

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（S）

研究期間：2007～2011

課題番号：19677002

研究課題名（和文） マウスにおける性特異的ペプチド性フェロモンの鋤鼻神経系での受容メカニズムの解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms for recognition and signal transduction of sex-specific peptides in the mouse vomeronasal organ

研究代表者

東原 和成 (TOUHARA KAZUSHIGE)

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）：

マウスのオスの涙に分泌されるペプチド ESP1 が、メスの性行動を誘導するフェロモンであることを明らかにした。哺乳類における初めてのペプチド性の性フェロモンであり、直接接触による個体間コミュニケーションが存在することが明らかになった。また、ESP1 を認識する鋤鼻受容体を同定し、その神経の投射先と神経回路の可視化に成功した。ESP1 はマウスの繁殖行動の制御に使える可能性があるので特許出願をおこなった。哺乳類で「フェロモン分子」から「行動」までの経路を明らかにした初めての研究であり、行動を司る脳神経関連研究領域に大きな学術的波及効果がある。

研究成果の概要（英文）：

We discovered a mouse male-specific peptide, named exocrine gland-secreting peptide 1 (ESP1), that was released into tear fluids from the extraorbital lacrimal gland. ESP1 turned out to be a sex pheromone that enhanced female sexual receptive behavior upon male mounting, leading to the successful copulation in mice. Moreover, we revealed the molecular mechanisms and the neural pathway involved in decoding the ESP1 signal in the vomeronasal system. The ESP1-signal processing in the vomeronasal system appears to be mediated by the selective neural pathway via the specific vomeronasal receptor. This study provided the first functional link between a sex peptide pheromone and a behavioral output via a selective neural pathway activated by a specific receptor in the vomeronasal system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008 年度	21,300,000	6,390,000	27,690,000
2009 年度	22,500,000	6,750,000	29,250,000
2010 年度	22,500,000	6,750,000	29,250,000
2011 年度	18,000,000	5,400,000	23,400,000
総計	88,700,000	26,610,000	115,310,000

研究分野：生命科学

科研費の分科・細目：機能生物化学

キーワード：マウス、フェロモン、鋤鼻器官、受容体、ペプチド

1. 研究開始当初の背景

哺乳類のなかでもネズミやマウスなど齧歯類では、フェロモン物質（体外に放出されて特有の生理的な効果を引き起こす物質）が、性や異種の識別、異性生殖機能の状態の識別、性周期・成熟度・性行動のタイミング、攻撃行動などを制御していることが知られている。フェロモン候補物質は、低分子揮発性有機化合物として、尿からいくつか単離・構造決定がなされていたが、一方で、フェロモン効果には個体同士の物理的接触も必要と考えられており、不揮発性のフェロモン物質の存在が示唆されていた。また、フェロモン物質の受容部位は、組織破壊の実験から、鼻腔内嗅上皮と鼻腔内下部に位置する鋤鼻器官の二カ所によって認識されていると考えられていたが、*in vivo* で鋤鼻器官に作用するフェロモンは見つかっていなかった。

我々は、鋤鼻神経における c-Fos タンパク質の発現を活性化の指標として、鋤鼻活性化物質の探索をおこなったところ、オス涙から分泌されてメス鋤鼻器官に取り込まれて鋤鼻神経を発火させる新規の性特異的ペプチド（約 7 kDa）を見つけて、ESP1 と命名した（Nature 2005）（図 1）。鋤鼻器官はマウスでフェロモン行動に深く関わる組織であることがわかっているので、ESP1 の情報は、鋤鼻神経系の特定の受容体を介して脳に伝達され、異性や個体の信号（フェロモン）として処理されると予想された。

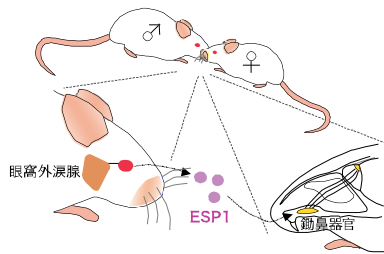


図 1 オスの涙から ESP1 が分泌

2. 研究の目的

本研究では、オスのマウスが涙に分泌する ESP1 の、メスに対するフェロモン機能とその作用機構を解明することを目的とする。具体的には、ESP1 のフェロモン効果を明らかにする。ESP1 を感知する受容体を見つけ、受容体によって認識された信号がどのような神経回路で脳に伝わりフェロモン効果が引き起こされるのかを解明する。

3. 研究の方法

(1) ESP1 の受容体の同定

鋤鼻神経には、約 120 種類の V2R 型鋤鼻受容体と約 180 種類の V1R 型鋤鼻受容体がそれぞれ基底層側と鋤鼻内腔側に発現している。

嗅覚受容体と同様に、一鋤鼻神経には一受容体のみが排他的に発現している。ESP1 は、V2R 型受容体を発現する鋤鼻神経のいくつかにおいて c-Fos の発現誘導を引き起こすことを見出している。そこで、まず、約 120 種類の V2R のなかから、c-Fos と二重染色される V2R 遺伝子のタイプを特定する。

(2) ESP1 受容体の再構成

特定した V2R を培養細胞 HEK293 に発現させ、カルシウムイメージング法によって ESP1 に対する応答を再構成する。レポーター遺伝子アッセイ法も組み合わせて行う。また、アフリカツメカエル卵母細胞での発現系も試す。

(3) ESP1 受容体発現神経の可視化

ESP1 受容体を発現する鋤鼻神経を可視化したトランスジェニックマウスを作製する。具体的には、受容体遺伝子の下流に DsRed タンパク質コード配列を挿入した Bac clone を作製し、トランスジェニック系統を樹立する。このトランスジェニックマウスと G-CaMP マウスとを掛け合わせ、カルシウムイメージングによって、ESP1 受容体発現細胞での ESP1 応答を測定し、受容体のリガンド特異性を解析する。

(4) ESP1 情報伝達経路の解析

鋤鼻神経の神経興奮の分子基盤と考えられている TRPC2 チャンネルが ESP1 経路に関わっているか、TRPC2 ノックアウトマウスで ESP1 シグナルが消失するかどうかを調べる。

(5) ESP1 のフェロモン効果の解析

オス特異的 ESP1 を受容したメスがどのような行動にでるかの解析を行う。具体的には、ESP1 に対する嗜好テスト、ロードシス反射など性行動を観察する。その他、陰部スニッフィン、グルーミング、超音波発生、運動性などの行動も解析する。

(6) ESP1 刺激が入力する脳内領域の同定

副嗅球において ESP1 によって活性化される神経を c-Fos 発現を指標に同定する。副嗅球の僧帽細胞が投射する領域（扁桃体など）、そしてその後の高次脳領域（視床下部など）において、ESP1 によって活性化される神経を c-Fos 発現を指標に同定する。

(7) ESP1 受容体遺伝子のノックアウトマウスの作製

ESP1 受容体遺伝子をノックアウトしたマウスを作製し、鋤鼻上皮における ESP1 に対する電気応答が消失すること、副嗅球および高次脳領域における ESP1 による c-Fos 上昇が消失すること、ESP1 のフェロモン効果が消

失することを確認する。

(8) ESP1 の発現制御および野生マウスにおける ESP1 発現

抗 ESP1 抗体を用いて、オス涙における ESP1 の分泌量を、様々な近交系マウス、野生由来マウスにおいて比較する。また、ESP1 の分泌のテストステロン依存性を検証する。

4. 研究成果

(1) ESP1 のフェロモン効果の発見

オスの涙に分泌されるペプチド ESP1 は、メスがオスを受け入れる性行動であるロードシス行動を誘導するフェロモンであることが明らかになった (図 2)。哺乳類における初めてのペプチド性の性フェロモンであり、揮発性のフェロモンだけでなく、不揮発性のフェロモンで直接接触による個体間コミュニケーションが存在することが明らかになった。



図 2 メスのロードシス行動

(2) ESP1 受容体の同定

ESP1 を認識する鋤鼻受容体 V2Rp5 を同定した。V2Rp5 を発現する神経を可視化したトランスジェニックマウスを作製し、ESP1 に対する応答を再構成することに成功した (図 3)。その受容体を発現している神経が副嗅球のどこに投射しているか、神経投射様式の可視化に成功した。

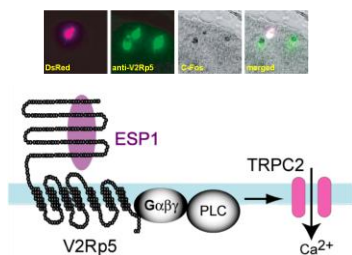


図 3 V2Rp5 の ESP1 に対する応答

(3) ESP1 情報入力の脳神経回路を解明

V2Rp5 ノックアウトマウスを用いて、「ESP1-鋤鼻受容体-神経回路-行動」の一連のシグナル経路の直接的証拠を得た。すなわち、ESP1 の引き起こすフェロモン行動が、ひとつの受容体によって制御されていることを明らかにした。哺乳類で「フェロモン分子」から「行動」までの経路を明らかにした初めての研究である (図 4)。行動を司る脳神経

関連研究領域に大きな波及効果がある。本研究成果は、学術的意義が極めて高く、Nature 誌に発表した。

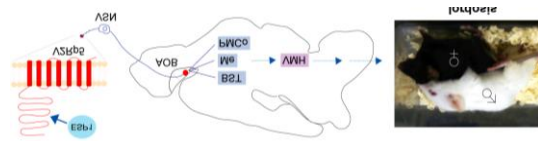


図 4 鋤鼻での ESP1 の受容から行動までに至る神経回路の解明 (VSN: 鋤鼻神経、AOB: 副嗅球、Me: 扁桃体、VMH: 視床下部)

(3) 野生マウスでの ESP1 の大量分泌

ESP1 はマウスにとって交尾のために重要なフェロモンだが、近交系など研究用マウスは小さなケージで何代も継代された結果、その必要性が低下し発現量が落ちていることが判明した。一方で、ほとんどの野生由来のオスマウスの涙には大量の ESP1 が分泌されていることが明らかになった。非常に早い遺伝進化が示唆されるだけでなく、ESP1 はマウスの繁殖行動の制御に使える可能性があるので特許出願をおこなった。社会的にも意義のある成果である。

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 9 件より抜粋)

1. 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)
2. Touhara, K. and Vosshall, L.B., "Sensing odorants and pheromones with chemosensory receptors" *Annu. Rev. Physiol.* 71, 307-332 (2009) (査読無)
3. Touhara, K., "Sexual communication via peptide and protein pheromones" *Current Opinion in Pharmacology* 8, 759-764 (2008) (査読無)
4. 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)
5. Touhara, K., "Molecular Biology of Peptide Pheromone Production and Reception in Mice" *Advances in*

Genetics 59, 141-171 (2007) (査読無)

[学会発表] (計 17 件より国際学会招待講演のみを抜粋)

1. Touhara, K. Sensing odorants by olfactory receptors: from neuron to behavior. *Frontier in Neuroscience: from brain to mind* 2011.12.7-9 Kyoto, Japan
2. Touhara, K. Odor and pheromone: natural products eliciting social or sexual behavior. *International Symposium on Natural Products Chemistry and Chemical Biology* 2011.11.20-21 China
3. Touhara, K. Chemosensory receptor and behavior. *International Titisee Conferences* 2010.10.13-15 Titisee, Germany
4. Touhara, K. Sensing odorant and pheromone. *Janelia Farm Conference* 2010.5.23-26 Janelia Farm, USA
5. Touhara, K. The ESP peptide family and its role in chemical communication. *European Chemoreception Research Organization Congress*. 2009.9.24-27 Sargenia, Italy
6. Touhara, K. Chemosensory receptors for odors and pheromones. *International Congress of Physiological Sciences*. 2009.7.27-8.1 Kyoto
7. 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
8. Touhara, K. Chemosensory receptor and behavior. *Keystone Symposium on Chemical Senses* 2009.3.15-18 CA, USA
9. 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
10. Touhara, K. Emerging view of insect olfactory receptor signaling. *International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT)* 2008.7.21-28 CA, USA

[図書] (英文計 6 件、邦文計 6 件より抜粋)

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)

[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 年 9 月 14 日

国内外の別: 国内

[その他]

研究室ホームページ:

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東原 和成 (TOUHARA KAZUSHIGE)

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