

称号及び氏名 博士(理学) 宮川 美紗

学位授与の日付 平成 30 年 3 月 31 日

論 文 名 Genetic variations and phylogenetic relationships among the populations of swallowtail butterfly, *Papilio machaon*, in the Japanese Islands.
(日本列島に分布するキアゲハの遺伝的多様性と系統関係)

論文審査委員 主査 八木 孝司
副査 加藤 幹男
副査 原 正之
副査 石原 道博

Genetic variations and phylogenetic relationships among the populations of swallowtail butterfly, *Papilio machaon*, in the Japanese Islands. (日本列島に分布するキアゲハの遺伝的多様性と系統関係)

宮川美紗

1. はじめに

日本列島はユーラシア大陸東端の沿岸沖に位置し、北海道、本州、四国、九州および多くの諸島から成る。その領域は南北に 3,000 km以上と弧状に長く、気候は亜寒帯から亜熱帯と、様々である。また、本州の日本アルプス、奥羽山脈など多くの山地を有し、起伏の激しい地形をしている。日本列島は約 1500 万年前に北東の陸塊と南西の陸塊に分かれてユーラシア大陸から分離したと考えられている。その後 500 万年前にこの 2つの陸塊は繋がりを、繋ぎ目はフォッサマグナとして知られる。日本列島は成立以降も、第四紀(260 万年前以降)の氷期に大陸と陸続きになったり間氷期に離れたりすることが繰り返された。この間、大陸から生物の移入と隔離もまた繰り返し起こったとされる。日本列島形成までの複雑な地史、多様な気候と起伏の激しい地形から、日本列島には多くの生物種が存在し、生物多様性のホットスポットとして知られている。日本列島に生息する陸棲哺乳類・維管束植物の約 4 割、爬虫類の約 6 割、両生類の約 8 割が固有種である。昆虫種においても多くの分類群において様々な固有種が見られ、チョウ目においてはギフチョウ、ヒカゲチョウ、ウラキンシジミ、フジミドリシジミなどが固有種である。

キアゲハ (*Papilio machaon*) は北半球(ユーラシア大陸、アフリカ大陸北部および北アメリカ大陸)の暖地から乾燥地、北極圏の寒冷地に至るまで広く分布するチョウである。極東アジア大陸にも分布し、日本列島では屋久島以北、九州、四国、本州、北海道、千島列島、サハリンまで分布しており、亜種 *hippocrates* として区別される。これら日本列島およびサハリンのキアゲハ集団と大陸集団の系統関係を明らかにするため、日本国内外諸地域のキアゲハおよびその近縁種のミトコンドリア DNA (mtDNA) ND5 遺伝子塩基配列の一部を決定して、それらの系統関係を調べた。また、日本列島、サハリン各地およびその周辺地域におけるキアゲハ集団の遺伝的構成(ハプロタイプ)を調べ、集団の成立背景を地史と関連づけて考察した。

2. 方法

2006 年 6~8 月、2008 年 7 月、2009 年 6 月に、サハリン 3 地点、北海道 4 地点、本州 19 地点、四国 3 地点、九州 3 地点およびその他小島 6 地点の合計 38 地点においてキアゲハを採集した。サハリン、宮城県(寒風沢島、桂島、七ヶ浜)、佐賀県(神崎市)の個体は提供していただいた。海外のキアゲハとその近縁種は 1996~2003 年の間に採集した個体を提供していただいた。各個体はエタノールに浸けて 4℃または-20℃で保管した。各個体から DNA を抽出し mtDNA の NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) 遺伝子領域の塩基配列 (982

塩基対)を決定した。得られた配列を用いて MEGA5 の最尤法および近隣結合法による系統樹を作成し、それらの系統関係を調べた。また TCS を用いてハプロタイプ・ネットワーク図を作成し、ハプロタイプ間の類縁関係を調べた。さらに各個体をサハリン、北海道、本州、四国、九州の島嶼グループに分け、Arlequin を用いて AMOVA 解析および Pairwise *Fst* 解析を行い、各島間での遺伝的構造の違いを調べた。Tajima's D 値と Fu' *Fs* 値による中立性のテストを行い、サハリンおよび日本列島の集団における歴史的なイベントを推定した。

3. 結果

日本列島および海外のキアゲハとその近縁種の系統樹を最尤法および近隣結合法で作成した結果、どちらの方法によっても世界のキアゲハは、遺伝的に異なる 5 つの集団 (クレード) に分けられた。また、日本列島およびサハリンのキアゲハは遺伝的に近縁の集団であるが、ユーラシア大陸および北アメリカ大陸のキアゲハとは遺伝的に明確に区別されることが明らかになった。これまで別種とされていた北アフリカのサハラキアゲハ (*Papilio saharae*) とチベットのタカネキアゲハ (*Papilio sikkimensis*) は、キアゲハの中で各々 1 つのクレードを形成し、キアゲハと同種であると推定された。日本列島およびサハリンの集団はキアゲハの中で最も早く分岐し、近縁のカラスアゲハで求められた進化速度 (0.81% substitutions per million years) を適用すると、分岐は約 80 万年前であると推定された。

日本列島およびサハリン集団内の各地個体の遺伝的差異は小さく、分子系統樹ではそれらの明確な系統関係を示すことができなかつたので、ハプロタイプ・ネットワーク解析を行なった。サハリン、日本列島のキアゲハについて、400 個体から合計 68 種類のハプロタイプが検出された。このうち、48 種類が各地でしか見られない固有のハプロタイプで、20 種類が複数の地域で見られる共通のハプロタイプとして検出された。特にハプロタイプ F2、F6、K1、K2、が多くかつ広域に見られた。ハプロタイプ K1 は本州、四国、九州地方で最も多く見られたが、サハリンでは全く検出されず、北海道では南端の恵山でしか見られなかった。ハプロタイプ K2 もまた、本州、四国、九州地方で多く見られたが、北海道およびサハリンでは全く検出されなかった。一方、ハプロタイプ F6 はサハリンで最も多く検出されたハプロタイプであり、北海道でも見られた。また、ハプロタイプ F2 は北海道でしか見られなかった。ハプロタイプ・ネットワーク図において、共通ハプロタイプ F2、F6、K1、K2 を核として、そこから数塩基程度の置換が起きた異なるハプロタイプが数多く枝分かれしている形になった。すべてのハプロタイプ間で異なる塩基の数は最大でも 15 塩基であり、地域固有のハプロタイプでも塩基置換数は多くないことがわかった。さらに、集団間の遺伝的構造の違いを調べた結果、サハリンと北海道との間、北海道と本州・四国・九州との間で有為の違いがあることが示された。また、中立性テストの結果、サハリン、北海道、本州の集団において Tajima's D 値と Fu' *Fs* 値に有意差があり、一部のハプロタイプの分布拡大が起こったことが示唆された。

4. 考察

キアゲハの分子系統樹において、日本列島・サハリン集団は、ユーラシア大陸集団および北アメリカ集団よりも早い時期にキアゲハ祖先集団から分かれていた。このことから、日本列島のキアゲハは、長期間大陸集団とほとんど交流なく隔離されていたことが示唆された。一方で、マガダン（サハリンからオホーツク海を挟んで北東に位置するロシアの町）において検出されたハプロタイプは、ユーラシア大陸広域で見られたハプロタイプ AE と、サハリンおよび北海道で多く見られたハプロタイプ F6 であった。ハプロタイプ F6 がマガダン、サハリン、北海道と、タタール海峡および宗谷海峡を越えて広域に検出されたこと、キアゲハは亜寒帯の広域に分布するチョウであることから、キアゲハはこれらの海峡が陸地化していた時代（第四紀更新世中期）にマガダン周辺地域からサハリンを経て日本列島へ分布を拡大したと推測される。その過程でハプロタイプ F2、K1、K2 へと変異が生じたと考えられる。中立性テストの結果およびハプロタイプ・ネットワークの形状から、サハリン、北海道、本州のキアゲハ集団において、海峡成立によって遺伝子流動が妨げられ、創始者効果またはボトルネック効果などが生じて北海道と本州で別々のハプロタイプの分布拡大が起こったことが示唆された。集団の遺伝的構造の解析で宗谷海峡と津軽海峡を境に差が見られたことから、キアゲハは高い飛翔能力を持つにもかかわらず、更新世中期に分布を拡げる途中に成立した広い海峡を越えて分布を拡げることはまれであったことが推測された。しかし、ハプロタイプ F6 の集団が祖先集団に近いかを結論付けるには、マガダンを含む周辺地域での更なるサンプリングが必要である。

北海道における F2、F5、F6、および本州・四国・九州における K1、K2 は、それぞれ島内各地でほぼ共通して見られるハプロタイプであるが、島内の離れた地域の集団間では遺伝的構造に違いがあった。キアゲハは、低地のみならず高山においても種々のセリ科植物を食草とするため、山脈を越えて移動して遺伝子流動が起こっているものの、遠距離の移動にはある程度の制限がかかっていることがわかった。

津軽海峡は哺乳類の分布境界となっていてブラキストン線とよばれる。これは最終氷期に津軽海峡がほとんど陸地化せず、動物の移動が妨げられたためであると考えられている。チョウにおいて津軽海峡が分布の南端となる種（キタバニヒカゲ、ヒメウスバアゲハ、エゾヒメシロチョウ、エゾシロチョウなど）または北端となる種（ベニヒカゲ、スジボソヤマキチョウなど）がある一方で、寒冷帯系の種が本州内で南限を持っていたり（多くの高山蝶、ヒメギフチョウ、ムモンアカシジミ、カバイロシジミ、クジャクチョウ、キベリタテハ、オオヒカゲなど）、温暖帯系の種が北海道内に北限を持っていたり（ウスバアゲハ、ヤマトスジグロシロチョウ、ゴイシシジミ、キタテハ、オオムラサキなど）する。キアゲハでは mtDNA ハプロタイプ解析によって、分布成立過程における海峡成立の影響が明らかになったが、チョウの種によってその分布は、海峡成立史の他に飛翔能力、温度適応能力、食餌植物の分布などによって決定されたと考えられる。

学位論文審査結果の要旨

キアゲハ (*Papilio machaon*) は全北区の暖地から乾燥地、北極圏の寒冷地に至るまで広く分布するチョウである。日本列島では屋久島以北、九州、四国、本州、北海道、千島列島、サハリンまで分布しており、亜種 *hippocrates* として区別される。日本列島は数百万年前の原型成立以降も、第四紀 (260 万年前以降) の氷期に大陸と陸続きになったり間氷期に離れたりすることが繰り返され、生物が移入されたり、隔離されたりして生物多様性が高い。日本列島に生息する固有種と大陸でのその近縁種との DNA 塩基配列の差異は日本列島における種の隔離の歴史を反映している。本研究では、キアゲハの日本列島、サハリン、ユーラシア大陸、北アメリカ大陸集団およびその近縁種のミトコンドリア DNA の *ND5* 遺伝子塩基配列を決定して、各集団間の系統関係を解析した。また、日本列島、サハリン各地およびその周辺地域におけるキアゲハ集団の遺伝的 (*ND5* 遺伝子ハプロタイプ) 構成を調べ、ハプロタイプネットワーク解析から集団の成立過程を地史と関連づけて考察した。

その結果①日本列島のキアゲハはユーラシア大陸・北アメリカ大陸のキアゲハとは大きく系統が異なるが、サハリンと日本列島の集団は系統的に近縁であることが示された。②サハリンと日本列島の集団は他のキアゲハ集団より系統的に先に分岐し (隔離され)、現在まで大陸との遺伝的交流はほとんどなかったと考えられる。③大陸、サハリン、北海道、本州以南の集団の遺伝的構造は互いに有意に異なっていることがわかった。すなわち、オホーツク海沿岸に分布していたハプロタイプの1つが、第四期の陸続きの時期に、サハリン、北海道を通過して本州以南に変異しながら広がり、海峡成立後にそれぞれの島において特徴的なハプロタイプが短期間で島内に分布を拡大したのち、安定したことが示唆された。

本研究は、固有種や孤立分布種ではなく、世界の広域に分布し飛翔能力が比較的高く斑紋の変化が小さい種においても、日本列島集団の成立が列島の地史を反映していることを、DNA 解析によって初めて明らかにした。この成果は昆虫の分子系統地理学において、高く評価できる。

以上のことから、本委員会は、当該学位論文が博士 (理学) の学位授与に値する内容であると判断した。

学位論文審査委員会

委員長 八木 孝司

原 正之

加藤 幹男

石原 道博