

令和元年6月21日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02591

研究課題名(和文) 恐怖行動を誘発する嗅覚受容体遺伝子の解明

研究課題名(英文) Sensory receptor genes regulating odor-induced fearful behaviors

研究代表者

小早川 高 (KOBAYAKAWA, Ko)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60466802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,400,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、マウスの鼻腔の特定の領域から開始する神経回路が匂いに対する先天的行動を制御することを解明した。この原理を応用し、極めて強力な先天的恐怖行動を誘発する人工匂い分子「チアゾリン類恐怖臭」を開発した。本研究では、これらの匂い分子を活用し、フォワードジェネティクススクリーニングで先天的な恐怖行動の誘発を担う遺伝子を探索しTrpa1遺伝子を同定した。Trpa1ノックアウトマウスやTrpa1標識マウスなどを用いて、三叉神経に発現するTRPA1はチアゾリン類恐怖臭を検知し、その情報が脳幹部の三叉神経脊髄路核へ伝達されることで、先天的な恐怖行動が誘導されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳が感覚刺激の意味を判断して行動を制御するメカニズムの多くは未解明である。これまでの私たちの研究により、強力な先天的恐怖行動を誘発する一連の匂い分子「チアゾリン類恐怖臭」が開発された。さらに、本研究によりチアゾリン類恐怖臭を検知して恐怖行動を誘発する受容体遺伝子と神経経路が解明された。ここで初めて確立された匂い刺激(チアゾリン類恐怖臭)と行動を誘発する受容体遺伝子(Trpa1)の組み合わせが脳にどのような情報を伝達しているのかを研究することで、脳の感覚情報処理原理の解明が進むと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We revealed that the neuronal pathway starting from specific area in the olfactory epithelium regulates odor-induced innate behavior in mice. Based on this rule, we developed artificial odors termed thiazoline-related fear odors (tFOs), which can induce ultra-potent innate fear behaviors. In this study, we searched for the genes regulating odor-induced innate fear behaviors by a forward genetics screening using tFOs, and identified Trpa1 gene. Using Trpa1 knockout and Trpa1-Cre knockin mice, we revealed that TRPA1 in the trigeminal nerve detects tFOs and the information is transmitted to the spinal trigeminal nucleus to induce innate fearful behaviors.

研究分野：先天的な恐怖行動を誘発する神経経路と遺伝子の解明

キーワード：先天的恐怖 恐怖臭 Trpa1 嗅覚行動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳は感覚器によって感知された外界の情報を、何らかの情報処理プロセスに従って意味判断し、その結果に基づいて適切な種類の行動や情動を誘発している。この意味判断、並びに、情動や行動の誘発プロセスを担う遺伝子や神経回路の多くは未解明である。嗅覚刺激は、恐怖行動、忌避行動、摂食行動、社会行動を含む様々な種類のマウスの行動を誘発する。私たちは、鼻腔内の異なる領域から開始する神経回路により、匂いに対する先天的と後天的な行動を誘発する情報が分離して脳へ伝達されることを証明し、先天的と後天的な嗅覚情報の分離伝達原則を提唱した。さらに、分離して脳へ伝達された嗅覚情報は、恐怖中枢である扁桃体に存在する亜核の一つである中心核に存在するセロトニン 2A 受容体を発現する細胞において、拮抗的に統合され、その結果、先天的恐怖行動が後天的恐怖行動に優先されるという階層制御を受けることを証明し、先天的と後天的な恐怖情報の拮抗的な統合と行動の階層制御の原則を提唱した。これらの一連の研究により、嗅覚刺激が脳へ伝達され行動制御に至る一連の過程を含む、先天的と後天的な嗅覚行動の分離と統合制御モデルが確立された。

一方で、これらの研究の過程で私たちは、先天的な嗅覚刺激に対する恐怖行動を強力に誘発できる人工匂い分子である「チアゾリン類恐怖臭(Thiazoline-related fear odors: tFOs)」を開発することに成功した。恐怖行動は刺激を与えた後の一定時間の間のすくみ(Freezing)行動の継続時間の割合、血液中のストレスホルモン量、筋電位などを指標に計測される。特に、Freezing 行動のレベルは恐怖情動を定量的に評価する指標として、様々な実験系で用いられている。すなわち、より強力な恐怖情動を誘発する感覚刺激は、より高いレベルの Freezing 行動を誘発すると考えられている。肉食動物などの天敵が分泌する匂いに対してマウスが忌避行動や恐怖関連行動を示すことが知られていた。しかし、これらの天敵臭をマウスに嗅がせても比較的弱いレベルの Freezing 行動しか誘発できない。一方で、元々は Freezing 行動を誘発しない匂い分子を嗅がせた直後に電気ショックを与えることで、後天的な恐怖条件付を行った後に、条件付をした匂い刺激を与えると強力な Freezing 行動が誘発される。このことは、天敵臭は先天的な恐怖行動を誘発できるものの、その恐怖情動のレベルは後天的な恐怖刺激に比較すると弱いことが示唆される。これに対して、tFOs 刺激は後天的な恐怖刺激に匹敵する強力な先天的 Freezing 行動を誘発できた。さらに、tFO 刺激は与えたすべての個体に対して同等レベルの強力な Freezing 行動を誘発できた。tFOs の開発により初めてマウスに対して強力な先天的恐怖情動を高い再現性で容易に誘発することが可能となった。

2. 研究の目的

匂い分子の受容体であると考えられている嗅覚受容体はマウスで 1000 種類以上存在する。さらに、一般的に、一種類の匂い分子は数十種類から 100 種類以上の嗅覚受容体を活性化させる性質がある。従って、特定の行動が一種類の匂い分子により誘発されるとしても、その匂い分子が誘発する多数の嗅覚受容体の中の、特定の一種類や少数の受容体が行動の誘発を担うのか、或いは、多数の受容体の組み合わせにより行動が誘発されるのかは不明であった。仮に、一種類の受容体が匂い分子に対する行動を担うとしても、最も適切な受容体を同定することは困難であると考えられた。このような背景で、私たちは、一種類の匂い分子で強力な行動を個体差なく誘発できる tFO を嗅がせたにもかかわらず、弱いレベルの Freezing 行動しか誘発されないミュータントマウスを探し、その原因遺伝子を同定するフォワードジェネティクススクリーニングの方法で、匂いに対する先天的な恐怖行動の誘発を担う原因遺伝子を同定することを目指した。フォワードジェネティクススクリーニングは筑波大学、テキサス大学と共同で実施した。

3. 研究の方法

tFO には様々な種類が存在するが、本研究では比較的強力な Freezing 行動を誘発でき、かつ、入手が容易な 2-methyl-2-thiazoline (2MT) を選択し使用した。まず、野生型マウスに対して 2MT を嗅がせた条件で誘発される Freezing 行動を計測し、その分布を解析した。その結果、2MT が誘発する Freezing 行動のレベルはある一定の範囲に集中する、すなわち、どの個体でも同等レベルの Freezing 行動が誘発されることが明らかになった。従って、この野生型マウスにおいて認められる Freezing 行動の分布から逸脱する個体においては、2MT に対する Freezing 行動の制御に何らかの異常が見られる確率が十分に高いと考えられた。

ENU 処理により変異を導入したマウスをかけ合わせ、得られた仔マウスのコーディング遺伝子上に存在する変異を全エキソームシーケンシングにより決定した。この仔マウスを更に掛け合わせを行い、ホモ変異が導入された子孫マウスを作成した。このホモ変異を持つマウスに対して 2MT を嗅がせ誘発される Freezing 行動のレベルを定量的に解析した。このスクリーニングの結果、野生型マウスに見られる Freezing 行動の分布から明らかに逸脱する異常行動を示す複数の変異マウスを同定した。

ここで同定された 2MT が誘発する Freezing 行動を低下させる変異遺伝子の機能を検証するために、ロックアウトマウスを作成し 2MT に対する応答を解析した。さらに、この遺伝子が 2MT 以外の天然物由来の匂い成分や、天然物自体が誘発する恐怖行動の誘発にも関与する可能性を検証した。さらに、2MT が受容体遺伝子を介して恐怖情報を伝達する経路を解明するために、全脳活性化マッピングによる解析を実施した。ここで同定された感覚神経経路の活性をウイル

スペクターを用いた遺伝子発現法などを用いて検証した。また、この遺伝子を培養細胞に発現させた条件での 2MT やその他の先天的恐怖行動を誘発する匂い分子に対する結合活性や、チャネル機能の誘発活性などを解析した。

4. 研究成果

フォワードジェネティクススクリーニングの結果同定された遺伝子は、これまで侵害刺激を感知して痛み情報を伝達する機能や、呼吸を制御する情報を脳へ伝達する機能が知られていた Transient receptor potential ankyrin 1 (Trpa1) であった。Trpa1 ノックアウトマウスを作成し、確かに Trpa1 が 2MT に対する Freezing 行動の誘発を制御することを確認した。一方で、Trpa1 と相性の高い遺伝子である Trpv1 ノックアウトマウスでは、2MT が誘発する Freezing 行動に対する影響は認められなかった。これまで匂い分子に対する恐怖行動は嗅覚受容体遺伝子により制御されると考えられてきたので、この結果は予想外のものであった。フォワードジェネティクススクリーニングは遺伝子の種類に関してノンバイアススクリーニングとなるために、様々な種類の遺伝子が同定される可能性がある。しかし、今回のスクリーニングでは受容体遺伝子は同定されたものの、脳に存在して行動制御に関与する遺伝子などは同定されなかった。また、今回のスクリーニングでは嗅覚受容体遺伝子も 2MT に対する Freezing 行動の誘発に関与する候補遺伝子としては同定されたものの、その影響は Trpa1 に比較すると小さいものであった。一方で、私たちは全嗅覚受容体機能発現スクリーニングも実施し、このスクリーニングの結果同定された複数の嗅覚受容体遺伝子についてもノックアウトマウスを作成し Freezing 行動の誘発に与える影響を解析した。しかし、これまでに検証した限りでは、2MT に対して比較的良く応答する複数の嗅覚受容体遺伝子のいずれであっても、その単独のノックアウトでは 2MT が誘発する Freezing 行動に大きな影響を与えることはなかった。一方で、Trpa1 ノックアウトマウスでは 2MT に対する Freezing が条件によっては殆ど完全に消失するという強力なフェノタイプが得られた。ただし、Trpa1 ノックアウトマウスであっても比較的濃い濃度で 2MT 刺激を与えると、依然として Freezing 行動が誘発されたという点は留意しておく必要がある。これらの結果から、2MT は主に Trpa1 を介して Freezing 行動を誘発するが、2MT は Trpa1 以外にも数多くの嗅覚受容体遺伝子を活性化するので、これらの活性化も Freezing 行動の誘発にある程度寄与している可能性があると考えられた。

2MT は濃い濃度では Freezing 行動を誘発するが、低い濃度では忌避行動や危機対応行動などの行動応答を誘発する。Trpa1 ノックアウトマウスでは低濃度の 2MT が誘発する行動に関して大幅に抑制された。Trpa1 ノックアウトマウスでは 2MT に類似した化学構造を持つが、天敵であるキツネの分泌物に由来する TMT や、マウスの尿にも含まれるアラームフェロモンとして機能すると考えられている SBT が誘導する Freezing 行動や危機応答行動などに関しても大幅に抑制された。天然物の中で最も強力な恐怖応答を誘発するのは蛇の脱殻である。Trpa1 ノックアウトマウスでは蛇の脱殻が誘導する危機回避行動などが大幅に抑制され、その代わりに、野生型マウスでは見られない蛇の脱殻に接近して噛み付くなどの行動が見られた。蛇の脱殻の匂い成分を分析したが 2MT やそれに類似したチアゾリン類縁化合物などは同定されなかった。蛇の抜け殻に含まれるチアゾリン類以外の匂い成分が野生型マウスの恐怖行動を誘発していると考えられた。これらの結果から、Trpa1 は 2MT に対する Freezing 行動の誘発を指標に同定されたが、2MT 以外の化合物が誘導する恐怖関連行動のみならず、蛇の脱殻などの天然物の匂いに対する恐怖行動を含む嗅覚誘導性の恐怖行動の全般を集中して制御する、マスター嗅覚恐怖誘導遺伝子であると考えられた。

全脳活性化マッピングの結果、2MT は嗅球以外に三叉神経が接続する脳幹部の Sp5 を活性化することが判明した。また、2MT 刺激は三叉神経に存在する Trpa1 陽性細胞における神経活動を誘導した。Trpa1 遺伝子は三叉神経に高発現することが知られているので、三叉神経に存在する Trpa1 が 2MT やその他の先天的恐怖誘導性の嗅覚刺激を感知して恐怖行動を誘発している可能性が考えられる。この可能性を検証するために、Trpa1 ノックアウトマウスの三叉神経節に Trpa1 遺伝子を発現するウイルスベクターを感染させることで、三叉神経特異的に Trpa1 遺伝子の発現回復を行った。この発現回復マウスでは 2MT に対する Freezing 行動も回復した。また、培養細胞に発現させた TRPA1 タンパク質が 2MT や TMT に結合し、その結果、カルシウム応答が誘発されることをカルシウムイメージングで確認した。さらに、クリックケミストリーの手法を用いて、TRPA1 タンパク質と匂い分子が直接結合することを確認した。興味深いことに、2MT はマウスの Trpa1 を活性化できるが、ヒトの Trpa1 は活性化できなかった。このことは、2MT がマウスに対しては強力な恐怖情動を誘発するが、ヒトに対してはそうではないことと符合する。これらの結果を総合して、Trpa1 遺伝子はチアゾリン類恐怖臭やその他の先天的恐怖を誘導する匂い分子を三叉神経において感知し、先天的な恐怖行動を誘発すると結論づけた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

- ① Wang Y, Cao L, Lee CY, Matsuo T, Wu K, Asher G, Tang L, Saitoh T, Russell J, Klewe-Nebenius D, Wang L, Soya S, Hasegawa E, Chérasse Y, Zhou J, Li Y, Wang T, Zhan X, Miyoshi C, Irukayama Y, Cao J, Meeks JP, Gautron L, Wang Z, Sakurai K, Funato H, Sakurai T, Yanagisawa M, Nagase H, Kobayakawa R, Kobayakawa K*, Beutler B*, Liu Q*. (2018) Large-scale forward genetics screening identifies Trpa1 as a chemosensor for predator odor-evoked innate fear behaviors. *Nat Comm.* 9(1): 2041 (* corresponding authors) 査読あり
doi: 10.1038/s41467-018-04324-3.
- ② Sato T, Katsuoka Y, Yoneda K, Nonomura M, Uchimoto S, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Mizutani Y. Sniffer mice discriminate urine odours of patients with bladder cancer: A proof-of-principle study for non-invasive diagnosis of cancer-induced odours. *Scientific Reports* 7: 14628 (2017) 査読あり
doi: 10.1038/s41598-017-15355-z.

〔学会発表〕(計10件)

Ko Kobayakawa, Innate fear odors orchestrate life-or-death effects in mice、遺伝研研究会 Circuit construction in the mammalian brain、2018年

小早川高、「先天的と後天的な行動制御メカニズムとその生理学的意義、第11回北陸合同バイオシンポジウム、2018年

小早川高、「先天的恐怖誘導性危機応答モードによる生命保護」、生理研研究会『感覚免疫学研究会』、2018年

小早川高、「先天的と後天的な嗅覚情報の意味判断と統合処理メカニズム」、生理学研究会『先天的と後天的なメカニズムの融合による情動・行動の理解と制御』、2017年

小早川高、「D9-THC, JWH-018, 5-fluoro-ADP が誘発するマウスの脳活動と行動」、日本方中毒学会、2017年

Ko Kobayakawa, Htr2a-expressing cells in the central amygdala control the hierarchy between innate and learned fear, Wiring and Functional Principles of Neural Circuit, 2016

小早川高、「匂いが誘発する行動と生理応答」、第10回メタボロームシンポジウム、2016年

小早川高、「先天的と後天的な恐怖情報の統合と行動制御メカニズム」、生理学研究会『神経回路研究と精神疾患研究の連合による情動機構解明』、2016年

小早川高、「先天的と後天的な情動の統合処理メカニズム」、第9回Symphony、2016年

小早川高、「嗅覚刺激が誘発する恐怖行動と自律神経応答」、耳鼻科ニューロサイエンス研究会、2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kmu.ac.jp/faculty/graduate/category1/unit16.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。