

平成 22 年 6 月 14 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19770015  
 研究課題名（和文）魚類の性的二形の進化に雄性ホルモンの免疫抑制効果を通じた性淘汰が果たす役割の解明  
 研究課題名（英文）Role of sexual selection in relation to immunosuppression of testosterone on evolution of sexual dimorphisms in fish  
 研究代表者  
 高橋 大輔（TAKAHASHI DAISUKE）  
 長野大学・環境ツーリズム学部・准教授  
 研究者番号：90422922

研究成果の概要（和文）：雄性ホルモンの免疫抑制効果とハンディキャップ原理を組み合わせた性的二形の進化モデルである免疫適格ハンディキャップ仮説を魚類において検証した。その結果、コイ科魚類オイカワでは、本仮説を構築する 3 つの仮定 [1) 雌は顕著な二次性徴形質を持つ雄を好む、2) 雌の配偶者選択に関わる雄の二次性徴形質の発現は雄性ホルモンに制御される、3) 雄性ホルモンは免疫機能を抑制する] が全て成立し、魚類の性的二形の進化モデルとして本仮説が有効であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The immunocompetence handicap hypothesis (ICHH) assumes that males with attractive sexual ornamentation are more handicapped than their less ornamented rivals because of the immunosuppressive androgens required for the production of secondary sexual characters. The predictions of ICHH were tested in freshwater fishes. The present results supported assumptions of ICHH [1) females prefer males with exaggerative sexual traits, 2) expressions of male sexual traits used in female choice are controlled by androgens, 3) androgens have immunosuppressive effects] in the pale chub *Zacco platypus* (Cyprinidae). This study suggests that ICHH is useful as a model of evolution of sexual dimorphisms in fishes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生態・環境

キーワード：生態学・性淘汰・ハンディキャップ原理・免疫能・雄性ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

有性生物の多くでは、外部形態などに性的二形が見られ、雌に比べて雄は著しく発

達した二次性徴形質を示す。このような雄の形質は、雌を巡る雄間競争に有利か、二次性徴が発達した雄ほど雌に好まれるとい

う雌の配偶者選択による性淘汰を通じて進化すると考えられている。雌の配偶者選択によって性的二形が進化するための前提条件は、雄の二次性徴形質の発達の程度と雄の質（例えば、生存能力等）との間に相関関係があり、雌は潜在的な番い相手の中から優れた雄を正確に選別できることである。雌が雄の質を正確に見分けることができるメカニズムとして、Zahavi (1975. *J. Theor. Biol.* 67: 603-605) は、「ハンディキャップの原理」を提出した。現在、魚類を含め様々な分類群の雌の配偶者選択性においてハンディキャップの原理が適用できることが知られている。

#### 免疫適格ハンディキャップ仮説

(Immunocompetence handicap hypothesis, 以下 ICHH) は、テストステロンなどの雄性ホルモンが免疫能を抑制することに注目した性的二形の進化に関するモデルである。雄性ホルモンは、雄の二次性徴形質を発達させると同時に、免疫能を抑制することが多くの生物で知られている。この雄性ホルモンの免疫抑制効果により、病原菌等に重度感染することなく雄性ホルモンを大量に分泌させて二次性徴形質を発達させることができるのは、高い免疫能を持つ雄だけだろう。よって、雌は雄性ホルモン依存の雄の二次性徴形質に基づく配偶者選択を行うことで、雄の病原菌への抵抗性を正確に評価でき、高い免疫能を持つ優れた雄と配偶することが可能となるだろう。この雄性ホルモンの免疫抑制効果とハンディキャップの原理を組み合わせたユニークな性的二形の進化モデルは、生態学において精力的に研究されている分野の1つである。

ICHHを構築する仮定は、1) 雌は顕著な二次性徴形質を持つ雄を好む、2) 雌の配偶者選択に関わる雄の二次性徴形質の発現

は雄性ホルモンに制御される、3) 雄性ホルモンは免疫能を抑制するの3つであり、これらの仮定を検証した研究が数多く行われている。しかし、現行の ICHH 研究にはいくつかの問題点が指摘されており、この仮説の妥当性について未だ統一した見解は得られていない。

これまでの ICHH 研究の問題点をまとめると次の3点になる；(1) これまでに ICHH 研究が行われた分類群は鳥類に著しく偏っており、他には哺乳類とは虫類がわずかに調べられているだけで、魚類に至ってはほとんど知見が無い。(2) テストステロン分泌や免疫能は気候や個体の栄養条件に影響されると予想されるが、これらの条件をコントロールした研究が少ない。(3) 免疫能に影響するコルチゾルなどの他ホルモンとテストステロンとの相互作用を検討した例がほとんど無く、テストステロンが直接的に免疫能を抑制するのか、あるいは他ホルモンを介して間接的に免疫能を低下させるのが不明である。

以上の3点に留意した研究を行うことで、ICHH の理解は飛躍的に促進し、生態学の発展に大いなる貢献をもたらすだろう。

## 2. 研究の目的

一般的に、魚類は鳥類よりも血中テストステロン濃度が高い種が多く、投与実験における体内ホルモン濃度のコントロールが容易であると予想される。また、魚類は非常に多種多様な二次性徴形質が見られるので性淘汰の研究に頻用されているにも関わらず、これまで ICHH に関する研究がほとんど行われていないので、その知見が不足している分類群でもある。さらに、魚類は飼育が容易な種が多く、効率良く飼育実験を行うことが可能である。以上の点から、魚

類は ICHH を検討するのに好適な材料といえる。

本研究の目的は、様々な二次性徴形質が雄に発現する日本産淡水魚（ヌマチチブ・オイカワ・ウグイ）を材料にして、これまでの ICHH 研究で問題となっていた上述の 3 点を考慮した野外調査及び室内実験を行い、ICHH の理解を大きく促進させることである。具体的には以下の 4 点について検証を行う。

(1) 雄の二次性徴形質の発現とテストステロン分泌及び免疫能の季節的变化、(2) 雄の二次性徴形質に対する雌の配偶者選択性、(3) 栄養条件とテストステロン分泌及び免疫能との関係、(4) テストステロンと間腎腺ホルモンのコルチゾルの相互作用と免疫能との関係。

### 3. 研究の方法

予備調査の結果、当初研究材料の候補に挙げた 3 魚種の内、個体収集の容易さや配偶者選択実験及び投与実験の簡便さ等から、オイカワ [繁殖期 (5~8 月) に雄は頭部追星や尻鰭が発達し、また体側に鮮やかな赤色と青緑色の婚姻色があらわれる] が本仮説の検証に最も適していることがわかった。以下はオイカワを対象とした研究成果を中心に述べる。

#### (1) 野生個体群における雄の性的形質と血中雄性ホルモン濃度の関係

雄の性的形質と雄性ホルモンとの関連性を明らかにするために、2007 年 8 月から 2008 年 3 月にかけて (2007 年 10 月は採集が実施されていない)、長野県産川の中流域においてオイカワの雄が採集された。採集個体はデジタルカメラで体側面を撮影後、ヘマトクリット管を用いて採血された。その後、全長、尻鰭長、頭部追星数を計測した。

撮影された雄の画像はコンピューターに取り込まれ、PHOTOSHOP CS4 (Adobe 社) を用いて、婚姻色の赤色及び青緑色の彩度と明度を計測した。また、ImageJ (1.36b W. Rasband National Institutes of Health) を用いて、婚姻色の赤色と青緑色の面積及び体側面積を測定した。

採血された血液は遠心分離により血漿を取り出し、血漿中のテストステロン (T) 及び 11-ケトテストステロン (KT) を酵素免疫測定法 (EIA) キット (Cayman Chemical 社) を用いて測定した。

雄性ホルモン濃度の季節変化の分析には ANOVA が用いられた。また、雄性ホルモンと雄の性的形質との関連を知るために、繁殖期である 8 月に採集された雄において、T 濃度及び KT 濃度と性的形質 [尻鰭長/全長)・頭部追星数・婚姻色の赤色の彩度・婚姻色の赤色の明度・婚姻色の青緑色の彩度・婚姻色の青緑色の明度・婚姻色面積 (婚姻色面積/体側面積)] との関係を Kendall の順位相関係数により解析した。

#### (2) 雌の配偶者選択性

雌の配偶者選択性を明らかにするために、2009 年 5 月~8 月にかけて、水槽内において二者択一実験を行った (2008 年 8 月に実験設定を決定するための予備実験を実施)。実験に用いた雌雄は産川中流域で採集された。採集個体は雌雄別にストック水槽 (95cm×45cm×45cm) で飼育された。実験には、ストック水槽で少なくとも 1 週間以上飼育された個体を用いた。

配偶者選択実験水槽 (90cm×45cm×45cm) は透明アクリル板と有色アクリル板によって 3 区画に分けられた (図 1)。雄間競争の影響を排除するために、それぞれの雄区画は有色アクリル板によって遮られた。また、

雌は両雄を認識できるように雌区画と雄区画は透明アクリル板によって区切られた。

雄を配偶者選択実験水槽のそれぞれの雄区画に1個体ずつ投入した。雄を1時間順化させた後、雌区画に雌を1個体投入した。雌を10分間順化させた後、雌がそれぞれの雄区画の前方5cm以内にいた時間を10分間記録した。そして、雌は長時間滞在した区画の雄を好んだと判断し、これを雌の配偶者選択の指標とした。

観察終了後、雌雄を取り出し、雄はデジタルカメラで撮影した後、全長、尻鰭長、頭部追星数を計測した。そして、先の手順に従って雄の赤色及び青緑色の婚姻色の彩度と明度、そして体側面積に対する婚姻色の面積を測定した。

雌の配偶者選択に関わる雄の形質を特定するために、雄に対する雌の選択性を従属変数に、雄の外部形態〔全長・尻鰭サイズ(尻鰭長/全長)・頭部追星数・婚姻色の赤色の彩度・婚姻色の赤色の明度・婚姻色の青緑色の彩度・婚姻色の青緑色の明度・婚姻色面積(婚姻色面積/体側面積)]を独立変数として多変量ロジスティック解析を行った。

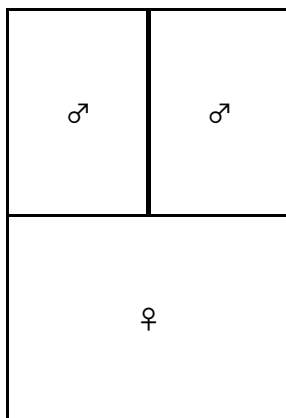


図1. 配偶者選択実験水槽(上面から見たもの)。

### (3) 雄性ホルモンと免疫能との関係

雄性ホルモンが雄の免疫能に及ぼす影響

を明らかにするために、2009年12月から2010年2月にかけて、オイカワの雄へのKT投与実験を行った。免疫能の評価は溶菌性酵素であるリゾチウムの腎臓中の濃度により行った。投与はサイラスティックチューブ(DOW CORNING社)を用いて行われた。KT10mgを99%エタノール100 $\mu$ lに溶解し、ひまし油400 $\mu$ lに添加して混和した。サイラスティックチューブ(外径3.18mm、内径1.57mm)を1cmに切断し、チューブの一端をシリコン製接着剤で封じ、マイクロピペットを用いてKT溶液を15 $\mu$ l注入した後、チューブの他端を接着剤で塞いでKTを含むインプラントを作製した(KTインプラント)。また、コントロールとしてエタノールとひまし油の混合液のみが入ったチューブを作製した(非KTインプラント)。そして雄の腹腔内にインプラントを投与し、水槽内(45cm $\times$ 30cm $\times$ 30cm)で1個体ずつ飼育した。栄養条件が免疫能に及ぼす影響を考慮するために、投与個体には毎日十分量の餌(テトラフィン)を与えた。投与から14日後に雄を取り出し、麻酔後、腹部を切開して腎臓を摘出した。摘出した腎臓はKバッファーと混合し、その混合液に *Micrococcus lysodeikticus* を加えた。そして、吸光度計を用いて計測した吸光度から、リゾチウム濃度を測定した。

KTインプラントが投与されたKT投与群と非KTインプラントが投与された非KT投与群のリゾチウム濃度の違いはMann-Whitney U検定によって検討された。

## 4. 研究成果

(1) 野生個体群における雄の性的形質と血中雄性ホルモン濃度の関係

野外で採集された雄の血中T濃度及びKT濃度は繁殖期である8月に高く、非繁殖期

である9月から2月にかけては比較的低い値を示し、3月に再び上昇する傾向がみられた(2007年8月:N=11, 9月:N=9, 11月:N=3, 12月:N=16, 2008年1月:N=9, 2月:N=4, 3月:N=3, ANOVA; T: F=3.38, P<0.01, KT: F=3.27, P<0.01; 図2)。

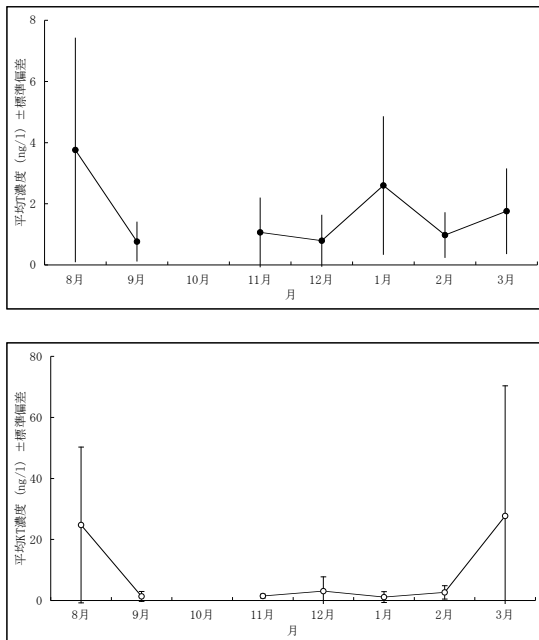


図2. 雄のテストステロン濃度 (T; 上図) 及び11-ケトテストステロン濃度 (KT; 下図) の季節変化。

繁殖期の雄のT濃度と性的形質との関係を調べたところ、T濃度と頭部追星数及び婚姻色面積との間に有意な正の相関関係がみられた(表1)。また、KT濃度と青色の婚姻色の彩度及び婚姻色面積との間に正の相関

表1. 繁殖期の雄のテストステロン濃度 (T) 及び11-ケトテストステロン濃度 (KT) と雄の性的形質との関係。サンプルサイズは11。

雄の性的形質	r	
	T	KT
尻鰭サイズ (尻鰭長/全長)	0.09	0.12
頭部追星数	0.63**	0.38
婚姻色 (赤色) の彩度	0.16	-0.09
婚姻色 (赤色) の明度	-0.05	-0.16
婚姻色 (青緑色) の彩度	0.34	0.52*
婚姻色 (青緑色) の明度	-0.14	-0.03
婚姻色面積 (婚姻色面積/体側面積)	0.67**	0.49*

\* P<0.05, \*\* P<0.01

がみられた(表1)。これらの結果は、雄の性的形質の一部は雄性ホルモンによってコントロールされていることを示唆する。

## (2) 雌の配偶者選択性

多変量ロジスティック回帰分析の結果、雌の配偶者選択性を説明する変数として、雄の婚姻色面積と青色の婚姻色の明度が重要であることが明らかとなった(表2)。雌が配偶者選択に用いた雄の性的形質の内、婚姻色面積はT及びKTによってその発現や維持がコントロールされていたことから(表1)、本種の雌は雄性ホルモンに依存する性的形質に基づいて配偶者選択を行うといえる。

表2. 雌の配偶者選択性を従属変数とし雄の形質を独立変数とした多変量ロジスティック回帰分析の結果。雄の形質はステップワイズ法により取り込まれたもののみを表示。サンプルサイズは18。

雄の性的形質	-2LogLR	P
婚姻色面積	5.22	0.02
婚姻色の青緑色の明度	3.77	0.05

モデル全体:  $\chi^2=6.65$ , P=0.03

## (3) 雄性ホルモンと免疫能との関係

KT投与群と非KT投与群の腎臓中のリゾチウム濃度を比較したところ、前者よりも後者の方がリゾチウム濃度が高いことがわかった(KT投与群:N=7, 非KT投与群:N=3; Mann-Whitney U検定, z=2.16, P<0.05; 図3)。この結果は、KTはオイカワの雄の免疫能の一部を低下させる働きを持つことを意味する。

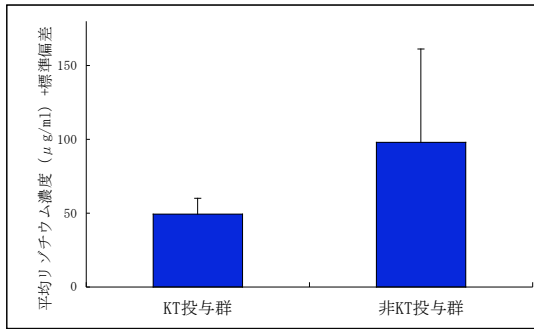


図 3. 11-ケトテストステロン (KT) 投与群と非 KT 投与群の平均腎臓中リソチウム濃度。

以上の野外調査及び室内実験の結果から、オイカワにおいて、ICHH を構築する 3 つの仮定 [ (1) 雌は顕著な二次性徴形質を持つ雄を好む、(2) 雌の配偶者選択に関わる雄の二次性徴形質の発現は雄性ホルモンに制御される、(3) 雄性ホルモンは免疫機能を抑制する ] が全て成立することが明らかとなった。本研究の成果から、魚類における性的二形の進化モデルとして、本仮説が有効である可能性が示唆される。これまで魚類でほとんど報告例の無かった本仮説の検証事例は、性淘汰研究の分野において多大なる貢献を果たすと思われる。

魚類では、今回測定した腎臓中のリソチウムなどの体内免疫機構だけではなく、体表面などで見られる体外免疫機構も発達している。今後は、体外免疫機構に雄性ホルモンや今回実施できなかった他ホルモンがどのような影響を及ぼすのかを調べることで、ICHH の理解をより深めていきたい。また、多くの動物で見られる雄の多様な繁殖戦術 (例えば性的形質を発達させずに繁殖を行うスニーカー戦術等) の決定要因を解明するために、これまで考慮されていなかった ICHH の視点を組み込んだ研究を進めたい。さらに、本研究成果を水産学の分野に応用し、免疫機能を低下させない水産資源の養殖・増殖法の開発を行いたい。

## 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 1 件)

- ① Takahashi D. Life-history variation in relation to nest site abundance in males of the freshwater goby *Tridentiger brevispinis*. *Ecology of Freshwater Fish*. 査読有り. 17: 71-77. 2008.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 高橋大輔・三浦さおり. コイ科魚類オイカワにおけるオスの性的形質と雄性ホルモンとの関係. 第 57 回日本生態学会大会. 2010 年 3 月 17 日. 東京大学、東京都.
- ② 高橋大輔. 潜在的な配偶候補者数によって変化するハゼ科魚類ヌマチチブの雌の配偶者選択性. 第 56 回日本生態学会大会. 2009 年 3 月 19 日. 岩手県立大学、岩手県.
- ③ Takahashi D. Variable male-male competition and female mate choice in relation to nest site abundance in the freshwater goby *Tridentiger brevispinis*. The 12th Biennial Congress of the International Behavioral Ecology Society. 2008 年 8 月 13 日. Cornell University, Ithaca, USA.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 大輔 (TAKAHASHI DAISUKE)  
 長野大学・環境ツーリズム学部・准教授  
 研究者番号：90422922

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：