

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06318

研究課題名(和文)下垂体後葉ホルモン-受容体系に焦点を当てた求愛行動制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) A study of the mechanism of expression of newt courtship behavior regulated by neurohypophyseal hormone and its receptors

研究代表者

蓮沼 至 (HASUNUMA, Itaru)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：40434261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：雄アカハライモリは繁殖期に雌に対して特徴的な求愛行動を示す。この求愛行動は、プロラクチンとアンドロゲンがアルギニンバソトシンニューロンを介して制御されることが示唆されていたが、本研究により、アンドロゲンは間脳視索前野でAVT前駆体遺伝子発現を高める効果があることが明らかとなった。また、AVTがイモリ脳内のどのAVT受容体サブタイプを介して求愛行動を制御するかを明らかにするべく、哺乳類アルギニンバソプレシン受容体のアンタゴニストおよびアゴニストのイモリAVT受容体サブタイプへの効果を検証し、ある一つのアゴニストが求愛行動に関わる受容体の特定に貢献する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はアカハライモリの雄の求愛行動をモデルとして、その行動発現のホルモン制御のメカニズムの解明につながる成果をあげている。アルギニンバソプレシン(AVP)/アルギニンバソトシン(AVT)の中枢神経系への作用メカニズムについて進化的側面からも学術的意義がある。また、AVPは哺乳類の社会行動制御に関わるホルモンとしても注目されており、本成果は脊椎動物のうち両生類における一つのモデルとしてAVP/AVTの社会行動制御への考察に対し貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：During the breeding season, the male newt *Cynops pyrrhogaster* exhibits a specific courtship behavior toward the female of its species. Prolactin, androgen, and arginine vasotocin (AVT) are involved in the expression of the tail vibration behavior, the initial step of the courtship behavior. In this study, we found that androgen stimulates the AVT precursor gene expression in the preoptic area of male newt.

In the male newt brain, four types of AVT receptors and mesotocin receptor are expressed. The potential receptor subtype involved in the regulation of courtship behavior is V1a-type receptor. However, this has not been demonstrated experimentally. In the present study, we found that one of the arginine vasopressin receptor agonists could stimulate newt V1a-type receptor. This result may contribute to the identification of AVT receptor subtypes involved in the expression of male newt tail vibration behavior.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：アルギニンバソトシン アルギニンバソトシン受容体 求愛行動 プロラクチン アンドロゲン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 有尾両生類アカハライモリの雄は、繁殖期に雌に対して特徴的な求愛行動を示す。これまで、求愛行動を制御する内分泌要因として下垂体前葉ホルモンであるプロラクチン (PRL)、性ステロイドホルモンのアンドロゲン、下垂体後葉ホルモンであるアルギニンバソトシン (AVT)、およびニューロステロイドである  $7\alpha$ -ヒドロキシプレグネノロンの関与が報告されていたが、近年の研究により、PRL とアンドロゲンは AVT 産生ニューロンまたは AVT 受容体発現に何らかの作用を及ぼし、求愛行動発現に関与する可能性が高まった (文献 1)。繁殖期イモリ雄の脳内に PRL の機能を阻害する抗イモリ PRL 受容体抗体やアンドロゲン受容体のアンタゴニストであるフルタミドを投与した場合、それぞれ雄の求愛行動の発現は抑制される。しかし、これらの求愛行動の発現抑制は、AVT の投与によって回復する。一方で、哺乳類のアルギニンバソプレシン (AVP) V1a 受容体のアンタゴニスト (Manning compound) を投与した場合も求愛行動の発現は抑制されるが、PRL やアンドロゲンの投与によって求愛行動の発現は回復しない。また、間脳視索前野の AVT 産生ニューロンには PRL 受容体やアンドロゲン受容体が発現していることから、上述の説が有力となった。しかし、PRL とアンドロゲンが AVT 産生ニューロンにおける AVT 前駆体遺伝子の発現を高めたり、または AVT の放出を高める確度の高いデータは得られていなかった。

(2) イモリ求愛行動の発現に関わる AVT 受容体の候補として V1a タイプ受容体が挙げられる。その理由として、求愛行動発現の制御に重要と考えられる間脳視索前野や延髄の第 8 脳神経根近傍に存在し、求愛行動のキーとなる尾を振る行動を制御するとされるマウスナー細胞に同受容体が発現していることが挙げられる (文献 2)。しかし、イモリ脳内には V1a タイプ受容体も含めて 4 種類の AVT 受容体サブタイプが発現していることを確認していた。さらに、AVT と同様に下垂体後葉ホルモンであるメソトシン (MT) の受容体は、MT と同程度の濃度 AVT により活性化されることが明らかにされた。よって、MT 受容体も AVT を受容する受容体の一つと考えることができる。この MT 受容体もイモリ脳内に発現するため、MT 受容体も考慮することが必要である。

### 2. 研究の目的

本研究では、雄イモリの求愛行動制御に関わる AVT-AVT 受容体システムに対する PRL およびアンドロゲンの調節機構を明らかにするとともに、AVT-AVT 受容体システムに焦点を当て、求愛行動を制御する神経ネットワークを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 間脳視索前野における AVT 前駆体遺伝子発現におよぼす PRL とアンドロゲンの影響

繁殖期雄イモリについて下垂体前葉および精巣の除去手術を施した。これら個体を 4 群に分け、生理食塩水投与群、PRL 投与群 (ovine PRL 30  $\mu$ g)、 $5\alpha$ ジヒドロテストステロン (DHT) 投与群 (DHT 2.5  $\mu$ g)、PRL + DHT 投与群 (ovine PRL 30  $\mu$ g + DHT 2.5  $\mu$ g) を設けた。また、対照群として偽手術群を設け、生理食塩水を投与した。1 日おきに 2 週間ホルモンを腹腔に投与し、ホルモン投与最終日の翌日に MS222 による麻酔後、4% パラホルムアルデヒドにて灌流後に脳を採取し、ブアン固定液にて 4°C 一晚浸漬固定した。この組織をエタノール系列で脱水し、キシレンで透徹した後、パラフィンに包埋した。回転式マイクロトームを用いて切片を作製し、in situ hybridization により AVT 前駆体遺伝子の発現を解析した。陽性シグナルが検出された細胞数を ImageJ を用いてカウントした。

(2) レポータージーンアッセイを用いたイモリ AVT 受容体に対する哺乳類下垂体後葉ホルモン受容体アンタゴニスト / アゴニストの効果の検証

イモリ AVT V1a, V1b, V2a, V2b タイプ受容体および MT 受容体 cDNA が組み込まれた pF9A Flexi Vector およびレポータージーンとして pGL4.30 Vector または pGL4.29 Vector を HEK293 細胞にトランスフェクトし、種々の濃度の AVT と反応させ、各受容体の 50% 効果濃度を算出した。その後同様に調製した HEK293 細胞を用い、各受容体の 50% 効果濃度と同等の濃度の AVT と各種濃度の哺乳類下垂体後葉ホルモン受容体アンタゴニストを反応させ、AVT の応答性の抑制度合いを検証した。同アゴニストの検証については、やはり同様に調製した HEK293 細胞に種々の濃度のアゴニストを反応させ、各受容体の応答性を検証した。

(3) 抗イモリ AVT V1a タイプ受容体抗体を用いたイモリ脳内の AVT V1a タイプ受容体発現細胞の性質の検証

我々は以前、抗イモリ AVT V1a 受容体を特異的に認識する抗体を作製したが、免疫組織化学的手法で解析する際、ブアン固定による強い固定が必要であり、特殊な抗原賦活化処理が必要であったため、容易に染色ができる抗体の作出を目指した。イモリ AVT V1a タイプ受容体の C 末端の 22 残基からなるペプチドを合成し、これをモルモットに投与することで、抗イモリ AVT

V1a タイプ受容体血清を取得した。さらに、抗原ペプチドカラムを作製し、抗イモリ AVT V1a タイプ受容体抗体を精製した。抗体の特異性については AVT V1a タイプ受容体を強制発現させた COS7 細胞からタンパク質を抽出し、Western blot 解析にて検証した。この抗体を用い、免疫組織化学的手法により、イモリ脳内の AVT V1a タイプ受容体発現細胞を可視化した。さらに同細胞が神経細胞であるか、神経以外のグリア細胞等であるかを、神経細胞マーカーである NeuN、グリア細胞マーカーである GFAP を特異的に認識する抗体との二重蛍光免疫染色により検証した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 間脳視索前野における AVT 前駆体遺伝子発現におよぼす PRL とアンドロゲンの影響

本実験では、アンドロゲンとして DHT を使用した。DHT は一般にテストステロンよりも強いアンドロゲン作用を示し、なおかつ P450 アロマターゼによる芳香化を受けない (エストラジオールへと代謝されない) ため、純粋にアンドロゲンとしての機能を検証することができる。まず、偽手術群と生理食塩水投与群を比較すると、下垂体前葉および精巣除去によって間脳視索前野における AVT 前駆体 mRNA シグナル陽性細胞数は有意に減少することがわかった。さらに、PRL 投与群では有意差はないものの、生理食塩水投与群と比較すると増加傾向を示した。DHT 投与群では、生理食塩水投与群と比較して有意に増加することがわかった。PRL+DHT 投与群では有意差は得られなかったが、DHT 投与群と近い結果となった。本結果より、間脳視索前野での AVT 前駆体遺伝子発現には下垂体前葉および精巣からの因子が重要であることがわかった。以前我々は下垂体前葉および精巣除去した雄イモリの間脳を採取し、リアルタイム PCR にて AVT 前駆体遺伝子発現を解析するとこれら器官の除去により有意に発現が低くなる現象を捉えていたが、本結果はその結果を裏付けるものとなった。また、本研究では芳香化されない DHT を用いることで、AVT 前駆体遺伝子発現へのアンドロゲンの重要性が示された。本結果より、PRL の明確な AVT 前駆体遺伝子への効果は確認できなかった。

##### (2) レポータージーンアッセイを用いたイモリ AVT 受容体に対する哺乳類下垂体後葉ホルモン受容体アンタゴニスト/アゴニストの効果の検証

AVP V1a 受容体アンタゴニストである Manning compound は V1a, V1b, V2b タイプ受容体および MT 受容体に対して強い阻害効果を示した。各受容体に対する Manning compound の 50% 阻害濃度は約 10~200 nM であり、阻害効果は V1a タイプ受容体 < V2b タイプ受容体 < MT 受容体 < V1b タイプ受容体となった。特に V1b タイプ受容体への効果は高かった。また、AVPV1b 受容体アンタゴニストである SSR149415 は、Manning compound と同様に V1a, V1b, V2b タイプ受容体および MT 受容体に対して強い阻害効果を示した。各受容体に対する SSR149415 の 50% 阻害濃度は約 20~200 nM であり、阻害効果は V1a タイプ受容体 < V2b タイプ受容体 < V1b タイプ受容体 < MT 受容体となった。また、本研究ではその他に AVP V1a 受容体アンタゴニストである OPC21268 や V2a 受容体アンタゴニストの OPC31260 も使用したが、効果は限定的または非常に低いものだった。

AVPV1a 受容体アゴニストの (Phe2, Orn8)-Oxytocin を用いた場合、V1a タイプ受容体に対して比較的低濃度で効果を示し、50% 効果濃度は約 2 nM であった。また V2a 受容体アゴニストの Desmopressin は V2a タイプ受容体に対して効果を示し、50% 効果濃度は約 150 nM であった。

これら結果をまとめると、今回使用した哺乳類下垂体後葉ホルモンのアンタゴニストのうち Manning compound および SSR149415 は、イモリ脳に発現する V2a タイプ受容体以外の AVT 受容体 (MT 受容体も含む) の AVT によるシグナル伝達を強く阻害することが明らかとなった。一方で、特定のイモリ AVT 受容体サブタイプのみに対して阻害作用を示すアンタゴニストは見つけられなかった。一方で、アゴニストについては (Phe2, Orn8)-Oxytocin は V1a タイプ受容体に対して、Desmopressin は V2a タイプ受容体に対して比較的低濃度で応答することがわかった。アゴニストはアンタゴニストと比較して特定のサブタイプに対して効果を示すことが明らかとなった。

##### (3) 抗イモリ AVT V1a タイプ受容体抗体を用いたイモリ脳内の AVT V1a タイプ受容体発現細胞の性質の検証

作製した抗イモリ AVT V1a タイプ受容体抗体は、イモリ AVT V1a タイプ受容体を発現させた COS7 細胞から抽出したタンパク質をサンプルに用いた Western blot 解析にて約 46 kDa から 175 kDa にかけてスメア状の免疫陽性バンドを検出した。このバンドは同受容体を発現していない COS7 細胞では認められず、また抗原吸収抗体を用いた場合には消失することから本抗体はイモリ AVT V1a タイプ受容体を特異的に認識すると判断した。なお、スメア状になった理由としては糖鎖の付加や受容体同士の間接結合などが考えられた。本抗体および抗 NeuN 抗体および抗 GFAP 抗体を用いた二重蛍光免疫染色の結果、大脳の嗅球、内側、背側および外側外套、線条体、分界上床核、間脳視索前野、背側視床、背側および腹側視床下部、中脳の脚間核、視蓋、および延髄にて V1a タイプ受容体免疫陽性反応と NeuN 免疫陽性反応の共存が観察された。また、大脳側脳室、間脳第三脳室、中脳水道周囲、第四脳室周囲には V1a タイプ受容体免疫陽性反応と GFAP 免疫陽性反応の共存が観察された。これら結果より、イモリ脳内にて V1a タイプ受容体は脳の幅広い領域で神経細胞に発現しており、また、脳室周囲の細胞ではグリア細胞または上皮細胞でも発現していることが明らかになった。よって、AVT は V1a タイプ受容体を介して神経細胞に

作用するとともに、脳室周囲ではグリア細胞や上皮細胞に対しても何らかの作用を及ぼすものと考えられる。

#### (4) 総括

本研究より、雄アカハライモリ間脳視索前野において AVT 前駆体遺伝子に対してアンドロゲンがその発現を高める効果があることが明らかにされた。一方で、PRL には明確な AVT 前駆体遺伝子発現の促進効果は検出されなかった。我々は以前、下垂体前葉除去および精巣除去した雄イモリを用い、生理食塩水投与群、PRL 投与群、テストステロンプロピオネート (TP) 投与群、または PRL + TP 投与群を設定し、AVT 免疫陽性細胞および免疫陽性繊維の観察をした。すると、生理食塩水投与群では偽手術群個体で AVT 産生ニューロンの軸索途中に観察されるヘリング小体と思われる構造が消失するが、PRL + TP 投与個体ではその構造が観察された。よって、それら結果と本結果を総合的に考えると、アンドロゲンは AVT 前駆体遺伝子の転写調節を促進し、PRL は AVT 前駆体遺伝子からの翻訳や、AVT 成熟ペプチド生合成過程や、AVT 成熟ペプチドの軸索内の移送に関わる可能性がある。アカハライモリ AVT 前駆体遺伝子の 5' 上流域の約 1.7 kbp の塩基配列をクローニングしており、そこにアンドロゲン/グルココルチコイド受容体の応答配列のハーフサイトが複数存在することを確認している。実際に AVT 前駆体遺伝子のアンドロゲン受容体を介した転写調節をレポーター遺伝子アッセイで確認する必要がある。PRL の機能に関しては特にペプチドに焦点を当てた研究が今後必要になってくる。哺乳類では PRL はオキシトシンや AVP の放出に関わるとの報告もあるため (文献 3)、脳内の AVT 含量や血液中の濃度を精査することが求められる。

本研究により複数の AVP 受容体のアンタゴニスト/アゴニストのイモリ AVT 受容体サブタイプに対する効果に関する情報が得られた。これまでイモリの求愛行動の解析に Manning compound が使用されたが、脳内の V2a タイプ受容体以外の AVT 受容体サブタイプ (MT 受容体も含む) の機能が阻害された可能性があり、このアンタゴニストを用いた場合、AVT が誘起する求愛行動はどの受容体サブタイプかを特定することは難しいことが改めて浮き彫りとなった。一方、AVP 受容体アゴニストはアンタゴニストと比較すると受容体サブタイプに対する特異性が見られた。(Phe<sup>2</sup>, Orn<sup>8</sup>)-Oxytocin はイモリ求愛行動発現に関わる受容体特定に対し、強力なツールになり得ると考えられる。

また、本研究により、イモリ脳内の AVT V1a タイプ受容体を免疫組織化学的に検出可能な有用な抗体の作製に成功した。今後、求愛行動発現を制御する脳部位の特定時に大きく貢献すると考えられる。また本研究により、イモリ脳内の V1a タイプ受容体は神経細胞だけでなく、グリア様細胞にも発現することが明らかとなった。この結果は最近報告されたニワトリ脳内の V1a タイプ受容体の発現パターンと類似しており (文献 4)、AVT の脳内の機能について進化的側面からも今後議論が必要である。

#### 引用文献

1. Toyoda et al., (2015) Possible hormonal interaction for eliciting courtship behavior in the male newt, *Cynops pyrrhogaster*. Gen. Comp. Endocrinol. 224: 96–103
2. Hasunuma et al., (2010) Localization of three types of arginine vasotocin receptors in the brain and pituitary of the newt *Cynops pyrrhogaster*. Cell Tissue Res. 342: 437–457.
3. Vega et al., (2010) Prolactin promotes oxytocin and vasopressin release by activating neuronal oxide synthase in the supraoptic and paraventricular nuclei. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 299: R1701–R1708.
4. Selvam et al., (2015) Distribution of the vasotocin type 4 receptor throughout the brain of the chicken, *Gallus gallus*. 523: 335–358.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kikuyama, S., Hasunuma, I., Okada R.	4. 巻 524
2. 論文標題 Development of the hypothalamo-hypophyseal system in amphibians with special reference to metamorphosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 111143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mce.2020.111143	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 Kikuyama, S. Okada, R. Hasunuma, I. Nakada, T.	4. 巻 284
2. 論文標題 Some aspects of the hypothalamic and pituitary development, metamorphosis, and reproductive behavior as studied in amphibians	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 113212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygcen.2019.113212	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 Nakano Masaki, Hasunuma Itaru, Minagawa Atsuko, Iwamuro Shawichi, Yamamoto Kazutoshi, Kikuyama Sakae, Machida Takeo, Kobayasi Tetsuya	4. 巻 267
2. 論文標題 Possible involvement of thyrotropin-releasing hormone receptor 3 in the release of prolactin in the metamorphosing bullfrog larvae	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 36 ~ 44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygcen.2018.05.029	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11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 花岡尚輝、岩佐亜美、大和田孝祐、岩室祥一、菊山榮、蓮沼至
2. 発表標題 成体アカハライモリ間脳視索前野における増殖細胞の性質と分化運命
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蓮沼至、中野真樹、小林哲也、岩室祥一、山本和俊、菊山榮
2. 発表標題 ウシガエルを用いた研究から見えてきた両生類3型甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体の特性および機能
3. 学会等名 日本下垂体研究会 第34回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩佐亜美、大和田孝祐、岩室祥一、菊山榮、蓮沼至
2. 発表標題 成体アカハライモリ大脳における神経新生
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩佐亜美、大和田孝祐、岩室祥一、菊山榮、蓮沼至
2. 発表標題 成体アカハライモリ大脳における新生神経細胞の機能
3. 学会等名 第44回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新妻朱音、中島康人、岩室祥一、菊山榮、蓮沼至
2. 発表標題 アカハライモリメソトシン受容体のリガンド応答性に関する解析
3. 学会等名 日本動物学会関東支部 第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蓮沼至、中野真樹、岩室祥一、山本和俊、菊山榮、小林哲也
2. 発表標題 ウシガエル下垂体前葉のプロラクチン放出に関わる甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体の同定
3. 学会等名 第33回日本下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 葉山舜、渡辺智美、菊山榮、岩室祥一、蓮沼至
2. 発表標題 ウシガエル幼生甲状腺のサイロキシン放出におよぼすプロラクチンの影響
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島康人、小野慧、豊田ふみよ、岩室祥一、菊山榮、蓮沼至
2. 発表標題 アカハライモリメソトシン受容体のリガンド応答性の検証
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野真樹、岩室祥一、小林哲也、山本和俊、菊山榮、蓮沼至
2. 発表標題 アフリカツメガエル3型甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体 (TRHR3) の構造と機能性発現の検討
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田卓聡、須藤百合子、岩室祥一、菊山榮、蓮沼至
2. 発表標題 アカハライモリ新規プロラクチン受容体の機能および発現解析
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩佐亜美、大和田孝祐、岩室祥一、菊山榮、蓮沼至
2. 発表標題 成体アカハライモリ大脳における分裂細胞の分化運命の検証
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東邦大学理学部生体調節学研究室ホームページ  <a href="https://www.lab.toho-u.ac.jp/sci/bio/regl/">https://www.lab.toho-u.ac.jp/sci/bio/regl/</a></p>
---

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
研究協力者	山本 和俊  (YAMAMOTO Kazutoshi)		



6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	豊田 ふみよ  (TOYODA Fumiyo)		
研究協力者	中田 友明  (NAKADA Tomoaki)		

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