

害虫防除のための放射線不妊化の機構ならびに不妊虫の性的競争力と精子競争に関する研究

Studies on the mechanisms of radiation-sterilization of insects: sexual competitiveness of sterile males and sperm competition

代表研究者	名古屋大学農学部教授 Faculty of Agriculture, Nagoya Univ. Yosiaki Irô	伊藤 嘉昭
協同研究者	名古屋大学農学部助手 Faculty of Agriculture, Nagoya Univ. Yoshitaka Tsubaki	椿 宜高
	岐阜大学農学部教授 Faculty of Agriculture, Gifu Univ. Hironori Sakurai	桜井 宏紀
	沖縄県ミバエ対策事業所課長 Okinawa Pref. Fruit Fly Eradication Project Office Hiroyuki Kakinohana	垣花 広幸
	沖縄県農業試験場研究員 Okinawa Agricultural Experiment Station Tadashi Teruya	照屋 匡

For the development of sterile insect technique (SIT, hereafter) to eradicate insect pests, we studied mechanisms of radiation-sterilization and sexual competitiveness of sterile males, as well as sperm competition between normal and sterile males, mainly with the melon fly, *Dacus cucurbitae*. The results obtained are as follows:

(1) Electromicroscopical studies revealed that the gamma-ray irradiation on melon-fly pupae at a dose of 70 Gy induced not only dominant lethal mutation in spermatozoa, a well known mechanism of the radiation-sterilization, but also malformation and weakening of spermatozoa (Ref. 5)*.

(2) The reason why melon flies copulate for more than 10 hr was studied. The amount of sperm transferred to a female increased with time after mounting. In sequential matings with normal and sterile males at an interval of 1 day, copulation duration was a major determinant of paternity (Ref. 1).

(3) Comparison of hatchability of eggs laid by females first mated with normal males and secondarily with virgin sterile males and those for females mated in the reverse order confirmed sperm mixing (Ref. 1). Sequential copulation experiments at an interval of 18 days proved sperm precedence of the last male ($P_2=0.83$) and the low competitiveness of sterile sperm (0.73 of normal sperm) (Ref. 2, 6).

(4) Mating with virgin sterile males after the normal mating reduced the hatch-ability of eggs while mating with 'exhausted' sterile males (which could copulated but had no spermatozoa) did not. Thus, also some spermatozoa of sterile males were malformed, which might be unable to enter into oocytes, some sterile spermatozoa actually plays a role in the sterile male technique (Ref. 2).

* Reference number corresponds to number of publications in p. 5.

(5) Sequential copulations with normal and red-eye mutant males also showed sperm precedence of the last male ($P_2=0.64$). The competition of sperm of red-eye males was, however, lower than that of normal males (Ref. 4, 7).

(6) It was found that females copulated with exhausted sterile males delayed their next mating as females copulated with normal males or virgin sterile males did. Thus seminal fluid itself or behavioural experience of copulation might be responsible for the delay of second copulation; different with *Drosophila melanogaster*, where existence of spermatozoa was important (Ref. 3).

(7) In evening, Okinawan melon fly males formed leks where each male establish territory on a leaf and females were attracted to the territory. This behaviour was somewhat different from behavior of Hawaiian melon fly males; raising an important question-whether Okinawan and Hawaiian melon flies belong to different species or not.

(8) Further studies are necessary 1) to compare the effect of sequential matings at short and long intervals, 2) to evaluate relative roles of sterile spermatozoa with a dominant lethal mutation and suppression of remating by copulation with spermless sterile males, and 3) to make detailed comparison of mating behaviour of Okinawan and Hawaiian melon flies.

(9) In addition to studies on the melon fly, we made experiments with another important insect pest, the onion fly, *Hylemya antiqua*. It was shown that hatchability of eggs decreased with age of onion fly females, suggesting exhaustion of sperm in spermathecae.

研究目的

放射線照射により不妊化した虫を放して害虫を根絶しようとする不妊化法は、害虫の無公害防除法中最も注目されるものの一つである。日本でも1977年の沖縄県久米島のウリミバエ根絶、1983年の小笠原諸島のミカンコバエ根絶の成果が上がっている。さらに沖縄では週2億匹の不妊虫を生産できるウリミバエ大量増殖不妊化施設が完成し、宮古島の根絶(1987)に続き、沖縄本島の根絶も迫っている。しかし、今後の日本における根絶事業の円滑な進行のためにも、また国外における不妊化法による害虫防除の展開のためにも、解決すべき研究課題は少なくない。

不妊化法の原理は放射線照射によって精子に優性致死突然変異が生じ、この精子を受入れた卵が発育初期に死ぬことにあるとされてきた。しかし、照屋らは最近、放射線照射は既に存在する精子に突然変異を誘発するのみならず、精原、精母細胞を破壊することを発見した。これは放射線不妊化による防除の際、無精子精液の役割をどう見るかという問題を提起する。本研究の目的の第一は、光学および電子顕微鏡観察によって不妊化メカニズムの再検討を行うことである。

久米島のウリミバエ根絶においては、根絶は達

成されたものの、根絶直前の時期には放飼した不妊オスの性的競争力が非常に低下していた。しかし、低下の原因はほとんど分かっていない。最近の社会生物学の展開によって、重複交尾する動物における「精子競争」(他のオスの精子による受精を阻止し、自分の精子の受精確率を高めようとするオス間の競争)の研究が進み、運動速度など精子自体の特性の他、分泌液による既存精子の不活性化、精子置換、メスの再交尾阻害などさまざまなことを考えねばならぬことが分かってきた。本研究の目的の第二はこの新しい観点から性的競争力と精子競争の関係を解明することである。

最近ウリミバエはオスが交尾集団(レック)をつくり、そこはメスが飛来すると、各オスは求愛し、メスの受け入れによって交尾に至ることが分かった。その際メスは一部のオスしか受け入れない(配偶者選択)。この時大量増殖系統のオスを受け入れるかどうかは性的競争力低下に関連する重要な要因となるので、本種の野外における配偶行動も調査した。

また、オランダなどですでに遺伝的防除が試みられているタマネギバエについても予備的な実験を行った。

研究経過

1988年3月の伊藤と垣花はマレーシアのクアラルンプールで開かれた第1回熱帯地域ミバエ類シンポジウムに出席し、そこでハワイ大学進化生物学研究施設のK. カネシロ博士と討議した。その結果、ハワイと日本のウリミバエは配偶行動が違わらしいという重要な印象が得られ、この問題で共同研究を行うことが決まった。

1988年5月、カネシロ博士の来沖に合せ、伊藤が別途研究費により訪沖し、石垣島で共同の野外調査を実施した。また沖縄在住の共同研究者と本研究の中心課題を討議した。

この結果に基づき、本研究費によって6月に椿が、7月、11月には伊藤が訪沖し、沖縄県ミバエ対策事業所の実験室で交尾時間と精子輸送、不妊オスの交尾経験と精子競争などについて研究した(両名は他の研究費によりもう一度訪沖している)。また、桜井は別途研究費により、7月に、本研究費により9月に訪沖し、照屋とともに不妊オスの精巣および不妊オスと交尾したメスの受精嚢の光学顕微鏡・電子顕微鏡観察を行った。

一方、沖縄からは8月に垣花が、1989年2月に山岸正明が名古屋を訪れ、データ解析を実施した。

これらの研究をもとに、1989年7月の時点で一つの論文が学術雑誌に発表され、二つが印刷中であり、他に二つの論文を執筆中である。

研究成果

(1) 精細胞に対するガンマ線照射の影響

寿命への悪影響なしに完全不妊化を達成できる70 Gyのガンマ線を蛹期に照射したオスの精巣を光学および電子顕微鏡で調査した結果、精原・精母細胞が破壊されるという照屋らの観察は再確認できた。さらに既存の精子にも多くの奇形が発見された。また、このオスと交尾させたメスの受精嚢内に見られた精子は精子束が解けずにいるものや奇形精子が多く、正常オスと交尾したメスの受精嚢内の精子と異なっていた。このことは放射線照射の作用が精子への優性致死突然変異誘起の他に精子の不活性化および精子生産の阻害を含む可能性を示唆する。

ではこうした奇形精子をもつ不妊オス、あるいは交尾により精子を失った不妊オスは不妊化法の武器としての役を果たさないのだろうか。次項で示すように、精子を失った不妊オスとの交尾によってもメスの再交尾は抑制されるので、メスが短命であれば正常交尾ができず、正常卵を残さない。しかし、優性致死突然変異による不妊化と、再交尾抑制による「不妊化」の相対的役割はまったく分かっておらず、それを知るには多数の標本による厳密な電子顕微鏡観察が不可欠である。

(2) 未交尾不妊オスと消耗(交尾済)不妊オスによる再交尾抑制効果

照射により、精原・精母細胞を破壊された不妊オスは数回の交尾で完全に精子を失うことが分かった。しかしこのオスも正常メスと同居させると交尾できる。昆虫では交尾によりメスの再交尾が抑制されることが知られている。これは再交尾の時間を産卵にふりあてるメスの戦略でもあり得るし、他オスとの交尾の阻止というオスの精子競争戦略でもありうるが、後者の場合、オスが化学的再交尾抑制物質を注入している可能性もある(ショウジョウバエのエステラーゼ6)。

この点を解明する第1歩として、正常メスに対し、1回目に正常オス、未交尾不妊オス(精子がある)、あるいは「消耗不妊オス」(事前に4回交尾させ、精子を失っていると考えられる不妊オス)を交尾させ、この正常メスに翌日以降正常オスを与えて再交尾を調べた。その結果、1時間の交尾ではどのオスとの第1回交尾でも翌日から高率の再交尾が見られたが、8時間の交尾では3日目でも50%のメスが再交尾せず、1週間くらいでようやく大部分のメスが再交尾した。そして、この再交尾抑制効果は消耗不妊オスでも正常オスと変わらず認められた。これは重大な結果なので、再度実験を試みたが、結果は同じであった。

ショウジョウバエでは精子の存在がメスの再交尾阻止に働いていることが知られている。ウリミバエでの上の結果は精液中に精子以外の再交尾抑制物質が含まれているか、受精嚢が精液で満たされることないし、長時間交尾の知覚によりメスが再交尾を抑制するという可能性を示唆している。

消耗不妊オスでも再交尾を阻止するという結果は、前述の放射線の精細胞への効果と関連して応用的にも重要である。なぜなら、これによって精子をもたない不妊オスも別の機構で卵の受精を阻止する効果が期待されるからである。

(3) 交尾時間と精子の輸送

ウリミバエはふつう日没前後に交尾を始め、暗黒になると交尾をしなくなる。そして交尾はふつう翌朝の薄明まで続く。この長時間の交尾は何のためか。正常オスとの交尾を10分、20分、40分、1、2、3、4、5時間およびそれ以上(1晩)で中断して精子の輸送を調べたところ、メスに渡された精子の量は交尾時間とともに増加した。長く交尾したメスほど多く産卵したが、卵の孵化率は1時間以上交尾させれば十分に高くなった。次に、正常オスと不妊オスを1日間隔で交尾させたところ、交尾時間が長いほど精子優先度が高くなることが分かった。これらの結果は、オスは長時間交尾によってできるだけ多量の精子をメスに渡すことにより、他オスとの精子競争に有利になることを示している。交尾の順序は精子優先度と関係がなかった。

(4) 蛹照射と成虫照射

ガンマ線を蛹に照射した場合と成虫に照射した場合で精子に与える影響が異なることが分かった。すなわち、蛹照射の場合は、不妊オスの精子の競争力が正常オスの精子に比べて低くなるが、成虫照射の場合は不妊オスと正常オスとでほとんど差がなかった。蛹照射の場合には精子発生の途中でガンマ線を当てることになるので、(1)でも書いたように、精原・精母細胞を破壊し、精子の異常が生じるが、成虫に照射した場合には発生を完了した精子にガンマ線を当てるので、精子の受精競争力がほとんど落ちないためであると考えられる。このことは、放飼虫を不妊化する場合、できるだけ遅いタイミングで放射線照射を行うのが良いことを示唆している。

(5) 正常オスと未交尾不妊オスないし消耗オスと重複交尾の作用

18日間隔で正常メスに最初正常オス、2回目は未交尾不妊オスないし消耗不妊オスを交尾させ、

あるいはその逆の交尾を行わせて、メスの産む卵の孵化率を調べた。その結果、正常オスと交尾し孵化卵を産んでいたメスは2回目未交尾不妊オスと交尾すると卵の孵化率が有意に低下した。しかし、2回目の交尾が消耗不妊オスだと孵化率は低下しなかった。このことは(1)で述べたような精子の奇形はあるとしても、少なくとも相当数の不妊オスにおいて優性致死突然変異精子が機能を果たしていることを示している。また未交尾不妊オス→正常オスの交尾の場合の孵化率は逆の場合のそれよりだいぶ高く、不妊オスの精子の競争力が弱いことが示唆された。さらに2回目のオスの精子優先度が高いことも示された。この結果は(3)の結果と異なっているが、(3)では交尾間隔は1日、今回は18日であり、今後交尾間隔の影響について実験する必要がある。

(6) 赤眼突然変異を用いた実験

沖縄県ミバエ対策事業所に保存中の赤眼突然変異系統と正常眼系統を用いて精子競争実験を試みた。正常眼は赤眼に対して完全優性なので、子世代の眼色からどちらの精子が受け入れられたかを判定できる。その結果は前節と同じく、2回目に交尾したオスの精子優先度が高かった。また、赤眼系統の精子は競争力が弱いことが示唆された。

(7) ハワイと日本のウリミバエの配偶行動の違い

ハワイ大学カネシロ博士との石垣島(未防除)での共同野外観察の結果、ハワイではメスが静止し、オスが飛び回ってメスを探索するのに対し、石垣ではオスがレックをつくって静止し、メスがそこに来ることが観察できた。この違いの一部は密度の違い(ハワイの方がずっと低密度)によると考えられたが、両地域のウリミバエが遺伝的に異なる可能性も示唆している。そこでハワイと沖縄のウリミバエは同種か否かという重大な問題も提起された。

(8) タマネギバエの日令と卵の受精率

タマネギバエを用いた実験では卵の孵化率が交尾後時間がたつうちに低下することが分かった(タマネギバエの交尾は数秒以下にすぎない)。これは受精囊中の精子数が不足するためではないか

と思われる。

今後の課題と発展

今後の課題については研究成果の項にでも述べたが、整理すると次の通りである。

(1) 放射線不妊化の機構が従来の定説である精子への優性致死突然変異誘起だけでなく、精子形成の阻害、精子の奇形化なども含むことが明らかとなった。これは不妊化法の適用に際して大きな影響をもつ発見であり、両者の相対的な役割を明らかにすることが必要である。しかし、正常なオスと交尾した後消耗不妊オスと交尾させても卵の孵化率が低下しなかった事実は、優性致死突然変異がある程度の役割を果たしていることは示している。今後、日本にいないチチュウカイミバエなどを含む多くの不妊化防除対象害虫について研究する必要もあろう。

(2) 消耗不妊オスと8時間交尾したメスの再交尾が抑制された事実は重要である。なぜなら、これによって消耗不妊オスないし奇形精子ばかりを持つ不妊オスも卵の孵化阻止という機能を果たし得ることが示されたからである。今後の課題は再交尾抑制機構の解明である。

(3) 蛹にガンマ線を照射した場合、不妊精子の競争力は正常精子より弱いと推定された。しかし、成虫に照射した場合は差は検出できなかった。不妊虫の作成にあたって、ガンマ線照射のタイミングを再検討する必要がある。

(4) 交尾間隔が18日の場合、2回目に交尾したオスの精子優先度が高くなる結果が得られたが、交尾間隔が1日では2匹のオスの精子がほぼ等しい割合で卵を受精させた。ショウジョウバエでは交尾間隔の長短によって精子優先度が変化することが知られている。ウリミバエについても中間的な交尾間隔を含め、詳しい実験をやり直す必要がある。なお、この研究は一般に昆虫で第2オスの精子優先度が高い理由の解明にもつながる。

(5) 沖縄とハワイのウリミバエの配偶行動の

違いは重要であり、いろいろな条件での野外観察と網室実験の実施が必要である。

以上のように1年間の研究でも多くの新事実が明らかとなり、今後の重要な研究課題が出てきた。これらは全沖縄からのウリミバエの根絶の前に研究を遂行し、日本以外の国々での防除事業にも役立てたいものであるが、現在そのための資金がほとんどないことが残念である。

発表論文 (*印が代表および共同研究者)

- 1) Tsubaki, Y.* and Y. Sokei (1988): Prolonged mating in the melon fly, *Dacus cucurbitae* (Diptera: Tephritidae): Competition for fertilization by sperm loading. *Res. Popul. Ecol.* 30 (2), 343-352.
 - 2) Itô, Y.* and M. Yamagishi (1989): Sperm competition in the melon fly, *Dacus cucurbitae* (Diptera: Tephritidae): effects of sequential matings with normal and virgin or non-virgin males. *Appl. Ent. Zool.* 24 (4), 466-477.
 - 3) Kuba, H. and Y. Itô* (in preparation) Effects of mating with spermful and spermless males on remating of melonfly females (Diptera: Tephritidae).
 - 4) Yamagishi, M. and Y. Itô* (in preparation) Sperm competition in the melon fly, *Dacus cucurbitae* (Diptera: Tephritidae): Sequential matings with normal and redeye mutant males.
- 以上のほか下記の学会口頭発表を行った。
- 5) 桜宏紀*・伊藤嘉昭*・照屋 匡* (1988) ウリミバエの精子形成に及ぼすガンマ線照射の影響。日本昆虫学会第48回大会 (1988年10月, 那覇)
 - 6) 伊藤嘉昭*・山岸正明 (1988) ウリミバエの精子競争における交尾時間と無精子精液の影響。日本応用動物昆虫学会第33回大会 (1989年4月, 松戸)
 - 7) 山岸正明・伊藤嘉昭* (1989) ウリミバエの精子競争—交尾時間を変えたときの精子優先度。日本応用動物昆虫学会第33回大会 (1989年4月, 松戸)

(追加)

桜井宏紀*・白石礼子・伊藤嘉昭*・照屋 匡*・武田 亨 (1989) ウリミバエの精子形成に対するガンマ線照射の影響。岐阜大学農学部研究報告 54 (印刷中)