

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07224

研究課題名(和文) 内分泌学的アプローチによるフィリアルカニバリズムの新規メカニズムの解明

研究課題名(英文) New mechanism for filial cannibalism: an endocrinological approach

研究代表者

竹垣 毅 (TAKEGAKI, Takeshi)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・准教授

研究者番号：50363479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：(1-1)ロウソクギンボ雄のMCH(メラニン凝集ホルモン)に摂食を抑制する傾向があったが、全卵食中の雄と摂食中の保護雄のMCHに差はなかった。(1-2)PRL放出刺激ホルモン(PrRP)投与実験では繁殖期に摂食抑制効果が示された。また給餌すると保護雄の保護行動が増加したことから、プロラクチン仮説が支持された。(2)全卵食誘発実験で、全卵食中の雄の11-KTは全卵食しなかった雄よりも有意に低かったことから、雄は11-KTが下がり求愛できなくなると全卵食することが示唆された。(3)卵海水を曝露すると無保護雄に保護行動が誘起されたため、卵の化学物質が保護行動を誘起する刺激である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：(1-1) Melanin-concentrating hormone (MCH) had a slight suppressing effect on feeding behavior of *Rhabdoblennius nitidus* males, but there was no significant difference in MCH levels between males cannibalizing eggs and males consuming food. (1-2) Administration of prolactin-releasing peptide (PrRP) showed a suppression effect on feeding during the breeding season and food provisioning experiments induced increase in parental care behaviors. These results are consistent with the prolactin hypothesis. (2) In the experiments inducing total-filial cannibalism, males cannibalizing all eggs showed significantly lower plasma 11-KT levels than males who did not, suggesting that males cannibalize eggs when they become incapable of courting due to the low levels of 11-KT. (3) The egg-water exposure experiments induced non care-giving males to parental care behaviors. This suggests the possibility that some kind of chemicals released from eggs stimulate the expression of parental care of males.

研究分野：行動生態学

キーワード：繁殖戦略 行動生態 魚類 全卵食 内分泌 プロラクチン 子の保護 子殺し

1. 研究開始当初の背景

親が保護中の子を食べるフィリアルカニバリズムは子殺しの1種で、かつては異常行動とされていたが、現在は逆に子の保護の適応進化を研究する格好のモデルシステムとして注目されている。一般に、親のコンディションが悪く保護コストが大きい際に、子を食べる栄養利益も期待して、保護を放棄するというエネルギーベースモデルでうまく説明されるが、親に給餌しても効果が無いなど矛盾する実証研究も多い。魚類の「全卵食」行動もその1つで、利益が小さく割の合わない少数卵保護を早々に打ち切って繁殖をやり直す適応戦略とされてきたが、本研究の対象種ロウソクギンボのように、営業して見張り型保護を行う魚種では、雄親は卵を保護しながらでも雌に求愛して追加卵を獲得できるため、雄が卵を全て食べる必要性が説明できない。

研究代表者らは、ロウソクギンボの雄が、求愛を促す雄性ホルモン(11-KT)レベルによって、求愛活性の高い「求愛フェイズ」と求愛活性が低く主に保護を行う「保護フェイズ」を繰り返す繁殖サイクルを持つことを見出し、保護雄の配偶成功が著しく低下する謎を解明した。さらに、卵の無い巣の雄に卵を与えると11-KTが下がり、逆に保護卵を除去すると上がることから、巣内の卵の存在が11-KT分泌の鍵刺激であることが示された。これらの結果から「卵の存在により内分泌学的に調節される繁殖サイクル」と「全ての卵が消失する全卵食現象」の関連性が強く示唆された。

本研究では、ロウソクギンボ雄の(1)「全卵食行動」が、自らの求愛活性を高める性ホルモンの分泌を促すために、卵の存在を「消す」ことを目的としていることを解明する。また、(2)全卵食が保護初期に集中するメカニズムについて、性ホルモンの分泌を介して速やかに求愛を再開するための適応であることを検証する。さらに、(3)求愛や卵保護を調節するホルモン分泌の鍵刺激(卵の存在)が、卵の化学シグナル(フェロモン)であることを検証する。このような内分泌学的アプローチからフィリアルカニバリズムの全く新しい進化要因と発現メカニズムを解明する。

2. 研究の目的

(1-1)全卵食行動の新規メカニズム・繁殖サイクルのリセット仮説の検証

ロウソクギンボの全卵食は、雄が栄養摂取のために卵を「食べている」のではなく、繁殖サイクルを求愛フェイズに戻す(リセットする)ために卵の存在を「消している」と考えた。

このリセット仮説を検証するために、研究代表者らはまず全卵食が雄の体コンディションとは無関係に起こることを実験的に示した。しかし「卵を食べる」という同じ行動の表現型に「卵を消す」という異なる目的があることは、行動観察や状況証拠をいくら重ねても検証には至らないと判断した。そこで本研究では、様々な分類群で摂食行動との関与が知られる脳内ペプチドホルモンのオレキシンとニューロペプチドY(NPY)に着目し、全卵食中と摂食中の雄の脳内ホルモン発現量を比較して、全卵食行動が摂食行動と異なることを示す。

(1-2)プロラクチン仮説の検証

当初の目的(1-1)に加えて、全卵食の発現メカニズムを説明するプロラクチン(PRL)仮説を新たに考案し、その検証を試みた。

本種雄の全卵食の目的が巣内の卵の存在を消すことならば、雄は飽食状態でも全卵食を行うはずである。給餌した卵保護雄が全卵食するかを野外で調査したところ、44%の無給餌雄(N=18)が全卵食したのに対して、飽食給餌した雄(N=15)だけでなく少量給餌した雄(N=11)も全く全卵食しなかった。この結果から、摂餌することで卵保護を継続する内分泌学的な作用が働いたと考えられた。そこで多くの動物で子の保護ホルモンであることが知られているPRLに着目した。PRLの放出刺激ホルモンであるPrRPには摂食抑制機能があることが他魚種で知られている。すなわち、雄が保護卵から何らかのシグナルを受け取って卵が少ないと認識した場合、PrRPの分泌が減少し(図1)、それに伴いPRLのレベルが低下することで、卵保護行動が抑制される(図1)。その一方で、PrRPレベルの低下により、栄養状態とは無関係に摂食行動が促進されることで(図1)、全卵食を引き起こすのではないかと考えた。

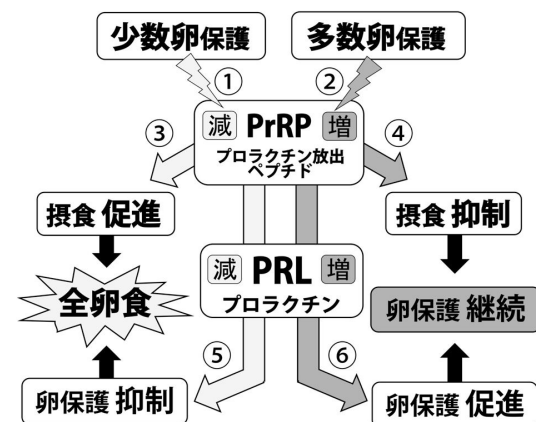


図1 予想される全卵食発現メカニズム

(2)全卵食が保護初期に集中するメカニズムの検証

魚類の全卵食行動は保護の初期段階で起こるのが特徴である。早期に保護を放棄するほど保護コストを小さく抑えることができ、かつ、栄養価の高い発生初期の卵を摂取できるとされてきた(保護コスト・栄養仮説)。しかし、研究代表者らは、本種の早期全卵食には別の理由があると考えた。本種雄は性ホルモンに制御された繁殖サイクルを持ち、最初の卵を獲得すると性ホルモンが低下し始め、約2日間で求愛できなくなる。雄が再び求愛を行うには卵の存在を消し、自身の性ホルモンレベルを上昇させる必要がある。雄が早期に全卵食するのは、性ホルモンが下がりきってから全卵食すると、求愛可能なレベルまでの回復に時間がかかり、再配偶が遅れてしまうためかもしれない(ホルモン仮説)。つまり、性ホルモンに制御された繁殖サイクルが制約となり早期化しているという仮説である。

(3)求愛や卵保護を調節するホルモン分泌の鍵刺激(卵の存在):卵の化学シグナルの可能性

これまでの一連の研究から、ロウソクギンボ雄の繁殖サイクルを制御し、全卵食を引き起こす鍵は「卵の存在」であることが分かる。しかし、雄が卵の存在や卵数をどのように認識しているか、その至近要因は分かっていない。これまでに、巢内の保護卵を入れ替えたり、ダミー卵を与える実験を行い、雄が配偶履歴や視覚、触覚では卵を認識していないことが分かっている(未発表データ)。これらの結果は、トゲウオで報告があるように、卵からの化学シグナル(フェロモン)によって雄の求愛や保護行動が調節されている可能性を強く示唆している。すなわち、卵の存在や卵数によって変動するフェロモン量が、雄の求愛や保護を調節するホルモンの分泌に影響していると考えた。

当初の計画では、発生段階あるいは卵数の異なる卵塊から溶出する化学物質を含む海水を営巣雄に曝露し、雄の行動変化を観察し、保護行動に関与すると考えられる脳下垂体ホルモン・プロラクチンと求愛行動を促す血中の雄性ホルモン11-KTレベルを測定する予定であったが、本研究では卵海水を巢内に曝露して保護雄の行動変化を観察する予備的な実験を行うに留まった。

3. 研究の方法

(1-1)繁殖サイクルのリセット仮説の検証

当初の計画では、全卵食中と摂食中のロウソクギンボ雄の脳内摂食関連ホルモン・ニューロペプチドY(NPY)とオレキシン(ORX)の産生量に違いがあるかを調べる予定であったが、さらにメラニン凝集ホルモン(MCH)と生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(cGnRH-II)を加えて、摂食行動との関連性を再検討した。

水槽実験)本種の摂食行動とNPY、ORX、MCH、cGnRH-IIの関連性を確認

繁殖期と非繁殖期に、7日間水槽内で馴致したロウソクギンボ雄を給餌条件と無給餌条件で飼育した後(2日後と7日後)に取り上げる。取り上げた供試魚は速やかに解剖して脳を採取し、分析まで-80度で冷凍保存した。NPYはmRNAの発現量で、他の3種は時間分解蛍光免疫測定法により測定した濃度でそれぞれ評価した。

野外実験)全卵食中と摂食中の雄の摂食関連ホルモン(MCH)を比較

野外に設置した人口巣で実験当日に産卵された卵を保護する雄を対象に、保護卵を約300個まで除去して全卵食を誘導させる「全卵食条件」と、保護卵はそのまま餌を与えて摂食させる「摂食中条件」および卵を保護しているだけの「コントロール条件」で、ホルモンの産生量を比較した。全卵食条件では全ての卵を食べ終わる直前に雄を採集し、摂食条件では摂食している状態の雄を採集した。採集した雄は現地で速やかに解剖し、開頭した状態で脳を固定あるいは氷蔵して研究室に持ち帰る。脳は研究室で取り出して、測定まで-80度で冷凍保存した。本実験では水槽実験で摂食行動との関連性が強いと判断されたMCHを指標とした。

(1-2)プロラクチン仮説の検証

水槽実験)PrRP投与実験

PrRPによる摂食抑制効果(図1)を検証するために、雄にPrRPを投与する実験を行った。水槽内で馴致した雄個体にPrRP(1000 pmol/g)を投与し、投与後15分後から経時的に雄の摂食意欲を評価した。摂食意欲は給餌の際に用いる透明ガラスピペットへの突つき行動を5段階で評価した。コントロールとして生理食塩水を投与した個体も同様に評価した。実験は繁殖期と非繁殖期の両方で行った。

野外実験)摂食が保護行動に与える効果

プロラクチン仮説によれば、保護雄への給餌は最終的に保護行動の促進に繋がると予想される(図1)。野外の人工巣で卵保護中の雄に給餌する前後の行動をビデオカメラで撮影し、その保護行動(ファニング行動)に費やした時間(秒/20分間)を比較した。

(2)全卵食が保護初期に集中するメカニズムの検証

ホルモン仮説を検証するために、野外で人工巣に営巣した雄の保護卵の一部を除去して全卵食を誘発させる操作を行い、全卵食中の雄と求愛期である卵保護初日の雄、卵保護期である卵保護4~5日目の雄の性ホルモンレベルを比較した。さらに、保護初期と保護後期の雄の卵を除去し、翌日の再配偶率を比較することで、異なる保護段階で全卵食が起こった場合の再配偶率の変化を検証した。

(3)保護雄が卵を認識する鍵刺激:卵からの化学シグナルの可能性

繁殖サイクルや全卵食を制御・誘導する至近要因(鍵刺激)が、卵から海水中に溶出する化学シグナル(フェロモン)であることを検証するために、水槽内で営巣中の無保護雄に卵海水を曝露する水槽実験を行った。

人工産卵巣に繋いだチューブを通して、生卵を養育している海水を点滴により雄に曝露し、巣内の雄の行動を暗視機能付きビデオカメラで撮影した。コントロールとして海水のみを曝露する実験を行った。

4. 研究成果

(1-1)繁殖サイクルのリセット仮説の検証

NPYは繁殖期も非繁殖期も絶食2日目に給餌条件よりも低い値を示し、7日目には高い値を示すことが示された。また、繁殖期のORXが絶食2日目に低下し、MCHが7日目に上昇することが示され、いずれのホルモンも摂食に関与することが示唆された。cGnRH-IIIには有意な変動は見られなかった。これらの結果から、本種の摂食行動とNPY、ORX、MCHには、一貫性は見られないが、それぞれ何らかの関連性があることが示唆された。摂食促進効果が得られたMCHを用いて、実際に野外で全卵食中の雄と給餌した摂食中の保護雄とを比較したが、有意な差は見られなかった。

(1-2)プロラクチン仮説の検証

水槽実験) PrRP投与実験

繁殖期にPrRPを投与した雄はコントロール個体比べて有意に摂食意欲が抑制され、その効果は投与後120分後まで維持された(図2)。その一方で、非繁殖期に行った実験ではPrRPによる摂食抑制効果は認められなかった(図2)。この結果はプロラクチン仮説を支持するだけでなく、PrRPが働く内分泌経路が本種が卵保護を行う繁殖期にのみ働く反応系であることが示唆された。

PrRP投与実験

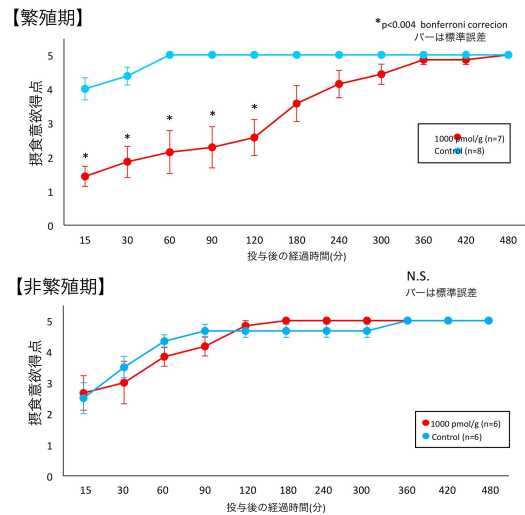


図2 PrRP投与実験の結果

野外実験) 摂食が保護行動に与える効果

卵保護中の雄に給餌すると卵保護行動は有意に増加し(図3)、無給餌条件では保護行動に費やす時間は変化しなかった。通常雄は保護卵の酸素要求量を満たす最小限のファニングしか行わないため、給餌による急激な保護行動の増加は内分泌的な効果によるものと推察された。この非適応的と思われる反応は、給餌によりPrRPの摂食抑制が働き、それと同時に保護が促進された反応と考えられ、プロラクチン仮説を強く支持する現象である。

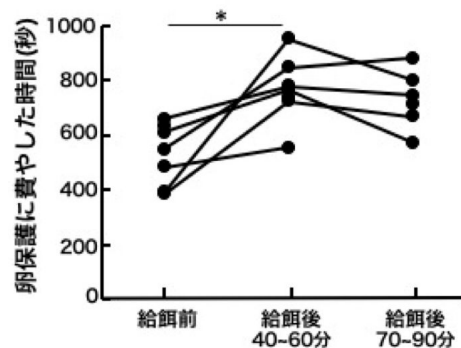


図3 給餌前後の卵保護行動の変化

(2) 全卵食が保護初期に集中するメカニズムの検証

保護卵の一部を除去して全卵食を誘発する操作をした際に、全卵食した(全卵食中の)雄の11-KTレベルは全卵食しなかった雄に比べて有意に低かった(図4)。すなわち、雄は雄性ホルモンレベルが求愛できるうちは追加配偶によって卵を増加させるが、求愛できないぐらいに低下している場合に全卵食することが示唆された。また、再配偶実験では保護初期(70%, n=116)と保護後期(63%, n=89)で翌日の再配偶率に有意差は無く、いずれも素早い再配偶が可能だった。よって、全卵食の早期化をもたらす要因は、予想に反して性ホルモンの挙動とは関係がないと考えられた。

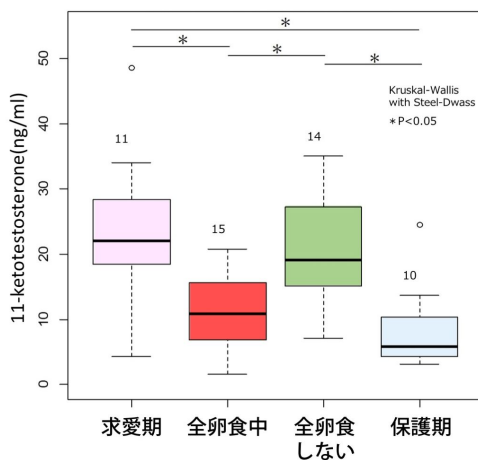


図4 雄の血中11-KT濃度の比較

(3) 保護雄が卵を認識する鍵刺激：卵からの化学シグナルの可能性

卵海水を巢内に曝露すると、営巣雄は巢の中に卵が無いにもかかわらず、卵保護中に行うファニング行動や巢内壁をつつくような行動を示すようになったほか、巢内で体を反転させる行動頻度が上昇した。これらの行動変化は卵海水内の何らかの化学物質が雄の行動を誘起した可能性を示唆するが、コントロールの海水のみの曝露実験でも同様の行動が低頻度ながら観察されたことから、より定量的な実験が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Matsumoto Y & Takegaki T. Male coercive mating in externally fertilizing species:

male coercion, female reluctance and explanation for female acceptance. *Scientific Reports*, 査読有, 6巻, 2016, 24536.

井手勇旗・松本 有記雄・竹垣 毅. シマギンポにおける雌の配偶者選択と雄の性的形質発現に与える雄性ホルモンの影響. 長崎大学水産学部研究報告, 査読無, 97巻, 2016, 19-24.

[学会発表](計4件)

中武洋佑・竹垣 毅「ロウソクギンポの卵保護雄が全卵食する雄性ホルモンレベル：求愛できないから食べるのか？」2017年度日本生態学会大会、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)、2018年3月

中武洋佑・阿見彌 典子・竹垣 毅「ロウソクギンポ雄の摂食行動が全卵食行動にもたらす影響 - 内分泌学メカニズムに着目して-」KOUDOU2017、東京大学(東京都目黒区)、2017年8月

松本 有記雄・竹垣 毅「体外受精種における雄の強制配偶の検証 - ロウソクギンポを例に -」三学会合同長崎地区例会、長崎大(長崎県長崎市)、2015年12月

松本 有記雄・竹垣 毅「ロウソクギンポ雄の強制配偶」2015年度日本魚類学会、奈良、近畿大(奈良県奈良市)、2015年9月

[その他]

ホームページ等

<http://takegaki-lab.sakura.ne.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹垣 毅 (TAKEGAKI, Takeshi)
長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・准教授
研究者番号：50363479

(2) 研究分担者

加川 尚 (KAGAWA, Nao)
近畿大学・理工学部・准教授
研究者番号：80351568

阿見彌 典子 (AMIYA, Noriko)
北里大学・海洋生命科学部・講師
研究者番号：20588503

(3) 研究協力者

松本 有記雄 (MATSUMOTO, Yukio)
中武 洋佑 (NAKATAKE, Yosuke)

