

蚕雄蛾の無精子精包による授精への利用

| | |
|-------|----------------------------------|
| 誌名 | 大日本蚕糸会研究報告 |
| ISSN | |
| 著者名 | 竹村,洋子 持田,裕司 松本,正江 大沼,昭夫 |
| 発行元 | 大日本蚕糸会 |
| 巻/号 | 59号 |
| 掲載ページ | p. 21-26 |
| 発行年月 | 2011年12月 |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



蚕雄蛾の無精子精包による授精への利用

竹村洋子・持田裕司・松本正江・大沼昭夫

蚕業技術研究所

YOKO TAKEMURA, YUJI MOCHIDA, MASAE MATSUMOTO, AKIO OHNUMA : A role in insemination of spermatophore of the silkworm male moth, their testes were removed at larval stage

緒 言

昆虫の精包は、雄が形成する小袋であり、精子が雌に移行する際の保護の役割を担うとされている。交尾時に、蚕の雄蛾は精包を雌蛾の交尾嚢内に移送し、その精包内で前立腺液により無核精子が活性化し、引き続いて有核精子束の解離が起こり、有核精子が雌の受精嚢へ移行する。産卵過程で卵が卵管を下って前庭を通るときに、受精嚢から精子が卵の精孔を通して卵内に入り受精が成立する。この過程における精包の役割についてはまだ未解明である。大村¹⁾は、幼虫期に精巣を除去した雄蛾を交尾させ、精子を含まない精包を得ており、この精包は雌に産卵を誘発しないと述べている。筆者らは、蚕の人工授精法を開発し、精液を人為的に雌蛾の交尾嚢に注入することで受精卵を得、また、前立腺分泌液の代替えとして精子の活性化にトリプシンが有効である事を提示した²⁾。これらの手法を用いて、今回、精巣を除去した雄蛾が形成する無精子精包が授精において、どのような役割があるかを人工授精法を用いて検討した。

本文に入るに先立ち、本稿の校閲を賜った蚕業技術研究所長井上元博士に深く感謝の意を表す。

材料と方法

1. 材料蚕

供試品種として、雌蛾は第2白卵系統を使用し、雄蛾は正常系統の「ひたち×にしき」および「烏竜」を使用し、全齡人工飼料育とした。この交配の受精卵は着色卵となる。

2. 精液の採集方法

(1) 貯精嚢精液

未交尾の雄蛾を背中腺に沿って解剖して生殖器官全体を取り出し、最初に精莖腺より下部、白線および前立腺部分を取り除き、前立腺液が精液に混入しないようにした。貯精嚢をピンセットで破いて内容物を集め、貯精嚢精液とした。器官の解剖はグレース昆虫培地 (GIBCO BRL) 中で行った。

(2) 交尾嚢内精液

2時間交尾させた雌蛾を解剖して交尾嚢を取り出し、ピンセットを使って精包のみを集めた。精包を切開して得た内容物を交尾嚢精液とした。器官の解剖はグレース昆虫培地 (GIBCO BRL) 中で行った。

3. 精液の凍結

採取した貯精嚢精液を等量の10%ジメチルスルフォキシド/グレース昆虫培地とよく混合し、0.25mlの凍結ストローに封入した。-80℃に10分間置いた後、液体窒素に10分間浸漬し凍結した。融解は37℃の温湯で行った。

4. 人工授精の方法

窒素ガスボンベ、圧力調整器、足踏みスイッチ、三方電磁弁、キャピラリーで構成された人工授精装置を使用し、雌が1頭当たり5~10 μ lの精液を注入した。

5. 精巣除去した雄蛾の作出

4 齢 1 日目から 2 日目の雄幼虫から、クリーンベンチ内で星状紋から精巣をピンセットで摘出して傷口をパラフィンで覆い、以後、清浄な環境で飼育した。

以上の実験の詳細は、Takemura et. al.^{2,3)} に依った。

結 果

1. 人工授精における交尾嚢および精包

通常交尾を行った雌蛾交尾嚢と人工授精で精液を注入した雌蛾の交尾嚢を取り出した (Fig 1-A,B)。通常交尾の雌蛾では、交尾嚢内に精包が存在し、交尾嚢からしっかりした膜の精包が取り出された。そして精包は雄蛾単独で形成され、稀に雌蛾の交尾嚢以外でも観察された (Fig 1-C)。しかし、人工授精の場合には、前立腺液を加えた貯精嚢精液や交尾嚢内精液どちらを使用しても、精包が形成されておらず、精包を解剖すると精液が流出した。しかし、受精嚢には精子が到達しており、受精卵は得られた。

また、通常交尾後 1 日が経過して産卵した雌蛾の交尾嚢では、精包との間に受精嚢に到達しきれなかった精子が蓄積されていた (Fig 1-D)。この交尾嚢中の精液を収集し、人工授精を試みたが、受精は全く成立しなかった。(Table 1)。

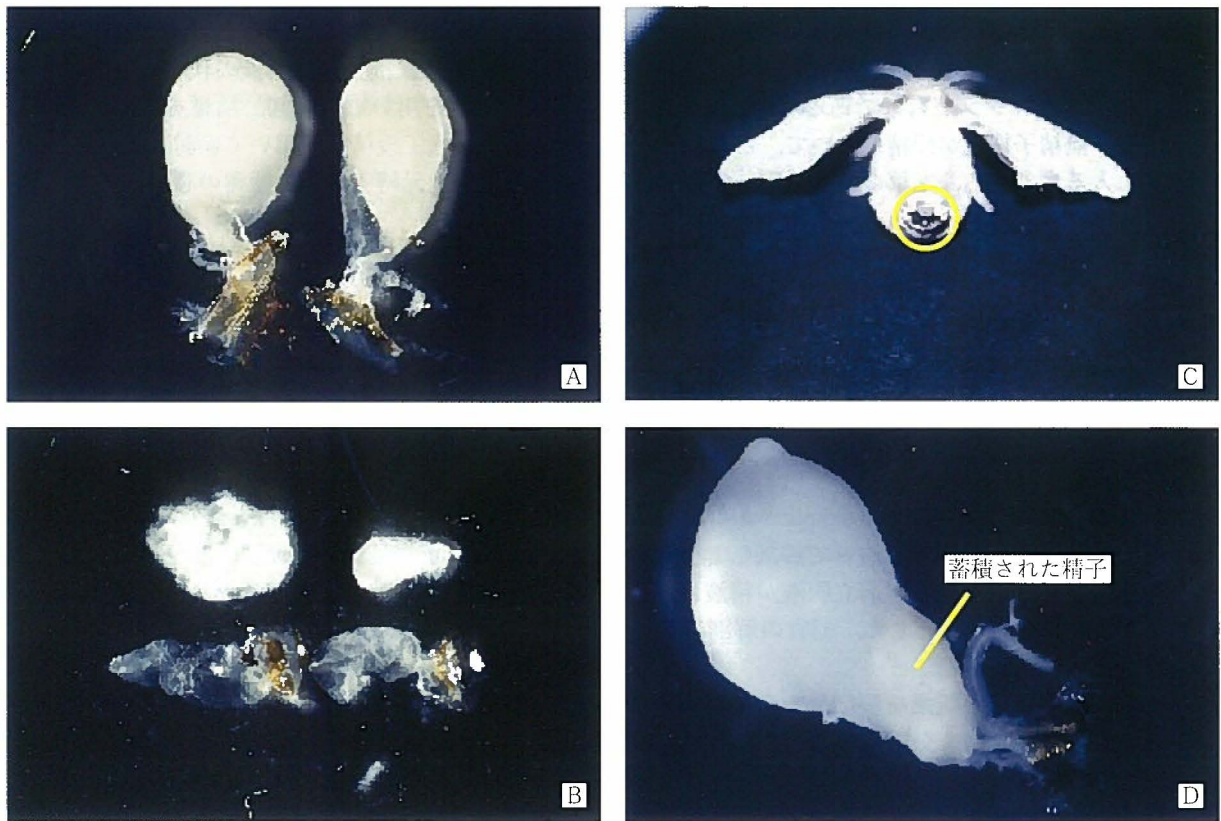


Fig 1. 雌蛾交尾嚢と精包

A - 左, 精子を人工授精した交尾嚢
右, 通常交尾した交尾嚢

B - 左, 精子を人工授精した交尾嚢内部
右, 通常交尾した交尾嚢内部

C, 雄蛾尾部に形成された精包

D, 交尾 1 日後の精包

Table 1. 交尾と人工授精による産卵成績

| | 産卵数 (粒) | 受精卵数 (粒) | 不受精卵数 (粒) | 受精卵率 (%) |
|---------------|----------|----------|-----------|----------|
| 通常交尾 | 589±78.2 | 585±81.5 | 4±7.7 | 99.2±1.5 |
| 産卵1日後の精包内精液*1 | 41±18.9 | 0±0.0 | 41±18.9 | 0.0±0.0 |
| 交尾嚢破壊+交尾*2 | 550±39.9 | 543±45.8 | 7±6.2 | 98.7±1.3 |
| 交尾嚢破壊+人工授精*2 | 63±96.2 | 0±0.0 | 63±96.2 | 0.0±0.0 |
| 片側精巢除去 | 620±42.4 | 613±46.5 | 7±6.7 | 98.8±1.2 |
| 両側精巢除去 | 45±19.2 | 0±0.0 | 45±19.2 | 0.0±0.0 |

処理個体15蛾についての平均値

*1:通常交尾し、産卵1日後の雌蛾交尾嚢を解剖し、精液を収集、人工授精を行う

*2:窒素ガス圧により未交尾雌蛾の交尾嚢を破壊

一方、未交尾の雌蛾交尾嚢へ挿入したキャピラリーに人工授精装置の窒素ガスによって圧力をかけ交尾嚢を破壊した。この雌蛾に交尾を行わせると、通常交尾と同様の産卵成績を示した。この場合、雌蛾内の精包は、破壊した交尾嚢と交尾嚢導管、および精包形成時の軟栓によって交尾嚢付近に固定されており、精子の活性化が生じて、精子は精子管に移行し受精嚢に達していた (Table 1)。また、同様に交尾嚢を破壊された雌蛾に人工授精を試みると、精液は交尾嚢付近に留まることができないので、受精卵は得られなかった。

2. 幼虫期に精巢を除去した雄蛾

幼虫期に精巢を全て除去した雄蛾を解剖したところ、付属腺、精管、貯精嚢、射精管まで、精巢以外の正常な生殖器官が存在していた (Fig.2-A)。器官には、それぞれの分泌液が含まれており、貯精嚢部分には乳白色の液体が存在していた。この精巢除去雄蛾を雌蛾に交尾させたところ、雌蛾の交尾嚢には、精包が存在しており、通常の精包とほぼ変わりなかった (Fig.2-B)。この精包の膜を破ると、外質と内質に明確に分かれておらず、精子は存在しなかった。また、この精包と精管の間に内容物が蓄積されていたが、受精嚢には何も到達していなかった。この両側精巢除去雄蛾と交尾した雌蛾は、産卵数が減少し、受精卵が全く得られなかった (Table 1)。

一方、幼虫期に片側精巢のみを除去した雄蛾と交尾した雌蛾は、産卵数、受精卵数、受精卵率とも対照区の通常交尾の場合とほぼ差異がなかった。

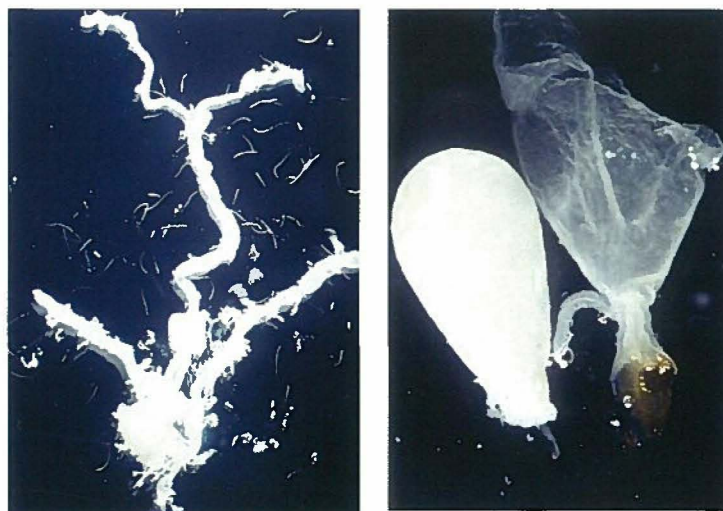


Fig 2. 幼虫期に精巢を除去した雄蛾

A, 生殖器官

B, 交尾した雌蛾の交尾嚢と精包

3. 幼虫期に精巣除去された雄蛾の精包

上述2において、精巣除去雄蛾から精子の存在しない精包（無精子精包）が得られたので、この精包を人工授精に用いて受精率の向上を試みた。貯精囊精液のみを人工授精した区、無精子精包の分泌液を貯精囊精液と混合し人工授精を行った区、精巣除去雄蛾と交尾後、貯精囊精液を人工授精した区、貯精囊精液を人工授精したのち、精巣除去雄蛾と交尾させた区を設定した（Table 2）。貯精囊精液のみを人工授精した区では産卵数が少なく、全く受精卵を得られなかった。無精子精包分泌液と貯精囊精液を混合した区では54%の受精卵が得られた。精巣除去雄蛾と交尾したのち貯精囊精液を人工授精した区では、受精卵率は82%で、やや通常交尾より低い成績であった。貯精囊精液を人工授精したのち精巣除去雄蛾と交尾させた区では、受精卵率は90%で、通常交尾とほぼ変わらない成績であった。

また、精巣除去雄蛾の交尾と凍結した精子の組み合わせも行った（Table 3）。精巣除去雄蛾と交尾したのち凍結精液をトリプシン溶液と混合して人工授精した区、および凍結精液を人工授精したのち精巣除去雄蛾と交尾させた区の両方の試験では、精子はわずかな量しか受精囊に到達せず、無精子精包を利用しても受精卵率は向上しなかった。

Table 2. 様々な人工授精による産卵成績

| | 産卵数（粒） | 受精卵数（粒） | 不受精卵数（粒） | 受精卵率（%） |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 通常交尾 | 542± 54.8 | 503± 58.7 | 39± 19.3 | 92.8± 3.6 |
| 雌蛾交尾囊から採取した精液 | 599±139.4 | 531±145.9 | 68± 41.0 | 88.2±25.1 |
| 精液のみ | 67± 67.6 | 0± 0.0 | 67± 67.6 | 0.0± 0.0 |
| 精液とトリプシン液の混合液 | 515±141.6 | 462±135.8 | 52± 30.7 | 84.2±23.1 |
| 精液と無精子精包液の混合液 | 387±217.5 | 238±231.4 | 140±109.7 | 53.8±25.3 |
| 精巣除去雄蛾と交尾後、精液を人工授精 | 539±190.5 | 467±214.9 | 73± 31.9 | 80.5±18.2 |
| 精液を人工授精後、精巣除去雄蛾と交尾 | 535± 63.0 | 481± 47.5 | 55± 42.5 | 90.3± 7.0 |
| 処理個体15蛾についての平均値 | | | | |
| 精液：ひたち×にしきの貯精囊精液 | | | | |

Table 3. 凍結精液による人工授精

| | 産卵数（粒） | 受精卵数（粒） | 不受精卵数（粒） | 受精卵率（%） |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 通常交尾 | 450± 78.0 | 410± 80.4 | 39± 31.4 | 91.3± 6.9 |
| 凍結精液とトリプシン液の混合液 | 189± 87.3 | 35± 20.4 | 154± 80.4 | 20.0± 9.8 |
| 精巣除去雄蛾と交尾後、凍結精液を人工授精 | 203± 85.6 | 19± 12.7 | 184± 87.8 | 12.8±12.6 |
| 凍結精液を人工授精後、精巣除去雄蛾と交尾 | 177± 69.2 | 27± 9.5 | 150± 66.7 | 17.2± 6.5 |
| 処理個体15蛾についての平均値 | | | | |
| 精液：烏竜の貯精囊精液 | | | | |

考 察

通常の交尾で雌蛾交尾嚢内に移送される精包は、大きさが精液量により変化する。特に、雄蛾再交尾時の精包は、1/3以下の大きさになることもある (Fig.3)。Omura⁴⁾ は人工授精においても精包が形成すると述べているが、今回の人工授精試験において、貯精嚢精液区と交尾嚢内精液区の両方とも精包は形成されず、しかも通常の精包の内部は雄蛾生殖器官のそれぞれの分泌液により内質と外質などに層をなして分かれるが、これらの現象は見られなかった。精包は、精液が雄蛾生殖器官から射精されるときに精子量により大きさが調節され、精子を効率よく活性化および受精嚢に移行するための容器の役割を持つと考えられる。雄が精包を外界に撒き、雌が精包を拾い受け取るトビムシ類やムカデのように雌の体内で1年以上も受精能力を有する精子を保護する役割を明確に担う⁵⁾ のに比べ、蚕は精包を交尾嚢内に移送するため、精包が無くとも精子が外界の影響を受けにくく、交尾嚢が精包の代替えとなり、適正濃度であれば、精子の活性化が行われる。また、精包内の1日後の精子は、受精能を有しておらず、人工授精による受精卵は得られなかった。同じ鱗翅目のナミアゲハでは、雄から得た精包から雌が栄養を取得し、卵の成熟にも関与していると言われている^{6,7)}。成熟卵を体内に持ち、2, 3時間後には産卵する蚕においては、雌蛾の栄養や卵の成熟に関与していることは考えにくい。長岡ら⁸⁾ は、精包内の精子成熟のアルギニン分解カスケードの解明を行っており、今後、精包の機能の解析が進むことを期待する。

精包から精子が精子管へ移行する時の穴口が開くことについては、精子による機械的圧力および化学物質による溶解等諸説⁹⁾ があるが、精巣を除去して形成させた精子を含まない精包（無精子精包）でも穴口が開いて内容物が交尾嚢に蓄積するため、精子による機械的圧力ではないと考えられる。

また、人為的に交尾嚢を破壊したのち交尾を行うと、精包が交尾嚢導管で固定されるため、活性化した精子が受精嚢まで達し受精卵が得られた。しかし人工授精では、精子が体内に分散してしまうため、精子が受精嚢に到達せず受精卵は得られなかった。

幼虫期に精巣を除去され雄蛾は、正常に雌蛾と交尾をした。片側の精巣のみが除去された雄蛾の交尾では、産下卵数と受精卵数に影響はみられず、残り1つの精巣の精子で十分な受精卵率を得ることができた。両側の精巣が除去された雄蛾の交尾では、受精卵は産下されず、産卵も誘発されないことを再確認した。この両側精巣を除去された雄蛾は、精巣以外の全ての生殖器官を有しており、各分泌液も存在し、この分泌液を正常の雄蛾貯精嚢精液と混合して人工授精を行うと受精卵が得られた。しかし、通常の人工授精の



Fig 3. 交尾回数と精包と受精嚢の大きさ

- 左, 1回目の交尾
- 中, 2回目の交尾
- 右, 3回目の交尾

場合よりも低い受精卵率であった。この場合、精包液には前立腺液のみでなく付属腺などからの分泌液も含まれており、これら分泌液の混濁の影響が出たものと考えられる。

本研究では、精巣除去雄蛾と交尾した雌蛾に、人工授精によって無精子精包内へ貯精嚢精液を注入することで、精包の影響の有無を調べたところ、通常の人工授精と変わらない成績であった。逆に、貯精嚢精液を人工授精した雌蛾を精巣除去雄蛾と交尾させると、通常交尾とほぼ変わらない産卵成績であった。精液と無精子精包内の分泌液は、精包膜に遮られているが、精子管付近にできる精包の穴口から前立腺液が流れだし、これにより活性化した精子が確実に受精嚢に到達できたと考える。実際、交尾嚢を解剖すると、精包の周りに解離した有核精子が多数存在した。

また、精巣除去雄蛾と交尾した雌蛾に、凍結精子の人工授精を行ったが成績は向上しなかった。もし、精包および内部の分泌液に受精に対する特別な役割があるならば、凍結の影響を受けている精子でも受精嚢に到達し、受精率は向上するであろうと期待された。

このように、蚕の人工授精では精包が形成されていないにもかかわらず、受精卵が獲得できる。また、未活性の精液を人工授精した雌蛾に、精巣を除去した無精子精包雄蛾を交尾させると、授精が成立してトリプシン処理の代替方法となった。しかし、凍結精子の人工授精の雌蛾に対しては効果的な影響を与えないことが判明した。

摘 要

人工授精においては、雌蛾の交尾嚢内に精包が形成されておらず、交尾嚢内で活性化した精子は直接受精嚢に到達する。交尾嚢を破壊した雌蛾に通常の雄蛾を交尾すると、交尾嚢導管に精包が固定され、通常交尾と同様の受精卵を産み、精包は交尾嚢の代替えとなりえるが、人工授精では受精卵は産下されなかった。精巣を除去した無精子精包は、精子以外の全ての分泌液を含んでいる。未活性精子を人工授精した雌蛾にこの無精子精包雄蛾を交尾させると受精卵が産下され、この方法は人工授精法における精子のトリプシン処理の代替えとなり得ることが明らかになった。

引用文献

- 1) 大村清之助 (1939) 家蚕蛾産卵の機構 I. 産卵を誘発する刺激. 日蚕雑, 10, 49-57.
- 2) Takemura, Y., Kanda, T., and Horie, Y. (1999) Artificial insemination using trypsin-treated sperm in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. 45, 471-477.
- 3) Takemura, Y., Kanda, T., and Horie, Y. (2000) Artificial insemination using cryopreserved sperm in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. 46, 491-497
- 4) Omura S. (1936) Artificial insemination of *Bombyx mori*. J. Facul. Agr. Hokkaido Imp. Univ., 38, 135-149
- 5) Hale, W. G. (1965) Observations on the breeding biology of collembola (I). Pedobiologia, 5, 146-152.
- 6) Watanabe, M. (1988) Multiple matings increase the fecundity of the yellow swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* L., in summer generations. Journal of Insect Behavior, 1:17-29.
- 7) Watanabe, M. (1992) Egg maturation in laboratory-reared females of the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* L. (*Lepidoptera: Papilionidae*), feeding on different concentration solutions of sugar. Zoological Science, 9:133-141.
- 8) 長岡純治 (2009) 精子が動き出す仕組み. 虫たちが語る生物学の未来. pp114-119, (財)衣笠会, 京都
- 9) Omura S. (1938) Structure and function of the female genital system of *Bombyx mori* with special reference to the mechanism of fertilization. J. Facul. Agr. Hokkaido Imp. Univ., 40, 111-128