

審査の結果の要旨

氏名 小坂田 拓哉

生物は、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る。化学シグナルの一種であるフェロモンは、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。マウスにおいて、雄個体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、雌の性行動を促進するフェロモンとして機能していることが知られている。また、ESP は多重遺伝子ファミリーを形成しており、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、性成熟した雄マウスの性行動を抑制するフェロモンとして機能している。これらのフェロモンの情報は、鼻腔下部に存在する鋤鼻器官で受容され、副嗅球を介して扁桃体や視床下部へ伝えられる。本論文では、ESP1 と ESP22 に着目して、性行動の促進と抑制といった、相反する性特異的な社会行動へ至る神経回路を明らかにすることを目的としている。

第一章では、本研究の背景となる、匂いやフェロモンといった化学シグナルとその受容機構についての知見が記述されている。

第二章では、順行性の神経トレーサーである改変型単純ヘルペスウイルス (*H129ΔTK-TT*) を用いて、ESP1 受容体である V2Rp5 を発現する鋤鼻神経細胞を起点とした神経回路網の可視化がおこなわれた。ESP1 の受容体である 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、Cre 依存的に *H129ΔTK-TT* を感染させてから 2-4 日後に、感染細胞特異的に発現する *tdTomato* の陽性細胞数を定量した。2-3 日後では、扁桃体内側核と扁桃体後内側皮質核で強い感染が観察されたが、分界条床核、視索前野、視床下部腹内側核は、4 日後になってはじめて顕著な感染が確認された。すなわち、単一の鋤鼻受容体 V2Rp5 を発現する鋤鼻神経細胞を起点とした神経回路網を経時的に可視化することに成功した。

第三章では、ESP22 の組み換えタンパク質を用いて、雌マウスに対する機能解析がおこなわれた。まず、ESP22 に対する探索行動実験をおこなったところ、交尾未経験雌マウスは ESP22 に対して特に興味を示さなかったが、母親マウスでは ESP22 を探索する行動時間が有意に長かった。さらに、母親マウスに ESP22 を事前提示すると、仔の回収に要する時間が有意に短くなった。すなわち、ESP22 は母親マウスの養育行動を促進する機能をもつことが明らかになった。一方、ESP22 を受容した交尾未経験

雌マウスは、雄マウスのマウントを顕著に拒否した。つまり、ESP22 は、母には養育行動促進、他の雌には性行動抑制（受け入れ拒否）といった異なる機能をもつことがわかった。自然界では、ESP22 の働きによってマウス群内の個体数の過度の増加が防止され、郡内の個体の生育環境が健全に保たれている可能性が考えられる。

次に、ESP22 を受容する鋤鼻受容体の同定がおこなわれた。初期応答遺伝子 *Egr1* と各鋤鼻受容体 *V2R* の共局在の有無を調べた結果、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 と共局在することが明らかになった。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て解析した結果、ESP22 の受容体が *V2Rp4* であることがわかった。すなわち、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。

さらに、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がおこなわれた。初期応答遺伝子 *c-Fos* の発現誘導で ESP22 シグナルとの関わりが示唆された扁桃体内側核、分界条床核、視床下部腹内側核の3つの脳領域のなかで、分界条床核の神経活動を Cre 依存的な hM4Di の発現によって抑制したところ、ESP22 による受け入れ拒否行動の促進が消失した。一方、*ArcCre^{ER}* 雌マウスを用いて、分界条床核内の活性化細胞特異的に hM3Dq を発現させたところ、拒否行動の促進が観察された。これらの結果より、ESP22 によって活性化される分界条床核の神経細胞が、雌マウスの拒否行動促進に必要十分性を有していることが示された。

本研究では、マウスにおいて、涙腺から分泌されるタンパク性のフェロモンによって引き起こされる新規行動が明らかにされ、さらに最先端のウイルス遺伝学と分子生物学的手法を用いて、その行動を制御する受容体と神経回路が同定された。これらは、多くの生物に共通する社会行動についての理解を深めることにつながる成果である。また、マウスなど都市部で繁殖している齧歯類の個体数制御の戦略に応用できる知見である。

以上、これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。