

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成27年4月28日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2014

課題番号：21228006

研究課題名(和文) 哺乳類フェロモンによる生理機能および行動の制御法開発

研究課題名(英文) Control of physiological function and behavior  
by mammalian pheromones

研究代表者

森 裕司 (Mori, Yuji)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：40157871

交付決定額(研究期間全体)(直接経費)：157,800,000円

研究成果の概要(和文)：動物におけるフェロモンの作用は強力で、受け取った個体の脳機能に大きな影響を与え行動や生理状態を変える。しかし哺乳類のフェロモンについては未だに多くの謎が残されている。本研究では、ヤギの雄効果フェロモンの主要成分が4-ethyloctanalであること、ラットの警報フェロモンが4-methylpentanalとhexanalという2種の混合物であり、それぞれの成分が鋤鼻系と主嗅覚系を経由して受容されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

Pheromones have powerful effects on animals, inducing specific behaviors or physiological changes to the recipient through brain function. In mammals, pheromones that regulate physiology have yet to be identified conclusively, and their mechanism of action is almost completely unknown. In this study, we identified a volatile molecule, 4-ethyloctanal, as a “male effect” pheromone that activates the central regulator of reproduction in female goats, and a mixture of 4-methylpentanal and hexanal as an alarm pheromone that increases anxiety in other rats. We also found that 4-methylpentanal and hexanal might be detected via the vomeronasal system and via the main olfactory system, respectively.

研究分野：農学

キーワード：機能性物質

## 1. 研究開始当初の背景

雄効果とは小型の反芻動物(ヤギやヒツジ)でみられる強力なフェロモン作用で、非繁殖期の雌は、雄が放出するわずかなフェロモンを嗅いただけで排卵する。フェロモンの作用機序が、視床下部の生殖内分泌中枢であることは知られていたものの、リガンド分子は不明であった。一方、警報フェロモンは不安・恐怖といった情動反応を引き起こす物質であり、様々な動物種で存在は知られていたが、同様にリガンド分子は全く不明であった。哺乳類では、リリーサーフェロモン(行動を誘発)についての報告は散見されるものの、本研究で同定に取り組むプライマーフェロモン(神経内分泌反応を誘発)の化学構造については決定的な研究報告は皆無であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず雄効果フェロモンと警報フェロモンそれぞれのリガンド分子を単離

精製し、化学構造の決定を目指した。さらにリガンド分子と特異的に結合する受容体を同定し、フェロモン感受器である鋤鼻器から標的部位である視床下部辺縁系の弓状核(雄効果)および分界条床核(警報反応)を結ぶ神経回路の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

いずれのフェロモンも揮発性の低分子化合物であることが想定されたので、候補分子の分析はGCMSにより行い、新奇化合物については全て化学合成することで入手し、フェロモン活性の評価を単品もしくは混合物として行った。バイオアッセイは、雄効果フェロモンについては視床下部 GnRH パルスジェネレーター(ニューロン)の活動を多ニューロン発射活動(MUA)としてリアルタイム観察することで、性腺刺激効果を評価した。また警報フェロモンについては聴覚性驚愕反射を利用して不安増大効果を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヤギにおける雄効果フェロモンの同定と神経回路の解明

フェロモン分子の同定に向けて、まずフェロモン分子の揮発性を確認した。その結果、雌ヤギが雄ヤギの被毛に直接触れなくても MUA ボレーが誘起されたことから、雄効果フェロモンは揮発性分子であることが明らかとなった。そこで、幅広い揮発性物質を回収できる吸着剤 (Tenax) を皮膚から数 cm 離して維持しておくことのできる帽子を開発し、それを雄ヤギに 1 週間かぶせておくことで、頭部の皮膚より放出される揮発性物質だけを吸着剤に捕捉した。この吸着剤の内容物から、特に揮発性の高い化学物質が数多く含まれると考えられる 1 画分を抽出し雌ヤギに呈示したところ MUA ボレーが誘起されたことから、この画分にフェロモン分子が含まれていることが明らかとなった。我々の先行研究により雄ヤギ被毛に含まれる酸性の物質と中性の物質が MUA ボレーを誘起することが明らかとなっており、また酸性の物質に着目した他の研究グループによる先行研究ではフェロモン分子の同定には至らなかったことから、MUA ボレーを誘起した画分に含まれる中性の物質に着目することとした。その結果、エチル基を持つアルデヒドやケトン、ジケトンなど 18 物質が画分の中から同定された。次にこの 18 物質を化学合成し、雄ヤギの被毛に含まれる含有率を模して混ぜ合わせたカクテルを作製して雌ヤギに呈示したところ、MUA ボレーが誘起されたこと (図 1A) から、フェロモン分子をこの 18 物質に絞り込

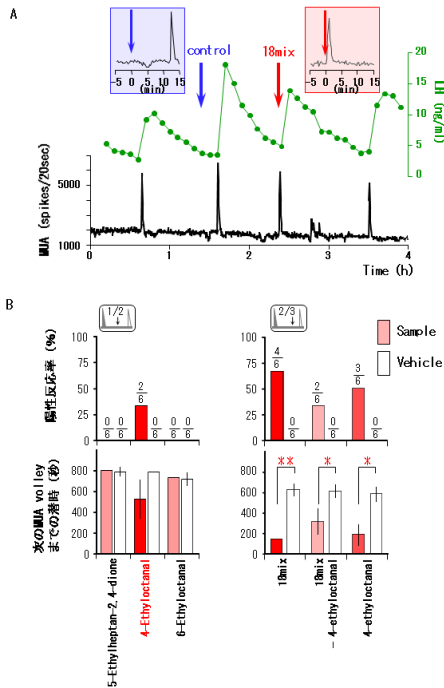


図 1 MUA ボレーを指標とした雄効果フェロモンの同定  
A: MUA ボレー周期の中間で 18 成分カクテルを呈示すると、直ちに MUA ボレー (GnRH のパルス分泌) が誘起され、下垂体より LH (黄体形成ホルモン) が追隨して分泌された。B: 厳しい呈示条件下 (ボレー間隔の 1/2 で呈示) では 4-ethyloctanal のみが MUA ボレーを誘起し、やや緩い条件下 (ボレー間隔の 2/3 で呈示) では 18 物質から 4-ethyloctanal を除くと MUA ボレーを誘起する効力が低下した。

むことができた。また、雄ヤギを去勢するとフェロモンが産生されなくなることが明らかとなっていることから、18 物質のうち去勢ヤギではその放出量が少なくなる物質に着目したところ、エチル基を持つ 7 物質へと候補分子を絞り込むことができた。この 7 物質がそれぞれ単独で MUA ボレーを誘起する効果を持つかを検討した結果、4-ethyloctanal だけ 1 つのみが MUA ボレーを誘起することや、また 18 物質から 4-ethyloctanal を除くと MUA ボレーを誘起する効力が低下することなどが明らかとなった (図 1B)。これらの結果より、4-ethyloctanal が雄効果フェロモンの主要分子であることが示唆された。

図 2 にはこれまでの研究より推察される雄効果フェロモンの受容・神経機構を示した。雄効果フェロモンは鋤鼻系および主嗅覚系の両方のシステムを経由して扁桃体に伝えられ、さらに弓状核に存在する GnRH パルスジェネレーターを刺激して GnRH の神経分泌とその下流にある下垂体前葉の LH 分泌を促し、フェロモン作用をもたらすと推測される。



図 2 雄効果フェロモンの想定神経回路

こうした神経機構は哺乳類を通じて普遍性が高いと考えられるので、今後の成果が期待される。

##### (2) ラットにおける警報フェロモンの同定と神経回路の解明

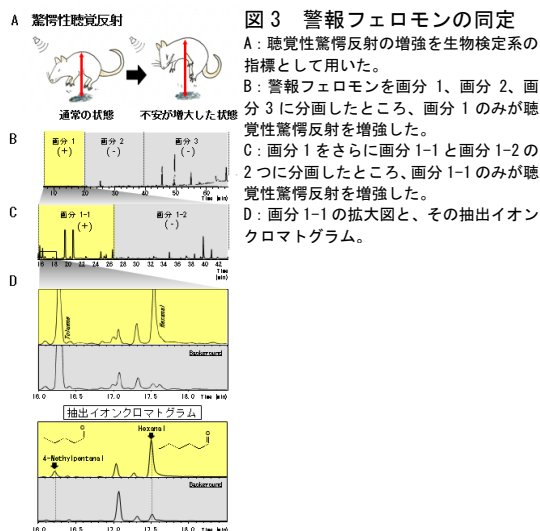
電気ショックを負荷できる実験箱を用意し、そこに警報フェロモンを放出させるために雄ラットを 2 頭導入した (ドナー動物)。電気ショックを負荷した後にドナーを取り出し、実験箱を異なる部屋へと運び、新たに別の雄ラットを導入した (レシピエント動物)。レシピエントにとって実験箱は新奇環境であるため、導入されるとストレス反応として一過性の体温上昇を示すが、事前にドナーが電気ショックを受けた実験箱に導入された場合には、この反応が増強されることが明らかとなった。そのため、ドナーは電気ショックを受けると警報フェロモンを放出し、それはレシピエントの自律機能反応を増強することが明らかとなった。

レシピエントの自律機能反応を指標として用いて、警報フェロモンに関する解析を進めた結果、麻酔下ドナーの肛門周囲部の皮下に刺した 2 本の針を通じて局部電気刺激を行い人工的に筋肉の収縮を引き起こすことで、肛

門周囲腺からフェロモンを自在に放出させられることが明らかとなった。また警報フェロモンを水のなかに捕捉する方法も確立できた。この警報フェロモン含有水を用いて、その効果を様々な実験系において検討した結果、警報フェロモンは直接的に自律機能反応を増強するのではなく、レシピエントの不安を増大させることで、実験系に応じた様々な反応を誘発することが明らかとなった。すなわち、これまで観察された自律機能反応の増強は、不安の増大による2次的な反応のひとつであることが判明した。そのため警報フェロモンは、レシピエントの不安を増大することが推察された。

レシピエントがフェロモンに対して示す反応のなかで、最も簡便に測定可能な反応である聴覚性驚愕反射の増強を、生物検定の指標として用いることとした。動物は突然大きな音を聞くと、全身の筋肉が硬直して飛び上がる驚愕反射を示すが、この反射の強度は動物の不安と関連していることが知られている。すなわち、不安が増大すると驚愕反射の強度が増すのである (図 3A)。

フェロモン分子の同定に向けてまず、フェロモン分子の揮発性を検討した。その結果、レシピエントは警報フェロモン含有水に直接接触しなくても驚愕反射の増強を示したことから、フェロモンは揮発性であることが確認された。そこで麻酔下ドナーの肛門周囲部から放出させた揮発性物質を吸着剤 (Tenax) が充填されたガラス管に吸い込むことで捕捉し、吸着剤の内容物を画分 1、画分 2、画分 3 の 3 つに分画した。その結果、画分 1 のみが聴覚性驚愕反射を増強したことから、この画分にフェロモン分子が含まれていることが判明した (図 3B)。画分 1 をさらに画分 1-1 と画分 1-2 の 2 つに分画したところ、画分 1-1 のみが聴覚性驚愕反射を増強したため、この画分にフェロモン分子が含まれていることが明らかとなった (図 3C)。この画分 1-1 に含まれる物質を精査したところ、フェロモンが存在するサンプルには 4-methylpentanal が存在し、hexanal の含有



量が増加することが明らかとなったため、この 2 つの物質がフェロモン分子の有力候補と考えられた (図 3D)。

次に、化学合成された 2 つの物質を用いて、これらがフェロモン分子であるかということについて検討した。その結果、それぞれの物質を単独で呈示した場合には驚愕反射を増強しないものの、2 物質を混合物として呈示した場合には驚愕反射を増強することが判明した。また、この 2 種混合物は非常に微量で効果を発揮することや、肛門周囲腺より放出される警報フェロモンと同じタイプの不安を増大することが薬理学的研究により明らかとなった。さらにこの 2 種混合物は、聴覚性驚愕反射とは異なる試験においても不安の増大を示唆する反応を引き起こすことが確認されたことから、4-methylpentanal と hexanal の 2 種混合物がフェロモン分子であることが明らかとなった。

図 4 にはこれまでの研究より推察されるラットの警報フェロモンの受容・神経機構を示した。4-methylpentanal は鋤鼻上皮に存在する鋤鼻受容体 (V1R) によって、hexanal は嗅上皮に存在する嗅覚受容体によってそれぞれ受容され、分界条床核にて統合されてフェロモン作用をもたらすと推測される。

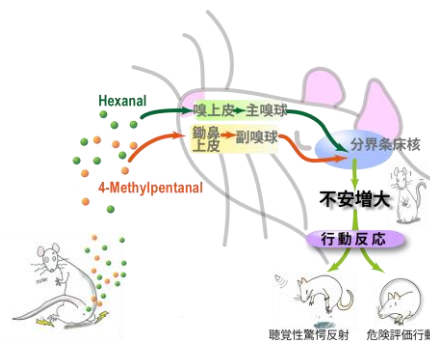


図 4 警報フェロモンの想定神経回路

主嗅覚系と鋤鼻系にてそれぞれ受容された情報が脳内で統合され、不安が増大する。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 29 件)

- ① Murata K., Tamogami S., Itou M., Ohkubo Y., Wakabayashi Y., Watanabe H., Okamura H., Takeuchi Y., Mori Y. (2014) Identification of an olfactory signal molecule that activates the central regulator of reproduction in goats. *Curr Biol* 24: 681-686. 査読有, DOI: 10.1016/j.cub.2014.01.073.
- ② Inagaki H., Kiyokawa Y., Tamogami S., Watanabe H., Takeuchi Y., Mori Y. (2014) Identification of a pheromone that increases anxiety in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 18751-18756. 査読有, DOI: 10.1073/pnas.1414710112.

- ③ Sakamoto K., Wakabayashi Y., Yamamura T., Tanaka T., Takeuchi Y., Mori Y., Okamura H. (2013) A population of kisspeptin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus may be the central target of the male effect phenomenon in goats. *PLoS One* 8: e81017. 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0081017.
- ④ Kiyokawa Y., Kodama Y., Kubota T., Takeuchi Y., Mori Y. (2013) Alarm pheromone is detected by the vomeronasal organ in male rats. *Chem Senses* 38: 661-668. 査読有, DOI: 10.1093/chemse/bjt030.
- ⑤ Matsuyama S., Ohkura S., Mogi K., Wakabayashi Y., Mori Y., Tsukamura H., Maeda K., Ichikawa M., Okamura H. (2011) Morphological evidence for direct interaction between kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone neurons at the median eminence of the male goat: an immunoelectron microscopic study. *Neuroendocrinology* 94: 323-332. 査読有, DOI: 10.1159/000331576.
- ⑥ Wakabayashi Y., Nakada T., Murata K., Ohkura S., Mogi K., Navarro V.M., Clifton D.K., Mori Y., Tsukamura H., Maeda K., Steiner R.A., Okamura H. (2010) Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci* 30: 3124-3132. 査読有, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5848-09.2010.
- ⑦ Okamura H., Murata K., Sakamoto K., Wakabayashi Y., Ohkura S., Takeuchi Y., Mori Y. (2010) Male effect pheromone tickles the gonadotrophin-releasing hormone pulse generator. *J Neuroendocrinol* 22: 825-832. 査読有, DOI: 10.1111/j.1365-2826.2010.02037.x.
- ⑧ Ohkura S., Takase K., Matsuyama S., Mogi K., Ichimaru T., Wakabayashi Y., Uenoyama Y., Mori Y., Steiner R.A., Tsukamura H., Maeda K.I., Okamura H. (2009) Gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity in the hypothalamus of the goat. *J Neuroendocrinol* 21: 813-821. 査読有, DOI: 10.1111/j.1365-2826.2009.01909.x.
- ⑨ Murata K., Wakabayashi Y., Kitago M., Ohara H., Watanabe H., Tamogami S., Warita Y., Yamagishi K., Ichikawa M., Takeuchi Y., Okamura H., Mori Y. (2009) Modulation of GnRH pulse generator activity by the pheromone in small ruminants. *J Neuroendocrinol* 21: 346-350. 査読有, DOI: 10.1111/j.1365-2826.2009.01836.x.
- [学会発表] (計52件)
- ① Kiyokawa Y., Inagaki H., Takeuchi Y., Mori Y. (2014.06.13). An alarm pheromone in rats. The 23rd Annual Meeting of the International Behavioral Neuroscience Society. Las Vegas (USA).
- ② 六山寛美, 稲垣秀晃, 清川泰志, 武内ゆかり, 森裕司. (2012.09.15). ラット警報フェロモンが超音波発声に与える影響. 第154回日本獣医学会学術集会, 岩手大学(岩手県・盛岡市).
- ③ Kiyokawa Y., Takahashi Y., Takeuchi Y., Mori Y. (2012.06.07). Appeasing pheromone mediates social buffering of conditioned fear responses. The 21th Annual Meeting of the International Behavioral Neuroscience Society. Kailua-Kona (USA).
- ④ Kobayashi T., Kiyokawa Y., Takeuchi Y., Mori Y. (2011.5.24-29). Alarm pheromone suppresses sexual behavior in male rats. The 20th Annual Meeting of the International Behavioral Neuroscience Society. Steamboat springs (USA).
- ⑤ 武内ゆかり, 森裕司, 渡邊秀典. (2010, 3.30). 哺乳類プライマーフェロモン分子の単離精製に関する共同研究. 日本農芸化学会2010年度大会, 東京大学駒場キャンパス(東京都・目黒区)
- ⑥ Wakabayashi Y., Sakamoto K., Murata K., Honma T., Ohkura S., Takeuchi Y., Mori Y., Okamura H. (2010, 7.14). A possible role of neurokinin B in the stimulatory action of the male pheromone on the GnRH pulse generator. The 7th International Congress of Neuroendocrinology, Rouen (France).
- ⑦ Murata K., Wakabayashi Y., Sakamoto K., Honma T., Tanaka T., Takeuchi Y., Mori Y., Okamura H. (2010, 7.14). Analysis of the male pheromone action on kisspeptin neurons in the arcuate nucleus in goats. The 7th International Congress of Neuroendocrinology, Rouen (France).
- ⑧ Mori Y., Takeuchi Y., Okamura H. (2010, 7.14). Male effect pheromone tickles GnRH pulse generator. The 7th International Congress of Neuroendocrinology, Rouen (France).

- ⑨ Mori Y. (2009.7.3-4). Pheromonal modulation of GnRH pulse generator activity in small ruminants. 1st International Symposium on Ecological Volatiles, 東京大学弥生講堂 (東京都・文京区)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：臭気性組成物

発明者：森裕司, 武内ゆかり, 清川泰志, 稲垣秀晃, 渡邊秀典

権利者：同上

種類：特許

番号：出願 2014-209897

出願年月日：平成 26 年 10 月 14 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/koudou/j-pheromone.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

◎森 裕司 (Mori, Yuji)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授  
研究者番号：40157871

### (2) 研究分担者

◎武内 ゆかり (Takeuchi, Yukari)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：10240730

### (3) 連携研究者

◎渡邊 秀典 (Watanebe, Hidenori)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授  
研究者番号：00202416

◎岡村 裕昭 (Okamura, Hiroaki)

(独) 農業生物資源研究所・ユニット長  
研究者番号：60213972

◎山岸 公子 (Yamagishi, Kimiko)

(財) 東京都医学総合研究所・主任研究員  
(H21~23 年度)

研究者番号：20200602

◎高橋 伸一郎 (Takahashi, Shin-ichirou)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：00197146

◎市川 真澄 (Ichikawa, Masumi)

(H21~23 年度)

(財) 東京都医学総合研究所・副参事研究員  
研究者番号：20124414

◎椛 秀人 (Kaba, Hideto)

高知大学・医学部・教授

研究者番号：50136371

◎谷口 睦男 (Taniguchi, Mutsuo)

高知大学・医学部・助教

研究者番号：10304677

◎若林 嘉浩 (Wakabayashi, Yoshihiro)

(独) 農業生物資源研究所・研究員

研究者番号：00510695

◎清川 泰志 (Kiyokawa, Yasushi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教  
研究者番号：70554484

(H22~26 年度)