

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07906

研究課題名(和文) 営巣繁殖する硬骨魚類の雄の腎臓分泌物の機能と起源に関する研究

研究課題名(英文) Function and origin of kidney-secreted substance in male teleost showing nest-breeding

研究代表者

古屋 康則 (Koya, Yasunori)

岐阜大学・教育学部・教授

研究者番号：30273113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：雄が繁殖期中に営巣するトゲウオ科、カジカ科、ハゼ科魚類では、雄の腎臓で粘性物質の合成が活発化し、膀胱に尿を蓄えるという共通した現象を見出した。トゲウオ科では雄の腎臓で巣材を接着する物質(スピギン)が合成されることが知られているが、カジカ科の雄の腎臓でもスピギンと相同の遺伝子が繁殖期中にのみ発現していることを見出した。また、トゲウオ科で雄の腎臓抽出物が成熟した雌を誘引する作用を持つことが示唆された。このことから、営巣繁殖するトゲウオ科、カジカ科、ハゼ科魚類の腎臓で合成される粘性物質の機能は、雌の巣への誘引であり、トゲウオ科では雌の誘引に加えて巣材の接着の機能が付加されたと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

営巣繁殖する硬骨魚類の繁殖成功には雄による雌の巣への誘引が重要であり、複数の分類群に跨って誘引物質の産生・分泌に腎臓が関わっている可能性を見出した。また、これまでにトゲウオ科魚類で巣材の接着物質(スピギン)が腎臓で産生・分泌されることが知られていたが、これと相同な遺伝子が、営巣繁殖する他の分類群の魚類にも存在することが示され、トゲウオ科魚類のスピギンが雌を誘引する物質から進化して巣材を接着する機能をも獲得したことが示された。

研究成果の概要(英文)：We found that active synthesis of viscous substance in the kidney and storage of urine in the urinary bladder occurred during the breeding season in male fish of Gasterosteidae, Cottidae, and Gobiidae showing nest-breeding. It was well known that male Gasterosteidae synthesizes viscous substance; i.e. spiggin which is used for nest building using vegetative piece, in their kidney. We demonstrated that homologous gene of spiggin expressed in male kidney during breeding season in Cottidae. Furthermore, we found that extract of male kidney had an effect of female attraction in Gasterosteidae. From these results, we concluded that viscous substance synthesized in male kidney during breeding season in Gasterosteidae, Cottidae, and Gobiidae, have a function of female attraction for the nest, and spiggin of Gasterosteidae originated from female-attracting substance.

研究分野：動物生理生態学

キーワード：腎臓 性フェロモン 営巣繁殖 スピギン 硬骨魚類 カジカ科 トゲウオ科

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

硬骨魚類の繁殖における腎臓の関わりについては、これまでに植物片などを材料として産卵巣を造るという特殊な生態をもつトゲウオ類についてのみ詳しく研究・報告されてきたが、それ以外の分類群の魚種では生殖と腎臓の関わりに関する報告はほとんどなかった。トゲウオ類の雄では、繁殖期になると雄性ホルモン(11-ケトテストステロン: 11-KT)の刺激によって腎臓が肥大し、そこで造巣のための接着剤となる粘性物質(スピギン)が作られる。これが尿に混ざって体外に放出され、巣材をくっつける役割を果たす。

申請者はこれまでに淡水にすむカジカ類を材料とした繁殖の生理・生態的な研究を行ってきた。その研究により、腎臓が繁殖に対してトゲウオ類とは別の関わり方をしていることをみいだした。カジカ類では性成熟に伴って血中 11-KT 濃度が増加し、これに伴って腎臓も肥大し、尿管上皮では多糖を含む物質の蓄積が見られた。カジカ類では雄が石の下の隙間に巣を構え、ここに雌を迎えて産卵する。繁殖期に水槽内で雄に営巣させる(基質の下に隠れさせる)と血中の 11-KT 濃度がさらに倍増し、膀胱内には粘性を帯びた尿が多量に貯められたが、非繁殖期に同様のことをしても尿量の増加は認められなかった。また、営巣した雄の尿中には多糖を含むタンパク質が検出された。Y 字水路を用いて左右の水路の上流に営巣させない雄と営巣させた雄を入れ、下流に排卵した雌を入れると、雌は営巣した雄のいる側の水路に有意に多く侵入した。以上のことから、カジカ類では雄の腎臓が雌の巣への誘引に働く物質の分泌に関与している可能性が考えられた。

以上のようにトゲウオ類とカジカ類の繁殖に対する腎臓の役割は大きく異なるが、ともに 11-KT の支配下にあり、「巣」に関係したものであることから、両者には何らかの共通の現象が背景に存在しているのではないかと考えた。また、トゲウオ類とカジカ類は分類学的には大きく異なるため、共通点があるならば他の分類群でも同様の共通点、すなわち硬骨魚類での普遍性があるのではないかと考えた。この考えは、トゲウオ類のスピギン遺伝子が真骨魚類の共通の祖先の単一の遺伝子としてムチン遺伝子ファミリーに端を発することが示唆されていることから支持される。そこで申請者は、カジカ類と同様に雄が繁殖期に石の下に営巣するハゼ科の魚種を用いて繁殖と腎臓・尿の関係を予備的に調べた結果、ハゼ科魚類でも雄が営巣すると膀胱内に尿を貯めることがわかった。いずれの魚種も流水中で石の下に営巣することから、繁殖における尿の役割としては巣そのものを造る(固める)ためではなく、雌の巣への誘引が有力視される。トゲウオ類においても、スピギンが元来雌の誘引物質として巣に塗りつけられていたものに接着剤の機能が付加されたという考えは受け入れやすい。さらに、申請者らはカジカ類にトゲウオ類のスピギン遺伝子と相同な遺伝子が存在するか否かを予備的に調べた結果、存在することが確認された。これらのことから、申請者は「営巣繁殖する硬骨魚類の雄は普遍的に雌を巣に誘引するための物質(フェロモンまたはその担体「vehicle」)を雄性ホルモンの影響のもと腎臓で合成・分泌し、尿に混入させて放出する」という仮説を立てた。

この仮説はトゲウオ類の造巣物質であるスピギンが雌誘引物質あるいはその担体「vehicle」に由来することをも予想している。すなわち、トゲウオ類では雄が雌を誘引する物質を産卵させたい場所(巣)に付けていたのが、やがては高度な産卵巣を造るための粘性を帯びた接着剤へと機能的に進化した可能性を予想している。

2. 研究の目的

「営巣繁殖する硬骨魚類の雄は普遍的に雌を巣に誘引するための物質を雄性ホルモンの影響のもと腎臓で合成・分泌し、尿に混入させて放出する」という仮説を検証することを目的として、ナマズ目アカザ科のアカザ、トゲウオ目トゲウオ科のトミヨ属淡水型、スズキ目ハゼ亜目のドンコ・ヌマチチブ・シマヨシノボリ・カワヨシノボリ、スズキ目カジカ科のハナカジカ・カジカ小卵型を研究対象魚として用い、以下の5項目について調査・研究を行った。

- 1) 腎臓組織の季節変化、特に繁殖期に向けた肥大や多糖を含む成分の分泌の有無
- 2) 繁殖期や繁殖のための営巣による膀胱内尿量の増加の有無
- 3) 尿中物質(トゲウオ類のスピギンおよび巣そのものを含む)の雌誘引作用の有無
- 4) トゲウオのスピギンに相同な遺伝子の探索と、相同遺伝子の腎臓での特異的な発現の有無
- 5) スピギン相同タンパク質の抗体を用いた遺伝子産物の腎臓での局在の証明

3. 研究の方法

研究目的の1)と2)については、アカザ・ドンコ・ヌマチチブ・シマヨシノボリ・カワヨシノボリを対象魚とし、野外で周年に渡って採集し、生殖腺組織の観察から生殖周期を明らかにした上で、成熟に伴う雄の腎臓の肥大や分泌物の有無について腎臓の組織観察により調べた。また、繁殖期の雄個体または繁殖期中に営巣している雄個体の膀胱内での尿の貯留の有無を調べた。次に、ドンコを除く3魚種について、水槽内で人為的に営巣させる実験(営巣実験)により腎臓肥大や膀胱内尿量の増加などが起きるか否かを確かめた。

研究目的の3)については、トミヨ属淡水型を対象に、Y字水路を用いた雌の誘引実験を行い、繁殖期の雄の腎臓抽出物が雌誘引作用を持つか否かを検証した。

研究目的の4)と5)については、トゲウオ科のイトヨのスピギン遺伝子と相同な遺伝子をハナカジカとカジカ小卵型の2魚種から探索し、腎臓での発現解析を行った。また、得られた相同遺伝子の塩基配列情報に基づいて合成されたペプチドに対する抗体を作成して、カジカ小卵

型におけるスピギン相同物質の局在部位を特定した。

4. 研究成果

繁殖への腎臓の関与

ハゼ亜目の3魚種については、アマチチブとシマヨシノボリにおいて繁殖期に雄の腎臓内の上皮組織に肥厚が認められ、特にアマチチブでは集合管の上皮が著しく肥厚し、上皮細胞はPAS染色により強い陽性反応を示したことから、多糖類を含む物質が産生されていることが示唆された。一方、このような現象は雌には見られなかった。繁殖期中の雄の膀胱に尿が貯められているという現象はドンコとアマチチブで確認された。特に、アマチチブでは繁殖期前の1-4月には尿を貯めている雄は見られなかったが、繁殖期の5-7月には多くの雄が尿を貯めていた。水槽内にレンガで営巣スペースを設置し、そこに雄を導入する営巣実験では、アマチチブとカワヨシノボリにおいて、対照として営巣させていない場合には5日目に解剖しても膀胱内に尿を貯めている個体は見られなかったが、営巣させた場合には多くの個体が尿を貯めていた。このことから、ハゼ亜目魚類で営巣繁殖をする魚種の多くでは、繁殖期中に雄の腎臓で多糖類を含む物質を産生し、雄が営巣すると膀胱内に尿を貯めると考えられる。ハゼ亜目では雄の腎臓・泌尿器系が繁殖に対して何らかの役割を演じていることが示唆される。

一方、ナマズ目のアカザについては繁殖期中の雄の腎臓が肥大するという証拠は得られず、組織観察においても腎臓内の上皮組織に肥厚や多糖類の存在を示す組織像は認められなかった。また、繁殖期・非繁殖期を通じて膀胱に尿を貯めている個体は見られず、水槽内で営巣させても膀胱内の尿量が増加することはなかった。

これまでに知られているトゲウオ科魚類とカジカ科魚類に加え、本研究によってハゼ亜目魚類という別の分類群においても繁殖と雄の腎臓との関わりが示された。一方でナマズ目魚類では雄の腎臓が繁殖に関わっているという証拠は得られなかった。従って、本研究の仮説の一部は検証されたものの、「普遍性」については否定された。トゲウオ科、カジカ科、およびハゼ亜目魚類は、系統学的には1つのグループ(棘鱗類)にまとめられており、ナマズ目が属する骨鰓類とは大きく異なる分類群とされていることから、本研究の開始当初に立てた仮説の中で、「営巣繁殖する硬骨魚類の雄は・・・」を「営巣繁殖する棘鱗類の雄は・・・」と変更すべきであると考える。

尿中物質による雌の誘引作用

トゲウオ科魚類の雄が繁殖期中に腎臓から分泌する接着物質であるスピギンに雌の誘引作用があるか否かを検証するために、雌の選択実験を実施した。1年目はイトヨを用いて予備実験(条件設定の検討)を行う予定であったが、水槽内で雄が容易に巣を作らず、予定していた予備実験も実施できなかった。そこで、2年目は実験魚種をトミヨ属淡水型に変更した。これは、トミヨ属淡水型の方がイトヨよりも水槽内で営巣しやすく、巣自体が基質に作られる貯め、移動が容易であると考えたためである。直方体型の長辺45cmのガラス水槽の左右両側から試験液を水槽内に流入させることにより、雌が水槽内の左右それぞれに滞在する時間を計測する実験を行った。試験液として雄が営巣している(雄とスピギンによって接着された巣を含む)水槽の水(刺激液)を用い、対照液として河川水を用いた。この実験の結果、雌は刺激液側に有意に長時間滞在するというのではなく、雄やスピギンの匂いに対する嗜好性は全く見られなかった。この実験では刺激液中の誘引物質の濃度が十分であったかや、雌の行動解析の方法に問題があると判断し、次年度はY字水路を用いることを検討した。

3年目は、実験魚を2年目と同様にトミヨ属淡水型を用いて、上流区が2股に別れたY字水路の上流からそれぞれ試験液を流入させることで、下流区にいる雌がどちらに移動するかを調べる方法をとった。この年の実験では繁殖期に入っても雄が巣を作らない期間が続いたため、急遽実験方法を変更し、雄の腎臓抽出物(MKE)を刺激液として用いることにした。この実験の結果、対照液の河川水(control)とMKEを比べた場合、MKEへの侵入回数が有意に多いことが示された。また、controlと雌腎臓抽出物(FKE)を比べた場合、侵入回数に偏りは見られなかったが、MKEとFKEを比べるMKE側への侵入回数が多い傾向は見られたものの有意な差はなかった。以上の結果から、雄腎臓抽出物には雌を誘引する作用があるとは言い切れなかったものの、各実験が繁殖期の前半と後半とで偏ったことや、雌の成熟状態(排卵後の時間)を均一にできなかったことなどを考慮すると、雄の腎臓には雌を誘引する作用があることを否定しきれず、むしろ肯定できると考えられた。今後、さらに条件を均一した実験を行うことで、この点を明らかにしたい。

スピギン相同物質

実験魚にはカジカ科のハナカジカ(野生)の雄、およびカジカ小卵型(継代飼育)の雌雄を用いた。ハナカジカ雄の腎臓から抽出された全RNAをもとにcDNAを合成し、トゲウオ科のイトヨのスピギン遺伝子の情報をもとに設計されたプライマーを用いてRT-PCRを行い、得られた増幅断片について、1570bpの塩基配列を決定した。この配列のイトヨスピギン遺伝子との相同性は、Query coverが80%、E-valueが $2e-153$ 、配列一致率が77%であった。この配列を元に、カジカ属に特異的なカジカスピギン・プライマーを設計した。カジカ属2種の雌雄から腎臓、心臓、肝臓、生殖腺、脳、脳下垂体、鱗、鰓、表皮、胃、腸、眼球、筋肉、膀胱の全RNAに対す

る cDNA を合成し、RT-PCR を行った。その際、内在性コントロールとしてカジカ属の eukaryotic elongation factor 1 alpha (eEF1 α) 遺伝子に特異的なプライマーを設計して用いた。

カジカスピギン・プライマーを用いて RT-PCR を行なった結果、ハナカジカとカジカ小卵型ではともに、精子形成期の雄の腎臓でのみスピギン遺伝子の増幅産物と予想される 240 bp のバンドが確認できたが、他の臓器・組織では増幅がみられなかった。一方、eEF1 α に対するプライマーで RT-PCR を行なった結果、一部の組織を除いて増幅産物と予想される 190 bp のバンドが確認できた。カジカスピギン・プライマーによる PCR での増幅には性差があり、カジカ小卵型の雌の腎臓では増幅がみられなかった。また、カジカ小卵型の雄では精子形成の初期(10 月)には増幅がわずかであったが、精子形成の後期に相当する 12 月には明瞭な増幅がみられた。

以上のことから、カジカ属魚類の雄は精子形成の進行とともにカジカスピギン遺伝子を腎臓で発現させることが強く示唆された。このことは、成熟したカジカ属の雄の尿中に含まれる粘性物質がスピギンに相同な物質である可能性を強く示唆している。

カジカ・スピギン遺伝子の塩基配列から、カジカ・スピギンはムチンファミリーに属する糖タンパク質であることが推定された。塩基配列情報を基に、ペプチド合成とこのペプチドに対する抗体作成を外注した。得られた抗体を用いたカジカ属魚類での局在について免疫組織学的方法により調べた結果、予備的に用いたカジカ大卵型とカジカ小卵型の 2 種において、雄の腎臓での免疫陽性反応が認められ、カジカスピギンは遺伝子の発現だけでなく、タンパク質としての実態もあることが示された。一方で、人的・時間的な制約のため、性特異性や組織特異性にまで踏み込んだ解析は実施できなかったため、今後はこの点を確認する予定である。

まとめ

硬骨魚類において繁殖に腎臓が関与することは、トゲウオ科以外ではほとんど知られていなかった。本研究では、営巣繁殖という硬骨魚類では比較的普通に見られる繁殖方法をとる魚種の中でも棘鱗類においては普遍的に腎臓の関与が認められ、その機能としては雌の巣への誘引が共通したものであると考えられた。また、カジカ科でもスピギン遺伝子とその遺伝子が発現して合成されるタンパク質が存在することが示唆されたことから、トゲウオ科に特有とされていたスピギンは、営巣繁殖する棘鱗類が普遍的にもち、雌誘引物質として腎臓で合成され、尿を介して体外に放出される物質である可能性が考えられた。また、トゲウオ科においては、これまでにスピギンは巣を作る際の接着剤としての機能のみが知られていたが、雄の腎臓抽出物が雌を誘引する作用を持つことが示唆されたことから、スピギンの本来の機能は雌の巣への誘引にあるのではないかと考えられた。トゲウオ類の雄が雌を産卵縄張りに誘引するために産卵基質にスピギンを擦り付けていた行動が、やがて植物片を材料とした精巧な巣作りへと発展した可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Awata Satoshi, Sasaki Haruka, Goto Tomohito, Koya Yasunori, Takeshima Hirohiko, Yamazaki Aya, Munehara Hiroyuki	4. 巻 166
2. 論文標題 Host selection and ovipositor length in eight sympatric species of sculpins that deposit their eggs into tunicates or sponges	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Marine Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00227-019-3506-4	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 伊藤 玄・北西 滋・古屋康則・向井貴彦	4. 巻 74
2. 論文標題 岐阜県神通川水系小鳥川から確認されたカジカ小卵型	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本生物地理学会会報	6. 最初と最後の頁 13～17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Koya Yasunori, Fujii Ryoji, Tahara Daisuke, Yambe Hidenobu, Natsumeda Takaharu	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of preventing a temperature decrease during winter on reproduction of male small-egged Kajika, <i>Cottus pollux</i> SE	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fish Physiology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10695-020-00787-8	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 Matsubara Hajime, Lokman P. Mark, Kazeto Yukinori, Okumura Hiromi, Ijiri Shigeo, Hirai Toshiaki, Young Graham, Adachi Shinji, Yamauchi Kohei	4. 巻 4
2. 論文標題 Changes in Sex Steroids and Ovarian Steroidogenic Enzyme mRNA Levels in Artificially Maturing Japanese Eel (<i>Anguilla japonica</i>) and Naturally Maturing New Zealand Longfin Eel (<i>Anguilla dieffenbachii</i>) during Vitellogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fishes	6. 最初と最後の頁 52～52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI: 10.3390/fishes4040052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yasufumi Fujimoto, Hidenobu Yamba, Kiyotaka Takahashi, and Shigeru Sato	4. 巻 11
2. 論文標題 Bile from reproductively mature male largemouth bass <i>Micropterus salmoides</i> attracts conspecific females and offers a practical application to control populations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Management of Biological Invasions	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小野哲治・松原創・古屋康則
2. 発表標題 カジカ属魚類の雄は繁殖期に腎臓でイトヨの造巢粘着物質の相同遺伝子を発現させる
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村瀬有香・古屋康則
2. 発表標題 繁殖期のアブラボテの雌における飲水量・膀胱内尿量の増加と腎臓組織の変化
3. 学会等名 日本魚類学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山家秀信
2. 発表標題 魚だって、匂いで惹きつける
3. 学会等名 BIOMIMETICS市民セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hajime Matsubara
2. 発表標題 Introduction to Japan aquaculture
3. 学会等名 Seminar of Project for Building Capacity for Can Tho University to be an Excellent Institution of Education, Scientific Research and Technology Transfer (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hajime Matsubara
2. 発表標題 General aquaculture in Japan
3. 学会等名 Joint Symposium between Kanazawa University and Prince of Songkla University on Recent Advances in Marine Science, Aquaculture and Food Technology (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古屋康則・高橋杏佳
2. 発表標題 ヌマチチブの雄の繁殖期における膀胱内への尿の蓄積
3. 学会等名 2017年度日本魚類学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長屋美希・山家秀信・古屋 康則
2. 発表標題 トミヨ属淡水型の生殖周期と雄の腎臓組織の季節変化
3. 学会等名 日本魚類学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古屋康則・喜多祥也
2. 発表標題 ドンコの精巢構造と精子形成の特徴
3. 学会等名 日本魚類学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 一般社団法人日本魚類学会（分担執筆：古屋康則）	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 756
3. 書名 魚類学の百科事典（真骨類の生殖器官pp. 142-143, 生理（扉）pp. 329, 胎生魚pp. 364-365, 実験動物としての魚類pp. 386, 受精pp. 392-393）	

1. 著者名 一般社団法人日本魚類学会（分担執筆：山家秀信）	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 756
3. 書名 魚類学の百科事典（性フェロモンpp. 362-363）	

1. 著者名 一般社団法人日本魚類学会（分担執筆：松原 創）	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 756
3. 書名 魚類学の百科事典（痛みと麻酔pp. 376-377）	

1. 著者名 山家秀信	4. 発行年 2018年
2. 出版社 フレグランスジャーナル社	5. 総ページ数 199
3. 書名 Aroma Research 74号 (魚類の性フェロモン. 水の中の匂いを科学する ~ 水中の匂いを生物が受け取る仕組み ~ . pp. 9-15)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	山家 秀信 (Yambe Hidenobu) (40423743)	東京農業大学・生物産業学部・准教授 (32658)	
研究分担者	松原 創 (Matsubara Hajime) (50459715)	金沢大学・生命理工学系・教授 (13301)	