

博士学位論文

社会性狩り蜂シダクロスズメバチにおける
多回交尾の進化過程と繁殖生態に関する研究

(Evolutionary process of multiple mating and
reproductive ecology in the social wasp *Vespula*
shidai)

佐賀 達矢

目次

| | |
|--|----|
| 第1章 総合序論 | 1 |
| 1-1. 本論文の背景 | 1 |
| 1-2. 各章の概要と目的 | 3 |
| 1-2-(1). 女王の交尾回数と生涯繁殖成功度の関係 (第2章) | 3 |
| 1-2-(2). 病気への抵抗性仮説の検証 (第3章) | 5 |
| 1-2-(3). 種内及び種間社会寄生の検証 (第4章) | 6 |
| 1-2-(4). 総合考察 (第5章) | 7 |
| 第2章 女王の交尾回数と生涯繁殖成功度の関係 | 9 |
| 2-1. 序論 | 9 |
| 2-2. 材料と方法 | 10 |
| 2-2-(1). 蜂の巣採集、飼育及び構成員の計測 | 10 |
| 2-2-(2). 遺伝解析 | 10 |
| 2-2-(3). 交尾、越冬実験 | 11 |
| 2-2-(4). データ解析 | 12 |
| 2-3. 結果 | 13 |
| 2-3-(1). 父系の数、父系の偏り、巣内の構成員の関係について | 13 |
| 2-3-(2). 越冬開始時期ごとの女王の特性 | 14 |
| 2-4. 考察 | 14 |
| 2-4-(1). 女王の交尾回数と働き蜂生産、新女王の形質について | 14 |
| 2-4-(2). 女王の交尾回数と適応度について | 16 |
| 2-4-(3). シダクロスズメバチの女王の多回交尾における進化過程 | 17 |
| 第3章 病気への抵抗性仮説の検証 | 37 |
| 3-1. 序論 | 37 |
| 3-2. 材料と方法 | 37 |
| 3-2-(1). 糸状菌の採集と維持 | 38 |
| 3-2-(2). 予備実験 | 38 |
| 3-2-(3). 蜂の父・母系による抵抗性と各菌株系統の病原性実験 | 39 |
| 3-2-(4). 遺伝的分析 | 39 |
| 3-2-(5). 統計解析 | 40 |
| 3-3. 結果 | 41 |
| 3-3-(1). 予備実験 (2014年) | 41 |
| 3-3-(2). 蜂の父・母系による抵抗性と菌株系統ごとの病原性実験 (2015年) | 42 |
| 3-4. 考察 | 43 |
| 第4章 種内及び種間社会寄生の検証 | 53 |

| | |
|---|----|
| 4-1. 序論 | 53 |
| 4-2. 材料と方法..... | 53 |
| 4-2-(1). クロスズメバチとシダクロスズメバチの分布域の調査 | 53 |
| 4-2-(2). クロスズメバチとシダクロスズメバチの社会寄生の調査..... | 54 |
| 4-3. 結果 | 54 |
| 4-3-(1). クロスズメバチとシダクロスズメバチの分布 | 54 |
| 4-3-(2). クロスズメバチとシダクロスズメバチの種内社会寄生 | 55 |
| 4-3-(3). クロスズメバチとシダクロスズメバチの種間社会寄生 | 55 |
| 4-3-(4). クロスズメバチとシダクロスズメバチの混在巣の繁殖虫生産..... | 56 |
| 4-4. 考察 | 56 |
| 第5章 総合考察 | 61 |
| 謝辞 | 67 |
| 引用文献 | 69 |

第1章 総合序論

1-1. 本論文の背景

群れ内に不妊階級が存在し、子が親を世話する真社会性昆虫の進化過程の解明は進化生物学上の大きな課題である。集団内での不妊階級の進化は、血縁者の適応度と自身の適応度を含めた包括適応度に対して自然選択が働くとした血縁選択説が理論的に提唱された (Hamilton 1964)。真社会性の進化には、巣仲間の血縁度が最も高まる一夫一妻が重要な条件であると考えられてきた (Boomsma 2007)。その後、系統学的な解析により、真社会性ハチ目の祖先種は一夫一妻の種であることが明らかにされた (Hughes et al. 2008)。一方で、アリ科の複数の亜科とミツバチ亜科、スズメバチ亜科ではそれぞれ独立に女王が多回交尾する種や多女王制の種が進化した (Hughes et al. 2008)。女王が多回交尾する種や多女王制の種は、巣仲間の血縁度が低下し、包括適応度を減少させることが考えられる (Boomsma and Ratnieks 1996)。これに加えて、動物のメスでは交尾回数の増加によるコストが知られている (Crozier and Fjerdingstad 2001)。例えば、交尾によるエネルギーの消耗 (Thornhill and Alcock 1983) や、被食される危険性の増加 (Arnqvist 1989)、性感染症の危険性の増加 (Sherman et al. 1988) が報告されている。女王が多回交尾する種の進化背景の解明は、30 年以上前から社会生物学の中心的な課題である (Starr 1979; Boomsma 2009)。

真社会性ハチ目における女王の多回交尾の進化要因については、14 仮説が提唱されている (Crozier and Fjerdingstad 2001)。その中でも、精子枯渇仮説 (Kraus et al. 2004) と性決定遺伝子座における遺伝的荷重の緩和仮説 (Page 1980)、遺伝的分業の促進仮説 (Waibel et al., 2006; Hughes et al. 2010)、病気への抵抗性仮説 (Sherman et al. 1988) は相互排反関係になく、特に検証すべきであると言われている (Crozier and Fjerdingstad 2001)。また、社会性ハチ目では親子間の子の性をめぐる対立が予測されている (Trivers and Hare 1976)。これは、半倍数性の性決定様式である社会性ハチ目では、単女王制で女王が一回交尾の場合には、働き蜂は弟に対するよりも妹に対して高い血縁度をもつため、妹をより多く育てた方が適応的である。一方、女王としては息子と娘の期待繁殖成功は同じであるため、1:1 の性比で子を産むことが適応的であり、女王と働き蜂間で子の性によって得られる適応度に非対称性が存在する。女王の多回交尾は働き蜂から見た妹への血縁度を低下させ、上記で述べた親子間の子の性比を巡る対立が緩和されることによる利益が予測されており (Ratnieks and Boomsma 1995)、これも上記の仮説と排反関係にない。これまで、上記仮説に関する様々な実証研究が行われてきたが、女王の多回交尾の進化の究極要因については未だ解明されていない。

様々な動物で、メス体内での精子競争や、メスが物理的、化学的に精子の受精率を制

御するメスの隠蔽的な選好みといった交尾後性選択がオスとメスの交配形質の進化を促進することが知られている (Andersson and Simmons 2006)。近年になって、真社会性ハチ目においても交尾後性選択が社会性進化に重要な役割を果たしたことが報告され始めた (Boomsma et al. 2005; Baer 2015)。交尾後性選択の中でもメスの隠蔽的な選好みは、精子の貯蔵時あるいは使用時に精子を操作し、巣仲間の遺伝的多様性を高める可能性がある (Crozier & Fjerdingstad 2001)。社会性ハチ目昆虫の中で特に交尾回数が多いミツバチでは、女王が受け取った精子を貯蔵する過程で父系の偏りを減少させている (Baer 2005; Schlüns et al. 2005)。また、セイヨウミツバチの女王は受精嚢に貯めた精子を特定の父系に偏らずに使用している (Page and Metcalf 1982; Sasaki et al. 1995)。社会性ハチ目昆虫では各種の女王の平均交尾回数と子の父系の偏りの平均値には負の相関があること、すなわち女王の交尾回数が多い種ほど、女王は自ら蓄えた精子を平等に用いており、巣の構成員の遺伝的多様性を高める方向へ進化していると考えられている (Jaffé et al. 2012; Loope et al. 2014)。先に述べた、病気への抵抗性仮説、遺伝的役割分業促進仮説、親子間の子の性比の対立緩和仮説はいずれも巣仲間の遺伝的多様性増加に伴う正の影響が考えられる (Kraus & Moritz 2010)。巣内の遺伝的多様性を高める方向に交尾後性選択が働いているか否かを検証するためにも、種内の女王の交尾回数と父系の偏りを調べる必要がある。

これまで、フタフシアリ亜科の *Pogonomyrmex occidentalis* (Wiernasz et al. 2004)、セイヨウミツバチ (Mattila and Seeley 2007)、スズメバチ亜科の *Vespula maculifrons* (Goodisman et al. 2007) の3種で、巣内の構成員の有効父系数と巣の規模、または巣の成長速度に正の相関があることが報告され、女王の多回交尾が適応的である可能性が示されている。有効父系数とは、女王が交尾した父系の数と偏りから計算することができ、巣内の働き蜂間の血縁度を反映した推定値である (Nielsen et al. 2003)。女王が多回交尾する種において巣内の構成員の血縁度と巣内対立について研究する際に有効父系数は非常に有益であり、しばしば使われてきた (例えば、Wenseleers & Ratnieks 2006)。一方で、有効父系数は父系の数と偏りを直接的には示しておらず、例えば、父系の数と偏りに異なる効果が考えられる際には、この推定値はあまり有効ではない (Jaffé 2014)。そのため、性選択の視点を踏まえて女王の多回交尾が適応的であるか否か調べる際には、女王の交尾回数と子の父系の偏りと女王の生涯繁殖成功度の関係を調べる必要がある。

ハキリアリの女王は20年以上 (Weber 1972)、セイヨウミツバチの女王は寿命が長い個体では8年生きる (Baer and Schmid-Hempel 2005) など、社会性昆虫の女王は複数年生きる種も多く、生涯繁殖成功度の計測は極めて困難である (Crozier and Fjerdingstad 2001)。クロスズメバチ属の蜂は単年生かつ単女王制で、女王が多回交尾する (Spradbery 1973)。春に越冬から目覚めた女王は単独で営巣し、春から秋にかけて働き蜂を、初秋からオスと新女王の生産を行う。各巣の羽化したオスと新女王は野外で交尾し、晩秋以降に創設女王と働き蜂、オスが次々と死亡し、新女王のみが越冬する。クロスズ

メバチ属の働き蜂とオスは働き蜂育房から羽化し、新女王は働き蜂育房よりも大きい女王育房から羽化する (Spradbery 1973; MacDonald and Matthews 1981)。クロスズメバチ属の研究では、働き蜂育房数や女王育房数を繁殖成功度の指標として用いて、女王の交尾回数や体サイズの変異と繁殖成功度の関係が調べられてきた (Harris & Beggs 1995; Goodisman et al. 2007)。クロスズメバチ属の働き蜂育房は複数回再利用される (Spradbery 1973; Matthews and Macdonald 1981)。筆者は、従来の育房数を繁殖成功度とする方法と比較して、より厳密に繁殖成功度を推定するために、個体が羽化した後に育房中に残る糞数から女王の生涯繁殖成功度を算出する方法を用いた。クロスズメバチ属は単年生であり、女王の繁殖成功度と交尾回数、巣内の構成員の父系の偏りの関係を調べるためには最適な材料だと考えられる。

本州の低山地から山地に分布するシダクロスズメバチは、中部日本の山間地域では食用昆虫として地元の人々が採集し、飼育する技術確立している (Nonaka 2010)。それらの伝統文化に基づく採集法や飼育法の知見を用いることによって、本種の営巣初期から営巣末期までの各時期のサンプルを得ることができる。そこで、本研究ではその技術をシダクロスズメバチに適用し、本種の女王の多回交尾が適応的であるか否か、及び交尾後性選択の可能性、多回交尾の利益仮説の検証を行った。

クロスズメバチ属の多くの種で女王単独営巣期に社会寄生の一種である同種の女王が作った巣に乗っ取ることが知られている (Greene 1991)。巣の乗っ取りによって、宿主と寄生者の働き蜂の混成巣が構成される可能性があり、これは巣内の遺伝的多様性を高める。そこで、本研究でも、シダクロスズメバチにおいて種内、及び種間で社会寄生が起こっているかどうかを検証した。

1-2. 各章の概要と目的

本研究では、多回交尾するシダクロスズメバチ女王の交尾回数と生涯繁殖成功度の関係を調べ、その結果から、女王の多回交尾が適応的な行動であるか否かを議論する (2章)。女王の多回交尾によって利益を生む要因は、主に巣仲間の遺伝的多様性増加に起因する病気への抵抗性仮説や遺伝的役割分業仮説が提唱されている。本研究では、働き蜂の父系によって病気への抵抗性の差があるか否かを検証する (3章)。巣仲間の遺伝的多様性を増加させる行動のひとつに、他の女王が作った巣の乗っ取り行動が挙げられる。そこで、本種でも社会寄生を行うか否かを検証する (4章)。上記の結果を踏まえたうえで、シダクロスズメバチの女王における多回交尾の進化過程について考察する (5章)。

1-2-(1). 女王の交尾回数と生涯繁殖成功度の関係 (第2章)

女王の多回交尾が適応的か否かを調べるために、シダクロスズメバチにおいて、女王の交尾回数と生涯繁殖成功度の関係を調べた。過去の研究では、女王の生涯繁殖成功度を算出することは難しく、女王育房数や働き蜂数が繁殖成功度の指標として用いられてきた (Goodisman et al. 2007; Loope et al. 2014)。本研究ではより厳密に女王の生涯繁殖成功度を測る手法を考案する。スズメバチ亜科の蜂は蛹化する際に巣盤の底に糞を、羽化する際には繭殻を残す。クロスズメバチ属では個体の養育のために一つの働き蜂育房が複数回利用され、1 育房から複数個体が羽化した場合には、巣盤に残される糞は複数層になる。筆者は、女王の多回交尾が適応的であるか否か検証するために、巣盤に残された糞数から新女王羽化数を算出することで、女王の生涯繁殖成功度を推定した。

社会性ハチ目昆虫は真社会性を獲得後に、女王が多回交尾する種や多女王制の種が現れ、巣内の遺伝的多様性を高める方向へ進化している (Hughes et al. 2008)。巣内の遺伝的多様性を高める方法は、女王の交尾回数を増やすこと以外にも、得られた精子を均等に使うことが考えられる (Jaffé et al. 2012)。そのため、交尾後性選択の存在も考慮しつつ、女王の多回交尾が適応的か否か理解するためには、巣内個体の父系数 (女王の交尾回数)、繁殖成功度の関係だけでなく、父系の偏りとそれらの変数の関係を調べる必要がある (Jaffé et al. 2014)。そこで、筆者は交尾後性選択の可能性を踏まえて、女王の多回交尾が適応的であるか否かについて、交尾回数と父系の偏り、生涯繁殖成功度の関係を調べ、考察する。

クロスズメバチ属の女王育房の構築開始時期は、巣によって大きく異なる (Spradbery 1973)。*Vespula maculifrons* の繁殖虫生産初期から中期においては、有効父系数が大きい女王の巣ほど有意に多くの新女王育房数が作られていた (Goodisman et al. 2007)。この結果から、交尾回数の多い女王は繁殖虫生産の開始時期が早い可能性が示唆された (Goodisman et al. 2007)。一方で、Goodisman ら (2007) の結果からは女王の交尾回数と働き蜂育房数に有意な関係は認められず、また、働き蜂数と女王育房の構築開始時期の関係についても調べられていない。そこで筆者は、女王の交尾回数と働き蜂数、女王育房の構築開始時期の関係を調査した。

女王が多回交尾する究極要因のひとつとして、精子枯渇仮説が提唱されている (Cole 1983)。この仮説では、女王がより多くの構成員をより長い期間生産し続けるために、多回交尾が進化したと考えられている。真社会性ハチ目のほとんどの女王はその生涯の一期間だけで交尾し、受け取った精子を長期間、受精嚢に保持しておく仕組みがある (Wilson 1971)。精子枯渇仮説は、ハキリアリ属のアリで実証されており、アリの女王における多回交尾の進化要因の一つであると考えられている (Fjerdingstad & Boomsma 1998)。本種においても、得られたデータから精子枯渇仮説の可能性について議論する。

スズメバチ亜科の新女王は離巣したその日に交尾をし、速やかに越冬を開始すると考えられている (松浦 1995)。シダクロスズメバチの新女王は 10 月中～下旬ころから約 1～2 か月間、次々に羽化する (松浦 1995)。これまでに筆者は、飼育下のシダクロス

ズメバチにおいて、11 月下旬以降に離巢した女王とオスが飛行せずに、巣の外を歩いている光景を何度も目撃した。私は、それらの羽化時期が遅い個体はエネルギーの損失も大きく、越冬中の生存率が低いと予測した。*V. maculifrons* では、体サイズが大きい女王ほど越冬中の生存率が高いことが示されている (Kovacs and Goodisman 2012)。そこで、筆者は女王の羽化時期と乾燥重量、脂肪量、越冬中の生存率の関係を調べた。これらの結果を踏まえて、巣内の父系と生涯繁殖成功度、新女王の形質について議論する。

1-2-(2). 病気への抵抗性仮説の検証 (第 3 章)

第 3 章では、女王の多回交尾の進化要因の一つと考えられている病気への抵抗性仮説 (Sherman et al. 1988; Kraus and Page 1998) を検証した。昆虫では遺伝子型によって病原菌への抵抗性が異なることが知られている (Cotter & Wilson 2002; Calleri et al. 2006)。病気への抵抗性仮説では、巣の構成員の母系あるいは父系によって、単一の遺伝子型の病原菌に対して異なる感受性または抵抗性をもち、反対に、病原菌側も遺伝子型によって同一宿主に対して異なる病原性をもつと考えられている (Sherman et al. 1988; Kraus and Page 1998)。女王の多回交尾によって巣仲間の遺伝的多様性が増加することは、巣規模では系統の異なる病原体への抵抗性をもつことになり、巣仲間の病気の伝染を抑制でき、巣の壊滅を防ぐ可能性がある (Sherman et al. 1988)。

病気への抵抗性仮説に関する初期の実証研究は、自然下で女王が一回交尾のセイヨウオオマルハナバチを用いて行われた。セイヨウオオマルハナバチの女王に対して複数の父系の精子を人工受精させた巣では、構成員間の腸内寄生原虫の伝染が、遺伝的に単一の構成員でできた巣よりも抑えられた (Baer and Schmid-Hempel 2001)。また、セイヨウオオマルハナバチでは異なる父系によって病原性原虫に対する感受性に差があることも明らかになった (Baer and Schmid-Hempel 2003)。その後、自然下でも女王が多回交尾するセイヨウミツバチにおいて構成員の遺伝的多様性が高い巣ほど、多様性が低い巣と比較して病原菌に対する抵抗性が高いことが明らかにされた (セイヨウミツバチ; Seeley and Tarpay 2007)。同様の結果は、女王が多回交尾するフタフシアリ亜科の *Acromyrmex echinator* でも認められ、さらに、父系によって病原菌への抵抗性の差があることも明らかにされた (Hughes & Boomsma 2004)。

病気への抵抗性仮説は、これまでに提唱されている多回交尾の利益仮説の中でも、最も検証されている仮説の一つである。真社会性ハチの女王の進化過程を考える上では、独立に女王の多回交尾が進化した分類群で、本仮説を検証することは非常に意義深い。さらに、病気への抵抗性仮説を検証するためには、宿主の遺伝子型の違いに基づく病原菌や寄生虫への抵抗性の差異だけでなく、病原菌や寄生虫の遺伝子型によっても、宿主への病原性が異なることを示す必要があるが、実際に両方が示されている例は少ない (Lee et al. 2013)。本研究ではシダクロスズメバチの複数の母系と父系の個体を昆虫病

原性糸状菌の *Beauveria bassiana* の複数の菌株に感染させる実験を行い、本仮説を検証する。

巣仲間の遺伝的多様性を高めるためには、女王の交尾回数を増やすことと、父系の偏りを小さくすることが考えられるが、継続的に巣仲間の遺伝的多様性を維持するためには、日によって生まれる子の父系がばらつく（偏らない）ことが考えられる。Eberhard (1996) は、昆虫のメスは精子を体内に取り入れた後に操作でき、メスの隠蔽的選好みが働く余地があると指摘している。社会性昆虫でも、形態的構造や生理機構からメスの隠蔽的選好みの存在が示唆されている (Bear 2015)。本研究では、羽化する働き蜂の父系の組合せが日によって異なるか、ランダムであるか調査した。

1-2-(3). 種内及び種間社会寄生の検証（第4章）

第4章では、シダクロスズメバチが同種あるいは他種へ社会寄生を行うかどうかを検証した。サムライアリの奴隷狩りなど、動物社会には動物間の協力関係をうまく利用し、その労力を搾取する行動が知られており (Hölldobler and Wilson 1990)、これは社会寄生と呼ばれる。社会性狩り蜂の多くの種では社会寄生を行うことが知られている (松浦・山根 1984, Röseler 1991)。社会寄生は以下の4種類に大別される (Taylor 1939)。(1) 種内の条件的一時的寄生：女王が条件に応じて同種の他の女王が作った巣に侵入して宿主の女王を殺し、居座ってその巣の働き蜂の労働力を搾取し、自身の働き蜂と繁殖虫を生産する。(2) 種間の条件的一時的寄生：異種間で行われる点以外は種内の条件的一時的寄生と同じである。(3) 種間の絶対的一時的寄生：他種に必ず寄生し、自ら働き蜂も繁殖虫も生産する。(4) 種間の絶対的永久的寄生：必ず他種に寄生し、自らは働き蜂を生産せず、繁殖虫のみを生産する。

スズメバチ亜科の種内及び種間社会寄生の利益は、もっぱら巣などの構造物の二次的利用と宿主の労働力を得ることが考えられてきたが、巣内の遺伝的多様性を高める効果もあると推察された。また、クロスズメバチ属の多くの種では種内の条件的一時的寄生を行うことが知られている (Matthews & Matthews 1979; Greene 1991)。そこで、本種でも種内の社会寄生が起こっているか調べた。

ハチ目の社会寄生については、19世紀から研究者によって観察されてきた (Huber 1810, Darwin 1859)。しかし、どのように寄生者と宿主が進化するのかといった、社会寄生の進化過程は未だに解明されていない。現在、社会寄生の進化仮説としては2つの仮説が有力である (Lopez-Orsorio et al. 2015)。一つは種内仮説と呼ばれ、寄生者が宿主から直接種分化することが考えられている (Buschinger 1986, 1990)。種内仮説では種内寄生が、将来の寄生者と宿主になる系統の繁殖隔離を通じて、同所的種分化を生じさせたと考えられている。種内寄生をする裏切り系統が分散せずに近親交配を行い、裏切り行為をしない宿主系統が分散して外交配することがあれば、分断選択によって、上記の

繁殖隔離は起こりうると考えられている (Rabeling et al. 2014; Boomsma & Nash 2014)。社会寄生の進化仮説のもう一方は種間仮説と呼ばれ、種分化後に 2 種が同所的に生息し、片方の種が寄生者に、もう片方が宿主になると考えられている (Wilson 1971, Starr 1979)。種間仮説を考えるうえでは、Wilson (1971) は寄生者の祖先種が種内寄生する形質は必須ではないと述べ、Starr (1979) は寄生者の祖先種が種内寄生をすることが前適応的に働き、将来の寄生者と宿主が同所的に生息した場合に、種間寄生が起こると述べている。ここで注意すべきは、種内寄生するからといって種内仮説が支持されるわけではなく、種内仮説と種間仮説どちらでも、種内寄生が前適応的に働く可能性があることである。

近年、分子系統解析の研究によって種内仮説を支持する結果が示された (Rabeling et al. 2014)。一方、これまでに種間仮説の直接的な証拠は示されていない。種間仮説を支持するためには、近縁な 2 種が同所的に生息する地域では種間寄生し、単独個体群では独立して生息するような例を発見することが必要である (Berlocher 2003; Buschinger 2009)。

本州に生息するシダクロスズメバチは中山地に分布し、平野から低山地に分布する姉妹種のクロスズメバチ (両種の系統関係については Perrard et al. 2015 を参照) と低山地で分布域が重複する (松浦 1995)。筆者は、2 種の分布が重複する地域で、どちらか片方の種からの社会寄生が明らかになれば、種間仮説を支持する証拠になると考えた。そのため、本種でも種内および種間での社会寄生が起こっているかを調査した。

1-2-(4). 総合考察 (第 5 章)

社会性ハチ目昆虫の女王における多回交尾の進化背景の研究は、血縁選択説の残された課題として多くの研究者によって取り組まれてきた (Palmer and Oldroyd 2000; Crozier and Fjerdingstad 2001; Boomsma 2009; Kraus and Moritz 2010)。本研究では、シダクロスズメバチでは巣内の父系の数が多い巣、つまり、働き蜂の遺伝的多様性が高い巣ほど繁殖成功度が高いことを明らかにし、女王の多回交尾が適応的であることを示した (第 2 章)。本研究でスズメバチ亜科では初めて、病気に対する抵抗性仮説を実証し、遺伝的多様性を高めることが巣内の構成員の生存に対して正の影響を与える一要因を解明した。また、働き蜂の父系と羽化時期に有意な関係は認められず、働き蜂は特定の父系に偏らずに生産されていた (第 3 章)。このことは、異なる父系の働き蜂が次々に生産され、巣内の働き蜂の遺伝的多様性を維持する効果があると考えられる。さらに、本種では同種および他種への社会寄生を行い、宿主の働き蜂を利用する事も確認した (第 4 章)。宿主と寄生者の働き蜂が混在して巣を構成することは、巣内の遺伝的多様性を高めることになる。高い血縁度が真社会性の進化を駆動したと考えられているが (Hamilton 1964)、本種では巣仲間の血縁度を下げ、遺伝的多様性を高める女王の多回交

尾、種内及び種間社会寄生が認められ、その進化背景を総合的に議論する。

本種では、巣内の父系の数と、父系の偏りには有意な相関は認められなかった。一方、繁殖初期では、父系の数が大きく、父系の偏りが小さい巣は労働力である働き蜂の生産数が多いという結果から、父系の偏りを小さくできる女王は適応的であると考えられた。社会性ハチ目の女王が特定の父系の精子を偏って利用したり、反対に、様々な父系の精子を利用したりすることが知られている (Baer 2015)。シダクロスズメバチの女王の多回交尾の進化背景には、交尾後性選択、特に隠蔽的選好み (メスによる体内での精子選好み) が働いている可能性が考えられる。これまで、社会性進化に関する研究の大部分は血縁選択に注目して進められてきたが (Boomsma 2007; Baer 2015)、女王の多回交尾の進化過程を解明するには性選択の研究が不可欠であると考え、今後の展望を考察する。

第2章 女王の交尾回数と生涯繁殖成功度の関係

2-1. 序論

女王の多回交尾が独立に進化したフタフシアリ亜科、ミツバチ亜科、スズメバチ亜科の種では、女王の有効父系数（女王の交尾相手の数を、生まれた子の各父系の割合で重みづけした値）が多い巣ほど、営巣途中の巣の規模や成長速度が大きいことが報告されており、女王の多回交尾が適応的である可能性が示唆されている（Wiernasz et al. 2004; Goodisman et al. 2007; Seeley & Tarpay 2007）。一方、この結果は交尾回数が多い女王は寿命の早い段階で繁殖に投資する生活史戦略の違いから生じている可能性も考えられる。女王の多回交尾が適応的であるか否かを調べるためには、女王の生涯繁殖成功度を調べる必要がある。多回交尾する女王は、自らが得た各父系の精子を平等に用いて、巣仲間の遺伝的多様性を高める交尾後性選択の存在も近年指摘されている（Jaffé et al. 2012; Baer 2015）。

クロスズメバチ属は、働き蜂とオスは働き蜂育房から、新女王は働き蜂育房よりも大きい新女王育房から羽化することが知られている（Spradbery 1973）。筆者は、クロスズメバチ属の種では個体が蛹化する際に糞を育房に残すことから、巣盤中の糞の数から蛹化数を推定することができ、これを繁殖成功度にできると考えた。そして、女王の交尾回数と父系の偏り、生涯繁殖成功度の関係を調べ、女王の多回交尾が適応的か否かと、交尾後性選択の可能性を調査した。

女王の多回交尾の進化要因は、遺伝的多様性の増加に由来するもの以外に、精子枯渇仮説が提唱されている（Cole 1983）。精子枯渇仮説の前提条件として、女王は利用可能な精子をすべて使い切ることと、オスの精子数に変異があることが考えられている（Jaffé et al. 2012）。Jaffé ら(2012) は、この仮説の下ではメス生産数が多い女王は精子数が異なる多くのオスと交尾をするため、生まれる子の父系に偏りがあると予測している。本種の新女王生産数と父系の数、偏りの関係から精子枯渇説が成立するか議論する。

クロスズメバチ属の新女王育房の構築開始時期は、巣によって異なることが知られている（Spradbery 1973）。また、交尾回数が多い女王の巣は、営巣途中の段階では、交尾回数が少ない女王の巣より多くの新女王育房を作っていたことから、新女王の生産開始時期が早い可能性が示唆されている（Goodisman et al. 2007）。シダクロスズメバチでは新女王は、1～2 か月間にわたって生産されるが（松浦 1995）、時期が遅くなればなるほど、餌資源が乏しく、かつ、気温も下がるため新女王の生存には不利になると考えられる。そこで、本研究では羽化時期によって越冬中の生存率及び体重、脂

肪量に差があるか否か調査し、女王の羽化時期と越冬中、越冬後の生存について議論する。

2-2. 材料と方法

2-2-(1). 蜂の巣採集、飼育及び構成員の計測

2014 年 6、7 月に岐阜県下呂市金山町（金山個体群）と長野県松本市（松本個体群）でシダクロスズメバチの巣を 10 巣ずつ、2015 年 7 月に長野県富士見町（富士見個体群）で 5 巣採集した。採集した巣は全て木製の飼育箱（30×30×60 cm, 図 2-1）に入れ、採集した市内または町内で巣の解散時期の直前まで飼育した。金山個体群と松本個体群は、父系の数と父系の偏り、巣内の構成員数の関係を調査するために用い、富士見個体群は交尾・越冬実験に用いた。飼育期間中は、30%ショ糖溶液とニワトリの心臓と肝臓をほぼ毎日、蜂が食べきれない量を与えた。また、蜂の採餌行動は制限せず、与えた餌以外の餌も巣に持ち帰っていた。金山個体群の 4 巣は、理由は分からないが、飼育途中で巣が解散した。飼育している巣とは別に、2014 年 10 月 11、12、14 日に岐阜県下呂市萩原町にて野外の巣を働き蜂と共に 11 巣採集した（萩原個体群）。これは繁殖初期巣と名付けた。回収した全ての働き蜂は-30℃で保存した。2014 年 11 月 28 日に金山個体群、11 月 29 日に松本個体群の巣の飼育を中止して巣と働き蜂を回収し、働き蜂は父系解析に用いた。飼育した 16 巣は繁殖終了巣と名付けた。飼育していた富士見個体群の 5 巣は、交尾・越冬実験を行うために 2015 年 11 月 5 日にそれまでの飼育場所から 300m 離れた場所にある屋根にビニール、側面にポリエチレンの網を張った建屋（3.6×7×2.1 m）内に移動させた。

本研究では、20 平方ミリメートル未満の育房を働き蜂育房とし、20 平方ミリメートル以上の育房を女王育房とした。巣の働き蜂育房と女王育房の数は、各巣盤の面積を平均育房面積で割って推定した。各巣盤の写真からソフトウェア ImageJ (version 1.48; NIH, Bethesda, MD, USA <http://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて、巣盤 1 枚につき無作為に選んだ 10 育房の面積を測り、平均育房面積を算出した。蛹化した働き蜂とオスの数は働き蜂育房中の糞数から、蛹化した新女王数は新女王育房の糞数から推定した（図 2-1b）。複数層の糞を観察した場合には、1 層が 1 個体蛹化したことを示すとした（図 2-1c）。予備実験により、巣盤 1 枚当たり 100 育房の糞数を数えると 1 育房中の糞数の標準誤差が 0.05 程度になるため（補足資料を参照）、巣盤 1 枚ごとに 100 育房中の糞数を数え、1 育房中の平均糞数を計算し、各巣盤の合計糞数を推定した。

2-2-(2). 遺伝解析

働き蜂の DNA を抽出するために、成虫の触角を 5%Chelex 溶液 (Chelex 100, Bio-Rad) 30 ul とプロテナーゼ K 溶液 (20mg/ml, Takara Bio) 0.5ul の混合液中で破碎して、56°C で 24 時間維持した後 95°C で 3 分静置した。DNA が含まれる混合液の上澄み 5ul は、Tris-EDTA 緩衝液 (10mM Tris, 1mM EDTA, Takara Bio) 45ul と混合し、-20°C で冷凍保存した。それぞれの巣ごとに、平均 38.64 ± 9.11 (S.D.) 個体の働き蜂の遺伝型特定を行った。遺伝子型特定のため、父系解析に適用できるマイクロサテライト領域 6 遺伝子座 (List2001, List 2003, List2004, List2020, VMA-3, VMA-6, 補足資料参照) を用いて Multiplex PCR を行った (Daly et al. 2002, Hasegawa and Takahashi 2002)。6 遺伝子座のフォワードプライマーには M13 配列のいずれか (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'、5'-TGTGGAATTGTGAGCGG-3'、5'-CTATAGGGCACGCGTGGT-3') を付加し、リバープライマーには PIG-tail 配列 (5'-GTTTCTT-3') を付加した。PCR 反応は QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) のプロトコルに基づいて行った。反応液は、DNA を 0.5ng、2×Multiplex PCR Master Mix を 5ul、フォワードプライマーを 0.01uM、リバープライマーを 0.2uM、蛍光付 M13 プライマー 0.1uM、滅菌蒸留水を混合し、全量は 10ul とした。PCR の温度条件は、95°C で 15 分間維持した後に、95°C で 30 秒、50°C で 90 秒、72°C で 60 秒維持することを 35 回繰り返し、最後に 30 分間 60°C で維持した。PCR 生成物は DNA Size Standard 400 (Beckman Coulter, Brea, California, USA) と共に GenomeLab GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter) で泳動し、遺伝子型は CEQ Fragment Analysis Software (Beckman Coulter) で決定した。

ソフトウェア Colony2 v2.0.6.1 (Jones and Wang 2010) を使用して、働き蜂の遺伝子型から最尤法によって、働き蜂の母系遺伝子型と父系遺伝子型を推定した。2 つ以上の遺伝子座が増幅できなかった働き蜂は分析から除外した。巣仲間と異なる女王由来の遺伝子型の働き蜂が検出された場合、その巣の女王の推定遺伝子型と照合した。その後、その働き蜂が女王と同じ遺伝子型である場合には、同母系の姉妹であると判断し、異なる遺伝子型の場合には、データセットから取り除き、再度分析を行った。母系遺伝子型と父系遺伝子型の推定後、観察父系数 (k_{obs}) と有効父系数 (m_e) を推定した (Nielsen et al. 2003 を参照)。また、女王が持つ各父親の精子の相対的な使用頻度の差を反映した父系の偏り (S) については、Crozier and Pamilo (1996) で提唱されている $S = (k_{obs} - m_e) / (k_{obs} - 1)$ により推定した。

2-2-(3). 交尾、越冬実験

富士見町個体群の飼育巣を 2015 年 11 月 5 日から 12 月 13 日の間、ビニールハウスに運び入れて飼育した。ハウス内ではほぼ毎日、30%砂糖水と、ニワトリの心臓と肝臓を与えた。上記の期間、ハウス内では当年に羽化した女王とオスを自由に交尾させ、軒部分に敷き詰めた新聞紙内で自由に越冬できるようにした。期間中、ほぼ毎日、新聞紙内

で越冬態勢をしている女王を確認し、合計で 27260 個体の越冬女王を回収した (越冬態勢については Spradbery 1973 を参照)。回収した女王は 4°C の保冷库内に静置し、翌春まで越冬させた。2016 年 3 月 28 日から 4 月 23 日の間に、前年から越冬している女王の生死を調査した。2016 年 4 月 10 日には 2015 年 11 月 9 日、24 日、12 月 1 日に越冬を開始した女王の生死判別に加えて、乾燥重量と脂肪量を測定した。乾燥重量は 80°C で 72 時間乾燥させた後に 0.1mg まで測定した (初期乾燥重量)。その後、クロロホルムとメタノール (2:1) 混合液に 36 時間液浸し、脂肪を取り除いた (Barnes and Blackstock 1973 参照)。脂肪を取り除いた虫体を再度 80°C で 72 時間乾燥させ、乾燥重量を測り、初期乾燥重量との差を脂肪量とした。

2-2-(4). データ解析

シダクロスズメバチの繁殖初期巣 11 巣及び繁殖終了巣 16 巣の構成員数や父系の数、父系の偏りは表 2-1,2-2 に示した。女王の多回交尾が適応的であるか評価するために、父系の数と偏り、巣内の構成員の関係について統計解析を行った。女王の交尾回数を示す指標である父系の数 (k_{obs}) がポアソン分布から有意に異なるか否かを調べるために、モンテカルロシミュレーションを用いた正確 χ^2 検定を行った。なお、人工的な X^2 値の頻度分布は父系の数の分布を 10 万回繰り返して作成した。次に、父系の数 (k_{obs}) と父系の偏り (S) に有意な関係があるか調べるために、父系の数を説明変数とし、父系の偏りを応答変数としてポアソン回帰分析を行った。

繁殖初期巣と繁殖終了巣の働き蜂育房中、女王育房中の糞数の確率分布は、いずれも負の二項分布であった (補足資料参照)。繁殖初期巣と繁殖終了巣の働き蜂育房と女王育房について、育房数と育房中の糞数の関係を調べるために、説明変数に育房数、応答変数に育房中の糞数を用いた負の二項回帰分析を行った (表 2-3)。

繁殖初期巣と繁殖終了巣において、父系の数 (女王の交尾回数) や父系の偏りによって、働き蜂生産数や新女王生産数、総生産個体数が有意に異なるか否かについて調べるために、表 2-4,2-5a-c に示した応答変数と説明変数、各説明変数の交互作用に関して一般化線形モデル (GLM) による負の二項回帰分析を行った。

シダクロスズメバチの越冬中の生存率が越冬開始時期によって異なるか、表 2-6a に示した応答変数、説明変数、ランダム効果を用いて、一般化線形モデル (GLM) によるポアソン回帰分析を行った。日によって、越冬開始した個体数にばらつきがあったため、GLM の offset 項に \log (総越冬個体数) を加えた。次に、越冬後の個体の乾燥重量と脂肪量の相関を調べるために、Spearman の相関検定を行った。また、越冬開始時期や、越冬中の女王の生死によって、乾燥重量と脂肪量に差があるか、表 2-6b に示した応答変数と説明変数、各説明変数の交互作用について恒等リンクの重回帰分析を行った。以上の解析において、複数の説明変数が存在する場合には、各説明変数と各説明変数の交互

作用の組み合わせごとにモデルを作成し、赤池情報量規準 (Akaike's Information Criteria, 以下, AIC) を用いてモデルを選択した。以上のデータ解析はソフトウェア R 3.2.4 を用いて行った。

2-3. 結果

2-3-(1). 父系の数、父系の偏り、巣内の構成員の関係について

本研究に用いた 6 つのマイクロサテライトマーカーは多型性が認められた。連鎖不平衡及び Hardy-Weinberg 平衡からの有意な逸脱は認められなかった (連鎖不平衡 $p > 0.05$, Hardy-Weinberg 平衡, Sequential Bonferroni 補正後 $p > 0.05$ 補足資料参照)。また、ヌルアリの頻度は 0.05 以下だった。繁殖初期巣と繁殖終了巣のすべての個体群において、2 個体のオスが同一遺伝子型を示す確率は極めて低かった (< 0.0001 , nondetection error)。上記の結果は、本研究で用いた遺伝子マーカーを父系解析に適用できることを意味している (Boomsma and Ratnieks 1996)。

繁殖初期巣と繁殖終了巣の構成員数や父系の数、父系の偏りは表 2-1, 2-2 に示した。本研究で調査した 27 巣の父系数は (k_{obs}) 3 から 8 で、平均 5.26 ± 1.34 (S.D.) であり、有効父系数 (me) は 2.30 から 7.12 で、平均 3.92 ± 1.31 (S.D.) だった。父系の偏り (S) は 0.02 から 0.66 であり、平均は 0.317 ± 0.18 (S.D.) だった。本研究で用いた 27 巣の父系の数の分布はモンテカルロシミュレーションの正確 χ^2 検定の結果、ポアソン分布と有意に異なることは認められなかった (X^2 値 = 9.4432, $p = 0.4648$)。父系数と父系の偏りに有意な関係は認められなかった (ポアソン回帰分析: $n = 27$, $p = 0.383$)。繁殖初期巣および繁殖終了巣において、働き蜂育房数が多い巣ほど働き蜂育房中の糞数も多く、女王育房数が多い巣ほど女王育房中の糞数も多かった (表 2-3)。

繁殖初期巣の WG5 と WG11、WG12、WG13 では新女王成虫を、WG1 と WG5、WG10、WG11、WG12、WG13 ではオス成虫をそれぞれ 10 個体以上観察した (表 2-1)。繁殖初期巣では、父系の数が多く、父系の偏りが小さい巣ほど働き蜂育房中の糞数が有意に多かった (表 2-4, 図 2-2a)。繁殖初期巣では、働き蜂育房中の糞数と父系の数、父系の偏りに連関が認められたため、それらの変数を説明変数から取り除き、応答変数として女王育房中の糞数、説明変数として働き蜂育房中の糞数として両者の関係を負の二項回帰を用いて解析した。その結果、働き蜂育房中の糞数が多い巣ほど有意に女王育房中の糞数が多かった (表 2-4, 図 2-2b)。

2014 年 10 月 30 日に金山個体群、2014 年 11 月 5 日に松本個体群のすべての飼育巣から新女王とオスが離巣していることを観察した。働き蜂育房 1 個当たりの蛹化回数は平均 1.301 ± 0.237 (S.D.) であり、最少蛹化回数は 0 回、最多蛹化回数は 3 回だった。女王育房 1 個当たりの蛹化回数は平均 0.795 ± 0.087 (S.D.) であり、最少蛹化回数は 0 回、最

多蛹化回数は1回だった。

繁殖終了巣では、金山個体群と松本個体群に分けた場合と両個体群を合わせた場合(金山・松本合算群)で解析を行った。両個体群のそれぞれと金山・松本合算群にも、働き蜂育房中の糞数は父系の数と父系の偏り、それらの交互作用と有意な関係が認められなかった(表 2-5a-c)。金山個体群では女王育房中の糞数に対して父系の数に有意な正の効果が認められた(表 2-5a, 図 2-3a)。松本個体群と金山・松本合算群では、女王育房中の糞数に対して父系の数と父系の偏り、働き蜂育房中の糞数が有意な正の効果を示し、父系の数と父系の偏りの交互作用は有意な負の効果を示した(表 2-5b, c)。金山個体群と松本個体群、金山・松本個体群のすべてにおいて、総糞数は父系の数と父系の偏りと有意な関係が認められなかった(表 2-5a-c)。

2-3-(2). 越冬開始時期ごとの女王の特性

シダクロスズメバチの越冬中の生存率が越冬開始時期によって異なるか、一般化線形混合モデルを用いて、ポアソン回帰分析を行った結果、越冬時期が早い個体ほど、越冬時期が遅い個体よりも越冬期間中の生存率が有意に高かった(表 2-4, 図 2-4)。

乾燥重量と脂肪量の関係を調べるために、Spearman の相関検定を行った結果、越冬女王の脂肪量は体重と強い相関を示した(Spearman の相関検定: $n = 104$, $p < 0.001$, $r = 0.7909$)。次に、越冬中の生死、あるいは越冬開始時期によって乾燥重量と脂肪量に差があるか調べるために、恒等リンクの重回帰分析を行った。越冬開始時期が早い、または生存した女王の乾燥重量は、越冬時期が遅い、または死亡した女王の乾燥重量よりも有意に重かった(表 2-6b, 図 2-5a)。越冬後に生存していた女王は死亡していた女王よりも脂肪量が有意に多かった(表 2-6b, 図 2-5b)。さらに、越冬時期が早い女王は遅い女王と比較して、越冬後の脂肪量が多い傾向が認められた(表 2-6b, 図 2-5b)。

2-4. 考察

働き蜂育房中の糞数は、働き蜂あるいはオスの蛹化数を示すが、時期を考慮すると、繁殖初期巣の働き蜂育房中の糞数は主に働き蜂の蛹化数を示していると考えた。*Vesupula maculifrons* では、女王育房からオスが生まれる割合は5%程度であると報告されている(MacDonald and Matthews 1981)。そのため、本種でも繁殖初期巣と繁殖終了巣の女王育房中の糞数の大部分は女王の蛹化数を示していると考えた。本研究では、蛹化した働き蜂とオス、新女王は羽化したものとした。

2-4-(1). 女王の交尾回数と働き蜂生産、新女王の形質について

繁殖初期巣では、父系の数が多く、父系の偏りが小さい巣ほど働き蜂羽化数が多いことを明らかにした (表 2-4, 図 2-2a)。さらに、働き蜂羽化数が多い巣ほど新女王羽化数も多く、労働力である働き蜂数が繁殖虫生産に直接的に影響することが示唆された (表 2-4, 図 2-2b)。父系の数が多く、父系の偏りが小さいほど、巣仲間の遺伝的多様性は高くなる。巣仲間の遺伝的多様性が高まることで、働き蜂の分業が効率化や、巣規模での病気に対する抵抗性が増加することが考えられており (例えば, Evison and Hughes 2011; Reber et al. 2008)、本種では、この遺伝的多様性に基づく利益が働き蜂の数に正の効果をもたらしている可能性が考えられた。

繁殖初期巣では、働き蜂羽化数が多い巣ほど新女王の発生段階が進んでおり、同じ時期でも多数の働き蜂が羽化していた巣では新女王が既に羽化しており (表 2-1, WG5, WG11, WG12, WG13)、働き蜂羽化数が繁殖虫生産開始時期と関係していると考えられた (図 2-2b)。ただし、本研究では女王生産を始める要因が、巣内に一定数の働き蜂が存在することか、あるいは、女王が一定数の働き蜂を産卵したことに基づくのかは結論付けられなかった。この点は、巣内の働き蜂を間引いて、巣内の働き蜂の数を操作する実験を行うことで、明らかにできると考えられる。

スズメバチ亜科の新女王は、離巣したその日に交尾を行い、速やかに越冬に入ると考えられている (松浦 1995)。そのため、本研究の交尾・越冬実験では、新女王の羽化日と越冬開始日には相関があると考えている。早期に越冬を開始した新女王は、遅くに越冬を開始した女王よりも乾燥重量が重く、また、越冬中の生存率も高かった (表 2-6a, b, 図 2-4, 2-5a)。越冬明けの女王の脂肪量は越冬開始時期によって有意な差は認められなかったが、越冬後生存した女王の方が死亡した女王よりも脂肪量は有意に多かった (表 2-6b, 図 2-5b)。この結果はクロスズメバチ属やマルハナバチ属では女王の体サイズが大きいほど越冬に成功しやすいこと (Kovacs & Goodisman 2012; Beekman et al. 1998)、越冬の成功には脂肪量が重要であるという過去の研究結果 (Spradbery 1973; Harris and Beggs 1995) を支持した。

キオビクロスズメバチでは、働き蜂の採餌行動の頻度が高い巣ほど、大きな女王が生産されている (Harris and Beggs 1995)。スズメバチ亜科の新女王は、羽化後しばらく巣にとどまり、巣仲間から栄養を補給してから離巣する。羽化直後に比べ、離巣時の新女王の生体重は 20-30% 増加し、羽化後から離巣するまでの間に主に脂肪を蓄えていると考えられている (松浦 1995)。本研究では、ビニールハウス内に飼育巣を移動させた後にも、十分量の餌を与え続けていたが、11 月中旬から明らかに働き蜂の採餌行動の頻度が低下したことを観察した。また、11 月中旬以降、自然下ではシダクロスズメバチの餌となる生物も少なくなっていると考えられる。このことから、繁殖虫生産期の早い時期に生産される新女王には十分な栄養が与えられ、遅い時期に生産される新女王には十分な栄養が与えられていない可能性が考えられる。これに加えて、遺伝的多様性が高い巣は働き蜂の数が多かったため、より多くの餌を巣に持ち帰っている可能性もあり、新女

王の幼虫期だけでなく、羽化後の栄養条件も優れているかもしれない。女王が単独で営巣を始める社会性昆虫では、女王の体サイズが営巣成功と相関していることも報告されている (Keller 1993; Heinze and Tsuji 1995)。以上の結果をまとめると、父系の数が多く、父系の偏りが小さい巣は、働き蜂生産数が多く、早い時期から新女王生産を開始していた。また、早い時期に生産された新女王は乾燥重量も重く、越冬中の生存率も高かった。交尾回数の多い女王は生存率の高い新女王を生産できるという点から適応的であると考えられた。

2-4-(2). 女王の交尾回数と適応度について

繁殖終了巣の金山個体群では父系の数が多い巣ほど、有意に多くの新女王を生産できていた (表 2-5a, 図 2-3a)。松本個体群と金山・松本合算群では、新女王生産数に対して、父系の数、父系の偏り、働き蜂育房中の糞数には有意な正の効果が認められ、父系の数と父系の偏りの交互作用には負の効果が認められた (表 2-5b, c)。以上のことから、女王の交尾回数が多いほど、生涯繁殖成功度 (新女王生産数) が高くなることが明らかとなった。また、松本個体群、金山・松本個体群で認められた上記の交互作用による負の効果は、父系の偏りが小さいほど、父系の数が増えた場合に新女王の数が増え、反対に父系の偏りが大きいと、父系の数が増えた場合に新女王の数が増えにくいことを示す。以上のことから、松本個体群、金山・松本個体群では新女王の生産数に対して父系の偏りによる有意な正の効果があつたが、その効果は小さく、父系の数による効果の方が大きいと考えられた (図 2-3b)。女王の交尾回数が増えることは直接的に巣仲間の遺伝的多様性を増やすため、巣仲間の遺伝的多様性が高いほど巣全体の繁殖成功度が高まる可能性が示唆された。

10 月中旬に採集した繁殖初期巣では、父系の数が多く、父系の偏りが少ない巣ほど、より多くの働き蜂を生産していた (表 2-4)。シダクロスズメバチは 10 月からオスと新女王の生産を開始する (松浦 1995)。そのため、10 月中旬以降の働き蜂育房からはもっぱら働き蜂は生産されず、オスが生産されたと考えられる。11 月末に回収した繁殖終了巣では、働き蜂育房中の糞数 (働き蜂とオス数) と、父系の数、父系の偏りに有意な関係は認められなかった (表 2-5a-c)。以上のことから、オス数は、父系の数と父系の偏りと有意な相関がないと考えられる。一方で、女王の交尾回数が多い巣ほど女王生産数が多く、新女王の生産数に対して、父系の数と父系の偏りの交互作用が負の効果をもつことから、巣内の遺伝的多様性が高い巣ほど新女王生産が多いことを示している (表 2-5b, c)。適応的な性比理論では、働き蜂が性比を調整できるとすると、働き蜂間の血縁度が個体群の平均血縁度よりも低い場合には、オスに偏った性比になることが予測されている (Boomsma and Grafen 1991; Ratnieks and Boomsma 1995)。ところが、本研究結果からは、遺伝的多様性が高い巣、つまり、巣内の働き蜂間の血縁度が低い巣ほど、性比がメ

スに偏っていることが推察される。血縁度に基づかない性比の変動の事例としては、女王の越冬中の状態によって性比の転換点が左右される現象がマルハナバチで (Duchateau et al. 2004) 、働き蜂のオス産卵の開始時期によって性比が変動する例がアシナガバチで知られている (Tsuchida et al. 2003) 。シダクロスズメバチには血縁選択を基にした適応的な性比理論が適応されない可能性が示唆されているが、本研究で用いた働き蜂育房中の糞数からは働き蜂数とオス数を分けて計数できておらず、結論を出すにはさらなる調査が必要である。

2-4-(3). シダクロスズメバチの女王の多回交尾における進化過程

Jaffé ら (2012) は、真社会性ハチ目において、種ごとの巣の平均規模 (平均働き蜂(蟻)数) と平均父系数に正の相関があることを明らかにした。また、種ごとの父系の数と父系の偏りに負の相関があることを示した。これは交尾回数が多い種ほど、巣内の遺伝的多様性を増す方向に選択がかかっている可能性を示唆している。本研究では、種内の父系の数と父系の偏りに有意な相関は認められなかった。一方で、遺伝的多様性が高い巣ほど繁殖初期までに生産する働き蜂数は多く、繁殖終了期では新女王生産数が多かった。以上の結果は、遺伝的多様性が高まることの利益仮説 (Crozier and Fjerdingstad 2001) を支持した。

精子枯渇説は、より多くの精子を保持するために女王の多回交尾が進化したという仮説である (Cole 1983) 。筆者は、精子枯渇仮説の下では、女王が得たすべての精子はメス生産のために使い切られるため、シダクロスズメバチの場合には、働き蜂生産後に生産される新女王数が女王の保持する精子数を示す指標になると考えた。Jaffé ら (2012) は、精子枯渇仮説の仮定 (オスの射精一回あたりの精子数はばらつき、女王は全ての精子を使い切る) の下では、メスが交尾した各オスの精子数の頻度に応じて、子が作られると考え、精子枯渇仮説が正しければ、真社会性ハチ目ではメス生産数が多い巣ほど父系の数が多く、かつ、父系の偏りが生じると予測した。本研究の結果からは、父系の数が多い巣ほど多くの新女王を生産しており、これは Jaffé らの精子枯渇仮説の予測に当てはまる(表 2-5, 図 2-3a, b)。さらに、新女王生産数に対して父系の偏りは正の効果があり、この結果も Jaffé ら (2012) の予測に当てはまった (表 2-5) 。一方で、新女王生産数に対する父系の数と父系の偏りに負の交互作用が認められたことは、Jaffé らの予測と合わない。上記の結果からは、本研究では精子枯渇仮説を支持することはできなかったが、父系の数と父系の偏り、メスの生産数の関係だけからは積極的に精子枯渇仮説を棄却することはできないと考えられる。その理由として、精子枯渇仮説はオスの一回の射精に含まれる精子数のばらつきによって、メス生産数と父系の数、父系の偏りの関係が変わると考えられる。今後、精子枯渇仮説の検証を進めるためには、オスの一回当たりの射精に含まれる精子数を計測すること、繁殖終了時期の創設女王では受精嚢内の精

子が枯渇しているか否か、また、創設開始直後の女王が十分な精子数を保持しているか調べる必要があるだろう。

繁殖初期では、父系の数、父系の偏りが小さい巣ほど、働き蜂生産数が多かったことから、各父系の精子を平等に使う創設女王が適応的であるとも考えられた (表 2-4a, b, 図 2-5)。社会性ハチ目においても、精子競争およびメスによる隠蔽的選好みによる交尾後性選択が起こっている可能性がある (Boomsma et al. 2005)。セイヨウミツバチではメスが精子の貯蔵過程で精子を操作し、父系の偏りを減少させている (Boomsma et al. 2005; Schlüns et al. 2005)。さらに、女王が保持した精子を操作するメスによる隠蔽的選好みは巣内の構成員の遺伝的多様性を増加させる働きがある (Baer 2015)。このように交尾後の性選択に関する研究は、社会性狩り蜂ではほとんどなされておらず、今後の課題である。

父系の数と働き蜂と繁殖虫数の正の相関関係は優れた女王仮説でも説明することができる (Bonduriansky 2001)。優れた女王仮説によれば、優れた女王は多くの交尾相手のオスを引きつけ、より多くの働き蜂と新女王を生産する。女王の交尾回数が多いことと繁殖成功度が高いことは創設女王の形質の一部であると解釈できる (Fjerdingstad & Keller 2004)。本研究では、繁殖初期巣では働き蜂の数、繁殖終了巣では新女王の数と父系の数 (女王の交尾回数) に正の相関が認められた。さらに、繁殖初期巣では、父系の数が多く、各父系の子を平等に生産する巣ほど、より乾燥重量が重く、越冬中の生存率が高い新女王を生産することが示された。交尾回数の多い女王と、生産された新女王の体重が重いことはそれぞれ適応的であると考えられた。これまでに、キオビクロスズメバチの女王の胸幅あるいは頭幅と女王育房数には有意な相関がないことが示されている (Harris and Beggs 1995)。今後の調査により、高体重の女王ほど、父系の数が多いことが明らかになれば、優れた女王仮説は支持されるだろう。

本研究では、女王の交尾回数が多い巣では生涯繁殖成功度が高まることを示し、女王の多回交尾が適応的であると結論付けられる。また、女王の交尾回数が増えることは巣仲間の遺伝的多様性を増加させ、それに起因する利益の存在が示唆された。さらに、女王の交尾回数が多い巣ほど早くから新女王生産を開始しており、早い時期に生産された新女王ほど越冬中の生存率が高く体重も重かったことは、その詳細なメカニズムは不明だが女王の多回交尾の利益のひとつであると考えられる。

表 2-1. 岐阜県下呂市萩原町の野外で採集したシダクロスズメバチの繁殖初期巣 11 巣の詳細なデータ (萩原個体群)。

| 巣番号 | 採集日 | 観察した成虫 | 働き蜂育房 | 女王育房 | 合計育房数 | 働き蜂育房中の糞数 | 女王育房中の糞数 | 総糞数 | k_{obs} | m_e | S | N |
|------|-----------|--------|--------|--------|---------|-----------|----------|---------|-----------|-------|-------|------|
| WG1 | 11 Oct 14 | W, M | 5693 | 1650 | 7343 | 7402 | 503 | 7905 | 5 | 3.57 | 0.36 | 47 |
| WG2 | 11 Oct 14 | W | 3897 | 438 | 4335 | 4907 | 0 | 4907 | 3 | 2.33 | 0.34 | 29 |
| WG3 | 11 Oct 14 | W | 1785 | 278 | 2063 | 2175 | 142 | 2317 | 5 | 4.75 | 0.06 | 47 |
| WG4 | 11 Oct 14 | W | 2227 | 319 | 2546 | 2080 | 0 | 2080 | 4 | 2.33 | 0.56 | 40 |
| WG5 | 11 Oct 14 | W,M,G | 7122 | 1732 | 8854 | 11423 | 1025 | 12448 | 4 | 3.93 | 0.02 | 46 |
| WG6 | 12 Oct 14 | W | 2609 | 212 | 2821 | 3647 | 0 | 3647 | 3 | 2.30 | 0.35 | 40 |
| WG8 | 12 Oct 14 | W | 3075 | 161 | 3236 | 3834 | 0 | 3834 | 5 | 3.66 | 0.33 | 41 |
| WG10 | 12 Oct 14 | W, M | 3033 | 1029 | 4062 | 3855 | 501 | 4356 | 6 | 4.78 | 0.24 | 38 |
| WG11 | 14 Oct 14 | W,M,G | 9901 | 5587 | 15488 | 16930 | 5167 | 22097 | 7 | 6.15 | 0.14 | 26 |
| WG12 | 14 Oct 14 | W,M,G | 20307 | 14079 | 34386 | 23272 | 9489 | 32761 | 5 | 4.55 | 0.11 | 29 |
| WG13 | 14 Oct 14 | W,M,G | 17314 | 9142 | 26456 | 28460 | 8574 | 37034 | 8 | 7.12 | 0.13 | 31 |
| 平均 | | | 6966.6 | 3147.9 | 10144.6 | 9816.8 | 2309.2 | 12126.0 | 5.0 | 4.133 | 0.241 | 37.6 |

採集日に観察した成虫の階級 (W; 働き蜂, M; オス, G; 新女王) 、働き蜂育房数、女王育房数およびそれらの育房中の糞数、観察した父系の数 (k_{obs}) 、有効父系数 (m_e) 、父系の偏り (S) 、遺伝子型鑑定に用いた働き蜂数 (N) を示した。

表 2-2. 飼育したシダクロズズメバチ繁殖終了巣 16 巣の詳細なデータ (BG1-6: 金山個体群, BM1-10: 松本個体群) 。

| 巣番号 | 回収日 | 飼育開始 日 | 働き蜂 育房 | 女王 育房 | 合計 育房数 | 働き蜂 育房中の 糞数 | 女王育房 中の糞数 | 合計糞数 | k_{obs} | m_e | S | N |
|------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-------------------|--------------|---------|-----------|-------|-------|------|
| BG1 | 28 Nov 14 | 5 Jul 14 | 12019 | 6657 | 18676 | 16677 | 4937 | 21614 | 6 | 5.10 | 0.18 | 47 |
| BG2 | 28 Nov 14 | 5 Jul 14 | 16551 | 4185 | 20736 | 18160 | 3070 | 21230 | 5 | 4.66 | 0.09 | 45 |
| BG3 | 28 Nov 14 | 5 Jul 14 | 16855 | 5978 | 22833 | 23566 | 4130 | 27696 | 4 | 2.35 | 0.55 | 45 |
| BG4 | 28 Nov 14 | 5 Jul 14 | 19617 | 2652 | 22269 | 21600 | 1563 | 23163 | 4 | 3.11 | 0.30 | 51 |
| BG5 | 28 Nov 14 | 6 Jul 14 | 7825 | 2526 | 10351 | 8526 | 1869 | 10395 | 4 | 2.62 | 0.46 | 48 |
| BG6 | 28 Nov 14 | 6 Jul 14 | 12056 | 6114 | 18170 | 17317 | 5339 | 22656 | 7 | 5.66 | 0.22 | 41 |
| BM1 | 29 Nov 14 | 15 Jul 14 | 10473 | 3200 | 13673 | 19751 | 2574 | 22325 | 4 | 3.52 | 0.16 | 47 |
| BM2 | 29 Nov 14 | 15 Jul 14 | 10242 | 4753 | 14995 | 14723 | 3393 | 18116 | 6 | 3.09 | 0.58 | 37 |
| BM3 | 29 Nov 14 | 15 Jul 14 | 8994 | 2252 | 11246 | 10276 | 1872 | 12148 | 4 | 2.92 | 0.36 | 28 |
| BM4 | 29 Nov 14 | 17 Jul 14 | 10148 | 6803 | 16951 | 14610 | 5894 | 20504 | 5 | 3.13 | 0.47 | 31 |
| BM5 | 29 Nov 14 | 17 Jul 14 | 13431 | 7219 | 20650 | 19556 | 5882 | 25438 | 7 | 3.01 | 0.66 | 39 |
| BM6 | 29 Nov 14 | 19 Jul 14 | 4577 | 3558 | 8135 | 6998 | 3075 | 10073 | 6 | 3.56 | 0.49 | 42 |
| BM7 | 29 Nov 14 | 19 Jul 14 | 9900 | 5667 | 15567 | 9704 | 5141 | 14845 | 7 | 4.12 | 0.48 | 40 |
| BM8 | 29 Nov 14 | 19 Jul 14 | 18023 | 4303 | 22326 | 18413 | 3468 | 21881 | 5 | 2.76 | 0.56 | 49 |
| BM9 | 29 Nov 14 | 20 Jul 14 | 12912 | 11677 | 24589 | 15163 | 10637 | 25800 | 7 | 5.82 | 0.20 | 31 |
| BM10 | 29 Nov 14 | 20 Jul 14 | 13763 | 8768 | 22531 | 17082 | 7317 | 24399 | 6 | 5.16 | 0.17 | 29 |
| 平均 | | | 12336.6 | 5394.5 | 17731.1 | 15757.6 | 4385.1 | 20142.7 | 5.4 | 3.787 | 0.370 | 40.6 |

働き蜂育房数、女王育房数およびそれらの育房中の糞数、観察した父系の数 (k_{obs})、有効父系数 (m_e)、父系の偏り (S)、遺伝子型鑑定に用いた働き蜂数 (N) を示した。

表 2-3. 繁殖初期巣と繁殖終了巣の育房数と育房中の糞数の関係。

| 巣の時期 | 応答変数 | 説明変数 | Coef. estimate | z 値 | 有意確率 (p) |
|-------------------|-----------------------------|---------------|----------------|-------|-------------------|
| 繁殖初期巣 (n = 11) | 働き蜂育房中の糞数 (働き蜂蛹化数) | 働き蜂育房数 | 1.359E-4 | 7.806 | < 0.001 |
| | 女王育房中の糞数 (女王蛹化数) | 女王育房数 | 2.212E-4 | 189.7 | < 0.001 |
| 繁殖終了巣 (n = 16) | 働き蜂育房中の糞数 (働き蜂とオスの合計蛹化数) | 働き蜂育房数 | 7.210E-5 | 5.884 | < 0.001 |
| | 女王育房中の糞数 (女王蛹化数) | 女王育房数 | 2.002E-4 | 13.26 | < 0.001 |

応答変数と説明変数を用いて負の二項回帰分析を行った結果を示した。応答変数に対して有意な効果があった説明変数は太字で示した。

表 2-4. 繁殖初期巣 (萩原個体群)の働き蜂育房中、女王育房中の糞数と父系の数、父系の偏りの関係。

| 個体群 | 応答変数 | 説明変数 | AIC | Coef. estimate | z 値 | 有意確率 (p) |
|-------------|----------------------------------|------------------------------------|-------------------|----------------|--------|-------------------|
| 萩原 (n = 11) | 働き蜂育房中の糞数 (働き蜂蛹化数, モデル 1) | k_{obs} (父系の数) | 218.62 | 0.2692 | 2.038 | 0.042 |
| | | S (父系の偏り) | | -2.3222 | -2.283 | 0.022 |
| | 働き蜂育房中の糞数 (モデル 2) | k_{obs}^* | 219.78 | 0.4854 | 1.792 | 0.073* |
| | | S | | 3.1535 | 0.532 | 0.594 |
| | | $k_{obs}: S$ | | -1.3043 | -0.945 | 0.345 |
| | 女王育房中の糞数 ^a (女王蛹化数) | 働き蜂育房中の糞数 | 8624 ^a | 1.393E-4 | 179.7 | < 0.001 |

応答変数と説明変数、各説明変数の交互作用項を用いて一般化線形モデルによる負の二項回帰分析の結果を示した。a では、働き蜂育房中の糞数と父系の数、父系の偏りに連関が認められたため、それらの変数を説明変数から取り除いて解析を行った。モデル選択により AIC が最小、2 番目に小さいモデルの結果を示した。応答変数に対して有意な効果があった説明変数は太字で示した。*は説明変数が応答変数に対してマージナルな効果をもつことを示す。

表 2-5a. 繁殖終了巣 (金山個体群) の働き蜂育房中、女王育房中の糞数への父系の数、父系の偏りの関係。

| 個体群 | 応答変数 | 説明変数 | AIC | Coef. estimate | z 値 | 有意確率 (p) |
|------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------|----------------|--------|--------------|
| 金山 (n = 6) | 働き蜂育房中の糞数 (働き蜂とオスの蛹化数) | k_{obs} (父系の数) | 125.82 ^a | -0.01591 | -0.050 | 0.960 |
| | | S (父系の偏り) | | 4.09801 | 1.127 | 0.260 |
| | | $k_{obs} \cdot S$ | | -0.47991 | -0.677 | 0.498 |
| | 女王育房中の糞数 | k_{obs} | 104.04 | 0.2945 | 3.099 | 0.002 |
| | (女王の蛹化数, モデル 1) | 働き蜂育房中の糞数 | | 3.374E-5 | 1.457 | 0.145 |
| | 女王育房中の糞数 (モデル 2) | k_{obs} | 104.21 | 0.2733 | 2.48 | 0.013 |
| | 総糞数 (総蛹化数) | k_{obs} | 127.32 ^b | 0.0650 | 0.216 | 0.829 |
| | | S | | 3.9930 | 1.165 | 0.244 |
| | | $k_{obs} \cdot S$ | | -0.5015 | -0.751 | 0.453 |

応答変数と説明変数、各説明変数の交互作用項を用いて一般化線形モデルによる負の二項回帰分析の結果を示した。モデル選択により AIC が最小、2 番目に小さいモデルの結果を示した。応答変数に対して有意な効果があった説明変数は太字で示した。a, b はヌルモデルが選択された(ヌルモデルの AIC: a, 121.68; b, 123.17)。

表 2-5b. 繁殖終了巣 (松本個体群)の働き蜂育房中、女王育房中の糞数への父系の数、父系の偏りの関係。

| 個体群 | 応答変数 | 説明変数 | AIC | Coef. estimate | z 値 | 有意確率 (p) |
|-------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------|--------|----------------|
| 松本 (n = 10) | 働き蜂育房中の糞数 | k_{obs} | 203.37 ^c | -0.1385 | -0.685 | 0.494 |
| | | S | | -2.1588 | -0.688 | 0.492 |
| | | $k_{obs}: S$ | | 0.3403 | 0.657 | 0.511 |
| | 女王育房中の糞数 (モデル 1) | k_{obs} | 173.64 | 0.7253 | 5.209 | < 0.001 |
| | | S | | 4.911 | 2.269 | 0.023 |
| | | 働き蜂育房中の糞数 | | 4.777E-5 | 3.024 | 0.002 |
| | | $k_{obs}: S$ | | -0.9794 | -2.752 | 0.006 |
| | 女王育房中の糞数 (モデル 2) | k_{obs} | 175.60 | 0.6791 | 2.521 | 0.012 |
| | | S | | 4.795 | 2.157 | 0.031 |
| | | 働き蜂育房中の糞数 | | 3.170E-5 | 0.386 | 0.699 |
| | | $k_{obs}: S$ | | -0.9636 | -2.658 | 0.008 |
| | | 働き蜂育房中の糞数: k_{obs} | | 2.742E-6 | 0.197 | 0.844 |
| | 総糞数 | k_{obs} | 206.25 ^d | 0.01026 | 0.058 | 0.954 |
| | | S | | -1.91526 | -0.697 | 0.486 |
| | | $k_{obs}: S$ | | 0.22985 | 0.507 | 0.612 |

応答変数と説明変数、各説明変数の交互作用項を用いて表 2-5a と同様の解析による結果を示した。モデル選択により AIC が最小、2 番目に小さいモデルの結果を示した。応答変数に対して有意な効果があった説明変数は太字で示した。c, d はヌルモデルが選択された(ヌルモデルの AIC: c, 198.03; d, 202.4)。

表 2-5c. 繁殖終了巣 (金山個体群と萩原個体群を合算)の働き蜂育房中、女王育房中の糞数への父系の数、父系の偏りの関係。

| 個体群 | 応答変数 | 説明変数 | AIC | Coef. estimate | z 値 | 有意確率 (p) |
|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------|--------|----------------|
| 金山と松本の合算 (n = 16) | 働き蜂育房中の糞数 | k_{obs} | 326.57 ^e | -0.0835 | -0.543 | 0.587 |
| | | S | | -0.6871 | -0.292 | 0.771 |
| | | $k_{obs} \cdot S$ | | 0.1221 | 0.300 | 0.764 |
| | 女王育房中の糞数 (モデル 1) | k_{obs} | 274.12 | 0.6649 | 5.640 | < 0.001 |
| | | S | | 3.945 | 2.198 | 0.028 |
| | | 働き蜂育房中の糞数 | | 3.392E-5 | 2.574 | 0.01 |
| | | $k_{obs} \cdot S$ | | -0.8242 | -2.657 | 0.008 |
| | 女王育房中の糞数 (モデル 2) | k_{obs} | 275.75 | 0.6824 | 5.747 | < 0.001 |
| | | S | | 3.505 | 1.790 | 0.073 |
| | | 働き蜂育房中の糞数 | | 1.877E-5 | 0.663 | 0.507 |
| | | $k_{obs} \cdot S$ | | -0.8806 | -2.794 | 0.005 |
| | | 働き蜂育房中の糞数: k_{obs} | | 4.733E-6 | 0.616 | 0.538 |
| | 総糞数 | k_{obs} | 329.05 ^f | 0.0626 | 0.451 | 0.652 |
| | | S | | -0.3619 | -0.170 | 0.865 |
| | | $k_{obs} \cdot S$ | | 0.0014 | 0.004 | 0.997 |

応答変数と説明変数、各説明変数の交互作用項を用いて表 2-5a と同様の解析結果を示した。モデル選択により AIC が最小、2 番目に小さいモデルの結果を示した。応答変数に対して有意な効果があった説明変数は太字で示した。e, f はヌルモデルが選択された(ヌルモデルの AIC: e, 319.07; f, 323.98)。

表 2-6. (a) 越冬開始時期と越冬女王の生存率の関係、(b) 越冬開始時期と越冬中の女王の生死、翌春の女王の乾燥重量、脂肪量の関係。

(a) 越冬女王の生存率に対する越冬開始時期の効果 (GLMM によるポアソン回帰分析, n = 27260)

| 応答変数 | 説明変数 | ランダム効果 | Coef. Estimate | z 値 | 有意確率 (p) |
|-------|--------------|--------|----------------|--------|-------------------|
| 生存個体数 | 越冬開始日 | 生死の確認日 | -0.0203 | -25.46 | < 0.001 |

(b) 翌春の女王の乾燥重量と脂肪量に対する越冬開始日と越冬中の女王の生死の効果 (恒等リンクの重回帰分析, n = 104)

| 応答変数 | 説明変数 | AIC | Coef. estimate | t 値 | 有意確率 (p) |
|-----------------|---------------|--------|----------------|--------|-------------------|
| 乾燥重量 (モデル 1) | 越冬開始日 | 690.20 | -0.2990 | -4.022 | < 0.001 |
| | 越冬中の生死 | | -9.0524 | -6.728 | < 0.001 |
| 乾燥重量 (モデル 2) | 越冬開始日* | 692.07 | -0.32094 | -1.668 | 0.0985* |
| | 越冬中の生死 | | -961.514 | -0.367 | 0.7143 |
| | 越冬開始日: 越冬中の生死 | | 0.05561 | 0.364 | 0.7168 |
| 脂肪量(モデル 1) | 越冬開始日* | 561.40 | -0.0740 | -1.860 | 0.0658* |
| | 越冬中の生死 | | -3.9325 | -5.462 | < 0.001 |
| 脂肪量(モデル 2) | 越冬中の生死 | 562.90 | -4.151 | -5.773 | < 0.001 |

(a) 以下の応答変数と説明変数、ランダム効果を用いて一般化線形混合モデル (GLMM, offset = log (総越冬個体数)) によるポアソン回帰分析を行った。(b) 以下の応答変数と説明変数、説明変数の交互作用項を含む恒等リンクの重回帰分析を行った。モデル選択により AIC が最小、2 番目に小さいモデルの結果を示した。応答変数に対して有意な効果があった説明変数は太字で示した。*は説明変数が応答変数に対してマージナルな効果をもつことを示す。



図 2-1. (a) 採集したシダクロスズメバチの巣は木製の飼育箱 (30×30×60cm) で飼育した。写真は 2014 年 11 月末に撮影された。(b) 女王育房の巣盤の写真を示した。中央の育房には個体が蛹化した痕跡の糞がなく、その隣の育房には糞がある。(c) 一つの働き蜂育房中にあった 2 層の糞。1 個体が蛹化するごとに 1 層の糞が巣盤に残される。

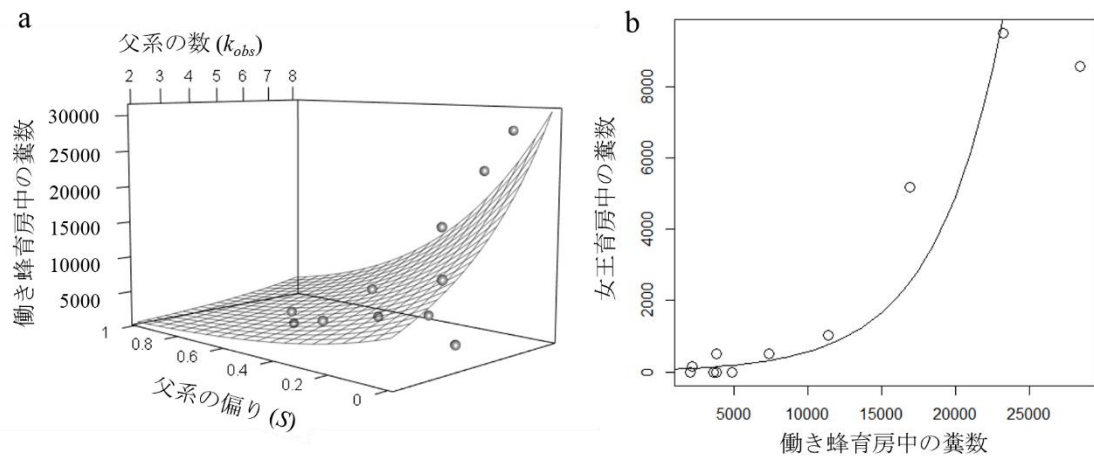


図 2-2. 繁殖初期巣 (萩原個体群) における働き蜂育房中、女王育房中の糞数と父系の数、父系の偏りの実測値を点で示した。それらの変数に関する負の二項回帰モデルを曲面または曲線で示した。(a) 父系の数(k_{obs})が多く、父系の偏り(S)が小さい巣では働き蜂育房中の糞数が有意に多かった。(b) 働き蜂育房中の糞数が多い巣ほど、女王育房中の糞数は有意に増加した (表 2-4 を参照)。

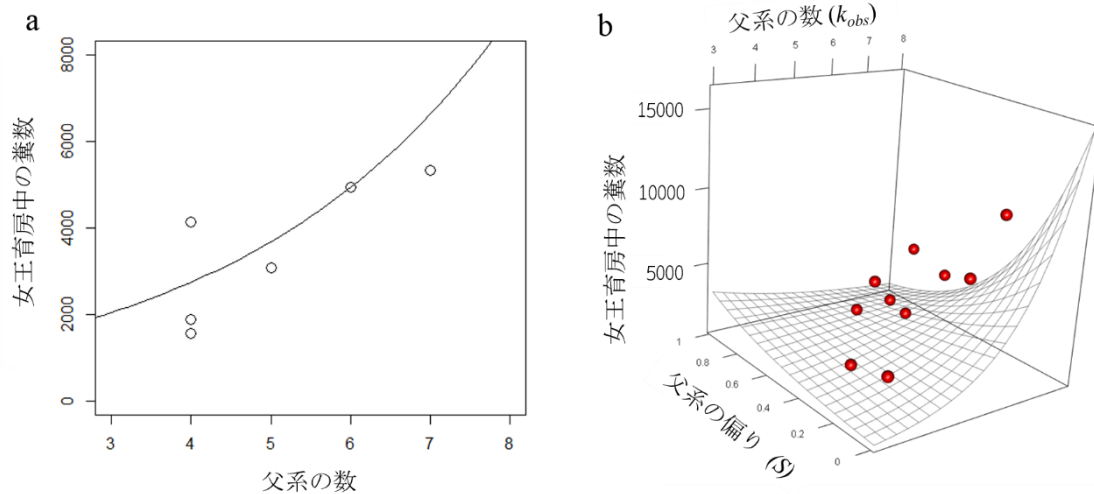


図 2-3. (a) 繁殖終了期の金山個体群における女王育房中の糞数と父系の数の実測値を点で示した ($n=6$)。曲線は変数間の負の二項回帰モデルを示している。(b) 松本個体群の女王育房中の糞数と父系の数、父系の偏りの実測値を点で示した ($n=10$)。曲面は、表 2-5b のモデル 1 の女王育房中の糞数、父系の数と父系の偏り、その交互作用に関する負の二項回帰モデルを示している。金山個体群では父系の数が多い巣ほど女王育房中の糞数が有意に多かった。松本個体群では、新女王育房中の糞数に対して父系の数、父系の偏り、働き蜂育房中の数に有意な正の効果があり、父系の数と父系の偏りの交互作用に有意な負の効果があった (表 2-5a, b を参照)。

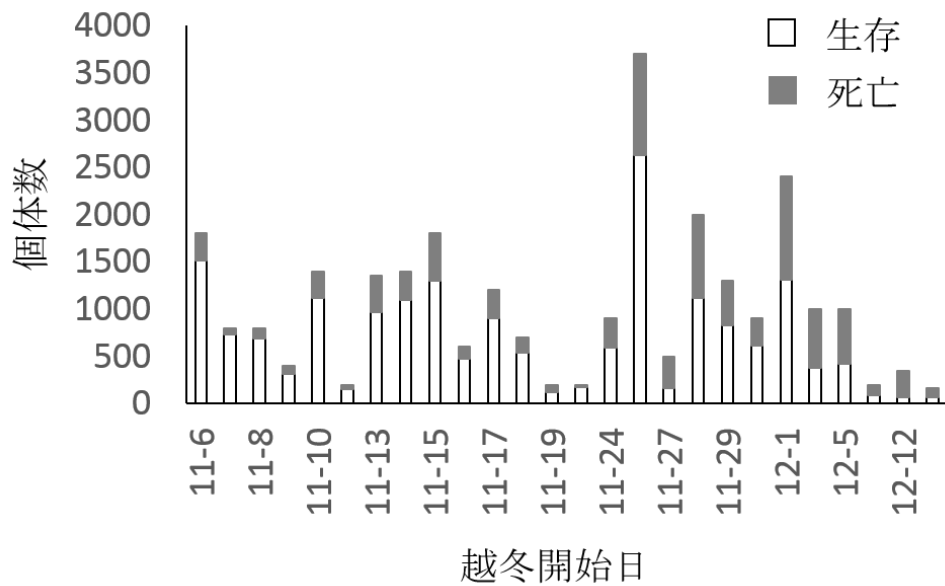


図 2-4. シダクロスズメバチの越冬開始日ごとの、越冬後の女王の生死個体数を示した (生存: 白, 死亡: 黒, $n = 27260$)。応答変数に生存個体数、説明変数に越冬開始日、個体の生死を確認した日をランダム効果とし、日によって越冬開始個体数が異なったため、offset 項に \log (総越冬個体数) を加えた一般化線形混合モデルを用いてポアソン回帰分析を行った。早期に越冬を開始した個体ほど末期に越冬を開始した個体よりも有意に越冬の生存率が高かった (表 2-6a を参照)。

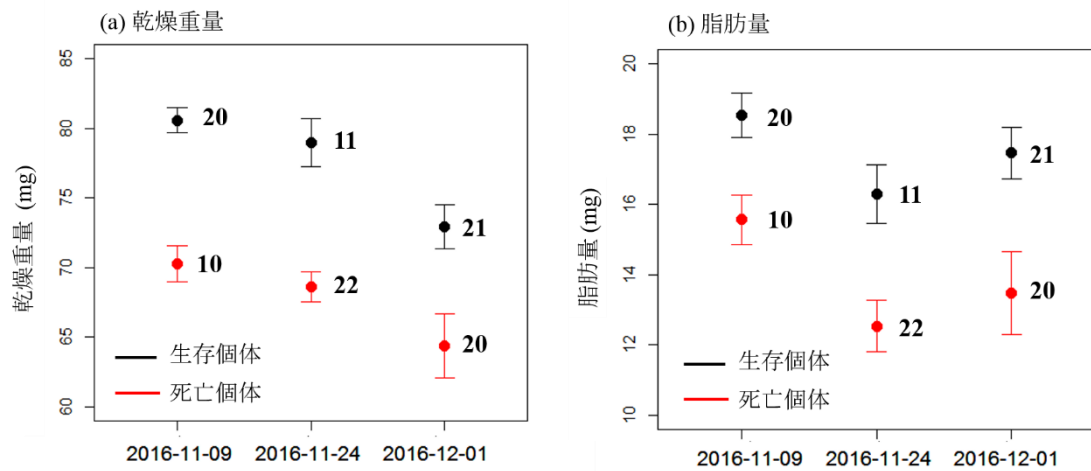


図 2-5. シダクロスズメバチの越冬開始日と乾燥重量の関係 (a)、脂肪量の関係 (b) を示した。エラーバーは標準誤差を示す。図中の数字はサンプル数を示す。乾燥重量は越冬開始日によって有意に異なり、生存個体の方が死亡個体よりも有意に大きかった。脂肪量も生存個体の方が死亡個体よりも有意に大きく、越冬開始日によって脂肪量が異なる傾向があった (表 2-6b を参照)。

補足資料

巣盤 1 枚あたりに調べるべき育房数の検討

巣盤 1 枚の糞数を推定する際に、調べるべき育房数（標本サイズ）を検証するために事前分析を行った。巣盤 1 枚中の総糞数は 1 育房中の平均糞数×総育房数で計算される。ここで、筆者は巣盤 1 枚につき、糞数を調べる育房数が少ない場合には 1 育房中の糞数の標準誤差が大きくなり、結果的に、巣盤 1 枚あたりの糞数を推定した際の誤差も大きくなると考えた。1 育房の糞数を調べた時の標準誤差は 0.1 未満であることが望ましいと考えた。巣盤 1 枚ごとの調べる育房数（標本サイズ）を判断するために、実際の巣盤 1 枚の総糞数からブートストラップ法を用いて、標本サイズと 1 育房中の糞数の標準誤差の関係を調べた。

筆者は野外巣と飼育巣の合計 27 巣の中から無作為に、働き蜂育房がある巣盤と女王育房がある巣盤をそれぞれ 6 つずつ選び、全育房数及び全育房中の糞数を計数した。調べた働き蜂育房数の合計は 7165、糞数の合計は 10851、巣盤一枚あたりの平均働き蜂育房数は 1194.2 ± 720.3 (S.D.)、平均糞数 1808.5 ± 1368.2 (S.D.)。調べた女王蜂育房数の合計は 6572、糞数の合計は 5244、巣盤一枚あたりの平均女王育房数は 1095.3 ± 174.8 (S.D.)、平均糞数 874 ± 223.8 (S.D.)。このデータを用いて、標本サイズ(調べる育房数: 1~500)ごとに、標本数 1000 として、1 育房あたりの糞数の平均と標準偏差の計算をした。標本抽出の際には、データからの反復抽出を許さなかった。その後、各標本サイズの 1 育房あたりの糞数の標準誤差を計算し、標準誤差が 0.1 未満になる標本サイズを調べた。すべての計算は、ソフトウェア R 3.2.4 を用いて行った。

結果として、働き蜂育房がある巣盤、女王育房がある巣盤、どちらにおいても 100 育房中の糞数を調べることにより、1 育房中の糞数の標準誤差が 0.05 程度になった (図 2-S1)。以上の結果から、働き蜂育房がある巣盤と女王育房がある巣盤、共に巣盤 1 枚あたり 100 育房調べることが適切だと考えた。

働き蜂育房中の糞数と女王育房中の糞数の確率分布について

繁殖初期巣と繁殖終了巣で働き蜂育房中の糞数を応答変数に説明変数に父系の数、父系の偏り、それらの交互作用を用いて一般化線形モデルによるポアソン回帰を行い、その結果を基に、分散が平均よりも有意に大きいか過分散の検定を行った。その結果、繁殖初期巣と繁殖終了巣ともに、働き蜂育房中の糞数は過分散であることが認められた (過分散の検定: 繁殖初期巣, $p = 0.010$; 繁殖終了巣, $p < 0.001$)。

繁殖初期巣の女王育房中の糞数を応答変数に、働き蜂育房中の糞数を説明変数に用いて一般化線形モデルによるポアソン回帰を行い、その結果を基に分散が平均よりも有意に

大きい過分散の検定を行った。次に、繁殖終了巣の女王の育房中の糞数を応答変数に、説明変数には働き蜂育房中の糞数、父系の数、父系の偏りを用い、各説明変数の交互作用を含む一般化線形モデルを用いてポアソン回帰を行い、その結果を基に分散が平均よりも有意に大きい過分散の検定を行った。その結果、繁殖初期巣と繁殖終了巣の女王育房中の糞数は過分散であることが認められた（過分散の検定：繁殖初期巣, $p = 0.005$; 繁殖終了巣, $p = 0.02$ ）。上記の結果により、繁殖初期巣と繁殖終了巣の働き蜂育房中、女王育房中の糞数の確率分布は、いずれも負の二項分布として統計解析を行った。

標本集団の遺伝的特徴

本研究で用いるマイクロサテライトマーカーが父系解析に適しているか確認をした。繁殖初期の萩原個体群 10 巣から働き蜂を 1 個体ずつ、繁殖終了期の金山個体群と松本個体群のそれぞれ 10 巣から働き蜂を 1 個体ずつ無作為に抽出し、3 個体群の働き蜂の遺伝子型のデータセットを構築した。それらのデータセットは、個体群ごとに Hardy-Weinberg 平衡の逸脱検定、連鎖不平衡の検定をソフトウェア Genepop 4.3 を用いて行った (Rousset 2008)。ヌルアリルが存在する可能性の推定はソフトウェア Cervus 3.0 を用いて行った。

各個体群における本研究で用いたマイクロサテライトの遺伝的特徴は表 S2-1,2,3 にまとめた。全ての個体群で、連鎖不平衡は認められず ($p > 0.05$)、ヌルアリルは検出されなかった ($p > 0.05$)。繁殖初期巣の萩原個体群、松本個体群(繁殖終了巣)では Hardy-Weinberg 平衡の有意な逸脱は認められなかった ($p > 0.05$)。金山個体群 (繁殖終了巣) の VMA-3 遺伝子座では有意確率 $p = 0.0155$ であったが、3 個体群で繰り返し、検定を行っていることを考慮した Sequential Bonferroni 補正 ($\alpha = 0.05$) 後には $p > 0.05$ となり、Hardy-Weinberg 平衡からの逸脱は認められなかった。以上のことから、本研究で用いたマイクロサテライト 6 遺伝子座は父系解析に適用できると考えた。

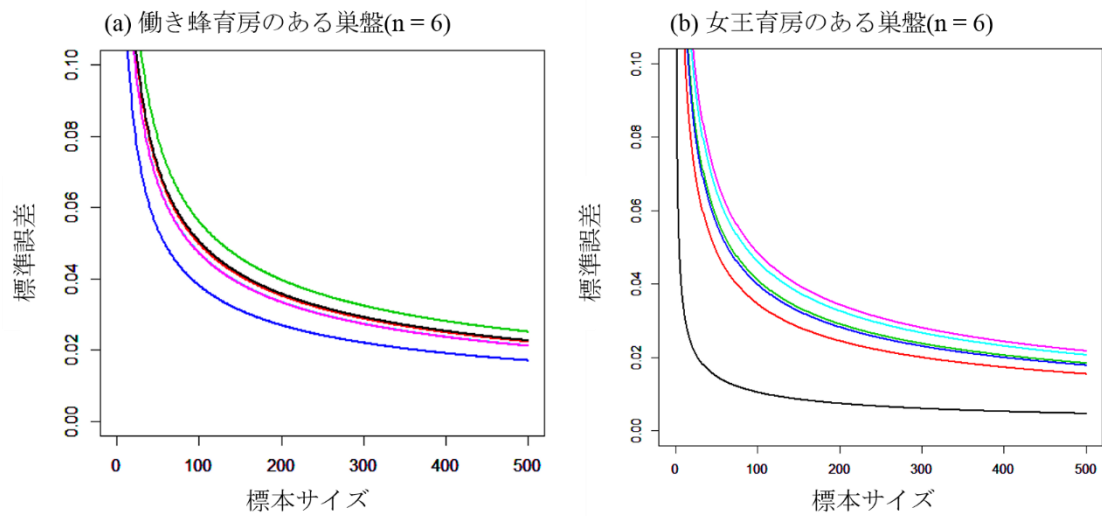


図 S2-1. ブートストラップ法によって (a) 働き蜂育房がある巣盤と (b) 女王育房がある巣盤の調べる育房数 (標本サイズ) と 1 育房あたりの糞数の標準誤差の関係を示した。実線はシミュレーションによって得られた 1 育房中の糞数の標準誤差を示した。色の違いは巣盤の違いを表している。働き蜂育房がある巣盤、女王育房がある巣盤、どちらにおいても標本サイズ 100 で 1 育房数中の糞数の標準誤差が 0.05 程度になった。

表 S2-1. シダクロスズメバチの繁殖初期巣(萩原個体群)におけるマイクロサテライトマーカーの遺伝的特徴。

| Locus | <i>n</i> | <i>Na</i> | <i>He</i> | <i>HW</i> (p-value) | <i>F</i> (<i>Null</i>) |
|----------|----------|-----------|-----------|---------------------|--------------------------|
| List2001 | 11 | 6 | 0.537 | 0.3677 | 0.0207 |
| List2004 | 11 | 6 | 0.818 | 0.7736 | 0.0370 |
| List2003 | 11 | 12 | 0.913 | 0.5299 | 0.0334 |
| List2020 | 11 | 14 | 0.952 | 0.6009 | -0.0030 |
| VMA6 | 11 | 3 | 0.680 | 0.4556 | -0.0600 |
| VMA3 | 11 | 6 | 0.797 | 0.1370 | -0.0547 |

Locus; 遺伝子座, *n*; サンプル数, *Na*; アリル多様度, *He*; 平均ヘテロ接合体度, *HW*; Hardy-Weinberg 平衡からの逸脱検定結果, *F* (*Null*); ヌルアリルの存在可能性の検定結果。

表 S2-2. シダクロスズメバチの繁殖終了巣(金山個体群)におけるマイクロサテライトマーカーの遺伝的特徴。

| Locus | <i>n</i> | <i>Na</i> | <i>He</i> | <i>HW</i> (p-value) | <i>F</i> (<i>Null</i>) |
|----------|----------|-----------|-----------|---------------------|--------------------------|
| List2001 | 10 | 3 | 0.637 | 0.7792 | 0.0172 |
| List2004 | 10 | 12 | 0.911 | 0.8620 | -0.0179 |
| List2003 | 10 | 16 | 0.979 | 1.0000 | -0.0366 |
| List2020 | 10 | 11 | 0.926 | 0.2782 | -0.0090 |
| VMA6 | 10 | 4 | 0.774 | 0.4233 | -0.0465 |
| VMA3 | 10 | 6 | 0.853 | 0.0255* | 0.0024 |

Locus; 遺伝子座, *n*; サンプル数, *Na*; アリル多様度, *He*; 平均ヘテロ接合体度, *HW*; Hardy-Weinberg 平衡からの逸脱検定結果, *F* (*Null*); ヌルアリルの存在可能性の検定結果。*Sequential Bonferroni 補正後、 $p > 0.05$ であり、Hardy-Weinberg 平衡からの逸脱は認められなかった。

表 S2-3. シダクロスズメバチの繁殖終了巣(松本個体群)におけるマイクロサテライトマーカーの遺伝的特徴。

| Locus | <i>n</i> | <i>Na</i> | <i>He</i> | <i>HW</i> (p-value) | <i>F</i> (<i>Null</i>) |
|----------|----------|-----------|-----------|---------------------|--------------------------|
| List2001 | 10 | 5 | 0.616 | 1.0000 | -0.2066 |
| List2004 | 10 | 7 | 0.868 | 0.6576 | -0.0993 |
| List2003 | 10 | 13 | 0.942 | 1.0000 | -0.0579 |
| List2020 | 10 | 12 | 0.937 | 0.2470 | -0.0061 |
| VMA6 | 10 | 3 | 0.653 | 1.0000 | 0.0306 |
| VMA3 | 10 | 4 | 0.611 | 0.7633 | -0.2079 |

Locus; 遺伝子座, *n*; サンプル数, *Na*; アリル多様度, *He*; 平均ヘテロ接合体度, *HW*; Hardy-Weinberg 平衡からの逸脱検定結果, *F* (*Null*); ヌルアリルの存在可能性の検定結果。

第3章 病気への抵抗性仮説の検証

3-1. 序論

女王の多回交尾の利益仮説として、巣仲間の遺伝的多様性増加に基づく仮説がいくつか提唱されている（病気への抵抗性仮説 Sherman et al. 1988, 遺伝的分業の促進仮説 Waibel et al. 2006, 性決定遺伝子座における遺伝的荷重の緩和仮説 Page 1980）。その中でも病気への抵抗性仮説は、女王の多回交尾が独立に進化したフタフシアリ亜科、ミツバチ亜科でも検証されており、女王の多回交尾の利益仮説としてもっとも検証されている仮説の一つである (Shykoff and Schmid-Hempel 1991; Baer et al. 1999; Tarpy 2003; Hughes & Boomsma 2004; Hughes & Boomsma 2006; Tarpy & Seeley 2006; Seeley & Tarpy 2007)。一方、病気への抵抗性仮説を実証するためには、宿主の遺伝子型によってある遺伝子型の病原体への抵抗性に差があることだけでなく、ある遺伝子型の病原体の病原性は異なる宿主の遺伝子型によって差があることも検証する必要がある (Lee et al. 2013)。そこで筆者は、同一母親由来で父系が異なるシダクロスズメバチを昆虫病原性糸状菌の *Beauveria bassiana* の異なる菌株系統に感染させる実験を行った。本研究で用いた *B. bassiana* は昆虫病原性糸状菌であり、様々な分類群の昆虫が罹患し、感染死した場合には球状の胞子が作られる (Hajek & Legar 1994; Schmid-Hempel 1998; Schmidt et al. 2011)。

メスが、特定の父系の精子を選択して利用している例が昆虫では知られている (Simmons 2001)。ハチ目において、多回交尾する種では、複数のオス由来の精子が束になって受精嚢内に固まる (sperm clumping) 可能性が示唆されている (Crozier and Bruckner 1981)。一方、女王が多回交尾する種では、特定の父系の働き蜂が特定の日に羽化するのではなく、それぞれの父系の働き蜂が継続的に羽化することも考えられ、これは巣内の働き蜂の遺伝的多様性を継続的に高めておくことに貢献するだろう。*Vespula maculifrons* では、ある父系の精子が有意に特定の日に偏って使われることは観察られず、精子が束になって固まっていることが仮にあっても、その効果が巣仲間の働き蜂の遺伝的多様性に与える効果は弱いと結論付けられている (Johnson et al. 2009)。筆者は、本種の働き蜂の羽化時期とその父系の関係を調べ、女王の受精嚢内で精子が束になって固まっている可能性を考察する。これらの結果を踏まえ、病気への抵抗性仮説と巣内の遺伝的多様性の関係について議論する。

3-2. 材料と方法

2014 年には、既に羽化したシダクロスズメバチの働き蜂を採集し、巣ごとで昆虫病原性糸状菌 *Beauveria bassiana* に対する抵抗性が異なるか、また、糸状菌の系統間で、

働き蜂に対する病原性に差があるか否かを主に調べた（予備実験）。2015 年には、蛹化後の環境を同一にした働き蜂を用いて、働き蜂の母系や父系によって糸状菌に対する抵抗性が異なるか、また、糸状菌の各系統の病原性が働き蜂の母系や父系によって異なるか否かを主に調べた（蜂の父・母系による抵抗性と各菌株系統の病原性実験）。

3-2-(1). 糸状菌の採集と維持

2013 年 11 月 3 日に、岐阜県恵那市で開催された蜂の巣コンテスト会場（蜂の巣コンテストについては Nonaka 2011 を参照）で、*B. bassiana* に感染していたシダクロスズメバチ女王の幼虫を 5 個体採集した。それらの虫体から糸状菌株 5 系統を単離し、サブロー寒天培地（0.01 g/ml yeast extract, 0.01 g/ml bacto peptone, 0.02 g/ml L-glucose, 0.02 g/ml agar, and distilled water）で冷蔵庫内（10°C）にて保存した。各菌株は 2014 年の実験の前にサブロー寒天培地で 3 回培養した。糸状菌の塗布実験のために、25°C で 8-14 日間、孢子形成させた培地から孢子を採集し、血球計算盤（Sigma, St. Louis, MO, USA）を用いて定量し、0.03%の界面活性剤（Tween 80）に溶かして高濃度（ 10^8 個/ml）と低濃度（ 10^6 個/ml）の孢子懸濁液を作成した。2014 年に行った各巣の働き蜂の菌抵抗性実験には *B. bassiana* の菌株 5 系統（A から E）使用し、2015 年に行った各父系の働き蜂の菌抵抗性実験には、2014 年の実験で対照区に比べて塗布後の働き蜂の生存率が低かった 2 系統（A,C）を使用した。

3-2-(2). 予備実験

2014 年 11 月 9 日に愛知県豊田市で開催された蜂の巣コンテスト会場にて、シダクロスズメバチの 5 巣から約 400 個体ずつ働き蜂成虫を採集した（豊田 1-5）。採集した働き蜂は、巣ごとに金網製の飼育箱（30×30×40cm）に入れ、明期 15 時間、暗期 9 時間、 $25\pm 2^\circ\text{C}$ の恒温室にて、毎日 30% ショ糖水を与え、飼育した。

採集日の一週間後に、働き蜂に *B. bassiana* を塗布する実験を行った。麻酔のために、働き蜂を菌塗布直前に -20°C の冷凍庫に 20 秒間入れた。働き蜂に糸状菌を塗布するため、菌株 5 系統の高濃度孢子懸濁液（ 10^8 個/ml）、あるいは対照区として界面活性剤溶液（0.03%, Tween 80）30ml に一個体ずつ 1 秒間沈めた。その後、虫体表面の余分な水分を濾紙で取り除き、一個体ずつ底に濾紙を敷いたプラスチック製のカップ（8×10×4cm）に入れ、24 時間ごとに 500 μl の蒸留水を与え、生存日数を計測した。糸状菌によって死んだか否かを調べるために、個体の死亡を確認した場合には、濾紙に水を加え、カップ内の湿度を 90% 以上にした。死亡後 2 週間以内に死体上に *B. bassiana* の菌糸が確認できた場合には、糸状菌で死んだと判断した。実験に用いたサンプル数は表 3-1a に示した。

3-2-(3). 蜂の父・母系による抵抗性と各菌株系統の病原性実験

予備実験に用いた働き蜂は、実験に用いるまでの飼育場所や飼育環境が巣によって異なっていた。そこで、この実験では生育環境を可能な限り統一するため、2015 年 7 月中旬に岐阜県中津川市で採集した 3 巣を中津川市内で同じ餌で飼育した (中津川 1-3)。また、実験に用いる働き蜂は、羽化後の環境を同一にした。採集した巣は木製の巣箱に入れ、ほぼ毎日 30% 蜂蜜水と鶏の心臓と肝臓を与えて中津川市内の屋外で 2015 年 10 月 11 日まで飼育した。2015 年 10 月 11 日に、全ての飼育巣を回収し、働き蜂の幼虫と蛹が入った巣盤を 1 枚ずつ、防虫ネット (1mm 目) で上部を覆ったプラスチック容器 (30×40×8cm) に入れ、明期 15 時間、暗期 9 時間、 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ の恒温室に静置した。本実験には、巣盤回収時に前蛹以降の発達段階で、2015 年 10 月 13 日から 22 日までに羽化した働き蜂を用いた。12 時間ごとに巣盤を確認し、羽化した働き蜂を一個体ずつ底に濾紙を敷いたプラスチック製のカップ (8×10×4cm) に入れ、2ml の 30% 蜂蜜水を与えた。羽化後 12 から 24 時間の働き蜂を、菌株 A または C の低濃度の孢子懸濁液 (10^6 個/ml) 30ml、あるいは界面活性剤 30ml に一個体ずつ 1 秒間沈めた。その後、蜂をカップに戻し、48 時間ごとに 30% 蜂蜜水を 2ml 与え、濾紙を取り換え、菌塗布後から 15 日間、12 時間ごとに個体の生死を確認した。個体の死亡を確認した場合には、父系解析のため中脚と触角をそれぞれ 2 対回収し、濾紙に水を加え、カップ内の湿度を 90% 以上にして糸状菌によって死んだか否か調べた。また、15 日間生存した個体も父系解析のため、中脚と触角を 2 対ずつ回収した。用いたサンプル数は表 3-1b に示した。

3-2-(4). 遺伝的分析

遺伝子抽出は、第 2 章の材料と方法で述べた Chelex 溶液 (Chelex 100, Bio-Rad) を用いる方法を採用した。働き蜂の遺伝子型特定のために、父系解析に適用できるマイクロサテライト領域 9 遺伝子座 (List2001, List2003, List2004, List2019, List2020, Rufa5, Rufa19, VMA-3, VMA-6, 補足資料参照) を用いた Multiplex PCR を行った (Thorén et al. 1995; Daly et al. 2002; Hasegawa & Takahashi 2002)。上記 9 遺伝子座に対して、蛍光付きプライマーを用いた 3-primer labeling 法によって PCR を行った (Blacket et al. 2012)。PCR 反応は QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) のプロトコルに基づいて行った。反応液は、DNA を 0.5ng、2×Multiplex PCR Master Mix を 5ul、フォワードプライマーを 0.01uM、リバープライマーを 0.2uM、蛍光付プライマーを 0.1uM、滅菌蒸留水を混合し、全量は 10ul とした。PCR の温度条件は、 96°C で 15 分間維持した後で、 95°C で 30 秒、 50°C で 90 秒、 72°C で 60 秒維持することを 35 回繰り返し、最後に 30 分間 60°C で維持した。PCR 生成物 0.5ul と HiDi Formamide (Thermo Fisher Scientific) 15ul、LIZ 500

DNA size standard (Applied Biosystems) 0.15 μ l の混合液を ABI-3730 DNA sequencer (Applied Biosystems) を用いて泳動した。遺伝子型は GeneMarker (SoftGenetics LLC)を用いて 2 度の目視観察で決定した。

働き蜂の母系遺伝子型と父系遺伝子型は、ソフトウェア Colony2 v2.0.6.1 (Jones and Wang 2010) を使用して、働き蜂の遺伝子型から最尤法によって推定した (Loope et al. 2015 も参照)。3 つ以上の遺伝子座が増幅できなかった働き蜂は分析から除外した。これ以降の父系解析は第 2 章で述べた方法と同様の方法を用いた。

3-2-(5). 統計解析

・予備実験 (2014 年)

死亡したが死因不明な個体は解析に用いず、糸状菌によって死亡した個体と生存個体のみを解析に用いた。初めに、菌塗布個体と対照区の個体の生存曲線を比較するため、ログランク検定を行った。菌塗布個体の生存日数が、菌株系統、または巣によって異なるか否かについて調べるために、表 3-2 に示した応答変数、説明変数、交互作用を用いた一般化線形モデル(GLM: ポアソン回帰モデル) を作成した。その後、赤池情報量基準 (AIC) をもとにモデル選択を行い、統計解析を行った。次に、菌株系統ごとに病原性が異なるか調べるために、同一巣内で異なる菌株を塗布した働き蜂の生存曲線をログランク検定により解析した。また、それぞれの巣によって病原菌への抵抗性に差があるか検証するため、塗布した菌株ごとに、巣間の働き蜂の生存曲線についてログランク検定を用いて比較した。

・蜂の父・母系による抵抗性と各菌株系統の病原性実験 (2015 年)

予備実験と同様に、糸状菌によって死亡した個体と生存個体のみを解析に用いた。初めに、特定の父系の働き蜂が特定の日に偏って羽化しているか否か調べるために、働き蜂の父系と羽化日の関係について分散分析によって解析した。

巣ごとに、菌塗布個体と対照区個体の生存曲線に差があるか否か、ログランク検定により解析した。その後、菌塗布個体の生存時間について巣 (母系) 、父系、菌株系統による影響を受けるかを調べるために、表 3-2 に示した応答変数、説明変数、交互作用を用いた一般線形モデル(GLM: ポアソン回帰モデル) を作成した。その後、AIC をもとにモデル選択を行い、統計解析を行った。次に、働き蜂の父系間で生存時間、生存率に差があるか調べるため、それぞれの巣ごとに同一菌株を塗布した時の父系間の生存曲線をログランク検定によって比較した。最後に、各菌株系統の病原性が働き蜂の父系によって異なるか調べるため、同一父系の個体に異なる菌株系統を塗布した場合の生存曲線の

差をログランク検定により解析した。以上すべての統計解析はソフトウェア R3.2.4 を用いて行った。

3-3. 結果

3-3-(1). 予備実験 (2014 年)

筆者は *Beauveria bassiana* の菌株 5 系統を 5 巣 (豊田 1-5) の働き蜂に塗布し、生存日数を調べた。初めに、ログランク検定を用いて、菌塗布区と対照区の生存日数を巣ごとに比較した。豊田 1 では、菌株系統に関わらず、対照区の個体は菌塗布個体よりも生存する傾向にあった (ログランク検定, Sequential Bonferroni; $0.05 < p < 0.1$ 、図 3-1A-a)。豊田 2 の対照区の個体は、菌株 A、B 塗布個体よりも生存する傾向にあったが (Sequential Bonferroni; $0.05 < p < 0.1$)、菌株 C、D、E 塗布個体と対照区の個体の生存曲線に有意な差は認められなかった (Sequential Bonferroni; $p > 0.1$ 、図 3-1A-b)。豊田 3 では、対照区の個体は菌株 A、B、D 塗布個体よりも有意に生存し (Sequential Bonferroni; $p < 0.05$)、菌株 C、E 塗布個体よりも生存する傾向にあった (Sequential Bonferroni; $0.05 < p < 0.1$ 、図 3-1A-c)。豊田 4 では、対照区の個体は、菌株 A、C、D、E 塗布個体よりも有意に生存し (Sequential Bonferroni; $p < 0.05$)、菌株 B の生存日数よりも生存する傾向にあった (Sequential Bonferroni; $0.05 < p < 0.1$ 、図 3-1A-d)。豊田 5 の対照区は、どの菌株系統を塗布した個体とも生存曲線に有意な差が認められなかった (Sequential Bonferroni; $p > 0.1$ 、図 3-1A-e)。

菌塗布個体の生存日数が、菌株によって、または巣によって異なるか否かについて調べた。その結果、巣によって有意に生存日数が異なり、菌株によって生存日数が異なる傾向がみられた (表 3-2)。

それぞれの菌株の系統によって働き蜂への病原性が異なるか検証するため、各巣の菌塗布個体の生存日数を菌株系統間で比較した。豊田 1、3 では、塗布した菌株の系統によって働き蜂の生存曲線は有意に異なり (ログランク検定; 豊田 1, $p = 0.041$, 豊田 3, $p = 0.026$, 図 3-1A-a, c)、豊田 2 では菌株系統によって菌塗布個体の生存曲線が異なる傾向があった (ログランク検定; $p = 0.071$ 、図 3-1A-b)。豊田 4、5 では塗布した菌株系統によって働き蜂の生存曲線に有意な差は認められなかった (ログランク検定; 豊田 4, $p = 0.409$, 豊田 5, $p = 0.658$, 図 3-1A-d, e)。塗布した菌株系統によって個体の生存日数に差がある傾向があった (GLMM; $p = 0.066$, 図 3-1A)。各巣における塗布した菌株系統間の生存曲線の差については補足資料にまとめた。

それぞれの巣によって、病原菌への抵抗性に差があるか検証するため、各菌株系統の塗布個体の生存日数を巣間で比較した。菌株 A、C 塗布区では、巣によって個体の生存曲線に有意な差は認められなかったが (ログランク検定; 菌株 A, $p = 0.575$, 菌株 B, $p =$

0.260)、菌株 B、D、E 塗布区では、巣によって個体の生存曲線は有意に異なった (ログランク検定; 菌株 B, $p < 0.001$, 菌株 D, $p < 0.001$, 菌株 E, $p = 0.012$, 図 3-1B)。各菌株系統における各巣の生存曲線の差については補足資料にまとめた。巣間で対照区の個体の生存曲線に差がある傾向がみられた (ログランク検定, $p = 0.0516$, 図 3-1B-f)。

3-3-(2). 蜂の父・母系による抵抗性と菌株系統ごとの病原性実験 (2015 年)

本研究に用いた 9 つのマイクロサテライトマーカーは多型性が認められた。平均ヘテロ接合度の期待値 (H_e) は、0.595 から 0.895、平均ヘテロ接合度の観察値は 0.444 から 1 であった (Genepop 4.2, Rousset 2008)。連鎖不平衡及び Hardy-Weinberg 平衡からの有意な逸脱は認められなかった (共に $p > 0.05$, 補足資料参照)。繁殖初期巣と繁殖終了巣のすべての個体群において、2 個体のオスが同一遺伝子型を示す確率は極めて低かった (< 0.0001 , nondetection error)。上記の結果は、本研究で用いた遺伝子マーカーを父系解析に適用できることを意味している (Boomsma and Ratnieks 1996)。

菌塗布実験に用いた働き蜂の羽化日 (2015 年 10 月 13 日から 21 日までの 7 日間) と父系には有意な関係は認められなかった (分散分析; 中津川 1; $n = 224$, $p = 0.878$, 中津川 2; $n = 152$, $p = 0.815$, 中津川 3; $n = 211$, $p = 0.312$)。

菌塗布区と対照区の個体の生存曲線を比較した結果、全ての巣で対照区の個体の生存時間は菌株 A、C 塗布区どちらの個体よりも有意に長かった (ログランク検定, Sequential Bonferroni; $p < 0.01$)。中津川 2 の対照区の個体は中津川 1、3 の対照区の個体よりも有意に生存時間が長かった (ログランク検定, Sequential Bonferroni; $p < 0.01$)。

モデル選択によって AIC が最小になったモデルでは、菌塗布個体の生存時間は、父系、巣、菌株系統とそれら 2 つずつの要因の交互作用による有意な効果が認められた (表 3-3)。次に AIC が小さかったモデルでは、生存時間に対して父系、巣、父系と巣の交互作用が有意な効果を示した (表 3-3)。

各巣によって、病原菌への抵抗性に差があるか検証するため、各菌株系統の塗布個体の生存日数を巣間で比較した。菌株 A 塗布区、菌株 C 塗布区では巣間で生存曲線に有意な差は認められなかった (ログランク検定; 菌株 A 塗布区, $p = 0.197$, 菌株 B 塗布区, $p = 0.305$)。次に、各父系によって病原菌への抵抗性に差があるか検証するため、同一菌株塗布した時の個体の生存曲線を父系間で比較した。菌株 A 塗布区ではすべての巣で、菌株 C 塗布区では中津川 1 において、父系によって有意に生存曲線が異なった (ログランク検定; 菌株 A-中津川 1, $p = 0.003$, 菌株 A-中津川 2, $p < 0.001$, 菌株 C-中津川 2, $p < 0.001$, 菌株 A-中津川 3, $p = 0.0164$, 図 3-3A-a, c, d, e)。菌株 C 塗布区の中津川 3 では父系によって生存曲線が異なる傾向があった (ログランク検定; $p = 0.0717$, 図 3-3A-f)。一方、菌株 C 塗布区の中津川 1 では、個体の父系によって生存曲線の差は認められなかった (ログランク検定; $p = 0.405$, 図 3-3A-b)。

それぞれの菌株系統によって働き蜂への病原性が異なるか検証するため、各巣の菌塗布個体の生存日数を菌株系統間で比較した。中津川 1、2 では、菌株 A 塗布個体の方が菌株 C 塗布個体よりも有意に生存曲線が異なった（ログランク検定, Sequential Bonferroni; 中津川 1, $p < 0.05$, 中津川 2, $p < 0.01$, 図 3-2a、b）。中津川 3 では塗布した菌株系統によって生存曲線に差は認められなかった（ログランク検定, $p = 0.767$, 図 3-2c）。次に、各菌株系統の病原性が働き蜂の父系によって異なるか調べた。中津川 2 の父系 i、中津川 3 の父系 m の個体の生存曲線は、塗布した菌株間で有意に異なった（ログランク検定; 中津川 2-父系 i; $p = 0.015$, 中津川 3-父系 m; $p = 0.0286$, 図 3-3B-b, c）。塗布した菌株によって、中津川 1 の父系 b の個体の生存曲線は異なる傾向があった（ログランク検定; $p = 0.0882$, 図 3-3B-a）。他のすべての父系の個体は塗布した菌株によって生存曲線に有意な差は認められなかった（ログランク検定; $p > 0.05$ ）。

3-4. 考察

予備実験の結果から、*Beauveria bassiana* の菌株によっては、菌塗布個体の生存時間が対照区よりも有意に短く、病原性が確かめられ、シダクロズズメバチと *B. bassiana* は病原菌への抵抗性仮説を検証できる材料だと考えられた（図 3-1A）。巣によって同一菌株を塗布した個体の生存日数が有意に異なった（図 3-1B, 表 3-2）。さらに、塗布した菌株系統によって同一巣内の個体の生存曲線が有意に異なる例も観察され、菌塗布個体の生存時間も菌株系統によって異なる傾向が見られたため（図 3-1A, 表 3-2）、糸状菌の病原性は菌株系統によって差があると考えられた。同一菌株に対する働き蜂の抵抗性が巣によって異なったことは母系または、母系と父系の相互作用によって病気への抵抗性に差が生じていることが示唆された。

蜂の父・母系による抵抗性と菌株系統ごとの病原性実験から、菌塗布実験に用いた働き蜂の羽化日と父系には有意な関係は認められず、特定の父系が特定の日に偏って羽化していなかった。本調査では、女王が受け取った各父系の精子数を調べていないため、各父系の精子の頻度に応じてそれぞれの父系の働き蜂が羽化しているのか、何らかの理由で平等に各父系の働き蜂が羽化しているのかは分からなかったが、少なくとも特定の父系に偏らず働き蜂が羽化することは、継続的に巣内の構成員の遺伝的多様性を維持することに貢献すると考えられた。

同一菌株を塗布した場合に、働き蜂の父系によって、生存時間は有意に異なった（図 3-3A, 表 3-3）。これは、それぞれの父系によって糸状菌に対する抵抗性に差があることを示している。これまで、ミツバチやアリで異なる父系の働き蜂（蟻）は病原菌への異なる抵抗性をもつことが知られている（例えば, Baer and Schmid-Hempel 2003; Hughes and Boomsma 2004）。セイヨウミツバチでは、各父系の個体をもつ免疫の強さが異なることで、集団規模での免疫の強さが高まると示されている（Simone-finstrom et al. 2016）。

一方で、病原菌の遺伝子型（株系統）によって宿主への病原性が異なるという報告はわずかである（Lee et al. 2013）。本研究では、同一父・母系の働き蜂に、異なる *B. bassiana* の菌株系統を接種した場合に、接種した菌株によって生存曲線が異なることを明らかにした（図 3-3B, 表 3-3）。以上をまとめると、シダクロスズメバチでは働き蜂の遺伝子型によって病原菌への抵抗性が異なることと、病原菌の系統によって働き蜂への病原性が異なることが示され、病気への抵抗性仮説が成立している可能性が強く示唆された。そして、Goodisman et al. (2007)で示されている社会性狩り蜂で巣仲間の遺伝的多様性が高い巣ほど繁殖成功度が高くなる要因の一つとして、遺伝的多様性が高いほど巣規模で多様な病気への抵抗性が高まることが示唆された。

同一母・父系の働き蜂に異なる 2 種の菌株系統（系統 A, C）を塗布した場合に、菌株系統によって生存率が異なったが、いずれの場合も片方の菌株系統（系統 A）の方が、もう片方の系統（系統 C）よりも一貫して致死性が高かった（図 3-3B）。Hamilton (1980) が提唱した病原体-宿主の軍拡競争による共進化が起こっているとすると、特定の父系はある病原菌系統には強いが、別のある病原菌系統には弱い、そして、別の父系では反対の状況が起こっていることが予測された。一方、本研究では予備実験を含めてそれを観察することができなかった（予備実験の詳細な結果は補足資料を参照）。実験に用いた菌が *B. bassiana* の 1 種であること、また、その菌株系統も予備実験では 5 系統、本実験では 2 系統と、比較的少数だったために、上記の軍拡競争から予測される結果が観察されなかったのかもしれない。病原体-宿主の軍拡競争があるかどうかを正確に判断するためには、今後は *B. bassiana* だけでなくの別の菌種を用い、より多くのサンプルサイズを得られる実験を行うことが必要だろう。

本章で、筆者は真社会性狩り蜂において初めて病気への抵抗性仮説を実証した。興味深いことに、糸状菌を塗布したにも関わらず、実験期間中に一頭も死亡しない父系があった。そのような父系の個体が存在することは、特定の糸状菌の株系統による巣の崩壊を防ぐだろう。クロスズメバチ属の女王は働き蜂が羽化すると採餌や巣材の採集活動をやめ、産卵だけに専念する（Spradbery 1973）。巣の営巣初期の働き蜂数が少ない時には、働き蜂が生存することが巣の維持にとって重要であると考えられ、女王が多回交尾し、かつ、特定の父系に偏らず産卵することは働き蜂の遺伝的多様性を高め、適応的だと考えられる。

Vespidae において、病気への抵抗性仮説が実証されたことから、真社会性ハチ目で女王が多回交尾する上位分類群（Formicidae, Apidae, Vespidae）すべてにおいて、本仮説が実証された。真社会性ハチ目において女王の多回交尾が進化、維持される要因の一つとして異なる遺伝子型の働き蜂(蟻)で巣を構成することにより、巣規模での病気への抵抗性が高まることの可能性が示唆された。本章で用いた実験手法は、他の社会性狩り蜂でも蜂の巣さえ確保できれば、病気への抵抗性仮説を検証できる。今後、他の社会性狩り蜂でも病気への抵抗性仮説の妥当性が実証されることが期待される。

表 3-1. (a) 予備実験 (2014 年)、(b) 蜂の父・母系による抵抗性と各菌株系統の病原性実験(2015 年)に用いたサンプル。

(a) 予備実験

| 巣の ID | 菌株系統 | | | | | 対照区 |
|-------|---------|---------|---------|---------|---------|-----|
| | 菌株 A | 菌株 B | 菌株 C | 菌株 D | 菌株 E | |
| 豊田 1 | 20 (20) | 20 (20) | 20 (20) | 23 (22) | 22 (22) | 10 |
| 豊田 2 | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 20 (18) | 20 (20) | 10 |
| 豊田 3 | 20 (20) | 20 (20) | 20 (20) | 23 (22) | 21 (21) | 10 |
| 豊田 4 | 20 (18) | 20 (18) | 20 (18) | 20 (18) | 20 (18) | 10 |
| 豊田 5 | 20 (11) | 14 (11) | 15 (10) | 14 (13) | 14 (9) | 10 |

括弧内の数字は、サンプル数から死因不明な個体を取り除いた後の、糸状菌による死亡個体と生存個体数の合計を示した。

(b) 蜂の父・母系による抵抗性と各菌株系統の病原性実験

| 巣の ID | 菌株系統 | | |
|-------|-----------|-----------|-----|
| | 菌株 A | 菌株 C | 対照区 |
| 中津川 1 | 140 (103) | 150 (115) | 100 |
| 中津川 2 | 86 (63) | 100 (84) | 84 |
| 中津川 3 | 140 (85) | 143 (105) | 100 |

括弧内の数字は、糸状菌による死亡個体と生存個体の中で遺伝解析にも成功した個体数を示した。

表 3-2. 予備実験 (2014 年) の菌塗布個体の生存日数と、塗布した菌株系統と巣、菌塗布個体の生存日数の関係。

| 応答変数 | 説明変数 | AIC | Coef. estimate | z 値 | 有意確率 (p) |
|-----------------|-------|--------|----------------|--------|--------------|
| 生存日数 (モデル 1) | 巣 | 1597.6 | -0.05281 | -2.733 | 0.006 |
| | 菌株系統* | | 0.03223 | 1.763 | 0.078* |
| 生存日数 (モデル 2) | 巣 | 1598.7 | -0.05376 | -2.785 | 0.005 |

応答変数と説明変数、各説明変数の交互作用を含んだ一般化線形モデル(GLM: ポアソン回帰, n = 439) を作成した。モデル選択により AIC が最小、2 番目に小さいモデルの結果を示した。応答変数に対して有意な効果があった説明変数は太字で示した。*は説明変数が応答変数に対してマージナルな効果をもつことを示す。

表 3-3. 2015 年に行った蜂の父・母系による抵抗性と各菌株系統の病原性実験結果についての統計解析結果。

| 応答変数 | 説明変数 | AIC | Coef. Estimate | z 値 | 有意確率 (p) |
|---------------------|-------------|---------|----------------|---------|----------------|
| 生存時間 (時) (モデル 1) | 父系 | 27471.3 | -0.10008 | -19.322 | < 0.001 |
| | 巣 | | -0.92572 | -16.856 | < 0.001 |
| | 菌株系統 | | -0.25524 | -2.795 | 0.005 |
| | 父系: 巣 | | 0.01560 | 18.574 | < 0.001 |
| | 父系: 菌株系統 | | 0.01220 | 5.054 | < 0.001 |
| | 巣: 菌株系統 | | 0.08567 | 3.097 | 0.002 |
| | | | | | |
| 生存時間 (時) (モデル 2) | 父系 | 27473.0 | -0.09483 | -8.229 | < 0.001 |
| | 巣 | | -0.87374 | -8.182 | < 0.001 |
| | 菌株系統 | | -0.15837 | -0.818 | 0.413 |
| | 父系: 巣 | | 0.01403 | 4.840 | < 0.001 |
| | 父系: 菌株系統 | | 0.00862 | 1.275 | 0.202 |
| | 巣: 菌株系統 | | 0.05360 | 0.852 | 0.394 |
| | 父系: 巣: 菌株系統 | | 0.0098 | 0.568 | 0.570 |

応答変数と説明変数、各説明変数の交互作用を含んだ一般化線形モデル(GLM: ポアソン回帰, n = 555) を作成した。モデル選択により AIC が最小、2 番目に小さいモデルの結果を示した。応答変数に対して有意な効果があった説明変数は太字で示した。*は説明変数が応答変数に対してマージナルな効果をもつことを示す。

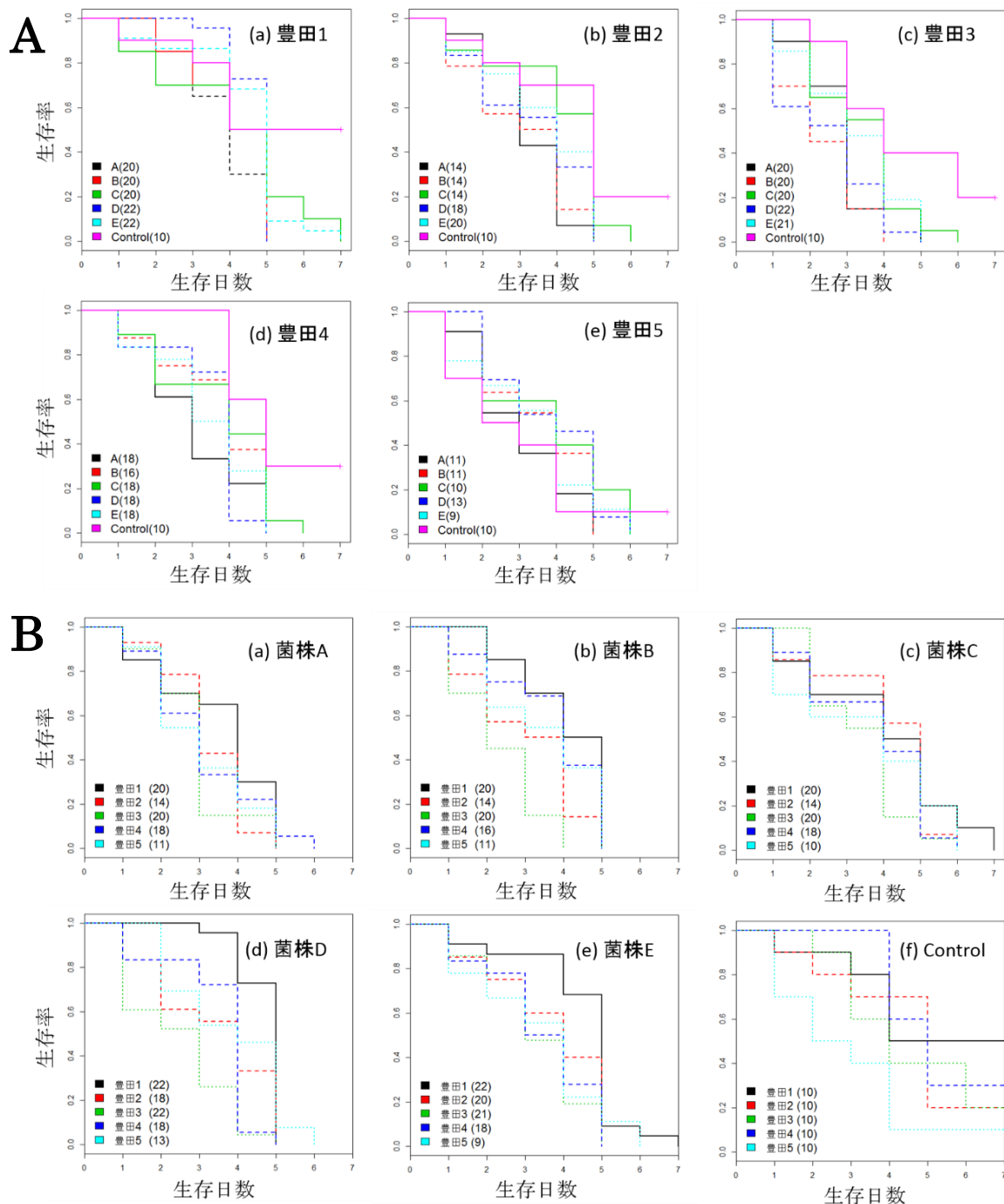


図 3-1. 既に羽化した働き蜂を用いた予備実験 (2014 年) の生存曲線。

A, B ともに同じデータを用いて異なる解析を行った。(A) 巣ごとに、菌株 5 系統の塗布区と対照区の生存時間を示した。凡例は塗布した菌株系統を、数字はサンプル数を示している。塗布した菌株系統によって個体の生存日数に差がある傾向があった。(B) 塗布した菌株ごとに、各巣の菌塗布個体の生存日数を示した。凡例は巣を、数字はサンプル数を示している。菌塗布個体の生存日数は巣によって有意な差があった(統計解析の結果は本文, 表 3-2 参照)。

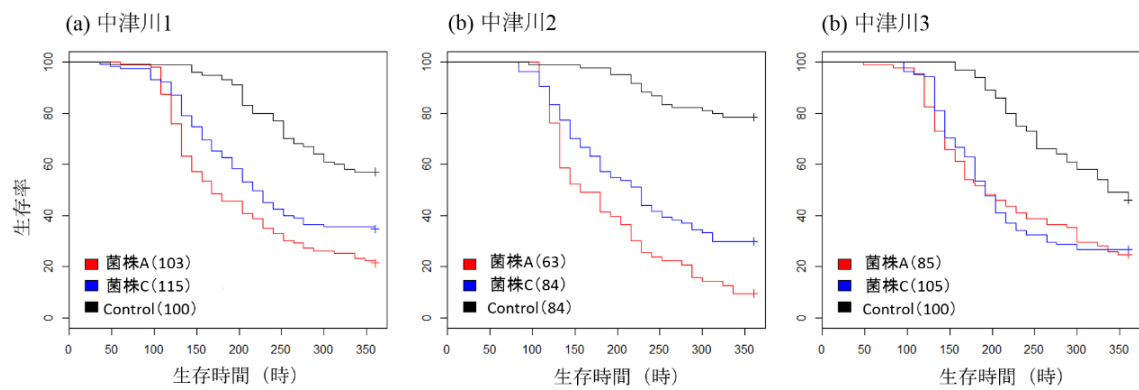


図 3-2. 2015 年に行った実験の巣ごとの菌塗布区及び対照区の生存曲線。

予備実験では異なる生育環境の働き蜂を実験に用いたが、本実験では中津川市内で同じ環境下で飼育した働き蜂を用いた。凡例は塗布した菌株系統を、数字はサンプル数を示している。全ての巣で対照区の個体の生存時間は菌株 A,C 塗布区どちらの個体よりも有意に長かった。中津川 1、2 では、菌株 A 塗布個体の方が菌株 C 塗布個体よりも有意に生存時間が短かったが、中津川 3 では塗布した菌株系統によって生存時間に差は認められなかった（統計解析の結果は本文参照）。

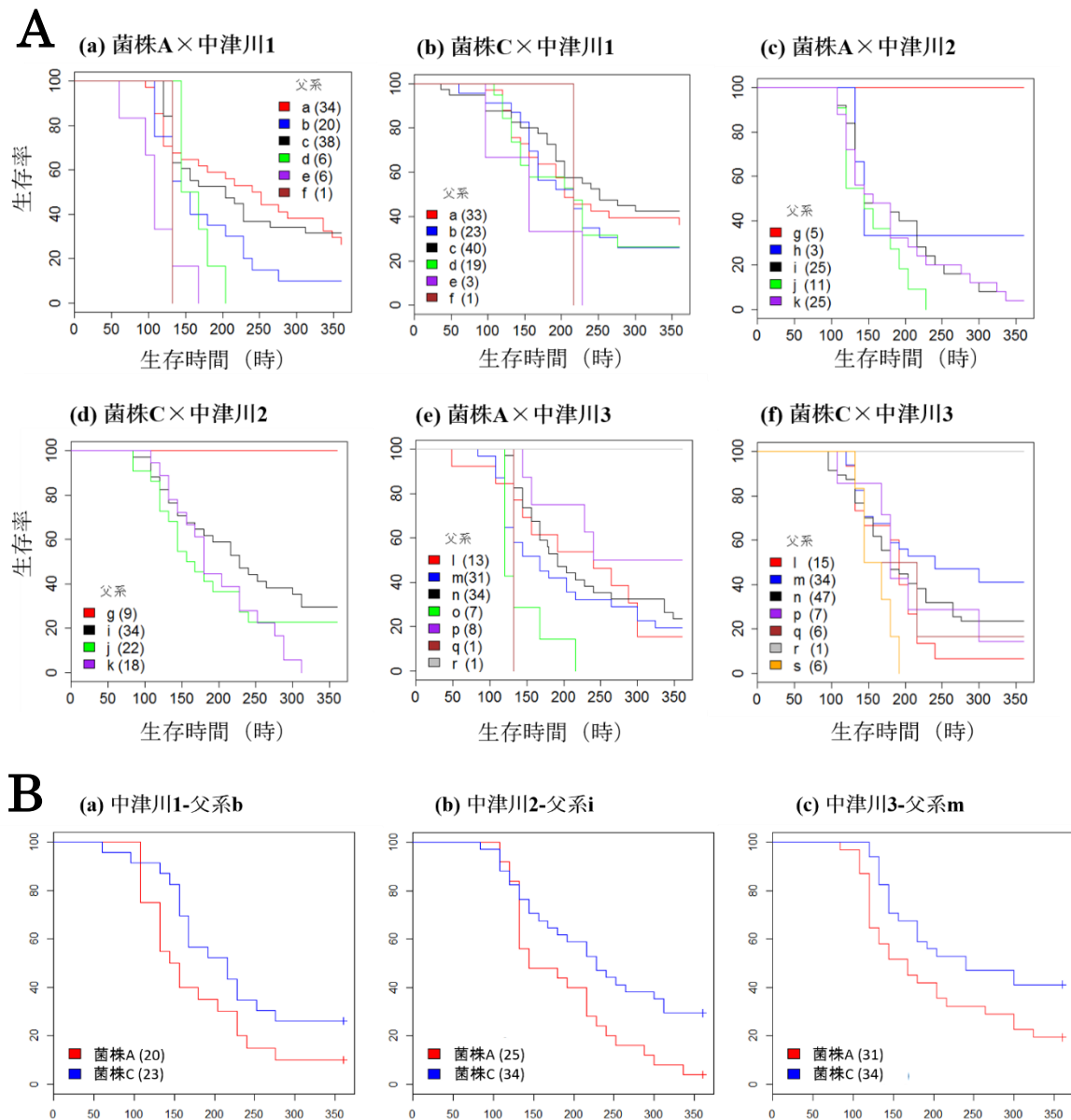


図 3-3. (A) 塗布した菌株ごとに、各父系の菌塗布個体の生存曲線(2015 年)。(B) 各父系の菌株 A 塗布個体と菌株 C 塗布個体の生存曲線 (2015 年)。

A: 凡例は各父系を、数字はサンプル数を示している。父系間で菌塗布個体の生存時間に有意な差が認められた。B: 凡例は菌株系統を、数字はサンプル数を示している。中津川 2 の父系 i と中津川 3 の父系 m では、菌株系統間で菌塗布個体の生存曲線に有意な差が認められた。中津川 1 の父系 b では菌株系統間で菌塗布個体の生存曲線が異なる傾向があった (統計解析の結果は本文参照)。

補足資料

予備実験の解析結果：各巣における塗布した菌株系統間での働き蜂の生存曲線の差

巣ごとに、塗布した菌株系統間ごとに働き蜂の生存曲線に差があるか否かログランク検定を用いて比較した。豊田 1 の菌株 A と D を塗布した個体の生存曲線には有意な差が認められ (Sequential Bonferroni; $p < 0.05$)、菌株 A と E を塗布した個体の生存曲線は異なる傾向があった (Sequential Bonferroni; $0.05 < p < 0.1$)。豊田 3 の菌株 B と C を塗布した個体の生存曲線には有意な差が認められた (Sequential Bonferroni; $p < 0.05$)。その他のすべての組合せでは生存曲線に有意な差は認められなかった (Sequential Bonferroni; $p > 0.05$)。

予備実験の解析結果：塗布した各菌株系統において、巣間の働き蜂の生存曲線の差

塗布した菌株系統ごとに、巣間で働き蜂の生存曲線に差があるか否かログランク検定を用いて比較した。菌株 B 塗布実験では、豊田 1 と 3、豊田 3 と 4、豊田 4 と 5 の生存曲線に有意な差が認められた (Sequential Bonferroni; $p < 0.05$)。菌株 D 塗布実験では、豊田 1 と 2、豊田 1 と 3、豊田 1 と 4、豊田 3 と 5 の生存曲線に有意な差が認められた (Sequential Bonferroni; $p < 0.05$)。菌株 E 塗布実験では、豊田 1 と 3、豊田 1 と 4 の生存曲線に有意な差が認められた (Sequential Bonferroni; $p < 0.05$)。その他のすべての組合せでは生存曲線に有意な差は認められなかった (Sequential Bonferroni; $p > 0.05$)。

標本集団の遺伝的特徴

本研究で用いるマイクロサテライトマーカーが父系解析に適しているか確認をした。病原菌の塗布実験に用いた 3 巣に加え、同じ個体群の 7 巣からそれぞれ 1 個体ずつ働き蜂を無作為に選択し、遺伝型のデータセット ($n = 10$) を構築した。それらのデータセットは Genepop 4.3 を用いて、Hardy-Weinberg 平衡の逸脱検定、連鎖不平衡の検定を行った (Rousset 2008)。ヌルアリルが存在する可能性の推定はソフトウェア Cervus 3.0 を用いて行った。

本個体群におけるマイクロサテライトの遺伝的特徴は表 S3-1 にまとめた。本個体群では連鎖不平衡は認められず ($p > 0.05$)、Hardy-Weinberg 平衡の有意な逸脱は認められなかった ($p > 0.05$)。また、ヌルアリルは検出されなかった ($p > 0.05$)。以上のことから、本研究で用いたマイクロサテライト 9 遺伝子座は父系解析に適用できると考えた。

表 S3-1. シダクロスズメバチの中津川個体群におけるマイクロサテライトマーカーの遺伝的特徴。

| Locus | N | N_a | He | $HW(p\text{-value})$ | $F(Null)$ |
|----------|-----|-------|-------|----------------------|-----------|
| Rufa5 | 10 | 3 | 0.658 | 1.000 | -0.1169 |
| Rufa19 | 10 | 6 | 0.800 | 0.480 | -0.0887 |
| List2001 | 10 | 5 | 0.742 | 0.400 | 0.0117 |
| List2003 | 10 | 9 | 0.879 | 0.132 | -0.0499 |
| List2004 | 10 | 8 | 0.868 | 0.480 | -0.1012 |
| List2019 | 10 | 5 | 0.668 | 0.765 | 0.0221 |
| List2020 | 10 | 5 | 0.747 | 0.267 | -0.0385 |
| VMA3 | 10 | 4 | 0.737 | 1.000 | -0.1270 |
| VMA6 | 10 | 7 | 0.811 | 0.104 | -0.0079 |

Locus; 遺伝子座, n ; サンプル数, N_a ; アリル頻度, He ; 平均ヘテロ接合体度, HW ; Hardy-Weinberg 平衡からの逸脱検定結果, $F(Null)$; ヌルアリルの存在可能性の検定結果。

第4章 種内及び種間社会寄生の検証

4-1. 序論

動物社会には、動物の協力行動を巧みに利用し、その労力を搾取する社会寄生と呼ばれる行動が知られている。社会性ハチ目では、社会寄生の行動は独立に複数回進化している (Hölldobler and Wilson 1990; Hines & Cameron 2010; Smith et al. 2013; Lopez-osorio et al. 2015)。クロスズメバチ属の多くの種では、種内および種間の条件的一時社会寄生を行うことが知られている (Greene 1991)。これらの社会寄生の利益としては、巣などの構造物の二次的利用と、宿主の労働力を得ることが考えられてきた (Wilson 1971)。社会寄生に成功した寄生者が宿主の構成員を得ることは、単に労働力を得るだけでなく、巣内の構成員の遺伝的多様性を増加させる。巣内の構成員の遺伝的多様性が増加することに基づく利益はいくつか提唱されており (Crozier & Fjerdingstad 2001)、社会寄生ではこの利益をも得ている可能性が考えられる。シダクロスズメバチの姉妹種のクロスズメバチは種内社会寄生することが分かっている (信太1959) が、シダクロスズメバチの社会寄生に関する知見はほとんどない。そこで、本章では、シダクロスズメバチが社会寄生をするか否か、調査した。

社会寄生の進化過程の一つとして、将来の寄生者と宿主が種分化後に同所的に生息し、そこで社会寄生が進化したとする種間仮説が提唱されているが (Wilson 1971, Starr 1979)、実証した例はない。この仮説を実証するためには社会寄生関係にある2種が、異なる分布域で単独に生息し、かつ、2種が同所的に生息する地域で種間社会寄生する例を発見することが必要であると提唱されている (Berlocher 2003; Buschinger 2009)。

本州中部地方ではシダクロスズメバチは中山地に分布し、平野から低山地に分布するクロスズメバチとは低山地で分布域が重複する (松浦 1995, 山内・渡辺 2013)。筆者は、クロスズメバチおよびシダクロスズメバチのどちらか片方が社会寄生していれば、種間仮説を支持する証拠が得られると考え、クロスズメバチが種間社会寄生をしているかについても調査した。

4-2. 材料と方法

4-2-(1). クロスズメバチとシダクロスズメバチの分布域の調査

クロスズメバチとシダクロスズメバチの分布域の調査は2015年の7月19、20日に岐阜県下呂市萩原町羽根 (495–583 m, 35°53'31"N, 137°11'52"E)、中呂 (589–751 m,

35°51'19"N, 137°13'56"E)、山之口 (770–1044 m, 35°59'26"N, 137°12'36"E)、2015年7月24日、8月7日に長野県諏訪郡富士見町境 (954–1490 m, 35°53'24"N, 138°17'17"E)、乙津 (958–1165 m, 35°54'58"N, 138°15'50"E) にて行った。山中にニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) またはスルメイカ (*Todarodes pacificus*) を200m間隔で設置し、蜂をおびき寄せた。餌を設置して一時間後から、一時間ごとに合計四回、餌に蜂が来ているか否かを目視で確認した。蜂の姿は確認できないが、餌に蜂が齧り取った跡がある場合には、餌の前で5分間、蜂が来るのを待った。萩原町の羽根と中呂では5地点ずつ、山之口と富士見町乙津では10地点ずつ、境では20地点、合計で50地点に餌を設置した (図4-1)。

4-2-(2). クロスズメバチとシダクロスズメバチの社会寄生の調査

クロスズメバチとシダクロスズメバチが社会寄生をしているか否か調べるために、2種の営巣初期巣を探した。野外調査は両種の分布が重複する岐阜県下呂市萩原町で2014年から2016年の6月中旬から7月中旬、長野県諏訪郡富士見町では2008年から2016年の6月中旬から7月中旬に行った。蜂の巣を見つける方法は以下の三つである。(1) 山中を歩いて偶然見つける。(2) 朽木を山中に設置して、その朽木を齧り取って巣に帰る創設女王を追いかける。(3) スルメイカを山中に設置して、おびき寄せた働き蜂に目印のついた餌を持たせて巣まで追いかける (詳細についてはNonaka 2011を参照)。発見した巣は土中から掘り出し、松浦 (1995) の検索表、識別図に従って頭部の模様による種同定を行った。また、巣の近くにクロスズメバチ属の女王の死体がある場合には、その巣では社会寄生があった可能性が考えられたため (Greene 1991)、巣を採集した際には、付近に女王の死体がないか調べた。採集した巣は木製の飼育箱に入れ、採集した町内にて、30%ショ糖液とニワトリの生の心臓と肝臓を与えて、次世代繁殖虫を生産するまで飼育した。本調査では、クロスズメバチ女王がいる巣を21巣、シダクロスズメバチ女王がいる巣を98巣採集した。

4-3. 結果

4-3-(1). クロスズメバチとシダクロスズメバチの分布

両種の分布調査の結果は図4-1に示した。岐阜県下呂市萩原町羽根ではクロスズメバチとシダクロスズメバチの働き蜂、中呂と山之口ではシダクロスズメバチの働き蜂のみを観察した。長野県諏訪郡富士見町境と乙津ではクロスズメバチとシダクロスズメバチの働き蜂を観察したが、境の標高が高い地点ではシダクロスズメバチのみを観察した。2014、2015年には羽根と境で、クロスズメバチ単独の巣を10巣以上採集し、中

呂と山之口、境でシダクロスズメバチ単独の巣を10巣以上採集した。

4-3-(2). クロスズメバチとシダクロスズメバチの種内社会寄生

2008年6月中旬に境 (954m、2種の分布が重複する地域) のクロスズメバチの巣の下からクロスズメバチ女王の死体を発見した。2008年6月16、17日に境 (954m) で、シダクロスズメバチの女王が巣上で争っているところを2例観察し、どちらの例も片方の女王が殺されていた。2014、2015年の6月下旬に、境 (954m) で、シダクロスズメバチの女王がいる巣の下から同種の女王の死体をそれぞれ発見した。

4-3-(3). クロスズメバチとシダクロスズメバチの種間社会寄生

2008年から2016年の調査で合計119巣発見し、そのうち、10巣でクロスズメバチとシダクロスズメバチが同居して営巣していた (表4-1)。2008年6月18日にクロスズメバチの働き蜂5個体とシダクロスズメバチの女王が争わず、同居している巣を発見した。その巣にクロスズメバチの女王が訪れ、クロスズメバチの働き蜂とシダクロスズメバチの女王から攻撃されているところを観察した (970m, 表4-1, 観察例1, 図4-2a)。2008年6月23日には富士見町境で、シダクロスズメバチ女王とクロスズメバチの働き蜂数個体が同居している巣を採集した (977m, 表4-1, 観察例2)。2010年6月中旬に境 (945m) で、シダクロスズメバチの女王と働き蜂が営巣する初期巣を採集し、同地区内 (954m) の屋外で飼育した。およそ一ヶ月後に、その飼育巣でクロスズメバチとシダクロスズメバチの働き蜂と、クロスズメバチ女王が同居しているところを観察した (表4-1, 観察例3)。2010年7月18日に境で、シダクロスズメバチの女王と働き蜂2個体、クロスズメバチの働き蜂20個体が同居している巣を発見した (973m, 表4-1, 観察例4)。

2011年6月23日に境で、クロスズメバチの女王と働き蜂3個体が営巣しているところを観察した。その翌日に、巣上で、シダクロスズメバチの女王とクロスズメバチの働き蜂が争っているところを観察した。また、巣の近くにはクロスズメバチの女王の体の一部と働き蜂の死体があった (946m, 表4-1, 観察例5)。2012年7月17日と2013年6月18日に境で、シダクロスズメバチの女王とクロスズメバチの働き蜂が同居している巣を採集した (2012年; 977m, 2013年; 945m, 表4-1, 観察例6, 7)。2013年6月18日に発見した巣の下には、シダクロスズメバチの女王の死体2個体、クロスズメバチの女王の死体1個体があった。2014年7月25日に羽根で、シダクロスズメバチ女王と働き蜂、クロスズメバチの働き蜂が同居している巣を発見した (495m, 表4-1, 観察例8)。

2015年6月16日に境で、シダクロスズメバチの女王とクロスズメバチの働き蜂3個体が同居している巣を採集し、巣の下にシダクロスズメバチの女王3個体の死体と、クロスズメバチ属の女王3個体の死体を発見した (970m, 図4-2b, c, d)。同年7月2日に、そ

の飼育箱の周囲をクロスズメバチ女王が徘徊しているのを観察し、その後、飼育箱の前でクロスズメバチの女王の死体を発見した。2016年7月26日に境で、シダクロスズメバチの女王とクロスズメバチの働き蜂11個体が同居する巣を採集した (956m, 表4-1, 観察例10)。

4-3-(4). クロスズメバチとシダクロスズメバチの混在巣の繁殖虫生産

クロスズメバチとシダクロスズメバチが混在する10巣のうち、5巣 (表4-1, 観察例1, 3, 4, 6, 8) で2種の働き蜂の採餌行動を観察した。繁殖虫生産時期には、観察例3でクロスズメバチの新女王とオス生産、観察例1、4、6でシダクロスズメバチの新女王とオス生産を観察した。

4-4. 考察

長期間の野外調査によって、クロスズメバチ女王とシダクロスズメバチ女王の巣の奪い合い、シダクロスズメバチ女王同士の巣の奪い合いを観察した。本研究では、クロスズメバチとシダクロスズメバチが同居している巣を10巣見つけ (表4-1)、いくつかの巣の付近では同種あるいは異種の女王の死体を発見した。2種混合巣において宿主の働き蜂が餌を巣に運ぶ行動も観察し、2種は社会寄生によって労働力を得ていることが明らかとなった。また、それらの巣からは、寄生者のオスと新女王が生産されており、社会寄生の形質は次世代に受け継がれるだろう。以上の結果から、上記2種は分布が重複する地域では、相互に種内、種間社会寄生していることが明らかとなった。両種の女王は単独でも営巣でき、2種の寄生の様式は種内および種間の条件的一時的社會寄生であると考えられた。

社会性ハチ目の女王が多回交尾する種や多女王制の種は、単女王制一回交尾の祖先種から進化してきた (Hughes et al. 2008)。女王の多回交尾や多女王制は巣仲間の遺伝的多様性を増加させ、それによる利益が提唱され、実証されている (病気への抵抗性仮説; 第3章、遺伝的役割分業)。社会寄生に成功したクロスズメバチ女王とシダクロスズメバチ女王の巣では、巣仲間の遺伝的多様性は増加し、それに起因する利益の可能性が考えられた。

Berlocher (2003) と Buschinger (2009) は種間仮説を実証するためには、姉妹種2種がそれぞれ単独分布域では独立あるいは種内寄生のみを行って生息し、生息域が重複する地域では寄生関係が生じている例を示す必要があると述べた。クロスズメバチは単独分布域で種内寄生を行っている可能性が示唆されている (信太 1959)。シダクロスズメバチの単独分布域にある複数の巣の下から複数のシダクロスズメバチ女王の死体が観察されている (佐賀 未発表)。さらに、シダクロスズメバチはクロスズメバチ

と分布が重複する地域では種内社会寄生していることから、単独分布域でも種内寄生していると考えられ、姉妹種のクロスズメバチと分布が重複する地域では種間社会寄生していることは種間仮説を支持する証拠であると考えられる。

Starr (1979) の種間仮説では、種間社会寄生は種内社会寄生する種が将来の宿主である近縁な種に対して、種内社会寄生の能力によって寄生に成功できた場合に進化しうると考えられている。クロスズメバチは種内寄生を行うことが知られており (信太 1959)、シダクロスズメバチも種内寄生を行っていた。この結果は、種内寄生が種間寄生の前適応的に働いて、種間寄生が進化するという Starr の仮説 (1979) を支持する。

理論的な研究によれば、種内社会寄生する2種が同所的に生息し、両種が種間の識別ができない場合には、相互の種間社会寄生は進化的に安定な戦略の一つである (Lowe et al. 2002)。一方、2種が種間識別できるように進化すると、両種の寄生能力に僅かな差が生じた場合に軍拡競争が起こり、相互の種間寄生の関係から、寄生者と宿主に分かれると結論付けられている (Lowe et al. 2002)。クロスズメバチとシダクロスズメバチは相互に種間社会寄生しており、これはLowe ら(2002) の結論とは一致しない。その理由として、側所的分布を示す両種の分布が重複する地域には、それぞれの種が独立に分布する地域から個体の流入が起こり、種間識別の進化や寄生能力の軍拡競争が起こりにくいことが考えられる。以上のことから、側所的分布を示す近縁な2種の分布が重複する地域では相互の種間社会寄生が起こりやすいと考えられる。

本研究結果は、社会寄生の進化過程としてStarrの種間仮説 (1979) を強く支持したが、生物地理学的手法によってクロスズメバチとシダクロスズメバチが異所的種分化したか否かを明らかにすることで、仮説の検証がさらに進むだろう。筆者の知る限りでは、*Bombus veteranus* と *B. humilis* が相互の種間社会寄生を行うことは知られているが (Vovčikov 1953)、スズメバチ亜科では本2種以外には、相互の種間社会寄生の例は知られていない。今後、側所的な分布を示す近縁な2種を詳細に調べることで、さらに相互の種間社会寄生の例が見つかると考えられる。相互の種間社会寄生を行う2種の勝敗や、その要因を調べることによって、寄生者と宿主に分かれる進化過程の解明が期待される。

表 4-1. 種間社会寄生を示すクロスズメバチとシダクロスズメバチが混在した 10 種の観察記録

| 観察例 | 観察日 | 地点 (標高: m) | 巣内の個体数 | | 備考 |
|------|-----------------|---------------|------------------------|----------------------|---|
| | | | クロスズメバチ | シダクロスズメバチ | |
| (1) | 2008 年 6 月 18 日 | 富士見町(970) | 働き蜂 5 個体 | 女王 1 個体 | クロスズメバチ女王が訪れ、働き蜂から攻撃を受けていた。 |
| (2) | 2008 年 6 月 23 日 | 富士見町(977) | 働き蜂 2-5 個体 | 女王 1 個体 | |
| (3) | 2010 年 7 月下旬 | 富士見町(954) | 女王 1 個体、 働き蜂 2-5 個体 | 働き蜂 40-50 個体 | 飼育巣 |
| (4) | 2010 年 7 月 18 日 | 富士見町(973) | 働き蜂 20 個体 | 女王 1 個体、働き蜂 2 個体 | |
| (5) | 2011 年 6 月 24 日 | 富士見町(946) | 働き蜂 2 個体 | 女王 1 個体 | 2011 年 6 月 23 日、クロスズメバチ女王と働き蜂の営巣を確認した。翌日、クロスズメバチ女王と働き蜂の死体を観察した。 |
| (6) | 2012 年 7 月 17 日 | 富士見町(977) | 働き蜂 5-10 個体 | 女王 1 個体 | |
| (7) | 2013 年 6 月 18 日 | 富士見町(945) | 働き蜂 2-5 個体 | 女王 1 個体 | 巣の下からシダクロスズメバチ女王 2 個体、クロスズメバチ女王 1 個体の死体を観察した。 |
| (8) | 2014 年 7 月 25 日 | 萩原町(495) | 働き蜂 3-5 個体 | 女王 1 個体、働き蜂 30-40 個体 | |
| (9) | 2015 年 6 月 16 日 | 富士見町(970) | 働き蜂 3 個体 | 女王 1 個体 | 巣の付近に、シダクロスズメバチの死体 3 個体と種判別できないクロスズメバチ属女王の死体 3 個体を観察した。2015 年 7 月 2 日には、巣箱の前にクロスズメバチ女王の死体を発見した。 |
| (10) | 2016 年 6 月 26 日 | 富士見町 (956) | 働き蜂 6 個体 | 女王 1 個体 | |

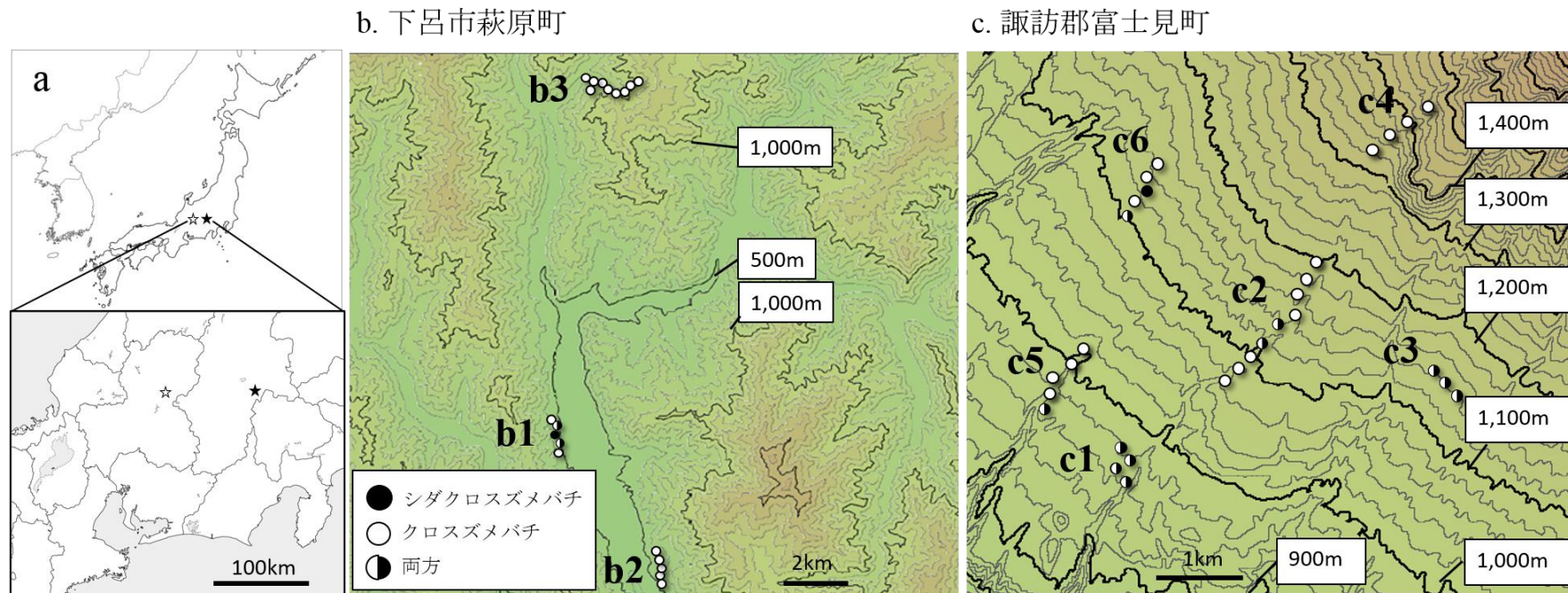


図 4-1. クロスズメバチとシダクロスズメバチの分布調査結果。

(a) 調査地の岐阜県下呂市萩原町と長野県諏訪郡富士見町の位置は白と黒の星印で示した。(b) 萩原町羽根 (b1)、中呂 (b2)、山之口 (b3) ; 標高 100m ごとに等高線を描き、太線で 500m 間隔を示した。(c) 富士見町境 (c1-4)、乙津 (c5,6) ; 標高 20m ごとに等高線を描き、太線で 100m 間隔を示した。蜂の観察記録は、クロスズメバチは白丸、シダクロスズメバチは黒丸、2 種両方の場合は白黒で表した。図は KASHMIR 3D を用いて作成した。

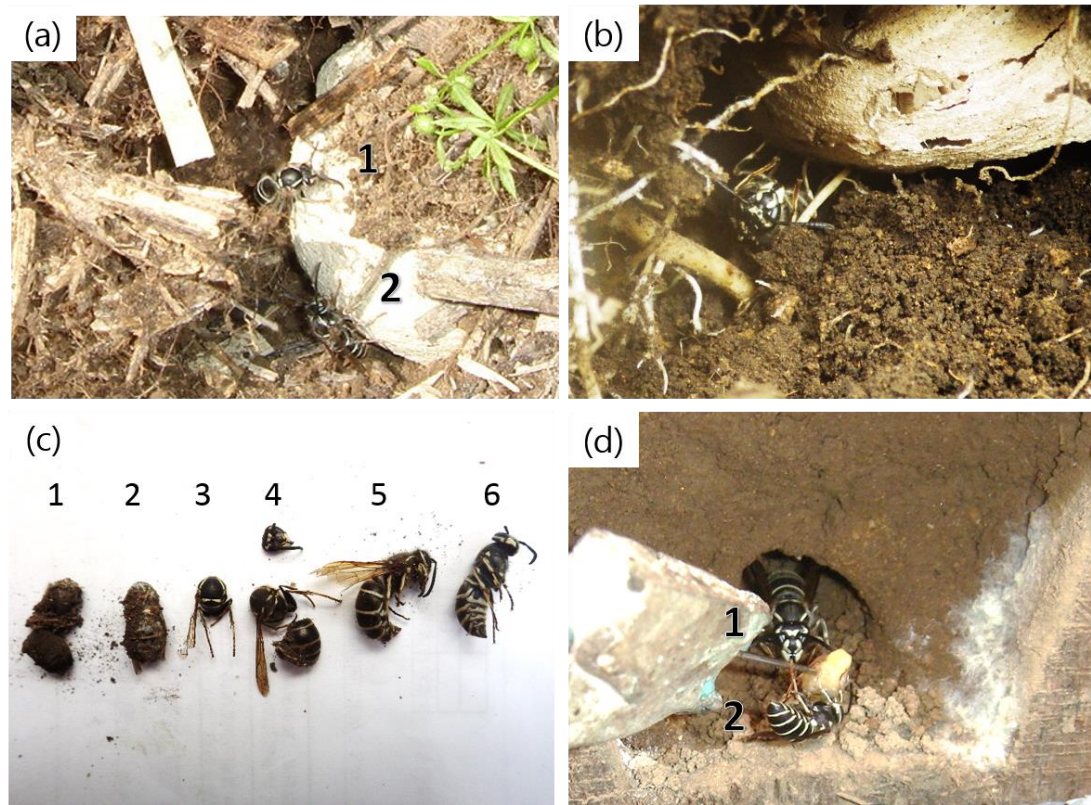


図 4-2. クロスズメバチとシダクロスズメバチの社会寄生の写真。

(a) クロスズメバチの女王(1)とシダクロスズメバチの女王(2)が巣上で争っている写真。(b,c)シダクロスズメバチの女王とクロスズメバチの働き蜂 3 個体が混在していた巣の周辺で見つけた他の女王蜂の死体 (観察例 9; 2015 年 6 月 16 日)。(b)下にいた瀕死のシダクロスズメバチ女王、(c) シダクロスズメバチ女王の死体 (4-6)、種は不明だがクロスズメバチ属の女王の死体(1-3)。(d)シダクロスズメバチの女王 (1)とクロスズメバチの働き蜂 (2)が同じ巣箱から出てきているところ (観察例 9)。

第5章 総合考察

ハチ目では真社会性の獲得後、女王の多回交尾や複数女王での共同営巣といった、巣内の遺伝的多様性が高まる方向の進化が起こっている(Hughes et al. 2008)。女王の多回交尾は巣仲間の血縁度を低下させるが、それらの種で真社会性が消失しなかった理由として、女王が多回交尾する種の働き蜂(蟻)が完全不妊であり、真社会性なしでは適応度を得られないことが考えられた(Hughes et al. 2008)。さらに、女王が多回交尾する種では働き蜂(蟻)の分業の進化、専門化が進んでおり、巣仲間の血縁度が減少しても、利他行動が維持される包括適応度を得ている可能性がある(Davies et al. 2012)。第2章では、単年生社会性狩り蜂のシダクロスズメバチにおいて女王の生涯繁殖成功度を巣盤中の糞数から推定する方法を考案した。その手法をもちいて、巣仲間の父系の数(女王の交尾回数の指標)が多い巣ほど、働き蜂の生産数と生涯繁殖成功度が高いことを示した。女王の交尾回数が多い巣ほど、巣仲間の血縁度が減少するが、適応度は増加したことから、女王の多回交尾は適応的であると考えられた。

第3章では、女王の多回交尾の利益仮説である病気への抵抗性仮説(Sherman et al. 1988)を検証するために、昆虫病原糸状菌 *Beauveria bassiana* を本種の働き蜂に接種して生存時間を調査し、父系によって生存時間に差があるか調べた。その結果、働き蜂の父系によって有意に菌塗布後の生存時間、生存割合に差があった。興味深いことに、ある父系では、菌塗布後から実験終了まで一個体も死亡しない例も観察された。以上の結果から、異なる遺伝子型の働き蜂は、病原体に対して異なる抵抗性をもつことが明らかにできた。また、本研究では病原糸状菌 *B. bassiana* の株系統ごとに同一遺伝子型の蜂への病原性が異なることも明らかにした。寄生主と宿主の遺伝子型の組合せによって、その病原性や抵抗性に差が見られたことは、両者に Hamilton (1980) が提唱した病原体-宿主の軍拡競争による共進化が起こっていると推察される。一方で、本研究では、特定の父系はある病原菌系統には強いが、別のある病原菌系統には弱いこと、また、別の父系では反対の性質をもつことは認められず、軍拡競争が生じている直接的な結果を示すことはできなかった。今後、*B. bassiana* だけでなくの別の菌種も用いて実験することで、病原体-宿主の軍拡競争があるか否かを正確に判断できるだろう。

第2章では父系の数が多く、遺伝的多様性が高い巣ほど適応的が高いことを示した。また、3章では遺伝的多様性の増加による利益仮説の一つである、異なる病気への抵抗性をもつ様々な遺伝子型の働き蜂で巣を構成することで、巣規模で病気への抵抗性を増加させる可能性を示した。以上のことから、シダクロスズメバチの女王が多回交尾して働き蜂の遺伝的多様性が増加することは、巣規模での病気への抵抗性が高まり、生産した働き蜂の死亡率が減少し、巣の活動性が維持、増強されやすくなり、結果的に働き蜂の生産数が増加したと考えられた。

生物一般に、個体群内の免疫形質に関する遺伝的なばらつきは、繁殖成功に強く影響することが知られている (Lazzaro and Little 2009)。また、病気や寄生に対する免疫防御への投資は、適応度を向上させる他の形質への投資とトレードオフの関係にある (Sheldon and Verhulst 1996)。ハチ目昆虫では半倍数性の性決定様式であるため、同じ巣内の同父母姉妹間の遺伝分散は2倍体生物よりも小さく、ハチ目の巣内は病原体にとって、一度侵入できれば一気に増殖できる環境であると考えられている (辻 1999)。さらに、土壌には多数の昆虫病原体が存在する事例が数多く報告されている (Rath et al. 1992; Keller et al. 2003; Hughes et al. 2004; Meyling & Eilenberg 2006; Pilz et al. 2008; Reay et al. 2008; Tuininga et al. 2009; Griffiths & Hughes 2010)。これらの理由から、シダクロスズメバチのようなハチ目の土中に営巣する種では病原体に対する抵抗性を獲得する必要があると考えられ、遺伝的多様性を高める女王の多回交尾が進化した原因の一つと推察される。そして近年、スズメバチ亜科で土中に営巣する種と、開放空間に営巣する種で女王の交尾回数に差があるか、種間比較が行われたが、有意な傾向は見出されなかった (Loope et al. 2014)。本種では、巣仲間の遺伝的多様性が増すことによって病気に対する抵抗性が高まると考えられたが、土中に営巣する他の女王の交尾回数が少ない種における病原体との関係や、開放空間に営巣する種の女王の多回交尾の利益仮説を検証することで女王の多回交尾の進化要因の全貌が見えてくると考えられる。

巣内の働き蜂の遺伝的多様性を高める要因は、複数のオスと交尾をすることと、女王がもつ各父系の精子を平等に使うことが考えられる。真社会性ハチ目の女王は生涯のある一定期間に交尾をし、一度産卵を始めると二度と交尾を行わない (Wilson 1971)。そのため、交尾期間に女王が何頭のオスと交尾するか (父系の数) が父系の偏りの程度よりも遺伝的多様性を高める主要因であると考えられる。仮に、各父系の精子を平等に使って働き蜂を生産できたとしても、女王の交尾回数が少なく、精子の父系の種類が少ない場合には遺伝的多様性を増加させることはできない。

Vespula maculifrons の繁殖初期巣において、有効父系数 (女王の交尾回数の指標; 各父系の精子が使われた割合で重みづけした父系の数) と女王育房数に正の相関が示されている (Goodisman et al. 2007)。この結果から、女王の多回交尾が適応的である可能性と、交尾回数の多い女王の巣は繁殖虫生産開始時期が早い可能性が示唆されている。第2章ではシダクロスズメバチでは繁殖初期巣において、女王の交尾回数が多く、父系の偏りが小さい巣ほど、有意に多くの働き蜂を生産することを明らかにした。また、働き蜂が多数の巣では、同じ時期の働き蜂が少ない巣と比較して、新女王の発達段階がより進んでおり、早くから繁殖虫生産を行っていることが示された。この結果は、先行研究で示唆されていた女王の交尾回数と繁殖虫生産開始時期との関係が、直接的に関連しているのではなく、働き蜂生産数を介した関係である可能性を示している。さらに、シダクロスズメバチでは早い時期に生産された女王ほど体重が重く、越冬中の生存率も高いと

ということが明らかとなった。本種では姉妹種のクロスズメバチと相互に、種内及び種間社会寄生する (第 4 章)。クロスズメバチ属では、体サイズが大きな女王ほど巢の奪い合いの闘争に勝つこと、営巣に成功する可能性が高いことが指摘されている (Harris and Beggs 1995)。以上の結果から、早期に羽化し、越冬した新女王は遅くに越冬した新女王よりも越冬後の生存率が高いと考えられる。女王の交尾回数が多く、父系の偏りが小さい巢では、遺伝的多様性の増加による利益に加え、高い生存率が期待される体重の大きな次世代女王も生産できる利益をも得られていると考えられた。

真社会性ハチ目の各種における女王の平均交尾回数と父系の偏りの平均には負の相関があり (Jaffé 2012)、女王が多回交尾する種ではメスの隠蔽的選好みにより、各父系の精子を平等に使い、巣仲間の遺伝的多様性を増加させている可能性がある (Baer 2015)。シダクロスズメバチでは、各女王の交尾回数と父系の偏りに有意な関係は認められなかったが、父系の偏りと働き蜂生産数には有意な負の相関が認められた (第 2 章)。この結果から、各父系の働き蜂を平等に生産できる女王ほど適応的であると考えられ、交尾後のメスの受精嚢内での精子競争やメスの隠蔽的選好みが起こっている可能性が示唆された。

女王の多回交尾の利益仮説である精子枯渇仮説 (Cole 1983) を検証するために、その仮説が成立するときのメス生産数、父系の数、父系の偏りに関する予測と実際のデータを比較した。実際のデータからは、父系の数と女王生産数には有意な正の関係が認められ、その関係からは精子枯渇仮説が支持された。さらに、新女王生産数と父系の偏りには正の相関があり、この結果は、精子枯渇仮説を基にしたメス生産数が多い巣ほど父系の偏りが生じるという予測のパターン (Jaffé et al. 2012) と合う。一方、新女王生産数に対して父系の数と父系の偏りには負の交互作用が認められ、これは上記の予測パターンと合わない。本研究の結果だけからは、仮説を棄却することはできなかった。今後、繁殖終了期の創設女王の受精嚢内の精子が枯渇しているか否かを調べることで、精子枯渇仮説の妥当性が明らかになると考えられる。

これまでの研究と本研究により、真社会性ハチ目の中で女王の多回交尾が進化しているヒメハキリアリ属、ミツバチ属、クロスズメバチ属で病気に対する抵抗性仮説が実証された (Hughes and Boomsma 2004; Seeley and Tarpay 2007; 第 3 章)。上記のことから、真社会性ハチ目では巣仲間の遺伝的多様性の増加によって、病気への抵抗性が高まることで得られる利益は、女王が多回交尾する種に分化する前の祖先種から普遍的に存在すると推察された。真社会性の集団構造をもつシロアリ目でも、その社会性が巣仲間の遺伝的多様性を保持する方向に進化している (松浦 2011)。ヤマトシロアリの女王は死後、自らに代わって繁殖を担う二次女王を単為生殖で生産し、働き蟻や有翅虫は有性生殖で生産している (Matsuura et al. 2009)。この単為生殖による女王位継承システムは、巣仲間の血縁度を高める近親交配を避け、巣仲間の遺伝的多様性を維持し、環境ストレスに対しての抵抗性を維持することができると考えられている (Vargo et al 2012; Matsuura

2017)。シロアリ目の中でこの女王位継承システムは、独立に複数回進化している (Fougeyrollas et al. 2015)。また、アリでも生殖虫は単為生殖で生産するが、働き蟻は有性生殖や遺伝子組み換えによって生産し、巣仲間の遺伝的多様性を維持している例も知られている (例えば、Pearcy et al. 2004; Okita and Tsuchida 2016)。真社会性昆虫では、巣仲間の遺伝的多様性を維持、増加させることに強い選択がかかっており、その要因として環境ストレス (病気) が考えられた。

スズメバチ亜科では、多くの種が種内、種間社会寄生を行うことが知られている (Carpenter & Perera 2006)。第4章では、クロスズメバチとシダクロスズメバチが相互に種内、種間社会寄生をすることを明らかにした。シダクロスズメバチを含むスズメバチ亜科の土中などの閉鎖空間に営巣する種では、好適な営巣場所を巡って種内および種間での闘争が考えられる (松浦・山根 1984)。一方、スズメバチ亜科でも営巣場所が無数にある開放空間に営巣する種でも巣の乗っ取り合いが起こっていることから、(*Vespa analis*; 松浦・山根 1984, *Vespa simmilima xanthoptera*; 佐賀未発表) 巣の乗っ取り合いは営巣場所よりも巣そのものが重要な資源であると推察されている (松浦・山根 1984)。本研究ではシダクロスズメバチとクロスズメバチの初期巣を約 120 採集し、少なくとも 10 巣は種間社会寄生による 2 種混在巣だった。クロスズメバチ属で種内寄生も含めた巣の乗っ取りが個体群の中でどの程度の割合で起こっているかについて、正確な研究はない。一方で、クロスズメバチ属の巣の下から頻繁に複数の女王の死体が見つかること (Greene 1991, 第4章)、本種では種間社会寄生だけでも全体の巣の少なくとも約 10% で起きていることから、本種の種内社会寄生の頻度は決して低くないと考えられる。巣の乗っ取り行動は非常に危険性が高いと考えられ、それに見合う利益が得られているのだろうか。筆者は巣の乗っ取りによって得られる利益は構造物としての巣や宿主の労働力だけでなく、遺伝的多様性を増加させることによって得られる利益もあると考えている。

シダクロスズメバチにおいて交尾回数が多い巣ほど、適応度が高くなる要因の一つとして、優れた女王仮説 (Bonduriansky 2001) も考えられる。これは、女王の交尾回数や繁殖成功度が高いことは、女王の形質の一部であるという仮説である。キオビクロスズメバチでは、創設女王の頭幅や体重と女王育房数に有意な相関はないが、胸幅と女王育房数に有意な正の相関があることが知られている (Harris and Beggs 1995)。さらに、セイヨウミツバチでは体サイズや体重の重い女王ほど、より発達した卵巣や大きな受精囊をもったり、得られる精子数が増大したりする (Nelson and Grey 1976)。さらに、この優れた女王仮説は、性選択とも密接な関わりがあると考えられる。真社会性ハチ目では、交尾回数が少ない種では父系の偏りを増加させ、巣仲間の血縁度を高める方向に、交尾回数が多い種では父系の偏りを減少させ、巣仲間の遺伝的多様性を増加させる方向へ交尾後性選択が起こっている可能性が示唆されている (Jaffé et al. 2012, Baer 2015)。第2章では、繁殖初期巣において、父系の数が多く、父系の偏りが小さい巣ほど、越冬生存

率が高く、越冬後の生存率も高いと考えられる新女王の生産が期待でき、交尾後性選択を行える女王ほど適応的である可能性が示された。これとは別に、オスが特定の求愛場所（レック）を形成する *Polistes dominulus* では、オスの腹部の模様によってメスからの選好みが存在する交尾前性選択が起きている (Izzo and Tibbetts 2012)。シダクロスズメバチのオスもレックを形成することが報告されており (松浦・山根 1984)、優れた女王は、優れたオスを選択しているかもしれない。優れた女王仮説を検証するためには、女王の乾燥重量や体サイズ、父系の数、父系の偏り、繁殖成功度の関係に加えて、これまであまり注目されてこなかった性選択についても調べる必要がある。

本研究で調査したシダクロスズメバチの 30 巣では観察された父系数 (女王の交尾回数) は 3 から 8、有効父系数は 2.33 から 7.12 だったが(第 2 章と第 3 章の結果から)、有効父系数が上記の範囲に収まる要因は何が考えられるだろうか。女王の交尾回数が 8 回よりも多い巣が見つからない理由としては、第 1 章で述べたような交尾によるコストが考えられた。他方で、女王の交尾回数が少ない例が観察されなかった理由としては、働き蜂と女王の間でオスの子を巡る争い (Trivers and Hare 1976) が考えられた。Bourke (1994) は有効父系数が 2 以下の場合には、働き蜂にとって、自分あるいは他の働き蜂のオスの子の方が女王の息子 (弟) よりも血縁度が高く、母親からの働き蜂への産卵抑制を取り除くために、働き蜂による母親殺しが起こると予測している。近年、*Dolichovespula arenaria* において、女王の交尾回数が少ない、または、父系の偏りが大きい巣仲間の血縁度が高い集団では、働き蜂による母親殺しが起きていることが実証された (Loope 2015)。Loope (2015) は、働き蜂と女王のオスの子を巡る争いが、女王の交尾回数を増加させる可能性を示した。シダクロスズメバチでも有効父系数が 2 以下の巣では母親殺しが起こりうり、仮に母親殺しが起きているとすると巣が大きくなり、筆者が巣を発見できていない可能性が推察された。

本研究では、真社会性ハチ目の女王の多回交尾が適応的であることを女王の生涯繁殖成功度から実証した。また、巣内の遺伝的多様性を高める利益仮説のひとつである病気への抵抗性仮説が本種に適用されることを示した。さらに、その仮説と排反でない精子枯渇仮説が適用される可能性も検証し、積極的には支持しない結果を得た。上記の結果は、繁殖虫生産開始時期まで生存できた巣から得られた。他方で、本研究では営巣に失敗した女王の巣や、営巣初期に解散した巣については調べられていない。筆者は、真社会性ハチ目の女王が行う多回交尾の進化背景の全容を解明するためには、女王の多回交尾のコストを明らかにする必要があると考えている。具体的には、女王の多回交尾による (1) 越冬期間中の生存に与えるコストと、(2) 越冬後から営巣までの生存に与えるコストの検証が今後の課題である。(1) は越冬直後の女王の交尾回数と、越冬終了後の女王の交尾回数を比較することで検証でき、(2) は、ある個体群内の春先に越冬から目覚め、巣場所探索している女王の交尾回数と、営巣初期の女王の交尾回数を比較することで検証できると考えている。上記の課題以外にも、今回実証した病気への抵抗性仮説と

排反でない多回交尾の利益仮説の検証、及び、女王の多回交尾について性選択の視点からの研究が必要だろう。シダクロスズメバチは、東海地方の山間地域で食べられる昆虫として、採集して飼育する文化が地域に根付いており、上記の課題に取り組むためには最も適した材料であると確信しており、今後の研究の発展が大いに期待される。

謝辞

本研究を遂行し、博士学位論文をまとめるにあたり、多大なるご支援とご指導を賜りました嶋田正和教授には衷心より感謝しております。学術的な議論の際には誰の意見にも真摯に向き合ってくださいとお人柄は、今後の目指す教員像でもあります。

本論文作成に当たり、博士学位審査委員として多くのご助言いただいた土田浩治教授、辻和希教授、伊藤元巳教授、吉田丈人准教授には大変感謝しております。土田教授には、卒業論文研究をご指導いただいた時からこれまで、不勉強な筆者を見限らず叱咤激励し続けてくださり、大変感謝しております。伊藤教授、並びに伊藤元巳研究室に在籍していた阪口翔太博士、青木誠志郎博士、石川直子博士、倉田正観氏、嶋田正和研究室の大林夏湖博士、長谷和子博士、京都大学生態学研究センターの程木義邦特任准教授には遺伝学的実験のご支援、ご指導を賜り、感謝しております。吉田准教授、並びに吉田丈人研究室の内田圭博士、森照貴博士、笠田実博士、国立学情報研究所の阿部真人博士、国立台湾師範大学の小島渉博士、東京大学の深野祐也助教、千葉大学の笹川幸治助教、専修大学の増子恵一教授を代表とする社会性昆虫勉強会の皆さま、嶋田研究室の先輩諸兄には、日頃より筆者の研究へのご助言を賜り、大変感謝しております。

本研究は、東海地方の蜂愛好会の方のご協力の下、遂行することができました。蜂の採集、飼育には、今井久喜氏、小林洋夫氏、高橋勝幸氏、日下部明男氏、青木達雄氏、青木滋氏、青木和治氏、佐藤文洋氏、鈴木就登氏、河辺穂奈美氏、高橋萌氏、加藤貴範氏にご協力いただき、感謝しております。また、蜂の採集に当たり宿舎を提供して下さった岐阜大学付属演習林の石田仁教授、都竹彰則氏、青木将也氏には感謝しております。共同研究者の岡田泰和助教、奥野正樹博士、金井實氏、柴崎祥太氏には本論文作成に当たり、有益な議論をしていただき、感謝しております。

博士課程在学期間中、家賃補助をしてくださった有限会社 Come On Up の永瀬泰子氏、アメリカ滞在中の生活をご支援くださった Alison J. James 氏、Joplin James 氏、Carol S. Spencer 博士、Edwin Webbley 博士、Brian Neufess 氏、羽場優紀氏には誠に感謝しております。本論文にご助言くださったバーモント大学の Sara Cahan 博士、アメリカ自然史科学博物館の Federico Lopez-Osorio 博士、カリフォルニア大学の Kevin Loope 博士には感謝しております。また、嶋田研究室に在籍していた小林祐一朗氏、清水裕也氏、藤岡春菜氏をはじめとする後輩の皆様には、研究の合間に、時には知性ある話題から、そうでない話題までお付き合いくださり、感謝しています。

筆者の自己啓発休業の取得を認め、博士課程進学を後押ししてくださった高賀敦子氏、渡辺美智子氏、前職場からいつも激励して下さった、千村芳正氏、田島さおり氏、山内美幸氏には心から感謝しております。英語論文作成や英語での研究発表に当たり、英文表現等の助言をして下さった元同居人の Daniel Nicholson-Hair 氏、Peter Williams 氏、吉

田研究室の **Kylie Park** 氏に感謝します。

本研究は、藤原ナチュラルヒストリー振興財団、武田科学振興財団、長野県科学振興財団より研究費の一部を援助していただきました。誠にありがとうございます。

最後に、3 年間、筆者を精神的、経済的に支え続けてくれた家族には感謝しております。

平成 28 年 12 月

佐賀達矢

引用文献

- Andersson, M. & Simmons, L.W., 2006. Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology and Evolution*, 21(6), pp.296–302.
- Arnqvist, G., 1989. Multiple mating in a water strider : mutual benefits or intersexual conflict ? *Animal Behaviour*, 38, pp.749–756.
- Baer, B., 2015. *Cryptic Female Choice in Arthropods* A. V Peretti & A. Aisenberg, eds., Cham: Springer International Publishing.
- Baer, B., 2005. Sexual selection in Apis bees. *Apidologie*, 36(2), pp.187–200.
- Baer, B. & Schmid-hempel, P., 1999. Experimental variation in polyandry affects parasite loads and fitness in a bumble-bee. *Nature*, 397, pp.151–154.
- Baer, B. & Schmid-Hempel, P., 2003. Bumblebee workers from different sire groups vary in susceptibility to parasite infection. *Ecology Letters*, 6, pp.106–110.
- Baer, B. & Schmid-Hempel, P., 2005. Sperm influences female hibernation success, survival and fitness in the bumble-bee *Bombus terrestris*. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 272(1560), pp.319–323.
- Baer, B. & Schmid-Hempel, P., 2001. Unexpected consequences of polyandry for parasitism and fitness in the bumblebee, *Bombus terrestris*. *Evolution*, 55(8), pp.1639–1643.
- Barnes, H. & Blackstock, J., 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: Detailed investigation of the sulphophosphovanilun method for “total” lipids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 12(1), pp.103–118.
- Beekman, M., Van Stratum, P. & Lingeman, R., 1998. Diapause survival and post-diapause performance in bumblebee queens (*Bombus terrestris*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 89(3), pp.207–214.
- Berlocher, S.H., 2003. When houseguests become parasites: sympatric speciation in ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12), pp.6896–6898.
- Blacket, M.J. et al., 2012. Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments-an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Molecular Ecology Resources*, 12(3), pp.456–463.
- Bonduriansky, R., 2001. The evolution of male mate choice in insects : a synthesis of ideas and evidence. *Biological Reviews*, 76, pp.305–339.
- Boomsma, J.J., 2007. Kin Selection versus Sexual Selection: Why the Ends Do Not Meet. *Current Biology*, 17(16), pp.R673–R683.
- Boomsma, J.J., 2009. Lifetime monogamy and the evolution of eusociality. *Philosophical*

- Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1533), pp.3191–3207.
- Boomsma, J.J., Baer, B. & Heinze, J., 2005. The evolution of male traits in social insects. *Annual review of entomology*, 50, pp.395–420.
- Boomsma, J.J. & Grafen, A., 1991. Colony-level sex ratio selection in the eusocial Hymenoptera. *Journal of evolutionary biology*, 407, pp.383–407.
- Boomsma, J.J. & Nash, D.R., 2014. Evolution: Sympatric Speciation the Eusocial Way. *Current Biology*, 24(17), pp.R798–R800.
- Boomsma, J.J. & Ratnieks, F.L.W., 1996. Paternity in eusocial Hymenoptera. *Society, The Royal Transactions, Philosophical Sciences, Biological*, 351, pp.947–975.
- Bourke, A.F.G., 1994. Worker matricide in social bees and wasps. *Journal of theoretical biology*, 167, pp.283–292.
- Buschinger, A., 1986. Evolution of social parasitism in ants. *Trends in Ecology & Evolution*, 1(6), pp.155–160.
- Buschinger, A., 2009. Social parasitism among ants: A review (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News*, 12, pp.219–235.
- Buschinger, A., 1990. Sympatric speciation and radiative evolution of socially parasitic ants - Heretic hypotheses and their factual background. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 28(4), pp.241–260.
- Calleri, D. V et al., 2006. Inbreeding and disease resistance in a social insect: effects of heterozygosity on immunocompetence in the termite *Zootermopsis angusticollis*. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 273(1601), pp.2633–2640.
- Carpenter, J.M. & Perera, E.P., 2006. Phylogenetic Relationships among Yellowjackets and the Phylogenetic Relationships Among Yellowjackets and the Evolution of Social Parasitism (Hymenoptera : Vespidae , Vespinae). *American Museum Novitates*, (3507), pp.1–19.
- Cole, B.J., 1983. Multiple mating and the evolution of social behavior in the hymenoptera. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 12(3), pp.191–201.
- Cotter, S.C. & Wilson, K., 2002. Heritability of immune function in the caterpillar *Spodoptera littoralis*. *Heredity*, 88, pp.229–234.
- Crozier, R.H. & Bruckner, D. 1981. Sperm clumping and the population genetics of Hymenoptera. *The American Naturalist*, 117(4), 561–563.
- Crozier, R. H. & Fjerdingstad, E., 2001. Polyandry in social Hymenoptera-disunity in diversity? *Annales Zoologici Fennici*, 38(3/4), pp.267–285.
- Crozier, R.H. & Pamilo P., 1996. *Evolution of Social Insect Colonies – Sex Allocation and Kin Selection*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Daly, D. et al., 2002. Polymorphic microsatellite loci for eusocial wasps (Hymenoptera : Vespidae). *Molecular Ecology Notes*, 2, pp.273–275.

- Darwin, C. R., 1859. Instinct. In *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. Chapter 7. London: Murray.
- Davies, N.B., Krebs, C.J. & West, S.A. (2012). Altruism and conflict in the social insects. In *An Introduction to Behavioural Ecology*, 4th Edition, chapter 13. Chichester: Wiley-Blackwell.
- Duchateau, M.J., Velthuis, H.H.W. & Boomsma, J.J., 2004. Sex ratio variation in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Behavioral Ecology*, 15(1), pp.71–82.
- Eberhard W.G., 1996. *Female control: sexual selection by cryptic female choice*. Princeton University Press, Princeton
- Evison, S.E.F. & Hughes, W.O.H., 2011. Genetic caste polymorphism and the evolution of polyandry in *Atta* leaf-cutting ants. *Die Naturwissenschaften*, 98(8), pp.643–9.
- Fjerdingstad, E.J. & Boomsma, J.J., 1998. Multiple mating increases the sperm stores of *Atta colombica* leafcutter ant queens. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 42(4), pp.257–261.
- Fjerdingstad, E.J. & Keller, L., 2004. Relationships between phenotype, mating behavior, and fitness of queens in the ant *Lasius niger*. *Evolution; international journal of organic evolution*, 58(5), pp.1056–1063.
- Fougereyrollas, R. et al., 2015. Asexual queen succession in the higher termite *Embiratermes neotenicus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282, p.20150260.
- Goodisman, M.A.D., Kovacs, J.L. & Hoffman, E.A., 2007. The significance of multiple mating in the social wasp *Vespula maculifrons*. *Evolution; international journal of organic evolution*, 61(9), pp.2260–7.
- Greene, A., 1991. *Dolichovespula* and *Vespula*. In: Ross KG, Matthews RW, eds. *The social biology of wasps*. Ithaca, NY: Cornell University Press, 263–305.
- Griffiths, H.M. & Hughes, W.O.H., 2010. Hitchhiking and the removal of microbial contaminants by the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Ecological Entomology*, 35(4), pp.529–537.
- Hajek, A.E. & Leger, R.J.S. (1994) Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*, 39, 293–322.
- Hamilton, W.D., 1964. The genetical evolution of social behaviour. I & II. *Journal of theoretical biology*, 7(1), pp.1–52.
- Hamilton, W.D., 1980 Sex versus non-sex versus parasite, *Oikos*, 35, 282–290
- Harris, R.J. & Beggs, J.R., 1995. Variation in the quality of *Vespula vulgaris* (L .) queens (Hymenoptera : Vespidae) and its significance in wasp population dynamics. *New Zealand Journal of Zoology*, 22(2), pp.131–142.
- Hasegawa, E. & Takahashi, J., 2002. Microsatellite loci for genetic research in the hornet *Vespa*

- mandarinia and related species. *Molecular Ecology Notes*, 2, pp.306–308.
- Heinze, J. & Tsuji, K., 1995. Ant Reproductive Strategies. *Researches on Population Ecology*, 37(2), pp.135–149.
- Hines, H.M. & Cameron, S.A., 2010. The phylogenetic position of the bumble bee inquiline *Bombus inexpectatus* and implications for the evolution of social parasitism. *Insectes Sociaux*, 57(4), pp.379–383.
- Hölldobler, B. & Wilson, E.O., 1990. *The ants*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Huber, P., 1810. *Recherches sur les mœurs des fourmis indi- gènes*. – J.J. Paschoud, Paris, XIII.
- Hughes, W.O.H. et al., 2008. Ancestral monogamy shows kin selection is key to the evolution of eusociality. *Science*, 320(5880), pp.1213–6.
- Hughes, W.O.H. et al., 2004. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85(1), pp.46–53.
- Hughes, W.O.H. & Boomsma, J.J., 2006. Does genetic diversity hinder parasite evolution in social insect colonies? *Journal of evolutionary biology*, 19(1), pp.132–43.
- Hughes, W.O.H. & Boomsma, J.J., 2004. Genetic diversity and disease resistance in leaf-cutting ant societies. *Evolution; international journal of organic evolution*, 58(6), pp.1251–60.
- Hughes, W.O.H., Bot, A.N.M. & Boomsma, J.J., 2010. Caste-specific expression of genetic variation in the size of antibiotic-producing glands of leaf-cutting ants. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 277(1681), pp.609–15.
- Izzo, A.S. & Tibbetts, E.A., 2012. Spotting the top male: sexually selected signals in male *Polistes dominulus* wasps. *Animal Behaviour*, 83(3), pp.839–845.
- Jaffé, R., 2014. An updated guide to study polyandry in social insects. *Sociobiology*, 61(1), pp.1–8.
- Jaffé, R. et al., 2012. Patterns of paternity skew among polyandrous social insects: What can they tell us about the potential for sexual selection? *Evolution*, 66(12), pp.3778–3788.
- Johnson, E.L. et al., 2009. Resource allocation in a social wasp: effects of breeding system and life cycle on reproductive decisions. *Molecular ecology*, 18(13), pp.2908–20.
- Jones, O.R. & Wang, J., 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), pp.551–555.
- Keller, L., 1993. *Queen number and sociality in insects*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Keller, S., Kessler, P. & Schweizer, C., 2003. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *BioControl*, 48(3), pp.307–319.
- Kovacs, J.L. & Goodisman, M.A.D., 2012b. Effects of size , shape , genotype , and mating status

- on queen overwintering survival in the social wasp *Vespula maculifrons*. *Environmental entomology*, 41(6), pp.1612–1620.
- Kraus, F.B. et al., 2004. Sperm limitation and the evolution of extreme polyandry in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 55, pp.494–501.
- Kraus, F.B. & Moritz, R.F.A., 2010. Extreme polyandry in social Hymenoptera: Evolutionary causes and consequences for colony organisation. *Animal Behaviour: Evolution and Mechanisms*, pp.413–439.
- Kraus, B., Page, R.E., 1998. Parasites, pathogens and polyandry in social insects, *The American Naturalist*, 151, 383–391.
- Lazzaro, B.P. & Little, T.J., 2009. Immunity in a variable world. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364(1513), pp.15–26.
- Lee, G.M., McGee, P. a & Oldroyd, B.P., 2013. Variable virulence among isolates of *Ascosphaera apis*: testing the parasite–pathogen hypothesis for the evolution of polyandry in social insects. *Naturwissenschaften*, 100(3), pp.229–234.
- Loope, K.J., 2015. Queen killing is linked to high worker-worker relatedness in a social wasp. *Current Biology*, 25(22), pp.2976–2979.
- Loope, K.J., Chien, C. & Juhl, M., 2014. Colony size is linked to paternity frequency and paternity skew in yellowjacket wasps and hornets. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), pp.1–12.
- Lopez-Osorio, F. et al., 2015. Phylogenetic tests reject Emery’s rule in the evolution of social parasitism in yellowjackets and hornets (Hymenoptera: Vespidae, Vespinae). *Royal Society Open Science*, 2(9), pp.150–159.
- Lowe, R.M., Ward, S. a & Crozier, R.H., 2002. The evolution of parasites from their hosts: intra- and interspecific parasitism and Emery’s rule. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 269(1497), pp.1301–1305.
- MacDonald, J.F., Matthews, R.W., Jacobson, R.S., 1981. Nesting biology of the yellowjacket, *Vespula flavopilosa*. *J Kansas Entomol Soc* 53:448–458.
- Matsuura, K., 2017. Evolution of the asexual queen succession system and its underlying mechanisms in termites. *The Journal of Experimental Biology*, 220(1), pp.63–72.
- Matsuura, K. et al., 2009. Queen Succession Through Asexual Reproduction in Termites. *Science*, 323(5922), pp.1687–1687.
- 松浦誠 1990. [図説] 社会性カリバチの生態と進化, 北海道大学図書刊行会, 札幌.
- 松浦誠・山根正気 1984. スズメバチ類の比較行動学, 北海道大学図書刊行会, 札幌.
- Matthews, R.W. & Matthews, J.R., 1979. War of the yellowjacket queens. *Natural History*, 88, pp.56–65.
- Mattila, H.R. & Seeley, T.D., 2007. Genetic Diversity in Honey Bee Colonies Enhances

- Productivity and Fitness. *Science*, 317(5836), pp.362–364.
- Meyling, N. V. & Eilenberg, J., 2006. Isolation and characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. *Mycological Research*, 110(2), pp.188–195.
- Nielsen, R., Tarpy, D.R. & Reeve, H.K., 2003. Estimating effective paternity number in social insects and the effective number of alleles in a population. *Molecular Ecology*, 12(11), pp.3157–3164.
- Nonaka, K., 2010. Cultural and commercial roles of edible wasps in Japan. In *Forest insects as food: human bite back*. pp. 123–130.
- Okita, I. & Tsuchida, K., 2016. Clonal reproduction with androgenesis and somatic recombination: the case of the ant *Cardiocondyla kagutsuchi*. *The Science of Nature*, 103(3–4), p.22.
- Page, R.J.E., 1980. THE EVOLUTION OF MULTIPLE MATING BEHAVIOR BY QUEENS (*Apis mellifera* L.). *Genetics*, 96, pp.263–273.
- Page, R. & Metcalf, R., 1982. Multiple Mating, Sperm Utilization, and Social Evolution. *The American Naturalist*, 119(2), 263–281.
- Palmer, K. A. & Oldroyd, B.P., 2000. Evolution of multiple mating in the genus *Apis*. *Apidologie*, 31(2), pp.235–248.
- Pearcy, M. et al., 2004. Conditional Use of Sex and Parthenogenesis for Worker and Queen Production in Ants. *Science*, 306(5702), pp.1780–1783.
- Perrard, A., Lopez-Osorio, F. & Carpenter, J.M., 2016. Phylogeny, landmark analysis and the use of wing venation to study the evolution of social wasps (Hymenoptera: Vespidae: Vespinae). *Cladistics*, 32(4), pp.406–425.
- Pigliucci, M. 2005 Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 481–486.
- Pilz, C., Wegensteiner, R. & Keller, S., 2008. Natural occurrence of insect pathogenic fungi and insect parasitic nematodes in *Diabrotica virgifera virgifera* populations. *BioControl*, 53(2), pp.353–359.
- Rabeling, C. et al., 2014. A Social Parasite Evolved Reproductive Isolation from Its Fungus-Growing Ant Host in Sympatry. *Current Biology*, 24(17), pp.2047–2052.
- Rath, A.C., Koen, T.B. & Yip, H.Y., 1992. The influence of abiotic factors on the distribution and abundance of *Metarhizium anisopliae* in Tasmanian pasture soils. *Mycological Research*, 96(5), pp.378–384.
- Ratnieks, F. L. & Boomsma, J. J., 1995. Facultative sex allocation by workers and the evolution of polyandry by queens in social Hymenoptera. *The American Naturalist*, 969–993.
- Reay, S.D. et al., 2008. Isolation and characterization of *Beauveria* spp. associated with exotic

- bark beetles in New Zealand *Pinus radiata* plantation forests. *Biological Control*, 46(3), pp.484–494.
- Reber, A. et al., 2008. Experimentally increased group diversity improves disease resistance in an ant species. *Ecology letters*, 11(7), pp.682–9.
- Röseler, P. F., 1991. Reproductive Competition during Colony Establishment. In: Ross KG, Matthews RW, eds. *The social biology of wasps*. Ithaca, NY: Cornell University Press, 309–335.
- Rousset, F., 2008. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular ecology resources*, 8(1), pp.103–6.
- Sasaki, K., Satoh, T. & Obara, Y., 1995. Sperm utilization by honey bee queens;DNA fingerprinting analysis. *Applied Entomology and Zoology*, 30(2), pp.335–341.
- Schlüns, H. et al., 2005. Multiple nuptial flights, sperm transfer and the evolution of extreme polyandry in honeybee queens. *Animal Behaviour*, 70(1), pp.125–131.
- Schmid-Hempel, P., 1998. *Parasites in Social Insects*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Schmidt, A.M. et al., 2011. No benefit in diversity? The effect of genetic variation on survival and disease resistance in a polygynous social insect. *Ecological Entomology*, 36(6), pp.751–759.
- Seeley, T.D. & Tarpy, D.R., 2007. Queen promiscuity lowers disease within honeybee colonies. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 274(1606), pp.67–72.
- Sheldon, B.C. & Verhulst, S., 1996. Ecological immunology - costly parasite defenses and trade- offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(96), pp.317–321.
- Sherman, P.W., Reeve, T.D. & Seeley, H.K., 1988. Parasites , Pathogens , and Polyandry in Social Hymenoptera. *The American Naturalist*, 131(4), pp.602–610.
- 信太利智 1959. 討論: クロスズメバチの場合. 今西錦司編 *動物の社会と個体*, pp89-92, 岩波書店, 東京.
- Shykoff, J. A. & Schmid-Hempel, P., 1991. Parasite and the advantage of genetic variability within social insect colonies. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 243, pp. 55-58.
- Simone-finström, M., Walz, M. & Tarpy, D.R., 2016. Genetic diversity confers colony-level benefits due to individual immunity. *Biology Letters*, 12, p.20151007.
- Simmons, L.W., 2001. *Sperm Competition and its Evolutionary Consequences in the Insectes*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.
- Smith, J.A. et al., 2013. Repeated origins of social parasitism in allodapine bees indicate that the weak form of Emery's rule is widespread, yet sympatric speciation remains highly problematic. *Biological Journal of the Linnean Society*, 109(2), pp.320–331.

- Spradbery, J.P., 1973. *Wasps: An account of the biology and natural history of solitary and social wasps*. University of Washington Press, Seattle
- Starr, C.K., 1979. Origin and Evolution of Insect Sociality : A Review of Modern Theory. In H. R. Hermann, ed. *Social Insects*. New York: Academic Press, pp. 35–79.
- Tarpy, D.R., 2003. Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 270(1510), pp.99–103.
- Tarpy, D.R. & Seeley, T.D., 2006. Lower disease infections in honeybee (*Apis mellifera*) colonies headed by polyandrous vs monandrous queens. *Die Naturwissenschaften*, 93(4), pp.195–9.
- Taylor, L. H. 1939: Observations on social parasitism in the genus *Vespula* Thomson. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 32: 304–315.
- Thorén, P.A., Paxton, R.J. & Estoup, A., 1995. Unusually high frequency of (CT) n and (GT) n microsatellite loci in a yellowjacket wasp, *Vespula rufa* (L.) (Hymenoptera: Vespidae). *Insect Molecular Biology*, 4(3), pp.141–148.
- Thornhill, R. & Alcock, J., 1983. *The evolution of insects mating systems*. Harvard University Press, Cambridge.
- Trivers, R.L. & Hare, H., 1976. Haplodiploidy and the evolution of the social insects. *Science*, 191, pp.249–263.
- 辻和希., 1999. 赤の女王蜂—昆虫の社会進化と病気. *個体群生態学会会報*, 56: 13-20.
- Tsuchida, K. et al., 2003. Queen-worker conflicts over male production and sex allocation in a primitively eusocial wasp. *Evolution; international journal of organic evolution*, 57(10), pp.2365–2373.
- Tuininga, A.R. et al., 2009. Isolation of entomopathogenic fungi from soils and *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) ticks: prevalence and methods. *Journal of medical entomology*, 46(3), pp.557–565.
- Voveikov, G.S., 1953. Estestvennaya smena samok vo cem'ya shmelej. (Hym., Bomb.). *Entomol Obozr* 33:174–184
- Waibel, M. et al., 2006. Division of labour and colony efficiency in social insects: effects of interactions between genetic architecture, colony kin structure and rate of perturbations. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 273(1595), pp.1815–1823.
- Weber, A., 1972. Gardening Ants, the Attines. Neal. In *The American Philosophical Society*. Philadelphia, pp. 856–856.
- Wenseleers, T. & Ratnieks, F.L.W., 2006. Comparative analysis of worker reproduction and policing in eusocial hymenoptera supports relatedness theory. *The American naturalist*, 168(6), pp.E163-79.

- Wiernasz, D.C., Perroni, C.L. & Cole, B.J., 2004. Polyandry and fitness in the western harvester ant, *Pogonomyrmex occidentalis*. *Molecular ecology*, 13(6), pp.1601–6.
- Wilson, E. O., 1971 *The insect societies*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- 山内健生・渡辺護, 2013. 富山県の標高の異なる3地点においてマレーズトラップで捕獲されたスズメバチ類の種構成. *ペストロジー*, 28(1), pp.13–16.