

哺乳動物における蛋白性フェロモンの引き起こす 血中性ホルモン濃度の増加

旭川医科大学生理学講座神経機能分野

柏柳 誠

Pheromones affect gonadal functions and sexual behaviors. They are received by the vomeronasal organ. Plasma progesterone concentrations in female Wistar rats after exposure to urine preparations with and without protease-treatment were measured to explore the effects of protease-sensitive pheromones on the endocrine state. Exposure to crude urine excreted from male rats induced an increase in the plasma progesterone concentration in female rats. The progesterone concentration of oestrous females increased with an increase in the protein concentration in urine samples. Exposure of females in the oestrous state to urine preparations treated with protease did not induce increases in plasma progesterone. These results suggest that the presence of a protease-sensitive component in male urine exerts an influence on the endocrine state of oestrous females.

1. 緒言

フェロモンは、多くの動物で生殖をスムーズに遂行するために必須であり、重要な役割を演じている^{1, 2)}。例えば、オスのフェロモンは、未成熟なメスの子宮重量の増加を促進し、初めての排卵日を早めるようにメスの性成熟を促進する。また、オスのフェロモンはメスの規則正しい排卵周期を維持する機能を有している。メスは、発情期に自分が子供を作ることが可能であることを知らせるフェロモンを放出する。ゾウの排卵周期は3ヶ月以上と長いために、一年のうちで妊娠できる期間が限られている。その上、メスゾウは普段はオスと分かれて生活している。このような状況の中で確実に子孫を残すために、メスのゾウは妊娠可能になったことを尿の中に混ぜたフェロモンを介してオスに伝えている。メスゾウの発情を知らせるフェロモンが化学的に調べられたところ、(Z)-7-dodecen-1-yl acetate がフェロモンとして働くことがわかった³⁾。驚いたことにこの物質はキャベツ尺取虫、トマト尺取虫、カブラ蛾、ヨトウ虫やキクイ虫など126種類の虫でフェロモンとして使われていることが既に発見されていた。すなわち、体の大きさが非常に異なるばかりではなく、昆虫と哺乳動物と種が全く異なっている動物が同一の化学物質をフェロモンとして用いていることが示された。

ラットでは、性経験を有するオスは、発情期のメスと発情期のメスの尿に対して異なる嗜好性を有することが行動学的に示されていた。一方、性経験を持たないオスはこの

ような嗜好性を示さなかった。最近、我々は、性経験をすることにより、フェロモン中枢の一部の介在神経細胞の発情フェロモンに対する興奮性が昂進することを見いだしている⁴⁾。このように、フェロモンは生理的に重要な情報の個体間でのやりとりを仲立ちするという側面からの研究対象としての意義を持つばかりではなく、記憶形成の機構を解明することを目的とした脳神経科学的な側面からも興味深い研究対象といえる。

ヒトにおいても、フェロモンを介する異性間および同性間におけるケミカルコミュニケーションは社会的行動および生殖行動に重要な役割を果たしている可能性を示す証拠が得られている⁵⁾。たとえば、共同生活をしている女性同士の月経周期は、だんだんと同期してくる⁶⁾。この現象が寄宿舎（ドミトリー）で共同生活している女子学生の間で初めて科学的に証明されたことから、ドミトリー効果と名付けられた。月経周期を延長するフェロモンと短縮するフェロモンがヒトに存在することが見いだされ、これらの2種類のフェロモンが月経周期の同期を引き起こすと考えられている⁷⁾。また、ヒトの細胞表面にはHLAクラスI抗原が存在していて、自己と非自己を識別するのに使われている。女性は、自分と異なるタイプのHLAクラスI抗原を有する男性の匂い（フェロモン？）を好む傾向が見られる。これは、自分の子供の遺伝子の多様性を増大させるためと解釈される。また、フェロモンを受容する可能性を有する遺伝子がヒトのジェノミックDNAから見つかっている⁸⁾。フェロモンを専門的に受容する器官である鋤鼻器は、ヒト胎児では明瞭に認められているが大人では特に退化している。ヒトで見つかったフェロモン受容体は、一般の匂いを受容している嗅上皮に存在することが示されている。魚類でも鋤鼻器は独立して存在せず、フェロモンを受容する細胞が嗅上皮に存在しているので、ヒトの嗅上皮にフェロモン受容細胞が存在して、フェロモンを受容する機能を有する可能性も十分に考えられる。



Protease-sensitive urinary pheromones increased plasma concentration of progesterone in mammals

Makoto Kashiwayanagi

Department of Physiology, Asahikawa Medical College

マウスでは、交尾後妊娠したメスが交尾相手とは異なる系統のオスの匂いを嗅ぐと、妊娠していたメスが流産する現象が見られる⁹⁾。この現象は Bruce 効果と呼ばれ、異系統のオスのフェロモンにより視床下部-下垂体系が刺激され、体内のホルモン濃度が変化することにより生じると考えられている。また、オスラットの尿には若年メスラットの性成熟を早めたり、不規則な排卵周期を正常に戻す効果が見られる。このように哺乳動物で見られるフェロモンの効果の多くには、内分泌系の変化を引き起こす効果を有している。現在、どのような物質がメスラットの体内において内分泌系変化を引き起こすのかは明らかではない。そこで、オスラットの尿中に存在する、メスラットの内分泌系変化を引き起こす物質がどのような性質をもつかを、生化学的手法を用いて検討した。

2. 実験

2-1 動物

実験には Wister 系オスラットおよびメスラットを用い、北海道大学大学院薬学研究科動物実験指針に基づいて行った。メスラットの性周期は、午後3時に膣垢検査を行うことにより確認した。角化上皮細胞のみが見られたメスラットを発情期とし、白血球が多数見られたメスラットを非発情期とした。

2-2 フェロモン刺激

1年齢のオスラットより採取した尿サンプル10mlを10分おきに3回、計30mlをメスラットの鼻先にスプレーで噴霧した。また、一群の11週齢オスラットをメスラットと同じケージに入れて交尾を経験させ12週齢で採尿した。さらに、オスラットのみで飼育した12週齢のオスラットからも採尿した。これらの尿サンプルをメスラットに提示して、プロゲステロン濃度を測定した。

2-3 プロゲステロン濃度の測定

尿提示終了から1時間静置した後エーテル麻酔下で、尾の血管より約1mlの血液を採取した。得られた血液を4℃で4時間静置した後、3000×gで15分遠心し、約400μlの血清を得た。血清中のプロゲステロン濃度の測定は、DPCプロゲステロンキット(Disgnostic Products Corporation, California, USA)を用いたRIAチューブ固相法にて行った。抗プロゲステロン抗体結合チューブに血清を反応させた。反応後デカントで反応液を取り除き、チューブに結合した放射能をγカウンター(WALLAC 1460SLR、ファルマシア、USA)にて測定した¹⁰⁾。

2-4 尿中蛋白の Pronase 処理

尿1mlあたり6.96mg tris (hydroxyethyl) aminomethaneを加え、適量の5N HClにてpHを7.0に調整した。次に、10mg Pronase (typeXIV, SIGMA, USA)を加えて溶解後、インキュベート(37℃、60分)し、尿中の蛋白質の消化を行った。

3. 結果

3-1 性周期によるオスフェロモン感受性の変化

ヒトやマウスのように性周期をもつ動物は、嗅覚系の生理機能が周期に伴い変化することが知られている。例えば、マウス嗅粘膜の匂い応答は発情期に上昇し、嗅覚行動実験では発情前期に嗅覚閾値が最も低くなり、発情後期に最も高くなる。また、性周期の安定している女性は月経期に限り嗅覚コントラストが有意に増大することが報告されている。これらのことから、フェロモンを受容する鋤鼻器官の匂い感受性も性周期により変化することが考えられる。性周期に伴うメスラットの血中プロゲステロン濃度を確認したところ、プロゲステロン濃度は排卵後に上昇し、妊娠が成立しないと徐々に低下した。

次に、非発情期メスラット、発情期メスラットそれぞれにオスラット尿を提示し、血中のエストロン濃度およびプロゲステロン濃度を測定した。非発情期メスラットにオスラット尿を提示した際の血中エストロン濃度(尿提示時: 19.3±4.16 pg/ml n=3)は、定常時とほぼ同濃度(定常時: 20.9±5.11 pg/ml)であった。発情期メスラットにオスラット尿を提示した際の血中エストロン濃度(尿提示時: 32.7±15.4 pg/ml n=3)は、上昇する傾向(定常時: 15.0±3.65 pg/ml)が見られたが、有意な差を認められなかった。また、非発情期メスラットにオスラット尿を提示した際の血中プロゲステロン濃度に関しても、上昇する傾向が見られたが有意な差を認められなかった(図1)。一方、発情期メスラットにオスラット尿を提示した際の血中プロゲステロン濃度は、顕著に増加し、定常時の3~4倍の濃度であった(F(1, 12)=4.7, p=0.05)。これらの結果は、メスラットの鋤鼻系の性ホルモン濃度に影響を与える匂い感受性は、非発情期では低く、発情期に高くなることが示唆した。

血中のプロゲステロン濃度は、フェロモン等の化学的刺激がない状態であっても性周期に伴い変動する。しかしながら、尿と同じ塩組成の溶液をコントロールとして発情期メスラットに提示したところ、血中プロゲステロン濃度は定常時とほぼ同濃度であった。この結果は、尿提示開始から採血に到るまでの時間経過に伴う血中プロゲステロン濃度の変動が生じたことや噴霧による機械的刺激のために、発情期の尿刺激後にプロゲステロンの濃度が上昇した可能

性よりも、尿フェロモンの作用によりプロゲステロン濃度が増加したことを示唆した。

3-2 発情期メスラットの血中プロゲステロン濃度変化を引き起こす物質の性質

現在のところ、ラットにおいて血中性ホルモン濃度の変化を引き起こす物質は同定されていない。一方、オスラットの尿中にはプロテアーゼ感受性の異なる少なくとも2種類の蛋白性フェロモン物質が存在している¹¹⁾。このことから、発情期メスラットの体内においてプロゲステロン濃度の変化を引き起こす物質が蛋白質である可能性が考えられる。そこで、刺激液中の蛋白質濃度のメスラット血中プロゲステロン濃度に対する影響を解析した。通常、オスラットから排出される尿の総蛋白質濃度は12.0 mg/ml程度である。尿を希釈し総蛋白質濃度が0.1 mg/ml、1.0 mg/mlおよび5.0 mg/mlの3種類の尿サンプルを調整し、それぞれを発情期メスラットに提示し、血中プロゲステロン濃度を測定した(図2)。血中プロゲステロン濃度は、刺激液中の蛋白質濃度が増加するとともに濃度依存的に増加する傾向が見られた。0.1 mg/mlの尿サンプルを提示すると、血中プロゲステロン濃度は定常時の2倍近くに上昇したが統計的な有意差は見られなかった。さらに高い蛋白質濃度の刺激液中で刺激すると、有意な血中プロゲステロン濃度の増加が見られた(p<0.001)。

図3は、刺激液中の蛋白質をプロナーゼで分解した後に発情期メスラットを刺激し、血中プロゲステロン濃度を測定した結果を示している。プロナーゼ処理をしていない尿を発情期メスラットに提示すると、血中プロゲステロン濃度は定常時の3~4倍に上昇した。一方、プロナーゼ処理をした尿を発情期メスラットに提示すると、血中プロゲステロン濃度の上昇は認められず、定常時とほぼ同濃度であった。これらの結果は、発情期メスラットの体内においてプロゲステロン濃度の増加を引き起こすフェロモン物質が蛋白分解酵素に感受性を有する可能性を示唆した。

3-3 プロゲステロン濃度上昇を引き起こすオスラットフェロモンに対する性経験の影響

性経験は、副嗅球の特定の領域に発情フェロモンに対する応答性の亢進を引き起こすような大きな変化を脳神経系に引き起こす。また、副嗅球内の神経活動をFos蛋白質の発現を指標として、オスから放出されるフェロモン活性の変化を解析すると、性経験によりフェロモン活性が顕著に増強する。すなわち、12週齢の性経験をしていないオス由来の尿サンプルは、10週齢サンプルと比べて、ややFos陽性細胞の密度が増加している傾向が見られたが、それほど顕著ではなかった⁴⁾。一方、同じ12週齢でも性経験をしたラットからのサンプルは、10週齢のサンプルを

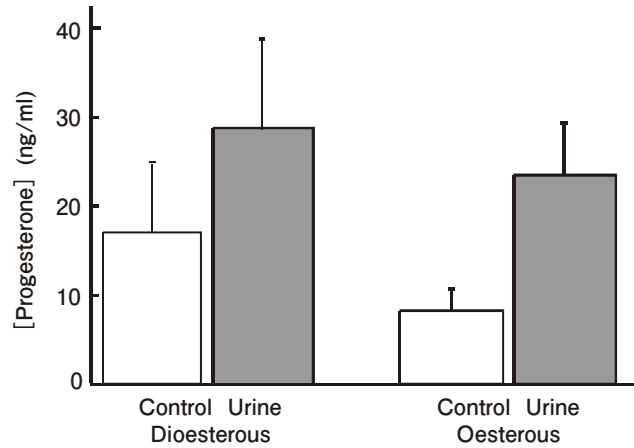


図1 非発情期および発情期メスラット血中プロゲステロン濃度に対するオスラット由来の尿フェロモンの効果

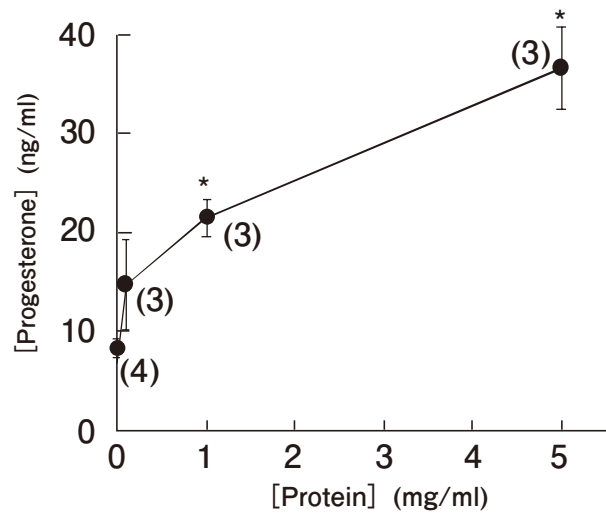


図2 メスラット血中プロゲステロン濃度と刺激に用いたオスラット由来尿フェロモン中の蛋白質濃度の関係

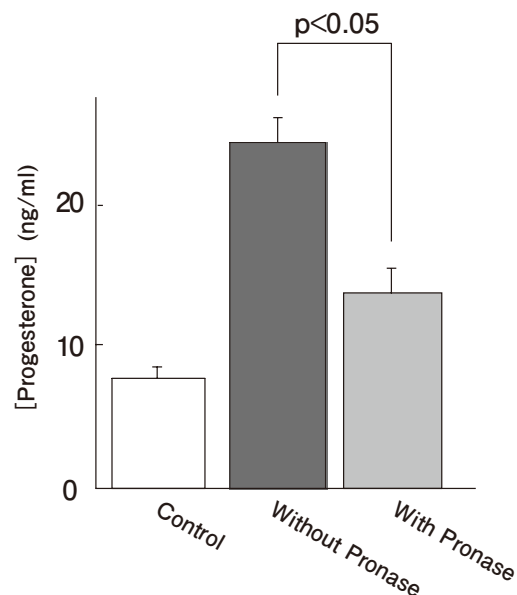


図3 オス尿中フェロモン活性に対するプロナーゼの効果

提示したときと比べ、倍以上の Fos 陽性細胞の発現を引き起こした。そこで、血中プロゲステロン濃度を上昇させるフェロモン効果に対する性経験の影響を発情期メスラットで検討した。性経験を持たないオスラット尿を発情期メスラットに提示すると、血中プロゲステロン濃度は定常時と比べ 3.3 倍強に増加した (図 4)。性経験を持つオスラット尿を発情期メスラットに提示した際の血中プロゲステロン濃度は、定常時と比べるとさらに顕著に増加した ($p < 0.05$)。この結果は、オスラットにおいて性経験により副嗅球へ強く伝達されたフェロモン情報が、メスラットの血中プロゲステロン濃度を上昇させる作用を有するフェロモンの放出を亢進することを示唆した。

4. 考察

本研究は、メスラットの血中プロゲステロン濃度は、発情期にオスラット尿中フェロモンにより増加することを示した。また、プロゲステロン濃度を増加させるフェロモンの活性は蛋白質分解酵素により消失することを示した。さらに、オスラットが性経験をすると、プロゲステロン濃度を増加させるフェロモン活性が増強されることを明らかにした。

齧歯類では、フェロモンは筒状の形態をして鼻腔下部に存在する鋤鼻器で受容される。鋤鼻器内には太い血管が長軸方向に走行し、収縮による血管径の変化により鋤鼻器内の容量が変化して、粘液に溶解したフェロモンを鋤鼻器内に吸引する鋤鼻ポンプと呼ばれる機能を有している。このため、揮発する性質を持たない蛋白質もフェロモンとして作用することが可能となっている。我々は、ラットの尿中に分子量 500 以下と 500 以上の少なくとも 2 種類以上のフェロモン分子が存在することを見いだしている¹²⁾。これらのフェロモンは、それぞれ単独では副嗅球の神経細胞を興奮させることは不可能であるが、両者が共存すると副嗅球神経細胞を興奮させる。本研究では、サンプルを蛋白質分解酵素で処理すると、プロゲステロン濃度上昇作用が見られなくなった。この結果は、ラットにおいて、蛋白性のフェロモン分子を受容する副嗅球を介したフェロモン受容系が内分泌系の調節を行っていることを示唆している。

オスラット尿を発情期と非発情期のメスラットにそれぞれ提示すると、発情期のメスラットにおいて有意に血中プロゲステロン濃度を上昇させたことから、プロゲステロン濃度を上昇させるオスラットフェロモンの効果は、発情期のメスラットに特徴的に見られることが示唆された。成熟動物では、排卵前は血中プロゲステロン濃度が低く、排卵後のその濃度は上昇し、黄体形成が始まる。黄体形成開始にともないエストロゲン濃度が上昇しはじめる。これより、オスラットの尿により尿提示開始から採血に到るまでの間

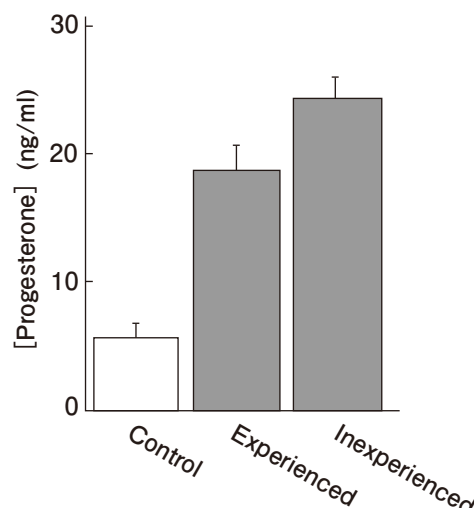


図 4 性経験により増強したオスラットフェロモン活性のメスラット血中プロゲステロン濃度への効果

に、本来ならまだ起こらない排卵が起きた可能性も考えられる。また、オスラット尿提示によるプロゲステロン濃度の変化は、発情期メスラットのみに見られたが、非発情期メスラットの体内においても、プロゲステロン以外のホルモンに変動が生じ、発情期のメスに対する効果とは別の効果を引き起こしている可能性も考えられる。

我々は、オスラット由来のフェロモン活性をメスラット副嗅球における神経細胞の興奮を指標に解析したところ、オスラットの性経験により尿中フェロモン活性が性経験により増強することを見いだした⁴⁾。性経験のあるオスラット尿を提示した時の血中プロゲステロン濃度は、性経験のないオスラット尿を発情期メスラットに提示した時の血中プロゲステロン濃度と比べ、高い値を示した。この結果は、性経験を有するオスは、メスの内分泌系に対してより強い影響を及ぼすフェロモンを放出することを示唆した。

謝辞

本研究は、北海道大学大学院薬学研究科の富岡真由美との共同研究として行った。また、本研究を遂行する上で、暖かい支援を頂いた財団法人コスメトロジー研究振興財団に感謝する。

(Reference List)

- 1) Kashiwayanagi, M.: Molecular recognition and intracellular transduction mechanisms in olfactory and vomeronasal systems. *Hormones, Brain and Behavior*, 1-16, Academic Press, San Diego (2002)
- 2) Halpern, M. and Martinez-Marcos, A.: Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog. Neurobiol.* 70, 245-318 (2003)
- 3) Rasmussen, L. E., Lee, T. D., Roelofs, W. L., Zhang,

- A., and Daves Jr., G. D.: Insect pheromone in elephants. *Nature* 379, 684–684 (1996)
- 4) Kashiwayanagi, M.: Augmentation of sensitivity to urinary pheromone and excreting of urinary pheromone by sexual experiences. *Chem. Senses* 30, i138-i139 (2005)
- 5) Wysocki, C. J. and Preti, G.: Facts, fallacies, fears, and frustrations with human pheromones. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* 281, 1201–1211 (2004)
- 6) McClintock, M. K.: Menstrual synchrony and suppression. *Nature* 229, 244–245 (1971)
- 7) Stern, K. and McClintock, M. K.: Regulation of ovulation by human pheromones. *Nature* 392, 177–179 (1998)
- 8) Rodriguez, I., Greer, C. A., Mok, M. Y., and Mombaerts, P.: A putative pheromone receptor gene expressed in human olfactory mucosa. *Nature Genet.* 26, 18–19 (2000)
- 9) Bruce, H. M.: An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. *Nature* 184, 105 (1959)
- 10) Tomioka, M., Murayama, T., and Kashiwayanagi, M.: Increases in plasma concentration of progesterone by protease-sensitive urinary pheromones in female rats. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 1770–1772 (2005)
- 11) Tsujikawa, K. and Kashiwayanagi, M.: Protease-Sensitive Urinary Pheromones Induce Region-Specific Fos- Expression in Rat Accessory Olfactory Bulb. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 222–224 (1999)
- 12) Yamaguchi, T., Inamura, K., and Kashiwayanagi, M.: Increases in Fos-immunoreactivity after exposure to a combination of two male urinary components in the accessory olfactory bulb of the female rat. *Brain Res.* 876, 211-214 (2000)