

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570029

研究課題名(和文)性ホルモンに制御された厳格な繁殖サイクルとそれに対抗する繁殖戦略の進化

研究課題名(英文)Evolution of androgen-dependent brood cycling and the counter tactics

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) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：(1)ロウソクギンボ雄の繁殖サイクルを調節する性ホルモン・アンドロゲン(テストステロン：T)には免疫機能を低下させる効果はなかった。子の保護行動に関与するとされる脳下垂体ホルモン・プロラクチン(PRL)の塩基配列を決定した。(2)巣内の卵操作実験から、卵の存在が繁殖フェーズを切り替えるカギ刺激であることが強く示唆された。(3)体コンディションと卵食数の関係から、全卵食の目的が栄養摂取ではなく卵の存在を消すことにある可能性が示唆された。(4)全卵食行動と摂食行動を区別するために、脳内ペプチドホルモン・ニューロペプチド-Y(NPY)とオレキシン(ORX)の摂食活性への効果を検討した。

研究成果の概要(英文)：(1) The male sexual hormone testosterone, which controls brood cycling of *Rhabdoblennius nitidus* males, has no effect on the reduction of their immune function. The base sequence of a pituitary hormone prolactin (PRL), which is expected to promote parental care behavior in animals, was determined. (2) The nest egg-removal and -adding experiments strongly suggested that the presence of eggs in the nests is a key stimulus for the switch between reproductive phases by regulating plasma androgen levels of the males. (3) There was no significant relationship between male body condition and the number of cannibalized eggs. These results suggested that males cannibalize all eggs not to take nutritional resource but to delete eggs from the nests. (4) The effects of peptide hormones neuropeptide-Y (NPY) and orexin (ORX) on male feeding activity were examined to discriminate total-filial cannibalism from feeding behavior.

研究分野：行動生態学

キーワード：行動生態 進化 繁殖戦略 内分泌 魚類 子の保護 ホルモン

1. 研究開始当初の背景

さまざまな形質の発現に関わる内分泌システムは、適応的な形質を発現するための適応的な至近メカニズムであると当然のように考えられてきた。しかし、ホルモンはたいてい複数の形質の発現に関与しており、その内分泌システム全体がひとつのパッケージとして進化の過程で維持されているため、非適応的な形質が発現することもある。例えば、性ホルモン・テストステロンは、雄の求愛行動を促進する一方で子の保護行動を抑制するため、より激しい求愛が有利になる状況では機械的に保護成功が低下する可能性がある。このような内分泌システムの特徴により生じる不利益やそれに対抗する形質の適応進化は、目に見える現象のみで構築されてきた進化メカニズムを根本から覆す可能性を秘めているにもかかわらず、これまでの行動生態学では全く考慮されてこなかった。本研究では、ロウソクギンポ(イソギンポ科魚類)の雄の、性ホルモンに制御された厳格な繁殖サイクルに着目し、その非適応的なサイクルの進化背景とそれに対抗する行動の適応進化を明らかにすることを目的とする。

雄が子を保護する種で確認される明確な繁殖サイクルは、これまで子の数や成長に伴って増加する保護投資が求愛投資を制限するトレードオフの結果とされてきたが、その分かり易さゆえに十分に検証されてこなかった。申請者らの研究から、ロウソクギンポ雄の繁殖サイクルは、このトレードオフ仮説では説明できないことが示され、保護 Phase の雄は、卵獲得後に機械的に低下する性ホルモン・11-ケトテストステロン(11-KT)の影響で、配偶可能な雌がいても生理的に求愛できない状態であることが分かっている。

2. 研究の目的

(1) 厳格な繁殖サイクルをもたらす内分泌システムの進化：ホルモンの多機能に着目して

非適応的に見える繁殖サイクルの適応的意義を明らかにするために、雄の求愛活性を促す 11-KT が、他方では白血球などの細胞に作用して免疫機能を低下させる多機能ホルモンであることに着目した。本種雄は繁殖期(約2ヶ月間)に繰り返し繁殖・卵保護することによって生理的コンディションが低下する。求愛を促す 11-KT を高いレベルで維持すれば、雄は高い配偶成功が得られるが、その一方で免疫が低下して早期に死亡するかもしれない。すなわち、一見非適応的に見える繁殖サイクルは、11-KT がもたらす免疫機能の低下を抑える働きがあると予測した。

(1)-① 11-KT が雄の免疫機能に与える影響を、白血球数とリゾチウム活性から検出する。

(1)-② 11-KT を投与して高いレベルを長期間持続させた「繁殖サイクルの無い雄」と通常の「サイクルのある雄」を野外で追跡調査して適応度を比較する。

(2) 機械的に進む繁殖サイクルをリセットする全卵食行動

ロウソクギンポを含む卵保護を行う多くの魚類で、獲得卵数が少ない場合に保護雄がすぐに保護卵を全て食べてしまう全卵食行動が知られている。保護卵の一部を卵食する部分卵食は、栄養状態が悪い雄が保護を継続するために起こるが、少数卵保護時の全卵食は栄養状態に関係なく起こるため、部分卵食とは異なるメカニズムで進化したと予測されている。

2011年の予備調査において、保護卵を除去した雄の 11-KT レベルが上昇して、速やかに新たな卵を獲得していたことから、この全卵食は「保護雄が機械的に進む繁殖サイクルを自らリセットする手段」ではないかと考えた。すなわち、求愛から保護に Phase がシフトする(11-KT 分泌が抑制される)際のカギ刺激が保護卵の存在であり(魚類・鳥類で報告有)、保護雄は保護コストの割りに合わない少数卵のまま保護 Phase に入りそうになると、保護卵を全卵食によって除去することで 11-KT レベルを上昇させて素早く繁殖をやり直しているという仮説である。

(2)-① 卵の存在が 11-KT 分泌を抑制するカギ刺激であることを検証する。

(2)-② 少数卵保護時の全卵食が、保護雄の栄養状態とは無関係に起こることを示す。

3. 研究の方法

(1)-①②

当初は魚体内で徐々にアンドロジェンが溶解するサイラックスチューブを用いて野外実験を実施する予定であったが、国内ではチューブの入手が困難であるため水槽実験を実施した。

ロウソクギンポ雄の非適応的に見える厳格な繁殖サイクルをもたらす内分泌システムの進化要因を明らかにするために、雄の求愛活性を促進する性ホルモン・アンドロジェンの免疫機能への影響(免疫仮説)を検証する長期アンドロジェン曝露水槽飼育実験を行った。テストステロンを溶解させた曝露水槽とコントロール水槽で繁殖期の約2ヶ月間飼育した雄個体の免疫の高さを比較した。雄の免疫機能の指標としては、魚類を含む多くの動物で使用されている、白血球数、体コンディション(肥満度)およびリゾチウム活性を用いた。

繁殖サイクルの形成に動物の子の保護行動に関与するとされる脳下垂体ホルモン・プロラクチンが影響している可能性を検討した(保護仮説)。本種雄の脳下垂体内のプロラクチン量をプロラクチン mRNA 発現量で定量化するためにプロラクチンの塩基配列の推定を試みた。

(2)-①

保護卵の存在がアンドロジェン（11-KT）分泌に与える影響を検証するために、野外で人工巣を利用する雄に卵を追加・除去する操作実験を行った。雄が卵保護中の巣から卵が産み付けられたシートを抜き出し、保護卵を除去する卵除去条件と、卵を保護していない雄の巣内に、他の雄の保護卵をシートごと挿入して保護させる卵追加条件を設定し、両条件の保護雄の翌日の 11-KT レベルを測定した。

(2)-②

当初は水槽内で栄養条件を操作した卵食実験を行う予定であったが、飼育条件が全卵食行動に与える影響を避けるため、野外操作実験を実施した。

本種雄の全卵食が、部分卵食のような栄養補給のための卵食ではないことを検証するために、野外で全卵食雄と部分卵食雄の体コンディション（肥満度）と卵食数を調査し、比較した。また、卵食中の雄の行動を観察し、卵の吐き出し行動を観察した。

全卵食行動と摂食行動の違いを内分泌生理学的に示すために、摂食関連脳内神経ペプチドホルモンである NPY と ORX と摂食行動との関係を調べた。水槽内で給餌条件と絶食条件で飼育した雄の脳を摘出し、NPY は免疫染色法により、ORX は時間分解蛍光測定法によりそれぞれホルモンの発現量を定量した。

4. 研究成果

(1) ロウソクギンボ雄の免疫機能の指標として用いた白血球数、肥満度、リゾチウム活性のいずれもアンドロジェン（テストステロン）暴露区とコントロール区で差がなく、本種においてはアンドロジェンが免疫機能に影響しない可能性が示唆された。

シーケンスの結果、PCR で増幅した DNA 断片の長さは 1211 bp であった。得られたエキソンは 5'側から 18 bp、108 bp、183 bp、124 bp でイントロンの長さは 5'側から 453 bp、244 bp、81 bp だった。得られた塩基配列と他種の PRL 塩基配列とを比較したところ、E-value の値が 10 よりも小さいため、相同性が高いことが明らかとなり、実験で得られた塩基配列は PRL であることが証明された。これにより、リアルタイム PCR を用いて PRL の mRNA 発現量を測定できるため、繁殖サイクルと PRL 動態の関係が調査可能になった。

(2) 野外で人工巣を利用する雄に卵を追加・除去する操作実験を行ったところ、卵を除去した雄の 11-KT と T レベルは上昇して求愛フェーズに戻り、卵を追加した雄のホルモンレベルは低下して保護フェーズに入った (Fig.1)。この結果は、巣内の卵の存在かあるいは卵の存在によって始まる（または終わる）雄自身の卵保護行動がカギ刺激であることを強く示唆する。

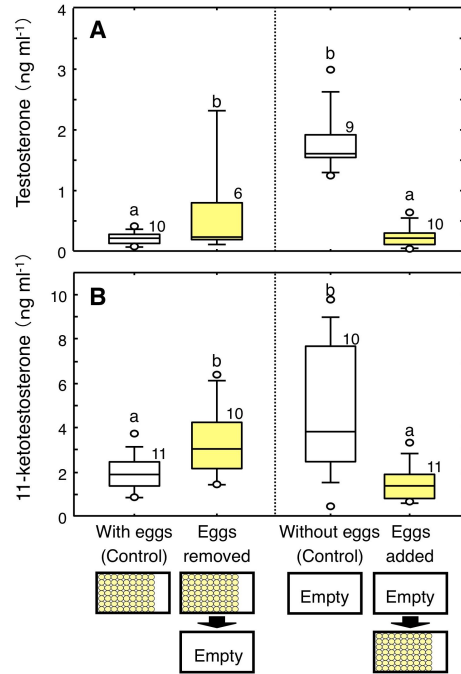


Fig. 1. Comparisons of testosterone (A) and 11-ketotestosterone (B) levels between males with eggs (control) and males that were removed eggs (left), and between males without eggs (control) and males that were added eggs (right). Data are given as boxplot diagrams showing medians (lines in the boxes), 25 and 75 % quartiles (boxes), 10 and 90 % percentiles (whiskers), and outliers (dots). Numbers near columns represent the sample size. Different letters (a, b) represent significant differences among the groups.

(3) 部分卵食した雄はコンディションが悪いほど多くの卵を食べていたが、全卵食した雄はコンディションにかかわらず全卵を食べていた (Fig.2)。また、全卵食中の雄が、卵を食べるだけでなく巣外に吐き出す行動が確認された。つまり、部分卵食する雄とは異なり、全卵食する雄は栄養摂取を目的とはしていないこと、すなわち産卵可能な求愛フェーズに速やかに移行するために卵を巣から消し去ることで自身のホルモンレベルを高めていると推察された。

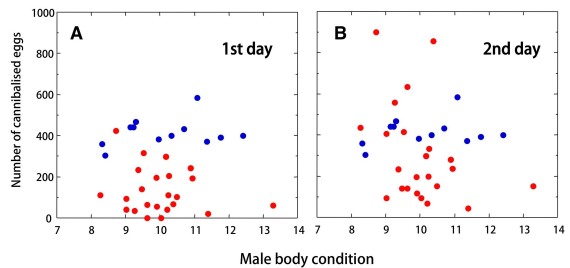


Fig. 2. Relationships between male body condition and the number of cannibalized eggs on the first day (A) and second day (B). Red and blue plots indicate males that conducted partial and total filial-cannibalism, respectively. To induce total filial-cannibalism, the initial number of eggs were reduced around 400 (details in methods).

(4) ORX は無給餌条件で濃度が低下する摂食抑制効果が示唆されたが、一貫した傾向は認められなかった。NPY は脳の免疫染色に有効な抗体の選定に時間を要し、測定には至らな

かった。飼育条件等を見直したさらなる研究が必要である。

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. Female mate-choice copying increases egg survival rate but does not reduce mate sampling cost in the barred-chin blenny. *Animal Behaviour*, 査読有、86 巻、2013、339-346
Matsumoto Y, Yabuno A, Kiros S, Soyano K & Takegaki T. Changes in male courtship intensity and androgen levels during brood cycling in the blenniid fish *Rhabdoblennius nitidus*. *Journal of Ethology*, 査読有、30 巻、2012、387-394

〔学会発表〕(計4件)

井手 勇旗・松本 有記雄・竹垣 毅「シマギンボの雄は繁殖サイクルを持つのか？」第32回日本動物行動学会、広島大(広島県東広島市)、2013年11月

松本 有記雄・立石 哲済・征矢野 清・竹垣 毅「性ホルモンに制御された繁殖サイクルに影響する卵の存在一雄保護魚の全卵食行動の進化」日本動物学会第83回大会、2012年9月、大阪大(大阪府豊中市)

松本 有記雄・立石 哲済・征矢野 清・竹垣 毅「ロウソクギンボ保護雄の全卵食行動:性ホルモンに制御された繁殖サイクルに着目して」三学会長崎地区例会、2012年12月、長崎大(長崎県長崎市)

松本 有記雄・立石 哲済・征矢野 清・竹垣 毅「保護雄の求愛行動を抑制する保護卵の存在 ~進化生態学に内分泌学が不可欠な1ケース~」第37回日本比較内分泌学会大会、福井大(福井県福井市)、2012年11月

〔図書〕(計2件)

竹垣 毅、東海大学出版、「魚類行動生態学入門」、2013、213-221

松本 有記雄、東海大学出版、「魚類行動生態学入門」、2013、61-91

〔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□

征矢野 清 (SOYANO, Kiyoshi)
長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授
研究者番号: 80260735

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

阿見 繭 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)
井手 勇旗 (IDE, Yuki)
寺田 龍介 (TERADA, Ryusuke)
河南 遙香 (KAWAMINAMI, Haruka)