

3. 昆虫と植物の共生関係および節足動物の系統進化

蘇智慧（主任研究員）、和智仲是（奨励研究員）、
佐々木綾子（研究補助員）、星野朱音（大阪大学大学院生）

3-1. イチジク植物とイチジクコバチの共生・共進化

はじめに

様々な生物種から構成される地球生態系のなかでの生物同士あるいは生物と環境との相互作用は、生物の多様性を生み出す大きな原動力と考えられる。昆虫と被子植物はそれぞれ陸上で最も多様化した生物群で、その多様化は互いに相互適応的な関係を築くことによって促されてきたように見える。その最たる例が「1種対1種」の密接な送粉共生関係を築くイチジク属植物（クワ科）と送粉コバチ（イチジクコバチ科、以下イチジクコバチ）であり、それぞれ数百種が知られている。我々は現在このイチジク属植物とイチジクコバチとの共生関係の構築過程と維持機構およびその共生系における種分化機構などについて研究を行っている。

イチジク属植物は、東南アジア・アフリカ・中南米など熱帯を中心に分布している。日本はイチジク属植物の分布域の北限にあたり、南西諸島を中心に16種が分布している。イチジク属植物は花囊とよばれる袋状の閉じた花序をつけ、その内側に多数の花を咲かせる。送粉者であるイチジクコバチは、この花囊に入り花粉を媒介するだけでなく同時に花に産卵する。ふ化した幼虫は虫こぶ（昆虫が改変した植物の組織）の中で成長する。やがて次世代のイチジクコバチが花囊内で羽化・交配し、雌成虫が花粉を持って他の花囊へと移動することで次の受粉が成立する。このようにイチジク属植物とイチジクコバチの二者は、繁殖において互いに強く依存し合った関係と言える。

イチジク属植物とイチジクコバチとの共生関係は、「1種対1種」という種特異性が極めて高いものと言われている。この「1種対1種」関係を維持しながら種分化が起きるとしたら、同調した種分化や系統分化が起こることが予想される。これまで分子系統学的解析を用いてこの仮説を検証する研究が行われてきた。その結果、イチジク属植物の節（植物では属 genus・亜属 subgenus・節 section・種 species と分類する）レベルの系統関係とイチジクコバチの属レベルの系統関係がおおまかに一致し、仮説が支持されている¹⁾。しかし種間・種内レベルでの系統関係の矛盾のほか、イチジクコバチの隠蔽種や1種のイチジク属植物に複数種のイチジクコバチ（あるいはその逆）が共生するなど、不明瞭な点が残っている¹⁻⁴⁾。我々のこれまでの研究によって、日本産のイチジク属植物とイチジクコバチでは「1種対1種」関係の厳密性が見られ、同調的系統分化が示唆された⁵⁾。一方でメキシコ産のイチジク属植物とイチジクコバチでは、近縁種間で「1種対1種」関係の乱れが見られた²⁾。また、小笠原諸島産のイチジク属植物の進化・種分化の過程においては異種間交雑が起きていたことが示唆され、雑種形成がイチジク属植物の種分化をもたらす要因の1つであると考えられた⁶⁾。また、イチジク属植物が特定のイチジクコバチを自らの花へ呼び寄せるための手段として、花の匂い（花から放出される分子量300以下の揮発性化学物質の集まり）が注目されてきた。多くの送粉者は匂いによって捉え花の探索に利用している。イチジク属植物でも、花囊の外見は緑色で非常に目立ちにくいいため視覚情報よりも嗅覚情報としての花の匂いが有効であると考えられる。

昨年度は、イヌビワとその近縁種間の遺伝的比較解析からコバチの寄主転換による、複数の

植物が1種のコバチを共有することが示唆された⁷⁾。このような背景のもとに、本年度は主にイヌビワとその近縁種およびそれぞれのイチジクコバチの種間・種内の関係性に注目して、生態や産卵行動の観察実験、集団遺伝学的解析、花の匂いを認識する遺伝子の探索を行った。また、種内の遺伝的分化をもたらす要因を探るために、雌雄同株と雌雄異株のイチジク植物の集団遺伝学的解析を行い、その違いを探った。

結果と考察

1) 近縁種のイチジク植物に対するイヌビワコバチの産卵行動と発育

イヌビワ (*Ficus erecta*) は関東以西から琉球、台湾、中国南部にかけて広く分布している。また台湾にはイヌビワに近縁な3種

F. formosana, *F. tannoensis* と *F. vaccinioides* が生育している。これら4種の近縁な植物種に対して、それぞれ種特異的に共生関係にあるイチジクコバチ (*Blastophaga nipponica*, *B. taiwanensis*, *B. tannoensis* と *B. yeni*) が知られている。植物種は形態的・遺伝的に明確に区別ができる。しかし、*F. vaccinioides* を寄主とする *B. yeni* を除くイチジクコバチ3種は、形態的によく似ており、記載時に用いられた種の識別

形質も連続的で曖昧である。また、台湾に分布するこれら3種のイチジクコバチは、寄主植物が異なるにも関わらず、明確な遺伝的分化がなく、3種の植物が1種のコバチを利用していることが示唆された (図1)⁷⁾。このことを検証するために、イヌビワコバチの産卵行動と発育の観察実験を行った。イヌビワコバチが

放出されているイヌビワの木の上に、**receptive** 状態の花囊が付いている *F. formosana* の木を置き、イヌビワコバチの産卵行動を観察した。その結果、イヌビワコバチは人為的な力を加えることなく、自然に *F. formosana* の花囊に侵入できることが分かった (図2の左図)。また、コバチが侵入した花囊の発育を観察し続けたところ、子どもコバチが出てくる前に花囊が落ちてしまうケースもあれば、子どもコバチが自然に花囊から出てくるケースもあった (図2の右下)。前者の場合、落ちた花囊中の子どもコバチの発育ステージが様々だが、すでに虫こぶから出て花囊中で死んでいるものも見られた (図2の右上)。

イチジク植物の場合、コバチが成熟 (成虫になる) すると、花囊が柔らかくな

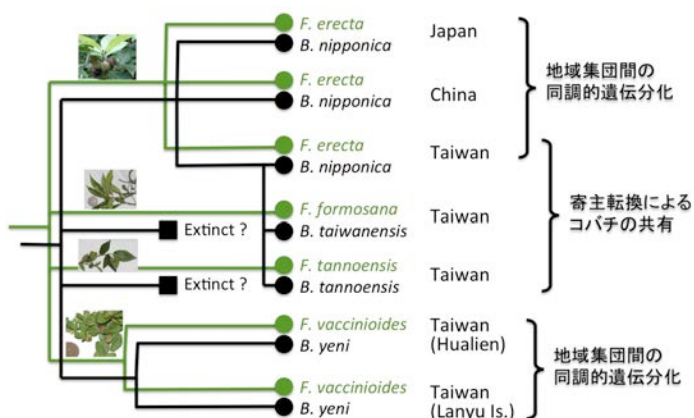


図1. イヌビワとその近縁種およびそれらの送粉コバチの系統関係と種分化。黒：コバチ；緑：イチジク植物。



図2. *F. formosana* の花囊に侵入し、発育するイヌビワコバチ。本来の寄主植物はイヌビワ *F. erecta* である。

るが、落ちた花囊はコバチがすでに成虫になっているにも関わらず、花囊はまだ硬いままだったので、これはおそらく花囊とコバチの発育があっていないためと考えられる。いずれにしても、イヌビワコバチが近縁種の寄主植物の花囊に入り、発育できることが判明したことは、イチジク植物とイチジクコバチの種特異的共生関係の維持や寄主転換、種分化の理解に寄与すると考える。

2) イヌビワ *F. erecta* の集団遺伝学的解析

上に述べたように、イヌビワは広い分布域をもち、日本、済州島、台湾、中国南部に生育している。これまでの我々の研究では、日本の5地域（伊豆、関西、九州、沖縄、八重山）と台湾でサンプルを採集し、これらの地域集団の遺伝的構造の解析を行った。



本年度はさらに、済州島と馬祖列島（大陸系と思われる）の集団を加えて解析を行った（図3）。

2.1. 葉緑体DNAによるネットワーク解析とハプロタイプの分布. 葉緑体DNA 6領域（rps16イントロン、trnGイントロン、petBイントロン、trnLイントロン、trnL-trnFスペーサー、atpB-rbcLスペーサー）

分布：
関東以西、四国、九州
琉球、台湾、中国南部、
済州島



図3. イヌビワ *F. erecta* の集団遺伝学的解析のサンプル採集地点。

解析ソフトは TCS v.1.21である。解析の結果、日本産のイヌビワには6ハプロタイプ、台湾産には7ハプロタイプ、馬祖列島には1ハプロタイプ、合計14ハプロタイプが見つかった（図4）。

日本産のイヌビワの6ハプロタイプのうちの2つはメインである（八重山タイプと本州・九州・沖縄タイプ）。

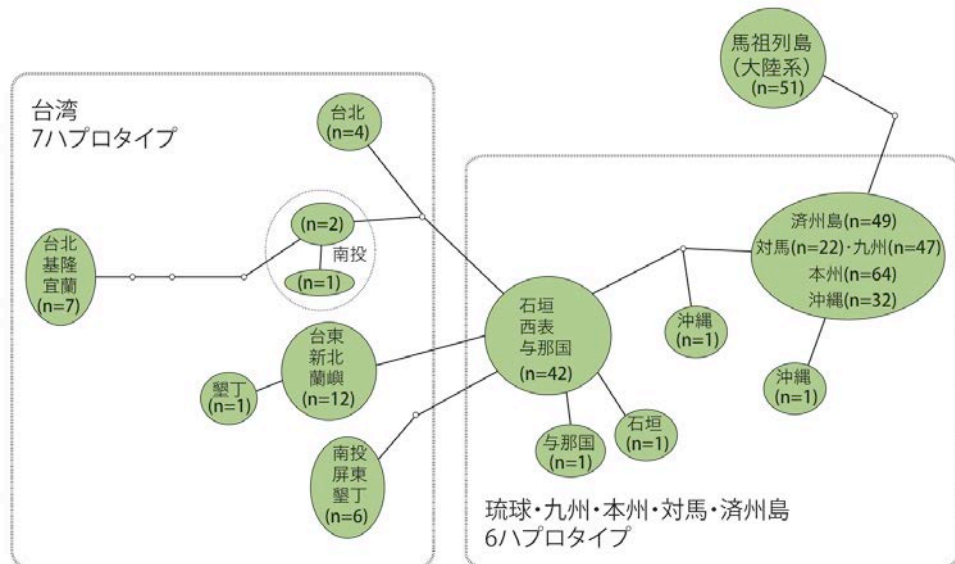


図4. イヌビワの葉緑体DNAのネットワーク図。

本州のイヌビワは九州から伊豆まで広い範囲にわたっているにもかかわらず、1つのハプロタイプしか見つからない。このタイプは沖縄の集団でもメインを占めている。この結果はこれまでのものと一致しており、日本産のイヌビワは南方から北進して分布域を拡大し、本州

に到達したあと、比較的短期間で広がったとの結論を支持している。一方、今回の解析に加えた2集団にはそれぞれ1つのハプロタイプしか見るからない。濟州島のハプロタイプは本州・九州・沖縄タイプと同じであり、馬祖列島のハプロタイプもこのタイプと繋がっている（2変異ある）（図4）。濟州島産のイヌビワは日本から侵入したものなのか、それとも逆に濟州島から日本にイヌビワが入ってきたのか、またなぜ馬祖列島のものが本州・九州産タイプに近いのか、興味深い課題が残っている（下記の考察も参照）。

2.2. マイクロサテライトマーカーを用いたイヌビワの集団遺伝構造の解析。 イヌビワの葉緑体DNAの塩基配列多型は非常に少ないことが示されていたため、集団間の遺伝的分化の有無を解析するには、より多型性の高いマイクロサテライトマーカー（核遺伝子座）を用いる必要があった。また葉緑体DNAは母性遺伝であるため、種子の分散のみが反映され、花粉の移動による遺伝的交流が反映されない。そのため、核遺伝子マーカーを用いた集団遺伝学的解析も必要である。

これまでに9つのマイクロサテライトマーカーを用いて、すでに伊豆、関西、九州、沖縄、八重山と台湾のサンプルの解析を行った（Kusumi *et al.*, 未発表）。本年度は新たに濟州島と馬祖列島の集団を加えて解析を行った。マイクロサテライトデータの解析は、Structure ver2.3.4 を用いて行った。イヌビワの遺伝構成を解析したところ、8つの遺伝的集団が確認され、それらは地域的集団と一致することが判明した（図5）。また、伊豆（静岡）と関西、それから台湾と馬祖列島はそれぞれ遺伝的構成が近いことが分かった（図5、K=6）。上に述べたように、葉緑体DNAでは、馬祖のものは本州・九州の集団に近いことが示唆されたが、核遺伝子では、台湾のものに近く、不一致な結果が示された。1つの可能性としては、本州・九州のイヌビワは大陸系から朝鮮半島を経由して侵入してきたものであると考えられる。大陸のイヌビワを詳細に解析すれば結論が見えてくる。

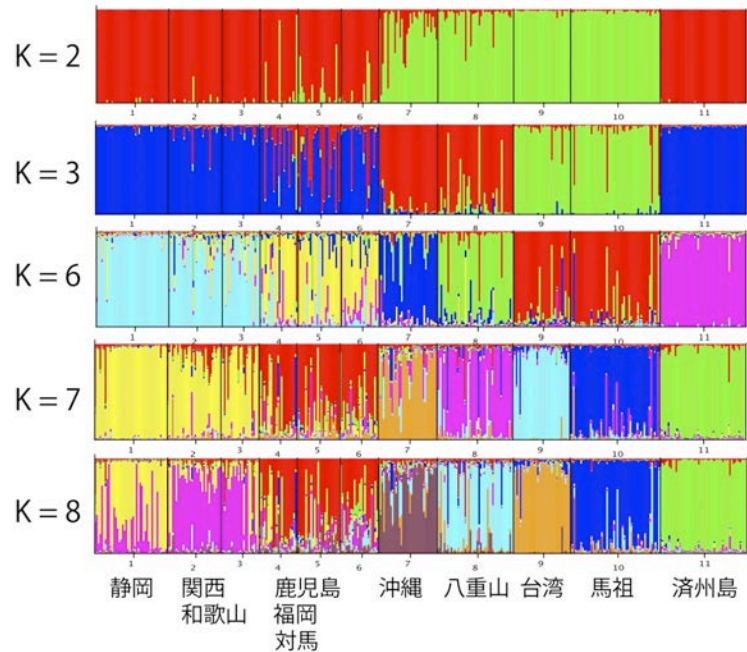


図5. 9つの核遺伝子座によるイヌビワの地域集団間の遺伝的分化。遺伝的な情報をもとに任意のK個の集団に個体を割り振った。

3) 雌雄同株と雌雄異株のイチジク植物の遺伝的分化の比較

イチジク属植物には、雌雄同株の種と雌雄異株の種がある。雌雄同株の種では、1つの成熟した花囊からイチジクの種子と次世代のイチジクコバチの両方ができるが、異株の種では、花囊につく花の違いから、雌株からはイチジクの種子がとれ、雄株からはコバチが産まれる分業制となっている。それだけでなく、雌雄同株と異株では樹高の傾向にも違いが見られ、一般的

に同株のほうが高木で、異株のほうが低木である。花囊から飛び立つ次世代のコバチにとって、高い位置から飛び立つ方が風にも乗りやすく遠くまで飛べることが予想されるため、同株のコバチのほうが異株よりも長距離にわたって分散していると考えられる。イチジクの花粉の唯一の運び手であるコバチの飛翔範囲が違うことは、雌雄同株／異株で地域集団の遺伝的分化の差をうむのではないかとの仮説をたて、同株2種(アコウ *F. superba* とガジュマル *F. macrocarpa*)、異株2種 (アカメイヌビワ *F. benguetensis* とハマイヌビワ *F. virgata*) のイチジク属植物の集団分化の実態を明らかにし、それらを比較して検証を行っている。

本研究は、沖縄本島、石垣島、西表島、与那国島と台湾を各種のイチジク属植物の地域集団として解析を行う。海による物理的な集団間の分断が本研究にとって好条件である。解析に用いる分子マーカーは葉緑体 DNA の遺伝子間領域 (*atpB-rbcL*) とマイクロサテライトマーカー (SSR: Simple Sequence Repeat) である。核遺伝子座である SSR を用いるのは、より多型性に富んでいるためと、花粉の分散を考慮するにあたって、母性遺伝である葉緑体 DNA のみを追うのでは不十分であるためである。本年度はサンプル採集を終え (表 1)、現在解析を進めている。

表 1. 採集したサンプル情報

	雌雄同株				雌雄異株			
	ガジュマル		アコウ		アカメイヌビワ		ハマイヌビワ	
	採集した株数	コバチも採集できた株数	採集した株数	コバチも採集できた株数	採集した株数	コバチも採集できた株数	採集した株数	コバチも採集できた株数
沖縄本島	54	5	45	6	60	6	97	16
石垣島	18	3	12	0	25	3	30	2
西表島	19	1	16	0	25	3	23	1
与那国島	25	7	19	0	26	4	23	2
台湾	39	10	38	4	54	15	36	9

るところである。八重山諸島 (石垣島、西表島、与那国島) のサンプルの葉緑体 DNA を解析した結果、雌雄同株のガジュマルとアコウ、雌雄異株のハマイヌビワは、それぞれ同一のハプロタイプであったが、雌雄異株のアカメイヌビワには2つのハプロタイプ (h1 と h2) が確認された。また台湾のアカメイヌビワにも同様の2つのハプロタイプが確認され、それは南北に分かれていることが判明した (図 6)。この結果は、台湾のアカメイヌビワは南北に遺伝的分化があることを示唆している。今後、より離れた沖縄本島のサンプルも加え、また、マイクロサテライトマーカーによる解析を追加して、雌雄同株／異株間の遺伝的分化の違いを詳細に明らかにしていきたい。

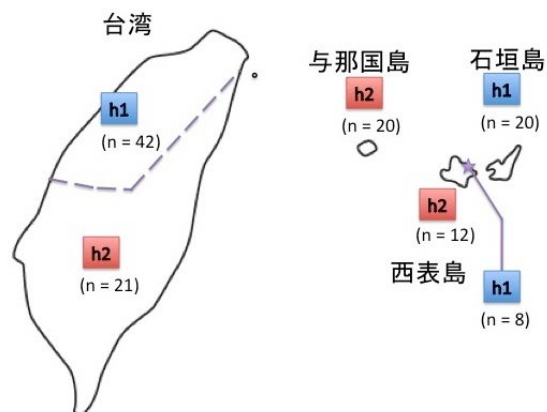


図 6. アカメイヌビワの葉緑体 DNA のハプロタイプの分布。西表島の h1 は星印の場所のみが確認されている。

おわりに

イチジク属植物とイチジクコバチとの共生・共種分化機構を解明するために、これまで主として分子系統学・集団遺伝学・化学生態学の手法を用いて研究を行ってきた。昨年度に引き続

き、本年度も主にイヌビワとその近縁種およびそれぞれのイチジクコバチの種間・種内の関係に注目して、産卵行動実験や集団遺伝学的解析を行った。イヌビワコバチが本来と異なる寄主植物の花囊に入り、発育できることは、イチジクコバチが寄主転換できることを強く示唆した。この知見はイチジク植物とイチジクコバチの種特異的共生関係の維持・崩壊と種分化の生態的メカニズムの理解に寄与するものである。イヌビワの集団遺伝学的解析から、日本産のイヌビワは、台湾経由と済州島経由の二つのルートで日本に侵入したことが示唆された。今後、コバチの解析と同時に大陸系のものを詳細に解析することによって、この結果を検証していきたい。また、雌雄同株と雌雄異株のイチジク属植物とそれらのコバチの集団間の遺伝的分化を比較し、種分化をもたらす要因を探っていきたい。さらにイチジク属植物種とイチジクコバチの種分化の分子機構を理解するために、ゲノム情報の比較と触角の発現遺伝子の比較解析も続けて行う予定である。

3-2. 多足類をはじめとする節足動物の系統進化

はじめに

記載種数において動物界最大の分類群である現生の節足動物門は、鋏角亜門 (Chelicerata; 以下、鋏角類)・多足亜門 (Myriapoda; 以下、多足類)・甲殻亜門 (Crustacea; 以下、甲殻類)と六脚亜門 (Hexapoda; 以下、六脚類) の 4 亜門に分類される。この節足動物門に属する生物は、地球上の至る所に分布しており人類にとっても身近なものが多い。しかし、節足動物の進化と多様化を理解するために最も必要となる、節足動物門の系統関係について多くの点が未だ明確になっていない。多足類の系統的位罫については多足類と鋏脚類が姉妹群を形成する Myriochelata 説と多足類が汎甲殻類 (甲殻類+六脚類) と姉妹群を作る Mandibulata (大顎類) 説が提唱されている。近年の分子系統学的研究では大顎類説がより支持されている。しかし、その多くが信頼性の低い樹形から得られた結論のため、検討の余地が残されている。六脚類と甲殻類の関係についてはミトコンドリア遺伝子による研究では無翅昆虫の内顎類 (カマアシムシ目+トビムシ目+コムシ目) が甲殻類の一部より前に分岐した可能性が示唆され、六脚類の単系統性も疑問視されていた。しかし、最近の多くの研究結果はその可能性を否定している^{8,9)}。

各亜門における「綱」間・「目」間の系統関係についても明確になっていないところが多く残されている。我々はこれまでに複数の核タンパク遺伝子を用いて、六脚類と多足類の目間の系統関係の解明を行ってきた^{8,10)}。六脚類については、これまで提唱されていた内顎類・無尾類・無眼類の単系統性を否定し、分子系統学的にカマアシムシ目が六脚類において最も先に分岐した系統であることを示した。また有翅昆虫の系統関係についても、多新翅類の単一起源を強く支持する系統仮説を分子情報に基づいて初めて提唱し、完全変態類昆虫の目間の系統関係をほぼ完全に明らかにした。最近、大量の遺伝情報を用いたゲノム系統学 (Phylogenomics) の研究によって、六脚類の系統進化に対する理解はさらに前進した¹¹⁾。多足類については、ムカデ綱 Chilopoda・ヤスデ綱 Diplopoda・コムカデ綱 Symphyla・エダヒゲムシ綱 Pauropoda のうち、コムカデ綱が最も祖先的な系統であることを明らかにした。さらに、その分岐はこれまで考えたより遙かに古く、カンブリア紀初期に遡ることが判明した。また、変態様式の祖先状態の推定を行った結果、多足類の祖先種は 1) 半増節変態を行っていたこと、2) 体節と脚の数が少なかっ

たことが示唆された¹²⁾ (図7)。しかし、これまでの研究によって六脚類と多足類の系統関係に対する理解が大きく深まったとはいえ、未解明な部分が多く残されている。多くの研究が行われて来たにも関わらず、節足動物門の系統関係についての十分な理解が進まない主な原因の一つは解析に使用される分子情報の不適切性と量の不足であると考えられる。そこで、我々は14年度から次世代シーケンサーを活用しトランスクリプトーム情報を用いたゲノム系統学的解析に取り組んでいる。本年度行った多足類の研究の進捗状況について報告する。

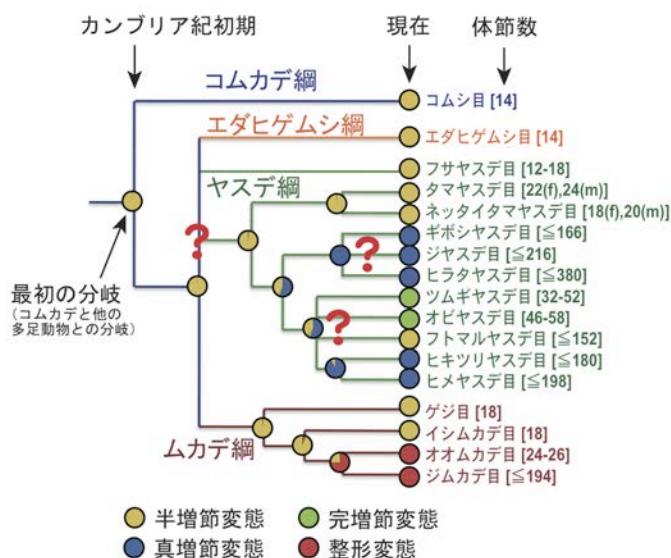


図7. 3つの核タンパク遺伝子による多足類の系統。

結果と考察

1. 解析に用いたサンプルとその配列情報

多足類は、ムカデ綱 (5目)・ヤスデ綱 (16目)・コムカデ綱 (1目)・エダヒゲムシ綱 (2目)の4綱からなる。これまで多足類の綱レベルの系統関係についてはさまざまな仮説が提唱されてきた。核タンパク質遺伝子 RNA polymerase II largest subunit (RPB1), RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) と DNA polymerase δ catalytic subunit (DPD1)を用いて系統関係を推定したところ、コムカデ綱が最初に分岐し残り3綱 (ムカデ綱・ヤスデ綱・エダヒゲムシ綱)が一つの系統群であることが示唆された (図7)。ムカデ綱とヤスデ綱の目レベルの系統関係では形態に基づく系統分類と矛盾しない結果になった。しかし、エダヒゲムシ綱・ヤスデ綱・ムカデ綱の綱レベルの関係やヤスデ綱の目レベルの関係の一部については、樹形の統計的支持が弱く、検討の余地が残されている。これらの系統関係を詳細に明らかにすることは、節足動物門において多足類特有の変態様式の起源や進化過程についての理解につながる。多足類の目レベルの系統関係を明らかにするために、それぞれの系統群から代表種を選んで解析に用いた。データベースに配列データを公表されたものは、新たに配列の決定を行わず、公開の配列データを利用することにした。これまでに多足類15種と鋏角類1種のトランスクリプトームの配列の決定を行った。そのうち、系統解析に十分な配列情報が得られたものは、多足類10種と鋏角類の1種であった。本年度はさらに公表されたヤスデ綱8種とイシムカデ目1種のトランスクリプトーム配列データを入手し解析に加えた。結果としてコムカデ綱2種、エダヒゲムシ綱1種、ヤスデ綱12目15種、ムカデ綱5目10種、計28種の多足類の配列データを解析に用いた (表2)。昨年度より6目のヤスデ類を新たに追加することができた。それに六脚類5種、甲殻類1種、鋏角類2種と節足動物以外 (外群) 3種の配列データを用いた。それらのデータの入手元は表2に示している。

表2. 系統解析に用いたサンプルとその配列情報

サンプル番号	種名	目名	リード数	コンティグ数 (500bp以上)	遺伝子 座数	ミッシング データ(%)	アミノ酸 座数	ミッシング データ(%)	データソース
1	<i>Symphylella vulgaris</i>	コムカデ目		22,911	697	18.1	108372	43.5	*1
2	ヤサコムカデ科の1種	コムカデ目	16,634,254	41,308	810	4.8	172767	9.9	This study
3	エダヒゲムシ科の1種	エダヒゲムシ目	12,222,399	26,445	834	2	178900	6.7	This study
4	<i>Scutigera coleoptrata</i>	ゲジ目		38,546	759	10.8	142170	25.8	*2
5	ゲジ	ゲジ目	15,272,771	51,434	834	2	179489	6.4	This study
6	<i>Craterostigma tasmanianus</i>	ナガズイシムカデ目		30,289	778	8.6	150688	21.4	*2
7	イシムカデ属の1種	イシムカデ目	16,634,254	19,139	679	20.2	127452	33.5	This study
8	<i>Himantarium gabrielis</i>	ジムカデ目		11,985	733	13.9	147837	22.9	*2
9	<i>Strigamia maritima</i>	ジムカデ目		24,627	808	5.1	172909	9.8	*3
10	<i>Cryptops hortensis</i>	オオムカデ目		29,795	829	2.6	176391	8	*2
11	<i>Alipes grandidieri</i>	オオムカデ目		32,712	819	3.8	174517	8.9	*2
12	オオムカデ目の1種	オオムカデ目	12,260,598	40,305	830	2.5	176623	7.9	This study
13	ニホンフサヤスデ属の1種	フサヤスデ目	10,743,472	36,464	818	3.9	175797	8.3	This study
14	<i>Glomeris pustulata</i>	タマヤスデ目		11,763	696	18.2	108721	43.3	*1
15	ジャスデ属の1種	ジャスデ目	10,407,925	21,956	811	4.7	175320	8.5	This study
16	オオギヤスデ属の1種	オビヤスデ目	15,272,771	24,736	825	3.1	174261	9.1	This study
17	<i>Polydesmus angustus</i>	オビヤスデ目		18,787	600	29.5	104416	45.5	*1
18	フトマルヤスデ目の1種	フトマルヤスデ目	11,697,126	30,135	808	5.1	172242	10.1	This study
19	ヒメヤスデ目の1種	ヒメヤスデ目	33,359,248	50,358	830	2.5	169412	11.6	This study
20	オオヒメグモ	クモ目		41,557	813	4.5	171159	10.7	*4
21	ザトウムシ目の1種	ザトウムシ目	10,407,925	20,855	824	3.2	173042	9.7	This study
23	ミジンコ	双殻目			849	0.2	185313	3.3	*5
24	コクヌストモドキ	コウチュウ目			850	0.1	184496	3.7	*5
25	セイヨウミツバチ	ハチ目			850	0.1	180775	5.7	*5
26	カイコガ	チョウ目			850	0.1	180413	5.9	*5
27	カギムシ	カギムシ目		20,269	691	18.8	132039	31.1	*2
30	キイロショウジョウバエ	チョウ目			851	0	185691	3.1	*5
34	ヒトシラミ	シラミ目			850	0.1	183745	4.1	*5
35	<i>Pristionchus pacificus</i>	桿線虫目			851	0	178634	6.8	*5
36	<i>Caenorhabditis elegans</i>	桿線虫目			851	0	185939	3	*5
60	<i>Glomeridesmus</i> sp.	ナメクジヤスデ目		14630	821	3.5	179328	6.4	*6
61	<i>Brachycybe lecontii</i>	ヒラタヤスデ目		12644	820	3.6	179792	6.2	*6
62	<i>Petaserpes</i> sp.	ジャスデ目		10054	740	13	142688	25.6	*6
63	<i>Pseudopolydesmus</i> sp.	オビヤスデ		11886	811	4.7	176798	7.8	*6
64	<i>Cleidogona</i> sp.	ツムギヤスデ目		12761	788	7.4	173479	9.5	*6
65	<i>Abacion magnum</i>	スジツムギヤスデ目		12746	761	10.6	161347	15.8	*6
66	<i>Prostemmiulus</i> sp.	ネツタイツムギヤスデ目		9364	698	18	122655	36	*6
67	<i>Cambala annulata</i>	ヒキツリヤスデ目		11083	778	8.6	166173	13.3	*6
68	<i>Lithobius</i> sp.	イシムカデ目		23471	825	3.1	179748	6.2	*6
合計 または 平均(%)					851	6.7	191670	14.2	

データベースより入手したデータ: *1, (Rehm et al., 2014); *2, (Fernandez et al., 2015); *3, (Chipman et al., 2014); *4, 小田ラボ;

*5, HaMStR coresetのarthropoda_hmmer3より; *6, (Brewer and Bond, 2013)

2. 系統解析用のデータセットの構築と系統樹の作成

配列情報(リード)をCLC Genomics Workbenchを用いてアセンブルを行い、得られたコンティグ配列中から500bp以上のコンティグを使用することにした。コンティグ数は種によって異なるが、約10,000~50,000得られた(表2)。得られたコンティグ配列は必ずしもそのまま全て系統解析に使用できるとは限らない。配列の中には系統解析に不適切なものが多く含まれているからである。大量の遺伝子配列から、解析に適したそれぞれの種で相同な遺伝子配列を得るために、それ以外の配列をとり除く必要がある。まず、それぞれのコンティグ配列をアミノ酸配列に翻訳する。複数の節足動物(全ゲノム配列が分かっているもの)に共通して存在する単一コピーの相同遺伝子(オーソログ遺伝子)を参考配列として、類似性の高いコンティグ配列を検索し集め、系統解析に使用するための候補配列を得た。参考配列として、セイヨウミツバチ、コクヌストモドキ、カイコガ、キイロショウジョウバエ、ヒトシラミ、ミジンコと桿センチュウ2種、計8種の全ゲノム配列から集められたオーソログ遺伝子を用いた。これらのオーソログ遺伝子セット(コアセット arthropoda_hmmer3)を参考配列にして、HaMStRというブ

プログラムを用いて、本研究で得られたコンティグ配列を検索し、各種の配列データからオーソログ遺伝子を抽出した。

各種から抽出したオーソログ遺伝子（系統解析用の候補配列）を MAFFT というプログラムを用いて遺伝子座ごとにアライメントを行う。その後、Gblocks プログラムを用いて系統推定の際にノイズとなるような配列を取り除いた。その結果、それぞれの種から約 670~850 の遺伝子座が得られた（表 2）。これらの遺伝子座を連結したアライメントのデータセットのアミノ酸座数は合計約 19 万となった。遺伝子座のミッシングデータの平均は 8.7% で、アミノ酸配列のミッシングデータの平均は約 14% であった（表 2）。

このように構築した配列データセットを用いて、LG4X 進化モデルと最尤法 (RAxML) による系統解析を行った。その結果、多足亜門の 4 綱の関係については、コムカデ綱とエダヒゲムシ綱、ヤスデ綱とムカデ綱がそれぞれ姉妹群となった。この結果は、3 つの核タンパク遺伝子を用いて得られたものと異なるが、トランスクリプトームデータを用いた昨年度の解析結果を支持している。ムカデ綱内の目レベルの系統関係についても、昨年度の解析結果と一致した。イシムカデ目とジムカデ目が近縁となり、これまでに提唱されてきた仮説と異なる。6 目を新たに加えたヤスデ綱の目レベルの系統関係については、ヒメヤスデ目とヒキツリヤスデ目の姉妹関係の支持率が 76% である以外、全て高い支持が得られた。未解決の目間の系統関係（図 7 を参照）はほぼ明らかになった。これらの結果は基本的にこれまでに考えられてきたものと一致した。節足動物門においては、まず鋏角亜門が分岐し、多足亜門と汎甲殻類（甲殻亜門+六脚亜門）が姉妹群になり、大顎類説を支持する結果となったが、支持率が低かった。多足類と鋏脚類が姉妹群を形成する Myriochelata 説と多足類が汎甲殻類（甲殻類+六脚類）と姉妹群を作る Mandibulata（大顎類）説の決着は更なる解析が必要である。

おわりに

これまでに複数の核タンパク遺伝子座の情報を用いて、昆虫類や多足類を中心に節足動物門の系統進化の解明を行い、その理解に大きく貢献してきた。しかし、現在でも未解明の問題は少数の遺伝子では解明することが困難であることが予想され、ゲノム規模の大量の遺伝情報を用いた系統解析が必要であると考えられる。昨年度と今年度の解析結果を見ると、サンプルと遺伝子座の増減も外群の変化も多足類の綱・目レベルの系統関係に影響を与えることはなかった。このことから今回得られた多足類の系統関係はかなり信頼性の高いものであると考えられる。この系統関係に基づいて多足類の変態様式と体節増加の進化過程を解明していきたい。一方、節足動物 4 亜門の系統関係は支持率が高くないうえ、データセットによって異なる樹形になるため、結論するには更なる解析の工夫が必要である。最終的には、鋏角類や汎甲殻類の情報をさらに加えて節足動物門全体の系統関係を解明し、その進化と多様化を理解したい。

引用文献

- 1) Herre E. A., Jander K. C. and Machado C. A. (2008) Evolutionary ecology of figs and their associates: recent progress and outstanding puzzles. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 39: 439-458.
- 2) Su Z.-H., Iino H., Nakamura K. Serrato A. and Oyama K. (2008) Breakdown of the one-to-one rule in Mexican fig-wasp associations inferred by molecular phylogenetic analysis.

Symbiosis 45: 73–81.

- 3) Cornille, A., Underhill, J.G., Gruaud, A., Hossaert-McKey, M., Johnson, S.D., Tolley, K.A., Kjellberg, F., von Noort, S. and Proffit, M. (2012) Floral volatiles, pollinator sharing and diversification in the fig-wasp mutualism: insights from *Ficus natalensis*, and its two wasp pollinators (South Africa). *Proc. R. Soc. B* 279: 1731–1739.
- 4) Cruaud, A. et al. (2012) An extreme case of plant–insect codiversification: figs and fig-Pollinating wasps. *Syst. Biol.* 61: 1029–1047.
- 5) Azuma H., Harrison R.D., Nakamura K. and Su Z.-H. (2010) Molecular phylogenies of figs and fig-pollinating wasps in the Ryukyu and Bonin (Ogasawara) islands, Japan. *Genes Genet. Syst.* 85: 177–192.
- 6) Kusumi, J., Azuma, H., Tzeng, H.-Y., Chou, L.-S., Peng, Y.-Q., Nakamura, K., and Su, Z.-H. (2012) Phylogenetic analyses suggest a hybrid origin of the figs (Moraceae: *Ficus*) that are endemic to the Ogasawara (Bonin) Islands, Japan. *Mol. Phylogenet. Evol.* 63: 168–179.
- 7) Wachi, N., Kusumi, J., Tzeng, H.-Y., and Su, Z.-H. (2016) Genome-wide sequence data suggest the possibility of pollinator sharing by host shift in dioecious figs (Moraceae, *Ficus*). *Mol. Ecol.* 29: 5732–5746.
- 8) 10) Sasaki, G., Ishiwata, K., Machida, R., Miyata, T. and Su, Z.-H. (2013) Molecular phylogenetic analyses support the monophyly of Hexapoda and suggest the paraphyly of Entognatha. *BMC Evol. Biol.* 13:236.
- 9) Regier J.C., Shultz J.W., Zwick A., Hussey A., Ball B., Wetzer R., Martin J.W., Cunningham C.W. (2010) Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. *Nature* 463: 1079–1083.
- 10) Ishiwata K., Sasaki G., Ogawa G., Miyata T. and Su Z.-H. (2011) Phylogenetic relationships among insect orders based on three nuclear protein-coding gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 58: 169–180.
- 11) Misof, B. et al. (2014) Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* 346: 763–767.
- 12) Miyazawa, H., Ueda, C., Yahata, K., and Su, Z.-H. (2014) Molecular phylogeny of Myriapoda provides insights into evolutionary patterns of the mode in post-embryonic development. *Scientific Reports* 4:4127.