

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770060

研究課題名(和文) 有尾両生類の求愛行動発現に関わるホルモンの協調作用メカニズム

研究課題名(英文) The synergistic action of androgen and pituitary hormones involved in the expression of courtship behavior of 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：アカハライモリ雄の求愛行動発現にはプロラクチンやアルギニンバソトシンなどの複数のホルモンが協調して作用する。中でも雄性ホルモンであるアンドロジェンは重要な分子である。本研究では中枢神経系でのアンドロジェン受容体(AR)の発現分布を詳細に解析し、求愛行動発現に重要な部位にARが発現していることを突き止めた。求愛行動発現に関与するホルモンの協調作用を分子レベルで解析するための基礎となるデータを得た。

研究成果の概要(英文)：In the breeding season, sexually developed male newt *Cynops pyrrhogaster* 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 anterior pituitary hormone prolactin (PRL) and posterior pituitary hormone arginine vasotocin (AVT), and sex steroid hormone androgen. In particular, androgen is one of the crucial factors for expression of reproductive behavior. In this study, the detailed localization of androgen receptor (AR) in the central nervous system of sexually active male newt was analyzed by immunohistochemistry technique using the specific antibody against newt AR. AR-immunopositive cells were widely distributed throughout the brain including the various regions involved in the regulation of courtship behavior. The results obtained in this study serve the information for understanding the synergistic actions of androgen and other hormonal factors.

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：求愛行動 アカハライモリ 雄性ホルモン プロラクチン アルギニンバソトシン 脳 下垂体

1. 研究開始当初の背景

有尾両生類アカハライモリの雄は、繁殖期になると雌に対して特異的な求愛行動を示す。この行動の発現には様々なホルモンが関与することが知られている。中でも下垂体前葉ホルモンのプロラクチン (PRL) および下垂体後葉ホルモンのアルギニンバソトシン (AVT) については、これらが中枢に作用して求愛行動の発現に関与することが示されている。また、間脳の視索前野に存在する AVT 産生ニューロンには PRL 受容体が発現していることが分かっており、また、抗イモリ PRL 受容体抗体を脳室投与によって求愛行動の発現を抑制しても、AVT の投与で求愛行動発現を回復できること、脳内の AVT 受容体の機能をブロックするためにバソプレシン V1a 受容体アンタゴニストを脳室投与して求愛行動発現を抑制した場合、PRL の投与では同発現を回復できないこと、などから、PRL の関与する求愛行動の発現は少なくとも AVT を介するものと考えられている。ただ、これらホルモンの作用は雄性ホルモンであるアンドロジェン存在下で増強され、単独ではその作用は限定されることから、アンドロジェンと協調作用していると考えられている。一方で、雌性ホルモンであるエストロジェンは求愛行動発現を抑制する機能があることが知られている。このようにタンパク質性またはペプチド性ホルモンとステロイドホルモンの協調作用が知られているが、その分子メカニズムについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、アカハライモリ求愛行動発現に対するホルモンの協調作用のメカニズムを探るため、重要度の高いアンドロジェンの作用に着目した。有尾両生類ではアンドロジェン受容体 (AR) 分子の解析がほとんど進んでいなかったため、遺伝子レベルおよびタンパク質レベルで解析ができるよう、cDNA のクローニング、AR 発現系の開発、イモリ AR と特異的に認識する抗体の作製を試みた。さらに抗体を用いて、繁殖期雄イモリの中枢神経系における AR の発現部位を詳細に解析することを目的とした。また、エストロジェンは求愛行動発現を抑えることから、エストロジェン受容体 (ER) の発現も解析できるよう、イモリ ER を特異的に認識する抗体の作製も試みた。

3. 研究の方法

(1) アカハライモリ AR cDNA のクローニング：アカハライモリ精巢から ISOGEN II (Nippon Gene) を用いて全 RNA を抽出した。これを出発材料に RACE 法によりアカハライモリ AR のタンパク質をコードする領域を含む cDNA の塩基配列の解析を行った。さらにクローニングしたイモリ AR cDNA が機能的であるかどうかをレポータージーンア

ッセイによって解析した。イモリ AR の open reading frame を pF9A CMV *hRluc-neo* Flexi Vector (Promega) に導入し、pGL 4.36[luc2P/MMTV/Hygro] vector とともに HEK293 細胞にトランスフェクションし、HEK293 細胞にイモリ AR を一過性発現させた。このイモリ AR を発現する細胞に各種ステロイドホルモンを種々の濃度で反応させ、ルシフェラーゼの活性により、イモリ AR と使用したステロイドホルモンとの反応性を検証した。

(2) RT-PCR によるアカハライモリ雌雄の嗅覚上皮および中枢神経系における性ステロイドホルモン受容体遺伝子の発現解析：繁殖期および非繁殖期雌雄アカハライモリより、嗅覚上皮および脳を採取し、RNA の分解を抑える RNA later (Qiagen) に浸漬した。これら組織から上記方法を用いて全 RNA を抽出した。この全 RNA を Superscript III 逆転写酵素 (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した。これを鋳型にアカハライモリ AR、ER α および ER β に特異的なプライマーを設計し、PCR を実施した。

(3) アカハライモリ AR および ER β タンパク質に特異的な抗体の作製：アカハライモリ AR タンパク質の N 末端の 23 残基および ER β タンパク質の C 末端近傍の 19 残基のペプチドを合成し、テンガイヘモシアニン付加後、AR についてはウサギに、ER β についてはモルモットにそれぞれ免疫した。これにより抗イモリ AR 血清および抗イモリ ER β 血清を得た。さらにそれぞれ抗原ペプチドカラムを作製し、これら抗血清から特異的に抗原を認識する IgG を精製した。さらに抗体の特異性を、COS7 細胞にイモリ AR および ER β を一過性発現させた COS7 細胞から抽出したタンパク質を用いた Western blot 解析で検証した。

(4) 抗イモリ AR 抗体を用いた免疫組織化学的手法によるイモリ脳内の AR 発現部位の解析：繁殖期および非繁殖期の雄アカハライモリを、まず 4% パラホルムアルデヒド液で灌流固定し、その後脳を取り出し、さらにブアン液で 5 時間 (4°C) 浸漬固定した。20% スクロース液に浸漬後、OCT コンパウンドを用いて凍結包埋した。約 10 μ m 厚の凍結切片を作製し、一次抗体として抗イモリ AR 抗体、二次抗体として抗ウサギ IgG 抗体 HRP 標識または抗ウサギ IgG 抗体 Cy3 標識を用いた。また、一次抗体として抗チロシンヒドロキシラーゼ抗体も使い、イモリ脳内の AR 発現部位とドーパミン発現部位とを比較した。また、精巢除去したイモリを 2 群準備し、一方には生理食塩水に溶解した合成アンドロジェンのテストステロンプロピオネートを 2 週間に渡り注射し、もう一方の群には、同一期間に生理食塩水を注射した。これら個体について免疫組織化学的手法で脳内の AR 免疫陽性細胞の分布を比較した。

4. 研究成果

(1)アカハライモリ AR の構造と AR の各種ステロイドホルモンに対する反応性：アカハライモリ AR をクローニングした結果、723 アミノ酸残基からなり、A/B 領域、C 領域、D 領域、E/F 領域というように典型的な核内受容体の構造が見られた。特に、C 領域 (DNA 結合領域) E/F 領域 (リガンド結合領域) で、他種 AR と相同性が高いことがわかった。レポーター遺伝子アッセイの結果、 5α ジヒドロテストステロンとの反応性が最も高く (50% 効果濃度: $1.6 \times 10^{-11} \text{ M}$)、次いで、テストステロンとの反応性が高かった (50% 効果濃度: $2.7 \times 10^{-11} \text{ M}$)。また、アンドロステンジオンにも反応を示した (50% 効果濃度: $3.9 \times 10^{-10} \text{ M}$)。なお、 17β -エストラジオールとはほとんど反応しなかった。これらより、今回クローニングした AR 分子は、アンドロゲンと反応する機能的な分子であることが実証された。

(2) アカハライモリ嗅覚上皮および脳における AR および ER α 、ER β 遺伝子の発現：アカハライモリ AR、ER α 、ER β cDNA を特異的に増幅するプライマーペアにて RT-PCR を行った結果、雌雄の嗅覚上皮では、AR および ER β の発現を確認することができた。さらに脳においても、雌雄ともに AR および ER β の発現を確認することができた。ER α については PCR 反応を 40 サイクルさせても cDNA の増幅することを確認することができなかった。アカハライモリの嗅覚上皮、脳では雌雄ともに AR および ER β 遺伝子は発現しており、ER α の発現はきわめて低いことがわかった。また、脳では他脊椎動物では、生殖に関連する ER は主として ER α であることが知られており、イモリの場合でもさらに検証する必要がある。

(3) 抗イモリ AR 抗体および ER β 抗体作製とその特異性の確認：アカハライモリ AR および ER β タンパク質に特異的な抗体の作製を試みた。アカハライモリ AR および ER β をそれぞれ COS7 細胞に一過性発現させ、それら細胞からタンパク質を抽出し、Western blot 解析を行い、抗体の特異性を確認した。すると抗イモリ AR 抗体を用いた場合には約 100 kDa の免疫陽性バンドが、抗イモリ ER β 抗体の場合には約 60 kDa の免疫陽性バンドが得られた。これら免疫陽性バンドはイモリ AR または ER β を一過性発現させていない COS7 細胞から抽出したタンパク質を用いた場合には得られず、またそれぞれ抗原ペプチドで吸収した抗体を用いた場合には免疫陽性バンドは消失した。以上から、これら抗体はイモリ AR またはイモリ ER β タンパク質を特異的に認識することを確認できた。また、抗イモリ AR 抗体については、イモリ脳、精巢、腹部肛門腺 (腹腺) から抽出した核タンパク質を用いた Western blot 解析を行った結果、COS7 細胞タンパク質を用いた解析と同様のサイズに免疫陽性バンドが得られた

ため、生体内の AR タンパク質も認識することも確かめられた。さらに精巢および腹腺の凍結切片を用いた免疫組織化学的手法により、精巢では生殖細胞と思われる細胞および隣り合った精細管の間隙に存在する体細胞と思われる細胞 (ライディッチ細胞) の核が免疫陽性反応を示し、腹腺上皮細胞でも核が濃染された。これら免疫陽性反応は、抗原ペプチドで吸収した抗体を用いると消失することから特異的であることがわかった。つまり、抗 AR 抗体は免疫組織化学的手法にも応用できることが確認された。

(4) イモリ脳内の AR 免疫陽性細胞の分布：抗イモリ AR 抗体を用いた免疫組織化学的手法により、繁殖期雄脳内の AR 免疫陽性細胞の分布を調べた。大脳から延髄にかけて広範囲に免疫陽性細胞が存在することが明らかになった。大脳では、嗅球、外側外套、扁桃体、分界上床核、間脳では視索前野、腹側・背側視床下部、中脳では視葉、脚間核で強いシグナルが見られ、延髄では運動ニューロンと思われる大型の細胞の核が染色された。また、第 8 脳神経根近傍に存在するマウスナー細胞の核も免疫陽性反応を示した。大脳の嗅球や、間脳視索前野腹側ではチロシンヒドロキシラーゼ免疫陽性細胞 (ドーパミンニューロン) の核が AR 免疫陽性反応を示すことがわかった。また、同じく間脳視索前野でも、背側の大細胞も免疫陽性細胞であった。さらに精巢除去し、テストステロンプロピオネートを投与した群または生理食塩水投与群で脳内 AR の発現部位を比較すると、発現部位自体には大きな違いは見られなかったが、前者のテストステロンプロピオネートを投与した個体では、前述の神経核において、核に強い免疫陽性反応が見られる細胞が観察されたが、後者では全体として免疫陽性反応が弱く、また、細胞質が染色される細胞も散見された。これは腹腺上皮細胞でも同様の傾向が見られており、テストステロンプロピオネートを投与した個体の腹腺上皮細胞の核に強い免疫陽性反応が見られたが、生理食塩水投与群の個体では核の免疫陽性反応は弱く、細胞質が染色された。

(5) イモリ嗅覚上皮および脳での ER β 免疫陽性細胞の分布：抗 ER β 抗体を用いた免疫組織化学的手法では、繁殖期雌の嗅覚上皮では免疫陽性反応が得られており、主嗅上皮および鋤鼻上皮双方に免疫陽性細胞が見られた。現状では、免疫陽性細胞がどのような性質の細胞なのかまだ不明である。また、雌脳では視索前野で免疫陽性反応が見られているが、脳での解析はまだ十分にできていない。

(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：AR や ER β 遺伝子発現に着目した解析では、イモリ雌雄の嗅覚上皮や脳で発現に明瞭には違いを見いだすことはできなかった。雌雄の違いはこれら受容体分子ではなく、これら受容体分子が制御する遺伝子が生んでいると推定される。今後、

雌雄イモリの中樞神経系について性ステロイドホルモンが制御する遺伝子を網羅的に解析することも必要だろう。

本研究により特に雄イモリ生殖活動に不可欠である AR 分子についてタンパク質レベルで解析ができるようになったことは主要な成果の1つといえる。特に下等脊椎動物では、遺伝子発現の解析が主流であり、機能分子をタンパク質レベルで解析している例は未だに少ないのが現状である。さらに機能的なイモリ AR を培養細胞で発現させることもできるようになり、AR による転写制御メカニズムや AR と相互作用するタンパク質分子の解析なども進められることとなる。今後タンパク質レベルでアンドロジェンと PRL や AVT との協調作用を解析することも可能となった。

イモリ求愛行動発現に対するホルモン制御という点から本研究を総括すると、AR が嗅球や外側外套や扁桃体など、嗅覚情報の伝達に関わる部位にも見られたことは興味深い。雄の求愛行動発現には性的に発達した雌の存在が重要であり、雌から放出されるフェロモンが行動発現のキーとなると考えられている。また嗅球では少なくともドーパミンニューロンに AR 免疫陽性反応が確認されたが、嗅球のドーパミンニューロンは介在ニューロンであるとされており、嗅覚情報の伝達や制御に関わると考えられているため、アンドロジェンもこれらに関与することで、生殖活動発現に寄与する可能性が考えられる。また、延髄の第8脳神経根近傍のマウスナー細胞既はアンドロジェンや PRL により細胞体や核の大型化が実験的に証明されているが、同細胞が AR 免疫陽性であることはアンドロジェンのマウスナー細胞への直接作用を証明するものである。このように AR は求愛行動発現にきわめて重要と考えられる部位に発現しており、アンドロジェンが不可欠であることを物語っている。

本研究により、ステロイドホルモンとタンパク質性およびペプチド性ホルモンとの協調作用について、分子レベルで解析するためのツールおよび基礎的なデータを得ることができた。この研究を推進することで比較内分泌学的、比較生理学的意義のある成果が得られるものと考えられる。

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 3 件)

Nakada T, Hagino-Yamagishi K, Nakanishi K, Yokosuka M, Saito TR, Toyoda F, Hasunuma I, Nakakura T, Kikuyama S.
Expression of G protein in the olfactory receptor neurons of the newt, *Cynops pyrrhogaster*: Their unique projection

into the olfactory bulbs.

The Journal of Comparative Neurology, 2014, in press, 査読有り
DOI:10.1002/cne.23619.

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, 2013, 304: 191-225. 査読有り
DOI:10.1016/B978-0-12-407696-9.00004-X.

Toyoda F, Hasunuma I, Nakada T, Haraguchi S, Tsutsui K, Kikuyama S.
Involvement of the neurosteroid 7 α -hydroxypregnenolone in the courtship behavior of the male newt *Cynops pyrrhogaster*.

Hormones and Behaviors, 2012, 62: 375-380. 査読有り
DOI:10.1016/j.yhbeh.2012.07.001.

〔学会発表〕(計 15 件)

石川由里菜、小林哲也、岩室祥一、菊山榮、蓮沼至

アカハライモリ脳における甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン前駆体遺伝子の発現
日本動物学会 第 66 回関東支部大会
2014 年 3 月 15 日、東京大学(千葉県柏市)

内山愛里、望月拓也、小西裕己、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥一
ウシガエルの生体防御における Catesbeianalectin の多機能性
日本動物学会 第 66 回関東支部大会
2014 年 3 月 15 日、東京大学(千葉県柏市)

齋藤朗、川崎はるな、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥一
トノサマガエル皮膚由来細胞株 LAH2 の生体防御ペプチド
日本動物学会 第 66 回関東支部大会
2014 年 3 月 15 日、東京大学(千葉県柏市)

宍戸駿、大森聖也、近藤博匡、蓮沼至、岩室祥一、菊山榮、小林哲也
ウシガエル舌における抗菌ペプチド遺伝子の発現
日本動物学会 第 66 回関東支部大会
2014 年 3 月 15 日、東京大学(千葉県柏市)

柿崎諒、蓮沼至、山本和俊、菊山榮、小林哲也
変態期のウシガエル幼生における PRL 受容体と ENaC mRNA の発現動態
日本動物学会 第 66 回関東支部大会
2014 年 3 月 15 日、東京大学(千葉県柏市)

鯉淵俊彦、豊田ふみよ、伊藤洋一、岩室祥一、菊山榮、蓮沼至
アカハライモリ脳内雄性ホルモン受容体の発現
第 38 回日本比較内分泌学会大会
2013 年 10 月 25 日、宮崎市民プラザ(宮崎県宮崎市)

近藤博匡、武田あすな、蓮沼至、岩室祥一、菊山榮、古館宏之、小林哲也
ファブリキウス嚢における fowlicidin-2 の生理機能の解析
第 38 回日本比較内分泌学会大会
2013 年 10 月 25 日、宮崎市民プラザ(宮崎県宮崎市)

木幡奈都乃、中野真樹、小林哲也、蓮沼至、山本和俊、菊山榮、岡田令子
ウシガエル TRH 前駆体 mRNA 発現に及ぼす環境温度の影響
第 38 回日本比較内分泌学会大会
2013 年 10 月 25 日、宮崎市民プラザ(宮崎県宮崎市)

寒河江望、小西裕己、森田愁、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥一
生体防御ペプチドにおける多機能性の測定法の確立
日本動物学会第 84 回大会
2013 年 9 月 28 日、岡山大学(岡山県岡山市)

近藤博匡、武田あすな、蓮沼至、岩室祥一、菊山榮
ファブリキウス嚢における fowlicidin の発現と生理機能の解析
日本動物学会第 84 回大会
2013 年 9 月 28 日、岡山大学(岡山県岡山市)

鯉淵俊彦、豊田ふみよ、伊藤洋一、岩室祥一、菊山榮、蓮沼至
アカハライモリ中枢神経系における雄性ホルモン受容体の発現
日本動物学会第 84 回大会
2013 年 9 月 27 日、岡山大学(岡山県岡山市)

豊田ふみよ、蓮沼至、原口省吾、中田友明、山本和俊、筒井和義、菊山榮
雄アカハライモリ求愛行動発現に関するホルモンの相互関係
日本動物学会第 84 回大会
2013 年 9 月 27 日、岡山大学(岡山県岡山市)

鯉淵俊彦、伊藤洋一、岩室祥一、菊山榮、蓮沼至
アカハライモリ精巣および腹部肛門腺における雄性ホルモン受容体の発現
日本動物学会 第 65 回関東支部大会
2013 年 3 月 16 日、東京工業大学(東京都)

蓮沼至、鯉淵俊彦、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(福井県福井市)

中田友明、中西功樹、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水中移行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(福井県福井市)

〔図書〕(計 1 件)
Kikuyama S, Toyoda F, Yamamoto K, Iwata T, Nakada T, Hasunuma I.
Sodefrin and related pheromones. /n "Handbook of Biologically Active Peptides second edition" (A. Kastin, Ed), Academic Press, New York, 2013 pp. 384-390.

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.lab.toho-u.ac.jp/sci/bio/reg1/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