

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 大原 海

反芻動物のヤギやヒツジでは非繁殖季節の雌に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。先行研究から雄効果フェロモンには特徴的な 2 つの性質、すなわちフェロモン分子がヤギとヒツジという異種間で作用し合う可能性とフェロモン受容過程に主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系の両嗅覚システムが関与している可能性が示されている。本研究では、こうした特徴を手掛かりに、フェロモン受容体候補分子の探索とフェロモン受容機構の解明を目指した研究が行われた。本論文は 5 章から構成され、第 1 章において本研究の背景と目的が論じられた後、第 2 章から第 4 章では本研究で実施された各実験について記述され、第 5 章において本研究で得られた結果をもとに総合考察が展開されている。

第 2 章では、雄ヤギ被毛から酸性抽出した雄効果フェロモン活性画分（以下、フェロモン画分）を非繁殖期の雌ヒツジに呈示した際の、生殖内分泌系の反応が解析された。その結果、フェロモン画分の呈示により、対照群（去勢ヤギから同手順で抽出した酸性画分を呈示）に比較して、黄体形成ホルモンの血中濃度が有意に増加し、また神経活動の指標である 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、雄ヤギ被毛由来のフェロモン画分は、雌ヒツジに対しても雄効果フェロモン活性を有することが確認されるとともに、雄効果フェロモンが酸性化学物質でヤギとヒツジの雄効果フェロモンは同一分子か少なくとも構造的に活性部位が酷似していること、それゆえ受容体についてもヤギとヒツジで類似性が非常に高いことなどが推察された。

第 3 章では、上記の条件に合致する雄効果フェロモン受容体候補として 1 型鋤鼻受容体（vomeronasal type 1 receptor : V1R）に着目した研究が進められた。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た V1R 遺伝子ファミリーは動物種によって異なるレパートリーを示している。ヤギやヒツジの V1R 遺伝子は未解明であったことから、本章ではヤギとヒツジのゲノム DNA から V1R 遺伝子群を同定し、近縁種でゲノムデータベースが構築されているウシの V1R 遺伝子群との比較解析が行われた。その結果、ヤギ・ヒツジ・ウシの V1R 遺伝子群は、ほぼ全てが共通の遺伝子から分岐したオーソログ遺伝子であり、V1R 遺伝子レパートリーが極めて類似していることが明らかとなった。またオーソログ V1R 遺伝子の配列から三次元構造とリガンド結合部位を予測した結果、三種間で非常に類似した構造となることが示され、このことから反芻動物三種の間では 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する可能性が示された。

第 4 章では、上記のように同定したヤギ 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が調べられた。その結果、同定した全ての V1R 遺伝子が嗅上皮と鋤鼻器の両方に発現していることが明らかになった。またヤギ 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先行研究から示されていたため、本章では Gi2 に対する抗体を用いた免疫組織化学により、Gi2 免疫陽性 (Gi2-ir) ニューロンの軸索投射先が解析された。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おり、さらに Gi2-ir ニューロンは神経軸索のマーカー分子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。すなわち、V1R-Gi2 ニューロンは主嗅球・副嗅球を介して高次の主嗅覚系・鋤鼻嗅覚系へと情報を伝達していることが示された。

以上、本研究では雄効果フェロモンの受容体候補として 1 型鋤鼻受容体 V1R ファミリーに着目し、その遺伝子の構造と発現が詳細に検討された。その結果、ヤギ、ヒツジおよびウシの近縁動物三種の間でオーソログ遺伝子の存在が高頻度に認められ、これらの動物種間ではフェロモン受容機構（おそらくはフェロモン分子本体も）の類似性が高いことが示唆された。また嗅覚神経系における V1R の発現様式から、雄効果フェロモンの情報は主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系の両者へ伝達されるものと推察された。こうした研究の成果は、反芻動物におけるフェロモン受容機構の解明に貢献することはもとより、哺乳類におけるケミカルコミュニケーションの実体とその生物学的背景を理解する上で重要な知見であり、学術上貢献するところが少なくない。

よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。