

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06422

研究課題名(和文) フィリアルカニバリズムの発現メカニズム：保護と摂食を調節する多機能ホルモンの効果

研究課題名(英文) Mechanism for the occurrence of filial-cannibalism: effects of multi-functional hormone regulating parental care and feeding behaviors

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はロウソクギンボの卵保護雄の全卵食行動発現の内分泌メカニズム解明を目的としている。雄が卵から溶出する化学物質により卵の存在を認識し、保護行動を発現させていることが、卵飼育海水の曝露実験の結果から示唆された。雄の卵保護行動がペプチドホルモン・プロラクチン(PRL)の分泌を阻害すると抑制されたことから、PRLに本種雄の保護行動を促進する機能があることが示された。免疫組織学的手法により、全卵食中の雄と卵保護中の雄の脳内神経活動を比較したところ、価値判断を制御するとされている終脳背側野内側部(Dm)と摂食調節に関与する視床下部外側結節核腹側部(NLTV)で全卵食雄の活性が高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ロウソクギンボ雄の全卵食は、雄親が栄養利益を期待して保護卵を「食べる」のではなく、自身の求愛を促進する11-KT分泌を促すために卵の存在を消す「子殺し」である。本研究は、雄親が卵の匂いで卵の存在を認識し保護行動が発現すること、保護行動を促進する子育てホルモンがプロラクチンであること、全卵食中の雄脳内のどのような部位で活性が高まっているかを明らかにした。これらの成果は、子を保護中の親が次の瞬間には子を食べ始めるドラスティックな転換メカニズム解明に貢献するものであるが、それは同時に子の保護の発現・維持メカニズムや進化の理解にも繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to clarify the endocrinological mechanism for occurrence of total-filial cannibalism by males of barred-chin blenny *Rhabdoblennius nitidus*. The results of egg-water exposure experiment suggested the possibility that males recognize the presence of eggs with the chemical cues from the eggs, and then increase parental care behaviors. The parental care behaviors were reduced by the administration of bromocriptine, a prolactin (PRL) secretion inhibitor, suggesting that PRL has a function of promoting parental care behavior of males in this species. Comparing neural activation in different 26 brain regions between cannibalizing males and brooding males, significant differences were detected in 8 regions, including Dm associated with value evaluation and NLTi associated with feeding regulation.

研究分野：進化生態学

キーワード：親による子の保護 子殺し フィリアルカニバリズム 繁殖戦略 行動生態 魚類 進化

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材料である。子の一部あるいは全部を食べるいずれの場合も、子を食べる栄養利益を期待するエネルギーベースモデルで説明される。魚類の「全卵食」行動も従来は利益が小さく割の合わない少数卵保護を打ち切って繁殖をやり直す適応戦略とされてきた。しかし、雄が営巣して見張り型保護を行う種では、雄は卵を保護しながらでも雌と産卵して保護卵を増やせるため、卵が少ないという理由で全て食べてしまう全卵食現象は大きな謎とされていた。

研究代表者らは、ロウソクギンポ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期と、求愛活性が低く主に保護を行う保護期を繰り返す繁殖サイクルを持つことを見出し(図1実線; Matsumoto et al. 2012; J Ethol)、さらに巣内の卵の存在が11-KT分泌の鍵刺激であることを発見した。全卵食は雄の体コンディションと無関係に発生するだけでなく、卵を食べずに吐き捨てる雄もいることから、本種の全卵食は、雄親が栄養利益を期待して保護卵を「食べる」のではなく、自身の求愛を促進する11-KT分泌を促すために卵の存在を消す「子殺し」であることが示された(図1点線; Matsumoto et al. 2018; Cur Biol)。

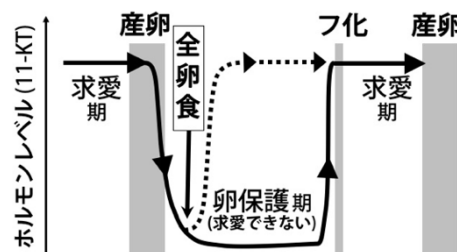


図1. 性ホルモンに依存した繁殖サイクル
卵を獲得すると11-KTが低下して2日以内に求愛できなくなる。卵が少ない場合は、全卵食で卵の存在を消して11-KTを回復させ、求愛を再開する

ロウソクギンポの全卵食は栄養利益を期待しない子殺しであると結論された。しかし、全卵食が誘導される少数卵保護条件で保護雄に給餌する実験を行ったところ、飽食給餌はもちろん、少量でも餌を食べると全卵食は抑制された。給餌により栄養要求が満たされたと考えられるなら、この結果は子殺し仮説と矛盾している。研究代表者らは少量給餌でも全卵食が抑制された点に着目し、食べた餌の量ではなく、摂食するという行動そのものが刺激となる内分泌的な作用が働いたと考えた。

魚類を含む多くの動物では、脳内ペプチドホルモン・プロラクチン(PRL)は子育てホルモンとして知られている。その分泌を調節するPRL放出ペプチド(PrRP)は、実は摂食を抑制する働きがあり、本種でもその効果が確認されている(図2④: Takegaki et al. 2020; J Fish Biol)。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2①)、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2⑤)。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2③)、全卵食を引き起こすのではないかと考えた。本研究では保護と摂食を調節する多機能ホルモンPrRPに着目し、全卵食が両機能の相乗効果により発現するメカニズムの解明を目的とした。

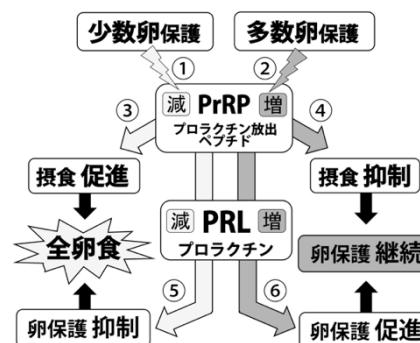


図2 予想される全卵食発現メカニズム
保護卵が少ないとPrRPとそれに伴うPRLの分泌が抑えられ、摂食抑制が解けると同時に保護行動が抑制され、全卵食が起こりやすくなる。

2. 研究の目的

本研究ではロウソクギンポ雄の全卵食行動が、PRL放出ペプチド(PrRP)によって調節される卵保護行動と摂食行動の相乗効果で発現することを検証する。

(1)PRLが卵保護行動に与える効果の検証(図2⑤, ⑥): PRLは魚類でも子の保護行動を促進することが分かっている。PRLまたはPRL阻害剤の投与実験を行い、雄の保護行動への効果を確認する。

(2)保護卵数がPRL分泌量に与える効果の検証(図2①, ②): 全卵食は少数卵保護時に起こりやすく(Matsumoto et al. 2011; Ethology)、卵からの量的なシグナルによりPrRPとPRLの分泌量が変化していると考えられる。①保護卵の一部除去実験を行い、多数卵保護雄とPRLレベルを比較する。②雄が卵からの化学シグナルを受信して反応している可能性を検討するため、無保護雄に卵飼育海水(多数卵条件・少数卵条件)を曝露して、条件間でPRLレベルを比較する。

(3)PrRP が全卵食行動発現に与える効果の検証：発現メカニズムの各経路が検証されれば、メカニズム全体を検証するための(1)PrRP 及び(2)PRL 阻害剤の投与実験を行う。

3. 研究の方法

(1)PRL が卵保護行動に与える効果の検証

野外で卵保護を開始した雄に 1 日 1 回 PRL 阻害剤(ブロモクリプチン)を腹腔内に投与して保護行動と保護成功に与える効果を検証する。投与前後の雄の行動を水中ビデオカメラで撮影して、保護行動の頻度と時間、および卵の生残率を生理食塩水のみを投与したコントロール個体と比較する。観察後直ちに雄を捕獲して解剖し、摘出した脳下垂体を固定して研究室に持ち帰る。リアルタイム PCR 法を用いて脳下垂体内の PRL の遺伝子発現量を測定し、阻害剤の投与効果を確認する。

(2)保護卵数が PRL 分泌量に与える効果の検証

研究項目(1)で、リアルタイム PCR 法を用いた PRL の定量が不安定であったため、実験項目(2)-②は雄の反応が得やすい雄性ホルモン・11-ケトテストステロン(11-KT)濃度で検討を試みた。水槽内で営巣させ馴致した無保護雄の巣内に、数の異なる未発眼卵(約 400 個&1200 個)の飼育水を点滴注入する。注入開始 10 分前、注入 10 分後、注入終了 10 分前に雄の行動を記録して海水のみを注入したコントロール個体と比較する。実験終了直後の雄の血中 11-KT 濃度を ELISA 法で測定する。

(3)PrRP が全卵食行動発現に与える効果の検証

研究項目(1)(2)からは、予想した全卵食発現メカニズムの各経路の検証に至らなかったため、PrRP 投与実験ではなく、脳内の PrRP の活性部位を検討した。①まず、全卵食を誘導した保護雄、通常の保護雄、満腹給餌した保護雄の脳内神経活動を免疫組織学的手法で比較する。②さらに PrRP の抗体を作成して 2 重染色を行い、全卵食雄で PrRP が特異的に活性化している脳内部位を特定する。

4. 研究成果

(1)PRL が卵保護行動に与える効果

PRL 阻害剤を投与した雄は、コントロール雄に比べて卵の生残率が低く、保護行動に費やす時間も短くなった(図3)。この結果から、本種の PRL には卵保護行動を促進する効果があることが示唆された。魚類において PRL が子の保護行動を調節することを示した例は数種に限られていることから(Blüm & Fiedler, 1964, 1965; Hoar et al., 1983; Kindler et al., 1991; Pall et al., 2004; Whittington & Wilson, 2013)、本研究の結果は貴重な事例になると考えられる。

しかし、実験個体の脳下垂体中の PRL 遺伝子発現量には条件間で有意な差が見られず、ブロモクリプチンの PRL 阻害効果が確認できていない。おそらく、阻害剤の効果が投与後数時間しか持続しないことが原因と考えられる。この点を考慮した実験デザインで今夏に再度投与効果を確認する実験を実施予定である。

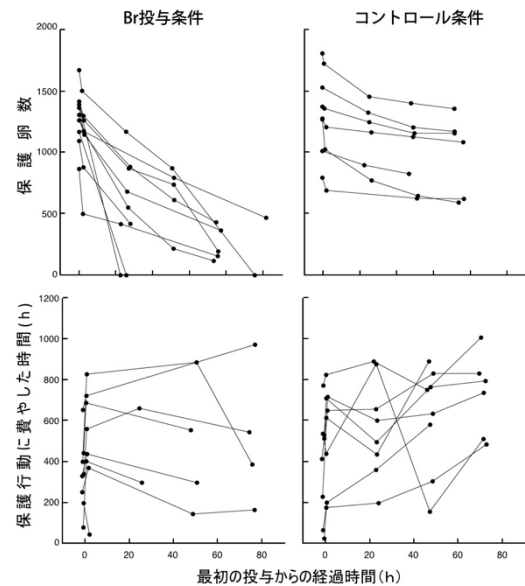


図3 PRL阻害剤(Br)投与後の保護卵数と保護行動の変化

(2) 保護卵の化学シグナルが雄の保護行動と雄性ホルモン 11-KT に与える効果

卵海水曝露条件の雄の血中 11-KT 濃度が、海水曝露条件のコントロール雄に比べて有意に低かった (図 4)。また、雄は卵海水に反応し、主に卵保護時に見られる「巣奥に滞在する行動」を増加させた (図 5)。何も曝露しない馴致個体は求愛期の状態を想定していたが、予想に反して卵海水曝露条件雄と同等の低い 11-KT 値を示した。これは馴致期間中に雄に雌を提示して求愛活性を高める操作が不十分であったことが原因と考えられた。曝露海水中で養育する卵数の違いは雄の血中 11-KT 濃度に差をもたらさなかった。また、卵数の違いによって保護行動にも有意な違いは認められなかった。以上の結果より、雄は卵海水中の化学物質の刺激で卵の存在は認識できるが、卵の数は認識できない可能性が示唆された。魚類では臭覚により血縁卵と非血縁卵を識別する種が報告されている (Loiselle, 1983)。今後は卵から溶出する化学物質を曝露することで特異的に活性化する脳領域を探索し、フェロモンとなる化学物質を特定していく予定である。

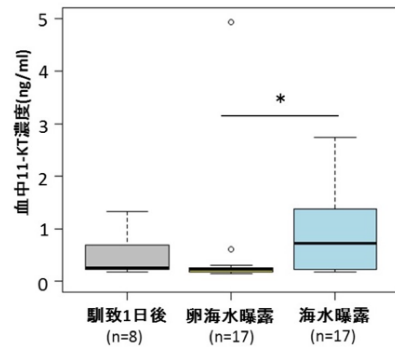


図 4 卵海水曝露が血中アンドロジェン濃度に与える効果

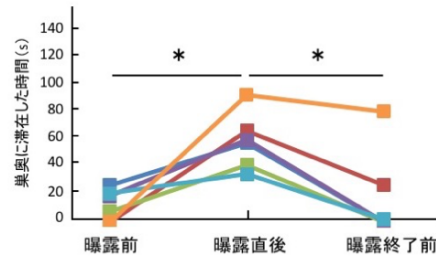


図 5 卵海水曝露が保護雄の巣内滞在時間に与える効果

(3) 脳内の PrRP 活性部位の検討

全卵食行動の惹起に関係する脳領域を特定するために、全卵食を誘導した保護雄 (n=4)、通常の保護雄 (n=4)、満腹給餌した給餌雄 (n=3) の脳内の神経活動を免疫組織学的手法で比較した。今回注目した 26 領域のうち 8 領域で群間に有意差が検出された。全卵食誘導個体では、特に脊椎動物で価値判断を制御するとされている終脳背側野内側部 (Dm) と、摂食調節に参与する視床下部外側結節核腹側部 (NLTv) で高い活性が認められた (図 6)。これらは、個体が子を保護するか全卵食を行うかの意思決定を行うプロセスにおいて、高次中枢での情報処理と摂食調節が密接に関係していることを示唆する。現在、これらの神経活動マーカーに加えて、作成した PrRP 抗体を用いて 2 重免疫染色を行い、PrRP が全卵食雄のどの脳内部位で特異的に活性化しているかを探索中である。

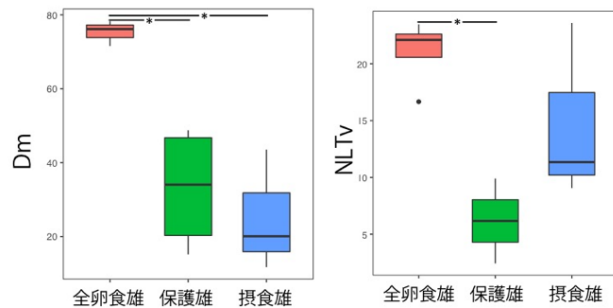


図 6 全卵食中の雄、卵保護中の雄、摂食中の雄の、終脳背側野内側部(Dm; 左)と視床下部外側結節核腹側部(NLTv; 右)の単位面積当たりの活動ニューロン数の比較。

さらに全卵食雄と卵保護雄の脳内に特異的に発現する遺伝子を抽出するために脳全体の RNA-seq を行って網羅的な遺伝子発現調査を試みている。2 個体の予備実験では、全卵食雄で PrRP の発現量が若干少ないことが分かっている。現在、2020 年に採集した 13 個体のデータを加えて解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sano K, Yokoyama R, Kitano T, Takegaki T, Kitazawa N, Kaneko T, Nishino Y, Yasumasu S & Kawaguchi M.	4. 巻 332
2. 論文標題 Male parental assistance in barred-chin blenny, <i>Rhabdoblennius nitidus</i> , embryo hatching.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Zoology Part B	6. 最初と最後の頁 81-91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jez.b.22854	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Y, Tateishi T, Terada R, Soyano K, Takegaki T	4. 巻 28
2. 論文標題 Filial Cannibalism by Male Fish as an Infanticide to Restart Courtship by Self-Regulating Androgen Levels	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 2831 ~ 2836
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2018.06.056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takegaki T, Nakatake Y, Amiya N	4. 巻 97
2. 論文標題 Effect of the administration of prolactin-releasing peptide2 on feeding activity in the intertidal blenny <i>Rhabdoblennius nitidus</i> (Gunther, 1861)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Fish Biology	6. 最初と最後の頁 566-571
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jfb.14367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

長崎大学 進化行動生態学研究室ホームページ
<https://takegaki3.wixsite.com/takegakilab>

発表論文に関する長崎大学のプレスリリース
<http://www.nagasaki-u.ac.jp/ja/about/info/science/science162.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	阿見彌 典子 (AMIYA Noriko) (20588503)	北里大学・海洋生命科学部・講師 (32607)	
研究分担者	菅 向志郎 (SUGA Koushi rou) (60569185)	長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関