

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22770058

研究課題名(和文) 昆虫類のメス交尾器に“隠された”多様性～観察技術の確立と応用～

研究課題名(英文) Cryptic variation in insect female genitalia: establishment and applications of their observational techniques

研究代表者

上村 佳孝 (KAMIMURA, Yoshitaka)

慶應義塾大学・商学部・准教授

研究者番号：50366952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫類などの体内受精をおこなう動物では、雄交尾器は一般に高い種間多様性を示す。しかし、より柔軟な構造であることが多い雌交尾器の多様性は過小評価されてきた。本研究では、雌交尾器形態の多様性を効率よく検出する手法を確立し、交尾器進化に果たす雌の役割を検討した。交尾中に瞬間固定された各種昆虫サンプルに対し、様々な手法を試みた結果、ベンジルアルコール・安息香酸ベンジル混合液により外骨格を透明化する手法が優れていた。この手法により、雌交尾器の膜質部は雄交尾器形態に対応した形態を示すことが多く、その「噛み合わせ」が、交尾時の創傷などのコストを軽減するのに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Animal genitalia of internal fertilizers generally show a rapid evolutionary rate compared with other morphological characters. However, compared to interspecific diversities in male genitalia, female genitalia, which usually consist of soft structures without conspicuous landmarks, received less attention because of the difficulty of observation. In this study, efficient methods to detect and describe diversities in female genital traits were explored using in-copula samples of various insect taxa. As the result, a mixture of benzyl alcohol and benzyl benzoate (BABB) has been proven to be highly effective to make insect exoskeleton transparent. The method revealed that female genitalia generally show a sizeable structural diversity in their soft parts corresponding to the species-specific male genitalia. Experiments showed that the structural fitting between male and female genitalia reduces mating costs for females such as caused by copulatory wounding and other mechanisms.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：交尾器 顕微鏡観察技術 性選択 性的対立

1. 研究開始当初の背景

「オスの交尾器は顕著な多様性を示すのに、メス交尾器の側にはそれに対応した多様性はない」。最も詳しく研究されているモデル生物、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* とその近縁種の交尾器を観察した Eberhard 交尾器の進化研究の第一人者として知られる らの結論である (Eberhard & Ramirez (2004) *Ann Entomol Soc Am* 97:1007-1017)。しかし、その後の申請者の研究により、この結論は誤りであり、ショウジョウバエ類のメス交尾器にオス交尾器に対応した構造が見られることがわかってきた。

昆虫類は種数の点で、記載された生物多様性の半分以上を占めるが、専門家が交尾器を見なければ同定できない種類も多い。これは交尾器形態の進化速度が一般に速いことを示す。しかし、それはオスの場合が多く、一般によりソフトな構造のメスの交尾器は「観察しにくいもの」、「観察しても多様性が見出しにくいもの」と軽視されてきた。メスの交尾器形態が記載・図示されることはあるが、一般に硬化部に限定されている。上記の成果は、従来手法上の制約により見過ごされてきたメス交尾器の形態に、非常に高い多様性が隠されていることを示唆している。

昆虫の軟組織を観察する際、樹脂等に包埋し切片を作成する手法もあるが、多数のサンプルの比較処理には向かず、特に交尾器のように硬化部と非硬化部が混在する場合、その3次元構造の再構築は容易ではない。すなわち、観察手法自体が十分に整備されていない点に問題があった。

2. 研究の目的

上記のような状況のもと、本研究は、メス交尾器の形の多様性を最大限に検出・記載する手法を確立し、雌雄の交尾器形態の進化に果たすメスの役割 これまで過小評価されてきた を、再検討することを目的として実施された。

メス交尾器の観察の難しさ、すなわち本研究において克服すべき課題は、観察の再現性・客観性の確保にあった。単純におしつぶし法によるプレパラートを作成した場合、軟組織は微妙な向きの違いにより、見え方が大きく異なってしまい、記載や計測に向かない。多サンプルの処理に適した簡便・確実な手法を考案し、雌雄交尾器形態の多様化の様相を正しく把握することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 本研究の第一義は、昆虫類のメス交尾器形態、特にその非硬化部の観察・記載手法について、多様性の検出という観点から検討・考案することであった。系統関係やゲノ

ム情報が最もよく解っているショウジョウバエの一群 (*Drosophila melanogaster* species subgroup) をメインの材料として、固定サンプルの寒天包埋技術、および B A B 溶液 (ベンジルアルコール・安息香酸ベンジル混合液) によって外骨格を透明化して観察する手法を検討した。

(2) 同じく *Drosophila melanogaster* species subgroup をメインの材料として、外部構造を一層ずつ除去しながら、走査電子顕微鏡を用いて表面構造を順次観察していく手法を検討し、上記(1)の手法との比較検討をおこなった。

(3) 上記のテーマの検討に伴い、近縁種間での雌雄交尾器形態の進化が、種間交尾において雌雄交尾器の不一致 (= うまくかみ合わない現象) を引き起こすことがわかってきた。また、このような不一致が与える影響の調査をショウジョウバエ類で実施した。具体的には、うまくかみあわない雄交尾器によって雌交尾器にもたらされる創傷を効率よく検出するとともに、傷を通した細菌感染のリスクを評価するため、微小な蛍光ビーズを雄交尾器に塗布する手法を開発した。

(4) 上記(3)のテーマをより詳細に分析するため、ショウジョウバエ類近縁2種間の交雑系統を多数保有する米国の研究者と共同で、雌雄交尾器のサイズおよび形の不一致が、創傷の頻度・程度に与える影響を調査した。この分析には、雄交尾器の形態の変異を定量するにあたり、楕円フーリエ解析および多変量解析の手法が用いられた。

(5) 上記のように、交尾の際に雄交尾器が雌交尾器に傷を負わせる現象 (Traumatic mating) が、近年多くの昆虫類で発見されつつある。この現象を示す新しい分類群を、熱帯アジア産の昆虫類の中に探し、この現象のモデル生物となる可能性を検討した。また、古くから Traumatic mating の研究に利用されているトコジラミ類の1種、ネッタイトコジラミ *Cimex hemipterus* について、雌の交尾器の左右性に見られる種内変異を再発見し、その進化的意義を探った。このテーマに関連して、交尾器をはじめとして、動植物の体制に見られる左右性の変異が遺伝的に維持されるメカニズムについて、新しい理論モデルを提示したほか、一連の研究成果に関する総説2報を発表した。

4. 研究成果

(1) 交尾中の昆虫サンプル瞬間凍結し、そのままエタノール固定に持ち込む手法、固定サンプルの寒天包埋技術、および B A B 溶液 (ベンジルアルコール・安息香酸ベ

ンジル混合液)によって外骨格を透明化して観察する手法の確立をおこなった。この手法を従来の手法と組み合わせることにより、雌雄交尾器の対応関係を記載する精度は大きく向上した。

(2)(1)で開発された手法をThe *Drosophila melanogaster* complex の4種に適用した。このグループには、生物学の幅広い分野の研究においてモデル生物として利用されているキヨショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) が含まれ、その近縁3種 (*D. simulans*, *D. sechellia*, *D. mauritiana*) との識別は、主に雄交尾器形態に基づいてなされている。しかし、この雄交尾器変異の意義は明らかでなかった。(1)の手法、および、交尾中固定ペアの構造を順次剥奪しながら走査電子顕微鏡で観察することにより、種特異的な変異を示す雄の posterior process (= posterior) lobe は、交尾中に雌の産卵管 (oviscapt) 周辺の膜質部を把握し、メスの被把握部位には、雄の構造に対応した種間変異が存在することを明らかにした。

(3)(2)の研究の中で、*D. simulans* や *D. sechellia* の雄は、その鋭い posterior process の先端によって、雌の被把握部位に頻繁に傷を付けていることが明らかとなってきた。そこで、「雄交尾器にフィットする交尾器を雌が持つことで、創傷のリスクを最大限に減少させている」という仮説を立てた。J. P. Masly 氏 (米・オクラホマ) との共同研究により、*D. sechellia*-*D. mauritiana* の雑種由来の系統を利用し、この仮説を検討した。*D. sechellia* w 系統の雌に、同系統の雄、同種他系統の雄、および雑種由来系統の雄をそれぞれ掛け合わせる、各系統の雄交尾器形態と、それによってもたらされる創傷の程度との関係を調査した。同系統の雄の交尾器形態と大きく異なる形態の交尾器の雄と掛け合わせた場合ほど、創傷の程度が大きくなることを明らかになった。この結果は、先の仮説を支持している。

(4)(3)と同様の現象が、*D. santomea* と *D. yakuba* という別の兄弟種のペアにおいても生じていることを明らかにした。*D. santomea* はアフリカ島嶼の固有種であるが、アフリカ中部に広く分布する *D. yakuba* との間には交雑体を生じている。*D. yakuba* の雄は、その aedeagus (精子を渡す器官) の腹側に一對の鋭い突起 (以下、棘) を持つが、雄の *D. santomea* においては、先の丸いこぶ状になっていることを発見した。また、雌の交尾器はこの変異に対応した種間変異を示し、*D.*

yakuba は生殖口の背側に一對のポケット状の窪みを有し、交尾の際に雄の棘を收容するが、*D. santomea* の雌交尾器にはこのような構造は観察されなかった。ショウジョウバエ類では、傷口を介して感染する数種のバクテリアが致死的な作用を示すことが知られている。このようなバクテリアのサイズを模したサイズの蛍光ビーズを雄交尾器に塗布し、種内・種間交配をおこなった。その結果、*D. yakuba*, *D. santomea* のいずれの種を雄とした場合も、雄交尾器は交尾の際に雌の交尾器に傷を付け、その頻度は、種内交配よりも種間交配の場合で高いことが分かった。このことは、雌雄の交尾器形態の一致は、雌交尾器への創傷および傷を通した病原体感染のリスクを低減することを示している。

また、*D. yakuba* の雄 (棘を持つ) を、*D. santomea* の雌 (ポケットを持たない) とかけ合わせた場合、交尾器形態の不一致により、雄の aedeagus が雌の生殖口に正しく挿入されず、精液が体外に放出されてしまうという現象が高頻度で生じていることを明らかにした。このような交尾の失敗が生じた場合、体外に放出された精液が乾固することにより、雌雄の体が固着されてしまい、カップリングの終了に時間を要する。この方向での種間交配では、雌 (*D. santomea*) の寿命や繁殖成功が大きく低下することが知られていたが、その原因はこのような交尾器の不一致による交尾コストによって引き起こされているものと考えられた。

(5) *D. teissierii* は、*D. yakuba*-*D. santomea* のペアに最も近縁な種である。本種の交尾行動と交尾による創傷の有無を調査したところ、雄は *D. yakuba* 同様に aedeagus の腹側に鋭い一對の突起 (ventral branch) を発達させ、雌の対応したポケット状構造に傷を負わせていることを明らかにした。この結果から、ventral branch の退化 (雄) および、それに対応したポケット構造の退化 (雌) は、*D. santomea* が分化する過程に生じたものと推定された。

(6) 上記のように、交尾の際に雄の交尾器が雌の交尾器に傷を負わせる現象は、近年多くの動物群で発見されつつあり、traumatic mating と呼ばれている。昆虫類では、これまで7つの目 (もく: order) でこのような現象が報告されていたが、今回の調査の過程で、新たにマレーシア産の革翅目 (ハサミムシ類: Dermaptera) の1種 *Echinosoma denticulatum* において観察することができた。本種の雄はペニスに多数の棘を有し、交尾の際、雌の膈周辺部に多数の傷を付ける。雌は創傷を受ける部位は、長い毛でカバーされているが、こ

のような構造は、雄のペニスに棘がない近縁の他種では観察されないものであり、創傷に対する対抗進化であることが示唆された。近縁種が多く、飼育も容易な本属のハサミムシ類は、traumatic matingの進化の新しいモデルになる可能性がある。

(7) 吸血性昆虫ネットイトコジラミの大発生が、近年問題になっている。本種の防除に関する研究の過程で、メス生殖器 (traumatic mating を受け止める器官である spermalege) に顕著な多型が維持されていることが明らかとなった。すなわち、この器官を右側にだけ持つものと両側に持つものが混在している。人工移精技術を含む各種実験により、左側の生殖器は機能的にも関わらず、交尾の際に利用されていないことを明らかにした。結果に基づき、動物の体制の左右対称性の進化過程を考察した。

(8) 左右非対称な体のつくりについて、右型と左型がほぼ 1:1 の割合で単一の個体群に混在・共存している状態は、Antisymmetry と呼ばれている。この場合、左右性は遺伝しないことが一般的であり、生物学上の大きな謎となっていた。本研究の過程で、新しい理論モデルを考案し、個体群に確率の変動があり、かつ、少数派が有利な選択を受けている場合、左右性をランダムに決定することが有利なることを示した。これは、上記の疑問に一つの解を提供するものである。

(9) 成果(1)で開発された BABB を用いる手法が、ブラジル産チャタテムシ類に適用され、タンパク質・脂質をアルカリで分解する手法との併用が工夫された。この研究は北海道大学大学院の吉澤和徳氏を中心となって進められ、このグループのチャタテムシでは、雌雄の交尾器形態が逆転していることが発見された。すなわち、雌が挿入器に棘状構造を発達させているのに対し、雄は膜質でシンプルな交尾器に雌挿入器の棘を受け止める構造を持ち、通常の昆虫とは逆転した進化パターンが見出された。

(10) 本研究課題で得られた成果も含めて、ショウジョウバエ類(キイロショウジョウバエ種群)・ハサミムシ類それぞれについて、交尾器の進化に関わる研究の現状と課題について総説を執筆した。併せて、これらのグループの交尾器形態の用語体系について、検討・整理をおこなった。

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 12 件)

Kamimura, Y., Mitsumoto, H., and Lee, C.-Y. (2014) Duplicated female receptacle organs for traumatic insemination in the tropical bed bug *Cimex hemipterus*: Adaptive variation or malformation?. *PLoS ONE* 9(2): e89265. (査読有)
doi:10.1371/journal.pone.0089265.

Kamimura, Y. (2014) Pre- and postcopulatory sexual selection and the evolution of sexually dimorphic traits in earwigs (Dermaptera). *Entomological Science* 17: 139-166. (査読有)
doi:10.1111/ens.12058

Yoshizawa, K., Ferreira, RL, Kamimura, Y., and Lienhard, C. (2014). Female penis, male vagina, and their correlated evolution in a cave insect. *Current Biology* 24: 1006-1010. (査読有)
doi: 10.1016/j.cub.2014.03.022

Kamimura, Y. and Lee, C.-Y. (2014) Mating and genital coupling in the primitive earwig species *Echinosoma denticulatum* (Pygidicranidae): implications for genital evolution in dermapteran phylogeny. *Arthropod Systematics and Phylogeny*. 72: 11-21. (査読有)
http://www.senckenberg.de/files/content/forschung/publikationen/arthropodsyste-matics/asp_72_1/02_asp_72_1_kamimura_11-21.pdf

⑤ Masly, J. P., and Kamimura, Y. (2014) Asymmetric mismatch in strain-specific genital morphology causes increased harm to *Drosophila* females. *Evolution* (in press) (査読有)
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/evo.12436/pdf>

Kamimura, Y., and Mitsumoto, H. (2012) Lock-and-key structural isolation between sibling *Drosophila* species. *Entomological Science* 15: 197-201. (査読有)
doi:10.1111/j.1479-8298.2011.00490.x

⑦ Kamimura, Y. (2012) Correlated evolutionary changes in *Drosophila* female genitalia reduce the possible infection risk caused by male copulatory wounding. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 66: 1107-1114. (査読有)
doi: 10.1007/s00265-012-1361-0

Kamimura, Y., and Mitsumoto, H. (2012) Genital coupling and copulatory wounding in *Drosophila teissieri* (Diptera: Drosophilidae). *Canadian Journal of Zoology* 90: 1437-1440. (査読有)
doi:10.1139/cjz-2012-0186

⑨ 上村 佳孝・三本 博之 (2011) キイロショウジョウバエ種群における交尾器形態の進化: その機能研究に関するレビュー. *低温科学* 69: 39-50. (査読有)
<http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/lts/LTS>

Kamimura, Y., and Polak, M. (2011) Does surgical manipulation of *Drosophila* intromittent organs affect insemination success? Proceedings of the Royal Society of London B 278: 815-816. (査読有)
doi: 10.1098/rspb.2010.2431

Kamimura, Y. (2011) Population stochasticity, random determination of handedness, and the genetic basis of antisymmetry. Journal of Theoretical Biology 290: 73-80. (査読有)
doi:10.1016/j.jtbi.2011.08.021

Kamimura, Y., and Mitsumoto, H. (2011) Comparative copulation anatomy of the *Drosophila melanogaster* species complex (Diptera: Drosophilidae). Entomological Science 14: 399-410. (査読有)
doi:10.1111/j.1479-8298.2011.00467.x

〔学会発表〕(計 6 件)

上村 佳孝、交尾器進化を巡る論争：*Drosophila*は解決できるか？第1回ショウジョウバエ多様性研究会シンポジウム(招待講演)(三島市：国立遺伝学研究所)(2013年09月30日)

澤村 京一・佐藤 玄・李 昭揚・上村 佳孝・松田 宗男、アナナスショウジョウバエ類野外集団における種間浸透 ペナン島(マレーシア)の事例.第1回ショウジョウバエ多様性研究会シンポジウム(三島市：国立遺伝学研究所)(2013年09月30日)

上村 佳孝、交尾器形態の不一致がもたらすメスの交尾コスト 種間交尾を用いた検証、日本昆虫学会第72回大会(東京都町田市：玉川大学)(2012年09月17日)

上村 佳孝、三本 博之、学会賞受賞講演：Kamimura Y. and Mitsumoto H. Comparative copulation anatomy of the *Drosophila melanogaster* species complex (Diptera: Drosophilidae)、日本昆虫学会第72回大会(東京都町田市：玉川大学)(2012年09月16日)

⑤ 上村 佳孝、三本 博之、ショウジョウバエ2種間の交尾器形態の違いによる生殖的隔離、日本昆虫学会第69回大会(長野県松本市：信州大学)(2011年9月18日)

上村 佳孝、The *Drosophila melanogaster* species subgroup における交尾器進化、北海道大学低温科学研究所ワークショップ「ショウジョウバエ研究のいまとこれから」(札幌市：北海道大学)(2010年9月23日)

6. 研究組織

(1)研究代表者

上村 佳孝 (KAMIMURA, Yoshitaka)
慶應義塾大学・商学部・准教授