

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650160

研究課題名(和文) 急激なメス化が生じている昆虫の地域集団における原因究明とその進化生態学的意義

研究課題名(英文) Phylogeographic origin of a mayfly unisexual reproduction strains and their rapid expansion across Japan

研究代表者

東城 幸治 (TOJO, Koji)

信州大学・学術研究院理学系・准教授

研究者番号：30377618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：日本列島のオオシロカゲロウは両性集団と雌性集団が地理的モザイク状に分布する、ユニークな地理的単為生殖種である。本種に注目し、大陸の両性集団も対象とした系統進化学的解析を実施した(ミトコンドリア遺伝子と核遺伝子のそれぞれ複数の領域を解析)。

この結果、日本列島の系統は短系統であり、地史の影響を強く受けた遺伝構造をもち、単為生殖系統は比較的最近に、西日本から起源したことを明らかにした。加えて、同所的に両系統が混生する集団において、系統間の遺伝子流動が生じていないことも明らかにした。

現在進行形で雌性集団化しつつある集団に注目した分子マーカーを用いた「性比シフト」プロセス解析に関しても重要な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：The burrowing mayfly *Ephoron shigae* is distributed East Asia. Some populations are bisexual, and others are unisexual. In general, parthenogenetic organisms are often found in harsh environments, such as at high latitudes and altitudes, in xeric as opposed to mesic conditions, in isolated habitats, and at the peripheral regions of the taxon's distribution range. However, the distributions of bisexual and unisexual populations overlap broadly in their respective geographical ranges. In the analysis of mtDNA (16S, COI), we revealed that unisexual populations were of monophyletic origin and recently differentiated in western Japan. In the nuDNA EF-1a, boule analysis, parthenogenetic strains had two genotypes, while specimens of bisexual lineage had 20 genotypes. These results are consistent with an automixis mode of reproduction for the parthenogenetic strains. Furthermore, there would be no gene flow between the specimens of the bisexual lineage and those of the parthenogenetic strain.

研究分野：進化生物学

キーワード：系統進化 系統地理 進化生態 進化発生 単為生殖 遺伝構造 遺伝子浸透 地史

## 1. 研究開始当初の背景

オオシロカゲロウ *Ephoron shigae* は日本列島の広域をはじめとする東アジア地域に生息するカゲロウである。このうち、日本列島の集団のなかには、オスがみられずにメスだけから構成される集団や、性比が著しくメスに偏った集団が存在し、オス・メスがほぼ1:1の性比で生息する両性集団とモザイク的に分布している。これらのことから、「地理的単為生殖集団」として扱ってきた (Sekine and Tojo, 2010a)。そして、メスだけで構成される地域集団では、オートミクス型単為生殖で世代を繋いでいることも明らかにしてきた (2010b)。

一般に地理的単為生殖が検出されるような場合、かならずしも良好とはいえないような厳しい環境下において単為生殖集団が起源し、定着する傾向が強いとされてきた。例えば、種の分布域の周辺地域、高緯度・高標高地域、乾燥地域、島や島嶼的環境などは、よく知られた事例である (Cuellar, 1977; Suomalainen et al., 1987; Sekine and Tojo, 2010a, b)。しかしながら、本研究であつかうオオシロカゲロウ *Ephoron shigae* は日本国内広域において、両性生殖集団と単為生殖集団がモザイク状に分布しており、これらの分布には何ら傾向が認められていない (Sekine and Tojo, 2010a, b)。さらに、メスに偏った性比の集団の存在は、両性生殖集団と単為生殖集団が同所的に混在していることが示唆される。

このようなユニークな状態が認められるオオシロカゲロウではあるが、その系統進化史、系統地理に関しては、まったく情報が得られていない状況にあった。

## 2. 研究の目的

以上のような背景から、本研究においては、メスだけで構成される単為生殖系統も含めた日本列島産オオシロカゲロウを網羅的に扱い、これらに大陸の系統も加え、本種の系統進化・系統地理的な解析を実施することを目的とした。また、性比がメスに著しく偏っている集団に関しては、両性生殖集団の中に、単為生殖系統が二次的に進入し、性比をメスへと偏らせている可能性が示唆されるが、実際にはどのような状況にあるのか？ を分子マーカーを用いた解析により究明することを目的とした。

さらに、一つの水系 (阿武隈川水系) 内において、1990年代以降、現在までに、急激に性比のメスへのシフトが生じてきたことを示す申請者自身の研究データに基づき、性比のシフトがどのようにして生じてきたのか？ 分子マーカーを用いた解析により究明すること、さらには、性比がメスへと偏っている地域集団レベルにおける将来の性比構成に関する動態予測を実施することも目的とした。

また、本種における単為生殖系統起源に深

く関わるような両性生殖系統や近縁種などにおける潜在的な単為発生能力の有無やその程度に関しても調査研究を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究材料の確保

本研究では、日本列島内のオオシロカゲロウの生息地をほぼ網羅するような地域集団からの標本採取を行い、遺伝子解析用の試料とした。この際、先行研究において (Sekine and Tojo, 2010a) 集団タイプ (性比構成) が明らかとなっている場合を除き、集団の性比調査も実施した。成虫メスは強い光への走行性が認められることから、性比調査に関しては、生息するマイクロハビタット (生息場) に雌雄差が検出されないと考えられる幼虫ステージにおける調査から算出した。

これら日本列島内をほぼ網羅する地域集団の標本確保と並行して、大陸の標本採集も実施した。ロシア沿海州においては、ここ数年ほどの情報がなく、大陸産オオシロカゲロウとしては、朝鮮半島広域に生息している集団を対象としてサンプリングを実施した。

### (2) 遺伝子解析

採取した試料をもとに、地域集団レベルでの集団遺伝解析ができるだけの個体数 (20個体超) を目処に、全ゲノム DNA を抽出精製し、ミトコンドリア DNA の COI 領域、16S rRNA 領域、核遺伝子の EF-1 領域、Histone H3 領域、CAD 領域の解析を実施した。これらの領域の解析に加えて、より鋭敏な分子マーカー開発を目論み、マイクロサテライト・マーカー開発を実施した (本開発に関しては、現在も進行中)。

これらの対象領域において、得られた配列情報のうち、種内多型が検出されたものを用いて、遺伝構造解析を実施した。

解析結果を評価しながら、同じような生態的ニッチを有する河川棲カゲロウ類における分子系統地理の研究も補足的に試み、本研究で注目するオオシロカゲロウとの比較・検討を試みた。

### (3) 潜在的な単為発生能力のスクリーニング

オオシロカゲロウにおいて単為生殖系統が出現するに至った要因を探るため、両性生殖系統のメスに潜在的な単為生殖能力があるかどうか？ 両性生殖を基本とする近縁種群のメスに潜在的な単為生殖能力があるかどうか？ についても補足的に検討した。

## 4. 研究成果

### (1) オオシロカゲロウ類の系統地理解析

日本列島および大陸のオオシロカゲロウを対象とした遺伝子解析の結果、地史の影響を極めてよく反映した遺伝構造をもつことが明らかとなった。

まず、大陸系統と日本列島産のオオシロカゲロウは、日本列島の大陸からの離裂により遺伝分化した可能性が強く示唆された。また、日本列島内においても、東日本と西日本の地域集団間では、大きな遺传的分化が認められ、これは、15-5Maの長年にわたり存在し、東西日本列島を隔てていたと考えられるフォッサマグナの影響を強く受けたものと考えられた。

また、朝鮮半島内においても、遺伝系統群が検出され、これらは半島内の脊梁山脈などが遺伝分化の障壁として機能したことが示唆された。これらの結果は、研究室内で並行して解析をしており、ほぼ同一の生態的ニッチを有すると考えられるチラカゲロウ *Isonychia japonica* における遺伝構造とも極めてよく似た結果であることから、両種が同じような地史の影響を受けていることが明らかとなった。

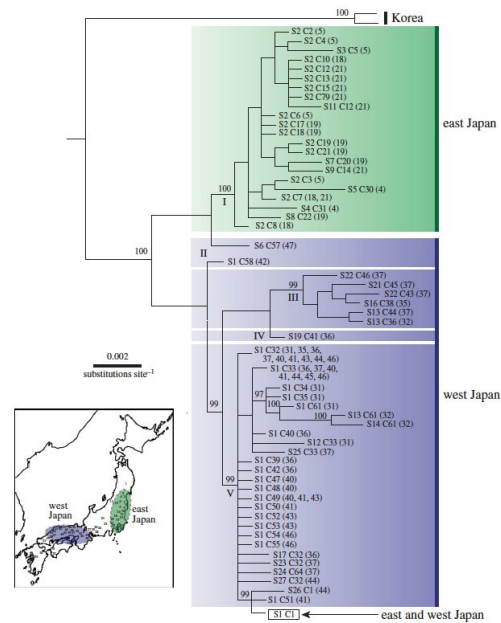
加えて、オオシロカゲロウの近縁種である同属のアカツキシロカゲロウ *Ephoron eophilium* やビワコシロカゲロウ *Ephoron limnobium* も含めた解析を実施した。この結果より、まず、アカツキシロカゲロウはかなり古い地質年代に種分化をしたことが明らかとなった。本種は、利根川水系の固有種であるが、日本列島内でオオシロカゲロウから派生的に種分化した系統ではなく、日本列島が大陸の東縁に位置していた時代における種分化であることが示唆された。一方、琵琶湖の固有種であるビワコシロカゲロウは、オオシロカゲロウの遺传的クレード内に位置づけられており、オオシロカゲロウ種内の一系統群であると考察した。これまで報告されてきたオオシロカゲロウとの形態学的相違に関しては、連続的な形質の誤評価や止水域への適応に伴う二次的な分化であり、種レベルでの系統の議論には不適なものであると考察した。

## (2) 単為生殖系統の起源

オオシロカゲロウ種内において、日本列島広域から検出される単為生殖系統は、そのモザイク的な分布から、単為生殖能力が、並行的に派生する形で獲得されたものと予想してきたが、本研究による解析結果は、当初の予想に反するものであり、比較的最近に、西日本のいずれかの地域において、単一起源として派生したものであることが明らかとなった。そして、この単為生殖系統に由来する個体が東日本への進出を果たし、現在に至ることが明らかとなった (右上図, Sekine and Tojo, 2015, Roy. Soc. Open Sci. )。

また、性比がメスに偏る地域集団を対象にした解析結果において、性比をメスへとシフトさせるプロセスが明確に示された。もともと両性生殖系統が生息していた集団に、二次的に単為生殖系統が進入することで、性比のメス化がスタートする。単為生殖系統の個体は、交配することなく確実に子孫を残すこと

ができ、その子孫は全てメスとなり、その子孫も交配なしに子孫を残すことができることから、一旦、両性生殖集団に単為生殖系統が進入すると、メスへの性比シフトが開始し、メスの割合が増えるほど加速的なメス化が生じることを示唆した。実際に、性比の偏り具合と、単為生殖系統特有の遺伝子型が占める割合には強い相関が認められた。



## (3) 単為生殖系統メスと両性生殖系統オス間での交配の可能性

自然界において、単為生殖系統メスと両性生殖系統オス間での交配が生じているのかどうか? を把握するため、ミトコンドリア遺伝子と核遺伝子の多型解析の結果を詳細に比較・検討したところ、これらの組み合わせでの交配は生じていないか、生じていたとしても、その子孫が残されていないことを示す結果が得られた。すなわち、両性生殖系統と単為生殖系統が混生する地域集団内においても、これらの系統間での交配が生じた痕跡は全く認められなかった。

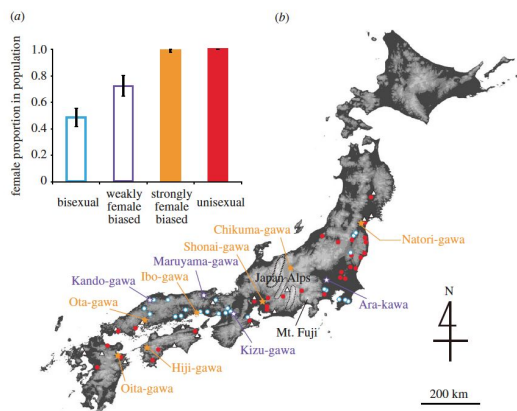
羽化期に、メス成虫を捕獲し、産下させた卵表あるいは卵内表層部 (卵門 Micropyle 付近) への精子の有無を蛍光顕微鏡による観察をし、産卵したメスの遺伝子解析から系統を判別する実験において、そのそも、単為生殖系統メスと両性生殖系統オス間での交配は生じていない可能性が強いことが示された。このことは、互いに両系統間での交配前識別が可能であるのか、あるいは、単為生殖系統のメスはそもそも配偶行動が全くことなるのか、実際のプロセスは観察できていないものの、なんらかの生殖前隔離機構が機能している可能性が示唆された。

この結果は、単為生殖系統のメスに交尾をしかけて、精子を無駄に浪費する可能性がないか、著しく低いことを意味するものである。

#### (4) 潜在的な単為生殖能力のスクリーニング

オオシロカゲロウの単為生殖系統出現要因を探るため、両性生殖系統のメスに潜在的な単為生殖能力があるかどうか？ 両性生殖を基本とする近縁種群のメスに潜在的な単為生殖能力があるかどうか？ についても補足的に検討した。

オオシロカゲロウの両性集団における潜在的な単為生殖能力については先行研究においても示していたが (Tojo et al., 2006), この研究では、産卵したメスの遺伝的背景まで把握しきれなかったことから、今回の研究においては、遺伝子解析も実施することで、対象とした非交尾個体が両性生殖系統であることを確認した上で、潜在的な単為生殖能力の調査を実施した。結果は、Tojo et al. (2006) と同様のものであり、他のカゲロウ類よりはやや高い単為生殖能力を潜在的に有していることを明らかにした (下図, Sekine and Tojo, 2015, Roy. Soc. Open Sci. )



次に、近縁種であるアカツキシロカゲロウに関しても、同様の実験を行い、オオシロカゲロウと同程度の潜在的な単為生殖能力を有していることを明らかにした。

以上の成果を、Roy. Soc. Open Sci. 誌、Eur. J. Entomol. 誌、Freshw. Sci. 誌、および Entomol. Res. 誌等に公表した。2年間の研究課題であったが、期間内に、これらの国際誌上での論文公表ができたこと、現在も投稿中の論文があるなど、順調に成果を蓄積できたと評価している。

今後は、現在進行形で性比が急激にシフトしている地域集団に焦点を絞り、当該集団で生じているような性比シフトの現象やその要因を現状以上に詳細に究明していくほか、両性生殖系統と単為生殖系統間での繁殖競争や繁殖干渉などにも着目した、進化生態学への発展が期待される。

また、boule 遺伝子の単為生殖への関与などを中心に、単為生殖を可能とする遺伝的基盤の究明などへも発展させていく計画である。

#### 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 6件)

Saito, R. and K. Tojo, Complex geographic and habitat based niche partitioning of an East Asian habitat generalist mayfly *Isonychia japonica* (Ephemeroptera, Isonychiidae), with reference to differences in genetic structure. Freshw. Sci., 35: 712-723. 2016, 査読有, doi: 10.1086/686564

Saito, R. and K. Tojo, Comparing spatial patterns of population density, biomass, and genetic diversity patterns of the habitat generalist mayfly *Isonychia japonica* Ulmer (Ephemeroptera, Isonychiidae), in the riverine landscape of the Chikuma-Shinano River Basin. Freshw. Sci., 35: 724-737. 2016, 査読有, doi: 10.1086/686537

Saito, R., J.I. Jo, K. Sekine, J. Bae and K. Tojo, Phylogenetic analyses of the isonychiid mayflies (Ephemeroptera: Isonychiidae) of the East Palaearctic region. Entomol. Res., (in press) 2016, 査読有, doi: 10.1111/1748-5967.12168

Sekine, K., F. Hayashi and K. Tojo, Unexpected monophyletic origin of *Ephoron shigae* unisexual reproduction strains and their rapid expansion across Japan. Roy. Soc. Open Sci., 2: 150072. 2015, 査読有, doi: 10.1098/rsos.150072

Sekine, K., K. Tojo and Y.J. Bae, Facultative parthenogenesis in the burrowing mayfly *Ephoron eophilum* (Ephemeroptera: Polymitarcyidae) with an extremely short alate stage. Eur. J. Entomol., 112: 606-612. 2015, 査読有, doi: 10.14411/eje.2015.074

Sekine, K., K. Tojo and Y.J. Bae, Distribution and genetic characteristics of *Ephoron shigae* (Ephemeroptera: Polymitarcyidae) in Korea. Entomol. Res., 45: 150-157. 2015, 査読有, doi: 10.1111/1748-5967.12107

[学会発表](計 13件)

齋藤梨絵・加藤慎也・野崎隆夫・東城幸治, 日本列島の河川における最優占種ヒゲナガカワトビケラにおける遺伝的多様性. 日本陸水学会第 8-回大会, 2015年9月26-29日, 函館(北海道大学).

Sekine, K., K. Tojo and Y.J. Bae, Phylogeny and evolution for synchronized mass emergence mayfly *Ephoron* (Ephemeroptera: Polymitarcyidae). Joint Meeting of the

14th International Conference on Ephemeroptera and 18th International Symposium on Plecoptera, May 31-June 5, 2015, Aberdeen, Scotland, UK.

Saito and K. Tojo, Phylogeographic structures and niche partitioning of the "Habitat-Generalist" mayfly *Isonychia japonica* (Ephemeroptera, isonychiidae): Observed two lineages and their habitat preference. Joint Meeting of the 14th International Conference on Ephemeroptera and 18th International Symposium on Plecoptera, May 31-June 5, 2015, Aberdeen, Scotland, UK.

Tojo, K., Molecular phylogeographic studies of freshwater benthos in East Asia, with special reference to the complex formation history of the Japanese Archipelago. Annual Meeting for Freshwater Science, May 16-23, 2015, Milwaukee, USA.

Tojo, K. and R. Saito, Biogeography of the isonychiid mayfly *Isonychia japonica* with a wide distribution in East Asia, inferred from molecular phylogenetic analyses (Ephemeroptera, Isonychiidae). Annual Meeting for Freshwater Science, May 16-23, 2015, Milwaukee, USA.

Jo, J.I. and K. Tojo, Biogeography of East Asian ephemeroptera mayflies, genus *Drunella* and *Cincticostella*, inferred from molecular phylogenetic analyses (Insecta: Ephemeroptera, Ephemeroptera). Annual Meeting for Freshwater Science, May 16-23, 2015, Milwaukee, USA.

Takenaka, M. and K. Tojo, Deep relationship between genetic structure and geological history of Japan's endemic dipteromimid mayflies, which inhabit the upper headwaters (Ephemeroptera, Dipteromimididae). Annual Meeting for Freshwater Science, May 16-23, 2015, Milwaukee, USA.

東城幸治, 日本列島の地の利を活かした昆虫生物地理学 (大会企画シンポジウム「昆虫学会秋の学校」での招待講演). 日本昆虫学会第 74 回大会, 2014.9.14-16, 東広島 (広島大学).

関根一希・東城幸治・LEE JE・Bae YJ, 世界広域に分布する一斉羽化昆虫シロイロカゲロウ種群の分子系統解析. 日本昆虫学会第 74 回大会, 2014.9.14-16, 東広島 (広島大学).

斎藤梨絵・東城幸治, 広域分布種・チラカゲロウにおける系統地理・系統進化、そして流程分布するクレードの検出につい

て. 日本昆虫学会第 74 回大会, 2014 年 9 月 14 日-16 日, 東広島 (広島大学).

東城幸治・関根一希・鈴木智也, 水生昆虫類における遺伝子解析を用いた最近の分類学的状況, 分子マーカーを用いた水生昆虫類・魚類における系統地理学. 日本陸水学会第 79 回大会, 2014 年 9 月 10-13 日, つくば (筑波大学).

斎藤梨絵・新井谷梨鈴・小林建介・東城幸治, 分子マーカーを用いた水生昆虫類・魚類における系統地理学. 日本陸水学会第 79 回大会, 2014 年 9 月 10-13 日, つくば (筑波大学).

Jo JI・東城幸治, 東アジア産マダラカゲロウ類 (昆虫綱・カゲロウ目)における分子系統地理学的研究, 日本陸水学会第 79 回大会, 2014 年 9 月 10-13 日, つくば (筑波大学).

[図書](計 8 件)

Tojo, K., K. Sekine, T. Suzuki, R. Saito and M. Takenaka, Chapter 8. The Species and Genetic Diversities of Insects in Japan, with Special Reference to the Aquatic Insects. In: Species Diversity of Animal in Japan (Motokawa, M. and Kajihara, H. eds). Springer (in press). 2016

東城幸治・伊藤建夫, 3 章, 日本の地史と昆虫相の成立: 地理形成に由来する進化の世界. 大場裕一・大澤省三・昆虫 DNA 研究会 (編)「遺伝子から解き明かす昆虫の不思議な世界」, 105-161 頁 (総 621 頁), 2015, 悠書館, 東京.

東城幸治・伊藤建夫, 4 章, 日本における昆虫の分布と棲みわけ: 時季や地理に由来する種分化の世界. 大場裕一・大澤省三・昆虫 DNA 研究会 (編)「遺伝子から解き明かす昆虫の不思議な世界」, 163-220 頁 (総 621 頁), 2015, 悠書館, 東京.

東城幸治, 7 章, 昆虫の多様で奇妙な生活史: 複雑な様相をみせる昆虫の生態の世界. 大場裕一・大澤省三・昆虫 DNA 研究会 (編)「遺伝子から解き明かす昆虫の不思議な世界」, 317-345 頁 (総 621 頁), 2015, 悠書館, 東京.

東城幸治, 第 4 章 生命の起源. 鷲谷いづみ (監修), 森誠・江原宏 (編)「ライフサイエンスのための生物学」, 198-205 頁 (総 241 頁), 2015, 培風館.

東城幸治, 第 5 章 生物の系統. 鷲谷いづみ (監修), 森誠・江原宏 (編)「ライフサイエンスのための生物学」, 206-215 頁 (総 241 頁), 2015, 培風館.

東城幸治, 第 6 章 進化のしくみ. 鷲谷いづみ (監修), 森誠・江原宏 (編)「ライフサイエンスのための生物学」, 216-223 頁 (総 241 頁), 2015, 培風館.

東城幸治, 第 7 章 進化の証拠とゲノム解析. 鷲谷いづみ (監修), 森誠・江原宏 (編)

「ライフサイエンスのための生物学」,  
224-232 頁 (総 241 頁), 2015, 培風館.

〔その他〕

ホームページ等

信州大学学術情報オンラインシステム SOAR

[http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/  
ja.0Ccebhlh.html](http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.0Ccebhlh.html)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

東城 幸治 (TOJO, Koji)

信州大学・学術研究院理学系・准教授

研究者番号 : 30377618