

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02569

研究課題名(和文)子殺しの内分泌メカニズムから探る「親による子の保護」の新しい枠組み

研究課題名(英文)A new framework for parental care investigated through the endocrine mechanism of infanticide

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ロウソクギンボ雄の全卵食行動がプロラクチン放出ペプチド(PrRP)に調節される卵保護行動と摂食行動の相乗効果で発現する機構を検討した。(1)全卵食雄と卵保護雄、摂食雄の脳内25領域の神経活動を比較し、全卵食は高次中枢領域が関係し、その領域と摂食を制御する領域により発現することが示唆された。PrRP細胞体と軸索がこれら領域で確認され、PrRPとPRLの影響が示唆された。(2)雄の嗅上皮に卵養育海水を暴露する実験を行った結果、雄は卵の存在をフェロモンで認識していることが示唆された。(3)雄の全脳のトランスクリプトーム解析を行い、全卵食発現との関係が示唆される摂食調節関連遺伝子が複数確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

親が保護中の子を食べる一見非適応的な現象は、親が割の合わない保護を打ち切って繁殖をやり直す適応戦略とされてきたが、申請者らはロウソクギンボ雄の全卵食が栄養利益を期待して保護卵を「食べる」のではなく、自身の求愛を促進する性ホルモン分泌を促すために卵の存在を消す「子殺し」であることを証明した。子を保護中の親が次の瞬間には子を食べ始めるドラスティックな転換機構の解明は、子殺し発現だけでなく子の保護の発現・維持機構の理解にも繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism by which total filial cannibalism in the male *Rhabdoblennius nitidus* occurs as a synergistic effect of parental care and feeding behaviors regulated by prolactin-releasing peptide (PrRP). (1) Comparison of neural activity in 25 brain regions in cannibalising, egg-tending, and feeding males suggested that total filial cannibalism involves specifically active higher-order central regions and is expressed in these regions and in regions that regulate feeding. (2) Egg-rearing seawater was exposed to the olfactory epithelium of males, suggesting that males may recognize the presence of eggs by pheromones. (3) Transcriptome analysis of male whole brains revealed several genes related to feeding regulation that were suggested to be related to the expression of cannibalism.

研究分野：行動生態学

キーワード：親による子の保護 子殺し 進化 行動生態 内分泌 魚類 脳

1. 研究開始当初の背景

親が保護中の子を殺す「子殺し」や食べる「フィリアルカニバリズム」はかつて異常行動とされたが、現在は逆に子の保護の適応進化を研究する格好の材料である。魚類の「全卵食」行動も、従来は保護成功が小さく割の合わない少数卵保護を打ち切って繁殖をやり直す適応戦略とされてきた。しかし、雄が卵保護中も雌と産卵して保護卵を増やせる種では、卵が少ないという理由で全て食べてしまう必要は無く、大きな謎であった。申請者らは、ロウソクギンポの雄が求愛を促す雄性ホルモン・11-ケトテストステロン

(11-KT) レベルによって、求愛活性の高い求愛期と、求愛活性が低く主に保護を行う保護期を繰り返す繁殖サイクルを持ち(図1実線)、その11-KTの変動を促す鍵刺激が巢内の卵の存在であることを発見した。全卵食は体コンディションの悪い雄で起こるわけではなく、卵を食べずに吐き捨てる雄もいることから、本種的全卵食は、雄親が栄養利益を期待して保護卵を「食べる」のではなく、自身の求愛を促進する11-KT分泌を促すために卵の存在を消す「子殺し」であることが示された(Matsumoto et al. 2018; Cur Biol)。

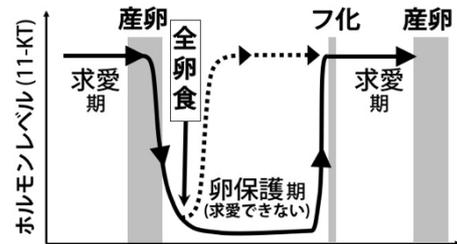


図1. 性ホルモンに依存した繁殖サイクル
卵を獲得すると11-KTが低下して2日以内に求愛できなくなる。卵が少ない場合は、全卵食で卵の存在を消して11-KTを回復させ、求愛を再開する

子殺し行動は多くの分類群で知られ、特に哺乳類で生理メカニズムの研究が進んでいる。齧歯類の雄では、子殺し時に雄性ホルモンが上昇するため攻撃行動に近いとされている。ロウソクギンポの全卵食行動も卵の存在を消すための「子殺し行動」であるため、同様に攻撃的な発現メカニズムを想像させる。しかし、上述のように全卵食は11-KTが低下するタイミングで起こり、さらに11-KTがより低下した個体が全卵食しやすいことも示されたことから、哺乳類の子殺しとは全く異なるメカニズムで発現していると考えられた。

申請者らは、まず全卵食雄の保護活性に着目し、魚類を含む多くの分類群で子育てホルモンとして知られるプロラクチン(PRL)に、本種でも保護行動を調節する機能があることを確かめた(図2⑤⑥)。興味深いのは、このPRLの分泌を調節するPRL放出ペプチド(PrRP)が、同時に摂食行動を抑制する機能も持つことが明らかになった点である(図2③④; Takegaki et al. 2020; J Fish Biol)。申請者らは、保護行動を調節するために分泌されたPrRPが摂食要求(栄養利益)とは無関係に摂食行動すなわち卵食行動を調節していると考え、PrRPを軸とする全卵食発現メカニズムを提案した(図2)：(1)雄は保護卵数を卵から放出される化学物質(フェロモン)で認識していると予想している(図2①②)；(2)保護卵数が少ない場合にPrRP分泌が減少して摂食が促進される

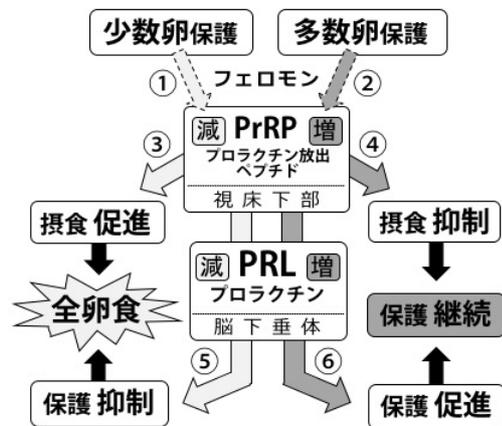


図2 PrRPを介した全卵食発現メカニズム(予想)

(図2①→③)；(3) PrRPの分泌減少によりPRLの分泌も減少して保護行動が抑制される(図2⑤)；(4) 両者の相乗効果により全卵食が発現する。

2. 研究の目的

本研究では、ロウソクギンポ雄の子殺しがPrRPレベルの低下に伴う保護抑制と摂食促進の相乗効果により発現するメカニズムを検証するために、以下の3項目の研究を実施する。

研究項目(1) 本種雄の全卵食は保護卵数が少なく、11-KTレベルが低い時に起こる(図1)。しかし、保護開始から数日経ち、11-KTが下がり切った雄では、保護卵数を減らしても全卵食は起こりにくい(竹垣, 未発表データ)。一方で、産卵直後から保護ホルモンPRLの分泌を阻害すると卵保護行動は抑制されるが(図2⑤)、保護卵数が多ければ全卵食に至る個体は少なかった(竹垣・中武; 未発表データ)。これらの結果から、本種的全卵食は少ない保護卵数と、低い11-KTレベル、そして低いPRLレベルの3つの条件が揃った時に起こると考えられた。本研究では、まだ把握できていないPRLの動態を明らかにした上で、PRLと11-KTが全卵食発現に与える効果を検証すると同時に、両者の相互作用を検討する。

研究項目(2) 全卵食発現の条件の1つは保護卵数の少なさであることから、雄は卵からの量的シグナルを認識していると考えられる(図2①,②)。雄が巢内の保護卵を視覚と触覚では認識できないことがダミー卵を使った実験から示唆されているほか、卵を養育中の海水を巢内に曝

露すると雄の 11-KT に有意な変化があったことから (魚生研 発表済, 2019)、卵からのシグナルは化学シグナル (フェロモン) と推察される。本研究では、雄が保護卵から放出されるフェロモンを化学刺激として認識しているかを検証し、その化学物質を特定する。

研究項目 (3) PrRP の投与実験により全卵食行動が阻害されるかを確認し、行動、ホルモンレベル、脳内活性が予測通りに発現するかを検証する。また、その他の摂食調節ホルモンが全卵食と通常摂食に与える効果も検討する。

3. 研究の方法

研究項目 (1) PRL の卵保護中の挙動と全卵食への効果

PRL の動態把握：繁殖期に、保護卵を減じて全卵食を誘導した全卵食中の雄と、様々な保護段階 (無保護、保護初期、保護中期、保護後期) の雄を野外で採集する。また非繁殖期にも雄を採集する。採集した雄を解剖して脳下垂体を採取し、下垂体内の PRL の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法で定量する。

研究項目 (2) 雄による卵フェロモンの認識とその物質の特定

卵フェロモンの認識：雄を卵養育海水と海水 (コントロール) に 24 時間曝露した後に、解剖して嗅上皮を取り出し、免疫染色を行う。

卵フェロモン物質の特定：人工海水中で発生段階の異なる卵を 24h 養育し、その卵海水中の化学物質を液体クロマトグラフィー質量分析法 (HPLC) を用いて分析する。人工海水と比較して卵海水で特異的に現れる物質をいくつかフェロモン候補とする。候補物質を実験①と同様に雄に曝露して卵海水曝露と同じ行動および同じ脳領域で応答が見られるかを確認し、フェロモンとして機能する化学物質を特定する。

研究項目 (3) 全卵食発現に与える PrRP の効果と発現時に活動する脳領域

PrRP 投与実験：野外で卵獲得初日の保護雄を対象に、保護卵の一部を除去して全卵食を誘導する操作を加え、同時に PrRP (500 pmol/g) を腹腔内に投与して、全卵食が阻害されるかを確認する。生理食塩水を投与したコントロール個体と全卵食の発生割合を比較する。また、投与前後の雄の行動をビデオ撮影して両条件の保護強度の変化を比較する。実験終了後に雄を採集して脳組織を免疫染色し活性化している脳領域を確認する。

4. 研究成果

研究成果 (1) PRL の動態把握

各条件間で PRL の遺伝子発現量に有意な差は検出されなかった (全て $p > 0.05$, 図 3)。しかし、非繁殖期条件は繁殖期中の条件に比べて低い傾向があり、PRL と繁殖との関係性が示唆された。繁殖期の保護初期は保護中期と後期に比べて高い傾向にあった。また、全卵食条件は保護初期条件よりも低い値を示した。全卵食を誘導する実験は保護初期の雄に対して行っていることから、全卵食の発現と PRL の低下の関係が示唆された。しかし、卵を持たない無保護の雄が保護初期の雄と同等の高い PRL 値を示していたことは、PRL が本種の卵保護行動を調節するホルモンであると考えられる本研究の仮説とは矛盾する結果となった。これは、本種の求愛行動のひとつである求愛ファニングが保護行動を起源としている可能性があることから、PRL が求愛行動も調節しているからかもしれない。この点は、現在検討中である。また、脳内の遺伝子発現量ではなく、血中に分泌された PRL を直接測定する ELISA 法でも PRL の挙動を検討する予定である。

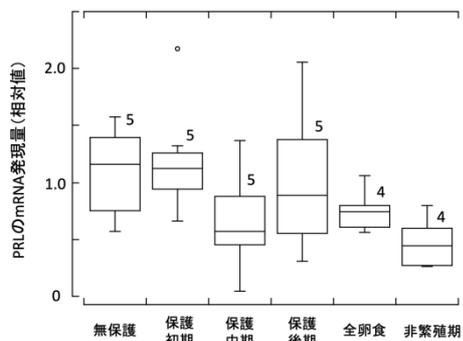


図3. リアルタイムPCRによって測定した各条件下における雄の脳下垂体のPRL遺伝子発現量(相対値)の比較。

研究成果 (2) 雄による卵フェロモンの認識とその物質の特定

化学シグナルへの雄の反応：卵養育海水と海水をそれぞれ曝露した雄の嗅上皮を免疫染色すると、卵養育海水曝露条件でのみ嗅細胞に顕著な反応が見られた (図 4)。これらの嗅細胞はクリプト型と繊毛型と思われる。この顕著な反応は卵養育海水を曝露した場合でのみ観察されたことから、雄が卵



図4. 卵培養海水と人工海水を曝露し免疫染色した雄の嗅上皮の比較。卵培養海水曝露条件でクリプト型と繊毛型の嗅細胞が活動している。

の存在を卵から溶出する化学物質(フェロモン)によって認識している可能性が強く示唆された。

卵海中の化学物質の特定: さまざまな濃度の卵養育海水を分析したが、フェロモンとして機能するアミノ酸等の化学物質の特定には至らなかった。海水からサンプルをろ過・抽出する過程で濃度が低くなりすぎることが原因と考えられた。フェロモンの暴露実験は卵養育海水を使用して実施すると同時に、引き続き物質を特定する方法を検討していく。

研究成果 (3)

PrRP 投与実験

行動への効果) 投与前後の雄の保護ファニング時間の変化量は、PrRP 投与条件が平均 +16.17 秒 (SD=± 89.22 秒)、コントロール条件が +41.67 秒 (SD=± 148.36 秒) で両条件で増加しており、条件間の変化量に有意な差はなかった (Mann-Whitney U test, $W = 61, p = 0.55$)。一方で、投与 30 分後の巢内滞在時間の変化量は、PrRP 投与条件が平均 +35.17 秒 (SD=± 49.63 秒)、コントロール条件で平均 +0.58 秒 (SD=± 38.90 秒) であった。巢内滞在時間の変化量は PrRP 投与条件がコントロール条件に比べて有意に大きかった ($W = 107, p < 0.05$, 図 5)。

全卵食発現への効果) PrRP 投与条件 (n=15) の全卵食の発現割合は、4 個体全卵食したのに対し、11 個体が全卵食しなかった。一方、コントロール条件の全卵食の発現割合は、7 個体が全卵食したのに対し、8 個体が全卵食しなかった。全卵食の発現割合は、PrRP 投与条件 とコントロール条件で有意な差はなかった (Fisher's exact test, $p = 0.22$)。投与操作を行わずに全卵食を誘導した過去の研究で観察された全卵食の発現割合 (10/18 例: 約 56%) は本研究のコントロール条件の発現割合 (約 53%) と類似していた。これらのコントロール条件の発現割合を考慮すると、今回の PrRP 投与条件の発現割合 (27%) は比較的低い値と考えられる。両投与条件間に有意な差が無かったが、PrRP の摂食抑制作用が働いた結果、全卵食が抑制された可能性が考えられた。

全卵食時に活動する脳領域調査

繁殖期に採集した全卵食雄と卵保護中の雄、摂食中の雄について、神経活動マーカー pS6 に対する一次抗体を用いて免疫染色を行い、脳内の 25 領域の神経活動を条件群間で比較した (図 6)。さらに、各脳領域における神経活動の相関関係に基づいてネットワーク解析を実施し、全卵食欲求を担う機能的ネットワークの抽出を試みた。

その結果、全卵食欲求、摂食欲求、および摂食刺激に関連して活動する脳領域をそれぞれ差別化できた。さらに、全卵食欲求に関連すると予想される機能的ネットワークを抽出できた。これらより、全卵食欲求の高い個体で特異的に活動する高次中枢領域が存在するものの、全卵食行動自体はそれらの領域と摂食制御を担う脳領域の協調によって表現されることが示唆された。また、PrRP 抗体を用いた免疫染色により、PrRP の細胞体と軸索が上述の全卵食に関係するとされる領域で確認されたことから、PrRP や PRL が全卵食行動時の神経活動に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

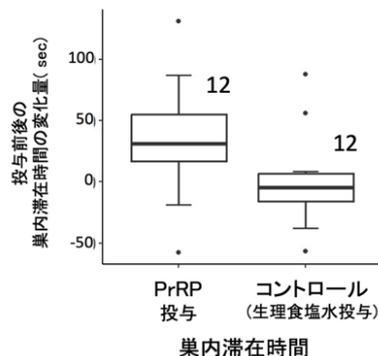


Fig. 5 PrRP 投与条件とコントロール条件(SA)の投与前後の巢内滞在時間の変化量。箱ひげ図の中の太い横棒は中央値を示し、箱ひげ図の上下はそれぞれ第3四分位、第1四分位を示し、上下のひげの先端は四分位 範囲を示す。

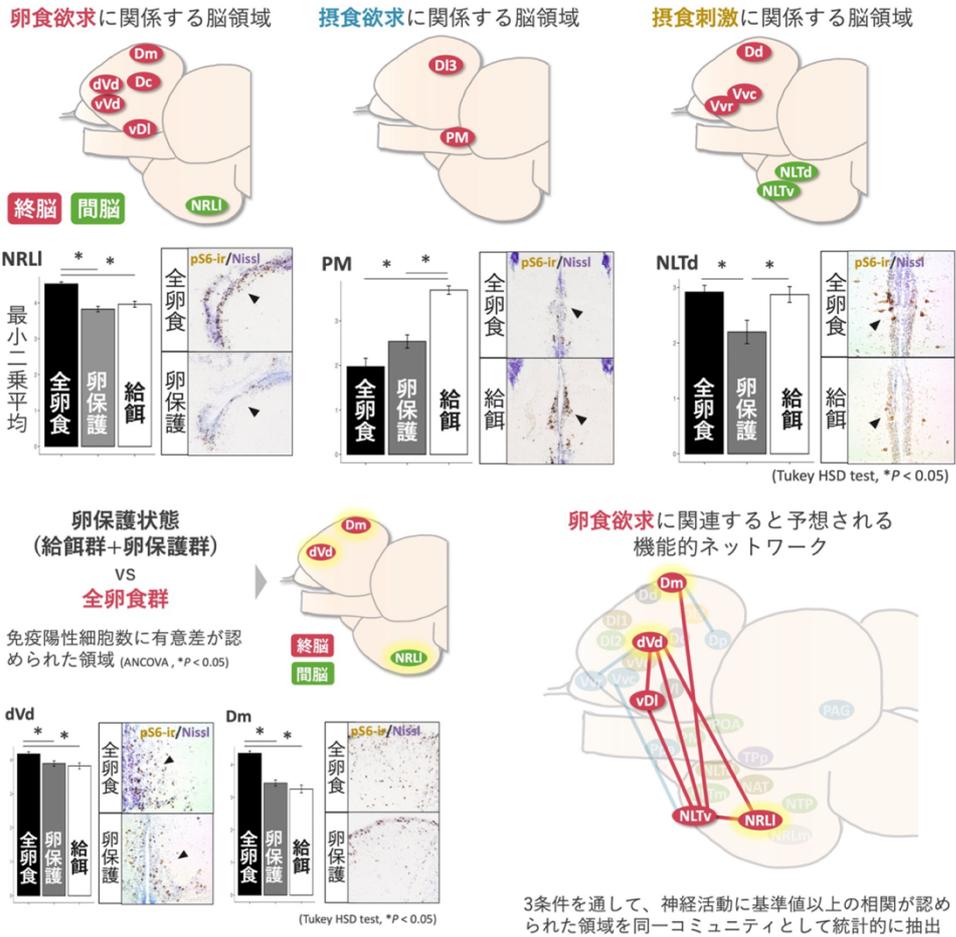


図6. 全卵食雄と卵保護雄、摂食雄の脳神経活動の比較

全卵食時に特異的に発現する脳内遺伝子探索

全卵食行動の発現に関与する脳内因子を調査するために、卵保護中と全卵食中の雄の全脳を用いてトランスクリプトーム解析を行った。両条件間で発現量に有意差のある遺伝子の中から摂食調節に関連する遺伝子が複数見つかった (図7)。さらに、その中から既知の機能と矛盾ない変動をしていた遺伝子が3つ見つかった (A~C と表記)。

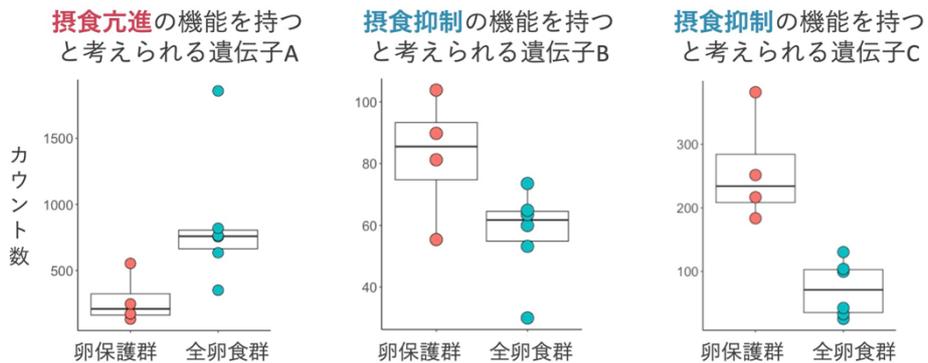


図7. 全卵食雄と卵保護雄における脳内遺伝子発現の違い

引用文献)

- Matsumoto Y, Tateishi T, Terada R, Soyano K & Takegaki T. 2018. Filial cannibalism by male fish as an infanticide to restart courtship by self-regulating androgen levels. *Current Biology*, 28: 2831-2836
- Takegaki T, Nakatake Y & Amiya N. 2020. Effect of the administration of prolactin-releasing peptide2 on feeding activity in the intertidal blenny *Rhabdoblennius nitidus* (Günther, 1861). *Journal of Fish Biology* 97: 566-571.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takegaki Takeshi, Nakatake Yosuke, Matsumoto Yukio, Suga Koushirou, Amiya Noriko	4. 巻 201
2. 論文標題 Early Filial Cannibalism in Fish Revisited: Endocrinological Constraint, Costs of Parental Care, and Mating Possibility	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The American Naturalist	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） 10.1086/724284	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田和也・阿見彌典子・竹垣 毅
2. 発表標題 魚類における戦略的な子殺しを制御する中枢調節機序の探索 行動生態学研究の新展開として
3. 学会等名 日本動物学会シンポジウム 魚たちの環世界を探る：分子・生理・行動学的研究の最前線
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福田和也・中山友哉・山田和秀・阿見彌 典子・竹垣 毅
2. 発表標題 脳における神経活動と遺伝子発現パターンから、ロウソクギンポRhabdoblennius nitidusの全卵食を制御する神経基盤を探索する
3. 学会等名 2023年度日本魚類学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福田和也・中山友哉・天谷貴史・山田和秀・阿見彌 典子・竹垣 毅
2. 発表標題 ロウソクギンポの子殺し行動を制御する中枢調節機構の探索
3. 学会等名 第42回日本動物行動学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 服部琢磨・福田和也・阿見彌 典子・竹垣 毅
2. 発表標題 ロウソクギンボ保護雄の全卵食を制御する中枢神経・内分泌機構
3. 学会等名 第34回魚類生態研究会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔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	阿見彌 典子 (Amiya Noriko) (20588503)	北里大学・海洋生命科学部・講師 (32607)	
研究分担者	福田 和也 (Fukuda Kazuya) (20882616)	北里大学・海洋生命科学部・助教 (32607)	
研究分担者	菅 向志郎 (Suga Koushi rou) (60569185)	長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授 (17301)	
研究分担者	天谷 貴史 (Amagai Takafumi) (70899054)	長崎大学・海洋未来イノベーション機構・助教 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------