

有性生殖クマムシの進化的背景解明に向けた
生殖行動と配偶子形態観察

2020 年度

杉浦 健太

学位論文 博士(理学)

有性生殖クマムシの進化的背景解明に向けた
生殖行動と配偶子形態観察

2020 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

杉浦 健太

目次

第1章 序論

1-1. 生殖がもたらす進化への影響	1
1-2. 緩歩動物クマムシ	2
1-3. クマムシの生殖様式とその研究	7
1-4. 本研究の目的	9

第2章 有性生殖クマムシの交尾行動観察

2-1. 緒言	11
2-2. 材料及び方法	
2-2-1. 実験動物の飼育	14
2-2-2. メスの成熟度判定	14
2-2-3. 雌雄の判定	15
2-2-4. 交尾行動の観察	15
2-2-5. 酢酸オルセイン染色	16
2-2-6. 交尾から産卵まで、及び産卵から孵化までの所要時間計測	16
2-2-7. DAPI 染色	16
2-3. 結果	
2-3-1. 交尾行動の観察	18

2-3-2. 交尾後の現象観察	21
2-3-3. 染色体動態	24
2-4. 考察	27
2-5. 結言	31
第3章 <i>Macrobiotus shonaicus</i> の日本分布	
3-1. 緒言	32
3-2. 材料及び方法	
3-2-1. クマムシの採取と飼育	35
3-2-2. DNA バーコーディングと系統解析	36
3-2-3. 形態観察	37
3-2-4. 核型観察と交尾行動	37
3-3. 結果	
3-3-1. <i>Macrobiotus shonaicus</i> 日本分布	40
3-3-2. 形態の多様性解析	40
3-3-3. 核型と交尾行動	46
3-4. 考察	47
3-5. 結言	50

第4章 クマムシの配偶子形態変化と比較	
4-1. 緒言	51
4-2. 材料及び方法	
4-2-1. 実験動物の飼育と交尾観察	53
4-2-2. 精子形態観察	53
4-2-3. SEMによる観察	53
4-3. 結果	
4-3-1. 精巣内精子の形態	55
4-3-2. 貯精嚢内精子の形態	55
4-3-3. 卵母細胞と卵のSEM観察	59
4-4. 考察	63
4-5. 結言	72
第5章 結論	73
参考文献	77
公刊論文及び学会発表の目録	94
謝辞	

第1章 序論

1-1. 生殖がもたらす進化への影響

生殖は生物が次世代を産生する過程であり、生命の始まりを司る極めて重要なプロセスである。このプロセスは複数の遺伝情報の混合を伴うか否かによって有性生殖と無性生殖に二分できる。この2つは生殖コストと遺伝的多様性のトレードオフを孕んでおり、一般的な有性生殖生物では雌雄配偶子の融合を行うことで遺伝的多様性を獲得することができる (Crow, 1994)。オスとメスが異個体として生存する雌雄異体種では配偶子の融合のために他個体を探索、交尾を行う必要があり、生殖コストが高い。一個体内で雌雄配偶子双方を産生可能な雌雄同体種では、自らの配偶子を受精させる自家受精と、他個体の配偶子と融合する他家受精の両者を行うことで、生殖コストと遺伝的多様性のトレードオフで生じるギャップを小さくすることができる (Tomlinson, 1966; Clark, 1978)。有性生殖による遺伝的多様性は、生物の環境への適応を許容し、また進化の起爆剤ともなり得る (Hamilton et al., 1990)。一方で一個体から次世代を産生できる無性生殖生物では、一般的に遺伝的多様性に乏しいものの、生殖コストが低く増殖に優れており、個体数を増やすことで生存の可能性を高めている。このように生殖様式の選択はその種の存続と繁栄、また進化にも大きな影響を与えている (Bell, 1982; Bengtsson, 2003)。

さらに、有性生殖を行う生物には、近縁種間での交雑によって更なる遺伝的多様性の獲得もあり得ることから、無性生殖と比較して進化を促進する可能性を秘めている (Hamilton et al., 1990; Harrison, 1990)。2種間の親集団での交雑によって産生されたハイブリッドが環境への高い適応度を持つ場合、そのハイブリッドは新たな種として分化する可能性がある。一方でハイブリッドの適応度が低ければ、親集団より優位とならずにハイブリッドは持続しない (Ayala & Fitch, 1997)。ハイブリッドの産生と種として

の分化は、個体間の不稔性を示す生殖隔離によって左右されることも論じられている (Schluter, 2001)。同集団の稔性に対する異集団間の稔性が生殖隔離の強弱の指標となり、異集団間での稔性が低い場合は生殖隔離が強いと表現される (Merrel, 1950; Malagolowkin-Cohen et al., 1965)。親集団の 2 種間の生殖隔離が強ければハイブリッドの産生そのものが望めず、親集団の種分化を完結させる方向に自然選択がはたらく (Arnold, 1997)。ハイブリッドと親集団の生殖隔離が弱い場合は、ハイブリッドが親集団から分離されず、種分化を阻害する (Servedio & Noor, 2003)。*Drosophila* 属では種の間に重要な生殖隔離について様々な観点から報告されている。行動的な観点からは求愛行動に種差が生じていることが明らかとなっており、異種間での余分な交尾を阻害していると考えられている。また交尾器にも形態的差異があり、異種間での雌雄交尾器の結合が物理的に困難となっている例が報告されている (Carmel et al., 2016)。生殖隔離による種の分化は、生物が生息する地域の違いに依存した個体間の出会いの減少によっても引き起こされる (Endler, 1977; Coyne & Orr, 2004)。例えばアメリカ大陸に生息する *Drosophila* 属では、山脈を境に西側に *Drosophila athabasca*、東側に *Drosophila mahican* が分布しており、地理的な隔離が種分化を促進したと推測されている (Yukilevich et al., 2018)。このように種の分岐を論ずる上で生殖行動、生殖能における差異を多面的に理解することは極めて重要で、生物の進化的背景を考察するために生殖プロセスの知見を拡充する必要がある (斎藤ら, 2012)。

1-2. 緩歩動物クマムシ

緩歩動物門の生物は、総称してクマムシと呼称される。体長が 1 mm 以下のクマムシは、顕微鏡の発達により Goeze が 1773 年に発見し (Goeze, 1773)、Doyère によって 1840 年に緩歩動物門 (phylum Tardigrada) と名付けられた (Doyère, 1840)。緩歩動物門に属する全ての生物は 4 対 8 本の脚を有し、その脚に節がないことが特徴である。緩

歩門は異クマムシ綱 (Heterotardigrada)、真クマムシ綱 (Eutardigrada) と中クマムシ綱 (Mesotardigrada) の3綱を含むとされてきたが、2019年の再編により Apotardigrada が新設された (Guil et al., 2019)。現在 8 目 31 科 150 属から 1339 種と 34 の亜種が確認されており (Degma et al., 2020, Table 1-2-1)、その種数は増え続けている。海産種、陸生種ともに存在するが、主に水中に生息する。海産種はほぼ全て異クマムシ綱に分類される。

形態的特徴は各綱間で顕著に異なる (Fig. 1-2-1)。真クマムシの身体は長球状で、脚部以外に目立った装飾がない (Fig. 1-2-1A)。頭部には口と、それに付随した咽頭があり、食物の摂取を行う。第三脚と四脚間の腹部側に、排泄と産卵を行う総排泄孔を持ち、外生殖器がない (Altiero et al., 2018)。Apotardigrada は真クマムシと比較してややシャープな長球状で、口部に感覚器と考えられているひだを持つ (Fig. 1-2-1B)。真クマムシと同様に腹部に総排泄孔を持ち、外生殖器がない (Altiero et al., 2018)。異クマムシは種によって形態が大きくことなる。寸胴状の種や平板状の種が存在し、また体部に様々な装飾を持つことが多い (Fig. 1-2-1C)。腹部に排泄孔、腹部または側部に生殖孔を独立して持つ (Suzuki & Kristensen, 2014; Altiero et al., 2018)。

異クマムシ、中クマムシを除く多くの陸生種が実験環境下で飼育可能であり、様々な研究に用いられている。多くの陸生種は土中や枯葉、コケの中といった、湿潤と乾燥を繰り返す環境に生息している。これらのクマムシは周囲に水がある湿潤条件下で生理活動を行い、乾燥時には身体を縮めたタル状態となる。タル状態では体内の水分を減らし、代謝を止めることができる。再水和とともにタル状態から復帰し、生命活動を再開させる。このタル状態下では高低温、高圧、真空、放射線の被曝や地球外環境でも生き残ることができる極限耐性を獲得し (Horikawa et al., 2006; 2008; 2009; 2012; 2013; Jönsson et al., 2005; Rebecchi et al., 2007; Jönsson et al., 2008; Persson et al., 2010;

Altiero et al., 2011; Jönsson et al., 2013; Hashimoto et al., 2016; Jönsson et al., 2016; Yoshida et al., 2017)、個として長い期間生存することが可能である。

Table 1-2-1. 緩歩動物門

Phylum (門)	Class (綱)	Order (目)	Family (科)	Genus (属) [†]	Species (種) [†]
			Anisonychidae	<i>Anisonyches</i>	
			Archechiniscidae	<i>Archechiniscus</i>	
			Batillipedidae	<i>Batillipes</i>	<i>Batillipes noerrevangi</i>
			Coronarctidae	<i>Coronarctus</i> <i>Trogloarctus</i>	
			Halechiniscidae	<i>Halechiniscus</i> <i>Wingstrandarctus</i> <i>Orzeliscus</i> など	<i>Orzeliscus belopus</i>
		Arthrotardigrada	Neoarctidae	<i>Neoarctus</i>	
			Neostygarctidae	<i>Neostygarctus</i>	
	Heterotardigrada		Renaudarctidae	<i>Nodarctus</i> <i>Renaudarctus</i>	
			Stygarctidae	<i>Stygarctus</i> など	
			Styraconyxidae	<i>Angursa</i> など	
			Tanarctidae	<i>Actinarctus</i> など	
Tardigrada			Echiniscoididae	<i>Echiniscoides</i> など	<i>Echiniscoides sigismundi</i>
			Carphaniidae	<i>Carphania</i>	
		Echiniscoidea	Oreellidae	<i>Oreella</i> など	
			Echiniscidae	<i>Echiniscus</i> <i>Pseudoechiniscus</i> など	<i>Echiniscus japonicus</i> <i>Echiniscus testudo</i>
	Mesotardigrada	Thermozodia	Thermozodiidae	<i>Thermozodium</i>	<i>Thermozodium esakii</i>
	Apotardigrada	Apochela	Milnesiidae	<i>Milnesium</i> など	<i>Milnesium tardigradum</i> <i>Milnesium inceptum</i> <i>Milnesium pacificum</i>
		Eohypsibioidea	Eohypsibiidae	<i>Eohypsibius</i> など	
			Calohypsibiidae	<i>Calohypsibius</i>	
	Eutardigrada	Hypsibioidea	Hypsibiidae	<i>Hypsibius</i> <i>Acutuncus</i> など	<i>Hypsibius exemplaris</i> <i>Acutuncus antarcticus</i>
			Microhypsibiidae	<i>Microhypsibius</i>	
			Ramazzottiidae	<i>Ramazzottius</i> など	<i>Ramazzottius varieornatus</i>

Table 1-2-1. 緩歩動物門 (continued)

Phylum (門)	Class (綱)	Order (目)	Family (科)	Genus (属) [†]	Species (種) [†]	
			Doryphoribiidae	<i>Thulinus</i> など	<i>Thulinus itoi</i>	
		Isohypsibioidea	Halobiotidae	<i>Halobiotus</i>		
			Hexapodibiidae	<i>Hexapodibius</i> など		
			Isohypsibiidae	<i>Dianeia</i> <i>Isohypsibius</i> など	<i>Isohypsibius dastychi</i>	
Tardigrada	Eutardigrada	Macrobotiidae		<i>Macrobiotus</i>	<i>Macrobiotus shonaicus</i>	
				<i>Paramacrobiotus</i>	<i>Macrobiotus hufelandi</i>	
				<i>Xerobiotus</i> など	<i>Paramacrobiotus richtersi</i> <i>Xerobiotus pseudohufelandi</i>	
			Macrobotioidea	Murrayidae	<i>Murrayon</i> など	
			Richtersiidae	<i>Richtersius</i> など	<i>Richtersius coronifer</i>	
			Beornidae	<i>Beorn</i>		
			Necopinatidae	<i>Necopinatum</i>		

† 属以降は著名な属、種のみを記載した

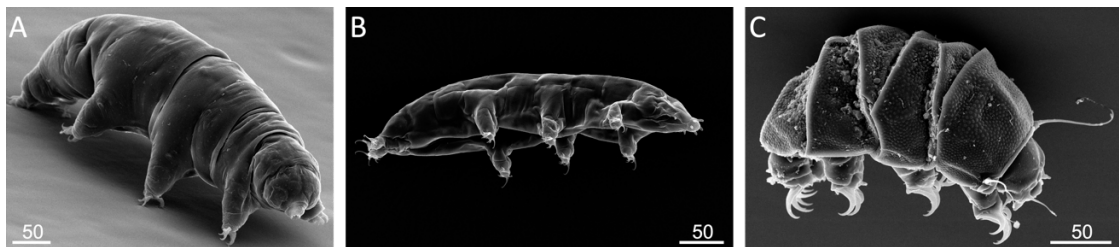


Fig. 1-2-1. 様々なクマムシ

真クマムシの *Macrobiotus shonaicus* (A)、Apotardigrada の *Milnesium pacificum* (B) と異クマムシの *Echiniscus* sp. (C)。走査型電子顕微鏡写真。右側が頭部。

Scale bars: = 50 µm。

1-3. クマムシの生殖様式とその研究

クマムシにおける生殖システムは生殖様式の差異と産卵方法によってグループ化することができる。種によって有性生殖、無性生殖の二通りの生殖様式を使い分けており、無性生殖種はメスがメスのみで産卵を繰り返す単為生殖を行う。一方で産卵方法は、メスが環境中に産卵する自由産卵種と (Fig. 1-3-1A)、メスが産卵と脱皮を同時に行い自らの脱皮殻内に産卵する脱皮殻産卵種に二分できる (Fig. 1-3-1B)。生殖様式と産卵方法に相関はなく、有性生殖を行う自由産卵種、脱皮殻産卵種と、単為生殖を行う自由産卵種、脱皮殻産卵種の4通りが存在する。

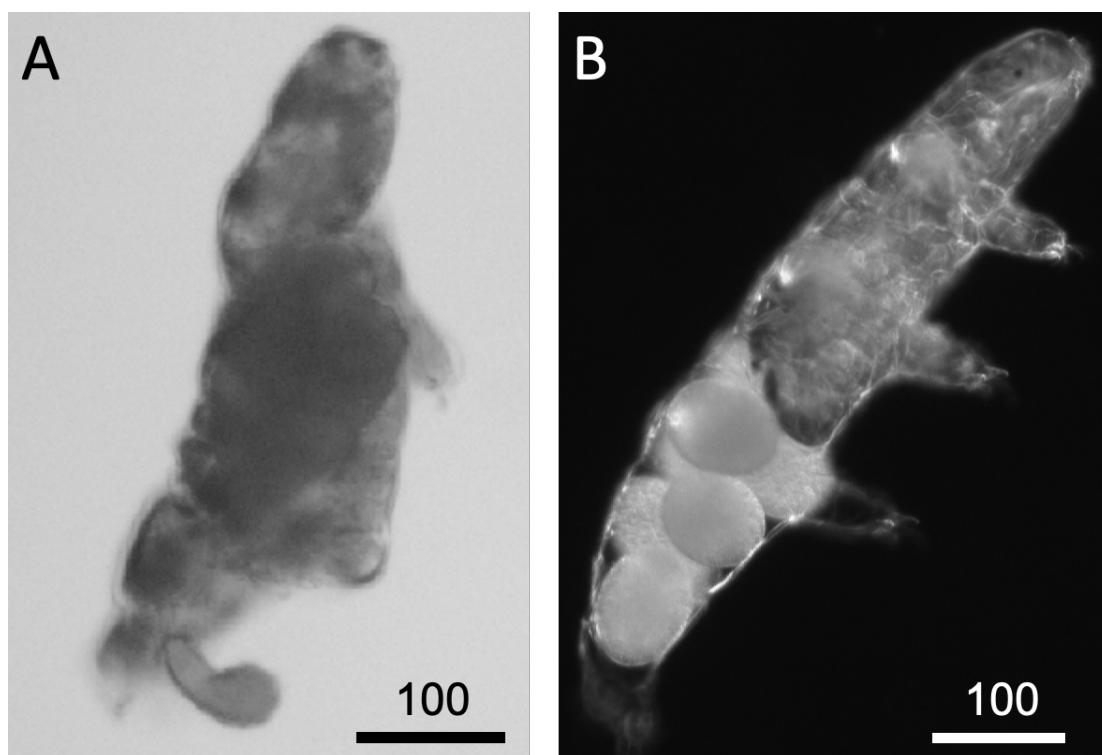


Fig. 1-3-1. クマムシの産卵

自由産卵する *M. shonaicus* (A)と、脱皮殻産卵をする *Mil. pacificum* (B)。

Scale bars: = 100 µm。

単為生殖種はその増殖スピードに有意性があり、緩歩動物におけるモデル生物として単為生殖種の *Hypsibius exemplaris* Gąsiorek, Stec, Morek & Michalczyk, 2018 や *Ramazzottius varieornatus* Bertolani & Kinchin, 1993 が様々な研究に用いられている。*Hypsibius exemplaris* は産卵から孵化までが約 4.5 日とクマムシの中では短いこと、孵化率がほぼ 100%で孵化日数の個体間分散が少ないこと、世代日数が約 1 週間とショートスケールであることから (Yoshida et al., 2019)、発生生物学における研究やゲノミクスに盛んに用いられている (Tenlen et al., 2012; Smith et al., 2016; Arakawa et al., 2016; Gross et al., 2017; Yoshida et al., 2017)。一方で *H. exemplaris* に比較して *R. varieornatus* は極限環境耐性が顕著に高く (Horikawa et al., 2008)、乾燥時の遺伝子発現量解析や細胞、DNA 保護タンパク質の単離、同定といった目的に多様されている (Yamaguchi et al., 2012; Tanaka et al., 2015; Hashimoto et al., 2016; Yoshida et al., 2017)。

有性生殖を行う種では、生殖に関係する報告がいくつかなされている。交尾と考えられる行動は 6 種で観察、報告され (von Erlanger, 1895; Henneke, 1911; von Wenck, 1914; Marcus, 1929; Baumann, 1961; Kristensen, 1979; Bertolani & Rebecchi, 1999; Suzuki, 2008; Bingemer et al., 2016)、その内 5 種は脱皮殻産卵種、残り 1 種は自由産卵を行う異クマムシであった。2000 年代までの報告では、雌雄のクマムシが近接している、もしくはオスがメスの付近をしきりに徘徊する、といった観察の報告に留まっていた。Bingemer らは脱皮殻産卵を行う真クマムシ *Isohypsibius dastychi* Pilato, Bertolani & Binda, 1982 を用いて、射精の瞬間を動画で捉えられることに成功し、クマムシの射精を含む交尾行動を包括的に記載した初めての報告をした (Bingemer et al., 2016)。以降、*I. dastychi* は脱皮殻産卵を行うクマムシの生殖行動を明らかにするための材料として研究対象となり、メスが産卵するタイミングに合わせてオスがアプローチを開始すること、また交尾成功率はオスとメス間の距離依存的に低下することが明らかになっ

た (Bartel & Hohberg, 2020)。一方で自由産卵を行うクマムシでは、射精まで含めた交尾行動の記載はなかった。

クマムシにおける生殖隔離に関する実験は、2020年に Stec らによって初めて報告された。*Paramacrobotus areolatus* Murray, 1907 に近縁な 2 群体間にて、異群体間の交配では産卵率が減少傾向となること、またヘテロ接合体の産生が示されたが、これらの群体は DNA マーカー、並びに形態比較では別種と区別されていない (Stec et al., 2020)。

有性生殖種に特徴的な雄性配偶子の形態報告も、複数の種を用いて行われてきた (Rebecchi & Guidi, 1991; 1995; Guidi & Rebecchi, 1996; Rebecchi, 1997; 2001; Rebecchi et al., 2003; 2011; Bertolani et al., 2014; Suzuki & Kristensen, 2014; Guidetti et al., 2019)。チョウメイムシ科 (Macrobotidae) のクマムシ *Paramacrobotus*、*Diaforobotus* 属では先体が長いのに対し、*Macrobotus*、*Xerobotus*、*Mesobotus* 属では先体が短く、精子の概形は属によって異なることが示唆されており、Suzuki らの報告では *Orzeliscus cf. belopus* の核傍小胞 (paranuclear vesicle) が排出管内で崩壊すると示唆された。一方で単一の種を用いて生殖行動と配偶子形態を含めた生殖プロセスを網羅的に明らかにした研究はなかった。

1-4. 本研究の目的

現在緩歩動物門クマムシには約 1400 種が確認されており、陸海問わず地球上に広く生息している。多くの陸生種は極限環境耐性を持ち、個としての生存能力を高めてきた。一方で種としての生き残りを左右するのは、その個体数を増殖させる現象である生殖である。単為生殖では効率の良い個体数の増殖を見込めるが、多様性を産み出す有性生殖は種数の繁栄に欠かすことできない。クマムシの繁栄にはこれらのような個として、そして種としての生存を懸けた戦略があるものと考えられるが、有性生殖

を行うクマムシ1種における、生殖行動から配偶子の形態、また受精メカニズムに関する網羅的な知見は皆無に等しかった。本研究では自由産卵を行う有性生殖真クマムシ *Paramacrobiotus* sp. と *Macrobiotus shonaicus* Stec et al., 2018a を用いて交尾行動と配偶子の形態、加えて産地の異なる個体間での生殖隔離の有無を観察し、有性生殖システムを包括的に解明することで、クマムシの種の繁栄と進化的背景に迫る基盤の作成を目的とした。

まず第2章では自由産卵種の生殖行動を明らかにするため、2種の求愛、交尾行動を観察、録画し、詳細な交尾記録の記載を行った。第3章では *M. shonaicus* の日本国内における地理分布を調査し、雌性配偶子の形態の比較と群体間の交尾行動を観察した。第4章では上記2種を用いて配偶子の形態観察することで、2種間で雌雄配偶子の形態比較と、生殖プロセス中の動態を調べた。第5章では総括と今後の展望を述べた。

第 2 章 有性生殖クマムシの交尾行動観察

2-1. 緒言

生殖行動は有性生殖動物にとって、雌雄配偶子の出会いを左右する極めて重要な生命活動の一つである。*Drosophila* 属では種によって、メスに対するオスの求愛行動が異なることが報告されており (Ferveur, 2010)、行動の差異が個体間での交尾数を減少させることにより生殖隔離が強まり、種としての独立と進化を促してきたと考えられている。

クマムシは種によって、メスのみで産卵を繰り返す単為生殖と、オスとメスの遺伝的混合を伴う有性生殖を使い分けている (Bertolani, 2001)。単為生殖種では減数分裂を行う種と行わない種が存在する (Bertolani and Buonagurelli, 1975; Bertolani, 2001)。有性生殖の中でも雌雄の配偶子を一個体内で産生できる雌雄同体種は、真クマムシの数属と海に生息する異クマムシで観測されており (Bertolani, 2001; Šatkauskienė, 2012; Suzuki and Kristensen, 2014)、その内の 2 種では自家受精を行っていると示唆されている (Bertolani and Rebecch, 1999; Rebecchi et al., 2000a)。有性生殖においてオスとメスが別個体として生息する種では、単為生殖や自家受精と比較して遺伝的多様性は拡充すると考えられるが、生殖を行う相手を見つけなくてはならない。配偶個体を探索、また生殖を行うために、求愛行動や交尾行動は極めて重要であり、個体数の増減を左右する大きな要因である。

クマムシにおいて交尾と見られる行動は 6 種で観察、報告されてきた (von Erlanger, 1895; Henneke, 1911; von Wenck, 1914; Marcus, 1929; Baumann, 1961; Kristensen, 1979; Bertolani and Rebecchi, 1999; Suzuki, 2008; Bingemer et al., 2016)。Bingemer らは脱皮殻産卵種 *I. dastychi* を用いて交尾行動の録画、記録を行った。当該報告によると一連の交尾行動はメスの脱皮によって誘発される。卵巣内に卵母細胞を充填したメスが

脱皮を開始すると、近辺をオスが徘徊する。その後オスはメスの頭部にしがみつき、腹部を屈曲させる。メスの産卵が始まると、オスは総排泄孔から精子を水中に放出する (Bingemer et al., 2016)。メスの脱皮に伴うオスの交尾行動の開始は、メスからの距離に依存する (Bartel & Hohberg, 2020)。メスから 1.0 mm の距離にいるオスは 90%以上が交尾行動を開始するのに対し、4.0 mm の距離にいるオスが交尾行動に至ったのは約 40%であった (Bartel & Hohberg, 2020)。以上のことから *I. dastychi* のメスは、交尾行動誘発に必要な性フェロモンを分泌しているものと示唆された。また *I. dastychi* の精子は産卵後に放出されるため、脱皮殻内の卵と受精に至ると推測され、受精は体外で起きると示唆された。

いくつかの自由産卵種は卵母細胞を保持する卵巢と、産卵孔である総排泄孔を結ぶ輸卵管に、精子を貯蓄する貯精嚢が付随しているため (Altiero et al., 2018, Fig. 2-1-1)、受精は体内で進行するものと考えられてきた (Bertolani & Rebecchi, 1999; Bertolani, 2001; Rebecchi, 1997; Rebecchi & Guidi, 2000)。しかしながら自由産卵種における交尾行動の詳細な記載、また録画はなく、生殖プロセスの多くは未解明だった。

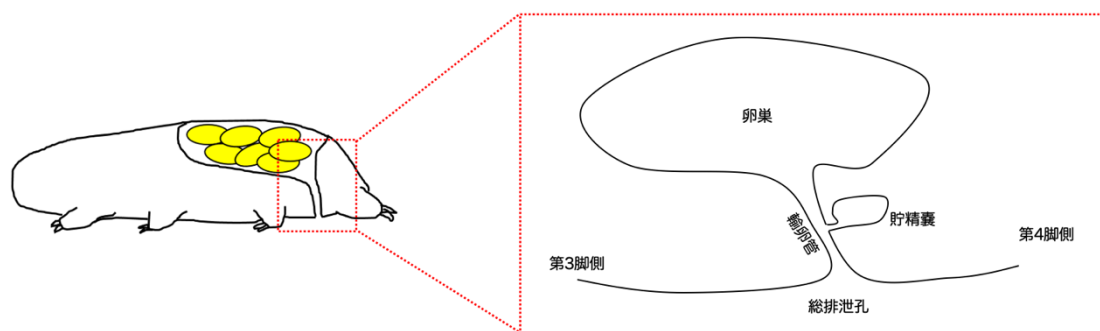


Fig. 2-1-1. メス体内の貯精嚢の位置

メス体内では貯精嚢は卵巢と総排泄孔を繋ぐ輸卵管に付随している。黄丸は卵母細胞を示す。右図赤点線はメス(左図)の拡大図。

そこで本章では有性生殖を行う自由産卵クマムシの生殖プロセスを明らかにするため、実験室環境で飼育、培養が可能な *Paramacrobiotus* sp. と *M. shonaicus* を用いて交尾行動の観察を試みた。加えて交尾前後、産卵前後での染色体挙動を明らかにすることで、雌雄配偶子の核融合の有無から受精のタイミングに迫った。また両種の生殖、発生におけるタイムスパンを明らかにすることで、有性生殖を行う自由産卵種のモデル生物として活用するための基盤を作成することを目指した。

2-2. 材料及び方法

2-2-1. 実験動物の飼育

本研究に用いた *Paramacrobiotus* sp. は東京大学 國枝武和博士によって 2006 年に、また *M. shonaicus* は慶應義塾大学 荒川和晴博士によって 2016 年に 1 組の雌雄から系統化されたものを用いた。

1.2% Agarose ゲルを敷いた 90 mm、もしくは 30 mm のプラスチックシャーレに、飼育水として Volvic®、餌としてクロレラ *Chlorella* sp. (Recenttec) とワムシ *Lecane inermis* Bryce, 1892 を混合して撒き、20°C、暗室内にてクマムシを飼育した (Suzuki, 2003; Horikawa et al., 2008; Ito et al., 2016)。飼育水は 3–5 日に、シャーレは 2–3 週に一度交換した。クマムシの観察には Mz95 実体顕微鏡 (Leica)、もしくは SZH10 (Olympus) を用いた。

2-2-2. メス成熟度の判定

メスの成熟度は背部に見える卵母細胞の大きさを基準に、以下のように分別した (Rebecchi and Bertolani, 1994, Fig. 2-2-2-1)。Stage 1: 卵母細胞が卵巣にない、Stage 2: 卵黄形成は始まり、卵巣が顕微鏡下で観察できる、Stage 3: 卵母細胞が大きく育ち、卵巣内に密に充填されている、Stage 4: Stage 3 より母体が脱皮を行なった状態。

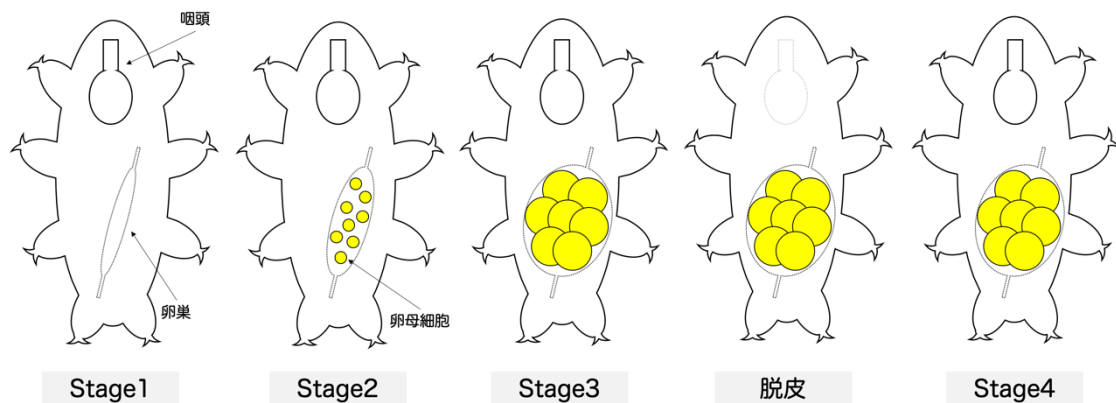


Fig. 2-2-2-1. 卵母細胞の成熟度によるメスのステージング

Stage1: 卵母細胞が卵巣にない、Stage 2: 卵黄形成は始まり、卵巣が顕微鏡下で観察できる、Stage 3: 卵母細胞が大きく育ち、卵巣内に密に充填されている、Stage 4: Stage 3より母体が脱皮を行なった状態 (Rebecchi and Bertolani, 1994)。

2-2-3. 雌雄の判定

Paramacrobiotus richtersi Murray, 1911 にて精巣が背部に透けて観察できることが報告されており (Rebecchi and Bertolani, 1994)、これに準じて雌雄の判断は精巣の有無にて行なった。用いた2種での雌雄比を測定するため、卵50個を1組として3組、計約150個の卵を性成熟するまで飼育した。統計学的検定は統計分析ソフトRを用いて Student's t-test にて行なった (R core team, 2016)。

2-2-4. 交尾行動の観察

交尾行動の観察の前に、オスとの交尾を妨げるために Stage 2 のメスを飼育プールから選び出し、メスのみを1週間以上個別のシャーレで飼育した。Stage 4 のメスとオスを1匹ずつ、30 mm シャーレに1.2% Agarose ゲルを敷いて Volvic®で満たした環境に入れ、倒立位相差顕微鏡 IX70 (Olympus) にて観察した。各種15ペア観察し、撮影はコンパクトデジタルカメラ TG-5 (Olympus) に接眼レンズアタッチメント (NY-TGV、Microscope Network) を付属したものをを用いて行なった。

Paramacrobiotus sp.、*M. shonaicus* それぞれについて、交尾行動開始からオス、メスが接触するまでの間を撮影し、ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij>) にて雌雄間の距離を測定した。種特異性を見せた交尾行動に関してその回数を測定し、統計解析ソフト R v3.3.1 の `chisq.test` 関数にてカイ二乗検定を行った (R core team, 2016)。

2-2-5. 酢酸オルセイン染色

貯精嚢内の精子を観察するため酢酸オルセイン染色を行なった (両種 n=3, Rebecchi, 1991)。交尾後 5 分経過したメスを酢酸メタノール固定液 (Acetic acid 1:Methanol 3) に 3 時間浸し、酢酸オルセイン染色液 (3% orcein、30% acetic acid、60% lactic acid) にて 20 分染色した。Lactic acid で脱色洗浄、スライドグラスへの封入を行い、正立顕微鏡 Axio Imager M1 (ZEISS) で観察した。

2-2-6. 交尾から産卵まで、及び産卵から孵化までの所要時間計測

交尾から産卵までの時間を計測するため、交尾したメスを 1 時間まで 1 分ずつ、6 時間まで 10 分ずつ、それ以降は日毎に観察して産卵の有無を調べた (*Paramacrobiotus* sp.: n=9、*M. shonaicus*: n=12)。40 個以上の *Paramacrobiotus* sp.、*M. shonaicus* の卵を日毎に観察し、孵化の有無を調べた。

2-2-7. DAPI 染色

染色体観察のために 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いた。メス成熟度ステージに従って個体を、また産卵後 5 分以内の卵を採取し、酢酸メタノール固定液で 3 時間固定した。スライドグラス上に個体乗せ、60% 酢酸滴下した後 26G ニードル (Terumo) を用いて破碎した (Rebecchi et al., 2002)。風乾後 1/1000 DAPI/PBS (phosphate-buffered saline) で 5 分染色、PBS で 2 度洗浄し Fluoro-KEEPER Antifade Reagent Non-

Hardening Type (Nacalai Tesque) にて封入した。観察は蛍光顕微鏡 Axio Imager M1 で行なった。統計学的検定は統計分析ソフト R を用いて Mann-Whitney U-test を行なった (R core team, 2016)。

2-3. 結果

2-3-1. 交尾行動の観察

両種ともオスとメスをシャーレに投入してから数秒から数十分後に交尾を始めた。*Paramacrobiotus* sp.のオスは数分間メスの後を追尾した後 (Fig. 2-3-1-1A)、口部でメスの総排泄孔を触り (Fig. 2-3-1-1B)、メスの腹側に潜り込む行動を複数回繰り返した。その後メスは行動を停止し、オスは腹部を屈曲させながら射精をした (Fig. 2-3-1-1C)。精子は水中に放出され、メス総排泄孔へ泳いで移動していた (Fig. 2-3-1-1D)。メスは射精中から射精後数分間、尾部を収縮させるような行動をした (Fig. 2-3-1-1E)。

Macrobiotus shonaicus を用いた行動観察でも、オスは *Paramacrobiotus* sp.と同様にメスの総排泄孔に複数回接触した後、腹部を縮めて射精に至った (Fig. 2-3-1-1F-I)。一方で *Paramacrobiotus* sp.と異なり、オスはメスの腹側に潜り込む行動をせず、また射精からその後にかけてメスは尾部を反り上げていた (Fig. 2-3-1-1I, J)。

両種ともにオスがメスの尾部に接触してから射精に至るまでは数分から数十分を要し、ペアごとにまばらであった。

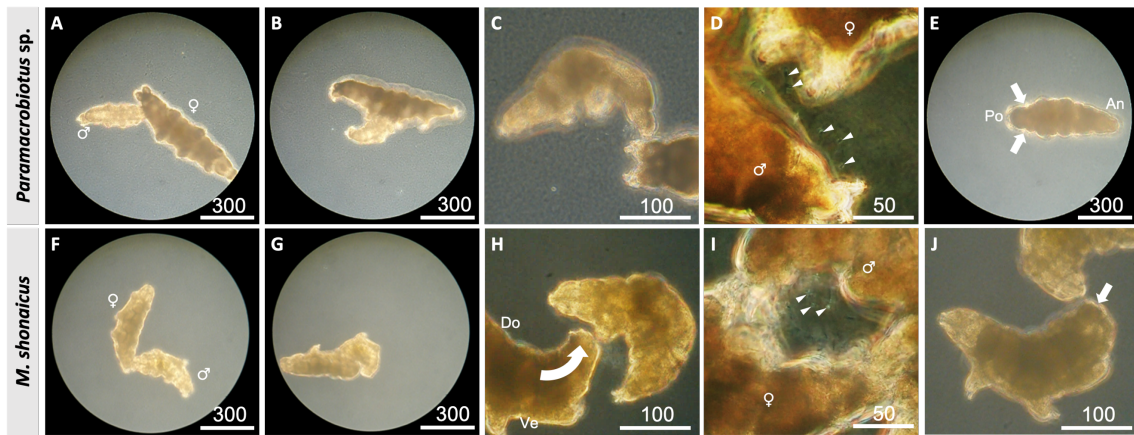


Fig. 2-3-1-1. *Paramacrobiotus* sp. と *M. shonaicus* の交尾行動

Paramacrobiotus sp. (A–E) と *M. shonaicus* (F–J) の交尾行動。オスはメスの総排泄孔に触れ(A, F)、メスの下腹部に潜り込む (B)。 *M. shonaicus* のオスは潜り込みを行わない (G)。射精時のオスは腹部を屈曲させ (C, H)、 *Paramacrobiotus* sp. のメスは下腹部を浮かし (C)、 *M. shonaicus* のメスは尾部を背側に反り上げる (H)。精子は水中を遊泳してメス体内に入り込み (D, I の矢尻)、メスは射精後尾部を収縮させたまま行動を停止する (E, J)。

それぞれの画像は交尾開始と判断してからから A: 5 秒、B: 1 分 26 秒、C: 1 分 57 秒、E: 2 分 32 秒、F: 1 分 24 秒、G: 2 分 7 秒、H: 8 分 5 秒後、J: 8 分 31 秒後のもの。

Do: Dorsal、Ve: Ventral、An: Anterior、Po: Posterior。

Scale bars: (A, B, E–G) = 300 μm; (C, H, J) = 100 μm; (D, I) = 50 μm。

交尾行動開始から雌雄間の距離は徐々に近づき、その速度の平均値は *Paramacrobiotus* sp. で 26.8 $\mu\text{m/s}$ 、*M. shonaicus* で 33.1 $\mu\text{m/s}$ だった(Fig. 2-3-1-2, n=5)。交尾行動はオスの潜り込みを行う回数と、射精時にメスが尾部を反り上げる回数を測定した。*Paramacrobiotus* sp. では 86.7%のオスが潜り込みを行ったのに対し、*M. shonaicus* では 23.1%で、有意に *Paramacrobiotus* sp.のオスが多く潜り込みを行っていた (Chi-squared test, n>13, $p<0.003$, Fig. 2-3-1-2)。一方でメスの尾部の反り上げは、*Paramacrobiotus* sp.のメスで 6.7%だったのに対し、*M. shonaicus* では 81.3%で、*M. shonaicus* のメスが反り上げる回数が有意に多かった (Chi-squared test, n>30, $p<1.7e-8$, Fig. 2-3-1-2)。

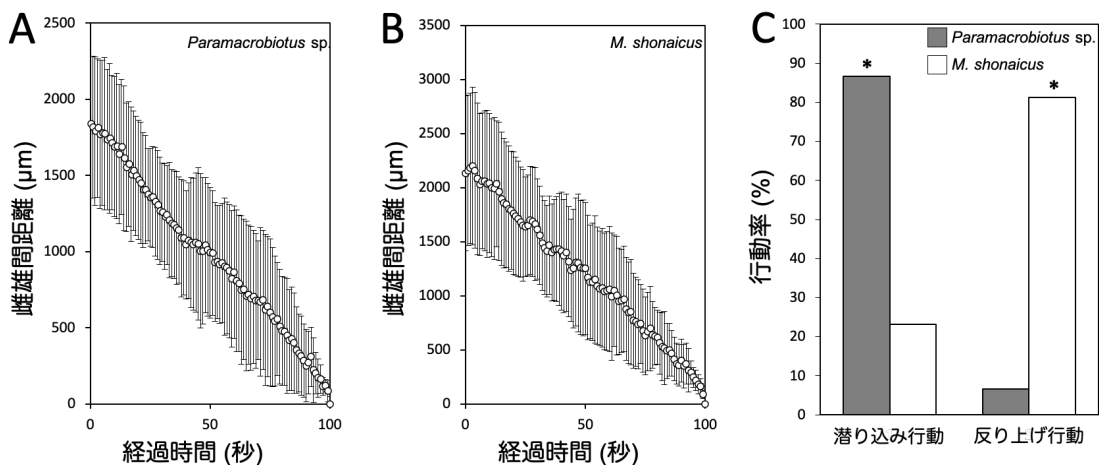


Fig. 2-3-1-2. 交尾行動の定量化

交尾行動中における *Paramacrobiotus* sp. (A) と *M. shonaicus* (B) の雌雄間距離の推移。各プロットは 1 秒毎の距離の平均値で、エラーバーは分散を示す。*Paramacrobiotus* sp. と *M. shonaicus* の交尾行動における潜り込み行動と反り上げ行動の回数 (C)。

*: $p<0.01$ (Chi-squared test)。

2-3-2. 交尾後の現象観察

交尾後のメスに対する酢酸オルセイン染色によって、第3–4脚間に貯精嚢が観察できた。貯精嚢は左右片側に見られ、約20 μm ほどであった (Fig. 2-3-2-1)。

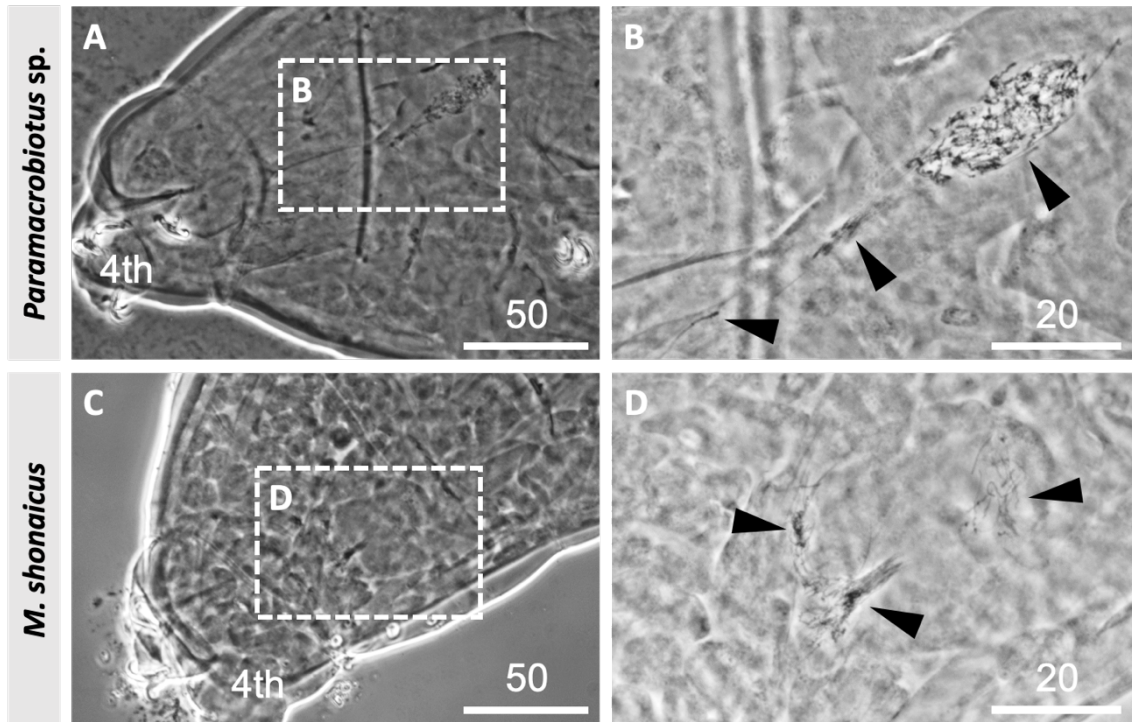


Fig. 2-3-2-1. メス体内の貯精嚢

酢酸オルセイン染色によるメス体内貯精嚢の観察。*Paramacrobiotus* sp. (A, B) と *M. shonaicus* (C, D)。第3–4脚の間に精子塊が存在する (B, D の矢尻)。

Scale bars: (A, C) = 50 μm ; (B, D) = 20 μm 。

Paramacrobiotus sp.のメスは交尾後 16 分から 70 分で産卵したのに対し、*M. shonaicus* のメスは 5 時間から 2 日程度を要した (Table 2-3-2-1)。それぞれ孵化率は $84.9 \pm 19.6\%$ 、 $79.1 \pm 28.0\%$ で (Table 2-3-2-2)、またそれぞれ 14 日、9.5 日を孵化に要した (Fig. 2-3-2-2)。雌雄比は *Paramacrobiotus* sp. で 31.4:68.6、*M. shonaicus* で 82.7:17.3 (メス:オス) であり、種間で顕著な差異があった (Table 2-3-2-3, Student t-test, $p < 0.05$)。

Table 2-3-2-1. 交尾から産卵までの時間

種	交尾から産卵までの時間
<i>Paramacrobiotus</i> sp.	16, 29, 32, 34, 35, 36, 50, 58, 70 (min)
<i>M. shonaicus</i>	5, ~24, ~24, ~24, ~24, ~24, ~24, ~24, ~24, ~24, ~48, ~48 (hrs)

Table 2-3-2-2. 孵化率

	<i>Paramacrobiotus</i> sp.			<i>M. shonaicus</i>		
	孵化数	産卵数	孵化率 (%)	孵化数	産卵数	孵化率 (%)
	7	11	63.6	9	9	100.0
	8	9	88.9	9	10	90.0
	5	5	100.0	9	10	90.0
	4	7	57.1	6	7	85.7
	6	6	100.0	3	10	30.0
	5	5	100.0			
計	35	43		36	46	
平均±分散	$84.9 \pm 19.6\%$			$71.9 \pm 28.0\%$		

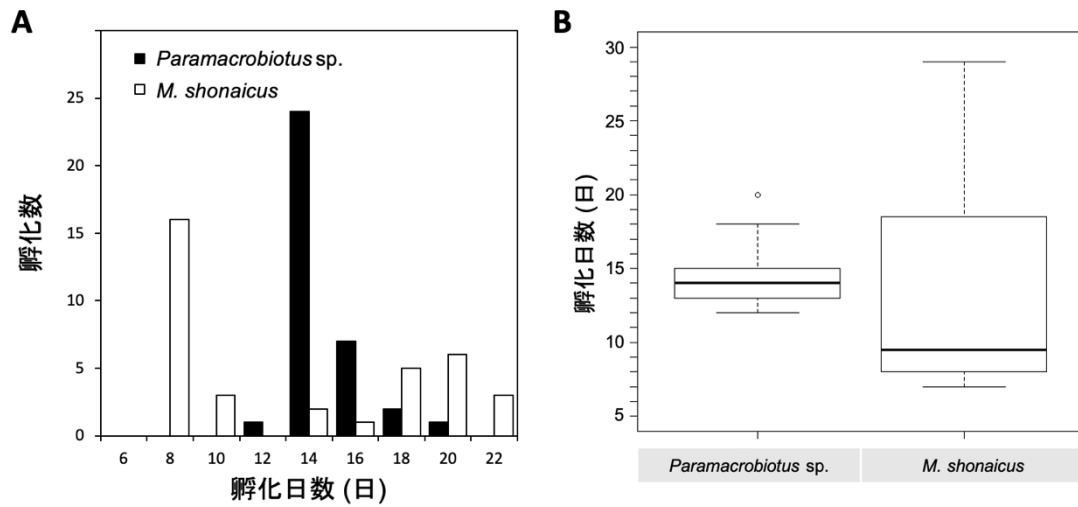


Fig. 2-3-2-2. 孵化日数と孵化数

孵化日数に対する孵化数のヒストグラム (A) と、孵化日数の箱ひげ図 (B)。

Table 2-3-2-3. 雌雄比

	Datasets	オス	メス	オス率 (%)	メス率 (%)	計
<i>Paramacrobotus sp.</i>	1	31	19	62.0	38.0	50
	2	34	10	77.3	22.7	44
	3	32	16	66.7	33.3	48
	平均±分散			68.6±7.8	31.4±7.8	
<i>M. shonaicus</i>	1	11	39	22.0	78.0	50
	2	9	41	18.0	82.0	50
	3	6	44	12.0	88.0	50
	平均±分散			17.3±5.0	82.7±7.8	

2-3-3. 染色体動態

Stage 2 の卵母細胞は減数第一分裂前期のレプトテン、サイゴテン、パキテン、ディプロテン、そしてディアキネシス期にあたる染色体像が観察できた (Fig. 2-3-3-1)。Stage 3 ではまとまった同サイズの染色体塊が観察でき、*Paramacrobrotus* sp. では 5 本 (Fig. 2-3-3-1E)、*M. shonaicus* では 6 本の染色体塊が存在した (Fig. 2-3-3-1J)。

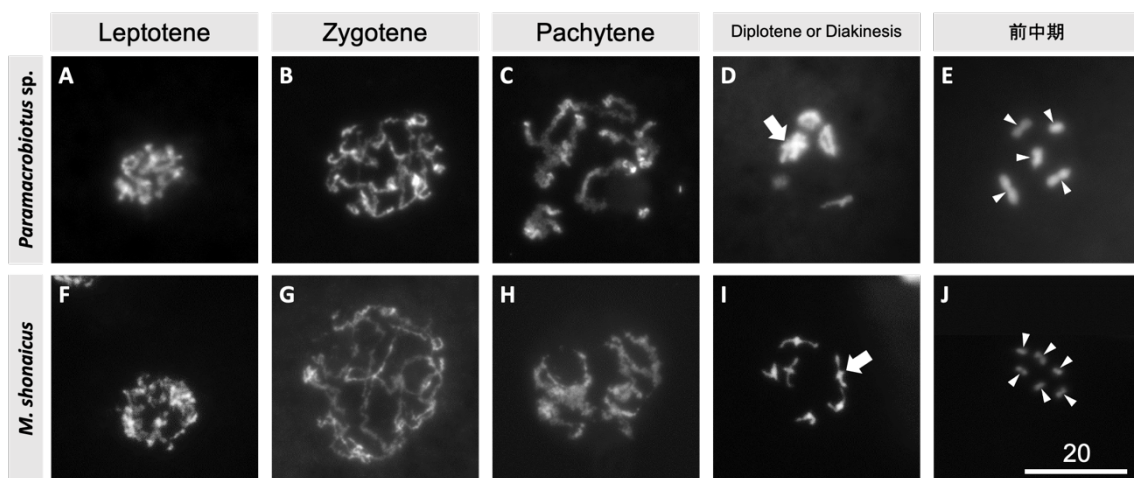


Fig. 2-3-3-1. 減数第一分裂

卵母細胞形成過程での減数第一分裂進行。*Paramacrobrotus* sp. (A-E) と *M. shonaicus* (F-J)。卵母細胞の成熟に従い減数第一分裂が進行し、ディプロテン期ではキアズマが形成される (D, I の矢印)。前中期では *Paramacrobrotus* sp. では 5 本 (E の矢尻)、*M. shonaicus* では 6 本の染色体塊が存在する (J の矢尻)。

Scale bar: 20 μm 。

Stage 4 では4つの染色分体を持つ減数第一分裂中期の染色体が正軌道面に整列していた (Fig. 2-3-3-2A, B)。交尾後のメスも減数第一分裂中期の染色体像が観察され、卵母細胞に対する減数第一分裂中期率は交尾前後で変化がなかった (Fig. 2-3-3-2C、Mann Whitney U-test, $p>0.05$)。

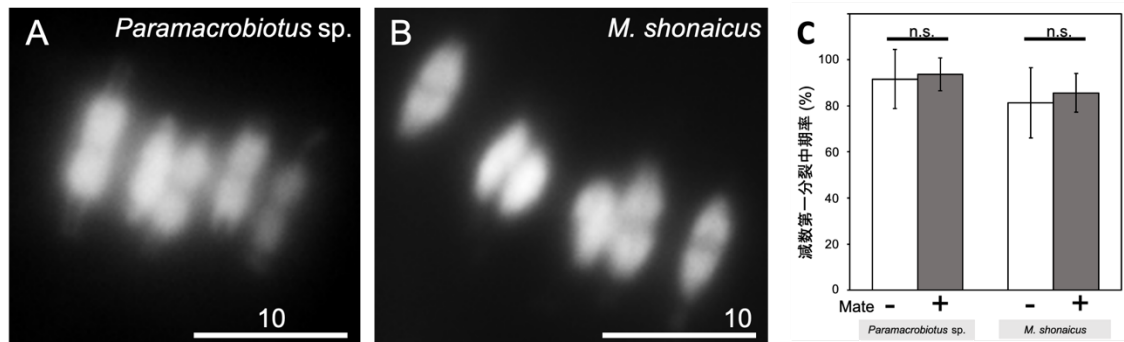


Fig. 2-3-3-2. 減数第一分裂中期と交尾前後での分裂進行比較

Paramacrobiotus sp. (A) と *M. shonaicus* (B) の染色体像。Stage 4 から交尾後で両種とも減数第一分裂中期で停止している (C)。

n.s.: no significant difference (Mann Whitney U-test, $p>0.05$)、Scale bar: 10 μm。

加えて産卵直後の卵に対して同様のプロトコルで DAPI 染色を行なったところ、それぞれ 5 本、6 本の卵細胞染色体と (Fig. 2-3-3-3B, C, F, G)、ヒモ状の精子核が卵殻の内側に付着している様子が観察でき (Fig. 2-3-3-3D, H)、雌雄配偶子の融合は起きていなかった。

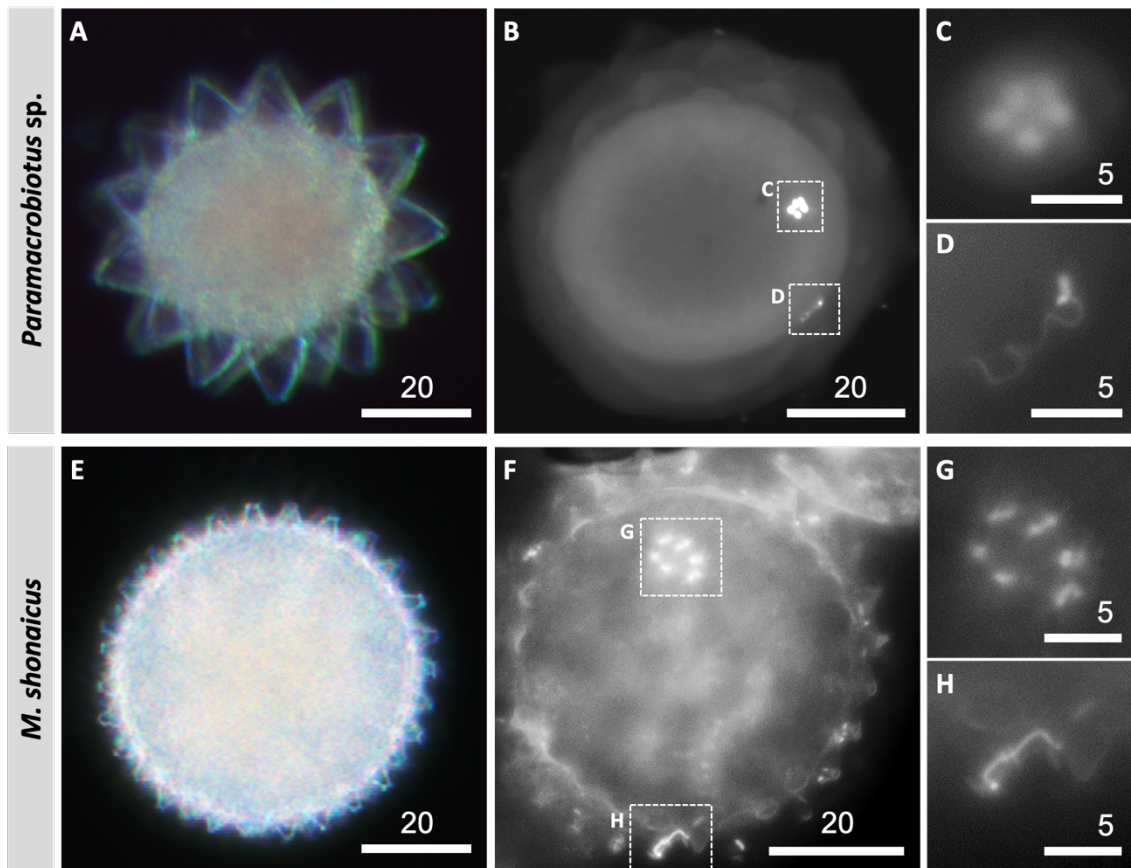


Fig. 2-3-3-3. 卵に対する精子の付着

Paramacrobiotus sp. (A–D) と *M. shonaicus* (E–H) の卵。産卵直後の DAPI による観察では卵核と (C, G)、精子核が見え (D, H)、減数第一分裂中期から進行していない。

Scale bars: (A, B, E, F) = 20 μm , others = 5 μm 。

2-4. 考察

本報告は自由産卵を行う真クマムシにおいて初の交尾行動の観察となった。この観察より、クマムシの交尾行動は以下の5つのステップに分けることができると考えられる。[1]追尾: オスはメスを見つけ、メスの歩いた後を追いかける、[2]接触: オスは口部でメスの総排泄孔に触れる、[3]行動停止: メスは動きを停止し交尾の終了を待つ、[4]射精: オスは腹部を屈曲させ、射精する、[5]緊縮: 射精後メスは数分間尾部を収縮させる。用いた2種の交尾行動では[3]行動停止、[4]射精中に差異が見られた。*Paramacrobiotus* sp.のメスは[3]行動停止からオスの[4]射精中に下腹部を地面から浮かせるような格好で行動を停止するが、*M. shonaicus*のメスは下腹部を反り返していた。用いた2種のメスは双方とも精子を第3-4脚の間にある総排泄孔から体内へ取り込むが (Altiero et al., 2018)、水中を遊泳した精子を効率よく取り込むため、総排泄孔付近のスペースを確保するための行動であると考えられる。また *Paramacrobiotus* sp.のオスは射精前にメスの下腹部に潜り込むような行動を見せたが、これは総排泄孔付近のスペースを確保するための行動であると考えられる (Fig. 2-4-1A)。一方で *M. shonaicus*のメスは尾部を反り返すことで総排泄孔付近のスペースを十分に確保できるため、オスは潜り込みを行う必要がないものと考えられる (Fig. 2-4-1B)。自由産卵種ではほとんどの行動が保存されているものの、一部で異なり、多様性があることが明らかとなった。

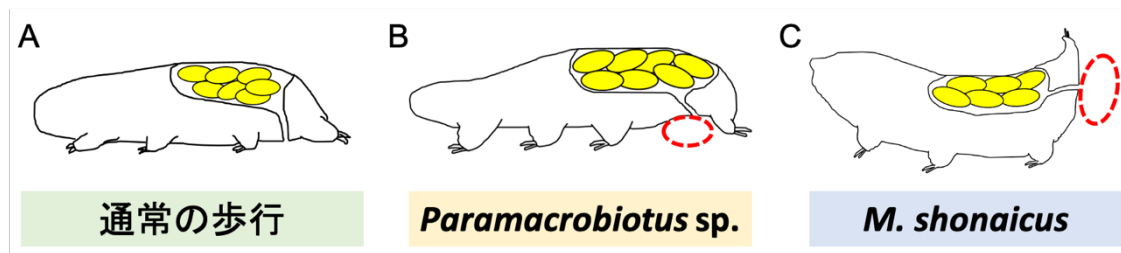


Fig. 2-4-1. 交尾行動の違い

通常の歩行時 (A) と *Paramacrobiotus sp.* (B) と *M. shonaicus* (C) の交尾行動の違い。通常の歩行時 (A) に対して *Paramacrobiotus sp.* のメスは総排泄孔を浮かすのに対し (赤点線)、*M. shonaicus* のメスは反り上げる (赤点線)。黄丸は卵母細胞を示す。

本研究で使用した 2 種で[4]射精前に[2]接触にてオスが口部でメスの総排泄孔を盛んに触れる行動が観察できた。また[1]追尾ではオスがメスを認知して追いかけているように見受けられることから、メス総排泄孔からオス誘引フェロモンが分泌されている可能性が示唆された。クマムシでは性フェロモンの分子構造は同定されていないが、他の生物での先行研究より、小分子、ペプチド、またタンパク質を性フェロモンとして用いているものと考えられている (Butenandt et al., 1961; Wyatt, 2014; Bartel & Hohberg, 2020)。渡辺、竹内は、本研究に用いた *Paramacrobiotus sp.*、*M. shonaicus* において、多くのメスのみを飼育して得られた飼育水をオスにアッセイすることで性フェロモンの存在を示した (渡辺, 2020; 竹内, 2020)。 *Paramacrobiotus sp.* の性フェロモンは 3 kDa から 10 kDa のペプチド、もしくはタンパク質で、熱安定性を持つことが示唆されている。加えてメスがオスを誘引するための誘引フェロモンと、オスの行動を制御する興奮フェロモンを使い分けていること、それぞれ誘引フェロモンは極性の高い分子、興奮フェロモンは極性の低い分子であることが示唆されている (渡辺, 2020)。一方で *M. shonaicus* の性フェロモンは 3 kDa 以下の熱安定性、極性が高い物質であることが示唆され、 *Paramacrobiotus sp.*、*M. shonaicus* の 2 種間では交尾行動は観察されな

かったことから、性フェロモンには種特異性があることが明らかとなっている (竹内, 2020)。

メス体内の卵母細胞形成過程において減数第一分裂が進行し、交尾前の Stage 4 では減数第一分裂中期で停止していることが明らかとなった。これまで複数のクマムシ種で卵母細胞内の染色体像が観察されており、メス体内では減数第一分裂中期で停止していることが示唆されてきたが (Bertolani, 1972a; b; 1975; 1979a; b; 1982; 2001; Rebecchi, 1991; Rebecchi et al., 2003)、本研究でも同様の結果を得られた。加えて交尾後の卵母細胞も Stage 4 と同様の染色体像を有したことから、少なくとも産卵後まで減数第一分裂中期で停止していることが分かった。

産卵直後の卵には貯精囊から排出されたと考えられる精子が付着しており、精子と卵の核は融合していなかった。現在までチョウメイムシ科では、卵が排出される総排泄孔と卵巢を繋ぐ卵管に付随して貯精囊が存在するため、受精は体内で行われていると考えられてきたが (Bertolani and Rebecchi, 1999; Bertolani, 2001; Rebecchi, 1997; Rebecchi et al., 2000b)、本研究により、産卵直後の時点で卵殻内に付着している精子核のみが観察でき、受精は産卵後に完了することが明らかとなった。

雌雄異体の生物では、性決定様式を二つに分けることができる。性染色体に代表されるような雌雄で異なる遺伝情報を持ち、その分配によって性決定を行う様式を遺伝的性決定と呼び、温度や栄養状態などの環境的な要因によって性決定を行う様式を環境依存的性決定と呼ぶ (Bull, 1985)。クマムシでは複数種で雌雄の染色体像が観察されているが、染色体の形態差はなく、性染色体、また染色体レベルでの雌雄差は不明である (Altiero and Rebecchi, 2003)。クマムシで雌雄の遺伝情報に差異があるならば、雌雄のゲノム比較を行うことで検出することができると考えられる。一方で一般的に性染色体のランダムな分配による性決定方式では雌雄比は 1:1 に収束するが、用いた 2 種のクマムシではそれに反していたことから環境依存型の性決定を行っている可能性

もある。環境依存型性決定を行う *Daphnia* 属のミジンコでは、幼若ホルモン様物質を飼育環境中に暴露することで、産生する子を全てオスにすることができ (Kato et al., 2011)、湊は同ホルモン様物質を *Paramacrobrotus* sp. と *M. shonaicus* に暴露することで、*Paramacrobrotus* sp. ではオスの産生を促進、*M. shonaicus* ではオスの産生を抑制することを見出した (湊, 2019)。この結果は、ホルモン様物質がそれぞれの種で多い方の性の産生を増長させることを表しており、性決定様式が *Daphnia* 属のような環境依存型であること、加えて性決定機構にホルモン様物質に近似したホルモンが関与を示唆している。

2-5. 結言

本章では *Paramacrobiotus* sp.、*M. shonaicus* の 2 種を用いて、有性生殖を行う自由産卵種において初めてとなる交尾行動の詳細な記載を行った。交尾行動は[1]追尾、[2]接触、[3]行動停止、[4]射精、[5]緊縮の 5 ステップで構成され、2 種の間では[3]行動停止、[4]射精中に、交尾行動の差異が見られた。[1-2]の求愛行動中では、他種のクマムシにて示唆されているオスを誘引する性フェロモンの存在が、本研究で用いた 2 種でも示唆された。[4]射精では脱皮殻産卵種と同様に、オスの総排泄孔から放出された精子が水中を遊泳していた。自由産卵種では精子は水中を遊泳してメスの総排泄孔に向かい遊泳し、メス体内に進入することが初めて明らかとなった。

雌雄配偶子の核の挙動を観察することで、受精は産卵後まで完了せず、減数第一分裂中期以降は体外で進行することを示唆した。今までメス体内の卵巢と貯精囊の位置関係から体内受精を行うと考えられてきたが、受精のタイミングについて新たな知見をもたらした。

2 種を用いて交尾後の産卵まで、また孵化までの時間計測を行い、生殖プロセスのタイムスパンを初めて明らかにした。また 2 種間共に性比は 1:1 ではなく、性比に偏りがあり、種によって性比が異なっていることを明らかにし、*Paramacrobiotus* sp.と *M. shonaicus* を生殖の研究に用いる上で欠かせない知見を得ることができた。

第3章 *Macrobiotus shonaicus* の日本分布

3-1. 緒言

現在までに緩歩動物門には約 1400 種が記載されており (Degma et al., 2020)、その種判別は簡易的な形態特徴の記載に依存していた。1981 年に Pilato が、咽頭管の長さを指標に各部位の長さの割合 (*pt* 値) を比較する形態比較法を確立した (Pilato, 1981)。さらに Michalczyk と Kaczmarek によって計測すべき部位が明確に記述され (Michalczyk & Kaczmarek, 2013)、より明瞭な種記載のために現在も更新され続けている (Kaczmarek & Michalczyk, 2017; Stec et al., 2018a, Fig. 3-1-1, 2)。加えて 2010 年前後から DNA の配列比較による種の比較法が整備され (Michalczyk et al., 2012; Stec et al., 2015; Guidetti et al., 2019; Stec et al., 2020)、分子系統解析が可能となった。分子系統解析には主に、かねてより用いられてきた 18S rDNA、28S rDNA 塩基配列と、Internal Transcribed Spacer 2 (ITS-2) 配列、ミトコンドリアゲノムの Cytochrome oxidase subunit I (COI) 配列が複合的に用いられるようになった。これらの結果、特に *Milnesium tardigradum* Doyère, 1840、*P. richtersi*、*Macrobiotus hufelandi* C.A.S. Schultze, 1834 と報告されてきたクマムシの中に複数の種が潜在していたことが明らかとなった。

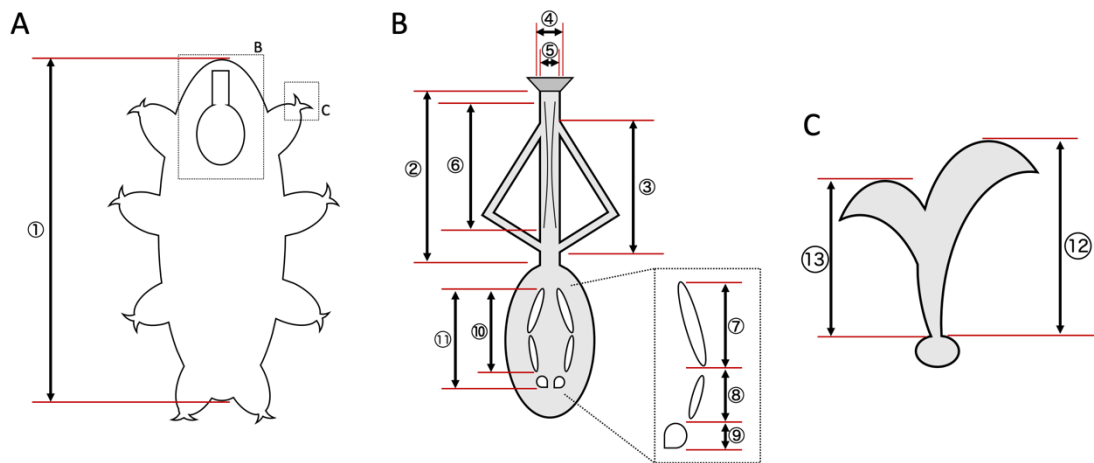


Fig. 3-1-1. クマムシ (チョウメイムシ科) の種判別に必要な個体の計測箇所

クマムシ (チョウメイムシ科) の種判別に用いられる個体の身体と (A)、咽頭管 (B)、爪の計測箇所 (C)。①Body length; ②Buccal tube length; ③Stylet support insertion point; ④Buccal tube external width; ⑤Buccal tube internal width; ⑥Ventral lamina length; ⑦Macroplacoid 1; ⑧Macroplacoid 2; ⑨Microplacoid; ⑩Macroplacoid row; ⑪Placoid row; ⑫Primary branch length; ⑬Secondary branch length (Kaczmarek & Michalczyk, 2017)。

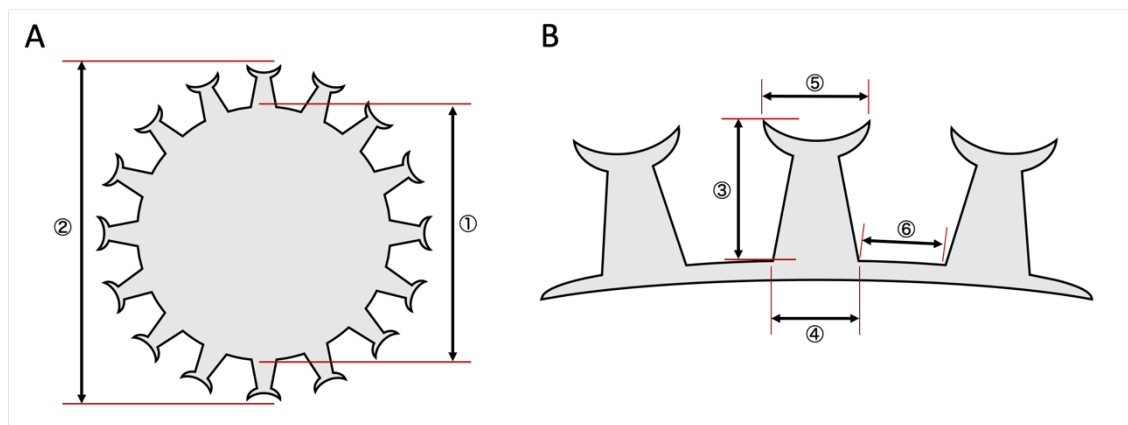


Fig. 3-1-2. クマムシ (チョウメイムシ科) の種判別に必要な卵の計測箇所

クマムシ (チョウメイムシ科) の種判別に用いられる卵の全体と (A)、卵殻表面突起の計測箇所 (B)。①円部直径; ②全直径; ③突起高; ④突起幅; ⑤天盤幅; ⑥突起間隔 (Stec et al., 2018a)。

日本では 170 種のクマムシの生息が確認されている (Suzuki 2017; Stec et al., 2018a; Morek et al. 2019; Sugiura et al., in press)。2018 年に記載された *M. shonaicus* は、山形県庄内地方で発見され、1 組の雌雄から系統化された。電子顕微鏡レベルでの形態観察と DNA 配列による分子系統解析も合わせて記載された (Stec et al., 2018a)。またその記載情報から、*M. hufelandi* に極めて近縁なグループ、*hufelandi* group に属することも明らかとなった。日本で *hufelandi* group に属するクマムシは他に *M. hufelandi* のみしか確認されていないが (Mathews 1937; Hatai 1956; Utsugi 1996; Suzuki et al., 2018)、その多くは簡易的な種判別手法に則っており、種を同定したとは言い難い状態であった。

本章では、第 2 章で交尾行動を観察した *M. shonaicus* の地理的生殖隔離と生息分布を解明することを目標とした。まず日本全国 19 地点からクマムシを採取し、形態比較と分子系統解析により種を同定することで、*M. shonaicus* の生息分布を明らかにした。加えて各地域のサンプルと、タイプ系統である庄内産 *M. shonaicus* を交尾させ、出産地による交尾行動誘発の有無を調査した。

3-2. 材料と方法

3-2-1. クマムシの採取と飼育

全国 19 箇所ですれ、もしくは曇りの日に蘚類と苔類を含むコケを採取し (Table 3-2-1-1)、シャーレ内で 20 分以上 Volvic® に浸した。実体顕微鏡下でチョウメイムシ科に属するクマムシを選出した。採取したクマムシは産地ごとに 2 章と同様の手法で飼育した。各実験の前には 1 週間以上飼育プールから単離した。

Table 3-2-1-1. クマムシの採集地点

ID	サンプリング地点	緯度経度	採集地点情報	採集時期
HOKKAIDO-1	北海道、忍路	43.2097 N, 140.8608 E	海岸沿い、コンクリートに繁茂 蘚類	4 月
HOKKAIDO-2	北海道、北海道大学	43.0810 N, 141.3429 E	市街地、コンクリートに繁茂 蘚類	8 月
HOKKAIDO-3	北海道、北海道大学	43.0723 N, 141.3411 E	市街地、コンクリートに繁茂 蘚類	8 月
HOKKAIDO-4	北海道、水徳大橋	43.0626 N, 141.3739 E	川にかかる橋、コンクリートに繁茂 蘚類 (ギンゴケ)	8 月
HOKKAIDO-5	北海道、新千歳空港	42.7858 N, 141.6771 E	駐車場、コンクリートに繁茂 蘚類 (ギンゴケ)	8 月
HOKKAIDO-6	北海道、白尻	41.9272 N, 140.9451 E	森林、土壌に繁茂 蘚類	4 月
ORITSUME	岩手県、折爪岳	40.2685 N, 141.3719 E	山岳地帯、土壌に繁茂 蘚類 (ギンゴケ)	6 月
HIYOSHI	神奈川県、慶應義塾大学	35.5518 N, 139.6533 E	市街地、コンクリートに繁茂 蘚類 (ギンゴケ)	4 月
KAMIYOSIDA	山梨県、上吉田	35.4816 N, 138.7821 E	市街地、コンクリートに繁茂 蘚類 (ギンゴケ)	4 月
SHIZUOKA	静岡県、駿河	34.9606 N, 138.4038 E	市街地、コンクリートに繁茂 蘚類 (ギンゴケ)	5 月
KYOTO	京都府、河川敷	35.0133 N, 135.7719 E	川の河川敷、コンクリートに繁茂 蘚類	2 月
ROKKO	兵庫県、六甲山	34.7780 N, 135.2654 E	山岳地帯、コンクリートに繁茂 蘚類	12 月
BIZAN	徳島県、眉山	34.0668 N, 134.5378 E	山岳地帯、コンクリートに繁茂 蘚類 (ギンゴケ)	7 月
OKI	島根県、隠岐島	36.2037 N, 133.3351 E	海岸沿い、コンクリートに繁茂 蘚類	6 月
KAGOSHIMA	鹿児島県、霧島	31.7406 N, 130.7830 E	市街地、コンクリートに繁茂 蘚類	5 月
OKINAWA-1	沖縄県、那覇空港	26.2067 N, 127.6520 E	駐車場、木の表面に繁茂 苔類	12 月
OKINAWA-2	沖縄県、小禄	26.1964 N, 127.6671 E	市街地、コンクリートに繁茂 蘚類 (ギンゴケ)	12 月
OKINAWA-3	沖縄県、漫湖	26.1940 N, 127.6868 E	湖の河川敷、コンクリートに繁茂 苔類	12 月
OKINAWA-4	沖縄県、石垣島	24.3402 N, 124.1554 E	海岸近く、コンクリートに繁茂 蘚類	12 月

3-2-2. DNA バーコーディングと系統解析

ゲノム DNA の抽出は Arakawa らの手法を一部改変して行なった (Arakawa et al., 2016)。実験に用いるクマムシは絶食、並びに 1% streptomycin 混合培地で 24 飼育した。できるだけ少量の水と共にチューブに移し、100 μ l の 1% 2-mercaptoethanol / cell lysis solution (QIAGEN) を加え、-80°C と 42°C の凍結融解サイクルを用いてクマムシを破碎した。その後は Mini Plus Column (VIOGENE) を用いて DNA を精製した。

続いて COI と ITS-2 領域増幅のため Polymerase chain reaction (PCR) を行なった。PCR に用いたプライマー配列は Table 3-2-2-1 に示した。サイクル条件は 94°C、2 分; (94°C、30 秒; 50°C、30 秒; 68°C、75 秒) \times 40 サイクル; 68°C、7 分とし、ポリメラーゼには Quick-Taq (TOYOBO) を用いた。PCR 産物は pGEM T-easy vector (promega) へ形質転換後、Eurofins genomics にてサンガー法によりシーケンスした。得られたシーケンスデータの読み取り、及びトリミングは GENETYX-MAC v17.0.0. を用いた。

分子系統解析には Table 3-2-2-2 に示した *Macrobiotus* 属のクマムシと、アウトグループとして *Milnesium* 属のクマムシを用いた。MAFFT v7.222 にてアライメント (Kato et al. 2002; Kato & Toh 2008)、MEGA7 にてトリミングと *p*-distance の算出を行なった (Kumar et al., 2016)。PartitionFinder v2.1.1 を用いて COI では GTR+I+G、ITS-2 では GTR+G が最適進化モデルを推測された (Lanfear et al., 2016)。最尤法による系統解析 (ML) には RAxML v8.0.0 を用い (Stamatakis, 2014)、1,000 回ブートストラップ法により分岐の評価を行なった。ベイズ推定法による系統解析 (BI) では MrBayes v3.6.2 を用いて 1,500,000 回世代、マルコフ連鎖を 1,000 世代ごとにサンプリング、収束が $p < 0.01$ になったことを確認した (Ronquist & Huelsenbeck 2012)。推定された系統樹は FigTree v1.4.3 にて可視化した (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)。遺伝的種限界は Poisson Tree Processes (PTP) による推定を行う bPTP server にて行なった (Zhang et al., 2013, <https://species.h-its.org/ptp/>)。設定は 100,000 マルコフ連鎖モンテカルロ世代、シニング

を 100、burn-in は 0.1 とした。ハプロタイプネットワーク作成には TCS 解析と可視化を、PopART v1.7 を用いて行なった (Clement et al. 2002; Leigh & Bryant 2015)。

Table 3-2-2-1. プライマー配列

Primer	Sequence (5'-3')	Target	参考文献
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	COI	Folmer et al., 1994
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTG	COI	Folmer et al., 1994
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	ITS-2	White et al., 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS-2	White et al., 1990

3-2-3. 形態観察

成体と卵を 30 個ずつ形態観察に用いた。各サンプルはスライドグラス上にてホイヤー氏液を用いて封入し (Stec et al., 2018a)、60°C で 5 日以上かけ硬化させた。位相差顕微鏡 Axio Imager M1 にて観察を行い、Pilato、Kaczmarek と Michalczyk、Stec らによって報告された観測点に対し、ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij>) にて形態測定を行なった (Pilato, 1981; Kaczmarek & Michalczyk, 2017; Stec et al., 2018a, Fig. 3-1-1, 2)。測定した形態情報は主成分分析 (PCA) にて解析した。PCA は統計的解析ソフト R v3.3.1 の `prcomp` 関数にて、描画は `ggbiplot` 関数にて行なった (R core team, 2016)。分散分析 (ANOVA) にて統計学的検定を行なった。加えて False discovery rate (FDR) を制御して多重比較検定補正を行うため、Benjamini-Hochberg 法を用いた。

3-2-4. 核型観察と交尾行動

核型の観察と交尾行動の観察、撮影は 2 章と同様の条件で行なった。

Table 3-2-2-2. 系統解析に用いたクマムシとそのシーケンスデータ

種名	記載論文	COI		ITS-2	
		Accession number	参考文献	Accession number	参考文献
<i>Macrobotus cf. hufelandi</i>	Schultze, 1834	HQ876589-94, HQ876596	Bertolani et al., 2011	-	-
<i>Macrobotus hufelandi</i> C.A.S.	Schultze, 1834	HQ876584, HQ876586-8	Bertolani et al., 2011	-	-
<i>Macrobotus kristenseni</i>	Guidetti et al., 2013	KC193575-6	Guidetti et al., 2013	-	-
<i>Macrobotus macrocalix</i>	Bertolani & Rebecchi, 1993	FJ176203-17	Cesari et al., 2009	MH063931	Stec et al., 2018b
		HQ876571	Bertolani et al., 2011		
		MH057767	Stec et al., 2018b		
<i>Macrobotus paulinae</i>	Stec et al., 2015	KT951668	Stec et al., 2015	KT935500	Stec et al., 2015
<i>Macrobotus polypiformis</i>	Roszkowska et al., 2017	KX810011-2	Roszkowska et al., 2017	KX810010	Roszkowska et al., 2017
<i>Macrobotus sandrae</i>	Bertolani & Rebecchi, 1993	HQ876566-70, HQ876572-83	Bertolani et al., 2011	-	-
<i>Macrobotus scoticus</i>	Stec et al., 2017	KY797267	Stec et al., 2017	KY797268	Stec et al., 2017
<i>Macrobotus terminalis</i>	Bertolani & Rebecchi, 1993	JN673960, AY598775	Cesari et al., 2011; Guidetti et al., 2005	-	-
<i>Macrobotus vladimiri</i>	Bertolani et al., 2011	HM136931-4, HQ876568	Bertolani et al., 2011	-	-
<i>Macrobotus canaricus</i>	Stec et al., 2018	MH057765-6	Stec et al., 2018d	MH064927-8	Stec et al., 2018d
<i>Macrobotus cf. recens</i>	Cuénot, 1932	MH057768-9	Stec et al., 2018d	MH063932-3	Stec et al., 2018d
<i>Macrobotus hannaе</i>	Nowak & Stec, 2018	MH057764	Nowak & Stec, 2018	MH063923	Nowak & Stec, 2018
<i>Macrobotus polonicus</i>	Pilato et al., 2003	-	-	HM150647	Welnicz et al., 2011
<i>Macrobotus sapiens</i>	Binda & Pilato, 1984	-	-	GQ403680	Schill et al., 2010
<i>Macrobotus papei</i>	Stec et al., 2018	MH057763	Stec et al., 2018c	MH063921	Stec et al., 2018c
<i>Macrobotus shonaicus</i>		MG757136-7	Stec et al., 2018a	MG757134-5	Stec et al., 2018a
<i>Macrobotus shonaicus</i> ORITSUME		LC431582		LC431591	
<i>Macrobotus shonaicus</i> HIYOSHI		LC431583		LC431592	
<i>Macrobotus shonaicus</i> KAMIYOSHIDA		LC431584		LC431593	
<i>Macrobotus shonaicus</i> SHIZUOKA	Stec et al., 2018	LC431585		LC431594	
<i>Macrobotus shonaicus</i> KYOTO		LC431586	本研究	LC431595	本研究
<i>Macrobotus shonaicus</i> ROKKO		LC431587		LC431596	
<i>Macrobotus shonaicus</i> BIZAN		LC431588		LC431597	
<i>Macrobotus shonaicus</i> OKI		LC431589		LC431598	

Table 3-2-2-2. 系統解析に用いたクマムシとそのシーケンスデータ (continued)

種名	記載論文	COI		ITS-2	
		Accession number	参考文献	Accession number	参考文献
<i>Macrobotus shonaicus</i> KAGOSHIMA		LC431590		LC431599	
<i>Milnesium berladnicorum</i>	Ciobanu et al., 2014	KT951659	Morek et al., 2016	KT951662	Morek et al., 2016
<i>Milnesium variefidum</i>	Morek et al., 2016	KT951663	Morek et al., 2016	KT951666-7	Morek et al., 2016

3-3. 結果

3-3-1. *Macrobiotus shonaicus* 日本分布

全国 19 箇所のうち、沖縄県と北海道を除く、岩手県、山梨県、神奈川県、静岡県、京都府、兵庫県、島根県、徳島県、鹿児島県の 9 箇所から *M. shonaicus* の採取に成功した (Fig. 3-3-1-1)。

系統解析では全ての個体群がタイプ系統と近接しており、COI は 8 ハプロタイプ (Fig. 3-3-1-2A)、ITS-2 は 11 ハプロタイプ存在した (Fig. 3-3-1-2B)。タイプ系統との遺伝的距離はそれぞれの DNA マーカーで平均して 0.61% と 0.75% であり、遺伝的に極めて近似していた。

ML 系統樹、BI 系統樹共に全ての個体群がタイプ系統と同クレードに帰属されることを示し (Fig. 3-3-1-3)、加えて PTP server による種限界推定でも同一種と強く推定された。

3-3-2. 形態の多様性解析

成体の形態情報を用いた PCA での PC1、2 の寄与率はそれぞれ 23.1%、9.3% だった (Fig. 3-3-2-1A)。PC1 には全ての爪の長さ成分によって構成されており、PC2 は咽頭間付近の形態によって構成されていた。14 の測定した部位のうち 10 点で有意な差があった (ANOVA、 $q < 0.05$)。一方で卵での PCA は PC1、PC2 の寄与率はそれぞれ 39.8%、21.4% で (Fig. 3-3-2-1B)、PC1 は卵全直径、突起高、突起幅、天盤幅で構成されていた。全ての計測部位で有意な差があった (Fig. 3-3-2-1C, ANOVA、 $q < 0.001$)。

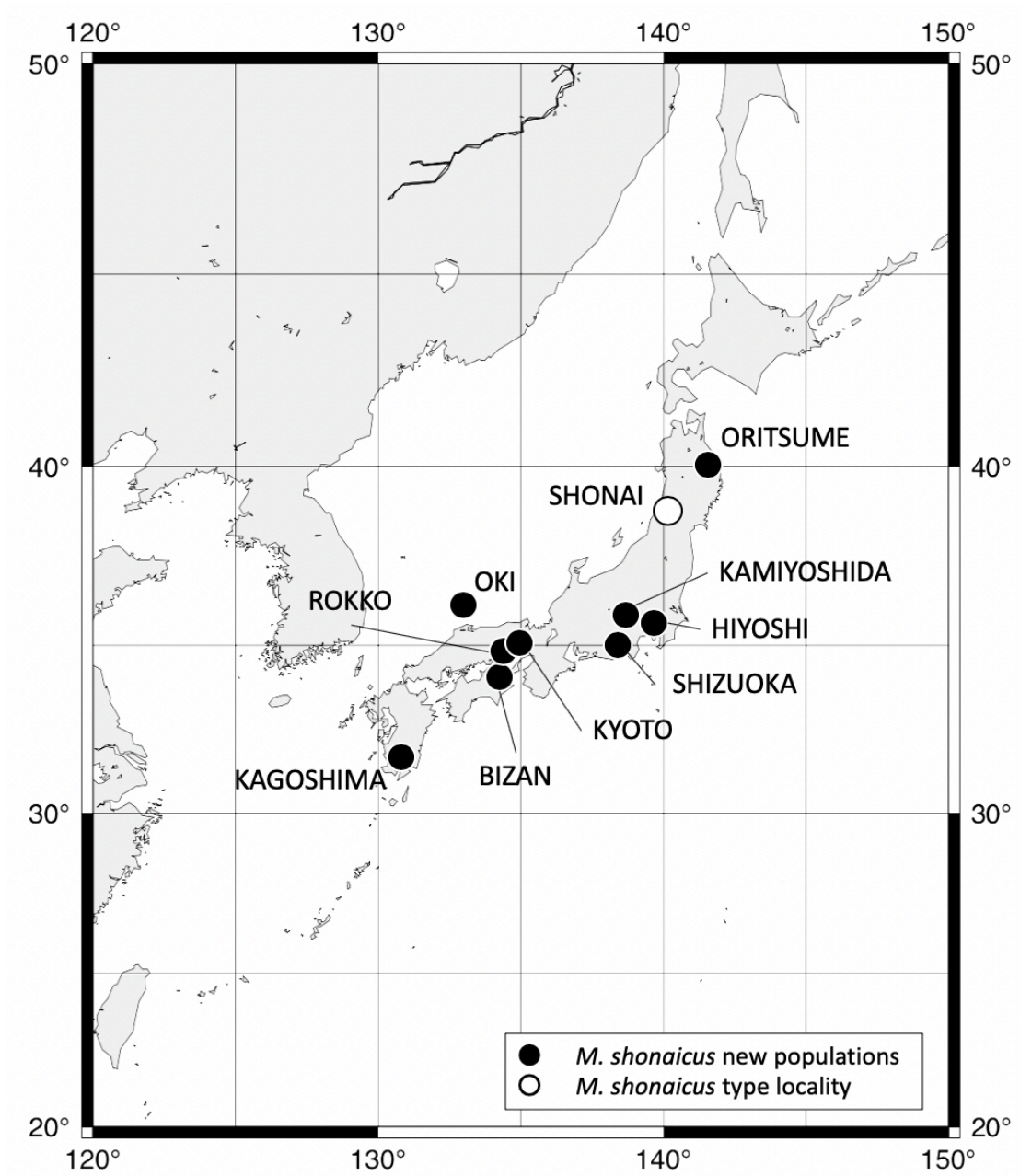


Fig. 3-3-1-1. *Macrobiotus shonaicus* の国内分布

Macrobiotus shonaicus の国内分布。●: *M. shonaicus* のタイプ産地、○: 発見した新たな生息地。描画は GMT v6 を用いた (Wessel et al., 2019)。

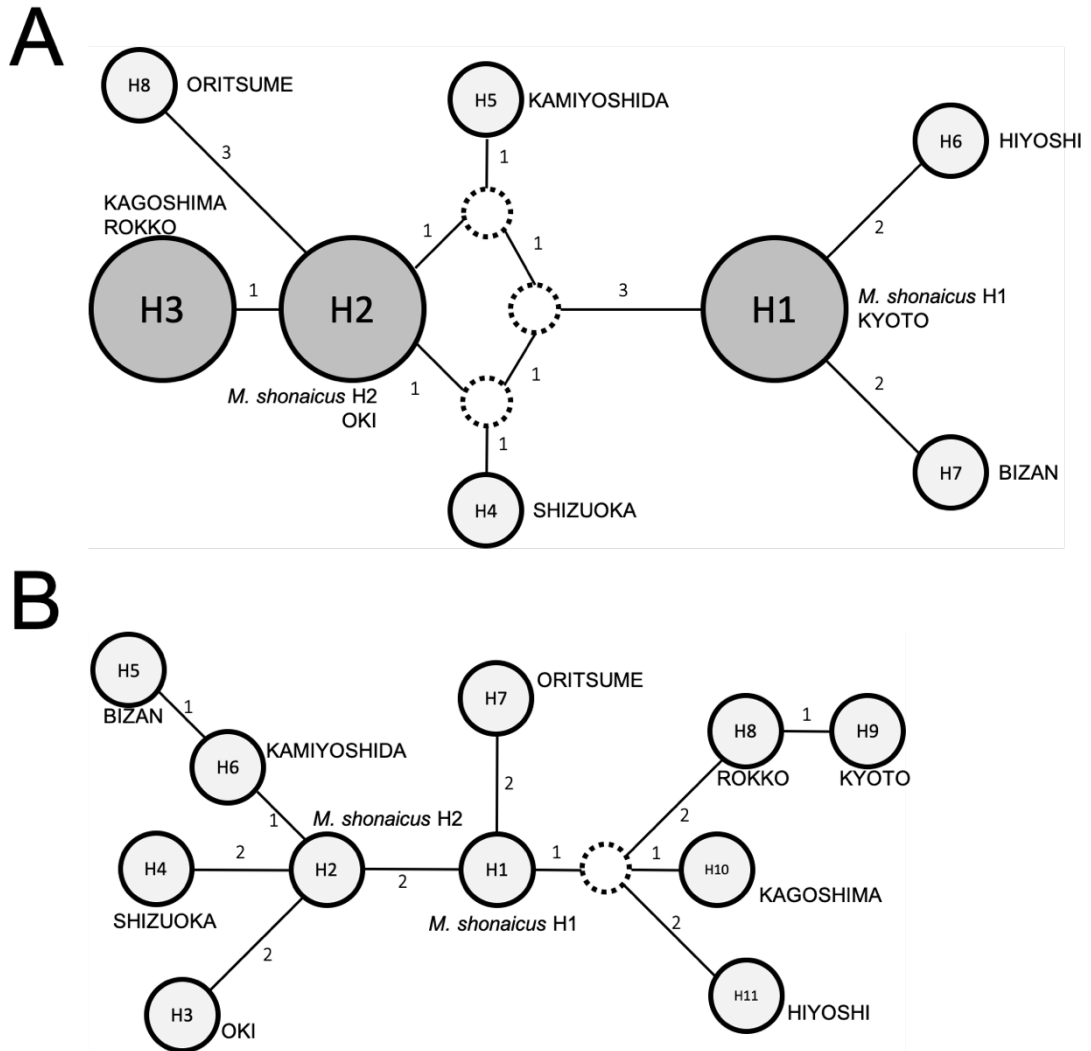


Fig. 3-3-1-2. ハプロタイプネットワーク

COI (A) と ITS-2 (B) のハプロタイプネットワーク。H1、H2 は Stec et al., (2018a) に相同。枝上部の数字は変異数。

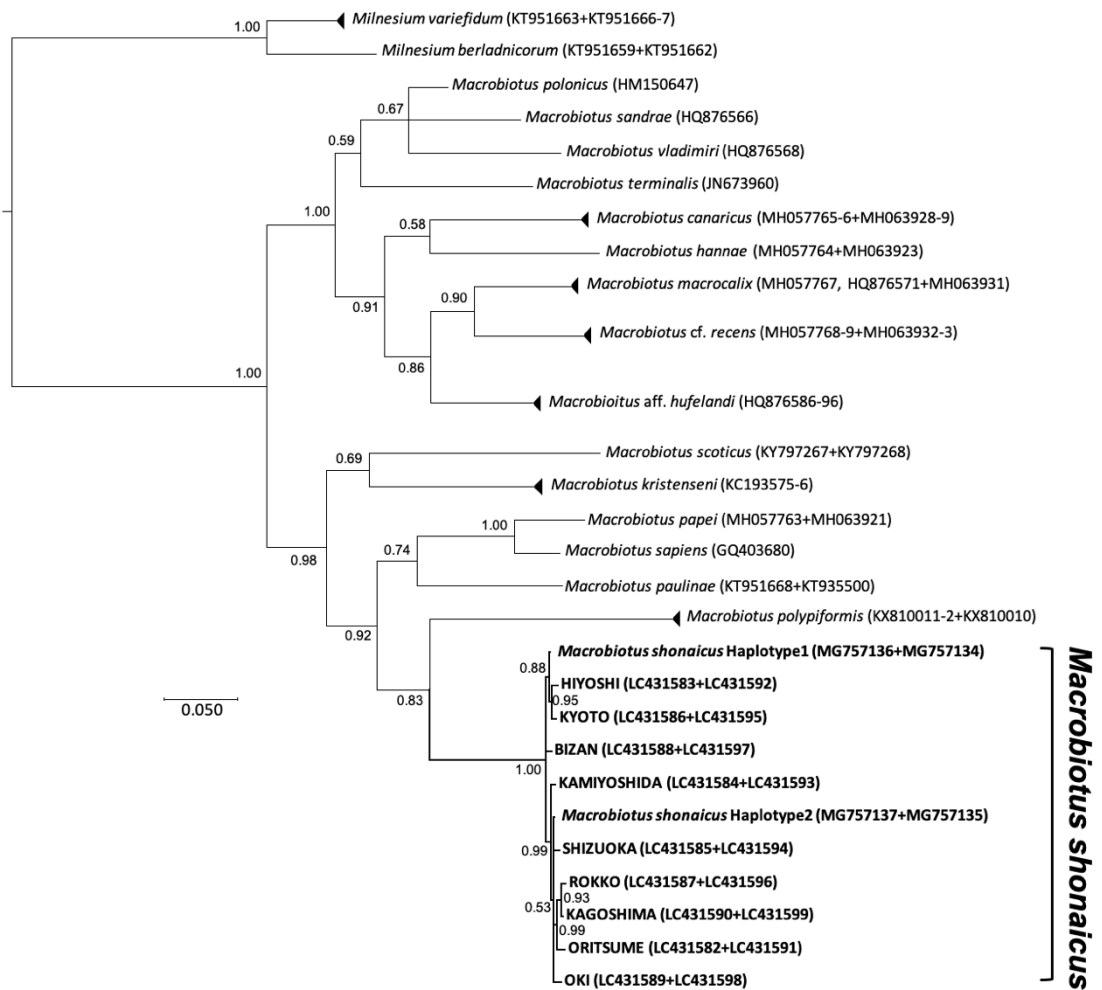
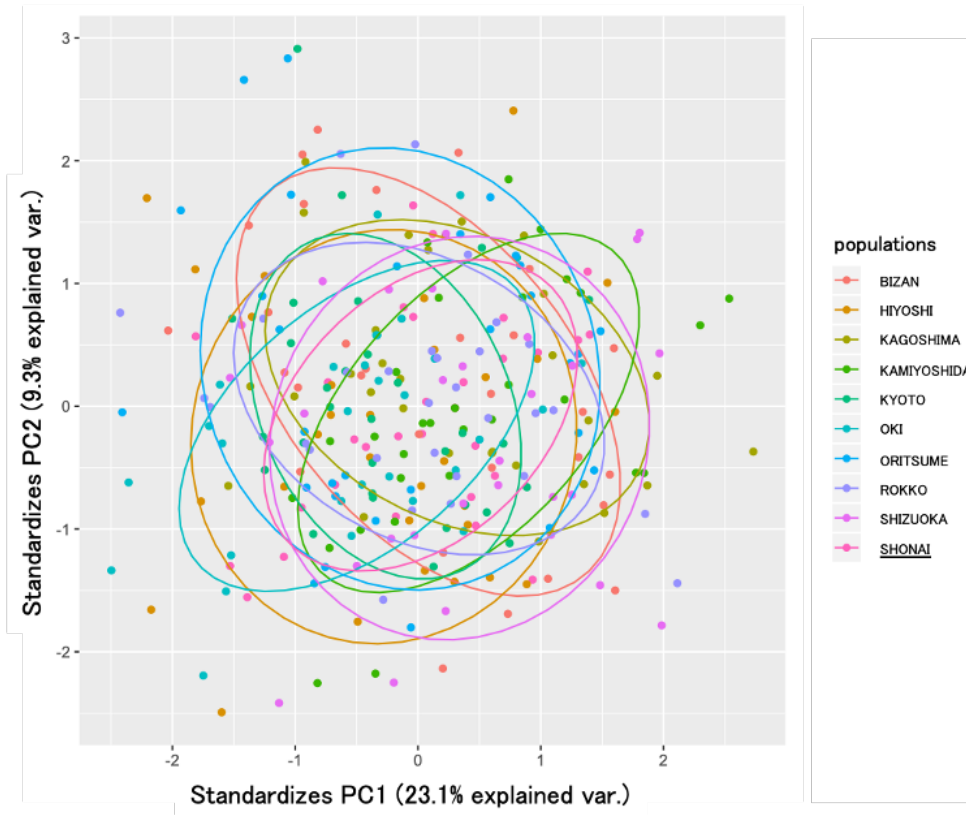
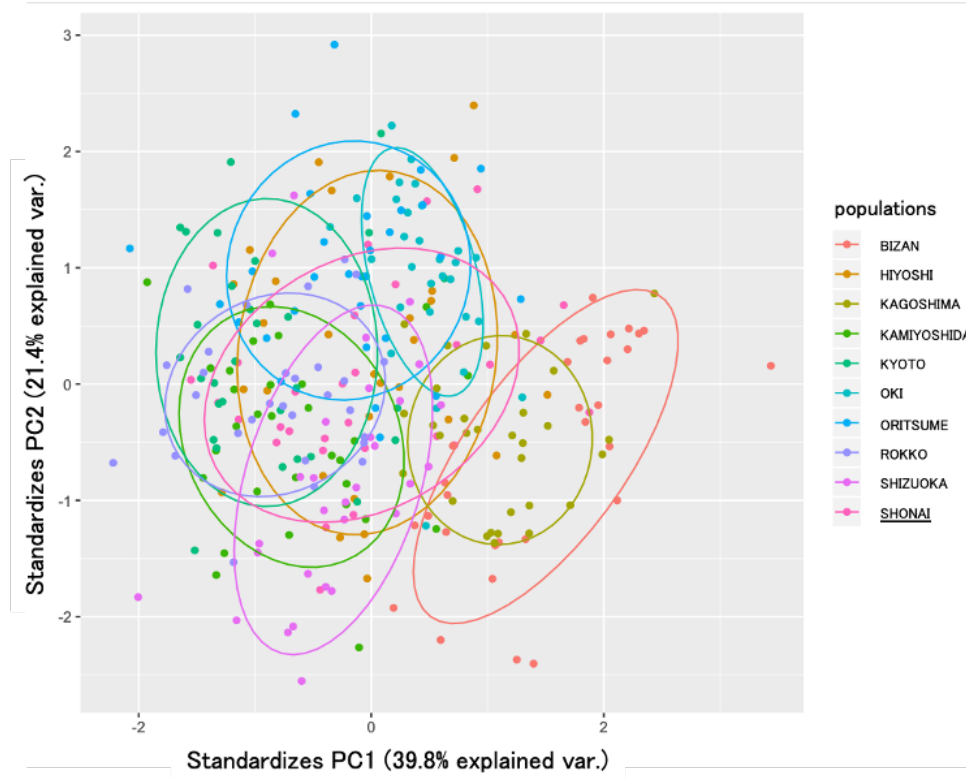


Fig. 3-3-1-3. COIと ITS-2 の連結系統樹

COIと ITS-2 の連結配列のベイズ推定法による分子系統樹。枝脇の数値はベイズ事後確率を示す。Scale bar: 塩基置換率。

A**B**

C

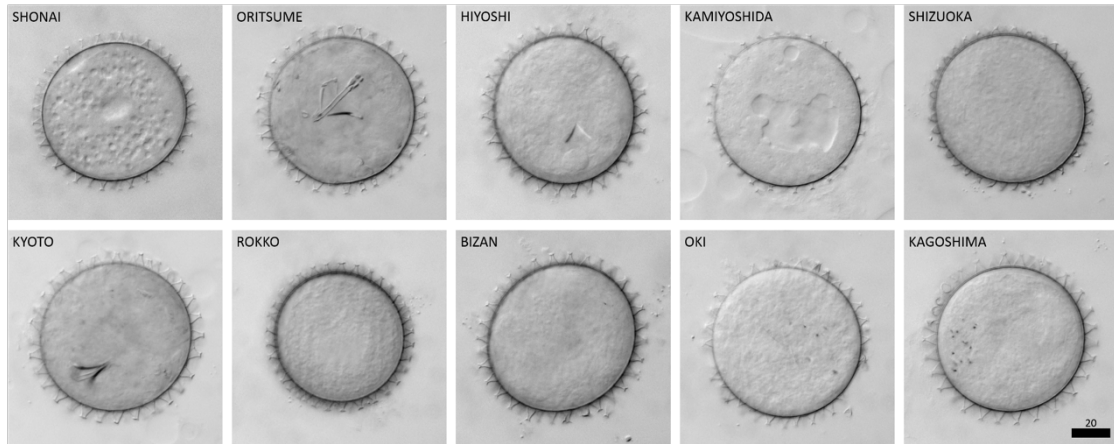


Fig. 3-3-2-1. 形態比較

成体形態 (A) と卵形態 (B) の PCA による比較と、卵の形態 (C)。

Scale bar: 20 μm 。

3-3-3. 核型と交尾行動

全ての個体群にて核型は $n=6$ で、タイプ系統と同型であった (Fig. 3-3-3-1)。

タイプ系統のメス、各個体群のオスの交尾行動、並びにタイプ系統のオスと個体群のメスの交尾行動を観察したところ、全てのオスが射精に至った。交尾行動の詳細も第2章で報告したものと差異はなかった。全てのメスは1週間以内に産卵に至り、孵化も観察できた。

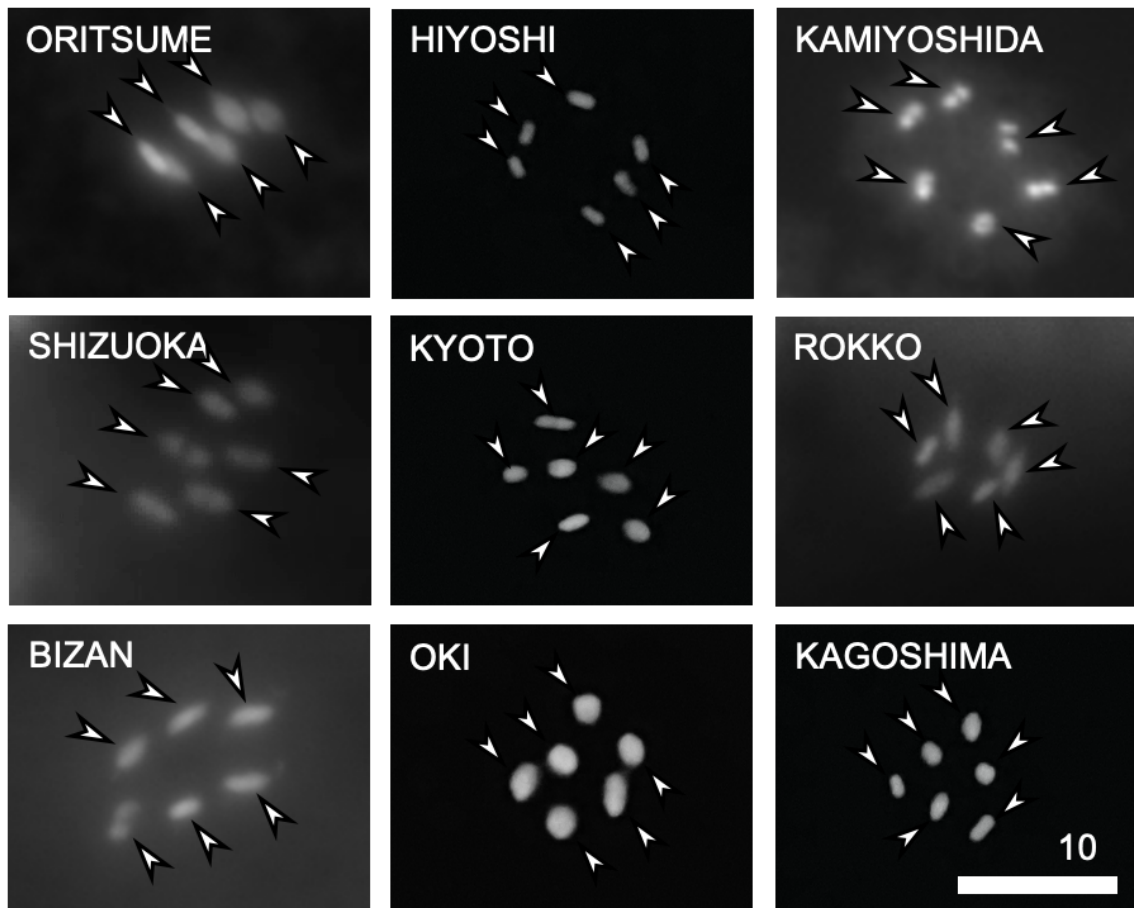


Fig. 3-3-3-1. 核型解析

矢尻はそれぞれの染色体を示す。

Scale bar: 10 μm 。

3-4. 考察

2017年まで日本における *hufelandi* group に属するクマムシは、*M. hufelandi* 1種のみしか生息報告がなかった (Suzuki, 2017)。報告例では北海道から沖縄に至るまで幅広く生息しているとされていたが、これらの報告での種同定は極めて簡易的な手法でのみ行われてきた。Stecらは2018年に *M. shonaicus* を庄内地方から発見、記載を行なったが、当記載は電子顕微鏡レベルでの形態観察とDNAバーコーディングが行われ、*M. hufelandi* グループに帰属されることを明らかにし、並びに他種との明確な比較を可能にした (Stec et al., 2018a)。本報告では *M. shonaicus* が本州、四国と九州地方にも生息していることを明らかにし (Table 3-2-1-1, Fig. 3-3-1-1)、またその過程で *M. hufelandi* が見つからなかったことから、現在までに *M. hufelandi* とされてきた日本のクマムシが誤って記載されている可能性を示唆した。

成体の形態に比べて卵の形態の方が高い多様性を見せた (Fig. 3-3-2-1)。同様の卵形態的多様性は他種でも報告されており (Bertolani & Rebecchi, 1993; Guidetti et al., 2013; Kaczmarek & Michalczyk, 2017; Stec et al., 2018a; d)、産卵場所嗜好性等による最適化が関与していると考えられてきた (Stec et al., 2016)。一方で近年、卵表面に精子が付着している様子が観察されており (Guidetti et al., 2019)、特に有性生殖種においては、卵の突起と精子の形状の間に効率良く受精を行えるようにする形態的關係性の存在が示唆される。加えて成体の形態と比較して卵の形態の進化速度が早いことが示唆され、これはチョウメイムシ科全体を俯瞰して、成体の形態より卵の形態の多様性が高いこととも矛盾しなかった (Kaczmarek & Michalczyk, 2017)。本研究では生殖に関係する卵の形態が多様であり、進化速度が速いことを示したが、生殖プロセスに関与する遺伝子や免疫反応に関わる遺伝子もその他の遺伝子と比較して進化速度が速いことが報告されており (Swanson & Vacquier, 2002)、*Drosophila* 属で精子貯蔵に関与する *Acp26Aa* (Tsaour & Wu, 1997)、哺乳類で精子の先体反応を受容する *Zp3* (Swanson et al., 2001)、緑

藻類で交尾型か否かを決定する *mid1* などが知られている (Ferris et al., 1997)。精子競争、メスの配偶者選択、性的対立といった要因が、この速度をもたらす駆動力として考えられており、この現象は例えば受精時における認識を妨げることで生殖隔離を生じさせ、種分化に繋がる可能性が指摘されている。

卵形態に多様性が確認された一方で、各群体間とタイプ系統の間では交尾も観察でき、第2章で示した交尾行動の5ステップも全て行われたこと、また産卵と孵化が観察できていることから、各群体とタイプ系統間に交尾行動までの段階で隔離は生じていないと考えられる。しかしながら本実験では交配実験に処女メスを用いていないために、現存の結果から生殖隔離の有無を完全に断定できない。貯精嚢が空の処女メスからも同様に産卵、孵化が確認できれば、*M. shonaicus* では生殖隔離がなく、群体ごとの卵形態差異による受精への影響もないことを明らかにすることができる。加えて、生殖関連遺伝子の速い進化速度による分子的な受精の阻害もないことが示唆される。一方で産卵はするが孵化をしない場合は受精が阻害されているものと考えられ、卵形態の相違による阻害、もしくは分子間での選択が行われることで阻害されていることが示唆される。産卵も行わない場合は卵形態に依存した阻害より、むしろメスの貯精嚢内にて分子間相互作用、もしくは精子形態の違いによって配偶者を選んでいることが示唆される。クマムシにおける異種交配実験は、DNA マーカー COI では異種と推定されるが ITS-2 では同種と判断される *Paramacrobiotus areolatus* group に属する2群体間にてのみ報告されている (Stec et al., 2020)。異群体間交配では産卵率が減少傾向となることが報告されたが、交尾行動を始めとした生殖過程の詳細な観察は行われていない。日本では *M. shonaicus* の他に7種の *Macrobiotus* 属のクマムシが生息していると報告されており (Mathews 1937; Hatai 1956; Utsugi 1986; 1987; 1988; 1995; 1996; Utsugi et al., 1997; Ito 1997, 1999; Biserov et al., 2001; Ishida & Matsui 2007; Suzuki, 2017; Suzuki et al., 2018)、これらを採取し、*M. shonaicus* と明確に別種であると確認した上で異種交配

実験を行うことで、交尾ステップをどこまで行うことができるか、また次世代産生能を検証し、クマムシにおける生殖隔離と地理的分離の関係を明らかにできると期待できる。

3-5. 結言

本章では *M. shonaicus* が北海道と沖縄を除く、本州、四国、九州と離島に広く生息していることを示した。このことより、*M. shonaicus* は飼育環境のみならず、自然界での生態や分布、地域差を調査するのに適したクマムシであることを示した。

地域差という観点から、本章では形態と染色体数、交尾行動に着目して実験を行った。染色体数には差がなく、全群体で $n=6$ だった。地域間での成体と卵の形態測定比較より、卵の形態がより多様化していることを明らかにし、成体の形態より卵の形態の進化速度が早いことが示唆された。交尾行動にも地域差がなく、タイプ系統と各群体間での交尾を観察できたことから、*M. shonaicus* 内では地理的に遠縁であることに起因する生殖行動段階での隔離は起きていないと示唆された。処女メスを用いて産卵と孵化の可否を調べることで、卵の形態による選択が交配能に及ぼす影響を明らかにすることが求められる。*Macrobiotus shonaicus* が海や山を隔てて広く生息していることから、大陸間に調査域を広げ分布の調査を行うこと、また日本国内に生息するであろう近縁種との地理的生殖隔離の可能性を推察するための基盤を構築することができた。

第4章 クマムシの配偶子形態変化と比較

4-1. 緒言

有性生殖を行う生物の生殖プロセスにおける、最後のステップは受精である。オスとメスで産生されたそれぞれの配偶子が融合することで、一つの個体としての始まりとなる受精は極めて重要である。多くの動物では精子が卵にアプローチし、両配偶子の融合をもって受精の完了とされており、雌雄同体、異体動物双方において生じる現象である。受精の様式は体内に取り込まれた精子と卵が融合する体内受精と、両配偶子が体外に放出されそのまま融合する体外受精に大きく二分される。

クマムシでは Bingemer らによる *I. dastychi* における交尾行動観察より、脱皮殻産卵種では産卵後に射精に至り、発生することから体外受精を行っていると考えられている (Bingemer et al., 2016)。一方で自由産卵種では、貯精嚢が卵巢と総排泄孔を結ぶ卵管に付随しており (Altiero et al., 2018)、その位置関係から貯精嚢に蓄えられた精子と卵母細胞はメス体内にて受精し、産卵に至る、体内受精を行うと考えられてきた (Rebecchi, 1997; Bertolani & Rebecchi, 1999; Rebecchi & Guidi, 2000; Bertolani, 2001)。しかし第2章で報告した結果より、産卵された卵内部では精子と卵の核の融合は起きておらず、受精の完了は体外であることが明らかとなった (第2章, 2-3-3)。精子と卵の接触については Guidetti らが報告しているが (Guidetti et al., 2019)、単に精子が卵殻上に乗っていると述べられているのみで、受精との関係や詳細な接触点の観察は未だかつて知見がなかった。

卵の形態は、種の記載の際に観察することが必須であり (Kaczmarek & Michalczyk, 2017)、種によって形態が異なることが報告されている。一方で精子の形態記載は限られている (Rebecchi & Guidi, 1991; Guidi & Rebecchi, 1996; Rebecchi, 1997; 2001; Rebecchi & Guidi, 1995; Rebecchi et al., 2003; 2011; Bertolani et al., 2014; Suzuki & Kristensen,

2014)。Rebecchi によって *Xerobiotus pseudohufelandi* Iharos, 1966 では、貯精囊内の精子の観察も行われており、貯精囊内では精子遊泳に必須な尾部が消失している様子が報告されている (Rebecchi, 1997)。これらは重要な知見であるものの、生殖プロセス内の機能や役割と結びつけるために、単一の種における個体の行動と配偶子の形態、動態などの生殖プロセスの網羅的な解明が求められてきた。

本章ではクマムシにおける受精の詳細なメカニズムを明らかにし、生殖プロセスを網羅的に解明するための足がかりとして、また配偶子の形態進化を生殖システムと関連付けて考察するための基盤を作成するために、本論文で交尾行動を詳細に報告した有性生殖クマムシ、*Paramacrobiotus* sp. と *M. shonaicus* を用いて、精子の形態観察と比較を行った。続いて生殖ステップに従い交尾後と産卵直後の卵を観察し、雌雄配偶子の結合の有無を調べた。

4-2. 材料と方法

4-2-1. 実験動物の飼育と交尾観察

実験動物 *Paramacrobiotus* sp. と *M. shonaicus*、また交尾行動の観察は 2 章の手法と同様に行った。*Paramacrobiotus* sp. の卵の形態測定は 3 章の手法と同様に行った。

4-2-2. 精子形態観察

精巣内精子はオス、貯精嚢内精子は交尾後のメスをそれぞれ解剖し、観察を行った。poly-L-lysine をコートしたスライドグラス上にクマムシを置き、26G ニードルで破碎後、2.5% glutaraldehyde/PBS にて 1 時間固定した。PBS にて洗浄後、1/1000 DAPI/PBS で 10 分間染色、2 章と同様に封入して観察を行った。各種 8 匹のオスから計 50 個の精子を選択し、尾部、中片、核、先体に分けて ImageJ にて長さの定量を行った (Rebecchi, 1997, Fig. 4-2-2-1)。配偶子の統計学的形態比較は統計分析ソフト R を用いて多重分散分析 (MONOVA) にて行った (R core team, 2016)。

4-2-3. SEM による観察

精子の形態と卵巣内の卵母細胞を SEM にて観察するため、カバーグラス上に 26G ニードルを用いて展開した。1% OsO₄/0.1 M Na-cacodylate buffer (pH 7.2) で 45 分固定後、100% Ethanol に置換、乾燥させた (Rebecchi & Guidi, 1991)。卵母細胞観察には交尾後のメスを用いた。

産卵後の卵は 100% Ethanol に 3 時間浸透後、tertiary-butyl alcohol に一晚置換し、JFD-320 (JOEL) を用いて凍結乾燥させた。

全ての SEM 用サンプルはアルミニウム試料台に乗せ、スパッターコーティング後、JSM6510 (JOEL) にて観察した。

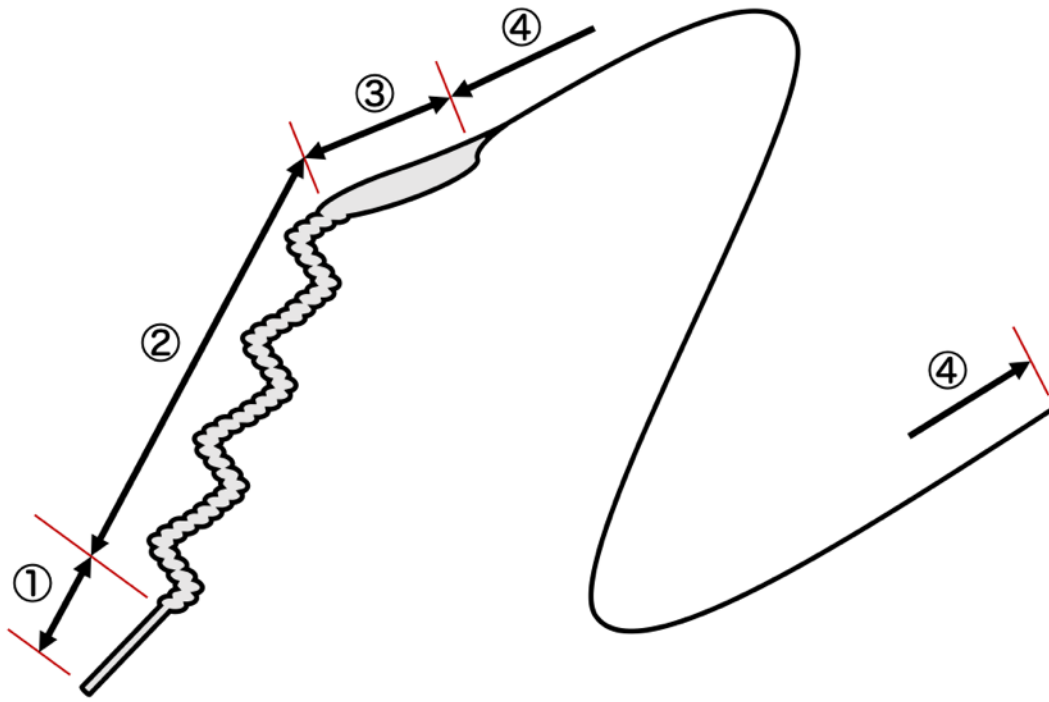


Fig. 4-2-2-1. 精子形態の計測箇所

①先体; ②核; ③中片; ④尾部 (Rebecchi, 1997)。

4-3. 結果

4-3-1. 精巣内精子の形態

用いた両種とも精子は尾部、中片、コイル上の核、先体にて構成されていた (Fig. 4-3-1-1)。中片は *Paramacrobrotus* sp. で腎臓状 (Fig. 4-3-1-1A, A')、*M. shonaicus* は棒状だった (Fig. 4-3-1-1B)。

各部位の長さには種間で有意な差があった (Fig. 4-3-1-2A, MANOVA、 $p < 2.2e-16$)。特に先体の長さが大きく異なっており、平均して *Paramacrobrotus* sp. で $37.6 \mu\text{m}$ だったのに対し、*M. shonaicus* では $1.5 \mu\text{m}$ だった (Table 4-3-1-1)。

Table 4-3-1-1. 精子の各部位の長さ

(μm)	<i>Paramacrobrotus</i> sp.				<i>M. shonaicus</i>			
	最短	最長	平均	分散	最短	最長	平均	分散
尾部	13.0	29.4	19.3	4.2	9.4	24.2	15.8	3.3
中片	1.5	6.6	3.7	1.1	1.1	3.6	2.3	0.6
核	13.2	35.0	21.4	4.3	6.2	18.2	10.8	2.5
先体	24.5	52.6	38.5	6.7	0.6	2.9	1.6	0.5

4-3-2. 貯精嚢内精子の形態

メス体内、貯精嚢内精子は両種で尾部が $5 \mu\text{m}$ ほどに短縮化していた。他の部位は精巣内精子と差異はなかった (Fig. 4-3-2-1)。

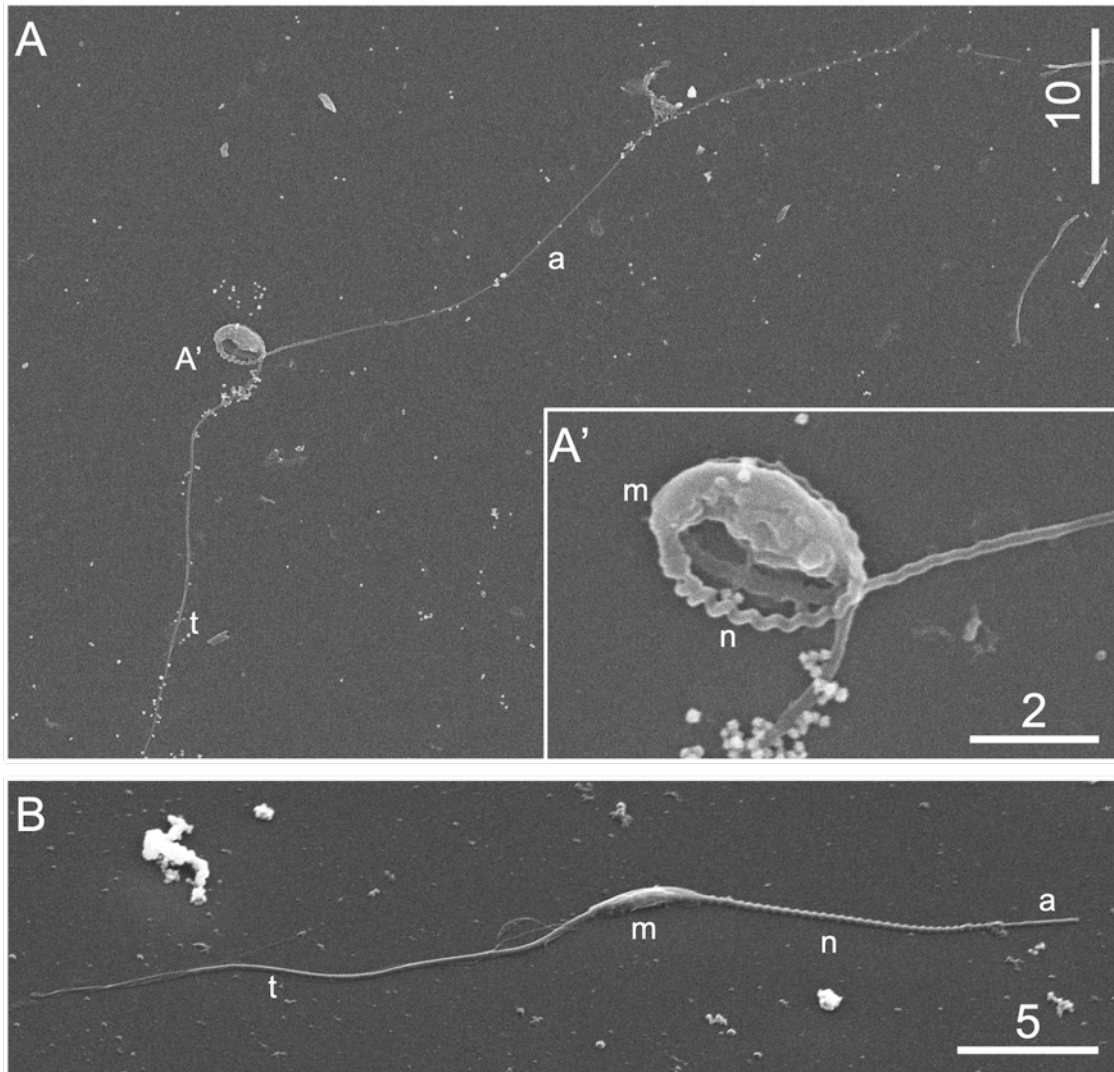


Fig. 4-3-1-1. 精子の SEM 像

Paramacrobotus sp. (A) と *M. shonaicus* (B) の SEM 像。A'は A の拡大図。t: 尾部、m: 中片、n: 核、a: 先体。Scale bars: (A) = 10 μ m、(B) = 2 μ m、(C) = 5 μ m。

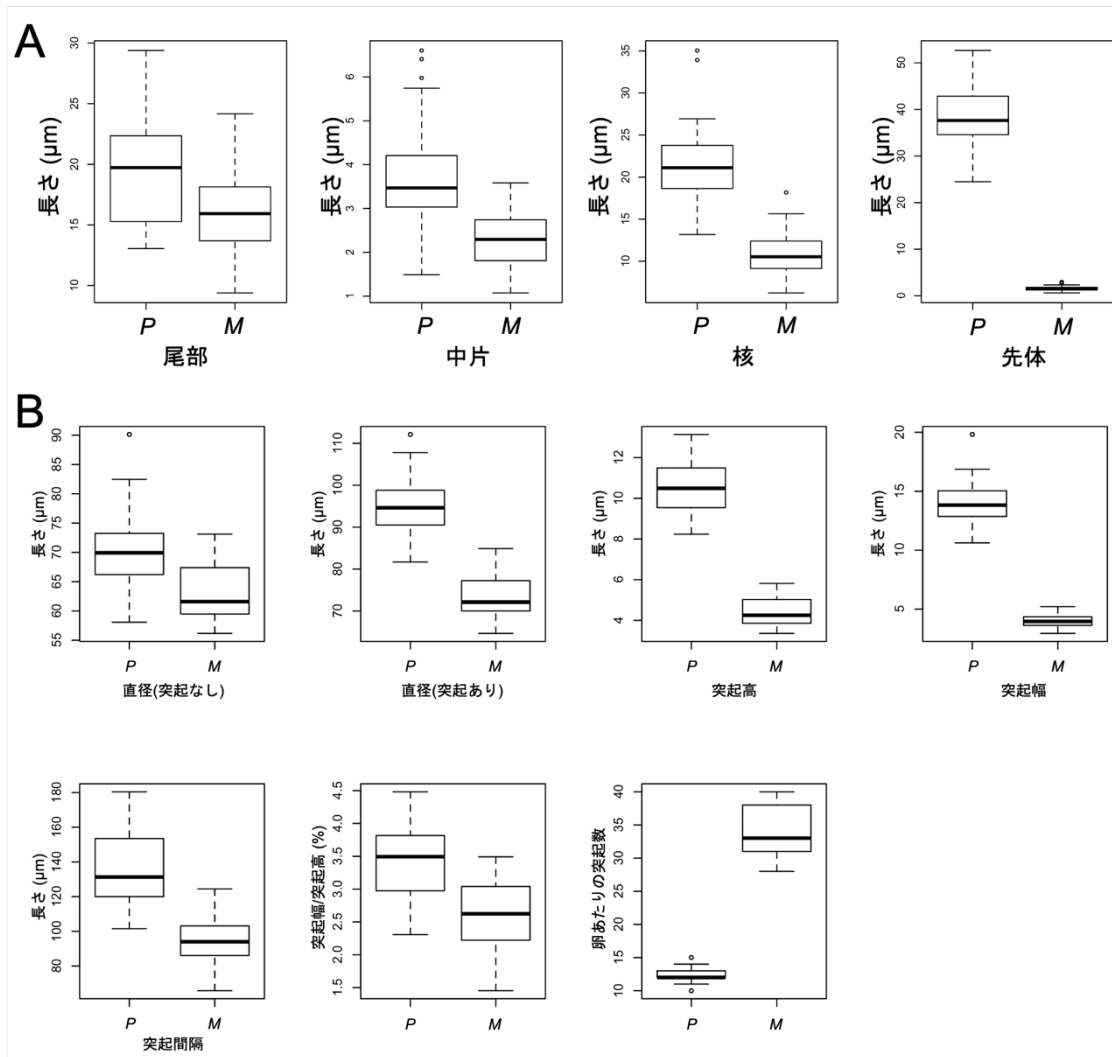


Fig. 4-3-1-2. 精子と卵の形態比較

精子 (A) と卵 (B) の計測部位ごとの形態比較。P: *Paramacrobiotus* sp.、M: *M. shonaicus*。

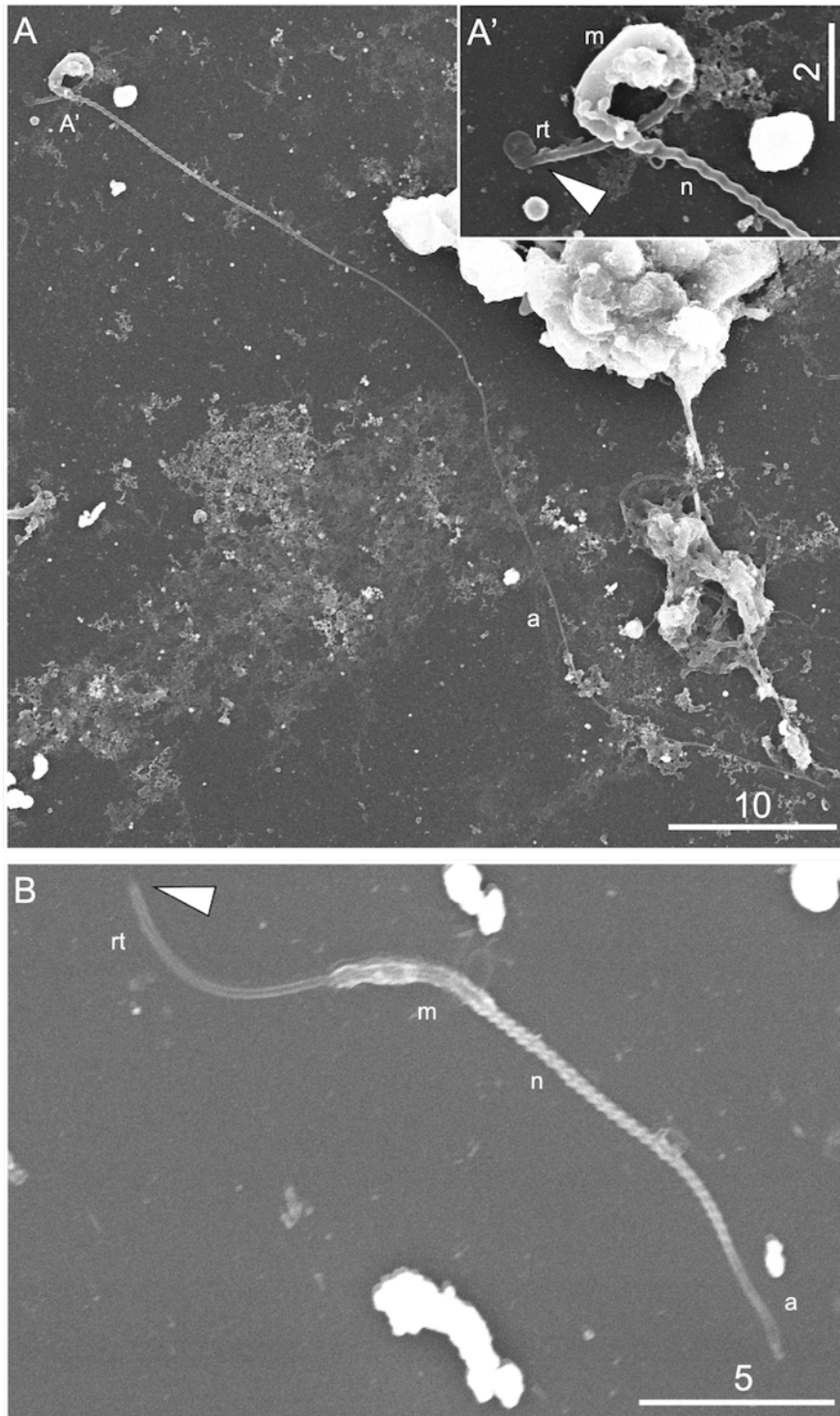


Fig. 4-3-2-1. 貯精囊内の精子 SEM 像

Paramacrobiotus sp. (A) と *M. shonaicus* (B) の貯精囊内精子。尾部の短縮化が起きている(矢尻)。A'はAの拡大図。rt: 短縮された尾部、m: 中片、n: 核、a: 先体。

Scale bars: (A) = 10 μm、(A') = 2 μm、(B) = 5 μm。

4-3-3. 卵母細胞と卵の SEM 観察

卵母細胞は兩種で未発達な卵殻突起を有していた。22 個の *Paramacrobiotus* sp.、20 個の *M. shonaicus* の卵を観察し、精子の付着は観察できなかった (Fig. 4-3-3-1)。

産後 5 分以内において、*Paramacrobiotus* sp. で 44% (8/18)、*M. shonaicus* で 40% (6/15) の卵表面に精子が付着しているものが見つかった (Fig. 4-3-3-2, 3)。付着した精子は尾部が短縮化しており、貯精囊内の精子と同じ形態で、卵表面の突起に接着していた (Fig. 4-3-3-2B, C, 3B, C)。先体の先端は卵突起間の卵殻表面部に進入していた (Fig. 4-3-3-2D, 3D)。

産卵後 1 日以上経過した卵の表面に精子が見られなかった (Fig. 4-3-3-4, $n > 14$)。また卵形態測定による MANOVA では、2 種間の卵形態に有意な差が見られた (Fig. 4-3-1-2B, $p < 2.2e-16$)。

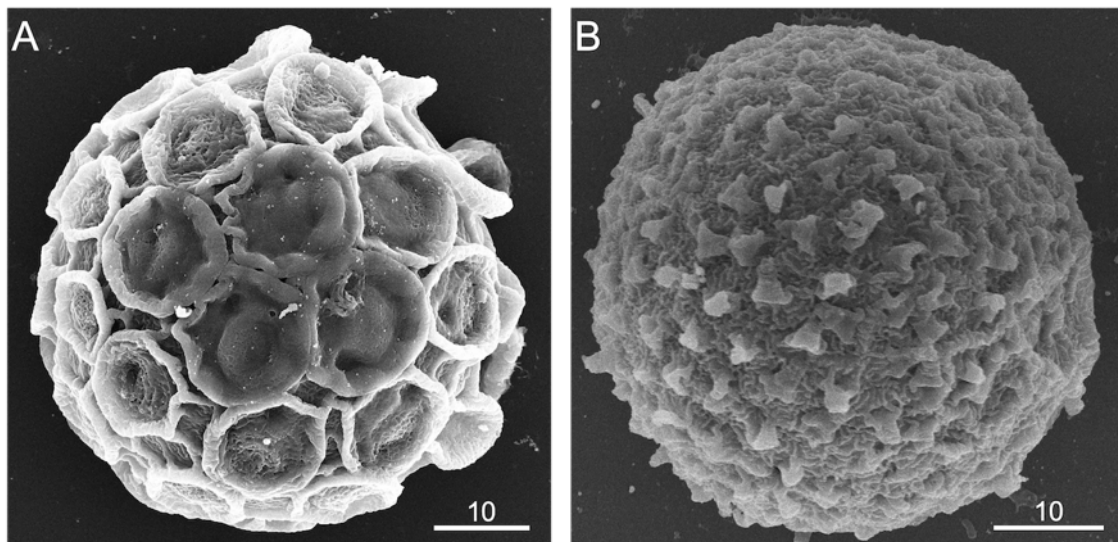


Fig. 4-3-3-1. 卵母細胞の SEM 像

Paramacrobiotus sp. (A) と *M. shonaicus* (B) の卵母細胞。

Scale bar: = 10 μm 。

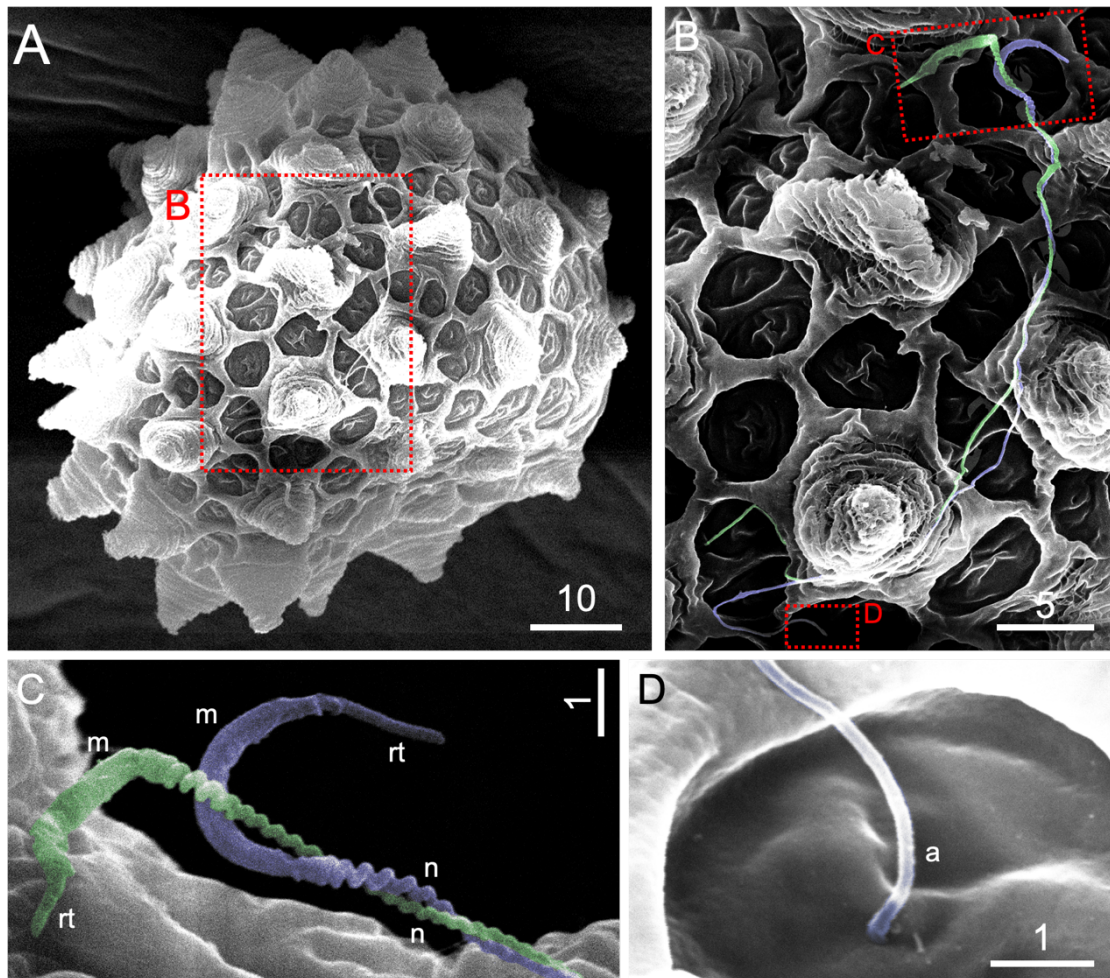


Fig. 4-3-3-2. *Paramacrobiotus* sp.の産卵直後の卵

Paramacrobiotus sp.の産卵直後の卵 (A)。表面に精子が付着しており (A, B)、貯精囊内精子と同様に尾部短縮化が起きている (C)。先体の先端は卵殻内部に進入している (D)。BはAの、C、DはBの拡大図。青と緑は個々の精子を示す。rt: 短縮された尾部、m: 中片、n: 核、a: 先体。

Scale bars: (A) = 10 μm 、(B) = 5 μm 、(C, D) = 1 μm 。

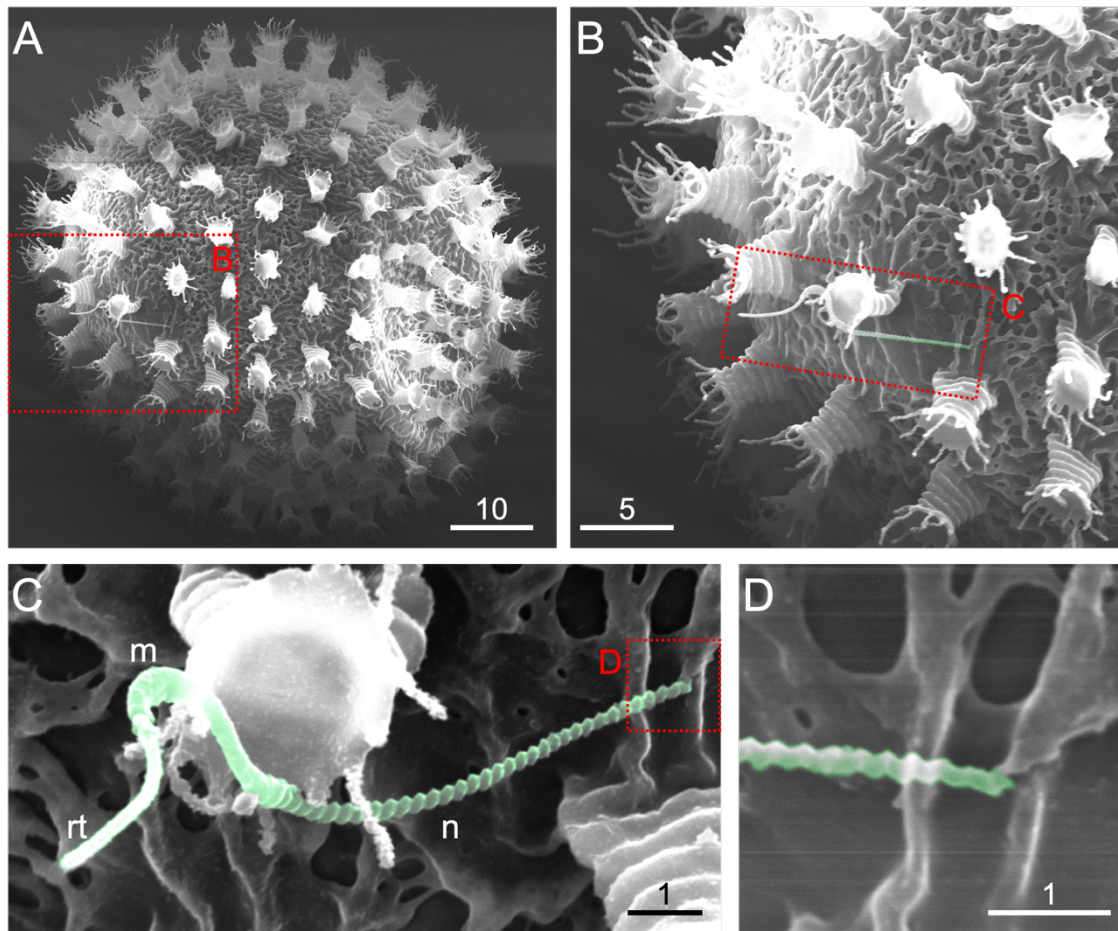


Fig. 4-3-3-3. *Macrobiotus shonaicus* の産卵直後の卵

Macrobiotus shonaicus の産卵直後の卵 (A)。表面に精子が付着しており (A, B)、貯精囊内精子と同様に尾部短縮化が起きている (C)。先体の先端は卵殻内部に進入している (D)。B は A の、C は B の、D は C の拡大図。緑で精子を示す。rt: 短縮された尾部、m: 中片、n: 核、a: 先体。

Scale bars: (A) = 10 μm、(B) = 5 μm、(C, D) = 1 μm。

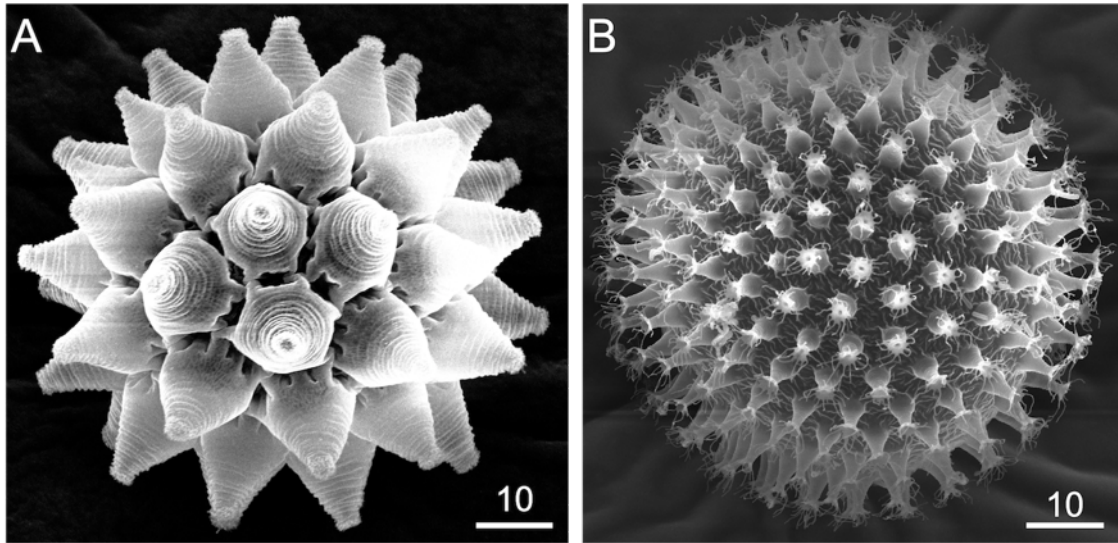


Fig. 4-3-3-4. *Paramacrobotus* sp., *M. shonaicus* の卵

産卵後 1 日以上が経過した *Paramacrobotus* sp. (A) と *M. shonaicus* (B) の卵。

Scale bars: (A, B) = 10 μm 。

4-4. 考察

チョウメイムシ科の卵殻突起の形態は種判別に用いられるため、その形態情報は充実している (Kaczmarek & Michalczyk, 2017)。そのうち精子の形態も明らかにされている種について、分子系統樹に従って Fig. 4-4-1 に示した。精子、卵ともに記載されているおおよその形状は、ほぼ属内で保存されている。*Paramacrobotus*、*Diaforobotus* 属では先体が長いのに対し、*Macrobotus*、*Xerobotus*、*Mesobotus* 属では先体が短い (Rebecchi & Guil, 1991; Guidi & Rebecchi, 1996; Rebecchi, 1997; 2001; Rebecchi et al., 2011; Bertolani et al., 2014)。本章で用いた *Paramacrobotus* sp.、*M. shonaicus* も先行研究と同様に先体の長短が観察でき (Fig. 4-3-1-1, 2)、これらの形態は属内で保存されているものと考えられる。またそれぞれの長さの精子は、進化の過程で獲得し、淘汰に勝ち抜いてきた性質であると考えられることから、生殖プロセスにおいて有益な機能を保持しているものと考えられる。以下では生殖プロセス中での精子と卵の形態の関係について、2つの仮説を示す。本研究ではクマムシの精子と卵が先体を介して結合している様子を初めて撮影することに成功した (Fig. 4-3-3-2, 3)。先体は卵突起間の卵殻表面部に刺さっており、精子のその他の部位は卵突起に接着していた。卵巣内の卵母細胞、また産卵直後の卵の表面の突起は、産卵後1日以上経過したものより未発達であり (Fig. 4-3-3-1, 4)、産卵後に時間をかけて発達していくものと考えられる。第一の仮説は、産卵後の精子が卵突起に接触した状態で卵突起の膨張が起きるために、精子の長短が進化的に変動するという仮説である。産卵後に突起の突出によって精子が持ち上げられることが予想され、先体での卵殻への接着や結合が物理的に阻害される可能性がある。有性生殖における極めて重要な現象である両配偶子の結合に対する阻害は、その種の存続をも脅かしかねない。そこで、属レベルで形態が大きく異なる卵突起に対し、より配偶子の結合が効率よく行われる精子の形態を獲得するという共進化の結果、主に先体の長短により精子の長さが異なるクマムシが生き残ってきたと考え

られる。一方で第二の仮説は、貯精囊に蓄えられた精子が卵に絡まって産卵に至ると
いう仮説である。現在までの知見では精子と卵の接触のタイミングは明らかでない
が、卵巢と総排泄孔の間に貯精囊が付随していることから (Fig. 2-1-1)、輸卵管を移動
する卵に貯精囊内の精子が付着して産卵に至る可能性がある。その場合、総排泄孔か
ら産卵される際に精子が解離しないようにする必要があり、そのために卵突起は未発
達ながらも精子が絡まるように、精子の長さが共進化してきたと考えられる。

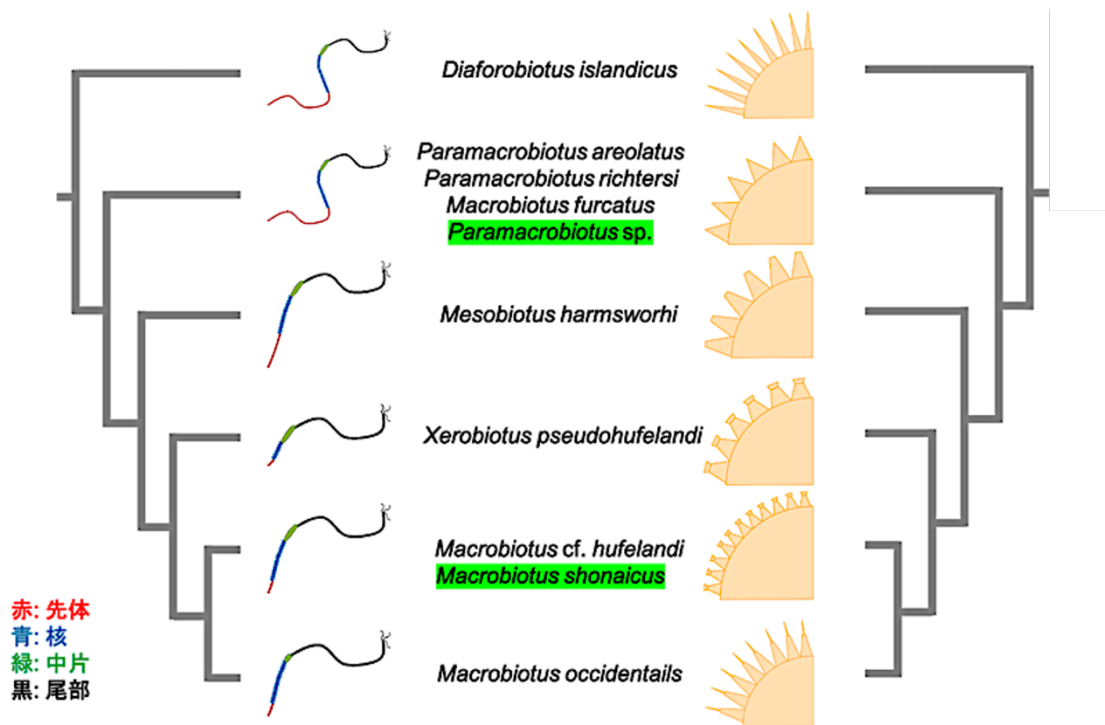


Figure 4-4-1. チョウメイムシ科の配偶子の形態とその系統関係

チョウメイムシ科のクマムシで精子と卵の形態が記載されている種を、Bertolani らに
よって作成された系統樹に従って列挙した (Bertolani et al., 2014)。本研究で使用した 2
種は緑色で示す。図左側が精子、右側が卵の形態の概略図。精子の形態は赤: 先体、
青: 核、緑: 中片、黒: 尾部と色分けした。

用いた2種では、精子の尾部は水中を遊泳するために用いられるが、その後貯精嚢内に蓄えられ受精に至るまでは不必要であると考えられる。また容量の限りある貯精嚢を効率良く使用するため、交尾後には精子尾部の短縮化が起きるものと考えられる (Fig. 4-3-2-1)。同現象はチョウメイムシ科の *X. pseudohufelandi* にて観察されており (Rebecchi, 1997)、チョウメイムシ科の3属で観察できたことから、科内で保存された現象であることが示唆された。

精子の形態と機能に関して分かっていることは少ないが、精子の形態差をもたらす要因は生殖様式や、卵と受精するために複数の精子が競合する現象である精子競争への適応と言われている (Jamieson, 1987; Pizzari & Birkhead, 2002)。多くの Muridae (ネズミ科) の精子では、精子の先端がフック状になっていることが報告されている (Immler et al., 2007)。Immler らは、種間での先端のフック構造の曲率と精巣の大きさを比較し、精巣が大きいほどフックの曲率が大きく、長くなる傾向にあることを見出した。精巣が大きいということは、多量の精子が産生されることと同義であり、精子競争が盛んになるが、ネズミにおけるフック構造の形態差異は精子競争への一般的な適応であると示唆された。加えてフック状の構造によって他の精子と絡まりあうことで精子群が形成され、単体よりも遊泳速度が早くなることが明らかにし、精子が協調している可能性を示唆した (Immler et al., 2007)。また種内で複数の精子を産生する生物も知られており、カイコガ *Bombyx mori* Linnaeus, 1758 では核を持つ有核精子と核を持たない無核精子が産生される (Sakai et al., 2019)。古くから無核精子の機能について考察がなされ、メス貯精嚢に蓄えられる際に、他個体との精子競争に勝ち抜くために存在していると考えられてきた。Sakai らは *Sex-lethal* のノックアウトにより無核精子の産生を阻害し、有核精子のみを持つオスを作成した。有核精子のみを持つオスと、メスの交配から受精卵が得られなかったことから、無核精子には精子競争ではない新たな機能があることが明らかにされた (Sakai et al., 2019)。本研究では *Paramacrobiotus* sp. の

精子は長く、それに比べて *M. shonaicus* の精子は短いことを見出した。種ごとに形態の異なる精子は、遊泳時やメス総排泄孔から体内へ移動する時、また卵殻に付着する際に精子群を形成し、交尾から受精までのプロセスを効率良く行わせる機能がある可能性がある。精子競争という面では、長く体積の大きい精子はメス貯精嚢内の容積を圧迫し、他個体間との精子競争を優位に進めることができると考えられる。一方で体積の小さい精子は大きいものより多く産生できると考えられ、その量でメス貯精嚢を圧迫でき得る。しかしながら、精子の尾部が短縮化する現象は貯精嚢内で多くの精子を貯蔵するためであるとも考えられるため、精子の体積を大きくして貯精嚢を圧迫するように適応したということは考えにくい。

Guidetti らは *Paramacrobrotus spatialis* Guidetti et al., 2019 で卵の表面に精子が付着していることを見出したが (Guidetti et al., 2019)、その精子の形態や状態は定かではなかった。本研究より、産卵後の卵に付着した精子が尾部を短縮化されていたことから、貯精嚢から排出された精子であると考えられる (Fig. 4-3-3-2, 3)。また先体の先端が卵殻に埋もれていたことから、先体反応のために卵殻に突き刺さっている状態であることも示唆された。卵殻に卵門のような構造は見受けられず、硬い卵殻を貫通させるためのメカニズムが存在すると考えられる。多くの生物で受精の際、卵に最初に結合する部位は先体で、先体の接触によって先体反応が起きる。クマムシの先体内部にも先体反応に必要な分泌物が含まれていると考えられ、それらが卵殻の貫通、並びに受精の開始を卵に伝達している可能性があり、今後の解明が求められる。

現在は、チョウメイムシ科の別属、*Mesobrotus* を用いて、交尾行動の多様性と配偶子形態の観察を進めている。*Mesobrotus* sp. は 2018 年に静岡県下田市にて採取、雌雄 1 組から系統化した自由産卵型有性生殖種である。*Macrobrotus shonaicus* と同様に、染色体数は $n=6$ で、貯精嚢があり、産卵後も減数第一分裂が進行していない (Fig. 4-4-2)。交尾行動は *Paramacrobrotus* sp. や *M. shonaicus* と同様に 5 ステップで後生されており、

射精時のメスの尾部の反り上げは観察できなかった。*Mesobiotus sp.*は他の2種と異なり、ステップ2から4の接触、停止、射精を1回の交尾で2回以上、平均で3回繰り返した (n=8)。またその射精時におけるメスとオス間の距離、射精継続時間を初回の射精、2回目以降、最後の射精に分けて測定すると、Fig. 4-4-3のように、初回の射精では雌雄間の距離が遠く、また射精時間も短いこと、一方で最後の射精では雌雄間の距離が近くなり、射精時間も延長することが明らかとなった (Fig. 4-4-3, n=27, ANOVAにて検定)。メスがオスの射精中に動き出しその場を離れた際は、射精された精子が射精開始時にメスの総排泄孔のあった場所に向けて遊泳し、凝集することも観察できた (Fig. 4-4-4, n=1)。精子は先体、核、中片、尾部で構成され、核はねじまき状、また *Paramacrobiotus sp.*や *M. shonaicus* と比較して中片が長い傾向に見られた (Fig. 4-4-5A)。産卵直後の卵殻表面には精子が付着しており (Fig. 4-4-5B, B')、卵は円錐状の突起の先端に細く伸びた組織を有していた (Fig. 4-4-5C, C')。卵突起の形状や大きさは極めて多様で、先端の形状が太く長い、細く短い、太く短い、細く長い4パターンが観察できた。本研究で使用した *Paramacrobiotus sp.*と *M. shonaicus* をモデルとして *Mesobiotus sp.*で行ったように比較を行なっていくことで、チョウメイムシ科内、またクマムシ全体にまで範囲を広げて、生殖に関わる形態、動態の多様性を明らかにしていくことが期待される。

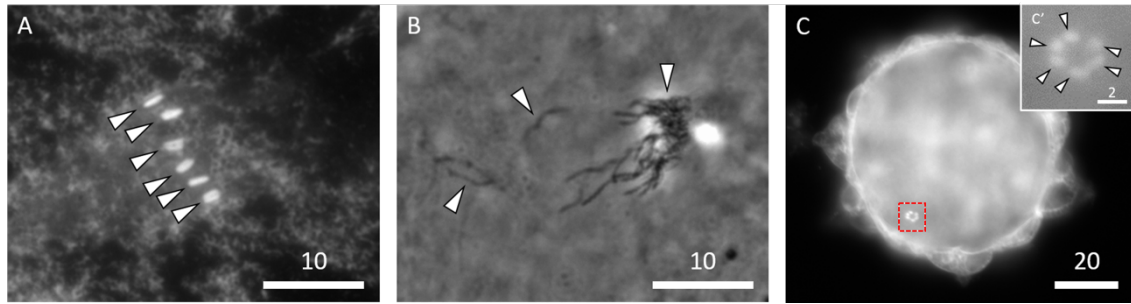


Fig. 4-4-2. *Mesobiotus* sp.の染色体と貯精嚢、産卵後の卵

Mesobiotus sp.の卵母細胞の染色体と (A, 矢尻)、貯精嚢 (B, 矢尻は精子を示す)。産卵直後の卵では卵の核が観察でき (C)、減数第一分裂で停止している (C', 矢尻)。C'はCの赤点線内を拡大した図。

Scale bars: (A, B) = 10 μm 、(C) = 20 μm 、(C') = 2 μm 。

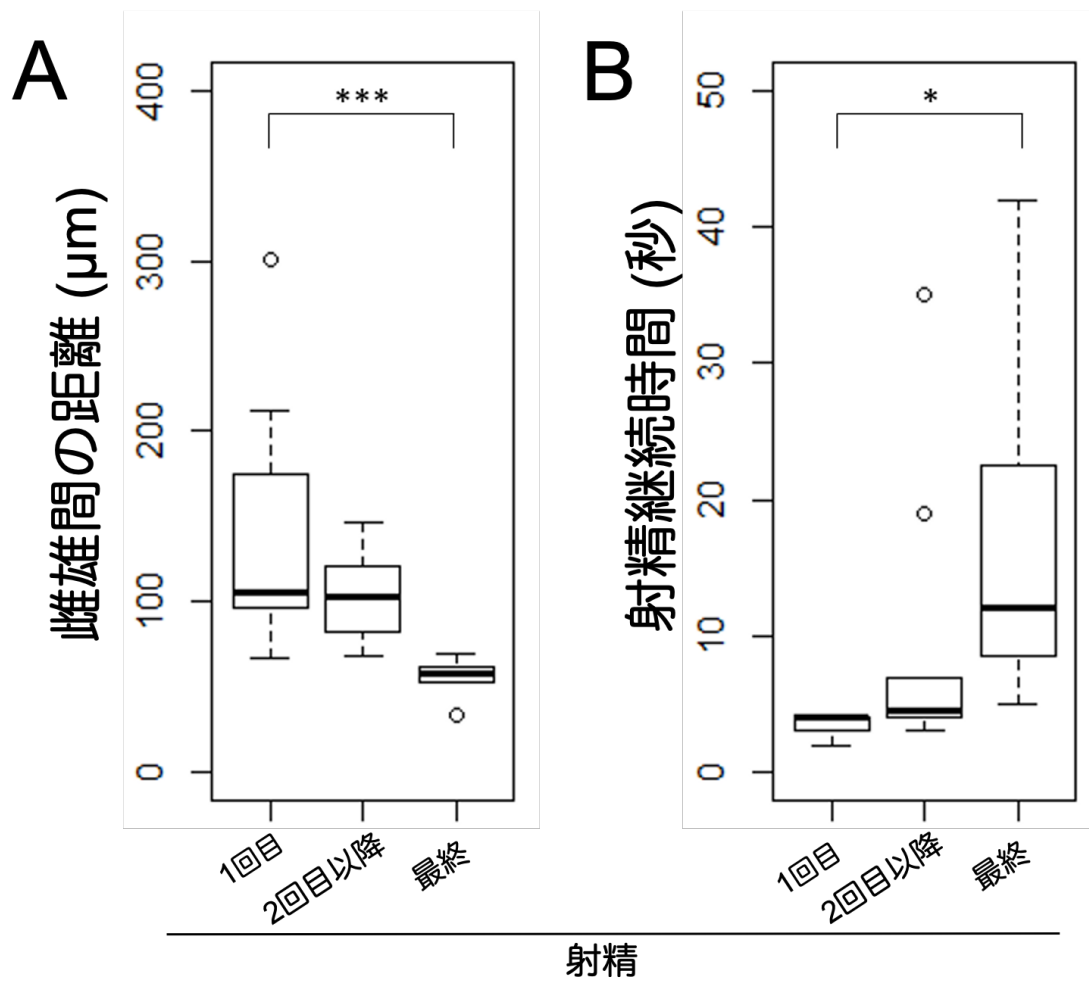


Fig. 4-4-3. *Mesobiotus* sp.の射精距離と継続時間

Mesobiotus sp.のオスが射精した際の雌雄間距離 (A) と射精継続時間 (B)。

アスタリスクは有意差を示す。***: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ (ANOVA)。

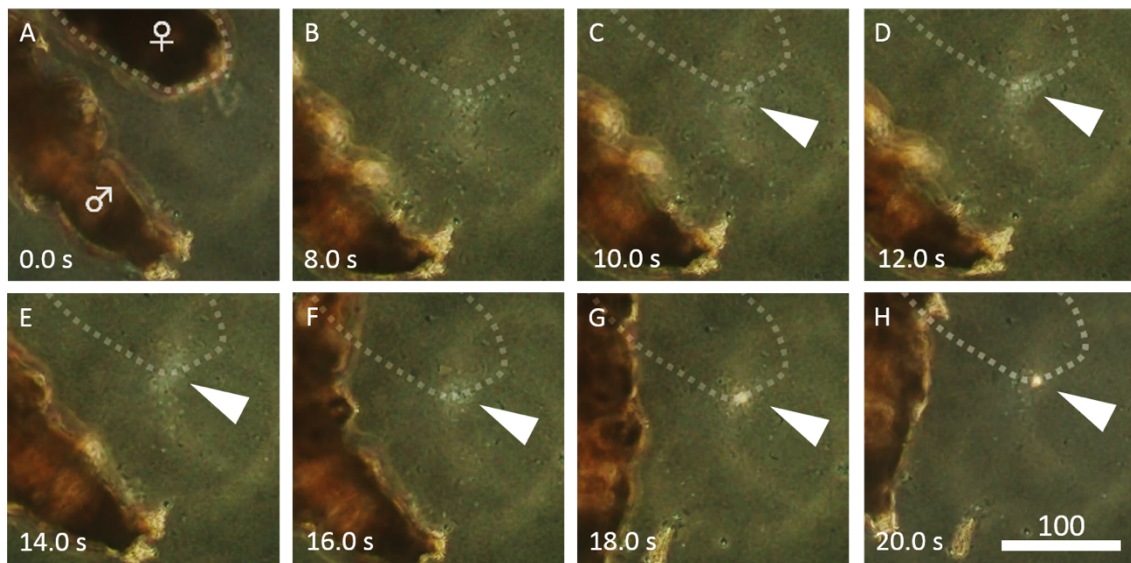


Fig. 4-4-4. *Mesobiotus* sp.オスの射精と精子の凝集

オス射精を開始した際にメスの総排泄孔があった場所に精子が凝集する様子。Aは射精開始時、B-Hは8秒後から2秒毎の写真。白点線でメスがいた場所、矢尻で精子の凝集を示す。

Scale bar: 100 μm 。

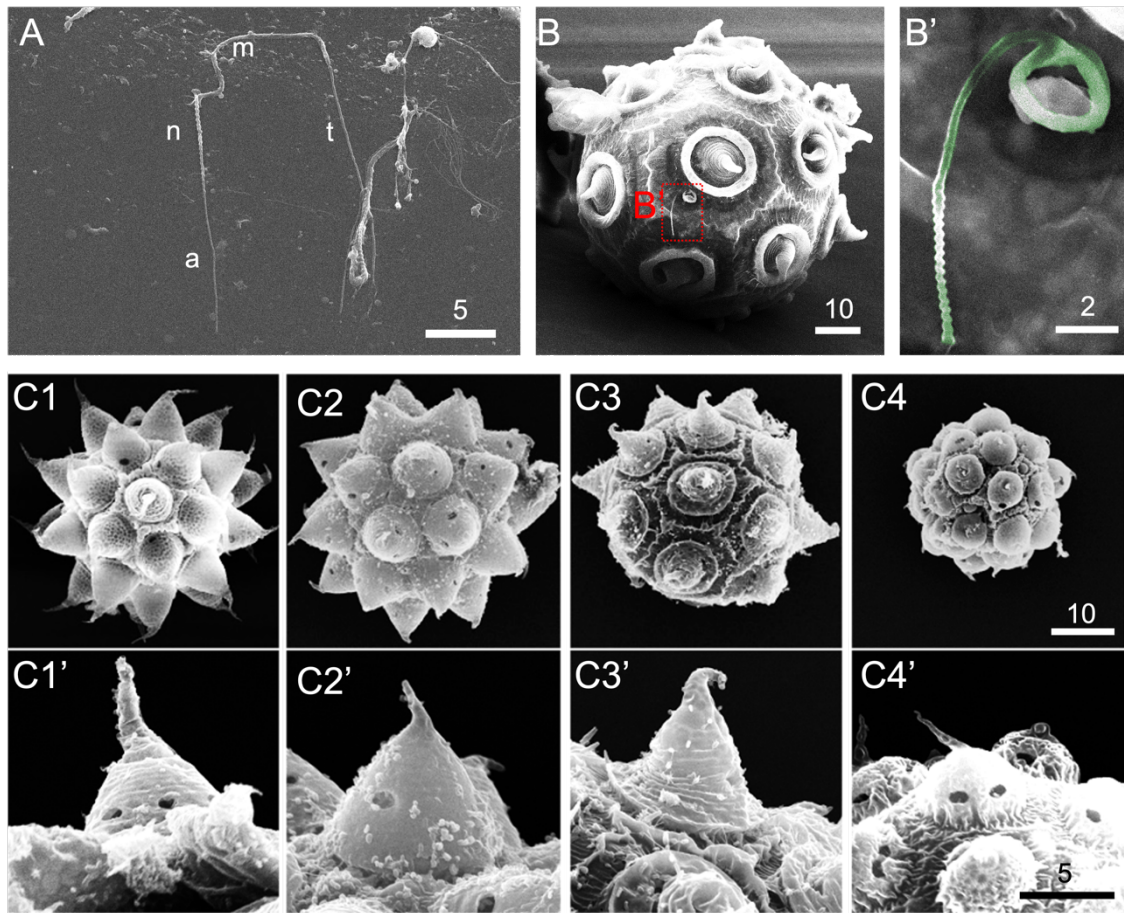


Fig. 4-4-5. *Mesobiotus* sp.の配偶子

Mesobiotus sp.の精子 (A)、産卵直後の卵 (C) とそれに付着した精子の拡大図 (B', 緑で精子を示す)。A のアルファベットはそれぞれ a: 先体、n: 核、m: 中片、t: 尾部を示す。B' は B の赤点線の拡大図。C1-4 は産卵後数日経過した卵で、C1'-4' はそれぞれの卵突起の拡大図。

Scale bars: (A) = 5 μ m、(B) = 5 μ m、(B') = 2 μ m、(C) = 10 μ m、(C') = 5 μ m。

4-5. 結言

本章では2種のクマムシ、*Paramacrobiotus* sp.と *M. shonaicus* において配偶子の形態観察を行い、精子の形態、卵の形態が2種間で大きく異なることを明らかにした。用いた *Paramacrobiotus* sp.、*M. shonaicus* の両配偶子形態の大まかな特徴は、それぞれの同属近縁種と似ており、属内で保存された形態であることを示唆した。

貯精嚢に蓄積した精子は鞭毛が消失しており、これはチョウメイムシ科内で保存された性質であると示唆された。また、この脱鞭毛した精子が先体を介して卵と結合している様子を初めて撮影することに成功した。結合した精子と卵突起の位置的關係から、受精効率を向上させるために精子の形態に共進化が起きてきたことを示唆した。本研究によりクマムシのより詳細な生殖プロセスに加え、配偶子の形態と挙動について、進化的保存性に関する知見を得ることができた。

第5章 結論

第2章では *Paramacrobiotus* sp.、*M. shonaicus* を用いて、有性生殖を行う自由産卵種において初めてとなる交尾行動の詳細な記載を行った。交尾行動は[1]追尾、[2]接触、[3]行動停止、[4]射精、[5]緊縮の5ステップで構成され、2種の間では[3]行動停止、[4]射精中に、*Paramacrobiotus* sp.のメスは下腹部を地面から浮かせるような格好で行動を停止するが、*M. shonaicus* のメスは下腹部を反り返している差異が見られた。種間による交尾行動の差異は生殖隔離をもたらす要因のひとつと考えられており、今後同属他種、同科他属のクマムシの交尾行動の記録を蓄積、比較することで、種を分かつ特異的な行動とその多様性を明らかにできると期待できる。また *I. dastychi* にて示唆されている性フェロモンの存在が (Bartel & Hohberg, 2020)、本研究で用いた2種でも示唆された。性フェロモンの構造差異は、交尾の誘発の有無を左右することから生殖隔離の要因の一つとなる。本研究で用いた *Paramacrobiotus* sp.、*M. shonaicus* においてはすでに、この両種の異性同士は交尾に至らないこと、性フェロモンと考えられる物質の分子量が異なることが示唆されており (渡辺, 2020; 竹内, 2020)、これは近縁な属間でさえも分子構造が異なることを示している。性フェロモンの単離、構造決定を行い、さらに同属内の複数種とその構造を比較することで、生殖隔離を引き起こす要因である異性誘引物質の種差にアプローチできる。また *I. dastychi* を始めとして、他科のクマムシと性フェロモンの構造を比較すること、加えてそのフェロモンを受容する受容体の分化を明らかにすることで、緩歩動物門全体の進化的背景を考察できると期待される。

[4]射精では脱皮殻産卵種 *I. dastychi* と同様に (Bingemer et al., 2016)、オスの総排泄孔から放出された精子が水中を遊泳していた。脱皮殻産卵種では産卵された卵に対して射精を行うのに対し、自由産卵種では精子に水中を遊泳させてメス体内へ向かわせることが初めて明らかとなった。生殖行動の成否の肝となる雌雄配偶子の出会いに対

し、外生殖器を持たないクマムシは、精子を遊泳させることで解決を図っていることが分かった。また本研究により、極めて自然環境に近い状態の射精された精子の運動を顕微鏡下で観察できることを見出した。スーパースローカメラ等を用いることで精子の挙動を詳細に明らかにし、精子の遊泳パターンをトレースすることで精子遊泳の走化性や方向性、遊泳自体の運動性を明らかにできると考えられる。

雌雄配偶子の核の挙動より、産卵後も受精は完了しておらず、減数第二分裂は体外で進行することを示唆した。メス体内の卵巣と貯精嚢の位置関係から体内受精を行うと考えられてが、受精のタイミングについて新たな知見をもたらした。ライブイメージングを用いてより詳細な受精のタイミング、また減数分裂の進行を追うことが今後の課題である。

2種を用いて交尾後の産卵まで、また孵化までの時間計測を行い、生殖プロセスのタイムスパンを明らかにした。産卵までの卵、精子の挙動や、発生過程の動態を調査する上で重要な知見となると考えられる。また2種間では性比が異なっていた。クマムシにおける性決定様式は未だ解明されていないが、雌雄それぞれのゲノム解読により染色体依存である可能性を検証することができると考えられる。一方で環境依存型の節足動物を参考にしたホルモン様物質の投与により性比が変動していることから、環境依存型の性決定を行っている可能性もある (湊, 2019)。性決定様式の解明は一般的な有性生殖を行うクマムシの雌雄を決定する要因のみならず、単為生殖集団からのオス産生が報告されているクマムシ、*Milnesium inceptum* Morek et al., 2019 でのオス産生メカニズムにも寄与できると考えられる。

第3章では *M. shonaicus* が北海道と沖縄を除く、本州、四国、九州と離島に広く生息していることを、形態情報と分子系統解析によって明らかにした。この結果から *M. shonaicus* は日本国内に広く分布する種であると言える。先行研究にて *M. hufelandi* と

記載されている個体にも *M. shonaicus* が潜在している可能性を示唆し (Suzuki, 2017)、再解析が望まれる。

成体と卵の形態測定結果より、地域ごとに形態に微差が生じていること、また成体の形態多様性と比較して、卵の形態がより多様化していることを明らかにした。このことより進化速度が成体の形態より卵の形態のほうが早いことが示唆された。卵形態の差が群体間で大きくなることは他種のクマムシでも報告されているが (Stec et al., 2016)、一方で雄性配偶子である精子の形態について、群体間での比較を行った報告はなく、今後は両配偶子の形態進化を考察する上で、精子の形態を詳細に記載することが重要であると考えられる。

染色体数は *M. shonaicus* の全ての群体間で一致し、 $n=6$ だった。また交尾行動も地域差がなく、*M. shonaicus* 内では少なくともタイプ系統と各群体間では交尾行動の差異による生殖隔離は起きていないと示唆された。生殖隔離の有無を証明するため、処女メスを用いた交配実験を行う必要がある。日本での *M. hufelandi* の生息の真偽は疑わしいが、報告されている *Macrobotus* 属のクマムシを採取できれば、生殖隔離と地理的分離の関係性を検証することができ、クマムシの進化的背景の知見を蓄積できると期待される。

第4章では2種のクマムシ、*Paramacrobotus* sp.と *M. shonaicus* において配偶子の形態観察を行い、精子の形態が種間で大きく異なることを明らかにした。卵の形態差も外見的に明らかであり、配偶子の形態に共進化が起きている可能性が示唆される。一方でその進化の要因、また形態の有意性は未解明である。この解明のためには、配偶子の重要な役割である受精における有意性と、産卵後の自然環境中における発生への影響を合わせて考察する必要があり、今後の課題である。

貯精嚢に蓄積した精子は鞭毛が消失しており、これはチョウメイムシ科内で保存された性質であると示唆された (Rebecchi, 1997)。この脱鞭毛のメカニズムは明らかにな

っていないが、小さい貯精囊を持つクマムシにとって、そのスペースを十分に使用するために進化の過程で獲得した現象であると考えられる。

卵と最初に結合する部位である先体の長さは、種間で大きく異なっていた。またクマムシにおいて、先体と卵が結合している様子を初めて撮影することに成功した。生命の始まりである受精において、特にその第一段階である先体反応のメカニズムを明らかにすること、またその反応に関わる先体の形態進化の背景は、クマムシの種としての存続に大きく関わる要因として、今後も探究が望まれる。

最も種数の多い動物分類群は節足動物門で、約 130 万種が記載されている (Zhong, 2013)。節足動物門は脱皮を行うことで成長する生物で、他の脱皮を行う動物とともに上記の分類階級とは別に脱皮動物群に分類される。脱皮動物群は線形動物門、類線形動物門、緩歩動物門、有爪動物門、動吻動物門、鰓曳動物門、胴甲動物門によって構成され、線形動物は 5 番目、緩歩動物は 13 番目に種数の多い動物門である (Zhong, 2013)。既知の生物の約 84%が脱皮動物に含まれることから、現存する動物の中で脱皮動物が最も繁栄した生物とも解釈できる。脱皮動物の中で 3 番目に種数の多い緩歩動物門クマムシの、繁栄と進化を支える生殖生物学的知見は非常に興味深い。本研究がその知見拡充の一端を担えるだろう。

参考文献

- Arakawa K, Yoshida Y and Tomita M (2016) Genome sequencing of a single tardigrade *Hypsibius dujardini* individual. *Scientific Data*, 3, 160063.
- Arnold ML (1997) Natural Hybridization and Species Concepts. In: Arnold ML (ed.). *Natural Hybridization and Evolution (Oxford Series in Ecology & Evolution)*. Oxford University Press, New York, US, pp. 11–21.
- Altiero T and Rebecchi L (2003) First evidence of achiasmatic male meiosis in the water bears *Richtersius coronifer* and *Macrobiotus richtersi* (Eutardigrada, Macrobiotidae). *Hereditas* 139: 116–20.
- Altiero T, Guidetti R, Caselli V, Cesari M and Rebecchi L (2011) Ultraviolet radiation tolerance in hydrated and desiccated eutardigrades. *Journal of Zoological Systems and Evolution Research*, 49: 104–110.
- Altiero T, Suzuki AC and Rebecchi L (2018) Reproduction, Development and Life Cycles. In: Shill RO (ed.). *Water Bears: The Biology of Tardigrades, Zoological Monographs 2*. Springer Nature, Basel, Switzerland, pp. 211–247.
- Ayala FJ and Fitch WM (1997) Genetics and the origin of species: An introduction. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 94 (15): 7691–7697.
- Baumann H (1961) Der Lebenslauf von *Hypsibius* (H.) convergens Urbanowicz (Tardigrada). *Zoologischer Anzeiger*, 167: 362–81.
- Bartel S and Hohberg K (2020) Experimental investigations on the partner-finding behaviour of *Isohypsibius dastychi* (Isohypsibiidae: Tardigrada). *Zoological Journal of Linnean Society*, 188 (3): 878–886.

- Bell G (1982) The Paradox of Sexuality. In: Bell G (ed.). *The Masterpiece of Nature: The evolution and Genetics of Sexuality*. University of California Press, Barkley, US, pp. 11–71.
- Bengtsson RO (2003) Genetic variation in organisms with sexual asexual reproduction. *Journal of Evolutionary Biology*, 16 (2): 189–199.
- Bertolani R (1972a) Sex Ratio and Geographic Parthenogenesis in *Macrobiotus* (Tardigrada). *Experientia*, 28: 94.
- Bertolani R (1972b) La partenogenesi nei Tardigradi. *Italian Journal of Zoology*, 39 (4): 577–581.
- Bertolani R (1975) Cytology and Systematics in Tardigrada. *Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia*, 32 Suppl.: 17–35.
- Bertolani R (1979a) Parthenogenesis and cytotaxonomy in Itaquasconinae (Tardigrada). *International Symposium on Tardigrades. Prace Zoologiczne-Zeszyt*, 25: 9–18.
- Bertolani R (1979b) Hermaphroditism in tardigrades. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 1: 67–71.
- Bertolani R (1982) Cytology and reproductive mechanisms in tardigrades. In: Nelson DR (ed.) *Proceedings of 3rd International Symposium on the Tardigrada*, East Tennessee State University Press, Johnson City, Tennessee, pp 93–114.
- Bertolani R and Rebecchi L (1993) A revision of the *Macrobiotus hufelandi* group (Tardigrada, Macrobiotidae), with some observations on the taxonomic characters of eutardigrades. *Zoologica scripta*, 22 (2): 127–152.
- Bertolani R (2001) Evolution of the Reproductive Mechanisms in Tardigrades – A Review. *Zoologischer Anzeiger*, 240: 247–52.

- Bertolani R and Buonagurelli GP (1975) Osservazioni cariologiche sulla partenogenesi meiotica di *Macrobotus dispar* (tardigrada). *Atti della Accademia nazionale dei Lincei. Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali. Rendiconti. Serie ottava*, 8a58: 782–786.
- Bertolani R and Rebecchi L (1999) Tardigrada. In: Knobil E, Neill JD, editors, Tardigrada. in *Encyclopedia of reproduction*, Vol. 4. San Diego: Academic Press, pp 703–17
- Bertolani R, Rebecchi L, Giovannini I and Cesari M (2011) DNA barcoding and integrative taxonomy of *Macrobotus hufelandi* C.A.S. Schultze 1834, the first tardigrade species to be described, and some related species. *Zootaxa*, 2997 (1): 19–36.
- Bertolani R, Guidetti R, Marchiro T, Altiero T, Rebecchi L and Cesari M (2014) Phylogeny of Eutardigrada: New molecular data and their morphological support lead to the identification of new evolutionary lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 76: 110–126.
- Bingemer J, Hohberg K and Schill RO (2016) First detailed observations on tardigrade mating behaviour and some aspects of the life history of *Isohypsibius dastychi* Pilato, Bertolani & Binda 1982 (Tardigrada, Isohypsibiidae). *Zoological Journal of Linnean Society*, 20(1): 49–57.
- Biserov VI, Dudichev AL and Biserova NM (2001) Preliminary data on tardigrades of Lake Biwa (Japan). *Arthropoda Selecta*, 10: 307–310.
- Bull JJ (1985) Sex determining mechanisms: an evolutionary perspective. *Experientia*, 41: 1285–1296.
- Butenandt A, Beekmann R and Hecker E (1961) Über den Sexuallockstoff des Seidenspinners I Der biologische Test und die Isolierung des reinen Sexuallockstoffes Bombykol. *Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiol Chemie*, 324: 71–83.

- Carmel I, Tram U and Heifetz Y (2016) Mating induces developmental changes in the insect female reproductive tract. *Current Opinion in Insect Science*, 13: 106–113.
- Cesari M, Bertolani R, Rebecchi L and Guidetti R (2009) DNA barcoding in Tardigrada: the first case study on *Macrobiotus macrocalix* Bertolani & Rebecchi 1993 (Eutardigrada, Macrobiotidae). *Molecular Ecology Resources*, 9 (3): 699–706.
- Cesari M, Giovanni I, Bertolani R and Rebecchi L (2011) An example of problems associated with DNA barcoding in tardigrades: a novel method for obtaining voucher specimens. *Zootaxa*, 3104: 42–51.
- Clark WC (1978) Hermaphroditism as a reproductive strategy for metazoans; some correlated benefits. *New Zealand Journal of Zoology*, 5 (4): 769–780.
- Clement M, Snell Q, Walker P, Posada D and Crandall K (2002) TCS: Estimating gene genealogies. *16th International Parallel and Distributed Processing Symposium. International Proceedings*, 2: 184.
- Coyne JA and Orr HA (2004) Allopatric and Parapatric Speciation. In: Coyne JA and Orr HA (eds.). *Speciation*, Sinauer Associate, Inc, Massachusetts, US, pp. 83–123.
- Crow JF (1994) Advantages of sexual reproduction. *Developmental Genetics*, 15 (3): 205–213.
- Doyère LMF (1840) Memoire sur les Tardigrades. I. *Annales des Sciences Naturelles, Paris, Series 2*, 14: 269–362.
- Degma P, Bertolani R, Guidetti R (2020) Actual checklist of Tardigrada species (2009– 2020, 37th Edition: 03-07-2020). Available at <https://iris.unimore.it/retrieve/269514/Actual%20checklist%20of%20Tardigrada%2037th%20Edition%2003-07-20.pdf?fbclid=IwAR3nxwJdmL4eaReo3DCrnZEWmzXe8E4zjOPXeO3MxUnFaLt8PtfUX83OFDY> accessed 6 July 2020.

- Endler JA (1977) Parapatric speciation. In: Endler JA (ed.). *Geographic Variation, Speciation and Clines*. Princeton University Press, New Jersey, US, pp. 142–152.
- Ferveur JF (2010) Drosophila Female Courtship and Mating Behaviors: Sensory Signals, Gene, Neural Structures and Evolution. *Current Opinion in Neurobiology*, 20 (6): 764–769.
- Ferris PJ, Pavlovic C, Fabry S and Goodenough (1997) Rapid evolution of sex-related genes in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 94: 8634–8639.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R and Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294–99.
- Goeze, JAE (1773) Über den kleinen Wasserbär. In: Bonnet, K. (Ed.), *Abhandlungen aus der Insektologie, Halle*, pp. 367–375.
- Guidetti R, Gandolfi A, Rossi V and Bertolani R (2005) Phylogenetic analysis of Macrobiotidae (Eutardigrada, Parachela): a combined morphological and molecular approach. *Zoologica Scripta*, 34: 235–244.
- Gross V, Minich I and Mayer G (2017) External morphogenesis of the tardigrade *Hypsibius dujardini* as revealed by scanning electron microscopy. *Journal of Morphology*, 1–11.
- Guidetti R, Peluffo JR, Rocha AM, Cesari M and Moly de Peluffo MC (2013) The morphological and molecular analyses of a new South American urban tardigrade offer new insights on the biological meaning of the *Macrobiotus hufelandi* group of species (Tardigrada: Macrobiotidae). *Journal of Natural History*, 47 (37–38): 2409–2426.
- Guidetti R, Cesari M, Bertolani R, Altiero T and Rebecchi L (2019) High diversity in species, reproductive modes and distribution within the *Paramacrobiotus richtersi* complex (Eutardigrada, Macrobiotidae). *Zoological letters*, 5 (1): 1–28.

- Guidi A and Rebecchi L (1996) Spermatozoan morphology as a character for tardigrade systematics: comparison with sclerified parts of animals and eggs in eutardigrades. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 116: 101–113.
- Guil N, Jørgensen A and Kristensen R (2019) An upgraded comprehensive multilocus phylogeny of the Tardigrada tree of life. *Zoologica Scripta*, 48 (1): 120–137.
- Hamilton WD, Axelrod R and Tanese R (1990) Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87 (9): 3566–3573.
- Harrison RG (1990) Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 7: 69–128.
- Hashimoto T, Horikawa DD, Saito Y, Kuwahara H, Kozuka-Hata H et al. (2016) Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. *Nature Communications*, 7: 12808.
- Hatai S (1956) On the Japanese Tardigrada. *Science Report Of The Yokosuka City Museum*, 1: 1–13.
- Henneke J (1911) Beiträge zur Kenntnis der Biologie und Anatomie der Tardigraden (*Macrobotus macronyx* Duj.). *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 97: 721–51, Taf. 33
- Horikawa DD, Sakashita T, Katagiri C, Watanabe M, Kikawada T et al. (2006) Radiation tolerance in the tardigrade *Milnesium tardigradum*. *International Journal of Radiation Biology*, 82(12): 843–848.
- Horikawa DD, Kunieda T, Abe W, Watanabe M, Nakahara Y et al. (2008) Establishment of a rearing system of the extremotolerant tardigrade *Ramazzottius varieornatus*: a new model animal for astrobiology. *Astrobiology*, 8(3): 549–56.

- Horikawa DD, Iwata K-I, Kawai K, Koseki S, Okuda T et al. (2009) High Hydrostatic Pressure Tolerance of four Different Anhydrobiotic Animal Species. *Zoological Science*, 26(3): 238–242.
- Horikawa DD, Yamaguchi A, Sakashita T, Tanaka D, Hamada N et al. (2012) Tolerance of anhydrobiotic eggs of the tardigrade *Ramazzottius varieornatus* to extreme environments. *Astrobiology*, 12(4): 283–289.
- Horikawa DD, Cumbers J, Sakakibara I, Rogoff D, Leuko S et al. (2013) Analysis of DNA repair and protection in the Tardigrade *Ramazzottius varieornatus* and *Hypsibius dujardini* after exposure to UVC radiation. *PLoS One*, 8(6): e64793.
- Immler S, Moore HDM, Breed WG and Birkhead TR (2007) By Hook or by Crook? Morphology, Competition and Cooperation in Rodent Sperm. *PLoS One*, 1: e170.
- Ishida M and Matsui T (2007) Noteworthy tardigrades from Kochi Prefecture. *The Natural Environmental Scientific Research*, 9: 45–58. [In Japanese, with English summary]
- Ito M (1997) Taxonomic study on the Eutardigrada from the northern slope of Mt. Fuji, central Japan. III. Families Macrobiotidae and Milnesiidae. *Species Diversity*, 2: 167–178.
- Ito, M (1999) Ecological distribution, abundance and habitat preference of terrestrial tardigrades in various forests on the northern slope of Mt. Fuji, central Japan. *Zoologischer Anzeiger*, 238: 225–234.
- Ito M, Saigo T, Abe W, Kubo T and Kunieda T (2016) Establishment of an isogenic strain of the desiccationsensitive tardigrade *Isohypsibius myrops* (Parachela, Eutardigrada) and its life history traits. *Zoological Journal of Linnean Society*, 178: 863–70.
- Jamieson BGM (1987) A biological classification of sperm types, with special reference to Annelids and Molluscs, and an example of spermiocladistics. In: Mohri H (ed.). *New*

- horizons in sperm cell research*. Scientific Society Press/Gordon and Breach Scientific Publication, Tokyo/New York, Japan/USA, pp. 311–332.
- Jönsson KI, Harms-Ringdahl M and Torudd J (2005) Radiation tolerance in the eutardigrade *Richtersius coronifer*. *International Journal of Radiation Biology*, 81(9): 649–656.
- Jönsson KI, Rabbow E, Schill RO, Harms-Ringdahl M and Rettberg P (2008) Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. *Current Biology*, 18(17): 729–731.
- Jönsson KI, Beltrán-Pardo EA, Haghdoost S, Wojcik A, Bermúdez-Cruz RM et al. (2013) Tolerance to gamma-irradiation in eggs of the tardigrade *Richtersius coronifer* depends on stage of development. *Journal of Limnology*, 72: 73–79.
- Jönsson KI, Hygum TL, Andersen KN, Clausen LK and Møbjerg N (2016) Tolerance to Gamma Radiation in the Marine Heterotardigrade, *Echiniscoides sigismundi*. *PLoS One* 11(12): e0168884.
- Kaczmarek Ł and Michalczyk Ł (2017) The *Macrobiotus hufelandi* group (Tardigrada) revisited. *Zootaxa*, 4363 (1): 101–113.
- Kato Y, Kobayashi K, Watanabe H and Iguchi T (2011) Environmental Sex Determination in the Branchiopod Crustacean *Daphnia magna*: Deep Conservation of a *Doublesex* Gene in the Sex-Determining Pathway. *PLoS Genetics*, 2011, 7 (3): e1001345.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K and Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30: 3059–66.
- Katoh K and Toh H (2008) Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics*, 9: 286–98.

- Kristensen RM (1979) On the fine structure of *Batillipes noerrevangi* Kristensen, 1978 (Heterotardigrada). 3. Spermogenesis. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Jagiellonskiego Prace Zoologiczne*, 25: 97–105.
- Kumar S, Stecher G and Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870–1874.
- Lanfear R, Hua X and Warren DL (2016) Estimating the effective sample size of tree topologies from Bayesian phylogenetic analyses. *Genome Biology and Evolution*, 8: 2319–2332.
- Leigh JW and Bryant D (2015) POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6: 1110–1116.
- Malagolowkin-Cohen C, Simmons AS and Levene H (1965) A study of sexual isolation between certain strains of *Drosophila paulistorum*. *Evolution*, 19: 95–103.
- Marcus E (1929) Zur Embryologie der Tardigraden. *Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere*, 50: 333–84.
- Mathews G (1937) Tardigrada from Japan. *Peking Natural History Bulletin*, 11: 411–412.
- Merrel DJ (1950) Measurements of sexual isolation and selective mating. *Evolution*, 4: 326–331.
- Michalczyk Ł and Kaczmarek Ł (2013) The Tardigrada Register: a comprehensive online data repository for tardigrade taxonomy. *Journal of Limnology*, 72 (s1): 175–181.
- Michalczyk Ł, Wełnicz W, Frohme M and Kaczmarek Ł (2012) Redescriptions of three *Milnesium* Doyère, 1840 taxa (Tardigrada: Eutardigrada: Milnesiidae), including the nominal species for the genus. *Zootaxa* 3154: 1–20.
- Morek W, Gąsiorek P, Stec D, Bladgen B and Michalczyk Ł (2016) Experimental taxonomy exposes ontogenetic variability and elucidates the taxonomic value of claw configuration

- in *Milnesium* Doyère, 1840 (Tardigrada: Eutardigrada: Apochela). *Contributions to Zoology*, 85 (2): 173–200.
- Morek W, Suzuki AC, Schill RO, Georgiev D, Yankova M et al. (2019) Redescription of *Milnesium alpigenum* Ehrenberg, 1853 (Tardigrada: Apochela) and a description of *Milnesium inceptum* sp. nov., a tardigrade laboratory model. *Zootaxa*, 4586 (1): 35–64.
- Nowak B and Stec D (2018) An integrative description of *Macrobotus hanna* sp. nov. (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae: *hufelandi* group) from Poland. *Turkish Journal of Zoology*, 42: 269–286.
- Persson D, Halberg KA, Jørgensen A, Ricci C, Møbjerg N et al. (2010) Extreme stress tolerance in tardigrades: surviving space conditions in low earth orbit. *Journal of Zoological Systems and Evolution Research*, 49: 90–97.
- Pilato G (1981) Analisi di nuovi caratteri nello studio degli Eutardigradi. *Animalia*, 8: 51–57.
- Pizzari T and Birkhead TR (2002) The sexually-selected sperm hypothesis: sex-biased inheritance and sexual antagonism. *Biological Reviews*, 77: 183–209.
- R Core Team (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from: <https://www.R-project.org> (accessed 5 April 2016)
- Rebecchi L (1991) Karyological analysis on *Macrobotus pseudohufelandi* (Tardigrada, Macrobiotidae) and a new finding of a tetraploid population. *Caryologia* 44(3–4): 301–307.
- Rebecchi L (1997) Ultrastructural Study of Spermiogenesis and the Testicular and Spermathecal Spermatozoon of the Gonochoristic Tardigrade *Xerobiotus pseudohufelandi* (Eutardigrada, Macrobiotidae). *Journal of Morphology*, 24: 11–24.

- Rebecchi L (2001) The spermatozoon in Tardigrades: Evolution and Relationships with the Environment. *Zoologischer Anzeiger*, 240: 525–533.
- Rebecchi L and Guidi A (1991) First SEM studies on tardigrade spermatozoa. *Invertebrate Reproduction and Development*, 19 (2): 151–156.
- Rebecchi L and Bertolani R (1994) Maturative pattern of ovary and testis in eutardigrades of freshwater and terrestrial habitats. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 26(2): 107–18.
- Rebecchi and Guidi A (1995) Spermatozoon ultrastructure in two species of *Amphibolus* (Eutardigrada, Euhypsibiidae). *Acta Zoologica*, 26 (2): 171–176.
- Rebecchi L, Guidi A and Bertolani R (2000a) Maturative pattern of the ovotestis in two hermaphrodite species of eutardigrades. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 37: 25–34.
- Rebecchi L, Guidi A and Bertolani R (2000b) Tardigrada. in: Adiyodi KG, Adiyodi RG. Reproductive Biology of Invertebrates. Vol. IX, Part B. Oxford & IBH Publishing Co., 267–291
- Rebecchi L, Altiero T and Bertolani R (2002) Banding techniques on tardigrade chromosomes: the karyotype of *Macrobotus richtersi* (Eutardigrada, Macrobiotidae). *Chromosome Research*, 10(6): 437–43.
- Rebecchi L, Rossi V, Altiero T, Bertolani R and Menozzi P (2003) Reproductive modes and genetic polymorphism in the tardigrade *Richtersius coronifer* (Eutardigrada, Macrobiotidae). *Invertebrate Biology*, 122(1): 19–27.
- Rebecchi L, Altiero T, Guidetti R, Cesari M, Bertolani R et al. (2007) Tardigrade Resistance to Space Effects: First Results of Experiments on the LIFE-TARSE Mission on FOTON-M3. *Astrobiology*, 9(6): 581–591.

- Rebecchi L, Altiero L and Guidi A (2011) The ultrastructure of the tardigrade spermatozoon: a comparison between *Paramacrobiotus* and *Macrobiotus* species (Eutardigrada). *Invertebrate Zoology*, 8 (1): 63–77.
- Ronquist F and Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572–4.
- Roszkowska M, Ostrowska M, Stec D, Janko K and Kaczmarek Ł (2017) *Macrobiotus polypiformis* sp. nov., a new tardigrade (Macrobiotidae; *hufelandi* group) from the Ecuadorian Pacific coast, with remarks on the claw abnormalities in eutardigrades. *European Journal of Taxonomy*, 327: 1–19.
- Sakai H, Oshima H, Yuri K, Gotoh H, Daimon T et al. (2019) Dimorphic sperm formation by *Sex-lethal*. *Proceedings of the National Academy of the United States of America*, 116 (21): 10412–10417.
- Šatkauskienė I (2012) Tardigrades (Tardigrada) in Baltic States. *Biologija* 58(4): 245–255.
- Schill RO, Forster F, Dandekar T and Wolf N (2010) Using compensatory base change analysis of internal transcribed spacer 2 secondary structures to identify three new species in *Paramacrobiotus* (Tardigrada). *Organisms Diversity & Evolution*, 10 (4): 287–296.
- Schluter D (2001) Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology & Evolution*, 16 (7): 372–380.
- Servedio MR and Noor MAF (2003) The role of reinforcement in speciation: theory and data. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34: 339–364.
- Smith FW, Boothby TC, Giovannini I, Rebecchi L, Jockusch EL and Goldstein B (2016) The Compact Body Plan of Tardigrades Evolved by the Loss of a Large Body Region. *Current Biology*, 26 (2): 224–229.

- Stamatakis A (2014) RaxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30: 1312–1313.
- Stec D, Smolak R, Kaczmarek Ł and Michalczyk Ł (2015) An integrative description of *Macrobiotus paulinae* sp. nov. (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae: *hufelandi* group) from Kenya. *Zootaxa*, 4052 (5): 501–526.
- Stec D, Morek W, Gąsiorek P, Kaczmarek Ł and Michalczyk Ł (2016) Determinants and taxonomic consequences of extreme egg shell variability in *Ramazzottius subanomalous* (Biserov, 1985) (Tardigrada). *Zootaxa*, 4208 (2): 176–188.
- Stec D, Morek W, Gąsiorek P, Blagden B and Michalczyk Ł (2017) Description of *Macrobiotus scoticus* sp. nov. (Tardigrada: Macrobiotidae: *hufelandi* group) from Scotland by means of integrative taxonomy. *Annales Zoologici*, 67 (2): 181–197.
- Stec D, Arakawa K, Michalczyk Ł (2018a) An integrative description of *Macrobiotus shonaicus* sp. nov. (Tardigrada: Macrobiotidae) from Japan with notes on its phylogenetic position within the *hufelandi* group. *PLoS One*, 13(2): e0192210.
- Stec D, Kristensen RM and Michalczyk Ł (2018b) Integrative taxonomy identifies *Macrobiotus papei*, a new tardigrade species of the *hufelandi* complex (Eutardigrada: Macrobiotidae) from the Udzungwa Mountains National Park (Tanzania). *Zootaxa*, 4446 (2): 273–291.
- Stec D, Morek W, Gąsiorek P and Michalczyk Ł (2018c) Unmasking hidden species diversity within the *Ramazzottius oberhaeuseri* complex, with an integrative redescription of the nominal species for the family Ramazzottiidae (Tardigrada: Eutardigrada: Parachela) *Systematics and Biodiversity*, 16 (4): 357–376.
- Stec D, Krzywański Ł and Michalczyk Ł (2018d) Integrative description of *Macrobiotus canaricus* sp. nov. with notes on *M. recens* (Eutardigrada: Macrobiotidae). *European Journal of Taxonomy*, 452: 1–36.

- Stec D, Krzywański Ł, Zawierucha K and Michalczyk Ł (2020) Untangling systematics of the *Paramacrobotus areolatus* species complex by an integrative redescription of the nominal species for the group, with multilocus phylogeny and species delineation within the genus *Paramacrobotus*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 188 (3): 694–716.
- Sugiura K, Minato H, Matsumoto M and Suzuki AC (in press) *Milnesium* (Tardigrada: Apochela) in Japan: the First Confirmed Record of *Milnesium tardigradum* s.s. and Description of *Milnesium pacificum* sp. nov. *Zoological Science*, accepted (May 31st, 2020).
- Suzuki AC (2003) Life history of *Milnesium tardigradum* Doyère (tardigrada) under a rearing environment. *Zoological Science*, 20(1): 49–57.
- Suzuki AC (2008) Appearance of Males in a Thelytokous Strain of *Milnesium cf. tardigradum* (Tardigrada). *Zoological Science*, 25(8): 849– 53.
- Suzuki AC (2017) Tardigrade Research in Japan. In: Morikawa, M. & Kajihara, H. (Eds.), *Species Diversity of Animals in Japan*. Springer Japan, Tokyo, pp. 267–84.
- Suzuki AC and Kristensen RM (2014) Spermatozoa in the reproductive system of a hermaphroditic marine tardigrade, *Orzeliscus belopus* (Tardigrada: Arthrotardigrada). *Zoologischer Anzeiger*, 253(6): 497– 511.
- Suzuki AC, Heard L and Sugiura K (2018) Terrestrial tardigrades from Mikurajima Island (the first report). *Mikurensis*, 7: 3–8.
- Swanson WJ, Yang Z, Wolfner MF and Aquadro CF (2001) Positive Darwinian selection drives the evolution of several female reproductive proteins in mammals. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 98: 2509–2514.

- Swanson WJ and Vacquier VD (2002) The rapid evolution of reproductive proteins. *Nature Reviews Genetics*, 3: 137–144.
- Tanaka S, Tanaka J, Miwa Y, Horikawa DD, Katayama T et al. (2015) Novel Mitochondria-Targeted Heat-Soluble Proteins Identified in the Anhydrobiotic Tardigrade Improve Osmotic Tolerance of Human Cells. *PLoS ONE*, 10: e0118272.
- Tenlen JR, McCaskill S and Goldstein B (2012) RNA interference can be used to disrupt gene function in tardigrades. *Development Genes and Evolution*, 223 (3): 171–181.
- Tomlinson J (1966) The advantages of hermaphroditism and parthenogenesis. *Journal of Theoretical Biology*, 11 (1): 54–58.
- Tsaur SC and Wu CI (1997) Positive selection and the molecular evolution of a gene of male reproduction, *Acp26Aa* of *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 544–549.
- Utsugi K (1986) Urban tardigrades in Kyushu. *Zoological Science*, 3: 1110.
- Utsugi K (1987) Urban tardigrades in Hokuriku area. *Zoological Science*, 4: 1111.
- Utsugi K (1988) Tardigrades in Hokkaido area. *Zoological Science*, 5: 1335.
- Utsugi K (1995) Terrestrial tardigrades from mountain areas of Japan. *Zoological science*, 12 (Supplement): 36.
- Utsugi K (1996) Study on terrestrial tardigrades in Japan. II. Summary of urban tardigrades in Japan. *The Natural Environmental Scientific Research*, 9: 33–46. [in Japanese, with English summary]
- Utsugi K, Hiraoka T and Nunomura N (1997) On the relation between tardigrade fauna and bryophyte flora in Toyama Prefecture. *Bulletin of the Toyama Science Museum*, 20: 57–71. [in Japanese, with English summary]
- von Erlanger R (1895) Zur Morphologie und Embryologie eines Tardigraden (*Macrobiotus macronyx* Duj.). Vorläufige Mitteilung II. *Biologisches Zentralblatt*, 15: 772–777

- von Wenck W (1914) Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an Tardigraden
(*Macrobiotus lacustris* Duj.). *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Anatomie und
Ontogenie der Tiere*, 37: 465–514, Taf. 35–8.
- Welnicz W, Grohme MA, Kaczmarek Ł, Schill RO and Frohme M (2011) ITS-2 and 18S rRNA
data from *Macrobiotus polonicus* and *Milnesium tardigradum* (Eutardigrada, Tardigrada).
Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 49 (Supplement 1): 34–39.
- Wessel P, Luis JF, Uieda L, Scharroo R, Wobbe F et al. (2019) The Generic Mapping Tools
version 6. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 20: 5556–5564.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal
ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innes, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. &
White, T.J. (Eds.), *PCR protocols: a guide to methods and application*. Academic Press,
San Diego, California, pp. 315–322.
- Wyatt TD (2014) Proteins and peptides as pheromone signals and chemical signatures. *Animal
Behaviour*, 97: 273–280.
- Yamaguchi A, Tanaka S, Yamaguchi S, Kuwahara H, Takamura C et al. (2012) Two Novel
Heat-Soluble Protein Families Abundantly Expressed in an Anhydrobiotic Tardigrade.
PLoS ONE, 7 (8): e44209.
- Yoshida Y, Koutsovoulos G, Laetsch DR, Stevens L, Kumar S et al. (2017) Comparative
genomics of the tardigrades *Hypsibius dujardini* and *Ramazzottius varieornatus*. *PLoS
Biology*, 15(7): e2002266.
- Yoshida Y, Sugiura K, Tomita M, Matsumoto M and Arakawa K (2019) Comparison of the
transcriptomes of two tardigrades with different hatching coordination. *BMC
Developmental Biology*, 19: 24.

- Yukilevich R, Maroja LS, Nguyen K, Hussain S and Kumaran P (2018) Rapid sexual and genomic isolation in sympatric *Drosophila* without reproductive character displacement. *Ecology and Evolution*, 8 (5): 2852–2867.
- Zhong ZQ (2013) Animal Biodiversity: An Outline of Higher-level Classification and Survey of Taxonomic Richness (Addenda 2013). *Zootaxa*, 3703 (1): 1–82.
- Zhang J, Kapli P, Pavlidis P and Stamatakis A (2013) A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29: 2869–2876.
- 斎藤 成也, 巖佐 庸, 遠藤 一佳, 他 (2012) 進化学辞典. 日本進化学会 編, 共立出版株式会社.
- 竹内 豪 (2020) 有性生殖クマムシ *Macrobiotus shonaicus* の性フェロモンの単離を目指して. 慶應義塾大学 2019 年度 卒業論文.
- 渡辺 絵莉 (2020) 緩歩動物クマムシの交尾行動に関わるフェロモンの研究. 慶應義塾大学大学院 2019 年度 修士論文.
- 湊 廣輝 (2019) クマムシの性決定に対する幼若ホルモン様物質フェノキシカルブの影響. 慶應義塾大学大学院 2018 年度 修士論文.

公刊論文及び学会発表の目録

本論文に関する原著論文

第2章

Sugiura K, Minato H, Suzuki AC, Arakawa K, Kunieda T and Matsumoto M (2019)

Comparison of Sexual Reproductive Behaviors in Two Species of Macrobiotidae
(Tardigrada: Eutardigrada).

Zoological Science, 36 (2): 120–127.

第3章

Sugiura K, Arakawa K and Matsumoto M (2020)

Distribution of *Macrobiotus shonaicus* Stec, Arakawa & Michalczyk, 2018 (Tardigrada:
Eutardigrada: Macrobiotidae) in Japan.

Zootaxa, 4767 (1): 56–70.

Erratum: *Zootaxa*, 4778 (3): 600.

第4章

Sugiura K and Matsumoto M (in press)

Spermatozoa morphology changes during reproduction and first observation of acrosomal
contact in two dioecious species of Macrobiotidae (Tardigrada: Eutardigrada).

Zygote, accepted (July 18th, 2020).

その他の論文

Sugiura K, Minato H, Matsumoto M and Suzuki AC (in press)

Milnesium (Tardigrada: Apochela) in Japan: the First Confirmed Record of *Milnesium tardigradum* s.s. and Description of *Milnesium pacificum* sp. nov.
Zoological Science, accepted (May 31st, 2020).

Yoshida Y, Sugiura K (co-first), Tomita M, Matsumoto M and Arakawa K (2019)

Comparison of the transcriptomes of two tardigrades with different hatching coordination.

BMC Developmental Biology, 19: 24.

Suzuki AC, Heard L and Sugiura K (2018)

御蔵島の陸生緩歩動物(第 1 報).

Mikurensis, 7: 3–8.

国際学会発表

口頭

Sugiura K, Minato H, Suzuki AC, Arakawa K, Kunieda T and Matsumoto M.

Comparison of sexual reproductive behaviors in two species of Macrobiotidae.

The 14th International Symposium on Tardigrada. 2018 年 7 月, Denmark.

ポスター

Sugiura K, Yoshida Y, Onoda K, Suzuki AC, Arakawa K and Matsumoto M.

Sex determination in Tardigrada for evolutionary insight.

The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan. 2016 年 11 月, 沖縄.

国内学会発表

口頭

杉浦健太, 松本緑. クマムシの交尾も、味わい深い.

日本動物学会第 90 回大阪大会. 2019 年 9 月, 大阪.

杉浦健太, 松本緑. クマムシの交尾も、味わい深い.

第 4 回クマムシ学研究会. 2019 年 9 月, 大阪.

杉浦健太, 荒川和晴, 國枝武和, 松本緑. 生殖からみるクマムシの世界.

日本動物学会第 89 回札幌大会. 2018 年 9 月, 札幌.

杉浦健太, 湊廣輝, 松本緑. ショウナイチョウメイムシは”ショウナイチョウメイムシ”か.

第 3 回クマムシ学研究会. 2018 年 9 月, 横浜.

杉浦健太, 松本緑. 生殖からみるクマムシの進化.

Evo-Devo 青年の会. 2018 年 8 月, 東京.

杉浦健太, 吉田祐貴, 國枝武和, 鈴木忠, 荒川和晴, 松本緑.

緩歩動物クマムシの有性生殖 -雌雄の違いと求愛・交尾行動の観察-.

日本動物学会第 88 回富山大会. 2017 年 9 月, 富山.

杉浦健太, 松本緑. クマムシの生殖戦略. 第 6 回生殖若手の会. 2018 年 3 月, 下田.

杉浦健太, 湊廣輝, 松本緑. 有性生殖クマムシの交尾行動.

第 2 回クマムシ学研究会. 2017 年 8 月, 東京.

杉浦健太, 松本緑. 日吉マムシ谷に生息するクマムシとその生殖様式.

第 1 回クマムシ学研究会. 2016 年 4 月, 横浜.

ポスター

杉浦健太, 梁瀬隆二、柴小菊、稲葉一男、松本緑.

シヨウナイチヨウメイムシ(*Macrobiotus shonaicus*)の生殖戦略.

日本動物学会関東支部会第 72 回大会. 2020 年 3 月, 横浜.

K Sugiura, R Yanase, K Shiba, K Inaba and M Matsumoto.

Transition of gametes structures on reproductive process in tardigrades *Macrobiotus shonaicus*.

ABiS Symposium 電子顕微鏡イメージングの最先端と未来. 2020 年 2 月, 岡崎.

杉浦健太, 松本緑. クマムシの精子の形態変化が与える生殖への影響.

日本進化学会第 21 回大会. 2019 年 8 月, 札幌.

杉浦健太, 松本緑. クマムシの精子の形態変化が与える生殖への影響.

第 0 回進化学若手の会. 2019 年 8 月, 札幌.

杉浦健太, 松本緑. クマムシにおける DM ドメイン遺伝子の進化.

日本進化学会第 20 回大会. 2018 年 8 月, 東京.

杉浦健太, 松本緑. 緩歩動物クマムシの性差をもたらす分子基盤の解明.

2017 年度生命科学系学会合同年次大会. 2017 年 12 月, 神戸.

杉浦健太, 松本緑. 緩歩動物クマムシの有性生殖.

第 1 回慶應ライフサイエンスシンポジウム. 2017 年 8 月, 横浜.

杉浦健太, 吉田祐貴, 小野田海道, 國枝武和, 鈴木忠, 荒川和晴, 松本緑.

クマムシの生殖戦略 -雄分化の謎に挑む-.

Hiyoshi Research Portfolio 2016. 2016 年 11 月, 横浜.

謝辞

本論文は、著者が慶應義塾大学大学院理工学研究科 後期博士課程在学中に行なった研究成果をまとめたものです。研究の遂行に対して終始ご指導いただき、加えて研究者として課題に向き合う姿勢をご教示いただいた同大学理工学部 准教授 松本緑 博士に心より感謝の意を表します。また近年稀にみる困難な状況の中、学位請求論文審査において貴重なご助言、ご指導をいただいた同学部 教授 清水史郎 博士、教授 土居信英 博士、准教授 堀田耕司 博士に深く感謝申し上げます。

本研究で用いた *Paramacrobiotus* sp. は東京大学理学系研究科 准教授 國枝武和 博士に、*Macrobiotus shonaicus* は慶應義塾大学環境情報学部 准教授 荒川和晴 博士に分与いただき、さらに本研究内外でもご指導、ご助言いただきました。慶應義塾大学医学部 准教授 鈴木忠 博士には本研究内外でご指導いただいたことに加え、著者がクマムシを題材として研究を始めるきっかけを作っていただきました。本研究を論文化するにあたり East Tennessee State University の Dr. Diane Nelson、Jagiellonian University の Dr. Lukasz Michalczyk には貴重なご助言をいただきました。本研究を遂行するにあたり、お世話になった多くの方々に心より御礼申し上げます。

著者は研究室、所属、年齢に関係なく多くの若手の同士に刺激をいただき、また濃密で実りある学生生活を満喫することができました。共に研究生活を過ごした松本研究室の皆様、生命情報学科の皆様、並びに研究生活を通じて知り合った友人の皆様に心より感謝申し上げます。

最後に博士過程への進学を快く受け入れ、このような充実した機会を与えてくださった家族、親族に感謝いたします。

なお本研究の一部は日本学術振興会 特別研究員奨励費(JP18J21345)、文部科学省科学研究費助成事業 先端バイオイメージング支援プラットフォーム(19C-010-L08)の支援を受けて遂行しました。