

# 研究報告書

## 「匂いに対する特異的な行動や情動を制御する神経ネットワーク」

研究タイプ: 大挑戦型(※大挑戦型課題として延長有/増額有)

研究期間: 平成21年10月～平成27年3月

研究者: 小早川 高

### 1. 研究のねらい

情動とはヒトや動物が生存に必須の本能を誘発する脳の機能であり、ヒトや動物の行動に大きな影響を与える。脳が感覚器官で感知した情報から情動や行動を誘発するメカニズムは明らかになっていない。悪臭は嫌悪情動と忌避行動、天敵臭は恐怖情動とフリージング行動などというように、匂い分子は動物に様々な種類の情動や行動を誘発する。本研究では、匂い分子の情報が情動や行動の誘発へと結びつく未知のメカニズムの解明を通して、脳が多様な情動を生成するメカニズムの解明と、情動を制御する新技術の開発を目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

多くの哺乳類は主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系の2つの嗅覚サブシステムを持つ。主嗅覚系の完全な遮断は鋤鼻嗅覚系へのフェロモンの到達を阻害するので、両サブシステムの機能的な分離は困難であった。両サブシステムを遺伝学的に分離するために2段階のノックアウトマウスを作成した。主嗅覚系を全領域で遮断したマウスでは、匂い嗅ぎ行動の減少と、新生期における生存確率の著しい低下が観察された。これに対し、背側の嗅球に局限した機能阻害を持つミュータントマウスでは、匂い嗅ぎ行動、フェロモン分子による鋤鼻嗅覚系の活性化は正常であった。しかし、雌の尿に対する誘因行動、それに伴う超音波による発声、匂い嗅ぎ行動の嗜好性、攻撃行動、母性行動、警戒フェロモンに対する危険関連行動などの、広範な社会行動異常が認められた。フェロモンの感知とそれに伴う行動の分離が可能になったことで、前嗅核が主嗅覚系の下流で社会行動を制御することが明らかになった。主嗅覚—前嗅核システムによるフェロモン経路の発見は、ヒトを含む機能的な鋤鼻嗅覚系を持たない動物のフェロモン情報処理に新たな知見を与えるという意味でも重要である。

先天的と後天的な情報処理の統合は行動制御の基本である。この現象を嗅覚による先天的恐怖と後天的恐怖の対比系により解析した。私たちは、強力な先天的恐怖を誘発するチアゾリン類恐怖臭の開発に成功し、同等レベルのフリージングを伴う先天的と後天的な恐怖の比較を可能にした。先天的な恐怖刺激を予め提示すると後天的な恐怖応答が緩和されるが、その逆は起こらなかった。この結果は、両者の恐怖の間の拮抗的で階層的な制御の可能性を示唆する。全脳活性化マッピングと薬理スクリーニングの結果、扁桃体中心核のセロトニン2A受容体発現細胞がこの制御に関与する可能性が示唆された。この仮説を、光ファイバー内視鏡による自由行動マウスの神経活動記録と、薬理遺伝学を用いた行動解析で検証した。その結果、先天的な恐怖刺激のみが扁桃体中心核のセロトニン2A受容体発現細胞の神経活動を低下させることと、人為的にこの細胞の活動を低下させると、先天的と後天的フリージングの、それぞれ上昇と低下が誘発された。これらの結果は、これまでに予測されていなか

った先天的と後天的な恐怖の拮抗的で階層的な関係性と、それを支える分子実体を解明するものであり、恐怖情動の理解と制御に新たな視点を与える。

## (2) 詳細

匂い分子を感知する嗅細胞が存在する嗅上皮は、背側と腹側の2つのゾーンに区分される。それぞれのゾーンには異なる種類の嗅覚受容体が発現している。一般的に、一種類の匂い分子は双方のゾーンに存在する、数十から百種類程度の嗅覚受容体に結合する。私たちが作成した、背側ゾーンに存在する嗅細胞を特異的に除去したミュータントマウスでは、悪臭や天敵臭を識別したり、後天的に学習したりすることはできるにも関わらず、これらの匂いに対する先天的な忌避行動を示さなかった。この結果は、匂いに対する忌避行動が背側の嗅覚神経回路によって先天的に制御されることを示すものである。私たちは、本研究の開始時点においてここまでの解明を進めていた。匂い分子は忌避性の情動や行動以外にも、様々な情動や行動を誘発する。それらの中には、動物から分泌されて同種の動物に影響を与えるフェロモンが含まれる。では、フェロモンに対する行動の制御に嗅覚系がどのように関与するのかを解析することから本研究を開始した。

多くの哺乳類は主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系の2つの主要な嗅覚サブシステムを持っている。マウスの社会行動は鋤鼻嗅覚系によって制御されると長らく考えられてきたが、最近の知見によって主嗅覚系もフェロモン制御に関与することが示唆されている。しかしながら、主嗅覚系の完全な遮断は鋤鼻嗅覚系へのフェロモンの到達自体を阻害するので、2つのサブシステムの社会行動制御に対する機能分担を解明することは困難であった。私たちは、主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系の機能を遺伝学的に分離するために、主嗅覚系の全ての領域、または、背側ゾーンのみを遮断する2種類のノックアウトマウスを作成した。主嗅覚系の全領域を遮断したマウスでは、匂い嗅ぎ行動の減少と、新生期における生存確率の著しい低下が観察された。これに対して、背側の嗅球に局限した機能阻害を持つミュータントマウスでは、匂い嗅ぎ行動、フェロモン分子の感知、鋤鼻嗅覚系の活性化は保たれていた。しかしながら、雌の尿に対する誘因行動、それに伴う超音波の発声、匂い嗅ぎ行動の嗜好性、攻撃行動、母性行動、警戒フェロモンに対する危険関連行動を含む、広範な社会行動に異常が認められた。フェロモンの感知とそれに伴う行動の分離がなされたことにより、前嗅核が主嗅覚系の下流で社会行動を制御することが明らかになった。破壊実験と神経活動マッピングの結果、扁桃体と視床下部の社会行動制御に重要な役割を果たす複数の核が、主嗅覚系と前嗅核の制御を受けることが明らかになった。主嗅覚—前嗅核システムによるフェロモン経路の発見は、ヒトを含む機能的な鋤鼻嗅覚系を持たない動物のフェロモン情報処理に新たな知見を与えるという意味でも重要である(論文 1,フェロモン情報処理の遺伝的な分離によって解明された主嗅覚系が仲介するマウスの社会行動)。これらの結果により、主嗅覚系は、悪臭に対する嫌悪、天敵に対する恐怖、フェロモンが誘発する警戒、攻撃、母性を含む、動物の生存に必須となる多様な情動や行動を先天的に制御するという視点が確立された。

主嗅覚系は揮発性の匂い分子によって活性化される。低分子量で極性が比較的低い化合物は匂い分子として感知できる可能性があり、これに該当する化合物は膨大な数が存在する。その中から、先天的な情動や行動を誘発する生理活性を持つ匂い分子を同定する方法は知られていない。特異的な情動や行動を誘発する匂い分子を発見することは、嗅覚系によ

る情動や行動の誘発メカニズムの研究において極めて重要であるにもかかわらず、これまで十分に研究がなされていなかった。そこで、本研究では先天的な恐怖を誘発する匂い分子の開発に取り組んだ。

先天的な恐怖は種の存続のために必須である。マウスの恐怖情動はフリージング行動を指標にして定量的に計測される。天敵の分泌物や、そこから抽出された活性成分は、マウスに対して忌避行動を誘発できるものの、フリージングの誘発活性は低いことが知られている。モデル動物に先天的恐怖を効率的に誘発する技術が不足していることは、先天的恐怖情動の性質の理解を妨げる要因となっている。私たちは、人工化合物ライブラリーを用いて、弱い生理活性を持つ天敵の分泌物の化学構造を最適化するという新たな方法によって、極めて強力な先天的フリージング行動を誘発する一群の匂い分子「チアゾリン類恐怖臭」の発見に成功した。チアゾリン類恐怖臭によって誘発される先天的恐怖と、あらかじめ電気ショックと関連学習した匂い分子による後天的な恐怖は、共に行動解析では区別できないフリージング行動を伴う。しかし、先天的な恐怖のみが、背筋を中心とした体表面温度と体深部温度の3℃もの低下、心拍数の急速な半減、睡眠状態と同等の脳波の徐波化、という特徴的な生理応答を伴うことが明らかになった。これらの結果は、嗅覚入力による恐怖情動は少なくとも2つの明らかに異なる様相、先天的な冷たい恐怖と後天的な温かい恐怖に分類できることを示唆している。チアゾリン類恐怖臭の発見は、文字通り「背筋の凍る恐怖」を人為的に制御することや理解するための出発点となる(論文タイトル:チアゾリン類恐怖臭の発見により解明されたマウスの複数の恐怖情動)。全脳活性化マッピング法を用いた解析によって、嗅覚入力による先天的と後天的な恐怖は大きく異なる神経回路によって分離して処理されることが示唆された。これまで、分離して存在する先天的と後天的な情報処理経路の間にどのような相互作用が存在するのかは明らかにされていない。そこで、この問題の解明を目指した研究を実施した。

先天的と後天的な情報処理の統合は行動制御の基本である。しかし、これを支える細胞や分子メカニズムはよく分かっていなかった。私たちは、この現象を嗅覚による先天的恐怖と後天的恐怖の対比を用いた独自の実験系を活用して研究した。私たちは、強力な先天的恐怖を誘発するチアゾリン類恐怖臭の開発に成功した。この結果、これまで技術的に困難であった同等レベルのすくみ行動(フリージング)を伴う先天的と後天的な恐怖を比較することが可能になった。興味深いことに、先天的な恐怖刺激を予め提示すると後天的な恐怖応答が緩和されるが、その逆の効果は起こらないことが明らかになった。この結果は、両者の恐怖の間に拮抗的かつ階層的な制御が存在する可能性を示唆している。全脳活性化マッピングと薬理スクリーニングの結果から、扁桃体中心核のセロトニン2A 受容体発現細胞がこの制御に関与する可能性が明らかになった。この仮説を検証するために、私たちは自由行動条件のマウスの神経活動の光ファイバー内視鏡による記録と、薬理遺伝学を活用した行動解析を行った。その結果、後天的な恐怖刺激ではなく、先天的な恐怖刺激のみが扁桃体中心核のセロトニン2A 受容体発現細胞の神経活動を低下させることと、人為的にこの細胞の活動を低下させると、それぞれ中脳水道周囲灰白質の異なる亜核を介した、先天的フリージング行動の上昇と後天的フリージングの低下が同時に誘発された。これらの結果は、これまで予測されていなかった先天的と後天的な恐怖の拮抗的で階層的な関係性と、それを支える細胞と分子実体を解明するものであり、恐怖情動の理解と制御に新たな視点を与える(論文タイトル:扁桃

体中心核のセロトニン 2A 受容体発現細胞は先天的と後天的な恐怖の階層性を制御する)。

### 3. 今後の展開

チアゾリン類恐怖臭の発見により、先天的恐怖を誘発する感覚入力の特異性が解明された。現在、個々の嗅覚受容体と匂い分子の結合から、情動情報が生成されるメカニズムの解明を進めている。チアゾリン類恐怖臭の発見は、先天的な恐怖情動の解明を進めるブレークスルー技術として活用できるという側面を持つ。本研究によって明らかになった、先天的と後天的な恐怖が互いに協調的ではなく拮抗的に作用するという現象は、恐怖情動を理解することに加え、向精神薬の開発においても重要な示唆を与える。例えば、統合失調症の治療薬に使われているリスペリドン<sup>®</sup>は、セロトニン2A受容体の阻害薬であり、後天的恐怖を緩和する作用があるが、同時に、先天的恐怖を増悪する作用がある。精神疾患の原因となる情動制御メカニズムを先天的と後天的な側面に分解して、適切な分子ターゲットへの作用を目指すという創薬戦略が必要になるだろう。この戦略において、本研究で開発された、先天的と後天的な恐怖情動を分離して計測する技術が有効に活用できる。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

一連の研究成果により、独自の視点による、嗅覚入力<sup>①</sup>が情動を誘発する末梢メカニズムの解明と、嗅覚入力によって誘発された恐怖情動が中枢で処理されるメカニズムの解明が進んだと評価できる。また、本研究によって開発された先天的恐怖の誘発と測定技術は、嗅覚入力の情報コーディングメカニズムの解明、恐怖情動を制御する分子メカニズムの解明などの今後の基礎研究の推進に加え、向精神薬の新たなスクリーニング技術や、革新的な有害動物忌避剤の開発技術としても応用可能である。既に、これらの技術を活用した産業界との共同開発や、製品の市販計画は大きく進展している。本研究は、完全な基礎生物学研究であっても、本質的に新しい視点からの成果を達成することができれば、速やかに実社会生活への還元ができることを証明する事例としても評価できる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

哺乳類の多くは発達した嗅覚系を有し、これは天敵回避、摂食行動、生殖行動、社会行動などに関わる神経回路の重要な入口となっている。本研究は匂い分子で誘発される行動・情動に着目し、嗅覚一次中枢である嗅球の限局された機能を阻害したマウスを作出することにより、匂い分子の情報が処理される経路の解明に挑んだものである。主嗅球の背側の機能を阻害された遺伝子改変マウスでは、匂い嗅ぎ行動、フェロモン分子による鋤鼻嗅覚系活性化は正常であるのに、雌尿への誘引行動と発声、攻撃性、母性行動、警戒フェロモンに対する警戒行動などの社会行動に異常を見出した。また天敵臭による先天的恐怖と学習による後天的恐怖による脳内の活性化を比較する組織学的全脳マッピング

ングの結果から、両恐怖行動は異なる神経回路基盤を有し、互いに拮抗的關係があること、また扁桃体中心核のセロトニン 2A 受容体発現細胞は先天的恐怖だけにより活動を低下させることなど、興味深い一連の発見に至っている。さらに天敵臭分子 TMT を起点として人工化合物ライブラリーのスクリーニングにより、10 倍以上の比活性を有する化合物も発見した。これらの成果はその独自性において優れた成果と認められ、その一部は論文として発表され、出願も行われた。増額により取得した自動免疫染色装置などを駆使してこの間に意欲的に推進した全脳マッピングデータなども含め、膨大なデータと未発表の成果を早い機会に論文報告することが期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

- |  |
|--|
| 1. Matsuo T, Hattori T, Asaba A, Inoue N, Kanomata N, Kikusui T, Kobayakawa R and <u>Kobayakawa K.</u><br>Genetic dissection of pheromone processing reveals main olfactory system-mediated social behaviors in mice. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> (in press)  |
| 2. Igarashi K M*, Iseki N, An M, Yamaguchi Y, Nagayama S, <u>Kobayakawa K</u> , <u>Kobayakawa R</u> , Tanifuji M, Sakano H, Chen W R, and Mori K*.<br>Parallel mitral and tufted cell pathways route distinct odor information to different targets in the olfactory cortex. <i>J Neuroscience</i> 32(23) p7970-7985, 2012 |
| 3. Yokoyama T K*, Mochimaru D, Murata K, Manabe H, <u>Kobayakawa K</u> , <u>Kobayakawa R</u> , Sakano H, Mori K, and Yamaguchi M.<br>Elimination of adult-born neurons in the olfactory bulb is promoted during the postprandial period. <i>Neuron</i> 71(5) p883-897, 2011  |
| 4. Matsumoto H, <u>Kobayakawa K</u> , <u>Kobayakawa R</u> , Tashiro T, Mori K, Sakano H and *Mori K.<br>Spatial arrangement of glomerular molecular-feature clusters in the odorant-receptor-class domains of the mouse olfactory bulb. <i>J Neurophysiol.</i> Vol.103, p3490-3500, 2010                                   |

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 4 件

1.  
発明者: 小早川高、小早川令子  
発明の名称: 恐怖又は不安の計測システム  
出願人: 公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所  
出願日: 2013/11/22(非公開希望)  
出願番号: PCT/JP2013/081548
2.  
発明者: 小早川高、小早川令子

発明の名称: 動物用忌避剤  
出願人: 公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所  
出願日: 2013/8/30  
出願番号: 特許第 5350496 号

3.  
発明者: 小早川高、小早川令子  
発明の名称: 恐怖又は不安の計測システム  
出願人: 公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所  
出願日: 2012/11/22(非公開希望)  
出願番号: 特願 2012-256514

4.  
発明者: 小早川高、小早川令子  
発明の名称: 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  
出願人: 公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所  
出願日: 2012/1/24(非公開希望)  
出願番号: 特願 2012-1168

5.  
発明者: 小早川高、小早川令子  
発明の名称: 動物用忌避剤  
出願人: 公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所  
出願日: 2011/2/8(非公開希望)  
出願番号: PCT/JP2011/052652

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 第10回バイオビジネスコンペ JAPAN 最優秀賞 (2010年3月11日)  
「神経回路の機能に基づいて哺乳類の本能情動を制御する機能性匂い分子の開発」
2. 第34回日本神経科学大会シンポジウム(2011年9月17日)  
「Neuronal mechanisms controlling innate and learned fear responses」
3. 第5回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres(2011年10月7日)  
「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」
4. 生理学研究所国際研究集会「Central Neuroplasticity in Sensory-Emotional Link」  
Odor-evoked innate and learned fear responses are mediated by distinct neuronal mechanisms. (2012年9月13-15日)
5. 第35回日本分子生物学会年会ワークショップ 2W1I(2012年12月12日)  
「匂いに対する恐怖のメタボロミクス」
6. 生理研研究会『感覚刺激・薬物による快・不快情動生成機構とその破綻』(2013年9月2日)  
「嗅覚入力誘発する先天的な冷たい恐怖と後天的な温かい恐怖」