

# 日本産アゲハチョウ科の分子系統学的研究

松村 行栄<sup>\*1</sup>・五十嵐聖貴<sup>\*2</sup>・松岡 教理<sup>\*3</sup>

<sup>\*1</sup> エーザイ株式会社信頼性保証本部コーポレート QA 部

<sup>\*2</sup> 弘前大学大学院理学研究科

<sup>\*3</sup> 弘前大学農学生命科学部分子進化学研究室

(2005年9月7日受付)

## 序 論

現在、鱗翅目のアゲハチョウ科は世界に 600 種以上が分類記載されており (Collins and Morris, 1985), 大半の種が熱帯あるいは亜熱帯地域に分布している。本科の系統分類学的研究は鱗翅目のなかで最も詳細に行われてきたが、未だに多くの未解決な問題点が残されている (Ackery *et al.*, 1998)。本科はウラギンアゲハ亜科, ウスバアゲハ亜科, アゲハチョウ亜科の 3 亜科に分類されているが、これら亜科の系統関係についても不明な点が多く、さらなる研究が必要である (Hauser, 1993)。

アゲハチョウ科各種の系統類縁関係は、主に形態学的観点から、分岐分類学的に研究されてきた (Ford, 1944; Munroe, 1960; Brock, 1971; Ackery, 1975; Scott, 1984; Igarashi, 1984; Miller, 1987)。また、細胞遺伝学的研究 (前木, 1957; 斎藤, 1988) も報告されている。本科の分類に採用されてきた形質は成虫の形態、幼虫の形態と食草、蛹の形態、地理的分布など多岐にわたる。しかし、これらの形質はグループが異なるとそれぞれの重み付けが変わってくるため、亜科、族、属などの高次レベルの分類の基準には同じ尺度が用いられてこなかった。

一方、分子的手法を用いて DNA やアロザイムレベルからの分子系統学的研究が現在、活発におこなわれている。このような研究は、現存生物が持っている相同な DNA やタンパク質を比較することによって、過去にそれらの生物がたどってきた進化のプロセスを明らかにすることが可能である。また、分子時計により、生物が共通祖先から分岐した年代を推定することもでき、生物の系統類縁関係を共通の尺度で客観的かつ定量的に研究することができる。

近年になって多くの研究者がミトコンドリア DNA (mtDNA) の制限酵素断片長多型 (RFLP) や塩基配列決定による系統解析について報告している。アゲハチョウ科においても Hagen and Scriber (1991) の研究から始まり、mtDNA の遺伝子である COI, COII などを用いた分子系統学的研究が報告されている (Caterino and

Sperling, 1999; Caterino *et al.*, 2001) が、従来の形態的研究から推定された系統とは見解の相違があった。その後、アゲハチョウ亜科 (Aubert *et al.*, 1999), アオスジアゲハ族 (Makita *et al.*, 2003), キシタアゲハ族 (Morinaka *et al.*, 1999; Moronaka *et al.*, 2000), ギフチョウ属 (Makita *et al.*, 2000), カラスアゲハ亜属 (八木, 2001) などの亜科、族、属レベルの分類学的検討もすすみ、日本のアゲハチョウ科については Yagi *et al.* (1999) が mtDNA の ND5 遺伝子領域による系統類縁関係について報告した。

mtDNA 分析の利点はその単純な遺伝様式と、分析に際しての取り扱いが容易なことによるものであるが、分析できる塩基サイト数はアロザイム分析と比較して必ずしも多くはない。また、mtDNA は核 DNA とは独立したものであり、異種間移入の例も数多く知られているため、進化関係を推測する際には注意が必要である。一方、それと比較してアロザイム分析は、核 DNA にコードされている多数の酵素遺伝子座を同時に分析することができるため、種間の系統解析には非常に有効な分子的手法で、鱗翅目においてもアロザイム分析が多くの分類群について報告されてきた (*eg.* Menken, 1982; Matsuoka *et al.*, 1983, 1984; Martin and Pashley, 1992; Sperling and Harrison, 1994)。しかし、アゲハチョウ科における報告例は極めて少なく、わずかに近縁種間の研究が報告されているだけである (Kominami *et al.*, 1991)。従って、アゲハチョウ科の総合的な系統分類学的位置付け、および族や属など、種レベル以上の高次分類群間の系統類縁関係についてはほとんど知見が得られていないのが現状である。

今回、著者らは、日本産アゲハチョウ科の属間、および族間の系統進化学的關係をアロザイム分析により調査したので、それらの結果について報告する。またアゲハチョウ科の自然集団内に保有されている遺伝的変異についても報告する。

表 1. アロザイム分析に用いたアゲハチョウ科 8 種の種名, 和名, 略称, 採集地, 採集年月日, 個体数

| 種 名                          | 和 名      | 略称  | 採 集 地     | 採集年月日              | 個体数 |
|------------------------------|----------|-----|-----------|--------------------|-----|
| <i>Sericanus montela</i>     | ホソオチョウ   | Sm  | 山梨県北巨摩双葉町 | 1994 年 7 月 6-14 日  | 3   |
| <i>Luehdorfia japonica</i>   | ギフチョウ    | Lj  | 鳥取県岩美郡国府町 | -----              | 10  |
|                              |          |     | 鳥取県鳥取市    | -----              |     |
| <i>Parnassius glacialis</i>  | ウスバシロチョウ | Pag | 群馬県藤岡市    | -----              | 4   |
| <i>Atrophaneura alcinous</i> | ジャコウアゲハ  | Ata | 群馬県藤岡市    | 1993 年 9 月 29 日    | 7   |
|                              |          |     |           | 1993 年 10 月 30 日   |     |
| <i>Papilio xuthus</i>        | アゲハ      | Px  | 群馬県藤岡市    | 1993 年 7 月 30 日    | 6   |
|                              |          |     |           | 1993 年 8 月 2 日     |     |
|                              |          |     | 群馬県勢多郡宮城村 | 1993 年 8 月 12 日    |     |
| <i>Menelaides helenus</i>    | モンキアゲハ   | Mh  | 群馬県多野郡吉井町 | 1994 年 7 月 23 日    | 4   |
| <i>Achillides bianor</i>     | カラスアゲハ   | Acb | 群馬県勢多郡宮城村 | 1994 年 8 月 12-14 日 | 3   |
| <i>Graphium sarpedon</i>     | アオスジアゲハ  | Gs  | 群馬県勢多郡宮城村 | 1993 年 8 月 12 日    | 6   |

## 材料および方法

### (1) 材料

本研究では日本に生息するアゲハチョウ科 9 属のうち, ペニモンアゲハ属以外の 8 属から各々代表種を選びアロザイム分析を行った。8 種の種名, 採集地点および分析個体数は表 1 にまとめて示してある。分析にはすべて成虫個体を使用した。採集個体は, 実験に使用するまで - 40℃ に冷凍保存しておいた。なお, 本文中の和名, 学名, および分類体系は Igarashi (1984) および五十嵐 (1979) に従った。

### (2) アロザイム分析

アロザイム分析には冷凍保存した成虫個体を, 翅・脚・触角・口吻を除去して重量を計り, 解剖バサミで細かく切り刻んでから, Potter-Elvehjem タイプのガラスホモジナイザーを用いて抽出した。抽出緩衝液には, 個体重量の 5 - 10 倍量の 20 mM リン酸緩衝液 (0.1 M KCl, 1 mM EDTA, pH7.0) を用いた。これを 15,000 rpm で 10 分間遠心分離し, その上清を電気泳動試料とした。アロザイム分析には各個体について 0.03 - 0.10 ml の電気泳動試料を用い, 7.5 % ポリアクリルアミドゲルを支持体とする電気泳動をおこなった (Matsuoka and Hatanaka, 1991)。アロザイム分析した酵素は - GPDH, ADH, G6PD, GCDH, ICDH, LDH, MDH, ME, ODH, XDH, HK, PGM, SOD, AAT, ALK, EST および LAP の 17 酵素であった。これら 17 酵素のアロザイム分析により合計 35 酵素遺伝子座が検出された。

### (3) 集団内の遺伝的変異の推定

35 酵素遺伝子座の対立遺伝子頻度から, 遺伝的変異の程度を示す 4 種のパラメータである 1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数 ( $A$ ), 多型的遺伝子座の割合 ( $P$ ), 平均ヘテロ接合体率の観察値 ( $H_{obs}$ ) と期待値 ( $H_{exp}$ ) を算出した。多型的遺伝子座は最も頻度の高い対立遺伝子頻度が 0.95 以下である遺伝子座とした。

### (4) アゲハチョウ科 8 属間の遺伝的距離と系統縁関係の推定

属間の遺伝的分化の程度を知るため, 35 酵素遺伝子座の対立遺伝子頻度から Nei (1972) の式により遺伝的類似度 ( $I$ ) と遺伝的距離 ( $D$ ) を算出した。そして, 遺伝的距離 ( $D$ ) から 3 つの分子系統樹を作成した。すなわち Sneath and Sokal (1973) の UPGMA 法 (非加重結合法), および Saitou and Nei (1987) と Studier and Keppler (1988) の NJ 法 (近隣結合法) によるアゲハチョウ科 8 属の分子系統樹と, UPGMA 法と NJ 法の両方の系統樹で共通する系統関係を示すコンセンサス分子系統樹の 3 つである。なお, NJ 法で得られる分子系統樹は無根系統樹であるため, OTU (Operational Taxonomic Unit: 操作上の分類単位) を結ぶ枝長の内, 最も長いものの中央を樹根として有根系統樹を距離 Wagner 法 (Farris, 1972) により作成した。

## 結 果

17 酵素のアロザイム分析の結果, 合計 35 遺伝子座が検出された。35 酵素遺伝子座における対立遺伝子頻度から, 集団内の遺伝的変異の程度を示す 4 種のパラメータを算出した。その結果は表 2 にまとめて示してある。それによるとアゲハはこれら 4 種のパラメータにおいて最大値を示し, 最も高い遺伝的変異を示した ( $A=1.78$ ,  $P=62.5\%$ ,  $H_{obs}=24.0\%$ ,  $H_{exp}=23.2\%$ )。一方, モンキアゲハはすべてのパラメータにおいて最小値を示し, 集団内の遺伝的変異がもっとも低かった ( $A=1.29$ ,  $P=20.8\%$ ,  $H_{obs}=7.3\%$ ,  $H_{exp}=8.4\%$ )。他の 6 種は遺伝的変異の程度は若干異なっていたが, 種間の差異はあまり見られなかった。

次に, アゲハチョウ科 8 属 8 種間の遺伝的分化の程度を調査するため, 35 酵素遺伝子座における対立遺伝子頻度から Nei (1972) の  $I$  と  $D$  を算出した (表 3)。その結果, アゲハチョウ科 8 属 8 種間で最も近縁関係にあるのはカラスアゲハ (カラスアゲハ属) とモンキアゲハ

表 2. アゲハチョウ科 8 種における遺伝的変異

| 指 標                               | <i>Sm</i> | <i>Lj</i> | <i>Pag</i> | <i>Ata</i> | <i>Px</i> | <i>Mh</i> | <i>Acb</i> | <i>Gs</i> |
|-----------------------------------|-----------|-----------|------------|------------|-----------|-----------|------------|-----------|
| 分析した酵素遺伝子座の数                      | 35        | 35        | 35         | 35         | 35        | 35        | 35         | 35        |
| 1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数 ( <i>A</i> )     | 1.29      | 1.52      | 1.29       | 1.46       | 1.78      | 1.29      | 1.46       | 1.48      |
| 多型的遺伝子座の割合 ( <i>P</i> ) (%)       | 28.6      | 42.9      | 28.6       | 42.3       | 62.5      | 20.8      | 39.3       | 35.5      |
| 平均ヘテロ接合体率 (観察値: <i>Hobs</i> ) (%) | 22.2      | 19.0      | 17.1       | 13.7       | 24.0      | 7.3       | 16.1       | 15.7      |
| 平均ヘテロ接合体率 (期待値: <i>Hexp</i> ) (%) | 12.7      | 16.7      | 11.0       | 17.8       | 23.2      | 8.4       | 17.5       | 16.4      |

(種名は略称で示した)

表 3. アゲハチョウ科 8 種間の遺伝的類似度 (*I* 斜め上半分) と遺伝的距離 (*D* 斜め下半分)

|            | <i>Sm</i> | <i>Lj</i> | <i>Pag</i> | <i>Ata</i> | <i>Px</i> | <i>Mh</i> | <i>Acb</i> | <i>Gs</i> |
|------------|-----------|-----------|------------|------------|-----------|-----------|------------|-----------|
| <i>Sm</i>  | -         | 0.344     | 0.315      | 0.375      | 0.314     | 0.209     | 0.453      | 0.358     |
| <i>Lj</i>  | 1.067     | -         | 0.371      | 0.246      | 0.414     | 0.244     | 0.334      | 0.325     |
| <i>Pag</i> | 1.155     | 0.992     | -          | 0.294      | 0.307     | 0.455     | 0.426      | 0.339     |
| <i>Ata</i> | 0.981     | 1.402     | 1.224      | -          | 0.414     | 0.375     | 0.480      | 0.381     |
| <i>Px</i>  | 1.158     | 0.882     | 1.181      | 0.882      | -         | 0.415     | 0.496      | 0.476     |
| <i>Mh</i>  | 1.565     | 1.411     | 0.787      | 0.981      | 0.879     | -         | 0.543      | 0.347     |
| <i>Acb</i> | 0.792     | 1.097     | 0.853      | 0.734      | 0.701     | 0.661     | -          | 0.410     |
| <i>Gs</i>  | 1.027     | 1.124     | 1.082      | 0.965      | 0.742     | 1.058     | 0.892      | -         |

(種名は略称で示した)

(モンキアゲハ属) ( $I=0.543$ ,  $D=0.661$ ) であり, 最も遠縁なのはホソオチョウ (ホソオチョウ属) とモンキアゲハ ( $I=0.209$ ,  $D=1.565$ ) であった。8 種の全組合せ (28 ペア) の  $I$  と  $D$  の平均値は  $I=0.374$ ,  $D=1.01$  であった。図 1 は,  $D$  から UPGMA 法によって作成した分子系統樹である。この分子系統樹から明らかなように, アゲハチョウ科 8 属 8 種の系統関係は, ホソオチョウ・ギフチョウ (ギフチョウ属) のグループ, ウスバシロチョウ (ウスバシロチョウ属)・カラスアゲハ・モンキアゲハのグループ, そして, アゲハ (キアゲハ属)・ジャコウアゲハ (ジャコウアゲハ属)・アオスジアゲハ (アオスジアゲハ属) のグループの 3 つの大きな系統群に分かれることが判明した。タイスアゲハ族の 2 種であるホソオチョウ・ギフチョウは 1 つのクラスターを形成した。このタイスアゲハ族とともにウスバアゲハ亜科を構成しているウスバシロチョウは, アゲハチョウ亜科に近縁であった。アゲハチョウ亜科は, カラスアゲハ・モンキアゲハの系統, アゲハ・ジャコウアゲハの系統, そしてアオスジアゲハの系統の 3 つのグループに分かれた。そしてアオスジアゲハはアゲハ・ジャコウアゲハのグループと近縁であった。また, ホソオチョウ, ギフチョウ, ウスバシロチョウ, アオスジアゲハは, それらの系統が分岐してからの枝長が比較的長かった。

図 2 は, 同じく  $D$  をもとにして NJ 法により作成したアゲハチョウ科 8 属 8 種の分子系統樹である。その結果, ホソオチョウ・ギフチョウのグループと, その他 6 種の 2 つの大きな系統群に分かれた。NJ 法を用いた分子系統樹でも UPGMA 法による分子系統樹と同様にタイスアゲハ族 2 種の近縁性, そしてウスバシロチョウと

アゲハチョウ亜科の近縁性が示唆された。アゲハチョウ亜科の分岐パターンは, まずアオスジアゲハの系統が分岐し, 次にアゲハの系統が分岐した後, ジャコウアゲハの系統とその他 2 種の系統が分岐する結果が得られた。

UPGMA 法と NJ 法により作成した 2 つの分子系統樹の違いは以下の 2 点である。すなわち, (1) ジャコウアゲハのクラスターの系統的位置が, UPGMA 法ではアゲハのクラスターと近縁なのに対し, NJ 法ではウスバシロチョウ・カラスアゲハ・モンキアゲハのグループと近縁である。(2) アオスジアゲハの系統の分岐の位置が, UPGMA 法では, キアゲハ・アゲハ・ジャコウアゲハの共通祖先と分岐しているのに対して, NJ 法ではウスバシロチョウ・アゲハチョウ族・ジャコウアゲハの合計 5 種の共通祖先と分岐する結果となった。

図 3 は, UPGMA 法と NJ 法の 2 つの分子系統樹で共通して得られた結果をまとめたコンセンサス系統樹である。この系統樹は樹形のみを考慮したものであり, 枝長は遺伝的分化の程度を示していない。UPGMA 法と NJ 法ではそれぞれ 6 の単系統群がみられたが, コンセンサス系統樹においてはそのうちの 4 つの単系統群が再現された。コンセンサス系統樹を現在の分類体系 (Igarashi, 1984) と比較すると以下ようになる。すなわち, 一致点は (1) タイスアゲハ族 2 属 2 種は単系統である。(2) 別族に分類されているアオスジアゲハは, アゲハチョウ亜科のなかでは系統的に異なる特異な種である。一方, 相違点は (1) ウスバアゲハ亜科は単系統群ではない。(2) アゲハチョウ族は単系統群ではないという点であった。

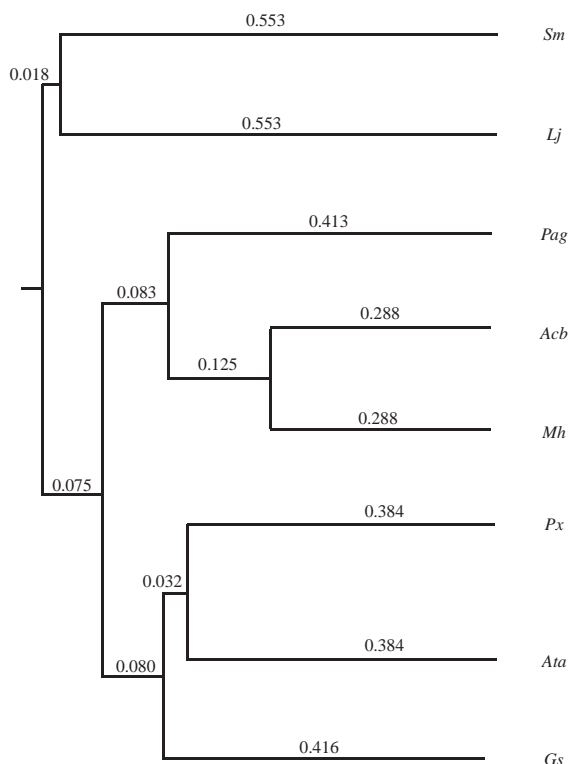


図 1. UPGMA 法により作成したアゲハチョウ科 8 種の分子系統樹。

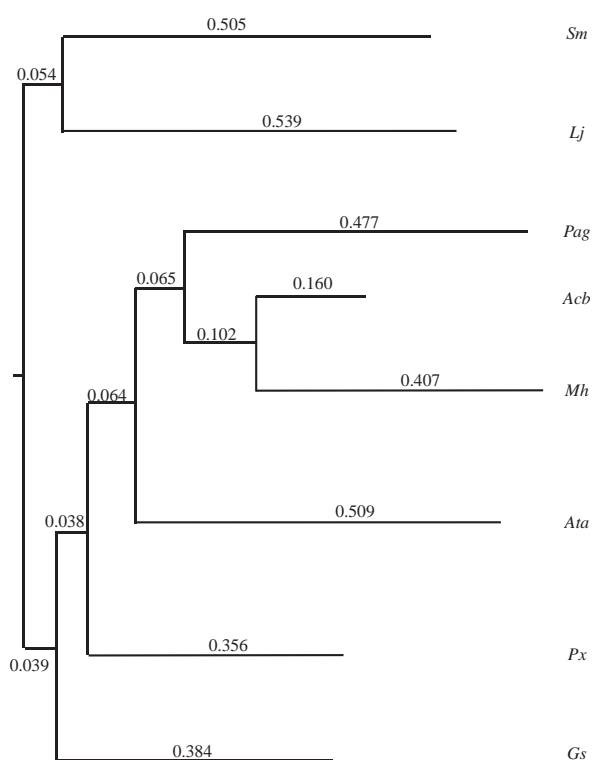


図 2. NJ 法により作成したアゲハチョウ科 8 種の分子系統樹。

## 考 察

### 集団内の遺伝的変異

表 2 に示した 4 種類のパラメータは、いずれも集団内に保有されている遺伝的変異の程度を表す尺度である。すなわち 1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数 ( $A$ )、多型的遺伝子座の割合 ( $P$ )、平均ヘテロ接合体率の観察値 ( $H_{obs}$ ) と期待値 ( $H_{exp}$ ) である。鱗翅類 68 分類群でこれまでに報告されている  $H_{exp}$  の平均値は 14 % で、今回の数値は、これらと同等の値であった。本研究で分析したアゲハチョウ科 8 属 8 種の中では、アゲハが最も高い遺伝的変異を示し、モンキアゲハがやや低い変異性を示した。

多様な生物における平均ヘテロ接合体率のデータが蓄積するにつれ、多くの研究者が遺伝的変異の程度に影響を与える要因について報告している。そのうち、相関関係が明らかになっている要因の一つに、生物集団の大きさ (population size) がある。Nei (1983) と Nei and Graur (1984) は、77 の生物種について  $H_{exp}$  と集団サイズとの相関関係を詳細に分析し、それらの間に有意な正の相関関係があると報告した。これは、集団サイズが大きくなるほど、より多くの遺伝的変異 (大半が中立突然変異) を集団内に保有できるためである。本研究で得られた  $H_{exp}$  にみられる差も種の集団サイズの差を反映している可能性が高い。つまり、アゲハ集団は大きく、モンキアゲハ集団は集団サイズが小さいことが示唆される。し

かし、現在棲息数が減少しているギフチョウ集団の遺伝的変異が平均的な数値 ( $H_{exp}=16.7\%$ ) であったことは、集団サイズ以外の他の要因も考慮しなければならないだろう。

### 系統樹の作成

Nei (1972) の遺伝距離 ( $D$ ) から、UPGMA 法と NJ 法を用いて分子系統樹を作成した。Nei *et al.* (1983) は、より正確な分子系統樹を作成するためには、距離尺度に Nei (1972) の  $D$  を用い、系統樹作成法は UPGMA 法を用いた方が良いと報告している。これは、 $D$  がアロザイム分析によって検出できるアミノ酸置換数を測定するために考案されたものであること、そして UPGMA 法は種の分子系統樹を作成するために考案されたものであるとともに、遺伝距離を平均化するという操作によって遺伝距離の誤差が減少するという利点があるためである。また、根井 (1990) は、近年考案された NJ 法の利点が高いことを考慮し、UPGMA 法と NJ 法の両方で相同な樹形が得られれば、その分子系統樹はかなり信頼性が高いと報告している。UPGMA 法と NJ 法で異なった樹形が得られた場合には、それらの相違点のどちらがより確かなものかを決定することは一般に困難であるが、そのような場合には、2 つの樹形の共通点を総合して作成したコンセンサス系統樹が高い信頼性をもつ。本研究では、UPGMA 法と NJ 法の分子系統樹の樹形がいくつかの点で異なっていたため、アゲハチョウ科 8 属 8 種の系統類

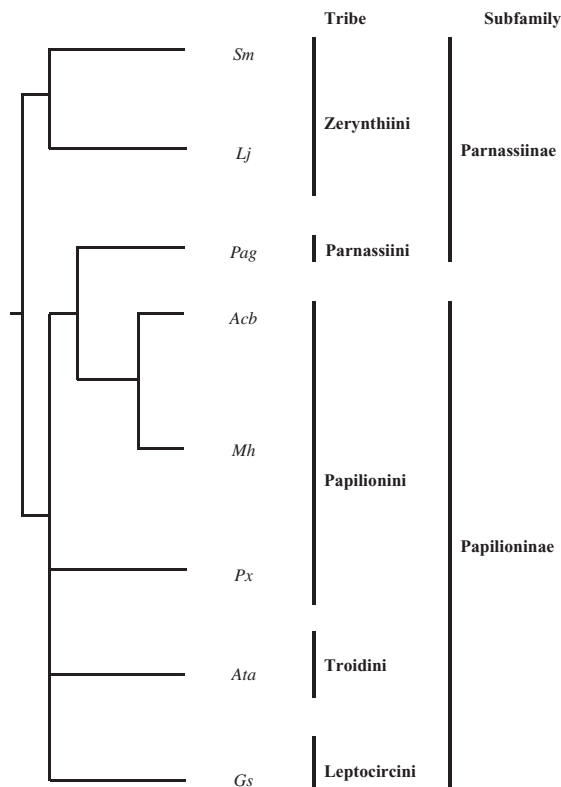


図3. アゲハチョウ科8種のコンセンサス系統樹。

縁関係については図3のコンセンサス系統樹に基づいて考察する。

アゲハチョウの細胞遺伝学的研究から、日本産アゲハチョウ科各種の染色体数( $n$ )はウスバシロチョウ属3種が $n=29$ 、キアゲハが $n=31$ 、アオスジアゲハが $n=20$ なのを除いて、その他の種は全て $n=30$ である(斎藤, 1988)。本研究の結果は、染色体レベルの知見とよく一致している。すなわち、ウスバシロチョウは、その系統が分岐してからの枝長が長く(UPGMA法とNJ法の平均で $D=0.445$ )、このグループを別亜科とする分類システムを支持するものである。また、アオスジアゲハは外部形態も他のアゲハチョウ亜科の種とは大きく異なっており、アオスジアゲハもその系統が分岐してからの枝長が長く(UPGMA法とNJ法の平均で $D=0.400$ )、本種をアゲハチョウ亜科内でアオスジアゲハ族として分類学上区別するのは妥当な分類体系であると考えられる。

#### 族(Tribe)間の系統類縁関係

日本列島には、ウスバシロチョウ族は1属3種、キシタアゲハ族は2属2種、アオスジアゲハ族は1属2種が棲息しているが、本研究ではこれら3族からは代表種を1種ずつ分析した。従って、これら3種は3族を代表しているものとした。Ford(1944)は、成虫および幼虫期の形態学的比較に加えて、幼虫の食性、成虫の鱗色素の化学的性質などの比較研究から世界に産するアゲハチョウ

ウ科の総合的な分類体系を提唱した。彼は日本産アゲハチョウ科の亜科として、アゲハチョウ亜科、ギフチョウ亜科、ウスバシロチョウ亜科の3亜科を設けた。このギフチョウ亜科は現在のタイスアゲハ族に、ウスバシロチョウ亜科は現在のウスバシロチョウ族にそれぞれ相当するものであり、現在の Ackery *et al* (1998) の分類体系では、これら2亜科はウスバアゲハ亜科としてまとめられている。Ford(1944)はそれら3亜科を独立した系統群と考えており、亜科間の近縁関係については示唆していない。

その後、白水(1955)はFord(1944)の分類体系を変更してアゲハチョウ科の系統類縁関係について新たな分類体系を提唱した。ここでもアゲハチョウ亜科、ギフチョウ亜科、ウスバシロチョウ亜科の3亜科を設けたが、最も大きな変更点はギフチョウ亜科とウスバシロチョウ亜科をより近縁なグループであると解釈した点である。白水(1955)が両亜科が近縁であると考えた根拠は、それらの雄性外部生殖器の形態学的類似性と、ウスバシロチョウ亜科のシリアアゲハ属(*Archon*)がギフチョウ亜科の形質も兼備している点である。また、Munroe(1960)も白水(1955)と同様な理由で両亜科を一つの亜科に再分類した。

本研究の結果では、タイスアゲハ族が系統的に独立したグループであること、そしてウスバシロチョウがかなり遺伝的に分化を遂げていることが示された。この結果は、両グループを独立した系統であると考えてた Ford(1944) の分類体系とよく一致する。

本研究では、アゲハチョウ族が3つの系統に分かれ、キシタアゲハ族はそのうちの1つの系統に近縁であった。つまり、アロザイム分析からはアゲハチョウ亜科を3族に分類することは妥当ではないと考えられる。またアオスジアゲハ族は比較的独立した系統群であることが示唆されたが、その分岐の位置は明確にされなかった。Munroe(1960)は、アゲハチョウ科の中でもアゲハチョウ亜科の分類が最も困難であると述べており、今後この亜科のさらなる系統分類学的研究が望まれる。

#### 属間の系統類縁関係

日本産アゲハチョウ科は、タイスアゲハ族とキシタアゲハ族がそれぞれ2属を含む他は、1族につき1属の分類である。本研究ではキシタアゲハ族のベニモンアゲハ(*Pachliopta aristolochiae interposita*)を分析していないため、タイスアゲハ族のホソオチョウ属とギフチョウ属間の系統類縁関係を分析した。

タイスアゲハ族は日本産の2属の他に、タイスアゲハ属(*Parnalius*)、シボリアゲハ属(*Bhutanitis*)の2属がユーラシア大陸と北アフリカに分布している。Ford(1944)は、以上の4属を形態学的観点から、ギフチョウ属・タイスアゲハ属の系統と、ホソオチョウ属・シボリアゲハ属の2つの系統に分化していると考えた。ただ

し、その分化の程度は別族に分類する程ではないと述べている。それに対し、白水(1955)は蛹と雄性外部生殖器の形態学的類似性から Ford(1944)の2系統説に異論を唱えた。本研究の結果は、ホソオチョウ属とギフチョウ属は遺伝的分化の程度がかなり高く、分子系統樹においても両者は系統的に異なる属であることを明らかに示した。この2属の高い遺伝的分化は、Ford(1944)の2系統説を支持する。

## 要 約

日本産アゲハチョウ科8属8種の系統類縁関係をアロザイム分析により調査した。分析した種はウスバアゲハ亜科タイスアゲハ族のホソオチョウ、ギフチョウ、同亜科ウスバシロチョウ族のウスバシロチョウ、アゲハチョウ亜科キシタアゲハ族のジャコウアゲハ、同亜科アゲハチョウ族のアゲハ、モンキアゲハ、カラスアゲハ、同亜科アオスジアゲハ族のアオスジアゲハの8属8種である。17酵素のアロザイム分析から35遺伝子座が検出された。35遺伝子座における対立遺伝子頻度から、Nei(1972)の遺伝的距離( $D$ )と遺伝的類似度( $I$ )を算出し、8属8種間の遺伝的分化の程度を推定した。その結果、8種間で最も近縁関係にあるのはカラスアゲハとモンキアゲハであり、最も遠縁なのはホソオチョウとモンキアゲハであった。次に、8属8種間の系統類縁関係を調査するため、遺伝的距離( $D$ )からUPGMA法とNJ法を用いて分子系統樹を作成した。その結果、(1)タイスアゲハ族の2種(ホソオチョウとギフチョウ)は単系統である。(2)アゲハチョウ科8属8種の中で外部形態が特殊化しているアオスジアゲハはやはり分子レベルからみても遺伝的分化の程度が高い。(3)アゲハチョウ族の3種(アゲハ、モンキアゲハ、カラスアゲハ)間の系統類縁関係は外部形態から推定されるものと、よく一致した。(4)一方、ウスバシロチョウの系統的位置付けは現在の分類体系とは異なり、ウスバシロチョウは、同じ亜科に分類されているタイスアゲハ族と系統的に近縁ではないことが示唆され、本属の分類学的再検討が望まれる。

## 引 用 文 献

- ACKERY, P. R. (1975) A guide to the genera and species of Parnassiinae (Lepidoptera: Papilionidae). *Bull. Br. Mus. nat. Hist. (Ent.)* 31: 73-105.
- ACKERY, P. R., DE JONG, R. and VANE-WRIGHT, R. I. (1998) The butterflies: Hedyloidea, Hesperoidea and Papilionoidea. In Kristensen, N. P. (Ed.), *Lepidoptera, moths and butterflies*, vol. 1. *Handb. Zool., Berl.* 4(35): 263-300.
- AE, S. (1960) A study of hybrids between *Papilio xuthus* and the *P. polyxenes-machaon* group. *J. Lepid. Soc.* 14: 5-18.
- AUBERT, J., LEGAL, L., DESCIMON, H. and MICHAEL, F. (1999) Molecular phylogeny of swallowtail butterflies of the Tribe Papilionini (Papilionidae, Lepidoptera). *Molec. Phylogenet. Evol.* 12: 156-167.
- BROCK, J. P. (1971) A contribution towards an understanding of the morphology and phylogeny of the ditrysian Lepidoptera. *J. nat. Hist.* 5: 29-102.
- CATERINO, M. S. and SPERLING, F. A. H. (1999) Papilio phylogeny based on mitochondrial cytochrome oxidase I and II genes. *Molec. Phylogenet. Evol.* 11: 122-137.
- CATERINO, M. S., REED, R. D., KUO, M. Y. and SPERLING, F. A. H. (2001) A partitioned likelihood analysis of swallowtail butterfly phylogeny (Lepidoptera: Papilionidae). *Syst. Biol.* 50: 106-127.
- COLLINS, N. M. and MORRIS, M. G. (1985) Threatened Swallowtail Butterflies of the World. *The IUCN red Data Book*. vii, 401 pp., 8 pls. IUCN, Gland and Cambridge.
- FARRIS, J. S. (1972) Estimating phylogenetic trees from distance matrices. *Am. Nat.* 106: 645-668.
- FORD, E. B. (1944) Studies on the chemistry of pigments in Lepidoptera, with reference to their bearing on systematics. 4. The classification of the papilionidae. *Trans. R. ent. Soc. Lond.* 91: 201-223.
- GRAUR, D. (1985) Gene diversity in Hymenoptera. *Evolution* 39: 190-199.
- HAGEN, R. H. and SCRIBER, J. M. (1991) Systematics of the *Papilio glaucus* and *P. troilus* species groups (Lepidoptera: Papilionidae). Inferences from allozymes. *Ann. ent. Soc. Am.* 84: 80-395.
- HÄUSER, C. L. (1993) Critical comments on the phylogenetic relationship within the family Papilionidae (Lepidoptera). *Nota lepid.* 16: 34-43.
- 五十嵐通 (1979) 世界のアゲハチョウ. 講談社, 東京.
- IGARASHI, S. (1984) The classification of the Papilionidae mainly based on the morphology of their immature stages. *Tyo to Ga* 34(2): 41-96.
- KOMINAMI, H., KASAHARA, M., SUMIYOSHI, K. and YAMAGUCHI, O. (1991) Protein variability detected by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in subspecies of *Papilio bianor* complex. *Tyo to Ga* 42(1): 1-9.
- 前木孝道 (1957) 日本産アゲハチョウの染色体研究. 染色体 32: 1115-1122.
- MAKITA, H., SHINKAWA, T., OHTA, K., KONDO, A. and NAKAZAWA, T. (2000) Phylogeny of Luehdofia butterflies inferred from mitochondrial ND5 gene sequences. *Ent. Sci.* 3: 321-329.
- MAKITA, H., SHINKAWA, T., OHTA, K., LIANXI, X. and NAKAZAWA, T. (2003) Phylogeny of the Graphium butterflies inferred from nuclear 28S rDNA and mitochondrial ND5 gene sequence. *Trans. lepid. Soc. Japan* 54: 91-110.
- MARTIN, J. A. and PASHLEY, D. P. (1992) Molecular systematic analysis of butterfly family and some subfamily relationships (Lepidoptera: Papilionoidea). *Ann. ent. Soc. Am.* 85: 127-139.
- MATSUOKA, N., CHIBA, Y. and SAITOH, K. (1983) Allozyme similarity in two species of the genus *Brenthis* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 74 B: 385-387.
- MATSUOKA, N., CHIBA, Y. and SAITOH, K. (1984) Biochemical evidence for the genetic differentiation between two morphologically very similar species of

- Neope* (Lepidoptera: Satyridae) from Japan. *Proc. Japan Acad.* 60 (B) : 245-248.
- 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.
- MENKEN, S. H. J. (1982) Biochemical genetics and systematics of small ermine moths (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Zool. Syst. Evolut.-forsch.* 20: 131-143.
- MILLER, J. S. (1987) Phylogenetic studies in the Papilioninae (Lepidoptera: Papilionidae). *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 186: 365-512.
- MORINAKA, S., MAEYANMA, T., MAEKAWA, K., ERNIWATI, N. S. P., GINARSA, I. K., NAKAZAWA, T. and HIDAHA, T. (1999) Molecular phylogeny of birdwing butterflies based on the representative in most genera of tribe Troidini (Lepidoptera: Papilionidae). *Ent. Sci.* 2: 347-358.
- MORINAKA, S., MINAKA, N., SEKIGUCHI, M., ERNIWATI, P. S. N., GINARSA, I. K., MIYATA, T. and HIDAHA, T. (2000) Molecular phylogeny of birdwing butterflies of the tribe Troidini (Lepidoptera: Papilionidae) - Using all species of the genus *Ornithoptera*-. *Biogeography*. 2: 103-111.
- MUNROE, E. (1960) The classification of the Papilionidae (Lepidoptera). *Can. Ent. (Suppl.)* 17: 1-51.
- NEI, M. (1972) Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283-292.
- NEI, M. (1983) Genetic polymorphism and the role of mutation in evolution. In Nei, M. and R. Koehn (Eds). *Evolution of Genes and Proteins*: 165-190. Sinauer, Sunderland, MA.
- NEI, M. (1987) Molecular Evolutionary Genetics. Columbia Univ. Press, New York.
- NEI, M., TAJIMA, F. and TATENO, Y. (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *J. Molec. Evol.* 19: 153-170.
- 斎藤和夫 (1988) 蝶類の染色体 - 1966 年前後から 1984 年までの形態学的研究から -. *Spec. Bull. lepid. Soc. Japan* (6) : 499-525.
- SAITOH, K. and KUDOH, K. (1972) A chromosome study of *Luehdorfia* hybrids. *Kontyû* 40: 290-293.
- SAITOH, K., KUDOH, K. and SHIRAHATA, K. (1971) A study of the spermatocyte chromosomes of *Luehdorfia japonica* Leech (Lepidoptera: Papilionidae). *Sci. Rep. Hirosaki Univ.* 18: 50-52.
- SAITOU, N. and IMANISHI, T. (1989) Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Mol. Biol. Evol.* 6: 514-525.
- SAITOU, N. and NEI, M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- SCOTT, J. A. (1984) The phylogeny of butterflies (Papilionoidea and Hesperioidea). *J. Res. Lepid.* 23: 241-281.
- 白水 隆 (1955) アゲハチョウ科における幼虫食性の進化 (2) 新昆虫 8 (5) : 38-44.
- 白水 隆 (1960) 原色台湾蝶類大図鑑. 保育社, 大阪.
- SNEATH, P. H. A. and SOKAL, R. R. (1973) Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco, CA.
- SPERLING, F. A. H. and HARRISON, R. C. (1994) Mitochondrial DNA variation within and between species of the *Papilio machaon* group of swallowtail butterflies. *Evolution* 48: 408-422.
- STUDIER, J. A. and KEPPLER, K. J. (1988) A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei. *Mol. Biol. Evol.* 5: 729-731.
- TATENO, Y., NEI, M. and TAJIMA, F. (1982) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. I. Distantly related species. *J. Mol. Evol.* 18: 387-404.
- YAGI, T., SASAKI, G. and TAKEBE, H. (1999) Phylogeny of Japanese papilionid butterflies inferred from nucleotide sequences of the mitochondrial ND5 gene. *J. molec. Evol.* 48: 42-48.
- 八木孝司 (2001) カラスアゲハ亜属の分子系統・分類および自然史. *昆虫と自然* 36 (13) : 9-12.

---

別刷請求先:

〒 375-0024 群馬県藤岡市藤岡 827-5  
松 村 行 栄

## Molecular Phylogeny of Japanese Papilionidae (Lepidoptera)

Takayoshi MATSUMURA<sup>\*1</sup>, Seiki IGARASHI<sup>\*2</sup> and Norimasa MATSUOKA<sup>\*3</sup>

<sup>\*1</sup> Corporate QA Department, Corporate Regulatory Compliance and Quality Assurance Headquarters, Eisai Co., Ltd., Tokyo 112-8088, Japan

<sup>\*2</sup> Graduate School of Science, Hirosaki University, Hirosaki 036-8561, Japan

<sup>\*3</sup> Division of Molecular Evolution, Faculty of Agriculture & Life Science, Hirosaki University, Hirosaki 036-8561, Japan

### ABSTRACT

The phylogenetic relationships among eight genera of the family Papilionidae (Lepidoptera) from Japan were studied by allozyme analysis of 17 different enzymes. Eight species adopted were *Papilio xuthus*, *Achillides bianor*, *Menelaides helenus*, *Parnassius glacialis*, *Luehdorfia japomoca*, *Atrophaneura alcinous*, *Graphium sarpedon* and *Sericinus montela*. From the allozyme variation in 35 genetic loci scored, the Nei's genetic distances between eight species of the Papilionidae were calculated and the molecular phylogenetic tree for eight species of the Papilionidae were constructed by UPGMA and NJ-methods. The phylogenetic trees indicated the followings:

- (1) The two species (*Sericinus montela* and *Luehdorfia japonica*) of tribe Zerynthiini were monophyletic.
- (2) Among eight species of the Papilionidae, *Graphium sarpedon* of special morphological characters was genetically differentiated from other seven species at allozyme level.
- (3) The phylogenetic relationships among three species of the tribe *Papilionini* were well consistent with that inferred from the morphological study.
- (4) The phylogenetic positions of *Parnassius glacialis* was inconsistent with the taxonomic system adopted widely by many workers: *P. glacialis* was not closely related with the member of Zerynthiini-group of the same subfamily Parnassiinae.