

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6月15日現在

機関番号：74415

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23658229

研究課題名（和文）野生動物に対して先天的な恐怖や誘引行動を誘発する匂い分子の開発理論

研究課題名（英文）Theory to identify odorants which evoke innate fear / attractive behaviors to wild animals

研究代表者

小早川 令子 (KOBAYAKAWA REIKO)

財団法人大阪バイオサイエンス研究所・神経機能学部門・室長

研究者番号：40372411

研究成果の概要（和文）：

私たちは、遺伝子操作の手法を駆使して、マウスの恐怖反応が特定の嗅覚神経回路によって先天的に誘発されることを世界に先駆けて証明した。続いて、自ら発見した嗅覚神経回路の活性に着目し、従来知られていた天敵臭に比較して遙かに高い活性で恐怖反応を誘発する匂い分子の発見に成功した。ここで開発した先天的な恐怖応答を誘発する匂い分子を用いて、先天的と後天的な恐怖応答を区別して計測する恐怖情動マーカーの開発を進めた。

その結果、体表面温度、体深部温度、心拍数が先天的な恐怖反応において特異的に変化することが明らかになった。また、血液成分の中から先天的な恐怖反応において特異的に変動する恐怖マーカーを発見した。

続いて、マウスの嗅覚受容体の発現ライブラリーの構築を行い、先天的な恐怖情動を誘発する匂い分子に対する嗅覚受容体のスクリーニングを実施した。強力に先天的な恐怖反応を誘発する匂い分子に対して特異性の高い嗅覚受容体を複数同定した。続いて、マウスに対して先天的な恐怖情動を誘発する匂い分子の他の生物への効果を解析した。その結果、シカなどの複数の動物に対してはマウスと同様の強い忌避効果が観察された。

研究成果の概要（英文）：

Using genetic manipulation method, we have clarified that the olfactory neural pathway which originates from the dorsal olfactory bulb innately regulates fear responses to predator odorants. By focusing on the neural pathway which induces fear responses to odorants, we identified a series of odorants named "fear odors" which have more than 10 times stronger bioactivity than TMT with respect to inducing freezing behaviors. By use of "fear odorants" we developed biological markers which can distinguish innate and fear responses. As a result, we clarified that cutaneous / core body temperature and heart rate is specifically changed in innate fear responses. We also identified serum "fear markers" which change during innate fear responses.

We constructed expression libraries of murine odorant receptors and screened for odorant receptors which interact with odorants that can induce innate fear responses in mice. We identified multiple odorant receptors which specifically interact with odorants that can induce prominent fear responses in mice. We then analyzed whether "fear odorants," which can induce fear responses in mice, also induce fear responses in other animal species. We observed "fear odorants" can induce prominent fear responses not only in mice but also in some animal species including deer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：嗅覚受容体・行動・進化

1. 研究開始当初の背景

草食動物と肉食動物は進化の過程で獲得したバランスを保つことで、安定した関係性が自然環境において形成された。ヒト社会が自然環境に影響を与えるようになった後にも、長い時間をかけることで持続可能な里山環境が形成されてきた。ところが、温暖化などの地球規模の環境変化や、過疎化や高齢化による農山村の荒廃、市街地の拡大などの地域社会レベルでの環境変化などが原因となって、野生動物のヒト生活圏への侵入被害は増大しつつある。農地への鳥獣害は被害金額の大きさもさることながら、被害者の耕作意欲を失わせるという問題も深刻である。また、空港でのバードストライクの問題や、山間部を走る高速道路や鉄道への大型野生動物の侵入は人命を危険にさらす可能性があり放置することはできない。

これまでに、草食動物が肉食動物の発する匂いに対して恐怖を感じることに着目した鳥獣害対策の可能性は検証されてきた。例えば、猛獣の体臭がしみ込んだ布や、排泄物に対して草食動物が忌避行動を示すことが明らかにされている。更に、猛獣の排泄物の成分の中から、草食動物に対して忌避行動を誘発する成分の同定も行われている。しかし、これらの研究は、草食動物が特定の匂い分子に対して何故恐怖を感じるのかというメカニズムの解明に基づくものではなく、少数の動物に対しての忌避行動を指標にして経験的に行われたものに過ぎない。自然環境下での野生動物への効果の検証には数年に渡る時間と、多額の費用と大規模な試験場が必要であることから、候補となる匂い分子のスクリーニングを実地試験で行うことは現実的ではない。社会的なニーズに答える信頼性の高い鳥獣害対策を行うためには、各種動物の脳が恐怖などの様々な情動を生成するメカニズムまで踏み込んだ科学的な根拠が必要である。

しかしながら、動物の脳の神経回路は複雑であり、また、生育環境などの変動する要因によっても大きな影響を受けることから、行動を理論的に予測することは困難であり、ましてや、人間にとって都合の良いように制御することなど不可能ではないかと思われてきた。このような状況で、私たちは、哺乳類動物の匂いに対する嫌悪行動や恐怖行動が、特定の嗅覚受容体遺伝子を発現する嗅細胞によって先天的に制御されていることを初めて発見した。この発見は、鼻腔内に発現する嗅覚受容体の活性によって行動が直接制御されるという全く新しい概念を提唱するも

のであり、哺乳類動物の行動は脳の中枢部に情報が伝達された後に決定されると漠然と考えられてきた常識を覆すものである。私たちは、自らが証明した概念を拡張し、既知の天敵臭に比較して10倍もの強度で「すくみ行動」を誘発する匂い分子群の発見に成功した。この匂い分子群は、繰り返し嗅がせると恐怖反応が強化されることが判明している。また、私たちのこれら匂い分子群はシカにも強い忌避行動を誘導できる。更に、私たちは、動物間の社会コミュニケーション行動も特定の嗅覚受容体遺伝子によって先天的に制御されている可能性も明らかにしている。

本計画は、自らが確立しつつある、嗅覚受容体遺伝子の機能に基づいてマウスの行動を制御する理論を、各種動物に適応するという極めて独自性の高いものである。本研究の成果は、野生動物の行動を制御する匂い分子を理論的に開発するという技術的ブレークスルーに繋がる可能性がある。また、天敵と捕食者の進化上の関係性を、各種動物の嗅覚受容体遺伝子に着目することで解き明かす「遺伝子進化行動学」という新しい研究領域が切り開かれることも期待できる。

2. 研究の目的

多くの哺乳類動物は天敵の発する匂い分子に対して恐怖反応を示すことが知られている。しかし、哺乳類動物が天敵の匂いに対して恐怖を感じるメカニズムは永らく解明されていなかった。

私たちは、複数種類のキヌタマウスを用いて、鼻腔内の特定の嗅細胞に発現する嗅覚受容体遺伝子によって恐怖行動が先天的に誘発されることを世界に先駆けて証明した(Kobayakawa et al., *Nature* (Article) 2007)。天敵臭は多数の匂い分子からなる混合物であり、単一の匂い分子によって恐怖行動を誘発できるかは不明であった。自ら発見した恐怖反応を制御する嗅覚神経回路の活性に着目することで、既知の天敵臭の成分に比較して、最大で10倍もの活性で恐怖反応の一種である「すくみ行動」を誘発する匂い分子を複数種類発見した。これらの匂い分子は特定の化学構造を共有することが判明した。以上の結果から、特定の化学構造を持つ匂い分子が、特定の嗅覚受容体を活性化することで、哺乳類動物の先天的な恐怖反応が誘発されると考えられる。また、予備実験の結果から、恐怖反応とは別の特定の嗅覚神経回路によって誘引反応も先天的に制御されることも示唆されている。

本計画では、(1)嗅覚神経回路の機能に基づいてマウスに先天的な誘引行動を引き起こす匂い分子を同定する。(2)マウスの恐怖行動と誘引行動を誘発する嗅覚受容体遺伝子を同定し、続いて、(3)サル、イノシシ、シカの相同遺伝子を同定する。(4)それら相同受容体の活性を指標にして、各種動物の行動を制御する候補となる匂い分子を探索する。(5)候補匂い分子の生理活性を、行動、血中ホルモン、生理指標の変化を指標にして解析する。以上の計画を通して、各種動物において先天的な恐怖や誘引行動を誘発する匂い分子の開発理論を確立する。

3. 研究の方法

(1)嗅覚神経回路の機能に基づいてマウスに先天的な誘引反応を引き起こす匂い分子の同定
図1aには私たちがこれまでに明らかにしてきた、特定のグループの嗅覚受容体遺伝子と、特異的な行動との対応関係を模式的に示した。図1bと1cに示したマウスを掛け合わせることで、特定のグループの嗅覚受容体遺伝子を発現する嗅細胞を除去や、不活性化することができる。図中に示したノックインマウスの多くは作製済みであり、計画通りに、部分的に嗅細胞が除去されることも確認した(私たちの発表した関連論文; Kobayakawa et al., *Nature* (Article) 450, p503-508, 2007; Imai et al., *Science* (Article) 325, p585-590, 2009)。この方法で作製した、部分的な嗅細胞の除去マウスの同種動物の匂いに対する誘引行動の行動学的な解析結果と、同種動物の匂いに応答する神経回路のイメージングの結果(私たちの発表した関連論文; Matsumoto et al., *J.Neurophysiol.* 103, p3490-3500, 2010)を合わせて、マウスの誘引行動を制御する嗅覚神経回路を同定する。私たちは、この方法を用いて、これまでに既知の天敵の分泌物由来の匂い分子と比較して10倍もの活性で恐怖反応を誘発する人工物由来の匂い分子の同定に成功している(特願 2010-025681; 論文投稿準備中)。恐怖反応同様の手法を用いて、神経回路の機能に基づいて、先天的な誘引反応を誘発する匂い分子のスクリーニングを行う。

(2) マウスの恐怖反応と誘引行動を誘発する嗅覚受容体遺伝子を同定

私たちは、先天的な恐怖反応を誘発する神経回路を活性化する匂い分子を探索し、天敵臭 TMT に比較して有意に高い頻度ですくみ行動を誘発できる匂い分子を9種類同定した。この9種類の匂い分子は特定の法則性のある化学構造を持つ。また、これらの匂い分子と類似した化学構造を持つがすくみ行動を全く誘発しないネガティブコントロールとして使用できる一連の匂い分子も同定した。すくみ行動を誘発する匂い分子によって特異的に活性化される嗅覚受容

体遺伝子を、HEK293 cell に嗅覚受容体に特異的なシャペロン分子を共発現させた Hana cell を用いた培養細胞系でスクリーニングする。同様の手法を用いて、マウスに誘引行動を誘発する嗅覚受容体遺伝子も同定する。

(3) 前頁(2)で同定した嗅覚受容体のサル、イノシシ、シカの相同遺伝子を同定

(4) 相同受容体の活性を指標に、サル、イノシシ、シカの行動を制御する匂い分子候補を探索
マウスにおいて先天的な恐怖行動と誘引行動を誘発する嗅覚受容体候補のサル、イノシシ、シカのホモログを RT-PCR 法やデータベース検索によって同定する。ここで同定された嗅覚受容体遺伝子は、サル、イノシシ、シカの恐怖行動や誘引行動を誘発する候補となる。ホモログ受容体を効率的に活性化する匂い分子を Hana cell を用いた培養細胞系を用いてスクリーニングする。ここで嗅覚受容体の機能に基づいて動物の行動を制御する匂い分子の候補が得られる。

(5) 上記候補匂い分子の生理活性を、行動、血中ホルモン、生理指標の変化を指標に解析
嗅覚受容体の機能に基づいて同定された、サル、イノシシ、シカに恐怖行動や誘引行動を誘発する匂い分子候補の効果を、特異的な行動や、生理指標を用いて解析する。マウスの恐怖行動は体表面温度の変化、血中ストレスホルモン量で計測できるので、これを他動物に適用する。

4. 研究成果

私たちは、遺伝子操作の手法を駆使して、マウスの恐怖反応が特定の嗅覚神経回路によって先天的に誘発されることを世界に先駆けて証明した。続いて、自ら発見した嗅覚神経回路の活性に着目し、従来知られていた天敵臭に比較して遙かに高い活性で恐怖反応を誘発する匂い分子の発見に成功した。本研究ではマウスに先天的な恐怖情動を誘発する匂い分子のスクリーニングを行った。その結果、様々なレベルで先天的な恐怖情動を誘発する匂い分子レパートリーを開発した。ここで開発した先天的な恐怖応答を誘発する匂い分子を用いて、先天的と後天的な恐怖応答を区別して計測する恐怖情動マーカーの開発を進めた。

その結果、体表面温度、体深部温度、心拍数が先天的な恐怖反応において特異的に変化することが明らかになった。また、血液成分の中から先天的な恐怖反応において特異的に変動する恐怖マーカーを発見した。これらの生理応答マーカーや血液マーカーを用いることで、先天的な恐怖反応を後天的な恐怖反応と区別して計測することが可能になった。

続いて、マウスの嗅覚受容体の発現ライブラリーの構築を行い、先天的な恐怖情動を誘発する匂い分子に対する嗅覚受容体のスクリーニングを実施した。強力に先天的な恐怖反応を誘発する匂い分子に対して特異性の高い嗅覚受容体を複数同定した。これらの複数の嗅覚受容体の組み合わせによって恐怖応答が誘発されるのか、単一の受容体によって恐怖応答が誘発されるのかは明らかではない。そこで、先天的な恐怖応答を誘発する匂い分子と、それらの匂い分子に類似した化学構造を持つが恐怖応答を誘発しない匂い分子との嗅覚受容体との結合特異性の比較解析を行った。続いて、マウスに対して先天的な恐怖情動を誘発する匂い分子の他の生物への効果を解析した。その結果、シカなどの複数の動物に対してはマウスと同様の強い忌避効果が観察された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Yokoyama T K, Mochimura D, Murata K, Manabe H, Kobayakawa K, Kobayakawa R, Sakano H, Mori K, and Yamaguchi M. "Elimination of adult-born neurons in the olfactory bulb is promoted during the postprandial period." *Neuron* 査読有 Vol. 71(5), 2011, p883-897, DOI: 10.1016/j.neuron.2011.05.046

[学会発表] (計4件)

- ① 小早川高、伊早坂智子、小早川令子
「先天的と後天的な恐怖によって誘発される不動行動は異なる神経回路によって制御される」第5回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres、品川プリンスホテル(2011年10月7日)
- ② 小早川高、伊早坂智子、小早川令子
Neuronal mechanisms controlling innate and learned fear responses、第34回日本神経科学大会シンポジウム、パシフィコ横浜(2011年9月17日)
- ③ 小早川令子「哺乳類の脳が多様な情動を生み出す神経メカニズム～猫が怖がらないネズミが教える心の仕組み～」第30回分子病理学研究会、鷺羽山下電ホテル(2011年7月23日)
- ④ 小早川令子「神経回路の機能に基づいて哺乳類の本能情動を制御する機能性分子の開発」バイオファーマジャパン、インテックス大阪(2011年7月13日)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: Carpt mRNA 発現細胞標識動物およびそれを用いたスクリーニング方法
発明者: 小早川高、小早川令子
権利者: (財)大阪バイオサイエンス研究所
種類: 特許
番号: 特願 2012-011682
出願年月日: 24年1月24日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

○報道活動 (計2件)

- ① 小早川令子、小早川高
「ネズミ忌避剤 製品化へーにおいて恐れる回路解明」化学工業日報(2012年3月30日掲載)

- ② 小早川令子
「動物の行動を探る(1)～遺伝子によってつくられる行動」NHK 高校生講座「生物」(2011年11月4日放映)

○アウトリーチ活動 (計1件)

- 小早川令子
「ワークライフバランスのとれた一流研究となるためには？」第84回日本生化学会大会フォーラム、京都国際会館(2011年9月23日)

○その他の口頭発表

- ① 小早川令子
「嗅覚神経回路の機能解明に基づいた、機能性香料の予測開発理論と本能情動の計測・調整技術の創薬応用」第6回大阪オープン・イノベーション・マッチング会、インテックス大阪(2012年3月7日)

- ② 小早川令子
「匂いに対する先天的と後天的な恐怖応答は異なる神経メカニズムによって制御される」東京大学大学院医学系研究科・神経生化学セミナー(2012年1月27日)

- ③ 小早川令子
「匂いに対する先天的と後天的な恐怖応答は異なる神経メカニズムによって制御される」京都大学大学院医学研究科・神経科学セミナー(2012年1月16日)

④小早川令子

「哺乳類の情動を定量・予測・制御する新技術」平成 23 年度産学連携推進会議・若手研究者による科学・技術説明会、東京国際フォーラム（2011 年 9 月 22 日）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小早川 令子 (KOBAYAKAWA REIKO)

財団法人大阪バイオサイエンス研究所・神経機能学部門・室長

研究者番号：40372411