

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成 22 年～平成 24 年

課題番号：22570075

研究課題名（和文）有尾両生類における性フェロモンの作用機構の解明

研究課題名（英文）The Action of the Sex Pheromones in Urodele

研究代表者 豊田 ふみよ（TOYODA FUMIYO）

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：10244708

研究成果の概要（和文）：

雄イモリ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雌嗅電図応答において互いに相加的、これらのステロイドと雌誘引ペプチドソデフリンは相乗的効果を示した。よって、3つの雌誘引フェロモンは協調して雌嗅上皮に作用して雌を誘引すると考えられる。雌誘引ステロイドに対する嗅電図応答は、雌ではプロラクチンとゴナドトロピン処理により高まったが、雄ではそのような効果はなかった。雌誘引ステロイド応答性はホルモン依存性および性依存性を有すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

A peptide pheromone (Sodefrin) and some steroidal pheromone candidates, androstenedione and pregnenolone, are secreted from the abdominal glands of the male newts, *Cynops pyrrhogaster*. Both androstenedione and pregnenolone attracted the sexually developed females. When subthreshold amounts of androstenedione and pregnenolone were applied in combination with sodefrin, they significantly enhanced the female-attracting activity of sodefrin. The preference of the females for both steroids was shown to be completely abolished by plugging the bilateral nostrils, indicating that these steroids act on the olfactory organ. In order to determine the sensitivity of the olfactory receptor cells in the ventral nasal epithelium to these steroids, electro-olfactograms (EOGs) were recorded. In the sexually developed females, the vomeronasal epithelium showed a great response to the steroids than the main olfactory epithelium. The EOG response of sexually developed females and undeveloped females treated with prolactin and gonatotropin was significantly greater than those of the hormone-treated males or untreated females. It was concluded that the main site of action of these steroids resides in the vomeronasal epithelium and that sensitivity to the steroids in this region is sex- and hormone-dependent.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：動物生理・行動

科研費の分科・細目：行動生理

キーワード：有尾両生類、性フェロモン、ホルモン、鋤鼻嗅覚上皮、求愛行動、ステロイド

1. 研究開始当初の背景

我々は、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発見、ソデフリンと命名した (Kikuyama, S., Toyoda, F., et al. **Sodefrin: a female-attracting peptide pheromone in newt cloacal glands.** Science 267:1643-1645, 1995)。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。一方、最近になって我々は雄イモリ腹部肛門腺にプレグネロン、プロゲステロン、アンドロステンダイオン、テストステロン、エストラジオールなど様々なステロイドが存在すること、そのうちのプレグネロンとアンドロステンダイオンが雌イモリに対する誘引効果を持ち、互いに相乗効果をもつことを確認した。両生類におけるステロイドフェロモンについては糖タンパクとステロイド物質の混合物がフェロモンとして働くという報告が1例あるのみで、我々がステロイド単独での有効性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など生理作用の解明が急務であった。一方、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。この両生類初の雄誘引フェロモンの解明に向けて研究を進めてきた。

2. 研究の目的

1) 最近我々が新たに発見した、雄イモリ腹腺由来の雌誘引ステロイドフェロモンの生理作用の解明、2) このステロイドフェロモンと我々がすでに明らかにしたペプチドフェロモンとの相互作用の追究、3) 両生類で初めての雄誘引フェロモンの解明を主な柱として、イモリ生殖行動発現に向けての雌雄のフェロモンの役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

雌誘引ステロイドがソデフリンと同様に鋤鼻嗅覚器官に作用するのか、両フェロモン間に相乗効果はあるのか、またフェロモン応答性がプロラクチンやゴナドトロピンなどのホルモンにより高まるのかどうか、ペプチド性の雄誘引フェロモンの雌誘引効果を明らかにするために、嗅覚阻害を含む誘引行動実験、そして嗅電図応答実験を行った。

4. 研究成果

(1) 我々が発見した雄イモリ腹腺由来の雌イモリ誘引ステロイド、プレグネロンとアンドロステンダイオンと雌誘引ペプチドソデフリンの相互作用を調べた。互いの有効量を組み合わせて調べた結果、雌を誘引できな

い閾値以下のプレグネノロンとアンドロステンダイオンでも互いに相加的に雌誘引効果を発揮すること、またこれらの閾値下の雌誘引ステロイドとソデフリンと組み合わせることにより、ソデフリンの持つ雌誘引効果を高めるなど両者の間に相加効果が安定して見られることを行動学的に確認した。

また雌誘引ステロイド作用部位とその応答性については、(2) プレグネノロンとアンドロステンダイオンに対する繁殖期雌イモリの嗜好性が嗅覚阻害により消失することを行動学的に明らかにした。さらに、(3) プレグネノロンとアンドロステンダイオンを性的に発達した雌イモリの鋤鼻嗅覚上皮に作用させた結果、嗅電図応答が生じることを確認した。このことから雌誘引ステロイドの作用部位が鋤鼻嗅覚上皮であると考えられる。また、雌誘引ステロイドとソデフリンの間には嗅電図応答性に関して相乗効果が見られることを確認した。以上のことから、プレグネノロンやアンドロステンダイオン両者は協調して雌の鋤鼻嗅覚上皮細胞膜上の受容体に作用して雌を誘引する可能性、さらにソデフリン応答性を高める効果があることを見出した。

さらに、雌誘引ステロイドに対する雄の応答性の調節に関して研究を進めた結果、(4) プレグネノロンやアンドロステンダイオンによる誘引活性や嗅電図応答は、雌ではプロラクチンとゴナドトロピン処理により高まるが、雄では同様のホルモン処理をしても高まらないことを確認した。このことから鋤鼻嗅覚上皮のプレグネノロンとアンドロステンダイオンに対する応答性はホルモン依存性および性依存性を有すると考えられる。

(5) 雌誘引ステロイドの合成メカニズムに関しては腹部肛門腺で合成されることを標識前駆体と肛門腺組織とのインキュベ-

ション後の産物を解析することにより明らかにした。これにより、腹腺から体外へと雌誘引ステロイドがどのように放出されるのかを解明してゆくための足掛かりを得た。

一方、(6) 雄誘引フェロモンの単離・同定を目的として、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、行動実験によりその活性を調べた。その結果、輸卵管水抽出物のタンパク質分解酵素処理結果から推定されていた通りペプチドであることを確認したので、アミノ酸シークエンサーを用いてアミノ酸配列を分析した。作成された合成品も雄誘引活性を有することを確認した。また、(7) 雄雌輸卵管由来の雄誘引ペプチドに対する雌の応答性は嗅覚系を介することを嗅覚阻害実験により証明、さらに嗅電図応答実験により雄嗅覚上皮において雄誘引ペプチド応答性を確認することができた。

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 3 件)

1) Hasunuma I., Toyoda F., Okada R., Yamamoto K., Kadono Y., Kikuyama S. Roles of arginine vasotocin receptors in the brain and pituitary of submammalian vertebrates. *International Review of Cell and Molecular Biology* Chapter 54, 査読有, 2013, (in press)

DOI: 10.1016/B978-0-12-407696-9.00004-X

2) Iwata T., Nakada T., Toyoda F., Yada T., Shioda S., Kikuyama S. Responsiveness of vomeronasal cells to a new peptide pheromone, sodefrin as monitored by

changes of intracellular calcium concentrations.

Peptides, 査読有, 45, 2013, 15-21

DOI: 10.1016/j.peptides.2013.04.006

3) Toyoda F., Hasunuma I., Nakada T., Haraguchi

S., Tsutsui K., Kikuyama S. (2012)

Involvement of the neurosteroid 7 α -hydroxypregnenolone in the courtship behavior of the male newt *Cynops*

pyrrhogaster. *Hormones and Behavior*, 査読有, 62, 2013, 375-380

DOI: 10.1016/j.yhbeh.2012.07.001

[学会発表] (計 10 件)

1) 豊田ふみよ、中田友明、原口省吾、山本和俊、筒井和義、山下勝幸、菊山榮、雄イモリ腹腺由来ステロイドに対する鋤鼻嗅覚上皮の応答、第90回日本生理学会大会、2013年03月28日、船堀タワーホール、東京都

2) 蓮沼 至、鯉渕俊彦、豊田ふみよ、中田友明、山本和俊、菊山榮、アカハライモリ嗅覚上皮のプロラクチン受容体と性ステロイドホルモン受容体の発現解析、第37回日本比較内分泌学会大会、2012年11月30日、福井大学文京キャンパス、福井県

3) 中田友明、中西功毅、山岸公子、豊田ふみよ、蓮沼至、菊山榮、プロラクチンとエストロジェンによるアカハライモリの行動と嗅覚上皮の組織学的変化、第37回日本比較内分泌学会大会、2012年11月30日、福井大学文京キャンパス、福井県

4) 豊田ふみよ、蓮沼至、中田友明、原口省吾、筒井和義、菊山榮、ニューロステロイド 7 α -hydroxypregnenoloneはイモリ求愛行動に関与する。

第35回日本神経科学大会、2012年09月19日、名古屋国際会議場、愛知県

5) 豊田ふみよ、中田友明、原口省吾、山本

和俊、筒井和義、菊山榮 雄イモリ腹腺由来ステロイドに対する雌鋤鼻嗅覚上皮の応答性、第83回日本動物学会大会、2012年09月15日、大阪大学豊中キャンパス、大阪府

6) Toyoda, F., Haraguchi S, Nakada, T, Yamamoto, K., Tsutsui, K., et al.

Abdominal gland-derived steroids act cooperatively with sodefrin to attract the female newt.

第89回日本生理学会、2012年3月31日長野県松本文化会館、長野県

7) 豊田ふみよ、原口省吾、中田友明、山本和俊、筒井和義、菊山榮、ステロイド性の雌イモリ誘引フェロモン、第36回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム、2011年11月24日、都道府県会館、東京都

8) 豊田ふみよ、原口省吾、中田友明、山本和俊、筒井和義、菊山榮、雄イモリ腹腺由来ステロイドの雌誘引作用、日本動物学会第82回大会2011年9月22日、旭川市大雪クリスタルホール・大雪アリーナ、北海道

9) Toyoda, F., Hasunuma, I., Nakada, T., Haraguchi, S. et al. Involvement of multiple hormones in the newt reproductive behavior. International Congress on Comparative Physiology and Biochemistry (ICCPB 2011) 2011年6月2日、名古屋国際会議場、愛知県

10) Toyoda, F., Hasunuma, I., Yamamoto, K., Yamashita, K., Kikuyama, S. Roles of prolactin and arginine vasotocin in the expression of the courtship behavior in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. 第88回日本生理学会、2011年3月28日~30日、パシフィコ横浜・会議センター、神奈川県

[図書] (計 1 件)

Kikuyama S., Toyoda F., Yamamoto K., Iwata

T., Nakada T., Hasunuma I. (2013) Handbook
of Biologically Active Peptides 2nd Ed.
Chapter 54 pp.384-390 Academic Press (in
press)

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・講師

研究者番号：10 244708