

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成 19 年度博士課程進学

氏 名 大原 海

指導教員名 森 裕司

論文題目 反芻動物のフェロモン受容機構に関する研究

多くの哺乳類は高度に発達した嗅覚を持っており、種内あるいは種間の情報交換における嗅覚の重要性は古くから示唆されてきた。嗅覚情報は種や個体を識別する重要な手掛かりであり、生殖行動をはじめとして様々な行動に多大な影響を及ぼしている。嗅覚情報の中でも、フェロモンは特に種特異的行動の発現に深く関わる生理活性物質である。反芻動物のヤギやヒツジでは雌の繁殖季節外に発情や排卵を誘起する「雄効果」と呼ばれる強力なフェロモン現象が知られている。先行研究によれば、雄効果フェロモンには2つの特徴、すなわち、(1) このフェロモンはヤギとヒツジの間で互いに種を超えて作用し合う可能性があること、(2) フェロモンの受容過程に「主嗅覚系」と「鋤鼻嗅覚系」と呼ばれる2つの嗅覚システムが関与している可能性があること、が示されている。本研究は、こうした雄効果フェロモンの特徴を手掛かりに、雄効果フェロモン受容機構を解明することを目的として、受容体候補分子の探索を行ったものである。

第一章は総合緒言である。哺乳類においてこれまで明らかとなっている嗅覚システムについて概観し、本研究の背景と目的について述べた。

第二章では、雄効果フェロモンの性質と生理作用に関する情報を基盤に、雄効果フェロモン受容体候補分子について検討した。すなわち雄効果フェロモンには、「同種他個体に作用する」というフェロモンの定義に反することになりかねない珍しい特徴がある。それは、ヤギとヒツジの雄効果フェロモンは種を超えて互いに作用し合う、という可能性である。そこで本章では、雄ヤギの被毛から抽出した雄効果フェロモン様活性酸性画分（以下、フェロモン画分という）を非繁殖期の雌ヒツジへと曝露し、生殖内分泌系への作用を解析した。その結果、フェロモン画分を曝露した群では、去勢ヤギより同手順で抽出した酸性画分を曝露した対照群に比較して、黄体形成ホルモンの血液中濃度が有意に増加し、また神経活動の指標とされる Fos タンパク質免疫陽性細

胞数が主嗅覚系の一部と鋤鼻嗅覚系の多くの神経核において有意に増加していることが明らかとなった。このことから、本章で用いた雄ヤギ被毛由来のフェロモン活性酸性画分は、同種である雌ヤギのみならず雌ヒツジに対しても雄効果フェロモンとしての活性を有することが確認された。以上、雄効果フェロモンが酸性の化学物質であること、ヤギとヒツジの雄効果フェロモンはおそらく活性部位が同一であるかもしくは非常に類似していること、それゆえ受容体についてもヤギとヒツジで類似性が高いこと、などが推察された。これらの条件に合致する雄効果フェロモン受容体候補として、本研究では1型鋤鼻受容体 (vomeronasal type 1 receptor : V1R) に着目し、第三章以下の研究を進めることとした。

第三章では、反芻動物における V1R 遺伝子について検討した。

V1R は多重遺伝子ファミリーを形成しており、これまでに同定されている V1R 遺伝子ファミリーは動物種によって全く異なるレパートリーを示している。ヤギやヒツジなどといったゲノムデータベースが構築されていない動物種では V1R 遺伝子の同定はほとんどなされていなかった。そこで本章では、これまで同定されているマウス・ラット・イヌの V1R 遺伝子配列のコンセンサス領域からプライマーを作製し、ヤギとヒツジのゲノム DNA から PCR によって V1R 遺伝子の同定を試みた。ヤギとヒツジの V1R 遺伝子を同定する過程で、これら遺伝子は同じ反芻動物でありゲノム情報が公開されたウシと非常に高い相同性を持つことが明らかとなったことから、ウシのゲノムデータベースをもとに、ウシ V1R 遺伝子の open reading frame (ORF) 全体を同定するようなプライマーを作製し、同様に PCR を行った。その結果、ヤギとヒツジから ORF を有するそれぞれ 23, 22 の V1R ホモログ遺伝子を同定することに成功した。ヤギ V1R 遺伝子群について、RT-PCR および *in situ* hybridization によって受容器官における発現を調べたところ、全ての遺伝子が主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系の受容器官である嗅上皮と鋤鼻器の両方に発現しており、嗅覚器官において受容体を発現する V1R 遺伝子であることが確認された。同定したヤギ・ヒツジの V1R 遺伝子群はほぼ全てがウシの V1R 遺伝子と対をなしており、ウシとヤギ・ヒツジの間で共通の遺伝子から分岐した遺伝子 (オーソログ遺伝子) であった。このことはヤギ・ヒツジそしてウシの V1R 遺伝子レパートリーが酷似していることを示している。また、これらオーソログ V1R 遺伝子の配列より、三次元構造とリガンド結合部位を予測した結果、3 動物種間で非常に類似した構造となることが明らかになった。これらのことを考え合わせると、ウシ・ヤギ・ヒツジの V1R は同一もしくは極めて類似した構造のリガンドを受容し得る可能性が高いと考えられた。

第四章では、第三章で確認した V1R 発現ニューロンの投射経路を明らかにすることを目的とした。

第三章で、ヤギ V1R 遺伝子群が嗅上皮と鋤鼻器において発現していることが明らかになったことから、V1R 発現ニューロンが主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系の双方の一次中枢神経系へ軸索投射している可能性が推察された。ヤギ V1R は G タンパク質共役受容体であり、嗅上皮と鋤鼻器において guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 2 (Gi2) と共役して発現していることが明らかになっているため、本章では Gi2 に対する抗体を用いて嗅球組織切片へ免疫組織化学染色を行い、Gi2 免疫陽性 (Gi2-ir) ニューロンの軸索投射先を検索した。その結果、Gi2-ir ニューロンは主嗅球と副嗅球の両方へ軸索投射していることが明らかになった。また、このニューロンは、神経軸索のマーカーである細胞接着分子 (NCAM) および olfactory marker protein (OMP) や、グルタミン酸シナプス小胞 (VGluT2) と共存していたことから、次のニューロンへ情報を伝達し得るニューロンである可能性が示され、このことは電子顕微鏡観察によっても確認された。以上のことから、主嗅球・副嗅球における Gi2-ir ニューロン、すなわち V1R-Gi2 ニューロンは主嗅球・副嗅球よりも更に高次の主嗅覚系・鋤鼻嗅覚系へと情報を伝達しているものと考えられる。第二章で示されたように、雄効果フェロモンの刺激で主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系双方が反応することと、本章で示された、V1R 発現ニューロンが主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系双方へ軸索投射しているという結果を勘

案すると、V1R が雄効果フェロモン受容体である可能性は高いと考えられる。

第五章は総合考察である。

嗅覚受容体遺伝子群は、生活環境や嗅覚以外の感覚系からも影響を受けながら速い速度で分子進化する遺伝子群であることが最近の研究から示唆されている。本研究の結果から、V1R 遺伝子がウシ・ヤギ・ヒツジで非常に良く似たレパートリーを持っていることが明らかになった。おそらくウシ、ヤギ、ヒツジの三種が分岐する過程においても、これら遺伝子群は重要な役割を担っており、保存されてきたのではないかと考えられる。本研究で着目した V1R についてはこれまで報告されてきた雄効果フェロモンの特徴に照らし合わせてみても矛盾が生じず、これが雄効果フェロモン受容体として機能し得るものと推察される。ヤギの V1R は主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系双方の受容器官において Gi2 と共役して発現している上、その発現ニューロンは主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系の一次中枢神経系へ軸索投射していた。これらのことから、雄効果フェロモンは嗅上皮と鋤鼻器の V1R に受容されると Gi2 シグナル伝達系を介して主嗅覚系・鋤鼻嗅覚系へとその情報が伝達されていくものと推察された。

雄効果フェロモンは強力な性腺刺激効果を有する生理活性物質であり、畜産現場においても潜在的な応用的価値は高い物質と考えられる。本研究では、雄効果フェロモン受容体候補である V1R がウシ・ヤギ・ヒツジにおいて高い類似性を持つことが示されたが、このことは、雄効果フェロモンがヤギとヒツジという二種の動物において種を超えて作用するのみならず、近縁の種であるウシにおいても何らかの作用をもたらす可能性を示している。今後、雄効果フェロモンのリガンド分子が同定されれば、乳肉羊毛生産などに関連する畜産業における活用が大いに期待されることになる。