

## 博士論文審査の結果の要旨

氏名	谷野 宏樹
学位名	博士（理学）
学位番号	甲 第 135 号
論文題目	昆虫における新規「胎生」の発見と 系統・進化・発生・生態学的研究
論文審査委員	主査 東城 幸治 浅見 崇比呂 市野 隆雄 新美 輝幸（自然科学研究機構・基礎生物学研究所）

(博士論文審査の結果の要旨)

本研究では、特殊な繁殖様式を進化させたフタバカゲロウ *Cloeon dipterum* に注目し、その系統新科学的な位置づけ、ならびに特異な繁殖生態やシステムに関して詳細な記載を実施した。

まず、フタバカゲロウの系統進化的背景について、近縁種間・種内の系統解析に汎用されている DNA バーコード法の問題点を指摘し、世界的に汎用されているユニバーサルプライマーを用いた PCR では偽遺伝子 *pseudogene* を増幅させてしまうことを指摘するとともに、その回避法を明確化した。この成果は、世界的に展開されている DNA バーコーディング法に一石を投じるもので、汎用されているプライマーセット (Folmer et al., 1994) を無批判に用いることで、目的遺伝子ではなく、そのコピーに由来する偽遺伝子を増幅してしまい、結果として非相同配列データを利用することにより、DNA バーコーディングにおける過ちを侵すことや、誤った系統解析結果を招き得るリスクがあることを明確に示した。さらに、このリスク回避方法として、DNA バーコーディング領域も含めたミトコンドリア DNA COI 領域内の、より長い配列のコピーを得るようなロング PCR 法を導入することの有効性を示した。これらの内容は、博士論文の第 1 章を構成するとともに、既に国際誌上で論文公表済みである (Yano et al., 2019, *Limnology*)。

次いで、相同性が確実となった DNA バーコーディング領域 (mtDNA COI 領域) の遺伝情報に基づく系統解析を実施し、日本列島のフタバカゲロウは、朝鮮半島の集団と共に最派生系統に位置づけられることを明示した。欧米の研究者の協力を得ながら、欧米やアフリカ、マカロネシア地域のフタバカゲロウの遺伝情報も加え、本人自身がサンプリングを実施した日本列島広域、朝鮮半島の韓国内広域、そして中国の南京周辺地域のフタバカゲロウと共に、全世界を網羅する地域集団を対象にした系統解析を実施した。その結果、アジア地域のフタバカゲロウは、欧米やアフリカ、マカロネシアの系統からは大きく分化した独立系統を構成すること、とくに日本列島と朝鮮半島の系統は種内における最派生系統であることを明らかにした。そして、これまでの欧米での研究では「卵胎生」であることや「単為生殖」能力をもつことが報告されてきたが、これらの研究報告がなされた欧州系統とは遺伝的に大きく分化していることも明確化した。以上の成果は、博士論文の第 2 章として纏められ、国際誌上で論文公表済みである (Yano et al., 2020, *Zoological Science*)。

第 3 章では、日本列島のフタバカゲロウを用いて、特殊な発生様式について纏められている。本種における欧州系統の研究では、単為生殖を行うことや卵胎生であることが報告されている。しかしながら、日本の系統には単為生殖能力がないことを明らかにした (この内容は、国際誌上で公表済みである; Yano and Tojo, 2021, *Zoological Science*)。さらに、卵生や卵胎生ではなく、卵形成時に卵内に蓄積される栄養物質は脂質のみであり、タンパク質性の物質は卵内には皆無であることを、組織化学的手法で明らかにした。一方で、母体からの栄養供給を示唆するような透過性の高い、極めて薄い層からなる卵膜構造をもつことや、卵巣外の特殊な膜状の構造内にタンパク質性の物質が蓄積され、そこから卵巣上皮 (側輸卵管上皮) を介して卵膜を透過し、最終的にはタンパク質 (栄養物質) が胚へ供給されていることを透過型電子顕微鏡による観察

から究明した。これは日本産フタバカゲロウが「胎生」システムを進化させたことを強く示唆するものである。すなわち、卵胎生ではなく母体からの栄養供給を受けることで胚発生が進行する「胎生」であることを究明した。種多様性の高い昆虫類のなかでも胎生昆虫は極めて稀な存在であり、かつ本種の胎生は既知の胎生昆虫における発生システムのいずれとも異なる新規のものである。また、これら光学・電子顕微鏡を駆使して、栄養物質（タンパク質・脂質）の受給様式における組織化学的手法でのアプローチのほか、卵黄タンパクの前駆物質である *vitellogenin* 遺伝子の発生段階における発現パターンの解析など、多角的なアプローチにより、フタバカゲロウの胎生進化を議論している。

最後に、未発生（未受精）状態の卵は、その後退化していくと共に、あらかじめ蓄積された脂質などの栄養物質に関しては母体へ吸収されることなど、胎生の獲得に伴う他の昆虫類には見られないような特徴も明らかにした。このような特殊化は、羽化後に交尾を行い、その後はすぐに産卵することなく受精卵を体内（卵巣内）で胚発生させるような特殊な繁殖システムへの進化したことで、この胚発生期間を、メス親は（カゲロウ類では極めて例外的な3週間程度の長期間にわたり）生き続ける必要があり、そのような観点での適応であると考えられる。これらの発生や繁殖生態に関わる成果は、第4章として纏められており、国際誌上で公表済みである（Yano and Tojo, 2021, *Zoological Science*）。

以上より、本研究はフタバカゲロウの特殊な発生システムを中心に、その胚発生や生態、遺伝、進化プロセスを多角的なアプローチにより紐解いた総合的研究であり、いわゆる「エボ・デボ・エコ EvoDevoEco」と喩えられるような、進化・発生・生態学的研究である。また、関連する研究成果は、3編の国際誌に、いずれも筆頭著者として論文公表されており、本論文が学位論文に相応しいレベルにあることを全審査委員にて確認した。

(公表主要論文名)

- (1)-1 **Yano K**, Takenaka M, Mitamura T, Tojo K. Identifying a "pseudogene" for the mitochondrial DNA COI region of the corixid aquatic insect, *Hesperocorixa distanti* (Heteroptera, Corixidae). *Limnology* 21:319–325. 2019.
- (1)-2 **Yano K**, Takenaka M, Tojo K. Genealogical position of Japanese populations of the globally distributed mayfly *Cloeon dipterum* and related species (Ephemeroptera, Baetidae): A molecular phylogenetic analysis. *Zoological Science* 36:479–489. 2019.
- (1)-3 **Yano K**, Tojo K. Possibility of undeveloped egg absorption during embryogenesis: A unique phenomenon observed in the ovoviviparous mayfly *Cloeon dipterum*. *Zoological Science* 38 (2021, in press).