

# 日本産クワガタムシの分子系統学的研究

松岡 教 理<sup>\*1</sup>・細 谷 忠 嗣<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup> 弘前大学農学生命科学部分子進化学研究室

<sup>\*2</sup> 弘前大学理学部生物学科

(2002年9月10日受付)

## 序 論

甲虫類クワガタムシ科は種類数が極めて多く、種分化が著しく激しい分類群であり、現在、分類記載されている種だけでも、世界中に約1,000種以上生息している。その約3分の2は熱帯の東南アジア地域に分布しており、日本には約30～40種が生息している。しかし、最近の日本のペットブームのあおりで、クワガタムシも海外から盛んに輸入され、それらが野外に進出し、日本の在来種集団に混じり交雑種が生じていることが、DNA判定などから判明している。そのような日本の生物相の危険な状況において、日本産クワガタムシの系統進化学的研究は、極めて重要であり緊急性を要する。クワガタムシの系統分類は、従来は主に形態学・生態学・古生物学などの観点からなされてきたが、最近、多様な生物群で活発に行なわれている分子をマーカーとした分子系統学的研究は非常に報告例が少ない(MATSUOKA, *et al.*, 1998)。クワガタムシは、種類によって体長が約1cmから、大型種では、約10cmのものまであり、体色も黒色のものから青色のものまで実に多種多様である。また、分類の重要な形態指標であるオスの大顎の形態変異などが、形態レベルでの系統分類を困難にしているのも事実である。そのため、クワガタムシの系統進化に関しては、ほとんど解明されていないのが現状である。本研究では、日本産クワガタムシの普通種である7種の系統進化学的関係を、アイソザイム変異により分析したので、それらの結果について報告する。また、今回得られた分子的知見を従来の形態レベルなどの知見と比較検討し、クワガタムシ科の系統進化について考察する。

## 材料および方法

本研究で分析したクワガタムシ科3属7種の種名と、それらの分析個体数および採集場所を以下に記す。ヒタラクワガタ (*Dorcus platymelus*), 2個体・福岡県, オオクワガタ (*D. hopei*), 2個体・福岡県, コクワガタ (*D. rectus*),

7個体・青森県, スジクワガタ (*D. striatipennis*), 4個体・青森県, アカアシクワガタ (*D. rubrofemoratus*), 8個体・青森県, ノコギリクワガタ (*Prosopocoilus inclinatus*), 6個体・青森県, ミヤマクワガタ (*Lucanus maculifemoratus*), 6個体・青森県。これらの試料を採集後すぐに、-45℃の冷凍庫に凍結保存した。Fig. 1には *Dorcus* 属の1種であるヒタラクワガタ (*Dorcus platymelus*) を示した。

アロザイム分析には、凍結保存しておいたクワガタムシを室温下で解凍し、外骨格を除去した個体から筋肉組織を取り出し、その筋肉を用いた。組織重量の5倍量の20mMリン酸緩衝液(pH=7.0, 0.1M KCl, 1mM EDTA)を加えて、氷冷下で、ホモゲナイズし、それを、13,000rpmで5分間遠心分離にかけ、その遠心上澄み液を電気泳動にかけた。タンパク電気泳動法は、MATSUOKA(1985)の方法に従った。分析した酵素は以下に記した合計17酵素であった。すなわち、グリセロリン酸脱水素酵素(GPDH), ホルムアルデヒド脱水素酵素(FDH), グル



Fig. 1. *Dorcus platymelus* of the members of the genus *Dorcus* of the family Lucanidae from Japan.

<sup>\*1</sup> 別刷請求先(住所: 〒036 8561 青森県弘前市文京町3 弘前大学農学生命科学部分子進化学研究室・松岡教理)

Table 1. Allele frequencies at 34 genetic loci in the seven Japanese stag-beetles of the family Lucanidae

Locus	Dp	Dh	Dre	Ds	Dru	Pi	Lm
<i>Gpdh</i>	b	b	α (0.07) b (0.93)	α (0.50) b (0.50)	b	a	a
<i>Fdh 1</i>	a	α (0.50) α (0.50)	b (0.25) α (0.75)	a		d	α (0.67) b (0.08) α (0.25)
<i>Fdh 2</i>	b	c	α (0.50) b (0.50)	α (0.75) α (0.25)	b (0.50) α (0.50)	c	b
<i>G6pd</i>	a	a	a	a	a	α (0.83) b (0.17)	a
<i>Hbdh</i>	α (0.50) b (0.50)	a	b (0.50) α (0.50)	a	b	d	c
<i>Mdh 1</i>			a			a	α (0.33) b (0.67)
<i>Mdh 2</i>		a	a	a	a	a	a
<i>Mdh 3</i>	α (0.50) b (0.50)	α (0.75) b (0.25)	α (0.86) b (0.14)	a	α (0.75) b (0.25)	a	a
<i>Mdh 4</i>	α (0.50) b (0.50)	a					
<i>Me</i>	a	b	α (0.29) b (0.71)	a	α (0.44) b (0.56)	α (0.50) b (0.50)	b
<i>Odh 1</i>	a	b	b	α (0.37) b (0.63)			a
<i>Odh 2</i>	b	b	α (0.75) b (0.25)	α (0.25) b (0.50) α (0.25)	b	b	b
<i>Sdh</i>	b	b	a	α (0.88) b (0.12)	a	b	b
<i>Xdh</i>		a	b	α (0.50) b (0.50)	a	b	a
<i>Sod 1</i>	b (0.50) α (0.50)		b (0.75) α (0.25)	b	b	b (0.30) α (0.50) α (0.20)	α (0.08) b (0.50) α (0.42)
<i>Sod 2</i>	b	b	α (0.21) b (0.72) α (0.07)	α (0.25) b (0.63) α (0.12)	α (0.50) b (0.50)	b (0.58) α (0.42)	b
<i>Hk</i>	c	c	c	b (0.12) α (0.38) α (0.50)	b (0.80) α (0.20)	α (0.25) b (0.75)	b
<i>Pgm 1</i>		c	b	α (0.50) b (0.50)	c		
<i>Pgm 2</i>	b	b	α (0.17)	b b (0.83)	b	b	c
<i>Aat 1</i>	d	b	c	b (0.25) α (0.75)	α (0.88) b (0.12)	c	α (0.50) α (0.50)

コース6リン酸脱水素酵素 (G6PD), ヒドロキシブチレート脱水素酵素 (HBDH), リンゴ酸脱水素酵素 (MDH), リンゴ酸酵素 (ME), オクタノール脱水素酵素 (ODH), ソルビトール脱水素酵素 (SDH), キサンチン脱水素酵素 (XDH), スーパーオキシドデイスムターゼ (SOD), ヘキソキナーゼ (HK), ホスホグルコムターゼ (PGM), アスパラギン酸転移酵素 (AAT), 酸性ホスファターゼ (ACPH), アルカリ性ホスファターゼ (ALK), エステラーゼ (EST), ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP)。酵素活性バンドの検出法は, MATSUOKA and HATANAKA (1991) の方法に従った。

### 結果および考察

#### クワガタムシ集団の遺伝的変異

集団内の遺伝的変異と系統進化をアロザイム分析により研究する場合に, どの程度の個体数を用い, また, どれくらいの数の遺伝子座を分析すべきか? という集団

遺伝学的な問題は, これまで多くの研究者等により, 報告されてきた。NEI and ROYCHOUDHURY (1974), NEI (1978) は, この問題を様々な方法を駆使して解明した。その結果, 集団内の遺伝的変異の推定や系統解析には, なるべく多くの遺伝子座を調査することが最も重要であり, 分析する個体数は, ほとんど, 各パラメータの推定には影響しないことが判明した。極端な場合, 分析した遺伝子座数が多ければ, 個体数は1あるいは2個体でも十分信頼性の高い数値を求めることが可能である。つまり, 遺伝子抽出の誤差は, その多くがゲノムから遺伝子座を抽出する際に生じており, 調査個体数による誤差はそれに比較すると極めて小さいということが分かっている。

アロザイム分析において最低限分析すべき酵素遺伝子座の数については, WARD (1977), NEI and GRAUR (1984), NEI (1987) 等が研究を行なった。その結果, 分析すべき遺伝子座は約15遺伝子座が標準的であり, 理想的には,

Table 1. ( Continued )

Locus	Dp	Dh	Dre	Ds	Dru	Pi	Lm
<i>Aat 2</i>	b	α (0.25 ) b (0.75 )	α (0.33 ) b (0.67 )	α (0.50 ) b (0.50 )	b (0.86 ) α (0.14 )	b (0.75 ) α (0.25 )	b
<i>Acph 1</i>		b	b	b	b	b	α (0.50 ) b (0.50 )
<i>Acph 2</i>	α (0.50 ) α (0.50 )	b (0.50 ) α (0.50 )	α (0.70 ) α (0.30 )	b (0.25 ) α (0.50 ) α (0.25 )	a	a	α (0.10 ) b (0.60 ) α (0.20 ) α (0.10 )
<i>Alk</i>	α (0.50 ) b (0.50 )	α (0.25 ) b (0.75 )	b (0.67 ) α (0.17 )	α (0.38 ) b (0.50 ) α (0.12 )	b	b (0.58 ) α (0.42 )	b
<i>Est 1</i>	a	α (0.25 ) b (0.75 )	α (0.43 ) b (0.57 )	α (0.25 ) b (0.75 )	b	b	α (0.80 ) b (0.20 )
<i>Est 2</i>	a	α (0.50 ) b (0.50 )	α (0.10 ) b (0.60 ) α (0.30 )	b	α (0.21 ) b (0.29 ) α (0.50 )	α (0.16 ) b (0.42 ) α (0.42 )	c
<i>Est 3</i>	b	b	α (0.37 ) b (0.63 )	α (0.67 ) b (0.33 )	α (0.64 ) b (0.36 )	α (0.25 ) b (0.75 )	α (0.67 ) b (0.33 )
<i>Est 4</i>		a	a	a	a	a	
<i>Est 5</i>		b	α (0.14 ) b (0.72 ) α (0.14 )	b	b (0.40 ) α (0.60 )	α (0.83 ) α (0.17 )	b (0.50 ) α (0.50 )
<i>Lap 1</i>		a	α (0.67 ) b (0.33 )	a	a	b	α (0.67 ) b (0.33 )
<i>Lap 2</i>	a	α (0.50 ) b (0.50 )	α (0.42 ) b (0.58 )	a	a	a	α (0.92 ) b (0.08 )
<i>Lap 3</i>	a	b (0.75 ) α (0.25 )	α (0.30 ) b (0.70 )	α (0.50 ) b (0.50 )	α (0.06 ) b (0.59 ) α (0.38 )	b (0.92 ) α (0.08 )	b
<i>Lap 4</i>	b	b (0.75 ) α (0.25 )	α (0.30 ) b (0.20 ) α (0.50 )	a	b (0.50 ) α (0.50 )	c	b (0.90 ) α (0.10 )
<i>Lap 5</i>		α (0.50 ) α (0.50 )	α (0.37 ) b (0.25 ) α (0.38 )	α (0.50 ) α (0.50 )	c	b	

Alleles are correspondingly lettered from "a", this being the allele of the lowest electrophoretic mobility. The value in parenthesis represents the frequency of each allele in population. Dp = *Dorcus platymelus*, Dh = *D. hopei*, Dre = *D. rectus*, Ds = *D. striatipennis*, Dru = *D. rubrofemoratus*, Pi = *Prosopocoilus inclinatus*, Lm = *Lucanus maculidemoratus*.

20 前後の遺伝子座を分析すれば十分に信頼性の高い結果が得られることを報告している。本研究では、その数をはるかに越える 34 酵素遺伝子座を分析しているので、十分にその条件を充たしている。

本研究においては、17 酵素タンパク質をアロザイム分析した。その結果、検出された酵素遺伝子座数は 34 であり、極めて多くの遺伝子座を集団遺伝学的に分析調査したことになる (Table 1)。さて、クワガタムシ集団の遺伝的変異であるが、分析した 34 酵素遺伝子座の内、94 % に相当する 32 酵素遺伝子座でタンパク多型現象 (Polymorphism) が観察された。すなわち、MDH 2 と EST 4 のみが、単型的遺伝子座 (Monomorphic loci) で、残りの 32 遺伝子座は、全て多型を示した。このような現象は、当研究室でこれまで報告してきた、棘皮動物 (ウニ類・ヒトデ類) や魚類などの海洋生物では、観察されなかった特異な現象であり、昆虫の集団に、いかに多くの遺伝的変異が保有されているかという、集団遺伝学に見て極めて興味深い結果が得られた。これは、形態レベルで、昆虫が他の動物に比べて極めて多様性に富み、形態レベルでの進化速度が速いことと何らかの関係がある

かも知れない。Table 2 は、今回、調査したクワガタムシ科 7 種の集団内の遺伝的変異をまとめたものである。1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数は、ヒラタクワガタの 1.24 からコクワガタの 1.85 の範囲で、平均値は 1.15 であった。多型的遺伝子座の割合 (Proportion of polymorphic loci : P) は、ヒラタクワガタの 24.0 % からコクワガタの 66.7 % の範囲であり、平均値は 42.4 % と極めて高い数値を示した。また、集団内の遺伝的変異の推定において最も信頼性が高く、よく使用される指標である平均ヘテロ接合体率 (Expected average heterozygosity : H) は、ヒラタクワガタの 12.0 % からコクワガタの 28.9 % の範囲であり、平均値は 18.7 % と高い値を示した。再度、言及するが、このように昆虫の自然集団に多量の遺伝的変異が保有されている機構は、集団遺伝学に見て極めて興味深い現象であり、今後に残された重要な研究課題である。Table 3 には、今回分析した 17 酵素をグルコース代謝に関与する酵素群 (Group 1) と、グルコース代謝に関与しない酵素群 (Group 2) に分類して、グループごとに平均ヘテロ接合体率 (H) を算出したものである。その結果、ヒラタクワガタを除いてグルコース代謝に関与する酵素群 (Group 1) の酵素群が、明らかに、グルコース代

Table 2. Genetic variation in the seven species of the family Lucanidae

Parameter	<i>Dp</i>	<i>Dh</i>	<i>Dre</i>	<i>Ds</i>	<i>Dru</i>	<i>Pi</i>	<i>Lm</i>
No. of alleles per locus	1.24	1.34	1.85	1.69	1.48	1.42	1.53
Proportion of polymorphic loci : <i>P</i> (%)	24.0	34.4	66.7	53.1	41.4	35.5	40.0
Expected average heterozygosity per locus : <i>H</i> (%)	12.0	14.8	28.9	25.6	18.1	14.7	17.0

*Dp* = *Dorcus platymelus*, *Dh* = *D. hopei*, *Dre* = *D. rectus*, *Ds* = *D. striatipennis*, *Dru* = *D. rubrofemoratus*, *Pi* = *Prosopocoilus inclinatus*, *Lm* = *lucanus maculifemoratus*.

Table 3. Expected average heterozygosity for glucose metabolizing enzymes (Group 1) and non-glucose metabolizing enzymes (Group 2) in the populations of seven Japanese stag-beetles of the family Lucanidae

Species	Expected Average Heterozygosity per Locus : <i>H</i> (%)	
	Group 1	Group 2
<i>Dorcus platymelus</i>	12.5	11.8
<i>Dorcus hopei</i>	3.8	19.9
<i>Dorcus rectus</i>	10.7	36.7
<i>Dorcus striatipennis</i>	20.0	27.8
<i>Dorcus rubrofemoratus</i>	13.2	20.3
<i>Prosopocoilus inclinatus</i>	12.9	14.4
<i>Lucanus maculifemoratus</i>	4.9	22.2
Weighted Mean	11.0	22.5

Table 4. Genetic identities (above diagonal) and genetic distances (below diagonal) among the seven Japanese stag-beetles of the family Lucanidae

Species	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>Dorcus platymelus</i>		0.464	0.363	0.418	0.400	0.317	0.452
2. <i>D. hopei</i>	0.768		0.610	0.626	0.595	0.474	0.494
3. <i>D. rectus</i>	1.013	0.494		0.741	0.572	0.597	0.477
4. <i>D. striatipennis</i>	0.872	0.468	0.300		0.577	0.500	0.487
5. <i>D. rubrofemoratus</i>	0.916	0.519	0.559	0.550		0.516	0.556
6. <i>Prosopocoilus inclinatus</i>	1.149	0.747	0.516	0.693	0.662		0.521
7. <i>Lucanus maculifemoratus</i>	0.794	0.705	0.740	0.719	0.587	0.652	

Genetic identities (*I*) and genetic distances (*D*) were calculated by the method of Nei (1972).

謝に参与しない酵素群 (Group 2) の酵素群よりも遺伝的変異が少ないことが判明した。この結果は、国立遺伝学研究所の木村資生博士 (KIMURA, 1983) が提唱した、分子進化の中立説 (Neutral theory) とよく一致する。すなわち、機能的制約が大きい Group 1 の酵素群のほうが、当然、中立突然変異率が小さく、進化速度も遅いので変異は少なくなり、逆に機能的制約がほとんど無い Group 2 の酵素群は、中立突然変異率が大きいので、進化速度も速く、遺伝的変異も高いことが期待される。この結果は、木村資生博士が提唱した分子進化の中立説を強く支持するものである。

## 分子レベルから見たクワガタムシ科 7 種の系統進化学的關係

### 1. クワガタムシ科 7 種間の遺伝的距離

次に、クワガタムシ科 7 種の系統進化学的關係を知るため、各種間の遺伝的類似度 (*I*) と遺伝的距離 (*D*) を Nei (1972) の方法により算出した。その結果は Table 4 に示してある。Table 4 より明らかなように、遺伝的類似度 (*I*) は、 $I = 0.317 \sim 0.741$  の範囲にあり、コクワガタとスジクワガタの間で最も高い遺伝的類似度 ( $I = 0.741$ ) が得られた。これは、7 種の中で、コクワガタとスジクワガタが最も近縁な系統関係にあることを示している。一方、最も小さな遺伝的類似度 ( $I = 0.317$ ) は、ヒラタクワ

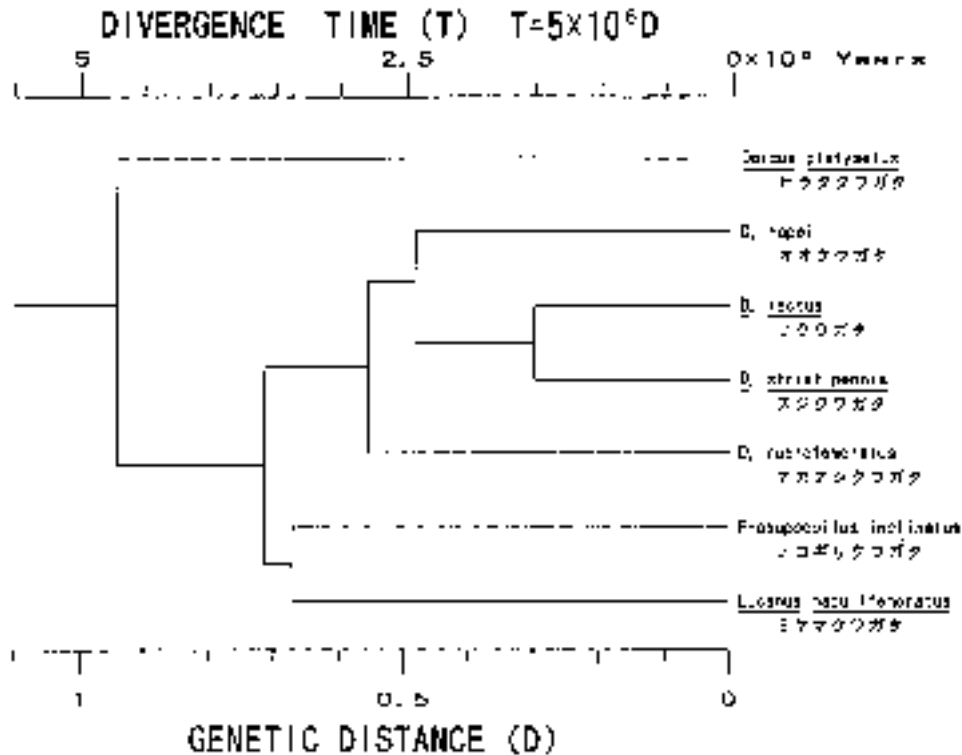


Fig. 2. Molecular phylogenetic tree for the seven species of the family Lucanidae from Japan. It was constructed from Nei's genetic distances by using the UPGMA clustering method. The divergence time estimated from Nei's equation using the genetic distance is also given in the phylogenetic tree.

ガタとノコギリクワガタで観察され、この2種が最も遠い関係にあることが判明した。今回得られた、 $D$ および $T$ を他の多くの昆虫群で報告されている $D$ 値 (THORPE, 1982) と比較すると、同属別種間、つまり *Dorcus* 属5種間の遺伝的距離 ( $D$ ) は、コクワガタとスジクワガタの間の  $D = 0.300$  から、ヒラタクワガタとコクワガタの間の  $D = 1.013$  の範囲にあり、これらの値は、他の昆虫群の同属別種間で観察される値と同等なものであった。また、同科別属間、つまり *Dorcus* 属、*Prosopocoilus* 属、*Lucanus* 属間の遺伝的距離は、コクワガタとノコギリクワガタの間の  $D = 0.516$  から、ヒラタクワガタとノコギリクワガタの間の  $D = 1.149$  の範囲にあり、これらの値も他の昆虫群の別属間の値と同等なものであった。従って、現在の比較形態学に立脚した分類ランクは、今回の分子レベルでの結果と矛盾せず、妥当な分類ランク付けであると考えられる。

## 2. クワガタムシ科7種の分子系統樹

次に、クワガタムシ科7種の系統進化学的關係を知るために、Table 4 の Nei (1972) の遺伝的距離 (Genetic distance:  $D$ ) の Matrix から、SNEATH and SOKAL (1973) の UPGMA 法を用いて、7種間の系統類縁関係を示す分子系統樹を作成した (Fig. 2)。また、この分子系統樹には、Nei (1975) が考案した Nei の式を用いて、遺伝的距

離から推定した種間の分岐年代 ( $T$ ) も示してある (単位は百万年)。この分子系統樹から明かなように、7種は大きく3つのグループに分類される。すなわち (1) ヒラタクワガタの系統、(2) ヒラタクワガタ以外の *Dorcus* 属のグループ、(3) ノコギリクワガタとミヤマクワガタのグループである。すなわち7種の系統類縁関係を見ると、最も近縁関係にあるのが、コクワガタとスジクワガタであり、このグループに近縁なのが、オオクワガタで、次にこれら3種に近縁関係にあるのが同属のアカアシクワガタである。一方、別属のノコギリクワガタとミヤマクワガタは、やはり遠い関係にある。そして、7種の中で最も遠い関係、すなわち、これら7種の祖先型・原始型 (Ancestral or Primitive type) が、ヒラタクワガタである (Fig. 1)。上記のように、Nei (1975) によると、遺伝的距離 ( $D$ ) から Nei の式を用いて、種間の分岐年代を推定することが可能である。それによると、約500万年前に、ヒラタクワガタタイプの共通祖先から、*Dorcus* 属のグループ、*Prosopocoilus* 属のノコギリクワガタ、*Lucanus* 属のミヤマクワガタが分岐した。次に、約400万年前にノコギリクワガタとミヤマクワガタの系統が分岐した。その後、約300万年前に、現在、クワガタムシ科の中で最も繁栄している、*Dorcus* 属のグループが出現した。*Dorcus* 属の中では、アカアシクワガタ・オオクワガタ (コクワガタ・スジクワガタ) の順序で種分化した

ものと推察される。

### 3. 分子系統学と従来の形態分類学との比較

分子系統樹が示すクワガタムシ科7種の系統進化学的關係 (Fig. 2) を、従来の比較形態学や古生物学などの Non-molecular data と比較検討したい。分子系統樹が示唆する、コクワガタとスジクワガタの近縁性は、黒沢 (1985) の分類システムの見解とよく一致する。すなわち、黒沢は、*Dorcus* 属を4つの属に分類していたが、それでもコクワガタとスジクワガタを同属に含めていた。ここで、彼は2種を *Dorcus* 属ではなく、*Macrodercus* 属に分類した。また、オオクワガタとコクワガタの種間雑種が、現在までに頻繁に野外調査で確認されており (境野と川田, 1982; 杉田, 1984; 塚脇, 1987)、これら2種は交配可能な程、遺伝的類似性が高く近縁関係にあると考えられ、今回の分子系統学的研究とよく一致する。KIKUTA (1986) は、彼の独自の分類システムを提唱した。彼によると、オオクワガタ、コクワガタ、スジクワガタ、アカアシクワガタの4種を、同じ *Dorcus* 属に分類した。この分類体系は、今回の分子系統樹とよく一致している。しかしながら、ヒラタクワガタが、*Dorcus* 属の他のメンバーよりも、かなり系統的に離れているという今回の分子的结果とは一致しない。形態学的観点から、今回調査した7種を比較してみると、前胸腹板突起は、*Dorcus* 属では、高くなっていないが、別属のノコギリクワガタとミヤマクワガタでは、竜骨状に高まっている。さらに、雄の頭部にある頭楯という形質が、*Dorcus* 属では長さに対して幅の広い形態であるのに対し、ノコギリクワガタとミヤマクワガタでは細長い舌状をしている。これらの形態学的知見は今回の分子系統樹と極めてよく一致している。

ノコギリクワガタとミヤマクワガタが分類学上、別属 (genus *Prosopocoilus*, genus *Lucanus*) にされているが、その根拠は、雄個体の頭部の形態形質の違いにある。すなわち、ノコギリクワガタは複眼の前方および後方が強く突き出ているが、ミヤマクワガタは耳状突起が著しく発達している等の特徴がある。さらに、雄個体の頭楯がノコギリクワガタでは台形であり、ミヤマクワガタでは屋根型であるという差異があり、それらにより別属にされている。今回の結果においても、この2種の遺伝的距離は  $D = 0.652$  であり、これは他の昆虫群の同科別属間で見られる値の範囲内であり、これら2種を分類学的に別属として扱うことは妥当である。

次に、*Dorcus* 属内の系統関係について検討したい。分子系統樹 (Fig. 2) は、次の事を強く示している。すなわち、ヒラタクワガタ以外の *Dorcus* 属4種 (コクワガタ、スジクワガタ、オオクワガタ、アカアシクワガタ) で1つのグループを形成しているが、その中で、アカアシクワガタが他の3種よりも最も遠い系統関係にある。アカアシクワガタは形態学的に見ても他の *Dorcus* 属3種とは異

なり、前胸背板の側縁後方が鋭くえぐれている。また、生態学的に見ても、アカアシクワガタは、昼行性であり、主に山地のヤナギの樹木に餌を求めて集まる習性を持つ。このように、アカアシクワガタが、形態学的・生態学的観点からも他の *Dorcus* 属3種と異なる点は、今回の分子系統学的知見とよく一致している。今回の分子系統学的研究より、*Dorcus* 属の中で、コクワガタとスジクワガタがかなり近縁関係にあることが判明したが、この結果は、形態学的知見ともよく一致する。すなわち、一般にクワガタムシの雄の大顎の形態は同種のものでも体長の違いにより異なるが、*Dorcus* 属では、コクワガタとスジクワガタの大顎の形態が極めてよく類似している。また、今回の結果では、*Dorcus* 属の中で、ヒラタクワガタ (Fig. 1) が系統的に最も遠い関係にあることが分かったが、これも形態学的知見とよく一致する。すなわち、雄の大顎の形態に着目してみると、*Dorcus* 属の中で、ヒラタクワガタ以外の種では、主に中央付近よりも前方に内歯が存在するが、ヒラタクワガタでは、基部から1/3の部分に内歯があり、他の *Dorcus* 属とは異なっている。さらに、雄の頭楯も、ヒラタクワガタでは、中央で深く切れこみ2片状に分断されている。しかしながら、ヒラタクワガタが、同属の *Dorcus* の種から、離れているだけではなく、別属のノコギリクワガタやミヤマクワガタよりも先に分岐したという結果については、著者等は、ヒラタクワガタは、元来、*Dorcus* 属とは別系統の種であり、何らかの要因によって収斂進化を起こし、*Dorcus* 属と形態的に類似したのではないかと推察される。

### 4. 日本産クワガタムシの日本列島への侵入経路

今回分析した7種は、ほとんどの種が北海道から九州までの日本列島全土に広く分布している。クワガタムシは、もともと南方系の昆虫であり、日本に生息している種は、南方方面から日本に侵入し定着したものと考えられる。7種の日本列島への侵入経路と、その時期については、次のように推察される。

ヒラタクワガタ (Fig. 1) は、日本全土の他に琉球列島、台湾、中国、ベトナムと極めて広い分布範囲を示すことから、本種は中国大陆で種分化を遂げたと考えられる。侵入経路については2つのルートが推察できる。すなわち、1つは朝鮮半島経由で日本列島へ侵入した経路と、2つ目は台湾から琉球列島を北上して日本列島に侵入した経路である。

ヒラタクワガタ以外の *Dorcus* 属4種の推定分岐年代が今から約150万年前から300万年前であり、さらに、これらが朝鮮半島などに広く分布していることから、これらは日本列島に侵入する前に中国大陆で種分化し、その後の第4紀更新世になってから朝鮮半島経由で日本列島に飛来したものと推察される。このうち、オオクワガタ、スジクワガタ、アカアシクワガタの3種は、これら3種および近縁種が琉球列島に生息していないことから、第

4 紀更新世の最後の氷期であるウルム氷期までの日本列島と朝鮮半島が陸続きであった時期に、朝鮮半島から対馬列島を経由して日本に侵入したと考えられる。コクワガタは、琉球列島に近縁種（同胞種 sibling species）であるリュウキュウクワガタ (*Dorcus okinawanus*) が生息していること、また、これらの近縁種が台湾に生息していないこと等から、コクワガタは、日本列島と琉球列島が地続きであった更新世初期までに朝鮮半島から日本に侵入した。その後、分布域を拡大し、日本列島と琉球列島が分離した後に、コクワガタとリュウキュウクワガタの 2 同胞種が分化したと推察される。

#### 5. 従来の分類体系の再検討

今回の分子系統学的研究結果を、従来の形態学に立脚した分類体系と比較検討したい。KIKUTA (1986) は、オオクワガタ、コクワガタ、スジクワガタ、アカアシクワガタを同じ属の *Dorcus* 属に分類したことは、今回の分子レベルでの知見とよく一致する。また、ノコギリクワガタを *Dorcus* 属とは別属の *Prosopocoilus* 属に、ミヤマクワガタを *Lucanus* 属に分類している点もよく一致する。分子系統樹からも明かなように、ヒラタクワガタは他の *Dorcus* 属のメンバーとは系統がことなるのではないかという結果が得られた。これは、黒沢 (1985) が提唱した分類体系とよく一致する。すなわち、黒沢はヒラタクワガタを *Dorcus* 属に分類せず、別属の *Serrognathus* 属に分類した。ヒラタクワガタ (Fig. 1) の分類学的位置に関しては今後十分な再検討の余地がある。

#### 6. アロザイム分析と DNA 分析の比較

近年、アメリカ合衆国のカリフォルニア大学バークレー校の Dr. Allan WILSON が開発した、ミトコンドリア DNA (mtDNA) を分子指標にした分子系統学的研究が多くの研究者により行なわれているが、NEI (1987) によれば、アロザイム分析と mtDNA の解像力 (resolving power) には、それ程の違いはなく、理論的研究によれば、アロザイム分析で 1 遺伝子座 (1 loci) を分析すれば、mtDNA の 100 base pair を分析したのと同等の解像力 (resolving power) があると報告している。通常、アロザイム分析では、30 前後の遺伝子座を分析するので、アロザイム分析では、DNA に換算すれば 3,000 base pairs を解析したことになる。この値は、多くの研究者が用いている 1,000 base pairs 程度の mtDNA の分析より、より優れた分子的指標 (molecular marker) である。MURPHY *et al.* (1996) も述べているように、系統学では、なるべく多くの分子形質を用いる必要があり、アロザイム分析では、分析した個々の遺伝子座が 1 つの分子形質になる。従って、形質の数から言えば、アロザイム分析の方が、はるかに mtDNA の分析より形質の数が多く、また感度も同等であると言える。さらに、NEI (1987) は、現代人のルーツを探る、具体的に言えば、世界中の様々な人種間の遺伝的

関係をアロザイム分析を用いて解析したが、極めて納得のいく重要な知見を得ている。

### 謝 辞

本研究に使用したクワガタムシを快く採集して頂いた、元弘前高校教諭の阿部 東氏に深く感謝する。

### 要 約

日本産クワガタムシ科の普通種である 7 種（ヒラタクワガタ、オオクワガタ、コクワガタ、スジクワガタ、アカアシクワガタ、ノコギリクワガタ、ミヤマクワガタ）の系統進化的関係を、アイソザイム分析により調査し、7 種の系統類縁関係を示す分子系統樹を作成した。その結果、7 種は大きく 3 つのグループに分かれた。すなわち、(1) ヒラタクワガタ以外の *Dorcus* 属 4 種（コクワガタ、スジクワガタ、オオクワガタ、アカアシクワガタ）から構成されるグループ (2) 別属のノコギリクワガタとミヤマクワガタから成るグループ、(3) *Dorcus* 属のヒラタクワガタ 1 種のみからなるグループである。最も近縁関係にあるのは、*Dorcus* 属の 2 種であるコクワガタとスジクワガタである。次に、この 2 種に近縁な種は、オオクワガタである。このクラスターの中で最も遠い関係にあるのは、アカアシクワガタであった。次に、これら *Dorcus* 属 4 種に近縁な種は、現在、別属に分類されているノコギリクワガタとミヤマクワガタである。一方、*Dorcus* 属に分類されてきたヒラタクワガタは、今回調査した 7 種の中で、最も遠い系統関係にあった。これは、旧来の分類体系とよく一致し、ヒラタクワガタは *Dorcus* 属以外の属に分類されるべきであると考えられる。また、ヒラタクワガタは、これら 7 種の祖先型であり、最も原始的な種であり、約 500 万年前に分化したと推察される。クワガタムシ科の中で最も大きなグループである *Dorcus* 属は、比較的近年に（今から約 300 万年前）に分化したグループである。また、ノコギリクワガタとミヤマクワガタは、分子レベルからも、*Dorcus* 属の種とは系統が異なる種であると推察された。

### 参 考 文 献

- KIKUTA, T. (1986) *On the Higher Taxa of the Stag Beetle Family Lucanidae*. Pap. Ent. pres. Nakane, Tokyo, pp. 131-138.
- KIMURA, M. (1983) *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- KUROSAWA, Y. (1985) The family Lucanidae. In *Illustrated Book of Japanese Beetles*, Vol. 2, pp. 329-346. Hoikussyo, Osaka, Japan (in Japanese).
- MATSUOKA, N. (1985) Biochemical phylogeny of the sea-urchins of the family Toxopneustidae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 80B : 767-771.
- MATSUOKA, N. and HATANAKA, T. (1991) Molecular evidence

- for the existence of four sibling species within the sea-urchin, *Echinometra mathaei* in Japanese waters and their evolutionary relationships. *Zool. Sci.*, 8 : 121-133.
- MATSUOKA, N., HOSOYA, T., HAMAYA, T. and ABE, A. (1998) Phylogenetic relationships among four species of stag beetles (Coleoptera : Lucanidae) based on allozymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119B : 401-406.
- MURPHY, R. W., SITES, J. W., BUTH, D. G. and HAUFLE, C. H. (1996) Protein : Isozyme Electrophoresis. In *Molecular Systematics* (Edited by HILLS, D. M., MORITZ, C. and MABLE, B. K.), pp. 51-120, Sinaur Associates, Massachusetts, USA.
- NEI, M. (1972) Genetic distance between populations. *Am. Nat.*, 106 : 283-292.
- NEI, M. (1975) *Molecular Population Genetics and Evolution*. North-Holland, Amsterdam.
- NEI, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89 : 583-590.
- NEI, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- NEI, M. and GRAUR, D. (1984) Extent of protein polymorphism and the neutral mutation theory. *Evol. Biol.*, 17 : 73-118.
- NEI, M. and ROYCHOUDHURY, A. K. (1974) Sampling variance of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 76 : 379-390.
- 境野宏行・川田一之 (1982) クワガタムシ科における種間雑種の一例. 月刊むし, 133 : 7-9.
- SNEATH, P. H. A. and SOKAL, P. R. (1973) *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco, CA.
- 杉田守輝 (1984) クワガタムシ科の種間雑種の採集例. 月刊むし, 163 : 25.
- THORPE, J. P. (1982) The molecular clock hypothesis : Biochemical evolution, genetic differentiation, and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 13, 139-168.
- 塚脇智成 (1987) クワガタムシ科種間雑種の記録. 月刊むし, 200 : 38.
- WARD, R. D. (1977) Relationship between enzyme heterozygosity and quaternary structure. *Biochem. Genet.*, 15 : 123-135.

## Molecular Phylogeny of Japanese Stag Beetles

Norimasa MATSUOKA<sup>\*1</sup> and Tadatsugu HOSOYA<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup>Division of Molecular Evolution, Faculty of Agriculture & Life Science, Hirosaki University, Hirosaki, Aomori 036-8561, Japan

<sup>\*2</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Hirosaki University, Hirosaki, Aomori 036-8561, Japan

### SUMMARY

The phylogenetic relationships among seven Japanese stag-beetles (*Dorcus platymelus*, *D. hopei*, *D. rectus*, *D. striatipennis*, *D. rubrofemoratus*, *Prosopocoilus inclinatus* and *Lucanus maculifemoratus*) of the family Lucanidae were investigated by allozyme analysis of 17 different enzymes. From the allozyme variation in 34 genetic loci, the Nei's genetic distances between species were calculated and the molecular phylogenetic tree for the seven species was constructed. The phylogenetic tree indicated the followings : (1) The seven species of the family Lucanidae were divided into the three large clusters : (1) *Dorcus platymelus*, (2) other four *Dorcus* species, and (3) the two different genera of *Prosopocoilus inclinatus* and *Lucanus maculifemoratus*. Among the four *Dorcus* species of the second cluster, *D. rectus* and *D. striatipennis* are the most closely related to each other and diverged later. On the other hand, *D. rubrofemoratus* is most distant species. The two different genera of *Prosopocoilus inclinatus* and *Lucanus maculifemoratus* is relatively related genera to each other. Among the seven species studied here, *Dorcus platymelus* is the most distant species and the primitive or ancestral type. This result is well consistent with the previous taxonomic system. Their phylogenetic relationships established by allozymic study were discussed through the comparison with the non-molecular data from morphology and ecology.