

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790188

研究課題名(和文) フェロモンシグナリングの動的機能形態学—発情期フェロモンとその受容細胞の同定—

研究課題名(英文) Dynamic functional morphology of pheromone signaling—Identification of estrous pheromone and its receptive vomeronasal neurons—

研究代表者

阿久津 仁美 (AKUTSU HITOMI)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：30398482

研究成果の概要(和文)：

申請者らは過去の研究において、雌ラット発情前期尿が雄ラット鋤鼻感覚細胞の細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の持続的な上昇という特有の反応を引き起こすことを見出した。本研究では、この持続的 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を生理活性の指標とし、雄ラット鋤鼻感覚細胞のカルシウムイメージング法をバイオアッセイ系として、雌ラット発情前期尿特異的に存在する生理活性物質(フェロモン)を同定することを目的としている。尿中成分の特性を知るために、限外濾過膜を通した尿や熱変性させた尿を用いてバイオアッセイをおこなうと、鋤鼻感覚細胞に持続的 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こすことから、尿中生理活性物質は低分子で熱変性しにくい特性を持つことが示された。また、HPLCの疎水性カラムに通して吸着させた雌ラット尿中成分を、アセトニトリルにて濃度勾配溶出させたところ、低濃度(0-15%)のアセトニトリルに多くのピークが出現した。このHPLCフラクションを“蛍光顕微鏡ベースのバイオアッセイ系”にて試験すると、発情前期の雌ラット尿から分取されたフラクションが特異的な細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こした。これまで利用してきた個々の鋤鼻感覚細胞の反応特性を詳細に解析できる“高速リアルタイム共焦点レーザー顕微鏡によるバイオアッセイ系”に加えて、本研究で確立した、厚みのある鋤鼻感覚上皮全体、あるいは鋤鼻感覚細胞の集団の反応を測定できる“蛍光顕微鏡ベースのバイオアッセイ系”を生理活性試験に導入することにより、細胞の反応を目的に応じて効率的に捉えることが可能になった。尿中成分の分離・精製とこれら2種類のバイオアッセイにより、雌ラットの発情前期尿特異的なフェロモンの同定の可能性が高まると期待できる。

研究成果の概要(英文)：

We found out in earlier study that female rats' urine excreted on proestrous stage (proestrous urine) had some bioactivity which induced a specific increase of intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in vomeronasal sensory neurons of male rat. By set such specific $[Ca^{2+}]_i$ increase as a indicator of bioactivity, in this study, we aimed to identify a bioactive substance, a pheromone, which was specific contained in proestrous urine with bioassay systems of calcium imaging of vomeronasal sensory neuron (VSN). Female rat's urine sample, treated with ultrafiltration membrane or boiled, were tested bioactivity with the bioassay system. It became clear that urinary substances which seemed to induce a specific $[Ca^{2+}]_i$ increase have properties as a low molecular and hard to denature by heat. By purification of female rats' urine with HPLC using hydrophobic column, most components of urine were eluted in low concentration acetonitril (0-15%).

When HPLC fractions were examined its bioactivity by “a bioassay system based on fluorescent microscope” which was built up in this study, bioactivity was observed as a specific $[Ca^{2+}]_i$ increase in some HPLC fractions of proestrous urine. We have applied the bioassay system using real time laser scanning microscope to measure the responses in individual VSNs, the new bioassay system based on fluorescent microscope was developed to measure the responses of the whole vomeronasal sensory epithelium and the mass of VSN. The purification of urinary component and the bioactivity examination by two ways of bioassay raised a possibility to identify a proestrous urine specific pheromone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

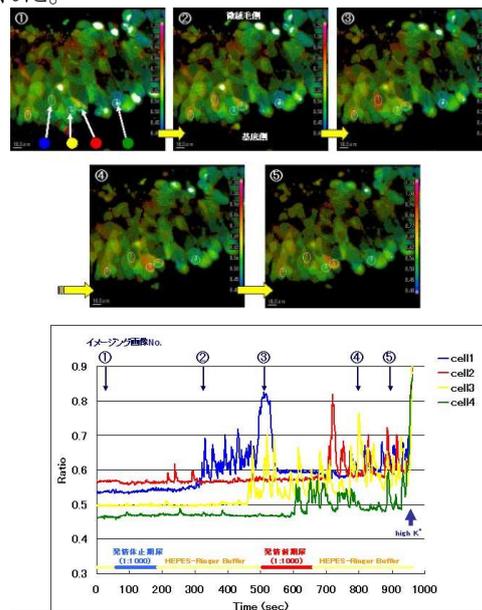
キーワード：フェロモン・カルシウムイメージング・鋤鼻器・生理活性物質・バイオアッセイ・ラット・尿

1. 研究開始当初の背景

嗅覚は、生物個体間における重要な情報伝達手段である。特に同種他個体間で放出・受容されるフェロモンは、個体の生存や適応に不可欠な社会的・生理的・遺伝的情報を伝達する。哺乳類フェロモンの研究は、飼育・取り扱いが容易で遺伝子操作が可能なマウスにおいて近年特に発達しており、尿や涙腺分泌物からのフェロモンの同定、受容体遺伝子の同定とその発現部位（鋤鼻器）の特定、フェロモン効果（リリーサー効果・プライマー効果）の解明がなされている。その成果から、マウス同士の相互関係、すなわち、雄マウス同士の逃走行動や雌における雄からの攻撃回避、交尾相手の匂いの記憶など、マウスの生態を形成する種々の生理的变化や行動がフェロモンによって制御されていることが示唆されている。

申請者らはこれまでに、雄ラット鋤鼻器スライス標本を用いて細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変化をモニターできるバイオアッセイ系を開発し、発情雌ラット尿（発情前期尿）と非発情雌ラット尿（発情休止期尿）が雄ラット鋤鼻感覚細胞にそれぞれ異なるパターンの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇をもたらし、特に発情前期尿は従前に観察されたことのない $[Ca^{2+}]_i$ 持続的上昇を引き起こすことを明らかにした。この細胞内カルシウム応答の特異性から、発情前期尿には過去に報告のない特別なフェロモンが含まれている可能性が強く示さ

れた。



雌ラット尿を鋤鼻上皮に暴露したときのカルシウムイメージング画像と、反応が認められた細胞のカルシウムイオン濃度の変化を示したグラフ。

2. 研究の目的

この鋤鼻感覚細胞カルシウムイメージング・バイオアッセイ系により、発情状態を雄ラットに知らせうる未知の雌ラットフェロモンを同定すること、そして雌ラットフェロ

モンの受容細胞を特定し、その情報伝達メカニズムを解明することが本研究の目的である。これまでに雌が繁殖に関わる生理的情報を伝達するためのフェロモンは同定されておらず、申請者らが見つけた活性がその候補のひとつと言えるであろう。学際的な dynamic morphology の手法を駆使した本研究は、新しいフェロモン様活性物質を用いたケミカルコミュニケーション解明の端緒となるものである。

3. 研究の方法

【平成 21 年度】

雄ラット鋤鼻感覚細胞のカルシウムイメージングバイオアッセイ系は、雄ラット鋤鼻器から 150・m 厚の生スライスを作製し、Ca²⁺感受性蛍光物質 Indo-1/AM (5・M) を取り込ませ、刺激物質によって引き起こされる感覚細胞の活性化を [Ca²⁺]_i の上昇として測定する。測定解析は、高速リアルタイム共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon RCM-8000/Ab) にておこなった。刺激物質としての試料の活性の有無の判定は、i) アッセイ開始後、刺激物質灌流前には [Ca²⁺]_i の上昇がほとんど認められないこと、ii) 刺激物質灌流中、あるいはその wash out 中に 30 秒以上 (または 50 秒以上) の [Ca²⁺]_i 上昇の持続が認められること、iii) [Ca²⁺]_i の上昇は、ratiometric intensity として 0.1 以上であること、これらの条件を満たす反応を示した細胞が認められた場合に、用いた試料を“活性あり”と判定する工夫をした。

刺激物質としては、① 雌ラット尿 (発情前期尿・発情休止期尿) を限外濾過膜に通し、一定のカットオフ値により尿中成分の分子量を分け、濾過膜の上部と下部に分離したそれぞれの試料、② 発情前期尿を 95℃にて 10 分間熱変性させた試料、をバイオアッセイに用いて、生理活性を試験した。

Nikon RCM-8000/Ab を用いたバイオアッセイ系では、150・m 厚の生スライスのうち、任意のある断層に並ぶ鋤鼻感覚細胞のみの精緻な画像を取得して詳細に観察している。観察している断層以外に存在する細胞に関しては、たとえ反応していても観察することができない。そこで、厚みのある鋤鼻感覚上皮全体を測定でき、細胞集団の反応を捉えられる“蛍光顕微鏡ベースのバイオアッセイ系 (OLYMPUS IX70, イメージングソフト AQUACOSMOS 2.6 (浜松ホトニクス) 使用)”を開発した。

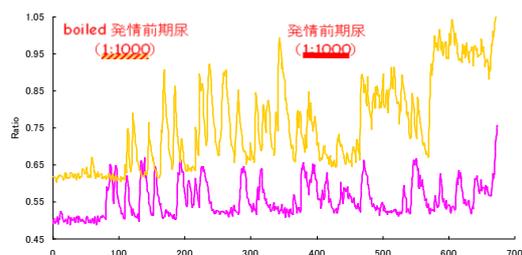
【平成 22 年度】

HPLC を用いて、雌ラット尿中成分の分離精製をおこなった。すなわち、C18 疎水性カラムに原尿を通して成分を吸着させ、0.1% TFA を含むアセトニトリルにて濃度勾配溶出を

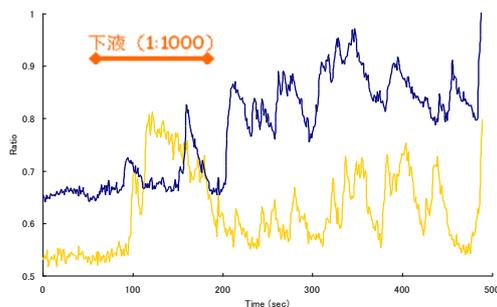
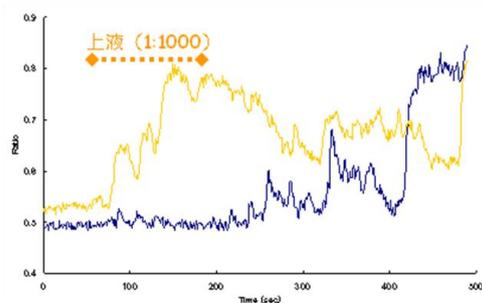
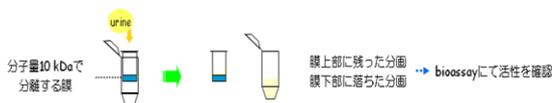
おこなった。フラクションを 1 分ごとに回収し、凍結乾燥して 10 mM HEPES に溶解したものを試料とし、蛍光顕微鏡ベースのバイオアッセイ系にて生理活性を試験した。

4. 研究成果

雌ラット発情前期尿を限外濾過膜に通し、膜の上部と下部に分離した試料を用いてバイオアッセイをおこなうと、両者に活性が認められた。また、熱変性させた発情前期尿においても活性が認められたことから、発情前期尿中の生理活性物質は、「小さい分子で、熱変性しにくい」という特性を持つことが示唆された。

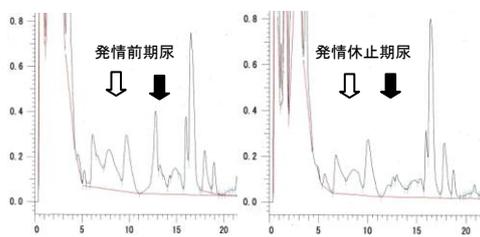


ポイルして熱変性させた発情前期尿で刺激した鋤鼻感覚細胞の [Ca²⁺]_i 上昇。活性が認められる。



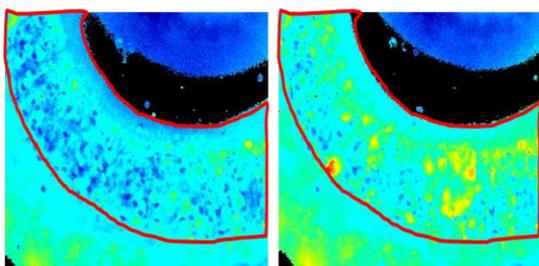
限外濾過膜の上下に分離した試料のバイオアッセイ。両者に活性が認められる。

HPLC における尿の分離精製では、低濃度のアセトニトリル (0-15 %) に尿中成分のほとんどが溶出した。発情前期尿と発情休止期尿では、ピークの出現に違いが認められ、成分に違いがあることが示された。ピークの違いが認められた部分のフラクションを用いて蛍光顕微鏡ベースのバイオアッセイ系にて活性を試験すると、発情前期尿、発情休止期尿ともに活性は認められたが、活性が確認されたフラクションは発情前期尿で多数であった。



HPLC による発情前期尿と発情休止期尿の 215nm 波長光吸収ピーク。それぞれの色の矢印の部分と比較すると、発情前期尿特異的なピークが認められる。

蛍光顕微鏡ベースのバイオアッセイ系で取得される画像では、細胞の輪郭が不明瞭であるため、個々の細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は測定できない。しかし感覚上皮全体および細胞集団の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を測定することができるため、非常に情報量の多いバイオアッセイである。今後は、このアッセイ系と共焦点レーザー顕微鏡によるアッセイ系を組み合わせ、HPLC フラクション中の生理活性を試験することにより、雌ラットの発情前期尿中に含まれる特異的なフェロモンの同定が可能になると考えられる。



発情前期尿の HPLC フラクションで刺激した鋤鼻感覚上皮。左が刺激前、右が刺激後。細胞の色は疑似カラーで示されており、刺激後の細胞が青・水色から緑・黄・赤に変わり、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が確認できる。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

阿久津仁美, 人見次郎, 佐藤洋一

尿が誘発する鋤鼻感覚細胞内 Ca^{2+} 上昇パターンの多様性 (シンポジウム)

第 115 回日本解剖学会・全国学術集会

(岩手県民会館・岩手)

2010 年 3 月 28-30 日

阿久津仁美

尿が誘発する鋤鼻感覚細胞内 Ca^{2+} の上昇 (シンポジウム)

日本農芸化学会東北支部シンポジウム

(岩手大学・岩手)

2010 年 6 月 26 日

Satoh Y, Saino T, Akutsu-Yamauchi H, Hamano Y:

New era of morphology - Developed by the fluorescent markers and the confocal microscopy.

XXI International Symposium on Morphological Sciences (Taormina, Italy)

2010, September

Hitomi Akutsu, Jiro Hitomi, Yoh-ichi Satoh:

Purification of the bioactive factors in female rats' urine which stimulate male rats' vomeronasal sensory neurons (ポスター発表)

第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会

(震災のため、誌上開催)

2011 年 3 月 28 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況（計 0 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 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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

阿久津 仁美 (AKUTSU HITOMI)
岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号：30398482

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：