

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2012

課題番号：21688016

研究課題名（和文） サクラマス成熟雄の生理に影響を与える性フェロモンの解明

研究課題名（英文） Elucidation of sex pheromones affecting the physiological condition of mature male masu salmon.

研究代表者

山家 秀信（YAMBE HIDENOBU）

東京農業大学・生物産業学部・講師

研究者番号：40423743

研究成果の概要（和文）：サクラマスにおける性フェロモンのプライマー効果を解明した。原尿やトリプトファン含む4代謝物を成熟雄のいるタンクに注入した後、性ステロイドホルモン量を定量した。HPLCによってサクラマス尿中のトリプトファン代謝物のプロファイルを明らかにした。その結果、排卵雌尿にはプライマーフェロモンが含まれることが示され、その効果は曝露4時間後にピークを示し、濃度依存性も示唆された。尿中トリプトファン代謝物の組成比には雌型と雄型が示された。本種のプライマーフェロモンはトリプトファン代謝物のキヌレニンとヒドロキシキヌレニンである可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：We elucidated primer effects of sex pheromones in masu salmon. After introduce original urine or 4 metabolites including tryptophan into tanks keeping mature males, male steroid hormones were measured. HPLC revealed profiles of tryptophan metabolites as major pheromonal components in the urine. We clarified that ovulated female urine contained priming pheromones and further, the primer effects peaked after exposure for 4 hours and showed the dose-response manner. Female and male-specific ratios of tryptophan metabolites were discovered in spawning season. Priming pheromones in the present species are likely to be kynurenine and hydroxy-kynurenine from tryptophan.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 4,000,000  | 1,200,000 | 5,200,000  |
| 2010年度 | 5,400,000  | 1,620,000 | 7,020,000  |
| 2011年度 | 3,200,000  | 960,000   | 4,160,000  |
| 2012年度 | 1,100,000  | 330,000   | 1,430,000  |
| 総計     | 13,700,000 | 4,110,000 | 17,810,000 |

研究分野：

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：性フェロモン、尿、ステロイドホルモン、サケ科魚類、トリプトファン、繁殖生理、行動生理

## 1. 研究開始当初の背景

多くの動物において性ホルモンと異なり性フェロモンは、その物質に加え分泌と受容等が解明されている種が少ない。魚類の性フ

エロモンは、キンギョで最も研究が進んだ結果、ホルモンがフェロモンとして転用されたというホルモナルフェロモン（性ステロイドやプロスタグランジンF）が一般的である

とされてきた。しかし今では多くの例外が報告および示唆されている。

サケ科魚類の繁殖時において、成熟雄の血中性ホルモン量などの内分泌因子を増長させる性フェロモン（プライマー効果）の存在は長年示唆されてきた。しかし、コイ科魚類の研究と同様にホルモナルフェロモンの概念を踏襲しており、タイセイヨウサケ属で幾つかのホルモン様物質がプライマーフェロモンの候補に挙げられているに過ぎず、同定されたとは言えない。

既に我々はサクラマス<sup>1</sup>の排卵雌尿に含まれるトリプトファン（Trp）代謝物のL-キヌレニン（Kyn）が成熟雄を誘引するリリーサーフェロモンの主成分であることを明らかにした。そこで、本種のプライマーフェロモンを同定し機能解析すれば、リリーサーフェロモンと対を為すことにより、魚類における新たな性フェロモン機構とその多様性を示すことができる。

## 2. 研究の目的

(1) 本種におけるプライマーフェロモンが排卵雌尿中に存在することを確認するため、様々な尿や排卵雌胆汁および体腔液に曝露された残留型排精雄が示すプライマー効果を調べる。

(2) 排卵雌尿中のプライマーフェロモンの有効性を精査するため、残留型排精雄を用いて排卵雌尿の経時的なプライマー効果を調べる（0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6時間曝露）。また、残留型排精雄に排卵雌尿を $10^{-5}$ 倍～ $10^{-10}$ 倍希釈で曝露しプライマー効果の濃度依存性を調べる。

(3) フェロモン分泌パターンを詳細に把握し、Trp代謝物4種のみで人工的に再現したフェロモン溶液を作成するため、本種における未熟雌雄尿、未排卵雌尿、排卵雌尿、排精雄尿中のTrp代謝物4種の放出プロファイル

を作成する。

(4) 各種尿とTrp代謝物各種および人工尿（Trp代謝物混合液）が残留型排精雄のプライマー効果を与えるか繁殖期を長期に渡り調査する。さらにリリーサー効果を有するKynにおける経時的变化も調査する。

## 3. 研究の方法

(1) 排卵雌尿、排卵雌胆汁、排卵雌体腔液、未排卵雌尿、排精雄尿、L-キヌレニン（Kyn  $10^{-4}$ M）、DW（イニシャルコントロールおよびファイナルコントロール）に排精雄を曝露し、そのプライマー効果を調べた。各刺激液の注入直前にタンクを止水にし、水量の $10^{-5}$ 倍希釈になるように各刺激液を注入した。曝露4時間後、採血および採精した。

(2) 排精雄を用いて排卵雌尿のプライマー効果の経時的応答（タイムコース）を調べた。実験開始24時間前に、排卵雌尿の注入直後（イニシャル群：0 min）、30 min後、1 h後、2 h後、3 h後、4 h後、5 h後、6 h後の8群と、対照実験としてDW注入直後（イニシャル群：0 min）、3 h後、4 h後、6 h後の4群に分けた。刺激液の注入直前にタンクを止水にし、それぞれ水量の $10^{-5}$ 倍希釈になるように刺激液を注入した。各群の曝露終了後、採血および採精した。

さらに、排精雄を用いて排卵雌尿のプライマー効果の濃度依存性（ドーズレスポンス）を調べた。実験開始24時間前に、 $10^{-5}$ 倍～ $10^{-10}$ 倍希釈の排卵雌尿注入群（6群）とDW曝露群に分けた。刺激液の注入直前にタンクを止水にし、それぞれ水量の $10^{-5}$ 倍希釈になるように刺激液を注入した。曝露4時間後、採血および採精した。

(3) 高速液体クロマトグラフィーを用いてサクラマスの未熟雌雄尿、未排卵雌尿、排卵雌尿、排精雄尿におけるTrp代謝物4種を経時的に定量し、その結果を基にそれら代謝物

による人工尿を作成した。

(4) 排精雄をイニシャルDW群、ファイナルDW群、未熟雌尿群、排卵雌尿群、排精雄尿群、ホルミルキヌレニン (F-Kyn) 群、Kyn 群、ヒドロキシキヌレニン (H-Kyn) 群、人工排卵雌尿 (H-Kyn: Kyn: F-Kyn: Trp = 9: 3: 5: 4) 群、人工排精雄尿 (同= 60: 1: 20: 120) 群に分け、各種サンプルを水量の  $10^{-5}$  倍希釈になるよう注入し、曝露 4 時間後に採血および採精した。これを繁殖期の前中後期として 3 回の試験を繰り返した。

さらに、Kyn への経時的応答の検証として、Kyn 注入直後 (0 時間)・1・2・3・4・5・6・12 時間後に、DW 曝露群はサンプル注入直後 (0 時間)・3・4・5・6・12 時間後に、採血および採精した。

(共通) 雄に対するプライマー効果として精液の体重当たりの重量比とスパマトクリット値の他、ELISA 法を用いて Testosterone (T)、11-ketotestosterone (11-KT)、 $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ( $17, 20\beta$ -P) を測定した。

#### 4. 研究成果

全ての実験において、精液重量比とスパマトクリット値には有意な結果が得られなかったので割愛する。

(1) T 濃度は DW 曝露群より排卵雌尿と Kyn 曝露群において有意に上昇した。11-KT では排卵雌尿曝露群が DW 曝露群に対して有意に上昇し、また L-キヌレニン曝露群にも上昇傾向が見られた。 $17, 20\beta$ -P の濃度は排卵雌尿、Kyn、未排卵雌尿において有意に上昇した。

(2) T 濃度は曝露 3 時間後に上昇し 4 時間後には降下した。11-KT 濃度は 5 時間後には上昇した。 $17, 20\beta$ -P 濃度は曝露 3 時間後から有意に上昇し、6 時間後には降下した。また、各種ステロイドホルモン濃度は、いずれもフ

ェロモン濃度依存性を示した。

(3) 未熟雌雄尿、未排卵雌尿、排卵雌尿、排精雄尿における Trp 代謝物は、日周性や経時的变化を示しつつ、雌雄および熟度による組成比の違いを示した。これらをレーダーチャートに表すと、僅か 4 種の Trp 代謝物ですら成熟個体の尿に雌型と雄型が存在した。

(4) Kyn と H-Kyn には排精雄の性ステロイド 3 種を増加させる効果が見られ、前期から後期にかけて H-Kyn から Kyn へと効果の高い物質が変化していく傾向が見られた。

Kyn の経時的応答実験では各種血中ステロイド量が曝露 2 時間後から上昇し、5 時間後にピークを迎え 12 時間後に減少する傾向が見られた。本種のプライマーフェロモンは、Trp 代謝物の Kyn と H-Kyn である可能性が高く、フェロモン効果を示す主要物質は産卵期に渡って変遷するが、産卵期中期にその効果が最も高いと考えられる。

#### 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 3 件)

1) 藤本泰文・高橋清孝・進東健太郎・山家秀信・佐藤繁、群れ形成の習性を利用したブルーギルの捕獲、日本水産学会誌、査読有、2010、76、913-919.

2) 三原徹大・小倉隆平・山家秀信、サクラマスの性フェロモンにおけるプライマー効果、日本味と匂い学会誌、査読有、2009、16(3)、583-584.

3) 山家秀信、平成 20 年度日本水産学会「水産学奨励賞」受賞者総説、サケ科魚類における性フェロモンに関する研究、日本水産学会誌、査読無、2009、75、648-651.

[学会発表] (計 10 件)

1) 福井 翔・山家秀信、サクラマスの尿中トリプトファン代謝物混合液に対する成熟

オスの選択行動、平成 25 年度日本水産学会  
春季大会、2013 年 3 月、東京海洋大学

2) 藤田健吾・福井 翔・山家秀信、サクラ  
マスの成熟オスはメス型の尿中トリプトフ  
アン代謝物混合液に強い行動反応を示す、平  
成 25 年度日本水産学会春季大会、2013 年 3  
月、東京海洋大学

3) 豊福康彦・山家秀信、サクラマスの成熟  
雄の生理に影響する性フェロモンとしての  
トリプトファン代謝物、平成 25 年度日本水  
産学会春季大会、2013 年 3 月、東京海洋大学

4) 山家秀信、魚類の行動とフェロモン、シ  
ンポジスト、水産学会春季大会ミニシポジ  
ウム「水産資源管理に向けた魚類の行動研  
究」、平成 24 年日本水産学会春季大会、2012  
年 3 月、東京海洋大学

5) 福井翔・豊福康彦・山家秀信、サクラマ  
スの成熟雄は雌型のトリプトファン代謝物  
混合液に強い行動反応を示す、平成 24 年度  
日本水産学会春季大会、2012 年 3 月、東京海  
洋大学

6) 豊福康彦・山家秀信、サクラマスの成熟  
雄の生理に影響する性フェロモンはトリプ  
トファン代謝物か？、平成 24 年度日本水産  
学会春季大会、2012 年 3 月、東京海洋大学

7) 山家秀信、魚類の性フェロモンとしての  
キヌレニン（招待講演）、日本生化学分子生  
物学会ワークショップ、2010 年 12 月、神戸  
国際展示場

8) 山家秀信、サケ科魚類の性フェロモン（招  
待講演）、「水産動物における生理現象と物質  
的基盤」、水産学会農芸化学会共催シポジ  
ウム、2010 年 3 月、東京大学

9) 石井孝介・三原徹大・山家秀信、サクラ  
マスの性フェロモンに対する雄の行動レベ  
ルの経時的变化、平成 22 年度日本水産学会  
春季大会、2010 年 3 月、日本大学

10) 三原徹大・鈴木 航・山家秀信、ニジ  
マスの性フェロモンの検索、平成 22 年度日  
本水産学会春季大会、2010 年 3 月、日本大学

〔図書〕（計 3 件）

1) 山家秀信、化学同人、DOJIN BIOSCIENCE  
シリーズ、化学受容の科学、第 18 章 魚類・  
両生類における化学感覚と行動、Part 5 化学  
感覚と行動・生理、2012, 202-213.

2) 山家秀信、恒星社厚生閣、水産学シリー  
ズ 176 巻、第 2 章 繁殖行動におけるフェロ  
モンの役割、2013, 28-45.

3) 山家秀信、北海道大学出版会、サケ学大  
全、第 22 章 雌の魅惑-フェロモン、2013,  
99-102.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山家 秀信 (YANBE HIDENOBU)

東京農業大学・生物産業学部・講師

研究者番号：40423743