

博士論文要約 (Summary)

2023 年 4 月入学

連合農学研究科 生物資源科学専攻

氏 名 上野山 怜子

タイトル	The behavioral response induced by a variety of iridoids in silver vine with high safety is conserved among a large part of Felidae species 多様なイリドイドによって誘起されるマタタビ反応は、安全性が高く多くのネコ科動物で保存されている
<p>Species-specific innate behaviors, exhibited without prior exposure or learning, often play a crucial role in the survival of each animal species. Such behaviors are often induced by chemical cues from conspecifics, prey, or predators. Additionally, secondary metabolites produced by plants can also evoke such types of behaviors. A well-known example of plant-induced behavior is a unique response to catnip (<i>Nepeta cataria</i>) and silver vine (<i>Actinidia polygama</i>) in domestic cats (<i>Felis silvestris catus</i>) and other Felidae species such as lions. When cats sniff these plants, they exhibit the characteristic behaviors comprising of licking and chewing the leaves, rubbing against them, and rolling over on them. This response is induced by iridoids which share a common chemical structure containing a five-membered ring fused to an oxygen-containing six-membered ring; nepetalactone in catnip and a mixture of iridomyrmecin, isoiridomyrmecin, dihydronepetalactone, and isodihyronepetalactone, which are called matatabilactone, and nepetalactol in silver vine.</p> <p>My master's thesis demonstrated that rubbing is a functional behavior that transfers nepetalactol with mosquito-repellent activity onto the cat's fur from silver vine leaves, allowing them to avoid mosquito landing. Additionally, licking and chewing that damage the leaves enhance the emission and complexity of iridoids, prolonging the duration of the response in cats and increasing mosquito-repellent effect. Therefore, the combination of licking, chewing, and rubbing is likely to serve as an adaptive behavior for chemical pest defense against pest insects. Furthermore, my previous study also revealed that iridoid stimulation increases plasma levels of β-endorphin, an endogenous opioid, and that pharmacological inhibition of μ-opioid receptors suppresses the response to iridoids in cats. These findings indicate that activation of the μ-opioid system is necessary to induce the response to iridoids in cats. Since exogenous opioids such as morphine have an addictive property, the development of addiction to iridoids in cats might be concerned. Nevertheless, no statistical data demonstrates the absence of negative effects of these plants on cats, while a lot of olfactory enrichment products using silver vine plant materials are commercially available for improving the welfare of household cats.</p> <p>Based on such the background mentioned in Chapter 1, the ultimate goal of this study is to uncover why only Felidae species show the response. To obtain clues for the identification of genetic factors for species-specificity of the response, I aimed to improve the understanding of this characteristic response in Felidae animals. I initially started with two aims: in Chapter 2, to investigate types of iridoids in damages silver vine leaves, and in Chapter 3, to assess the safety of the response to silver vine in cats. Given the chemical understanding and the safety of silver vine, in Chapter 4, I examined the responsiveness of non-domesticated Felidae and non-Felidae animals.</p> <p>In Chapter 2, I investigated the presence of iridoids other than nepetalactol and matatabilactones</p>	

using a gas chromatograph/mass spectrometry (GC/MS)-based volatile organic compounds (VOC) collection/omission system. Silver vine extracts whose nepetalactol and matatabilactones were omitted using the system which can prepare odor samples with and without targeted VOCs easily had still bioactivity toward cats, indicating the presence of unidentified bioactive iridoids other than nepetalactol and matatabilactones. Thus, I carefully examined the mass spectrums of minor compounds and found nine candidates of iridoids other than nepetalactol and matatabilactone. Therefore, I further compared iridoid amounts and composition in different parts of silver vine and other *Actinidia* species, across various sampling seasons and in response to drying treatment. Among plant tissues of silver vine, the levels of nepetalactol, matatabilactone, and most of candidate iridoids are highest in normal fruits followed by fruit galls, green leaves, white leaves, and lowest in branches. Silver vine green leaves with maximum levels of iridoids are obtainable from May to August. Drying treatment of silver vine leaves for at least 24 h improves iridoid complexity by increasing matatabilactones and many types of candidate iridoids, which prolongs the duration of the response in cats as compared to fresh leaves. These iridoids are also accumulated in the roots of *Actinidia deliciosa*, *Actinidia arguta*, and *Actinidia kolomikta* rather than the leaves.

In Chapter 3, behavioral and physiological assessments addressed the safety of silver vine exposure in cats. During continuous exposure to silver vine extract for 4 h, cats stop responding to the extract spontaneously and do not spend most of their time contacting it, showing the absence of no hallmarks of the addictive property of silver vine. Serum levels of cortisol and glucose, stress indicators, show little variation between immediately after a response to the extract and control conditions in cats, indicating the absence of any negative physiological stress response to silver vine. A 3-year follow-up study of the serum levels of alanine aminotransferase and creatinine, which are biomarkers for hepatic and renal function, respectively, showed no significant changes among cats under 9 years old that experienced repeated exposure to iridoids at most 56 times with median of 26 times, suggesting no major side effects of long-term exposure to silver vine on feline liver and kidney health.

Chapter 4 examined responsiveness to silver vine and catnip in non-domesticated Felidae and closely related species. I tested 25 out of 41 Felidae species other than domestic cats and seven species from the families Hyaenidae, Herpestidae, Viverridae, and Canidae, closely related to Felidae species, which were kept at Japanese and German zoos. In behavioral assays in which 265 individuals from Felidae species participated, positive responders that showed rubbing and/or rolling against extracts of silver vine and catnip were found in 14 out of 25 species, though not all individuals in these species exhibited a response. African wild cats, lions, pumas, and jaguars show comparable or higher proportions of positive responders than domestic cats (approximately 70%), while relatively lower proportions of positive responders are observed in sand cats, rusty-spotted cats, servals, Eurasian lynxes, leopards, snow leopards, and clouded leopards. By contrast, no positive responder was found in several Felidae species, including tigers, cheetahs, and leopard cats. There was no positive responder among 60 individuals from other families. Considering that positive responders are widely observed in Felidae species from the Domestic cat lineage to the *Panthera* lineage, which diverged 11 million years ago, the trait for the responsiveness to iridoid-containing plants might have evolved specifically in common ancestors of Felidae. The presence of both positive and negative responders in these Felidae species strongly suggests that the polymorphisms in responsible genes that are necessary to evoke the response would have predated Felidae speciation and been maintained by balancing selection, which is a genetic force to protect genetic variations and increases their lifespan within populations. On the other hand, a part of Felidae species might

have lost the trait for the responsiveness for some reason such as the genetic drift and the negative pressure of the response in their environments.

Chapter 5 is general discussion based on the findings from Chapter 2, 3, and 4. Especially, I focused on the discussion of how the response toward a complex mixture of such plant second metabolites has been acquired in ancestors of Felidae as species-specific innate behavior and maintained among a large part of modern Felidae species. These findings in the present study suggest that a Felidae ancestor might have acquired two or more olfactory receptors each of which has different sensitivity to distinct types of iridoids contained in ancestral plant species, and these receptors might be associated with the species-specificity and individual differences of the responsiveness. The activation of the μ -opioid system via Felidae-specific olfactory receptors for evoking the innate response might become a cause of the harmlessness of iridoids in cats.

(和訳)

動物の種に固有の本能行動は、学習や経験を介さずに示され、生存において重要な役割を果たす。このような行動は、同種の個体や捕食者、あるいは餌となる動物の化学的刺激によって誘起されることが多いが、植物の二次代謝産物によって引き起こされることもある。その最もよく知られた例が、ネコ (*Felis silvestris catus*)をはじめとするネコ科動物がキャットニップ (*Nepeta cataria*) やマタタビ (*Actinidia polygama*) に対して示す特異的な反応である。これらの植物を嗅いだネコは、葉を舐めたり噛んだり、顔や頭を葉に擦りつけたり、葉の上で転がったりする行動を示す。この行動を誘起する成分として、キャットニップに含まれるネペタラクトン、マタタビに含まれるネペタラクトールおよびマタタビラクトン類と総称される 4 種の化合物が知られており、これらは共通して酸素を含む六員環と五員環が融合したイリドイドと呼ばれる化学構造を持つ。私の先行研究では、転がり行動よりも特に擦り付け行動が重要であること、ネペタラクトールには蚊の忌避効果があること、さらに擦り付けによってマタタビの葉からイリドイドがネコの被毛に付着し、蚊に刺されにくくなることを明らかにした。また、ネコが葉を舐め噛み傷つけると、イリドイドの放出量が増加し、イリドイド組成が複雑化することで、ネコと蚊双方への生物活性が高まることも見出された。よって、舐める、噛む、擦り付ける行動の組み合わせによるマタタビ反応は、イリドイドによる蚊への化学防御効果を最大化して得る、適応的な行動として機能することが分かった。このようにネコに対する活性にイリドイドの組成はとても重要なので、この行動をより深く理解するためには、マタタビ損傷葉にネペタラクトールとマタタビラクトン以外の分子種のイリドイドが含まれている可能性も調べることが不可欠である。私の先行研究はまた、イリドイドの刺激が内因性オピオイドである β エンドルフィンの血中濃度を上昇させること、マタタビ反応は μ オピオイド受容体の阻害剤投与によって抑制されることを発見し、 μ オピオイド系の活性化がマタタビ反応発動に必須であると明らかにした。モルヒネのような外因性オピオイドは中毒性があるので、ネコのイリドイドに対する依存性が懸念される可能性がある。しかし、マタタビを活用した嗅覚エンリッチメント商品は数多く市販されている一方で、マタタビのネコに対する毒性が無いという科学的なデータはこれまでのところ存在しない。第一章にこのような研究背景を述べた後、本研究は当初、損傷マタタビ葉におけるイリドイドの分子種を明らかにすること、マタタビ反応の安全性を評価することの二つの研究目的を立て開始した。第二章では、当研究室で開発した、ガスクロマトグラフ質量分析 (GC/MS) を改良したにおい分画装置を活用して、ネペタラクトールとマタタビラクトン以外のイリドイドの存在を探索した。結果、損傷したマタタビの葉から活性物質候補となる 9 種類のイリドイド化合物が発見された。イリドイドの含量は、マタタビの植物部位で比較すると実で特に多く、葉では 5 月から 8 月

に収穫したものに多く含まれていた。さらにマタタビ葉に 24 時間以上の乾燥処理を施すことで、イリドイドの複雑性が増し、ネコの反応時間が長くなることが分かった。マタタビ以外の *Actinidia* 属の植物の根にもイリドイドが含まれていたが、ほとんどの試料で葉には含まれていなかった。第三章では、行動試験と血液検査によってマタタビの安全性を検証した。ネコが 4 時間にわたってマタタビ抽出物を連続的に提示されると、自発的に反応を停止することから、依存性の兆候が見られないことが確認された。また、マタタビ反応後に血中コルチゾールやグルコース濃度が有意に変化しないことから、ストレス反応も誘発されないことが示された。さらに、3 年間にわたる追跡調査では、ネコの肝機能と腎機能に関するバイオマーカーの値（アラニンアミノ基転移酵素とクレアチニンの血中濃度）にマタタビ反応経験が関連しないことが確認され、マタタビを継続的に提示しても安全性が高いと考えられた。このようにマタタビの化学的特性と安全性について明らかにできたので、残された疑問である、なぜネコ科動物だけがマタタビ反応するのか、その遺伝的メカニズムの特定を将来的な研究課題に設定した。マタタビ反応の種特異性の遺伝的要因の特定の手がかりを得るために、第四章では、ネコ科動物 41 種中ネコ以外の 25 種と、ネコ科に近縁であるハイエナ科・マングース科・ジャコウネコ科・イヌ科の 7 種のマタタビ反応性を調査した。ネコ科の 265 個体の行動試験において、14 種ではマタタビとキャットニップの抽出物に対して擦り付けまたは転がり反応を示す個体がいた一方で、トラやチーターなどの種では反応陽性個体が見られなかった。ライオンやピューマ、ジャガーはネコ（7 割）と同等またはそれ以上の陽性率を示したが、スナネコやヒョウでは比較的陽性率が低いことが分かった。ネコ科以外の種では反応個体は全く見られなかった。以上の結果からネコ科の共通祖先がマタタビ反応を獲得し、ネコ科が種分化する前に既に陽性と陰性の形質が存在していたこと、マタタビ反応陽性と陰性の形質は多くの種において平衡選択によって保持されてきた一方で、一部のネコ科動物では何らかの原因によりマタタビ反応陽性形質を失ったと考えられた。第五章の総合考察では、植物の生産する二次代謝産物であるイリドイドの複雑な混合物に対する反応が、どのようにネコ科の祖先において種特異的な本能行動として獲得され、現代のネコ科の種の大部分において維持されてきたかを考察している。本研究で得られた知見から、ネコ科の祖先が、祖先植物種に含まれる複数のイリドイドに対してそれぞれ異なる感受性を持つ 2 つ以上の嗅覚受容体を獲得し、これらの受容体が現生ネコ科動物のマタタビ反応性の種特異性や個体差に関係している可能性が示唆された。また、ネコ科特有の嗅覚受容体を介して μ オピオイド系が活性化され、本能反応が引き起こされることが、ネコにおけるイリドイドの無害性と関連している可能性が考えられた。