

クモハゼのネストホルダー雄による産卵前精子塗り付け行動

中西 絢子, 金谷 洋佑, 竹垣 毅

Prespawning sperm release behavior by the nest-holding males of dusky frillgoby *Bathygobius fuscus*

Ayako NAKANISHI, Yosuke KANATANI and Takeshi TAKEGAKI

Prespawning sperm release on the nest substrate by the nest-holding males of the dusky frillgoby *Bathygobius fuscus* was investigated in the tank. The nest-holding males repeatedly rubbed their genital papillae on the inner surface of the nests from before female egg-laying through the end of the spawning. Moreover, many sperm were confirmed in the sea water sampled from inside of the nests before spawning. These results indicate that nest-holding males of this species lay sperm with the secretion of the sperm duct glands on the nest substrate even before spawning, as known in some other gobies. The unique fertilization process of this species may be adaptive for the nest-holding males as a counter-tactic against males with sneak fertilization tactic.

Key words : 代替繁殖戦術 alternative reproductive tactics, 受精様式 fertilization mode, ハゼ科 Gobiidae, 精子競争 sperm competition, スニーキング sneaking, 精巣付属器官 sperm duct gland

魚類の多くは体外受精を行い、産卵の際に雌と雄が近接して放卵と放精を同時あるいは放卵直後に放精するのが一般的である。これは、媒介する水の影響で配偶子が拡散しやすいことと関係していると考えられている。^{1, 2)} しかし、いくつかの種では、雌雄の配偶子が非同時的に放出されることが知られている。例えば、二枚貝の鰓に産卵するバラタナゴ *Rhodeus urehztws* では、雄が雌を巣に誘導する間に他の雄が先に巣内に放精する。³⁾ このような雄の寄生的な代替繁殖戦術「スニーキング戦術」は、体外受精種の多い魚類で一般的であり、^{4, 5)} 他の戦術を採用する雄との間に受精を巡る精子競争をもたらす。

雄がスニーキング戦術を採用する数種のハゼ科魚類では、産卵巣を占有して雌とペア産卵を行うなわばり雄が、雌の産卵前に精子を巣に塗り付ける「産卵前精子塗り付け行動」を行うことが報告されている。^{6, 7)} なわばり雄は、雌の産卵開始前から、体を左右に動かしながら生殖突起を巣内の基質表面に擦り付ける。⁶⁻¹¹⁾ この行動によって精子を含む粘性物質が基質表面に塗り付けられ、その粘性物質が徐々に海水に溶

けて精子が海水中に放出されて活性化し、後から産み付けられた卵に受精する。^{6, 7)} この粘性物質を生産する精巣付属器官は特になわばり雄で大きく発達している。^{7, 12)} なわばり雄は、この産卵前精子塗り付け行動によって、スニーカー雄よりも先に自身の精子を卵に受精できる可能性が高くなるほか、数時間続く雌の産卵中に放精のために常に雌の側にいる必要がなく、スニーカー雄の巣への侵入を妨げる防衛行動に多くの時間を投資できると考えられている。^{6, 12)} そのため、なわばり雄の産卵前精子塗り付け行動はスニーキング戦術への対抗戦術として機能していると考えられている。

本研究の対象魚であるクモハゼ *Bathygobius fuscus* は、全長10cm程度になるハゼ科魚類で、インド洋から太平洋、国内では能登半島から九州南岸の日本海・東シナ海沿岸、千葉以南から琉球列島に至る太平洋沿岸の岩礁性海岸やサンゴ礁域の潮間帯および河口付近の汽水域に生息する。¹³⁾ 本研究の供試魚の採集場所である長崎県南部における繁殖期は6月上旬から9月中旬である。¹⁴⁾ 本種は、繁殖期になると雄が岩の下や割れ目などに営巣して求愛し、そこに複数の雌が訪

れて産卵する「なわばり訪問型複婚¹⁵⁾」と呼ばれる配偶システムを持つ。¹⁶⁾ 卵は沈性の付着卵であり、巣の内壁表面に一層に産み付けられる。ペア産卵は、水槽実験下で約4時間(最長11時間; 金谷, 未発表データ), 野外で3時間以上続くことが確認されている。¹⁴⁾ 産卵後, 雄は卵に酸素を供給するためのファニング行動や口で卵に付着したゴミを除去するマウシング行動, 巣に近づく卵捕食者を追い払うなどの卵保護を行う。¹⁶⁾ このような一連の繁殖行動をネストホルディング戦術と呼び, この戦術を採用する比較的大型の雄をネストホルダー雄と呼ぶ (Fig. 1a)。¹⁶⁾ 一方で, 比較的小型の雄は産卵巣周辺に定位し, ペア産卵中に巣内に侵入して放精のみを行うスニーキング戦術を採用する (Fig. 1b, d)。¹⁶⁾ 精子塗り付けを行う他のハゼ類と同様に, 本種のネストホルダー雄にも大型の精巣付属器官が見られるほか (Fig. 1c), 産卵前に生殖突起を産卵基質に擦り付ける精子塗り付けのような行動が水槽内で観察されている。しかしながら, 実際に精子を塗り付けているかどうかは本種では確認されていない。本研究では, クモハゼのネストホルダー雄が雌の産卵前に巣に精子を塗り付けている可能性を検証した。

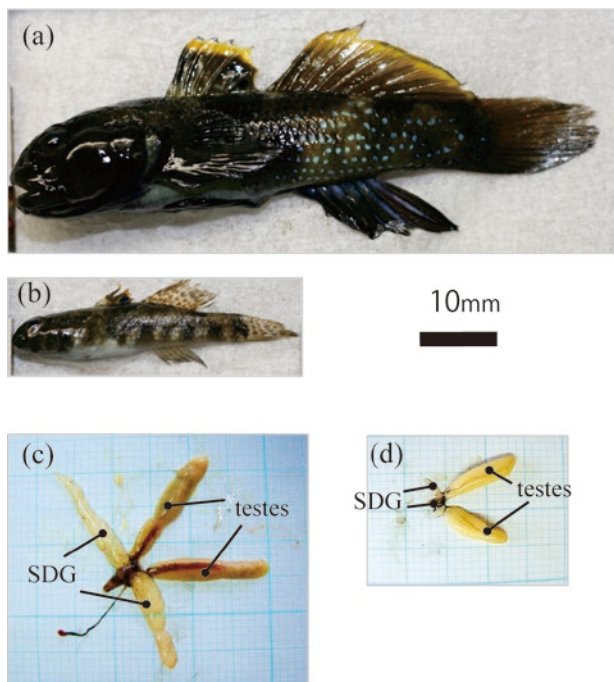


Fig. 1 (a) *Bathygobius fuscus* nest-holding male and (b) sneaker male. Testes and sperm duct glands (SDG) removed from (c) nest-holding male and (d) sneaker male.

方法

ネストホルダー雄による産卵前の精子塗り付けを確認するため, 2014年と2015年の繁殖期間中に水槽内で実験を行った。実験に使用したクモハゼは長崎県壱山町三重崎海岸(北緯32度48分, 東経129度44分)の潮間帯で本種の繁殖期である6月上旬から9月中旬の干潮時に採集した。性の判別は生

殖突起の形状によって行った。¹⁷⁾ すなわち, 生殖突起が長く細い形状の個体を雄, 短く扁平な個体を雌として実験に用い, 判別が困難な個体は使用しなかった。

実験には10基のガラス水槽(45cm×30cm×30cm)を用いた。水槽底面に底質として砂を約2cmの深さまで敷き詰め, 産卵巣として素焼きの植木鉢(3号: 外径9.5cm×高さ8.5cm)を設置した。水槽側面から巣内の行動をデジタルビデオカメラ(HC-W850, Panasonic)で撮影するために, 植木鉢の上部開口部を水槽壁面に固定した。海水中の精子を確認するために, 巣内水採水用に産卵巣の底面から水槽外まで透明なシリコンチューブ(外径: 5mm, 内径: 3mm)を設置した。飼育水には人工海水(MARINE ART Hi, 富田製薬株式会社)を用いて循環濾過した。塩分は30-33‰に, 水温は22-28℃に調整・維持した。採集したクモハゼを一時的に収容するためのストック水槽(ガラス水槽: 60cm×30cm×30cm)も, 実験水槽と同様の条件とした。供試魚には餌として冷凍アルテミア(クリーンブラインシュリンプ, キョーリン)を1日1回十分量与えた。光条件は明: 暗=14: 10とした。

比較的大型の雄(全長65.7-78.2mm)を各水槽に1個体ずつ収容し, 営巣させてネストホルダー雄とした。その後, 抱卵雌(42.0-65.3mm)1個体を水槽内に導入し, ペア産卵させた。雌を導入した時点, すなわち産卵前から産卵終了まで, 30分間隔で産卵巣に取り付けたチューブからシリンジを用いて巣内海水を50mlずつ採水した。雌が産卵に応じなかった場合についても, 産卵前にネストホルダー雄が精子を塗り付けるような行動を示したため, 産卵した場合と同様の方法で雌導入時と30分後に採水を行った。

海水中の精子数の計数は先行研究¹⁸⁾の手法に従った。採取した海水サンプルを0.04mlの2%ローズベンガル染色液で染色し, 10mlの10%ホルマリンで固定した後に吸引濾過(MF-ミリポア: 孔径0.22μm×直径25mm, メルクミリポア)を行った。濾過後のフィルターを乾燥器で40℃で24時間乾燥させ, イマージョンオイルを数滴滴下してフィルターを透明化させた後, 生物顕微鏡下(ECLIPSE Ci-S, Nikon)で観察した(倍率400倍)。各フィルター上のランダムに選んだ4ヶ所で視野内に観察された精子を計数し, 4ヶ所の平均値からフィルター上の精子数を計算して精子濃度を求めた。1ヶ所(視野)の面積は, レンズの視野数と倍率から求めた。実験終了後, ネストホルダー雄は致死濃度のキナルジン溶液(1250ppm)で安楽死させ, 全長と体重を測定後, 解剖して精巣重量と精巣付属器官重量を測定した。長さはノギスを用いて0.05mmの精度で, 重量は電子天秤を用いて0.0001gの精度で測定した。

水槽側面から撮影した巣内の映像から, 雌が産卵を開始するまでにネストホルダー雄が精子塗り付け行動に費やす時間を記録した。また, 産卵開始後も雄が精子塗り付け行動を行うかについても確認した。なお, 本研究では, 他のハゼ科魚類で報告されている研究と同様に, 雄が生殖突起を巣内壁の表面に擦り付ける行動を精子塗り付け行動とみなした。

結果

ペア産卵が確認された9例全てでネストホルダー雄が産卵前に精子を塗り付ける行動が観察された (Fig.2; <http://www.momo-p.com/index.php?movieid=momo161222bf01b&embed=on>)。雌が入巢するまでに要した時間は雌を導入後14-68分間 (平均35.4分間) であった。塗り付け行動は雌の産卵が始まる最大60分前から雌が入巢するまで繰り返し観察され、それに費やした時間は1分あたり平均4.06秒 (SD = 2.56秒) であった。

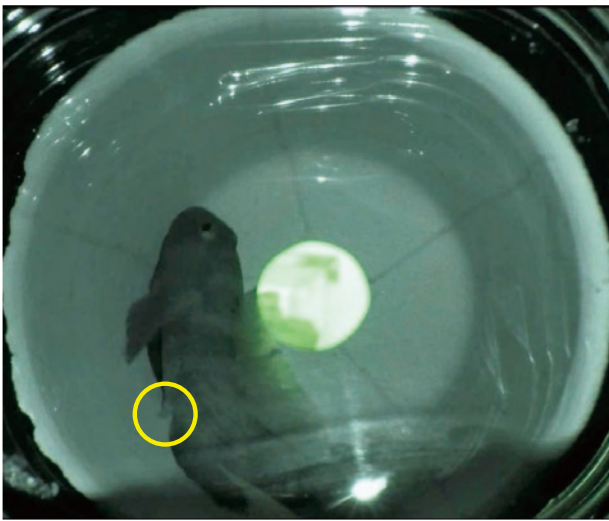


Fig. 2 A nest holding-male rubbing his genital papillae on the inner surface of the artificial nest before spawning (a depth side of the nest is shown in the front of this photo). A yellow circle indicates a male genital papillae. The video is available on the web site of Movie Archives of Animal Behavior (<http://www.momo-p.com/index.php?movieid=momo161222bf01b&embed=on>).

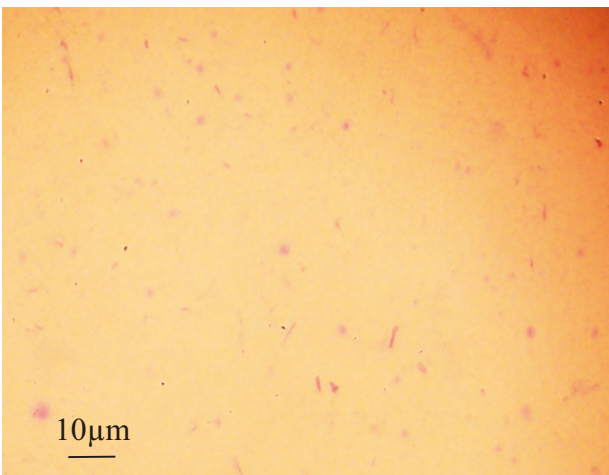


Fig. 3 Sperm observed on the filter paper which had been sampled from sea water after the prespawning sperm-laying behavior (400×). Sperm head stained red with rose bengal.

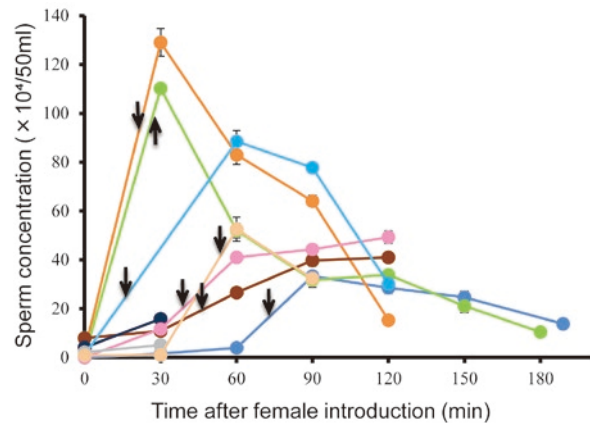


Fig. 4 Changes in the sperm concentration in the nest water from female introduction to the end of spawning (n=9 males). Arrows indicate the timing of the start of female egg-laying. Error bars show SE.

9例全ての巣内海水サンプルから精子が確認された (Fig. 3, 4)。雌が産卵した7例のうち5例で、雌の産卵開始後最初の測定時に最も精子濃度が高かった (Fig. 4)。さらに、ペア産卵を行った7例中4例 (残りの3例では最初の採水前に産卵が始まった) と、産卵が行われずに塗り付けのみが行われた2例の計6例で、雌が産卵していないのにも関わらず巣内海水中に精子が存在するのが確認された (Fig. 4)。

考察

本研究の水槽観察において、全てのネストホルダー雄が産卵前に産卵巣内壁表面に生殖突起を擦り付ける行動が観察された。この行動は、他のハゼ科魚類で報告されている精子塗り付け行動^{6, 7, 11)}に極めて類似している。また、雌がまだ産卵を始めていない巣内の海水中から数多くの精子が確認された。精子は粘液に混合された状態で塗り付けられるが、^{6, 7, 9)}その粘液を生産するための精巣付属器官が、本種においてもネストホルダー雄で大型化することが分かっている。^{14, 19)}これらのことから、クモハゼのネストホルダー雄も産卵前に巣内で精子塗り付けを行っていると考えられた。

ハゼ科魚類の1種 *Pomatoschistus minutus* で、スニーカー雄が産卵前の巣内に侵入するのが観察され、その後にその巣に産み付けられた卵塊中にそのスニーカー雄の父性が確認されている。²⁰⁾このことから、*P. minutus* ではスニーカー雄も産卵前の巣に精子を塗り付けている可能性が示唆されている。クモハゼのスニーカー雄でもネストホルダー雄と同様に精子を塗り付けている行動が映像で報告されている (<http://www.momo-p.com/index.php?movieid=momo161222bf01b&embed=on>)。スニーカー雄は、産卵中の巣内に侵入した際に生殖突起を巣内表面に擦り付けており、さらにその擦り付けた箇所に精液と思われる白色の物質が付着しているのが確認できた。この精液と思われる物質は数秒で海水中に分散して見えなくなった。本研究におけるネストホル

ダー雄の観察では、このような物質は肉眼では観察されなかった。しかし、塗り付け行動そのものは両戦術雄に違いは見られなかったことから、スニーカー雄で観察された精子塗り付け行動は、ネストホルダー雄が精子塗り付け行動を行っているという本研究の結果を強く支持するものである。ネストホルダー雄が塗り付け行動を行った際には精液が観察されなかったことから、スニーカー雄の1回の放精量はネストホルダー雄に比べて多い可能性が考えられる。

本種のネストホルダー雄による精子塗り付け行動は、雌の産卵が始まる60分前から産卵終了まで繰り返し観察された。ネストホルダー雄は産卵前から巣に精子を塗り付け、巣内海水中に精子を滞留させることによって、雌が産み付ける卵にいち早く受精させることができると思われる。また、数時間に亘って続く雌の産卵中に、ネストホルダー雄は雌の側に定位して放精する必要がなく、巣への侵入を試みようとするスニーカー雄に対する防衛に多くの時間を費やせると考えられる。実際に、本種のネストホルダー雄は雌が産卵中は巣の入口から顔を外に向けて定位していることがほとんどで、その体勢から巣に近づくスニーカー雄を激しく追い払っている。

ネストホルダー雄は産卵前だけでなく産卵中も精子塗り付け行動を継続していた。粘性物質と一緒に塗り付けられた精子は水中に溶け出して初めて活性化するとされているが、⁹⁾数時間に亘って産み続けられる卵を受精させ続けるには産卵前に塗り付けた精子だけでは十分ではないと思われる。また、産卵中にスニーカー雄にスニッキングされた場合にも受精を巡る争いに有利になるように、ネストホルダー雄は塗り付け行動を継続して常に巣内の精子濃度を高く保っていると考えられる。

本研究の結果から、クモハゼのネストホルダー雄は、数種のはぜ科魚類と同様に、産卵前に巣内の基質表面に精子を塗り付けていると考えられた。この特殊な受精様式を明らかにしたことは、魚類の受精様式に関する貴重な知見となるだけでなく、本種雄の繁殖戦術の進化や戦術間の精子競争を理解する上で不可欠な極めて重要な情報である。

謝 辞

本研究を行うにあたり、様々な御協力・御指導を頂きました。向 草世香博士、竹下文雄博士、高橋宏司博士、進化・行動生態学研究室の永瀬翔一氏、迎 佳織氏、大朝 葵氏に感謝の意を表して、厚く御礼を申し上げます。また、野外での採集に深いご理解を頂いた新三重漁業共同組合、ならびに周辺住民の方々に厚く御礼を申し上げます。本研究の一部は平成27年度笹川科学研究助成により行われました。なお、本研究は長崎大学水産学部魚類実験要項に従って実施された(承認番号 NF-0008号)

引用文献

- 1) Levitan DR, Sewell MA, Chia FS. How distribution and abundance influence fertilization success in the sea urchin *Strongylocentotus franciscanus*. *Ecology* 1992; **73**: 248-254.
- 2) Oliver J, Babcock R. Aspects of the fertilization ecology of broadcast spawning corals: sperm dilution effects and in situ measurements of fertilization. *Biol. Bull.* 1992; **183**: 409-417.
- 3) Kanoh Y. Preoviposition ejaculation in externally fertilizing fish: how sneaker male rose bitterlings contrive to mate. *Ethology* 1996; **102**: 883-899.
- 4) Taborsky M. Alternative reproductive tactics in fish. In: Oliveira R, Taborsky M, Brockmann HJ (eds). *Alternative Reproductive Tactics*. Cambridge University Press, Cambridge. 2008; 251-299.
- 5) Taborsky M. Sperm competition in fish: bourgeois male and parasitic spawning. *Trends Ecol. Evol.* 1998; **13**: 222-227.
- 6) Marconato A, Rasotto MB, Mazzoldi C. On the mechanism of sperm release in three gobiid fishes (Teleostei: Gobiidae). *Environ. Biol. Fish.* 1996; **46**: 321-327.
- 7) Ota D, Marchesan M, Ferrero EA. Sperm release behaviour and fertilization in the grass goby. *J. Fish Biol.* 1996; **49**: 246-256.
- 8) Hidaka T, Takahashi S. Reproductive strategy and interspecific competition in the lake-living gobiid fish Isaza, *Chaenogobius isaza*. *J. Ethol.* 1987; **5**: 185-196.
- 9) Tavolga WN. Reproductive behavior in the gobiid fish *Bathygobius soporator*. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 1954; **104**: 431-459.
- 10) Zerunian S, D'onofrio E, Gibertini G. The biology of *Gobius nigricans* (Osteichthyes, Gobiidae). I. Observations on the reproductive behaviour. *Ital. J. Zool.* 1988; **55**: 293-298.
- 11) Mashiko K. Reproductive behaviour of an eleotrid goby *Odontobutis obscurus* in aquaria. *Jap. J. Ichthyol.* 1976; **23**: 69-78.
- 12) Scaggiante M, Mazzoldi C, Petersen CW, Rasotto MB. Sperm competition and mode of fertilization in the grass goby *Zosterisessor ophiocephalus* (Teleostei: Gobiidae). *J. Exp. Zool.* 1999; **283**: 81-90.
- 13) 明仁, 坂本勝一, 池田祐二, 藍澤正宏. はぜ科. 「日本産魚類検索 全種の同定 第3版II」(中坊徹次編) 東海大学出版会, 秦野. 2013; 1447.
- 14) Takegaki T, Kaneko T, Matsumoto Y. Large-and small-size advantages in sneaking behaviour in the dusky frillgoby *Bathygobius fuscus*. *Naturwissenschaften* 2012; **99**: 285-289.

- 15) 桑村哲生. 魚類の繁殖戦略入門. 「魚類の繁殖戦略 1」(桑村哲生・中嶋康裕編) 海游舎, 東京. 1996; 1-41.
- 16) Taru M, Kanda T, Sunobe T. Alternative mating tactics of gobiid fish *Bathygobius fuscus*. *J. Ethol.* 2002; **20**: 9-12.
- 17) 道津善衛. クモハゼの生活史. 九州大学農学部学芸雑誌 1955; **15**: 77-86.
- 18) Leong, RJH. Sperm concentrations and egg fertilization rates during spawning of captive anchovy, *Engraulis mordax*. *Calif. Coop. Oceanic. Fish. Invest. Rep.* 1989; **30**: 136-139.
- 19) Takegaki T, Kaneko T, Matsumoto Y. Tactic changes in dusky frillgoby *Bathygobius fuscus* sneaker males: effects of body size and nest availability. *J. Fish Biol.* 2013; **82**: 475-491.
- 20) Svensson O, Kvarnemo C. Parasitic spawning in sand gobies: an experimental assessment of nest-opening size, sneaker male cues, paternity, and filial cannibalism. *Behav. Ecol.* 2007; **18**: 410-419.