

## 【学位論文審査の要旨】

### 1 研究の目的

隠蔽種とは、形態上区別がつかないために 1 種として分類されているが、実際には複数の種を含んだ種群のことである (Bickford *et al.* 2007)。従来の分類学では伝統的に形態情報によって種を定義してきたため、隠蔽種の存在はほとんど認識されてこなかったが、近年では DNA 塩基配列情報に基づく分子系統解析が簡便に行えるようになり、隠蔽種と考えられる遺伝的集団が実際には非常に多く存在することが分かっている。しかし、確認された複数の遺伝的集団が生物学的種 (Mayr 1942)なのか、あるいは単なる遺伝的な多型なのかについて結論づけるためには、それらの集団の間に生殖的隔離が存在しているか否かを確認する必要がある。特に動物においてはモデル生物などの限られた分類群でしか交尾実験を行うことができないために、生殖的隔離の存在の確認は容易ではない (Dincă *et al.* 2013)。

ナミヒメクモバチ *Auplopus carbonarius* (Scopoli, 1763) は昆虫綱膜翅目クモバチ科に属し、旧北区温帯域 (ヨーロッパ~極東アジア) に広く分布する。メスは泥を使って壺状の育房をつくり、中に麻酔したクモを運び込んで幼虫の餌とする。今までにオスの頭部の色彩やメスの営巣生態にいくつかの型が知られ、複数の隠蔽種の存在が示唆されていた (Priesner 1960; 岩田 1975; Tsuneki 1990; 羽田 1994)。本種は竹筒トラップを用いることにより、大量の未交尾成虫を確保でき、これを用いて交尾実験による生殖的隔離の検証が可能である。

本研究の目的は、本種群に何種の隠蔽種が存在し、またそれらが遺伝的、形態的および生態的にどのように多様化しているのかを解明することである。まず分子系統解析によって、本種に含まれる遺伝的集団の存在を明らかにした。次に交尾実験によって、それらの集団間の生殖的隔離 (交配前隔離) の有無を検証し、隠蔽種の存在を証明した。また、形態形質の解析によって、各遺伝的集団を比較し、形態による分類を試みた。さらに、各集団の分布、営巣形態および獲物について調べ、各集団の生態的分化を明らかにした。

### 2 研究の方法と結果

日本 (北海道~沖縄)、韓国、ロシア、スウェーデン、フランスおよびイギリスの計 121 サンプルを用い、核 28S、ミトコンドリア COI、ミトコンドリア D-loop の 3 領域の塩基配列情報に基づいた分子系統解析の結果、本種は 13 の遺伝的集団を含むことが明らかとなった (第 2 章)。

分子系統解析によって明らかとなった遺伝的集団のうち、生きた未交尾個体が得られた 8 集団の計 831 個体を用いて 1,542 回の交尾実験を行ったところ、日本および韓国に分布する 4 集団は自身の集団以外とは交尾せず、他集団との間に明確な交配前隔離を持つ隠蔽種だと考えられた。この隔離は、オスが自集団のメスに対して他集団のメスと比べて有意に高い割合で求愛することと、メスが自集団以外のオスからの交尾を受け入れないという 2

段階で行われていると推察された（第3章）。

確認された4種の隠蔽種について頭部および前翅の23形質を計測し、判別分析を行った。その結果、算出された判別式を用いて各集団を高い精度で識別することができた（第4章）。

生態情報が多く得られた日本産の3種の隠蔽種について、分布、羽化時期、営巣方法および獲物（クモ）の種構成の比較を行った。営巣方法については、2種は竹筒のような既存孔にのみ営巣したが、残りの1種は既存孔に営巣せず、葉の裏や崖下の根などに育房を附着させ、さらに泥で上塗りするという全く異なる営巣習性をもつことが分かった。一方でそれ以外の調査項目については3種の間に明確な違いは認められなかった（第5章）。

以上の結果から、ナミヒメクモバチは多数の遺伝的集団から成り、そのうち少なくとも4種は生殖的に隔離され、形態的にも分化した隠蔽種であることが強く示唆された。また、営巣習性においては明確な分化が生じていたが、他の生態的特徴には明確な分化は確認できず、各種の生態情報に関してさらなる調査が必要だと考えられた。本研究はクモバチ科をはじめとする類似の分類群でも同様の多様化が起きていることを示唆し、それらの解明のモデルケースとなりうる（第6章：General discussion）。

### 3 審査の結果

今日、隠れた種多様性（＝隠蔽種を含む種多様性）の解明は、分類群を問わず生物多様性研究における中心的課題の一つとなっている。なぜなら、種の誤同定は、生物多様性の評価、希少生物種の保全、生物資源の開発・管理、有害種の防除などにおいて、しばしば大きな問題を引き起こすからである。隠蔽種の存在を証明するためのもっとも説得力のある手法は、野外での求愛・配偶行動の観察や飼育条件下での交配実験によって、集団間の交配前および交配後生殖隔離の有無を直接確認することである。しかし、動物では交配に際して特定の環境条件を要する場合が多いことから、それは容易ではない。

本研究では、旧北区の温帯域に広域に分布するナミヒメクモバチ *Auplopus carbonarius* を研究対象とした。ナミヒメクモバチには、頭部の色彩の多型や営巣習性の多型が知られており、単一種ではなく複数の隠蔽種からなる種群である可能性が指摘されていた。学位申請者は、竹筒トラップを用いることにより、ナミヒメクモバチの未交尾成虫を容易に採集できること、また小さな容器の中で交尾が観察できることに着目し、分子系統学的解析（第2章）、室内交尾実験（第3章）、形態学的解析（第4章）、野外から得られた生活史情報の解析（第5章）を組み合わせ、ナミヒメクモバチが数多くの遺伝的集団からなり、そのうちの4集団は互いに生殖的に隔離された隠蔽種であることを明らかにした。

本研究の中で特筆すべきは、分子系統解析によって認識された13の遺伝的集団（＝隠蔽種候補）のうちの8つの集団について、1542例もの交配実験を行ったことにある（第3章）。その結果として、4集団が生殖的に隔離された隠蔽種であることを示す強力な証拠を得た。また、更なる追加実験が必要ではあるが、非対称な生殖的隔離（すなわち、一方の集団を母親、もう一方を父親とした場合において、逆の場合よりも交配の成功率が明らかに低下

する状態)も観察され、本種群の中には種分化の途中段階にある遺伝的集団が存在することが示唆された。

DNA barcoding の普及に伴い、多様な生物群において「隠蔽種群」の報告が指数関数的に増加している。しかしながら、本研究のように分子系統解析と大規模な交配実験を組み合わせる生殖的隔離の存在を明らかにした研究事例は未だ少ない。また、本種群は野生動物であるのにも関わらず、未交尾成虫が入手しやすく、室内飼育も容易であり、さらに本研究によって本種群の中に種分化の途上にある集団が少なからず存在することが明らかになったことから、本種群は、Dincă らによって研究されているユーラシア産のヒメシロチョウ類 (*Leptidea* spp.) と並んで、種分化研究のモデル生物としても有望である。このように、本研究の結果は、多様性生物学の幅広い分野に対して貢献をしており、高く評価できる。

なお、本研究の成果の一部は、学位申請者が第一著者の論文1報として、国際的に認知されている学術誌に既に掲載されている。

Kurushima H, Yoshimura J, Kim JK, Kim JK, Nishimoto Y, Sayama K, Kato M, Watanabe K, Hasegawa E, Roff DA, Shimizu A. 2016. Co-occurrence of ecologically equivalent cryptic species of spider wasps. *Royal Society Open Science*, 3: 160119. (下線：学位申請者)

以上のことから、本研究は本学の博士(理学)の学位に十分値するものと判断した。

#### 4 最終試験の結果

本学の学位規定に従って、試験および試問を行った。公開の席上で論文発表を行い、生命科学専攻の教員による質疑応答をもって試験にあてた。また、論文審査委員が本論文および関連分野について試問を行った。その結果、専門科目および外国語についても十分な学力があることを認め、合格と判定した。