

平成17年度科学研究費補助金（学術創成研究費）研究進捗状況報告書

ふりがな		もり ゆうじ		所属研究機関 ・部局・職	東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授	
研究代表者氏名		森 裕司				
研究課題名	和文	フェロモン系を介する視床下部・辺縁系機能の制御				
	英文	Pheromonal control of the hypothalamo-limbic function				
研究経費 (直接経費) 18年度以降は内約額 単位:千円	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
	90,600	88,000	87,000	85,000	82,000	432,600
研究組織 (研究代表者及び研究分担者)						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担 (研究実施計画に対する分担事項)			
森 裕司	東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授	獣医動物行動学	研究の統括・フェロモン分子の単離精製			
北原 武	東京大学・大学院農学生命科学研究科・名誉教授	有機合成化学	フェロモン分子の構造決定と合成 (平成16年度まで; 東京大学定年のため渡邊教授と交替)			
渡邊 秀典	東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授	有機合成化学	フェロモン分子の構造決定と合成 (平成17年度より; 北原名誉教授の後任として参加)			
市川 眞澄	東京都医学研究機構・神経科学総合研究所・副参事研究員	神経形態生物学	フェロモン受容機構の解明			
岡村 裕昭	農業生物資源研究所・生体機能研究グループ・チーム長	神経内分泌学	フェロモン中枢作用機序の解明			
武内 ゆかり	東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教授	獣医動物行動学	フェロモン合成機構の解明			
菊水 健史	東京大学・大学院農学生命科学研究科・助手	獣医動物行動学	フェロモン作用の行動学的解析			
<p>当初の研究目的 (交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。)</p> <p>本研究ではまず、これまでにまだ成功例の報告されていない哺乳類プライマーフェロモン分子の単離精製・構造決定と合成を目指す。得られたフェロモンリガンドの化学構造に関する情報を基盤に、フェロモンの産生・分泌機構、鋤鼻・嗅覚系におけるフェロモン受容機構、そしてフェロモンが視床下部・辺縁系の神経活動を修飾する機構などについて解明を行い、これにより哺乳類フェロモンの産生から作用にいたる化学的情報通信システム全容の理解と、フェロモンによる動物機能の制御法開発といった応用的研究の基盤となる新たな研究パラダイムの創成を目指している。</p> <p>なお本研究では、反芻動物の“雄効果(Male Effect)”というフェロモンによる強力な性腺刺激現象を第一義的な研究モデルとして取り上げるが、その理由は、哺乳類においてフェロモンによる中枢神経系への刺激効果が視床下部神経活動のレベルで直接的に証明されている唯一の現象であり、またこのことを利用した特異的な生物検定系が申請者らによりすでに開発・実用化されているからである。すなわち、雄効果をもたらすフェロモン分子の同定を研究のコアとして、フェロモン系を介する視床下部・辺縁系機能の制御システムについての、哺乳類全般に敷衍できるような理論を構築することが本研究の目的である。</p>						

これまでの研究経過

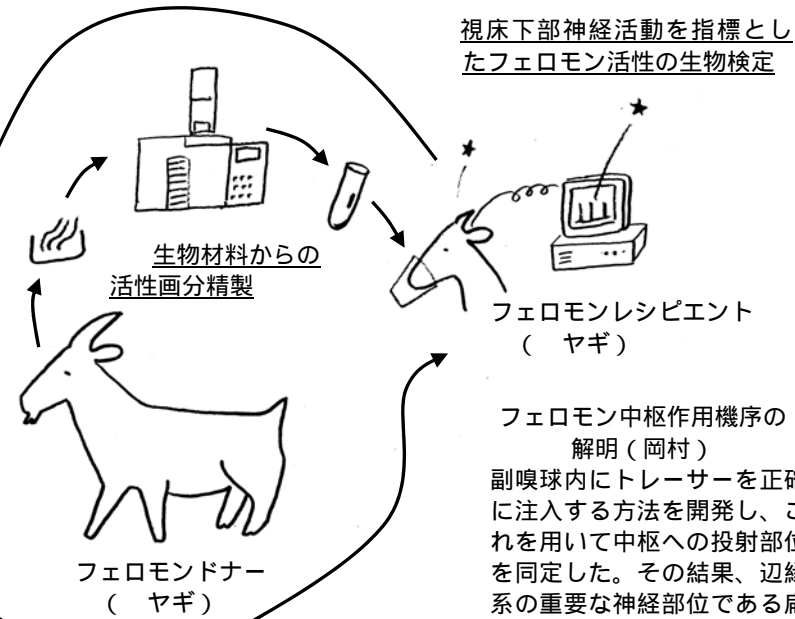
本研究は、学術創成研究費の趣旨の3つの観点のうち、どの観点到に主眼を置いて研究を行っているかについてお書きください。

本研究は、創造的・革新的・学際的学問領域を創成する観点到に主眼をおいている。本研究で同定と合成を目指している視床下部作用型プライマーフェロモン分子を接点として、専門を異にする各研究者がそれぞれ得意とする発想とアプローチによって分担研究を実施し得られた知見を統合し構造化する。この作業を通じて、最終的には“哺乳類のフェロモンがどこでどのように作られ、どのように受け取られ、またどのように情動や自律機能そして行動を変化させるのか”、という問題を解明するための包括的モデルを創造したいと考えている。

研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、研究組織内の連携状況を含め、具体的に記入してください。

研究組織内の連携：下記に示したフェロモンドナーから始まる実線矢印の流れに沿って連携して研究を進めている。

フェロモン活性画分の単離精製と生物検定（森・岡村）
視床下部GnRHニューロンからのパルス状神経分泌を多ニューロン発射活動としてとらえ、フェロモンの中枢作用をリアルタイム評価する生物検定系を改良して検出感度と精度を改善することができた。これを用いて雄ヤギ被毛抽出物のGC分取によりリテンションタイム幅1分以下の範囲まで活性画分を絞り込めた。



視床下部神経活動を指標としたフェロモン活性の生物検定

フェロモン候補物質の合成（北原・渡邊）
上記の活性画分に含まれるピークをGCMSで同定し、構造を推定して有機合成を実施した。これまでに20を超える候補物質を合成し、それらの合成物質のパネルを森・岡村グループに渡して単独あるいは混合でのフェロモン活性の評価を行うための生物検定の準備を整えた。

候補分子の合成

合成した候補分子の活性評価

フェロモン中枢作用機序の解明（岡村）
副嗅球内にトレーサーを正確に注入する方法を開発し、これを用いて中枢への投射部位を同定した。その結果、辺縁系の重要な神経部位である扁桃体において主嗅覚系と鋤鼻系の神経回路がネットワークを形成している可能性を示唆するデータが得られた。

フェロモン合成機構の解明（武内）
アンドロゲン依存性に雄シバヤギの頭頸部皮膚で特異的に転写誘導されるmRNA群を同定した。その中には未知の遺伝子も多数含まれており、フェロモン合成カスケードの酵素遺伝子である可能性が示された。

フェロモン受容機構の解明（市川）
シバヤギなど多くの哺乳類では機能的なフェロモン受容体ファミリーは一種類（V1R）のみであり、また鋤鼻器だけでなく嗅上皮にもフェロモン受容体遺伝子が発現しているなど、げっ歯類とは多くの点で異なることを見出した。

フェロモン作用の行動学的解析（菊水）
反芻動物の性フェロモンとはカテゴリーの異なるフェロモンとしてげっ歯類の警報フェロモンに関する研究を進めた結果、雄ラットでは肛門周囲腺からアンドロゲン非依存性に水溶性の警報フェロモンが放出され、これを受容した個体ではストレス性体温上昇など自律機能の著しい反応が引き起こされることが明らかとなった。

情報の構造化（全員）：定期的なプロジェクト全体会議に加えて、平成16年度にはフェロモンに関連する二つの国際シンポジウム（7月と9月、いずれも京都）を主催・共催して国内外から当該分野の研究者を招聘し最新情報の交換と新知見の構造化を図り、その成果の一部は記録集として刊行を準備中である。

特記事項

〔 これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入するとともに、推薦者の期待がどの程度達成されつつあるかについて記入してください。 〕

昨年度（2004年）のノーベル医学生理学賞がアクセルおよびバック両博士（匂い受容体とフェロモン受容体の遺伝子群を同定したことで嗅覚研究に貢献した）に授与されたことを契機に嗅覚研究に対する関心が一段と高まっており、またフェロモンが動物の社会的行動に及ぼす役割や行動発現の基盤となる情動反応系のフェロモンによる人為的制御といった課題にも興味もたれはじめている。実際、フランスでは最近になって家畜種を対象とした不安軽減フェロモンなどが開発されているが、いずれの製品もその実体は未発表であり効果についても科学的根拠に乏しいのが現状である。哺乳類フェロモン分子の実体や作用機序についてはまだほとんど未解明であるが、その最大の原因は多くのフェロモンが同定されている昆虫（触覚電位を直接モニターできる）などと比較して哺乳類では特異性と感度に優れたフェロモン活性の神経生理学的バイオアッセイ系を確立できないことにある。

そこで申請者らは研究モデルとして反芻動物における“雄効果”の中枢メカニズムに着目し、シバヤギを用いて雌の視床下部 GnRH ニューロンの活動を覚醒状態で記録解析する独自のシステムを開発することによりフェロモン活性に対する特異的生物検定系を確立し、活性画分の絞込み、候補分子の構造推定と有機合成および活性評価、受容体の探索、合成機構の解明を並行して進めてきた。これまでの約2年間の研究期間における特記事項として下記の知見を得た。

（1）反芻動物において強力な生殖内分泌系刺激作用すなわち“雄効果”をもたらすフェロモンは、頭頸部皮膚において活性型アンドロジェンであるジヒドロテストステロン（DHT）の作用により合成が誘導される揮発性の酸性分子であり、単独でフェロモン作用をもつ可能性に加えて粘膜内の受容体周辺において複数の分子がエステルを作ることで活性物質に変化しているといった可能性も示唆された。こうした観点はフェロモンの実体を探る上で重要なだけでなく、その合成機構や受容機構を解明するためのヒントとしても役立つものと思われる。

（2）このフェロモンは雄でのみ産生されるが、DHT を長期処理することにより卵巣摘除（OVX）雌でも合成を誘導できた。その際、皮脂腺の発達は伴わないため、この“OVX+DHT モデル”がフェロモン分子や合成酵素群の探索に有用であり、またホルモン作用の性差やエピジェネティック制御を研究する上でもユニークな材料になりうることを示唆された。

（3）これまでの先行研究から、げっ歯類ではフェロモン受容体群は二つのファミリー（V1R と V2R）に分類できることが知られているが、市川らの研究によりヤギではV1Rのみが発現していることや鋤鼻器だけでなく嗅上皮粘膜にもフェロモン受容体遺伝子が発現していることが明らかとなった。また岡村らの研究からは主嗅覚系と鋤鼻系の情報が扁桃体で統合されている可能性が示唆された。市川らが他の哺乳類についても検討したところ、哺乳類ではヤギのタイプが一般的であり、げっ歯類のタイプはむしろ例外的であることが明らかとなった。したがってアクセルとバックの受容体遺伝子の発見を端緒として進展してきた多くの研究により構築されてきたフェロモン情報の伝達機構に関する理論は、その大半がげっ歯類を対象としたものであったため必ずしも哺乳類の一般法則とはなり得ない可能性があり、本研究でのヤギのように他の動物種を対象とした研究の成果が比較動物学的に重要な意味を持つことが示された。今後、げっ歯類と反芻動物の対比という新たな観点を加えることで、嗅覚システムの理解がより一層深化しうるものと推察される。

（4）一方、そのげっ歯類については菊水らにより警報フェロモンに関する研究が進みさまざまな新知見が得られた。雄ラットがストレスを受けると、肛門周囲と顔面よりそれぞれ異なる種類の警報フェロモンを放出し、前者はストレス性一過の体温上昇（Stress Induced Hyperthermia）など自律機能反応を、また後者はすくみなど行動的反応を引き起こすことを見出した。また肛門周囲から放出される警報フェロモンはその合成にアンドロジェンを必要としないことが分かり、おそらく生物学的により重要な役割を果たしていると推察されたため、前者を中心にその受容に関する中枢神経回路やフェロモンリガンドの物性（水溶性であることが判明）について検討が進められた。この警報フェロモンが同定されれば、げっ歯類において自律機能に影響を与えるプライマーフェロモンとして中枢作用が確かめられたはじめてのフェロモンとなるため、ヤギの性フェロモンとの対比という観点からも今後のフェロモン研究の好個のモデルとなることが期待される。

研究成果の発表状況

〔 この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）最初と最後のページ、発表年（西暦）及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。 〕

[学術誌等掲載論文]

- 1 Kiyokawa Y., Kikusui T., Takeuchi Y., Mori Y. Mapping the neural circuit activated by alarm pheromone perception by c-Fos immunohistochemistry. *Brain Research* 1043:145-154, 2005
- 2 Okamura H., Mori Y. Characterization of the primer pheromone molecules responsible for the 'male effect' in ruminant species. *Chemical Senses* 30 (suppl 1) : i140-i141, 2005
- 3 Moriya-Ito K., Osada T., Ishimatsu Y., Muramoto K., Kobayashi T., Ichikawa M. Maturation of vomeronasal receptor neurons *in vitro* by coculture with accessory olfactory bulb. *Chemical Senses* 30: 111-119, 2005
- 4 Kiyokawa Y., Kikusui T., Takeuchi Y., Mori Y. Modulatory role of testosterone in alarm pheromone release by male rats. *Hormones & Behavior* 45: 122-127, 2004
- 5 Kiyokawa Y., Kikusui T., Takeuchi Y., Mori Y. Alarm pheromones with different functions are released from different regions of the body surface of male rats. *Chemical Senses* 29: 35-40, 2004
- 6 Takigami S., Mori Y., Tanioka Y., Ichikawa M. Morphological evidence for two types of mammalian vomeronasal system. *Chemical Senses* 29: 301-319, 2004
- 7 Takigami S., Wakabayashi Y., Ohsako S., Ohkura S., Okamura H., Ikai A., Ichikawa M., Osada T. Fetal development of vomeronasal system in the goat. *Developmental Brain Research* 149: 113-120, 2004
- 8 Hagino-Yamagishi K., Moriya K., Kubo H., Wakabayashi Y., Isobe N., Saito S., Ichikawa M., Yazaki K. Expression of vomeronasal receptor genes in *Xenopus laevis*. *Journal of Comparative Neurology* 472: 246-256, 2004
- 9 Ichimaru T., Matsuyama S., Ohkura S., Mori Y., Okamura H. Central cholecystokinin-octapeptide accelerates the activity of the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator in goats. *Journal of Neuroendocrinology* 15: 80-86, 2003
- 10 Iwata E., Kikusui T., Takeuchi Y., Mori Y. Substances derived from 4-ethyl octanoic acid account for primer pheromone activity for the "male effect" in goat. *Journal of Veterinary Medical Science* 65: 1019-1021, 2003 (他 36 編)

[国際会議における発表]

- 1 Wakabayashi Y., Okamura H., Mori Y., Ichikawa M. Morphological analysis of two types of receptor neurons in goat olfactory epithelium. *ACHEM S XXVII 2005 Annual Meeting* (2005 April, Florida)
- 2 Kiyokawa Y., Kikusui T., Mori Y. Water-soluble alarm pheromone induced autonomic stress response in male rats. *ACHEM S XXVII 2005 Annual Meeting* (2005 April, Florida)
- 3 Okamura H., Ohkura S., Mori Y. Vomeronasal system in domestic animals. *Current Status and Perspectives in Reproductive Biology and Biotechnology* (2004 September, Kyoto)
- 4 Kikusui T., Kiyokawa Y., Mori Y. Rat's alarm pheromones; its mechanisms of production, perception and behavioral effects. *Current Status and Perspectives in Reproductive Biology and Biotechnology* (2004 September, Kyoto)
- 5 Mori Y. Characterization of the primer pheromone molecules responsible for the "male effect" in ruminant species. *The 14th International Symposium on Olfaction and Taste* (2004 July, Kyoto)
- 6 Ichimaru T., Sakurai K., Mogi K., Ohkura S., Mori Y., Okamura H. Central projections from the accessory olfactory bulb in goats. *The 14th International Symposium on Olfaction and Taste* (2004 July, Kyoto)
- 7 Kakuma Y., Ichimaru T., Yonezawa T., Momozawa Y., Iwata E., Takeuchi Y., Mori Y. Potential ability of producing male pheromones in female goats. *The 8th Annual Meeting for Society for Behavioral Neuroendocrinology* (2004 July, Lisbon)
- 8 Wakabayashi Y., Mori Y., Hagino-Yamagishi K., Ichikawa M. Expression pattern of pheromone receptor genes and G proteins in two distinct olfactory organs in goats. *Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting* (2003 November, New Orleans)

(他 36 題)

[学会等における発表]

- 1 森裕司 哺乳類のフェロモンと行動 第 26 回分子生物学会シンポジウム (2003 年 12 月、神戸)

(他 61 題)