

論文の内容の要旨

応用動物科学 専攻

平成 11 年度博士課程 進学

氏 名 若林嘉浩

指導教官名 森 裕司

論文題目 哺乳類のフェロモン受容機構に関する研究

哺乳類には二種類の嗅覚系が存在する。匂い分子は嗅上皮に存在する嗅神経で受容され、その情報は嗅神経が投射する主嗅球へ伝達される。この経路が主嗅覚系である。一方、フェロモン分子は鋤鼻器に存在する鋤鼻神経で受容され、その情報は鋤鼻神経が投射する副嗅球へ伝達される。この経路を鋤鼻系という。齧歯類では 3 種類の受容体ファミリー(V1Rs, V2Rs および V3Rs) 遺伝子が鋤鼻器特異的に発現しており、いずれもフェロモン受容体をコードしていると考えられている。しかし齧歯類以外の様々な哺乳類でこれら遺伝子が存在・機能しているかどうかは殆ど解っていない。フェロモン受容体遺伝子は、哺乳類では齧歯類とヒトで同定されている。哺乳類の中でも、視覚よりも嗅覚に依存した齧歯類では、主嗅覚系・鋤鼻系共に発達している。一方で、ヒトの嗅覚系は、他の哺乳類と比較すると非常に退化しており、鋤鼻系に関しては機能的な鋤鼻器が存在するかどうかは未だ論争の的となっている。嗅覚系は、その生物の棲息環境によって、発達の程度が非常に異なっている可能性が考えられ、齧歯類で用いられている嗅覚受容機構が、全ての哺乳類で一般的に用いられているかどうかは疑問である。

本研究では、齧歯類におけるフェロモン受容機構をもとに、機能的な鋤鼻器を有し、また雄

効果と呼ばれるフェロモン効果が存在することが既によく知られているシバヤギを対象に、そのフェロモン受容機構に関する研究を行った。さらに、ヒツジ、ブタなどの数種類の哺乳類では、鋤鼻系だけでなく主嗅覚系でもフェロモン分子を受容する可能性を示す報告があることから、これら 2 種類の嗅覚系におけるフェロモン受容体遺伝子の発現様式を解析することで、シバヤギにおける主嗅覚系および鋤鼻系の機能について検討した。本論文は以下の五章からなる。

第一章は総合緒言であり、嗅覚系および鋤鼻系に関する現在までの研究を概観し、本研究の背景と目的について述べた。

第二章では、主に齧歯類で同定されているフェロモン受容体遺伝子が、偶蹄類でも存在しているかを検討するために、2 種類のフェロモン受容体遺伝子ファミリー (V1Rs, V2Rs) のそれぞれに属するホモログ遺伝子の同定を試みた。その結果、2 種類の V1R ホモログ遺伝子 (gV1R1, gV1R2) と 8 種類の V2R ホモログ遺伝子 (gV2R1-8) を同定することができた。V1R ホモログ遺伝子の予想されるアミノ酸配列は、齧歯類 V1Rs と約 40-50% の相同性を示した。また、V2R ホモログ遺伝子断片の予想されるアミノ酸配列は齧歯類のものと約 50-70%、魚類のものと約 30-40% の相同性を示した。これらの遺伝子のなかで、V1R ホモログ遺伝子の 1 種類のみ (gV1R1) が open reading frame (ORF) を持っていた。

齧歯類のフェロモン受容体ファミリーは、互いに高い相同性を持つ数十～百前後の遺伝子によって形成されている。そのため、齧歯類において genomic Southern hybridization を行うと、緩い条件下では、10 本前後のバンドが検出できる。シバヤギフェロモン受容体遺伝子では、齧歯類と同様の条件下でもバンドは 1-2 本しか検出できなかつた。このことから、シバヤギ V1R ファミリーの遺伝子数は、齧歯類に比べると少ないと推察された。

第三章では、同定されたホモログ遺伝子の種々の組織における発現を、RT-PCR/ Southern hybridization 法を用いて解析した。さらに、ORF を持ち、鋤鼻器に発現している gV1R1 遺伝子について、発現細胞の同定と、gV1R1 および G タンパク質との関係について検討する目的で、in situ hybridization による解析を行った。齧歯類の鋤鼻神経細胞層では、apical 側半分に

V1Rs が発現し、さらに V1Rs 発現領域に G タンパク質 α サブユニットの Gi2 が発現している。

一方、basal 側半分には、V2Rs と Go が共発現することが知られている。シバヤギと齧歯類の鋤鼻器における鋤鼻神経細胞層を比較すると、鋤鼻器自体の大きさは齧歯類に比べてずっと大きいにも関わらず、神経細胞層の厚さは齧歯類の約 1/3 程度しかない。これらのことから、シバヤギ鋤鼻神経細胞層においては、齧歯類のような 2 層に分離した構造をとるとは考えにくく、おそらく齧歯類とは異なる構造を持つであろうと予想された。そこで、シバヤギ鋤鼻神経上皮について、gV1R1, Gi2 および Go mRNA の発現を調べる目的で *in situ hybridization* を行った。

その結果、gV1R1 mRNA は、鋤鼻神経細胞に特異的に局在していることが示されたが、齧歯類でみられるような apical 側に限局した発現は観察されなかった。また、Gi2 は鋤鼻神経細胞層全体に発現していたのに対して、Go の発現は検出できなかった。さらに Gi2 および gV1R1 遺伝子の double labeled *in situ hybridization* の結果から、シバヤギ鋤鼻神経細胞において、これら 2 種類の遺伝子は同一細胞で発現していることが明らかとなった。これらの結果から、シバヤギでは齧歯類で見られたような 2 種類の受容機構は存在せず、V1Rs-Gi2 の受容機構のみが存在している可能性が示唆された。

第四章では、フェロモン受容体の主嗅覚系における発現について検討した。齧歯類のフェロモン受容体遺伝子は、鋤鼻器特異的に発現しており、嗅上皮に発現しているという報告はない。しかし、最近、V1R ホモログ遺伝子がヒト嗅上皮に発現していることが報告され、またヒツジ、ブタおよびウサギでは、フェロモンが嗅上皮で受容されることを示唆する報告がある。これらのことから、ある種の哺乳類では、フェロモン分子が嗅上皮でも認識されている可能性が推察された。そこで、シバヤギ嗅上皮にフェロモン受容体遺伝子が存在しているかどうかを RT-PCR/ Southern hybridization を用いて解析した。その結果、嗅上皮 mRNA 内に、gV1R1 mRNA が存在することが示された。次に、gV1R1 発現細胞を同定する目的で、シバヤギ嗅上皮の *in situ hybridization* を行った。その結果、gV1R1 発現細胞は、嗅上皮の感覚神経細胞層に発現していることが示された。これらの結果から、シバヤギでは鋤鼻器だけでなく、嗅上皮においてもフェロモンを受容している可能性が示された。

第五章では、総合考察を行った。本研究より、シバヤギでは **V1Rs-Gi2** の共発現系は存在しているが、**V2Rs-Go** の共発現は存在していない可能性が示された。これまでに哺乳類を含む多くの脊椎動物において報告されている知見を考え合わせると、**V1Rs-Gi2** 系を有するものは主に陸生脊椎動物であり、**V2Rs-Go** 系を有するものは主に水性脊椎動物であるということが注目された。すなわち、動物の棲息する環境によって、フェロモン受容機構が大きく異なっているものと推察され、こうした観点から、哺乳類におけるフェロモン受容機構を解明するためには、今後、さらに様々な動物種を対象とした研究が必要であると考えられた。

また、本研究では、シバヤギのフェロモン受容体遺伝子の発現様式が齧歯類とは大きく異なることが明らかとなった。フェロモン受容体遺伝子は、齧歯類では鋤鼻器特異的に発現すると考えられている。一方、機能的な鋤鼻器を持たないとされるヒトでは、嗅上皮 mRNA 内にフェロモン受容体遺伝子が発現していることを示唆する報告があり、本研究では *in situ hybridization* による解析から、哺乳類の嗅神経細胞におけるフェロモン受容体遺伝子の発現をより直接的に証明することが出来た。このことから、シバヤギをはじめ哺乳類のいくつかの種では、フェロモン分子が鋤鼻器だけでなく、嗅上皮でも受容されている可能性が考えられた。

以上、本研究の結果より、シバヤギにおいても、2 種類のフェロモン受容体遺伝子ファミリーが存在すること、鋤鼻神経上皮におけるその遺伝子と **Gi2** および **Go** の発現様式が齧歯類とは異なっていること、さらに嗅神経においてもフェロモン受容体遺伝子が発現していることなどが示された。齧歯類で発見されてきた知見の一部はシバヤギには適応せず、このことから動物種によって異なる様々なフェロモン受容機構が存在する可能性が考えられた。しかし、**V1R** 遺伝子と **Gi2** の共発現系はシバヤギと齧歯類のいずれにおいても確認できたことから、おそらくこの系は種を越えて保存された受容機構であろうと推察された。また、嗅上皮におけるフェロモン受容体遺伝子の発現については、フェロモン分子が主嗅覚系でも受容される可能性を示したものといえよう。複雑な哺乳類のフェロモン受容機構を解明する上で、フェロモン受容における主嗅覚系の関与について示唆した本研究の結果は、今後の研究進展に新たな方向性を示すものと考えられる。