

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18570

研究課題名(和文)性フェロモン応答神経系とその機能のホルモンによる調節

研究課題名(英文)Endocrine regulation of the pheromone-responsive system in the newt.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、雄のアカハライモリで見つかった雌誘引活性フェロモン(ソデフリン)の受容機能が内分泌的にいかに調節されているかを調べるた。その過程で、ソデフリンとは逆にアカハライモリの雌もまた雄を誘引するフェロモン(アイモリン)を分泌することが見つかった。繁殖相手の性行動に影響を与える性フェロモンが両性で見つかったことは、今後それぞれのフェロモンが受容動物の性行動を誘起するまでの過程を調べることを可能とし、その作用機序や性行動が起きるまでの過程を理解することは、単にイモリの生殖だけでなく、水産・畜産動物、更には希少動物などの生殖や性行動に関する問題の解決にも寄与する研究に発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Previously, we isolated a decapeptide pheromone (sodefrin) from the abdominal glands of the male red-bellied newts (*Cynops pyrrhogaster*). Sodefrin plays an important role in keeping the female attracted to the male until the sperm transfer has been successfully completed. In this study, endocrine regulations of the pheromone-responsive neurons were analyzed, and a novel peptide pheromone in sexually developed female was discovered. This pheromone has an activity to prompt the sexually developed males to commence courtship behavior toward the females. This is the first female sexual attractiveness peptide pheromone to be identified in a vertebrate. The finding of sex pheromones emitted by both reproductive male and female newts is expected to make it possible to analyze neural pathways and mechanisms involved in transferring the signals of both pheromones and transforming the pheromonal signals into the sexual behaviors in the newts of both sexes.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：性フェロモン 性行動 内分泌調節 鋤鼻器官 ソデフリン イモリ アイモリン

1. 研究開始当初の背景

世界で初めて同定された脊椎動物のペプチドフェロモンであるソデフリン(sodefrin)は、雄のイモリ(学名 *Cynops pyrrhogaster*)の肛門腺より単離・同定された性フェロモンで、繁殖期の雌の性行動を誘起する(引用文献[1])。ソデフリンは189残基の前駆体タンパク質からプロセッシングを受けて分泌されるアミノ酸10残基より成るペプチド(アミノ酸配列: SIPSKDALLK)である。ソデフリンの生成や前駆体遺伝子の発現調節については既に多くの先行研究が行われ、繁殖期にイモリを水棲移行させるプロラクチン(PRL)と性ステロイドであるテストステロン(T)がソデフリンのペプチド生成量および前駆体遺伝子発現量を増加させることが分かっている(引用文献[2])。

一方で、ソデフリンの発見以後、いくつかの動物種(無尾・有尾両生類、マウス、シバヤギ等)で雄性フェロモンが同定されたが、受容機序における内分泌調節の分子の解明に焦点を当てた研究は現在までほとんど見当たらない。自明のことではあるが、フェロモンは個体間相互作用に関わる化学物質であり、リガンド分子の生成機序と同等に受容動物の受容機序の解明とその調節機構を明らかにする事が、性フェロモンの介した生命現象とその基盤を理解する上で緊急の課題であると言える。

最近、研究代表者らは Ca^{2+} imaging 法によって、解離した鋤鼻感覚細胞でのソデフリン応答性を観察し、性成熟した雌イモリ由来の感覚細胞中で1%強の細胞がソデフリン刺激に対して特異的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇をみせることを明らかにした(引用文献[3])。この応答細胞数は性的に未発達の雌や成熟した雄では著しく少ない。また、フェロモン応答細胞の数は内分泌的支配を受けて調節されている事が示された。すなわち、性成熟した雌であっても、脳下垂体および卵巣を除去した動物ではソデフリン応答細胞がほとんど観察されず、同手術を施しても、PRLとエストラジオール(E2)を補給すれば応答細胞数が偽手術対照イモリと同等にまで回復する。つまり、雌のソデフリン応答細胞数(即ちフェロモン受容能)は、雄のソデフリン(フェロモンリガンド)の合成と同様に、プロラクチンと性ステロイドによって調節されている事が明らかになった。

計画を進めていくうえで、研究代表者らは次の5つの予備的な研究結果を得ていた(印は当時論文未発表)。

1) Ca^{2+} imaging 法を用いたフェロモン受容細胞の検出法を確立し、ソデフリン受容細胞は鋤鼻器の感覚細胞の一部(1%強)であり、細胞数は内分泌的に調節されている(上述;引用文献[3])と示唆されていた。

2) ソデフリン受容を担う鋤鼻感覚細胞は副嗅球のみへ神経投射し、 G_o 発現細胞が支配的であることを確かめたことで、ソデフリ

ン受容体は G_o と共役する2型鋤鼻受容体(V2R)ファミリーに属し、受容神経系は副嗅球を一次感覚野とすることが明らかであった。(引用文献4)

3) イモリ嗅覚上皮組織のトランスクリプトーム解析(RNA-Seq)により嗅覚関係連遺伝子を同定した。約300種のV2R遺伝子と嗅覚受容に関連する各種遺伝子を同定、local BLASTによるin silicoでの遺伝子同定ツールを構築した(筑波大学・千葉親文博士らとの共同研究)。

4) 感覚上皮中に新生する G_o 発現感覚細胞数は下垂体および性腺を除去した個体に比べ同手術後にPRLとE2を投与した個体で2倍程度多くみられ、感覚上皮中に両ホルモン受容体の発現がみられる。従って、ソデフリン受容細胞を含む G_o 発現細胞の分化誘導は同ホルモンで促進されると考えられた。

5) アカハライモリの性行動の観察から、性成熟した雌イモリはソデフリンとは逆に雄を誘引する性フェロモンを分泌すると考えられ、事実成熟雌を飼育した飼育水は性成熟した雄を誘引する作用があることを確かめていた。

2. 研究の目的

性フェロモンは動物の繁殖に関わる重要な因子の一つであり、多くの脊椎動物種でその実態が明らかになりつつあるが、その作用機序がいかなる生理学的調節機構によって支えられているかが解明されていない。しかし、それこそが学術的に重要な意味を持ち、繁殖調節への応用面にも活かせる情報と考えられる。研究代表者は本研究の申請にあたって、雄イモリの分泌する雌誘引ペプチド性フェロモン、ソデフリンの受容応答細胞の細胞内情報伝達系を解明し、雌の鋤鼻器に存在する受容細胞が内分泌的支配を受けてその細胞数を季節により変動させていることを見出した。本研究では、ソデフリンの受容処理機構を分子/形態/行動生理という多角的視点で解析し、フェロモンによる配偶者選択機構を解明することで、フェロモン効果の分子化学的な研究基盤を確立し、希少動物や産業動物の繁殖の効率化に資することを目的として行った。

3. 研究の方法

研究代表者はこれまでに、脊椎動物の生殖制御に重要な性フェロモン(ソデフリン)について、そのリガンド探索から生理活性の解明、受容神経基盤の形態的解析までの研究を行ってきた経験を生かし、本研究ではその受容体と脳内神経回路を明らかにし、性フェロモンを介した個体間での生殖制御機序の全貌を解明するために、以下の3つの実験を計画した。

[1] ソデフリン受容細胞で特異発現する2型鋤鼻受容体(ソデフリン受容体)の分子生物学的同定

[2] 神経活動のマーカートンパク質である phospho-p44/42 MAP kinase (pERK1/2) を指標に、ソデフリン応答時に活性化する脳内神経回路の同定

[3] 主にプロラクチン (PRL) とエストラジオール (E2) に着目した、内分泌系によるソデフリン受容体の細胞単位での変化と、応答神経回路単位の調節機構の解明

[4] 生殖に際して雌から分泌される性フェロモンの実体解明とその生成・受容に関する内分泌的調節因子の同定

4. 研究成果

本研究では、脊椎動物の性フェロモン作用機序を明らかにする目的で交付申請書に記した、(1)イモリの雄性フェロモン(ソデフリン)の受容体遺伝子の同定、(2)受容細胞の内分泌調節機構の解明の計画に照らし、下記の実験研究を行い、一定の結果を得て成果を学術論文として国際誌に掲載するとともに、学会等で発表した。

(1) ソデフリン受容体の探索

ソデフリンの受容体が属すると思われる 2 型鋤鼻受容体 (V2Rs) はイモリで 300 種ほどの多重遺伝子群を形成し、他生物で確かめられている通り、鋤鼻感覚細胞に単独で発現していると推測される。単一の受容細胞に 1 種の受容体のみが発現している特性を利用して、顕微鏡下で採取した単一のソデフリン受容細胞から、PCR 法での目的の受容体遺伝子のクローニングならびに単一細胞の mRNA (トランススクリプトーム) の解析を試みた。

(2) ソデフリン受容細胞の内分泌調節機構

繁殖関連ホルモンの中樞である脳下垂体と卵巣を除去したメスイモリはソデフリンに対する応答性を受容細胞レベル(カルシウムイメージング法によって検定)、行動レベル(嗅覚嗜好性試験によって検定)で失うが、繁殖期に雌で分泌量の高まるホルモンである 17 エストラジオールとプロラクチンの投与によってソデフリンに対する各レベルでの応答性が観察されるようになる。雌のイモリがソデフリン受容・応答能を獲得する際に、受容細胞にいかなる変化が起きているのかを調べた。V2Rs (ソデフリン受容体を含むと思われる) に共役する G タンパク質 サブユニット (G_o) を発現する感覚神経細胞の新生が上記二つのホルモンによって誘導されることを見出した。この新生細胞の増加は、鋤鼻器官の基底細胞 (未分化細胞) から生まれる新生神経の G_o 陽性感覚細胞への分化誘導によるものと考えられ、17 エストラジオール、プロラクチンのそれぞれ単独投与では二つのホルモンを合わせて投与した時ほ

ど新生神経の G_o 陽性感覚細胞への分化は促進されない結果となった。また、両ホルモン受容体が鋤鼻器官に存在することを免疫組織化学的手法 (それぞれのホルモン受容体に対する特異抗体を用いて受容体タンパク質の局在を確かめる実験) によって確かめた。

(3) 性フェロモンの地域性

ソデフリンの相同遺伝子は、同一個体に多種発現している。今回、性フェロモンの地域性を調べる目的で、国内 12 のイモリ個体群から 432 クローンのソデフリン相同遺伝子をクローニングし、その遺伝子配列にコードされるフェロモン前駆体タンパク質分子の多型解析を行った。その結果、全個体群でソデフリン遺伝子が観察された一方で、西日本・南日本の 2 系統では特異的なフェロモン候補ペプチドをコードする遺伝子がみられた。さらに南西諸島に産する同属他種のイモリのイモリで同様にソデフリン相同遺伝子の解析を行ったところ、奄美大島の一部の個体でソデフリンが発現していること、その地域の雌はソデフリンに行動的に応答しうることが示された。さらに、これまでに知られていなかったシリケンイモリの性フェロモンペプチドの存在も明らかとなった。

(4) 雌性フェロモンとその生成・受容機序

一連のイモリの性行動を観察していく過程で、これまで取り組んできた雄性フェロモンのソデフリンとは別に、繁殖期の雌が交尾相手の雄を誘引する性フェロモンを放出していると確信するに至り、同生理活性物質の同定を試みた結果、雌イモリの卵管から 3 アミノ酸残基の雄誘引活性ペプチドを発見し、『アイモリン』と命名した。

この物質は、繁殖期に肥厚する雌の卵管の繊毛性上皮細胞から分泌され、性的に成熟した雄のみを誘引することがわかった。さらに 2 つの性フェロモンの受容は、受容動物 (ソデフリンでは雄、アイモリンでは雌が受容動物) でのみ観察される特定の鋤鼻感覚細胞が担っており、その細胞数は内分泌支配を受けて、繁殖期に雄その数を増加させることで、繁殖期に性フェロモンへの感受性を高めていることが分かった。

繁殖相手の性行動に影響を与える性フェロモンが両性で見つかったことは、今後それぞれのフェロモンが受容動物の性行動を誘起するまでの過程を調べることを可能とし、その作用機序や性行動が起きるまでの過程を理解することは、単にイモリの生殖だけでなく、水産・畜産動物、更には希少動物などの生殖や性行動に関する問題の解決にも寄与する研究に発展することが期待される (次頁図 1)。

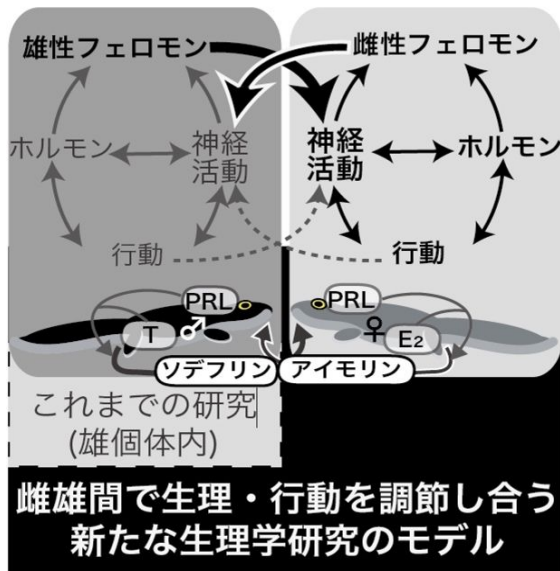


図1. 両性フェロモンとホルモンが協調する新たな繁殖研究モデル

<引用文献>

1. Kikuyama et al. *Science*.1995
2. Kikuyama and Toyoda, *Reviews of reproduction* 1999
3. Iwata and Nakada et al., *Peptides* 2013
4. Nakada et al., *Journal of comparative neurology* 2014

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 2件)

1. Tomoaki Nakada et al. Imorin: a sexual attractiveness pheromone in female red-bellied newts (*Cynops pyrrhogaster*). *Scientific Reports* 7, Article number: 41334 (2017). 査読あり .DOI: 10.1038/srep41334

2. Fumiyo Toyoda, Itaru Hasunuma, Tomoaki Nakada et al. Possible hormonal interaction for eliciting courtship behavior in the male newt, *Cynops pyrrhogaster*. *General and Comparative Endocrinology* 224. 96-103 (2015) 査読あり .DOI: 10.1016/j.ygcen.2015.06.016

[学会発表](計 16件)

1. 中田友明. ソデフリンとアイモリン: 異性を惹きあうイモリの性フェロモン. 日本味と匂学会第51回大会(招待講演). 2017

2. 中田友明ほか. 同属イモリ間における性フェロモンの変異と反応性の検討. 日本動物学会第88回大会. 2017

3. 中田友明. アイモリン: アカハライモリ雌で見つかった雄誘引フェロモン. 第3回ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会. 2017

4. 中田友明ほか. アイモリン: アカハライモリ雌で見つかった雄誘引フェロモン. 次世代両生類研究会. 2017

5. 松本侑子, 横須賀誠, 中田友明. 西日本に生息するイモリの性フェロモン分化. 日本動物学会 関東支部 第69回大会. 2017

6. 豊田ふみよ, 中田友明ほか. 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性. 第41回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム. 2016

7. Tomoaki Nakada et al. Differential response to *Cynops pyrrhogaster* pheromones of *Cynops ensicauda* newts inhabiting in Okinawa and Amami-Oshima islands. 22nd International Congress of Zoology/ 87th Meeting of Zoological Society of Japan joint meeting. 2016

8. 中田友明. イモリ性フェロモンの分化. 第11回化学生態学研究会(招待講演). 2016

9. 古宮昌記, 中田友明ほか. 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. 日本動物学会関東支部 第68回大会. 2016

10. Komiya Masaki, Tomoaki Nakada et al. Sequence analysis of the 5'-flanking region of sodefrin gene. *CompBiol* 2015 (第40回日本比較内分泌学会大会日本比較生理生化学会第37回大会合同大会). 2015

11. Fumiyo Toyoda, Itaru Hasunuma, Tomoaki Nakada et al. Possible hormonal interaction for electing courtship behavior in the male newt, *Cynops pyrrhogaster*. *CompBiol* 2015 (第40回日本比較内分泌学会大会日本比較生理生化学会第37回大会合同大会). 2015

12. Tomoaki Nakada et al. Hormonal control of population of vomeronasal sodefrin-receptive G_o cells in the female newt. *CompBiol* 2015 (第40回日本比較内分泌学会大会日本比較生理生化学会第37回大会合同大会). 2015

13. 中田友明ほか. 日本国内におけるイモリ性フェロモンの遺伝的多様性. 日本味と匂学会 第49回大会. 2015

14. 豊田ふみよ、中田友明ほか. 雄イモリ腹線由来の雌誘因ステロイドの作用部位. 第86回日本動物学会.2015

15. 中田友明ほか. イモリの性フェロモンの分化. 第86回日本動物学会.2015

16. Fumiyo Toyoda, Itaru Hasunuma, Tomoaki Nakada et al. Possible hormonal interaction for eliciting courtship behavior in the male. 第38回日本神経科学大会.2015

〔図書〕(計 1件)

1. 霍野晋吉、中田友明. 緑書房. カラーアトラス エキゾチックアニマル 爬虫両生類編. 2016. 528頁

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)
該当項目なし

取得状況(計 0件)
該当項目なし

〔その他〕

ホームページ等

1. プレスリリース

性的魅力をアピールするフェロモンを雌イモリで発見

<http://www.nvlu.ac.jp/news/20170125-01.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

菊山 榮 (KIKUYAMA, Sakae)

豊田 ふみよ (TOYODA, Fumiyo)

松田 恒平 (MATSUDA, Kouhei)

蓮沼 至 (HASUNUMA, Itaru)

中倉 敬 (NAKAKURA, Takashi)

山本 和俊 (YAMAMOTO, Kazutoshi)

富永 篤 (TOMINAGA, Atsushi)

ほか