

ヒダサンショウウオの産卵行動の解明

鶯谷中学・高等学校 自然科学部

1. 研究目的

ヒダサンショウウオは、環境省ならびに岐阜県のレッドデータブックで準絶滅危惧に指定されている小型のサンショウウオである。保護の必要性が指摘されているにも関わらず、生態や生活史に関する研究は少ない。特に産卵行動については、溪流の中で石の裏側に卵嚢を産むため、観察が極めて困難であり詳細に調べた例はない。そこで、産卵行動の詳細を明らかにするため、3年間の試行錯誤の末、2017年に産卵水槽を完成させ、産卵行動をビデオに収めることができた。その結果、メスは単独で産卵することはできずオスがメスの腹を足で押しながら卵嚢を引き出すことや、オスが卵嚢に巻きつき受精することが明らかとなった(福田、2019)。

サンショウウオの仲間では、オスのスニーカー行動(優位オスとメスとのペア産卵に劣位オスが侵入して放精する行動)が知られている(Tanaka, 1989)。2017年の観察では、ヒダサンショウウオにおいてもペアのオス以外のオスを入れた際に、産卵直前にオス同士の争いがあることや、産卵時に1対の卵嚢を奪い合い別のオスが1本ずつ抱きかかえて受精することが観察された。一般に、オスではメスや卵をめぐるオス間の競争が起こるが、メスではオスによるメスや卵への接触等による負の影響を避けるような行動がみられることが知られている。

そこで、本研究では、これらの行動がヒダサンショウウオにも起こっているか、また、オスの行動がメスや卵に負の影響をもたらしているかを明らかにするため、以下の実験および観察を行った。

2. 研究材料と研究方法

(1) 産卵行動の観察

石の裏の産卵(以下、単独産卵)の行動を観察するため、2018年の1月に岐阜県山県市大桑の集団(以下、大桑集団)にて、産卵間近なペアおよびオスの成体を

採集した。その後、水槽で10日ほど飼育した後、産卵水槽に産卵直前のメスおよび成体のオス(ペアのオスを含む)を1匹:3匹で入れ、産卵させた。産卵行動は、2台の赤外線ビデオカメラで正面と側面の二方向から撮影した。映像を観察し、体表のまだら模様と尾の形で個体識別をした上で、各個体の行動の詳細を記録した。メスによる卵嚢の接着が始まるまでを「産卵直前」、卵嚢の接着からオスの受精行動(卵嚢にしがみつき強く抱きつく行動)が終わるまでを「産卵時」、それ以降の時間を「産卵後」とした。卵嚢の接着が始まる30分前から産卵後の5時間30分の計6時間の映像を観察し、産卵後は30分ごとに区切り解析した。

(2) オスの数と受精率の関係

受精率を調べるため、メスとオスを1匹:3匹、1匹:5匹にして産卵させた。この時、卵嚢の位置と大きさ、卵数を測定した。卵嚢を孵化する寸前まで(約60日間)水槽で飼育し、卵嚢を切開して、幼生と卵の位置を記録し数を数えた。卵は、未受精卵または発生が進まなかったものとして扱った。

(3) マイクロサテライトマーカーによる父性解析の試み

どのオスがいくつの卵を受精させたかを調べるため、マイクロサテライトマーカーを用いて父性解析を試みた。マイクロサテライトマーカーはカスミサンショウウオのDNAを元にYoshikawara(2013)が開発したものをを用いた。まず、ヒダサンショウウオで利用できるかどうかを調べるため、19座位について、PCR法で増幅がみられるかを調べた。次に増幅がみられた座位についてDNA断片の大きさを調べ、各個体の遺伝子型を決定し、親子間で比較した。

(4) 野外での産卵状況の観察

野外では、大桑集団において、2017年の2月に砂利の中に複数の卵嚢が1箇所にとまって見つかる産卵

(以下、集団産卵)が観察された。このような産卵様式が同じ場所で毎年見られるのか、また他の集団でも見られるのかを明らかにするため、2018年12月から2019年3月に、ほぼ1週間に一度の頻度で、大桑集団および岐阜県関市の寺尾の集団(以下、寺尾集団)にて、産卵状況を観察した。2つの集団は直線距離でおよそ10キロメートル離れており、石の裏の卵囊の有無や砂利の中の産卵の様子について観察した。

3. 結果

(1) 産卵行動の観察

産卵直前、産卵時、産卵後に分け、行動が生じた回数を個体ごとにまとめたところ、オスとメスで顕著な違いがみられた。今回は特に違いがみられた産卵後の行動を中心に報告する。以下、個体識別したオス3匹を「オス1」、「オス2」、「オス3」と表記する。1匹:3匹の条件では、28分頃からオス1個体(オス2)がレンガの上へ移動してしまったため、途中から実質的には1匹:2匹の条件となった。

a. 産卵直前

卵囊の接着が始まるまでの30分を観察したところ、オス1が頭や尾でメスの体をつつき産卵を促す行動が16回みられた。メスは仰向けになる練習を何度もしていた。

b. 産卵時

卵囊の接着から受精終了までは19分間で、メスは総排泄口をレンガに押し付け卵囊を接着させていた(5分20秒間)。オスは、その間、周囲を歩きまわり見守っていた。その後、オス1による卵囊の引き出しがみられた。まず、オス1が卵囊の接着部分とメスの間に割って入り、メスの体を足場にして卵囊にしがみつき体を大きく反らせて、1本ずつ引き出した(図1-1、1分41秒間)。その後、オス1の受精行動(卵囊を強く抱く)がみられた(図1-2)。その途中、オス3が入り込み、オス1とオス3の奪い合いが生じた後、それぞれ1本の卵囊を抱きかかえ受精していた(図1-3)。受精行動は、オス1では12分17秒間、オス3では8分33秒間であった。産卵後、メスは14秒間失神していたが、その後、蘇生し、卵囊の周りをウロウロと歩きまわっていた。

c. 産卵後

オスの受精行動が終了した時点から、5時間30分(330分)間を観察したところ、9種類の特徴的な行動がみられた(図2、図の行動の記号は表1のとおり)。

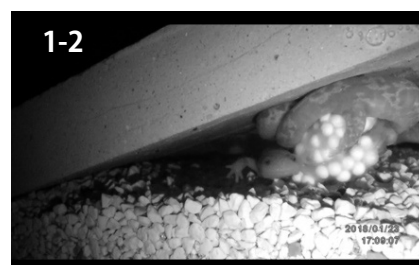


図1 産卵時にみられた行動

観察した時間を30分ごとに区切り、それぞれの行動の頻度を示すと図3のようになった。

産卵後では、メスはオスに比べ、かなり活発に行動していたが、オスは、卵囊にあまり興味を示さなかった。メスは受精直後から、卵囊のまわりをぐるぐると周り、卵囊に注意を払うような行動がみられた。最も回数が多くみられたのは、抱きつき行動で、産卵時終了の60分以降から生じ、150分では5回、210分では13回も観察された。抱きつき行動は、大きく二つのケースがあり、尾を曲げて卵囊を全身でかばうように抱きつくものと卵囊を強く抱きかかえるものがあった。次に多く観察されたのは、持ち上げ行動で、産卵終了後からすぐにみられた。その回数は、徐々に増え、270分で最大の8回となった。持ち上げ行動は、卵囊の下に入り頭をつかって持ち上げるもので、持ち上げた際にエアポンプの近くにもっていくような行動も2回ほどみられた。さらには、オスの受精の時のように強く抱きつきぐるぐる回る受精様行動が60分に2回、300分に1回みられ、その持続時間は、29秒、17秒、1分9秒であった。その他、卵囊に嘔み付くような行動やつつく行動も複数回みられた。

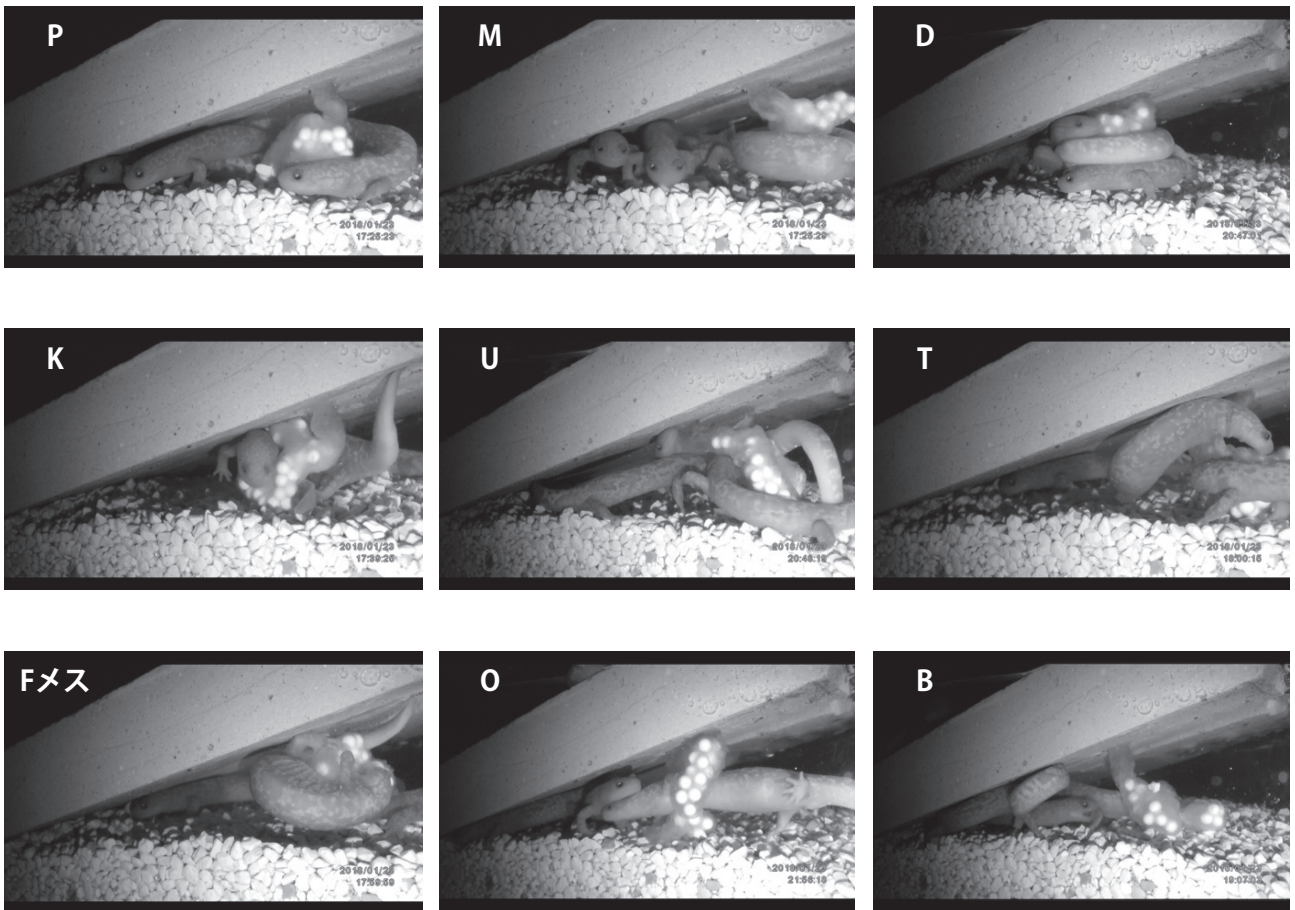


図2 産卵後にみられた行動

記号	行動
P	パトロール
M	卵をもちあげる
D	卵に抱きつく
K	卵にかみつく
U	卵に頭を突っ込む
T	卵をつつく
F	受精行動
O	成体を追い払う
B	成体にかみつく

表1 産卵後にみられた行動

オスの行動では、オス3が産卵終了後の30分に再度受精に現れ受精を試みたものの、オス1に追い払われ失敗に終わった。210分にもメスが卵嚢を抱えているところにオス3が割り込むように現れ、卵嚢を横取りして25秒ほど強く抱きついてきた(受精行動)。オス1では、メスおよびオス3に噛み付く行動が複数回みられた。オスの2個体では、回数は少ないものの、メスと同様に、卵嚢を持ち上げる、つつく、噛み付く、頭をうずめるなどの行動がみられた。

(2) オスの数と受精率の関係

卵嚢を切開したところ、エラがしっかりと発達した茶

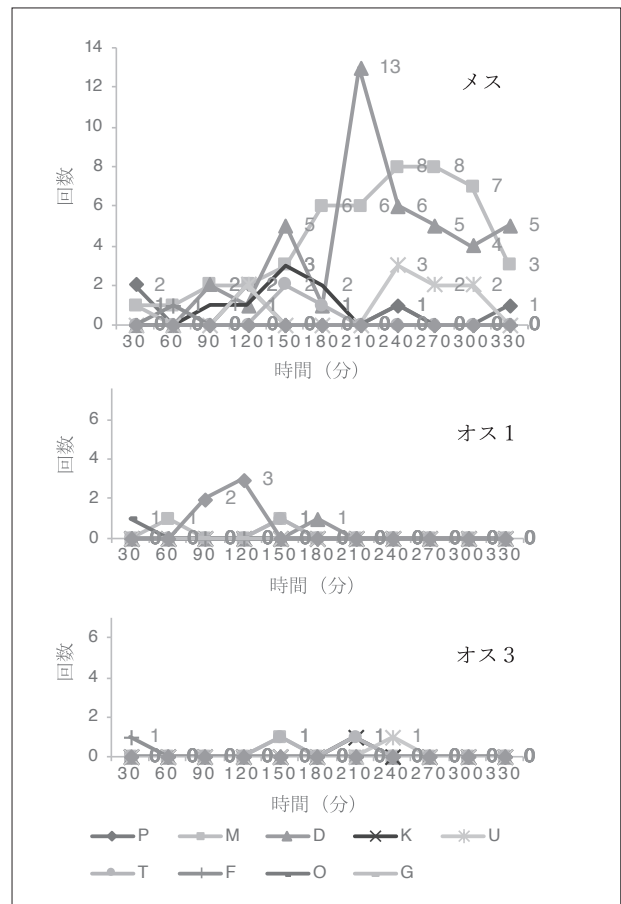


図3 産卵後の各行動の回数

褐色の幼生が泳いで勢いよく飛び出してきた。湾曲した中央部に進むと、半透明のドロドロの内容物とともにクリーム色の卵が出てきた（未受精卵）。

卵囊の大きさは、オス3匹で産卵させたものの方がオス5匹のものより大きく、卵数（未受精卵を含む数）も多かった。また、卵囊1本あたりの卵数は、オス3匹では25個と15個、オス5匹では12個と12個、と異なり、1対の卵囊でみると16個も差があった。

卵囊の1本ごとの受精率を求めると、41.6%から88.0%まで異なっていた。受精率はオス5匹の方が、低い傾向にあった（図4）。卵囊1本あたりの幼生の数は、オス3匹では22匹と11匹、オス5匹では5匹と9匹となっており、1対の卵囊あたりでみると、オス3匹では33匹、オス5匹では14匹と異なっていた。

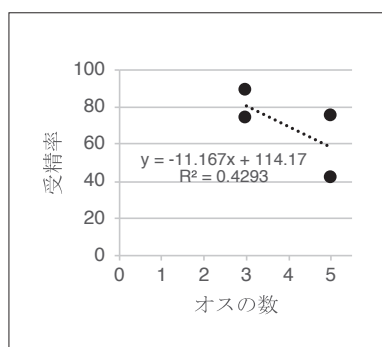


図4 オスの数と受精率の関係

(3) マイクロサテライトマーカーによる父性解析の試み

19の座位のうち6つでDNA増幅がみられ、そのうち4つでは、予想されるサイズで山型のピークが観察された。各座位のアレル（対立遺伝子）数は最大で2つと少なかったものの、メスの持つアレルを子が持っており、親と子の遺伝子型に矛盾のあるものはなかった。

(4) 野外での産卵状況の観察

a. 大桑集団

2017年2月中旬に、単独産卵を2カ所、集団産卵を1カ所見つけた（図5）。単独産卵の卵囊は大きな石の裏にあった。集団産卵は、川の上流部の魚止めの滝壺から少し下流にある長径およそ40cmの砂利がたまった楕円形の場所で、深さおよそ20cmまでのところの砂利の中に30本の卵囊が観察された（図6）。砂利の中の卵囊の向きはさまざまで、中には小石に接着していた卵囊もみられた。卵囊の周りには、メス7匹とオス21匹がみられた。



図5 集団産卵がみられた調査地



図6 卵囊の様子

2019年の調査では、1月から繁殖のために移動してきた複数の成体を目撃したが、単独産卵、集団産卵とも観察されなかった。

b. 寺尾集団

2019年2月中旬に、単独産卵を2カ所、産卵直前の成体が多数凝集しているのを1カ所見つけた（図7）。単独産卵の卵囊は、水が常に流れ込む大きな石の裏にあった。産卵直前の成体は、砂利の中に凝集しており、産卵直前のメス7匹、オス25匹の計32匹であった。メスは腹部に卵が透けて見え、オスは放精していた（図8）。発見したのは、単独産卵よりも川上のなだらかな地形の所で、砂利の深さ16センチあたりに成体があり、砂利を除けると一旦は水が濁るがわずかに数十秒で濁りがなくなりきれいな水になったことから、伏流水が流れ込んでいる環境であった（図9、10）。



図7 調査地



図8 産卵直前の成体：メス（左）、オス（中）、凝集していた32匹



図9 伏流水の流れ

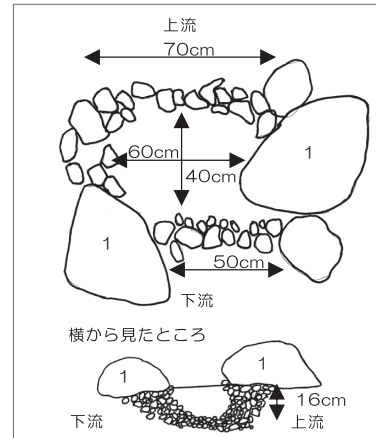


図10 成体の集合場所の地形

4. 考察と今後の課題

産卵行動の解析から、オスは産卵直前・産卵時に活動がピークになるのに対し、メスは産卵後長時間に渡り活発に動き、頻繁に卵嚢と接触することがわかった。また、オスの数が多い条件下では、卵嚢の中央部に未受精卵がみられ、受精率に下がる傾向がみられた。これらの結果をもとに、以下の3つについて考察する。

(1) オスはなぜ受精後の卵嚢に関心を示さなくなるのか？

オスは受精後の卵嚢に関心を払うよりも、すぐに次のメスを探した方が自分の受精した子の数を多くできるのではないかと考える。実際、野外集団でも繁殖期にオスが移動しているのを観察している。しかしながら、どのようにして、オスが卵嚢の受精状態を知るのか、そのメカニズムはまだわかっていない。急激に活動量が減るには、卵嚢の状態を知る手がかりとなる物質があるのではないかと考える。カエルやイモリでは性フェロモンの存在が報告されているが、ヒダサンショウウオでもメスやオスの成体から放出されるフェロモンのような物質や、卵嚢から直接放出される物質や精子の濃度などが関与している可能性がある。これらの物質が産卵直前と産卵後に急激に変化すると予想されるが、狭い産卵水槽内でもみられたことから、産卵時に放出し

急速に分解される物質かもしれない。今後、こういった観点からも観察や実験を続けていきたい。

(2) メスはなぜ受精後、長時間にわたり卵嚢に関心を示すのか？

当初、メスはオスを警戒して卵嚢の近くにいるものと考えていたが、実際にはオスとの関わりはあまりみられず、むしろ単独で卵嚢に接触する行動が頻繁にみられた。中でも、顕著だった卵嚢の持ち上げ行動は、卵嚢の位置を変えたり、酸素のある方へ移動させたりといった卵嚢の環境を良好に保つ役割があるのかもしれない。一方、メスによる受精様行動や卵嚢にかみつくなど、一見すると卵嚢にとって不利益となるような行動も観察された。卵嚢の内容物は、産卵後、水を吸って膨らみ卵を保護するクッションの役割をもつことから、観察された受精様行動は、この給水を促すような役割があるのかもしれない。メスがなぜそのような行動をとるのか興味もたれる。

今回、大桑集団および寺尾集団の2つにおいて、従来の単独産卵に加え、これまで観察されていない集団産卵や繁殖直前の多数の成体の凝集が初めて見つかった。いずれも砂利の中であつた。秋田ら(2009)は石川

県宝達山のヒダサンショウウオにおいて、人工的に設けた容器内で今回と同様の産卵直前まで団子状に塊となっている様子を観察している。しかしながら、自然状態では発見しておらず、どのような環境を好み、いつ、何を手がかりに集まってくるのかなど、未だ多くの謎が残されている。今回、集団産卵および凝集がみられた場所は、上流のなだらかな地形のところ、常に水が砂利の間に流れ込む環境であった。このことから、卵囊の周りの環境は産卵水槽とは異なっていると考えられる。そのため、砂利の中では水槽での観察とは異なる行動が起こると考えられる。砂利の中での産卵（集団産卵）と石の裏側での産卵（単独産卵）がどのように使い分けられているのか、また、産卵行動がどのように異なるのかは、新たな課題となった。今後、さらなる解明に向けて、観察や実験および野外調査を続けていきたい。

(3) オスの数と受精率の関係

オスを多くした1匹:5匹の条件下では、中央部に未受精卵がみられたことから、十分に受精できていない可能性が考えられる。その原因が、卵囊の形状によるのか、オスの密度が高すぎて十分な受精時間が取れないなどの要因によるのかは、今のところ定かではない。今後、産卵水槽をより自然状態を再現したものに改良して、さらに詳しく調べていきたい。今回のマイクロサテライトマーカーの解析では、座位あたりのアレル数が少なかったため、卵のオス親を同定するまでは至らなかった。今後は、例数を増やして観察するとともに、遺伝子型の異なるオスを入れた産卵ペアで産卵させることで、オスの行動が受精率に与える影響を調べていきたい。

以上、本研究で得られた知見は、溪流性の他の小型のサンショウウオ類の室内繁殖や保全の施策に貢献できるものとする。今後は、専門家から助言や指導を受けながら、研究をさらに発展させていきたい。

5. 謝辞

本研究を進めるにあたり、多くの方々にお世話になりました。なお、本研究は、公益財団法人河川財団による河川基金の助成（2019年4月から2020年4月）を受けています。深く感謝申し上げます。

6. 参考文献

- 福田英治、岩城蘭、村瀬すぐり、加藤なつき、三宅遥香（2019）ヒダサンショウウオの産卵行動、爬虫両棲類学年報、1:28-31.
- Tanaka, K. (1989) Mating strategy of male *Hynobius nebulosus* (Amphibia: Hynobiidae). *Current Herpetology in East Asia*, 437-448.
- Yoshikawa, N. and Matsui, M. (2013) Characterization of nineteen microsatellite DNA markers for Japanese clouded salamander, *Hynobius nebulosus*, using NGS. *Conservation Genetics Resources* 5:603-605.
- 秋田善憲、宮崎光二（2009）宝達山におけるヒダサンショウウオの繁殖生態、爬虫両棲類学会報、1:30-39.

鶯谷中学・高等学校
自然科学部