

[別紙2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 村田 健

哺乳類においては、受容した個体に行動的な変化をもたらすリリーサーフェロモンを同定した報告が存在する一方で、内分泌系に作用することで繁殖や発達を制御するプライマーフェロモンに関してはいまだかつて同定に成功した例はない。本研究では、シバヤギを研究モデルとして、視床下部弓状核キスペプチンニューロン群近傍の神経活動を多ニューロン発火活動 (Multiple Unit Activity: MUA) として記録することで GnRH パルスジェネレーターの活動を MUA の顕著な一過性上昇 (MUA ボレーすなわち GnRH のパルス状神経分泌を生み出す短期的神経興奮) としてとらえるシステムを利用して、雄効果フェロモンリガンド分子の同定を目指すとともに、雄効果フェロモンの受容機構を解明することを目的とした。本論文は以下のように 5 章で構成され、第 1 章において本研究の背景と目的が論じられている。

第 2 章ではフェロモン分子同定のための適切なバイオアッセイ系を確立することを目的に、雄効果フェロモンに対する GnRH パルスジェネレーターの反応性について解析した。実験当日の平均 MUA ボレー間隔を T とし、任意の内因性ボレーから $1/4 T$ 、 $1/2 T$ もしくは $3/4 T$ が経過したタイミングで、約 1 秒間雄ヤギ被毛呈示を行った際の MUA の反応を比較した。その結果、フェロモンシグナルは常に GnRH パルスジェネレーターに伝わるものの、早いタイミングではその後の MUA ボレーの誘起が抑制される機構が備わっていることが示唆された。この発見を利用することで、被験物質の特性に応じて早めのタイミングの呈示では強いフェロモン活性だけをとらえ、遅いタイミングの呈示では弱いフェロモン活性もとらえられる効率の良いバイオアッセイ系が確立された。

第 3 章では、雄効果フェロモンリガンド分子の探索が行われた。本研究では、フェロモン産生母地である頭部皮膚から放出される揮発性フェロモン分子を直接捕集する方法を開発し、吸着剤テナックスの入った自作キャップをヤギの頭部に一週間装着することで、夾雑物を含むことなく生体由来の揮発性分子群を回収した結果、フェロモン単離精製の効率が飛躍的に高まった。サンプルの活性の評価には、第 2 章で確立したバイオアッセイ系を活用し、呈示タイミングを考慮することでサンプル間の相対的強弱を判断することとした。まず、雄ヤギ頭部由来揮発性成分のガスクロマトグラフィー画分をそれぞれバイオアッセイしたところ、炭素数 10 前後のアルデヒドやケトンなどの中極性で比較的揮発性の高い成分が含まれる画分において、確実にフェロモン活性が認められた。この画分に存在する成分を雄ヤギとフェロモン活性を含まない去勢雄ヤギで比較し

たところ、雄ヤギ特異的にエチル基側鎖のある様々な新奇成分（4-ethyloctanal、6-ethyloctanal、3-ethylnonanal など）が検出された。これらの雄ヤギ特異的成分を中心に 18 成分から構成される合成品のカクテルを作製してバイオアッセイしたところ、フェロモン活性が確認され、この中に活性成分があることが示唆された。続いて、18 成分カクテルに含まれる各単体成分のバイオアッセイを実施したところ、18 成分カクテルには劣るものの、4-ethyloctanal 単体が最も強いフェロモン活性を示すことが明らかとなった。

第 4 章では、4-ethyloctanal の受容機構について検討が行われた。哺乳類のフェロモン受容体候補遺伝子は、V1R と V2R という 2 タイプの 7 回膜貫通型受容体ファミリーから構成されると推測されてきたが、ヤギにおいては V2R がすべて偽遺伝子であり、20~30 種類の V1R が主な嗅覚器官である嗅上皮と鋤鼻上皮に発現していることから、雄効果についても V1R がフェロモン受容体の候補と考えられる。まず、各種 V1R 同士での double *in situ* hybridization を嗅上皮および鋤鼻上皮で行ったところ、極めて相同性の高いペア以外では cross-hybridization は認められなかった。また、各 V1R グループの混合プローブを用いて、グループ間の double *in situ* hybridization を行ったところ、お互いにシグナルが重なることはなかった。次に 4-ethyloctanal を呈示したヤギの嗅上皮および鋤鼻上皮の切片を作製し、c-Fos の *in situ* hybridization を行った。その結果、嗅上皮のみで c-Fos の発現が認められた。そこで、嗅上皮切片を用いて、V1R の 5 種混合プローブと c-Fos の double *in situ* hybridization を行ったところ、シグナルが重なる細胞が認められた。これらの結果より、4-ethyloctanal は嗅上皮の V1R で受容される可能性が示された。

第 5 章では総合考察が展開されている。本研究の結果より、哺乳類で初めて嗅覚呈示によって GnRH パルスジェネレーターを促進するリガンド分子、4-ethyloctanal が同定され、この分子が嗅上皮の V1R で受容される可能性が示された。こうした研究の成果は、哺乳類フェロモンの受容機構を明らかに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。