

平成 21 年 4 月 24 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17570022
 研究課題名（和文） 雄が卵を保護するヒラタヤスデの繁殖生態：親の投資・配偶システムと性選択
 研究課題名（英文） Breeding ecology of a millipede with paternal egg-care: parental investment, mating system and sexual selection
 研究代表者
 工藤 慎一（KUDO SHIN-ICHI）
 鳴門教育大学・大学院学校教育研究科・准教授
 研究者番号：90284330

研究成果の概要：

本研究は、雄が抱卵する多足類ヒラタヤスデを対象とし、配偶システムと繁殖行動の進化を理解することを目的とした。雄は、菌類の感染から卵を保護していた。野外では、体節幅の広い雄ほど繁殖に成功し抱卵数も多かった。これは、体節幅の広い雄ほど雌に配偶者として選ばれ、抱卵しながら複数の雌と配偶した結果であると考えられた。これらの結果は、性選択が雄による子の保護の進化に重要な役割を果たすことを示唆している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	1,200,000	0	1,200,000
2006年度	700,000	0	700,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：行動生態学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生態・環境

キーワード：親の投資，配偶システム，性選択，ヒラタヤスデ

1. 研究開始当初の背景

親の投資とは「子供の生存率を高める親のあらゆる性質」を指し、卵サイズや保護行動などは代表的な投資形態である。この親の投資の進化は進化生態・行動生態学の中心課題の一つであり、投資の最適化とそれを巡る雌雄（親子）間の対立という観点から様々な一般理論が生みだされたことは周知の通りである。親の投資の進化を考える際、その増大が親自身の将来の繁殖成功に対してコストとなる点が特に重要であり、当座の子供の高い生存率から得られる適応度利益とのバラ

ンスは環境によって、そして保護者の性によって異なると考えられている。

一方、この親の投資は雌雄の相対的な繁殖速度を規定し、その結果、配偶システムや性選択の様相と密接に関係している。通常、産卵後の親の投資（＝子供の保護）の大きな性は雌である。これは一般に、「配偶相手の数に応じて繁殖成功が高まる雄では当座の子供に対する保護が特に高いコストになる」こと等から説明されている。しかし一部の動物、例えば魚類には雄親が子供の保護を行うものが多い。その理由の一つに、これらの雄が

「配偶機会を失うことなく複数の雌由来の子供（重複ブルード）を保護できる」ことが指摘されていた（雌訪問型複婚の配偶システム）。最近、Manica & Johnstone (2004) は、この重複ブルードによる配偶コストの軽減効果をモデル化し、個体群パラメータと結び付けて親による子供の保護の進化理論を拡張することに成功した。一方、雄親による子供の保護の進化における性選択の役割を強調した仮説も現われた。「もし（従来コストと考えられてきた）保護行動自体が雌による配偶者選択のターゲットとなるなら、逆に雄の配偶成功を上昇させる」というアイデアである (Tallamy, 2001)。これらの理論は、雄親による子供の保護の進化における自然選択と性選択両者の役割を相対的に評価する（例えば、保護ブルードの父性の確保は前者にとって、逆に配偶頻度を左右する個体群密度は後者にとってクリティカル）ことを可能にしているが、その検証は始まったばかりである。また、繰り返し繁殖する動物で配偶相手によって子供の適応度が異なる場合、配偶相手の表現型（＝性的魅力）の違いが当座の最適な繁殖投資に影響することがある。これは差別的繁殖投資（differential allocation: Sheldon, 2000）と呼ばれており、近年になって検証例が急増している。特に雄が大きな親の投資を行う動物では、この可能性が高い。

このような雄親の投資と自然選択・性選択の不可分な関係を理解するには、適切な対象を用いた実証研究が必要である。雄が卵保護を行う節足動物は、先の仮説群を検証する鍵となる分類群と考えられてきた (Tallamy, 2001)。ただし、過去の研究例は昆虫類とザトウムシ類に限られており、これら以外の分類群における雄の保護行動に関しては研究が全く進んでいない。以上の現状をふまえて本研究は計画された。

2. 研究の目的

本研究は、雄が単独で卵の保護を行う多足類ヒラタヤスデ *Brachycybe nodulosa* (三好, 1951; 村上, 1962; 図1) を対象とし、以下の3点の解明によって、配偶システムと繁殖行動の進化を理解することを目的とする。

(1) 配偶システムの特定と繁殖行動の適応的意義：マイクロサテライト遺伝子座マーカーを用いた配偶システムの把握と雄の繁殖成功の測定、並びに繁殖行動の適応度（繁殖成功）損益分析。

(2) 繁殖成功の雄間変異を生み出す要因：繁殖成功に影響する雄の表現型と個体群（コロニー）パラメータの特定。

(3) 繁殖成功の雄間変異を生み出すメカニズム：配偶者選択を伴う重複ブルード（＝雌訪問型複婚の配偶システム）仮説および差別

的繁殖投資仮説の検証。



図1 抱卵するヒラタヤスデの雄

3. 研究の方法

(1) マイクロサテライト遺伝子座マーカーの開発

ヒラタヤスデの成体のアセトン液浸標本から、QUIAGEN DNA Tissue Kit (QUIAGEN) を用いてプロトコルに従いDNAを抽出した。SauAIで切断し、65°C、5minで失活後、Quiaquick PCR purification Kitで50ulに溶出した。切断DNAの両端にCassete Sau3AIをライゲーションし、精製物をTaKaRa Cassete Primer CIを用いてPCR増幅した。精製後溶液を95°C10分間加熱後、氷上で急冷し、ビオチン標識(CA) x 12と混合、60°C 1hr放置後、精製した。全量をプロトコル通り前処理したDynabeads280と混合し、室温で45分放置した。プロトコルに従い洗浄後、dw 100ulを加え、65°Cで30分混合しながら放置した。これを鋳型にしてPrimerCIで再びPCRし、産物をpGEM-Tにライゲーションし、EpicurianXL1にトランスフォームし、常法に従いクローンを分離した。各クローンのDNAを、ベクターのプライマーを用いてPCR増幅し、産物1ulをナイロン膜に転写したあと、ビオチン標識CAx12をハイブリダイズさせ、発色法で検出した。ポジティブクローンをシーケンスし、繰り返しの両側にプライマーを設定し、多型検出を行った。

(2) 野外の個体群・コロニー構成と抱卵クランチサイズ・繁殖成功の調査

徳島県西部と長崎県島原半島の個体群で、以下の野外調査を行った。異なる時期に、倒木上のコロニー毎に個体を回収し、各倒木の地表と接する表面積を測定、個体密度、体節数（脱皮履歴と令を反映）、性比等のコロニーのデモグラフィーに関するデータを得た。採集個体の性別は生殖肢の形態を元に判定し、体節数や体幅を測定した。

発見した抱卵雄は、静止していた朽ち木樹皮ごと個別の容器に入れて持ち帰った。野外に準じた条件（20°C長日）で室内飼育し、孵

化開始までの期間（産卵開始の時期を推定）や孵化開始から終了までの時間（抱卵クラッチの完成に費やされた時間を反映）を測定した。孵化させた幼体と抱卵雄は無水アルコール中に保存した。

(3) マイクロサテライト遺伝子座マーカーを用いた父性・母性判定

野外で採集した雄親と抱卵していたブルードサンプルと次項の配偶者選択実験の一部サンプルを対象にして、マイクロサテライト遺伝子座マーカーで明らかにした遺伝子型の対応関係から父性・母性判定を行い、雄の繁殖成功並びに遺伝学的配偶システムを特定する予定であった（ただし、研究成果の項(1)参照）。

(4) 配偶者選択の検証

野外で観察される雄の抱卵クラッチサイズの変異が、特定の表現型を持つ雄が複数の雌由来の卵塊を同時に保護した結果（重複ブルード）だとすると、高い繁殖成功を得る雄は雌による配偶者選択に有利な形質を持つと予想される。野外の繁殖開始前に採集した性的に成熟した個体を用いて、2雄1雌を同一容器中で室内飼育し配偶・産卵させて、抱卵に成功した雄と不成功の雄間で表現型を比較した。

(5) 差別的繁殖投資仮説の検証

野外で観察される雄の抱卵数の変異は、配偶者選択に有利な雄ほど雌がより多く産卵した結果かも知れない（差別的繁殖投資）。この仮説を検討するため、配偶者選択の検証実験によって明らかになった選択に有利な形質を持った雄と相対的に不利な雄の実験区を設けて、1雄にランダムに選んだ1雌を振り分けた配偶実験（従って雌の表現型には実験区間に差が無い）によって得られた雌の繁殖形質を実験区間で比較した。

(6) 重複ブルード仮説の検証

室内条件で雌雄を配偶・繁殖させ一度に産卵されたクラッチから得られたデータを、野外のクラッチのデータと比較した。もし、野外のクラッチが室内で得られたものより大きく、野外のクラッチの孵化開始から終了に必要な時間が室内のものよりも長く、かつ両者の間に正の相関が存在すれば、野外で重複ブルードが生じていると判断できる。

(7) 雄親の保護行動の適応的意義

室内実験：卵の死亡要因を特定し雄親による保護の適応度利益を測定するため、雄親から卵塊を除去して朽ち木表面に放置することで抱卵期間を短縮する実験を行い、クラッチの生存を実験区間で比較した。予備調査か

ら、卵の主要な死亡要因としては菌類感染の可能性が高い。そこで、捕食者をできる限りを排除した室内環境で実験を行う。適当な抗菌物質の処理と雄親からの除去を組み合わせ、雄親の保護のない状態で抗菌物質を処理することで卵の生存率が高まれば、雄親の行動が菌類の感染を防ぐ機能を持つと判断できる。

野外実験：捕食など他の死亡要因も込みにした雄親保護の適応度利益を推定するため、野外での除去実験を行った。浅く蓋のないプラスチック容器に朽ち木樹皮上で抱卵する雄と、別雄から除去した卵塊を入れてスギ倒木の下に設置した。

4. 研究成果

(1) マイクロサテライト遺伝子座マーカーの開発

個体群内で多型に富む11領域を特定することに成功した。また、これらのマーカーは親子判定に利用できる条件を満たすことも確認できた。ただし、マーカーの開発が最終年度の終盤にずれ込んだため、実際の親子判定を実施するには至らなかった。

(2) 野外における雄の繁殖成功変異

野外で繁殖に成功した雄は、いずれの個体群でも一部に留まった。雄の配偶の有無を従属変数、雄の表現型とコロニーの属性を独立変数にした一般化線形モデルを構築し、AICを用いてモデル選択した結果、雄の配偶は生殖肢の存在する体節幅に依存しており、体幅の広い雄ほど配偶に成功していたことが明らかとなった。これは、雌による配偶者選択の存在を示唆する結果である。

抱卵雄のブルードサイズも雄個体間で大きく変異し、100卵を大きく越えるブルードも散見された。配偶成功と同様の分析を行った結果、体節幅の広い雄ほどブルードサイズが大きくなる傾向が検出された。コロニー密度や雄雌比などの要因は、雄の配偶・繁殖成功に影響を与えていなかった。

(3) 配偶者選択の検証

2雄1雌を同一容器中で飼育し配偶・産卵させる実験を行い、抱卵に成功した雄と不成功の雄間で表現型を対比較したところ、ライバル雄に比べて相対的に体節数が多く体幅の広い雄が配偶・繁殖に成功する顕著な傾向が検出された。一方、雄間に攻撃的な相互作用は全く観察されなかった。これらの結果は、本種の雌が配偶者選択を行うこと、そして選択のターゲット形質は雄の相対的な体サイズであることを示している。

(4) 差別的繁殖投資仮説の検証

差別的繁殖投資仮説を検討するため、前項

の検討で明らかになった配偶者選択に有利な大型雄（体節数が多く体幅の広い雄）と不利な小型雄の実験区を設けて繁殖を見たところ、産卵頻度、産卵までに要する日数、産卵数に実験区間で有意な差は検出されなかった。つまり、本種の雌が差別的繁殖投資を行うという仮説は支持されない。

(5) 重複ブルード仮説の検証

繁殖盛期に野外で雄が保護していたクラッチの孵化期間（孵化開始から終了までの期間）を調査したところ、大きなクラッチほど孵化期間が延長するという傾向が見いだされた。さらに、孵化期間の長いクラッチは間欠的に孵化する様子が観察された。また、飼育条件下で雌は平均40卵程度を一度に産下したが、野外における雄の抱卵数はしばしばこの値を大きく越えていた。これらの事実は、雄が重複ブルードを保護している、すなわち、本種は雌訪問・複婚型の配偶システムを持つことを強く示唆している。配偶に有利な大型雄は、抱卵したまま繰り返し雌と配偶し卵を受け取ることによって高い繁殖成功を得る可能性が高い。

(6) 雄親の保護行動の適応的意義

室内実験：卵の死亡要因を特定し雄親による保護の適応度利益を測定するため、雄親から卵塊を除去して朽ち木表面に放置することで抱卵期間を短縮する実験を行い、卵塊の生存を実験区間で比較した。その結果、保護を受けなかった実験区の卵塊は短期間で菌糸に覆われ、孵化したものは皆無だった。一方、雄に保護された卵塊の孵化率は95%を越えた。この結果は、雄親による卵保護行動の機能が菌類寄生からの防衛であることを強く示唆する。ただし、卵塊に抗菌物質（プロピオン酸）を処理した実験区においても孵化に成功した卵塊は無かった。従って、「雄親による保護の機能は胚子の生理条件の改善である」という仮説を棄却することはできなかった。

野外実験：菌類による寄生以外の死亡要因も込みにした雄親保護の適応度利益を推定するため、野外で雄親の除去実験を実施した。浅く蓋のないプラスチック容器に朽ち木樹皮上で抱卵する雄と、別雄から除去した卵塊を入れてスギ倒木の下に設置したが、残念ながら十分なサンプルサイズが得られなかったため実験区間の比較はできなかった。しかし、雄親除去区ではアリ類による卵の捕食を確認することができた。雄親の卵保護が捕食者からの防衛として機能するか否かは今後の課題である

体幅の広い大型雄は、卵の菌類感染に対し高い防衛能力を持つかも知れない。さらに、雄の体サイズは脱皮履歴を反映するので、高

い生存能力のシグナルとなっている可能性もある。このような直接・間接的利益が期待できるため、体幅の広い大型雄は雌に配偶者として選択されているのであろう。さらに、卵保護行動自体が雌の利益を反映するシグナルになるのであれば (Tallamy 2000), 大型雄は抱卵を続けたまま複数の雌と配偶し繁殖成功を大きく高めるはずである。本研究の結果は、ヒラタヤスデの雄による卵保護行動の進化が、自然選択だけでなく性選択の影響も受けてきたことを強く示唆している。特に、野外における繁殖成功変異の決定因を分析した上で、その変異の生じるメカニズムを操作実験によって明らかにした点は重要であろう。雄の保護行動進化における自然選択と性選択の不可分な関係を解きほぐす実証研究は、従来、魚類を中心とした脊椎動物に限られていた (例えば Forsgren 1997; Ostlund & Ahnesjo 1998; Lindstrom et al. 2006; Hale 2008)。無脊椎動物では、雄親の保護の知られるカメムシ目昆虫でわずかな研究例があるに過ぎない (Thomas & Manica 2005; Gilbert et al. 2009)。これらの分類群とは大きく異なる進化的制約を持つであろう多足類においても、雄親の保護が類似のメカニズムによって進化したことを示唆する点で、本研究は大きな意義を持つと思われる。現在、主要な成果を国際学術誌に投稿すべく準備を進めているところである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Kudo, S., C. Koshio & T. Tanabe 2009. Male egg-brooding in the millipede *Yamasinaium noduligerum* (Diplopoda: Andrognathidae). *Entomological Science* (in press).

[学会発表] (計5件)

- ① 工藤慎一. 雌から見た雄の子育て：繁殖のコスト・重複ブルードそして配偶者選択. ラウンドテーブル「配偶者選択の波紋：選択する側が得る直接的利益をめぐって」. 日本動物行動学会第26回大会. 京都. 2007年10月21日.
- ② Kudo, S. Breeding system and sexual selection in a millipede with exclusive male parental care. 11th Congress of the International Society for Behavioral Ecology, Tours, France, 25 July 2006.

- ③ 工藤慎一. ヒラタヤスデの繁殖生態：雄親の保護投資と性選択. 第29回日本土壤動物学会大会. 鳥取. 2006年5月27日
- ④ 工藤慎一・安尾隆二・赤城嘉宣. ヒラタヤスデの個体群構成. 日本昆虫学会第65回大会. 岡山. 2005年9月23日.
- ⑤ Kudo, S. Exclusive male egg-care and reproductive success in a millipede. XXIX International Ethological Conference, Budapest, Hungary, 25 August 2005.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 慎一 (KUDO SHIN-ICHI)
鳴門教育大学・大学院学校教育研究科・
准教授
研究者番号：90284330

(2) 研究分担者

長谷川 英祐 (HASEGAWA EISUKE)
北海道大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：40301874

小汐 千春 (KOSHIO CHIHARU)
鳴門教育大学・大学院学校教育研究科・
助教
研究者番号：60263878