

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570019

研究課題名(和文) アゲハ類における精子間競争 - 無核精子最後の戦い -

研究課題名(英文) Sperm Competition in the Swallowtail Butterflies: final conflict of apyrene sperm

研究代表者

渡邊 守 (WATANABE, Mamoru)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：80167171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：蝶類の精子には、核をもち卵と受精できる有核精子と、核がなく受精できない無核精子が存在する。一方、雌の生殖器官は、交尾嚢と受精嚢があり、交尾に際して、精子の含まれる精包は交尾嚢へ注入される。交尾後、有核精子は精包を出て交尾嚢から受精嚢へと移動し、産卵時の受精を待つことになる。無核精子も同様の移動を行ない、有核精子よりもやや早く受精嚢に到達すると共に、有核精子よりも多量に受精嚢に移動することがわかった。しかし、単婚制のアゲハ類の場合、交尾後の時間経過と共に、受精嚢内の無核精子は失活し、無核精子の役割が精子間競争のみにあるのではなく、婚姻贈呈や有核精子の移動補助にもあることが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：Lepidopteran males including swallowtail butterflies transfer two types of sperm, nucleated eupyrene and non-nucleated apyrene sperm, within a single spermatophore. Both types of sperm migrate to the spermatheca. The cheap filler hypothesis has been proposed on the role of apyrene sperm in the polyandrous species, where motile apyrene sperm in the spermatheca reduce female receptivity of re-mating. Males of monandrous species also produce apyrene sperm, migrating to the spermatheca. Sperm dynamics and the motility of apyrene sperm in the spermatheca after copulation were examined in polyandrous and monandrous species. In the polyandrous species, apyrene sperm disappeared from the spermatheca in a couple of days after the copulation. In the monandrous species, although apyrene sperm remain in the spermatheca long time after copulation, they lost the motility soon after the migration to the spermatheca. Then, alternative hypotheses of the role of apyrene sperm was discussed.

研究分野：生態学

キーワード：有核精子 無核精子 交尾嚢 受精嚢 精子移動 精包 精子活性 単婚制

1. 研究開始当初の背景

1930年代に、蝶類の雄は無核精子と有核精子を生産することが明らかにされたが、その意義は1980年代になってから解析され始めた。その結果、交尾後、雌の交尾嚢に注入された精包内の精子が受精嚢へと移動する「精子移動sperm migration」において、両型の精子が共に移動すると認識されるようになったのは1990年代半ばである。ここにおいて、受精に預からない無核精子の役割について、精子競争の観点から議論されるようになった。渡辺・益野(2001)は、それまでに提出された無核精子の役割に関する様々な仮説をまとめて検討し、特に多回交尾制の種における雌雄のせめぎ合いに重要な役割をもつと示唆している。しかし、雄の精子生産量の変動や雌体内における精子移動と各精子貯蔵器官における動態の解析は、ようやく緒についたばかりで、無核精子の最終的な役割についての直接的証拠は未だ提出されていなかった。

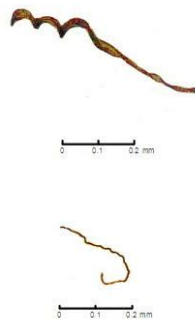


図1. 交尾直後の精包内におけるナミアゲハの有核精子束(上)と無核精子(下)

そこで、交尾戦略や生涯交尾回数、人工的交尾法などの情報や技術が比較的確立しているアゲハ類とシロチョウ類において、雄の立場と雌の立場の両面から、無核精子の役割を総合的に明らかにし、蝶類の繁殖活動における雌雄の戦術・戦略の進化にアプローチすることにした。そのためには、雌雄それぞれの立場において、交尾開始から産卵までの間の無核精子の移動を有核精子のそれと比較しな

ければならない。本研究では、これまでに提出されてきた無核精子の役割の仮説を検討し、雌雄のそれぞれの立場から総合的に明らかにしようとしたものである。

2. 研究の目的

鱗翅目昆虫の雄が生産する有核精子と無核精子は、前者が通常の精子であるに対し、後者は授精能力を欠くため、配偶子として機能しないと言われてきた。したがって、雄が繁殖成功度を高めようとするなら、後者の精子よりも、卵に受精できる前者の精子を量産すべきであることは疑いもない。しかし、雄が生産し、雌に注入する精子の8割近くは無核精子が占めることが多くの種で明らかにされてきた。

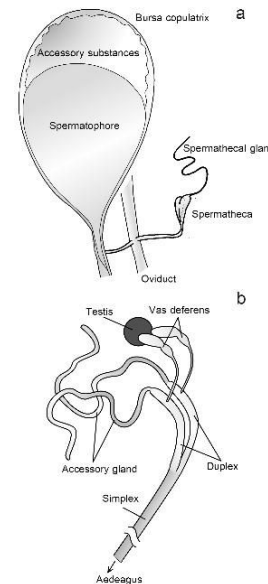


図2. 蝶類の雌(a)と雄(b)の生殖器官の配置

蝶類の雄は交尾の際、両型の精子を精包というカプセルに入れて、雌の交尾嚢に注入している。交尾後まもなく、両型の精子は交尾嚢を出て、受精のための精子貯蔵器官である受精嚢に移動していく。現在、この現象の説明として、受精嚢に到達した無核精子は雌の再交尾を抑制するという「安価な詰め物仮説 cheap filler hypothesis」が有力視されるようになってきた。

鱗翅目では、受精嚢に到達した有核精子の運動活性が産卵時まで維持されている。このような運動活性をもつ有核精子が受精嚢を出て卵管へ至り受精するので、雌にとって、受精可能な精子数を評価するためには、受精嚢内の精子の運動活性を把握すれば良いと言えよう。もしそうなら、交尾相手の雌の再交尾までの期間を延ばさせたい雄の手段は、受精嚢内の精子の運動活性が常に高くなっているように適応してきたに違いない。すなわち、「安価な詰め物仮説」では、受精嚢内の無核精子が有核精子と同等の運動活性を示すことで、十分な量の有核精子が受精嚢に存在すると雌に誤認識させ、雌の再交尾を抑制するという機構が想定されたのである。したがって、この仮説が成立するためには、無核精子が受精嚢に到達し、受精嚢内で無核精子が高い運動活性を維持できていなければならない。

これまでの無核精子の研究は、多回交尾制の種を対象に行なわれてきた。雌の再交尾抑制は、多回交尾制の種における雄が繁殖成功度を高めるうえで最も重要な問題だからである。一方、単婚制の種においても、無核精子は多量に生産されていることが明らかにされてきた。その結果、単婚制の種において雌の再交尾が常に抑制されているのは、従来から知られている交尾栓のような物理的あるいは生理的な機構によるものだけでなく、多回交尾制の種よりも強力な役割をもつ無核精子の存在も可能性として浮上してきたのである。したがって、無核精子の役割を解明するには、多回交尾制の種に並行して、単婚制の種も研究すべきといえよう。

本研究では、多回交尾制のアゲハ類と単婚制のアオジャコウアゲハとジャコウアゲハについて、無核精子の雌体内での動態を明らかにしようとした。さらに、ジャコウアゲハの雌体内における精子の活性を調べ、無核精子の役割の解明を試みている。

3. 研究の方法

(1) 多回交尾制のアゲハ類

原則として、第1化のアゲハ類の成虫を採集し、採卵して、幼虫を飼育し、第2化成虫を得て、実験を開始した。

羽化成虫は、雌雄別々のケージで飼育し、様々な日齢の雌雄を組み合わせ、ハンドペアリングにより交尾させた。

雄を解剖し、精巣と貯精嚢を取り出し、別々にホールスライド上の生理食塩水に浸し、ゆっくりと攪拌した。これを精子運動解析装置によって撮影し、解析した。この装置により、有核精子と無核精子それぞれについて、運動精子数と不動精子数を計測すると共に運動量を測定した。

精子生産量測定のために解剖に供した雄は、未交尾を保った個体（コントロール）と、生涯に1回交尾させた個体（羽化翌日交尾）、2回交尾させる個体（1日齢の交尾後翌日に再交尾させた個体と、少なくとも3日間は休息させてから再交尾させた個体）であった。交尾させた雄の場合、精巣と貯精嚢内の精子数の測定は交尾後となる。したがって、雌に注入した精子数を調べて、合計した数が、交尾直前に雄が準備していた精子数といえる。

交尾実験に供した雌は、処女雌と既交尾雌を適宜用いた。なお、有核精子束を実体顕微鏡下で直接数え、自由有核精子と自由無核精子数は、Watanabe *et al.* (2000) の方法に従って乾燥標本を作成して計測した。

(2) 単婚制のアゲハ類

2013年7月、アリゾナ砂漠の生息地において、アオジャコウアゲハの雌を12日間にわたって採集した。捕獲した雌の前翅長を測定し、羽化後のエイジを、翅の汚損状態から、若い順にFF、F、B、BB、BBBの5段階で推定した。

捕獲した雌はその日のうちに解剖し、卵巣内の成熟卵と亜成熟卵、未熟卵を数えると共

に、受精嚢内の有核精子と無核精子の数を数えた。また、交尾嚢内の精包の形も調べた。

交尾嚢内の精包の形は崩壊程度により、～に分けた。完全な形をしている精包は交尾後2～3日以内といえ、これをステージ1、ネックと呼ばれる先端の突出部の欠けている精包は交尾後数日経過しており、これをステージ2とした。崩壊がかなり進んでしまった精包は、ステージ3とし、これは交尾後1週間以上経過している。

また、我が国における単婚制のジャコウアゲハでも、様々な日齢の雌雄を交尾させ、雄の精子生産数と精子注入数を調べた。

4. 研究成果

(1) 多回交尾制のアゲハ類

ナミアゲハの1～5日齢までの未交尾雄を未交尾雌と交尾させたところ、精包の生産量や精子の生産数（注入数＋残存数）は加齢と共に増加していた。注入精子数は生産数と共に増加したが、徐々に増加は緩やかとなり、最終的に増加は停止した。一方、1日齢で交尾させた雄を1～5日間休息させて再び未交尾雌と交尾させたところ、休息日数と共に精包や精子の生産量は増加した。再交尾時に注入する精子の数は頭打ちにならず、雄は生産したほとんどの精子を雌へ注入していたといえた。

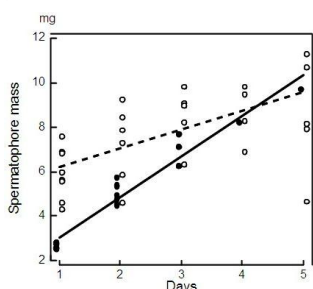


図3. ナミアゲハの雄が注入した精包の重さの変化。白丸と点線は羽化後の日齢と初回交尾の精包を、黒点と実線は再交尾までの休息日数と再交尾時の精包を示す。

雌が多回交尾制であるナミアゲハの雄は、精包の生産能力が高く、有核精子束の生産能力は低い傾向が明らかとなった。この結果は、

精包と精子の生産が雄にとってコストであり、片方の生産能力を上げようとするとは他方の生産能力が下がるといったトレードオフの関係があり、多回交尾制の種の雄は、精子より精包の生産に重きを置いていることを示唆している。大きな精包は様々な方法で雄の繁殖成功度を高めることができるので、トレードオフが存在する場合、多回交尾制の種の雄が精包の生産能力を優先することは非常に効率的であると考えられた。精子注入数が未交尾雄で頭打ちになり、既交尾雄で頭打ちにならなかったことから、雄は自らの交尾歴によって注入戦術を変えていると考えられた。

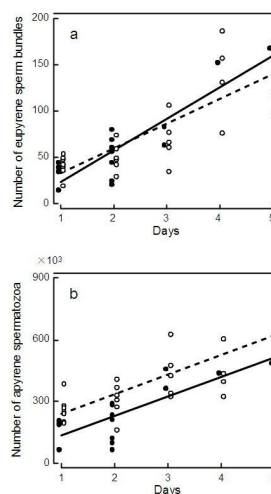


図4. ナミアゲハの雄が生産した有核精子（上）と無核精子（下）の数。白丸と点線は羽化後の日齢と初回交尾時の精子数を、黒点と実線は再交尾までの休息日数と再交尾時の精子数を示す。

精子活性は、ナミアゲハとクロアゲハを用いて、交尾後24時間経過した雌の受精嚢内の有核精子の回転運動の測定で解析した。有核精子の回転活性速度は、クロアゲハで0.34mm/s、ナミアゲハで0.28mm/sとなり、クロアゲハのほうが活性は高い傾向があった。両型の精子生産量と注入量、精子移動率について、両種で比較した結果、有核精子の活性が高ければ無核精子の必要性が低くなるという仮説は満たせそうであることがわかった。

(2) 単婚制のアゲハ類

アオジャコウアゲハの交尾直後と推定された雌は、3,300本の有核精子と4,000本の無核精子を受精嚢に保有していた。交尾後かなり時間が経過したと思われる雌の受精嚢にも、120本の無核精子が認められ、単婚制の種でも無核精子は受精嚢に長期間存在し続ける可能性の高いことが明らかになった。

捕獲した雌がもっていた精包の数を調べると、FFの雌の場合、ほとんどの個体は精包を1個もっており、2個もっていた雌はまれだった。しかし、未交尾の雌は捕獲できていなかった。その結果、平均精包数は1.1となり、エイジが進むにつれて2個以上の精包を持つ雌の数は増加したものの、BBBの雌でも平均すれば1.4個の精包しかもっていなかった。もっていた精包の崩壊段階を調べると、

や となっている精包が多く、平均すると、どの雌も、少なくとも交尾後数日は経っているといえた。特に、FFの雌の精包の崩壊段階は2.2だったので、本種は羽化後間もない時期に交尾をしてしまう種であるといえた。

捕獲した雌の受精嚢内には、有核精子と無核精子が存在し、交尾直後と思われる精包をもつ雌では、3300本の有核精子と4000本の無核精子をもっていたのに対し、の段階の精包をもっていた雌の受精嚢内にも、700本の有核精子と、120本の無核精子があった。すなわち、無核精子も雌の寿命が来るまで残存する可能性が高いといえよう。

捕獲した雌の大きさには、かなり変異があり、前翅長と保有卵数には正の関係があった。多回交尾制の種の場合、雄から受け取る精包を雌の体の維持や産下卵数の増加のための栄養にあてられるが、単婚制の種の場合はそれを行なうことができず、幼虫時代の摂食量がそのまま蔵卵数に影響を与えてしまうと考えられた。また、無核精子が比較的長期間受精嚢内に残存していたことは、単婚制の種における再交尾の抑制の役割を無核精子も

担っていた可能性が高いと示唆された。

我が国におけるジャコウアゲハでは、生産される精子の約90%は無核精子であった。雄は、生産した有核精子の53%と無核精子の86%を雌に注入していたので、注入する精子のほとんどが無核精子となっていた。

交尾後12時間の時点で、有核精子の約10倍に相当する約50,000本の無核精子が受精嚢に到達した。その後、無核精子は受精嚢から次第に減少するものの、交尾後8日経っても約10,000本が受精嚢に留まっていた。

受精嚢に到達した有核精子の運動活性は交尾後の時間経過によって変化しなかった。他方、無核精子の運動活性は交尾後2日で低下し、8日経つと全ての無核精子の運動活性が失われた。単婚制のジャコウアゲハでは「安価な詰め物仮説」の前提が成立していなかったといえる。

ジャコウアゲハの雄は、交尾時に雌の交尾孔を交尾栓という物質で塞いでしまうので、無核精子によって雌の再交尾を抑制する必要がないのかもしれない。しかし、本種においても、雄は大量の無核精子を雌に注入し、有核精子よりも多くの無核精子が受精嚢に移動していた。

無核精子の役割として有力視されている「安価な詰め物仮説」は必ずしも普遍的でないといえた。一方、単婚制の雄も多量の無核精子を生産し、受精嚢に到達した精子の大部分も無核精子であった。これを説明するには、無核精子が有核精子の受精嚢への移動を助けるという「有核精子移動補助説」や、無核精子が雌の栄養になるという「婚姻贈呈説」といった、他の仮説を再検討する必要があるといえよう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Sasaki, N., S. Todoriki & **M. Watanabe** (2016) Effect of sperm ejection by females on male fertilization success in the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* L.

(Lepidoptera: Papilionidae). Journal of Research on the Lepidoptera, 49 (in press) < 査読有 >

Sasaki, N. & **M. Watanabe** (2015) Alternative ejaculate allocation tactics in relation to male mating history of the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* L. (Lepidoptera; Papilionidae). Journal of Research on the Lepidoptera, 48:1-8. < 査読有 >

Konagaya, T., N. Mutoh, M. Suzuki, R. L. Rutowski & **M. Watanabe** (2015) Estimates of female lifetime fecundity and changes in the number and types of sperm stored with age and time since mating in the monandrous swallowtail butterfly, *Battus philenor*, in the Arizona desert. Applied Entomology and Zoology, 50:(in press) DOI : 10.1007/s13355-015-0336-9 < 査読有 >

Konagaya, T. & **M. Watanabe** (2015) Adaptive significance of the mating of autumn-morph females with non-overwintering summer-morph males in the Japanese common grass yellow, *Eurema mandarina* (Lepidoptera: Pieridae). Applied Entomology and Zoology, 50:41-47. DOI: 10.1007/s13355-014-0300-0 < 査読有 >

小長谷達郎・**渡辺 守** (2013) キタキチヨウの夏型雄の精子生産と注入精子数. 応動昆, 57:243-248. DOI: 10.1303/jjaez.2013.243 < 査読有 >

[学会発表](計 18 件)

井戸川直人・小長谷達郎・**渡辺 守** 2015.03.27-28. ジャコウアゲハの雌体内における注入精子の動態と活性. 第 59 回日本応用動物昆虫学会大会. 山形. 山形大学.

小長谷達郎・**渡辺 守** 2015.03.27-28. 成虫越冬するキタキチヨウ秋型雌の交尾戦略. 第 59 回日本応用動物昆虫学会大会. 山形. 山形大学.

小長谷達郎・**渡辺 守** 2015.03.19. 成虫越冬するキタキチヨウの秋型雌をめぐる夏型雄と秋型雄の移動戦略. 第 62 回日本生態学会大会. 鹿児島. 鹿児島大学.

鈴木瑞穂・小長谷達郎・武藤直樹・**渡辺 守** 2014.11.02. アリゾナ砂漠における単婚制のアオジャコウアゲハの雌の卵生産と保有精子数. 第 33 回日本動物行動学会大会. 長崎. 長崎大学.

小長谷達郎・井戸川直人・**渡辺 守** 2014.11.01. 単婚性のジャコウアゲハにおける精子注入数と雌体内での精子動態. 第 33 回日本動物行動学会大会. 長崎. 長崎大学.

Konagaya, T. & **M. Watanabe** 2014.08.13. Adaptive significance of pre-overwinter copulation in females with non-overwinter males in the Japanese common grass yellow, *Eurema mandarina*. 7th International Conference on the Biology of Butterflies. Turku (Finland).

渡辺 守・武藤直樹 2014.3.28. アゲハ類における有核精子の活性と無核精子の役割. 第 58 回日本応用動物昆虫学会大会. 高知. 高知大学.

小長谷達郎・**渡辺 守** 2014.3.16. キタキチヨウの秋型雌が越冬前と越冬後に交尾する意義. 第 61 回日本生態学会大会. 広島. 広島国際会議場.

小長谷達郎・**渡辺 守** 2013.11.29. キタキチヨウの成虫越冬する雌は冬を越せない雄の足下を見る? 第 32 回日本動物行動学会大会. 広島. 広島大学.

Konagaya, T. & **M. Watanabe** 2013.06.29.

Factors affecting mating activity of virgin males on the sperm number produced in Japanese small yellow sulfur, *Eurema mandarina*. 62nd Annual Meeting of the Lepidopterists' Society. Florida (U.S.A.).

Muto, N. & **M. Watanabe** 2013.06.29. Euphyrene sperm migration in relation to the number of apyrene sperm transferred in the swallowtail butterflies. 62nd Annual Meeting of the Lepidopterists' Society. Florida (U.S.A.).

小長谷達郎・**渡辺 守** 2013.03.06. キタキチヨウの雄の精子生産速度と注入精子数. 第 60 回日本生態学会大会. 静岡. グランシップ静岡.

武藤直樹・滝 若菜・**渡辺 守** 2013.03.06. アゲハ類における精子の授受と活性. 第 60 回日本生態学会大会. 静岡. グランシップ静岡.

小長谷達郎・東 敬義・**渡辺 守** 2013.01.12. キタキチヨウの雄の精子生産過程. 日本生物教育学会第 94 回全国大会. 広島. 広島大学.

武藤直樹・**渡辺 守** 2013.01.12. アゲハ類における精子の移動と活性の観察. 日本生物教育学会第 94 回全国大会. 広島. 広島大学.

小長谷達郎・**渡辺 守** 2012.11.23. キタキチヨウの季節型と雄の注入精子数. 第 31 回日本動物行動学会大会. 奈良. 奈良女子大学.

武藤直樹・**渡辺 守** 2012.11.23. アゲハ類の精子における運動活性. 第 31 回日本動物行動学会大会. 奈良. 奈良女子大学.

Watanabe, M. 2012.08.21. The role of apyrene sperm in the polyandrous swallowtail butterflies. XXIV International Congress of Entomology. Daegu (Korea). (招待講演)

[図書](計 1 件)

Watanabe, M. (2016) Sperm Competition in Butterflies. Springer. 約 200 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 守 (WATANABE, Mamoru)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号: 80167171

(2) 研究分担者

なし