雌ヤギの生殖制御中枢を刺激するプライマーフェロモンの同定

村 田 健・武 内 ゆかり*

フェロモンはある個体が発し、同種の他個体に受容されることで特定の行動や生理的变化を誘起する化合物である。特定の行動を生じさせるフェロモンはリリーサーフェロモン、生理的变化を誘起するフェロモンはプライマーフェロモンと呼ばれている。これまでに同定されたフェロモンのほとんどはリリーサーフェロモンであり、プライマーフェロモンは昆虫類を含めても数えるほどしか同定されていない。これは、プライマーフェロモンのバイオアッセイが非常に困難であることに起因すると考えられる。我々の研究グループは、シバヤギをモデル動物として、生殖制御中枢の活動を電気生理学的にリアルタイムで測定する独自のバイオアッセイシステムを用いることで、プライマーフェロモンの探索を行い、雄ヤギが発する4-ethyloctanalという化合物に活性を見いだした。このように中枢作用機構をとらえたバイオアッセイシステムを用いることで、畜産学的に重要な動物種のプライマーフェロモンの同定や作用機構の理解が進み、将来的にはフェロモンを用いた繁殖制御技術に応用されることが期待される。

1. プライマーフェロモン

フェロモンは、その作用によってリリーサーフェロモンとプライマーフェロモンに分類される。リリーサーフェロモンは受容してから短時間で行動の変化を誘起するのに対して、プライマーフェロモンは内分泌系に作用することで性成熟や性周期のような長期的な変化を誘起する。プライマーフェロモンによって生殖内分泌系が調節される現象は、様々な種の哺乳類で報告されている。マウスでは研究が比較的進んでおり、現象の発見者の名前を冠したいくつかのプライマー効果が知られている。単独飼育の雌マウスは発情周期が4～6日間であるが、雌のみの集団飼育下では、発情周期の遅延や不規則化が生じる(Lee-Boot効果)³⁴⁾。この発情周期の抑制は、雄やその尿を集団飼育下の雌のケージに導入することで解除され、4～6日周期に回帰する(Whitten効果)³⁹⁾。また、雌だけの集団飼育下では性成熟が遅延するが、雄やその尿にさらされると春機発動が早まる(Vandenbergh効果)³⁵⁾。マウスだけでなく、ラットやブタ、ウシにおいても雄やその尿に曝露されることで、春機発動が早まるプライマーフェロモン効果が報告されている^{1, 12, 36)}。ヒトにおいては、集団で生活する女性の月経周期が同期化する現象が、寮効果(dormitory effect)として知られており¹⁹⁾、卵胞期の女性の腋下に由来する成分は周期を縮めるのに対して、排卵期のそれは逆に延ばすことで、

このような同期化がおくとされている³²⁾。また、男性の腋下に由来する成分は、女性の月経周期を安定化させることが報告されている⁵⁾。以上のように、プライマーフェロモンによる生殖中枢の調節は多くの哺乳類に共通した機構だと考えられるが、確実なプライマーフェロモンの分子同定に至った例は未だに存在しない。

マウスのWhitten効果やVandenbergh効果に関与するフェロモン候補物質については、様々な報告がなされており、以下にその特徴や例を挙げる。(1) いずれも尿中の主要尿タンパク質[major urinary protein (MUP)]に結合している。(2) アンドロゲン依存的に雄が産生放出する。(3) 2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazole(ST)とdehydro-exo-brevicommin (DB)の混合物は、Whitten効果を誘起し¹³⁾、STあるいはDB単独ではVandenbergh効果を引き起こす¹⁶⁾。(4) 雄マウスの包皮腺から分泌される(*E, E*)- α -farneseneと(*E*)- β -farneseneはVandenbergh効果を引き起こす¹⁶⁾。(5) MUP自体にフェロモン活性が存在する²²⁾。(6) これらの成分の純粋な合成物のフェロモン活性は非常に弱いか、あるいは全くない⁷⁾。したがって、最近では、これらの分子に本当にフェロモン活性があるかどうかは議論が分かれている。このような状況になっている主因は、バイオアッセイにおいて「サンプル呈示から春期発動までの期間」¹⁶⁾や「サンプル呈示による性周期の変化」¹³⁾という最終アウトプットを指標としており、実験環境や実験者の手技に大きく影響を受けるため、再現が難しいのだと考えられる。そのため、フェロモンの受容から内分泌系の変化の過程を、短時間でロバストに確認することが可能なバイオアッセイ系の利用が必要だと考えられる。

2. 雄効果

雄効果とは、季節性繁殖動物であるヤギやヒツジにおいて、非繁殖期にある雌の群れに成熟雄を導入すると、排卵や発情が誘起される現象である。この現象は、成熟雄の被毛に付着した揮発性成分の呈示のみでも再現することができる、明瞭なプライマーフェロモン効果である¹⁴⁾。非繁殖期に雄のフェロモンによって排卵が誘起されてしまっただけの問題のように思えるが、野生下において非繁殖期には、ヤギやヒツジの雌は雄と離れた群れで暮らしている³¹⁾ためそのようなことは起こらず、繁殖期の始めに雄と出会ったタイミングで効率良く排卵、発情を可能にすることが、自然界における雄効果フェロモンの本来の役割であろう。ヤギやヒツジは、品種によっては非常に繁殖期が短いことや、

* Ken MURATA, Yukari TAKEUCHI, 東京大学大学院農学生命科学研究科応用動物科学専攻 (〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1)

Received 2 March 2015, Accepted 28 April 2015

繁殖期の始めに妊娠すると、出産して子育てをする時期が気候の良い春となることから、雄効果フェロモンによる排卵、発情の誘起は非常に有意義なものと考えられよう。

マウスのWhitten効果やVandenberg効果とは対照的に、雄効果に関しては、その内分泌メカニズムが明確にとらえられている。雄効果フェロモンは性腺刺激ホルモン放出ホルモン [gonadotropin-releasing hormone (GnRH)] /黄体形成ホルモン [luteinizing hormone (LH)] のパルス状分泌頻度を上昇させる。その結果、卵巣が刺激されて血中エストロゲン濃度が上昇し、一定以上の濃度に達するとGnRH/LHのサージ状分泌が起こり、排卵が誘起されると考えられる^{2,18)}。

前述したように、血中LHパルスの頻度の変化が顕著なために、これを指標にしたバイオアッセイによって雄効果フェロモンの同定が試みられたことがあるが、この実験は数週間の雄との隔離、血中プロゲステロン測定による非繁殖期であることの確認、その上でサンプル呈示前後の数時間にわたる連続採血とLH濃度測定が必要となるために、年に数回しかできない手法であり^{3,29)}、極めて効率が悪かった。そのため、より効率的なバイオアッセイ系が必要とされていた。

3. 生殖制御中枢のリアルタイムモニタリングによるバイオアッセイ

GnRHのパルス状分泌は性成熟と正常な性周期回帰に必須であり、脳にはそのパルス形成を司るGnRHパルスジェネレーターという神経機構が存在すると考えられている³⁰⁾。脳の局所破壊実験から、GnRHパルスジェネレーターは視床下部の弓状核にあることが推測され、この領域近傍に電極を留置して多ニューロン発火活動 [multiple unit activity (MUA)] を記録すると、血中LHパルスに先立つMUAの一過性の上昇 (MUA ボレー) が認められることが、アカゲザル⁴⁰⁾、ラット²⁵⁾、ヤギ²¹⁾において確認されている (図1)。ただし、弓状核に存在するどのようなタイプのニューロンがGnRHパルスジェネレーターであるかは長く不明であった。近年、Gタンパク共役型受容体GPR54のリガンドとして、新奇ペプチド「キスペプチン」が見つかり²⁸⁾、GPR54遺伝子およびキスペプチンをコードする*Kiss1*遺伝子の不活化変異が低ゴナドトロピン性性腺機能低下症につながる

図1 GnRHパルスジェネレーターの活動記録 ヤギの弓状核近傍に電極を留置し、多ニューロン発火活動 [multiple unit activity (MUA)] を記録することで、LHパルスに先立つMUAの一過性の上昇 (MUA ボレー) が認められる。

ことが示された⁶⁾。さらに、キスペプチンはGnRHニューロンに直接作用してGnRH分泌を誘起すること²⁰⁾や、キスペプチンを産生分泌するニューロン (キスペプチンニューロン) が弓状核に密集することから、現在ではGnRHパルスジェネレーターの実体として視床下部弓状核のキスペプチンニューロン群が想定されている。以上を勘案すると、雄効果フェロモンのターゲットがこの弓状核キスペプチンニューロン群であることが推測される。我々はこの弓状核キスペプチンニューロン群の分布領域に留置した電極からMUAを記録するシステムを構築し、これをバイオアッセイ系として用いることで、雄効果フェロモンの探索を行った²³⁾。

4. バイオアッセイ条件の検討

雄効果フェロモンの分子同定のためのバイオアッセイでは、フェロモンを含むサンプルを呈示した際に、内因性のMUAボレーよりも早いタイミングでMUAボレーが誘起される現象を利用した。適切なバイオアッセイ条件を検討するため、雄ヤギ被毛を様々なタイミングで呈示した際の雌ヤギのGnRHパルスジェネレーターの反応性について解析した²⁴⁾。エストロゲンはパルスジェネレーターの活動を抑制し、パルス頻度を少なくするネガティブフィードバックの作用がある。そこで、電極留置する雌ヤギには卵巣除去を施し、エストロゲンによるネガティブフィードバックをなくすことでMUAボレーを数十分間隔に安定させて実験を行った。実験当日の平均MUAボレー間隔をTとし (図2A)、任意の内因性MUAボレーから1/2 T、2/3 Tもしくは3/4 Tが経過したタイミングで、ヤギ被毛呈示を行った際のMUAボレーの誘起率を解析した (図2A, B)。

雄ヤギ被毛呈示によるMUAボレーの誘起率は、1/2 Tでは56%、2/3 Tでは67%、3/4 Tでは89%と、内因性のMUAボレーから時間が経つにつれて高くなった。従って、MUAボレーの直後には、フェロモンシグナルによってMUAボレーが誘起されない不応期が存在することが示唆された。

以上の知見を利用することで、MUAボレー後の早い時期の呈示では、強いフェロモン活性のみを検出することが可能であり、一方、遅いタイミングの呈示では、弱いフェロモン活性を検出することが可能であることが示唆された。

5. 雄効果フェロモンの探索

ヤギでは、雄効果フェロモンは主に雄ヤギの頭部と頸部の皮脂腺においてアンドロゲン依存的に産生されており¹¹⁾、テストステロンが5 α リダクターゼにより変換されたジヒドロテストステロンが皮脂腺のフェロモン合成酵素の発現を誘導し、フェロモンが産生される³⁷⁾ことが我々の研究によって示唆されている。雄効果フェロモンは成熟雄被毛に付着しており、有機溶媒で抽出可能であるが、この方法では環境中の化合物が大量に混入してしまう。そこで、揮発性成分の吸着剤 (Tenax) を入れたヘッドキャップを雄ヤギにかぶせることで、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分子群を回収した (図3上図)。この捕集成分のGC-MS解析と、MUAシステムによるバイオアッセイを組み合わせ、雄効果フェロモンリガンド分子の単離・同定を進めた。

図2 MUA システムを用いたバイオアッセイの条件検討 (A) MUA ボレーがほぼ一定の間隔で認められ、3時間のコントロール期間におけるMUA ボレー間隔の平均値を「T」とした。(B) 内因性のMUA ボレーから1/2 Tが経過したタイミングでコントロール(サンプル呈示に用いるプラスチックカップ)(左)あるいは雄ヤギ被毛(右)を呈示した際のMUA。コントロールの呈示ではMUAは影響を受けず、雄ヤギ被毛の呈示では、呈示から60秒以内にMUA ボレーが誘起されている。このようにサンプルの呈示から60秒以内にMUA ボレーが認められた場合に、「MUA ボレーが誘起された:陽性」とカウントし、以下のバイオアッセイの指標とした。(C) 内因性のMUA ボレーから1/2 T, 2/3 T, 3/4 Tの呈示タイミングにおいて、雄ヤギ被毛またはコントロールを呈示した際のMUA ボレーの誘起率(陽性率)。棒グラフの上の分母は用いたヤギの頭数、分子は陽性を示した頭数を示す。文献23)より改変。

まずは捕集した揮発性成分をGC分取した画分についてバイオアッセイしたところ、雄ヤギ頭部由来揮発性成分の炭素数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(図3下図、点線で挟まれた画分)において、MUA ボレーを誘起する活性が認められた(図4 A)。この画分を詳細にGC-MS分析したところ、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-ethylnonalanalなど)が検出された(図3下図)。一般にフェロモン分子は種特異的な構造であることが多いため、これらの化合物は有力なフェロモン候補成分と考えられた。そこで、上記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、フェロモン活性が認められ、この中に活性成分があることが示唆された(図4 A)。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、4-ethyloctanalが各単体の中で最も強いフェロモン活性を示した(図4 B, C)。ただし、4-ethyloctanal単品の活性は18成分カクテルよりは弱いことが図4 Dから推測される。18成分カクテルから4-ethyloctanalを除き、17成分カクテルとすると、4-ethyloctanal単体より活性が弱まることも示された(図4 D)。従って、4-ethyloctanalは18成分の中で活性を示す主成分であると考えられた。

4-Ethyloctanalは雄ヤギからアンドロゲン依存的に発せられ、雌ヤギに受容されてGnRHパルスジェネレーターの活動を促進することから、プライマーフェロモンの定義に当てはまる。4-Ethyloctanalは雄効果フェロモンの主要成分であり、他の成分との協調作用によりさらに強い活性が生じるのであろう。

雄被毛由来成分の分析により、雄ヤギ特異臭として4-ethyloctanoic acidが単離同定されている。この成分は雌ヤギを誘引するリリーサー効果があるものの、LHの分泌や排卵の誘起といったプライマー効果はないとされている^{29, 33)}。また、雄ヤギでは4-ethyloctanoic acid以外にもエチル基側鎖のある様々な鎖長のカルボン酸が同定されており、これらは雌ヤギ被毛からは検出されない¹⁰⁾。4-Ethyloctanalとこれらの成分の協調作用によって、より強いフェロモン活性が生じるかもしれない。

6. 今後の展望

マウスでは鋤鼻神経系がプライマーフェロモンの伝達に関与することが示唆されており、鋤鼻神経には2タイプの鋤鼻受容体ファミリー(V1RとV2R)が発現している¹⁵⁾。ヤギやヒツジではV2Rは偽遺伝子となっており、V1Rがフェロモンの受容に関与している可能性が考えられる。これまでにヤギでは23種、ヒツジでは21種のV1Rが同定されており、これらのV1Rは鋤鼻器と嗅上皮の両方で発現する^{26, 38)}。ヒツジを用いた研究では、嗅上皮を硫酸亜鉛で破壊すると雄被毛呈示によるLHの上昇率が著しく低下し⁸⁾、一方で、鋤鼻神経の軸索を切除した場合にはLHの上昇は影響を受けない³⁾。また雄被毛を呈示する際に、麻酔を用いて扁桃体皮質核を一時的に不活化することにより、LHの上昇効果が低下する⁹⁾。従って、雄効果には主嗅覚系が必須であり、鋤鼻系は不必要な補助的な役割しか担っていないことが推定される。以上から、4-ethyloctanalのシグナル伝達経路として、嗅上皮のV1Rから主嗅球、扁桃体皮質核を介して最終的に弓状核のキスペプチンニューロンに至る経路が予想される(図5)。今後はV1Rのリガンド分子群

図3 雄ヤギ頭部由来の揮発性化合物のGC-MS解析 上図のように雄ヤギ頭部にTenaxという吸着剤を入れたヘッドキャップをかぶせて揮発性化合物を回収し、GC-MS解析やGC分取アッセイに使用した。雄ヤギ(黒クロマトグラム)と去勢雄ヤギ(灰色クロマトグラム)の頭部揮発性化合物のGCクロマトグラムの典型例。それぞれのピークに対応する化合物名をピーク付近に示した。下線を引いた化合物を18成分のカクテルに用いた。点線で挟まれた分画のGC分取物に活性が認められた。

図4 合成化合物のバイオアッセイ (A) GC分取物と18成分カクテルのバイオアッセイ。(B) 3/4 Tのタイミングにおける単一化合物のバイオアッセイ。(C) 1/2 Tのタイミングにおける単一化合物のバイオアッセイ。(D) 18成分カクテル、カクテルから4-ethylheptanalを差し引いたもの、4-ethylheptanal単品のバイオアッセイ。それぞれのパネルは、呈示サンプルに対する陽性率を示す。上部に呈示タイミング、棒グラフの上に(陽性頭数/使用した頭数)を示し、黒塗りの棒グラフがサンプル呈示、白抜きの棒グラフがコントロール呈示を示す。B～Dは文献23)より改変。

- 38) Wakabayashi, Y., Ohkura, S., Okamura, H., Mori, Y. & Ichikawa, M.: J. Comp. Neurol., 503, 371-380 (2007)
- 39) Whitten, W.K.: J. Endocrinol., 13, 399-404 (1956)
- 40) Wilson, R.C., Kesner, J.S., Kaufman, J.M., Uemura, T., Akema, T. & Knobil, E.: Neuroendocrinol., 39, 256-260 (1984)

Abstract

Identification of primer pheromone in goats

Ken MURATA, Yukari TAKEUCHI

Laboratory of Veterinary Ethology, Department of Animal Resource Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan.

Pheromone is defined as chemical released by one organism that modulates the behavior or physiology of a second organism of the same species. Releaser pheromones induce specific behavior by exerting acute effects on the neuronal response, whereas primer pheromones induce physiological changes with long-lasting effects by changing the neuroendocrine status of the recipients. In mammals, although several types of releaser pheromones have been identified, the identities of primer pheromones remain largely unknown. In sheep and goats, the seasonally anestrus endocrine state of females is changed to the estrus state upon exposure to male scents. This so-called "male effect" is one of the most conspicuous primer pheromone effects in mammals. We have identified an olfactory signal molecule that activates the central regulator of reproduction, the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse generator, in goats. Using gas chromatography-mass spectrometry to analyze male goat headspace volatiles, we identified several ethyl-branched aldehydes and ketones. We electrophysiologically demonstrated that one of these compounds, 4-ethyloctanal, activates the GnRH pulse generator in female goats. This discovery opens a new avenue toward a deeper understanding of the pheromone-dependent regulation of reproduction in mammals, as well as the development of novel and more natural technology for increasing the reproductive efficiency of livestock animals.

Keywords: primer pheromone, goat, male effect, GnRH pulse generator