

哺乳類におけるプライマーフェロモンの同定と  
神経生理基盤の解明

Identification of primer pheromones in mammals and  
elucidation of a neural basis for the pheromone action

課題番号：18H05267

東原 和成 (Touhara, Kazushige)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授



研究の概要

生理変化を引き起こすフェロモンをプライマーフェロモンと呼ぶが、哺乳類においてはそれらの分子実体、受容体、神経基盤についてはほとんど分かっていない。本研究では、マウスにおいては性成熟の促進、発情の誘起・抑制および妊娠阻害効果、ヒトでは性周期を同調させるプライマーフェロモンについて、分子実体から中枢作用までを明らかにする。

研究分野：神経科学、生化学、分子生物学、分析化学

キーワード：フェロモン、嗅覚、受容体、神経回路、生殖

1. 研究開始当初の背景

フェロモンは、行動を引き起こすリリーサーフェロモンと生理変化を引き起こすプライマーフェロモンに大別される。リリーサーフェロモンの研究は、半世紀以上も前にカイコの研究からスタートして以来、昆虫やマウスにおいて、分子から受容体、神経回路レベルに至るまでかなり進んできている。一方で、ヒトを含む哺乳類ではより重要と考えられているプライマーフェロモンに関しての知見はほとんどない。古くは、1980-90年代に Novotny らが、マウスを用いて、生理変化を指標に候補分子を報告しているが、その再現性は疑問視され続け、2011年に米国 Stowers のグループによって否定されている。ヒトにおいては、1971年に米国 McClintock が女子寮で性周期が同調するという「寄宿舎効果」を発表したが、その原因のフェロモン物質は発見されていない。

2. 研究の目的

マウスにおいては、性成熟の促進、発情の促進・抑制、妊娠阻害など生殖機能へ影響するプライマーフェロモン群を同定し、それらの受容体、神経回路、生理状態依存的なシグナル伝達経路の変化について明らかにする。

ヒトにおいては、性周期を同調させるフェロモンを同定し、脳機能イメージングにより脳の作用部位を明らかにする。

3. 研究の方法

マウスのプライマーフェロモンに関して

は、ファイバーフォトメトリー法による生殖中枢の *in vivo* Ca<sup>2+</sup>イメージングにより、尿に含まれるフェロモンの中枢作用の解析を行うとともに、バイオアッセイ系としても利用する。尿を様々な分析化学的手法で分画し、バイオアッセイを組み合わせることでフェロモン活性成分を精製し、GC-MS、LC-MS、NMR 解析により構造を推定し、有機合成して構造を決定する。受容体に関しては、各種受容体の *in situ* hybridization と、神経活動マーカーとしてリン酸化リボソームの抗体染色の組み合わせにより、約 300 種類の鋤鼻受容体ファミリーの中から同定する。同定された受容体については、CRISPR-Cas9 システムを用いてノックアウトマウスを作出し、その必要性を検証する。フェロモン効果に至る脳神経回路に関しては、ウイルス工学、光遺伝学、薬理遺伝学的手法を用いてアプローチする。

ヒトのフェロモンに関しては、月経周期に伴う女性の腋臭変化を GC-MS によって分析し、各段階に特異的な匂い物質を同定する。脳機能イメージング法や自律神経・内分泌系などの非侵襲的な測定法で、生理活性の検証および作用部位の同定を行う。

4. これまでの成果

マウスにおいて性成熟を促進するプライマーフェロモンの粗精製、受容体候補の同定、中枢作用解析系の確立を行なった。具体的には、オスマウス尿の 3 kDa 未満、アセトン沈殿する画分に雌マウスの性成熟促進効果が

あり、その画分には鋤鼻受容体ファミリーのうちV2Rタイプの1つが応答することが組織化学的手法により示唆された。そこで、CRISPR-Cas9システムを用いてその受容体をノックアウトしたマウスを作出した。組織化学的手法を用いた解析により、ノックアウトマウスでは、雄尿精製画分に対する鋤鼻細胞、視床下部および辺縁系の応答が認められなくなった。以上から、同定した受容体が生殖中枢に作用するプライマーフェロモン受容体の1つであることが示唆された。そこで、このリガンドの同定を試みた。ODSカラムには緩く保持され、親水性のカラムには比較的強く保持された。限外濾過、有機溶媒沈殿、固相抽出、5種類のHPLC精製を経て、同様に精製をした去勢雄尿、雌尿由来画分とのLCMS解析結果の比較により、分子量500未満の分子が有力な候補となった。これまでに同定されたV2Rタイプの鋤鼻受容体ファミリーのリガンドは全てペプチドであるが、この分子は含まれるアミノ酸はあっても1つであり、新たな物性のリガンドレパートリーであることが質量分析によって示唆された。

マウスの妊娠阻害効果フェロモンの作用点と想定される弓状核ドーパミン神経の *in vivo* Ca<sup>2+</sup> imaging 系のセットアップを行い、フェロモン源として雄尿を呈示したが、応答が認められなかった。そこで、妊娠初期に特異的にシグナルが伝わるという仮説が考えられ、検証を進めている。

雌マウスを群居させると性周期が抑制される現象については、系統差があることが示唆された。性周期が抑制されたケージの雌マウス尿に応答する鋤鼻受容体や視床下部の神経種を同定し、それらの応答を指標として精製を進めている。

ヒトの性周期同調効果は、月経周期内の各ステージに特有な匂い物質による影響の結果と推定される。そこで、月経周期に伴う女性の腋臭変化をGC-MSによって分析し、主成分分析の結果、卵胞期と黄体期の腋臭が異なったクラスターを作ることが示唆された。そして、被験者を増やし、詳細なGCMS解析を行った結果、各性周期に特異的な成分が同定された。現在これらの合成化合物の生理作用を検証している。

## 5. 今後の計画

マウスにおいて性成熟を促進するフェロモンの同定のため、雄マウス尿を大量に捕集し、大容量の固相抽出で粗精製を行い、その後3種類ほどのカラムを用いてHPLC精製を行い、活性物質を精製する。精製の各ステップでは、LCMSにより、受容体を活性化する分子イオンが多い画分をピックアップする。以上の操作により候補成分を単離し、950MHzのNMRで分析することで、構造推定を行う。推定された化合物を合成し、雄尿由来成分のマスペクトルおよびNMRスペクトルと一致することを確認、構造決定する。次に、合成化合物が、同定した受容体を発現する鋤鼻神経、および視床下部の応答を誘起するかを、組織化学的手法およびファイバーフォトメトリーにより確かめる。また、性成熟の促進や、発情誘起効果があるかどうかを確かめる。

妊娠阻害効果フェロモンについては、妊娠初期のプロラクチンサージの際の弓状核ドーパミン神経の雄尿に対する応答を検証する。

性周期抑制フェロモンに関しては、群居雌の尿に特異的に応答する鋤鼻受容体や視床下部の神経を同定し、それらの応答を指標として精製を行い、リガンド同定を目指す。

ヒトの女性において、月経周期の各段階に特異的に見出された化合物を準備する。それらの化合物を嗅いだ際の女性の脳の反応を、種々の脳計測法によって測定することで、生殖を制御する脳領域への作用を解析する。

## 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

・Fu, O., Iwai, Y., Narukawa, M., Ishikawa, W., A., Ishii, K., K., Murata, K., Yoshimura, Y., Touhara, K., Misaka, T., Minokoshi, Y., and Nakajima, K. "Hypothalamic neuronal circuits regulating hunger-induced taste modification" **Nature communications** 10, 4560 (2019)

・Horio, N., Murata, K., Yoshikawa, K., Yoshihara, Y., and Touhara, K. "Contribution of individual olfactory receptors to odor-induced attractive or aversive behavior in mice" **Nature Communications** 10, 209 (2019)

・Ishii, K., K., Touhara, K. "Neural circuits regulating sexual behaviors via the olfactory system in mice" **Neuroscience Research** 140, 59-76 (2019)

## 7. ホームページ等

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