



Title	キイロショウジョウバエ種群における交尾器形態の進化：その機能研究に関するレビュー
Author(s)	上村, 佳孝; 三本, 博之
Citation	低温科学, 69, 39-50 生物進化研究のモデル生物群としてのショウジョウバエ. 北海道大学低温科学研究所編
Issue Date	2011-03-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/45188
Type	bulletin (article)
File Information	LTS69_007.pdf



[Instructions for use](#)

キイロショウジョウバエ種群における 交尾器形態の進化：その機能研究に関するレビュー

上村 佳孝¹⁾, 三本 博之¹⁾

2010年12月13日受付, 2010年12月20日受理

動物の交尾器, 特にオス交尾器の形態は, 他の形態形質よりも進化・多様化が速い傾向にあり, その機構について議論が続いている. 本稿では, モデル生物であるキイロショウジョウバエを含むキイロショウジョウバエ種群について, 交尾器形態の機能とその進化に関わる研究についてレビューした. オス交尾器による創傷行動の発見により, 従来の研究では見出されてこなかった, オス交尾器に対応した多様性がメス交尾器の側にも同定されるようになった. しかし, メス交尾器の多様性は, 柔軟な膜質構造の形態変化によるものが多い. 交尾時の雌雄交尾器の対応関係の把握は, そのような旧来の手法では観察の難しい構造の特定を容易にし, 種間比較や操作実験による機能の研究に足がかりを与える. そのため手法の一つとして, 交尾中ペアを透明化する技術を紹介し, 本種群が交尾器研究のモデル系となる可能性を示す.

The evolution of genitalia in the *Drosophila melanogaster* species group: a review on the studies of genital functions

Yoshitaka Kamimura¹, Hiroyuki Mitsumoto¹

Animal genitalia, especially those of males, generally evolve more rapidly compared to other morphological traits. The driving forces underlying such evolutionary trends are much debated. In the present article, we review evolutionary and functional studies on the genitalia of drosophilid flies (Diptera) belonging to the *Drosophila melanogaster* species group. Despite that the male genitalia of this group show astonishing diversity, previous studies failed to detect any species-specific differences in female morphology that corresponded to interspecific differences in the male genital morphology. However, recent discovery of copulatory wounding behavior, that is, the phenomenon that male genitalia inflict wounds on the genitalia of the mate, enabled us to identify counter-evolutions in the female genitalia. Such diversification in the female genitalia is mainly represented as modifications in the soft membraneous regions. With description of a newly developed transparentizing technique of mating pairs, we discuss the potential of this species group to be a model research system of genital evolution.

1. はじめに

体内受精をおこなう動物の多くでは, オスは交尾器を用いてメスに精子を渡し, メスはそれを受け取り, 卵の受精に必要な時まで貯蔵する. 精子の受け渡しがオスの交尾器の基本機能であるが, 交尾器形態はこのような単純な基本機能のみでは説明できないくらい多様であることが多い. 昆虫類を含む多くの動物において, 分類学の専門家が交尾器を観察しなければ, その動物が一体何者であるのかを正しく同定できない場合も多く, このこと

は, 動物の他の外部形態よりも, 交尾器は速く進化していく傾向があることを示している (Eberhard, 1985; Hosken and Stockley, 2004). その急速な進化をもたらす要因は何であろうか? 最も古くから知られる仮説は, 雌雄が正しい同種の交尾相手を他種から識別するために, 種特異的な交尾器形態が進化したとする考えである (Shapiro and Porter, 1989). この鍵と鍵穴 (lock and key) 仮説と呼ばれる考えによれば, 交尾開始後に交尾器の形態によって同種か否かが認識でき, もしも別種であれば交尾を中断することで卵 (または精子) の浪費を回避することができると期待される. しかし, 近縁種と遭遇する機会の少ない寄主特異性の高い動物 (例えばシラミ類) でも種特異的な交尾器形態の進化が観察されるなど, この仮説を強く支持する実例は乏しい

1) 慶應義塾大学・生物学教室

¹ Department of Biology, Keio University, Yokohama, Japan

(Eberhard, 1985; Hosken and Stockley, 2004). 現在では、精子競争 (メスの体内で複数のオスに由来する精子が卵の受精をめぐる競争関係に置かれること), あるいはメスによっておこなわれる精子の選択, 交尾の開始や継続時間をめぐる雌雄の対立といった, 交尾開始以後に作用する性選択の働きを重視する考え方が一般的となりつつある (Eberhard, 1985; Hosken and Stockley, 2004; Simmons et al., 2009). *Drosophila melanogaster* (キイロショウジョウバエ) は、遺伝学・分子生物学・発生生物学上の重要なモデル生物であるが、交尾器形態の進化研究においては、モデル生物として研究を先導しているとは言えないのが現状である。本稿では、ショウジョウバエ属 (*Drosophila*), シマショウジョウバエ亜属 (*Sophophora*) に属するキイロショウジョウバエ種群 (*D. melanogaster* とその近縁種を含む) を対象に、本グループの交尾器形態の進化に関する現状, 課題, 展望についてまとめてみたい。

キイロショウジョウバエ種群 (the *Drosophila melanogaster* species group) は 200 種近くが記載されている大きなグループで、12 の亜群 (種亜群 species subgroup) に分けられる (表 1; Bock, 1980; Lemeunier et al., 1986; Toda, 1991)。ショウジョウバエ科 (Drosophilidae) では 12 種についてそのゲノム情報の解読が完了しているが (*Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007), そのうち半数の 6 種が本種群に属している。種分化研究, さらに近年では進化発生学上のモデルとしても広く利用されており (例えば Prud'homme et al., 2006), 分子生物学的・遺伝学的情報が最も蓄積している生物群の一つと言える。

本種群に特徴的な形質としては、腹部背板に分断されない黒帯があること, オスは前肢附節に性櫛 (sex comb) を持ち、腹端が黒化すること, メスの管状受精

囊 (ventral receptacle; 交尾の際にオスから受け取った精子を貯蔵する器官の一つ) やオスの精巢は長く、後者はコイル状になることなどがあげられるが、各特長を個別にみると例外も多い (Sturtevant, 1942; Bock and Wheeler, 1972; Bock, 1980; Lemeunier et al., 1986)。しかし、材料の入手や飼育が困難な一部の亜群 (*D. longissima* 亜群, *D. denticulata* 亜群) は解析に含まれていないものの、これまでの分子系統解析の研究結果は本種群が単系統であること支持している (例えば Kopp, 2006; Da Lage et al., 2007; van der Linde et al., 2010)。研究結果は多くの亜群 (*D. montium*, *D. ananassae*, *D. melanogaster* 各亜群など) も単系統であることを支持しているが、*D. suzukii* 亜群については多系統と考えられている (Schawaroch, 2002; Kopp, 2006; van der Linde et al., 2010)。*D. montium* および *D. ananassae* 両亜群についてはそれぞれを種群として独立させる分類体系も提案されているが (Da Lage et al., 2007), ここではこれらもキイロショウジョウバエ種群に含めて扱うことにする。

ショウジョウバエ類の交尾器形態の進化の話題として、しばしばメスの体内にある管状受精囊の長さ, 精子の長さ (あるいは精巢長) が比例する例が取り上げられる。この話題に関しては多くの優れた研究があるが (例えば Joly and Schiffer, 2010), ここでは交尾器を「交尾の際に雌雄の直接的接触がある部位」と狭義にとり、これら内部生殖器の進化に関する議論については扱わない。また、以下、各種名は基本的には学名表記とし、一般的に使用される和名がある種については初出時のみ和名を併記した。

表 1: キイロショウジョウバエ種群の 12 亜群 (種亜群, species subgroup) とその代表種。代表種は本文中に登場するものや系統解析等の研究に用いられることが多いものを中心に選んだ。亜群より下の分類階級である種複合体 (species complex) については、本文中に登場するもののみ示した

亜群名	代表種
1. <i>D. ananassae</i> 亜群	<i>D. ananassae</i> , <i>D. pallidosa</i> , <i>D. ercepeae</i> , <i>D. varians</i> , <i>D. atripex</i> , the <i>D. bipectinata</i> complex の 4 種 (<i>D. bipectinata</i> , <i>D. parabipectinata</i> , <i>D. malerkotliana</i> , <i>D. pseudoananassae</i>)
2. <i>D. montium</i> 亜群	<i>D. baimaii</i> , <i>D. auraria</i> , <i>D. rufa</i> , <i>D. kikkawai</i> , <i>D. serrata</i> , <i>D. birchii</i> , <i>D. greeni</i>
3. <i>D. suzukii</i> 亜群*	<i>D. suzukii</i> , <i>D. biarmipes</i> , <i>D. mimetica</i> , <i>D. lucipennis</i>
4. <i>D. ficusphila</i> 亜群	<i>D. ficusphila</i>
5. <i>D. rhopaloa</i> 亜群	<i>D. rhopaloa</i> , <i>D. fuyamai</i>
6. <i>D. elegans</i> 亜群	<i>D. elegans</i> , <i>D. gunungcola</i>
7. <i>D. takahashii</i> 亜群	<i>D. takahashii</i> , <i>D. pseudotakahashii</i> , <i>D. lutescens</i> , <i>D. trilutea</i> , <i>D. prostipennis</i>
8. <i>D. eugracilis</i> 亜群	<i>D. eugracilis</i>
9. <i>D. melanogaster</i> 亜群	<i>D. erecta</i> , <i>D. orena</i> , <i>D. teissieri</i> , <i>D. yakuba</i> , <i>D. santomea</i> , the <i>D. melanogaster</i> complex の 4 種 (<i>D. melanogaster</i> , <i>D. simulans</i> , <i>D. sechellia</i> , <i>D. mauritiana</i>)
10. <i>D. flavohirta</i> 亜群	<i>D. flavohirta</i>
11. <i>D. longissima</i> 亜群	<i>D. longissima</i>
12. <i>D. denticulata</i> 亜群	<i>D. denticulata</i>

*多系統とされる (本文参照)

2. ショウジョウバエ類の交尾器形態と用語体系をめぐむ問題

本稿で議論の対象とするキロショウジョウバエ種群も含めて、ショウジョウバエ科のオス交尾器は、phallic organとその周辺を取り囲む形で存在するperiphallic organの2つに大別して扱ふと便利である。この区分は「交尾時にメスの生殖管内に挿入される部分」と「交尾時にメス生殖管とそれを囲むメス交尾器に外から接触・把握する部分」という機能的分類にほぼ相当する。ここではまず、*D. sechellia* (セイシェルショウジョウバエ; *D. melanogaster* 亜群に属する) と *D. ananassae* (アナナスショウジョウバエ; *D. ananassae* 亜群に属する) を例に、キロショウジョウバエ種群のオス交尾器形態について概説する (図1)。メスの交尾器については、内部生殖器と併せて基本構造を図2に示す。本稿では基本的に McAlpine (1981), Zhang and Toda (1992), Hu and Toda (2001) で提唱・使用されている用語体系に従う。これは、ハエ目 (Diptera) 全体での共通性が高い用語体系である。

2.1 オスの periphallic organ

オスの交尾器の最も大きな部分を構成するのは第9腹

節である。第9腹節背板 (9th abdominal tergite) は鞍状に発達し、epandrium (図1 a, b, d) と呼ばれる (多くの文献で genital arch と呼ばれる; 表2)。この後方背側には肛門が開口し、その左右両脇には cercus (肛板) が存在する。種によっては肛板の特に腹側が強い剛毛等で修飾されている。その腹側で、epandriumの左右は細い架橋部で結ばれているが、そこから剛毛を備えた左右1対の突起が腹側へ向かって伸びており、これを surstylus (把握片) と呼ぶ。一般に強い剛毛を多数備えるが、多くの種ではその一部は鈍端な peg-like setae (ペグ状剛毛) となる。*D. ananassae* 亜群の大部分の種などでは、cercus と surstylus の間に、ventral cercal lobe と呼ばれるやはり剛毛を備えた1対の突起を有する場合がある (図1 d)。Epandriumの左右腹側末端の突出部は ventral lobe と呼ばれ、多くの長毛を備えるのが普通である。

2.2 オスの phallic organ

Phallic organ は、hypandrium (第9腹節腹板が変形したものと考えられている) の背側に存在し、交尾の際以外は periphallic organ、特に左右の surstylus の間に隠れていて観察しにくい。後述する一部の例外を除き、中央に1本の aedeagus があり、精巢で作られた精子や

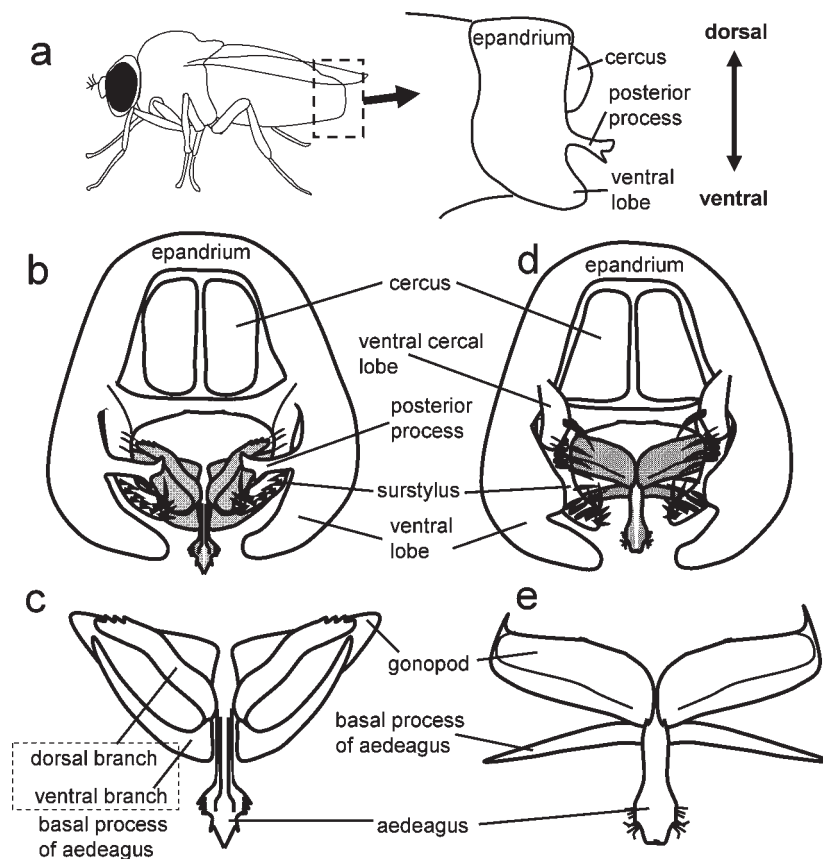


図1: キロショウジョウバエ種群2種のオス交尾器の模式図。(a-c) *Drosophila sechellia* (*D. melanogaster* 亜群), (d, e) *D. ananassae* (*D. ananassae* 亜群)。(a)はオス側面図と交尾器部分の拡大図。(b-e)はオス交尾器を後方から見た図。(b, d)はperiphallic organとphallic organ双方を示し、後者は灰色で示している。(c, e)はphallic organの拡大図。Cercus等の毛や、phallic organの一部(hypandriumやparamere)は省略して描く。Phallic organは交尾時の開いた状態として描いてある。*D. ananassae*のphallic organについては図6も参照。

表2: キイロシヨウジョウバエ種群の雌雄交尾器に関する用語

	本稿での用語	よく使われる別称
オス交尾器		
Periphallalic organs	epandrium cercus(-i) ventral cercal lobe(s) surstylus(-i) posterior process(es) ventral lobe(s)	genital arch, tergite IX anal plate(s), secondary clasper(s), tergite X secondary clasper(s) (primary) clasper(s) ventral lobe(s), lateral lobe(s), posterior lobe(s) lateral plate(s)
Phallic organs	hypandrium hypandrial apodeme aedeagus aedeagal apodeme basal process(es) of aedeagus dorsal branch(es) ventral branch(es) paramere(s) gonopod(s)	sternite IX, novasternum ventral fragma penis, phallosome, phallus penis apodeme anterior paramere(s) posterior paramere(s)
メス交尾器	oviscape oviscapt(s)	ovipositor oviscape valve(s), ovipositor plate(s), ovipositor lobe(s), egg guide(s), vaginal plate(s), sternite VIII

付属腺で作られた化学物質を含む精液をメスへと渡す管として機能する。背側から aedeagus を囲むように1対の gonopod (多くの場合葉状) があり, 交尾時には左右に開く。Aedeagus に対して腹側には, 1対の paramere と呼ばれる突起があり, 数本の感覚毛 (sensillum) を備えることで特徴づけられる。キイロシヨウジョウバエ種群では小さいことが多く (図6参照), 交尾時の機能もよくわかっていない (ただし, 3.2.1において後述する *D. mimetica* など例外も多い)。Aedeagus の根元から関節して, もしくは aedeagus に融合して, 通常1対の強く硬化した突起がある。この basal processes of the aedeagus (以下, basal process と略記) は, *D. melanogaster* 亜群においては2対あり, aedeagus の背側 (dorsal branch) と腹側 (ventral branch) に分けられる (図1c)。腹側の1対はしばしば gonopod と融合している。

2.3 メスの交尾器と内部生殖器

主に腹部の第7節以降から構成されるメスの交尾器は, 一般にオスに比べて単純な構造をしている。ここでは内部生殖器と併せてその一般的特徴を概説する (図2)。左右1対の卵巣で成熟した卵は輸卵管を通り, 精子貯蔵器官である1対の spermatheca や1本の ventral receptacle の中に蓄えられていた精子によって受精される。受精卵はその後方にある uterus と呼ばれる部分に産卵まで保持される。ここは, メスの生殖管 (reproductive tract あるいは genital tract) が太くなっている部分であるが, その後方で狭まり (post-vagina と呼ばれることがある; 例えば Lung and Wolfner, 1999), 腹端に外部生殖口として開口する。

外部生殖口は交尾の際にはオスの phallic organ の挿入を受けるとともに, 産卵口として機能する。その部分は左右から oviscapt と呼ばれる sclerite に挟まれている。そのクチクラの硬化の程度は種ごとに様々である。これらの領域は産卵管に相当し, oviscape と呼ばれる (図2)。

肛門はオスと同様に生殖口に対して背側に位置し, 鞍状の第8腹節背板に囲まれた部分に開口する。第10腹節背板および第10腹節腹板がそれぞれ変形したものとされる epiproct, hypoproct の2枚の sclerite に上下から挟まれる形で開口しており, 左右の cercus で挟まれているオスの場合とは異なる。メスの epiproct-hypoproct の部分は, 交尾中にオス交尾器とかみ合うことは無いようで, 一般に交尾器 (genitalia) の範疇には含めないことが多い。

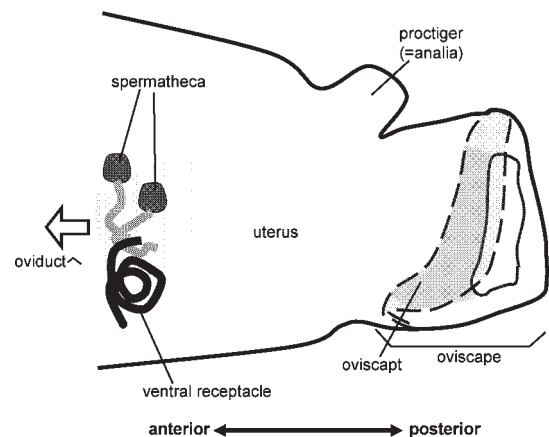


図2: キイロシヨウジョウバエ種群のメスの内部生殖器および交尾器の模式図 (側面図)。

2.4 用語体系をめぐる問題

以上概説したように、ショウジョウバエ類の交尾器形態、特にオスのそれは多くのパーツからなる大変複雑な構造であり、混乱や誤解の原因となっている (Kamimura and Polak, 2010). 問題をさらに複雑にしているのは、その用語体系の混乱である。ショウジョウバエ科以外のハエ目研究者が一般的に用いている用語体系 (ただし、用語の統一や相同性に関する議論が全て解決しているわけではない) が存在するのに対し、モデル生物として長い歴史を持つショウジョウバエ類では、ショウジョウバエ研究者 (例えば遺伝学者や発生生物学者) に特有の用語体系が複数あり、交尾器の同じパーツが研究者毎に違った名称で呼ばれているのが現状である (表2). 例えば、ventral lobe という同じ用語が、研究者によって periphalllic organ の別の部位を指し示すのに使用されていることがわかる。

今後、ショウジョウバエ類のみならず、ハエ目の様々な分類群で分子発生学的な研究が進展し、交尾器形態の相同性や進化についての横断的な議論をおこなえる素地が形成されていくだろう。そのような状況を考えると、ハエ目全体での共通性が高い用語体系を採用していくことが望ましい。生態・行動分野等では、専門的な形態に関する用語よりも、「把握器」等の一般的な呼称の使用が好まれることもあるが、研究対象とした部位を図示するとともに、採用した用語体系とそれに基づく部位の名称を併せて明示することが重要であると考えられる (Kamimura and Polak, 2010).

3. キイロショウジョウバエ種群の交尾器形態に関する進化・機能研究

3.1 交尾器形態の適応的意義に関する研究

交尾器の機能に関する研究は、そのアプローチから大きく二つに分けることができる。一つは特定の種類の交尾器の使用について記載的観察をおこなう、あるいは交尾器パーツに切除等の実験的操作を加えることにより、その機能を推定・検証するアプローチである。もう一方は、種内・種間にみられる交尾器形態の変異を利用し、その機能を推定する比較法のアプローチである。

代表的なモデル生物である *D. melanogaster* をはじめとして、ショウジョウバエ類はその種内の遺伝的変異 (人為的に作出されたものを含む) に関する膨大な研究の蓄積がある。しかし、交尾器形態の遺伝的変異に関する研究は、発生生物学上のテーマに関わるものを除けば少ない。野生種の種内 (あるいは生殖的隔離の認められない個体群間) に観察される交尾器形態変異の報告もあるが (例えば Matsuda et al., 2005; Joly et al., 2010), 機能の研究とは結びついていないのが現状であり、形態的差異の比較に基づくアプローチによる研究は、全て種

間の比較を通しておこなわれている。

3.1.1 種間比較に基づく研究

キイロショウジョウバエ種群の種間に見られる交尾器形態の差異に初めて説明を試みた論文は Robertson (1988) によるものと思われる。彼は、キイロショウジョウバエ種複合体 (the *D. melanogaster* species complex) の4種、すなわち、*D. melanogaster* とそれに最も近縁な *D. simulans* (オナジショウジョウバエ)、*D. sechellia*, *D. mauritiana* の3種を対象に、posterior process の種間の形態の違い (図3) に着目した研究をおこなっている。この突起は epandrium の一部が後方へ伸長したものであり (図1 a, b), 4種の共通祖先で進化したと考えられている (Jagadeeshan and Singh, 2006). 最も簡便かつ確実にこの4種を識別するための形質として利用されており、種間雑種を利用した研究から、その形態差の遺伝学的側面については研究の蓄積がある (Coyne, 1983; Coyne and Kreitman, 1986; Liu et al., 1996; True et al., 1997; MacDonald and Goldstein, 1999; Zeng et al., 2000). しかし、機能の観点から探求した研究は、Robertson (1988) までなかった。彼は液体窒素で固定した交尾中のペアを走査型電子顕微鏡 (以下、SEM と略記する) で観察し、① posterior process は、交尾中にメスの腹節第7および第8背板 (Robertson, 1988 では第8および第9背板となっているが、これは退化したとされる腹節のカウントの仕方の違いによるものである) の下に隠されるかたちで、メスの腹部を把握し、②メスにおいて、posterior process の挿入を受け入れると考えられる部位には、posterior process のサイズの種間差に相関した違いが観察される、と報告している。そして、大きな posterior process を持つ *D. simulans* のオスと *D. mauritiana* のメスでは種間の交尾が成立し難く (48時間以内の交尾成功率0%), 逆では高率 (76%) で交尾が成功することの原因を、この雌雄の交尾器形態のサイズの対応にあるものと考察している (Robertson, 1988).

上記①の posterior process の機能に関しては、後述の通り、その後の研究において同様の観察結果が得られている。しかし、②の雌雄の交尾器に見られる相関については、その後、この結果を追認する報告は無い。ハエ類の腹部は、硬化した背板・腹板が、柔軟な節間膜に

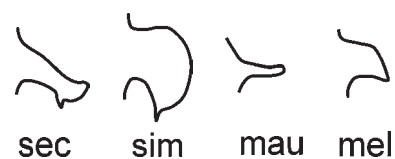


図3: キイロショウジョウバエ種複合体 (the *Drosophila melanogaster* species complex) 4種の posterior process の形態。左側のものを後方から見た図。sec, *D. sechellia*; sim, *D. simulans*; mau, *D. mauritiana*; mel, *D. melanogaster*. 図1 a, b も参照。

よって結合された蛇腹状の構造であり、彼の記載した部位は再現性の高い観察をすることが困難である(図4)。また Robertson (1988) には詳細な観察手法の記載がなく、追試をおこなうこと自体が困難となっている。

Eberhard and Ramirez (2004) は、キイロショウジョウバエ種群の2種 (*D. melanogaster* と *D. malerkotliana*) と、他の2種群に属する各1種 (*D. saltans* と *D. willistoni*) について、オスの交尾器の種間差を探究する研究をおこなっている。ここでは後者2種の観察結果の詳細については省略する。彼らは、交尾中のペアを液体窒素で固定し、冷凍状態を保ったまま、エタノール固定と乾燥をおこない、SEMでの観察をおこなっている。一部については、固定後に雌雄を引き離し、交尾中に隠されて見えない部分の観察もおこなっている。観察にあたり、交尾器形態、特にオスのその速い進化に関して次の三つの主要な仮説を挙げ、それぞれの仮説が成立した場合の予測を与えている。

交尾器の進化が同種の識別のための「鍵と鍵穴」として進化する場合 (Shapiro and Porter, 1989)、雌雄交尾器の間には形態的な対応が予測される。雌雄が交尾の成立や精子の授受に関して対立状態にある時 (性的対立 sexual conflict と呼ぶ)、例えば、オスは交尾を望むのに対して、メスが交尾を拒否しようとする際、雌雄交尾器の形態に軍拡競争 (arms race) が生じると予想される。この時、例えばオスが交尾を拒否しようとするメスを把握するような構造を進化させるのに対し、メスはその把握を逃れるような構造を進化させるだろう。これは拮抗的共進化 (antagonistic coevolution) 仮説と呼ばれ、「鍵と鍵穴」仮説と同様に雌雄交尾器の間に形態的対応が見られることが予測される。一方、cryptic female choice 仮説は、メスはオスの交尾器形態に基づいて、そのオスから受け取る精子の量や受精の確率を変

化させているという考えである。オスの交尾器形態と、そのオスの精子によって受精された子の生存率や繁殖率との間に相関がある場合、メスによる精子の選択が進化しうることが理論的に示されている (Yasui, 1997)。先の「鍵と鍵穴」仮説が同種か異種かの識別に関わる仮説であるのに対し、この仮説は同種オス間での選択である点が異なる。この仮説が成立する場合、メスは感覚神経系を介して選択をおこなっている可能性もあるため、雌雄交尾器の間の形態的対応が観察できるとは、必ずしも予測されない。

彼らの観察の結果は次の通りである。*D. melanogaster* の posterior process (Eberhard and Ramirez, 2004 中では ventral lobe) に関しては、Robertson (1988) 同様、主にメスの腹部第7背板の下に隠されることを報告している。観察した4種すべてについて、左右の surstylus は交尾中に開いていることを観察し、メスの oviscapt (Eberhard and Ramirez, 2004 中では oviscape valve) を押し開き、aedeagus 等の挿入を助ける働きを持つと考察している。*D. malerkotliana* の1対の basal process (Eberhard and Ramirez, 2004 中では aedeagus が左右に分割されたものと誤認されている) については、左右が融合した状態で通常の aedeagus と同様に機能すると報告されているが、これは表面構造のみの観察に基づいたことによる誤りであり、本種を含むフタクシショウジョウバエ種複合体 (the *D. bipunctata* complex) の特殊な交尾については 3.2.2 において詳述する。

彼らはまた、メス交尾器の中で数少ない硬化した構造である oviscapt に、オスの交尾器形態の種間差に対応した点を探した。しかし、そのような変異をメス側に見出すことができなかった彼らは、「鍵と鍵穴」仮説や拮抗的共進化の証拠は得られなかったと結論付け、消去法による弱い状況証拠ではあるが、メスの感覚神経系を介した cryptic female choice がショウジョウバエ類の交尾器進化に重要な役割を果たしているものと推察している。

Jagadeeshan and Singh (2006) は Robertson (1988) と同様にキイロショウジョウバエ種複合体における posterior process の種間差 (図3) に着目した研究をおこなっている。その手法は Eberhard and Ramirez (2004) が用いたものと基本的に同様であるが、特に *D. melanogaster* と *D. simulans* の2種について、種間交尾も含めて、交尾の時間経過に沿った固定をおこない、交尾経過中の雌雄交尾器の変化を報告している。Robertson (1988) や Eberhard and Ramirez (2004) の観察とほぼ同様の結果を報告しているが、cercus がメスの oviscapt 基部の把握に用いられている可能性を新たに指摘している。また、種間交尾においては、種内で見られたような交尾器のカップリングの成立が遅れるものの、交尾時間についてはオスが決定する傾向にあ

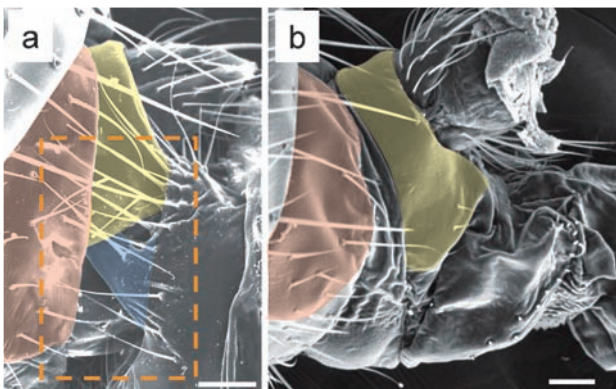


図4: (a)交尾中、および(b)伸展された状態での *Drosophila sechellia* のメスの腹端部のSEM像。赤、黄色で示された部分はそれぞれ第7および第8腹節背板を示す。(a)において、青で示されているのは第7および第8腹節背板の下に挿入されているオスの posterior process、破線で囲まれている部分が Robertson (1988) の Fig. 2 において、オスの posterior process の種間差 (図3参照) に対応する構造として描かれている部分である。スケールバーは 25 μ m。

り、種内交尾と大きな違いがないことを報告している。この研究でもまた、メスの側にオスの種間差に対応する構造は見出されていない。

Kamimura (2010) も *D. melanogaster* の交尾を観察し、posterior process について同様の観察結果を得ているが、これについては関連した話題とともに 3.2.1 において後述する。

3.1.2 交尾器形態の実験的操作に関する研究

Polak and Rashed (2010) は、マイクロレーザーを用いて、*D. bipectinata* (フタクシヨウジョウバエ) の ventral cercal lobe (図 1 d) の先端の剛毛を切除する実験を行い、手術を受けた個体の交尾成功率および交尾に成功した際の精子の受け渡しの有無を調査した。その結果、コントロール (周辺の他の剛毛をランダムに選んで切除したもの) に比べ、交尾成功率が半減するが、交尾に成功した場合には、コントロールと変わりなく精子を渡していることを明らかにした。このことは、ventral cercal lobe が把握器官の一つとして重要な役割を持つことを示唆している。彼ら自体は、この器官の使用を直接観察していないが、同様な交尾器の構造を持つ *D. malerkotliana* の交尾を観察した Eberhard and Ramirez (2004) の Figs. 6, 9 には、ventral cercal lobe がメスの oviscapt の腹側と接触している様子が写されており、推定された把握機能と矛盾しない (Kamimura and Polak, 2010)。ただし、Eberhard and Ramirez (2004) ではこの点について言及されていない。

同様に、Acebes et al. (2003) によって、*D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. sechellia* の surstylus 先端付近の感覚毛をピンセットで切除する実験がおこなわれている。*D. melanogaster* では、片側一方のみの切除では交尾成功率に有意な低下は認められないが、左右両側を切除すると交尾成功率が半減すると報告されている。ただし、片側のみの切除の場合、オスの交尾姿勢が感覚毛を切除した側の反対側に傾く。このような効果は、他の 2 種では認められていない。また、ventral lobe の毛を同様に処理した場合には交尾成功率や交尾姿勢に影響は無かった。この研究では、精子がメスに渡されているか否かについては調査されていない。

3.2 交尾時のオス交尾器による創傷現象

交尾の際にオスが交尾器により、メスの交尾器やその周辺に傷をつける現象が、甲虫類 (Crudginton and Siva-Jothy, 2000; Rönn et al., 2007), アリ類 (Baer and Boomsma, 2006; Kamimura, 2008), クロバエ科 (Merritto, 1989)・ツヤホソバエ科 (Blanckenhorn et al., 2002; Teuschl et al., 2007) といったハエ類など、様々な分類群の昆虫で報告されている。そのような現象を本稿では交尾時創傷 (copulatory wounding) と呼ぶことにするが、キイロシヨウジョウバエ種群でも広く生じていることが分かってきた (Kamimura, 2007,

2010)。交尾時創傷についてこれまでにおこなわれてきた研究は、その種間変異に関するものであるが、ここでは 3.1.1 と分けて、研究例を紹介したい。

3.2.1 キイロシヨウジョウバエ種群における交尾時創傷

これまでにキイロシヨウジョウバエ種群 9 亜群 28 種について調査した結果、82%にあたる 23 種において、交尾したメスの交尾器や生殖管の末端部に現れる褐色斑が観察されている (Kamimura, 2007, 2010)。昆虫は体表に傷が生じた場合、免疫反応により傷の部分に「かさぶた」に相当する構造が作られ、褐色を呈するようになる (Pathak, 1993)。既交尾のメスにのみ観察される「かさぶた」は、交尾時創傷を示唆するが、その位置、サイズ、数は種によって、場合によっては種内においても変異が見られる (Kamimura, 2007, 2010)。いくつかの種では傷を負わせるオス器官が特定されている。*D. mimetica* では、オスは鋭くとがった 1 対の paramere を持ち (図 5 a), メス交尾器の背側体表 (oviscapt と analia の間の部位) に傷を負わせる。メスが傷を負う部分は 1 対の椀状の窪みとなっている (図 5 b-d; Kamimura, 2007)。*D. melanogaster* のメスにも交尾時創傷が見られるが、本種の場合はオスの aedeagus に付属する 2 対の basal process のうち、背側の 1 対 (dorsal branch) によって傷が作られる (Kamimura, 2010)。この突起は、aedeagus とともに交尾時にメスの生殖管内に挿入されるため、*D. mimetica* とは異なり、生殖管の表面、いわばメスの「内表面」に傷がつけられる (Kamimura, 2010)。メスの傷を負う部分には、ひ

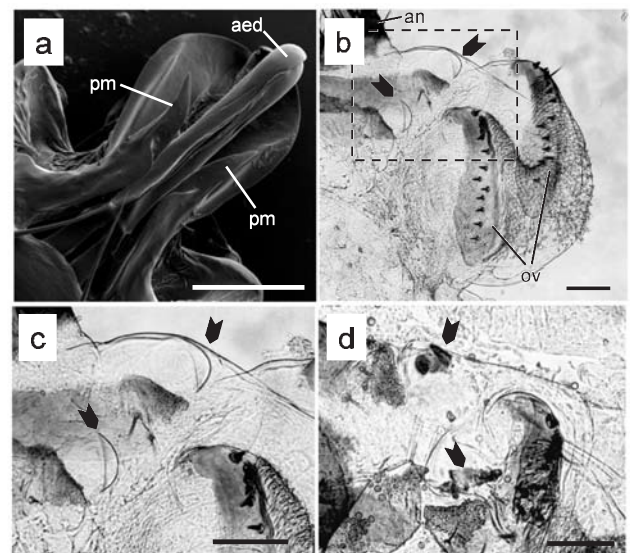


図 5: *Drosophila mimetica* の雌雄交尾器。(a) オスの phallic organ には aedeagus (aed) の両側に左右 1 対の鋭い先端をもつ paramere (pm) がある。(b) メス交尾器には analia (an) と oviscapt (ov) の間の背側体表に 1 対の椀状のポケット (矢印で示す) を持つ。(c) 未交尾メスにおける (b) の点線部の拡大。(d) 既交尾メスの (c) と同一部; オスの paramere によって生じた傷 (矢印) がポケットに生じている。スケールバーはすべて 50 μ m。

だ状の浅い窪みがあり, そこに dorsal branch が交尾中にかみ合うことで, dorsal branch 先端により傷がつくものと考えられている. また, この創傷部位近傍は, メスの体表側からはオスの posterior process によって把握される. すなわち, 生殖管の内外から挟みこむ形で, 交尾中のメスが把握されている (Kamimura, 2010). このように, 交尾時にメスが傷を受ける部位や, 創傷に関与するオスの構造は多様である. 以下, 創傷の特別なケースである traumatic insemination (傷穴を通して精子を渡す現象) を紹介し, 交尾時創傷の進化に関する議論と研究の現状を概観したい.

3.2.2 傷穴を通して精子を渡す (traumatic insemination)

フタクシショウジョウバエ種複合体 (the *D. bipunctinata* species complex) は, *D. bipunctinata*, *D. parabipectinata*, *D. malerkotliana*, *D. pseudoananassae* の 4 種からなり, *D. ananassae* 亜群に属する. この 4 種に近縁な *D. ananassae* の phallic organ が 1 本の aedeagus, 1 対の basal process, 1 対の paramere, 1 対の gonopod からなるのに対して (図 1e, 6), フタクシショウジョウバエ種複合体の 4 種では, 中心の aedeagus が著しく退縮する代わりに, その部分に 1 対のよく発達した爪状突起を持つ点が特殊である (図 6). この爪状突起は aedeagus が二叉したものと従前は解釈されてきた (例えば Bock and Wheeler, 1972; Eberhard and Ramirez, 2004). しかし, SEM 観察等の結果, フタクシショウジョウバエ種複合体の aedeagus は退化して無色透明の柔軟な膜状構造になっており, 2 本の爪状突起はその両側の basal process が大きく発達したものであった (Kamimura, 2007). この特異な交尾器構造を持つグループの精液移送の過程を明らかにするため, 交尾中のペアを瞬間冷凍固定し, 共焦点レーザー顕微鏡で観察をおこなった. この際, オスに蛍光色素 (Rhodamine B) を摂食させることで精液を経口的に染

色した. その結果, フタクシショウジョウバエ種複合体の basal process はメスの生殖口の両脇にある膜質のポケット (窪み) に挿入され, その底を破り, 傷穴を通して精液を渡すことが明らかとなった. 近縁な *D. ananassae* では, basal process はやはりメスにある同様のポケットに傷を与えるが, 精子は傷穴ではなく, 生殖口に挿入された aedeagus から渡される (Kamimura, 2007).

このような特殊な精子の渡し方の進化をもたらした選択圧については不明である. 創傷行動そのもののオスにとっての意義は以下で議論するが, メスにとってはコストである可能性が高い. メスは繁殖のために最低でも 1 回の交尾から精子を得る必要があるが, その必須の移精 (sperm transfer) と創傷とを不可分とすることで, オスがより確実にメスに傷を与えている可能性がある. 詳しい精液移送のメカニズムの解明とともに, 今後の研究課題である.

傷穴を通して精子を渡すという現象はネジレバネ類や一部のカメ類などいくつかの分類群の昆虫で報告されているが, 特に研究されているのはトコジラミ類である (例えば Siva-Jothy, 2006). 興味深いことに, トコジラミ類においても創傷に用いられる器官は aedeagus (カメムシ類において一般的に精子を渡す器官) そのものではなく, それに隣接する paramere と呼ばれる突起が発達し, aedeagus と融合したものである (Siva-Jothy, 2006). Traumatic insemination の進化的起原についてはほとんど情報がないが, このような類似性は, その起原が交尾時の創傷現象であった可能性を示唆する.

3.2.3 精液中化学物質の生理的作用との関連

交尾時創傷がキイロショウジョウバエ種群の多くの種で観察されることがわかってきたが, その行動のオスにおける意義やメスに対する影響についてはほとんど何も明らかにされていないのが現状である. Siva-Jothy

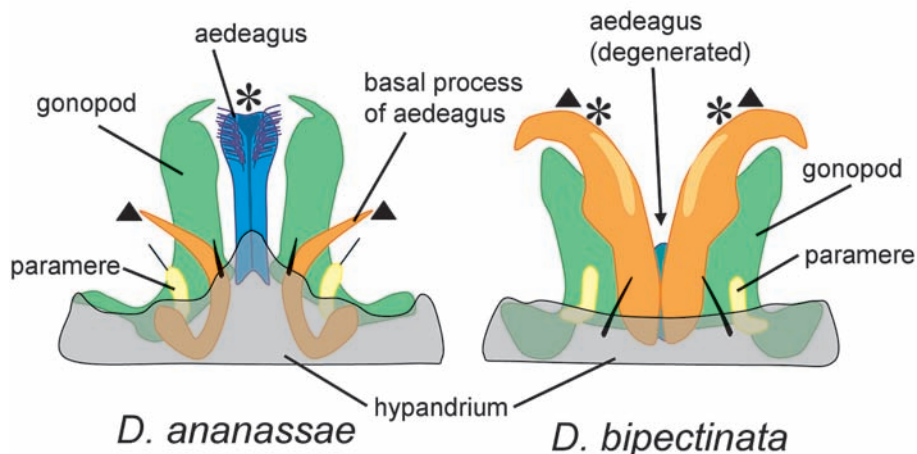


図 6: *Drosophila ananassae* と *D. bipunctinata* の phallic organ の比較. 腹側 (ventral) より観察した図. * はメスに精子を渡すのに使用される器官を, ▲ は創傷器官を示す. *D. bipunctinata* の場合は 1 対の basal process が両機能を兼ねている. *D. ananassae* の phallic organ は, 図 1d, e とは異なり, 閉じた状態で描いてある.

(2009) はこのような交尾時創傷行動の意義として、オスの生産する精液物質のメス体内への浸入口としての機能を提案している。*D. melanogaster* をはじめとする同種群の多くの種において、オスが交尾相手のメスの生理特性を自分に有利な方向に変化させる精液タンパク質を生産することが報告されている（最近の総説としては Ravi Ram and Wolfner, 2007 参照）。これらのタンパク質はオスの精巣付属腺で生産されるため、accessory gland protein (s) を略し Acp (s) と呼ばれることが多い。その具体的作用は、その後の交尾拒否行動、速やかな排卵・産卵などであるが、同時にメスの寿命や生涯産卵数を低下させる「毒」としての作用も報告されている。このようなことから、メスが再交尾する前に、自分の渡した精子による受精卵を多数産ませるといふ、オスによる化学物質を介したメスの行動制御（ケミカルコントロール）と解釈されている。

Lung and Wolfner (1999) は、キイロシヨウジョウバエにおいて各種 Acp がオスからメスへ渡された後のメス体内での分布を調査した。一部の Acp はメスの内部生殖器に局在するのに対し、他の Acp、特に分子量の小さいものはメスの体液中からも検出されることがわかった。また、免疫染色の結果から、この体液への移動はメス生殖管の post-vagina 領域で生じているものと推測されている (Lung and Wolfner, 1999)。Post-vagina 領域は、キイロシヨウジョウバエにおいてオスが傷をつける部分であるが、もしこの傷が Acp の侵入口として機能している場合、Lung and Wolfner (1999) が観察したような、分子量依存的な浸入が起こるとは考え難い。実際に、先に紹介した手法で精液を蛍光染色し、傷から体腔への精液侵入を調査したが、そのような様子は観察されなかった (Kamimura, 2010)。これは傷が aedeagus 先端の射精口に対して後方に生じるため、精液と接触することが少ないためと考えられた。このようなことから、*D. melanogaster* においては、Acps の侵入口を作るために交尾時創傷が進化してきたとは考え難い (Kamimura, 2010)。同様に、*D. mimetica* のように外部体表にのみ傷をつける種類でも傷は精液の侵入口になりえない。しかし、*D. eugracilis* (*D. eugracilis* 亜群) では、射精口周辺に多くの棘状突起を持ち、それによってメス生殖管に傷が生じ、そこから精液が体腔に侵入する様子が観察されている (Kamimura, 2010)。このような種類においては、Siva-Jothy (2009) の仮説を実験的に検討していくことが重要であろう。

3.2.4 物理的ダメージや感染リスクとの関連

交尾時創傷行動の、オスにとっての適応的意義に関するもう一つの仮説として以下のようなものがある。創傷による物理的ダメージにより、①傷のためメスが再交尾することのコストが大きくなり、再交尾が抑制される (Johnstone and Keller, 2000)、または②メスの期待余

命が短縮し、それに対する適応的応答としてメスがより早くに（再交尾前に）多くの卵を産卵するようになるため、交尾時に創傷したオスの適応度が上がる（例えば Lessells, 1999）という考えである。これは交尾をめぐる性的対立にもとづく仮説であり、ここでいう物理的ダメージには、傷口を通しての病原体への感染リスクも含めて考えることができる。これら仮説の検証実験は交尾時創傷が発見される以前に、Morrow et al., (2003) により *D. melanogaster* について既におこなわれていた。

Morrow et al. (2003) は、*D. melanogaster* を含む 3 種の昆虫類について、人為的な創傷がメスの繁殖に及ぼす影響を調査した。具体的には、メスの触角・肢・翅のいずれかを一つ切除する、あるいは胸部または腹部を細い針で刺すという 5 種の物理的ダメージを与えたいうで、その後の産卵速度と再交尾率を調査している。結果として、*D. melanogaster* では、胸部・腹部への創傷により産卵速度は低下しても、再交尾率は変わらず、オスに「交尾終了後の利益」をもたらすものではないと結論している。この結論は、彼らが調べた他の 2 種の昆虫についても同様であり、交尾中にメスにダメージを与える行動は、例えば交尾の際に拒否しようとするメスを把握する際の副産物であり、ダメージそのものには機能がないものと考察している。

Morrow et al. (2003) の実験において人為的につけられた傷は、交尾による傷と部位も程度も異なるが、*D. melanogaster* においては交尾による傷の方がより軽微であると考えられ、交尾時創傷がオスの「交尾終了後の利益」に貢献している可能性は低いと考えられる。ハヤトビバエの 1 種など他の昆虫でも、交尾時創傷は交尾中の把握による副産物という見方を支持する結果が報告されている (Edvardsson and Tregenza, 2005; Teuschl et al., 2007; Hotzy and Arnqvist, 2009)。

交尾時創傷によって、メスが病原体に感染するリスクが高まることも予想されている (Siva-Jothy, 2009)。*D. melanogaster* においては、交尾の際にオスからメスに渡される Acp の作用によって、各種抗菌タンパク質の転写活性の上昇が報告されており（例えば Domanitskaya et al., 2007）、最近では、病原体の侵入を伴わない創傷のみでも、一部の抗菌タンパク質が発現誘導されることが明らかとなってきた (Wigby et al., 2008)。メスに対する物理的ダメージの影響は、このような免疫防御によってマスクされている可能性がある。抗菌活性の進化も考慮に入れて、交尾時創傷の進化的意義を検討していく必要があるだろう。

4. 今後の研究への展望

4.1 旧来の研究の問題点

ここまで、キイロシヨウジョウバエ種群に観察される

雌雄交尾器形態の変異とその進化にまつわる研究事例を紹介してきた。同種群の研究を対象を絞ったが、ここで紹介したような機能研究は、ショウジョウバエ類の他のグループでは、筆者らの知る限りおこなわれていない(ただし, Eberhard and Ramirez, 2004 も参照)。ショウジョウバエ類の多様な交尾器形態は、飼育・入手の容易さや遺伝・系統に関する情報の豊富さから、交尾器形態の多様化・進化の機構を探る格好のモデルとなり得る可能性を秘めている。しかし、その交尾器の進化のメカニズムについては多くの点が推察の域を出ていないのが現状と言えるだろう。各交尾器パーツの機能に関してさえ、交尾時にどこにどのような形で位置するのかといった基本的な情報が不明であったり、誤って認識されていたりする。そのような情報のないままに、切除実験や種間比較をおこなったとしても、結果を適切に解釈することは困難である。オスの交尾器は複雑であり、メス交尾器は柔軟で形が定まり難く、交尾時に多くのパーツが外から見えなくなるような昆虫の交尾器に対して、新しい観察手法が必要である。以下我々が検討している交尾中ペアの透明化の手法を紹介し、その可能性とともに今後の展望を議論したい。

4.2 透明化手法の開発と検討

McGurk et al. (2007) はショウジョウバエの外皮を透明化し、内部構造を3Dで観察する手法を考案している。McGurk et al. (2007) は交尾器や交尾中のペアの観察をおこなっていないが、以下、我々がその手法を交尾中ペアに応用した結果を紹介する。

交尾時の雌雄交尾器の位置関係を保って観察するためには、ペアの瞬間固定が必要となる。そのためには液体窒素 (Eberhard and Ramirez, 2004 などで使用されている) もしくは粒状ドライアイスを加えた100%エタノールを、交尾中のペアの入った容器に注ぐことで固定できる。そのままエタノール中で -20°C に保管し、2週間以上固定することで、常温に戻しても交尾中の雌雄交尾器の位置関係が保たれる。

十分に固定した交尾ペアを10分程度、常温の水中に移すことで、次の寒天包埋の前処理とする。1%寒天中に包埋し、寒天が固まったらトリミングをおこなう。切り出したブロックを100%メタノールもしくは100%エタノール中で脱水する。脱水が充分でないと次の処理において、寒天が半透明に硬化してしまい観察が困難となるので、ブロックが大きい場合は特に注意が必要である。BABB溶液(ベンジルアルコールと安息香酸ベンジルを1:2 v/vで混合した溶液)に寒天ブロックを移すと、透明化および脱色が始まる。BABB溶液で透明化・脱色をおこなう最適な時間は用いる材料と観察したい構造に依存する。*D. bipunctata*のように、雌雄の腹部末端に黒色部が少ない種では、1日以内にphallic organを透視できるようになる(図7)。*D. melanogaster*

のように特にオスの腹部末端の黒化部が広い種であっても、100日程度の液浸により全身がほぼ無色透明になる。内部の構造も同時に脱色されていき、コントラストの弱い構造は観察が難しくなっていくため、定期的に取り出して検鏡し、最適な処理時間を求める必要がある。

4.3 おわりに

ショウジョウバエ科、そしてハエ目に限らず、これまでの昆虫類の交尾器形態の研究はメス側の研究が立ち遅れてきた。メス側の交尾器には変異が少ないということが言われてきたが、ここで紹介してきた研究事例のように、オス交尾器に対応するメス側の形態変異は柔軟な膜質構造上に生じることが多く、従来の乾燥処理やSEMによる表面構造の観察のみではそれらを特定することが難しい。本稿で紹介した透明化の手法は、交尾時の雌雄交尾器の対応を位置関係を保ったまま観察できるため、柔軟で着色部の少ないメス交尾器において、着目すべき部位の特定を可能としてくれる。

ここに紹介したキイロショウジョウバエ種群の研究結

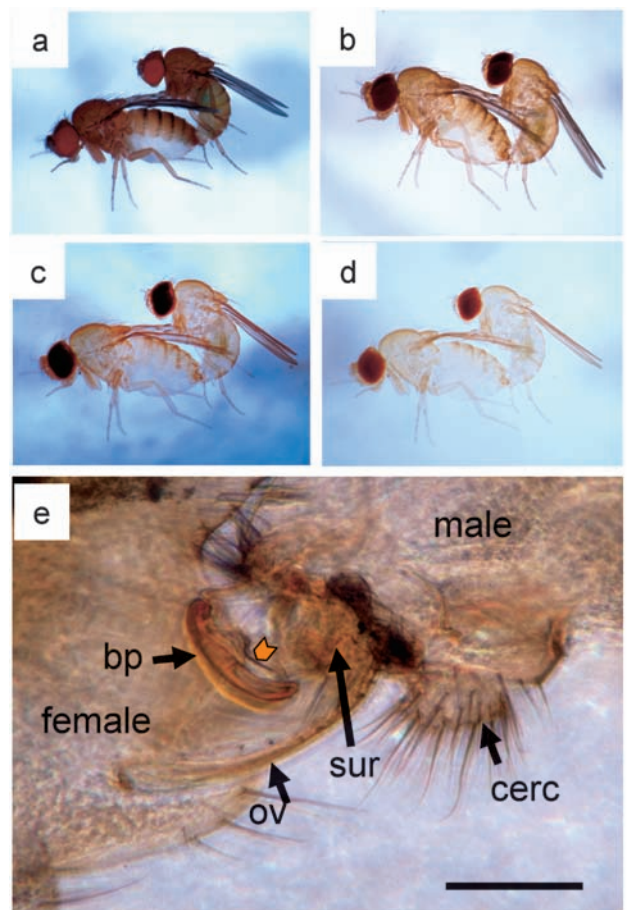


図7: 交尾中に固定された *Drosophila bipunctata* ペアのBABB処理による透明化の経過。(a)BABB処理前の寒天包埋サンプル、(b)BABB処理1日後、(c)BABB処理14日後、(d)BABB処理28日後、(e)透過により包埋状態のまま観察可能となった雌雄交尾器のカップリング(cerc, cercus; sur, surstylus; bp, basal process; ov, oviscapt)。矢印(橙色)の先に、メスの膜質のポケットの一部が見える。スケールバーは100 μm 。

果から、本種群のオスは交尾中のメスを把握するための様々な構造を発達させていることがうかがえる。なぜ把握のための構造を複数持つのか、それらの構造は把握以外の機能を持ち合わせていないかなど、これらの点を解明するためには、複数の手法を駆使した多角的な検討が必要となるであろう。

謝辞

研究会での発表と本稿執筆の機会をいただき、また、ショウジョウバエ類の形態・分類・用語体系に関してご助言をいただいている北海道大学低温科学研究所の戸田正憲教授に感謝いたします。本稿に紹介した研究を進めるに当たって、木村正人教授（北海道大学）、小野裕剛講師（慶應義塾大学）、林文男准教授（首都大学東京）、および首都大学東京細胞遺伝学研究室、旧 Tucson *Drosophila* Species Stock Center, UC San Diego *Drosophila* Stock Center の多くの方々にお世話になりました。ここに感謝いたします。林文男准教授、松村洋子氏（北海道大学）には原稿を読んでいただき、有益なコメントを頂きました。また、今回紹介した著者らの研究成果は科学研究費補助金（No.19770046 および 22770058）の補助を受けて得られたものです。

参考文献

- Acebes, A., M. Cobb, and J. F. Ferveur (2003) Species-specific effects of single sensillum ablation on mating position in *Drosophila*. *J. Exp. Biol.*, **206**, 3095-3100.
- Baer, B., and J. J. Boomsma (2006) Mating biology of the leaf-cutting ants *Atta colombica* and *A. cephalotes*. *J. Morph.*, **267**, 1165-1171.
- Blanckenhorn, W. U., D. J. Hosken, O. Y. Martin, C. Reim, Y. Teuschl, and P. I. Ward (2002) The costs of copulating in the dung fly *Sepsis cynipsea*. *Behav. Ecol.*, **13**, 353-358.
- Bock, I. R. (1980) Current status of the *Drosophila melanogaster* species-group (Diptera). *Syst. Entomol.*, **5**, 341-356.
- Bock, I. R., and M. R. Wheeler (1972) The *Drosophila melanogaster* species group. *Univ. Texas Publ.*, 7213, 1-102.
- Coyne, J. A. (1983) Genetic basis of differences in genital morphology among three sibling species of *Drosophila*. *Evolution*, **37**, 1101-1118.
- Coyne, J. A., and M. Kreitman (1986) Evolutionary genetics of two sibling species of *Drosophila*: *D. simulans* and *D. mauritiana*. *Evolution*, **40**, 673-691.
- Crudginton, H. S., and M. T. Siva-Jothy (2000) Genital damage, kicking and early death. *Nature*, **407**, 855-856.
- Da Lage, J.-L., G. J. Kergoat, F. Maczkowiak, J.-F. Silvain, M.-L. Cariou, and D. Lachaise (2007) A phylogeny of Drosophilidae using the *Amyrel* gene: questioning the *Drosophila melanogaster* species group boundaries. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, **45**, 47-63.
- Domanitskaya, E. V., H. Liu, S. Chen, and E. Kubli (2007) The hydroxyproline motif of male sex peptide elicits the innate immune response in *Drosophila* females. *FEBS J.*, **274**, 5659-5668.
- Drosophila 12 Genomes Consortium (2007) Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature*, **450**, 203-218.
- Eberhard, W. G. (1985) *Sexual Selection and Animal Genitalia*. Harvard University Press, Cambridge.
- Eberhard, W. G., and N. Ramirez (2004) Functional morphology of the male genitalia of four species of *Drosophila*: failure to confirm both lock and key and male-female conflict predictions. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **97**, 1007-1017.
- Edvardsson, M., and T. Tregenza (2005) Why do male *Callosobruchus maculatus* harm their mates? *Behav. Ecol.*, **16**, 788-793.
- Hosken, D. J., and P. Stockley (2004) Sexual selection and animal genitalia. *Trends Ecol. Evol.*, **19**, 87-93.
- Hotzy, C., and G. Arnqvist (2009) Sperm competition favors harmful males in seed beetles. *Curr. Biol.*, **19**, 404-407.
- Hu, Y.-G., and M. J. Toda (2001) Polyphyly of *Lordiphosa* and its relationships in Drosophilinae (Diptera: Drosophilidae). *Syst. Entomol.*, **26**, 15-31.
- Jagadeeshan, S., and R. S. Singh (2006) A time-sequence functional analysis of mating behaviour and genital coupling in *Drosophila*: role of cryptic female choice and male sex-drive in the evolution of male genitalia. *J. Evol. Biol.*, **19**, 1058-1070.
- Johnstone, R. A., and L. Keller (2000) How males can gain by harming their mates: sexual conflict, seminal toxins, and the cost of mating. *Am. Nat.*, **156**, 368-377.
- Joly, D., M.-L. Cariou, T. Mhlanga-Mutangadura, and D. Lachaise (2010) Male terminalia variation in the rainforest dwelling *Drosophila teissieri* contrasts with the sperm pattern and species stability. *Genetica*, **138**, 139-152.
- Joly, D., and M. Schiffer (2010) Coevolution of male and female reproductive structures in *Drosophila*. *Genetica*, **138**, 105-118.
- Kamimura, Y. (2007) Twin intromittent organs of *Drosophila* for traumatic insemination. *Biol. Lett.* **3**, 401-404.
- Kamimura, Y. (2008) Copulatory wounds in the monandrous ant species *Formica japonica* (Hymenoptera: Formicidae). *Ins. Soc.*, **55**, 51-53.
- Kamimura, Y. (2010) Copulation anatomy of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae): wound-making organs and their possible roles. *Zoomorphology*, **129**, 163-174.
- Kamimura, Y., and M. Polak (2010) Does surgical manipulation of *Drosophila* intromittent organs affect insemination success? *Proc. R. Soc. B*, (published on line) doi: 10.1098/rspb.2010.2431
- Kopp, A. (2006) Basal relationships in the *Drosophila melanogaster* species group. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **39**,

- 787-798.
- Lemeunier, F., J. R. David, L. Tsacas, and M. Ashburner (1986) The *melanogaster* species group. In: Ashburner, M. et al. (eds) *The Genetics and Biology of Drosophila*, **3e**: 148-256. Academic Press, London.
- Lessells, C. M. (1999) Sexual conflict in animals. In: Keller, L. (ed) *Levels of Selection in Evolution*: 75-99. Princeton University Press, Princeton.
- Liu, J., J. M. Mercer, L. F. Stam, G. C. Gibson, Z.-B. Zeng, and C. C. Laurie (1996) Genetic analysis of a morphological shape difference in the male genitalia of *Drosophila simulans* and *D. mauritiana*. *Genetics*, **142**, 1129-1145.
- Lung, O., and M. F. Wolfner (1999) *Drosophila* seminal fluid proteins enter the circulatory system of the mated female fly by crossing the posterior vaginal wall. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **29**, 1043-1052.
- MacDonald, S. J., and D. B. Goldstein (1999) A quantitative genetic analysis of male sexual traits distinguishing the sibling species *Drosophila simulans* and *D. sechellia*. *Genetics*, **153**, 1683-1699.
- Matsuda, M., Y. Tomimura, and T. N. Tobari (2005) Reproductive isolation among geographical populations of *Drosophila bipectinata* Duda (Diptera, Drosophilidae) with recognition of three subspecies. *Genetica*, **125**, 69-78.
- McAlpine, J. F. (1981) Morphology and Terminology-adults. In: McAlpine, J. F. (ed) *Manual of Nearctic Diptera*, **1**: 9-63. Canadian Government Publishing Center, Quebec.
- McGurk, L., H. Morrison, L. P. Keegan, J. Sharpe, and M. A. O'Connell (2007) Three-dimensional imaging of *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, e834.
- Merritto, D. J. (1989) The morphology of the phallosome and accessory gland material transfer during copulation in the blowfly *Lucilia cuprina* (Insecta, Diptera). *Zoomorphology*, **108**, 369-366.
- Morrow, E. H., G. Arnqvist, and S. Pitnick (2003) Adaptation versus pleiotropy: why do males harm their mates. *Behav. Ecol.*, **14**, 802-806.
- Pathak, J. P. N. (1993) Cell-mediated defence reactions in insects. In: Pathak, J. P. N. (ed) *Insect Immunity*: 47-58. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Polak, M., and A. Rashed (2010) Microscale laser surgery reveals adaptive function of male intromittent genitalia. *Proc. R. Soc. B*, **277**, 1371-1376.
- Prud'homme, B., N. Gompel, A. Rokas, V. A. Kassner, T. M. Williams, S.-D. Yeh, J. R. True, and S. B. Carroll (2006) Repeated morphological evolution through cis-regulatory changes in a pleiotrophic gene. *Nature*, **440**, 1050-1053.
- Ravi Ram, K., and M. F. Wolfner (2007) Seminal influences: *Drosophila* Acps and the molecular interplay between males and females during reproduction. *Integr. Comp. Biol.* **47**, 427-445.
- Robertson, H. M. (1988) Mating asymmetries and phylogeny in the *Drosophila melanogaster* species complex. *Pac. Sci.*, **42**, 72-80.
- Rönn, J., M. Katvala, and G. Arnqvist (2007) Coevolution between harmful male genitalia and female resistance in seed beetles. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **104**, 10921-10925.
- Schwaroch, V. (2002) Phylogeny of a paradigm lineage: the *Drosophila melanogaster* species group (Diptera: Drosophilidae). *Biol. J. Linn. Soc.*, **76**, 21-37.
- Shapiro, A. M., and A. H. Porter (1989) The lock-and-key hypothesis: evolutionary and biosystematic interpretation of insect genitalia. *Annu. Rev. Entomol.*, **34**, 231-245.
- Simmons, L. W., C. M. House, J. Hunt, and F. García-González (2009) Evolutionary response to sexual selection in male genital morphology. *Curr. Biol.*, **19**, 1442-1446.
- Siva-Jothy, M. T. (2006) Trauma, disease and collateral damage: conflict in cimicids. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **361**, 269-275.
- Siva-Jothy, M. T. (2009) Reproductive immunity. In: Rolff, J., and Reynolds, S. E. (eds) *Insect Infection and Immunity*: 241-251. Oxford University Press, Oxford.
- Sturtevant, A. H. (1942) The classification of the genus *Drosophila*, with descriptions of nine new species. *Univ. Texas Publ.*, 4213, 5-51.
- Teuschl, Y., D. J. Hosken, and W. U. Blanckenhorn (2007) Is reduced female survival after mating a by-product of male-male competition in the dung fly *Sepsis cynipsea*? *BMC Evol. Biol.*, **7**, 94.
- Toda, M. J. (1991) Drosophilidae (Diptera) in Myanmar (Burma) VII. The *Drosophila melanogaster* species-group, excepting the *D. montium* species subgroup. *Orient. Ins.*, **25**, 69-94.
- True, J. R., J. Liu, L. F. Stam, Z.-B. Zeng, and C. C. Laurie (1997) Quantitative genetic analysis of divergence in male secondary sexual traits between *Drosophila simulans* and *Drosophila mauritiana*. *Evolution*, **51**, 816-832.
- van der Linde, D. Houle, G. S. Spicer, and S. J. Stepan (2010) A supermatrix-based molecular phylogeny of the family Drosophilidae. *Genet. Res., Camb.*, **92**, 25-38.
- Wigby, S., E. V. Domanitskaya, Y. Choffat, E. Kubli, and T. Chapman (2008) The effect of mating on immunity can be masked by experimental piercing in female *Drosophila melanogaster*. *J. Insect. Physiol.*, **54**, 414-420.
- Yasui, Y. (1997) A 'good-sperm' model can explain the evolution of costly multiple mating by females. *Am. Nat.*, **149**, 573-584.
- Zeng, Z.-B., J. Liu, L. F. Stam, C.-H. Kao, J. M. Mercer, and C. C. Laurie (2000) Genetic architecture of a morphological shape difference between two *Drosophila* species. *Genetics*, **154**, 299-310.
- Zhang, W. X., and M. J. Toda (1992) A new species-subgroup of the *Drosophila immigrans* species-group (Diptera, Drosophilidae), with description of two new species from China and revision of taxonomic terminology. *Jap. J. Entomol.*, **60**, 839-450.