

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23688035

研究課題名(和文)フェロモンによる情動制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Understanding of the pheromonal control of emotions

研究代表者

清川 泰志(Kiyokawa, Yasushi)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：70554484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究助成により、ストレスを受けたラットは4-メチルペンタナルとヘキサナルから構成される警報フェロモンを肛門周囲部より放出することを明らかとした。この2種化合物は同時に受容されると、分界条床核を活性化することで受容個体に不安を惹起することで、様々な不安反応を引き起こすことを明らかとした。また、ストレスを受けていないラットは揮発性の安寧フェロモンを放出し、受容個体の扁桃体の活性化を抑制することで、嫌悪条件刺激に対するストレスを軽減することを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Supported by this grant, we found that rats released 4-methylpentanal and hexanal from the perianal region when they were stressed. These molecules activated the bed nucleus of the stria terminalis and evoked a variety of anxiety responses in other rats when rats detected these molecules simultaneously. We also found that the volatile appeasing pheromone released from non-stressed rats suppressed the amygdala activation to the auditory conditioned stimuli, which resulted in the amelioration of stress responses.

研究分野：獣医動物行動学

キーワード：警報フェロモン 安寧フェロモン 社会的緩衝作用 揮発性分子 鋤鼻系 主嗅覚系 分界条床核 扁桃体

1. 研究開始当初の背景

不安や恐怖といった情動は、正常なレベルであれば適応的な心的反応であるため、哺乳類を通じて広く保存されている。しかし一方でこれらの情動が不必要に強くなってしまふと、正常な社会生活を妨げてしまうことになりかねない。このため、社会性の高い動物が正常に生活を営むためには、情動を適切なレベルに維持すべく制御することが重要であるものの、そうした情動抑制メカニズムに対する理解は進んでいない。

申請者らの先行研究により、事前にラットに電気ショックを負荷した実験箱に新たなラットを導入すると、新奇環境由来の一過性体温上昇反応が増強されることが明らかとなり、警報フェロモンの存在が示された。その後の研究から、警報フェロモンは肛門周囲部よりテストステロン非依存性に放出される揮発性かつ水溶性の低分子であり、その受容に鋤鼻系が関与していることが明らかとなった。またフェロモン効果として様々な不安反応が観察されたことから、警報フェロモンは不安回路を活性化する作用が第一義的であり、その結果として様々な行動的・生理的反応を引き起こされていることが示唆された。これらの研究と並行して、警報フェロモン分子同定を目指す研究も行ってきた。ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー(GC/MS)を用いて分析を進めた結果、警報フェロモン分子は低分子量の物質が含まれる画分に存在することが明らかとなった。

こうした警報フェロモンに関する一連の研究の過程で、これとは逆の作用をもつフェロモン、すなわち安寧フェロモンの存在が偶然示唆された。恐怖条件づけを体験したラットは、その後条件刺激に対してストレス反応を示すようになるが、その際に他のラット(パートナー)が存在すると、ストレス反応が大幅に緩和されることが明らかとなった。またこの効果は、パートナー由来のシグナルを主嗅覚系で受容することが重要であることが判明し、安寧フェロモンによって引き起こされていることが示唆された。

2. 研究の目的

申請者らの先行研究によって見出された警報フェロモンと安寧フェロモン分子を同定することが、本研究の目的である。

またこの物質探索研究と並行して、フェロモン作用の中枢メカニズム解明を目指す。警報フェロモンが不安回路を活性化するためには、鋤鼻系にて受容されたフェロモン情報

が分界条床核へと伝達されることが考えられる。また同様に、安寧フェロモンがストレス反応を抑制するためには、主嗅覚系にて受容されたフェロモン情報がストレス反応を調節する扁桃体へと伝達されることが考えられる。そのため本研究では、これらの伝達経路を明らかとすることで、警報・安寧フェロモン作用の中枢メカニズム解明を目指す。

3. 研究の方法

フェロモン分子を同定するためには、精度の高い生物検定系を用いてフェロモン分子が確実に含まれていることが確認された試料(フェロモン陽性試料)を作製し、それを分画していくことが必要である。分画されたそれぞれの画分のフェロモン活性を生物検定法によって判定し、フェロモン陽性画分を再び分画していくという作業を繰り返すことで、陽性画分に含まれるフェロモン候補分子を絞り込み、最終的にフェロモン分子を同定する。

また同時に、2つのフェロモンを実験モデルとして用い、まずは分界条床核が警報フェロモン作用に、扁桃体が安寧フェロモン作用に、それぞれ関与していることを明らかとする。その後、脳破壊法やトレーサーを用いた解剖学的手法など、様々な手法を用いた神経科学的解析により、警報フェロモン情報が鋤鼻器から分界条床核へ、安寧フェロモン情報が嗅上皮から扁桃体へとそれぞれ伝達されていくルートを解明し、フェロモンの中枢作用メカニズムを明らかとする。

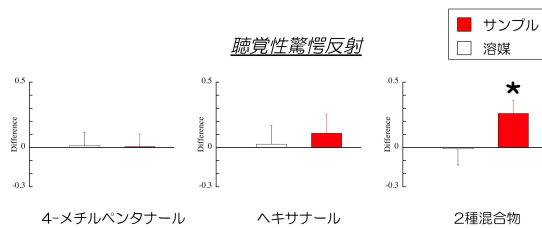
4. 研究成果

(1) 警報フェロモンに関する研究

これまでの研究により、麻酔下ラットの肛門周囲部を電気刺激することで、警報フェロモンを放出させられることが明らかとなっていた。そのため、同方法によって8頭のラットから放出させた警報フェロモンを吸着剤に捕集し、その内容物を分子量に応じて画分1、画分2、画分3の3つに分画した。フェロモンに対する反応の1つである聴覚性驚愕反射の増強を指標として用い、それぞれの画分のフェロモン活性を判定した結果、画分1のみが驚愕反射を増強したことから、この画分にフェロモン分子が含まれていることが判明した。画分1をさらに画分1-1と画分1-2の2つに分画したところ、画分1-1のみが聴覚性驚愕反射を増強したため、この画分にフェロモン分子が含まれていることが明らかとなった。そこで50頭のラットから捕

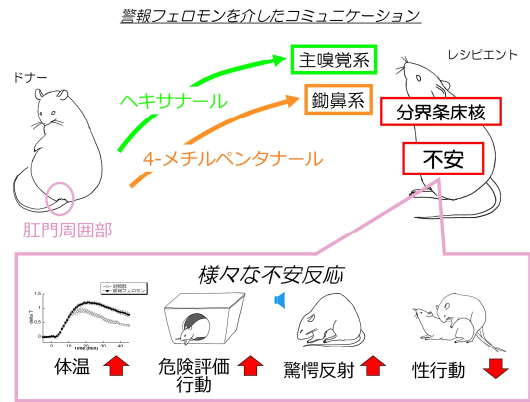
集した警報フェロモンを用いて画分 1-1 を作製し、そこに含まれる物質を解析した結果、4-メチルペンタナールが存在し、ヘキサナールの含有量が増加することを突き止めた。

これらの物質を化学合成し、さらなる解析を行った結果、それぞれの化合物を単独で提示した場合には驚愕反射を増強しないものの、2 種類を混合物として提示した場合には驚愕反射を増強することが明らかとなった。また、この2 種混合物は微量で効果を発揮することや、あらかじめ抗不安薬をラットに投与することでその効果がなくなること、聴覚性驚愕反射の増強とは異なる試験においても不安反応を引き起こすこと、などが明らかとなった。これらの結果より、この2 種類混合物がラット警報フェロモンの主要成分であることが示唆された。



次にこのフェロモンが不安反応を引き起こすメカニズムを検討した。その結果、4-メチルペンタナールは鋤鼻系（鋤鼻上皮）で受容されることが明らかとなった。一方ヘキサナールは、主嗅覚系（嗅上皮）で受容されることが示唆された。そして、それぞれの物質が単独で受容された場合には効果が観察されないものの、2 物質が同時に受容されると初めて、不安回路の中で重要な役割を担っている分界条床核を活性化することが明らかとなった。しかし、2 種類の化合物はたとえ同時に受容されても、ストレス内分泌反応において重要な働きを担っている室傍核を活性化しなかったため、警報フェロモンを受容すること自体はストレスではないことが明らかとなった。

以上の結果より、警報フェロモンを介したコミュニケーションの概要が明らかとなった。ラットはストレスにさらされると4-メチルペンタナールとヘキサナールを肛門周囲部より放出する。4-メチルペンタナールが鋤鼻系で、ヘキサナールが主嗅覚系でそれぞれ受容されると、受容したラットの不安回路が活性化される。その結果、受容したラットは様々な脅威に対して状況に応じた適切な反応を示すことが可能となる。



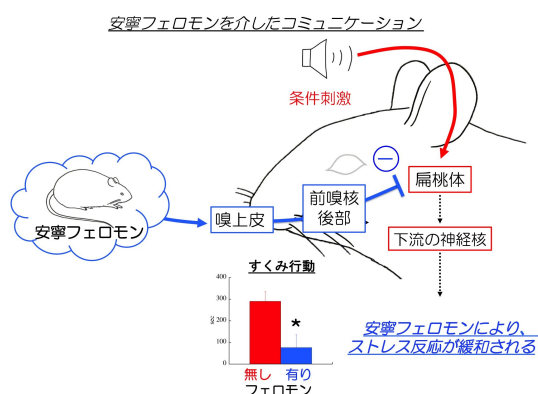
(2) 安寧フェロモンに関する研究

安寧フェロモンの存在をより直接的に検討するために、パートナー由来の嗅覚シグナルがストレス反応を緩和するかを検討した。その結果、事前にパートナーを3時間導入しておくことでパートナー由来の嗅覚シグナルを充満させた実験箱を作製し、その中で条件刺激を提示すると、恐怖条件づけを体験したラットでもストレス反応を示さないことが明らかとなった。さらに、揮発性成分だけが通過できる仕切りを用いて、パートナーを導入する区画を区切った実験箱を用いても、パートナー由来の嗅覚シグナルは同様にストレス反応を緩和した。そのため、揮発性分子から成り、主嗅覚系で受容されてストレスを緩和する安寧フェロモンの存在が明らかとなった。

上記の研究と並行して、フェロモン作用の中枢メカニズムの解析を行った。条件刺激によってストレス反応が引き起こされる神経メカニズムは明らかとされており、条件刺激は扁桃体、その中でも特に外側核と中心核と呼ばれる部位を活性化することで様々なストレス反応を引き起こすことが知られている。そのため、安寧フェロモン作用の中枢メカニズムとして、扁桃体の活性化が抑制されることが考えられた。そこで、電気生理学的に検討したところ、安寧フェロモンが存在すると扁桃体の活性化が抑制されることが明らかとなった。そのため、嗅上皮で受容された安寧フェロモンが扁桃体へ伝達され、その活性化を抑制していることが示唆された。しかし解剖学的知見より、嗅上皮で受容された安寧フェロモン情報は主嗅球へと伝達されるものの、その後扁桃体へは間接的に伝達されていることが示唆された。そこで、安寧フェロモン情報を扁桃体へと受け渡す領域を検討した結果、嗅脚後内側部、その中でも特に前嗅核後部という領域がその役割を担っ

ていることが明らかとなった。

以上の結果より、安寧フェロモンを介したコミュニケーションの概要が明らかとなった。ストレスを受けていないラットは安寧フェロモンを放出し、他のラットはそれを嗅上皮で受容する。受容された安寧フェロモン情報は嗅脚後内側部、その中でも特に前嗅覚後部を経て扁桃体へと伝達され、その活性化を抑制する。その結果ストレス反応が緩和される。



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16件)

Inagaki, H., Kiyokawa, Y., Tamogami, S., Watanabe, H., Takeuchi, Y. & Mori, Y. (2014) Identification of a pheromone that increases anxiety in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 18751-18756. 査読有
10.1073/pnas.1414710112

Takahashi, Y., Kiyokawa, Y., Kodama, Y., Arata, S., Takeuchi, Y. & Mori, Y. (2013) Olfactory signals mediate social buffering of conditioned fear responses in male rats. *Behavioural Brain Research*, 240, 46-51. 査読有
10.1016/j.bbr.2012.11.017

Kiyokawa, Y., Wakabayashi, Y., Takeuchi, Y. & Mori, Y. (2012) The neural pathway underlying social buffering of conditioned fear responses in male rats. *European Journal of Neuroscience*, 36, 3429-37. 査読有
10.1111/j.1460-9568.2012.08257.x

[学会発表](計26件)

Kiyokawa, Y., Inagaki, H., Takeuchi, Y. & Mori, Y. (2014) An alarm pheromone in rats. *The 23rd Annual Meeting of the International Behavioral Neuroscience Society, Symposia: "Scents that matter - from olfactory stimuli to genes, behaviors and beyond,"* Las Vegas, USA

Kiyokawa, Y. (2013) Social buffering as a novel way to suppress fear responses. *The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Symposia: "Neural circuits of experience dependent emotional change,"* 国立京都国際会館(京都府・京都市)

清川 泰志 (2012) 情動系に作用するフェロモン. 平成23年度日本獣医師会学会年次大会(北海道), 日本獣医学会・日本小動物獣医学会, シンポジウム:「動物たちの匂いの世界:その研究の最前線」, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称:臭気性組成物

発明者:森 裕司、武内 ゆかり、清川 泰志、稲垣 秀晃、渡邊 秀典

権利者:同上

種類:特許

番号:出願2014-209897号

出願年月日:平成26年10月14日

国内外の別:国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/koudou/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

清川 泰志 (KIYOKAWA, Yasushi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号:70554484