

カスミサンショウウオの性フェロモンと受容体について

About a sexual pheromone and the receptor of the Clouded salamander

岐阜県立岐阜高等学校 2年8組 河野有香 2年4組 村瀬すぐり

Abstract : We hypothesized the existence of a sexual pheromone which provokes the reproductive behavior of the male Clouded salamander. Based on the experiment, we found that the sexual pheromone doesn't exist as a protein. In addition, the males detected the pheromone with a vomeronasal organ, and nearby species could also detect the pheromone of the Clouded salamander.

Keywords : *Hynobius nebulosus*, Sexual pheromone, Receptor, Reproductive behavior

1. 研究背景

カスミサンショウウオ(*Hynobius nebulosus*)は西日本を中心に広く分布する、止水産卵性の小型サンショウウオである。岐阜県は生息域の北東端で、岐阜県版レッドリスト絶滅危惧I類に指定されている。カスミサンショウウオの生殖行動において、オスは産卵前のメスに対して盛んに尾を振るなどアピールし、産卵を促す行動をとるが、メスの産卵後、オスは卵嚢に抱き着き放精すると、メス個体に対して全く反応しないことが報告されている(林, 1980, 前田ら, 2015)。オスの生殖行動における上記のような差異は、メスが分泌する性フェロモンに起因すると仮説をたて本研究を行った。性フェロモンとは、生物から体外に分泌され、同種の他個体に特定の反応を引き起こす物質であり、性の判別や異性の誘引に携わる化学物質である(生物教育用語集, 1998)。現在、有尾両生類であるアカハライモリの性フェロモンの研究が進んでいるが、受容体は同定されておらず、近縁種には効果が無いことが報告されている(Kikuyama ら, 1995, Nakada ら, 2007, 2017)。

2. 研究目的・意義

生殖行動における同種のオスとメスの出会いと、個体間の化学的なコミュニケーションの仕組みを解明することは、非常に重要である。化学的なコミュニケーションは、情報分子とその受容体があってはじめて成り立つものであり、原生生物から哺乳類まで様々な生物の生殖行動において、その原因物質として性フェロモンの存在が示されている。本研究では、カスミサンショウウオのオスの生殖行動を誘引する性フェロモンの存在を明らかにし、科学的性質、受容体の特定を目的とした。また、性フェロモンが近縁種でどの程度有効であるかを明らかにすることで、脊椎動物の陸生環境への適応に伴う嗅覚系や生殖能力の進化に迫ることを目指した。

3. 研究方法

- ①ホルモン処理：安定的に生殖行動を観察する実験を行うため、性ホルモン投与を試みた。
- ②行動実験：以下の実験1～5を行い生殖行動の原因物質と考えられる性フェロモンの性質を調べた。
 - 実験1 (存在の有無)：採取した卵嚢をオスに与えて、生殖行動が誘引されるか観察した。
 - 実験2 (分泌部位の特定)：産卵直後の卵嚢、卵管、子宮部のホモジェネートをスポンジに塗布し、オスに与えて反応を観察した。
 - 実験3 (化学的性質の特定)：実験2のホモジェネートを加熱処理、タンパク質分解酵素処理(ProK処理)をしてスポンジに塗布し、オスに与えて反応を観察した。
 - 実験4 (受容部位の特定)：ワセリン綿球で鼻孔を塞いだオスと眼球切除したオスに、採取した卵嚢を与えて反応を観察した。
 - 実験5 (性フェロモンに対する近縁種の反応)：*Hynobius*属7種、*Onychodactylus*属1種、*Cynops*属1種に、カスミサンショウウオから採取した卵嚢を与えて反応を観察した。
- ③RNA-seq解析(性フェロモン受容体遺伝子の解析)：性フェロモン受容体が副嗅覚系の鋤鼻器官で発現していると考え、非繁殖期(12月)と繁殖期(3月)のオス、繁殖期(3月)のメスの鋤鼻器官を採取し、total RNAを抽出し、次世代シーケンサーによるRNA-seq解析を業者に委託し行った。

4. 結果・考察

- ①産卵前のメスにゴナドトロピンを注射し、人為的に産卵させることに成功した。繁殖期のオスにゴ

ナドトロピンとプロラクチンを注射し、投与前より活発に生殖行動を起こさせることに成功し、ホルモン処理による、安定的に行動実験を行う方法を確立した。

② **実験1**：繁殖期のオスは、メスが不在にも関わらず卵嚢を抱く生殖行動を行った。メスの産卵中にオスが行う生殖行動は、メスより分泌され、卵嚢に付着した性フェロモンに起因すると示唆された。

実験2：卵管、子宮部のホモジェネートを塗布したスポンジにのみ、オスは抱き着いた（図1）。この結果から、本性フェロモンは卵巣ではなく、卵管、子宮部で合成、分泌されていることが判明した。

実験3：加熱処理やProK処理の効果はなく、オスは同様にスポンジに抱き着いた。これより本性フェロモンはタンパク質ではないことが示唆された。アカハライモリのメスの性フェロモン（アイモリン）はアミノ酸3残基からなる短いペプチドである(Nakadaら, 2017)ため、同様の物質である可能性が高いと考える。

実験4：鼻孔片側を塞いだオスと眼球切除したオスは生殖行動を行ったが、鼻孔両側を塞いだオスは全く反応しなかった。よって性フェロモンは鼻腔内にある鋤鼻器官で受容されていると考えられる。

実験5：カスミサンショウウオと同じ *Hynobius* 属4種と *Onychodactylus* 属1種が卵嚢に抱き着いた。このことはカスミサンショウウオの性フェロモンが種間または属間で有効である可能性を示唆している。アカハライモリやシリケンイモリの性フェロモンが近縁種には効果が無いこと(Nakadaら, 2007)より、両生類以上の高等生物における既報の性フェロモンが種間で効果を示す報告例はなく、本研究成果が世界初の事例となる。両生綱有尾目サンショウウオ科サンショウウオ属は世界で39種類報告されており、その約60%が日本に固有分布する(Frost, 2018)。特に多様化した日本のサンショウウオの種分化の原動力は、性フェロモンの違いによる生殖的隔離ではなく、止水、流水、高地、低地など日本国土の多様な環境への適応による地理的隔離であることを示唆する結果となった。

③ RNA-seq解析結果より、繁殖期のオスに特異的に多く発現している遺伝子で、かつ嗅覚受容体ファミリー(OR)と鋤鼻受容体V2Rに的を絞り、カスミサンショウウオの性フェロモン受容体候補遺伝子を70個特定した。ORはゼブラフィッシュの性フェロモン受容体として(吉原, 2017)、V2Rはマウスの性フェロモン受容体としての役割が知られており、ペプチドなどの不揮発性の物質や水溶性の物質を受容すると考えられている(埜, 2005, Hagaら, 2010)。このことから水中で生殖行動を行うカスミサンショウウオの性フェロモン受容体候補としてORとV2Rに着目した。

5. 結論及び今後の展望

本研究により、カスミサンショウウオのオスに観察される生殖行動は、メスの卵管または子宮部で合成されている性フェロモンに起因することが明らかとなった。本性フェロモンは、種間、属間でも作用する非タンパク質系物質で、鼻腔内の鋤鼻器官で受容されている可能性が極めて高いことが示された。鋤鼻器官は魚類には存在せず、器官として発生するのは系統進化的に有尾両生類からである(齋藤, 2016)。最も原始的な鋤鼻器官をもつ有尾両生類での性フェロモンと受容体の研究は、動物のライフイベントの中で最も重要な生殖行動を理解する上で必須である。今後、HPLCや組織化学的解析を用いて、より詳細に性フェロモンの物性、分泌箇所、受容体を調べ、鋤鼻器官の系統進化を追究し、現在の動物種がどのように陸上生活へ適応し、種分化を進めたか解明したい。また、近縁種での実験において、*Hynobius* 属内で性フェロモンの作用効果に違いが出たのは、繁殖に最適な状態でない卵嚢と繁殖期を過ぎたオスを実験に用いた可能性が考えられる。今後は実験をさらに反復して行い、検討を重ねたい。

参考文献・引用文献

- ・林康行 (1980) 『カスミサンショウウオの産卵行動』, *両生爬虫類研究会誌*, 16:1-10
- ・前田晃太郎ら (2015) 『守れ!ふるさとのカスミサンショウウオⅦ〜保護活動の推進と生殖行動の解析〜』, 第14回AITサイエンス大賞研究発表論文集, 41-48
- ・日本動物学会, 日本植物学会 (1998) 生物教育用語集, 東京大学出版
- ・S. Kikuyama, et al. (1995) 『Sodefrin: A female-attracting peptide pheromone in newt cloacal glands』, *Science*, 267:1643-1645
- ・T. Nakada et al. (2007) 『Isolation, characterization and bioactivity of a region-specific pheromone, [Val⁸] sodefrin from the newt *Cynops pyrrhogaster*』, *Peptides*, 28:774-780
- ・T. Nakada et al. (2017) 『Imorin: a sexual attractiveness pheromone in female red-bellied newts (*Cynops pyrrhogaster*)』, *Scientific Reports*, 7:41334
- ・齋藤正一郎 (2016) 『嗅覚系の進化』, *Clinical Neuroscience*, 34(12):1296-1298
- ・吉原良浩 (2017) 『プロスタグランジン P2a のセクシーな香り: ゼブラフィッシュの求愛行動をつかさどるフェロモン受容体の発見』, *Journal of Japanese Biochemical Society*, 89(2):244-246
- ・D. Frost (2018) 『Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 6.0』, American Museum of Natural History
- ・埜紗智子 (2005) 『哺乳類フェロモン受容体の構造と機能』, *におい・かおり・環境学会誌* 36(3):144-146
- ・S. Haga et al. (2010) 『The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behaviour through a specific vomeronasal receptor』, *Nature*, 466:118-122

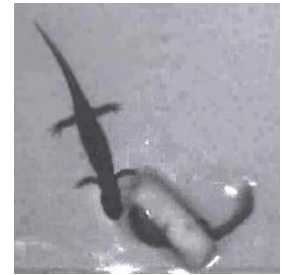


図1 実験2の結果
スポンジに抱き着く様子