

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14558

研究課題名(和文) 情動と体温を結ぶ分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms linking emotion and body temperature

研究代表者

小早川 令子 (KOBAYAKAWA, Reiko)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：40372411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：先天的恐怖行動は遺伝的に規定されているものの、その分子基盤に関しては殆ど明らかにされていない。本研究では先天的恐怖行動を制御する分子機構を明らかにするための研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Innate behaviors are genetically encoded, but their underlying molecular mechanisms remain largely unknown. We analyzed molecular mechanisms regulating innate fear responses.

研究分野：神経科学

キーワード：情動

1. 研究開始当初の背景

先天的恐怖行動は遺伝的に規定されていると考えられるが、その分子基盤に関しては殆ど明らかにされていない。本研究では先天的恐怖行動を制御する分子機構を明らかにするための研究を行った。

先天的行動は動物が生存する上で普遍的かつ有利に働く。先天的行動は数なくとも以下の3つの重要な特色を持っている。

- (1) 先天的行動は本能的であり、学習を必要としない。たとえ隔離された環境で生育した動物であっても、先天的刺激に晒されると、それに対応した適切な先天的行動を示す。
- (2) 先天的行動はステレオタイプな行動パターンを示す。同じ種に属する全ての個体は毎回同じパターンの行動を示す。
- (3) 先天的行動は遺伝する。先天的行動は遺伝子を介して世代から世代へと受け継がれる。

しかしながら、先天的行動を支える遺伝的基盤に関してはこれまでほとんど明らかにされていなかった。

恐怖は基本的な情動であり、危険な状況において個体の生存を高めるための特徴的な行動と生理的反応を誘発する。恐怖は先天的と後天的なメカニズムによって誘発される。パプロフの恐怖条件付けパラダイムにおいて、げっ歯類は、匂い・音・視覚刺激などの条件刺激と電気ショックなどの無条件刺激を関連学習することにより、条件刺激に対してすくみ行動を示すようになることが知られている。これに対して、実験室で飼育されたげっ歯類は、何世代も天敵から隔離された条件で飼育されているにもかかわらず、本能的に蛇や猫などの天敵を恐れることが知られている。従って、先天的恐怖は進化的に保存され、遺伝的にコードされた生存メカニズムであると考えられる。そこで、我々は、先天的恐怖の分子メカニズムをフォワードジェネティクスにより明らかにすることは実行実現性が高いと考え、これを明らかにするための研究を行なった。

2. 研究の目的

げっ歯類の天敵の匂いである 2,4,5-trimethyl-3-thiazoline (TMT) およびその強力なアナログである 2-methyl-2-thiazoline (2MT) はげっ歯類に対して先天的な恐怖および防衛行動を誘発することが明らかになっている。本研究では、これらの先天的恐怖行動の誘発にかかわる分子を明らかにするための研究を行なった。

天敵の毛皮・皮膚・尿・糞・分泌腺から放出される天敵の匂いやカイロモンはマウスに対して先天的な、忌避行動やリスクアセスメント行動などの恐怖行動や防衛行動を引き起こすことが広く知られていた。その中でもキツネの分泌物に含まれる TMT は、カイロモンとして最もよく知られており、TMT

に未感作のマウスに対して本能的なすくみ行動を誘発することが知られている。TMT に行動が類似した 2MT は、強力な先天的すくみ行動を誘発する匂い分子として、我々の研究室により発見された (Cell 2015)。これまでは、マウスのゲノムに 1000 種類以上存在する嗅覚受容体遺伝子の中で、特定の嗅覚受容体遺伝子が TMT や 2MT に対する恐怖行動や防衛行動を誘発すると考えられてきた。我々の研究室は、背側の嗅神経細胞を遺伝的に除去した遺伝子操作マウスが、TMT に対する忌避行動を示さなくなることを報告した (Nature 2007)。また、分子生物学的・生化学的手法により、TMT に対して応答する嗅覚受容体が少なくとも約 20 種類程度報告されていた。また、嗅覚受容体遺伝子の 1 つである Olfr1019 を発現する嗅覚受容体遺伝子を光遺伝学的手法により活性化すると、マウスは不動行動を示し、Olfr1019 をノックアウトすると TMT に対するすくみ行動が部分的に阻害されることが報告されている。さらに、主嗅覚系とは異なるサブシステムである Grueneberg ganglion が TMT の誘発するすくみ行動に関わることが示唆されてきた。また、これとは別に、三叉神経系が TMT によるすくみ行動に関与するという可能性も示唆されていた。しかしながら、TMT や 2MT による先天的な恐怖行動の誘発に関与する決定的な分子メカニズムに関しては明らかにされていなかった。そこで、私たちはランダムに変異を導入したマウスから劣勢の変異マウスを大規模にスクリーニングするフォワードジェネティクススクリーニングを行うことで、2MT によって誘発される強力な先天的な恐怖行動を誘発する遺伝子を道程する研究を行なった。

3. 研究の方法

我々は、マウスの ENU ミュータジェネシスによる大規模な劣勢変異スクリーニングを行うことで、TMT および 2MT による先天的恐怖行動誘発にかかわる遺伝子の同定を行った。フォワードジェネティクススクリーニングを行う上では、強力なアッセイ系を確立することが不可欠となる。これまで試みられてきた後天的恐怖行動を担う分子のスクリーニングは、後天的恐怖行動にばらつきがあることが技術的に難しかった。これに対して、先天的な恐怖行動は、学習を必要としないために、操作が簡便であり、また遺伝的に規定されたステレオタイプな行動のため、個体間の行動のばらつきが非常に少ないことから、大規模なフォワードジェネティクススクリーニングを行う上で、非常に有利であると考えられた。強力な先天的恐怖を誘発する人工恐怖臭である 2MT は、キツネの匂いである TMT に比較すると安価で入手がしやすく、また 2MT によって誘発されるすくみ行動は、TMT によって誘発されるすくみ行動に比較するとはるかに強力で、個体間のばらつきが非常

に少ないことから、2MT を用いた行動アッセイ系を用いてフォワードジェネティクススクリーニングを行なった。マウスの週齢・2MT の量・アッセイの時間を検討した結果、野生型マウスでは匂いなしの条件で 0-15% のすくみ行動を示し、2MT ありの条件では 55-95% のすくみ行動を示す条件を確立した。この最適化した条件では、RSD 値が約 10% と小さく、この条件でフォワードジェネティクススクリーニングを行なった。この条件では 2MT を提示した際に 47% 以下のすくみ行動を示した場合に、3SD 以下のすくみ行動を示したことになるため、さらなる解析を行なうことにした。

我々は、表現系と ENU によって変異が導入された原因遺伝子との間の関係が瞬時に判明するような劣勢遺伝子スクリーニング系を構築した。ENU によって変異を導入された全ての G1 の雄マウスは野生型マウスと交配し、これによって生まれた G2 の娘マウスと交配することで 15 から 30 匹の G3 マウスのコロニーを産生した。全ての G1 マウスは次世代シークエンサーを用いて全エキソームシークエンスを行い、全ての G2, G3 マウスに関して変異遺伝子を明らかにした。G3 マウスは平均で 5.68 ± 3.8 の遺伝子に関してホモの変異を持っており、 24.7 ± 10.8 の遺伝子に関してヘテロの変異を持っており、 1.01 ± 4.2 の遺伝子に関して中間型の変異を持っていた。これらの独自の手法により、G3 の表現系のスクリーニングを行った後には、ENU によって導入された変異と表現系との間の関係性を速やかに同定することを可能にする系が構築された。

4. 研究成果

上述した大規模フォワードジェネティクスを用いて 13,222 匹の G3 マウスをスクリーニングし、2MT に対するすくみ行動に異常のある変異マウスを同定した。これらのスクリーニングにより、13,828 遺伝子の 33,069 のコーディングおよびスプライシングの変異の解析を行なった。この結果、約 6.5% の遺伝子に関しては十分に遺伝子が破壊されるとともに、3 から 4 匹のホモ変異を解析することが可能となった。本スクリーニングによって同定した変異ファミリーの中で、fearless と名付けたファミリーは、4 匹の表現系を解析した結果、2MT に対して 20-30% のすくみ行動しか示さなかった。マンハッタンプロットの結果、fearless は、Trpa1 遺伝子のホモ変異と強いリンクが見出された。Fearless は、Trpa1 遺伝子の 5' のスプライス配列に変異を持つことによってミスプライスが起ることで、mRNA が不安定となり、Trpa1 の全ての膜貫通ドメインを欠失した不活性な Trpa1 タンパク質を産生する null mutant となっていると予想された。これに対して、スクリーニングの過程で複数の Trp 変異ファミリーの表現系を解析したが、これらのファミリーは 2MT に対するすくみ行動の顕著な異常は認められなかったこれらの結果から、Trpa1 遺伝子は 2MT によって誘発され

る先天的恐怖行動に対して主要な役割を果たすことが示唆された。

ENU による Trpa1 の変異が fearless マウスで観察された表現系の異常の単独の原因であることを確認するために、Trpa1 ノックアウトマウスを Jax mice より購入・繁殖し Trpa1 ノックアウトマウスの表現系の解析を行なった。Trpa1 ノックアウトマウスは、オープンフィールドテストおよび高架十字迷路テストの結果、不安行動に異常は認められなかった。しかしながら、Trpa1 ノックアウトマウスは野生型マウスやヘテロマウスと比較すると 2MT および TMT に対するすくみ行動がほぼ完全に消失していた。また、Trpa1 ノックアウトマウスでは、2MT や TMT と類似した構造を持ち、アラームフェロモンの成分として知られている 2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazole (SBT) に対するすくみ行動も顕著に減少していた。Trpa1 発現神経細胞の多くは Trpv1 を共発現することが報告されている。そこで、Trpv1 ノックアウトマウスの解析を行い、Trpv1 が Trpa1 と共に 2MT や TMT によって誘発される恐怖行動に関与する否かを解析した。その結果、Trpv1 ノックアウトマウスで Trpa1 ノックアウトマウスとは異なり、2MT や TMT に対するすくみ行動に明らかな異常は認められなかった。従って、Trpv1 は 2MT や TMT によって誘発される先天的なすくみ行動に必須の遺伝子ではないと考えられた。2MT の呈示は、血液中のストレスホルモンとして知られるコルチコステロンのレベルを上昇させるが、Trpa1 ノックアウトマウスでは 2MT によるコルチコステロンの上昇がほぼ完全に消失することが明らかになった。

我々は Trpa1 遺伝子がすくみ行動以外の恐怖行動や防護行動に関与するか否かを明らかにするために、低濃度の 2MT に対する Trpa1 ノックアウトマウスの行動を解析した。その結果、Trpa1 ノックアウトマウスでは、低濃度の 2MT に対するすくみ行動が顕著に減少すると共に、低濃度の 2MT に対する忌避行動、驚愕反応、リスクアセスメント行動がヘテロマウスと比較して有意に減少していた。さらに我々は天然物に対する先天的恐怖行動に対する Trpa1 遺伝子の関与を明らかにするために、蛇の皮に対する Trpa1 ノックアウトマウスの行動を解析した。その結果、Trpa1 ノックアウトマウスではヘテロマウスと比較して、蛇の皮によって誘発されるすくみ行動・驚愕反応・リスクアセスメント行動が顕著に減少していた。その一方で、Trpa1 ノックアウトマウスでは、蛇の皮に対して匂いを嗅いだり、移動させたり、噛み付いたり引き裂いたりする探索行動が顕著に上昇していた。これらの結果から、Trpa1 遺伝子は匂いによって誘発される先天的な恐怖行動や防護行動に対して重要な役割を果たすこと示された。

我々の過去の研究により、2MT の呈示は、恐怖反応に重要な役割を果たすことが知られている central amygdala (CeA)-periaqueductal gray (PAG) 経路などの恐怖関連脳領域において immediate early gene として知られる c-fos 遺伝子

の発現を誘導することが明らかになっていた。そこで、Trpa1 ノックアウトマウスにおいて、2MT によって誘発される c-fos 遺伝子の発現を解析した結果、Trpa1 ノックアウトマウスでは、CeA、vPAG、視床下部 paraventricular nucleus (PVN) での c-fos 遺伝子の発現が顕著に減少していることが明らかになった。PVN は、ストレス反応において重要な役割を果たす hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA axis) の一部に含まれ、ストレスホルモンの分泌に関与することが知られている。これらの結果は、Trpa1 遺伝子がこれまでによく知られた脳内の恐怖中枢やストレス中枢の活性化に関与することを示している。

Trpa1 遺伝子は嗅覚系において発現することが報告されていることから、Trpa1 ノックアウトマウスでは嗅覚全般に異常が生じる可能性が考えられた。しかしながら、Trpa1 ノックアウトマウスは床しきの下に隠された餌を探することができることから、一般的な嗅覚異常は示さないと考えられた。また、我々は 2MT の呈示は、Trpa1 ノックアウトマウスの嗅球において、ヘテロマウスと同程度の c-fos 遺伝子発現を誘導することを見出した。我々は以前、嗅球の背側領域が、TMT によって誘発される忌避行動に重要な役割を果たすことを報告している(Nature 2007)が、2MT の呈示は、嗅球の背側領域においても Trpa1 ノックアウトマウスとヘテロマウスに関して同程度の c-fos 発現を誘導した。先行研究により、嗅覚系によって活性化される cortical amygdala (CoA) 内のサブセットの神経細胞が TMT による忌避行動に重要な役割を果たすことが報告されていたが、CoA における c-fos 遺伝子の活性化レベルには Trpa1 ノックアウトマウスとヘテロマウスとの間で明確な差は認められなかった。Trpa1 ノックアウトマウスは、2種類の匂いを用いた弁別学習や音と電気ショックとの関連学習に異常は認められなかったことから、Trpa1 ノックアウトマウスは匂いの識別能力や後天的な恐怖行動には異常がないと考えられた。また、Trpa1 ノックアウトマウスは 2MT を電気ショックを関連学習することができたことから、2MT の感知能力には異常がないと考えられた。

Trpa1 遺伝子は三叉神経で発現し、三叉神経は鼻腔内に神経終末を持つことが知られている。2MT の呈示は Trpa1 ヘテロマウスの三叉神経細胞において c-fos 発現を誘導するが、Trpa1 ノックアウトマウスでは c-fos 発現がほとんど認められなかった。三叉神経細胞は spinal trigeminal nucleus (Sp5C) に投射することが報告されているが、2MT の呈示は Trpa1 ヘテロマウスにおいてのみ Sp5C での c-fos 発現を誘導した。そこで、我々は 2MT による先天的すくみ行動に対する三叉神経系の関与を明らかにするために三叉神経系の破壊実験を行なった。両側の三叉神経系の破壊を行うとマウスは 2-3 日以内に死亡してしまったことから、片側の破壊を行なった。片側の三叉神経系を破壊したマウスでは、破壊した側での 2MT による Sp5C における c-fos 遺伝子の発現が消失するとともに 2MT によるす

くみ行動が顕著に減少することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) 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, Chérasse 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. *Nat Comm.* 9(1): 2041 (2018) 査読あり

(2) Sato T, Katsuoka Y, Yoneda K, Nonomura M, Uchimoto S, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Mizutani Y. Sniffer mice discriminate urine odours of patients with bladder cancer: A proof-of-principle study for non-invasive diagnosis of cancer-induced odours. *Sci Rep.* 7(1):14628 (2017). 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) Reiko Kobayakawa. Htr2a-expressing cells in the central amygdala control the hierarchy between innate and learned fear. 第 40 回日本神経科学大会、2017 年 7 月 20~23 日、千葉 (2017)

(2) 小早川 令子、花尻 瑠璃、小早川 高「D9-THC, JWH-018m 5-fluoro-ADB が誘発するマウスの脳活動と行動」、日本法中毒学会第 36 回年会、2017 年 7 月 6~7 日、東京 (2017)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小早川 令子 (KOBAYAKAWA, Reiko)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：40372411