

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657063

研究課題名(和文) 蛍光ビーズを用いた昆虫類のオス交尾器の機能解明

研究課題名(英文) Examination of the function of insect male genitalia using a fine fluorescent beads

研究代表者

林 文男 (Hayashi, Fumio)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：40212154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫類のオスの交尾器の多様性は顕著である。そうした多様性は、雌雄の交尾器の接合を通して進化してきたものである。しかし、交尾器のそれぞれの部分の機能については、その方法上の問題からほとんど解明されていない。そこで、本研究では、新しい手法として、微細蛍光ビーズをオスの交尾器の各部に塗布し、交尾後にその蛍光ビーズがメスの腹部末端のどこに付着するのかを調べることによって、交尾器の接合部を明らかにした。大型昆虫であるカマキリ類を用いて、この手法を確立し、カマキリ類のオスの左右非対称な交尾器の機能が、メスの産卵弁を持ち上げることにあることを明らかにした。この手法は交尾器の機能解明に広く応用できる。

研究成果の概要(英文)：Male genitalia of insects are complex in their shape including several independent parts. However, the function of each part of male genitalia remains mostly unknown. In this project, the attachment sites of male and female genitalia were examined using a fine fluorescent beads. These fluorescent beads were attached to the each part of male genitalia, and after copulation with the female we detected the beads on the female abdominal tips under the binocular scope. In mantids, we found that the asymmetric male genitalia functions in grasping the female ovipositor before spermatophore transfer. Thus, this method may be used for examining the insect male genital function.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：交尾器 昆虫 配偶行動 精子 進化

1. 研究開始当初の背景

体内受精を行なう動物では、オスからメスへ精子を渡すため、オスの交尾器がよく発達している。とくに昆虫類では、オスの交尾器が複雑な様相を呈し、そうした交尾器形態に基づいて種の記載が行なわれる。そのため、多くの昆虫のグループに関しては、交尾器の比較形態学的研究が進んでいる。しかし、交尾器の各部分の機能に関しては、その研究手法上の困難さから、まったくと言ってよいほどわかっていない。その大きな理由の一つは、複雑な構造の各部の機能を個別に調べる手法が欠如しているためである。交尾時にオスとメスの交尾器の対応関係を観察する方法としては、交尾の瞬間にペアを急速に凍結させたり、エタノール中において固定をしたりする方法がとられてきた。しかし、これらの手法を適用できる種は限られており（通常は刺激で交尾が解除される）、また、かなり偶発的な固定のチャンスに依存していた（交尾が瞬時に終了するため、偶然な観察例としてしか報告されない）。

一方、オスの交尾器の機能（メスへの付着の仕方など）は、その後の精子の受け渡しに影響を与え、オスの交尾成功率と密接に関わると考えられる。交尾器の付着がどれくらいずれると、オスの交尾成功率がどれくらい低下するかはこれまで定量的に評価されたことがない。こうしたオスの交尾行動と交尾成功率との関連を明らかにするためにも、雌雄の交尾器の接合関係を知る術が必要である。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、微細蛍光ビーズをオスの交尾器の各部に塗布し、交尾後にそれがメスのどこに付着しているのかを調べることによって、交尾器の各部の機能を明らかにすることを目的とする。さらに、雌雄の交尾器のマッチングという観点から機械的生殖隔離の実証的研究へと発展させる。

そのために、まず、どのような微細蛍光ビーズを用いて、どのように観察すれば良いか、その手法を確立させることを第1の目的とする。次に、その手法を用いてある特定の昆虫群に関するオスの交尾器の形態と交尾行動の関連性について明らかにすることを第2の目的とする。

材料として、オスが左右非対称な交尾器を有するカマキリ類を用い、方法の確立と、左右非対称な交尾器の機能および交尾行動との関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 材料収集

日本に広く分布し、普通に見られる比較的大型の4種のカマキリ類を実験材料として用いた。2012年から2013年のそれぞれ9月か

ら11月にかけて、オオカマキリ148個体、チョウセンカマキリ13個体、コカマキリ49個体、ハラビロカマキリ23個体を採集し、観察および実験を行った。野外で採集してきた個体は、恒温室内で飼育した。カマキリ類は1頭ずつプラスチック容器（およそ20 cm × 20 cm × 30 cm、一面は網になっている）に入れ、止まり木（直径1 cmほどの自然の枯れ枝）を置いた。水は常時小型カップ（直径3 cm、高さ2 cmほどのプラスチック容器）に入れておき、餌として、数日に1回、首都大学東京南大沢キャンパス内の緑地で得た、バッタ類、コオロギ類、トンボ類などの生きた昆虫を与えた。餌は、直接手渡しで飼育カマキリに捕まえさせることもあったが、飼育容器の中に入れておくだけのこともあった。また、天気が不順なときなどには、鶏ひき肉、冷凍エビ、あるいは釣り餌であるサシ（ハエの幼虫）を手渡しで与えた。恒温室は、25 ± 1（相対湿度50~70%）に保たれ、明期12時間、暗期12時間の日長とした。飼育個体は、死亡後、あるいは適宜冷凍庫（-20）に入れて殺した後、すべて乾燥標本として保存した。

(2) 形態の測定

4種について、それぞれオス5個体、メス5個体について、腹部尾端を約50に保った約20% KOH水溶液に5時間ほど浸け、雌雄の交尾器の構造を実体顕微鏡下で観察し、合わせて写真撮影を行った。採集することのできたすべてのオスについて、交尾器に鏡像多型が認められないかどうかを実体顕微鏡で観察した。

(3) 微細蛍光ビーズによる機能解析

オオカマキリのオスの交尾器に見られる3個の硬化した突起のうち、鉤状に右側に尖る下陰茎板突起と、やや左上方に鉤状に尖る左上陰茎板突起に関して、これら2つの突起が、交尾時にメスのどの部分に接するのかを明らかにするため、微細蛍光ビーズを用いた交配実験を行った。今回用いた蛍光ビーズは、直径1 μmの蛍光ビーズ（Fluoresbrite Yellow Orange Carboxylate Microspheres, excitation maximum 529 nm, emission maximum 546 nm, Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA）で、これを金属針の先端に付けて、ジエチルエーテルで麻酔をしたカマキリのオスの一つの鉤状突起に実体顕微鏡下で塗布した。麻酔から覚めるのを待って（約2時間後）、恒温室内で、あらかじめメスを入れておいた交配用の大型容器（26 cm × 26 cm × 42 cm）に静かに移した。交配用の大型容器は木製で、前面がガラス、両側面が金網、後面が木の板になっている。オスがメスに接近を始めてから、交尾が終了するまで、直接観察を行い、交尾に成功した場合、直ちにメスを冷凍庫（-20）に入れ固定し、室温にもどした後、蛍光実体顕微鏡（MZ FLIII,

Leica) 下で観察を行い、通常の写真(露光時間自動)と蛍光写真(露光時間5~10分)を同時に撮影した。同じオスを2回実験に使うことはしなかった。

(4) 配偶行動の観察

野外で交尾中のペアを見つけた場合は、種の同定を行い、攪乱させないように気をつけて、交尾行動の観察を続けた。この時、オスが自身の腹部をメスの腹部のどちらから下に回しているかを記録した。恒温室内で、飼育中の個体を用いて、交配用の大型容器の中での配偶行動についても観察した。カマキリ類の交尾行動は、オスによるメスへのアプローチ、メスの上から腹部を回して交尾、交尾から交尾終了までの3段階に分けられる。そこで、オスとメスを交配用の容器へ入れてから(オスがすぐに反応しない場合は、観察を中止)、オスがメスに接触できるまでの時間、メスに接触後交尾に成功するまでの時間、そこから交尾が解かれるまでの時間(交尾が解かれるとただちに雌雄は分離)を、直接観察によって1分刻みで記録した。オスは原則として1回のみ交尾実験に用いたが、室内での交尾経験のあるオスとして、1個体は2回分の交尾時間の測定をした。

4. 研究成果

(1) 研究結果

4種とも調べたオスの交尾器についてすべて同方向への非対称性を示した。つまり、鏡像多型は見いだされなかった。4種のオスの交尾器の形態は共通しており、左寄りに左上陰茎板と下陰茎板が、右側に右上陰茎板がある(図1)。一方、メスの腹部末端には明らかな左右非対称性は認められなかった(図1)。メスでは、生殖弁と呼ばれる3対の弁(下弁、上弁、中弁)が、昆虫類の一般的産卵管に相当するが、これを第7腹板が側方から包み込むような形状になっているのが特徴的である。生殖口(内部生殖器の開口部)は、この生殖弁の下方奥に位置するため、完全に第7腹板によって覆い隠されていることになる。オオカマキリのオスの交尾器のうち、下陰茎板の突起の蛍光ビーズはメスの右側の第7腹板(右側の亜生殖板)と生殖弁の境界付近に付着し(図1a)、左上陰茎板の突起の蛍光ビーズは左側の第7腹板(左側の亜生殖板)と生殖弁の境界付近に付着した(図1b)。このことから、下陰茎板の突起はメスの右側の第7腹板と生殖弁の境界付近に差し込まれ、左上陰茎板の突起は左側の第7腹板と生殖弁の境界付近に差し込まれることになる(図7)。交尾の際、メスの生殖弁が、それを収納している第7腹板から瞬時に持ち上げられ、生殖口(内部生殖器の開口部)のある部分(生殖腔)が開くが、この時、オスの交尾器のうち、下陰茎板の突起と左上陰茎板の突起がその役割を担っていると考えられた。こうしてメ

スの生殖口の部分が開口すると、オスは交尾器をずらして、第9腹板の腹面を用いてメスの生殖弁を支え(閉まらないようにし)、そこに自身の生殖口を侵入させて精包を形成する。

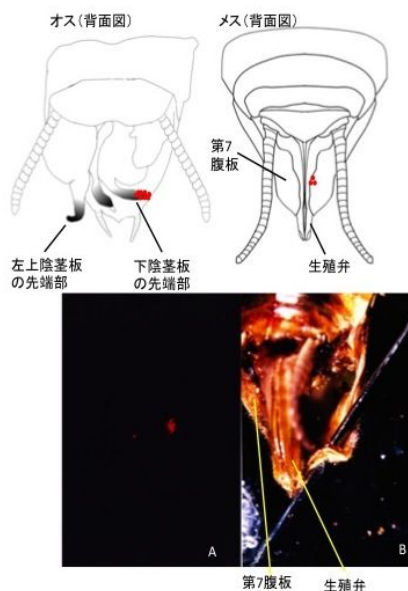


図1a. オス下陰茎板の先端部に微細蛍光ビーズ(赤で示す)を塗布して交尾させ、メスの体表のどこに付着しているかを蛍光実体顕微鏡で観察した結果。Aは蛍光撮影(蛍光ビーズは赤色に発光)。Bは通常撮影。

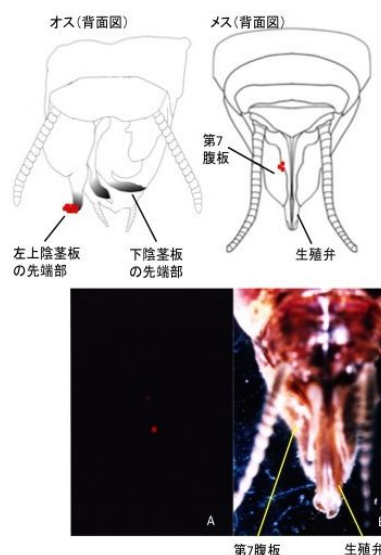


図1b. 今度はオス左上陰茎板の先端部に微細蛍光ビーズを塗布して交尾させた結果。

カマキリ類の交尾は、例外なくオスがメスの上に乗って行われた。この時、オスはメスの前胸部から中脚基部付近を前脚で挟む。オスは腹部を必ずメスの右側から下に曲げ、交尾器をメスの腹部の左側後方から接合させ

た。野外および飼育下で、オオカマキリについては 29 例、チョウセンカマキリについては 20 例、コカマキリについては 11 例、ハラビロカマキリについては 5 例の交尾を観察したが、いずれも右側から曲げた。

オオカマキリについて、交尾経験の有無がオスの交尾行動に及ぼす影響について調べたが、野外採集オスでも（交尾経験については不明）、野外採集後に飼育下で 1 回交尾をさせたオスでも（少なくとも 1 回以上は交尾経験あり）、野外で終齢幼虫を採集して飼育下で羽化させたオス（交尾未経験）でも、メスとの交配において、試行錯誤することなく右側から下方へと腹部を曲げて交尾に成功した。また、交尾時間を、オスがメスへの接近を始めてから接触するまで、メスと接触してから交尾まで、交尾開始から交尾終了までの 3 つに区分して測定した結果、これら交尾経験の異なる 3 グループのオスの間で差は認められなかった。これは、右側から下方へと腹部を曲げる交尾行動が、学習によって獲得されるわけではなく、生得的な行動であることを示している。

(2) 考察

カマキリ類の交尾器と交尾行動に関して、これまでに知られている知見のうち、本研究では、まず、オスの交尾器の形態について顕著な左右非対称性を示すことが確認できた。日本産 4 種のカマキリ類には共通の左右非対称性があり、いずれも、左上陰茎板の先端突起と下陰茎板の先端突起が鉤状に硬化してよく発達していた。左上陰茎板に付随する擬陰茎にも硬化部が認められるが、これは鉤状となっていない。しかし、メスでは非対称な形態は腹部末端のどこにも見られず、左右対称であった。

これまでの研究では、こうしたオスの左右非対称な交尾器の各部分が、交尾のときにどう使われているのかは不明のままであった。今回得られた微細蛍光ビーズによる雌雄の交尾器の接触部位の特定から考えられる交尾の順番は、

1. 左上陰茎板と下陰茎板の鉤状突起を用いて、メスの第 7 腹板に埋没されている生殖弁を持ち上げる。

2. 持ち上がった生殖弁をオスの第 9 腹板の腹面で支え（閉じないようにし）、開口部に自身の生殖口を挿入する。

3. 精包（精子を含む）を、開口部奥のメスの生殖口に到達するように放出して交尾器をはずす。

となる。つまり、カマキリ類では、通常は、メスの生殖口が生殖弁と側方に湾曲した第 7 腹板によって閉じられており、オスが交尾を行う際には、まず、この部分を開口させる必要がある。そのために、生殖弁をすくい上げる機能をもった鉤状の突起が発達したのではないかと考えられる。

生殖弁をすくい上げるためには、オスの腹

部を用いて、メスの腹部末端を固定することが必要であるだろう。全体を固定しておかないと、生殖弁を引っ張り出すための力が分散してしまう。オスはメス右側から下面を通して左側で交尾するが、これはオスの腹部でメスの腹部末端を固定する役割を担っている可能性が高い。

今後、この点をさらに確認するためには、下陰茎板の先端突起あるいは、左上陰茎板の先端突起を切除して交配させる実験が有効である。どちらか一方、あるいは両方が欠けると、交尾初期の重要なイベントであるメスの生殖弁を第 7 腹板から持ち上げ、生殖口のある部分（生殖腔）を開口させることができないのではないかと予測される。そうすると、それ以後の一連の交尾行動が進まず、精包の受け渡しに失敗すると予測される。

観察した 4 種のカマキリ類とも、例外なく、オスの尾部はメスの腹部の右側から下面へ回されることから、オスのこうした交尾行動は遺伝的に固定しており、可塑性に乏しい行動である可能性が高い。実際に、カマキリ類では交尾中にメスによるオスの捕食（共食い）が起こる。これを避けるため、学習の余地が残されていない可能性がある。

(3) 今後の課題

今回はカマキリ類の非対称なオスの交尾器の機能を明らかにするために、微細蛍光ビーズを用いた機能解明の研究を行った。この手法は、オスの交尾器の各部位の機能（メスのどこに付着あるいは挿入されるか）を明らかにするための強力な手法となり得ることが示された。他にも様々な昆虫類に関して、予備的にこの手法を用いて雌雄の交尾器の接点を調べたが、小型の昆虫類では微細蛍光ビーズの塗布が難しく、昆虫の麻酔方法と合わせて今後のさらなる検討が必要である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

鈴木航, カマキリ類のオスの交尾器の左右非対称性とその特異な交尾行動. 第 3 4 回関東地区生態学関係修士論文発表会, 2014 年 3 月 1 日, 神田. (指導教員: 林 文男)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 文男 (HAYASHI, Fumio)
首都大学東京・理工学研究科・准教授
研究者番号：40212154

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

上村 佳孝 (KAMIMURA, Yoshitaka)
慶応義塾大学・商学部・准教授
研究者番号：50366952