

平成21年 5月 29日現在

研究種目：基盤研究(C)(2)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570061

研究課題名（和文） フェロモン候補としてのイモリ腹腺ステロイドに関する研究

研究課題名（英文） A Female-attracting activity of steroidal substances in the male abdominal gland of the newt

研究代表者 豊田 ふみよ (FUMIYO TOYODA)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号 10244708

研究成果の概要：

雄イモリ腹部肛門腺のステロイド画分は雌誘引活性を有することを確認した。その成分である腹腺中プレグネノロンとアンドロステンダイオンの一部が腹腺の管腔内に生理的濃度で放出され、各々単独で雌イモリに対する誘引効果をもつことを示した。以前我々が明らかにした腹部肛門腺由来のペプチド性のフェロモン・ソデフリンの間には雌誘引活性に関して相乗効果が存在することから、両者は協調してフェロモンとして働くと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：形態・構造

キーワード：動物形態

1. 研究開始当初の背景

昆虫などでは、フェロモンに関して多くの研究が行われ、その単離や構造決定がなされた例も多い。一方、脊椎動物ではフェロモンの化学構造の決定まで進んでいる例は数少ない。特に哺乳動物では受容体候補がクローニングによって明らかにされていても、そのリガンドであるフェロモンの正体が明らかに

なっていなかった。このことが、フェロモン以外の匂い物質の受容機構が近年明らかにされつつある中で、フェロモン受容の研究が立ち遅れている原因となっている。我々は、1995年両生類で初の性フェロモン、脊椎動物で初めてのペプチド性のフェロモンを発見した(Kikuyama, S., Toyoda, F., Ohmiya, Y., Matsuda, K., Tanaka, S., and Hayash

i, H. Sodefrin: a female-attracting peptide pheromone in newt cloacal glands. *Science* 267:1643-1645, 1995)。このペプチド性のフェロモンは雄イモリ腹部肛門腺から分泌され、雌イモリの鋤鼻嗅覚器官に作用することにより雌を誘引する。これに触発されて、その後3種の両生類でペプチド、タンパク性のフェロモンが単離・同定されるに至った(Wabritz, P.A., Bowie, J.H., Tyler, M.J., Wallace, J.C. & Smith, B.P. Aquatic sex pheromone from a male tree frog. *Nature* 40: 444-445, 1999; Rollmann, S. M., Houck, L.D. & Feldhoff, R.C. Proteinaceous pheromone affecting female receptivity in a terrestrial salamander. *Science* 285: 1907-1909, 1999; Yamamoto, K., Kawai, Y., Hayashi, T., Ohe, Y., Hayashi, H., Kawahara, G., Toyoda F., Iwata, T. & Kikuyama, S. Silefrin, a sodefrin-like pheromone in the abdominal gland of the sword-tailed newt, *Cynops ensicauda*. *FEBS Lett.* 472: 267-270, 2000)。さらに昨年になって、マウスの雄涙腺より7kDaのペプチド性フェロモン物質が同定されるに至った(Kimoto, H., Haga, S., Sato, K. & Touhara, K. Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature* 437: 898-901, 2005)。最近我々は雄イモリ腹部肛門腺(腹腺)でプレグネノロン、プロゲステロン、アンドロステンダイオン、テストステロン、エストラジオールなどのステロイドが合成されること、そのうちのプレグネノロンとアンドロステンダイオンの一部は腹腺の管腔内に放出されることを見出した。先に述べたように、我々はイモリにペプチドフェロモンの存在を示したが、それに加えてステロイドフェロモンの存在の可能性が考えられる。魚類ではステロイド物質が異性の内分泌に影響することが知られており、両生類の場合でも同様の作用があるかどうかなど生理作用の解明が急務である。また、フェロモンとしての活性が確認されれば、従来のペプチドフェロモンとどのように関連して作用するかも明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究は、新たに見出されたステロイド物質がフェロモンとして(生理的な量で)作用するか、どの部位で受容されるか、また、すでに我々が明らかにした異なるタイプのステロイド性のフェロモンとの相互作用を追究することによりイモリにおけるフェロモンによる

生殖行動の発現調節を明らかにしようとするものである。

3. 研究の方法

性的に発達した雄イモリ腹腺を取り出し、培養液中でインキュベートし、培養液中に溶出したステロイド成分 HPLC を用いて測定することにより分泌量を推定する。各ステロイドが生理的分泌量で雌を誘引する効果を持つかどうかを、種々の量の合成ステロイドの用いた場合の結果から判定する。雌誘引ペプチドと雌誘引ステロイドの雌誘引効果について相乗あるいは相加効果が認められるのか、両者の腹部肛門腺からの生理的分泌量を基準とした時の有効量を比較し、どちらが主な誘引物質であるのかを推定する。誘引活性については従来の嗜好性テスト(Physiol. And Behav. (1994) 55:569-577)により調べた。

4. 研究成果

本研究では雄イモリ腹部肛門腺のステロイド画分の雌誘引有効量を確認した。その結果、1) 水100mlに腹部肛門腺100分の1個体分に含まれる量で雌誘引活性を持つようになることを確認した。2) その成分である、プレグネノロン、プロゲステロン、アンドロステンダイオン、テストステロン、エストラジオールの分泌量を調べた。腹腺のスライスをメディウム中に放置した後、メディウム中へ溶出したステロイド成分と組織中にステロイド成分の量を質量分析を行うことにより比較した。その結果、腹腺中プレグネノロンとアンドロステンダイオンの一部が腹腺の管腔内に放出されることを確認した。3) また、その分泌量はそれぞれの総含有量の約半分近くに相当することも確認した。一方、プロゲステロン、テストステロン、エストラジオールはメディウム中には検出されず、腹腺組織中に残ることが確認された。4) プレグネノロンとアンドロステンダイオンは、それぞれ単独で雌イモリに対する誘引効果をもつことを確認した。またその有効量をしらべたところ、ステロイド有効量と同様で腹腺約100分の1個体分に含まれる量に相当することを確認、5) 先に我々が単離・同定したペプチド性フェロモン“ソデフリン”の方がステロイドよりも雌誘引効果が強いが、6) プレグネノロンとアンドロステンダイオンをソデフリンと組み合わせるとソデフリン単独よりも強い雌誘引効果がみられることがわかった。このことからプレグネノロンとアンドロステンダイオンはソデフリンと同時に放出されることにより、ソデフリンの雌誘引効果を高める役割を果たすものと考えられた。

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 5 件)

1. Kikuyama, S., Hasunuma, I., Toyoda, F., Haraguchi, S., Tsutsui, K.. Hormone-mediated reproductive behavior in the newt. Ann. N. Y. Acad. Sci. in press. (2009) 査読有り。

2. Toyoda, F., Haraguchi, S., Matsunaga, M., Tsutsui, K., Nakada, T., et al. Female-attracting activity of steroids secreted by the abdominal gland of the male *Cynops pyrrhogaster*. J. Physiol. Sci. 58(Suppl.).S141(2009). 査読無し

3. Nakada, T., Toyoda, F., Iwata, T., Yamamoto, K., Conlon, JN., Kato, T. and Kikuyama, S. Isolation, characterization and bioactivity of region-specific pheromone, [Val⁸]sodefrin from the newt, *Cynops pyrrhogaster*. Peptides 28, 774-780. (2007) 査読有り。

4. Hasunuma, I., Sakai, I., Nakada, T., Toyoda, F., Namiki, H. and Kikuyama, S. Molecular cloning of three types of arginine vasotocin receptor in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. Gen. Comp. Endocrinol. 151, 252-258. (2007) 査読有り。

5. Nakada, T., Ishizuka, Y., Iwata, T., Toyoda, F., Kato, T. Conlon, JN and Kikuyama, S. Evidence for processing enzymes in the abdominal gland of the newt, *Cynops pyrrhogaster*. Zool. Sci. 24, 521-525 (2007) 査読有り。

[学会発表] (計 5 件)

1. 豊田ふみよ、蓮沼至、山本和俊、菊山榮 イモリ求愛行動発現に関するプロラクチンとアルギニンヴァソトシンの中枢作用 第 33 回日本比較内分泌学会大会 2008 年 12 月広島

2. 豊田ふみよ、蓮沼至、原口省吾、山本和俊、筒井和義、菊山榮 イモリ求愛行動発現に関するプロラクチン脳内作用機序。第 79 回日本動物学会大会 2008 年 9 月福岡

3. 蓮沼至、山本和俊、豊田ふみよ、並木秀男、菊山榮 イモリのアルギニンバソトシン

V3V1タイプ受容体の発現解析。第 78 回日本動物学会大会。2007 年 9 月弘前

4. 豊田ふみよ、原口省吾、松永昌宏、中田友明、筒井和義、菊山榮 ニューロステロイド 7 α -ヒドロプレグネロンは汚水森求愛行動発現に関与する。第 78 回日本動物学会大会。2007 年 9 月弘前

5. 中田友明、伊藤敦子、山岸公子、豊田ふみよ、長田俊哉、市川真澄、筒井和義、菊山榮 イモリの側鼻腔に発現する鋤鼻受容体と Gタンパク質。第 78 回日本動物学会大会。2007 年 9 月弘前

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊田 ふみよ (TOYODA FUMIYO)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号 10244708

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし

