

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440179

研究課題名(和文)イモリ性フェロモン情報処理機構の解明

研究課題名(英文)Stud of the receptive and processing system to newt pheromones

研究代表者

豊田 ふみよ (Toyoda, Fumiyo)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10244708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アカハライモリ雄腹腺由来の雌誘引ペプチド、ソデフリンは雄鋤鼻細胞に作用することを確認した。ソデフリン応答細胞はホルモンであるプロラクチンとエストラジオールにより増加した。雌鋤鼻細胞の投射先は副嗅球であった。雄腹腺由来の雌誘引ステロイドも雌誘引効果をもつこと、雌鋤鼻上皮の嗅電図応答を引き起こすことを確認した。これらの両方の効果においてソデフリンとの間に相乗効果があった。脊椎動物で初めて雄誘引活性を持つペプチド、アイモリンを雌卵管からの単離・同定した。その合成品も有効であった。アイモリンが性的に発達した雄鋤鼻細胞でのみ受容されることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Sodefrin, a male newt pheromone elevates Ca^{2+} in the female vomeronasal cells. The elevation of Ca^{2+} in response to sodefrin is sex- and hormone (i.e. prolactin and estradiol)-dependent. Two steroidal substances, pregnenolone and androstenedione excreted from the male abdominal gland were revealed to exert a female-attracting activity and a considerable electro-olfactogram response in the vomeronasal epithelium in the sexually developed females, synergistically with sodefrin. We found that a tripeptide is secreted by the ciliary cells in the epithelium of the proximal portion of the oviduct of sexually developed males and confirmed that this is the major active substance in water in which sexually developed female newts have been kept. This substance only attracted sexually developed male newts and acted by stimulating the vomeronasal epithelial cells. This is the first female sexual attractiveness peptide pheromone to be identified in a vertebrate.

研究分野：神経生理学

キーワード：フェロモン アカハライモリ プロラクチン 性ステロイド

1. 研究開始当初の背景

昆虫では、フェロモンに関して古くより多くの研究が行われ、その単離や構造決定が成された例も多い。それに比べ、脊椎動物ではフェロモンの構造決定まで進んでいる例は少ない。特に哺乳類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、リガンドであるフェロモンの実体の解明が遅れている。このことが、フェロモン以外の匂い物質の受容機構が次々と明らかにされる一方で、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。

申請者らは、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アカハライモリで発見、ソデフリンと命名した^{文献1)}。ソデフリンは雄イモリ腹部肛門腺から分泌され、主に雌イモリの鋤鼻嗅覚器官に作用して雌を誘引することを我々は確認した。ソデフリンの発見に触発され、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^{文献2,3)}。また、哺乳類でも、マウスの雄涙腺より約7kDaのペプチド性フェロモン物質が同定された^{文献4,5)}。一方、最近になって我々は雄イモリ腹部肛門腺で様々なステロイドが合成されること、そのうちのプレグネロンとアンドロステンダイオンが分泌され雌イモリに対して誘引効果をもつことを発見した。これらのステロイドはソデフリンと相乗的に働いて雌を誘引すること、またソデフリンと同様、雌イモリの鋤鼻嗅覚器官に作用して雌を誘引することがわかった。かつてクシイモリで糖タンパク抱合体として肛門腺に存在するステロイドがフェロモンとして働くという報告があったが物質的に完全に同定されるに至っていない^{文献6)}、我々は上記二つのステロイドを肛門腺で同定し、フェロモン活性を示すことを初めて証明したことになる。魚類ではステロイド物質が嗅覚系を介して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。一方、両生類の雄誘引フェロモンについては未だ報告がない。すでに、我々は雌の輸卵管水抽出物に雄誘引効果があり、その物質がペプチド性であることを確認している。本研究で雄誘引フェロモンの単離・同定を成功させることができれば、両生類で初めて雄誘引フェロモンの解明に成功することになる。一方、われわれはこれまで雄求愛行動の発現には様々なホルモン(性ステロイド、プロラクチン、アルギニンヴァソトシン、ニューロステロイド)が関与することを明らかにしてきた^{文献7-10)}。特にプロラクチンやアルギニンヴァソトシン、ニューロステロイドが脳に作用して雄求愛行動を引き起こすこと^{文献9,10)}、プロラクチン受容体やアルギニンヴァソトシン受容体が脳内に存在することを我々はつきとめた^{文献11)}。

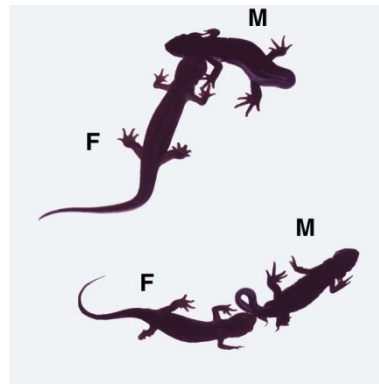


図1 雄アカハライモリ求愛行動(上)とそれに続く雌の追従行動(下)。M:雄、F:雌

引用文献

- 1) Kikuyama, S., Toyoda, F., Ohmiya, Y., Matuda, K., Tanaka, S., Hayashi, H. Sodefrin: a female-attracting peptide pheromone in newt cloacal glands. *Science* 267:1643-1645, 1995)
- 2) Wabritz, P.A., Bowie, J.H., Tyler, M.J., et al., 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. 3) 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. 4) Kimoto, H., Haga, S., Sato, K., Touhara, K. Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature* 437: 898-901, 2005. 5) Ferrero, D.M. et al. A juvenile mouse pheromone inhibits sexual behaviour through the vomeronasal system. *Nature* 502: 368-371. 6) Andreoletti, G.E., Giacomini, C., Vellano, C. Biochemical characteristics of the newt courtship pheromone. In Argano, R., et al, eds. *Contribution to animal biology*. Palermo: Halocynthia Association: 41-45, 1994. 7) Toyoda, F., Ito, M., Tanaka, S., Kikuyama, S. 1993. Hormonal induction of male courtship behavior in the Japanese newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Horm. Behav.* 27: 511-522. 8) Toyoda, F., Matsuda, K., Yamamoto, K., Kikuyama, S. Involvement of endogenous prolactin in the expression of courtship behavior in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102: 191-196. 9) Toyoda, F., Yamamoto, K., Ito, Y., Tanaka, S., Yamashita, M., Kikuyama, S. Involvement of arginine vasotocin in reproductive events in the male newt *Cynops pyrrhogaster*. *Horm. Behav.* 44: 346-353. 10) Toyoda, F., Hasunuma, I., Yamamoto, K., Yamashita, M., Kikuyama, S., (2005). Prolactin acts centrally to enhance newt courtship behavior. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 141:172-177. 11) Hasunuma, I., Toyoda, F., Yamamoto, K., Kikuyama, S. (2004). Localization of prolactin receptor in the newt brain. *Cell Tissue Res.*, 320: 477-485.

2. 研究の目的

本研究では、1)我々が発見した雄イモリ腹腺由来の雌誘引ペプチドフェロモンと雌誘引ステロイドフェロモン、2)我々が実体を明らかにしつつある両生類で初めての雄誘引フェロモン、について受容メカニズムおよび受容細胞から中枢でのフェロモン情報処理システムを解明することにより、雌雄の性行動発現機構における性フェロモンの役割を探求することを主な目的とする。

3. 研究の方法

(1)雄イモリ腹部肛門腺より単離・同定された雌誘引ペプチドフェロモンとステロイドフェロモンの主な作用部位である鋤鼻上皮に電極を置き、ソデフリン刺激に対する応答性を電気生理学的手法、Caイメージング法を用いて解析した。

(2)DiI 標識、HRP 標識、蛍光標識法等の組織学的手法により、受容細胞から中枢への投射経路を明らかにした。

(3)投射部位の破壊あるいは刺激により雌追従行動の発現がどう変化するかを行動解析した。

(4)雌輸卵管水抽出物より雄誘引フェロモンの単離・同定を成功させるためにゲル濾過により分子ふるいにかけ、高速液体クロマトグラフィーでさらにピークに分け、雄誘引活性をもつピークを探り当てた。雄誘引活性は行動解析により行った。雄誘引活性が確認されたピークについてアミノ酸シーケンサーによりアミノ酸配列を明らかにした。それをもとに雄誘引フェロモンの化学合成を行い、その有効量を行動解析により決定した。

5)免疫組織学的手法を用いて合成部位、受容部位を決定した。

4. 研究成果

(1)雌誘引ペプチド“ソデフリン”受容部位の解析

雌誘引フェロモンの受容部位の解析を行った。ソデフリンについては従来、嗅覚障害実験や嗅電図応答実験により、主に性的に発達した鋤鼻嗅覚上皮で受容されると考えられていたが、鋤鼻細胞でソデフリン刺激により細胞内Ca濃度の上昇が生じること、またそのような応答細胞はプロラクチンとエストラジオールにより増加することをCa-イメージング法により確認した。ソデフリン情報伝達経路には小胞体からCa²⁺が放出されるPLC/IP3経路とL型Ca²⁺チャネルを介するPLC/DAG/PKC経路の二つが関与することも確認できた。また、ソデフリン刺激により細胞内Ca濃度の上昇がみられる雌鋤鼻細胞の数はプロラクチンとエストラジオールを投与することにより増大した。また、性的発達、未発達に関わらず雄の鋤鼻細胞では見られないことから、鋤鼻細胞のソデフリン応答系にはホルモン依存性と性依存性が存在する

ことを確認した。

これらの結果から、これまで、行動学および電気生理学的に得られていたソデフリン応答性が細胞レベルで確認された。また、脊椎動物で初めてフェロモン応答の細胞内情報伝達機構も解明された。今後ソデフリン受容体が解明されること、フェロモン受容の分子レベルでのメカニズムが解明されることが期待される。

(2)雌誘引ステロイドの受容部位の解析

アンドロステンダイオンとプレグネノロンは雄腹腺から放出されるステロイドのうち、雌誘引効果が確認されたステロイドである。これらの嗅電図応答もソデフリンと同様に鋤鼻上皮で大きな応答が生じることが確認された。その応答性もまた性的に発達した雌の鋤鼻上皮では確認されたが、性的に未発達な雌雄や性的に発達した雄では応答は確認されなかった。ソデフリンとの間には嗅電図応答に相乗効果があることもわかった。このことはペプチドとステロイドの異なるタイプの雌誘引フェロモンの相互作用を細胞レベルでの解析を行う足がかりとなった。

(3)雌誘引フェロモンの受容細胞から中枢への投射経路。

雌誘引フェロモンの受容部位である鋤鼻嗅覚上皮にDiIを注入し、受容細胞より中枢へ向かう神経をトレースした結果、第一投射経路は副嗅球であると考えられていた。イモリ鋤鼻上皮においては哺乳類で知られている2型鋤鼻受容体と共役する個々のGタンパク質サブユニットを持つ細胞が支配的に存在することがGタンパク質サブユニットの免疫染色によって確認された。G_o陽性嗅細胞が支配的に存在する鋤鼻器の軸索は全て副嗅球(主嗅球の尾側に位置)へと到達し、こちらは哺乳動物の鋤鼻系と相同な神経系と認められた。副嗅球にはG_o陽性線維がそれぞれほぼ排他的に嗅神経軸索末端の集まる嗅系球体層に分布していた。このことから、G_o陽性神経は副嗅球へ軸索を伸ばしていることが予想される結果となった。

(4)雄誘引フェロモンの単離・同定

これまでの研究から雌飼育水には雄誘引効果があること、卵管を取り除いた雌の飼育水では雄誘引効果がないこと、卵管抽出物には雄誘引効果が存在することから、卵管抽出物から雄誘引フェロモンを単離・同定を試みた。雌輸卵管水抽出物より雄誘引活性を有する物質の単離をゲルろ過および高速液体クロマトグラフィーを用いて行い、申請者らが開発し雌誘引活性測定に用いた行動測定法により、活性を調べた。その結果、2種類の雄誘引活性ペプチドの雄誘引物質の単離・同定に至った。そのうちの一つがアミノ酸三残基からなる雄誘引ペプチド、“アイモリン(imorin)”である。アイモリンの雄誘引効果は

嗅覚障害実験、さらに嗅電図応答実験により、主に鋤鼻嗅覚上皮で受容されると考えられた。雄さらに、鋤鼻上皮細胞でアイモリン刺激により細胞内 Ca 濃度の上昇が生じることを確認した。また同物質によって鋤鼻上皮細胞内の Ca²⁺濃度上昇を示す細胞の割合は、プロラクチンおよび生殖腺刺激ホルモンの投与により性的に発達した雄イモリの鋤鼻上皮では大きく、それに比べて未発達の雄や、発達・未発達を問わず雌の上皮では有意に小さいことを確認した。即ち雄誘引ペプチドフェロモン、アイモリンに対する鋤鼻上皮の反応性は性およびホルモン依存적であると考えられた。また、アイモリンに対する抗体を用いて同物質の卵管における局在を調べた結果、アイモリン免疫応答シグナルは性的に発達した雌の卵管基部の線毛細胞の細胞質および内腔に面した線毛表面で見られた。雌飼育水には雄誘引効果が主にアイモリンに由来することをアイモリン抗体カラムによる実験で明らかにした。これらのことから、アイモリンは卵管で作られて水中に放出され、雄を誘引すると考えられる。

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豊田ふみよ、求愛・性行動と脳の性分化-愛 両生類の求愛・性行動とホルモン、比較内分泌学、査読有、2017、43: 83.

②Nakada T., Toyoda F., Matsuda K., Nakakura T., Hasunuma I., Yamamoto K., Onoue S., Yokosuka M., Kikuyama S.

Imorin: a sexual attractiveness pheromone in female red-bellied newts (*Cynops pyrrhogaster*).

Scientific Reports、査読有、2017、7、41334.

DOI: 10.1038/srep41334

③Toyoda, F., Hasunuma, I., Nakada, T., Haraguchi, S., Tsutsui, K., Kikuyama, S. Possible hormonal interaction for eliciting courtship behavior in the male newt, *Cynops pyrrhogaster*. Gen. Comp. Endocrinol.、査読有、2015、224、96-103
DOI: 10.1016/j.ygcen.2015.06.016.

④ Nakada, T., Hagino-Yamagishi, K., Nakanishi, K., Yokosuka, M., Saito, T. R., Toyoda, F., Hasunuma, I., Nakakura, T., Kikuyama, S. Expression of G proteins in the olfactory receptor neurons of the newt *Cynops pyrrhogaster*: Their unique projection into the olfactory bulbs.

J. Comp. Neurol.、査読有、2014、522、3501-3519

DOI: 10.1002/cne.23619.

⑤豊田ふみよ、イモリ性行動発現とフェロモン作用の内分泌調節、日本味と匂学会誌、査読無、2015、22: 125-130

<http://jasts.com/gakkaishi/backnumber/>

[学会発表](計17件)

①豊田ふみよ、両生類の求愛・性行動とホルモン第41回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム、北里大学相模原キャンパス、相模原市、2016年12月10日

②豊田ふみよ、中田友明、松田恒平、中倉敬、蓮沼至、山本和俊、菊山榮

アカハライモリ雄誘引物質に対する鋤鼻上皮細胞の感受性の性およびホルモン依存症第41回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム、北里大学相模原キャンパス、相模原市、2016年12月10日

③西井淳雄、小野慧、豊田ふみよ、山本和俊、岩室祥一、菊山榮、蓮沼至

イモリ間脳視索前野 AVT 前駆体 mRNA 発現へのプロラクチンおよび雄性ホルモンの影響第41回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム、北里大学相模原キャンパス、相模原市、2016年12月10日

④ Toyoda F., Nakada T., Haraguchi S., Yamamoto K., Tsutsui K., Kikuyama S.

Abdominal gland-derived steroids in the newt, *Cynops pyrrhogaster* may act as pheromones

第39回日本神経科学大会 横浜国際会議場、横浜市2016年7月23日

⑤Toyoda, F., Hasunuma, I., Nakada, T., Haraguchi, S., Tsutsui, K., Kikuyama, S. Possible hormonal interaction for eliciting courtship behavior in the male newt, *Cynops pyrrhogaster*

日本比較内分泌学会第40回大会・日本比較生理生化学会第37回大会、2015年、12月11日 - 13日、JMSアステールプラザ、広島市

⑥Nakada, T., Toyoda, F., Hasunuma, I., Kikuyama, S.

Hormonal control of population of vomeronasal sodefrin-receptive G₀ cells in the female newt.

日本比較内分泌学会第40回大会・日本比較生理生化学会第37回大会、2015年、12月11日 - 13日、JMSアステールプラザ、広島市

⑦ Komiya, M., Nakada, T., Toyoda, F., Yamamoto, K., Kikuyama, S.

Sequence analysis of the 5'-flanking region of sodefrin gene.

日本比較内分泌学会第40回大会・日本比較

生理生化学会第 37 回大会、2015 年、12 月 11 日 - 13 日、JMS アステールプラザ、広島市
⑧豊田ふみよ、蓮沼至、中田友明、原口省吾、筒井和義、菊山榮、雄イモリ腹腺由来の雌誘引ステロイドの作用部位

日本動物学会第 86 回大会、2015 年、9 月 17 日-19 日、新潟コンベンションセンター、新潟市

⑨大和田孝祐、豊田ふみよ、山本和俊、菊山榮、蓮沼至、アカハライモリ脳内細胞分裂におよぼすプロラクチンの影響

日本動物学会第 86 回大会、2015 年、9 月 17 日-19 日、新潟コンベンションセンター、新潟市

⑩中田友明、豊田ふみよ、菊山榮

にも方言がある ~ 日本動物学会第 86 回大会 2015 年、9 月 17 日-19 日、新潟コンベンションセンター、新潟市

Toyoda, F., Hasunuma, I., Nakada, T., Haraguchi, S., Tsutsui, K., Kikuyama, S. Possible hormonal interaction for eliciting courtship behavior in the male newt, *Cynops pyrrhogaster*

日本神経科学学会第 38 回大会 2015 年 7 月 28 - 31 日、神戸国際会議場、神戸市

Hasunuma, I., Toyoda, F., Okada, R., Yamamoto K., Iwamuro, S., Kikuyama, S. Arginine vasotocin receptors in the amphibian brain and pituitary.

The 8th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology, 2014 年 11 月 7 - 9 日、岡崎会議場、愛知県岡崎市

Toyoda, F., Hasunuma, I., Nakada, T., Haraguchi, S., Tsutsui, K., Kikuyama, S. Involvement of multiple hormones in the courtship behavior in the male newt, *Cynops pyrrhogaster*

The 8th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology, 2014 年 11 月 7 - 9 日、岡崎会議場、愛知県岡崎市

Nakada, T., Hagino-Yamagishi, K., Nakanishi, K., Yokosuka, M., Saito, T. R., Toyoda, F., Hasunuma, I., Nakakura, T., Kikuyama, S. Involvement of multiple hormones in the courtship behavior in the male newt, *Cynops pyrrhogaster*

The 8th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology, 2014 年 11 月 7 - 9 日、岡崎会議場、愛知県岡崎市

豊田ふみよ、イモリ性行動発現とフェロモ

ン作用の内分泌調節、日本味と匂学会第 48 回大会、嗅覚シンポジウム「嗅覚と内分泌調節」、2014 年、10 月 2-4 日、清水文化会館マリナート、静岡県静岡市

中田友明、中西功毅、横須賀誠、豊田ふみよ、菊山榮 プロラクチンとエストロゲンによる雌イモリ嗅覚上皮の組織学的変化 日本味と匂学会第 48 回大会、嗅覚シンポジウム「嗅覚と内分泌調節」、2014 年、10 月 2-4 日、清水文化会館マリナート、静岡県静岡市

豊田ふみよ、蓮沼至、中田友明、原口省吾、筒井和義、菊山榮 イモリ求愛行動にニューロステロイド 7-hydroxypregnenolone が関与する 日本生理学会第 91 回大会 2014 年 3 月 16-18 日、鹿児島大学郡元キャンパス、鹿児島県鹿児島市

〔図書〕(計 2 件)

①豊田ふみよ・関隆晴、丸善出版、自然科学のためのはかる百科、2016 年、pp.384-393.

②豊田ふみよ、裳華房、両生類の求愛・性行動とホルモン、ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ IV、求愛・性行動と脳の性分化愛、2016 年、pp.33-52 (2016).

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・准教授
研究者番号：10244708

(2) 連携研究者

蓮沼 至 (HASUNUMA, Itaru)
東邦大学・理学部・講師
研究者番号：40434261

中田 友明 (NAKADA, Tomoaki)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師
研究者番号：50549566