

「信州大学審査学位論文」

共生から紐解くクワガタムシ科の進化生物学的研究

令和5年3月

信州大学院総合医理工学研究科  
総合理工学専攻 山岳環境科学分野  
上木 岳

## 目次

緒言	1
第 I 章 クワガタムシ科の適応放散と共生酵母との共進化	3
I-1. 背景	4
I-2. 方法	8
I-2-1. 研究材料	
I-2-2. 雌成虫および幼虫からの共生酵母の単離培養	
I-2-3. 共生酵母の遺伝子解析	
I-2-4. 宿主クワガタムシの遺伝子解析	
I-2-5. 分子系統解析	
I-2-6. 宿主クワガタムシの分岐年代推定および幼虫食性の祖先形質復元	
I-3. 結果	13
I-3-1. 雌成虫および幼虫からの共生酵母の単離培養	
I-3-2. 核遺伝子 ITS 領域に基づく共生酵母の系統学的位置付け	
I-3-3. 核遺伝子 IGS 領域に基づく共生酵母の系統学的位置付け	
I-3-4. 宿主クワガタムシの系統関係	
I-3-5. 宿主クワガタムシの分岐年代推定および幼虫食性の祖先形質復元	
I-4. 考察	19
I-4-1. クワガタムシ科の食性進化と共生酵母の代謝機能の関係	
I-4-2. 特殊な環境の枯死木を利用するクワガタムシの共生酵母	
I-4-3. 宿主クワガタムシと共生酵母の系統関係の不一致	
I-4-4. 宿主クワガタムシの分布する気候帯や植生帯と共生酵母の系統の関係	



III-2-1. 研究材料および試料からのゲノム DNA 抽出	
III-2-2. mtDNA の遺伝子解析	
III-2-3. ゲノムワイドな一塩基多型 (SNPs) の遺伝子解析	
III-2-4. mtDNA の分子系統解析および分岐年代推定	
III-2-5. SNPs の分子系統解析および集団遺伝構造解析	
III-2-6. 遺伝的多様性および空間的遺伝構造の解析	
III-2-7. 集団動態解析	
III-2-8. 生息適地推定と分布変遷が集団間の遺伝的分化に及ぼす影響の検定	
III-3. 結果	85
III-3-1. mtDNA に基づく分子系統解析と分岐年代推定	
III-3-2. SNPs の分子系統解析および集団遺伝構造解析	
III-3-3. 遺伝的多様性および空間的遺伝構造	
III-3-4. 集団動態解析	
III-3-5. 生息適地推定と分布変遷が集団間の遺伝的分化に及ぼす影響の検定	
III-4. 考察	90
III-4-1. ヒメオオクワガタの分子系統地理	
III-4-2. ブナの地理的な遺伝構造との比較	
III-4-3. ヒメオオクワガタの遺伝的分化の創出機構	
図表	98
<b>総合考察</b>	<b>122</b>
謝辞	127
引用文献	128

## 緒言

地球上には多種多様な生物が様々な環境に生息しており、地球という限られた空間にも関わらず多くの生物が共存している。これは地球誕生以来の長い時間をかけて繰り返されてきた生物の適応放散の結果であると言える。つまり、適応放散の機構を解明することは、地球上の生物多様性の創出機構の解明でもある。生物の適応放散の解明は、進化生物学研究における最重要課題の一つとして、古くから多くの研究者を魅了してきたが、その解決には至っていない。適応放散は異所的な分断や生殖隔離による種分化が引き起こす「種」の多様化と、多種多様な生息環境への進出によって生じる「生態学的ニッチ」の多様化から構成される (Schluter, 2000)。すなわち、種分化が引き起こされる機構と新規ニッチへの拡大や進出が生じる機構の解明は、生物の適応放散を理解する上で重要な課題である。本研究では、様々な生物群間でみられる相互作用である「共生」に着目し、生物群間の共進化や相互作用を通じて、種と生態学的ニッチの多様化が生じるメカニズムの解明を目指した。

共生は互いに利益のある相利共生から寄生などの片利共生、さらには被食－捕食の関係性にまで至り、その関係性や程度は多岐にわたる (Paracer & Ahmadjian, 2000)。昆虫は地球上で最も多様な分類群であり (Grimaldi & Engel, 2005)、その中でも最大の分類群である甲虫目は地球上の既知の生物種数の 4 分の 1 を占める (Hunt et al., 2007)。このような甲虫目の多様性を創出した背景には、植食性甲虫の急速な適応放散が挙げられ、被食－捕食の関係にある植物と植食性甲虫の種間相互作用の結果として高い種多様性が創出されてきたと思われる (McKenna et al., 2019)。特に多くの植食性甲虫は微生物と共生関係を築くことにより、多くの動物にとって代謝が困難な植物組織の代謝能の獲得や二次代謝産物などの防御物質に対する克服、あるいは必須アミノ酸などの栄養の合成を可能とし、微生物との共生関係は宿主甲虫の生態学的なニッチの多様化を促進した要因であると考えられる (Salem & Kaltentpoth, 2022)。このことから植食性甲虫の高い種多

様性は餌資源となる植物および共生微生物との相互作用の結果として創出されたと思われ、植食性甲虫の適応放散のメカニズムに迫るためには、それらの個々の生物間相互作用を紐解く必要がある。

本研究では植食性甲虫の中でも枯死木を摂食するクワガタムシ科に注目した。クワガタムシ類は樹木の放散によって引き起こされた枯死木の腐朽型の多様化にともなって、適応放散を遂げたと考えられる (Araya, 2006)。そこで本研究では日本のクワガタムシ科を取り巻く共生系からクワガタムシ類の適応放散機構の解明を試みた。日本のクワガタムシ相の大きな特徴としては、クワガタムシ科の祖先的なグループから比較的新しいグループまでを網羅する分類群が分布する点が挙げられる (Hosoya & Araya, 2005)。このような背景には、日本列島が生物地理学的に旧北区、東洋区、新北区の境界に位置することや、亜寒帯から亜熱帯に至る気候帯を跨ぎ、クワガタムシの生息環境である森林植生帯が多様であることが挙げられる (荒谷, 2017a)。さらには複雑な地史を背景にもつ日本列島のクワガタムシ類の特徴は山地あるいは島嶼ごとに遺伝的に分化している点である (Kubota et al., 2011; 荒谷, 2017b)。以上のことから、クワガタムシ科の多様性進化を解明する上で、日本列島は最適なフィールドであるといえる。また、クワガタムシの雌成虫は菌嚢に共生酵母を保持しており、共生酵母は幼虫が食べる枯死木の代謝の補助を担うと考えられる (Tanahashi et al., 2010; Tanahashi & Hawes, 2016; Roets & Oberlander, 2020)。そこで、本論文では日本列島のクワガタムシ科を網羅する共生酵母の系統関係を解明し、共生酵母との共進化が宿主の生態学的ニッチの多様化に及ぼした影響を究明する。また、共生酵母とクワガタムシの両者の系統関係を比較することで、共生酵母の多様な獲得プロセスに迫る。さらには、被食-捕食の関係にある樹木との歴史的な相互作用からクワガタムシの遺伝的分化の創出機構を究明する。これらの結果から、クワガタムシ-酵母-宿主樹木の共生系を紐解くことでクワガタムシの適応放散メカニズムの解明を目的とする。

## 第 I 章

### クワガタムシ科の適応放散と共生酵母との共進化

## I-1. 背景

生物の適応放散は種と生態学的ニッチの多様化から成り立つ (Schluter, 2000)。種の多様化を引き起こす種分化のメカニズムについては解明されつつあるものの (Coyne & Orr, 2004)、生態学的ニッチが多様化する要因については未解明な点が多い (Schluter, 2000)。地球上の既知の生物種数の 4 分の 1 を占める甲虫目の多様性の背景には、植物の多様化にともなう植食性甲虫の適応放散が挙げられる (Hunt et al., 2007; McKenna et al., 2019)。微生物との共生関係は昆虫の多様化を促進したと考えられ (Vega & Blackwell, 2005; Biedermann & Vega, 2020)、特に植食性甲虫と共生微生物の間には、植物組織の消化吸収の補助を担う消化共生や、必須アミノ酸をはじめとした栄養分の生合成を担う栄養共生などの多様な共生関係が認められる (Salem & Kaltenpoth, 2022)。植食性甲虫の生態学的ニッチの拡大や多様化の解明には、宿主の分類群を網羅する共生微生物との共進化プロセスの解明が重要である (Zhang et al., 2017; Reis et al., 2020; Salem et al., 2020)。

木材を摂食する昆虫は、多くの動物種にとって消化が困難な高分子化合物であるセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンを代謝可能な微生物と共生する (Parkin, 1940; Haack & Slansky, 1987; Stokland et al., 2012a)。木材摂食性昆虫と共生する多くの真菌類は、好気性であり、腸内あるいは外部の器官に共生する (Batra, 1963; Suh et al., 2003, 2005; Nguyen et al., 2007; Grünwald et al., 2010)。特に真菌類と共生する養菌性キクイムシ類、コメツキモドキ科、ツツシンクイムシ科、キバチの仲間およびオトシブミ科などの昆虫は、菌嚢と呼ばれる共生真菌類を運搬するための特殊な器官を保持する (Six, 2003; Grebennikov & Leschen, 2010; Toki et al., 2012)。一方で、木材食性の甲虫を対象に宿主甲虫の分類群を網羅する共生微生物の系統関係を解明した研究は、葉食性甲虫の共生微生物研究と比較して非常に乏しく (キクイムシ類: Vanderpool et al., 2018)、木材食性の甲虫の生態学的ニッチの多様化プロセスの解明に至っていない。

本研究で対象とするクワガタムシ科は世界に 1,300 種以上が知られており、その幼虫

は枯死木を摂食する (Araya, 1993; Tanahashi et al., 2010; Kim & Farrell, 2015)。クワガタムシ類の幼虫が利用する枯死木は、枯死木に作用する腐朽菌の種類に対応して白色腐朽、褐色腐朽および軟腐朽の3つに区分される (図 1-1; Araya, 2006)。白色腐朽を引き起こす白色腐朽菌は木材の構成成分であるセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンを全て分解する (Stokland et al., 2012a)。白色腐朽は広葉樹に多く発生し、多くのクワガタムシの属 (オオクワガタ属 *Dorcus* Macleay, 1819; ノコギリクワガタ属 *Prosopocoilus* Hope & Westwood, 1845; ミヤマクワガタ属 *Lucanus* Scopoli, 1763; オニクワガタ属 *Prismognathus* Motschulsky, 1860; チビクワガタ属 *Figulus* MacLeay, 1819; ツノヒョウタンクワガタ属 *Nigidius* MacLeay, 1819; ルリクワガタ属 *Platycerus* Geoffroy, 1762) が白色腐朽材食性を示す (図 1-1a; Araya, 2006)。一方で、褐色腐朽を引き起こす褐色腐朽菌はセルロースとヘミセルロースを選択的に分解するものの、リグニンをほとんど分解することができない (Stokland et al., 2012a)。褐色腐朽は比較的冷涼な環境の針葉樹に多く発生する傾向があり (Gilbertson, 1980)、クワガタムシ科では祖先的なグループであるマダラクワガタ属 *Aesalus* Fabricius, 1801 やツヤハダクワガタ属 *Ceruchus* Macleay, 1819 が褐色腐朽材食性を示す (図 1-1b; Araya, 2006)。白色腐朽と褐色腐朽は、主に担子菌類によって引き起こされるのに対して、軟腐朽は主に子囊菌類により引き起こされる (Worrall et al., 1997)。軟腐朽の枯死木は白色腐朽と同様にセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンが分解されるものの、その発生環境は高湿度下の木材で発生する (Levy et al., 1987)。ルリクワガタ属の一部の種やマグソクワガタ属 *Nicagus* LeConte, 1862 が軟腐朽食性を示す (図 1-1c; Araya, 2006)。さらにクワガタムシ科の中には、以上の3つの食性以外にも枯死木起源の腐植質を利用するグループがいる。このような腐植質は枯死木がシロアリなど他の木材摂食性昆虫などの関与を経て長い時間をかけて分解されたものであり、窒素含有量の高い餌資源である (Okajima & Araya, 2012)。ネブトクワガタ属 *Aegus* Macleay, 1819 やマルバネクワガタ属 *Neolucanus* Thomson, 1862、ミヤマクワ

ガタ属の一部の種が、枯死木由来のこのような腐植質を利用している（図 1-1d; Araya, 2006; Huang, 2018）。

クワガタムシ科の雌成虫は、腹部先端背側の第 8 節と第 9 節の間の節間膜の一部からなる菌嚢を持ち、これまでに調べられたクワガタムシ科の北半球の 13 属（ネプトクワガタ属; オオクワガタ属; ノコギリクワガタ属; ミヤマクワガタ属; マルバネクワガタ属; オニクワガタ属; チビクワガタ属; ツノヒョウタンクワガタ属; ルリクワガタ属; マダラクワガタ属; マグソクワガタ属; ツヤハダクワガタ属; イッカククワガタ属 *Sinodendron* Hellwig, 1792）および南半球の 1 属（オニシカクワガタ属 *Xiphodontus* Westwood, 1838）において菌嚢が確認されている（Tanahashi et al., 2010; Tanahashi & Hawes, 2016; Roets & Oberlander, 2020）。これらの菌嚢内からは共生酵母が検出されており、白色腐朽材食性を示すクワガタムシ類は、キシロース発酵性酵母である *Scheffersomyces stipitis* や *Scheffersomyces segobiensis* に近縁な共生酵母を保持することが知られている（Tanahashi et al., 2010, 2017; Kubota et al., 2020; Ueki et al., 2021）。一方で、褐色腐朽材食性のオニシカクワガタ *Xiphodontus antilope* は、セロビオース発酵性酵母である *Scheffersomyces coipomoensis* に近縁な共生酵母を保持している（Roets & Oberlander, 2020）。また、菌嚢から検出される酵母のほとんどが幼虫の腸内からも認められることから（Tanahashi & Hawes, 2016; Roets & Oberlander, 2020）、これらの共生酵母は雌成虫から幼虫へと垂直伝播されている（Tanahashi et al., 2010）。キシロースはヘミセルロースの主成分であり、セロビオースはセルロースの主成分であることから、共生酵母はクワガタムシ類の幼虫の腸内において木材成分の代謝の補助を担うと推測される（Tanahashi et al., 2010）。クワガタムシ科を網羅する属の雌成虫が菌嚢をもつことから、クワガタムシ類の系統進化において共生酵母との共進化は、種および生態学的なニッチの多様化と密接に関係していると考えられる。しかしながら、クワガタムシ科全体を網羅する共生酵母の種類や系統関係は把握されておらず、クワガタムシ科の食性の適応放散と共生酵母

との共進化の関係については未解明である。また、宿主クワガタムシ類の生態において共生酵母の果たす役割や相互作用に関しては検証されていない (Kubota et al., 2020)。

Kubota et al. (2020) では、日本列島のルリクワガタ属とその共生酵母の系統関係を分子系統地理学的手法により解明したところ、両者の系統関係は完全ではないものの、互いに共種分化してきたことが支持された。この結果は、共生酵母は基本的には雌成虫から幼虫へと共生酵母が垂直伝播されていることを示唆する。一方で、歴史的な分布域や選好する環境が重複するクワガタムシの種間では、別属どうしにおいても稀に共生酵母の水平伝播が生じるとともに、宿主種内において新規に獲得した共生酵母への置換も示唆されている (Ueki et al., 2021)。さらに、クワガタムシ類の温度耐性は酵母の系統ごとに異なり、特にルリクワガタ属においては共生酵母の温度耐性が宿主の分布標高からマイクロハビタットに至るスケールで生息域を制限している可能性、あるいは宿主の選好する環境条件が共生酵母の温度耐性に影響を及ぼす可能性が示唆された (Zhu et al., 2022)。クワガタムシ科では同属近縁種間においても、生息する標高や植生帯には違いが認められ、種ごとに生息環境に対する選好性が異なる (Huang, 2018)。宿主クワガタムシ類の生息環境と共生酵母の温度耐性には密接な関係性が示唆されることから、共生酵母との共進化はクワガタムシ類の食性の多様化のみならず生息環境の放散にも関係することが推測される。

第 I 章では日本のクワガタムシ類に着目し、共生酵母との系統関係を解明した。日本列島には、クワガタムシ科高次系統において祖先的な分類群から派生的な分類群を網羅する主要な分類群が生息している (Hosoya & Araya, 2005)。さらに、亜寒帯から亜熱帯に至る気候帯を跨ぐ日本列島に分布するクワガタムシ類の生息環境は冷温帯林から亜熱帯林にまで至り、日本のクワガタムシ類の種、およびその生息環境には高い多様性が認められる。そこで、日本のクワガタムシ科と共生酵母の分子系統解析を実施し、(1) クワガタムシ科の幼虫食性の進化プロセス、(2) 宿主の食性進化と共生酵母の系統進化

の関係性、および (3) 宿主の生息環境と共生酵母の系統進化の関係について検討する。これらの結果から、共生酵母との共進化にともなうクワガタムシ科の生態学的ニッチの多様化について究明する。

## I-2. 方法

### I-2-1. 研究材料

本研究では日本列島の冷温帯から亜熱帯に至る 44 地点から、日本のクワガタムシ科全属を網羅する 13 属 25 種の 105 個体（雌成虫 85 個体、幼虫 20 個体）を採取した。本研究におけるクワガタムシ類の採集地点を表 1-1 および図 1-2 に示す。また本研究で用いた各個体の情報および単離培養された酵母株を表 1-2 に示す。マダラクワガタ *Aesalus asiaticus*、マメクワガタ *Figulus punctatus* およびネブトクワガタ *Aegus subnitidus* は幼虫しか採取できなかつたため、幼虫の腸から共生酵母を単離培養した。また、ノコギリクワガタ *Prosopocoilus inclinatus*、コクワガタ *Dorcus rectus* およびアカアシクワガタ *Dorcus rubrofemoratus* は雌成虫の菌嚢および幼虫の腸から共生酵母を単離培養した。それ以外の種は全て雌成虫の菌嚢から共生酵母を単離培養した。採集した幼虫は、野外で生息していた枯死木と同じものを用いて実験室で飼育した。

### I-2-2. 雌成虫および幼虫からの共生酵母の単離培養

リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中で各雌成虫から菌嚢および幼虫の腸を先行研究と同様の手法にて解剖および摘出した（Tanahashi et al., 2017）。摘出した菌嚢および腸を 1.5 ml のプラスチックチューブ内でペレットペストルを用いて PBS 中ですり潰し、均質化した菌嚢溶液を作成した。均質化した菌嚢溶液を基に 5 倍希釈系列の菌嚢溶液（菌嚢の  $1/5^1$ 、 $1/5^2$ 、 $1/5^3$ 、 $1/5^4$ 、 $1/5^5$  に相当）を作成した。各種クワガタムシの個体サイズに応じ

て適当な濃度の菌囊溶液を選択し、20 $\mu$ l/ml リファンピシンを含む PDA 培地プレート上に塗布した (PDA : BIOKAR Diagnostics, Rue des 40 Mines, 60000 Allonne, France)。このプレートを 20°C で 4 日間培養し、酵母コロニーが出芽したプレートを基に、菌囊あたりのコロニー形成数 (CFU: colony-forming units) を算出した。また、CFU が 10 以下だった個体は酵母コロニーの検出がないものとして扱った。

### I-2-3. 共生酵母の遺伝子解析

各宿主個体についてランダムに 2~8 コロニーを選択し、その後の DNA 解析のために新しい PDA 培地プレートに移植した。各酵母コロニーの一部を摘出し、50 $\mu$ l の lyticase 溶液 (0.4 U/ $\mu$ L lyticase, 50 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA]) を用いて酵母の懸濁溶液を作成した。酵母の懸濁溶液を 37°C で 2 時間インキュベートした後、(Tanahashi et al., 2017) に従い酵母から全ゲノム DNA を抽出・精製し、TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) に溶解した。

この全ゲノム DNA を鋳型に核遺伝子 ITS 領域と IGS 領域の配列を PCR 法によって増幅した。各領域の PCR 条件は、95°C で 3 分間のプレヒート後、95°C で 45 秒間の熱変性、52°C で 45 秒間のアニーリング、そして 72°C で ITS 領域では 1 分 30 秒間、IGS 領域では 2 分 15 秒間の伸長反応を 1 サイクルとする反応を 35 サイクル行った後、72°C で 5 分間のファイナルエクステンションを行い、4°C で保存した。PCR 産物の精製には Illustra ExoStar (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いた。シーケンス反応においては ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) を用いて蛍光ラベリングを行い、これらの反応には Applied Biosystems 2720 サーマルサイクラー (Applied Biosystems, California) を用いた。これらの PCR 法およびシーケンス反応で使用したプライマー情報を表 1-4 に示す。この後、ABI 3130xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, California) を用いて塩基配列を解析した。シーケ

ンス後の塩基配列については、ソフトウェア CLC Genomics Workbench (Filgen, 名古屋) を用いてアセンブリを実施し、解析サンプル間の塩基配列のアライメントには MAFFT online service (Katoh & Standley, 2013) を用いた。

各宿主個体内の共生酵母の系統学的位置づけを明らかにするため、ITS 領域全体 (塩基の欠損および挿入を含む ITS1、5.8SrRNA および ITS2 をカバーする約 0.86–1.1kb) の配列を決定した。また IGS 領域は酵母株レベルの遺伝的な差異を検出するのに適しているものの、遺伝的変異が多いため本研究で用いたプライマーでは、*Scheffersomyces* 属の酵母の塩基配列のみが増幅できる。加えて、IGS 領域においてはデータベース登録配列の分類学的網羅率が不十分である。そこで、ITS 領域による系統解析の結果、*Scheffersomyces* 属に位置付けられる共生酵母を保持するクワガタムシを対象に、宿主雌成虫 1 個体当たり 2~8 コロニーの IGS 領域の塩基配列 (塩基の欠損および挿入を含む約 2.2–2.7kb) を決定した。得られた塩基配列は、*Scheffersomyces* 属内の共生酵母の詳細な遺伝的変異の検出、および系統関係の推定に使用した。

#### I-2-4. 宿主クワガタムシの遺伝子解析

宿主虫体を実体顕微鏡下で解剖し、胸部あるいは脚部筋肉の一部を摘出し、全ゲノム DNA を抽出・精製した。全ゲノム DNA 抽出および精製に関しては、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて製品プロトコルに準じて行った。この全ゲノム DNA を鋳型に mtDNA 16SrRNA 領域と nuDNA の 18SrRNA 領域、28SrRNA 領域および *wingless* 領域の部分配列を表 1-4 に示したプライマーを用いて PCR 法によって増幅した。16SrRNA 領域の PCR 条件は、94°C で 1 分 30 秒間のプレヒート後、94°C で 1 分間の熱変性、48°C で 1 分間のアニーリング、72°C で 1 分間の伸長を 1 サイクルとする反応を 40 サイクル行った後、72°C で 3 分間のファイナルエクステンションを行い、4°C で保存した。18SrRNA 領域の PCR 条件は、94°C で 5 分間のプレヒート後、94°C で

45 秒間の熱変性、60°Cで 45 秒間のアニーリング、72°Cで 1 分間の伸長を 1 サイクルとする反応を 32 サイクル行った後、72°Cで 7 分間のファイナルエクステンションを行い、4°Cで保存した。28SrRNA 領域は、Touch down PCR 法あるいは 2 step PCR 法により増幅した。Touch down PCR 法は 94°Cで 1 分 30 秒間のプレヒート後、94°Cで 30 秒間の熱変性、最初の 1 サイクル目 70°Cとし 1 サイクルごとに 1°Cずつ下げる 1 分間のアニーリング、72°Cで 1 分間の伸長を 1 サイクルとする反応を 5 サイクル行った後、94°Cで 30 秒間の熱変性、65°Cで 1 分間のアニーリング、72°Cで 1 分間の伸長を 1 サイクルとする反応を 35 サイクル行い、72°Cで 7 分間のファイナルエクステンションを行い、4°Cで保存した。2 step PCR 法は 94°Cで 1 分 30 秒間のプレヒート後、94°Cで 30 秒間の熱変性、68°Cで 30 秒間のアニーリングおよび伸長を 1 サイクルとする反応を 35 サイクル行った後、72°Cで 7 分間のファイナルエクステンションを行い、4°Cで保存した。*wingless* 領域の PCR 条件は 94°Cで 3 分間のプレヒート後、94°Cで 1 分間の熱変性、48°Cで 1 分間のアニーリング、72°Cで 1 分間の伸長を 1 サイクルとする反応を 30 サイクル行った後、72°Cで 7 分間のファイナルエクステンション行い、4°Cで保存した。その後の PCR 産物の精製、シーケンス反応および塩基配列の決定とアセンブリ、アライメントの手法は酵母の遺伝子解析と同様である。

#### I-2-5. 分子系統解析

DnaSP v.6.12.03 (Rozas et al., 2017) を用いて、共生酵母の ITS 領域と IGS 領域、および宿主クワガタムシの 16SrRNA 領域、18SrRNA 領域、28SrRNA 領域および *wingless* 領域のハプロタイプ行列を構築した。整理したハプロタイプ配列および先行研究で単離されたクワガタムシ類の共生酵母株の GenBank 登録配列を用いて、最尤法およびベイズ推定法に基づく系統樹を構築した。先行研究で単離された酵母株および使用した GenBank の登録配列の情報を表 1-3 に示す。また、宿主クワガタムシにおいては、4 領

域の部分配列の結合データセットを用いて、クワガタムシ科と同じくコガネムシ上科に属する別の科を外群指定し系統解析を実施した。各系統解析の塩基置換モデルの選択にはソフトウェア Kakusan4 (Tanabe, 2007) を用い、Schwarz's Bayesian Information (BIC; (Schwarz, 1978)) により最適モデルの選択を行った。また、宿主クワガタムシの系統解析の塩基置換モデルの選択は、領域ごと、および *wingless* 領域についてはコドン位置ごとに最適モデルの選択を実施した。最尤系統樹は、RAxML v. 8.2.9 (Stamatakis, 2014) を用いて構築した。各ノードにおける信頼度は、1,000 回のブートストラップ複製を用いて評価した。ベイズ系統樹は、MrBayes v.3.2.6 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) を用いて構築した。共生酵母の ITS 領域に基づくベイズ推定は 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った。共生酵母の IGS 領域に基づくベイズ推定は MCMC 解析を 1,500,000 世代繰り返し、100 回毎にサンプリングを行った。宿主クワガタムシのベイズ推定は MCMC 解析を 4,000,000 世代繰り返し、100 回毎にサンプリングを行った。Tracer v1.6 (Rambaut et al., 2018) を用いて各推定パラメーターの要約統計量を確認した後に、最初の 10%の世代を定常状態に達していない世代と仮定して解析から取り除いた。作成した系統樹は、FigTree ver. 1.4.4 (Rambaut, 2018) を用いて可視化および編集した。

#### I-2-6. 宿主クワガタムシの分岐年代推定および幼虫食性の祖先形質復元

宿主クワガタムシの分岐年代を推定するために、4 領域の部分配列の結合データセットを基に、BEAST 2 ver. 2.6.6 を用いて Relaxed Bayesian molecular clock 解析を実行した (Bouckaert et al., 2014) 。分岐年代の較正には、Kim & Farrell (2015) における汎世界的なクワガタムシ科の高次系統の分岐年代推定に従って、以下のクワガタムシ科の 3 つの化石記録を使用した。また、各化石記録の年代は Behrensmeier & Turner (2013) に従った。ジュラ紀中期からジュラ紀後期の境界の地層 (164.7–155.7Ma) から記載された

*Juraesalus atavus* (Nikolajev et al., 2011) をクワガタムシ科全体の共通祖先の較正に使用した (図 6、分岐 C<sub>1</sub>)。加えて、白亜紀前期の地層 (125.45–122.46Ma) から記載された *Prosinodendron krelli* (Bai et al., 2012) を、マダラクワガタ属を除くクワガタムシ類の共通祖先として年代較正を実施した (図 1-6、分岐 C<sub>2</sub>)。また、始新世の地層 (37.2–33.9Ma) から記載された *Dorcus primigenius* (Deichmüller, 1881) を *Dorcus* 属全体の共通祖先として年代較正した (図 1-6、分岐 C<sub>3</sub>)。各分岐の較正は、化石記録の年代を上限および下限とする正規分布を仮定した。Kakusan4 (Tanabe, 2007) を用いて、適合モデルの選択を領域ごと、および *wingless* 領域についてはコドン位置ごとに行った。Bayesian MCMC 解析を 200,000,000 世代繰り返す、2,000 回毎にサンプリングを実施した。以上の Bayesian MCMC 解析を独立に 3 回試行した。Tracer v1.6 (Rambaut et al., 2018) を用いて各推定パラメーターの要約統計量、および独立に試行した 3 回の Bayesian MCMC 解析が同じ局所最適解に収束しているかどうかを確認した。最初の 10%の世代を定常状態に達していない世代と仮定して解析から取り除いた。作成した系統樹は、FigTree ver. 1.4.4 (Rambaut, 2018) を用いて可視化および編集した。

クワガタムシ科の幼虫の食性の祖先形質を RASP version 4.2 を用いて Bayesian binary MCMC 法 (BBM) により推定した (Yu et al., 2020)。解析は BEAST 2 による分岐年代推定出力された多数決合意樹を基に実行した。各クワガタムシの幼虫の食性は表 2 に示す。独立した 2 つの MCMC 解析を 500,000 世代繰り返す、1,000 回毎にサンプリングを実施した後、最初の 10%の世代を定常状態に達していない世代と仮定して解析から取り除いた。

### I-3. 結果

#### I-3-1. 雌成虫および幼虫からの共生酵母の単離培養

採取したクワガタムシ各種の雌成虫の菌嚢および幼虫の腸から単離された共生酵母のコロニー形成数を表 1-5 に示す。対象としたクワガタムシ科の内、12 属 24 種の計 89 個体（雌成虫 76 個体、幼虫 13 個体）において共生酵母のコロニーが認められた。各種の雌成虫および幼虫の腸 1 個体あたりのコロニー形成数は、最小がアマミシカクワガタ *Rhaetulus recticornis* の  $5.0 \times 10^4$  で、最大はアカアシクワガタの  $4.3 \times 10^5$  であった。一方で、ミクラミヤマクワガタ *Lucanus gamunus* の雌成虫の菌嚢からは共生酵母のコロニーが検出されなかった。また、ネブトクワガタの幼虫の腸においても共生酵母のコロニーは確認されなかった。さらに、ノコギリクワガタにおいては雌成虫の菌嚢からは共生酵母のコロニーが検出されなかったものの、幼虫の腸からは多くの共生酵母コロニーが認められた。

#### I-3-2. 核遺伝子 ITS 領域に基づく共生酵母の系統学的位置付け

核遺伝子 ITS 領域に基づく分子系統解析の結果、日本のクワガタムシ科の共生酵母において大きく 5 つのクレードが認められた（図 1-3）。白色腐朽材食性を示す 6 属 15 種（オオクワガタ属 8 種、ノコギリクワガタ属 1 種、シカクワガタ属 1 種、ミヤマクワガタ属 1 種、オニクワガタ属 2 種、チビクワガタ属 1 種）、および白色腐朽材食性あるいは軟腐朽材食性を示すルリクワガタ属 3 種の共生酵母は、キシロース発酵性酵母である *Scheffersomyces stipitis* と単系統を構成した。このキシロース発酵性酵母のクレードには先行研究で調べられたヨーロッパのクワガタムシ類 2 属（*Dorcus parallelipedus*、*Lucanus cervus*）および韓国のルリクワガタ属（*Platycerus hongwonpyoi*）から単離された共生酵母も含まれた。さらに、このキシロース発酵性酵母のクレード内において、チビクワガタ属 2 種の共生酵母から構成されるサブクレードが認められた。一方で、褐色腐朽材食性を示すマダラクワガタおよびツヤハダクワガタ *Ceruchus ligunarius* から単離された共生酵母は、セロビオース発酵性酵母である *Scheffersomyces coipomoensis* と単系

統を構成した。このセロビオース発酵性酵母のクレードには、アフリカのオニシカクワガタから単離された共生酵母も含まれた。

また、マルバネクワガタ属、マグソクワガタ属およびツノヒョウタンクワガタ属における共生酵母は、上述した2系統とは大きく異なる系統学的な位置づけを示した。アマミマルバネクワガタ *Neolucanus protogenetivus* の雌成虫の菌嚢から単離された共生酵母は、キシロース発酵性酵母である *Candida maltosa* (Lin et al., 2010) に近縁な共生酵母であった。マグソクワガタ *Nicagus japonicus* の雌成虫の菌嚢から単離された共生酵母は、ヨーロッパに生息するイッカクワガタ *Sinodendron cylindricum* の雌成虫の菌嚢から単離された主要な共生酵母と単系統を構成した。しかしながら、マグソクワガタの共生酵母は既知の DNA 配列が取得されているサッカロミセス亜門の酵母では近縁な種が見当たらないことから、新規の酵母の系統であることが示唆される。ルイスツノヒョウタンクワガタ *Nigidius lewisi* の雌成虫の菌嚢から単離された共生酵母は、*Yarrowia* 属の共生酵母と単系統を構成した。しかしながら、既知の *Yarrowia* 属酵母とは遺伝的に大きく分化しており、マグソクワガタの共生酵母と同様に新規の共生酵母の系統であると思われる。一方で、ルイスツノヒョウタンクワガタの共生酵母はアフリカのオニシカクワガタの雌成虫の菌嚢のみから単離された共生酵母と単系統を形成した。

### I-3-3. 核遺伝子 IGS 領域に基づく共生酵母の系統学的位置付け

核遺伝子 IGS 領域に基づく *Scheffersomyces* 属共生酵母の分子系統解析の結果、ITS 領域による系統解析の結果と同様にキシロース発酵性酵母とセロビオース発酵性酵母の大きく2系統に分化した (図 1-4)。また日本のクワガタムシ科の共生酵母は宿主クワガタムシの種あるいは属に特異的な傾向を示す 14 のクレードに分化した。

キシロース発酵性酵母の系統内において、クレード A からクレード E は一つの大きな系統を構成し、冷温帯林を生息環境とするクワガタムシ類の共生酵母の単系統性が支

持された。クレード A は、主に日本のルリクワガタ属 10 種と韓国のルリクワガタ属 *Platycerus hongwonpyoi* から単離された共生酵母から構成される。一方で、クレード A には対馬のキンオニクワガタ *Prismognathus dauricus* 1 個体 (GU34) と韓国のキンオニクワガタ 1 個体から単離された全ての共生酵母のコロニー、および対馬のキンオニクワガタ 1 個体 (GU33) から得られた共生酵母の一部のコロニーも含まれた。クレード B は、日本のオニクワガタ属のみの共生酵母から構成される。クレード C は、主にアカアシクワガタの共生酵母から構成されるものの、オニクワガタ *Prismognathus angularis* 2 個体 (GU45、GU46) から得られた共生酵母の一部のコロニーも含まれた。クレード D はスジクワガタ *Dorcus striatipennis* の共生酵母のみから構成され、クレード E はヒメオオクワガタ *Dorcus montivagus* の共生酵母のみから構成された。また、クレード C-E の共生酵母は、タマムシ類 *Chalcophora mariana massiliensis* (Coleoptera: Buprestidae) から初めて単離された酵母 *Scheffersomyces segobiensis* (Santa Maria & Garcia Aser, 1977) と単系統になることが明らかになった。

クレード F は主にミヤマクワガタ *Lucanus maculifemoratus* の共生酵母から構成されるものの、ノコギリクワガタの幼虫 3 個体 (GU136、GU138、GU139) から単離された共生酵母のコロニーの一部も含まれた。クレード G は主にコクワガタの共生酵母から構成されるが、ノコギリクワガタ 1 個体 (GU135)、チビクワガタ *Figulus binodulus* 1 個体 (GU23) およびマメクワガタ 2 個体 (GU93、GU94) から得られた一部の共生酵母コロニーも含まれた。またクレード G には、スジクワガタの 1 個体 (GU144) から得られた全ての共生酵母、および別の個体 (GU77) から得られた共生酵母コロニーの一部も含まれた。クレード H はアマミコクワガタ *Dorcus amaminus* の共生酵母のみから構成される。クレード I は主にオオクワガタ *Dorcus hopei* の共生酵母から構成されるが、ノコギリクワガタ 1 個体 (GU139) から得られた共生酵母コロニーの一部も含まれた。クレード J は主にヒラタクワガタ *Dorcus titanus* とスジブトヒラタクワガタ *Dorcus*

*metacostatus* の共生酵母から構成されるものの、ノコギリクワガタ 3 個体から得られた一部の共生酵母コロニーとアマミシカクワガタの共生酵母も含まれた。クレード K はチビクワガタ属 2 種の共生酵母のみから構成される系統であった。

セロビオース発酵性酵母の系統内において、クレード L はツヤハダクワガタの共生酵母のみから構成された。一方で、クレード M はマダラクワガタの共生酵母のみで構成される、また、クレード N はツヤハダクワガタ 2 個体 (GU26、GU107) から得られた共生酵母の全て、および別のツヤハダクワガタ 2 個体 (GU15、GU106) およびマダラクワガタ 1 個体 (GU109) から単離された共生酵母コロニーの一部から構成された。

#### I-3-4. 宿主クワガタムシの系統関係

宿主クワガタムシの mtDNA 16SrRNA 領域および nuDNA 18SrRNA 領域、28SrRNA 領域、*wingless* 領域の 4 領域の部分配列の結合データセットに基づく分子系統解析の結果 (図 1-5)、本研究で使用した日本のクワガタムシ 13 属は単系統性を示し、コガネムシ上科におけるクワガタムシ科の単系統性が支持された。日本のクワガタムシ科においては、マダラクワガタ属、ツヤハダクワガタ属およびマグソクワガタ属の 3 属から構成されるクレード II と、それ以外の 10 属 (オオクワガタ属、ノコギリクワガタ属、シカクワガタ属、ミヤマクワガタ属、オニクワガタ属、ネブトクワガタ属、マルバネクワガタ属、ツノヒョウタンクワガタ属、チビクワガタ属、ルリクワガタ属) から構成されるクレード I に大きく分化した。各クレード内におけるクワガタムシ各種および各属の単系統性は強く支持された。クレード II においてツヤハダクワガタ属とマダラクワガタ属は単系統を示したが、最尤法のブートストラップ値およびベイズ法の事後確率の値が低いため、クレード II 内における 3 属の系統関係は不明であった。クレード I においては、ルリクワガタ属から構成される系統とそれ以外の 9 属から構成される系統に分化し、ルリクワガタ属はクレード I の中でも最初期に分岐した祖先的な分類群であること

が示唆された。次にツノヒョウタンクワガタ属とチビクワガタ属からなる系統の分岐が支持された。また、ノコギリクワガタ属とシカクワガタ属の2属からなる系統、およびミヤマクワガタ属とオニクワガタ属の2属からなる系統のそれぞれの単系統性が支持された。オオクワガタ属内においては、コクワガタ、アマミコクワガタ、オオクワガタの3種から構成される系統の単系統性が支持された。また、ヒラタクワガタとスジブトヒラタクワガタは分類学的研究においては *Serrognathus* 属としてまとめて扱われることが多く (Hao & Chang-Chin, 2013)、分子系統解析からもこの2種が単系統になることが明らかになった。

#### I-3-5. 宿主クワガタムシの分岐年代推定および幼虫食性の祖先形質復元

宿主クワガタムシの化石記録に基づく分岐年代推定の結果、クワガタムシ科全体の共通祖先はジュラ紀中期から後期の約 160 Ma (95%HPD: 158.1 – 162.0 Ma) に出現したことが推定された (図 1-6)。次にマダラクワガタ属を除く 12 の属の共通祖先は白亜紀前期の約 124 Ma (95%HPD: 122.0 – 125.9 Ma) に出現したことが推定された。また、クワガタムシ科の分子系統解析 (図 1-5) において支持されたクレード I (オオクワガタ属、ノコギリクワガタ属、シカクワガタ属、ミヤマクワガタ属、オニクワガタ属、ネプトクワガタ属、マルバネクワガタ属、ツノヒョウタンクワガタ属、チビクワガタ属、ルリクワガタ属) の共通祖先は、約 98.4 Ma (95%HPD: 74.4 – 121.4 Ma) に出現したことが推定された。本研究で使用した現生のクワガタムシ類 13 属は、古代三紀の始新世から漸新世ごろには出現していたことが推定された。BBM 解析によるクワガタムシ科における幼虫食性の祖先形質を復元したところ、クワガタムシ科全体の共通祖先は褐色腐朽材食性であったことが推定された。その後、白亜紀前期から白亜紀後期ごろの間に白色腐朽材食性および軟腐朽材食性を示す共通祖先の出現が推定された。また、分子系統解析において支持されたクレード I (図 1-5) において、ルリクワガタ属を除く 9 属から構成

される系統の共通祖先は、白色腐朽材食性であったことが推定された。腐植質を利用する分類群（ネプトクワガタ属、マルバネクワガタ属、ミクラミヤマクワガタ）は、白色腐朽材食性を示す系統の一部から少なくとも1回は独立に出現したと思われる。

#### I-4. 考察

##### I-4-1. クワガタムシ科の食性進化と共生酵母の代謝機能の関係

共生酵母の核遺伝子 ITS 領域の分子系統解析の結果、白色腐朽材食性を示すクワガタムシ類の大部分の属がキシロース発酵性酵母である *Scheffersomyces stipitis* と近縁な共生酵母を保持していた（図 1-3; Jeffries & Kurtzman, 1994; Jeffries et al., 2007）。キシロースはヘミセルロースの主成分であり、白色腐朽材中に多く残存する糖類である（Araya, 2002）。また、枯死木を摂食する多くの昆虫類の腸内などからもこのようなキシロース発酵性酵母が認められる（Suh et al., 2003）。このことから、キシロース発酵性の共生酵母は白色腐朽材食性のクワガタムシ類の幼虫の腸内において、キシロース代謝の補助を担うことが推測される（Tanahashi et al., 2010）。一方で、褐色腐朽材食性を示すマダラクワガタ属とツヤハダクワガタ属はセロビオース発酵性酵母である *Scheffersomyces coipomoensis* と近縁な共生酵母を保持していた（図 1-3; Urbina & Blackwell, 2012）。また、アフリカのクワガタムシ類であるオニシカクワガタも褐色腐朽材を摂食し（Araya, 2009）、これらのセロビオース発酵性の共生酵母を保持している（Roets & Oberlander, 2020）。セロビオースはセルロースの主成分であり、褐色腐朽材中に多く残存する糖類である（Takahashi, 1986）。このことから、褐色腐朽材食性のクワガタムシ類の幼虫の腸内では、これらのセロビオース発酵性の共生酵母がセロビオースの代謝を補助していると推測される。また、褐色腐朽材中には多量のリグニンが残存している。しかし、褐色腐朽材食性のツヤハダクワガタ幼虫において、摂食前の腐朽材中と摂食後の糞中のリグ

ニン量に変化がみられなかったことから、ツヤハダクワガタ幼虫はリグニンを消化できないことが示唆されている (Araya, 2002)。

宿主クワガタムシ類の mtDNA 16SrRNA 領域および nuDNA 18SrRNA 領域、28SrRNA 領域、*wingless* 領域の 4 領域の部分配列の結合データセットに基づく分子系統解析の結果から、日本のクワガタムシはマダラクワガタ属、ツヤハダクワガタ属およびマグソクワガタ属の 3 属から構成されるクレードと、それ以外の 10 属から構成されるクレードに大きく分化することが明らかになった (図 1-5)。世界のクワガタムシ科の主要な分類群を網羅した分子系統解析の結果および化石記録からマダラクワガタ属、ツヤハダクワガタ属およびマグソクワガタ属はクワガタムシ科の中でも祖先的な分類群であることが示唆されている (Kim & Farrell, 2015)。またクワガタムシ科の分岐年代推定および幼虫食性の祖先形質復元の結果から、クワガタムシ科の出現はジュラ紀中期ごろであり、クワガタムシ科の共通祖先は褐色腐朽材食性であったことが示唆された。また白亜紀後期ごろから白色腐朽材食性の新しいグループが出現したことが推定された (図 1-6)。このことはクワガタムシ科の系統進化の過程において、褐色腐朽材から白色腐朽材への生態学的ニッチの多様化が生じたことを示唆する。

褐色腐朽は針葉樹に多く発生する一方で、白色腐朽は広葉樹に多く発生する (Stokland et al., 2012a)。木本植物のうち、広葉樹が属する被子植物の出現は、針葉樹が属する裸子植物の出現よりもはるかに新しく白亜紀に入ってからであり、その後急速な放散を遂げ、現在では最も多様な植物のグループになったと考えられる (Stokland et al., 2012b)。また、現生の主要な広葉樹の目の出現は約 100 Ma であり (Magallón & Castillo, 2009)、これは本研究で推定されたクワガタムシ科における白色腐朽材食性を獲得した時期と合致する (図 1-6)。さらに、このような広葉樹の放散にともない白色腐朽を発生させる白色腐朽菌も約 100 Ma から急速に多様化し (Krah et al., 2018)、クワガタムシ類の餌となる白色腐朽材の資源量も増加したと考えられる。実際に野外では白色腐朽の方が褐色

腐朽に比べて資源量が多い (Araya, 1993)。加えて、白色腐朽材は褐色腐朽材よりも栄養面でもクワガタムシにとって優れている (Araya, 2006)。さらにクワガタムシ科において、白色腐朽食性の幼虫は褐色腐朽材も利用することができる一方で、褐色腐朽食性の幼虫は白色腐朽材を利用することができない (Araya, 2002)。これに対して Araya (2002) は、白色腐朽材に多く残存するキシロースが褐色腐朽材食性の成長阻害物質である可能性を示唆しており、キシロース代謝機能の獲得によりクワガタムシ科の白色腐朽材の利用を可能にしたことを推測している。本研究の結果は、クワガタムシ科においてキシロース発酵性酵母の獲得は幼虫の白色腐朽材の代謝を可能とし、生態学的ニッチの多様化を促進したことが支持するものである。また、*Scheffersomyces stipitis* と近縁なキシロース発酵性酵母はセロビオースを発酵能が認められない (Suh et al., 2003)。一方で、*Scheffersomyces coipomoensis* と近縁なセロビオース発酵性酵母はキシロースを発酵することができない (Suh et al., 2013)。白色腐朽菌はセルロースを分解後、すぐに吸収するため白色腐朽材中にはセロビオースが残存しないものの、褐色腐朽菌は吸収を上回る木材成分の過剰な分解が行われるため、セロビオースを主としてキシロースなどの糖類も残存する (Takahashi, 1986)。すなわち、キシロース発酵性の酵母と共生する進化的に新しいグループの白色腐朽食性のクワガタムシは褐色腐朽材も利用可能であるのに対し、セロビオース発酵性の酵母と共生する祖先的な褐色腐朽食性のクワガタムシは白色腐朽材を利用できないという生理学的な生態を支持する結果が得られた。一方で、*S. stipites* はキシロースのみならずセロビオース培地あるいはヘミセルロースの一種であるキシラン培地でも生育が可能である (Kubota, unpublished)。このことから *S. stipites* に近縁なキシロース発酵性酵母と共生するクワガタムシは白色腐朽材だけでなく、褐色腐朽材も代謝が可能であることに加えて、分解があまり進んでいない枯死木も利用できる可能性が示唆される。現生のクワガタムシ科の中でも大多数の種が含まれ、大型かつ性的二型が発達する種の多いオオクワガタ亜科 Lucaninae は (Kim & Farrell, 2015)、主と

して白色腐朽材を利用する種群である（図 1-5、クレード I）（Araya, 2006）。このことから、クワガタムシ科におけるキシロース発酵性の共生酵母の獲得は、幼虫の利用可能な生態学的ニッチの拡大をもたらし、急速な放散を促進した原動力であったと考えられる。

#### I-4-2. 特殊な環境の枯死木を利用するクワガタムシの共生酵母

腐植質を摂食する分類群は、白色腐朽材食性のクワガタムシの系統の一部から独立に出現したことが明らかになった（図 1-6）。また、腐植質を幼虫が摂食するネブトクワガタおよびミクラミヤマクワガタからは、共生酵母が確認されなかった（表 1-5）。ネブトクワガタ属やマルバネクワガタ属の幼虫が摂食する枯死木由来の腐植質は、シロアリなどの他の木材利用昆虫による関与を経ているため代謝が困難な木材成分がほとんど分解されているだけでなく、窒素含有量が高く栄養にも富む（Araya, 2002）。このことから、腐植質を利用するネブトクワガタ属やミクラミヤマクワガタにおいては、白色腐朽材から腐植質へと進出した過程において独立に共生酵母を喪失したことが示唆される。一方で、アマミマルバネクワガタの菌囊からは *Candida maltosa* に近縁な共生酵母が検出された（図 1-3）。興味深いことに *Lodderomyces* 属の酵母において、*Candida maltosa* は数少ないキシロース発酵性の酵母である（Lin et al., 2010）。枯死木を摂食するクロツヤムシ科（Passalidae, Coleoptera）の腸内からも *Candida maltosa* が得られていることから、この共生酵母が木材成分の代謝の補助を担うことが示唆されている（Suh et al., 2008; Urbina et al., 2013）。これらの腐植質食性のクワガタムシ類の幼虫は著しく肥大した腹部を持ち、代謝のシステムが褐色腐朽食性や白色腐朽食性のクワガタムシ類とは大きく異なることが予想される（Araya, 2006）。また、マルバネクワガタ類の幼虫の腸内微生物叢は、白色腐朽食性のコクワガタのそれと比較して多様であることに加えて、コクワガタでは認められない独自のバクテリアを保持している（荒谷, 2020）。これらの結果から、腐植質食性のクワガタムシ類は白色腐朽材から腐植質へと進出した過程におい

て独立に共生酵母を喪失したことに加えて、新規の共生酵母や共生バクテリアを獲得し、腐植質を利用するための独自の代謝システムを保持していることが示唆される。

マグソクワガタから単離された共生酵母は、既知のサッカロミケス亜門の酵母とは近縁な種がおらず、未記載の酵母の1種であることが示唆された(図1-3)。一方で、イッカクワガタの菌囊から単離された共生酵母と単系統を構成した(Tanahashi & Hawes, 2016)。イッカクワガタの共生酵母はキシロースやセロビオースに対する発酵性を示すことから、これらの共生酵母は各クワガタムシの幼虫の枯死木の代謝の補助を担う可能性が支持される(Tanahashi & Hawes, 2016)。興味深いことに、クワガタムシ科においてマグソクワガタ属とイッカクワガタ属はともに祖先的な系統に位置づけられており、この2属は支持率が低いものの単系統を示す(Kim & Farrell, 2015)。本研究においてマグソクワガタ属は、白亜紀に白色腐朽および軟腐朽食性のクワガタムシが出現した最初期に分岐したグループと推定された(図1-6)。このことから、マグソクワガタ属とイッカクワガタ属は広葉樹が出現した初期のクワガタムシ類が獲得した共生酵母を保持していることが示唆される。また、ルイスツノヒョウタンクワガタの共生酵母は、*Yarrowia* 属の酵母と単系統を構成するものの遺伝的に大きく分化しており、マグソクワガタの共生酵母と同様未記載の酵母1種と思われる(図1-3)。興味深いことに、この共生酵母は南アフリカに分布するオニシカクワガタの菌囊から単離された酵母と非常に近縁であった(Roets & Oberlander, 2020)。褐色腐朽材を利用するオニシカクワガタの幼虫はセロビオース発酵性の酵母も保持している。Roets & Oberlander (2020) は、同一種内において共生酵母の多型が認められる生態学的意義の一つとして、機能の異なる複数種類の酵母と共生することで、栄養状態などの条件が異なる多様な枯死木の利用可能性の向上を挙げている。ルイスツノヒョウタンクワガタは亜熱帯から温帯の沿岸部の森林に生息し、黒潮による南方から北方への海流分散が示唆されている(Fujita, 2010)。また本種の利用する枯死木は含水率が高いことから(Okajima & Araya, 2012)、塩分濃度が高

い枯死木を利用できたために海流による分散が可能であったと予想される。また、マグソクワガタは河川沿いに生息し、幼虫は砂に埋没した含水率の高い軟腐朽の流木を利用する (Okajima & Araya, 2012)。いずれの種も *Scheffersomyces* 属の酵母と共生する他のクワガタムシ類とは大きく異なる環境に生息することから、特殊な幼虫食性の進化と新規の共生酵母の獲得の進化的な関連性が考えられる。今後はこれらのクワガタムシにおける種内の共生酵母の多型および共生酵母の耐水性や塩分耐性の機能を明らかにし、宿主の生態学的な進化との共生酵母の関係性について解明する必要がある。

#### I-4-3. 宿主クワガタムシと共生酵母の系統関係の不一致

IGS 領域に基づく *Scheffersomyces* 属の共生酵母の分子系統解析の結果から、クワガタムシ科の共生酵母は宿主クワガタムシの種あるいは属などの分類群に特異的な系統に分化する傾向が認められた (図 1-6)。ルリクワガタ属における共生酵母の系統関係からも宿主と共生酵母の共種分化が支持されている (Kubota et al., 2020; Ueki et al., 2021; Zhu et al., 2022)。このような宿主クワガタムシ類の種と共生酵母の系統の間の一対一の関係は、甲虫目の多くの分類群に加えて半翅目、膜翅目および双翅目とそれらの共生微生物の間で認められる絶対共生と同様に垂直伝播を支持する結果である (Bright & Bulgheresi, 2010; Koga et al., 2012; Luan et al., 2018; Salem & Kaltenpoth, 2022)。加えて、本研究においてコクワガタとアカアシクワガタにおいて、雌成虫の菌嚢から単離された共生酵母と幼虫から腸から単離された共生酵母の系統が同じであったことから、クワガタムシ科では共生酵母が基本的には垂直伝播で受け渡されることが考えられる。

垂直伝播により共生微生物を伝達する甲虫において、両者の系統関係には共種分化が認められる (ネクイハムシ亜科: Reis et al., 2020; カメノコハムシ亜科: Salem et al., 2020)。しかしながら、IGS 領域に基づく共生酵母の系統関係は、宿主クワガタムシ科の系統分化とは一致しなかった (図 1-4)。クワガタムシ科の系統解析から単系統性が支持された

オオクワガタ属の8種の共生酵母は、単系統が支持されなかった。一方で、オオクワガタ属の中でも冷温帯林に生息するアカアシクワガタ、スジクワガタおよびヒメオオクワガタの共生酵母の系統（クレード C-E）は、同じく冷温帯林に生息するルリクワガタ属の共生酵母（クレード A）およびオニクワガタ属の共生酵母（クレード B）と単系統になることが明らかになった。また、共生酵母の各クレードの詳細な構成に着目すると、クレード A は主にルリクワガタ属の共生酵母から構成されるものの、キンオニクワガタの共生酵母の一部も含まれていた（Zhu et al., 2020a; Ueki et al., 2021）。クワガタムシ類における共生酵母の置換は、共生酵母の水平伝播により生じると考えられる（Ueki et al., 2021）。Ueki et al. (2021) は、オニクワガタ属とルリクワガタ属の共生酵母の系統関係および宿主クワガタムシの過去から現在の潜在的な生息適地の推定に基づき、歴史的な分布域および選好する生息環境が重複する宿主間においては、別属のクワガタムシの種間でも共生酵母の水平伝播が生じた可能性を示唆している。本研究において、主にアカアシクワガタの共生酵母からなるクレード C には、オニクワガタの共生酵母の一部も含まれていた。実際に野外においてはアカアシクワガタとオニクワガタが冷温帯林内の同一の枯死木に共棲みすることが明らかになっている（Araya, 1993）。加えて、クワガタムシが穿孔する枯死木において、幼虫の糞で満たされたトンネル状の食痕からは（図 1-1）、その幼虫の共生酵母が優占して検出される（Roets & Oberlander, 2020）。すなわち、同じ枯死木を利用するアカアシクワガタとオニクワガタでは、アカアシクワガタの幼虫の糞をオニクワガタが摂食した際に宿主間の共生酵母の水平伝播が生じ得ることが推測される。同様に、主にコクワガタの共生酵母から構成されるクレード G からは、チビクワガタ属2種の共生酵母の一部も含まれた（図 1-6）。我々の観察において、暖温帯林の白色腐朽材からはコクワガタとチビクワガタ属がしばしば同じ枯死木内から観察された。このことから、同じ枯死木を利用するクワガタムシ種間では、共生酵母の水平伝播が生じる得ることも考えられる。環境中から水平伝播による共生微生物の獲

得は、甲虫目の複数の分類群においても知られており機能的に有益な微生物のみが垂直伝播されていることが示唆されている（ゾウムシ類: Berasategui et al., 2016; ハムシ類: Shukla & Beran, 2020）。このように水平伝播による共生微生物の獲得は、餌資源に対する代謝能の革新の源として認識されつつある（Itoh et al., 2018）。しかしながら、共生酵母の水平伝播は同じ枯死木に生息するクワガタムシ種間において必ずしも認められるわけではないことから、クワガタムシ科の中でも共生酵母の伝達経路は分類群ごとに異なると考えられる（Ueki et al., 2021）。

興味深いことに、白色腐朽材を利用するノコギリクワガタの雌成虫は菌嚢内に共生酵母を保持しないにも関わらず、その幼虫の腸からキシロース発酵性の共生酵母が検出された（表 1-5; 図 1-3）。加えて、多くのクワガタムシは各分類群に特異的な共生酵母の系統が認められた一方で、ノコギリクワガタに特異的な共生酵母の系統は認められなかった（図 1-6）。ノコギリクワガタは、ミヤマクワガタ、コクワガタ、オオクワガタおよびヒラタクワガタのそれぞれの種に特異的な系統の共生酵母を保持していた。ノコギリクワガタの幼虫を採取した暖温帯林に位置する地点（Site 23）には、筆者らの観察から同所的にコクワガタ、スジクワガタ、オオクワガタ、ヒラタクワガタ、ミヤマクワガタの生息が認められている。ノコギリクワガタ、ヒラタクワガタおよびミヤマクワガタの3種の幼虫は、白色腐朽の立ち枯れの根部を頻繁に利用している（Okajima & Araya, 2012）。また、筆者らは野外において、コクワガタとノコギリクワガタを同一の枯死木から確認している。このことから、ノコギリクワガタの幼虫は雌成虫からの垂直伝播ではなく、同所的に生息する他のクワガタムシ由来の共生酵母を水平伝播により世代ごとに獲得することが示唆される。同様にホソヘリカメムシ *Riptortus clavatus* においても、環境中から共生微生物を毎世代獲得していることが知られている（Kikuchi et al., 2007）。

本研究におけるクワガタムシ類と共生酵母の系統関係の不一致と同様に、半翅目の共生微生物は複数の独立した起源が認められ（カメムシ類: Duron & Noël, 2016; セミ類:

Matsuura et al., 2018)、その多くが水平伝播による共生微生物の置換に由来すると推定される (Kikuchi et al., 2010)。特に最適な共生微生物が大きく変動する環境下において、水平伝播による共生微生物の獲得が選択されることが示唆されている (Salem et al., 2015)。

#### I-4-4. 宿主クワガタムシの分布する気候帯や植生帯と共生酵母の系統の関係

クワガタムシ科の共生酵母は系統ごとに異なる高温耐性を示し、宿主の生息する標高や微生物環境と強く関係していることが示唆されている (Zhu et al., 2022)。冷温帯林に生息するクワガタムシの共生酵母 (クレード A-E) と比較して、暖温帯林や亜熱帯林に生息するクワガタムシの共生酵母 (クレード G、I-K) は高温環境に対する優れた耐性を示す (Zhu et al., 2022)。このような共生酵母の各系統の温度耐性は、宿主クワガタムシの生息する植生帯とよく対応していた。

特に冷温帯から亜熱帯に至る多様な環境に生息するオオクワガタ属においては、宿主の系統分化と共生酵母の系統関係に大きな不一致が認められた (図 1-4)。このことは、オオクワガタ属内において共生酵母の置換が生じたことを示唆する。このような共生酵母の置換は、宿主の生息環境にも影響を及ぼし、今日のオオクワガタ属における多様な生息環境に関係したと思われる。あるいは宿主の生息環境に対応して共生酵母の高温耐性が変化することで水平伝播が生じた可能性も考えられる (Zhu et al., 2022)。加えて、幅広い植生帯に生息するスジクワガタからは、冷温帯林のクワガタムシの共生酵母の系統に属するスジクワガタ特異的なクレード D と主にコクワガタの共生酵母からなるクレード G が検出され、種内における共生酵母の多型が認められた (図 1-4)。この結果から、スジクワガタが元来共生関係にあった酵母はクレード D であり、本種の本来の生息環境は冷温帯林であることが予想される。そして、より高温耐性の高い共生酵母をコクワガタから水平伝播により獲得したことで暖温帯林へと進出できた、あるいは進出

の途上であることが考えられる。

#### I-4-5. 共生酵母との共進化にともなうクワガタムシ科の生態学的ニッチの多様化

これまでの木材利用昆虫における共生酵母の研究は、昆虫の腸や菌嚢などの器官において検出された酵母が宿主の食生をはじめとした生態学的特性と関連するであろうという仮定の下で、検出された酵母の記載に留まっていた (e.g., Suh et al., 2013; Urbina et al., 2013)。一方で、木材利用昆虫の系統進化と生態学的ニッチの放散に対して、共生酵母との共進化の関係性を議論した研究は乏しい。本研究によりクワガタムシ科の共生酵母の系統分化は、まず宿主の幼虫の食性に対応し、次に宿主の生息する環境、最後に宿主の系統分化に対応することが明らかになった。さらに新規共生酵母の獲得は宿主の新規ニッチへの拡大を促進したことが示唆された。また、より栄養価の高い餌資源である腐植質への進出にともないクワガタムシ科において独立に共生酵母を喪失あるいは異なる共生酵母を獲得したことが解明された。一方で、これらの共生酵母が、宿主クワガタムシ類の栄養生理や幼虫の成長などの生態学的な面から実際にどのような役割を担うのかは不明である (Kubota et al., 2020)。また、クワガタムシの菌嚢からは共生酵母以外にも多様な細菌が確認されており (Miyashita et al., 2015)、共生酵母との相互作用など不明な点が多い。今後、共生酵母の除去および移植実験から共生酵母の生態学的な機能について迫るとともに、メタゲノム解析による菌嚢内における共生微生物群集の構造および相互作用の解明が期待される。本研究の結果は、クワガタムシ科において初めて共生酵母との共進化が宿主の生態学的ニッチの多様化に関連してきたことを示唆し、植食性甲虫の適応放散の解明、特に木材食性甲虫の多様化プロセスの理解に貢献する成果である。

表1-1. 試料のサンプリング地点.

Site	Locality	Altitude (m)	Latitude	Longitude
1	Toishiyama, Sapporo Minami-ku, Hokkaido	567	43.00	141.27
2	Nakanokawa, Suttsugun Kuromatsunaicho, Hokkaido	17	42.70	140.27
3	Kuromatsunai, Suttsugun Kuromatsunaicho, Hokkaido	24	42.67	140.31
4	Shiroikawa, Suttsugun Kuromatsunaicho, Hokkaido	55	42.67	140.38
5	Garou, Shimamakigun Shimamakimura, Hokkaido	528	42.60	139.98
6	Sakaeno, Nishigun Otohecho, Hokkaido	667	42.05	140.27
7	Hiyoriyamacho, Hakodate, Hokkaido	403	41.83	141.00
8	Chokaimachimomoyake, Yurihonjo, Akita	837	39.10	140.11
9	Iwakura, Nishiokitamagun Iidemachi, Yamagata	805	37.82	139.80
10	Hokushin, Shimominochigun Sakaemura, Nagano	564	37.00	138.57
11	Ichiyama, Iiyama, Nagano	1126	36.99	138.39
12	Myoga, Higashishirakawagun Yamatsurimachi, Fukushima	857	36.94	140.29
13	Akinari, Nakaonumagun Tsunanmachi, Niigata	471	36.93	138.65
14	Toyosato, Shimotakaigun Nozawaonsenmura, Nagano	1459	36.90	138.49
15	Dorobu, Nikko, Tochigi	839	36.88	139.59
16	Arigasaki, Matsumoto, Nagano	751	36.26	137.95
17	Okuhidaonsengonakao, Takayama, Gifu	1351	36.25	137.58
18	Satoyamabe, Matsumoto, Nagano	752	36.25	138.01
19	Azumi (kamikôchi), Matsumoto, Nagano	1601	36.21	137.60
20	Minamihara, Kamiinagun Minamiminowamura, Nagano	740	35.86	137.94
21	Ina, Ina, Nagano	1490	35.82	137.85
22	Kutsukioisugi, Takashima, Shiga	583	35.35	135.77
23	Koshimizushakegoyama, Nishinomiya, Hyogo	323	34.78	135.31
24	Kamiagatamachisago, Tsushima, Nagasaki	368	34.58	129.38
25	Izuharamachitsutsu, Tsushima, Nagasaki	225	34.15	129.22
26	Izuharamachiagami, Tsushima, Nagasaki	132	34.14	129.27
27	Mikurajimamura, Tokyo	180	33.89	139.59
28	Ugui, Higashimurogun Nachikatsuuracho, Wakayama	35	33.66	135.99
29	Ushiwaramachi, Tosu, Saga	747	33.40	130.44
30	Kain, Asogun Minamiasomura, Kumamoto	1096	32.79	131.01
31	Kitagawamachikawachimyo, Nobeoka, Miyazaki	1505	32.76	131.48
32	Obamachounzen, Unzen, Nagasaki	1096	32.76	130.28
33	Midorikawa, Kamimashikigun Yamatocho, Kumamoto	1481	32.58	131.09
34	Hayakusu, Shimomashikigun Misatomachi, Kumamoto	1183	32.58	130.90
35	Kawakita, Koyugun Tsunocho, Miyazaki	1317	32.28	131.43
36	Makizonochotakachiho, Kirishima, Kagoshima	1247	31.94	130.84
37	Satahetsuka, Kimotsukigun Minamiosumicho, Kagoshima	467	31.11	130.85
38	Satamagome, Kimotsukigun Minamiosumicho, Kagoshima	44	31.03	130.69
39	Kasarichosani, Amami, Kagoshima	5	28.51	129.67
40	Toguchi, Oshimagun Tatsugocho, Kagoshima	62	28.36	129.55
41	Nazekominato, Amami, Kagoshima	280	28.30	129.52
42	Sumiyochoishihara, Amami, Kagoshima	407	28.26	129.43
43	Nishikomi, Oshimagun Setouchicho, Kagoshima	365	28.25	129.19
44	Agina, Oshimagun Setouchicho, Kagoshima	305	28.16	129.34

表1-2. 解析に用いた宿主虫体および酵母の試料情報.

Host insect species	Rot type*	Vegetation zone**	Site	Host stag beetle no.	Organ	ITS		IGS	
						Strain no. (number of clones examined)***	Strain no. (number of clones examined)		
Genus <i>Aesalus</i>									
<i>Aesalus asiaticus</i> Lewis, 1883	B	CT		GU109	Larval gut	YGU109.1(6)	YGU109.1(6)	YGU109.5(1)	YGU109.5(1)
						YGU109.8(1)	YGU109.8(1)	YGU110.1(6)	YGU110.1(6)
				GU110	Larval gut	YGU110.5(1)	YGU110.5(1)	YGU110.8(1)	YGU110.8(1)
			27	GU111	Larval gut	YGU111.1(8)	YGU111.1(8)	YGU112.1(6)	YGU112.1(6)
				GU112	Larval gut	YGU112.2(1)	YGU112.2(1)	YGU112.7(1)	YGU112.7(1)
				GU113	Larval gut	YGU113.1(3)	YGU113.1(3)	YGU113.2(4)	YGU113.2(4)
						YGU113.7(1)	YGU113.7(1)		
Genus <i>Ceruchus</i>									
<i>Ceruchus ligunarius</i> Lewis, 1883	B	CT	12	GU107	Mycangium	YGU107.1(8)	YGU107.1(8)	YGU105.1(1)	YGU105.1(1)
spp. <i>monticola</i> Nakane, 1978						YGU105.2(3)	YGU105.2(3)	YGU105.5(1)	YGU105.5(1)
			17	GU105	Mycangium	YGU105.6(1)	YGU105.6(1)	YGU105.7(1)	YGU105.7(1)
				GU106	Mycangium	YGU105.8(1)	YGU105.8(1)	YGU106.1(4)	YGU106.1(4)
			21	GU26	Mycangium	YGU106.4(2)	YGU106.4(2)	YGU26.1(1)	YGU26.1(1)
						YGU26.2(7)	YGU26.2(7)	YGU15.1(1)	YGU15.1(1)
spp. <i>nodai</i> Fujita, 1987				GU15	Mycangium	YGU15.2(2)	YGU15.2(2)	YGU15.4(1)	YGU15.4(1)
						YGU15.5(1)	YGU15.5(1)		



<i>Figulus punctatus</i> Waterhouse, 1873	W(P)	WT/ST	37	GU93	Larval gut	YGU85.7(2)	YGU85.7(2)	
							YGU93.1(5)	YGU93.1(5)
Genus <i>Nigidius</i>			27	GU94	Larval gut	YGU93.2(3)	YGU93.2(3)	
							YGU94.1(5)	YGU94.1(5)
<i>Nigidius lewisi</i> Boileau, 1905	W(P)	WT/ST		GU81	Mycangium	YGU94.4(3)	YGU94.4(3)	
Genus <i>Prismognathus</i>				GU82	Mycangium			
				GU83	Mycangium	YGU81.1(8)		
						YGU82.1(5)		
<i>Prismognathus angularis</i> Waterhouse, 1874	W	CT	30	GU24	Mycangium	YGU83.1(8)		
spp. <i>morimotoi</i> Y. Kurosawa, 1975			32	GU25	Mycangium	YGU24.1(1)	YGU24.1(1)	
							YGU24.2(5)	YGU24.2(5)
							YGU24.5(2)	YGU24.5(2)
							YGU25.1(4)	YGU25.1(4)
							YGU25.3(3)	YGU25.3(3)
	W	CT	34	GU45	Mycangium	YGU25.7(1)	YGU25.7(1)	
						YGU45.1(3)	YGU45.1(3)	
						YGU45.2(1)	YGU45.2(1)	
						YGU45.3(2)	YGU45.3(2)	
						YGU45.6(1)	YGU45.6(1)	
						YGU45.7(1)	YGU45.7(1)	
						YGU46.1(5)	YGU46.1(5)	
			35	GU46	Mycangium	YGU46.3(1)	YGU46.3(1)	
							YGU46.5(1)	YGU46.5(1)
							YGU46.8(1)	YGU46.8(1)
							YGU47.1(5)	YGU47.1(5)
							YGU47.2(1)	YGU47.2(1)
<i>Prismognathus dauricus</i> Motschulsky, 1860	W	CT	36	GU47	Mycangium	YGU47.7(1)	YGU47.7(1)	
			25	GU32	Mycangium	YGU32.1(8)	YGU32.1(8)	
				GU33	Mycangium	YGU33.1(5)	YGU33.1(5)	
		GU34		Mycangium	YGU33.3(3)	YGU33.3(3)		
			24	GU36	Mycangium	YGU34.1(8)	YGU34.1(8)	
							YGU36.1(6)	YGU36.1(6)
							YGU36.2(2)	YGU36.2(2)
							YGU37.1(6)	YGU37.1(6)
				GU37	Mycangium	YGU37.2(1)	YGU37.2(1)	





<i>Dorcus hopei binodulus</i> Waterhouse, 1874	W	WT	9	GU140	Mycangium	YGU143.4(1)	YGU143.4(1)
						YGU140.1(7)	YGU140.1(7)
						YGU140.3(1)	YGU140.3(1)
<i>Dorcus montivagus</i> (Lewis, 1883)	W	CT	10	GU141	Mycangium	YGU141.1(8)	YGU141.1(8)
			1	GU72	Mycangium	YGU72.2(5)	YGU72.2(5)
			6	GU73	Mycangium	YGU73.1(8)	YGU73.1(8)
				GU74	Mycangium	YGU74.1(7)	YGU74.1(7)
			7	GU75	Mycangium	YGU75.1(6)	YGU75.1(6)
spp. <i>adachii</i> (Fujita et Ichikawa, 1987)	W	CT	35	GU11	Mycangium	YGU11.1(5)	YGU11.1(5)
						YGU11.2(1)	YGU11.2(1)
						YGU11.3(2)	YGU11.3(2)
						YGU75.8(1)	YGU75.8(1)
						YGU20.4(5)	YGU20.4(5)
<i>Dorcus rubroformatus</i> (Vollenhoven, 1865)	W	CT	18	GU20	Mycangium	YGU20.2(1)	YGU20.2(1)
						YGU20.3(1)	YGU20.3(1)
						YGU76.1(1)	YGU76.1(1)
						YGU76.4(2)	YGU76.4(2)
						YGU76.3(1)	YGU76.3(1)
			22	GU76	Larval gut	YGU76.5(1)	YGU76.5(1)
						YGU76.8(1)	YGU76.8(1)
						YGU13.1(2)	YGU13.1(2)
						YGU13.2(4)	YGU13.2(4)
						YGU13.4(2)	YGU13.4(2)
			31	GU3	Mycangium	YGU3.1(1)	YGU3.1(2)
						YGU3.2(2)	YGU3.2(2)
						YGU3.5(1)	YGU3.5(1)
						YGU3.7(1)	YGU3.7(1)
						YGU78.1(8)	YGU78.1(8)
<i>Dorcus striatipennis</i> (Motehulsky, 1861)	W	CT/WT	3	GU78	Mycangium	YGU77.3(4)	YGU77.2(4)
			5	GU77	Mycangium	YGU79.1(8)	YGU79.1(8)
			13	GU79	Mycangium	YGU21.2(7)	YGU21.2(7)
			20	GU21	Mycangium	YGU144.1(8)	YGU144.1(8)
			23	GU144	Mycangium	YGU145.1(2)	YGU145.1(2)
			GU145	Mycangium			



表1-3. 系統解析に用いたGenBank登録配列.

Host insect species	Yeast			
	Strain (number of clones examined)		GenBank accession no.	
	ITS	IGS	ITS	IGS
(Yeast symbionts of Lucanidae)				
Genus <i>Sinodendron</i>				
<i>Sinodendron cylindricum</i> (Linnaeus, 1758) (from Europe)			(LC119086)*	
			(LC119083)*	
			(LC119085)*	
			(LC119082)*	
Genus <i>Platyceus</i>				
<i>Platyceus delicatulus</i> Lewis, 1883		YW65.2(2)		(LC438669)***
		YW10.1(2)		(LC438670)***
	YW52.1(1)	YW52.1(2)	(LC133297)**	(LC133308)**
		YW55.1(2)		(LC438671)***
		YW46.1(2)		(LC438672)***
		YW68.3(4)		(LC438673)***
		YW72.2(4)		(LC438674)***
		YW61.2(2)		(LC438675)***
		YW60.2(2)		(LC438676)***
ssp. <i>unzendakensis</i> Fujita et Ichikawa, 1982		YW47.2(3)		(LC438677)***
		YW51.1(2)		same as LC438677
<i>Platyceus kawadai</i> Fujita et Ichikawa, 1982		YW53.1(2)		(LC438678)***
		YW56.1(2)		(LC438679)***
		YW3.1(3)		(LC438680)***
		YW12.1(3)		(LC438681)***
		YW18.1(2)		(LC438682)***
		YW70.3(4)		(LC438683)***
		YW74.3(4)		(LC438684)***
<i>Platyceus acuticollis</i> K. Kurosawa, 1969	YW07.8(1)	YW7.8(6)	(LC133296)**	(LC133307)**
		YW6.1(4)		(LC438685)***
<i>Platyceus albisomni</i> Kubota, Kubota et Otobe, 2008		YW19.1(3)		(LC438686)***
		YW21.1(3)		(LC438687)***
		YW22.1(3)		(LC438688)***
		YW23.1(2)		(LC438689)***
ssp. <i>chichibuensis</i> Kubota, Kubota et Otobe, 2008		YW8.1(2)		(LC438690)***
		YW9.1(3)		(LC438691)***
		YW11.1(3)		(LC438692)***
<i>Platyceus takakawai</i> Fujita, 1987		YW54.1(2)		(LC438693)***
		YW57.1(2)		(LC438694)***
		YW86.3(3)		(LC438695)***
		YW13.1(3)		(LC438696)***
		YW17.1(2)		(LC438697)***
		YK1.1(8)		(LC438698)***
		YK2.1(8)		(LC438699)***
		YK3.1(8)		(LC438700)***
ssp. <i>akitai</i> Fujita, 1987		YW73.3(4)		(LC438701)***
		YW38.1(2)		(LC438702)***
		YW64.1(2)		(LC438703)***
		YW88.1(8)		(LC438704)***
		YW89.1(8)		(LC438705)***
ssp. <i>namedai</i> Fujita, 1987		YW43.2(2)		(LC438706)***
		YW82.3(4)		(LC438707)***
<i>Platyceus viridicuprus</i> Kubota, Kubota et Otobe, 2008		YW75.3(4)		(LC438708)***
		YW76.3(4)		(LC438709)***
		YW04.1(3)		(LC438710)***
		YW15.1(2)		(LC438711)***
		YW78.3(4)		(LC438712)***
		YW79.3(4)		(LC438713)***

ssp. <i>kanadai</i> Kubota, Kubota et Ootobe, 2008		YW58.1(2)		(LC438714)***
		YW59.1(2)		(LC438715)***
		YW87.1(8)		(LC438716)***
<i>Platycerus akitaorum</i> Imura, 2007		YW14.9(3)		(LC438717)***
		YW16.1(2)		(LC438718)***
<i>Platycerus sugitai</i> Okuda et Fujita, 1987		YW44.1(2)		(LC438719)***
		YW83.3(4)		(LC438720)***
		YW81.3(4)		(LC438721)***
		YW84.3(4)		(LC438722)***
<i>Platycerus urushiyamai</i> Imura, 2007		YW48.1(2)		(LC438723)***
		YW49.2(2)		(LC438724)***
		YW50.1(2)		(LC438725)***
<i>Platycerus sue</i> Imura, 2007		YW45.1(2)		(LC438726)***
		YW80.3(4)		(LC438727)***
<i>Platycerus hongwonpyoi</i> Imura et Choe, 1989	YW36.1(1)	YW36.1(7)	(LC133288)**	(LC133299)**
(from South Korea)	YW34.8(1)	YW34.8(5)	(LC133289)**	(LC133300)**
	YW34.2a(1)	YW34.2a(3)	(LC133290)**	(LC133301)**
	YW33.8(3)	YW33.8(8)	(LC133291)**	(LC133302)**
	YW5.8(1)	YW05.8(8)	(LC133292)**	(LC133303)**
	YW24.1(1)	YW24.1(4)	(LC133293)**	(LC133304)**
	YW37.8(1)	YW37.8(8)	(LC133294)**	(LC133305)**
	YW35.8(1)	YW35.8(8)	(LC133295)**	(LC133306)**
Genus <i>Xiphodontus</i>				
<i>Xiphodontus antilope</i> Westwood, 1838			(MT277139)****	
(from Africa)			(MT277146)****	
			(MT277387)****	
Genus <i>Prismognathus</i>				
<i>Prismognathus angularis</i> Waterhouse, 1874	YW25.8(3)	YW25.8(8)	(LC133298)**	(LC133309)**
		YC21.5(1)		(LC492886)****
<i>Prismognathus dauricus</i> Motschulsky, 1860		YC19.1(1)		(LC492885)****
Genus <i>Lucanus</i>				
<i>Lucanus cervus</i> (Linnaeus, 1758)			(LC120355)*	
(from Europe)				
<i>Lucanus maculifemoratus</i> Motschulsky, 1861			(LC120354)*	
Genus <i>Dorcus</i>				
<i>Dorcus parallelipedus</i> (Linnaeus, 1758)			(LC120356)*	
(from Europe)				
<i>Dorcus rectus</i> (Motschulsky, 1857)			(LC120353)*	
(Yeast Species)				
<i>Sheffersomyces segobiensis</i>				(LC133310)
<i>Sheffersomyces stipitis</i>			(CP000497)	
<i>Sheffersomyces coipomoensis</i>			(LC120359)	
<i>Sheffersomyces lignosus</i>			(LC120360)	
<i>Sheffersomyces shehatae</i>			(LC120361)	
<i>Sheffersomyces insectosa</i>			(LC120362)	
<i>Sheffersomyces queiroziae</i>			(HM566445)	
<i>Sheffersomyces amazonensis</i>			(JF826438)	
<i>Sheffersomyces ergatensis</i>			(HQ652046) +(HQ999950)c	
<i>Candida lignicola</i>			(HQ652074) +(HQ652029)c	
<i>Candida quercitrusa</i>			(AM158924)	
<i>Candida tunisiensis</i>			(JQ612155)	
<i>Candida incommunis</i>			(EU343837) +(FN428859)c	
<i>Candida tropicalis</i>			(EU589208) +(EU589206)c	
<i>Candida albicans</i>			(HQ876043) +(HQ876051)c	
<i>Candida mycetangii</i>			(FJ381699) +(FJ381706)c	

<i>Candida hispaniensis</i>			(MK394173)
<i>Candida maltosa</i>			(MK394118)
<i>Arxula adeninivorans</i>			(Z50840)
<i>Sugiyamaella americana</i>			(HM208606) +(HM208605) +(HM208604)c
<i>Sugiyamaella valdiviana</i>			(NG062125) +(NR111544) +(U45835)c
<i>Sugiyamaella lignohabitans</i>			(HM208609) +(HM208608) +(HM208607)c
<i>Sugiyamaella novakii</i>			(LC120357)
<i>Yarrowia deformans</i>			(MK394171)
<i>Yarrowia lipolytica</i>			(MH545931)
<i>Yarrowia osloensis</i>			(MK394172)
<i>Yarrowia alimentaria</i>			(KY101920) +(KY106282)c
<i>Yarrowia hollandica</i>			(KY102134) +(KY106500)c
<i>Yarrowia galli</i>			(KY102097) +(KY106459)c
<i>Yarrowia divulgata</i>			(KY105964) +(KY110178)c
<i>Yarrowia keelungensis</i>			(EF621566) +(EF621561)c
<i>Yarrowia yakushimensis</i>			(KY106000) +(KY110210)c
<i>Hanseniaspora vineae</i>			(KY103580) +(KY107860)c
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>			(LC120363)
<i>Kurtzmaniella quercitrusa</i>			(MK394107)
<i>Tortispora caseinolytica</i>			(KC681892)
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>			(AHBE01000021)
(Outgroup)			
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>			(Z19578)
<i>Trichosporon porosum</i>			(JN939405) +(JN943732) +(JN939465)c

\*, Tanahashi and Hawes (2016)の登録配列. \*\*, Tanahashi et al. (2017)の登録配列. \*\*\*, Kubota et al. (2020)の登録配列.  
\*\*\*\*, Roets and Oberlander (2020)の登録配列. \*\*\*\*\*, Zhu et al. (2020)の登録配列.  
c, 複数のデータセットに基づくコンセンサス配列.

表1-4. 本研究で使用したプライマー情報

Gene	Name	Sequence (5'-3')	Strand direction	Usage*	Reference
(Primers for symbiont yeasts)					
ITS	NS7	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	Forward	P, S	White et al. (1990)
	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	Forward	S	White et al. (1990)
	NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	Reverse	P	White et al. (1990)
IGS	IGS1	GCCTTGTTGTTACGATCTGC	Forward	P, S	Tanahashi et al. (2017)
	IGS2	ACCGTTCCCGTCCGATCAAC	Reverse	S	Tanahashi et al. (2017)
	IGS3	TCCCACTACACTACTCGGTC	Forward	S	Tanahashi et al. (2017)
	IGS4	GAGACAAGCATATGACTAC	Reverse	P, S	Tanahashi et al. (2017)
	IGS7i	GAAGAGAGTTAATGGTGAAC	Forward	S	Tanahashi et al. (2017)
	IGS8i	GTTCAACATTAACACTCTCTCC	Reverse	S	Tanahashi et al. (2017)
(Primers for host stag beetles)					
16SrRNA	16SC	TACCTTGTGTATCAGGGTTTAT	Forward	P, S	Hosoya et al. (2001)
	16SB	CCGGTTTGAACCTCAGATCATGT	Reverse	P, S	Hosoya et al. (2001)
18SrRNA	ZR1	GTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCT	Forward	P, S	Mallat and Sullivan (1998)
	rd5b	CTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACC	Reverse	P, S	Whiting (2002)
28SrRNA	CV7F-1	CTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACC	Forward	P, S	Kim and Farrell (2015)
	CV7R	GATTCCTTCAGTGTAGCGCGCGTG	Reverse	P, S	Raupach et al. (2010)
<i>wingless</i>	Wg550F	ATGCGTCAGCARTGYAARTGYCAYGGYATGTC	Forward	P	Wild & Maddison (2008)
	Wng578F	TGCACNGTGAARACYTGCTGGATG	Forward	S	Ward & Downie (2005)
	WgAbR	ACYTCGCAGCACCARTGGAA	Reverse	S	Abouheif & Wray (2002)
	WgAbRZ	CACTTNACYTCRCARCACCARTG	Reverse	P	Wild & Maddison (2008)

\*: P, PCR; S, シーケンス反応.

表1-5. 各種の雌成虫の菌囊および幼虫の腸あたりのコロニー形成数 (CFU)

Species	Organ	n	CFU	
			Range	Average (SD)
<i>Aesalus asiaticus</i>	Larval gut	5	$5.6 \times 10^3 - 1.0 \times 10^5$	$4.0 \times 10^4$ ( $3.7 \times 10^4$ )
<i>Ceruchus ligunarius</i>	Mycangium	6	$4.5 \times 10^2 - 2.4 \times 10^4$	$7.7 \times 10^3$ ( $8.3 \times 10^3$ )
<i>Nicagus japonicus</i>	Mycangium	3	$6.0 \times 10^2 - 5.6 \times 10^3$	$2.4 \times 10^3$ ( $2.3 \times 10^3$ )
<i>Platycerus delicatulus</i>	Mycangium	2	$1.3 \times 10^2 - 1.1 \times 10^5$	$5.6 \times 10^4$ ( $5.6 \times 10^4$ )
<i>Platycerus albisomni</i>	Mycangium	2	$3.8 \times 10^2 - 2.4 \times 10^3$	$1.4 \times 10^3$ ( $9.9 \times 10^2$ )
<i>Platycerus takakuwai</i>	Mycangium	1	$2.5 \times 10^3$	$2.5 \times 10^3$
<i>Figulus binodulus</i>	Mycangium	2	$5.0 \times 10^2 - 6.0 \times 10^3$	$3.2 \times 10^3$ ( $2.7 \times 10^3$ )
<i>Figulus punctatus</i>	Larval gut	2	$5.0 \times 10^2 - 2.4 \times 10^4$	$1.2 \times 10^4$ ( $1.2 \times 10^4$ )
<i>Nigidius lewisi</i>	Mycangium	3	$1.3 \times 10^2 - 8.0 \times 10^3$	$3.3 \times 10^3$ ( $3.4 \times 10^3$ )
<i>Prismognathus angularis</i>	Mycangium	5	$6.8 \times 10^2 - 2.7 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$ ( $1.1 \times 10^4$ )
<i>Prismognathus dauricus</i>	Mycangium	5	$3.3 \times 10^3 - 2.7 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$ ( $7.8 \times 10^3$ )
<i>Lucanus maculifemoratus</i>	Mycangium	5	$3.0 \times 10^4 - 1.2 \times 10^5$	$6.5 \times 10^4$ ( $3.2 \times 10^4$ )
<i>Lucanus gamunus</i>	Mycangium	6	No colony	
<i>Aegus subnitidus</i>	Larval gut	7	No colony	
<i>Neolucanus protogenetivus</i>	Mycangium	3	$2.9 \times 10^4 - 1.1 \times 10^5$	$6.8 \times 10^4$ ( $3.4 \times 10^4$ )
<i>Prosopocoilus inclinatus</i>	Mycangium	3	No colony	
	Larval gut	4	$1.9 \times 10^4 - 3.8 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$ ( $1.4 \times 10^5$ )
<i>Rhaetulus reticornis</i>	Mycangium	2	$5.0 \times 10 - 2.0 \times 10^2$	$1.3 \times 10^2$ ( $7.5 \times 10$ )
<i>Dorcus rectus</i>	Mycangium	6	$3.8 \times 10^3 - 4.1 \times 10^5$	$9.5 \times 10^4$ ( $1.6 \times 10^5$ )
	Larval gut	1	$1.3 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$
<i>Dorcus amaminus</i>	Mycangium	3	$1.8 \times 10^4 - 6.3 \times 10^4$	$3.6 \times 10^4$ ( $1.9 \times 10^4$ )
<i>Dorcus hopei</i>	Mycangium	2	$1.2 \times 10^4 - 1.2 \times 10^5$	$6.8 \times 10^4$ ( $5.6 \times 10^4$ )
<i>Dorcus montivagus</i>	Mycangium	5	$5.1 \times 10^4 - 1.7 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$ ( $4.5 \times 10^4$ )
<i>Dorcus rubrofemoratus</i>	Mycangium	3	$9.4 \times 10^4 - 4.3 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$ ( $1.5 \times 10^5$ )
	Larval gut	1	$9.4 \times 10^4$	$9.4 \times 10^4$
<i>Dorcus striatipennis</i>	Mycangium	6	$1.3 \times 10^2 - 2.0 \times 10^4$	$7.0 \times 10^3$ ( $6.7 \times 10^3$ )
<i>Dorcus titanus</i>	Mycangium	7	$1.8 \times 10^4 - 5.2 \times 10^4$	$3.4 \times 10^4$ ( $1.4 \times 10^4$ )
<i>Dorcus metacostatus</i>	Mycangium	5	$7.1 \times 10^4 - 2.3 \times 10^5$	$1.2 \times 10^5$ ( $5.8 \times 10^4$ )

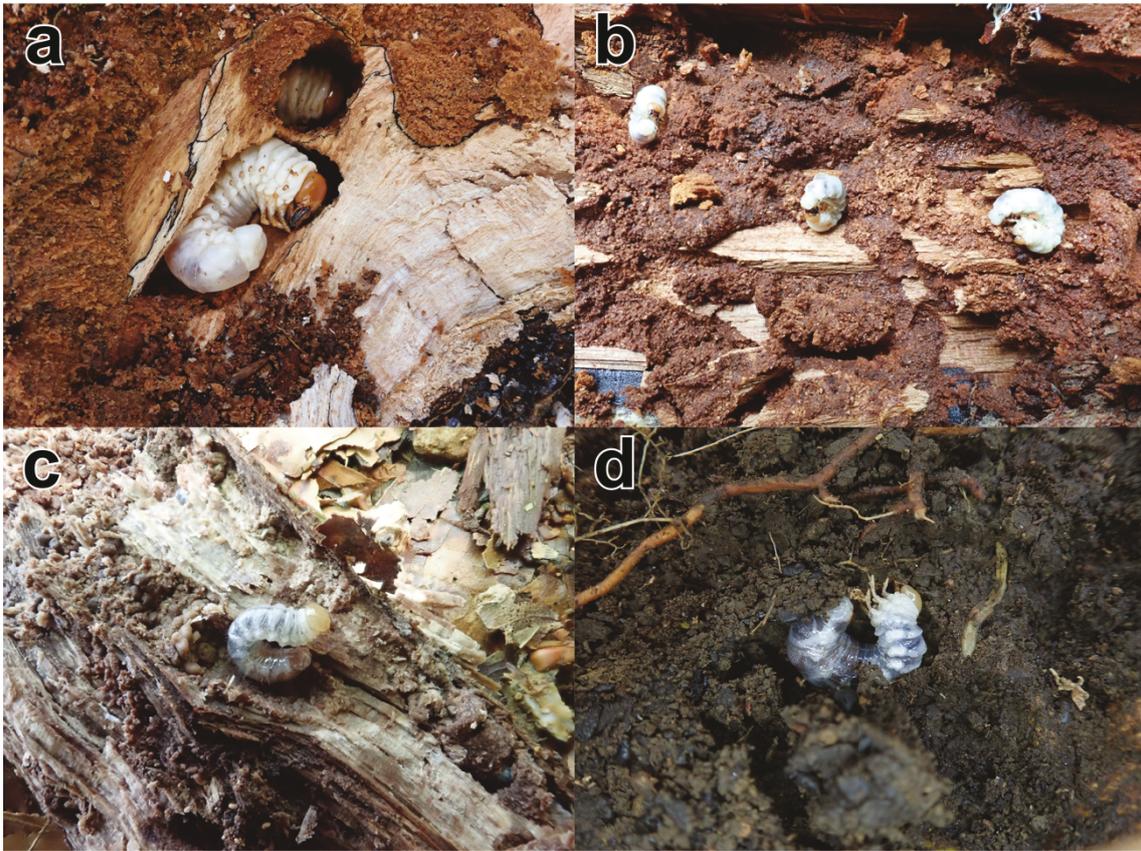


図 1-1. クワガタムシ科の幼虫の食性。a) 白色腐朽材を食べるヒメオオクワガタ、b) 褐色腐朽材を食べるツヤハダクワガタ、c) 軟腐朽材を食べるコルリクワガタ、d) 腐植質を食べるネブトクワガタ。

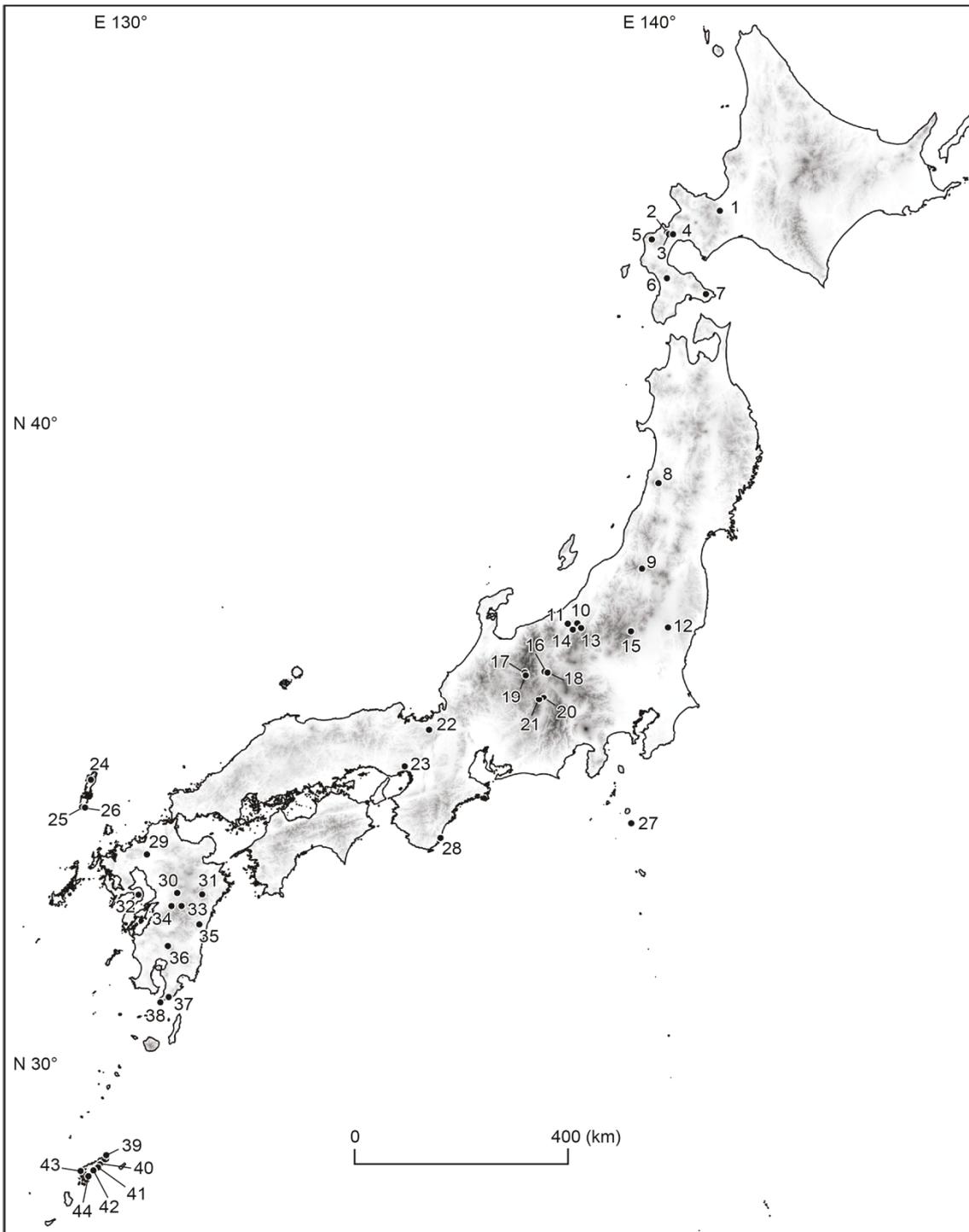


図 1-2. 本研究におけるサンプリング地点。地点番号は表 1-1 と対応。



図 1-3. ITS 領域に基づくクワガタムシの共生酵母と酵母種のベイズ系統樹。ノードの数字はベイズ (BI) の事後確率 (>50%) / 最尤法 (ML) のブートストラップ確率 (>50%) を示す。YW、YGU、YC に続く数字は雌の個体番号と酵母のコロニー番号を示す (表 1-2、表 1-3 参照)。破線枠は宿主クワガタムシの複数種に共通する ITS ハプロタイプを示す。Kakusan 4 により GTR+Gamma Invariant model (BI) と GTR+Gamma model (ML) が最適置換モデルとして選択され、BI と ML の系統樹は周辺枝を除いて同一であった。

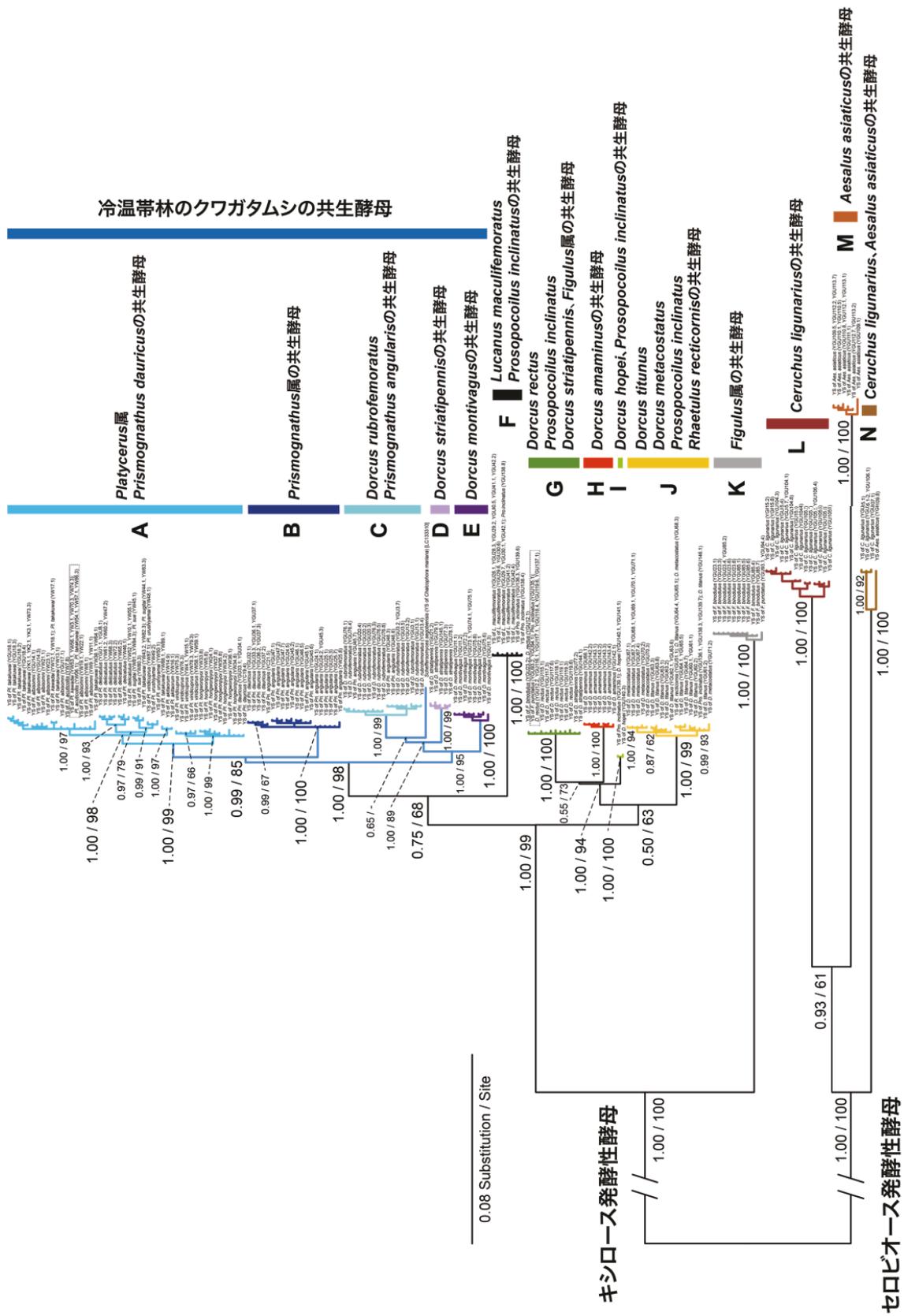


図 1-4. IGS 領域に基づくクワガタムシの共生酵母と酵母種のベイズ系統樹。ノードの数字はベイズ (BI) の事後確率 (>50%) / 最尤法 (ML) のブートストラップ確率 (>50%) を示す。YW、YGU、YC に続く数字は雌の個体番号と酵母のコロニー番号を示す (表 1-2、表 1-3 参照)。破線枠は宿主クワガタムシの複数種に共通する ITS ハプロタイプを示す。Kakusan 4 により HKY85+ Gamma Invariant model (BI) と GTR + Gamma model (ML) が最適置換モデルとして選択され、BI と ML の系統樹は周辺枝を除いて同一であった。

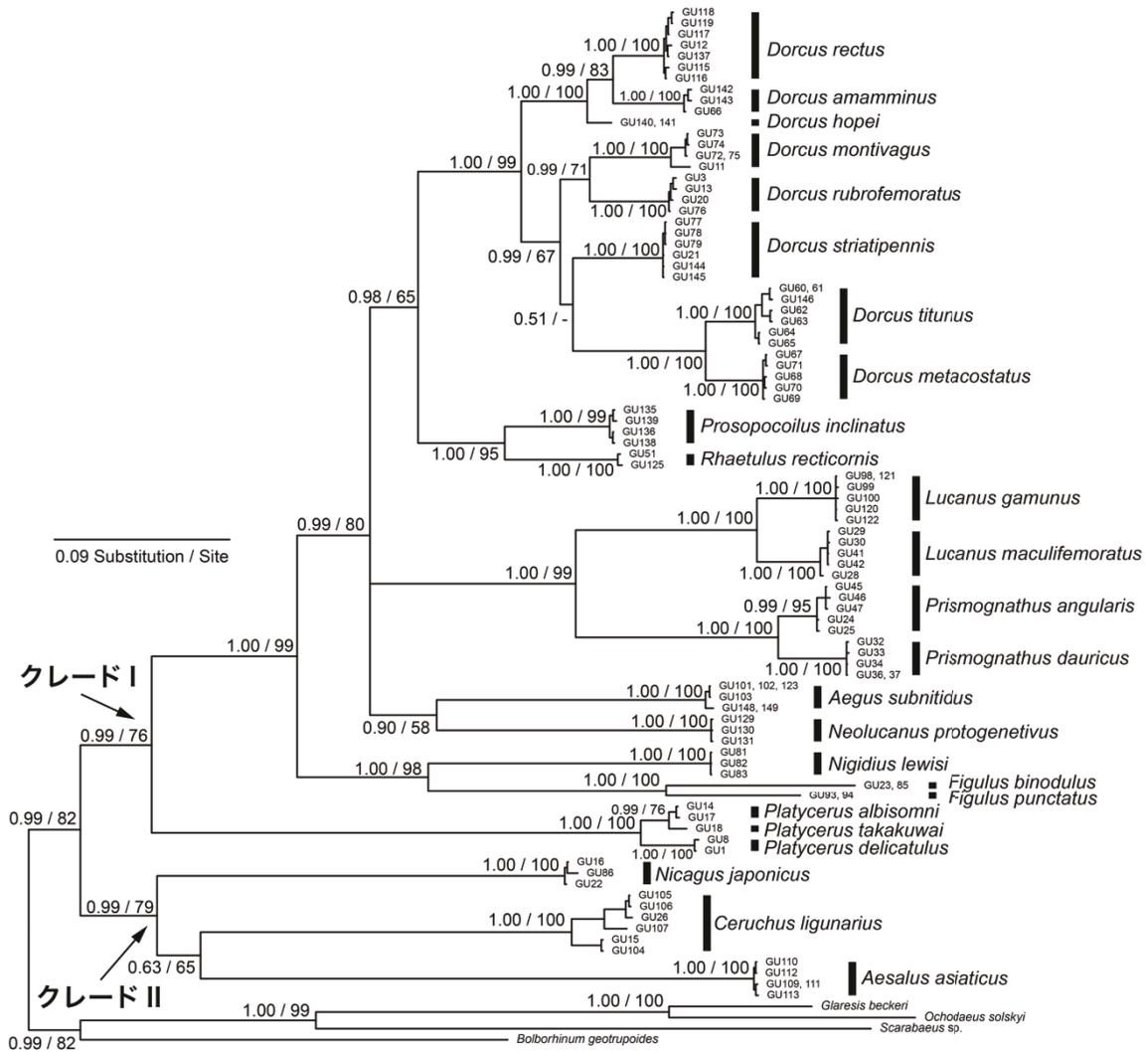


図 1-5. mtDNA 16SrRNA 領域と nuDNA 18SrRNA 領域、28SrRNA 領域および *wingless* 領域の結合配列データセットに基づくクワガタムシのベイズ系統樹。ノードの数字はベイズ (BI) の事後確率 (> 50%) / 最尤法 (ML) のブートストラップ確率 (> 50%) を示す。GU に続く数字は雌の個体番号を示す (表 1-2 参照)。Kakusan 4 により BI において 16SrRNA では HKY85 + Gamma Invariant model、18SrRNA では K80 + Gamma model、28SrRNA では K80 + Gamma model、*wingless* では 第一、第三コドンが GTR + Gamma model、第二コドンが K80 + Gamma model が最適置換モデルとして選択された。ML においては全ての領域で GTR + Gamma model が最適置換モデルとして選択され、BI と ML の系統樹は周辺枝を除いて同一であった。

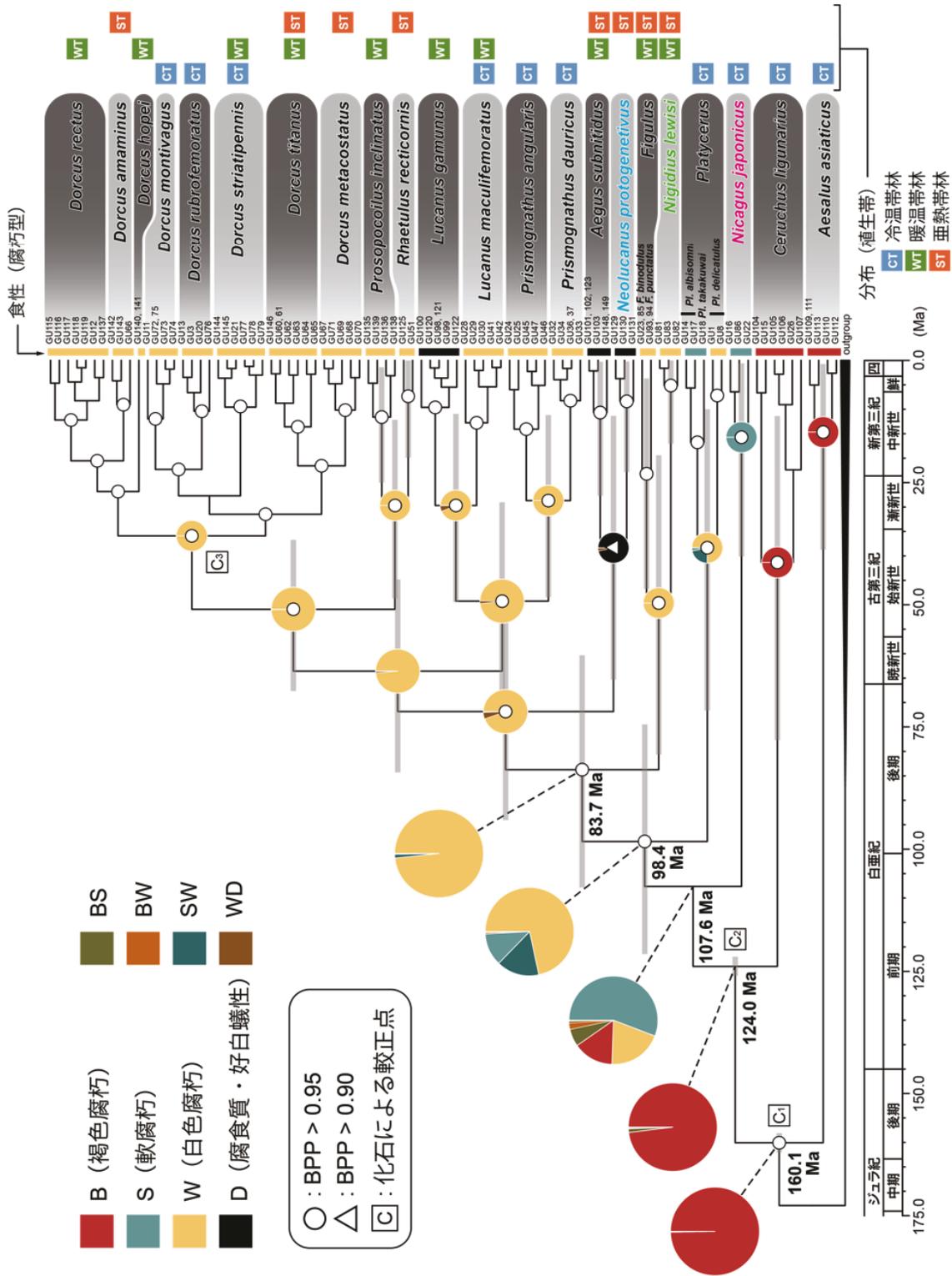


図 1-6. mtDNA 16SrRNA 領域と nuDNA 18SrRNA 領域、28SrRNA 領域および *wingless* 領域の結合配列データセットに基づくクワガタムシの分岐年代推定と幼虫食性の祖先形質の復元解析。円グラフは各ノードにおける幼虫の食性の形質の割合を示す（左上の凡例参照）。主要なクレードにおける太字の数字とバーは推定分岐年代および 95%信頼区間を示す。GU に続く数字は雌の個体番号を示す（表 1-2 参照）。Kakusan 4 により BI において 16SrRNA では HKY85 + Gamma Invariant model、18SrRNA では K80 + Gamma model、28SrRNA では K80 + Gamma model、*wingless* では 第一、第三コドンが GTR + Gamma model、第二コドンが K80 + Gamma model が最適置換モデルとして選択された。

## 第II章

### オニクワガタ属とルリクワガタ属における 共生酵母の水平伝播

## II-1. 背景

昆虫と菌類の共生関係において、共生微生物の伝播様式は両者間の依存関係や共生系の進化に密接に関わっている (Salem et al., 2015)。昆虫と菌類の共生系では一般的に垂直伝播、すなわち親から子へと共生微生物が伝播されるが、生息環境が隣接あるいは重複する宿主間では共生微生物の水平伝播が生じることが知られている (Biedermann & Vega, 2020)。一般的に、共生する菌類を保持するための器官を宿主昆虫が有することは、宿主と共生微生物との絶対的な依存関係を示唆し、宿主種内における共生菌類の遺伝的な均質性を促進する (Mueller et al., 1998; Aanen et al., 2009)。一方で、昆虫と菌類の共生系において水平伝播は、共生菌類の多様性を増加させるものの、絶対共生関係の進化はほとんど生じないと考えられる (West et al., 2015; Biedermann & Vega, 2020)。

本研究で対象とするクワガタムシ科の幼虫は枯死木を摂食する (Tanahashi et al., 2010, 2018; Tanahashi & Kubota, 2013)。その雌成虫は共生酵母を運搬するための菌嚢と呼ばれる器官を保持しており、その共生酵母はキシロース発酵性酵母である *Scheffersomyces stipitis* や *Scheffersomyces segobiensis* に近縁である (Tanahashi et al., 2010; Tanahashi & Hawes, 2016; Kubota et al., 2020)。さらに共生酵母は、ルリクワガタ属 *Platycerus*、オニクワガタ属 *Prismognathus*、オオクワガタ属 *Dorcus* およびミヤマクワガタ属 *Lucanus* をはじめとした白色腐朽材を摂食するクワガタムシ類の雌成虫の菌嚢から普遍的に得られている (Tanahashi et al., 2010, 2017; Kubota et al., 2020)。これらの共生酵母は、宿主クワガタムシにおいて重要な役割を果たしていると思われるものの、共生酵母の正確な機能や役割について未解明である (Kubota et al., 2020)。

Kubota et al. (2020) はルリクワガタ属とその共生酵母の分子系統地理学的解析に基づき、両者間の共進化関係を明らかにした。また雌成虫 1 個体あたりから単離される全ての共生酵母コロニー間では遺伝的変異をほとんど示さず、同一の集団に由来する個体同士の共生酵母は互いに近縁であった (Tanahashi et al., 2017; Kubota et al., 2020)。しかし

ながら、宿主クワガタムシと共生酵母の系統関係は、完全には一致しないためクワガタムシ集団間や種間での共生酵母の水平伝播や置換が生じていることが示唆される (Kubota et al., 2020)。 *Scheffersomyces* 属の酵母は他の木材穿孔性甲虫の幼虫腸内からも一時的に検出される (Santa Maria & Garcia Aser, 1977; Suh et al., 2003, 2005)。しかし、筆者らの観察および Roets & Oberlander (2020) の結果から、枯死木内においてクワガタムシの幼虫の食痕である糞からは共生酵母が検出されるものの、それ以外の非摂食部位からは発見されなかった。一方で、 *S. stipitis* や *S. segobiensis* およびその近縁種である *Scheffersomyces* 属の酵母は、多くのクワガタムシ類の菌嚢や幼虫の腸内から検出される。すなわち、これらの *Scheffersomyces* 属の酵母グループは、基本的にはクワガタムシ類とともに遺伝的に分化してきたと思われる (Kubota et al., 2020)。

第 II 章では、日本と韓国のルリクワガタ属 *Platycerus* およびオニクワガタ属 *Prismognathus* の共生酵母に着目した。ルリクワガタ属は、韓国からは *Platycerus hongwonpyoi* Imura and Choe, 1989 の 1 種のみが知られているが、日本には単系統群を構成する 10 種が生息している (Imura, 2010; Kubota et al., 2011)。またオニクワガタ属は、韓国においてはキンオニクワガタ *Prismognathus dauricus* (Motschulsky, 1860) の 1 種のみが生息しているのに対し、日本にはオニクワガタ *Prismognathus angularis* Waterhouse, 1874、ヤクシマオニクワガタ *Pr. tokui* Kurosawa, 1975 およびキンオニクワガタの 3 種が生息している。これらの内、ヤクシマオニクワガタはオニクワガタの亜種として扱われることも多い (Fujita, 2010)。またキンオニクワガタは日本国内では日本列島と朝鮮半島の境界に位置する島である対馬にのみ分布する。これらのルリクワガタ属およびオニクワガタ属の多くの種は冷温帯落葉広葉樹林に生息しているが、キンオニクワガタなど一部の種は、暖温帯の常緑広葉樹林にも生息している。

Tanahashi et al. (2017)、Zhu et al. (2020a)、Kubota et al. (2020) で実施された分子系統解析の結果から、日本と韓国のルリクワガタ属およびオニクワガタ属の共生酵母の核

遺伝子 ITS 領域の配列は、同一あるいはほとんど変異が見られないことが明らかになった。また系統レベルの遺伝的な差異を検出するのに適した核遺伝子 IGS 領域に基づく分子系統解析の結果、これらのクワガタムシ類の共生酵母は大きく 3 系統に分化した (Tanahashi et al., 2017; Kubota et al., 2020)。特に、韓国の *Pl. hongwonpyoi* とキンオニクワガタの共生酵母と西日本の中国地方から九州北部にかけて生息するニシコルリクワガタ *Platycerus viridicuprus* Kubota et al., 2008 の大多数の共生酵母は単系統を構成した (Kubota et al., 2020; Zhu et al., 2020a)。これら結果は、日本と韓国が陸橋により接続していた際に、これらの種間で共生酵母の水平伝播が比較的最近生じたことを示唆している (Zhu et al., 2020a)。また系統的に大きく離れたルリクワガタ属とオニクワガタ属の種間が同系統の酵母を共有していることが初めて判明した (Zhu et al., 2020a)。

クワガタムシ類と共生酵母の共進化関係は、両者の絶対的な依存関係を示唆している (Kubota et al., 2020)。そのような中、日本列島と朝鮮半島の間におけるルリクワガタ属とオニクワガタ属の酵母との共生関係は、稀な水平伝播の過程を推定する機会を提供すると思われる (Zhu et al., 2020a)。日本列島と朝鮮半島の境界に位置する対馬にはキンオニクワガタが生息するものの、ルリクワガタ属は分布しない。しかし、対馬のキンオニクワガタの共生酵母の系統学的位置づけは未解明である。そこで第 II 章では、対馬のキンオニクワガタの共生酵母の系統学的位置づけを解明し、ルリクワガタ属とオニクワガタ属の間で、共生酵母の水平伝播あるいは祖先多型に由来する不完全系統仕分けの可能性について検討した。また、属間および種間での共生酵母の伝播経路について考察した。

## II-2. 方法

### II-2-1. 研究材料

本研究および先行研究における宿主クワガタムシ類の採集地点を表 2-1 および図 2-1 に示す。また本研究と先行研究で単離培養された酵母株を表 2-2 に示す。キンオニクワガタは対馬の 2 地点 (Site 34、Site 35) で成虫を採取した。またオニクワガタは、九州の 2 地点 (Site 30、Site 31) で枯死木から幼虫を採取した。これらの幼虫は、野外で生息していたのと同じ木材を用いて成虫まで個別に飼育した。これらの日本国内の 4 地点で採集したオニクワガタ属の雌成虫 7 頭から共生酵母を単離培養した。

#### II-2-2. 雌成虫からの共生酵母の単離培養

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で各雌成虫から菌嚢を先行研究と同様の手法にて解剖および摘出した (Tanahashi et al., 2017)。摘出した菌嚢を 1.5 ml のプラスチックチューブ内でペレットペストルを用いて PBS 中ですり潰し、均質化した菌嚢溶液を作成した。均質化した菌嚢溶液を基に 5 倍希釈系列の菌嚢溶液 (菌嚢の  $1/5^1$ 、 $1/5^2$ 、 $1/5^3$ 、 $1/5^4$ 、 $1/5^5$  に相当) を作成し、それぞれを 20 $\mu$ l/ml リファンピシンを含む PDA 培地プレート上に塗布した (PDA: BIODIAGNOSTICS, Rue des 40 Mines, 60000 Allonne, France)。このプレートを 20°C で 4 日間培養し、十分な数の酵母コロニー (通常 30~500) が出芽したプレートを基に、菌嚢あたりのコロニー形成数 (CFU: colony-forming units) を算出した。

#### II-2-3. 共生酵母の遺伝子解析

各プレート上に出芽した酵母コロニー間に形態的な差異は認められなかったため、各宿主個体についてランダムに 8 コロニーを選択し、その後の DNA 解析のために新しい PDA 培地プレートに移植した。各酵母コロニーの一部を摘出し、50 $\mu$ l の lyticase 溶液 (0.4 U/ $\mu$ L lyticase, 50 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA]) を用いて酵母の懸濁溶液を作成した。酵母の懸濁溶液を 37°C で 2 時間インキュベートした後、(Tanahashi et al., 2017) に従い酵母から全ゲノム DNA を抽出・精製し、TE バッファー (10 mM Tris-HCl,

1 mM EDTA; pH 8.0) に溶解した。

この全ゲノム DNA を鋳型に核遺伝子 ITS 領域と IGS 領域の配列を PCR 法によって増幅した。各領域の PCR 条件は、95°Cで3分間のプレヒート後、95°Cで45秒間の熱変性、52°Cで45秒間のアニーリング、そして72°CでITS領域では1分30秒間、IGS領域では2分15秒間の伸長反応を1サイクルとする反応を35サイクル行った後、72°Cで5分間のファイナルエクステンションを行い、4°Cで保存した。PCR産物の精製には Illustra ExoStar (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いた。シーケンス反応においては ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) を用いて蛍光ラベリングを行い、これらの反応には Applied Biosystems 2720 サーマルサイクラー (Applied Biosystems, California) を用いた。これらの PCR 法およびシーケンス反応で使用したプライマー情報を表 2-3 に示す。この後、ABI 3130xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, California) を用いて塩基配列を解析した。シーケンス後の塩基配列については、ソフトウェア CLC Genomics Workbench (Filgen, 名古屋) を用いてアセンブリを実施し、解析サンプル間の塩基配列のアライメントには MAFFT online service (Kato & Standley, 2013) を用いた。

各宿主個体内における共生酵母の微細な遺伝的変異を検出するため、まず宿主雌成虫 1 個体当たり 2~8 コロニーの IGS 領域の塩基配列 (約 2.2kb) を決定した。また IGS 領域は酵母株レベルの遺伝的な差異を検出するのに適しているものの、遺伝的変異が多いことに加え、データベース登録配列の分類学的網羅率が不十分であるため、より高次分類での種の同定や系統解析には利用されていない。そこで、共生酵母の種同定および系統解析を目的として ITS 領域全体 (ITS1、5.8SrRNA および ITS2 を含む約 1.1kb) の配列を決定した。

#### II-2-4. 宿主クワガタムシの遺伝子解析

宿主虫体を実体顕微鏡下で解剖し、胸部あるいは脚部筋肉の一部を摘出し、全ゲノム DNA を抽出・精製した。全ゲノム DNA 抽出および精製に関しては、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて製品プロトコルに準じて行った。この全ゲノム DNA を鋳型に mtDNA *COI* 領域の部分配列を表 2-3 に示したプライマーを用いて、94°Cで3分間のプレヒート後、94°Cで1分間の熱変性、48°Cで1分間のアニーリング、72°Cで1分間の伸長を1サイクルとする反応を30サイクル行った後、72°Cで7分間のファイナルエクステンションの PCR 法によって増幅し、4°Cで保存した。その後の PCR 産物の精製、シーケンス反応および塩基配列の決定とアセンブリ、アライメントの手法は酵母の遺伝子解析と同様である。

#### II-2-5. 分子系統解析

DnaSP v.6.12.03 (Rozas et al., 2017) を用いて、共生酵母の ITS 領域と IGS 領域、および宿主クワガタムシの *COI* 領域のハプロタイプ行列を構築した。整理したハプロタイプ配列を用いて、最尤法およびベイズ推定法に基づく系統樹を構築した。各系統解析の塩基置換モデルの選択にはソフトウェア Kakusan4 (Tanabe, 2007) を用い、Schwarz's Bayesian Information (BIC; Schwarz, 1978) により最適モデルの選択を行った。最尤系統樹は、RAxML v. 8.2.9 (Stamatakis, 2014) を用いて構築した。各ノードにおける信頼度は、1,000 回のブートストラップ複製を用いて評価した。ベイズ系統樹は、MrBayes v.3.2.6 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) を用いて構築した。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 v1.6 (Rambaut et al., 2018) を用いて各推定パラメーターの要約統計量を確認した後に、最初の 10%の世代を定常状態に達していない世代と仮定して解析から取り除いた。作成した系統樹は、FigTree ver. 1.4.4 (Rambaut, 2018) を用いて可視化および編集した。

## II-3. 結果

### II-3-1. 雌成虫からの共生酵母の単離

採集した全ての *Prismognathus* 属雌成虫の菌嚢から共生酵母のコロニーを得ることができた。PDA 培地上のコロニーの形状は白色かつ円形で突起があり、縁は滑らかで表面はつや消しを示し、コロニー間で均質であった。酵母の CFU 値は *Prismognathus dauricus* と *Pr. angularis* で  $1.2 \times 10^2$  から  $2.7 \times 10^4$  の範囲であった。

### II-3-2. 核遺伝子 ITS 領域に基づく共生酵母の系統学的位置付け

九州にて採集したオニクワガタ 2 個体から得られた共生酵母の ITS 配列はいずれも遺伝的変異を示さなかった (18S rRNA の一部配列、ITS1、5.8S rRNA、ITS2、26S rRNA の一部配列を含む 651bp; n=6)。これらの配列は、先行研究においてオニクワガタ 2 個体から得られた共生酵母の配列と完全に一致した (Tanahashi et al., 2017; Zhu et al., 2020a)。また、対馬で採集されたキンオニクワガタ 3 個体 (GU32、GU36、GU37) の共生酵母の ITS 配列もオニクワガタの共生酵母と同一配列 (n=7) であった。一方、対馬で得られたキンオニクワガタの内 1 個体 (GU34) に由来する共生酵母の 2 つの配列 (652bp) は、オニクワガタの共生酵母の配列と比較して 1 塩基置換と 1 塩基挿入の遺伝的変異が認められた。これらの遺伝的変異が認められた 2 配列は、韓国のキンオニクワガタ 1 個体 (Zhu et al., 2020a) および韓国と日本のルリクワガタ属 (Tanahashi et al., 2017; Kubota et al., 2020) と同一配列であった。さらに、対馬で採取したキンオニクワガタ 1 個体 (GU33) から単離した 8 個の酵母コロニーの ITS 配列には、3 個の酵母コロニーが前者のオニクワガタと同一配列、残りの 5 個の酵母コロニーが後者のルリクワガタ属および韓国のキンオニクワガタと同一であり、本個体 (GU33) の共生酵母は両方のハプロタイプを含んでいた。これらのオニクワガタ属とルリクワガタ属の共生酵母の配列は、タマムシ類

*Chalcophora mariana massiliensis* (Coleoptera: Buprestidae) から初めて単離された酵母 *Scheffersomyces segobiensis* の配列と類似していた (Santa Maria & Garcia Aser, 1977)。また、ITS 配列に基づく系統解析の結果、オニクワガタ属とルリクワガタ属の共生酵母は、既知の環境中から得られた *Scheffersomyces* 属酵母を含む他のすべてのクワガタムシ類の共生酵母の系統とは別系統を構成していた (図 2-2、表 2-2)。クワガタムシ類の共生酵母と *Scheffersomyces* 属酵母の間では、合計 42 の塩基置換と 12 塩基の挿入が確認された。

### II-3-3. 核遺伝子 IGS 領域に基づく共生酵母の系統学的位置付け

オニクワガタとキンオニクワガタについて、IGS 配列 (26S rRNA の一部配列、IGS1、5S rRNA、IGS2 および 18S rRNA の一部配列を含む; 2,184-215bp, n = 16) を決定した。その結果、IGS 配列には 75 の塩基置換と 23 の挿入が確認された。オニクワガタでは、雌成虫 1 個体から単離した 8 コロニーの IGS 配列は、用いた 2 個体 (GU24、GU25) について 1-5 塩基の置換と 1 つの挿入を示し、単一雌個体の菌囊内の共生酵母の間に遺伝的変異が認められた。キンオニクワガタでは、雌成虫 1 個体から分離された 8 つのコロニーの IGS 配列は、GU32 と GU34 の 2 個体については同一であったものの、GU36 と GU37 の 2 個体については 2 塩基置換と 2 つの挿入が見られた。例外的に、キンオニクワガタの雌 1 個体 (GU33) から単離した 8 つの酵母コロニーでは、67 塩基置換と 10 の挿入を含む 2 つの大きく異なる IGS 配列が認められた。

IGS 領域に基づく系統解析の結果、ルリクワガタ属全種、対馬のキンオニクワガタ 1 個体、韓国のキンオニクワガタ 1 個体から単離された全ての共生酵母のコロニー、および対馬のキンオニクワガタ雌 1 個体から得られた共生酵母の一部のコロニーが単系統を構成した (図 2-3)。また、この系統内には、2 つの主要なサブクレードが認められた。クレード I は、日本のルリクワガタ属の共生酵母のみから構成された。一方で、クレード

ド II は西日本の中国地方から九州北部にかけて生息するニシコルリクワガタのほとんどの集団から得られた共生酵母と韓国の *Pl. hongwonpyoi* の全集団から得られた共生酵母、および対馬のキンオニクワガタ 2 個体と韓国のキンオニクワガタ 1 個体の共生酵母から構成されていた。また、日本のオニクワガタから得られた全ての共生酵母および対馬のキンオニクワガタ 4 個体の共生酵母は、別の単系統（クレード III）を構成した。

クレード II の共生酵母（GU33、34）およびクレード III の共生酵母（GU32、33、36、37）は、対馬のキンオニクワガタから単離された。また GU33 はクレード II およびクレード III の両系統の共生酵母が単離された唯一の雌個体であった（図 2-3; 表 2-2）。

#### II-3-4. 宿主クワガタムシの系統、および共生酵母の系統との比較

宿主クワガタムシ類の *COI* 領域を基に系統樹を構築し（図 2-4）、共生酵母の *IGS* 領域に基づく系統樹と比較した。その結果、宿主の系統と共生体の系統は一致せず、オニクワガタ属とルリクワガタ属の進化の過程では、宿主と共生酵母の厳密な共種分化は成立していないことが示唆された。オニクワガタ属とルリクワガタ属は、大きく異なる独立した単系統群を示した。さらに、キンオニクワガタはオニクワガタとは異なる系統を構成した。一方で、日本産のルリクワガタ属 10 種は生殖器などの形態的特徴により明確に識別されるものの（Kubota et al., 2009）、トウカイコルリクワガタ *Pl. takakuwai* など一部の種間では浸透交雑が生じている（図 2-4; Kubota et al., 2011）。このようなルリクワガタ属の種の共生酵母は *IGS* 領域において普遍的にクレード I に含まれていた。またニシコルリクワガタは明確な単系統を形成した（図 2-4）。

## II-4. 考察

### II-4-1. 宿主クワガタムシと共生酵母の系統関係の不一致

ルリクワガタ属とその共生酵母は共進化してきたと思われるものの、分子系統解析の結果から両者の系統関係は完全には一致しなかった (Kubota et al., 2020)。この結果は、*Scheffersomyces* 属共生酵母の水平伝播あるいは置換は稀ではあるものの、ルリクワガタ属の進化史の過程で繰り返し生じてきたことを示唆するものである (Kubota et al., 2020)。

IGS 領域の系統解析の結果から、日本と韓国のルリクワガタ属とオニクワガタ属の共生酵母は単系統を構成することが強く示唆された (クレード I+II+III; 図 2-3)。一般的にクワガタムシ類の共生酵母の系統は種あるいは属に特異的であるため、ルリクワガタ属とオニクワガタ属の共生酵母の系統は、既知の東アジアの他のクワガタムシ類 (ネブトクワガタ属 *Aegus*、オオクワガタ属 *Dorcus*、ノコギリクワガタ属 *Prosopocoilus*、ミヤマクワガタ属 *Lucanus*、マルバネクワガタ属 *Neolucanus*、チビクワガタ属 *Figulus*、ツノヒョウタンクワガタ属 *Nigidius*、マダラクワガタ属 *Aesalus*、マグソクワガタ属 *Nicagus*、ツヤハダクワガタ属 *Ceruchus*) の共生酵母とは異なる系統である (Tanahashi et al., 2010; Zhu et al., 2020a; Kubota et al., 2020)。すなわち、クワガタムシの分類群間での共生酵母の水平伝播は稀であることを示唆する。日本のルリクワガタ属全種の祖先は、*Pl. hongwonpyoi* を含むアジアの大陸のルリクワガタ属の共通祖先から約 10Ma ごろに分化したと思われる (Zhu et al., 2020b)。その分岐と比較して、ルリクワガタ属とオニクワガタ属は 10Ma よりも以前に分化していた (図 2-4)。日本のニシコルリクワガタの生息範囲を網羅する個体から得られた共生酵母は (Sites 16、17、18、24: 表 2-1)、単系統を構成し、クレード II において韓国の種の共生酵母よりも派生的な系統学的位置づけを示した (図 2-3)。一方で、他の日本のルリクワガタ属の共生酵母はクレード I に含まれた (図 2-3)。したがって、クレード II 内における酵母の IGS 配列間の変異が小さいことから、クワガタムシと共生酵母の系統関係の不一致を祖先多型に由来する不完全系統仕分けにより説明するには不十分であると思われる。このことから、共生酵母は韓国の *Pl. hongwonpyoi* あるいはキンオニクワガタからニシコルリクワガタへと水平伝播され

たことが示唆された。

本研究により、クワガタムシの集団内、さらには雌の個体内において起源の異なる2系統の共生酵母を保持していることが新たに判明した(図2-2、図2-3)。集団および個体レベル(GU33)での共生酵母のIGS領域の系統解析の結果、対馬のキンオニクワガタはクレードIIとクレードIIIの異なる2系統の酵母を保持していた。これらの内、クレードIIIの共生酵母は日本のオニクワガタに由来していた(図2-3)。これらのオニクワガタ属2種は10Maよりも早い時期に分化していると思われることから(図2-4)、クレードIIIの共生酵母は日本のオニクワガタから対馬のキンオニクワガタへと水平伝播したと思われる。

#### II-4-2. オニクワガタ属とルリクワガタ属の共生酵母の水平伝播

*Scheffersomyces* 属共生酵母は、宿主の共生器官外でも生存が可能であり、培養も可能である。我々の観察の結果、これらの酵母はクワガタムシが生息する枯死木内でも幼虫の食痕において普遍的に存在しており、単離が可能であった。*Scheffersomyces* 属酵母はキシロース発酵に関与することから、クワガタムシの木質の摂食に関係している可能性が高い(Jeffries et al., 2007; Tanahashi et al., 2010)。また、共生酵母の系統関係は宿主クワガタムシ類の種あるいは属などの分類群と概ね対応していた(図2-2、図2-3)。このような宿主と共生酵母の系統の相同性は、クワガタムシ類で一般的に観察される菌嚢を介した垂直伝播の結果によるものであると考えられる(Tanahashi et al., 2010)。我々の野外での観察から、ルリクワガタ属とオニクワガタ属の種は共通して温帯性の落葉広葉樹林を生息地に選好してことに加えて、同じ枯死木から得られることが多い。実際に、日本と韓国ではこの2属の成虫および幼虫が同じ枯死木から得られることが多く、これらの分類群間での共生酵母の水平伝播が生じている可能性がある(Zhu et al., 2020a)。一方で、オニクワガタ属とルリクワガタ属以外の分類群のクワガタムシは、本研究で認め

られた共生酵母のクレード I、II および III とは異なる独自の系統の酵母を保持することから、同所的に生息する他のクワガタムシ類からオニクワガタ属やルリクワガタ属へと共生酵母が水平伝播した可能性は低いと思われる (Tanahashi et al., 2010; Kubota et al., 2020)。クワガタムシ科以外の昆虫類は一時的にクワガタムシ類の共生酵母を保有、あるいは運搬している可能性もある。そのように他の昆虫を介したクワガタムシ個体間の酵母の水平伝播が生じたとしても、それはクワガタムシからクワガタムシへの伝播と同義であると考えることが可能である (Ueki et al., 2021)。

日本と韓国の種間で共生酵母の伝播が生じたとすれば、過去に同所的に生息していた種間で起きた可能性が高い。しかしながら、現在日本ではニシコルリクワガタとオニクワガタが、韓国では *Pl. hongwonpyoi* とキンオニクワガタがそれぞれ側所的に分布している。したがって、これらの種の過去の分布域を推定することは、酵母の伝播経路を議論する上で非常に重要である。ルリクワガタ属とオニクワガタ属は分散能力が乏しく、地理的な遺伝的分化を示すことから海峡を越えて分散するとは考えにくい (図 2-4; Kubota et al., 2011; Zhu et al., 2020b)。対馬を陸橋として介した日本列島と朝鮮半島の接続は、約 130ka ごろ消失した (Ohshima, 1990; Guedes et al., 2016)。そこで、最終間氷期 (LIG: 約 120–140ka) における対象種の分布域の推定は、4 種の最後の同所的な生息の可能性を推定している (Ueki et al., 2021)。

Ueki et al. (2021) における生態ニッチモデル解析の結果、ニシコルリクワガタと *Pl. hongwonpyoi* は現在および LIG においても潜在的な生息域の重複は認められなかった。また、この 2 種が選好する気候環境についても重複が認められなかった。すなわち、*Pl. hongwonpyoi* とニシコルリクワガタの種間での共生酵母の水平伝播の可能性は非常に低いと考えられる。一方で、キンオニクワガタとニシコルリクワガタは潜在的な分布域の重複が支持されており、特に LIG において九州内での広範囲の重複が示唆されている。LIG におけるキンオニクワガタの生息範囲は九州にまで及ぶと推定されたものの、ニシ

コルリクワガタの生息範囲は対馬や韓国にまで及ばないと推定された。さらに、これらの2種の選好する気候環境には大きな重複が認められた。これらの結果から、日本ではキンオニクワガタとニシコルリクワガタの種間の共生酵母の水平伝播が生じた可能性が示唆される。また、キンオニクワガタはオニクワガタ、ニシコルリクワガタおよび *Pl. hongwonpyoi* よりも幅広い生態学的なニッチの範囲を利用できることが示唆されている (Ueki et al., 2021)。

加えて、LIG においてオニクワガタは日本から対馬にかけて生息していた可能性が支持されており、キンオニクワガタとオニクワガタの生息範囲の重複が示唆された (Ueki et al., 2021)。これらの2種は同属近縁種であることから、両者の間には種間競争や生殖干渉にともなう相互排除が生じると予測される。仮にそのような関係性であれば、この2種は現在の分布の境界に近い対馬から九州にかけて接触していた可能性が高い。このことから、クレード III の共生酵母はオニクワガタとキンオニクワガタの種間において水平伝播された可能性が高い。本研究における共生酵母の系統解析の結果と Ueki et al. (2021) の生息適地推定の結果から、LIG ごろに九州ではキンオニクワガタからニシコルリクワガタに共生酵母クレード II が伝播し、対馬から九州北部においてオニクワガタからキンオニクワガタへと共生酵母クレード III が伝播したと思われる。また、対馬のキンオニクワガタの共生酵母は、クレード II からクレード III へと置換が進行中である可能性がある。

しかしながら、オニクワガタおよびニシコルリクワガタを含む10種の日本のルリクワガタ属は日本では広範囲において同所的に生息するものの、クレード III の酵母を保持するルリクワガタ属はおらず (n=67)、クレード I あるいはクレード II の酵母を保持するオニクワガタ (n=7) はいない (Tanahashi et al., 2010, 2017; Zhu et al., 2020a; Kubota et al., 2020)。このことはルリクワガタ属とオニクワガタの間で酵母の水平伝播が起きる可能性が極めて低いことを示唆する。加えて、ニシコルリクワガタはルリクワガタ *Pl.*

*delicatulus* と同所的に、キュウシュウニセコルリクワガタ *Pl. urushiyamai* やトウカイコルリクワガタ *Pl. takakuwai* と側所的に分布している。しかしながら、ニシコルリクワガタ以外の日本のルリクワガタ属は、ニシコルリクワガタと同一の枯死木から得られた場合でも普遍的にクレード I の共生酵母を保持している。対象的に、日本の一部のルリクワガタ属においては、別種にもかかわらず同一系統の酵母を保持している種も認められる (Kubota et al., 2020)。このことは、近縁種であっても酵母の伝播の有無や伝達経路は多様であることを示唆している。しかしながら、宿主クワガタムシにとって共生酵母の置換がどのような利益をもたらすのかは不明である。韓国においてキンオニクワガタやチョウセンルリクワガタは標高 300m 程度の低山地にも多く生息している。同様に日本列島のルリクワガタ属の中でもニシコルリクワガタは比較的低標高 (標高 400–500m) に多く生息している (Kubota, unpublished)。これらのクワガタムシ類の共生酵母の系統 (図 2-3; クレード II) は高温に対して他のルリクワガタ属の共生酵母の系統 (図 2-3; クレード I) よりも高い耐性を示す (Zhu et al., 2022)。このことから、水平伝播は共生酵母の温度耐性による宿主の生息環境への影響が示唆される (Zhu et al., 2022)。本研究により示唆される共生微生物の多様な伝播経路の解明は、昆虫と微生物共生系の進化動態、特に共進化関係の理解に貢献するものと思われる。

表2-1. 本研究におけるサンプリング地点

Site	Locality	Altitude	Latitude	Longitude
Japan				
1	Yumiharidaira, Nishikawa-machi, Yamagata Pref.	640	38.48	140.01
2	Mt. Takayama, Nikko-shi, Tochigi Pref.	1280	36.75	139.44
3	Mt. Akagunayama, Fujioka-shi, Gunma Pref.	1100	36.15	138.90
4	Irikawa, Chichibu-shi, Saitama Pref.	1300	35.94	138.80
5	Kubo, Dōshi-mura, Yamanashi Pref.	460	35.54	139.09
6	Mt. Kanyudoyama, Yamakita-chō, Kanagawa Pref.	1400	35.51	139.05
7	Mt. Mikuniyama, Kanagawa Pref.	1280	35.40	138.92
8	Mt. kamiyama, Hakone-chō, Kanagawa Pref.	1420	35.23	139.02
9	Haccho-ike, Izu-shi, Shizuoka Pref.	1200	34.85	138.96
10	Mt. Kenashiyama, Nozawaonsen-mura, Nagano Pref.	1330	36.91	138.48
11	Mt. Torikurayama, Ōshika-mura, Nagano Pref.	1640	35.55	138.09
12	Mt. Funayama, Takayama-shi, Gifu Pref.	1470	36.02	137.24
13	Mt. Ōborayama, Tsu-shi, Mie Pref.	770	34.53	136.22
14	Mt. Nagoyadake, Ōdaigaharayama, Ōdai-chō, Mie Pref.	1520	34.19	136.10
15	Mt. Obagamine, Kamikitayama-mura, Nara Pref.	1100	34.23	136.02
16	Mt. Ōginosen, Shin-onsen-chō, Hyōgo Pref.	1000	35.44	134.46
17	Mt. Washigamine, Okinoshima-chō, Shimane Pref.	450	36.26	133.33
18	Mt. Tachieboshiyama, Shōbara-shi, Hiroshima Pref.	1180	35.05	133.07
19	Dosu-tōge Pass, Kamiyama-chō, Tokushima Pref.	1030	33.92	134.29
20	Mt. Marusayama, Mima-shi, Tokushima Pref.	1370	33.87	134.09
21	Mt. Tsurugisan, Miyoshi-shi, Tokushima Pref.	1320	33.87	134.09
22	Mt. Ishizuchisan, Saijo-shi, Ehime Pref.	1430	33.75	133.15
23	Mt. Ishizuchisan, Saijo-shi, Ehime Pref.	1680	33.77	133.12
24	Mt. Fukuchiyama, Nōgata-shi, Fukuoka Pref.	680	33.75	130.80
25	Mt. Hikosan, Hikosan, Soeda-machi, Fukuoka Pref.	960	33.48	130.93
26	Mt. Gakumekisan, Soeda-machi, Fukuoka Pref.	740	33.46	130.91
27	Mt. Yufudake, Beppu-shi, Ōita Pref.	1100	33.28	131.40
28	Mt. Kurodake, Yufu-shi, Ōita Pref.	880	33.12	131.29
29	Mt. Gokaharadake, Ōmura-shi, Nagasaki Pref.	900	32.96	130.08
30	Mt. Unzendake, Unzen-shi, Nagasaki Pref.	1100	32.76	130.28
31	Mt. Ōyanodake, Asogun Minamiasomura, Kumamoto	1100	32.79	131.01
32	Mt. Shiratoriyama, Yatsushiro-shi, Kumamoto Pref.	1480	32.48	131.00
33	Mt. Shiragadake, Asagiri-machi, Kumamoto Pref.	1370	32.16	130.94
34	Mt. Taterasan, Tsushima-shi, Nagasaki Pref.	230	34.15	129.22
35	Mt. Mitake, Tsushima-shi, Nagasaki Pref.	370	34.58	129.38
South Korea				
36	Mt. Hangeryeoung, Gangwon Province I	950	38.09	128.41
37	Mt. Jengoge Pass, Gangwon Prov. II	650	37.79	128.62
38	Birosa, Gyensanbuk Prov.	600	36.94	128.50
39	Mt. Deogyusan, Jeollabuk Prov. I	1600	35.86	127.75
40	Mt. Jeoksangsan, Jeollabuk Prov. II	500	35.97	127.70
41	Mt. Nogodan, Jeollanam Prov.	1430	35.30	127.53

Sites 30-31 and 34-35 are collection sites in this study. Sites 1-6, 8-29, 32-33 from Kubota et al. (2020); Sites 7 and 38 from from Zhu et al. (2020); Sites 36-41 from Tanahashi et al. (2017).

表2-2. 本研究および先行研究で単離された酵母株

Host insect species	Site	Host female no.	Yeast				Insect sequence		
			Strain (number of clones examined)		GenBank accession no.		GenBank accession no.		
			ITS	IGS	ITS	IGS	<i>COI</i>		
<i>Prismognathus dauricus</i> Motschulsky, 1860	34	GU32	YGU32.1(8)	YGU32.1(8)	LC631316	LC631331	LC631346		
		GU33	YGU33.1(5) YGU33.3(3)	YGU33.1(5) YGU33.3(3)	LC631317 LC631318	LC631332 LC631333	LC631347		
	34	GU34	YGU34.1(8)	YGU34.1(8)	LC631319	LC631334	LC631348		
	35	GU36	YGU36.1(6) YGU36.2(2)	YGU36.1(6) YGU36.2(2)	LC631320 LC631321	LC631335 LC631336	LC631349		
			YGU37.1(6) YGU37.2(1) YGU37.3(1)	YGU37.1(6) YGU37.2(1) YGU37.3(1)	LC631322 LC631323 LC631324	LC631337 LC631338 LC631339	LC631350		
	38	C19	YC19.1(1)	YC19.1(1)	(LC492883)***	(LC492885)****	(LC492881)****		
	<i>Prismognathus anguralis</i> Waterhouse, 1874	31	GU24	YGU24.1(1) YGU24.2(5) YGU24.5(2)	YGU24.1(1) YGU24.2(5) YGU24.5(2)	LC631325 LC631326 LC631327	LC631340 LC631341 LC631342	LC631351	
				30	GU25	YGU25.1(4) YGU25.3(3) YGU25.7(1)	YGU25.1(4) YGU25.3(3) YGU25.7(1)	LC631328 LC631329 LC631330	LC631343 LC631344 LC631345
7				C21		YC21.5(1)	YC21.5(1)	(LC492884)***	(LC492886)****
14		W25	YW25.8(3)	YW25.8(8)	(LC133298)*	(LC133309)*			
<i>Platycerus delicatulus</i> Lewis, 1883		2	W65		YW65.2(2)		(LC438669)***	(LC438728)***	
		4	W10		YW10.1(2)		(LC438670)***	(AB426945)**	
	6	W52	YW52.1(1)	YW52.1(2)	(LC133297)*	(LC133308)*	(LC133287)*		
	6	W55		YW55.1(2)		(LC438671)***			
	21	W46		YW46.1(2)		(LC438672)***	(AB426954)**		
	26	W68		YW68.3(4)		(LC438673)***	(LC438729)***		
	26	W72		YW72.2(4)		(LC438674)***			
	27	W61		YW61.2(2)		(LC438675)***	(AB609396)**		
	28	W60	YW60.2(2)	YW60.2(2)	(LC438646)***	(LC438676)***	(AB426955)**		
	<i>ssp. unzendakensis</i> Fujita et Ichikawa, 1982	29	W47		YW47.2(3)		(LC438677)***	(LC438730)***	
29		W51		YW51.1(2)		same as LC438677			
<i>P. kawadai</i> Fujita et Ichikawa, 1982	6	W53	YW53.1(2)	YW53.1(2)	(LC438647)***	(LC438678)***	(LC438731)***		
	6	W56		YW56.1(2)		(LC438679)***			
	8	W03		YW03.1(3)		(LC438680)***	(LC438732)***		
	9	W12		YW12.1(3)		(LC438681)***	(LC438733)***		
	9	W18	YW18.1(2)	YW18.1(2)	(LC438648)***	(LC438682)***			
	11	W70		YW70.3(4)		(LC438683)***	(LC438734)***		
	11	W74		YW74.3(4)		(LC438684)***			
<i>P. acuticollis</i> K. Kurosawa, 1969	2	W07	YW07.8(1)	YW07.8(6)	(LC133296)*	(LC133307)*	(LC133286)*		
	5	W06	YW06.1(2)	YW06.1(4)	(LC438649)***	(LC438685)***	(LC438735)***		
<i>P. albisomni</i> Kubota, Kubota et Otobe, 2008	1	W19	YW19.1(2)	YW19.1(3)	(LC438650)***	(LC438686)***	(AB426970)**		
	1	W21		YW21.1(3)		(LC438687)***			
	10	W22		YW22.1(3)		(LC438688)***	(LC438736)***		
	10	W23		YW23.1(2)		(LC438689)***			
<i>ssp. chichibuensis</i> Kubota, Kubota et Otobe, 2008	3	W08		YW08.1(2)		(LC438690)***	(AB573678)**		
	4	W09		YW09.1(3)		(LC438691)***	(AB426987)**		
	4	W11		YW11.1(3)		(LC438692)***			
<i>P. takakuwai</i> Fujita, 1987	6	W54	YW54.1(2)	YW54.1(2)	(LC438651)***	(LC438693)***	(LC438737)***		
	6	W57		YW57.1(2)		(LC438694)***			
	8	W86		YW86.3(3)		(LC438695)***	(LC438738)***		
	9	W13		YW13.1(3)		(LC438696)***	(LC438739)***		
	9	W17		YW17.1(2)		(LC438697)***			
	11	K01		YK01.1(8)		(LC438698)***			
	11	K02		YK02.1(8)		(LC438699)***	(LC438740)***		
	11	K03		YK03.1(8)		(LC438700)***			
	<i>ssp. akitai</i> Fujita, 1987	12	W69	No colony				(AB609474)**	
12		W73		YW73.3(4)		(LC438701)***			
13		W38		YW38.1(2)		(LC438702)***	(LC438741)***		
13		W64		YW64.1(2)		(LC438703)***			
15		W88		YW88.1(8)		(LC438704)***	(LC438742)***		
<i>ssp. namedai</i> Fujita, 1987	15	W89		YW89.1(8)		(LC438705)***			
	19	W43		YW43.2(2)		(LC438706)***	(AB427025)**		
	19	W82		YW82.3(4)		(LC438707)***			

<i>P. viridicuprus</i> Kubota, Kubota et Otake, 2008	16	W75		YW75.3(4)		(LC438708)***		
	16	W76		YW76.3(4)		(LC438709)***		(AB427017)**
	17	W04		YW04.1(3)		(LC438710)***		
	17	W15	YW15.1(2)	YW15.1(2)	(LC438652)***	(LC438711)***		(LC438743)***
	18	W78		YW78.3(4)		(LC438712)***		
	18	W79		YW79.3(4)		(LC438713)***		(AB609531)**
<i>ssp. kanadai</i> Kubota, Kubota et Otake, 2008	24	W58		YW58.1(2)		(LC438714)***		
	24	W59		YW59.1(2)		(LC438715)***		(AB427032)**
	26	W87		YW87.1(8)		(LC438716)***		(LC438744)***
<i>P. akitaorum</i> Imura, 2007	14	W14		YW14.9(3)		(LC438717)***		
	14	W16	YW16.1(2)	YW16.1(2)	(LC438653)***	(LC438718)***		(AB427035)**
<i>P. sugitai</i> Okuda et Fujita, 1987	20	W44	YW44.1(2)	YW44.1(2)	(LC438654)***	(LC438719)***		
	20	W83		YW83.3(4)		(LC438720)***		(AB588794)**
	22	W81		YW81.3(4)		(LC438721)***		
	22	W84		YW84.3(4)		(LC438722)***		(AB588806)**
<i>P. urushiyamai</i> Imura, 2007	25	W48		YW48.1(2)		(LC438723)***		(AB427045)**
	32	W49		YW49.2(2)		(LC438724)***		(LC438745)***
	33	W50	YW50.1(1)	YW50.1(2)	(LC438655)***	(LC438725)***		(AB609567)**
<i>P. sue</i> Imura, 2007	23	W45	YW45.1(2)	YW45.1(2)	(LC438656)***	(LC438726)***		
	23	W80	YW80.3(2)	YW80.3(4)	(LC438657)***	(LC438727)***		(AB588778)**
<i>P. hongwonpyoi</i> Imura et Choe, 1989	36	W36	YW36.1(1)	YW36.1(7)	(LC133288)*	(LC133299)*		(LC133280)*
(from South Korea)	37	W34	YW34.8(1)	YW34.8(5)	(LC133289)*	(LC133300)*		(LC133281)*
			YW34.2a(1)	YW34.2a(3)	(LC133290)*	(LC133301)*		
	38	W33	YW33.8(3)	YW33.8(8)	(LC133291)*	(LC133302)*		(LC133282)*
	39	W05	YW05.8(1)	YW05.8(8)	(LC133292)*	(LC133303)*		(LC133283)*
		W24	YW24.1(1)	YW24.1(4)	(LC133293)*	(LC133304)*		
	40	W37	YW37.8(1)	YW37.8(8)	(LC133294)*	(LC133305)*		(LC133284)*
	41	W35	YW35.8(1)	YW35.8(8)	(LC133295)*	(LC133306)*		(LC133285)*
<i>Lucanus cervus</i> (Linnaeus, 1758)					(LC120355)			
<i>L. maculifemoratus</i> Motsulsky, 1861		W28	YW28.1(2)		(LC438658)***			
		W31	YW31.1(2)		(LC438659)***			
<i>Dorcus parallelipedus</i> (Linnaeus, 1758)					(LC120356)			
<i>D. striatipennis</i> (Motsulsky, 1861)		W29	YW29.2(2)		(LC438660)***			
		W40	YW40.1(2)		(LC438661)***			
<i>D. rubrofemoratus</i> (Vollenhoven, 1865)		W27	YW27.1(2)		(LC438662)***			
		W41	YW41.1(2)		(LC438663)***			
<i>D. rectus</i> (Motsulsky, 1857)		W01	YW01.2(2)		(LC438664)***			
<i>D. montivagus</i> (Lewis, 1883)		W26	YW26.1(2)		(LC438665)***			
<i>D. hopei binodulosus</i> Waterhouse, 1874		W42	YW42.1(2)		(LC438666)***			
<i>D. titanus pilifer</i> Vollenhoven, 1861		W63	YW63.1(2)		(LC438667)***			
<i>Figulus binodulus</i> Waterhouse, 1873		W71	YW71.1(2)		(LC438668)***			
(Yeast Species)								
<i>Sheffersomyces segobiensis</i> (Santa Maria & C. Garcia)			JCM10740		(LC120358)	(LC133310)		
<i>S. stipitis</i> (Pignal)			CBS6054		(CP000497)			
<i>S. coipomensis</i> (Ramirez & Gonzalez)			JCM8916		(LC120359)			
<i>S. lignosus</i> (Kurtzman)			JCM9837		(LC120360)			
<i>S. shehatae</i> (H.R. Buckley & van Uden)			JCM9840		(LC120361)			
<i>S. insectosa</i> (Kurtzman)			JCM9842		(LC120362)			
<i>Candida quercitrusa</i> S. A. Meyer & Phaff					(AM158924)			
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i> (Zopf) Lodder & Kreger-van Rij			MTCC_234		(AHBE01000021)			

Accession numbers in parentheses have already been published in previous studies. \*, from Tanahashi et al. (2017). \*\*, from Kubota et al. (2010); Kubota & Kubota (2011); Kubota et al. (2011). \*\*\*, from Kubota et al. (2020). \*\*\*\*, from Zhu et al. (2020).

表2-3. 本研究で使したプライマー

Name	Sequence (5'-3')	Strand direction	Usage*	Reference
NS7	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	Forward	P, S	White et al. (1990)
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	Forward	S	White et al. (1990)
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	Reverse	P	White et al. (1990)
IGS1	GCCTTGTTGTTACGATCTGC	Forward	P, S	Tanahashi et al. (2017)
IGS2	ACCGTTTCCCGTCCGATCAAC	Reverse	S	Tanahashi et al. (2017)
IGS3	TCCCACTACACTACTCGGTC	Forward	S	Tanahashi et al. (2017)
IGS4	GAGACAAGCATATGACTAC	Reverse	P, S	Tanahashi et al. (2017)
IGS7i	GAAGAGAGTTTAATGGTGAAC	Forward	S	Tanahashi et al. (2017)
IGS8i	G TTCACCATTAAACTCTCTCC	Reverse	S	Tanahashi et al. (2017)
C1-J-2183	CAACATTTATTTTGATTTTTTGG	Forward	P, S	Simon et al. (1994)
L2-N-3014	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	Reverse	P, S	Simon et al. (1994)

\*: P, PCR; S, sequencing analysis.

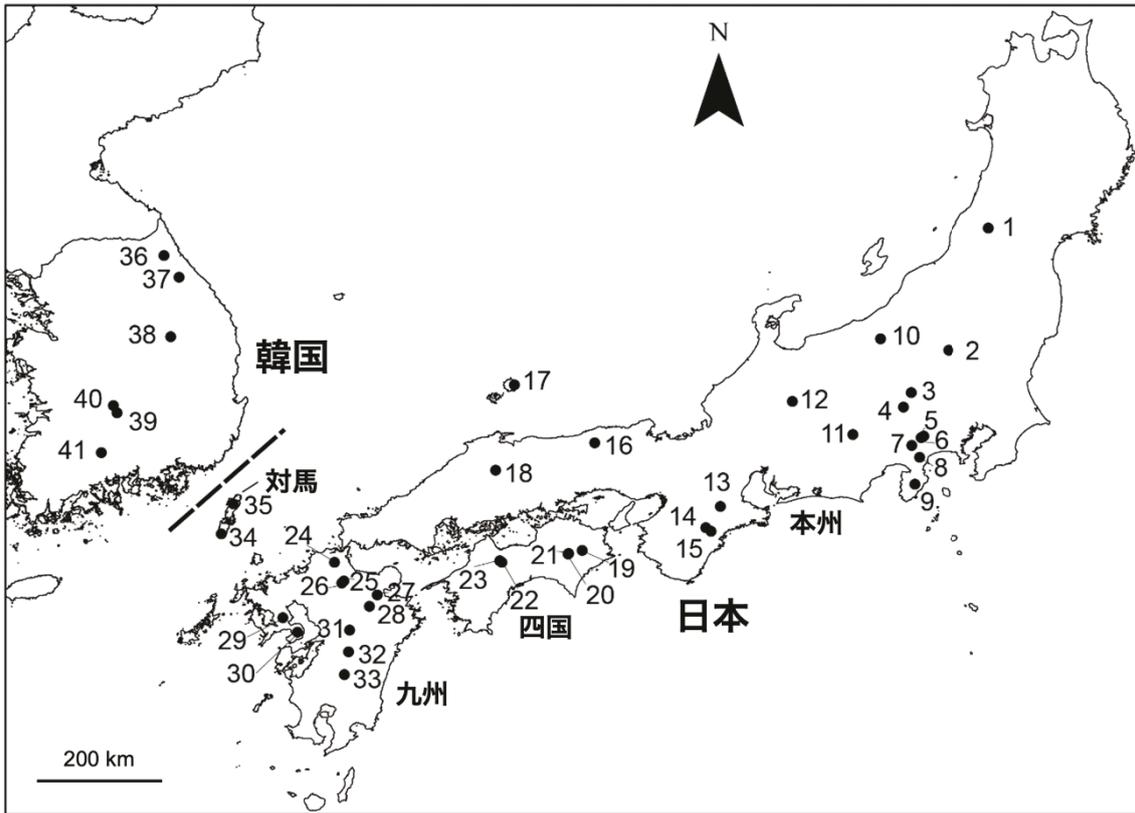


図 2-1. 本研究で使用了試料のサンプリング地点 (Kubota et al., 2020 and Zhu et al., 2020 のサンプルを含む)。

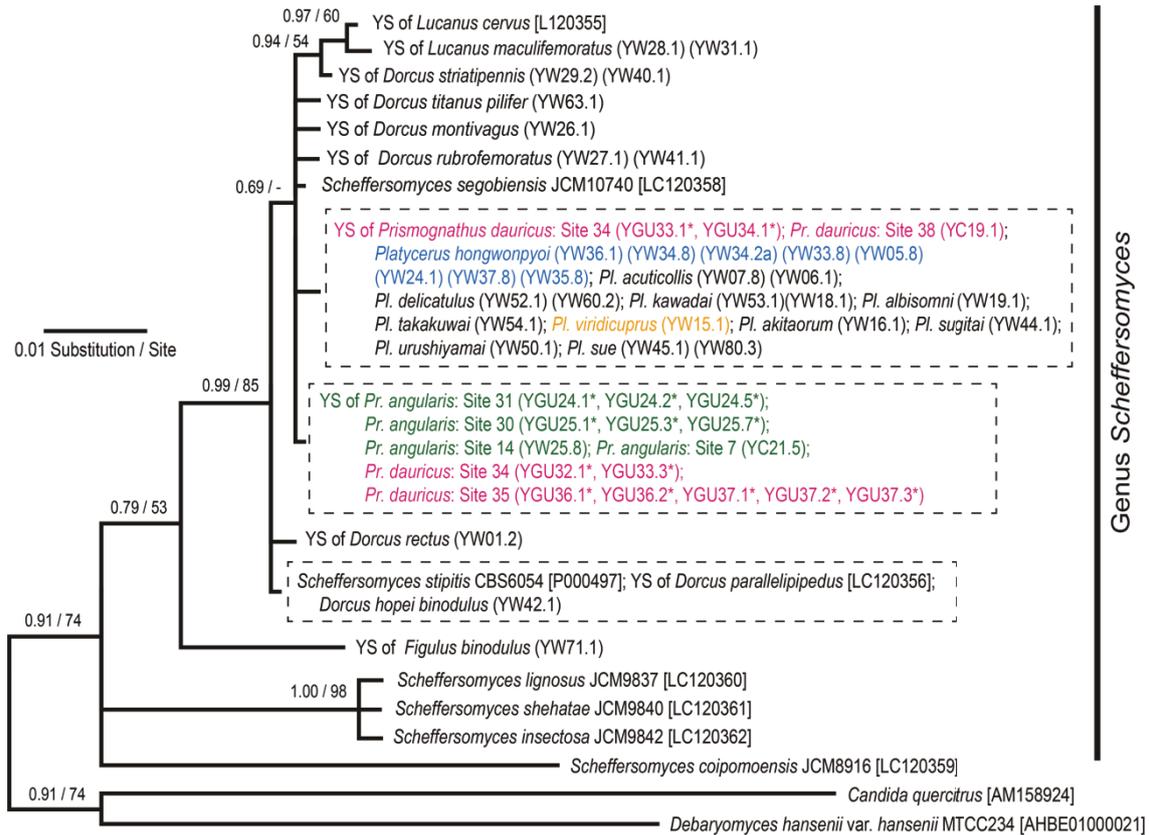


図 2-2. ITS 配列に基づくルリクワガタ属 *Platycerus*、オニクワガタ属 *Prismognathus* およびその他のクワガタムシの共生酵母と一部の酵母種のベイズ系統樹。ノードの数字はベイズ (BI) の事後確率 (> 50%) / 最尤法 (ML) のブートストラップ確率 (> 50%) を示す。YW、YGU、YC に続く数字は雌の個体番号と酵母のコロニー番号を示す (表 2-2 参照)。破線枠は宿主クワガタムシの複数種に共通する ITS ハプロタイプを示す。\* は本研究で決定した配列を示す。Kakusan 4 により HKY 85 + Gamma model (BI) と GTR + Gamma model (ML) が最適置換モデルとして選択され、BI と ML の系統樹は周辺枝を除いて同一であった。

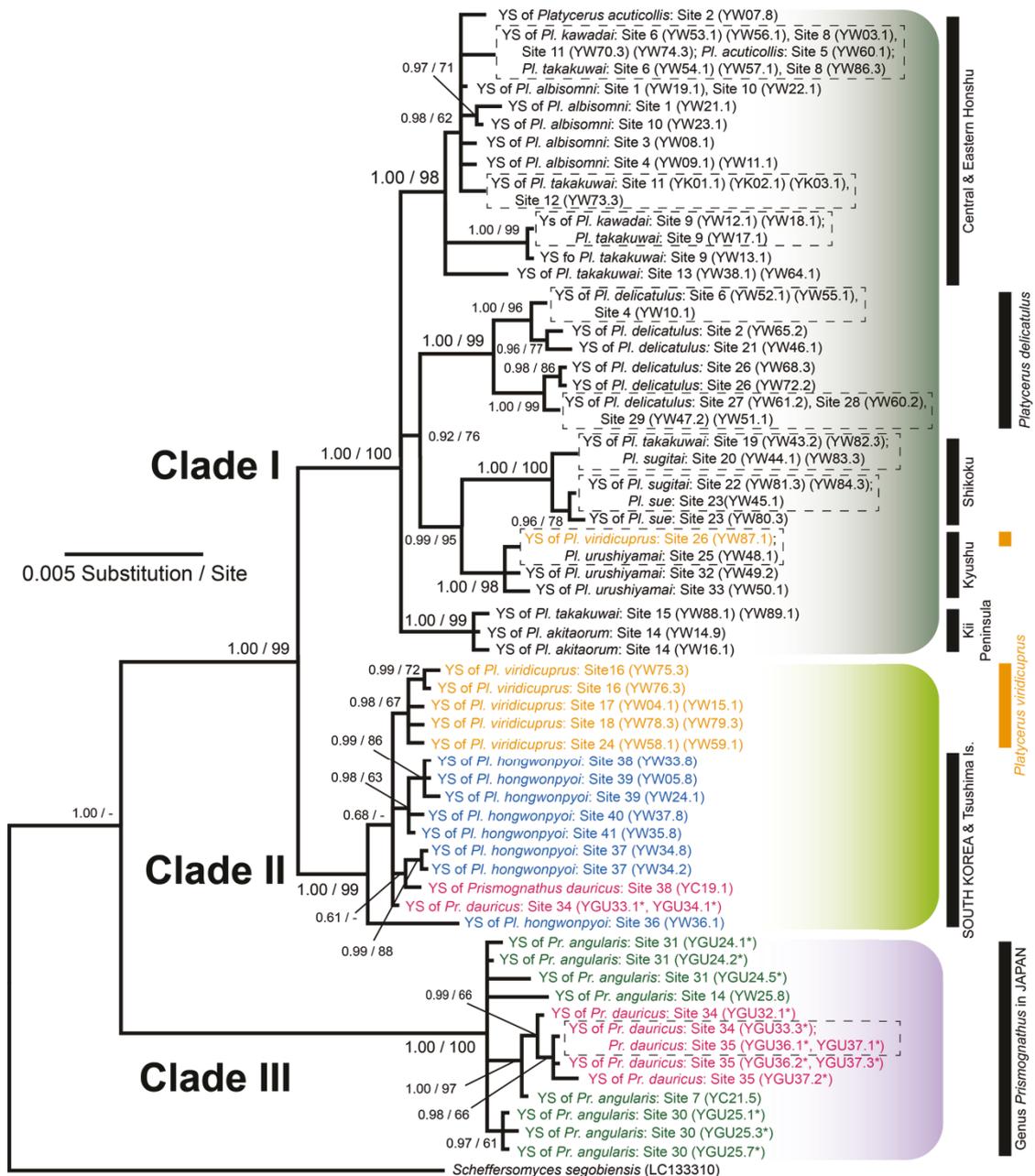


図 2-3. IGS 配列に基づくルリクワガタ属 *Platycerus*、オニクワガタ属 *Prismognathus* の共生酵母のベイズ系統樹。ノードの数字はベイズ (BI) の事後確率 (> 50%) / 最尤法 (ML) のブートストラップ確率 (> 50%) を示す。YW、YGU、YC に続く数字は雌の個体番号と酵母のコロニー番号を示す (表 2-2 参照)。破線枠は宿主クワガタムシの複数個体に共通する IGS ハプロタイプを示す。\*は本研究で決定した配列を示す。Kakusan 4 により HKY 85 + Gamma model (BI) と GTR + Gamma model (ML) が最適置換モデルとして選択され、BI と ML の系統樹は周辺枝を除いて同一であった。

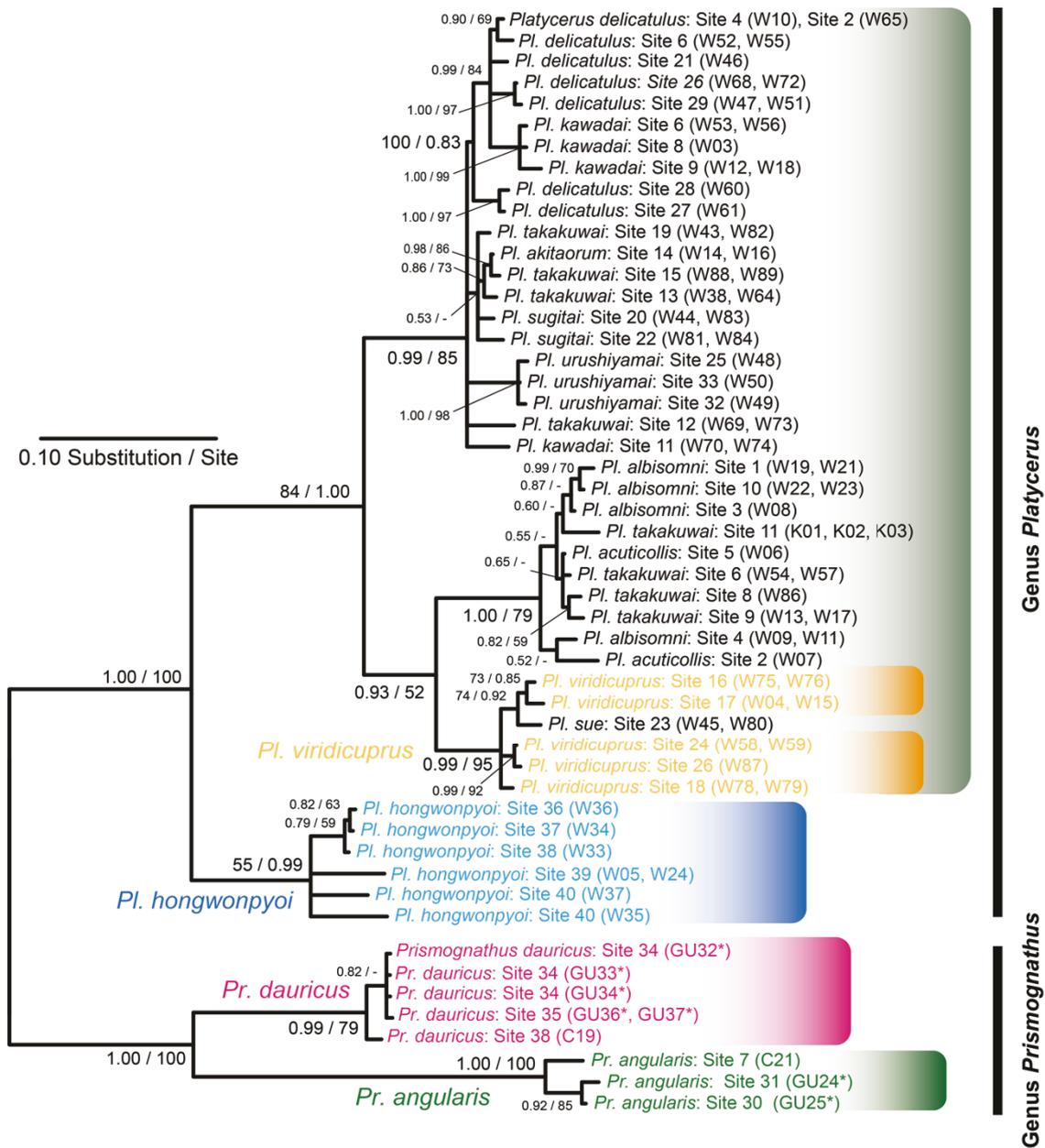


図 2-4. COI 配列に基づくルリクワガタ属 *Platycerus*、オニクワガタ属 *Prismognathus* のベイズ系統樹。ノードの数字はベイズ (BI) の事後確率 (>50%) / 最尤法 (ML) のブートストラップ確率 (>50%) を示す。W、GU、C に続く数字は雌の個体番号を示す (表 2-2 参照)。破線枠は宿主クワガタムシの複数個体に共通する IGS ハプロタイプを示す。\*は本研究で決定した配列を示す。Kakusan 4 により HKY 85 + Gamma Invariant model (BI) と GTR + Gamma model (ML) が最適置換モデルとして選択され、BI と ML の系統樹は周辺枝を除いて同一であった。

### 第 III 章

ヒメオオクワガタの分子系統地理と  
寄主樹木ブナの分布変遷との関係

### III-1. 背景

日本列島の生物相は高い種多様性と固有性をもち、生物の種多様性における「世界的ホットスポット」として扱われている (Marchese, 2015; Tojo et al., 2017)。このような日本列島における生物多様性の高さの背景の一つとして、亜寒帯から亜熱帯に至る気候帯と、それにとまなう多様な植生帯の存在が挙げられる。特に多様な植生帯を有する日本列島において中核を成す植生が、最も広域に分布する冷温帯落葉広葉樹林である (Shimizu, 2014)。日本列島における冷温帯落葉広葉樹林の分布は、更新世の氷期-間氷期サイクルにより形成されてきた (Momohara, 2016)。寒冷な氷期には現在よりも南方もしくは海岸沿いの低標高域へと分布域を移動させた一方で、温暖な間氷期には北方へと拡大するとともに高標高域へと分布域を移動させてきた (Tsukada, 1983, 1985)。このように更新世における気候変動は冷温帯林を構成する樹種の分布を変動させ、種内の遺伝的多様性と集団遺伝構造に強く影響を及ぼしてきたことが示唆されている (Tsuda & Ide, 2005; Okaura et al., 2007; Sugahara et al., 2011)。樹木と被食-捕食の関係にある植食性昆虫も気候変動の影響を寄主樹木とともに受け、同様の分布変遷を辿ったと考えられる (Aoki et al., 2009; Shoda-Kagaya et al., 2010; Drag et al., 2018)。冷温帯落葉広葉樹林に生息する植食性昆虫の遺伝構造が寄主樹木との相互作用により形成された過程を解明することは、日本列島の生物種群の遺伝的多様性の創出機構を理解する上でも重要である。

ブナ *Fagus crenata* は、日本の冷温帯落葉広葉樹林において優占する樹種であり (Horikawa, 1972)、ブナを主体に構成される森林はブナ林と呼ばれる。日本列島のブナ林の分布の中心は、北海道南部から中部地方までの日本海側であり、人工的な土地利用により分布域が分断・縮小されてはいるものの、現在においても標高 200–1,400 m の範囲に広域かつ連続的に分布している。一方で、中部地方の太平洋側から四国、九州地方にかけてのブナ林の多くは各山岳域の標高 1,000 m 以上に隔離分布している (National Conservation Bureau, Ministry of the Environment, 1999)。花粉化石分析から最終氷期最寒

冷期には、ブナ林は北緯 38 度より南の海岸に沿って日本海側と太平洋側に分断されたレフュジアに退避していた (Tsukada, 1982a, 1982b)。その後の気候の温暖化と湿潤化にともないブナ林は東北日本ではより北進し、西南日本ではより高標高地域へと隔離分布し、現在の分布を形成するに至った。このようなブナ林の分布変遷はブナの遺伝的変異や遺伝構造の地理的傾向に強く影響を及ぼしてきた (Tomaru et al., 1997, 1998; Fujii et al., 2002; Okaura & Harada, 2002; Hiraoka & Tomaru, 2009)。

更新世の気候変動にともなうブナ林の歴史的な分布変遷はブナの遺伝構造だけでなく、ブナ林を選好する生物種群の遺伝的多様性や集団遺伝構造にも影響を及ぼしてきたことが予想される。植食性昆虫をはじめとした哺乳類や鳥類など幅広い分類群において、ブナ林に依存あるいはブナ林を主な生息地として選好する種が確認されている (Murai et al., 1991)。これまでの研究において、これらのブナ林棲生物種を対象とした分子系統地理学的研究が実施されてきたものの (Ohnishi et al., 2009; Kubota et al., 2011; Gasca-Pineda et al., 2020)、ブナ林に強く依存する生物種を対象としていなかった。そのため、日本列島の冷温帯林を代表する樹木であるにもかかわらず、ブナとの歴史的な相互作用がブナ依存の生物種の分子系統地理学的構造に及ぼした影響の解明には至っていない。

ヒメオオクワガタ *Dorcus montivagus* は、ブナを専食する日本固有のクワガタムシである。本種の雌成虫は、白色腐朽菌によって朽ちたブナ大径木の枯死木に好んで産卵し、孵化した幼虫はブナ枯死木を摂食し、枯死木内で成虫に変態する (Okajima & Araya, 2012)。ブナ枯死木を専食するという典型的な狭食性を示す本種の分布は、ブナ林のほぼ南限に位置する熊本県の白髪岳を分布の南限とし、本州、四国、そして北海道の渡島半島にかけて日本列島におけるブナ林の分布と概ね一致するように棲息する (Ueki & Tojo, 2018)。このことから、本種の移動分散スケールはブナ林の分布に強く制限されてきたと考えられる (上木・東城, 2019; Ueki & Tojo, 2023)。

第 III 章では、ミトコンドリア遺伝子およびゲノムワイドな一塩基多型 (SNPs) を用いて、ヒメオオクワガタの分布域を網羅する種内の系統分化、遺伝的変異の地理的パターンおよび集団動態を解明した。そして、ヒメオオクワガタの系統地理学的構造と既知のブナの遺伝的変異の地理的構造と比較した。さらに、両者の現在から中期完新世までの複数の時間断面の潜在的な生息適地を推定した。これらの結果から、ヒメオオクワガタは宿主であるブナと同じように更新世の気候変動の影響を受けて、地理的な遺伝構造や遺伝的分化が形成されてきた過程について究明する。

## III-2. 方法

### III-2-1. 研究材料および試料からのゲノム DNA 抽出

2016 年から 2021 年の期間において、日本全国のブナ林をほぼ網羅するサンプリングを行い、64 地点より 239 個体のヒメオオクワガタを採集した。サンプリング地点およびその詳細を図 3-1、表 3-1 に示す。また、系統解析の外群として用いるために同属近縁種のアカアシクワガタ *Dorcus rubrofemoratus* とコクワガタ *Dorcus rectus* を採取した (Hosoya, 2011; Hao & Chang-Chin, 2013)。採集したサンプルは 100%EtOH で固定した後、胸部あるいは脚部筋肉の一部を摘出し、全ゲノム DNA を抽出・精製した。全ゲノム DNA 抽出および精製に関しては、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden) を用い、製品プロトコルに準じて行った。

### III-2-2. mtDNA の遺伝子解析

得られた全ゲノム DNA を鋳型に mtDNA cytochrome c oxidase submit I (*COI*) 領域と 16SrRNA 領域の配列を表 3-2 に示したプライマーを PCR 法によって増幅した。mtDNA の *COI* 領域と 16SrRNA 領域の PCR プロトコルは先行研究に従って、以下の方法を実

行した (Kim & Farrell, 2015; Zhu et al., 2018)。COI 領域の PCR では、94°Cで3分間のプレヒート後、94°Cで1分間の熱変性、48°Cで1分間のアニーリング、72°Cで1分間の伸長を1サイクルとする反応を30サイクル行った後、72°Cで7分間のファイナルエクステンションを行い、4°Cで保存した。16SrRNA 領域の PCR は、94°Cで1分30秒間のプレヒート後、94°Cで1分間の熱変性、48°Cで1分間のアニーリング、72°Cで1分間の伸長を1サイクルとする反応を40サイクル行った後、72°Cで3分間のファイナルエクステンションを行い、4°Cで保存した。

PCR 産物の精製には ExoProSTAR (GE Healthcare, Buckinghamshire) を用い、シーケンス反応においては BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, California) を用いて蛍光ラベリングを行った。これらの反応には、Applied Biosystems 2720 サーマルサイクラー (Applied Biosystems, California) を用いた。この後、ABI 3130xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, California) を用いて塩基配列を解析した。シーケンス後の塩基配列については、CLC Workbench software (CLC bio, Aarhus) と MEGA ver. 7.0.26 (Kumar et al., 2016) を用いてアセンブリとアライメント作業を行った。解析サンプル間の塩基配列のアライメントには MAFFT v7.490 (Katoh & Standley, 2013) を用いた。

### III-2-3. ゲノムワイドな一塩基多型 (SNPs) の遺伝子解析

ヒメオオクワガタの分布域を網羅する 62 地点 183 個体の全ゲノム DNA を用いて、トヨタ自動車株式会社 (愛知、日本) が開発した GRAS-Di 法 (Genotyping by Random Amplicon Sequencing-Direct; 特許 ID P2018042548A; Hosoya et al., 2019) によるジェノタイプ解析を実施した。ライブラリー調整および塩基配列の決定は、ライセンス契約に基づき株式会社ジーンベイが実施した。Ito et al. (2020) に従って 64 のランダムプライマーによる PCR 増幅、および 2nd PCR により実施した。個体ごとに増幅されたすべ

でのアンプリコンは、次世代シーケンサーIllumina HiSeq 2000 を用いて配列を決定した。GRAS-Di データは、fastq v. 0.21 (Chen et al., 2018) を用いてクオリティチェックをした後に、fqtools v. 2.3 (Droop, 2016) によりリードの長さを 100bp にトリミングした。処理したショートリードは、Stacks v. 2.55 (Catchen et al., 2011) に実装された de novo アセンブリパイプラインを用いて解析し、全個体に共通する遺伝子座を Stacks を用いて抽出した。共通する遺伝子座同士をまとめる際の塩基置換に基づく最大許容距離を M=3 に指定し、それ以外は既定の設定により Stacks の手順に従ってリードを解析した。また、Stacks パイプラインの最後のプログラムでは、全サンプルに共有する SNPs を含むようにフィルタリングした。加えて、mtDNA および SNPs に基づく分子系統解析により明確に区別される 2 つのクレード (クレード I: 北海道、本州全域および四国の集団から構成される; クレード II: 九州の集団のみから構成される) のそれぞれにおいても、同様の設定で de novo アセンブリパイプラインを用いて、それぞれのクレード内の全個体に共通する遺伝子座を Stacks を用いて抽出した。

#### III-2-4. mtDNA の分子系統解析および分岐年代推定

DnaSP v.6.12.03 (Rozas et al., 2017) を用いて、mtDNA の各領域のハプロタイプ行列を構築した。整理したハプロタイプ配列を用いて、最尤法およびベイズ推定法に基づく系統樹を構築した。各系統解析の塩基置換モデルの選択にはソフトウェア 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った。最尤系統樹は、RAxML v. 8.2.9 (Stamatakis, 2014) を用いて構築した。各ノードにおける信頼度は、1,000 回のブートストラップ複製を用いて評価した。ベイズ系統樹は、MrBayes v.3.2.6 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) を用いて構築した。MCMC 解析を 100,000,000 世代繰り返し、1,000 回毎にサンプリングを行い、Tracer v1.6 (Rambaut et al., 2018) を用いて各推定パラメーターの要約統計量を確認した

後に、最初の 10%の世代を定常状態に達していない世代と仮定して解析から取り除いた。作成した系統樹は、FigTree ver. 1.4.4 (Rambaut, 2018) を用いて可視化および編集した。

ヒメオオクワガタのクレード間の分岐年代を推定するために、*COI* 領域および 16SrRNA 領域の結合配列を基に、BEAST2 ver. 2.6.6 を用いて Relaxed Bayesian molecular clock 解析を実行した (Bouckaert et al., 2014) 。分岐年代の較正には、Papadopoulou et al. (2010) により算出された以下の甲虫目の分子時計を用いた。*COI* 領域は 100 万年あたり 1.77%の塩基置換率を仮定し、16SrRNA 領域は 100 万年あたり 0.54%の塩基置換率を仮定して分岐年代を推定した。Kakusan4 (Tanabe, 2007) を用いて、最適モデルの選択を行った後に、Bayesian MCMC 解析を 1000 回毎にサンプリングを行い 100,000,000 世代繰り返し実行した。Tracer v1.6 (Rambaut et al., 2018) を用いて各推定パラメーターの要約統計量を確認した後に、最初の 10%の世代を定常状態に達していない世代と仮定して解析から取り除いた。作成した系統樹は、FigTree ver. 1.4.4 (Rambaut, 2018) を用いて可視化および編集した。

### III-2-5. SNPs の分子系統解析および集団遺伝構造解析

ジェノタイピング解析を実施した全サンプルで共有されていた遺伝子座に含まれる SNPs (4,545 SNPs) の内の invariant sites を raxml\_ascbias.py スクリプトを用いて除去し (Martin, 2018)、得られた 1,508 SNPs を基に最尤法およびベイズ推定法に基づく系統樹を構築した。各系統解析の塩基置換モデルの選択には、ModelTest-NG v. 0.2.0 (Darriba et al., 2019) を用いて、Akaike's entropy based Information Criterion (AIC; Akaike, 1974) により最適モデルの選択を行った。最尤系統樹は、RAxML-NG v. 1.1 (Kozlov et al., 2019) を用いて構築した。各ノードにおける信頼度は、1,000 回のブートストラップ複製を用いて評価した。ベイズ系統樹は、MrBayes v.3.2.7 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) を用いて

構築した。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 v1.6 (Rambaut et al., 2018) を用いて各推定パラメーターの要約統計量を確認した後に、最初の 25%の世代を定常状態に達していない世代と仮定して解析から取り除いた。作成した系統樹は、FigTree ver. 1.4.4 (Rambaut, 2018) を用いて可視化および編集した。SNPs データセットを基に ADMIXTURE (Alexander et al., 2009) を用いて、ヒメオオクワガタの集団遺伝構造の解析を実施し、得られた結果を CLUMPAK (Kopelman et al., 2015) を用いて視覚化した。ジェノタイピング解析を実施した全サンプルで共有されていた遺伝子座に含まれる SNPs に加えて、それぞれのクレード内の全サンプルで共有される遺伝子座に含まれる SNPs に基づいて ADMIXTURE 解析を実施した。ADMIXTURE 解析は集団を K=2 から K=10 の間で遺伝的にクラスタリングし、最適な K を Cross Validation error により求めた。最小の Cross Validation error を示した際の K を ADMIXTURE 解析における最適な遺伝的クラスタリング数とした。

### III-2-6. 遺伝的多様性および空間的遺伝構造の解析

分子系統解析により検出された各系統について、mtDNA および SNPs の遺伝的多様性を算出した。mtDNA に基づく各系統のハプロタイプ数 ( $H_n$ )、ハプロタイプ多様度 ( $hd$ ) およびヌクレオチド多様度 ( $\pi$ ) は、DnaSP v. 6.12.03 (Rozas et al., 2017) を用いて算出した。また空間的な遺伝的変異を視覚化するために、QGIS 3.16.9-Hannover (Quantum GIS Development Team, 2021) を用いて mtDNA *COI* 領域のヌクレオチド多様度に基づくヒートマップを作成した。北海道、本州全域および四国の集団から構成されるクレード I については、Hukushima et al. (1995) により定義された日本のブナ林の植物社会学的な群集区分に基づいて、ブナ林以北の集団も含むブナーチシマザサ群集、ブナークロモジ群集、ブナーズタケ群集、ブナーヤマボウシ群集およびブナーシラキ群集 (九州を除く) の 5 つの地理的まとまりを示すグループに区分し (図 3-1)、各グルー

プにおける遺伝的多様性も算出した。POPART version 1.7 (Leigh & Bryant, 2015) を用いて mtDNA の *COI* 領域と 16SrRNA 領域に基づく Median-joining ハプロタイプネットワークを構築した。また、SNPs に基づく各地理的グループのアリル数 (Num)、有効アリル数 (Eff\_num)、観察されたヘテロ接合度 (Ho)、集団内のヘテロ接合度 (Hs) を GENODIVE v. 3.0.6 (Meirmans, 2020) を用いて算出した。

全個体で共通する遺伝子座に含まれる SNPs および各個体の地点情報に基づいて、距離による隔離の帰無モデルの下で集団間の遺伝的な類似度が期待よりも早く減衰する地域を推定する手法である EEMS (Estimated Effective Migration Surfaces: Petkova et al., 2016) により遺伝子流動と遺伝的多様性の空間的パターン視覚化した。EEMS に実装された bed2diffs により各個体間の遺伝的非類似度を算出した。生息域を 600 のデームグリッドに等分し (デームの密度パラメータ  $nDemes = 600$ )、各個体を最も近接するデームグリッドにグループ化した。EEMS は 3 つの独立した MCMC 解析により実行し、9,999 回の間引き間隔で 10,000,000 回繰り返し、バーンインを 1,000,000 とした。EEMS に実装された R EEMS plots を用いて、3 つの MCMC 解析が同じ局所最適解に収束しているか確認し、地理的な有効移入率 ( $m$ ) と有効多様性 ( $q$ ) を可視化した。

### III-2-7. 集団動態解析

mtDNA の配列を基に、中立性の検定を行い、過去の集団サイズの変化と中立性の乖離を解明した。各クレードについて Arlequin ver. 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) を用いて、過去に生じた集団動態を示す統計値である Tajima's  $D$  (Tajima, 1989) と Fu's  $FS$  (Fu, 1997) を算出した。同様にクレード I 内の 5 つの地理的なグループについても以上の 2 つの統計値を算出した。クレード I 内の 5 つのグループとクレード II における、有効集団サイズ ( $N_e$ ) の歴史的な集団動態を推定するために BEAST 2 ver. 2.6.6 (Bouckaert et al., 2014) を用いて、Bayesian skyline plot 解析を実行した。Bayesian skyline plot 解析は、

mtDNA の COI 領域と 16SrRNA 領域の結合配列に基づいて実行した。塩基置換率の仮定には、分岐年代推定で用いたものと同じ分子時計を用いた (Papadopoulou et al., 2010)。Bayesian MCMC 解析を、クレード I のブナーチシマザサ群集およびブナースズタケ群集では、10,000 回毎のサンプリングで 1,000,000,000 世代、ブナークロモジ群集およびブナーシラキ群集では、1,000 回毎のサンプリングで 100,000,000 世代、ブナーヤマボウシ群集では、8,000 回毎のサンプリングで 800,000,000 世代繰り返し実行した。クレード II では 2,000 回毎にサンプリングを行い 200,000,000 世代繰り返し実行した。Tracer v1.6 (Rambaut et al., 2018) を用いて各推定パラメーターの要約統計量を確認した。

### III-2-8. 生息適地推定と分布変遷が集団間の遺伝的分化に及ぼす影響の検定

現在のヒメオオクワガタとブナの地点情報に基づいて CCSM4 および MIROC-ESM の気候モデルから、現在、中期完新世 (約 6 ka)、最終氷期最寒冷期 (LGM: 約 21 ka) および最終間氷期 (LIG: 約 12 ka) における気候的に適した潜在的な生息適地をソフトウェア MAXENT v. 3.4.4 (Phillips & Dudík, 2008) を用いて推定した。ヒメオオクワガタの分布地点情報は、自身が採集したサンプルの地点を使用した。ブナの分布地点情報は、環境省が実施した自然環境保全調査第 5 回植生調査を基に全国のブナ林を抽出した (National Conservation Bureau, Ministry of the Environment, 1999)。それぞれの地点情報は、半径 20km の範囲に複数地点が含まないように間引き、解析に用いる分布情報の地理的な偏りをなくした。環境データとしては、WorldClim における 19 個の「Bioclimatic factors」を用いて、最初に現在の分布域を予測し、Bioclimatic factors の貢献度を推定した。最終的な解析にはモデル推定への貢献度が高く、互いに相関が少ない 5 つのパラメーター (BIO2 = Mean Diurnal Range、BIO5 = Max Temperature of Warmest Month、BIO7 = Temperature Annual Range、BIO17 = Precipitation of Driest Quarter、BIO18 = Precipitation of Warmest Quarter) を用いて複数時間断面における潜在分布域を推定した。100 回のブ

ートストラップ解析による平均値を採用し、その他はデフォルトの設定で解析し、最終的な解析結果において両種とも高い AUC 値（ヒメオオクワガタ: AUC = 0.987、ブナ: AUC = 0.954）が得られたため、本解析結果として採用した。

ヒメオオクワガタの集団間の遺伝的分化に対する、距離による隔離（IBD: Isolation by distance; Wright, 1943）および生息適地あるいはブナ林の接続性の抵抗（IBR: Isolation by resistance; McRae, 2006）が及ぼす影響を検定した。まず、mtDNA *COI* 領域に基づく集団間の遺伝的分化の程度 ( $F_{st}$ ) を、Arlequin ver. 3.5（Excoffier & Lischer, 2010）を用いて算出した。また、全個体で共通する SNPs データセット（4,545 SNPs）に基づく集団間の遺伝的分化の程度 ( $F'_{st}$ ) を、GENODIVE v. 3.0.6（Meirmans, 2020）を用いて算出した。集団間の地理的な距離は、Matrix Generator ver. 1.2.3（Ersts, 2011）により計算した。生息適地などの景観的要素における面的な広がり、歴史的に大きく変化するため、遺伝子流動に対する抵抗性は時間断面によって変異に富む。そこで、集団間の景観的要素における歴史的な抵抗性を以下の方法により算出した。まず、それぞれの種において複数の時間断面の潜在生息適地を示すマップを QGIS 3.16.9-Hannover（Quantum GIS Development Team, 2021）を用いて合成した。合成する際の各時間断面の重み付けは、現在を 25%、中期完新世を 25%（CCSM4: 12.5%、MIROC: 12.5%）、LGM を 25%（CCSM4: 12.5%、MIROC: 12.5%）、LIG を 25%とした。次に、得られた合成マップを基に、circuitscape v.4.0（McRae et al., 2008）を使用して、ヒメオオクワガタの集団間における生息適地およびブナ林の接続性の程度を数値化した。これらの接続性の程度は、抵抗値として算出され、集団間の生息適地あるいはブナ林が連続している場合の抵抗値は小さい値を示す。一方で、集団間の生息適地あるいはブナ林が不連続である場合の抵抗値はより大きな値を示す。そして、ヒメオオクワガタ集団間の遺伝的分化と 3 要因の値（地理的距離、生息適地の接続性、およびブナ林の接続性）の間に相関があるかどうかを回帰分析により検定した。

### III-3. 結果

#### III-3-1. mtDNA に基づく分子系統解析と分岐年代推定

239 個体から mtDNA *COI* 領域 (808 bp) に基づく 126 ハプロタイプを検出した。また、231 個体から mtDNA 16SrRNA 領域 (934 bp) に基づく 72 ハプロタイプを検出した (表 3-1)。*COI* と 16SrRNA の塩基配列を組み合わせたデータセットに基づくベイズ推定と最尤法による系統解析の結果、ヒメオオクワガタ種内には大きく異なる 2 つの系統が認められた (図 3-2)。クレード I は北海道、本州全域および四国の集団からなり、クレード II は九州の集団のみから構成された。クレード I 内には、主に日本海側の集団から構成されるサブクレード I-A と主に太平洋側の集団から構成されるサブクレード I-B に系統分化した (図 3-2)。サブクレード I-A は、北海道、東北地方、中部地方日本海側および紀伊半島の全集団、中国地方のほとんどの個体、中部地方太平洋側の一部の個体、四国地方東部 (St. 52) の集団から構成された。サブクレード I-B は、中部地方の太平洋側の個体、四国地方西部 (St.53、54) の集団、中国地方の 1 個体から構成された (図 3-2)。

ヒメオオクワガタの mtDNA の配列に基づく分岐年代推定の結果を図 3-2 に示す。クレード I とクレード II の分岐年代は、1.85 Ma (95%HPD: 2.59 – 1.20 Ma) と推定された。また、サブクレード I-a とサブクレード I-b が分岐した年代は 0.91 Ma (95%HPD: 1.26 – 0.60 Ma) と推定された。クレード II 内における遺伝的分化は 0.86 Ma (95%HPD: 1.19 – 0.54 Ma) と推定された。これらの結果に基づき、ヒメオオクワガタの各系統内における遺伝的多様化は約 1.0 Ma 以降に生じたと思われる。

#### III-3-2. SNPs の分子系統解析および集団遺伝構造解析

de novo 解析によりヒメオオクワガタ全個体に共通する遺伝子座を抽出した結果、4,545 SNPs を含む 772 遺伝子座を取得した。また、クレード I の全個体に共通する遺伝子座を抽出した結果、5,100 SNPs を含む 1,190 遺伝子座を取得した。一方で、クレード II の全個体に共通する遺伝子座を抽出した結果、9,584 SNPs を含む 3,595 遺伝子座を取得した。得られた SNPs に基づく分子系統解析の結果、mtDNA の分子系統解析の結果と同様に、北海道、本州全域および四国の集団から構成されるクレード I と九州の集団のみから構成されるクレード II のそれぞれの単系統性が強く支持された (図 3-3)。また、クレード I 内には最尤法による支持率が低いものの、以下の 4 つのサブクレードが認められた。サブクレード I-a は北海道、東北および中部地方の日本海側の集団から構成された。サブクレード I-b は中部地方および四国の集団から構成された。サブクレード I-c は中国地方の集団から構成された。また、サブクレード I-d は紀伊半島の集団から構成された。

全個体に共通する遺伝子座に含まれる 4,545 SNPs に基づく ADMIXTURE 解析の結果、 $K=2$  のときに分子系統解析の結果と同じく北海道、本州全域および四国の集団からなる遺伝的クラスター (クレード I) と九州の集団のみからなる遺伝的クラスター (クレード II) が明確に区別された (図 3-4a)。クレード I の全個体に共通する遺伝子座に含まれる 5,100 SNPs に基づく ADMIXTURE 解析の結果、 $K=2$  のときに日本海側と太平洋側の集団間で地理的な遺伝的分化が認められた (図 3-4b)。また、日本海側の集団においては、中部地方以南の集団において太平洋側の遺伝的クラスターの割合が増加する地理的なクラインが認められた (図 3-5a)。また、クレード I の ADMIXTURE 解析において、 $K=5$  が最適な遺伝的クラスタリングであった (図 3-6)。 $K=5$  のとき、クレード I 内の日本海側の集団においては、北海道から東北の集団からなる遺伝的クラスターと中国地方の集団からなる遺伝的クラスターが認められた。一方で、クレード I 内の太平洋側の集団においては、中部地方西部と四国の集団からなる遺伝的クラスター、中部地方

東部の集団からなる遺伝的クラスター、および紀伊半島の集団からなる遺伝的クラスターが認められた。また、中部地方の日本海側の集団においては、日本海側と太平洋側の遺伝的クラスターの混合が認められた (図 3-4b、3-5b)。一方で、クレード II の全個体に共通する遺伝子座に含まれる 9,584 SNPs に基づく ADMIXTURE 解析の結果、最適な遺伝的クラスタリングは  $K=2$  のときであり (図 3-6b)、九州北部と九州南部の集団間で地理的な遺伝的分化が認められた (図 3-4c)。また、九州中部の集団においては 2 つの遺伝的クラスターの混合が認められた (図 3-5)。

### III-3-3. 遺伝的多様性および空間的遺伝構造

mtDNA における各系統およびクレード I 内の 5 つの地理的なグループの遺伝的多様性は、16SrRNA 領域よりも *COI* 領域の方が高かった (表 3-3)。サブクレード I-A の遺伝的多様性は、サブクレード I-B およびクレード II よりも低い傾向を示した。クレード I 内において、ブナ林以北およびブナ-チシマザサ群集に分布する集団から構成されるグループ (SK-F) は、最も多くの個体を含むにも関わらず、遺伝的多様性が最も低い値を示した (表 3-3)。また、*COI* 領域のヌクレオチド多様度に基づくヒートマップの結果、遺伝的多様性には地理的な勾配がみられ、東北日本では低いものの、西南日本では高かった (図 3-7)。一方で、西南日本においても、紀伊半島および九州北部など一部の集団においてヌクレオチド多様度が低かった。mtDNA に基づくハプロタイプネットワーク解析の結果、東北地方以北の多くの集団は少数のハプロタイプに由来した (図 3-8、図 3-9)。また *COI* 領域に基づくハプロタイプネットワークから、東北以北の集団は主要なハプロタイプ (H1、H2) から一塩基置換で派生する少数のハプロタイプから構成された (図 3-8)。また、*COI* 領域における主要ハプロタイプ H2 は東北地方、中部地方および中国地方の集団間で、主要ハプロタイプ H1 は東北地方と北海道の集団間でそれぞれ共有されていた (図 3-8)。一方で、中部地方以南の集団では、地域特異的なハプロタイ

プが多数検出された。加えて、中部地方以南の太平洋側の集団では、仮想ハプロタイプを介したループ構造を示す多数のハプロタイプが地域的なまとまりを示した (図 3-8)。

4,545 SNPs に基づく遺伝的多様性は、mtDNA のそれと同様に東北日本では低く、西南日本で高くなる傾向が認められた (表 3-4、図 3-10b)。有効アレル数 (Eff\_num)、観察されたヘテロ接合度 (Ho) および集団内のヘテロ接合度 (Hs) は、ブナ林以北の集団およびブナーチシマザサ群集に分布する集団から構成される地理的グループ (SK-F) で最も低く、ブナーヤマボウシ群集に分布する集団から構成される地理的グループ (C-F) で最も高い値を示した (表 3-4)。EEMS の結果、日本海側と太平洋側の集団間の有効移入率 ( $m$ ) が負の値を示した (図 3-10a)。このことは、日本海側の集団と太平洋側の集団の間における遺伝子流動の障壁の存在を示唆する。また、西南日本においては集団の地理的まとまりの間においても、有効移入率が負の値を示した (e.g., 中部地方太平洋側と紀伊半島の間、紀伊半島と四国の間)。同様に九州内においても、集団間の移入率が負の値を示した (図 3-10a)。一方で、東北以北の集団においては広範な遺伝子流動が推定された。EEMS による空間的な遺伝的多様性 ( $q$ ) は、mtDNA と同様に西南日本では高いものの、東北日本では低くなる傾向が認められた (図 3-10b)。また、西南日本でも中国地方では遺伝的多様性が低かった。

#### III-3-4. 集団動態解析

mtDNA に基づく各クレードの中立性検定の結果、サブクレード I-A は 16SrRNA 領域の Tajima's  $D$ 、および  $COI$  領域と 16SrRNA 領域の Fu's  $F_s$  において有意な負の値を示した ( $p < 0.01$ ; 表 3-3)。一方で、サブクレード I-B は  $COI$  領域と 16SrRNA 領域の Fu's  $F_s$  のみが有意な負の値を示した ( $p < 0.01$ )。同様に、クレード II も  $COI$  領域と 16SrRNA 領域の Fu's  $F_s$  のみが有意な負の値を示した ( $COI$ :  $p < 0.01$ ; 16SrRNA:  $p < 0.05$ )。クレード I 内の地理的まとまりを示す 5 つのグループにおける中立性検定の結果、ブナ林以北の集

団およびブナーチシマザサ群集に分布する集団から構成されるグループ (SK-F) のみが、Tajima's  $D$  ( $COI$  領域:  $p < 0.05$ ) と Fu's  $F_s$  ( $COI$  領域:  $p < 0.01$ ) がともに有意な負の値を示した (表 3-3)。また、ブナーヤマボウシ群集に分布する集団から構成されるグループ (C-F) とブナーシラキ群集に分布する集団から構成されるグループ (SJ-F; クレード II の九州の集団を除く) は、Fu's  $F_s$  ( $COI$ :  $p < 0.01$ ; 16SrRNA:  $p < 0.05$ ) において有意な負の値を示した。Bayesian skyline plot 解析の結果、ブナ林以北の集団およびブナーチシマザサ群集に分布する集団から構成されるグループのみが、約 0.02 Ma からの急速な集団拡大が支持された (図 3-11a)。また、ブナーヤマボウシ群集に分布する集団からなるグループ、ブナーシラキ群集に分布する集団からなるグループ、および九州の集団からなるクレード II は、約 0.15 Ma からの緩やかな集団拡大が支持された (図 3-11d-f)。一方で、ブナクロモジ群集に分布する集団からなるグループとブナースズタケ群集に分布する集団からなるグループは、顕著な集団拡大を示さなかった (図 3-11b-c)。

### III-3-5. 生息適地推定と分布変遷が集団間の遺伝的分化に及ぼす影響の検定

潜在的な生息適地推定の結果、ブナ林の生息適地の範囲内にヒメオオクワガタの生息適地が含まれ、両者の複数時間断面における生息適地が概ね合致した (図 3-12、図 3-13)。また、現在、中期完新世 (6 Ka)、および最終間氷期 (LIG; 120 Ka) の温暖な期間においては、両者とも北海道南部まで分布を北上させるとともに、日本列島の内陸部や山地への分布拡大が認められた (図 3-12a-b、図 3-12d、図 3-13a-b、図 3-13d)。一方で、最終氷期最寒冷期 (LGM; 21 Ka) においては、両者ともに生息適地が北緯 40 度以南に後退し、本州および四国では日本海側と太平洋側の沿岸部へと分布が分断されたことが示唆された (図 3-12c、図 3-13c)。また、九州を中心とした西南日本では、東北日本と比較して歴史的な分布域の変動が小さいことが認められた。

mtDNA  $COI$  領域に基づく集団間の遺伝的分化 ( $F_{st}$ ) と地理的距離、および集団間の

遺伝的分化と生息適地あるいはブナ林の接続性の抵抗のペアワイズ空間遺伝図を図 3-14 に示す。クレード I および II はともに、集団間の遺伝的分化と地理的な距離の間に相関が認められた ( $p=0.001$ ; 図 3-14a-b)。クレード I においては集団間の遺伝的分化と生息適地の接続性の抵抗値の間には、1%有意水準の場合に相関が認められた (図 3-14c)。一方で、クレード II においては集団間の遺伝的分化と生息適地の接続性の抵抗値の間には、0.1%有意水準での相関が認められた (図 3-14d)。また、両クレードともに、集団間の遺伝的分化とブナ林の接続性の抵抗の間には、有意な相関が認められた ( $p=0.001$ ; 図 3-14e-f)。SNPs に基づく集団間の遺伝的分化 ( $F^{st}$ ) と地理的距離、および集団間の遺伝的分化と生息適地あるいはブナ林の接続性の抵抗のペアワイズ空間遺伝図を図 3-15 に示す。クレード I では、集団間の遺伝的分化と地理的距離、および集団間の遺伝的分化と生息適地あるいはブナ林の接続性の抵抗の間に相関関係が認められた ( $p=0.001$ ; 図 3-15a、図 3-15c、図 3-15e)。一方で、クレード II においては、集団間の遺伝的分化と地理的距離、および集団間の遺伝的分化とブナ林の接続性の抵抗の間には、5%有意水準での相関関係が認められた (図 3-15b、図 3-15f)。しかしながら、集団間の遺伝的分化と生息適地の接続性の抵抗の間には、相関関係が認められなかった (図 3-15d)。

#### III-4. 考察

##### III-4-1. ヒメオオクワガタの分子系統地理

本研究における mtDNA と SNPs の分子系統解析の結果から、ヒメオオクワガタは北海道、本州全域および四国の集団から構成されるクレード I と九州の集団のみから構成されるクレード II の 2 系統群に大きく分化していることが明らかになった (図 3-2、図 3-3)。ヒメオオクワガタの九州に分布する集団は、北海道、本州および四国に分布する集団よりも体型が太短く、体表がより艶消しを帯びる形態的特徴の違いから亜種キュウ

シュウヒメオオクワガタ *D. m. adachii* として区別されている (Fujita & Ichikawa, 1987)。クレード I とクレード II は約 1.85 Ma ごろに系統分化し (図 3-2)、その後クレード II は九州内陸の山地に隔離されたことで中国地方や四国の集団と二次的に接触することなく、遺伝的かつ形態的に大きく分化したと考えられる。同様に他のブナ林棲クワガタムシ類 (Hosoya et al., 2001; Kubota et al., 2011) に加えて、山地棲サンショウウオ類 (Nishikawa et al., 2007) や温帯林を構成する樹木 (Tsuda et al., 2009) など多くの分類群において九州の集団とそれ以外の地域集団との遺伝的分化が知られている。このような山地棲生物種群に共通する系統分化パターンは海峡やその他の地理的障壁の形成による地史的隔離に起因すると考えられる。加えて、九州内陸の山地は更新世の気候変動下において山地棲生物種群にとって隔離された主要なレフュジアであったことが示唆された。

ヒメオオクワガタの遺伝的多様度は、中部地方以南の集団においては高い多様度を示すものの、東北地方以北の地域集団では急激に多様度が減少する (図 3-7、図 3-10b; 表 3-3、表 3-4)。またハプロタイプネットワーク解析から東北地方以北の集団では、中核をなすハプロタイプとこのハプロタイプから数塩基置換までのハプロタイプで構成されている (図 3-8、図 3-9)。このようなネットワークは、東北地方以北の集団は比較的短い時間の中で集団サイズが大きくなり、限られたハプロタイプから派生した分化の浅いハプロタイプのみから構成されている集団であることを示唆する。一方で、中部地方以南の集団からは東北地方の集団と比較して多様なハプロタイプが検出されるとともに、ループ構造を示すネットワークを構築した (図 3-8)。このようなネットワークは、中部地方以南の集団が歴史的に長期間安定していることを示唆する。中立性テストからサブクレード I-A やブナーチシマザサ群集以北に分布する集団など主に中部地方以北の集団における近年の集団拡大が支持されている (表 3-3)。加えて、Bayesian skyline plot analysis においてもブナーチシマザサ群集以北に分布する集団における約 2 万年前から

の急激な集団拡大が支持されている (図 3-11a)。このことからヒメオオクワガタは氷期後の北方の温暖化と湿潤化にともない、中部地方以南のレフュジアから北東日本へと集団拡大したことが示唆された。一般に温帯地域の生物種群では、温暖な地域が氷期のレフュジアであったため、温暖な地域は寒冷な地域よりも遺伝的多様性が高い傾向が認められる (Hewitt, 1996, 2000)。遺伝的多様性が東北日本では低く、西南日本では高くなるという遺伝的変異の地理的な勾配は、日本列島の温帯地域に棲息する様々な生物種群で知られており (Hiraoka & Tomaru, 2009; Ohnishi et al., 2009; Oshida et al., 2009; Kubota et al., 2011; Sakaguchi et al., 2011)、ヒメオオクワガタも典型的な温帯棲生物種群の遺伝的特性を備えていることが明らかになった。

ヒメオオクワガタの日本海側集団と太平洋側の遺伝的分化は約 1.0Ma から始まったと推定され (図 3-2)、41 kyr 周期だった氷期-間氷期サイクルが 100 kyr 周期へと変化し、寒冷化と温暖化がより顕著になった更新世中期遷移と合致する (Zachos et al., 2001)。中期更新世以降の氷期には、冷温帯落葉樹林は日本海側と太平洋側の沿岸部のレフュジアへと退避した (Tsukada, 1983, 1985)。約 1.0Ma の更新世中期遷移以降は温暖かつ湿潤な環境を好む冷温帯林が日本海側と太平洋側の沿岸部にそれまでよりも長い期間分断され、ヒメオオクワガタの遺伝的分化も促進されたと思われる。また、SNPs による集団遺伝学的解析の結果からも、クレード I における日本海側と太平洋側の集団の地理的な遺伝的分化および遺伝子流動の障壁が認められた (図 3-4、図 3-10a)。このようなヒメオオクワガタの日本海側集団と太平洋側集団の遺伝的分化の要因は、更新世中期以降の氷期-間氷期サイクルの変化にともなう冷温帯林の分断が引き起こした遺伝子流動の制限に由来すると思われる。

SNPs における分子系統解析および集団遺伝学的解析から、中部地方を中心とした日本海側と太平洋側の遺伝的分化に加えて、中国地方および紀伊半島の集団が他の集団から遺伝的に分化し、地理的まとまりを示した (図 3-3、図 3-4)。また LGM の潜在的な

生息適地の推定結果から、西南日本におけるヒメオオクワガタの分布域は中部地方の日本海側や太平洋側、中国地方や紀伊半島などの複数の地理的まとまりに分断されていることが示唆された (図 3-12c)。加えて、EEMS 解析の結果から、西南日本におけるこれらの地理的まとまりの間には、遺伝子流動の障壁があることが支持された (図 3-10a)。このことはヒメオオクワガタにとって LGM の主要なレフュジアであったと思われる西南日本の内部においても、地理的なまとまりを示す独立した複数のレフュジアが存在した *refugia within refugia* 理論 (Gómez & Lunt, 2007) を示唆するものである。九州の集団を含めた西南日本の地域集団は遺伝的多様性が、東北日本の集団と比較して高いことに加えて (表 3-3、表 3-4)、比較的長い時間をかけての集団サイズの緩やかな拡大が示唆される地域もあるものの、LGM 以降の急激な集団拡大は認められなかった (図 3-11)。西南日本のブナ林は、後氷期の温暖化にともない、より冷涼な環境を求めて内陸の高標高地域へと移動しただけで、中部地方以北のブナ林のように北東へと分布拡大しなかったと考えられている (Tomaru et al., 1998)。このことから西南日本においては、氷期と間氷期を通じて安定したサイズの集団が長期間維持されてきたと思われる。特に九州などの標高の高い山地が少ない地域では、後氷期の温暖化の過程において高標高域へと退避できなかったブナ林の局所的な消失が生じた結果、現在の九州のブナ林は中央部から南部へと跨る脊梁山地にはまとまって大きな規模で分布するのに対して、九州北部では小さな山地ごとに孤立分布すると思われる。そのためクレード II のハプロタイプネットワークは、局所集団の消失を示唆するミッシングハプロタイプを介したネットワーク構造が形成されたと考えられる (図 3-8、図 3-9)。

#### III-4-2. ブナの地理的な遺伝構造との比較

ヒメオオクワガタと寄主植物であるブナとの歴史的な相互作用の影響を評価するために、本研究で明らかになったヒメオオクワガタの系統地理学的構造とブナの地理的遺伝構造 (Tomaru et al., 1997, 1998; Fujii et al., 2002; Hiraoka & Tomaru, 2009) を比較した。加えて、本研究における両者の歴史的な生息適地推定の結果と花粉化石分析から推定されるブナ林の LGM におけるレフュジアとその後の移住ルート (Tsukada, 1982a, 1982b) から両者の分布変遷を検討した。ブナのアロザイムと SSR の集団内変異 (Tomaru et al., 1997; Hiraoka & Tomaru, 2009) は、日本海側の集団において南西から北東に向かって低下し、ヒメオオクワガタの遺伝的多様性の地理的勾配と合致する (表 3-3、表 3-4; 図 3-7、3-10b)。さらに、生息適地推定の結果、両者ともに LGM には北緯 40 度以南のレフュジアに分布が後退していたが、後氷期には北方へと急速に分布を拡大させたことが示唆された (図 3-12、図 3-13)。これらの結果から、両者の北東地域の集団における遺伝的変異の減少は、日本海側において LGM 以後の気候の温暖化および湿潤化にともなうブナ林の北方への急速な分布拡大が引き起こした創始者効果が考えられる。加えて、最終氷期には北限のレフュジアほど寒冷かつ乾燥化が厳しかったためブナ林の生育環境が悪く、それにともないヒメオオクワガタの集団サイズも減少したことで遺伝的浮動の影響が強くなったためであると考えられる (戸丸, 2013)。加えて、ヒメオオクワガタの中部地方以北の日本海側集団においては東北日本への LGM 以降の急速な集団拡大が支持されている (図 3-11a)。またブナの葉緑体遺伝子 (Fujii et al., 2002) およびヒメオオクワガタのクレード I において、東北地方から中国地方にかけて日本海側の集団から検出される共有ハプロタイプは (図 3-8、図 3-9)、日本海側のレフュジアに由来する特定の集団の近年の北方への分布拡大を反映していると考えると上手く説明が可能である。一方で、西南日本においては、ヒメオオクワガタの遺伝構造は地域ごとに分化し、地理的まとまりを示す (図 3-4、図 3-5)。同様にブナの葉緑体遺伝子でも西南日本の集団における地域的なハプロタイプのまとまりをもつ (Fujii et al., 2002)。このことから氷期に

は太平洋側を中心とした西南日本において、地域ごとに複数のブナ林のレフュジアの存在が示唆され、ヒメオオクワガタも各レフュジアへと退避したと思われる。加えて、ほとんどのハプロタイプが各地域固有であったことから、西南日本のブナ林では後氷期には内陸の山地へ移動するのみで北方への分布拡大をしなかったという推定とも合致する (Tomaru et al., 1998)。

ブナの地理的な遺伝構造の大きな特徴は、日本海側の系統と太平洋側の系統の大きく2つの系統に分化する点である (Fujii et al., 2002; Okaura & Harada, 2002; Hiraoka & Tomaru, 2009)。ヒメオオクワガタでは、mtDNA においては完全ではないものの日本海側と太平洋側の集団の遺伝的分化が認められた (図 3-2)。また、SNPs では日本海側と太平洋側の集団間で遺伝的分化が認められたことに加えて、日本海側の集団においても中部地方以南の西南日本においては太平洋側の遺伝的クラスターの割合が増加する地理的クラインが認められた (図 3-4)。ブナの SSR に基づく結果からも、日本海側と太平洋側の遺伝的分化のみならず、ヒメオオクワガタと同様の日本海側の集団における遺伝的クラスターの地理的クラインが認められている (Hiraoka & Tomaru, 2009)。これらの結果から、ヒメオオクワガタの地理的な遺伝的分化は、ブナのそれと強く合致することが明らかになった。さらに、ヒメオオクワガタとブナの歴史的な生息適地推定の結果から、両者は現在のような温暖な期間には北海道南部まで分布を北上させるとともに、内陸部へと分布を拡大させた一方で、LGM には北緯 40 度以南へと後退し、日本海側と太平洋側の沿岸部へと分布が分断されることが推定された (図 3-12、図 3-13)。これらの結果から、寄主樹木であるブナに同調したヒメオオクワガタの分布変遷が示唆された。また、花粉化石分析に基づく Tsukada (1985) の LGM における植生図では、ブナを含む冷温帯落葉広葉樹林が北緯 38 度以南の日本海側と太平洋側の沿岸部に分断分布したことが推測されており、本研究における生息適地の推定結果と概ね合致する。SNPs に基づく ADMIXTURE 解析の結果、中部地方の日本海側集団では遺伝的クラスターの混合が認

められた (図 3-5b)。同様にブナの SSR の結果においても、日本海側と太平洋側の集団を分断するような地理的障壁がない中部地方では遺伝的クラスタの混合がみられる (小山, 2013)。生息適地推定の結果から、ヒメオオクワガタはブナとともに LGM 以降に日本海側と太平洋側の沿岸部のレフュジアから中部地方内陸部への分布拡大し、集団間の遺伝子流動が生じたと思われる (図 3-12、図 3-13)。

#### III-4-3. ヒメオオクワガタの遺伝的分化の創出機構

ヒメオオクワガタの集団間の遺伝的分化と地理的距離、および集団間の遺伝的分化と生息適地あるいはブナ林の接続性の抵抗の間には基本的に正の相関関係が認められた (図 3-14、図 3-15)。これらの結果は、ヒメオオクワガタの集団間の遺伝子流動の頻度は、地理的距離が遠くなるにつれて減少するのみならず、集団間の生息適地あるいはブナ林が歴史的に不連続になるにつれて、遺伝子流動の頻度も減少することを示す。西南日本では、氷期-間氷期の気候変動サイクル下においても生息適地およびブナ林の分布域の変動は小さく、安定していたものの、地域や山塊ごとに隔離分布していたと推測される (図 3-12、図 3-13)。このことから、西南日本では集団間のブナ林が歴史的に不連続であったために、地理的に近い集団間でも遺伝的に分化したと考えられる。一方で、東北日本においては、氷期-間氷期の気候変動サイクル下における生息適地およびブナ林の分布域の変動が大きかったと推測された (図 3-12、図 3-13)。特に LGM においては、東北以北のヒメオオクワガタ集団もブナ林の後退にともなって、北緯 40 度付近のレフュジアへと逃避したと思われる。このことから、東北日本では集団間のブナ林が歴史的に連続していたため、集団間の遺伝子流動の頻度も高かったと考えられる。

ブナとヒメオオクワガタの系統地理学的構造の一致およびヒメオオクワガタの集団間の遺伝的分化の程度とブナ林の歴史的な分布様式との相関関係は、寄主樹木の分布変遷は木材穿孔性昆虫も移動分散を制限し、その遺伝的多様性の地理的構造にも強く影響

を及ぼしてきたことを示唆する。また、ブナと同様に降水量の多い地域を好むスギ *Cryptomeria japonica* も氷期には日本海側と太平洋側の沿岸部のレフュジアに分断分布し (Tsukada, 1982c)、日本海側と太平洋側の集団の間で遺伝的な分化が認められることに加えて (Tsumura et al., 2012)、スギの木材穿孔甲虫であるスギカミキリ *Semanotus japonicus* の遺伝的変異も宿主スギの遺伝的分化と対応関係がある (Shoda et al., 2003)。このことから冷涼かつ湿潤な環境を好む日本列島の樹木は、寒冷かつ乾燥化が卓越する氷期には日本海側と太平洋側の沿岸部のレフュジアへと分断分布し、植食性昆虫も寄主樹木に同調した分布変遷を経てきたという共通性の高い進化史が推測される。本研究の結果は、温帯域の生物種群における、系統地理学的構造の創出プロセス、特に更新世の気候変動にともなうハビタットの縮小や拡大が集団間の遺伝子流動に及ぼす影響の理解に貢献する成果と思われる。

表3-1. 本研究における試料の採取地点と遺伝情報

Site no. and locality name	ブナ群集 <sup>a</sup>	Latitude (N)	Longitude (E)	Alt. (m)	COI				16SRRNA				SNPs					
					Haplotype	(N)	hd	$\pi$	Haplotype	(N)	hd	$\pi$	(N)	Num	Eff <sub>num</sub>	Ho	Hs	
St. 1 Toishiyama, Sapporo Minami-ku, Hokkaido	Northern	43.00	141.27	567	H1	(3)	0.000	0.000	0.000	h1	(3)	0.000	0.000	(2)	1.050	1.035	0.027	0.027
St. 2 Nishinosawa, Suisugun Kuronatsumatcho, Hokkaido	SK-F	42.64	140.26	472	H1	(3)	0.000	0.000	0.000	h1	(3)	0.000	0.000	(2)	1.044	1.033	0.024	0.025
St. 3 Garou, Shimamagun Shimamakimura, Hokkaido	SK-F	42.60	139.98	528	H1	(3)	0.000	0.000	0.000	h1	(3)	0.000	0.000	(2)	1.044	1.032	0.024	0.025
St. 4 Matsue, Okushirigun Okushiricho, Hokkaido	SK-F	42.12	139.48	396	H1	(3)	0.000	0.000	0.000	h1	(3)	0.000	0.000	(2)	1.043	1.031	0.024	0.023
St. 5 Sakaeno, Nishigun Oboecho, Hokkaido	SK-F	42.05	140.27	667	H1	(1)	0.667	0.003	0.003	h1	(1)	1.000	0.002	(2)	1.043	1.031	0.024	0.023
					H2	(2)				h2	(1)							
					H3	(1)				h3	(1)							
St. 6 Hyoriyamacho, Hakodate, Hokkaido	SK-F	41.83	141.00	403	H1	(2)	0.000	0.000	0.000	h1	(2)	0.000	0.000	(2)	1.042	1.030	0.024	0.022
St. 7 Hayakawa, Hyamagun Kaminokunicho, Hokkaido	SK-F	41.58	140.13	605	H1	(3)	0.000	0.000	0.000	h1	(3)	0.000	0.000	(2)	1.048	1.035	0.024	0.028
St. 8 Tomari, Kamikotungun Rokkashomura, Aomori	SK-F	41.06	141.35	349	H1	(2)	0.667	0.003	0.003	h1	(2)	0.667	0.002	(2)	1.047	1.034	0.025	0.026
					H2	(1)				h3	(1)							
St. 9 Hitsumorimachi, Nishitsugun Ajiigasawamachi, Aomori	SK-F	40.57	140.12	424	H2	(2)	0.000	0.000	0.000	h2	(1)	1.000	0.001	(2)	1.047	1.035	0.025	0.027
					H3	(1)				h3	(1)							
St. 10 Okuse, Towada, Aomori	SK-F	40.54	140.90	646	H2	(2)	0.667	0.001	0.001	h3	(3)	0.000	0.000	(2)	1.053	1.039	0.029	0.030
					H3	(1)				h3	(3)							
St. 11 Moriyoishi, Kitaakita, Akita	SK-F	40.00	140.62	708	H2	(3)	0.000	0.000	0.000	h3	(3)	0.000	0.000	(2)	1.057	1.041	0.030	0.032
St. 12 Nishine, Iwategun Shizukushicho, Iwate	SK-F	39.75	140.83	909	H2	(1)	1.000	0.002	0.002	h3	(3)	0.000	0.000	(2)	1.065	1.045	0.034	0.036
					H4	(1)												
St. 13 Sawauchikabata, Wagagun Nishiwagamachi, Iwate	SK-F	39.52	140.76	596	H1	(1)	1.000	0.004	0.004	h1	(2)	0.667	0.002	(2)	1.064	1.046	0.037	0.035
					H2	(1)				h3	(1)							
					H6	(1)												
St. 14 Etsunagi, Miyako, Iwate	SK-F	39.52	141.57	922	H1	(2)	0.667	0.003	0.003	h1	(2)	0.667	0.002	(2)	1.063	1.044	0.035	0.034
					H2	(1)				h3	(1)							
St. 15 Sawauchizumizawa, Wagagun Nishiwagamachi, Iwate	SK-F	39.46	140.71	835	H2	(2)	0.667	0.004	0.004	h1	(1)	1.000	0.003	(2)	1.071	1.050	0.039	0.039
					H7	(1)				h4	(1)							
St. 16 Isawakayanagi, Oshu, Iwate	SK-F	39.14	140.79	697	H1	(1)	0.667	0.003	0.003	h1	(1)	1.000	0.003	(2)	1.066	1.046	0.035	0.036
					H2	(2)				h3	(1)							
					H5	(1)				h5	(1)							
St. 17 Masuda, Sakata, Yamagata	SK-F	39.08	140.11	821	H2	(2)	0.667	0.001	0.001	h3	(2)	0.667	0.001	(2)	1.069	1.050	0.036	0.039
					H8	(1)				h2	(1)							
St. 18 Minase, Yuzawa, Akita	SK-F	38.95	140.70	554	H1	(1)	1.000	0.004	0.004	h1	(1)	0.667	0.002	(2)	1.076	1.054	0.040	0.043
					H2	(1)				h3	(2)							
St. 19 Iwanezawa, Nishimurayamagun Nishikawamachi, Yamagata	SK-F	38.51	140.09	986	H9	(1)	1.000	0.003	0.003	h3	(3)	0.000	0.000	(2)	1.059	1.043	0.034	0.032
					H10	(1)												
					H11	(1)												
St. 20 Bado, Murakami, Niigata	SK-F	38.37	139.70	729	H2	(3)	0.000	0.000	0.000	h3	(3)	0.000	0.000	(2)	1.062	1.045	0.034	0.035
St. 21 Yanagawa, Nishimurayamagun Oemachi, Yamagata	SK-F	38.33	140.00	578	H2	(1)	-	-	-	h2	(1)	-	-					
St. 22 Iwakura, Nishokitamagun Idemachi, Yamagata	SK-F	37.83	139.80	832	H1	(2)	0.667	0.003	0.003	h1	(2)	0.667	0.002	(2)	1.063	1.046	0.034	0.036
					H2	(1)				h3	(1)							
St. 23 Magata, Onumagun Mishimamachi, Fukushima	SK-F	37.37	139.61	853	H2	(1)	-	-	-	h3	(1)	-	-	(2)				
St. 24 Huchiganke, Minamiazumagun Hinoemataura, Fukushima	SK-F	37.03	139.29	1121	H2	(2)	0.000	0.000	0.000	h2	(1)	1.000	0.001	(2)	1.099	1.070	0.049	0.056
					H3	(1)				h3	(1)							
St. 25 Mtsuata, Minamionumagun Yuzawamachi, Niigata	SK-F	36.91	138.74	1263	H2	(2)	0.667	0.001	0.001	h2	(2)	0.667	0.001	(2)	1.098	1.069	0.052	0.054
					H12	(1)				h6	(1)							
St. 26 Sakai, Shimominochigun Sakaemura, Nagano	SK-F	36.86	138.52	1440	H1	(1)	0.833	0.005	0.005	h1	(1)	1.000	0.002	(1)	-	-	-	-
					H2	(2)				h2	(1)							
St. 27 Kitanoari, Kitaazumigun Otairimura, Nagano	SK-F	36.87	137.96	1233	H2	(1)	1.000	0.004	0.004	h3	(2)	0.833	0.002	(3)	1.079	1.050	0.035	0.035
					H5	(1)				h3	(1)							
					H14	(1)				h7	(1)							
					H15	(1)				h8	(1)							
					H16	(1)												
St. 28 Hokujo, Kitaazumigun Hakubamura, Nagano	SK-F	36.75	137.80	1336	H2	(2)	0.000	0.000	0.000	h3	(1)	1.000	0.003	(2)	1.068	1.050	0.038	0.038
					H9	(1)				h9	(1)							

St. 29	Okuchidansengomakao, Takayama, Gifu	SK-F	36.25	137.58	1351	H17 H18	(1) (1)	1.000	0.005	1.000	0.005	(2)	1.080	1.056	0.042	0.044
St. 30	Miyagawachoromami, Hida, Gifu	SK-F	36.40	137.11	1265	H2 H17 H19 H20 H21 H22 H23	(2) (1) (1) (1) (1) (1) (1)	0.964	0.004	0.929	0.003	(4)	1.126	1.068	0.046	0.048
St. 31	Kawaichomo, Hida, Gifu	SK-F	36.25	136.98	1376	H24 H25	(1) (1)	1.000	0.010	1.000	0.005	(3)	1.114	1.068	0.049	0.049
St. 32	Oyachoyokoiki, Yabu, Hyogo	LU-F	35.35	134.52	1383	H2 H27 H28	(1) (1) (1)	1.000	0.007	1.000	0.001	(4)	1.115	1.063	0.044	0.044
St. 33	Daisen, Saitakugun Daisencho, Tottori	LU-F	35.39	133.56	1018	H29 H30 H31	(1) (1) (1)	0.900	0.007	0.667	0.001	(5)	1.119	1.067	0.043	0.045
St. 34	Sajochoyuki, Shobara, Hiroshima	LU-F	35.05	133.06	1254	H32 H33 H34	(1) (2) (1)	0.833	0.011	0.500	0.004	(3)	1.074	1.047	0.034	0.033
St. 35	Higashiyawatohara, Yamagatagun Kihiroshimacho, Hiroshima	LU-F	34.69	132.20	1114	H32 H35	(3) (1)	0.700	0.003	0.700	0.002	(5)	1.096	1.052	0.038	0.035
St. 36	Nishikimachiusu, Iwakuni, Yamaguchi	LU-F	34.47	132.07	1286	H36 H37	(1) (1)	0.833	0.004	0.500	0.001	(4)	1.089	1.055	0.037	0.037
St. 37	Myoga, Higashishirakawagun Yamatsurimachi, Fukushima	S-F	36.94	140.29	871	H2 H3	(6) (1)	0.286	0.000	0.286	0.000	(3)	1.095	1.063	0.045	0.044
St. 38	Nagawakawaura, Matsumoto, Nagano	S-F	36.04	137.61	1557	H22 H40 H41 H42	(1) (1) (1) (1)	1.000	0.010	0.900	0.007	(4)	1.117	1.065	0.043	0.045
St. 39	Ina, Ina, Nagano	S-F	35.82	137.85	1514	H43 H44 H45 H46	(1) (2) (2) (2)	0.889	0.008	0.778	0.005	(4)	1.103	1.060	0.043	0.041
St. 40	Enzankamihagihara, Koshu, Yamanashi	C-F	35.74	138.84	1698	H47 H48 H49 H50	(1) (1) (1) (1)	1.000	0.006	1.000	0.005	(3)	1.128	1.076	0.051	0.056
St. 41	Ono, Tsuru, Yamanashi	C-F	35.49	138.94	1546	H51 H52 H53 H54 H55 H56 H57 H58	(1) (3) (1) (1) (1) (1) (1) (1)	0.933	0.009	0.956	0.006	(6)	1.184	1.089	0.059	0.060
St. 42	Hannochoomakomaru, Hamamatsu Tenryu-ku, Shizuoka	C-F	35.13	138.03	1494	H59 H60 H61 H62 H63	(2) (1) (1) (1) (1)	1.000	0.008	0.867	0.003	(5)	1.128	1.067	0.044	0.046
St. 43	Inabuecho, Toyota, Aichi	SI-F	35.19	137.58	1147	H45 H64 H65 H66 H67	(1) (1) (1) (1) (1)	1.000	0.011	0.900	0.005	(5)	1.134	1.065	0.044	0.046

St. 44	Damine, Kinshitarugun Shitaracho, Aichi	SI-F	35.12	137.47	952	H40 H68	(2) (1)	0.667	0.008	b24 b40	(1) (2)	0.667	0.007	(3)	1.088	1.057	0.043	0.039
St. 45	Takama, Gosu, Nara	SI-F	34.42	135.67	1101	H69	(2)	0.000	0.000	b41	(1)	-	-	(2)	1.078	1.056	0.042	0.043
St. 46	Muegtani, Yoshinogun Higashiyoshinomura, Nara	SI-F	34.36	136.09	1383	H70 H71	(1) (1)	1.000	0.007	b42 b43	(1) (1)	1.000	0.003	(3)	1.121	1.068	0.049	0.051
						H72 H73	(1) (1)			b44 b45	(1) (1)							
St. 47	Kotochi, Yoshinogun Kamikitayamamura, Nara	SI-F	34.20	136.09	1617	H72	(2)	0.000	0.000	b44 b46	(1) (1)	1.000	0.001	(2)	1.097	1.067	0.051	0.053
St. 48	Nishihara, Yoshinogun Kamikitayamamura, Nara	SI-F	34.19	135.94	1439	H72 H74	(2) (2)	0.667	0.001	b44 b47	(3) (1)	0.500	0.001	(3)	1.109	1.069	0.049	0.049
St. 49	Ryujimurayujin, Tanabe, Wakayama	SI-F	34.06	135.57	1269	H75 H76	(1) (1)	1.000	0.006	b44 b48	(2) (1)	0.667	0.002	(2)	1.090	1.065	0.047	0.051
St. 50	Kamiyukawa, Aridagun Aridagawacho, Wakayama	SI-F	34.04	135.50	1176	H77 H78 H79	(1) (1) (1)	1.000	0.007	b43 b44 b49	(1) (2) (1)	0.833	0.001	(4)	1.147	1.074	0.050	0.053
St. 51	Oritachi, Yoshinogun Toitsukawamura, Nara	SI-F	33.93	135.83	1049	H80 H81	(1) (2)	0.667	0.003	b44	(1)	0.667	0.001	(2)	1.094	1.066	0.051	0.051
St. 52	Iwakura, Nakagun Nakecho, Tokushima	SI-F	33.83	134.09	1607	H82 H83 H84	(1) (1) (1)	1.000	0.005	b50 b19 b51	(2) (2) (1)	0.667	0.001	(3)	1.097	1.061	0.042	0.044
St. 53	Nishinokawa, Sujo, Ehime	SI-F	33.76	133.17	1338	H85 H86 H87	(1) (1) (1)	1.000	0.007	b52 b53	(1) (2)	0.667	0.002	(3)	1.094	1.058	0.041	0.041
St. 54	Nakagawa, Kitagun Uchikocho, Ehime	SI-F	33.50	132.87	1316	H88 H89 H90	(1) (2) (1)	0.833	0.004	b53 b54	(3) (1)	0.500	0.001	(4)	1.095	1.057	0.040	0.038
St. 55	Yamakunimachisukinoki, Nakatsu, Oita	SI-F	33.48	130.93	1088	H91 H92	(1) (4)	0.000	0.000	b55	(2)	0.667	0.001	(4)	1.141	1.071	0.049	0.052
St. 56	Maetsunomachiyugi, Hita, Oita	SI-F	33.19	130.87	1113	H93 H94	(2) (1)	0.833	0.004	b56 b57	(2) (1)	0.833	0.001	(4)	1.133	1.067	0.047	0.049
St. 57	Kain, Asogun Minamiasomura, Kumamoto	SI-F	32.79	131.01	1096	H95 H96 H97 H98 H99	(1) (1) (1) (1) (1)	1.000	0.015	b58 b59 b60 b61	(1) (1) (1) (1)	1.000	0.008	(5)	1.144	1.074	0.045	0.052
St. 58	Kitagawamachikawachimyo, Nobeoka, Miyazaki	SI-F	32.76	131.48	1484	H100 H101 H102 H103 H104 H105	(1) (2) (1) (1) (1) (1)	0.933	0.012	b62 b63 b64 b65	(1) (2) (3) (1)	0.733	0.005	(6)	1.177	1.073	0.051	0.052
St. 59	Midorikawa, Kamimashikigun Yamatocho, Kumamoto	SI-F	32.58	131.08	1419	H107 H108 H109	(1) (1) (1)	1.000	0.006	b66 b67	(1) (3)	0.500	0.002	(2)	1.099	1.071	0.052	0.055
St. 60	Hayakusa, Shimomashikigun Misatoeichi, Kumamoto	SI-F	32.58	130.90	1175	H110 H111 H112 H113 H114 H115	(1) (1) (1) (1) (1) (2)	0.933	0.011	b64 b67 b68	(2) (3) (1)	0.733	0.003	(6)	1.171	1.075	0.052	0.052
St. 61	Izumimachimomiji, Yatsushiro, Kumamoto	SI-F	32.47	131.01	1541	H116 H117 H118 H119	(1) (1) (1) (1)	1.000	0.011	b67 b69	(3) (1)	0.500	0.003	(4)	1.145	1.073	0.051	0.053
St. 62	Okawauchi, Higashisakigun Shibason, Miyazaki	SI-F	32.30	131.17	1512	H120	(1)	-	-	b67	(1)	-	-	(1)	-	-	-	-
St. 63	Kawakita, Koyegun Tsunocho, Miyazaki	SI-F	32.28	131.43	1317	H121 H122	(1) (4)	0.400	0.001	b70 b71	(5) (3)	0.000	0.000	(5)	1.125	1.064	0.042	0.044
St. 64	Mingaoe, Kumagun Asagiriho, Kumamoto	SI-F	32.15	130.95	1241	H123 H124 H125 H126	(1) (2) (1) (1)	0.900	0.005	b67 b71 b72	(1) (3) (1)	0.700	0.002	(5)	1.153	1.077	0.054	0.053



表3-2. mtDNAのPCRに用いたプライマー

Gene	Primer names	Primer direction	Primer sequence (5'-3')	Length	Usage*	Reference
mtDNA <i>COI</i>	C1-J-2183	Forward	CAACATTTATTTTGGATTTTGG	831-bp	P, S	Loxdale & Lushai, 1998
	L2-N-3014	Reverse	TCCAATGCACACTAAATCTGCCATATTA			
mtDNA 16SrRNA	16SC	Forward	TACCTTGTGTATCAGGGTTTAT	989-bp	P, S	Hosoya et al., 2001
	16SB	Reverse	CCGGTTTGAACCTCAGATCATGT			

\*: P, PCR; S, sequencing analysis

表3-3. mtDNAに基づく遺伝的多様性、および中立性の検定

Clade	N		Hn		hd		$\pi$		Tajima's D		Fu's $F_s$	
	COI	16S	COI	16S	COI	16S	COI	16S	COI	16S	COI	16S
I-A	151	151	56	38	0.875	0.878	0.006	0.002	-2.066	-2.076 **	-25.627 **	-26.574 **
I-B	36	36	30	16	0.989	0.852	0.008	0.004	-1.674	-0.905	-22.490 **	-5.221 **
II	44	44	34	18	0.983	0.907	0.013	0.005	-0.783	-1.003	-16.830 **	-5.252 *
<b>Clade Iにおける地理的グループ</b>												
SK-F	92	88	26	15	0.741	0.738	0.004	0.002	-1.688 *	-1.277	-13.249 **	-4.185
LU-F	22	19	13	8	0.926	0.754	0.007	0.003	-1.694 *	-1.402	-2.662	-1.584
S-F	21	21	11	9	0.9	0.848	0.008	0.005	-0.130	-0.073	-0.913	0.036
C-F	20	20	17	13	0.979	0.942	0.009	0.005	-1.422	-0.371	-8.285 **	-4.233 *
SJ-F (Clade IIを除く)	40	39	30	20	0.974	0.916	0.011	0.005	-1.301	-1.212	-14.668 **	-6.976 *

N, number of individuals; Hn, haplotype number; hd, haplotype diversity;  $\pi$ , nucleotide diversity. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

<sup>a</sup> ブナ群集は図3-1と対応 (SK-F, ブナ林以北とブナ-チシマザサ群集; LU-F, ブナ-クロモジ群集; S-F, ブナ-スズタケ群集; C-F, ブナ-ヤマボウシ群集; SJ-F, ブナ-シラキ群集).

表3-4. 4,545SNPsに基づく遺伝的多様性

	<b>N</b>	<b>Num</b>	<b>Eff_num</b>	<b>Ho</b>	<b>Hs</b>
SK-F	61	1.308	1.062	0.035	0.040
LU-F	21	1.192	1.066	0.040	0.043
S-F	11	1.187	1.073	0.043	0.049
C-F	14	1.249	1.085	0.052	0.057
SJ-F (Clade IIを除く)	32	1.394	1.078	0.045	0.054
Ckade II	46	1.389	1.078	0.049	0.054

N, number of individuals; Num, Number of alleles; Eff\_num, Effective number of alleles; Ho, Observed heterozygosity; Hs, Heterozygosity within populations.

<sup>a</sup> ブナ群集は図3-1と対応 (SK-F, ブナ林以北とブナーチシマザサ群集; LU-F, ブナークロモジ群集; S-F, ブナーズタケ群集; C-F, ブナーヤマボウシ群集; SJ-F, ブナーシラキ群集).

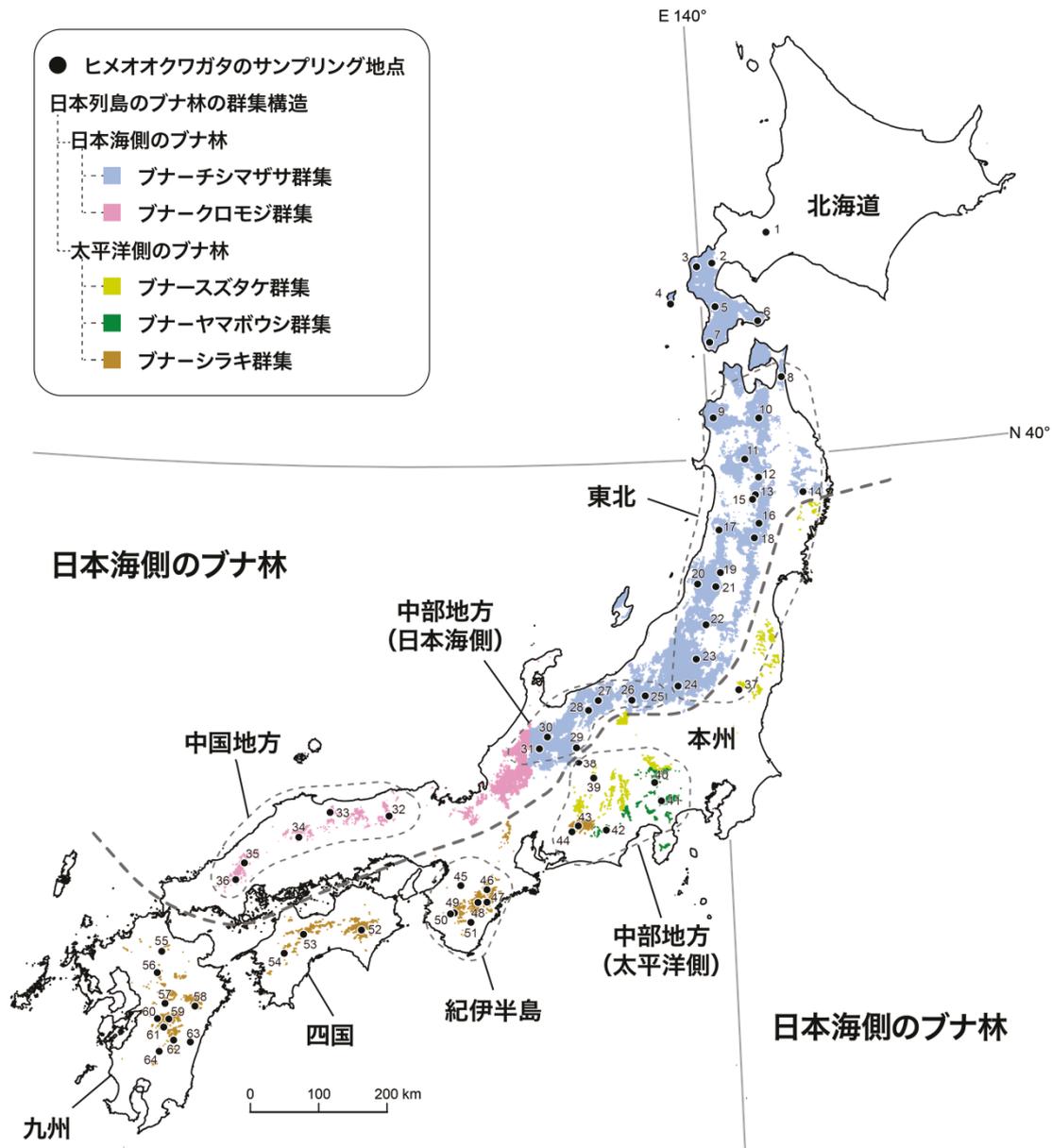


図 3-1. ヒメオオクワガタのサンプリング地点およびブナ林の分布。地点番号は表 3-1 と対応する。ブナ林の分布は環境省が実施した自然環境保全調査第 5 回植生調査に基づく (National Conservation Bureau, Ministry of the Environment, 1999)。ブナ林の群集構造は、Hukushima et al. (1995) に従った。

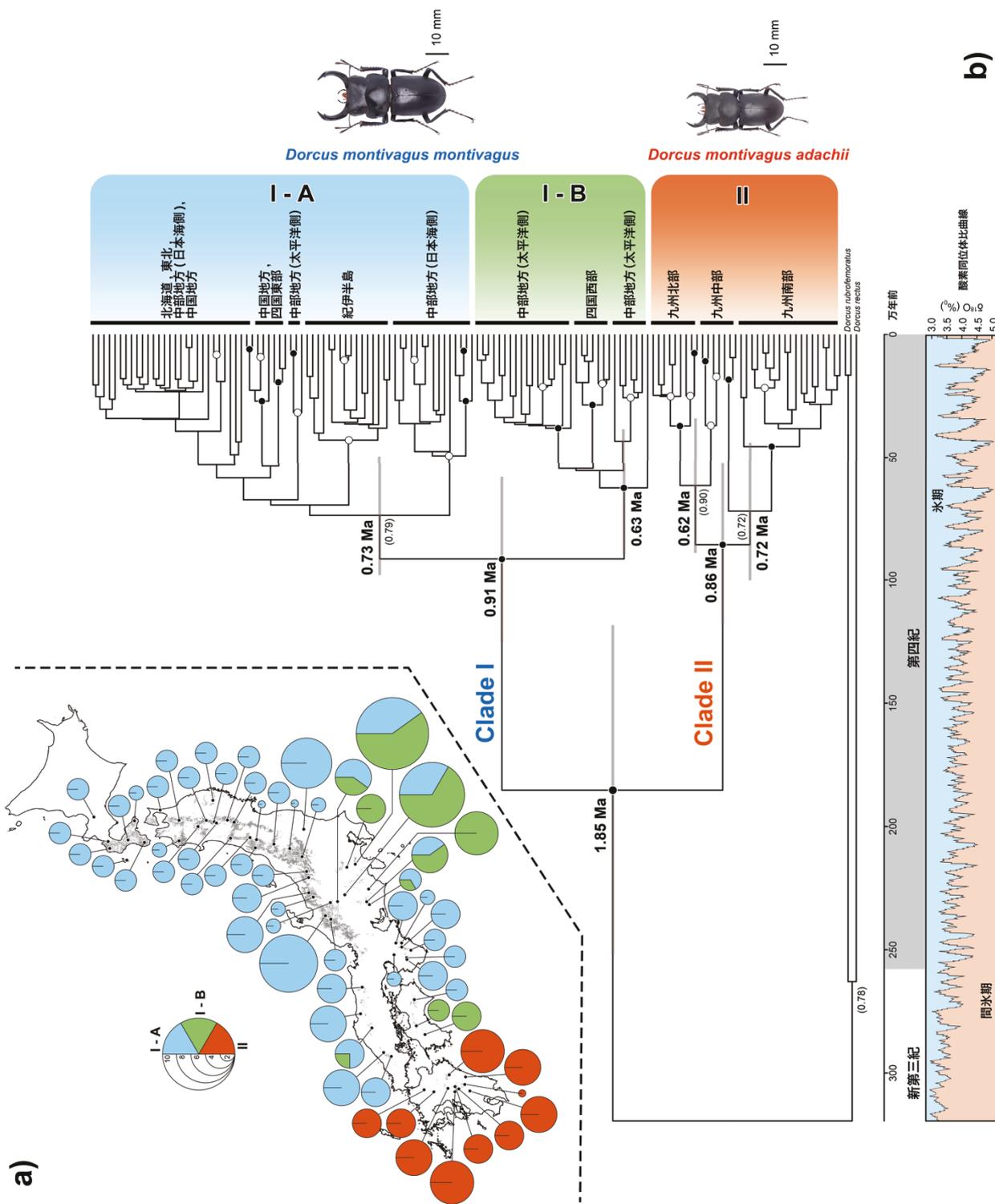


図 3-2. COI 領域と 16SrRNA 領域の結合配列に基づくベイズ系統樹 (b)。各ノードの●はベイズの事後確率 (100%)、○はベイズの事後確率 (>95%) を示す。Kakusan 4 により HKY 85 + Gamma Invariant model が最適置換モデルとして選択された。系統樹の下の折れ線グラフは、酸素同位体比曲線を示し、酸素同位体比の値が大きいほど氷期が卓越したことを示す (Lisiecki & Raymo, 2005 を一部改変)。主要なクレードにおける太字の数字とバーは推定分岐年代および 95%信頼区間を示す。主要な各クレードの地理的な分布を示す (a)。

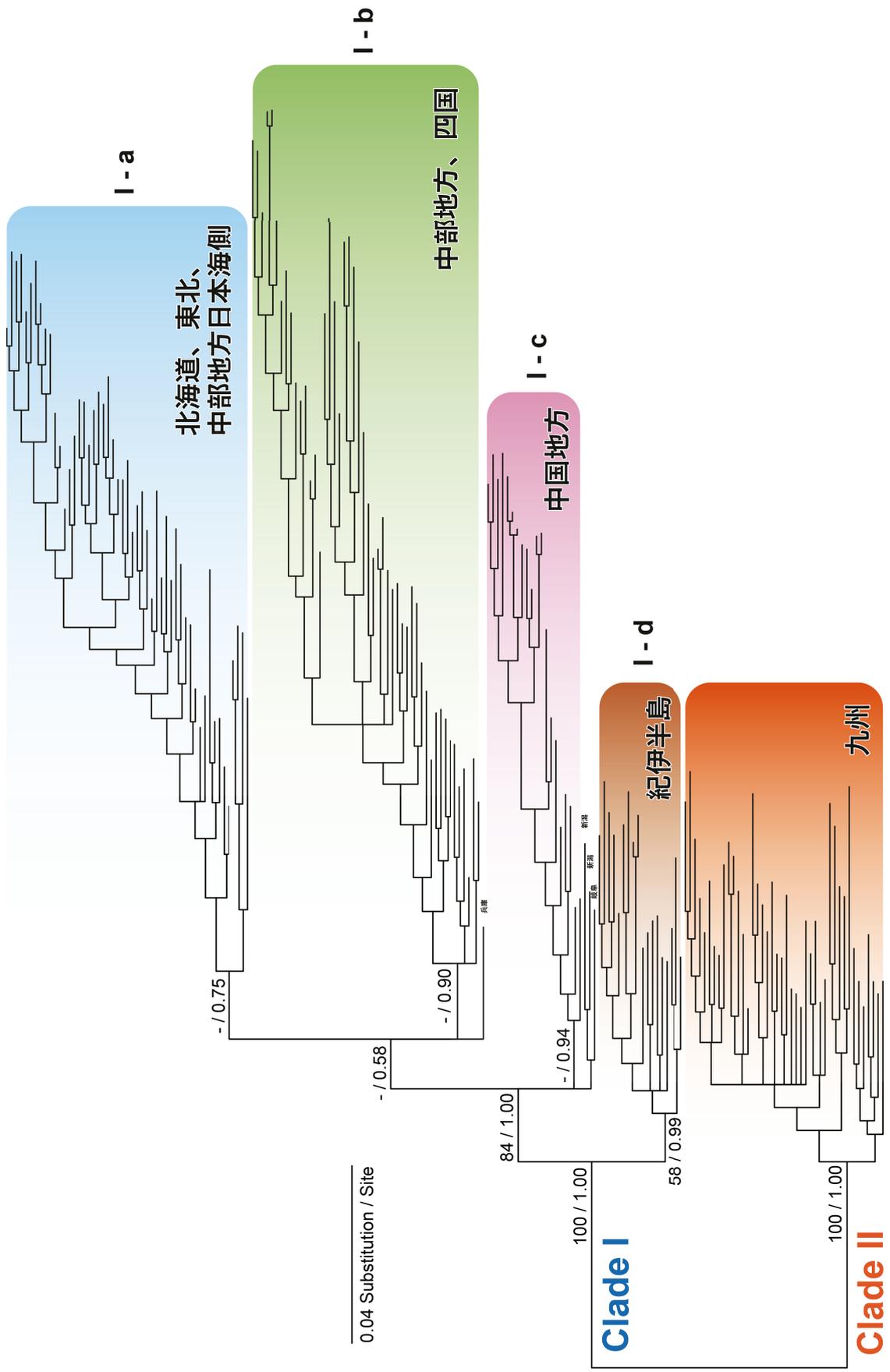


図 3-3. 全サンプルが共有する遺伝子座に含まれる 4,545 SNPs の内の invariant sites を除く 1,508 SNPs に基づくベイズ系統樹。ノードの括弧内の数字はベイズ (BI) の事後確率 (> 50%) / 最尤法 (ML) のブートストラップ確率 (> 50%) を示す。Modeltest-NG により GTR + Gamma model (BI) と GTR + Gamma Invariant model (ML) が最適置換モデルとして選択された。

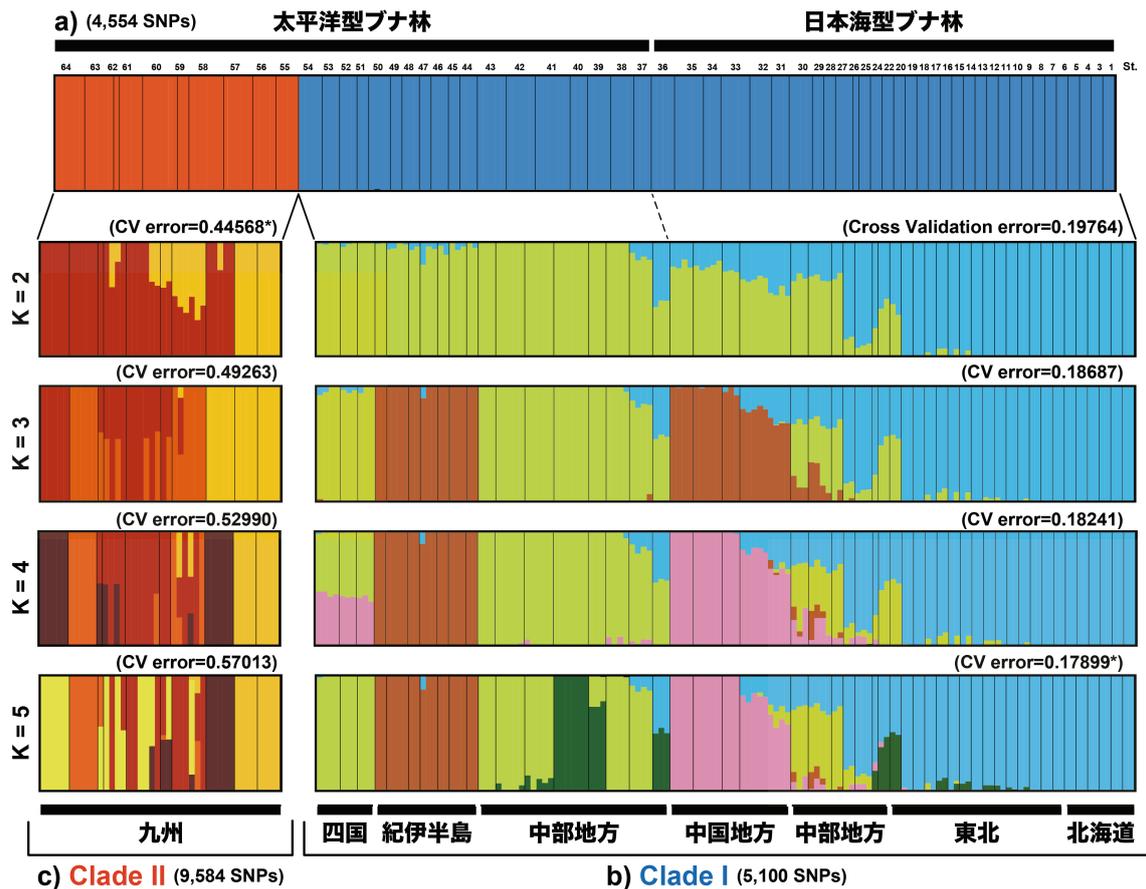


図 3-4. SNPs に基づく ADMIXTER 解析の結果。a) 全サンプルが共有する遺伝子座に含まれる 4,545SNPs に基づく ADMIXTER 解析の結果 (K=2)。日本海型と太平洋型のブナ林を区分は Hukushima et al. (1995) に従った。b) クレード I 内の全サンプルが共有する遺伝子座に含まれる 5,100SNPs、および c) クレード II 内の全サンプルが共有する遺伝子座に含まれる 9,584SNPs に基づく ADMIXTER 解析の結果 (K=2-5)。\*: 各クレードにおける最適な遺伝的クラスター数を支持する Cross Validation error。

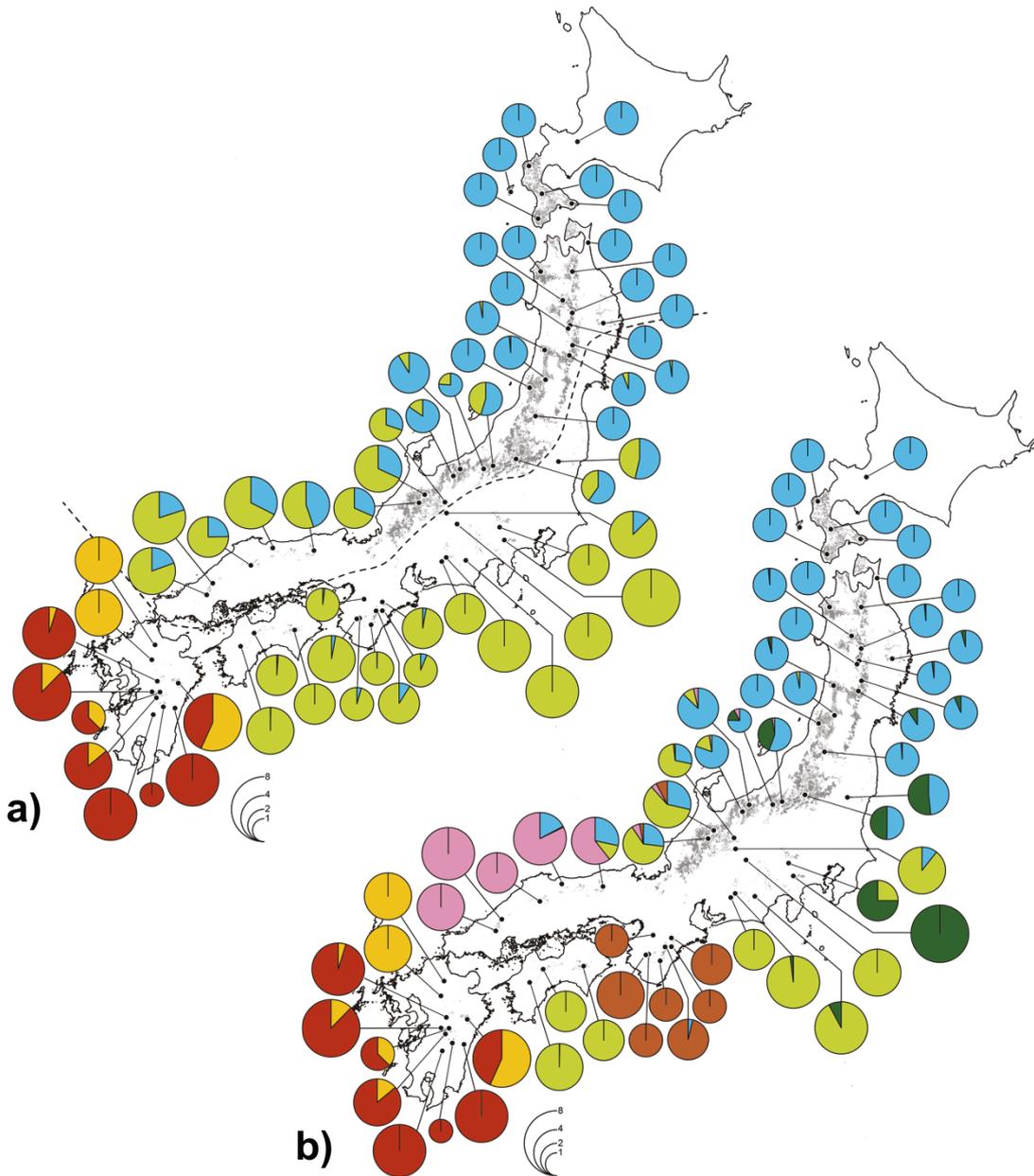


図 3-5. a) 各クレードにおいて ADMIXTURE 解析の結果が  $K=2$  のときの遺伝的クラスターの地理的分布。破線は日本海型と太平洋型のブナ林を区分する植生学的な境界 (Hukushima et al. 1995)。b) 各クレードにおいて ADMIXTURE 解析の結果が最適な  $K$  のときの遺伝的クラスターの地理的分布 (クレード I:  $K=5$ 、クレード II:  $K=2$ )。

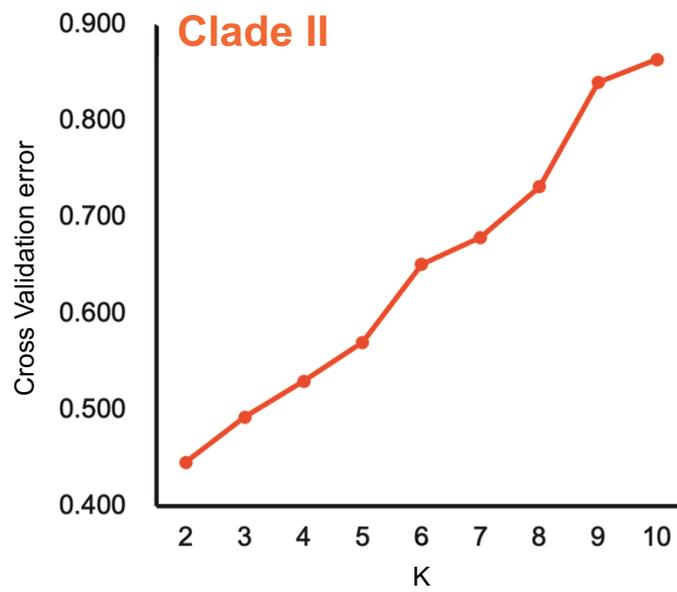
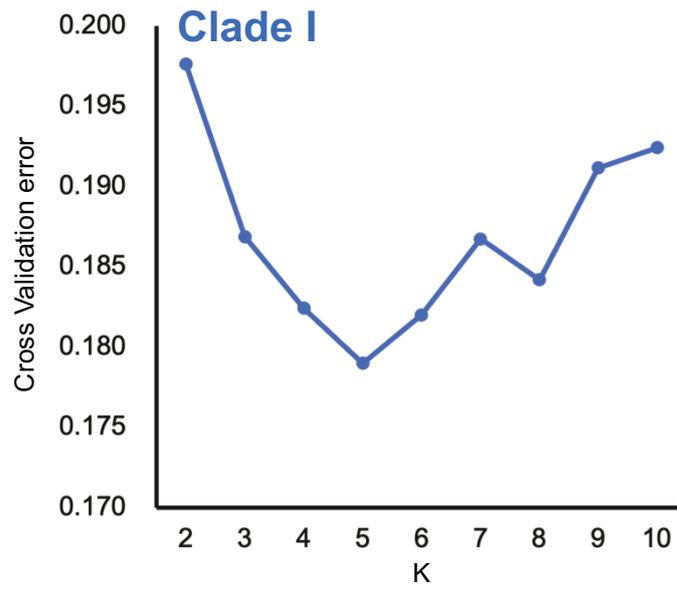


図 3-6. K=2-10 における各クレードの ADMIXTER 解析の Cross Validation error。

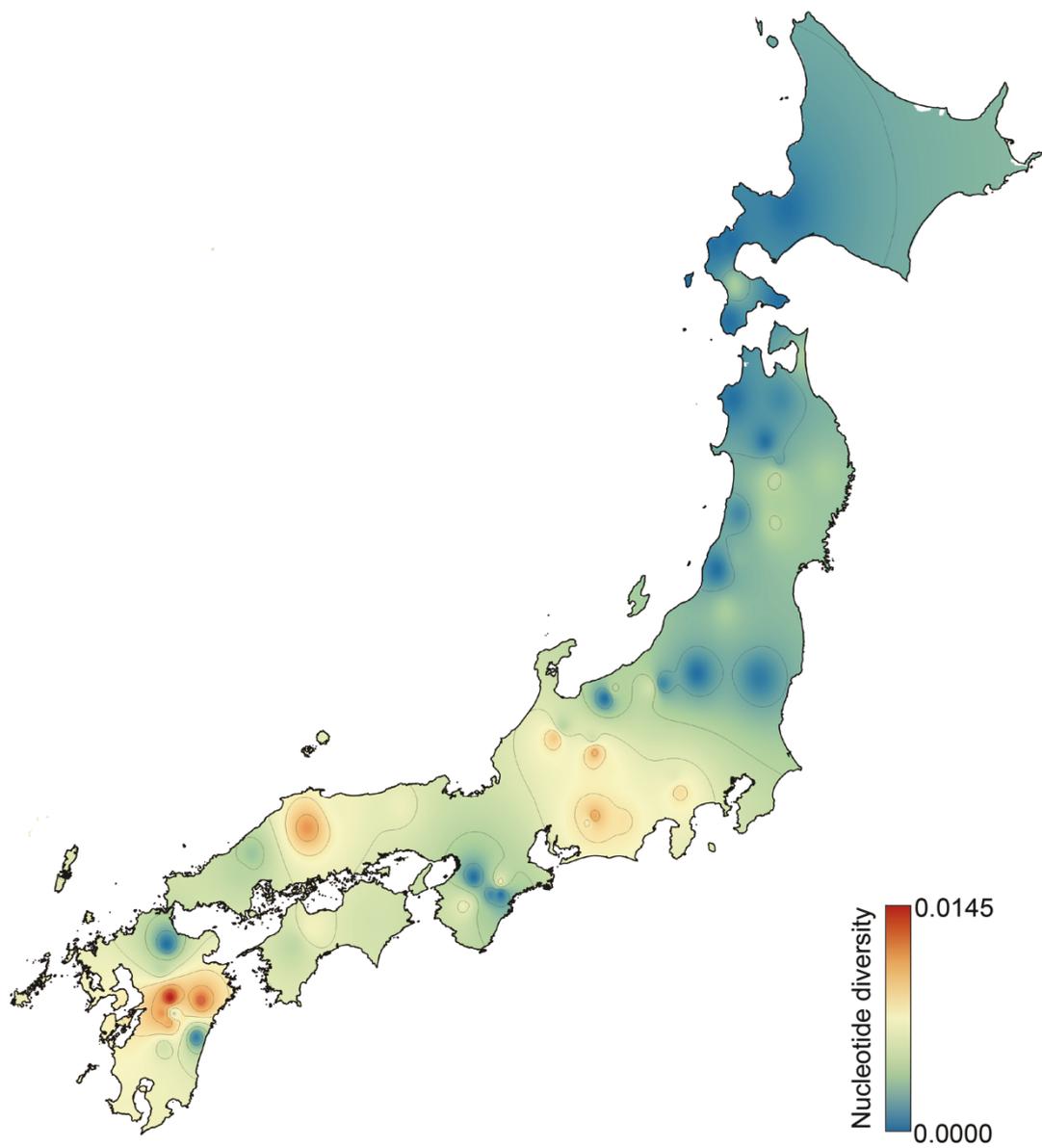


図 3-7. mtDNA の *COI* 領域に基づくヌクレオチド多様度のヒートマップ。ヌクレオチド多様度が高い地域は暖色系、低い地域は寒色系で示す。

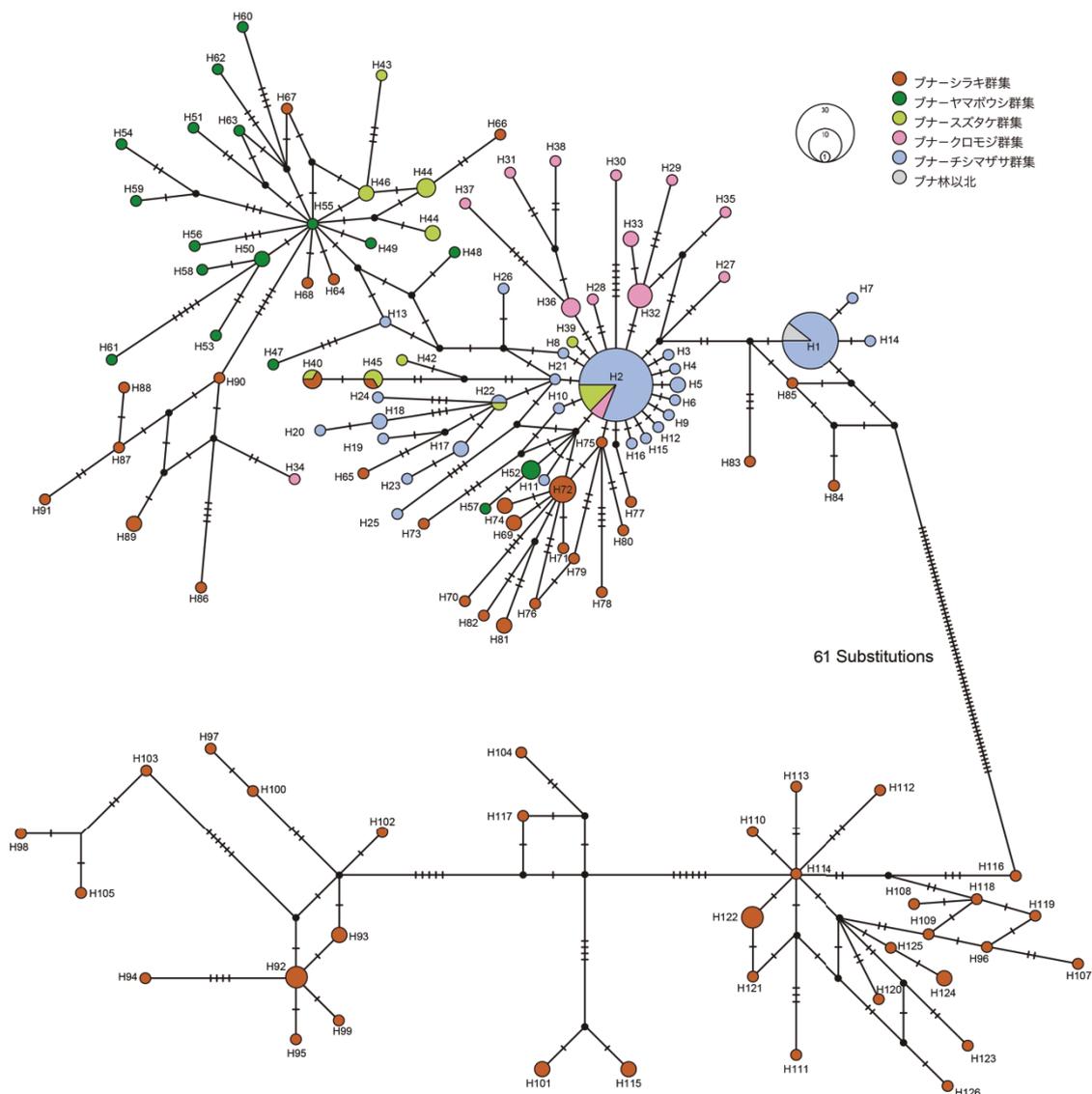


図 3-8. *COI* 領域に基づく 126 ハプロタイプから構成される Median-joining ネットワーク図。黒丸はミッシングハプロタイプを示す。ハプロタイプ間のバーは塩基置換数を示す。各ハプロタイプの円の大きさはサンプルサイズを示し、ハプロタイプの色は図 3-1 のブナ林群集と対応する。

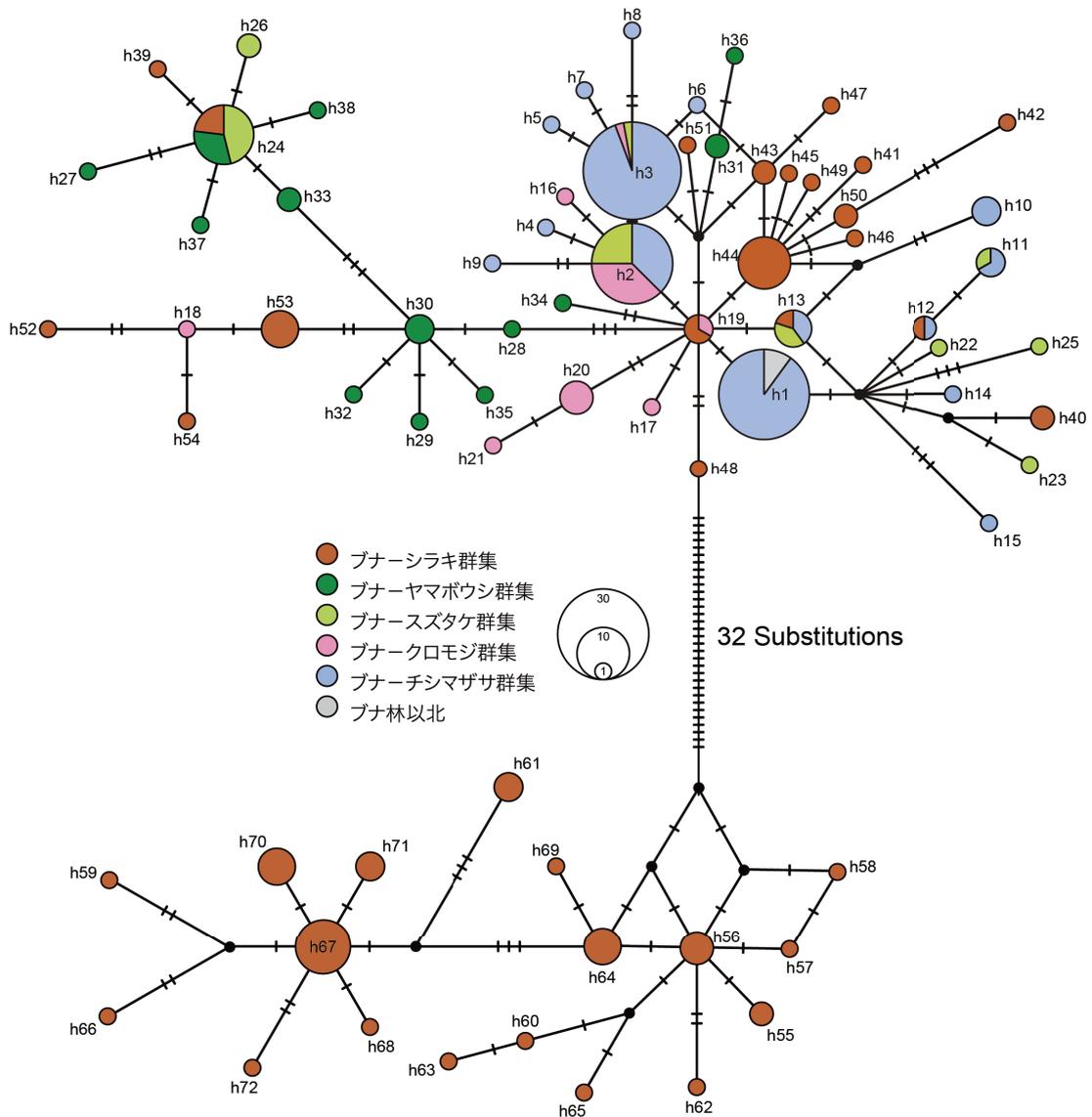


図 3-9. 16SrRNA 領域に基づく 72 ハプロタイプから構成される Median-joining ネットワーク図。黒丸はミッシングハプロタイプを示す。ハプロタイプ間のバーは塩基置換数を示す。各ハプロタイプの円の大きさはサンプルサイズを示し、ハプロタイプの色は図 3-1 のブナ林群集と対応する。

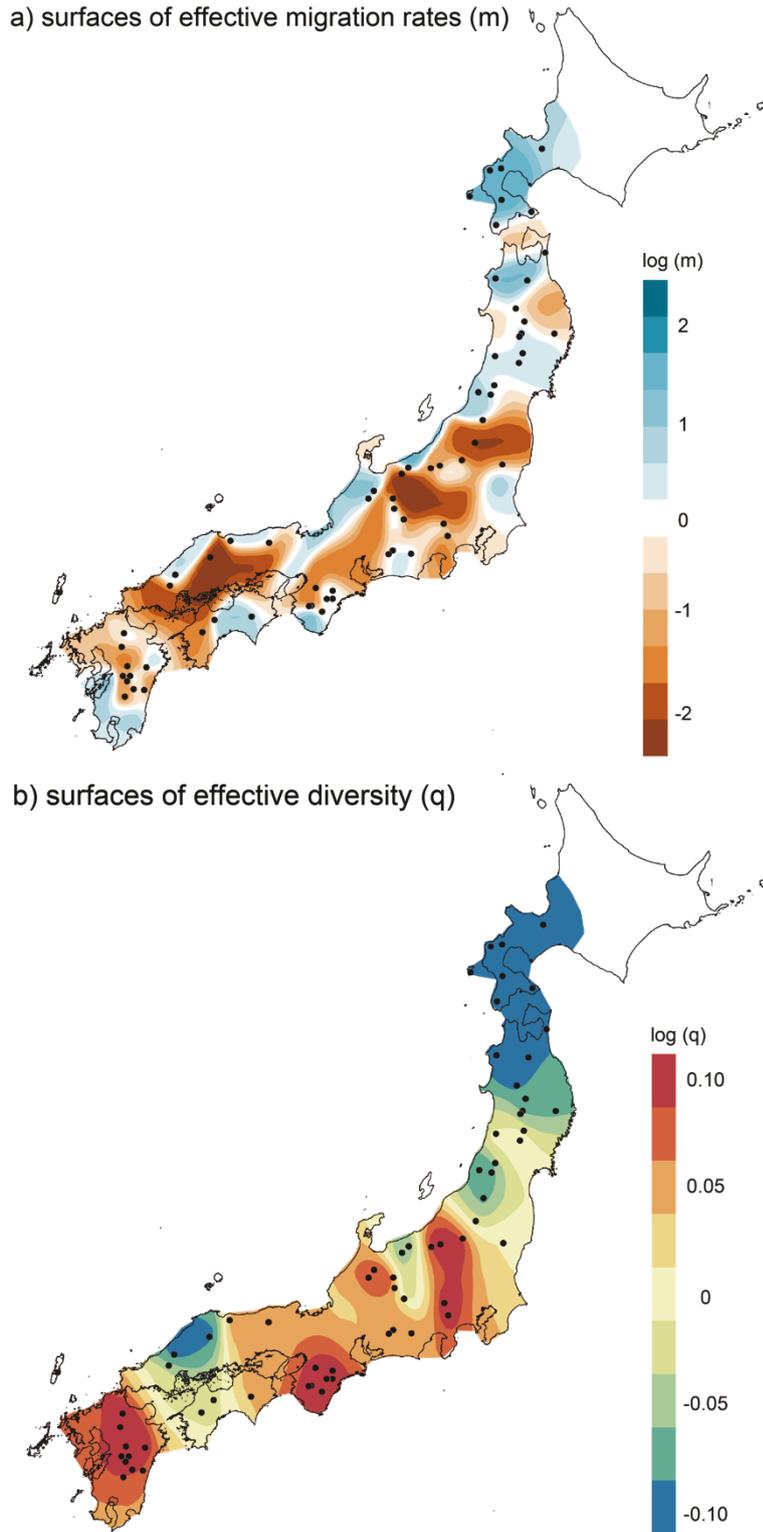


図 3-10. 4,545SNPs に基づく EEMS 解析による遺伝子流動 (a) と遺伝的多様性 (b) の空間的パターン。有効移入率 ( $m$ ) は、遺伝子流動の頻度が多い地域を青色、遺伝子流動の障壁となる地域を茶色で示す。有効多様性 ( $q$ ) は、遺伝的多様性の高い地域を暖色系、遺伝的多様性の低い地域を寒色系で示す。

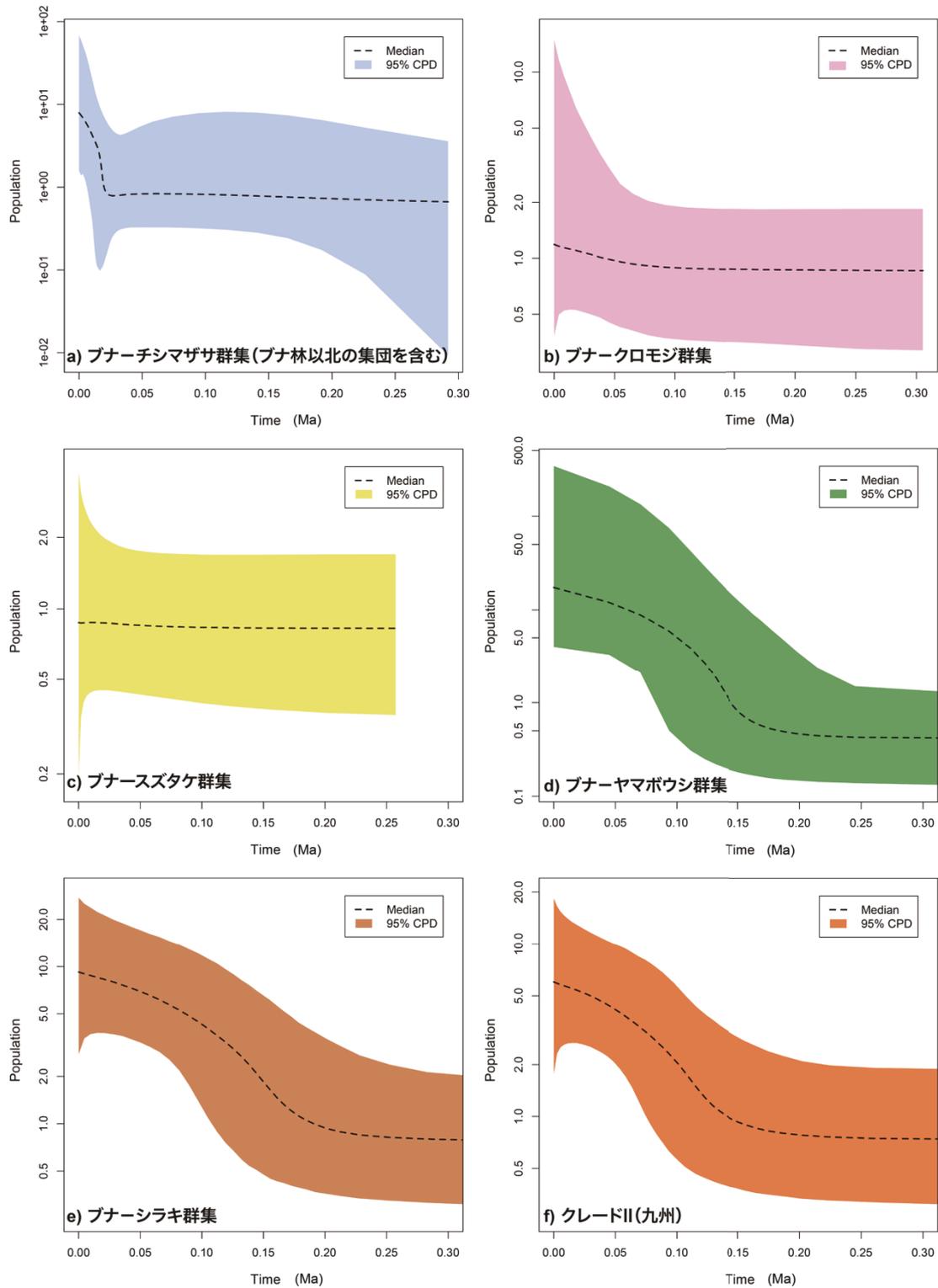


図 3-11. mtDNA *COI* 領域と 16SrRNA 領域の結合配列に基づく各地理的なグループの Bayesian skyline plot 解析の結果。Kakusan 4 により HKY 85 + Gamma Invariant model が最適置換モデルとして選択された。

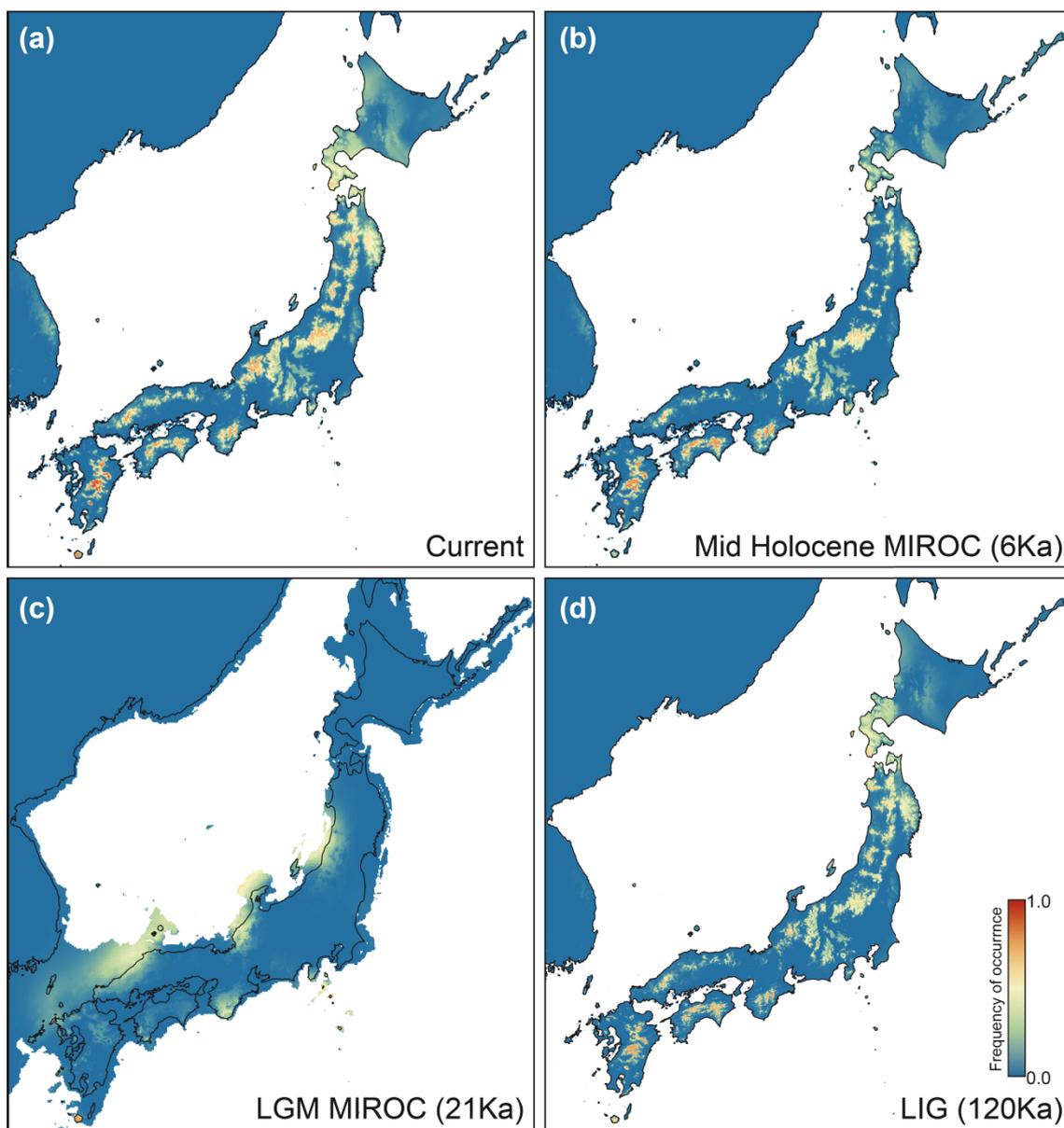


図 3-12. ヒメオオクワガタの潜在的な生息適地推定の結果。分布確率の高い地域は暖色系、分布確率の低い地域を寒色系で示す。(a) 現在、(b) 中期完新世 (6 Ka)、(c) 最終氷期最寒冷期 (LGM; 21 Ka)、(d) 最終間氷期 (LIG; 120 Ka)。

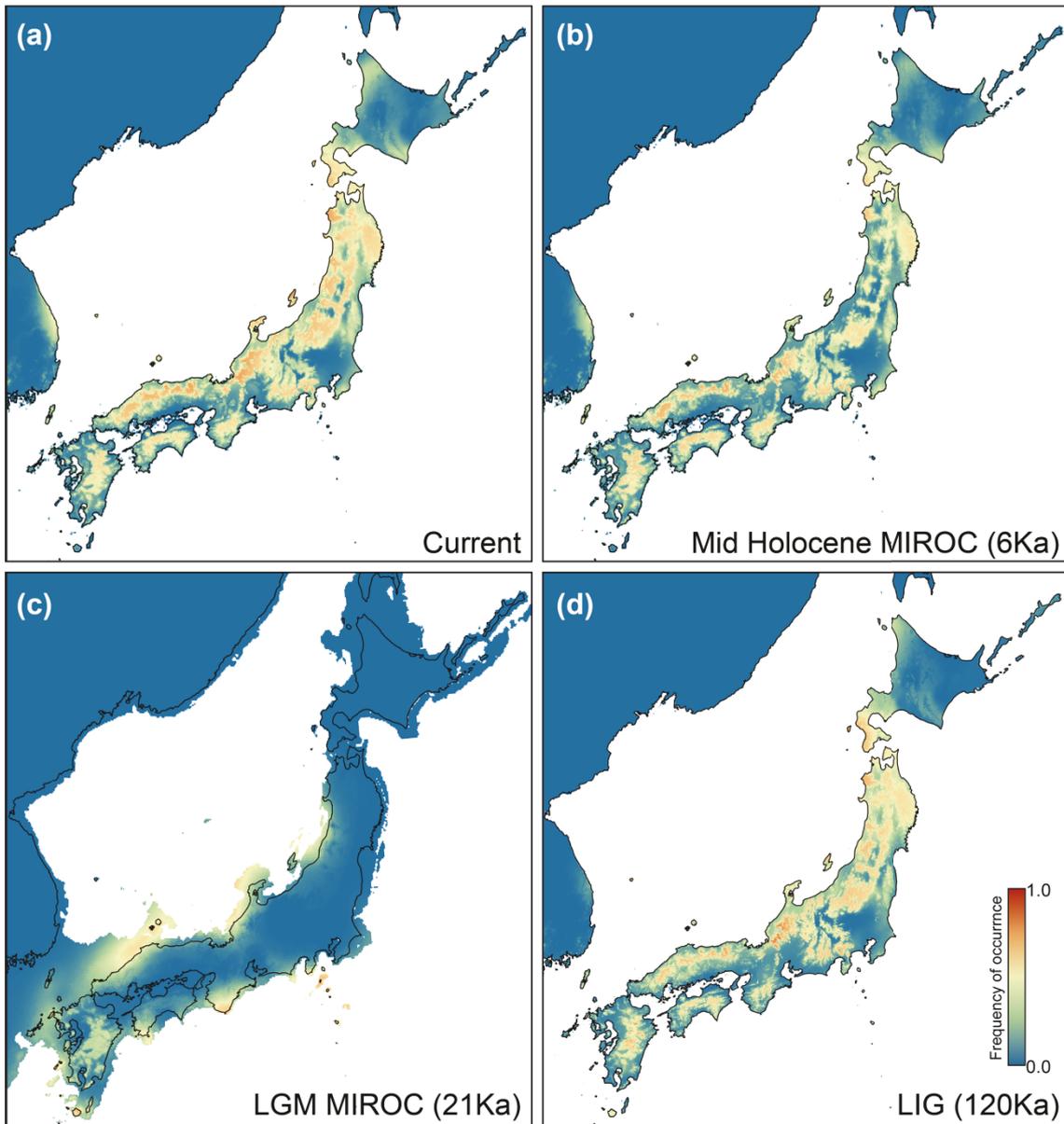
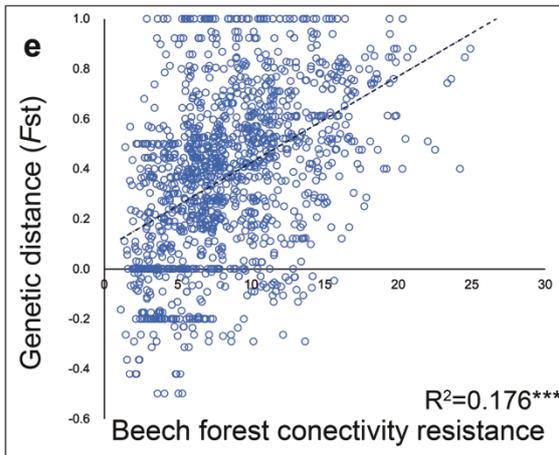
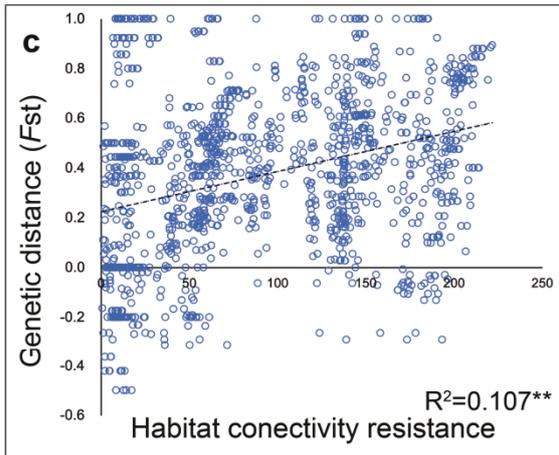
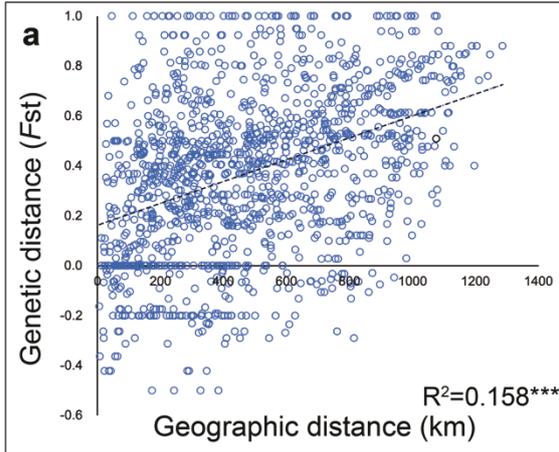


図 3-13. ブナ林の潜在的な生息適地推定の結果。分布確率の高い地域は暖色系、分布確率の低い地域を寒色系で示す。(a) 現在、(b) 中期完新世 (6 Ka)、(c) 最終氷期最寒冷期 (LGM; 21 Ka)、(d) 最終間氷期 (LIG; 120 Ka)。

## Clade I



## Clade II

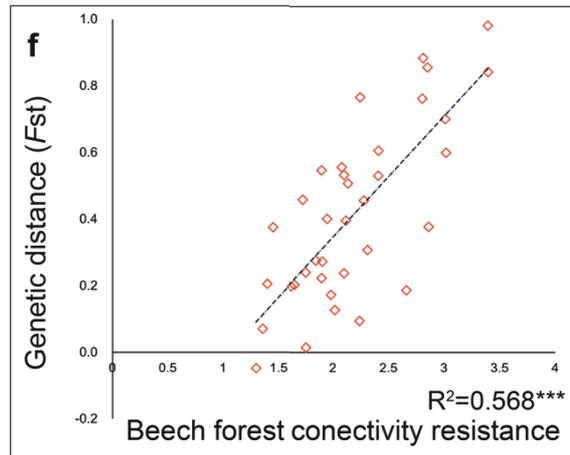
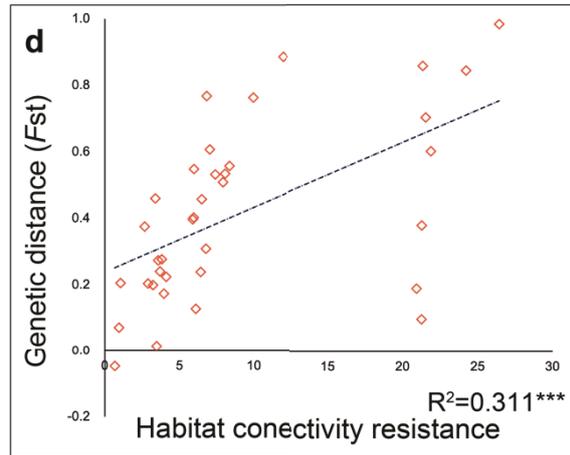
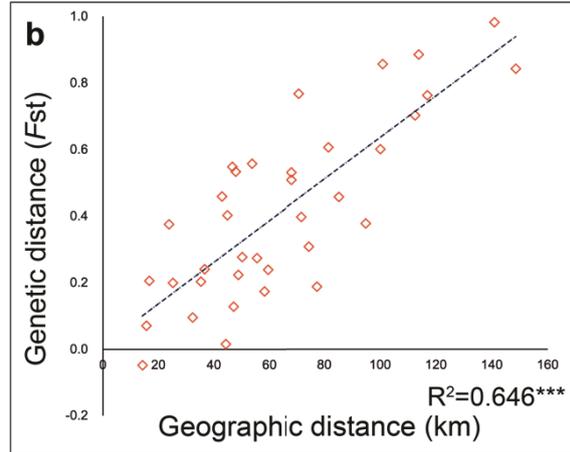
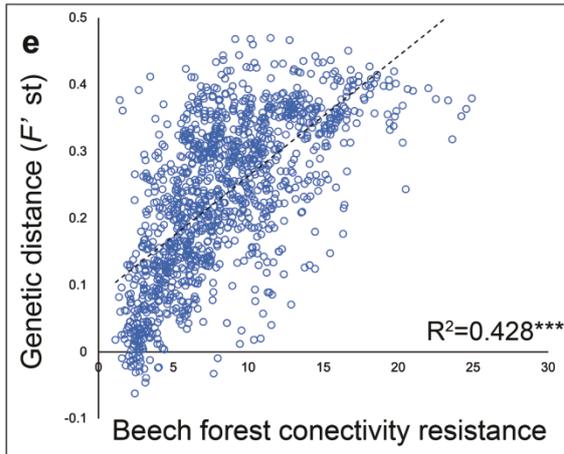
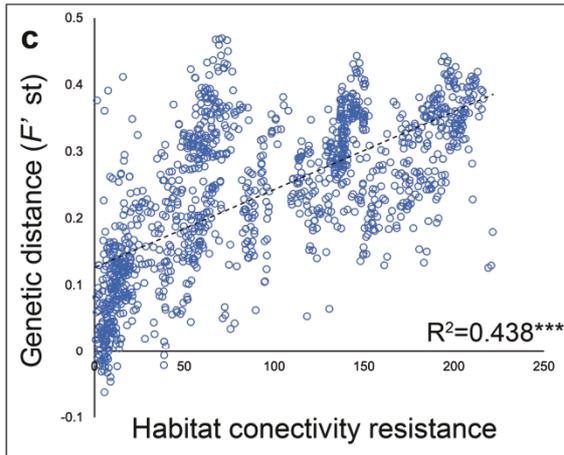
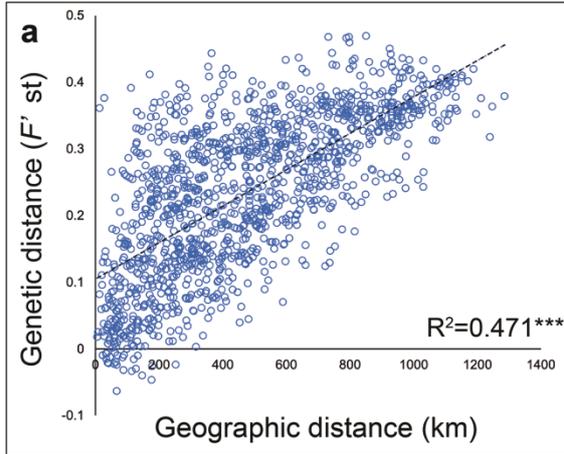


図 3-14. *COI* 領域に基づく主要 2 クレードにおける集団間の遺伝的分化 ( $F_{st}$ ) と地理的距離 (a-b)、および集団間の遺伝的分化と生息適地 (c-d) あるいはブナ林 (e-f) の接続性の抵抗のペアワイズ空間遺伝図。生息適地とブナ林の接続性の抵抗は、値が小さいほど集団間の生息適地およびブナ林が連続していることを示し、値が大きいほど集団間の生息適地およびブナ林が不連続であることを示す。

## Clade I



## Clade II

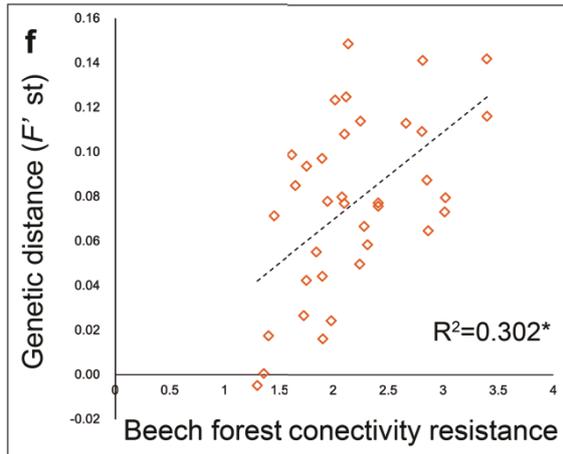
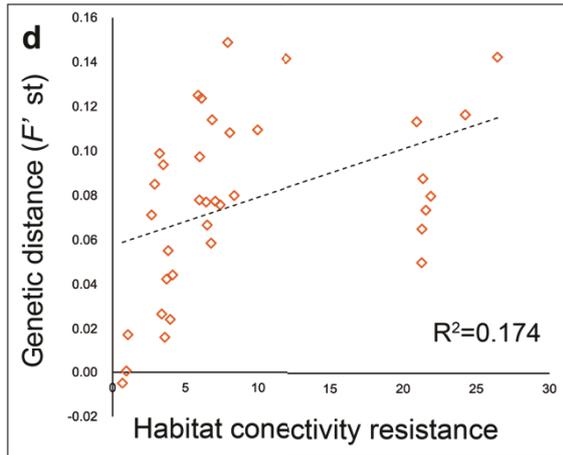
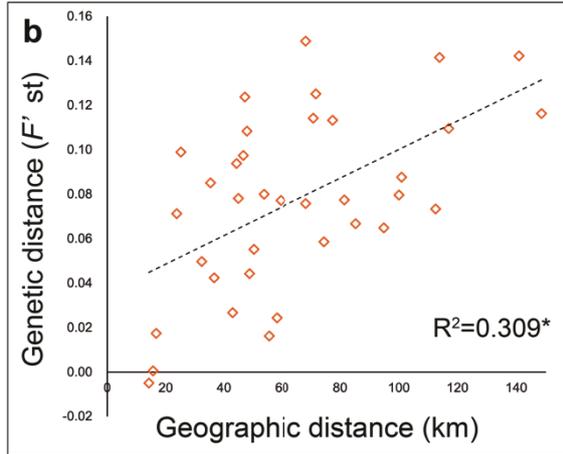


図 3-15. 4,545SNPs に基づく主要 2 クレードにおける集団間の遺伝的分化 ( $F_{st}$ ) と地理的距離 (a-b)、および集団間の遺伝的分化と生息適地 (c-d) あるいはブナ林 (e-f) の接続性の抵抗のペアワイズ空間遺伝図。生息適地とブナ林の接続性の抵抗は、値が小さいほど集団間の生息適地およびブナ林が連続していることを示し、値が大きいほど集団間の生息適地およびブナ林が不連続であることを示す。

## 総合考察

緒言および第I章の背景でも述べたように、生物の適応放散は種分化により生じる種の多様化と様々なハビタットへの進出や拡大による生態学的ニッチの多様化から成り立つ (Schluter, 2000)。本研究はクワガタムシを取り巻く共生系に着目することで、共生酵母との共進化にともなう生態学的なニッチの多様化と寄主樹木との歴史的な相互作用による種分化プロセスの解明を試みた。

第I章では、日本列島のクワガタムシ類を用いて、クワガタムシ科における褐色腐朽食性の祖先的なグループから白色腐朽食性の新しいグループまでを網羅した共生酵母の系統関係を世界で初めて明らかにした。この結果、褐色腐朽食性のクワガタムシ類はセロビオース発酵性酵母を保持していた一方で、白色腐朽食性のクワガタムシ類はキシロース発酵性酵母を保持していた。すなわち、クワガタムシ類は摂食する枯死木の腐朽型に対応した代謝機能をもつ酵母と共生していることを解明した。加えて、特殊な環境の枯死木を利用するクワガタムシ類からは、既知の共生酵母とは全く異なる系統や未記載と思われる酵母を発見した。これらの結果から、クワガタムシ科における幼虫食性の多様化の背景には新規共生酵母の獲得が関係することが示唆された。このような幼虫食生と対応した共生酵母の系統は、クワガタムシ類の枯死木の代謝などの生理生態において共生酵母が消化共生などの重要な役割を果たしていることを示唆する (Tanahashi et al., 2010)。しかしながら、宿主クワガタムシの生存や成長において共生酵母がどの程度重要なのかは不明である (Kubota et al., 2020)。今後は共生酵母を人為的に除去する操作実験により、クワガタムシ類の成長や生存における酵母の役割を検討する必要がある。

また、クワガタムシ類は基本的には種あるいは属などのグループに特異的な共生酵母の系統を保持しており、クワガタムシと共生酵母の一对一の系統関係が明らかになった。このことは、基本的には共生酵母が雌成虫から幼虫へと垂直伝播されており、両者の依存的な共生関係を示唆する (Kubota et al., 2020)。一方で、共生酵母の系統関係は宿主ク

ワガタムシの系統関係とは一致せず、宿主の生息する標高帯に対応していた。すなわち、系統的には遠縁なクワガタムシ属同士にもかかわらず、同所的に生息するクワガタムシ種間では近縁な系統の共生酵母を保持していた。このようなクワガタムシと共生酵母の系統関係の不一致に注目し、第 II 章ではルリクワガタ属とオニクワガタ属の共生酵母の水平伝播プロセスを解明した。その結果、ルリクワガタ属における共生酵母との系統関係の不一致は、全く異なるグループであるオニクワガタ属を介した水平伝播により生じたことが明らかになった。さらに、現在の分布域は重複しないものの、歴史的に分布域が重複した種間において共生酵母の水平伝播が生じたこと、および地域集団内において新規に獲得した共生酵母への置換が現在進行形であることが示唆された (Ueki et al., 2021)。これらの結果から、第 I 章で認められた宿主クワガタムシと共生酵母の系統関係の不一致が、同所的に生息するクワガタムシ種間での歴史的な共生酵母の水平伝播に由来すること示唆された (Ueki et al., 2021)。また、比較的標高の高い冷温帯林に生息するクワガタムシ類の共生酵母は高温への耐性が低いのに対して、標高の低い暖温帯や亜熱帯の森林に生息するクワガタムシ類の共生酵母は高温への耐性は高いことが明らかになっている (Zhu et al., 2022)。クワガタムシと共生酵母が互いに依存的な関係性をもつのであれば、共生酵母の温度耐性は宿主の分布を制限する要因の一つになり得ると思われる (Zhu et al., 2022)。特に冷温帯林に生息するクワガタムシ類は西南日本では山地帯上部に分布が制限されるため、西南日本を中心とした集団間の遺伝的分化が認められる (Kubota et al., 2011; Ueki & Tojo, 2023)。このような冷温帯林のクワガタムシ類の遺伝的分化の背景には、共生微生物の温度耐性による宿主クワガタムシの分布域の制限も考えられる。すなわち共生酵母との共進化にともなう宿主クワガタムシの種分化が示唆される。さらに共生酵母の水平伝播は宿主クワガタムシ種内の共生酵母の置換および新規共生酵母獲得を引き起こし、宿主の新規ハビタットへの拡大を促進する要因となることが示唆される。中でも冷温帯林から亜熱帯に至るまで多様な環境に生息するオオクワガ

タ属は、宿主と共生酵母の系統関係に大きな乖離が認められた。このことから、オオクワガタ属では過去に同所的に生息する他の分類群のクワガタムシからの共生酵母の水平伝播が生じた結果、属内でも種ごとに生息する森林帯に対応した共生酵母の系統を保持していると思われる。オオクワガタ属における共生酵母の水平伝播と生息する森林帯の多様化の関係の解明には、日本に生息する種と同種や姉妹種などの近縁種が多数生息するアジアを中心としたオオクワガタ属を網羅する共生酵母の系統関係の解明が期待される。

クワガタムシ雌成虫の菌囊からは共生酵母以外にも多様なバクテリアが確認されている (Miyashita et al., 2015)。また、クワガタムシ類幼虫の腸内には共生酵母のみならずセルロースやキシラン分解性のルミノコッカス科に代表される偏性嫌気性細菌類や窒素固定細菌などの共生微生物が報告されている (三島, 2017)。本研究のように培地を用いた共生微生物の培養は、好気性かつ優占する酵母のみが検出されてしまい、真の共生微生物叢を把握することが困難である (e.g., Rani et al., 2009)。クワガタムシ類の食性の多様化を紐解くには共生微生物間の相互作用を明らかにする必要がある。今後は雌成虫の菌囊および幼虫の腸内の微生物細菌叢をメタゲノムシーケンスにより解明し、共生微生物種間の相互作用を明らかにする必要がある。加えて、抗生物質を用いた共生バクテリアの除去実験によって、クワガタムシ類幼虫の成長における共生バクテリア類の栄養生理的な機能についても解明することが重要である。

第 III 章では、日本列島を代表する樹木であるブナに依存するヒメオオクワガタの系統地理学的構造を明らかにした。その結果、両者はともに日本海側と太平洋側の遺伝的分化が認められた。また、寄種であるブナの分布変遷にともなってヒメオオクワガタも分布域を変動させ、その遺伝子流動の頻度は生息環境であるブナ林の歴史的な分布様式に制限されてきたことを明らかにした。これらの結果は、更新世の気候変動下における寄主樹木の分布域の変化がクワガタムシの遺伝的分化を創出する過程、すなわち種分化

が生じる機構の解明に貢献するものと思われる。ヒメオオクワガタは日本のオオクワガタ属の中でも、比較的標高が高い地域にのみ生息する種である。また、その共生酵母の高温への耐性も他のオオクワガタ属に比べて低いことが示唆されている (Zhu et al., 2022)。このことからヒメオオクワガタが冷涼な生息環境であるブナ林に依存する背景には、共生酵母の温度耐性による分布域の制限も関与している可能性が考えられる。しかしながら、本種がブナの枯死木に依存する栄養生理的な理由は不明であることから、共生微生物をはじめとしたヒメオオクワガタ幼虫の代謝機能を明らかにすることで本種がブナ特異的な食性を獲得した背景を究明する必要がある。

第I章で明らかになったようにクワガタムシは、幼虫が食べる枯死木の腐朽型に応じて、残存する木材成分を代謝可能な酵母と共生している。しかしながら、同じ白色腐朽を選好するクワガタムシ類でも、種ごとに枯死木の状態や部位、あるいは樹種に対する好み異なる (Araya, 2006)。例えば、暖温帯林に生息する白色腐朽食性のクワガタムシに着目すると、オオクワガタは比較的乾燥した立ち枯れの上部を好むが、ヒラタクワガタやノコギリクワガタは立ち枯れの根部や土中に埋まった枯死木を好む。キシロース発酵性酵母の系統内でも宿主クワガタムシごとに特異的な系統の共生酵母に系統分化する。加えて、クワガタムシ類の中でもヒメオオクワガタのように樹種に対する寄主特異性を示すクワガタムシは稀である。今後は各クワガタムシの共生酵母の代謝機能や栄養合成経路を明らかにし、共生酵母の系統間で比較する。またヒメオオクワガタのように樹種に対する特異性を示す種とそうでない種の共生酵母の系統や代謝機能を比較することにより、本研究では未解明である枯死木の部位や樹種などのマイクロハビタットスケールでのクワガタムシの生態学的ニッチの多様化プロセスに迫る。

クワガタムシの適応放散の解明には上述したようないくつかの課題に取り組む必要がある。一方、これまでのクワガタムシと共生酵母の共進化的関係はルリクワガタ属で示されているものの (Kubota et al., 2020)、本論文のようにクワガタムシ科を網羅する分

類群を対象として、両者の共進化を明らかにし、宿主の生態学的ニッチの多様化を示唆した研究は世界でも初めてである。緒言でも述べたように葉食性の甲虫は共生微生物との共進化が引き起こした植物との相互作用の結果として適応放散を遂げてきたと思われる (e.g., Reis et al., 2020; Salem et al., 2020)。そのような中、枯死木食性のクワガタムシと共生酵母の共進化を明らかにした本論文では、樹木に加えて腐朽菌も含めた種間相互作用、すなわち既知の葉食性甲虫とは異なる相互作用を通じてクワガタムシが適応放散を遂げてきたことが明らかになった。また、クワガタムシの種と寄主樹木との共進化的関係からクワガタムシの種分化プロセスを解明した研究も他に例をみない新知見である。本論文においてクワガタムシ-共生酵母-寄主樹木の共生系からクワガタムシの適応放散の一端を解明したということは、甲虫の多様性創出機構の理解に大きく貢献するものである。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、信州大学学術研究院理学系の東城幸治教授には研究活動の全過程を通じて多大なご協力をいただきました。東京大学大学院農学生命科学研究科の久保田耕平教授には共生酵母の実験系の指導や論文執筆において多くのご助力をいただきました。副査の市野隆雄教授、柴田直樹准教授および松本卓也助教をはじめ、信州大学理学部学術研究院理学系の先生方には、多くのご助力をいただきました。篠原弘氏、吉田有岐氏には多くのサンプルを提供していただきました。東京大学の Sheng-Nan Zhang 博士には、第 II 章の成果を含めて発表した論文においてルリクワガタ属とオニクワガタ属の生態ニッチモデリングに関わる解析を担当していただくとともに論文執筆をご協力していただきました。本論文で使用したサンプルの一部は、環境省九州地方環境事務所、九州森林管理局長崎森林管理署、文化庁、鹿児島県大島郡奄美市、瀬戸内町、宇検村、東京都御蔵島村から許可を得て採取しました。黒松内町ブナセンターの斎藤均氏をはじめとした黒松内町町民の方々には、北海道のサンプルの提供および調査において多くのご助力をいただきました。信州大学の竹中將起特任助教、京都大学の鈴木智也博士、基礎生物学研究所の谷野宏樹博士、国立研究開発法人土木研究所の岡本聖矢博士、信州大学東城研究室の OB・OG である小池花苗氏、尾崎貴久氏、百瀬加奈子氏、山崎遙氏、河内理子氏、井上恵輔氏、富澤亮太氏には、実験手法や解析手法について、そしてサンプリングなど多くのご指導、ご助力をいただきました。また、鈴木啓久氏、吉田匠氏、田頭春乃氏、野田聖氏をはじめとした信州大学東城研究室の方々には、日々の研究活動を行う上でご協力、ご助力いただきました。学生生活を続ける上で不可欠な支援をしてくださった家族には多くの助力をいただき、研究活動をスムーズに行うことができました。これまで私に関わってくださった全ての方々にも、この場を借りて深くお礼申し上げます。

## 引用文献

- Aanen, D.K., de Fine Licht, H.H., Debets, A.J.M., Kerstes, N.A.G., Hoekstra, R.F. & Boomsma, J.J. (2009) High symbiont relatedness stabilizes mutualistic cooperation in fungus-growing termites. *Science*, **326**, 1103–1106.
- Akaike, H. (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, **19**, 716–723.
- Alexander, D.H., Novembre, J. & Lange, K. (2009) Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research*, **19**, 1655–1664.
- Aoki, K., Kato, M. & Murakami, N. (2009) Phylogeographical patterns of a generalist acorn weevil: insight into the biogeographical history of broadleaved deciduous and evergreen forests. *BMC Evolutionary Biology*, **9**, 103.
- Araya, K. (1993) Relationship between the decay types of dead wood and occurrence of Lucanid beetles (Coleoptera:Lucanidae). *Applied Entomology and Zoology*, **28**, 27–33.
- Araya, K. (2002) Effects of variation in dead wood on resource utilization patterns and fitness of lucanid beetles (Insecta, Coleoptera, Lucanidae). *Japanese Journal of Ecology*, **52**, 89–98. (In Japanese with English title)
- Araya, K. (2006) Effort on feeding tree trunks: a case of decaying wood and lucanid larvae. In: Shibata, E. & Togashi, K. (Eds), *The fascinating lives of insects residing in tree trunks*, pp. 213–236. Tokai University Press, Kanagawa. (In Japanese)
- Araya, K. (2009) Ecological notes on *Xiphodontus antilope* Westwood, 1838 distributed in South Africa. *The Natural and Insects*, **44**, 22–26. (In Japanese with English title)

- Bai, M., Ren, D. & Yang, X. (2012) *Prosinodendron krelli* from the Yixian Formation, China: A missing link among Lucanidae, Diphylostomatidae and Passalidae (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Cretaceous Research*, **34**, 334–339.
- Batra, L.R. (1963) Ecology of ambrosia fungi and their dissemination by beetles. *Transactions of the Kansas Academy of Science. Kansas Academy of Science*, **66**, 213.
- Behrensmeyer, A.K. & Turner, A. (2013) Taxonomic Occurrences of Suidae Recorded in the Paleobiology Database. <http://fossilworks.org>. Available at: <http://fossilworks.org> (accessed 10 October 2022).
- Berasategui, A., Axelsson, K., Nordlander, G., Schmidt, A., Borg-Karlson, A.-K., Gershenzon, J., Terenius, O. & Kaltenpoth, M. (2016) The gut microbiota of the pine weevil is similar across Europe and resembles that of other conifer-feeding beetles. *Molecular Ecology*, **25**, 4014–4031.
- Biedermann, P.H.W. & Vega, F.E. (2020) Ecology and evolution of insect-fungus mutualisms. *Annual Review of Entomology*, **65**, 431–455.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.-H., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A. & Drummond, A.J. (2014) BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*, **10**, e1003537.
- Bright, M. & Bulgheresi, S. (2010) A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nature Reviews. Microbiology*, **8**, 218–230.
- Catchen, J.M., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W. & Postlethwait, J.H. (2011) Stacks: building and genotyping Loci de novo from short-read sequences. *G3*, **1**, 171–182.

- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y. & Gu, J. (2018) fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* , **34**, i884–i890.
- Coyne, J.A. & Orr, H.A. (2004) *Speciation*. 545pp. Oxford University Press, USA.
- Darriba, D., Posada, D., Kozlov, A.M., Stamatakis, A., Morel, B. & Flouri, T. (2019) ModelTest-NG: a new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models. *Molecular Biology and Evolution*, **37**, 291–294.
- Deichmüller, J.V. (1881) Fossile Insecten aus dem Diatomeenschiefer von Kutschlin bei Bilin, Böhmen. *Nova Acta Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Germanicae Naturae Curiosorum*, **42**, 293-331.
- Drag, L., Hauck, D., Rican, O., Schmitt, T., Shovkoon, D.F., Godunko, R.J., Curletti, G. & Cizek, L. (2018) Phylogeography of the endangered saproxylic beetle *Rosalia longicorn*, *Rosalia alpina* (Coleoptera, Cerambycidae), corresponds with its main host, the European beech (*Fagus sylvatica*, Fagaceae). *Journal of Biogeography*, **45**, 2631–2644.
- Droop, A.P. (2016) fqtools: an efficient software suite for modern FASTQ file manipulation. *Bioinformatics* , **32**, 1883–1884.
- Duron, O. & Noël, V. (2016) A wide diversity of *Pantoea* lineages are engaged in mutualistic symbiosis and cospeciation processes with stinkbugs. *Environmental Microbiology Reports*, **8**, 715–727.
- Ersts, P.J. (2011) Geographic Distance Matrix Generator (version 1.2.3). Available at: [https://biodiversityinformatics.amnh.org/open\\_source/gdmg/](https://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg/) (accessed 23 January 2022)

- Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. (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.
- Fu, Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915–925.
- Fujii, N., Tomaru, N., Okuyama, K., Koike, T., Mikami, T. & Ueda, K. (2002) Chloroplast DNA phylogeography of *Fagus crenata* (Fagaceae) in Japan. *Plant Systematics and Evolution = Entwicklungsgeschichte und Systematik der Pflanzen*, **232**, 21–33.
- Fujita, H. (2010) *The Lucanid Beetles of the World*. 480pp. Mushi-sha, Tokyo. (In Japanese)
- Fujita, H. & Ichikawa, T. (1987) A new subspecies of *Nipponodorcus montivagus* (LEWIS) from Kyūshū. *Gekkan-Mushi*, **193**, 17–20. (In Japanese)
- Gasca-Pineda, J., Velez, P. & Hosoya, T. (2020) Phylogeography of post-Pleistocene population expansion in *Dasyscyphella longistipitata* (Leotiomycetes, Helotiales), an endemic fungal symbiont of *Fagus crenata* in Japan. *MycKeys*, **65**, 1–24.
- Gilbertson, R.L. (1980) Wood-rotting fungi of north America. *Mycologia*, **72**, 1–49.
- Gómez, A. & Lunt, D.H. (2007) Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian peninsula. In: Weiss, S. & Ferrand, N. (Eds), *Phylogeography of Southern European Refugia*, pp. 155–188. Springer, Dordrecht.
- Grebennikov, V.V. & Leschen, R.A.B. (2010) External exoskeletal cavities in Coleoptera and their possible mycangial functions. *Entomological Science*, **13**, 81–98.

- Grimaldi, D. & Engel, M. S. (2005). *Evolution of the Insects*. 733pp. Cambridge University Press, USA.
- Grünwald, S., Pilhofer, M. & Höll, W. (2010) Microbial associations in gut systems of wood- and bark-inhabiting longhorned beetles [Coleoptera: Cerambycidae]. *Systematic and Applied Microbiology*, **33**, 25–34.
- Guedes, J., Austermann, J. & Mitrovica, J.X. (2016) Lost foraging opportunities for east Asian Hunter-gatherers due to rising sea level since the last glacial maximum. *Geoarchaeology*, **31**, 255–266.
- Haack, R.A. & Slansky, F. (1987) Nutritional ecology of wood-feeding coleoptera Lepidoptera and Hymenoptera. *Insect Adaptations to Woody Environments*, **15**, 449-486.
- Hao, H. & Chang-Chin, C. (2013) Phylogeny and systematics of Lucanidae (sensu Holloway, 1960 & 1968) from China. In: Hao, H. & Chang-Chin, C. (Eds), *Stag Beetle of China II*, pp. 41–113. Formosa Ecological Company, Taiwan.
- Hewitt, G.M. (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological journal of the Linnean Society. Linnean Society of London*, **58**, 247–276.
- Hewitt, G.M. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907–913.
- Hiraoka, K. & Tomaru, N. (2009) Genetic divergence in nuclear genomes between populations of *Fagus crenata* along the Japan Sea and Pacific sides of Japan. *Journal of Plant Research*, **122**, 269–282.

- Horikawa, Y. (1972) *Atlas of the Japanese Flora, an introduction to plant sociology of East Asia*. 500pp. Gakken, Tokyo.
- Hosoya, S., Hirase, S., Kikuchi, K., Nanjo, K., Nakamura, Y., Kohno, H. & Sano, M. (2019) Random PCR-based genotyping by sequencing technology GRAS-Di (genotyping by random amplicon sequencing, direct) reveals genetic structure of mangrove fishes. *Molecular Ecology Resources*, **19**, 1153–1163.
- Hosoya, T. (2011) Phylogenetic relationships of the genus *Dorcus* and its related genera (Coleoptera, Lucanidae): a reanalysis of allozyme data. *Elytra New Series*, **1**, 199–209.
- Hosoya, T. & Araya, K. (2005) Phylogeny of Japanese stag beetles (Coleoptera: Lucanidae) inferred from 16S mtrRNA gene sequences, with reference to the evolution of sexual dimorphism of mandibles. *Zoological Science*, **22**, 1305–1318.
- Hosoya, T., Honda, M. & Araya, K. (2001) Genetic variation of 16S rRNA gene observed in *Ceruchus lignarius* and *Dorcus rectus rectus* (Coleoptera: Lucanidae). *Entomological Science*, **4**, 335–344.
- Huang, T.I. (2018) Diversity and ecology of stag beetles (Lucanidae). In: Ulyshen M.D. (Ed), *Saproxylic Insects: Diversity, Ecology and Conservation*, pp. 149–165. Springer Cham, USA.
- Hukushima, T., Takasuna, H., Matsui, T., Nishio, T., Kyan, Y. & Tsunetomi, Y. (1995) New phytosociological classification of beech forests in Japan. *Japanese Journal of Ecology*, **45**, 79–98. (In Japanese with English abstract)
- Hunt, T., Bergsten, J., Levkanicova, Z., Papadopoulou, A., John, O.S., Wild, R., Hammond, P.M., Ahrens, D., Balke, M., Caterino, M.S., Gómez-Zurita, J., Ribera, I., Barraclough, T.G.,

- Bocakova, M., Bocak, L. & Vogler, A.P. (2007) A comprehensive phylogeny of beetles reveals the evolutionary origins of a superradiation. *Science*, **318**, 1913–1916.
- Imura, Y. (2010) *The genus Platycerus of East Asia*. 240pp. Roppon-Ashi Entomological Books, Tokyo.
- Ito, H., Nakajima, N., Onuma, M. & Murayama, M. (2020) Genetic diversity and genetic structure of the wild Tsushima leopard cat from genome-wide analysis. *Animals : An Open access Journal from MDPI*, **10**, .
- Itoh, H., Tago, K., Hayatsu, M. & Kikuchi, Y. (2018) Detoxifying symbiosis: microbe-mediated detoxification of phytotoxins and pesticides in insects. *Natural Product Reports*, **35**, 434–454.
- Jeffries, T.W., Grigoriev, I.V., Grimwood, J., Laplaza, J.M., Aerts, A., Salamov, A., Schmutz, J., Lindquist, E., Dehal, P., Shapiro, H., Jin, Y.-S., Passoth, V. & Richardson, P.M. (2007) Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nature Biotechnology*, **25**, 319–326.
- Jeffries, T.W. & Kurtzman, C.P. (1994) Strain selection, taxonomy, and genetics of xylose-fermenting yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*, **16**, 922–932.
- Katoh, K. & Standley, D.M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 772–780.
- Kikuchi, Y., Hosokawa, T. & Fukatsu, T. (2007) Insect-microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 4308–4316.

- Kikuchi, Y., Hosokawa, T. & Fukatsu, T. (2011) An ancient but promiscuous host–symbiont association between *Burkholderia* gut symbionts and their heteropteran hosts. *The ISME Journal*, **5**, 446–460.
- Kim, S.I. & Farrell, B.D. (2015) Phylogeny of world stag beetles (Coleoptera: Lucanidae) reveals a Gondwanan origin of Darwin’s stag beetle. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **86**, 35–48.
- Koga, R., Meng, X.-Y., Tsuchida, T. & Fukatsu, T. (2012) Cellular mechanism for selective vertical transmission of an obligate insect symbiont at the bacteriocyte–embryo interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, E1230–E1237.
- Kopelman, N.M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N.A. & Mayrose, I. (2015) Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, **15**, 1179–1191.
- Kozlov, A.M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B. & Stamatakis, A. (2019) RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, **35**, 4453–4455.
- Krah, F.-S., Bässler, C., Heibl, C., Soghigian, J., Schaefer, H. & Hibbett, D.S. (2018) Evolutionary dynamics of host specialization in wood-decay fungi. *BMC Evolutionary Biology*, **18**, 119.
- Kubota, K., Kubota, N. & Otake, H. (2009) A morphological phylogeny of the genus *Platycerus* (Coleoptera, Lucanidae) in Japan. *Biogeography*, **11**, 57–72.
- Kubota, K., Nagahata, Y., Ikeda, H., Kubota, N., Otake, H. & Umetsu, K. (2011) Diversification process of stag beetles belonging to the genus *Platycerus* Geoffroy (Coleoptera: Lucanidae)

- in Japan based on nuclear and mitochondrial genes. *Entomological Science*, **14**, 411–427.
- Kubota, K., Watanabe, K., Zhu, X.-J., Kawakami, K., Tanahashi, M. & Fukatsu, T. (2020) Evolutionary relationship between *Platycerus* stag beetles and their mycangium-associated yeast symbionts. *Frontiers in Microbiology*, **11**, 1436.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, **33**, 1870–1874.
- Leigh, J.W. & Bryant, D. (2015) Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in ecology and evolution / British Ecological Society*, **6**, 1110–1116.
- Levy, J.F., Eveleigh, D.E., Hartley, B.S., Broda, P.M.A. & Senior, P.J. (1987) The natural history of the degradation of wood. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical and Physical Sciences*, **321**, 423–433.
- Lin, Y., He, P., Wang, Q., Lu, D., Li, Z., Wu, C. & Jiang, N. (2010) The alcohol dehydrogenase system in the xylose-fermenting yeast *Candida maltosa*. *PloS One*, **5**, e11752.
- Lisiecki, L.E. & Raymo, M.E. (2005) A Pliocene-Pleistocene stack of 57 globally distributed benthic  $\delta^{18}\text{O}$  records. *Paleoceanography*, **20**, .
- Luan, J., Sun, X., Fei, Z. & Douglas, A.E. (2018) Maternal inheritance of a single somatic animal cell displayed by the bacteriocyte in the whitefly *Bemisia tabaci*. *Current biology*, **28**, 459-465.
- Magallón, S. & Castillo, A. (2009) Angiosperm diversification through time. *American Journal of Botany*, **96**, 349–365.

- Marchese, C. (2015) Biodiversity hotspots: a shortcut for a more complicated concept. *Global Ecology and Conservation*, **3**, 297–309.
- Martin, B. (2018) raxml\_ascbias: Script for removing or counting invariant sites for the RAxML ascertainment bias corrections. Available at: [https://github.com/btmartin721/raxml\\_ascbias](https://github.com/btmartin721/raxml_ascbias) (accessed 8 November 2022).
- Matsuura, Y., Moriyama, M., Łukasik, P., Vanderpool, D., Tanahashi, M., Meng, X.-Y., McCutcheon, J.P. & Fukatsu, T. (2018) Recurrent symbiont recruitment from fungal parasites in cicadas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **115**, E5970–E5979.
- McKenna, D.D., Shin, S., Ahrens, D., Balke, M., Beza-Beza, C., Clarke, D.J., Donath, A., Escalona, H.E., Friedrich, F., Letsch, H., Liu, S., Maddison, D., Mayer, C., Misof, B., Murin, P.J., Niehuis, O., Peters, R.S., Podsiadlowski, L., Pohl, H., Scully, E.D., Yan, E.V., Zhou, X., Ślipiński, A. & Beutel, R.G. (2019) The evolution and genomic basis of beetle diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **116**, 24729–24737.
- McRae, B.H. (2006) Isolation by resistance. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, **60**, 1551–1561.
- McRae, B.H., Dickson, B.G., Keitt, T.H. & Shah, V.B. (2008) Using circuit theory to model connectivity in ecology, evolution, and conservation. *Ecology*, **89**, 2712–2724.
- Meirmans, P.G. (2020) Genodive version 3.0: easy-to-use software for the analysis of genetic data of diploids and polyploids. *Molecular Ecology Resources*, **20**, 1126–1131.

- Miyashita, A., Hirai, Y., Sekimizu, K. & Kaito, C. (2015) Antibiotic-producing bacteria from stag beetle mycangia. *Drug Discoveries & Therapeutics*, **9**, 33–37.
- Momohara, A. (2016) Stages of major floral change in Japan based on macrofossil evidence and their connection to climate and geomorphological changes since the Pliocene. *Quaternary International: the Journal of the International Union for Quaternary Research*, **397**, 93–105.
- Mueller, U.G., Rehner, S.A. & Schultz, T.R. (1998) The evolution of agriculture in ants. *Science*, **281**, 2034–2038.
- Murai, H., Yamaya, K., Kataoka, H. & Yui, M. (1991) *Natural Environment and Its Conservation on Buna (Fagus crenata) forest*. 399pp. Soft Science, Tokyo. (In Japanese)
- National Conservation Bureau, Ministry of the Environment (1999) *The 5th Basic Nature Conservation Survey, Report on Vegetation Survey*. 346pp. Asia Air Survey, Tokyo. (In Japanese)
- Nguyen, N.H., Suh, S.-O. & Blackwell, M. (2007) Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from Neuroptera and other insects. *Mycologia*, **99**, 842–858.
- Nikolajev, G.V., Wang, B., Liu, Y. & Zhang, H. (2011) Stag beetles from the Mesozoic of inner Mongolia, China (Scarabaeoidea: Lucanidae). *Acta Palaeontologica Sinica*, **50**, 41–47.
- Nishikawa, K., Matsui, M., Tanabe, S. & Sato, S. (2007) Morphological and allozymic variation in *Hynobius boulengeri* and *H. stejnegeri* (Amphibia: Urodela: Hynobiidae). *Zoological Science*, **24**, 752–766.
- Ohnishi, N., Uno, R., Ishibashi, Y., Tamate, H.B. & Oi, T. (2009) The influence of climatic

- oscillations during the Quaternary Era on the genetic structure of Asian black bears in Japan. *Heredity*, **102**, 579–589.
- Ohshima, K. (1990) The history of straits around the Japanese Islands in the late-quaternary. *Quaternary Research*, **29**, 193–208.
- Okajima, S. & Araya, K. (2012) *The Standard of Scarabaeoid Beetles in Japan*. 300pp. Gakken, Tokyo. (In Japanese)
- Okaura, T. & Harada, K. (2002) Phylogeographical structure revealed by chloroplast DNA variation in Japanese beech (*Fagus crenata* Blume). *Heredity*, **88**, 322–329.
- Okaura, T., Quang, N.D., Ubukata, M. & Harada, K. (2007) Phylogeographic structure and late Quaternary population history of the Japanese oak *Quercus mongolica* var. *crispula* and related species revealed by chloroplast DNA variation. *Genes & Genetic Systems*, **82**, 465–477.
- Oshida, T., Masuda, R. & Ikeda, K. (2009) Phylogeography of the Japanese giant flying squirrel, *Petaurista leucogenys* (Rodentia: Sciuridae): implication of glacial refugia in an arboreal small mammal in the Japanese Islands. *Biological Journal of the Linnean Society*, **98**, 47–60.
- Papadopoulou, A., Anastasiou, I. & Vogler, A.P. (2010) Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: the mid-Aegean trench calibration. *Molecular Biology and Evolution*, **27**, 1659–1672.
- Paracer, S. & Ahmadjian, V. (2000). *Symbiosis: An Introduction to Biological Associations*. 291pp. Oxford University Press, USA.

- Parkin, E.A. (1940) The digestive enzymes of some wood-boring beetle larvae. *The Journal of Experimental Biology*, **17**, 364-377.
- Petkova, D., Novembre, J. & Stephens, M. (2016) Visualizing spatial population structure with estimated effective migration surfaces. *Nature Genetics*, **48**, 94–100.
- Phillips, S.J. & Dudík, M. (2008) Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography*, **31**, 161–175.
- Quantum GIS Development Team (2021) QGIS Geographic Information System; Open Source Geospatial Foundation Project. Available at: <http://www.qgis.org> (accessed 20 January 2021).
- Rambaut, A. (2018) FigTree Version 1.4.4. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (accessed 21 January 2022).
- Rambaut, A., Drummond, A.J., Xie, D., Baele, G. & Suchard, M.A. (2018) Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, **67**, 901–904.
- Rani, A., Sharma, A., Rajagopal, R., Adak, T. & Bhatnagar, R. K. (2009). Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. *BMC Microbiology*, **9**, 1–22.
- Reis, F., Kirsch, R., Pauchet, Y., Bauer, E., Bilz, L.C., Fukumori, K., Fukatsu, T., Kölsch, G. & Kaltenpoth, M. (2020) Bacterial symbionts support larval sap feeding and adult folivory in (semi-)aquatic reed beetles. *Nature Communications*, **11**, 2964.
- Roets, F. & Oberlander, K.C. (2020) Symbiotic yeasts from the mycangium, larval gut and woody

- substrate of an African stag beetle *Xiphodontus antilope* (Coleoptera: Lucanidae). *Antonie van Leeuwenhoek*, **113**, 1123–1134.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**, 1572–1574.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E. & Sánchez-Gracia, A. (2017) DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, **34**, 3299–3302.
- Sadaki, R., Hayashi, T. & Tsuchiya, T. (2014) *Neolucanus in Japan*. 136pp. Mushi-sha, Tokyo. (In Japanese)
- Sakaguchi, S., Takeuchi, Y., Yamasaki, M., Sakurai, S. & Isagi, Y. (2011) Lineage admixture during postglacial range expansion is responsible for the increased gene diversity of *Kalopanax septemlobus* in a recently colonised territory. *Heredity*, **107**, 338–348.
- Salem, H., Florez, L., Gerardo, N. & Kaltenpoth, M. (2015) An out-of-body experience: the extracellular dimension for the transmission of mutualistic bacteria in insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **282**, 20142957.
- Salem, H. & Kaltenpoth, M. (2022) Beetle–bacterial symbioses: endless forms most functional. *Annual Review of Entomology*, **67**, 201–219.
- Salem, H., Kirsch, R., Pauchet, Y., Berasategui, A., Fukumori, K., Moriyama, M., Cripps, M., Windsor, D., Fukatsu, T. & Gerardo, N.M. (2020) Symbiont digestive range reflects host plant breadth in herbivorous beetles. *Current biology*, **30**, 2875–2886.

- Santa Maria, J. & Garcia Aser, C. (1977) *Pichia segobiensis*, sp. nov.[yeast]. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Serie General*, **5**, 45-50.
- Schluter, D. (2000) *The ecology of adaptive radiation*. 296pp. Oxford University Press, USA.
- Schwarz, G. (1978) Estimating the dimension of a model. *Annals of statistics*, **6**, 461–464.
- Shimizu, Y. (2014) Process of the formation of Japanese forest and typification of vegetation zone : from an east Asian viewpoint. *Regional Views = Chiiki-Gaku-Kenkyu*, **27**, 19–75. (In Japanese with English abstract)
- Shoda, E., Kubota, K. & Makihara, H. (2003) Geographical structuring of mitochondrial DNA in *Semanotus japonicus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Applied Entomology and Zoology*, **38**, 339-345.
- Shoda-Kagaya, E., Saito, S., Okada, M., Nozaki, A., Nunokawa, K. & Tsuda, Y. (2010) Genetic structure of the oak wilt vector beetle *Platypus quercivorus*: inferences toward the process of damaged area expansion. *BMC Ecology*, **10**, 21.
- Shukla, S.P. & Beran, F. (2020) Gut microbiota degrades toxic isothiocyanates in a flea beetle pest. *Molecular Ecology*, **29**, 4692–4705.
- Six, D.L. (2003) Bark beetle-fungus symbioses. *Insect Symbiosis*, **1**, 97–114.
- Stamatakis, A. (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, **30**, 1312–1313.
- Stokland, J.N., Siitonen, J. & Jonsson, B.G. (2012a) Wood decomposition. In: Stokland, J.N. (Ed), *Biodiversity in dead wood*, pp. 10–28. Cambridge University Press, USA.

- Stokland, J.N., Siitonen, J. & Jonsson, B.G. (2012b) Evolution of saproxylic organisms. In: Stokland, J.N. (Ed), *Biodiversity in dead wood*, pp. 218–247. Cambridge University Press, USA.
- Sugahara, K., Kaneko, Y., Ito, S., Yamanaka, K., Sakio, H., Hoshizaki, K., Suzuki, W., Yamanaka, N. & Setoguchi, H. (2011) Phylogeography of Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinata*) in the Japanese Archipelago based on chloroplast DNA haplotypes. *Journal of Plant Research*, **124**, 75–83.
- Suh, S.-O., Houseknecht, J.L., Gujjari, P. & Zhou, J.J. (2013) *Scheffersomyces parashehatae* f.a., sp. nov., *Scheffersomyces xylosifermentans* f.a., sp. nov., *Candida broadrunensis* sp. nov. and *Candida manassasensis* sp. nov., novel yeasts associated with wood-ingesting insects, and their ecological and biofuel implications. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **63**, 4330–4339.
- Suh, S.-O., Marshall, C.J., McHugh, J.V. & Blackwell, M. (2003) Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. *Molecular Ecology*, **12**, 3137–3145.
- Suh, S.-O., McHugh, J.V., Pollock, D.D. & Blackwell, M. (2005) The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. *Mycological Research*, **109**, 261–265.
- Suh, S.-O., Nguyen, N.H. & Blackwell, M. (2008) Yeasts isolated from plant-associated beetles and other insects: seven novel *Candida* species near *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, **8**, 88–102.
- Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585–595.

- Takahashi, M. (1986) Fungal decay types, their significance in wood preservation. *Wood Research and Technical Notes*, **22**, 19–36.
- Tanabe, A.S. (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.
- Tanahashi, M. & Hawes, C.J. (2016) The presence of a mycangium in European *Sinodendron cylindricum* (Coleoptera: Lucanidae) and the associated yeast symbionts. *Journal of Insect Science*, **16**, .
- Tanahashi, M., Ikeda, H. & Kubota, K. (2018) Elementary budget of stag beetle larvae associated with selective utilization of nitrogen in decaying wood. *The Science of Nature*, **105**, 33.
- Tanahashi, M., Kim, J.-K., Watanabe, K., Fukatsu, T. & Kubota, K. (2017) Specificity and genetic diversity of xylose-fermenting *Scheffersomyces* yeasts associated with small blue stag beetles of the genus *Platycerus* in East Asia. *Mycologia*, **109**, 630–642.
- Tanahashi, M. & Kubota, K. (2013) Utilization of the nutrients in the soluble and insoluble fractions of fungal mycelium by larvae of the stag beetle, *Dorcus rectus* (Coleoptera: Lucanidae). *European Journal of Entomology*, **110**, 611–615.
- Tanahashi, M., Kubota, K., Matsushita, N. & Togashi, K. (2010) Discovery of mycangia and the associated xylose-fermenting yeasts in stag beetles (Coleoptera: Lucanidae). *Naturwissenschaften*, **97**, 311–317.
- Tojo, K., Sekiné, K., Takenaka, M., Isaka, Y., Komaki, S., Suzuki, T. & Schoville, S.D. (2017) Species diversity of insects in Japan: their origins and diversification processes.

*Entomological Science*, **20**, 357–381.

Toki, W., Tanahashi, M., Togashi, K. & Fukatsu, T. (2012) Fungal farming in a non-social beetle. *PloS One*, **7**, e41893.

Tomaru, N., Mitsutsuji, T., Takahashi, M., Tsumura, Y., Uchida, K. & Ohba, K. (1997) Genetic diversity in *Fagus crenata* (Japanese beech): influence of the distributional shift during the late-Quaternary. *Heredity*, **78**, 241–251.

Tomaru, N., Takahashi, M., Tsumura, Y., Takahashi, M. & Ohba, K. (1998) Intraspecific variation and phylogeographic patterns of *Fagus crenata* (Fagaceae) mitochondrial DNA. *American Journal of Botany*, **85**, 629.

Tsuda, Y. & Ide, Y. (2005) Wide-range analysis of genetic structure of *Betula maximowicziana*, a long-lived pioneer tree species and noble hardwood in the cool temperate zone of Japan. *Molecular Ecology*, **14**, 3929–3941.

Tsuda, Y., Kimura, M., Kato, S., Katsuki, T., Mukai, Y. & Tsumura, Y. (2009) Genetic structure of *Cerasus jamasakura*, a Japanese flowering cherry, revealed by nuclear SSRs: implications for conservation. *Journal of Plant Research*, **122**, 367–375.

Tsukada, M. (1982a) Late-Quaternary development of the *Fagus* forest in the Japanese archipelago. *Japanese Journal of Ecology*, **32**, 113–118.

Tsukada, M. (1982b) Late-quaternary shift of *Fagus* distribution. *The Botanical Magazine = Shokubutsu-Gaku-Zasshi*, **95**, 203–217.

Tsukada, M. (1982c) *Cryptomeria japonica*: glacial refugia and late-glacial and postglacial

- migration. *Ecology*, **63**, 1091–1105.
- Tsukada, M. (1983) Vegetation and climate during the last glacial maximum in Japan. *Quaternary Research*, **19**, 212–235.
- Tsukada, M. (1985) Map of vegetation during the last glacial maximum in Japan. *Quaternary Research*, **23**, 369–381.
- Tsumura, Y., Uchiyama, K., Moriguchi, Y., Ueno, S. & Ihara-Ujino, T. (2012) Genome scanning for detecting adaptive genes along environmental gradients in the Japanese conifer, *Cryptomeria japonica*. *Heredity*, **109**, 349–360.
- Ueki, G. & Tojo, K. (2018) The potential distribution area of the endangered saproxylic stag beetle, *Dorcus montivagus* (Coleoptera, Lucanidae) : with special reference to its specific host tree, the Japanese beech, *Fagus crenata*. *New Entomologist*, **67**, 63–68.
- Ueki, G. & Tojo, K. (2023) The phylogeography of the stag beetle *Dorcus montivagus* (Coleoptera, Lucanidae): Comparison with the phylogeography of its specific host tree, the Japanese beech *Fagus crenata*. *Entomological science*, **26**, e12535.
- Ueki, G., Zhang, S.-N., Zhu, X.-J., Wen, X.-J., Tojo, K. & Kubota, K. (2021) Lateral transmission of yeast symbionts among Lucanid beetle taxa. *Frontiers in Microbiology*, **12**, 794904.
- Urbina, H. & Blackwell, M. (2012) Multilocus phylogenetic study of the *Scheffersomyces* yeast clade and characterization of the N-terminal region of xylose reductase gene. *PloS One*, **7**, e39128.
- Urbina, H., Schuster, J. & Blackwell, M. (2013) The gut of Guatemalan passalid beetles: a habitat

- colonized by cellobiose- and xylose-fermenting yeasts. *Fungal Ecology*, **6**, 339–355.
- Vanderpool, D., Bracewell, R.R. & McCutcheon, J.P. (2018) Know your farmer: ancient origins and multiple independent domestications of ambrosia beetle fungal cultivars. *Molecular Ecology*, **27**, 2077–2094.
- Vega, F.E. & Blackwell, M. (2005) *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution*. 350pp. Oxford University Press, USA.
- West, S.A., Fisher, R.M., Gardner, A. & Kiers, E.T. (2015) Major evolutionary transitions in individuality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**, 10112–10119.
- Worrall, J.J., Anagnost, S.E. & Zabel, R.A. (1997) Comparison of wood decay among diverse lignicolous fungi. *Mycologia*, **89**, 199–219.
- Wright, S. (1943) Isolation by distance. *Genetics*, **28**, 114–138.
- Yu, Y., Blair, C. & He, X. (2020) RASP 4: ancestral state reconstruction tool for multiple genes and characters. *Molecular Biology and Evolution*, **37**, 604–606.
- Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E. & Billups, K. (2001) Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science*, **292**, 686–693.
- Zhang, G., Browne, P., Zhen, G., Johnston, A., Cadillo-Quiroz, H. & Franz, N. (2017) Endosymbiont diversity and evolution across weevil tree of life. *BioRxiv*, 171181.
- Zhu, X.-J., Jang, T.-W., Kim, J.-K. & Kubota, K. (2018) Genetic divergence of *Platycerus hongwonpyoi* (Coleoptera: Lucanidae) in South Korea. *Entomological Science*, **22**, 86–97.

Zhu, X.-J., Jang, T.-W. & Kubota, K. (2020a) First report of two phylogenetically distant Lucanid taxa, *Platycerus hongwonpyoi* Imura et Choe and *Prismognathus dauricus* (Motschulsky) (Coleoptera, Lucanidae) in South Korea, sharing the same lineage of yeast symbionts. *Elytra. New series*, **10**, 187–194.

Zhu, X.-J., Ma, T., Imura, Y., Wen, X.-J. & Kubota, K. (2020b) Molecular phylogeny and historical biogeography of the genus *Platycerus* (Coleoptera, Lucanidae) in East Asia. *Zoologica Scripta*, **49**, 582–595.

Zhu, X.-J., Zhang, S.-N., Watanabe, K., Kawakami, K., Kubota, N., Takagi, E., Tanahashi, M., Wen, X.-J. & Kubota, K. (2022) Diverse heat tolerance of the yeast symbionts of *Platycerus* stag beetles in Japan. *Frontiers in Microbiology*, **12**, 793592.

荒谷邦雄 (2017a) 日本列島のクワガタムシの起源と種分化. 長谷川道明編「クワガタムシ、カブトムシ学の最新研究」. pp. 10–13. 豊橋市自然史博物館, 愛知.

荒谷邦雄 (2017b) 琉球列島におけるクワガタムシの起源と進化. 長谷川道明編「クワガタムシ、カブトムシ学の最新研究」. pp. 14–16. 豊橋市自然史博物館, 愛知.

荒谷邦雄. (2020). 樹洞性大型甲虫類 (ヤンバルテナガコガネ・マルバネクワガタ類) の保全管理ユニットの設定と保全技術の開発. 城ヶ原貴通編「奄美・琉球における遺産価値の高い森林棲絶滅危惧種に対応する保全技術開発」. pp. 89–104. 独立行政法人環境再生保全機構, 神奈川.

小山泰弘 (2013) ブナの保全単位の設定に関する保全遺伝学的研究. 長野県林業総合センター研究報告, **27**, 45–106.

三島達也 (2017) クワガタムシ、カブトムシの栄養生理. 長谷川道明編「クワガタムシ、

カブトムシ学の最新研究」. pp. 39–56. 豊橋市自然史博物館, 愛知.

戸丸信弘 (2013) シリーズ:日本の森林樹木の地理的遺伝構造(2) ブナ(ブナ科ブナ属).  
*森林遺伝育種*, **2**, 56–61.

上木岳, 東城幸治 (2019) ヒメオオクワガタとアカアシクワガタの遺伝構造と遺伝的多  
様性およびブナ林との分布変遷との関連性. *昆虫 DNA 研究会ニュースレター*, **31**,  
19–24.