

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24年5月30日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770060

研究課題名（和文） 有尾両生類の求愛行動発現制御の内分泌学的解析

研究課題名（英文） Hormonal regulation of courtship behavior in the urodele amphibian

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

研究成果の概要（和文）：アカハライモリの雄の求愛行動発現に重要なホルモンであるプロラクチン（PRL）は、同様に求愛行動発現を誘起するアルギニンバソトシン（AVT）の放出や前駆体遺伝子の発現に影響を与えることがわかった。また、イモリ AVT 受容体を特異的に認識する抗体を用いた免疫組織化学的手法や AVT 受容体アンタゴニストを用いたレポーター遺伝子アッセイにより、イモリ脳内に発現する3種類の AVT 受容体のうち、特に V1a タイプ受容体が求愛行動発現に重要であると推定された。

研究成果の概要（英文）：It is known that anterior pituitary hormone prolactin (PRL) and posterior pituitary hormone arginine vasotocin (AVT) play important roles in the expression of courtship behavior of the male newt *Cynops pyrrhogaster*. In this study, we demonstrated that PRL has AVT releasing activity by the organ culture technique and up-regulates the expression of AVT precursor gene. Judging from the result of reporter gene assay using vasopressin V1a receptor antagonist and the localization of AVT V1a-type receptor in the newt brain, it was concluded that the AVT V1a-type receptor is one of the most important receptor in the courtship behavior induced by AVT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、形態・構造

キーワード：アカハライモリ；求愛行動；プロラクチン；アルギニンバソトシン；比較内分泌学

1. 研究開始当初の背景

繁殖期アカハライモリの雄は、雌に対して特異的な求愛行動を行う。この求愛行動発現にはプロラクチン (PRL) やアルギニンバソトシン (AVT) が重要な役割を果たす。これらホルモンを脳室または腹腔に投与して、行動実験を行うと、脳室に投与した場合、ごく微量で求愛行動が誘起されることから、中枢に作用して求愛行動が発現することが明らかにされている。一方で、我々は抗イモリ PRL 受容体抗体と抗 AVT 血清を用いた免疫組織化学的手法により、間脳視索前野の AVT 含有ニューロンに PRL 受容体が発現していることを見いだした。そこで、a) あらかじめ PRL を腹腔投与した雄に AVT 受容体アンタゴニストを脳室に投与する。b) あらかじめ AVT を腹腔投与した雄に抗 PRL 受容体抗体を脳室に投与する。以上の2つの実験を実施したところ、a) では求愛行動は抑制されたが、b) では求愛行動は抑制されなかった。つまり、PRL 存在下でも AVT 受容体をブロックすると求愛行動発現が抑制され、AVT が存在すれば PRL 受容体をブロックしても求愛行動は誘起される、ということが言えた。これら実験の結果と AVT 含有ニューロンに PRL 受容体が発現しているということを考慮すると、PRL による求愛行動誘起は AVT を介するという仮説を立てることができた。これら先行研究より、PRL の AVT 含有ニューロンへの作用、AVT の中枢への作用を分子レベルで解き明かす必要性が高まった。

2. 研究の目的

本研究では、PRL が(1) AVT 含有ニューロンに対してどのような作用を有するか、(2) AVT による求愛行動の誘起メカニズムに迫る、ということを目적으로した。具体的には、(1)ではPRLにAVT放出活性があるのかどうか、PRLがAVT含有ニューロンでAVT前駆体遺伝子の発現に対してどのような影響をおよぼすのかを解析することとした。(2)では、アカハライモリは3種類のAVT受容体が脳で発現しているが、それら受容体に対する特異的抗体を作成し、詳細に脳内のAVT受容体発現部位を特定すること、レポーター遺伝子アッセイを利用してどの受容体が求愛行動発現に関与するかを特定すること、それら結果を総合し、求愛行動誘起に重要な脳部位を特定することを目的とした。

3. 研究の方法

1) アカハライモリ脳培養系を用いたプロラクチンのAVT産生および放出に与える影響

の解析：両生類生理食塩水 (111 mM NaCl, 1.9 mM KCl, 1.1 mM CaCl₂, 2.4 mM NaHCO₃)、培養液 (70% M199, 20 mM Hepes, 10 mM NaHCO₃, 100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin) を準備した。あらかじめメディウムを 500 µl 入れておいた 48 穴プレートのウェルに脳 (脳膜、脈絡叢、下垂体を除去したもの) を一つづ入れた。メディウムを再度交換し、23°C, 95% Air, 5% CO₂ で 90 分インキュベート。90 分後 oPRL 含 or 不含メディウムと交換した。oPRL 濃度は 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ M である。23°C, 95% Air, 5% CO₂ で 24 時間インキュベートした。24 時間後、メディウムおよび脳を回収し、メディウムは凍結乾燥した。脳は、ボイル後、5% 酢酸中でホモジナイズし、C18 カラムに通すことによって AVT を粗精製した。メディウム中および脳内の AVT 量は抗 AVT 抗血清を用いた放射免疫測定法によって測定した。

2) PRL の AVT 前駆体 mRNA 発現レベルへの影響：下垂体除去手術を施した雄イモリの脳室に PRL を投与した個体について、間脳視索前野の AVT 含有ニューロンにおける AVT 前駆体 mRNA 発現を *in situ* hybridization により解析した。AVT 前駆体 mRNA と相補的なプローブは fluorescence で標識しており、*in vitro* transcription により合成した。プローブの長さはおよそ 300 base で、メソトシン前駆体 mRNA とは反応しないことをあらかじめ確認した。ハイブリダイゼーション後、切片を洗浄し、抗 fluorescence 抗体-ペルオキシダーゼ標識を反応させ、ジアミノベンジジン(DAB)をクロモゲンに発色反応を別々に進めた。発色反応は全てのサンプルを同時に、同一時間行った。

3) プロラクチンの間脳視索前野における AVT 免疫陽性反応への影響：下垂体除去手術を施した雄イモリの腹腔に PRL を投与し、脳を採取した。ウサギ抗 AVT 抗血清を用いた免疫組織化学的手法 (ABC 法) により間脳視索前野における AVT の免疫陽性反応性を解析した。使用した抗 AVT 抗血清は上記条件下では MT と交叉しないことをあらかじめ確認している。また、発色にはジアミノベンジジンをクロモゲンに使用したが、発色反応は全てのサンプルで同時に、同一時間行った。

4) アカハライモリ脳内の AVT 免疫陽性細胞・繊維および AVT タイプ受容体免疫陽性細胞の分布：抗 AVT 血清およびアカハライモリ AVT V1a、V2、V3/V1b タイプ受容体カルボキシ末端のペプチドを抗原としたモルモット抗イモリ AVT V1a、V2、V3/V1b タイプ受容体抗血清を使用した免疫組織化学的手法 (ABC 法) により、雄イモリ脳内の AVT 免疫陽性細胞・繊維および AVT 受容体免疫

陽性細胞の分布を解析した。

5) レポーター遺伝子アッセイを用いたイモリ AVT 受容体のバソプレッシン V1a 受容体のアンタゴニストに対する反応性の検証: HEK293 細胞に各イモリ AVT 受容体の ORF が組み込まれた発現ベクター (pF9A CMV *hRluc*-neo Flexi Vector: プロメガ) およびレポーター遺伝子ベクター (pGL4.29[*luc2P*/CRE/Hygro]Vector または pGL4.30[*luc2P*/NFAT-RE/Hygro] Vector) を導入した。レポーター遺伝子の発現が活性化する AVT 濃度を決定し、一定濃度の AVT に対し、種々の濃度のバソプレッシン V1a 受容体のアンタゴニスト ([$(\text{CH}_2)_5^1$, Tyr(Me)², Arg⁸]-vasopressin) を加え、レポーター遺伝子の発現を解析した。

4. 研究成果

1) アカハライモリ脳培養系を用いたプロラクチンの AVT 産生および放出に与える影響の解析: イモリ脳からメディウム中に放出された AVT はコントロールと比較し、PRL 濃度依存的に増加する傾向にあり、 10^{-6} M の PRL に曝露されたとき、統計的に有意に AVT 放出量が増加した。また、培養脳内の AVT 量についても、PRL 濃度依存的に増加する傾向にあったが、統計的に有意な差は見られなかった。

2) PRL の AVT 前駆体 mRNA 発現レベルへの影響: 間脳視索前野に AVT 前駆体 mRNA シグナルの集団が観察された。PRL を投与した個体では AVT 前駆体 mRNA シグナル強度が生理食塩水投与個体と比較し、高まっている様子が観察された。

3) プロラクチンの間脳視索前野における AVT 免疫陽性反応への影響: 腹腔内に PRL を投与した個体および生理食塩水を投与したコントロール群で、間脳視索前野の AVT 免疫陽性反応を比較したところ、PRL 投与群の方が、コントロール群と比較し、免疫陽性反応の強度が強い様子が観察された。

4) アカハライモリ脳内の AVT 免疫陽性細胞・繊維および AVT タイプ受容体免疫陽性細胞の分布: AVT 免疫陽性細胞は、主として間脳視索前野に見られた。ごくわずかに大脳内側外套、分界上床核で見られた。免疫陽性繊維は下垂体後葉に投射しているものだけでなく、多くの脳部位で観察された。特に大脳内側外套、扁桃核、分界上床核、間脳視索前野、腹側視床下部、視葉、延髄白質等で観察された。V1a 受容体は大脳では内側外套に最も強い発現を示しており、扁桃核、分界上床核にも発現が確認された。間脳では視索前野、視交叉上核、視床、室周核、背側および腹側視床下部に、中脳では視葉、脚間核、延髄では網様体および縫線核に発現が認められ、さらに、イモリ雄の求愛行動時の尾を振

る行動に直接関わりがあると考えられている第 8 脳神経根近傍に存在するマウスナー細胞も免疫陽性反応を示した。V2 タイプ受容体は大脳の内側外套、扁桃核、分界上床核、中脳の視蓋等の非常に限られた部分に発現が確認された。最も発現レベルが高い部位は副生体であった。V3/V1b タイプ受容体は大脳での発現が確認されず、間脳では背側視床、室周核、背側視床下部、中脳では視蓋および脚間核、延髄では縫線核で発現が確認された。

5) レポーター遺伝子アッセイを用いたイモリ AVT 受容体のバソプレッシン V1a 受容体のアンタゴニストに対する反応性の検証: 求愛行動発現を抑えるバソプレッシン V1a 受容体のアンタゴニスト ([$(\text{CH}_2)_5^1$, Tyr(Me)², Arg⁸]-vasopressin) は V1a、V3/V1b タイプ受容体を発現させた HEK293 細胞でのレポーター遺伝子の発現を抑制させた。つまり、これら 2 種類の受容体のシグナルトランスダクションを抑制することがわかった。

6) 結果のまとめ、結果の国内外における位置づけ、今後の展望: 本研究より、PRL には AVT 含有ニューロンより AVT を放出する活性を有すること、また AVT 前駆体 mRNA 発現や翻訳を促進する活性があることがわかった。哺乳類でも、特に齧歯目では PRL は母性行動を誘起することがわかっており、その中枢作用に関連した研究がなされている。しかし分子メカニズムに関する知見はまだ乏しいと言える。本研究の成果は、PRL の中枢作用に、後葉ホルモン含有ニューロンが密接に関与していることを示すものであり、他脊椎動物の PRL の中枢作用に新たな知見・可能性を与えられよう。また、AVT 受容体のイモリ脳内の詳細な発現分布を解析したが、サブタイプごとに解析した例は、その他の脊椎動物では報告がなく、本研究は先駆的成果と言える。レポーター遺伝子アッセイの結果、求愛行動を抑制することができるバソプレッシン V1a 受容体アンタゴニスト ([$(\text{CH}_2)_5^1$, Tyr(Me)², Arg⁸]-vasopressin) は V1a タイプ、V3/V1b タイプ受容体のシグナルトランスダクションを抑制することがわかったが、V3/V1b タイプ受容体の脳内での発現部位は間脳や延髄のごく限られた部位に発現するにとどまり、一方で V1a タイプ受容体は生殖行動発現に重要と考えられている間脳視索前野や求愛行動時に尾を振る行動に直接的に関与すると目されているマウスナー細胞にも発現することから、求愛行動発現には V1a タイプ受容体が、より重要な役割を担っているのではないかと考えられる。今後は実際に雄イモリが求愛行動発現しているときの、血中の PRL や AVT レベルを測定すること、脳内の活性化神経細胞を同定すること、AVT V1a タイプ受容体が発現している細胞がどのようなニューロペプチド、アミン、ニューロ

ステロイドを合成しているか等について検証していく必要がある。また、近年、PRLやAVTのみならず、ニューロステロイドである7 α -ヒドロキシプレグネノロンも求愛行動を助長する活性を有すること、7 α -ヒドロキシプレグネノロンはさらにドーパミンを介して求愛行動発現に関与することなどが確かめられてきている。これらホルモンがどのように相互作用しているかを詳細に解析していくことが求められる。

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7件)

1: Haraguchi S, Koyama T, Hasunuma I, Okuyama S, Ubuka T, Kikuyama S, Do Rego JL, Vaudry H, Tsutsui K. Acute stress increases the synthesis of 7 α -hydroxypregnenolone, a new key neurosteroid stimulating locomotor activity, through corticosterone action in newts. *Endocrinology*. 2012, 153:794-805. 査読有り

DOI: 10.1210/en.2011-1422

2: Takase M, Haraguchi S, Hasunuma I, Kikuyama S, Tsutsui K. Expression of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme mRNA and production of pregnenolone in the brain of the red-bellied newt *Cynops pyrrhogaster*. *Gen Comp Endocrinol*, 2011, 170:468-74. 査読有り
DOI: 10.1016/j.ygcen.2010.10.019

3: Hasunuma I, Toyoda F, Kadono Y, Yamamoto K, Namiki H, Kikuyama S. Localization of three types of arginine vasotocin receptors in the brain and pituitary of the newt *Cynops pyrrhogaster*. *Cell Tissue Res*. 2010, 342:437-57. 査読有り
DOI: 10.1007/s00441-010-1079-0

4: Nakano M, Minagawa A, Hasunuma I, Okada R, Tonon MC, Vaudry H, Yamamoto K, Kikuyama S, Machida T, Kobayashi T. D2 Dopamine receptor subtype mediates the inhibitory effect of dopamine on TRH-induced prolactin release from the bullfrog pituitary. *Gen Comp Endocrinol*. 2010, 168:287-92. 査読有り

DOI: 10.1016/j.ygcen.2010.05.008

5: Haraguchi S, Koyama T, Hasunuma I, Vaudry H, Tsutsui K. Prolactin increases the synthesis of 7 α -hydroxypregnenolone, a key factor for induction of locomotor activity, in

breeding male Newts. *Endocrinology*. 2010, 151(5): 2211-22. 査読有り

DOI: 10.1210/en.2009-1229

6: Hasunuma I, Iwamuro S, Kobayashi T, Shirama K, Conlon JM, Kikuyama S. Expression of genes encoding antimicrobial peptides in the Harderian gland of the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2010, 152(3):301-5. 査読有り

DOI: 10.1016/j.cbpc.2010.05.005

7: Nakano M, Hasunuma I, Okada R, Yamamoto K, Kikuyama S, Machida T, Kobayashi T. Molecular cloning of bullfrog D2 dopamine receptor cDNA: Tissue distribution of three isoforms of D2 dopamine receptor mRNA. *Gen Comp Endocrinol*. 2010, 168(1):143-8. 査読有り

DOI: 10.1016/j.ygcen.2010.04.016

[学会発表] (計2件)

1: 豊田ふみよ、蓮沼至、他 Involvement of multiple hormones in the newt reproductive behavior
8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry-ICCPB-Nagoya, Japan 2011
2011年6月2日名古屋

2: 蓮沼至、菊山榮、他 アルギニンバソトシンによるアカハライモリ求愛行動発現機構
第35回日本比較内分泌学会大会
2010年11月18日静岡

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

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし