

論文の内容の要旨

論文題目 血液ヘモグロビンのマウス鋤鼻器を介した生理作用についての研究

氏名 阿部 峻之

序論

環境への適応は、外界からの情報を正確に受け取ることからはじまる。自然界から情報を感知し、適切な応答をすることは、生殖、生存に必須である。自然界から発せられる多くの重要な情報は、嗅覚器で受容されている。中でも嗅覚系のサブシステムである鋤鼻器で受容される同種もしくは他種の個体からシグナルは、受容者の定型的な反応を引き起こすことが知られている。たとえば、雄のマウスから発せられるフェロモンである ESP1 は、鋤鼻受容体 V2Rp5 によって受容され、雌の性行動を促進する。他にも同種、他種個体の情報が鋤鼻器を介して、マウスの定型的な行動を誘引することが明らかになりつつある。

ところで、この ESP1 が同定された際、組織に混入した血液が鋤鼻器を刺激するという示唆が得られていた。血液の情報は、肉食動物にとっての被捕食者の情報となりうると考えられている。また、被捕食者にとっては危険シグナルとして働くことも、水生動物では示されている。本研究は哺乳類における血液シグナルの意味を紐解くために、実際に鋤鼻で受容される血液中の物質を同定することを目的とする。また、分子レベルでの鋤鼻活性化の仕組みを明らかにし、さらに生理学的、行動学的見地から、マウスにとって血液を鼻で感知することの意義を明らかにすることを試みる。

結果

1. 血液に含まれる鋤鼻活性物質の同定

実際に血液が鋤鼻器を刺激するかどうか確かめるために、さまざまな血液用量でマウスを刺激した。血液刺激を受けたマウスの鋤鼻を免疫組織化学染色に供したところ、1 μ l の血液で初期応答遺伝子である c-Fos、Egr-1 の発現誘導が確認された。また、リボソームを構成する ribosomal protein S6 のリン酸化も確認された。S6 のリン酸化が鋤鼻活性化の指標となることは、本実験で初めて明らかにされたことである（参考文献）。また、これらのシグナルは鋤鼻上皮における基底

層にのみ観察することができた。鋤鼻神経の一次投射先である副嗅球の僧帽・房飾細胞層においても、尾側にシグナルが観察された。これらの結果は、血液が鋤鼻神経に発現する G タンパク共役型受容体 V2R ファミリーを活性化していること、また、一次感覚神経である鋤鼻神経で受容された情報が二次神経に伝達されていることを示すものである。

血液に含まれる鋤鼻活性物質を同定するために、副嗅球における c-Fos 発現誘導を活性化の指標として活性物質の精製を行った。BALB/c マウス雄の血液を遠心分離したところ、血球成分にのみ活性があることがわかった。さらにこの血球画分を陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに供したところ、2 つのメジャーなピークに分かれた。吸光スペクトル測定によって、この二つは BALB/c マウスの血液に含まれる、異なるヘモグロビンのアイソフォームであることが分かった。過去の文献に倣い、これらを Major と Minor とする。活性検定を行ったところ、Major ヘモグロビンの存在する画分でのみ活性が確認された。逆相クロマトグラフィーで更なる精製を行ったところ、ヘモグロビンを構成する α グロビン、 β グロビン、ヘムに分画され、その中で β グロビンの画分に活性があることが確認された。これらの物質の同定は質量分析及び、吸光スペクトル測定にて行った。

続いて、精製したヘモグロビンに対して鋤鼻神経が電気的な応答を示すかどうか、鋤鼻電図測定によって検証した。その結果、ヘモグロビンや β グロビンによって引き起こされる、電気応答が観察された。一方で、 α グロビンは応答を引き起こさなかった。

β グロビンが活性物質であることを確認するために、組換えタンパク質の作製を行った。その結果、組換え β グロビン(β major)によって、副嗅球が活性されることが分かった。一方で、Minor ヘモグロビンに含まれる β グロビン (β minor) の組換えタンパク質は活性をもたなかった。以上の結果から、血液に含まれる鋤鼻活性物質は β グロビン (β major) であり、自然条件ではヘモグロビンが鋤鼻器で受容されていることが明らかになった。

2. ヘモグロビンのアイソフォームの活性と構造について

上記の結果から、BALB/c に含まれるヘモグロビンの 2 つのアイソフォームは鋤鼻刺激活性が異なることが明らかになった。ヘモグロビンは普遍的に生物が保有する、アミノ酸配列の保存性が高い物質である。異系統、異種のヘモグロビンが鋤鼻刺激活性を示すのかどうか検定したところ、C57BL/6 マウス、ラット、モルモット、ヒトのヘモグロビンは、BALB/c マウスのものと同等の活性があることが分かった。一方で、ウマヘモグロビンの活性は上記生物種のもの比べてやや弱く、またゼブラフィッシュ、アフリカツメガエルのヘモグロビンには活性が無いことが明らかになった。 β major、 β minor、また、C57BL/6、ラット、ヒト、ウマ、モルモットの β グロビンの

アミノ酸配列を比べたところ、 β minor と、ウマの β グロビンにのみ含まれるアミノ酸変異を 3 か所見出した。この 3 か所に変異を導入したマウス β グロビンの組換えタンパク質を作製した。これらを用いて活性検定を行ったところ、N 末端から 17 番目のグリシンをアラニンに変えた変異体で、顕著に活性が減少することが分かった。構造上、このグリシンは第一 α ヘリックスの終端に位置し、ヘモグロビンの立体構造の中で表面に位置することが分かった。このことは、17 番目のグリシンやその近くの構造が、ヘモグロビンと受容体の相互作用に重要な役割を果たしていることを示唆する。

3. ヘモグロビンの持つ情報について

マウスがヘモグロビンを鼻で感知することによってどのような意味を持つのか。まず、血が出る状態として、自己や他己、あるいは他の種の負傷の場合がある。それに対する応答として、雑食であるマウスが負傷した獲物を食べる行動、仲間に対する社会行動、または危険のシグナルとしてストレスを感じるという可能性を考えた。

まず、摂食行動に対する血の影響を検証した。血の付いたエサと血の付いていないエサを与えて、どちらを好むかを検定した。その結果、血の付いたエサを好んで食べる行動も、避ける行動も観察できなかった。次にヘモグロビン刺激をしたマウスの社会行動を観察した。居住者-侵入者テストを行い、刺激を受けたマウスの侵入相手に対する匂い嗅ぎ行動、グルーミング、マウンティング、攻撃、というパラメータで時間と回数を定量化したが、コントロール刺激との間に差を見出すことが出来なかった。続いて、ヘモグロビン投与による自律神経系への影響を、テレメトリーを用いて検討した。ヘモグロビン刺激から経時的な体温変化を観察した結果、コントロールである水刺激とヘモグロビン刺激の間に体温上昇の差異は認められなかった。

ヘモグロビン刺激を受けたマウスの不安様行動について評価を行うために、オープンフィールド試験を行った。ヘモグロビン刺激を行ったマウスを、フィールドに放ち観察した。その結果、不安様行動を評価する指標である、中央への侵入時間に差はなかった。しかし、詳細に行動を見ていくと、移動距離が有意に減少した。この差は止まっていた時間が長くなったのではなく、速度の低下によって説明されることが分かった。また、試験中のマウスの行動として、壁際での立ち上がり行動の時間が上昇することが分かった。続いて、高架式十字迷路試験を行った。こちらでも不安様行動の指標である、オープンアームへの侵入には変化が見られなかったが、立ち上がり行動の時間が上昇した。

ヘモグロビンの生理作用が急性の刺激では効果が弱く、差が観察できない可能性を考えた。そこで 2 週間にわたり継続的にヘモグロビン刺激をして、行動の変化や、臓器の秤量、血液検査を

行った。2週間の刺激の中で、摂食量や飲水量、体重変化には差がなかった。2週間後の行動試験は、オープンフィールド、新奇物質探索テスト、十字式高架迷路を行ったがコントロールとの差はなかった。一方で、各種の臓器を秤量したところ、ヘモグロビン投与群で副腎の重量が有意に増えていることが分かった。

考察

本研究において、マウスが鋤鼻系を介して血を感知できることが分かった。さらに血に含まれるヘモグロビンが鋤鼻活性因子であることを明らかにした。ヘモグロビンは鋤鼻器で受容され、副嗅球へとその情報が伝わる。そして、二次神経を介してさらに中枢へと情報が送られていることが示唆された。この情報が、マウスにとってどのような意味を持っているのかを、生理学的、行動学的に明らかにしようと試みた。さまざまな実験の結果、ヘモグロビン刺激したマウスにおいて新奇環境での行動に変異がみられた。具体的には歩く速度が遅くなり、立ち上がりの行動時間が増えた。これらの意味づけはそれだけでは難しく、脳におけるヘモグロビン刺激による活性様式などから多角的に評価することが必要となる。また、継続的な刺激によって、副腎の重量が上昇した。ストレスホルモンを産生する臓器である副腎の重量増加は、一般的に継続的な強いストレス環境下の動物において観察される。しかし本実験において、急性なヘモグロビン刺激がマウスの血中ストレスホルモン濃度を上昇させる証拠は得られていない。ストレスによるものとは別の機構で、副腎重量を増加させていることが示唆される。

一方、本研究室において、ヘモグロビンの鋤鼻受容体が同定されている。さらにその欠損マウスも作製されている（江口修士論文）。このマウスを用いた実験により、詳細な解析が可能になると考える。

参考文献

Abe T, Touhara K. (2014) Biochem Soc Trans. 42(4) 873-877.