

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05780

研究課題名(和文) 営巣繁殖魚における雄腎臓から分泌される雌誘引物質とその同定

研究課題名(英文) Identification of female-attractive substance secreted from male kidney in nest-spawning teleosts

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：カワヨシノボリの雄は繁殖期に腎臓を肥大させ、尿細管上皮で多糖類を含む成分(分子量74および33 kDa)の産生を活性化させた。雄の腎臓抽出物には、排卵している雌を誘引する成分が含まれることが示された。トミヨ属淡水型の雄は繁殖期に腎臓を肥大させ、尿細管上皮では植物片を接着する成分であるスピギンの産生を活性化させた。繁殖期の雄の腎臓抽出物には排卵した雌を誘引する成分が含まれ、この成分は分子量3 kDa以上であった。雄が作った巣からは雌を誘引する成分が出ていることが示され、スピギンが雌誘引物質であることが強く示唆された。腎臓でのスピギン産生は雄性ホルモンによって刺激されていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究および先行研究での知見から、営巣繁殖する魚類には雄が腎臓で産生する物質によって雌を巣まで誘引するという普遍性が存在することを示すことができた。これは営巣繁殖魚において、繁殖巣を防衛しつつ繁殖成功を最大にする上で理にかなった仕組みであり、今後も多くの営巣繁殖魚の繁殖生理生態を理解する上で基礎となる概念になり得る。トゲウオ科魚類に見られる特異な造巣生態に関しては、巣材を接着する成分が雌誘引物質に由来する可能性を示し、単純な縄張り繁殖から、営巣繁殖、さらには造巣繁殖へと進化する過程で、雌誘引物質が巣材接着物質へと機能を進化させてきたと言う新たな概念を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：In male *Rhinogobius*, kidneys were enlarged during the breeding season and the production of polysaccharide-containing components (molecular weights 74 and 33 kDa) in the renal tubule epithelium is stimulated. Kidney extracts from males were shown to contain components that attract ovulating females. During the breeding season, male *Pungitius* enlarged his kidney, and activated the production of spiggin, a substance that adheres plant fragments, in the renal tubular epithelium. Kidney extracts from breeding males contain a substance that attracts ovulated females, with a molecular weight of 3 kDa or more. Nests built by males were shown to contain a substance that attracts females, strongly suggesting that spiggin is a female attractant. It was thought that spiggin production in the kidney is stimulated by androgen.

研究分野：動物生理生態学

キーワード：性フェロモン 営巣繁殖 腎臓 雌誘引 多糖類 トゲウオ科 ハゼ科 スピギン

1. 研究開始当初の背景

硬骨魚類の中には繁殖期に雄が縄張りを形成し、そこを繁殖のための「巣」として雌の訪問を待つという繁殖生態を示すものが多数見られる。例えば、ハゼ科やカジカ科の多くの魚種では、石の下の隙間を繁殖のための巣にして、雌を誘い入れて産ませた卵を雄が保護する。また、トゲウオ科の魚種では、雄が植物片などを寄せ集め、腎臓から分泌される接着物質によって植物片を固めた巣を水底や抽水植物の茎などに作り、巣に訪問した雌に産ませた卵を雄が保護する。このような繁殖方法を以下では「営巣繁殖」とよぶ。

営巣繁殖する魚類では、1)雄の腎臓が繁殖期に肥大し、腎臓で多糖類を含む成分が産生される、2)繁殖期に営巣している雄の膀胱内には多量の尿が貯留されている、3)雄の腎臓抽出物や巣、営巣している雄そのものが雌を誘引する作用を持つ、などの知見がこれまでに集まってきている。これらの知見を総合して、申請者らは「営巣繁殖する硬骨魚類の多くは、雄が腎臓で産生する誘引物質で雌を巣まで科学的に誘引している」という仮説を立てた。この仮説が示す現象は、雄が自分の縄張り(巣)を防衛しつつ、繁殖成功度を高めるために雌の訪問を受けなければならない状況において、非常に理にかなったものと言える。

トゲウオ科魚類に関しては、繁殖期の雄は巣を作る際に尿に混ぜて接着剤の役割を果たす「スピギン」とよばれる糖タンパク質を放出することが知られている。スピギンはムチン・ファミリーに属する高分子の糖タンパク質である。カジカ科魚類でも、繁殖期中には雄の腎臓が肥大し、腎臓で特異的にスピギンに相同な遺伝子を発現していることが申請者らの研究で明らかになっていることから、営巣繁殖する魚類では普遍的に雄が腎臓でスピギンに相同な糖タンパク質を産生している可能性が考えられる。申請者らによるトゲウオ科のトミヨ属淡水型を用いた研究では、腎臓の抽出物が雌の誘引性を持つことが示唆されているが、スピギンそのものが雌の誘引性を持つのか否かは現時点で不明である。むしろ、スピギンが粘性を帯びた物質であることから、尿とともに放出された腎臓由来の雌誘引物質が急激に拡散するのを防ぎながら下流へと運ぶ「担体」のような役割が想定される。何れにしても営巣繁殖を行う魚類の雄から放出されていると考えられる雌誘引物質が、どのような物質であるのかは不明である。

2. 研究の目的

営巣繁殖するトゲウオ科とハゼ科魚類における雌誘引物質の存在を明らかにし、雌誘引物質を同定することを主要な目的とした。

3. 研究の方法

対象魚種としてハゼ科のカワヨシノボリ (*Rhinogobius flumineus*) およびトゲウオ科のトミヨ属淡水型 (*Pungitius* sp. 1; 以下トミヨ) を用いた。雄の腎臓と生殖周期との関係を明らかにするために、腎臓組織の周年変化を調べた。雄の腎臓抽出物や雄に由来する成分が雌を誘引するか否かを Y 字水路を用いた選択実験により調べた。雌誘引作用が確認された雄由来の雌刺激物を電気泳動や HPLC 等に供し、雌由来のものと比較することで、雄に特異的に多い成分を特定し、分画し、その特徴を明らかにした。トミヨに関しては巣材接着成分であるスピギンが有力であるため、雄が作った巣そのものを用いた選択実験を実施し、巣材接着成分の雌誘引性を検証した。

4. 研究成果

以下では魚ごとに得られた成果を解説する。

【カワヨシノボリ】 本種は雄が石の下の隙間に営巣し、雌を巣に誘い入れて産卵する。雄は営巣することで膀胱内に尿を溜めることが知られている。雄の腎臓重量が体重に占める割合の周年変化を調べた結果、割合は繁殖期初期（4-5月）に急増し、繁殖期中に漸減した。腎臓組織の観察の結果、集合管の上皮の高さが繁殖期初期には非繁殖期の2倍程度まで増加すること、肥厚した集合管上皮はPAS染色で陽性を示したことから、多糖類を含む物質を産生していることが示された。

上流側が二股に分かれたY字水路を用いて、左右の上流区から種々の刺激液を滴下して、下流区に入れた雌の行動を調べた。その結果、雄が営巣している水槽の水には成熟した雌を誘引する作用が認められた。また、雄の腎臓抽出物を刺激液として用いた場合、排卵した雌は誘引されたが、未排卵の雌は誘引されなかった。このことから、繁殖期の雄の腎臓には排卵した雌を誘引する物質が含まれ、営巣中の雄はこの誘引物質を尿を介して放出していると考えられた。繁殖期と非繁殖期の雌雄の腎臓抽出物をSDS-PAGEによって解析したところ、繁殖期の雄の腎臓にのみ含まれている糖タンパク質のバンドが2本（分子量74および33kDa）確認された。これらの成分が雌誘引物質として働いている可能性が考えられる。

【トミヨ】 本種は雄が腎臓で作ったスピギンとよばれる接着成分を尿とともに放出して植物片を固めて巣を作り、その中に雌が産卵する。Y字水路を用いた先行研究により、繁殖期の雄の腎臓抽出物が排卵雌を誘引することが確認されている。腎臓抽出物中の成分を高速液体クロマトグラフィーで解析した結果、雄に特異的と見られるピークが分画分子量3000以下と3000以上の試料で確認された。そこで、腎臓抽出物を限外濾過により分子量3,000で分画したものを刺激液として誘引実験を行った。その結果、分子量3,000以上の分画に雌誘引効果が認められた。本種に近縁のイトヨのスピギンの分子量は203kDaとされていることから、スピギンそのものが雌誘引物質である可能性がある。そこで、雄が植物片を固めて作った巣を入れた水槽の水を刺激液として誘引実験を行った。その結果、雌は巣の入った水に誘引された。以上の結果から、スピギンそのものが雌を誘引すると考えられた。トゲウオ目魚類は本来、雄の腎臓で雌誘引物質を産生する営巣繁殖を行っており、この誘引物質が巣作りの進化に伴って接着剤としての機能を進化させたと推察される。

繁殖期に向けた雄の腎臓肥大と精巣発達との関係を明らかにするために、腎臓組織と精巣組織の周年変化を調べた。その結果、本種の精子形成は繁殖期を終えた直後から開始しており、繁殖開始の半年前（10月）にはほぼ完了させていた。腎臓は繁殖期中に著しく肥大し、集合管の上皮が肥厚するとともに、PAS染色で陽性を示したことから、繁殖期中にスピギン産生が活発化することが示された。腎臓肥大と精巣発達に対する雄性ホルモン（11KT）の関わりを明らかにするために、血中の11KT濃度の周年変化を調べた結果、精子形成期（9-10月）には低値で推移し、腎臓肥大期（3-5月）に高値をとった。このことから、11KTは主に腎臓を刺激してスピギンの産生を促すが、精子形成には直接関わっていないことが示唆された。本種の精子形成の内分泌制御は一般の魚類の場合とは異なる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9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 Gen Ito, Yasunori Koya	4. 巻 24
2. 論文標題 Phylogeographic structure of an endemic lineage of the eight-barbel loach <i>Lefua echigonia</i> around the Suzuka and Yoro Mountains, central Honshu, Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biogeography	6. 最初と最後の頁 39-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11358/biogeography.24.39	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・小山直人・川瀬成吾・古屋康則	4. 巻 44
2. 論文標題 大阪府淀川水系における国内外来ミナミアカヒレタビラの確認と遺伝的特徴	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 地域自然史と保全	6. 最初と最後の頁 45-50
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 Hiroyuki Munehara, Kouji Togashi, Sayuri Yamada, Takushi Higashimura, Aya Yamazaki, Shota Suzuki, Takuzo Abe, Satoshi Awata, Yasunori Koya, Osamu Tsuruoka	4. 巻 70
2. 論文標題 <i>Rhamphocottus nagaakii</i> (Cottoidea: Rhamphocottidae), a new species of grunt sculpin from the northwestern Pacific, with notes on the phylogeography of the genus <i>Rhamphocottus</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Ichthyological Research	6. 最初と最後の頁 268-285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10228-022-00885-y	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 Takeshi Ito, Masaya Morita, Kazuo Inaba, Kogiku Shiba, Hiroyuki Munehara, Yasunori Koya, Mitsuo Homma, Satoshi Awata	4. 巻 12
2. 論文標題 Fertilization modes and the evolution of sperm characteristics in marine fishes: paired comparisons of externally and internally fertilizing species	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ece3.9562	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 -

1. 著者名 伊藤 玄、北村 淳一、野口 亮太、長太 伸章、古屋 康則	4. 巻 68
2. 論文標題 三重県北勢地域における国内外来タビラ <i>Acheilognathus tabira</i> 類の確認と遺伝的特徴	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 魚類学雑誌	6. 最初と最後の頁 47～52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11369/jji.20-034	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、旗 薫、北村 淳一、古屋 康則	4. 巻 advpub
2. 論文標題 宮城県鳴瀬川水系における国内外来ヤリタナゴ <i>Tanakia lanceolata</i> の確認と遺伝的特徴	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 魚類学雑誌	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) 10.11369/jji.20-24	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 Awata Satoshi, Ito Takeshi, Crow Karen D., Koya Yasunori, Munehara Hiroyuki	4. 巻 100
2. 論文標題 The first record of egg masses in tunicates deposited by the snubnose sculpin, <i>Orthonopias triacis</i> , from the Northeastern Pacific: evidence for convergent evolution of an unusual reproductive strategy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Fish Biology	6. 最初と最後の頁 82～91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jfb.14920	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 該当する

1. 著者名 久保敦暉、伊藤 玄、野口亮太、北村淳一、古屋康則	4. 巻 76
2. 論文標題 三重県加茂川水系におけるやりタナゴ <i>Tanakia lanceolata</i> の初記録	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物地理学会会報	6. 最初と最後の頁 70～74
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 Kanio Michiya, Yambe Hidenobu, Fusetani Nobuhiro	4. 巻 88
2. 論文標題 Chemical cues for intraspecific chemical communication and interspecific interactions in aquatic environments: applications for fisheries and aquaculture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 203 ~ 239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-021-01563-0	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, Morishita Ryotaro, Ito Gen	4. 巻 -
2. 論文標題 Process of gametogenesis in golden venus chub, <i>Hemigrammocypripis neglecta</i> (Cyprinidae), with special regard to the comparison in initiation pattern of gametogenesis with other cyprinids	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Ichthyological Research	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/s10228-024-00949-1	査読の有無 無
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 Kondo Yuki, Kohda Masanori, Koya Yasunori, Awata Satoshi	4. 巻 202
2. 論文標題 Sperm allocation in relation to male-male aggression and courtship in an externally fertilizing fish, the medaka	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Animal Behaviour	6. 最初と最後の頁 9 ~ 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anbehav.2023.05.011	査読の有無 無
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17件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 伊藤玄・古屋康則
2. 発表標題 鈴鹿山脈の低標高地帯に着目した損斐川・琵琶湖水系間における河川争奪の検証
3. 学会等名 第56回日本魚類学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤湧生・児玉恵弥・安房田智司・古屋康則
2. 発表標題 ミナミメダカの雌は雄の配偶行動を誘発するフェロモンを放出しているのか？
3. 学会等名 第56回日本魚類学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長屋美希・山家秀信・古屋康則
2. 発表標題 トミヨ類の雄の腎臓から分泌・放出される巣材接着成分による雌の誘引性について
3. 学会等名 第56回日本魚類学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 若園彩花・古屋康則
2. 発表標題 ミナミメダカの繁殖で同時放精スニーキングを行う雄の行動の特徴
3. 学会等名 第56回日本魚類学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長屋美希・山家秀信・古屋康則
2. 発表標題 トゲウオ科の特異な精子形成過程
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤玄、小山直人、野口亮太、田畑諒一、川瀬成吾、北村淳一、古屋康則
2. 発表標題 シロヒレタビラの遺伝的集団構造
3. 学会等名 第55回日本魚類学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 草留大岳、古屋康則
2. 発表標題 アブラボテの雌の産卵生態 - 産卵周期に着目して
3. 学会等名 第55回日本魚類学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部勝徳、鬼倉徳雄、加納光樹、桑原正樹、古屋康則、杉山秀樹、東信行、曾我部篤
2. 発表標題 耳石Sr/Ca比分析によるクルマサヨリの回遊履歴推定
3. 学会等名 第55回日本魚類学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 若園 彩花、古屋 康則
2. 発表標題 ミナミメダカにおける雄間の優劣と交配をめぐる立場の関係
3. 学会等名 第92回日本動物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古屋康則、森下凌太郎、伊藤玄
2. 発表標題 カワバタモロコの生殖年周期
3. 学会等名 第57回日本魚類学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 沖 天斗、石原優一、安房田智司、伊藤 岳、古屋 康則、野原 健司
2. 発表標題 浅海性カジカ科魚類アサヒアナハゼの系統分化と種内交雑
3. 学会等名 第57回日本魚類学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長屋美希、中西陽人、舟崎大翔、古屋康則
2. 発表標題 営巣しているカワヨシノボリの雄は雌を巣まで化学的に誘引するか？
3. 学会等名 第57回日本魚類学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長屋 美希、山家 秀信、古屋 康則
2. 発表標題 トゲウオ科のオスが分泌する巣材接着物質はメスを誘引するか？
3. 学会等名 令和5年度日本動物学会中部支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丸山 司、古屋 康則
2. 発表標題 メダカの排卵雌の尿には雄の求愛円舞を誘起する物質が含まれている？
3. 学会等名 令和5年度日本動物学会中部支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 舟崎大翔、長屋美希、古屋康則
2. 発表標題 繁殖期のカワヨシノボリの雄は腎臓で産生される物質で排卵雌を誘引する
3. 学会等名 令和5年度日本動物学会中部支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Miki NAGAYA; Hidenobu YASMBE; Yasunori KOYA
2. 発表標題 Does nest-building glue secreted by the kidney of male stickleback attract females?
3. 学会等名 11th Indo-Pacific Fish Conference and Annual Conference of the Australian Society for Fish Biology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yasunori KOYA; Miki NAGAYA
2. 発表標題 Males of nest-spawn fish lure females using attractants produced by their kidney
3. 学会等名 11th Indo-Pacific Fish Conference and Annual Conference of the Australian Society for Fish Biology, (国際学会)
4. 発表年 2023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	山家 秀信 (Yambe Hidenobu) (40423743)	東京農業大学・生物産業学部・准教授 (32658)	

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
---------	---------