

ミトコンドリア DNA に基づく矢作川流域における ミカワオサムシの遺伝的構造の解明

Genetic structure of *Carabus arrowianus* in Yahagi-Gawa River
based on mitochondrial DNA

長太伸章¹⁾・間野隆裕²⁾・曾田貞滋¹⁾

Nobuaki NAGATA, Takahiro MANO and Teiji SOTA

要 約

豊田市を中心とした矢作川流域のミカワオサムシ *Carabus arrowianus* について、地域集団間の遺伝的關係や分散の障害としての矢作川の機能を解明するために、167 個体についてミトコンドリア DNA NADH 脱水素酵素サブユニット 5 (ND5) 遺伝子の塩基配列を決定した。得られたハプロタイプは大きく 2 つのクレード (分岐群) に分かれ、集団によって保有するクレードの頻度は大きく異なった。クレードの頻度の分布は地理的なまとまりを示し、矢作川など河川による分散の制限が示唆されたが、同時に山地と平野といった地形とも関連が見られた。

キーワード オサムシ、地域集団、分子系統

はじめに

オサムシ亜族 (鞘翅目オサムシ科) の甲虫は後翅が退化しているため飛翔することができず、歩行のみによって移動分散する。そのため分散能力に限られるだけでなく、地理的な障壁の影響を受けやすいと考えられる。日本列島固有であるオサムシ属 *Carabus* オオオサムシ亜属 *Ohomopterus* のオサムシは形態から 5 種群 15 種に分類されているが (石川, 1991)、種内においても地域間分化が著しく、多数の亜種が記載されている。本亜属では分子系統を用いた種分化過程の推定の研究も早くから行われており (Su et. al., 1996; Sota & Vogler 2001, 2003; 大澤ほか, 2002)、多くの知見が得られている。

近年、種内の遺伝的多様性や地域集団間の遺伝的分化の程度を評価したり、形態や生態的特性の変異と遺伝的分化の関係を調べるために、種内の地域集団ごとの遺伝的な構成 (遺伝的構造) を解明する研究が多く行われている。日本国内でもメダカ *Oryzias latipes* (Takehana et. al., 2001) やホタル類 (Suzuki et. al., 2002; 吉川ら, 2001; 草桶・日和, 2002; 鈴木, 2004) など様々な生物で種内の遺伝的構造の研究が行われており、様々な地域的な生態的特性の違いが遺伝的分化をともなっていることが明らかになっている。さらに遺伝的多様性の保全という観点から、保全生物学の分野でも積極的に研究が行われている (小池・松井, 2003)。しかし、オオオサムシ亜属では地域間分化が大きいと考えられている

にもかかわらず、種内の遺伝的構造を解明した研究はミカワオサムシとアオオサムシの交雑帯の研究 (Sota et. al., 2001) 以外ではほとんど行われていない。

ミカワオサムシ *Carabus arrowianus* Breuning はオオオサムシ亜属の中では中型の種で、東海地方を中心に大井川以西から長良川以东および三重県の一部に分布する。本種は主に交尾器の形態から 7 亜種に分けられるが (Ishikawa & Kubota, 1994; Kubota & Yahiro, 2003)、矢作川流域には基亜種 *C. a. arrowianus* が分布する。本種は頭部、前胸背板、鞘翅など背面の色彩に多型があり、赤銅色、黒色に大別される (長谷川ほか, 2001)。この地域では地域集団ごとの色彩多型が著しく (長谷川ほか, 2001; 小鹿・長谷川, 2003)、また上流の集団と下流の集団では体サイズにも集団間の変異が見られる。これらの変異には矢作川やその支流による分散の制限が影響していると考えられ、遺伝的にもこれらの地域集団間で分化が生じていると考えられる。特に豊田市周辺は巴川や籠川、伊保川などの比較的大きな支流が矢作川に流れ込んでおり、地域集団間の遺伝的交流に対する河川の影響が顕著であると考えられる。また、矢作川流域の北部や東部は山地であるが、西部や南部は平野になっており、地形や環境が変化に富んでいる。そのため微生物場所ごとに環境適応が起こり、遺伝的構造に影響を及ぼしている可能性もある。

そこで本研究では豊田市を中心とした矢作川流域のミカワオサムシの地域集団について、ミトコンドリアの遺

伝子に関する遺伝的構造を解明し、分散の障害としての矢作川の機能や地域集団間の遺伝的関係について解析した。ミトコンドリアは母系遺伝し、組み換えが起こらないこと、個体あたり1コピーであることなどから集団の遺伝的構造を解析するのに適しており、多くの生物でミトコンドリアDNAを用いた研究が行われている。

方法

採集

2003年および2004年にピットフォールトラップおよび直接捕獲によって、豊田市8集団、足助町・下山村・安城市・瀬戸市各1集団の合計12集団167個体のミカワオサムシを採集した。ピットフォールトラップの誘因剤には酢酸もしくは蛹粉を用いた。採集した個体は直ちに100%もしくは70%エタノールに保存した。一部の個体は冷凍処理によって殺した後で、オスは精巣を、メスは交尾器周辺の筋肉を取り出し、100%エタノールに保存した。図1に採集した集団の位置、個体数を示した。

PCRとダイレクトシーケシング

筋肉または精巣からフェノール・クロロホルム法によって全DNAを抽出した。ミトコンドリアDNA NADH脱水素酵素サブユニット5 (ND5) 遺伝子のPCRはEx Taq (TaKaRa) を使用し、6-1 (5'-CCT GTT TCT GCT TTA GTT CA-3'), 4-4 (5'-GTC ATA CTC TAA ATA TAA GCT A-3') の両プライマー (Su et. al., 1996) を用いて行った。PCR産物は1%のアガロースゲルを用いた電気泳動によって増幅を確認した。増幅が確認されたPCR産物はBoom et. al. (1990) を改良したシリカゲル法か、QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen) で精製した。その後、PCRと同じプライマーを使用し、ABI PRISM™ Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてダイターミネーター法によるサイクルシーケンス反応を行った。反応物をABI 377オートシーケンサー (Applied Biosystems) で電気泳動し、それぞれの個体の塩基配列を決定した。

データ解析

得られた全長1,083bpの塩基配列のうち、不明確な場合があった前半30bpと後半33bpを除外した1,020bpについて、目視でアライメントを行った。その後、COLLAPSE v1.1 (Posada, 1999) を用いてハプロタイプの特定を行った。また、Su et. al. (1996), Sota and Vogler (2001), Sota et. al. (2001) で解析され

たミカワオサムシ4亜種 (ミカワオサムシ *C. a. arrowianus*, テンリュウオサムシ *C. a. nakamurai*, カケガワオサムシ *C. a. komiyai*, イセオサムシ *C. a. murakii*) のND5遺伝子の塩基配列23個をデータベースDDBJ / GenBankから引用し (アクセッションナンバー AF219463-AF219466, AF227382-AF227394, AF227398, AF227399, D50722, D50723, D50726, D50727, D87135), 解析に含めた。系統樹はKimuraの2変数モデルによる補正を行ったのち、PAUP*10.4b (Swofford, 2001) を用いて近隣結合法 (NJ法) によって構築した。外群には同じくデータベースに登録・公表されているキイオサムシ *C. iwawakianus kiiensis* (D50721), シズオカオサムシ *C. esakii* (AF227414, AF219468) およびマヤサンオサムシ *C. maiyasanus* (D87172, AF227405, AF227407) を用いた (Su et. al., 1996; Sota and Vogler, 2001; Sota et. al., 2001)。系統樹の信頼性は1000回のブートストラップによって評価した。

結果

12集団167個体のミカワオサムシより32個のハプロタイプが見つかった。これらには塩基の欠失や挿入は見られなかった。32個のハプロタイプのうち、複数の個体が保有していたハプロタイプは17個で、特にハプロタイプ1026は28個体、ハプロタイプ0032は21個体が保有していた。複数の集団で共有されていたハプロタイプは11個で、特にハプロタイプ0622は5集団で共有されていた。残りの21個は特定の集団に固有なハプロタイプだった。

これらのハプロタイプとデータベースから引用したデータを含めて構築した系統樹が図2である。今回解析した矢作川流域のミカワオサムシのハプロタイプは高いブートストラップ値で支持される2つのクレードAとBに分かれた。クレードAは今回見つかったミカワオサムシのハプロタイプ52個のうち44個から構成され、クレードBはミカワオサムシのハプロタイプ6個と北陸地方のマヤサンオサムシ *C. m. hokurikuensis* から構成された。ハプロタイプ間の塩基置換率はクレードA内が平均が0.37%, 最大が0.88%であった。一方、クレードB内は平均が0.36%, 最大が0.69%であった。また、クレードAとクレードB間での塩基置換率は平均が2.06%, 最大が2.45%であった。猿投山, 足助町, 下山村, 広幡町, 岩倉町, 加茂川町ではクレードAの頻度が高く, 安城市, 樹木町, 小坂本町, 毘森町, 秋葉町ではクレードBの頻度が高かった。



図1 解析した集団の位置と保有するクレードの頻度、それぞれの円のグラフは解析した集団の位置を示し、白色はクレードAのハロプロタイプ、黒色はクレードBのハロプロタイプ、灰色はクレードCのハロプロタイプを示す。円グラフ内の数字はそれぞれのクレードを保有していた個体の数を示し、拡大図の円グラフの大きさは解析数の大きさ、全体の等高線はそれぞれ100m、200m、500m、1000mを示し、拡大図の等高線は100mごとの標高を示す。

考 察

今回の調査では、豊田市を中心とした矢作川流域のミカワオサムシのミトコンドリア DNA ND5 遺伝子の分子系統樹 (図 2) から平均塩基置換率が約 2%, 最大塩基置換率も約 2.5% と大きく離れている 2 つのクレードが検出された (図 2)。多くのミカワオサムシのハプロタイプが含まれるクレード A にはより東に分布するテンリュウオサムシやカケガワオサムシの持つハプロタイプも含まれており、ミカワオサムシが本来持っているハプロタイプのクレードであると考えられる。

一方、クレード B はクレード A とは塩基置換率が平均約 2% とかなり離れている上に、データベース上のミカワオサムシは含まれず、さらに日本海側のマヤサンオサムシに近縁であった。また、クレード A との間には別種のシズオカオサムシのクレードが存在する。このことからクレード B はミカワオサムシが本来持っているクレードではないかも知れない。そのため、これらのハプロタイプを持つ個体は北陸地方に生息する集団と近縁なマヤサンオサムシであるとも考えられるが、地理的に離れている上に形態上はミカワオサムシであり、マヤサンオサムシとは考えにくい。また、植栽等に伴う人為的な移入個体との雑種形成や浸透性交雑も考えられるが、クレード B は安城市および豊田市の複数の集団で検出されていることや、その分布も広く、保有している個体数も多いため、人為的な移入である可能性は低いと思われる。ミカワオサムシの分布域全体での解析では、クレード B は知多半島のミカワオサムシや伊勢湾を挟んで反対側の三重県に分布する亜種イセオサムシからも検出されており (Nagata, Kubota & Sota, 未発表データ)、クレード B を持つミカワオサムシは伊勢湾周辺の平野部に広く分布しているようである。伊勢湾に流入する河川のうち、長良川や揖斐川の上流にはマヤサンオサムシが分布する。オオオサムシ亜属では浸透性交雑が頻繁に起こっていると考えられていることから (曾田, 2000; Sota & Vogler, 2001; Sota et. al., 2001; Sota, 2002)、クレード B は伊勢湾に漂着したマヤサンオサムシのミトコンドリアが平野部のミカワオサムシに浸透したことが起源かも知れない。

今回の調査では東部では巴川流域 (加茂川町や岩倉町) と矢作川流域 (秋葉町や樹木町)、北部では山間部 (猿投山や広幡町) と平野部 (平芝町や樹木町など) の間で、それぞれクレード A とクレード B の頻度が大きく入れ替わっていた (図 1)。このうち、東部では岩倉町、加茂川町の個体数が少ないが矢作川を境界にして頻度が大きく

変わっている。これは矢作川によって分散が大きく制限されているからと考えられる。また、北部の広幡町と平芝町では距離が直線距離が 10km にも満たないのにクレードの頻度が完全に入れ替わっており、両集団の間では遺伝的交流が全くないか、中間の集団で急激に頻度が変化していると考えられる。この両集団の間には矢作川の支流である箆川や伊保川が流れているが、これらの河川は決して大きいものではないため、分散を制限する隔離機構として機能しているかは疑問である。一方、矢作川流域におけるハプロタイプの分布は標高 100m 付近を境に、クレード A が山間部、クレード B が平野部と、環境変化と関連しているようにも見える。そのため、形態的には同一亜種とされているが、山地のミカワオサムシと平野部のミカワオサムシの間には生息場所の違いなどによる生態的隔離が働いており、遺伝的交流が妨げられているのかも知れない。

今回の解析では下流の安城市を含め平野部における矢作川東岸の集団をあまり解析していないため、矢作川がミカワオサムシの遺伝的構造にどれくらい影響を与えているかは明確にできなかった。また、広幡町と平芝町の間も環境変化と河川の両方の要因が存在するため、どちらがより影響を及ぼしているかは不明である。しかし直線距離で 10km も離れていない集団が全く異なる遺伝的構造を持っていることは何らかの隔離要因の存在を強く示唆している。

以上のように本研究では矢作川流域のミカワオサムシには 2 つのクレードに属するハプロタイプが存在すること、集団によってクレードの頻度が大きく異なることが明らかとなり、クレードの分布は河川や環境変化と関連があることが示唆された。今後は矢作川東岸や箆川、伊保川流域を中心とした集団の綿密な採集および解析を行うことによって、隔離要因の解明ができると考えられる。また、矢作川流域ではミカワオサムシの色彩も集団ごとに大きく変わることが知られており (長谷川ほか, 2001; 小鹿・長谷川, 2003)、今後はミトコンドリア DNA だけでなく核遺伝子や形態についても詳細に解析することが必要だろう。

謝 辞

本研究では宮川崇氏に採集に協力して頂いた。また京都大学大学院理学研究科の山根征英氏、高見泰興博士には有益な助言を頂いた。ここにお礼申し上げます。

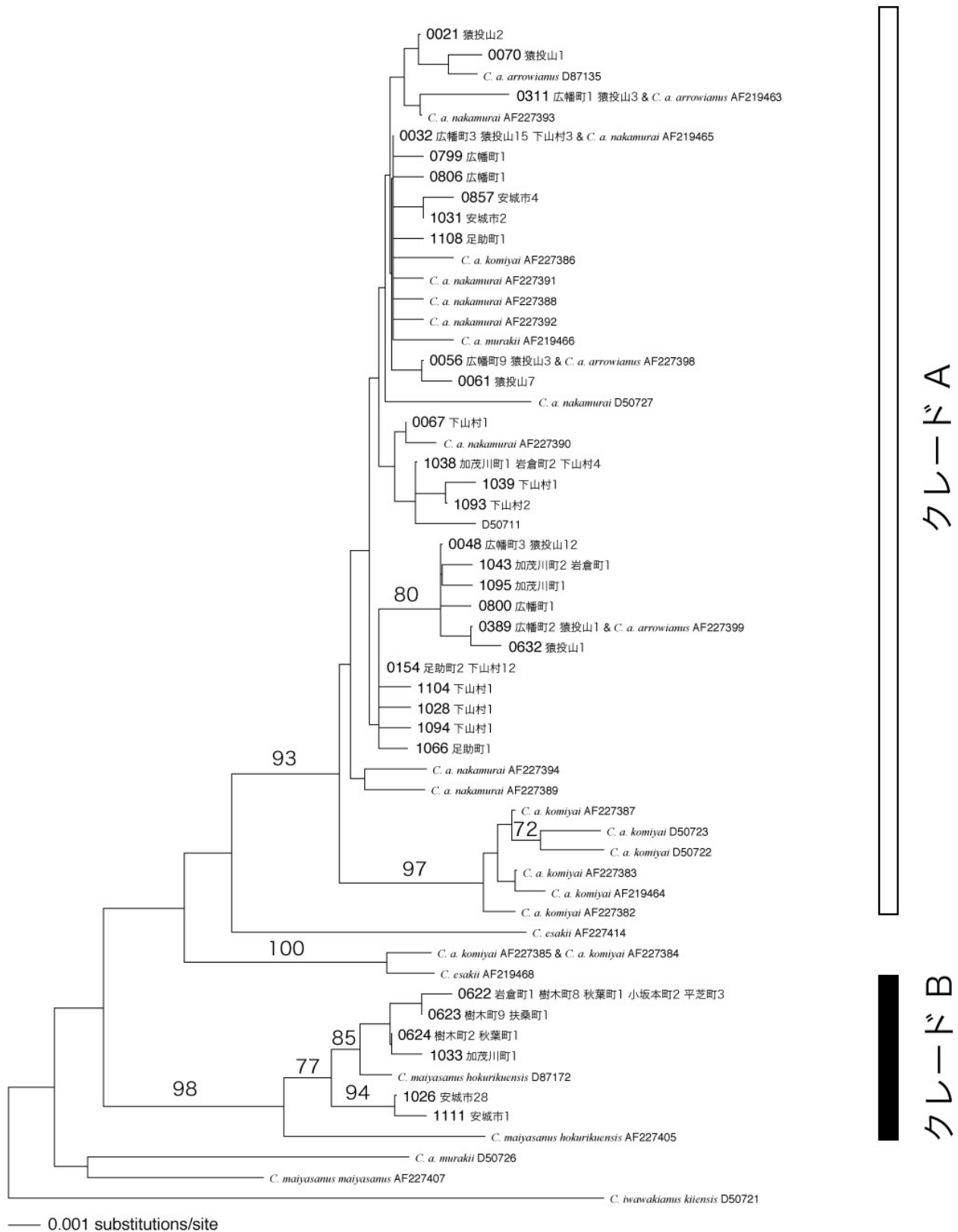


図 2 解析したミカワオサムシのミトコンドリアDNAの系統樹. 4 桁の数字はハプロタイプのナンバーを表し, 次に集団名と個体数を示した. データベースより引用したものについては学名に続いてアクセッションナンバーを示した. 系統樹の枝上には 70%以上だった場合のみ, 1000 回のブートストラップによる支持率を示した.

引用文献

- Boom R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, W-V. Dillen & J. V-D. Noordaa (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 495-503.
- 長谷川道明・小鹿亨・四方圭一郎 (2001) ミカワオサムシの色彩変異. *東海甲虫誌, 穂積俊文博士記念論文集*: 281-291.
- 石川良輔 (1991) オサムシを分ける錠と鍵. 八坂書房, 東京
- Ishikawa, R. and K. Kubota (1994) Geographical races of *Carabus maiyasanus* (Bates) and *C. arrowianus* (Breuning) in honsyu, Japan: A tentative revision (Coleoptera, Carabidae). *Bulletin of the Biogeographical Society of Japan*, 49: 105-128.
- 小池裕子・松井正文 (2003) 保全遺伝学. 東京大学出版, 東京.
- Kubota, K. & K. Yahiro (2003) Description of an isolated and specialized population of *Carabus arrowianus* (Breuning, 1934) (Coleoptera, Carabidae) discovered in the southern most part of Mie prefecture, Japan, as a new subspecies, with analyses of its morphological features. *Biogeography*, 5: 9-15.
- 草桶秀夫・日和佳政 (2002) ホタルの分子系統と遺伝的分化. *昆虫と自然*, 37: 16-22.
- 小鹿亨・長谷川道明 (2003) 矢作川中流域に生息するミカワオサムシの色彩変異. *三河の昆虫*, 50: 551-553.
- 大澤省三・蘇智慧・井村有希 (2002) DNA でたどるオサムシの系統と進化. 哲学書房, 東京
- Posada, D. (1999) Collapse Version 1.1. Department of Zoology, Brigham Young University.
- 曾田貞滋 (2000) 分子系統で見るオサムシの進化? オオオサムシ亜属は平行進化したのか? *インセクタリアム*, 37: 176-185.
- Sota, T. (2002) Radiation and reticulation: extensive introgressive hybridization in the carabid beetles *Ohomopterus* inferred from mitochondrial gene genealogy. *Population Ecology*, 44: 145-156.
- Sota, T., R. Ishikawa, M. Ujiie, F. Kusumoto and A. P. Vogler (2001) Extensive trans-species mitochondrial polymorphism in the carabid beetles *Carabus* subgenus *Ohomopterus* caused by repeated introgressive hybridization. *Molecular Ecology*, 10: 2833-2847.
- Sota, T. and A. P. Vogler (2001) Incongruence of mitochondrial and nuclear gene trees in the carabid beetles *Ohomopterus*. *Systematic Biology*, 50: 39-59.
- Sota, T. and A. P. Vogler (2003) Reconstructing species phylogeny of the carabid beetles *Ohomopterus* using multiple nuclear DNA sequences: heterogeneous information content and the performance of simultaneous analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26: 139-154.
- Su, Z. H., O. Tominaga, T. Ohama, E. Kajiwara, R. Ishikawa, T. S. Okada, K. Nakamura and S. Osawa (1996) Parallel evolution in radiation of *Ohomopterus* ground beetles inferred from mitochondrial ND5 gene sequences. *J. Mol. Evol.*, 43: 662-671.
- Suzuki H., Y. Sato & N. Ohba (2002) Gene diversity and geographic differentiation in mitochondrial DNA of the genji firefly, *Luciola cruciata* (Coleoptera: Lampyridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 22: 193-205.
- 鈴木浩文 (2004) ホタルの系統と進化. *昆虫と自然*, 39: 14-18.
- Swofford D. L. (2001) PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b8. Sinauer associates, Sunderland, Massachusetts.
- Takehana Y., N. Nagai, M. Matsuda, K. Tsuchiya & M. Sakaizumi (2003) Geographic variation and diversity of the cytochrome b gene in Japanese wild populations of medaka, *Oryzias latipes*. *Zoological science*, 20: 1279-1291.
- 吉川貴浩・井出幸介・窪田康男・中村好宏・武部寛・草桶秀夫 (2001) ミトコンドリア ND5 遺伝子の塩基配列から推定されたゲンジボタルの種内変異と分子系統. *Japanese Journal of Entomology (New Series)*, 4: 117-127.

- 1) 京都大学大学院理学研究科動物生態研究室：〒606-8502
京都府京都市左京区北白川追分町
- 2) 豊田市矢作川研究所：〒471-0025 愛知県豊田市西町2-19
豊田市職員会館 1F

付表 それぞれの集団のクレードおよびハプロタイプ出現数.

ハプロタイプ	豊 田 市								足助町	安城市	下山村	瀬戸市 猿投山	総計
	加茂川町	岩倉町	広幡町	樹木町	秋葉町	小坂本町	扶桑町	平芝町					
クレード A													
0021												2	2
0032			3							3		15	21
0048			3									12	15
0056			9									3	12
0061												7	7
0067										1			1
0070												1	1
0154								2		12			14
0311			1									3	4
0389			2									1	3
0632												1	1
0799			1										1
0800			1										1
0806			1										1
0857									4				4
1028										1			1
1031									2				2
1038	1	2									4		7
1039										1			1
1043	2	1											3
1066								1					1
1093										2			2
1094										1			1
1095	1												1
1104										1			1
1108								1					1
A 計	4	3	21					4	6	26		45	109
クレード B													
0622		1		8	1	2		3					15
0623				9			1						10
0624				2	1								3
1026										28			28
1033	1												1
1111										1			1
B 計	1	1		19	2	2	1	3		29			58
総計	5	4	21	19	2	2	1	3	4	35	26	45	167