

ミミズ類におけるセクシャル・コンフリクトに関する研究

Sexual conflict in earthworm

慶応義塾大学 小林一也

Department of Biosciences and Informatics, Keio University Kazuya KOBAYASHI

派遣期間 2006年10月1日～2007年9月30日

October 1, 2006 – September 30, 2007

研究期間 Animal Evolutionary Ecology, Zoological Institute, University of Tübingen, Auf Der

Morgenstelle 28, 72076 Tübingen, Germany

研究指導者 Prof. Dr. Nico Michiels

Sexual conflict between mating partners can give rise to strategies that are advantageous for one sex but harmful to the opposite sex. In general, males develop offensive traits to enhance their chances in sperm competition, females evolve defensive traits that allow them to stay in control of who fathers their offspring. In hermaphrodites, selection on one sex cannot be independent from influencing selection on the other one in the same individual. This often results in bizarre reproductive tactics and mating behaviors. Here, I try to demonstrate that these processes are also at work in simultaneous hermaphrodites. The hermaphroditic earthworm *Lumbricus terrestris* uses specialized setae, namely copulatory setae, to pierce through the partner's skin and inject a setal gland product during copulation. I propose that the setal glands may produce a substance that triggers cocoon production in the partner and leads to both a reduction in sperm competition for the injecting worm and an increase in reproductive success relative to other worms in the population. Unfortunately, there was no statistical difference in the cocoon production by the experimental injection of the setal gland extracts. Further studies are required to confirm whether or not the extracts contain a substance controlling cocoon production.

背景

有性生殖を成立させるための有利な特徴は、自然選択によって次世代に受け継がれやすいと考えられており、自然選択の中でも特に性選択と表現されている。そもそも、性選択は、動物が生涯に作る卵の数に比べて、精子の数が圧倒的であるという事実が原理になっている。(卵は高価で、精子は安価。Bateman, 1948; Stearns & Hoekstra, 2000)。つまり、雌は自分の貴重な遺伝子を運ぶ卵をそう易々といい加減に適当な雄に渡せないわけである。一方、無尽蔵に精子を作れる雄は雌を選ぶというよりむしろ貴重な雌の卵を獲得するために他の雄を蹴落とすことに必死になるわけである。その結果、一般的に性選択は、専ら雄が行うパートナー獲得のための同性の個体間の競争（同性間選択）と雌が行うパートナーの選択（異性間選択）の二つに大きく分けられる。子孫を残そうという共通目的を遂げようとするものの、このような雄と雌との間での攻防を、Sexual conflict と総称する。それゆえに、Sexual conflict が進化のひとつの原動力になっているといっても過言ではない(Tregenza, 2003; Chapman *et al.*, 2003)。

一般に、性選択は交尾前の現象であるように理解されているが、それは一夫一婦制でかつ雌は受け取った精子を貯蔵しないという前提で研究が進められたという偏った歴史があるからである(Birkhead & Pizzari, 2002)。しかしながら、実際には、多くの動物は多夫一婦制をとり、雌は精子を一定期間貯蔵する特殊な器官を持っている。このような特徴は、交尾後の性選択の存在を十分示唆するものであり、近年、研究が始められてきている(Møller, 1998)。交尾後性選択でも交尾前性選択と同様に、雄による同性間選択と雌による異性間選択が起っていると考えられており、それぞれ Sperm competition と Cryptic female choice と呼ばれている(Eberhard & Cordero, 1995; Møller, 1998)。交尾後性選択の研究では、交尾時に注入される分泌物（主に精液）に含まれる化学成分に焦点が当てられている。なぜなら、これらには Sperm competition や Cryptic female choice に影響を与える物質が含まれているからである。その研究は専ら、ショウジョウバエで行われており、これまで、射精された雌の性欲を一時的に落とし、他の雄との交尾を阻止するように働く Sex peptides (Wigby & Chapman, 2005) などがわかってきている。このように、交尾後性選択に関わる研究は、生化学的あるいは分子生物学的手法による解析が容易であることから、分子進化生態学の発展に貢献しているといえる。また、性選択の提唱者であるダーウィンでさえ、雌雄同体動物における性選択の存在を疑っていたが(Darwin, 1871)、交尾後性選択という新たな概念が、雌雄同体動物でも Sexual conflict が起こりうるという可能性を許した。

このような背景のもと、私は、雌雄同体動物ミミズ *Lumbricus terrestris* を材料として用い、Sexual conflict に関わっている可能性のある化学物質の存在を明確にすることを本研究の目標に掲げた。ミミズの交尾は、図1のように2匹のミミズがお互いに腹側をあわせて行われる。受け取った精子は Spermatheca と呼ばれる袋に貯められる。貯められた他個体由来の精子は卵殻形成時までは受精に使われず、時として8ヶ月もの長期間この袋に貯蔵されていることもある(Butt & Nuutinen, 1998)。その間、ミミズは不特定多数のパートナーと交尾することができることから、ミミズでも Sperm

competition が起っていると予想されている。一方、自己の貴重な卵との受精をどのようなタイミングで許すのか、あるいは強制的に受精させられているのか、それは全て卵殻形成のタイミングに依存している。もし、卵殻形成のタイミングが相手側から受けた何らかの化学物質によって制御されているとするならば、その物質が Sexual conflict に関与している可能性が考えられる。ミミズには 9-10 節、26 節そして 31-38 節に Copulatory setae と呼ばれる特殊な貧毛が生えており (Feldkamp, 1924)、3 時間にもおよぶ交尾の間、相手の体表を突き破り互いの体が離れないようにしている。それに加えて重要なことは、Copulatory setae には 4 本の溝が走っていて、Copulatory setae の根元にある特有の分泌器官 (Setal gland) からの分泌物を相手の筋肉層に注入していることが観察されている (Koene *et al.*, 2002)。本研究では、卵殻形成のタイミングが、この分泌物に含まれる何らかの化学物質によって調節を受けていると仮定した。特に Clitellum と呼ばれる卵殻形成部位に注入されることになる 9-10 節の分泌物と頭部に近い Spermatheca のある体節に注入されることになる 31-38 節の分泌物に注目して研究を行った。



Fig.1 A mating pair of *Lumbricus terrestris*

材料と方法

本研究の材料には、カナダから輸入した *L. terrestris* (環形動物門貧毛綱オヨギミミズ目) を用いた (12 Giant Canadian Night Crawlers, BAITMASTER™)。馬糞と土壌を 1 : 1 で混合した飼育土を詰めたポローと呼んでいる筒 (高さ 4.5 cm x 縦 1.5 cm x 横 3 cm) に一匹ずつ導入した。ポローの上には単独またはペア飼育用のケースを取り付けた (単独 : 高さ 12 cm x 縦 9 cm x 横 9 cm ; ペア : 高さ 8.5 cm x 縦 9 cm x 横 16 cm)。ミミズは暗条件下でポローからでてきて摂食・交尾行動を行う。飼育温度は 13°C。明暗条件は 8 時-18 時の明条件 (10 時間) と 18 時-8 時 (14 時間) のサイクルで制御されており、ミミズの交尾行動を暗視カメラで記録した。原則的に毎日、飼育土が乾燥することがないように水分補給を行い、餌はレタスを 2 週間に一度与えた。

Copulatory setae が位置する体節の Setal gland に卵殻形成のタイミングに影響を及ぼす物質が含まれているかどうかを確かめるために、Setal gland に由来する抽出物をミミズに注射する実験を行った。ミミズを市販の炭酸水 (Schönborn Quelle Classic mit Kohlensäure, ELITESS) 中で麻酔にかけ解剖を行い、目的の Setal gland および対照実験の為の組織 (背側表皮) を切り出した。300 匹の

ミミズに由来する組織片を集め、液体窒素を注ぎながらすり鉢を用いて破碎した。その破碎物に純水を加えてさらに超音波破碎を行った (SONOPULS UW2070, BANDELIN)。最終的に組織湿重量の10倍量の純水中で抽出するように調整した。破碎液を超遠心 (100,000xg, 4°C, 1hr) にかけて、その上清画分を凍結乾燥した。乾燥物を出発段階の組織湿重量当たり 300 μ L/g になるようにリンガー液に再懸濁し、これを注射原液とした。

注射実験には、2週間、ボロー内で飼育して実験環境に適応したミミズを用いた。ミミズの選別や実験デザインに関して、全ての実験においてランダム化を行った。その選別の統計学的正当性は性的成熟度と相関する体重を基準に行われた。マイクロシリンジ (Microliter™ Syringes #702) を用いてミミズ1匹に対して 3 μ L のサンプルを注射した。注射箇所は、自然状態で、9-10節の分泌物が注入される卵殻形成部位と 31-38節の分泌物が注入されることになる Spermatheca のある体節とした。注射後、1週間ごとにボロー内に産卵された卵殻数を調査し、3週間分の結果に対して統計学的解析を行った。

結果と考察

注射実験に先立って、交尾後の卵殻形成のタイミングが自然状態で起っているかどうか調査した。購入した300匹のミミズを解剖した際、Spermatheca に他個体由来の精子が入っていないことはなかった。既に交尾経験はあるという前提で、96匹のミミズを用意し、48匹をペア飼育、残りの半分を単独飼育した。ペア飼育で交尾が記録された場合、翌日に単独飼育に変更し、それ以後1週間毎に6週間、卵殻数を調査した。交尾を行った個体に隣接する単独飼育個体の卵殻数を対照とした。140日間の観察期間に8ペア (16匹) のミミズが交尾した。卵殻数は常に対照個体と比べて約1.5倍になっており、6週目では、対照個体30個に対して、交尾個体48個の卵殻が確認された。一過的かつ劇的な卵殻数増加はないものの、交尾によって卵殻数増加が起っていることがわかった。その増加傾向は少なくとも6週間に渡って特に変化がないことから、注射実験では、調査期間を3週間に設定した。

分泌物は Setal gland から自然状態で Copulatory setae に沿って注入されることから、目的物質が存在するならば、それは水溶性であると仮定した。また、目的物質の分子量がわからないので限外濾過による脱塩処理は現段階で不相当と考え、抽出溶液に緩衝液ではなく純水を選択した。31-38節の Setal gland に由来する抽出物を用いた注射実験では、96匹を7グループにわけ、抽出原液、1/5希釈液そして1/25希釈液の効果を調査した。その結果、卵殻産生に影響はみられなかった (Kruskal-Wallis test, $\chi^2=2.610$, $df=6$, $P=0.856>0.05$)。但し、注射作業直後から死亡する個体が多く、組織抽出物ではないリンガー液の注射でも死亡することがあった。その注射箇所は、頭部に近く、ほぼ心臓直下でもあることから、作業上の問題である可能性が高い。その注射方法に改善を加えて、よりミミズにダメージのない状況を検討し、再度、調査する必要があるといえる。9-10節の Setal gland に由来する抽出物を用いた注射実験では、50匹を5グループにわけ、抽出原液と1/5希釈液の効果を調査した。その結果、実験中に死亡する個体はおらず、ミミズの健康状態は良い条件下で観

察することができたが、卵殻産生に統計学的な有意差は得られなかった (Kruskal-Wallis test, $\chi^2=8.1336$, $df=4$, $0.05 < P=0.0868 < 0.1$)。但し、抽出原液の注射の場合、卵殻数増加傾向は認められているので、今後、注射サンプルを抽出原液に限定し、調査個体数を増やして、再検討する必要がある。

参考文献

- Bateman, A. J. (1948) Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* 2: 349-368.
- Birkhead, R. T., Pizzari, T. (2002) Postcopulatory sexual selection. *Nature publishing group* 3: 262-273
- Butt, K. R., Nuutinen, V. (1998) Reproduction of the earthworm *Lumbricus terrestris* L after the first mating. *Can. J. Zool.* 76: 104-109.
- Chapman, T., Arnqvist, G., Bangham, J., Rowe, L. (2003) Sexual conflict. *Trends Ecol. Evol.* 18: 41-47.
- Darwin, C. (1871) *The descent of man and selection in relation to sex*. Murray, London.
- Eberhard, W. G., Cordero, C. (1995) Sexual selection by cryptic female choice on male seminal products – a new bridge between selection and reproductive physiology. *Tree* 10: 493-496.
- Feldkamp, J. (1924) Untersuchungen über die Geschlechtsmerkmale und die Begattung der Regenwürmer. *Zool. Jahrb. Anat.* 46: 609-623.
- Koene, J. M., Sundermann, G., Michiels, N. K. (2002) On the function of body piercing during copulation in earthworms. *Inv. Reprod. Develop.* 41: 35-40.
- Moller, A. P. (1998) Sperm competition and sexual selection, in Birkhead, T. R., Moller, A. P., *Sperm competition and sexual selection*, Academic Press Ltd: 55-90.
- Stearns, S. C., Hoekstra, R. F. (2001) *Evolution: An introduction*. Oxford University Press.
- Tregenza, T. (2003) The battle between the sexes. *Nature* 423: 929-930.
- Wigby, S., Chapman, T. (2005) Sex peptide causes mating costs in female *Drosophila melanogaster*. *Current Biol.* 15: 316-321.