

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830027

研究課題名(和文) 父性発現の脳内機構：雄マウスの攻撃から養育への行動変化を制御するメカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of pheromone receptors responsible for pup-directed aggression in sexually naive male mice

研究代表者

刀川 夏詩子 (Tachikawa, Kashiko)

東京大学・農学生命科学研究科・特任研究員

研究者番号：70424182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：交尾未経験雄では仔から発せられるフェロモンによって、鋤鼻神経回路が活性化し、攻撃行動が誘発される。しかしながら、約300種類のフェロモン受容体のうち、仔フェロモンがどれを介して受容されるのかについては不明である。そこで我々は、神経活動依存的に発現が誘導されるEgr-1と約300個あるフェロモン受容体との二重in situハイブリダイゼーションを行うことにより、仔を提示した際に活性化された鋤鼻神経細胞に発現するフェロモン受容体の同定を行った。その結果、受容体候補としてV1R 2個とV2R 1個を同定した。このうちV1R発現鋤鼻神経細胞は仔由来の特異的な化学物質によって活性化されることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Sexually naive male mice show aggressive behavior toward pups by receiving pheromones from pups inducing pup-directed aggression through the vomeronasal organ (VNO). However it is not clear which pheromone receptors among 300 are responsible for this pup-directed aggression in sexually naive males. To identify it, we performed double fluorescent in situ hybridization with Egr1 as a neuronal activation marker and respective pheromone receptors. As a result, we identified two V1Rs among 180 and one V2R among 120 as candidates pheromone receptors for pup-directed aggression. Especially, chemical compounds to activate the VSNS expressing the two V1Rs were specifically included in pup urine. From these results it was suggested that the two V1Rs might be the strong candidate pheromone receptors responsible for pup-directed aggression in sexually naive male mice.

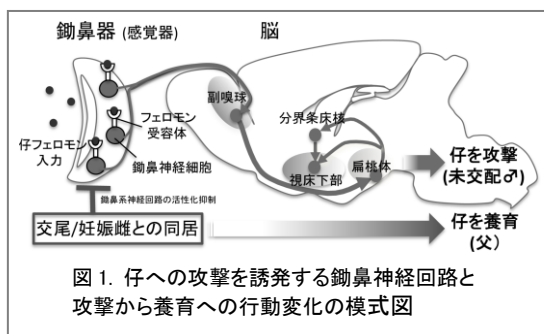
研究分野：神経科学

キーワード：父性行動 養育行動 フェロモン 鋤鼻器

1. 研究開始当初の背景

養育行動は仔の生存を高めるための親の行動の総称であり、全ての哺乳類種の生存に必須である。実験室マウスにおいて、『雌』は交尾未経験であっても養育を行う。一方、『交尾未経験の雄』は仔に接すると直ちに攻撃を行う。しかし『交尾を経験し、妊娠雌と同居した雄(父)』は自らの仔が出生する時期になると見知らぬ仔であっても攻撃せずに養育するようになる。未交配期の仔への攻撃は他の雄の仔を排除することにより、自らの性殖成功率と、将来生まれてくる自分の仔の生存率を高める可能性がある。一方、仔への攻撃の抑制機構は自分の仔を誤って殺す事がないように機能する。従って、養育・攻撃はいずれもその雄の遺伝子を持つ子孫維持のための適応的な行動であり、ライオンやハヌマンラングールなどハーレムを形成する哺乳類種でよく見られる。この現象自体は20年以上前に報告されていたが、仔からの知覚刺激は同じなのに、雌との社会的経験を経ることにより、雄がどのようにして行動を変化させているかという脳内メカニズムについてはほとんど説明されていない。

これまでの当研究から、交尾未経験雄では仔から発せられるフェロモンによって、鋤鼻神経回路が活性化し、攻撃行動が誘発されていること、一方父ではその情報伝達が抑制されていることが分かった。さらに交尾未経験雄において鋤鼻器を切除し、仔のフェロモン情報の伝達を遮断すると、攻撃の抑制と同時に養育行動の開始が観察されたことから、雄の攻撃から養育への行動変化(父性の発現)には、鋤鼻系の神経回路における仔のフェロモン情報の伝達抑制が必要十分であることが示唆された(図1)。しかしながら、仔のフェロモンが約300種類あるフェロモン受容体のうち、どれを介して受容されるのか、また、交尾や妊娠雌との同居といった経験がどのようにして仔のフェロモンを認識する受容体を発現する鋤鼻神経細胞の活性化を抑制しているのか、そのメカニズムについては不明である。



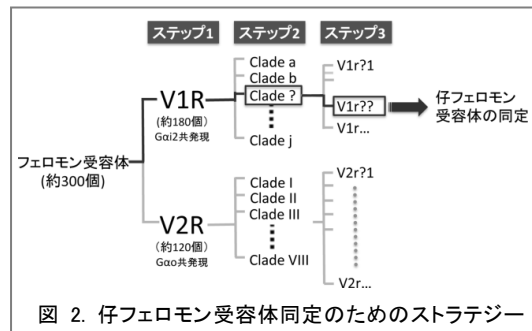
2. 研究の目的

以上の背景をふまえ、将来的には仔のフェ

ロモンの入力から攻撃行動の出力に至るまでの過程を明らかにする事と、仔のフェロモン情報が遮断される事によって開始される父性発現のメカニズムの解明を目指し、本申請ではまず、1.仔のフェロモンを感じる“仔フェロモン受容体”の同定を行った。続いて2.同定したフェロモン受容体欠損マウスを作出し、仔のフェロモンが受容できない事により、未交配雌において仔への攻撃行動が抑制されているかを検討し、同定した仔フェロモン受容体が機能的な受容体である事を確認することを目指した。

3. 研究の方法

神経活動依存的に発現が誘導される Egr-1 と約 300 個あるフェロモン受容体 (V1Rs 及び V2Rs) との二重 *in situ* ハイブリダイゼーションを行うことにより、仔を提示した際に活性化された Egr-1 mRNA 陽性鋤鼻神経細胞に共発現するフェロモン受容体の検索を行った。マウスには約 180 種類の V1R 遺伝子、約 120 種類の V2R 遺伝子が存在する。V1R は G 蛋白質 α サブユニットのサブタイプである $G\alpha i2$ を V2R は $G\alpha o$ をそれぞれ共発現している。遺伝子配列の類似性により、V1R、V2R はさらに大きく分けて 8 つの Clade に分類され、Clade 間の遺伝子の配列類似性は高い。そこで、多数のフェロモン受容体の中から、仔のフェロモン特異的な受容体を同定するため、以下ステップ 1~3 の戦略に沿って行った(図2)。ステップ1: 仔フェロモンによって Egr-1 陽性となった細胞が、 $G\alpha i2$ と $G\alpha o$ のどちらを共発現しているかを検討し、仔フェロモン受容体が V1R と V2R のどちらに属するかを決定した。ステップ2: クレード内に共通する配列に対してプローブを設計し、8 つのどのクレードに属するかを検討した。ステップ3: 個々の遺伝子の配列に特異的なプローブを作製し、仔のフェロモン特異的な受容体の候補を絞り込んでいった(図2)。さらに同定したフェロモン受容体について、CRISPR/CAS9 システムにより KO マウスの作製を行った。



4. 研究成果

上述のように、神経活動依存的に発現が

誘導される最初期遺伝子、Egr-1 と約 300 個あるフェロモン受容体 (V1Rs 及び V2Rs) との二重 *in situ* ハイブリダイゼーションを行うことにより、仔を提示した際に活性化された Egr-1 mRNA 陽性鋤鼻神経細胞に共発現するフェロモン受容体の検索を行った。その結果、V1R 2 個 (V1Rx/y (仮名)) と V2R 1 個 (V2Rz (仮名)) が仔への攻撃の際に活性化されていることが分かった (図 3)。この内、2 つの V1Rx/y はゲノム上で隣り合った場所に存在し、配列の類似性が 96% と非常に高く、同じリガンドを認識すると推測された。さらにこれらの受容体を活性化する物質が仔由来のものであるかを検討した。具体的には、仔あるいは成体の分泌腺 (眼窩外涙腺、耳下腺、唾液腺) 及び、尿を交尾未経験雄に提示し、これらの受容体が活性化されるか否かを検討した。その結果、V2Rz は仔以外に成体の雌から分泌される化学物質によっても活性化されるが、V1Rx/y は仔の尿に含まれる特異的な化学物質によって活性化されることが分かった。また、V1Rx/y は成体雌や雄の尿を提示したときには活性化していなかった (図 4)。そこで我々は V1Rx/y が仔への攻撃行動を誘発するフェロモンの有力な受容体候補であると考え、CRISPR/CAS9 システムを用いて V1Rx/y の受容体欠損マウスの作出を行い、そのうち V1Rx の受容体欠損マウスの作出が完了した。今後はこの V1Rx が仔への攻撃行動を誘発するフェロモンの機能的な受容体であるか否かを行動実験により検討していく予定である。

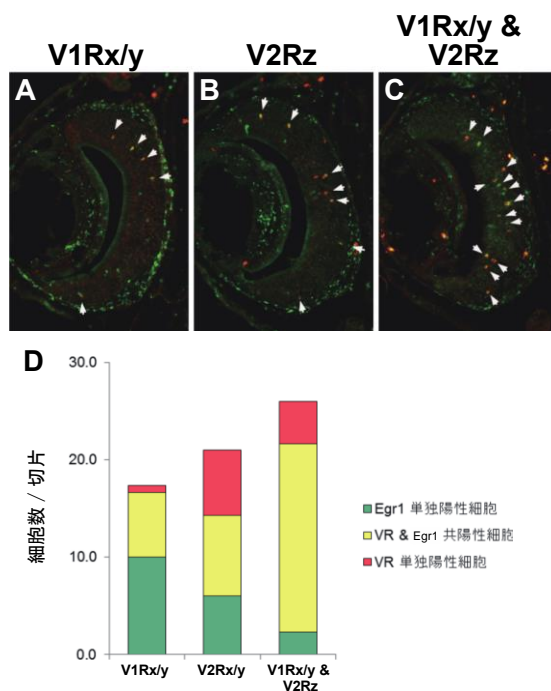


図 3. 交尾未経験雄マウスに仔を提示したときに活性化されていた鋤鼻神経細胞に発現するフェロモン受容体
仔への攻撃行動を示した交尾未経験雄マウスの鋤鼻器において、Egr-1 とフェロモン受容体の

ダブル *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、mRNA の発現解析を行った。Egr1: 緑、各フェロモン受容体: 赤、矢印: Egr-1 とフェロモン受容体が共発現。A、D. Egr-1 と V1Rx/y の mRNA の発現。Egr-1 陽性細胞の 40% が V1Rx/y を発現している。B、D. Egr-1 と V2Rz の mRNA の発現。Egr-1 陽性細胞の 58% が V1Rx/y を発現している。C、D. Egr-1 と V1Rx/y 及び V2Rz の mRNA の発現。Egr-1 陽性細胞の 90% が V1Rx/y または V2Rz を発現している。以上の結果から、仔への攻撃行動を示した交尾未経験雄マウスでは、V1Rx/y または V2Rz を発現している鋤鼻神経細胞が活性化されていることがわかった。

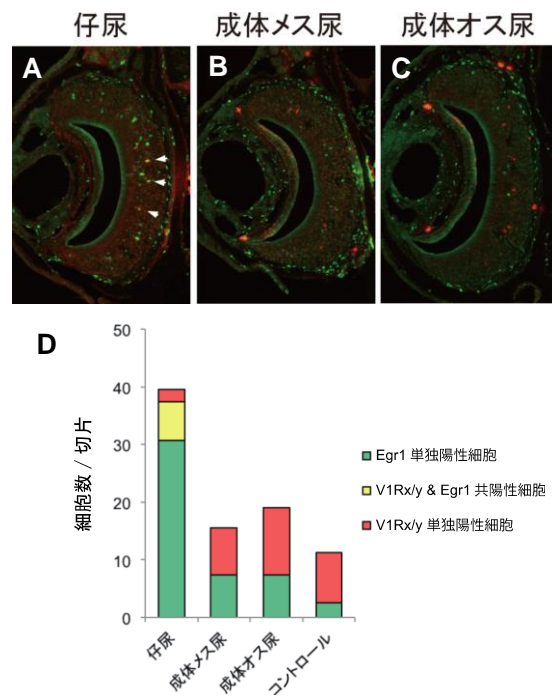


図 4. V1Rx/y を発現する鋤鼻神経細胞は仔尿中の化学物質によって活性化される。

交尾未経験雄マウスに仔 (A)、成体メス (B)、成体オス (C) の尿をそれぞれ提示し、V1Rx/y を発現する鋤鼻神経細胞が活性化されているか否かを Egr-1 と V1Rx/y のダブル *in situ* ハイブリダイゼーションを行うことにより確認した。Egr1: 緑、V1Rx/y: 赤、矢印: Egr-1 と V1Rx/y が共発現。A~D. 仔の尿を提示した時のみ V1Rx/y を発現している鋤鼻神経細胞が Egr-1 共陽性となり、活性化されていることがわかった。以上の結果から、V1Rx/y を活性化させる化学物質は仔の尿に特異的に含まれていることがわかった。

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 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

刀川夏詩子、黒田公美、吉原良浩、東原和成
“父性発現の脳内機構：雄マウスの攻撃から
養育への行動変化を制御するメカニズムの
解明”第14回東京大学生命科学シンポジウ
ム、東京本郷キャンパス、2014.4.26

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 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 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

刀川 夏詩子 (TACHIKAWA KASHIKO)

東京大学・農学生命科学研究科・特任研究
員

研究者番号：70424182

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：