

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21062

研究課題名(和文)主嗅覚系を介した性行動を引き起こす神経回路形成メカニズムの解明

研究課題名(英文)Neural circuits of social behavior in the mouse main olfactory system

研究代表者

井ノ口 霞(Inokuchi, Kasumi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任研究員

研究者番号：90632349

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): 嗅覚情報は性行動、攻撃行動といった生存に必須な先天的行動を誘起する上で重要な役割を果たしている。しかし、主嗅覚系で受容されるフェロモン情報が性行動にどのように影響しているのか、その神経回路構築の分子メカニズムとはよくわかっていなかった。本研究では、主嗅球で受容されるフェロモン物質の情報は扁桃体内側核へと伝えられていることを明らかにした。さらにこの回路を操作すると複数の性行動が減少することを見出した。

研究成果の概要(英文): Odor information induces various innate responses that are critical to the survival of the individual and for the species. An axon guidance molecule, Neuropilin 2 (Nrp2), is known to mediate targeting of olfactory sensory neurons to the posteroventral main olfactory bulb (PV MOB) in mice. Here, we report that Nrp2-positive (Nrp2+) mitral cells (MCs) play crucial roles in transmitting attractive social signals from the PV MOB to the anterior part of medial amygdala (MeA). Semaphorin 3F, a repulsive ligand to Nrp2, regulates both migration of Nrp2+ MCs to the PV MOB and their axonal projection to the anterior MeA. In the MC-specific Nrp2 knockout mice, circuit formation of Nrp2+ MCs and odor-induced attractive social responses are impaired. In utero electroporation demonstrates that activation of the Nrp2 gene is sufficient to determine the functional lineage of MCs and instruct their circuit formation from the PV MOB to the anterior MeA.

研究分野：神経回路

キーワード：神経回路 軸索投射 嗅覚 性行動 逆行性トレーシング 細胞移動

## 1. 研究開始当初の背景

嗅覚情報は性行動、攻撃行動といった生存に必須な先天的行動を誘起する上で重要な役割を果たしている。これまでの研究からマウス嗅覚系では、フェロモンを受容する器官として知られている鋤鼻器を介した情報伝達が、性行動の誘起に必要なと考えられていた。しかし近年、主嗅覚系においてもフェロモンを受容していることが明らかにされてきた。ヒトを含めた高等霊長類の鋤鼻器は退化し、機能していないことから主嗅覚系の一部が鋤鼻器の機能を担っていると考えられる。しかし、主嗅覚系における情報伝達経路が性行動にどのように影響しているのか、その神経回路構築の分子メカニズムは明らかになっていない。

主嗅覚系では、匂い分子と嗅覚受容体との結合情報は嗅細胞を介し終脳前部に位置する嗅球へと伝えられている。嗅球へ伝えられた匂い情報は二次神経細胞である僧帽・房飾細胞を介し高次脳領域である嗅皮質（前嗅核、嗅結節、梨状皮質、皮質扁桃体）へと伝えられている（図1、濃い灰色の器官）。一方で、鋤鼻系では、鋤鼻器官でフェロモン物質が受容され、その情報は副嗅球へと伝えられている。鋤鼻系の二次神経細胞は情動を制御している扁桃体内側核と分界条床核に軸索を投射させていることが分かっている（図1、白色の器官）。

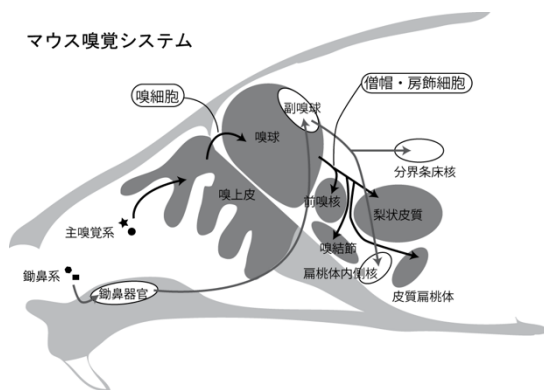


図1.マウス嗅覚システム

主嗅覚系の嗅球背側領域では、天敵臭など異種の匂いを認識しており (Kobayakawa et al., 2007 *Nature*)、腹側領域では尿など同種の匂いを認識していることが明らかになっている (Da Yu Lin et al., 2005 *Nature*)。このように嗅球の背側と腹側では機能的に違いが存在することが示唆されている。社会行動を引き起こすことが知られている尿の成分は嗅球の腹側を活性化している。申請者はこれまでに

嗅球上に位置特異性をもって二次神経細胞で発現する分子を複数同定している。嗅球の発生過程において、*Nrp2* は嗅球の腹側特異的に発現し、生後数日で消失する（図2）。発生過程における一時的かつ位置特異的な *Nrp2* の発現は二次神経細胞の大まかな回路構築、軸索投射領域の規定に寄与する可能性が高いと考えられる。

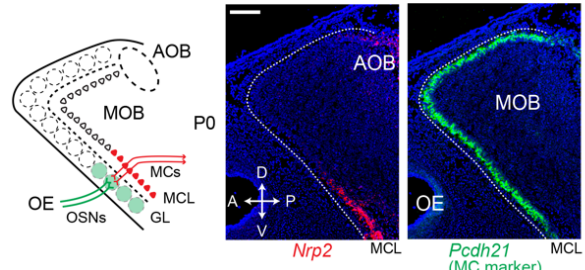


図2. 二次神経細胞における *Nrp2* の発現

## 2. 研究の目的

本研究では社会行動を制御する主嗅覚系の神経回路の同定およびその分子メカニズムの解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 嗅球腹側の二次神経細胞（僧帽・房飾細胞）の回路形成機構の解明

*Nrp2* を発現するサブタイプの軸索投射領域に特異的なパターンがあるかを検証するために、*Nrp2* プロモーター依存的に *Cre recombinase* を発現する BAC トランスジェニックマウスを作製した。このマウスを僧帽・房飾細胞特異的に、かつ *Cre* 依存的に標識タンパク質 (EGFP) を発現するトランスジェニックマウスと掛け合わせることで、二次神経細胞の軸索投射を特異的にラベルした。この実験により *Nrp2* 陽性細胞は扁桃体内側核に投射していることが明らかになった。扁桃体内側核は性行動に関わっていることがわかっており、これまでに主嗅覚系からの投射は知られていなかった。

そこで本研究では、扁桃体内側核への主嗅覚系からの投射が *Nrp2* 陽性の嗅球腹側細胞特異的かを検証するため、逆行性ウイルスである改変型狂犬病ウイルスを扁桃体内側核に injection し、標識された二次神経細胞のプロファイルを調べる。また、*Nrp2* が細胞自律的に作用しているのかを明らかにするため、二次神経細胞特異的に *Nrp2* をノックアウトしたマウスを作製し、投射様式を観察する。また、*Nrp2* の反発性リガンドである *Sema3F*

がどこで発現し、どのように機能するのかを明らかにする。以上の実験により、末梢神経の嗅神経細胞から行動の出力を担う高次中枢までの情報伝達経路としての二次神経細胞の回路の一端を明らかにする。

## (2) 主嗅覚システムから扁桃体内側核への情報伝達の機能解析

先行研究から、鋤鼻器のシグナル伝達を阻害した **TRPC2** ノックアウトマウスでは、いくつかの性行動に異常がみられるものの、雄の雌に対するマウンティング行動や雌に対する求愛歌である超音波の発生は正常であることが示されている (Kimchi T et al., 2007 *Nature*)。一方で、主嗅覚系のシグナル伝達を阻害した **CNGA2** ノックアウトマウスの雄は、雌の匂い嗅ぎ行動やマウンティング行動などの性行動を示さなくなることが報告されている (Mandiyar et al., 2005 *Nat Neuroscience*)。主嗅覚系で受容されるフェロモン物質として、雌尿から単離された **MTMT** (methylthio methanethiol) が提起されている。この物質は雌マウスの雄に対する誘因行動を引き起こし、嗅球の腹側の細胞で認識されている (Da Yu Lin et al., 2005 *Nature*)。

本研究では、扁桃体内側核への二次神経細胞の投射を遺伝子改変により変化させたマウスにおいて、雄の匂い嗅ぎ行動や求愛歌である超音波の発生など性行動を観察する。これらの行動に異常がみられない場合は攻撃行動や母子間の行動など情動にかかわる行動についても解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 嗅球腹側の二次神経細胞 (僧帽・房飾細胞) の回路形成機構の解明

逆行性トレーシングに用いるウイルスを扁桃体内側核 (MeA) に局所投与し、嗅球において標識された細胞を検証した (図 3)。扁桃体内側核に投射する二次神経細胞は主に嗅球の腹側に位置していることが明らかになった。それに対し、嗅内野 (Pir) にウイルスを局所投与したマウスでは嗅球の背側腹側両方の二次神経細胞がラベルされた。

また、二次神経細胞特異的に発現している遺伝子 **AP2e** プロモーター依存的に **Cre recombinase** を発現するマウスを **Nrp2-flxed** マウスと掛け合わせることで、二次神経細胞特異的に **Nrp2** をノックアウトした。このマウスでは扁桃体内側核に投射する二次神経細胞の軸索が有意に減少していることが

わかった。

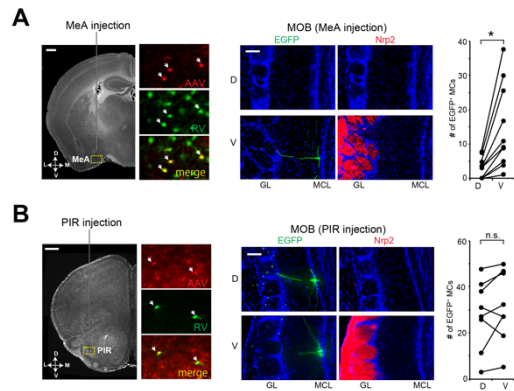


図 3. 改変型狂犬病ウイルスを用いた二次神経細胞の標識

**Nrp2** の反発性リガンドである **Sema3F** の発現を *in situ* hybridization により解析した。**Sema3F** は扁桃体内側核の周辺組織で発現していることがわかった。

**Sema3F** が二次神経細胞の扁桃体内側核への投射に関わっているかを調べるために **Sema3F** のノックアウトマウスの解析を行った。このマウスでも二次神経細胞特異的 **Nrp2** ノックアウトマウスと同様に扁桃体内側核に投射する軸索が減少していることがわかった。

### (2) 主嗅覚システムから扁桃体内側核への情報伝達の機能解析

二次神経細胞特異的に **Nrp2** をノックアウトしたマウスを用いて、雄マウスの尿に対する匂い嗅ぎ実験を行った。野生型マウスでは異性の雌尿に誘引されるのに対し、この遺伝子改変マウスでは雄雌どちらの尿に対しても同程度の匂い嗅ぎ行動を示した (図 4 A)。

また、雄マウスが雌に対して発する求愛歌の超音波 (USV) を測定した。このノックアウトマウスでは USV が減少していることが明らかになった (図 4 B)。

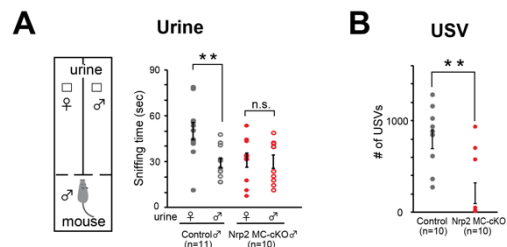


図 4. 二次神経細胞特異的 **Nrp2** ノックアウトマウスにおける性行動

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 1 件)

Inokuchi K, Imamura F, Takeuchi H, Kim R, Okuno H, Nishizumi H, Bito H, Kikusui T, Sakano H. (2017)

Nrp2 is sufficient to instruct circuit formation of mitral-cells to mediate odour-induced attractive social responses.

Nat Commun. 査読有り 2017 Jul 21;8:15977. doi: 10.1038/ncomms15977.

[学会発表] (計 3 件)

1. Kasumi Inokuchi, Fumiaki Imamura F, Haruki Takeuchi, Ryang Kim, Hiroyuki Okuno, Hirofumi Nishizumi, Haruhiko Bito, Takefumi Kikusui, Hitoshi Sakano  
Nrp2 is sufficient to instruct circuit formation of mitral-cells to mediate odor-induced attractive social responses  
The 48th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington Convention Center, Washington DC, USA. Nov 11th-15th, 2017.
2. Kasumi Inokuchi, Fumiaki Imamura F, Haruki Takeuchi, Ryang Kim, Hiroyuki Okuno, Hirofumi Nishizumi, Haruhiko Bito, Takefumi Kikusui, Hitoshi Sakano  
Nrp2 is sufficient to instruct circuit formation of mitral-cells to mediate odor-induced attractive social responses  
第 60 回日本神経化学会大会、仙台国際センター、仙台、2017 年 9 月 7-9 日
3. Kasumi Inokuchi, Fumiaki Imamura F, Haruki Takeuchi, Ryang Kim, Hiroyuki Okuno, Hirofumi Nishizumi, Haruhiko Bito, Takefumi Kikusui, Hitoshi Sakano  
Nrp2 is sufficient to instruct circuit formation of mitral-cells to mediate odor-induced attractive social responses  
The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Makuhari, Japan. 2017 年 7 月 20-23 日

[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：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井ノ口 霞 (INOKUCHI, kasumi)  
東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員  
研究者番号：90632349

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者  
なし