

## F-1 野生生物集団の絶滅プロセスに関する研究

### (3) 種間関係の攪乱の影響の解明

研究代表者 国立環境研究所生物圏環境部 椿 宜高

環境庁国立環境研究所

生物圏環境部

地球環境研究グループ

地域環境研究グループ

(委託先)

上席研究官

野生生物保全研究チーム

化学物質生態影響評価研究チーム

筑波大学生物科学系

京都大学総合人間学部

富山大学理学部

京都大学生態学研究センター

椿 宜高

高村 健二・永田尚志

五箇公一

鷲谷 いずみ

加藤 真

辻 和希

山村則雄

平成8～10年度合計予算額 23,425 千円

(平成10年度予算額 7,411 千円)

〔要旨〕異型花柱性植物であるサクラソウおよびシロバナサクラタデを用いた研究から、生育場所の分断孤立化に伴い、送粉昆虫との生物間相互作用の喪失やクローンの孤立化による受粉の失敗により種子生産が制限されたり、生産された種子の発芽能力が低下したりする現象が、現実にも生じていることが明らかにされた。

日本の南部に点在する島嶼、小笠原諸島、奄美大島、大東諸島、沖縄諸島、先島諸島において、開花フェノロジーと訪花昆虫群集を調査した結果、それぞれの島嶼固有のハナバチ群集が重要な送粉者群集であると位置づけられた。小笠原諸島ではセイヨウミツバチが定着しており、それが小笠原の固有の送粉共生系に大きな影響を与えていることが明らかになった。

ハウス用トマトの花粉媒介用として輸入されているヨーロッパ原産のセイヨウオオマルハナバチは、日本の在来種と交雑できるため、野生化した場合、遺伝的汚染が生じる可能性がある。本研究では、遺伝的汚染をモニタリングするための遺伝的マーカーの探索を行った。また、近年、一部生態学者やメーカーが試みている在来のマルハナバチの商品化に伴う問題として、地域個体群の遺伝的攪乱の可能性を考え、在来種個体群の遺伝子組成における地理的変異の検出も試みた。

野生生物の絶滅要因を検討するにあたって、(1) イチジクとそれを餌としかつその送粉者であるイチジクコバチとの相利共生関係、(2) 近縁のマダラテントウ類の種間競争 (3) 捕食者1種と餌種2種のシステムを例にして、個体群の絶滅要因を分析したところ、相利共生関係、競争関係、捕食関係の種間関係が重要な寄与をすることが分かった。

南西諸島と熱帯アジアにおいて、アリ類の社会構造と棲息環境に関する広範な比較研究を行った。自然林では、単女王制・単巢性で小さなコロニーを持つ狭域分布種が優占する一方で、人的攪乱が多く伴う環境では、多女王制・多巢性の大きなコロニーを持つ広域分布種が優占していた。

〔キーワード〕 生息地分断化、共生、侵入種、交雑

野生生物が絶滅に至る主な筋道の一つとして、ある種が絶滅することによってそれ以外の種が存続を脅かされる場合がある。進化的に継続して形成・維持されてきた種間関係の攪乱の影響である。その関係は競争であったり、捕食-被食関係であったり、また寄生であったりと、生物群集の中で極めて多彩な様相を呈しているが、なかでも攪乱の影響が大きい密接な種間関係はしばしば共生的な要素が強く、とくに植物と動物との間に密接な共生関係が多い。その中には送粉共生があり、種子散布共生があり、防衛共生がある。共生関係の攪乱の影響とは、例えば、花粉媒介者の絶滅によって、その種に種子生産を頼っていた植物種が絶滅の危機に追い込まれる、などという波及効果である。こういった過程が種の絶滅の一つの筋道として重要であることは古くから指摘されてきたが、その機構に関しての詳しい研究が乏しく、とくに希少植物種とそれと共生関係にある動物との関係の仕組みについて明らかにすることを目的とした。

## 1. 異型花柱性植物サクラソウの野生集団

### (1) はじめに

サクラソウ *Primula sieboldii* E. Morren は柱頭と葯の高さが交互に異なる二種類の花形態を持ち、自家・同型不和合性を示す異型花柱性の多年生草本で、種子生産につながる異型花間の授粉はトラマルハナバチの女王によってもたらされる<sup>1)</sup>。

関東地方の低地、長野県、および北海道のサクラソウの自生地いくつかでの調査では、トラマルハナバチの女王がよく花を訪れているサクラソウの自生地ではどの花型の花も十分に種子を生産するが、それがいない場所ではサクラソウの花が咲いても種子は十分にはできず花型間に明瞭な違いが認められ<sup>2) 3)</sup>、このような現状が続けば個体群の存続可能性が損なわれ、遺伝的な多様性が喪失することが危惧される<sup>4)</sup>。しかし、異なる地域の自生地では、いくつもの環境要因が同時に大きく異なるため、そこで見られた種子生産の違いが果たしてトラマルハナバチの訪花の有無を反映したものであるかどうかについて、はっきりした結論を出すことは難しい。より明確な証拠を得るためには、同じ地域の多数の自生地/個体群を比較するような調査が必要である。

### (2) 調査地

#### ①北海道における調査

現在、日本で最大のサクラソウ自生地が残されている北海道南部において、2年間にわたり、サクラソウ開花ピーク時の5月下旬から7月上旬にかけて、20ヶ所のサクラソウ自生地でクローン毎に訪花の指標として有効なマルハナバチの爪跡<sup>1)</sup>のある割合、花や果実の食害・病害および種子生産を調べて個体群間で比較した。

各個体群の個体の潜在的な交配相手がどれだけ存在しているか知るためにすべての開花クローンの数と花型比を調べた。その他の調査については、両花型各20クローン以上ある比較的大きな個体群においては、両花型20クローンについて10花序ずつ、計200花茎について、20クローンに満たない個体群では、全てのクローンについて同様に調査対象とした。開花時にビニールテープで花茎にマーキングしておき、結実後7月に花茎を回収し、花あたりの生産種子数、種子の食害<sup>5)</sup>、サクラソウに特異的に感染するクロホ病菌による被害<sup>6)</sup>、それ以外の菌類による被害、の有無を花毎に記録した。生産種子数については、花毎の平均を各個体群の値とし、自生地におけるマルハナバチの利用性(爪痕の頻度)との関係を回帰によって分析した。病害・

食害による果実の被害については各個体群毎に要因別に被害の率を求めた。食害者は、花卉、種子の食害者を現場で採集し、同定した。

## ②八ヶ岳山麓における調査

送粉昆虫との生物間相互作用とともに局所個体群の空間構造が種子生産「量」と生産された種子の「質」、すなわち種子の発芽力と実生の生存率や成長速度におよぼす影響を検討した。

野外調査は複数の局所個体群からなる筑波大学八ヶ岳演習林内のサクラソウ個体群<sup>5)</sup>を対象として行った。4つの局所個体群で、開花後期（5月下旬～6月上旬）クローン（一つの種子に由来する遺伝的に同一な個体）の分布、開花ラメット数、それぞれの開花ラメットの最近接異型花までの距離、マルハナバチによる訪花、食害昆虫であるハナムグリハネカクシの有無、クロボ病菌による寄生の有無を調べた。結実期（8月上旬）に果実を採取し、局所個体群毎に花当たりの平均生産種子数を算出した。病食害の影響のないところで生産された種子についてはその発芽力（最適条件下での発芽可能性）および発芽した実生の温室内での生存率と、相対成長度を測定した。定着した芽生えについては酵素多型分析を行った。これらのデータから、個体群の空間構造と種子生産や生産された種子の質との関係を検討した。

## (3) 結果・考察

### ①北海道南部の自生地

20個体群のうち、クローン数の比較的多い個体群について、マルハナバチ女王の訪花がある所（訪花が観察され、多くの花に爪痕が見られる）とない所（訪花が観察されず、花には爪痕がまったくみられない）で種子生産を比べてみると、その年に多くの爪痕が確認される場所では、花型を問わず比較的良好な種子を生産が認められるが、そうでない場所では、全体として種子生産は低く、自殖能の高い長花柱型に偏っていることが示された。

クローン数が4クローン以下の個体群では、まったく種子が生産されなかった。

マルハナバチの訪花が全般的に良好な年には、どの自生地でも種子生産は増加したが、個体群の間にはやはりかなりの種子生産の変異がみられ、その一部は病害や食害の程度によって説明された。

### ①八ヶ岳山麓の自生地

サクラソウの種子繁殖成功に影響を及ぼす生物間相互作用的要因は、局所個体群間で大きく異なり、病食害の影響の大きい場所では、種子生産はそれによって低く抑えられていた。病食害の影響の少ない局所個体群では、最近接異型花との距離で表される交配相手の利用性が種子生産と種子の発芽力や実生の初期の生存を制限する要因として重要であることが示された。しかし、定着した芽生えの成長やヘテロ接合度には、親個体の花型や孤立度による有意な差は認められなかった。

以上の結果から、最近接異型花との距離で表される交配相手の利用性が種子生産だけでなく発芽可能な健全な種子の割合を決める重要な要因であることが示唆された。交配相手に限られることによってもたらされる近交弱勢は発芽と発芽直後の発生段階までに強く現れ、生存力の劣る子孫が除かれる可能性が示唆された。

#### (4) 引用文献

- 1) Washitani I., M. Kato, J. Nishihiro, K. Suzuki, Importance of queen bumble bees as pollinators facilitating inter-morph crossing in *Primula sieboldii*. *Plant Species Biology* 9: 169-176 (1994).
- 2) Washitani I., H. Namai, R. Osawa, & M. Niwa, Species biology of *Primula sieboldii* for the conservation of its lowland-habitat population: I. Inter-clonal variations in the flowering phenology, pollen load and female fertility components. *Plant Species Biology* 6: 27-37 (1991)
- 3) Washitani I., R. Osawa, H. Namai, & M. Niwa, Patterns of female fertility in heterostylous *Primula sieboldii* under severe pollinator limitation. *Journal of Ecology* 82: 571-579 (1994).
- 4) Washitani I. (1996) Predicted genetic consequences of strong fertility selection due to pollinator loss in an isolated population of *Primula sieboldii*. *Conservation Biology*, 10, 59-64..
- 5) Washitani I., Y. Okayama, K. Sato, H. Takahashi & T. Ogushi, Spatial variation in female fertility related to interactions with flower consumers and pathogens in a forest metapopulation of *Primula sieboldii*. *Researches on Population Ecology* 38: 249-256 (1996)
- 6) Kakishima, M., Y. Yamazaki, Y. Okayama & I. Washitani *Urocystis tranzscheliana*, a newly recorded smut fungus on *Primula sieboldii* from Japan. *Mycoscience*, 36: 239-241 (1995)

## 2. 霞ヶ浦の分断・孤立化したヨシ原のシロバナサクラタデの受粉と種子生産

### (1) はじめに

ヨシの分断化が送粉昆虫との生物間相互作用の喪失やそこを生育場所とする植物の繁殖成功に与える影響を明らかにするために、霞ヶ浦右岸の湖岸線約 25km に沿って存在する 25 のヨシ原内のシロバナサクラタデ個体群を対象として訪花昆虫、受粉および種子生産を調査し、種子生産と個体群の特性（生育場所となるヨシ原の面積、個体数、花型の偏り）との関係を解析した。また、いくつかの個体群において花粉添加実験を行い、和合性のある花粉供給が種子生産を制限している程度を調べた。

### (2) 方法

シロバナサクラタデ (*Persicaria japonica* (Meisn.) H. Gross) は、低地のヨシ原などの湿地に生育し、地下茎の伸長によってクローン成長するタデ科の多年生草本である。異型花柱性の繁殖様式をもち、ほぼ完全な自家および同型花間の不和合性を示す<sup>7) 8)</sup>。霞ヶ浦周辺にも、かつては広範囲にわたってシロバナサクラタデの生育に適したヨシ原が広がっていたが、現在では湖周辺の土地利用の変化や湖岸堤の工事などによってヨシ原の面積が減じ、著しく分断化・孤立化している。本研究では比較的多くのヨシ原が残存している霞ヶ浦右岸の新利根川から小野川河口

部にかけての約 25km の範囲に分布する 25 のヨシ原（空間的に連続したヨシ群落を一つのヨシ原とした）に生育するすべてのシロバナサクラタデのクローンを調査対象とした。霞ヶ浦全体のシロバナサクラタデ集団をメタ個体群とすれば、それぞれのヨシ原に生育する集団はその局所個体群にあたる。

なお、シロバナサクラタデは小花や果実が脱落した後も小花柄が果序に残るため、それらを数えることによって開花数を推定することができる。採集したすべての果序に対して、果序ごとに残存していた小花柄数を実体顕微鏡下で直接計数した。

### (3) 結果・考察

局所個体群により、生育場所のヨシ原の面積（120m<sup>2</sup>～17,935m<sup>2</sup>）やクローン数（1～53クローン）、花型の偏りが大きく異なった。ヨシ原の面積とクローン数との間には正の相関があり（ $R=0.43$ ,  $N=25$ ,  $P<0.05$ ）、クローン数と花型の偏りの間には負の相関があった（ $R=-0.45$ ,  $N=25$ ,  $P<0.05$ ）。

調査により、シロバナサクラタデには、膜翅目 21 種、双翅目 26 種、鱗翅目 10 種、鞘翅目 1 種の昆虫の訪花が確認された。特に頻繁に訪花がみられた昆虫は、ハナアブ (*Eristalomyia tenax* Linne, ヒメハラナガツチバチ (*Campsomeris annulata* Fabricius), およびミドリキンバエ (*Lucilia illustris* Meigen) であった。開花の中期には、どの個体群でも比較的頻繁に昆虫の訪花が観察された。

花序あたりの結実率に対する分散分析の結果は、年の間では有意差がなく、局所個体群の違いおよび各年におけるクローンの間の違いは有意で、これらの因子により 51% の分散成分が説明された。クローン数が 2 以下、あるいは花型の偏りが 0.5 以上である局所個体群では種子生産が低く、これらの局所個体群とそれ以外の局所個体群における平均結実率の間には有意差が認められた ( $df=21$ ,  $t=6.5$ ,  $P<0.001$ ;  $df=23$ ,  $t=4.1$ ,  $P<0.001$ )。局所個体群あたりの平均結実率には、年間で有意な自己相関があった ( $r=0.510$ ,  $P=0.0007$ )。

両調査年とも局所個体群の平均結実率はクローン数との間では有意な正の相関を示し、花型の偏りとの間では有意な負の相関を示した。

花粉添加処理により、放任受粉下で結実率が低かった孤立したクローンのみからなる 4 局所個体群のうち 3 局所個体群で結実率が有意に向上した。また複数のクローンからなる局所個体群でも、実験した 2 局所個体群のうちの 1 局所個体群で有意な処理の効果が認められた。

本研究でみられた、クローン数が少ない個体群や花型の偏りが著しい個体群における種子生産の制限は、和合性のある花粉の供給が制限されたことによって生じていたと考えられ、これは人工的な花粉添加によって結実率が増加した事からも支持される。一般に植物の分断化・孤立化した生育地における種子生産に有効な受粉の低下を通じた種子生産の制限は、利用可能な交配相手の減少、送粉者の利用性の低下、あるいはそれらの両方の作用によって生じると考えられる。本研究において平均結実率の個体群間の違いが個体群を構成するクローン数と花型の偏りと強く相関していたことは、対象としたシロバナサクラタデの小さな個体群における種子生産の低下は有効な交配相手の減少が主要な原因となって生じていたことを示唆している。

一方、昆虫のシロバナサクラタデへの訪花は必ずしも低くなかった。シロバナサクラタデは、平開した花冠形態からも予測されるように送粉者に関してはジェネラリスト的であり、本

研究でもハナアブ類やハエ類を中心とする多種の昆虫の盛んな訪花が観察された。一般に、ハナアブ類は花間の移動距離が短く、パッチを形成する植物ではパッチ内の移動が優先的であることが知られている。シロバナサクラタデはクローンパッチを形成する植物であり、したがってハナアブ類によって種子生産に有効な送粉が行われるためには、空間的に連続する場所かあるいは非常に近い位置に異型の個体が存在することが必要である可能性がある。そのためには大きな広がりをもったヨシ原が維持される必要がある。またヨシ原どうしの空間的な近さは、そこに生育地する植物のメタ個体群レベルの遺伝的多様性の維持において重要であると考えられる。

異型花柱性植物サクラソウおよびシロバナサクラタデを用いたこれらの研究の結果は、「送粉昆虫の喪失」と「配偶相手の不在」、そのいずれかあるいは両方が原因での「実り無き秋」が、今ではかなり普遍的な現象になっていることを示唆する。「実り無き秋」とは、これまで当たり前前に存在していた生物の種間の絆が断ち切れ、さらには同種の個体間の結びつきまでが失われ、生物の全般的な孤立化が進みつつあることを示す「異変の徴」の1つである。

#### (4) 引用文献

- 7) Nishihiro J. & I. Washitani, Patterns and consequences of self-pollen deposition on stigmas in heterostylous *Persicaria japonica* (Polygonaceae). *American Journal of Botany* 85, 352-359 (1998).
- 8) Nishihiro J. & I. Washitani Effect of population spatial structure on pollination and seed set of a clonal distylous plant *Persicaria japonica* (Polygonaceae). *Journal of Plant Research* 111: 547-555 (1998).

### 3. 島嶼における植物と昆虫のパートナーシップの成立と崩壊

(1) 方法 小笠原諸島、奄美大島、大東諸島（北大東島、南大東島）、沖縄諸島（沖縄本島、久米島）、先島諸島（宮古島、石垣島、西表島）において、(1) 開花フェノロジー、(2) 訪花昆虫群集、の調査を行ない、小笠原諸島ではそれに加えて、(3) セイヨウミツバチが巣に持ち帰った花粉組成の季節変化の調査を行なった。(3) に関しては、自然植生のよく残る兄島と自然植生の多くを失った父島でセイヨウミツバチが採集して巣に持ち帰る花粉を1年間毎月サンプリングし、それを分析することによって、セイヨウミツバチと野生ハナバチとの競争について解析した。

#### (2) 結果

小笠原諸島には10種の在来のハナバチが生息しているが（うち9種が小笠原固有）、現在、小笠原の在来・帰化植物いずれの花上でもセイヨウミツバチが卓越していた。コロニーへの持ち帰り花粉の分析から、花の少ない冬季には、セイヨウミツバチはリュウキュウマツやシロバナセンダングサなどのような帰化植物に花粉資源の多くを依存しており、これら帰化植物の存在がセイヨウミツバチのコロニー存続に重要であること、春から夏にかけての在来植物の花粉利用が在来ハナバチを圧迫している可能性があることが明らかになった。

小笠原諸島と同様に海洋島である大東諸島には、4種のハナバチが生息しており、セイヨウミツバチは帰化していなかった。大東諸島はほとんど全島がサトウキビ畑になっており、自然植生は海岸や断崖に極めてわずかに残されているのみである。送粉共生系だけでなく、固有の植生や

生物相そのものが失われる寸前の状態にあった。

ブナ科植物オキナワジイが優占する奄美大島には、ムカシハナバチ科4種、ヒメハナバチ科7種、ハキリバチ科8種を含む合計35種のハナバチが生息していた。ミツバチ科ではニホンミツバチが生息しているがその個体数は少なく、またセイヨウミツバチの個体数も多くなかった。自生植物の送粉者として、アマミクマバチとアオスジコシブトハナバチ、オキナワヒゲナガハナバチ、ヒメハナバチ類、ハウジャク類の役割が大きく、小型ハナバチが卓越する小笠原や大東諸島の送粉共生系と対照的であった。

沖縄本島の植生は奄美大島のそれと似ているが、ハナバチ相はヒメハナバチ類が少ない点で大きく異なっていた。

先島諸島の植生は台湾北部のそれとよく似ているが、ハナバチ相はやや貧困だった。ヒメハナバチがないかわりに、コハナバチが多いことが特色であった。しかし、近年の養蜂の隆盛とともに、花上でのセイヨウミツバチの卓越と在来ハナバチの減少が顕著であり、その傾向は特に宮古島と石垣島で著しかった。

### (3) 考察

小笠原諸島、大東諸島、奄美大島はほぼ同じ緯度上にあるものの、大きく異なる植生を持ち、またそこには全く異なるハナバチ相と送粉共生系が形成されていた。小笠原固有ハナバチはすべて木材などの孔の中に営巣する種ばかりであり、地中営巣性のハナバチがないことが、海洋島のハナバチ相の巣漂着起源を物語っている。

小笠原では父島・母島の2つの有人島と、兄島や母島属島などの無人島でハナバチの個体数構成が大きくことなっていた。前者ではセイヨウミツバチが独占しているのに対し、後者では在来のハナバチが卓越している。自然植生が大規模に破壊され、帰化植物が繁栄している島でセイヨウミツバチが卓越しているわけである。小笠原におけるセイヨウミツバチは、冬期を中心にリュウキュウマツやモクマオウ、ギンネム、シロバナセンダングサといった帰化植物に強く花粉を依存していた。これらの帰化植物が存在しなければ、セイヨウミツバチは島でコロニーを維持することはおそらくできなかつたであろうと考えられる。

セイヨウミツバチはしかし帰化植物だけでなく、在来植物の花粉も数多く利用しており、これらの在来植物はまさに在来ハナバチの重要な餌資源でもあった。現在、父島と母島では多くの在来ハナバチが絶滅か絶滅寸前の状態にあるが、その背景には在来ハナバチの花粉源を独占してしまうほどのセイヨウミツバチのすぐれた採餌能力がある。

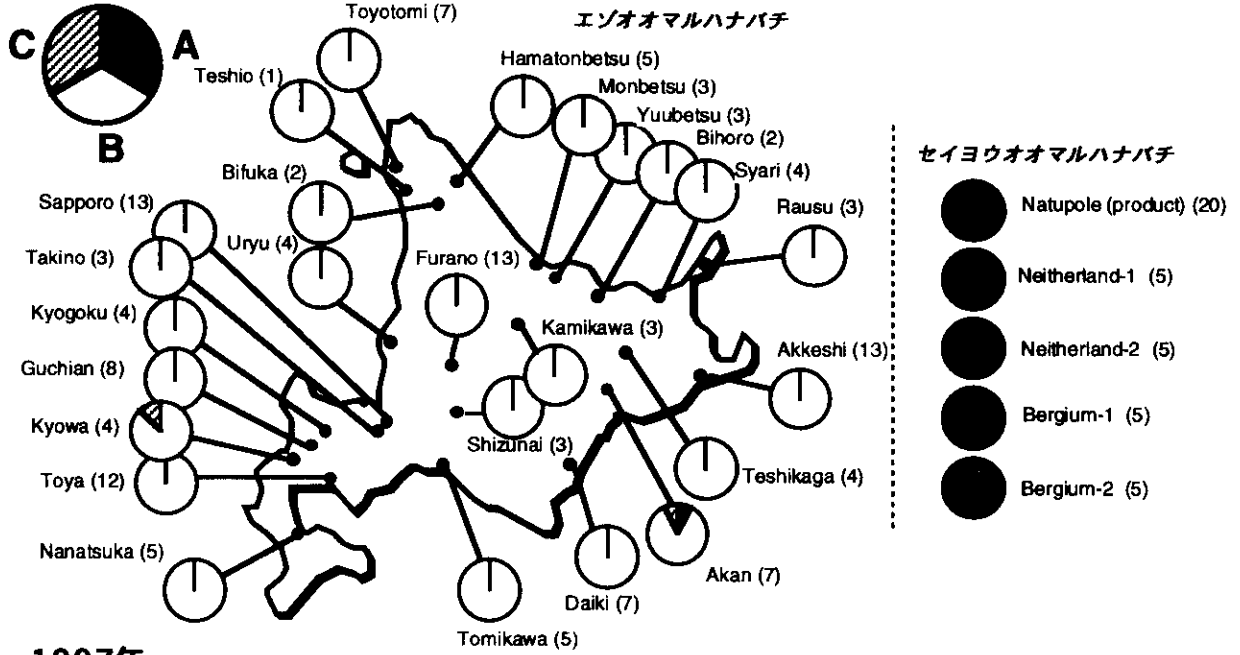
今回、小笠原のみならず、琉球列島の各島においても、セイヨウミツバチの繁栄と在来ハナバチの減少が観察された。これらの島々では近年シロバナセンダングサが原野や路傍に著しく繁茂しており、かつてのフロラを大きく変化させてしまったばかりでなく、セイヨウミツバチの重要な蜜源植物となって、送粉共生系をも大きく変えつつある。

## 4. セイヨウオオマルハナバチの野生化による在来種の遺伝子汚染

### (1) はじめに

セイヨウオオマルハナバチはハウス栽培作物の花粉媒介昆虫としてヨーロッパにおいて商品化され、我が国にも1992年からハウストマト受粉用に導入が始まっている。本種により農家

遺伝子頻度



**1998年**

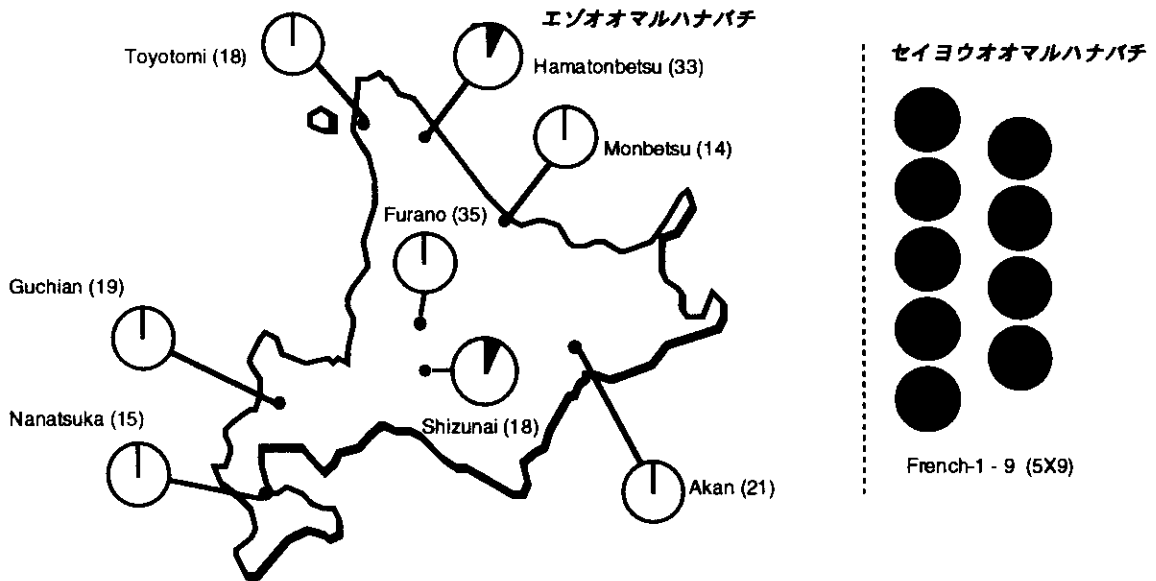


図 1. セイヨウオオマルハナバチ輸入コロニーと在来マルハナバチ二亜種（エゾオオマルハナバチ、オオマルハナバチ）地域個体群におけるフォスフォグルコムターゼアロザイムの遺伝子頻度。○内の数字は調査個体数。セイヨウオオマルハナバチの調査コロニーは全て A 遺伝子に固定しており、在来マルハナバチの調査個体群では、圧倒的に B 遺伝子が多い。セイヨウオオマルハナバチによる遺伝的汚染が進行すれば、在来マルハナバチ個体群から A 遺伝子が検出される頻度が高まると考えられる。



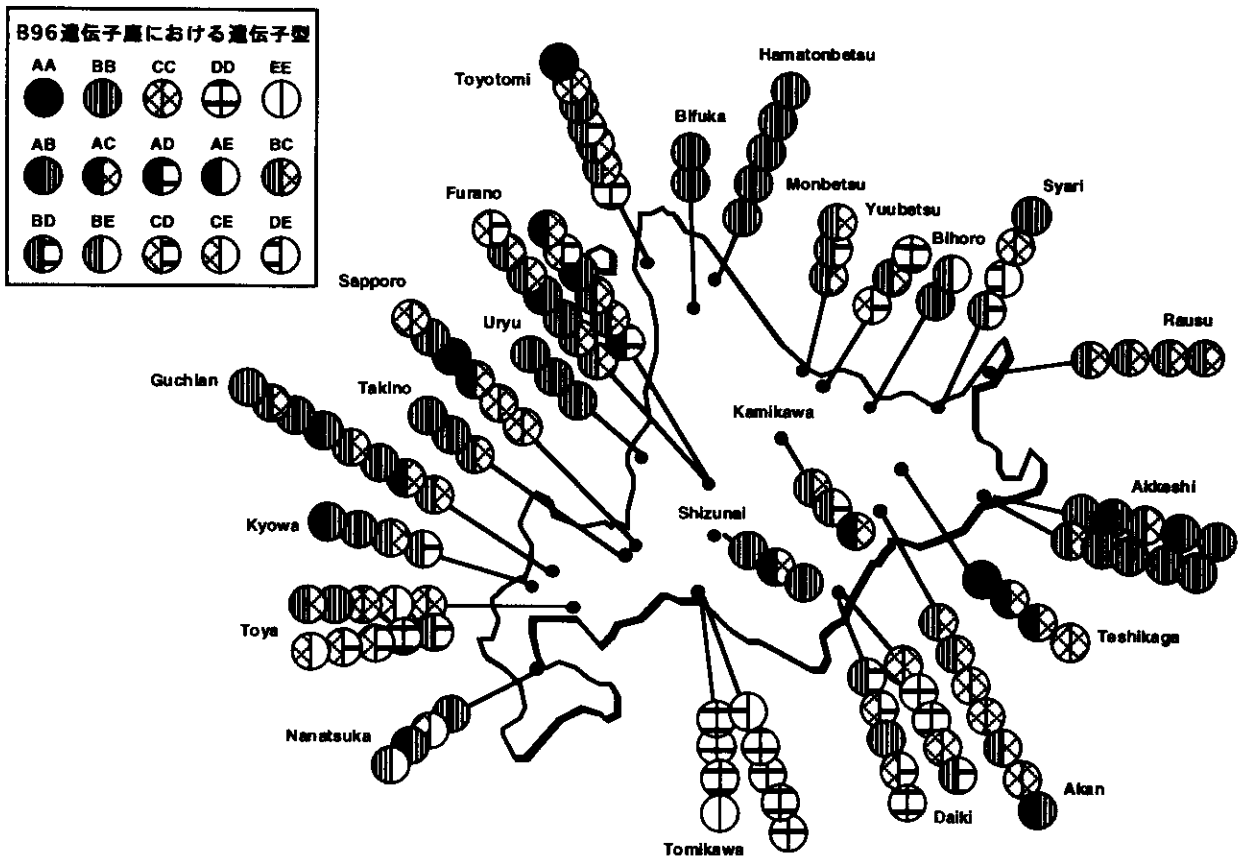


図 2.北海道より採集したエゾオオマルハナバチワーカーのマイクロサテライト一遺伝子座における遺伝子型分布パターン。6 つのマイクロサテライト遺伝子座における遺伝的変異を調査した。図はそのうちの一つの遺伝子座 B96 における各個体サンプル（ワーカー）の遺伝子型（ひとつの円で表示）を採集地域毎にまとめて示してある。この遺伝子座では対立遺伝子は 5 つあり（A～E）、遺伝子型の組み合わせは全部で 15 通り考えられる。遺伝子型頻度（あるいは遺伝子頻度）に特に顕著な地域性は認められないが、いずれの地域も様々な遺伝子型の個体が採集されており、コロニー間の遺伝的変異が豊富であることが示唆される。

の受粉作業は大幅に軽減され、安全で質の高いトマトが供給できるようになった。こうした恩恵の反面、その生態系影響が多くくの生態学者によって懸念された。すなわち、本種が野外で定着した場合、生態ニッチェが類似した在来のハナバチ類との間に競争関係や病原生物の感染などが生じて、在来種の衰退をもたらす可能性が指摘されたのである。そして 1996 年秋、北海道でセイヨウオオマルハナバチの野生巣が発見され、我が国でも本種の定着が進行していることが明らかになった<sup>1)</sup>。本種の「侵入」には、競争や病原体媒介以外に在来種におよぼす生物学的影響とし

て遺伝的汚染が起こる可能性も示唆されている。遺伝的汚染とは、地理的に隔離され、出会うことのなかった近縁種どうしが人為的要因による移動によって出会い、交雑し、次世代が形成されることで在来種の遺伝的純系が失われてしまうことである。

セイヨウオオマルハナバチは在来種のマルハナバチの一種エゾオオマルハナバチと交尾し、雑種形成することが実験的に確かめられている<sup>2)</sup>。従って、セイヨウオオマルハナバチが今後、野外でその分布を拡大するとすれば、在来種のマルハナバチと交雑して遺伝的汚染が起こる可能性がある。いまのところ「雑種」は在来種と形態的に識別することが難しく、遺伝的汚染の実態をモニタリングするためには、有効な遺伝的マーカーが必要となる。一方、セイヨウオオマルハナバチの野生化に対する問題意識が高まる中、各メーカーはエゾオオマルハナバチを含む在来種の増殖・販売の検討を始めている。しかし、ここでまた、別の遺伝的汚染の問題が生じる。すなわち商品化のための女王蜂の大量捕獲や室内飼育されたコロニーの放飼が在来種の各地域個体群の遺伝子組成を攪乱するのではないかという問題である。我が国におけるマルハナバチ類の地理的変異に関する情報は乏しく、その影響評価は難しい。

そこで、我々は、セイヨウオオマルハナバチと在来種エゾオオマルハナバチの種間差および種内変異をとらえる有効な遺伝的マーカーの開発を目的として、二種の様々なコロニーにおけるアロザイムおよびDNA（マイクロサテライト）変異の解析を行った。

## (2) 材料および方法

セイヨウオオマルハナバチの遺伝子分析には、1997年に株式会社トーメンより購入した1コロニー中の20個体、アビ株式会社から提供されたオランダ産の2コロニーから各5個体、ベルギー産3コロニーから各5個体の合計45個体の働きバチを用いた。1998年には、アビ株式会社から提供されたフランス産9コロニーからの各5個体、合計45個体の働きバチを用いた。

エゾオオマルハナバチの遺伝子分析には、1997年および1998年の8月から9月にかけて野外より採集した働きバチを用いた。1997年には北海道の25地点から合計141個体、1998年には北海道の8地点で合計173個体を採集した(図1)。このとき、同じコロニーからの個体を採集する可能性を小さくするために、各採集地点間の距離は15km以上となるようにした。採集されたサンプルは分析に供するまで-80℃にて保存した。

### ①アロザイム多型分析

マルハナバチ各個体の後脚を1本ずつ切り取り、酵素抽出用バッファー20 $\mu$ Lですり潰したものを酵素液とした。スラブ式ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて、Goka and Takafuji<sup>3)4)</sup>の方法に従ってアロザイム多型を検出した。

### ②マイクロサテライト多型分析

マルハナバチ各個体の後脚を1本ずつ切り取り、酵素抽出用バッファー50 $\mu$ Lですり潰し、1.5%プロテナーゼKを10 $\mu$ L加え、タンパク質分解処理を50℃で60分間行ったあと、95℃の熱処理を10分間行い、プロテナーゼを失活させた。この粗抽出液をTEバッファーで10倍に希釈したものをDNAテンプレート溶液とした。マイクロサテライト領域の増幅は、Estoup et al. (1996)<sup>5)</sup>が開発したセイヨウオオマルハナバチの6遺伝子座(B11、B96、B100、B118、B121、

B132) のプライマーセットを用いて、PCR 法により行った。得られた増幅産物は、オートシーケンサーによりフラグメント解析を行い、各個体の各遺伝子座における遺伝子型を求めた。

### (3) 結果

#### ①アロザイム多型分析

セイヨウオオマルハナバチおよびエゾオオマルハナバチで、16 の酵素のザイモグラムが検出されたが、このうち 15 の酵素では二種の間および種内で泳動帯（バンド）の相対易動度に差が認められなかった。残りの一つ、PGM（フォスフォグルコイソメラーゼ）の泳動帯に種間差および種内変異が認められ、3 つの対立遺伝子 A、B および C が存在することが示された。1997 年および 1998 年に捕獲・収集したエゾオオマルハナバチおよびセイヨウオオマルハナバチの働きバチサンプルの遺伝子型を調べた結果（図 1）、セイヨウオオマルハナバチのコロニーは全て A 遺伝子で固定していた。一方、エゾオオマルハナバチはほとんどの個体群が B 遺伝子で固定していたが、1997 年に AB ヘテロ接合体が 1 個体、BC ヘテロ接合体が 2 個体検出され、1998 年には AB ヘテロ接合体が 3 個体検出された。

#### ②マイクロサテライト多型分析

セイヨウオオマルハナバチおよびエゾオオマルハナバチのいずれにおいても、マイクロサテライト遺伝子座に変異が認められた。B121 を除く 5 つの遺伝子座は変異量が大きく、遺伝子座あたりの対立遺伝子数が 5~18 もあった。二種の間には各遺伝子座の遺伝子頻度に差が認められたが、サイズが同一の対立遺伝子も共有しており、マイクロサテライトは有効な種間差マーカーにはなり得ないと考えられた。

北海道のエゾオオマルハナバチ地域個体群の遺伝子頻度を調べた結果、地域内、地域間で高い多型性が認められた（図 2）。遺伝子頻度をもとに個体間、および個体群間の遺伝的距離を系統解析ソフトを用いて求め、さらに遺伝的類縁関係を NJ 法による類似樹（フェノグラム）で調べた結果、北海道の北部、東部、西部の 3 地域で遺伝的分化が生じていることが示された。

### (4) 考察

アロザイム分析により、PGM アロザイムのザイモグラムにセイヨウオオマルハナバチとエゾオオマルハナバチの明瞭な種間差があることが判明した。すなわち、セイヨウオオマルハナバチは A 遺伝子の特異的にもち、エゾオオマルハナバチでは圧倒的に B 遺伝子の頻度が高かった。従って、種間交雑が起きれば、雑種は AB ヘテロの遺伝子型を示すと考えられる。北海道のエゾオオマルハナバチ野外サンプルの調査から、1997 年に 1 個体、1998 年に 3 個体の AB ヘテロ接合体が見つかったが、これらが果たして雑種か、エゾオオマルハナバチの種内変異なのかは現在、別の形質によって精査を試みている。少なくとも現時点では、エゾオオマルハナバチの個体群には A 遺伝子は極低頻度でしか存在せず、今後、野外で雑種化が進行するとすれば、A 遺伝子の頻度が高くなると考えられる。PGM は雑種のモニタリングに有効なマーカーであり、さらに長期的に野外サンプルの監視を続けていく必要がある。

セイヨウオオマルハナバチおよびエゾオオマルハナバチとも、マイクロサテライト遺伝子座に

おける変異量は大きく、種内変異を捉える有効なマーカーと考えられた。エゾオオマルハナバチ野外個体群の遺伝的構造を、その遺伝子頻度から調べた結果、遺伝子流動のあり方に地域性が存在することが示唆された。このことは、エゾオオマルハナバチの地理的変異を示唆するものであり、今後、その他の在来種も含めて、様々な形質について、地理的な変異を調べる必要がある。また、これらのデータをもとに在来種の商品化に関わる採集や放飼については慎重に議論を進める必要がある。

#### (5) 引用文献

- 1) 鷲谷いづみ、保全生態学からみたセイヨウオオマルハナバチの侵入問題。日本生態学会誌 48:73-78 (1998)
- 2) Mitsuhashi, M. & M. Ono, Hybridization between Japanese and European bumblebees (*Bombus* spp.). Summaries of the 7th International Pollination Symposium. Lethbridge, Canada. (1996)
- 3) Goka, K. & A. Takafuji, Enzyme variations among Japanese populations of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. Applied Entomology and Zoology 27:141-150. (1992)
- 4) Goka, K. & A. Takafuji, Genetic basis of esterase, malate dehydrogenase and phosphoglucosomerase allozymes in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. Applied Entomology and Zoology 30:529-535. (1995)
- 5) Estoup, A., M. Solignac, J. M. Cornuet, J. Goudet and A. Scholl, Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. Molecular Ecology 5:19-31. (1996)

#### 5. 種間競争や共生が絶滅に及ぼす影響の数理的解析

数理モデルを作成し、解析的分析、コンピュータによる数値計算をおこなった。

(1) 熱帯雨林では雌雄異株イチジクはパッチ状に分布していて、それに依存しているイチジクコバチは個体群ごとに隔離している。イチジクコバチが繁殖するためには、イチジクの陰花果から羽化したイチジクコバチが他のイチジクの木陰花果に入らなければならない。したがって、イチジクがパッチ全体として示すフェノロジーがイチジクコバチの存続を決める一つの重要な要因となっている。雌雄異株のイチジクのフェノロジーの違いがイチジクコバチ個体群の存続にどのような影響を及ぼすのかを、コンピューターシミュレーションによって明らかにできた。さらに、雌雄同株のイチジクが、林冠部から林床部という異なる生活環境に進出する過程で、イチジクコバチの飛翔能力が制限となってイチジクコバチ個体群を維持するイチジクの個体数が減少し、それが翻ってイチジクの花期の周期の短縮を招き、資源をより有効に利用できる雌雄異株の進化が起りやすくなるという、雌雄異株のイチジクの進化の新仮説を提示することができた。

(2) 日本のマダラテントウ類は、日本の数カ所で近縁種が交雑帯を作っている。隔離された食草の上での交雑帯では、精子競争によって多数種が少数種を駆逐することが予想される。種内種

間の精子置換率をパラメーターとして含む数理モデルを作り、そのモデルを解析することによって少数種の絶滅までの時間を予測することが出来た。

(3) 飽和型捕食の数理モデルは、富栄養化によって餌種的环境容量が増すと、その個体数の周期的変動の振幅が増幅し、システムが崩壊（捕食者または餌種が絶滅）する危険が増すという結果（富栄養化のパラドックス）を導く。しかし、これまで行われた野外研究や実験研究においては、そのような例はまれであり、システムが安定に保たれることが多かった。本研究では、捕食者がその主要な餌が欠乏したときに、他に代替餌種を食う行動を示し、その代替餌種の栄養価が主要な餌に比べて少し低ければ、富栄養化が起こっても、システムは安定に持続することを示すことができた。

#### (4) 考察

以上の結果は、相利共生関係、競争関係、捕食関係などの種間関係が、各生物種の絶滅過程に大きく関与していることを明らかにした。一般に、ある種の絶滅が危惧される場合、物理環境、直接の人為的影響の変化の他に、他の種との関係の検討が不可欠であることを示唆することができた。

### 6. 熱帯・亜熱帯における環境攪乱とアリの社会構造

#### (1) 方法

南西諸島（沖縄本島、西表島、久米島）およびインドネシアのジャワ島（ボゴール、ゲデ山、ハリムン山）において、アリ類の生活史や社会構造を比較した。環境を、自然林、2次林、裸地・草地の3つに分け、それぞれの環境で30分間連続で地表下に存在するアリの巣を探すタイムユニット観察を繰り返した。これと並行し、各種アリのコロニーごと採集し標本の社会構造（女王数、コロニー当たり巣数、コロニーの大きさ）を調べた。一部のアリは室内に持ち帰り行動観察や分子系統樹の作成のために用いた。

#### (2) 結果および考察

アリは陸上のあらゆる環境に適応した、我々の身近に最も普通に見られる陸上動物のひとつである。それらが示す大きな多様性は、我々が環境の自然度を知る上で貴重な情報を提供していると思われる。しかしアリ類に注目した保全生態学的研究はあまりない。我々は、温帯から亜熱帯の湿潤な環境においては、アリ類の種構成だけでなくそれらが示す社会構造が、環境攪乱の程度の指標になるのではないかと考え、コロニー当たりの女王数や巣数といった社会構造と森林伐採などの人的攪乱の程度の相関関係を明らかにするとともに、それらの相関を説明する社会構造と環境パラメーターの進化生態学的な因果関係の解明を目指して研究を行った。Tsuji & Tsuji<sup>1)</sup> は生活史戦略モデルの観点から、環境攪乱とコロニー当たりの女王数には正の相関関係があるのではないかと予測した。材料と方法に記した調査の結果、沖縄においてもジャワ島においても、自然林では、単巢性（コロニーあたり巣がひとつ）単女王制（コロニーあたり女王が1個体）のアリ種が多く見付き、裸地や2次林などの人為的な攪乱に近い過去に伴った環境では、多巢性（コロニーあたり巣が複数）多女王制（コロニーあたり女王が複数）の種が多いことが示唆され、

モデルの予測は支持された。また、自然林にすむ単巢・単女王性種には、狭域分布する在来のアリ類あるいは固有種・稀少種が多く見つかる一方で、攪乱環境で見つかる多巢・多女王性種は、トランプ種と呼ばれる広域分布あるいは非在来のアリ種がその大勢を占めることが明らかになった。これらの情報は、多巢・多女王性種あるいはトランプ種の多さが、環境の保全度の指標になる可能性を示し、アリ類の分類作業が不十分な熱帯地域における保護区の選定の際にも有効な情報源に成りうることを示す。また、林床に棲息し狭域分布するアリ種には、自然の倒木によってできた湿った朽ち木などの中に小さなコロニーを持つものが多い。女王による独立創設を行うアリ（これらが単女王制で単巢性を示すことが多い）においては一般に、コロニー創設から次世代繁殖虫を生産するまでコロニーが成熟するのに5年程度かかることが知られている。また、初期コロニーは移動性が乏しいため、朽ち木など巣場所そのものがなくなっても、近くの森林伐採による乾燥等によっても致命的な影響を受ける。従って、これらのアリ種に安定な巣環境を提供するには、比較的広範囲の森林の保全が不可欠と思われた。

攪乱環境に棲む特にトランプ種と呼ばれるものには、コロニーが大型化する傾向が示された。これは、大きなコロニーサイズが環境攪乱に対する緩衝の効果を持つという、Kaspari & Vargo<sup>2)</sup>の議論を支持するものである。以上に示したパターンが、Tsuji & Tsuji が考えたようにアリの適応戦略と関わるものなのか、あるいは系統特異的な性質を反映しているだけなのか、より厳密に判断するためには系統関係に関する情報が必要である。そこで、まず、オオズアリ属を用いて分子系統樹を用いた比較研究を行った。結果、サンプルサイズの不足と信頼度の高い分子系統樹を得ることができなかったことから、環境パラメータとコロニー当たり女王数の間の関係が、適応的な現象であるとの結論を得るまでには至らなかった。今後は、他の系統群も加えてサンプルを増やすと同時に、野外における実験的な研究も必要であろう。

また、熱帯産のアミメアリ属にスポットを当て、行動やコロニー構成を調べ、攪乱環境に棲み広域分布する日本産の *Pristomyrmex pungens* と比較し、アリが攪乱環境へ適応する進化の過程を推論を試みた。本属の種は、分布の中心地である東南アジアではほとんどが林床に棲息することから、*Pristomyrmex* 属の祖先的な生活形態は林床性であることを示している。実際、インドネシア（および一部マレーシア）で採集された、2種（*P. sp.*, *P. brevispinosus*；後者は日本の沖縄県にも分布しているが、恐らく別種）は、ともにワーカー数数十から数百の小型コロニーを示し、社会構造は単女王制・単巢性であることが判明した。これは、コロニーサイズ数万からなる大きなコロニーを形成し、単為生殖するワーカーによる著しい多女王制を示す日本産の *Pristomyrmex pungens* とは対照的である。また、熱帯アジア産の種はどれも比較的保全度の高い森林の林にしか見つからないのに対して、*Pristomyrmex pungens* は攪乱環境に好んで生息している。これらは、先に述べたアリ類全体の生活史の対比（単女王・単巢・小コロニー・林床性 vs 多女王・多巢・大コロニー・攪乱環境に適応）の典型を示すものである。一方、とくにワーカーの行動面では、若い個体が巣で働き老齢個体が採餌をするという齢分業やワーカーの産卵能力（ただし雄しか生産できない）の保持など、共通したものが見られた。しかし、雌生産性単為生殖や多女王制などは攪乱環境に棲む日本産種だけが持つ特徴であることが判明した。これは多女王制や雌生産性単為生殖能力は、日本産のアミメアリの祖先が攪乱環境に進出した際に獲得したもので、元々の生息地である林床に棲む同属の多くの種が前適応として広く持つ潜在能力ではないことが明かとなった。

### (3) 引用文献

- 1) Tsuji, K. & N. Tsuji, Evolution of life history strategies in ants: variation in queen number and mode of colony founding. *Oikos* 76: 83-92. (1996)
- 2) Kaspari, M. & E. L. Vargo, Colony size as a buffer against seasonality: Bergmann's rule in social insects. *The American Naturalist* 145, 610-632. (1995)

#### [研究成果の発表状況]

##### (1) 口頭発表

- 古水孝尚・五箇公一・鷺谷いづみ：第 45 回日本生態学会（1998）「セイヨウオオマルハナバチの侵入にともなう在来種の遺伝子汚染モニタリングに関する研究-1：アロザイムマーカ-の確立」
- 五箇公一：第 53 回日本生物地理学会大会（1998）「侵入生物の在来生物相への影響-セイヨウオオマルハナバチのケース-」
- 五箇公一・岡部貴美子・丹羽里美・米田昌浩：第 46 回日本生態学会大会（1999）「マルハナバチの商品化に絡む生物学的問題-寄生性ダニに関する調査報告」
- 五箇公一：第 43 回日本応用動物昆虫学会大会（1999）「マルハナバチの商品化に絡む生物学的問題-遺伝的攪乱について」
- 五箇公一・古水孝尚・鷺谷いづみ：第 42 回日本応用動物昆虫学会大会（1998）「セイヨウオオマルハナバチの野生化による在来種の遺伝子汚染モニタリングに関する研究」
- 加藤 真：第 45 回日本生態学会大会（1998）「島嶼における送粉共生系」
- 加藤 真：日本植物分類・地理研究会大会（1999）「島嶼における送粉共生系」
- Jun Nishihiro and Izumi Washitani: International symposium: Differentiation patterns of plant populations and adaptive mechanisms. Kyoto. 1996. "Spatial variations in pollen deposition and seed set in a heterostylous plant, *Persicaria japonica* (Polygonaceae)"
- 西廣淳:種生物学会（1998）「異型花柱性植物における柱頭の高さに対する自然選択の解析」
- 西廣淳, 藤平浩, 鷺谷いづみ: 第 46 回日本生態学会大会（1999）「異型花柱性植物シロバナサクラタデの訪花昆虫の体表面付着花粉」
- 辻 和希, 木野村恭一, 辻 宣行, 山内克典: 第 44 回日本生態学会大会（1997）「攪乱環境と生活史戦略および社会進化-南西諸島におけるアリ類の比較」
- 鷺谷いづみ: 第 45 回日本生態学会大会（1998）「保全生態学的復元とは」
- 鷺谷いづみ: 第 45 回日本生態学会大会（1998）「二次的自然である里山をどう評価するか」
- 鷺谷いづみ: 第 46 回日本生態学会大会（1999）「実りの秋よ永久に-保全生態学のめざすもの」
- 鷺谷いづみ: 第 46 回日本生態学会大会（1999）「遺伝的変異と種子の質」

##### (2) 論文発表

- OTsui, K. & N. Tsuji: *Oikos* 76: 83-92. (1996) "Evolution of life history strategies in

- ants: variation in queen number and mode of colony founding”
- Tsuji, K. & K. Yamauchi: *The American Naturalist* 148: 588–596. (1996) “Intra-colonial sex ratio variation with and without local mate competition in an ant”
- Tsuji, K., K. Nakata, & J. Heinze: *Naturwissenschaften* 83: 577–578. (1996) “Lifespan and reproduction in a queenless ant”
- 辻 和希・伊藤文紀・大河原恭祐: *蟻* 21: 5–7 (1997) 「インドネシアおよびマレーシア産のアミメアリ属3種の採餌行動とコロニー構成に関する予備的報告」
- Tsuji, K. & N. Tsuji: *Evolutionary Ecology* 12, 141–152. (1998) “Indices of reproductive skew depend on mean reproductive success”
- 五箇公一: *日本生物地理学会* 53:91–101. (1998) 「侵入生物の在来生物相への影響—セイヨウオオマルハナバチはエゾオオマルハナバチの遺伝子組成を汚染するか?—」
- 加藤 真 島嶼における送粉共生系。 *フェノロジー研究* 31: 1–7. (1998)
- Kato, M.: *Annals of the Entomological Society of America* 91: 71–80. (1998) “Unique leafmining habit in the bark beetle clade: a new tribe, genus, and species of Platypodidae (Coleoptera) found in the Bonin Islands”
- Kato, M., A. Shi, T. Yasui & H. Nagamasu: *Researches on Population Ecology*. (in press) “Impact of introduced honeybees, *Apis mellifera*, upon native bee communities in the Bonin (Ogasawara) Islands”
- Washitani I.: *Conservation Biology*, 10: 59–64. (1996) “Predicted genetic consequences of strong fertility selection due to pollinator loss in an isolated population of *Primula sieboldii*”
- Washitani I, Y. Okayama, K. Sato, H. Takahashi & T. Ogushi: *Researches on Population Ecology* 38: 249–256 (1996) “Spatial variation in female fertility related to interactions with flower consumers and pathogens in a forest metapopulation of *Primula sieboldii*”
- Nishihiro J. & I. Washitani: *American Journal of Botany* 85: 352–359 (1998) “Patterns and consequences of self-pollen deposition on stigmas in heterostylous *Persicaria japonica* (Polygonaceae)”
- Nishihiro J. & I. Washitani: *Journal of Plant Research* 111: 547–555 (1998) “Effect of population spatial structure on pollination and seed set of a clonal distylous plant *Persicaria japonica* (Polygonaceae)”
- 西廣淳・友部恭子・鷲谷いづみ: *保全生態学研究* 3:97–110 (1998) 「シロバナサクラタデの種子生産に対するヨシ原の分断化の影響」
- Yamamura, N.: *Diversity and evolution of symbiotic interaction*, (eds. Abe, T., Levin, S.A., and Higashi, M.) 75–82, Springer, New York (1997) “Biodiversity: An Ecological perspective”
- Wakano, J. Y., Nakata, K. and Yamamura, N.: *Journal of theoretical Biology* 193:153–165 (1998) “Dynamic model of optimal age polyethism in social insects under stable and fluctuating environments”