

平成30年 5月28日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14802

研究課題名(和文)統合的内分泌アプローチによるペアボンド維持行動の至近的機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the proximate mechanism for the maintenance of pair bond by integrated endocrine approach

研究代表者

曽我部 篤(Sogabe, Atsushi)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：80512714

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文): ヨウジウオ科魚類イシヨウジでは、日の出直後の数分間だけペアの近接性が認められ、挨拶行動と呼ばれるペア内行動を通じてペアボンドが維持される。本研究では、ペアボンド維持における挨拶行動と内分泌動態の関係性を検証するため、挨拶行動後の経過時間に応じて脳と血漿を採取し、脳全体をライブラリとする遺伝子発現解析と血漿のホルモン定量分析を行なった。RNA-Seqにより1個体当たり平均5500万リードが得られ、発現量解析を進めている。血漿中のコルチゾールと11-ケトテストステロンの濃度は、挨拶行動直後に最も高くなり、その後緩やかに低下した。また、挨拶行動阻害の24時間後にコルチゾール濃度の上昇が認められた。

研究成果の概要(英文): In a monogamous pipefish, *Corythoichthys haematopterus*, spatial proximity of paired fish is recognized only for a few minutes immediately after sunrise, and pair bond is maintained through intra-pair courtship, called the greeting behavior. To verify the relationship between the greeting behavior and endocrine dynamics in maintenance of pair bond, whole-brain RNA-Seq and plasma hormone quantification were performed using the brain and plasma collected according to the elapsed time after the greeting behavior. An average of 55 million raw reads was obtained for each individual by next-generation sequencing, and Gene expression analysis is under way. Concentrations of cortisol and 11-keto testosterone in plasma were highest immediately after greeting behavior and then gradually declined. In addition, an increase in cortisol concentration was observed 24 hours after the inhibition of greeting behavior.

研究分野：進化生態学

キーワード：配偶システム 一夫一妻 ペアボンド RNA-Seq 内分泌 社会行動

1. 研究開始当初の背景

一夫一妻は動物界全体で稀な配偶システムであり、その成立要因と適応的意義がさかんに研究されてきた。近年、ハタネズミ属における先駆的な研究をきっかけに、ペアボンド維持の至近的機構として、オキシトシンやバソプレシンなど神経内分泌機構に焦点をあてた研究が、ヒトを含む哺乳類を中心に進められている。しかし、ペアボンド維持機構を包括的に理解し、動物界におけるその普遍性を検証するには、繁殖行動制御に働く「脳-脳下垂体-生殖腺軸 (BPG-axis)」全体の内分泌動態を解明すると共に、多様な分類群の比較が必要である。

ヨウジウオ科魚類には、著しい配偶システムの多様性が認められ、生涯にわたる一夫一妻を示す種も珍しくない。一夫一妻の本科魚類では「挨拶行動」と呼ばれる、配偶者認識にもとづき、ペア雌雄間でのみ交わされる一風変わった行動が知られている。日中は別々に過ごすペアの雌雄が、日の出直後にだけペアごとに決まった場所で落ち合い、ごく短時間の求愛を交わして、また別れるという行動を、繁殖期・非繁殖期を問わず毎日行っている。複婚(乱婚や一妻多夫)の近縁種は挨拶行動を行わないことや、挨拶行動を阻害すると一夫一妻が崩壊してしまうことから、挨拶行動がペアボンド維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

ヨウジウオ科魚類は以下の3つの特性により、ペアボンド維持の内分泌機構を明らかにする上で絶好のモデル系である。

1. ペアボンドが非繁殖期中も維持される

BPG-axis は、配偶子生産や産卵、子の保護など繁殖行動の内分泌制御にも働いている。そのため、繁殖期にのみペアボンドが維持される動物では、これら内分泌の動態が繁殖サイクルに応じたものなのか、それともペアボンド維持に関係したものなのか識別することは容易ではない。非繁殖期中にもペアボンドが維持されるヨウジウオ科魚類の特性を利用することにより、繁殖の影響を完全に排除し、純粹にペアボンドの維持に働く内分泌動態を検出することが可能である。

2. ペアボンド維持行動が明確で、かつ時間限定的である

多くの一夫一妻の動物は、ペア雌雄間の時間空間的な近接性が高く、なわばり防衛や子育て、摂餌など常に行動を共にする「ペア行動」を基本とする。そのため、ペアのつながりが何をきっかけに、どのような行動で強化されているのか特定するのは困難である。一方、一夫一妻のヨウジウオ科魚類では、ペアの近接性は早朝の挨拶行動のときに限られる。挨拶行動の阻害がペアボンドの崩壊に直結することからも、本行動がペアボンド維持のための唯一にしてもっとも重要なことは明白である。1日1回周期的に繰り返されるごく短時間の行動であるため、観察が容易であり、実験操作に適している。

3. 配偶システムによらず同じ繁殖・社会システムを種間で共有する

多くの動物では、配偶システムの変異に応じて、子の保護様式(両親保護 vs 母親保護)や生活様式(なわばり vs 群れ生活)など社会システムも合わせて変化する。一方、ヨウジウオ科魚類では、一夫一妻か複婚かという配偶システムの違いに関わらず、子の保護を行なうのは雄のみであり、その他の社会システムにも配偶システム間で違いは見られない。そのため、配偶システムの異なる種間で、内分泌系に何らかの差異が認められたなら、この差異が配偶システムの違いに、ひいては配偶システムの決定に関わる行動の違い(ペアボンドを維持するか、しないか?)に直接関係している可能性が高い。

本研究では、ヨウジウオ科魚類のこれら特性を最大限に活かした実験系を組むことで、他の一夫一妻動物では検証の困難な、ペアボンド維持の包括的な内分泌機構の解明に挑む。

2. 研究の目的

本申請課題では、一夫一妻のヨウジウオ科魚類イシヨウジを対象に、ペアボンド維持に重要な役割を果たす挨拶行動を人為的に阻害することで、ペアボンドの維持とその崩壊、新規配偶者探索を経験させ、その過程であられる内分泌動態を、BPG-axis に沿った遺伝子発現定量解析(RNA-Seq)と血漿ホルモン定量解析により追跡する。

イシヨウジでは、ペアの接触は早朝の挨拶行動の時に限られ、日中は別々の場所で過ごしている。ペアの片方を除去すると、翌朝、挨拶行動場所に現れた「残された個体」は、パートナーの到着をしばらくの間じっと待っているが、やがてパートナーを探して挨拶行動場所周辺を活発に泳ぎ回るようになる。この時にパートナー以外の異性に求愛されても反応しないが、翌朝には新たな配偶者の探索・求愛を開始する。以上の特徴から、本研究では挨拶行動によるペアボンドの維持とその内分泌機構について、次のような仮説を立てた(図1)。

1. ペアボンドの維持に働く内分泌機構は、パートナーと離れている時間と共に徐々に減退し、一方、新規配偶者探索に働く内分泌機構は徐々に亢進する(図中)。

2. 挨拶行動により、両内分泌機構は即座にリセットされ、ペアボンドが維持される(図中)。

3. 挨拶行動阻害により、ペアボンド維持の内分泌機構は減退、新規配偶者探索の内分泌機構は亢進を続ける。行動面では、挨拶行動場所周辺でのパートナー探索が観察される(図中)。

4. パートナーと会わない時間がさらに経過すると、新規配偶者探索に働く内分泌機構が優勢となり、ペアボンド維持から新規配偶者獲得へとモチベーションが変化する。行動面

では、新規配偶者の探索やパートナー以外の異性に対する求愛があらわれる（図中）。

この仮説のもと、水槽飼育環境下でペアの視覚的・物理的接触を妨げる挨拶行動阻害実験を行ない、挨拶行動終了後の隔離時間に応じた内分泌動態を追跡する。

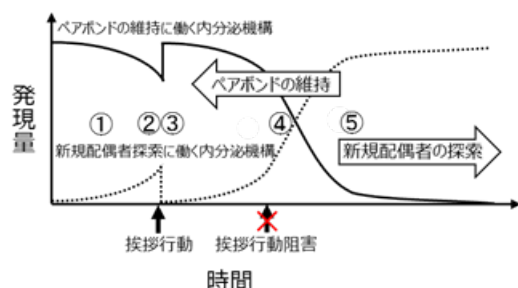


図 1 . 予測される内分泌動態 .

3 . 研究の方法

野外で採取したイシヨウジをペア毎にアクリル製水槽に入れ、挨拶行動を行なう早朝以外は不透明なアクリル板によって視覚的・物理的に隔離して一定期間飼育した。サンプリングは 前回の挨拶行動から 10 時間後、挨拶行動の直前（前回の挨拶行動から 24 時間後）、挨拶行動の直後、挨拶行動阻害の 10 時間後（前回の挨拶行動から 34 時間後）、挨拶行動阻害の 24 時間後（前回の挨拶行動から 48 時間後）に行なった。

麻酔をかけた実験個体からすみやかに脳と生殖腺を摘出し、ヘマトクリット毛細管を用いて血液を採取した。摘出した器官は RNA の分解を防ぐため 24 時間 RNA later に液浸して冷蔵した後、RNA later を除去して -80 で冷凍保存した。ヘマトクリット管遠心機を用いて血液成分を分画し、血漿成分のみ -80 で冷凍保存した。

脳と生殖腺それぞれについて、RNA-Seq による遺伝子発現定量解析を行なった。分析にはリード数に利点を持つイルミナ社の次世代シーケンサー（HiSeq4000）を利用した。取得したリードをリファレンス配列にマッピングし、遺伝子発現行列を得ることで、サンプリングのタイミングにより発現量が大きく異なる遺伝子を器官ごとに検出する。また、ゲノム解読の進んだモデル生物（ゼブラフィッシュ、メダカ、トゲウオなどの魚類）のゲノムデータベースで、アノテーションを行なった。

採取した血漿をホルモン定量分析に供した。先行研究によりペアボンド維持との関係が強く示唆されているステロイドホルモン（11-ケトテストステロン）と配偶者消失のストレスに反応して分泌量の増加が予測されるコルチゾールをターゲットホルモンとした。ホルモン定量分析には市販の定量キット（EIA Kit, Cayman Chemical Company）を用いた。

4 . 研究成果

HiSeq4000 を用いたシーケンス（2x150bp）により、1 個体当たり平均 5500 万リードが得られた。現在、デノボアセンブリにより得られたリファレンス配列へのマッピングとアノテーション、発現量解析を進めている。

血漿中のコルチゾール濃度は挨拶行動直後に最も高くなり、その後緩やかに低下した（図 2a）。挨拶行動阻害後 10 時間ではコルチゾール濃度は低かったが、阻害後 24 時間では上昇していた。11-ケトテストステロンの濃度は挨拶行動直後に最も高くなり、次いで挨拶行動直前が高かった（図 2b）。挨拶行動阻害による影響は見られなかった。

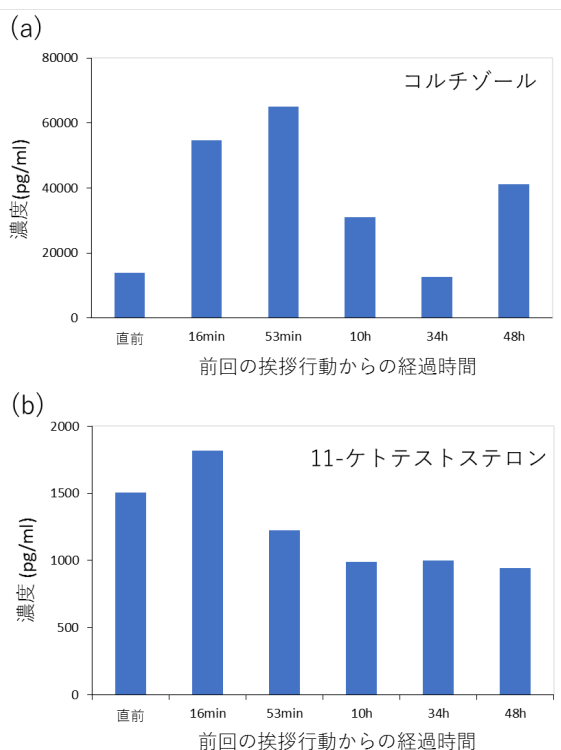


図 2. 血漿中の(a)コルチゾールと(b)11-ケトテストステロン濃度の挨拶行動後の経過時間に応じた変化 .

本研究と平行して、一夫一妻のイシヨウジと比較するため、複婚のヨウジウオとオクヨウジの 2 種について、配偶システムを水槽実験と分子マーカーによる親子判定により調査した。ヨウジウオでは国内 4 地域の個体群間で配偶システムの変異が見られ、高緯度の個体群ほど乱婚の程度が高いことが明らかになった。雌雄の繁殖速度の比較からオクヨウジの潜在的な配偶システムを調査したところ、雌の繁殖速度は雄に比べて 2 倍早く、雄は 1 匹の雌の産んだ卵塊のみ保護可能なため、一妻多夫型の配偶システムを持つと推測された。

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 1 件)

1. Sogabe, A., Hamaoka, H., Fukuta, A., Shibata, J., Shoji, J. & Omori, K. 2017. Application of stable isotope analysis for detecting filial cannibalism. Behavioural Processes 140: 16-18. (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Sogabe, A. Ovarian structure and mode of egg production as a phylogenetic constraint on mating patterns in Syngnathids. Syngbio 2017, Tampa, May 2017. (招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/staff.atsushi-sogabe>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾我部篤 (Atsushi Sogabe)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：80512714