

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K07490

研究課題名(和文)イモリ性フェロモン情報処理メカニズムの解明

研究課題名(英文)The action of the sexual pheromone on the vomeronasal epithelium of the newt

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)：雄腹腺由来の雌誘引ステロイド、プレグネノロンとアンドロステンダイオンは互いに相加的に雌誘引効果を持ち、雌鋤鼻上皮の嗅電図応答を引き起こすこと、その作用は鋤鼻上皮細胞膜にある受容体を介することがわかった。ソデフリンは雌誘引ステロイドより少ない腹腺相当量で効果をもつため、腹腺由来の主な雌誘引物質はソデフリンであると結論した。両ステロイドの組み合わせとソデフリンとの間には相乗効果が認められた。また、生殖に際する陸から水環境への移行に内因性のプロラクチンが関与することを確認した。雄求愛行動の持続時間や速度は雄誘引フェロモンや雌による触刺激、アルギニンヴァソトシンが雄求愛行動を促進することを確かめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は我々がアカハライモリで発見した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フェロモンについて、その作用機序を行動学的、電気生理学的、組織学的手法を用いて探った。これまでの我々による生殖行動発現の内分泌調節の詳細な研究成果に基づくと、フェロモン刺激により活性化される神経回路が同時にホルモンにより調整される可能性が考えられる。その神経回路の存在を探り当て、組織・単一ニューロンレベルで解明しようとする研究は本研究において国内外に例を見ない。本研究は、この点において生殖生理学において先駆的な立場にあるといえる。

研究成果の概要(英文)：Two steroidal substances, pregnenolone and androstenedione excreted from the male abdominal gland (AG) were revealed to exert a female-attracting activity and a considerable electro-olfactogram (EOG) response in the vomeronasal epithelium in the sexually developed female newts, *Cynops pyrrhogaster*. When subthreshold amount of the steroids was applied together with female attracting peptide sodefrin secreted from AG, the EOG response was markedly elevated as compared with the response to sodefrin alone. PRL was known to induce migration to water, in which courtship and oviposition take place. Intracerebroventricular administration of anti-newt prolactin receptor antibody blocked spontaneously the preference of aquatic over terrestrial habitats, suggesting that endogenous PRL enhances the preference by acting centrally through the PRL receptors localized in the brain area. The exposure of male attracting peptide, imorin, to the newts enhanced the male courtship behavior effectively.

研究分野：行動内分泌学

キーワード：性フェロモン イモリ プロラクチン 性ステロイド アルギニンヴァソトシン 性行動

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物のフェロモンの研究は、この10年で研究が飛躍的に進んだが、受容メカニズムやその作用機序に関して明らかになっている例は少ない。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おり、そのことがフェロモン受容の研究が滞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でつくられ、総排出腔から放出され、雌イモリの鋤鼻嗅覚器官に作用して雌を誘引する。このソデフリンの発見に触発され、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)}が、その後哺乳類でも、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ノ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らなかった^{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、体外受精をするサンショウウオの一種、*Hynobius leechii*では産卵間近の雌が放出する、或いは卵塊に含まれるプロスタグランジンが雄に生殖行動を誘起することが報告されている^{文献7)}。我々は、雌の卵管水抽出物から両生類初のペプチド性雄誘引フェロモンの単離・同定に成功した。この雄誘引ペプチドフェロモンが雄求愛行動の発現にどの様に影響するのか調べることが可能になった。我々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、アルギニンバソトシン、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8-11)}。特にプロラクチンやアルギニンバソトシン、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10,11)}、プロラクチン受容体やアルギニンバソトシン受容体が脳内に存在するをつきとめた^{文献12)}。脳におけるこれらのホルモンの受容部位と中枢でのフェロモン情報処理部位が一致すれば、性フェロモン情報が性行動発現の神経基盤に重要な役割を担っていると考えられる。実際に雄誘引効果をもつ雌卵管抽出物が雄求愛行動をひきおこすことを観察しており、性フェロモン情報がホルモンと同様、生殖行動の発現に直接関わっている可能性がある。

以上のように本研究は、我々が発見したペプチド性とステロイド性の雌誘引フェロモン、それに加えて、雄誘引ペプチドフェロモンの受容部位および中枢での投射部位を明らかにし、さらにその投射部位における性フェロモン情報処理の解明、雌雄性行動発現への影響を調べることによりフェロモンの性行動発現における役割を明らかにしようというものであり、他に例を見ない。

2. 研究の目的

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、同じく雌イモリで卵管から単離同定に成功した、両生類で初めての雄誘引ペプチドフェロモン、についてその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明らかにすることにより、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、ソデフリン刺激やステロイドフェロモン

刺激に対する応答性を電気生理学的手法を用いて解析した。

(2) 行動解析装置を用いて、雄求愛行動(尾を振る行動)の1時間当たりの回数(=頻度)、一連の行動の持続時間、1時間あたりに占める行動のTotal時間を調べた。また、フェロモンの誘引効果については嗜好性テストを用いた。

4. 研究成果

(1) 雌誘引ステロイドの受容部位の解析

雄腹腺で合成、放出されるステロイドである、プレグネノロンとアンドロステンダイオンは互いに相加的に性的に成熟した雌を誘引する効果をもつこと、雌鋤鼻上皮において嗅電図応答を引き起こすこと、その作用は鋤鼻上皮細胞膜にある受容体を介することがわかった。ソデフリリンと雌誘引ステロイドの最少有効量を比較したところ、ソデフリリンは雌誘引ステロイドより少ない腹腺相当量で雌誘引効果や嗅電図応答を引き起こすことがわかったため、腹腺由来の主な雌誘引物質はソデフリリンであると結論した。両ステロイドの組み合わせとソデフリリンとの間には雌誘引効果や嗅電図応答性に関して相乗効果が認められた。

雌の嗅電図応答性は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。

(2) イモリの陸から水環境への移行に対するプロラクチンの作用

アカハライモリは春の繁殖期を迎えると受精及び産卵のために陸から水環境へと移行することが知られている。この陸から水への移行にプロラクチンが関わることを連続撮影装置を用いて明らかにした。非繁殖期の雄イモリにプロラクチンを投与すると水環境に長く滞在するようになった。一方繁殖期に水環境に移行した雄イモリにイモリプロラクチン受容体抗体を脳室内投与した結果、対照群と比べ陸環境に滞在することがわかった。さらにその後プロラクチンを腹腔投与すると再び水へと移動することを確認した。このことは繁殖期における陸から水への移動は内因性のプロラクチンが脳に作用することを示唆している。

(3) アルギニンヴァソトシンの雄求愛行動の促進効果

雄ではアルギニンヴァソトシン(AVT)が雄求愛行動の頻度を高めることをすでに明らかにしているが、AVTが雄求愛行動に及ぼす影響を及ぼすのかを詳しく調べた。1時間あたりの求愛行動の発現率(行動した動物の割合)、頻度、一連の行動の1回あたり持続時間、1時間あたり求愛行動に費やすトータル時間などを指標にした。その結果、AVTはこれらすべての指標について有意に増加させることがわかった。また、非繁殖期の雌にプロラクチンやゴナドトロピンを投与して性的活性を高めた状態の雌にAVTを腹腔内投与すると抱卵行動(イミテーションの水草を後ろ足で抱える行動)の1時間あたりの頻度が上昇することや、持続時間の延長が起こることを明らかにした。

(4) 雄誘引ペプチド、アイモリンの雄求愛行動に及ぼす効果

性的に成熟した雌雄の周囲における雄誘引ペプチド、アイモリンの存在や、雌が雄の頸部に触れる触刺激が、雄求愛行動の持続時間や速度を増加させることがわかった。また、両刺激の間には相加効果がみられた。異なる種類の刺激が求愛行動の発現を協調的にかかわることが示された。

<引用文献>

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)

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.

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.

Kimoto, H., Haga, S., Sato, K., Touhara, K. Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature* 437: 898-901, 2005.

Ferrero, D.M. et al. A juvenile mouse pheromone inhibits sexual behaviour through the vomeronasal system. *Nature* 502: 368-371.

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.

Eom, J., Jung, Y.R., Park, D. 2009. F-series prostaglandin function as sex pheromones in the Korean salamander, *Hynobius leechii*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 154: 61-69.

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.

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.

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.

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.

Hasunuma, I., Toyoda, F., Yamamoto, K., Kikuyama, S. (2004). Localization of prolactin receptor in the newt brain. Cell Tissue Res., 320: 477-485.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 豊田ふみよ	4. 巻 44
2. 論文標題 行動を指標としたバイオアッセイ法～イモリの性的活性を測定する～	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 比較内分泌雑誌	6. 最初と最後の頁 19-20
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 Nakada T, Toyoda F, Matsuda K, Nakakura T, Hasunuma I, Yamamoto K Onoue S, Yokosuka M, Kikuyama S.	4. 巻 7
2. 論文標題 Imorin: a sexual attractiveness pheromone in female red-bellied newts (<i>Cynops pyrrhogaster</i>).	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Send to Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 41334-41344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep41334.	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 該当する

1. 著者名 豊田ふみよ	4. 巻 44
2. 論文標題 行動を指標としたバイオアッセイ法～イモリの性的活性を測定する～	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 比較内分泌雑誌	6. 最初と最後の頁 19-20
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 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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Toyoda, F., Haraguchi, S., Yamamoto, K., Matsunaga, M, Takase, M, Nakada, T. Tsutsui, K. and Kikuyama, S
2. 発表標題 Steroidal substances derived from the abdominal gland of the male newt, <i>Cynops pyrrhogaster</i> , may act as female-attracting pheromones
3. 学会等名 日本生理学会別府大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中田友明、富永篤、持田浩治、豊田ふみよ、菊山榮
2. 発表標題 イモリ性フェロモンの地域多様性
3. 学会等名 第89回日本動物学会
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及びシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toyoda, F., Nakada, T., Matsuda, K., Nakakura, T., Hasunuma, I., Yamamoto, K., and Kikuyama, S.
2. 発表標題 Responsiveness of vomeronasal cells to a male-attractant, imorin in the newt, <i>Cynops pyrrhogaster</i>
3. 学会等名 The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野、豊田、岩室、菊山、蓮沼
2. 発表標題 アカハライモリ脳内アルギニンバソトシンV2bタイプ受容体の発現
3. 学会等名 日本動物学会第88回富山大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中田、豊田、持田、富永、菊山
2. 発表標題 同族イモリ間における性フェロモンの変異と反応性の検討
3. 学会等名 日本動物学会第88回富山大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大和田、豊田、岩室、菊山、蓮沼
2. 発表標題 プロラクチンのイモリ脳内細胞の分裂活性に及ぼす影響
3. 学会等名 第42回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小野、中島、豊田、岩室、菊山、蓮沼
2. 発表標題 アカハライモリ脳および下垂体におけるアルギニンバソトシンV2bタイプ受容体の発現
3. 学会等名 第42回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2017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

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