

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月14日現在

機関番号：74415

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2011～2012

課題番号：23687003

研究課題名（和文） 哺乳類嗅覚受容体遺伝子と特異的な行動との対応関係の解明

研究課題名（英文） Relation analysis between odorant receptors and specific behaviors in mammals

研究代表者

小早川 高 (KOBAYAKAWA KO)

公益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）：

人工化合物ライブラリーから極めて高い先天的な Freezing 行動の誘発活性を持つ一連の匂い分子（恐怖臭）を同定した。先天的な恐怖情動の誘発に必須となる化学構造ルールを初めて解明した。約1000種類のマウス全嗅覚受容体遺伝子の発現スクリーニング系を構築し、恐怖臭と全嗅覚受容体の結合特異性を解析した。その結果、恐怖情動の誘発には嗅覚受容体の特異性に加え、匂い分子の化学構造の特異性も必要である可能性を初めて解明した。恐怖臭に対して特異的に応答する生物種を複数同定した。

研究成果の概要（英文）：

We identified a series of odorants (fear odors) which has extremely strong activity to induce innate freezing behaviors in mice. We clarified rules of chemical structures, which is indispensable to induce innate fear emotions. We cloned about 1000 odorant receptors, representing almost all of mouse odorant receptors in the mouse genome, to develop an expression screening system, and analyzed the binding specificity of fear odors and odorant receptors. As a result, we clarified the possibility that, in addition to the specificities of odorant receptors, chemical structures of odorants are also important to induce fear emotions. We identified a number of animal species that specifically respond to fear odors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	11,300,000	3,390,000	14,690,000
2012年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
総計	21,600,000	6,480,000	28,080,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：遺伝・ゲノム動態

キーワード：嗅覚、情動

1. 研究開始当初の背景

|

哺乳類の行動は複雑な遺伝子の組み合わせによって制御されており、単独の遺伝子と特異的な行動との間に明瞭な対応を付けることは一般的には困難である。例えば、転写因子である **FOXP2** 遺伝子は言語能力に関与すると考えられているが、**FOXP2** 遺伝子の配列や機能と言語能力とを結び付ける神経メカニズムの基盤は不明である。「ゲノム行動学」の分野を立ち上げるためには、特定の行動と明確に結びつく候補遺伝子を見つけ出す必要があり、嗅覚受容体遺伝子に着目することが本研究計画における鍵となる。

私たちは遺伝子操作の方法を用いて特定の嗅覚受容体遺伝子を発現する嗅細胞のみを選択的に除去したキックアウトマウスを作成した。このキックアウトマウスは除去されずに残された嗅細胞を使って、天敵の匂い分子自体を感知することができるが、それを危険なものであると判断できないために、恐れるそぶりも見せずに猫に接近してしまう。私たちは、このキックアウトマウスなどを用いた一連の実験結果から、鼻腔内の特定の嗅細胞に発現する嗅覚受容体遺伝子によって天敵の匂い分子に対する恐怖行動が遺伝的に制御されていることを世界に先駆けて証明した。この発見によって、嗅覚受容体遺伝子は単に匂い分子のセンサーとして機能するのみではなく、匂いに対する行動に直結している可能性が初めて示された。

2. 研究の目的

嗅覚系においては、腐敗物に対しては忌避行動、天敵臭に対しては恐怖行動、異性動物の匂いに対しては性行動などの例で示すように、特定の匂い分子と特定の行動とが良く結び付いている。ところが、特定の匂い分子と対応する行動とを結び付けるメカニズムは永らく解明されていなかった。嗅覚受容体遺伝子は鼻腔深部の嗅上皮に局在する嗅細胞に発現している。マウスのゲノムに嗅覚受容体遺伝子は約 1000 種類存在するが、個々の嗅細胞には単一種類の嗅覚受容体遺伝子のみが発現している。嗅細胞は神経細胞であり匂い分子を感知するとその情報を脳の嗅球へ伝達する。嗅上皮には背側ゾーンと腹側ゾーンと呼ばれる領域が存在する。嗅覚受容体遺伝子にはクラス I 型とクラス II 型の 2 つのサブファミリーが存在する。背側ゾーンにはクラス I とクラス II の双方の受容体遺伝子が発現するが、腹側ゾーンにはクラス II の受容体遺伝子のみが発現している。背側ゾーンの嗅細胞のみをジフテリア毒素 A 断片遺伝子の発現によって除去した遺伝子改変マウスでは、腐敗臭に対する忌避行動、天敵臭に対する恐怖行動、同種動物の匂いに対する幾つかの社会コミュニケーション行動などの

先天的な反応が完全に消失していた。一方で、クラス II 嗅細胞を除去した遺伝子改変マウスは、腐敗物臭に対する先天的な忌避行動を示した。匂い分子に対するイメージングの実験結果と合わせることで、背側-クラス I 嗅覚受容体の一部によって腐敗物臭への忌避行動が、背側-クラス II 嗅覚受容体の一部によって天敵臭に対する恐怖行動、同種動物に対する社会コミュニケーション行動が遺伝的に制御されることを解明した (嫌悪・恐怖反応; Kobayakawa et al., *Nature (Article)*, 2007, イメージング; Matsumoto et al., *J Neurophysiol* 2010, 社会コミュニケーション反応; 論文投稿準備中、図 1 参照)。

天敵臭は多数の匂い分子からなる混合物なので、単一の匂い分子によって恐怖行動を誘発できるのかは不明であった。私たちは、自ら発見した天敵臭に対する恐怖反応を遺伝的に制御する嗅覚神経回路の活性に着目することで、これまでに知られていた天敵臭の成分(TMT)に比較して、最大で 10 倍もの頻度で恐怖反応の指標である「すくみ行動」や特異的な生理応答を誘発する単独の匂い分子群を発見した。これらの先天的な恐怖反応を誘発する匂い分子の化学構造を比較したところ、幾つかの法則を満たす化合物は共通して恐怖反応を誘発できることが明らかになった。また、類似した化合物であっても、これらの法則を満たさないものは恐怖反応を全く誘発できないことも判明した。これらの実験結果から、特定の化学構造を持つ匂い分子が、特定の構造を持つ嗅覚受容体に結合することで、すくみ行動や恐怖に伴う生理応答が遺伝的に誘発されるという基本法則が成立する可能性が初めて明らかになった。また、私たちの予備実験の結果から、個体間の社会コミュニケーション行動などに関しても同様の法則が当てはまる可能性が考えられる。嗅覚受容体遺伝子が発現する特異的な行動に着目することで、ゲノムと行動とを直接的に結び付けることが可能になると考えられた。

本計画では、マウスを用いて、恐怖行動と社会コミュニケーション行動を遺伝的に誘発する嗅覚受容体遺伝子を同定することで、ゲノムと行動とを結び付ける基本法則を発見することを目指す。マウスにおけるゲノムと行動との対応関係を、各種実験動物や家畜に拡張することで、多様な動物の行動特異性の進化をゲノムから解明する新領域「ゲノム行動学」の創成を目指した。

3. 研究の方法

(1) 特定の嗅覚受容体遺伝子群を特異的に除去した遺伝子改変マウスの作製と特異的な匂い認識能力の解析

図1aには私たちがこれまでに明らかにしてきた、特定のグループの嗅覚受容体遺伝子と、特異的な行動との対応関係を模式的に示した。図1bと1cに示したマウスを掛け合わせることで、特定のグループの嗅覚受容体遺伝子を発現する嗅細胞を除去や、不活性化することができる。図中に示したノックインマウスの多くは作製済みであり、計画通りに、部分的に嗅細胞が除去されることも確認した。この方法で作製した、部分的な嗅細胞の除去マウスの匂い認識能力を、行動実験の手法（すくみ行動の解析など）や特異的な生理指標を定量する手法（ストレスホルモンの定量など）を用いて解析し、特異的な行動や生理応答を制御する嗅覚受容体グループを同定する。

(2) 先天的な恐怖行動などの特異的な行動を誘発する匂い分子に対応する嗅覚受容体遺伝子候補の培養細胞系によるクローニング

私たちは、先天的な恐怖反応を誘発する神経回路を活性化する匂い分子を探索し、天敵臭TMTに比較して有意に高い頻度ですくみ行動を誘発できる匂い分子を9種類同定した。この9種類の匂い分子は特定の法則性のある化学構造を持つ。また、これらの匂い分子と類似した化学構造を持つがすくみ行動を全く誘発しないネガティブコントロールとして使用できる一連の匂い分子も同定した。

(1)の実験によって絞り込んだ機能的な嗅覚受容体遺伝子グループの中から、すくみ行動を誘発する匂い分子によって特異的に活性化されるものを、HEK293 cellに嗅覚受容体特異的なシャペロン分子を共発現させたHana cellを用いた培養細胞系でスクリーニングする。同様の手法を用いて、マウスに社会行動を誘発する嗅覚受容体遺伝子も同定する。

4. 研究成果

鼻腔から脳へ匂い情報を伝達する嗅覚神経回路は背側と腹側の2つの経路に分離できる。既に確立した背側嗅覚神経回路を除去したマウスに加え、背側と腹側の双方の嗅覚神経回路を特異的に不活性化したマウスを作成した。これらのマウスでは匂い分子の感知や識別能力を正常に保ったまま、匂い分子の意味判断ができないという特異的な異常が認められた。これらのマウスを活用することで、恐怖、食欲、性、母性、攻撃などの動物が生存や繁殖する上で必須となる情動のいずれもが嗅覚神経回路によって先天的に制御されていることを解明した。続いて、先天的な情動を制御する具体的な匂い分子の研究を実施した。これまでは天敵に由来する少数の匂い分子によって先天的な恐怖反応を

誘発することが知られていた。しかし、先天的な恐怖反応を誘発する匂い分子の化学構造の特異性を解明するほどの匂い分子のレパートリーは存在しなかった。本研究では先天的な恐怖情動を誘発する匂い分子を人工化合物ライブラリーから探索した。その結果、既知の天然物由来の匂い分子に比較して、有意に高いFreezing誘発活性を持つ人工物由来の匂い分子を数十種類も同定することに成功し、これらの匂い分子を恐怖臭と名付けた。恐怖臭の化学構造と恐怖情動反応の特異性を比較解析することで、匂い分子の化学構造と情動反応とを明確に結びつける化学構造ルールが存在することが初めて明らかになった。続いて、恐怖臭の化学構造ルールと恐怖情動とを結びつける嗅覚受容体の特異性を解析した。約1000種類のマウス全嗅覚受容体遺伝子の発現スクリーニング系を構築し、特定の恐怖情動と嗅覚受容体の活性化との間の相関関係を解析した。その結果、複数種類の嗅覚受容体遺伝子群が恐怖臭に特異的に結合することと、恐怖臭の化学構造の特異性と嗅覚受容体のコンビネーションによって特異的な情動反応が制御されるという新たなモデルが提唱された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

1. Yokoyama T K*, Mochimaru D, Murata K, Manabe H, Kobayakawa K, Kobayakawa R, Sakano H, Mori K, and Yamaguchi M. Elimination of adult-born neurons in the olfactory bulb is promoted during the postprandial period. *Neuron* 71(5) 883-897, 2011 (査読有)

DOI: 10.1016/j.neuron.2011.05.046

2. Igarashi K M*, Iseki N, An M, Yamaguchi Y, Nagayama S, Kobayakawa K, Kobayakawa R, Tanifuji M, Sakano H, Chen W R, and Mori K*. Parallel mitral and tufted cell pathways route distinct odor information to different targets in the olfactory cortex. *J Neuroscience* 32(23) 7970-7985, 2012 (査読有)

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0154-12.2012.

[学会発表] (計9件)

① 小早川高、「Odor-evoked innate and learned fear responses are controlled by distinct neuronal mechanisms.」包括脳ネットワーク夏のワークショップシンポジウム”Reward and aversive information processing and monoamine signaling”神戸国際会議場 (2011年8月22日)

② 小早川高、「Neuronal mechanisms controlling innate and learned fear responses.」、第34回日本神経科学大会、パシフィコ横浜（2011年9月17日）

③ 小早川高、「先天的と後天的な恐怖によって誘発される不動行動は異なる神経回路によって制御される」、第5回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres、品川プリンスホテル（2011年10月7日）

④ 小早川高、「匂いに対する恐怖反応のメタボロミクス」、第31回キャピラリー電気泳動シンポジウム、鶴岡メタボロームキャンパスレクチャーホール（2011年11月10日）

⑤ 小早川高、「嗅覚神経回路による情動と行動の制御」、第42回城南神経懇話会、目黒雅叙園（2012年6月14日）

⑥ 小早川高、「Odor-evoked innate and learned fear responses are mediated by distinct neuronal mechanisms.」、生理学研究所国際研究集会 Central Neuroplasticity in Sensory-Emotional Link、生理学研究所（2012年9月13日）

⑦ 小早川高、「匂いに対する先天的と後天的な恐怖を制御するメカニズム」、日本味と匂学会第46回大会シンポジウム「匂いが決める仲良しこよし」、大阪大学（2012年10月5日）

⑧ 小早川高、「匂いに対する恐怖のメタボロミクス」、第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場（2012年12月12日）

⑨ 小早川高、「匂いに対する多様な情動を先天的と後天的に規定する神経メカニズム」、第9回宮崎サイエンスキャンプ、シーガイアコンベンションセンター（2013年2月15日）

〔図書〕（計1件）

① 小早川高、日本香料協会、香料、2012、10

〔産業財産権〕

○出願状況（計3件）

名称：Cartpt mRNA 発現細胞標識動物およびそれを用いたスクリーニング方法
発明者：小早川高、小早川令子
権利者：(公財)大阪バイオサイエンス研究所
種類：特許
番号：特願 2012-011682
出願年月日：24年1月24日
国内外の別：国内

名称：恐怖又は不安の計測システム
発明者：小早川高、小早川令子
権利者：(公財)大阪バイオサイエンス研究所
種類：特許
番号：特願 2012-256514
出願年月日：24年1月22日
国内外の別：国内

名称：情動の計測方法
発明者：小早川高、小早川令子
権利者：(公財)大阪バイオサイエンス研究所
種類：特許
番号：特願 2013-094653
出願年月日：25年4月26日
国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.obi.or.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小早川 高 (KOBAYAKAWA KO)
公益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) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし