

66. 個体の生存と種の保存を担う嗅覚行動機構の統合的解明

吉原 良浩

理化学研究所 脳科学総合研究センター

Key words : 嗅覚, ゼブラフィッシュ, フェロモン, プロスタグランジン F2 α , 求愛行動

緒言

嗅覚系は物体から発せられる匂い分子を受容し、その情報を鼻から脳へと伝え、匂いのイメージを脳内に表現する神経システムである。また鋤鼻系は同種他個体から発せられるフェロモン分子を受容し、内分泌系の変化や特有の行動を発現させる神経システムである。これらの感覚は総称して『化学感覚』と呼ばれ、無脊椎動物から哺乳類に至るまで多くの生物種で重要な役割を果たしている。化学感覚の刺激によって、物体の認知、快・不快という感情の誘起、記憶の形成・想起、内分泌系の変化などが起こり、個体の生存、生体の恒常性維持や種の保存のために必要な行動出力が発現・調節される。とりわけ、好きな匂いへの誘引行動、嫌いな匂いからの逃避行動、フェロモンを介した性行動は、多くの生物に共通する3つの根源的な嗅覚行動である¹⁾。

キンギョなどの魚類において、脂質メディエーターであるプロスタグランジン F2 α (PGF_{2 α}) が、メスの体内で排卵・産卵を調節するホルモンとしてはたらくだけでなく、メスから水中に放出された PGF_{2 α} がオスの性行動を誘起する性フェロモンとしても機能することが1980年代に報告された²⁾。しかしながら、その神経回路メカニズムについてはまったく分かっていなかった。本研究ではゼブラフィッシュを用いて、性フェロモン PGF_{2 α} を認識する嗅覚受容体の同定および求愛行動促進の神経機構を解析した³⁾。

方法および結果

1. 性フェロモン PGF_{2 α} を特異的に認識する嗅覚受容体の同定

ゼブラフィッシュの嗅上皮には、その形態、分子発現および嗅上皮における局在が異なる4種類の嗅細胞(繊毛嗅細胞、微繊毛嗅細胞、Crypt 嗅細胞、Kappe 嗅細胞)が存在する。まず、PGF_{2 α} 刺激したゼブラフィッシュの嗅上皮を、神経興奮マーカーである抗リン酸化 ERK 抗体を用いて免疫組織染色をしたところ、繊毛嗅細胞が特異的に活性化されていることがわかった。各々の繊毛嗅細胞は、約150種類の OR ファミリー受容体と約100種類の TAAR ファミリー受容体のうち、どれか1種類を選択的に発現する¹⁾。PGF_{2 α} はアミノ基を持たない化合物であるため、その受容体が微量アミン関連受容体である TAAR ファミリーに属することは考えにくく、OR ファミリー受容体に的を絞った。

そこで、ゼブラフィッシュのすべての OR 遺伝子を PCR でクローニングして cRNA プローブを作製し、PGF_{2 α} 刺激した嗅上皮における蛍光二重 *in situ* ハイブリダイゼーション法によって、神経興奮マーカーである c-Fos mRNA の発現と重なりが観察される OR mRNA を探索した。その結果、OR114-1 が c-Fos 陽性細胞の約90%において発現することがわかった(図1 A)。さらにデータベース検索により、OR114-1 と57%のアミノ酸同一性を示す新規の OR 遺伝子を見出し、OR114-2 と名付けた。これら2つの遺伝子は嗅覚受容体 β グループに属し、一般的なプロスタノイド受容体とはまったく関連のないものであった(図1 B)。

次に OR114-1 および OR114-2 を HEK293 細胞に発現させて、リガンド特異性、濃度依存性を調べた。OR114-1、OR114-2 とともに、PGF_{2 α} とその代謝産物である 15-keto-PGF_{2 α} のみによって活性化され、その高いリガンド特異性が明らかとなった(図1 C)。また、OR114-1 は高親和性、OR114-2 は低親和性の PGF_{2 α} 嗅覚受容体であることがわかった(図1 D)。

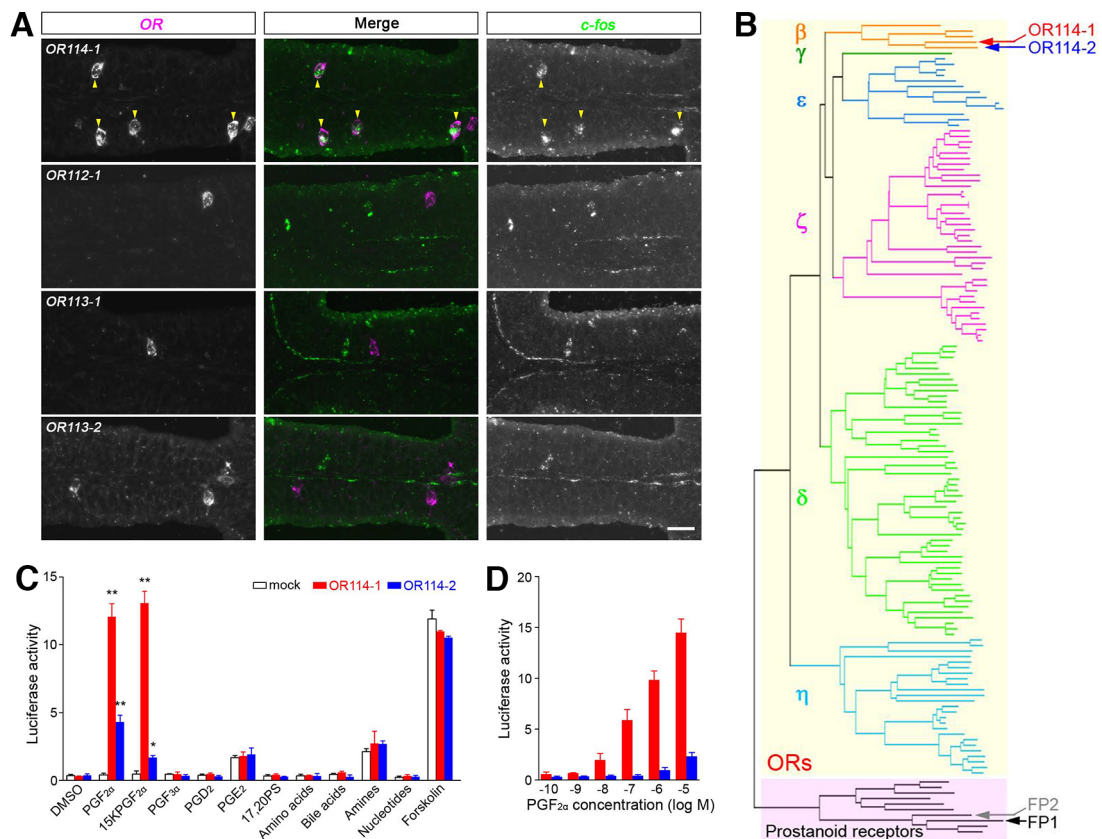


図1. 性フェロモン PGF_{2α} を特異的に認識するゼブラフィッシュ嗅覚受容体の同定

- A) 嗅覚受容体 (OR) プローブと c-Fos プローブを用いた蛍光二重 *in situ* ハイブリダイゼーション。PGF_{2α} 刺激によって c-Fos が誘導されている嗅細胞において、OR114-1 mRNA が発現する。Scale Bar: 20 μm。
- B) ゼブラフィッシュ嗅覚受容体とプロスタノイド受容体遺伝子の系統樹。
- C) OR114-1 あるいは OR114-2 を発現させた HEK293 細胞におけるリガンド特異性。unpaired t-test, *p < 0.05, **p < 0.01.
- D) OR114-1 あるいは OR114-2 を発現させた HEK293 細胞における PGF_{2α} 濃度反応性。

2. 性フェロモン PGF_{2α} によって活性化される嗅覚神経回路の解析

嗅細胞で受容された匂い・フェロモン情報は、次に嗅覚一次中枢である嗅球の特定の糸球体へと伝えられて匂い地図として表現される。さらにその後、終脳や間脳の高次嗅覚中枢へと情報は伝えられ、匂い地図の解読とともに多様な嗅覚行動の発現へと至る⁴⁾。そこでまず嗅球において、PGF_{2α} によって活性化される糸球体の同定を試みた。抗リン酸化 ERK 抗体を用いた嗅球のホルマウント免疫染色 (図 2 A、B) および GCaMP7 発現トランスジェニックゼブラフィッシュにおける嗅球のカルシウムイメージング (図 2 C) において、PGF_{2α} は腹内側領域の隣接する 2 つの糸球体を活性化することがわかった。この結果は Friedrich らによって発表されているこれまでの報告⁵⁾ と合致するものである。

次に、PGF_{2α} 刺激によって活性化される高次嗅覚中枢を ERK のリン酸化を指標にして解析した。その結果、終脳腹側部腹側核 (Vv)、視索前核 (PPa)、外側視床下部 (LH) などの領域において、PGF_{2α} 刺激に特異的な c-Fos の発現が観察された (図 2 D、E)。

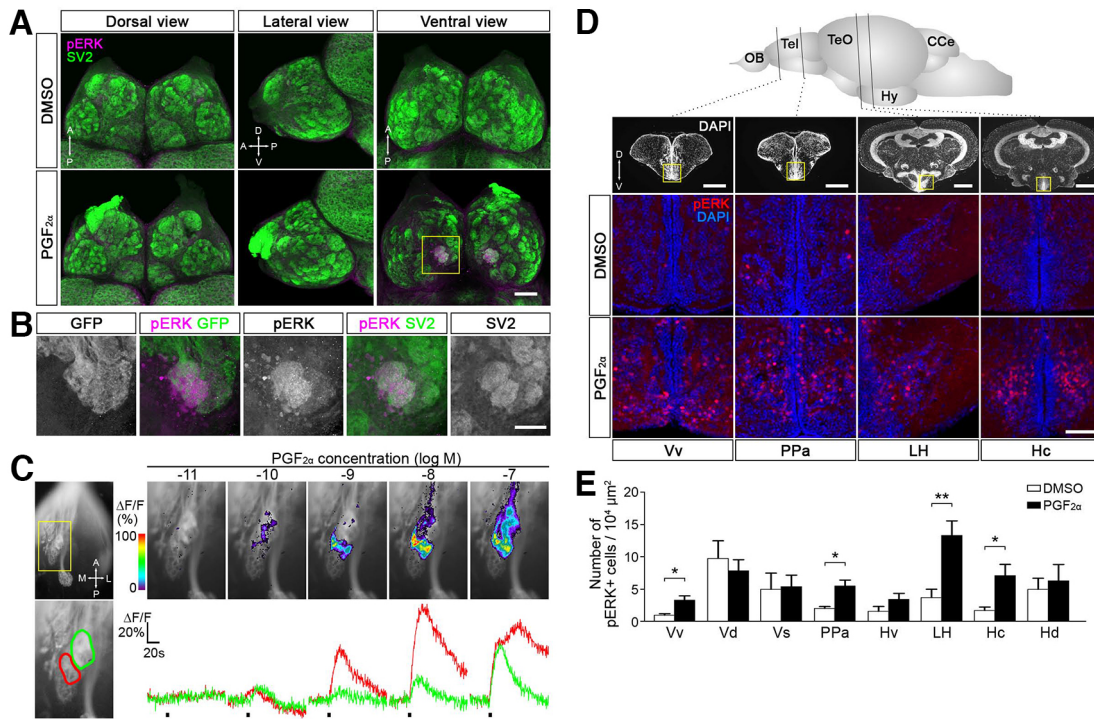


図2. 性フェロモン PGF_{2α} によって活性化される嗅覚神経回路

- A) 抗リン酸化 ERK 抗体を用いた嗅球のホルマウント免疫染色像。PGF_{2α} で刺激したゼブラフィッシュでは、嗅球の腹内側領域にリン酸化 ERK 陽性シグナルが観察される。Scale bar: 100 μm.
- B) A の枠内の拡大像。2つのリン酸化 ERK 陽性糸球体が観察される。Scale bar: 50 μm.
- C) GCaMP7 発現トランスジェニックゼブラフィッシュ嗅球のカルシウムイメージング。嗅上皮への PGF_{2α} 刺激によって2つの腹内側糸球体が活性化されている。
- D) PGF_{2α} 刺激によって活性化される高次嗅覚中枢。リン酸化 ERK 陽性シグナルの増加が終脳の Vv、PPa、視床下部の LH、Hc で観察される。Scale bar: 上図 500 μm, 下図 50 μm.
- E) 各脳部位におけるリン酸化 ERK 陽性細胞数の定量。unpaired t-test, *p < 0.05, **p < 0.01.

3. PGF_{2α} 嗅覚受容体遺伝子欠損ゼブラフィッシュにおける求愛行動の異常

高親和性 PGF_{2α} 嗅覚受容体 OR114-1 の生理機能を明らかにするために、TALEN ゲノム編集技術を用いて OR114-1 遺伝子欠損ゼブラフィッシュを作製した(図3 A)。野生型ゼブラフィッシュのオスは PGF_{2α} に対して顕著な誘引行動を示したが、OR114-1 欠損体ではそのような行動が観察されなかった(図3 B)。

最後に、野生型メスに対する求愛行動を、野生型オスと OR114-1 欠損オスで比較した。野生型オスはメスに対して、追尾 (Chase)、接触 (Touch)、回り込み (Encircle) などの求愛行動を頻繁に行っていたが、OR114-1 欠損オスではこれらの回数・時間が大きく減少していた(図3 C-F)。以上の結果から、高親和性 PGF_{2α} 嗅覚受容体 OR114-1 が、ゼブラフィッシュの求愛行動において重要な役割を果たすことが明らかとなった。

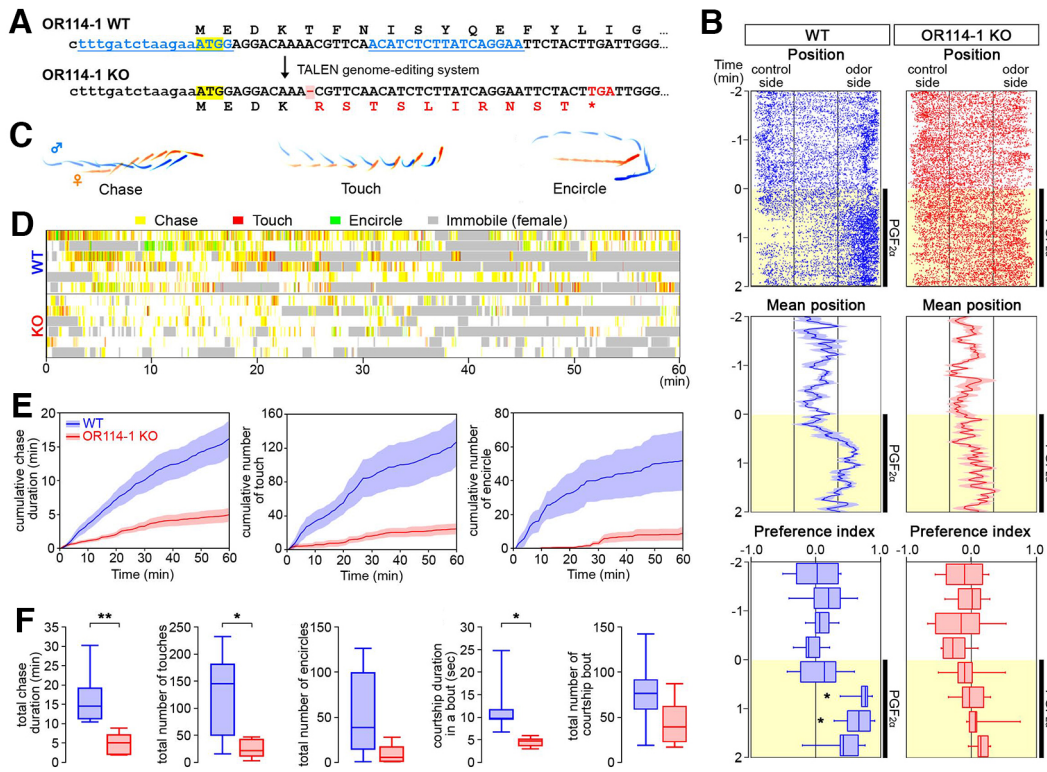


図3. PGF_{2α} 嗅覚受容体遺伝子欠損ゼブラフィッシュにおける求愛行動の異常

- A) TALEN ゲノム改変技術による高親和性 PGF_{2α} 嗅覚受容体遺伝子欠損ゼブラフィッシュの作製。
- B) 高親和性 PGF_{2α} 嗅覚受容体遺伝子欠損ゼブラフィッシュでは、PGF_{2α} への誘引行動が消失する。Wilcoxon signed-rank test, *p < 0.05.
- C) ゼブラフィッシュの求愛行動。追尾 (Chase)、接触 (Touch)、回り込み (Encircle)。
- D) メスへの求愛行動のラスタープロット。
- E) 追尾、接触、回り込み反応の時間経過。
- F) 追尾時間、接触回数、回り込み回数、求愛行動時間、求愛行動回数の比較。unpaired t-test, *p < 0.05, **p < 0.01.

考 察

PGF_{2α}、PGD₂、PGE₂ などの各種プロスタグランジンは、それぞれが特異的なプロスタノイド受容体を介して、体内において多様な機能を発現するホルモンあるいはオータコイドとして知られてきた⁶⁾。本研究では、排卵期のメスの魚から放出される PGF_{2α} が性フェロモンとして、オスの魚の嗅覚受容体に結合し、求愛行動を惹き起こすという個体間コミュニケーションの現象を分子レベル、細胞レベルさらには神経回路レベルで証明し、プロスタグランジン研究の新たな地平を開拓した。

性フェロモン PGF_{2α} によって活性化される高次脳領域として、終脳腹側部腹側核 (Vv)、視索前核 (PPa) が見出された。魚の Vv は哺乳類の中核野に対応すると考えられており、中核野が快感や報酬のモチベーションの調節をする報告⁷⁾ との関連が示唆される。また、PPa は哺乳類において交尾行動を司ると報告されている⁸⁾。金魚では Vv、PPa を破壊すると産卵行動が著しく阻害され⁹⁾、サンフィッシュでは PPa の電気刺激により、オスの求愛行動や放精が起こる¹⁰⁾。以上のように、ゼブラフィッシュで得られた本研究の知見は、これまでに発表されている高次脳領域の生殖行動における機能と合致し、種の壁を越えた性行動の中核機構の存在が示唆される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、理化学研究所脳科学総合研究センターの矢吹陽一、小出哲也、宮坂信彦、脇阪紀子および増田美和である。本稿を終えるにあたり、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Yoshihara Y. Zebrafish olfactory system. In *The Olfactory System: from Odor Molecules to Motivational Behaviors*, ed. by Mori K. Springer, Tokyo, pp 71-96, 2014.
- 2) Sorensen PW, Hara TJ, Stacey NE, Goetz FW. F prostaglandins function as potent olfactory stimulants that comprise the postovulatory female sex pheromone in goldfish. *Biol. Reprod.* 1988;39(5):1039-1050. PMID: 3219377.
- 3) Yabuki Y, Koide T, Miyasaka N, Wakisaka N, Masuda M, Ohkura M, Nakai J, Tsughe K, Tsuchiya S, Sugimoto Y, Yoshihara Y. Olfactory receptor for prostaglandin $F2\alpha$ mediates male fish courtship behavior. *Nat. Neurosci.* 2016;19(7):897-904. PMID: 27239939.
- 4) Miyasaka N, Arganda-Carreras I, Wakisaka N, Masuda M, Sumbul U, Seung HS, Yoshihara Y. Olfactory projectome in the zebrafish forebrain revealed by genetic single-neuron labeling. *Nat. Commun.* 2014;5:3639. Doi: 10.1038/ncomms4639. PMID: 24714622.
- 5) Friedrich RW, Korsching SI. Chemotopic, combinatorial, and noncombinatorial odorant representations in the olfactory bulb revealed using a voltage-sensitive axon tracer. *J. Neurosci.* 1998;18(23):9977-9988. PMID: 9822753.
- 6) Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 1999;79(4):1193-1226. PMID: 10508233.
- 7) Olds J, Milner P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1954;47(6):419-427. PMID: 13233369.
- 8) Sakuma Y. Neural substrates for sexual preference and motivation in the female and male rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008;1129:55-60. PMID: 18591469.
- 9) Koyama Y, Satou M, Oka Y, Ueda K. Involvement of the telencephalic hemispheres and the preoptic area in sexual behavior of the male goldfish, *Carassius auratus*: a brain-lesion study. *Behav. Neural Biol.* 1984;40(1):70-86. PMID: 6610412.
- 10) Demski LS, Bauer DH, Gerald JW. Sperm release evoked by electrical stimulation of the fish brain: a functional-anatomical study. *J. Exp. Zool.* 1975;191(2):215-232. PMID: 1113069.