

平成 22 年 6 月 21 日現在

研究種目：若手研究 (A)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20680019
 研究課題名 (和文) 神経回路の改変マウスを用いた匂いに対する情動や行動を引き起こす原理の解明
 研究課題名 (英文) Clarification of the mechanisms to control odor-evoked responses using genetically manipulated mice with neuronal modifications.
 研究代表者
 小早川 高 (KOBAYAKAWA KO)
 財団法人大阪バイオサイエンス研究所・神経機能学部門・研究員
 研究者番号：60466802

研究成果の概要 (和文)：嗅球の背側ドメイン内のそれぞれ異なる位置に存在する嗅覚神経回路によって、匂い分子に対する恐怖情動や行動に加え、各種の社会コミュニケーション反応を司る情動や行動が先天的に制御されていることが明らかになった。各種の嗅覚神経回路の部分的な除去マウスを作製し、匂いに対する様々な反応を定量解析する系を構築した。本研究の成果によって、匂いに対する多様な情動や行動を制御する神経メカニズムを特異的な嗅覚神経回路の機能に基づいて解明する方法が確立した。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we found that specific neuronal circuits in the main olfactory system which start from distinct area on the dorsal-domain of the olfactory bulb regulate various social communication responses in addition to fear responses. Various kinds of genetically manipulated mice with partial depletions of the specific neuronal circuits in the main olfactory system were generated, and quantitative analysis systems for odor-evoked specific behaviors and emotions were constructed. From these results, we established the methods to study the neuronal mechanisms to regulate odor-evoked responses based on the functions of the specific neuronal circuits in the main olfactory bulb.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	14,000,000	4,200,000	18,200,000
2009年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
年度			
年度			
年度			
総計	20,300,000	6,090,000	26,390,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：行動神経科学・神経回路の改変・恐怖行動・社会行動・情動

1. 研究開始当初の背景

私たちの研究テーマ

私たちは、嗅覚神経回路を部分的に除去したミュータントマウスを用いて匂い分子を感知した際に誘発される情動や行動の特異性を神経回路レベルで解明することを目的として研究を行ってきた。

具体的な研究の経緯

具体的には、背側の嗅覚神経回路を特異的に除去した「背側除去マウス」や、クラス II 型嗅覚受容体を発現する嗅細胞を特異的に除去した「クラス II 除去マウス」を用いて、嗅覚神経回路と悪臭に対する嫌悪反応や天敵臭に対する恐怖反応を制御する神経回路の解析を行ってきた。

具体的な実験結果

「背側除去マウス」は匂いに対する忌避行動を示さない

「背側除去マウス」では、腹側の嗅覚神経回路が除去されずに残されているので、腐敗物、刺激物、天敵の匂いを野生型マウスと同様に感知することができた。ところが、「背側除去マウス」は私たちが調べた限り全ての腐敗物、刺激物、天敵の匂いに対して忌避行動を全く示さなかった。

背側除去マウスは後天的に学習すれば匂いに対する忌避行動を示す

「背側除去マウス」は類似した化学構造を持った匂い分子を識別する能力は正常であった。また、忌避性の匂い分子を嗅がせた後に、痛み刺激によって嫌悪学習を行うと、「背側除去マウス」は匂いに対する忌避行動を示した。

腹側の嗅細胞を除去した「クラス II 除去マウス」は匂いに対する忌避行動を示す

嗅覚受容体にはクラス I 型とクラス II 型が存在する。クラス I 型の嗅覚受容体を発現する嗅細胞は背側の嗅覚神経回路にのみ接続する。一方、クラス II 型の嗅細胞は背側と腹側の双方の嗅覚神経回路に接続する。従って、クラス II 型の嗅細胞を除去した「クラス II 除去マウス」は、背側の嗅覚神経回路のみを持っていることになる。

「クラス II 除去マウス」は腐敗物の匂いに対して先天的な忌避行動を示した。従って、背側の嗅覚神経回路が活性化されることが、腐敗物に対する忌避行動を誘発する必要十

分条件であると考えられた。

嫌悪反応と恐怖反応を先天的に誘発する糸球は嗅球上で分離して存在する

イメージング法を用いることで嗅球の背側領域において、匂い分子を嗅がせた際に活性化される糸球を解析できる。また、神経細胞の活性化マーカーである Zif268 の発現を指標にしたマッピング法を用いて嗅球の全領域において、匂い分子を嗅がせた際に活性化される糸球を解析できる。

2MB-acid などの腐敗物の匂いは背側-クラス I ドメインと、腹側ドメインの糸球を活性化した。齧歯類動物にとって天敵であるキツネから分泌されるトリメチルチアゾリン (TMT) は背側クラス II ドメインと、腹側ドメインの糸球を活性化した。

クラス II 嗅覚受容体を発現する嗅細胞を選択的に標識したトランスジェニックマウスを用いた解析から、嗅球の背側領域でクラス I ドメインは前方に、クラス II ドメインは後方に局在して分布していることが明らかになった。

匂いに対する恐怖反応を先天的に制御する脳内神経回路

天敵の匂いを嗅がせた際に、野生型マウスは先天的な恐怖反応を示すが、「背側除去マウス」は全く恐怖反応を示さない。両者の動物に恐怖を誘発する匂い分子を嗅がせた際に、野生型マウスでのみ活性化される神経細胞は、先天的な恐怖情動の誘発に関与している可能性が考えられる。

天敵臭である TMT を嗅がせた際には、野生型マウスでは分界条床核の中央領域と、側方領域が活性化されたのに対して、背側除去マウスでは側方領域のみが活性化された。また、同じく TMT を嗅がせた際には、野生型マウスにおいて血中のストレスホルモン ACTH の濃度が 10 倍に上昇したのに対し、背側除去マウスでは殆ど上昇しなかった。

分界条床核の中央領域を活性化すると、ストレス経路である、視床下部→下垂体→副腎軸が活性化されるために血中の ACTH 濃度が上昇することが知られている。

これらの結果をまとめると、天敵臭である TMT が嗅球の背側-クラス II ドメインの特定の糸球を活性化すると、分界条床核の中央領域へ情報が伝達され、その結果、ストレス経路が活性化し、ストレスホルモンが血中に分泌されているというモデルが示された。

2. 研究の目的

私たちは、遺伝子操作の手法を用いて、部分的に嗅覚神経回路を除去した神経回路の改変マウスを用いて、背側の嗅覚神経回路によって恐怖と嫌悪の忌避性の情動が先天的に制御されることを明らかにした。

本計画では、匂いによって誘発される恐怖の情動を制御する神経メカニズムをより詳細に解明することと、匂いによって制御される恐怖や嫌悪以外の多様な情動や行動を制御する神経メカニズムを解明することとを目的とした研究を実施した。

目的1 恐怖の情動を制御する神経メカニズムの解明

具体的な研究目的

- 恐怖情動を定量化する方法の開発
- 恐怖反応を誘発する匂い分子の探索
- 部分的な糸球除去マウスに対する行動実験を用いた恐怖行動を制御する糸球ドメインの機能解析

目的2 多様な情動や行動を制御する神経メカニズムの解明

具体的な研究目的

- 様々な情動・行動を誘発する匂い分子を嗅がせた際に活性化する糸球ドメインの解析
- 部分的な糸球除去マウスに対する行動実験を用いた社会行動を制御する糸球ドメインの機能解析

目的3 上記の2つの目的を達成するために必要となる遺伝子改変マウスの作製

3. 研究の方法

目的1 恐怖の情動を制御する神経メカニズムの解明に関して

- 恐怖情動を定量化する方法の開発
天敵臭は恐怖、腐敗臭は嫌悪のそれぞれ異なる情動を誘発すると考えられるが、両者の匂い分子は共に忌避行動を誘発するので、単純な行動解析によって両者を区別することは困難である。恐怖と嫌悪の情動は分界条床核の中央領域の活性化や血中ストレスホルモン濃度によって区別できることを解明してきたが、これらの指標を基にした解析は多数の匂い分子を用いた迅速なスクリーニングには適さない。そこで、恐怖情動を迅

速に定量化する指標を開発する。

すくみ行動は天敵臭などの恐怖情動に関連する匂い分子によって特異的に誘発される反応であって、腐敗物臭などによっては誘発されない。すくみ行動を定量化するビデオ画像解析装置を構築し、様々な匂い分子に対するすくみ行動を定量化する。

- 恐怖反応を誘発する匂い分子の探索
すくみ行動を指標にして恐怖情動を定量化する解析系を立ち上げた後に、様々な匂い分子に対する恐怖情動を定量化する。匂い分子が誘発する恐怖情動の程度と、その匂い分子が活性化する糸球のパターンとの相関関係を解析する。

- 部分的な嗅細胞の除去マウスに対する行動実験を用いた恐怖行動を制御する糸球ドメインの機能解析

野生型マウスと各種の部分的な嗅細胞の除去マウスをに対して、恐怖反応を誘発する各種匂い分子を嗅がせた際の応答を解析し、特定の糸球ドメインの恐怖反応の制御に関する機能を解析する。

目的2 多様な情動や行動を制御する神経メカニズムの解明に関して

- 様々な情動・行動を誘発する匂い分子を嗅がせた際に活性化する糸球ドメインの解析

TMT は天敵から発せられマウスに恐怖行動を誘発する。おなじくチアゾリン類に属する SBT は雄マウスから発せられ、雄マウスの攻撃行動や雌マウスの性行動の誘発に関与することが知られている。チアゾリン類は天敵と捕食者の間や、同種動物の間のコミュニケーションを仲介する匂い分子である可能性がある。TMT や SBT のなどのチアゾリン類や、同じく同種動物間の性行動や攻撃行動に関与することが知られているブレビコミン類が活性化する糸球ドメインをイメージング法を用いて解明する。

- 部分的な嗅細胞の除去マウスに対する行動実験を用いた社会行動を制御する糸球ドメインの機能解析

攻撃や性行動などの社会行動の制御に関わる SBT が嗅球の背側ドメインを活性化することが判明したので、背側の嗅覚神経回路を除去した神経回路の改変マウスを用いて、嗅球の背側ドメインによって

各種社会行動が制御されている可能性を検証する実験を行う。

攻撃行動に関しては行動実験の一種である Resident-intruder テストを用いて解析する。性行動に関しては、超音波の発声頻度の定量や、性行動のビデオ解析などの方法を用いて解析する。

目的3 上記の2つの目的を達成するために必要となる遺伝子改変マウスの作製に関して

部分的な嗅細胞の除去マウス

嗅細胞特異的に発現する OMP プロモーターの下流に、Cre 組換え酵素に依存してジフテリア毒素 A 断片遺伝子を発現するコンストラクトを接続した、OMP-STOP-DTA ノックインマウスを作製する。

背側ゾーン特異的に発現する O-MACS プロモーターを用いて Cre 組換え酵素を発現する O-MACS-Cre ノックインマウスに加え、腹側ゾーン特異的に発現する OCAM、一部の嗅細胞で発現する Neuropilin-1, Neuropilin-2 の各プロモーターを用いて Cre 組換え酵素を発現するノックインマウスを作製する。

OMP-STOP-DTA ノックインマウスと Cre 発現ノックインマウスとを掛け合わせて、各種の部分的な糸球の除去マウスを作製する。

部分的な嗅細胞の不活性化マウス

CNG A2 は嗅細胞の匂い応答に必須のチャネルである。CNG A2 を特定の嗅細胞において特異的にノックアウトすることで、特定の嗅細胞を不活性化する。

Cre 組換え酵素が発現する嗅細胞で特異的に CNG A2 チャネルが不活性化されるノックインマウスを作製する。このマウスを特定の嗅細胞で Cre 組換え酵素を発現するノックインマウスと掛け合わせることで、部分的な嗅細胞の不活性化マウスを作製する。

時期特異的かつ部分的な嗅細胞の除去または不活性化マウスの作製

タモキシフェンの注射やテトラサイクリンを含む餌の投与によって、時期特異的に部分的な嗅細胞の除去や、嗅細胞の不活性化を行うためのノックインマウスを作製する。

4. 研究成果

目的1 恐怖の情動を制御する神経メカニズムの解明に関する研究成果

● 恐怖情動を定量化する方法の開発

様々な匂い分子に対する恐怖反応をすくみ行動を指標にして定量解析する実験系を構築した。

● 恐怖反応を誘発する匂い分子の探索

様々な種類の匂い分子に対するすくみ行動を計測した。これまで、単物質としては TMT がマウスにすくみ行動を誘発するほぼ唯一の匂い分子として知られていた。本研究によって様々な頻度ですくみ行動を誘発する匂い分子の同定に成功した。

これらの匂い分子の中には TMT に比較して 10 倍もの頻度ですくみ行動を引き起こすものも含まれており、極めて強力な動物忌避剤として使用できる可能性があるので特許出願した。

● 部分的な嗅細胞の除去マウスに対する行動実験を用いた恐怖行動を制御する糸球ドメインの機能解析

各種頻度ですくみ行動を誘発する匂い分子を野生型マウスと背側除去マウスに嗅がせた際のすくみ行動を解析した。

TMT の匂いを嗅がせた際には、野生型マウスにおいてすくみ行動が観察されたが、背側除去マウスにおいては観察されなかった。従って、TMT に対するすくみ行動は背側の嗅覚神経回路が制御していることが明らかになった。続いて、様々な頻度ですくみ行動を誘発する匂い分子に対する応答を解析した。その結果、特定の種類の匂い分子に対しては背側除去マウスであっても野生型マウスに比較して低い頻度ではあるもののすくみ行動が観察されることが判明した。この結果は、特定の種類の匂い分子に対するすくみ行動は、背側の嗅覚神経回路に加え、腹側の嗅覚神経回路や、鋤鼻嗅覚神経回路などによっても協調的に制御されている可能性が明らかになった。

目的2 多様な情動や行動を制御する神経メカニズムの解明に関する研究成果

● 様々な情動・行動を誘発する匂い分子を嗅がせた際に活性化する糸球ドメインの解析

マウスの社会行動に関与することが知られている SBT や DHB が活性化する糸球ドメインを解析した結果、TMT が活性化する糸球後方のドメインは、これらの社会行動に関与する匂い分子によっても活性

化されることが判明した。ここで新たに発見した嗅球の後方領域に存在する糸球ドメインは、異種動物間と同種動物間の双方を含む社会的なコミュニケーション反応の制御に重要な役割を果たしている可能性が明らかになった。

● **部分的な嗅細胞の除去マウスに対する行動実験を用いた糸球ドメインの機能解析**

嗅球の背側後方領域の糸球が SBT や DHB などの社会行動の制御に関与する匂い分子によって活性化されることが明らかになった。これら背側後方領域の糸球の社会行動の制御に対する役割を解明するために、背側除去マウスの様々な社会行動を解析した。

攻撃行動に関して

Resident-Intruder テストを行った結果、背側除去マウスでは雄マウス間の攻撃行動が全く見られなかった。背側除去マウスでは雄マウス間で性行動の一種であるマウンティング行動が頻繁に観察された。野生型マウスでは雄マウス間のマウンティング行動は全く観察されなかった。背側の嗅覚神経回路が雄マウス間の攻撃行動を制御していることが明らかになった。

性行動に関して

雄の野生型マウスは、雌マウスの頭部、背部、陰部のなかでは陰部の匂いを嗅ぐ頻度が高い。これに対して雄の背側除去マウスは雌マウスの陰部よりも頭部の匂いを頻繁に嗅ぐことが判明した。頭部、背部、陰部の各部の匂いを嗅いだ時間の総和は、野生型マウスと背側除去マウスとの間で違いはなかった。背側の嗅覚神経回路によって陰部への嗜好性が制御されていることが明らかになった。

雄の野生型マウスに対して雌マウス個体や雌マウスの尿を提示すると超音波を発生する。この条件での超音波の発生は性行動の一種であると考えられている。雄の野生型マウスは、雌個体と、雌の尿に対して共に超音波を発生した。これに対して、背側除去マウスでは雌の尿に対しては全く超音波を発生せず、雌マウスの個体に対して発生する超音波の頻度は低下していることが明らかになった。

雄の背側除去マウスのテストステロンの量や、雌の背側除去マウスの性周期は野生型マウスと変化がなかった。また、背側除去マウスの脳内の遺伝子発現の性的二型は野生型マウスと同様に観察

された。背側除去マウスは各種性行動に明瞭な異常が認められるのに対して、性分化は正常であることが示唆された。

鋤鼻神経回路と背側嗅覚神経回路による協調的な社会行動の制御

これまでは鋤鼻神経回路がマウスの性行動を制御していると考えられてきた。これに対して本研究の成果や、本研究期間に発表された他グループによる研究の結果によって、嗅覚神経回路もマウスの性行動の制御に関与すると考えられるようになった。

しかし、鋤鼻神経回路と嗅覚神経回路の性行動の制御における役割分担は明らかになっていない。

本研究によって、攻撃行動は鋤鼻神経回路と背側の嗅覚神経回路の双方からの活性化シグナルの入力があって初めて誘発されることが明らかになった。これに対して、性行動の一種である超音波の発生に関しては、鋤鼻神経回路によって抑制シグナルが入力されるのに対して、背側の嗅覚神経回路は活性化シグナルが入力されることが明らかになった。

これらの実験結果から、マウスにおける社会行動は、鋤鼻神経回路と背側の嗅覚神経回路による並行した情報入力によって制御されており、異なる種類の社会行動に対しては両者の神経回路が異なる種類の情報を伝達していることが初めて明らかになった。

目的 3 上記の 2 つの目的を達成するために必要となる遺伝子改変マウスの作製に関する研究成果

研究方法で示した各種の嗅覚神経回路の除去や不活性化マウスの作製に必要なノックインマウスを樹立した。

本研究期間内に東京大学から大阪バイオサイエンス研究所への移動に伴って、遺伝子改変マウスを SPF 化した。更に、行動解析の実験結果を安定化させるために C57/BL6 との戻し交配を進めた。

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 2 件)

- ① Matsumoto H, Kobayakawa K, Kobayakawa R, Tashiro T, Mori K, Sakano H and Mori K. Spatial arrangement of glomerular molecular-feature clusters in the odorant-receptor-class domains of the mouse olfactory bulb. *J Neurophysiol.*

査読有 (in press)

- ② Imai T, Yamazaki T, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Abe T, Suzuki M, Sakano H. Pre-target axon sorting establishes the neural map topography. *Science* 査読有 (Article) 325, p.585-590, 2009

[学会発表] (計4件)

- ① 小早川高 Neural Mechanisms to control odor evoked emotion and behaviors、第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (2009年12月9-12日)
- ② 小早川高 「嗅覚入力による快・不快情動生成と他感覚入力への影響」平成20年度生理学研究所研究会、原始刺激・薬物による不快情動生成機構とその破綻 (2009年10月1-2日)
- ③ 小早川高 「匂い分子が引き起こす嫌悪感や恐怖感を先天的に制御する神経回路」平成20年度生理学研究所研究会、原始刺激・薬物による不快情動生成機構とその破綻 (2008年11月27-28日)
- ④ 松本英之、小早川高、小早川令子、坂野仁、森憲作 Molecular feature clusters of glomeruli in the odorant receptor class domains of the mouse olfactory bulb、第31回日本神経科学大会、東京国際フォーラム (2008年7月9-11日)

[図書] (計4件)

- ① 小早川高、小早川令子、共立出版、入門構造生物学、p.178-184 (2010)
- ② 小早川高、小早川令子、医歯薬出版、医学のあゆみ vol. 232/No.1 p.53-60 (2010)
- ③ 小早川高、小早川令子、フレグランスジャーナル社、Aroma Research vol. 10/No. 3、p.82-88 (2009)
- ④ 小早川高、小早川令子、秀潤社、細胞工学 vol.27 no.11 p1131-1138 (2008)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：動物用忌避剤
発明者：小早川 高、小早川 令子

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2010-025681

出願年月日：22年2月8日

国内外の別：国内

[その他]

第13回東京大学理学公開講演会

猫を怖がらないマウスが教える心の仕組み
東京大学駒場キャンパス(2008年5月10日)

生化若手の会 2009 夏の学校

若手ワークショップ

猫を怖がらないマウスが教える心の仕組み
神戸セミナーハウス (2009年8月28日)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小早川 高 (KOBAYAKAWA KO)

財団法人大阪バイオサイエンス研究所・

神経機能学部門・研究員

研究者番号：60466802

(2)連帯研究者