

ワサビ受容体(TRPA1)リガンド候補化合物による忌避剤の開発に向けた予備的検討： マウスを用いた行動解析について

○中村隆聖¹、水野信哉^{1,2}

(1)岡山理科大学・大学院理工学研究科自然科学専攻・生態環境科学コース・

②同・理学部・動物学科・動物分子生態病態学研究室)

【はじめに】キツネ肛門腺由来の天然化合物（チアゾール化合物, TMT）は齧歯類に竦み行動を誘導する。当研究室では TMT とその合成誘導体を用いて、マウスでの埋めた餌の掘り起こしを指標に忌避効果を検討してきた。実際、原田は 2-メチル-2-チアゾリン(2MT)がマウスに強い忌避効果を誘導する一方、佐々木はこの効果が嗅覚に依存する事を明らかにしている。近年、TMT とその一部の誘導体の受容体はワサビ受容体（TRPA1）である事が立証されている。そこで今回、TRPA1 リガンドの候補と考えられるいくつかの化合物を用いて、マウスに対する竦みと忌避の行動を評価する事とした。

【材料と方法】日本 Slc 社（浜松）より購入した雌 ICR マウスを用いた。(1)掘り起こし試験：動物を 24 時間絶食させ、原田の方法に準じて以下の解析を行った。空腹による求食行動を視覚ではなく嗅覚に依存した評価を行うため 2cm の深さの木製チップ（オガクズ）に固形食（MF, オリエンタル酵母）を埋めて隠し、餌を掘り起こして齧るまでの時間を計測した。(2)候補化合物：TMT 誘導体である 2,4,5-トリメチルチアゾール(245TMO, サンタクルズ社), 4-メチルチアゾール(4MTO, 東京化成), 2,4-メチルチアゾール(24DMTO, 東京化成)および 2-メチル-2-チアゾリン(2MT, 東京化成)を評価に用いた。それぞれ 3%濃度となるように蒸留水で希釈して固形食に塗り、掘り起こし時間を計測した。8 分以上を経過しても餌を掘り起こさない場合は時間切れとして計測を打ち切った。

【結果】(i) 245TMO: 3 %濃度の餌に対する竦み行動は弱かった。埋没した餌に興味を示し、餌を埋没した地点に接近し、オガクズをかける異様な行動が目立った。掘り起こしに躊躇し、その場から離れるといった行動が目立った。(ii)4MTO: 掘り起こしに躊躇して忌避行動を示す個体が多くったが、個体間でのバラツキが大きかった。若齢個体、老齢個体ともに竦みを示す個体は掘り起こしを躊躇するが、竦みを示さない個体は少し時間がかかるが餌を掘り起こしていた。掘り起こし試験を繰り返した結果、回を重ねるにつれて掘り起こし時間が短縮する傾向が見られた。(iii)24DMTO: 竦みに一致して大半の個体が餌の掘り起こしに躊躇し、8 分が経過しても掘り起こさない個体が続出した。(iv) 2 MT: 若齢・老齢とともに竦みが強く、餌を埋めた地点に接近せず、8 分間の時間切れを記録した。

【考察】小早川らはマウスにおける TMT 誘導体による竦みの効果は 2MT>24DMTO> 4MTO >245TMO の順である事を報告している。彼らは三叉神経の神経核に存在する TRPA1 が 2MT による竦み誘導のセンサーになる事を KO マウスの解析より実証している。しかしながら、竦みと忌避の関係は解析されていない。強弱の異なる TMT 誘導体を用いた今回の解析により、竦みの強さが忌避行動に直結する事は実感できた。一方、245TMO のように竦みが弱くても忌避が獲得される、という興味深い知見も得られた。つまり、忌避の獲得には竦みは必ずしも必要でない局面が存在する可能性が考えられる。この点に関して、当研究室では 2-MT による忌避行動は嗅覚に依存する、とする興味深い知見も得られている。マウスでの忌避獲得において、三叉神経依存経路と嗅覚依存経路の関係性について、今後の更なる解析が必要と考えられた。

G-2

近接ビオチン標識による精子軸糸タンパク質 EFCAB5 の同定と機能解析

○宮田 治彦¹、Haoting Wang¹、嶋田 圭祐¹、Anh Hoang Pham¹、大山 裕貴¹、鴨下 真紀¹、

小林 浩子¹、大浦 聖矢¹、藪田 紀一¹、伊川 正人¹

(¹大阪大学微生物病研究所・遺伝子機能解析分野)

【背景と目的】

精子の運動性は受精能力に直結しており、その運動装置である鞭毛軸糸の構造や構成タンパク質の機能解明は、男性不妊の病態を理解するうえで重要である。軸糸に存在するラジアルスパークは精子運動の制御に関与することが知られているが、その構成タンパク質は十分に解明されていない。そこで本研究では、ラジアルスパークに局在する CFAP91 に近接するタンパク質を探索することで、ラジアルスパークを構成する新たなタンパク質の同定を試みた。

【方法】

ビオチンリガーゼ (BioID) を融合させた CFAP91 を発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。ビオチン存在下で成熟精子を培養することで CFAP91 に近接するタンパク質をビオチン標識し、質量分析により同定した。さらに、候補因子として得られた EFCAB5 の機能を検証するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて *Efcab5* ノックアウト (KO) マウスを作製し、生殖能力および精子運動性を解析した。

【結果と考察】

近接ビオチン標識により、CFAP91 に近接するタンパク質として EFCAB5 を同定した。精巢以外の繊毛組織では *Efcab5* の発現が低く、EFCAB5 は精子特異的な軸糸タンパク質であると考えられる。*Efcab5* KO 雄マウスを野生型の雌マウスと交配させたところ、野生型の雄マウスと比較して産仔数は減少していた。また、*Efcab5* KO 精子では運動性が有意に低下していた。以上の結果から、EFCAB5 は精子のラジアルスパークに存在し、精子特有の運動性を制御する役割を担うことが示唆された。