド、南米に固有の鞘吻亜目

Coleorrhyncha、およびコオイムシ科が含まれる (4) 異翅亜目 Heteroptera (カメムシ類) (吉澤, 2008)。これら 4 亜目からなる半翅目昆虫に共通してみられる特徴として、特殊化した細長い穿孔・吸汁型の口器 (口吻) が挙げられるが、その他の体制は極めて多様であるとともに、食性においても多様で、植物の汁液や昆虫や小動物のほか、哺乳類や鳥類に外部寄生して吸血する種群まで認められている。さらに、棲息環境も陸上の多様な環境のみならず、水面や水中にもおよび、ウミアメンボ類 Halobatinae のように海洋生活に適応した数少ない昆虫の一群も含まれる (吉澤, 2008)。

以上のように、半翅目昆虫の形態・体制や生活環境・生態はたいへん多様化していると言え、多様性創出の鍵を握る体制 (*i.e.*, ボディプラン) の理解は極めて重要な課題である。しかしながら、半翅目昆虫における形態形成の基本プラン (半翅目に共通する形態形成様式) に迫る発生学的研究は、陸生半翅類を対象としたものがほとんどであり (*e.g.*, Newcomer, 1948; Butt, 1949; Kelly & Huebner, 1989)、近年では、陸棲半異翅亜目の *Oncopeltus fasciatus* (ナガカメムシ科 Lygaeidae) を材料とした研究が中心的に行われている (*e.g.*, Angelini *et al.*, 2005; Panfilio & Roth, 2010)。一方、遺伝子解析手法に基づく系統解析では、水棲半翅類が異翅亜目昆虫の中で最もベーサルな位置づけにあることが明らかとなり (Xie *et al.*, 2008; 図 i-2)、異翅亜目、さらには半翅目昆虫類の形態形成におけるグラウンドプランを論じる上では、原始系統である水棲半翅類を対象とする研究はたいへん重要な鍵を握るものであると考えられる。

さらに第 IV 章では、胚発生が深く関わるコオイムシ類の父育システムについて、今後その進化・維持機構の解明を行う際に、基礎となる知見を蓄積することを目的とし、飼育実験を行い、父育の必要不可欠性やメスによるオスの選択の有無について検証した。

総合考察では、各章で得られた結果・結論を受け、「エコ-エボ-デボ」といった多角的なアプローチから、どのようにコオイムシ類の父育システム進化・維持機構を解明することが可能であるのか、今後の課題も含めて記述した。



図 i-1. ヒラタカゲロウ (タニガワカゲロウ *Ecdyonurus* 属の一種) 幼生を捕食しているコオイムシ *Appasus japonicus* (A) および卵塊を背負うコオイムシのオス (B: 1 個体が孵化の最中)

コオイムシ亜科 Belostomatinae に属するコオイムシはオス親が自分の背中に卵塊を背負い、孵化まで世話をする「父育 paternal care」を行う水棲半翅類で、小型の節足動物や魚類等を捕食する肉食性の昆虫である。

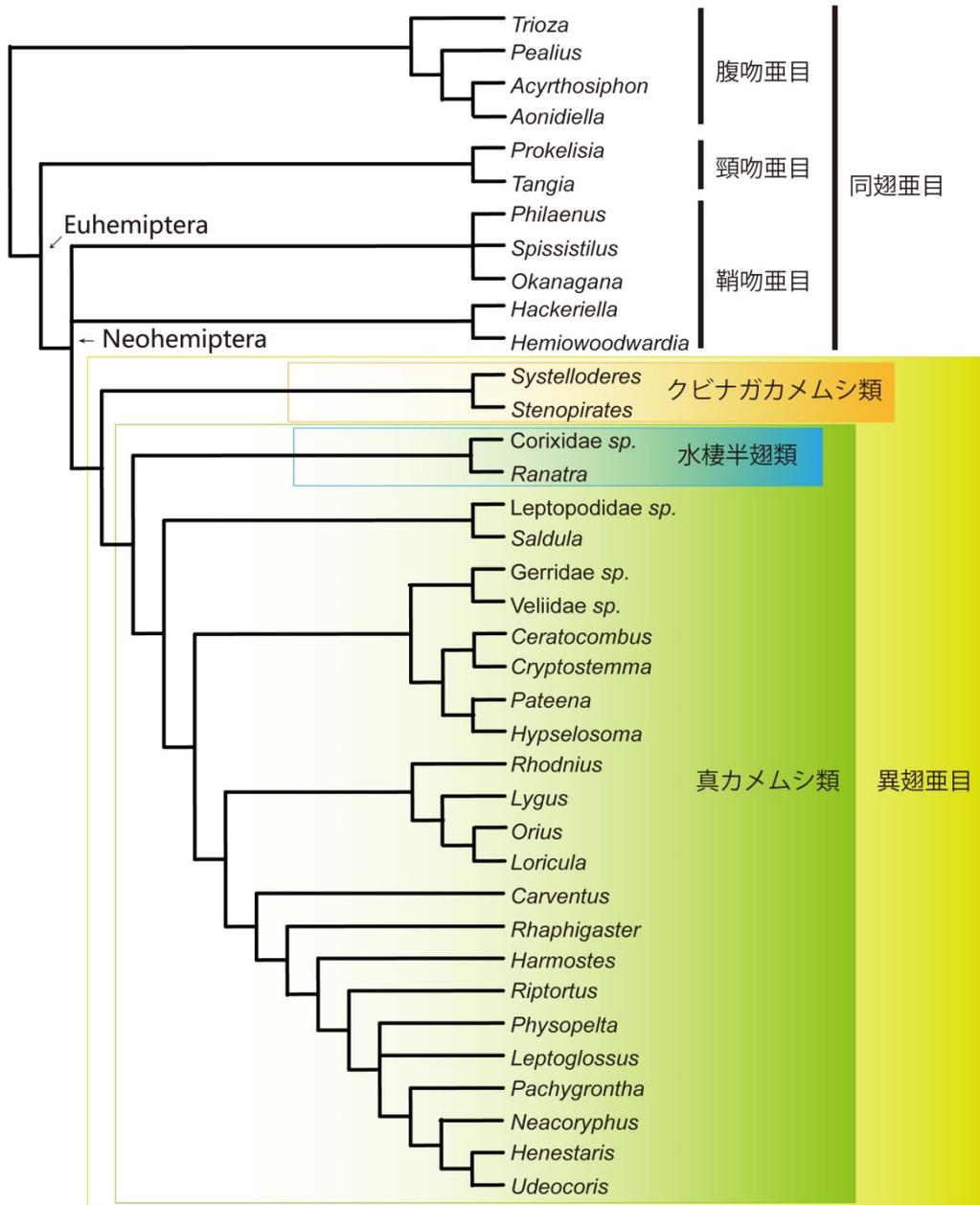


図 i-2. 半翅目類内における水棲半翅類の系統的位位置 [Xie *et al.* (2008) を改変]

## 第 I 章

### コオイムシおよびオオコオイムシの系統・分類

## 第1章 コオイムシおよびオオコオイムシの系統・分類

### 1-1. 背景

ある生物種がある地域空間に生息できるか否か、すなわち生物種の分布域は、その場の地史や地質、地形などの地理的要因や環境要因、そして対象となる種の進化史や種間競争、そして偶然性などの様々な要因が複雑に絡み合い、その総合的な結果として決定される (Gaston, 2003)。すなわち、ある生物の分布域とは、図鑑などでの基本情報としての一面のみならず、その生物の総合生物学的な理解と深く関連した重要な情報であると言える。そして、地理的障害により隔離された集団間では遺伝的交流が遮断されるため、この状況が長くつづくことで分集団間には様々な相違 (e.g., 生態、形態、生理機能、行動など) が創出される場合があり (Dobzhansky, 1951; Mayr, 1963; Coyne & Orr, 2004)、これらの相違の蓄積が異所的な種分化へ繋がると考えられている。しかしながら、このように異所的に種分化した2種の分布域が再び近接化するなど、二次的な接触が生じると、とくに種分化してからそれほど長い時間が経過していない近縁種間では、生態的ニッチが重複するために種間競争が生じるケースが多い。このような近縁種同士では、餌資源やマイクロハビタット、行動などを変化させ生態的ニッチをシフトさせることが知られている (Nagata *et al.*, 2007; Gröning & Hochkirch, 2008; Komaki *et al.*, 2012)。また、これらの近縁種同士が混棲する地域においては、種間交雑が生じるなど、何らかの繁殖干渉が生じている事例も報告されている (Dame & Petren, 2006; Gröning *et al.*, 2007; Okuzaki *et al.*, 2010; Komaki *et al.*, 2012)。

本研究で対象とするコオイムシ類に関しては、これまでに2亜科3属5種のコオイムシ科 Belostomatidae 昆虫が日本列島から記録されている。タガメ亜科 Lethocerinae からは、タガメ *Kirkaldyia deyrolli* およびタイワンタガメ *Lethocerus indicus* の2属2種が記録されており、コオイムシ亜科 Belostomatinae からは、コオイムシ *Appasus japonicus*、オオコオイムシ *Appasus major*、そしてタイワンコオイムシ *Diplonychus rusticus* の2属3種が記録されている (林・宮本, 2005)。これらのコオイムシ科の昆虫種群は、環境省版レッドリストやいくつ

かの都道府県版レッドリストにおいて絶滅危惧種として登録されている (e.g., 環境省, 2006)。しかし、このように保全生物学的にも重要な分類群であり、かつ本研究で注目するような進化生物学的にも重要であるとされるコオイムシ科昆虫であるにもかかわらず、その同定・分類といった最も基礎的な生物学的知見さえ十分に把握されているとは言えない状況にある。一般的な水棲半翅目昆虫において種の同定が困難とされているのと同様に、とくにコオイムシ亜科昆虫は日本産コオイムシ科昆虫の中でも極めて分類が難解視されてきた。

コオイムシやオオコオイムシとは別属にあたるタイワンコオイムシについては、精子構造 (Lee & Lee, 1992) や触角の分節様式などの頭部形態形質 (Polhemus, 1995; 林・宮本, 2005) により識別が比較的容易であるほか、分布についても、日本国内におけるタイワンコオイムシの記録は沖縄県 (西表島) のみであり、九州以北に生息する他のコオイムシ亜科種との分布域のオーバーラップがないことから、誤同定は少ないものと考えられる。一方で、コオイムシとオオコオイムシの識別については、形態学的類似性や分布域のオーバーラップなどによりたいへん難解であるとされてきた。Vuillefroy (1864) によりコオイムシが記載された後、Esaki (1934) によってオオコオイムシが新規独立種として新種記載されたが、これら 2 種は、形態・棲息環境・分布のいずれにおいてもたいへん類似、あるいは重複している。分布については、コオイムシが北海道・本州・四国・九州および朝鮮半島・中国に生息しているのに対し、オオコオイムシは北海道・本州・四国・九州および朝鮮半島・中国・極東ロシアに生息しており、極東ロシアを除いた広い範囲で両種の分布域が広くオーバーラップしている (図 I-1A, B)。また、棲息環境に関しても、コオイムシは低地の水田、池沼や河川のワンドなどの開放水域を、一方のオオコオイムシは丘陵地の湿地、谷地などの閉鎖的水域を好むとされている (Okada & Nakasuji, 1993a; 林・宮本, 2005)。しかし、両種が同所的に棲息するような混棲地も多く認められており (堀, 2001)、両種間には直接的な種間競争が存在しない可能性も示唆されている (Okada *et al.*, 1992)。また、過去の研究におい

てなされた体サイズ (体長) や体色に基づく分類に関して、後の再調査によると、そのほとんどが誤同定であったことを指摘するような報告もある (苅部・高桑, 1994)。以上のように、コオイムシおよびオオコオイムシにおける種識別や分類学的標徴の整理は、たいへんに混沌とした状況にあり、種間交雑が生じている可能性も示唆されてきた (星川, 2001)。

このような状況から、筆者は、北海道、本州、四国、九州、韓国および中国のコオイムシ、北海道、本州、四国、九州および韓国のオオコオイムシを用いて、これまで同定の鍵形質として用いられてきた形態形質 (体サイズや前胸背板、口吻、前脚、交尾器側葉片の形態) の再検討を試みた。さらに、これらの両種に対するミトコンドリア遺伝子 16S rRNA 領域 (432 bp) および COI 領域 (658 bp)、核遺伝子 Histone H3 領域 (328 bp) の分子系統解析を行い、コオイムシおよびオオコオイムシのそれぞれの種としての独立性、および種間交雑の可能性に関する議論・考察を行った。

## I-2. 材料と方法

### I-2-1. サンプルング

2005 年から 2013 年にかけて、北海道・本州・四国・九州・韓国・極東ロシアおよび中国のコオイムシ類を採集した (表 I-1, 図 I-1C)。採集したサンプルについては、形態形質計測および遺伝子解析に用いるために 100%EtOH で固定した。残念ながら、極東ロシアおよび中国で採集されたコオイムシ類はいずれも幼虫ステージの個体と脱皮殻であり、II 章で扱う遺伝子解析にのみ用いた。さらに、市場に流通していた中国産コオイムシを購入し、遺伝子解析データに加えた (表 I-1, 2)。

### I-2-2. 遺伝子解析

固定されたサンプルからのトータル遺伝子 (total DNA/ genomic DNA) の抽出には、

DNeasy® Tissue Kit (QIAGEN, Hilden) を用いた。各遺伝子領域における PCR による遺伝子断片の増幅には、表 I-4 に示したプライマーのセットを目的に応じて適宜用いた。以下に記述する PCR の反応溶液 (20 µl) を 0.5 ml プラスチックチューブ内に調製した。10 × rTaq polymerase buffer (2.0 µl)、25 mM MgCl<sub>2</sub> (1.2 µl)、2 mM dNTPmix (2.0 µl)、5 U/µg rTaq polymerase (0.1 µl) (TOYOBO, 大阪)、各領域におけるプライマー・セット (forward および reverse それぞれ 0.5 µl)、トータル遺伝子 (3.0 µl)、SQ (10.7 µl)。PCR 反応の条件としては、ミトコンドリア遺伝子 16S rRNA 領域および COI 領域の増幅については、熱変性 (94°C, 1 分) を行った後、熱変性 (94°C, 1 分)、アニーリング (50°C, 1 分)、伸長反応 (72°C, 1 分) を 35 サイクル行い、最後に 72°C で 7 分間の伸長反応を行った。核遺伝子 Histone H3 領域については、熱変性 (94°C, 2 分) を行った後、熱変性 (94°C, 30 秒)、アニーリング (60°C, 30 秒)、伸長反応 (74°C, 30 秒) を 33 サイクル行い、74°C で 7 分間の伸長反応を行った。PCR 産物の精製には、Microcon® Kit (MILLIPORE, Massachusetts)、ExoSAP-IT あるいは ExoStar (GE Healthcare, Buckinghamshire) を使用した。精製した PCR 産物を DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire) あるいは BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, California) を用いて蛍光ラベリングし、ABI 377 あるいは ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, California, USA) にて塩基配列の解析を行った。解析に用いたサンプルの産地情報等は、表 I-2 および図 I-1C に記した。

### I-2-3. 系統樹作成

解析サンプル間の塩基配列のアライメントにはソフトウェア Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) および MEGA ver. 5 (Tamura *et al.*, 2011) を用いた。ミトコンドリア遺伝子 16S rRNA 領域および COI 領域の解析には、韓国で採集した *Diplonychus esakii* および日本と韓国で採集したタイコウチ *Laccotrephes japonensis* の配列もそれぞれ外群として使用した。また、核遺伝子 Histone H3 領域における系統解析においては、セミ科 Cicadidae に属するオーストラ

リア産 *Froggattoides typicus* (Cryan, 2004; AY744872)、およびコガシラアワフキムシ科 Cercopidae に属する *Prosapia bicincta* (Cryan, 2004; AY744861) の配列データを GenBank データベースから引用し、外群として使用した。アライメントした配列データを基に、PAUP ver. 4.0 beta10 (Swofford, 2002) を用いて近隣結合法 [Neighbor Joining (NJ) 法; Saitou & Nei, 1987]、最節約法 [Most Parsimonius (MP) 法; Fitch, 1971]、TREEFINDER ver. Oct. 2008 (Jobb *et al.*, 2004) を用いて最尤法 [Maximum likelihood (ML) 法; Felsenstein, 1981]、MrBayes5D ver. 3.1.2 (Tanabe, 2008) を用いてベイズ法 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) による分岐図を作成した。ミトコンドリア遺伝子 16S rRNA 領域におけるインデル箇所の配列データは系統解析から除外した。最尤法およびベイズ法解析を行う際の塩基置換モデルの選択には Kakusan4 (Tanabe, 2007) を用い、Schwarz's Bayesian Information Criterion (BIC; Schwarz, 1978) により最適モデルの選択を行い、選択されたモデルを表 I-3 に示した。Bayes の MCMC 解析を 10,000,000 世代繰り返し、1,000 回毎にサンプリングを行い、Tracer ver. 1.5 (Rambaut & Drummond, 2007) を用いて各パラメーターの確認をした後に、最初の 1,000,000 世代を定常状態に達していない世代と仮定して解析に含めなかった。評価された系統樹における各分岐点において、それぞれのクレードが単系統群である信頼性を評価するために、NJ 法、MP 法、および ML 法においては 1,000 回反復のブートストラップ検定における信頼確率を計算し、ベイズ法においては事後確率を計算した。さらに、TREEFINDER および BEAST ver. 1.7.1 (Drummond *et al.*, 2012) を用いて、ミトコンドリア遺伝子 16S rRNA および COI 領域、および核遺伝子 Histone H3 領域を結合したデータセットでの ML 樹およびベイズ樹を作成した。3 領域を結合した系統樹では外群の配列を準備することができなかつたため、無根系統樹を作成した。

#### I-2-4. 形態学的解析

日本広域および韓国において採集した 122 産地 353 個体のコオイムシ類 (コオイムシ A.

*japonicus* + オオコオイムシ *A. major*) を対象にした外部形態の観察を行ったほか、従来は分類学的に有効であると考えられてきた形態形質を観察・計測した。解析に用いたサンプルの産地情報等は、表 I-1 および図 I-1 に記した。観察対象とした形質およびその特徴を以下に記すと共に、図 I-2 に示した。体長 (従来、オオコオイムシがより大きいとされる; 図 I-2A, B)、前胸幅 (従来、オオコオイムシがより大きいとされる; 図 I-2C)、前胸背板左右 2 対の白帯の有無 (従来、コオイムシにのみ認められるとされる; 図 I-2D)、口吻の形態 (口吻第 2 節と 3 節の比: コオイムシでは第 2 節がより長いとされる; 図 I-2E)、前脚腿節形態 (オオコオイムシがより太いとされる; 図 I-2F)、腹部第 7 節腹板形態 (オオコオイムシがより大きいとされる; 図 I-2G)、呼吸管長 (オオコオイムシがより長いとされる; 図 I-2H)。交尾器側葉片の先端構造 (コオイムシは鉤型、オオコオイムシは波型とされる; 図 I-2I)。また、これらの形態形質の計測においては、体長、最大前胸幅、口吻第 2 節幅、口吻第 2 節長、口吻第 3 節長、口吻第 4 節長、前脚腿節長、前脚腿節幅、腹部第 7 節腹板長、腹部第 7 節腹板幅、呼吸管長、呼吸管幅の計 12 形質を対象とした (図 I-2; i-xii)。

形態形質の観察は、双眼実体顕微鏡 SMZ1500 (Nikon, 東京) 下において、0.1mm の精度で各形態形質を計測した。交尾器側葉片の形態に関しては、一部の個体において、走査型電子顕微鏡 TM-1000 Miniscope (Hitachi High-Technologies, 東京) による観察も併用した。全個体における各形態形質の計測値を表 I-5 に示した。

形態形質計測を行った 12 の形質データを基に、まず、それぞれの形質単独による分類学的評価を行うため、体サイズ (体長と前胸幅の関係)、前脚腿節形態 (前脚腿節長と前脚腿節幅の関係)、口吻形態 (口吻第 2 節長と口吻第 3 節長の関係、および口吻第 2 節長と口吻第 2 節幅の関係)、腹部第 7 節腹板形態 (腹部第 7 節腹板長と腹部第 7 節腹板幅の関係)、呼吸管形態 (呼吸管長と呼吸管幅の関係) の比較を行った。そして複数の形質の組合せによる評価を行うため、R ver. 2.14.1 (R Development Core Team, 2011) を用い、主成分分析も実施した。主成分分析を行う際には、各計測値を対数変換して実施した。また、各形態形質お

よび主成分分析の有用性を検定するために、線形判別分析 (LDA) を実施した。

また、コオイムシにおける北海道および韓国東部の個体群では、体サイズがやや大きい傾向がみられたため、コオイムシを北海道、本州+四国+九州、韓国東部、韓国南西部 (地点番号 118, 119 および 122) の 4 地域に区分し、オオコオイムシを北海道、本州+四国、韓国の 3 地域に区分して体サイズ比較を行った。各地域間で体サイズに有意差があるか否かについて、Mann-Whitney U 検定により確認した。得られた  $p$  値は Bonferroni の有意水準補正を行った。

### I-3. 結果

#### I-3-1. 分子系統解析

表 I-2 に列記した 44 産地 58 個体の日本、韓国および中国産コオイムシ類を対象に、ミトコンドリア遺伝子 16S rRNA 領域、COI 領域および核遺伝子 Histone H3 領域の部分塩基配列を用いて分子系統解析を行い、近隣結合法 (NJ 法)、最大節約法 (MP 法)、最尤法 (ML 法)、およびベイズ法によって系統樹を作成した。図 I-2 に示した形態的特徴により、明確にコオイムシもしくはオオコオイムシであると判断された個体を遺伝子解析に複数加えることで、得られたクレードがどちらの種であるかの判断を行った。本来、両種のタイプ産地で採取されたサンプル (トポタイプ) を遺伝子解析に加えることが有効であるが、コオイムシのタイプ産地は単に「日本」とのみ記されていること (Vuillefroy, 1864)、オオコオイムシのタイプ産地である東京 (Esaki, 1934) の地域個体群は既に絶滅していることから、残念ながらトポタイプを系統解析に加えることはできなかった。

遺伝子解析の結果、核遺伝子 Histone H3 領域およびミトコンドリア遺伝子 16S rRNA 領域においては、NJ 法および MP 法ではコオイムシおよびオオコオイムシの単系統性が強く支持された。また、ML 法およびベイズ法においてはオオコオイムシの単系統性は支持され

なかったものの、コオイムシの単系統性は強く支持された (図 I-3, 4)。また、ミトコンドリア遺伝子 COI 領域においては、コオイムシおよびオオコオイムシの単系統性が、いずれの系統樹においても強く支持された (図 I-5)。さらに、ミトコンドリア遺伝子 COI 領域における両種の分岐が最も深く、両種間における平均遺伝的距離は 13.3%であった。また、ミトコンドリア遺伝子において、コオイムシあるいはオオコオイムシのクレードに入る個体が、核遺伝子 Histone H3 領域では逆にオオコオイムシあるいはコオイムシのクレードに入るといようなミトコンドリア遺伝子-核遺伝子間での結果の相反は認められなかった。両種の混棲が明らかとなった 9 産地から採集された 23 個体を対象とした解析においても、所属するクレードの相反は認められなかった。また、3 領域を結合した無根系統樹においても両種の単系統性は強く支持される結果が得られた (図 I-6)。

### I-3-2. 形態比較

コオイムシとオオコオイムシの種識別を遺伝子解析の結果に基づいて行った後に、従来、コオイムシとオオコオイムシの種識別において有効とされてきた分類形質を用いて、計測データの比較を行った。この結果、いずれの形態形質においても、コオイムシとオオコオイムシにおける計測値間にはオーバーラップが認められた (図 I-7A-F)。

先ず、体サイズ (体長と前胸幅の関係) についてであるが、従来はオオコオイムシがより大きいとされており、本研究の結果でもその傾向は認められたものの、両種間でのオーバーラップが認められた (図 I-7A)。前脚腿節形態 (前脚腿節長と前脚腿節幅の関係) については、従来、オオコオイムシがより太いとされ、本研究の結果でもその傾向は認められるものの、両種間でのオーバーラップが認められた (図 I-7B)。口吻形態 (口吻第 2 節長と口吻第 3 節長の関係、および口吻第 2 節長と口吻第 2 節幅の関係) については、オオコオイムシがより太く、短い傾向が認められた。しかし、いずれもコオイムシおよびオオコオイムシの種間でのオーバーラップが多い結果となった (図 I-7C, D)。腹部第 7 節腹板形態 (腹部第

7 節腹板長と腹部第 7 節腹板幅の関係) については、オオコオイムシの腹部第 7 節腹板がより大きいとされる従来の傾向は認められるものの、とくにオオコオイムシにおいては個体差が大きく、種間でのオーバーラップが認められた (図 I-7E)。呼吸管形態 (呼吸管長と呼吸管幅の関係) については、オオコオイムシの呼吸管がより大きいという従来の傾向が認められるものの、種間でのオーバーラップも認められた (図 I-7F)。また、線形判別分析では、いずれの形態形質を用いても両種を完全に識別することができないという結果が得られた (表 I-6)。以上のように、従来、種識別において有用であるとされてきた各形態形質からの種識別はたいへん困難であるという結果が得られた。

次に、形態形質データの計測を行った 12 の全形態形質データを用いた総合的検討 (主成分分析) の結果を図 I-8 に示す。第一主成分は主として体サイズの小ささ、第二主成分が主として口吻の長さを示しており、各形態形質の因子負荷量、第一および第二主成分の寄与率については表 I-7 に示した。主成分分析においてはコオイムシ・オオコオイムシ種間でのオーバーラップはほとんど認められず、線形判別分析ではたいへん高い一致率 (98.3%) を示したものの、北海道中川郡幕別町産のコオイムシ 2 個体、北海道十勝郡浦幌町産コオイムシおよび韓国永同郡深川産コオイムシそれぞれ 1 個体ずつが、オオコオイムシとオーバーラップする結果となったほか、北海道釧路郡釧路市産のオオコオイムシ 1 個体および大分県玖珠郡玖珠町産のオオコオイムシ 3 個体がコオイムシとオーバーラップし、岩手県一関市産のオオコオイムシ 1 個体についても、他のオオコオイムシのプロット群からは外れ、コオイムシのプロット群に近い位置に評価されるなど、完全には両種を判別できなかった (図 I-8)。

また、地域間での体サイズを比較すると、コオイムシでは北海道および韓国東部の個体群の体サイズが、他の個体群のそれよりも大きい傾向がみられた。とくに、北海道産コオイムシの体サイズに関しては、日本産オオコオイムシの体サイズとのオーバーラップが広く認められ、有意差も認められなかった (表 I-8, 図 I-9)。また、韓国南西部 (地点番号 125,

126 および 133) における個体群の体サイズは、他の個体群のそれと比較してたいへん小型である傾向がみられた (表 I-8, 図 I-9)。また、オオコオイムシにおいては、北海道と本州・四国の個体群間では体サイズに大きな差は認められなかったものの、韓国個体群の体サイズが日本個体群のそれと比べて大型であったほか、九州個体群の体サイズはたいへん小型である傾向が認められた (表 I-8, 図 I-9)。

従来、コオイムシのみに認められるとされてきた前胸背板から小楯板にかけての左右 1 対の白帯については、いずれの地域のコオイムシにおいても明瞭に認められた。しかしながら、オオコオイムシに関しても、EtOH での固定後、長時間が経過した標本において、白帯が認められる個体が確認された。

最後に、これまで最も精度が高い形態分類の鍵形質であるとされてきた、オスの交尾器側葉片における先端部分の形状に関しては、日本産の個体を比較する限りにおいては、コオイムシでは例外なく「鉤型」であるのに対し、オオコオイムシでは例外なく「波型」であることが、ほぼ受け入れられる結果となった (n=153; 図 I-10A, B)。しかしながら、韓国産コオイムシおよびオオコオイムシでは、観察できた全ての両種オス個体の交尾器側葉片における先端の形状が全て「波型」であった (すなわち、種間において差がない; n=23; 図 I-10C, D)。

#### I-4. 考察

##### I-4-1. 分子系統解析によるコオイムシおよびオオコオイムシの分類学的再検討

コオイムシ *Appasus japonicus* およびオオコオイムシ *A. major* における、核遺伝子の Histone H3 領域、ミトコンドリア遺伝子の 16S rRNA 領域および COI 領域の遺伝子解析結果は、いずれの遺伝子領域においても両種間には明確な遺伝的分化が生じていることを強く支持するものであった (図 I-3, 4, 5)。とくに、ミトコンドリア遺伝子 COI 領域においては、コオイ

ムシとオオコオイムシの種間で大きな遺伝的差異が認められた (図 I-5)。さらに、両種の混棲地である北海道雨竜郡妹背牛町、北海道中川郡幕別町、福島県福島市、福島県双葉郡浪江町、福島県西白河郡西郷村、千葉県夷隅郡大多喜町、江原道華川郡史内、江原道横城郡公根および忠清北道永同郡深川において採集されたコオイムシとオオコオイムシについては、ミトコンドリア遺伝子および核遺伝子のいずれにおいても同一クレードに入る結果となった。すなわち、ミトコンドリア遺伝子と核遺伝子の解析結果が相反することはなかった。これまで、コオイムシとオオコオイムシの混棲地においては、種間交雑が生じている可能性も示唆されてきたが (星川, 2001)、本研究の結果からは、コオイムシおよびオオコオイムシが遺伝的には明確に分化・独立した種であることが強く示唆され、自然界における両種間の交雑が生じている可能性はないものと考えられる。

これまで、コオイムシおよびオオコオイムシの両種間における生態学的な相違についてはいくつかの報告があり、食性 (コオイムシが巻貝類を主に捕食するのに対し、オオコオイムシは水棲昆虫類を主に捕食する; 岡田, 1993; Okada & Nakasuji, 1993b; Ohba & Nakasuji, 2006)、標高 (オオコオイムシの方がより高標高に生息する; 岡田, 1993; Okada & Nakasuji, 1993a) による棲み分けなどが示唆されてきた。しかし、両種が同所的に棲息するような混棲地も認められており (堀, 2001)、本研究においても同所的に棲息する地点が複数箇所で見られたことから、それほど強く厳格な棲み分けが行われているわけではないと考えられる。両種の形態についても、現在までに、口吻、前脚、前胸背板の形態による分類など (荻部・高桑, 1994; 堀, 2001; 角田, 2002; 林・宮本, 2005) 様々な提案がなされているものの、それぞれ単独の形態形質にはコオイムシ・オオコオイムシ両種間でのオーバーラップが広く認められる。しかし、これほど形態や生態が酷似している両種でありながらも、遺伝子解析を行った結果、互いに大きな遺伝的分化を遂げていることが支持された。これらのことから、単なる棲み分けのみではなく、例えば繁殖行動などの何らかの生殖隔離機構が働いていることが示唆された。

また、ミトコンドリア遺伝子 COI 領域におけるコオイムシおよびオオコオイムシの両種間での遺伝的距離が大きく、それぞれの独立性を示す分岐におけるブートストラップ確率も高く、両種の単系統性が強く支持される結果となった (図 I-5)。このように、ミトコンドリア遺伝子 COI 領域においては、両種が明確に分化していることがわかることから、昆虫類をはじめ、多くの動物群の種識別において有用視されているミトコンドリア遺伝子 COI 領域を用いた遺伝子バーコーディング法 (e.g., Zhou *et al.*, 2010; Ogitani *et al.*, 2011) がコオイムシ類においても極めて有用であることが明示された。さらに、本研究を進めていく中で、GenBank に登録されているタイワンコオイムシ *Diplonychus rusticus* およびオオコオイムシのミトコンドリア遺伝子 COI 領域の部分配列 (FJ456940; Hua *et al.*, 2009, GQ292288; Jung *et al.*, 2011) を本研究における解析に加えてみたところ、これらはいずれも大陸 (韓国・中国) 産コオイムシのクレード内に配置される結果となった。すなわち、これら 2 つの GenBank 登録配列は、コオイムシと誤同定されたものであることが強く示唆される。またこれらの事実は、コオイムシ類における同定が容易ではないことを傍証するものと考えられる。

#### I-4-2. 両種間の形態比較

従来、コオイムシおよびオオコオイムシにおける両種の識別については、同定に有用な形質として、口吻、前脚、前胸背板、交尾器側葉片の形態などが提案されてきた (苅部・高桑, 1994; 堀, 2001; 角田, 2002; 林・宮本, 2005)。本研究においては、これまで提案されてきた形態形質を用い、個々の形質の有用性を確認し、計測した全ての形質データに基づく主成分分析を行ったほか、地域間での体サイズの比較を行った。

結果は、体サイズにおいて韓国東部および北海道におけるコオイムシが、やや大型である傾向がみられたほか (図 I-9)、いずれの形質においても、単独での比較においてはコオイムシ・オオコオイムシ両種間でのオーバーラップが広く認められた (図 I-7A-D)。また、計

測した 12 の形態形質データの主成分分析を行った結果においても、北海道樺戸郡新十津川町産のコオイムシ 2 個体および韓国忠清北道永同郡深川産のコオイムシ 1 個体がオオコオイムシのプロット群内に内包される結果となり、両種間で若干のオーバーラップがみられた (図 I-8)。また、両種のプロット群が近接していることから、複数形態形質を用いた主成分分析では、大まかな識別は可能であるものの、精確に両種を区別することはできないと言える。地域間の体サイズ差については、個体群間の系統との関連性がみられなかったことから、環境要因による傾向が生じていることが考えられるが、今後、様々な要因を視野に入れて追究していく必要があるだろう。

日本産コオイムシおよびオオコオイムシの種識別において、最も有用であるとされ、唯一オーバーラップがないとされてきた、オスの交尾器側葉片・先端部の形態については (苅部・高桑, 1994; コオイムシが鉤型: 図 I-10A, オオコオイムシが波型: 図 I-10B)、本研究においても、日本産のサンプルに関してはこれらの見解を強く支持する結果となった。しかしながら、朝鮮半島産のサンプルまでを対象とすると、日本産オオコオイムシと韓国産コオイムシとでその形態は酷似しており、韓国産オオコオイムシの交尾器側葉片についても波型であることがわかった (図 I-10D)。コオイムシおよびオオコオイムシにおけるオスの交尾器側葉片形態による同定は、これまで日本国内の個体群のみで検討されてきたために、最有用視されてきたが、本研究で韓国産コオイムシおよび韓国産オオコオイムシのオスにおける交尾器側葉片形態を観察した結果、コオイムシが鉤型でオオコオイムシが波型であるのは、日本国内産個体に限った傾向であることが新たに明らかとなった。このことから、単独の形態形質によるコオイムシおよびオオコオイムシの種識別は、誤同定をもたらす原因となる可能性が高いと言えるだろう。しかしながら、本研究においては、複数の形態形質を観察するなどによる、複合的評価をすることで、誤同定のリスクをかなり回避できることも併せて明示したと言える。

次に、コオイムシとオオコオイムシのオスの交尾器側葉片・先端部の形態が、朝鮮半島

では両種とも波型であったのに対し、日本国内のコオイムシでは例外なく鉤型であり、コオイムシでは日本国内と朝鮮半島間で種内変異があったことについて、どのようにしてこのような形態形質の差が生じたのか議論を行う。まず、朝鮮半島では両種ともにオスの交尾器側葉片・先端部の形態が波型であったことから、オスの交尾器側葉片・先端部の祖先形質は波型であると考えられる。また、朝鮮半島では両種の交尾器側葉片・先端部の形態に差異がみられなかったが、朝鮮半島内ではコオイムシの棲息地数と比較してオオコオイムシの棲息地数が極めて少なく、一方で日本国内での棲息地数は両種ともほぼ同等であり混棲地も多いことが本研究で明らかとなった。さらには、オスの交尾器側葉片・先端部は生殖に関する形質であることから、日本国内でコオイムシのオスの交尾器側葉片・先端部の形態が種間交雑による淘汰の結果、波型から鉤型へ形質置換した可能性があると考えられる。また、オスの交尾器側葉片・先端部の形質に差異がみられない朝鮮半島の個体群では、両種の体サイズの差が日本国内のそれに比べて明瞭であり、日本国内ではコオイムシ・オオコオイムシの体サイズがオーバーラップするのに対し、朝鮮半島では体サイズのオーバーラップが認められない (図 I-9)。このような極端な体サイズの差があることが要因となり、朝鮮半島ではオスの交尾器側葉片・先端部の形態に形質置換が生じず、両種ともに波型を維持しているのかもしれない。オスの交尾器側葉片・先端部の形態については、日本国内産と朝鮮半島産の個体間で交配が可能であるか否かなど、興味深い点が多く、今後さらなる追究が必要であると言える。

表I-1. 形態計測に用いた個体の産地番号, 産地名, 雌雄 (個体数), 胸部背板の白帯の有無, オス交尾器側葉片の形態およびミトコンドリア遺伝子COI領域の解析結果による種の判別結果

地点情報				オス: M/メス:	白帯の	交尾器側葉片の	COI領域の
No.	市町村名	都道府県名	地域区分*2	F (N)	有無*3	形態	解析結果
日本							
1	天塩郡幌延町-1	北海道	北海道	M (1) F (1)	++ ++	鉤型 -	<i>japonicus</i> <i>japonicus</i>
2	天塩郡幌延町-2	北海道	北海道	M (1) F (1)	- -	波型 -	<i>major</i> <i>major</i>
3	留萌市	北海道	北海道	F (1)	-	-	<i>major</i>
4*1	雨竜郡妹背牛町	北海道	北海道	M (1) F (2)	- ++	波型 -	<i>major</i> <i>japonicus</i>
5	樺戸郡新十津川町	北海道	北海道	M (1) F (1)	++ ++	鉤型 -	<i>japonicus</i> <i>japonicus</i>
6	釧路郡釧路市	北海道	北海道	M (2)	++	鉤型	<i>japonicus</i>
7*1	中川郡幕別町	北海道	北海道	M (3)	++ - -	鉤型 波型 波型	<i>japonicus</i> <i>major</i> <i>major</i>
8	千歳市	北海道	北海道	F (1) M (1)	++ ++	- 鉤型	<i>japonicus</i> <i>japonicus</i>
9	虻田郡ニセコ町	北海道	北海道	F (1) F (2)	++ -	- -	<i>japonicus</i> <i>major</i>
10	十勝郡浦幌町	北海道	北海道	M (1)	++	鉤型	<i>japonicus</i>
11	勇払郡鷗川町	北海道	北海道	M (1) F (1)	++ ++	鉤型 -	<i>japonicus</i> <i>japonicus</i>
12	勇払郡厚真町	北海道	北海道	M (2)	-	波型	<i>major</i>
13	五所川原市	青森	本州	M (2)	++ ++	鉤型 鉤型	<i>japonicus</i> <i>japonicus</i>
14	津軽町-1	青森	本州	M (1) F (2)	+ +	波型 -	<i>major</i> <i>major</i>
15*1	津軽町-2	青森	本州	M (1) F (1)	++ -	鉤型 -	<i>japonicus</i> <i>major</i>
16	八戸市	青森	本州	M (6)	++ ++ ++ ++ ++	鉤型 鉤型 鉤型 鉤型 鉤型	- - - - -
				F (3)	++ ++ ++	- - -	<i>japonicus</i> <i>japonicus</i> -
17	三戸郡田子町	青森	本州	M (2)	-	波型 波型	<i>major</i> <i>major</i>
18	大館市	秋田	本州	F (2)	-	-	<i>major</i>
19	北秋田市	秋田	本州	F (1)	-	-	<i>major</i>
20	秋田市	秋田	本州	M (4)	+ - - -	波型 波型 波型 波型	<i>major</i> <i>major</i> <i>major</i> <i>major</i>
22	由利本荘市	秋田	本州	M (1) F (3)	- - - -	波型 - - -	<i>major</i> <i>major</i> - -
23	岩手郡滝沢村	岩手	本州	M (1)	++	鉤型	<i>japonicus</i>
24	花巻市	岩手	本州	M (1) F (1)	- -	波型 -	<i>major</i> <i>major</i>
25	北上市	岩手	本州	F (2)	-	-	<i>major</i>
26	一関市	岩手	本州	F (2)	+ +	- -	<i>major</i> <i>major</i>
27	酒田市	山形	本州	F (1)	+	-	<i>major</i>
28	西村山郡西川町-1	山形	本州	F (2)	-	-	-
29	西村山郡西川町-2	山形	本州	F (2)	- -	- -	- <i>major</i>

30	東置賜郡高島町	山形	本州	M (2)	-	波型	major
					+	波型	major
31	米沢市	山形	本州	F (3)	-	-	major
					-	-	major
					-	-	-
32	栗原市-1	宮城	本州	M (1)	++	鉤型	japonicus
33	栗原市-2	宮城	本州	M (1)	-	波型	major
34	東松山市	宮城	本州	M (2)	++	鉤型	-
					++	鉤型	-
35	仙台市	宮城	本州	M (2)	-	波型	major
					-	波型	-
				F (2)	-	-	major
					-	-	-
36	胎内市	新潟	本州	F (3)	++	-	major
					+	-	major
					+	-	major
37	新潟市	新潟	本州	M (2)	++	鉤型	japonicus
					++	鉤型	japonicus
38	妙高市	新潟	本州	M (1)	-	波型	major
39	佐渡市-1	新潟	本州	M (1)	-	波型	major
				F (1)	-	-	major
41	耶麻郡北塩原村	福島	本州	F (2)	-	-	major
					-	-	major
42* <sup>1</sup>	福島市	福島	本州	M (7)	++	鉤型	japonicus
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
					-	波型	major
					-	波型	major
					-	波型	-
					-	波型	-
				F (5)	++	-	-
					-	-	major
					-	-	major
					-	-	-
					-	-	-
43	南相馬市	福島	本州	M (3)	++	鉤型	-
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
				F (6)	++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
44* <sup>1</sup>	双葉郡浪江町	福島	本州	M (10)	++	鉤型	japonicus
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
				F (8)	++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
					-	-	-
					-	-	-
45	郡山市	福島	本州	M (2)	-	波型	major
					-	波型	major
				F (1)	-	-	-
46	須賀川市	福島	本州	M (2)	-	波型	major
					-	波型	major
				F (2)	-	-	major
					-	-	-
47	大沼郡昭和村	福島	本州	F (2)	+	-	major
					-	-	major
48* <sup>1</sup>	西白河郡西郷村	福島	本州	M (4)	++	鉤型	japonicus
					++	鉤型	japonicus
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-

				F (1)	-	-	major
49	東白川郡基町	福島	本州	M (1)	++	鉤型	-
50	飯山市-1			M (1)	-	波型	-
				F (3)	-	-	-
					-	-	-
					++	-	-
51	飯山市-2	長野	本州	M (1)	++	鉤型	-
52	上水内郡信濃町	長野	本州	M (1)	-	波型	-
53	北安曇郡白馬村	長野	本州	F (2)	-	-	major
					-	-	-
54	大町市	長野	本州	M (3)	++	鉤型	-
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
				F (4)	++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
55	上田市	長野	本州	M (7)	++	鉤型	-
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
				F (8)	++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
56	埴科郡坂城町	長野	本州	M (1)	++	鉤型	japonicus
57	安曇野市	長野	本州	F (2)	++	-	japonicus
					++	-	japonicus
58	松本市	長野	本州	M (2)	++	鉤型	japonicus
					++	鉤型	-
				F (6)	++	-	japonicus
					++	-	japonicus
					++	-	japonicus
					++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
59	塩尻市	長野	本州	M (1)	++	鉤型	japonicus
				F (1)	++	-	japonicus
60	諏訪市	長野	本州	M (2)	++	鉤型	-
					++	鉤型	-
				F (1)	++	-	-
61	木曾郡木祖村	長野	本州	M (3)	++	鉤型	-
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
				F (2)	++	-	-
					++	-	-
62	伊那市	長野	本州	F (1)	++	-	-
63	駒ヶ根市	長野	本州	F (1)	++	-	japonicus
64	塩谷郡塩谷町	栃木	本州	M (1)	++	鉤型	japonicus
				F (1)	++	-	japonicus
65	東茨城郡城里町	茨城	本州	M (8)	-	波型	major
					-	波型	-
					-	波型	-
					-	波型	-
					-	波型	-
					-	波型	-
					-	波型	-
					-	波型	-
				F (9)	-	-	major
					-	-	-
					-	-	-
					-	-	-
					-	-	-
					-	-	-
					-	-	-
					-	-	-
66	鹿嶋市	茨城	本州	F (1)	-	-	major

67	北杜市	山梨	本州	M (3)	++	鉤型	japonicus
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
				F (4)	++	-	japonicus
					++	-	-
				++	-	-	
				++	-	-	
68	大月市	山梨	本州	M (1)	++	鉤型	-
				F (2)	++	-	-
					++	-	-
69	愛甲郡愛川町	神奈川	本州	M (2)	++	鉤型	japonicus
					++	鉤型	japonicus
70	秦野市	神奈川	本州	F (3)	-	-	major
					-	-	major
					-	-	major
71	小田原市	神奈川	本州	F (1)	++	-	japonicus
72	犬山市	愛知	本州	M (1)	++	鉤型	japonicus
73	瀬戸市	愛知	本州	M (1)	++	鉤型	japonicus
74	新城市	愛知	本州	M (1)	-	波型	major
76*	夷隅郡大多喜市	千葉	本州	M (3)	++	鉤型	japonicus
					++	鉤型	japonicus
					-	波型	major
				F (3)	++	-	japonicus
					++	-	japonicus
					-	-	major
					-	-	major
					-	-	major
77	富津市	千葉	本州	M (2)	+	波型	major
					++	波型	major
					-	-	major
78	浜松市-1	静岡	本州	M (1)	++	鉤型	japonicus
				F (2)	++	-	japonicus
					++	-	japonicus
79	浜松市-2	静岡	本州	M (2)	++	鉤型	japonicus
					++	鉤型	japonicus
					++	-	japonicus
80	伊賀市-1	三重	本州	M (2)	-	波型	major
					+	波型	major
81	伊賀市-2	三重	本州	M (2)	-	波型	major
					-	波型	major
					-	波型	major
				F (1)	-	-	major
82	奈良市	奈良	本州	F (1)	-	-	major
83	豊能郡能勢町	大阪	本州	F (5)	++	-	japonicus
					++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
84	船井郡京丹波町	京都	本州	M (8)	++	鉤型	japonicus
					++	鉤型	japonicus
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
					++	鉤型	-
					F (3)	++	-
		++	-	japonicus			
		++	-	japonicus			
85	三田市	兵庫	本州	M (3)	++	鉤型	japonicus
					++	鉤型	japonicus
					++	鉤型	-
					++	-	-
					++	-	-
86	淡路市	兵庫	本州	M (1)	++	鉤型	-
87	豊岡市	兵庫	本州	M (2)	-	波型	major
					-	波型	major
					-	-	major
88	姫路市	兵庫	本州	M (1)	++	鉤型	japonicus
					++	-	japonicus
89	佐用郡佐用町-1	兵庫	本州	M (2)	++	鉤型	japonicus
					++	鉤型	japonicus
90	佐用郡佐用町-2	兵庫	本州	F (1)	-	-	major
91	東かがわ市	香川	四国	M (1)	++	鉤型	japonicus
					++	-	japonicus
92	三好市	徳島	四国	F (1)	-	-	major
93	松山市	愛媛	四国	M (1)	++	鉤型	japonicus

94	美作市	岡山	本州	F (1)	++	-	japonicus
96	鳥取市	鳥取	本州	F (1)	++	-	japonicus
97	安来市	島根	本州	F (1)	++	-	japonicus
				M (2)	++	鉤型	japonicus
					++	鉤型	japonicus
98	出雲市	島根	本州	F (1)	++	-	japonicus
				F (3)	-	-	major
					-	-	major
					-	-	major
99	世良郡世良市	広島	本州	M (2)	-	波型	major
					-	波型	major
100	三原市	広島	本州	M (1)	++	鉤型	japonicus
101* <sup>1</sup>	東広島市	広島	本州	F (1)	++	-	japonicus
				M (1)	-	波型	major
104	唐津市	佐賀	九州	F (1)	++	-	japonicus
				F (2)	++	-	japonicus
105	玖珠郡玖珠町	大分	九州		++	-	japonicus
				M (2)	-	波型	major
					-	波型	major
				F (3)	-	-	major
					-	-	major
					-	-	major
106	長崎市	長崎	九州	M (1)	++	鉤型	japonicus
				F (2)	++	-	japonicus
109	薩摩川内市	鹿児島	九州	F (1)	++	-	japonicus
韓国							
110* <sup>1</sup>	華川郡史内面	江原道	韓国東部	M (1)	++	波型	japonicus
				F (1)	+	-	major
111	漣川郡全谷里	京畿道	韓国東部	F (2)	++	-	japonicus
112	洪川郡内村面	江原道	韓国東部	F (2)	++	-	japonicus
					++	-	japonicus
113	江陵市	江原道	韓国東部	M (1)	++	波型	japonicus
				F (4)	++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
114* <sup>1</sup>	横城郡公根面	江原道	韓国東部	M (2)	++	波型	japonicus
					++	波型	japonicus
115	三陟郡近徳面-1	江原道	韓国東部	F (1)	+	-	major
				M (5)	+	波型	major
					+	波型	major
					+	波型	-
					+	波型	-
					+	波型	-
				F (5)	+	-	major
					+	-	major
					+	-	-
					+	-	-
117	原州市	江原道	韓国東部	M (1)	++	波型	japonicus
				F (5)	++	-	japonicus
					++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
118	堤川市	忠清北道	韓国東部	M (2)	++	波型	japonicus
					++	波型	-
				F (3)	++	-	-
					++	-	-
					++	-	-
120	聞慶市	慶尚北道	韓国東部	M (1)	++	波型	japonicus
				F (2)	++	-	japonicus
					++	-	japonicus
121	安東市	慶尚北道	韓国東部	M (1)	++	波型	japonicus
123	尚州市	慶尚北道	韓国東部	M (1)	++	波型	japonicus
				F (1)	++	-	japonicus
124* <sup>1</sup>	永同郡深川面	忠清北道	韓国東部	M (2)	++	波型	japonicus
					+	波型	major
				F (1)	++	-	japonicus
125	錦山郡南一面	忠清南道	韓国南西部	M (1)	++	波型	japonicus
				F (1)	++	-	japonicus
126	慶州市-1	全羅北道	韓国南西部	F (2)	++	-	japonicus

129	陝川郡伽倻面	慶尚南道	韓国東部	M (1)	++	-	<i>japonicus</i>
132	咸安郡漆西面	慶尚南道	韓国東部	M (1)	++	波型	<i>japonicus</i>
133	長城郡森西面	全羅南道	韓国南西部	M (3)	++	波型	<i>japonicus</i>
					++	波型	<i>japonicus</i>
					++	波型	<i>japonicus</i>
				F (1)	++	-	<i>japonicus</i>

\*<sup>1</sup> 混棲地

\*<sup>2</sup> 体サイズ比較を行った際の地域区分

\*<sup>3</sup> 白帯の有無については、白帯がはっきりと確認できた個体を++, 薄く確認できた個体を+, 白帯が無い個体を-とした

表I-2. 遺伝子解析に用いた個体の産地番号, 産地名, 個体数および各遺伝子領域におけるハプロタイプ名

地点番号/地点名	解析個体数	遺伝子型/ハプロタイプ名 (N)			
		COI	16S rRNA	Histone 3	
<b>コオイムシ <i>Appasus japonicus</i></b>					
日本					
4*	北海道雨竜郡妹背牛町	2	Cj1 (1)	16Sj1 (1)	Hj1 (2)
			Cj2 (1)	16Sj2 (1)	
5	北海道樺戸郡新十津川町	2	Cj1 (2)	16Sj2 (2)	Hj1 (2)
7*	北海道中川郡幕別町	2	Cj3 (2)	16Sj2 (2)	Hj1 (2)
16	青森県八戸市	1	Cj4 (1)	16Sj2 (1)	Hj1 (1)
42*	福島県福島市	1	Cj5 (1)	16Sj3 (1)	Hj1 (1)
44*	福島県双葉郡浪江町	1	Cj6 (1)	16Sj4 (1)	Hj1 (1)
48*	福島県西白河郡西郷村	1	Cj7 (1)	16Sj5 (1)	Hj1 (1)
67	山梨県北杜市	1	Cj8 (1)	16Sj6 (1)	Hj1 (1)
69	神奈川県愛甲郡愛川町	2	Cj9 (1)	16Sj2 (2)	Hj1 (2)
			Cj10 (1)		
76*	千葉県夷隅郡大多喜市	1	Cj11 (1)	16Sj2 (1)	Hj1 (1)
84	京都府船井郡京丹波町	1	Cj12 (1)	16Sj7 (1)	Hj1 (1)
85	兵庫県三田市	1	Cj13 (1)	16Sj8 (1)	Hj1 (1)
88	兵庫県姫路市	1	Cj14 (1)	16Sj9 (1)	Hj1 (1)
96	鳥取県鳥取市	1	Cj15 (1)	16Sj10 (1)	Hj1 (1)
97	島根県安来市	1	Cj15 (1)	16Sj10 (1)	Hj2 (1)
100	広島県三原市	2	Cj16 (1)	16Sj10 (1)	Hj3 (1)
			Cj17 (1)	16Sj11 (1)	Hj4 (1)
103	佐賀県多久市	1	Cj18 (1)	16Sj10 (1)	Hj1 (1)
韓国					
110*	江原道華川郡史内面	1	Cj20 (1)	16Sj12 (1)	Hj5 (1)
113	江原道江陵市	1	Cj21 (1)	16Sj13 (1)	Hj1 (1)
114*	江原道横城郡公根面	2	Cj22 (1)	16Sj12 (1)	Hj1 (2)
			Cj23 (1)	16Sj14 (1)	
118	忠清北道堤川市	1	Cj24 (1)	16Sj15 (1)	Hj1 (1)
124*	忠清北道永同郡深川面	2	Cj25 (1)	16Sj12 (2)	Hj1 (2)
			Cj26 (1)		
129	慶尚南道陝川郡伽倻面	1	Cj27 (1)	16Sj12 (1)	Hj6 (1)
中国					
—	—	1	Cj28 (1)	16Sj12 (1)	Hj1 (1)
<b>オオコオイムシ <i>Appasus major</i></b>					
日本					
3	北海道留萌市	1	Cm1 (1)	16Sm1 (1)	Hm1 (1)
4*	北海道雨竜郡妹背牛町	1	Cm1 (1)	16Sm1 (1)	Hm2 (1)
7*	北海道中川郡幕別町	2	Cm1 (2)	16Sm1 (2)	Hm2 (2)
22	秋田県由利本荘市	1	Cm2 (1)	16Sm2 (1)	Hm2 (1)
23	岩手県岩手郡滝沢村	1	Cm3 (1)	16Sm3 (1)	Hm3 (1)
29	山形県西村山郡西川町-2	1	Cm4 (1)	16Sm2 (1)	Hm2 (1)
35	宮城県仙台市	1	Cm5 (1)	16Sm4 (1)	Hm1 (1)
42*	福島県福島市	2	Cm6 (1)	16Sm4 (2)	Hm1 (2)
			Cm7 (1)		
46	福島県須賀川市	1	Cm8 (1)	16Sm4 (1)	Hm1 (1)
48*	福島県西白河郡西郷村	1	Cm6 (1)	16Sm5 (1)	Hm1 (1)
53	長野県北安曇郡白馬村	1	Cm9 (1)	16Sm1 (1)	Hm1 (1)
66	茨城県鹿嶋市	1	Cm10 (1)	16Sm4 (1)	Hm1 (1)
76*	千葉県夷隅郡大多喜町	1	Cm6 (1)	16Sm4 (1)	Hm1 (1)
82	奈良県奈良市	1	Cm11 (1)	16Sm6 (1)	Hm4 (1)
87	愛知県豊岡市	2	Cm12 (1)	16Sm4 (2)	Hm4 (2)
			Cm13 (1)		
98	島根県出雲市	3	Cm14 (1)	16Sm4 (1)	Hm4 (2)
			Cm15 (1)	16Sm7 (2)	
			Cm16 (1)		Hm5 (1)
99	広島県世良郡世良町	3	Cm12 (1)	16Sm4 (2)	Hm4 (2)
			Cm17 (1)		
			Cm18 (1)	16Sm7 (1)	Hm6 (1)
韓国					
110*	江原道華川郡史内面	1	Cm19 (1)	16Sm8 (1)	Hm7 (1)
114*	江原道横城郡公根面	1	Cm20 (1)	16Sm9 (1)	Hm7 (1)
124*	忠清北道永同郡深川面	1	Cm21 (1)	16Sm10 (1)	Hm7 (1)

\*混棲地

表I-3. ベイズ法およびML法において採用した塩基置換モデル

領域	配列長	パーティション	塩基置換モデル	
			ベイズ法	ML法
16S rRNA	435 bp	-	HKY85 + G	HKY85 + G
COI*	658 bp	COI C.P. 1	HKY85 + G	TN93 + G
		COI C.P. 2	SYM + G	TN93ef + G
		COI C.P. 3	F81	F81
Histone H3*	328 bp	H3 C.P. 1	HKY85	HKY85
		H3 C.P. 2	SYM	TN93ef
		H3 C.P. 3	JC69	JC69

\*第一コドン: C.P. 1, 第二コドン: C.P. 2, 第三コドン C.P. 3

表I-4. 本研究で使⽤したプライマー情報

プライマー名	配列 (5'→3')	F/R (領域)	引用文献
LR-K-13417	CGCCTGTTTAACAAAAACAT	F (16S)	Simon <i>et al.</i> (1994)
LR-J-12961	TTTAATCCAACATCGAGG	R (16S)	Cognato & Vogler (2001)
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	F (COI)	Folmer <i>et al.</i> (1994)
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	R (COI)	Folmer <i>et al.</i> (1994)
HexAF	ATGGCTCGTACCAAGCAGACGGC	F (H3)	Ogden & Whiting (2003)
HexAR	ATATCCTTGGGCATGATGGTGAC	R (H3)	Ogden & Whiting (2003)

表I-5. 形態計測データ

地点情報			オス: M / ス: F (N)	計測値 (mm)											
No.	地点名	都道府県名		体長	最大前胸幅	口吻第2節幅	口吻第2節長	口吻第3節長	口吻第4節長	前腕節長	前腕節幅	腹部第7腹板幅	腹部第7腹板長	呼吸管幅	呼吸管長
コオイムシ <i>Appasus japonicus</i>															
日本															
1	天塩郡幌延町-1	北海道	M (1)	22.6	8.1	0.5	1.2	1.4	0.6	1.8	5.5	2.1	3.1	0.5	4.6
			F (1)	23.2	8.0	0.5	1.2	1.4	0.6	1.9	5.5	2.3	2.4	0.5	4.5
4*	雨竜郡妹背牛町	北海道	F (2)	21.5	8.0	0.4	1.1	1.3	0.7	1.7	5.2	2.2	2.3	0.6	4.9
				20.7	7.6	0.5	1.1	1.3	0.7	1.6	5.1	2.1	2.2	0.5	4.4
5	樺戸郡新十津川町	北海道	M (1)	21.6	8.2	0.5	1.1	1.3	0.7	1.8	5.3	2.2	2.7	0.5	5.3
			F (1)	20.7	7.6	0.4	1.0	1.2	0.7	1.7	5.1	2.0	2.3	0.5	4.6
6	釧路郡釧路市	北海道	M (2)	24.4	9.5	0.5	1.4	1.5	0.8	2.0	5.9	2.4	3.0	0.6	5.5
				22.0	8.1	0.4	1.3	1.4	0.8	1.8	5.4	2.0	2.9	0.5	5.0
7*	中川郡幕別町	北海道	M (1)	24.9	9.2	0.6	1.2	1.4	0.7	2.0	6.1	2.0	3.0	0.7	5.6
			F (1)	25.5	9.9	0.6	1.1	1.4	0.8	2.0	6.1	2.5	2.6	0.6	5.5
8	千歳市	北海道	M (1)	22.0	8.8	0.5	1.3	1.5	0.6	1.9	5.1	2.1	2.8	0.6	4.7
			F (1)	23.1	8.5	0.5	1.2	1.6	0.7	1.9	5.4	2.1	2.1	0.5	4.5
10	十勝郡浦幌町	北海道	M (1)	24.5	8.5	0.5	1.3	1.4	0.8	2.0	5.7	2.5	3.0	0.6	5.3
11	勇払郡鶴川町	北海道	M (1)	23.4	9.0	0.5	1.2	1.5	0.6	1.9	5.7	2.3	3.0	0.6	4.9
			F (1)	22.9	8.0	0.4	1.3	1.4	0.6	1.8	5.5	2.1	2.3	0.4	4.4
13	五所川原市	青森	M (2)	21.7	8.2	0.4	1.2	1.3	0.6	1.8	5.1	2.2	2.8	0.5	4.8
				20.5	7.9	0.4	1.1	1.2	0.6	1.8	5.0	2.1	2.7	0.5	4.7
15*	津軽町-2	青森	M (1)	20.0	7.4	0.4	1.1	1.2	0.6	1.8	5.0	2.0	2.7	0.4	4.5
16	八戸市	青森	M (6)	20.9	7.5	0.4	1.3	1.4	0.7	1.7	5.2	2.1	2.6	0.5	4.8
				21.2	7.2	0.3	1.2	1.4	0.7	1.7	4.9	1.8	2.6	0.5	4.8
				20.9	7.5	0.4	1.3	1.3	0.6	1.7	5.2	2.2	2.7	0.6	4.6
				20.0	7.4	0.4	1.2	1.2	0.6	1.6	4.9	2.1	2.5	0.5	4.6
				20.5	7.5	0.4	1.3	1.4	0.6	1.7	5.4	2.1	2.6	0.5	4.5
				20.0	7.2	0.3	1.2	1.5	0.6	1.4	5.1	2.2	2.6	0.5	4.8
			F (3)	21.6	7.3	0.3	1.3	1.6	0.6	1.7	5.1	2.2	2.3	0.5	4.4
				21.0	7.2	0.3	1.2	1.6	0.7	1.6	5.1	2.0	2.3	0.5	4.2
				22.0	7.5	0.4	1.3	1.5	0.6	1.7	5.0	2.1	2.4	0.4	3.8
23	岩手郡滝沢村	岩手	M (1)	20.5	7.2	0.4	1.1	1.3	0.6	1.8	5.1	2.1	2.8	0.4	4.4
32	栗原市-1	宮城	M (1)	21.2	7.5	0.4	1.3	1.5	0.5	1.8	5.4	2.3	2.7	0.5	5.0
34	東松山市	宮城	M (2)	21.4	7.5	0.4	1.3	1.5	0.6	1.7	5.2	2.0	2.6	0.5	5.0
				21.5	7.5	0.5	1.3	1.4	0.7	1.7	5.2	2.2	2.7	0.6	5.0
37	新潟市	新潟	M (2)	22.9	8.2	0.5	1.3	1.4	0.7	1.8	5.1	2.4	3.0	0.5	5.1
				19.9	7.1	0.4	1.1	1.3	0.6	1.6	4.7	1.9	2.1	0.4	3.7
42*	福島市	福島	M (3)	21.3	7.4	0.5	1.2	1.3	0.5	1.6	5.2	2.0	2.6	0.5	4.8
				21.1	7.7	0.5	1.3	1.6	0.7	1.5	5.2	2.2	2.6	0.5	4.7
				21.3	7.6	0.4	1.2	1.4	0.6	1.5	5.2	2.1	2.7	0.7	4.9
			F (1)	22.0	7.7	0.4	1.3	1.5	0.7	1.8	5.3	2.2	2.4	0.6	4.6
43	南相馬市	福島	M (3)	19.4	6.9	0.3	1.3	1.4	0.6	1.5	4.8	2.1	2.5	0.5	4.2
				21.2	7.9	0.4	1.3	1.4	0.6	1.7	5.0	2.2	2.7	0.5	4.9
				20.2	7.2	0.4	1.2	1.3	0.7	1.5	4.8	2.1	2.7	0.6	5.0
			F (6)	19.8	6.9	0.4	1.2	1.3	0.6	1.6	4.8	2.0	2.1	0.5	4.2
				20.6	7.4	0.3	1.2	1.4	0.6	1.7	5.2	2.2	2.2	0.5	4.4
				21.8	7.0	0.4	1.2	1.6	0.6	1.6	5.2	2.1	2.3	0.5	4.2
				21.0	7.3	0.3	1.3	1.7	0.7	1.5	5.0	2.1	2.1	0.5	4.3
				20.5	7.1	0.5	1.3	1.5	0.7	1.5	5.2	1.9	2.2	0.4	4.2
				22.1	7.3	0.4	1.3	1.5	0.7	1.6	5.3	2.1	2.2	0.5	4.2
44*	双葉郡浪江町	福島	M (10)	20.8	7.5	0.3	1.2	1.4	0.6	1.7	5.2	2.0	2.6	0.5	4.6
				19.7	6.9	0.4	1.1	1.5	0.5	1.5	4.8	2.0	2.4	0.4	4.5
				19.6	7.0	0.3	1.2	1.3	0.7	1.6	5.0	2.2	2.6	0.4	4.4
				20.2	7.5	0.4	1.1	1.3	0.6	1.8	5.3	2.0	2.5	0.4	4.4
				20.1	7.2	0.5	1.2	1.4	0.6	1.5	5.0	2.1	2.4	0.5	4.2
				20.8	7.4	0.4	1.2	1.3	0.4	1.7	5.1	1.9	2.5	0.5	4.5
				19.5	6.8	0.4	1.1	1.3	0.7	1.5	4.9	2.0	2.4	0.5	4.7
				19.8	7.0	0.5	1.1	1.5	0.6	1.5	5.2	2.0	2.5	0.5	4.4
				20.5	7.4	0.4	1.2	1.4	0.7	1.6	5.2	2.2	2.7	0.5	4.5
				21.2	7.2	0.5	1.2	1.5	0.6	1.5	5.1	2.4	2.6	0.5	4.5
			F (6)	21.1	7.4	0.4	1.3	1.6	0.6	1.6	5.4	2.2	2.2	0.5	4.3

				20.8	7.3	0.4	1.2	1.4	0.6	1.4	5.0	2.2	2.2	0.5	4.3
				20.9	7.4	0.5	1.2	1.4	0.6	1.6	5.1	2.2	2.4	0.4	4.1
				19.8	7.0	0.3	1.2	1.5	0.6	1.6	4.9	2.1	2.3	0.5	3.9
				20.6	7.2	0.4	1.3	1.5	0.7	1.5	5.1	2.1	2.3	0.5	4.1
				22.4	7.8	0.4	1.2	1.6	0.6	1.6	5.3	2.2	2.2	0.6	4.5
48*	西郷町	福島	M (4)	19.4	6.9	0.3	1.2	1.4	0.6	1.5	5.0	2.0	2.4	0.6	4.5
				20.3	7.2	0.4	1.2	1.3	0.7	1.6	5.2	2.0	2.8	0.5	4.5
				19.5	6.7	0.3	1.3	1.3	0.6	1.4	4.9	1.8	2.4	0.4	4.2
				20.4	7.4	0.3	1.2	1.5	0.6	1.6	5.1	2.1	2.6	0.4	4.5
49	東白川郡塙町	福島	M (1)	20.8	7.0	0.3	1.1	1.3	0.6	1.5	4.8	2.0	2.6	0.4	4.5
51	飯山市-2	長野	M (1)	20.2	7.3	0.3	1.1	1.3	0.5	1.5	4.5	2.0	2.7	0.5	4.6
54	大町市	長野	M (3)	21.4	7.2	0.5	1.2	1.5	0.6	1.7	5.1	2.3	2.7	0.5	5.0
				20.2	7.5	0.4	1.3	1.4	0.6	1.6	5.0	2.0	2.7	0.6	4.8
				21.2	7.8	0.4	1.2	1.3	0.6	1.6	5.4	2.2	2.5	0.5	5.0
			F (4)	22.0	7.8	0.3	1.1	1.4	0.7	1.8	5.2	2.2	2.2	0.6	4.6
				21.8	7.4	0.5	1.1	1.5	0.7	1.7	5.1	2.2	2.4	0.6	4.5
				21.3	7.6	0.5	1.2	1.3	0.7	1.7	5.0	2.2	2.3	0.6	4.6
				20.0	7.1	0.4	1.2	1.4	0.7	1.6	4.8	2.0	2.2	0.5	4.5
55	上田市	長野	M (7)	21.5	7.7	0.3	1.2	1.3	0.7	1.5	5.2	2.1	2.7	0.6	5.0
				20.8	7.3	0.4	1.2	1.3	0.6	1.4	4.9	2.2	2.5	0.5	5.0
				20.9	7.6	0.4	1.1	1.3	0.5	1.8	5.1	2.1	2.7	0.5	5.0
				21.2	8.1	0.4	1.3	1.3	0.6	1.8	5.0	2.2	2.6	0.6	5.0
				21.8	7.9	0.5	1.2	1.4	0.6	1.8	5.1	2.2	2.6	0.4	4.8
				20.8	7.4	0.5	1.1	1.5	0.6	1.6	4.9	2.2	2.5	0.6	4.5
				20.2	7.4	0.4	1.2	1.3	0.6	1.5	4.9	2.1	2.6	0.7	4.7
			F (8)	22.1	7.8	0.5	1.2	1.3	0.6	1.6	5.1	2.1	2.2	0.6	4.9
				21.3	7.6	0.3	1.2	1.4	0.7	1.7	5.0	2.3	2.3	0.7	4.7
				21.2	7.7	0.4	1.2	1.6	0.8	1.9	5.0	2.1	2.3	0.7	4.8
				22.0	7.8	0.4	1.2	1.3	0.6	1.7	5.1	2.1	2.3	0.6	4.7
				20.9	7.6	0.5	1.1	1.4	0.6	1.7	4.9	2.2	2.2	0.6	5.0
				20.6	7.3	0.3	1.1	1.4	0.5	1.5	4.6	2.1	2.2	0.4	4.2
				21.4	7.6	0.3	1.2	1.4	0.6	1.7	5.0	2.2	2.2	0.5	4.3
				20.1	7.4	0.5	1.2	1.4	0.5	1.5	4.5	2.2	2.3	0.5	4.2
56	埴科郡坂城町	長野	M (1)	20.2	8.0	0.4	1.1	1.4	0.7	1.8	4.8	2.0	2.6	0.5	5.0
57	安曇野市	長野	F (2)	20.0	7.8	0.4	1.0	1.5	0.7	1.5	4.5	2.0	2.1	0.5	4.2
				21.1	8.1	0.5	1.3	1.4	0.7	1.8	4.7	2.0	2.1	0.5	4.9
58	松本市	長野	M (2)	21.2	7.4	0.4	1.1	1.4	0.6	1.7	5.0	2.3	2.6	0.6	4.6
				20.9	7.3	0.4	1.1	1.4	0.7	1.6	4.8	2.0	2.4	0.4	4.2
			F (6)	21.6	7.4	0.3	1.3	1.4	0.6	1.6	4.9	2.1	2.2	0.6	4.9
				20.3	7.0	0.4	1.0	1.3	0.7	1.5	4.4	2.1	2.2	0.5	4.7
				20.9	7.5	0.4	1.2	1.3	0.7	1.6	4.9	2.1	2.1	0.4	4.7
				22.0	7.8	0.4	1.2	1.3	0.5	1.6	5.0	2.0	2.2	0.5	4.5
				19.5	7.0	0.4	1.1	1.3	0.6	1.6	4.7	2.0	2.1	0.5	4.2
				22.2	7.9	0.5	1.2	1.3	0.7	1.7	5.1	2.0	2.3	0.6	4.8
59	塩尻市	長野	M (1)	21.9	8.1	0.5	1.1	1.5	0.8	1.7	5.0	2.0	2.8	0.6	4.8
			F (1)	19.1	8.0	0.4	1.2	1.4	0.8	1.7	5.0	2.1	2.1	0.6	4.3
60	諏訪市	長野	M (2)	19.5	7.1	0.4	1.1	1.3	0.6	1.5	4.9	1.9	2.6	0.4	4.6
				21.0	7.3	0.4	1.2	1.5	0.6	1.7	5.3	2.1	2.6	0.4	4.5
			F (1)	22.0	7.3	0.4	1.2	1.4	0.7	1.6	5.1	2.1	2.4	0.5	4.5
61	木曽郡木祖村	長野	M (3)	21.0	7.2	0.4	1.2	1.4	0.7	1.6	4.8	2.1	2.6	0.5	5.0
				22.8	7.4	0.4	1.2	1.5	0.6	1.7	5.2	2.0	2.5	0.5	4.9
				20.7	7.3	0.4	1.2	1.6	0.6	1.6	4.8	2.1	2.5	0.5	4.2
			F (2)	22.1	7.6	0.4	1.2	1.4	0.6	1.7	5.3	2.2	2.2	0.6	4.6
				20.4	7.8	0.3	1.3	1.5	0.7	1.7	5.3	2.2	2.3	0.6	4.9
62	伊那市	長野	F (1)	22.2	8.0	0.4	1.2	1.5	0.8	1.7	5.0	2.2	2.3	0.6	4.8
63	駒ヶ根市	長野	F (1)	23.3	8.2	0.4	1.3	1.5	0.8	1.5	5.1	2.0	2.3	0.5	4.1
64	塩谷郡塩谷町	栃木	M (1)	19.2	7.8	0.4	1.2	1.3	0.7	1.8	4.9	2.1	2.4	0.5	4.1
			F (1)	19.0	7.7	0.4	1.2	1.3	0.7	1.8	4.9	2.1	2.2	0.4	4.1
67	北杜市	山梨	M (3)	21.9	7.1	0.3	1.2	1.4	0.7	1.5	5.0	2.0	2.8	0.4	4.3
				21.0	7.6	0.3	1.2	1.5	0.6	1.6	5.1	2.1	2.9	0.5	4.8
				20.4	7.4	0.4	1.2	1.4	0.6	1.6	5.1	2.2	2.6	0.5	4.7
			F (4)	23.0	8.0	0.6	1.3	1.6	0.7	1.8	5.3	2.1	2.2	0.5	4.7
				21.1	7.2	0.4	1.2	1.5	0.7	1.4	4.9	2.1	2.2	0.5	4.2
				21.3	7.8	0.4	1.2	1.4	0.6	1.6	5.3	2.2	2.3	0.6	4.8
				21.6	8.0	0.5	1.2	1.5	0.6	1.8	5.4	2.2	2.2	0.5	4.6
68	大月市	山梨	M (1)	20.2	7.2	0.3	1.1	1.3	0.6	1.6	4.8	2.3	2.5	0.5	4.3
			F (2)	21.2	7.6	0.5	1.2	1.2	0.6	1.8	4.9	2.0	2.2	0.5	4.6
				21.8	7.7	0.4	1.2	1.6	0.5	1.7	4.9	2.1	2.2	0.5	4.7

69	愛甲郡愛川町	神奈川	M (2)	18.4	6.9	0.4	1.0	1.3	0.6	1.5	4.3	1.9	2.2	0.6	4.2	
				19.4	7.2	0.4	1.2	1.3	0.7	1.6	4.6	2.1	2.4	0.6	4.3	
71	小田原市	神奈川	F (1)	20.3	7.6	0.4	1.3	1.4	0.7	1.9	5.0	2.2	2.2	0.4	4.3	
72	犬山市	愛知	M (1)	22.0	8.3	0.5	1.1	1.4	0.7	1.9	5.2	2.1	2.9	0.4	5.1	
73	瀬戸市	愛知	M (1)	21.9	7.9	0.4	1.3	1.4	0.7	1.8	5.1	2.1	2.8	0.5	4.8	
76*	夷隅郡大多喜市	千葉	M (2)	20.1	7.0	0.4	1.2	1.4	0.6	1.4	5.1	2.0	2.2	0.7	4.7	
				19.8	7.6	0.4	1.0	1.3	0.6	1.5	4.9	2.0	2.5	0.4	4.8	
				F (1)	21.0	8.1	0.4	1.4	1.3	0.7	1.8	5.0	2.1	2.4	0.5	4.4
78	浜松市-1	静岡	M (1)	19.3	7.3	0.4	1.2	1.3	0.7	1.7	5.0	2.0	2.5	0.4	4.4	
				F (2)	20.3	7.4	0.4	1.3	1.3	0.6	1.7	4.7	2.0	2.0	0.5	4.5
				20.9	8.0	0.5	1.3	1.3	0.7	1.8	5.0	2.1	2.1	0.5	4.8	
79	浜松市-2	静岡	M (2)	20.0	7.2	0.4	1.1	1.3	0.6	1.7	5.0	2.0	2.9	0.4	4.6	
				19.1	7.2	0.4	1.1	1.2	0.6	1.7	4.8	2.0	2.5	0.4	4.5	
				F (1)	19.0	7.2	0.4	1.3	1.3	0.6	1.5	4.5	2.0	2.0	0.4	4.0
83	豊能郡能勢町	大阪	F (5)	20.2	7.1	0.4	1.2	1.3	0.6	1.4	4.8	2.1	2.2	0.6	4.7	
				22.0	7.9	0.4	1.4	1.4	0.6	1.7	5.4	2.2	2.3	0.5	4.5	
				18.9	6.7	0.3	0.9	1.2	0.6	1.4	4.5	1.9	2.1	0.4	4.2	
				20.5	7.4	0.4	1.0	1.3	0.7	1.5	4.9	2.1	2.1	0.4	4.2	
				21.4	7.8	0.4	1.1	1.3	0.7	1.7	5.1	2.2	2.4	0.5	4.9	
84	船井郡京丹波町	京都	M (8)	21.3	7.7	0.3	1.2	1.2	0.6	1.6	5.1	2.0	2.6	0.5	5.0	
				20.9	7.3	0.3	1.1	1.3	0.6	1.7	4.8	2.1	2.5	0.6	5.0	
				21.1	7.5	0.3	1.2	1.4	0.5	1.7	5.3	2.0	2.6	0.5	4.9	
				20.3	7.2	0.4	1.0	1.3	0.5	1.6	4.7	2.0	2.5	0.5	4.8	
				20.8	7.5	0.4	0.9	1.3	0.6	1.7	4.9	2.0	2.6	0.6	4.8	
				20.7	7.2	0.4	1.1	1.2	0.5	1.5	4.7	2.0	2.5	0.5	4.9	
				21.7	7.7	0.4	1.0	1.4	0.5	1.6	5.2	2.1	2.7	0.6	5.0	
				19.2	7.2	0.4	1.0	1.2	0.5	1.4	4.9	2.0	2.6	0.5	4.9	
				F (3)	20.5	7.1	0.4	1.2	1.3	0.7	1.6	4.9	2.1	2.3	0.6	4.5
				21.7	7.7	0.3	1.2	1.4	0.7	1.7	5.2	2.2	2.2	0.6	4.8	
85	三田市	兵庫	M (3)	21.2	7.6	0.4	1.2	1.5	0.6	1.7	5.1	2.1	2.4	0.6	4.7	
				20.4	7.2	0.4	1.3	1.5	0.7	1.7	4.9	2.2	2.6	0.5	5.0	
				21.2	7.8	0.3	1.2	1.2	0.6	1.7	5.0	2.2	2.6	0.5	4.9	
				18.7	6.8	0.4	1.1	1.3	0.5	1.5	4.7	2.0	2.7	0.5	4.3	
				F (2)	20.1	7.2	0.3	1.2	1.3	0.7	1.7	5.0	2.0	2.2	0.6	4.7
86	淡路市	兵庫	M (1)	19.3	7.1	0.3	1.1	1.2	0.6	1.6	4.5	1.9	2.5	0.5	4.5	
				88	姫路市	兵庫	M (1)	19.4	7.3	0.4	1.0	1.3	0.7	1.7	4.8	2.0
89	佐用郡佐用町-1	兵庫	M (2)	F (1)	18.1	7.1	0.4	1.1	1.2	0.6	1.8	4.8	1.9	2.0	0.4	3.9
				20.9	7.6	0.4	1.1	1.3	0.6	1.7	4.9	2.0	2.3	0.5	4.4	
91	東かがわ市	香川	M (1)	20.0	7.1	0.4	1.1	1.3	0.6	1.8	4.5	2.0	2.4	0.4	4.2	
				19.1	7.5	0.5	1.0	1.1	0.6	1.7	4.7	2.0	2.4	0.5	4.5	
93	松山市	愛媛	M (1)	20.0	7.8	0.4	1.0	1.2	0.7	1.6	4.9	2.1	2.1	0.5	4.6	
				19.0	7.0	0.4	1.0	1.1	0.7	1.6	4.7	1.9	2.4	0.5	4.5	
94	美作市	岡山	F (1)	18.0	6.7	0.4	1.0	1.1	0.6	1.5	4.5	1.9	2.0	0.4	4.2	
96	鳥取市	鳥取	F (1)	20.8	7.9	0.4	1.0	1.4	0.6	1.8	4.9	2.0	2.1	0.4	4.1	
97	安来市	鳥根	M (2)	19.4	7.3	0.5	0.9	1.2	0.6	1.7	4.7	2.1	2.1	0.5	4.4	
				19.6	7.1	0.4	1.0	1.2	0.6	1.5	4.6	2.1	2.5	0.5	4.3	
100	三原市	広島	M (1)	19.2	7.0	0.5	1.0	1.2	0.6	1.5	4.6	2.0	2.4	0.5	4.4	
				18.9	7.3	0.4	0.9	1.2	0.6	1.6	4.8	2.1	2.1	0.4	4.3	
				19.8	7.2	0.4	0.9	1.0	0.7	1.6	4.4	2.0	2.3	0.4	4.7	
101*	東広島市	広島	F (1)	F (1)	19.7	8.0	0.5	0.8	1.4	0.6	1.7	4.9	1.8	2.0	0.6	4.5
				19.0	7.5	0.5	1.0	1.2	0.7	1.6	4.5	1.9	2.0	0.5	4.3	
104	唐津市	佐賀	F (2)	19.0	7.2	0.4	1.2	1.4	0.6	1.7	4.7	2.0	2.0	0.4	4.7	
				19.1	7.1	0.4	1.3	1.4	0.6	1.6	4.7	2.0	2.0	0.4	4.5	
106	長崎市	長崎	M (1)	19.0	7.1	0.4	1.0	1.2	0.7	1.5	4.7	1.9	2.4	0.5	4.8	
				18.8	7.4	0.4	1.0	1.2	0.6	1.6	4.7	2.1	1.9	0.4	4.2	
				19.2	7.6	0.4	0.9	1.2	0.7	1.6	4.6	2.0	1.9	0.4	4.4	
109	薩摩川内市	鹿児島	F (1)	19.1	7.4	0.4	1.2	1.4	0.6	1.8	4.9	2.1	2.2	0.4	4.0	
110*	華川郡史内面	江原道	M (1)	21.7	8.0	0.5	1.2	1.4	0.7	1.7	4.9	2.1	2.7	0.5	4.9	
111	漣川郡全谷里	京畿道	F (2)	22.9	8.3	0.5	1.0	1.4	0.8	1.9	5.2	2.1	2.1	0.6	4.5	
				20.4	7.5	0.5	1.0	1.4	0.6	1.8	4.9	2.0	2.2	0.5	4.3	
112	洪川郡内村面	江原道	F (2)	21.5	8.1	0.5	1.2	1.5	0.8	2.0	5.1	2.1	2.1	0.5	4.3	
				23.0	8.8	0.5	1.2	1.7	0.7	1.9	5.5	2.2	2.4	0.5	4.8	
113	江陵市	江原道	M (1)	19.0	7.9	0.5	1.1	1.3	0.7	1.6	5.2	2.0	2.5	0.5	4.9	
				F (4)	21.3	8.3	0.4	1.2	1.3	0.8	1.7	4.8	2.2	2.1	0.6	4.7
				22.1	8.4	0.5	1.2	1.5	0.8	1.8	5.4	2.2	2.1	0.6	4.9	
				20.8	7.9	0.5	1.3	1.4	0.9	1.8	5.1	2.2	2.2	0.5	4.9	

114*	横城郡公根面	江原道	M (2)	21.1	8.0	0.5	1.2	1.3	0.8	1.7	5.0	2.1	2.0	0.6	4.8
				22.1	7.9	0.5	1.1	1.3	0.8	1.7	5.1	2.2	2.7	0.5	5.1
				21.0	8.1	0.5	1.1	1.4	0.8	1.7	5.2	2.1	2.7	0.5	4.9
117	三陟郡近徳面-1	江原道	M (1)	21.1	7.8	0.5	1.1	1.3	0.7	1.8	5.3	2.1	2.5	0.6	4.8
			F (5)	19.4	7.5	0.4	1.1	1.2	0.7	1.8	4.8	1.9	2.1	0.5	4.7
				21.6	8.2	0.6	1.1	1.5	0.9	1.8	5.3	2.3	1.9	0.5	4.8
				21.1	8.0	0.5	1.2	1.4	0.8	1.8	5.5	2.4	2.4	0.6	5.4
				22.9	8.8	0.5	1.2	1.4	0.8	1.7	5.0	2.2	2.2	0.5	4.8
				22.3	8.3	0.5	1.2	1.5	0.8	1.8	5.2	2.3	2.1	0.5	5.1
118	堤川市	忠清北道	M (2)	21.6	8.2	0.5	1.1	1.3	0.7	1.7	4.7	2.0	2.6	0.4	4.8
				20.6	7.8	0.5	1.2	1.4	0.8	1.8	5.3	2.2	2.6	0.5	5.3
			F (3)	23.3	8.8	0.5	1.2	1.4	0.9	1.8	5.4	2.2	2.3	0.4	5.5
				20.7	7.6	0.5	1.1	1.3	0.7	1.7	4.8	2.0	2.1	0.5	4.9
				22.0	8.6	0.6	1.1	1.5	0.8	2.0	5.4	2.2	2.3	0.6	5.0
120	開慶市	慶尚北道	M (1)	22.0	7.9	0.5	1.2	1.4	0.7	1.8	5.1	2.1	3.0	0.6	4.9
			F (2)	22.5	8.8	0.6	1.3	1.5	0.8	2.0	5.3	2.2	2.3	0.5	4.8
				22.4	8.2	0.5	1.4	1.6	0.8	1.9	5.2	2.1	2.2	0.5	4.7
121	安東市	慶尚北道	M (1)	20.1	7.3	0.4	1.1	1.2	0.6	1.6	4.8	2.0	2.4	0.5	4.5
123	尚州市	慶尚北道	M (1)	21.9	7.5	0.4	1.1	1.4	0.8	1.9	5.0	2.1	2.9	0.5	5.0
			F (1)	23.1	9.2	0.5	1.2	1.4	0.8	2.0	5.1	2.2	2.1	0.5	4.8
124*	永同郡深川面	忠清北道	M (1)	22.0	8.5	0.5	1.0	1.3	0.8	1.8	5.3	2.2	2.6	0.5	5.0
			F (1)	21.9	8.3	0.5	1.1	1.3	0.8	1.7	5.0	2.2	2.2	0.5	4.6
125	南一面錦山郡	忠清南道	M (1)	20.2	8.1	0.4	1.2	1.5	0.7	1.7	5.0	2.0	2.7	0.5	4.6
			F (1)	20.0	7.4	0.5	1.0	1.3	0.7	1.7	4.8	2.0	2.2	0.5	4.0
126	完州郡慶州市-1	全羅北道	F (2)	20.1	7.1	0.4	1.1	1.2	0.7	1.7	4.6	1.9	1.9	0.4	3.9
				19.4	7.0	0.4	1.0	1.2	0.6	1.5	4.3	2.0	2.1	0.4	3.8
129	陝川郡伽倻面	慶尚南道	M (1)	17.9	6.9	0.4	0.9	1.2	0.7	1.4	4.0	1.8	2.2	0.4	3.9
132	咸安郡漆西面	慶尚南道	M (1)	20.4	7.4	0.5	1.1	1.3	0.8	1.7	5.1	2.1	2.6	0.5	5.1
133	長城郡森西面	全羅南道	M (3)	18.1	6.4	0.4	0.9	1.2	0.6	1.4	4.2	1.6	2.3	0.5	4.2
				18.3	6.6	0.4	0.9	1.2	0.6	1.5	4.5	1.9	2.3	0.4	4.0
				19.9	7.4	0.4	1.1	1.3	0.7	1.6	4.9	2.0	2.5	0.4	4.8
			F (1)	21.6	8.2	0.4	1.1	1.4	0.7	1.9	5.4	2.2	2.3	0.4	4.5

オオコオイムシ *Appasus major*

日本

2	天塩郡幌延町-2	北海道	M (1)	22.3	8.5	0.6	0.9	1.1	0.6	2.0	5.2	2.6	3.2	0.6	4.8
			F (1)	24.2	9.7	0.6	1.0	1.3	0.6	2.2	5.6	3.1	3.2	0.6	4.7
3	留萌市	北海道	F (1)	25.9	10.0	0.6	0.8	1.2	0.7	2.1	5.9	2.9	2.9	0.8	5.4
4*	雨竜郡妹背牛町	北海道	M (1)	23.9	9.2	0.5	0.9	1.1	0.7	2.0	5.5	2.8	3.1	0.6	5.3
7*	中川郡幕別町	北海道	M (2)	25.5	9.7	0.6	0.9	1.2	0.7	2.0	5.9	2.9	3.3	0.7	5.8
				24.6	8.7	0.5	0.8	1.0	0.6	1.9	5.4	2.5	2.9	0.7	5.2
9	虻田郡ニセコ町	北海道	F (2)	23.2	9.0	0.5	1.0	1.1	0.6	2.0	5.3	2.8	2.8	0.7	4.8
				24.9	9.9	0.6	1.0	1.2	0.6	2.1	5.4	2.7	2.7	0.8	5.0
12	勇払郡厚真町	北海道	M (2)	23.7	9.0	0.7	1.1	1.3	0.7	2.1	5.5	2.5	3.2	0.7	5.2
				22.9	8.7	0.6	1.0	1.1	0.6	2.0	5.1	2.5	3.0	0.7	5.3
14	津軽町-1	青森	M (1)	24.4	9.2	0.6	0.9	1.2	0.7	2.1	5.1	3.0	3.5	0.7	5.1
			F (2)	25.5	10.0	0.7	1.1	1.5	0.7	2.3	5.9	2.9	2.9	0.6	5.1
				24.9	9.3	0.5	1.0	1.4	0.7	2.2	5.6	3.0	2.9	0.7	5.0
15*	津軽町-2	青森	F (1)	25.0	9.3	0.5	1.0	1.2	0.6	2.1	5.3	2.7	2.9	0.6	5.1
17	三戸郡田子町	青森	M (2)	21.3	7.7	0.4	0.9	1.0	0.7	1.8	5.0	2.3	3.0	0.5	5.3
				22.5	8.1	0.4	1.0	1.0	0.8	1.9	5.3	2.4	3.2	0.6	5.3
18	大館市	秋田	F (2)	23.2	7.8	0.5	1.0	1.1	0.6	2.0	5.0	2.3	2.7	0.5	5.3
				24.8	9.0	0.6	1.2	1.2	0.7	2.2	5.9	2.8	2.8	0.6	5.1
19	北秋田市	秋田	F (1)	24.9	9.1	0.5	1.0	1.3	0.6	2.0	5.5	3.1	3.0	0.8	5.5
20	秋田市	秋田	M (4)	24.8	9.7	0.6	1.0	1.2	0.7	2.2	5.7	2.9	3.4	0.7	5.5
				21.8	8.9	0.6	1.0	1.0	0.5	2.1	5.0	2.7	3.1	0.6	4.8
				20.6	8.1	0.5	1.0	1.1	0.6	1.9	4.9	2.3	2.6	0.6	4.7
				23.0	9.7	0.7	1.0	1.1	0.8	2.3	5.7	3.0	3.2	0.6	5.1
22	由利本荘市	秋田	M (1)	24.5	8.9	0.6	1.0	1.3	0.5	1.9	5.4	2.8	3.2	0.7	5.5
			F (3)	24.2	8.5	0.5	1.1	1.2	0.6	2.1	5.5	2.8	2.8	0.7	4.9
				24.3	8.8	0.4	1.0	1.2	0.5	2.0	5.3	2.8	2.7	0.8	5.0
				25.3	9.0	0.5	1.0	1.3	0.6	2.2	5.8	2.6	2.9	0.7	5.6
24	花巻市	岩手	M (1)	24.8	9.0	0.5	1.0	1.3	0.7	2.2	5.5	2.5	3.2	0.7	5.8
			F (1)	23.8	8.5	0.5	0.9	1.3	0.7	1.9	5.2	2.5	2.6	0.6	5.0
25	北上市	岩手	F (2)	21.7	8.2	0.5	1.1	1.1	0.6	1.9	4.9	2.5	2.6	0.5	4.5
				23.1	9.0	0.6	1.0	1.2	0.7	2.0	5.1	2.9	2.8	0.6	4.8
26	一関市	岩手	F (2)	21.7	8.7	0.6	0.9	1.1	0.7	1.9	4.9	2.5	2.6	0.5	4.7
				22.7	8.4	0.4	1.3	1.7	0.8	1.8	5.5	2.3	2.5	0.5	4.8
27	酒田市	山形	F (1)	24.0	9.3	0.6	1.0	1.2	0.7	2.1	5.3	2.8	2.8	0.5	5.0

28	西村山郡西川町-1	山形	F (2)	25.5	9.3	0.5	1.1	1.3	0.7	2.0	5.6	2.8	2.8	0.7	5.2
				25.0	9.1	0.5	1.1	1.3	0.6	2.1	5.8	2.9	2.9	0.8	5.0
29	西村山郡西川町-2	山形	F (2)	25.1	9.1	0.5	1.1	1.2	0.6	2.2	5.4	2.7	2.7	0.7	5.5
				25.8	9.5	0.5	1.2	1.4	0.6	2.2	5.8	3.0	3.0	0.8	5.4
30	東置賜郡高島町	山形	M (2)	24.1	9.5	0.5	1.1	1.2	0.7	2.1	5.4	2.8	3.1	0.7	5.3
				24.6	9.7	0.6	1.1	1.2	0.8	2.1	5.5	2.9	3.1	0.6	5.5
31	米沢市	山形	F (3)	25.3	9.2	0.5	0.9	1.3	0.6	2.2	5.3	2.8	2.9	0.6	5.2
				24.1	7.8	0.4	1.1	1.2	0.7	2.1	5.6	2.8	2.9	0.6	5.3
				24.9	8.9	0.5	1.2	1.3	0.6	2.1	5.7	2.7	2.7	0.6	5.2
33	栗原市-2	宮城	M (1)	24.1	7.5	0.6	1.0	1.2	0.6	1.9	5.2	2.6	2.9	0.7	5.5
35	仙台市	宮城	M (2)	23.8	8.8	0.5	1.1	1.2	0.7	1.9	5.0	2.6	3.2	0.6	4.6
				24.4	9.1	0.5	1.1	1.3	0.6	2.0	5.4	2.7	3.2	0.6	4.9
				24.0	8.8	0.6	1.1	1.3	0.6	2.1	5.3	2.6	2.8	0.7	5.1
				24.1	8.7	0.6	1.0	1.3	0.6	2.1	5.3	2.4	2.5	0.6	5.2
36	胎内市	新潟	F (3)	24.1	9.1	0.6	1.0	1.2	0.5	2.2	5.4	2.8	2.9	0.6	5.1
				22.0	8.2	0.5	1.0	1.1	0.6	2.0	5.0	2.5	2.5	0.5	4.5
				23.9	9.1	0.6	1.1	1.2	0.6	2.1	5.2	2.8	2.8	0.6	5.0
38	妙高市	新潟	M (1)	21.8	7.8	0.5	1.1	1.2	0.7	1.9	5.3	2.2	3.3	0.6	5.3
39	佐渡市-1	新潟	M (1)	24.9	9.7	0.6	1.2	1.3	0.9	2.1	5.7	2.6	3.2	0.7	5.1
				24.9	9.6	0.6	1.3	1.4	0.9	2.2	5.6	2.8	2.9	0.6	4.7
41	耶麻郡北塩原村	福島	F (2)	23.1	8.9	0.6	1.0	1.1	0.8	2.1	5.2	2.5	2.7	0.5	4.6
				23.5	8.9	0.5	1.0	1.2	0.7	2.0	5.1	2.6	2.6	0.6	4.6
42*	福島市	福島	M (5)	24.9	9.3	0.5	1.2	1.2	0.7	2.1	5.5	2.8	3.2	0.8	5.6
				25.6	9.4	0.6	1.2	1.4	0.7	2.2	5.8	2.9	3.2	0.7	5.6
				25.7	9.1	0.5	1.0	1.2	0.7	2.1	5.4	2.8	3.4	0.7	5.6
				25.1	9.2	0.5	1.1	1.3	0.8	2.2	5.4	2.8	3.2	0.8	5.6
				26.9	8.5	0.6	1.0	1.3	0.8	2.0	5.4	2.8	3.2	0.5	5.8
				25.0	9.0	0.6	1.3	1.5	0.7	2.1	5.4	2.8	2.8	0.6	5.7
				23.6	8.4	0.5	1.0	1.3	0.6	2.1	5.5	2.5	2.6	0.6	5.3
				22.6	8.5	0.5	0.9	1.2	0.6	1.9	5.0	2.5	2.5	0.5	4.7
				22.8	8.5	0.5	0.9	1.3	0.6	1.9	5.0	2.5	2.5	0.6	4.5
				24.9	9.0	0.5	1.0	1.3	0.6	2.1	5.5	2.6	2.7	0.6	5.5
44*	双葉郡浪江町	福島	F (2)	24.4	9.2	0.6	1.1	1.3	0.6	2.1	5.6	2.7	2.7	0.7	5.1
				23.9	8.3	0.6	0.9	1.2	0.7	2.0	5.4	2.4	3.2	0.8	6.0
45	郡山市	福島	M (2)	24.8	8.9	0.5	1.3	1.3	0.6	2.1	5.6	2.9	3.4	0.7	5.5
				24.0	8.7	0.5	1.0	1.2	0.6	1.9	5.5	2.6	2.6	0.5	5.2
46	須賀川市	福島	M (2)	22.8	8.3	0.5	1.0	1.2	0.7	2.0	5.1	2.4	3.0	0.6	5.8
				25.0	8.9	0.5	1.1	1.2	0.9	2.2	5.3	2.8	3.5	0.6	5.9
				22.0	8.1	0.5	0.9	1.3	0.6	1.8	4.8	2.4	2.6	0.5	4.5
				24.7	8.8	0.5	1.0	1.4	0.7	2.1	5.6	2.9	2.9	0.7	5.2
47	大沼郡昭和村	福島	F (2)	23.9	9.1	0.7	1.2	1.3	0.6	2.1	5.5	2.9	2.9	0.6	5.0
				22.1	8.1	0.5	1.0	1.1	0.5	1.9	5.0	2.4	2.5	0.5	4.7
48*	西郷町	福島	F (1)	23.8	8.9	0.5	1.1	1.3	0.8	2.1	5.3	2.8	2.9	0.7	5.0
50	飯山市-1		M (1)	24.9	9.0	0.6	1.2	1.3	0.6	2.1	5.4	3.0	3.5	0.6	5.3
				21.2	7.9	0.5	0.9	1.2	0.8	1.9	5.0	2.4	2.2	0.5	4.7
				24.8	8.9	0.6	0.9	1.3	0.7	2.2	5.6	2.5	2.8	0.6	5.4
				24.9	8.8	0.5	1.0	1.2	0.7	2.0	5.4	2.9	2.9	0.7	5.4
52	上水内郡信濃町	長野	M (1)	24.0	8.9	0.6	1.2	1.3	0.6	2.0	5.2	3.0	3.5	0.6	5.2
53	北安曇郡白馬村	長野	F (2)	24.0	8.7	0.6	1.0	1.3	0.6	2.1	5.3	2.7	2.9	0.6	5.5
				24.2	8.6	0.4	0.9	1.3	0.7	2.2	5.3	2.6	2.8	0.6	5.2
65	東茨城郡城里町	茨城	M (8)	21.2	7.4	0.4	1.0	1.1	0.8	1.8	4.7	2.2	2.9	0.5	5.2
				21.5	7.8	0.4	0.9	1.2	0.6	1.9	4.9	2.3	2.9	0.5	5.0
				21.6	7.5	0.4	1.0	1.2	0.6	1.8	4.7	2.3	2.8	0.5	5.0
				23.9	7.5	0.6	1.2	1.3	0.6	2.1	5.6	2.6	3.2	0.5	5.2
				23.8	7.6	0.5	1.0	1.3	0.6	2.1	5.5	2.5	3.1	0.4	5.2
				24.1	8.2	0.4	1.2	1.3	0.6	2.1	5.3	2.6	2.9	0.4	5.2
				22.3	8.1	0.6	1.2	1.3	0.7	2.0	5.5	2.4	3.1	0.6	4.8
				23.0	8.2	0.5	0.9	1.2	0.6	1.9	5.2	2.8	3.1	0.7	5.4
				23.5	8.3	0.5	1.0	1.3	0.6	2.0	5.2	2.2	2.5	0.5	5.0
				23.9	8.5	0.5	1.0	1.3	0.7	2.1	5.4	2.2	2.3	0.4	4.8
				23.0	8.5	0.5	1.1	1.2	0.6	1.9	5.3	2.4	2.5	0.5	5.0
				22.8	8.2	0.5	1.0	1.3	0.7	2.0	5.2	2.4	2.5	0.5	4.9
				23.3	8.7	0.5	1.0	1.3	0.7	2.1	5.5	2.6	2.6	0.5	5.0
				23.4	8.2	0.4	0.9	1.3	0.6	1.9	5.0	2.5	2.6	0.5	5.0
				23.9	9.1	0.6	1.1	1.2	0.9	2.1	5.5	2.5	2.6	0.5	4.8
24.0	7.7	0.5	1.0	1.2	0.7	2.1	5.4	2.4	2.7	0.5	5.0				
23.1	8.6	0.5	1.2	1.3	0.7	2.0	5.1	2.4	2.7	0.6	4.8				
66	鹿嶋市	茨城	F (1)	18.5	7.4	0.5	1.0	1.1	0.6	1.9	4.5	2.2	2.3	0.5	4.7

70	秦野市	神奈川	F (3)	23.1	9.1	0.7	1.0	1.4	0.7	2.0	5.0	2.5	2.8	0.5	5.0	
				24.0	9.2	0.6	1.1	1.2	0.7	2.1	5.0	2.7	2.9	0.5	5.1	
				21.5	8.1	0.6	1.0	1.0	0.6	1.9	4.7	2.5	2.4	0.5	4.9	
74	新城市	愛知	M (1)	21.1	8.1	0.5	1.1	1.2	0.7	1.9	5.0	2.4	3.0	0.5	4.3	
76*	夷隅郡大多喜市	千葉	M (1)	21.9	8.1	0.4	1.2	1.2	0.6	1.8	4.9	2.5	3.2	0.5	5.2	
				F (2)	22.8	8.7	0.6	1.0	1.1	0.7	2.0	4.7	2.3	2.8	0.5	4.8
				23.0	8.8	0.6	1.0	1.1	0.7	2.0	4.9	2.6	2.6	0.5	4.7	
77	富津市	千葉	M (2)	22.1	8.2	0.5	0.9	1.1	0.6	1.9	4.7	2.2	3.0	0.5	5.1	
				19.7	8.3	0.6	0.9	1.0	0.6	1.9	4.8	2.5	2.9	0.5	4.9	
				F (1)	21.0	8.1	0.6	1.0	1.1	0.7	2.0	5.0	2.8	2.9	0.6	5.0
80	伊賀市-1	三重	M (2)	25.9	10.0	0.7	1.0	1.4	0.9	2.2	6.0	2.7	3.4	0.6	5.9	
				25.9	10.2	0.7	1.1	1.4	1.0	2.2	5.8	2.6	3.4	0.5	6.0	
81	伊賀市-2	三重	M (2)	25.5	10.0	0.8	1.3	1.4	0.9	2.2	5.9	2.6	3.3	0.6	5.9	
				22.9	9.1	0.6	1.0	1.2	0.7	2.1	5.5	2.4	3.1	0.5	5.0	
				F (1)	24.0	9.6	0.7	1.2	1.4	0.8	2.1	5.3	2.6	2.7	0.5	5.1
82	奈良市	奈良	F (1)	25.9	10.0	0.7	1.3	1.6	0.8	2.2	6.0	2.6	2.6	0.5	5.2	
87	豊岡市	兵庫	M (2)	25.9	10.3	0.7	1.0	1.3	0.9	2.2	6.0	2.7	3.3	0.7	6.4	
				24.1	9.8	0.6	1.0	1.3	0.8	2.1	5.7	2.7	3.3	0.6	5.8	
				F (1)	26.8	10.5	0.6	1.1	1.5	0.9	2.2	6.2	2.9	2.8	0.5	5.8
90	佐用郡佐用町-2	兵庫	F (1)	24.0	9.5	0.6	1.1	1.5	0.7	2.1	5.8	2.5	2.7	0.6	4.8	
92	三好市	徳島	F (1)	25.1	9.8	0.6	1.0	1.0	0.9	2.1	5.7	2.7	2.8	0.6	5.2	
98	出雲市	鳥根	F (3)	24.9	9.7	0.6	1.1	1.4	0.8	2.0	5.7	2.6	2.8	0.5	5.3	
				25.7	9.8	0.6	1.0	1.4	0.8	2.3	6.0	2.7	2.7	0.6	5.8	
				26.1	10.0	0.7	1.0	1.5	0.8	2.2	6.0	2.7	2.8	0.6	5.4	
99	世良郡世良町	広島	M (2)	26.8	9.6	0.6	1.2	1.4	0.8	2.1	5.5	2.7	3.3	0.6	6.0	
				24.3	8.8	0.6	1.2	1.5	0.7	2.1	5.6	2.5	3.2	0.7	5.7	
				M (1)	24.1	9.6	0.6	1.0	1.3	0.7	2.0	5.5	2.6	2.9	0.6	5.5
101*	東広島市	広島	M (1)	24.1	9.6	0.6	1.0	1.3	0.7	2.0	5.5	2.6	2.9	0.6	5.5	
105	玖珠郡玖珠町	大分	M (2)	22.0	9.0	0.6	1.2	1.3	0.8	2.0	5.3	2.5	3.0	0.6	5.1	
				22.5	8.4	0.6	1.3	1.3	0.9	2.0	5.1	2.3	2.9	0.5	4.5	
				F (3)	22.9	9.1	0.5	1.3	1.4	0.7	2.1	5.1	2.6	2.6	0.5	4.4
				22.0	8.2	0.5	1.1	1.2	0.8	2.0	4.8	2.5	2.5	0.5	4.5	
				22.8	8.9	0.6	1.3	1.3	0.7	2.0	5.0	2.4	2.4	0.6	4.0	
韓国																
110*	華川郡史内面	江原道	F (1)	27.8	11.2	0.7	0.9	1.4	0.8	2.3	6.3	2.7	2.7	0.7	5.8	
114*	横城郡公根面	江原道	F (1)	26.9	10.8	0.6	1.0	1.4	0.9	2.2	6.1	2.6	2.7	0.6	5.7	
115	三陟郡近徳面-1	江原道	M (5)	27.1	10.2	0.7	1.3	1.4	0.7	2.2	5.8	2.5	3.3	0.6	5.9	
				28.7	10.4	0.6	1.3	1.5	0.8	2.3	5.9	2.8	3.6	0.6	5.7	
				27.0	10.1	0.7	1.4	1.5	0.9	2.5	6.2	2.9	3.5	0.6	5.6	
				26.7	9.9	0.6	1.1	1.4	0.7	2.3	5.8	2.7	3.1	0.6	5.8	
				25.1	10.0	0.7	1.4	1.5	0.9	2.2	6.0	2.7	3.3	0.5	5.6	
				F (5)	27.9	10.5	0.7	1.1	1.7	0.8	2.3	6.0	2.9	3.0	0.5	5.6
				29.0	11.0	0.7	1.3	1.5	0.8	2.5	6.0	2.9	2.8	0.6	5.6	
				28.0	10.7	0.7	1.3	1.5	0.8	2.4	6.0	3.0	3.1	0.6	5.9	
				28.1	10.7	0.8	1.2	1.4	0.9	2.4	6.1	2.7	3.0	0.5	5.6	
				26.2	10.7	0.6	1.3	1.4	0.8	2.2	6.0	2.8	3.0	0.5	5.5	
124*	永同郡深川面	忠清北道	M (1)	24.8	10.2	0.5	0.9	1.3	0.8	2.1	6.1	2.7	3.1	0.6	5.6	

\*混接地

表I-6. 各形態形質における平均計測値および線形判別分析による一致率

形態形質		コオイムシ 平均値 (mm)	オオコオイムシ 平均値 (mm)	一致率 (%)
I) 体サイズ	体長	20.8	23.9	88.7
	前胸幅	7.6	8.9	
II) 前腕腿節形態	前腕腿節幅	1.7	2.0	93.2
	前腕腿節長	5.0	5.4	
III) 口吻形態	口吻第2節長	1.2	1.0	75.7
	口吻第3節長	1.4	1.3	
IV) 口吻形態	口吻第2節幅	0.4	0.5	86.4
	口吻第2節長	1.2	1.0	
V) 腹部第7節腹板形態	腹部第7節腹板幅	2.1	2.6	93.5
	腹部第7節腹板長	2.4	2.9	
VI) 呼吸管形態	呼吸管幅	0.5	0.6	82.2
	呼吸管長	4.6	5.2	

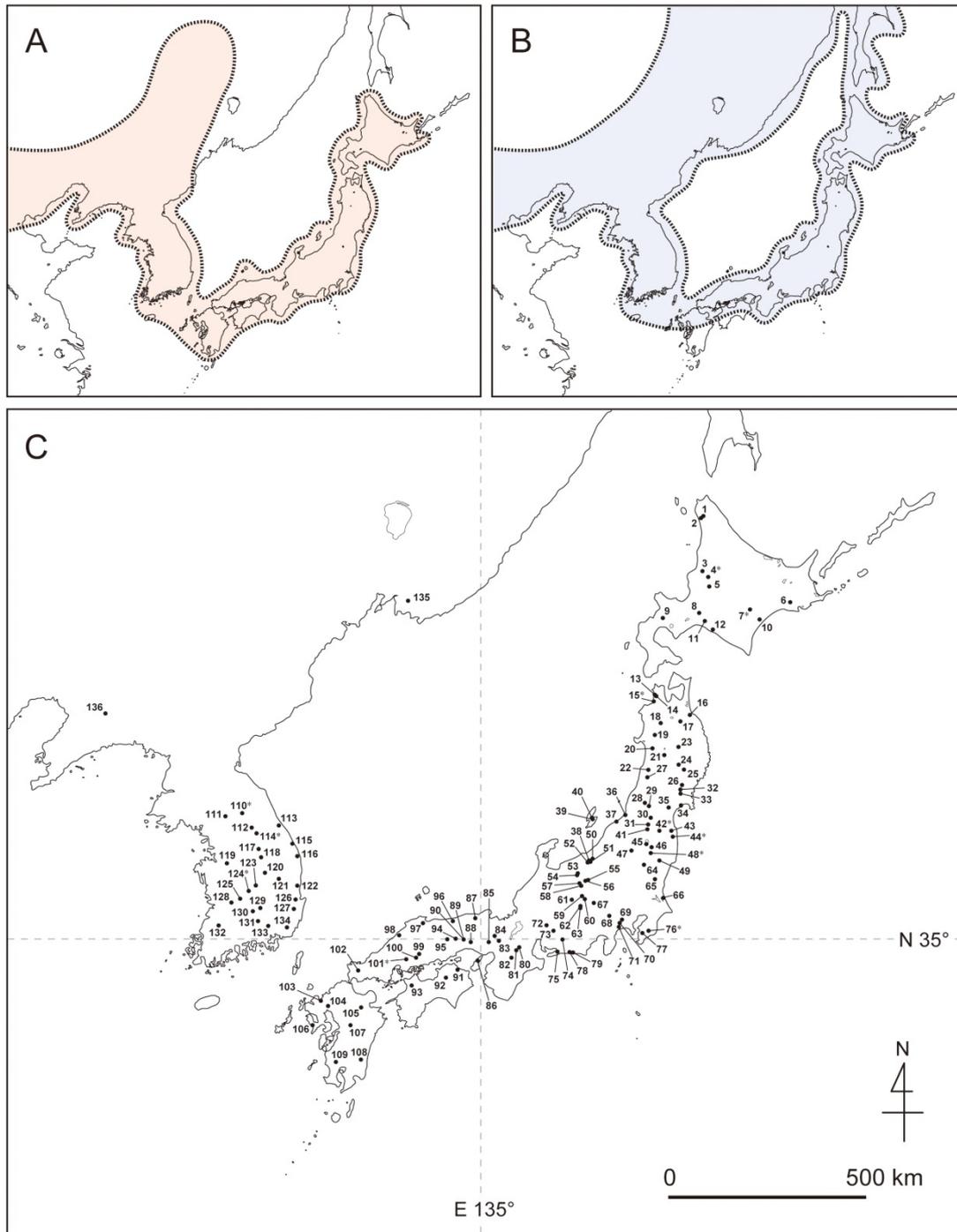
表I-7. 全12形態形質の因子負荷量および第一、第二主成分の寄与率

	第一主成分	第二主成分
体長	-0.363	0.086
最大前胸幅	-0.363	0.047
口吻第2節幅	-0.310	-0.026
口吻第2節長	0.048	0.616
口吻第3節長	0.013	0.656
口吻第4節長	-0.181	0.274
前脚腿節長	-0.354	-0.041
前脚腿節幅	-0.328	0.240
腹部第7腹板幅	-0.345	-0.120
腹部第7腹板長	-0.295	-0.131
呼吸管幅	-0.242	-0.107
呼吸管長	-0.328	-0.030
寄与率	99.970	0.031
解釈	体サイズの小ささ	口吻の長さ

表1-8. 各地域間での体サイズ比較

	コオイムシ <i>A. japonicus</i>					オオコオイムシ <i>A. major</i>				
	地域	北海道	本州 + 四国 + 九州	韓国東部	韓国南西部	北海道	本州 + 四国	九州	韓国	
	体長の平均値 (S.D.) (mm)	22.82 (1.46)	20.76 (1.21)	21.52 (1.10)	19.24 (1.17)	23.96 (1.16)	23.83 (1.50)	22.44 (0.38)	27.02 (1.22)	
コオイムシ	北海道 (N=13)	-	<0.01	n.s.	<0.01	n.s.	n.s.	n.s.	<0.01	
<i>A. japonicus</i>	本州 + 四国 + 九州 (N=181)	2.15	-	0.04	n.s.	<0.01	<0.01	0.04	<0.01	
	韓国東部 (N=27)	1.30	0.85	-	<0.01	<0.01	0.01	n.s.	<0.01	
	韓国南西部 (N=18)	2.95	0.80	1.65	-	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	
オオコオイムシ	北海道 (N=12)	1.15	3.30	2.45	4.10	-	n.s.	n.s.	<0.01	
<i>A. major</i>	本州 + 四国 (N=119)	1.10	3.25	2.40	4.05	0.05	-	n.s.	<0.01	
	九州 (N=5)	0.50	1.35	0.80	2.45	1.65	1.60	-	0.04	
	韓国 (N=13)	4.12	6.27	5.42	7.07	2.97	3.02	4.62	-	

表下部は体長の中央値の差、表上部はMann-Whitney U検定で得られたp値を示す。



図I-1. コオイムシ *Appasus japonicus* (A) およびオオコオイムシ *Appasus major* (B) の分布域および本研究で用いたサンプルの産地情報 (C) 地点番号は表 I-1, 2 と対応する.

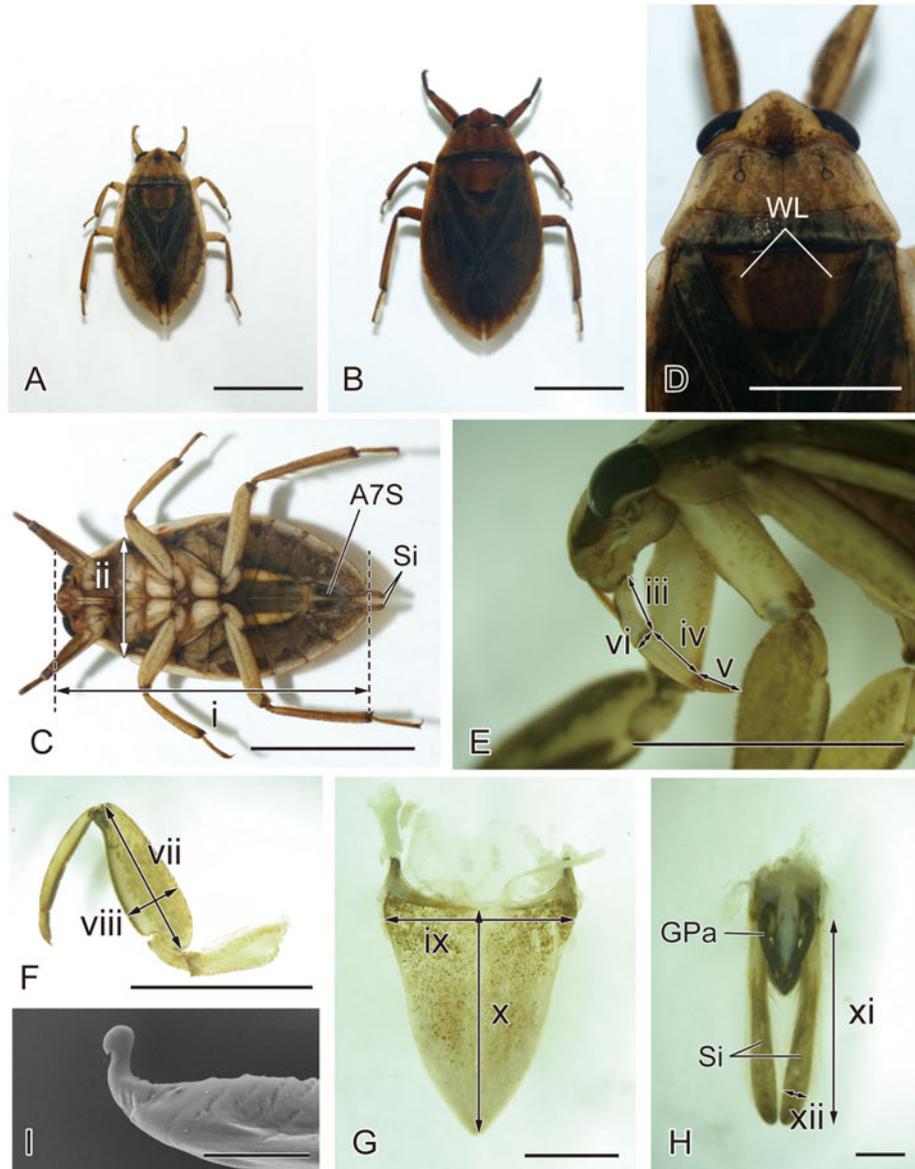


図1-2. コオイムシおよびオオコオイムシの種識別に有用視されてきた形態形質

A: 典型的な特徴を示すコオイムシ (B と同じスケール), B: 典型的な特徴を示すオオコオイムシ (A と同じスケール), C-I コオイムシ・オオコオイムシの種識別に有用視されている形態形質 (写真は長野県産コオイムシ♂個体を例示), C:成虫腹面, D: 前胸背板拡大図, E: 頭部拡大図, F: 前脚形態, G: 腹部第7節腹板, H: 呼吸管および生殖器. i-xii は 形態形質として測定を行った i: 体長, ii: 最大前胸幅, iii: 口吻第2節長, iv: 口吻第3節長, v: 口吻第4節長, vi: 口吻第2節幅, vii: 前脚腿節長, viii: 前脚腿節幅, ix: 腹部第7節腹板長, x: 腹部第7節腹板幅, xi: 呼吸管長, xii: 呼吸管幅. A7S: 腹部第7節腹板, GPa: 交尾器側葉片, Si: 呼吸管, WL: 前胸背板から小楯板にかけてみられる白帯. Bars: A-C=10mm, D-F=5mm, G,H=1mm, I=100µm.

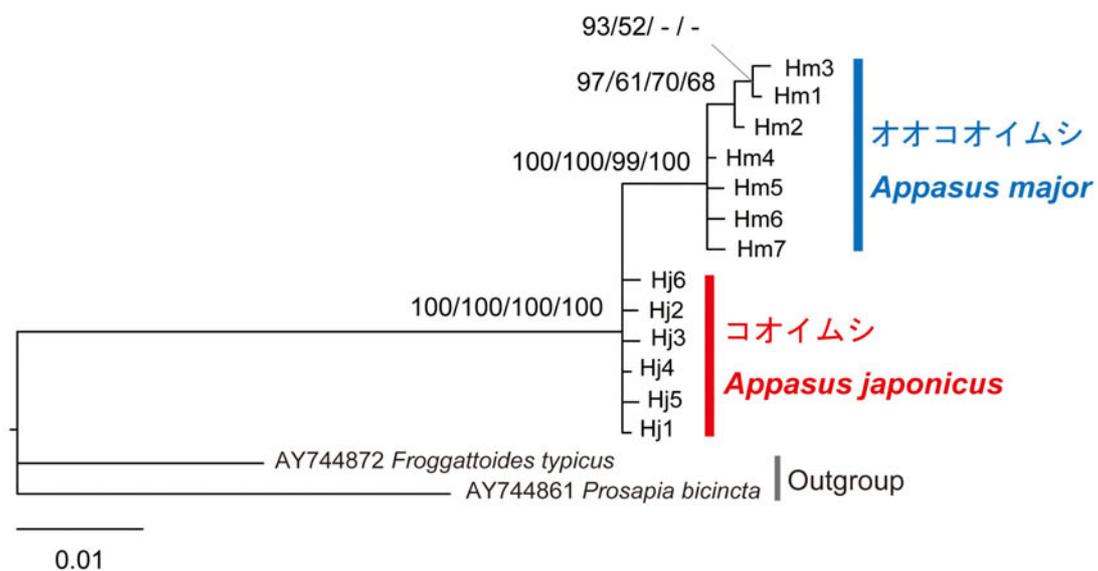


図 I-3. コオイムシ・オオコオイムシにおける核遺伝子 Histone H3 領域 (328 bp) の塩基配列に基づくベイズ樹  
 各ノードの数値はベイズの事後確率, ML 法, MP 法および NJ 法におけるブートストラップ確率を示す.

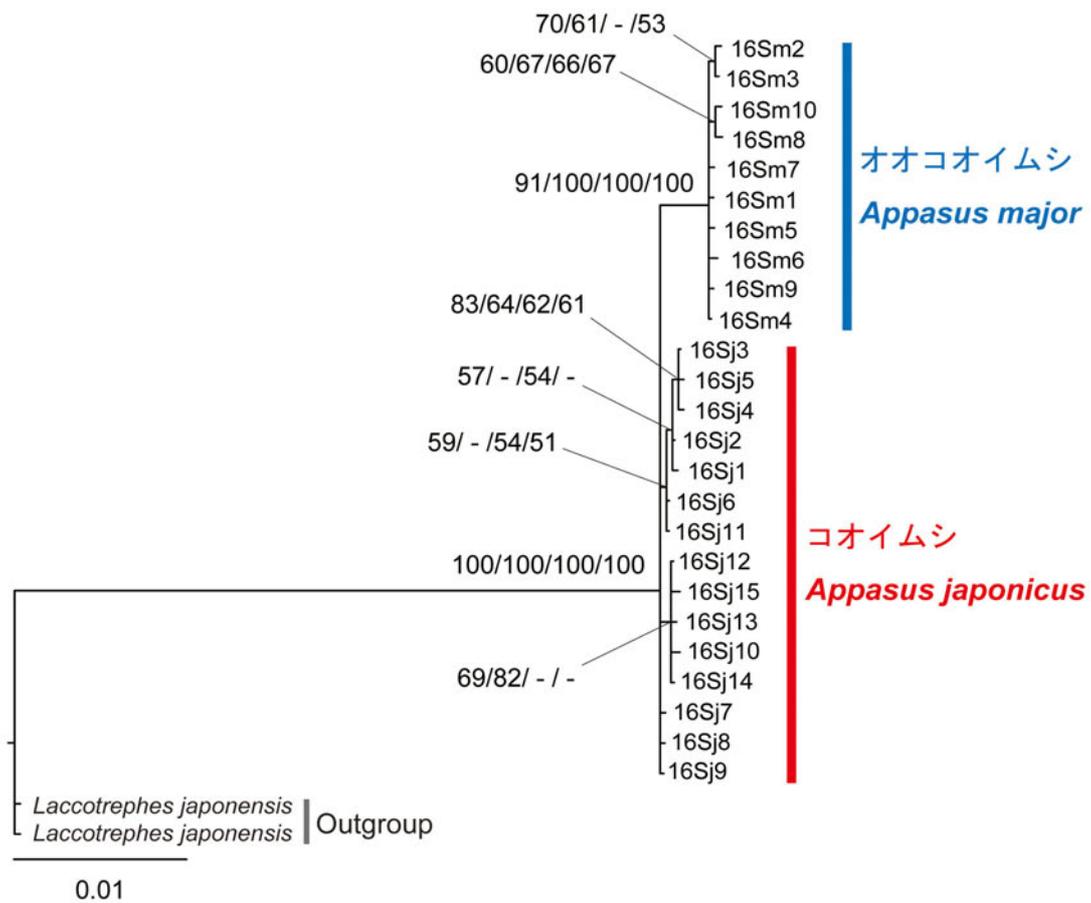


図1-4. コオイムシ・オオコオイムシにおけるミトコンドリア遺伝子 16S rRNA 領域 (435 bp) の塩基配列に基づくベイズ樹  
各ノードの数値はベイズの事後確率, ML 法, MP 法および NJ 法におけるブートストラップ確率を示す.

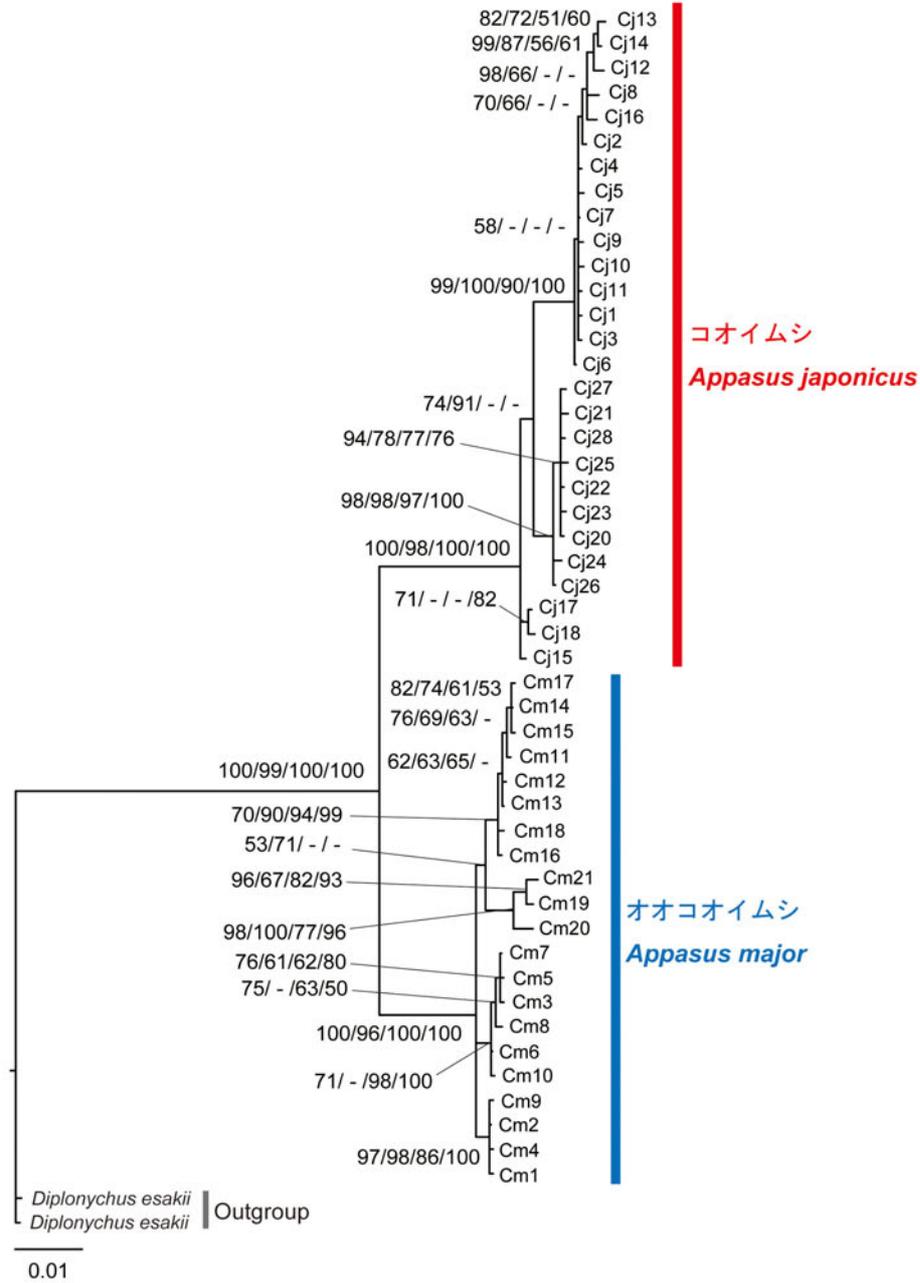


図 I-5. コオイムシ・オオコオイムシにおけるミトコンドリア遺伝子 COI 領域 (658 bp) の塩基配列に基づくベイズ樹  
 各ノードの数値はベイズの事後確率, ML 法, MP 法および NJ 法におけるブートストラップ確率を示す.

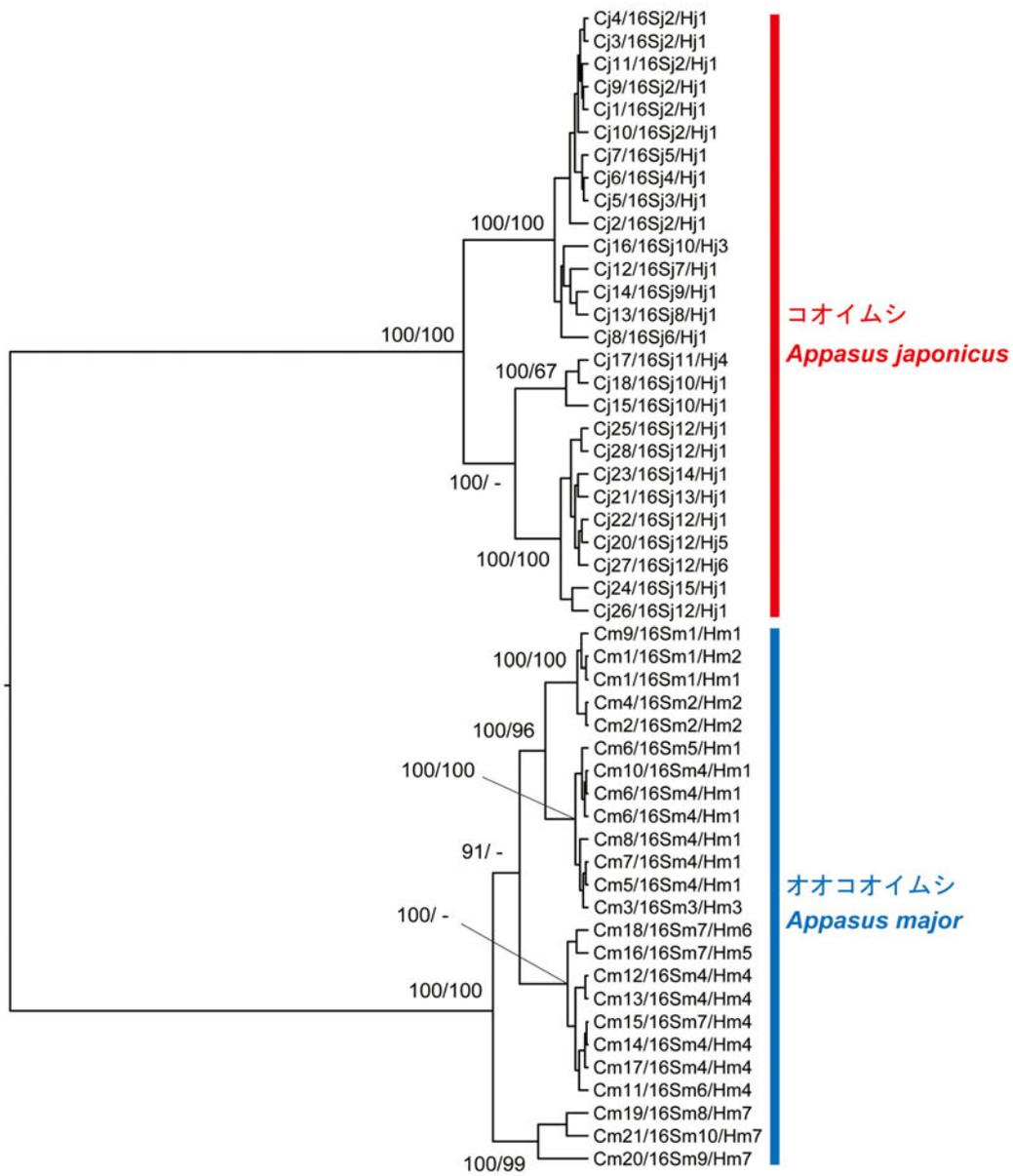


図 I-6. コオイムシ・オオコオイムシにおけるミトコンドリア遺伝子 COI, 16S rRNA 領域および核遺伝子 Histone H3 領域の塩基配列の結合データセット (1,421 bp) に基づくベイズ樹各ノードの数値はベイズの事後確率および ML 法におけるブートストラップ確率を示す。

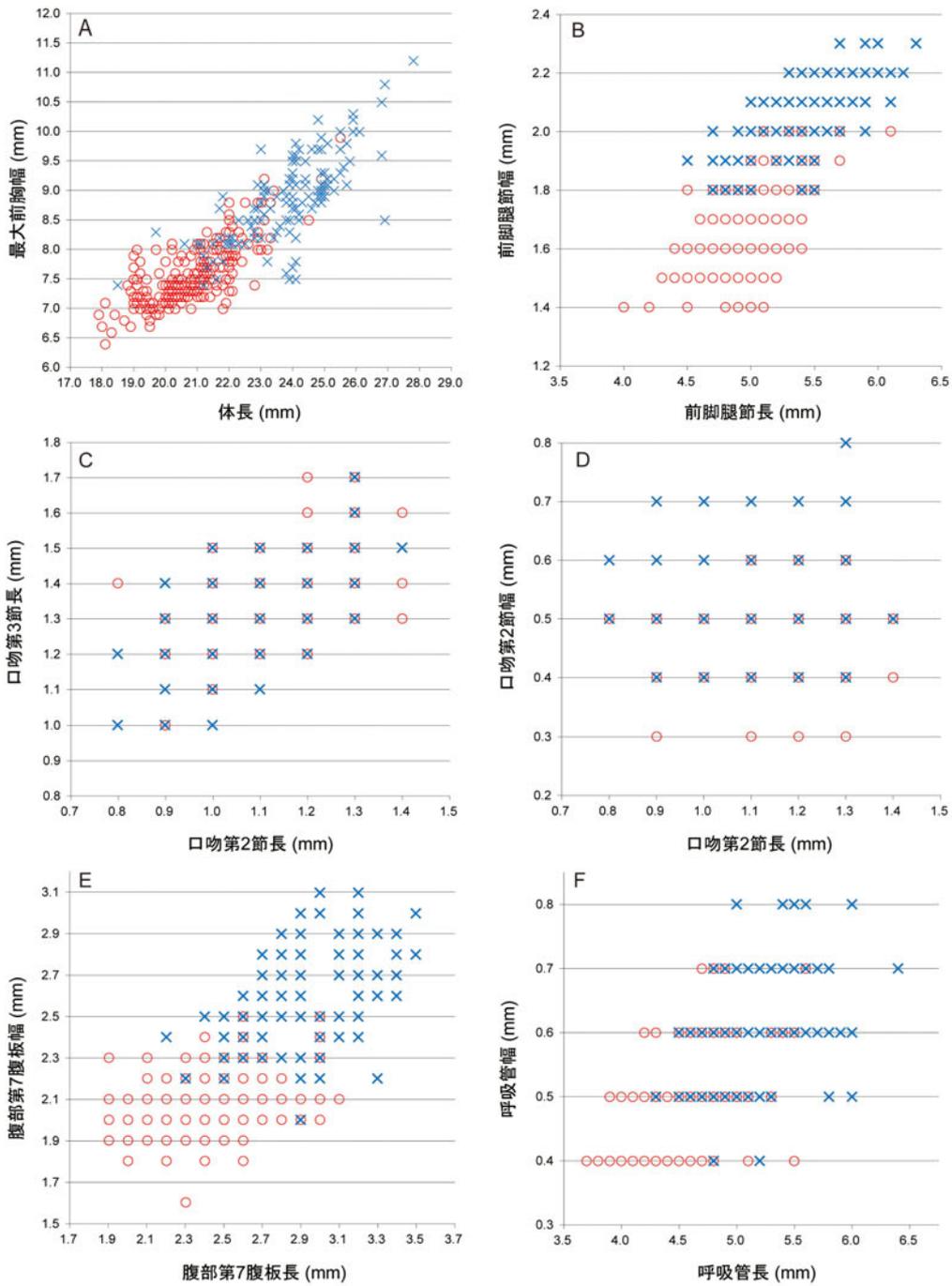


図 1-7. コオイムシおよびオオコオイムシの種識別において有用視されてきた形態形質の比較検討結果

○: コオイムシ, ×: オオコオイムシ.

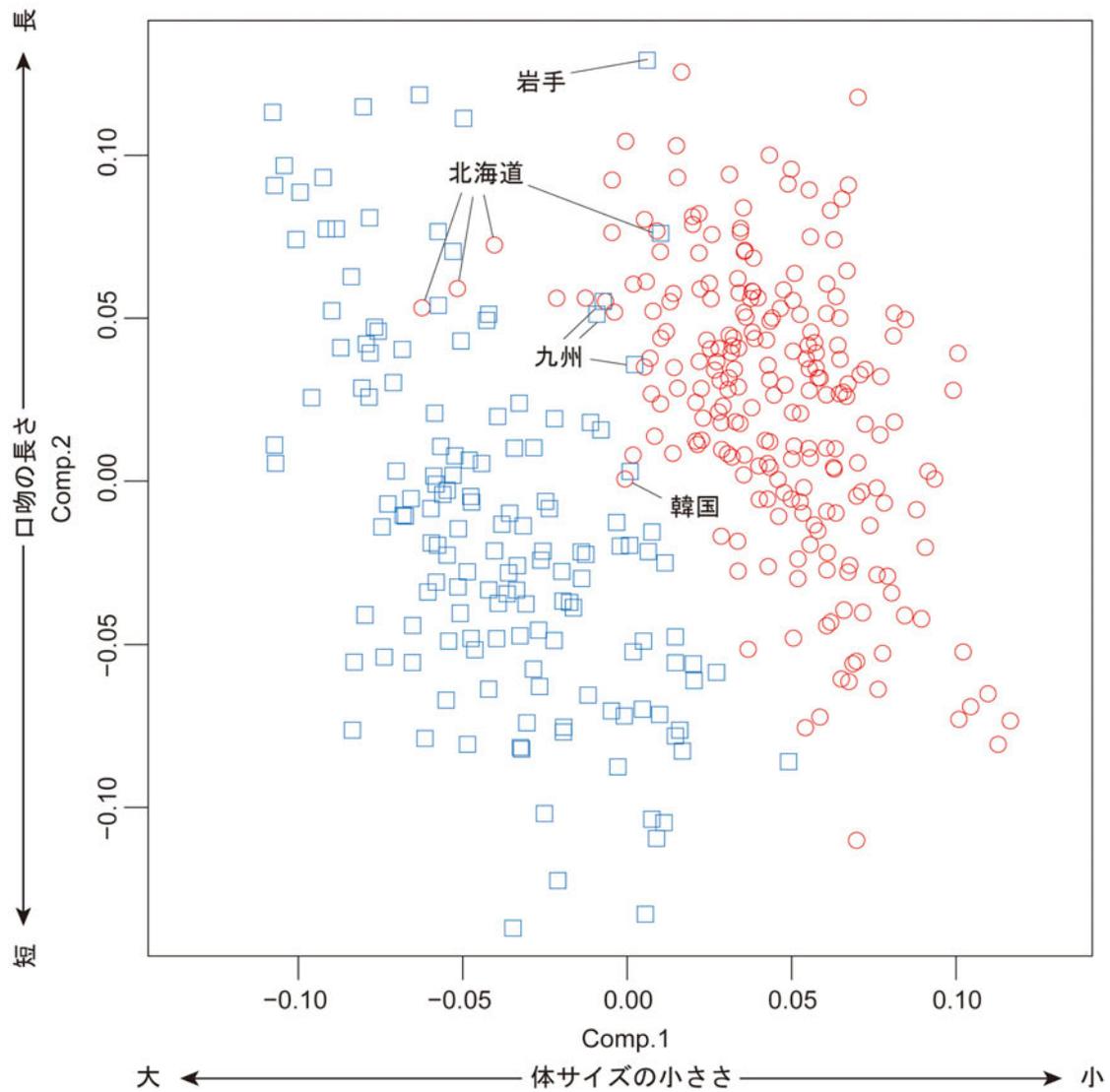


図 I-8. コオイムシおよびオオコオイムシの種識別において有用視されてきた 12 形態形質を基にした主成分分析結果

第一主成分は口吻の長さ、第二主成分が体サイズの小ささを示す。○: コオイムシ, □: オオコオイムシ。

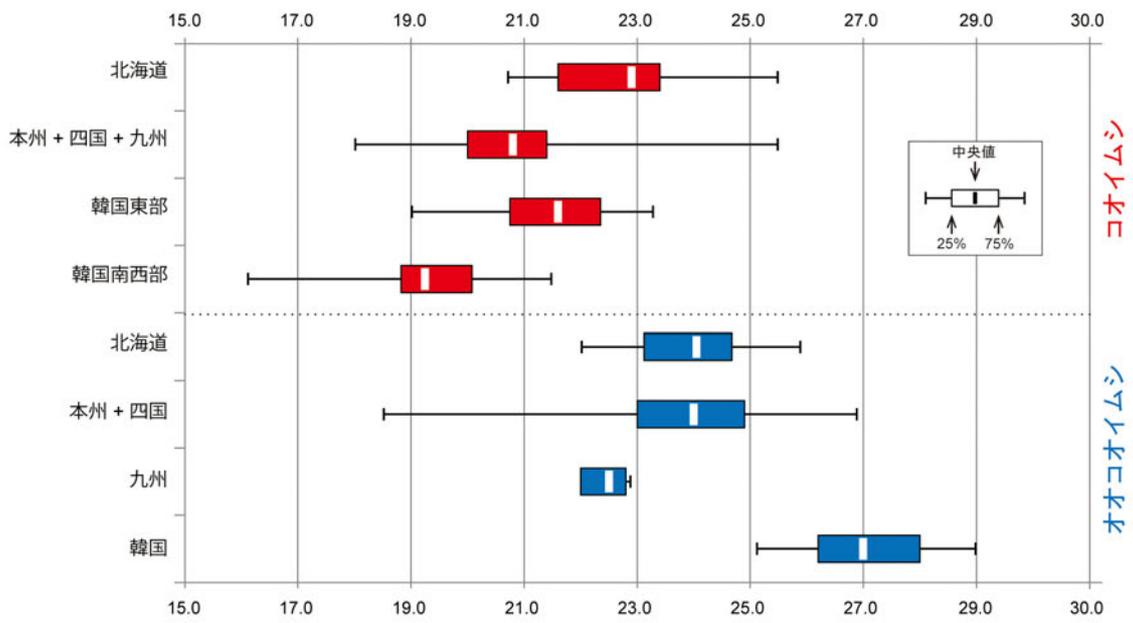


図 I-9. コオイムシおよびオオコオイムシにおける地域個体群間の体サイズ比較結果

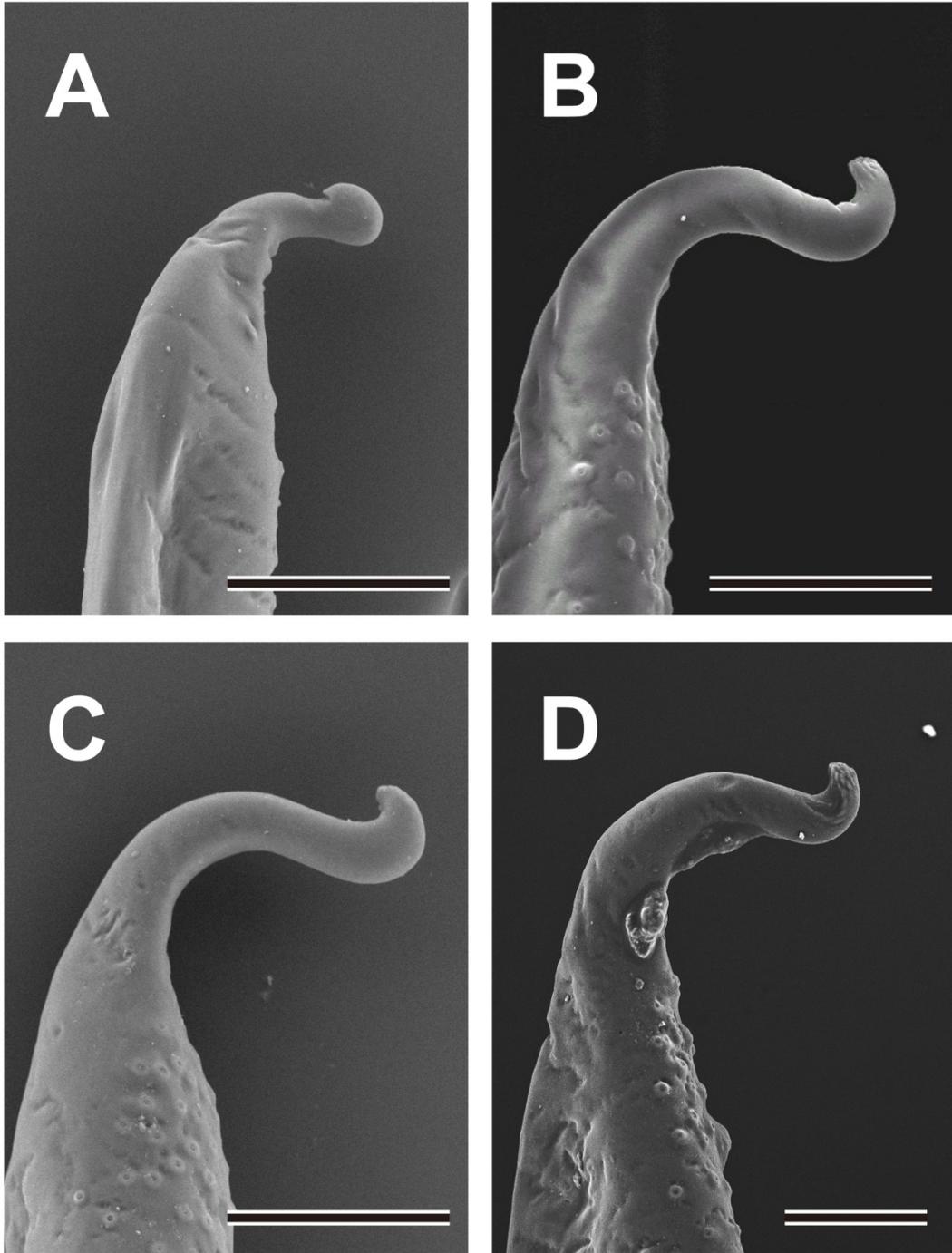


図 I-10. 日本産コオイムシ (A), 日本産オオコオイムシ (B), 韓国産コオイムシ (C), 韓国産オオコオイムシ (D) におけるオス交尾器側葉片の SEM 画像  
Bars=100 $\mu$ m.

## 第II章

### コオイムシおよびオオコオイムシの系統地理

## 第 II 章 コオイムシおよびオオコオイムシの系統・分類

### II-1. 背景

日本列島は南北 3,000 km にも及ぶ長く配置された島嶼群で、気候的には亜熱帯から亜寒帯まで、さらに生物地理的障壁となり得る山地や海峡を数多く有している。また、季節風による影響から、夏季には湿った空気が流れ込むことにより湿潤な気候が形成される。このことから、日本列島に生息する生物は多様性に富んでおり、様々な分類群の生物において生物地理学的研究が注目されてきた (e.g., 哺乳類: Tsuchiya *et al.*, 2000; Matsuhashi *et al.*, 2001; Ohnishi *et al.*, 2009; 両生類: Tominaga *et al.*, 2010; Komaki *et al.*, 2012; 淡水魚類: Takehana *et al.*, 2003; Kitagawa *et al.*, 2005; Miyazaki *et al.*, 2007, 2011; 節足動物類: Kiyoshi & Sota, 2006; Ikeda *et al.*, 2009; Schoville *et al.*, 2012; Kato *et al.*, 2013)。

また、古第三紀まではユーラシア大陸の東縁に位置していた日本列島が、およそ 20 Mya、大陸から分離・離列して孤立した後にも、第四紀の氷期-間氷期サイクル中、氷期における海水面の後退によって朝鮮半島や極東ロシアとの間に陸橋が形成され、ユーラシア大陸と日本列島間における生物の移動分散が可能になった時期が複数回あったことが、地質学的研究および大型哺乳類などの化石記録や遺伝子解析によって傍証されている (e.g., 大嶋, 1990; 木村, 1996; 小西・吉川, 1999; Matsuhashi *et al.*, 2001)。このような背景から、朝鮮半島や極東ロシアと日本列島を絡めた生物地理学的研究は、たいへん興味深いものであると考えられ、これまでも多くの研究が展開されてきた (e.g., Tsuchiya *et al.*, 2000; Matsuhashi *et al.*, 2001; Kitagawa *et al.*, 2005; Miyazaki *et al.*, 2007, 2011; Alonso *et al.*, 2012; Arribas *et al.*, 2012; Jeratthitikul *et al.*, 2013; Sekiné *et al.*, 2013)。

本研究の対象生物であるコオイムシおよびオオコオイムシは、互いに系統的に近い姉妹種であると考えられ、形態や生態的ニッチも酷似している。さらに、分布域についても広くオーバーラップしていることから、種間交雑の可能性も示唆されてきたが (星川, 2001)、両種は遺伝的に大きく分化していること、加えて種間交雑の可能性は低いことが、第 I 章に

おける結果から明らかとなった。両種における現在の棲息環境は、低標高から中標高域における水田や池、流れの緩やかな川などが中心であり、人類が農耕を始める以前は河川のワンドなどが主要な棲息地であったと考えられる。また、このようなコオイムシ類は淡水が無い環境下では棲息が不可能であることから、河川に沿った移動分散が生じる可能性は高い一方で、山脈や海峡など、コオイムシ類の棲息環境が無い地域を越えた移動分散はほとんど生じず、コオイムシ類では山脈や海峡による個体群の分断および遺伝的分化が生じやすいものと予想される。

本研究の材料であるコオイムシとオオコオイムシは同属の姉妹種であるが、これまで日本列島においては、標高傾度や緯度に応じて棲み場の分化をしている近縁種間における遺伝的構造の比較研究などは注目を集めてきた (*e.g.*, Sota & Hayashi, 2007; Ikeda *et al.*, 2009; Ogitani *et al.*, 2011)。しかしながら、分布域が広くオーバーラップする姉妹種の遺伝的構造を比較した研究はいくつか事例があるものの (*e.g.*, Quek *et al.*, 2007; Ueda *et al.*, 2010)、世界的にもたいへん少ない。これらの点において、コオイムシ類では分布域のオーバーラップのみならず、同所的に生息している地点も多く報告されているなど (堀, 2001)、たいへんユニークな特徴を有している。また、直接的な証拠は示唆されてきていないものの、コオイムシとオオコオイムシの種間には、飛翔能力 (*i.e.*, 分散力) に差異があると考えられている (大庭, 私信; 北野, 私信; 谷澤, 私信)。一般的には、コオイムシの方がより移動分散力が高いと考えられており、このような生態的特徴の差違が遺伝的構造にも反映されている可能性が十分に考えられる。これらのことから、コオイムシ属 2 種間における遺伝的構造の比較は、生物地理学のみならず、進化生態学的にもたいへん興味深いと言える。

以上の背景から本章では、第 I 章の研究課題において得られたミトコンドリア遺伝子 COI 領域 (658 bp) および 16S rRNA 領域 (435 bp) の塩基配列情報に、さらなるサンプルを追加し、両種それぞれのより詳細な遺伝的構造を明らかにすると共に、種間の遺伝的構造を比較・検討した。加えて、前述のような種間における分散力の差異などの生態的特徴も考慮

しながら、遺伝的構造を対比・考察した。さらに、分岐年代推定を行い、当該年代における地史的情報を参照しながら両種の進化史について議論した。

## II-2. 材料と方法

### II-2-1. サンプリング

第I章における研究課題で実施したサンプリングと同様に、2005年から2013年にかけて、日本列島広域（北海道・本州・四国・九州）、韓国、中国および極東ロシアより、コオイムシ類を採集した。これらの採集したサンプルを、遺伝子解析に用いるために100% EtOHで固定した。解析に用いたサンプルの産地情報、ハプロタイプ多様度、ヌクレオチド多様度、検出されたハプロタイプ名を表II-1に列記した。また、地点番号は表I-1, I-2, 図I-1における番号と対応させて示している。

### II-2-2. 遺伝子解析

第I章の「I-2-2. 遺伝子解析」に記した手法を用いて、トータルDNAの抽出を行い、ミトコンドリア遺伝子のCOIおよび16S rRNA領域の遺伝子断片を増幅させた。

### II-2-3. 系統樹作成

本章での分子系統解析では、ミトコンドリア遺伝子のCOIおよび16S rRNA領域の塩基配列データを結合させて系統解析することが問題ないかを検定するため、領域間での進化速度の有意差の有無をILD検定 (Incongruence length difference test; Farris *et al.*, 1995) により検定し、有意差のないことが棄却されなかったため ( $p=0.37$ )、これらの2領域を結合した塩基配列のデータセット (1,093 bp) を用いて系統解析を行った。近隣結合法 [Neighbor Joining (NJ) 法; Saitou & Nei, 1987]、最節約法 [Most Parsimonious (MP) 法; Fitch, 1971] および最尤法

[Maximum likelihood (ML) 法; Felsenstein, 1981] による分岐図を第I章の「I-2-3. 系統樹作成」に記した手法により作成した。ハプロタイプネットワーク樹作成には、TCS ver. 1.21 (Clement *et al.*, 2000) を用いた。また、系統解析によって区分された各クレードを対象に、各クレードの歴史性 (安定・成長・ボトルネック) を比較するため、Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) を用いてミスマッチ分布解析を行うとともに、過去におきた個体数の増減を示す統計値である Tajima's *D* および Fu's *F<sub>s</sub>* の値を算出した。また、ハプロタイプ多様度およびヌクレオチド多様度を DnaSP5.10.01 (Librado & Rozas, 2009) により算出した。

#### II-2-4. 分岐年代推定

コオイムシ類におけるミトコンドリア遺伝子の COI および 16S rRNA 領域に基づく分岐年代推定を、BEAST ver. 1.7.1 (Drummond *et al.*, 2012) を用いた Bayesian relaxed molecular clock により解析した。近隣結合法、最節約法および最尤法による解析と同様に、韓国で採集した *Diplonychus esakii* の配列を外群として使用した。塩基置換率に関しては、節足動物で汎用されている Papadopoulou *et al.* (2010) による 100 万年あたり 2.39% を採用し、0.01195 の値を用いた。BEAUti ver. 1.7.1 (BEAST ソフトウェア・パッケージ) を用いて BEAST のインプットファイル (.xml) を作成し、uncorrelated lognormal molecular clock による解析を行った。ミトコンドリア遺伝子の COI および 16S rRNA 領域を結合させた全配列長を用いて解析し、塩基置換モデルの選択には Kakusan4 を用いて Schwarz's Bayesian Information Criterion (BIC) より最適なモデルを選択したところ、HKY + G モデルが採用された。サイズの MCMC 解析を 50,000,000 世代繰り返し、1,000 回毎にサンプリングを行い、Tracer ver. 1.5 (Rambaut & Drummond, 2007) を用いて各パラメーターの確認をした後、最初の 5,000,000 世代を定常状態に達していない世代と仮定し、解析には含めなかった。FigTree ver. 1.3.1 (Rambaut, 2009) を用いて作成した系統樹ファイルを編集し、BEAST ver. 1.7.1 を用いて各クレード毎に Bayesian Skyline Plot 解析を行った。

## II-2-5. AIS によるレフュジアの推定

ミトコンドリア遺伝子の COI および 16S rRNA 領域の結合データを基に、ソフトウェア AIS (Alleles In Space; Miller, 2005) を用いて、各クレード内で遺伝的に多様性の高い地域の検出を行った。分布域の縮小が生じ、これに伴う遺伝的ボトルネックが生じたような歴史性が認められる場合、一般的に、レフュジアとなった地域では祖先的な遺伝子型が検出され、遺伝的多様性が高くなると考えられる。このことから、コオイムシ類を対象とした本研究においても、AIS による解析の結果、それぞれのクレード内で高い遺伝的多様性を示した地域を推定されるレフュジア地域として扱った。

## II-3. 結果

### II-3-1. 遺伝子解析および分岐年代推定

75 産地で採集されたコオイムシ 158 個体の分子系統解析を行った結果、113 のハプロタイプが検出された。ハプロタイプ多様度は 0.993 で、塩基多様度は 0.02138 であった (表 II-1)。オオコオイムシについても 56 産地の 117 個体を解析したところ、68 のハプロタイプが検出された。ハプロタイプ多様度は 0.976 で、塩基多様度は 0.01297 であった (表 II-1)。これらのハプロタイプ間の分岐樹として、BEAST ver. 1.7.1 によって得られた樹形を図 II-1 に示す。このミトコンドリア遺伝子の COI および 16S rRNA 領域の 1,093 bp を基にした分子系統解析の結果、両種の間はたいへん深く、分岐年代推定を行ったところ、中新世の中期から後期 [95%最高事後密度区間 (HPD) 13.36 – 6.83 Mya] と評価された (図 II-1)。

次に、両種それぞれの解析結果について詳しく示す。

#### II-3-1-a. コオイムシ種内の分子系統地理

分子系統解析の結果、コオイムシは大きく 3 つのクレード (Clade I, Clade II および Clade

III) から構成されることが明らかとなった。Clade I は本州広域 (北海道、鳥取県、島根県および山口県を除く) および四国の個体群から構成され、最祖先系統であると評価された (表 II-1, 図 II-2, 4)。Clade II は九州と山陰地方 (鳥取県、島根県、山口県) および広島県三原市の個体群から構成された。広島県三原市 (地点番号 100) でのみ、Clade I 系統 (J55, J57 ハプロタイプ) と Clade II 系統 (J56 ハプロタイプ) の個体が混棲していた (表 II-1, 図 II-2, 4)。Clade III は韓国および中国産の個体群から構成され (表 II-1, 図 II-2, 4)、Clade II と Clade III は姉妹群と評価された。すなわち、日本列島産コオイムシが側系統群として評価された (図 II-2)。

分岐年代推定の結果、Clade I (日本広域) と Clade II + III (九州および山陰地方 + 大陸) の分岐 (図 II-2 のノード A) は後期鮮新世から初期更新世 (95% HPD 2.72–1.47 Mya) と評価された。また、Clade II (九州および山陰地方) と Clade III (大陸) の分岐 (図 II-2 のノード B) は中期更新世 (95% HPD 1.68–0.80 Mya) と評価された。各ノード内での遺伝的細分化は、いずれもおおよそ 0.5 Mya 以降であり、近年になってから遺伝的分化・多様化が生じたことが示された (図 II-2)。

#### II-3-1-b. オオコオイムシ種内の分子系統地理

分子系統解析の結果、オオコオイムシは大きく 4 つのクレード (Clade IV, Clade V, Clade VI および Clade VII) から構成されることが明らかとなった。Clade IV は北海道および東日本の日本海側の個体群から構成された (表 II-1, 図 II-3, 4)。Clade V は北海道を除く東日本の太平洋側の個体群から構成された (表 II-1, 図 II-3, 4)。これらの Clade IV および Clade V は姉妹群を構成した (図 II-3)。Clade VI は西日本の個体群から構成され (表 II-1, 図 II-3, 4)、Clade IV + V に対する姉妹群として単系統群を構成し、日本列島産オオコオイムシの単系統性が支持された (図 II-3)。Clade VII は韓国・中国および極東ロシアの個体群から構成され、大陸産個体群の単系統性が支持された (表 II-1, 図 II-3, 4)。

分岐年代推定の結果、日本列島 (Clade IV + V + VI) と韓国 (Clade VII) の分岐 (図 II-3: ノード C) は中期更新世 (95% HPD 2.05 – 1.07 Mya) と評価された。これはコオイムシにおける日本列島と大陸の分岐よりもやや古い時代の分化となる。Clade VI (西日本個体群) と Clade IV + V (東日本個体群) の分岐 (図 II-3: ノード D) は、中期更新世 (95% HPD 1.40 – 0.68 Mya) と評価された。Clade IV (北海道および東日本の日本海側) と Clade V (北海道を除く東日本太平洋側) の分岐 (図 II-3: ノード E) は、更新世の中–後期 (95% HPD 1.13 – 0.52 Mya) と評価された。各ノード内での遺伝的細分化は、日本列島個体群においてはコオイムシと同様、いずれもおよそ 0.5 Mya 以降であり、比較的近年になってから遺伝的な多様化が生じたことが示された (図 II-3)。

### II-3-2. 各クレード内の解析結果

コオイムシにおける 3 つのクレード (Clade I - III) はいずれもハプロタイプ多様度がたいへん高く (Clade I: 0.982, Clade II: 0.939, Clade III: 0.989)、広域から検出されるような優占ハプロタイプも認められなかった (表 II-1)。塩基多様度は Clade I で最も高く 0.00705 で、最も低かった Clade II では 0.00478 であった (表 II-1)。各クレード間の遺伝的分化は、Clade I-II 間で 27 塩基置換、Clade I – III 間では 25 塩基置換、Clade II – III 間では 13 塩基置換であった (図 II-4)。また、ミスマッチ分布解析を行ったところ、コオイムシにおける 3 つのクレード (Clade I - III) は、いずれも近年の安定的な個体群成長を示唆する正規分布的な一山型分布の指数的增加パターンを示した (図 II-5)。また、Clade I および Clade II では Bayesian Skyline Plot 解析の結果からも個体群拡大が支持された (図 II-5)。これについては Tajima's *D* と Fu's *F<sub>s</sub>* の値についても、有意に負の値を示しており、個体群拡大が支持される結果となっている (表 II-2)。さらに、AIS を用いたレフュジア地域の推定を行ったところ、Clade I では兵庫県に、Clade II では島根県と宮崎県にレフュジアと推定される地域が検出された (図 II-6)。Clade III については、どの地域についても遺伝的に均一かつ多様であり、特定の地域がレフ

ュジアとして示唆されることはなかった (図 II-6)。

オオコオイムシにおける 4 つのクレード (Clade IV - VII) のうち、Clade IV および Clade V についてはハプロタイプ多様度がコオイムシにおける 3 つのクレードのいずれよりも低かった (表 II-1)。また、オオコオイムシにおいては、広域から検出される優占ハプロタイプが認められた。Clade IV では M4 ハプロタイプが北海道から福島県までの広域で検出され、Clade V では M33 ハプロタイプが福島県から千葉県までの広域で検出された (表 II-1)。塩基多様度は、Clade VII を除き、いずれのクレードについてもコオイムシより低く、Clade IV が 0.00236、Clade V が 0.00325、Clade VI が 0.0038 であった (表 II-1)。Clade VII については、ハプロタイプ多様度、塩基多様度は高い値を示した (表 II-1)。各クレード間の遺伝的分化は、Clade IV - V 間では 11 塩基置換、Clade V - VI 間では 12 塩基置換、Clade VI - VII 間では 18 塩基置換であった (図 II-4)。

ミスマッチ分布解析および Bayesian Skyline Plot 解析の結果に関しては、Clade VII についてはサンプル数が少なかったため、Clade IV - VI の結果についてのみ示す (図 II-5)。Clade VI については、コオイムシと同様に、近年の安定的な個体群成長を示唆する正規分布的な一山型分布の指数的増加パターンを示した (図 II-5)。Clade IV および Clade V は、近年にボトルネックの影響を受けた後に、急速な個体群拡大が生じたことを示唆する、アリルペア間における配列差異の頻度分布が 0 付近に偏った分布パターンを示し、Bayesian Skyline Plot 解析の結果についても、近年に急速に個体群を拡大させたことを示唆する結果となった (図 II-5)。Tajima's  $D$  と Fu's  $F_s$  の値については、Clade VI の Tajima's  $D$  の値を除き、全てのクレードで有意に負の値となった (表 II-2)。

また、ハプロタイプネットワークについても、とくに Clade IV では、優占ハプロタイプから 1 塩基置換の関係にあるハプロタイプが多く、「花火型」のネットワーク樹形になるなど、過去にボトルネックを受けた可能性を示唆する結果となった (図 II-4)。また、AIS によるレフュジア地域の推定結果は、Clade IV では青森県と福島県、Clade V では岩手県にレフ

ユジアと推定される地域が検出された (図 II-6)。Clade VI については、愛知県、滋賀県、兵庫県、山口県にレフュジアと推定される地域が検出された (図 II-6)。

## II-4. 考察

### II-4-1. 両種における遺伝的分断パターンと生物地理的障壁および推定レフュジア地域の比較

分子系統解析の結果、コオイムシにおいては、東日本から四国、山陽地方までの日本広域の個体群から構成される Clade I と九州および山陰地方の個体群から構成される Clade II、そして韓国および中国産の個体群から構成される Clade III の 3 系統が存在することが、明らかとなった (図 II-2, 4)。このうち、Clade II と Clade III における分岐 (図 II-2 のノード B) が対馬海峡の成立によるものであることは、ほぼ間違いないと考えられる。日本列島は、中新世後期-鮮新世 (10 – 3.1 Mya) に陸橋を介して大陸と繋がっていたが、この時期以降の氷期-間氷期サイクルにおいて海峡の出現および離水による陸橋形成が何度も繰り返されてきたと考えられている (Iijima & Tada, 1990; Tada, 1994; Kitamura *et al.*, 2001; 北村・木元, 2004)。コオイムシにおける日本と大陸の分岐年代推定結果は、中期更新世 (95% HPD 1.68 – 0.80 Mya) であったことから、氷期-間氷期サイクルにおいて形成と沈下を繰り返していた陸橋を介した遺伝的交流が中期更新世に途絶え、分集団化したと考えられる。また、これ以降にも、最終氷期にかけて氷期-間氷期サイクルによる陸橋の形成と沈下が繰り返されてきたことが、大型哺乳類の化石記録を根拠として示唆されている (小西・吉川, 1999)。海浜棲ハンミョウ類のカワラハンミョウ *Cicindela laetescripta* やルイスハンミョウ *Cicindela lewisi* の研究では、0.7 Mya 以降にも日本列島と大陸の遺伝的交流があったことが示唆されているが (Satoh *et al.*, 2004)、コオイムシにおいてはハビタットが淡水域に限定されているために、他の動物種群よりも早い時期に日本列島-大陸間の移動分散が困難となったものと

考えられる。

次に、Clade I と Clade II + III 間の分岐 (ノード A) であるが、Clade I と Clade II の地理的境界は、中国山地・冠山山地がある位置と一致する (図 II-2, 7)。これらの山地は、いずれも第四紀 (2.58 Mya) 以降に、とくに激しく隆起したとされており (岡田, 2004)、図 II-2 のノード A における分岐年代推定結果 (95% HPD 2.72 – 1.47 Mya) とほぼ合致する。また、両生類ではトノサマガエル *Pelophylax nigromaculatus* におけるアロザイム解析結果から、中国山地および冠山山地を境界として大きく 2 系統に分化していることが明らかになっているほか (Nishioka *et al.*, 1992)、魚類ではシロヒレタビラ *Acheilognathus tabira* の亜種における分布境界にも中国山地および冠山山地が関連していることから (Arai *et al.*, 2007)、コオイムシにおいてもこれらの山地が生物地理学的障壁となってきたと考えられる。また、Clade I および Clade II を構成する両系統の個体が混棲している広島県三原市の個体群 (地点番号 100) の存在は、稀にクレード分化に寄与したと考えられる地理的障壁間での移動があることの傍証であると考えられる。この場合の分散経路については、Clade II 系統が山口県の海岸沿い (瀬戸内海岸沿い) を経由して移動分散してきたのか (図 II-7 の a ルート)、もしくは広島県三原市の混棲地は 2 つの山塊の切れ目となる低山地域の付近に位置していることから、この低山地を経由して日本海側から瀬戸内側へと移動分散してきたのか、のいずれかであると考えられる (図 II-7 の b ルート)。しかしながら、現在までのデータではいずれがより妥当であるのかといった判断は困難である。また、オオコオイムシと比較して、コオイムシはより温度の高い環境を好むとされることから (岡田, 1993; Okada & Nakasuji, 1993a)、コオイムシにおいて推定される日本国内の各クレード内でのレフュジア地域が、Clade I で兵庫県、Clade II で島根県と宮崎県であるという推定結果は、妥当であると考えられる。

一方、オオコオイムシにおいては、北海道および東日本・日本海側の個体群から構成される Clade IV、北海道を除く東日本・太平洋側の個体群から構成される Clade V、西日本の個体群から構成される Clade VI、および韓国の個体群から構成される Clade VII の 4 系統に

分かれることが明らかとなった (図 II-3, 4)。オオコオイムシにおいても、コオイムシと同様に日本クレード (Clade IV-VI) と韓国クレード (Clade VII) 間の分岐 (図 II-3 のノード C) は対馬海峡の成立による地理的分断によるものであると考えられる。対馬海峡の成立は更新世中期 (1.55 Mya) であるとされており (Kitamura & Kimoto, 2006; Osozawa *et al.*, 2012)、両種の間での分岐年代推定結果ともおおよそ合致する。また、オオコオイムシにおける日本列島と大陸の個体群間での分岐年代測定結果は、1.98 – 1.02 Mya (95% HPD) と、コオイムシよりもやや早い時期であった (図 II-2 vs 図 II-3)。直接的な証拠となるような研究例はないものの、複数の水棲昆虫研究者による野外観察から、コオイムシとオオコオイムシでは、コオイムシの方がより飛行能力が高い印象が強いということが示唆されている (大庭, 私信; 北野, 私信; 谷澤, 私信)。本研究の結果においても、オオコオイムシがより早い時期に日本列島-大陸間の遺伝的分化が生じていることから、より飛行能力の低いオオコオイムシで先に分断が生じたと考えられ、両種の飛行能力の差を示唆する結果であると言える。

次に Clade IV + V と Clade VI の分岐 (図 II-3 のノード D) についてであるが、これらのクレードを構成する個体群間の地理的境界は、中部山岳域が広がる地域と合致している (図 II-8)。中部山岳の隆起年代は前期更新世-中期更新世 (2.0 – 0.7 Mya) とされており (町田, 2006)、分岐年代推定で得られた図 II-3 のノード D における分岐年代 (95% HPD 1.40 – 0.68 Mya) とほぼ合致する。中部山岳域は日本国内最大の山塊であり、昆虫類ではゲンジボタル *Luciola cruciata* において、中部山岳域を境界として遺伝的構造が東西に分かれることが明らかになっているほか (Suzuki *et al.*, 2002)、魚類ではギギ属 *Pseudobagrus* 魚類の分布境界が中部山岳域にあり (Watanabe & Nishida, 2003)、哺乳類においてもモグラ類でアズマモグラ *Mogera imaizumi* とコウベモグラ *Mogera wogura* のおおよその分布境界が中部山岳域にある (Tsuchiya *et al.*, 2000)。このように、他の動物種群においてもそうであるように、オオコオイムシにおいても中部山岳域が大きな生物地理学的障壁となっていると言える。

Clade IV と V を構成する個体群間の地理的境界 (図 II-3 のノード E) は、奥羽山脈が広が

る地域と合致する。奥羽山脈は 3 Mya 以降に隆起が本格化し、第四紀火山群を数多く有するとされている (太田ら, 2010)。これらの火山群は 1 Mya 以降に活動が活発化しており (Umeda *et al.*, 1999)、これらの火山活動による山岳隆起や噴火による棲息適地の縮小などによって東日本個体群が東西に分断されたと考えられる。また、東日本個体群の 2 系統については、ハプロタイプネットワークおよびミスマッチ分布解析によりボトルネックが生じたことが示唆されており (図 II-4, 5)、第四紀の火山活動によってオオコオイムシの東日本個体群が奥羽山脈の東西に分断され、その後、個体群が縮小・孤立化した可能性も示唆される。AIS によるレフュジア地域の推定では、Clade IV では青森県と福島県に、Clade V では岩手県に推定レフュジア地域が検出されており (図 II-6)、ミスマッチ分布解析の結果では Clade IV が 0.06 Mya、Clade V が 0.14 Mya 以降に個体群を急増させたことと示唆されることから (表 II-2)、火山活動によりボトルネック効果を受けた個体群が比較的近年になって分布域を広めたものと考えられる。

奥羽山脈が生物地理的障壁となっている他の動物種群の例としては、アズマモグラ類 *Mogera* やメダカ *Oryzias latipes* が挙げられるが (Takehana *et al.*, 2003; Iwasa *et al.*, 2006)、アズマモグラ類は日本海側系統が奥羽山脈の北端 (青森県) で太平洋側へ進出して南下し、もともと生息していた太平洋側の系統との間で二次的接触が生じたことが明らかとなっている (Iwasa *et al.*, 2006)。本研究においては検出されなかったものの、今後、解析個体および地点数を追加することで、オオコオイムシにおいても奥羽山脈北端地域で両系統が混棲する棲息地が発見される可能性が十分に考えられる。

#### II-4-2. 両種における遺伝的構造の比較

コオイムシとオオコオイムシは、形態や生態的ニッチが酷似した同属の近縁種であるにも関わらず、遺伝構造は大きく異なることが本研究から明らかとなった。両種における日本列島-大陸間の遺伝的分化は、オオコオイムシの方がより大きく評価されたが (図 II-2 vs

図 II-3)、これは移動分散能力がオオコオイムシの方がより低いためであると考えられる。さらに興味深いことに、コオイムシにおいては日本個体群が単系統群を構成せず、山陰・九州産個体群 (Clade II) と大陸産個体群 (Clade III) の単系統性が強く支持されている。これはオオコオイムシにおける結果とは大きく異なるものである (図 II-2 vs 図 II-3)。これらのことから、コオイムシとオオコオイムシは全く異なる進化史を辿ってきたことが推測される。また、コオイムシとオオコオイムシが種分化した年代は、本研究の分岐年代推定からは中新世の中期から後期 (13.36 – 6.83 Mya) であったという結果が得られた (図 II-1)。この時代には、日本列島が既にユーラシア大陸から離列していたとされている (Otofujii, 1996; Martin, 2011)。さらに、コオイムシでは最祖先系統が北海道を含む日本広域系統 (Clade I) であったのに対し、オオコオイムシでは大陸産個体群 (Clade VII) であったことから、コオイムシとオオコオイムシは、それぞれ日本列島と大陸で異所的に種分化した後、コオイムシでは日本列島から朝鮮半島を経由して大陸へ移動分散していき、オオコオイムシでは逆に大陸から朝鮮半島を経由して日本列島へ進入してきた可能性も考えられる。しかしながら、実際に大陸産個体群と九州などの日本産個体群が遺伝的に近縁な動物種群であっても、実際には日本列島や陸橋の形成史と複雑に絡み合った進化史をもつことが示唆されている (e.g., 両生類のサンショウウオ属 *Hynobius*, Li *et al.*, 2011; 鱗翅目昆虫のクロツバメシジミ *Tongeia fischeri*, Jeratthitikul *et al.*, 2013)。また本研究で解析した大陸産サンプルは、そのほとんどが朝鮮半島産であることから、さらに広域での大陸産コオイムシ類の解析を行うことで、より詳細な議論を行う必要があるものとする。

コオイムシにおいては、オオコオイムシで認められた奥羽山脈および中部山岳域の山岳形成が要因であると考えられる遺伝的分化パターンが認められなかった。実際には、現在、山脈を越えた飛翔による移動分散が生じている可能性は低いと考えられ、両種共に各山脈で個体群間の遺伝的な交流の分断が生じているものと思われるが、オオコオイムシでは移動分散能力が低いため、コオイムシに比べて山脈などの生物地理学的障壁による遺伝的分

化が生じやすく、日本国内での分化がより細かなスケールになっているものと考えられる。一方で、オオコオイムシにおいてはコオイムシで認められた中国山地による分断が認められなかったが、AIS によるレフュジア地域の探索の結果、オオコオイムシの西日本系統では遺伝的に多様な地域がたいへん多く (図 II-6)、この地域ではオオコオイムシが優占して生息していた可能性があると考えられ、海岸線に沿った、もしくは山塊を越えた移動分散が生じていたのかもしれない。これについては、実際に本研究におけるコオイムシの遺伝子解析結果でも、広島県三原市では Clade I と Clade II の両系統が混棲しており (図 II-7)、稀に系統間での移動分散が生じているものと考えられる。

本研究の結果は、コオイムシおよびオオコオイムシという、東アジア広域で分布がオーバーラップしている同属の 2 種における遺伝的構造を明らかにし、両種が全く異なる遺伝的構造および進化史を持つことを究明した、たいへん興味深い結果である。しかしながら、本研究で明らかとなった両種の主要クレード内における分散の方向性や、さらに細かなスケールでの生物地理学的障壁の有無の可能性については、さらなる議論の余地があり、今後、他のミトコンドリア遺伝子領域や核遺伝子領域の遺伝子マーカー、マイクロサテライトマーカーなどを用いた追究を行うことで、さらに詳細な議論を深められるものとする。

表II-1. 遺伝子解析に用いたサンプルの採集地点情報、遺伝的多様度およびハプロタイプ数

種名	地点番号/地点名	個体数 (N)	ハプロタイプ 多様度	ヌクレオチ ド多様度	ハプロタイプ 数 (N)
コオイムシ <i>Appasus japonicus</i>		158	0.993	0.02138	
Clade I	日本				
	1 北海道天塩郡幌延町-1	2	1.000	0.00366	J1 (1) J2 (1)
	4* 北海道雨竜郡妹背牛町	2	1.000	0.00366	J3 (1) J4 (1)
	5 北海道樺戸郡新十津川町	2	0.000	0.00000	J4 (2)
	6 北海道釧路郡釧路市	2	1.000	0.00091	J5 (1) J6 (1)
	7* 北海道中川郡幕別町	2	0.000	0.00000	J7 (2)
	8 北海道千歳市	2	0.000	0.00000	J8 (2)
	10 北海道十勝郡浦幌町	1	-	-	J5 (1)
	11 北海道勇払郡鷗川町	2	1.000	0.00091	J5 (1) J9 (1)
	13 青森県五所川原市	2	1.000	0.00183	J10 (1) J11 (1)
	15* 青森県津軽町-2	1	-	-	J5 (1)
	16 青森県八戸市	2	1.000	0.00091	J5 (1) J12 (1)
	23 岩手県岩手郡滝沢村	1	-	-	J13 (1)
	32 宮城県栗原市-1	1	-	-	J14 (1)
	42* 福島県福島市	1	-	-	J15 (1)
	44* 福島県双葉郡浪江町	1	-	-	J16 (1)
	48* 福島県西白河郡西郷村	2	1.000	0.00183	J17 (1) J18 (1)
	56 長野県埴科郡坂城町	1	-	-	J21 (1)
	57 長野県安曇野市	2	1.000	0.00091	J22 (1) J23 (1)
	58 長野県松本市	4	0.500	0.00046	J24 (3) J25 (1)
	59 長野県塩尻市	2	1.000	0.00091	J24 (1) J26 (1)
	63 長野県駒ヶ根市	1	-	-	J21 (1)
	64 栃木県塩谷郡塩谷町	2	1.000	0.00366	J19 (1) J20 (1)
	67 山梨県北杜市	2	1.000	0.00091	J27 (1) J28 (1)
	69 神奈川県愛甲郡愛川町	2	1.000	0.00365	J29 (1) J30 (1)
	71 神奈川県秦野市	1	-	-	J31 (1)
	72 愛知県犬山市	1	-	-	J35 (1)
73 愛知県瀬戸市	1	-	-	J36 (1)	
75 愛知県豊橋市	1	-	-	J37 (1)	
76* 千葉県夷隅郡大多喜市	3	1.000	0.00244	J32 (1) J33 (1)	

Clade II	78	静岡県浜松市-1	3	1.000	0.00488	J34 (1) J38 (1) J39 (1) J40 (1)
	79	静岡県浜松市-2	3	0.667	0.00244	J41 (2) J42 (1)
	83	大阪府豊能郡能勢町	1	-	-	J43 (1)
	84	京都府船井郡京丹波町	5	0.900	0.00494	J43 (1) J44 (1) J45 (2) J46 (1)
	85	兵庫県三田市	3	0.667	0.00609	J43 (2) J47 (1)
	88	兵庫県姫路市	3	1.000	0.00366	J47 (1) J48 (1) J49 (1)
	89	兵庫県佐用郡佐用町-1	2	1.000	0.00548	J50 (1) J51 (1)
	91	香川県東かがわ市	2	1.000	0.00274	J52 (1) J53 (1)
	93	愛媛県松山市	2	0.000	0.00000	J54 (2)
	94	岡山県美作市	1	-	-	J49 (1)
	101*	広島県東広島市	1	-	-	J55 (1)
	100	広島県三原市	10	0.600	0.01389	J55 (6) J57 (3) J56 (1)
	96	鳥取県鳥取市	4	0.833	0.00107	J58 (2) J59 (1) J60 (1)
	97	島根県安来市	3	0.000	0.00000	J60 (3)
	102	山口県下関市	1	-	-	J61 (1)
	103	佐賀県唐津市	2	1.000	0.00457	J62 (1) J63 (1)
	104	佐賀県多久市	2	1.000	0.00091	J64 (1) J65 (1)
	106	長崎県長崎市	3	0.000	0.00000	J66 (3)
	107	熊本県上益木郡大和町	2	0.000	0.00000	J61 (2)
	108	宮崎県宮崎市	2	1.000	0.00548	J67 (1) J68 (1)
	109	鹿児島県薩摩川内市	2	0.000	0.00000	J69 (2)
	韓国					
	110*	江原道華川郡史内面	1	-	-	J72 (1)
	111	京畿道漣川郡全谷里	2	1.000	0.00274	J70 (1) J71 (1)
	112	江原道洪川郡内村面	4	1.000	0.00960	J73 (1) J74 (1) J75 (1) J76 (1)
	113	江原道江陵市	2	1.000	0.00091	J79 (1) J80 (1)

Clade III	114*	江原道横城郡公根面	2	1.000	0.00366	J77 (1)
						J78 (1)
	116	江原道三陟郡近徳面-2	2	1.000	0.00274	J109 (1)
						J110 (1)
	117	江原道原州市	2	1.000	0.00274	J81 (1)
						J82 (1)
	118	忠清北道堤川市	1	-	-	J83 (1)
	119	忠清南道天安市	2	1.000	0.00915	J85 (1)
						J107 (1)
	120	慶尚北道聞慶市	3	1.000	0.00488	J84 (1)
						J85 (1)
						J86 (1)
	121	慶尚北道安東市	1	-	-	J87 (1)
	122	慶尚北道盈徳郡達山面	1	-	-	J112 (1)
	123	慶尚北道尚州市	2	1.000	0.00457	J88 (1)
						J89 (1)
	124*	忠清北道永同郡深川面	4	1.000	0.00449	J90 (1)
						J91 (1)
						J92 (1)
						J93 (1)
125	忠清南道錦山郡南一面	2	1.000	0.00548	J85 (1)	
					J94 (1)	
126	慶尚北道慶州市-1	2	1.000	0.00274	J103 (1)	
					J105 (1)	
127	慶尚北道慶州市-2	2	1.000	0.00366	J103 (1)	
					J106 (1)	
128	全羅北道完州郡龍進面	2	1.000	0.00640	J95 (1)	
					J96 (1)	
129	慶尚南道陝川郡伽倻面	1	-	-	J97 (1)	
130	慶尚南道居昌郡馬利面	2	1.000	0.00915	J93 (1)	
					J108 (1)	
131	慶尚南道陝川郡大并面	2	0.000	0.00000	J96 (2)	
132	慶尚南道咸安郡漆西面	1	-	-	J98 (1)	
133	全羅南道長城郡森西面	6	0.933	0.00609	J96 (2)	
					J99 (1)	
					J100 (1)	
					J101 (1)	
					J102 (1)	
134	慶尚南道梁山市	2	1.000	0.00732	J104 (1)	
					J111 (1)	
中国						
-	-	1	-	-	J113 (1)	
オオコオイムシ <i>Appasus major</i>			117	0.976	0.01297	
日本						
2	北海道天塩郡幌延町-2	2	1.000	0.00091	M1 (1)	
					M2 (1)	
3	北海道留萌市	1	-	-	M2 (1)	
4*	北海道雨竜郡妹背牛町	1	-	-	M2 (1)	
7*	北海道中川郡幕別町	2	0.000	0.00000	M2 (2)	

Clade IV	9	北海道虻田郡ニセコ町	2	0.000	0.00000	M3 (2)
	12	北海道勇払郡厚真町	2	1.000	0.00091	M2 (1)
	14	青森県津軽町-1	3	1.000	0.00183	M4 (1)
						M5 (1)
						M6 (1)
	15*	青森県津軽町-2	1	-	-	M7 (1)
	18	秋田県大館市	2	0.000	0.00000	M8 (2)
	19	秋田県北秋田市	1	-	-	M9 (1)
	20	秋田県秋田市	4	0.500	0.00046	M4 (3)
						M10 (1)
	21	秋田県仙北郡太田町	1	-	-	M4 (1)
	22	秋田県由利本荘市	2	1.000	0.00091	M8 (1)
						M11 (1)
	27	山形県酒田市	1	-	-	M12 (1)
	29	山形県西村山郡西川町-2	2	1.000	0.00091	M8 (1)
						M11 (1)
	30	山形県東置賜郡高畠町	2	1.000	0.00366	M4 (1)
						M13 (1)
	31	山形県米沢市	2	1.000	0.00366	M14 (1)
						M15 (1)
36	新潟県胎内市	3	0.667	0.00183	M4 (2)	
					M16 (1)	
38	新潟県妙高市	1	-	-	M17 (1)	
39	新潟県佐渡市-1	5	0.000	0.00000	M18 (5)	
40	新潟県佐渡市-2	2	1.000	0.00091	M18 (1)	
					M19 (1)	
41	福島県耶麻郡北塩原村	2	1.000	0.00274	M20 (1)	
					M21 (1)	
45	福島県郡山市	2	1.000	0.00091	M4 (1)	
					M22 (1)	
47	福島県大沼郡昭和村	2	0.000	0.00000	M4 (2)	
53	長野県白馬村	1	-	-	M23 (1)	
Clade V	17	青森県三戸郡田子町	2	1.000	0.00366	M24 (1)
						M25 (1)
	24	岩手県花巻市	2	1.000	0.00548	M26 (1)
						M27 (1)
	25	岩手県北上市	2	1.000	0.00457	M28 (1)
						M29 (1)
	33	宮城県栗原市-2	1	-	-	M30 (1)
	35	宮城県仙台市	2	1.000	0.00274	M31 (1)
						M32 (1)
	42*	福島県福島市	4	1.000	0.00548	M33 (1)
						M34 (1)
						M35 (1)
						M36 (1)
	48*	福島県西白河郡西郷村	1	-	-	M38 (1)
	46	福島県須賀川市	3	0.667	0.00061	M31 (2)
M37 (1)						
65	茨城県東茨城郡城里町	2	0.000	0.00000	M33 (2)	

Clade VI	66	茨城県鹿嶋市	1	-	-	M39 (1)
	70	神奈川県秦野市	3	0.000	0.00000	M40 (3)
	76*	千葉県夷隅郡大多喜市	3	-	-	M33 (2)
						M41 (1)
	77	千葉県富津市	3	0.000	0.00000	M33 (3)
	74	愛知県新城市	1	-	-	M42 (1)
	80	三重県伊賀市-1	2	0.000	0.00000	M43 (2)
	81	三重県伊賀市-2	3	1.000	0.00427	M44 (1)
						M45 (1)
						M46 (1)
	82	奈良県奈良市	2	0.000	0.00000	M47 (2)
	87	兵庫県豊岡市	3	0.667	0.00061	M46 (1)
						M48 (2)
	90	兵庫県佐用郡佐用町-2	1	-	-	M49 (1)
	92	徳島県三好市	1	-	-	M50 (1)
	95	岡山県久米郡美咲町	1	-	-	M51 (1)
	98	島根県出雲市	3	1.000	0.00366	M52 (1)
					M53 (1)	
					M54 (1)	
99	広島県世良郡世良町	4	0.833	0.00366	M46 (1)	
					M55 (2)	
					M56 (1)	
101*	広島県東広島市	1	-	-	M57 (1)	
105	大分県玖珠郡玖珠町	6	0.000	0.00000	M58 (6)	
韓国						
Clade VII	110*	江原道華川郡史内面	1	-	-	M59 (1)
	114*	江原道横城郡公根面	1	-	-	M60 (1)
	115	江原道三陟郡近徳面-1	4	0.833	0.00091	M61 (2)
						M62 (1)
						M63 (1)
	124*	忠清北道永同郡深川面	1	-	-	M64 (1)
		ロシア				
135	沿海州アニシモフカ	2	1.000	0.02377	M65 (1)	
					M66 (1)	
中国						
136	遼寧省丹東市	2	1.000	0.01554	M67 (1)	
					M68 (1)	

コオイムシ *Appasus japonicus*

Clade I	84	0.982	0.00705
Clade II	22	0.939	0.00478
Clade III	52	0.989	0.00569

オオコオイムシ *Appasus major*

Clade IV	49	0.908	0.00231
Clade V	29	0.916	0.00325
Clade VI	28	0.942	0.00490
Clade VII	11	0.982	0.01017

\*混棲地

表II-2. 各クレードにおけるミスマッチ分布解析結果およびTajima's *D*とFu's *F<sub>s</sub>*の値

Clade	N	n	$\tau$	$\theta_0$	$\theta_1$	T (Mya)	SSD	R	Tajima's <i>D</i>	Fu's <i>F<sub>s</sub></i>
コオイムシ <i>Appasus japonicus</i>										
Clade I	84	55	8.938	0.004	49.219	0.342	0.007	0.016	-1.695*	-24.845**
Clade II	22	13	6.824	0.000	19.475	0.261	0.017	0.030	-0.344	-2.947
Clade III	52	44	3.977	2.579	191.562	0.152	0.001	0.007	-2.024**	-25.223**
オオコオイムシ <i>Appasus major</i>										
Clade IV	49	23	1.566	0.698	99999	0.060	0.004	0.048	-2.133**	-17.386**
Clade V	29	18	3.645	0.000	19.219	0.140	0.005	0.023	-1.882*	-10.161**
Clade VI	28	17	6.617	0.000	19.971	0.253	0.002	0.012	-1.113	-5.540*

N, 解析個体数; n, ハプロタイプ数;  $\tau$ , 母集団サイズ急増期間を表す推定値;  $\theta_0$ , 個体群急増前の集団サイズ;  $\theta_1$ , 個体群急増後の集団サイズ; T, 個体群急増年代; SSD, 偏差平方和; R, raggedness indexes. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

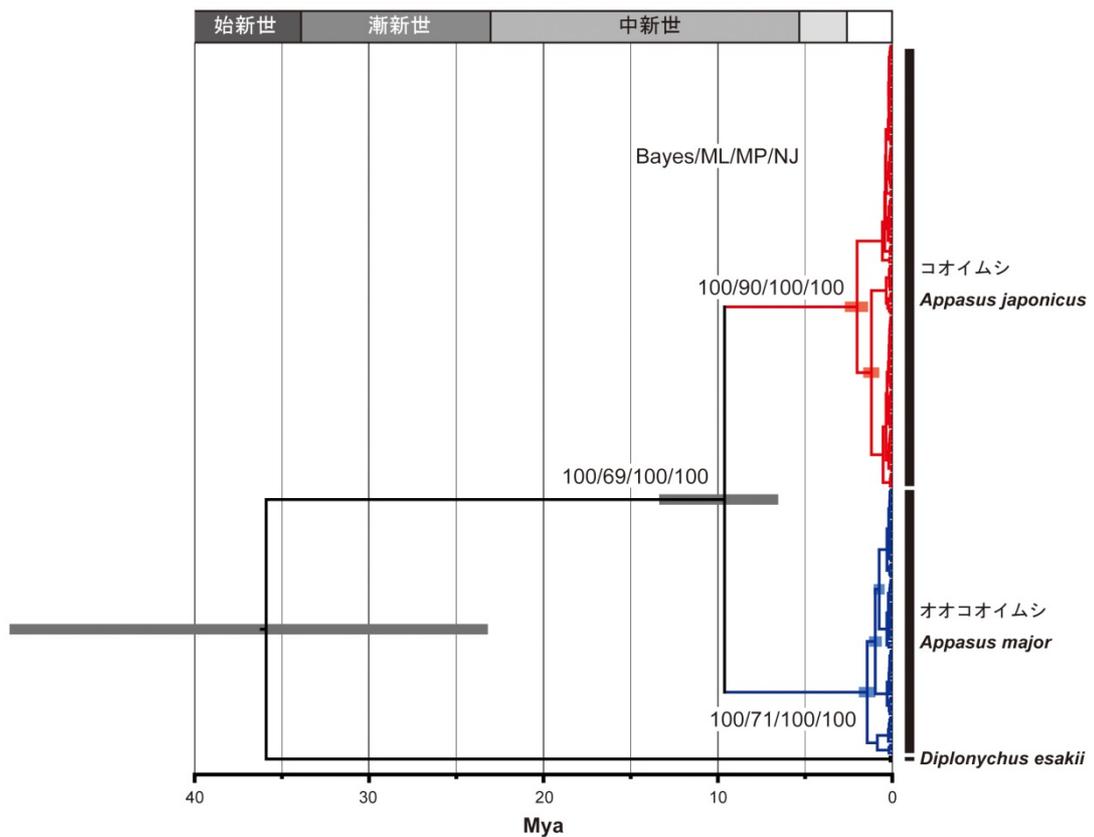
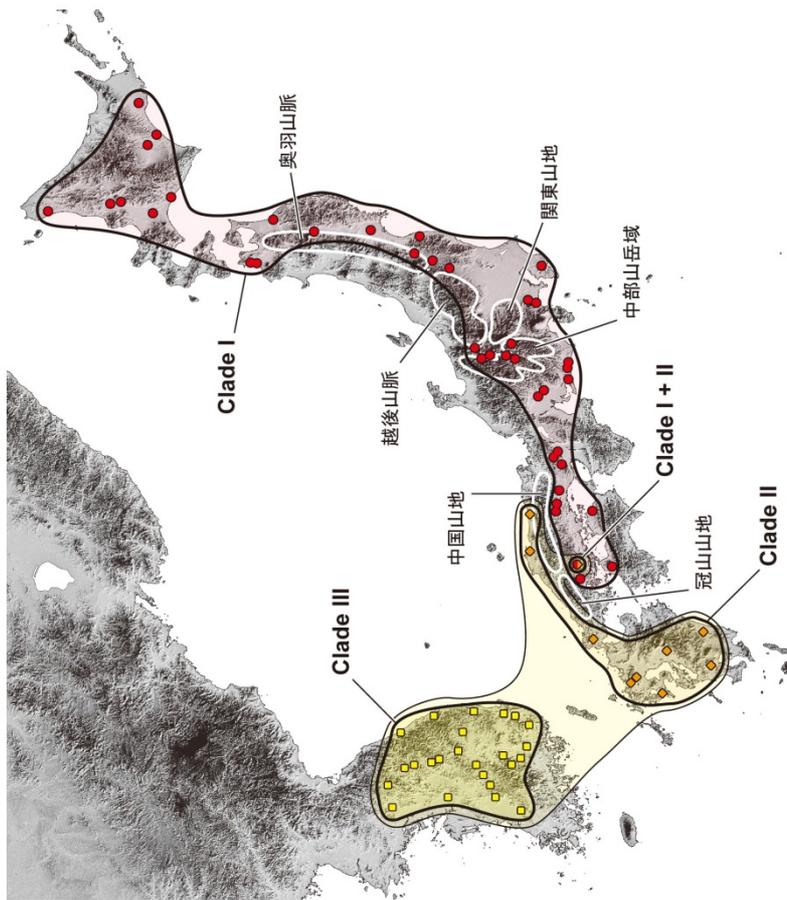


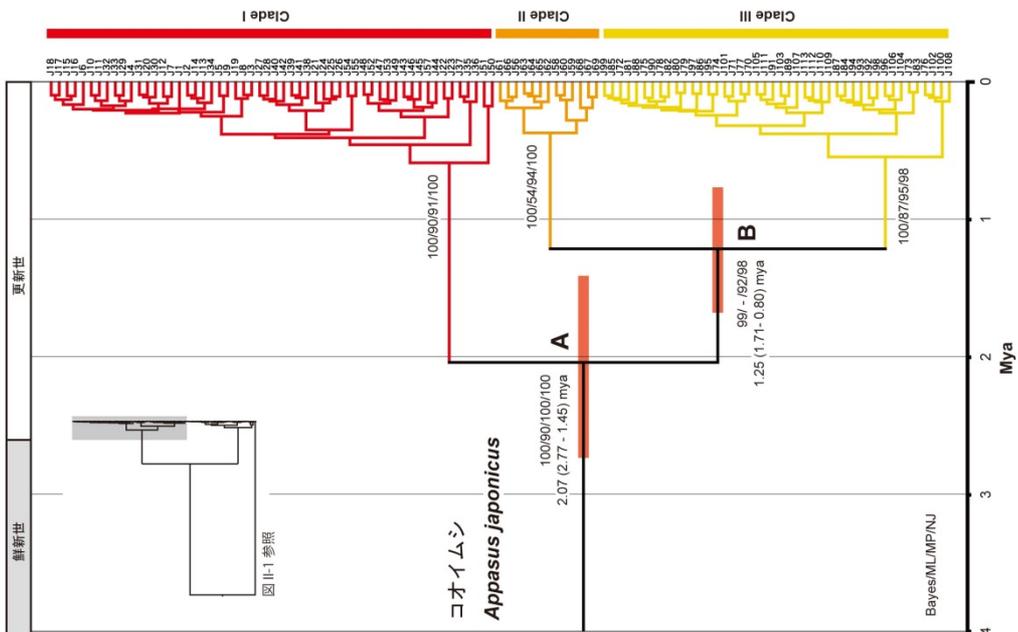
図 II-1. ミトコンドリア遺伝子 COI 領域および 16S rRNA 領域 (1,093 bp) を基に BEAST 解析によって得られた分岐図

各ノードにおける上部の数値は Bayes の事後確率および ML, MP, NJ 樹におけるブートストラップ確率を示す. コオイムシおよびオオコオイムシのクレード内については、それぞれ図 II-2 および図 II-3 で詳しく示す. 半透明のバーは 95% HPD を示す.



図II-2. BEAST解析によって得られたコオイムシ種内の分岐図と各系統の地域区分

各ノードにおける上部の数値はベイズの事後確率およびML, MP, NJ 樹におけるブートストラップ確率を示す. ノード A および B における事後確率、ブートストラップ値の下部の数値は分岐年代 (95% HPD) を示し、半透明のバーは 95% HPD を示す.



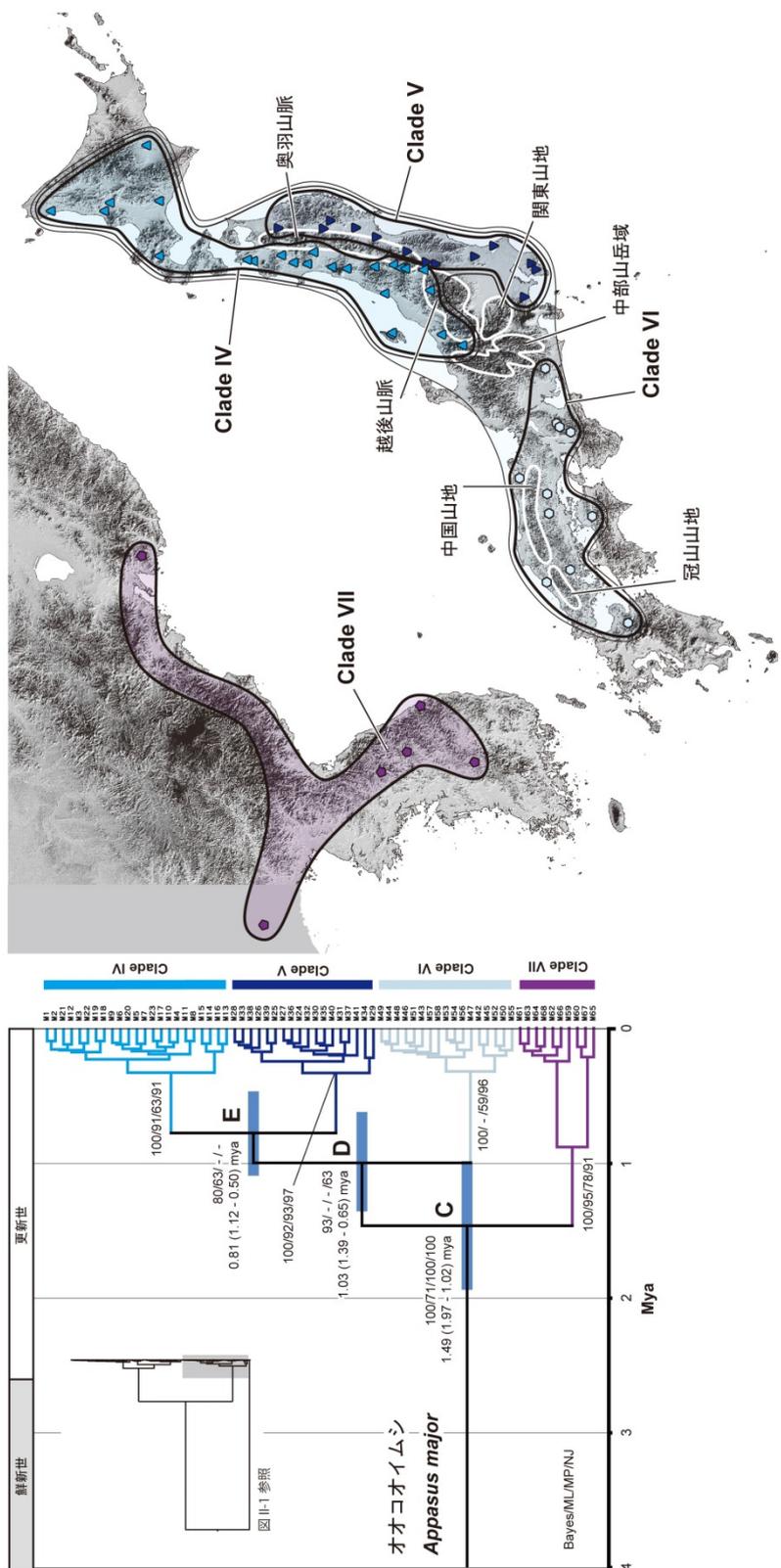


図 II-3. BEAST 解析によって得られたオオコオイムシ種内の分岐図と各系統の地域区分  
 各ノードにおける上部の数値はベイズの事後確率および ML, MP, NJ 樹におけるブートストラップ確率を示す. ノード C, D および E  
 における事後確率、ブートストラップ値の下部の数値は分岐年代 (95% HPD) を示し、半透明のバーは 95% HPD を示す.

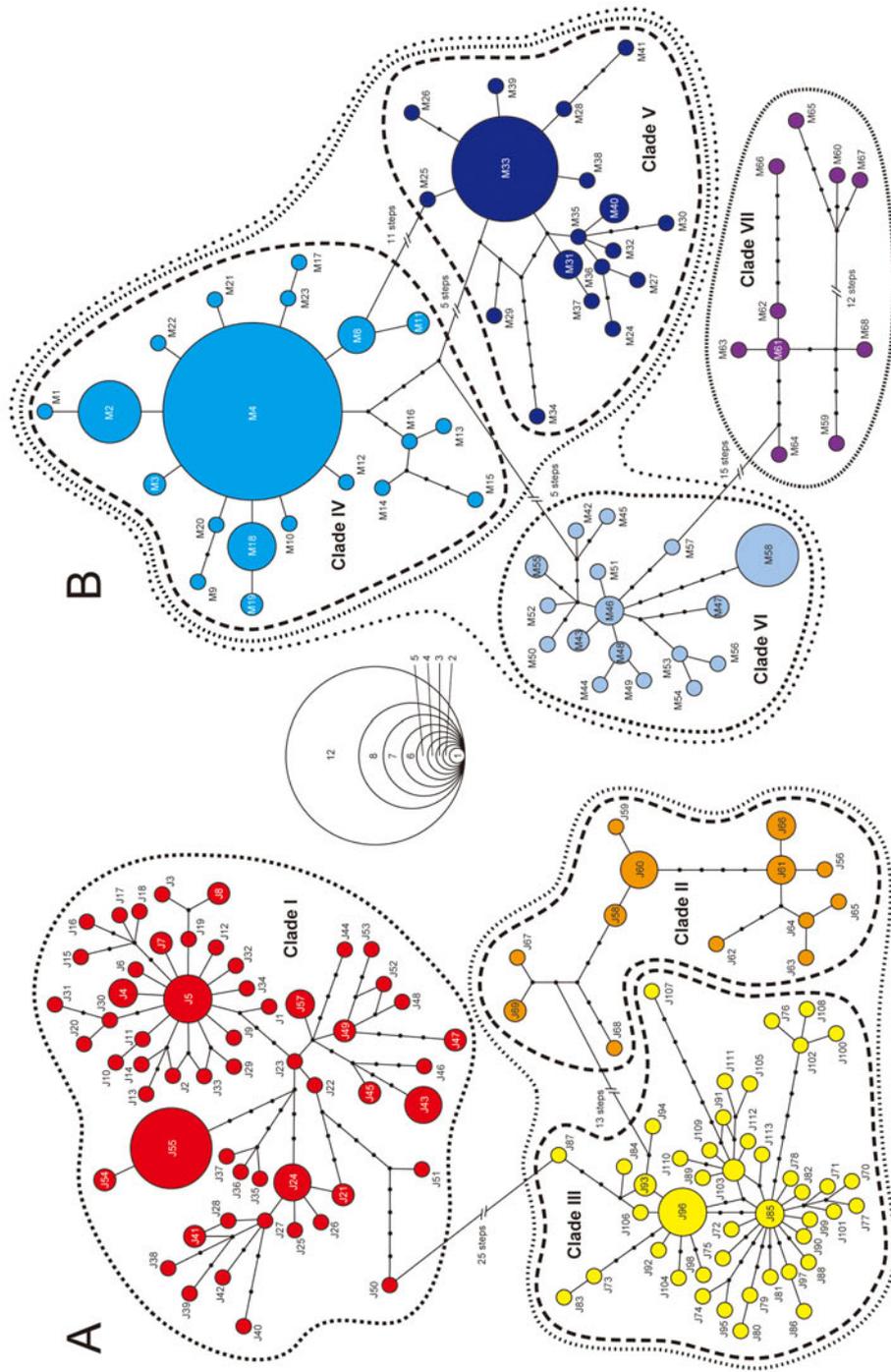


図 II-4. コオイムシ (A) およびオオコオイムシ (B) におけるミトコンドリア DNA COI 領域および 16S rRNA 領域 (1,093 bp) を基にしたハプロタイプネットワーク図。

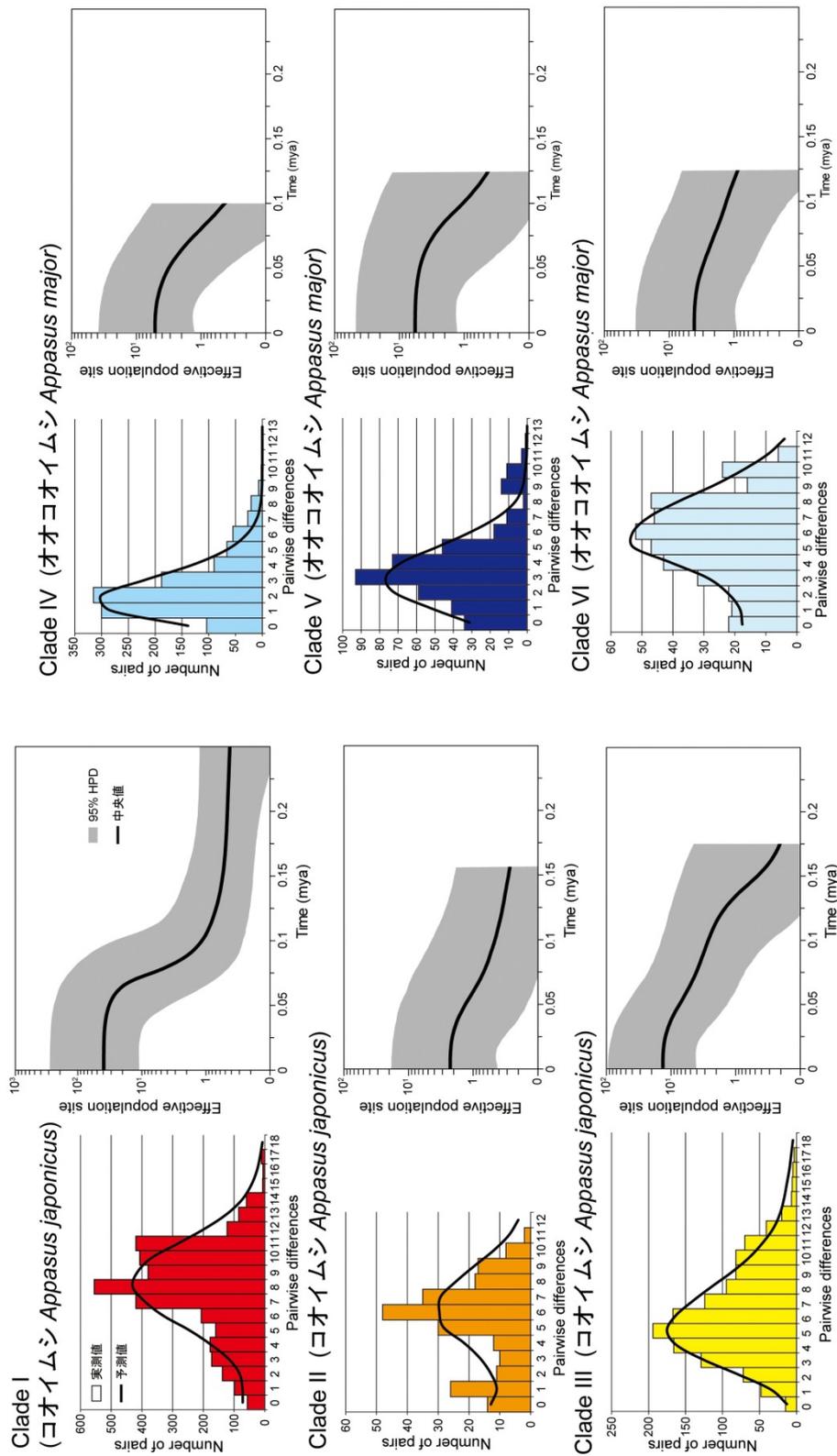


図 II-5. Clade I - VI におけるミスマッチ分布解析および Bayesian Skyline Plot 解析の結果  
棒グラフが実測値を示し、実線は母集団サイズ急増モデルによる予測を示す。

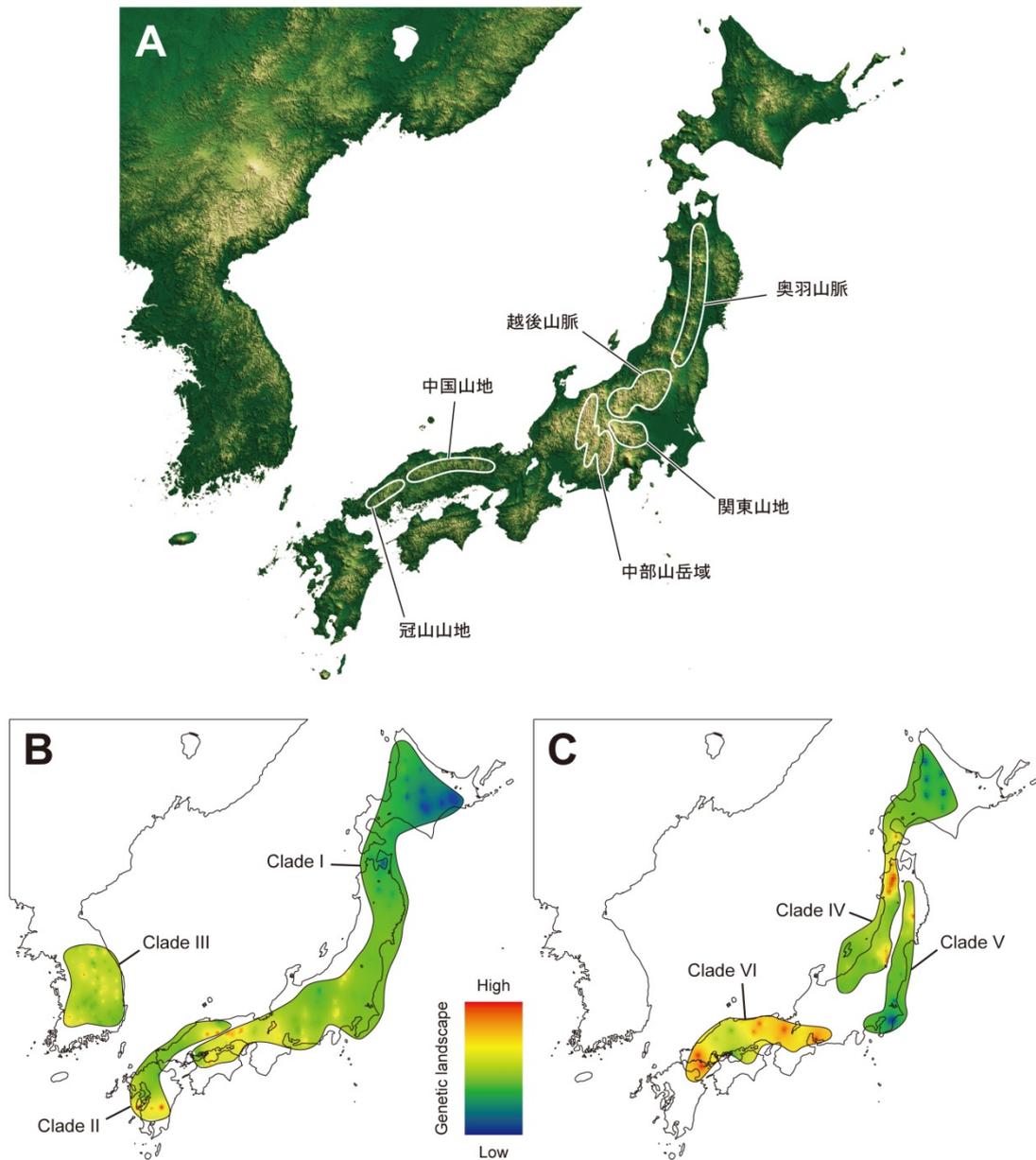


図 II-6. 東アジアの地形図 (A) および AIS 解析の結果 (B: コオイムシ, C: オオコオイムシ)  
 AIS 解析の結果は、赤色部がレフュジアであった可能性が高い地域、青色部がレフュジアで  
 あった可能性が低い地域を示す。

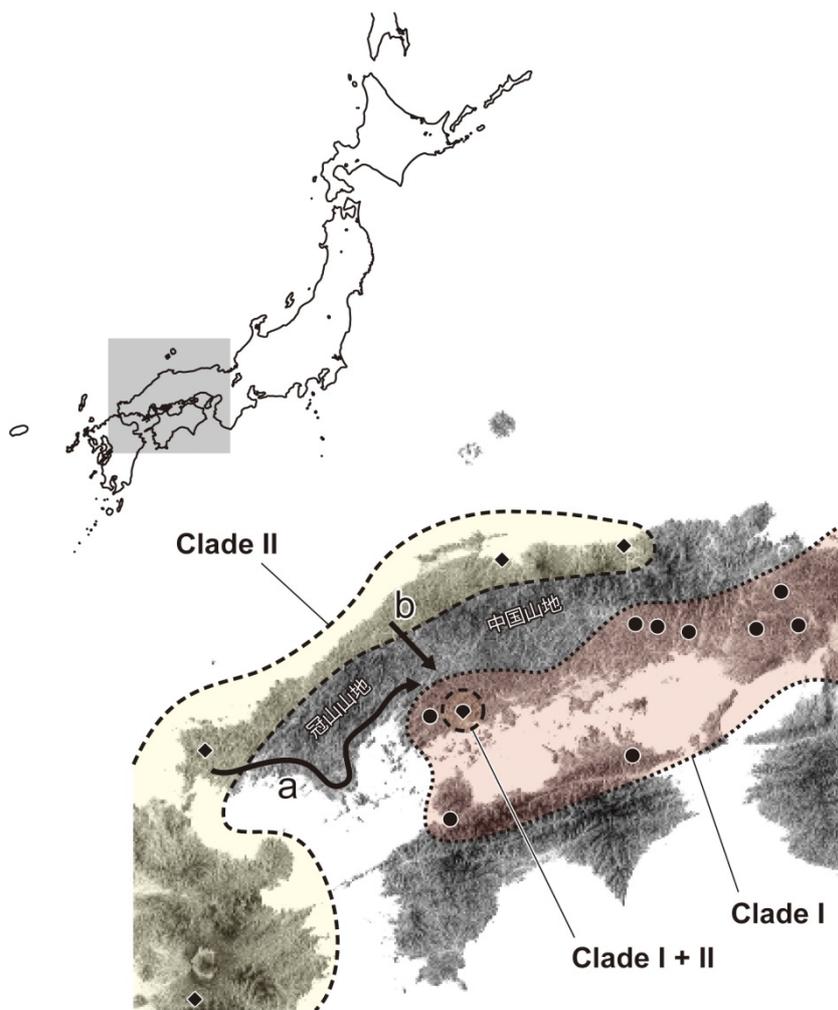


図 II-7. Clade I と Clade II の境界地域の地形図

広島県三原市でのみ、両系統の個体が混棲していた。a: Clade II 系統の個体が海岸線を経由して移動していた場合に予想される分散ルート, b: Clade II 系統の個体が山塊間を経由して移動していた場合に予想される分散ルート。

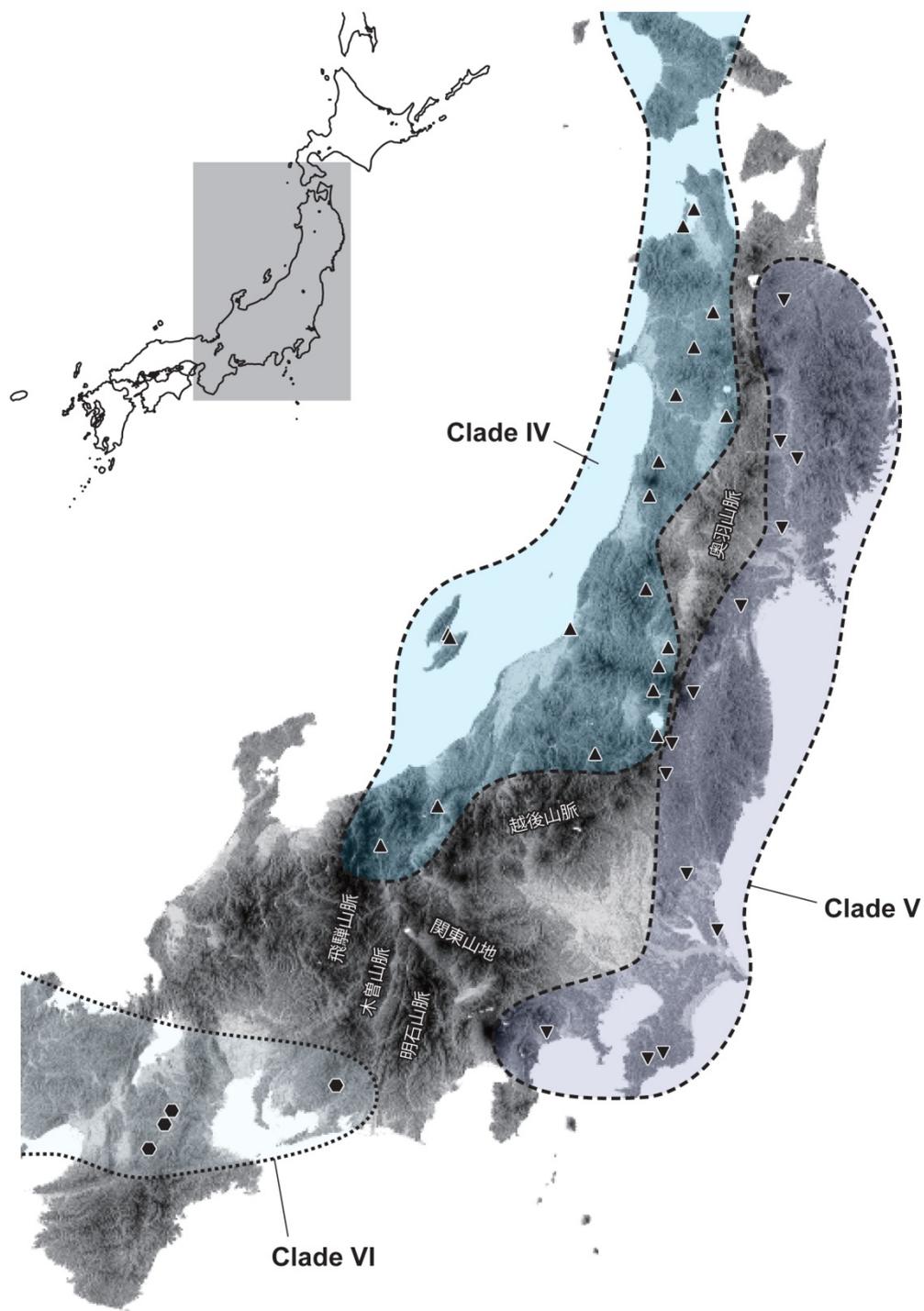


図 II-6. Clade IV, V および Clade VI の境界地域の地形図.

### 第 III 章

#### コオイムシの胚発生

### 第 III 章 コオイムシの胚発生

#### III-1. 背景

タガメ亜科 Lethocerinae とコオイムシ亜科 Belostomatinae の 2 亜科からなるコオイムシ科 Belostomatidae の昆虫は、例外なく「父育 paternal care」を行うことが知られている (e.g., Ichikawa, 1995; Tallamy, 2000, 2001)。とくに、コオイムシ亜科昆虫ではメス親がオス親の背に卵塊を産みつけるという、たいへんユニークな繁殖様式が知られているほか、孵化後の空の卵塊をオス親がタイミングよく背から落下させることで、オス親が次の繁殖サイクルへとスムーズに移行できることが知られている (e.g., Smith, 1979)。そして、胚発生が進行している期間 (孵化までの期間) にはしっかりとオス親の背に接着されていることが必須 (必要不可欠) である。しかしながら、逆に、孵化後には空となった卵塊はできるだけ早く剥離・落下することがオス親の繁殖適応度において重要となる。このように、一見すると相反するシステムではあるが、コオイムシ類ではこれらのことがたいへんスムーズに進行しており、空となった孵化後の卵塊を背負いつづけているようなオス親が野外において観察される機会はほとんどない。このような要因として、バッタ類の一種 *Melanoplus differentialis* における胚発生の知見 (Slifer, 1937, 1938) を参考に、安藤 (1991, 1999) は「胚発生中のみ腹部第 1 節に分化する特殊な付属肢である側脚 pleuropodium から分泌される酵素が関与しているのではないか」というたいへん興味深い仮説を提唱している。この仮説を受けて谷澤 (2007a) は、安藤 (1991, 1999) により提唱された仮説の検証を目指し、コオイムシ *Appasus japonicus* の胚発生を観察し、コオイムシの胚発生において、確かに側脚の分化が認められること、そしてこの側脚には腺状構造が発達し、胚発生期において酵素の分泌活動を行っていることを組織学的に明らかにした。このことから、仔 (胚) が胚発生中に側脚から酵素を分泌し、孵化後に空となった卵塊が剥離・落下しやすくすることで、オス親が次の繁殖サイクルへとスムーズに移行できるようにする、つまり、「胚がオス親の繁殖適応度を高めるのではないか」という安藤 (1991, 1999) により提唱された仮説の妥当

性を部分的に評価した。

以上のように、谷澤 (2007a) は繁殖戦略と胚発生を絡めた追究を進めてきたが、コオイムシが属する半翅目は、以下に述べるように、繁殖戦略以外においてもたいへん興味深い分類群であると言える。半翅目は不完全変態昆虫類で最も種数が多く、陸域に加えて淡水域から海水域まで幅広い環境へと適応している。形態についても、ツノゼミ類のように様々な形態をもつ種群や、アメンボ類のように水上生活に適応した形態をもつ種群、さらには水中生活に適応した形態をもつ種群など、たいへん多様性に富むグループであるが、この半翅目昆虫類における多様性獲得においては、このグループの共有派生形質である吸収型口器が、鍵要因の一つであると考えられている (Yoshizawa & Saigusa, 2003)。しかしながら、この特殊な口器形態や機能の形成過程や獲得・進化については、これまでには半翅目昆虫類の中でも派生的な種群である陸生半翅類を材料としたいくつかの断片的な研究において議論が展開されてきたに過ぎない (e.g., Snodgrass, 1935; Newcomer, 1948; Dorn & Hoffmann, 1983; Rogers *et al.*, 1997, 2002)。一方、半翅目が属する準新翅類 Paraneoptera の最ベーサル・クレードであるチャタテムシ目 Psocoptera における口器との形態比較の研究なども展開されてはきたものの (Yoshizawa & Saigusa, 2003)、半翅目昆虫における口器と一般的な昆虫がもつ咀嚼型口器との相同関係について、とくに小顎 maxilla における相同性については、いまだに結論が導かれていない。この点に関しては、研究自体が十分には進展されていない点、加えて近年の研究で対象とされているのが、半翅目昆虫類でも派生的な陸生カメムシの限られた系統のみである点も問題であるかも知れない。

昆虫類の口器は、上唇 labrum・大顎 mandible・小顎 maxilla・下唇 labium、原始的昆虫類ではこれらに下咽頭 hypopharynx も加わり構成される。さらに、一般的に、上唇は単葉からなるシンプルな形態をしているが、大顎は臼歯 molar と切歯 incisor に分化し、小顎 maxilla は小顎鬚 maxillary palp・内葉 lacinia・外葉 galea に、下唇 labium には下唇鬚 labial palp・中舌 glossa・副舌 (側舌) paraglossa が分化する (図 III-1A)。そして、原始的昆虫類における

下咽頭は *lingua* と *superlingua* に分化する。半翅目昆虫の口器においては、大顎および小顎が針状になっていることに加え、小顎板 *maxillary plate* と呼ばれる構造があり (図 III-1B)、Snodgrass (1935) の形態学的研究によると、半翅目昆虫は小顎鬚および下唇鬚を欠くとされている。しかし Dorn & Hoffmann (1983) の形態学的研究においては、小顎板が小顎鬚起源であると解釈されている。また、Rogers *et al.* (2002) は発生遺伝学的研究から、小顎刺針 *maxillary stylets* が小顎鬚に相同な構造であり、小顎板はそれとは異なる新たに獲得された構造ではないかと解釈している。これに対して、チャタテムシ目昆虫における口器の形態との比較からは、内葉が半翅目昆虫における小顎刺針に相同であることが示唆されている (Yoshizawa & Saigusa, 2003)。このように、半翅目昆虫の口器における各器官の相同性については、現在も混沌とした状況にあると言える。

また、近年の遺伝子解析による研究により、水棲半翅類が、異翅亜目 *Heteroptera* の中でもよりベーサルなグループであることが明らかになっている (Xie *et al.*, 2008)。すなわち、水棲半翅類であるコオイムシは、異翅亜目、さらには半翅目における胚発生のグラウンドプランを解明する上でも、重要な系統的位置にある分類群であると考えられる。しかし、谷澤 (2007a) の研究においては、側脚の分化・形成にのみ焦点が当てられており、側脚以外の器官に関する観察は十分ではない。また、従来より中心的に行われてきた半翅目昆虫における発生学的研究は、陸生半翅類に関するものが大多数で、そのほとんどがナガカメムシ科昆虫 *milkweed bugs* の一種 *Oncopeltus fasciatus* を用いた発生遺伝学的研究であり (e.g., Angelini *et al.*, 2005)、水棲半翅類の胚発生に関する研究は断片的なものが多く、十分ではないと言える。

以上のような背景から、本章では第 I・II 章において従来より懸念されてきた分類学的課題を明解としたコオイムシ *Appasus japonicus* とオオコオイムシ *Appasus major* の2種うち、研究室周辺での採集が容易であり、採卵・固定方法も確立されているコオイムシを材料とし、外部形態形成を中心とした胚発生全般、とくに口器形成過程については詳細な観察を

行い、比較発生的アプローチから半翅目 Hemiptera 昆虫類の進化・多様化について議論を行った。

## III-2. 材料と方法

### III-2-1. サンプルング

長野県松本市稲倉地区にて、胚発生の観察に用いたコオイムシの採集を行った。採集したコオイムシを室温下にて飼育・産卵させ、卵塊を背負ったオスを 20℃ 条件下にて飼育し、採卵した。コオイムシの餌として、コイ科魚類であるアブラハヤ *Rhynchocypris logowskii steindachneri* の稚魚や水棲巻貝類、カゲロウ類やトビケラ類の幼虫などを与えた。採卵後、卵の固定に際しては、硫酸液中で電気分解して製作した自作のエルジロイ針（ロッキーマウンテンモリタ，東京）で頑丈な卵殻 chorion を穿孔・開孔させた後に、アルコール・ブアン氏液（ピクリン酸飽和アルコール溶液：ホルマリン：酢酸＝15:5:1）、またはカルノフスキー氏液（2%パラフォルムアルデヒド + 2.5%グルタルアルデヒド）によって室温下で約 24 時間の条件での固定を行った。固定卵を 70% EtOH に置換・保存し、組織学的研究に用いた。

### III-2-2. 光学実体顕微鏡による胚外部形態の観察

固定卵の卵殻 chorion と漿膜クチクラ serosal cuticle を 70% EtOH 下で柄付き針とエルジロイ製針を用いて取り除き、コオイムシ胚を摘出した。0.01% ヘマトキシリン水溶液 Mayer's Hämalaulösung (Merck, Darmstadt) で 12 時間染色し、双眼実体顕微鏡 SMZ1500 (Nikon, 東京) 下で観察を行った。漿膜クチクラが分泌・形成された後にあたる胚反転 katatrepsis 以降のステージでは、同法での胚染色が有効でなくなるため、ブアン固定後の胚を染色なしに観察した。胚発生のステージ分けは、田中 (2001) による先行研究を参考

に、胚発生期間を全 9 ステージに区分し、さらに孵化から 1 齢幼生をステージ 10 として扱った。

### III-2-3. 走査型電子顕微鏡による胚の外部形態観察

走査型電子顕微鏡を用い、卵構造およびコオイムシ胚の外部形態を観察した。とくに、コオイムシ胚の外部形態観察では、固定卵の卵殻、漿膜クチクラ、および羊漿膜 amnio-serosal cuticle を 70% EtOH 下にて、エルジロイ針とピンセットを用いて取り除く前処理を行った。前処理を終えた試料を、EtOH 系列 [70% EtOH (30 分)、90% EtOH (30 分)、95% EtOH (30 分)、100% EtOH (30 分)] により脱水した。この後、100% EtOH:100% t-BtOH=1:1 (30 分)、100% t-BtOH (30 分) により、試料中の EtOH を徐々に t-BtOH へと置換し、さらに、40°C の恒温下にて 100% t-BtOH に浸透させた (1 時間)。t-BtOH の氷点は約 25°C であるため、4°C の冷蔵庫内で 1 時間かけて凍結処理を行った。このようにして準備した凍結試料を凍結乾燥機 VFD-21S (Vacuum Device Inc, 茨城) を用いて凍結乾燥処理した。

凍結乾燥させた試料を、両面テープにて走査型電子顕微鏡用の試料台に貼付、試料台ごと金蒸着器 FINECOAT IONSPUTTER JFC-1100 (JEOL, 東京) にて白金蒸着した。以上の処理を施した試料を、卓上走査型電子顕微鏡 TM-1000 Miniscope (日立ハイテク, 東京) 下で形態観察した。

### III-2-4. 胚の組織切片の作成・染色および観察

パラフィン切片作成の際には固定卵を n-BtOH 35 液 (100% n-BtOH:100% EtOH:DW=35:50:15) (2 時間)、n-BtOH 55 液 (100% n-BtOH:100% EtOH:DW=55:40:5) (2 時間)、n-BtOH 75 液 (100% n-BtOH: 100% EtOH=75:25) (2 時間)、100% n-BtOH ① (12 時間以上)、100% n-BtOH ② (12 時間から 3 日間) の順に浸透させ、これらの処理により組織の脱水、および n-BtOH への置換を施した。さらに、100% n-BtOH:パラフィン=1:1 (6 時間)、パラフ

イン①(6時間)、パラフィン②(2時間)、の順にパラフィン浸透・包埋処理を行った。包埋用パラフィンには PARAPLAST X-TRA (Fisher HealthCare, Houston) を使用した。回転式ミクロトーム (大和光機, 埼玉) を用いて、包埋した試料を 5.0 $\mu$ m の厚さに薄切りし、連続切片を作成した。自作の卵白グリセリンを塗布したスライドグラス上に、シリンジにより蒸留水を滴下し、この蒸留水上に連続切片を載せて、約 40°C に設定したホットプレート上で伸展させ、スライドグラスへの連続切片の貼付を行った。この後、Tojo & Machida (1997, 1998, 2003), Sekiné & Tojo (2010) に従いヘマトキシリン-エオジン-ファストグリーンによる三重染色を施した。各染色における濃度や時間に関しては以下に記す。

#### ヘマトキシリン-エオジン-ファストグリーン三重染色

キシレン (10分)、キシレン (10分) により脱パラフィンした後、100% EtOH (2分)、90% EtOH (2分)、70% EtOH (2分)、50% EtOH (2分)、DW (2分) にて加水し、1%ヘマトキシリン水溶液 Mayer's Hämalunlösung (Merck, Darmstadt) (20分) にて染色した。この後、TW (30分)、DW (1分) で水洗し、1% エオジン Y (Eosin Yellowish; Nacalai, 京都) (5分) 染色後、70% EtOH (2分)、90% EtOH (2分)、100% EtOH (2分) で脱水し、0.01% ファストグリーン FCF EtOH 溶液 FastGreen FCF (東京化成工業, 東京) (3分) にて染色した。この後、100% EtOH (数秒) にて洗浄し、クレオソート・キシレン (2分)、キシレン (2分)、キシレン (2分) の順に透徹した後、カナダバルサム (ナカライテスク, 京都) を用いてプレパラート封入した。

樹脂切片作成の際には、固定卵を 70% EtOH (30分)、80% EtOH (30分)、90% EtOH (30分)、100% EtOH ① (2時間)、100% EtOH ② (2時間)、100% EtOH:アセトン= 1:1 (2時間)、アセトン (3時間) の処理により、組織の脱水およびアセトンへの置換を施した。さらに、アセトン : 樹脂 = 1 : 1 (5時間)、樹脂① (2日間)、樹脂② (6時間)、冷蔵庫内 (4°C、3日間)、

室温 (12 時間) によって樹脂浸透・包埋処理を行った。包埋用樹脂には水溶性の Technovit 7100 (Kulzer, Frankfurt) を使用した。樹脂包埋した試料を回転式マイクローム HM325 (Zeiss, Oberkochen) を用いて、3.0 $\mu$ m の厚さの連続切片を作成した。卵白グリセリンを塗布したスライドガラス上に、シリンジにより蒸留水を滴下し、この蒸留水上に連続切片を載せて約 90°C のホットプレート上で伸展させ、連続切片をスライドガラスに貼付した。この後、ヘマトキシリン-エオジン-ファストグリーンの三重染色を施した。各染色における濃度や時間に関しては以下に記す。

#### ヘマトキシリン-エオジン-ファストグリーン三重染色

10%ヘマトキシリン水溶液 Mayer's Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt) (12 時間) にて染色した。この後、TW (8 時間)、DW (1 分) で水洗し、1% エオジン Y (Eosin Yellowish; Nacalai, 京都) (2 時間) 染色後、TW (1 分)、DW (1 分) で水洗し、90°C のプレートホットプレート上で乾燥・再貼付し、0.01 % ファストグリーン FCF EtOH 溶液 FastGreen FCF (東京化成工業, 東京) (2 時間) にて染色した。この後、100% EtOH ① (2 分)、100% EtOH ② (数秒) にて洗浄し、クレオソート・キシレン (2 分)、キシレン (2 分)、キシレン (2 分)、の順に透徹した後、カナダバルサムにてプレパラート封入した。

#### III-2-5. DAPI 染色法

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 染色による観察の際には、カルノフスキー氏液によって固定した卵試料を用いた。DAPI 染色を行う際には、予め固定卵の卵殻を 70% EtOH 下にて、自作のエルジロイ針を用いて除去し、0.1% DAPI/PBS 溶液に置換した。その後、約 4°C の条件下で約 12 時間静置し、卵に 0.1% DAPI/PBS 溶液を浸透させた。DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) は DNA に特異的に強く結合する蛍光色素で、紫外線照射時に青白く発光するため、染色後の卵の観察には蛍光顕微鏡 MZ 10F (ライカマイクロシステム

ムズ, 東京) を用い、紫外線照射下での観察を行った。

### III-3. 結果

#### III-3-1. コオイムシの胚発生

##### III-3-1-a. コオイムシの卵形態

産卵直後における卵の大きさは、長径約 1.8mm、短径約 0.8mm の回転楕円体で、前極側が茶色に着色し、その他の部分は乳白色をしている (図 III-2A, B)。卵門開口部 micropylar opening は卵前極付近の 1 か所におよそ 5 個あり、各開口部の長径は 5 $\mu$ m 程度である (図 III-2C, D)。また、卵殻にはエアロパイル aeropyle 構造が散在し、各エアロパイルにおける孔所の長径は 2 $\mu$ m 程度である (図 III-2C, E)。さらに、卵後極付近 (卵の背面) にはハイドロパイル hydropyle と称される構造があり (図 III-2B)、この部分は水分を卵内外へ出し入れする機能を担っていることから、他の領域における卵殻表面とは全く異なる構造をしている (図 III-2F, G)。田中 (2001) による報告と同様、卵サイズはステージ 7 の胚反転 katatrepsis 期から増大する傾向がみられ、最終的な卵サイズは長径約 2.4mm、短径約 1.0mm となり、長径で約 130%、短径で約 120%ほど長くなることが観察された。

##### III-3-1-b. コオイムシの胚発生ステージ

コオイムシの卵期は 20 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C 条件下で約 20 日間であった。コオイムシのメスは、交尾後にまず 2-3 卵をオスの背部に産みつける。この際、最初に卵を産みつける場所はおおよそ決まっており、オスの腹部の中心よりやや後方に産卵される。2-3 卵を産卵すると再び交尾を行い、さらに産卵をつづける。後から産下される卵は、最初に産下された卵を中心に、同心円状に配置されることで卵塊が形成される。また、オスは複数個体のメスと交尾を行い、20-100 の卵を背負うため、背負う卵数が多い場合は前胸部にまで卵塊が達する場

合もある。

田中 (2001) によるコオイムシにおける胚発生のステージ分けを基に、本研究では、胚発生期を全9ステージに分け [ステージ 1: 成熟 (減数) 分裂および受精、ステージ 2: 卵割、ステージ 3: 胚盤葉形成、ステージ 4: 胚帯形成-胚帯伸長および付属肢原基形成、ステージ 5: 付属肢原基の伸長・分節化および腹部節の分節化、ステージ 6: 腹部幅の増大と腹部長の短縮、および胸部付属肢の屈曲、ステージ 7: 胚の姿勢転換 (胚反転)、ステージ 8: 胚の急激な成長と複眼の着色および背部閉鎖、ステージ 9: 胸部付属肢のさらなる伸長]、孵化後の1齢幼生をステージ 10 とした。なお、本研究では、口器形成を中心とした形態形成を重視しており、胚原基が形成されるステージ 4 以降について、とくに詳しく観察した。

#### ステージ 1-2: 成熟分裂および受精、卵割

本研究においては初期胚発生についての詳細な観察を行うことはできなかったが、コオイムシにおける卵割は、一般的な昆虫類と同様、典型的な表割型卵割 superficial egg cleavage type であることが確認された (図 III-3A, A')。

#### ステージ 3: 胚盤葉形成 (図 III-3)

DAPI 染色卵の蛍光顕微鏡による観察において、いくつかの卵割核 cleavage nuclei が卵表に到達した後も (図 III-3A, A')、ひきつづき卵表域でこれらが分裂する様子が確認された (図 III-3B, B')。最初に卵表へ到達する核の数は疎らで少ないものの、徐々に卵表の核数が増え、やがて卵表全体を卵割核が覆うようになり、これらの核の間に細胞性の膜 (*i.e.*, 細胞膜) が分化することで胚盤葉 blastoderm (*i.e.*, 細胞性胚盤葉 cellular blastoderm) が形成される。つづくステージ 4 では、胚盤葉を構成する細胞が胚域 embryonic area と胚外域 extra embryonic area (*i.e.*, 漿膜 serosa) とに分化し、このうちの胚域細胞が集合することで胚原基 germ disc、つづいて胚帯 germ band が形成される。コオイムシでは、卵後極付近に胚帯が

形成される (図 III-3C)。

#### ステージ 4: 胚原基の形成-胚帯形成期 (図 III-4)

初期の胚帯は、原頭域 protocephalon が卵背面の後極寄りに形成され、その後方 (後極付近) に原胴域 protocorm がつづく (図 III-4A)。原頭域はハート形を呈しており、原胴域との境界部分はややくびれる (図 III-4A)。原胴域は卵後極頂点付近に形成される。卵後極周辺に原胴域には羊漿膜褶 amnio-serosal fold が観察される (図 III-4A)。

さらに発生が進行すると、胚は全体的に胚の後方へと後退する方向に移動し、原頭域の位置は徐々に卵後極側へと向かうとともに、卵後極を経て卵腹面にまで達していた胚の原胴域末端は卵前極側へと向かい、卵腹面の中央 (赤道面) あたりまで達する (図 III-4B)。

この頃から原胴域は卵前極に向かってより細長く伸長しはじめ、原頭葉 head lobe - 顎部 gnathal parts、胸部、腹部の 3 領域が区別できるようになる。胚縁より伸長する羊漿膜褶は胚の腹面で完全に閉じられ、羊膜腔 amniotic cavity が完成する。この結果として、全卵表が漿膜 serosa (漿膜細胞 serosal cells) で覆われることとなる。また、この時期の腹部の幅は胸部のおよそ 3 分の 1 程度である (図 III-4B)。

さらに発生が進むと、原頭域の位置は卵の後極方向へと移動し、胚反転 katatrepsis がはじまるまで胚はこの位置にとどまる (図 III-4D)。原胴域は卵の前極へ向かって細長く伸長していき、腹部予定域の末端は卵前極付近まで到達する (図 III-4C, D)。この時期に胚腹部の末端は、卵黄内へと潜り込むことが認められた。

またこの時期には、左右一対の双山型を呈する上唇原基、およびそれぞれ一対の触角・顎部 (大顎、小顎、下唇)・胸部付属肢の原基が形成されはじめる (図 III-4B, 22A)。各付属肢原基は、触角原基が最も小さく、つづいて大顎原基、小顎原基、下唇原基の順に大きくなっており、胸部付属肢原基が最も大きい (図 III-4C)。胸部第 1-3 付属肢原基は、ほぼ同程度の大きさであった (図 III-4D)。

また、このステージには双山型の上唇原基の下側（体軸に対して後方）に口陥 stomodaeum が形成され（図 III-4C, 22A）、一方、細長く伸長した腹部後端には、肛門陥 proctodaeum が形成されはじめる（図 III-24A）。

#### ステージ 5: 付属肢原基の伸長・分節化および腹部節の分節化 (図 III-5)

このステージの胚では、腹部にも分節化が進行する（図 III-5A, B）。腹部の分節化は前方の体節から後方の体節へと徐々に進行していく。同時に、これも頭部から腹部へと、胚の前方から後方へと向かうように神経節隆起 ganglionic swelling の形成が進行する。これに伴い、胚腹面の正中線上には神経溝 neural groove が明瞭に観察できるようになる（図 III-5A'）。このステージの顎部および胸部体節には、神経節隆起がより明瞭に観察することができるが、腹部における神経節隆起は明瞭ではなく、神経溝も腹部の後方体節になるほど不明瞭となる（図 III-5A, B）。腹部体節の分節化がはじまると、まもなく腹部第 1 節には側脚 pleuropodium が形成される（図 III-5A, 23A, 25A）。胸部付属肢が神経隆起よりも外側の位置に分化するのと同様に、側脚も神経隆起より外側に形成される。本ステージにおいて腹部の分節化が完了し、最終的に全 11 節の腹部体節が認められる。胸部付属肢は背側方へと伸長しはじめ、基肢節 coxopodite と端肢節 telopodite の 2 節に分節化する。この後のステージで端肢節はさらに細かく分節化が進むことになるが、このステージ（胸部付属肢に基肢節一端肢節が分化するステージ）においては、触角において分節化は認められるものの、小顎および下唇に分節化は認められない。また、大顎については、他の昆虫類と同様に、これ以降ステージが進行しても分節化は認められない。

前ステージ（ステージ 4）にて卵表を覆った漿膜細胞がクチクラを分泌するため、このステージにおいては漿膜クチクラ serosal cuticle が胚および卵黄塊全体を包み込む。漿膜クチクラはこの後、孵化に至るまでの以降の全胚発生ステージにおいて卵表に認められる。

#### ステージ 6: 腹部幅の増大と腹部長の短縮、および胸部付属肢の屈曲 (図 III-6, 7)

前ステージ (ステージ 5) での腹部分節化が完了した後、徐々に腹部の幅が増大し、前後軸方向に対する腹部長は短縮していく (図 III-6A, B)。さらに腹部第 1-8 節には、一对の腹隆起 abdominal swelling が観察されるようになり、それに少し遅れて側脚は胚体の内部へと陥没していく (図 III-6B)。腹隆起が顕著に観察されるようになるのは、腹部における神経隆起および背板 tergum が明瞭に分化することに起因している。腹部第 2-8 節における腹隆起は、側脚の位置にほぼ並んで形成されるが、腹部第 1 節の腹隆起は側脚の外側に観察されるため、2-8 節の腹隆起の位置より外側に観察される。さらに、各節の腹隆起が発達すると、神経隆起と腹隆起の間には腹板 sternum の形成が始まる (図 III-6A, B)。この頃、腹部第 1-8 節における腹隆起の前方、神経隆起よりの位置には気門 spiracle が形成される (図 III-6A, 23A)。腹部幅の増大と腹部長の短縮が進むにつれて、腹隆起がさらに発達して明瞭となる一方、腹部第 10 節および 11 節に関しては、腹部の短縮に伴い節の境界が徐々に不明瞭となっていくことが観察された。コオイムシ類における気門は、腹部に形成されるほか、中胸および後胸でも形成されるが (Miller, 1961; Parsons, 1972)、本研究では胸部気門の形成過程を追究することはできなかった。

本ステージでは小顎と下唇が側方へ伸長し、基肢節 coxopodite と端肢節 telopodite に相当する分節化が生じる (図 III-14A, 20G)。その後、まもなくして下唇の端肢節域が細分節化して 3 節となり (図 III-14C)、これまで胚の外側へと伸長していた下唇および胸部付属肢は本ステージでは徐々に内側に屈曲しはじめる (図 III-7A-C)。胸部付属肢の屈曲と同時期に、3 対の胸部付属肢は、それまで基肢節と端肢節の 2 分節であった付属肢が、基肢節には亜基節 subcoxa と基節 coxa が分節し、端肢節では転節 trochanter、腿節 femur、脛節 tibia、跗節 tarsus、前跗節 pretarsus が分節化して、合計で 8 節となる (図 III-7A)。第 3、第 2、第 1 胸節の順に胸部付属肢の屈曲が完了する頃、これらの胸部付属肢が腹部腹面を覆うようになり、胚外部からの腹部腹面観察は難しくなる。

#### ステージ 7: 胚の姿勢転換 (図 III-8)

下唇および胸部付属肢が内側に (胚腹面の正中線方向へと) 折りたたまれると、左右の下唇は正中線上で接するようになり、下唇の端肢節域がさらに細分節化して 4 節となる (図 III-15A, B, 20J, K)。やがて羊漿膜摺の解消が生じ、この結果として胚反転 *katatrepsis* が開始される (図 III-8A-C, 9A, B)。この胚反転により、胚は一時的な背部閉鎖 *provisional dorsal closure* を済ませたこととなる。胚反転の初期には、若干の着色により複眼の分化が認められる。また、コオイムシにおいては、胚反転と並行して胚が卵長軸を中心に 180°向きを変える回転運動 *rotation* が生じる (図 III-8A-C, 9A, B)。回転運動は胚反転直後に開始され、胚反転終了後に完了する。また、この胚の回転運動は、観察した約 20 個の胚では例外なく卵前極からみて時計回りであった。また胚反転の際には、さらに著しく腹部長が短縮し、腹部第 9-11 節が極端に密着した状態となる (図 III-23E)。このため、胚反転後には、見かけ上、9-11 腹部体節が 1 体節のように観察されることとなる。

胚反転と胚の回転により胚は姿勢転換し、より卵の背面後方に位置していた胚頭部が時計回りに卵腹面の赤道面付近へと移動し、もともとは卵の腹部赤道面あたりに位置していた胚の腹部末端部が卵の後極付近に達すると、胚反転は完了する。この胚反転により、接近していた左右の各胸部付属肢は一旦両側方向へと離れるため、再び腹部腹面が観察しやすくなる。また、胚反転が終わると、胚は卵黄を背負って背中を丸くしたような姿勢となる。このとき、腹隆起は腹部の両側端に沿って位置するようになり、背板は胚縁から卵背面の正中線に向かって卵黄を取り囲むように伸長しはじめる。すなわち真の背部閉鎖 *definitive dorsal closure* の開始となる。

#### ステージ 8: 胚の急激な伸長と複眼の着色および背部閉鎖 (図 III-9)

ステージ 7 の終盤に胚反転が完了すると、胚の背板縁の伸長を伴う、真の背部閉鎖 *definitive dorsal closure* がはじまり、本ステージにおいて背板の伸長による背部閉鎖が進行

する。真の背部閉鎖は腹部後方から前方へ向かい、そして胸部へと、胚のより後方から前方へと向かい進行する。並行して胚は伸長をつづけ、頭部は徐々に卵前極側へと移動していく (図 III-9A, B)。同時に、胸部付属肢も伸長して、再び左右の付属肢が腹部腹面の正中線上に接近し、腹部腹面を覆う。さらに、各胸部付属肢の前附節は爪 *craw* へと分化しはじめ、第3胸節の付属肢は上下に重なるようにして伸長を続ける (図 III-9B')。この頃、胚の両側端の腹側に沿って観察されていた腹隆起は徐々に偏平となる (図 III-9A, B)。また、本ステージでは、小顎端肢節が大顎および小顎基肢節を覆い、小顎板 *maxillary plate* と呼ばれる構造となる (図 III-16A-C, 21A, B, C)。さらに、本ステージでは側脚から酵素が分泌される。

腹部の背部閉鎖が完了すると、次に胸部の背部閉鎖が開始されるが、この段階では前胸部背面に卵黄が残存する。残存する卵黄を取り囲むように進行する背部閉鎖により、頭胸部の背方には二次背器 *secondary dorsal organ* (起源としてはクチクラ分泌の機能を終えて退縮する漿膜の集合体) が顕著となる (図 III-9B)。背部閉鎖が完了する頃、頭部はさらに前極へと移動し、それまで卵黄を背負い、背を丸めたような格好をしていた胚の姿勢は、背筋を伸ばしたようになる。複眼の着色はさらに濃くなる。

#### ステージ 9: 胚サイズのさらなる増大 (図 III-10)

背部閉鎖の完了に伴い、本ステージでは二次背器が胚内 (将来的には消化管内) に取り込まれることにより外部からは観察されなくなる。また、小顎板が下唇第1節 (基肢節) の基部から上を隙間なく覆い、頭楯との隙間もなくなる (図 III-17, 21D)。胚はさらに伸長し、複眼の着色域もさらに広がる (図 III-10A)。胸部付属肢もさらに伸長し、とくに第3胸節の付属肢 (後脚) の腿節および脛節が著しく伸長し、この脛節は後極付近で屈曲し、胚側面に沿って附節および前附節が前極方向へと伸長する (図 III-10A)。この頃になると胚の幅も増大しはじめ、徐々に1齢幼虫の形態へと近づく。多くの昆虫類で孵化の際に卵殻を卵内

から破断するための構造としてその分化が知られている卵歯 egg teeth に関しては、その形成そのものが確認されなかった。

胸部付属肢 (前-後脚) も含めた全身がやや褐色を帯び、爪にも着色が生じる。赤く着色していた複眼は黒化し、卵殻の外からでも明瞭に複眼を確認できるようになる (図 III-10B)。また、体表の細かな毛状構造も明瞭となる (図 III-10B)。これらの過程を経て、本ステージ末には 1 齢幼虫の形態にまで発達する。

#### ステージ 10 : 1 齢幼虫 (図 III-11)

早く産下された卵から順に、オスの背において卵塊が付着されたままの状態では孵化がはじまる。まず、卵前極付近の卵殻が、背部の一部を除いて卵前後軸に対する水平方向に裂開し、1 齢幼虫の頭部が徐々に出てくる。さらに胸部付属肢全脚の基半分ほどが卵外へ出てくると、幼虫は体を反らせて胸部付属肢を左右に広げるような姿勢となり、その後、体を腹方へと屈倒する。幼虫はその姿勢のまま静止し、オス親が水中に潜り、孵化を促すことで、胚は全身を抜け出し、孵化が完了する。この際、胚クチクラは卵殻内に残る。

孵化後間もなく、収縮していた 1 齢幼虫のクチクラは拡張し体サイズが大きくなる。孵化直後の 1 齢幼虫は、薄黄色の体色で、複眼は赤黒色である。また、中腸には背部閉鎖により包み込んだ卵黄が詰まっており、緑色に観察される。この後、孵化から数分が経過すると、体表クチクラが硬化し、体色は薄茶色へと変化するが、薄黄色部分も斑点のように残存する。

胸部体節では前胸が最も大きく、後胸が最も小さい (図 III-11A)。腹部においては、ステージ 5 において体節分化が生じるが、徐々に節長が狭くなるステージ 8 以降、腹部第 1 節は背側からしか観察することができなくなる。このステージ以降は、腹部第 9-11 節の境界も不明瞭となるため、腹側からは、見かけ上、8 腹節しかないように観察される (図 III-11B, 23B, C, D, E)。コオイムシ類における腹部体節の気門は、腹部第 1-2 節においては胸部体節

との溝の深い位置に開口部があるため外部からは観察できないが、腹部第 3-8 節の気門は露出しているため開口部を確認することができる (図 III-11B)。

### III-3-2. コオイムシの口器形成

ステージ 4 で胚帯が形成されると、ひきつづいて胚帯の前方より体節化が生じる。頭部では触角体節 antennal segment、間挿体節 intercalary segment、大顎体節 mandibular segment、小顎体節 maxillary segment、および下唇体節 labial segment がそれぞれ分節化し、このうちいくつかの体節においては付属肢の分化も生じ、触角原基 antennal rudiment、大顎原基 mandibular rudiment、小顎原基 maxillary rudiment、および下唇原基 labial rudiment が形成される (図 III-12A-C, 20A-C)。触角よりも前方においては頭楯上唇原基 clypeolabral rudiment の分化が認められるが、この構造の付属肢性や分化する体節については、外部形態の観察上、明確ではない。触角体節より前方における体節性は明確ではなく、付属肢に相同な構造の分化が認められない間挿体節に関してもその境界はやや不明瞭である。形成初期の頭楯上唇原基は左右一对の双山型の構造で、ステージ 4 の後半に腹面正中線上に神経溝が観察されるようになると、頭楯上唇原基の後方に口陥 stomodaeum が形成される (図 III-12C, 22A)。

その後、ステージ 5 では頭楯上唇原基が体軸に対して後方へと伸長しながら口陥を覆っていき、双山型の形状をしていたものが、やがて一つの大きな塊状となった頭楯上唇原基へと変化する (図 III-13A-C, 22A-C)。さらに発生が進行すると、胸部付属肢の分節にやや遅れて触角原基が伸長しながら基肢節 coxopodite と端肢節 telopodite との 2 節に分節する (図 III-13C, 20F)。この時期には複眼原基が形成され、また、頭部には特徴的な一对の小隆起 small swelling 構造が観察されるようになる (図 III-13C, 22D)。

さらに発生が進行し、小顎と下唇が側方へ伸長するステージ 6 になると、これらの原基もほぼ同時に基肢節 coxopodite と端肢節 telopodite に相当する分節化が生じる (図 III-14A,

20G)。また、前ステージで観察された頭部における一对の小突起は消失する (図 III-14A, 22E)。このステージに、頭楯上唇は触角体節域を通り越えて大顎体節の領域に至るまでに伸長するため、間挿体節は外部から観察できなくなる (図 III-14B)。触角も同様に大顎体節にまでに伸長する。この結果、大顎は触角と頭楯上唇の間に位置することになる (図 III-14B, 20H)。この頃、下唇の端肢節域が細分節化し、3 節となる。また、大顎体節、小顎体節、下唇体節が圧縮されるような形となり、各体節の神経隆起が癒合していく。さらに発生が進行すると、胸部付属肢に先立ち、下唇が内側 (正中線側) に折りたたまれる (図 III-14C)。

ステージ 7 では、左右の下唇は胚腹面の正中線上で接するようになり、下唇の端肢節域がさらに細分節化して 4 節となる (図 III-15A, B, 20J, K)。頭楯上唇は先端が尖りはじめ、基部側の頭楯 clypeus 部および先端側の上唇 labrum 部への分化がはじまり、上唇はより後方へ伸長していく (図 III-15A-C)。さらに発生が進行すると、外部からの観察では小顎の端肢節が基肢節から分離したように観察されるが (図 III-15C, 20L)、切片による観察では、大顎および小顎が頭部の内部 (頭蓋内) に落ち込むように伸長し、内部では小顎基肢節および端肢節が連続していることが確認される (図 III-24B)。ステージ 7 の最後には、互いに接近した左右の下唇は、先端が尖るように鋭くなり、基部から先端部までの各 4 節全てが正中線上で接触するようになる (図 III-15C, 20L)。

つづくステージ 8 では、小顎端肢節が大顎および小顎基肢節を覆い、小顎板 maxillary plate と呼ばれる構造となる (図 III-16A-C, 21A, B, C)。このため、これ以降は外部から大顎、小顎基肢節および頭蓋内部での小顎端肢節 (小顎板) の発生を追うことはできない。半翅目昆虫における大顎および小顎は鋭く細長い針状の構造を呈しており、それぞれ大顎刺針 mandibular stylets、小顎刺針 maxillary stylets と呼ばれる。頭蓋内部では大顎および小顎基肢節が伸長し、大顎刺針と小顎刺針に分化することが予想される。このステージでは、上唇が細長く伸長し、下唇第 2 節部あたりまで達する (図 III-16A)。また、左右の下唇腹面は互いに癒合しはじめ、下唇背面の正中線上には細溝が形成される。この細溝は孵化後も維持

され、1 齢幼虫以降に管状になった上唇、さらに、その上唇が形成する管内に収まっている大顎刺針および小顎刺針を収納する鞘状構造となる。下唇第 1 節 (基肢節) には、上唇が貫通するための溝が形成される。また、左右の下唇第 3 節にはそれぞれ小片 *intercalary sclerites* が形成される (図 III-16B)。

ステージ 9 では、小顎板が下唇第 1 節 (基肢節) の基部から上を隙間なく覆い、頭楯との隙間もなくなる (図 III-17, 21D)。さらに、下唇第 4 節および下唇第 3 節に形成される小片がさらに鋭くなり、コオイムシにおける口器形成はほぼ完了する (図 III-17, 21D)。また、触角は頭部腹面に形成されるため、頭部の背部閉鎖と同時に頭部腹面に隠れるようになり、先端部が観察されるのみとなる (図 III-17, 21D)。

孵化した 1 齢幼虫 (ステージ 10) における口吻は、成虫の口吻と基本的には同じ形態をしている (図 III-18A, B)。頭楯から細長く伸びた上唇は管状構造となり、その内部を大顎および小顎が貫通する。下唇第 1 節には上唇を受ける溝があり、下唇第 2 節からは上唇先端部、大顎刺針および小顎刺針を包む鞘構造となっている (図 III-18A, 21E)。下唇第 3 節からは小片が分化し、最先端部となる下唇第 4 節の基部を覆う構造となる (図 III-18B, 22F)。下唇第 4 節の先端は鋭くなっており、その先端には大顎刺針および小顎刺針を出し入れする小さな穴が認められる。

### III-4. 考察

#### III-4-1. 胚運動 *blastokinesis*

昆虫類の胚発生においては、胚発生期間中に胚反転 *katatrepsis* や回転 *rotation* といった「胚運動 *blastokinesis*」がしばしば観察されてきた。胚反転については、多くの場合、胚体が卵の前後軸に対して 180°の転換をする極めてダイナミックな運動だけに、この「反転」そのものが注目されがちではあるものの、その第一義的意味は (1) 反転前の胚陥入 *anatrepsis*

期における羊漿膜摺 *amnio-serosal fold* の形成、および (2) 全卵表を漿膜細胞 *serosal cells* が覆うこと、そしてこのことを受けて、(3) 全卵表における漿膜クチクラ *serosal cuticle* 分泌、といった一連の発生システムを遂げた後に、(4) 機能を終えた羊漿膜摺が裂開・解消することに伴う付随的運動にすぎず、羊漿膜摺の起点となる胚の頭頂域が羊漿膜退縮の際に卵前極方向へ引き寄せられる結果として、二次的に胚の姿勢が変化するものであると考えられている (Dorn, 1976; Tojo & Machida, 1997; Machida & Ando, 1998; Lamer & Dorn, 2001; Machida *et al.*, 2002)。胚反転に関しては、本研究においても、羊漿膜摺の起点となっている頭頂域が卵前極方向へ引っ張られるように移動していき、それに付随するように胸部および腹部が位置を変えていくことが観察されている (図 III-8A-C, 22A,B)。すなわち、本研究においても、コオイムシの胚反転時の姿勢転換は羊漿膜摺解消に伴う付随的運動であると考えられる。一方、胚反転と並行して生じる回転運動については、(1) 解消される羊漿膜に引き寄せられることで付随的に姿勢転換する反転運動と、この羊漿膜摺の解消により、(2) 卵表に対する胚の位置を固定する構造的制限がなくなったことで自由な回転が可能となる、といったこれら2つの要素が連動した運動であると考えられる。このような回転運動は、卵が何らかの基質に産下されることにより、基質の性質上、ある方向には物理的に孵化できない、つまり特定の方向へ孵化しなければならないといった種群においては、孵化方向の決定と共に、選択圧のかかるシステムが働いているものと考えられる。その例として、半翅目のアメンボ科昆虫やマツモムシ科昆虫などでは胚反転後に回転運動が生じ、最も適した方向へ孵化をするような方向性の調節が進化してきた可能性が示唆されている (Cobben, 1968)。また、同じく半翅目カメムシ科のミナミアオカメムシ *Nezara viridula* においては、産下された卵塊のうち最も外側に位置する卵が、卵塊の内側に腹面を向けるように背腹軸が調節されることで、孵化後の1齢幼虫が中心を向くように集合でき、空となった卵塊上に集団を形成しやすくなることも報告されている (Lockwood & Story, 1986)。コオイムシにおいては、Cobben (1968) によって回転運動が行われている可能性が

示唆されていたものの、実際に回転運動が生じることを報告した研究は皆無であった。しかしながら、本研究におけるコオイムシの胚発生の観察からは、ステージ7からステージ8にかけての胚反転と並行して、確かに回転運動が生じていることが確認された。

Smith (1976a) は、コオイムシ亜科昆虫における孵化の際、1 齢幼虫は例外なくオス親の後方へ向かう方向で孵化をすることを報告しており、これは孵化直後にオス親に捕食されないための適応的な意義があるとしている。本研究において、コオイムシの回転運動が明らかとなったが、このことは Smith (1976a) が示唆するようにコオイムシにおける回転運動がオス親に捕食されないための適応とも考えられる。仮に、孵化方向がオス親前方に向くようなことが生じた場合に、卵塊から孵化した 1 齢幼虫をオス親が積極的に捕食することがあるのかどうかについては疑問も残る。今後、コオイムシが背負う卵塊の方向性を人為的に 180°回転させて背負わせてみるなどの実験的な検証を試みることで、より深い議論が可能となるだろう。

#### III-4-2. 腹部形態形成

コオイムシにおける腹部形態形成は、ステージ4において胚帯が形成された後、腹部予定域が伸長することで開始される。昆虫における胚帯形成パターンとしては、(1) 胚帯形成初期には小さな原頭葉しか形成されず、胚発生が進行するにつれて胚帯後方の伸長、そして体節形成帯 segment forming zone の分化により顎部体節以降が順次に形成されていく「短胚 short germ」型、および (2) 初期段階から長大な初期胚帯が形成され、胚帯そのものはその後の伸長は生じず、初期からの長大な胚帯において体節化が生じる「長胚 long germ」型、そして (3) 前述の二型 (短胚型と長胚型) の中間型で、初期胚帯が原頭葉と顎胸部からなり、胚発生が進行するにつれて伸長する増殖域から腹部が形成される「半長胚 semi-long germ」型の3タイプに区分される (安藤, 1991)。この安藤 (1991) による胚運動のタイプ区分と、本研究で観察した結果から、コオイムシは半長胚型の胚帯形成タイプで

あると言える。ステージ4で腹部が伸長した後、ステージ5では、胸部の分節化にやや遅れて腹部の分節化が始まる (図 III-5A', B')。これはナガカメムシ科の一種 *Oncopeltus fasciatus* における腹部形成様式と類似する (Butt, 1949)。ステージ6では腹部体節は11節に分節化するが (図 III-6A')、ステージ7の急激な腹部長の短縮により、腹部第9-11節が極端に密着した状態になるほか、腹部第1節は徐々に前後軸方向の幅が狭くなり、胸部第3節の腹板の腹板内側に入り込むことによって隠れてしまうため、背面からしか観察されなくなる。ナガカメムシ科の一種 *Oncopeltus fasciatus* においてはこのような腹部形態形成の報告はないが、一般的にカメムシ類における腹部第1節を外腹面から観察することはできないとされており (Miller, 1961; Parsons, 1972; 安永ら, 1993)、また、半翅目が属する準新翅類における最ベーサル・クレードであるチャタテムシ目においても、同様に腹部第1節は背面からしか確認できないと報告されていることから (Yoshizawa, 2005)、コオイムシの腹部形態は準新翅類に共有される基本プランであり、準新翅類における腹部体制のグラウンドプランを考える上でも重要な知見となることが考えられる。今後、このような腹部形成様式がどの段階でどのように獲得されたのか、その進化プロセスをさらに詳細に追究していく必要があるだろう。

昆虫類が属する節足動物 Arthropoda は、同規的な「体節」構造を繰り返し有する (連続して有する) ことを基本とし、その体節性の基本プランを土台としながら、いくつかの体節が合体節化 tagmosis し、これらの体節群 compartments が機能分化しながら、異規的体制化・多様化を成し遂げたと理解されるのが大きな特徴である (Snodgrass, 1939; 東城, 1999)。すなわち、節足動物の体制における基本プランの理解において「体節制」を理解することは極めて重要視される。その「体節」を定義づけるクライテリアの一つには、一对の神経節 ganglion を有すること、一对の体腔 coleom を有することと共に、一对の付属肢 appendage を有することが挙げられる (Snodgrass, 1935; Tojo & Machida, 1997)。一般に、多くの昆虫類の腹部に付属肢は発達しないが、例外的に原始的種群 (e.g., 無翅昆虫類 Apterygota) には

全個体発生ステージ (*i.e.*, 胚期、幼生期、成虫期) に渡り腹部付属肢が残存、そして機能しているほか、より派生的であるとされる有翅昆虫類 Pterygota においても幼生・幼虫ステージにのみ腹部付属肢分化が認められる種群も少なくない [*e.g.*, シリアゲムシ類 Mecoptera (*e.g.*, Suzuki & Ando, 1981)、ハバチ類 Symphyta (*e.g.*, Yamamoto *et al.*, 2004; Oka *et al.*, 2010; Yoshiyama *et al.*, 2013)、トビケラ類 Trichoptera (*e.g.*, Kobayashi & Ando, 1990)、鱗翅類 Lepidoptera (*e.g.*, Tomita & Kikuchi, 2009)]。

ほとんどの昆虫類において、腹部は 10 体節以上であることが知られているが、腹部第 10 節以降の境界は不明瞭になることが多い (Snodgrass, 1935)。完全変態類の幼虫においては腹部第 10 節以降も識別が可能であるものの、不完全変態類の幼虫・成虫形態においては、腹部末端領域の体節制を確認することは困難であることが多い。コオイムシにおいても、胚発生が完了して孵化した後は腹部第 1 節が観察し難くなり、腹部第 9-11 節の境界も不明瞭となることから、孵化後の外部形態からの体節制の理解は困難である。しかしながら、胚発生を詳細に観察することにより、腹部 1-11 体節を確認することが可能であり、その発生過程も詳細に追うことが可能であることが、本研究において明らかとなった。

さらに、昆虫類の中には、胚発生期間中にのみ腹部付属肢が形成される種群も多く知られる。コオイムシの胚発生においては、ステージ 6 に腹部第 1-8 節で一对の腹隆起 abdominal swelling が分化し、このうち腹部第 1 節における腹隆起のやや正中線寄りの位置には一对の側脚 pleuropodium が形成される。側脚は、他の昆虫においても観察されている付属肢由来の器官であり (*e.g.*, Strauss & Lakes-Harlan, 2006; Viscuso & Sottile, 2008)、コオイムシにおいてはステージ 5 に付属肢原基的に膨出する構造として分化するが、ステージ 6 で胚体内へ陥入 (陥没) し、腺状構造を呈するようになる (図 III-6B', 25B)。この後、側脚からは酵素が分泌される。バッタ類などにおいても腺状構造を呈する側脚から孵化酵素 (孵化の際、卵殻を特異的に分解する働きをする) を分泌することが報告されており (Slifer, 1937, 1938)、コオイムシ類においては、酵素の機能がオスの背に卵塊を固着させる固着物質の固

着力を低下させる機能をもつ可能性が示唆されている (谷澤, 2007a, b)。

また、本研究においては、腹部第 1-8 節において気門の形成が認められた。気門については、一般的に、付属肢の基節 coxa よりもさらに基部側、とくに亜基節 subcoxa 部分に分化する器官であるとされている (e.g., Suzuki, 1990; Masumoto & Machida, 2005; Uchifune & Machida, 2005; Komatsu & Kobayashi, 2012; Kobayashi *et al.*, 2013)。このことから、腹部第 1-8 節における腹隆起 (腹部第 1 節においては、側脚のやや外側にみられる隆起状構造) は亜基節域に相当し、腹部第 1 節における側脚が陥没する箇所は基節域に相当すると考えられる。また、これらの腹隆起は胸部付属肢と同じく、神経隆起の外側に分化する。腹部第 1 節における腹隆起のみ、腹部第 2 節以降の腹隆起と比較するとやや外側に外れているように観察されるが、これは側脚の陥入が生じた結果、腹隆起が外側に押し出される形となるためであり、形成される位置が神経隆起と背板の間であることは他の腹部体節における腹隆起と同様であり、胸部付属肢の分化位置とも一致する。このことから腹隆起が付属肢に相同な構造であることが言える。

また Weber (1952) は、節足動物における形態・組織学および発生学的研究より、腹板の進化を議論し、腹板構造が付属肢の亜基節に由来するものであると結論づけている。同じく Uchifune & Machida (2005) によるヒメガロアムシ *Galloisiana yuasai* の胚発生の外部形態形成観察や増本ら (2007) による総説においても、「最終的腹板 (形態形成完了後に、外部から認められる腹板)」のほとんどは付属肢亜基節由来の領域であると考察されている。本研究では、コオイムシにおける腹部腹板が付属肢亜基節由来であるか否かの決定的証拠を得るまでには至らなかったものの、ステージ 7 のコオイムシ胚の横断 cross 切片作成とその組織学的観察においては、付属肢基部および腹部隆起と腹板が連続している様子が観察されたことから (図 III-24C)、今後、発生段階を詳細に追究していくことで、Weber (1952)、Uchifune & Machida (2005) や増本ら (2007) による腹板の亜基節由来説を支持する知見が得られる可能性が高いと考えている。また、腹部における気門形成を指標に、今後、胸部

第2,3節における気門形成の観察も行うことで、胸部付属肢と腹隆起における相同性についての議論を深めることができるだろう。

### III-4-3. 頭部の複眼原基と正中線の間に分化する小隆起

コオイムシの胚発生においては、ステージ5で頭部における左右の複眼原基と正中線の間に対の特徴的な小隆起構造が形成される (図 III-13C, 22D)。他の昆虫類はもちろんのこと、他の節足動物においても、本構造との相同性が示唆されるような類似した構造の分化に関する知見は皆無であり、極めて高い固有性をもつ興味深い構造であるとともに、節足動物における頭部領域の体節制 segmentation の議論において重要な構造物である可能性が高い。とくに、昆虫類をはじめ、節足動物における前触角域 preantennal region の体節制に関しては、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster*、コクヌストモドキ *Tribolium castaneum*、カイコガ *Bombyx mori*、カブラハバチ *Athalia rosae* やオオヒメグモ *Achaearanea tepidariorum* などといったモデル生物を用いた発生遺伝学的研究をもってしても依然として混沌とした状態にあるが、前触角域の体節制の理解において、重要な知見を提供することになる可能性がある。

コオイムシにおいて認められたような小隆起は観察されないものの、鞘翅目昆虫の一種コクヌストモドキにおいては、擬体節を規定する *wingless* (*wg*) 遺伝子が触角節より前方でも発現しており、これは眼擬体節 *ocular parasegment* として解釈されているほか (Posnien *et al.*, 2009)、ナガカメムシ科の一種 *Oncopeltus fasciatus* における *wg* 遺伝子発現における研究においては、著者らは全く議論していないものの、彼らが示した図を見る限り、触角節よりも前方の領域において対の *wg* 発現があることが明確に図示されており (Angelini & Kaufman, 2005)、これらの発現部位とコオイムシにおける頭部小隆起の形成される位置が酷似している。しかしながら、この問題に関する議論を深めるためには、外部形態観察法のみならず、組織切片の作成により、前触角体節域における神経系配置の観察を詳細に行

うことや、コオイムシの胚発生における遺伝的基盤を追究する必要性があり、これらについては今後の課題である。

#### III-4-4. 口器形成

##### 上唇 labrum (頭楯上唇 clypeolabrum)

上唇 labrum は、現存するほとんどの節足動物の口器前方にみられる構造である。咀嚼型口器をもつ節足動物類では、摂食の際に食物が前方へ脱落するのを防ぐための器官であると考えられている。これに対し、半翅目における上唇は筒状構造となっており、その上唇内部を大顎刺針および小顎刺針が貫通する、他の節足動物と比べてもたいへん特殊化している構造であると言える。これは、半翅目昆虫が餌となる基質に口器を突き刺して栄養摂取することに因る、二次的な特殊化であると考えられる。

コオイムシ *Appasus japonicus* における頭楯上唇原基は、触角原基や顎部付属肢原基が分化するのと同時期に、頭部予定域の先端近くに分化しはじめる (図 III-12B)。分化しはじめた頃の頭楯上唇原基は左右一对の双山型であり、同じ半翅目であるナガカメムシ科昆虫 milkweed bugs の一種 *Oncopeltus fasciatus* における胚発生を知見 (Newcomer, 1948; Butt, 1949) と同様の形状であるほか、その分化のタイミングについても一致した。この後、コオイムシおよび *Oncopeltus fasciatus* の頭楯上唇原基においては、双山型から一つの塊状へと変化する、後方へと伸長していく (図 III-13A-C, 22A-C)。一方、近縁なグループであり、半翅目と同様に吸収型口器をもつアザミウマ目 Thysanoptera の一種 *Haplothrips verbasci* においては、頭楯上唇原基が形成当初から一つの塊状であること (対状構造をもたないこと) が報告されている (Heming, 1980)。従来、節足動物における上唇の起源については、頭部の付属肢起源であるとする説 (e.g., Snodgrass, 1935; Kraus, 2001) と、非付属肢性の構造であるとする説 (e.g., Weber, 1952; Sharov, 1966) があり、様々な議論がされてきた。近年では、上唇の起源を巡り、胚発生期における遺伝子発現パターンの比較解析もなされている

が、そこでも付属肢起源説（間挿体節 intercalary segment の付属肢起源説）を支持する報告がある一方で（e.g., Haas *et al.*, 2001a, b; Kimm & Prpic, 2006）、非付属肢性構造説を支持する報告もあり（e.g., Posnien *et al.*, 2009）、いまだにコンセンサスが得られていない状況である。

本研究における観察結果では、ステージ4の触角、顎部および胸部付属肢原基が形成される時期と同時に、上唇が対をなす構造として分化しはじめることが確認された。分化のタイミングから付属肢起源であるようにも思われるが、形成される位置が胚帯の正中線付近であることから、それ以降の体節における付属肢との連続相同性は薄く、付属肢とは異なる構造であると示唆される。また、本研究では頭楯上唇はステージ5以降、後方へ向かって伸長しながら大顎および小顎が貫通する筒状構造を形成することを明らかにした。これらの形成過程は、ナガカメムシ科の一種 *Oncopeltus fasciatus* において、口器形成を観察した Newcomer (1948) の研究においても詳しく記載・議論されていない新知見である。コイムシにおいては、ステージ8以降で大顎および小顎が小顎板に覆われるため、外部からの観察が困難になり、さらに頭楯上唇の形態についても先端部が細長く伸長していくことから（図 III-16, 17）、ステージ8以降に筒状構造が完成していくものと考えられる。

#### 大顎 mandible、小顎 maxilla、および小顎板 maxillary plate

半翅目における大顎および小顎は針状構造をしており、他の咀嚼型口器をもつ昆虫目の大顎や小顎と比べ、非常に特殊化した形状であると言えるほか、咀嚼型口器をもつ昆虫類にはみられない「小顎板 maxillary plate」と呼ばれる構造を有している。また、一般的な昆虫において、大顎は端肢節部 telopodite を欠くとされており（Snodgrass, 1935）、そもそも基肢節と端肢節との分節化は生じず、小顎においては先ず基肢節 coxopodite と端肢節に分節化した後、端肢節が小顎鬚 maxillary palp となり、基肢節（蝶咬節 stipes）の内側には内葉 lacinia と外葉 galea が分化する（図 III-1A, 19; Machida, 2000）。

一方、半翅目の小顎については非常に特殊化しているため、一般的な昆虫における小顎

鬚、内葉および外葉と、半翅目の小顎における構造との相同性については、いまだに多くの異論があるなど、コンセンサスは得られていない。半翅目昆虫では、大顎における端肢節欠失と同様に小顎や下唇体節においても、その端肢節部に相当するとされる小顎鬚および下唇鬚を欠くとする説が提唱されてきたほか (Snodgrass, 1935)、小顎板が小顎鬚起源であるとする説 (Dorn & Hoffmann, 1983)、さらに近年では、ナガカメムシ科の一種 *Oncopeltus fasciatus* における発生遺伝学的研究から、小顎刺針 maxillary stylets が小顎鬚に相同な構造であり、小顎板はそれとは異なる新たに獲得された構造であるとの解釈もなされている (Rogers *et al.*, 2002)。

本研究において、コオイムシにおける小顎の形成過程を観察した結果、小顎はステージ 6 において基肢節と端肢節とに分節化し (図 III-14A, 20G)、その後、小顎における「端肢節」、つまり一般的な咀嚼型口器をもつ昆虫における「小顎鬚」が肥大していき、小顎板となることが明らかになった。この結果は、小顎板が小顎鬚起源であるとする Dorn & Hoffmann (1983) の説を支持するものである。Rogers *et al.* (2002) はナガカメムシ科の一種 *Oncopeltus fasciatus* のほか、直翅目昆虫におけるコオロギ科 Gryllidae のヨーロッパエコオロギ *Acheta domestica*、およびシミ目昆虫のマダラシミ *Thermobia domestica* における *distal-less (Dll)* 遺伝子の発現パターンから、小顎刺針が小顎鬚に相同な構造であり、小顎板はそれとは異なる新規獲得された構造ではないかと考察している。しかしながら、本研究において胚発生を詳細に観察した結果、端肢節 (=小顎鬚) から小顎板が形成されていることは明白であるため、小顎板は小顎鬚由来の構造であることは間違いないと考える。小顎における *Dll* の発現パターンについては、一部の昆虫種群の小顎構造が系統進化の過程において著しく形態変化を伴ったため、このような種群においては従来知られる小顎での発現パターンとは異なるものとなったことが考えられる。かつて、*Dll* が付属肢の端肢節域を特徴づける分子マーカーとして評価されていたこともあるが (Cohen & Jürgens, 1989; Diaz-Benjumea *et al.*, 1994)、最近の研究からは、体軸より側方へと外伸長 outgrowth する構

造に対して（とくに、付属肢端肢節に特異的な発現をする訳ではなく）発現することが指摘されている（Oka *et al.*, 2010）。本研究で得られた知見は、Oka *et al.* (2010) の指摘を傍証し得るものであり、また、*Dll* の発現を直ちに付属肢端肢節域を規定するものとして議論してきたいくつかの発生遺伝学的研究に対し警鐘を鳴らすものである。

小顎刺針に関しては、半翅目が属する準新翅類の中でも最ベーサルなグループであるチャタテムシ目 Psocoptera における口器形態では、咀嚼型口器でありながら内葉 lacinia が針状構造に近い形態をしていることから、これが咀嚼型口器と吸収型口器の中間形質とも考えられ、内葉が小顎刺針に相同な器官であることが示唆されているほか（Yoshizawa & Saigusa, 2003）、アザミウマ目についても小顎刺針は内葉由来であると考えられている（Heming, 1980）。これらのことから、半翅目における小顎刺針は内葉由来の器官であると考えられる。また本研究においては、小顎板によって大顎および小顎基肢節が胚内部に隠れてしまった後のステージにおける、大顎刺針および小顎刺針の形成過程を連続的に追うことはできなかったが、ステージ 8 におけるコオイムシの横断 cross 切片の組織学的観察において、胚体内では小顎刺針および小顎板が連続していることが確認された（図 III-24B）。さらに、ナガカメムシ科の一種 *Oncopeltus fasciatus* において大顎刺針および小顎指針の伸長が外部からでも観察することができるとされているステージでは、小顎板が小顎指針の基部と連続していることも確認されており（Newcomer, 1948）、この発生様式はアザミウマ類の一種 *Haplothrips verbasci* における発生様式と類似している（Heming, 1980）。コオイムシについては今後、胚体内での大顎刺針および小顎刺針における形態形成を切片作成などの組織学的な観察を行う必要がある。

また、半翅目と同様に吸収型の口器をもつアザミウマ目では、半翅目における小顎板と類似した構造がみられるが、これらは小顎鬚由来ではなく、蝶咬節 stipes 由来であると考えられており、実際に、蝶咬節由来であるとされる小顎板に類似した構造から、たいへん小さな小顎鬚が分化することが観察されている（Heming, 1980）。またアザミウマ類の一種

*Haplothrips verbasci* の胚発生では、小顎原基が分化してまもなく、蝶咬節が胚側方へと伸長し、その基部で内葉が分化するとされている (Heming, 1980)。これらのことから、アザミウマ目と半翅目では口器を構成する器官には若干の差異が認められるものの、小顎構造が特殊化することで、大顎刺針および小顎刺針を覆う器官が発達したことが示唆されるなど、これらの点においては吸収型口器の形成における共通プランがあるのかもしれない。

### 下唇 labium

従来、コオイムシにおける下唇は3節に分節化するとされており(田中, 2001)、コオイムシ類の種識別における検索表においてもそのように扱われてきた (e.g., 林・宮本, 2005)。しかしながら、本研究において詳細に口器形成過程を観察した結果、下唇は4節に分節化すること、しかし胚発生の終盤にはその基部が小顎板に覆われてしまうため、見かけ上は3節であるかのように観察されることが明らかとなった。このことは、谷澤 (2007a) によるコオイムシの胚発生の観察とも合致する結果である。さらには、純形態学と言えども、形態形成が完了した最終的な形態 end product の精査や評価だけでは不十分であり、その形態がどのように形成されるのか、その形成プロセスを追究することの重要性を示す典型的事例の一つと言えよう。

また、半翅目の下唇に関しては、咀嚼型口器との相同性に関する議論が、小顎のように活発に行われているわけではないが、Snodgrass (1935) は半翅目における下唇は下唇鬚を欠くものと解釈している。しかしながら、本研究における下唇形成過程の観察においては、ステージ6で下唇は基肢節と端肢節に分節化し、端肢節から下唇第2-4節部分が分節化することが確認された。これは、Snodgrass (1935) の解釈とは異なる結果である。一般的な昆虫における下唇形成過程では、小顎同様、基肢節および端肢節に分節化した後、端肢節は下唇鬚となり、基肢節からは中舌 glossa および側舌 paraglossa が分化することから (図 III-19)、端肢節由来であるコオイムシの下唇第2-4節は下唇鬚に相同な器官であると言える。

Snodgrass (1935) の形態学的研究では、既に完成された形態を解剖学的アプローチにより相同性を推察しているが、本研究におけるような、その形成プロセスを逐次的に追究するアプローチの方が、より正確な相同性の検討が可能であると共に、より信頼性の高い考察であると考えている。そしてまた、本研究での解釈は双翅目 Diptera および鞘翅目 Coleoptera 昆虫の下唇鬚形成において重要な役割を担うとされる *proboscipedia* (*pb*) 遺伝子、および *Dll* 遺伝子の発現パターンから、下唇鬚が下唇端肢節由来であると解釈している Rogers *et al.* (2002) による見解とも合致する。一方で、アザミウマ目の下唇については、半翅目における下唇と同様に大顎刺針および小顎刺針を下から支える役割をするが、その全ての部分が下唇基肢節によるもので、下唇先端に非常に小さい下唇鬚が形成されることが報告されている (Heming, 1980)。

また、コオイムシの下唇においては、ステージ 8 で下唇第 3 節先端から小片が分化する (図 III-16B, 22F)。下唇第 3 節は下唇鬚であることが本研究の観察から明らかとなったので、この小片は下唇鬚から分化した構造であると考えられる。この構造が何に由来する構造であるかは、本研究においては明らかにできなかったものの、小顎鬚から分化する興味深い構造であると言えるだろう。

#### 吸収型口器獲得による半翅目の多様化

半翅目昆虫類は種多様性の観点から考えた際に、不完全変態昆虫類の中で最も繁栄したグループであると言える。また、種数のみならず、ツノゼミ類のようにユニークな形態をもつ種群や、アメンボ類のように水上生活に適応した形態をもつ種群、さらには水棲半翅類のように水中生活に適応した形態をもつ種群など、その形態もたいへん多様である。さらには、アブラムシ類のように集団生活を行う種群や、セミ類のように幼虫期がたいへん長い種群、また、ウミアメンボ類のように昆虫としてはたいへん珍しく海上生活に適応した種群など、その生態もたいへん多様であると言える。背景でも触れたように、上記の様

な半翅目昆虫における種多様性や繁栄の鍵要因の一つとして、半翅目昆虫類の共有派生形質である吸収型口器の獲得が挙げられてきた (Yoshizawa & Saigusa, 2003)。半翅目昆虫は系統的に、咀嚼型と吸収型の中間的な口器を有するチャタテムシ目や、半翅目ほど高度に特殊化はしていないものの吸収型口器を有するアザミウマ目と近縁であり、準新翅類というグループを構成する (Wang *et al.*, 2013)。半翅目昆虫類は他の準新翅類昆虫 (チャタテムシ目、アザミウマ目) と比較して、たいへん特殊化した吸収型口器を有しており、とくに、小顎板は他の昆虫類にはみられない特殊な構造であると言える。このことから小顎板の獲得が特殊な吸収型口器の獲得へと繋がったと考えられる。具体的には、小顎板を獲得したことにより、小顎板が口器の基部 (下唇基部) を覆い、摂食時における口器の動きを補助する働きを担うことで、口器を特殊化させることが可能になった可能性などが考えられる (*e.g.*, 口吻を基質に刺す際に口吻基部が動かないように支える機能など)。これまで、小顎板が咀嚼型口器を有する昆虫類のどの部位と相同であるのかという議論は、半翅目類の中でも派生的種群である陸生カメムシを材料に展開されてきており、小顎鬚起源であるとする解釈や (Dorn & Hoffmann, 1983)、他の昆虫類にはない全く新しい形質であるとする解釈など様々な説があり (Rogers *et al.*, 2002)、混沌とした状況にあった。しかしながら本研究において、異翅亜目類の中で最もベーサルな種群である水棲半翅類のコオイムシを材料とし、詳細な胚発生プロセスの観察を行ったところ、小顎板は小顎鬚起源であることが明らかとなった (図 20, 21)。これらの結果から、準新翅類の中でも小顎鬚を小顎板にモディファイさせた半翅目昆虫類のみが、高度に特殊化した吸収型口器を獲得することが可能となり、その結果、他の準新翅類、さらには不完全変態類の中で最も多様化することが可能となったと言える。この結果は、これまでの混沌とした半翅目における吸収型口器の獲得・進化プロセスを明確にするためのたいへん重要な知見となるものと考えられる。

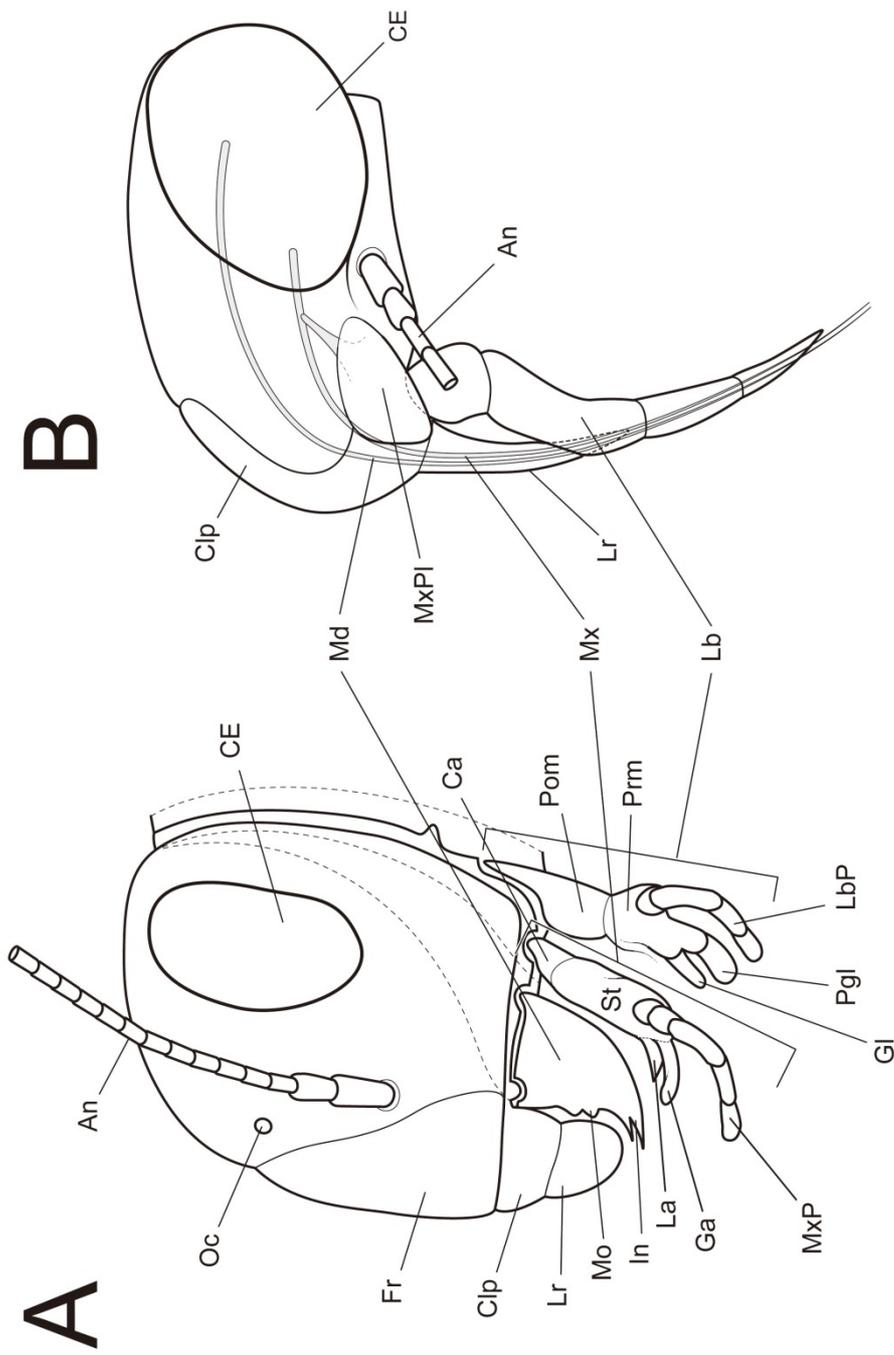


図 III-1. 咀嚼型昆虫類 [Snodgrass, (1935) を基に作図] における頭部模式図 (A)、および半翅目 (コオイムシ *Appasus japonicus* を基に作図) に  
 おける頭部模式図 (B)  
 半翅目における上唇 labrum および下唇 labium および大顎 mandible は筒状構造をしており、大顎 mandible および小顎 maxilla は、上唇および下唇の内部を通過して外  
 部に出てくる。An: 触角, CE: 複眼, Clip: 頭楯, Fr: 頭楯, Ga: 外葉, In: 中舌, La, 内葉, Lb: 下唇, LbP: 下唇鬚,  
 Lr: 上唇, Md: 大顎, Mo: 小顎, Mx: 小顎, MxP: 小顎鬚, MxPI: 小顎鬚, Oc: 単眼, Pgl: 側舌, Prm: 下唇前基節, Sm: 下唇後基節, St:  
 蝶咬節.

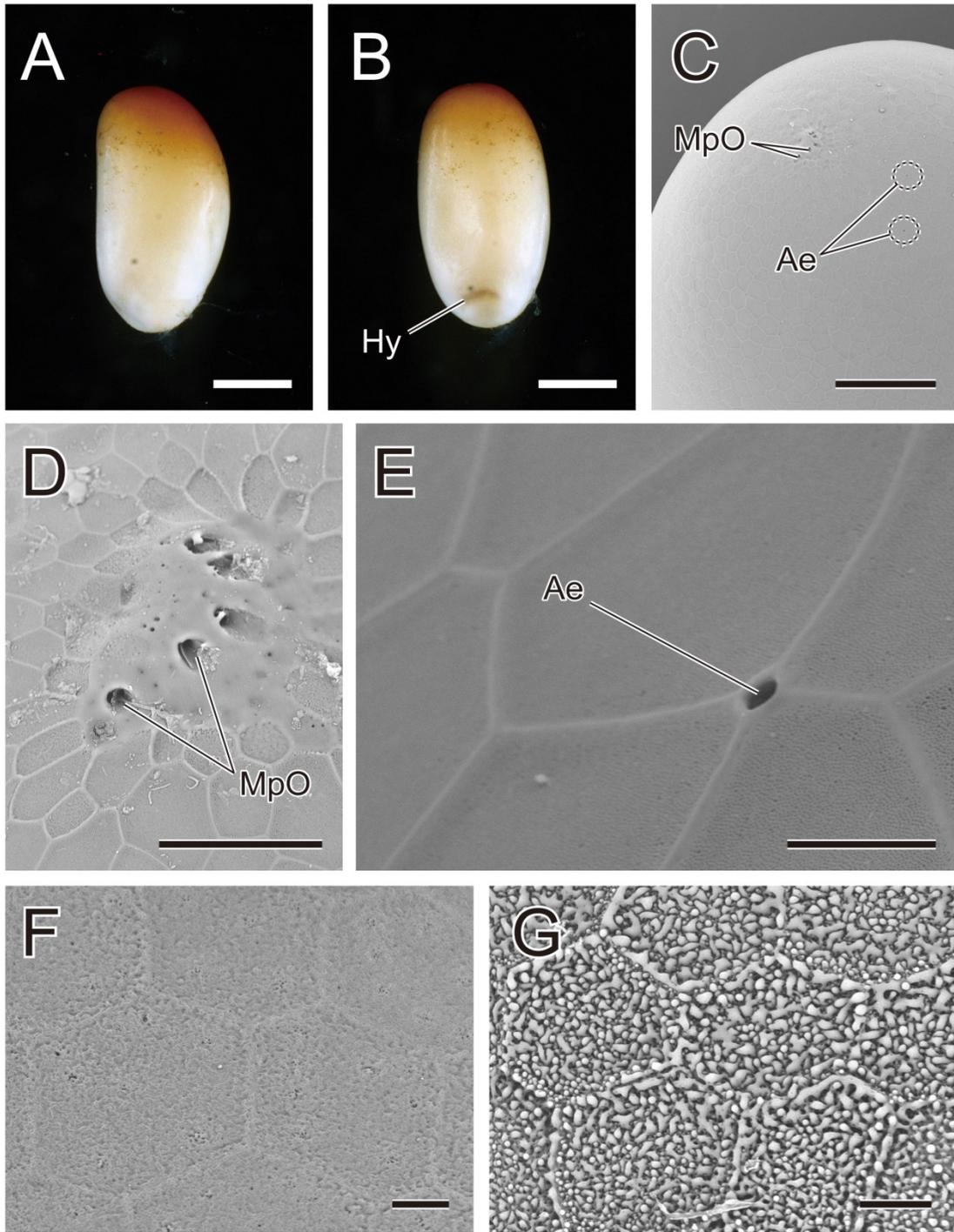


図 III-2. コオイムシ *Appasus japonicus* の卵およびその微細構造

産下直後の卵 (ステージ 1: 成熟分裂および受精、卵割期) 卵側面 (A) および卵背面 (B). 卵前極には卵門開口部があり (C, D)、エアロパイルも複数観察される (C, E). 卵後極の hidroパイルは、他の卵表域 (F) とは異なる卵表面構造を呈する (G). Ae: エアロパイル, Hy: hidroパイル, MpO: 卵門開口部. Bars: A, B=500 $\mu$ m, C=200 $\mu$ m, D=50 $\mu$ m, F, G, E=10 $\mu$ m.

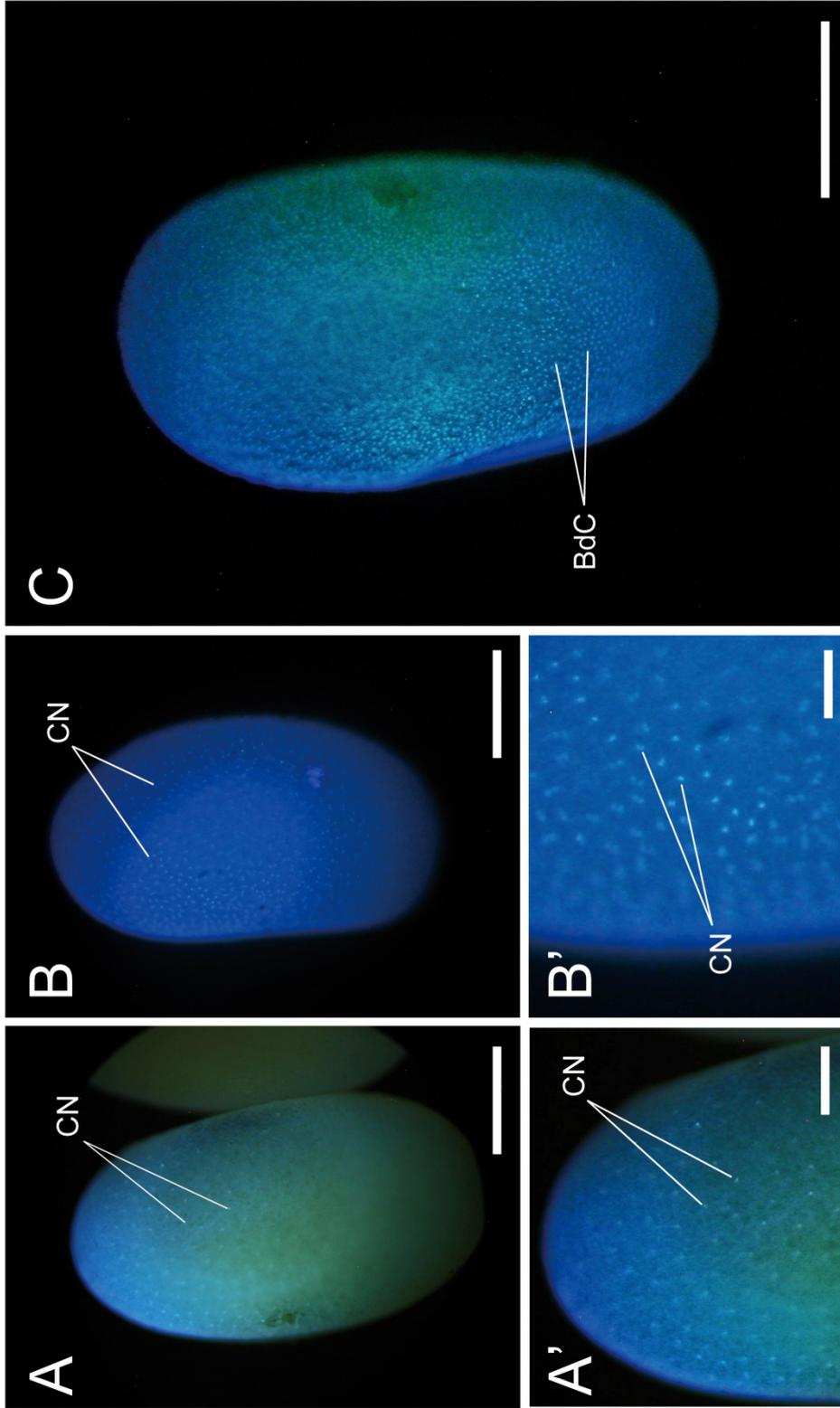


図 III-3. コオイムシ *Appasus japonicus* の胚発生 (ステージ 2-3 : 卵割-胚盤葉形成) 卵割核が卵表へ到達し、胚盤葉を形成する. BdC : 胚盤葉細胞の核, CN : 卵割核. Bars : A, B, C = 500 $\mu$ m, A' = 200 $\mu$ m, B' = 100 $\mu$ m.

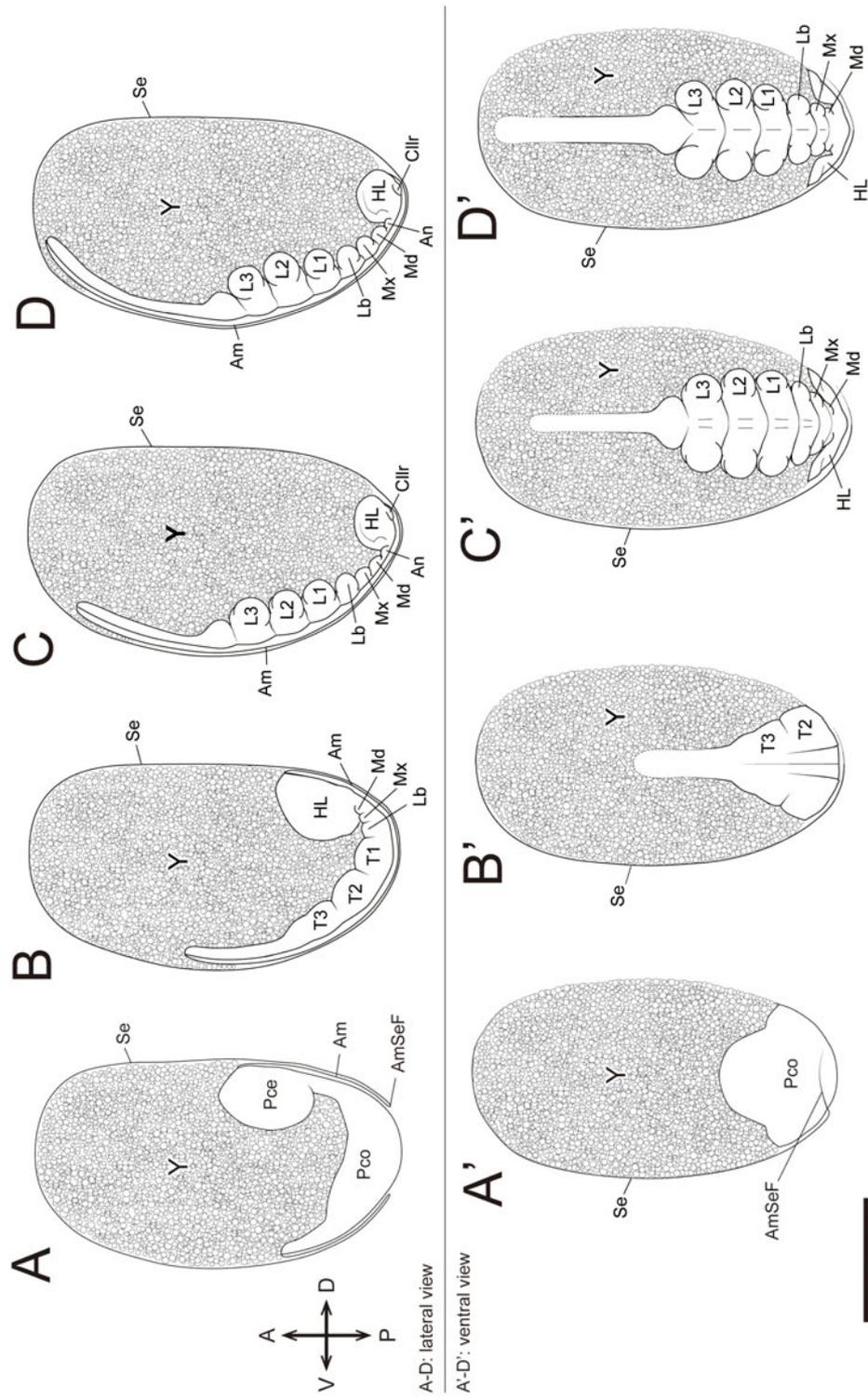


図 III-4. コイムシ *Appasus japonicus* の胚発生 (ステージ4: 胚帯形成-胚帯伸長、および付属肢原基形成) の卵殻除去後のスケッチ。頭部は徐々に卵後極へと移動し、腹部は細長く卵前極方向へと伸長していく。頭部、顎部および胸部体節は分節が開始するが、腹部はステージ5以降に分節化する。A-D: 側面図, A'-D': 腹面図. Am: 羊膜, AmSeF: 羊漿膜褶, An: 触角, Cllr: 頭楯上唇, HL: 頭葉, L1-3: 胸部第1-3付属肢, Lb: 下唇, Md: 大顎, Mx: 小顎, Pce: 原頭域, Pco: 原胴域, Se: 漿膜, T1-3: 胸部第1-3節 (前-後胸), Y: 卵黄. Bar=500 $\mu$ m.

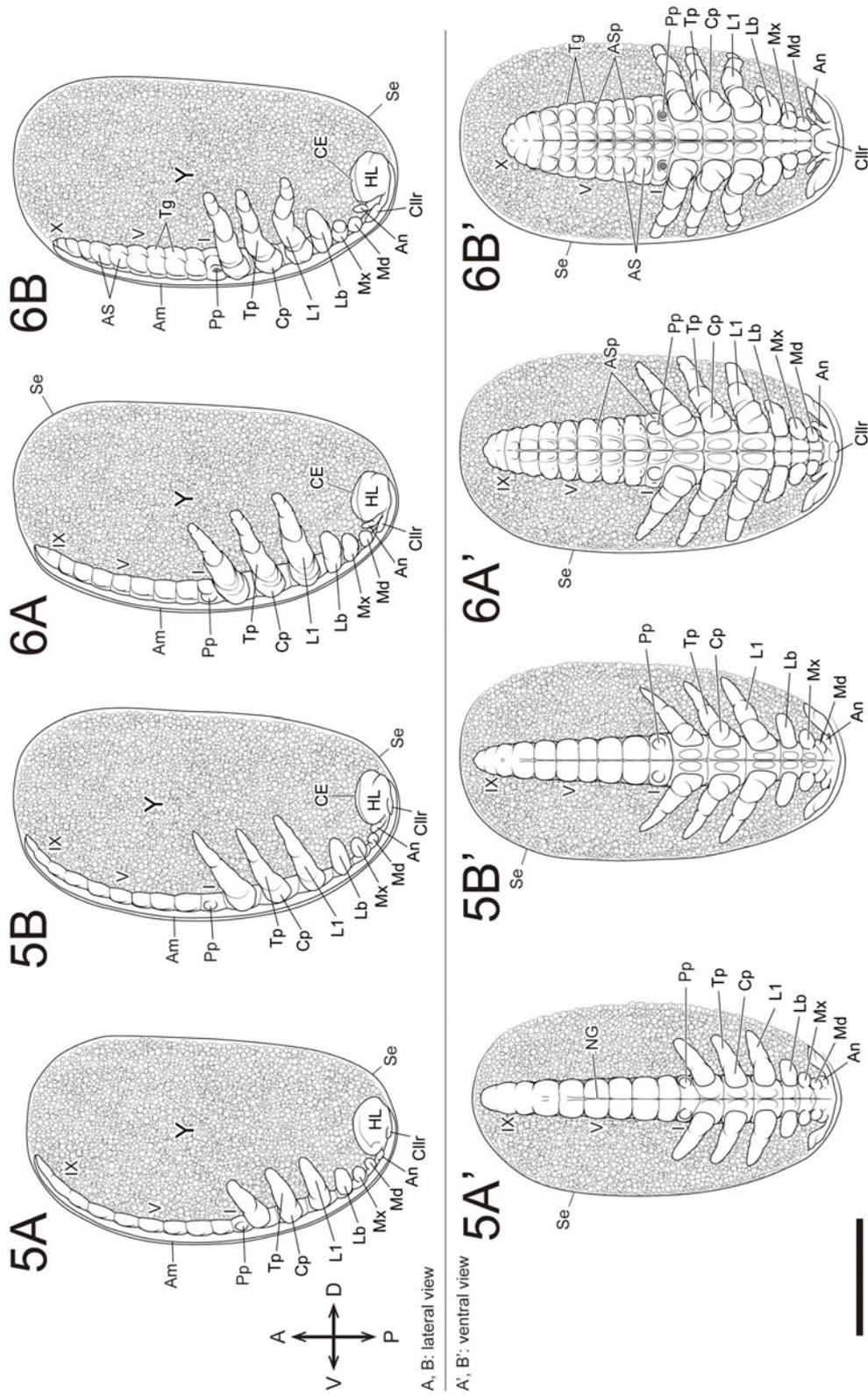


図 III-5, 6. コオイムシ *Appasus japonicus* の胚発生 (ステージ 5: 付属肢原基の伸長・分節化および腹部節の分節化, ステージ 6: 腹部幅の増大と長さの短縮) の卵殻除去後のスケッチ  
 腹部はステージ 5 で分節化が始まり、腹隆起、気門、背板などが形成される。A, B: 側面図, A', B': 腹面図. I, V, IX, X: 腹部第 1, 5, 9, 10 節, Am: 羊膜, An: 触角, AS: 腹部気門, CE: 複眼, Cllr: 頭楯上唇, Cp: 基肢節, HL: 頭葉, L1-3: 胸部第 1-3 付属肢 (前-後脚), Lb: 下唇, Md: 大顎, Mx: 小顎, NG: 神経溝, Pp: 側脚, Se: 漿膜, Tg: 背板, Tp: 端肢節, Y: 卵黄. Bar=500 $\mu$ m.



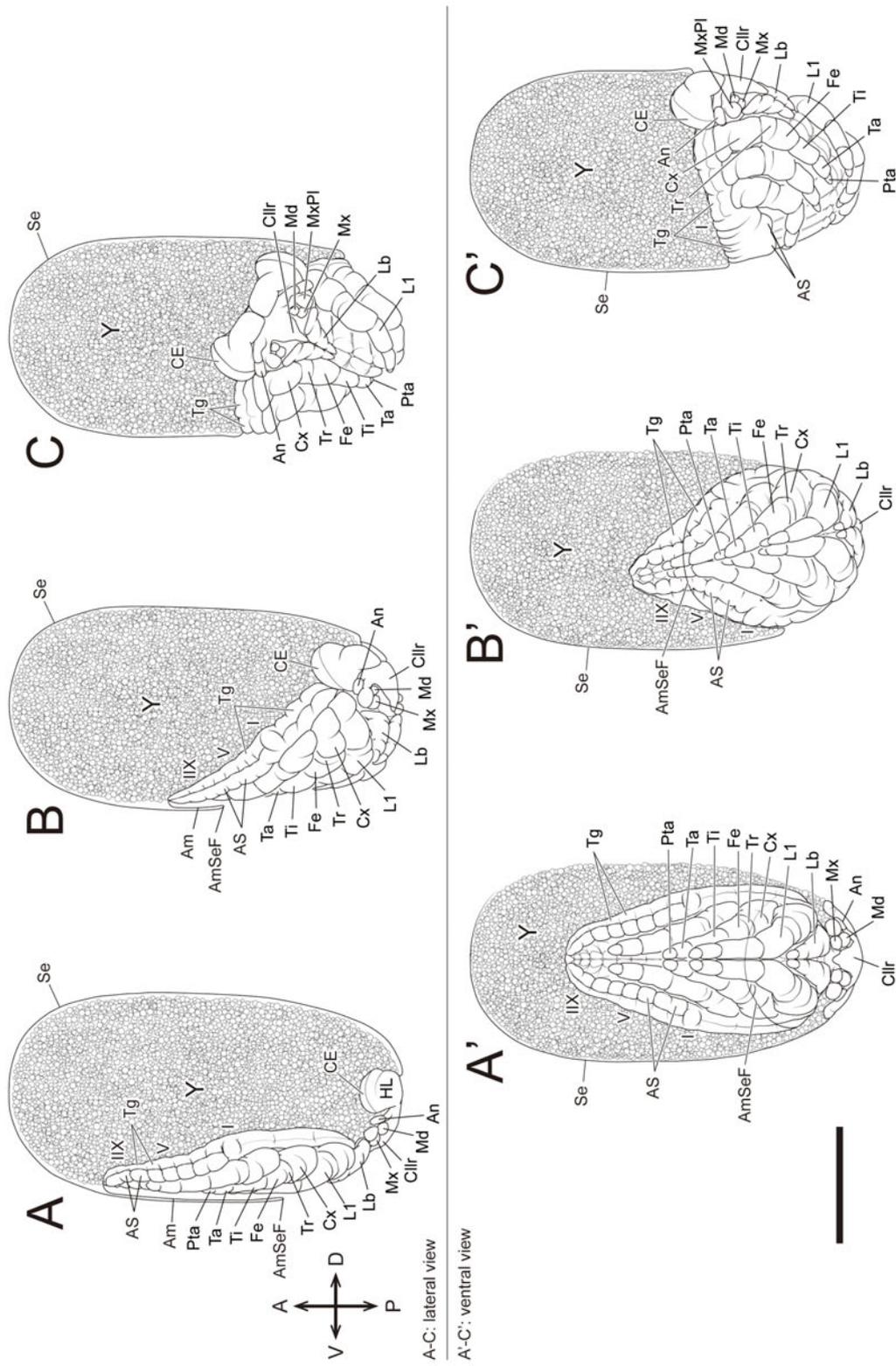
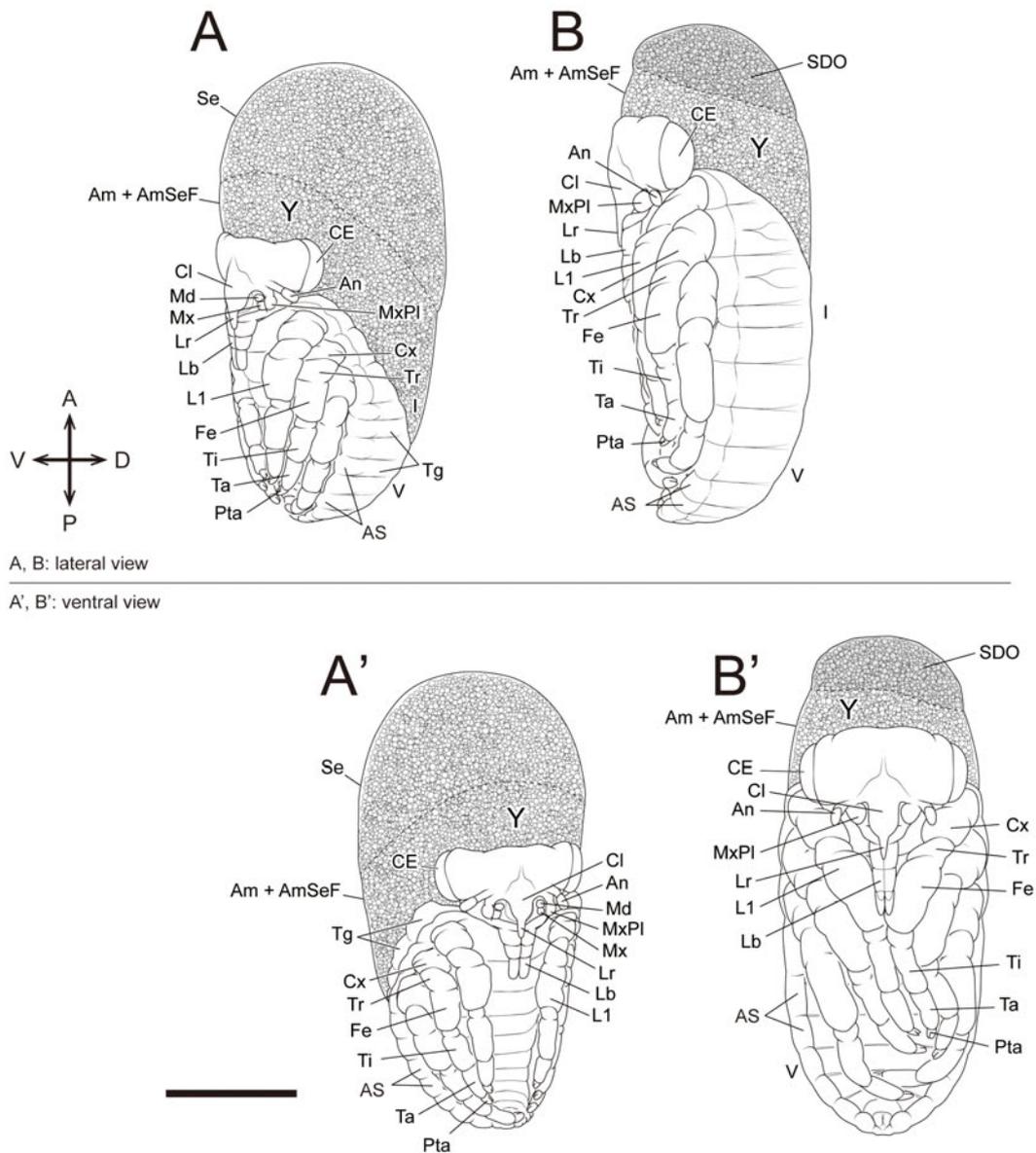


図 III-8. コオイムシ *Appasus japonicus* の胚発生 (ステージ7: 胚の姿勢転換) の卵殻除去後のスケッチ  
 ステージ7には、羊漿膜褶の解消に伴い、胚反転が生じる。これに付随して回転運動を伴う姿勢転換も生じる。A-C: 側面図, A'-C': 腹面図. I, V, X: 腹部第1, 5, 10節, Am: 羊膜, AmSeF: 羊漿膜褶, An: 肛門, AS: 腹隆起, CE: 腹膜, Cllr: 複眼, CE: 腹隆起, Cx: 基節, Cx: 頭楯上唇, Fe: 腸節, HL: 頭葉, Lb: 下唇, L1: 胸部第1付属肢 (前脚), Md: 大顎, Mx: 小顎, MxPI: 小顎板 (前脚), Pp: 側脚, Pta: 小顎板, Ta: 附節, Tg: 尾節, Ti: 尾節, Tr: 腸節, Y: 卵黄. Bar=500 $\mu$ m.



A, B: lateral view

A', B': ventral view

図 III-9. コオイムシ *Appasus japonicus* の胚発生 (ステージ 8: 胚の急激な成長と複眼の着色および背部閉鎖) の卵殻除去後のスケッチ

ステージ 8 では胚反転が完了し、胚長が急激に伸長する。A, B: 側面図, A', B': 腹面図。I, V: 腹部第 1, 5 節, AmSeF: 羊漿膜褶, An: 触角, AS: 腹隆起, CE: 複眼, Cl: 頭楯, Cx: 基節, Fe: 腿節, Lb: 下唇, Lr: 上唇, L1: 胸部第 1 付属肢, Md: 大顎, Mx: 小顎, MxPI: 小顎板, Pta: 前跗節, SDO: 二次背器, Se: 漿膜, Ta: 跗節, Tg: 背板, Ti: 脛節, Tr: 転節, Y: 卵黄。Bar=500 $\mu$ m.

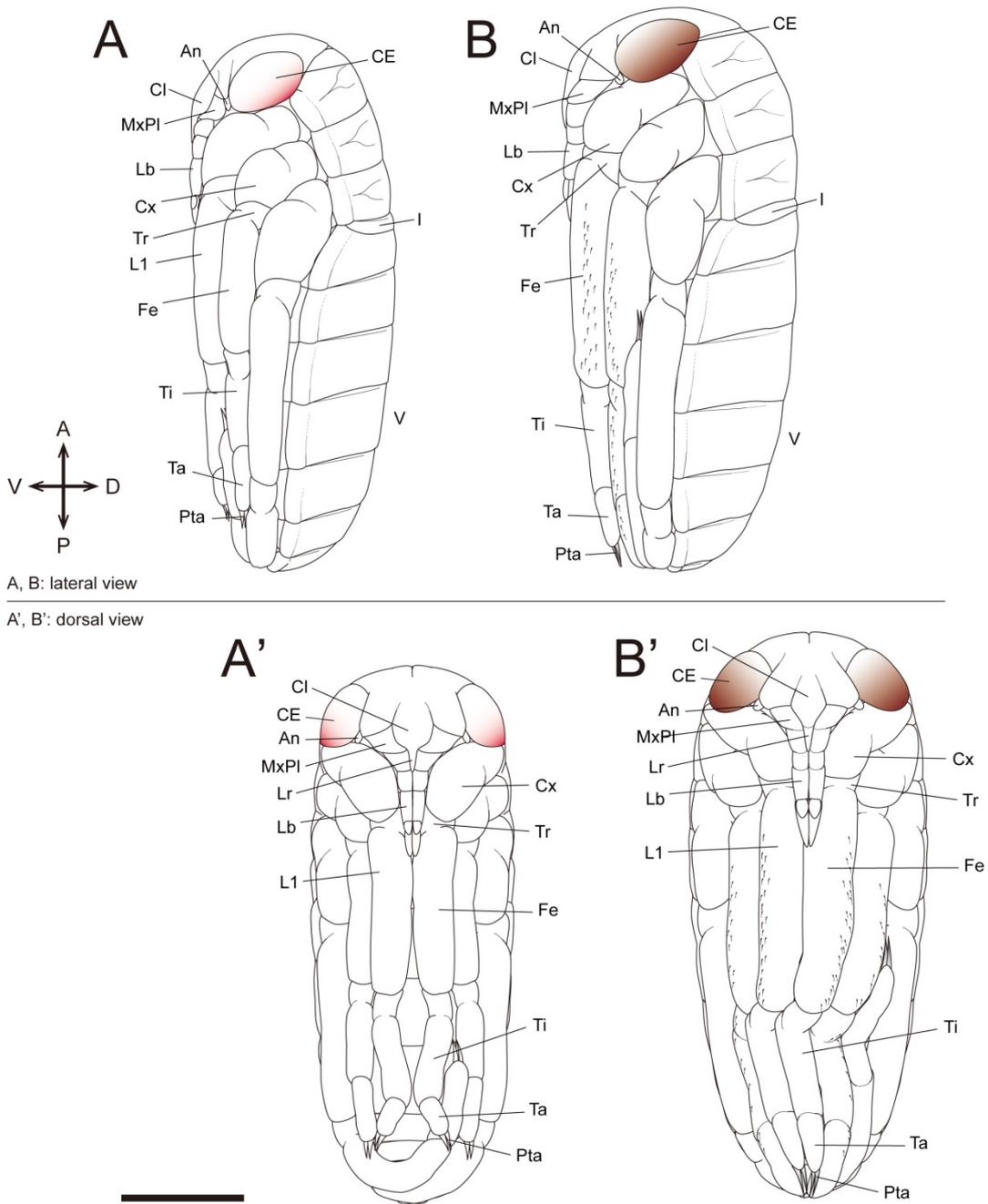


図 III-10. コオイムシ *Appasus japonicus* の胚発生 (ステージ9: 胚サイズのさらなる増大) の卵殻除去後のスケッチ  
 ステージ9には、胚サイズが増大し、爪や複眼の着色が強くなる. A, B: 側面図, A', B': 腹面図. I, V: 腹部第1, 5節, An: 触角, CE: 複眼, Cl: 頭楯, Cx: 基節, Fe: 腿節, Lb: 下唇, Lr: 上唇, L1: 胸部第1付属肢 (前脚), MxPl: 小顎板, Pta: 前跗節, Ta: 跗節, Ti: 脛節, Tr: 転節. Bar=500 $\mu$ m.

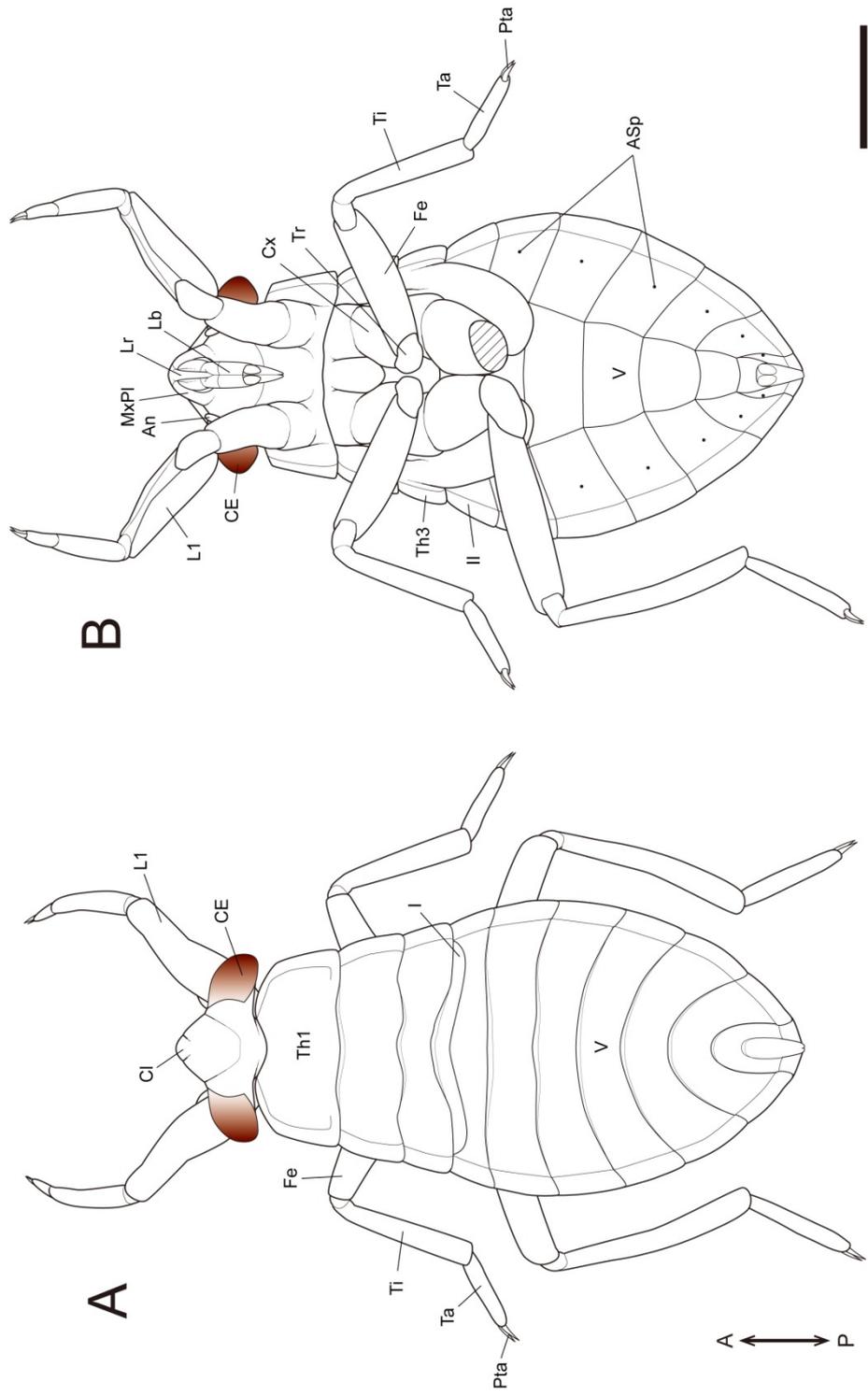


図 III-11. コオイムシ *Appasus japonicus* の胚発生 (ステージ 10 : 1 齢幼虫)

A : 背面図. 腹面図 (B) の左後脚は腹部腹面構造を可視化するため、切除した図として示してある. I, II, V : 腹部第 1, 2, 5 節, An : 触角 ASP : 腹部気門, CE : 複眼, Cl : 頭楯, Cx : 基節, Fe : 腿節, Lb : 下唇, Lr : 上唇, L1 : 胸節第 1 付属肢 (前脚), MxPI : 小顎板 (前脚), Pta : 前附節, Ta : 跗節, Th1, 3 : 胸部第 1, 3 節 (前、後胸), Ti : 脛節, Tr : 転節. Bar=1mm.

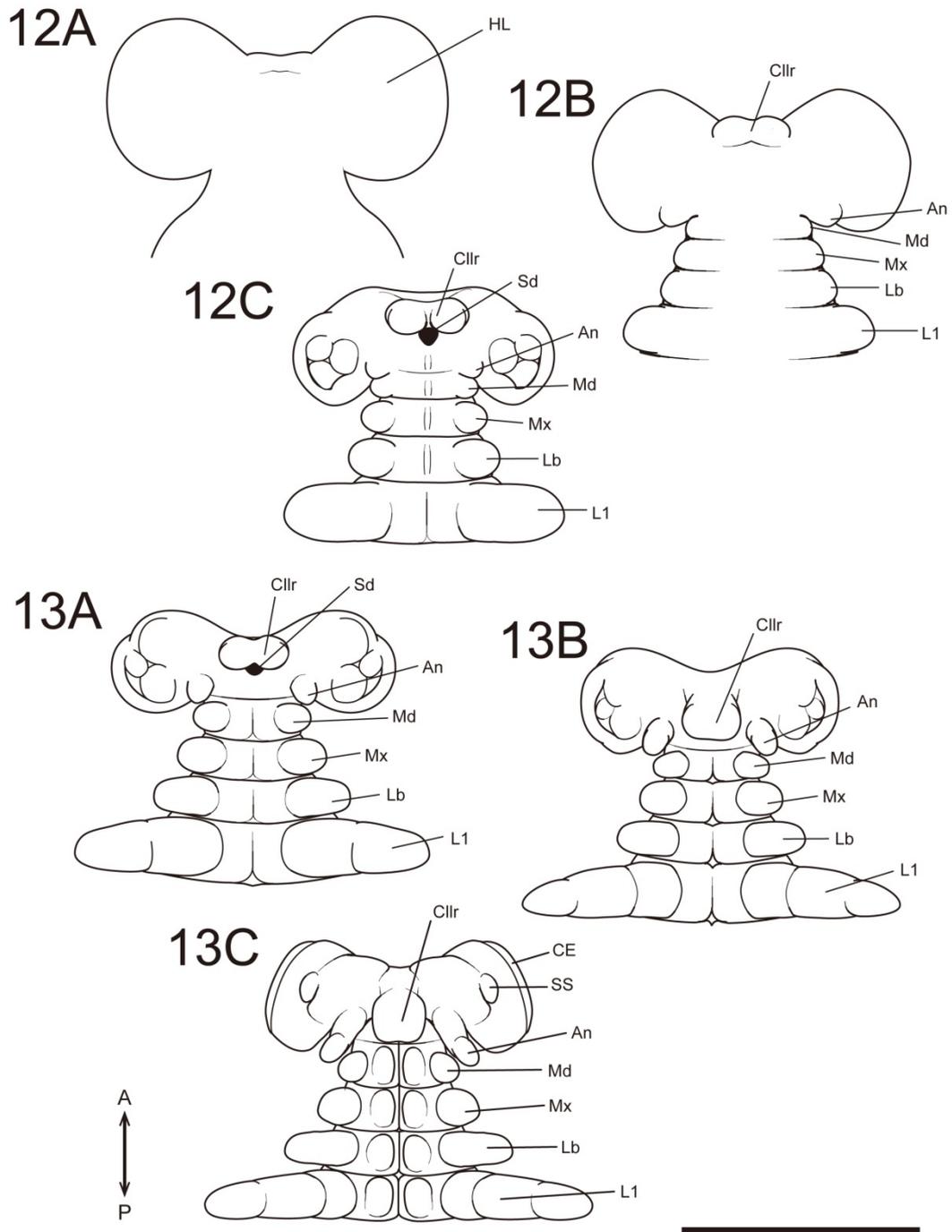


図 III-12, 13. コオイムシ *Appasus japonicus* の口器形成 (ステージ 4、およびステージ 5)  
 An: 触角, CE: 複眼, Cllr: 頭楯上唇, HL: 頭葉, L1: 胸部第 1 付属肢 (前脚), Lb: 下唇,  
 Md: 大顎, Mx: 小顎, Sd: 口陥, SS: 小隆起. Bar=500 $\mu$ m.

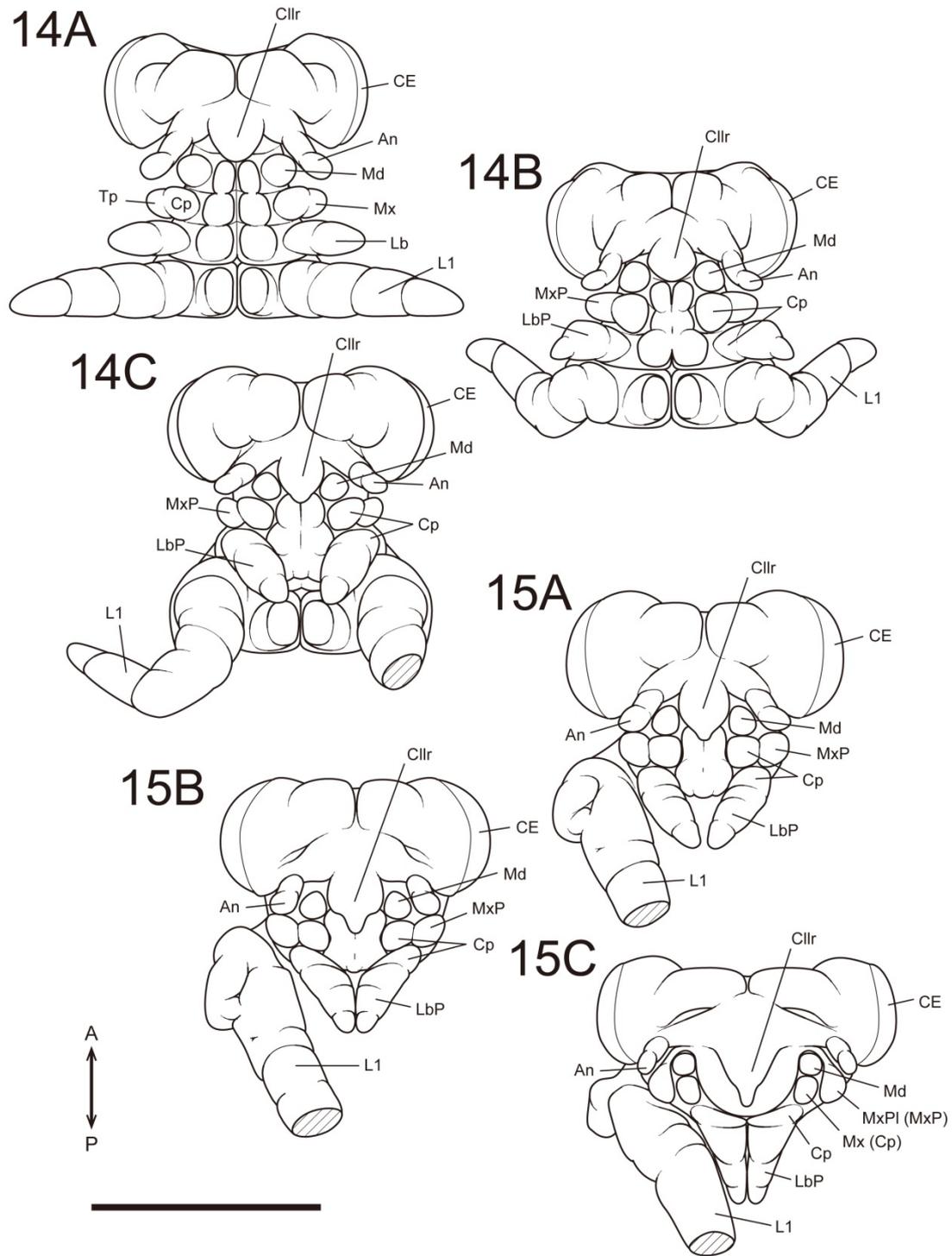


図 III-14, 15. コオイムシ *Appasus japonicus* の口器形成 (ステージ 6 およびステージ 7)  
 An: 触角, CE: 複眼, Cllr: 頭楯上唇, Cp: 基肢節, L1: 胸部第 1 付属肢 (前脚), Lb: 下唇, LbP: 下唇鬚, Md: 大顎, Mx: 小顎, MxP: 小顎鬚, MxPl: 小顎板, Tp: 端肢節. Bar=500 $\mu$ m.

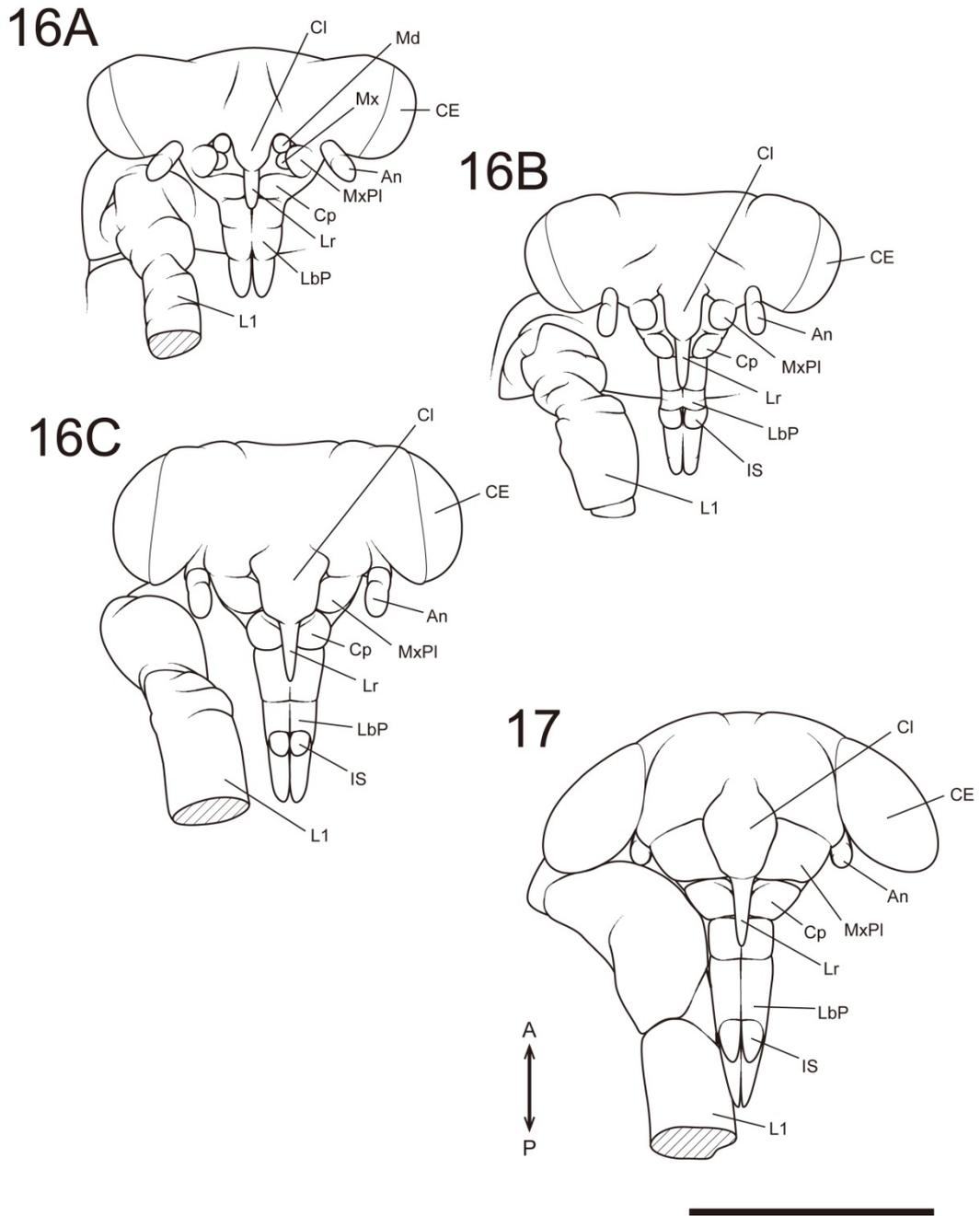


図 III-16, 17. コオイムシ *Appasus japonicus* の口器形成 (ステージ 8 およびステージ 9)  
 An: 触角, CE: 複眼, Cl: 頭楯, Cp: 基肢節, L1: 胸部第 1 付属肢 (前脚), Lr: 上唇, LbP: 下唇鬚, Md: 大顎, Mx: 小顎, MxPl: 小顎板, IS: 下唇小片. Bar=500 $\mu$ m.

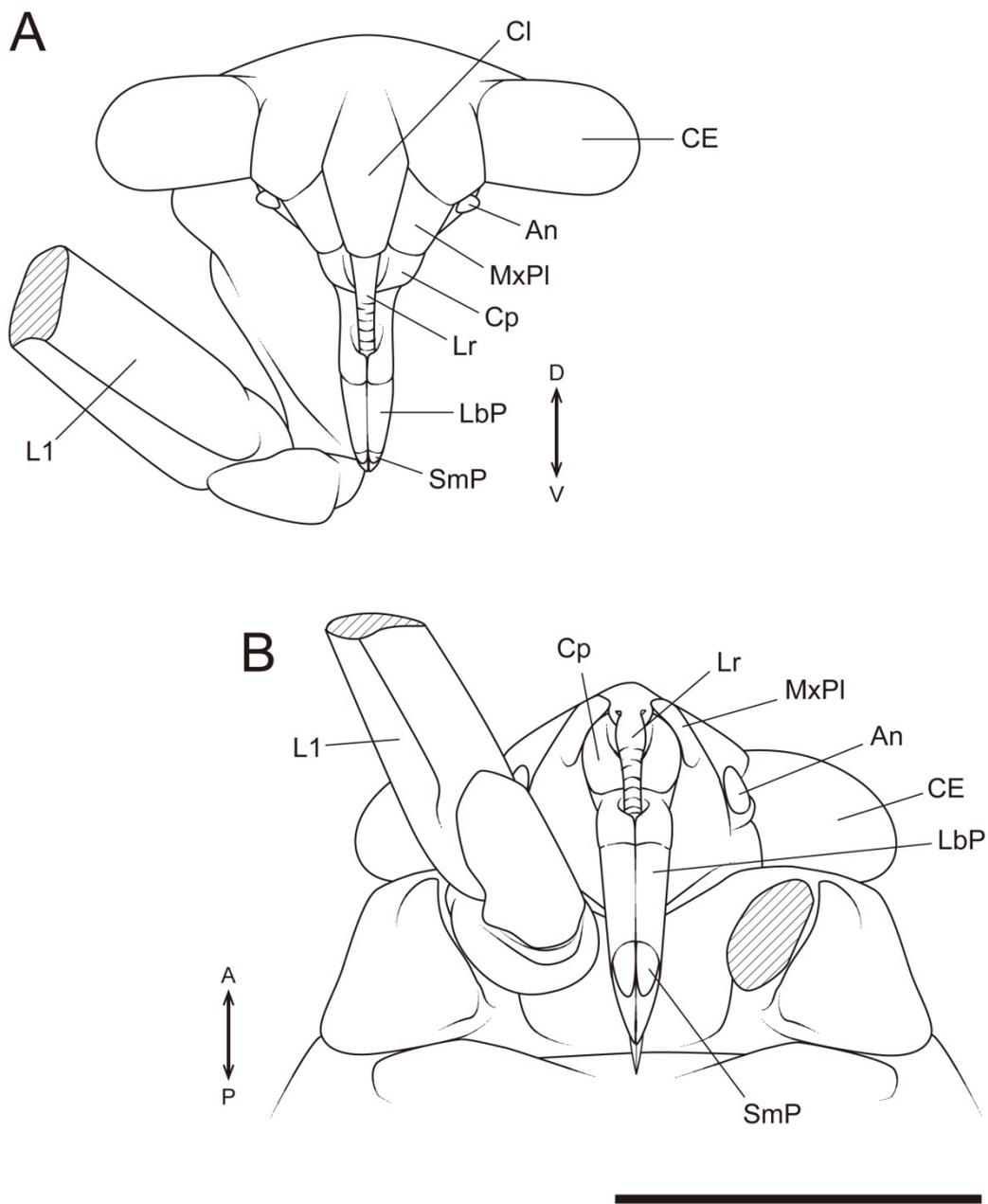


図 III-18. コオイムシ *Appasus japonicus* の口器形成 (ステージ 10)

An: 触角, CE: 複眼, Cl: 頭楯, Cp: 基肢節, L1: 胸部第 1 付属肢 (前脚), Lr: 上唇, LbP: 下唇鬚, MxPI: 小顎板, IS: 下唇小片. Bar=500 $\mu$ m.

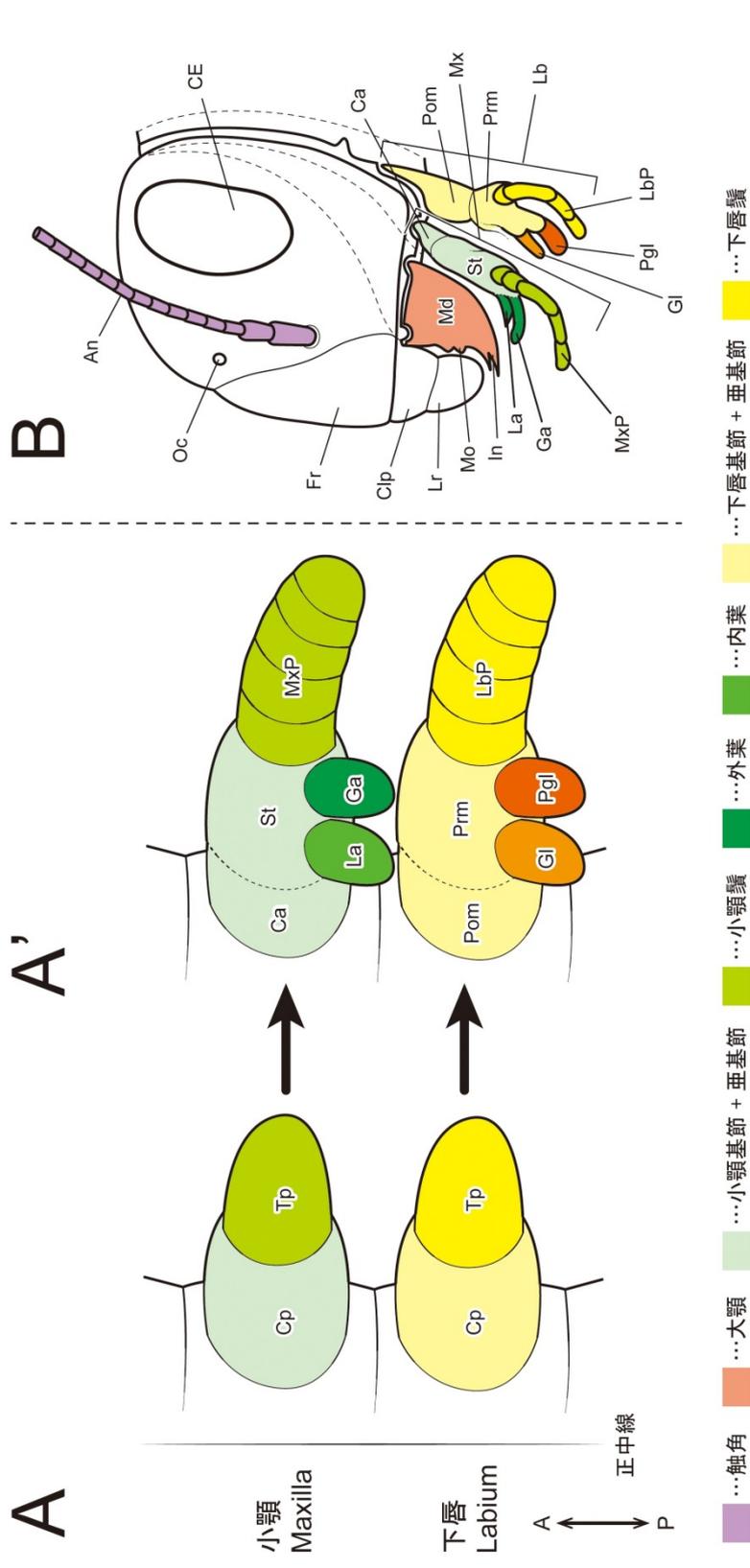


図 III-19. 一般的な咀嚼型口器をもつ昆虫における小顎および下唇の形成過程 (左半身図)、および頭部模式図 (A)、端基節はそれぞれ小顎基部 (MxP: maxillary palp) および下唇基部 (LbP: labial palp) となる (A', B)。基節は小顎では基節 (蝶咬節, St: stipes) および亜基節 (軸節, Ca: cardo) に分節化した後、蝶咬節から内葉 (La: lacinia) および外葉 (Ga: galea) が分化し、下唇では基節 (前基節, Prm: prementum) および亜基節 (後基節, Pom: postmentum) に分節化した後、前基節から中舌 (Gl: glossa) および側舌 (Pgl: paraglossa) が分化する (A', B)。半翅目の吸収型口器 (図 III-1) は特殊化しているため、孵化後の完成された口器では一般的な咀嚼型口器との比較は困難であるが、胚発生中における口器の形成過程を観察することでその比較が可能となる。An: 触角, CE: 複眼, Fr: 頭額, Lr: 前額, La: 觸角, Cl: 複眼, Ca: 觸角, Oc: 単眼。

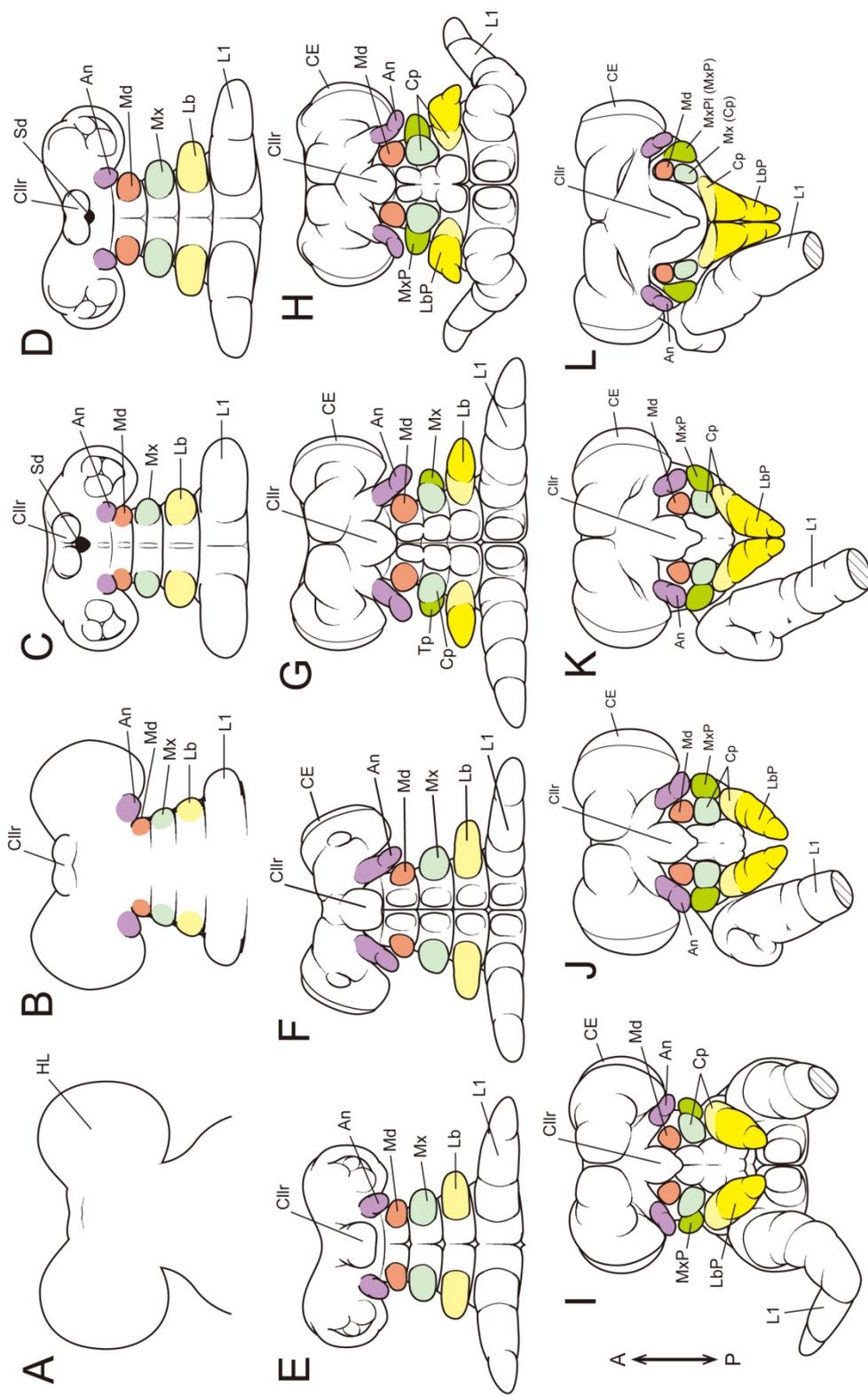


図 III-20. コオイムシ *Appasus japonicus* の口器形成

A-C : ステージ 4, D-F : ステージ 5, G-I : ステージ 6, J-L : ステージ 7. 各付属肢に付した配色は図 III-19 における配色と対応する. An : 触角, CE : 複眼, Cllr : 頭楯上唇, HL : 基肢節, Cp : 基肢節, HL : 頭葉, L1 : 胸部第 1 付属肢 (前脚), Lb : 下唇, LbP : 下唇鬚, Md : 大顎, Mx : 小顎, MxP : 小顎鬚, MxPI : 小顎板, Tp : 端肢節, Sd : 口陥, SS : 小隆起.

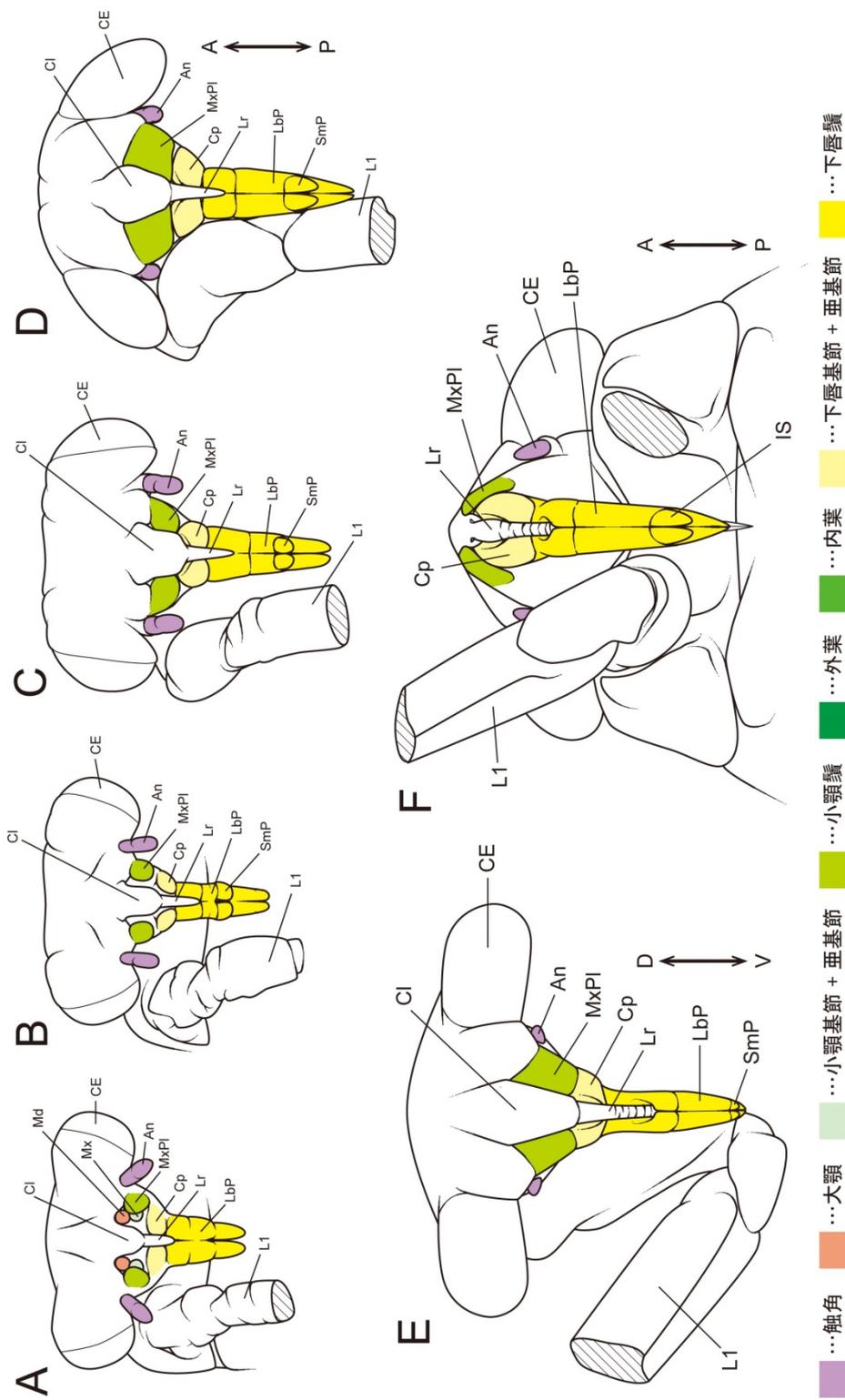


図 III-21. コオイムシ *Appasus japonicus* の口器形成

A-C: ステージ 8, D: ステージ 9, E, F: ステージ 10. 各付属肢に付した配色は図 III-19 の配色と対応する. An: 触角, CE: 複眼, Cl: 頭楯, Cp: 基肢節, Lr: 上唇, L1: 胸部第 1 付属肢 (前脚), LbP: 下唇, Mx: 大顎, MxPI: 小顎, MxP: 小顎, IS: 下唇小片.

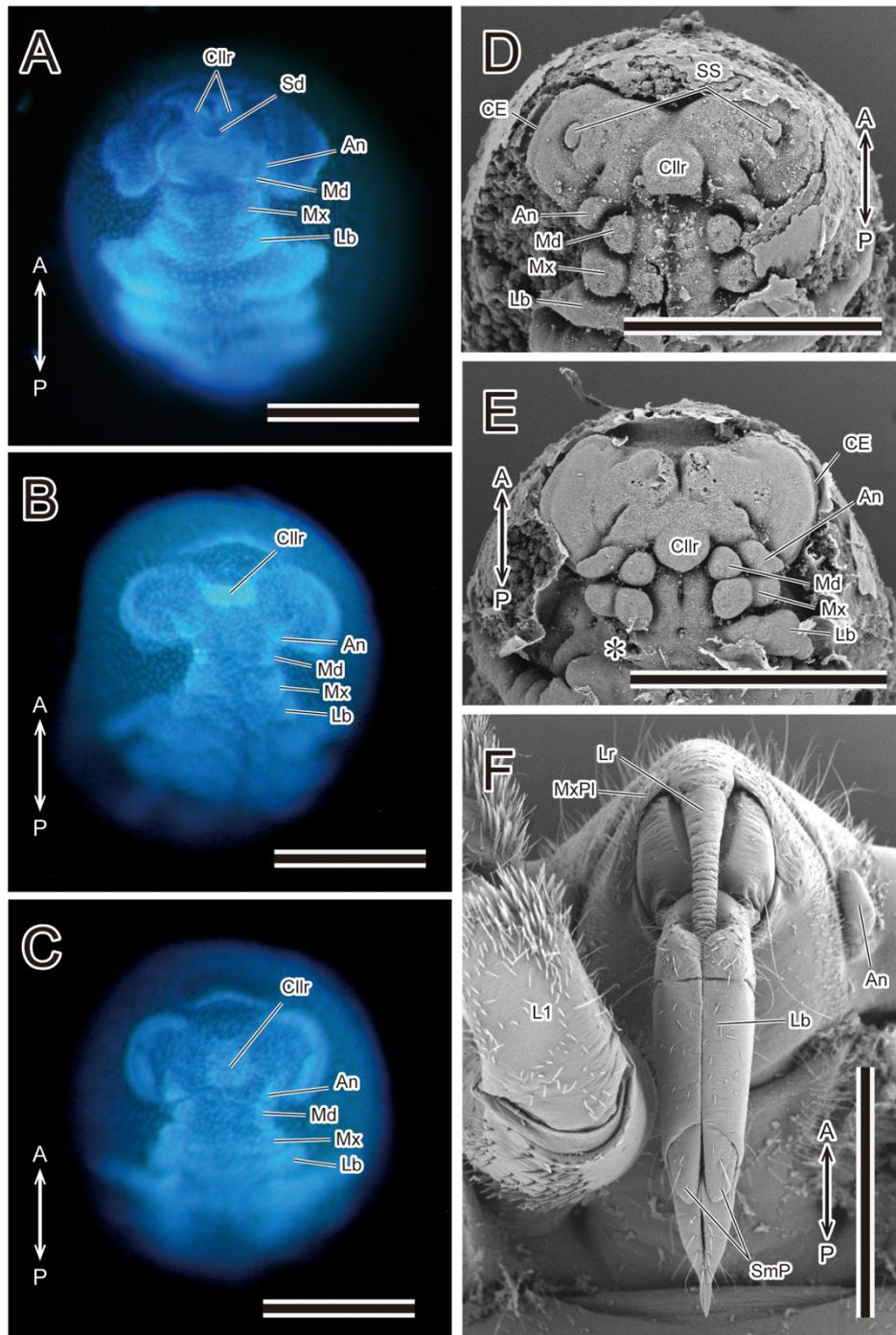


図 III-22. コオイムシ *Appasus japonicus* の胚発生期、および 1 齢幼虫における頭部とその周辺構造

頭楯上唇原基の初期形成過程 (A-C)、小隆起の出現および消失 (D, E)、1 齢幼虫の下唇小片 (F). \*部分はアーティファクト. An: 触角, CE: 複眼, Cllr: 頭楯上唇, Lb: 下唇, Md: 大顎, MxPl: 小顎板, Mx: 小顎, Sd: 口陥, IS: 下唇小片, SS: 小隆起. Bars=500 $\mu$ m.

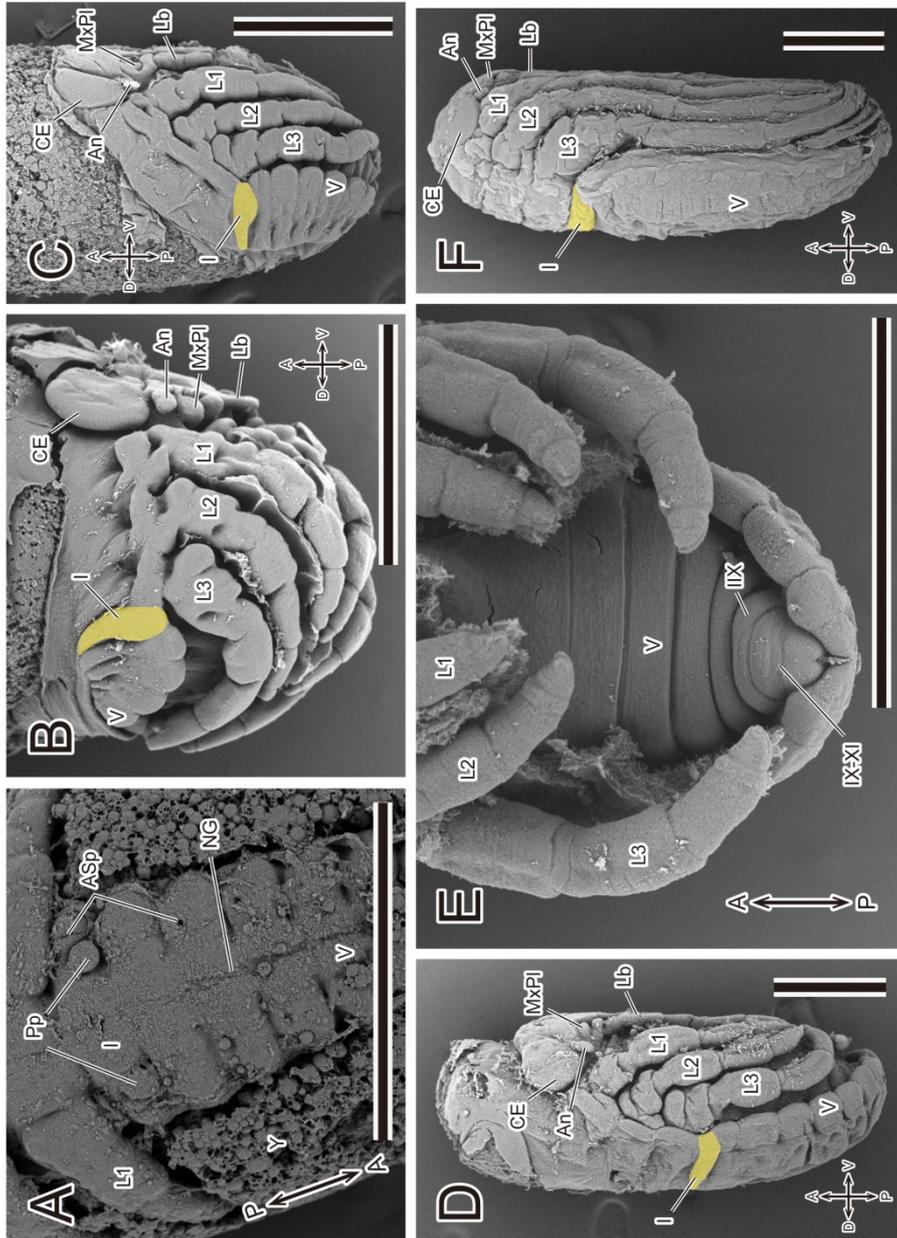


図 III-23. コオイムシ *Appasus japonicus* の腹部形成  
 ステージ 6 (A)、ステージ 7 (B)、ステージ 8 (C-E)、およびステージ 9 (F). 黄色部分は腹部第 1 節背板 I, V, IX, IX-XI: 腹部第 1, 5, 8, 9-11  
 節, An: 触角, Asp: 腹角, NG: 神経溝, PP: 側脚, Lb: 小顎板, MxPI: 下唇, L1-3: 胸部第 1-3 付属肢 (前-後脚), V: 複眼, Bars=500 $\mu$ m.

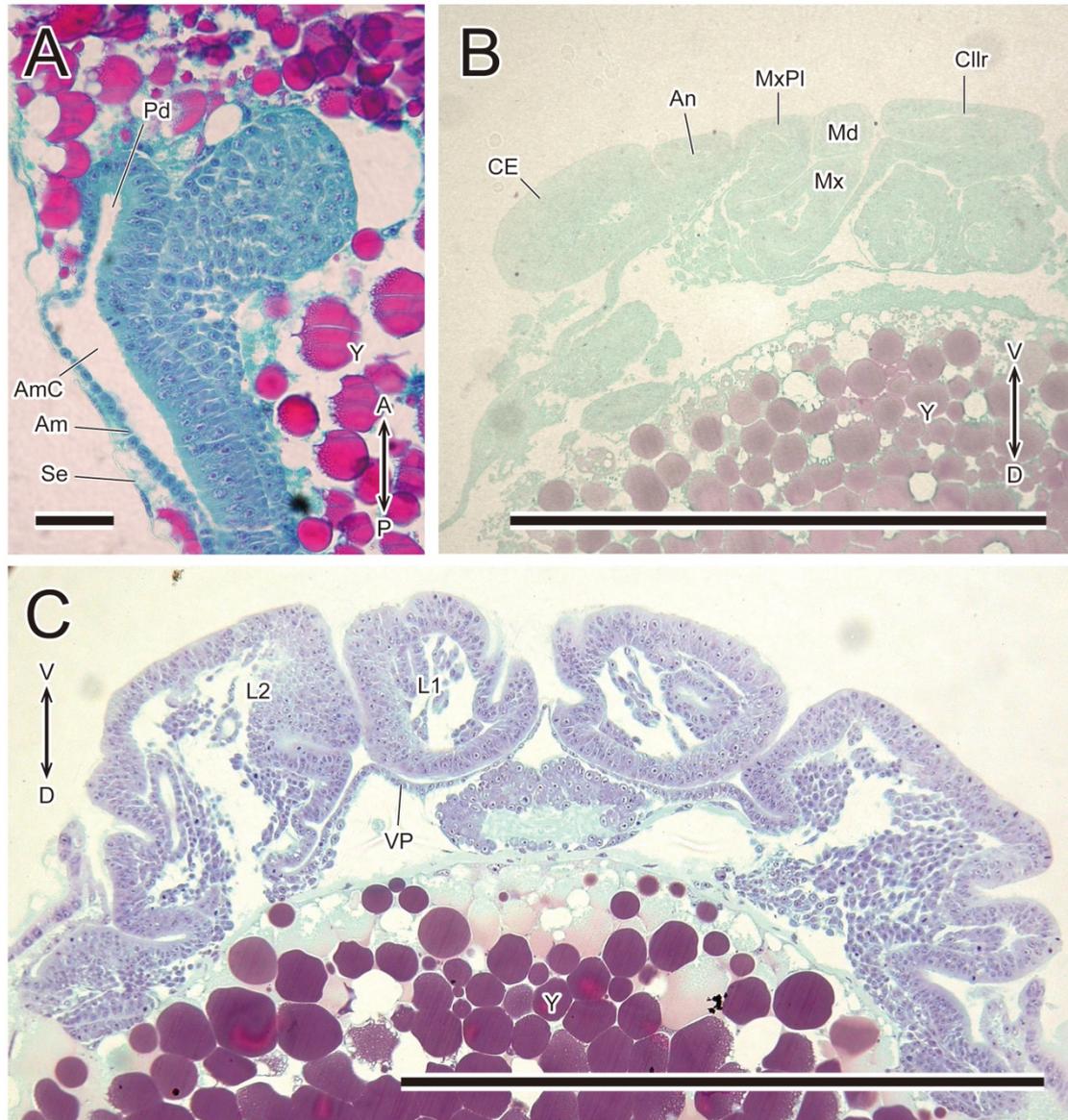


図 III-24. 組織切片によるコオイムシ *Appasus japonicus* の胚発生

ステージ 4 における肛門陥 proctodaeum の縦断面 (パラフィン切片) (A)、ステージ 8 における頭部の横断面 (樹脂切片) (B)、ステージ 7 における胸部第 2 節の横断面 (樹脂切片) (C). Am : 羊膜, AmC : 羊膜腔, An : 触角, CE : 複眼, Cllr : 頭楯上唇, L1, 2 : 胸部第 1, 2 付属肢 (前, 中脚), Md : 大顎, Mx : 小顎, MxPI : 小顎板, Pd : 肛門陥, Se : 漿膜, VP : 腹板. Bars : A=50 $\mu$ m, B, C=500 $\mu$ m.



図 III-25. コオイムシ *Appasus japonicus* の側脚  
 形成初期 (ステージ 5) の側脚 (A)、および胚体内へ陥没した後 (ステージ 7) の側脚 (B)。Am : 羊膜, L1-3 : 胸部第 1-3 付属肢 (前-後脚), Lb :  
 下唇, Mx : 小顎, Pp : 側脚, Se : 漿膜, GS : 腺状構造, Y : 卵黄。Bars = 500 $\mu$ m.

## 第 IV 章

### コオイムシにおける繁殖システム

## 第 IV 章 コオイムシにおける繁殖システム

### IV-1. 背景

タガメ亜科 Lethocerinae とコオイムシ亜科 Belostominae の 2 亜科から構成されるコオイムシ科 Belostomatidae 昆虫は、例外なくオス親のみが卵の世話をする「父育 paternal care」を行うことが知られている (Smith, 1979; Tallamy, 2001)。また、これらの亜科間では、父育の様式が大きく異なり、両亜科は父育の起源やそのスタイルの多様化を近縁な分類群間で比較する上でも重要な分類群である。

タガメ亜科昆虫はメス親が卵塊を水面上の基質 (水面上に突き出た木や水草) に産みつけ (Tallamy, 2001)、オス親は卵塊に対する水分の供給や (Ichikawa, 1989; Smith & Larsen, 1993)、配偶相手ではないメス個体による卵塊破壊行動からの保護を行うことで卵の孵化率を高めていると考えられている (Ichikawa, 1990, 1995)。近年では、オス親が 1 齢幼虫の保護を行うことも明らかとなっている (Ohba *et al.*, 2006)。また、このような繁殖システムであるため、配偶相手 (オス) を得られないメスが、卵塊を保護しているオスと交尾するためにそのオスが保護している卵塊を破壊する行動も報告されている (Ichikawa, 1990, 1995)。

一方のコオイムシ亜科昆虫では、交尾後、メスは交尾相手 (オス) の背に卵塊を産みつける (Lauck & Menke, 1961)。このように卵塊を背負うスタイルで卵塊保護を行うオス親は、水面上に定位することで卵内への酸素の供給量を高めたり (Smith, 1976a, 1979)、陸上に定位して卵塊表面を乾かしたりすることで、菌類の発生を防止するなどにより卵の発生率を高めていると考えられている (川野, 2003)。また、オス親自身が移動することにより卵の被食率低下を促すなど、これらの複合的行動により繁殖適応度を高めていると考えられている。このように、コオイムシ亜科昆虫の繁殖システムは効率的酸素供給や耐乾燥、対天敵という点においてたいへん優れたシステムであると言える (Kraus, 1989)。

一方、コオイムシ亜科昆虫の卵は、不慮の事故などにより孵化前にオスの背から剥離・脱落すると孵化できないことが断片的に知られてきた (Smith, 1976b)。しかしながら、こ

のような脱落卵が孵化に至らないことを科学的データによって示したり、実験的に示した事例はほとんどなく、また、脱落時の胚発生ステージと孵化率を関連づけた事例は皆無である。また、コオイムシ亜科昆虫では、オス親自身が卵塊を背負うスタイルの繁殖システムをもつため、背 (*i.e.*, 前胸背板や小楯版、前翅背面) のスペース的な制約により、一度に最大でも100卵程度しか背負うことができない。コオイムシでは一繁殖シーズンに8回、オオコオイムシでは6回の卵塊保護が報告されているなど (大和田, 2002; Ohba *et al.*, 2010)、コオイムシ類においては一繁殖シーズンに複数回の繁殖を行うこと、かつ同時に複数の交配メスの卵を背負うことはできるものの、背のスペース的な制約から世話できる卵数には制約が生じている (Smith, 1979; Ichikawa, 1989; Kraus, 1989; Kraus *et al.*, 1989)。さらに、近年のオオコオイムシにおけるマイクロサテライト解析を用いた研究において、背負っている卵塊のうち、平均すると約30%の卵は自身の精子で授精させた卵ではなく、他オスの精子により受精した卵であることが明らかとなっている (Inada *et al.*, 2011)。一般的には、父性が確実でない種では、オスの仔 (卵) に対する投資行動 (父育) はコストが大きくなることから進化しにくいと考えられている (Kokko & Jennions, 2003)。このような状況から、コオイムシ類においては「種内托卵」や、魚類などに多くみられる「スニーカー」が存在する可能性が考えられる。

本章では、まずコオイムシにおいてオスの背から剥離・脱落した卵の孵化率を確認する実験を実施した。さらに個体識別した複数ペアを実験室内で飼育して交配させることにより、オス親が背負った卵塊の全てが孵化した後、直ぐに次の繁殖へと移行するか否かを検証した。魚類においては、体サイズが大きい個体がメスに選択されやすいといった傾向が強く、そのような種群では体サイズの小さな個体は「スニーカー」となることが報告されている (Taborsky, 2008)。コオイムシ類においてもオスにとっては背のスペースが広いほど多くの卵を背負うことが可能であり、このようなオスがメスから選択されやすい可能性も考えられるため、オス親が背負う卵塊数および卵数とオスの体サイズの間に関係があるか

否かを検証することで、コオイムシ類における繁殖システム、「種内托卵」や「スニーカー」の存在の有無について追究した。

## IV-2. 材料と方法

### IV-2-1. サンプルング

第 III 章における研究課題で実施したサンプルングと同様、長野県松本市稲倉地区にて卵塊剥離実験による父育の必要不可欠性検証用 (5 ペア)、および個体識別して実験室内で飼育、交配させ、オスが父育を完了した後に、直ぐに次の繁殖へ移行するか否かを検証し、さらにオスの背負う卵塊数および卵数とオスの体サイズとの相関を検証するためのコオイムシ (20 ペア) を採集した。実験室では、卵塊剥離実験用の個体と繁殖システム観察用の個体を別々の飼育容器 (365×210×150mm) にて室温で飼育し、自由交配させた。

### IV-2-2. 卵塊剥離実験

父育の必要不可欠性を検証するため、飼育容器内で繁殖 (交尾・産卵) させ、卵塊を背負ったオスを確保した。これらの卵塊を背負ったオスに対して、約半数の卵 (卵塊の約半分) を背から剥ぎ取り、人為的に落下させた。人為的に落下させた半分の卵塊 (実験区) と残り半分の卵塊を背負ったオス [対照区 (コントロール)] をそれぞれ、水を容器の半分程度まで入れた同規格のプラスチック容器 (111×78×42mm) に移し、25°Cの同一条件化でインキュベートした。また、コオイムシ類においては卵塊を背負ったオスが、卵塊を水面上に出す行動が知られていることから (川野, 2003)、対照区の容器内にはオスの足場となる構造物を入れて、このような行動が可能になるようにした。その後、実験区と対照区において胚発生が正常に進行するか否かを観察した。落下させる卵の発生ステージは、第 III 章で定義したステージ 1, 4, 8, 9 で行い (ステージ 1 は産卵直後、ステージ 9 は孵化直前に

まで胚発生が進行したステージ)、落下時の発生段階による孵化率の変動の有無を検証した。卵塊の半分を剥離させた行為そのものが、その後の胚発生の進行や、孵化に与える影響を評価するため、一度、剥離させた卵塊を再度、人為的にオス親の背に付着させた場合、その後の胚発生の進行や孵化に影響を与えないことを予備的実験において確認している。また、川野 (2003) によるオオコオイムシでの実験においても、人為的な卵塊剥離がその後の胚発生の進行に影響しないことが示されている。

#### IV-2-3. 室内飼育実験による繁殖システム観察

コオイムシにおける繁殖システムを観察し、オスが背負う卵数における個体差の有無を確認するため、実験室内でコオイムシ (20 ペア) を 2012 年 6 月末から 7 月末まで約 1 ヶ月間 (34 日間)、実験室内の飼育容器 (365×210×150mm) にて飼育した。飼育容器内には全飼育個体に対して十分な数の足場 (樹木の枯れ枝) を入れ、容器の半分程度まで水を入れた。餌としてカゲロウ類の幼虫を毎日 100 個体以上与えた。全ての飼育個体には前胸背板に油性ペン (ぺんてる ホワイト極細; ペンてる株式会社, 東京) で番号を付し、個体識別を行った。飼育期間中に卵塊を背負ったオスについては、別容器 (111×78×42mm) で個別飼育し、背負っている卵塊の孵化が完了し、卵塊の剥離を確認した後に飼育容器へ戻した。飼育期間中にオスが背負った卵塊とその卵数を記録し、卵塊を複数回背負うオスや全く背負わないオスの有無を検証した。

#### IV-2-4. オスの背負う卵数と体サイズの比較

飼育実験終了後、オスの体サイズ [卵塊を背負うことが可能なスペース (=背部の広さ)] と実際に背負った卵数の実測データ間での相関関係の有無を確認するために、飼育実験に用いた全 20 個体のオスの体長を計測した。また、前胸部の幅を計測し、体長と前胸部幅間における相関係数を算出し t 検定を実施したところ、強い相関が認められ (相関係数  $r =$

0.95,  $p < 0.001$ )、体長が大きい個体では前胸部幅も広く、卵塊を背負うことが可能な背部のスペースも広くなることが示されたことから、体長の計測値を各個体の体サイズとして扱った。次に、それぞれのオスが背負った卵数の平均値を算出して、オスの体長と背負った卵数の平均値間での相関係数を算出し t 検定を実施した。

#### IV-2-5. 成虫メスの卵巣内における成熟卵数

コオイムシの繁殖期である 7 月末に、成熟メス成虫 10 個体を長野県松本市稲倉地区より採集し、双眼実体顕微鏡 SMZ1500 (Nikon, 東京) 下で腹部を解剖し、成熟蔵卵数を確認した。成熟卵の判定においては、卵殻形成 chorionization が生じているか否かを指標とした。

### IV-3. 結果

#### IV-3-1. 卵塊剥離実験結果

父育の必要不可欠性を検証するために、コオイムシにおける卵塊剥離実験を行った結果、コントロール区 (父育を受けつづけた卵塊) では孵化率が平均で 95.3 (S.D.=4.6) %であったのに対し、卵塊剥離させた実験区 (父育を人為的に停止させた卵塊) ではいずれのステージで剥離させた場合においても孵化率は 0 (S.D.=0.0) %であった。産卵直後にあたるステージ 1 や胚発生の前期ステージに相当するステージ 4 において卵塊を剥離・落下させた場合、父育を受けられなくてもステージ 8 までの胚発生は進行したものの (図 IV-1)、このステージ 8 で胚発生は停止し、これ以降の胚発生は進行しなかった。また、胚発生の後期にあたるステージ 8 や孵化直前のステージ 9 で卵塊を剥離させた場合、孵化直前まで胚発生が進行するものの、孵化には至らなかった。

#### IV-3-2. 室内飼育実験による繁殖システム観察結果

実験室内で個体識別したコオイムシ (20 ペア) を飼育した結果、オス 20 個体のうちの 2 個体は飼育期間中に一度も卵塊を背負うことがなかった (図 IV-2)。父育した (卵塊を背負った) 回数が最も多かった個体は個体番号 3, 5, 9, 10, および 15-20 の 10 個体でいずれも期間内に 3 回の繁殖 (父育) が観察された。しかしながら、父育回数が多い個体の中でも、一度に背負う卵数はオス個体によって大きく異なり、3 回卵塊を背負った個体の中で最も多く卵を背負った個体では合計 301 卵 [平均 100.3 (S.D.=5.5) 卵] を父育したのに対し、最も少なかった個体では 78 卵 [平均 26.0 (S.D.=21.9) 卵] であった (図 IV-2)。また、背負った卵数と体サイズの間に関連は認められなかった (相関係数  $r = -0.13$ ,  $p = 0.58$ ; 図 IV-3)。

#### IV-3-3. 成虫メスの卵巣内における成熟卵数

繁殖期のメス成虫 23 個体における卵巣内の成熟卵数を計数した結果、最も多かった個体で 46 卵、最も少なかった個体では 5 卵で、平均は 22.6 (S.D.=13.5) 卵であった。

### IV-4. 考察

#### IV-4-1. 父育の必要不可欠性

コントロールとして位置づけた父育を受けつづけた通常の卵塊の孵化率は 95.3 (S.D.=4.6) % とたいへん高い値であった。一方、父育中のコオイムシのオス親が背負っている卵塊のうち、約半分を人為的に剥離・脱落させることで、父育を人為的に停止させた卵塊での孵化率はいずれの発生ステージで停止させた場合においても孵化率は 0% であった。これらのことから、コオイムシにおける卵が、自然界で偶然的にオスの背から脱落し、水中に落下してしまった場合、その卵塊はいずれのステージであっても孵化に至らないと言える。

一方で、産卵直後にあたる発生ステージ 1 で剥離・脱落させた卵についてもステージ 8 までは胚発生が進行したことから、胚発生後期 (ステージ 8 以降) にはとくに胚発生の進行における酸素必要量が高まるために、これ以降の胚発生が進行しなかったのかもしれない。このことは、卵が成熟するステージになるとオス親は陸上に定位する傾向が強まるとする川野 (2003) によるオオコオイムシのオス親における父育行動の観察結果にも合致する。

また、孵化直前のステージ 9 で剥離・脱落させた条件下においても、オス親の背から落下してしまうと孵化できないことが明らかとなった。本研究を進める過程では、100 個体以上にもおよぶコオイムシの孵化の様子を観察してきたが、1 齢幼虫が孵化する際、幼虫の上半身が卵殻から抜け出し、全 3 対の胸部付属肢 (*i.e.*, 歩脚) が卵殻から抜け出た後には、例外なくオス親が水中へと潜り、孵化終盤に 1 齢幼虫が卵殻から抜け出すことを補助するオス親の行動が観察された (図 IV-4)。このような孵化時にオス親がとる行動は、コオイムシおよびオオコオイムシの孵化を観察した先行研究においても報告されている (川野, 2003)。これらのことから、コオイムシにおいてはいずれの発生ステージの卵 (塊) であっても、父育中に脱落してしまった場合の生存率が極めて低くなるため、メスがオスの背に産卵する際には固着物質によって容易に卵塊が脱落しないようにし、さらに、胚発生中に形成される側脚から胚発生後期に分泌される酵素が固着物質の固着力を低下させる働きが、コオイムシにおける繁殖システムにおいて極めて重要な役割を果たしていると言える。

#### IV-4-2. コオイムシ類における繁殖システム

一般的に父性が確実でない種では、仔 (卵) に対する投資行動 (父育) はコストが大きくなることから進化しにくいと言われているが (Kokko & Jennions, 2003)、オオコオイムシにおいてはその父性が確実でない場合もあることが、先行研究により明らかとなっている (Inada, 2011)。父性が確実でない要因として、メスには貯精囊 sperm reservoir があり、コオ

イムシ類の繁殖形態が乱婚型であることが挙げられる。また、オスが背負う卵塊は、多い場合は 100 卵以上にも達するが (図 IV-2)、本研究で観察したコオイムシの成熟メスにおける卵巣内の成熟卵数においては、最多個体でも 46 卵であり、オスが一度に背負うことのある卵数の半分以下しかないことが示された。このことから、オス親の背負う卵塊には、とくに 50 卵を越えるような卵数を背負っている場合は、ほぼ確実に複数のメスによって産みつけられた卵が混在していると言える。このような状況が父性低下の一因を招いているものと言える。

しかしながら、現実としてコオイムシ類においては父育システムが進化し、現在でも維持されている。これは、オスが卵塊を背負うことで動きにくくなったり、外敵に見つかりやすくなったりするといった、デメリットを上回るメリットが存在しているためであることが考えられる。コオイムシ類と同様に父育行動を行うことが報告されている南米産ザトウムシの一種 *Pseudopucroliia* sp. (節足動物門, 鋏角綱) では、メスは卵塊を保護しているオス個体を有意に選好して、オスにより保護されている卵塊に卵を産み足す傾向が強いという興味深い結果が示されている (Nazareth & Machado, 2010)。つまり、卵塊を保護するオスは交配相手としてメスからより選択されやすくなるようなシステムが成立していると言える。コオイムシにおける繁殖システムについても同様の傾向がある可能性が考えられており (大庭, 私信)、また、本研究における飼育実験の結果においても、ある特定のオスが卵塊を背負いやすく、背負う卵数も多いことが示された (図 IV-2)。つまり、最初の卵を背負い始める段階で、メスから交配相手として選択されやすい個体と、そうでない個体が存在するものと考えられる。魚類においては、体サイズが大きい個体がメスに選択されやすいといった傾向が強く、そのような種群においては体サイズの小さな個体は「スニーカー」となるが (Taborsky, 2008)、コオイムシにおいては体サイズと背負う卵数には相関が認められなかった (図 IV-3)。どのような基準で、オスがメスに選択されているのかについての詳細は不明であるが、少なくとも体サイズが大きく、卵を背負う背部のスペースが広い個体

がメスから選択されているわけではないことが、本研究の結果から明らかとなった。

しかし、飼育実験期間を通して一度も卵塊を背負うことのなかったようなオスに関して、交尾を行い、メスの貯精嚢へ精子を送り込んでいた可能性も否定はできない。さらには、このような個体の精子が受精に用いられた可能性も否定できない。鳥類では 100 以上の種でペア外のオスが父親であることが報告されているほか (Birkhead, 1998)、魚類においては「スニーカー」の存在が多く報告されている (e.g., ピーコック・ブレニー *Salarias pavo*: Gonçalves *et al.*, 1996; クモハゼ *Bathygobius fuscus*: Taru *et al.*, 2002)。また、一部の昆虫類においても「スニーカー」の存在が報告されており (e.g., フンコロガシ *Onthophagus taurus*: Emlen, 1997; Emlen & Nijhout, 1999)、コオイムシにおいても乱婚型の繁殖システムをうまく利用し、自分の精子によって授精させた卵を他オスに背負わせて保護してもらう、といった「種内托卵」のような現象が生じている可能性がある。一般的には、父性が低くなると父育システムは進化しにくいとされており、父育を行う種群においては、ヨウジウオ類やタツノオトシゴ類でみられるように、たいへん特殊な繁殖方法で父性を確実にしている [ヨウジウオ類・タツノオトシゴ類では、メスが未受精卵をオスの育児嚢内へ移し、オスはこの育児嚢内に直接精子を放出する (Jones & Avise, 1997; Jones *et al.*, 1998)]。父育を行うにも関わらず父性が確実にないコオイムシ類は、たいへん興味深い種群であると言える。

仮に、コオイムシ類において種内托卵が生じているとなれば、多様な繁殖システムを有することで知られる昆虫類においても、初めての事例となり、たいへん興味深い。本研究ではこの実験に用いた全ての個体のトータル DNA (genomic DNA)、および孵化した幼虫全個体のトータル DNA を解析可能な状態で保管しているため、今後、マイクロサテライトマーカーの開発・設計、およびマイクロサテライト法を用いた親子識別を行うことで、このような種内托卵の可能性についても追究していく計画である。

表IV-1. 卵塊剥離実験の結果

コントロール区 (父育あり)			
卵塊No. (総卵数)	父育を続けさせた卵数	孵化個体数	孵化率 (%)
No.1 (35)	23	23	100.0
No.2 (52)	42	40	95.2
No.3 (74)	44	43	97.7
No.4 (83)	48	44	91.7
No.5 (73)	49	47	95.9
No.6 (57)	32	32	100.0
No.7 (85)	57	49	86.0
平均±S.D			
	42.1±10.5	39.7±8.5	95.3±4.6
実験区 (父育の人為的停止)			
卵塊No. (卵塊剥離時の発生ステージ)	剥離卵数	孵化個体数	孵化率 (%)
No.1 (ステージ1)	12	0	0.0
No.2 (ステージ1)	10	0	0.0
No.3 (ステージ1)	30	0	0.0
No.4 (ステージ4)	35	0	0.0
No.5 (ステージ8)	24	0	0.0
No.6 (ステージ9)	25	0	0.0
No.7 (ステージ9)	28	0	0.0
平均±S.D			
	23.4±8.6	0.0±0.0	0.0±0.0



図 IV-1. 発生ステージ 1 (産卵直後のステージ) でオス親の背より剥離・脱落させた後、14 日間インキュベートしたコオイムシの卵  
ステージ 8 まで胚発生が進行し、複眼 (CE) の形成が確認できる. CE: 複眼. Bar=500 $\mu$ m.



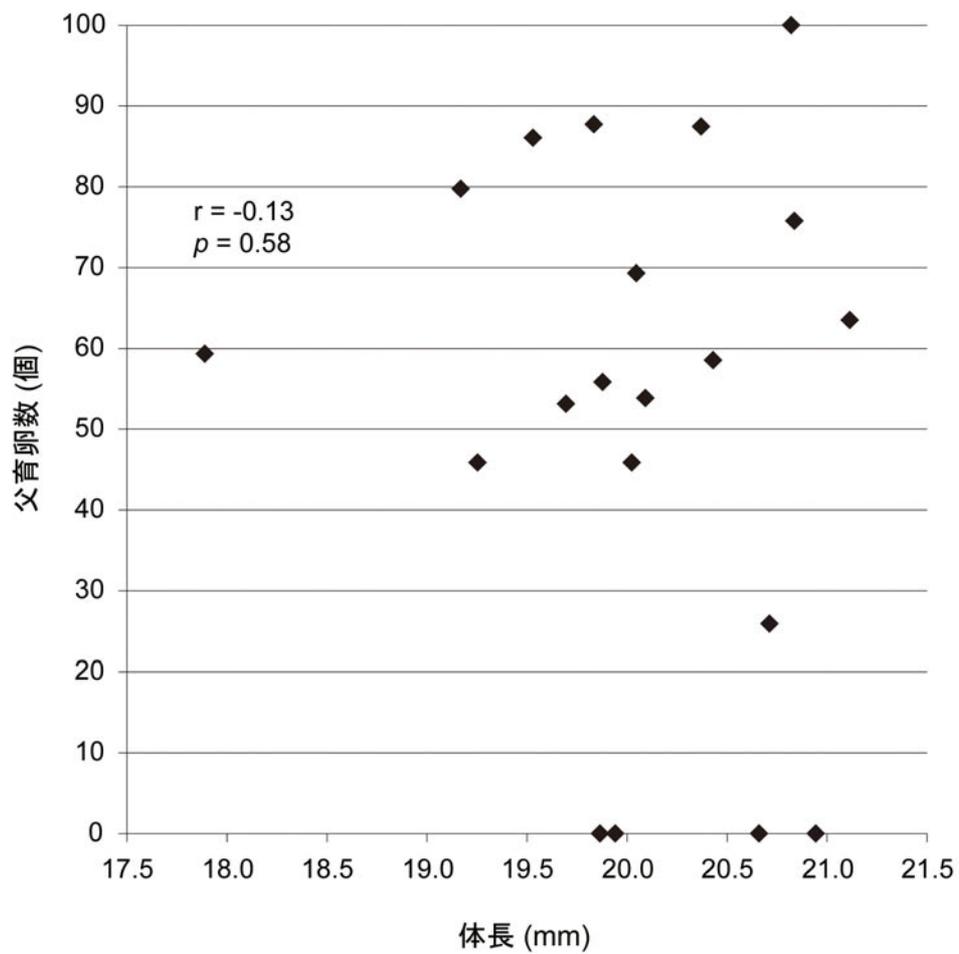


図 IV-3. コオイムシにおけるオス個体あたりの父育卵数と体長の相関  
 父育卵数と体長には相関がみられなかった。r：相関係数。

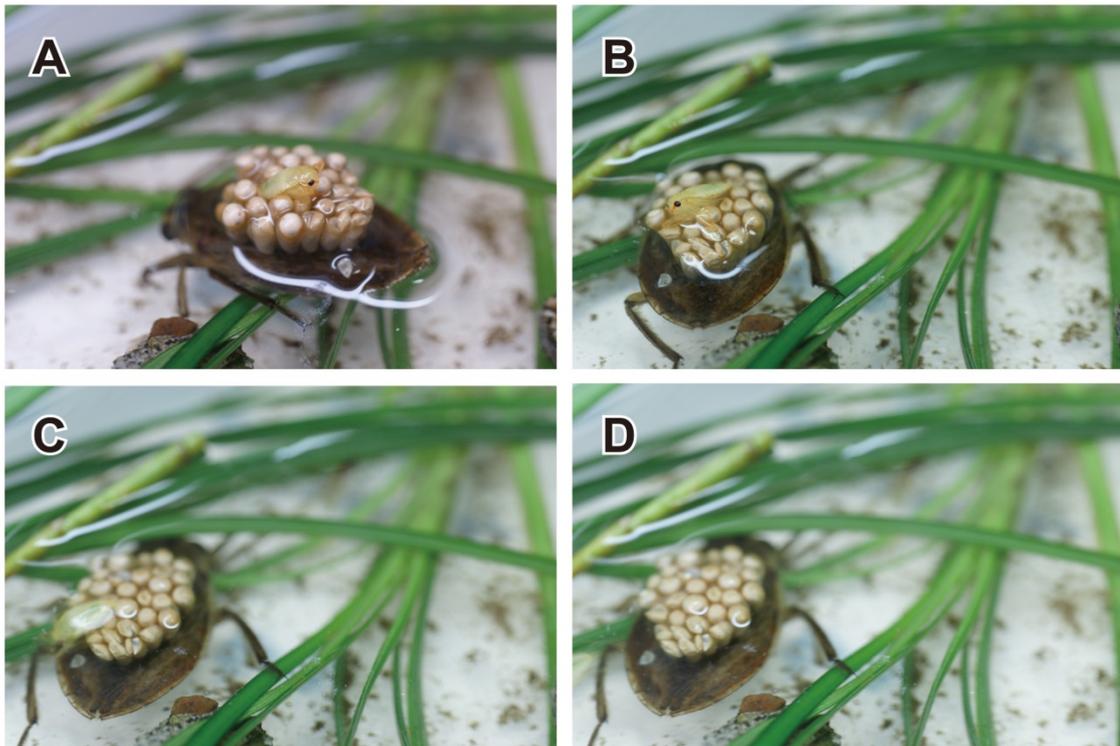


図 IV-4. コオイムシにおける 1 齢幼虫孵化時にオス親がとる行動

A : 卵塊が水面に出た状態で 1 齢幼虫の体が 3 分の 2 程度卵外へ出てくる. B : 1 齢幼虫の頭胸部、とくに全 3 対 6 本の歩脚が抜け出すと、オス親は水中へ潜る行動をとる. C : 1 齢幼虫の全身が卵殻から出る. D : 1 齢幼虫は泳いでオス親から離れる.

## 総合考察

## 総合考察

緒言でも述べたように、地球上の生物は様々な要因が複雑に絡み合うことによって、多種多様な進化を成し遂げてきた。したがって、一つの生命現象を解き明かすためには、「エボ (系統進化 evolution) -デボ (発生 development) -エコ (生態 ecology)」といった多角的なアプローチが必須であると言える。しかしながら、このような多角的なアプローチを行うには、系統進化・発生・生態それぞれの基礎生物学的な知見が必須である。

本研究で着目したコオイムシ類 (半翅目, コオイムシ亜科) は、オス親が卵塊を背負って孵化まで世話をするという、たいへん特殊な父育を進化させた。安藤 (1991, 1999) は、この特殊な父育には、胚発生中に腹部第 1 節の付属肢として分化し、胚発生期間に限定される器官である「側脚 pleuropodia」が深く関係しているのではないかという仮説を提案した。一般的な昆虫類においては、側脚から孵化酵素を分泌することが知られており、この酵素が固い卵殻を分解することで孵化時に卵殻を破り易くする働きをすることがバツタ類などで実証されている (Slifer, 1937, 1938)。また、コオイムシ類ではオスの背にメスが卵を産み付ける際に、卵が父育途中に落下しないよう、(オス親も自力で背負い始めた卵塊を剥離させることは困難なほど) 卵を固着物質でしっかりとオスの背に接着させるが、幼虫の孵化後にはオス親が空卵塊を容易に剥離させることが知られている。安藤 (1991, 1999) の仮説は、コオイムシ類では孵化酵素をモディファイさせ、固着物質の固着力を低下させることで、オス親は孵化後の空卵塊を容易に剥離させることが可能になったのではないかというものである。

谷澤 (2007a, b) はこの仮説を受けて、断片的に側脚の働きを明らかにした。谷澤 (2007a) における実験では、オス親が背負う卵塊の半分の卵を実験区とし、側脚が形成される前の胚発生ステージで発生を停止させ、残る半分をコントロール区として正常に発生を進行させた。その結果、コントロール区においては正常に卵塊剥離が生じたが、実験区においては卵塊剥離が生じなかったことから、谷澤 (2007a) は卵塊剥離に孵化酵素が関与している

ことを示唆した。しかしながら、この実験における実験区への処理は、熱メスを用いて発生初期段階で卵を焼き殺すことで、胚発生を停止させるというもので、酵素分泌の有無だけでなく発生途中で胚が死亡することによる影響が考慮されておらず、酵素分泌ステージ後に同様の処理を施すことによる対照実験の必要性が課題として残っている。

このように、検証すべき課題はあるもののコオイムシ類におけるオス親が卵塊を背負うという特殊な父育行動の進化には胚発生が深く関係している可能性が極めて高く、系統進化・発生・生態分野を統合した多角的なアプローチを行うことで、このような特殊な父育がどのように進化してきたのかを明らかにすることは重要であると言える。しかしながら、コオイムシ類における胚発生の基礎的な知見はほとんどなかった。さらに、日本産コオイムシ類にはコオイムシ・オオコオイムシ間で種識別が困難であり、種間交雑も示唆されるなど(星川, 2001)、系統進化・発生・生態分野を統合した多角的なアプローチを行うには解決しなければならない問題点が多くあった。本研究は、第 I 章でコオイムシ・オオコオイムシの分類学的問題の解決を目的とし、両種は形態的にオーバーラップがあるため、単独の形態形質を用いた種識別が困難ではあるものの、複数形態形質を用いて主成分分析を行うことで、誤同定のリスクをある程度回避できること、また、遺伝子解析の結果、両種は遺伝的には大きく分化しており、種間交雑も生じていないことを明らかにした。第 II 章では遺伝子解析を行い、両種の個体群構造を明らかにし、その遺伝的構造が種間で大きく異なることを明らかにした。さらに、第 III 章ではコオイムシの胚発生について、その詳細な外部形態形成過程を明らかにした。これによって、コオイムシ類における基礎生物学的基盤を築いた。

これらの結果を基盤にし、今後はコオイムシ類を材料として系統進化・発生・生態分野を統合した多角的なアプローチから、コオイムシ類における特殊な父育行動の進化・維持機構を解明することが可能になったと言える。例えば、RNAi 法などの実験発生学的手法を用いることにより、側脚の酵素分泌機能を失わせる(側脚の分化そのものを抑制する)

ことで、卵を死亡させることなく、直接的な側脚における機能の検証が可能となるかもしれない (実際、コオイムシで発現する機能遺伝子の発現解析をするべく、RNA 抽出を実施し、cDNA ライブラリー作成までを済ませた段階にある)。しかし、このような実験発生学的手法を取り入れる際には、まず正常発生がどのように進行するのかを理解している必要性があり、本研究で得られた発生学の基礎的な知見は必要不可欠である。

また、他の昆虫類 (あるいは節足動物類) において明らかとなっている孵化酵素を参考に、コオイムシにおける孵化酵素のスクリーニングを行い、酵素の成分や酵素タンパク質を特定することが可能かもしれない。酵素の特定が行えれば、人工酵素を生成し、オス親が背負い始めた発生初期段階の卵塊の固着物質に滴下することにより、側脚形成前に固着力が低下するか否かを検証することが可能となる。この実験についても、本研究で得られた側脚の形成過程における基礎的な知見がなければ成立しないだろう。また、孵化酵素の特定は、コオイムシ類における特殊な父育行動の進化が如何にして生じたのかを明らかにする上でも重要であると言える。コオイムシ科で卵塊を背負わずに父育を行うタガメ亜科昆虫における孵化酵素の特定も併せて行い、その比較を行うことで、コオイムシ亜科とタガメ亜科における酵素の差違を明らかにし、具体的にコオイムシ亜科がどのように酵素をモディファイさせたことによって、現在のような父育システムを獲得できたのかについて言及することが可能かもしれない。

一方、側脚機能を変化させたことを明らかにできたとしても、水面上の基質に卵塊を産みつけるタガメ亜科昆虫の父育システムから、どのようにしてコオイムシ類のように卵塊を背負うという特殊な父育システムが進化していったのかについては、タガメ亜科昆虫とコオイムシ亜科昆虫の父育システムの間接的な形質をもつ種群が存在しないため、その究明はたいへん困難である。参考になる例として、コオイムシ類と同様にオスが卵を背負って父育を行う陸生カメムシ類のヘリカメムシ科の一種 *Phyllomorpha laciniata* では、メスが誤ってオスの背以外の基質に産卵してしまうケースが知られており、そのような卵につい

ては極めて高い確率で寄生蜂に寄生されてしまい、このような状況が父育システムの進化・維持に繋がっている可能性が示唆されている (García-González *et al.*, 2003)。コオイムシ類においても、現生タガメ類のように水面上の基質に卵を産みつけていた祖先系統において、偶然的にオスの背に卵を産卵したメスが出現し、現在のコオイムシ類の系統に至るようなたいへん特殊化した父育システムが進化したのかもしれない。さらに、父育を受けなければ卵が孵化まで至らないという状況が、コオイムシ類における父育システムの進化・維持に繋がったのかもしれない。

また、コオイムシ類は飼育・採卵が容易であり、継代飼育も可能であることから、今後、新たなモデル生物として確立することも可能であると考えられる。その際にも、本研究で行った基礎生物学的研究が必要不可欠となるだろう。近年では、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析プロジェクトも非モデル生物を含む様々な生物で行われていることから、コオイムシについても全ゲノムを決定することを視野に入れる必要があるだろう。

さらに第 IV 章では、飼育実験からコオイムシにおける種内托卵・スニーカーの存在の可能性を示唆したが、この結果は、今後コオイムシ類における繁殖システムについて追究するための重要な知見であると考えられる。Inada *et al.* (2011) ではオオコオイムシの父性を確認するために 3 座位のマイクロサテライトマーカーを開発し、その父性が平均で約 70% 程度であることを明らかにしている。本研究ではこのマイクロサテライトマーカーを用いて、飼育実験に用いたコオイムシの親子関係を推定しようと試みたが、オオコオイムシのマイクロサテライト用に設計されたプライマーであったため、残念ながら上手く解析が行えなかった。しかしながら、前述のようにコオイムシについても次世代シーケンサーを利用したメタゲノム解析を行うことで、マイクロサテライトマーカーを開発することが容易に可能となり、種内托卵・スニーカーの存在について、具体的な検証が可能になるものと言える。このような解析を行う際には、本研究の第 I 章で明らかにした系統分類学的知見はもちろんのこと、第 II 章で明らかにした種内の個体群構造における知見についてもた

いへん重要になる。なぜなら、マイクロサテライト解析を行う際には、どのような地域個体群を材料として用いるかによって、有用な座位が変わってくる可能性があるからである。これまで挙げてきたことが究明されれば、コオイムシ類のみではなく、他の節足動物、さらには動物界の父育システム進化・維持機構における重要な知見となり得ると考えられ、いずれも本研究において明らかとなった基礎生物学的知見が必要不可欠であると言える。

また、各章における主目的を追究している際に派生的に明らかとなった事象についても、たいへん興味深く、進化生物学的に重要な知見であると言える。これまでコオイムシおよびオオコオイムシを種識別する際に最も有用であり、誤同定もないと考えられてきたオスの交尾器側葉片先端の形態が、日本国内の両種個体群を対象にした場合であればコオイムシの交尾器側葉片の先端は鉤型で、オオコオイムシでは波型であることで種識別が可能であるものの、大陸産個体群については両種ともに波型であるために、この形態形質は両種の識別において適用できないことも明らかとなった。大陸では両種ともに波型であったことから、波型が祖先形質であり、日本国内においては形質置換が生じていることも考えられる。日本国内には多数の混棲地が認められるほか、体サイズのオーバーラップもあることから、交尾器側葉片の形質置換が生じた一方で、大陸産コオイムシ類においては体サイズにオーバーラップがないことから、体サイズに形質置換が生じているのかもしれない。

また、本研究でのコオイムシにおける胚発生の外部形態観察で認められたステージ5において、頭部の複眼原基と正中線の間に分化する小隆起構造 (図 III-22D) は、他の昆虫類はもとより、他の節足動物類においても現在までに同様の構造が認められた報告はない。節足動物類における頭部前方領域の形態進化、その体節制について議論はいまだに解決しておらず、コオイムシにおける小隆起構造が、この議論に決着をつける上でたいへん重要な構造であると可能性がある。さらに、本研究はコオイムシにおける口器形成過程を詳細に観察し、小顎板が小顎鬚由来であることを明らかにした。Rogers *et al.* (2002) は、ナガカメムシ科の一種 *Oncopeltus fasciatus* における遺伝子発現パターンから小顎板を小顎鬚とは

異なる新たに獲得した構造であるとしたが、本研究において小顎板の形成過程を観察した結果、小顎端肢節から小顎板が形成されることから、小顎鬚由来であることは間違いないと言える。このことから、半翅目昆虫類における顎部の遺伝子発現パターンは、形態の特異化に伴い変化したことが考えられる。半翅目類はアザミウマ類と姉妹群であることが示唆されていることから (Wang *et al.*, 2013)、両種群の共通祖先のうち、小顎鬚を小顎板にモディファイさせた半翅目昆虫類の祖先が、高度に特殊化させた吸取型口器を獲得し、大きく多様化するに至ったのかもしれない。これらの知見についても、RNAi 法などの実験発生的手法を用いることで、さらに決定的な証拠を得ることができるかもしれない。

本研究はコオイムシ類において、系統進化・発生・生態の分野を複合した多角的なアプローチを行う際の基盤を築いたと言える。地球上には多種多様な生物が様々な進化を成し遂げており、私たち進化生物学者の興味関心が尽きることはない。しかしながら、如何なる生物であっても、その興味深い生命現象を追究する際には、その生物に関する基礎生物学的知見がなければ発展しないだろう。本研究の各章で得られた知見は、それぞれ個別にも進化生物学的にたいへん興味深く、重要な知見であることはもちろんであるが、コオイムシ類を用いて様々な研究を行う際に必要不可欠な多くの基礎生物学的知見を提供するものである。また、前述してきたようにコオイムシ類における系統進化・発生・生態の分野を複合した多角的なアプローチを用いた様々な追究は、コオイムシ類のみではなく、節足動物、さらには動物界における父育システムに関する進化生物学的研究に重要な知見を提供するものであり、本研究はその基盤となる重要な基礎生物学的研究であると考えられる。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、信州大学生物科学科の東城幸治准教授には研究活動の全過程を通じて多大なご協力を頂きました。また、首都大学東京の小林幸正博士をはじめ、筑波大学の町田龍一郎教授、八畑謙介講師、福島大学の塘忠顕教授、長崎大学の大庭伸也准教授、東海大学の北野忠准教授、徳島県徳島市の大原賢二氏、徳島県立博物館の山田量崇氏、豊田蛍の里ミュージアムの川野敬介氏、面河山岳博物館の矢野真志氏、北海道水生生物研究所の伊藤富子氏、千歳市教育委員会の久原直利氏、千葉県立中央博物館の倉西良一氏、横浜市の司村宜祥氏、福岡県保健環境研究所の中島淳氏、水源地環境センターの一柳英隆氏、新潟大学の大脇淳特任准教授、信州大学の井田秀行准教授、郡山市の吉井重幸氏、米国・ウィスコンシン大学の Sean D. Schoville 氏、農業生物資源研究所の畠山正統氏、姫路市立水族館の市川憲平氏、筑波大学の関谷薫氏、信州大学理学部の上田昇平氏、服部充氏、小西繭氏、氏家由利香氏、日本女子体育大学の鈴木信夫教授には、研究にあたって多くのご助言、ご指導やサンプル提供を頂きました。また、信州大学理学部の市野隆雄教授、浅見崇比呂教授、高田啓介准教授、柴田直樹准教授、佐藤利幸教授、藤山静雄教授、久保浩義教授、高橋耕一准教授にも、研究にあたり多くのご助言やご指導を頂きました。

農業生物資源研究所の関根一希氏には、実験手法や解析方法などにご助言を頂き、サンプル採集や野外調査などにも多大なご協力を頂きました。信州大学大学院総合工学系研究科の井坂友一氏、雪印メグミルク株式会社の谷澤 崇氏、北海道大学の末吉正尚氏、石山信雄氏には、研究にあたって多くのご助言やサンプル提供を頂きました。信州大学大学院工学系研究科・信州大学理学部生物科学科卒業生の國見順子氏、吉井幸氏、嘉納拓真氏、田中吉輝氏、菅家恵未氏、扇谷正樹氏、吉山直利氏、小林建介氏、久米あずさ氏、坂野亜矢菜氏、東北大学の森井悠太氏、広島大学の小巻翔平氏、東京大学の新井谷梨鈴氏、信州大学大学院総合工学系研究科の斎藤梨絵氏、信州大学大学院理工学系研究科の塚野真生氏、加藤慎也氏、加藤雄登氏、信州大学理学部生物科学科の竹中將起氏、篠田健太氏、三上賢

司氏、大西央士郎氏、柴田幸紀氏、田村大也氏には研究やサンプルの採集に際し、お手伝い頂きました。信州大学・理学部生物科学科の東城研究室の皆様には、日頃から多くのご助言を頂きました。

また、学生生活を続ける上で多大な支援をしてくださった両親や両祖父母をはじめ、多くの方々のご助力の下、研究活動を円滑に進めることができました。この場を借りて深く御礼申し上げます。最後に、研究材料として犠牲となった数多くのコオイムシ類に心より感謝の意を捧げます。

## 引用文献

- Alonso R, Crawford AJ, Bermingham E. 2012. Molecular phylogeny of an endemic radiation of Cuban toads (Bufonidae: Peltophryne) based on mitochondrial and nuclear genes. *Journal of Biogeography* 39: 434-451.
- 安藤 裕. 1991. 昆虫発生学入門. 東京: 東京大学出版会.
- 安藤 裕. 1999. 側脚 -胚子の間に生じ消滅する器官-. *インセクタリウム* 36: 40-346.
- Angelini DR, Kaufman TC. 2005. Functional analyses in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera) support a role for Wnt signaling in body segmentation but not appendage development. *Developmental Biology* 283: 409-423.
- Angelini DR, Liu PZ, Hughes CL, Kaufman TC. 2005. Hox gene function and interaction in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera). *Developmental Biology* 287: 440-455.
- Arai R, Fujikawa H, Nagata Y. 2007. Four new subspecies of Acheilognathus bitterlings (Cyprinidae: Acheilognathinae) from Japan. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series A (Zoology), Supplement* 1: 1-28.
- Arribas P, Velasco J, Abellán P, Sánchez-Fernández D, Andújar C, Calosi P, Millán A, Ribera I, Bilton DT. 2012. Dispersal ability rather than ecological tolerance drives differences in range size between lentic and lotic water beetles (Coleoptera: Hydrophilidae). *Journal of Biogeography* 39: 984-994.
- Birkhead TR. 1998. Sperm competition in birds: mechanisms and functions. Birkhead TR, Møller AP, eds. *Sperm competition and sexual selection*. San Diego: Academic Press.
- Butt FH. 1949. Embryology of the milkweed bug, *Oncopeltus Fasciatus* (Hemiptera). *Cornell University Agricultural Experiment Station* 283: 43.
- Clement M, Posada D, Crandall KA. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1659.

- Cobben RH. 1968. *Evolutionary trends in Heteroptera: Part I Eggs, architecture of the shell, gross embryology and eclosion*. Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation.
- Cognato AI, Vogler AP. 2001. Exploring data interaction and nucleotide alignment in a multiple gene analysis of *Ips* (Coleoptera: Scolytinae). *Systematic Biology* 50: 758-780.
- Cohen SM, Jürgens G. 1989. Proximal—distal pattern formation in *Drosophila*: cell autonomous requirement for *Distal-less* gene activity in limb development. *The EMBO Journal* 8: 2045-2055.
- Coyne JA, Orr HA. 2004. *Speciation*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Cryan JR. 2004. Molecular phylogeny of Cicadomorpha (Insecta: Hemiptera: Cicadoidea, Cercopoidea and Membracoidea): adding evidence to the controversy. *Systematic Entomology* 30: 563-574.
- Dame EA, Petren K. 2006. Behavioural mechanisms of invasion and displacement in Pacific island geckos (*Hemidactylus*). *Animal Behaviour* 71: 1165-1173.
- Diaz-Benjumea FJ, Cohen B, Cohen SM. 1994. Cell interaction between compartments establishes the proximal-distal axis of *Drosophila* legs. *Nature* 372: 175-179.
- Dobzhansky T. 1951. *Genetics and the origin of species, 3rd ed*. New York: Colombia University Press.
- Dorn A. 1976. Ultrastructure of embryonic envelopes and integument of *Oncopeltus fasciatus* Dallas (Insecta, Heteroptera) I. Chorion, amnion, serosa, integument. *Zoomorphology* 85: 111-131.
- Dorn A, Hoffmann P. 1983. Segmentation and differentiation of appendages during embryogenesis of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*: a scanning electron microscopical study. *Zoologische Jahrbucher. Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere* 109: 277-298.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969-1973.

- Emlen DJ. 1997. Alternative reproductive tactics and male dimorphism in the horned beetle *Onthophagus acuminatus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 41: 335-341.
- Emlen DJ, Nijhout HF. 1999. Hormonal control of male horn length dimorphism in the dung beetle *Onthophagus taurus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Insect Physiology* 45: 45-53.
- Esaki T. 1934. New or unrecorded aquatic Heteroptera from Japan and Saghalien. *Mushi* 7: 26-29.
- Excoffier L, Lischer HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- Farris JS, Källersjö M, Kluge AG, Bult C. 1995. Constructing a significance test for incongruence. *Systematic Biology* 44: 570-572.
- Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17: 368-376.
- Fitch WM. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Biology* 20: 406-416.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.
- García-González F, Núñez Y, Ponz F, Roldán ERS, Gomendio M. 2003. Sperm competition mechanisms, confidence of paternity, and the evolution of paternal care in the golden egg bug (Phyllomorpha laciniata). *Evolution* 57: 1078-1088.
- Grimaldi D, Engel MS. 2005 *Evolution of the Insects*. New York: Cambridge University Press.
- Gaston KJ. 2003. Range edges. In: Gaston KJ, ed. *The Structure and Dynamics of Geographic*. Oxford: Oxford University Press, 20-65.

- Gonçalves EJ, Almada VC, Oliveira RF, Santos AJ. 1996. Female mimicry as a mating tactic in males of the blenniid fish *Salaria pavo*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 76: 529-538.
- Gröning J, Hochkirch A. 2008. Reproductive interference between animal species. *The Quarterly Review of Biology* 83: 257-282.
- Gröning J, Lücke N, Finger A, Hochkirch A. 2007. Reproductive interference in two ground-hopper species: testing hypotheses of coexistence in the field. *Oikos* 116: 1449-1460.
- 林 正美, 宮本正一. 2005. 半翅目. 川合 禎, 谷田一三 (共編). *日本産水生昆虫, 科・属・種への検索*. 神奈川: 東海大学出版会, 291-378.
- Haas MS, Brown SJ, Beeman RW. 2001a. Homeotic evidence for the appendicular origin of the labrum in *Tribolium castaneum*. *Development Genes and Evolution* 211: 96-102.
- Haas MS, Brown SJ, Beeman RW. 2001b. Pondering the procephalon: The segmental origin of the labrum. *Development Genes and Evolution* 211: 89-95.
- Heming BS. 1980. Development of the mouthparts in embryos of *Haplothrips verbasci* (Osborn) (Insecta, Thysanoptera, Phlaeothripidae). *Journal of Morphology* 164: 235-263.
- 堀 繁久. 2001. 北海道におけるコオイムシ属 2 種の形態と分布. *北海道開拓記念館研究紀要* 29: 59-66.
- 星川和夫. 2001. 昆虫と気象. *ホシザキグリーン財団研究報告* 5: 222.
- Hua J, Li M, Dong P, Cui Y, Xie Q, Bu W. 2009. Phylogenetic analysis of the true water bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Nepomorpha): evidence from mitochondrial genomes. *BMC Evolutionary Biology* 9: 134.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Ichikawa N. 1989. Breeding strategy of the male brooding water bug, *Diplonychus major* Esaki

- (Heteroptera: Belostomatidae): Is male back space limiting? *Journal of Ethology* 7: 133-140.
- Ichikawa N. 1990. Egg mass destroying and guarding behaviour of the giant water bug, *Lethocerus deyrollei* Vuillefroy (Heteroptera: Belostomatidae). *Journal of Ethology* 9: 25-29.
- Ichikawa N. 1995. Male counterstrategy against infanticide of the female giant water bug *Lethocerus deyrollei* (Hemiptera, Belostomatidae). *Journal of Insect Behavior* 8: 181-188.
- Iijima A, Tada R. 1990. Evolution of Tertiary sedimentary basins of Japan in reference to opening of the Japan Sea. *Journal of the Faculty of Science. University of Tokyo, Section 2: Geology, Mineralogy, Geography, Geophysics* 22: 121-171.
- Ikeda H, Kubota K, Cho YB, Liang H, Sota T. 2009. Different phylogeographic patterns in two Japanese *Silpha* species (Coleoptera: Silphidae) affected by climatic gradients and topography. *Biological Journal of the Linnean Society* 98: 452-467.
- Inada K, Kitade O, Morino H. 2011. Paternity analysis in an egg-carrying aquatic insect *Appasus major* (Hemiptera: Belostomatidae) using microsatellite DNA markers. *Entomological Science* 14: 43-48.
- Iwasa MA, Kawakubo C, Tsuchiya K, Suzuki H. 2006. Intraspecific differentiation in the lesser Japanese mole in eastern Honshu, Japan, indicated by nuclear and mitochondrial gene analyses. *Zoological Science* 23: 955-961.
- Jeratthitikul E, Hara T, Yago M, Itoh T, Wang M, Usami S, Hikida T. 2013. Phylogeography of Fischer's blue, *Tongeia fischeri*, in Japan: Evidence for introgressive hybridization. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66: 316-326.
- Jobb G, von Haeseler A, Strimmer K. 2004. TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology* 4: 18.
- Jones AG, Avise JC. 1997. Polygynandry in the dusky pipefish *Syngnathus floridae* revealed by microsatellite DNA markers. *Evolution* 1611-1622.

- Jones AG, Kvarnemo C, Moore GI, Simmons LW, Avise JC. 1998. Microsatellite evidence for monogamy and sex-biased recombination in the Western Australian seahorse *Hippocampus angustus*. *Molecular Ecology* 7: 1497-1505.
- Jung S, Duwal RK, Lee S. 2011. COI barcoding of true bugs (Insecta, Heteroptera). *Molecular Ecology Resources* 11: 266-270.
- 環境省自然環境局野生生物課. 2006. 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物 -レッドデータブック- 5 昆虫類. 東京: 環境省.
- 菊部治紀, 高桑正敏. 1994. 神奈川県を主としたコオイムシ属 2 種について. *神奈川県自然誌資料* 15: 11-14.
- Kato Y, Morii Y, Tojo K. 2013. Molecular phylogeographic analysis of East Asian cryptoperlan stoneflies (Insecta: Plecoptera, Peltoperlidae). *Limnology* 14: 179-194.
- 川野敬介. 2003. オオコオイムシ *Appasus major* (Vuillefroy, 1864) 雄成虫による卵塊剥離と剥離のタイミング決定 -雄はどのようにして孵化/剥離を判断しているのか?-. 島根大学大学院生物資源科学研究科修士論文.
- Kelly GM, Huebner E. 1989. Embryonic development of the Hemipteran insect *Rhodnius prolixus*. *Journal of Morphology* 199: 175-196.
- Kimm MA, Prpic NM. 2006. Formation of the arthropod labrum by fusion of paired and rotated limb-bud-like primordia. *Zoomorphology* 125: 147-155.
- 木村政昭. 1996. 琉球弧の第四紀古地理. *地學雜誌* 105: 259-285.
- Kitagawa T, Jeon SR, Kitagawa E, Yoshioka M, Kashiwagi M, Okazaki T. 2005. Genetic relationships among the Japanese and Korean striated spined loach complex (Cobitidae: *Cobitis*) and their phylogenetic positions. *Ichthyological Research* 52: 111-122.
- Kitamura A, Takano O, Takata H, Omote H. 2001. Late Pliocene–early Pleistocene paleoceanographic evolution of the Sea of Japan. *Palaeogeography, Palaeoclimatology,*

*Palaeoecology* 172, 81-98.

北村晃寿, 木元克典. 2004. 3.9Ma から 1.0Ma の日本海の南方海峡の変遷史. *第四紀研究* 43: 417-434.

Kitamura A, Kimoto K. 2006. History of the inflow of the warm Tsushima Current into the Sea of Japan between 3.5 and 0.8 Ma. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 236: 355-366.

Kiyoshi T, Sota T. 2006. Differentiation of the dragonfly genus *Davidius* (Odonata: Gomphidae) in Japan inferred from mitochondrial and nuclear gene genealogies. *Zoological science* 23: 1-8.

Kobayashi Y, Ando H. 1990. Early embryonic development and external features of developing embryos of the caddisfly, *Nemotaulius admorsus* (Trichoptera: Limnephilidae). *Journal of Morphology* 203: 69-85.

Kobayashi Y, Niikura K, Oosawa Y, Takami Y. 2013. Embryonic development of *Carabus insulicola* (Insecta, Coleoptera, Carabidae) with special reference to external morphology and tangible evidence for the subcoxal theory. *Journal of Morphology* 274: 1323-1352.

Kokko H, Jennions M. 2003. It takes two to tango. *Trends in Ecology & Evolution* 18: 103-104.

Komaki S, Kurabayashi A, Islam MM, Tojo K, Sumida M. 2012. Distributional change and epidemic introgression in overlapping areas of Japanese pond frog species over 30 years. *Zoological Science* 29: 351-358.

Komatsu S, Kobayashi Y. 2012. Embryonic development of a whirligig beetle, *Dineutus mellyi*, with special reference to external morphology (insecta: Coleoptera, Gyrinidae). *Journal of Morphology* 273: 541-60.

小西省吾, 吉川周作. 1999. トウヨウゾウ・ナウマンゾウの日本列島への移入時期と陸橋形成. *地球科学* 53: 125-134.

Kraus O. 2001. "Myriapoda" and the ancestry of the Hexapoda. *Annales de la Société entomologique*

*de France* 37: 105-127.

Kraus WF. 1989. Is male back space limiting? An investigation into the reproductive demography of the giant water bug, *Abedus indentatus* (Heteroptera: Belostomatidae). *Journal of Insect Behavior* 2: 623-648.

Kraus, WF, Gonzales MJ, Vehrencamp SL. 1989. Egg development and an evaluation of some of the costs and benefits for paternal care in the belostomatid, *Abedus indentatus* (Heteroptera: Belostomatidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 62: 548-562.

Lauck DR, Menke AS. 1961. The higher classification of the Belostomatidae (Hemiptera). *Annals of the Entomological Society of America* 54: 644-657.

Lamer A, Dorn A. 2001. The serosa of *Manduca sexta* (Insecta, Lepidoptera): Ontogeny, secretory activity, structural changes, and functional considerations. *Tissue and Cell* 33: 580-595.

Lee YH, Lee CE. 1992. Ultrastructure of spermatozoa and spermatogenesis in Nepomorpha (Insecta: Heteroptera) with special reference to phylogeny. *Zoologica Scripta* 9: 971-981.

Li J, Fu C, Lei G. 2011. Biogeographical consequences of Cenozoic tectonic events within East Asian margins: a case study of *Hynobius* biogeography. *PLoS ONE* 6, e21506.

Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

Lockwood JA, Story RN. 1986. Embryonic Orientation in pentatomids: Its mechanism and function in southern green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae). *Annals of the Entomological Society of America* 79: 963-970.

町田 洋. 2006. 後期鮮新世以降の山地と盆地の発達. 町田 洋・松田時彦・海津正倫・小泉武栄, (共編), *日本の地形5 中部*. 東京: 東京大学出版, 326-329.

Machida R. 2000. Serial homology of the mandible and maxilla in the jumping bristletail *Pedetontus unimaculatus* Machida, based on external embryology (Hexapoda: Archaeognatha, Machilidae).

*Journal of Morphology* 245: 19-28.

Machida R, Ando H. 1998. Evolutionary changes in developmental potentials of the embryo proper and embryonic membranes along with the derivative structures in Atelocerata, with special reference to Hexapoda (Arthropoda). *Proceedings of the Arthropodan Embryological Society of Japan* 33: 1-13.

Machida R, Ikeda Y, Tojo K. 2002. Evolutionary changes in developmental potentials of the embryo proper and embryonic membranes in Hexapoda: a synthesis revised. *Proceedings of the Arthropodan Embryological Society of Japan* 37: 1-11.

Martin AK. 2011. Double saloon door tectonics in the Japan Sea, Fossa Magna, and the Japanese Island Arc. *Tectonophysics* 498: 45-65.

Masumoto M, Machida R. 2005. Origin of ventral epidermis in a silverfish, *Lepisma saccharina* Linnaeus (Insecta: Zygentoma, Lepismatidae). *Proceedings of the Arthropodan Embryological Society of Japan* 40: 5-8.

増本三香, 内船俊樹, 佐久間将, 町田龍一郎. 2007. 昆虫類の腹板の起源. *日本比較内分泌学会ニュース* 124: 54-60.

Matsuhashi T, Masuda R, Mano T, Murata K. 2001. Phylogenetic relationships among worldwide populations of the brown bear *Ursus arctos*. *Zoological Science* 18: 1137-1143.

Mayr E. 1963. *Animal species and evolution*. Cambridge: Harvard University Press.

Miller PL. 1961. Some features of the respiratory system of *Hydrocyrius columbiae* Spin. (Belostomatidae, Hemiptera). *Journal of Insect Physiology* 6: 243-248.

Miller MP. 2005. Alleles in space: computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* 96: 722-724.

Miyazaki JI, Nakao K, Mihara M, Sakai T, Gunji Y, Tojo K, Muraoka K, Hosoya K. 2007. Incongruence between mtDNA phylogeny and morphological and ecological characters in

- loaches of the genus *Lefua* (Balitoridae, Cypriniforms). *Zoological Science* 24, 666-675.
- Miyazaki J, Dobashi M, Tamura T, Beppu S, Sakai T, Mihara M, Hosoya K. 2011. Parallel evolution in eight-barbel loaches of the genus *Lefua* (Balitoridae, Cypriniformes) revealed by mitochondrial and nuclear DNA phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 60: 416-427.
- Nagata N, Kubota K, Sota T. 2007. Phylogeography and introgressive hybridization of the ground beetle *Carabus yamato* in Japan based on mitochondrial gene sequences. *Zoological Science* 24: 465-474.
- Nazareth TM, Machado G. 2010. Mating system and exclusive postzygotic paternal care in a Neotropical harvestman (Arachnida: Opiliones). *Animal Behaviour* 79: 547-554.
- Newcomer WS. 1948. Embryological development of the mouth parts and related structures of the milkweedbug, *Oncopeltus fasciatus* (Dallas). *Journal of Morphology* 82: 365-411.
- Nishioka M, Sumida M, Ohtani H. 1992. Differentiation of 70 populations in the *Rana nigromaculata* group by the method of electrophoretic analyses. *Scientific Report of the Laboratory for Amphibian Biology* 11: 1-70.
- Ogden TH, Whiting MF. 2003. The problem with “the Paleoptera Problem:” sense and sensitivity. *Cladistics* 19: 432-442.
- Ogitani M, Sekiné K, Tojo K. 2011. Habitat segregation and genetic relationship of two heptageniid mayflies, *Epeorus latifolium* and *Epeorus l-nigrus*, in the Shinano-gawa River basin. *Limnology* 12: 117-125.
- Ohba S, Hidaka K, Sasaki M. 2006. Notes on paternal care and sibling cannibalism in the giant water bug, *Lethocerus deyrolli* (Heteroptera: Belostomatidae). *Entomological Science* 9: 1-5.
- Ohba S, Nakasuji F. 2006. Dietary items of predacious aquatic bugs (Nepoidea: Heteroptera) in Japanese wetlands. *Limnology* 7: 41-43.

- Ohnishi N, Uno R, Ishibashi Y, Tamate HB, Oi T. 2009. The influence of climatic oscillations during the Quaternary Era on the genetic structure of Asian black bears in Japan. *Heredity* 102: 579-89.
- 大嶋和雄. 1990. 第4紀後期の海峡形成史. *第四紀研究* 29: 193-208.
- Oka K, Yoshiyama N, Tojo K, Machida R, Hatakeyama M. 2010. Characterization of abdominal appendages in the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera), by morphological and gene expression analyses. *Developmental Genes and Evolution* 220: 53-59.
- 岡田篤正. 2004. 中国山地とその周辺. 太田陽子・成瀬敏郎・田中眞吾・岡田篤正, (共編), *日本の地形6 中部*. 東京: 東京大学出版, 117-147.
- 岡田浩明. 1993. コオイムシとオオコオイムシの生態と種間競争. *インセクトリウム* 30: 4-11.
- Okada H, Fujisaki K, Nakajisi F. 1992. Effects of interspecific competition on development and reproduction in two giant water bugs, *Diplonychus japonicus* vuillefroy and *Diplonychus major* Esaki (Hemiptera: Belostomatidae). *Researches on Population Ecology* 34: 349-358.
- Okada H, Nakasuji F. 1993a. Patterns of local distribution and coexistence of two giant water bugs, *Diplonychus japonicus* and *Diplonychus major* (Hemiptera: Belostomatidae) in Okayama, Western Japan. *Japanese Journal of Entomology* 61: 79-84.
- Okada H, Nakasuji F. 1993b. Comparative studies on the seasonal occurrence, nymphal development and food menu in two giant water bugs, *Diplonychus japonicus* Vuillefroy and *Diplonychus major* Esaki (Hemiptera: Belostomatidae). *Researches on Population Ecology* 35: 15-22.
- Okuzaki Y, Takami Y, Sota T. 2010. Resource partitioning or reproductive isolation: the ecological role of body size differences among closely related species in sympatry. *The Journal of Animal Ecology* 79: 383-392.

- 大和田卓郎. 2002. オオコオイムシの生活史と繁殖行動. *昆虫と自然* 37: 29-31.
- Osozawa S, Shinjo R, Armid A, Watanabe Y, Horiguchi T, Wakabayashi J. 2012. Palaeogeographic reconstruction of the 1.55 Ma synchronous isolation of the Ryukyu Islands, Japan, and Taiwan and inflow of the Kuroshio warm current. *International Geology Review* 54: 1369-1388.
- 太田陽子, 小池一之, 鎮西清高, 野上道男, 町田 洋, 松田時彦. 2010. 鮮新世以降の地殻変動による隆起域と沈降域の出現 *日本列島の地形学*. 東京: 東京大学出版会, 47-70.
- Otofuji Y. 1996. Thematic Article Large tectonic movement of the Japan Arc in late Cenozoic times inferred from paleomagnetism: Review and synthesis. *Island Arc* 5: 229-249.
- Panfiliu KA, Roth S. 2010. Epithelial reorganization events during late extraembryonic development in a hemimetabolous insect. *Developmental Biology* 340: 100-115.
- Papadopoulou A, Anastasiou I, Vogler AP. 2010. Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: the Mid-Aegean Trench calibration. *Molecular Biology and Evolution* 27: 1659-1672.
- Parsons MC. 1972. Respiratory significance of the thoracic and abdominal morphology of *Belostoma* and *Ranatra* (insecta, heteroptera). *Zoomorphology* 73: 163-194.
- Polhemus JT. 1995. Nomenclatural and synonymical notes on the genera *Diplonychus* Laporte and *Appasus* Amyot and Serville (Heteroptera: Belostomatidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 97: 649-653.
- Posnien N, Bashasab F, Bucher G. 2009. The insect upper lip (labrum) is a nonsegmental appendage-like structure. *Evolution and Development* 11: 480-488.
- Quek S-P, Davies SJ, Ashton PS, Itino T, Pierce NE. 2007. The geography of diversification in mutualistic ants: a gene's-eye view into the Neogene history of Sundaland rain forests. *Molecular Ecology* 16: 2045-2062.
- Rambaut, A., 2009. *FigTree version 1.3.1*. Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>
- Rambaut A, Drummond AJ. 2007. *Tracer version 1.5: MCMC Trace analysis tool*. Available at

<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>

R Development Core Team. 2011. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna.

Available at: <http://www.r-project.org/>

Rogers BT, Peterson MD, Kaufman TC. 1997. Evolution of the insect body plan as revealed by the Sex combs reduced expression pattern. *Development* 124: 149-157.

Rogers BT, Peterson MD, Kaufman TC. 2002. The development and evolution of insect mouthparts as revealed by the expression patterns of gnathocephalic genes. *Evolution and Development* 4: 96-110.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.

Satoh A, Sota T, Ueda T, Enokido Y, Paik JC, Hori M. 2004. Evolutionary history of coastal tiger beetles in Japan based on a comparative phylogeography of four species. *Molecular Ecology* 13: 3057-3069.

Schoville SD, Uchifune T, Machida R. 2012. Colliding fragment islands transport independent lineages of endemic rock-crawlers (Grylloblattodea: Grylloblattidae) in the Japanese Archipelago. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66: 915-927.

Schwarz G. 1978. Estimating the dimension of a model. *The Annals of Statistics* 6: 461-464.

Sekiné K, Hayashi F, Tojo K. 2013. Phylogeography of the East Asian polymitarcyid mayfly genus *Ephoron* (Ephemeroptera: Polymitarcyidae): a comparative analysis of molecular and ecological characteristics. *Biological Journal of the Linnean Society* 109: 181-202.

Sekiné K, Tojo K. 2010. Automictic parthenogenesis of a geographically parthenogenetic mayfly, *Ephoron shigae* (Insecta: Ephemeroptera, Polymitarcyidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 99: 335-343.

Sharov AG. 1966. *Basic arthropodan stock: With special reference to insects*. New York: Pergamon

Press.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 651-701.

Slifer EH. 1937. The origin and fate of the membranes surrounding the grasshopper egg; together with some experiments on the source of the hatching enzyme. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 79: 494-507.

Slifer EH. 1938. The formation and structure of a special water-absorbing area in the membranes covering the grasshopper egg. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 80: 437-457.

Smith RL. 1976a. Male brooding behavior of the water bug *Abedus herberti* (Hemiptera: Belostomatidae). *Annals of the Entomological Society of America* 69: 740-747.

Smith RL. 1976b. Brooding Behavior of a Male Water Bug *Belostoma flumineum* (Hemiptera: Belostomatidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 49: 333-343.

Smith RL. 1979. Paternity assurance and altered roles in the mating behaviour of a giant water bug, *Abedus herberti* (Heteroptera: Belostomatidae). *Animal Behaviour* 27: 716-725.

Smith RL. 1997. Evolution of paternal care in the giant water bugs (Heteroptera: Belostomatidae). In: Choe JC, Crespi BJ. eds. *The Social Behavior in Insects and Arachnids*. Cambridge: Cambridge University Press, 116-149.

Smith RL, Larsen E. 1993. Egg attendance and brooding by males of the giant water bug *Lethocerus medius* (Guerin) in the field (Heteroptera: Belostomatidae). *Journal of Insect Behavior* 6: 93-106.

Snodgrass RE. 1935. *Principles of Insect Morphology*. New York: McGraw-Hill Book Company.

Snodgrass RE. 1939. The Principles of Insect Physiology. *Science* 90: 159-159.

- Sota T, Hayashi M. 2007. Comparative historical biogeography of *Plateumaris* leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) in Japan: interplay between fossil and molecular data. *Journal of Biogeography* 34: 977-993.
- Strauss J, Lakes-Harlan R. 2006. Embryonic development of pleuropodia of the cicada, *Magicicada cassini*. *Journal of Insect Science* 6: 1-6.
- Suzuki H, Sato Y, Ohba N. 2002. Gene diversity and geographic differentiation in mitochondrial DNA of the Genji firefly, *Luciola cruciata* (Coleoptera: Lampyridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 193-205.
- Suzuki N. 1990. Embryology of the Mecoptera (Panorpidae, Panorpididae, Bittacidae, and Boreidae). *Bulletin of the Sugadaira Montane Research Center* 11: 1-87.
- Suzuki N, Ando H. 1981. Alimentary canal formation of the scorpion fly, *Panorpa pryeri* MacLachlan (Mecoptera: Panorpidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 10: 345-354.
- Swofford DL. 2002. *PAUP\**. *Phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods)*. Version 4.0b. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Taborsky M. 2008. Alternative reproductive tactics in fish. In: Oliveira R, Taborsky M, Brockmann HJ, eds. *Alternative reproductive tactics: an integrative approach*. New York: Cambridge University Press, 251-299.
- Tada R. 1994. Paleooceanographic evolution of the Japan Sea. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 108: 487-508.
- Takehana Y, Nagai N, Matsuda M, Tsuchiya K. 2003. Geographic variation and diversity of the cytochrome b gene in Japanese wild populations of Medaka, *Oryzias latipes*. *Zoological Science* 20: 1279-1291.
- Tallamy DW. 2000. Sexual selection and the evolution of exclusive paternal care in arthropods.

*Animal Behaviour* 60: 559-567.

Tallamy DW. 2001. Evolution of exclusive paternal care in arthropods. *Annals Review of Entomology* 46: 139-165.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Tanabe AS. 2007. Kakusan: a computer program to automate the selection of a nucleotide substitution model and the configuration of a mixed model on multilocus data. *Molecular Ecology Notes* 7: 962-964.

Tanabe AS. 2008. *MrBayes5D*. Software distributed by the author at <http://www.fifthdimension.jp/>

田中正弘. 2001. コオイムシ (半翅目, コオイムシ科) の胚子発生 I. 卵と胚の外部形態の变化. *New Entomologist* 50: 35-42.

谷澤 崇. 2007a. コオイムシ科昆虫の進化・生態・発生学的研究. 信州大学大学院工学系研究科学位論文.

谷澤 崇. 2007b. コオイムシの子どもは親の繁殖を手助けする!? *昆虫発見* 6: 42-47.

Taru M, Kanda T, Sunobe T. 2002. Alternative mating tactics of the gobiid fish *Bathygobius fuscus*. *Journal of Ethology* 20: 9-12.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

東城幸治. 1999. 昆虫の脚はなぜ6本か? 翅はなぜ4枚か? *自然科学のとびら* 5: 18-19.

東城幸治. 2014. 生命の起源. 鷺谷いづみ (監) 生命科学のための生物学入門. 東京: 培風館, 印刷中.

Tojo K, Machida R. 1997. Embryogenesis of the mayfly *Ephemera japonica* McLachlan (Insecta:

- Ephemeroptera, Ephemeridae), with special reference to abdominal formation. *Journal of Morphology* 234: 97-107.
- Tojo K, Machida R. 1998. Early Embryonic Development of the Mayfly *Ephemera japonica* McLachlan (Insecta : Ephemeroptera , Ephemeridae). *Journal of Morphology* 335: 327-335.
- Tojo K, Machida R. 2003. Techniques in embryological studies of mayflies (Insecta: Ephemeroptera). *Research update on Ephemeroptera & Plecoptera*. Perugia: Perugia University Press, 205-209.
- Tominaga A, Ota H, Matsui M. 2010. Phylogeny and phylogeography of the sword-tailed newt, *Cynops ensicauda* (Amphibia: Caudata), as revealed by nucleotide sequences of mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 910-921.
- Tomita S, Kikuchi A. 2009. *Abd-B* suppresses lepidopteran proleg development in posterior abdomen. *Developmental Biology* 328: 403-409.
- Tsuchiya K, Suzuki H, Shinohara A, Harada M, Wakana S, Sakaizumi M, Han SH, Lin LK, Kryukov AP. 2000. Molecular phylogeny of East Asian moles inferred from the sequence variation of the mitochondrial cytochrome b gene. *Genes & Genetic Systems* 75: 17-24.
- 角田 亘. 2002. 福島県と神奈川県のコオイムシとオオコオイムシの外部形態. *横須賀市博研報 (自然)* 49: 23-34.
- Uchifune T, Machida R. 2005. Embryonic development of *Galloisiana yuasai* Asahina, with special reference to external morphology (Insecta: Grylloblattodea). *Journal of Morphology* 266:182-207.
- 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. *Population Ecology* 52: 137-146.
- Umeda K, Hayashi S, Ban M, Sasaki M, Ohba T, Akaishi K. 1999. Sequence of the volcanism and

- tectonics during the last 2.0 million years along the volcanic front in Tohoku district, NE Japan. *Bulletin of the Volcanological Society of Japan* 44: 233-249.
- Viscuso R, Sottile L. 2008. Fine structure of pleuropodia in three species of Insecta Orthoptera during embryonic development. *Italian Journal of Zoology* 75:11-19.
- Vuillefroy F de. 1864. Hémiptères nouveaux. *Annales de la Société Entomologique de France* 4: 141-142.
- Wang Y, Engel MS, Rafael JA, Dang K, Wu H, Wang Y, Xie Q, Bu W. 2013. A unique box in 28S rRNA is shared by the enigmatic insect order Zoraptera and Dictyoptera. *PLoS ONE* 8: e53679.
- Watanabe K, Nishida M. 2003. Genetic population structure of Japanese bagrid catfishes. *Ichthyological Research* 50: 140-148.
- Weber H. 1952. Morphologie, Histologie und Entwicklungsgeschichte der Articulating. *Fortschritte der Zoologie* 9: 18-231.
- Xie Q, Tian Y, Zheng LY, Bu WJ. 2008. 18S rRNA hyper-elongation and the phylogeny of Euhemiptera (Insecta: Hemiptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 463-471.
- Yamamoto DS, Sumitani M, Tojo K, Lee JM, Hatakeyama M. 2004. Cloning of a *decapentaplegic* orthologue from the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera), and its expression in the embryonic appendages. *Development Genes and Evolution* 214: 128-133.
- 安永智秀, 高井幹夫, 山下 泉, 川村 満, 川澤哲夫. 1993. *日本原色カメムシ図鑑*. 友国 雅章 (編). 東京: 全国農村教育協会.
- Yoshiyama N, Tojo K, Hatakeyama M. 2013. A survey of the effectiveness of non-cell autonomous RNAi throughout development in the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera). *Journal of Insect Physiology* 59: 400-407.
- Yoshizawa K. 2005. Morphology of Psocomorpha (Psocodea: 'Psocoptera'). *Insecta Matsumurana, New Series* 62: 1-44.

吉澤和徳. 2008. カメムシ目 (半翅目) Order Hemiptera. 石川良輔 (編). *節足動物の多様性と系統*. 東京: 裳華房, 369-371.

Yoshizawa K, Saigusa T. 2003. Reinterpretations of clypeus and maxilla in Psocoptera, and their significance in phylogeny of Paraneoptera (Insecta: Neoptera). *Acta Zoologica* 84: 33-40.

Zhou X, Jacobus LM, DeWalt RE, Adamowicz SJ, Hebert PDN. 2010. Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera fauna of Churchill (Manitoba, Canada): insights into biodiversity patterns from DNA barcoding. *Journal of the North American Benthological Society* 29: 814-837.