

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：31603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24570075

研究課題名(和文)クマノミ類の社会行動と性別決定メカニズムに関する研究

研究課題名(英文)Social behavior and sex determination in Anemonefish

研究代表者

岩田 恵理 (Iwata, Eri)

いわき明星大学・科学技術学部・教授

研究者番号：70382786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円

研究成果の概要(和文)：熱帯性の海水魚であるクマノミ類は、社会順位により性別が決定される性転換魚である。カクレクマノミをモデルとして、社会順位の形成維持と性分化のとの関係について研究を行った。ストレスホルモンであるコルチゾルは、生殖腺アロマターゼ遺伝子を介して性分化や性転換に関与することが知られているが、カクレクマノミでは同様の現象は認められなかった。また、優位性行動である威嚇行動は、男性ホルモンではなく、女性ホルモンによって誘導された。群れの優位個体が雌であるカクレクマノミでは、他の魚種とは異なる社会行動発現や性分化のメカニズムを持つものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Anemone fishes are sex changing fish, living in tropical sea waters of the Indo-Pacific, forming a social unit consisting of a monogamous pair and several nonbreeders. We studied the relationship between social rank maintenance and sex differentiation using false clown anemone fish. Oral administration of steroid hormones to sexually immature individuals revealed that cortisol did not involve in gonadal sex differentiation, which is induced by gonadal aromatase gene. Dominant behaviors were induced by estradiol, not by androgen. The mechanisms of sex differentiation and behavior expression may be different from other teleost, because the dominant individual in a group must be a female in anemone fishes.

研究分野：動物行動学

キーワード：社会行動 性別決定 社会順位

1. 研究開始当初の背景

硬骨魚類には様々な性転換のパターンが存在する。その中でもクマノミ類は優位個体が雌である比較的珍しい雄性先熟型であるが、他の性転換魚種に比較して性転換を完了するのに45日程度と時間がかかるため(他魚種では4日~2週間)観賞魚としてポピュラーな割には内分泌学的研究があまりなされていない。また、飼育下や生息密度の低い海域ではクマノミの未成熟個体が性転換のプロセスを経ず直接雌雄へと性分化することも広く知られているが、このメカニズムについても詳細は不明である。申請者は、この未成熟魚の性分化モデルを使用して、クマノミの性を決定する環境要因とそのメカニズムについて研究を行ってきた。

これまでの研究で、未成熟なカクレクマノミを群れで飼育すると、飼育開始初日には早くも社会順位が形成され、この順位は、優位個体の負傷などがない限り入れ替わる事はないことが判明した。群れ内では、優位個体による威嚇行動や劣位個体による安寧行動が日常的に繰り返されており、これらの行動が群れ内社会順位を維持する上に不可欠な事が考えられ、さらに各個体の行動特性には経時的变化が認められた。また、血液中の11-ケトテストステロン(11-KT)、エストラジオール(E_2)などの性ステロイド、およびストレスの指標とされるコルチゾル値も、社会順位に応じて変化すると同時に、やはり時間経過の影響を強く受けることが示唆された。

一方、群れ形成直後において、1位個体の脳内アロマトラーゼ遺伝子の転写活性が有意に上昇しており、各順位の個体の血中コルチゾルと攻撃行動との間には高い正の相関が認められた。アロマトラーゼは、テストステロンを E_2 に変換する酵素であり、魚類では脳型と生殖腺型の2種の遺伝子が知られているが、クマノミでは両遺伝子とも脳と生殖腺に一定量存在する。多くの雌性先熟型性転換魚種においてアロマトラーゼ阻害剤の投与により雌から雄への性転換が誘導できることから、この遺伝子が性転換の開始に重要な役割を持つとされている。また、水温により性比が変化する魚種では、コルチゾルにより生殖腺アロマトラーゼ遺伝子の転写活性が抑制されると報告されている。しかし、申請者の平成22年度に採択された基盤Cにおいて行った実験では、カクレクマノミへのコルチゾルの10日間投与により、未成熟カクレクマノミ脳内の2種のアロマトラーゼ遺伝子の転写活性は上昇したが、生殖腺では変化しなかった。

以上の結果より、未成熟カクレクマノミの性分化は、群れを形成してから数カ月を要するが、この長期にわたる性分化の過程においては、各社会順位の個体が示す行動特性とステロイドホルモンのプロファイルが時系列的に変化する、という仮説が導き出された。

2. 研究の目的

クマノミ類は群れ内の社会順位に応じた雄性先熟の性転換を行う魚として有名であるが、飼育下や生息密度の低い海域では、未成熟個体が直接雌雄へと性分化してゆくことも知られている。

そこで本課題では、このクマノミの未成熟個体における性分化現象をモデルとして、性分化をコントロールする脳内メカニズムを明らかにしたいと考えた。具体的には、群れ形成初期の社会順位決定に付随するストレス状態が、ストレスホルモンであるコルチゾルを介して中枢に働きかけ、まず先に脳の性分化が引き起こされ、その後の群れでの個体同士の相互作用に伴うストレス状態が、最終的に生殖腺の性分化を誘導する、という仮説(図1)の検証を行った。

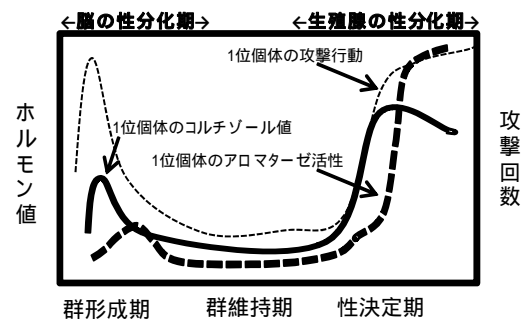


図1. 将来メスへと性分化する第1位個体の、予想される性分化の過程。群れ形成期に脳の性分化がおこり、その後かなり遅れて生殖腺の性分化がおこるとの仮説をたてた。

3. 研究の方法

(1) 未成熟カクレクマノミへのステロイド投与実験

カクレクマノミの未成熟魚10匹に、コルチゾル、 E_2 、メチルテストステロンを餌に混ぜて経口投与し、10日間飼育を行った。飼育開始当日と飼育終了日に動画を撮影し、威嚇行動の頻度を確認した。飼育終了後、生殖腺を採材した。社会順位の影響を排除するため、採材は下位の個体5匹に対してのみ行った。生殖腺から構築したcDNAを用いて、生殖腺型アロマトラーゼ遺伝子(*cyp19a1a*)と、テストステロンを魚類の主要なアンドロゲンである11-KTへと変換する11-HSD遺伝子(*11-HSD*)の転写活性を測定した。

(2) カクレクマノミ性分化の時系列的変化の検証

未成熟カクレクマノミを3匹一組で飼育し性分化の誘導を試みた。群れ形成後1日目、90日目、360日目に行動特性の観察、および採血を行った。血液は血漿中 E_2 、11-KT、およびコルチゾル濃度の測定に供した。行動特性は、群れ内の個体間同士で見られる優位性行動と劣位性行動について評価を行った。生殖腺の一部はヘマトキシリン-エオジン染色で

性分化の度合いを組織学的に確認した。

(3) カクレクマノミ成魚の各種プロファイルの検証

性成熟したカクレクマノミのペアを用いて、行動特性の検証と、血漿中ステロイドホルモン濃度の測定を実施した。

(4) カクレクマノミ未成熟魚における威嚇行動の調節メカニズムの検証

カクレクマノミの優位性行動である威嚇行動は E_2 によって誘導されることが、実験(1)において明らかとなった。しかし、未成熟魚における威嚇行動の発現にも E_2 が関与しているとは考えがたい。そこで E_2 を10日間経口投与した未成熟魚と、3匹一組にして90日間飼育を行った未成熟魚の脳を採材し、魚類の社会行動に関与するとされる脳内ノナペプチドレセプターの転写活性の評価を行った。転写活性を測定した遺伝子はアルギニンバソトシン受容体の V1a、V2a、V2b 型遺伝子とイソトシン受容体 (ITR) 遺伝子である。

4. 研究成果

(1) 未成熟カクレクマノミへのステロイド投与実験

実験開始日と実験開始後10日の威嚇行動の頻度の変化を図2に示した。ピークル(V)群とメチルテストステロン投与(MT)群の威嚇行動の頻度にはほとんど変化が認められなかったが、コルチゾール投与(C)群は有意に低下し、 E_2 投与(E)群は有意に上昇した。

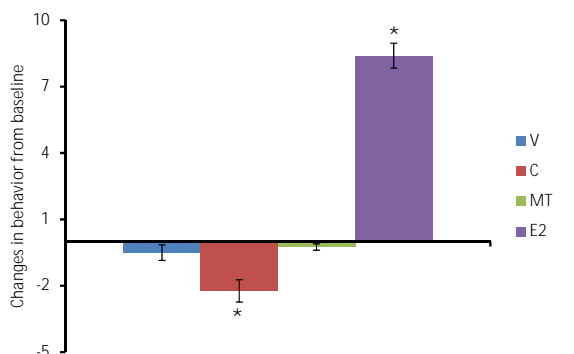


図2 ステロイドホルモンを経口投与して10日間飼育した未成熟カクレクマノミの威嚇行動の変化

E群の *cyp19a1a* 遺伝子の転写活性はV群に比較して有意に上昇したが、他の実験群には有意差は認められなかった。*11β-HSD* 遺伝子の転写活性には有意差は認められなかった(図3)。

以上の結果より、カクレクマノミの未成熟魚において、 E_2 により優位性行動が増加することが明らかとなった。メチルテストステロンは優位性行動の頻度に影響を与えず、コルチゾールは抑制することも示された。

他の魚種では、コルチゾールの投与により、

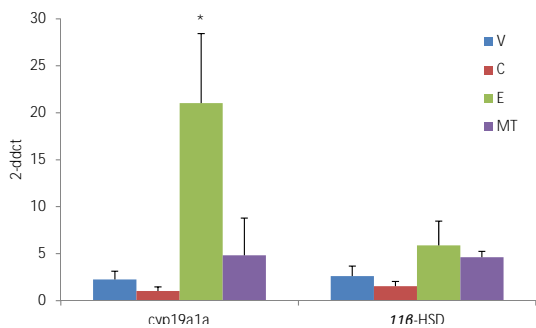


図3 ステロイドホルモンを経口投与して10日間飼育した未成熟カクレクマノミ生殖腺の遺伝子転写活性量の比較

cyp19a1a 遺伝子の転写が抑制され、雄化が起こることが知られている。しかしカクレクマノミにおいては、コルチゾール投与により転写活性の低下する傾向は認められたが、統計的な有意差は認められなかった。*11β-HSD* 遺伝子の転写活性については、ステロイドの影響を受けずに常に一定量が発現しているという、他の魚種における報告と類似した結果が認められた。

(2) カクレクマノミ性分化の時系列的変化の検証

カクレクマノミを3匹一組とし、360日まで飼育を行った。生殖腺組織像の確認と血漿中 E_2 および 11-KT 濃度を測定したところ、360日間飼育の個体のいずれの個体にも性成熟は認められず、性分化を誘導することはできなかった。

優位性行動と劣位性行動の経時的な変化を検証したが、飼育日数による差は認められなかった。観察期間を通して、優位性の威嚇行動は1位(α)個体が最も多く、3位(γ)個体にはほとんど観察されなかった。2位(β)個体の威嚇行動の頻度は、 α と β の中間値であった(図4)。劣位性の安寧行動は、 α が最も少なく、 β と γ との間には有意差は認められなかった(図5)。

血漿中コルチゾール濃度の経時的変化を検証したところ、 α 、 β 、 γ いずれの個体も飼育開始後1日では高値を示し、90日目で低下するが、360日目でまた上昇していたことが明らかとなった。特に飼育開始後360日目の α

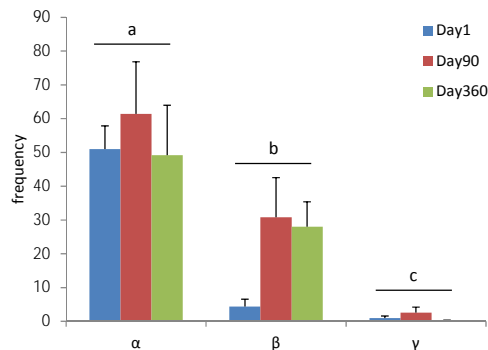


図4 3匹一組にして360日飼育した未成熟カクレクマノミの威嚇行動の頻度の推移

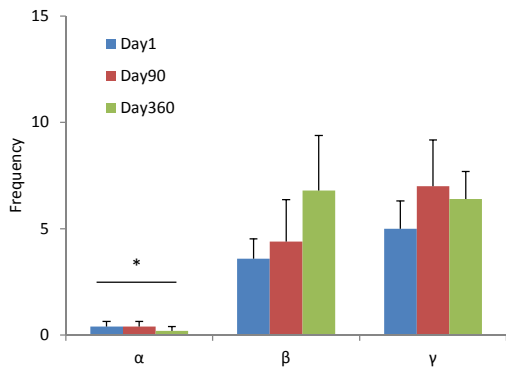


図5 3匹一組にして360日飼育した未成熟カクレマノミの安寧行動の頻度の推移

表1 3匹一組にして360日飼育した未成熟カクレマノミの血漿コルチゾル濃度の推移

	Day1	Day90	Day360
α	48.69±17.00 ^{ab}	5.95±3.61 ^b	117.17±26.01 ^a
β	69.02±38.67 ^{ab}	4.40±2.18 ^b	67.3±32.96 ^{ab}
γ	25.07±11.36 ^{ab}	5.78±3.46 ^b	76.24±25.15 ^{ab}

個体のコルチゾル濃度が高値の傾向が認められた(表1)。

以上の結果より、カクレマノミの社会順位による行動特性は、経時的な変化を伴わず、比較的安定していることが明らかとなった。今回の実験では、残念ながら性分化を誘導することができなかったが、360日飼育したα個体、つまり将来雌になる個体において血漿コルチゾル濃度が上昇する傾向が認められたことから、雌への性分化に対するコルチゾルの関与が示唆された。

(3) カクレマノミ成魚の各種プロファイルの検証

未成熟なカクレマノミの性分化を誘導することができなかったため、性成熟個体の行動特性と血漿ステロイドホルモン濃度の測定、および生殖腺の組織像を検証した。性成熟したカクレマノミのペア(雌雄)には、1年6か月(550日)以上継続的なペアリングを行ったにもかかわらず、産卵に至ったペアと産卵に至らなかったペアが存在した。そこでペアを繁殖ペアと非繁殖ペアの二群に分けて検証を行った。

ペア間での威嚇行動と安寧行動の頻度には、実験群間に有意差は認められなかった。しかし、繁殖ペアは非繁殖ペアに比べ、雄が単独、または雌と一緒にシェルターに入っている時間が有意に長いことが判明した。また、血漿11-KT濃度と生殖腺における精巢組織の示す割合は、繁殖ペアの雄が非繁殖ペアの雄に比較して有意に高いことが明らかとなった(図7)。

以上の結果より、カクレマノミにおいては、社会順位が決定すれば必ず性分化が誘導

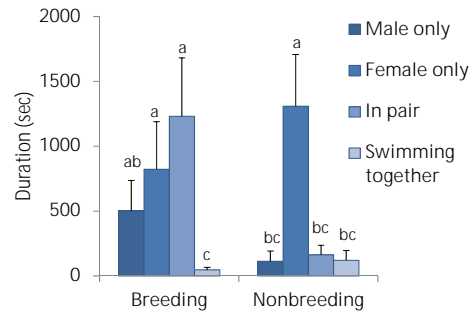


図6 カクレマノミ繁殖ペアと非繁殖ペアのシェルター利用状況

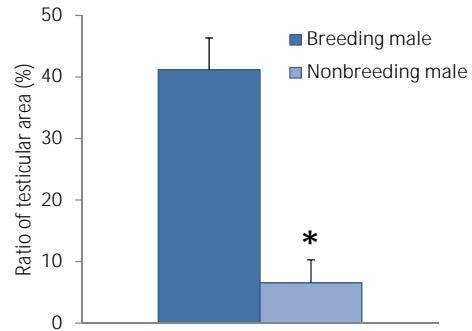


図7 カクレマノミ繁殖ペアと非繁殖ペア雄の生殖腺における精巢組織の割合

されるわけではないと考えられた。ペアによって性成熟の度合いには差が存在し、非繁殖ペアにおいて、雄の性成熟が抑制傾向にあることが示された。

(4) カクレマノミ未成熟魚における威嚇行動の調節メカニズムの検証

E₂を10日間経口投与した未成熟魚における脳内ノナペプチド受容体の発現量を図8に示した。アルギニンバソトシン受容体遺伝子であるV1aおよびV2bにおいて、E₂投与により有意な低下が認められた。

一方、3匹一組で90日間飼育した未成熟カクレマノミ脳において、V1a受容体遺伝子の転写活性を測定したところ、すべての受容体でα個体が低値を示したが、統計的な有意差は認められなかった(図9)。

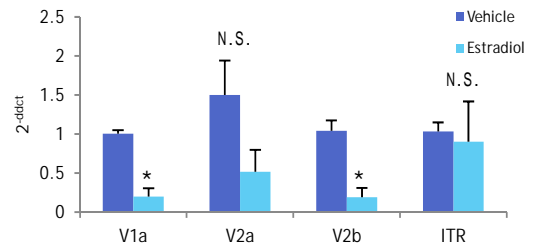


図8 E₂を10日間経口投与したカクレマノミ脳のノナペプチド受容体の転写活性

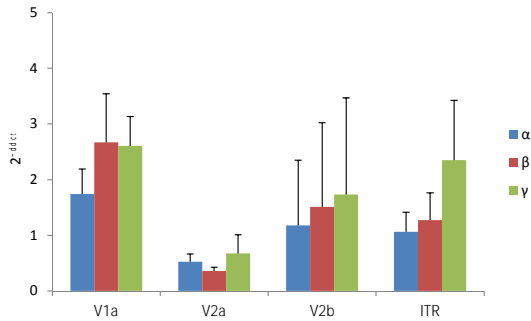


図9 3匹一組で90日間飼育したカクレマノミ脳のノナペプチド受容体の転写活性

以上の結果より、 E_2 は一部の AVT 受容体遺伝子の転写を抑制することが明らかとなった。また、 E_2 の影響が考えられない未成熟個体の脳においても、 α 個体の *V1a* 遺伝子の転写活性が低い傾向にあったことから、AVT システムが威嚇行動の発現に関与している事が示された。

(5) 考察

本課題では、カクレマノミの性分化メカニズムを解明することを目的として研究を行った。一般に魚類では、コルチゾルにより生殖腺アロマターゼ遺伝子の転写活性が抑制されるとされている。カクレマノミ未成熟個体にステロイドホルモンを投与し、生殖腺アロマターゼ遺伝子転写活性を評価したところ、本課題の仮説とは異なり、コルチゾルは生殖腺アロマターゼ遺伝子の転写活性を抑制する傾向は認められたが、統計的な有意差は認められなかった。よってコルチゾルはカクレマノミ生殖腺の性分化に直接関与している可能性は低いと考えられた。一方、3匹一組で飼育を行い、性分化誘導を試みたところ、群のいずれの個体の血漿コルチゾル濃度も時系列的な変化を示した。各個体の血漿コルチゾル濃度は、社会順位形成直後には上昇し、90日目では低値となり、再び360日目に高値の傾向を示した。残念ながら本課題では性分化を誘導することはできなかったが、図1に示したようなコルチゾルの時系列的变化を確認することができた。雄性先熟型の性転換魚であるカクレマノミでは、雌が優位個体である点が多く魚種と異なる特徴である。カクレマノミにおいてコルチゾルは、生殖腺に直接働きかけるのではなく、脳へ働きかけて HPG 軸を調節することによって性分化を誘導しているのかもしれない。

群れの長期飼育で性分化が誘導できなかった事と、550日以上ペアリングを行っても産卵に至らないペアがいたことから、カクレマノミの性分化は社会順位のみで単純に決定するものではないことが明らかとなった。成熟個体の実験終了後に、非繁殖ペアの雄を入れ替えたところ、産卵に至った雌も居た。つまり、カクレマノミは社会順位によってパートナーが決まる一夫一婦制である

にも関わらず、相性のようなものがあり、相性の悪い個体同士では産卵にまで至らない場合もある、という事である。このことは、社会順位形成実験における実験データが、投与実験と比較して大きくばらついたことの原因の一つとも考えられた。

脊椎動物においては、アンドロゲンによって攻撃性が上昇することが一般的である。しかしカクレマノミでは、優位性行動でもある威嚇行動は E_2 により誘導され、メチルテストステロンは全く影響を与えない事が明らかとなった。これもまた、雄性先熟で雌が優位個体であるカクレマノミにおけるユニークな現象であると推察された。さらに、コルチゾルには攻撃性を抑制する効果が認められた。一般に魚類の劣位個体は血漿コルチゾル濃度が高い事が多いが、先に述べたようにカクレマノミにおいては必ずしもそうではない。コルチゾルによる攻撃性の抑制が、カクレマノミの社会構造の維持にどのような役割をはたしているかについては現状では不明である。まだ未解析の行動データがあるので、ステロイドホルモンと行動プロファイルの関連については、さらに検証を行う予定である。

カクレマノミの性分化、および社会行動の発現メカニズムを明らかとするためには、ステロイドホルモンと脳機能との関係を明らかにしてゆくことが必要である。すでにカクレマノミのエストロゲンおよびアンドロゲン受容体遺伝子の部分配列を決定しており、今後はこれら受容体の脳における機能について検討してゆきたいと考えている。また、AVT やイソトシンなどの脳内ノナペプチドシステムと社会行動発現との関係についても、さらなる検討が必要である。

<引用文献>

Eri Iwata, Yukiko Nagai, Mai Hyoudou, Hideaki Sasaki, Social Environment and Sex Differentiation in False Clown Anemonefish, *Amphiprion ocellaris*, Zoological Science, 2008, 25, 123-128.

Eri Iwata, Kyohei Mikami, Jun Manbo, Keiko Moriya-Ito, Hideaki Sasaki, Social interaction influences blood cortisol values and brain aromatase genes in the protandrous false clown anemonefish *Amphiprion ocellaris*, Zoological Science, 2012, 29, 849-855.

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5件)

Eri Iwata, Kazuki Tanno, Chiharu Fujii, Shinya Yamauchi, Takashi Yanagimoto, Toshiro Saruwatari, The use of RNA transcription rates to assess the onset of sexual maturation in the hermaphroditic greeneye *Chlorophthalmus*

albatrossis, DNA Polymorphism, 査読有、2016、24、8-16.

岩田恵理、情動行動の起源を探る ~ 魚類をモデルとして~、基礎心理学研究、査読有、2014、33、1-4.

Eri Iwata, Jun Manbo, Territorial behaviour reflects sexual status in groups of false clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*) under laboratory conditions, Acta Ethologica, 査読有、16、2013、96-103.

Eri Iwata, Kyohei Mikami, Jun Manbo, Keiko Moriya-Ito, Hideaki Sasaki, Social interaction influences blood cortisol values and brain aromatase genes in the protandrous false clown anemonefish *Amphiprion ocellaris*, Zoological Science, 査読有、2012、29、849-855.

Yoko Yamaguchi, Hiroyuki Kaiya, Norifumi Konno, Eri Iwata, Mikiya Miyazato, Minoru Uchiyama, Justin D. Bell, Tes Toop, John A. Donald, Sydney Brenner, Byrappa Venkatesh, Susumu Hyodo, The fifth neurohypophysial hormone receptor is structurally related to the V2-type receptor but functionally similar to V1-type receptors, General and Comparative Endocrinology, 査読有、2012: 178、519-528.

〔学会発表〕(計10件)

岩田恵理、野尻健、カクレクマノミの社会順位：何匹までなら数えられる？、日本動物行動学会第35回大会、2016年11月、新潟大学(新潟県・新潟市)

Eri Iwata, Brain peptide and social behavior in teleost, The 87th meeting of Zoological Society of Japan, 2016年11月、沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

鈴木望美、岩田恵理、長期飼育におけるカクレクマノミの行動特性、平成27年度日本水産学会春季大会、2015年3月、東京海洋大学(東京都・品川区)

Eri Iwata E, Tasku Yoshida, Kotaro Kaneko, Norihumi Konno, Koji Masuda, Kataaki Okubo, Female partner preference affects male sexual maturation in monogamous teleost false clown anemonefish. (*Amphiprion ocellaris*)、The International Congress of Neuroendocrinology 2014、2014年8月、シドニーヒルトン(シドニー・オーストラリア)

Eri Iwata, Tasuku Yoshida, Koutaro Kaneko, Norifumi Konno, Koji Masuda, and Kataaki Okubo, Female affects male sexual maturation in monogamous teleost false clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*)、2014第39回日本比較内分泌学会大会・第8回国際両生類爬虫類神経内分泌学会合同大会、2014年11月、基礎生物学研究所(愛知県・岡崎市)

岩田恵理、今野紀文、飯村竜也、カクレクマノミの攻撃性とAVT受容体に対するエストラジオールの影響、第38回日本比較内分泌学会大会、2013年10月、宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)

金古宏太郎、岩田恵理、今野紀文、カクレクマノミの雌性ホルモン処理による早期性転換誘導の試み、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(東京都・品川区)

岩田恵理、カクレクマノミの攻撃行動~社会順位か性差か~、JSBN第3回関西支部勉強会、2013年3月、岡山大学理学部附属牛窓臨海実験所(岡山県・瀬戸内市)

Eri Iwata, Norifumi Konno N, Tatsuya Iimura, Estrogen promotes aggression and alters arginine vasotocin receptors in the brain of false clown anemonefish *Amphiprion ocellaris*、17th International Congress of Comparative Endocrinology、2013年7月、ルーアン大学(ルーアン・フランス)

Eri Iwata, Chiho Ishikawa, Kotaro Kaneko, Yuji Chiku, Jun Manbo, Norifumi konno, Cortisol induces aromatase transcription in false clown anemonefish. The 7th Congress of Asia Oceania Society for the Comparative Endocrinology、2012年3月、サンウェイリゾートホテル(クアラルンプール・マレーシア)

〔図書〕(計2件)

岩田恵理、魚類における社会順位とホルモン、水澤寛太、矢田崇(編)ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ第7巻 生態防衛・社会性、裳華房、2016、pp191-202.(2016).

Orphal Colleye, Eri Iwata, Eric Parmentier, Clownfishes, Bruno Frederich, Eric Parmentier (Ed.) Biology of Damsel Fishes, CRC Press、2016、pp246-266

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.facebook.com/iwakianimalethology/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩田 恵理 (Iwata Eri)

いわき明星大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：70382786

(2)研究分担者

大久保 範聡 (Kataaki Ohkubo)

東京大学大学院・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：10370131

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし