

機関番号：12601

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006年度～2010年度

課題番号：18077001

研究課題名（和文）個体生存戦略における匂い・フェロモンセンサーの環境応答機能

研究課題名（英文）Studies on odorant and pheromone receptor as a chemosensor for the external environment

研究代表者 東原 和成

（東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授）

研究者番号：00280925

研究成果の概要（和文）：

匂いやフェロモンは、食物認知、個体認識、生殖活動の誘発など生存に不可欠な行動や習性を制御する。これら化学情報分子は、多重遺伝子ファミリーを構成する七回膜貫通型受容体によって感知される。本研究では、カイコにおける匂いやフェロモン受容体、およびマウスのペプチド性フェロモンの受容体の構造と機能を解析し、脊椎動物と無脊椎動物における化学感覚受容体の高感度分子認識機能と情報伝達機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Animals are attracted by general odorants derived from food or by pheromones released from the opposite sex. The chemical information is detected by seven-transmembrane chemosensory receptors expressed by peripheral olfactory sensory neurons. In this project, we revealed the molecular mechanisms underlying chemosensory reception and the neural circuitry activated by the chemosensory receptors for a pheromone or a biologically important odorant that is crucial for survival or mating in various animal species.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	14,800,000	0	14,800,000
2007年度	13,900,000	0	13,900,000
2008年度	17,600,000	0	17,600,000
2009年度	17,300,000	0	17,300,000
2010年度	14,500,000	0	14,500,000
総計	78,100,000	0	78,100,000

研究分野：生命科学

科研費の分科・細目：特定領域

キーワード：匂い、フェロモン、嗅覚、センサー、受容体、チャネル、昆虫、マウス

1. 研究開始当初の背景

多くの生物では、匂いやフェロモンといった化学物質の情報を介して、食物の認知、個体の認識、生殖活動の誘発など生存に不可欠な行動や習性が制御されている。これら外部環境からの化学情報は、高感度・高選択性の嗅覚センサーによって受容され、脳へシグナル伝達され、最終的に生存のための個体応答というアウトプットに変換される。センサー

分子である嗅覚受容体とフェロモン受容体は7回膜貫通型タンパク質であり、昆虫から哺乳類まで多くの生物において多重遺伝子ファミリーを形成している。90年代から2000年前半にかけて、受容体の機能解析は徐々に進んできたが、多くの受容体はリガンドのわかっていないオーファン受容体であり、リガンドがどのようにして感知され、どのようにしてシグナルが伝達されて、どのような神経回路を介して行動や生理的变化などが引き

起こされるか、分子レベルでの知見は乏しい。

2. 研究の目的

匂いやフェロモンの受容体の構造・発現空間・機能は、生物の進化の過程で、情報分子の性質の変化とともに、適応変化してきている。この変化を我々は受容体（センサー）のモーダルシフトと呼ぶ。本研究では、独自の嗅覚システムを進化させた齧歯類と昆虫に着目して、匂いとフェロモンのセンサー機能、センサー間相互作用、センサーを介した情報伝達経路、センサー情報を統合する神経回路網、センサー刺激による行動・内分泌変化などの個体応答を解析して、細胞感覚モジュールとしての嗅覚センサーの構造的・機能的モーダルシフトを解析する（図1）。すなわち、情報分子であるフェロモンの物性が環境要因によって変遷し、センサーが構造的・機能的にどのように適応してきたかという分子進化を明らかにすること（進化時間軸のモーダルシフト）、個体レベルで匂いという食シグナルとフェロモンという生殖シグナルが区別されるセンシング機構を明らかにすること（発現空間軸のモーダルシフト）、昆虫の嗅覚においてセンサー間相互作用が信号変換にどのように関わるか（構造的モーダルシフト）を明らかにすることを目指した。

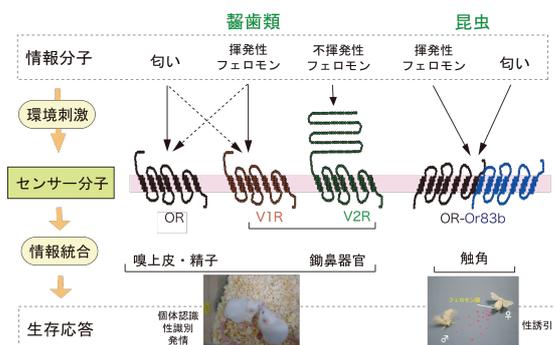


図1. 本研究で対象とする匂いやフェロモンのセンサーの構造と機能

3. 研究の方法

(1) マウスの匂いセンサー：

マウス嗅球における匂いの応答はカルシウムイメージング法を用いた。応答糸球体に蛍光色素を注入し、レトログレードに嗅神経細胞をラベルして、発現嗅覚受容体遺伝子をクローニングした。マウス嗅覚受容体はHEK293細胞を用いて機能解析を行った。

嗅粘液を鼻腔内から洗いながら採取し、匂い物質の酵素変換反応を、ガスクロマトグラフィ質量分析計で定量した。酵素変換の匂い知覚への影響は、報酬行動実験で検証した。

(2) 昆虫の嗅覚センサー：

昆虫の嗅覚受容体は、アフリカツメガエル

卵母細胞で発現させて、リガンド応答を測定した。ガスクロマトグラフィ質量分析計と誘引行動実験を組み合わせ、桑の葉の抽出物のなかからカイコを誘引する匂い物質を同定した。カイコ触角における受容体の発現は、in situ hybridization法を用いて解析した。昆虫嗅覚受容体複合体をHEK293細胞に発現させて、リガンドに対する応答をパッチクランプおよび単一チャネル記録で測定した。

(3) マウスのフェロモンセンサー：

ESP1を認識する鋤鼻受容体は、免疫組織化学二重染色法によって同定した。トランスジェニックマウスを作製し、カルシウムイメージング法で受容体機能を解析した。受容体を発現する神経に赤色蛍光タンパク質を発現させて神経回路を可視化した。免疫組織化学染色法によって高次脳領域へのESP1の情報入力部位を同定した。行動実験によりESP1のフェロモン作用を解析し、受容体のノックアウトマウスを作製してその行動への影響を解析した。以上、生物有機化学、神経科学、細胞生理学、分子生物学、動物行動学の手法を駆使した。

4. 研究成果

(1) マウスの匂いセンサー：

匂いは数百種類にもわたる嗅覚受容体の組み合わせによって識別される。嗅球での匂い応答を指標に嗅覚受容体を機能的に同定する方法を確立し、自由行動下のマウスの匂い受容機構を明らかにした（Neuron 2006）。

匂い物質が嗅粘液中で酵素変換される現象を見出し、この反応が匂い知覚にも影響を与えることを示した。匂いの種類によっては、その匂いを純粋に感じているのではなく、その匂いと酵素代謝物の混合物をセンシングしているという発見である（図2、J. Neurosci. 2010）。

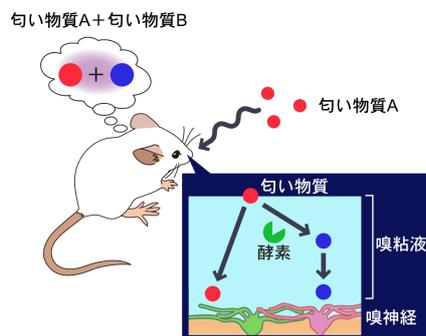


図2. 嗅粘液中で起こる匂い物質変換反応とその匂い知覚への影響。空気中を漂う匂い物質A（赤丸）の一部が、鼻腔内の嗅粘液中で酵素（緑）による反応を受けて匂い物質B（青丸）となる。その結果、脳では純粋に匂い物質Aを感じるのではなく、匂い物質Aと匂い

物質 B の混合物として知覚される。

(2) 昆虫の嗅覚センサー：

カイコは桑の葉に引き寄せられるが、それは微量に放出されるジャスミン様の香気シスジャスモンに強力に誘引されているからだとわかった。シスジャスモンの嗅覚受容体を同定し、その応答と行動に構造活性相関があることを見出した (Current Biol. 2009)。

昆虫の嗅覚受容体はアミノ末端が細胞質側に位置するという非典型的な 7 回膜貫通型受容体であり、ヘテロ複合体を形成する。細胞生物学・電気生理学的手法を用いて解析した結果、この複合体そのものが匂いやフェロモンによって開口するリガンド作動性チャネルであることがわかった (図 3、Nature 2008)。匂い受容体という同じ機能をもつ嗅覚受容体が、進化の過程で構造的モジュールシフトをおこした結果と考えられる。

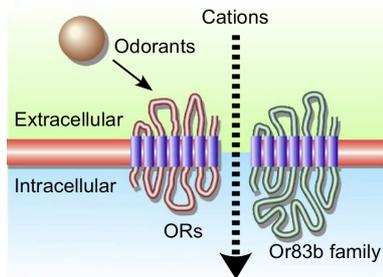


図 3. 昆虫の嗅覚受容体はヘテロ複合体を形成し、リガンド作動性のカチオンチャネル

(3) マウスのフェロモンセンサー：

オスマウスの涙腺から ESP1 と名付けた 7 kDa のペプチドが涙に分泌される。ESP1 は 40 個ほどからなる新規の遺伝子ファミリーの一つであることがわかり、メス特異的な ESP も存在した (Current Biol. 2007)。

ESP1 は鋤鼻器官に発現する V2R タイプの G タンパク質共役型受容体のひとつによって認識されていること、ESP1 刺激でメス特異的な脳神経回路が活性化すること、アウトプットとしてメスのロードシス性行動を促進することが明らかになった (図 4、Nature 2010)。具体的には、ESP1 は、鋤鼻神経(VSN)に発現する V2Rp5 受容体を活性化し、その結果、副嗅球 (AOB) に信号が伝わる。その後、分界条床核(BST)、扁桃体内側核(Me)および後内方扁桃皮質核(PMCo)に神経は投射し、視床下部腹内側領域 (VMH) を介して最終的にロードシス行動が引き起こされるという神経情報伝達経路が明らかになった。

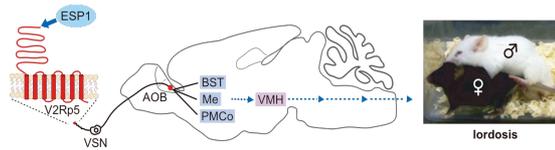


図 4. オスフェロモン ESP1 によるメスの性行動の促進にいたるシグナル伝達経路

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (英語計 25 件、日本語計 37 件)

1. Nagashima, A. and Touhara, K. "Enzymatic conversion of odorants in nasal mucus affects olfactory glomerular activation patterns and odor perception" **J. Neurosci.** 30, 16391-16398 (2010) (査読有)
2. Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Sato K, Nakagawa T, Funata M, Yamaguchi M, Namiki S, Nakayama R, Tabata M, Ogata H, Kubota N, Takamoto I, Hayashi YK, Yamauchi N, Waki H, Fukayama M, Nishino I, Tokuyama K, Ueki K, Oike Y, Ishii S, Hirose K, Shimizu T, Touhara, K., Kadowaki T. "Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1" **Nature** 464, 1313-1319 (2010) (査読有)
3. Haga, S., Hattori, T., Sato, T., Sato, K., Matsuda, S., Kobayakawa, R., Sakano, H., Yoshihara, Y., Kikusui, T. and Touhara, K. "The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behavior through a specific vomeronasal receptor" **Nature** 466, 118-122 (2010) (査読有)
4. Touhara, K. and Vossahl, L.B., "Sensing odorants and pheromones with chemosensory receptors" **Annu. Rev. Physiol.** 71, 307-332 (2009) (査読無)
5. Kim, K., Sato, K., Shibuya, M., Zeiger, D.M., Butcher, R.A., Ragains, J.R., Clardy, J., Touhara, K. and Sengupta, P. "Two chemoreceptors mediate the developmental effects of dauer pheromone in *C. elegans*" **Science** 326, 994-998 (2009) (査読有)
6. Oka, Y., Takai, Y., and Touhara, K. "Nasal airflow rate affects the sensitivity and pattern of glomerular odorant responses in the mouse olfactory bulb" **J. Neurosci.** 29, 12070-12078 (2009) (査読有)
7. Tanaka, K., Uda, Y., Ono, Y., Nakagawa, T., Suwa, M., Yamaoka, R., and Touhara, K. "Highly selective tuning of a silkworm olfactory receptor to a key mulberry leaf volatile" **Current Biology** 19, 881-890 (2009) (査読有)
8. Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T.,

- Nakagawa, T., Vosshall, L.B., and Touhara, K. "Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated channels" **Nature** 452, 1002-1006 (2008) (査読有)
9. Kato, A., Katada, S., and Touhara, K. "Amino acids involved in conformational dynamics and G-protein coupling of an odorant receptor: targeting gain-of-function mutation" **J. Neurochem.** 107, 1261-1270 (2008) (査読有)
 10. Kimoto, H., Sato, K., Nodari, F., Haga, S., Holy, T., and Touhara, K. "The mouse ESP family: sex and strain differences, and implications in the vomeronasal sensory system" **Current Biology** 17, 1879-1884 (2007) (査読有)
 11. Oka, Y., Katada, S., Omura, M., Suwa, M., Yoshihara, Y. and Touhara, K. "Odorant receptor map in the mouse olfactory bulb: in vivo sensitivity and specificity of receptor-defined glomeruli" **Neuron** 52, 857-869 (2006) (査読有)
- [学会発表] (国外計 33 件、国内計 111 件)
1. Touhara, K. Chemosensory receptor and behavior. International Titisee Conferences 2010.10.14 Titisee, Germany
 2. Touhara, K. Sensing odorant and pheromone. Janelia Farm Conference 2010.5.23-26 Janelia Farm, USA
 3. Touhara, K. The ESP peptide family and its role in chemical communication. European Chemoreception Research Organization Congress. 2009.9.24-27 Sargenia, Italy
 4. Touhara, K. Chemosensory receptors for odors and pheromones. International Congress of Physiological Sciences. 2009.7.27-8.1 Kyoto
 5. Touhara, K. Vomeronasal reception of a sex peptide pheromone ESP1 in mice: the receptor, neural circuitry, and behavior. 31st Annual meeting of association for chemoreception sciences 2009.4.22-26 Florida, USA
 6. Touhara, K. Chemosensory receptor and behavior. Keystone Symposium on Chemical Senses 2009.3.15-18 CA, USA
 7. Touhara, K. A neural circuitry activated by a sex-specific peptide pheromone in mice: sexual communication via direct contact. UK-Japan FoS symposium 2008.10.3-5 France
 8. Touhara, K. Emerging view of insect olfactory receptor signaling. International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT) 2008.7.21-28 CA, USA
 9. Touhara, K. Molecular mechanisms underlying sex pheromone reception. Keystone Symposium on Chemical Senses 2007.1.21-24 Utah, USA

[図書] (英語計 6 件、日本語計 4 件)

1. Touhara, K. Encyclopedia of Neuroscience Vol. 7. pp. 163-169, Oxford, Academic Press (2009)
2. Touhara, K. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology Vol. 1 Signaling in Neural Development and Function pp.141- 162, Springer (2009)
3. Touhara, K. The Senses: a comprehensive reference, Vol. 4, Olfaction & Taste pp.527-544, San Diego, Academic Press (2008)
4. 東原和成、香りを感知する嗅覚のメカニズム (八十八出版) 66 ページ (2007)
5. Touhara, K., Katada, S., Nakagawa, T., and Oka, Y. G protein coupled receptors: structure, function, and ligand screening pp.85-109, CRC (2006)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：マウスフェロモン

発明者：東原和成、菊水健史、寺沢宏明

権利者：東京大学、麻布大学、熊本大学

種類：特願

番号：2009-211748

出願年月日：2009.9.14

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/biological-chemistry/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者：東原和成

(東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授) 研究者番号：00280925

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし