

反芻動物のフェロモン受容機構に関する研究

平成 19 年度進学

東京大学大学院農学生命科学研究科

応用動物科学専攻 博士課程

大原 海

目次

第一章 総合緒言	3
1-1 緒言	
1-2 フェロモンの定義	
1-3 反芻動物の雄効果	
1-4 哺乳類の嗅覚受容体	
1-5 嗅覚受容体とリガンド候補	
1-6 嗅覚システムの神経軸索投射	
1-7 本研究の目的	
第二章 反芻動物種間において種を超えて作用する雄効果フェロモン	18
2-1 緒言	
2-2 材料および方法	
2-3 結果	
2-4 考察	
2-5 小括	
第三章 反芻動物における1型鋤鼻受容体遺伝子の分子進化学的解析	39
3-1 緒言	
3-2 材料および方法	
3-3 結果	
3-4 考察	

3-5 小括

第四章 反芻動物の嗅球における嗅神経の軸索投射 70

4-1 緒言

4-2 材料および方法

4-3 結果

4-4 考察

4-5 小括

第五章 総合考察 90

5-1 結果の要約

5-2 嗅覚受容体の分子進化

5-3 2つの嗅覚システムにおけるフェロモン受容機構

5-4 畜産動物のフェロモン

5-5 本研究の意義

要旨 104

参考文献 109

第一章

総合緒言

1-1 緒言

多くの哺乳類において嗅覚は高度に発達しており、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、生殖行動をはじめ様々な行動に多大な影響を及ぼしているのである。

1-2 フェロモンの定義

匂いは、好ましい環境・好ましくない環境に関わらず、ありとあらゆる環境に存在する。ヒトがより匂いに接する機会は食事のときであろう。このとき料理から立ち込める匂いは「芳しい匂い」を意味する「香り」としてヒトの脳内を刺激して、料理への嗜好性を高めている。しかしヒト以外の哺乳類においては匂いの果たす役割の範囲は広い。安全な食物の匂い、仲間の匂い、あるいは危険な捕食者の匂いなど、匂いによる情報は生活に深く関わっている。更に、哺乳類の嗅覚の世界には、「フェロモン」と呼ばれる生理活性物質が存在する。

フェロモンという言葉は **Karlson** と **Luscher** によって定義された (**Karlson and Luscher 1959**)。それによるとフェロモンとは「同種個体間で分泌・伝達され、それを受容した個体に特定の行動または生理的变化を引き起こす化学物質」である。またフェロモンが受容した個体に及ぼす影響は、その機能的な観点からリリーサー効果とプライマー効果に分類されている (**Wilson and Bossert 1963**)。リリーサー効果とは、フェロモンを受容した個体に対して行動変化を引き起こすものである。哺乳類では、繁殖期における雌雄の誘引作用、仲間に警戒を知らせるものなど、様々な現象が報告されている (**Melrose et al. 1971, Reed et al. 1974, Singer et al. 1976, Rasmussen et al. 1996**)。一方、プライマー効果とは、フェロモンを受容した個体に生理的变化を引き起こすものである。プライマー効果には、雄マウスのフェロモンによって集団飼育している雌マウスが発情を誘発される **Whitten** 効果や (**Whitten 1956**)、交尾相手以外の雄マウスのフェロモ

ンに曝されることによって妊娠阻害が起こる Bruce 効果 (Bruce 1959) などが知られている。反芻動物であるヒツジやヤギでは「雄効果」というプライマー効果がある。

1-3 反芻動物の雄効果

ヤギやヒツジは短日型の季節性繁殖動物であり、日長が長くなる春から夏にかけて雌は雄と離れて群をなし、互いに繁殖行動が起こらなくなる。また、雌では卵巣の活動と性周期が停止する。しかし、このような雌の群に成熟した雄を人為的に導入すると、雌の性腺活動が刺激されて発情や排卵が引き起こされる。このような現象を「雄効果」という (Martin and Scaramuzzi 1983)。雄効果は雌へ雄の被毛を嗅がせるだけでも引き起こされることから (Claus et al. 1990)、雄の被毛に付着したフェロモンによるものだと考えられている。雄効果フェロモンには珍しい特徴があり、ヤギとヒツジの雄効果フェロモンは種を超えて互いの雌へ作用し合うことが報告されている (Over et al. 1990, Ichimaru et al. 2007)。

雄効果はフェロモンが引き起こすプライマー効果の中でも、中枢神経系におけるターゲットが知られているフェロモン現象の一つである。生殖機能の制御に重要な働きをもつ因子として、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (gonadotropin-releasing hormone : GnRH) があり、この GnRH は下垂体における黄体形成ホルモン (luteinizing hormone : LH) の産生および分泌を調節していることが広く知られている。GnRH 産生ニューロンは、神経終末から下垂体門脈中にパルス状に GnRH を放出し、その結果として下垂体からの LH のパルス状分泌を形成している。この GnRH 産生ニューロン終末付近の視床下部内側基底部に記録電極を慢性的に留置し、多ニューロン発射活動 (multi-unit activity : MUA) を電気的理学的に計測したところ、MUA の一過性上昇 (MUA volley) と末梢血中の LH パルスが同期して発生することが明らかになった (Knobil 1989, Mori et al. 1991)。このことから、視床下部内側基底部に於いてパルス状 GnRH 放出を司る GnRH パルスジェネレーターという神経機構の存在が想定されている。更に、視床下部内側基底部に記録電極を留置した雌ヤギを用いて、雌ヤギに対する雄ヤギ被毛の効

果を解析してみると、雄ヤギ被毛の曝露によって直ちに MUA volley と末梢血中の LH パルスが引き起こされることが確認された (Hamada et al. 1996)。このことから、雄効果フェロモンの中樞神経系におけるターゲットは、視床下部内側基底部の GnRH パルスジェネレーターであると考えられている。つまり、雄効果フェロモンは、嗅覚系を経由して最終的に視床下部内側基底部の GnRH パルスジェネレーターを刺激して GnRH の放出を促進し、下垂体からの LH 分泌、ひいては卵巣の周期的活動を再開させることによって、非繁殖期における雌の発情および排卵を誘起するものと考えられている (Figure 1-1)。

1-4 哺乳類の嗅覚受容体

「多種多様な匂いは、どのように認識されているのか？」1991 年、コロンビア大学の Buck と Axel が「推定上の」嗅覚受容体遺伝子のクローニングに成功するまで、それすらも明らかになっていなかった。それまでは、匂い分子と受容体の分子構造の形によるという「立体化学説」(Amoore 1963) や、嗅神経細胞の膜上に吸着して膜が物理的に変化することによるという「膜吸着説」(Kashiwayanagi and Kurihara 1985)、そして匂い分子そのものの分子振動によるという「分子振動説」(Turin 1996) など、複数の説が提唱されていたのである。しかし前述の Buck と Axel が嗅覚受容体の発見を報告したことによって立体化学説が最も有力な説であるということが判明した (Buck and Axel 1991)。以降、嗅覚の研究は著しい発展を遂げることとなる。1998-1999 年になると、「推定上の」嗅覚受容体遺伝子について 3 研究グループがその機能解析に成功し (Zhao et al. 1998, Touhara et al. 1999, Wetzel et al. 1999)、この遺伝子が匂いを認識するタンパク質をコードしていることが実証された。

Buck と Axel に端を発した嗅覚受容体遺伝子の同定であるが、現在は複数の種類の嗅覚受容体ファミリーが見つかっている。これまでに見つかっているものとしては、Buck と Axel が発見した匂い受容体 (olfactory receptor : OR) (Buck and Axel 1991) をはじめ、1 型鋤鼻受容体 (vomeronasal type 1 receptor : V1R) (Dulac and Axel 1995)、2

型鋤鼻受容体(vomer nasal type 2 receptor: V2R)(Herrada and Dulac 1997, Matsunami and Buck 1997, Ryba and Tirindelli 1997)、痕跡アミン関連受容体 (trace amine-associated receptor: TAAR)(Liberles and Buck 2006)、D型グアニリルシクラーゼ(guanylyl cyclase D: GC-D)(Gibson and Garbers 2000)、ホルミルペプチド受容体(formyl peptide receptor: FPR)(Liberles et al. 2009, Riviere et al. 2009)などがある。また特殊な例として、苦味を司る2型味覚受容体(taste type 2 receptor: T2R)も一部嗅覚受容体として機能することが示唆されている(Lin et al. 2008)。嗅覚受容体のうち、OR、V1R、V2R、TAAR、FPR、T2Rは多重遺伝子ファミリーを形成しており、バラエティに富んでいる。また、互いの嗅覚受容体ファミリー間ではホモロジーはほとんどない(Figure 1-2)。これら嗅覚受容体は、1回膜貫通型受容体であるGC-Dを除き、全て7回膜貫通型受容体の構造をとっており、guanine nucleotide binding protein(Gタンパク質)を介するシグナル伝達系を有しているものと考えられている。

1-5 嗅覚受容体とリガンド候補

数多くの嗅覚受容体が存在することは、嗅覚の世界がいかに多彩であるのかを示している。哺乳類では嗅覚受容体として、OR、V1R、V2R、TAAR、GC-D、FPR、そしてT2Rなどが存在するが、これらの嗅覚受容体ファミリーはそれぞれどのようなリガンドを受容するのだろうか？

Table 1-1において、齧歯類マウスにおける嗅覚受容体とリガンド候補物質の性質、そしてリガンドを受容することによってもたらされる効果について示した。

ORは食物から放たれる匂い分子や周囲の環境に漂う匂い分子など、いわゆる揮発性の匂い分子を受容する。クローブ油の香りあるいは歯科医の詰め物の匂いとして知られるeugenolなど(Zhang and Firestein 2002)、ヒトに馴染み深い匂いや香りはほぼこのORによって受容されると考えられている。

V1RやV2Rはフェロモン受容体候補として知られている。V1Rは、これまでに雄マウスの攻撃行動を引き起こす2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazoleや

3,4-dehydro-exo-brevicomine (Leinders-Zufall et al. 2000)、雌マウスの性成熟を抑制する 2-heptanone (Boschat et al. 2002) などの揮発性フェロモン候補物質へ反応することが明らかになっている。一方、V2R は交尾後雌マウスの着床阻害 (Bruce 効果) を引き起こす可能性があると考えられている major histocompatibility complex (MHC) class I ペプチドや (Leinders-Zufall et al. 2004)、雄マウスの涙に分泌され、個体認識に用いられると考えられている exocrine gland secreting protein (ESP) I (Kimoto et al. 2005)、また雄マウスの尿中に高濃度で存在して雄の攻撃行動を引き起こす major urinary protein (MUP) (Chamero et al. 2007) など主に不揮発性のフェロモン候補物質を受容するとされる。

TAAR は主に尿中に含まれる揮発性アミン系の匂い分子を受容するものと考えられており、雌マウスの性成熟を促進するフェロモン候補物質 isoamylamine を受容するため (Borowsky et al. 2001, Liberles and Buck 2006)、V1R や V2R と同様にフェロモン受容体候補の 1 つとされる。

GC-D は二酸化炭素を生体内で匂い刺激として受け取る受容体だと考えられており、齧歯類においては、GC-D に受容された二酸化炭素は警報シグナルとして認識され、受容した動物へ忌避行動を引き起こすと考えられている (Hu et al. 2007)。ちなみにヒトでは GC-D は偽遺伝子化していることからほとんど機能していないと考えられており (Young et al. 2007)、二酸化炭素がヒトにとっては基本的に無臭である所以とされる。また、齧歯類の嗅上皮における GC-D は、消化管ホルモンペプチドである uroguanylin や guanylin を受容することが示唆されており (Leinders-Zufall et al. 2007)、空腹感、満腹感、喉の渇きなどの認識に関わっていると考えられている。

FPR は齧歯類において最近になって発見された嗅覚受容体ファミリーであるが、その機能についてはほとんど明らかになっていない。しかし、FPR を発現する細胞が病気や炎症に関与するホルミルペプチドに反応することから、他個体の健康状態を認識するような機能を持つのではないかと考えられている (Riviere et al. 2009)。

T2R は、一般に苦味を認識する味覚受容体として知られている。しかし、T2R は citral や geraniol といった、揮発性の匂い分子に反応することが示唆されており (Finger et al.

2003, Kaske et al. 2007, Lin et al. 2007, Lin et al. 2008)、嗅覚受容体としても機能しているものと考えられている。

1-6 嗅覚システムの神経軸索投射

哺乳類は、複数の嗅覚受容器官を起点とした複数の嗅覚システムを持っている。研究の進んでいる齧歯類を例に挙げると Figure 1-3 に示された 5 つの嗅覚システムが確認されている (Munger et al. 2009)。これまでに、哺乳類において解剖学的また機能的にもよく知られている嗅覚システムとして、主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系がある。

主嗅覚系は、鼻腔の最奥に位置する嗅上皮を受容器官として始まる嗅覚システムである。嗅上皮には OR (Buck and Axel 1991)、GC-D (Fulle et al. 1995) そして TAAR (Liberles and Buck 2006) が発現している。TAAR を発現している嗅神経の軸索投射については明らかではないが、OR や GC-D を発現している嗅神経は、主嗅覚系の一次中枢神経系である主嗅球へ軸索投射している。主嗅球は明瞭な層構造をなしており、表層から順に、嗅上皮から伸びた嗅神経からなる嗅神経層、糸球体層、房飾細胞が散在する外叢状層、僧帽細胞からなる僧帽細胞層、房飾細胞や僧帽細胞の軸索が分布する内叢状層、さらに顆粒細胞からなる顆粒細胞層で構成されている。OR は数百種類もの多重遺伝子ファミリーを形成しているが、同じ種類の OR を発現する嗅神経は主嗅球表面に並ぶ約 2,000 個の糸球体のうち、内側と外側のそれぞれ 1 つの糸球体へ軸索投射している (Mombaerts 2004)。また、GC-D を発現する嗅神経はネクレス糸球体という副嗅球周辺の主嗅球糸球体へ軸索投射している (Juilfs et al. 1997)。糸球体においては、僧帽細胞が主樹状突起を伸ばして嗅神経とシナプスを形成しており、高次中枢神経系への匂い情報伝達は僧帽細胞が担っている。嗅上皮からの情報は糸球体で僧帽細胞によって受け取られると、大脳辺縁系である梨状葉皮質、扁桃体皮質核へと伝達され、最終的に大脳皮質へ伝達されると考えられている (Meredith 1998, Zelano and Sobel 2005)。

一方、鋤鼻嗅覚系は鼻中隔基底部に位置する鋤鼻器を受容器官として始まる嗅覚シ

ステムである。齧歯類においては、鋤鼻器の表層には V1R が、基底層には V2R が発現している (Berghard et al. 1996, Jia and Halpern 1996)。V1R または V2R を発現する鋤鼻神経の軸索投射は互いに異なる分布を示し、V1R を発現する鋤鼻神経は副嗅球の吻側部の糸球体へ軸索投射しているのに対し、V2R を発現する鋤鼻神経は尾側部へ軸索投射している (Berghard et al. 1996, Jia and Halpern 1996)。副嗅球もまた主嗅球と同様に層構造をなしており、表層から鋤鼻神経層、糸球体層、僧帽房飾細胞層、さらに顆粒細胞層により構成されている。僧帽房飾細胞は枝分かれした樹状突起を複数の糸球体に伸ばしており、鋤鼻器からの情報を糸球体で受け取るとその情報を扁桃体内側核や分界条床核へ伝達し、さらに視索前野、腹内側核などの視床下部神経核群へ伝達するものと考えられている (Scalia and Winans 1975, Meredith 1998, von Campenhausen and Mori 2000, Brennan and Kendrick 2006)。また鋤鼻器には、V1R や V2R 以外に OR (Levai et al. 2006) や FPR (Munger 2009) も発現しており、これらを発現する鋤鼻神経は副嗅球の糸球体へ軸索投射していると考えられている。

反芻動物においても、発達した感覚神経細胞層を持つ嗅上皮や鋤鼻器が存在することや、中枢神経系において、齧歯類の主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系に対応する神経回路が解剖学的に確認されていることから (Jansen et al. 1998, Meurisse et al. 2009)、主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系が存在することが考えられている。反芻動物の主嗅球・副嗅球も齧歯類と同様に層構造をなしており (Figure 1-4)、それぞれ受容器官からの神経軸索投射を受けているものと考えられる。しかし、受容器官において個々の嗅覚受容体を発現するニューロンがどのような軸索投射をしているものなのかは不明な点が多い。少なくとも、反芻動物における副嗅球への神経軸索投射様式については、齧歯類と異なるということが明らかになっている。齧歯類では、V1R や V2R と共役して発現している G タンパク質の解析によって、V1R または V2R を発現するニューロンは副嗅球の吻側部と尾側部に分かれて軸索投射していることが明らかになっている (Berghard et al. 1996, Jia and Halpern 1996)。しかし反芻動物においては、同様の実験を行った際に副嗅球における V2R 発現ニューロンの軸索投射は確認されておらず、V1R 発現ニューロンが副嗅球全体へ軸索投射していることが明らかになっている (Takigami et al.

2004)。また反芻動物においては機能的な V2R 遺伝子が同定されていないため(Shi and Zhang 2007, Young and Trask 2007)、副嗅球における V2R 発現ニューロンの軸索投射が存在しないものと考えられる。

嗅覚システムには、齧歯類においては、主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系以外に septal organ 系、grueneberg ganglion 系、そして三叉神経系の存在が確認されている。しかし、これらの嗅覚システムが反芻動物においても存在するものなのかは明らかではない。以下に、各嗅覚システムの概要を簡単に述べる。

septal organ 系は、鼻腔の基底部付近に存在する septal organ から始まる嗅覚システムである。septal organ には、OR (Kaluza et al. 2004, Tian and Ma 2004) や GC-D (Ma et al. 2003, Walz et al. 2007) が発現しており、これらの受容体を発現しているニューロンは、主嗅球の腹側尾側部における系球体へ軸索投射している (Levai and Strotmann 2003, Breer et al. 2006)。

grueneberg ganglion 系は鼻の先端部に位置する grueneberg ganglion と呼ばれる嗅覚受容器官から始まる嗅覚システムである。grueneberg ganglion には TAAR が発現しており (Fleischer et al. 2007)、主嗅球の背側部、副嗅球周辺そしてネックレス系球体と呼ばれる領域への神経軸索投射が存在する (Fuss et al. 2005, Roppolo et al. 2006)。

三叉神経系は頭部の感覚を受ける感覚神経系で、触覚・圧覚・温度感覚・痛覚・深部感覚などの感覚情報を伝達しているが、嗅覚システムとしても機能している。最近では、三叉神経系とシナプスを形成している孤立性化学受容体細胞が鼻腔に局在しており (Finger et al. 2003)、この孤立性化学受容体細胞に発現している T2R が匂い分子を受容することが示唆されている (Finger et al. 2003, Kaske et al. 2007, Lin et al. 2007, Lin et al. 2008)。

1-7 本研究の目的

反芻動物のフェロモン現象である雄効果は、中枢神経系におけるフェロモン情報の到達地点と内分泌への作用が明らかになっている。従って、フェロモンがどのように

受容され、脳内のどのような領域で情報処理されて内分泌反応へ働きかけるのかといった、フェロモン情報処理機構を理解することが可能だと言える。

雄効果フェロモンには次の2つの特徴がある。すなわち、(1) 雄効果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という点 (Over et al. 1990, Ichimaru et al. 2007)、(2) 雄効果フェロモンの情報処理に中枢神経系における主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系の2つの嗅覚システムが関与している点 (Gelez and Fabre-Nys 2006) である。本研究ではこれらの特徴を手掛かりとして、雄効果フェロモン受容体候補を探索し、その受容機構を考察することを目的とした。そのために、第二章では、雄効果フェロモンの特徴(1)をもとに、種を超えて作用する雄効果フェロモンの特性から雄効果フェロモン受容体候補を検討した。続く第三章では、第二章から検討された雄効果フェロモン受容体候補に着目してヤギとヒツジとの間の類似性を比較し、その受容体が種を超えて作用するフェロモン現象を裏付けるものであるのかについて考察した。第四章では、雄効果フェロモン受容体候補を発現するニューロンが嗅球の何処へ軸索投射しているものなのかを解析し、雄効果フェロモンの特徴(2)を裏付けるものであるのかについて考察した。

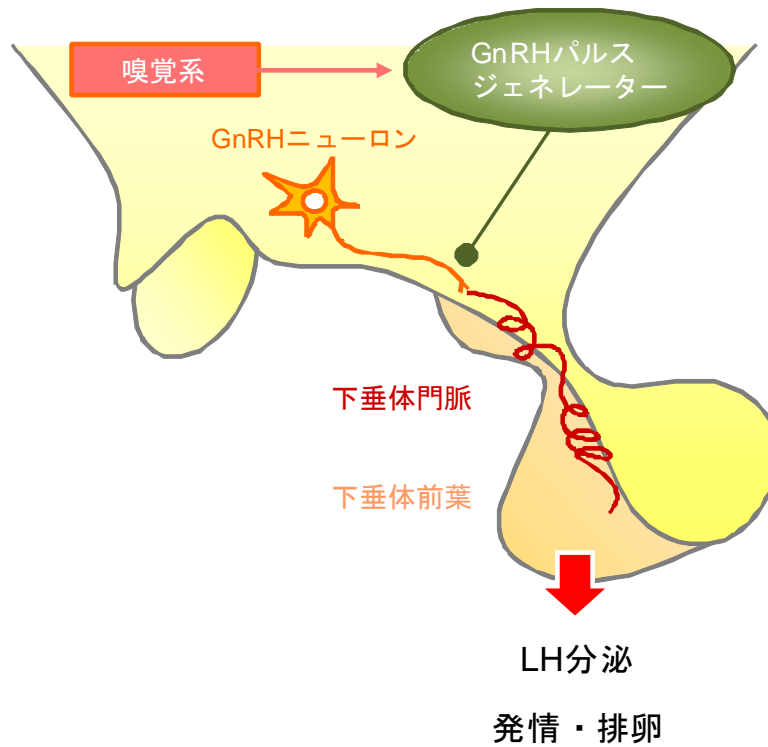


Figure 1-1 雄効果フェロモンによる内分泌変化

雄効果フェロモンは嗅覚系を介して、最終的には視床下部の性腺刺激ホルモン放出ホルモン（gonadotropin-releasing hormone : GnRH）パルスジェネレーターの神経活動を亢進する（Hamada et al. 1996）。GnRH は下垂体門脈へパルス状に分泌されると、下垂体前葉からの黄体形成ホルモン（luteinizing hormone : LH）のパルス状分泌を亢進して、雌の発情や排卵を誘起する。

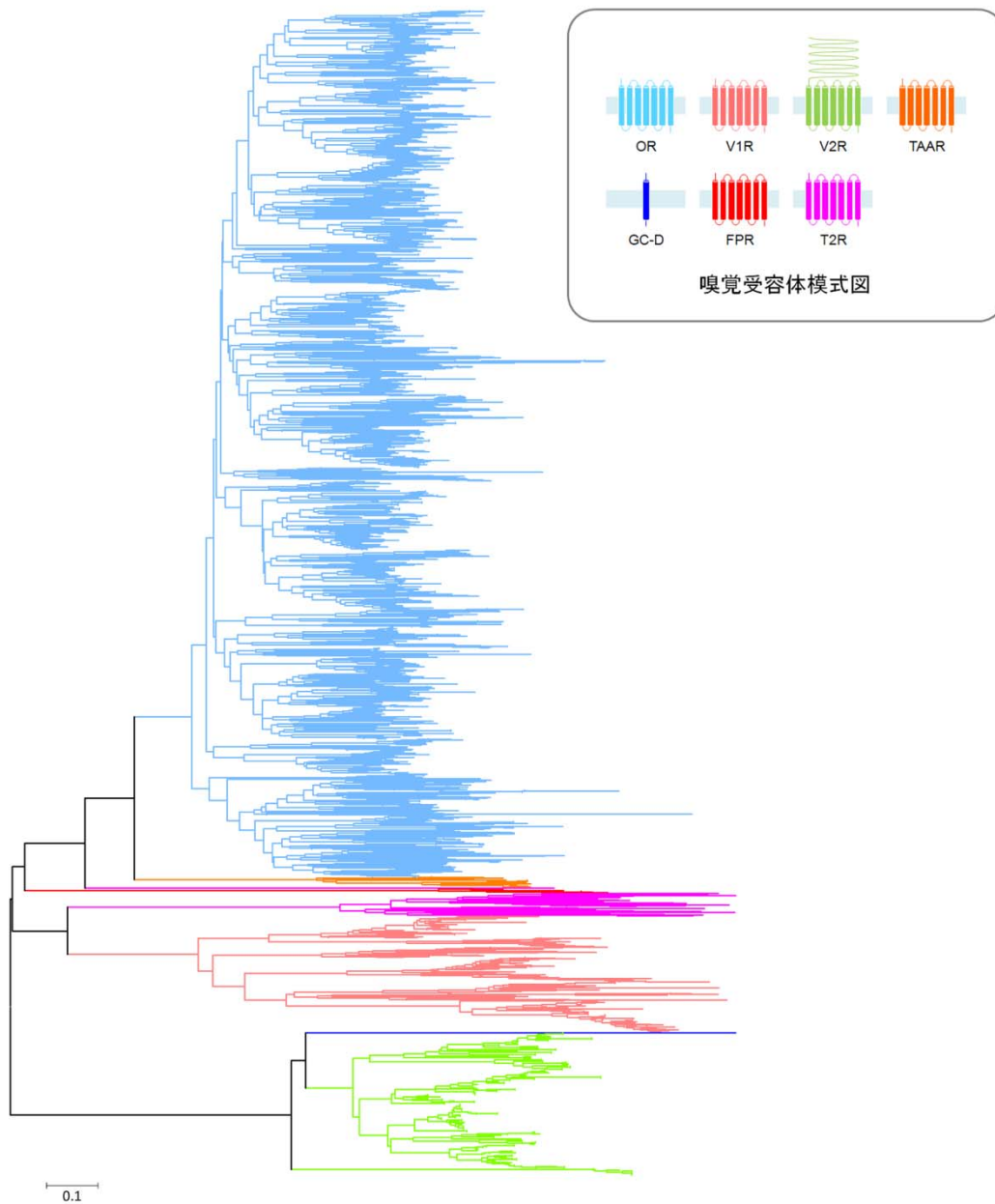


Figure 1-2 齧歯類マウスにおける嗅覚受容体遺伝子進化系統樹

匂い受容体 (olfactory receptor : OR)、1 型鋤鼻受容体 (vomeronasal type 1 receptor : V1R)、痕跡アミン関連受容体 (trace amine-associated receptor : TAAR)、ホルミルペプチド受容体 (formyl peptide receptor : FPR)、2 型味覚受容体 (taste type 2 receptor : T2R) は 7 回膜貫通型受容体である。2 型鋤鼻受容体 (vomeronasal type 2 receptor : V2R) もまた 7 回膜貫通型受容体であるが、N 末端に長い細胞外ドメインを持っている。D 型グアニリルシクラーゼ (guanylyl cyclase D : GC-D) は 1 回膜貫通型受容体構造を取る。各嗅覚受容体遺伝子はそれぞれ異なる多重遺伝子ファミリーを形成しており (GC-D は除く)、各々のファミリー間にホモロジーはない。

Table 1-1 齧歯類マウスにおける嗅覚受容体とリガンド候補物質

(Dulac and Torello 2003, Zufall and Leinders-Zufall 2007, Munger et al. 2009 を改変)

受容体	リガンド性質	リガンド候補物質	由来	機能
OR	揮発性匂い分子	eugenol	食物・環境	香り
V1R	揮発性 フェロモン分子	2-sec-butyl-4,5- dyhydrothiazole	尿	雄の攻撃行動
		3,4-dehydro-exo- brevicommin	尿	雄の攻撃行動
		2-heptanone	尿	雌の発情抑制
V2R	不揮発性 フェロモン分子	MHC class I ペプチド	尿	雌の妊娠阻害 (Bruce効果)
		ESPI	涙	個体識別
		MUP	尿	雄の攻撃行動
TAAR	揮発性アミン	isoamylamine	尿	雌の性成熟促進
GC-D	二酸化炭素 消化管ペプチド	二酸化炭素	空気	忌避行動
		uroguanylin	尿	空腹感、満腹感、喉の渴き
		guanylin	尿	空腹感、満腹感、喉の渴き
FPR	ホルミルペプチド	?	尿	健康状態の認識
T2R	揮発性匂い分子	citral	食物・環境	香り
		geraniol	食物・環境	香り

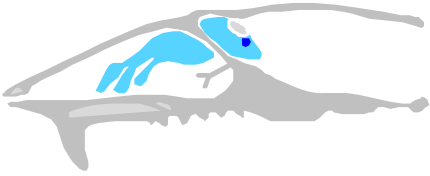
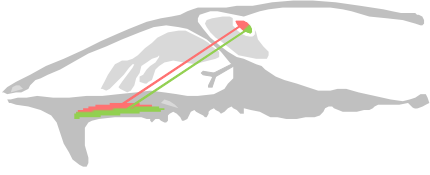
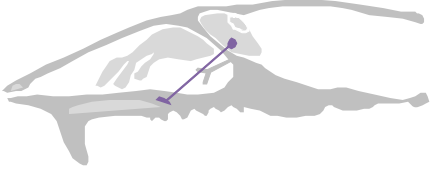

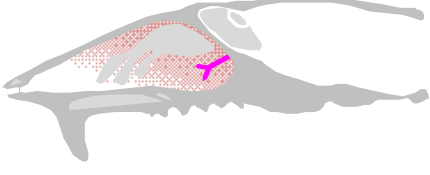
嗅覚システム (マウス頭部模式図)	受容器官	受容体	神経軸索投射先
主嗅覚系 	嗅上皮	OR	主嗅球の糸球体
		TAAR	?
		GC-D	主嗅球の ネクレス糸球体
鋤鼻嗅覚系 	鋤鼻器 神経上皮表層部	V1R	副嗅球の吻側部
		FPR	?
		OR	副嗅球の吻側部
	鋤鼻器 神経上皮基底部	V2R	副嗅球の尾側部
FPR	?		
Septal organ系 	Septal organ	OR	主嗅球の腹側尾側部
		GC-D	?
Grueneberg ganglion系 	Gruenberg ganglion	TAAR	主嗅球の ・背側 ・副嗅球周辺 ・ネクレス糸球体
三叉神経系 	鼻腔	T2R	三叉神経

Figure 1-3 齧歯類の嗅覚システムにおける神経軸索投射様式

(Munger et al. 2009 を改変)

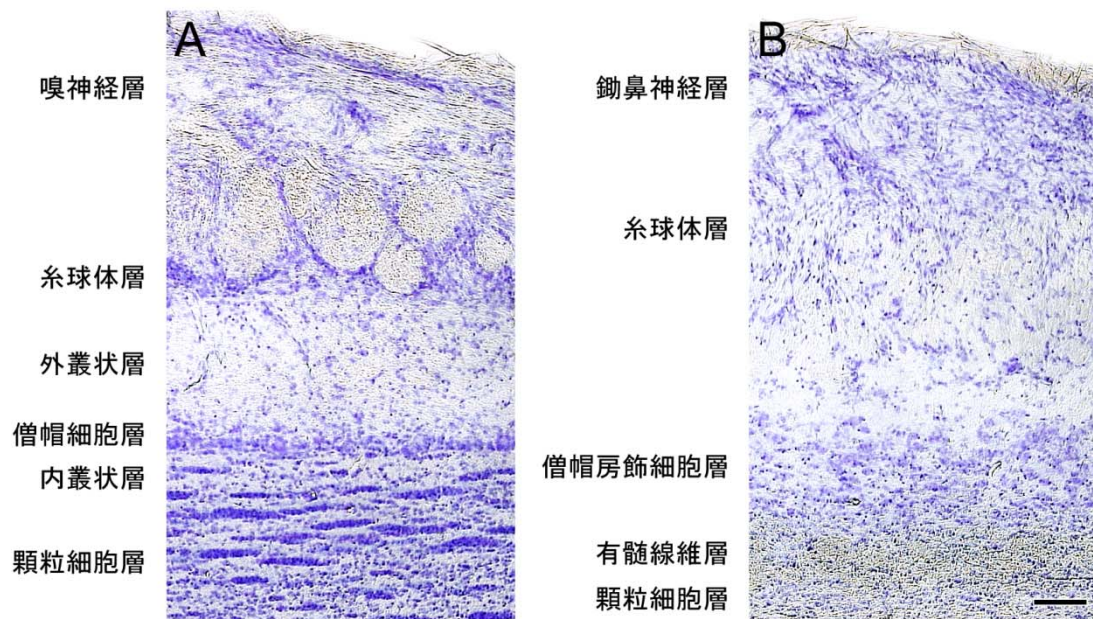


Figure 1-4 反芻動物における主嗅球および副嗅球の層構造

A；主嗅球の層構造。表層から背腹方向に、嗅神経層、糸球体層、外叢状層、僧帽細胞層、内叢状層、顆粒細胞層からなる。

B；副嗅球の層構造。表層から背腹方向に、鋤鼻神経層、糸球体層、僧帽・房飾細胞層、有髓線維層、顆粒細胞層からなる。

Scale bar：100 μ m

第二章

反芻動物種間において 種を超えて作用する雄効果フェロモン

2-1 緒言

反芻動物であるヒツジとヤギでは、非繁殖期の雌の群に性成熟した雄を放つと、雌の下垂体前葉からの黄体形成ホルモン（luteinizing hormone：LH）分泌が促進されて発情と排卵が誘起される「雄効果」という現象が知られている（Martin and Scaramuzzi 1983）。更に、雄効果は雄の被毛を雌へ嗅がせるだけでも確認できることから、雄の被毛に付着したフェロモンによる効果だと考えられている（Claus et al. 1990）。フェロモンは「同種個体間で分泌・伝達される」と定義されている（Karlson and Luscher 1959）。ところが、雄効果についてはこの定義に当て嵌まらないことが示唆されている。雄ヤギの被毛は雌ヒツジに雄効果様の作用を示し（Over et al. 1990）、逆に雄ヒツジの被毛は雌ヤギにも作用するという（Ichimaru et al. 2007）。これらのことから、ヤギとヒツジのフェロモンには類似した分子が含まれていることや、ヤギとヒツジのフェロモン受容体は互いに非常に良く似たものであることが推測される。雄効果のフェロモン受容機構を解析する上で、このような現象は非常に興味深い。

ヤギやヒツジの雄効果フェロモンは未だ単離には至っていない。しかし、ヤギの雄効果フェロモンに関してはいくつかの現状証拠から徐々にその実体が明らかになりつつある。1つ目は、ヤギの雄効果フェロモンは恐らく頭部から頸部の皮脂腺でテストステロン依存的に産生されることである（Iwata et al. 2000）。このことは雄効果フェロモン活性が成熟した雄ヤギの頭部から頸部を中心とした皮脂腺に特異的に認められることと、また去勢してしまった雄は皮脂腺が萎縮して雄効果フェロモン活性も失われてしまうが、このような雄にテストステロンを持続投与すると皮脂腺は再び発達して雄効果フェロモン活性も復活することなどから示唆されている。2つ目は、雄効果フェロモンは酸性あるいは中性の物質であることである（Claus et al. 1990）。このことは成熟した雄ヤギの被毛から脂溶成分を抽出して、酸性・中性・塩基性成分に分画したものをそれぞれ雌ヤギへ曝露すると、酸性画分と中性画分に雄効果フェロモン活性が認められたことから示唆される。

ヤギやヒツジでは主嗅球や副嗅球への順向性・逆向性トレーサー実験によって、主

嗅覚系および鋤鼻嗅覚系の2つの嗅覚システムの神経回路が調べられており (Jansen et al. 1998, Meurisse et al. 2009)、基本的に齧歯類と同様の神経回路が保存されていることが明らかになっている (Figure 2-1)。主嗅覚系とは鼻腔内の嗅上皮の神経細胞から、一次中枢神経系の主嗅球を経て、脳内の梨状葉、扁桃体前皮質核、扁桃体後外側皮質核からなる神経回路である。一方、鋤鼻嗅覚系とは鋤鼻器の神経細胞から、一次中枢神経系の副嗅球を経て、扁桃体後内側皮質核、分界条床核、視床下部の視索前野からなる神経系である。嗅覚系は脳内で生殖系とリンクしており、視床下部における視床下部内側視索前野や腹内側核、弓状核などがそれにあたる。

本章では、種を超えて作用する雄効果フェロモンの特性から雄効果フェロモン受容体候補を検討することを目的とした。そのために、雄ヤギの被毛から抽出した酸性・中性・塩基性画分のうち、酸性画分を雌ヒツジへ曝露し、雄効果フェロモン活性を示すものなのかについて確認した。雄効果フェロモン活性には、LH分泌と脳内における嗅覚系・生殖系神経核群の反応を指標とした。脳内で反応した領域を調べる手段としては、活性化した細胞の核に即時的に発現する Fos タンパク質の抗体を用いた免疫組織化学染色法が多く用いられており (Hoffman and Lyo 2002, Gelez and Fabre-Nys 2006)、本章でもその手法を利用した。

2-2 材料および方法

実験 1 雄ヤギ被毛抽出物による雌ヒツジへのフェロモン活性解析

供試動物、時期、場所

供試動物として、成熟雌セントクロイ種ヒツジ7頭を用いた。採血は東京大学農学部附属牧場(北緯36度16分)において、非繁殖期である2006年6月15日に行った。なお、実験用サンプルの曝露手順に慣れさせるため、全ての動物に対して実験の1ヶ月前から3-4日ごとに実際の曝露と同様の方法で空の飲料用カップを供試動物の鼻先に2分間呈示する作業を行った。

雄ヤギ被毛抽出物の精製

成熟雄シバヤギ(東京大学農学部附属牧場)および去勢雄シバヤギ(農業生物資源研究所)の頭部・頸部からそれぞれ採取した被毛から、二酸化炭素超臨界流体抽出装置により脂溶成分を抽出して、向流分配抽出操作にて酸性画分を得た。成熟雄ヤギ被毛および去勢雄ヤギ被毛から得られた酸性画分(以下、TestとControl)は、チューブ1本につき2mg被毛からの酸性画分を含むよう分注し、チューブ内側面に付着させた状態で-20°C下にて保存した。

曝露する際には、酸性画分を付着させたチューブに800μlのジエチルエーテルを加えてボルテックスし、それをキムワイプに塗布した。同キムワイプはジエチルエーテルを蒸発させてから、底を切り抜いて代わりにビニル製網を付けた飲料用カップの底に貼付した。カップの口は曝露直前までパラフィルムで被った。

TestおよびControlの雄効果フェロモン活性の有無は、成熟雌シバヤギを用いて確認した。

頻回採血

互いに約 1 m 離れた 2 ヶ所の実験用ケージ (2.0 × 2.5 m²) へ動物を 4 頭ずつ配置して、外頸静脈に連続採血用 18G カニューレ (日本シャーウッド) を装着した。このカニューレから血液を 10 分おきに 2 ml ずつ、ヘパリンを含んだチューブに採取し、遠心分離して血漿を得た。血漿は約 1 ml ずつサンプルリングチューブに分注し、血漿 LH 濃度を測定するまで -30°C 下にて保存した。

採血開始後 2 時間に、片方のケージの 4 頭に対して、Control を曝露し、さらに 2 時間 30 分後に Test を曝露した。もう一方のケージの 4 頭に対しては、採血開始後 2 時間に Test を曝露し、さらに 2 時間 30 分後に Control を曝露した。各サンプルは曝露の際には、10 分ごと 2 分間の曝露を 3 回繰り返した。

血中黄体形成ホルモン (LH) 濃度測定

血中 LH 濃度は、二抗体法によるラジオイムノアッセイにより測定した (Mori and Kano 1984, Ohkura et al. 2004)。標識ホルモンには NIDDK-oLH-I-4 を用い、¹²⁵I で標識した。一次抗体には抗ヒツジ LH ウサギ血清を用い、二次抗体には抗ウサギ γ -グロブリンヤギ血清 (シバヤギ) を用いた。最小測定感度は血漿サンプル 200 μ l において 0.19 ng/ml であり、アッセイ内およびアッセイ間変動係数はそれぞれ 3.82 ng/ml で 5.1%、3.55 ng/ml で 6.5% だった。

統計解析

Test および Control 曝露前後 2 時間の血中 LH 濃度平均値の経時変化について、two-way repeated measures ANOVA 検定を実施した後、*t* 検定を実施した。危険率 (P) が 0.05 未満をもって有意差とした。

実験 2 雄ヤギ被毛抽出物による雌ヒツジ脳内神経核群の反応解析

供試動物、時期、場所

供試動物として、成熟雌セントクロイ種ヒツジ 7 頭を用いた。動物は実験を実施す

る2日前に放飼場から実験用ケージ（2.0×2.5 m²）へ移動させた。各サンプルの曝露および屠殺は、非繁殖期である2006年3-7月に、東京大学農学部附属牧場（北緯36度16分）で行った。

酸性画分抽出方法および曝露方法

実験1と同様の方法で、成熟雄シバヤギ被毛から脂溶成分抽出物酸性画分（Test）と去勢雄シバヤギ被毛から脂溶成分抽出物酸性画分（Control）を得た。TestおよびControlの曝露方法は実験1と同様に、2分間の曝露を10分おきに3回繰り返した。

灌流および脳固定

雄ヤギサンプルまたは去勢ヤギサンプルの1回目の曝露から2時間後に供試動物へ過剰量のネンブタール（30 mg/kg、大日本製薬）を投与した。頸部皮膚を切開して両側の頸動脈にカニューレを留置し、Masterflex 送液ポンプ（Masterflex）により、ヘパリン（4,000 単位/L）および0.05 M 亜硝酸ナトリウム/0.1 M PBS を灌流し、外頸静脈から放血した。心停止を確認後、断頭してさらに灌流を続け、合計5 L 灌流した。続いて4%パラホルムアルデヒド/0.1 M PB を合計5 L 灌流して組織を固定した。灌流終了後、頭蓋より脳を摘出し、嗅球から視床下部内側基底部および扁桃体までを含む脳ブロックを切り出して、4%パラホルムアルデヒド/0.1 M PBS 中にて後固定を行った（4°C、24 時間）。続いて脳ブロックを20%スクロース/0.1 M PBS 中に移し、沈下するまで浸漬した（4°C）。

脳組織切片の作製

凍結ミクロトーム（Microm International GmbH）により、前頭葉の一部を含む嗅球のブロックは矢状断面で、それよりも尾方の脳ブロックは前額断面で薄切し、厚さ50 μm の連続浮遊切片を作製した。浮遊切片は各染色を行うまで、クライオプロテクト溶液（30%スクロース、30%ポリエチレングリコール、1%ポリビニルピロリドン/50 mM PB）内で、使用するまで-20°C に保存した。

各種染色方法

(1) ニッスル染色

組織切片における神経核群の局在を検討するために、すべての動物の組織切片を 6 枚 (300 μm) おきにニッスル染色を行った。

浮遊切片を 0.5% Triton X-100/PBS (PBST) で洗浄した後 (20 分間、4 回)、0.45% 食塩水で洗浄し (15 分、3 回)、ゼラチンコートしたスライドガラスに貼り付けた。スライドガラス上の切片を室温にて十分に乾燥させた後、蒸留水で洗浄し、0.5% クレシルバイオレット (Sigma Chemical Co) 溶液に浸漬した (室温、7 分)。蒸留水で濯いだ後、上昇アルコール系列で脱水し、飽和臭化カリウムを加えた 95% アルコールで分別してからさらに脱水し、Hemo-Clear (S & S Company) で透徹して SUPER mount (松浪ガラス工業) で封入した。

神経核群および神経細胞層の分布は、「The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates」(Paxinos and Watson 1998) および「シバヤギ用脳地図」(Zuccolilli et al. 1995, Zuccolilli and Mori 1995) を参照した。Figure 2-2 は、本章において観察した神経核群を含む嗅球、視床下部および扁桃体神経核群模式図である。

(2) Fos 免疫組織化学染色

切片を PBST で洗浄し (5 分、3 回)、3% 過酸化水素/メタノールに浸漬し (15 分)、内因性のペルオキシダーゼ活性を除去した。更に PBST で洗浄後 (10 分、3 回)、ブロッキング反応液 (0.2% Block Ace (大日本製薬)、0.02% アジ化ナトリウム、5% 正常ヤギ血清/PBST) に反応させた (室温、1 時間)。反応後、2% 正常ヤギ血清/PBST に一次抗体 (anti-c-Fos Ab-5, a rabbit polyclonal antiserum, 1:10,000 希釈、Oncogene Science) を加え、反応させた (4°C、48 時間)。PBST で洗浄した後 (15 分、3 回)、二次抗体 (ビオチン化ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン IgG, 1:500 希釈、Vector Labs) による反応を行い (室温、1 時間)、アビジン-ビオチン複合体 (ABC) 溶液 (1:200 希釈、Vector Labs)

による反応を行った（室温、30分）。反応終了後、0.1 M PBS で洗浄し（室温、10分、3回）、発色反応液（0.02% 3,3'-ジアミノベンジジン、0.25%塩化ニッケル（II）、0.3%過酸化水素/50 mM Tris-HCl）で反応させた（室温、8分）。その後、PBST で洗浄し（10分、3回）、さらに0.45%食塩水で洗浄し（10分、2回）、ゼラチンコートしたスライドガラスに貼り付けた。

免疫組織化学染色を行った切片は、スライドガラスに貼り付けた後に室温にて十分に乾燥させ、0.25%クレシルバイオレット溶液に室温で浸漬して（30分）、対比染色した。その後、蒸留水で濯いでから上昇アルコール系列を通し、飽和臭化カリウムをパスツールピペットで2、3滴加えた95%アルコールで分別し、さらに脱水した後、Hemo-Clear（S & S Company）で透徹してからSUPER mount（松浪ガラス工業）で封入した。

Fos 免疫陽性（Fos-immunoreactive ; Fos-ir）細胞数計測方法

各神経核を含む標本組織をそれぞれ300 µm おきに3枚ずつデジタルカメラで撮影後、パーソナルコンピューターに記録し、神経核ごとに一定面積の枠を神経核内に設置してプリントアウトした。各々の神経核を含む3枚の写真上のFos-ir細胞の合計数を各神経核のFos-ir細胞数とした。Fos-ir細胞数の計測は、プリントアウトした写真上で実験に関する情報が与えられていない者1名が行った。

統計解析

Test および Control における Fos-ir 細胞数を Mann-Whitney *U* 検定で比較し、危険率（*P*）が0.05未満をもって有意差とした。

2-3 結果

実験1 雄ヤギ被毛抽出物による雌ヒツジへのフェロモン活性解析

Test および Control 間の血中 LH 濃度平均値の経時変化には有意差があり ($P < 0.05$ 、two-way repeated measures ANOVA 検定)、Test 曝露後 30-70 分における血中 LH 濃度平均値は、Control と比較して有意に高かった ($P < 0.05$ 、 t 検定) (Figure 2-3)。

実験2 雄ヤギ被毛抽出物による雌ヒツジ脳内神経核群の反応解析

免疫組織化学染色による各神経核群の Fos-ir 数結果を Table 2-1 に示した。主嗅覚系では、一次中枢である主嗅球（糸球体層・僧帽細胞層・顆粒細胞層）(Figure 2-4)、ならびに扁桃体の基底核、前皮質核、後外側皮質核において Fos-ir 細胞数に Test と Control の間で有意な差はなかった。しかし、梨状葉の後皮質腹側部においては Test の Fos-ir 細胞数が Control と比較して有意に多かった (Figure 2-5)。鋤鼻嗅覚系については、一次中枢である副嗅球（僧帽房飾細胞層・顆粒細胞層）において Test の Fos-ir 細胞数は Control と比較して有意に多かった (Figure 2-6)。鋤鼻嗅覚系から視床下部への中継地点である分界条床核の前部、扁桃体内側核 (Figure 2-7) および後内側皮質核、そして生殖機能に関わる終板器官や内側視索前野、弓状核においても、Test の Fos-ir 細胞は Control と比較して有意に多かった。嗅覚系・生殖系以外の神経核で主にストレス反応に関与する視索上核や室傍核や大脳辺縁系の扁桃体中心核において有意差はなかった (Figure 2-8)。

2-4 考察

本章では、雄ヤギの被毛から抽出された酸性画分を雌ヒツジに曝露した際に雌ヒツジの LH 分泌が増加したことを示し、このとき雌ヒツジ脳内では嗅覚系と生殖系が反応していることを示した。これらの結果から、雄ヤギから産生された雄効果フェロモン（酸性画分）は、動物種を超えて雌ヒツジへ作用するということが示唆された。

本章の結果からは、雄効果フェロモンの受容機構を解析するにあたって鍵となるフェロモン受容体候補をある程度絞り込むことが出来る。これまで同定されている嗅覚受容体は匂い受容体（olfactory receptor：OR）（Buck and Axel 1991）、1 型鋤鼻受容体（vomeronasal type 1 receptor：V1R）（Dulac and Axel 1995）、2 型鋤鼻受容体（vomeronasal type 2 receptor：V2R）（Herrada and Dulac 1997, Matsunami and Buck 1997, Ryba and Tirindelli 1997）、痕跡アミン関連受容体（trace amine-associated receptor：TAAR）（Liberles and Buck 2006）、D 型グアニリルシクラーゼ（guanylyl cyclase D：GC-D）（Gibson and Garbers 2000）、ホルミルペプチド受容体（formyl peptide receptor：FPR）（Liberles et al. 2009, Riviere et al. 2009）、そして 2 型味覚受容体（taste type 2 receptor：T2R）である。本章では、雄の被毛から抽出された化学物質の中でも、酸性画分が雄効果フェロモン様生理活性を持っていることを示した。そのため、塩基性物質を受容する TAAR が雄効果フェロモン受容体であることを積極的に肯定することはできないと考えられた。また、ヤギをはじめ陸上で生活する大型哺乳類では、V2R 遺伝子は全て偽遺伝子化しており、その機能については疑わしい（Wakabayashi et al. 2002, Shi and Zhang 2007）。そのため、V2R もまた候補から外された。FPR、GC-D も同様に、齧歯類のみでその存在が確認されている嗅覚受容体である（Riviere et al. 2009）。T2R については、嗅上皮や鋤鼻器では発現していないことや、三叉神経系と関連した受容体であることから、やはり雄効果フェロモン受容体としては可能性が低いと考えられた。残された嗅覚受容体は OR、V1R であるが、これらの受容体の検討には注意が必要である。しかし、16 個の V1R 遺伝子をノックアウトしたマウスの鋤鼻器では複数の揮発性フェロモン

分子に対する応答が消失することや (Del Punta et al. 2002)、V1R 遺伝子の 1 つである V1Rb2 を発現する鋤鼻神経細胞が揮発性フェロモン分子 2-heptanone を特異的に認識することが明らかになっているなど (Boschat et al. 2002)、V1R は OR と比較してよりフェロモン受容体として機能する証拠が揃っている。OR、V1R のどちらが雄効果フェロモン受容体であるのかは現時点で決定することは難しい。しかし、解析する順序としては、フェロモン受容体としてより多く報告されている V1R から始めることが現実的であると考えられた。

V1R が雄効果フェロモン受容体候補としてふさわしいか否かは、本章で用いた「ヤギとヒツジの間で種を超えて作用する雄効果フェロモン」の特徴から検討することができる。ヤギの雄効果フェロモンが雌ヒツジへ作用するということは、ヤギとヒツジのフェロモン受容体が非常に高い類似性を持っているということが考えられる。従って、V1R が雄効果フェロモン受容体候補としての証拠を得るには、ヤギとヒツジの V1R の構造の類似性について調べる必要がある。

雄効果フェロモンは、鋤鼻嗅覚系と主嗅覚系の両方によって認識されるということは、中枢神経系における Fos-ir 細胞数の解析によって、示唆されている (Gelez and Fabre-Nys 2006)。本章においても同様の手法によって解析を行った。その結果、確かに両嗅覚システムは雄効果フェロモン活性物質を認識している可能性が見出せた。しかし興味深いことに、鋤鼻嗅覚系についてはそれに属する神経核のほとんどが反応していたのに対し、主嗅覚系については反応していた神経核は一部であった。このことから、雄効果フェロモンの認識には、鋤鼻嗅覚系がより重要な役割を果たしているのではないかと考えられた。しかし、主嗅覚系に属する神経核群においても、一部反応している神経核が存在することから、雄効果フェロモンの認識に何らかの役割を果たしている可能性は否めない。

2-5 小括

本章では、種を超えて作用する雄効果フェロモンの特性から雄効果フェロモン受容体候補を検討することを目的とした。雄ヤギの被毛から抽出された酸性画分を雌ヒツジへ曝露し、雌ヒツジの血中LH濃度変化解析および中枢神経系における神経細胞反応解析を行った結果、酸性画分は雌ヒツジへ作用することが確認された。本章結果からは、雄効果フェロモンが酸性物質である可能性が高いことから、V1Rが雄効果フェロモン受容体候補として考えられた。

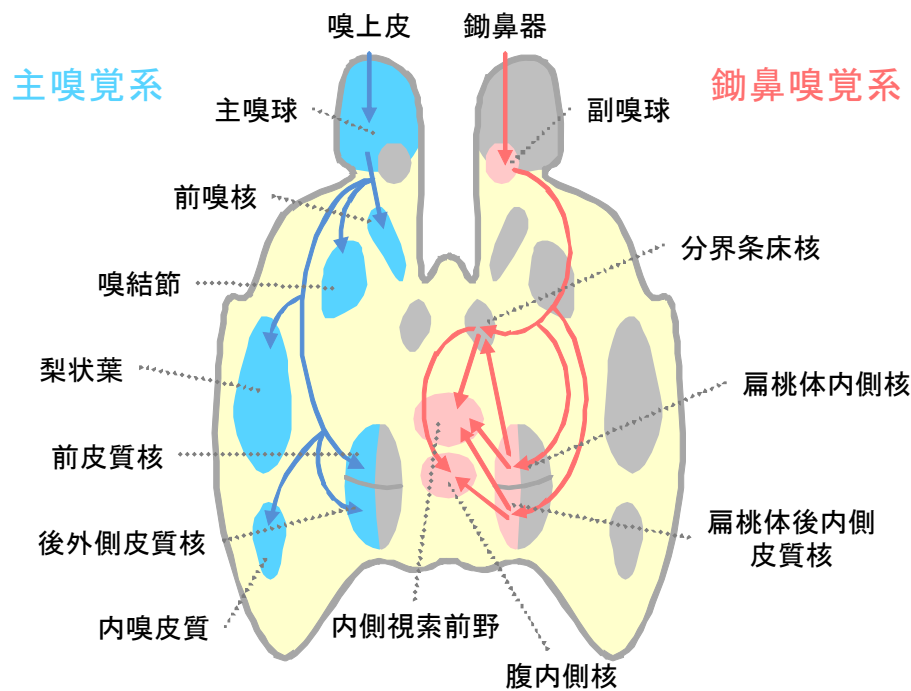


Figure 2-1 主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系の神経回路概略図

嗅上皮で受容されたりガンドは電気シグナルに変換された後、主嗅球から前嗅核、嗅結節、梨状葉、扁桃体前皮質核、扁桃体後外側皮質核、内嗅皮質にそれぞれ伝達される。一方、鋤鼻器で受容されたりガンドは電気シグナルに変換された後、副嗅球から分界条床核、扁桃体内側核、扁桃体後内側皮質核を介し、更に内側視索前野や腹内側核などの視床下部神経核群に伝達される。視床下部への情報は、一部は運動系を制御する脳部位に入力して行動を支配し、もう一部は下垂体刺激ホルモン等の神経内分泌系の働きを介することにより内分泌を調節して生殖機能などを支配するとされる。

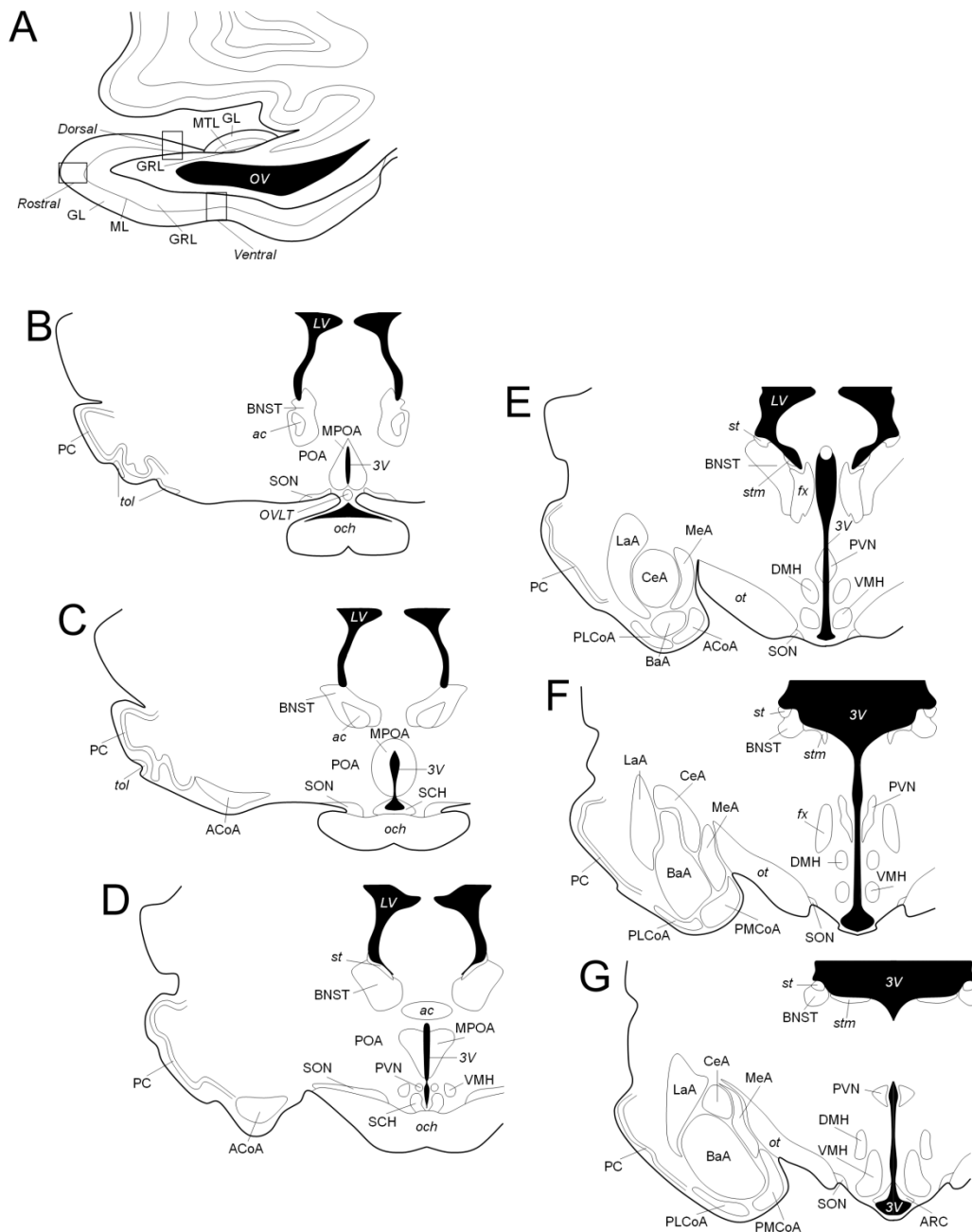


Figure 2-2 嗅球 (A)、視床下部および扁桃体神経核群 (吻側 B-尾側 G) 模式図

ac : 前交連、ACoA : 扁桃体前皮質核、AON : 前嗅核、AOB : 副嗅球、ARC : 弓状核、BaA : 扁桃体基底核、BNST : 分界条床核、CeA : 扁桃体中心核、fx : 脳弓、LV : 側脳室、MeA : 扁桃体内側核、ME : 正中隆起、MPOA : 内側視索前野、MOB : 主嗅球、och : 視交叉、ot : 視索、OV : 嗅脳室、OVLT : 終板器官、PC : 梨状葉、PLCoA : 扁桃体後外側皮質核、PMCoA : 扁桃体後内側皮質核、POA : 視索前野、PVN : 室傍核、SCH : 視交叉上核、SON : 視索上核、st : 分界条、stm : 視床髓条、tol : 外側嗅索、Tu : 嗅結節、VMH : 腹内側核、3V : 第3脳室

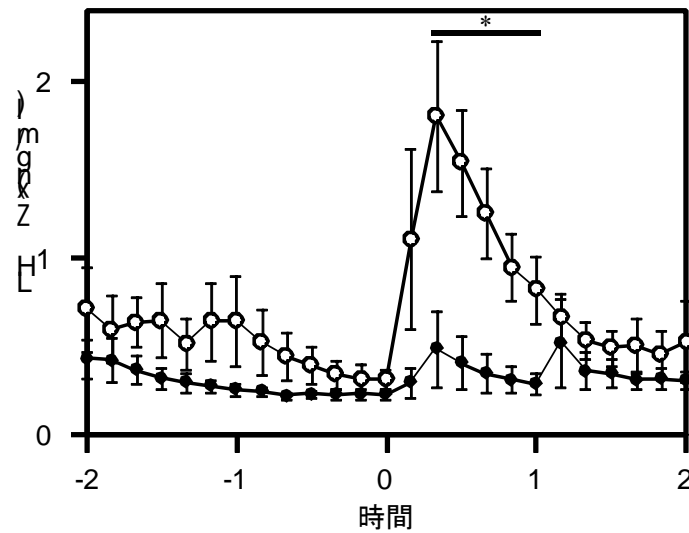


Figure 2-3 サンプル曝露前後における血中 LH 濃度平均値の経時変化

Test および Control 間の血中 LH 濃度平均値の経時変化には有意差があり (P<0.05、two-way repeated measures ANOVA 検定)、Test 曝露後 30-70 分における血中 LH 濃度平均値は、Control と比較して有意に高かった。

● : Control (n=7)、○ ; Test (n=7)、* : P<0.05 (t 検定)

Table 2-1 神経核群における Fos-ir 細胞数

	Control (n=3)		Test (n=4)		
主嗅覚系					
主嗅球					
糸球体層	545.7	± 97.2	769.3	± 153.3	
僧帽細胞層	951.7	± 127.9	1160.3	± 99.0	
顆粒細胞層	426.9	± 82.1	475.0	± 49.1	
梨状葉					
前部	192.3	± 22.4	147.3	± 24.0	
後部	99.3	± 16.4	149.8	± 19.7	*
扁桃体					
基底核	82.3	± 33.8	105.3	± 10.6	
前皮質核	79.7	± 26.6	102.8	± 21.1	
後外側皮質核	112.0	± 34.4	114.8	± 28.3	
鋤鼻嗅覚系					
副嗅球					
糸球体層	7.3	± 0.9	13.3	± 6.1	
僧帽房飾細胞層	14.0	± 4.2	41.0	± 12.2	*
顆粒細胞層	14.0	± 4.9	52.5	± 14.1	*
扁桃体					
内側核	113.7	± 19.7	194.3	± 15.3	*
後内側皮質核	56.0	± 14.1	150.5	± 40.2	*
分界条床核					
前部	61.3	± 11.8	112.3	± 13.5	*
後部	72.7	± 23.7	59.5	± 12.5	
生殖系					
内側視索前野	64.0	± 27.9	256.5	± 120.8	*
終板器官	14.7	± 2.7	33.0	± 4.7	*
腹内側核	142.0	± 41.1	255.8	± 58.0	
弓状核	189.7	± 28.3	403.3	± 82.4	*
大脳辺縁系					
扁桃体中心核	103.3	± 19.5	125.5	± 10.1	
視床下部					
室傍核	110.7	± 38.5	197.5	± 72.1	
視索上核	55.3	± 8.4	84.3	± 16.3	

* ; P<0.05 (Mann-Whitney U 検定)

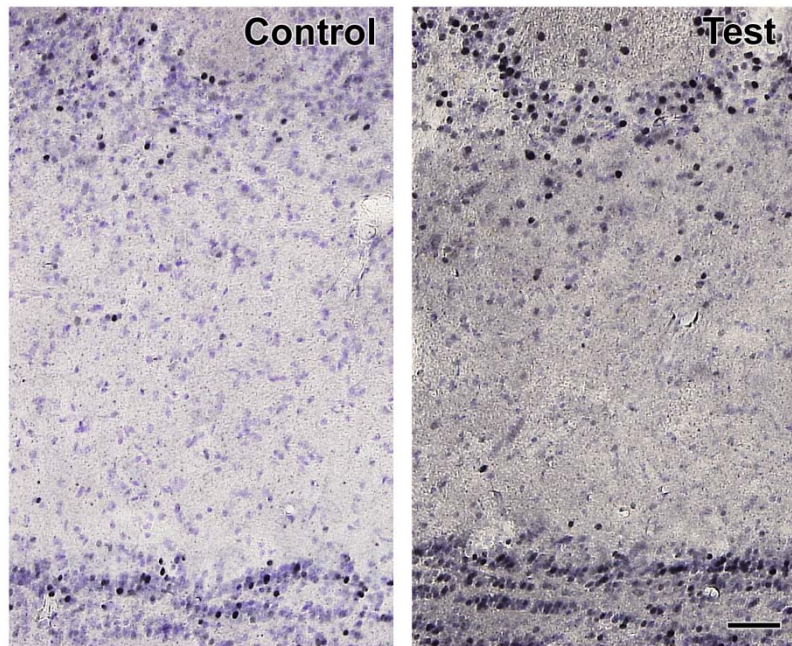


Figure 2-4 主嗅球における Fos-ir

主嗅覚系の一次中枢神経系である主嗅球においては、Control と Test との間に明瞭な差は見られなかった。

Scale bar : 100 μ m

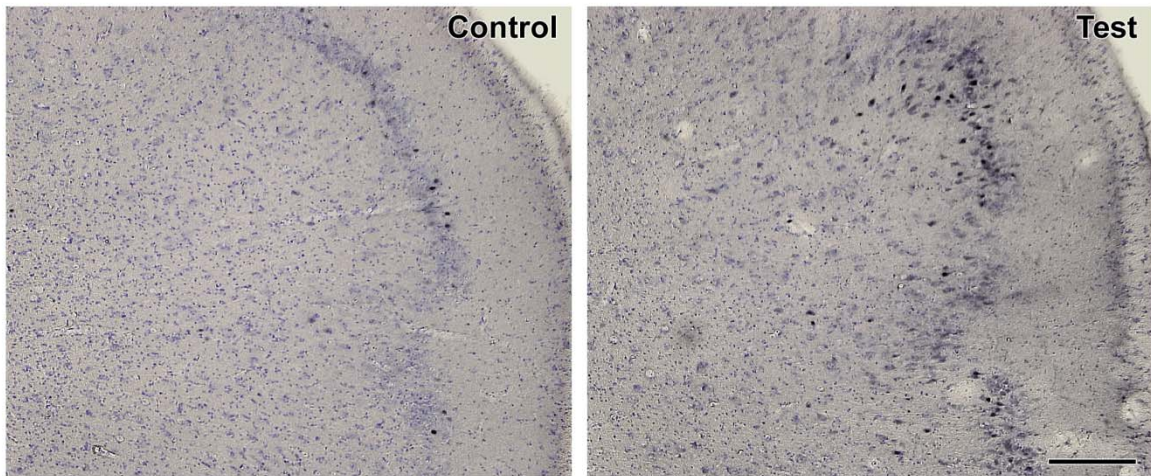


Figure 2-5 梨状葉後部における Fos-ir

梨状葉は、主嗅覚系からの入力がある嗅覚系の領域の一つである。梨状葉後部において、Test の Fos-ir 細胞数は、Control と比較して多かった。

Scale bar : 200 μ m

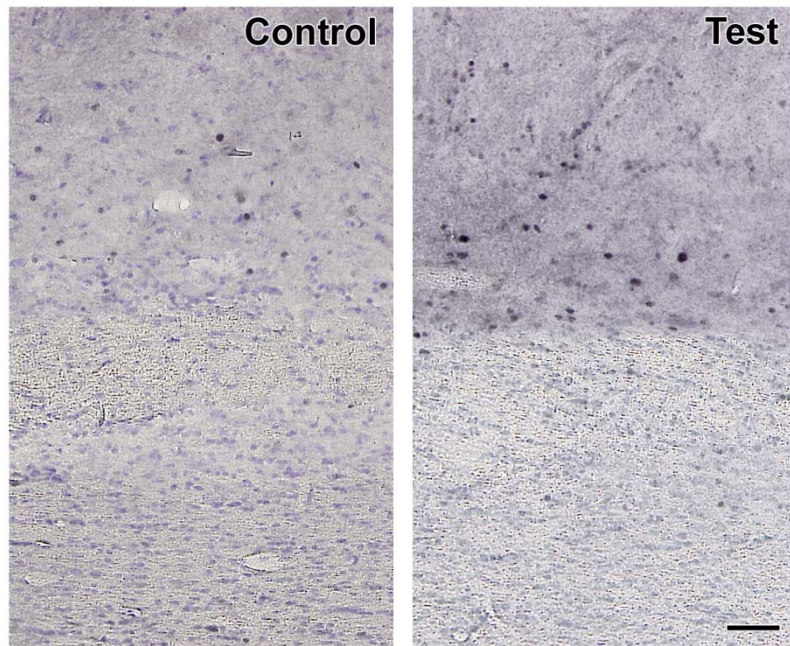


Figure 2-6 副嗅球における Fos-ir

鋤鼻系の一次中枢神経系である副嗅球における僧帽房飾細胞層および顆粒細胞層において、Test の Fos-ir 細胞数は、Control と比較して多かった。

Scale bar : 100 μ m

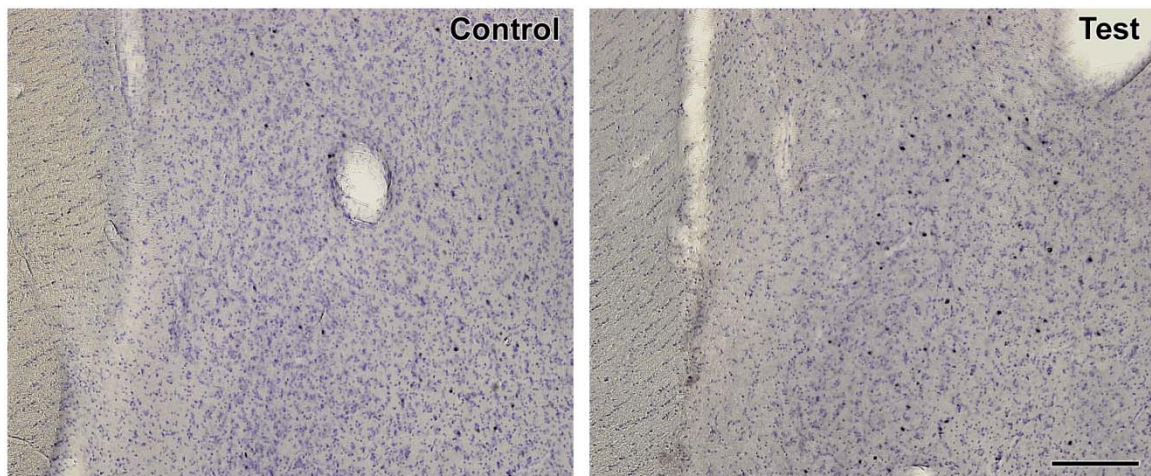


Figure 2-7 扁桃体内側核における Fos-ir

扁桃体内側核は鋤鼻系の一部であり、嗅覚系から視床下部への中継地点である。扁桃体内側核における Test の Fos-ir 細胞数は、Control と比較して多かった。

Scale bar : 200 μ m

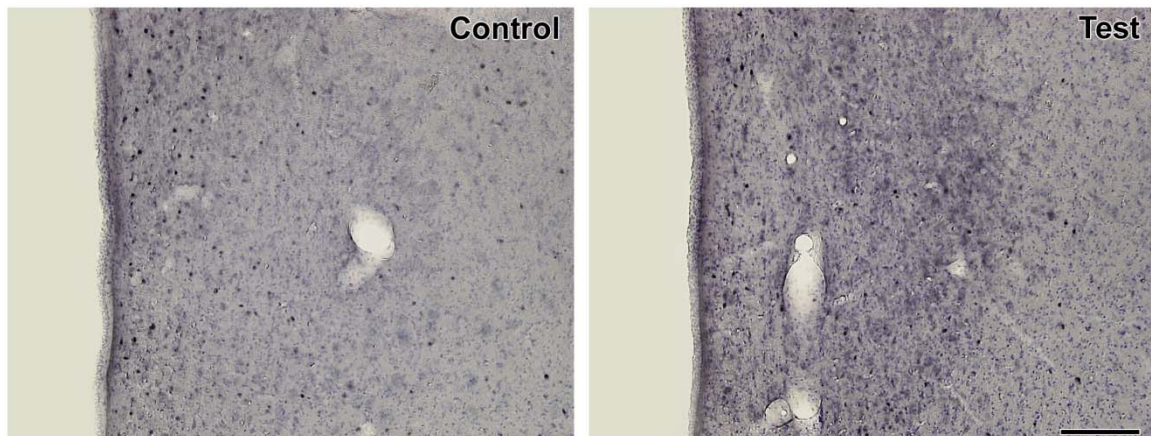


Figure 2-8 室傍核における Fos-ir

室傍核には副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンや、アルギニンバソプレッシン、オキシトシンの産生ニューロンが局在しており、主にストレス反応に関与する神経核の1つであると考えられており、嗅覚系とは直接関与しないとされる領域である。Control と Test との間で Fos-ir 細胞数に明瞭な差は見られなかった。

Scale bar : 200 μ m

第三章

反芻動物における 1 型鋤鼻受容体遺伝子の 分子進化学的解析

3-1 緒言

Karlson らのフェロモンの定義の一部を抜粋すると、フェロモンとは、「同種個体間で分泌・伝達される化学物質」となる (Karlson and Luscher 1959)。いわば「種特異的に認識される化学物質だということである。そうであるならば、フェロモンの受容体は動物種ごとにそれぞれ独自のレパートリーを持っているということなのだろうか？

近年、ゲノムデータベースの構築が進んでいる複数の脊椎動物について、フェロモン受容体候補の 1 つである 1 型鋤鼻受容体 (vomeronasal type 1 receptor : V1R) 遺伝子群の同定がなされている (Figure 3-1) (Grus et al. 2005, Rodriguez 2005, Shi and Zhang 2007)。そして更に哺乳類の V1R 遺伝子群はその配列の類似性により、A/B/O、C-G、H/I、J/K、L/M/N、P/Q、R と名付けられるサブグループに分類される (Grus et al. 2005)。ところが、V1R 遺伝子群のレパートリーは比較的近縁種である齧歯類のマウスやラットの間でさえ全く異なることが示されている (Grus and Zhang 2004)。マウスでは V1R がフェロモン受容体として機能することが示されているため (Boschat et al. 2002)、少なくともマウスとラットの間では V1R 遺伝子群のレパートリーの違いが種特異的なフェロモンの認識の違いをもたらしているのではないかと考えられている。

第二章では、ヤギの雄効果フェロモン活性物質がヒツジにも作用することを述べた。このことは「種特異的に作用する」というフェロモンの定義に反してしまう。しかし同時に、フェロモン受容体がヤギとヒツジの間では互いに似通っているのではないか、という仮説が浮かんでくる。そこで本章では、フェロモン受容体候補である V1R に着目して、ヤギとヒツジの V1R 遺伝子を分子進化学的に比較しながら、「種を超えて作用する雄効果フェロモン」との関係について考察することにした。実験 1 では、ヤギとヒツジの V1R 遺伝子を同定し、ヤギとヒツジそしてこれらの近縁種で反芻動物であるウシを解析に加えて、V1R 遺伝子の配列・立体構造の類似性について調べた。また、ヤギとヒツジにおける V1R 遺伝子のおおよそのゲノムサイズを予測するために、relaxed condition 下のサザンブロッティングを行った。実験 2 では、同定された V1R 遺伝子の嗅覚器官における発現をヤギについて、RT-PCR および *in situ*

hybridization により解析した。

3-2 材料および方法

実験 1 V1R 遺伝子の同定および分子進化学的解析

供試動物

供試動物として、シバヤギ（6頭）および日本コリデール種ヒツジ（4頭）を用いた。供試動物は、（独）生物資源研究所より入手した。

ゲノム DNA 抽出

(1) ヤギゲノム DNA の抽出

ヤギのゲノム DNA は若林ら（Wakabayashi et al. 2002）の手法を用いて肝臓より抽出した。

(2) ヒツジゲノム DNA の抽出

供試動物の頸静脈より血液をヘパリン入り真空採血管へ採取した。血液は、RBC lysis 緩衝液（10 mM NH_4HCO_3 、144 mM NH_4Cl ）を加えて白血球を単離した後、proteinase K Buffer（50 mM Tris pH 7.4、100 mM NaCl、10 mM EDTA）を加えた。フェノール抽出、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール抽出およびクロロホルム・イソアミルアルコール抽出を行い、1.2 ml の 8M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ を加えて DNA を得た。DNA は、70%エタノールで洗浄し、2 ml の TE 緩衝液（10 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA）へ溶解させて 4°C で保存した。

V1R 遺伝子増幅 PCR

ヤギおよびヒツジ V1R 遺伝子を同定する目的で、各々のゲノム DNA を鋳型とした PCR を行った。

PCR 反応に用いるプライマーは、当初はゲノムデータベースに公開されているウシ、

イヌ、マウス V1R 遺伝子において比較的保存性の高い領域より作製したデジェネレートプライマーを用いた。しかしこの手法によって同定していった過程で、同定されたヤギとヒツジの V1R 遺伝子配列は、ウシ V1R 遺伝子群のいずれかの V1R 遺伝子と塩基配列で 90%以上の高い相同性を示すことが明らかになった。そこで、公開されているウシのゲノムデータベースを利用して個々のウシ V1R 遺伝子の open reading frame (ORF) を同定するような 100%マッチプライマーを作製して PCR を行ったところ、ヤギとヒツジの V1R 遺伝子を同定することができた。本研究にてヤギとヒツジの V1R 遺伝子を同定した際に用いたプライマーを Table 3-1 に示す。

PCR 反応は、Ex Taq polymerase (TaKaRa) を用いてサーマルサイクラー (PerkinElmer) にて行った。反応条件は、用いるプライマーの GC% に応じてアニーリング温度を考慮しながら、95°C 60 秒、45-50°C 60 秒、72°C 60 秒を 35 サイクル行った。

V1R 遺伝子クローニング

デジェネレートプライマーを用いた PCR 反応から得られた目的鎖長の DNA 断片は、2%アガロースゲル電気泳動した後、ゲルから切り出し、QIA quick Gel extraction Kit (QIAGEN) を用いて回収した。一方、100%マッチプライマーを用いた PCR 反応から得られた DNA 断片は QIA quick PCR purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した後、回収した。回収後の DNA 断片は、pBluescript II SK⁺ (Stratagene) の *Eco* RV サイトに、ライゲーションさせた。ライゲーションには、Takara ligation kit Ver.2 (TaKaRa) を用いた。ライゲーションサンプルは、コンピエントセル XL1-Blue (Stratagene) にトランスフォーメーションさせ、IPTG、X-gal およびアンピシリンを添加して、Luria-Bertani 寒天培地上で一晩培養を行った。生じた白色コロニーを回収し、2 ml の Luria-Bertani 液体培地で一晩培養した。培地を 1.5 ml チューブに移し、遠心することによって (7000 rpm、5 分) 菌体を回収した。菌体からのプラスミド抽出には、QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN) を用いた。回収後のプラスミドは、*Eco* RV および *Hind* III 処理を行い、2%アガロースゲル電気泳動を行うことで、目的鎖長のインサートを持つクローンのみを用いた。

V1R 遺伝子塩基配列の決定

pBluescript II SK⁺にクローニングされた種々の断片の塩基配列を決定するために、サイクルシークエンシング法を用いた。サイクルシークエンシング法には、Thermo SequenceTM II Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham) を用い、96°C 10 秒、50°C 5 秒、60°C 4 分の反応を 25 サイクル行った。反応液は、未反応の dNTP を除去するために、セファデックス G50 (Amersham) を用いてカラム精製を行った後、真空乾燥機を用いて乾燥させた。サンプルは、TSR (PerkinElmer) に溶解した後、ABI PRISMTM 310 シークエンサー (PerkinElmer) を用いて塩基配列を決定した。

ヤギ・ヒツジ特異的な V1R 遺伝子増幅

同定されたヤギとヒツジの V1R 遺伝子は、互いのゲノム DNA のコンタミネーションから増幅された可能性が考えられる。そこで、同定されたヤギとヒツジの個々の V1R 遺伝子をそれぞれ特異的に増幅するプライマーを作製して、各々の動物のゲノム DNA を鋳型とした PCR を行った。

V1R 遺伝子配列の解析

ヤギ・ヒツジから得られた塩基配列の ORF の解析、予想されるアミノ酸配列への翻訳は、塩基配列解析ソフトウェア GENETYX Version 7.03 (GENETYX) を用いて行った。

サザンブロッティング

(1) フィルターの作製

10 µg のヤギおよびヒツジゲノム DNA を制限酵素 *Eco* RI、*Hind* III、*Bgl* II でそれぞれ切断した。切断したゲノム DNA はフェノール・クロロホルム精製後、エタノール沈殿操作を行い、TAE で溶解して、0.8%アガロースゲル電気泳動を行った。電気泳動後のアガロースゲルは 0.24 M 塩酸で加水分解処理した後 (室温、10 分)、アルカリ変

性溶液 (0.5N NaOH, 1.5M NaCl) へ浸漬した (室温、15 分 2 回)。アガロースゲル中の DNA は、アルカリ変性溶液を用いたアルカリブロットリング法でメンブレン (Pall) に転写して固定させた。一晚ブロットリングさせたフィルターは 2 × SSC 液内にて 4°C で保存した。

(2) DIG 標識プローブの作製

サザンブロットリングのプローブには、digoxigenin (DIG) 標識 DNA プローブを用いた。クローニングした V1R 遺伝子を pBluescript II vector の *Eco* RV サイトに挿入して、このプラスミドを鋳型にした。50 pg のプラスミドと各 V1R 遺伝子を同定した際に用いたプライマーおよびプローブの DIG ラベルに PCR DIG probe synthesis kit

(Roche) を用いて PCR を行った。PCR は 95°C 10 秒、55°C 30 秒、72°C 2 分の反応を 10 サイクル行った後、95°C 10 秒、55°C 30 秒、72°C 2 分 + 5 秒 × 各サイクル数の反応を 20 サイクル行った。

(3) ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションは relaxed condition 下で行った。フィルターを入れたハイブリバッグ (コスモバイオ) に 10 ml High SDS ハイブリダイゼーション緩衝液 (7% SDS、30%ホルムアミド、5 × SSC、0.1% N-Lauroylsarcosine、2% Blocking Reagent (Roche)、50 mM PB pH7.0) を加え、ハイブリオープン (岩城硝子) 内で振盪させ (42°C、4 時間)、プレハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーション後に熱変性させたプローブをハイブリバッグに加え、さらに振盪させ (42°C、一晚)、ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーションの洗浄は、2 × SSC、0.1% SDS (室温、10 分、2 回)、2 × SSC、0.1% SDS (55°C、30 分、2 回)、Wash 緩衝液 (0.1 M マレイン酸、0.15 M NaCl、0.3% Tween20) (室温、10 分) の順に行った。

洗浄後のフィルターは、1.0% Blocking Reagent/TBS 緩衝液でブロッキングした後 (室温、4 時間)、AP-conjugated anti-DIG Fab fragment (Roche) と抗体反応させた (4°C、

30 分)。

抗体反応後のフィルターは、Wash 緩衝液で洗浄した後(室温、10 分、3 回)、Detection 緩衝液 (0.1 M Tris-HCl pH9.5、0.1 M NaCl) に振盪させ (室温、2 分)、10% CDP-Star detection reagent (Roche) /Detection 緩衝液と反応させた (室温、5 分)。

反応後のフィルターは、LAS4000 (富士フイルム) 上で 30 分間、感光・検出した。

V1R 遺伝子の分子進化学的解析

哺乳類の中でのウシ・ヤギ・ヒツジの V1R 遺伝子の類似性を調べるために、ClustalX 2.0 (Thompson et al. 2002) を用いてアラインメントを行い、MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007) を用いて哺乳類 V1R 遺伝子の進化系統樹を作成した。哺乳類の V1R 遺伝子は過去の論文で報告されているデータ (Grus et al. 2005, Zhang and Firestein 2007) を用いた。

V1R 立体構造・リガンド結合部位の予測

立体構造が未知のタンパク質のアミノ酸配列から立体構造を予測するための最も単純なアプローチは、Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>) に登録された立体構造が既知のタンパク質の中に、構造を知りたいアミノ酸配列と類似した配列を持つタンパク質が存在するかどうか検索することとされている。そして検索されたタンパク質を鋳型とし、この鋳型の構造を手掛かりにして計算による立体構造とリガンド結合部位の予測方法がある。本章では、以下の様な手法によって、V1R の立体構造とリガンド結合部位を予測した。

(1) 3D-Jury (http://meta.bioinfo.pl/submit_wizard.pl) (Ginalska et al. 2003) により、V1R 遺伝子に対する鋳型の検索を行った。検索された鋳型と V1R 遺伝子と鋳型のアミノ酸配列とのアラインメントを行った。アラインメントに従って鋳型の座標を参照しながら、V1R の実際のアミノ酸残基を割り当てた。このとき、原子間接触などの立体障害を回避するよう、分子力学計算を行った。計算には、Modeller 9v1

(<http://salilab.org/modeller/>) (Eswar et al. 2008) を利用した。

(2) 予測された立体構造のタンパク質構造としての適正度合いを計算サーバー Verify3D (http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/) (Bowie et al. 1991) によって確認した。

(3) 予測された立体構造から、立体構造のアミノ酸残基同士のエネルギー計算に基づいたりガンド結合部位を予測した。予測には、計算サーバー Q-site finder (<http://www.modelling.leeds.ac.uk/qsitefinder/>) (Laurie and Jackson 2005) を利用した。

実験 2 V1R 遺伝子発現解析

(1) RT-PCR による V1R 遺伝子発現解析

組織採取

ヤギの頸静脈に過剰量ネンブタール (30 mg/kg、大日本製薬) を投与して安楽死させた後、鋤鼻器、嗅上皮を切除した。

RNA 抽出

鋤鼻器、嗅上皮を RNAlater (Ambion) に移し、一晚浸透させた (4°C)。各組織からの RNA は、Purelink micro Midi RNA kit (Invitrogen) を用いて抽出し、キット内の RNA-Free Water に溶解させた。

cDNA 合成

種々の total RNA は、DNase I (PROMEGA) で処理することで、ゲノム DNA の混入を除去した。これらの RNA サンプルに、5 × First Strand Buffer (Invitrogen)、0.1 M DTT (Invitrogen)、RNase inhibitor (Wako)、SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen) を加えて *in vitro* Reverse Transcription を行い、1st strand cDNA を合成した。また、陰性コントロールとして、SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase を加えない反応を同時に行った (RT (-))。合成反応終了後、RNase H (TaKaRa) を加え

た反応を行った。

RT-PCR

cDNA で作製した各サンプルを鋳型として、各 V1R 遺伝子グループ特異的プライマーを用いて PCR を行った (1st PCR)。さらに 1 µl の反応液を鋳型として、各 V1R 遺伝子特異的プライマーを用いて PCR を行った (2nd PCR)。PCR は、95°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 30 秒の反応を 30 サイクル行った。RT-PCR に使用したプライマーを Table 3-2 に示す。2nd PCR 後、反応液を 2%アガロースゲル電気泳動し、目的鎖長の DNA 断片を確認した。

(2) *in situ* ハイブリダイゼーションによる V1R 遺伝子発現解析

組織採取

ヤギの頸静脈に過剰量ネンブタール (30 mg/kg、大日本製薬) を投与して安楽死させた後、鋤鼻器、嗅上皮を切除した。

DIG 標識プローブの作製

in situ ハイブリダイゼーションのプローブには、DIG 標識 cRNA プローブを用いた。クローニングした V1R 遺伝子を pBluescript II vector の *Eco* RV サイトに挿入して、このプラスミドを鋳型にした。10 µg のプラスミドを *Eco* RI および *Hind* III で切断した。制限酵素で消化した各々の DNA を proteinase K 処理した後、フェノール・クロロホルム処理を経てエタノール沈澱を得て、精製を行った。プローブの DIG ラベルには、10 × DIG RNA labeling mixture (Roche) を用いた。2 µg の DNA を鋳型として、DIG-labeled dUTP を含む溶液中で、T3 および T7 RNA polymerase (PROMEGA) による cRNA 合成反応を行った (37°C、2 時間)。反応後、LiCl を用いて cRNA を沈殿させて回収した。

凍結切片作製

鋤鼻器および嗅上皮を 3-5 mm に細断して 4%パラホルムアルデヒド/PBS 中にて後固定を行った (4°C、24 時間)。続いて脳ブロックを 20%スクロース/PBS 中に移し、沈下するまで浸漬した (4°C)。組織は OCT compound (SAKURA) 内に入れ、ドライアイス上のヘキサンで凍結させて包埋を行った。凍結切片からクライオスタット (Leica) で 15 μ m の切片を作製し、MAS コートスライドガラス (松浪ガラス工業) 上に貼り付け、直ちにドライヤーで乾燥させた。1 時間室温で乾燥させた後、使用するまで -80°C にて保管した。

ハイブリダイゼーション

切片は PBS で洗浄した後 (室温、10 分)、2%パラホルムアルデヒド/PBS で固定を行った (室温、5 分)。PBS で洗浄した後 (室温、5 分)、内因性ペルオキシダーゼを処理するために、0.3%過酸化水素/PBS へ浸漬した (室温、15 分)。PBS で洗浄した後 (室温、5 分)、20 μ g/ml proteinase K で処理した (37°C、10 分)。PBS で洗浄した後 (室温、5 分)、4%パラホルムアルデヒド/PBS で再固定を行い (室温、10 分)、0.2% glycine/PBS (室温、5 分)、0.2N 塩酸で処理した (室温、20 分)。最後に、組織のアセチル化を行うために、0.1M トリエタノールアミン pH 8.0 へ浸漬し (室温、1 分)、PBS で洗浄した (室温、5 分)。

洗浄した切片へハイブリダイゼーション緩衝液 (50%ホルムアミド、10 mM Tris-HCl pH 7.6、0.2 mg/ml yeast tRNA、10% Dextran sulfate、0.6 M NaCl、0.25% SDS、1 mM EDTA pH 8.0) を加え、プレハイブリダイゼーションを行った後 (室温、30 分)、各プローブを加え、ハイブリダイゼーションを行った (55°C、一晚)。

ハイブリダイゼーションの洗浄は、5 \times SSC (50°C、30 分)、50%ホルムアミド/5 \times SSC (50°C、30 分、2 回)、TNE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl pH7.5、500 mM NaCl、1 mM EDTA pH 7.6) (37°C、10 分)、2 μ g/ml RNase/TNE 緩衝液 (37°C、30 分)、2 \times SSC (50°C、30 分、2 回)、0.2 \times SSC (50°C、30 分、2 回)、TBS 緩衝液 (0.1 M Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl) (室温、10 分) の順に行った。

洗浄後のスライドは、1% Blocking Reagent/TBS 緩衝液でブロッキングした後 (室温、

30分)、AP-conjugated anti-DIG Fab fragment と抗体反応させた (4°C、一晚)。

抗体反応後のスライドは、0.2% Tween 20/TNB 緩衝液で洗浄した後 (室温、20分、2回)、発色反応緩衝液 (0.1 M Tris-HCl pH 9.5、0.1 M NaCl、50 mM MgCl₂) でブロッキングした。発色反応は、0.45% 4-nitro blue tetrazolium chloride (NBT) in 発色反応緩衝液および 0.35% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (Roche) /発色反応緩衝液により行った (室温、一晚)。発色反応を停止させるために、純水で洗浄し (室温、15分、2回)、風乾させた。スライドはキシレンで透徹し、封入した。

3-3 結果

実験 1 V1R 遺伝子の同定および分子進化的解析

ヤギとヒツジのゲノム DNA から、23 のヤギ V1R 遺伝子 (AB519013-AB519035) と 21 のヒツジ V1R 遺伝子 (AB519036-AB519056) の全長を同定することができた。ヤギの V1R 遺伝子についてはこれまでに 1 遺伝子同定されているため (Wakabayashi et al. 2002)、合計 24 のヤギ V1R 遺伝子が得られたことになる。ヤギ・ヒツジの V1R 遺伝子は、ウシの V1R 遺伝子との間に非常に相同性の高い遺伝子を持つことが明らかになった (Figure 3-2A)。なお、ヤギとヒツジから同定された全ての V1R 遺伝子は、それを特異的に増幅するプライマーを用いた PCR により、ヤギとヒツジのコンタミネーションではないことが確認された (Figure 3-2B)。

ヤギとヒツジの V1R 遺伝子とゲノムデータベースが構築されている哺乳類の V1R 遺伝子から進化系統樹を作成した結果 (Figure 3-3)、ヤギとヒツジの V1R 遺伝子は A/B/O、D-F、J/K、L/M/N のサブグループに含まれていた。ウシの V1R 遺伝子は、A/B/O、D-F、J/K、L/M/N そして P/Q のサブグループに含まれる。しかし、ヤギとヒツジから同定された遺伝子で P/Q サブグループに含まれたものは偽遺伝子のみであり (Figure 3-4)、全長をもつ V1R 遺伝子は同定できなかった。

ヤギとヒツジの V1R 遺伝子のゲノムサイズを予測するために、relaxed condition 下のサザンブロットィングを行ったところ、A/B/O、D、E/F、J/K、L/M/N のサブグループにおいてヤギではそれぞれ 2、8、15、5、4 のバンドが検出され、ヒツジではそれぞれ 2、8、15、4、5 のバンドが検出された (Figure 3-5)。

ヤギとヒツジから同定された V1R 遺伝子はいずれもウシ V1R 遺伝子配列を同定するようなプライマーを用いて同定したものであるが、ウシ・ヤギ・ヒツジの 3 動物種の V1R 遺伝子から作成した進化系統樹が Figure 3-6 である。同定されたヤギとヒツジの V1R 遺伝子のうち、各々 E グループに属する 1 遺伝子、D グループに属する 1 遺伝

子の合計 2 遺伝子以外の全てが、ウシの V1R 遺伝子と対を為しており、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、すなわちオーソログ遺伝子だった。

ウシの V1R 遺伝子でヤギまたはヒツジとの間にオーソログ遺伝子を持つ割合を算出すると、それぞれ 68.8%および 59.4%であった (Figure 3-7)。比較対象として、マウスとラットのデータを用いて、互いにオーソログである V1R 遺伝子の割合を算出すると、マウスでラットとオーソログである割合は 9.9%、ラットでマウスとオーソログである割合は 16.5%であった。ウシの V1R 遺伝子の総数はマウスやラットと比較すると少ないものの、ヤギやヒツジとオーソログを持つものの割合は非常に高い。そしてその相同性は、ウシとヤギの間では 80.6-97.1%、ウシとヒツジの間では 87.5-97.4%であり、マウスとラットの間での 71.2-88.6%と比較すると高い傾向があった (Figure 3-8)。なお、今回同定されたヤギとヒツジの V1R 遺伝子のみからの結果ではあるが、ヤギとヒツジの間でのオーソログ遺伝子は 94.2-99.1%と非常に高い相同性を示していた。

本研究では、ウシ・ヤギ・ヒツジの全ての V1R 遺伝子についてアミノ酸配列からなる一次構造だけでなく、三次構造でもその類似性を比較した。Figure 3-9 は、3 動物種間でのアミノ酸配列相同性が低い V1R オーソログである V1R3 の立体構造予測図およびリガンド結合予測部位を示したものである。ウシ・ヤギ・ヒツジの V1R3 は、立体構造を重ね合わせると、互いに比較的良く似た構造をとることがわかった。その立体構造からは、リガンド結合部位がウシ・ヤギ・ヒツジとの間でほぼ共通の領域に位置した。更に、ヤギとヒツジの間では、それぞれのリガンド結合部位を構成するアミノ酸が、アミノ酸配列上で共通のものであることがわかった。ウシについても、ヤギとは 80%、ヒツジとは 85%がアミノ酸配列上で共通のものであった。

実験 2 V1R 遺伝子発現解析

同定した V1R 遺伝子群が組織上で発現しているのかを RT-PCR で解析した結果、24 の V1R 遺伝子は全て、鋤鼻器と嗅上皮の両方で発現していた (Figure 3-10)。更に *in situ*

hybridization で組織学的に解析した結果、全ての 24 の V1R 遺伝子は鋤鼻器で発現していることが確認できた。嗅上皮においては、V1R1 (A/B/O グループ)、V1R31 (D グループ)、V1R16 (F グループ)、V1R9 (J/K グループ)、V1R14 (L/M/N グループ) が発現していることが確認できたが、E グループに属する V1R については確認できなかった (Figure 3-11)。

3-4 考察

本章では、反芻動物のウシ・ヤギ・ヒツジのフェロモン受容体候補である V1R 遺伝子の分子進化学的解析を行い、その類似性を明らかにすることを目的とした。ヤギとヒツジからはウシ V1R 遺伝子で分類されているほぼ全てのサブグループに属する V1R 遺伝子を同定することが出来た。しかし、P/Q グループの V1R 遺伝子は、偽遺伝子については同定できたものの、完全な ORF を持つ遺伝子を同定することは出来なかった。ヤギとヒツジにおいては P/Q グループに属する V1R 遺伝子はもはや退化してしまっているのではないかと考えられた。

ウシの V1R 遺伝子でヤギまたはヒツジとの間にオーソログ遺伝子を持つ割合は齧歯類マウス・ラットとの間のオーソログ遺伝子の割合よりも非常に高かった。また、サザンブロッティングの結果からは、ヤギとヒツジの間で V1R 遺伝子数はほぼ同じであろうということが示された。これらの結果からは、ウシからヤギ・ヒツジへ種分岐が起こった後に各動物種独自の V1R 遺伝子数の爆発的な増加は起こらなかったということが考えられた。

嗅覚受容体ファミリーの 1 つ、匂い受容体 (olfactory receptor : OR) は通常複数の匂い分子を異なる反応閾値で受容する。しかし、ある特定の匂い分子のみに反応する OR も存在する。マウスの嗅覚受容体 OR544 と OR545 は、発酵臭を構成する匂い分子である nonanedioic acid に対して強い特異性を持っている (Malnic et al. 1999)。これらの OR はアミノ酸遺伝子配列での相同性はおよそ 90% である。つまり、90% 以上のアミノ酸配列での相同性を持つ V1R であれば、同一のリガンドを受容する可能性がある。ウシ・ヤギ・ヒツジのオーソログ V1R 遺伝子の中には、90% を超える相同性のものは少なくない。またウシ・ヤギ・ヒツジの V1R オーソログの中でも最も遺伝子配列相同性が低い V1R3 でさえ、その立体構造のリガンド結合部位は 3 動物種間で高い類似性を持っていた。これらのことから、ウシ・ヤギ・ヒツジのオーソログ V1R は、互いに類似したリガンドを受容する可能性が高いと考えられた。第二章では、ヤ

ギの雄効果フェロモンがヒツジへも作用することを示した。このことは、雄効果フェロモン受容体はヤギとヒツジの間で非常によく似ている可能性があることを示している。V1R はヤギとヒツジとの間で高い類似性を示していることから、雄効果フェロモン受容体であっても不思議ではない。

本章では、V1R 遺伝子を同定するだけでなく、その遺伝子が嗅覚器官で発現しているのか否かについても解析した。RT-PCR の結果からは同定された全てのヤギ V1R 遺伝子は鋤鼻器と嗅上皮の両方に発現していることを示した。このことから、各々の V1R によって受容されたりガンドの情報は鋤鼻嗅覚系と主嗅覚系の両方へ伝達されることが示唆された。しかし、*in situ hybridization* では、嗅上皮での発現を見つけることが出来なかった V1R 遺伝子 (V1R19) が存在した。これは嗅上皮における V1R19 の発現量が他の V1R 遺伝子と比較して非常に少ないからだと推測された。

3-5 小括

本章では、反芻動物における **V1R** の類似性について、分子進化学的解析によって検討した。その結果、反芻動物であるウシ・ヤギ・ヒツジの **V1R** 遺伝子は高い相同性を持っており、類似性の高いリガンドを受容する可能性が考えられた。

本章で新たに同定したヤギ **V1R** 遺伝子群は、全て鋤鼻器と嗅上皮の両方に発現していることが明らかになった。このことから、**V1R** によって受容されたりガンドの情報は、鋤鼻嗅覚系と主嗅覚系の両方へ伝達されることが示唆された。

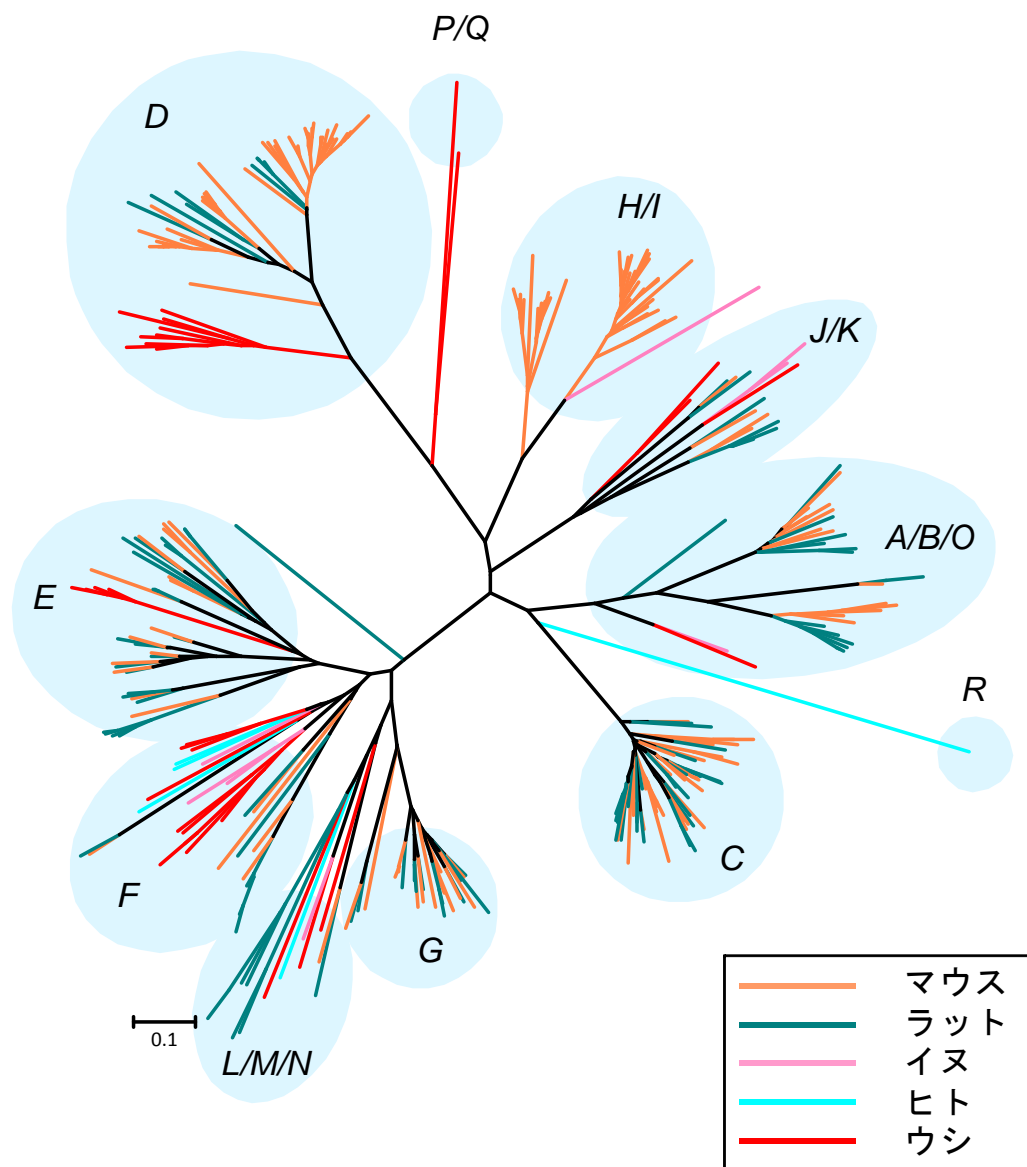


Figure 3-1 哺乳類 V1R 遺伝子進化系統樹

哺乳類の V1R 遺伝子群には、A/B/O、C-G、H/I、J/K、L/M/N、P/Q、R のサブファミリーがある。マウス、ラット、イヌ、ヒト、ウシは、各々独自の V1R 遺伝子レパートリーを持っている。

(Grus et al. 2005 を改変)

Table 3-1 V1R 遺伝子同定に用いたプライマー

サブファミリー	遺伝子	センスプライマー (5'-3')	アンチセンスプライマー (5'-3')	
A/B/O	V1R1	AGACTTTCCAGTTCCATTGACATAAG	CATATGGGTGAGATGGCATTAA	
D	V1R3	TGAGAAACCCAGGGGAGATG	TGAAATAGTAAATATGAAGC	
	V1R5	AATCCCCATTCAGAAAGATG	TGAATCTTGGCAAATAGCTG	
	V1R7	CTCTTGACATCCTCTCCATG	GACTTGTTAGAATATATGG	
	V1R8	ACCACCTATCTCTTACAGATG	CCTGAATTATTTAAATGTATTG	
	V1R28	TGGTGGAGAATAAGGAAATG	GATGCCCTTCAATAATAACCA	
	V1R31	CTCTGACATCCTCTCCATG	GAGTCATTAGAATGTATGA	
	E	V1R19	AAGAAAGTTGTCTCTCGATG	TGAAGAACTCAGTATCCCCT
V1R23		AGGAAACTTGGCTGTTGATG	CAAGTTATACTTGATTTCTC	
V1R27		AGGAAAGTTGGCTGTCAATG	CCACGCACCTATGGACACCTT	
F		V1R12	TCTTGAGACCTGAGAGGATG	GTCCTAGGTAATAATTAT
	V1R13	GCTCACATACTCCTGCAATG	ATTTTCCACTTGTATTCCACA	
	V1R16	CACTGAGACCTGACGGCATG	TAATGTCCAACCTTGTGTGA	
	V1R17	GACTGTGAACCGGGAGGATG	TGAATTGGGTGTATTTCTGA	
	V1R18	GTTGCCTTTCAGTTTACATG	AAATGGTATATATTTGCAC	
	V1R21	GACTGTGAACTGAGAGGATG	TGAGCCACTGCCAGCTCAT	
	V1R22	TACTCAGACCTGACAGCATG	TAAATGGTATGTGTTTGGCT	
	V1R30	CACTGAGACCTGAGAGCATG	TGAATGGTATGTATTTGCAC	
	V1R32	GACTGTGAACTGAAAGGATG	ATCATTGCAGCGTGGTTC	
	J/K	V1R9	AGAGAGACTGAAAGACAATG	CTCCGTAGTATTCTGCACCA
		V1R10	AAAACGGGATTAAGATAATG	TGACCTGATACCCGCAGGCA
V1R11		CGAAGGAAAACATATAAAAC	TGATCTGATGCTTGTATCTT	
L/M/N	V1R4	GTCCCATAGATACCAATATG	TAACCAGTTGACTCTATTCT	
	V1R14	GTTTTCTCTAAAGATAACTC	CTTCTGTGAAAGAAATTTAA	
	V1R20	TGACTTGAAGAAATTCATACA	CCTCATTCTATGAAGTACCT	

Table 3-2 RT-PCR に用いたプライマー

サブファミリー	遺伝子	1 st PCR		2 nd PCR
		センスプライマー (5'-3')	センスプライマー (5'-3')	アンチセンスプライマー (5'-3')
A/B/O	V1R1	TAATCCACATAGTCATGCTA	TGGGATGACATCCAATGTAA	ATGCTTGTGGGAAATGGCTA
D	V1R3	TCCTGAGCACCTATCAGTCC	CTGTTGCGCCTGCTGGTTGC	GCCCTGATGGTCTGGTCCAG
	V1R5	TCCTGAGCACCTATCAGTCC	TCCTGAGCACCTATCAGTCC	GGCCCATGATGATTTTCGCC
	V1R7	TCCTGAGCACCTATCAGTCC	GTTCTGTTCACTCCTCACCTG	CGTCTATGGCTGATACAGAC
	V1R8	TCCTGAGCACCTATCAGTCC	TCCCTAGAAGTGAAGGGAGG	GGTGGTTCTGCACGTCCTTG
	V1R28	TCCTGAGCACCTATCAGTCC	GTCTCTTAATGTACATCCCTG	GTTTCGTCTGTGTTGATGCA
	V1R31	TCCTGAGCACCTATCAGTCC	GAAAATCACTGGTCCTTGGG	ACACCATCCTGATGCTCATG
	E	V1R19	CAGTGCATGTTGTACATCTC	TTTCTGAAAAATGGCAGAGC
V1R23		ATGACACAATAGCCTCCAGC	CCTCTTTCTTTACCACACTCT	TACCCAAAGCATCCTACTC
V1R27		TCCTTCTGCTGGATCCAGTG	CCTCTATATGCATTATATGT	GTACAGTACATACACAAGGC
F	V1R12	TACTGTGCTGGATTGTGAAC	TTCTGAGTGGAGATTGAGC	TACAGCCACAAGCAAAGCGT
	V1R13	CTGTAGTCGGAATCTTAGGG	ACGTCACCATTACCTCAG	GCTCTGCACCATTTTTGTG
	V1R16	MTGDTRAATSTMAWTTATCC	ACATTGAGAAACAGAAGCAC	TCCACGGTTTTTCATCCTGTA
	V1R17	TAGCATCTGCCTCTTGAGTG	GGAACATAAGGTGTGCAGC	GGCTTTGTATGTCCCAACTG
	V1R18	TACTGTGCTGGATTGTGAAC	GCTGGGAAATGTTGTGTATCC	CTGTCCTTCTTGTTGAGC
	V1R21	TAGCATCTGCCTCTTGAGTG	AGGTGATCACAATCAGTCCC	GACGCCTTGTATGCAGCATT
	V1R22	MTGDTRAATSTMAWTTATCC	TGACTCGAATAATGAACAAC	GGCTCCACAGTTTTTCATCTT
	V1R30	MTGDTRAATSTMAWTTATCC	CGTGACTGGAATATTGAGTA	GGCTCCACAGTTTTCACTCT
	V1R32	TAGCATCTGCCTCTTGAGTG	AGGTGATCACAATCAGTCCC	TGGCAGCTCCATGGTTCTCAT
	L/M/N	V1R9	ATGTCTTTGGGCTAATGGGGAA	TCTTTTAAATTCTTCCCATAA
V1R10		ATGTCTTTGGGCTAATGGGGAA	ACTTGCATAACTCAGCCTCA	GCCTATCAAGCCATCACCAT
V1R11		ATGTCTTTGGGCTAATGGGGAA	CACCTTCTTAACTCAGTCTTG	AATTCTAAGTGGGCCTGGCT
V1R4		TAACCTCACTTTGCTCACTG	CAGACTTGATTCTCAATCAG	TGGCCAGAGGATTTGCCTT
V1R14		GGAGACAAGGTGAGACCTTC	TCTTTAGTCTTCTCTCTAG	GCAATTTTGGATACTGTTCT
V1R20		TCTGTTGATGGGGCAATAGG	ATCCCTCCAACATTGGCAG	GCAAGTCCAACACATTACAG

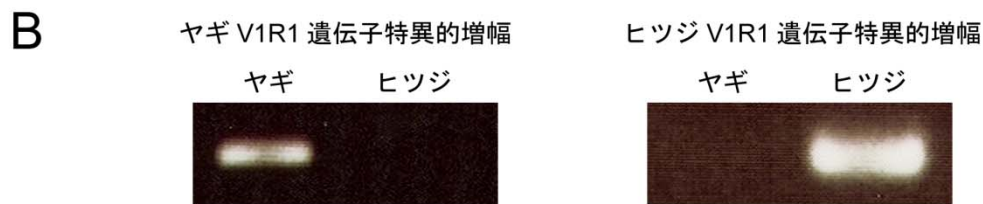


Figure 3-2 V1R1 遺伝子塩基配列およびヤギ・ヒツジ V1R 遺伝子特異的増幅 PCR

A ; ウシ・ヤギ・ヒツジ V1R1 遺伝子塩基配列

ウシ V1R1 遺伝子およびヤギ V1R 遺伝子は先行研究において同定された遺伝子であり、ヒツジ V1R 遺伝子は本研究において同定した。ヤギ・ヒツジ V1R 遺伝子は、ウシ V1R1 遺伝子と高い相同性を持っていた。

B ; ヤギ・ヒツジ V1R 遺伝子特異的増幅 PCR

ヤギ・ヒツジ V1R1 遺伝子をそれぞれ特異的に増幅するプライマーを用いて PCR を行った結果、各々特異的に遺伝子が増幅された。

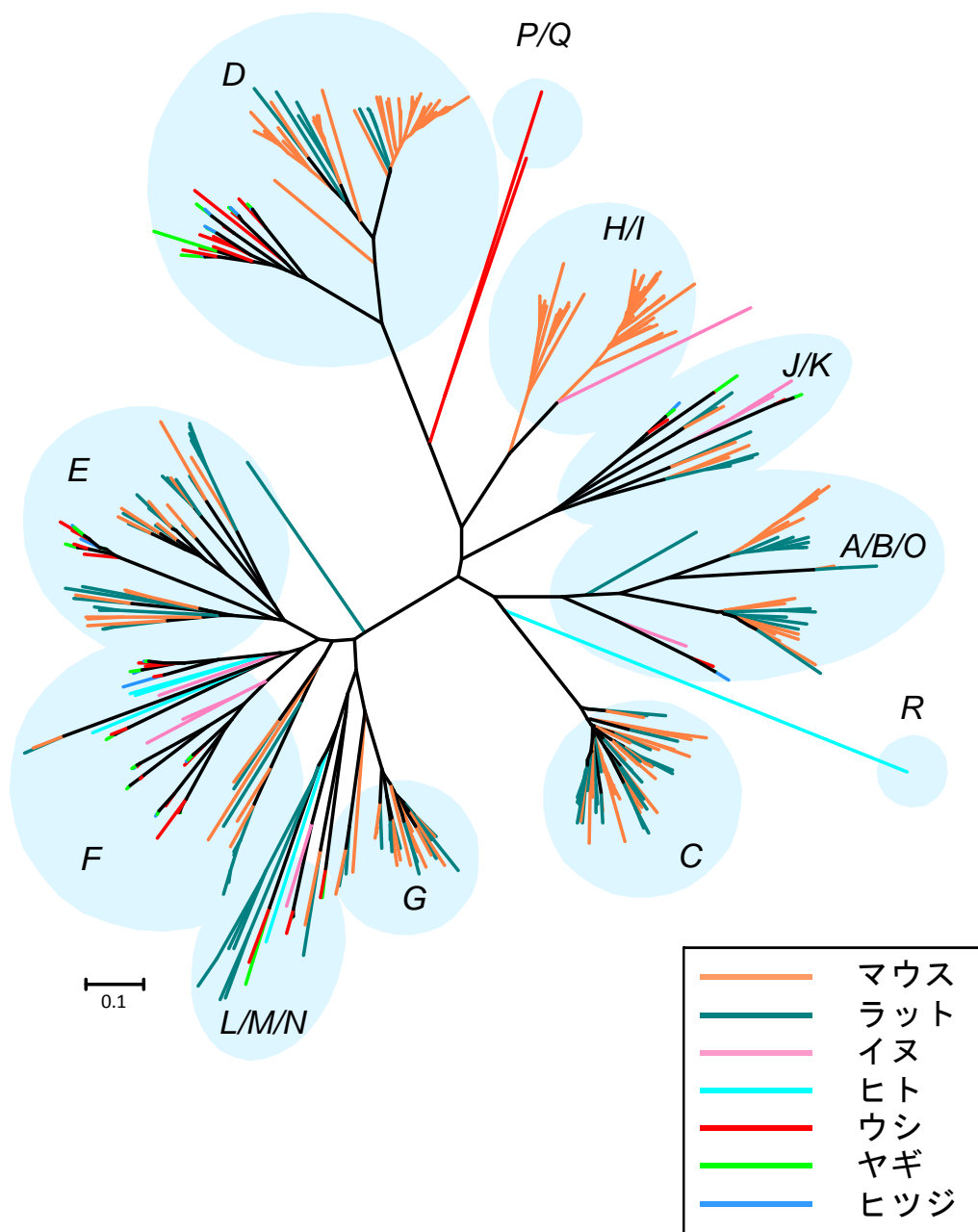


Figure 3-3 哺乳類 V1R 遺伝子進化系統樹

ヤギ・ヒツジから同定された V1R 遺伝子群は、全てウシの持つ V1R 遺伝子ファミリーに属するもの (A/B/O、D-F、J/K、L/M/N) であった。



Figure 3-4 V1R 遺伝子 P/Q サブグループ塩基配列

ヤギ・ヒツジから同定された P/Q サブグループ V1R 遺伝子は、複数の箇所にストップコドンが存在する偽遺伝子だった。

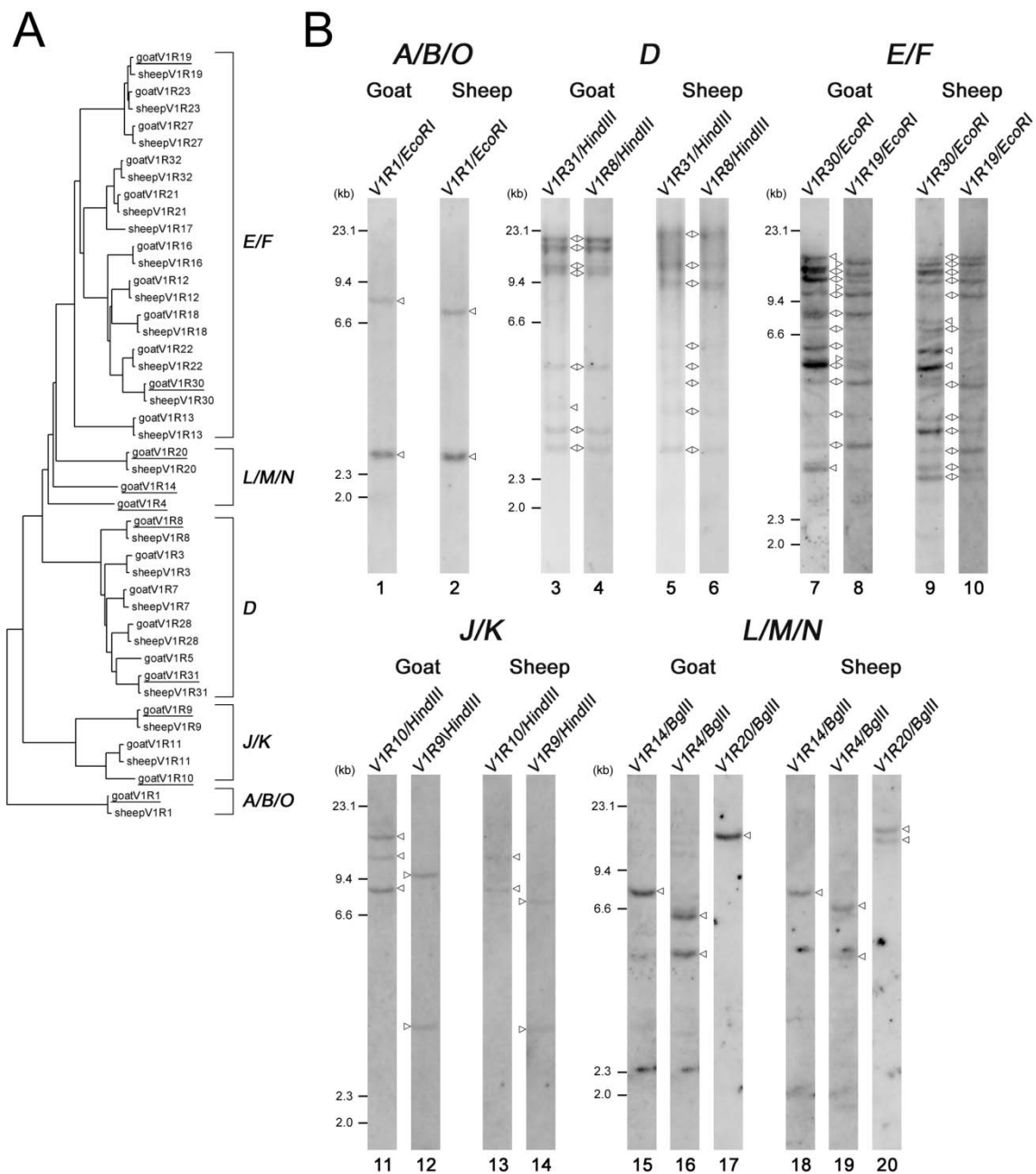


Figure 3-5 サザンブロッティング結果

A; 同定されたヤギとヒツジのV1R遺伝子からなる進化系統樹であり、下線部は各サブファミリーの代表としてプローブを作製した遺伝子を示している。

B; ヤギ (1、3-4、7-8、11-12、15-17) とヒツジ (2、5-6、9-10、13-14、18-20) の各サブファミリーにおけるサザンブロッティングの結果である。

ヤギとヒツジの各サブファミリーにおけるバンドは、ABOはヤギが2本でヒツジが2本、Dはヤギが7本でヒツジが8本、E/Fはヤギが15本でヒツジが15本、J/Kはヤギが5本で、ヒツジが4本、LMNはヤギが4本でヒツジが5本であった。

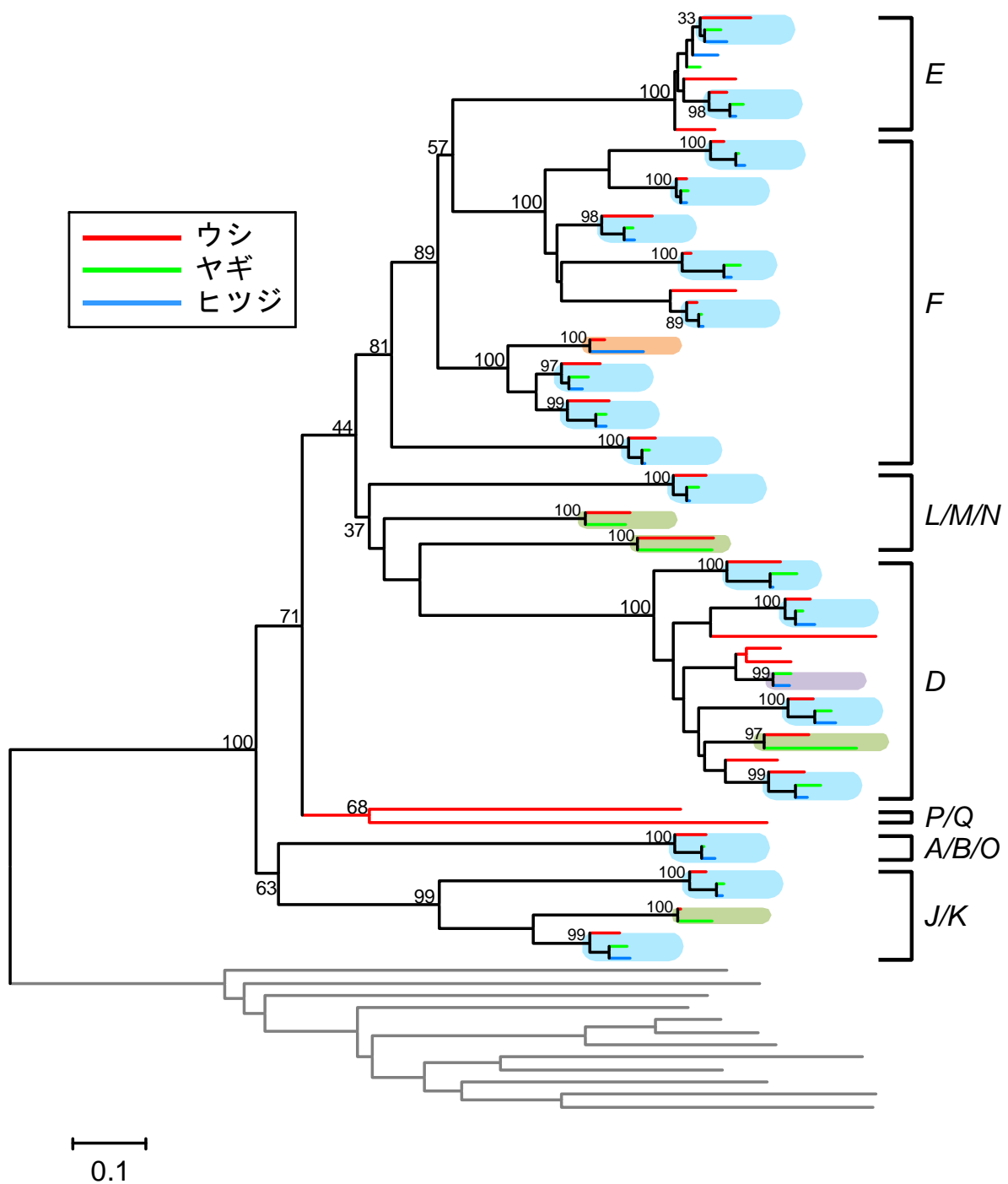


Figure 3-6 ウシ・ヤギ・ヒツジ V1R 遺伝子進化系統樹

同定したヤギ・ヒツジの V1R 遺伝子は、それぞれ 2 遺伝子を除いた全てがウシの V1R 遺伝子のオーソログであった。ウシ・ヤギ・ヒツジのオーソログは 18 (薄い青)、ウシ・ヤギのみのオーソログは 4 (薄い緑)、ウシ・ヒツジのみのオーソログは 1 (薄い赤)、ヤギ・ヒツジのみのオーソログは 1 (薄い紫) である。

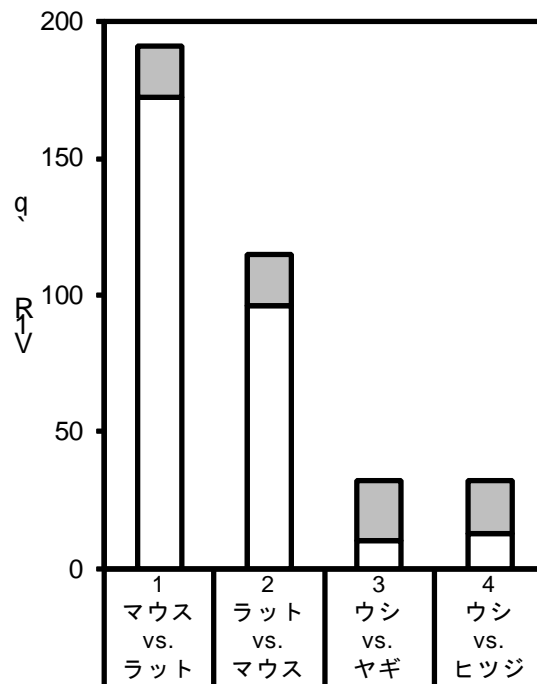


Figure 3-7 オーソログ遺伝子を持つ V1R 遺伝子の割合

全 V1R 遺伝子中、相手とオーソログを持つ V1R 遺伝子の割合（灰色部分）を示している。ウシの V1R 遺伝子の中で、同定されたヤギとヒツジの V1R 遺伝子とオーソログであるものの割合は、ヤギとは 68.8% であり (bar 3)、ヒツジとは 59.4% であった (bar 4)。比較対照として齧歯類のデータを用いると、マウスの V1R 遺伝子でラットとオーソログであるものの割合は 9.9% (bar 1)、ラットの V1R 遺伝子でマウスとオーソログであるものの割合は 16.5% であった (bar 2)。

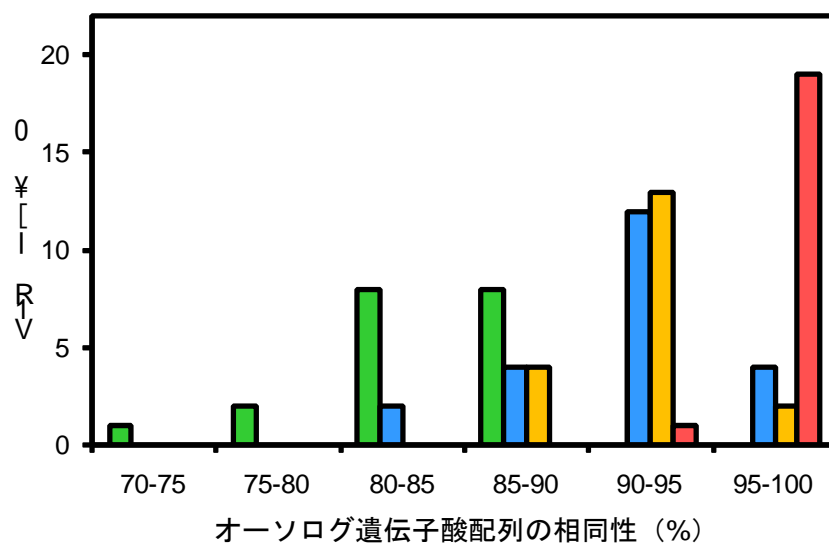
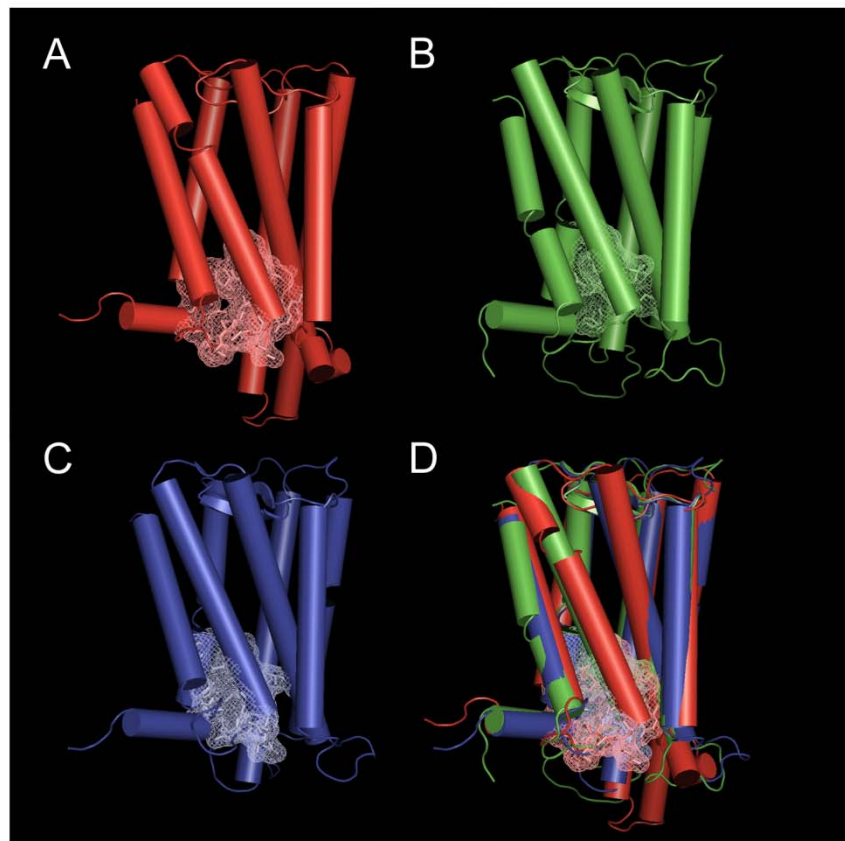


Figure 3-8 オーソログ遺伝子アミノ酸配列の相同性 (%)

マウス・ラットのオーソログの相同性が71.2-88.6%であるのに対し（緑）、ウシ・ヤギのオーソログの相同性は80.6-97.1%（黄）、ウシ・ヒツジの相同性は87.5-97.4%（青）、そしてヤギ・ヒツジの相同性は94.2-99.1%（赤）と相対的に高い値を示していた。

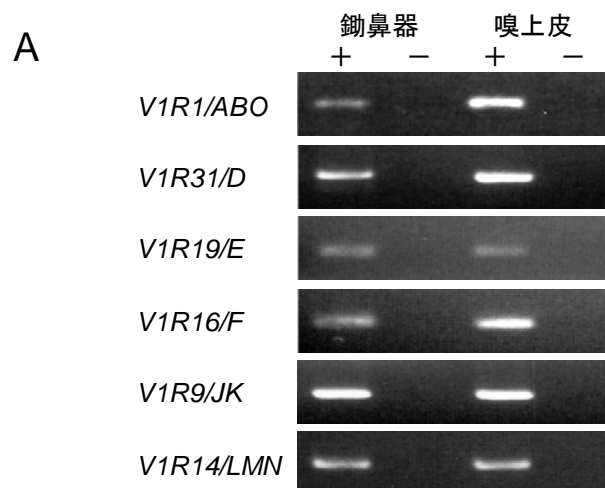


E

	10	20	30	40	50	60	70
cowV1R3	MVLE	TISL	LQM	VVGA	LGNV	ILFF	HTIS
goatV1R3	MVLE	TISL	LQM	VVGA	PGNV	ILFF	HTIS
sheepV1R3	MVLE	TISL	LQM	VVGA	LGNV	ILFF	HTIS
	80	90	100	110	120	130	140
cowV1R3	LSGL	LGCK	FVYY	IQRV	ARGST	FLC	STCI
goatV1R3	LSGL	LGCK	FVYY	VQRV	ARGTT	FLC	STCI
sheepV1R3	LSGL	LGCK	FVYY	VQRV	ARGTT	FLC	STCI
	150	160	170	180	190	200	210
cowV1R3	VPVT	VITG	PQGT	NNYT	DNHG	KWF	CSSA
goatV1R3	VPVT	VITG	PQGT	NNYT	DNHG	KWF	CSSA
sheepV1R3	VPVT	VITG	PQGT	NNYT	DNHG	KWF	CSSA
	220	230	240	250	260	270	280
cowV1R3	PTGR	HRRP	PE	TRA	AHTI	LM	LV
goatV1R3	PTGR	HRRP	PE	TRA	AHTI	LM	LV
sheepV1R3	PTGR	HRRP	PE	TRA	AHTI	LM	LV
	290						
cowV1R3	DPR	TR	GCC	SW	FR	RH	HG
goatV1R3	DPR	TR	GCC	SW	FR	RH	RG
sheepV1R3	DPR	TR	GCC	SW	FR	RH	RG

Figure 3-9 V1R3 立体構造およびリガンド結合部位予測図

A : ウシ V1R3、B ; ヤギ V1R3、 C ; ヒツジ V1R3、 D ; ウシ・ヤギ・ヒツジ V1R3 であり、メッシュ部分は予測されたリガンド結合部位である。E ; ウシ・ヤギ・ヒツジ V1R3 アミノ酸配列であり、各々のリガンド結合部位を形成するアミノ酸は濃い灰色の部分である。黒線は立体構造における膜貫通領域を示している。



B

サブファミリー	遺伝子	鋤鼻器	嗅上皮
A/B/O	V1R1	+	+
D	V1R3	+	+
	V1R5	+	+
	V1R7	+	+
	V1R8	+	+
	V1R28	+	+
	V1R31	+	+
E	V1R19	+	+
	V1R23	+	+
	V1R27	+	+
F	V1R12	+	+
	V1R13	+	+
	V1R16	+	+
	V1R17	+	+
	V1R18	+	+
	V1R21	+	+
	V1R22	+	+
	V1R30	+	+
	V1R32	+	+
	J/K	V1R9	+
V1R10		+	+
V1R11		+	+
L/M/N	V1R4	+	+
	V1R14	+	+
	V1R20	+	+

Figure 3-10 RT-PCRによる鋤鼻器および嗅上皮におけるV1R遺伝子発現解析結果

A；各V1R遺伝子ファミリー代表のRT-PCR結果であり、+は逆転写酵素を含むサンプルであり、-は逆転写酵素を含まないサンプルから反応させた。これらのV1R遺伝子は鋤鼻器と嗅上皮の両方で発現していた。

B；全てのV1R遺伝子のRT-PCR結果であり、+は遺伝子が各嗅覚器官で発現していたことを示している。全てのV1R遺伝子は鋤鼻器と嗅上皮の両方で発現していた。

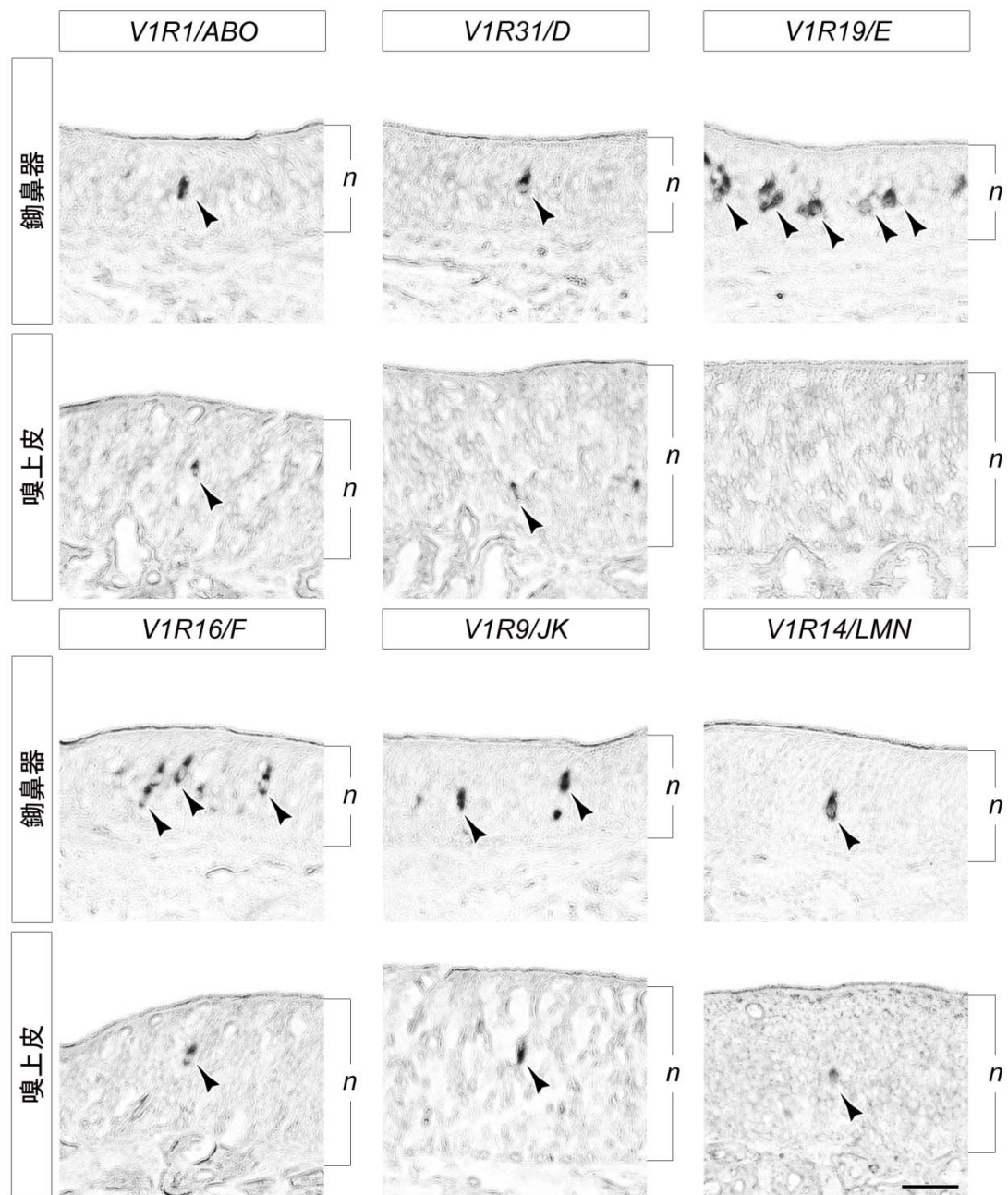


Figure 3-11 *in situ* hybridization による鋤鼻器および嗅上皮における V1R 遺伝子発現

V1R1/ABO、V1R31/D、V1R16/F、V1R9/JK、V1R14/LMN は、鋤鼻器と嗅上皮の両方で発現していた。V1R19/E は嗅上皮での発現を見つけることはできなかった。

V1R19/E は、RT-PCR では嗅上皮での発現が認められたため、嗅上皮での発現量が非常に少ないものと考えられた。

矢頭：V1R 遺伝子発現細胞、*n*：神経細胞層、Scale bar：50 μ m

第四章

反芻動物の嗅球における嗅神経の軸索投射

4-1 緒言

嗅覚受容体が同定されるまで、匂い分子が認識される分子機構には複数の説が提唱されていた。しかし、嗅神経細胞内に adenylyl cyclase III (AC III) が存在すること (Kurihara and Koyama 1972, Pace et al. 1985)、匂い刺激によって開くチャネルが cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 依存性であることが見出されたことから (Nakamura and Gold 1987)、匂い分子は guanine nucleotide binding protein (G タンパク質) 共役型受容体によって受容され認識される可能性が示された。更に、1991 年、Buck と Axel が嗅覚受容体遺伝子の同定に成功し (Buck and Axel 1991)、その遺伝子の機能解析が証明されることによってこの可能性は裏付けられることになる (Zhao et al. 1998, Touhara et al. 1999, Wetzel et al. 1999)。

哺乳類は複数の嗅覚システムを持っているが、中でも主嗅覚系と鋤鼻系については、齧歯類における研究から、受容器官におけるリガンド受容機構が詳細に調べられている (Figure 4-1) (Munger et al. 2009)。主嗅覚系の受容器官である嗅上皮には、嗅覚受容体 (olfactory receptor : OR) や痕跡アミン関連受容体 (trace amine-associated receptor : TAAR) が発現しており、それぞれ guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating, olfactory type (Golf) を共発現している。リガンドが受容体と結合すると Golf が活性化して AC III を活性化する。それによって cAMP 濃度が上昇することで cyclic-nucleotide-gated channel (CNGC) が開口し、膜電位が変化するのである。膜電位の変化によってもたらされた電気信号は主嗅球へと伝達される。一方、鋤鼻嗅覚系の受容器官である鋤鼻器では、神経上皮層の上層部に 1 型鋤鼻受容体 (vomeronasal type 1 receptor : V1R) が、下層部に 2 型鋤鼻受容体 (vomeronasal type 2 receptor : V2R) が発現しており、それぞれ guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 2 (Gi2) または guanine nucleotide binding protein, alpha O (Go) を共発現している。リガンドが受容体と結合すると、Gi2 (あるいは Go) が活性化して、G タンパク質の $\beta\gamma$ ユニットが遊離する。それが phospholipase C type $\beta 2$ (PLC $\beta 2$) を活性化することによって phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) を加水分解し、inositol 1,4,5-trisphosphate (Ins

(1,4,5)P3)と diacyl glycerol(DAG)の濃度上昇を導くことで、transient receptor potential channel 2 (TRPC2) が開口し、膜電位が変化する。鋤鼻器でも嗅上皮と同様に、膜電位の変化によってもたらされた電気信号は、副嗅球へと伝達されるのである。ヤギでは、V1R 遺伝子の1つである gV1R1 は Gi2 を共役して発現していることが明らかになっている (Wakabayashi et al. 2007)。従って、ヤギにおいては、V1R によって受容されたりガンドが何であるのか不明だが、そのリガンドの情報は V1R-Gi2 シグナル伝達系を介して一次中枢神経系である嗅球へ伝達される可能性が考えられる。

嗅覚システムにおいて、嗅覚受容体と G タンパク質は非常に強く結びついてシグナル伝達を司っている。従って、特定の嗅覚受容体ファミリーを発現する神経群の投射を解析するにあたって、その嗅覚受容体と共役している G タンパク質は良いマーカーになる。

第3章において、ヤギの V1R 群は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。中枢神経系における雄効果フェロモンの情報処理には主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系の2つの嗅覚システムが働いていることが示唆されているが (Gelez and Fabre-Nys 2006)、このことと V1R が嗅上皮・鋤鼻器に発現していることは関連している可能性がある。そこで本章では、実験1において、ヤギの嗅覚器官における V1R 発現ニューロン群が主嗅球と副嗅球へ軸索投射しているのかを調べるために、V1R と共役して発現している Gi2 に対する抗体を用いた嗅球の免疫組織化学染色を行い、Gi2 免疫陽性 (Gi2-ir) ニューロンの解析を行った。

受容器官からの一次ニューロンは、嗅球の表層で糸球体を形成している。糸球体では、一次ニューロン終末は二次ニューロンとの間にシナプス後膜肥厚が顕著なシナプスを形成しており、主にグルタミン酸を情報伝達物質として受容器官からの情報を伝達している (Gabellec et al. 2007)。この糸球体の周囲には neurocalcin 産生ニューロン (Murias et al. 2007) やチロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase : TH) (Cave and Baker 2009) などの傍糸球体細胞が取り巻いており、一次ニューロンと二次ニューロンとの情報伝達を調節していると考えられている。本章では、一次ニューロンである V1R 発現ニューロン、すなわち Gi2-ir ニューロンが嗅球において二次ニューロンへと情報

を伝達しているのか否かについても検討した。そのために、神経軸索マーカーである細胞接着分子（neural cell adhesion molecule : NCAM）や、成熟感覚神経軸索のマーカーである嗅覚標識タンパク質（olfactory marker protein : OMP）によって Gi2-ir ニューロンが成熟した嗅神経であることを解析した。更に、神経終末においてグルタミン酸のトランスポーターである 2 型小胞性グルタミン酸トランスポーター（vesicular glutamate transporter 2 : VGluT2）および傍系球体細胞である neurocalcin と TH 産生ニューロンの局在を調べた。

鋤鼻器に V1R が発現していることが明らかになっていることから、V1R-Gi2 発現ニューロンが副嗅球へ軸索投射していることは多く報告されている（Berghard et al. 1996, Jia and Halpern 1996, Takigami et al. 2004）。しかし、主嗅球へ Gi2 発現ニューロンが軸索投射しているとの報告は未だなく、たとえ軸索投射があったとしても果たしてそれが情報伝達の機能を持っているものなのかは不明である。そこで本章では、主嗅球における Gi2-ir ニューロンが観察された場合に、それが二次ニューロンへ情報を伝達する機能を持つものなのかを検討するために、実験 2 として電子顕微鏡観察によってシナプスの有無を確認した。

4-2 材料および方法

実験 1 免疫組織化学染色による嗅球における Gi2-ir ニューロンの観察

供試動物

供試動物として、雌シバヤギ（6頭）を用いた。供試動物は、（独）生物資源研究所より入手した。

灌流および脳固定

雄ヤギサンプルまたは去勢ヤギサンプルの1回目の曝露から2時間後に供試動物へ過剰量のネンブタール（30 mg/kg、大日本製薬）を投与した。頸部皮膚を切開して両側の頸動脈にカニューレを留置し、Masterflex 送液ポンプ（Masterflex）により、ヘパリン（4,000 単位/L）および 0.05 M 亜硝酸ナトリウムを添加した PBS を灌流し、外頸静脈から放血した。心停止を確認後、断頭してさらに灌流を続け、合計 5 L 灌流した。続いて 4%パラホルムアルデヒド/PBS を合計 5 L 灌流して組織を固定した。

灌流終了後、頭蓋より脳を摘出し、嗅球を含む脳ブロックを切り出して、4%パラホルムアルデヒド/PBS 中にて 4°C 下で 24 時間の後固定を行った。続いて脳ブロックを 20%スクロース/PBS 中に移し、4°C 下で沈下するまで浸漬した。

凍結切片作製

組織は OCT compound（SAKURA）内に入れ、ドライアイス上のヘキサンで凍結させて包埋を行った。凍結切片からクライオスタット（Leica）で 10 μm の水平断面の連続切片を 600 枚作製し、MAS コートスライドガラス（松浪ガラス工業）上に貼り付け、直ちにドライヤーで乾燥させた。1 時間室温で乾燥させた後、使用するまで -80°C に保管した。

免疫組織化学染色

切片は PBS で洗浄した後（室温、10 分）、2%パラホルムアルデヒド/PBS で固定を行った（室温、5 分）。PBS で洗浄して（室温、3 回）、1% Blocking Reagent 緩衝液でブロッキングした後（室温、30 分）、一次抗体反応（抗 Gi2 抗体、1:400 希釈、Millipore；抗 Golf 抗体、1:400 希釈、（財）東京都臨床医学総合研究所 山岸公子先生より譲り受けた；抗 NCAM 抗体、1:400 希釈、Sigma；抗 OMP 抗体、1:400 希釈、（財）東京都神経医学総合研究所 大迫俊二先生より譲り受けた；抗 VGluT2 抗体、1:400 希釈、Sigma；抗 neurocalcin 抗体、1:400 希釈、Biomol International；抗 TH 抗体、1:400 希釈、Protos Biotech Corporation）を行った（4°C、一晚）。PBS で洗浄した後（室温、3 回）、二次抗体反応を行った（室温、60 分）。

抗体反応後のスライドは PBS で洗浄した後（室温、3 回）、オールインワン蛍光顕微鏡（キーエンス）で観察した。

実験 2 主嗅球における Gi2-ir ニューロンの電子顕微鏡観察

供試動物

供試動物として、雌シバヤギ（2 頭）を用いた。供試動物は、（独）生物資源研究所より入手した。

脳固定

実験 1 と同様に頭部灌流を行った後、0.05%グルタルアルデヒド、2%パラホルムアルデヒド/PBS を合計 5 L 灌流して組織を 2 時間、固定した。

頭蓋より脳を摘出し、嗅球を切り出して、2%パラホルムアルデヒド/PBS 中にて後固定を行った（4°C、24 時間）。

凍結切片作製

嗅球を 3%寒天、2%ゼラチン/0.1 M PB に沈めて固形化した後、回転式マイクロト-

ム (Leica) で 50 μm の水平断面浮遊切片を作製し、クライオプロテクタント溶液 (30% スクロース、30% ポリエチレングリコール、1% ポリビニルピロリドン/50 mM PB) 内で、使用するまで -20°C に保存した。

免疫組織化学染色

切片を 0.1 M PBS で洗浄し (室温、5 分)、1% Blocking Reagent 緩衝液でブロッキングした後 (室温、30 分)、一次抗体 (抗 Gi2 抗体、1:800 希釈、Millipore) 反応を行った (4°C 、二晩)。PBS で洗浄した後 (室温、10 分、3 回)、二次抗体 (ビオチン化ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン IgG、1:500 希釈、Vector Labs) による反応を行い (室温、1 時間)、アビジン-ビオチン複合体 (ABC) 溶液 (1:200 希釈、Vector Labs) による反応を行った (室温、30 分)。反応終了後、0.1 M PBS で洗浄し (室温、10 分、3 回)、発色反応液 (0.02% 3,3'-ジアミノベンジジン、0.25% 塩化ニッケル (II)、0.3% 過酸化水素/0.175 M 酢酸ナトリウム緩衝液) で反応させた (室温、5 分)。

電子顕微鏡観察

免疫組織化学染色を行った切片を 1% 四酸化オスミウム/0.1 M PB で室温にて 1 時間固定した。洗浄後、アルコール脱水系列で脱水し、エポン樹脂 (Quetol 812) に包埋した。嗅球の水平断面になるよう、包埋された嗅球の方向を合わせてウルトラミクロトーム (Leica) で超薄切片を作製した。飽和酢酸ウラン溶液に室温にて 30 分間、0.3% クエン酸鉛溶液に室温にて 3 分間、電子染色を行い、透過型電子顕微鏡 (日立ハイテク) で観察した。

4-3 結果

実験 1 免疫組織化学染色による嗅球における Gi2-ir ニューロンの観察

ヤギ嗅球の水平断面連続切片を背側から腹側へ、Gi2-ir を観察した結果、Gi2-ir は副嗅球の鋤鼻神経層および糸球体層で特に多く局在しているとともに、主嗅球尾側部の外側から内側にかけて複数の領域で局在していた (Figure 4-2)。主嗅球における Gi2-ir は Golf-ir とは共存しておらず、Golf-ir の糸球体とは独立して分布していた。

主嗅球と副嗅球における Gi2-ir の性質を調べるために、神経軸索を染色する NCAM 抗体、成熟感覚神経を染色する OMP 抗体、神経終末を染色する VGluT2 抗体、neurocalcin 産生ニューロン抗体、TH 産生ニューロン抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。これらの抗体がヤギの嗅球における嗅神経軸索および傍糸球体細胞を染色することは、予備実験として確認した (Figure 4-3)。主嗅球と副嗅球における Gi2-ir は NCAM-ir と共存しており (Figure 4-4)、神経軸索であることが示された。また、OMP-ir とも共存していることから (Figure 4-5)、成熟感覚神経軸索であることが示された。更に、この Gi2-ir ニューロンその末端部分と見られる領域においては、VGluT2-ir と共存していたことから (Figure 4-6)、グルタミン酸を伝達物質とする神経終末を持っているであろうことが示唆された主嗅球・副嗅球における Gi2-ir の近傍には、neurocalcin-ir (Figure 4-7) や TH-ir (Figure 4-8) が存在していた。各々の neurocalcin-ir と TH-ir は、神経核を染色する Dapi と共存しており、細胞体として Gi2-ir 近傍に存在していることが示された。

実験 2 主嗅球における Gi2-ir ニューロンの電子顕微鏡観察

電子顕微鏡観察により、主嗅球 Gi2-ir ニューロンと隣接するニューロンとの間にシナプスが観察された。シナプスの構造は、後膜肥厚が顕著であり、非対称シナプスで

あった (Figure 4-9)。

4-4 考察

本章では、ヤギにおいて **Gi2-ir** が主嗅球と副嗅球の両方に存在することを示した。これらの **Gi2-ir** は **NCAM-ir** や **OMP-ir** と共存していることから、嗅覚受容器官から軸索投射している成熟感覚神経軸索であることが示唆された。さらに、主嗅球と副嗅球における **Gi2-ir** ニューロンは、神経細胞層よりやや深層領域において **VGluT2-ir** と共存していたことから、グルタミン酸を伝達物質とするシナプスを有することが示唆された。**Gi2-ir** ニューロンは、副嗅球において二次ニューロンとの間にシナプスを形成していることは報告されているが、主嗅球においては未だ報告なされていない。そこで、本章では主嗅球における **Gi2-ir** ニューロンを電子顕微鏡によって観察した。その結果、主嗅球における **Gi2-ir** ニューロンもまた二次ニューロンとの間にシナプスを形成していることが明らかになった。このシナプスは後膜肥厚が顕著な非対称シナプスであり、これは主嗅球の他の領域における嗅神経で観察されたシナプス形態と同様のものであった。これらのことから、**Gi2** ニューロン、すなわち **V1R** 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、二次ニューロンへ情報を伝達していることが示唆された。また、主嗅球と副嗅球における **Gi2-ir** ニューロンが寄り集まった系球体用領域の周囲には、**neurocalcin-ir** ニューロンや **TH-ir** ニューロンが存在することが示されことから、これらのニューロンは傍系球体細胞として、**V1R** ニューロンと二次ニューロンとの間の情報伝達に関与する可能性が示された。

鋤鼻器に **V1R-Gi2** シグナル伝達系が存在することは広く知られており、副嗅球へ **Gi2** 発現ニューロンが軸索投射していることは多くの動物種で確認されている。齧歯類では、**Gi2** 発現ニューロンは副嗅球吻側部の系球体へ軸索投射していることが明らかになっており、齧歯類以外の奇蹄類ウマ、食虫類スナグサ、肉食類イヌ、霊長類マーモセットなどでは副嗅球全体の系球体に **Gi2** 発現ニューロンが軸索投射している (Takigami et al. 2004)。一方、主嗅球へ **Gi2** 発現ニューロンが軸索投射しているとの報告は全くなされていない。ヤギにおいて、主嗅球における **Gi2** 発現ニューロンがど

こに由来するものなのかは不明であるが、最も有力な受容器官は嗅上皮である。最近になって、齧歯類ラットでは嗅上皮において V1R-Gi2 シグナル伝達系の一部を構成する TRPC2 が存在することが報告されたことから (Venkatachalam and Montell 2007)、齧歯類では主嗅覚系において V1R-Gi2 の機能している可能性がある。すなわち、本章で示したような主嗅覚系における V1R-Gi2 シグナル伝達系の存在はヤギに特異な例ではなく、他の哺乳類にも存在し得るものと考えられる。

第三章において、ヤギ V1R 遺伝子群は全て鋤鼻器と嗅上皮の両方に発現していることを示した。本章では、V1R-Gi2 ニューロンは主嗅球と副嗅球の両方において軸索投射しており、二次ニューロンとの間にシナプスを形成していることを示したが、第三章の結果と考え合わせると、ヤギの鋤鼻器と嗅上皮の V1R で受容されたりガンドの情報は更に高次の鋤鼻系と主嗅覚系へ伝達される可能性がある。そしてこのことは過去に報告されているような (Gelez and Fabre-Nys 2006)、雄効果フェロモンは中枢神経系における主嗅覚系と鋤鼻系によって情報処理されている可能性があることと矛盾しない。今後は任意の V1R を発現する嗅神経の嗅上皮から主嗅球への軸索投射を実証する必要があるものと考えられる。

4-5 小括

本章では、V1R 発現ニューロンが嗅球のどこへ軸索投射しているものなのかを明らかにするために、Gi2 発現ニューロン軸索投射解析を免疫組織化学染色によって行った。その結果、Gi2 発現ニューロンは、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。これらの Gi2 発現ニューロンの特性について更に詳細に解析した結果、これらのニューロンは成熟感覚神経細胞であり、その近傍には neurocalcin、TH 産生ニューロンが局在していた。また電子顕微鏡観察によって、主嗅球における Gi2-ir ニューロンは二次ニューロンとの間にシナプスを形成することが明らかになった。これらのことから、V1R 発現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、二次ニューロンへ情報を伝達していることが考えられた。

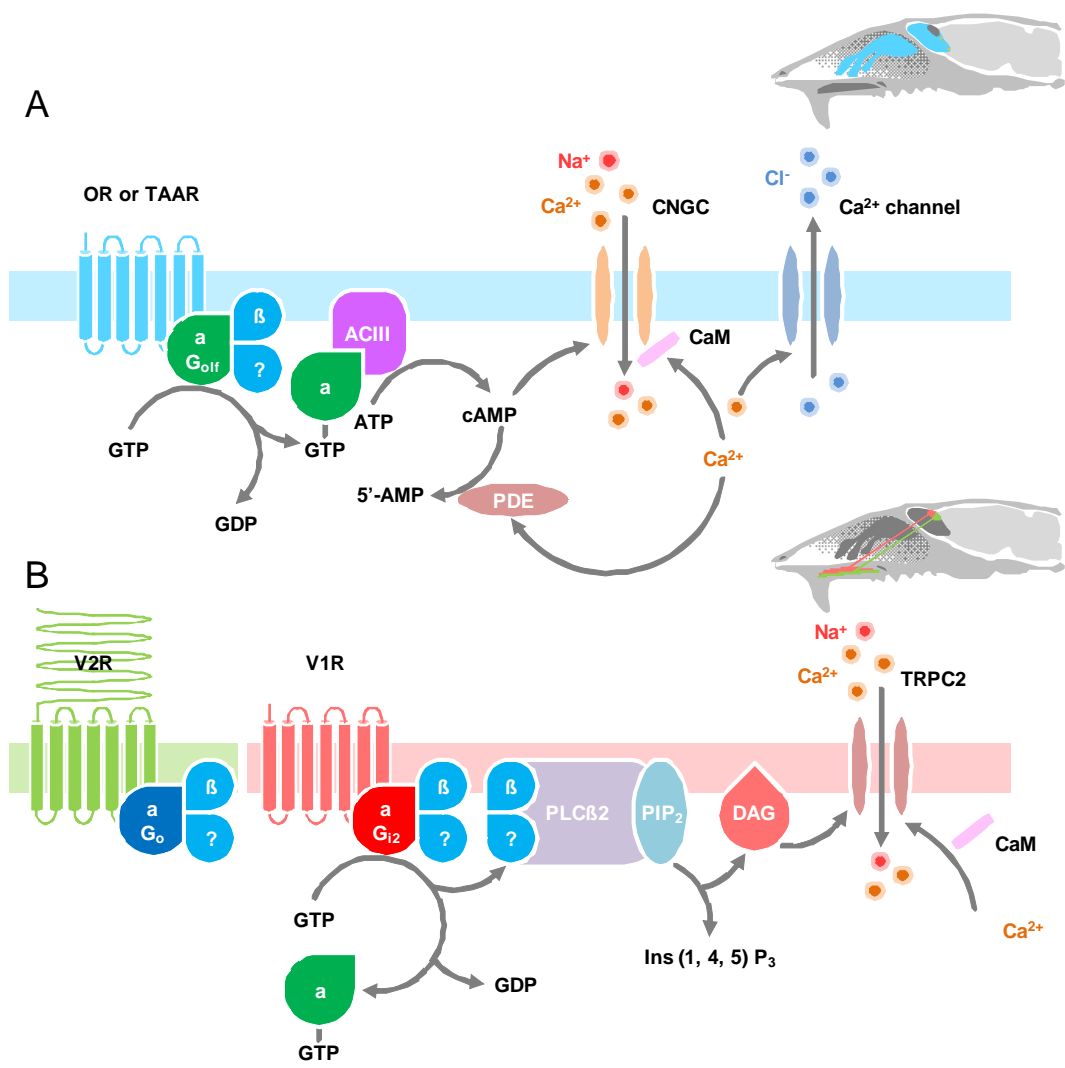


Figure4-1 齧歯類嗅上皮・鋤鼻器におけるリガンド受容機構

A：嗅上皮における受容機構：リガンドが受容体と結合すると Golf が活性化して adenylyl cyclase III (AC III) の活性化・cAMP 濃度上昇が起こり、cyclic-nucleotide-gated channel (CNGC) が開口されて膜電位が変化する。また、CNGC は calmodulin (CaM) によってフィードバックを受ける。phosphodiesterase type 2 (PDE2) はカルシウムイオンの影響を受けて、cyclic adenosine monophosphate (cAMP) を 5'-AMP に異化する。

B：鋤鼻器における受容機構：リガンドが受容体と結合すると Gi2 (あるいは Go) が活性化して、G タンパク質の βγ ユニットが遊離する。それが phospholipase C type β2 (PLCβ2) を活性化することによって phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) を加水分解し、inositol 1,4,5-trisphosphate (Ins (1,4,5) P₃) と diacyl glycerol (DAG) の濃度上昇が起こり、transient receptor potential channel 2 (TRPC2) が開口されて膜電位が変化する。また、TRPC2 は calmodulin (CaM) によってフィードバックを受ける。

(Munger et al. 2009 を改変)

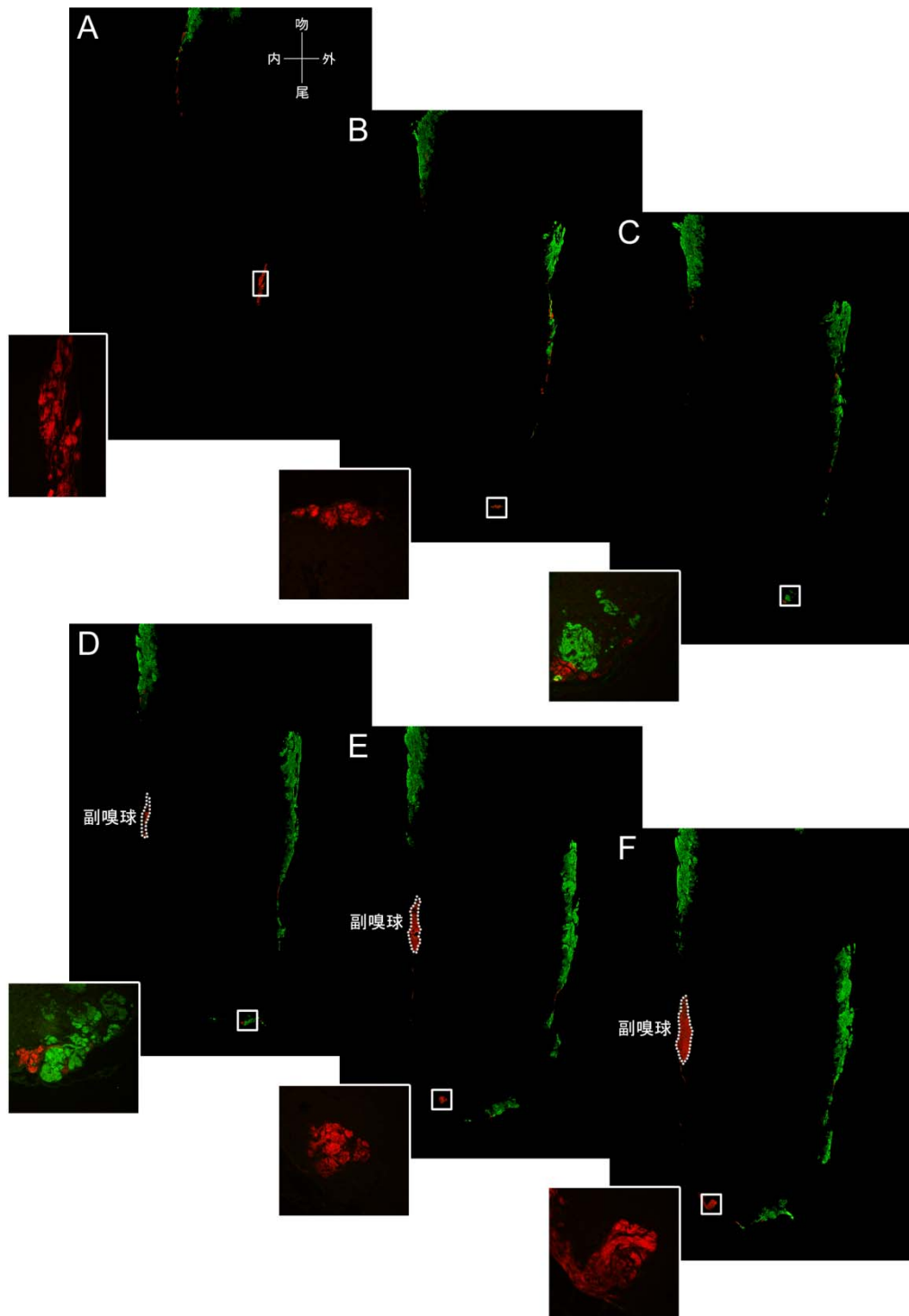


Figure 4-2 嗅球水平断面切片における Gi2-ir (赤) と Golf-ir (緑) (背側 A-腹側 F)
 各嗅球全体像の左に示した反応陽性像は、各々全体像中に示した枠内を拡大したものである。
 破線部領域は、副嗅球を示している。
 吻：吻側部方向、内：内側部方向、外：外側部方向、尾：尾側部方向

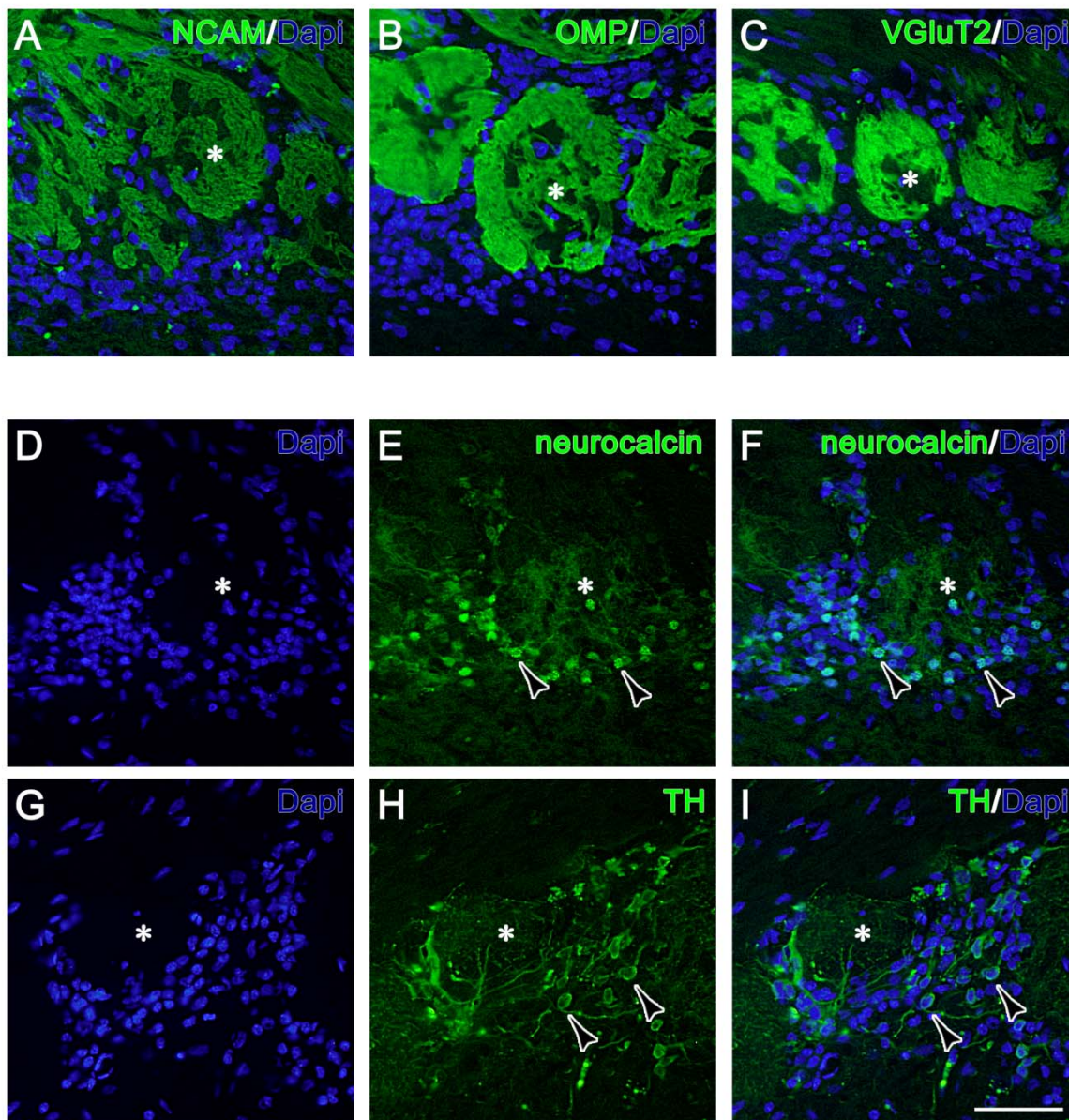


Figure 4-3 主嗅球における神経軸索マーカーおよび傍系球体細胞

A-C ; 神経接着分子 (neural cell adhesion molecule : NCAM) -ir、嗅覚標識タンパク質 (olfactory marker protein : OMP) -ir、小胞性グルタミン酸トランスポーター2 (vesicular glutamate transport protein 2 : VGLUT2) -ir の神経軸索および Dapi、D-F ; Dapi、neurocalcin-ir の細胞体、G-I ; Dapi、チロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase : TH) -ir の細胞体を示している。全ての神経軸索マーカーおよび傍系球体細胞は主嗅球を形成する系球体およびその周囲にて観察された。矢頭：細胞体、*：系球体、Scale bar：50 μ m

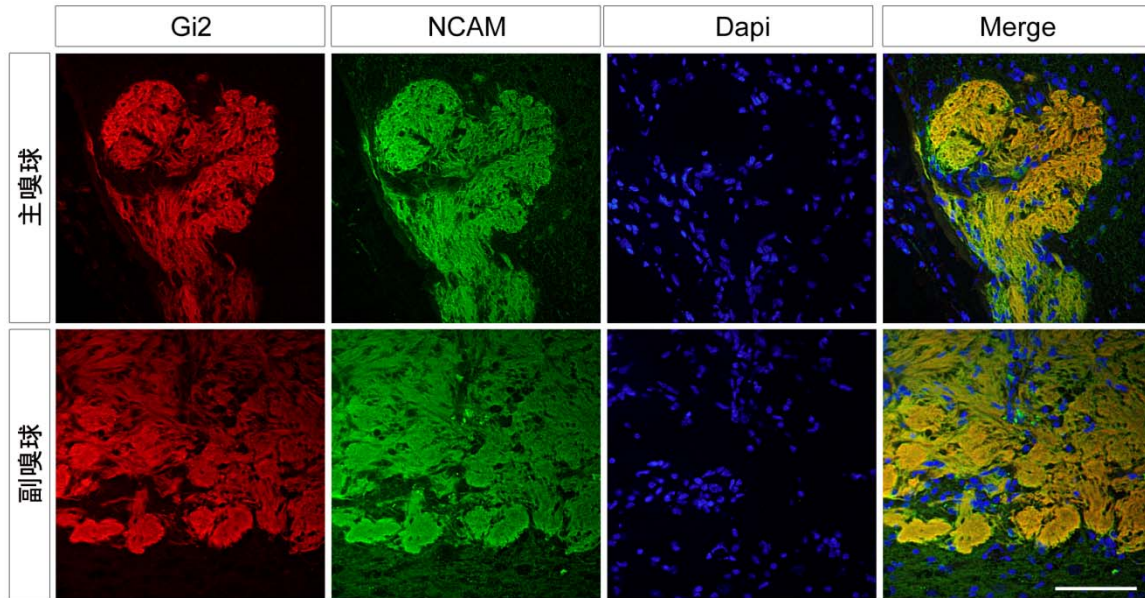


Figure 4-4 主嗅球および副嗅球における Gi2-ir と NCAM-ir

NCAM は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する糖蛋白質である。神経の細胞膜上に存在し、細胞間接着や、細胞・細胞外基質間接着により組織構築や形態形成を決定する因子であり (Linnemann and Bock 1989, Schwanzel-Fukuda and Pfaff 1991)、神経軸索のマーカーとして用いられる。

主嗅球と副嗅球の両方において、Gi2-ir は NCAM-ir と共存していた。また、Gi2-ir/NCAM-ir は、細胞核を染色する Dapi と共存していなかった。これらのことから、Gi2-ir が神経軸索であることが示された。

Scale bar : 100 μ m

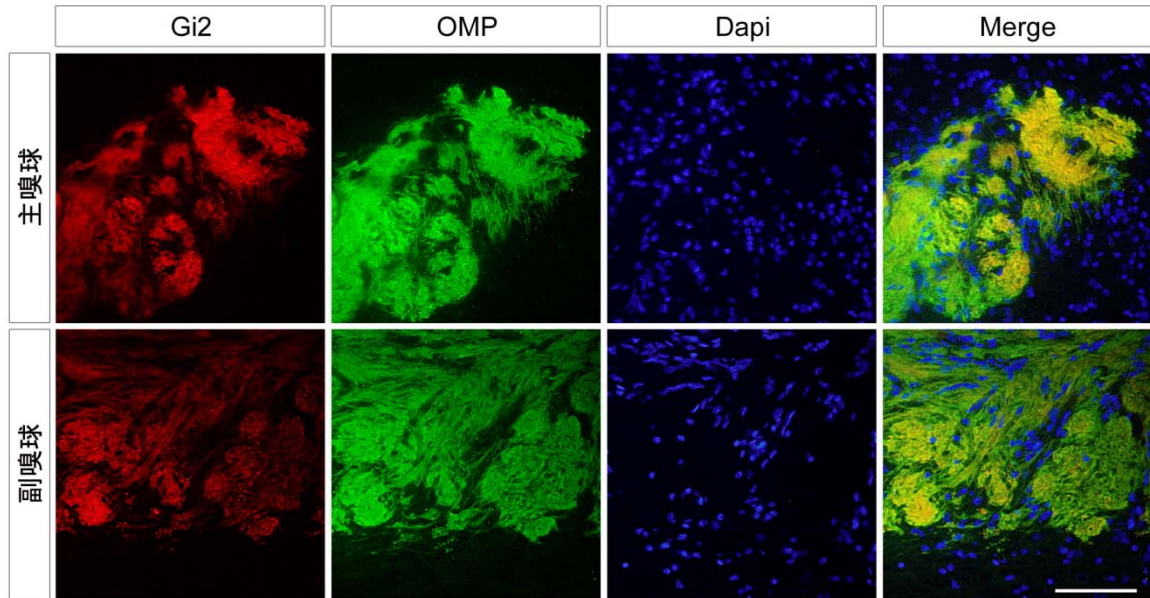


Figure 4-5 主嗅球および副嗅球における Gi2-ir と OMP-ir

OMP は、嗅覚シグナル伝達カスケードの修飾因子であり、成熟した嗅神経細胞や鋤鼻神経細胞に発現している (Monti-Graziadei et al. 1977, Farbman and Margolis 1980, Takigami et al. 2004)。

主嗅球と副嗅球の両方において、Gi2-ir は OMP-ir と共存していた。また、Gi2-ir/OMP-ir は Dapi と共存していなかった。これらのことから、副嗅球と主嗅球における Gi2-ir はともに成熟感覚神経軸索であることが示された。

Scale bar : 100 μ m

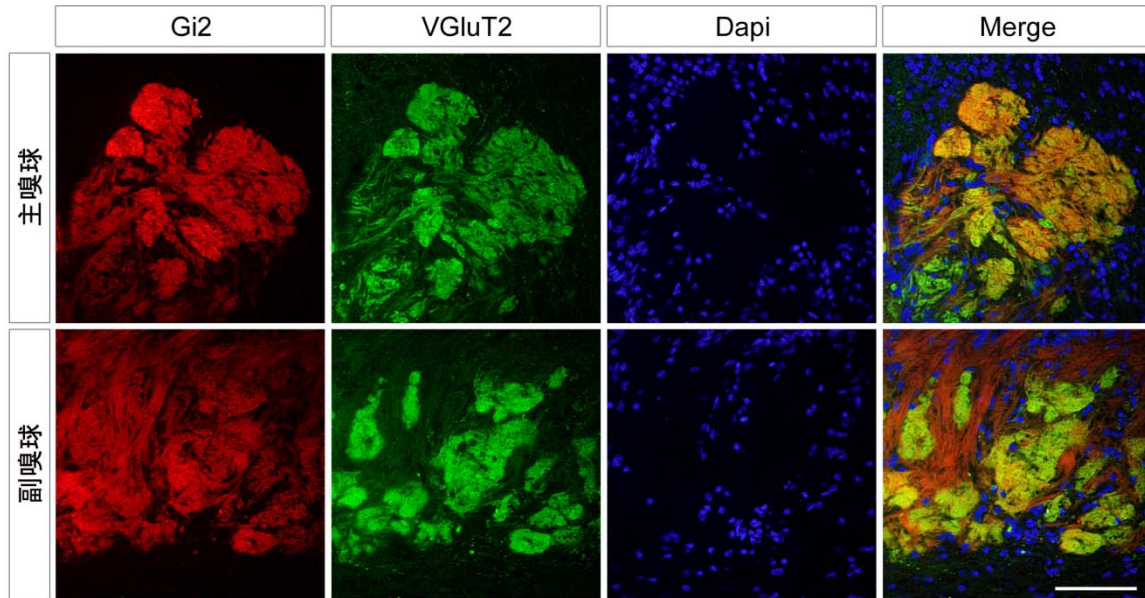


Figure 4-6 主嗅球および副嗅球における Gi2-ir と VGluT2-ir

グルタミン酸は嗅神経・鋤鼻神経終末から二次ニューロンへの情報伝達物質である (Gabellec et al. 2007)。VGluT2 は、グルタミン酸を伝達物質とする神経終末のマーカーである。

主嗅球と副嗅球における Gi2-ir は VGluT2-ir と共存していた。また、Gi2-ir/VGluT2-ir は Dapi と共存していなかった。これらのことから、副嗅球と主嗅球の Gi2-ir はグルタミン酸を伝達物質とする神経終末を有するニューロンである可能性が示された。

Scale bar : 100 μ m

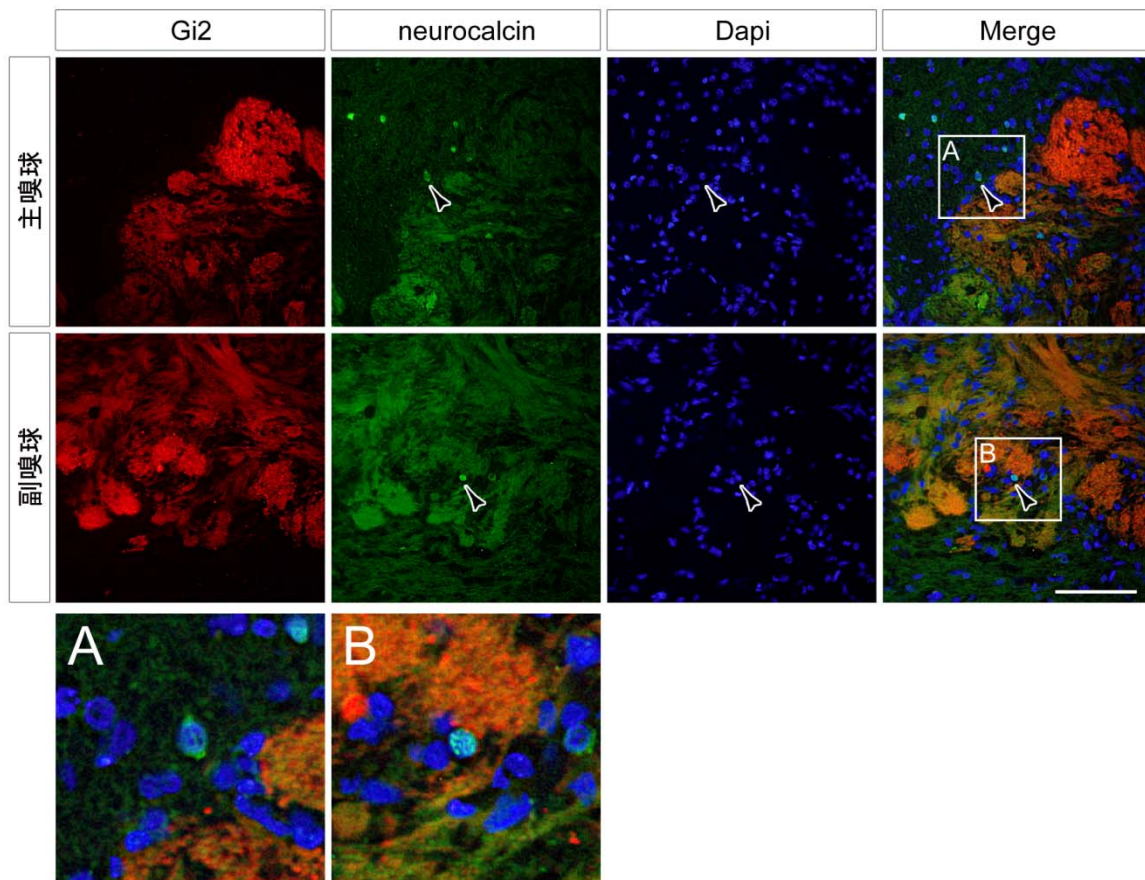


Figure 4-7 主嗅球および副嗅球における Gi2-ir と neurocalcin-ir

neurocalcin 産生ニューロンは、傍系球体細胞として系球体近傍に存在し、細胞内セカンドメッセンジャーであるカルシウムイオンの働きを調節している (Murias et al. 2007)。

主嗅球と副嗅球 Gi2-ir 近傍には Dapi と共存した neurocalcin-ir が局在しており、neurocalcin 産生ニューロンが存在することが示された。

矢頭：neurocalcin 細胞体、Scale bar：100 μm 、A：主嗅球枠内拡大図、B：副嗅球枠内拡大図

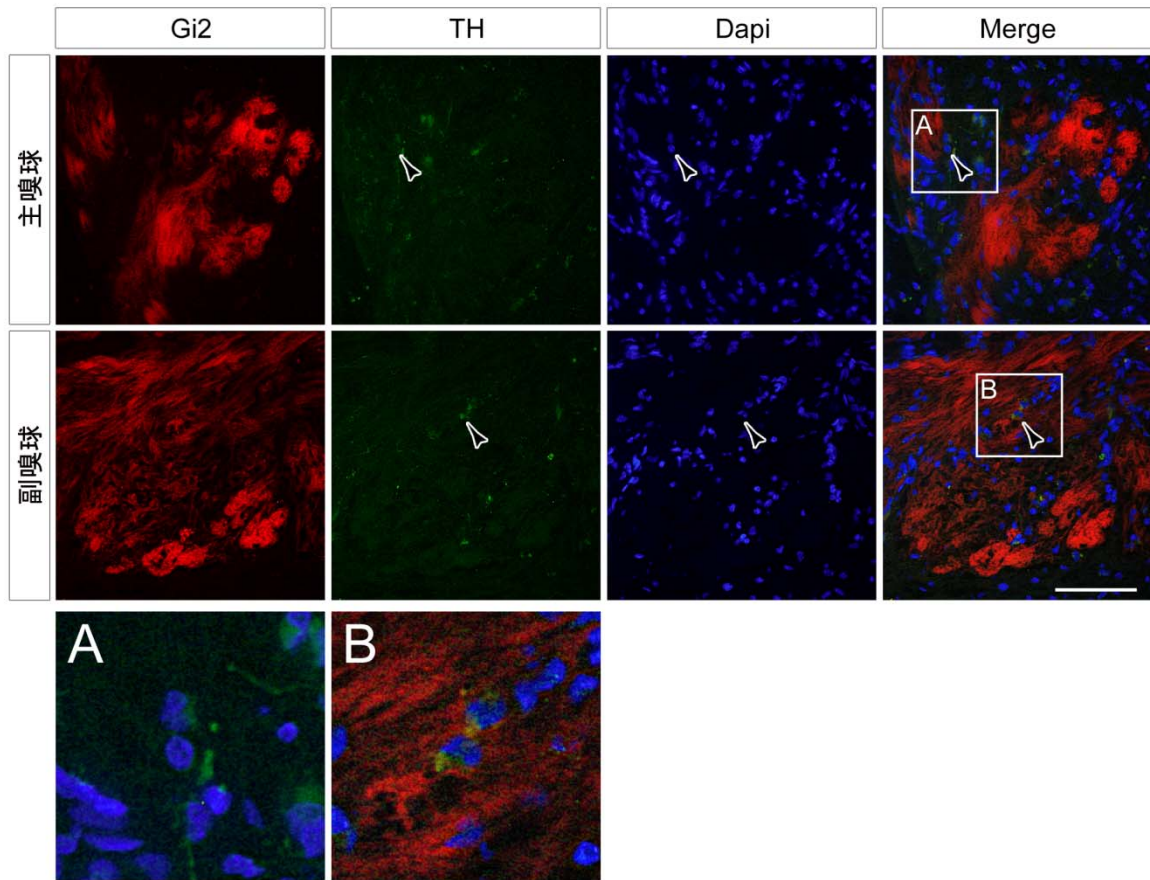


Figure 4-8 主嗅球および副嗅球における Gi2-ir と TH-ir

TH 産生ニューロンは、糸球体近傍にて嗅覚情報伝達を調節する働きを担う傍糸球体細胞だと考えられている (Cave and Baker 2009)。

主嗅球と副嗅球 Gi2-ir 近傍には Dapi と共存した TH-ir が局在しており、TH 産生ニューロンが存在することが示された。

矢頭：TH 細胞体、Scale bar：100 μ m、A：主嗅球枠内拡大図、B：副嗅球枠内拡大図

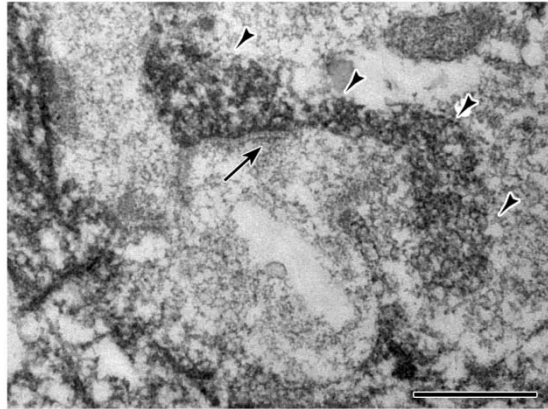


Figure 4-9 主嗅球における Gi2-ir ニューロン軸索終末のシナプス

Gi2-ir ニューロンと隣接するニューロンとの間にシナプスが観察された。シナプスの構造は、後膜肥厚が顕著であり、非対称シナプスであった。

矢頭：Gi2-ir、矢印：シナプス、Scale bar：500 nm

第五章

総合考察

5-1 結果の要約

本研究では、雄効果フェロモンの2つの特徴である(1)雄効果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点(Over et al. 1990, Ichimaru et al. 2007)、(2)雄効果フェロモンの情報処理に中枢神経系における主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系の2つの嗅覚システムが関与している点(Gelez and Fabre-Nys 2006)を手掛かりとして、雄効果フェロモン受容体候補を探索した。以下が、本研究結果の要約である。

第二章では、雄ヤギの被毛から抽出された酸性物質が異なる動物種である雌ヒツジへ雄効果フェロモン活性を持つことを示した。このことから、雄効果フェロモンは酸性物質である可能性が高く、それを受容する受容体として有力な候補の一つが1型鋤鼻受容体(vomer nasal type 1 receptor: V1R)であることを示した。ヤギとヒツジの間で種を超えて作用するフェロモンは、ヤギとヒツジの間で非常に良く似た構造の分子で、その受容体も高い類似性をもつ可能性が考えられた。

第三章ではヤギとヒツジそして同じ反芻動物であるウシのV1R遺伝子を分子進化的解析によって比較した。その結果、ヤギ・ヒツジ・ウシのV1R遺伝子は互いに非常に高い類似性を持っていることが明らかになった。第三章では、ヤギやヒツジのV1R遺伝子群を同定するだけでなく、ヤギについて、同定したV1R遺伝子の群嗅覚器官における発現を解析した。その結果、V1R遺伝子群は全て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。このことから、雄効果フェロモンは嗅上皮と鋤鼻器の両方に受容される可能性が考えられた。

第四章では、免疫組織化学染色によって、V1R-Gi2発現ニューロンが主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系の両方の一次中枢神経系へ軸索投射していることと、この神経軸索は終末においてシナプスを形成していることを明らかにした。このことから、V1Rに受容されたりガンド、すなわち雄効果フェロモンの情報は、更に高次の主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系へと伝達される可能性が考えられた。

以上の結果は、Figure 5-1にてまとめて示した。

5-2 嗅覚受容体の分子進化

近年、ゲノムプロジェクトによるゲノムデータベースの構築によって、様々な動物種で嗅覚受容体遺伝子ファミリーが見つかっている (Figure 5-2) (Nei et al. 2008)。特に興味深いことは、進化の過程で生活圏が水中から陸上へ移った際に嗅覚受容体、特に匂い受容体 (olfactory receptor : OR) やV1Rなど揮発性化学物質を受容する受容体遺伝子数が爆発的に増加していることである。陸上には当然のことだが空気が存在し、不揮発性の化学物質だけでなく揮発性の化学物質など多彩な匂い利用し得る条件にある。恐らく、陸上へ生活圏を移した動物はそのような新たな環境に適応するために、嗅覚受容体遺伝子を獲得していったのではないかと考えられる。

機能的な嗅覚受容体遺伝子は、視覚・嗅覚・味覚・聴覚・触覚のどの五感を優位に使うかによって容易に偽遺伝子化してしまうと考えられている。例えば、霊長類においては、視覚の発達がOR遺伝子の偽遺伝子化へ影響を及ぼすことが考えられている (Figure 5-3、A)。視界が遠くまで開けていないジャングルに棲息している新世界ザルは、自分の縄張りを主張するマーキングなど、嗅覚を介するコミュニケーションを頻繁に行っており (Heymann 2006)、このことを裏付けるかのように、新世界ザルにおいては機能し得るOR遺伝子は比較的高い割合で保存されている (Gilad et al. 2004)。しかし一方で、高い樹木の間を自由に飛び交うための空間認識能力や食べ物を色で見分ける色彩感覚が優れている旧世界ザルや大型類人猿においては、OR遺伝子の偽遺伝子化が進んでおり、例えば、ヒトは800個余りのOR遺伝子を持っているが、その50%以上は偽遺伝子となっており、実際に機能しているものは約400個に過ぎない (Gilad et al. 2004)。また海棲哺乳類クジラやイルカなどでは、嗅覚は視覚だけでなく聴覚からも影響を受けることが示されている (Figure 5-3、B) (McGowen et al. 2008)。クジラやイルカの共通祖先であるセミクジラは、OR遺伝子の偽遺伝子化はその総数の30%に留まっているが、セミクジラから種分岐したクジラやイルカにおける偽遺伝子化は70-100%も進んでおり、ほとんど機能していないと考えられる。これは、クジラやイルカは音波を利用した反響定位の能力を発達させている代わりに嗅覚は退化してし

まったためと考えられる。そのため、クジラやイルカにおける嗅覚受容体遺伝子の偽遺伝子化が種分岐の過程で急速に進んだということが推測できる。嗅覚受容体遺伝子は生活環境だけでなく、感覚系にも影響され、凄まじい速さで分子進化を繰り返す遺伝子だと言える。

反芻動物であるウシやヤギ、そしてヒツジは鋭い嗅覚を持っており、自分の仔を匂いで嗅ぎ分けることや (Levy and Keller 2009)、捕食者の匂いを敏感に嗅ぎ取ることができる (Apfelbach et al. 2005)。しかし一方で、視覚を介した社会行動が高度に発達した動物でもあり、同じ群れの仲間の顔を覚えて強い絆を結ぶことや、相手の表情から感情を読み取ることさえ出来る (Tate et al. 2006)。これらのことから、ウシは嗅覚の機能を十分に残しつつも、嗅覚が果たす役割の一部は視覚からの情報によって代替していったのではないかということが推測できる。本研究では、V1R遺伝子がウシからヤギ・ヒツジへ種分岐してもなお高い類似性を持つことを示した。このようなV1Rは、視覚の情報よりも上位の情報伝達を担い、生存する上で何か重要な役割を持っているため、これまで保存されてきた可能性がある。その役割として可能性が高いものが、雄効果フェロモンの受容と考えられる。

5-3 2つの嗅覚システムにおけるフェロモン受容機構

かつて、哺乳類においてフェロモンは鋤鼻嗅覚系によってのみ受容されるものだと考えられてきた。しかし、このような考えは変わりつつある。主嗅覚系もまたフェロモンの受容に関わるということが言われるようになってきたのである。特に最近では、主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系の両方によって受容されるフェロモンの報告が相次いでいる。マウスのフェロモン候補物質2-heptanoneもその1つである。しかし、この2-heptanoneはマウスの鋤鼻器と嗅上皮ではそれぞれ異なるシグナル伝達系によって情報処理されるようである。これまでの遺伝子欠損マウスを用いた実験から、2-heptanoneは鋤鼻器ではGi2シグナル伝達系によって (Leypold et al. 2002)、嗅上皮ではGolfシグナル伝達系によって情報処理されることが示唆されている (Wang et al. 2006)。

本研究ではヤギV1R遺伝子群は全て嗅上皮と鋤鼻器の両方に発現していることを示した。ヤギV1R遺伝子は嗅上皮と鋤鼻器の両方においてGi2と共役して発現していることが明らかになっており (Wakabayashi et al. 2007)、本研究では更に、V1R-Gi2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を示した。つまり、V1Rがヤギのフェロモン受容体だとすると、ヤギはマウスとは異なり、嗅上皮と鋤鼻器のいずれにおいてもフェロモンの情報処理にVR-Gi2シグナル伝達系を使っていると考えられる。そして、その情報は中枢神経系における主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系へ伝達されている可能性が高い。このことは雄効果フェロモンの情報処理に中枢神経系における主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系の2つの嗅覚システムが関与するとの報告 (Gelez and Fabre-Nys 2006) と矛盾しない。すなわち、V1Rは嗅上皮または鋤鼻器で雄効果フェロモンを受容すると、いずれもGi2シグナル伝達系を介して、主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系へその情報を伝達するという受容機構が考えられる。

それでは、何故、フェロモンの受容に主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系という2つの嗅覚システムが用いられるのであろうか? その理由の1つとして、主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系はそれぞれ異なるフェロモン情報処理機構を持つ可能性があることが挙げられる。

最近になって、主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系の一次中枢神経系である主嗅球・副嗅球では系球体-二次ニューロンの結合様式が微妙に異なるということがわかってきた (Figure 5-4)。主嗅球では、1つの系球体へ同じ嗅覚受容体遺伝子を発現している嗅神経のみが集束しており、1つの系球体はその1種類の嗅覚受容体を表現している (Imai and Sakano 2007)。そして二次ニューロンである僧帽細胞はたった1つの系球体へ受容突起を伸ばしてシグナルを受け取っている。一方、副嗅球では、やはり1つの系球体へ同じ嗅覚受容体遺伝子を発現している鋤鼻神経のみが集束して、各々の系球体は1種類の嗅覚受容体を表現している。しかし、主嗅球と異なる点は、二次ニューロンである僧帽房飾細胞が、複数の系球体へ樹状突起を伸ばしてシグナルを受け取っているということである (Wagner et al. 2006)。副嗅球における系球体-二次ニューロンの結合様式には3種類あり、(1) 各々が同じ受容体遺伝子を表現している系球体へ二次ニューロンが樹状突起を伸ばしているもの (homotypic)、(2) 分子進化学的に近いサブファ

ミリーに属する嗅覚受容体遺伝子を表現している糸球体へ二次ニューロンが樹状突起を伸ばしているもの (**selective heterotypic**)、(3) 各々が全く異なる嗅覚受容体遺伝子を表現している糸球体へ二次ニューロンが樹状突起を伸ばしているもの (**random heterotypic**) がある。このような主嗅球と副嗅球で異なる糸球体-二次ニューロンの結合様式からは、嗅神経で受容されたフェロモンと鋤鼻神経で受容されたフェロモンは、主嗅球と副嗅球の段階で異なる情報処理が行われていることを思わせる。

また、主嗅球・副嗅球よりも更に高次の中樞神経系においても主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系は異なる神経回路を形成している (**Figure 5-4**)。古典的なトレーサー実験から、主嗅覚系は複数の神経核群が互いに相互リンクした複雑な神経回路をとっており、主嗅球から梨状葉や扁桃体を介して複数の経路に分岐しながら最終的には大脳皮質へ達することが明らかになっている (**Meredith 1998, Zelano and Sobel 2005**)。大脳皮質の中でも嗅覚系に深く関わる領域には、眼窩前頭皮質中央後部、眼窩前頭皮質外側後部、前頭前野眼窩皮質が考えられている (**Tanabe et al. 1975, Yarita et al. 1980, Anderson et al. 2003, de Araujo et al. 2005**)。無麻酔ザルの電気生理実験から、眼窩前頭皮質中央後部は、匂いに対して高い選択性を持っていることから匂いの識別機能を司ると考えられており (**Tanabe et al. 1975**)、眼窩前頭皮質外側後部は眼窩前頭皮質中央後部ほど匂いへの高選択性がないため詳細な機能は明らかではないが、匂いに対するイメージを統合的に構築する機能を持っているのではないかと考えられている (**Yarita et al. 1980**)。前頭前野眼窩皮質は前嗅索・梨状葉・扁桃体・嗅内皮質など複数の神経投射経路が存在するため、主嗅覚系の高次中枢神経系であると考えられている。また一方で、前頭前野眼窩皮質は嗅覚系以外にも視覚や味覚などの感覚神経からの入力をも受けているため、複数の感覚系を統合して記憶の形成や物の認識を行う場としても解釈されている。主嗅覚系は匂いの識別や記憶の形成を行い、更には他の感覚系と相互作用しながら匂いを意味付ける神経回路と言えよう。一方、鋤鼻嗅覚系は主嗅覚系よりも比較的単純な神経回路をとっており、副嗅球から扁桃体を介して分界条床核、視床下部へと直結している (**Scalia and Winans 1975, Meredith 1998, von Campenhausen and Mori 2000, Brennan and Kendrick 2006**)。視床下部は運動系を制御する脳部位への入力によ

って本能行動を支配し、また下垂体刺激ホルモンなどの神経内分泌系をも支配している。そのため、鋤鼻嗅覚系は視床下部を介して、動物の意識にのぼることなく、本能行動や内分泌に影響を及ぼす神経回路だと言える。

以上のように、主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系はそれぞれ異なる情報処理機構を持っている。フェロモンは繁殖や危機への回避など、受容した動物の内分泌や行動に影響を及ぼすものであり、その情報処理は正確に行われる必要がある。そのために2つの異なる情報処理機構を利用し、より精度の高いフェロモン情報処理を行っているのかもしれない。その可能性を示す例として、哺乳類の「フレーメン」という現象がある。フレーメンとは、頭を上げて唇を巻き上げる行動反応であり、特に異性の尿の匂いを嗅いだ際によく起こる。頭を上げて唇をまくり上げ、まるで笑っているような表情を浮かべることが特徴だが、これは頭を上げて唇で鼻を塞ぎ、鋤鼻器へフェロモンを送り込むためだと考えられている (Haupt 1991)。例えば、ウマでは、雄は雌の発情を調べるために雌に近づいて匂いを嗅ぎ、雌の尿を舐めてフレーメンを行う、という2段階の匂い嗅ぎ行動を経て性行動を起こす。このような一連の行動からは、雄はまず主嗅覚系によってフェロモンを感知し、鋤鼻嗅覚系によってフェロモンの詳細な情報処理を行い、本能行動が誘発されている印象を受ける。真相については明らかではないが、主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系によるフェロモン情報処理が異なるものであり、両方が存在することによってフェロモンが正しく認識されるということを考えさせ得る現象である。

5-4 畜産動物のフェロモン

トリュフはフランス料理の高級食材の一つである。その匂いは、欧米人には「マイルドで高貴な香り」と感じるが、日本人にとっては「ウニと海苔のような芳しくない匂い」と感じるものであるらしい。この奇妙な匂いには雌ブタを惹き付ける力があり、雌ブタは地中のトリュフの匂いを嗅ぎつけて掘り出すことに長けている。それは、トリュフの匂いに雄ブタが発するフェロモンと同じ分子、 5α -androst-16-en-3-oneが含まれているからである。 5α -androst-16-en-3-oneは発情した雌ブタへ、齧歯類ではロード

シスに相当する不動反応という姿勢を促すフェロモンである (Reed et al. 1974)。不動反応は雌ブタが発情しているのかどうかを判別する指標であるため、このフェロモンは発情を判別した上で人工授精する場合に大変便利である。

ブタのフェロモン 5α -androst-16-en-3-one は、畜産業で製品化・実用化されているフェロモンの中でも最も有名なものである。繁殖に関わるフェロモンは、畜産業において非常に有益であり、利用価値が高い。ブタ以外にも、畜産業で有用なフェロモンは複数存在する (Table 5-1)。例えば、性成熟の早期化を促すフェロモンは動物の生産効率を高めるし、雄効果に代表される繁殖機能の亢進や発情周期の同期化を促すフェロモンは人工授精の際に有用となる。

日本では、乳牛・肉牛の約90%が人工授精によって生産されている。人工授精を行う上で最も重要なのが、正確な発情排卵時間の把握あるいは発情周期の調節である。発情排卵時間の特定については、スタンディング発情（発情雌が雄の乗駕を許容する行動）以外に簡易で正確な技術は確立されていない。一方、発情周期の調節については、ホルモン製剤の一種である prostaglandin 製剤の効果が知られており、2週間間隔で2回雌ウシに投与すると約80%の雌の発情周期が同期化される。しかし、このようなホルモン処置以外に発情同期化を促すフェロモンを用いれば、より簡便な作業で済む。またフェロモンはホルモン製剤のように動物体内に蓄積されることがほとんどなく、食の安全面でも有益だと考えられる。

本研究では、反芻動物におけるフェロモン受容機構の解明を進める過程で、雄効果フェロモン受容体候補である VIR はヤギとヒツジだけでなく、ウシとも高い類似性を持つことを期せずして明らかにした。雄効果フェロモンはヤギ・ヒツジとの間だけでなく、ヤギとヒツジの近縁種であるウシへも作用する可能性が見出されたのである。ウシにも雄効果様のフェロモン現象が存在することから、これらの動物種のいずれかの雄効果フェロモンの同定に成功すれば、乳生産業・食肉生産業・羊毛生産業に関連する畜産業においての活用が大いに期待される。

5-5 本研究の意義

ここで、再びフェロモンの定義を繰り返したい。フェロモンとは、「同種の個体間で分泌・伝達され、それを受容した個体に特定の行動または生理反応を引き起こす化学物質」である (Karlson and Luscher 1959)。本研究は、ヤギとヒツジの間における「種を超えて作用する」フェロモン現象・雄効果に着目することから始まった。しかし、このような「種を超えて作用する」フェロモン現象は所謂フェロモンの定義に反する現象である。フェロモンの定義が提唱された時代は約半世紀前であり、フェロモンは昆虫の世界のみに存在するものであろう、と考えられていた嗅覚研究の黎明期でもある。しかし、現在では哺乳類の世界においてもフェロモンは確かに存在するということが示され、分子生物学的・分子進化学的・生理学的な分野において研究が進んでいる。今後、嗅覚の分子基盤や作用機序に関する研究が発展することによって、フェロモンの定義が変化する可能性は大いにあり得る。本研究結果は、従来のフェロモンの定義に囚われない、哺乳類の多様なフェロモン現象の一端を示すものと言える。

第二章 ヤギの雄効果フェロモン様活性物質は、雌ヒツジにも作用した。

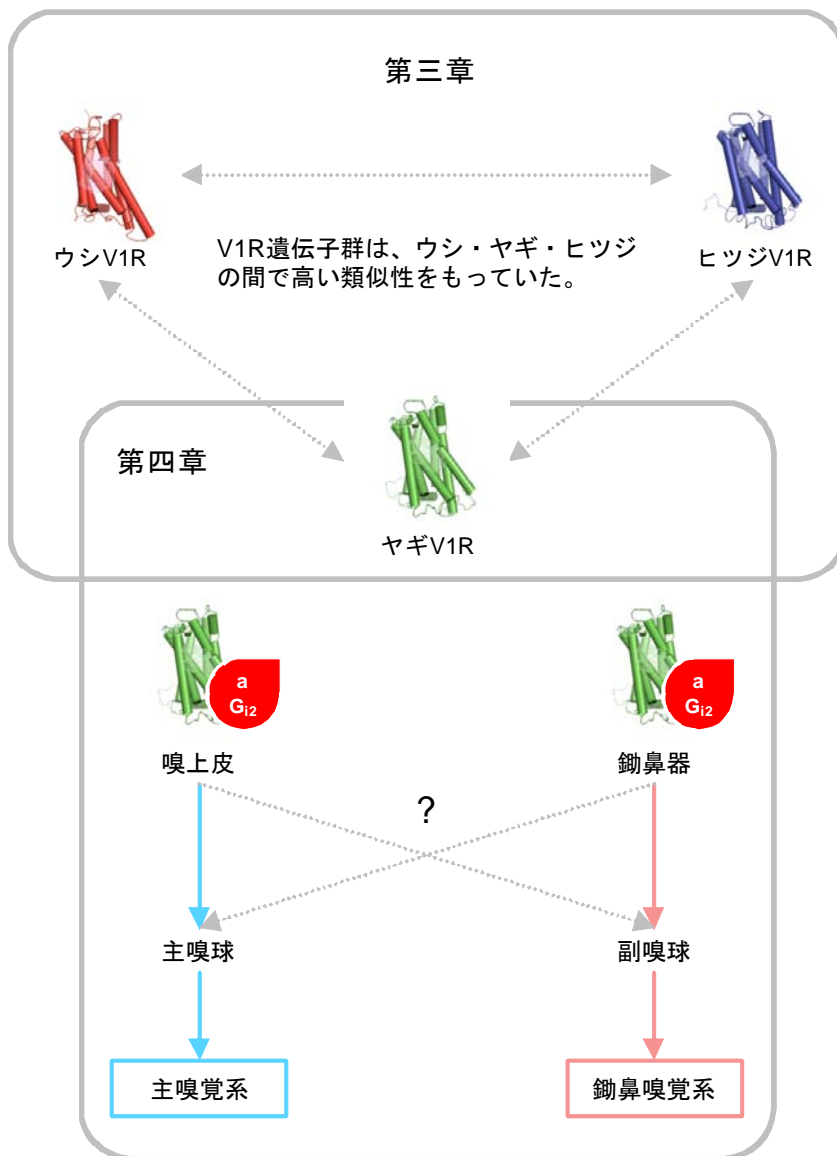


Figure 5-1 本研究結果の要約

第二章では、ヤギの雄効果フェロモン様活性物質が雌ヒツジへも作用することを確認し、この結果から1型鋤鼻嗅覚系受容体（vomeronasal type 1 receptor：V1R）が雄効果フェロモン受容体候補として考えられた。第三章では、ヤギとヒツジそしてウシにおけるV1R遺伝子群が非常に高い類似性を示すことを明らかにした。また、V1R遺伝子は嗅上皮と鋤鼻器の両方に発現していることを明らかにした。第四章では、V1R-Gi2発現ニューロンが主嗅球と副嗅球の両方へ軸索投射していることを明らかにした。

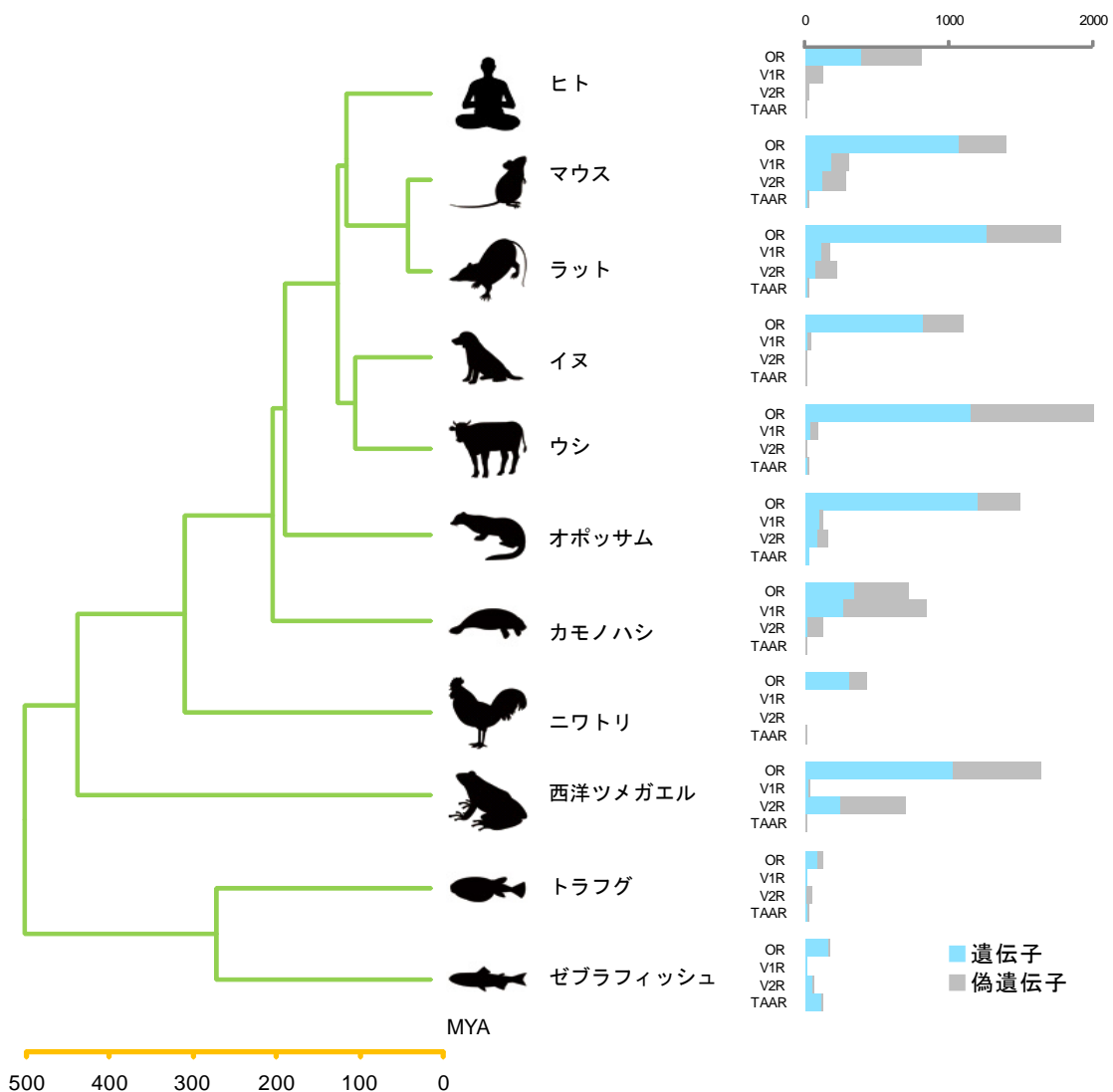


Figure 5-2 脊椎動物の嗅覚受容体遺伝子

水中から陸上へ生活圏を変えた動物種は、嗅覚受容体遺伝子ファミリーが爆発的に増加している。このことは水溶性化学物質だけでなく、揮発性化学物質を嗅覚情報として利用するよう環境に適応していった結果によるものと考えられている。

OR：匂い受容体 (olfactory receptor)、V1R：1型鋤鼻受容体 (vomeronasal type 1 receptor)、V2R：2型鋤鼻受容体 (vomeronasal type 2 receptor)、TAAR：痕跡アミン関連受容体 (trace amine-associated receptor)

(Nei et al. 2008 を改変)

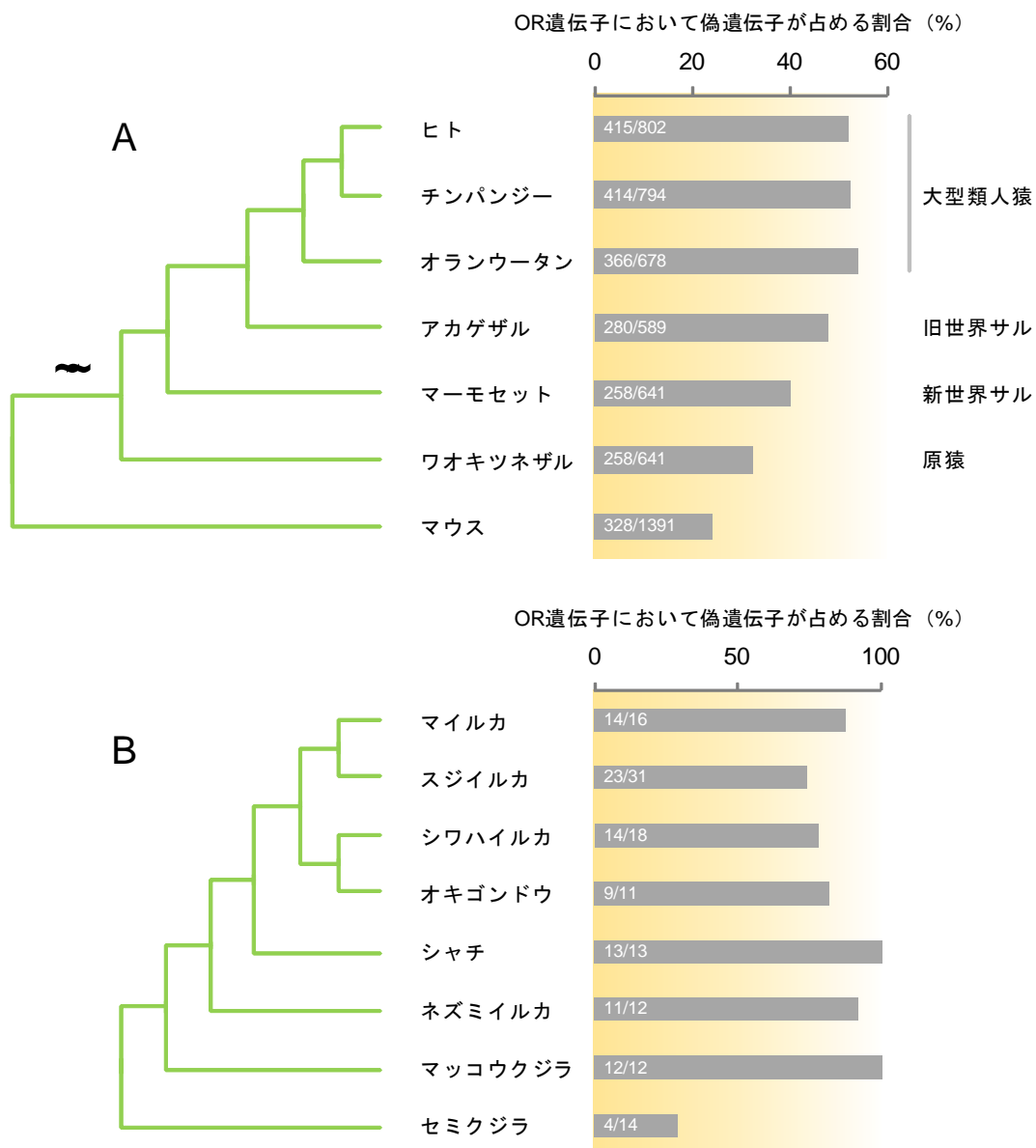


Figure 5-3 感覚系に影響を受ける OR 受容体遺伝子の偽遺伝子化

機能的な嗅覚受容体遺伝子は、視覚・嗅覚・味覚・聴覚・触覚のどの五感を優位に使うかによって容易に偽遺伝子化してしまうと考えられる。

A：空間認識・色彩感覚が優れている旧世界ザルや大型類人猿は、嗅覚をコミュニケーションとして用いる原猿・新世界ザルと比較して OR 遺伝子の偽遺伝子化が進んでいる。

(Gilad et al. 2004 を改変)

B：音波を利用した反響定位の能力を発達させているクジラやイルカは、共通祖先のセミクジラよりも OR 遺伝子の偽遺伝子化が進んでいる。

bar の数字は、OR 偽遺伝子/全 OR 遺伝子を示している。

(McGowen et al. 2008 を改変)

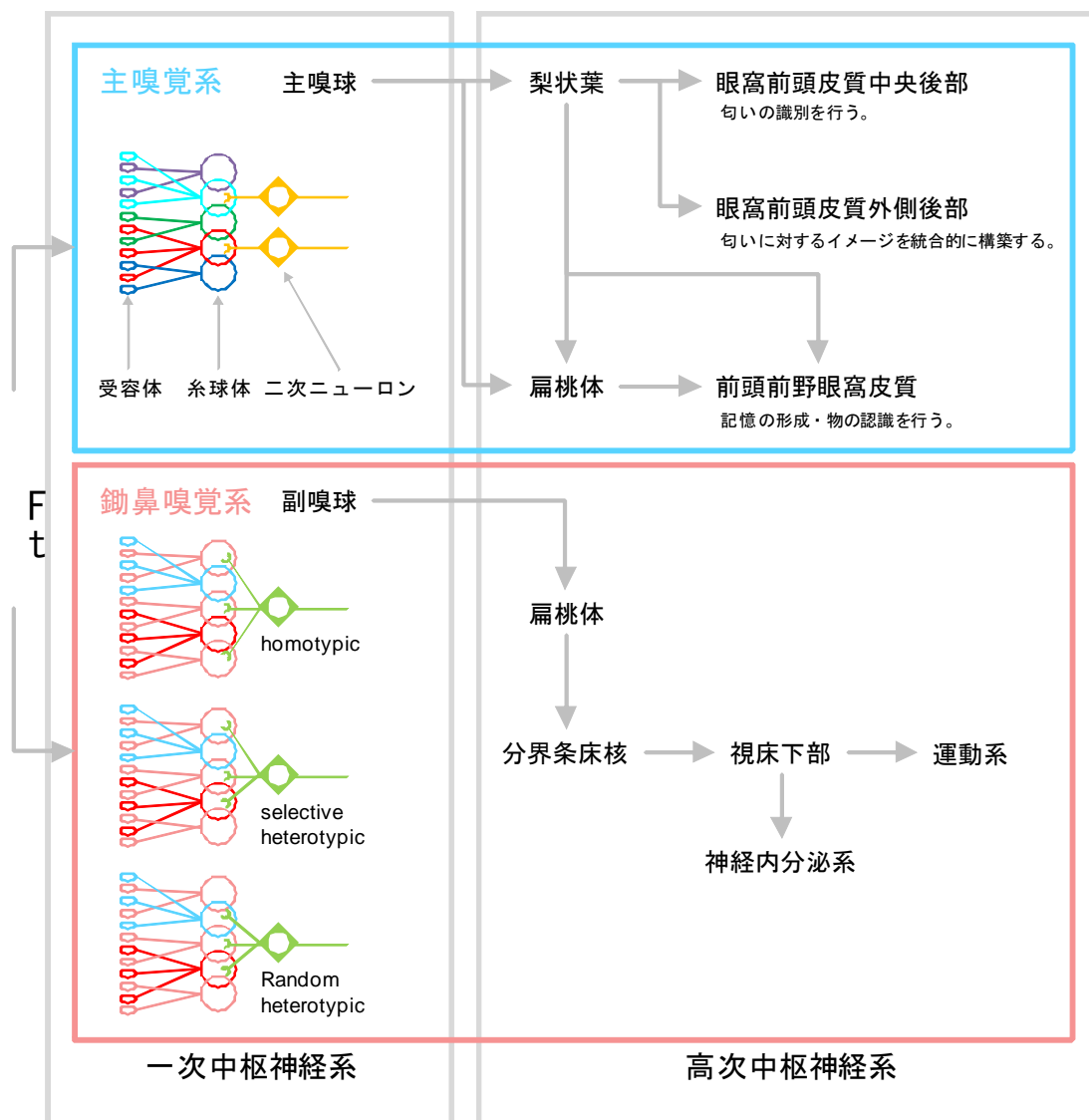


Figure 5-4 2つの嗅覚システムの一次中枢神経系と高次中枢神経系

主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系は、一次中枢神経系における系球体-二次ニューロン結合様式が異なる。主嗅球では1つの嗅覚受容体遺伝子を表現している1つの系球体へ二次ニューロンが樹状突起を伸ばしている。副嗅球では、(1) 1つの嗅覚受容体遺伝子を表現している複数の系球体へ二次ニューロンが受容突起を伸ばしているもの (homotypic)、(2) 分子進化学的に近いサブファミリーに属する嗅覚受容体遺伝子を表現している系球体へ二次ニューロンが樹状突起を伸ばしているもの (selective heterotypic)、(3) 各々が全く異なる嗅覚受容体遺伝子を表現している系球体へ二次ニューロンが樹状突起を伸ばしているもの (random heterotypic) がある。高次中枢神経系においても主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系は異なる神経回路を持っており、主嗅覚系は匂いの識別や記憶の形成、匂いの意味付けなどを行うのに対し、鋤鼻嗅覚系は視床下部を介して本能行動や内分泌反応を司る。雄効果フェロモンは、これら異なる2つの嗅覚システムを介して、高い精度で認識されると考えられる。

Table 5-1 畜産動物のフェロモン現象

(Rekwot et al. 2001)

生理作用	動物種	由来
雌の発情行動の強化	ブタ	成熟雄の唾液・尿
雌の性成熟の早期化	ブタ	成熟雄の存在
	ウシ	成熟雄の尿
	ヤギ	成熟雄の存在
	ヒツジ	成熟雄の皮膚・被毛
雌の繁殖機能の亢進	ウシ	成熟雄の尿
	ヤギ	成熟雄の皮膚・被毛
	ヒツジ	成熟雄の皮膚・被毛
雌の発情周期の同期化	ウシ	発情期雌の頸管粘液
	ヤギ	成熟雄の尿
	ヒツジ	成熟雄の皮膚・被毛

要旨

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た。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た。

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た。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た。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となる。

参考文献

- Amoore, J. E. 1963. Stereochemical theory of olfaction. *Nature* **198**:271-272.
- Anderson, A. K., K. Christoff, I. Stappen, D. Panitz, D. G. Ghahremani, G. Glover, J. D. Gabrieli, and N. Sobel. 2003. Dissociated neural representations of intensity and valence in human olfaction. *Nat Neurosci* **6**:196-202.
- Apfelbach, R., C. D. Blanchard, R. J. Blanchard, R. A. Hayes, and I. S. McGregor. 2005. The effects of predator odors in mammalian prey species: a review of field and laboratory studies. *Neurosci Biobehav Rev* **29**:1123-1144.
- Berghard, A., L. B. Buck, and E. R. Liman. 1996. Evidence for distinct signaling mechanisms in two mammalian olfactory sense organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:2365-2369.
- Boehm, U., Z. Zou, and L. B. Buck. 2005. Feedback loops link odor and pheromone signaling with reproduction. *Cell* **123**:683-695.
- Borowsky, B., N. Adham, K. A. Jones, R. Raddatz, R. Artymyshyn, K. L. Ogozalek, M. M. Durkin, P. P. Lakhani, J. A. Bonini, S. Pathirana, N. Boyle, X. Pu, E. Kouranova, H. Lichtblau, F. Y. Ochoa, T. A. Branchek, and C. Gerald. 2001. Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:8966-8971.
- Boschat, C., C. Pelofi, O. Randin, D. Roppolo, C. Luscher, M. C. Broillet, and I. Rodriguez. 2002. Pheromone detection mediated by a V1r vomeronasal receptor. *Nat Neurosci* **5**:1261-1262.
- Bowie, J. U., R. Luthy, and D. Eisenberg. 1991. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* **253**:164-170.
- Breer, H., J. Fleischer, and J. Strotmann. 2006. The sense of smell: multiple olfactory subsystems. *Cell Mol Life Sci* **63**:1465-1475.
- Brennan, P. A., and K. M. Kendrick. 2006. Mammalian social odours: attraction and individual recognition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**:2061-2078.
- Bruce, H. M. 1959. An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. *Nature* **184**:105.
- Buck, L., and R. Axel. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**:175-187.

- Cave, J. W., and H. Baker. 2009. Dopamine systems in the forebrain. *Adv Exp Med Biol* **651**:15-35.
- Chamero, P., T. F. Marton, D. W. Logan, K. Flanagan, J. R. Cruz, A. Saghatelian, B. F. Cravatt, and L. Stowers. 2007. Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature* **450**:899-902.
- Claus, R., R. Over, and M. Dehnhard. 1990. Effect of male odour on LH secretion and the induction of ovulation in seasonally anoestrous goats. *Anim Reprod Sci* **22**:27-38.
- de Araujo, I. E., E. T. Rolls, M. I. Velazco, C. Margot, and I. Cayeux. 2005. Cognitive modulation of olfactory processing. *Neuron* **46**:671-679.
- Del Punta, K., T. Leinders-Zufall, I. Rodriguez, D. Jukam, C. J. Wysocki, S. Ogawa, F. Zufall, and P. Mombaerts. 2002. Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. *Nature* **419**:70-74.
- Delgadillo, J. A., H. Gelez, R. Ungerfeld, P. A. Hawken, and G. B. Martin. 2009. The 'male effect' in sheep and goats--revisiting the dogmas. *Behav Brain Res* **200**:304-314.
- Dong, H. W., T. Heinbockel, K. A. Hamilton, A. Hayar, and M. Ennis. 2009. Metabotropic glutamate receptors and dendrodendritic synapses in the main olfactory bulb. *Ann N Y Acad Sci* **1170**:224-238.
- Dulac, C., and R. Axel. 1995. A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* **83**:195-206.
- Dulac, C., and A. T. Torello. 2003. Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nat Rev Neurosci* **4**:551-562.
- Eswar, N., D. Eramian, B. Webb, M. Y. Shen, and A. Sali. 2008. Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol* **426**:145-159.
- Farbman, A. I., and F. L. Margolis. 1980. Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. *Dev Biol* **74**:205-215.
- Finger, T. E., B. Bottger, A. Hansen, K. T. Anderson, H. Alimohammadi, and W. L. Silver. 2003. Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:8981-8986.

- Fleischer, J., K. Schwarzenbacher, S. Besser, N. Hass, and H. Breer. 2006. Olfactory receptors and signalling elements in the Grueneberg ganglion. *J Neurochem* **98**:543-554.
- Fleischer, J., K. Schwarzenbacher, and H. Breer. 2007. Expression of trace amine-associated receptors in the Grueneberg ganglion. *Chem Senses* **32**:623-631.
- Fulle, H. J., R. Vassar, D. C. Foster, R. B. Yang, R. Axel, and D. L. Garbers. 1995. A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:3571-3575.
- Fuss, S. H., M. Omura, and P. Mombaerts. 2005. The Grueneberg ganglion of the mouse projects axons to glomeruli in the olfactory bulb. *Eur J Neurosci* **22**:2649-2654.
- Gabellec, M. M., P. Panzanelli, M. Sassoe-Pognetto, and P. M. Lledo. 2007. Synapse-specific localization of vesicular glutamate transporters in the rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* **25**:1373-1383.
- Gelez, H., and C. Fabre-Nys. 2004. The "male effect" in sheep and goats: a review of the respective roles of the two olfactory systems. *Horm Behav* **46**:257-271.
- Gelez, H., and C. Fabre-Nys. 2006. Neural pathways involved in the endocrine response of anestrus ewes to the male or its odor. *Neuroscience* **140**:791-800.
- Gibson, A. D., and D. L. Garbers. 2000. Guanylyl cyclases as a family of putative odorant receptors. *Annu Rev Neurosci* **23**:417-439.
- Gilad, Y., M. Przeworski, and D. Lancet. 2004. Loss of olfactory receptor genes coincides with the acquisition of full trichromatic vision in primates. *PLoS Biol* **2**:E5.
- Ginalski, K., A. Elofsson, D. Fischer, and L. Rychlewski. 2003. 3D-Jury: a simple approach to improve protein structure predictions. *Bioinformatics* **19**:1015-1018.
- Gire, D. H., and N. E. Schoppa. 2009. Control of on/off glomerular signaling by a local GABAergic microcircuit in the olfactory bulb. *J Neurosci* **29**:13454-13464.
- Grus, W. E., P. Shi, Y. P. Zhang, and J. Zhang. 2005. Dramatic variation of the vomeronasal pheromone receptor gene repertoire among five orders of placental and marsupial mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:5767-5772.

- Grus, W. E., and J. Zhang. 2004. Rapid turnover and species-specificity of vomeronasal pheromone receptor genes in mice and rats. *Gene* **340**:303-312.
- Hamada, T., M. Nakajima, Y. Takeuchi, and Y. Mori. 1996. Pheromone-induced stimulation of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator in ovariectomized, estrogen-primed goats. *Neuroendocrinology* **64**:313-319.
- Herrada, G., and C. Dulac. 1997. A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell* **90**:763-773.
- Heymann, E. W. 2006. Scent marking strategies of New World primates. *Am J Primatol* **68**:650-661.
- Hoffman, G. E., and D. Lyo. 2002. Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'fos-ed out'? *J Neuroendocrinol* **14**:259-268.
- Houpt, K. A. 1991. Investigating equine ingestive, maternal, and sexual behavior in the field and in the laboratory. *J Anim Sci* **69**:4161-4166.
- Hu, J., C. Zhong, C. Ding, Q. Chi, A. Walz, P. Mombaerts, H. Matsunami, and M. Luo. 2007. Detection of near-atmospheric concentrations of CO₂ by an olfactory subsystem in the mouse. *Science* **317**:953-957.
- Ichimaru, T., K. Mogi, S. Ohkura, Y. Mori, and H. Okamura. 2007. Exposure to ram wool stimulates gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the female goat. *Anim Reprod Sci.*
- Imai, T., and H. Sakano. 2007. Roles of odorant receptors in projecting axons in the mouse olfactory system. *Curr Opin Neurobiol* **17**:507-515.
- Iwata, E., Y. Wakabayashi, Y. Kakuma, T. Kikusui, Y. Takeuchi, and Y. Mori. 2000. Testosterone-dependent primer pheromone production in the sebaceous gland of male goat. *Biol Reprod* **62**:806-810.
- Jacob, S., L. H. Kinnunen, J. Metz, M. Cooper, and M. K. McClintock. 2001. Sustained human chemosignal unconsciously alters brain function. *Neuroreport* **12**:2391-2394.
- Jansen, H. T., G. A. Iwamoto, and G. L. Jackson. 1998. Central connections of the ovine olfactory bulb formation identified using wheat germ agglutinin-conjugated horseradish peroxidase. *Brain Res Bull* **45**:27-39.

- Jia, C., and M. Halpern. 1996. Subclasses of vomeronasal receptor neurons: differential expression of G proteins (Gi alpha 2 and G(o alpha)) and segregated projections to the accessory olfactory bulb. *Brain Res* **719**:117-128.
- Juilfs, D. M., H. J. Fulle, A. Z. Zhao, M. D. Houslay, D. L. Garbers, and J. A. Beavo. 1997. A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:3388-3395.
- Kaluza, J. F., F. Gussing, S. Bohm, H. Breer, and J. Strotmann. 2004. Olfactory receptors in the mouse septal organ. *J Neurosci Res* **76**:442-452.
- Karlson, P., and M. Luscher. 1959. Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature* **183**:55-56.
- Kashiwayanagi, M., and K. Kurihara. 1985. Evidence for non-receptor odor discrimination using neuroblastoma cells as a model for olfactory cells. *Brain Res* **359**:97-103.
- Kaske, S., G. Krasteva, P. Konig, W. Kummer, T. Hofmann, T. Gudermann, and V. Chubanov. 2007. TRPM5, a taste-signaling transient receptor potential ion-channel, is a ubiquitous signaling component in chemosensory cells. *BMC Neurosci* **8**:49.
- Keller, M., S. Pierman, Q. Douhard, M. J. Baum, and J. Bakker. 2006. The vomeronasal organ is required for the expression of lordosis behaviour, but not sex discrimination in female mice. *Eur J Neurosci* **23**:521-530.
- Kikuyama, S., F. Toyoda, Y. Ohmiya, K. Matsuda, S. Tanaka, and H. Hayashi. 1995. Sodefrin: a female-attracting peptide pheromone in newt cloacal glands. *Science* **267**:1643-1645.
- Kimoto, H., S. Haga, K. Sato, and K. Touhara. 2005. Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature* **437**:898-901.
- Knobil, E. 1989. The electrophysiology of the GnRH pulse generator in the rhesus monkey. *J Steroid Biochem* **33**:669-671.
- Kurihara, K., and N. Koyama. 1972. High activity of adenyl cyclase in olfactory and gustatory organs. *Biochem Biophys Res Commun* **48**:30-34.

- Laurie, A. T., and R. M. Jackson. 2005. Q-SiteFinder: an energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites. *Bioinformatics* **21**:1908-1916.
- Leinders-Zufall, T., P. Brennan, P. Widmayer, P. C. S. A. Maul-Pavicic, M. Jager, X. H. Li, H. Breer, F. Zufall, and T. Boehm. 2004. MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science* **306**:1033-1037.
- Leinders-Zufall, T., R. E. Cockerham, S. Michalakis, M. Biel, D. L. Garbers, R. R. Reed, F. Zufall, and S. D. Munger. 2007. Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:14507-14512.
- Leinders-Zufall, T., A. P. Lane, A. C. Puche, W. Ma, M. V. Novotny, M. T. Shipley, and F. Zufall. 2000. Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature* **405**:792-796.
- Levai, O., T. Feistel, H. Breer, and J. Strotmann. 2006. Cells in the vomeronasal organ express odorant receptors but project to the accessory olfactory bulb. *J Comp Neurol* **498**:476-490.
- Levai, O., and J. Strotmann. 2003. Projection pattern of nerve fibers from the septal organ: DiI-tracing studies with transgenic OMP mice. *Histochem Cell Biol* **120**:483-492.
- Levy, F., and M. Keller. 2009. Olfactory mediation of maternal behavior in selected mammalian species. *Behav Brain Res* **200**:336-345.
- Leypold, B. G., C. R. Yu, T. Leinders-Zufall, M. M. Kim, F. Zufall, and R. Axel. 2002. Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:6376-6381.
- Liberles, S. D., and L. B. Buck. 2006. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature* **442**:645-650.
- Liberles, S. D., L. F. Horowitz, D. Kuang, J. J. Contos, K. L. Wilson, J. Siltberg-Liberles, D. A. Liberles, and L. B. Buck. 2009. Formyl peptide receptors are candidate chemosensory receptors in the vomeronasal organ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:9842-9847.
- Lin, D. Y., S. Z. Zhang, E. Block, and L. C. Katz. 2005. Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature* **434**:470-477.
- Lin, W., R. Margolskee, G. Donnert, S. W. Hell, and D. Restrepo. 2007. Olfactory neurons expressing

- transient receptor potential channel M5 (TRPM5) are involved in sensing semiochemicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:2471-2476.
- Lin, W., T. Ogura, R. F. Margolskee, T. E. Finger, and D. Restrepo. 2008. TRPM5-expressing solitary chemosensory cells respond to odorous irritants. *J Neurophysiol* **99**:1451-1460.
- Ma, M., X. Grosmaître, C. L. Iwema, H. Baker, C. A. Greer, and G. M. Shepherd. 2003. Olfactory signal transduction in the mouse septal organ. *J Neurosci* **23**:317-324.
- Malnic, B., J. Hirono, T. Sato, and L. B. Buck. 1999. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* **96**:713-723.
- Marshall, D. A., and J. A. Maruniak. 1986. Maser's organ responds to odorants. *Brain Res* **366**:329-332.
- Martin, G. B., and R. J. Scaramuzzi. 1983. The induction of oestrus and ovulation in seasonally anovular ewes by exposure to rams. *J Steroid Biochem* **19**:869-875.
- Matsunami, H., and L. B. Buck. 1997. A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell* **90**:775-784.
- McGowen, M. R., C. Clark, and J. Gatesy. 2008. The vestigial olfactory receptor subgenome of odontocete whales: phylogenetic congruence between gene-tree reconciliation and supermatrix methods. *Syst Biol* **57**:574-590.
- Melrose, D. R., H. C. Reed, and R. L. Patterson. 1971. Androgen steroids associated with boar odour as an aid to the detection of oestrus in pig artificial insemination. *Br Vet J* **127**:497-502.
- Meredith, M. 1998. Vomeronasal, olfactory, hormonal convergence in the brain. Cooperation or coincidence? *Ann N Y Acad Sci* **855**:349-361.
- Meurisse, M., E. Chaillou, and F. Levy. 2009. Afferent and efferent connections of the cortical and medial nuclei of the amygdala in sheep. *J Chem Neuroanat* **37**:87-97.
- Mombaerts, P. 2004. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nat Rev Neurosci* **5**:263-278.
- Mori, Y., and Y. Kano. 1984. Changes in plasma concentrations of LH, progesterone and oestradiol in relation to the occurrence of luteolysis, oestrus and time of ovulation in the Shiba goat (*Capra*

- hircus). *J Reprod Fertil* **72**:223-230.
- Mori, Y., M. Nishihara, T. Tanaka, T. Shimizu, M. Yamaguchi, Y. Takeuchi, and K. Hoshino. 1991. Chronic recording of electrophysiological manifestation of the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the goat. *Neuroendocrinology* **53**:392-395.
- Munger, S. D. 2009. Olfaction: Noses within noses. *Nature* **459**:521-522.
- Munger, S. D., T. Leinders-Zufall, and F. Zufall. 2009. Subsystem organization of the mammalian sense of smell. *Annu Rev Physiol* **71**:115-140.
- Murata, K., Y. Wakabayashi, M. Kitago, H. Ohara, H. Watanabe, S. Tamogami, Y. Warita, K. Yamagishi, M. Ichikawa, Y. Takeuchi, H. Okamura, and Y. Mori. 2009. Modulation of gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity by the pheromone in small ruminants. *J Neuroendocrinol* **21**:346-350.
- Murias, A. R., E. Weruaga, J. S. Recio, C. Airado, D. Diaz, and J. R. Alonso. 2007. Distribution of neurocalcin-containing neurons reveals sexual dimorphism in the mouse olfactory bulb. *Chem Senses* **32**:673-680.
- Nakamura, T., and G. H. Gold. 1987. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* **325**:442-444.
- Nei, M., Y. Niimura, and M. Nozawa. 2008. The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity. *Nat Rev Genet* **9**:951-963.
- Ohkura, S., T. Ichimaru, F. Itoh, S. Matsuyama, and H. Okamura. 2004. Further evidence for the role of glucose as a metabolic regulator of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in goats. *Endocrinology* **145**:3239-3246.
- Olender, T., D. Lancet, and D. W. Nebert. 2008. Update on the olfactory receptor (OR) gene superfamily. *Hum Genomics* **3**:87-97.
- Over, R., J. Cohen-Tannoudji, M. Dehnhard, R. Claus, and J. P. Signoret. 1990. Effect of pheromones from male goats on LH-secretion in anoestrous ewes. *Physiol Behav* **48**:665-668.
- Pace, U., E. Hanski, Y. Salomon, and D. Lancet. 1985. Odorant-sensitive adenylate cyclase may

- mediate olfactory reception. *Nature* **316**:255-258.
- Paxinos, G., and C. Watson. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 4. ed edition. Academic Press, London.
- Rasmussen, L. E., T. D. Lee, W. L. Roelofs, A. Zhang, and G. D. Daves, Jr. 1996. Insect pheromone in elephants. *Nature* **379**:684.
- Reed, H. C., D. R. Melrose, and R. L. Patterson. 1974. Androgen steroids as an aid to the detection of oestrus in pig artificial insemination. *Br Vet J* **130**:61-67.
- Rekwot, P. I., D. Ogwu, E. O. Oyedipe, and V. O. Sekoni. 2001. The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. *Anim Reprod Sci* **65**:157-170.
- Riviere, S., L. Challet, D. Fluegge, M. Spehr, and I. Rodriguez. 2009. Formyl peptide receptor-like proteins are a novel family of vomeronasal chemosensors. *Nature* **459**:574-577.
- Rodriguez, I. 2005. Remarkable diversity of mammalian pheromone receptor repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:6639-6640.
- Rodriguez, I., C. A. Greer, M. Y. Mok, and P. Mombaerts. 2000. A putative pheromone receptor gene expressed in human olfactory mucosa. *Nat Genet* **26**:18-19.
- Roppolo, D., V. Ribaud, V. P. Jungo, C. Luscher, and I. Rodriguez. 2006. Projection of the Gruneberg ganglion to the mouse olfactory bulb. *Eur J Neurosci* **23**:2887-2894.
- Ryba, N. J., and R. Tirindelli. 1997. A new multigene family of putative pheromone receptors. *Neuron* **19**:371-379.
- Sam, M., S. Vora, B. Malnic, W. Ma, M. V. Novotny, and L. B. Buck. 2001. Neuropharmacology. Odorants may arouse instinctive behaviours. *Nature* **412**:142.
- Scalia, F., and S. S. Winans. 1975. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol* **161**:31-55.
- Shi, P., and J. Zhang. 2007. Comparative genomic analysis identifies an evolutionary shift of vomeronasal receptor gene repertoires in the vertebrate transition from water to land. *Genome Res* **17**:166-174.
- Shirokova, E., J. D. Raguse, W. Meyerhof, and D. Krautwurst. 2008. The human vomeronasal type-1

- receptor family--detection of volatiles and cAMP signaling in HeLa/Olf cells. *Faseb J* **22**:1416-1425.
- Singer, A. G., W. C. Agosta, R. J. O'Connell, C. Pfaffmann, D. V. Bowen, and F. H. Field. 1976. Dimethyl disulfide: an attractant pheromone in hamster vaginal secretion. *Science* **191**:948-950.
- Sorensen, P. W., T. J. Hara, N. E. Stacey, and F. W. Goetz. 1988. F prostaglandins function as potent olfactory stimulants that comprise the postovulatory female sex pheromone in goldfish. *Biol Reprod* **39**:1039-1050.
- Stacey, N. E., P. W. Sorensen, G. J. Van der Kraak, and J. G. Dulka. 1989. Direct evidence that 17 alpha,20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one functions as a goldfish primer pheromone: preovulatory release is closely associated with male endocrine responses. *Gen Comp Endocrinol* **75**:62-70.
- Stowers, L., T. E. Holy, M. Meister, C. Dulac, and G. Koentges. 2002. Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* **295**:1493-1500.
- Sugiyama, T., and H. Sasada. 1988. Chemistry and biochemistry of unusual branched fatty acids with pheromonal activity from mature male goat. *Seikagaku* **60**:118-122.
- Takigami, S., Y. Mori, Y. Tanioka, and M. Ichikawa. 2004. Morphological evidence for two types of Mammalian vomeronasal system. *Chem Senses* **29**:301-310.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**:1596-1599.
- Tanabe, T., H. Yarita, M. Iino, Y. Ooshima, and S. F. Takagi. 1975. An olfactory projection area in orbitofrontal cortex of the monkey. *J Neurophysiol* **38**:1269-1283.
- Tate, A. J., H. Fischer, A. E. Leigh, and K. M. Kendrick. 2006. Behavioural and neurophysiological evidence for face identity and face emotion processing in animals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**:2155-2172.
- Thitaram, C., S. Chansitthiwet, P. Pongsopawijit, J. L. Brown, W. Wongkalasin, P. Daram, R. Roongsri, A. Kalmapijit, S. Mahasawangkul, S. Rojanasthien, B. Colenbrander, G. C. van der Weijden,

- and F. J. van Eerdenburg. 2009. Use of genital inspection and female urine tests to detect oestrus in captive Asian elephants. *Anim Reprod Sci* **115**:267-278.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, and D. G. Higgins. 2002. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics* **Chapter 2**:Unit 2 3.
- Tian, H., and M. Ma. 2004. Molecular organization of the olfactory septal organ. *J Neurosci* **24**:8383-8390.
- Touhara, K., S. Sengoku, K. Inaki, A. Tsuboi, J. Hirono, T. Sato, H. Sakano, and T. Haga. 1999. Functional identification and reconstitution of an odorant receptor in single olfactory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:4040-4045.
- Turin, L. 1996. A spectroscopic mechanism for primary olfactory reception. *Chem Senses* **21**:773-791.
- Venkatachalam, K., and C. Montell. 2007. TRP channels. *Annu Rev Biochem* **76**:387-417.
- von Campenhausen, H., and K. Mori. 2000. Convergence of segregated pheromonal pathways from the accessory olfactory bulb to the cortex in the mouse. *Eur J Neurosci* **12**:33-46.
- Wabnitz, P. A., J. H. Bowie, M. J. Tyler, J. C. Wallace, and B. P. Smith. 1999. Aquatic sex pheromone from a male tree frog. *Nature* **401**:444-445.
- Wagner, S., A. L. Gresser, A. T. Torello, and C. Dulac. 2006. A multireceptor genetic approach uncovers an ordered integration of VNO sensory inputs in the accessory olfactory bulb. *Neuron* **50**:697-709.
- Wakabayashi, Y., Y. Mori, M. Ichikawa, K. Yazaki, and K. Hagino-Yamagishi. 2002. A putative pheromone receptor gene is expressed in two distinct olfactory organs in goats. *Chem Senses* **27**:207-213.
- Wakabayashi, Y., S. Ohkura, H. Okamura, Y. Mori, and M. Ichikawa. 2007. Expression of a vomeronasal receptor gene (V1r) and G protein alpha subunits in goat, *Capra hircus*, olfactory receptor neurons. *J Comp Neurol* **503**:371-380.
- Walz, A., P. Feinstein, M. Khan, and P. Mombaerts. 2007. Axonal wiring of guanylate cyclase-D-expressing olfactory neurons is dependent on neuropilin 2 and semaphorin 3F. *Development* **134**:4063-4072.

- Wang, Z., C. Balet Sindreu, V. Li, A. Nudelman, G. C. Chan, and D. R. Storm. 2006. Pheromone detection in male mice depends on signaling through the type 3 adenylyl cyclase in the main olfactory epithelium. *J Neurosci* **26**:7375-7379.
- Wetzel, C. H., M. Oles, C. Wellerdieck, M. Kuczkowiak, G. Gisselmann, and H. Hatt. 1999. Specificity and sensitivity of a human olfactory receptor functionally expressed in human embryonic kidney 293 cells and *Xenopus Laevis* oocytes. *J Neurosci* **19**:7426-7433.
- Whitten, W. K. 1956. Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. *J Endocrinol* **13**:399-404.
- Wilson, E. O., and W. H. Bossert. 1963. Chemical Communication among Animals. *Recent Prog Horm Res* **19**:673-716.
- Wyart, C., W. W. Webster, J. H. Chen, S. R. Wilson, A. McClary, R. M. Khan, and N. Sobel. 2007. Smelling a single component of male sweat alters levels of cortisol in women. *J Neurosci* **27**:1261-1265.
- Wyatt, T. D. 2009. Fifty years of pheromones. *Nature* **457**:262-263.
- Wysocki, C. J., and J. J. Lepri. 1991. Consequences of removing the vomeronasal organ. *J Steroid Biochem Mol Biol* **39**:661-669.
- Yarita, H., M. Iino, T. Tanabe, S. Kogure, and S. F. Takagi. 1980. A transthalamic olfactory pathway to orbitofrontal cortex in the monkey. *J Neurophysiol* **43**:69-85.
- Yoon, H., L. W. Enquist, and C. Dulac. 2005. Olfactory inputs to hypothalamic neurons controlling reproduction and fertility. *Cell* **123**:669-682.
- Young, J. M., and B. J. Trask. 2007. V2R gene families degenerated in primates, dog and cow, but expanded in opossum. *Trends Genet* **23**:212-215.
- Young, J. M., H. Waters, C. Dong, H. J. Fulle, and E. R. Liman. 2007. Degeneration of the olfactory guanylyl cyclase D gene during primate evolution. *PLoS One* **2**:e884.
- Zelano, C., and N. Sobel. 2005. Humans as an animal model for systems-level organization of olfaction. *Neuron* **48**:431-454.
- Zhang, X., and S. Firestein. 2002. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat Neurosci*

5:124-133.

Zhang, X., and S. Firestein. 2007. Comparative genomics of odorant and pheromone receptor genes in rodents. *Genomics* **89**:441-450.

Zhao, H., L. Ivic, J. M. Otaki, M. Hashimoto, K. Mikoshiba, and S. Firestein. 1998. Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science* **279**:237-242.

Zuccolilli, G. O., S. Hayashi, and Y. Mori. 1995. Hypothalamic structures of the goat on stereotaxic coordinates. *J Vet Med Sci* **57**:459-467.

Zuccolilli, G. O., and Y. Mori. 1995. Cranial and cerebral-ventricular landmarks for accurate stereotaxic approach to hypothalamic nuclei in the goat brain. *J Vet Med Sci* **57**:453-457.

Zufall, F., and T. Leinders-Zufall. 2007. Mammalian pheromone sensing. *Curr Opin Neurobiol* **17**:483-489.

謝辞

本研究の遂行と本論文の執筆にあたり、御指導、御鞭撻を賜りました本学農学生命科学研究科 森 裕司教授に心から感謝申し上げます。また、(財)東京都臨床医学総合研究所 山岸公子先生には、実験の遂行および投稿論文、学会発表等、終始御指導頂きました。謹んで感謝致します。

本学農学生命科学研究科 武内ゆかり准教授には、本研究の遂行にあたり、御指導頂いたことに深く感謝致します。

本論文を御査読下さいました、本学農学生命科学研究科 西原真杉教授、山内啓太郎准教授、桑原正貴准教授に御礼申し上げます。

(独)農業生物資源研究所 岡村裕昭先生には、本研究の遂行にあたり、実験動物の入手をはじめ、御指導頂いたことに深く感謝致します。

東京工業大学大学院生命理工学研究科 岡田典弘教授、二階堂雅人助教には、本研究の遂行および投稿論文の執筆にあたり、御指導頂いたことに深く感謝致します。

(財)東京都神経医学総合研究所基盤技術部門 市川真澄先生、守屋敬子博士、安食京子さんには、本研究の遂行にあたり、御指導頂いたことに深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、御助言ならびに御指導を頂いた、伊藤敦子博士、麻布大学動物応用科学科 茂木一孝講師に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、(財)東京都臨床医学総合研究所、(独)農業生物資源研究所、(財)東京都神経医学総合研究所、ならびに本学獣医動物行動学研究室の皆様には多大な御協力を頂きました。深く感謝致します。

大原 海