

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2014

課題番号：22255001

研究課題名(和文) 東南アジア熱帯におけるアリが介在した動植物6者共生系の多様性の進化

研究課題名(英文) Evolution of biodiversity in a six-party insect-plant symbiosis mediated by ant-plant *Macaranga* in Southeast Asian tropics

研究代表者

市野 隆雄 (ITINO, Takao)

信州大学・学術研究院理学系・教授

研究者番号：20176291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,600,000円

研究成果の概要(和文)：アリ植物オオバギ属は、多様な共生者(アリ・カイガラムシ)および寄生者(シジミチョウ・カメムシ・タマバエ・ナナフシ)と緊密な相互作用を持つ。本研究では、この系の著しい種多様化が、寄生者と共生者の対抗的な共進化によってもたらされたという仮説を、7者の系統多様化解析によって検証した。その結果、この7者系は、約2000万年前に起源した植物-アリ共生が基盤となり、逐次的に他の群集メンバーが参入することで形成されたこと、および寄生者の寄主特異性が極めて高いことが明らかになった。これらの結果は、共生者と寄生者が対抗的な共進化を起こすことで種特異化がすすみ、それが系全体の多様化を促進したことを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Ant plant *Macaranga* has a close interaction with various symbionts (ants and scale insects) and parasites (butterflies, bugs, gall midges, and stick insects). In this study, the hypothesis that the species diversity of this system has been brought about by the co-evolution between parasites and symbionts was verified by using phylogenetic analyses of the 7 parties. It was shown that the ant-plant symbiosis was founded about 20 million years ago, and then the other members of the system sequentially took part in the system. Additionally, the species specificities among the parasites and the symbionts proved to be high. These results suggest that the counter adaptation and co-evolution among parasites and symbionts promoted the diversification of the overall system.

研究分野：生態・環境

キーワード：種間関係 共生 寄生 共進化 東南アジア熱帯雨林 アリ植物 シジミチョウ カメムシ

1. 研究開始当初の背景

東南アジア熱帯雨林のアリ植物オオバギ属 29 種の幹内には、特殊化したアリ(シリアゲアリ属)が共生しており、アリは寄主植物を植食者(寄生者)の食害から防衛している。アリの巣内には第3の共生者であるカイガラムシ(ヒラタカタカイガラムシ属)が共生しており、カイガラムシが排出する甘露はアリの餌となる。この3者共生系は近年、動植物共生系の共進化に関するモデル系として世界の注目を集めており、日・独・米の研究者が生態学的、行動学的、系統学的研究を進めてきた。申請者のグループ(日・米)は、この3者が、ここ約2000万年の間、緊密な相利共生関係を保ちながら、平行的、同調的に多様化し、それぞれが数十種に分化・多様化してきたことを明らかにした。これらの研究は、高等生物の3者系における多様化の歴史を再構成した、世界で初めての研究と位置づけることができる。

しかし、共生する3者がなぜ多数の種に多様化し得たのか、そのプロセスは未だ解明されていない。エールリッヒとレーベンは、植物と昆虫の多様化が生物の中でも際だってすすんだ理由として、植物の防御形質と植食昆虫の攻撃形質が互いに影響し合いながら進化すること(対抗的共進化)が両者の多様化を生み出したという仮説をたてた。しかし、この仮説を検証するためには両者間の特異性が極めて高い系で研究する必要がある、これまで検証例はほとんどなかった。

我々は、この3者共生系に対する植食昆虫の攻撃が極めて激しく寄主特異性が高いこと、および、近縁植物には近縁の昆虫が寄生(食害)していることを明らかにしてきており、これらのことは、多様化に対抗的共進化がかかわっている可能性を強く示唆している。本研究では、3者共生系の多様性が、主要な寄生者3者との対抗的共進化によってもたらされたという仮説を、群集全体(7者)の系統解析によって検証する。

植物-昆虫の対抗的共進化による多様化をみつかった研究は Becerra et al. (2009) を除いてはほとんどない。ベセラらは、*Bursera* 属植物の昆虫に対する化学防御物質の多様化が、系統樹上の種多様化と並行しておこったこと、および昆虫の種多様化も同じ時期におこったことから、昆虫との対抗的共進化によって植物の多様化がおこったことを示した。しかし、彼女らの研究は、昆虫の寄主転換が頻繁に起こっている2者系を扱ったものである。これに対し、本研究で扱う7者系は、相互に高度に特殊化し、防衛アリの具体的な機能(防衛の強度や質)を定量的に扱うことができるという絶対的な有利性がある。本研究は、熱帯雨林の生物多様性が、対抗的共進化によって生み出されたという仮説を、共進化の歴史解析によって初めて検証したものであり、新規性が高く、多様性研究のモデル系となることが期待できる。

2. 研究の目的

熱帯雨林における動植物の多様性は、温帯にくらべて10倍以上高いことが知られている。この多様性の創出メカニズムとしては、植物と昆虫の間で過去におこってきた対抗的共進化が重要であるとされてきた。しかし、そのことを共進化の歴史解析から明確に示した研究はない。これまで、我々は植物・アリ・カイガラムシの3者共生系が相互に高度に特殊化しており、それらは、ここ約2000万年間、同調して多様化してきたことを明らかにしてきた。本研究の目的は、アリ植物をめぐる7者共進化系を用いて、これらの多様化が甚大な被害を与える寄生者4者との対抗的共進化により生み出されたという仮説を検証し、熱帯の生物多様性がどのようなプロセスによって生み出されたかを、動植物の系統解析から明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) サンプリング

東南アジアの広域(マレー半島、スマトラ島、ボルネオ島)において、オオバギ属20種500株以上の調査をおこない、アリ374サンプル、カイガラムシ153サンプル、シジミチョウ43サンプル、カメムシ38サンプル、タマバエ62サンプル、ナナフシ37サンプルを採集した。採集には小松貴氏、丸山宗利氏、清水加耶氏、市岡孝朗氏らの協力を得た。

(2) アリの mtDNA 解析

マレー半島の山岳地帯を含む8地点において5種のオオバギ属から採集したアリ192サンプルについて mtDNA の COI 遺伝子(589bp)の塩基配列を決定し、分子系統地理解析、遺伝的多様性解析、及び個体群統計学的解析をおこなった。

(3) アリのマイクロサテライト解析

ボルネオ島のランビル国立公園において10種のオオバギ属から採集したアリ98サンプルについて、核DNAのマイクロサテライト部位(5座位)を用いた多型解析をおこなった。得られた多型パターンと既存の mtDNA 系統樹を比較し、一致性を検証した。

(4) 核 DNA 遺伝子を用いたアリの分子系統解析

熱帯アジアの広域(マレー半島、スマトラ島、ボルネオ島)の25地点において18種のオオバギ属から採集したアリ84サンプルについて、核DNAの9遺伝子(計5000bp)を用いた分子系統解析をおこなった。得られた核DNA系統樹と既存の mtDNA 系統樹の一致性を検証した。

(5) 核 DNA 遺伝子を用いたカイガラムシの分子系統解析

熱帯アジアの広域(マレー半島、ボルネオ

島)の12地点において19種のおオバギ属から採集したカイガラムシ153サンプルについて、核DNAのWG遺伝子とEF-1a遺伝子を用いた分子系統解析をおこなった。得られた系統樹を形態に基づく種分類、mtDNA系統と比較した。そして、核DNA系統からみた寄主特異性を検証した。

(6)シジミチョウの分子系統解析

熱帯アジアの広域(マレー半島,ボルネオ島)の3地点において8種のおオバギから採集したカメムシ43サンプルについてmtDNAと核DNA遺伝子を含む5遺伝子を用いた分子系統解析をおこなった。得られた分子系統樹からシジミチョウの起源年代および好蟻性形質の進化過程を推定した。

(7)カメムシの分子系統解析

熱帯アジアの広域(マレー半島,スマトラ島,ボルネオ島)の6地点において7種のおオバギから採集したカメムシ38サンプルについて核DNAの28S rRNA遺伝子とミトコンドリアDNAのCOI遺伝子を用いた分子系統解析をおこなった。得られた分子系統樹から、カメムシの寄主植物・アリに対する寄主特異性およびカメムシがオオバギに寄生を開始した年代を推定した。

(8)タマバエの分子系統解析

ボルネオ島のランピル国立公園において8種のおオバギから採集したアリ62サンプルについて、mtDNAのCOI遺伝子を用いた分子系統解析をおこなった。得られた分子系統樹から寄主特異性を検証した。

(9)ナナフシの分子系統解析

ボルネオ島のランピル国立公園において5種のおオバギから採集したナナフシ37サンプルについて、mtDNAのCOI遺伝子を用いた分子系統解析をおこなった。得られた分子系統樹から寄主特異性を検証した。

4. 研究成果

(1)オオバギ属植物に共生するシリアゲアリ類のマレー半島における系統地理解析

mtDNA解析を行なった結果、マレー半島に分布するアリは5つの遺伝的系統に分かれること、それぞれの系統は特徴的な地理分布、標高分布、及び寄主植物選好性をもっていることが明らかになった。系統ごとに地点間の遺伝的多様性を比較した結果、5つのうち3つのアリ系統において、山岳域の遺伝的多様性は低地のそれよりも高いことが明らかになった。また、系統ごとにミスマッチ解析を行った結果、上記の3系統は更新世の一時期(数十万年前)に個体群の急増がおこったことが推定された。さらに、各系統の分布変遷について、低標高に分布する系統は更新世後期の移入によってマレー半島の西海岸に分布するようになったこと、中標高に分布

する系統は更新世の間に個体数の増加減少を繰り返したこと、高標高に分布する系統は、過去に地理的に分断され、現在は亜系統に分かれていることがそれぞれ明らかになった。以上の結果から、マレー半島における更新世の氷期レフュジアは山岳地帯にあること、更新世の氷期・間氷期サイクルの影響で、マレー半島の熱帯雨林の分布域は拡大と縮小を繰り返したことが示唆された。

(2)アリ植物オオバギ属に共生するシリアゲアリ類のマイクロサテライト解析

マイクロサテライト解析をおこなった結果、アリは6つの遺伝子型に分化していること、および、これらの遺伝子型は既存のmtDNA系統と一致することが明らかになった(図1)。アリ遺伝子型間の交雑は約2%の頻度で起こっていたが、mtDNAの異種間浸透は起こっておらず、mtDNA系統樹の信憑性は高いことが示された。マイクロサテライト解析によって新たに発見された系統内のグループが、特定のオオバギ種に対し高い種特異性を示すことが明らかになった。

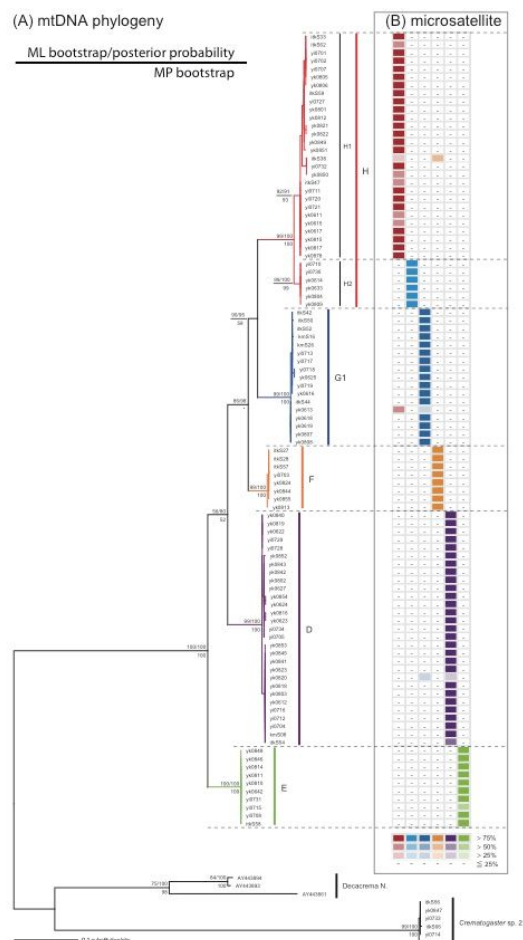


図1 アリ植物オオバギ属に共生するシリアゲアリ類のmtDNA系統樹(左)とマイクロサテライトを用いたクラスター解析の比較(Ueda et al. 2015)。

(3)アリ植物オオバギ属に共生するシリアゲアリ類における mtDNA と核 DNA 系統樹の不一致

核 DNA の 9 遺伝子を用いた分子系統解析によって得られた核 DNA 系統樹と既存の mtDNA 系統樹の一致性を検証した。系統レベルの一致性でみた場合、核 DNA と mtDNA 系統は一致しており、この結果は核 DNA 系統間に mtDNA の浸透はない、すなわち交雑は起こっていないことを示す。一方、系統樹の一致性でみた場合、複数の核 DNA 系統を含む単系統群が多数の系統にある mtDNA 系統によって構成されており、また、核 DNA 姉妹系統間の mtDNA の遺伝的分化の程度は合着シミュレーションを用いた推定値より高いことが示された。これらの結果は、核 DNA 系統群の分岐が起こる以前、共通祖先が複数の mtDNA 系統を内包しており（祖先多型）、その mtDNA 多型が各核 DNA 系統に引き継がれたことを示す。すなわち、核 DNA と mtDNA 系統の不一致の要因は種間交雑の影響ではなく不完全な系統ソーティングであったことになる。

(4)アリ植物オオバギ属に共生するカイガラムシ類の核 DNA 遺伝子を用いた分子系統解析
熱帯アジア広域におけるアリ植物の調査から、標高 500m 以上からカイガラムシ不在のオオバギが確認されるようになり、オオバギ属の分布限界に近い標高 1000m 周辺では、どの木にもほぼカイガラムシが不在になることが明らかになった。

核 DNA の 2 遺伝子に基づいて推定されたカイガラムシの分子系統樹は高い確率で支持された 9 つの核 DNA 系統に分かれ、それぞれの系統には単一のカイガラムシ種が対応した。この系統樹を、既存の mtDNA 系統樹と比較した結果、一致しないことが明らかになった。この不一致は、カイガラムシ種間の交雑・系統ソーティングによって起こった可能性がある。カイガラムシ系統のオオバギ種に対する特異性を検証した結果、カイガラムシのオオバギ・アリに対する特異性は、これまで考えられていたよりも高いことが示された。

(5)オオバギ属を食樹とするシジミチョウ類における好蟻性形質の系統進化

5 遺伝子を用いてオオバギを食樹とするシジミチョウの分子系統解析をおこなった結果、*amphimuta* グループは約 200 万年前にオオバギ・アリ共生に寄生を開始したことが明らかになった（図 2）。また、この系統樹を用いて、*amphimuta* グループ内における好蟻性形質の進化過程を推定した結果、アリ絶対共生から任意共生のシフト、及び、好蟻性器

官の消失は派生的に起こったこと、好蟻性形質が消失した系統の種数は好蟻性形質を保持する系統よりも少ないことが示された。

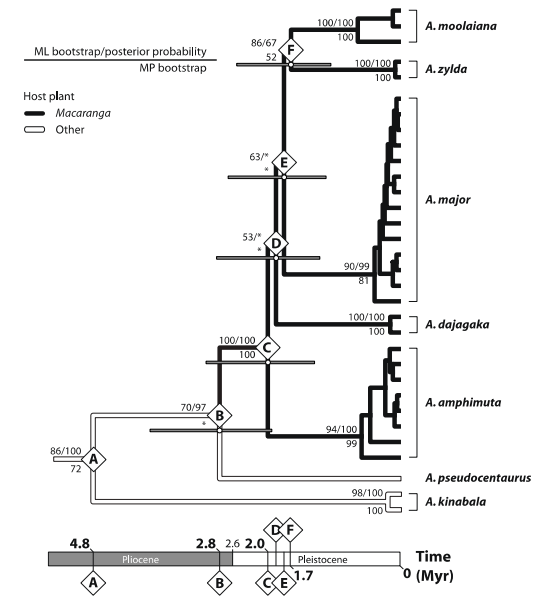


図 2 アリ植物オオバギ属を食樹とするムラサキシジミ属の分子系統樹 (Ueda et al. 2012)。

(6)アリ植物オオバギ属に寄生するカメムシ類の新種記載と分子系統樹

マレー半島、ボルネオでこれまで得られたカスミカメムシのサンプルの形態を精査した結果、7 新種が含まれることが判明し、記載を行った（図 3）。これらの種は、種ごとに寄生するオオバギ種が厳密に決まっており、オオバギがアリの餌として托葉や新葉から分泌する栄養体を盗み食べる習性を持っていた。さらに、インドネシアとボルネオ、マレー半島での追加サンプリングにより、新たに 2 新種が発見され、計 9 新種を記載するに至った。核 DNA の 28S rRNA 遺伝子とミトコンドリア DNA の COI 遺伝子を用いて、オオバギに共生するカイガラムシの分子系統樹を作成し、カメムシがオオバギに寄生を開始した年代を推定した。カメムシの系統樹は高い確率で支持された 8 つの核 DNA 系統に分かれ、それぞれの系統には単一のカイガラムシ種が対応した。また、系統的に古いカメムシ種は系統的に古いオオバギ種に寄生するという傾向が得られた。内群の起源年代はおよそ 2000 万年前と推定され、およそ 2000 万年前と推定されているオオバギとアリの共生系起源とほぼ一致することが明らかになった。

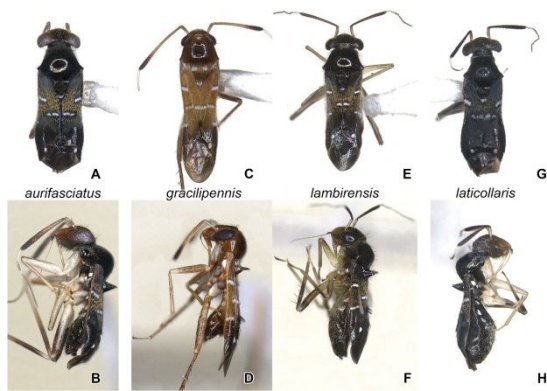


図 3 アリ植物オオバギ属に寄生するヒョウタンカスミカメ属 (Nakatani et al. 2013)。

(7)アリ植物オオバギ属に寄生するタマバエ類の分子系統解析

mtDNA の COI 遺伝子を用いて, 10 種のオオバギ属に寄生するタマバエ類の分子系統樹を作成した。オオバギのタマバエ類は単系統になり, 4 つの系統に分化し, それぞれのタマバエ系統のオオバギ種に対する寄主特異性は高いことが示された。タマバエは約 1200 万年前以前にオオバギをめぐる生物群集に参入した可能性が示された。

(8)アリ植物オオバギ属を食樹とするナナフシ類の分子系統解析

mtDNA の COI 遺伝子を用いて, 9 種のオオバギ属から採集した 2 種のナナフシの分子系統樹を作成した。複数のオオバギ種を食樹とする *Orthomeria alexis* は 7 つのハプロタイプに分化したが, それらの遺伝的分化は寄主植物種ごとに起こっている訳では無かった。近縁な 2 種のオオバギを食樹とする *O. cuprinus* は大きく 2 つの遺伝的系統に分化し, 系統ごとに寄主利用のパターンは異なった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

Ueda S., Nagano Y., Kataoka Y., Komatsu T., Itioka T., Shimizu-kaya U., Inui Y., Itino T. (2015) Congruence of microsatellite and mitochondrial DNA variation in acrobat ants (*Crematogaster* subgenus *Decacrema*, Formicidae: Myrmicinae) inhabiting *Macaranga* (Euphorbiaceae) myrmecophytes, *PLoS ONE*, 10(2) e0116602 15 pages, DOI: 10.1371/journal.pone.0116602. 査読有 Nakatani Y., Komatsu T., Itino T., Shimizu-kaya U., Itioka T., Hashim R., Ueda S. (2013) New *Pilophorus* species

associated with myrmecophilous *Macaranga* trees from the Malay Peninsula and Borneo (Heteroptera: Miridae: Phyllinae), *Tijdschrift voor Entomologie*, 156: 113-126. 査読有 <http://booksandjournals.brillonline.com/content/journals/10.1163/22119434-00002024>

Handa C., Ueda S., Tanaka H., Itino T., Itioka T. (2012) How do scale insects settle into the nests of plant-ants on *Macaranga* myrmecophytes? Dispersal by wind and selection by plant-ants, *Sociobiology*, 59(2): 435-446. 査読有 <http://science.shinshu-u.ac.jp/~bios/Evo/itino/publication.html>

Ueda S., Okubo T., Itioka T., Shimizu-kaya U., Yago Y., Inui Y., Itino T. (2012) Timing of butterfly parasitization of a plant-ant-scale symbiosis, *Ecological Research* 27(2): 437-443. 査読有

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11284-011-0915-3#page-1>

Murase K., Yamane S., Itino T. and Itioka T. (2010): Multiple factors maintaining high species-specificity in *Macaranga-Crematogaster* (Hymenoptera: Formicidae) myrmecophytism: higher mortality in mismatched ant-seedling pairs. *Sociobiology*, 55, 883-898. 査読有

<http://science.shinshu-u.ac.jp/~bios/Evo/itino/publication.html>

上田昇平, 市野隆雄 (2010) オオバギ属植物の幹内に共生するアリとカイガラムシ, *生物科学* 「特集: 好蟻性昆虫の隠れた多様性」, 61(4): 219-226. 査読有

http://www.ruralnet.or.jp/seibutsu/06_1_04.htm

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. 査読有

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10144-009-0162-4#page-1>

[学会発表] (計 15 件)

上田昇平, 小松貴, Quek S-P, 清水加耶, 乾陽子, 市岡孝朗, 市野隆雄, アリ植物オオバギ属に共生するシリアゲアリ類の核 DNA シーケンスを用いた分子系統解析, 第 62 回日本生態学会大会, 鹿児島大学, 鹿児島, 2015 年 3 月 21 日

上田昇平, 清水加耶, 大久保忠浩, 市岡孝朗, 乾陽子, 矢後勝也, 小松貴, 市野隆雄, オオバギ属を食樹とするムラサキ

シジミ類における好蟻性形質の進化,日本昆虫学会第74回大会,広島大学,広島,2014年9月16日

上田昇平,清水加耶,大久保忠浩,市岡孝朗,乾陽子,矢後勝也,市野隆雄,オオバギ属(トウダイグサ科)を食樹とするシジミチョウ類における好蟻性形質の系統進化,第61回日本生態学会,広島国際会議場,広島,2014年3月15日

上田昇平,長野祐介,小松貴,片岡陽介,市岡孝朗,清水加耶,乾陽子,市野隆雄,アリ植物オオバギ属に共生するシリアゲアリ属のマイクロサテライト解析,日本昆虫学会第73回大会,北海道大学,札幌,2013年9月14日

上田昇平,長野祐介,小松貴,片岡陽介,市岡孝朗,清水加耶,乾陽子,市野隆雄,アリ植物オオバギ属に共生するシリアゲアリ属のマイクロサテライト解析,日本昆虫学会第73回大会,北海道大学,札幌,2013年9月14日

上田昇平,長野祐介,小松貴,片岡陽介,市岡孝朗,清水加耶,乾陽子,市野隆雄,アリ植物オオバギ属に共生するシリアゲアリ属のSSRジェノタイプング,第8回好蟻性生物勉強会,ウッドビレッジ伊奈ヶ湖,南アルプス,2013年8月25日

上田昇平,長野祐介,小松貴,片岡陽介,市岡孝朗,清水加耶,乾陽子,市野隆雄,アリ植物オオバギ属に共生するシリアゲアリ属のSSRジェノタイプング,第8回好蟻性生物勉強会,ウッドビレッジ伊奈ヶ湖,南アルプス,2013年8月25日

小松貴,上田昇平,片岡陽介,市野隆雄,清水加耶,市岡孝朗,乾陽子,東南アジア産アリ植物に見られる共生系およびアリの系統学的再検討,第56回日本応用動物昆虫学会大会,近畿大学,奈良,2012年3月28日

Komatsu T, Hashim H, Ueda S, Itino T, Food habit of plant bugs (Hemiptera; Miridae) parasitizing on myrmecophytic *Macaranga* trees in Southeast Asia. 8th International Conference on Ants: ANeT Meeting 19 Oct 2011, Prince of Songkla University, Thailand

小松貴,上田昇平,片岡陽介,市野隆雄,清水加耶,市岡孝朗,乾陽子,東南アジア産アリ植物を巡る共生系および共生アリの系統学的再検討,第55回日本応用動物昆虫学会大会,九州大学,福岡,2011年3月28日

上田昇平,Quek S-P, Gullan PJ, 近藤拓正,市岡孝朗,村瀬香,市野隆雄,アリ植物オオバギ属の幹内に共生するカイガラムシ類の寄主選好性:核DNA系統樹を用いた検証,日本生態学会第58回大会,北海道大学,札幌,2011年3月10日

上田昇平,Quek S-P,大久保忠浩,清水加耶,市岡孝朗,市野隆雄,アリ植物をめぐる生物間相互作用の形成過程を探る,小集会「好蟻性昆虫小集会」,日本昆虫学会第70回大会,山形大学,鶴岡,2010年9月19日(招待講演)

[その他]

<ホームページ>

<http://science.shinshu-u.ac.jp/~bios/Evo/itino/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市野 隆雄 (ITINO, Takao)
信州大学・学術研究院理学系・教授
研究者番号: 20176291

(3) 連携研究者

上田 昇平 (UEDA, Shouhei)
信州大学・理学部・研究員
研究者番号: 30553028

乾 陽子 (INUI, Yoko)
大阪教育大学・教育学部・准教授
研究者番号: 10343261

平尾 章 (HIRAO, Akira)
筑波大学・菅平実験センター・助教
研究者番号: 20447048

坂本 洋典 (SAKAMOTO, Hironori)
玉川大学・脳科学研究所・研究員
研究者番号: 70573624

(4) 研究協力者

小松 貴 (KOMATSU, Takashi)
九州大学・熱帯農学研究センター・学振特別研究員
研究者番号: なし

丸山 宗利 (MARUYAMA, Munetoshi)
九州大学・総合研究博物館・助教
研究者番号: 80512186

市岡 孝朗 (ITIOKA, Takao)
京都大学大学院・人間環境学研究科・教授
研究者番号: 40252283

清水 加耶 (SHIMIZU, Kaya)
京都大学大学院・人間環境学研究科・研究員
研究者番号: なし