

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18811

研究課題名(和文) マウスの生殖中枢に作用するフェロモンの同定と作用機構の解明

研究課題名(英文) Identification and analysis of central action of the pheromone that modulates reproductive physiology in mice

研究代表者

村田 健 (Murata, Ken)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任研究員

研究者番号：30749643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生殖中枢を構成する神経群の活動を記録し、フェロモンを受容した際のそれらの神経の応答を解析するとともに、その応答を指標にしてフェロモン分子の同定を行うことを目的とした。そのため、光遺伝学的手法により、特定の神経核において特定の遺伝子を発現する神経の活動を、自由行動下のマウスで記録するシステムを構築した。このシステムを用いて、フェロモンを含む雄マウス尿を提示した際に、生殖中枢の神経活動が促進されることを見出した。さらに、この反応を指標にして、雄マウス尿の比較的低分子量で親水性の高い成分にフェロモン活性があることが認められた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to record the neural activity of central regulator of reproduction to reveal the central response to male pheromone exposure and identify the pheromone molecule based on the response in mice. By using optogenetic technology, we established a system to record neural activity of neurons expressing specific genes in specific brain area. It was shown that exposure to male mouse urine containing pheromone activated the central regulator of reproduction. Furthermore, relatively low molecular weight hydrophilic compounds in male mouse urine were suggested to have pheromone activity.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：フェロモン 生殖 キスペプチン GnRH

1. 研究開始当初の背景

生物にとって、繁殖の成功は重要である。内分泌系に作用するプライマーフェロモンは、生殖内分泌系に作用して繁殖状態を制御することで、繁殖の成功に寄与する。多くの哺乳類において、雄が発するフェロモンによって、雌の排卵や発情が誘発される現象が知られている。このタイプのフェロモンの同定と中枢作用機構の解明は、哺乳類に共通する生殖内分泌系促進の原理の解明に大きく寄与することが期待される。

マウスにおいては、雄マウスの尿に雌の発情を促進するプライマーフェロモン活性 (Whitten 効果) があり、いくつかのフェロモン候補分子の報告がなされているものの、近年ではこれらの成分のフェロモン活性に関して異論が唱えられている。これまでに確固としたフェロモンの同定が達成されていないのは、フェロモンの作用機構が不明であり、排卵や発情といった最終アウトプットのみを指標としたバイオアッセイが不安定であったためと考えられる。そのため、視床下部の生殖制御に関与するニューロン群の活動を *in vivo* で解析するシステムを構築することで、プライマーフェロモンの中枢作用を解明し、さらに、作用機構もおさえた上で真のフェロモンの同定が望まれていた。

哺乳類の生殖は【視床下部 (性腺刺激ホルモン放出ホルモン: GnRH のパルス状分泌) 下垂体 (黄体形成ホルモン: LH のパルス状分泌) 性腺】の軸により制御されており、GnRH のパルス状分泌を制御する神経機構 (GnRH パルスジェネレーター) が生殖中枢だと考えられる。この GnRH パルスジェネレーターの実体は明らかとなっていないが、脳領域の破壊実験から視床下部弓状核に存在することが推定され、弓状核近傍の多ニューロン発火活動 (multiple unit activity: MUA) を記録することで、定期的に繰り返されるバースト状の発火が認められ、これが血中の LH パルスに対応することが、アカゲザル、ヤギ、ラットで報告されている。近年同定された GnRH の分泌を強力に促進する神経ペプチド、キスペプチン (*Kiss1* 遺伝子にコードされる) を産生する弓状核のキスペプチンニューロンが GnRH パルスジェネレーターの実体の候補である。

視床下部は、様々なタイプのニューロンが混在しているため、特定のタイプのニューロンの活動記録は困難であったが、近年発達の目覚ましい光遺伝学的手法を導入することで道が拓かれた。具体的には、特定の遺伝子を発現するニューロンに、光照射によって神経活動を誘起するチャンネルロドプシンや、神経活動を蛍光強度の変化としてイメージングできる GCaMP などのツールの発達によって、特定のタイプのニューロンの操作や活動記録が可能となった。

2. 研究の目的

本研究では、マウスをモデル動物として、生殖中枢を構成するニューロン群の活動を記録する系の確立を目指す。そのシステムの利用によって、生殖中枢の活動パターンを明らかにする。さらに、プライマーフェロモンを受容した際のそれらのニューロンの応答を解析するとともに、その応答を指標にしてフェロモン分子の同定を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

電気生理学的手法および光遺伝学的手法により、特定の神経核において特定の遺伝子を発現するニューロンの活動を、覚醒下のマウスで記録するシステムを構築する。具体的には、生殖中枢であると考えられる、視床下部弓状核のキスペプチンニューロン群の *in vivo* での記録系の立ち上げを試みた。

電気生理学的手法では、キスペプチンニューロンにチャンネルロドプシンを発現させ、光刺激により、キスペプチンニューロンにおいて活動電位を誘起できるようにする。そして、電極と光ファイバーを組み合わせたものを弓状核に留置して、光照射した際に活動するニューロンとして、キスペプチンニューロンを同定し、その際の波形情報を元に、個々のキスペプチンニューロンの活動を記録するシステムの構築を試みた。

一方で、キスペプチンニューロンにカルシウムセンサータンパク質である GCaMP6s をアデノ随伴ウイルスを用いて発現させ、弓状核の上方に留置した光ファイバーを介してカルシウムイメージングを行う、ファイバーフォトメトリーシステムの構築も試みた。

上記で立ち上げたシステムを用いて、雌マウスにおいて、キスペプチンニューロンがどのような活動パターンを示すのかを解析した。その上で、プライマーフェロモン源としてオスマウスの尿を呈示した際のキスペプチンニューロンの応答解析を行った。

バイオアッセイでは、頭部を固定した、覚醒下のマウスでキスペプチンニューロンの記録を行い、フェロモン活性を評価したいサンプルを特定のタイミングで呈示し、その際のキスペプチンニューロンの応答を解析した。

4. 研究成果

まず、キスペプチン発現細胞において DNA 組み換え酵素 Cre を発現する *Kiss1-Cre* マウスを入手した。*Kiss1-Cre* マウスの弓状核に、Cre 依存的にチャンネルロドプシンを発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) インジェクションすることで、弓状核キスペプチンニューロンにチャンネルロドプシンを発現させることを試みた。いくつかの血清型の AAV を試したところ、AAV1、AAV2、AAV5 ではあまり発現が認められなかったが、AAV9 では十分な発現が認められた。そこで、以降の実験では AAV9

を使うこととした。

次に、テトロード電極を用いた単一細胞解像度のある記録系を立ち上げ、光ファイバーと電極を組み合わせて使うことで、光刺激と神経活動の記録を同時に行う系を確立した。このシステムの利用によって、光刺激により活動電位を生じるニューロンの活動を記録ができるようにはなったが、この系はノイズが入りやすく、キスペプチンニューロンの活動を長時間安定して記録するには至っていない。

次に、キスペプチンニューロンにカルシウムセンサータンパク質である GCaMP6s を AAV9 を用いて発現させ、弓状核の上方に留置した光ファイバーを介してカルシウムイメージングを行う、ファイバーフォトメトリーシステムの構築を行った。この系は単一細胞の解像度はなく、キスペプチンニューロン群の活動をひとまとめに記録するため、上記の電気生理学的手法と比べると、解像度は悪くなる。ただし、キスペプチンニューロン群は、同期して一斉発火することで、GnRH のパルス状の分泌を制御すると予想されるため、この系で十分だと判断し、実験を進めた。

まず、性ホルモンによるネガティブフィードバックがない、卵巣除去したメスマウスにおいて、視床下部弓状核のキスペプチンニューロン群のファイバーフォトメトリーを行った。その結果、約 10 分おきのバースト状のカルシウムシグナルの上昇が認められた。これは生殖中枢に特徴的な、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) のパルス状分泌に対応すると考えられ、弓状核キスペプチンニューロンがこのパルス状分泌の制御を行っている、つまり生殖中枢であることが示唆された。

この系を用いて、頭部固定した覚醒下の雌マウスに、フェロモン源としての雄マウス尿を呈示した際のキスペプチンニューロンの応答を解析したところ、直後にカルシウムシグナルの上昇が認められ、自発的なパルスよりも早いタイミングでパルスが誘起されることが認められた。この効果を指標にして、雄マウス尿を各種分析化学的手法を用いて分画したサンプルの活性を評価し、フェロモン活性を有する画分を絞り込んだ。その結果、3 kDa 未満で親水性の高い成分に活性があることが認められた。この画分には、これまでに報告されていたプライマーフェロモン候補分子は含まれていないため、新奇成分であることが予想される。

本研究は生殖中枢の記録系を立ち上げることで、その活動パターンを明らかにし、プライマーフェロモンの同定に向けた道を拓いた。また、この系はフェロモン研究のみならず、様々な環境や内的要因の生殖中枢への影響の研究にも利用可能である。

また、フェロモン活性の認められた尿の低分子、親水性の画分には様々な化合物が含まれるが、それらの分子実態はほとんどがわか

っていない。そのため、天然物化学としても、新たな研究分野の開拓につながるかもしれない。

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 2 件)

1. 村田 健、マウスのプライマーフェロモンと神経内分泌、Chemosensation and Behavior Workshop 2017、2018 年 3 月 13 日、静岡県熱海市

2. 村田 健、宮道 和成、東原 和成、Sex-specific Activity Patterns of Central Reproductive Regulators in Mice、新学術領域「適応回路シフト」国際シンポジウム、2017 年 12 月 18 日、東京都千代田区

〔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

村田 健 (MURATA, Ken)
東京大学大学院農学生命科学研究科・特任
研究員
研究者番号：30749643

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()