

令和元年6月6日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07445

研究課題名(和文) 嗅覚受容体における匂い情報統合機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of olfactory receptors in odorant-induced physiological responses

研究代表者

松尾 朋彦 (MATSUO, Tomohiko)

関西医科大学・医学部・研究員

研究者番号：90641754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：匂い物質の感知によって先天的・遺伝的に決定された特定の情動やそれに付随した行動・生理応答を誘発し、個体や種の存続に有利に働くようなシステムを生物は獲得してきた。これら一連の匂い物質によって引き起こされる応答機構を明らかにするために、*in vitro*、*in vivo*のスクリーニングにおいて同定された匂い物質の受容体候補群を用い、それら受容体遺伝子破壊マウスの行動解析、匂い暴露後の脳の活性化領域の同定等を行った。これらの結果、特定の生理応答に関わる受容体を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、後天的な学習によらず、先天的な機構で特定の行動・生理応答を誘発する匂い物質と結合する受容体、またその匂い情報を受容し行動・生理応答の発現に関与する脳領域について知られていることは少なかった。本研究により、一連の生体応答の起点となる匂い物質の受容体、およびその下流で機能する脳領域の同定に繋がる結果を得ることができた。これらにより、匂い物質を用いて人体に有益あるいは有害動物などに不利益に働くような生理応答を人為的に誘発できるような系の開発につながる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Specific odorants induce innate, genetically-determined, behaviors and/or physiological responses without prior learning. Receptors and neural mechanisms underlying these odorant-induced innate responses have been poorly understood. Functional analysis of receptors, which were identified in our *in vitro* and *in vivo* screenings, demonstrated several candidate receptors and brain regions responsible for odorant-induced innate behaviors.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 嗅覚受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

匂いの感知、およびそれによって引き起こされる一連の応答は、匂い物質がその受容体に結合するところから始まる。多くの哺乳動物において、匂いを用いた外界からの情報 食物や他個体の存在など の感知は生存に必須の役割を持っている。匂いは情動とも深く結びついており、例えば腐った食物の匂いによって不快な情動が引き起こされる。またマウスにおいては、これまで出会ったことのない天敵の匂いに対して恐怖応答 (不快情動) を示すことが知られている。

このように特定の匂い物質によって先天的・遺伝的に決定された、特定の情動やそれに付随した行動・生理応答が誘発され、個体や種の存続に有利に働くようなシステムを生物は獲得してきた。これら一連の匂い物質によって引き起こされる応答がどのようなメカニズムによって誘発されているのか、これまで明らかになっていることは少ない。特に、後天的な学習によらず、先天的な機構で特定の行動・生理応答を誘発する生理活性をもつ匂い物質がどの受容体と結合するのか、またその受容情報が脳のどの領域に、どの様に伝わっているのかについてはほとんどわかっていなかった。

2. 研究の目的

私たちの研究室ではマウスをモデル動物として用い、匂い物質が惹起する行動や生理応答、あるいは脳内における神経細胞の活性状態を測定し、匂い物質がもたらす一連の生体応答の研究を行ってきた。そこで、これら一連の応答が誘発される際に、その起点となる末梢における匂い物質と受容体の結合を明らかにすることを目的として、特定の行動・生理応答を誘発することが知られている匂い物質の受容体スクリーニングを行ってきた。この結果、これまでに複数の受容体候補群を得ることができた。

そこで本研究では、ここで得られた受容体候補群を用いて、匂い物質の受容情報が脳へと伝わり最終的に行動や生理応答が誘発される機構を明らかにすることを目指し、匂い物質の末梢における受容機構の解明を試みた。

3. 研究の方法

まず、これまでに単離された受容体とそのリガンドである匂い物質が誘発する行動・生理応答に関与しているのかを明らかにするために、受容体遺伝子を破壊したノックアウトマウスを作製した。これら遺伝子破壊マウスの匂い物質提示後の行動解析を行った。また、これら受容体を発現する神経細胞を標識し、その投射先を明らかにするためにトランスジェニックマウスの作製も行った。さらに、神経活性化マーカーである c-fos 遺伝子の匂い物質暴露後の脳内における発現解析を受容体遺伝子破壊マウスで行った。

4. 研究成果

In vitro のスクリーニングにおいて同定された受容体の機能解析を行うために、CRISPR/Cas9 システムを用い、4 種類の受容体をターゲットとしたガイド RNA を同時に導入した。この結果、3 種類の受容体において遺伝子の前半部においてフレームシフトを誘発する変異が確認された。掛け合わせにより各受容体遺伝子にホモで変異を持つノックアウトマウスを作製した。これらノックアウトマウスに、受容体の in vitro リガンドである恐怖情動を誘発する匂い物質を提示し、恐怖行動の解析を行った。恐怖行動の指標として、マウスが動作を停止するすくみ行動を用い、これの頻度を経時的に測定することで恐怖行動の定量的な解析を行った。この結果、2 種類の嗅覚受容体のノックアウトマウスにおいて、恐怖を誘発する匂い物質に暴露時の恐怖行動が対照群のマウスよりも低下する傾向が観察された。これらのことから、恐怖情動に関与する匂い物質の新規受容体について新たな知見を得ることができた。また、スクリーニングにおいて同定された受容体を発現する神経細胞を蛍光標識するために、BAC トランスジェニックマウスの作製を行った。このトランスジェニックマウスにおいては、CFP 蛍光タンパク質および Cre リコンビナーゼが目的受容体とポリシストロニックにコードされ共発現することが期待される。全部で 6 種類の F0 マウスが得られ、野生型マウスと掛け合わせたのちに F1 マウスの解析を行った。このうち 2 システムにおいて CFP の発現が観察され、嗅神経細胞の投射先である嗅球において糸球体への軸索の投射が見られた。しかしながら、嗅球における CFP 蛍光が非常に弱く、投射糸球体を簡便に同定することは困難であった。

そこで次に、in vivo のスクリーニングにおいて同定された恐怖誘発匂い物質の受容体の解析を行った。この受容体遺伝子のノックアウトマウスでは、恐怖誘発匂い物質に暴露時の恐怖行動が対照群のマウスよりも著しく低下していた。また受容体を発現する神経細胞において神経活性化マーカーである c-fos の発現を調べたところ、恐怖誘発匂い物質の暴露時に c-fos の発現が誘導されることがわかった。またこの時、c-fos の発現が受容体発現神経細胞の投射先領域においても観察され、この c-fos 発現が受容体ノックアウトマウスにおいては低下してい

ることも明らかになった。さらに、受容体ノックアウトマウスでは恐怖情動に關与することが知られている脳中枢領域においても、恐怖誘発匂い物質の暴露時に発現誘導される c-fos の発現量が低下していた。これらのことから、受容体の下流で恐怖応答の発現に重要な脳領域が機能していることがわかってきた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Wang Y, Cao L, Lee CY, Matsuo T, Wu K, Asher G, Tang L, Saitoh T, Russell J, Klewe-Nebenius D, Wang L, Soya S, Hasegawa E, Cherasse Y, Zhou J, Li Y, Wang T, Zhan X, Miyoshi C, Irukayama Y, Cao J, Meeks JP, Gautron L, Wang Z, Sakurai K, Funato H, Sakurai T, Yanagisawa M, Nagase H, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Beutler B, Liu Q

Large-scale forward genetics screening identifies Trpa1 as a chemosensor for predator odor-evoked innate fear behaviors.

Nature Communications, 9, 2041 (2018)

DOI: 10.1038/s41467-018-04324-3

査読あり

Otsubo Y, Matsuo T, Nishimura A, Yamamoto M, Yamashita A

tRNA production links nutrient conditions to the onset of sexual differentiation through the TORC1 pathway.

EMBO reports (2018) 19, e44867

DOI: 10.15252/embr.201744867

査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

Tomohiko Matsuo, Tatsuya Hattori, Akari Asaba, Naokazu Inoue, Nobuhiro Kanomata, Takefumi Kikusui, Reiko Kobayakawa, and Ko Kobayakawa

Main olfactory system-mediated social behaviors in mice.

17th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT2016)

パシフィコ横浜、神奈川 (2016-06-05)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

(1)研究分担者
該当なし

(2)研究協力者
該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。