

## 論文内容の要旨

論文題目 マウスにおける性特異的ペプチドフェロモンの

同定および解析

氏 名

木 本 裕 子

### 序論

フェロモンは、動物の体外に放出され同種<sup>の</sup>他個体に受容されると、その個体に対して特異的な行動や内分泌変化を引き起こす物質である。フェロモンが媒介する情報には、それを放出した個体の社会的な地位や生殖周期、健康状態などが含まれると考えられている。

多くの脊椎動物（両生類からヒト以外の霊長類）は、鼻の下部に位置する鋤鼻器官<sup>（じよび）</sup>でフェロモンを受容する。マウスにおいては、鋤鼻器官を除去したり、鋤鼻神経細胞のシグナル伝達を担う遺伝子を欠損させたりすると、様々な社会行動や生殖行動が異常になることが知られている。

鋤鼻器官では、揮発性の物質だけでなく不揮発性の物質も受容される。実際に、鋤鼻神経細胞には、揮発性の匂いを受容する V1R 受容体ファミリーと、不揮発性のペプチドやタンパク質を受容すると考えられる V2R 受容体ファミリーの 2 種類の受容体が発現している。V1R は G タンパク質の G $\alpha$ i とともに神経上皮の内腔側に、V2R は G $\alpha$ o とともに基底層側に、互いに排他的に存在している。また、1 つの細胞には 1 種類の受容体のみが発現すると考えられている。電気生理学的手法やカルシウムイメージングにより、尿中に含まれるいくつかの揮発性物質が、V1R を発現する内腔側の鋤鼻神経細胞で受容されることが示されている。しかし、自由に行動するマウスを使い、鋤鼻神経の投射先である副嗅球における神経活動を電氣的に記録すると、これらの揮発性物質に対する応答は確認されず、別の個体の顔や臀部付近に接触したときのみ応

答が見られたという。それゆえに、マウスが実際に鋤鼻器官でどのような物質を受容しているのかは、未だ不明な部分が多いといえる。

本研究では、神経活性化の指標として c-Fos を用い、自由に行動するマウスの鋤鼻神経の活性化が、性・週令・系統によってどのように異なるのかを明らかにすることを目的とした。さらに、メスの鋤鼻神経細胞を活性化するオス由来のシグナル物質の同定を目指した。

## 結果と考察

### 1. 床敷刺激による c-Fos 発現誘導：性・週令・系統による違い

フェロモン源として、2日間マウスを飼育した床敷を使用した。c-Fos 発現細胞は、免疫染色により同定した。BALB/c 系統の 10 週令のメスを BALB/c 成熟オスの床敷に曝し始めてから 1 時間半から 3 時間後に、鋤鼻器官における c-Fos 発現誘導細胞数は最大となり、12 時間経つと完全に消失した。すなわち、床敷刺激により鋤鼻神経細胞において一過性の c-Fos 発現が誘導されることが示された。

次に、BALB/c 成熟オスの床敷に対する BALB/c オス・メスの鋤鼻神経細胞の応答を調べた (図 1a)。2 週令・3 週令のメスでは 1 切片につき平均 2-4 個の c-Fos 発現誘導細胞が見られた。思春期の 4 週令・成熟した 10 週令になると発現は大幅に増加し、1 切片あたり平均 8-9 個の c-Fos が発現した。オスでは、思春期前の 2 週令・3 週令ではメスと同様に 1 切片あたり 2-4 個の c-Fos 発現誘導細胞が見られたが、4 週令以降は全く発現誘導されなかった。すなわち、4 週令以降に性特異的な応答が起きていることが示唆された。また、すべてのマウスにおいて、c-Fos の発現が誘導された鋤鼻神経細胞のほとんどは、G $\alpha$ o を発現している基底層側の細胞だった。

BALB/c 3 週令オスの床敷刺激を BALB/c 10 週令メスに対して行ったところ、その c-Fos 発現数は成熟オスの床敷刺激と比較して有意に少なかった (Mann-Whitney U-test,  $p < 0.01$ , 図 1b 左)。BALB/c 10 週令メスを、他系統の C57BL/6 と ICR 成熟オスの床敷に曝すと、どちらの床敷に対しても BALB/c 成熟オスのものと同程度の c-Fos の発現が引き起こされた (図 1b 右)。これらの結果は、BALB/c メスの鋤鼻神経細胞における c-Fos の発現誘導は、系統によらず、成熟オスの床敷によって引き起こされることを示している。

### 2. メスの鋤鼻神経細胞で c-Fos の発現を誘導するオスのシグナル物質の探索

これまでに、尿が様々なフェロモン効果を引き起こすという多数の報告がある。それゆえ、c-Fos の発現は尿中の物質により誘導されているのではないかと考えられた。そこで、4-10 週令

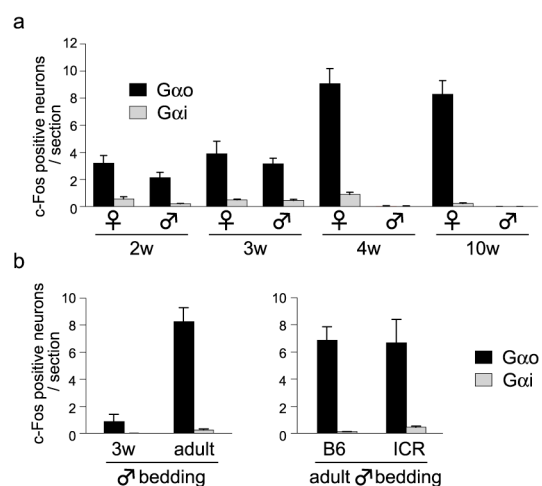


図1 性・週令・系統によるc-Fos発現の違い

a, 2-10週令のBALB/cオス・メスの鋤鼻器官において、BALB/c 成熟オスの床敷により誘導されるc-Fos発現細胞数と発現部位。4週令以降に性特異的なc-Fosの発現が見られた。b, 10週令のメスに対する様々なオスの床敷刺激。未成熟オスの床敷では c-Fos発現細胞は少ないが、系統が異なる成熟オスの床敷では同系統と同様の発現誘導が見られた。

のメスを用いて、オスの尿あるいは尿中のフェロモン候補物質に対する c-Fos 応答を調べた。しかしながら、これらの刺激に対して、メスの鋤鼻神経細胞において c-Fos の発現はほとんど引き起こされなかった。一方、成熟オスの顔・臀部周辺の毛に対しては、床敷刺激には及ばないものの、1切片あたり平均4個程度の c-Fos 発現誘導細胞が見られた。これらの結果は、メスの鋤鼻神経細胞で c-Fos の発現を誘導するオスの因子は、尿由来の物質ではなく、何らかの外分泌腺から体表に分泌されるものであることを示唆する。

そこで、6種類の外分泌腺（ハーダー腺、眼窩外涙腺、耳下腺、舌下腺、顎下腺、包皮腺）の抽出液によるメスの応答を調べた。その結果、成熟オスの眼窩外涙腺と顎下腺抽出液による刺激により、10週令のメスの鋤鼻神経細胞において、床敷刺激と同程度の c-Fos 発現誘導細胞が見られた（図2）。

一方、当研究室において、BALB/c、C57BL/6 および ICR 成熟オスの床敷刺激による BALB/c メスの c-Fos 発現誘導細胞の大部分は、ある特定の V2R 受容体を発現していることが示された。さらに、眼窩外涙腺によって c-Fos 発現が引き起こされる全ての細胞に、同じ受容体が発現していることが判明した。したがって、メスの鋤鼻神経細胞において c-Fos の発現を誘導する物質の大部分は、眼窩外涙腺から分泌され、系統間で共通の物質であると予想された。

### 3. 眼窩外涙腺由来のオスシグナル物質の同定

そこで、オスの眼窩外涙腺から、c-Fos 発現誘導活性をもつオス特異的物質の同定を試みた。BALB/c 成熟オスの眼窩外涙腺から可溶成分を抽出し、HPLC により3段階の精製を行った。最終的に、逆相カラムを用いた分離により、図3の矢頭で示す2画分に c-Fos 発現誘導活性が見出された。N末端アミノ酸配列分析を行い、どちらの画分においても、同じ20アミノ酸残基の配列を確認した。また、質量分析により、それぞれの画分に含まれる主要なペプチドの分子量は7,106 Da と7,375 Daであることが判明した。これらの結果をもとにデータベース検索を行ったところ、精製したペプチドは、既知のタンパク質に該当するものではなく、67アミノ酸残基からなるペプチドのC末端が3または1残基欠如した新規ペプチドであることが推測された。

予想ペプチドが c-Fos 発現を誘導する物質であるかどうかを確かめるために、大腸菌による大量発現系を用いて組換えペプチドを作製・精製し、その活性を調べた。組換え精製ペプチド1μgを10週令のメスに曝すと、鋤鼻神経細胞で

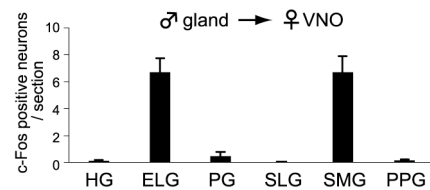


図2 外分泌腺によるc-Fos発現誘導

6種類のオスの外分泌腺のうち、眼窩外涙腺と顎下腺がメスの鋤鼻神経細胞においてc-Fosの発現を誘導した。

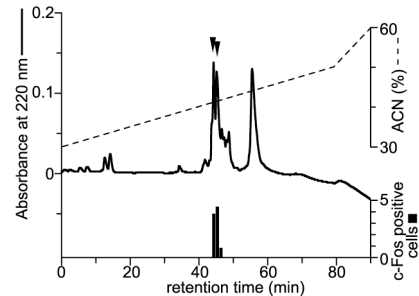


図3 逆相カラムを用いた最終精製と活性画分  
逆相カラムで分離した各画分の活性検定により、矢頭で示す2つのピークにc-Fos誘導活性が認められた。

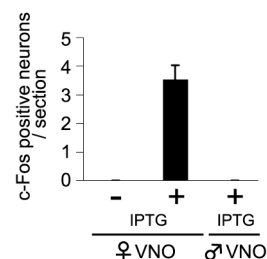


図4 組換えペプチドによるc-Fos発現誘導

大腸菌によって合成されたペプチドは、メスの鋤鼻神経細胞のみで、c-Fosの発現を誘導した。

c-Fos の発現誘導が見られた (図 4)。10 週令のオスに対する刺激では、c-Fos の発現は全く見られず、コントロールの大腸菌抽出液による刺激では、メスでもオスでも発現誘導は起こらなかった。これにより、このペプチドがメスの鋤鼻神経細胞特異的な c-Fos 発現誘導活性を有するオスシグナル物質であることが証明された。これは新規のペプチドであったため、ESP1 (exocrine gland-secreting peptide 1) と命名した。

#### 4. オスシグナル物質の発現解析

RT-PCR により様々な器官における ESP1 の発現を調べたところ、オスの眼窩外涙腺特異的に発現していることが判明した (図 5)。3 週令では発現しておらず、4 週令ではじめて発現が確認されたことから、オスマウスは ESP1 を思春期になってから分泌し始めることが示唆された。

また、5'RACE と 3'RACE を行い、ESP1 をコードする遺伝子配列を決定した。遺伝子は3つのエクソンからなり (図 6)、第2エクソンにある開始メチオニンから 22 アミノ酸残基がシグナルペプチドとして機能することが予想された。シグナルペプチドの切断ののち、プロセッシング機構が働いてN末端とC末端が切断され、ESP1 が細胞外に分泌されると推測される。

さらに、ホモロジー解析により、相同性を持つ 27 種類の類似ペプチドを同定した。これらは ESP1 遺伝子のセントロメア方向 1.95 Mb 以内にコードされており、新規のペプチドファミリーを形成していると思われる (図 6)。

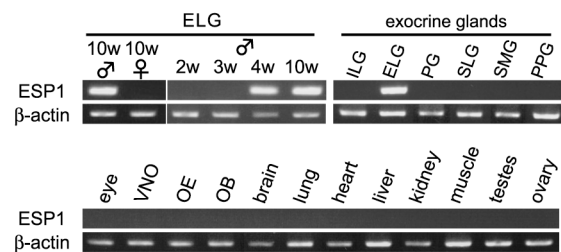


図5 同定した遺伝子ESP1の発現分布解析

同定した遺伝子は、オスの眼窩外涙腺特異的に発現している。その発現時期は、思春期の4週令以降である。

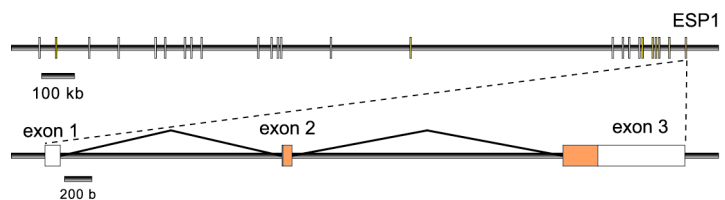


図6 遺伝子構造と相同遺伝子のゲノム上での分布

ESP1をコードする遺伝子は、3つのエクソンからなっている。相同遺伝子は、ゲノム上1.95 Mb以内に位置している。

#### 結論

神経活性化の指標として c-Fos を用い、性特異的な鋤鼻神経の応答が思春期以降に起きることを示した。また、系統にかかわらず成熟オスの床敷に含まれる物質が、メスの鋤鼻神経細胞において c-Fos の発現を誘導することを明らかにした。興味深いことに、その大部分は、眼窩外涙腺から分泌されたものであった。眼窩外涙腺抽出液の分離・精製を行い、1 種類の新規活性ペプチド ESP1 の同定に成功した。その発現は、思春期以降のオス特異的に見られた。これらの結果から、オスは眼からペプチドフェロモン ESP1 を分泌し、床敷や身体に付着したものをメスが鋤鼻器官で受容していると推測される。ESP1 遺伝子は性特異的な発現を示すことから、マウスの性識別に関する何らかの役割を担っていることが示唆される。