

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 25 年度 博士課程進学
氏 名 小坂田 拓哉
指導教員名 東原 和成

論文題目

マウスのフェロモン ESP ファミリーが引き起こす社会行動とその神経回路基盤の解析

マウスをはじめとする様々な生物種は、正常なライフサイクルを営むために、化学シグナルを用いた個体間コミュニケーションをとっている。フェロモンは、性行動や攻撃行動といった社会行動や、生体内の生理的变化を引き起こす。雄マウスの涙液中に分泌される約 7 kDa のペプチド ESP1 (Exocrine-gland Secreting Peptide 1) はマウスのフェロモンのひとつとして知られている。ESP1 は、フェロモンなどを受容する鋤鼻嗅覚系の受容器である鋤鼻器官で受容され、雌マウスのロードシス反射（性的受け入れ行動）を促進する。しかしながら、ESP1 の情報が伝達される神経回路について詳細な解析はなされていなかった。本論文の前半では、経シナプス性の順行性ウイルストレーサーを用い、ESP1 の受容体を発現する神経細胞を起点とした神経回路網の可視化を目指した。

ESP は多重遺伝子ファミリーを形成しており、マウスゲノム中には 38 個の相同遺伝子が存在する。そのなかの 1 つである ESP22 は生後 2-3 週齢のマウスの涙液から幼少期特異的に分泌されており、雄マウスの性行動を抑制する働きをもつことが知られていた。しかしながら、ESP22 の受容機構や、雌マウスに対する機能、また、行動の発現を支える神経回路については未解明であった。そこで本論文の後半では、ESP22 を受容する鋤鼻受容体、ESP22 の雌マウスへの機能、また、雌マウスの行動発現に重要な脳領域を明らかにすることを目標とした。

1. ESP1 を受容する V2Rp5 発現神経細胞を起点とした順行性神経トレーシング

ESP1 は、鋤鼻神経細胞に発現する G タンパク質共役型受容体のひとつである V2Rp5 で受容される。また、ESP1 によって活性化される鋤鼻嗅覚系の高次中枢には性的二型が存在する。しかしながら、受容体である V2Rp5 発現神経細胞を起点とした神経回路網のマッピングはなされていなかった。ここでは順行性神経トレーサーを用い、V2Rp5 発現神経細胞を起点とした神経回路網の可視化を目指した。近年、単純ヘルペスウイルスを改変し、順行性かつ経シナプス性の神経トレーサーとして用いる手法が開発された。そこで、改変型

単純ヘルペスウイルス (H129ΔTK-TT) を用いて、順行性神経トレーシングを行った。

H129ΔTK-TT は初期感染したあと、Cre 組み換え酵素 (Cre) が発現している神経細胞においてのみ増殖が可能であり、その後は経シナプス性の性質とともに順行性に感染する。H129ΔTK-TT を用いるために、V2Rp5 と Cre を共発現させたトランスジェニックマウスを作製した。まず、BAC (bacteria artificial chromosome) を用いたターゲティングベクター (V2Rp5-IRES2-Cre-Kan^r) を相同組み換えによって作製し、それを受精卵にインジェクションすることでトランスジェニックマウス V2Rp5-Cre を作製した。V2Rp5-Cre マウスの一次神経に H129ΔTK-TT を微量注入し、V2Rp5 発現神経細胞特異的に H129ΔTK-TT を感染、増殖させた。微量注入後、2-3 日後ならびに 4 日後に個体の解剖を行い、感染細胞特異的に発現する蛍光タンパク質 tdTomato を指標として定量することで、各脳領域における H129ΔTK-TT の感染の有無を解析した。2-3 日後では、鋤鼻嗅覚系の二次中枢のうち、扁桃体内側核 (MeA) と扁桃体後内側部 (PMCo) で強い感染が観察された。また、4 日後では、MeA と PMCo に加えて、二次中枢の分界条床核 (BNST) と、三次中枢である視索前野 (MPA) と視床下部腹内側核 (VMH) において感染が確認された。以上の結果から、V2Rp5 発現神経細胞を起点とした神経回路網においては、一次中枢である副嗅球に情報が伝達された後、まずは主に MeA と PMCo に、続いて MPA や VMH など、さらなる高次中枢へと伝達がされている可能性が示唆された。また、感染細胞の分布パターンに明瞭な雌雄差は観察されなかった。本項の実験によって、単一の鋤鼻受容体 V2Rp5 を発現する神経細胞を起点とした神経回路網を、継時的な変化とともに可視化することに成功した。

2. ESP22 の雌マウスに対する機能の解析

ESP22 は雄マウスの性行動を抑制することが知られているが、ESP22 の雌マウスに対する機能は明らかにされていない。そこで本項では、ESP22 の雌マウスに対する機能を明らかにすることを目指した。ESP22 は生後 1 週齢では遺伝子発現が見られず、生後 2-3 週齢に発現のピークが存在する。また、4 週齢以降でも遺伝子発現がほとんどみられない。つまり、幼少フェロモンといえる。そこで、ESP22 の雌マウスへの機能の解析にあたり母親マウスと交尾未経験雌マウスのそれぞれの行動解析を行った。提示された ESP22 の近くに留まるのか、もしくは、嫌悪するような行動を示すのかを明らかにするため、探索行動時間アッセイを行った。交尾未経験雌マウスでは、ESP22 を含むろ紙と含まないろ紙、それぞれに対する探索行動時間に有意な差は存在しなかった。一方、母親マウスでは、ESP22 を含むろ紙に対する探索行動時間が有意に長くなることが明らかになった。この結果は、ESP22 が交尾未経験雌マウスと母親マウスに対して異なる価値を有している可能性を示唆するものである。続いて、母親マウスにおける仔の巣への回収時間を測定した。母親マウスに ESP22 を事前提示すると、仔の回収時間に要する時間が有意に短くなった。すなわち、ESP22 が母親マウスの養育行動を促進する機能をもっていることが明らかになった。同時期に所属研究室で並行して進められた解析によって、ESP22 は交尾未経験雌マウスに対し

て、雄マウスからのマウントを拒否する行動を促進させることが明らかにされた。

以上の結果から、幼少マウスから分泌される ESP22 は、母親マウスと交尾未経験雌マウスに対して異なる行動を引き起こすことが明らかになった。幼少マウスは ESP22 を分泌することで、母親マウスの養育行動を促進させ、自らが十分な養育を受けることができる可能性を高めている。また、ESP22 が周辺に生息する母親以外の雌マウス、ならびに、雄マウスの性行動を抑制することで、マウスの個体群はその個体数が過度に増加してしまうことを防ぎ、属する個体の生育環境を健全に保つことができるのではないかと推測される。

3. ESP22 を受容する鋤鼻受容体の同定

鋤鼻器官に分布する鋤鼻神経細胞には、匂いなど揮発性の物質を主に受容する V1R ファミリー、ペプチドなど不揮発性の物質を受容する V2R ファミリー、また、揮発性アミンなどを受容する TAAR ファミリーの 3 種類の GPCR が発現している。ESP は不揮発性のペプチドであるので、V2R ファミリーで受容されると考えられる。まず、ESP22 の受容体同定にあたって、double *in situ* hybridization によって初期応答遺伝子 *Egr1* の mRNA と各 V2R の mRNA の共局在の有無を調べた。その結果、ESP22 の刺激によって発現誘導される初期応答遺伝子 *Egr1* の mRNA は、121 種類の V2R のなかで V2Rp4, V2Rp5, V2Rp6 の mRNA との共局在が観察された。これら 3 つの V2R が ESP22 の受容体候補となったが、3 つの V2R は相同性が高く、double *in situ* hybridization によってさらに絞り込みを行うのは困難であった。そこで、CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムによってそれぞれのノックアウトマウスを作製し、*in situ* hybridization と行動実験によって受容体を同定することとした。今回作製した V2Rp4, V2Rp6 ノックアウトマウスに加え、すでに作製されていた V2Rp5 ノックアウトマウスの副嗅球の切片を用い、初期応答遺伝子 *c-Fos* の mRNA プローブによる *in situ* hybridization を行った。V2Rp5 ならびに V2Rp6 ノックアウトマウスでは、ESP22 によって *c-Fos* の mRNA の発現が誘導された細胞数が有意に増加した。しかしながら、V2Rp4 ノックアウトマウスでは、ESP22 による *c-Fos* の発現が誘導された細胞数の有意な増加は観察されず、ESP22 が V2Rp4 で受容されていることが示唆された。また、V2Rp4 ノックアウト雌マウスを用いて性行動実験を行った。交尾未経験 V2Rp4 ノックアウト雌マウスでは、ESP22 による拒否行動の促進が観察されなかった。以上の結果から、ESP22 は単一の鋤鼻受容体 V2Rp4 によって受容されていることが明らかになった。

4. ESP22 が交尾未経験雌マウスの拒否行動を促進させる際の神経回路の解析

ESP22 を交尾未経験雌マウスに提示した際に、扁桃体内側核 (MeA)、分界条床核 (BNST)、視床下部腹内側核 (VMH) の 3 つの脳領域で初期応答遺伝子 *c-Fos* の発現が有意に上昇することが所属研究室において明らかになった。そこで、MeA、BNST、VMH のどの脳領域が雌マウスの拒否行動促進に関わっているのかを明らかにすることを目指した。

まず、3 つの脳領域のなかで BNST に着目した。Cre 組み換え酵素 (Cre) のコード領域が挿入されたアデノ随伴ウイルス (AAV) と、hM4Di のコード領域が挿入された AAV を

C57BL/6 雌マウスの BNST に微量注入した。hM4Di は Cre 特異的に発現するように設計されており、Cre を発現する AAV を同時に BNST に微量注入することで hM4Di を BNST だけで発現させることができる。hM4Di は CNO (Clozapine-N-Oxide) 存在下で神経活動を抑制する。そこで、AAV を微量注入したマウスに CNO を事前投与し、雌マウスの性行動実験を行った。CNO 存在下の BNST の神経活動が抑制されている状況では、ESP22 による雌マウスの拒否行動促進が観察されなかった。よって、雌マウスの拒否行動の促進には BNST が必要であることが示された。

次に、拒否行動の促進における BNST の十分性について解析を行った。ArcCre^{ER} 雌マウスの BNST に hM3Dq のコード領域が挿入された AAV を微量注入した。ArcCre^{ER} マウスは、タモキシフェン依存的に Cre を核内に発現する Cre^{ER} を、初期応答遺伝子 *Arc* のプロモーター下流に挿入したトランスジーンと、レポーターとなる tdTomato を Cre 依存的に発現するトランスジーンをもち、特定の刺激に应答する細胞を標識できる。本実験では、Cre 依存的に hM3Dq を発現する AAV の微量注入により、標識された BNST の細胞を再活性化できる。まず、AAV を注入した個体に、ESP22 または Tris 緩衝液をタモキシフェン存在下で提示し、活性化細胞群を標識した。そして、CNO 投与によって標識された BNST の細胞を再活性化させ、雌マウスの性行動を観察した。すると、ESP22 で標識した個体群で、雌マウスの拒否行動が高頻度で観察された。このことから、ESP22 によって活性化される BNST の神経細胞が、雌マウスの拒否行動の促進に十分性をもつことが示唆された。

BNST に分布する神経細胞の多くは抑制性の細胞である。よって、交尾未経験雌マウスが ESP22 を受容すると、BNST の抑制性の神経細胞群が活性化される。その結果、軸索を伸ばす下流の脳領域の神経活動が抑制され、拒否行動の促進が生じると推測される。

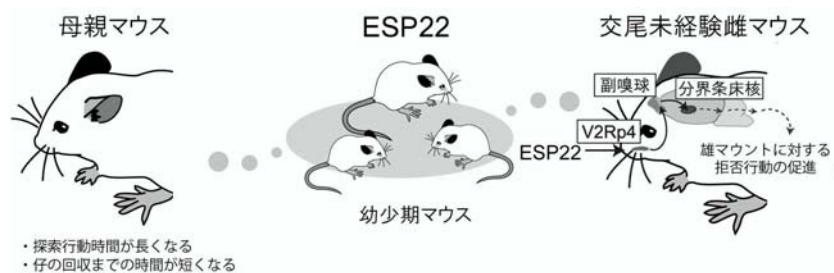


図 1) ESP22 の雌マウスに対する機能に関するモデル図

発表論文

1) Ferrero D, Moeller L, Osakada T, Horio N, Li Q, Roy DS, Cichy A, Spehr M, Touhara K, Liberles S. A juvenile mouse pheromone inhibits sexual behavior through the vomeronasal system. *Nature* **502**, 368-371 (2013)

2) Hattori T, Osakada T, Matsumoto A, Matsuo N, Haga-Yamanaka S, Nishida T, Mori Y, Mogi K, Touhara K, Kikusui T. Self-exposure to the male pheromone ESP1 enhances male aggressiveness in mice. *Current Biology* **26**, 1229-1234 (2016)