

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07135

研究課題名(和文) 有尾両生類求愛行動を制御する神経内分泌的基盤の解明

研究課題名(英文) Investigation of the neuroendocrinological basis involved in the regulation of the newt courtship behavior

研究代表者

蓮沼 至 (HASUNUMA, Itaru)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：40434261

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)：アカハライモリの求愛行動はプロラクチン、アンドロジェンおよびアルギニンバソトシン(AVT)がその発現に重要であるが、その作用機序は十分には理解されていない。本研究により、アンドロジェンは間脳視索前野AVT前駆体遺伝子の発現を高める作用を有することが分かった。また、イモリ脳内には以前我々が明らかにした3種類のAVT受容体サブタイプの他に、V2bタイプ受容体が発現していることを突き止めた。さらに求愛行動発現時に、大脳の内側外套、線条体、視索前野、腹側および背側視床下部でリン酸化細胞内シグナル調節キナーゼの免疫陽性反応が高まる結果を得た。

研究成果の概要(英文)：In the breeding season, sexually developed male newt vibrates its tail in front of the female partner at an early stage of courtship behavior. This behavior is elicited by several hormonal factors such as prolactin and arginine vasotocin (AVT), and androgen. However, the mechanism of the regulation of courtship behavior by these hormones is still unknown. In this study, we have obtained following results: 1) It was revealed that androgen up-regulates the expression of AVT precursor gene in the preoptic area of the brain of male newt. 2) It was confirmed that the expression of four-types of AVT receptors in the newt brain, including V2b-type receptor, which is identified as a novel AVT receptor subtype. 3) It was revealed that the numbers of phospho-ERK1/2-immunoreactive cells increased in the medial pallium and bed nucleus of the stria terminalis in the telencephalon, preoptic area and ventral and dorsal hypothalamic nuclei in the diencephalon during courtship 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 アンドロジェン プロラクチン 求愛行動 アカハライモリ

1. 研究開始当初の背景

アカハライモリ雄は繁殖期になると雌に対して特異的な求愛行動を示す。雄はこの時雌誘引フェロモンや精包を放出するが、この一連の現象にはホルモンが深く関わっている。中でも下垂体前葉ホルモンであるプロラクチン (PRL)、下垂体後葉ホルモンであるアルギニンバソトシン (AVT)、性ステロイドホルモンであるアンドロジェンは中枢神経系に作用し求愛行動の制御に関与することが明らかにされている。これまでの研究により、性的に発達したイモリの脳室に抗イモリ PRL 受容体抗体やアンドロジェン受容体のアンタゴニストであるフルタミドを投与すると求愛行動は抑制されるが、AVT を投与すると求愛行動は回復すること、アルギニンバソプレシン (AVP) V1a 受容体アンタゴニストの脳室への投与も求愛行動の発現を抑制するが、PRL やアンドロジェンの投与では求愛行動は回復しないことが行動学的実験により確かめられている。これらより、PRL とアンドロジェンは AVT 前駆体遺伝子の発現や AVT の分泌を促して求愛行動を誘起していると推定されている。すでに間脳視索前野の AVT 産生ニューロンに PRL 受容体やアンドロジェン受容体 (AR) が発現していることを確認しているが、PRL とアンドロジェンが実際に AVT 前駆体遺伝子の発現や AVT の分泌を促すという直接的な証明はできていない。また、AVP V1a 受容体アンタゴニストはイモリ AVT V1a 受容体および V1b 受容体のリガンドの応答を阻害することがわかっており、どちらの受容体サブタイプが求愛行動誘起に関わるか結論は出ていない。さらに、AVT が制御する求愛行動の中心となる脳内の神経核についても不明である。

2. 研究の目的

本研究は AVT 産生ニューロンや AVT 受容体に着目し、繁殖期にイモリ雄が雌に示す求愛行動の発現メカニズムを解き明かすことを目的とした。1) 雄イモリ脳に発現する AVT 前駆体遺伝子発現に対する PRL とアンドロジェンの影響を解析すること、2) 求愛行動誘起に関わる AVT 受容体を同定すること、3) 求愛行動を制御する神経核を突き止めること、を具体的な目的として掲げた。2) では、近年下垂体後葉ホルモン受容体に V2b タイプ受容体ファミリーという新たなファミリーの存在が提唱されており、アカハライモリでもその受容体も考慮するため、同遺伝子が存在するか、また存在する場合には脳で発現しているかを検証することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) AVT 前駆体遺伝子発現および AVT 合成におよぼす PRL とアンドロジェンの影響

繁殖期雄イモリについて、精巣除去手術および下垂体前葉手術を施し、4 群に分けた。それぞれ生理食塩水投与群、PRL 投与群、テ

ストステロンプロピオネート (TP) 投与群、PRL および TP 投与群とした。また、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、MS222 による麻酔後に 4%パラホルムアルデヒドにて灌流後脳を採取し、ブアン固定液にて浸漬固定した。その後、20%ショ糖液に浸漬後、凍結包埋した。クライオスタットミクロトームによって凍結切片を作製し、*in situ* hybridization によって AVT 前駆体遺伝子の発現を解析した。また、抗 AVT 血清を用いた免疫組織化学的手法により、AVT 免疫陽性反応について検証した。

(2) AVT V2b タイプ受容体およびメソトシン (MT) 受容体 cDNA のクローニングおよびリガンド応答性の検証

イモリネットワークで公開されているトランスクリプトームデータ (<http://antler.is.utsunomiya-u.ac.jp/imori/>) の解析より、AVT V2b タイプ受容体 cDNA の部分配列とみられる塩基配列を取得した。それをもとにプライマーを設計し、イモリ脳全 RNA を用いて RT-PCR を実施した。V2b タイプ受容体 cDNA 断片を取得し、その配列をもとに 5'-, 3'-RACE 法を実施し、タンパク質コード領域の取得を試みた。また、同様のデータベースから MT 受容体 cDNA のクローニングも試みた。イモリ AVT V2b タイプ受容体および MT 受容体 cDNA のタンパク質コード領域を pF9A Flexi vector に組み込み、ルシフェラーゼアッセイにより、これら受容体の AVT および MT との反応性を検証した。

(3) AVT V2b タイプ受容体および MT 受容体の脳内での遺伝子発現解析

イモリ脳を部位ごとに分けて採取し、RT-PCR にて領域ごとのこれら受容体遺伝子の発現を解析した。

(4) 求愛行動発現時の脳内 c-fos 発現部位およびリン酸化細胞内シグナル調節キナーゼ (ERK1/2) 陽性細胞の局在解析

求愛行動発現時に脳内のどの領域の神経細胞が活性化するかを検証するため、前初期遺伝子である c-fos の発現、または ERK1/2 のリン酸化を指標に解析を試みた。まず、イモリ c-fos タンパク質を特異的に認識する抗体を作製し、求愛行動を示した雄および求愛行動を示さなかった雄脳内の c-fos 陽性細胞の分布や、陽性反応を比較した。さらにリン酸化 ERK1/2 陽性細胞の分布および陽性反応についても比較検討した。

4. 研究成果

(1) AVT 前駆体遺伝子発現におよぼすプロラクチンとアンドロジェンの影響

精巣および下垂体前葉を除去すると、間脳視索前野での AVT 前駆体遺伝子発現が著しく低下することを *in situ* hybridization によ

り見出した。また、TP を投与した場合、AVT 前駆体遺伝子発現が生理食塩水投与群と比較して偽手術群ほどではないがシグナル強度が高まっており、発現レベルが回復することがわかった。一方、PRL 単独では生理食塩水投与群とほとんど変わらなかった。TP と PRL 投与した群では TP 投与群と同等の発現レベルであった。大脳の内側外套や分界上床核では AVT 前駆体遺伝子発現はどの群も大きな違いは観察されなかった。

抗 AVT 血清を用いた免疫組織化学的手法により、精巣および下垂体前葉を除去すると、間脳視索前野における AVT 産生ニューロンの細胞体の免疫陽性反応は偽手術群と比較して大きな差異は見出せなかったが、軸索の途中にみられる膨大部が減少している様子が観察された。この軸索途中の膨大部については TP 投与群および TP と PRL を投与した群で偽手術群に近いレベルで観察された。また、偽手術群では大脳の腹側に多数の AVT 免疫陽性繊維が観察されたが、生理食塩水投与群では同部位で免疫陽性繊維ほとんど観察されなかった。しかし、TP を投与した群では免疫陽性繊維が観察され、特に TP と PRL を両方投与した群では多くの免疫陽性繊維が観察された。

これらのことから、精巣除去および下垂体前葉除去は間脳視索前野での AVT 前駆体遺伝子発現や AVT 合成に大きな影響をおよぼすことが判明した。また、TP 投与によって間脳視索前野での AVT 前駆体遺伝子発現の回復が見られたこと、PRL 単独ではほとんど効果が見られなかったことから、アンドロジェンが AVT 合成のキーになっている可能性がある。一方、TP を投与した群では間脳視索前野の AVT 産生ニューロンの軸索における膨大部や大脳腹側の AVT 免疫陽性繊維が明瞭に観察され、TP とともに PRL を投与した群ではそれらがより明瞭に観察されたことから、PRL はアンドロジェンと協調して AVT 合成や AVT の軸索輸送に関与している可能性がある。

(2) AVT V2b タイプ受容体およびメソトシン (MT) 受容体 cDNA のクローニングおよびリガンド応答性の検証

アカハライモリ AVT V2b タイプ受容体および MT 受容体についてタンパク質コード領域を含む cDNA をクローニングした。ルシフェラーゼアッセイにより V2b タイプ受容体は MT よりも AVT とより低濃度で反応することがわかった。しかし、MT 受容体は AVT と MT がほぼ同等の濃度で反応することがわかった。

(3) AVT V2b タイプ受容体および MT 受容体の脳内での遺伝子発現解析

AVT V2b タイプ受容体および MT 受容体について、ともに脳での発現がみられた。V2b タイプ受容体については、RT-PCR により脳

のどの領域での発現が高いかを検証したところ、大脳、間脳、中脳、後脳のいずれにも発現を確認できたが、副生体-第三脳室脈絡叢複合体に強く発現することを明らかにした。副生体では V2a タイプ受容体が強く発現していることは既に我々は報告しており、類似した発現パターンを示すことがわかった。

(4) 求愛行動発現時の脳内 c-fos 発現部位およびリン酸化 ERK1/2 陽性細胞の局在解析

抗イモリ c-fos 抗体を作製し、イモリ c-fos タンパク質を特異的に認識することを Western blot 解析により確認した。繁殖期雄および雌をつがいにし、求愛行動を示した雄個体について脳をサンプリングした。コントロールとして求愛行動を示さなかった雄を用いた。これら脳の切片を用い、両者の c-fos 免疫陽性細胞を比較した。しかし、両者で明確な差を見いだすことはできなかった。同一のサンプルを用いて、抗リン酸化 ERK1/2 抗体を利用したリン酸化 ERK1/2 免疫陽性細胞を比較したところ、大脳の内側外套、線条体、間脳の視索前野、腹側および背側視床下部で強いリン酸化 ERK1/2 陽性反応を示し細胞が増加している様子を確認した。

(5) 総括

雄イモリにおいて精巣除去および下垂体前葉除去は視索前野における AVT 前駆体遺伝子発現を著しく低下させることから、AVT 前駆体遺伝子発現は精巣および下垂体前葉の影響下にあると言える。特に、本研究からアンドロジェンの影響が強いことがわかった。一方で、PRL は単独では AVT 前駆体遺伝子発現にはほとんど影響はなかったが、アンドロジェンと協調作用し、AVT 合成や軸索内の輸送に関与している可能性があることがわかった。実際に求愛行動を発現している時に、血中のアンドロジェン濃度や PRL 濃度がどのようになっているかは今後精査していく必要がある。

近年新しく下垂体後葉ホルモン受容体ファミリーとして提唱されている V2b タイプ受容体遺伝子はイモリにも存在することが明らかになり、脳で発現していることがわかった。MT 受容体も脳で発現しており、これまでの研究成果と合わせると、イモリ脳では AVT V1a タイプ、V1b タイプ、V2a タイプ、V2b タイプ受容体の 4 種類の AVT 受容体および MT 受容体が発現していることが明らかになった。脊椎動物全般を見渡してみてもイモリをはじめ、両生類では多くのサブタイプの下垂体後葉ホルモン受容体が発現している可能性がある。さらにこれまでの研究から、それぞれのサブタイプの脳内での発現分布は異なっている。本研究より、V2b タイプ受容体の脳内分布はさらに組織学的に詳細な解析を必要とするが、V2a タイプ受容体と類似した発現分布をしている可能性がある。MT 受容体については、AVT と MT に対する

反応性が実はほとんど変わらないという結果を得た。MT 受容体と分類されているが、両生類では AVT および MT の共受容体として機能している可能性がある。本研究では求愛行動に主に関与する下垂体後葉ホルモン受容体のサブタイプを確定させることはできなかったが、今後上記 5 つのサブタイプを候補に入れた上で、生化学的な手法で、受容体の特性を見極めながら、実際に脳内の受容体の機能を個別に阻害したり、受容体遺伝子の発現を個別に制御することで特定が可能と思われる。

本研究では求愛行動を制御する神経核の特定には至っていないが、リン酸化 ERK1/2 局在解析の結果は、求愛行動を制御する神経核を特定していく上で重要なデータとなり得る。特に、視索前野の AVT 産生ニューロンや、尾を振る行動を制御する延髄のマウスナー細胞に着目して解析を進める必要があるだろう。求愛行動を制御する AVT 受容体サブタイプが特定されれば、求愛行動発現のための神経核やそれらの連関について解明できると考えられる。

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 4 件)

1. Nakano, M., Hasunuma, I., Minagawa, A., Iwamuro, S., Yamamoto, K., Kikuyama, S., Machida, T., Kobayashi, T. Possible involvement of thyrotropin-releasing hormone receptor 3 in the release of prolactin in the metamorphosing bullfrog larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* in press
DOI: 10.1016/j.ygcen.2018.05.029
査読有り

2. Nakada, 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*). *Sci. Rep.* 7: 41334 (2017)
DOI: 10.1038/srep41334
査読有り

3. Okada, R., Yamamoto, K., Hasunuma, I., Asahina, J., Kikuyama, S. Arginine vasotocin is the major adrenocorticotrophic hormone-releasing factor in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 237: 121-130 (2016)
DOI: 10.1016/j.ygcen.2016.08.014
査読有り

4. 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*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 224: 96-103 (2015)
DOI: 10.1016/j.ygcen.2015.06.016
査読有り

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 須藤百合子、池田卓聡、岩室祥一、菊山榮、蓮沼至 アカハライモリ新規プロラクチン受容体遺伝子の同定 日本動物学会第 70 回関東支部大会(東京) 2018 年 3 月

2. 大和田孝祐、豊田ふみよ、岩室祥一、菊山榮、蓮沼至 プロラクチンのイモリ脳内細胞の分裂活性におよぼす影響 第 42 回日本比較内分泌学会大会(奈良) 2017 年 11 月

3. 小野慧、中島康人、豊田ふみよ、岩室祥一、菊山榮、蓮沼至 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 第 42 回日本比較内分泌学会大会(奈良) 2017 年 11 月

4. 中野真樹、蓮沼至、皆川温子、岩室祥一、山本和俊、菊山榮、町田武夫、小林哲也 両生類 3 型甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体 (TRHR3) の構造と機能の解析 第 42 回日本比較内分泌学会大会(奈良) 2017 年 11 月

5. 小野慧、豊田ふみよ、岩室祥一、菊山榮、蓮沼至 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 日本動物学会第 88 回大会(富山) 2017 年 9 月

6. 小野慧、豊田ふみよ、岩室祥一、菊山榮、蓮沼至 アカハライモリのアルギニンバソトシン V2b 受容体の発現とその機能 日本動物学会第 69 回関東支部大会(東京) 2017 年 3 月

7. 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(神奈川) 2016 年 12 月

8. Hayama, S., Watanabe, T., Yamamoto, K., Iwamuro, S., Kikuyama, S., Hasunuma, I. Prolactin acts directly on the thyroid gland of larval bullfrogs to suppress its function. Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of the Zoological Society of Japan. (Okinawa) Nov. 2016

9. 大和田孝祐、豊田ふみよ、山本和俊、菊山榮、岩室祥一、蓮沼至 プロラクチンが関与

する雄アカハライモリ脳内の細胞増殖メカニズム 日本動物学会第 68 回関東支部大会 (神奈川) 2016 年 3 月

10. 古宮昌記、中田友明、豊田ふみよ、山本和俊、菊山榮、岩室祥一、蓮沼至 ソデフリン遺伝子の雄性ホルモンによる転写制御メカニズムの検証 日本動物学会第 68 回関東支部大会 (神奈川) 2016 年 3 月

11. 葉山舜、渡辺智美、山本和俊、菊山榮、岩室祥一、蓮沼至 ウシガエル幼生甲状腺によるサイロキシン放出におよぼすプロラクチンの影響 日本動物学会第 68 回関東支部大会 (神奈川) 2016 年 3 月

12. Komiya, M., Nakada, T., Toyoda, F., Yamamoto, K., Kikuyama, S., Hasunuma, I. Sequence analysis of the 5'-flanking region of sodefrin gene 第 40 回日本比較内分泌学会大会・第 37 回日本比較生理生化学会合同大会 (広島) 2015 年 12 月

13. 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及ぼすプロラクチンの影響 日本動物学会第 86 回大会 (新潟) 2015 年 9 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.lab.toho-u.ac.jp/sci/bio/regl/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蓮沼 至 (HASUNUMA, Itaru)

東邦大学・理学部・講師
研究者番号：40434261

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

豊田ふみよ (TOYODA, Fumiyo)

山本和俊 (YAMAMOTO, Kazutoshi)