

## 論文内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成 23 年度博士課程 進学  
氏名 角田麻衣  
指導教員名 東原和成

## 論文題目

ラット涙液に含まれるマウス鋤鼻活性物質に関する研究

### 【序論】

マウスなどげっ歯類の鋤鼻器官は、鼻腔下部に位置する円筒状の神経上皮であり、フェロモンを含む本能行動の誘起に関わる物質を受容していると考えられている。近年当研究室で、雄マウスの涙液から 7 kDa のペプチド ESP1 (Exocrine-gland Secreting Peptide 1) が鋤鼻活性物質として同定された (Kimoto et al., 2005)。ESP1 は雌マウスの雄に対する交尾受け入れ行動を促進させる物質であり (Haga et al., 2010)、「同種他個体に特定の行動や生理的变化を引き起こす物質」というフェロモンの定義に当てはまる。この先行研究により、涙液は同種内での個体間コミュニケーションに関わる分子を分泌していることが見出された。それでは、涙液により仲介される個体間コミュニケーションは同種内のものだけにとどまるのであろうか。本研究では、捕食者-被捕食者の関係にあるラットとマウスに着目し、涙液から異種のシグナルとなる鋤鼻活性物質を同定すること、さらにその生理的機能を解明することを目指した。

### 【結果】

#### 1、涙液刺激によるマウス副嗅球での c-Fos 発現誘導

ラットの涙液に、マウスの鋤鼻器官で受容される物質が含まれているかどうかを調べるために、ラットの涙液でマウスを刺激した時に、鋤鼻神経において、神経活性化のマーカータンパク質である c-Fos タンパク質が発現誘導されるかどうかを検証した。その結果、雄ラットの涙液を染み込ませたコットンでマウスを刺激すると、マウスの鋤鼻神経の投射先

である副嗅球の僧帽・房飾細胞層（MT 層）の主に尾側で c-Fos 発現誘導が観察された。尾側には、ペプチドなどの不揮発性物質を受容する神経が投射していることから、この結果は、雄ラットの涙液には不揮発性の鋤鼻活性物質が含まれていることを示唆する。次に、ラット以外の様々な生物種の涙液にもマウスの鋤鼻神経で受容される物質が含まれているかどうかを検証した。その結果、ヒトの涙液で刺激したマウスでは、副嗅球の MT 層において c-Fos 発現誘導が観察されなかったが、イヌ、ネコ、ウマ、ヤギの涙液で刺激したマウスでは c-Fos 発現誘導が観察された。これらの結果から、ラットを初めとする様々な生物種の涙液には、マウスの鋤鼻器官で受容される物質が含まれていることが初めて示唆された。

## 2、 ratESP のマウス鋤鼻活性の検討

異種のシグナルとなる涙液中の鋤鼻活性物質を同定する目的に際して、マウスの捕食者でもあるラットの涙液に着目した。現在、涙液に分泌される不揮発性の鋤鼻活性化物質として唯一知られているものは、ESP ペプチドファミリーである。そこで、ラット涙液に含まれるマウス鋤鼻活性物質として、ラットの ESP (ratESP) を候補とした。ラットゲノム上に存在する 10 個の ratESP ファミリー遺伝子の涙腺における発現解析の結果、ratESP5、ratESP7 が雌ラットの涙液に分泌されていることが明らかになった。そこで、ratESP5、ratESP7 の組換えタンパク質を作製し、コットンに染み込ませてラットとマウスを刺激したところ、雄ラットの副嗅球の MT 層においては c-Fos 発現誘導が観察されたのに対し、マウスの副嗅球の MT 層では c-Fos 発現誘導が観察されなかった。これらの結果から、ratESP5、ratESP7 は、ラット種内においては性の情報を持つ鋤鼻活性物質として機能している可能性があるが、ラットの涙液に含まれるマウス鋤鼻活性物質は、ratESP5、ratESP7 以外の物質であることが示唆された。

## 3、ラット涙液に含まれるマウス鋤鼻活性物質の同定

そこで、ラットの涙液を HPLC に供して分画し、それぞれの画分を染み込ませたコットンでマウスを刺激して、副嗅球での c-Fos 発現の有無を観察することにより、鋤鼻活性物質の精製を行った。精製の結果、HPLC の 280 nm における吸収クロマトグラムおよび SDS-PAGE より、単一のタンパク質が含まれると推測される活性画分が得られた。この活性画分を N 末端ペプチドシーケンスに供すると、得られたアミノ酸配列は cystatin-related protein 1 (ratCRP1) の配列と一致した。

## 4、ratCRP1 の相同遺伝子の解析

ratCRP1 の相同遺伝子検索を、ラットゲノムに対して行った。その結果、ラットゲノム上には ratCRP1 と相同な遺伝子が 18 種存在すること、さらにこれらの遺伝子は、全てシスタチンファミリー遺伝子に属していることが明らかになった。さらに、マウスやヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ヤギのゲノム上にもシスタチンファミリー遺伝子が存在することが判

明した。

## 5、ratCRP1 の発現解析

ratCRP1 が、実際に涙液をつくる外分泌腺で発現し、涙液に分泌されているかどうかの検証を行った。RT-PCR 法による解析の結果、ratCRP1 遺伝子は、涙液をつくる外分泌腺のうち眼窩外涙腺で発現していることが明らかになった。また、ウェスタンブロット法による解析の結果、ratCRP1 は雄ラットの涙液、唾液、尿のうち、涙液に特異的に分泌されることが明らかになった。

## 6、ratCRP1 の鋤鼻活性について

ratCRP1 が実際にマウスの鋤鼻神経を刺激する物質であるかどうかを調べた。組換え ratCRP1 を作製し、コットンに染み込ませてマウスを刺激したところ、副嗅球の MT 層の尾側で c-Fos 発現誘導が観察された。一方で、鋤鼻神経細胞の鋤鼻受容体を介したシグナル伝達経路に必要なイオンチャネルである Transient receptor potential C2 (TRPC2) 遺伝子を欠損させたマウスを ratCRP1 で刺激したときには、c-Fos 発現誘導が観察されなかった。これらの結果から、ratCRP1 は雄ラットの涙液に分泌され、鋤鼻受容体を介してマウスの鋤鼻神経を活性化する物質であることが明らかになった。

## 7、ratCRP1 の生理的機能の検討

ratCRP1 がマウスにどのような行動もしくは生理的変化を引き起こすのかを明らかにするために、以下の 5 つの観点から実験を行った。

### ① ratCRP1 刺激による高次脳での c-Fos 発現誘導

組換え ratCRP1 でマウスを刺激した際に、高次脳におけるどの領域で c-Fos 発現誘導が引き起こされるかを観察したところ、視床下部腹内側核の背内側部で c-Fos 発現細胞数の有意な上昇が確認された。視床下部腹内側核の背内側部は、マウスの防御反応が引き起こされる際に活性化される部位であることが知られていることから、ratCRP1 がラットという捕食者の情報として受容され、マウスの防御反応に関わっている可能性が示唆された。

### ② ratCRP1 刺激による血中コルチコステロン量の変化

ラットとマウスは捕食者-被捕食者の関係にあることから、ratCRP1 は、マウスに受容されると、マウスの血中において、ストレスホルモンであるコルチコステロンの量を上昇させるのではないかと考えた。そこで、ratCRP1 刺激をしたマウスの血中コルチコステロン量を測定したところ、血中コルチコステロン量が有意に上昇することが示された。一方で、TRPC2 遺伝子を欠損させたマウスを ratCRP1 で刺激したところ、血中コルチコステロン量の上昇は観察できなかった。この結果から、ratCRP1 は鋤鼻神経を介してマウスの血中コル

チコステロン濃度を上昇させている可能性が示唆された。この結果から、**ratCRP1** は鋤鼻神経を介してマウスの血中コルチコステロン濃度を上昇させている可能性が示唆された。

### ③ **ratCRP1** がマウスの巣作り行動に関わるかの検証

**ratCRP1** を塗布した区画に、マウスが巣をつくらなくなるかどうかを観察した。その結果、コントロールを塗布した場所に巣をつくる割合と、**ratCRP1** を塗布した場所に巣をつくる割合では差が認められなかった。このことは、**ratCRP1** はマウスの忌避行動を引き起こさないことを示唆する。

### ④ **ratCRP1** 刺激による体重変化

捕食者のシグナルを認識した被捕食者では、体重の減少が引き起こされることが知られている。そこで、**ratCRP1** を与えたマウスで体重の減少が引き起こされるかどうかを観察したところ、**ratCRP1** を与えたマウスでは、コントロールと比較して体重の減少は認められなかった。

### ⑤ **ratCRP1** 刺激による自律神経系の変化

捕食者のシグナルを認識した際に、自律神経系の支配下にある、体温、心拍数、活動量に変化が見られることが知られている。そこで、**ratCRP1** を与えたマウスで、自律神経系の変化が引き起こされるかどうかを観察したところ、体温、心拍数、活動量の全てに低下が引き起こされることが明らかになった。

## 【総括および展望】

本研究では、ラットの涙液に含まれる新規マウス鋤鼻活性物質として、機能未知のタンパク質である **ratCRP1** を同定した。涙液から、異種個体の鋤鼻神経を活性化させる物質を同定したのは、本研究が初めてである。マウスの鋤鼻神経で受容された **ratCRP1** のシグナルは、マウスの防御反応が引き起こされる際に活性化される高次脳部位、視床下部腹内側核の背内側部へと伝達される。同時に、ストレスホルモンである血中コルチコステロン濃度の上昇を引き起こす。そして、体温、心拍数、運動量の下降といった、自律神経系の変化を引き起こす。これらの結果は、ラットの涙液から分泌される **ratCRP1** はマウスの防御反応を引き起こす可能性を示唆している。今後は、**ratCRP1** を用いて行動や高次脳の活性化領域について詳細に解析することで、鋤鼻神経系を介して制御される種間コミュニケーションに関する新知見が導き出されることが期待される。**ratCRP1** は、ESP や Major Urinary Protein (MUP) など他の鋤鼻活性物質と同様に、ゲノム上で遺伝子ファミリーを形成する。さらに、ESP や MUP とは異なり、**ratCRP1** の相同遺伝子は、げっ歯類のみならず、ヒトなど様々な生物のゲノム上にも存在する。今後は、他の生物種においても、シスタチンファミリーが個体間のコミュニケーションに関わっているかを明らかにしていきたい。