

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06321

研究課題名(和文)イモリ性フェロモンをモデルとした配偶者選択機構の解明

研究課題名(英文)Physiological analysis of the courtship pheromones in both sexes: a study of the molecular mechanism of mate selection in newts.

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本課題研究でもたらされた成果をまとめると以下の3点である。
今回多数の雄イモリに発現する性フェロモン遺伝子を調査した結果、シリケンイモリには新規ソデフリン相同ペプチド機能していた。雌の非存在下で雄の求愛行動が誘発される条件を検討し、雄の体型や婚姻色が他個体からの求愛を抑制、雌の飼育水には未同定の性フェロモン分子が存在すると解った。遺伝子改変イモリの作成：ゲノム編集技術を研究対象のアカハライモリに実用化できるようになったことで、今後さらに高解像度な性フェロモンコミュニケーションの分子生理学的な機序の解明を行える準備ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

性フェロモンは動物の配偶者選択に深く関わる生殖制御因子の1つである。本研究は、異性の性行動を誘起する雌雄両性の性フェロモンペプチドが同定された唯一の四肢動物であるイモリを用いて、異性の性行動を誘起する性フェロモンの分子的作用機構について分子生物学・組織形態学・行動生理学などの多角的アプローチで調査し、脊椎動物の配偶者選択に関わる雌雄間コミュニケーションの研究基盤を確立することを目的として実施した。

研究成果の概要(英文)：The results of this research project can be summarized in the following three points.

(1) As a result of investigating sex pheromone genes expressed in a large number of male newts in this study, it was revealed that a novel sodefrin homologous peptide functions in sword-tailed newts, *Cynops ensicauda*. (2) We examined the conditions under which male courtship behavior is induced in the absence of females, and found that while the body shape and nuptial color of males inhibit courtship by other males, there is an unidentified sex pheromone molecule in the conditioned water of females. (3) The genome editing technology can now be practically applied to the red-bellied newt, and we are now ready to further elucidate the molecular physiological mechanisms of sex pheromone communication at a higher resolution in the future.

研究分野：行動学

キーワード：性フェロモン ソデフリン アイモリン 両生類 生殖行動 配偶者選択

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 生殖コミュニケーションに深く関わる信号の1つとして、異性の生殖行動に誘起する嗅覚物質である性フェロモンは、特定の化学物質を実体として異性の生殖行動の誘起するため、純粋な行動誘発刺激を物質として同定でき、人為合成した純粋な性フェロモン分子でその作用機序を実験的に解析できるため、酵母や昆虫類などを中心に研究されてきた。近年では、本研究課題で取り扱ったイモリのペプチド性フェロモンの発見を端緒に、いくつかの脊椎動物でもタンパク質・ペプチド性の雄性フェロモンとそれらをコードする多重遺伝子群が同定され、脊椎動物の雄性フェロモンの遺伝子の多くは複数の類似フェロモンをコードするパラログ遺伝子で構成され、多成分性の翻訳産物(タンパク質やペプチドの性フェロモン)が種や配偶者との血縁度などの遺伝的な情報を雌へ提示していると示唆されてきた。

(2) また、雄性フェロモンが複数の脊椎動物種で同定される一方で、雄の性行動を誘起する雌性フェロモンの実体を明らかにした研究は少なく、四肢動物で生殖に関わる化学コミュニケーションを雌雄相互に解析できる研究モデルはなかった。

したがって本研究では、雌雄両性のペプチド性フェロモン分子が同定された両生類のイモリを対象として、生殖コミュニケーションを個体レベルから組織・細胞・分子レベルで理解する新しい研究モデルを提案し、四肢動物の生殖コミュニケーションを担う雌雄両性の信号が如何にして生殖活動の成立につながるのかという学術的「問い」に挑戦したいと考えていた。

2. 研究の目的

性フェロモンは雌雄間の生殖相互作用を担う分子であるため、雌雄双方が分泌する性フェロモンの機能や生成機序と共に、それぞれが異性によって如何に受容・処理され、その受容機構が如何に制御されるかを明らかにすることが、性フェロモンの介した雌雄間相互作用を理解する上での課題である。本研究では、異性の性行動を単一分子で誘起し得る雄性フェロモン(ソデフリン)と雌性フェロモン(アイモリン)が共に同定された唯一の四肢動物であるアカハライモリをモデルに、性フェロモンを介した脊椎動物の雌雄間でのコミュニケーション機序を探り、生殖生理学の新たな研究モデルを開拓することで、ひいては希少動物や産業動物の繁殖の効率化に資する基盤研究の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 他の脊椎動物同様に多成分性の雄性フェロモンを構成する分子をアカハライモリで把握するため、性成熟した雄に備わるフェロモン合成器官たる腹腺(肛門腺)に発現するソデフリン類似ペプチドをコードする mRNA 配列のレパートリーを分析した。調査対象は本邦に生息するアカハライモリとシリケンイモリ(アマミシリケンイモリとオキナワシリケンイモリの2亜種)としたが、種内変異が激しく遺伝学的に明確に区別される4系統の遺伝学的集団で構成されるアカハライモリについては全系統を網羅すべく8つの個体群から動物を採集した。得られたソデフリン類似ペプチドをコードする mRNA 配列から性フェロモンペプチドの前駆体タンパク質の全長配列を予測し、雄性フェロモン分子の個体差、個体群間差、種差について解析するとともに分子系統解析によってソデフリン様性フェロモンの分子進化について考察した。

(2) 多成分性の性フェロモンを構成する個々の性フェロモンの機能を解析するためには、アカハライモリでの特定遺伝子欠損モデル動物や外来遺伝子導入動物の作成を行う必要があり、両生類モデル動物としてすでに遺伝子操作において多大な実績を持つアフリカツメガエルでの方法論を参考にCRISPR-Cas9法やメダカTo12 Transposaseを利用した遺伝子ノックアウトイモリや遺伝子導入イモリの作成を行った。

(3) 一方で、アカハライモリの雄は生殖行動の初期に出会った他個体を吟味し、対象が性成熟した同種雌であった場合にのみソデフリンを雌の鼻先へ届けるための求愛行動(求愛の場である水中で尾を振り肛門腺分泌物を水流に乗せて届けようとする行動)を示すが、現在までに同定されている雌性フェロモン(アイモリン)のみの提示ではこの雄の求愛行動が誘起されないことがわかっていたため、CTスキャンによって取得した生体イモリ3次元データを3Dプリンターによって出力することで作成した精巧な樹脂製のイモリ模型に雄イモリが求愛行動を発現する条件を検討した。樹脂模型にはアイモリンや雌の飼育水(雌から分泌されるアイモリンや未同定の雌性フェロモンを含むと考えられる)などの嗅覚刺激に加えて、イモリの雌雄に特長的な色彩を組み合わせて提示することで、オスの求愛行動を誘発する因子を同定した。

4. 研究成果

(1) アカハライモリ(8個体群)とシリケンイモリ(アマミシリケンイモリとオキナワシリケンイモリの2亜種)に属す雄イモリの肛門腺に発現するソデフリン関連遺伝子を調査した結果、両種

の肛門線中では複数のソデフリン類縁遺伝子が発現していた。アカハライモリでは調べた 54 個体で例外なくソデフリン遺伝子が発現することから、ソデフリンは雄のアカハライモリの生殖成功に必須の信号と推測された一方で、シリケンイモリではこれまでソデフリン構成する 10 個のアミノ酸残基(SIPSKDALLK)のうち 2 つが置換したペプチドであるシレフリン(SILSKDAQLK)がシリケンイモリの主要な雄性フェロモンと考えられてきたが、今回の調査でシレフリン遺伝子を発現する個体はオキナワシリケンイモリ亜種に限られ、アマミシリケンイモリ亜種には見られないこと、両シリケンイモリ亜種には共通して、構造的にソデフリンとシレフリンの中間的な新規ペプチド(SIPSKDAQLK)をコードする遺伝子が発現することが確かめられた。このペプチドを化学合成して成熟雌の反応を調べたところ、アカハライモリの雌には性フェロモン活性がなく、シリケンイモリの両亜種には性フェロモン活性があることが確かめられた。さらにアマミシリケンイモリにはこれまでアカハライモリに特有のものとして目されてきたソデフリンをコードする遺伝子が発現していること、雌のアマミシリケンイモリはソデフリンに対して有意に誘引されることなどもわかり、ソデフリン分子はアカハライモリとシリケンイモリの種分化に先んじて両種の共通祖先の性フェロモンとして存在しており、後にオキナワシリケンイモリでは消失、新たにシレフリン分子が備わったことが分子系統解析の結果からも推測された。

(2) 遺伝子欠損動物による性フェロモンコミュニケーションの解析を行うためにノックアウト(KO)動物や遺伝子導入動物を作成する技術を CRISPR-Cas9 法等を利用して開発した(下図)。

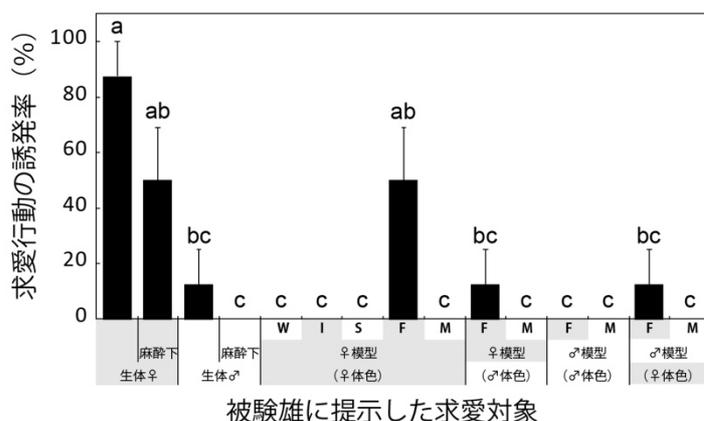


ノックアウト動物作成手技の条件検討には、表現型が明確なメラニン合成に関わる酵素である tyrosinase を用いた。具体的には、アカハライモリからクローニングした同酵素遺伝子パラログ 2 種を指定するガイド RNA と Cas9 酵素をイモリ受精卵にマイクロインジェクションした際にノンモザイクと思われる Tyrosinase 欠損動物(アルビノ動物)を効率的に作成する条件を見出し、イモリでの遺伝子操作実験に必要な基礎技術が確立できた。

続いて、アカハライモリの全個体が発現している雄性フェロモンであるソデフリンの遺伝子のノックアウトを行った。今後、KO 動物の性成熟を待って正常雌との性行動を観察し、多成分性フェロモン中でのソデフリンの役割を解析するとともに、多成分フェロモンカクテルを構成するソデフリン以外のソデフリン類縁遺伝子の特異欠損動物を作成することで、雄性フェロモンの実体についてさらなる研究が推進される見込みである。

(3) 性成熟した雄の配偶者認知の鍵刺激を同定する目的で、3D プリンターによって可能な限り精巧に作成した樹脂模型に対して雄の求愛行動が誘発される条件を検討したところ、実験を通じて、被験雄の求愛行動の発現強度は本来の求愛対象たる生体の成熟雌で最も高く、麻醉下の成熟雌に対しては減弱し、生体の雄イモリに対して求愛行動はほとんどみせなかった。イモリの樹脂模型を求愛対象に用いた解析では、付加する嗅覚情報として雄の飼育水もしくは既知の性フェロモンの単独提示では求愛行動を誘起しなかったが、雌の飼育水を成熟雌の外見を持った模型から呈示した際に模型に対する求愛行動が観察された。また、この雌の飼育水の求愛行動誘発活性は模型の体型と体色を雄のものに置換すると減弱をみせたことから、雌の飼育水中に含まれる未知の雌性フェロモンに加えて成熟雌の体型および体色が求愛行動誘発因子の実体であることが推測された(右図)。

今後、雌の飼育水に含まれる求愛行動誘発物質の同定や、視覚刺激を含めた誘発因子の個別提示時での脳内神経活動領域の同定によって、四肢動物に根元的な配偶者選択機構や求愛行動発現機序の解明が期待される。



様々な求愛対象に対する雄イモリの求愛行動誘発率の比較

W: 水道水 I: アイモリン(雌性フェロモン) S: ソデフリン(雄性フェロモン)
F: ♀の飼育水 M: ♂の飼育水

各値は 8 個体平均値(エラーバーは標準誤差)、図中の a-c は統計的有意性を示す。

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakae Kikuyama, Reiko Okada, Itaru Hasunuma, Tomoaki Nakada	4. 巻 284
2. 論文標題 Some aspects of the hypothalamic and pituitary development, metamorphosis, and reproductive behavior as studied in amphibians.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygcen.2019.113212	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 中田 友明	4. 巻 51(2)
2. 論文標題 ホルモンによる性フェロモンの生成と応答神経系の調節	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 44-48
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 -

1. 著者名 中田 友明	4. 巻 29(1)
2. 論文標題 有尾両生類の生殖行動と性フェロモン	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本味と匂学会誌	6. 最初と最後の頁 3-12
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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 伊豆半島に生息するイモリ 性フェロモン遺伝子の地域多様性
3. 学会等名 (公社)日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中田 友明, 豊田ふみよ, 富永 篤, 菊山 榮
2. 発表標題 イモリ雄性フェロモンペプチドの地域および種間変異
3. 学会等名 日本味と匂学会 第53回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊田 ふみよ, 原口 省吾, 山本 和俊, 松永 昌宏, 高瀬 稔, 中田 友明, 筒井 和義, 菊山 榮
2. 発表標題 雄イモリ腹腺由来ステロイドの性フェロモンとしての作用
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
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遺伝子の地域多様性
3. 学会等名 日本動物学会関東支部 第71回大会
4. 発表年 2019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 札幌大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 中田 友明、菊山 榮	4. 発行年 2020年
2. 出版社 有尾社	5. 総ページ数 5
3. 書名 Caudata 第4号	

1. 著者名 編：緑書房編集部 [中田 友明・横須賀 誠 (第4部 実験動物学)]	4. 発行年 2020年
2. 出版社 緑書房	5. 総ページ数 全：368のうち、担当：28p
3. 書名 動物看護の教科書 新訂版 第4巻	

〔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
---------	---------