

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：14602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658274

研究課題名（和文）シカ・イノシシの天敵が産生する本能に訴える忌避物質の単離精製法の確立

研究課題名（英文）Development of the isolation method for repellent compounds that appeal to the instinct as to think of the natural enemy of deer and/or wild boar

研究代表者 植野 洋志（Ueno Hiroshi）

奈良女子大学・生活環境科学系・教授

研究者番号：30241160

研究成果の概要（和文）：

動物の本能を利用した忌避物質の同定とその作用機構から忌避性を示す動物の本能の遺伝子探索を目的とした。シカを対象として、忌避効果を定量的に評価するシステムを構築した。奈良のシカはシカ煎餅により餌付けされており、シカ煎餅に微量の忌避物質（候補物質）を滴下して餌とする。同じ物質を4枚のシカ煎餅に滴下し、何枚をシカが食したかにより、定量化することができた。米国のオオカミの尿から忌避物質の同定を行った。

研究成果の概要（英文）：

This study aims to quantify the repellent from the urine of the American wolf in order to build a system for a gene search of the animal instinct and for isolating repellent compounds. In Nara, deer is fed by a deer rice cracker. A very small amount of repellent (candidate material) was dropped on a deer rice cracker and fed to deer. How many pieces of deer rice crackers being eaten was statistically analyzed for the establishment of the assay system.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：忌避物質，本能，オオカミ，尿，シカ，カラス，ネコ，天敵

1. 研究開始当初の背景

忌避物質や誘引物質は、ゴキブリや害虫を始め、ヒトの社会生活には不可欠な物質であり、広く社会で使われている。しかし、昨今の異常気象や土地開発のために、野生の動物・鳥類の生態に変化がおき、ヒト社会に出没し、多大な被害を及ぼしているのは周知である。作物への被害、高速道路での被害、一

般家庭のゴミへの被害、等々がある。動物はヒトを恐れなくなったのか、平気でヒトの前に出没するが、天敵からは逃避する。わが国では、100年前にシカ、イノシシ、サルなどの天敵であるオオカミが絶滅したことにより、これらの動物には現在天敵が存在しない。しかし、国外のオオカミの尿は我が国の動物に絶大な効果があり、そこからの忌避物

質の同定は国益のために必要と考えられる。また、オオカミの尿中の忌避物質は、動物の本能に働きかける物質であることより、「匂」->「本能に関与する遺伝子の同定」に行きつくことができ、きわめて学際的なテーマであると考えられる。

ちなみに、予備実験として、オオカミの尿には、奈良公園のシカ、三重の山林のイノシシとサル、大阪の生駒山近辺の住宅地でのカラスによるゴミの被害、またネコの糞害の駆除に威力を発揮することは確認済みである。

2. 研究の目的

動物や鳥類を近づけない忌避物質は現代社会において高いニーズがある。特に、生物の本能に働きかけるような忌避物質にはいわゆる「馴れ」というものがなく、継続的に有効であるとされる。本研究においては、シカ、イノシシ、サル、ネコ、カラスなどに有効とされるオオカミやライオンの尿から忌避物質の単離・同定を行う。さらに、化学構造の決定を行い、より有効な誘導体の化学合成にチャレンジする。

3. 研究の方法

本申請研究の核は、オオカミの尿中に存在する忌避物質の単離・精製であり、忌避物質としての性質を示す成分の評価システムの構築にある。忌避性の定量化は困難であると考えているが、アッセイ系としては、奈良に生息するシカによる評価システムの開発を行う。

忌避物質の単離・精製には、古典的な有機溶媒による分画抽出法、液体クロマトグラフィーによる分離法、ガスクロマトグラフィーによる分離法、薄層クロマトグラフィーによる分離法を試みる。そして、物質の同定には、LC-MASS もしくは GC-MASS を用いて、分

子量から化学構造の予想、NMR による構造決定と進める。

オオカミの尿から忌避物質の抽出を行い、忌避活性の測定法を確立する。

試料の入手：

申請者はすでに 20 リットルのオオカミの尿を米国より輸入している。これを分析に供する。

忌避性のアッセイ系の構築：

野生動物に対する忌避性を評価するには、いくつかの手段を用いる。

1) 奈良にはシカが放し飼いにされており、シカを相手に試験することができる。奈良女子大学構内には常時何頭ものシカがいることより、忌避性のテスト対象とする。数 mL のサンプルを小型のペットボトルに入れ、香気成分が拡散しやすいように穴を数か所開けたものを準備する。試料をどの程度シカに近づけると忌避行動が観察されるかを検討するために、シカとの距離を測定する。数値は、統計的に処理することで、忌避物質の効力として評価する。また、常時シカがたむろする場所に試料をつるしておくことで、どれほどの期間シカを遠ざけておけるかも評価項目として検討する。

2) カラスの被害にあっているゴミ置き場に 1) と同様に試料を設置する。毎回のゴミ収集日にどれほどの割合でカラスの被害にあうのかを年間を通じて統計をとり、忌避物質の評価とする。

忌避物質の分離・精製：

尿の分析は基本的にヒトの尿の分析手法を用いる。

ガスクロマトグラフィー：尿サンプルは、

除タンパクしたものを直接キャピラリーガスクロマトグラフィ (GC) にて分離する。この方法では、揮発性物質は直接検出できる。申請者が所属する学科には、食品中の匂い物質を研究できる GC が備わっている。この機械では、分離された物質はスプリッターにより二経路に分けられ、一つの経路はフレームイオン化検出器に送られてピークの検出がなされる。もう一つの経路は、そのまま大気中に放出されるが、ヒトの鼻をアウトレットに近づけて匂いを嗅げるようになっている。魚臭や腐敗臭などの同定に威力を発揮するが、本研究には、動物臭を目安としてピーク解析を進める。もし必要ならば、久原らのメタボロミクス解析の手法[Kuhara, T. *et al.*, *Urinary metabolic profile of phenylketonuria in patients receiving total parenteral nutrition and medication. Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23:3167 (2009)]などのように、除タンパク後の尿のサンプルをトリメチルシリカによる誘導化を行って分離する。

ここで述べた GC による手法では、ピークの分取を行って、アッセイ系に持っていくことは困難である。そこで、ピーク解析とは別に、サンプルの分画を計画する。分画には、有機溶媒による抽出と液体クロマトグラフィ (LC) を用い、GC に戻ってピーク解析によりどの分画がどのピークと対応するかのマッピングを行う。

基本的にピーク解析と分画の手法が確立した時点で、GC-MS もしくは LC-MS による分子量の解析を進める。質量分析結果より得られる親ピークより化学式 ($C_xH_yO_zN_xS_yP_z$: x,y,z は任意の数値) が求められるので、これより化学構造を推察する。近年では、アメリカ化学会が提供する化合物のデータベースより、既知の化合物の検索が可能なので、できるだけ化合物と分析ピークの対応をし、尿

のピーク解析を完成する。

匂い物質は複数あると考えられるので、それぞれを分取し、アッセイ系により効果の有無を検討する。現時点では単独の化合物が忌避効果を発揮することを前提にしているが、それが複数個存在すること、また、混合物により強力な忌避効果を発揮することも考えて、研究を進めていく。

液体クロマトグラフィによる分取：尿サンプルは、ODS カラムを用いた HPLC で分離する。通常の水・アセトニトリル系の分離溶液を用いる。得られた分画は、それぞれ乾燥させ、再度、水溶液にしてアッセイ系に用いる。忌避活性を示す分画は、GC による解析を行い、GC ピークとの相関を樹立する。忌避物質を含む分画は、再度 HPLC を行い、ピークごとの分取を試みる。この時点で、単一のピークが得られれば、LC-MS もしくは GC-MS 解析を行う。

NMR 解析；忌避物質の単離・精製がなされた場合、そして、LC-MS や GC-MS では解決できない場合、NMR による構造決定を行う。報告者は、学位をビタミン B₆ 誘導体の構造を NMR を用いて決定する研究において取得したことより、NMR に関しては十分に技術と知識を持ち合わせている。本学に設置されている機器を用いての解析を行う。

忌避物質の合成：

忌避物質の同定が完了した段階で、化合物の合成を試みる。構造類似物などの合成を行い、天然の忌避化合物よりも強力な作用をもつ化合物の探索を行う。安定性・揮発性・効力などを評価しながら、誘導体化に取り組む。一般社会で利用しやすい忌避物質であるべきなので、その点に留意できればよいと考える。

忌避物質と遺伝子：

忌避物質は、野生動物の本能に訴えるもの

である。それは、ゲノム上の特定の部分に作用するものかもしれない。DNA チップによる発現様式の検討などを行い、遺伝子レベルでの解析を進める。コントロールとして、忌避物質が作動しないと思えるヒトゲノム由来の DNA チップを用い、野生動物のものと対比する。

4. 研究成果

動物の本能を利用した忌避物質の同定とその作用機構から忌避性を示す動物の本能の遺伝子探索を目的とした。シカを対象として、忌避効果を定量的に評価するシステムを構築した。奈良のシカはシカ煎餅により餌付けされており、シカ煎餅に微量の忌避物質（候補物質）を滴下して餌とする。同じ物質を4枚のシカ煎餅に滴下し、何枚をシカが食したかにより、定量化することができた。シカの天敵である日本オオカミは絶滅しているが、米国のオオカミの尿が輸入されており、その尿から忌避物質の同定を行った。尿を水とエーテルで抽出し、水相とエーテル相の忌避効果を評価した。その結果、水相に忌避活性が残った。さらに、水相のpHを塩酸で酸性にし、同様の抽出を行うと、忌避活性はエーテル相と中間の液面に変性した沈殿物として残った。変性した沈殿物は水で溶解でき、臭いがほぼ感じられないことより、都会地での用途があると判断した。忌避効果はシカだけでなく、カラスやネコにも有効であることが判明した。カラスには、4年間以上の継続した効果がみられ、一般の忌避物質とは異なり、いわゆる慣れることがないことが想像できる。液体クロマトグラフィーにより単離精製を試みたところ、数箇所溶出分画で忌避効果が見られ、単一成分でないことが判明。MSによる分析などを続けているが、この部分に関しては、設備的な制約があり、現在進行形である。初期目標には本能の遺伝子探索を計画して

いたが、シカ・カラス・オオカミ・イノシシなどのゲノム解析がまだ完了されておらず、独自でゲノム解析にまで研究を発展できる資金がないために、ペンディング状態である。

昨今、わが国の農業はシカやイノシシにより多大な被害を受けており、さらに、一般家庭ごみはカラスの被害にもあっており、環境にやさしい忌避物質は大いに望まれている。オオカミの尿中には、有力な候補となる忌避物質が含まれており、引き続き研究を継続する意義はあるし、各方面からの支援も必要と感じる。

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0件）

〔学会発表〕（計2件）

1. 徳嵩 さゆみ, 水野 薫, 赤桐 里美, 植野 洋志, オオカミの尿のシカに対する忌避効果の検討と目的化合物の同定, 2012 年度日本生物高分子学会大会, 2012 年 9 月 22 日, 秋田
2. 水野 薫, 棚瀬 知明, 赤桐 里美, 植野 洋志, 忌避剤の効果の検討と目的化合物の同定, 2011 年度日本生物高分子学会大会, 2011 年 9 月 16 日, 金沢

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：忌避物質
発明者：植野 洋志
権利者：植野 洋志
種類：特許
番号：特願 2012-058772
出願年月日：2012 年 3 月 15 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植野 洋志 (Ueno Hiroshi)

奈良女子大学・生活環境科学系・教授
研究者番号：30241160