

称号及び氏名	博士（緑地環境科学）	坂本 佳子
学位授与の日付	平成25年3月31日	
論文名	シルビアシジミの生活史と遺伝的多様性に関する保全生態学的研究	
論文審査委員	主査	石井 実
	副査	大木 理
	副査	藤原 宣夫
	副査	広渡 俊哉

論文要旨

シルビアシジミ *Zizina emelina emelina* (シジミチョウ科) (以下、本種) は、関東地方以西から種子島以北と韓国に分布する。河川敷、畦畔、海岸などの丈の低い草地に生息し、幼虫の主な寄主植物としてミヤコグサ *Lotus japonicus* (マメ科) やシロツメクサ *Trifolium repens* (マメ科) が知られる。本種は近年、各地で生息地や個体数が減少し、環境省レッドリストでは絶滅危惧 IB 類にランクされており、同省による生息域外保全モデル事業の対象になっている。生息域外保全を含む、本種の保全方法を検討するためには、分布状況や遺伝的多様性、寄主植物、生活史形質、配偶行動、共生細菌などの基礎情報を収集するとともに、成虫の交配、採卵、幼虫の飼育、休眠個体の管理などの基礎技術の確立が欠かせない。そこで本研究では、本種の保全のあり方について考察することを目的として、これらの基礎情報や基礎技術を集積するための野外調査と室内実験を日本各地および韓国の個体群を用いて行った。第1章では、本種の生活史や寄主利用を明らかにするために、室内飼育実験を行った。また第2章では、本種の配偶行動を生息地で観察するとともに、近縁種ヒメシルビアシジミや同所的に生息するヤマトシジミとの繁殖干渉の可能性について調査を行った。さらに、第3章では遺伝子解析により共生細菌の感染状況と本種への影響について調査し、第4章では日本各地および韓国の個体群の遺伝的分化の程度について解析を行った。

第1章 生活史と寄主植物利用

本種の生活史と寄主植物利用を明らかにするために、野外調査および室内実験を行った。まず、野外での季節消長を明らかにするために、近畿地方中部の1ヶ所の生息地において、2009年に成虫の捕獲調査を実施するとともに、雌成虫から採卵し、子世代の卵・幼虫・蛹を20~30°C16 L（明期16時間、暗期8時間、以下同様）および20°C15~12 Lの条件下で飼育し、発育期間や休眠性の有無を調査した。野外では、成虫は4月下旬~10月下旬にほぼ継続的に確認された。飼育実験の結果、16 Lでは、すべての個体が発育の遅延を生じることなく4齢の幼虫期を経て蛹化し成虫になったのに対して、20°C12 Lでは、ほとんどの個体で4齢期以降の発育が遅延し、わずかに摂食を続けながら脱皮を繰り返すことが確認された。これらのことから、本種は幼虫期後期に休眠に入り越冬することが明らかになった。また、各日長条件における休眠率から、休眠誘起の臨界日長は20°Cで約12時間40分と推定された。飼育実験より得られた発育零点、有効積算温度、臨界日長と生息地付近の日平均気温の季節変化から、本種は近畿地方中部において1年に5~6世代を経過すると推定された。推定された周年経過と野外での季節消長がほぼ一致していたことから、本種は定住性が高いと考えられた。

日本各地の生息地における雌成虫の産卵選好性を比較するために、計8ヶ所の個体群を対象として、ミヤコグサとシロツメクサの生葉を野外で採集した雌成虫に同時に提示し、各植物上の卵数を記録した。その結果、シロツメクサに産卵した割合は、近畿地方中部の個体群がもっとも大きく、中部地方、近畿地方西部、九州地方南部の各個体群では小さかったことから、選好性は個体群間で異なることが明らかになった。シロツメクサに産卵した割合がごく小さい個体群に大きい個体群を交配したところ、その子世代ではやや大きくなった。次に、各植物を与えた場合の幼虫の発育を調べるために、上記の8ヶ所のうち4ヶ所の個体群を対象として、両植物による幼虫の飼育を行った。その結果、羽化率には個体群と供試植物による違いは認められず、ほとんどの個体が正常に羽化したが、蛹体重は、いずれの個体群においても、ミヤコグサを与えた区の方が有意に重かった。また、いずれの食草を与えた場合も、近畿地方中部と四国地方の個体群は近畿地方西部と九州地方南部の個体群よりも蛹体重は有意に重かった。蛹体重の異なる個体群間で交配を行ったところ、子世代の蛹体重は中間的な傾向を示した。これら一連の実験で得られたデータをもとに、雌の蛹体重と総産卵数について解析を行ったところ、両者には正の相関が認められた。韓国の個体群は、シロツメクサにも産卵し、幼虫もこの植物で成虫まで発育した。

これらのことから、本種の本来の食草はミヤコグサで、一部の個体群でシロツメクサに寄主の拡大が起こったと推察された。

第2章 配偶行動と近縁種の影響

本種の配偶行動における雄の雌探索の鍵刺激を明らかにするために、さまざまな成虫

の標本モデルを用いて野外観察を行った。その際、本種と同所的に生息し、比較的近縁なヤマトシジミ *Pseudozizeeria maha* についても同様の観察を行った。その結果、両種ともに、雄は翅を広げたモデルにはほとんど接近しなかったのに対して、翅を閉じたモデルに強い関心を示すことが明らかになった。交尾試行にいたるまでの過程では、本種の雄はモデルに接近し、直後に接触して交尾姿勢をとったが、*P. maha* の雄はモデルの近隣で求愛を行うなど、種間で違いが見られた。本種の雄は、*P. maha* の雌雄のモデルにはほとんど接近しなかったが、*P. maha* の雄は、本種の雄モデルに対して、求愛や接触を行った。

次に、近縁種ヒメシルビアシジミ *Z. otis* との交雑の可能性を明らかにするために、同種の雄と本種の雌を円筒型ネットに入れて配偶行動を観察した。その結果、*Z. otis* 雄は本種の雌に強い関心を示し、交尾が成立した。**F1** 世代をシロツメクサで飼育したところ、雄は正常に発育したが、雌は卵期または幼虫期に発育が遅延した。

これらのことから、本種は上記 2 種の近縁種の雄から求愛行動を受けることが明らかになり、とくに *Z. otis* が同所的に生息する場合には、繁殖干渉が起こる可能性が考えられた。

第 3 章 *Wolbachia* 感染と寄主操作

飼育実験の結果、子世代がすべて雌になる事例が発見されたため、日本各地の 14 ヶ所と韓国の個体群を対象に、*wsp* 領域の一部 (555-558 bp) と *ftsZ* 領域の一部 (621 bp) を用いて、昆虫類に性比異常を引き起こすことが知られる細胞内共生細菌 *Wolbachia pipientis* (以下、*Wolbachia*) の感染の有無とその系統を調査した。その結果、全体で合計 3 系統の *Wolbachia* (**Tn1**、**Tn2**、**Ny1**) が確認された。近畿地方中部の 2 ヶ所の個体群では **Tn1** と **Tn2** が確認され、そのうち 1 ヶ所では 50% 以上の高頻度で **Tn1** に感染していた。九州地方の個体群では **Tn1**、関東地方の個体群では **Tn2** または **Ny1**、中部地方の個体群では **Ny1** が確認されたのに対して、近畿地方西部と四国地方の個体群はすべて非感染であった。また、韓国の個体群では、解析した 16 個体すべてが **Tn1** もしくは **Ny1** に感染しており、非感染個体は見られなかった。これらのことから、*Wolbachia* の感染については、非感染も含めて個体群間で頻度が異なるとともに、感染系統にも違いがあることが明らかになった。

各個体群の子世代の性比を調査したところ、近畿・関東両地方の個体群では、**Tn2** 感染雌の子世代のふ化率は約 50% でほとんどが雌として羽化したが、擬成虫期に死亡した個体や羽化に失敗した個体のほとんどは雄の翅の斑紋パターンと外部生殖器に雌雄の特徴を有する性モザイクであった。その細胞を観察したところ、これらの性モザイク個体はすべて遺伝的には雄であったことから、体の一部が雌化したものと考えられた。また、**Tn2** 感染雌の一部では、産卵初期の子世代に性モザイクの出現率が高い傾向が認められた。一部の個体群では **Tn1** と **Ny1** が高い感染率を示したものの、明確な寄主操作

は確認されなかった。

これらのことから、**Tn2** 系統の *Wolbachia* は、本種に対して「雄殺し」と呼ばれる寄主操作を行い、さらに一部の個体を性モザイク化することが明らかになった。

第4章 遺伝的多様性

本種の遺伝的多様性と集団分化の程度を明らかにするために、前章の個体群を対象として、ミトコンドリア DNA (以下、mtDNA) の **ND5** 領域の一部 (832 bp) と **COI** 領域の一部 (658 bp)、核 DNA の **Tpi** 領域の一部 (355-360 bp) の塩基配列を調査した。日本各地の個体群における mtDNA の解析では、**ND5** と **COI** の 2 つの領域を合わせて 6 通りのハプロタイプ (I~VI) が確認された。近畿地方の個体群では、3 ハプロタイプ (I、II、IV) が確認され、関東地方北部、四国地方、九州地方の個体群では、共通のハプロタイプが見られたが、それらの出現頻度は異なっていた。関東地方南部の個体群では 1 ハプロタイプ (III)、中部地方の個体群では 2 ハプロタイプ (V、VI) が見られ、他のいずれの個体群とも共通のものは認められなかった。mtDNA ハプロタイプは、**Tn1** 感染個体では IV、**Tn2** 感染個体では I、II、III のいずれか、**Ny1** 感染個体では I または V であったことから、*Wolbachia* 感染系統と関連していると考えられた。核 DNA の解析では 6 ハプロタイプ (A~F) が確認された。ハプロタイプ A は全国に分布していたが、ハプロタイプ B、C は近畿・四国両地方の個体群、ハプロタイプ D、F は関東・中部両地方の個体群にのみ見られ、個体群間で出現頻度は異なっていた。また、韓国の個体群で見られた 2 種類の mtDNA ハプロタイプ (VII、VIII) は、いずれも日本国内のものとは異なったが、核 DNA はすべて関東・中部両地方の個体群で見られたハプロタイプ D と一致した。

日本国内の個体群の遺伝的多様性を比較したところ、ほぼすべての個体群間でハプロタイプ頻度が異なり、個体群の分化が認められた。遺伝的分化の程度と地理的距離の関係について解析したところ、離れた個体群間では分化の程度が高かったことから、本種の移動性は低く、各個体群の遺伝的構造は不連続であることが明らかになった。

以上のような本研究の結果から、本種の保全方法を検討するうえでの基礎情報が明らかになり、飼育や交配などの繁殖に関する技術も確立された。本種の保全においては、まず、各個体群の寄主植物の利用能力、*Wolbachia* 感染の有無、遺伝的多様性解析などの調査を実施したうえで、最小保全単位を決定し、生息環境の維持・管理手法を確立する必要がある。また、生息域外での累代飼育と野生復帰を実施する場合には、近縁種による繁殖干渉を考慮しつつ、保全単位をもとにファウンダー個体や導入場所の選定を行うことが重要と考えられる。

審査結果の要旨

シルビアシジミ *Zizina emelina emelina* (以下、本種) は、日本と韓国に分布し、河川敷、畦畔、海岸などの草丈の低い草地に生息する。幼虫の主な寄主植物としてミヤコグサやシロツメクサが知られる。本種は近年、各地で生息地が減少し、環境省レッドリストでは絶滅危惧 **IB** 類にランクされており、同省による生息域外保全モデル事業の対象種になっている。本種のような希少チョウ類の保全方法を検討するためには、分布状況や遺伝的多様性、寄主植物、生活史形質、配偶行動、共生細菌などの基礎情報を収集するとともに、成虫の交配、採卵、幼虫の飼育、休眠個体の管理などの基礎技術の確立が欠かせない。本研究では、これらの生態学的知見について調査・研究を行い、本種の保全のあり方について考察した。

まず、近畿地方中部の本種の生息地において季節消長の野外調査を行うとともに、同生息地で得られた成虫の子世代を異なる温度・日長条件で飼育することにより、休眠性や発育零点、有効積算温度などを調査した。その結果、本種は同生息地において、**10** 月以降に幼虫期後期に休眠に入って越冬し、**1** 年に **5~6** 世代を経過する季節生活環が推定された。また、この推定生活環が野外での成虫の季節消長とほぼ一致することから、本種の高い定住性が予測された。

本種の産卵時の寄主選好性を比較するために、**8** ヶ所の個体群を対象として、採集した雌成虫にミヤコグサとシロツメクサを同時に提示し、各植物上の卵数を記録した。その結果、ミヤコグサにはすべての個体群がよく産卵するのに対して、シロツメクサに産卵する割合は個体群間で大きく異なることが明らかになった。両植物を与えて幼虫の飼育を行った結果、羽化率には個体群と供試植物による違いは認められず、ほとんどの個体が正常に羽化したが、蛹体重はいずれの個体群においても、ミヤコグサを与えた区の方が有意に大きかった。

本種の配偶行動における雄成虫による雌探索の鍵刺激を明らかにするために、同所的に生息することが多く本種と比較的近縁なヤマトシジミの雄成虫を対象に、さまざまな成虫の標本モデルを提示する野外観察を行った。その結果、両種ともに翅を閉じたモデルに強い関心を示すことが明らかになった。ヤマトシジミの雄成虫は本種の雄のモデルに求愛を行った。また、本種と同属のヒメシルビアシジミ *Z. otis* との種間交雑の可能性を調査した結果、両種の交尾は成立し、**F1** 世代では雌のみ幼虫発育が遅延した。これらのことから、本種は上記 **2** 種が同所的に生息する場合には、繁殖干渉が生じる可能性があることが明らかになった。

飼育実験の結果、子世代がすべて雌になる事例が発見されたため、日本と韓国の個体群を対象に、昆虫類に性比異常を引き起こすことが知られる細胞内共生細菌 *Wolbachia* 感染の有無とその系統を調査した。本種からは、合計 **3** 系統の *Wolbachia* 感染が確認され、非感染も含めて個体群間で感染頻度や感染系統が異なることが判

明した。そのうち **1** 系統は、本種に対して「雄殺し」と呼ばれる寄主操作を行い、さらに一部の個体を性モザイク化することが明らかになった。

本種の遺伝的多様性と集団分化の程度を明らかにするために、ミトコンドリア DNA（以下、**mtDNA**）の **ND5** 領域および **COI** 領域の一部と、核 DNA の **Tpi** 領域の一部の塩基配列を調査した。日本と韓国の個体群における **mtDNA** と核 DNA の解析では、それぞれ **8** 通りと **6** 通りのハプロタイプが確認され、個体群間で出現頻度が異なった。また、**mtDNA** ハプロタイプは **Wolbachia** 感染系統との関連が認められた。日本産本種ではほぼすべての個体群間で遺伝的な分化が認められ、分化の程度と地理的距離との関係から、各個体群の遺伝的構造は不連続で、本種の移動・分散能力が低いことが明らかになった。

以上のような本研究の成果として、本種の保全方法を検討するための十分な基礎情報が得られ、飼育や交配などの繁殖に関する技術も確立された。また、各個体群の寄主利用能力、**Wolbachia** 感染の有無と系統、**mtDNA** と核 DNA のハプロタイプなどに基づく、本種の最小保全単位の決定方法が示され、生息域内保全と生息域外保全のあり方について具体的な提言がなされた。これらの成果は昆虫学や生態学などの基礎分野に加えて、保全生態学などの緑地環境科学領域の発展に大きく寄与するものと考えられる。よって、最終試験の結果とあわせて、博士（緑地環境科学）の学位を授与することを適当と認める。