

学位論文題名

Mechanisms of pheromone perception  
and discrimination in mammalian  
vomeronasal system

(哺乳動物におけるフェロモン受容・識別機構)

学位論文内容の要旨

多くの脊椎動物は、嗅覚器で一般的な匂いを受容し、鋤鼻器でフェロモンを受容している。フェロモンとは、同じ動物種の中で異性あるいは同性の行動や内分泌系に影響を与えるものと定義される。ラットにおけるフェロモンの効果は、メスを飼育しているケージにオスを入れるとメスの性的な成熟が促進されることや、メス同士を密に飼育すると性的成熟が抑えられることが知られている。これらの効果は、尿中に存在するフェロモンが引き金になっていることが示されている。本研究では、メスラットの鋤鼻器上皮標品にパッチクランプ法を適用して、鋤鼻器感覚細胞の電気的特性、セカンドメッセンジャーの同定、尿中のフェロモンに対する応答の測定を行った。

一方、G蛋白質に対する抗体を用いた実験で、齧歯類の鋤鼻器感覚上皮の上部には  $G_{12}$ 、下部には  $G_o$  陽性細胞が局在することが示されている。これらの細胞は、一次中枢である副嗅球にそれぞれ前半部と後半部に分かれて軸索を投射していると報告されている。この結果は、フェロモン情報は異なる伝達経路で中枢に送られる可能性を示唆している。そこで、各種尿に対する応答を鋤鼻器感覚上皮スライス中の細胞から測定し、 $G_{12}$  陽性および  $G_o$  陽性細胞のフェロモン選択性について調べた。さらに、各種尿をラットに提示した後、神経の興奮により速やかに発現が誘導される Fos 蛋白質を副嗅球内で検出することにより、フェロモン情報の副嗅球への情報伝達経路を検討した。

1. ラット鋤鼻器感覚細胞の電気生理学的性質

Wistar 系メスラットの鋤鼻器感覚上皮からスライス標本を作成し、鋤鼻器感覚細胞の電気的性質を調べた。電圧固定下の細胞に、1 から 3 pA の電流を細胞内に注入するだけで活動電位が発生した。このような高感度の電流依存性は、フェロモンによりわずかに脱分極しただけでも活動電位を発生させることを可能とし、フェロモンを高感度で受容するのに役立っているものと思われる。また、鋤鼻器感覚細胞には、 $Na^+$ 、 $K^+$  や  $Ca^{2+}$  チャンネルなどの各種電位依存性チャンネルが存在していた。

2. cAMP および  $IP_3$  に対する電流応答

鋤鼻器感覚細胞のセカンドメッセンジャー候補に対する応答性を調べた。パッチ電極から 1 mM cAMP を直接細胞内に投与したところ、ほとんどの細胞で全く応答がみられなかった。ラット鋤鼻器には cAMP を GTP 依存的に産生させる経路が存在しているが、cAMP は鋤鼻器感覚細胞において、細胞内情報伝達系には直接関与しないことが示唆された。

一方、0.1 mM  $IP_3$  を細胞内に直接投与してみたところ、半分程度の細胞で内向き電流が測定された。これは、細胞に興奮性の応答が生じたことを示している。内向き電流応答強度の平均値は 85 pA であった。また、応答しなかった細胞の中には電流変動が生じる細胞もあった。  $IP_3$  に対する応答は、 $Na^+$  および  $Ca^{2+}$  を外液から除くと可逆的に抑制され、  $IP_3$  作動性チャネル阻害剤であるルテニウムレッドでも完全に阻害された。以上の結果は、ラット鋤鼻器感覚細胞には  $IP_3$  作動性チャネルが存在していることを示唆している。0.1 mM  $IP_3$  が引き起こした応答の平均値は 80 pA 程度と小さいが、鋤鼻器感覚細胞の電流感受性が非常に高いために活動電位を発生させるには十分であると思われる。

### 3. 尿に対する応答

ラットに作用するフェロモンは現在までのところ同定されていないが、行動学的実験から尿中にフェロモンが含まれていることが示唆されている。そこで、Wistar 系メスラットの鋤鼻器感覚細胞から、尿に対する応答を調べた。単一の感覚細胞は、Wistar 系オスとメス、Donryu 系オスから採取した 3 種類の尿のうち、1 種類の尿のみに特異的に応答した。このようにラット鋤鼻器感覚細胞が尿に対して高い選択性を示すことは、個々の細胞が異なる受容体を有することを示唆する。嗅細胞の場合は、個々の細胞は多種類の匂い物質に応答することが報告されているので、鋤鼻器感覚細胞は嗅細胞よりもはるかに特異性の高い受容機構が発達していることになる。フェロモンは、生理的機能に直接的に影響を与えるので、その情報は厳密に識別されることが必要であるからと思われる。

### 4. 尿応答の発生機構

次に、尿に対する応答の発生機構を調べるため、ホールセルモードで測定した。負電位に感覚細胞をクランプしておく、Wistar 系オス尿の投与によって内向き電流応答が引き起こされた。SD 系オスラットおよびオスハムスターの尿でも同様に、内向き電流応答が引き起こされた。Wistar 系オス、SD 系オスラットおよびオスハムスターの尿に対する応答の逆転電位の平均値はそれぞれ -10 mV 前後であり、  $IP_3$  に対する応答の逆転電位 (-7.2 mV) と類似していた。また、尿に応答する感覚細胞を U-73122 (PLC 阻害剤) やルテニウムレッド ( $IP_3$  作動性チャネル阻害剤) で前処理すると、尿に対する応答は完全に抑制された。以上の結果は、哺乳動物においては、フェロモンがホスホリパーゼ C を介して  $IP_3$  の産生を引き起こし、  $IP_3$  作動性チャネルを開口させることにより脱分極を生じさせることを示唆している。

### 5. フェロモン情報の副嗅球への伝達経路

次に、種々の尿に対して応答した感覚細胞の上皮内での分布を調べた。その結果、Wistar 系オス尿に応答した細胞は感覚上皮の上半部に存在し、Donryu 系オスおよび Wistar 系メスの尿に応答した細胞は下半部に存在していた。尿に応答する細胞の分布パターンは、感覚上皮での G 蛋白質の発現分布および鋤鼻器特異的 G 蛋白質共役型受容体ファミリーの発現パターンと類似し、感覚細胞は 2 種類に分類されることおよびフェロモンは G 蛋白質共役型受容体を介して受容されることが示唆された。

感覚上皮内で層状に分かれて存在している  $G_{i2}$  陽性および  $G_o$  陽性細胞は、副嗅球の前半部と後半部に分かれて投射している。先の感覚上皮で得られた結果から、Wistar 系オスラット由来のフェロモン情報は副嗅球の前半部に限局して伝えられることが予想される。そこで、フェロモン受容時の副嗅球における神経細胞の活動をモニターするため、ラットに尿を提示した後に副嗅球を抗 Fos 抗体で免疫染色した。副嗅球スライスの抗  $G_{i2}$  抗体を用いた染色により、前半部と後半部を確定した。副嗅球の主要な出力細胞である僧帽細胞層において、Fos 陽性細胞の数は前半部の方が後半部よりも 2 倍程度多く存在していた。この結果は、尿に対する電気生理学的測定結果とほぼ一

致し、オス尿に含まれているフェロモンは、 $G_{i2}$  陽性細胞で受容され、その情報は特異的な経路を介して中枢に伝達される可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 徳 光 幸 子  
副 査 教 授 野 村 靖 幸  
副 査 助 教 授 松 岡 一 郎  
副 査 助 教 授 柏 柳 誠

学 位 論 文 題 名

## Mechanisms of pheromone perception and discrimination in mammalian vomeronasal system

(哺乳動物におけるフェロモン受容・識別機構)

多くの動物は、嗅覚器で一般的な匂いを受容し、鋤鼻器でフェロモンを受容している。哺乳動物の鋤鼻器感覚細胞は、酵素を用いて遊離するとフェロモン受容機能が失われてしまうため、細胞レベルでのフェロモン受容・識別機構はほとんど明らかになっていない。本研究は、哺乳動物のフェロモン受容・識別機構を明らかにするために、ラット鋤鼻器感覚上皮のスライスを作成して、細胞レベルにおけるフェロモン受容・識別機構を明らかにしたものである。

1. ラット鋤鼻器感覚細胞の電気的性質：Wistar系メスラットの鋤鼻器感覚上皮のスライスを用い、1から3 pAの電流を細胞内に注入すると活動電位が発生した。この鋤鼻器感覚細胞の電流依存性は、フェロモンによりわずかに脱分極しただけでも活動電位が発生することを可能にした。さらに、鋤鼻器感覚細胞には、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ などの電位依存性チャネルが存在して、フェロモンが高感度で受容するのに役立っていることを示した。

2. cAMP および  $\text{IP}_3$  に対する電流応答：一般の嗅細胞では、cAMP と  $\text{IP}_3$  が匂い物質の情報伝達系に関与している。爬虫類の鋤鼻器感覚細胞でも、cAMP と  $\text{IP}_3$  がフェロモンの情報伝達に関与しているといわれているが、ラット鋤鼻器の cAMP 生成系は関与していなかった。一方、 $\text{IP}_3$  の注入は内向き電流を生じ、この応答には、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{IP}_3$  作動性チャネルが介在し、鋤鼻器感覚細胞の情報伝達に関与していることを明らかにした。

3. 尿に対する応答：Wistar系ラットのオスとメス、Donryu系ラットのオス

から採取した尿をフェロモン含む尿標品とした。Wistar 系ラットメスの鋤鼻器感覚細胞の中の単一細胞は、3 種類の尿標品の中の同系のオス 1 種類の尿標品のみで特異的に応答した。嗅細胞の場合は、個々の細胞は多種類の匂い物質に応答する。しかし、鋤鼻器感覚細胞は嗅細胞よりもはるかに特異性の高い受容機構が発達しており、個々の細胞が異なる受容体を有することによって、フェロモンによる情報は厳密に識別されていることを明らかにした。

4. 尿応答の発生機構：鋤鼻器感覚細胞を U-73122 (PLC 阻害剤)、ルテニウムレッド( $IP_3$  作動性チャネル阻害剤)あるいは百日咳毒素で前処理すると、尿標品に対する応答は抑制された。このことから、フェロモンは百日咳毒素感受性 G 蛋白質を介して  $IP_3$  の産生を引き起こし、 $IP_3$  作動性チャネルを開口したことにより情報が伝達されたことを示している。

5. フェロモン情報の副嗅球への伝達経路：齧歯類の鋤鼻器感覚上皮では、 $G_{i2}$  は上半部に、 $G_o$  は下半部に存在する。Wistar メスの感覚細胞は 2 種類に分類され、同系オス尿標品には感覚上皮の上半部に存在する  $G_{i2}$  に共役した受容体に、他系の Donryu 系オスおよび同系の Wistar 系メスの尿標品は下半部に存在する  $G_o$  に共役する受容体に結合することを見いだした。さらに、 $G_{i2}$  陽性細胞と  $G_o$  陽性細胞は副嗅球の前半部と後半部に別れて投射しているので、神経細胞が活動すると Fos 蛋白質が産生することを利用して、尿暴露後に副嗅球を抗 Fos 抗体で免疫染色した。Wistar 系メスラットに Wistar 系オス尿標品を暴露すると、副嗅球の前半部に多数の Fos 陽性細胞の局在が認められた。鋤鼻器感覚細胞において、尿中のフェロモンは  $IP_3$  生成を介して興奮性の応答を引き起こすが、単一の鋤鼻器感覚細胞は、1 種類の尿標品のみに応答した。したがって、Wistar 系オスラットの尿に含まれるフェロモンは同系のメスラットあるいは他系のラット尿中に含まれているフェロモンとは異なった経路で中枢に伝達されるという種特異性の情報機構を有することを明らかにした。

以上の研究は、オスラット尿中に存在する種特異性のフェロモン様物質が、メスラットの鋤鼻器感覚細胞に受容して応答するというフェロモン受容・識別機構を明らかにしたものである。審査員一同これらの研究を高く評価し、本論文提出者が博士(薬学)の称号を受けるにふさわしいものと一致して判断した。