

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	新規鋤鼻受容体候補分子ancV1Rの機能解明
Title(English)	Functional analyses of a novel putative vomeronasal receptor ancV1R
著者(和文)	近藤宏
Author(English)	Hiro Kondo
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京科学大学, 報告番号:甲第16号, 授与年月日:2024年12月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:廣田 順二,桑 昭苑,鈴木 崇之,二階堂 雅人,白木 伸明
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Institute of Science Tokyo, Report number:甲第16号, Conferred date:2024/12/31, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

# 新規鋤鼻受容体候補分子 ancV1R の機能解明

博士論文

2024 年度

近藤 宏

東京科学大学大学院  
生命理工学院  
生命理工学系  
生命理工学コース

## 本研究の要約

多くの動物ではフェロモンを介した個体間コミュニケーションをおこなう。陸棲脊椎動物では鋤鼻器（じょびき）と呼ばれる嗅覚器官によってフェロモンを感知する。鋤鼻器に発現する鋤鼻受容体（V1R・V2R）はフェロモン物質の受容を担う。一般的に V1R 遺伝子は数やレパートリーにおいて動物種間で多様化している

最近、広範な脊椎動物種に保存される例外的な V1R 遺伝子が発見された。この遺伝子は古代魚から哺乳類にわたり、少なくとも4億年以上の間保存される唯一の V1R であり、「ancient V1R (ancV1R)」と命名された。鋤鼻器を有する動物で ancV1R は完全なオープンリーディングフレームを有する一方、鋤鼻器の退化した動物では偽遺伝子化している。また、通常 V1R は、1つの鋤鼻神経細胞で1種類のみが選択的に発現されるため、特定の受容体を発現する細胞は鋤鼻上皮にまばらに存在する。これに対し、ancV1R は鋤鼻上皮全体で発現し、他の V1R や V2R と共発現していた。これらのことから、ancV1R は通常の V1R とは異なる、鋤鼻系の機能に基盤的役割を担っていることが予想される。本研究では、新規鋤鼻受容体候補分子 ancV1R の機能解明を目的として、ancV1R 欠損マウスの表現型解析をおこなった。

メスマウスではフェロモンの受容が交配相手の認識や正常な性行動に重要である。AncV1R の欠損がメスの性行動に与える影響を解析した。その結果、ancV1R 欠損メスはオスの性行動に対して拒絶行動を強く示した。また、発情期のメスで示される異性の尿への嗜好性が ancV1R 欠損型では認められなかった。これらの結果から、ancV1R 欠損メスはフェロモンを介したオスの認識に異常を生じていることが考えられた。

次に、オスのフェロモンに対する鋤鼻器の生理学的応答を解析した。AncV1R 欠損マウスでも刺激に対して活性化する鋤鼻神経細胞が認められ、ancV1R が細胞の活性化に必須ではないことが示唆された。しかしながら、フェロモン刺激に対して活性化した細胞の数は野生型と比較し減少していた。オスのフェロモン以外にも、新生仔や ESP1、 $\beta$ -エストラジオール 3-硫酸に対する鋤鼻器の応答も低下していた。

AncV1R の欠損による末梢器官の応答の低下が高次中枢神経系での情報処理にどのような影響を与え、性行動の異常につながったのかを解析した。オス尿を提示した際のメスの高次中枢領域の応答を解析した結果、ancV1R 欠損メスでは副嗅球と扁桃体内側部の応答が野生型と比較し低下していた。この結果は、鋤鼻器からの感覚入力の低下を反映しているものと考えられる。一方、オスと接触した際には、扁桃体内側部と扁桃体皮質後内側部の応答が増加していた。鋤鼻器を介した感覚入力の低下に対してこれらの領域の応答が増加していたことは、鋤鼻系以外の入力、もしくは、拒絶行動の発現によって生じている可能性がある。更に、ancV1R 欠損メスでは、オスと接触したときのみ、ストレス関連領域の外側中隔の活動が増加しており、ストレスホルモン ACTH の血中濃度が上昇していた。

まとめると、本研究の結果から、ancV1R がフェロモン刺激に対する鋤鼻器の応答を促進する機能を有する可能性が示唆される。オス尿を提示した際、ancV1R 欠損メスでは鋤鼻器を介した感覚入力が低下し、嗜好性が消失したと考えられる。また、ancV1R 欠損メスはオスを交配相手と認識できておらず、オスの接近に対してストレス応答が増加し、性行動に異常をきたしたものと考えられる。

## 略語一覽

ACTH	adrenocorticotrophic hormone
ancV1R	ancient V1R
AOB	accessory olfactory bulb
AOB-GCL	accessory olfactory bulb, granule cell layer
AOB-MTL	accessory olfactory bulb, mitral/tufted cell layer
Ascl1	achaete-scute family bHLH transcription factor 1
AVPV	anteroventral periventricular nucleus
BSA	bovine serum albumin
BNST	bed nucleus of the stria terminalis
Cckar	cholecystokinin A receptor
CRF	corticotropin-releasing factor
CRP1	cystatin related protein 1
DAG	diacylglycerol
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEGs	differential expression genes
DIG	digoxigenin
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
Egr1	early growth response protein 1
ELISA	enzyme-linked immuno-sorbent assay
ESP1	exocrine gland-secreting peptide 1
ESP22	exocrine gland-secreting peptide 22
Esr1	estrogen receptor 1
FDR	false discovery rate
Fpr	formyl peptide receptor
GABA	$\gamma$ -aminobutyric acid
Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Gap43	growth associated protein 43
GPCR	G protein-coupled receptor
HRP	horseradish peroxidase
MeA	medial amygdala
MeApv	medial amygdala, posteroventral region
MHC	major histocompatibility complex
MPA	medial preoptic area
MUPs	major urinary proteins
NBT/BCIP	nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
Neurod1	neurogenic differentiation 1
Neurog1	neurogenin 1

OlfC	olfactory receptors related to class C
OMP	olfactory marker protein
ORA	olfactory receptors related to class A GPCR
PAGd	periaqueductal gray, dorsal part
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldehyde
PI(4,5)P <sub>2</sub>	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PLCβ2	phospholipase C beta 2
PMCo	posteromedial cortical amygdala
PGRMC1	progesterone receptor membrane-component 1 protein
pS6	phosphorylated ribosomal protein subunit S6
qRT-PCR	quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction
RNA-seq	RNA sequence
SEM	standard error of the mean
SF1	steroidogenic factor 1
SNCAIP	synuclein alpha interacting protein
Tacr1	tachykinin receptor 1
Tac1	tachykinin
TBS	tris-buffered saline
Trpc2	transient receptor potential cation, subfamily C, member 2
VMH	ventromedial hypothalamus
VMHd	ventromedial hypothalamus, dorsal region
VMHvl	ventromedial hypothalamus, ventrolateral region
VR	vomer nasal receptor
V1R	vomer nasal type-1 receptor
V2R	vomer nasal type-2 receptor

## 目次

本論文の要約	1
略語一覧	2
第一章 序論	6
1-1. 鋤鼻（じよび）系によるフェロモン感知	7
1-1-1. 鋤鼻受容体	7
1-1-2. 鋤鼻受容体のシグナル伝達	8
1-1-3. 鋤鼻受容体のリガンド特性	9
1-1-4. 鋤鼻系を介した社会行動	11
1-1-5. 鋤鼻系の神経回路	12
1-2. 脊椎動物における鋤鼻受容体遺伝子の多様性	13
1-3. 新規鋤鼻受容体候補分子 <b>ancV1R</b> ( <b>ancV1R</b> )	14
1-3-1. <b>ancV1R</b> の発見	14
1-3-2. <b>ancV1R</b> の発現	15
1-4. 本研究の目的と意義	16
1-4-1. 本研究の目的	16
1-4-2. 本研究の意義	16
第二章 <b>ancV1R</b> 欠損がメスの性行動に与える影響	36
2-1. 目的	37
2-2. 実験手法	37
2-2-1. マウス	37
2-2-2. <i>In situ</i> hybridization	37
2-2-3. 免疫組織化学	40
2-2-4. 性行動実験	41
2-2-5. 尿の嗜好性試験	42
2-2-6. フェロモン刺激と最初期遺伝子発現解析	43
2-2-7. RNA シーケンスによる網羅的遺伝子発現解析	44
2-2-8. 定量逆転写 PCR	44
2-2-9. <i>In situ</i> hybridization と免疫組織化学の共染色	45
2-2-10. 免疫細胞化学	46
2-2-11. フェロモン刺激と pS6 陽性細胞の検出	46
2-2-12. 母性攻撃行動試験	47
2-3. 結果	47
2-3-1. <b>ancV1R</b> の欠損が鋤鼻神経細胞の分化発生に与える影響	47
2-3-2. <b>ancV1R</b> 欠損メスマウスの性行動	48

2-3-3. オス尿中フェロモンに対する行動応答	48
2-3-4. 鋤鼻器の生理学的応答	49
2-3-5. 鋤鼻受容体の遺伝子発現解析	50
2-3-6. ESP1 に対する生理学的・行動応答	51
2-3-7. 鋤鼻器のリガンド感受性	52
2-3-8. 母性攻撃行動	52
2-4. 考察	52
2-4-1. ancV1R の欠損による鋤鼻受容体遺伝子の発現変動	53
2-4-2. ancV1R の欠損がメスの性行動に与える影響	53
第三章 ancV1R 欠損メスの性行動異常と高次中枢神経応答	73
3-1. 目的	74
3-2. 実験手法	74
3-2-1. マウス	74
3-2-2. メスマウスへの刺激と脳試料の採取	74
3-2-3. <i>c-Fos in situ hybridization</i>	74
3-2-4. <i>c-Fos</i> 発現細胞の定量	75
3-2-5. 副腎皮質刺激ホルモンの測定	75
3-3. 結果	76
3-3-1. オス尿に対する鋤鼻系高次中枢神経応答	76
3-3-2. オスと接触した際の高次中枢領域の応答	76
3-3-3. オス接触時のストレス応答	77
3-4. 考察	77
3-4-1. オス尿への嗜好性消失と高次中枢神経応答	77
3-4-2. オスとの接触時の高次中枢神経応答	78
3-4-3. ストレス応答と ancV1R 欠損メスの性行動異常	78
第四章 結言	90
参考文献	95
謝辞	107

## 第一章

### 序論

## 1-1. 鋤鼻（じよび）系によるフェロモン感知

フェロモンは動物の性行動や社会行動の制御に重要な役割を担う。フェロモンには、分泌者の性別、年齢、発情状態、個体間の違い等の様々な情報がコードされており、それを感知した動物は分泌個体に対して適切な行動を示す。陸棲脊椎動物ではフェロモンは鋤鼻器と呼ばれる嗅覚器官によって受容される。マウスでは鋤鼻器は鼻腔の底部に存在する（図 1-1）。鋤鼻器の上皮は鋤鼻神経細胞、支持細胞、基底細胞によって構成される。鋤鼻神経細胞は、フェロモン物質の感知を担っており、鋤鼻内腔に侵入したフェロモン物質を樹状突起の先端にある微絨毛で検出する。支持細胞は鋤鼻神経細胞の樹状突起を取り囲むことで構造を保持する機能を持ち、基底細胞は上皮を構成する細胞全体の幹細胞である。鋤鼻神経細胞は、脳の副嗅球で二次ニューロンと接続し、高次中枢神経系へと情報を伝達する。本章では、フェロモンとその受容体による動物の行動の制御について概説し、その後本研究の対象である ancV1R について詳述する。

### 1-1-1. 鋤鼻受容体

鋤鼻神経細胞はフェロモン物質の受容を担う鋤鼻受容体 (vomeronasal receptor; VR) を発現する。鋤鼻受容体は鋤鼻 1 型受容体 (vomeronasal type-1 receptor; V1R) と鋤鼻 2 型受容体 (vomeronasal type-2 receptor; V2R) の二種類の多重遺伝子ファミリーからなる (Dulac and Axel, 1995; Matsunami and Buck, 1997; Herrada and Dulac, 1997; Ryoba and Tirindelli, 1997)。V1R と V2R は七回膜貫通型構造を有する G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor; GPCR) スーパーファミリーに属する。V1R と V2R は構造的に異なり、V1R と比べて V2R は長い N 末端を有している (図 1-2)。鋤鼻上皮は表層と基底層の二層に分かれており、V1R は上皮表層側、V2R は上皮基底側に発現する (図 1-1)。1 つの鋤鼻神経細胞は 1 種類の受容体を選択的に発現することが知られている。これは「1 細胞-1 受容体」と呼ばれる発現様式であり、このため特定の受容体を発現する細胞は鋤鼻上皮にまばらに存在する (図 1-2)。同じ受容体を発現する細胞は軸索を副嗅球上の 6~20 個程度の糸球体へと収束させる (Rodriguez *et al.*, 1999)。この際、V1R 発現細胞集団は副嗅球前方、V2R 発現細胞は副嗅球後方に軸索を投射する (図 1-1)。

マウスゲノム中には機能的 V1R 遺伝子が 215 個、機能的 V2R 遺伝子が 126 個存在する。マウス V1R および V2R のアミノ酸配列から作製された系統樹を図 1-3 に示す。アミノ酸配列の類似性から V1R ファミリーは 12 個のクレード(a~l)に分類される (Rodriguez *et al.*, 2002)。V2R ファミリーは A~D の 4 つに大別され、ファミリー A はさらに A1~A10 の 10 個のクレードに細分化される (Yang *et al.*, 2005)。V2R ファミリー C は Vmn2r1~Vmn2r7 の 7 個の V2R によって構成されており、V2R2 と呼ばれる。V2R のおよそ 95% はファミリー A、B、D のいずれかに属し、これらの V2R は「1 神経細胞-1 受容体」ルールに則った発現を示す。一方、ファミリー C の V2R は例外的に他の V2R と共発現することが知られる (Martini *et al.*, 2001; Silvotti *et al.*, 2011)。ファミリー B、D、および、ファミリー A の一部 (A8~A10) の V2R はファミリー C のうち Vmn2r1 との共発現率が高いのに対し、それ以外のファミリー A (A1~A6) の V2R はファミリー C の Vmn2r2~Vmn2r7 と様々な組み合わせで共発現している (Silvotti *et*

al., 2011)。すなわち、鋤鼻上皮基底側ではファミリーA、B、D とファミリーC の V2R が非ランダムな組み合わせで共発現している。Vmn2r1 を欠損したマウスでは、野生型で共発現するファミリーA8~A10、B、D の発現細胞数が減少しており、鋤鼻神経細胞の維持に関与している可能性がある (Akiyoshi *et al.*, 2018)。しかし、Vmn2r1 を含むファミリーC の機能は明らかになっていない。

鋤鼻器では V1R や V2R のほか、ホルミル化ペプチド受容体 (formyl peptide receptor; Fpr) も発現している (Rivière *et al.*, 2009; Liberles *et al.*, 2009; 図 1-2)。ホルミル化ペプチドは原核生物の翻訳機構の生成物であることから、Fpr は病原性を持った細菌やウイルスに由来するリガンドの検出、それに対する忌避に貢献している (Rivière *et al.*, 2009; Bufe *et al.*, 2019)。マウスゲノム中に Fpr 遺伝子は 7 つ存在し、鋤鼻上皮表層側に発現するもの (Fpr-rs3, Fpr-rs4, Fpr-rs6, Fpr-rs7)、基底側に発現するもの (Fpr-rs1)、免疫系に発現するもの (Fpr1, Fpr-rs2) がある。Fpr 遺伝子は免疫系での発現を起源としているが、齧歯類の一部では進化の過程で V1R、V2R のプロモーター配列を獲得したことで、鋤鼻系でも発現するようになったと考えられている (Dietschi *et al.*, 2017)。そのため Fpr も V1R や V2R と同様に「1 神経細胞-1 受容体」ルールに則った発現を示す。

### 1-1-2. 鋤鼻受容体のシグナル伝達

鋤鼻上皮において V1R は表層側の神経細胞で  $G\alpha_{i2}$  と共発現している。一方、V2R は基底側の神経細胞で  $G\alpha_o$  と共発現している。 $G\alpha_{i2}$  遺伝子もしくは  $G\alpha_o$  遺伝子の欠損は、それぞれ V1R もしくは V2R のリガンドに対する鋤鼻器の応答を消失させることから、V1R は  $G\alpha_{i2}$  と、V2R は  $G\alpha_o$  と共役していると考えられる (Trouillet *et al.*, 2019; Chamero *et al.*, 2011)。また、V1R と V2R のシグナル伝達の下流では、鋤鼻神経細胞特異的に発現する陽イオンチャンネル Trpc2 (transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 2) が機能する。Trpc2 は鋤鼻神経細胞の活性化に重要であり、Trpc2 を欠損した鋤鼻神経細胞では鋤鼻受容体のリガンドに対する応答が消失、または顕著に減弱する (Stowers *et al.*, 2002; Leypold *et al.*, 2002)。V1R にリガンドが結合すると  $G\alpha_{i2}$  が活性化し、解離した  $G\beta$  と  $G\gamma$  がホスホリパーゼ C  $\beta 2$  (PLC $\beta 2$ ) を活性化する。活性化 PLC $\beta 2$  はホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 (PI(4,5)P $_2$ ) を加水分解し、生成されたジアシルグリセロール (DAG) が Trpc2 を活性化し、 $Na^+$  や  $Ca^{2+}$  を細胞内へ流入させることで脱分極が誘導されると考えられている (Zufall *et al.*, 2005; 図 1-4)。

V2R 発現細胞のうち基底側に位置する細胞集団では、主要組織適合性遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC) のクラス 1b に属する H2-Mv を発現する (Ishii *et al.*, 2003; Loconto *et al.*, 2003)。H2-Mv は 9 個の遺伝子から構成される多重遺伝子ファミリーであり、それぞれ、MHC クラス 1b 分子の構造の安定化に寄与する  $\beta 2$ -マイクログロブリンと共に鋤鼻器に発現している。H2-Mv -  $\beta 2$ -マイクログロブリンの機能として、V2R の細胞膜への輸送に関与する分子シャペロンとして機能する可能性が提唱されている (Loconto *et al.*, 2003)。 $\beta 2$ -マイクログロブリンを欠損した鋤鼻器では V2R の樹状突起先端への膜移行が消失することや、培養細胞において V2R を H2-Mv と共発現させると膜輸送効率が促進することが報告されている (Loconto *et al.*, 2003; Dey and Matsunami 2011)。しかしながら、別のグループの研究では、

これらの結果の一部の再現性が取れなかったことが報告されている (Ishii and Mombaerts, 2008; Leinders-Zufall *et al.*, 2014)。Leinders-Zufall らの研究では、*H2-Mv* 遺伝子クラスターを欠失したマウスにおいて、*V2R* のリガンドに対する鋤鼻器の応答の閾値が増加しており、*H2-Mv* がリガンド感受性に寄与している可能性が示されている (Leinders-Zufall *et al.*, 2014)。

### 1-1-3. 鋤鼻受容体のリガンド特性

フェロモンは動物に特定の行動の発現や生理状態の変化を誘導する作用を持つため、その分子実態を明らかにすることは動物行動を理解する上で重要である。*V1R* と *V2R* の多くがいまだリガンドの同定されていないオーファン受容体であるものの、これまでに同定されている受容体とリガンドの組み合わせから、*V1R* は揮発性の低分子有機化合物やステロイド化合物、*V2R* は水溶性のペプチドを受容する傾向が認められている (Boschat *et al.*, 2002; Del Punta *et al.*, 2002a; Kimoto *et al.*, 2005; Isogai *et al.*, 2018; 表 1-1)。

鋤鼻受容体は「1 神経細胞-1 受容体」ルールに則って発現するため、フェロモン分子を感知した際に活性化した鋤鼻神経細胞で発現する受容体を調べることで、リガンドと受容体の組み合わせを同定することができる。フェロモン分子を受容し活性化した鋤鼻神経細胞では最初期遺伝子と呼ばれる遺伝子群の発現が一過的に誘導される。これを利用し、鋤鼻器に対しフェロモン刺激を与えた後に、最初期遺伝子と鋤鼻受容体遺伝子の共発現解析をおこなうことで、与えたフェロモンがどの受容体を活性化したかを調べることができる。Isogai らは、オスやメスマウスから発せられるフェロモン等を用いて、マウス *V1R* と *V2R* のリガンド特性をクレードごとに明らかにした (Isogai *et al.*, 2011; 図 1-5)。

マウスの尿中には多様なフェロモン物質が含まれており、異性に対する誘引行動、性行動や攻撃行動など本能的な行動を引き起こす生理活性を持つ。2002 年、Boschat らの研究によって、マウス尿中より同定されていた 2-ヘプタノンが *V1Rb2* (*Vmn1r49*) によって受容されることが示された (Boschat *et al.*, 2002)。また、*V1R* のクレード a、b をクラスターで欠損させたマウス鋤鼻器ではイソブチルアミンや酢酸ペンチルなど複数の有機化合物に対する生理応答が消失することが示され、*V1R* によって揮発性有機化合物が受容されることが明らかとなった (Del Punta *et al.*, 2002a)。この *V1Ra*、b クラスター欠損マウスでは *V1Rb2* も欠失しているが、2-ヘプタノンに対する応答は残っており、単一の化合物が複数の受容体によって受容されることが示唆されている。

また、*V1R* はメスマウス尿中に豊富に含まれる硫酸化ステロイドを受容する (Nodari *et al.*, 2008; Isogai *et al.*, 2011)。硫酸化ステロイドは、メスの発情状態によって化学構造の異なる代謝産物が尿中に分泌されており、その構造の違いによって活性化される *V1R* のレパートリーも変化する。後の研究で、発情期のメスマウスの尿がオスの性行動を促進することが示された (Haga-Yamanaka *et al.*, 2014)。Haga-Yamanaka らの研究では、発情期のメス尿中に分泌される硫酸化エストロゲンによって活性化される *V1R* と、発情状態に関わらずメス特異的に尿中に分泌される物質によって活性化される *V1R* が同定され、これら 2 つのリガンド物質の両方が存在する条件で、メスに対するオスの性行動が顕著に増加することが示された。動物が交配する上でメスが妊娠可能な生理状態であるかを見極めることは重要であり、オスがメスの発

情状態を識別する際に V1R を介した化学コミュニケーションがおこなわれていると考えられる。

硫酸化エストロゲン以外にも、コルチコステロン骨格にカルボキシ基を持つリガンドがメス尿中より同定され、オスの性行動を促進することが報告されている (Fu *et al.*, 2015)。マウス糞中には胆汁酸が含まれており、近年、胆汁酸を受容する V1R が同定された (Wong *et al.*, 2020)。生理作用の明らかになっていないものも含め、多様なステロイド化合物が V1R を活性化すること、また、単一の化合物が複数の V1R を活性化する場合もあることが示されている (Isogai *et al.*, 2011)。同じリガンドで複数の受容体が活性化される場合、最初期遺伝子の発現を指標として受容体の応答性を区別することは難しいが、近年、Ca<sup>2+</sup>イメージングと単一細胞 RNA シーケンス解析を組み合わせることによって、リガンドに対する感受性や特異性を区別して受容体を同定する手法が確立されている (Lee *et al.*, 2019; Wong *et al.*, 2020)。

Isogai らの研究によると、オスまたはメスに由来するフェロモン、もしくは、他の動物種の分泌物のいずれかに対して特異的に応答する V1R は、解析した 56 個のうち 29 個 (52%) であった。それに対し V2R では、32 個のうち 29 個 (90%) が特異的な応答を示した (Isogai *et al.*, 2011)。特定の V2R を活性化するフェロモンの例として、オスマウス涙液中に分泌される外分泌腺分泌ペプチド (exocrine gland-secreting peptide 1; ESP1) が挙げられる (Kimoto *et al.*, 2005)。ESP1 は、V2R ファミリー A3 (図 1-5 中 clade 4; p clade とも呼ばれる) に属する Vmn2r116 (V2Rp5) によって受容される。ESP1 を受容したメスマウスは、ロードシスと呼ばれる交尾を受け入れる体勢をとるようになり、交配の成功率が上昇する (Haga *et al.*, 2010)。ESP1 は ESP ファミリーの一員である。ESP ファミリーに属する 38 個のペプチドの中で、涙液や唾液中に分泌されているものは 16 種類存在し、それぞれ鋤鼻器を活性化する作用を持つ (Kimoto *et al.*, 2007)。その中でも ESP22 については生理作用が明らかにされている。ESP22 は 2~3 週齢の幼若マウスの涙液中に分泌され、感知したオスの性行動を抑制させる効果を持つ。すなわち、未成熟状態で妊娠できない個体に対する交尾を防止する上で機能するフェロモンである (Ferrero *et al.*, 2013)。また、ESP22 はメスのロードシス行動を低下させる効果も有する (Osakada *et al.*, 2018)。ESP22 は、ESP1 の受容体である Vmn2r116 と同一のクレードに属する Vmn2r115 (V2Rp4) によって受容される。同一のクレードに属する相同性の高い受容体であっても、それぞれの受容体の活性化によって引き起こされる行動応答は全く異なる例といえる。

オスマウス尿中にも V2R のリガンド物質が存在する。主要尿タンパク質 (major urinary proteins; MUPs) はマウスゲノム中の 21 の遺伝子ファミリー (*Mup1*~*Mup21*) によってコードされており、メスよりもオスでの分泌量が高い (Roberts *et al.*, 2010)。C57BL/6 系統オスマウス尿中では 5 種類の MUPs の発現が確認されており、その内、MUP3 はオス同士の間で起こる攻撃行動を促進することが示された (Chamero *et al.*, 2007; Kaur *et al.*, 2014)。MUP20 は darcin とも呼ばれ、メスマウスを誘引する作用を持つ (Roberts *et al.*, 2010)。MUPs は V2R/Gα<sub>o</sub> 発現をする鋤鼻器基底側の細胞を活性化するが、受容体は同定されていない (Chamero *et al.*, 2007)。電気生理学的手法によって単一細胞ごとに MUPs に対する応答を解析した結果では、特定の MUP に対して応答する鋤鼻神経細胞と複数種類の MUPs に対して応答する鋤鼻神経

細胞が存在することが報告されており、リガンド特異性の異なる複数の V2R によって MUPs が受容されている可能性が考えられる (Kaur *et al.*, 2014)。

鋤鼻受容体のリガンドには、同種個体間で作用するフェロモン物質だけでなく、他の動物種によって分泌される物質も含まれる。マウスの捕食者である肉食哺乳類や猛禽類等の動物の分泌液は鋤鼻器を活性化し、本能的な恐怖行動を引き起こす。ネコの唾液中には Feld4 と呼ばれる、マウス Mup ファミリーのホモログが分泌されており、鋤鼻系を介してマウスに忌避行動を引き起こす (Papes *et al.*, 2010)。また、ラットもマウスの天敵であり、Tsunoda らはオスラット涙液中に分泌されるシスタチン関連タンパク質 (cystatin related protein 1; CRP1) がマウス Vmn2r28 を活性化し、歩行活動や体温、心拍数の低下を引き起こすなどの生理作用があることを報告している (Tsunoda *et al.*, 2018)。ラット CRP1 は、メスラットに対し、性行動時に示されるような停止行動を引き起こすことが示されており、捕食者側の動物種の雌雄間の化学コミュニケーションに使用されるリガンドが被食者側にも作用する例といえる。

#### 1-1-4. 鋤鼻系を介した社会行動

鋤鼻器を介したフェロモン受容は、動物の社会行動や本能的行動に重要である。通常、オスマウスは異性の匂いに対する嗜好性を示す。鋤鼻器を外科的に切除したオスや、鋤鼻神経細胞の活性化に重要なチャネル Trpc2 を欠損したオスでは、異性の尿中フェロモンに対する嗜好性が消失しており、相手個体の性別を正常に認識できない (Pankevich *et al.*, 2004; Bayless *et al.*, 2019)。Trpc2 を欠損したオスはオスとの接触時、攻撃行動が顕著に減少し、メスに対するような性行動を示すようになる (Stowers *et al.*, 2002; Leypold *et al.*, 2002)。鋤鼻系のシグナル伝達に関わる遺伝子を欠損したマウスの行動解析の結果について表 1-2 にまとめる。

V1R と共役する  $G\alpha_{12}$ 、および、V2R と共役する  $G\alpha_o$  の欠損マウスの行動についても解析がおこなわれている。成熟嗅神経細胞特異的にそれぞれの  $G\alpha$  遺伝子を欠損させた場合、 $G\alpha_o$ -cKO オスでは攻撃行動が減少するのに対し、 $G\alpha_{12}$ -cKO オスでは攻撃行動が増加する (Chamero *et al.*, 2011; Trouillet *et al.*, 2019)。この結果から、V2R 発現細胞集団は攻撃行動を促進させるシグナル伝達をおこなっている一方、V1R 発現細胞集団の感覚入力 は攻撃行動に抑制的に作用している可能性が考えられる。

メスマウスにおいても、鋤鼻器の切除や Trpc2 の欠損によって性識別や性行動に異常を生じることが示されている。通常、発情期にあるメスはオスの尿に対する嗜好性を示すが、鋤鼻器を切除した場合オス尿への嗜好性は示されない (Martel and Baum, 2009)。この誘引行動には MUP20 (darcin) が関与している。MUP20 を分泌しない Balb/c 系統の雌雄の尿を用いた嗜好性試験では、C57BL/6 系統の尿でみられたような顕著なメスマウスの誘引行動は認められない (Roberts *et al.*, 2010)。近年、MUP20 で刺激したメスマウスが超音波発声やマーキング行動 (放尿) を示すことが報告されており、オス尿中フェロモンによって引き起こされるこれら一連のメスの行動応答は、交配相手であるオスとの接触頻度を増加させる効果があると考えられる (Demir *et al.*, 2020)。

鋤鼻器の切除や Trpc2 欠損によってメスマウスの交尾の受容性は低下するため、交配の成功にはオスと接触した際の鋤鼻器の正常な活性化が重要であると言える (Martel and Baum,

2009; Fraser and Shah, 2014)。メスの性行動の受容性の低下は  $G\alpha_{i2}$ -cKO や  $G\alpha_o$ -cKO メスマウスの両方でも認められ、V1R と V2R 発現細胞の両方からの感覚入力が必要であると考えられる (Trouillet *et al.*, 2019; Oboti *et al.*, 2014)。Trpc2 を欠損したメスでは、オスやメスに対してオス様のマウント行動を示すことも報告されている (Kimchi *et al.*, 2007; Fraser and Shah, 2014)。この結果は、オスの性行動を発現するための神経回路がオスとメスの両方に備わっており、その活動は鋤鼻系によって制御されていることを示唆する。

更に、嗅覚系の感覚異常は不安やストレスにも影響を与える (Glinka *et al.*, 2012)。ラットにおいて、鋤鼻器を切除した際に不安様行動の指標が増加することが示されており、鋤鼻系の入力が動物の不安を制御していることが示唆される (Contreras *et al.*, 2013)。

### 1-1-5. 鋤鼻系の神経回路

鋤鼻神経細胞の軸索は、鼻中隔を通過して篩板 (しばん) を通過し、嗅球の背側後方に位置する副嗅球 (accessory olfactory bulb; AOB) に接続する。AOB では二次ニューロンにあたる僧房・帽飾細胞とシナプス接続し糸球体を形成する。主嗅覚系の一次・二次ニューロンの接続とは異なり、AOB の二次ニューロンは樹状突起を複数の糸球体にまたがって接続している。この中には、同じ受容体発現細胞の糸球体に接続しているもの (homotypic connectivity) と、異なる受容体発現細胞の糸球体に接続しているもの (heterotypic connectivity) が存在する (Del Punta *et al.*, 2002b)。

二次ニューロンは大脳辺縁系に属する分界上床核 (bed nucleus of the stria terminalis; BNST)、扁桃体内側部 (medial amygdala; MeA)、扁桃体皮質後内側部 (posteromedial cortical amygdala; PMCo) という3つの主要な脳領域へと接続する (von Campenhausen and Mori, 2000; Meredith, 1998)。これらの領域に存在する三次ニューロンは視床下部内側視索前野 (medial preoptic area; MPA) や視床下部腹内側部 (ventromedial hypothalamus; VMH) へと投射している (図 1-6)。視床下部領域は多様なホルモンの分泌し生理状態や行動を制御する。実際に、これらの領域を活性化し特定の行動を誘導するフェロモン物質が発見されている (Ishii *et al.*, 2017; Demir *et al.*, 2020)。

先行研究において、メスの交尾の受け入れ行動 (ロードシス行動) を促進させる ESP1 の受容から行動発現に至る神経回路が同定されている (Ishii *et al.*, 2017; 図 1-7)。Ishii らの研究では、まず ESP1 の受容体である Vmn2r116 発現細胞の入力を受ける二次ニューロン投射先のうち、MeA の活動が行動発現に必須であることを示した。MeA の中でも、VMH の背側領域 (VMHd) へと投射する後腹側領域 (MeApv) 細胞集団が重要である。VMHd ではステロイド産生因子 (steroidogenic factor 1; SF1) を発現する細胞集団が強く活性化され、さらにこれらの神経細胞は、中脳水道周囲灰白質の背側領域 (dorsal periaqueductal gray; PAGd) のエストロゲン受容体 (estrogen receptor 1; Esr1) 発現細胞へと投射していることを明らかとした。

ESP1 はメスに対してはオスの性行動を受容するロードシスを促す一方、オスに対しては、オスへの攻撃行動を増加させる作用を有する (Hattori *et al.*, 2016)。オス同士の間で起こる攻撃行動について解析した結果、ESP1 と、自身と異なる系統のオスマウスの尿を用いて刺激することでオスの攻撃行動が促進することが示された。ESP1 で刺激したオスマウスでは、

MeApv の細胞集団の中でも MPA へと接続する細胞が強く活性化される (Ishii *et al.*, 2017; 図 1-7)。すなわち、オスマウスで ESP1 によって活性化される神経回路と、メスで活性化される回路は MeApv で分岐している。

メスマウスに対して交尾の受け入れを低下させるフェロモンである ESP22 が活性化する神経回路も明らかにされている (Osakada *et al.*, 2018; 図 1-8)。ESP22 の受容によって Vmn2r115 発現細胞が活性化されると、AOB を介して MeApv と BNST が活性化される。BNST では抑制性の神経伝達をおこなう GABA 作動性神経細胞が強く活性化され、これらの神経細胞は VMH の腹外側領域 (VMHvl) に存在する Esr1 発現細胞に接続する。VMHvl の Esr1 発現細胞の活動はメスの性行動に必須であり (Inoue *et al.*, 2019)、ESP22 はその活動を抑制することによって性行動の受容性の低下、拒絶行動の発現を引き起こす。Vmn2r115 は ESP1 の受容体である Vmn2r116 と 87% の高いアミノ酸相同性を有しているが、そのリガンド受容情報は、MeApv まで Vmn2r116 のものと並行した経路をたどった後、VMH へと抑制性の伝達をおこなう回路を活性化させて、ESP1 と正反対の行動応答を引き起こす。

VMHvl の Esr1 発現細胞の中でも、コレシストキニン A 受容体 (cholecystokinin A receptor: Cckar) 発現細胞が、メスの性行動の受容性を制御する中枢となっていることが近年明らかにされた (Yin *et al.*, 2022)。メスマウスは発情状態によって性行動に対する受容性を変化させることが知られており、体内を循環するエストロゲン濃度の高い発情期で交尾の受容性が高くなる。発情期のメスでは VMHvl の Esr1・Cckar 発現細胞の活動が増加しており、また、エストロゲンの受容によって視索前野の前腹側室周囲核 (anteroventral periventricular nucleus; AVPV) へのシナプス接続を増強させる (Yin *et al.*, 2022; Inoue *et al.*, 2019)。この VMHvl と AVPV の接続回路の活動抑制によって交尾に対する受容性が低下する。VMHvl の Cckar 発現細胞は発情期のメスに特異的に存在する細胞集団であり、オスの VMH には存在しない (Knoedler *et al.*, 2022)。これらのことから、VMHvl の Esr1・Cckar 発現細胞はメスの性行動に必須の機能を担う細胞集団であるといえる。

オスマウスの示す性行動には BNST の Esr1 発現細胞集団の活動が重要である (Bayless *et al.*, 2019)。オスマウスとメスマウスの匂いに対し BNST の Esr1 発現細胞は異なる強度で応答する。Trpc2 の欠損によって鋤鼻器からの入力を遮断したオスでは BNST の Esr1 発現細胞の応答強度に差がなくなり、雌雄の識別ができなくなる。これらの細胞集団の中でもタチキニン (*Tachykinin 1; Tac1*) 発現細胞は MPA のタチキニン受容体 (Tachykinin receptor 1; Tacr1) 発現細胞へと接続し、性行動の発現、報酬系の活性化を促す (Bayless *et al.*, 2023)。

## 1-2. 脊椎動物における鋤鼻受容体遺伝子の多様性

鋤鼻受容体遺伝子は、陸棲脊椎動物だけでなく水棲の真骨魚類にも存在する。鋤鼻器を有さない魚類では、嗅上皮において嗅覚受容体発現細胞と鋤鼻受容体発現細胞が混在している。このため、脊椎動物の進化の過程で、水棲から陸棲環境へと適応した際に空気中でのフェロモン受容をおこなうために鋤鼻器を獲得したと推定される。一方、進化の過程で鋤鼻器を失った種も存在する。ワニや鳥類、霊長類やコウモリの一部では鋤鼻器が退化している。また

イルカやクジラのような水棲哺乳類にも鋤鼻器官は存在しない。これらの動物種では、フェロモンを介さない手段による個体間コミュニケーションが発達していると考えられる (Silva and Antunes, 2017)。

哺乳類では、283 個の *V1R* 遺伝子を有するカモノハシから、*V1R* 遺伝子を持たないコウモリやイルカまで、動物種ごとに遺伝子数は大きく異なる (Shi and Zhang, 2007; Nikaido, 2019; 図 1-9)。これら哺乳類の持つ *V1R* 遺伝子から作製された系統樹上では動物種特異的なクレードのクラスターが認められ、種間で保有する *V1R* のレパートリーは異なっている (Young *et al.*, 2007; 図 1-10)。このような *V1R* 遺伝子の数やレパートリーにおける多様化は他の化学受容体遺伝子 (嗅覚受容体遺伝子) と比較しても顕著であり (Zhang *et al.*, 2007; Dietschi *et al.*, 2022)、また、マウスとラットのようなごく近縁な動物種間でも保有する *V1R* 遺伝子に違いがある (Zhang *et al.*, 2007; Kurzweil *et al.* 2009)。遺伝子配列の相違は、発現する受容体タンパク質、および、そのリガンドが動物種間で異なっていることを意味し、種内固有の化学コミュニケーションの確立に貢献していると考えられる (Nikaido, 2019)。

*V2R* 遺伝子の多様化は、マウスやラット、オポッサムなどの一部の動物種に限定的である。また、霊長類やイヌ、ウシでは機能的な *V2R* 遺伝子は見つかっていない (Young and Trask, 2007; Hohenbrink *et al.*, 2012; Nei *et al.*, 2008)。

陸棲脊椎動物の持つ *V1R* と同源性のある遺伝子が、真骨魚類においても発見されており、*ORA* (*olfactory receptors related to class A GPCRs*) と呼ばれる (Saraiva and Korsching, 2007)。真骨魚類において *ORA* 遺伝子は 6 つ同定されている (図 1-11)。陸棲脊椎動物の *V1R* で示されるような遺伝子重複や欠失は見られず、*ORA1*~*ORA6* 遺伝子が種間で保存されており多様性はない。近年、ゼブラフィッシュの *ORA1* が 4-ヒドロキシフェニル酢酸を受容し交配ペア間での産卵効率を促進させることや、*ORA5* と *ORA6* が排泄物中の胆汁酸を受容し誘引行動を引き起こすことが報告され、魚類 *ORA* がフェロモン物質を受容している可能性が示されている (Behrens *et al.*, 2014; Cong *et al.*, 2019; Buchinger *et al.*, 2014)。陸棲脊椎動物の持つ *V1R* と *ORA* を併せた系統学的解析から、陸棲脊椎動物の持つ *V1R* は全て、*ORA1* の共通祖先にあたる遺伝子から進化したものであることが示唆されている (Saraiva and Korsching, 2007; Zapilko and Korsching, 2016; 図 1-12)。

真骨魚類における *V2R* 様遺伝子は *OlfC* (*olfactory receptors related to class C*) 遺伝子と呼ばれる (Alioto and Ngai, 2006)。真骨魚類の持つ *OlfC* 遺伝子数は種によって 20~60 と多様性が見られ、これらは 16 のサブファミリーに分類される (Hashiguchi and Nishida, 2006)。*OlfC* は食物中に豊富に含まれるアミノ酸によって活性化されることが知られており、索餌・摂食行動に重要であると考えられている (Specca *et al.*, 1999; Koide *et al.*, 2009)。また、*OlfC* 遺伝子の種多様化は特定のサブファミリーに偏っており、限定的なアミノ酸の受容体として機能しているものは真骨魚類で進化的に保存されている可能性がある (Zhang *et al.*, 2022)。

### 1-3. 新規鋤鼻受容体候補分子 ancient *V1R* (anc*V1R*)

#### 1-3-1. anc*V1R* の発見

陸棲脊椎動物は主に揮発性の匂い物質やフェロモン物質を感知する。一方、水棲の魚類は水溶性の物質を感知する。脊椎動物の進化において、水棲から陸棲への環境適応の過程で化学感覚系も大きく変化している。近年、魚類と陸棲脊椎動物の中間に位置するシーラカンスについてゲノム解析がおこなわれ、そのゲノム中の化学受容体遺伝子が同定された (Nikaido *et al.*, 2013; Picone *et al.*, 2014)。ゼブラフィッシュの持つ *ORA1*~*ORA6* のタンパク質配列をもとにゲノム中の *ORA* 遺伝子が探索された結果、シーラカンスは、真骨魚類の持つ 6 つの *ORA* 遺伝子と、陸棲脊椎動物と類似し多重遺伝子化した *VIR* 遺伝子の両方を有していることが明らかとなった (図 1-12)。この結果は、肉鰭類の共通祖先で *VIR* の種特異的多様性が生じており、陸棲脊椎動物型の *VIR* を獲得した後に陸棲適応が起こった可能性を示唆するものである。

これら *ORA* と *VIR* 遺伝子に加え、*ORA5* と *ORA6* に系統学的に近縁関係のある新規の遺伝子配列がシーラカンスゲノム中より発見された (Nikaido *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2018; 図 1-12)。更に、この新規 *VIR* 遺伝子は、ガーやカエル、イヌやウシなど、広範な脊椎動物にも保存されており、通常の *VIR* にはない保存性を有することが明らかとなった。この遺伝子は、古代魚から哺乳類にわたって 4 億年以上もの間保存される唯一の *VIR* 遺伝子であることから、「ancient *VIR* (*ancVIR*)」遺伝子と命名された (Suzuki *et al.*, 2018)。

*AncVIR* 遺伝子は、シヌクレイン  $\alpha$  相互作用タンパク質 *SNCAIP* (*synuclein alpha interacting protein; synphilin*) 遺伝子の第一イントロンに存在し、典型的な *VIR* に見られる多重遺伝子化は認められない。*SNCAIP* 遺伝子はエキソン-イントロン構造が魚類から哺乳類にわたって保存されている遺伝子であり、広範な脊椎動物ゲノムを対象とした *ancVIR* 遺伝子のシクエンシー解析がおこなわれた。その結果、全ての陸棲脊椎動物でオーソログ遺伝子配列が発見されたが、真骨魚類では検出されなかった (図 1-13)。また、多くの陸棲脊椎動物で完全なオープンリーディングフレームを有する *ancVIR* 遺伝子配列が認められる一方、ワニや鳥類、霊長類など、進化の過程で鋤鼻器の退化した動物種では、フレームシフト変異やストップコドンの発生によって *ancVIR* が偽遺伝子化していることが明らかとなった (Suzuki *et al.*, 2018; Zhang and Nikaido, 2020; 図 1-13; 表 1-3)。

鋤鼻受容体のシグナル伝達により活性化するチャネル *Trpc2* は、動物種を超えて鋤鼻神経細胞の活動に重要である。*Trpc2* 遺伝子は鋤鼻神経細胞に特異的に発現しており、鋤鼻器を有する動物種で機能的である一方、鋤鼻器の退化した動物種では偽遺伝子化している (Liman and Innan, 2003)。これらのことから、*Trpc2* 遺伝子と同様に、鋤鼻器の退化と偽遺伝子化に密接な関係が認められる *ancVIR* 遺伝子も、鋤鼻系の機能に重要な機能を担っていることが予想される。

### 1-3-2. *ancVIR* の発現

*AncVIR* の発現は鋤鼻器に特異的である (Suzuki *et al.*, 2018)。マウス鋤鼻器における *ancVIR* の発現解析の結果を図 1-14B に示す。典型的な *VIR*、および、*V2R* を発現する細胞はまばらに存在するのに対し、*ancVIR* は鋤鼻上皮全体にわたって発現している。マーモセットやネコ、ヤギやカエルにおいても、*ancVIR* はほぼすべての鋤鼻神経細胞で発現している様子が見られた。このような発現様式は、*ancVIR* が他の *VIR* や *V2R* と共発現することを示唆し、実際に幾つ

かの受容体について共発現することが明らかとなっている (図 1-15)。すなわち、*ancV1R* は「1 神経細胞-1 受容体」ルールに則らず、ほぼすべての鋤鼻受容体と共発現すると考えられる。「1 神経細胞-1 受容体」ルールに従わない鋤鼻受容体として、これまでに *V2R* のファミリー C に属する *Vmn2r1*~*Vmn2r7* が知られている (Martini *et al.*, 2001)。ただし、これらの受容体の共発現は上皮基底側の *V2R* 発現細胞に限定的であり、*V1R* と *V2R* の両方と共発現する鋤鼻受容体 (候補) 分子は *ancV1R* 以外に存在しない。

マウス鋤鼻器における *ancV1R* の発現は生後 3 日から認められ、成長につれて発現が強くなる傾向がある (Suzuki *et al.*, 2018; 図 1-16A)。鋤鼻神経細胞の分化マーカー遺伝子との共発現解析の結果、*ancV1R* は未成熟鋤鼻神経細胞マーカーである *Gap43* とは共発現せず、成熟鋤鼻神経細胞マーカーである *OMP* と共発現していた (図 1-16B)。これらの結果から、*ancV1R* は成熟した鋤鼻神経細胞が機能する上で何らかの役割を担っていると考えられる。

## 1-4. 本研究の目的と意義

### 1-4-1. 本研究の目的

*AncV1R* は動物種を超えて保存される唯一の鋤鼻受容体候補分子である。陸棲脊椎動物において、典型的な *V1R* や *V2R* が動物種特異的な多重遺伝子ファミリーを形成するのに対し、*ancV1R* は古代魚から哺乳類にわたって 1 コピーの遺伝子が保存されている。また、典型的な *V1R* が「1 神経細胞-1 受容体」ルールに従って発現する一方、*ancV1R* はほぼすべての成熟鋤鼻神経細胞で発現が認められる。このような特徴的に加え、鋤鼻器の退化と *ancV1R* の偽遺伝子化には密接な関係があることから *ancV1R* は鋤鼻系の機能に重要な役割を担っていることが示唆される。しかしながら、これまでにその機能は明らかになっていない。本研究では、*ancV1R* の機能解明を目的として、*ancV1R* 欠損マウスの表現型解析に取り組んだ。

### 1-4-2. 本研究の意義

これまでの研究から、*ancV1R* 遺伝子は鋤鼻器を有する動物に高度に保存される一方、鋤鼻器の退化した動物では偽遺伝子化していることが明らかとなっている。また、*ancV1R* はほぼすべての鋤鼻受容体と共発現することも示されている。これらの特徴は、鋤鼻神経細胞の活動に必須の機能を担うことの知られる *Trpc2* でも認められるものである。本研究による *ancV1R* の機能の解明は、動物種を超えたフェロモン受容のメカニズムに新たな知見をもたらさしめるものである。

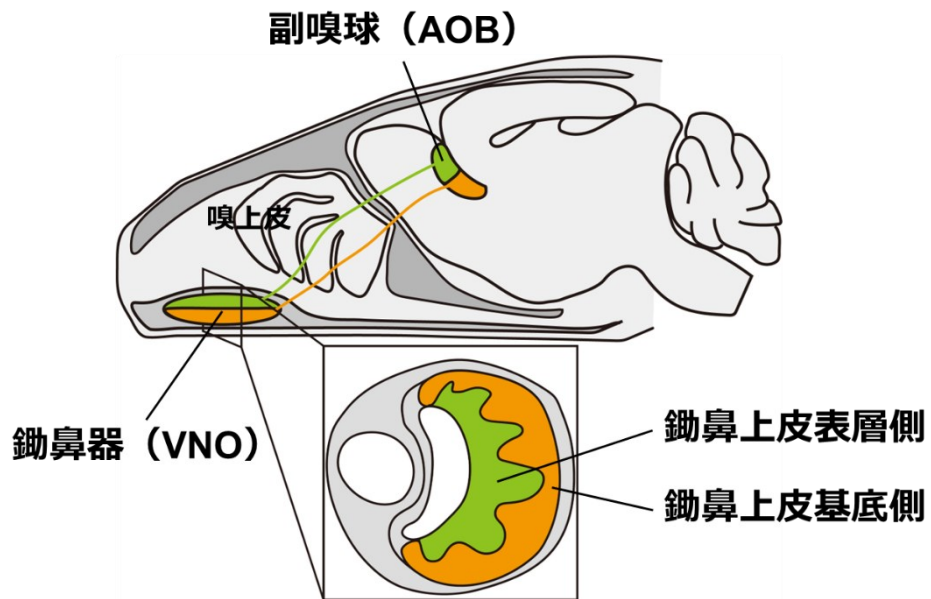


図 1-1. マウス鋤鼻系の構造

マウスでは鋤鼻器は鼻腔の底部に位置する。鋤鼻器に存在する鋤鼻神経細胞は脳の副嗅球へと軸索を投射する。鋤鼻上皮は二層に分けられ、表層側の鋤鼻神経細胞は副嗅球前方に、基底側の細胞は副嗅球後方に投射する (Chamero *et al.*, 2012)。

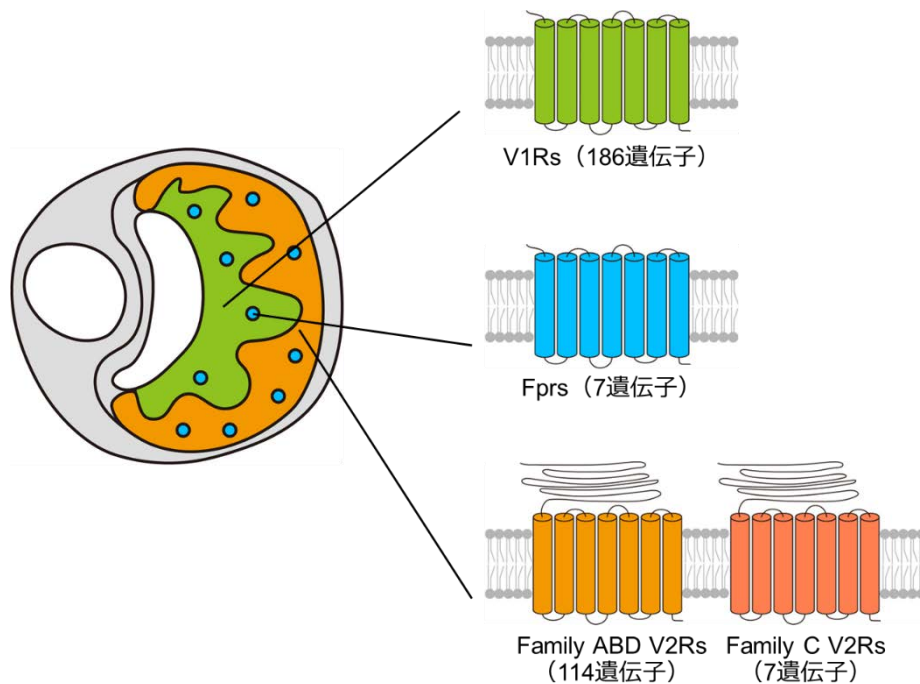


図 1-2. 鋤鼻受容体の発現・構造

鋤鼻器に発現する受容体には V1R、V2R、Fpr がある。これらの受容体は G タンパク質共役型受容体であり、それぞれが多重遺伝子ファミリーを形成する。V1R や Fpr と比較し、V2R は長い N 末端を有する構造となっている。V1R は鋤鼻上皮表層側で発現する。V1R は 1 つの神経細胞に 1 種類のみが選択的に発現する（「1 神経細胞-1 受容体」ルール）。V2R は上皮基底側で発現する。ファミリー A、B、D に属する V2R は「1 神経細胞-1 受容体」ルールに則った発現をする一方、ファミリー C に属する V2R (V2R2) は他の V2R と共発現する。Fpr は上皮表層側に発現するものと基底側に発現するものが存在し、それぞれ「1 神経細胞-1 受容体」ルールに従った発現を示す。

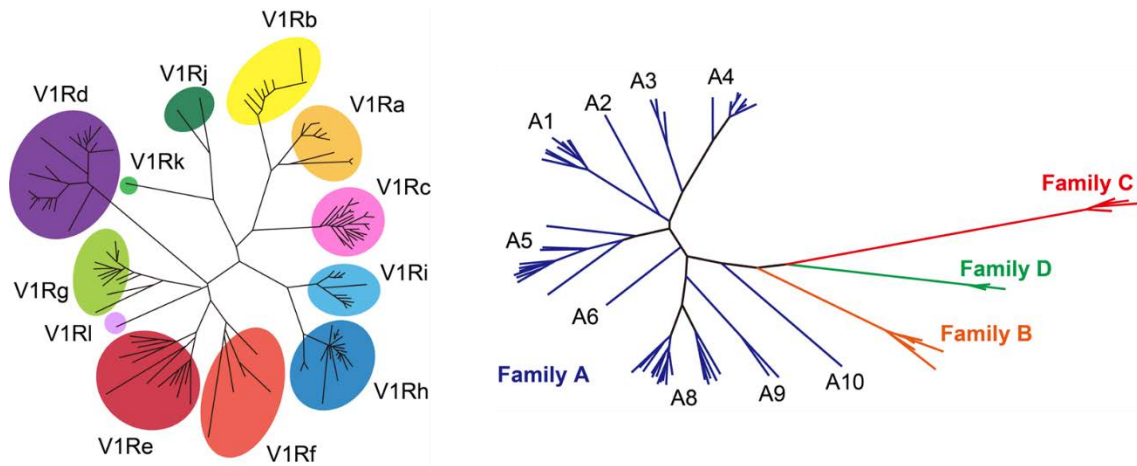


図 1-3. マウスの持つ鋤鼻受容体の系統樹

マウスゲノム中には 186 の *V1R* 遺伝子と 121 の *V2R* 遺伝子が存在する。*V1R* と *V2R* のアミノ酸配列から作製された系統樹を示す。*V1R* は a~l の 12 個のクレードに分類される。*V2R* は A~D の 4 つのファミリーに大別され、ファミリーA はさらに A1~A10 に細分化される (Rodriguez *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2005; Silvotti *et al.*, 2011)。

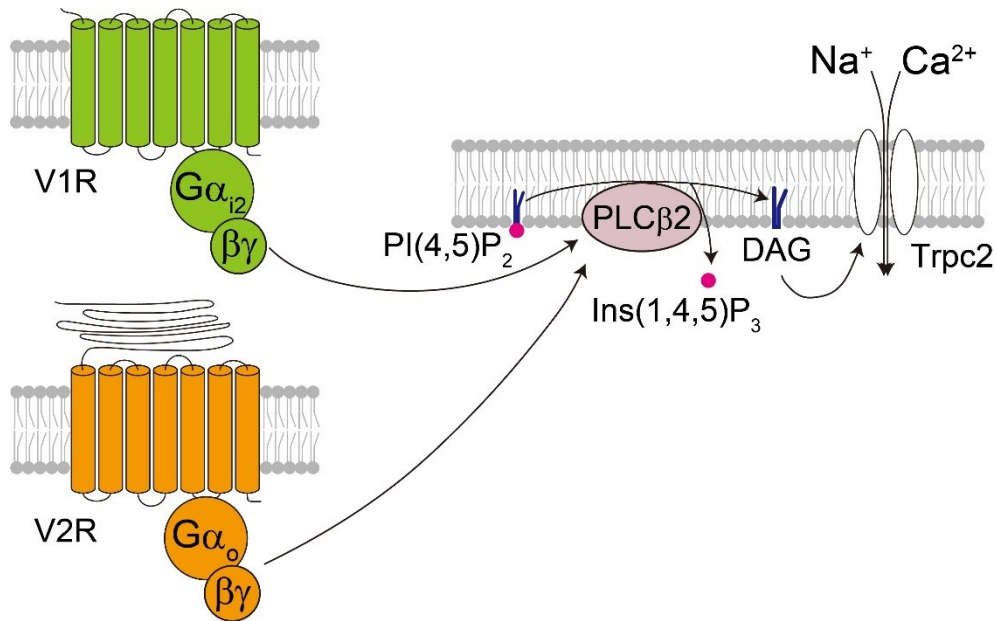


図 1-4. 鋤鼻受容体のシグナル伝達経路

V1R は  $G\alpha_{i2}$  と共役し、V2R は  $G\alpha_o$  と共役する。鋤鼻受容体にリガンド物質が結合すると、G タンパク質が活性化される。解離した  $\beta$ 、 $\gamma$  サブユニットは PLC $\beta$ 2 を活性化し、ホスファチジルイノシトール(4,5)ビスリン酸 (PI(4,5)P<sub>2</sub>) を加水分解しジアシルグリセロール (DAG) を生成する。その後、陽イオンチャネルである Trpc2 が開口し、細胞の脱分極を促す (Chamero *et al.*, 2012)。

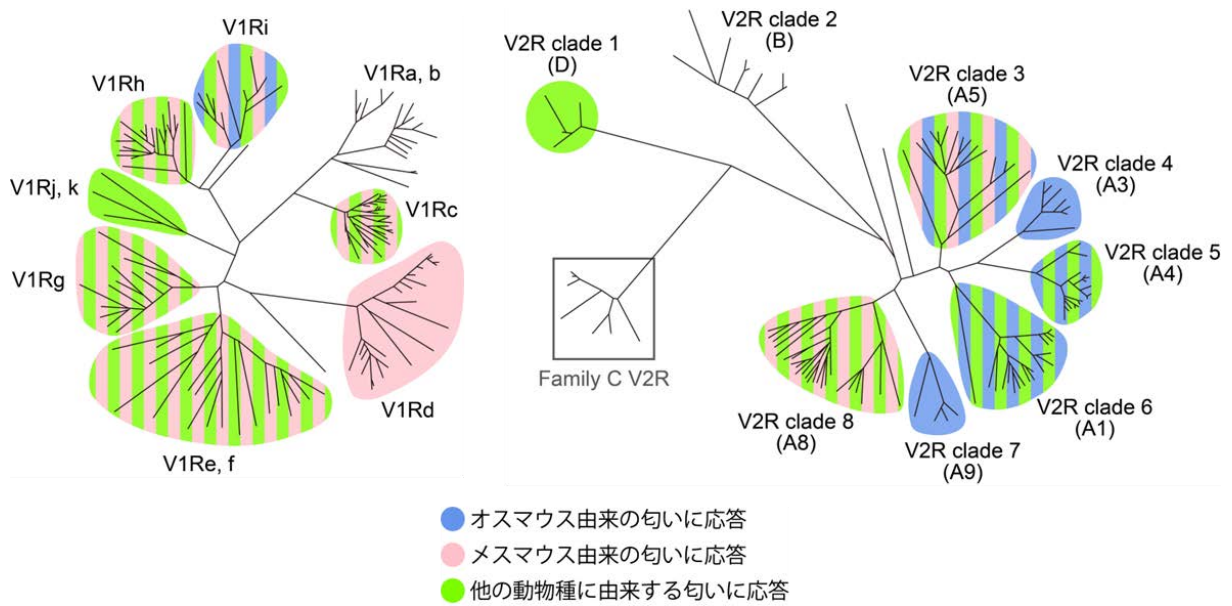
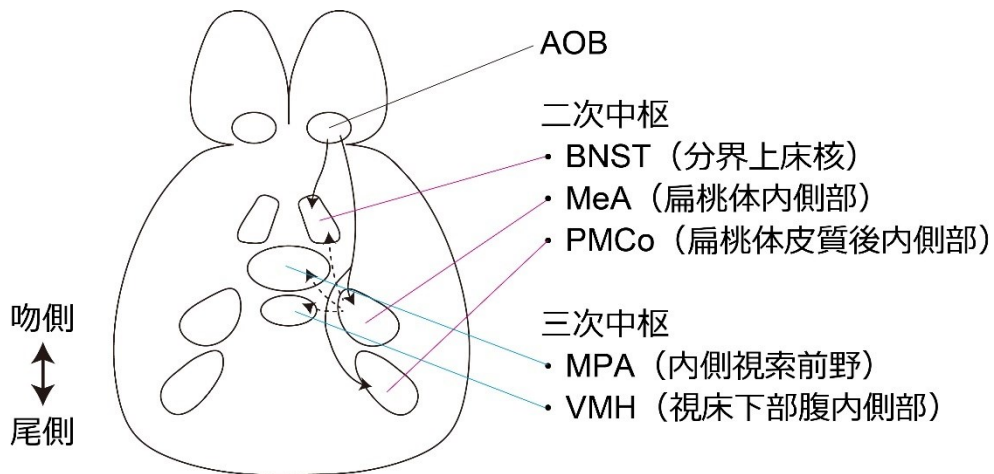


図 1-5. 鋤鼻受容体のリガンド特性

同一のクレードに存在する受容体はアミノ酸配列の相同性が高く、類似したリガンドを受容する可能性がある。Isogai らの研究ではクレード特異的なプローブと最初期遺伝子に対するプローブを用いた 2 color-*in situ* hybridization によって、鋤鼻受容体の各クレードがどのような物質によって活性化するかを解析した。オスマウスの匂いによって活性化されるクレードを青色、メスマウスの匂いによって活性化されるクレードを赤色、他の動物種の匂いによって活性化されるクレードを緑色で示す (Isogai *et al.*, 2011)。



**図 1-6. 鋤鼻系の神経回路**

鋤鼻神経細胞は副嗅球 (AOB) に投射し二次ニューロンと接続する。二次ニューロンは分界上床核 (BNST)、扁桃体内側部 (MeA)、扁桃体皮質後内側部 (PMCo) へと投射する。さらに、これらの領域に存在する三次ニューロンは内側視索前野 (MPA) や視床下部腹内側部 (VMH) へと接続している (Meredith, 1998)。

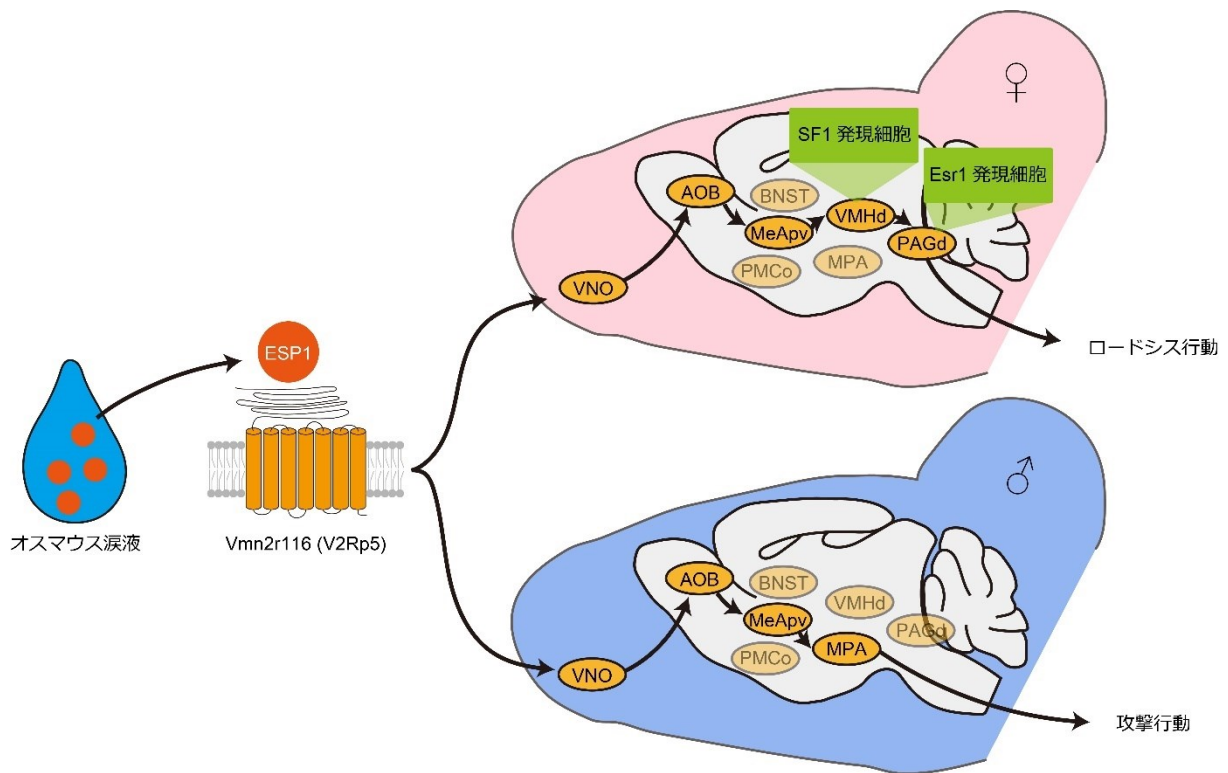


図 1-7. ESP1 の神経回路

オスマウスの涙液に含まれる ESP1 は、メスに対しロードシスと呼ばれる交尾の受け入れ行動を促す効果があり、オスに対し攻撃行動を促進する効果がある。ESP1 は鋤鼻受容体 Vmn2r116 に受容され、その感覚入力は副嗅球を介して MeA の後腹側領域 (MeApv) へと伝達される。続いて、VMH の背側領域 (VMHd) の SF1 発現細胞集団、中脳水道周囲灰白質の背側領域 (PAGd) の Esr1 発現細胞集団を活性化し、行動発現を促す。これに対しオスでは、MeApv まではメスと同じ経路をたどった後、内側視索前野 (MPA) を活性化し、攻撃行動を促す (Haga *et al.*, 2010; Hattori *et al.*, 2016; Ishii *et al.*, 2017; Woodson, *et al.*, 2017)。

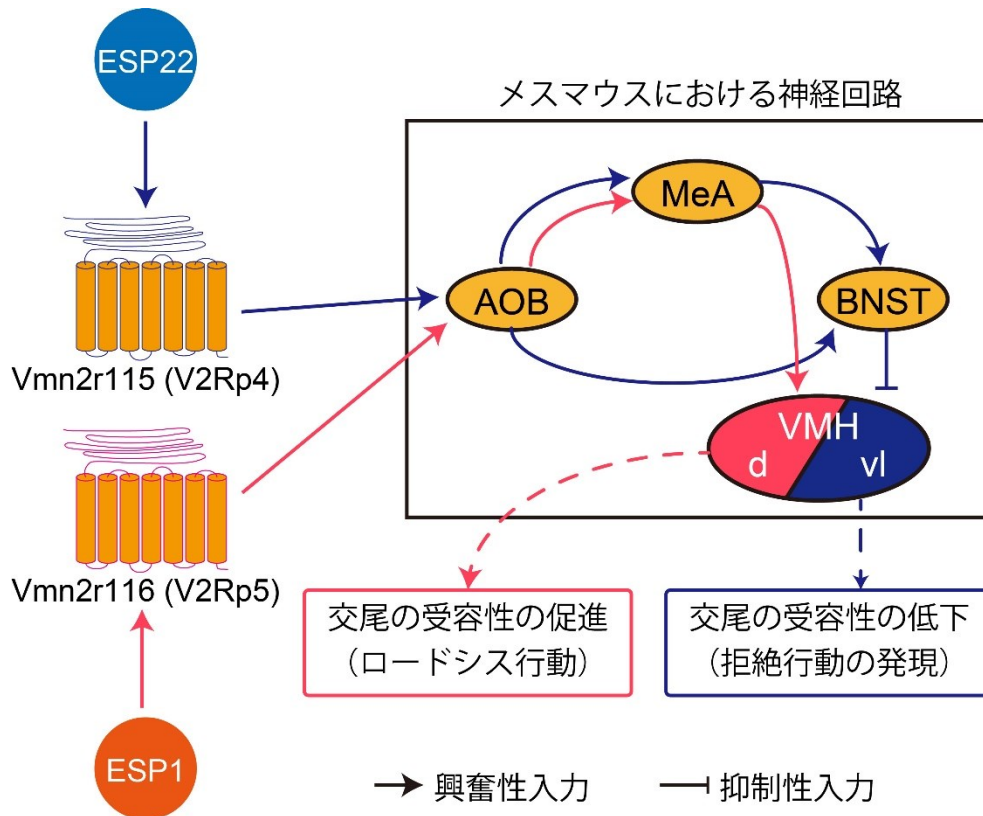


図 1-8. ESP1 と ESP22 の神経回路

ESP1 は Vmn2r116 を活性化し、メスの交尾の受け入れ行動を促進する。ESP22 は Vmn2r115 を活性化し、メスの交尾の受け入れを抑制する。ESP22 の回路は MeApv まで ESP1 のシグナルと平行した経路をたどった後、BNST の GABA 作動性神経細胞へと接続し、性行動に必須な VMH 腹外側領域 (VMHvl) の活動を抑制する (Osakada *et al.*, 2018)。

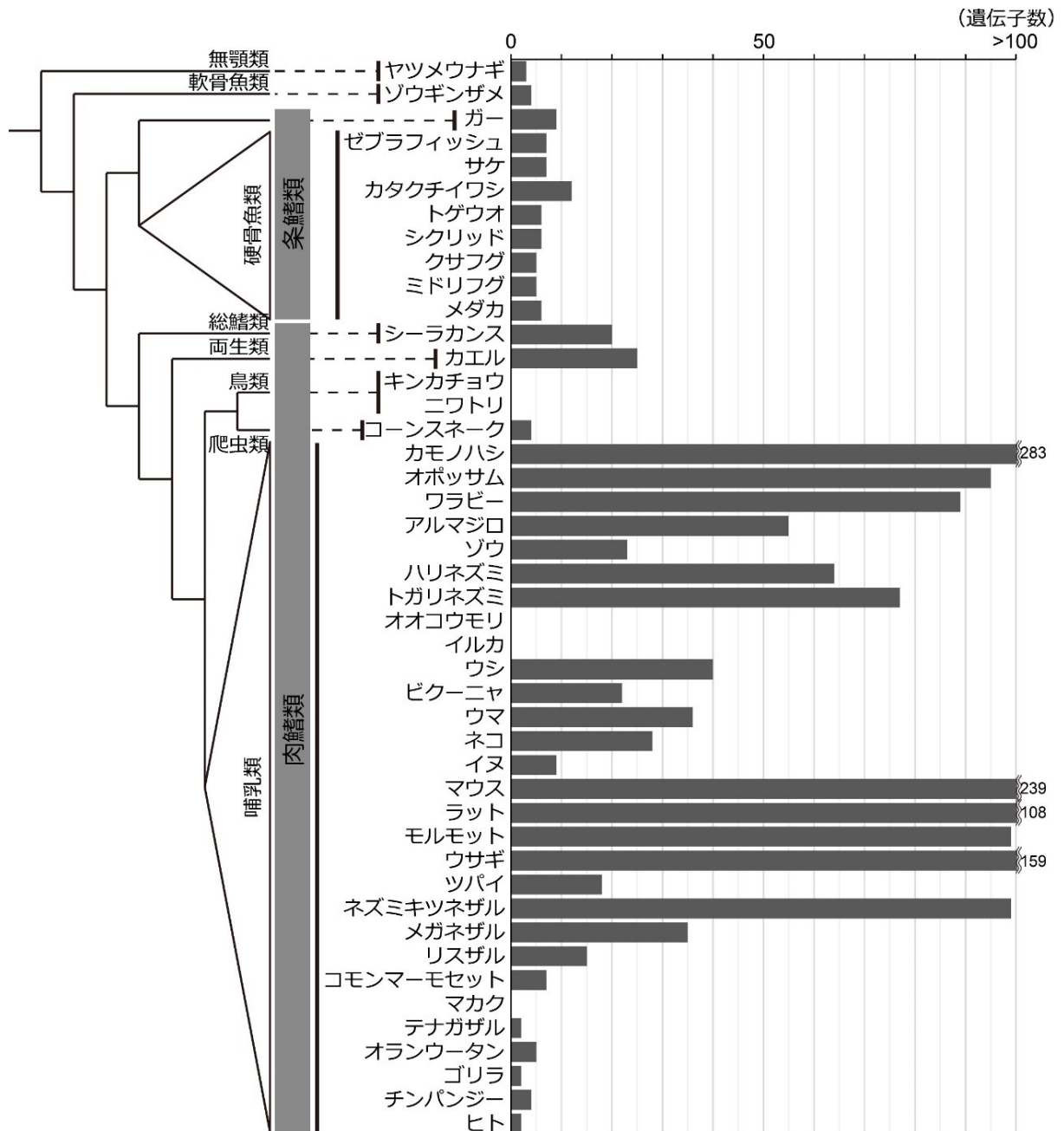


図 1-9. 脊椎動物の持つ *VIR* 遺伝子数

陸棲脊椎動物において *VIR* 遺伝子は数やレパートリーが種多様に富んでいる。哺乳類の中でも、283 個の *VIR* を有するカモノハシから *VIR* を持たないコウモリやイルカまで、種間で遺伝子数が大きく変化する。一方、硬骨魚類における多様性は乏しく、多くの種が 6 遺伝子を保有している (Nikaido, 2019)。

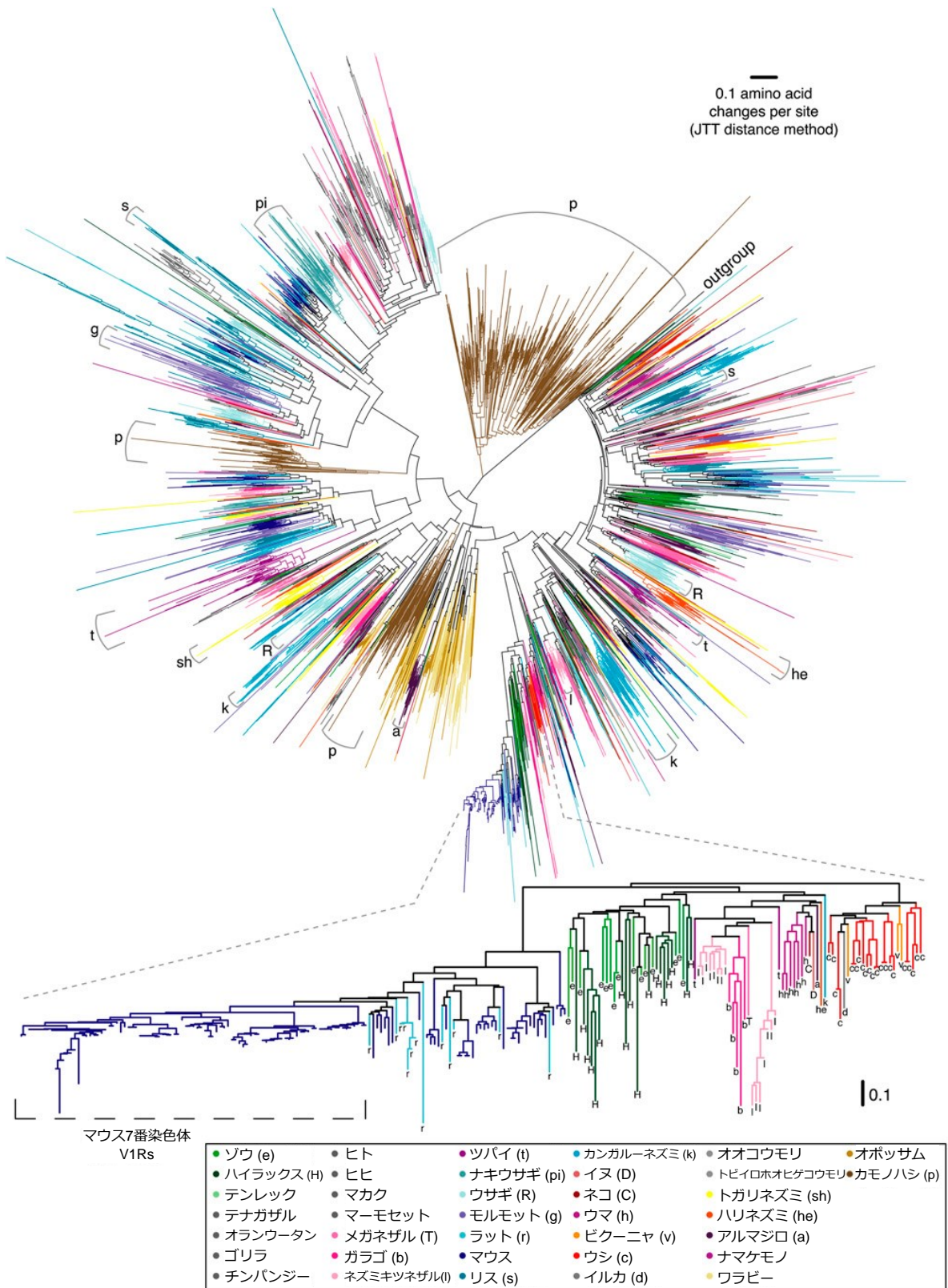


図 1-10. 哺乳類の持つ V1R の系統樹

37 種の哺乳類ゲノムに存在する 4954 個の V1R のアミノ酸配列から作製された系統樹。種特異的なクレードが多数生じており、陸棲脊椎動物において V1R の多様性が非常に高いことが示されている。このような V1R の種多様性はそれぞれの動物種に固有の化学コミュニケーションの確立に貢献していると考えられる (Young *et al.*, 2010)。

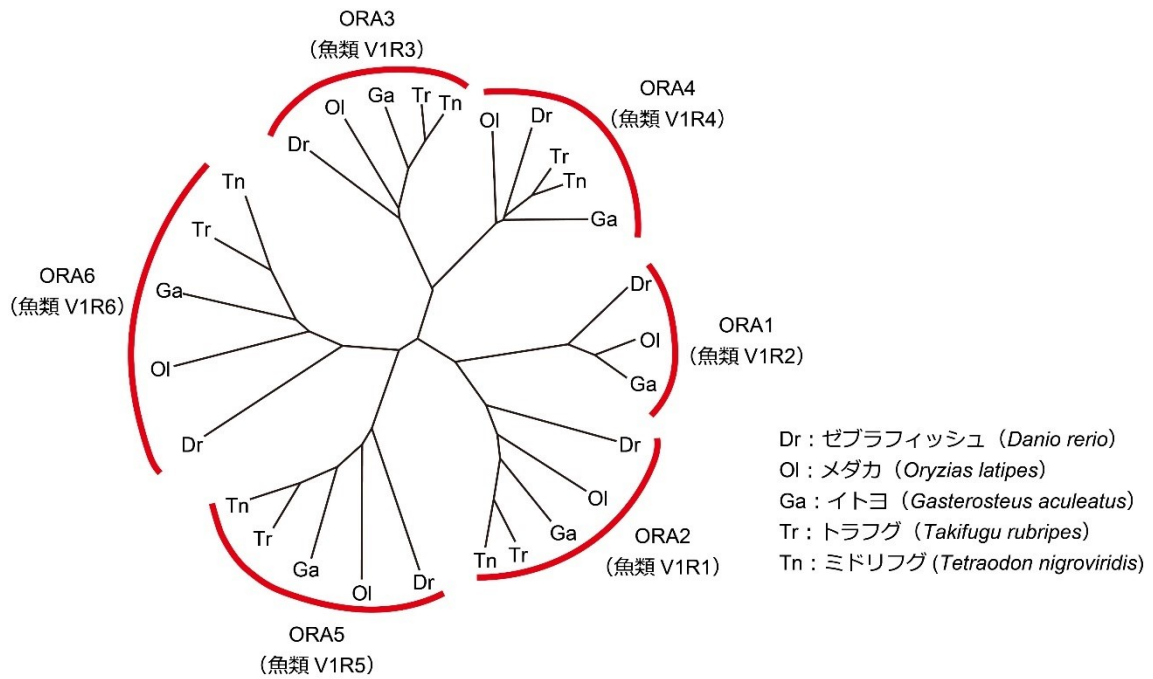


図 1-11. 魚類の持つ V1R (ORA) の系統樹

5 種の魚類から発見された 28 種類の ORA のアミノ酸配列から作製された系統樹。ORA1～ORA6 の 6 つの ORA を種間で共有しており、陸棲脊椎動物で V1R が多様化していることとは対称的である (Saraiva and Korsching, 2007)。

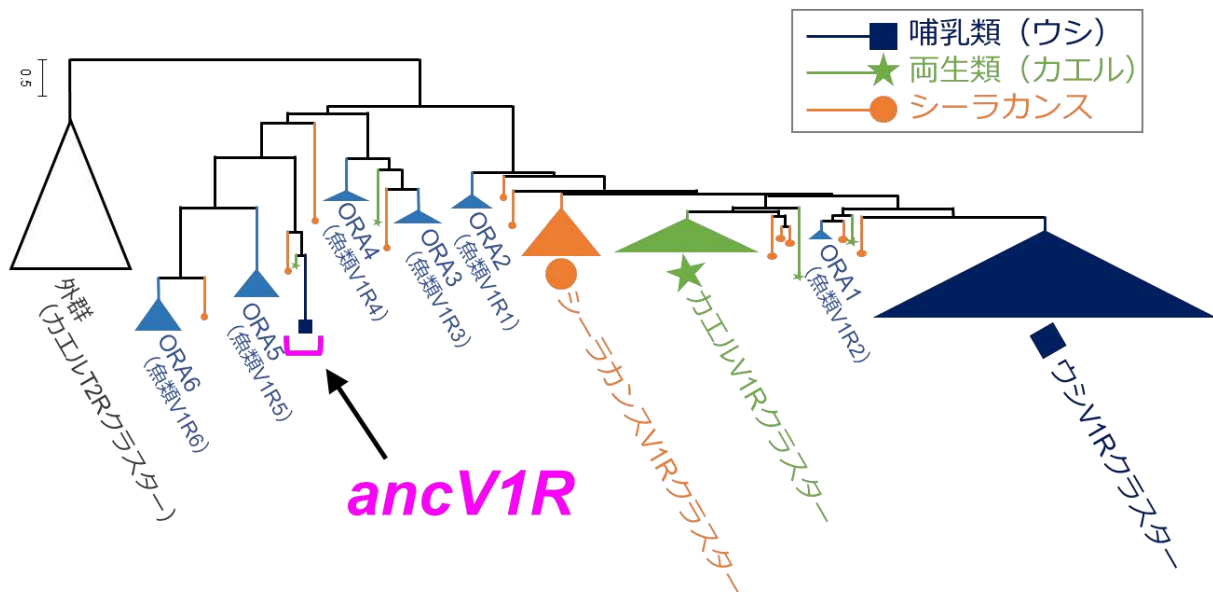


図 1-12. 脊椎動物の持つ V1R の系統樹

陸棲脊椎動物、魚類、および、シーラカンスの持つ V1R のアミノ酸配列から作製された系統樹。陸棲脊椎動物の持つ V1R は ORA1 と ORA2 の共通祖先に由来していることが示唆される。また、ORA5・ORA6 と姉妹関係にある新規の V1R 遺伝子が発見された。この遺伝子は、古代魚から哺乳類にわたって保存される例外的な V1R であり、「ancient V1R (ancV1R)」遺伝子と命名された (Nikaido *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2018)。

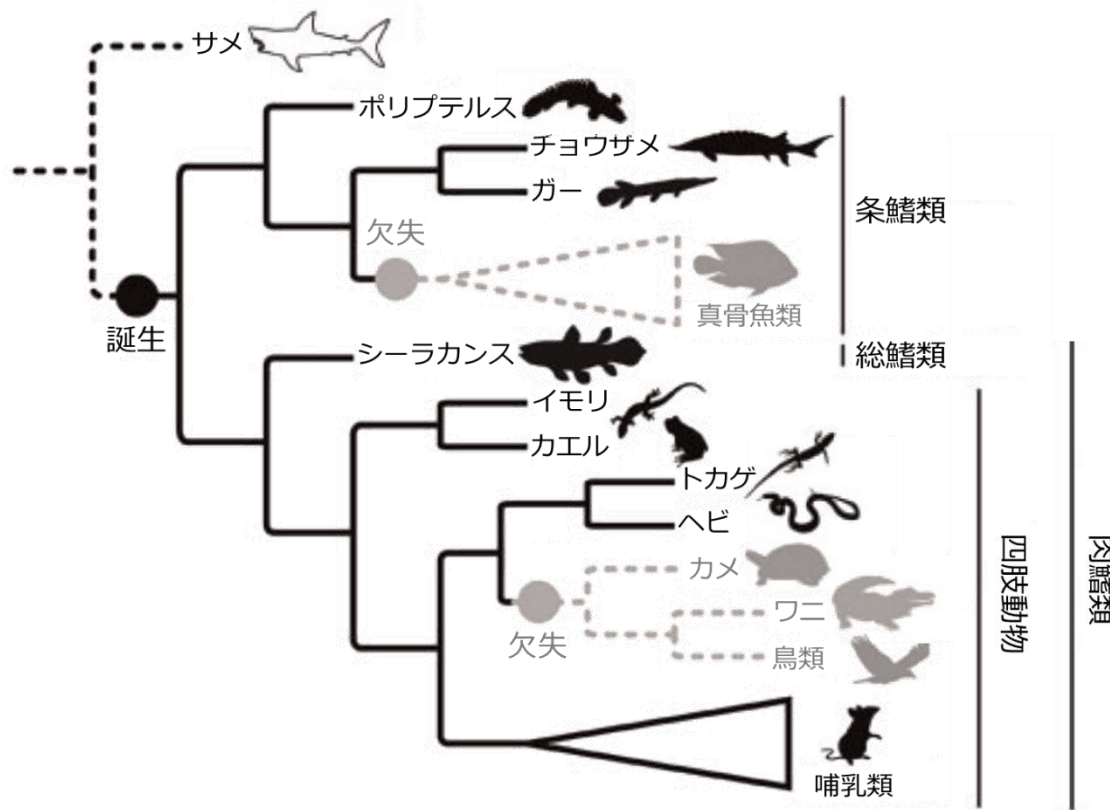


図 1-13. 鋤鼻器の退化と *ancVIR* の偽遺伝子化

黒で示す動物種はオープンリーディングフレームが完全な *ancVIR* 遺伝子を有する一方、灰色で示す動物種では機能的な *ancVIR* 遺伝子を有していない。真骨魚類では *ancVIR* 遺伝子配列が欠失しており、ワニやカメ、鳥類では偽遺伝子化している。哺乳類の中でも、イルカやクジラ、コウモリや霊長類ではそれぞれ *ancVIR* が偽遺伝子化している。これらの動物種は全て鋤鼻器を持っていない。鋤鼻器の退化と *ancVIR* の偽遺伝子化に密接な関係が認められる (Suzuki *et al.*, 2018)。

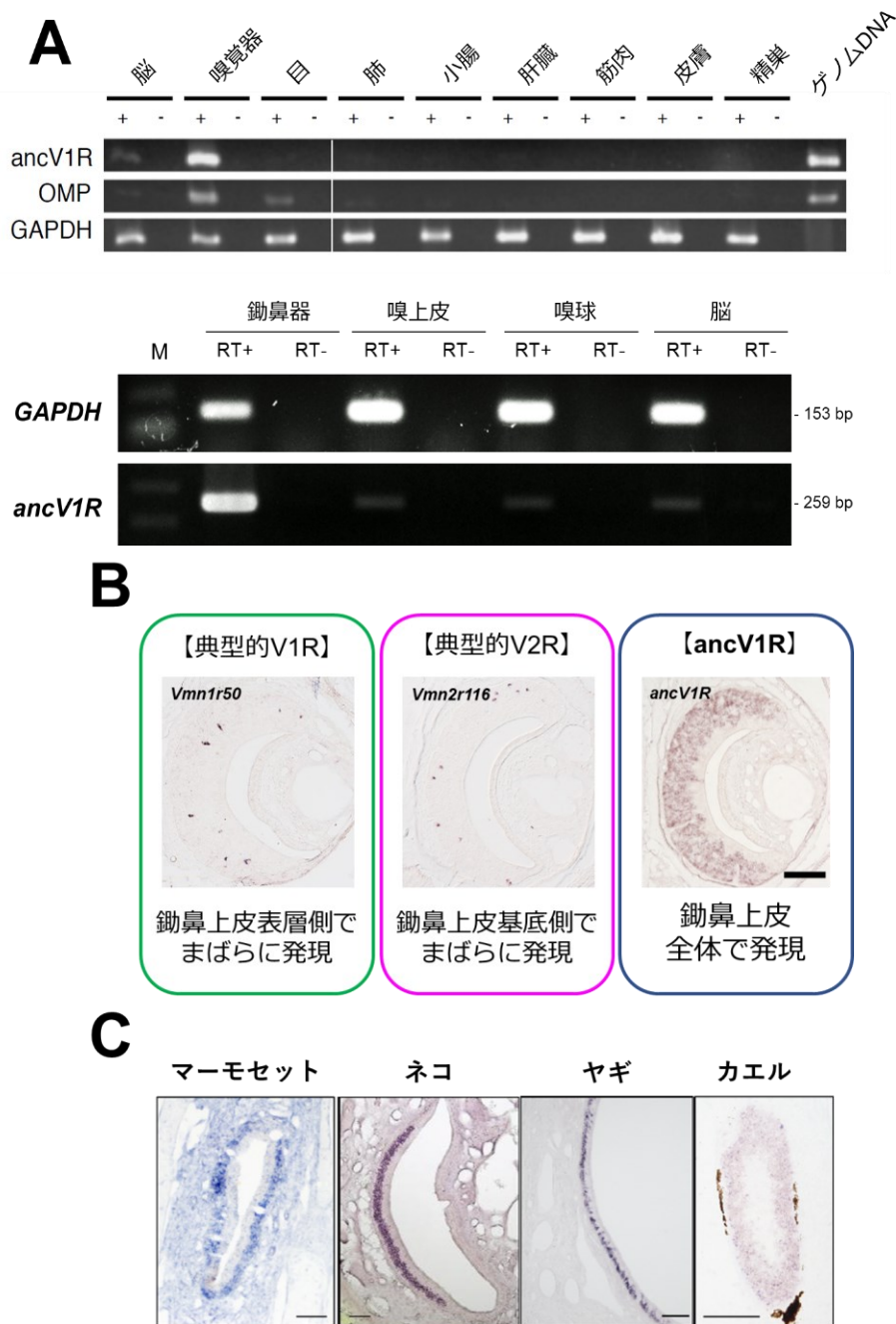


図 1-14. 鋤鼻器における *ancV1R* の発現

(A) ポリプテルス組織（上段）とマウス組織（下段）における *ancV1R* の発現を逆転写 PCR により解析した結果。*AncV1R* の発現は鋤鼻器に特異的である（M：マーカー；RT：逆転写反応）。

(B) マウス鋤鼻器における典型的 *V1R*、*V2R* と *ancV1R* の発現を *in situ* hybridization により解析した結果。通常、*V1R* は 1 つの神経細胞で 1 種類のみが選択的に発現するため、特定の受容体を発現する細胞は鋤鼻上皮上でまばらに認められる。それに対し *ancV1R* は鋤鼻上皮全体にわたって発現している（スケールバー、100  $\mu$ m）。

(C) マーモセットやネコ、ヤギやカエルでも *ancV1R* が鋤鼻上皮全体にわたって発現している様子が認められた（スケールバー、100  $\mu$ m）。（Suzuki *et al.*, 2018）

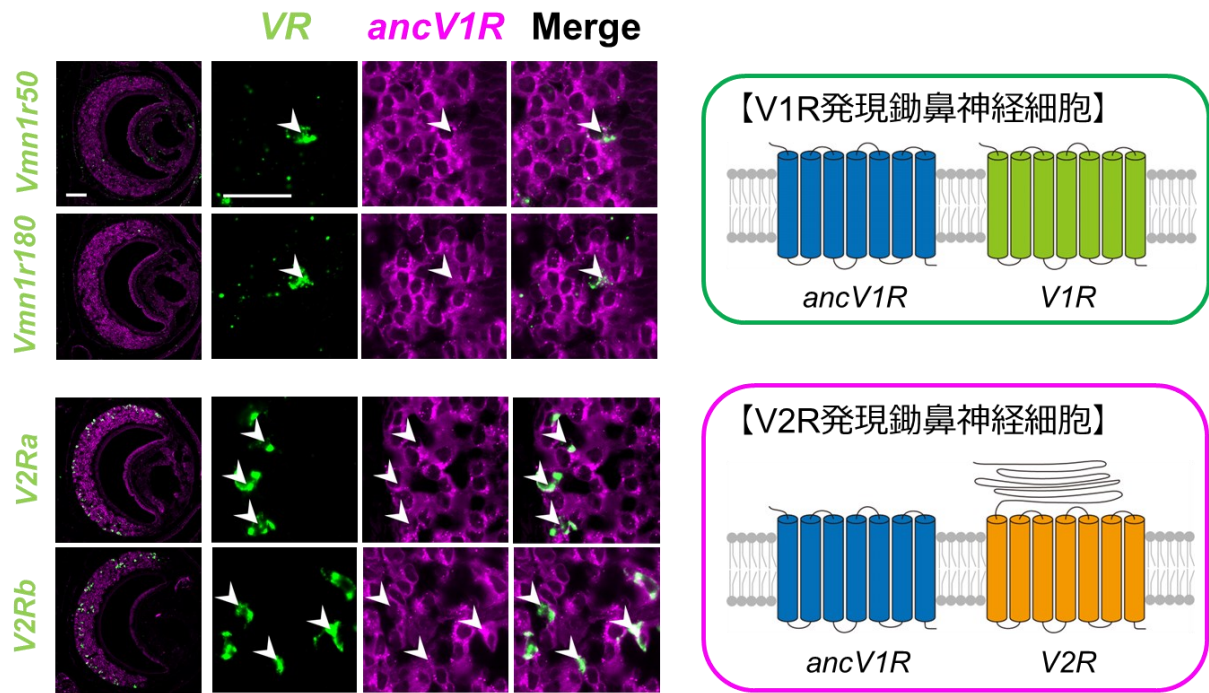


図 1-15. *ancV1R* と鋤鼻受容体の共発現

典型的な *V1R* (*Vmn1r50*、*Vmn1r180*)、*V2R* (*V2Ra*、*V2Rb*) と *ancV1R* の共発現を 2 color-*in situ* hybridization により解析した。その結果、それぞれ共染色された細胞 (矢じり) が認められ、*ancV1R* が他の *V1R*、*V2R* と共発現していることが明らかとなった (Suzuki *et al.*, 2018)。

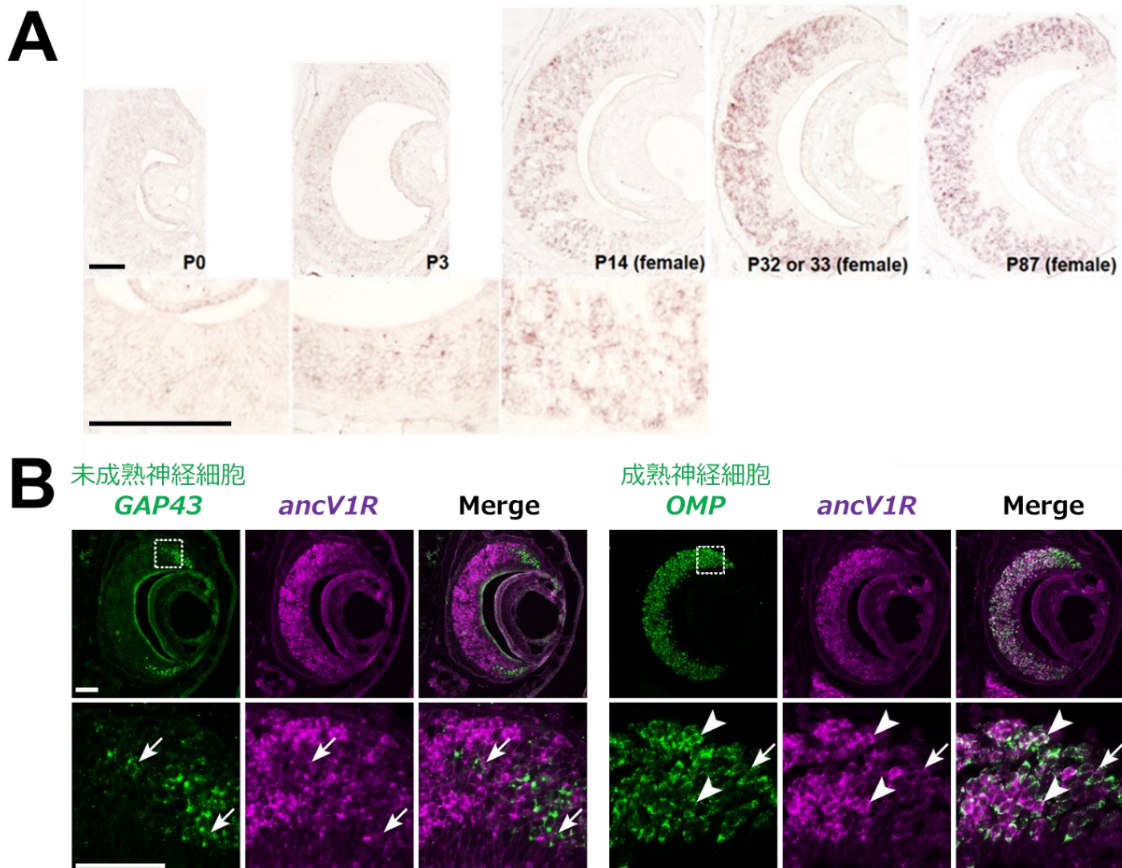


図 1-16. *ancV1R* の発現時期

(A) マウス鋤鼻器における *ancV1R* の発現を *in situ* hybridization により解析した結果、生後 3 日ごろから発現が認められ、成長とともに発現が強くなっていった (スケールバー、100  $\mu\text{m}$ )。

(B) *ancV1R* を発現する鋤鼻神経細胞の成熟段階を解析した結果。矢じりは共染色された細胞、矢印は分化マーカーのみ発現する細胞を示す。*AncV1R* は未成熟鋤鼻神経細胞マーカー *Gap43* と共発現せず、成熟鋤鼻神経細胞マーカー *OMP* との共発現が認められた。このことから、*ancV1R* は成熟した鋤鼻神経細胞で機能していることが示唆される (スケールバー、100  $\mu\text{m}$ )。 (Suzuki *et al.*, 2018)

表 1-1. これまでに同定されている鋤鼻受容体活性化物質 (Ishii and Touhara, 2018)

リガンド物質	分泌源	受容体	行動・生理応答	参考文献
2-heptanone	尿	Vmn1r49 他	メスの思春期の遅延	Novotny <i>et al.</i> , 1986
$\alpha$ -, $\beta$ -farnesenes	オス尿	V1Rs	メスの発情期の誘導 オス間攻撃行動の促進	Ma <i>et al.</i> , 1990 Novotny <i>et al.</i> , 1990
2-sec-butyl-dihydrothazole (SBT)	オス尿	V1Rs	メスの発情期の誘導 オス間攻撃行動の促進	Jemiolo <i>et al.</i> , 1985; 1986 Novotny <i>et al.</i> , 1985
2,3-dehydro-exo-brevicomine (DHB)	オス尿	V1Rs	メスの発情期の誘導 オス間攻撃行動の促進	Jemiolo <i>et al.</i> , 1985; 1986 Novotny <i>et al.</i> , 1985
MUP3	オス尿	V2Rs	オス間攻撃行動の促進	Kaur <i>et al.</i> , 2014
MUP20 (darcin)	オス尿	V2Rs	オス間攻撃行動の促進 メスの誘引行動、超音波発声、マーキング	Kaur <i>et al.</i> , 2014 Demir <i>et al.</i> , 2020
MUPs	オス尿	V2Rs	個体識別	Chamero <i>et al.</i> , 2007; Hurst <i>et al.</i> , 2001; Kaur <i>et al.</i> , 2014
MHC class I peptide	尿	V2Rs	個体識別	Leinders-Zufall <i>et al.</i> , 2004
ESP1	オス涙液	Vmn2r116	メスの交尾の受け入れ促進 オス間攻撃行動の促進 交配相手の識別 (Bruce 効果)	Kimoto <i>et al.</i> , 2005; Haga <i>et al.</i> , 2010. Hattori <i>et al.</i> , 2016 Hattori <i>et al.</i> , 2017
ESP22	幼若マウス涙液	Vmn2r115	オスの性行動の抑制 メスの交尾の受け入れ抑制	Ferrero <i>et al.</i> , 2013 Osakada <i>et al.</i> , 2018
sulphated estrogens	メス尿	Vmn1r85, 89	オスの性行動の促進	Haga-Yamanaka <i>et al.</i> , 2014
steroid carboxylic acids	メス尿	V1Rs	オスの性行動の促進	Fu <i>et al.</i> , 2015
Hemoglobin	血液	Vmn2r88	授乳期メスの穴掘り行動・立ち上がり行動	Osakada <i>et al.</i> , 2022
(未同定)	オス尿	Vmn2r53	経験依存的なオス間攻撃行動促進	Itakura <i>et al.</i> , 2022
Feld4	ネコ唾液	V2Rs	忌避行動	Papes <i>et al.</i> , 2010
CRP1	オスラット涙液	Vmn2r28	歩行運動の減少、体温・心拍数の低下	Tsunoda <i>et al.</i> , 2018
MgrB	腸内細菌	Fpr-rs1	忌避行動	Bufe <i>et al.</i> , 2019

表 1-2. 嗅覚系のシグナル伝達に関わる分子を欠損したマウスの行動異常

Trpc2-KO は鋤鼻神経細胞の活性化に重要なチャンネル Trpc2 を欠損したマウスを示している。Gα<sub>12</sub>-cKO、Gα<sub>o</sub>-cKO はそれぞれ V1R、V2R と共役する Gα タンパク質を嗅神経細胞特異的に欠損したマウスを示す。V1Ra,b-KO は V1R の a、b クレードに属する 16 個の V1R を欠損したマウス、H2Mv-KO は 9 個の H2-Mv を欠損したマウスを示す。Cnga2-KO は嗅神経細胞の活性化に重要なチャンネル Cnga2 を欠損し主嗅覚系のシグナル伝達を欠失したマウスを示す ([1] Martel and Baum, 2009; [2] Kimchi *et al.*, 2007; [3] Bean and Wysocki, 1989; [4] Pankevich *et al.*, 2004; [5] Tachikawa *et al.*, 2013; [6] Fraser and Shah, 2014; [7] Stowers *et al.*, 2002; [8] Leypold *et al.*, 2002; [9] Chamero *et al.*, 2007; [10] Wu *et al.*, 2014; [11] Trouillet *et al.*, 2021; [12] Trouillet *et al.*, 2019; [13] Oboti *et al.*, 2014; [14] Chamero *et al.*, 2011; [15] Del Punta *et al.*, 2002a; [16] Leinders-Zufall *et al.*, 2014; [17] Mandiyan *et al.*, 2005)。

	メスの行動				オスの行動			
	交尾の受け入れ (ロードシス)	オス様の性行動	新生仔の巣戻し行動	母性攻撃行動	メスに対する性行動	オスに対する性行動	オスへの攻撃行動	新生仔への攻撃行動
鋤鼻器切除マウス	減少[1]	発現[2], なし[1]	変化なし[3]	消失[3]	変化なし[2,4]	増加[2]	消失[2]	減少[5]
Trpc2-KO マウス	減少[6]	発現[2, 6]	変化なし[6]	消失[6]	変化なし[2]	増加[7, 8]	減少[7-9]	減少[10]
Gα <sub>12</sub> -cKO マウス	やや減少[11]	なし[11]	減少[11]	変化なし[11]	変化なし[12]	変化なし[12]	増加[12]	減少[12]
Gα <sub>o</sub> -cKO マウス	減少[13]	なし[13]	-	減少[14]	変化なし[14]	変化なし[14]	減少[14]	-
V1Ra,b-KO マウス	-	-	変化なし[15]	減少[15]	減少[15]	減少[15]	減少[15]	-
H2Mv-KO マウス	減少[16]	-	変化なし[16]	やや減少[16]	-	-	減少[16]	-
Cnga2-KO マウス	減少[6]	なし[6]	減少[6]	消失[6]	消失[17]	-	消失 [17, 18]	-

表 1-3. 脊椎動物種における *ancVIR* 遺伝子

オープンリーディングフレームが完全な *ancVIR* を持つ種は intact と表記し、偽遺伝子化している種では変異が生じているアミノ酸の位置 (a) と変異の種類 (b) を示す。複数のフレームシフト変異を有する場合は a を省略する。fs はフレームシフト変異、psdg は偽遺伝子、NF は *ancVIR* 配列がゲノム上に存在しないことを示し、ND は RNA-seq において *ancVIR* 配列が検出されなかったことを示す。(Suzuki *et al.*, 2018)

種名	科名	(a, b)	異節上目	科名	状態
Homo sapiens	ヒト	144, stop	Dasyptus novemcinctus	アルマジロ	intact
Pan troglodytes	チンパンジー	144, stop	Choloepus hoffmanni	ナマケモノ	intact
Gorilla gorilla	ゴリラ	144, stop	アフリカ獣上目		
Pong abelii	オランウータン	144, stop	Loxodonta africana	ゾウ	intact
Normascus leucogenys	テナガザル	108, stop	Procavia capensis	ハイラックス	intact
Chlorocebus sabaeus	ベルベットモンキー	123, fs	Trichechus manatus	マナティー	psdg
Paplo hamadryas	ヒヒ	123, fs	Orycteropus afer	ツチブタ	intact
Macaca mulatta	マカク	124, fs	Echinops telfairi	ヒメハリテンレック	intact
Callithrix jacchus	マーモセット	intact	Chrysochloris asiatica	ケープゴールデンモグラ	intact
Salmiri Boliviensis	リスザル	intact	Elephantulus edwardii	ケープソウトガリネズミ	intact
Tarsius syrichta	メガネザル	intact	有袋類		
Otolemur garnettii	ガラゴ	intact	Macropus eugenii	ウラビー	intact
登木目			Sarcophilus harrisii	タスマニアデビル	intact
Tupaia chinensis	シナトガリネズミ	intact	Monodelphis domestica	オボッサム	intact
皮膚目			哺乳類		
Galeopterus variegatus	マレーヒヨケザル	intact	Ornithorhynchus anatinus	カモノハシ	intact
齧歯目			爬虫類		
Mus musculus	マウス	intact	Anolis carolinensis	アノールトカゲ	intact
Rattus norvegicus	ラット	intact	Pantherophis guttatus	コーンスネーク	intact
Mesocricetus auratus	ゴールデンハムスター	intact	Ophiophagus hannah	キングコブラ	intact
Cricetulus griseus	チャイニーズハムスター	intact	Chrysemys picta belli	ニシキガメ	psdg
Microtus ochrogaster	アメリカ平原ハタネズミ	intact	Pelodiscus sinensis	スッポン	psdg
Jaculus jaculus	ヒメミユビトビネズミ	intact	Alligator mississippiensis	アメリカアリゲーター	psdg
Dipodomys ordii	カンガルーネズミ	intact	Alligator sinensis	ヨウスコウアリゲーター	psdg
Heterocephalus glaber	ハダカデバネズミ	intact	鳥類		
Cavia porcellus	モルモット	intact	Gallus gallus	セキショクヤケイ	psdg
Spermophilus tridecemlineatus	リス	intact	Anas platyrhynchos	マガモ	psdg
兔形目			Taeniopygia guttata	キンカチヨウ	psdg
Oryctolagus cuniculus	ウサギ	intact	Ficedula albicollis	ヒタキ	psdg
Ochotona princeps	ナキウサギ	intact	Meleagris gallopavo	シチメンチヨウ	psdg
真無盲腸目			両生類		
Cyanocitta cristata	ホシバナモグラ	intact	Xenopus tropicalis	ネットタイツメガエル	intact
Vicugna pacos	アルパカ	intact	Xenopus laevis_a	アフリカツメガエル	intact
Sus scrofa	ブタ	intact	Xenopus laevis_b	アフリカツメガエル	psdg
Giraffa camelopardalis	キリン	intact	Cynops pyrrhogaster	アカハライモリ	intact
Capra hircus	ヤギ	intact	シラカンス目		
Ovis aries	ヒツジ	intact	Latimeria chalumnae	シラカンス	intact
Bos taurus	ウシ	intact	ガ目		
Hippopotamus amphibius	カバ	intact	Lepisosteus oculatus	スポッテッドガー	intact
Lipotes vexillifer	ヨウスコウイルカ	93, fs	チョウザメ目		
Orcinus orca	シャチ	94, fs	Acipenser sp.	チョウザメ	intact
Tursiops truncatus	ハンドウイルカ	95, fs	ポリプテルス目		
Balaenoptera acutorostrata	ミンククジラ	96, fs	Polypterus senegalus	ポリプテルス	intact
Balaenoptera bonaerensis	クロミンククジラ	97, fs	真骨魚類		
Physeter catodon	マッコウクジラ	98, fs	Astyanax mexicanus	Mexican cave fish	NF
Balaena mysticetus	ホッキョククジラ	99, fs	Danio rerio	ゼブラフィッシュ	NF
食肉目			Fundulus heteroclitus	キリフィッシュ	NF
Felis catus	ネコ	intact	Gasterosteus aculeatus	トゲウオ	NF
Canis lupus familiaris	イヌ	intact	Haplochromis chilotes	シクリッド	NF
Ailuropoda melanoleuca	パンダ	intact	O. niloticus	ティラピア	NF
Odobenus rosmarus divergence	太平洋セイウチ	intact	Oryzias latipes	メダカ	NF
Leptonychotes weddellii	ウェッデルアザラシ	intact	Poecilia formosa	アマゾンモーリー	NF
Mustela putorius furo	フェレット	intact	Tetraodon nigroviridis	ミドリフグ	NF
鱗甲目			Salmo salar	タイセイヨウサケ	NF
Manis pentadactyla	ミミセンザンコウ	intact	Xiphophorus maculatus	サザンブラディフィッシュ	NF
奇蹄目			Pantodon buchholzi	バタフライフィッシュ	ND
Equus caballus	ウマ	intact	Paprocraus afer	アロワナナイフフィッシュ	ND
Ceratotherium simum simum	サイ	intact	Osteoglossum bicirrhosum	シルバーアロワナ	ND
翼手目			軟骨魚類		
Pteropus alecto	クロオオコウモリ	psdg	Callorhynchus millii	ゾウギンザメ	NF
Pteropus vampyrus	Java fruit bat	psdg	円口類		
Rhinolophus ferrumequinus	キクガシラコウモリ	psdg	Petromyzon marinus	ウミヤツメ	NF
Myotis brandti	ウスリホオヒゲコウモリ	psdg			
Myotis davidii	David's myotis	psdg			
Myotis lucifugus	トビイロホオヒゲコウモリ	psdg			
Miniopterus natalensis	ナタールユビナガコウモリ	intact			
Desmodus rotundus	ナミチスイコウモリ	intact			

## 第二章

ancV1R 欠損がメスの性行動に与える影響

## 2-1. 目的

本章では、新規鋤鼻受容体候補分子 **ancV1R** の機能解明を目的として、**ancV1R** 欠損マウスの表現型解析に取り組んだ。具体的には、まずメスマウスの行動に着目し、**ancV1R** の欠損が性行動や異性の識別に与える影響を解析した。次に、フェロモン刺激を与えた際の鋤鼻器の生理学的応答と、鋤鼻受容体の遺伝子発現を解析した。

## 2-2. 実験手法

### 2-2-1. マウス

本研究で使用したマウスは全て、12時間の明暗サイクル（7:00～19:00）で水や餌に自由に摂取できる環境で飼育した。動物実験は「東京工業大学動物実験等管理規則」に基づき承認申請をおこない、動物実験安全委員会の承認を得た。また、動物の飼育・保管、および実験にあたっては、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、その他関連法規を遵守した。

**AncV1R** 欠損 (**ancV1R**<sup>-/-</sup>) マウスは、当研究室岩田博士らによって CRISPR-Cas9 ゲノム編集を用いて作出された（図 2-1、2）。本 **ancV1R**<sup>-/-</sup> マウスは、**ancV1R** (*Mus musculus predicted gene Gm50457*, NCBI accession number: NM\_001367923) の推定第二細胞外領域をコードする塩基配列のうちの 22 bp (GRCm39/mm39, chr18:52,958,600-52,958,621) を欠失しており、フレームシフト変異によって第三膜貫通ドメイン手前で転写終結配列が現れ、**ancV1R** の機能が欠損する。変異マウスの遺伝子型は PCR によって決定した。遺伝子型判定に使用したプライマーとして、**ancV1R** 欠損アレルの検出には 5'-GGCACAATTCAGCATCTACC と 5'-CTGTAGTGAAGTGCAGAGCAAG (**ancV1R** 欠損アレル、254 bp 増幅；野生型アレル、増幅なし)、野生型アレルの検出には 5'-GGCACAATTCAGCATCTACC と 5'-GCTTTGCAGCCAACGGAGTC (**ancV1R** 欠損アレル、増幅なし；野生型アレル、259 bp 増幅) を用いた。この変異体マウスを C57BL/6J 系統と 9～10 世代戻し交配し、**ancV1R** 欠損マウスとして使用した。

表 2-1. 遺伝子型判定に用いた PCR プライマー

プライマー名	方向	配列	アニーリング温度、時間	増幅サイズ (野生型マウスゲノム)	増幅サイズ ( <b>ancV1R</b> 欠損マウスゲノム)
J842_ancV1R_F	Forward	5'-GGCACAATTCAGCATCTACC	58℃、30 秒	(なし)	254 bp
J1048_ancV1R_Rmut2	Reverse	5'-GCTTTGCAGCCAACGGAGTC			
J842_ancV1R_F	Forward	5'-GGCACAATTCAGCATCTACC	58℃、30 秒	259 bp	(なし)
J1047_ancV1R_Rwt	Reverse	5'-CTGTAGTGAAGTGCAGAGCAAG			

### 2-2-2. *In situ* hybridization

*Ascl1*、*Neurog1*、*Neurod1*、*Gap43*、および *Omp* に対するリボプローブの情報は Hirota and Mombaerts, 2004 に記載されている。*Gα<sub>i2</sub>*、および *Gα<sub>o</sub>* に対するプローブはマックス・プランク生物物理学研究所、Mombaerts 博士より提供いただいた (Rodriguez *et al.*, 2002; Ishii *et al.*, 2003)。*Vmn2r116* に対するプローブは東京大学、東原博士より提供いただいた (Haga *et al.*, 2010)。*Egr1* に対するプローブは嗅上皮の cDNA ライブラリーより PCR で増幅して pGEM-T

easy vector (Promega, A1360) にクローニングし、遺伝子配列を確認した。*Egr1* プローブはおよそ 3 kb の *Egr1* mRNA の全長をカバーするために 3 つから構成される。RNA プローブは T3、T7、または、Sp6 RNA ポリメラーゼ (Roche, 11031163001; 10881767001; 10810274001) を用いて *in vitro* 転写反応により、UTP をジゴキシゲニン (DIG) またはフルオレセイン (Flu) で標識し合成した。

**表 2-2. *In situ* hybridization に用いたプローブ**

遺伝子名	プローブ配列	クローニング
<i>Ascl1</i> ( <i>Mash1</i> )	1674 bp full-length	Guillemot and Joyner, 1993
<i>Neurog1</i> ( <i>Ngn1</i> )	U63841, nt 111-811	Hirota and Mombaerts, 2004
<i>Neurod1</i>	coding region (695 bases)	Guillemot and Joyner, 1993
<i>Gap43</i>	NM_008083, nt 147-860	Hirota and Mombaerts, 2004
<i>Omp</i>	U01213, nt 820-2891	Hirota and Mombaerts, 2004
<i>Gα<sub>2</sub></i>	XM135080, nt 218-1109	Ishii <i>et al.</i> , 2003
<i>Gα<sub>o</sub></i>	NM010308, nt 226-1859	Ishii <i>et al.</i> , 2003
<i>Vmn2r116</i>	NM_001104580, nt1-397 (+5' UTR) (499 bp)	Haga <i>et al.</i> , 2010
<i>Egr1#1</i>	NM_007913.5, nt 369-1219	本研究にてクローニング
<i>Egr1#2</i>	NM_007913.5, nt 1200-2188	本研究にてクローニング
<i>Egr1#3</i>	NM_007913.5, nt 2169-3048	本研究にてクローニング
<i>Vmn1r237</i> ( <i>V1rf3</i> )	NM_134200.1, nt 1-870	本研究にてクローニング

固定切片の調製は、8 週齢以上のマウスをイソフルランの吸引麻酔、および、アバーチン (1 mg/mL 2,2,2-トリブromoエタノール (Tokyo Chemical Industry) /2-メチルブタン-2-オール (Wako) を 1.25% の濃度でリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶解) の腹腔投与による麻酔後、4% パラホルムアルデヒド (PFA, Wako) /PBS で灌流固定しおこなった。頭部、または、脳を摘出して 4% PFA/PBS に 4°C で一晩浸漬した後固定した。頭部組織は 0.45 M EDTA/PBS に浸漬し脱灰処理した。その後、15% スクロース/PBS、30% スクロース/PBS に浸漬し凍結保護し、組織を FSC22 Frozen Section Media (Leica Biosystems, 3801481) に包埋した。クライオスタット (Microm HM505E; PHC HM525NX) を用いて 12 μm 厚の冠状切片を作製し、MAS-coat glass slide (Matsunami, 59441) に貼り付けた。Fresh-frozen 切片の作製については、マウスをアバーチンの腹腔投与により麻酔後、断頭し、摘出した鋤鼻器を氷冷した PBS 中で解剖して FSC22 Frozen Section Media に包埋した。クライオスタットを用いて 12 μm 厚の冠状切片を作製し、MAS-coat glass slide に貼り付けた。

固定切片の単色 *in situ* hybridization は Enomoto *et al.*, 2011、Ishii *et al.*, 2003 に記載される手法に従いおこなった。特筆しない限り、操作は室温にておこなっている。組織切片を 4% PFA/PBS に 15 分間浸漬し、PBS で 3 分間洗浄、10 μg/mL protease K (Invitrogen) /TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA) に 37°C で 12 分間浸漬して透過処理し、4% PFA/PBS に 10 分間浸漬、PBS で 3 分間洗浄、0.2 M HCl に 10 分間浸漬し、PBS で 3 分間洗浄した。次に、0.1 M トリエタノールアミン-HCl に 1 分間浸漬した後、0.25% (v/v) で無水酢酸を加えてアセチル化処理を 10 分間おこない、PBS に 3 分間洗浄した。60%、80%、95%、100%、100% エタノールに 3 分ずつ浸漬し脱水処理し、乾燥させた。ハイブリダイゼーションバッファー (50% ホルムアミ

ド (Sigma-Aldrich) ; 10 mM Tris-HCl; 200 µg/mL yeast tRNA (Sigma-Aldrich) ; 10%デキストラン硫酸 (pK Chemicals) ; 1×Denhardt's 溶液 (Sigma-Aldrich) ; 600 mM NaCl; 0.25% SDS; 1 mM EDTA) にリボプローブを 1:200 で溶解したプローブ溶液を、乾燥させた組織切片に乗せて、50%ホルムアミドで満たしたチャンバーに入れ、65°Cで 16 時間以上ハイブリダイゼーションをおこなった。ハイブリダイゼーション後、5×SSC (standard saline citrate, 75 mM クエン酸ナトリウム; 750 mM NaCl) に 65°Cで浸漬、2×SSC-ホルムアミド (30 mM クエン酸ナトリウム; 300 mM NaCl; 50%ホルムアミド) に 65°Cで 30 分間浸漬し洗浄した。次に、37°Cの TNE (10 mM Tris-HCl (pH 7.4); 500 mM NaCl; 1 mM EDTA (pH 8.0)) に 10 分間浸漬、20 µg/mL RNaseA (Sigma-Aldrich) /TNE で 37°C、30 分間処理し、TNE で 37°C、10 分間洗浄した。続いて、2×SSC (30 mM クエン酸ナトリウム; 300 mM NaCl)、0.2×SSC (3 mM クエン酸ナトリウム; 30 mM NaCl)、0.1×SSC (1.5 mM クエン酸ナトリウム; 15 mM NaCl) に 65°Cで 20 分間ずつ浸漬して洗浄し、DIG1 (100 mM Tris-HCl (pH7.4); 150 mM NaCl; 0.01% Tween20) に浸漬した。組織切片を 1.0% (w/v) blocking reagent (Roche, 1096176) /DIG1 で 1 時間ブロッキングした後、アルカリホスファターゼ結合抗 DIG 抗体 (Roche, 11093274910, 1:1,000 diluted in 1.0% blocking reagent) で 2 時間インキュベートした。DIG1 で 10 分間の洗浄を 4 回おこない、detection buffer (100 mM Tris-HCl (pH 9.5); 100 mM NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.01% Tween20) に 10 分間浸漬した後、NBT/BCIP (Roche, 11681451, 1:50 diluted in detection buffer) で 16 時間以上インキュベートし発色反応をおこなった。染色後の切片は乾燥させた後、封入剤 Entellan New Mounting Media (Merck Millipore, 107961) を用いて封入した。

Fresh-frozen 切片を用いた *in situ* hybridization は Ohmoto *et al.*, 2008、Ohmoto *et al.*, 2020 に記載される方法に従いおこなった。組織切片を 4% PFA/PBS に 10 分間浸漬して固定後、0.1% ジエチルピロカルボネート (Nakarai) /PBS に 15 分間、2 回浸漬しカルボキシル化処理し、5×SSC で洗浄した。組織切片にプレハイブリダイゼーションバッファー (50%ホルムアミド; 5×SSC; 40 µg/mL herring sperm DNA (Promega)) を乗せて 63°Cでプレハイブリダイゼーション処理をおこなった。その後、ハイブリダイゼーションバッファー (50%ホルムアミド; 5×SSC; 5×Denhardt's 溶液; 250 µg/mL yeast tRNA; 500 µg/mL herring sperm DNA; 1 mM ジチオスレイトール) にリボプローブを 1:200 で溶解したプローブ溶液を乗せて 63°Cで 16 時間以上ハイブリダイゼーションをおこなった。ハイブリダイゼーション後、63°Cの 5×SSC に 10 分間、2 回浸漬、0.2×SSC に 30 分間、2 回浸漬して洗浄し、TBST (0.05% Tween20 含有 Tris 緩衝生理食塩水) に浸漬した。組織切片を 0.5% blocking reagent で 1 時間ブロッキングし、アルカリホスファターゼ結合抗 DIG 抗体 (1:500 diluted in 0.5% blocking reagent) を乗せて 90 分間インキュベートした。その後、TBST で 10 分間 4 回洗浄し、detection buffer に 10 分間浸漬した後、NBT/BCIP で 16 時間以上インキュベートし発色反応をおこなった。染色後の組織は封入剤 Fluoromount mounting media (Diagnostic BioSystems, K024) を用いて封入した。

二色 *in situ* hybridization では Flu 標識プローブと DIG 標識プローブを蛍光で検出した。上記の単色 *in situ* hybridization と同様の手順で RNA プローブのハイブリダイゼーション、洗浄、ブロッキング処理をおこなった切片に、ビオチン結合抗 Flu 抗体 (Vector Laboratories, BA-0601, 1:500 diluted in blocking solution) で 2 時間インキュベート、ペルオキシダーゼ結合アビジン-

ビオチン酵素複合体 (ABC-HRP, Vector, VECTASTAIN Elite ABC Kit) で 30 分間インキュベートし、チラミドシグナル増幅 (TSA-plus biotin, Akoyo Biosciences, NEL749B001KT, 1:50 dilution) を 10 分間おこなった後、3% 過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) /PBS に 1 時間浸漬して HRP を失活させた。次に、HRP 結合抗 DIG 抗体 (Roche, 11207733910, 1:500 diluted in blocking solution) を乗せて 4°C で一晩インキュベートし、チラミドシグナル増幅 (TSA-plus Cyanine 3 solution, Akoyo Biosciences, NEL744001KT, 1:50 dilution) で 10 分間発色した。その後、Alexa Fluor 488 結合ストレプトアビジン (Thermo Fisher Scientific, 1:500 in TBS with 0.05% Tween20) で 2 時間インキュベートし発色した。最後に、4'-ジアミノ-2-フェニルインドールジヒドロクロリド (DAPI, VECTOR, 2 µg/mL) による対比染色をおこなった。

単色 *in situ* hybridization の明視野画像は DP74 デジタル CCD カメラ (Olympus) 搭載 Olympus BX51 microscope により取得した。蛍光画像は、405、488、532 nm 励起レーザー搭載 Leica SPE confocal microscope で、10×/0.3NA 対物レンズ、40×/1.15NA 油浸対物レンズを用いて取得した。共焦点顕微鏡により、15 µm の範囲の z-stack を 3 枚、または、9 µm の範囲の z-stack を 5 枚撮影し (scan speed, 400 Hz; averaging, 4 times)、ImageJ/Fiji (NIH) により最大値投影画像を出力し解析に使用した。鋤鼻受容体発現細胞数、*Omp* 発現細胞数、*Gα<sub>i2</sub>* 共発現細胞の定量では、鋤鼻器全体から 15 枚に 1 枚ずつ冠状切片 (12 µm 厚) を採取し、3 切片中のシグナル陽性細胞数を定量し、切片 1 枚当たりの平均値を算出した。

### 2-2-3. 免疫組織化学

抗 ancV1R 抗体は、株式会社スクラムに依頼し作製した抗ペプチド抗血清から精製した。AncV1R 推定アミノ酸配列の C 末端部分のペプチド配列 (CGVQREKSTPQPP) を抗原としてウサギに免疫し、63 日後に全採血がおこなわれた。抗血清サンプルから抗 ancV1R 抗体を Sulfolink Immobilization Trial Kit (Thermo Scientific, 20325) を用いて精製した。免疫に使用した合成ペプチドを結合させたカラムに抗血清 7 mL を通した後、0.1 M グリシン-HCl (pH 2.5) で溶出し、溶出液を 1 M リン酸緩衝液 (pH 8.8) で中和した。精製した抗 ancV1R 抗体溶液は NaN<sub>3</sub> を終濃度 0.05% (w/v) で添加した。

抗 ancV1R 抗体の免疫組織化学では、fresh-frozen 切片を用いておこなった。8 週齢以降のマウスから摘出した鋤鼻器を Frozen Section Media (Leica Biosystems) に包埋して -80°C で凍結し、クライオスタットで 12 µm 厚の冠状切片を作製した。特筆しない限り操作は室温でおこなった。組織切片を 100% メタノールで 10 分間固定後、0.2% TritonX-100/PBS に 30 分間浸漬して透過処理し、PBST (0.01% Tween20 含有リン酸緩衝生理食塩水) に浸漬した。組織切片を 10% (v/v) 正常ウマ血清で 1 時間ブロッキングし、抗 ancV1R 抗体 (1:200 diluted in 10% normal horse serum) を乗せ 4°C で 16 時間インキュベートした。Villin との共免疫染色では、抗 ancV1R 抗体と抗 villin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, sc-7672, goat, 1:100 in 10% normal horse serum) を乗せ 4°C で 16 時間インキュベートした。その後、PBST で 10 分間、3 回洗浄し、Alexa Fluor 488 結合抗ウサギ IgG 抗体 (Abcam, ab181346, 1:500 diluted in 10% normal horse serum) を乗せて 2 時間インキュベートした。Villin との共免疫染色では、Alexa Fluor 555 結合抗ヤギ抗体 (Abcam, ab150138, 1:500 in 10% normal horse serum) を加えて抗 villin 抗体を検出した。洗浄

後、2 µg/mL 4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI, VECTOR) で対比染色した。染色した組織を封入剤 Fluoromount (Diagnostic BioSystems) で封入した。

Vmn2r116 の免疫組織化学には、抗 Vmn2r116 抗体 (東京大学、東原博士より提供、Haga *et al.*, 2010) を用いた。8 週齢以上のマウスをイソフルランの吸引麻酔、および、アバーチンの腹腔投与による麻酔後、4% PFA/PBS で灌流固定し、頭部を摘出して 4% PFA/PBS に 4°C で 20 分間後固定した。0.45 M EDTA/PBS に浸漬し脱灰処理し、15% スクロース/PBS、30% スクロース/PBS に浸漬し凍結保護をおこなった。組織を FSC22 Frozen Section Media に -80°C で包埋し、クライオスタットを用いて 12 µm 厚の冠状切片を作製した。作製した組織切片を PBS で洗浄し、0.1% Triton X-100/PBS で 5 分間透過処理後、PBST (0.01% Tween20/PBS) に浸漬した。組織切片を 10% 正常ウマ血清で 1 時間ブロッキングし、抗 Vmn2r116 抗体 (1:1,000) を乗せて 4°C で 16 時間以上インキュベートした。PBST で 10 分間、3 回洗浄した後、Alexa Fluor 488 結合抗ウサギ IgG 抗体 (Abcam, 1:500) で 2 時間インキュベートした。洗浄後、2 µg/mL DAPI で対比染色した。染色した組織を封入剤 Fluoromount (Diagnostic BioSystems) で封入した。

リン酸化リボソームタンパク質 S6 (pS6) の免疫染色では、灌流固定後に 3 時間の後固定をおこなった鋤鼻組織の凍結切片を用いた。組織切片を 4% PFA/PBS で 15 分間固定し、0.3% Triton X-100/PBS で 10 分間透過処理、PBST (0.01% Tween20/PBS) に浸漬した。切片を 3% ウシ血清アルブミン (BSA, Wako, diluted in 0.3% Triton X-100/PBS) で 1 時間ブロッキングし、抗 pS6 抗体 (Cell Signaling Technology, 4858S, rabbit, 1:1,000 in blocking solution) を乗せて 4°C で 16 時間インキュベートした。その後、PBST で 10 分間、3 回洗浄した後、Alexa Fluor 488 結合抗ウサギ IgG 抗体 (Abcam, 1:500) で 2 時間インキュベートした。洗浄後、2 µg/mL DAPI で対比染色した。

抗 ancV1R 抗体、または、抗 pS6 抗体で染色した組織切片の画像は、405、488、532 nm 励起レーザー搭載 Leica SPE confocal microscope を使用し、10×/0.3NA 対物レンズと 63×/1.30NA 油浸対物レンズにより取得した。15 µm の範囲の z-stack を 3 枚、または、9 µm の範囲の z-stack を 10 枚取得し (scan speed, 400 Hz; averaging, 4 times)、ImageJ/Fiji (NIH) により最大値投影画像を出力した。抗 Vmn2r116 抗体で染色した組織切片の画像は、405、488、561 nm 励起レーザー搭載 Carl Zeiss LSM780 confocal microscope を使用し、63×/1.4NA 油浸レンズにより取得した。7 µm の範囲の z-stack を 11 枚取得し (pixel dwell, 3.15 µsec; averaging, 4 times)、最大値投影画像を出力した。

#### 2-2-4. 性行動実験

メスマウスの性行動解析の手順は、Haga *et al.*, 2010、Ishii *et al.*, 2017 に記載される手法に従いおこなった (図 2-4A)。本実験では、メスの発情期と関連した行動のばらつきを最低限とするために、卵巣除去しホルモン投与により発情状態を誘導したメスを使用した。性未経験の野生型と ancV1R 欠損メスマウスを 5 週齢以降で卵巣除去手術した。メスマウスをイソフルラン吸入麻酔下、ホットプレート上で背後から 5 mm 程皮膚を切り、その直下の腹膜を 5 mm 程切って卵巣を露出させた。卵管と子宮の境目付近を糸で結紮し卵巣を切除し、切開した皮膚、腹膜を糸で縫合した。術後の回復期間は 1 週間以上とし、以降の行動実験に用いた。

性行動実験は卵巣除去したメスマウスに、試験 24 時間前と 48 時間前に  $\beta$ -エストラジオール (Wako, 0.4 mg/mL in corn oil, 0.1 mL)、4 時間前にプロゲステロン (Wako, 10 mg/mL in corn oil, 0.05 mL) を背面皮下注射し、発情状態を誘導しておこなった。性行動実験では 8~20 週齢の ICR 系統オスマウスを用いた。試験と同じ環境でメスと接触させ、30 分間で 10 回以上マウントするオス個体を選別し、実際の試験に使用した。

行動実験は飼育室暗期開始から 1 時間以上経ってから、赤色電灯下でおこなった。それぞれの実験はテストケージ (16×23×12 cm) 内でおこない、直径 5 mm の通気口を中央に 3 つ開けたアクリル板 (20 cm×25 cm) を蓋として置き、横からビデオカメラで撮影した。試験 2 日前から 1 日 1 回同時刻に、対象のメスを試験環境で 30 分間自由行動させる馴化作業をおこなった。試験当日、メスマウスを 10 分間馴化させた後、オスマウスをケージ内に導入し、行動を 30 分間記録した。オスマウスの示した性行動とメスの示した拒絶行動について、Haga *et al.*, 2010、Osakada *et al.*, 2018 に記載される方法に従い解析をおこなった。Anogenital sniffing はマウスが相手の臀部付近に鼻を接触させ匂いを嗅ぐ行動、mount はオスがメスの腰を両前脚で掴んで背後から登り交尾しようとする行動と定義した。メスの示す行動は、オスの接近に警戒し立ち上がる行動を boxing posture、オスから走って逃げる行動を running away、オスの mount 中に立ち上がり交尾を阻害する行動を standing up、オスの mount 中に体を翻す行動を turning とし、これらを拒絶行動と定義した (図 2-4B、C)。オスの mount 中に示されるリズム的な腰の前後運動を intromission とし、メスが mount に拒絶を示すことなく、四つ足を地面につけ背部を床から上げた状態を lordosis とした。

ESP1 による前刺激を与えた際の性行動の解析では、東京大学、東原博士よりいただいたリコンビナント ESP1 を使用して実験をおこなった (図 2-14)。前述と同様の手順で野生型・ancV1R 欠損型メスマウスとオスマウスを用意し、馴化作業をおこなった。試験当日、テストケージで 10 分間の馴化の後、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) に溶解した ESP1 20  $\mu$ g を脱脂綿に染み込ませ、メスマウスに提示し 30 分間刺激した。その後、オスマウスと接触させ、前述と同様の手順で行動実験をおこなった。

#### 2-2-5. 尿の嗜好性試験

メスマウスの異性の尿に対する嗜好性は、Martel and Baum, 2009、Roberts *et al.*, 2010 に記載される手法を参考に試験した。実験は 8~13 週齢の野生型および ancV1R 欠損型のメスを用いておこなった。オスの尿に対する嗜好性は発情期のメスにのみ認められる (McHenry *et al.*, 2017)。解析対象のメスマウスは、3 日間以上個別飼育し、その間、膣スメアから発情状態を確認した (Byers *et al.*, 2012)。発情期のメスマウスの嗜好性を、飼育室暗期 (20:00~22:00) に赤色灯下で、テストケージ (16×23×12 cm) にアクリル板を蓋として置いておこなった。メスをテストケージに 30 分間入れて馴化作業をおこなった。その後、オスとメスの尿を 10  $\mu$ L ずつ染み込ませた 2 つの濾紙片 (1.5×10 cm) をアクリル板に磁石で固定し、メスの馴化に用いたテストケージの蓋と交換して尿を提示した。メスの行動をビデオテープに記録し、5 分間にメスマウスがそれぞれの尿を探索した時間を測定した。オスの尿に対する嗜好性指数 (preference index) として、オスとメスの尿の探索時間の差を、合計探索時間で割った値を計

算した。試験個体の学習によるデータの乱れを防ぐため、各個体の試験回数は一度のみとした。

尿と生理食塩水を用いた嗜好性試験では、上記と同様の手順で発情期のメスマウスと試験環境を用意し、尿と生理食塩水 10  $\mu$ L を染み込ませた濾紙片を提示し、濾紙片に対する探索時間を測定した。嗜好性指数 (preference index) は、オスまたはメスマウスと生理食塩水の探索時間の差を、合計探索時間で割った値としている。試験個体の学習によるデータの乱れを防ぐため、各個体の試験回数は一度のみとした。

#### 2-2-6. フェロモン刺激と最初期遺伝子発現解析

8~18 週齢の野生型、および、ancV1R 欠損マウスを用いて解析をおこなった。マウスを 1 日以上単離飼育し、試験当日、それぞれの刺激物に 40 分間暴露した後に速やかに鋤鼻器を採取した。冷やした PBS 中で鋤鼻器を解剖し FSC22 Frozen Section Media (Leica Biosystems) に包埋して、fresh-frozen 切片を作製し *Egr1* の *in situ* hybridization をおこなった。

オスマウスとの接触による刺激では、性行動実験と同様の手順でメス・オスマウスを用意し、接触時間を 40 分間として刺激をおこなった。野生型と ancV1R 欠損型のメスマウスを卵巣除去し、 $\beta$ -エストラジオールとプロゲステロンの投与によって発情状態を誘導した。テストケージでメスを 10 分間馴化させた後、ICR 系統オスマウスと 40 分間接触させ刺激した。

液体状態の刺激物を用いた解析では、卵巣除去していないメスを用いておこなった。解析対象のメスを新しいケージに移し 30 分間馴化させた後、まずは新しい脱脂綿 (20 mg) を提示した。その 1 時間後、刺激物を染み込ませた脱脂綿をケージ内に導入し、40 分間刺激した。オスマウスの刺激では、100  $\mu$ L のオスマウスの尿を脱脂綿に染み込ませた。C57BL/6J 系統の成体オスマウス 4~6 匹から採取した尿サンプルを 110  $\mu$ L ずつ分注して使用時まで -80  $^{\circ}$ C で保存した。

ESP1 を用いた刺激では、リコンビナント ESP1 (東京大学、東原博士より提供) を用いた (Haga *et al.*, 2010; Ishii *et al.*, 2017)。Esp1 遺伝子配列を組み込んだ発現ベクター pET-28a (Novagen, cat#69864) を大腸菌 BL21 (DE3) 株に導入して培養し、大腸菌ペレットを超音波破碎し粗試料を採取した。HPLC を用いて、タンパク質混合物を陰イオン交換 DEAE-SPW カラムと C4 カラムにかけて ESP1 画分を得た。20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 45  $\mu$ L に溶解した 20  $\mu$ g または 80  $\mu$ g の ESP1 を脱脂綿に染み込ませて、マウスへの刺激をおこなった。

血液を用いた刺激では、Osakada *et al.*, 2022 に記載される手法で調製した血液細胞溶解液 20  $\mu$ L を脱脂綿に染み込ませた。C57BL/6J オスマウスの血液を 1,500 $\times$ g、4  $^{\circ}$ C、10 分間遠心し、上清の血清成分を除いた。上清と同量の PBS を加えて混和し、1,500 $\times$ g、4  $^{\circ}$ C、10 分間遠心して上清を除いた。この過程を 2 回繰り返した後、同量の水を添加して溶血させた。残渣成分を除くために 1,500 $\times$ g、4  $^{\circ}$ C、10 分間遠心し、上清を使用時まで -80  $^{\circ}$ C で保存した。

マウス飼育ケージの床敷き、または、新生仔を用いた刺激では、野生型および ancV1R 欠損型メスとオスを対象としておこなった。床敷きは ICR 系統のオス 1 匹を 1 週間飼育したケージ、または、メス 3 匹を 1 週間飼育したケージから採取した新鮮なもの (およそ 100 mL) を使用した。新生仔を用いた刺激では生後 1.5~2.5 日の C57BL/6J 系統 2 匹を用いた。妊娠し

たメスを出産前に単離飼育しておき、出産された新生仔を刺激に用いたため、オスに由来する刺激は含まれていない。

鋤鼻器における *Egr1* 発現細胞の *in situ* hybridization による染色、およびその染色細胞数定量は、Isogai *et al.*, 2011 に記載される手法を参考におこなった。1 個体につき鋤鼻器切片 (12  $\mu\text{m}$  厚) 最低 10 枚分を定量に用いた。鋤鼻器中間部分の冠状切片の上皮面積がおよそ 0.2  $\text{mm}^2$  のため、切片の染色細胞数と上皮面積を測定し 0.2  $\text{mm}^2$  あたりの *Egr1* 発現細胞数を算出した。

#### 2-2-7. RNA シーケンスによる網羅的遺伝子発現解析

8~9 週齢の野生型、および、ancV1R 欠損型メスマウスから鋤鼻器を採取し速やかに液体窒素で凍結した。2 個体分の凍結組織をまとめて破碎し、RNeasy mini kit (Qiagen, 74104) で DNase 処理と RNA 抽出をおこない、得られたおよそ 6  $\mu\text{g}$  の RNA サンプルを 1 サンプル分とした。RNA シーケンス (RNA-seq) のデータ取得は株式会社マクロジェン・ジャパンに依頼し、シーケンスデータの解析は東京工業大学、二階堂博士、株式会社 digzyme、鈴木博士におこなっていただいた。解析に用いた RNA サンプルの濃度測定とクオリティチェックは Agilent Technology 21000 bioanalyzer により解析された。各サンプルから合成された cDNA は Illumina NovaSeq6000 sequencer (read-length 100 bp, total-length, 4 Gbp) によってシーケンシングされた。シーケンスデータはマウス cDNA 参照配列にマッピングし、各遺伝子のリードカウントから発現量を測定された (Patro *et al.*, 2017)。野生型および ancV1R 欠損型をそれぞれ 3 サンプルずつ解析し、iDEGES/edgeR を用いた false discovery rate (FDR) が 0.05 を下回った遺伝子を、ancV1R 欠損型で有意に発現変動した遺伝子 (differential expression genes; DEGs) とした (Sun *et al.*, 2019; Robinson *et al.*, 2010)。

#### 2-2-8. 定量逆転写 PCR

定量逆転写 PCR (quantitative reverse transcription PCR; qRT-PCR) は 8~15 週齢の野生型、および、ancV1R 欠損型メスマウスの鋤鼻器を用いておこなった。各個体から得た鋤鼻器を破碎し、RNeasy micro kit (Qiagen, 74004) を用いて total RNA を抽出した。RNA 500 ng の逆転写を PrimeScript RT reagent kit (Takara, RR037A) を用いておこない、リアルタイム PCR を、Thermal Cycler Dice Real Time System III TP 上で TB Green Premix Ex Taq II (TaKaRa, RR820A) を用いておこなった。PCR の条件は次の通りとした：95°C で 30 秒、95°C で 5 分と 60°C で 30 秒を 40 周。すべての実験は 2 回おこない、測定された Ct 値の平均値から各遺伝子の発現量を算出した。ハウスキーピング遺伝子 *Gapdh* の発現量で正規化し、相対発現量を算出し、ancV1R 欠損型における相対発現量を野生型の値で割り fold change を算出した ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法)。

表 2-3. 定量逆転写 PCR に用いたプライマー

遺伝子	遺伝子 ID	配列 (forward)	配列 (reverse)	増幅位置	生産物 (bp)
<i>Gapdh</i>	ENSMUST00000118875.8	5'-TGAACGGATTGGCCGTATTGG	5'-TGCCGTTGAATTTGCCGTGAG	exon 1-2	153
<i>Vmn1r224</i>	ENSMUST00000233980.2	5'-GGCAGTGTACTTGCTGTGTCC	5'-GCTCTACATTTGACCACCTTCC	3'-UTR	177
<i>Vmn2r49</i>	ENSMUST00000108550.4	5'-CCTTTGTGTGCAGTTCTGATTG	5'-AAGCATCTGCCTCTCATTCTG	3'-UTR	72
<i>Vmn2r50</i>	ENSMUST00000074943.9	5'-TGGCCAATTGTCTAAGGAGGAAG	5'-GCTGATGTTTCTATGGGTTGCC	3'-UTR	151
<i>Vmn2r74</i>	ENSMUST00000232886.2	5'-AGCTTCCTGTGAATTGCTTTCC	5'-GAGCCTTCATGTTCTTCTTCC	3'-UTR	120
<i>Vmn2r81</i>	ENSMUST00000020547.10	5'-CTTCAGAGTCCATCCCCAAC	5'-TGGAGAACCAGCAATCTCAAC	3'-UTR	136
<i>Vmn2r88</i>	ENSMUST00000159674.4	5'-ACGCTACCATCATCTGACC	5'-TGGTGATTACTGGCTTACTTCC	3'-UTR	170
<i>Vmn2r107</i>	ENSMUST00000042090.8	5'-GCACATACCAATCCCTCACAC	5'-GCTGTAATCCTTCTGTTCTTCC	3'-UTR	151
<i>Vmn2r116</i>	ENSMUST00000234010.2	5'-TTCCATTGACCCATATTTCTTCCAC	5'-ATGCAACCCAAAAGAGACATCAA	3'-UTR	193
<i>Omp</i>	ENSMUST00000098281.3	5'-CTAGCTGCTCCTCTGTGCT	5'-CAGCATCCGGCTTCTAGACT	3'-UTR	129
<i>Gnai2</i>	ENSMUST0000005704.12	5'-TGACTCAGCCGCTTACTACC	5'-GCTGACCACCCACATCAAAC	exon 4-6	167
<i>Gnao1</i>	ENSMUST00000125716.8	5'-ACCTCTTGTCTGTATAGCAACC	5'-TACACAGCCGTCAGTCACTC	exon 8-9	161

### 2-2-9. *In situ* hybridization と免疫組織化学の共染色

*In situ* hybridization による鋤鼻受容体発現細胞と pS6 の免疫組織化学による共染色は Ohmoto *et al.*, 2008 に記載される方法を参考におこなった。ジゴキシゲニン (DIG) 標識 RNA プローブを *in vitro* 転写反応で合成しハイブリダイゼーションに使用した。灌流固定後、3 時間の後固定をおこなった鋤鼻組織の凍結切片を染色に使用した。切片を TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0); 1 mM EDTA) に浸漬し、3 µg/mL protease K (Invitrogen) /TE で 10 分間処理し、再度 TE で 5 分間洗浄した。切片を PBS に 5 分間浸漬し、4% PFA/PBS で 10 分間固定し、再度 PBS で 10 分間洗浄した。切片を 0.1 M トリエタノールアミン-HCl に 1 分間浸漬し、無水酢酸を 0.25%(v/v)で添加しアセチル化処理を 10 分間おこない、5×SSC (75 mM クエン酸ナトリウム; 750 mM NaCl) に浸漬した。組織切片にプレハイブリダイゼーションバッファー (50%ホルムアミド; 5×SSC; 40 µg/mL herring sperm DNA (Promega)) を乗せて 65°Cでプレハイブリダイゼーション処理をおこなった。その後、ハイブリダイゼーションバッファー (50%ホルムアミド; 5×SSC; 5×Denhardt's 溶液; 250 µg/mL yeast tRNA; 500 µg/mL herring sperm DNA; 1 mM ジチオスレイトール) にリボプローブを 1:200 で溶解したプローブ溶液を乗せて 65°Cで 16 時間以上ハイブリダイゼーションをおこなった。ハイブリダイゼーション後、65°Cの 5×SSC に 10 分間、2 回浸漬して洗浄し、37°Cの TNE (10 mM Tris-HCl (pH 7.4); 500 mM NaCl; 1 mM EDTA (pH 8.0)) に 10 分間浸漬、20 µg/mL RNaseA (Sigma-Aldrich) /TNE で 37°C、30 分間処理し、TNE で 37°C、10 分間洗浄した。次に、0.2×SSC に 30 分間、2 回浸漬して洗浄し、PBST (0.01% Tween20 含有 PBS) に浸漬した。組織切片を 3% BSA/0.3% Triton X-100/PBS で 1 時間ブロッキングし、HRP 結合抗 DIG 抗体 (1:2,000 diluted in blocking solution) と抗 pS6 抗体 (Cell Signaling Technology, 4858S, rabbit, 1:500) で 120 分間インキュベートした。その後、PBST で 10 分間 3 回洗浄し、チラミドシグナル増幅 (TSA-plus Cyanine 3, Akoyo Biosciences, NEL744001KT, 1:50) で 10 分間発色反応をおこなった。その後、PBST で 10 分間 3 回洗浄し、Alexa Fluor 488 結合

抗ウサギ IgG 抗体 (Abcam, ab181346, 1:500 diluted in blocking solution) で 120 分間インキュベートして発色をおこなった。洗浄後、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DAPI で対比染色し、封入剤 Fluoromount mounting media (Diagnostic BioSystems, K024) を用いて封入した。

染色した組織切片は、405、488、532 nm 励起レーザー搭載 Leica SPE confocal microscope で 10 $\times$ /0.3NA 対物レンズ、または、40 $\times$ /1.15NA 油浸対物レンズを用いて撮影した。15  $\mu\text{m}$  の範囲で 3 枚の z-stack 画像、または、9  $\mu\text{m}$  の範囲で 5 枚の z-stack 画像を取得し (scan speed, 400 Hz; averaging, 4 times)、ImageJ/Fiji (NIH) で最大値投影画像を出力し解析に用いた。

#### 2-2-10. 免疫細胞化学

マウス ancV1R 配列を鋤鼻器の cDNA ライブラリーから PCR で増幅し pcDNA3.1 (Invitrogen, V79020) にクローニングしシーケンスを確認した。ヒト胎児腎細胞 (HEK) 293T 細胞を 10% ウシ胎仔血清、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ペニシリン・ストレプトマイシン混合 D-MEM (Wako, 044-29765) で培養し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 11668027) でトランスフェクションをおこなった。HEK293T 細胞に ancV1R 発現ベクター、または、空ベクターをトランスフェクションし、37 $^{\circ}\text{C}$  で 5%  $\text{CO}_2$  存在下で一晩培養した。培養細胞を PBS で洗浄し、4% PFA/PBS で 10 分間固定し、0.2% TritonX-100/PBS で 10 分間透過処理をおこない、PBST (0.01% Tween20 含有 PBS) で洗浄した。その後、4% BSA/0.1% TritonX-100/PBS で 1 時間ブロッキングをおこない、アフィニティ精製した抗 ancV1R 抗体 (1:200 in blocking solution) で 2 時間インキュベートした。細胞を PBST で 10 分間 3 回洗浄し、Alexa Fluor 488 結合抗ウサギ IgG 抗体 (Abcam, ab181346, 1:500 diluted in blocking solution) で 120 分間インキュベートして発色をおこなった。洗浄後、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DAPI で対比染色し、封入剤 Fluoromount mounting media (Diagnostic BioSystems, K024) を用いて封入した。染色した細胞を 405、488 nm 励起レーザー搭載 Leica SPE confocal microscope で、63 $\times$ /1.30NA 油浸対物レンズを用いて撮影した。9  $\mu\text{m}$  の範囲で 5 枚の z-stack 画像を取得し (scan speed, 400 Hz; averaging, 4 times)、ImageJ/Fiji (NIH) で最大値投影画像を出力し解析に用いた。

#### 2-2-11. フェロモン刺激と pS6 陽性細胞の検出

活性化された神経細胞ではリボソームタンパク質 S6 のリン酸化が誘導されるため、pS6 を標的とした免疫組織化学によってフェロモン刺激に応答した鋤鼻神経細胞を可視化することができる (Knight *et al.*, 2012; Itakura *et al.*, 2022)。8~20 週齢の野生型と ancV1R 欠損型メスマウスを 1 日以上個別飼育し、新品の床敷きを加えたケージに移して 1 時間馴化した。その後、マウスを保定し、マイクロピペットを用いて刺激溶液 20  $\mu\text{L}$  をマウスの鼻腔内に直接導入した。 $\beta$ -エストラジオール 3-硫酸 (1,3,5(10)-estratrien-3,17 $\beta$ -diol 3-sulphate, E1100, Sigma-Aldrich) をジメチルスルホキシド (DMSO, Wako) に 10 mM の濃度で溶解し、さらに生理食塩水で希釈して刺激溶液として用いた (残留 DMSO 濃度は 0.1%)。刺激から 30 分後、マウスに麻酔をかけて灌流固定をおこなった。鋤鼻器を解剖して 4% PFA/PBS に浸漬し氷上で 3 時間の後固定をおこない、前項「2-2-2. *In situ* hybridization」と同様の手順で凍結切片を作製した。pS6 の免疫組織化学は前項「2-2-3. 免疫組織化学」「2-2-9. *In situ* hybridization」と免疫組織化学の共染

色」に記載される手順でおこなった。定量解析では、1 個体あたり最低 10 枚の鋤鼻切片を用いておこなった。染色細胞数と鋤鼻上皮面積の測定を ImageJ/Fiji (NIH) を用いておこない、0.2 mm<sup>2</sup>あたりの平均シグナル陽性細胞数を計算した。

### 2-2-12. 母性攻撃行動試験

8 週齢以降の性未経験の野生型、および、ancV1R 欠損メスマウスを用いて試験をおこなった。メスを 1 日以上単離飼育し、毎日 16:00~18:00 に膻スミアから発情状態を確認し、発情期が観測された日に飼育ケージにオスマウスを導入し、10 日間同棲させ交配をおこなった。その後、オスマウスを除き、交配を始めてから 28 日間メスの妊娠・出産を確認した。新生仔が確認された当日を出産 0 日目とし、出産 1 日目での新生仔の生存数を確認した。母性行動のモチベーションの維持には新生仔による吸乳の刺激が必要であることから (Stern and Johnson, 1990)、仔の数が 3 を下回った場合は里仔を充て、出産 1 日目で仔が全て死んだ場合は以降の解析から除外した。

母性攻撃行動は Ng *et al.*, 2023 に記載される手法を参考におこなった。行動試験は飼育室暗期開始から 1 時間後に、赤色灯下でおこなった。出産後の母マウスの攻撃試験は、出産 3~5 日目に 3 日間連続しておこなった。試験当日、飼育ケージ内から仔を全て除き 5 分間の環境馴化をおこなった。ケージ内の巣から一番遠い位置にあたる隅からオスマウスを導入し 10 分間の行動をビデオテープで記録した。母マウスがオスに対して示した臀部の匂い嗅ぎ行動 (anogenital sniffing) と攻撃行動 (attack) の回数と累計時間を、Ng *et al.*, 2023、Guo *et al.*, 2023 を参考にして定量した。攻撃行動として、メスがオスに対して示した噛みつき行動 (biting)、追跡行動 (chasing)、取っ組み合い (wrestling)、突進 (lunge) を攻撃行動とした。試験終了後、メスの飼育ケージから導入したオスは除き、仔を巣内に戻した。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. ancV1R の欠損が鋤鼻神経細胞の分化発生に与える影響

AncV1R 欠損マウスにおいて ancV1R タンパク質が合成されていないことを確認するために、ancV1R の C 末端ペプチド配列 (CGVQREKSTPQPP) に対するポリクローナル抗体を作製した (図 2-2B)。作製した抗 ancV1R 抗体の特異性を培養細胞の免疫染色で確認した結果、ancV1R 発現ベクターをトランスフェクションした細胞で特異的にシグナルが認められた (図 2-2C)。この抗 ancV1R 抗体を用いて鋤鼻器の免疫組織化学をおこなった。野生型の鋤鼻器では鋤鼻神経細胞の細胞体よりも微絨毛部分で強くシグナルが検出された (図 2-2D、E)。このことから、ancV1R タンパク質が鋤鼻受容体やそのシグナル伝達分子の存在する鋤鼻神経細胞微絨毛上に局在していることが示された。一方、ancV1R 欠損型マウスの鋤鼻器では、微絨毛上のシグナルは認められず、作出された ancV1R 欠損系統で機能的な ancV1R タンパク質が発現していないことを確認した。

AncV1R の欠損が鋤鼻神経細胞の分化発生に与える影響を解析するために、ancV1R 欠損マウス鋤鼻器における分化マーカー遺伝子の発現を解析した (Enomoto *et al.*, 2011)。In situ

hybridization により、*Ascl1* (neuronal progenitors)、*Neurog1* (neuronal precursors)、*Neurod1* (early post-mitotic neurons)、*Gap43* (immature neurons)、*Omp* (mature neurons) の発現を調べた結果、野生型と ancV1R 欠損型で顕著な差は認められなかった (図 2-3A)。このことから、ancV1R は鋤鼻神経細胞の分化発生には必須ではないと考えられる。更に、*Omp* と *Gai2* の二色 *in situ* hybridization をおこない、成熟鋤鼻神経細胞の数を定量した (図 2-3B)。鋤鼻上皮に存在する *Omp* 発現細胞の数と密度に野生型と ancV1R 欠損型で顕著な差は認められなかった (図 2-3C、D)。表層側鋤鼻神経細胞マーカーである *Gai2* の発現細胞数に変化はない一方、基底側の *Gai2* 非発現細胞数は有意ではないもののわずかに増加していた (図 2-3E、F)。これらの結果から、ancV1R の欠損は成熟鋤鼻神経細胞の維持に顕著な影響を与えないと考えられる。

### 2-3-2. ancV1R 欠損メスマウスの性行動

AncV1R 欠損マウスは野生型と同様に健康に成長し生殖可能であった。しかしながら、ancV1R 欠損系統の戻し交配の過程で、ancV1R 欠損型メスがオスから過剰に逃げる様子が見られた。鋤鼻器の外科的切除や鋤鼻神経細胞のシグナル伝達分子の欠損は性行動に異常を生じることが知られていることから (Martel and Baum, 2009; Fraser and Shah, 2014)、ancV1R 欠損メスマウスがオスに対して示す行動について解析をおこなった。

まず野生型と ancV1R 欠損マウスで発情状態 (発情周期) に違いがないかどうかを調べるために、膣スメアテストをおこなった。その結果、野生型と同様に ancV1R 欠損マウスも発情状態を示すことを確認した。メスマウスの性行動の解析においては、発情周期と関連した行動のばらつきを最低限に抑えるために、性未経験のメスマウスを卵巣除去し、 $\beta$ -エストラジオールとプロゲステロンの投与により発情状態を誘導し実験に使用した (図 2-4A)。

メスマウスのいるケージにオスを導入すると、オスはメスマウスに対して anogenital sniffing、および、mount を示した。オスマウスがメスに対して示した anogenital sniffing と mount の回数を定量した結果、使用したメスの遺伝子型による違いは認められなかった (図 2-5)。メスの ancV1R 欠損がオスの性行動に影響を及ぼさないことが確認できたので、次にメスマウスの性行動を解析した。戻し交配時に導入したオスマウスを ancV1R 欠損メスマウスが拒絶する (逃げる) 様子が認められたことから、オスが接近または mount した際の、メスマウスの典型的な以下の行動、boxing posture、running away、standing up、turning をメスの拒絶行動として定義し解析した (Osakada *et al.*, 2018; Lenschow and Lima, 2020; 図 2-4B~E)。その結果、ancV1R 欠損メスではオスの性行動に対し、特に standing up が顕著に増加し (図 2-6A、B)、拒絶行動の回数とその持続時間が有意に増加していた (図 2-6C、D)。オスの示す全 mount に対し拒絶行動が示された割合を比較した結果、ancV1R 欠損メスで有意に高かった (図 2-6E-F)。これらの結果から、ancV1R の欠損によってメスの性行動に異常が生じることが明らかとなった。

### 2-3-3. オス尿中フェロモンに対する行動応答

鋤鼻器を介したフェロモンの受容は異性の認識と性行動に重要である (Kimchi *et al.*, 2007; Martel and Baum, 2009; Hellier *et al.*, 2018)。AncV1R 欠損メスで認められた性行動の異常は、

フェロモンを介したオスの認識ができていないために生じた可能性が考えられた。これを検証するために、オスフェロモンへの誘引行動について解析をおこなった。通常、発情期のメスマウスはオスの尿中フェロモンに誘引されるため、メスよりもオスの尿に対する嗜好性を示す (Roberts *et al.*, 2010)。そこで、ancV1R 欠損メスのオス尿に対する嗜好性について試験した。発情期のメスマウスに対して、オスとメスの尿を同時に提示し、それぞれの探索時間を測定した (図 2-7A)。野生型メスマウスではオスの尿に対する探索時間が有意に高くなっていた (図 2-7B、C)。それに対し ancV1R 欠損メスでは、オスとメスの尿の探索時間に差はなく、オスの尿に対する嗜好性が認められなかった (図 2-7B~D)。異性の尿に対する嗜好性の消失は鋤鼻器を切除したメスで報告されていることと一致する (Martel and Baum, 2009)。

AncV1R の欠損によって雌雄の尿の探索時間に差がなくなったことが、対比として提示したメスの尿への誘引性の増加に起因している可能性もある。これを検証するため、メスの尿と生理食塩水を提示し嗜好性を解析した (図 2-8A)。しかしながら、メスの尿に対する嗜好性は野生型と ancV1R 欠損型の両方で認められなかった (図 2-8B~D)。また、オスの尿と生理食塩水を提示した結果 (図 2-8E)、野生型メスでオスの尿に対する探索時間が高いことに対し、ancV1R 欠損メスでは有意な差が認められなかった (図 2-8F~H)。これらの結果は、ancV1R がオスの尿中フェロモンに対する誘引性に必須であることを意味する。

#### 2-3-4. 鋤鼻器の生理学的応答

上記の可能性を検証するために、まずオスフェロモンに対する ancV1R 欠損メスマウスの鋤鼻器の生理学的応答に異常が認められないかどうかを解析した。活性化した鋤鼻神経細胞では最初期遺伝子の 1 つである *Egr1* (*early growth response protein 1*) の発現が一過的に誘導される。そこで、メスマウスにフェロモン刺激を与え、活性化した鋤鼻神経細胞を *Egr1* の *in situ hybridization* によって染色した。オスの尿を提示した際の鋤鼻器の応答を解析した結果、野生型と同様に、ancV1R 欠損型においても *Egr1* 発現細胞が認められた (図 2-9A)。このことは、ancV1R 欠損鋤鼻神経細胞もオスの尿刺激に応答できることを示しており、ancV1R はオスフェロモンによる鋤鼻神経細胞の活性化に絶対的に必須な因子ではないことが示唆される。しかしながら、*Egr1* 発現細胞の数を定量した結果、ancV1R 欠損型マウスの鋤鼻器では、野生型と比較しおよそ 40%減少していた (図 2-9B)。メスがオスと直接接触した際の鋤鼻器の応答についても解析した結果、ancV1R 欠損型における *Egr1* 発現細胞数はおよそ 19%減少していた (図 2-9C、D)。

AncV1R の欠損による *Egr1* 発現細胞数の減少が、鋤鼻上皮の表層側、または、基底側で特異的に起こっていることかを検証するために、*Egr1* と基底側鋤鼻神経細胞マーカー *Gα<sub>o</sub>* の共発現解析をおこなった (図 2-9E)。メスマウスをオスと接触させて刺激し、*Gα<sub>o</sub>* 陰性の表層側と *Gα<sub>o</sub>* 陽性の基底側で検出された *Egr1* 発現細胞を定量した。その結果、ancV1R 欠損型の鋤鼻器では表層側と基底側の両方で *Egr1* 発現細胞は有意に減少していた (図 2-9F)。野生型のメスでは *Egr1* 発現細胞のおよそ 77%が *Gα<sub>o</sub>* 陽性であった (図 2-9G)。このことは、オスのフェロモン刺激に応答する細胞が基底側に豊富に存在するという過去の結果と一致する (Kimoto *et al.*, 2005)。AncV1R 欠損メスの鋤鼻器では *Egr1* 発現細胞の総数が減少していたも

の、*Egr1* 発現細胞中の  $G\alpha_o$  の陽性率は野生型と差がなかった。このことから、ancV1R 欠損メスでは鋤鼻上皮表層と基底側の両方で、オスのフェロモンに応答する細胞が平等に減少していること示唆する。

AncV1R はほぼすべての鋤鼻神経細胞に発現するため、ancV1R の欠損がその他の様々なフェロモン刺激に対しての応答にも影響を与える可能性がある。そこで、さらにオスマウス飼育ケージの床敷き、マウス新生仔、血液に対する応答を解析した。床敷きには尿や糞、唾液や皮脂、その他の分泌液中に含まれる広範な化学物質を吸着しており、その中には性特異的に分泌されるフェロモン物質も含まれる。近年、マウスの新生仔や血液にも鋤鼻器を活性化させるフェロモン物質が含まれていることが示されている (Isogai *et al.*, 2019; Osakada *et al.*, 2022)。これらのフェロモン刺激に暴露した際に活性化した鋤鼻神経細胞を *Egr1* の *in situ* hybridization によって検出した (図 2-10A)。その結果、オスの床敷き、および、新生仔に反応した鋤鼻神経細胞の数は ancV1R 欠損型で有意に減少していた (図 2-10B)。さらに、ancV1R 欠損によるフェロモン刺激に対する応答性の低下が性特異的なものかを解析するため、オスにメスの床敷きを提示した際の応答についても解析をおこなった。その結果、野生型オスマウスと比較し ancV1R 欠損オスでは異性の床敷き刺激に反応した鋤鼻神経細胞の数は有意に減少していた (図 2-10C、D)。これらの結果から、ancV1R の欠損によってフェロモン刺激を与えた際の鋤鼻器の応答が低下することが示唆された。

### 2-3-5. 鋤鼻受容体の遺伝子発現解析

AncV1R の欠損によってフェロモン刺激に対する応答細胞数が減少した原因として、2つの可能性が考えられる。一つは、ancV1R 欠損マウスでは鋤鼻受容体の発現量が減少しているためにフェロモン刺激に対する応答が低下した可能性である。もう一つの可能性として、ancV1R が典型的な鋤鼻受容体のリガンドに対する応答性を促進する機能を担っていることが考えられる。

まず前者の可能性について確認するために、ancV1R 欠損マウス鋤鼻器における鋤鼻受容体遺伝子の発現を、RNA-seq により網羅的に解析した。野生型と ancV1R 欠損型メスの鋤鼻器より抽出した RNA を 3 サンプル分ずつ用意しシーケンス解析をおこなった (図 2-11A)。その結果、検出された 186 の機能的 *V1R* 遺伝子のうち、2つの遺伝子の発現が ancV1R 欠損型で有意に増加していた。また、123 の機能的 *V2R* 遺伝子のうち、ancV1R 欠損型では 24 個の遺伝子の発現が増加、4 個の遺伝子の発現が減少していた。

RNA-seq の解析結果を確認するために、増加が認められた 5 つの *V1R*・*V2R* 遺伝子 (*Vmn1r224*, *Vmn2r49*, *Vmn2r50*, *Vmn2r74*, *Vmn2r81*)、減少が認められた 1 つの *V2R* 遺伝子 (*Vmn2r107*)、発現変動が認められなかった 2 つの *V2R* 遺伝子 (*Vmn2r88*, *Vmn2r116*)、鋤鼻神経細胞マーカー遺伝子 (*Omp*,  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_o$ ) の発現量を qRT-PCR により測定した (図 2-12A)。その結果、定量したすべての遺伝子について RNA-seq 解析と一致した結果が得られ、ancV1R 欠損マウスでは一部の鋤鼻受容体の発現が有意に変動していた。しかしながら、大部分の鋤鼻受容体遺伝子 (*V1R* の 99%、*V2R* の 77%) の発現は変動しておらず、発現が減少した *V2R* は 4 つのみであったことから、ancV1R の欠損によってフェロモン刺激に対する応答細胞数が

減少したことが、鋤鼻受容体のリガンドに対する応答性の低下に起因している可能性が考えられた。ただし、ancV1R 欠損マウスで発現が減少した4つのV2Rが、前項2-3-4の解析に用いたフェロモンを受容している可能性は排除できない。

### 2-3-6. ESP1 に対する生理学的・行動応答

AncV1R の欠損によってフェロモン物質に対する鋤鼻神経細胞の応答性が低下しているかどうかを検証するために、野生型と ancV1R 欠損マウスにおいて発現量が変動せず、かつリガンドが既知の受容体 Vmn2r116 に着目した。Vmn2r116 の遺伝子発現は、RNA-seq と qRT-PCR による発現量の解析、および *in situ hybridization* による発現細胞数の定量の両方から、野生型と ancV1R 欠損型の違いが認められない (図 2-11A、2-12A、2-13A)。Vmn2r116 のリガンド物質として、ESP1 (exocrine gland-secreting peptide 1) と呼ばれるペプチドが同定されている (Haga *et al.*, 2010)。そこで ESP1 を提示した際の ancV1R 欠損マウスの応答について解析した。

まず、発現したタンパク質の細胞内局在を調べるために、抗 Vmn2r116 抗体を用いて鋤鼻器の免疫組織化学をおこなった (図 2-13B)。その結果、野生型と同様に ancV1R 欠損型においても、鋤鼻神経細胞の樹状突起が染色され、ancV1R の欠損が Vmn2r116 の細胞内局在にはほとんど影響しないことがわかった。

野生型、および、ancV1R 欠損型マウスに 20 µg/45 µL の ESP1 を提示し、活性化した鋤鼻神経細胞を *Egr1* の *in situ hybridization* により可視化した (図 2-13C)。その結果、ancV1R 欠損マウスにおいても ESP1 に応答した細胞は認められた。しかし、*Egr1* 発現細胞数を定量した結果、その数は野生型と比べて ancV1R 欠損マウスで有意に減少していた (図 2-13D)。Vmn2r116 の発現に変化がないにも関わらず ESP1 応答細胞数が減少したことから、ancV1R 欠損マウスによって Vmn2r116 発現細胞のリガンド感受性が低下していると考えられる。そこで、濃度を4倍高くした ESP1 溶液 (80 µg/45 µL) に対する応答を測定した。その結果、ancV1R 欠損マウス鋤鼻器において *Egr1* 発現細胞数は野生型と同レベルまで増加した (図 2-13D)。この結果は、ancV1R 欠損マウスでは Vmn2r116 発現鋤鼻神経細胞の ESP1 に対する感受性が低下しており、鋤鼻神経細胞が活性化する上でより高濃度のリガンドを要することを意味する。

更に ESP1 のメス性行動に対する効果を検証した。ESP1 はメスマウスに対し交尾の受容性を高め、lordosis 行動を促進する効果を持つことがわかっている (Haga *et al.*, 2010)。ESP1 の刺激によって、ancV1R 欠損メスで性行動の受容性を促進し、拒絶行動を克服できるかを検討した。メスに対し 20 µg の ESP1 を提示し 30 分間刺激し、オスマウスと接触させて性行動を解析した (図 2-14A)。その結果、ESP1 の前刺激を与えた場合でも ancV1R 欠損メスマウスはオスの性行動に対して拒絶行動を強く示した (図 2-14C)。オスの mount に対し ancV1R 欠損メスは lordosis をほとんど示さず、オスの intromission の回数は野生型と比較し顕著に少なかった (図 2-14D、E)。AncV1R 欠損メスマウスでは ESP1 に対する鋤鼻器の応答の低下に伴い、ESP1 によって引き起こされる行動応答に異常を生じたことが示唆された。

### 2-3-7. 鋤鼻器のリガンド感受性

AncV1R の欠損が鋤鼻器のリガンド応答に与える影響をより詳細に解析するために、濃度依存的な神経応答を測定した。活性化した神経細胞ではリボソームタンパク質 S6 のリン酸化 (pS6) が誘導されることが知られており、抗 pS6 抗体は高感度な活性化神経細胞の検出方法として用いられている (Knight *et al.*, 2012; Itakura *et al.*, 2022)。まず、オス尿を生理食塩水で段階希釈してメスマウスに提示し、鋤鼻器切片を抗 pS6 抗体の免疫組織化学により染色した (図 2-15A)。野生型と ancV1R 欠損型の両方で、オス尿の濃度に従った pS6 陽性細胞の増加が認められたが、ancV1R 欠損型では、特に 10%、100%濃度で刺激した場合、pS6 陽性細胞数は有意に少なかった (図 2-15B)。ただし、10~100%オス尿での pS6 陽性細胞数はプラトーに達しておらず、鋤鼻神経細胞の応答は、尿中に自然に分泌されるリガンド濃度では飽和しないことが示唆された。次に、鋤鼻受容体を活性化することが知られる化学物質である  $\beta$ -エストラジオール 3-硫酸に対する応答を解析した (Isogai *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2019)。0.1~10  $\mu$ M の濃度で刺激をおこない、野生型と ancV1R 欠損型の両方で、濃度依存的な pS6 陽性細胞数の増加が示された (図 2-15C、D)。リガンド感受性について解析するために、 $\beta$ -エストラジオール 3-硫酸の受容体の一つである *Vmn1r237* に焦点を当て、*Vmn1r237* 発現細胞数に占める pS6 の陽性率を測定した (図 2-15E)。1  $\mu$ M の  $\beta$ -エストラジオール 3-硫酸に対する *Vmn1r237* 発現細胞の応答率は ancV1R 欠損型で有意に低かった。それに対し、10  $\mu$ M の刺激では野生型と ancV1R 欠損型の両方で、およそ 85%の *Vmn1r237* 発現細胞が活性化されていた。*Egr1* の *in situ* hybridization と pS6 の免疫組織化学の両方の神経応答解析の結果から、ancV1R は鋤鼻神経細胞においてリガンドに対する感受性を増強する機能を持っており、ancV1R の欠損によって様々なフェロモン物質に対する鋤鼻器の生理学的応答が低下することが示唆される。

### 2-3-8. 母性攻撃行動

発情期のメスマウスはオスの性行動に対して高い受容性を示す一方、授乳期のメスは単に侵入する同種の成体 (イントルーダー) に対して攻撃行動を示す。この母性攻撃行動の発現には鋤鼻系の入力が必要であることが報告されている (Leypold *et al.*, 2002; Fraser and Shah, 2014)。そこで、ancV1R 欠損マウスの母性攻撃行動についても解析をおこなった (図 2-16A)。野生型、および、ancV1R 欠損型メスマウスをオスと同棲させ妊娠させた後、飼育ケージからオスを外してメスを単離飼育した。メスの出産から 3~5 日後に、ケージ内の仔を一時的に外し、イントルーダーのオスを導入する行動実験をおこなった。AncV1R 欠損型母マウスでもイントルーダーに対する探索行動と母性攻撃行動は認められた (図 2-16B~E)。しかしながら、野生型と比較して攻撃行動の回数と持続時間の両方が顕著に減少していた。このため、ancV1R の欠損による鋤鼻器の応答の低下は、性未経験のメスの性行動だけでなく、母マウスの示す攻撃行動にも異常を生じることが明らかとなった。

## 2-4. 考察

本章では、新規鋤鼻受容体候補分子 ancV1R の機能解明を目的とし、ancV1R の欠損が性行

動と鋤鼻器の応答に与える影響について解析した。その結果、ancV1R 欠損メスは性行動に対する拒絶行動を顕著に示し、ancV1R がメスの性行動に重要な役割を担っていることが明らかとなった。AncV1R 欠損メスでは、オス尿中フェロモンに対する嗜好性の消失と、オスのフェロモン刺激に対する鋤鼻器の応答の低下が認められ、オスに由来するフェロモンシグナルの感知に異常を生じていることがわかった。

#### 2-4-1. ancV1R の欠損による鋤鼻受容体遺伝子の発現変動

AncV1R 欠損マウス鋤鼻器の鋤鼻受容体遺伝子発現を網羅的に解析した結果、99%の V1R、77%の V2R の発現は変化していなかった。AncV1R 欠損マウス鋤鼻器の *Vmn2r116* の発現量と発現細胞数は野生型と差異がないことに対し、そのリガンドである ESP1 に対する応答細胞数は減少していた (図 2-12C、D)。また近年同定された、マウス新生仔に由来する化学シグナルを受容する鋤鼻受容体 (Isogai *et al.*, 2020; *Vmn1r9*、*Vmn1r10*、*Vmn1r193*、*Vmn2r65*、*Vmn2r88*、*Vmn2r122*) の発現も RNA-seq 解析で変動が認められなかった (図 2-11A)。これに対し、新生仔と接触した際の鋤鼻器の応答も低下していた (図 2-10A、B)。更に、*Vmn1r237* 発現細胞に着目した応答解析をおこない、ancV1R 欠損型でリガンド感受性が低下していることを示した (図 2-15E)。本研究の結果から、ancV1R が様々なフェロモンに対する鋤鼻神経細胞の応答性を促進する機能を有していることが明らかとなった。

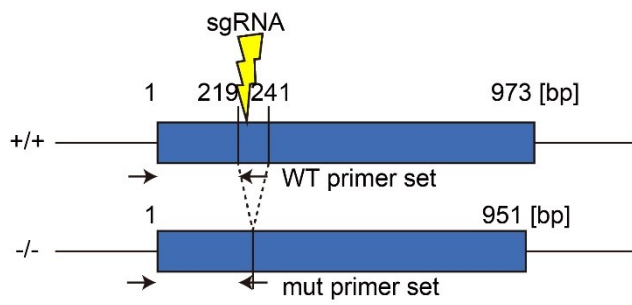
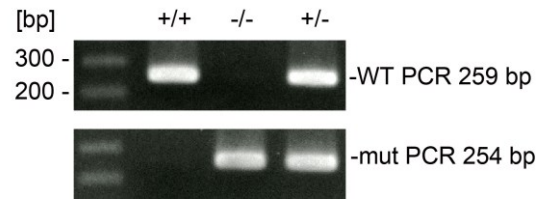
大部分の鋤鼻受容体の発現が変化していない一方、一部の鋤鼻受容体の発現は ancV1R の欠損によって変動した。186 個中 2 つの V1R、123 個中 24 個の V2R の発現が増加、4 つの V2R の発現が減少しており、発現変動遺伝子の中では発現が増加していたものが多かった (図 2-11)。シグナル伝達分子の欠損は受容体の発現細胞数に影響を与える (Stowers *et al.*, 2002; Chamero *et al.*, 2011; Trouillet *et al.*, 2019)。Trpc2 を欠損したマウスでは *Vmn1r51* 発現鋤鼻神経細胞の軸索投射が成長につれて減少する。G $\alpha_{i2}$  の欠損によって V1R 発現細胞数が、G $\alpha_o$  の欠損によって V2R 発現細胞数が減少し、鋤鼻神経細胞の活動が細胞の維持に必要であると考えられる。これらのことを踏まえると、多くの鋤鼻受容体のシグナル伝達を促進する ancV1R を欠損した結果、発現が増加した一部の受容体は、ancV1R 非存在下でもリガンド応答が減少しない可能性がある。これらの受容体と ancV1R の関係について調べることで、ancV1R の機能をより明確にできる可能性がある。しかしながら、発現変動受容体 30 個の中でリガンドが明らかになっているものはほとんどない。唯一、*Vmn2r81* は先行研究でペプチド SEIDLILGY を受容することが報告されているが (Leinders-Zufall *et al.*, 2014)、実際にこのペプチド溶液 (50  $\mu$ M, 1 mM) をマウスに提示し鋤鼻器の応答を解析したところ、野生型と ancV1R 欠損型の両方で最初期遺伝子の発現を検出できなかった。今後、ancV1R の欠損によって受容体の発現が変動する原因を解析するには、まずはこれらのリガンド物質を同定する必要がある。

#### 2-4-2. ancV1R の欠損がメスの性行動に与える影響

鋤鼻神経細胞のシグナル伝達分子 (Trpc2、G $\alpha_{i2}$ 、G $\alpha_o$ ) を欠失したメスでは、性行動の受容性が低下する (Kimchi *et al.*, 2007; Trouillet *et al.*, 2021; Oboti *et al.*, 2014; 表 1-2)。AncV1R 欠損メスで性行動に対する拒絶行動が強く見られたことは、これら鋤鼻神経細胞の活動に異常を

生じたメスの行動異常に類似しており、オスとの接触時の鋤鼻系の正常な活動がメスの性行動に重要であるという知見と一致する。一方、*Trpc2* の欠失によって鋤鼻系の入力を遮断したメスマウスでは、交尾の受容性が低下することに加え、接触相手に対しオス様のマウント行動を示すことが報告されている (Kimchi *et al.*, 2007; Fraser and Shah, 2014)。本研究で *ancV1R* 欠損メスマウスの性行動を解析した結果、オスに対するマウント行動は認められなかった。*AncV1R* 欠損メスと *Trpc2* 欠損メスの表現型の違いは、鋤鼻器からの入力が増少しているか、消失しているかの違いによって生じるものと考えられる。*V1R* と共役する  $G\alpha_{i2}$ 、または、*V2R* と共役する  $G\alpha_o$  を欠損したメスでも、オス様の性行動は示されない (Trouillet *et al.*, 2021; Oboti *et al.*, 2014)。このため、鋤鼻器の活動の部分的な欠失ではメスにオス様の性行動を発現させるには至らないものと考えられる。*AncV1R* 欠損による末梢器官の応答の低下が、高次中枢神経系でどのように処理され、性行動の異常につながったのかについては、次章でその解析結果を述べる。

*AncV1R* 欠損メスと *Trpc2* 欠損メスの表現型の違いは、母性攻撃行動にも認められた。*Trpc2* を欠損した授乳期のメスではイントルーダーに対する攻撃は消失する一方 (Leypold *et al.*, 2002; Fraser and Shah, 2014)、*ancV1R* 欠損メスの母性攻撃行動は、野生型と比較し低下していたが消失はしていなかった (図 2-16)。 $G\alpha_o$  欠損メスの母性攻撃行動は顕著に減弱するのに対し、 $G\alpha_{i2}$  欠損母マウスでは攻撃行動およびその他の母性行動にコントロールとの差は認められていない (Chamero *et al.*, 2011; Trouillet *et al.*, 2021)。このため、*ancV1R* 欠損母マウスの攻撃行動の低下は主に *V2R* 発現細胞を介した入力の減少によって生じたと考えられる。

**A****B**

### 図 2-1. *ancV1R* 欠損マウスの作出

(A) CRISPR-Cas9 システムにより作出された *ancV1R* 欠損マウスの遺伝子構造の模式図。推定第二細胞外ドメインの位置に 22 bp の欠失が生じている。

(B) A に示すプライマーセットを用いた遺伝子型判定。

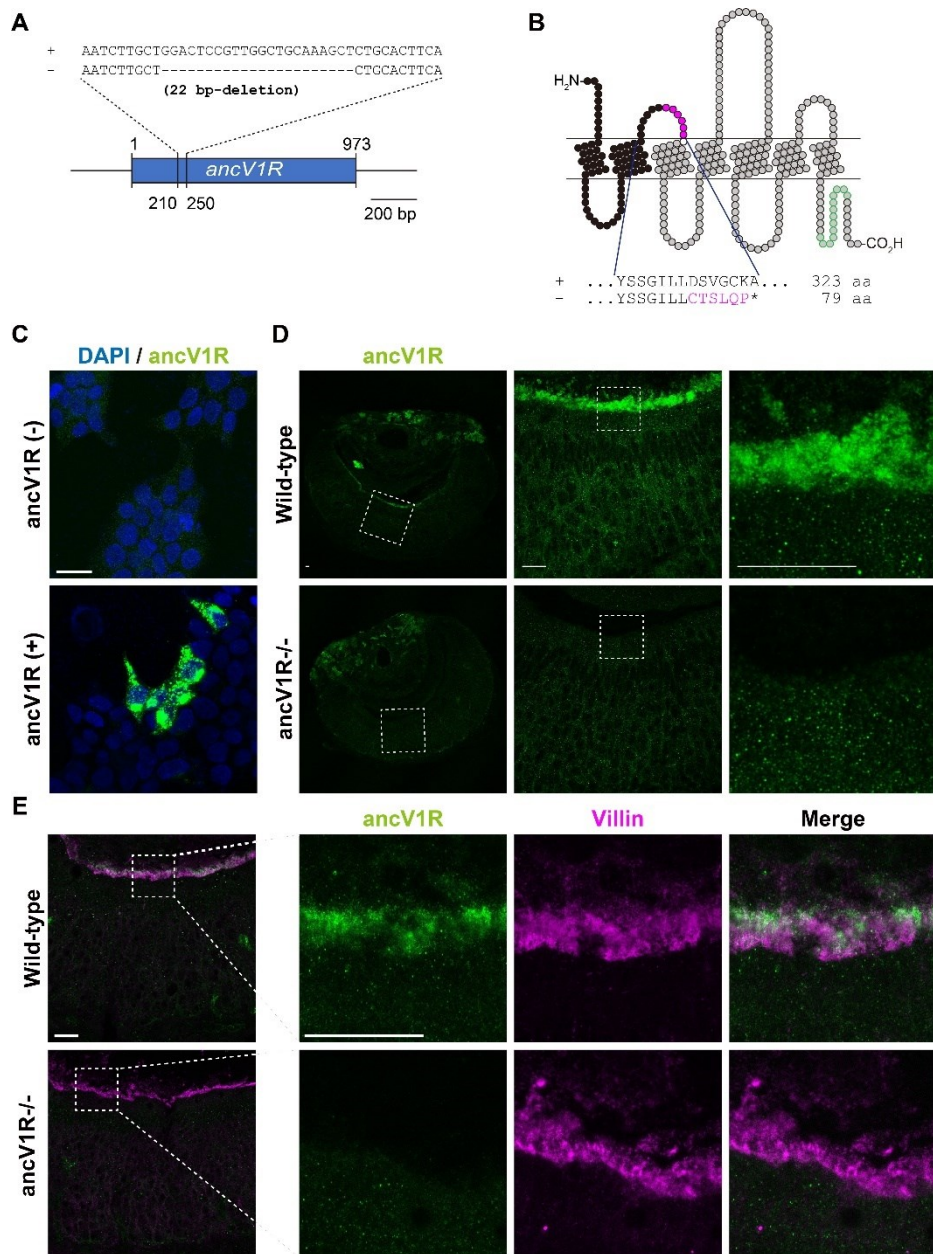


図 2-2. ancV1R の免疫組織化学

(A) ancV1R 欠失アレルの DNA 配列。

(B) ancV1R アミノ酸配列のスネークプロット。ancV1R 欠損マウスにおいて、フレームシフト変異で置換されたアミノ酸残基をマゼンタ、終止コドン以降の残基を灰色で示す。また、抗 ancV1R 抗体で抗原とした部位を緑の枠線で示す。

(C) ancV1R を発現させた (ancV1R(+))、もしくは、発現しない (ancV1R(-)) HEK293 細胞を抗 ancV1R 抗体によって染色した結果。

(D) 野生型と ancV1R 欠損型マウス (8 週齢) の鋤鼻器を抗 ancV1R 抗体により染色をおこなった結果。

(E) マウス鋤鼻器の ancV1R と Villin (微絨毛マーカー) の共免疫組織化学をおこなった結果。スケールバー、20  $\mu$ m。

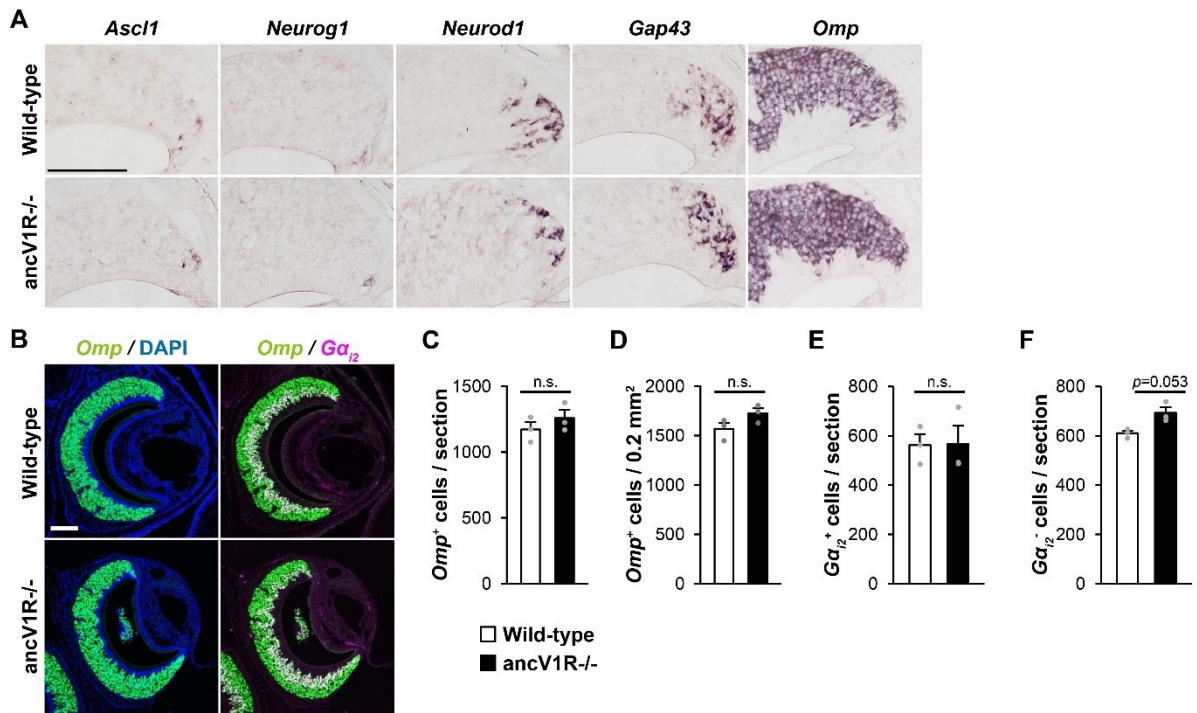


図 2-3. ancV1R の欠損が鋤鼻神経細胞の分化発生に与える影響

(A) 野生型、および、ancV1R 欠損マウス (8 週齢) 鋤鼻器における分化マーカー遺伝子の発現を *in situ* hybridization により解析した。Ascl1 (神経前駆細胞)、Neurog1 (神経前駆細胞)、Neurod1 (神経細胞への最終分化段階)、Gap43 (未成熟鋤鼻神経細胞)、Omp (成熟鋤鼻神経細胞)。スケールバー、100  $\mu$ m。

(B) 鋤鼻器の Omp と G $\alpha_{i2}$  の二色 *in situ* hybridization をおこなった結果。スケールバー、100  $\mu$ m。

(C, D) Omp 発現細胞の数 (C) と密度 (D) を定量した結果。

(E, F) G $\alpha_{i2}$  陽性表層側鋤鼻神経細胞と G $\alpha_{i2}$  陰性基底側鋤鼻神経細胞の数を定量した結果。

Data are represented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  females for each genotype). Unpaired Student's *t*-test.

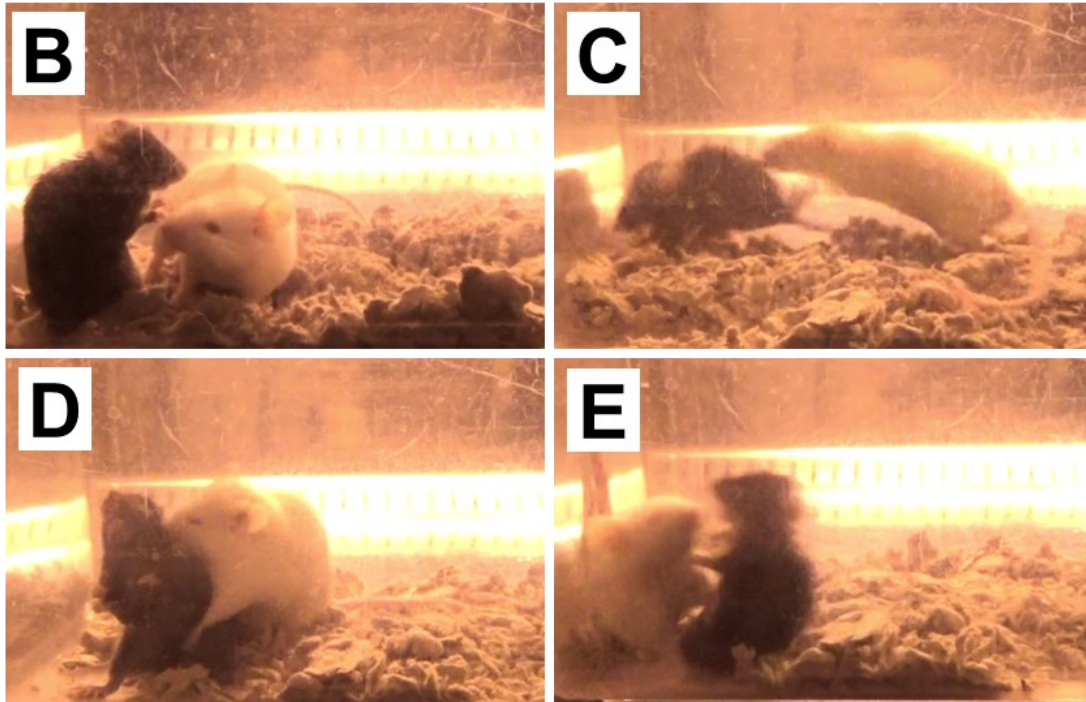
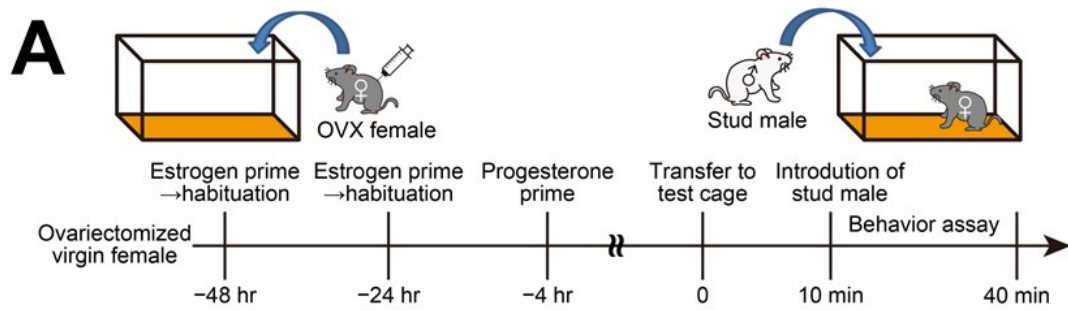


図 2-4. メスの性行動解析

(A) メスマウスの性行動の解析手順。卵巣を除去し、 $\beta$ -エストラジオールとプロゲステロンの投与によって発情状態を誘導した。オスマウスと 30 分間接触させ行動を解析した。  
 (B-E) オスの性行動に対するメスの拒絶行動。オスの接近に対し警戒する姿勢 (boxing posture、B)、オスから走って逃げる行動 (running away、C)、オスの mount 中に立ち上がる行動 (standing、D)、オスの mount に対し体を翻す行動 (turning、E) を拒絶行動と定義して解析した。

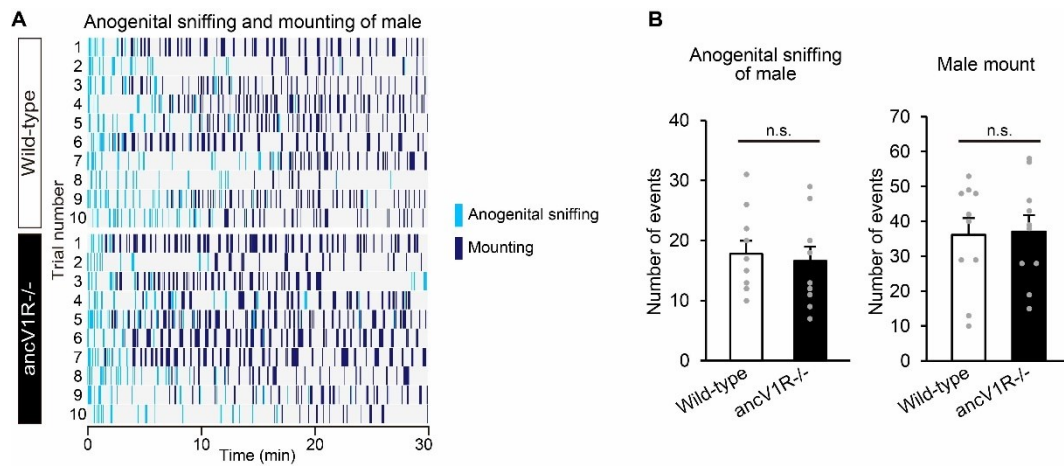


図 2-5. 性行動実験でオスが示した行動の解析

(A-B) オスがメスに対して示した anogenital sniffing と mount の解析。野生型メスと ancV1R 欠損メスを用いた場合でオスの示した行動の回数に顕著な差は見られなかった。

Data are represented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 10$  for each genotype). Wilcoxon rank-sum test.

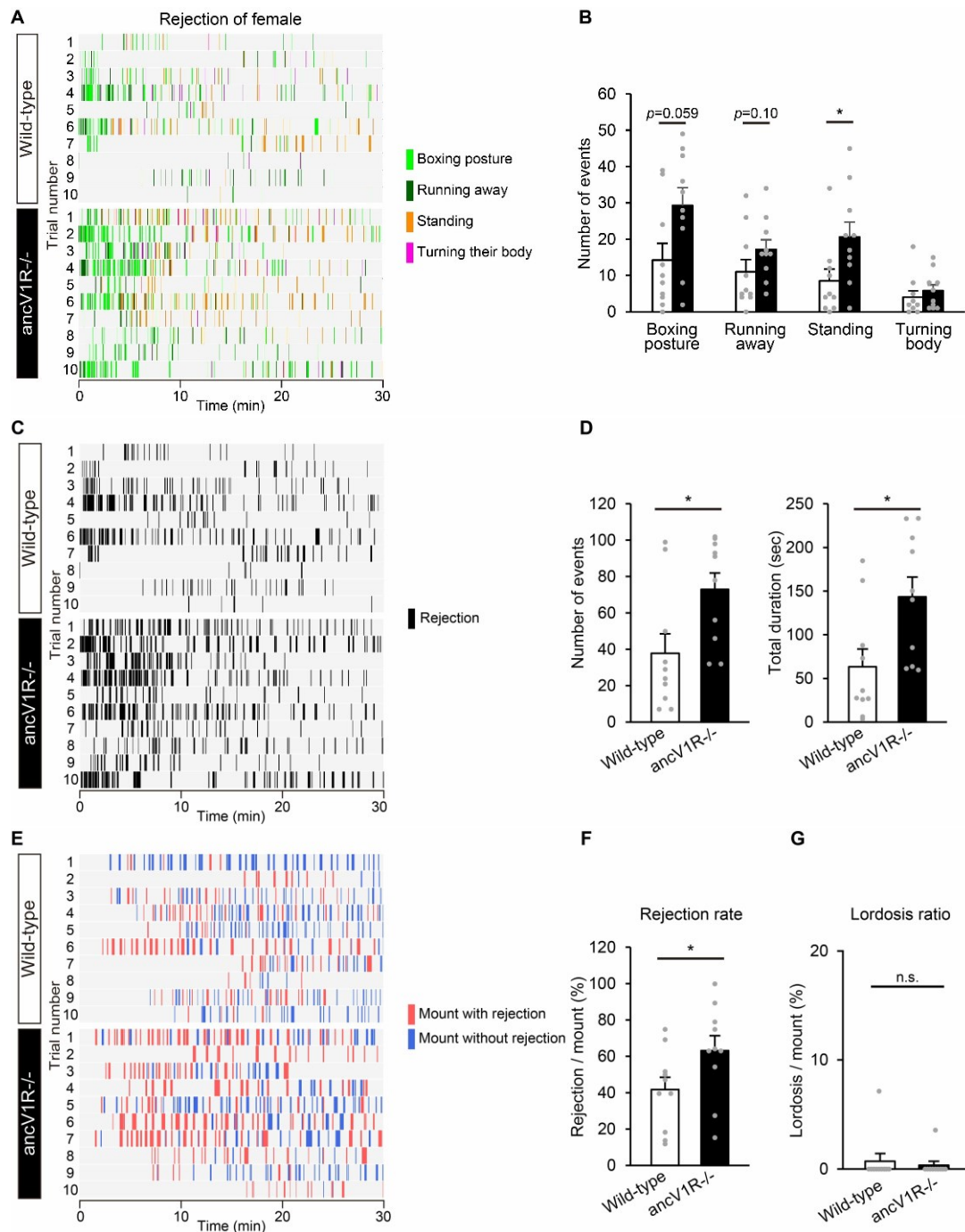


図 2-6. ancV1R 欠損メスの性行動解析

(A-D) オスの性行動に対しメスが示した拒絶行動の解析結果。野生型と比較し ancV1R 欠損メスでは攻撃行動の回数と時間が有意に増加していた。

(E-F) オスの mount に対するメスの反応の解析。オスの mount に対しメスが拒絶行動を示した割合は ancV1R 欠損型で有意に高かった。

(G) オスの mount に対しメスが lordosis を示した割合。

Data are represented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 10$  for each genotype). Wilcoxon rank-sum test ( $p < 0.05$ ).

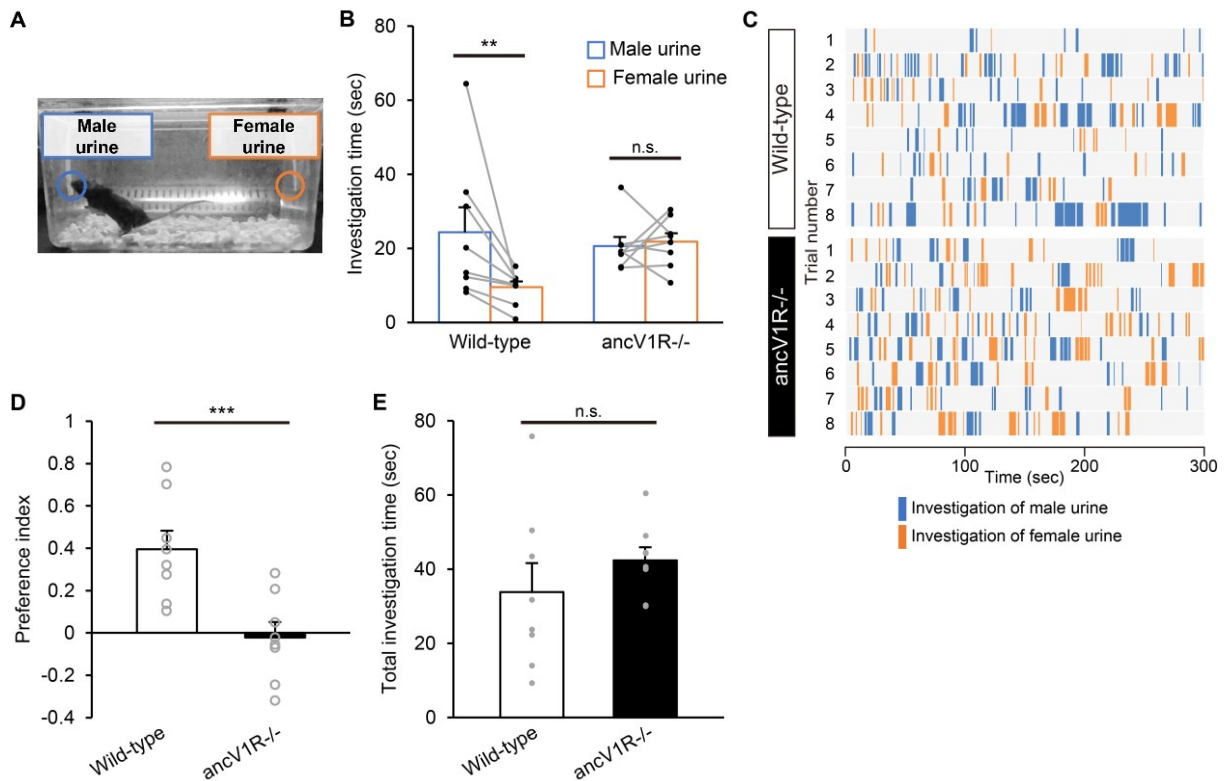


図 2-7. ancV1R 欠損メスのオス尿に対する嗜好性の消失

(A) 発情期のメスマウスに、オスとメスの尿を同時に提示し、それぞれの探索時間を測定した。

(B) 野生型、および、ancV1R 欠損メスの尿の探索時間の測定結果。Data are represented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$  females for each genotype). Wilcoxon signed-rank test (\*\* $p < 0.01$ ).

(C) オスとメスの尿の探索行動のラスタープロット。

(D) オス尿とメス尿の探索時間の差を、合計時間で割って算出した嗜好性指数。

(E) 尿探索の合計時間。

Data are represented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$  females for each genotype). Wilcoxon rank-sum test (\*\* $p < 0.005$ ).

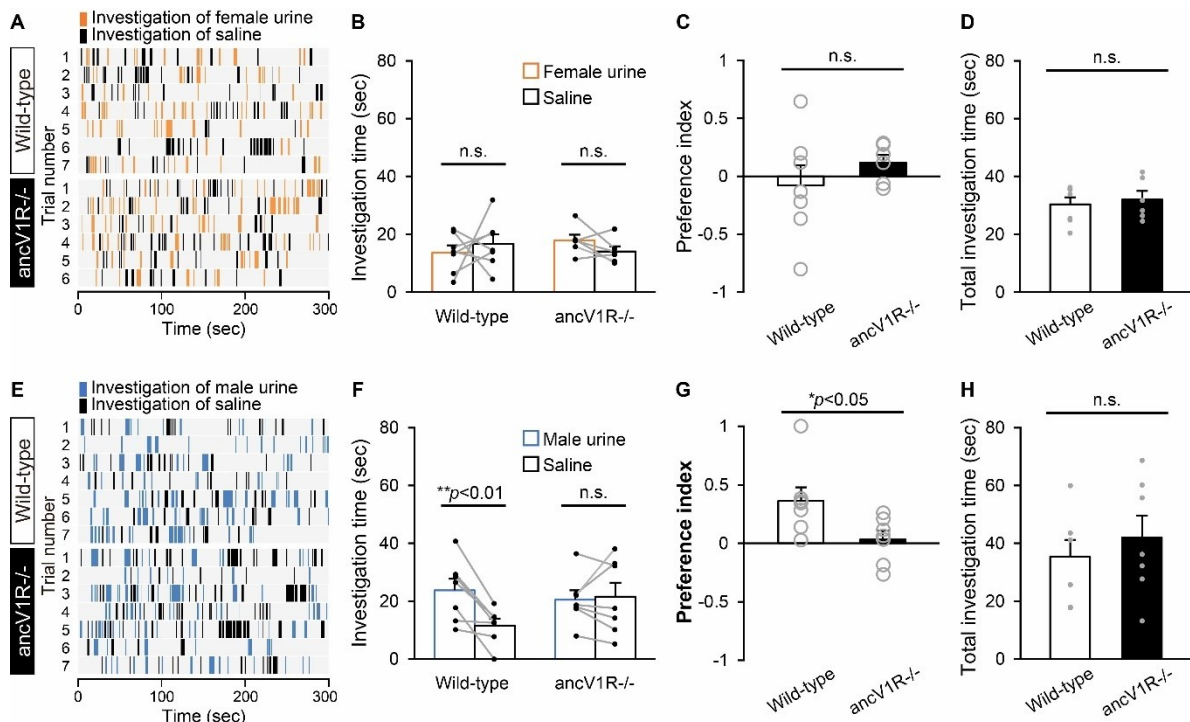


図 2-8. ancV1R 欠損メスのメス・オス尿に対する嗜好性の解析

(A-D) 発情期のメスマウスに、メスの尿と生理食塩水を同時に提示し、それぞれの探索時間を測定した結果。

(A) 5 分間にメス尿と生理食塩水を探索したタイミングを表すラスタープロット。

(B) メス尿と生理食塩水の探索時間の比較。Data are represented as mean  $\pm$  SEM (Wild-type,  $n = 7$  females; ancV1R $^{-/-}$ ,  $n = 6$  females). Wilcoxon signed-rank test.

(C-D) メス尿に対する嗜好性指数 (C) と、尿・生理食塩水の合計探索時間 (D) を遺伝子型間で比較した結果。Data are represented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 6-7$  females). Wilcoxon rank-sum test.

(E-H) 発情期のメスマウスに、オスの尿と生理食塩水を同時に提示し、それぞれの探索時間を測定した結果。

(E) 5 分間にオス尿と生理食塩水を探索したタイミングを表すラスタープロット。

(F) オス尿と生理食塩水の探索時間の比較。Data are represented as mean  $\pm$  SEM (Wild-type,  $n = 7$  females; ancV1R $^{-/-}$ ,  $n = 7$  females). Wilcoxon signed-rank test (\*\* $p < 0.01$ ).

(G-H) メス尿に対する嗜好性指数 (G) と、尿・生理食塩水の合計探索時間 (H) を遺伝子型間で比較した結果。

Data are represented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 7$  females for each genotype). Wilcoxon rank-sum test.

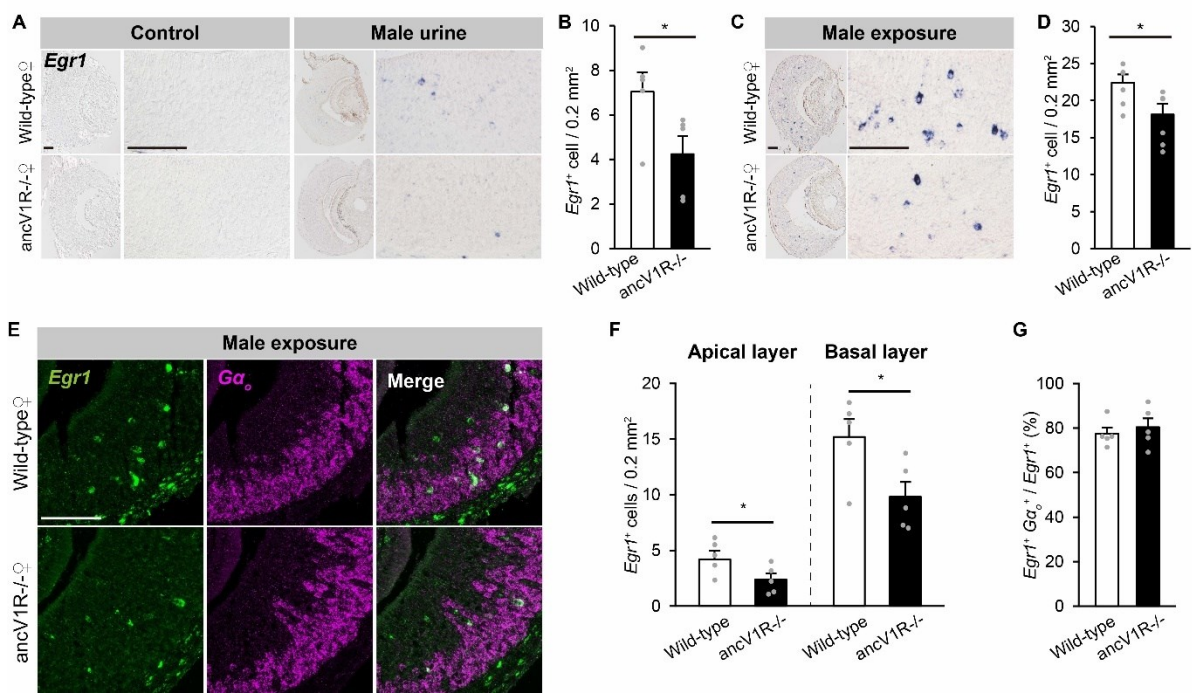


図 2-9. オスフェロモンに対する鋤鼻器の生理学的応答の解析

(A) メスマウスにオス尿の刺激を提示した際に活性化した鋤鼻神経細胞を *Egr1* の *in situ* hybridization によって可視化した結果。刺激のない条件で染色細胞が認められず、オス尿による刺激で *Egr1* の発現が誘導される様子が、野生型と *ancV1R* 欠損型の両方で認められた。スケールバー、100  $\mu\text{m}$ 。

(B) オス尿刺激を与えたメスマウス鋤鼻器における *Egr1* 発現細胞数を定量した結果 ( $n = 5$  females for each genotype)。

(C-D) メスマウスがオスと接触した際に活性化した鋤鼻神経細胞を可視化し、細胞数を定量した結果 ( $n = 6$  females for each genotype)。スケールバー、100  $\mu\text{m}$ 。

(E-G) オスと接触させ刺激したメスマウスの鋤鼻器の *Egr1* と *Gαo* の二色 *in situ* hybridization (E)。 *Gαo* 陰性の上皮表層側 (apical) と *Gαo* 陽性の基底側 (basal) の *Egr1* 発現細胞を定量した結果 (F)。 *Egr1* 発現細胞中の *Gαo* 共発現率 (G)。スケールバー、100  $\mu\text{m}$ 。

Data are represented as mean  $\pm$  SEM. Unpaired Student' s *t*-test ( $*p < 0.05$ ).

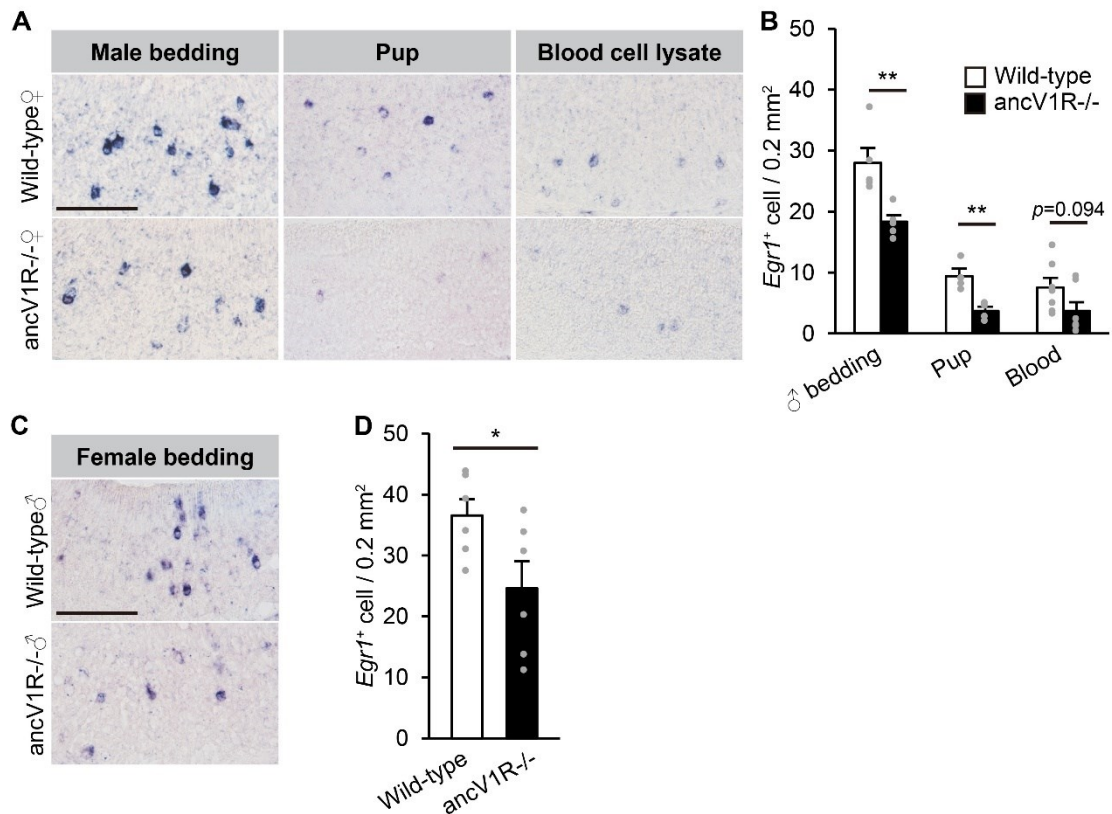


図 2-10. ancV1R の欠損がフェロモンに対する鋤鼻器の応答に与える影響

(A) メスマウスに対し、オスの飼育ケージの床敷き、新生仔、血液を提示した際に活性化した鋤鼻神経細胞を *Egr1* の *in situ* hybridization によって可視化した結果。スケールバー、100  $\mu$ m。

(B) それぞれのフェロモン刺激を与えた際の *Egr1* 発現鋤鼻神経細胞数を定量した結果。

(C-D) オスマウスに対し、メスの飼育ケージの床敷きを提示した際に活性化した鋤鼻神経細胞を可視化し、細胞数を定量した結果 ( $n = 6$  males for each genotype)。スケールバー、100  $\mu$ m。

Data are represented as mean  $\pm$  SEM. Unpaired Student's *t*-test ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ )

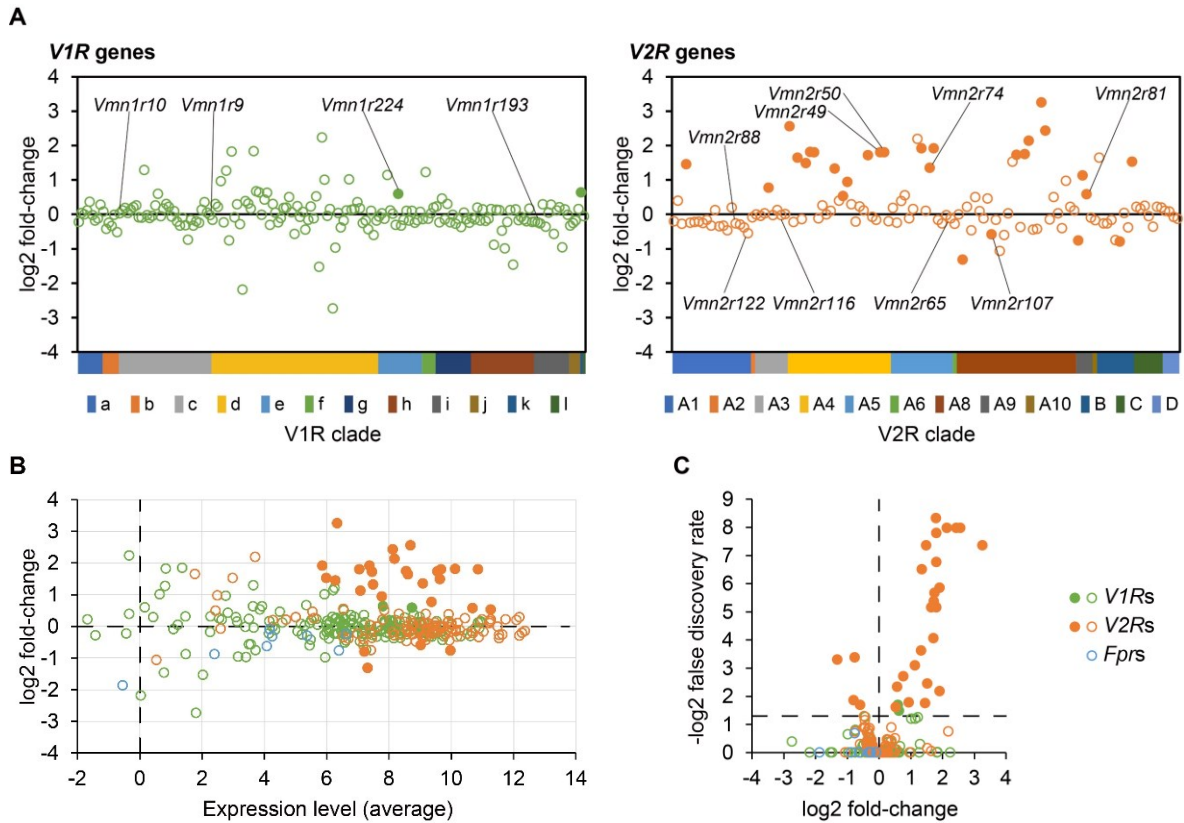


図 2-11. ancV1R 欠損マウスにおける鋤鼻受容体発現の網羅的解析

(A) ancV1R 欠損メスマウスにおける *V1R* と *V2R* の発現を RNA-seq により解析した結果 ( $n = 3$  biological replicates per genotype)。 *V1R* と *V2R* 遺伝子の log<sub>2</sub>-fold change を、受容体のクレード分類に沿って示した。 *V1R* のプロットを緑、 *V2R* のプロットをオレンジで示し、 ancV1R 欠損型で発現が有意に変動した遺伝子 (FDR value < 0.05) のプロットを塗りつぶして示している。

(B) 鋤鼻受容体の発現量を横軸、 log<sub>2</sub>-fold change を縦軸にとった MA プロット。

(C) log<sub>2</sub>-fold change を横軸、 FDR value の対数值 (-log FDR) を縦軸にとった volcano プロット。

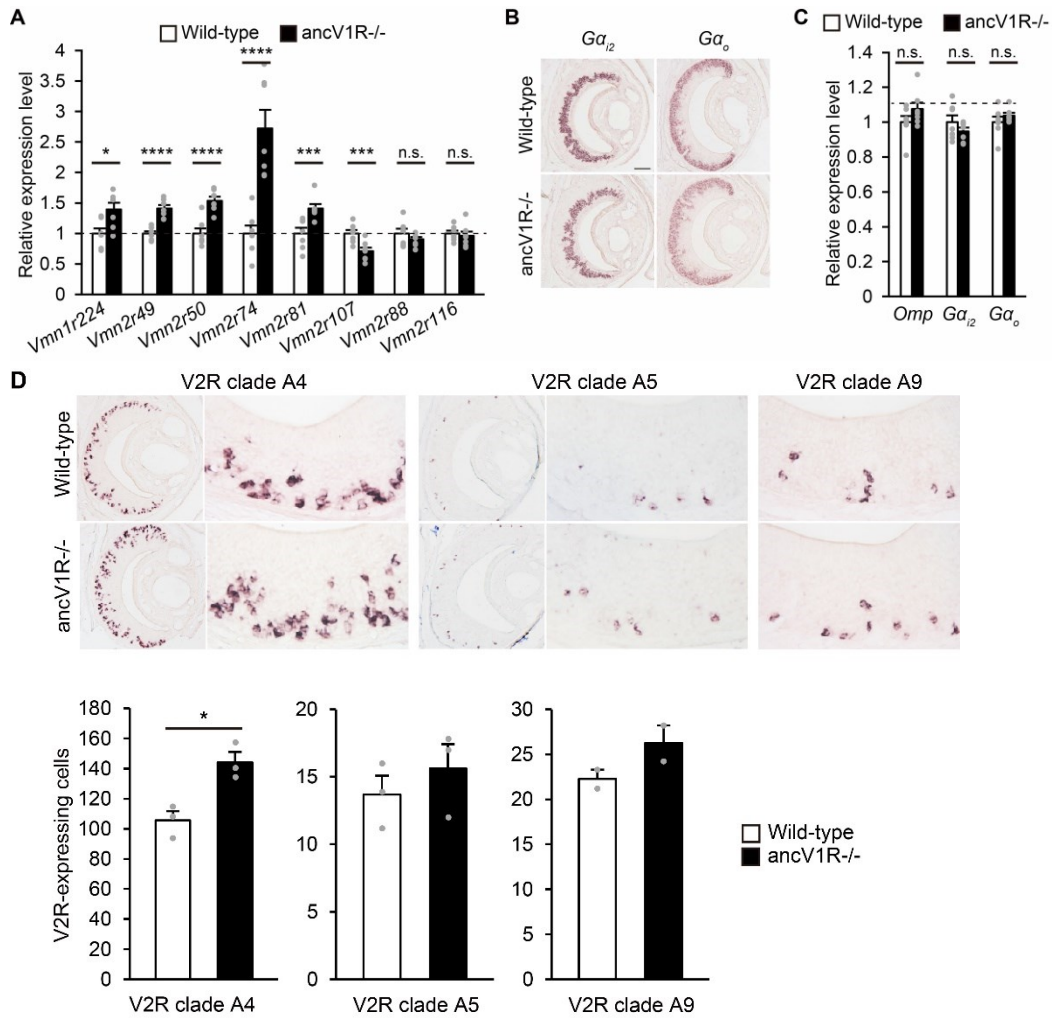


図 2-12. ancV1R の欠損が鋤鼻受容体発現に与える影響

(A) ancV1R 欠損マウスにおいて発現が増加、減少、変化しない鋤鼻受容体遺伝子の相対発現量を定量 RT-PCR で解析した結果 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法, Wild-type,  $n = 7$  females for each gene; ancV1R<sup>-/-</sup>,  $n = 7$  females for each gene)。

(B) ancV1R 欠損マウス鋤鼻器の *in situ* hybridization による *Gα<sub>12</sub>* と *Gα<sub>o</sub>* の発現解析。スケールバー、100  $\mu\text{m}$ 。

(C) ancV1R 欠損マウス鋤鼻器の定量 RT-PCR による *Omp* と *Gα<sub>12</sub>*、*Gα<sub>o</sub>* の発現解析 ( $n = 7$  females for each gene)。

(D) *V2R* のクレード特異的プローブを用いた *in situ* hybridization による *V2R* 発現細胞数の定量 ( $n = 2-3$  for each genotype)。

Data are represented as mean  $\pm$  SEM. Unpaired Student's *t*-test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.001$ , n.s. = not significant)。

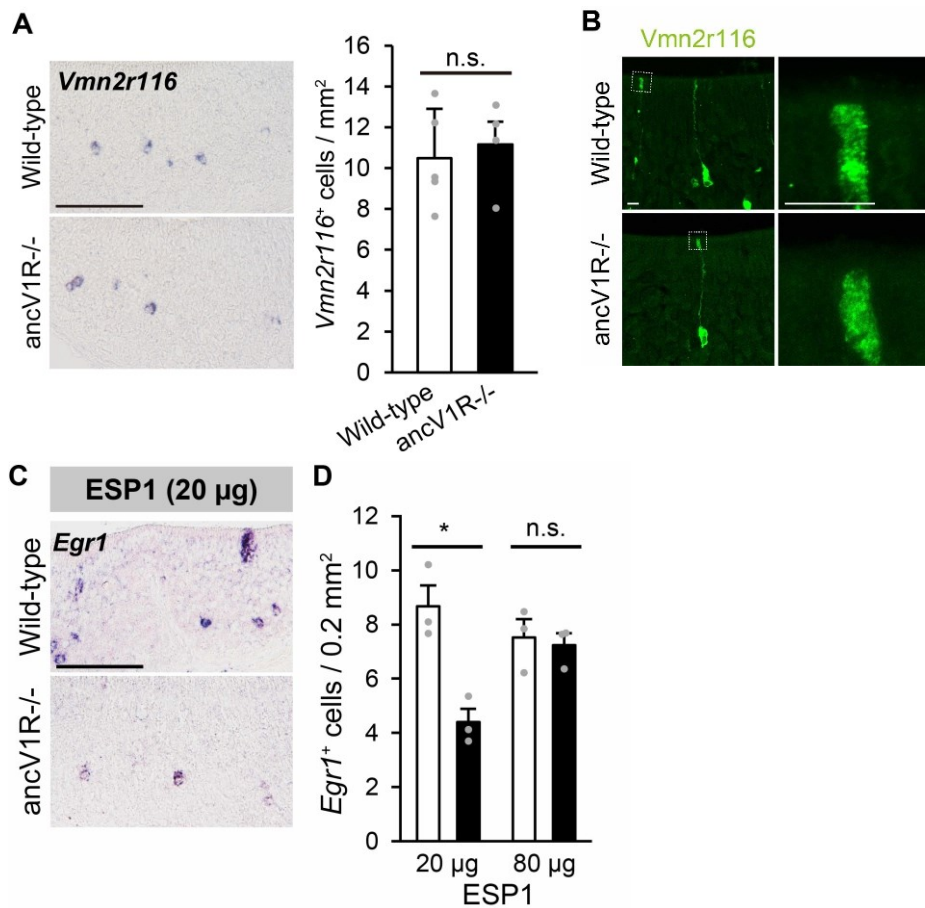


図 2-13. ESP1 に対する鋤鼻器の生理学的応答の解析

(A) ESP1 受容体 (Vmn2r116) 発現細胞を *in situ* hybridization によって染色し、定量した結果。スケールバー、100  $\mu$ m。Data are represented as mean  $\pm$  SEM (Wild-type,  $n = 5$  females; ancV1R<sup>-/-</sup>,  $n = 4$  females).

(B) 抗 Vmn2r116 抗体を用いて野生型と ancV1R 欠損型マウス鋤鼻器の免疫組織化学をおこなった結果。スケールバー、10  $\mu$ m。

(C-D) 野生型と ancV1R 欠損型マウスに ESP1 (20  $\mu$ g・80  $\mu$ g) を提示し、活性化した鋤鼻神経細胞の数を *Egr1* の *in situ* hybridization により解析した結果。スケールバー、100  $\mu$ m。Data are represented as mean  $\pm$  SEM (Wild-type,  $n = 3$  females for each concentration; ancV1R<sup>-/-</sup>,  $n = 3$  females for each concentration). Unpaired Student's *t*-test (\* $p < 0.05$ )

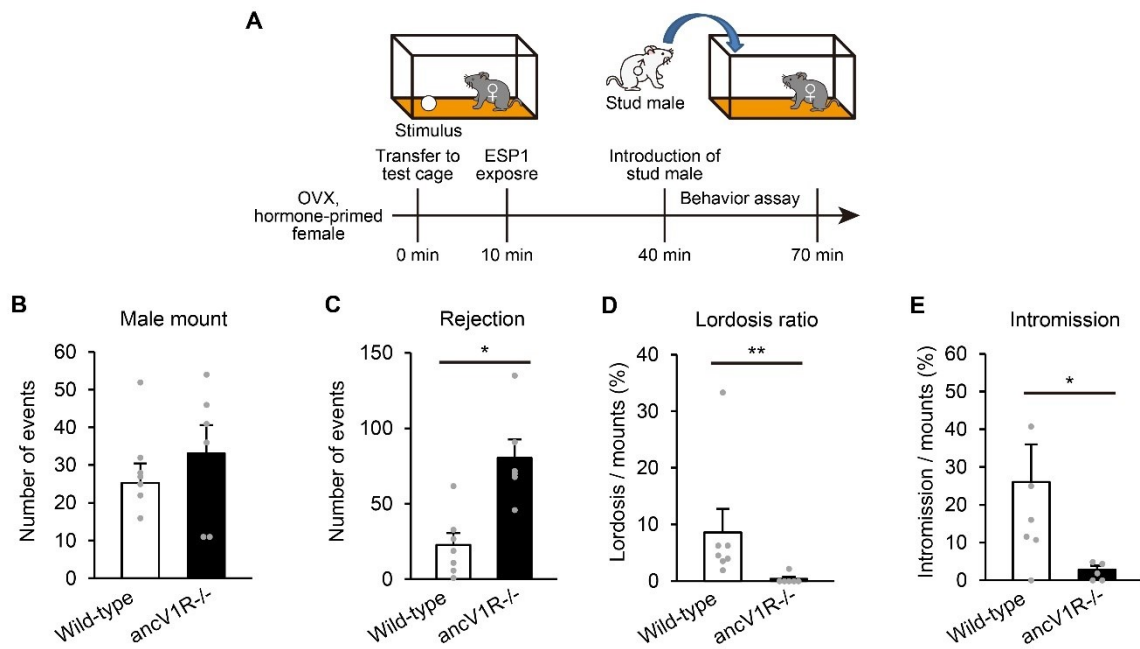


図 2-14. ESP1 で刺激したメスの性行動

(A) 卵巣除去し、ホルモン投与によって発情させたメスに、ESP1 で 30 分間前刺激しておく、オスを導入し行動を解析した。

(B-E) オスの mount 回数 (B)、メスの拒絶行動の回数 (C)、オスの mount に対してメスが lordosis を示した割合 (D)、オスが mount した際に intromission が示された割合 (E) をそれぞれ定量した結果。Data are represented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 7$  for wild-type and  $n = 6$  for ancV1R<sup>-/-</sup>). Wilcoxon rank-sum test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

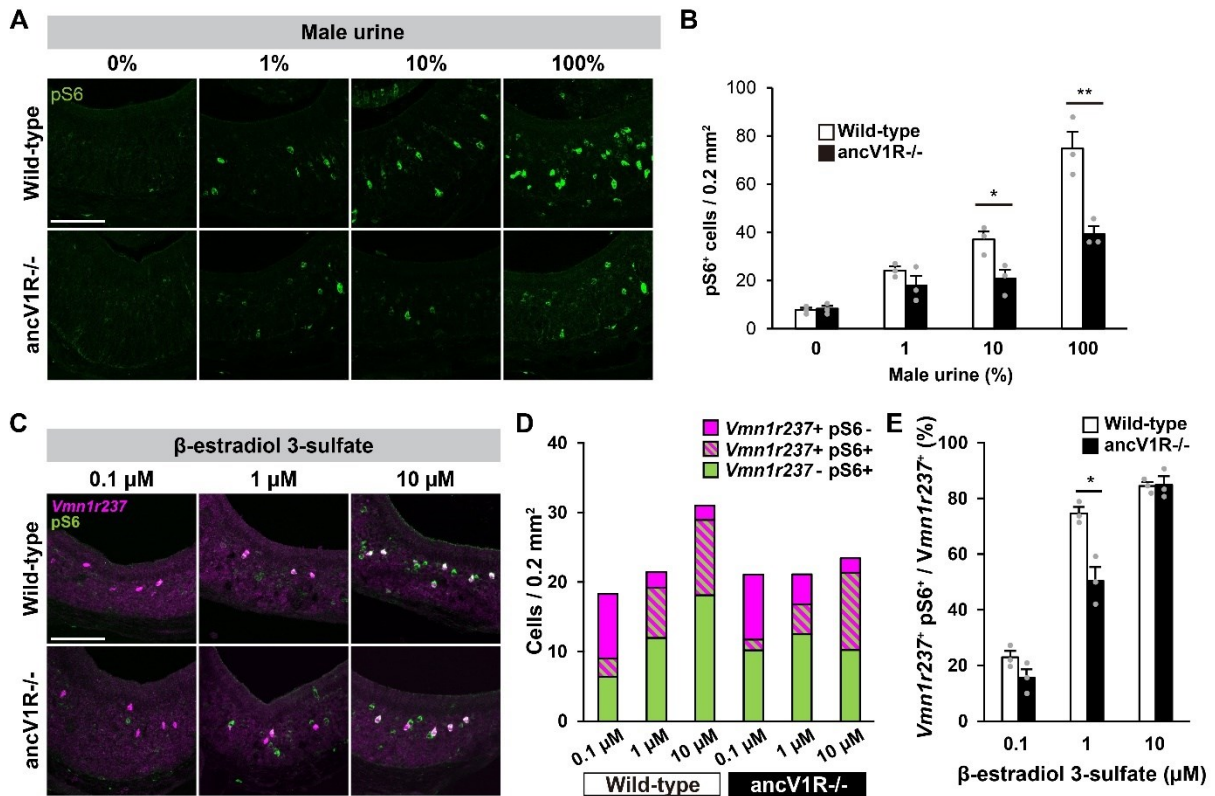


図 2-15. 鋤鼻受容体リガンドに対する濃度依存的神経応答

(A) オス尿の濃度依存的な鋤鼻器の応答を pS6 の免疫組織化学によって解析した結果。スケールバー、100 μm。

(B) それぞれの濃度のオス尿で刺激した際に検出された pS6 陽性細胞の数 (Wild-type,  $n = 3$  females for each concentration; ancV1R<sup>-/-</sup>,  $n = 3$  females for each concentration)。

(C) β-エストラジオール 3-硫酸の濃度依存的な鋤鼻器の応答を、pS6 と *Vmn1r237* 発現細胞の共染色によって解析した結果。スケールバー、100 μm。

(D) それぞれの濃度の β-エストラジオール 3-硫酸で刺激した際に検出された pS6 のみ陽性細胞 (緑色)、*Vmn1r237* のみ陽性細胞 (マゼンタ)、および、共染色細胞 (ストライプ) の数 (Wild-type,  $n = 3$  females for each concentration; ancV1R<sup>-/-</sup>,  $n = 3$  females for each concentration)。

(E) *Vmn1r237* 発現細胞中の pS6 陽性率 (Wild-type,  $n = 3$  females; ancV1R<sup>-/-</sup>,  $n = 3$  females)。

Data are represented as mean ± SEM. Student's *t*-test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

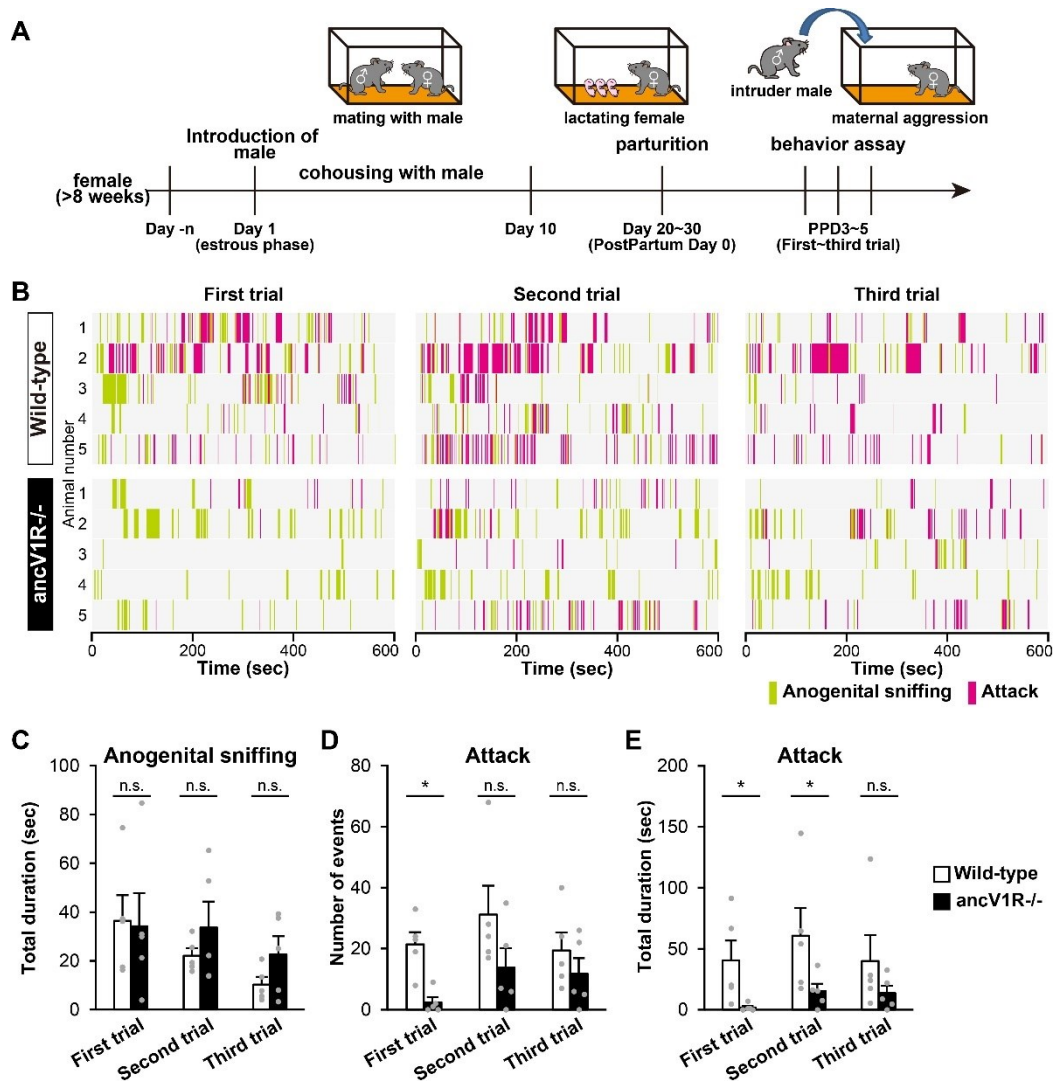


図 2-16. *ancV1R* の欠損が母性攻撃行動に与える影響

(A) メスが発情期の日から 10 日間オスと同棲させ、妊娠メスを得た。出産 3~5 日後、飼育ケージ内にオスを導入し、10 分間の行動を解析した。

(B) メスがオスに対する探索行動（緑色）と攻撃行動（マゼンタ）を示したタイミングを示すラスタープロット (Wild-type,  $n = 5$  females; *ancV1R*<sup>-/-</sup>,  $n = 5$  females)。

(C) メスがオスに対する探索行動を示した累計時間。

(D-E) メスがオスに対する攻撃行動を示した数 (D) と累計時間 (E)。

Data are represented as mean  $\pm$  SEM. Wilcoxon rank-sum test ( $*p < 0.05$ , n.s. = not significant).

表 2-4. 定量データ

Figure	Target	No. of Animals	Wild-type value (Mean ± SEM)	ancV1R <sup>-/-</sup> value (Mean ± SEM)	Statistics	p value
図 2-3C	No. of <i>Omp</i> <sup>+</sup> cells	Wild-type, n=3; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=3	1172.6 ± 54.7	1258.2 ± 62.2	unpaired Student's t-test	0.3602
図 2-3D	Density of <i>Omp</i> <sup>+</sup> cells / 0.2 mm <sup>2</sup>	Wild-type, n=3; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=3	1567.2 ± 61.9	1724.1 ± 51.6	unpaired Student's t-test	0.1258
図 2-3E	No. of <i>Gα2</i> <sup>+</sup> <i>Omp</i> <sup>+</sup> cells	Wild-type, n=3; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=3	562.6 ± 44.0	565.3 ± 75.3	unpaired Student's t-test	0.9765
図 2-3F	No. of <i>Gα2</i> <sup>-</sup> <i>Omp</i> <sup>+</sup> cells	Wild-type, n=3; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=3	610.0 ± 10.7	692.9 ± 23.3	unpaired Student's t-test	0.0528
図 2-5B	No. of anogenital sniffing of male	Wild-type, n=10; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=10	17.8 ± 2.17	16.6 ± 2.36	Wilcoxon rank-sum test	0.622
	No. of male mounting	Wild-type, n=10; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=10	36.1 ± 4.83	37.1 ± 4.63	Wilcoxon rank-sum test	0.8797
図 2-6B	No. of boxing posture	Wild-type, n=10; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=10	14.3 ± 4.56	29.3 ± 4.87	Wilcoxon rank-sum test	0.0586
	No. of running away	Wild-type, n=10; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=10	11.0 ± 3.39	17.2 ± 2.68	Wilcoxon rank-sum test	0.1028
	No. of standing	Wild-type, n=10; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=10	8.5 ± 3.22	20.6 ± 4.17	Wilcoxon rank-sum test	0.0188
	No. of tuning their body	Wild-type, n=10; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=10	4.0 ± 1.74	5.8 ± 1.62	Wilcoxon rank-sum test	0.302
図 2-6D	No. of rejection	Wild-type, n=10; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=10	37.8 ± 10.7	72.9 ± 9.05	Wilcoxon rank-sum test	0.0232
	Total duration of rejection	Wild-type, n=10; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=10	63.4 ± 20.22	143.3 ± 22.85	Wilcoxon rank-sum test	0.0191
図 2-6F	% of rejection rate	Wild-type, n=10; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=10	41.6 ± 6.90	63.1 ± 8.21	Wilcoxon rank-sum test	0.0449
図 2-6G	% of lordosis ratio	Wild-type, n=10; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=10	0.714 ± 0.71	0.357 ± 0.36	Wilcoxon rank-sum test	0.9422
図 2-7B	Investigation time for male and female urine, Wild-type female	Wild-type, n=8	male urine, 24.4 ± 6.75; female urine, 9.50 ± 1.59		Wilcoxon signed-rank test	0.0078
	Investigation time for male and female urine, ancV1R <sup>-/-</sup> female	ancV1R <sup>-/-</sup> , n=8	male urine, 20.6 ± 2.41; female urine, 21.8 ± 2.34		Wilcoxon signed-rank test	0.6406
図 2-7D	Preference index	Wild-type, n=8; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=8	0.396 ± 0.087	-0.0215 ± 0.072	Wilcoxon rank-sum test	0.0030
図 2-7E	Total investigation time	Wild-type, n=8; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=8	33.9 ± 7.76	42.4 ± 3.50	Wilcoxon rank-sum test	0.2786
図 2-8B	Investigation time for female urine and saline, Wild-type female	Wild-type, n=7	female urine, 13.7 ± 2.57; saline, 16.7 ± 3.30		Wilcoxon signed-rank test	0.5781
	Investigation time for female urine and saline, ancV1R <sup>-/-</sup> female	ancV1R <sup>-/-</sup> , n=6	female urine, 17.9 ± 2.00; saline, 14.1 ± 1.74		Wilcoxon signed-rank test	0.1753
図 2-8C	Preference index	Wild-type, n=7; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=6	-0.079 ± 0.174	0.117 ± 0.069	Wilcoxon rank-sum test	0.2949
図 2-8D	Total investigation time	Wild-type, n=7; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=6	30.37 ± 2.45	32.07 ± 2.89	Wilcoxon rank-sum test	0.7308
図 2-8F	Investigation time for male urine and saline, Wild-type female	Wild-type, n=7	male urine, 23.0 ± 4.66; saline, 11.4 ± 2.74		Wilcoxon signed-rank test	0.0313
	Investigation time for male urine and saline, ancV1R <sup>-/-</sup> female	ancV1R <sup>-/-</sup> , n=6	male urine, 20.9 ± 3.79; saline, 24.4 ± 6.61		Wilcoxon signed-rank test	1
図 2-8G	Preference index	Wild-type, n=7; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=6	0.359 ± 0.138	0.001 ± 0.098	Wilcoxon rank-sum test	0.0649
図 2-8H	Total investigation time	Wild-type, n=7; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=6	34.4 ± 6.85	45.3 ± 9.47	Wilcoxon rank-sum test	0.9372
図 2-9B	No. of <i>Egr1</i> <sup>+</sup> cells / 0.2 mm <sup>2</sup> , +male urine	Wild-type, n=5; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=5	7.04 ± 0.87	4.24 ± 0.82	two-tailed unpaired t-test	0.0472
図 2-9D	No. of <i>Egr1</i> <sup>+</sup> cells / 0.2 mm <sup>2</sup> , +male	Wild-type, n=6; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=6	22.4 ± 1.12	18.1 ± 1.46	two-tailed unpaired t-test	0.0342
図 2-9F	No. of apical <i>Egr1</i> <sup>+</sup> cells / 0.2 mm <sup>2</sup> , +male	Wild-type, n=5; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=5	4.19 ± 0.80	2.36 ± 0.56	unpaired Student's t-test	0.0451
	No. of basal <i>Egr1</i> <sup>+</sup> cells / 0.2 mm <sup>2</sup> , +male	Wild-type, n=5; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=5	15.2 ± 1.61	9.81 ± 1.34	unpaired Student's t-test	0.0345
図 2-9G	% of <i>Gα</i> <sub>2</sub> -positive cells, +male	Wild-type, n=5; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=5	77.4 ± 2.68	80.4 ± 4.01	unpaired Student's t-test	0.5608
図 2-10B	No. of <i>Egr1</i> <sup>+</sup> cells / 0.2 mm <sup>2</sup> , +male bedding	Wild-type, n=5; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=5	28.0 ± 2.41	18.3 ± 1.09	two-tailed unpaired t-test	0.0064
	No. of <i>Egr1</i> <sup>+</sup> cells / 0.2 mm <sup>2</sup> , +pup	Wild-type, n=4; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=4	9.44 ± 1.20	3.72 ± 0.70	two-tailed unpaired t-test	0.0062
	No. of <i>Egr1</i> <sup>+</sup> cells / 0.2 mm <sup>2</sup> , +blood	Wild-type, n=7; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=7	7.58 ± 1.56	3.70 ± 1.45	two-tailed unpaired t-test	0.0939
図 2-10D	No. of <i>Egr1</i> <sup>+</sup> cells / 0.2 mm <sup>2</sup> , +female bedding	Wild-type, n=6; ancV1R <sup>-/-</sup> , n=6	36.6 ± 2.73	24.6 ± 4.49	two-tailed unpaired t-test	0.0463

☒ 2-12A	Relative expression level of <i>Vmn1r224</i>	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	1.00 ± 0.109	1.36 ± 0.080	unpaired Student's <i>t</i> -test	2.92e-02
	Relative expression level of <i>Vmn2r49</i>	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	1.00 ± 0.020	1.56 ± 0.034	unpaired Student's <i>t</i> -test	1.44e-04
	Relative expression level of <i>Vmn2r50</i>	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	1.00 ± 0.069	1.58 ± 0.027	unpaired Student's <i>t</i> -test	1.43e-03
	Relative expression level of <i>Vmn2r74</i>	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	1.00 ± 0.176	3.03 ± 0.091	unpaired Student's <i>t</i> -test	5.05e-04
	Relative expression level of <i>Vmn2r81</i>	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	1.00 ± 0.091	1.46 ± 0.124	unpaired Student's <i>t</i> -test	4.04e-02
	Relative expression level of <i>Vmn2r107</i>	Wild-type, <i>n</i> =6; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =6	1.00 ± 0.052	0.703 ± 0.065	unpaired Student's <i>t</i> -test	5.09e-03
	Relative expression level of <i>Vmn2r88</i>	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	1.00 ± 0.070	0.989 ± 0.058	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.9092
	Relative expression level of <i>Vmn2r116</i>	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	1.00 ± 0.036	1.00 ± 0.105	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.9899
☒ 2-12C	Relative expression level of <i>Gd<sub>z</sub></i>	Wild-type, <i>n</i> =6; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =6	1.00 ± 0.039	0.94 ± 0.02	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.2082
	Relative expression level of <i>Gd<sub>o</sub></i>	Wild-type, <i>n</i> =6; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =6	1.00 ± 0.036	1.03 ± 0.017	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.4144
☒ 2-13A	No. of <i>Vmn2r116</i> <sup>+</sup> cells / 0.2 mm <sup>2</sup>	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =4	10.5 ± 1.08	11.2 ± 1.10	two-tailed unpaired <i>t</i> -test	0.6755
☒ 2-13D	No. of <i>Egr1</i> <sup>+</sup> cells / 0.2 mm <sup>2</sup> , +ESP1 (20 μg)	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	8.66 ± 0.78	4.40 ± 0.49	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.015
	No. of <i>Egr1</i> <sup>+</sup> cells / 0.2 mm <sup>2</sup> , +ESP1 (80 μg)	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	7.52 ± 0.67	7.24 ± 0.43	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.7424
☒ 2-14B	No. of male mounting, +ESP1	Wild-type, <i>n</i> =7; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =6	28.9 ± 4.30	33.2 ± 7.42	Wilcoxon rank-sum test	0.5672
☒ 2-14C	No. of rejection, +ESP1	Wild-type, <i>n</i> =7; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =6	22.7 ± 7.82	80.3 ± 12.4	Wilcoxon rank-sum test	0.0023
☒ 2-14D	% of lordosis ratio, +ESP1	Wild-type, <i>n</i> =7; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =6	8.55 ± 4.17	0.362 ± 0.362	Wilcoxon rank-sum test	0.0033
☒ 2-14E	% of intromission ratio, +ESP1	Wild-type, <i>n</i> =7; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =6	26.0 ± 9.95	2.77 ± 1.01	Wilcoxon rank-sum test	0.0216
☒ 2-15B	No. of pS6 <sup>+</sup> cells / 0.2 mm <sup>2</sup> , 0% male urine	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	7.8 ± 0.92	8.2 ± 1.27	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.7795
	No. of pS6 <sup>+</sup> cells / 0.2 mm <sup>2</sup> , 1% male urine	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	24.2 ± 1.61	17.9 ± 4.11	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.2228
	No. of pS6 <sup>+</sup> cells / 0.2 mm <sup>2</sup> , 10% male urine	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	37.0 ± 3.32	20.7 ± 3.67	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.0302
	No. of pS6 <sup>+</sup> cells / 0.2 mm <sup>2</sup> , 100% male urine	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	74.8 ± 6.96	39.3 ± 3.21	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.0098
☒ 2-15E	% of pS6 <sup>+</sup> cells expressing <i>Vmn1r237</i> , +0.1 μM E1100	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	23.0 ± 2.24	15.5 ± 3.16	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.1332
	% of pS6 <sup>+</sup> cells expressing <i>Vmn1r237</i> , +1 μM E1100	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	74.7 ± 2.22	50.5 ± 4.96	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.0247
	% of pS6 <sup>+</sup> cells expressing <i>Vmn1r237</i> , +10 μM E1100	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	84.5 ± 1.46	84.9 ± 3.01	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.9048
☒ 2-16C	Total duration of anogenital sniffing (sec), 1st trial	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	36.4 ± 10.5	34.2 ± 13.5	Wilcoxon rank-sum test	0.8413
	Total duration of anogenital sniffing (sec), 2nd trial	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	22.1 ± 3.01	33.6 ± 10.7	Wilcoxon rank-sum test	1
	Total duration of anogenital sniffing (sec), 3rd trial	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	10.3 ± 3.07	22.7 ± 7.41	Wilcoxon rank-sum test	0.3095
☒ 2-16D	No. of attack, 1st trial	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	21.4 ± 4.06	2.4 ± 1.69	Wilcoxon rank-sum test	0.016
	No. of attack, 2nd trial	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	31.2 ± 9.40	13.8 ± 6.32	Wilcoxon rank-sum test	0.2222
	No. of attack, 3rd trial	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	19.4 ± 5.87	11.8 ± 5.12	Wilcoxon rank-sum test	0.3095
☒ 2-16E	Total duration of attack (sec), 1st trial	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	40.4 ± 16.5	1.85 ± 1.37	Wilcoxon rank-sum test	0.016
	Total duration of attack (sec), 2nd trial	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	60.8 ± 22.8	15.2 ± 6.11	Wilcoxon rank-sum test	0.0318
	Total duration of attack (sec), 3rd trial	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	39.9 ± 21.3	13.7 ± 6.00	Wilcoxon rank-sum test	0.3095

### 第三章

#### ancV1R 欠損メスの性行動異常と高次中枢神経応答

### 3-1. 目的

本章では、ancV1R の欠損による鋤鼻器の活動の低下が高次中枢神経系の応答に与える影響を解析した。具体的には、まず ancV1R 欠損メスマウスにオス尿による刺激、および、オスとの接触刺激を与え、高次中枢領域の神経応答を解析した。次に、ancV1R 欠損メスがオスと接触した際のストレス応答を解析した。

### 3-2. 実験手法

#### 3-2-1. マウス

第二章「2-2-1. マウス」の項目に準ずる。

#### 3-2-2. メスマウスへの刺激と脳試料の採取

マウスに対して刺激を与える手順は第二章「2-2-6. フェロモン刺激と最初期遺伝子発現解析」の項目に準ずる。8~18 週齢の野生型、および、ancV1R 欠損型マウスを 1 日以上単離飼育し、試験当日、それぞれの刺激物に 40 分間暴露し刺激した。その後、速やかに麻酔をかけ、4%パラホルムアルデヒド (Wako, PFA) /PBS を心臓から灌流して固定した。頭部より脳組織を摘出して 4% PFA/PBS に 4°Cで一晩浸漬した後固定した。その後、15%スクロース/PBS、30%スクロース/PBS に浸漬し凍結保護をおこない、組織を FSC22 Frozen Section Media (Leica Biosystems, 3801481) に包埋した。クライオスタット (Microm HM505、PHC HM525NH) を用いて、大脳・小脳部分から 30  $\mu$ m 厚の冠状切片、嗅球部分から 30  $\mu$ m 厚の矢状切片を作製し、MAS-coat glass slide (Matsunami, 59441) に貼り付けた。

オスマウスの尿による刺激では、卵巣除去していないメスを用いた。解析対象のメスを単離飼育し、スミアチェックで発情状態を管理した (Byers *et al.*, 2012)。発情期の夜間 (20:00~23:00)、新しいケージ (16  $\times$  23  $\times$  12 cm) に移して 30 分間順化した後、まずは新しい脱脂綿 (20 mg) を提示した。その 1 時間後、オス尿 100  $\mu$ L を染み込ませた脱脂綿をケージ内に導入し、40 分間刺激した。オスマウスの尿は C57BL/6J 系統の成体 4~6 匹から採取し 110  $\mu$ L ずつ分注して使用時まで -80°C で保存したものを使用した。また、新しい脱脂綿を提示したメスをコントロールとして解析した。

オスマウスとの接触による刺激では、第二章「2-2-4. 性行動実験」の項目に記載される内容と同様の手順でメス・オスマウスを用意し、接触時間を 40 分間として刺激をおこなった。野生型と ancV1R 欠損型のメスを卵巣除去し、 $\beta$ -エストラジオール (Wako, 0.4 mg/mL in corn oil, 0.1 mL) とプロゲステロン (Wako, 10 mg/mL in corn oil, 0.05 mL) の投与によって発情状態を誘導した。テストケージでメスを 10 分間馴化させた後、ICR 系統のオスマウスと接触させた。また、同様の手順で準備し、オスと接触させていないメスをコントロールとして解析した。

#### 3-2-3. *c-Fos in situ* hybridization

*c-Fos* に対するプローブは、脳組織の cDNA ライブラリーより PCR で増幅して pBluescript

II SK(+) (Stratagene) にクローニングし、遺伝子配列を確認した。*c-Fos* プローブは、およそ 2 kb の *c-Fos* mRNA の全長をカバーするために 2 つから構成される。RNA プローブは T3 RNA ポリメラーゼ (Roche, 11031163001) を用いて *in vitro* 転写反応により合成した。

**表 2-2. *In situ* hybridization に用いたプローブ**

遺伝子名	プローブ配列	クローニング
<i>c-Fos</i> #1	NM_010234.3, nt 13-797	本研究にてクローニング
<i>c-Fos</i> #2	NM_010234.3, nt 913-1898	本研究にてクローニング

*In situ* hybridization による染色手順は第二章「2-2-2. *In situ* hybridization」の項目に準ずる。

### 3-2-4. *c-Fos* 発現細胞の定量

脳切片の *c-Fos* 発現細胞の定量は Enomoto *et al.*, 2019、Ishii *et al.*, 2017 に記載される方法を参考におこなった。分界上床核 (bed nucleus of the stria terminalis; BNST)、扁桃体内側部 (medial amygdala; MeA)、扁桃体皮質後内側部 (posteromedial cortical amygdala; PMCo)、内側視索前野 (medial preoptic area; MPA)、視床下部腹内側部 (ventromedial hypothalamus; VMH)、外側中隔 (lateral septum; LS) は 30  $\mu$ m 厚の冠状切片を 2 枚おきに採取し解析に用いた。副嗅球 (accessory olfactory bulb; AOB) は 30  $\mu$ m 厚の矢状切片を 2 枚おきに採取し解析した。脳領域は mouse brain atlas (Franklin and Paxinos, 2001) に従って決定し、ImageJ/Fiji (NIH) を使用して解析した。脳切片の *c-Fos in situ* hybridization の染色写真を二値画像 (8 bit B/W) に変換し、非特異的シグナルを Despeckle 機能と Watershed 機能で自動除去し、染色細胞数の定量をおこなった。

### 3-2-5. 副腎皮質刺激ホルモンの測定

8~10 週齢の野生型と ancV1R 欠損型メスを卵巣除去して使用した。メスマウスを 3 日以上単離飼育し、刺激の 48 時間前と 24 時間前に  $\beta$ -エストラジオール (0.4 mg/mL in corn oil, 0.1 mL) を投与し、刺激の 4 時間前にプロゲステロン (10 mg/mL in corn oil, 0.05 mL) を投与した。刺激と血液の採取は 20:00~21:00 におこなった。メスマウスの飼育ケージに、オスマウス、または、オスの尿 100  $\mu$ L を染み込ませた脱脂綿を導入し、30 分間刺激した。その後、ケージからメスマウスを取り出し二酸化炭素の吸引により麻酔をかけた。15 秒間以内にマウスを断頭し、0.5 M EDTA (pH8.0) 4.5  $\mu$ L の入った 1.5 mL チューブに血液を採取した。採取した血液を 2,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心して血漿を採取し、使用時まで -80 $^{\circ}$ C で保存した。血漿サンプル中の副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone; ACTH) の濃度は酵素結合免疫吸着測定法 (enzyme-linked immuno-sorbent assay; ELISA) により、ACTH ELISA kit (MD Biosciences, M046006) を使用して測定した。ELISA の反応液の吸光度をプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, 51119050) で測定した。ELISA の測定は 1 サンプルにつき 2 回おこない、その平均値を ACTH 濃度とした。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. オス尿に対する鋤鼻系高次中枢神経応答

AncV1R 欠損による鋤鼻器の感覚入力の低下と性行動異常を結びつける高次中枢神経回路を明らかにするために、ancV1R 欠損メスにオスフェロモン刺激を提示した際の高次中枢領域の応答を解析した。鋤鼻神経細胞は AOB で二次ニューロンと接続し、その情報は BNST、MeA、PMCo へと伝達される (図 1-6)。これらの領域に存在する三次ニューロンは視床下部領域に属する MPA、VMH に接続する。そこで鋤鼻系の入力を受けるこれらの領域の活動を解析した。

まず、オスマウスの尿刺激に暴露した際の神経応答について解析した。野生型と ancV1R 欠損メスマウスにオスの尿を提示し、活性化した神経細胞を最初期遺伝子 *c-Fos* の *in situ* hybridization によって染色し、各領域の染色細胞数を定量した (図 3-1A)。提示したオス尿に対する探索行動に野生型と ancV1R 欠損型で差は見られず (図 3-2A)、野生型と ancV1R 欠損型の両方で、オス尿の刺激によって鋤鼻系の入力を受ける各領域の *c-Fos* 発現細胞数は増加した (図 3-2B、C)。しかしながら、野生型と比較し ancV1R 欠損型では、オス尿で刺激した際の AOB の顆粒細胞層 (granule cell layer; GCL) と MeA の後部領域 (MeAp) の *c-Fos* 発現細胞数は有意に低かった (図 3-1B、2F)。これらの領域の応答の減少は、ancV1R の欠損による鋤鼻器からの感覚入力の低下を反映していると考えられる。また、AOB と MeA 以外に *c-Fos* 発現細胞数が顕著に変動した領域は認められなかった (図 3-1B、2D、E)。

#### 3-3-2. オスと接触した際の高次中枢領域の応答

次に、オスマウスと接触した際の ancV1R 欠損メスの高次中枢領域の応答を解析した (図 3-3、3-4)。オス尿で刺激した結果とは異なり、野生型と比較し応答が低下している領域は認められなかった (図 3-3A、B)。AOB、BNST、MPA、VMH の *c-Fos* 発現細胞数に顕著な差は認められない。また、MeAp と PMCo の *c-Fos* 発現細胞数は有意に増加していた。

MPA や VMH はメスの交尾の受容性に重要であり (Yang *et al.*, 2013; Inoue *et al.*, 2019; McHenry *et al.*, 2017)、これらの領域の応答に差は認められなかった。このことから、ancV1R 欠損メスがオスと接触した際、交尾の受け入れに抑制的に作用する領域、もしくは、拒絶行動の発現に関わる領域が活性化している可能性が考えられた。メスのラットやハムスターを対象とした先行研究では、外側中隔 (LS) の切除によってロードシスが促進され、LS を電気刺激により活性化した場合には逆に低下することが示されており (Gorzalka and Gray, 1981; Nance *et al.*, 1975; Zasorin *et al.*, 1975)、LS はメスの性行動に抑制的に作用する領域であると考えられている (Menon *et al.*, 2022; Tsukahara *et al.*, 2014)。そこで、ancV1R 欠損メスの LS の応答を解析した。オスの尿による刺激を与えた結果、野生型と ancV1R 欠損型で顕著な差は認められなかった (図 3-2B、C、5A)。一方、オスと直接接触させた結果、ancV1R 欠損型では LS の *c-Fos* 発現細胞が有意に増加していた (図 3-4B、C、5B、C)。

すなわち、オスとの接触時、ancV1R 欠損メスでは MeAp、PMCo、および、LS の応答が増加している。これらの領域の応答増加はオス尿による刺激では認められない。また、ancV1R 欠損メスがオスと接触した際の行動は野生型と異なっており、性行動に対する拒絶行動を強

く示す(図 2-6)。これらのことから、鋤鼻器からの感覚入力低下に対して MeAp、PMCo、LS の応答が増加したことは、鋤鼻系以外の感覚入力、もしくは、拒絶行動の発現によって生じている可能性が考えられる。

### 3-3-3. オス接触時のストレス応答

嗅覚・鋤鼻系の入力の喪失は不安やストレスと関連しており (Glinka *et al.*, 2012; Contreras *et al.*, 2013)、ストレスはメスの性行動の受容性を低下させる (Bentefour and Bakker, 2024)。LS の活動は不安やストレスと関連していることが知られており (Anthony *et al.*, 2014)、ancV1R 欠損メスがオスとの接触時にストレスを感じている可能性が考えられた。動物がストレスを受けた際には、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (corticotropin-releasing factor; CRF) に応じ、下垂体から血液中に副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone; ACTH) が分泌される。そこで、ancV1R 欠損型メスマウスの血中 ACTH 濃度を測定することで、ストレス応答を解析した。メスマウスを 30 分間刺激した後に血漿を採取し、ELISA により ACTH 濃度を測定した。オスとの接触刺激を与えた ancV1R 欠損型メスでは、野生型と比較し血中 ACTH 濃度が有意に高かった (図 3-6)。このことから、ancV1R 欠損メスはオスとの接触に対し不安やストレスを感じていることが示唆された。先行研究において、ラット Mup13 やネコ Feld4 など、鋤鼻器を介してストレス応答を引き起こす物質が同定されている (Papes *et al.*, 2010)。しかし、ACTH 濃度の上昇はオスの尿への暴露では認められないため (図 3-6)、オスに由来する嗅覚刺激が ancV1R 欠損メスのストレス応答を直接引き起こしているわけではないことが示唆される。鋤鼻器を外科的に切除したラットでは、高架式十字迷路試験、および、他個体との接触試験において、不安様行動の指標が増加していることが示されており (Contreras *et al.*, 2013)、鋤鼻器の活動の消失や低下は個体の不安やストレスに影響を与える可能性がある。AncV1R を欠損したメスでは鋤鼻器の活動が低下したことで、オスの接近や性行動に対してストレス応答を引き起こすことが明らかとなった。

## 3-4. 考察

本章では、オスのフェロモン刺激、および、オスとの直接接触による刺激を与えた際の ancV1R 欠損メス高次中枢領域の神経応答を解析した。オス尿による刺激を与えた際、ancV1R 欠損メスでは鋤鼻系の入力を受ける AOB-GCL と MeAp で活動の低下が認められた。一方、オスと接触による刺激を与えた際には、これらの領域での活動の低下は認められず、MeAp、PMCo、LS の活動が増加していた。

### 3-4-1. オス尿嗜好性消失と高次中枢神経応答

オスマウス尿中には、揮発性有機化合物や MUPs 等の鋤鼻器を活性化させる多様な物質が分泌されており (Jemiolo *et al.*, 1985; Kaur *et al.*, 2014; Itakura *et al.*, 2022; Nagel *et al.*, 2024)、その中にはメスマウスに対する誘引作用を有するものが存在する (Roberts *et al.*, 2010; McHenry *et al.*, 2017)。近年、オス尿中に含まれる MUP20 (darcin) がメスマウスの AOB・MeAp を活性

化し、更に、この活性化がオスの尿への嗜好性に重要であることが報告されている (Demir *et al.*, 2020)。AncV1R 欠損メスへのオス尿の提示では、鋤鼻器だけでなく AOB-GCL と MeAp の応答が低下していたことから (図 2-9、図 3-1)、オス尿に対する嗜好性の消失は、感覚入力 of 低下によっておこったものと考えられる (図 3-7)。

### 3-4-2. オスとの接触時の高次中枢神経応答

オス尿に対し、鋤鼻器とその下流領域の生理学的応答が低下していたことと、行動応答の異常、すなわち、嗜好性が消失していたことから (図 2-7、8)、ancV1R 欠損メスはオスを交配相手として認知できておらず、このことが性行動の異常につながったと考えられる。AncV1R 欠損メスがオスの性行動に対し拒絶行動を示した原因として、メスの性行動に重要な領域の活動が低下していた可能性と、性行動に抑制的に作用する領域が活性化していた可能性の 2 つが考えられる。本章でオスと接触した際の最初期遺伝子発現を解析した結果、ancV1R 欠損型で応答細胞数が減少している領域は認められず、前者を支持する結果は得られなかった (図 3-3)。オス尿刺激時の応答が低下していた AOB-GCL についても、オスと直接接触した際の応答に有意な差はなかった。先行研究で、AOB は BNST や MeA、PMCo からのフィードバック投射を受けており、特に AOB-GCL は MeA と PMCo のグルタミン酸作動性神経細胞の接続を受けていることが示されている (Fan and Luo, 2009; Kwon *et al.*, 2021)。オスとの接触時、MeAp と PMCo の応答が増加していたことから、ancV1R 欠損メスにおいて AOB-GCL は、鋤鼻器からの減少した感覚入力と、中枢領域からの増加した入力の両方を受けていた可能性が考えられる (図 3-7)。

オスとの接触時に ancV1R 欠損メスで活動が増加していた領域である LS は、メスの性行動の制御に抑制的に作用していることが知られる (Tsukahara *et al.*, 2014)。LS は鋤鼻系の神経回路に属さない領域であり (Meredith, 1998)、また、オスの尿による刺激で ancV1R 欠損メスの LS の活動は増加しない (図 3-5)。このため、オスと接触した際の LS の活動増加は、鋤鼻系の入力の低下と独立していることが示唆される。

LS の活動はストレスと関連する (Anthony *et al.*, 2014)。MeAp にもストレス刺激に応答する細胞集団が存在し (Wu *et al.*, 2017)、オスとの接触時、ancV1R 欠損メスでは MeAp のストレス応答性の細胞が活性化していた可能性がある。LS と MeAp の活性化細胞数の増加は、 $G\alpha_{12}$  を欠損したオスがオスと接触した際にも認められる (Trouillet *et al.*, 2019)。これはオスマウスを対象とした解析結果ではあるものの、鋤鼻系の活動の低下によって、他個体との接触時に LS・MeAp の活性化やストレス応答を生じる可能性を支持する。

### 3-4-3. ストレス応答と ancV1R 欠損メスの性行動異常

LS の活動増加と関連し、ancV1R 欠損メスがオスと接触した際に、ストレスホルモン ACTH の血中濃度の上昇が認められ (図 3-6)、ancV1R 欠損メスにとって、オスとの接触が不安やストレスを生じる刺激となっていることが示唆される。また、メスの脳室への ACTH の投与や視床下部への CRF の注入によって、性行動の受容性が低下し拒絶行動が顕著に示されることが、ラットを用いた先行研究で報告されている (de Catanzaro *et al.*, 1981; Sirinathsinghji *et al.*,

1983)。すなわち、これらストレスホルモンの分泌は、メスを性行動に対して消極的にさせ拒絶行動を増強させている可能性がある。以上のことから、ancV1R 欠損メスでは鋤鼻器の応答の低下によってオスを交配相手と認識できず、性行動をとろうと接近するオスに対して不安やストレスを感じ、また、拒絶行動を強く示したものと考えられる。

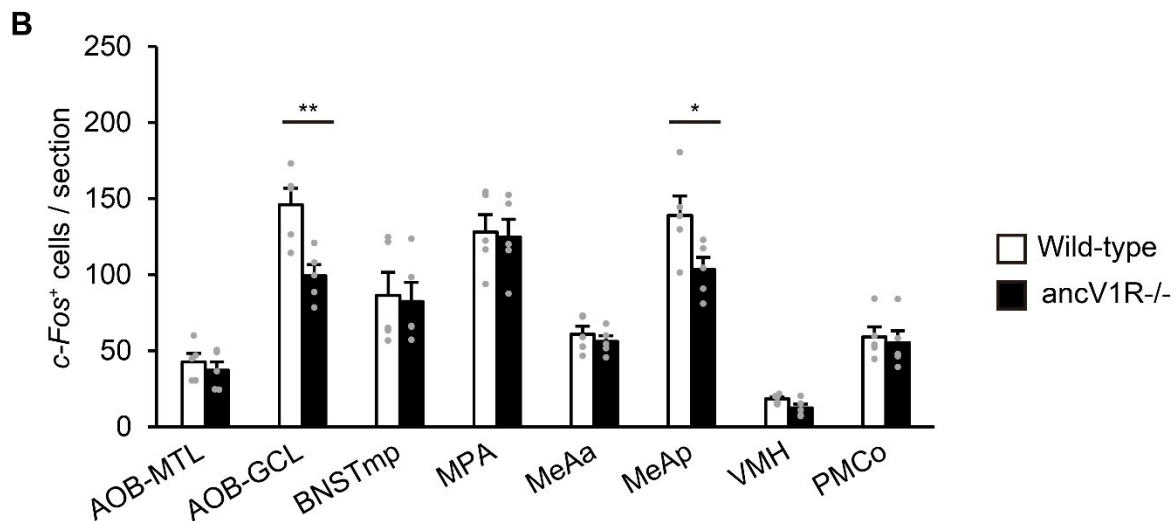
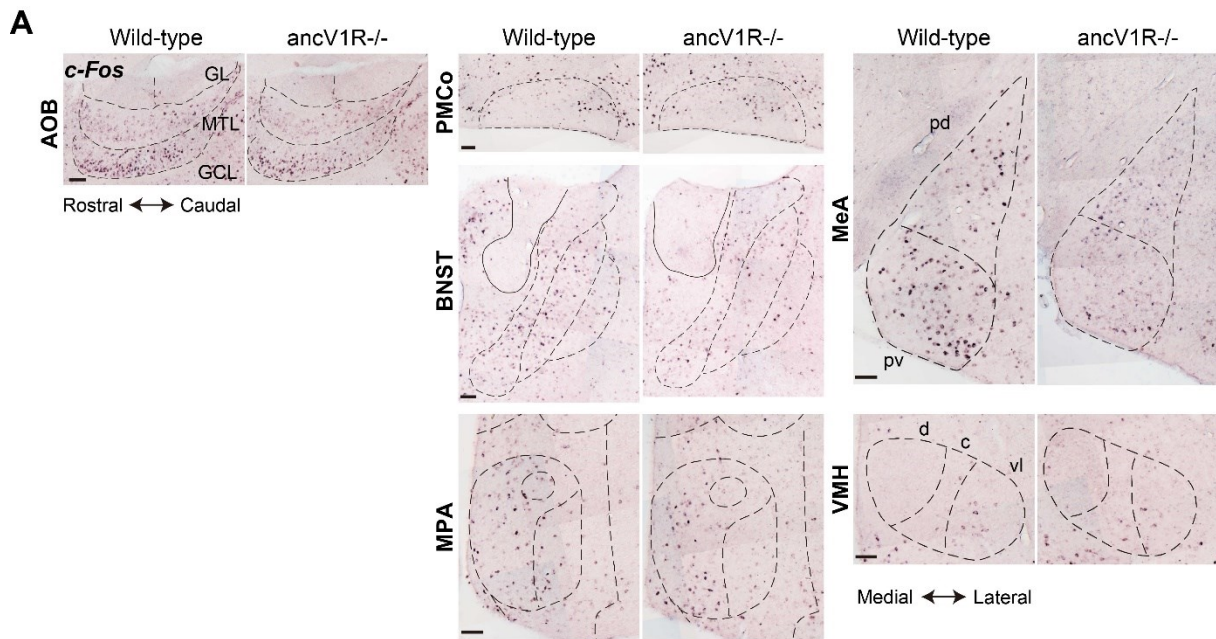


図3-1. オス尿に対する鋤鼻系高次中枢領域の応答

(A) オス尿に暴露したメスマウスにおける AOB、PMCo、BNST、MeA、MPA、VMH の *c-Fos* 発現細胞を *in situ* hybridization により染色した結果。スケールバー、100  $\mu$ m。AOB、副嗅球；PMCo、扁桃体皮質後内側部；MeA、扁桃体内側部；MPA、内側視索前野；VMH、視床下部腹内側部

(B) 鋤鼻感覚系の入力を受ける各領域の *c-Fos* 発現細胞数の定量結果。MTL、僧房・帽飾細胞層；GCL、顆粒細胞層；MeAa、MeA 前部領域；MeAp、MeA 後部領域。Data are represented as mean + SEM (Wild-type,  $n = 5$  females; *ancV1R*<sup>-/-</sup>,  $n = 5$  females). Student's *t*-test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

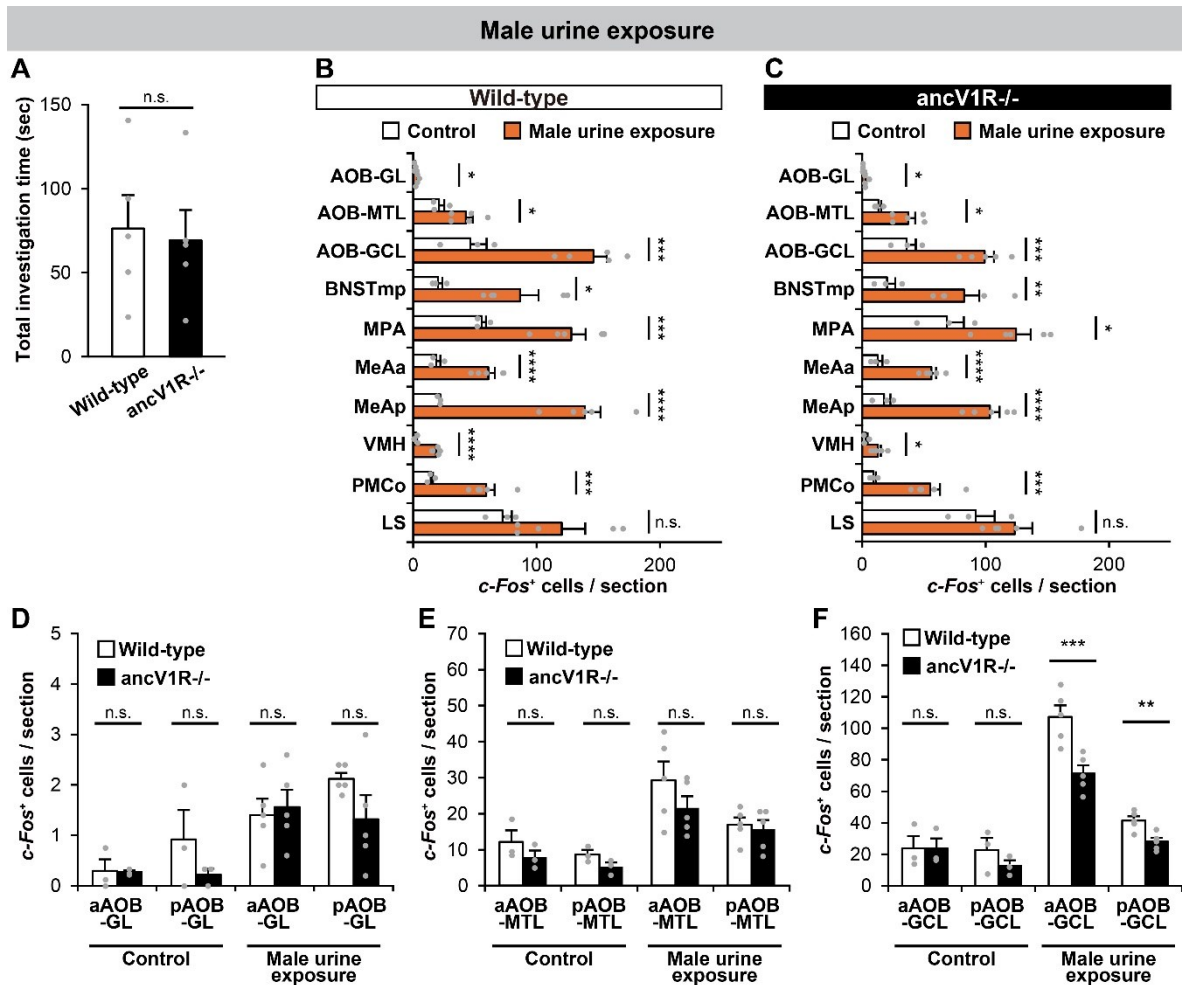


図 3-2. オス尿に対する高次中枢領域の応答解析の補足データ

(A) 提示したオス尿をメスが探索した時間。

(B-C) オス尿による刺激を与えたメス (Male urine exposure) と刺激を与えていないメス (Control) における AOB、BNSTmp、MPA、MeA、VMH、PMCo、LS の *c-Fos* 発現細胞を定量した結果。AOB、副嗅球；MTL、僧房・帽飾細胞層；GCL、顆粒細胞層；BNST、分界上床核；MPA、内側視索前野；MeA、扁桃体内側部；MeAa、MeA 前部領域；MeAp、MeA 後部領域；VMH、視床下部腹内側部；PMCo、扁桃体皮質後内側部；LS、外側中隔。

(D-F) AOB の前方と後方で検出された *c-Fos* 発現細胞をそれぞれ定量した結果。aAOB；AOB 前方、pAOB；AOB 後方。

Data are represented as mean + SEM ( $n = 3$  females per genotype for control;  $n = 5$  females per genotype for male urine exposure). Student's *t*-test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.001$ , n.s. = not significant).

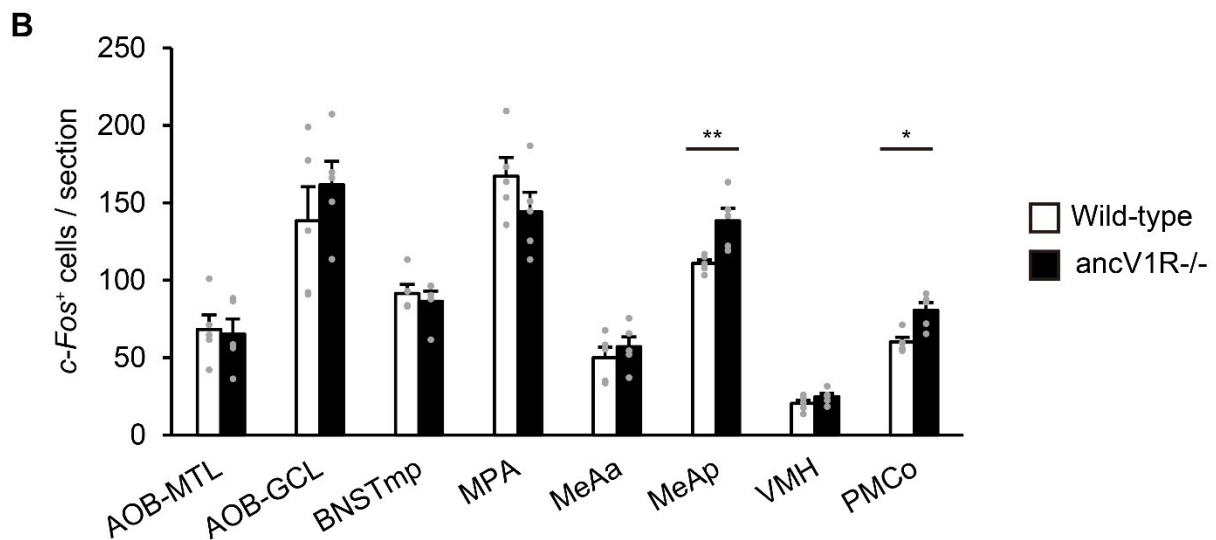
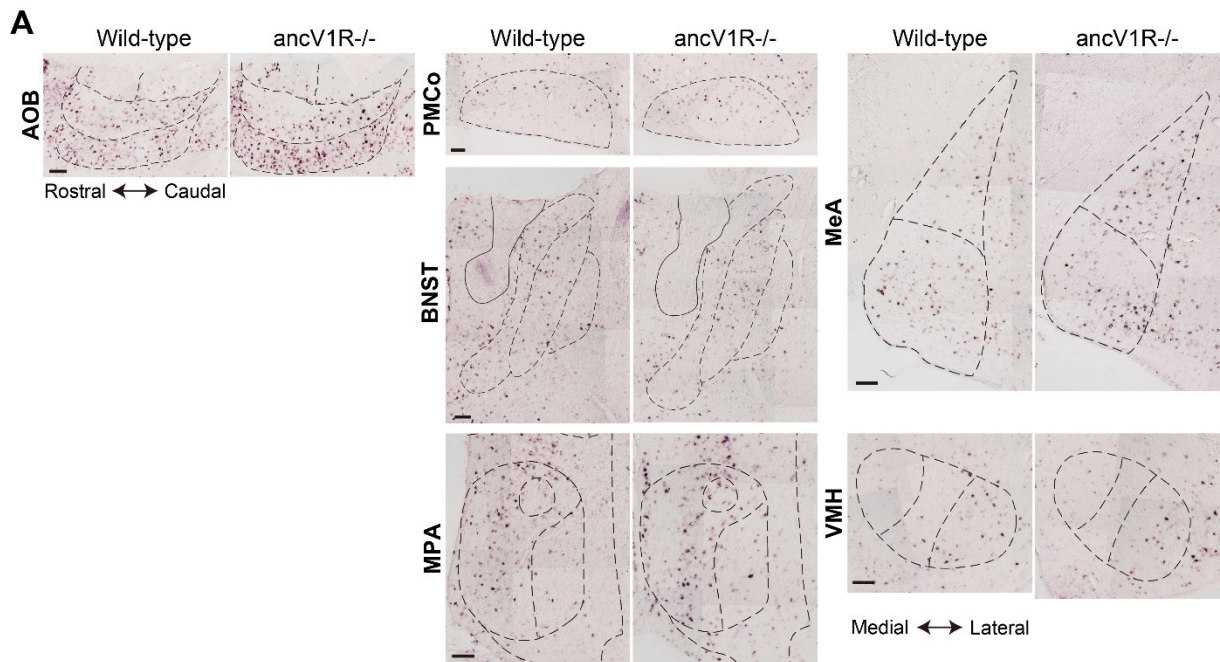


図 3-3. オスと接触した際の鋤鼻系高次中枢領域の応答

(A) オスマウスとの接触刺激を与えたメスマウスにおける AOB、PMCo、BNST、MeA、MPA、VMH の *c-Fos* 発現細胞を *in situ* hybridization により染色した結果。スケールバー、100  $\mu$ m。

(B) 鋤鼻感覚系の入力を受ける各領域の *c-Fos* 発現細胞数の定量結果。Data are represented as mean + SEM ( $n = 5$  for wild-type and ancV1R-/-). Student's *t*-test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

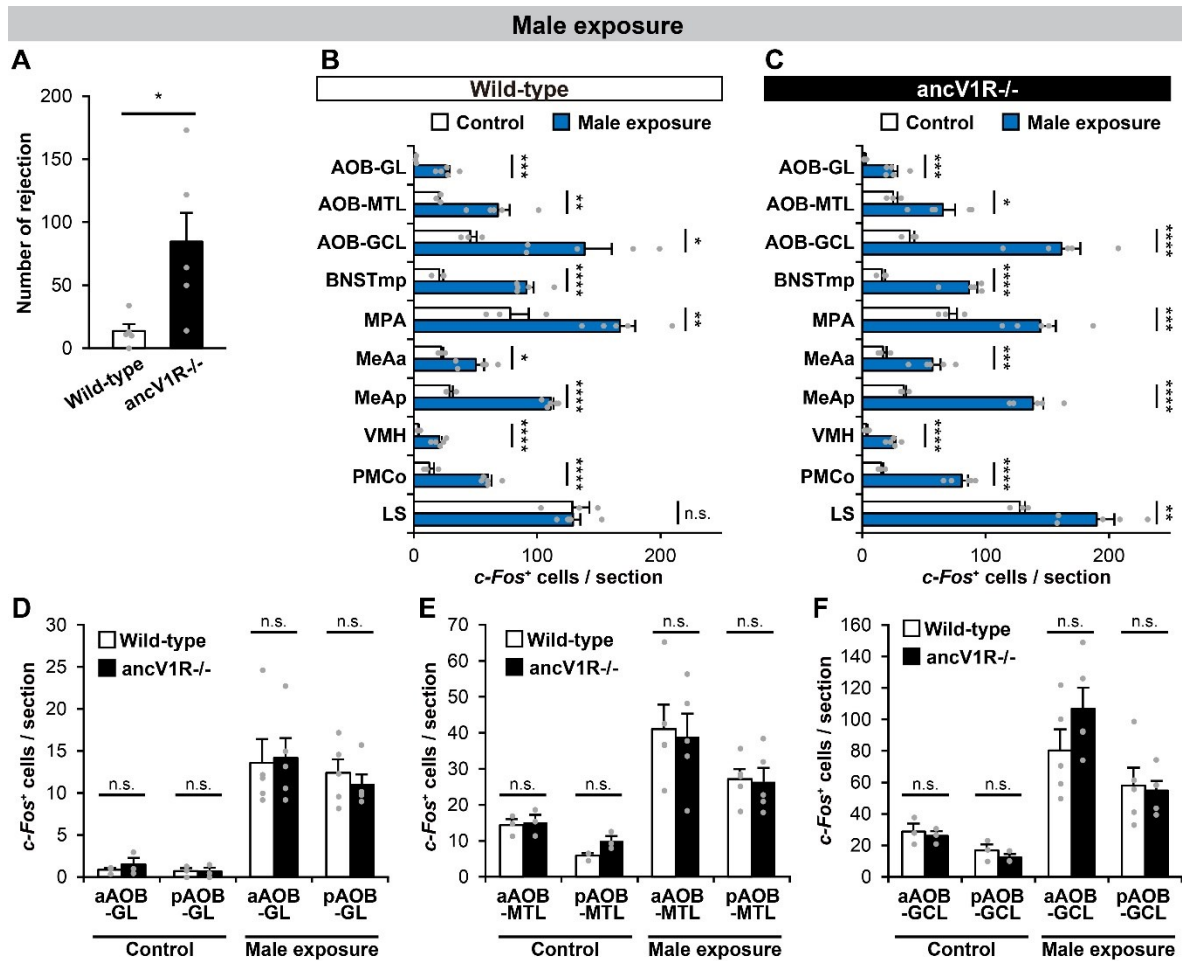


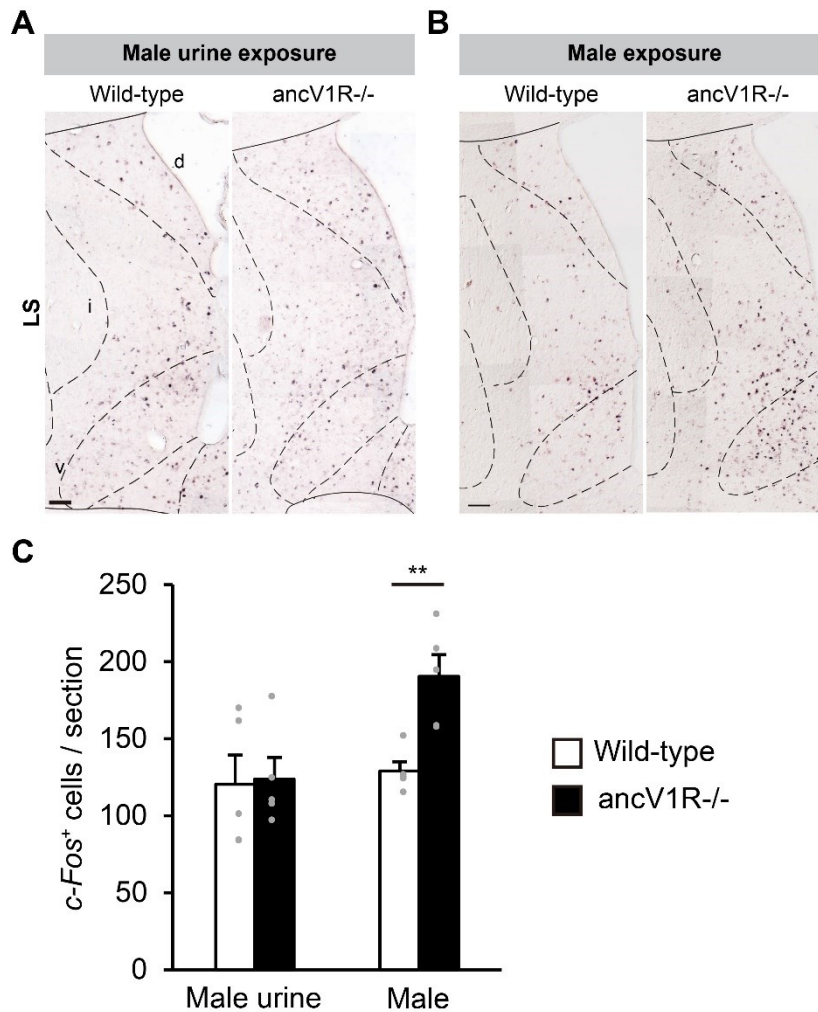
図 3-4. オスと接触した際の高次中枢領域の応答解析の補足データ

(A) メスがオスに対して拒絶行動を示した回数。

(B-C) オスと接触させ刺激したメス (Male exposure) と刺激を与えていないメス (Control) における AOB、BNSTmp、MPA、MeA、VMH、PMCo、LS の *c-Fos* 発現細胞を定量した結果。

(D-F) AOB の前方と後方で検出された *c-Fos* 発現細胞をそれぞれ定量した結果。

Data are represented as mean + SEM ( $n = 3$  females per genotype for control;  $n = 5$  females per genotype for male urine exposure). Student's *t*-test ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.005$ ,  $****p < 0.001$ , n.s. = not significant).



**図 3-5. メスマウス外側中隔の活動**

(A) オスの尿に暴露したメスマウスにおける LS の *c-Fos* 発現細胞を *in situ* hybridizationにより染色した結果。スケールバー、100  $\mu\text{m}$ 。

(B) オスとの接触刺激を与えたメスマウスにおける LS の *c-Fos* 発現細胞を *in situ* hybridizationにより染色した結果。スケールバー、100  $\mu\text{m}$ 。

(C) LS の *c-Fos* 発現細胞数の定量結果。Data are represented as mean + SEM ( $n = 5$  for wild-type and ancV1R-/-). Student' s *t*-test (\*\* $p < 0.01$ ).

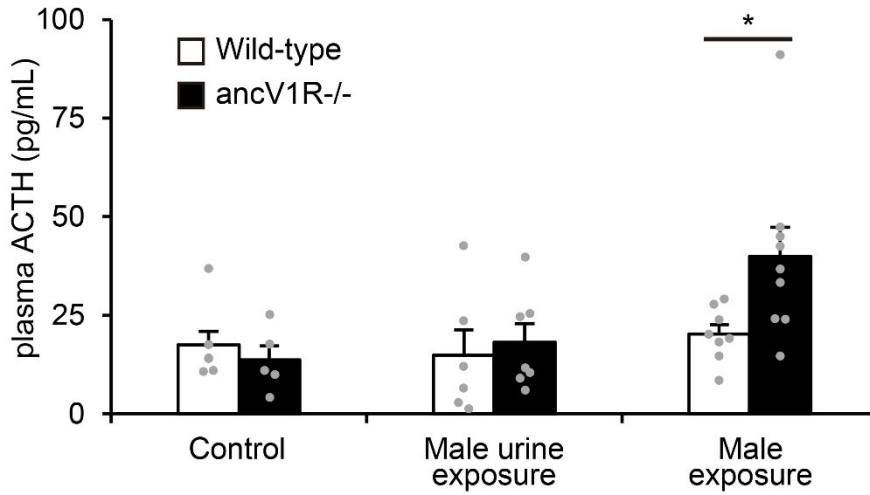


図 3-6. 血漿中 ACTH 濃度の測定

メスマウスに、オス尿への暴露 (Male urine exposure)、または、オスとの直接接触 (Male exposure) による刺激を 30 分間与え、血漿中 ACTH 濃度を測定した結果。Data are represented as mean + SEM (wild-type with male,  $n = 8$ ; ancV1R-/- with male,  $n = 9$ ; wild-type with male urine,  $n = 6$ ; ancV1R-/- with male urine,  $n = 7$ ; wild-type without stimuli,  $n = 7$ ; ancV1R-/- without stimuli,  $n = 5$ ). Wilcoxon rank-sum test ( $*p < 0.05$ ).

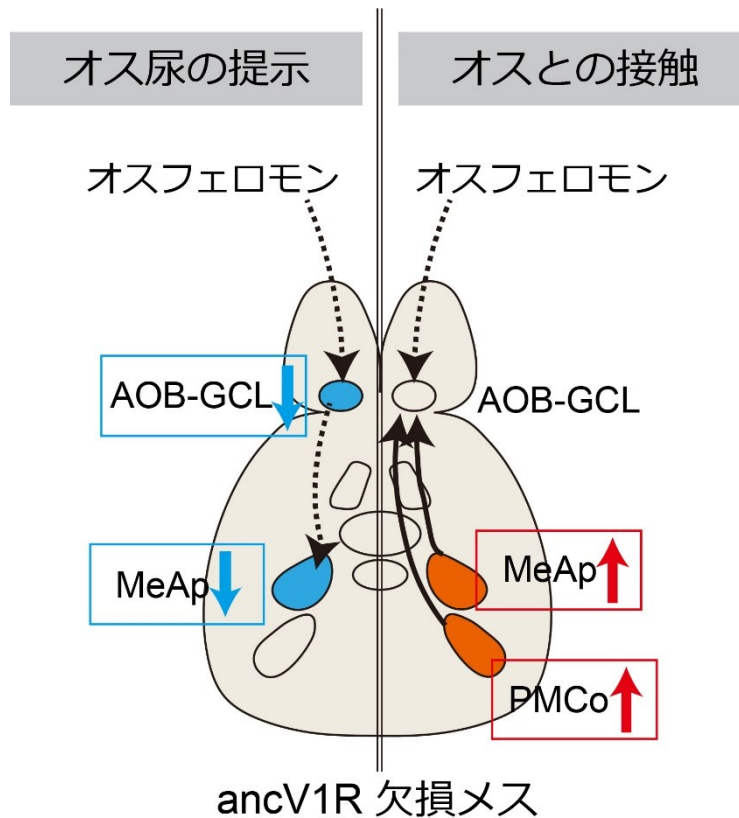


図 3-7. ancV1R 欠損メスマウスの高次中枢領域の応答

オス尿の刺激を与えた際、野生型と比較し ancV1R 欠損メスマウスでは、AOB-GCL と MeAp の応答が低下していることがわかった。これらの領域の活動は、メスマウスがオス尿に誘引行動を示す上で重要である (Demir *et al.*, 2020)。鋤鼻器を介したこれらの領域への感覚入力の低下が ancV1R 欠損メスでオス尿への嗜好性が認められなかったことと関連していると考えられる。一方、オスと接触した際、AOB-GCL の応答は野生型と差がなく、また、MeAp と PMCo の活動は増加していた。AOB-GCL は MeAp や PMCo からフィードバック接続を受けている (Fan and Luo, 2009)。そのため、オスと直接接触した場合 AOB-GCL は、鋤鼻器からの減少した入力と高次中枢からの増加した入力を受けていたと考えられる。

表 3-2. 定量データ

Figure	Target	No. of Animals	Wild-type value (Mean ± SEM)	ancV1R <sup>-/-</sup> value (Mean ± SEM)	Statistics	p value
☒ 3-1B	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in AOB-GL, +male urine	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	3.2 ± 0.46	2.88 ± 0.68	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.7070
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in AOB-MTL, +male urine	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	42.7 ± 5.56	37.2 ± 5.66	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.5093
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in AOB-GCL, +male urine	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	146.0 ± 11.0	99.3 ± 7.40	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.0078
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in BNSTmp, +male urine	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	86.5 ± 15.1	82.5 ± 12.5	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.8450
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in MPA, +male urine	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	128.1 ± 11.5	124.8 ± 11.7	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.8435
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in MeAa, +male urine	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	61.0 ± 5.30	56.1 ± 3.75	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.4780
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in MeAp, +male urine	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	139.1 ± 12.7	103.5 ± 7.89	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.0447
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in VMH, +male urine	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	18.5 ± 1.32	12.6 ± 2.52	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.0683
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in PMCo, +male urine	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	59.1 ± 6.76	55.36 ± 7.84	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.7252
☒ 3-2A	Investigation time for male urine (sec)	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	76.2 ± 19.9	69.2 ± 18.2	Wilcoxon rank-sum test	0.6905
☒ 3-2B	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in AOB-GL	Wild-type, <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male urine exposure	Control, 1.21 ± 0.40; Male urine exposure, 3.20 ± 0.46		unpaired Student's <i>t</i> -test	0.0176
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in AOB-MTL	Wild-type, <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male urine exposure	Control, 20.9 ± 4.32; Male urine exposure, 42.7 ± 5.56		unpaired Student's <i>t</i> -test	0.0212
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in AOB-GCL	Wild-type, <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male urine exposure	Control, 46.5 ± 13.0; Male urine exposure, 146.0 ± 11.0		unpaired Student's <i>t</i> -test	2.61E-03
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in BNSTmp	Wild-type, <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male urine exposure	Control, 20.2 ± 3.49; Male urine exposure, 86.5 ± 15.1		unpaired Student's <i>t</i> -test	0.0104
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in MPA	Wild-type, <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male urine exposure	Control, 55.4 ± 3.54; Male urine exposure, 128.1 ± 11.5		unpaired Student's <i>t</i> -test	2.17E-03
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in MeAa	Wild-type, <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male urine exposure	Control, 18.7 ± 3.33; Male urine exposure, 61.0 ± 5.30		unpaired Student's <i>t</i> -test	5.36E-04
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in MeAp	Wild-type, <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male urine exposure	Control, 21.1 ± 0.74; Male urine exposure, 139.1 ± 12.7		unpaired Student's <i>t</i> -test	7.31E-04
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in VMH	Wild-type, <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male urine exposure	Control, 2.40 ± 0.74; Male urine exposure, 18.5 ± 1.32		unpaired Student's <i>t</i> -test	5.31E-05
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in PMCo	Wild-type, <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male urine exposure	Control, 14.3 ± 1.87; Male urine exposure, 59.1 ± 6.76		unpaired Student's <i>t</i> -test	1.91E-03
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in LS	Wild-type, <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male urine exposure	Control, 72.4 ± 7.34; Male urine exposure, 120.4 ± 18.9		unpaired Student's <i>t</i> -test	0.0639
	☒ 3-2C	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in AOB-GL	ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male urine exposure	Control, 0.49 ± 0.12; Male urine exposure, 2.88 ± 0.68		unpaired Student's <i>t</i> -test
No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in AOB-MTL		ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male urine exposure	Control, 13.2 ± 2.11; Male urine exposure, 37.2 ± 5.66		unpaired Student's <i>t</i> -test	0.0105
No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in AOB-GCL		ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male urine exposure	Control, 36.1 ± 7.33; Male urine exposure, 99.3 ± 7.41		unpaired Student's <i>t</i> -test	1.37E-03
No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in BNSTmp		ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male urine exposure	Control, 20.2 ± 6.57; Male urine exposure, 82.5 ± 12.5		unpaired Student's <i>t</i> -test	5.17E-03
No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in MPA		ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male urine exposure	Control, 68.7 ± 13.6; Male urine exposure, 124.8 ± 11.7		unpaired Student's <i>t</i> -test	0.028
No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in MeAa		ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male urine exposure	Control, 12.6 ± 3.86; Male urine exposure, 56.1 ± 3.75		unpaired Student's <i>t</i> -test	3.78E-04
No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in MeAp		ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male urine exposure	Control, 17.8 ± 5.14; Male urine exposure, 103.5 ± 7.89		unpaired Student's <i>t</i> -test	1.02E-04
No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in VMH		ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male urine exposure	Control, 2.95 ± 1.33; Male urine exposure, 12.6 ± 7.84		unpaired Student's <i>t</i> -test	0.01637

	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in PMCo	ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male urine exposure	Control, 9.11 ± 1.89; Male urine exposure, 55.4 ± 7.84		unpaired Student's <i>t</i> -test	3.28E-03
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in LS	ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male urine exposure	Control, 92.1 ± 15.1; Male urine exposure, 123.7 ± 14.2		unpaired Student's <i>t</i> -test	0.1879
☒ 3-2D	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in aAOB-GL, control	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	0.29 ± 0.23	0.27 ± 0.033	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.93
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in pAOB-GL, control	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	0.92 ± 0.58	0.22 ± 0.11	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.3557
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in aAOB-GL, +male urine	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	1.4 ± 0.32	1.6 ± 0.34	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.7427
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in pAOB-GL, +male urine	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	2.1 ± 0.12	1.3 ± 0.48	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.1703
☒ 3-2E	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in aAOB-MTL, control	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	12.2 ± 3.18	7.91 ± 1.91	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.3276
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in pAOB-MTL, control	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	8.69 ± 1.24	5.25 ± 1.18	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.1148
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in aAOB-MTL, +male urine	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	29.3 ± 5.22	21.6 ± 3.29	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.2547
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in pAOB-MTL, +male urine	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	16.9 ± 2.03	15.6 ± 2.56	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.7056
☒ 3-2F	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in aAOB-GCL, control	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	23.8 ± 7.84	23.5 ± 6.49	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.9843
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in pAOB-GCL, control	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	22.7 ± 7.83	12.6 ± 3.57	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.3282
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in aAOB-GCL, +male urine	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	107.2 ± 7.36	71.3 ± 5.17	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.005
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in pAOB-GCL, +male urine	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	41.4 ± 2.72	28.0 ± 2.42	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.0062
☒ 3-3B	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in AOB-GL, +male	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	25.3 ± 2.76	23.6 ± 3.30	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.6980
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in AOB-MTL, +male	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	68.2 ± 9.52	65.4 ± 9.88	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.8406
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in AOB-GCL, +male	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	138.4 ± 21.9	161.6 ± 15.1	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.4094
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in BNSTmp, +male	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	91.4 ± 5.81	86.6 ± 6.46	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.5932
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in MPA, +male	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	167.2 ± 12.2	144.4 ± 12.6	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.2308
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in MeAa, +male	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	50.2 ± 6.71	57.1 ± 6.50	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.4853
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in MeAp, +male	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	110.9 ± 2.44	138.6 ± 8.12	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.0114
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in VMH, +male	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	20.5 ± 2.19	24.8 ± 2.13	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.1934
☒ 3-4A	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in PMCo, +male	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	60.3 ± 2.95	80.6 ± 5.02	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.0083
	No. of rejection	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	13.6 ± 5.57	84.6 ± 28.1	Wilcoxon rank-sum test	0.0159
☒ 3-4B	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in AOB-GL	Wild-type, <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male exposure	Control, 1.53 ± 0.27; Male exposure, 26.0 ± 3.27		unpaired Student's <i>t</i> -test	1.65E-03
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in AOB-MTL	Wild-type, <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male exposure	Control, 20.3 ± 1.19; Male exposure, 68.2 ± 9.52		unpaired Student's <i>t</i> -test	6.94E-03
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in AOB-GCL	Wild-type, <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male exposure	Control, 45.7 ± 5.01; Male exposure, 138.4 ± 21.9		unpaired Student's <i>t</i> -test	0.012
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in BNSTmp	Wild-type, <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male exposure	Control, 20.7 ± 3.23; Male exposure, 91.4 ± 5.81		unpaired Student's <i>t</i> -test	5.32E-05
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in MPA	Wild-type, <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male exposure	Control, 78.3 ± 14.8; Male exposure, 167.2 ± 12.2		unpaired Student's <i>t</i> -test	7.03E-03
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in MeAa	Wild-type, <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male exposure	Control, 22.1 ± 1.57; Male exposure, 50.2 ± 6.72		unpaired Student's <i>t</i> -test	0.0124
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in MeAp	Wild-type, <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male exposure	Control, 28.8 ± 2.73; Male exposure, 110.9 ± 2.44		unpaired Student's <i>t</i> -test	3.83E-06
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in VMH	Wild-type, <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male exposure	Control, 3.48 ± 0.82; Male exposure, 20.5 ± 2.19		unpaired Student's <i>t</i> -test	7.78E-04
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in PMCo	Wild-type, <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male exposure	Control, 12.6 ± 3.65; Male exposure, 60.3 ± 2.95		unpaired Student's <i>t</i> -test	2.80E-04
☒ 3-4C	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in LS	Wild-type, <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male exposure	Control, 128.6 ± 13.5; Male exposure, 129.0 ± 6.12		unpaired Student's <i>t</i> -test	0.9807
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in AOB-GL	ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male exposure	Control, 2.13 ± 0.64; Male exposure, 25.14 ± 3.53		unpaired Student's <i>t</i> -test	2.46E-03

	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in AOB-MTL	ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male exposure	Control, 25.2 ± 3.44; Male exposure, 65.4 ± 9.88		unpaired Student's <i>t</i> -test	0.0126
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in AOB-GCL	ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male exposure	Control, 38.6 ± 3.63; Male exposure, 161.6 ± 15.1		unpaired Student's <i>t</i> -test	8.88E-04
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in BNSTmp	ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male exposure	Control, 16.0 ± 2.45; Male exposure, 86.6 ± 6.46		unpaired Student's <i>t</i> -test	1.51E-04
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in MPA	ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male exposure	Control, 70.5 ± 6.27; Male exposure, 144.4 ± 12.6		unpaired Student's <i>t</i> -test	2.47E-03
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in MeAa	ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male exposure	Control, 16.7 ± 3.01; Male exposure, 57.1 ± 6.50		unpaired Student's <i>t</i> -test	1.90E-03
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in MeAp	ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male exposure	Control, 33.6 ± 2.08; Male exposure, 138.6 ± 8.12		unpaired Student's <i>t</i> -test	1.13E-04
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in VMH	ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male exposure	Control, 3.43 ± 1.09; Male exposure, 24.8 ± 2.13		unpaired Student's <i>t</i> -test	1.63E-04
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in PMCo	ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male exposure	Control, 15.3 ± 1.64; Male exposure, 80.6 ± 5.02		unpaired Student's <i>t</i> -test	8.11E-05
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in LS	ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3 for control, <i>n</i> =5 for male exposure	Control, 127.8 ± 4.36; Male exposure, 190.2 ± 14.3		unpaired Student's <i>t</i> -test	9.90E-03
☒ 3-4D	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in aAOB-GL, Control	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	0.84 ± 0.22	1.48 ± 0.78	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.498
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in pAOB-GL, Control.	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	0.69 ± 0.38	0.65 ± 0.44	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.943
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in aAOB-GL, +male	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	13.6 ± 2.83	14.2 ± 2.37	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.8799
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in pAOB-GL, +male	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	12.4 ± 1.63	11.0 ± 1.21	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.5131
☒ 3-4E	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in aAOB-MTL, +male	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	14.4 ± 1.65	15.2 ± 2.09	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.7814
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in pAOB-MTL, +male	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	5.89 ± 0.69	9.99 ± 1.39	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.0794
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in aAOB-MTL, +male	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	41.1 ± 6.78	38.9 ± 6.49	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.8225
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in pAOB-MTL, +male	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	27.1 ± 2.82	26.5 ± 3.81	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.8909
☒ 3-4F	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in aAOB-GCL, +male	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	28.9 ± 4.93	26.1 ± 2.81	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.6611
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in pAOB-GCL, +male	Wild-type, <i>n</i> =3; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =3	16.8 ± 3.82	12.4 ± 2.12	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.3853
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in aAOB-GCL, +male	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	80.4 ± 13.4	106.8 ± 13.5	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.2026
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in pAOB-GCL, +male	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	58.1 ± 11.4	54.9 ± 6.16	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.8135
☒ 3-5C	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in LS, +male urine	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	120.4 ± 19.0	123.7 ± 14.2	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.8928
	No. of <i>c-Fos</i> <sup>+</sup> cells in LS, +male	Wild-type, <i>n</i> =5; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	129.0 ± 6.12	190.2 ± 14.3	unpaired Student's <i>t</i> -test	0.0043
☒ 3-6	plasma ACTH level, control	Wild-type, <i>n</i> =7; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =5	18.8 ± 3.22	14.9 ± 3.66	Wilcoxon rank-sum test	0.6389
	plasma ACTH level, male urine	Wild-type, <i>n</i> =6; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =7	14.9 ± 6.46	18.2 ± 4.61	Wilcoxon rank-sum test	0.5338
	plasma ACTH level, male	Wild-type, <i>n</i> =8; ancV1R <sup>-/-</sup> , <i>n</i> =9	20.7 ± 2.45	40.0 ± 7.31	Wilcoxon rank-sum test	0.0111

## 第四章

### 結言

新規鋤鼻受容体候補分子 *ancV1R* は、進化的保存性と遺伝子発現様式、および、鋤鼻器の退化と偽遺伝子化の強い相関関係から、鋤鼻系の機能に基盤的役割を担っていることが予想される (Suzuki *et al.*, 2018)。本研究ではこの *ancV1R* の機能を明らかにすることを目的として、*ancV1R* 欠損マウスの表現型解析に取り組んだ。

*AncV1R* 欠損メスマウスではオスのフェロモンや新生仔、ESP1 に対する鋤鼻器の応答が低下していたこと (図 2-9、10)、また *ancV1R* 欠損オスマウスにおいてもメスの分泌物に対する鋤鼻器の応答が減弱していたことから、*ancV1R* はフェロモン刺激に対する鋤鼻器の応答を促進する機能を有すると考えられる。一般的に、オスから発せられるフェロモンは、交配相手に対して分泌者の性別や性的な発達状態、縄張りにおける支配性などの情報を伝達する役割を持ち、これらの情報は交配の成功率に深く関わると考えられている (Asaba *et al.*, 2014; Ishii and Touhara, 2019)。鋤鼻器の外科的切除や鋤鼻神経細胞のシグナル伝達分子の遺伝的欠失によって、鋤鼻器のフェロモンへの応答は消失し、メスの交尾の受容性は低下する (Martel and Baum, 2009; Kimchi *et al.*, 2007)。これに対し、*ancV1R* の欠損は鋤鼻器の応答を低下させるのみであった。神経活動が消失していないにも関わらず、*ancV1R* 欠損メスではオスの尿への嗜好性がなくなり (図 2-7、8)、またオスの交尾行動に対して強い拒絶行動を示した (図 2-6)。このことは、これまでの鋤鼻器の神経応答の消失のみならず、応答の低下によっても、フェロモンの認知と性行動に異常が生じる得ることを新たに示すものである。更に、*ancV1R* 欠損オスマウスの鋤鼻器でも、メスに由来するフェロモンへの応答が低下しており (図 2-10)、*ancV1R* は雌雄両方でフェロモンを介する様々な社会行動に重要であることが示唆される。これについて検証するために、今後、*ancV1R* 欠損オスマウスの示す性行動や攻撃行動についても解析をおこなう必要がある。

さらに鋤鼻器以降の高次中枢神経系の応答を解析した結果、オス尿刺激に対して *ancV1R* 欠損メスでは副嗅球 (AOB) や扁桃体内側部 (MeAp) の応答も低下していた (図 3-1)。AOB は一次ニューロンである鋤鼻神経細胞の接続する領域であり、MeAp は二次ニューロンの投射先の一つである。オス尿中フェロモンに対するメスの誘引行動には、AOB や MeAp の活性化が重要であることがわかっている (Demir *et al.*, 2020)。*AncV1R* 欠損メスでは、これらの領域に鋤鼻器を介した感覚入力十分に伝達されておらず、その結果、オスの尿への嗜好性が示されなかったと考えられる (図 4-1)。

一方オスと直接接触した場合、高次中枢領域では応答が減弱した領域は認められず、MeAp、PMCo の応答が増加していた (図 3-3)。鋤鼻器を介した感覚入力の低下に対しこれらの領域の活動が増加していたことは、鋤鼻系以外の入力、もしくは、性行動に対する拒絶行動の発現によって生じた可能性が考えられる。さらに、*ancV1R* 欠損メスではオスとの接触時、不安やストレス刺激と関連する外側中隔 (LS) の活動が増加しており、ストレスホルモン ACTH のレベルの増加も認められた (図 3-5、6)。*AncV1R* 欠損メスではフェロモンを介したオスの認識に異常を生じており、その結果、性行動をとるために接近するオスに対して強い拒絶行動を引き起こすとともにストレス応答が誘導されたと考えられる (図 4-1)。

本研究では、*ancV1R* の欠損によってフェロモン刺激に対する鋤鼻器の応答が低下する分子メカニズムは明らかにできていない。他の感覚系で GPCR がヘテロ多量体を形成しリガン

ド受容をおこなう例が報告されている。味細胞では、旨味物質の受容は *Tas1r1* と *Tas1r3*、甘味物質の受容は *Tas1r2* と *Tas1r3* によっておこなわれる。*Tas1r1* または *Tas1r3* の欠失によって旨味物質に対する味細胞の応答、*Tas1r2* または *Tas1r3* の欠失によって甘味物質に対する応答が消失し、また、これらの *Tas1rs* がヘテロ多量体を形成することが実証されている (Nelson *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003)。*AncV1R* は *V1R* ファミリーに属する新規受容体候補分子として同定されたものであることから、*ancV1R* が典型的な *V1R* や *V2R* に直接相互作用することで、リガンド応答を促進する可能性が考えられる。抗 *ancV1R* 抗体を用いた免疫組織化学で鋤鼻神経細胞の微絨毛にシグナルが検出されたことは、*ancV1R* が *V1R* や *V2R* と共局在する可能性を示唆する (図 2-2)。

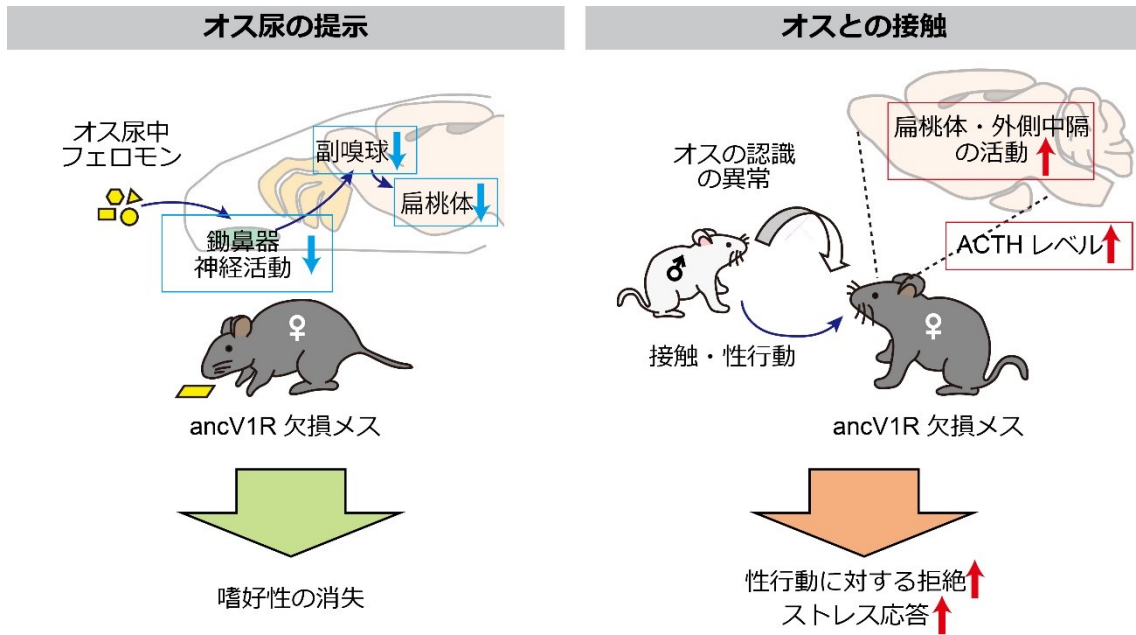
しかしながら、*V1R* と *V2R* ではアミノ酸配列の相同性がほとんどなく共役する G タンパク質も異なる。このため、これら 2 種類の受容体に *ancV1R* が直接結合しシグナル伝達を調節するのではなく、鋤鼻受容体のシグナル伝達経路に *ancV1R* が間接的に関わる可能性も考えられる。先行研究では、メスマウスの鋤鼻神経細胞の MUPs に対する応答がプロゲステロンによって抑制されることが報告されている (Dey *et al.*, 2015)。鋤鼻神経細胞ではプロゲステロンの受容能をもつ膜タンパク質 *PGRMC1* (progesterone receptor membrane-component 1) が発現しており、*PGRMC1* が体内を循環するプロゲステロンを受容すると *PLCβ2* のセリン残基をリン酸化し活性を低下させると考えられている。このことは、リガンド受容とは異なる経路で鋤鼻受容体のシグナル伝達を調節する機構が存在することを示唆している。また、鋤鼻受容体のリガンドに対する感受性を促進する分子が他の研究で同定されている (Leinders-Zufall *et al.*, 2014)。*V2R* 発現細胞の一部に発現する MHC クラス 1b 分子 *H2-Mv* は、遺伝的に欠失すると *V2R* のペプチドリガンドに対する感受性が低下する。*H2-Mv* は共発現する *V2R* の細胞膜への輸送に関わる可能性も示されている (Leconto *et al.*, 2003; Dey and Matsunami, 2011)。

昆虫嗅覚系では脊椎動物とは異なる構造を持つ七回膜貫通型タンパク質が嗅覚受容体として発現している。その構造は N 末端が細胞内ドメイン、C 末端が細胞外ドメインとなっており、脊椎動物の嗅覚受容体・鋤鼻受容体とはトポロジーが逆になっている膜タンパク質である。GPCR として機能する脊椎動物のものとは異なり、昆虫嗅覚受容体は匂い物質の結合によって活性化する陽イオンチャンネルを形成する (Sato *et al.*, 2008)。昆虫の嗅神経細胞の大部分は 2 種類の嗅覚受容体を発現している。1 つは数十から成る遺伝子ファミリーを形成する嗅覚受容体であり、個々の神経細胞ではその中から単一、もしくは複数の嗅覚受容体を選択的に発現する。もう 1 つは *Orco* (*Or83b*) と呼ばれる受容体であり、嗅神経細胞に広く発現するという性質を持つ (Vosshall *et al.*, 1999; 2000)。また、一般的な嗅覚受容体は昆虫種間で多様化しているのに対し、*Orco* は種間でのアミノ酸配列の保存性が高い (Hill *et al.*, 2002; Krieger *et al.*, 2003; Pitts *et al.*, 2004)。種を超えて高度に保存されている点と、嗅覚系の受容体と広く共発現する点は、脊椎動物の鋤鼻神経細胞で発見された *ancV1R* と類似しているといえる。昆虫嗅覚受容体は、典型的な嗅覚受容体と *Orco* が複合体を形成し機能することが知られる (Sato *et al.*, 2008; Nakagawa *et al.*, 2012)。*Orco* を欠損したショウジョウバエでは、嗅神経細胞で発現した典型的な嗅覚受容体タンパク質が樹状突起へと移行せず細胞体に蓄積されて

おり、また、広範な匂い物質に対する電気生理学的応答が消失する (Larsson *et al.*, 2004)。

本研究の結果から、ancV1R 欠損マウスの鋤鼻神経細胞では、免疫組織化学で解析した Vmn2r116 については樹状突起にタンパク質の存在が認められ (図 2-13B)、典型的鋤鼻受容体の細胞内局在は顕著に変化していないことが示唆される。また、フェロモン刺激に対する鋤鼻神経細胞の応答自体は認められた (図 2-9、10)。昆虫嗅覚系が Orco に高度に依存している一方で、ancV1R は鋤鼻神経細胞の活性化に絶対的に必須でないものの、フェロモン受容に重要な役割を担っていると考えられる。

本研究をまとめると、ancV1R はメスマウスがオスに由来するフェロモンを知覚する上で重要であり、ancV1R の欠損によってメスの性行動に異常をきたすことが明らかとなった。鋤鼻器を有するすべての動物種に保存されていることを踏まえると、ancV1R は脊椎動物全体の鋤鼻系におけるフェロモン受容に重要な因子であることが示唆される。これまでの研究で、ancV1R の欠損によって鋤鼻神経細胞の生理学的応答・リガンド感受性が変化する分子メカニズムは明らかにできていない。AncV1R と典型的な鋤鼻受容体が直接相互作用しているか否かは、ancV1R の分子機能解明の重要な手掛かりとなる。今後、共免疫沈降法や近接ライゲーションアッセイ、培養細胞を用いた機能解析等によって、ancV1R が典型的な鋤鼻受容体と相互作用する可能性を検証し、鋤鼻受容体のリガンド受容における ancV1R の役割を明らかにすることを目指す。



**図 4-1. ancV1R の欠損がメスマウスの生理学的応答と行動応答に与える影響のモデル図**  
AncV1R 欠損メスマウスでは、鋤鼻器を介した感覚入力低下しており、オス尿への嗜好性が消失する。また、オスとの接触時には、MeA、PMCo、LS の活動が増加する。AncV1R 欠損メスでは異性の認識に異常を生じており、オスとの接触にストレスを感じ、交尾に対する拒絶行動を発現したことが示唆される。

## 参考文献

- Akiyoshi, S., Ishii, T., Bai, Z., and Mombaerts, P. (2018). Subpopulations of vomeronasal sensory neurons with coordinated coexpression of type 2 vomeronasal receptor genes are differentially dependent on *Vmn2r1*. *Eur. J. Neurosci.* *47*, 887-900. 10.1111/ejn.13875.
- Alioto, T.S., and Ngai, J. (2006). The repertoire of olfactory C family G protein-coupled receptors in zebrafish: candidate chemosensory receptors for amino acids. *BMC Genomics* *7*, 309. 10.1186/1471-2164-7-309.
- Anthony, T.E., Dee, N., Bernard, A., Lerchner, W., Heintz, N., and Anderson, D.J. (2014). Control of stress-induced persistent anxiety by an extra-amygdala septohypothalamic circuit. *Cell* *156*, 522-536. 10.1016/j.cell.2013.12.040.
- Asaba, A., Hattori, T., Mogi, K., and Kikusui, T. (2014). Sexual attractiveness of male chemicals and vocalizations in mice. *Front. Neurosci.* *8*, 231. 10.3389/fnins.2014.00231.
- Bayless, D.W., Davis, C.-H.O., Yang, R., Wei, Y., Carvalho, V.M.A., Knoedler, J.R., Yang, T., Livingston, O., Lomvardas, A., Martins, G.J., Vicente, A.M., Ding, J.B., Luo, L., and Shah, N.M. (2023). A neural circuit for male sexual behavior and reward. *Cell* *186*, 3862-3881. 10.1016/j.cell.2023.07.021.
- Bayless, D.W., Yang, T., Mason, M.M., Susanto, A.A.T., Lobdell, A., and Shah, N.M. (2019). Limbic neurons shape sex recognition and social behavior in sexually naive males. *Cell* *176*, 1190-1205. 10.1016/j.cell.2018.12.041.
- Bean, N.J., and Wysocki, C.J. (1989). Vomeronasal organ removal and female mouse aggression: the role of experience. *Physiol. Behav.* *45*, 875-882. 10.1016/0031-9384(89)90209-6.
- Behrens, M., Frank, O., Rawel, H., Ahuja, G., Potting, C., Hofmann, T., Meyerhof, W., and Korsching, S. (2014). *ORA1*, a zebrafish olfactory receptor ancestral to all mammalian *V1R* genes, recognizes 4-hydroxyphenylacetic acid, a putative reproductive pheromone. *J. Biol. Chem.* *289*, 19778-19788. 10.1074/jbc.M114.573162.
- Bentefour, Y., and Bakker, J. (2024). Stress during pubertal development affects female sociosexual behavior in mice. *Nat. Commun.* *15*, 3610. 10.1038/s41467-024-47300-w.
- Boschat, C., Pélofi, C., Randin, O., Roppolo, D., Lüscher, C., Broillet, M.-C., and Rodriguez, I. (2002). Pheromone detection mediated by a *V1r* vomeronasal receptor. *Nat. Neurosci.* *5*, 1261-1262. 10.1038/nn978.
- Buchinger, T.J., Li, W., and Johnson, N.S. (2014). Bile salts as semiochemicals in fish. *Chem. Senses* *39*, 647-654. 10.1093/chemse/bju039.
- Bufe, B., Teuchert, Y., Schmid, A., Pyrski, M., Pérez-Gómez, A., Eisenbeis, J., Timm, T., Ishii, T., Lochnit, G., Bischoff, M., Mombaerts, P., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2019). Bacterial MgrB peptide activates chemoreceptor *Fpr3* in mouse accessory olfactory system and drives avoidance behaviour. *Nat. Commun.* *10*, 4889. 10.1038/s41467-019-12842-x.
- Byers, S.L., Wiles, M.V., Dunn, S.L., and Taft, R.A. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS ONE* *7*, e35538. 10.1371/journal.pone.0035538.
- Chamero, P., Katsoulidou, V., Hendrix, P., Bufe, B., Roberts, R., Matsunami, H., Abramowitz, J.,

- Birnbaumer, L., Zufall, F., and Leinders-Zufall, T. (2011). G protein G(alpha)o is essential for vomeronasal function and aggressive behavior in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *108*, 12898-12903. 10.1073/pnas.1107770108.
- Chamero, P., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2012). From genes to social communication: molecular sensing by the vomeronasal organ. *Trends Neurosci.* *35*, 597-606. 10.1016/j.tins.2012.04.011.
  - Chamero, P., Marton, T.F., Logan, D.W., Flanagan, K., Cruz, J.R., Saghatelian, A., Cravatt, B.F., and Stowers, L. (2007). Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature* *450*, 899-902. 10.1038/nature05997.
  - Cong, X., Zheng, Q., Ren, W., Chéron, J.-B., Fiorucci, S., Wen, T., Zhang, C., Yu, H., Golebiowski, J., and Yu, Y. (2019). Zebrafish olfactory receptors ORAs differentially detect bile acids and bile salts. *J. Biol. Chem.* *294*, 6762-6771. 10.1074/jbc.RA118.006483.
  - Contreras, C.M., Gutiérrez-García, A.G., and Molina-Jiménez, T. (2013). Anterior olfactory organ removal produces anxiety-like behavior and increases spontaneous neuronal firing rate in basal amygdala. *Behav. Brain Res.* *252*, 101-109. 10.1016/j.bbr.2013.05.037.
  - de Catanzaro, D., Gray, D.S., and Gorzalka, B.B. (1981). Effects of acute central and peripheral ACTH1-24 administration on lordosis behavior. *Physiol. Behav.* *26*, 207-213. 10.1016/0031-9384(81)90013-5.
  - Del Punta, K., Leinders-Zufall, T., Rodriguez, I., Jukam, D., Wysocki, C.J., Ogawa, S., Zufall, F., and Mombaerts, P. (2002a). Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. *Nature* *419*, 70-74. 10.1038/nature00955.
  - Del Punta, K., Puche, A., Adams, N.C., Rodriguez, I., and Mombaerts, P. (2002b). A divergent pattern of sensory axonal projections is rendered convergent by second-order neurons in the accessory olfactory bulb. *Neuron* *35*, 1057-1066. 10.1016/s0896-6273(02)00904-2.
  - Demir, E., Li, K., Bobrowski-Khoury, N., Sanders, J.I., Beynon, R.J., Hurst, J.L., Kepecs, A., and Axel R. (2020). The pheromone darcin drives a circuit for innate and reinforced behaviours. *Nature* *578*, 137-141. 10.1038/s41586-020-1967-8.
  - Dey, S., and Matsunami, H. (2011). Calreticulin chaperones regulate functional expression of vomeronasal type 2 pheromone receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *108*, 16651-16656. 10.1073/pnas.1018140108.
  - Dey, S., Chamero, P., Pru, J.K., Chien, M.-S., Ibarra-Soria, X., Spencer, K.R., Logan, D.W., Matsunami, H., Peluso, J.J., and Stowers, L. (2015). Cyclic regulation of sensory perception by a female hormone alters behavior. *Cell* *161*, 1334-1344. 10.1016/j.cell.2015.04.052.
  - Dietschi, Q., Tuberosa J., Rösingh, L., Loichot, G., Ruedi, M., Carleton, A., and Rodriguez, I. (2017). Evolution of immune chemoreceptors into sensors of the outside world. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *114*, 7397-7402. 10.1073/pnas.1704009114.
  - Dietschi, Q., Tuberosa, J., Fodouliau, L., Boillat, M., Kan, C., Codourey, J., Pauli, V., Feinstein, P., Carleton, A., and Rodriguez, I. (2022). Clustering of vomeronasal receptor genes is required for transcriptional stability but not for choice. *Sci. Adv.* *8*, eabn7450. 10.1126/sciadv.abn7450.

- Dulac, C., and Axel, R. (1995). A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 83, 195-206. 10.1016/0092-8674(95)90161-2.
- Enomoto, T., Ohmoto, M., Iwata, T., Uno, A., Saitou, M., Yamaguchi, T., Kominami, R., Matsumoto, I., and Hirota, J. (2011). Bcl11b/Ctip2 controls the differentiation of vomeronasal sensory neurons in mice. *J. Neurosci.* 31, 10159-10173. 10.1523/JNEUROSCI.1245-11.2011.
- Fan, S., and Luo, M. (2009). The organization of feedback projections in a pathway important for processing pheromonal signals. *Neuroscience* 161, 489-500. 10.1016/j.neuroscience.2009.03.065.
- Ferrero, D.M., Moeller, L.M., Osakada, T., Horio, N., Li, Q., Roy, D.S., Cichy, A., Spehr, M., Touhara, K., and Liberles, S.D. (2013). A juvenile mouse pheromone inhibits sexual behaviour through the vomeronasal system. *Nature* 502, 368-371. 10.1038/nature12579.
- Franklin, K.B.J., and Paxinos, G. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press).
- Fraser, E.J., and Shah, N.M. (2014). Complex chemosensory control of female reproductive behaviors. *PLoS One* 9, e90368. 10.1371/journal.pone.0090368.
- Fu, X., Yan, Y., Xu, P.S., Geerlof-Vidavsky, I., Chong, W., Gross, M.L., and Holy, T.E. (2015). A molecular code for identity in the vomeronasal system. *Cell* 163, 313-323. 10.1016/j.cell.2015.09.012.
- Glinka, M.E., Samuels, B.A., Diodato, A., Teillon, J., Mei, D.F., Shykind, B.M., Hen, R., and Fleischmann, A. (2012). Olfactory deficits cause anxiety-like behaviors in mice. *J. Neurosci.* 32, 6718-6725. 10.1523/JNEUROSCI.4287-11.2012.
- Gorzalka, B.B., and Gray, D.S. (1981). Receptivity, rejection and reactivity in female rats following kainic acid and electrolytic septal lesions. *Physiol. Behav.* 26, 39-44. 10.1016/0031-9384(81)90076-7.
- Guillemot, F., and Joyner, A.L. (1993). Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system. *Mech. Dev.* 42, 171-185. 10.1016/0925-4773(93)90006-j.
- Guo, Z., Yin, L., Diaz, V., Dai, B., Osakada, T., Lischinsky, J.E., Jonathan, C., Yamaguchi, T., Urtecho, A., Tong, X., Chen, Z.S., and Lin, D. (2023). Neural dynamics in the limbic system during male social behaviors. *Neuron* 111, 3288-3306. 10.1016/j.neuron.2023.07.011.
- Haga, S., Hattori, T., Sato, T., Sato, K., Matsuda, S., Kobayakawa, R., Sakano, H., Yoshihara, Y., Kikusui, T., and Touhara, K. (2010). The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behaviour through a specific vomeronasal receptor. *Nature* 466, 118-122. 10.1038/nature09142.
- Haga-Yamanaka, S., Ma, L., He, J., Qiu, Q., Lavis, L.D., Looger, L.L., and Yu, C.R. (2014). Integrated action of pheromone signals in promoting courtship behavior in male mice. *eLife* 3, e03025. 10.7554/eLife.03025.
- Hashiguchi, Y., and Nishida, M. (2006). Evolution and origin of vomeronasal-type odorant receptor gene repertoire in fishes. *BMC Evol. Biol.* 6, 76. 10.1186/1471-2148-6-76.
- Hattori, T., Osakada, T., Masaoka, T., Ooyama, R., Horio, N., Mogi, K., Nagasawa, M., Haga-

- Yamanaka, S., Touhara, K., and Kikusui, T. (2017). Exocrine gland-secreting peptide 1 is a key chemosensory signal responsible for the Bruce effect in mice. *Curr. Biol.* *27*, 3197-3201. 10.1016/j.cub.2017.09.013.
- Hattori, T., Osakada, T., Matsumoto, A., Matsuo N., Haga-Yamanaka, S., Nishida, T., Mori, Y., Mogi, K., Touhara, K., and Kikusui, T. (2016). Self-exposure to the male pheromone ESP1 enhances male aggressiveness in mice. *Curr. Biol.* *26*, 1229-1234. 10.1016/j.cub.2016.03.029.
  - Hellier, V., Brock, O., Candlish, M., Desroziers, E., Aoki, M., Mayer, C., Piet, R., Herbison, A., Colledge, W.H., Prévot, V., Boehm, U., and Bakker, J. (2018). Female sexual behavior in mice is controlled by kisspeptin neurons. *Nat. Commun.* *9*, 400. 10.1038/s41467-017-02797-2.
  - Herrada, G., and Dulac, C. (1997). A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell* *90*, 763-773. 10.1016/s0092-8674(00)80536-x.
  - Hill, C.A., Fox, A.N., Pitts, R.J., Kent, L.B., Tan, P.L., Chrystal, M.A., Cravchik, A., Collins, F.H., Robertson, H.M., and Zwiebel, L.J. (2002). G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. *Science* *298*, 176-178. 10.1126/science.1076196.
  - Hirota, J., and Mombaerts, P. (2004). The LIM-homeodomain protein Lhx2 is required for complete development of mouse olfactory sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *101*, 8751-8755. 10.1073/pnas.0400940101.
  - Hohenbrink, P., Mundy, N.I., Zimmermann, E., and Radespiel, U. (2012). First evidence for functional vomeronasal 2 receptor genes in primates. *Biol. Lett.* *9*, 20121006. 10.1098/rsbl.2012.1006.
  - Hurst, J.L., Payne, C.E., Nevison, C.M., Marie, A.D., Humphries, R.E., Robertson, D.H., Cavaggioni, A., and Beynon, R.J. (2001). Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins. *Nature* *414*, 631-634. 10.1038/414631a.
  - Inoue, S., Yang, R., Tantry, A., Davis, C.-H., Yang, T., Knoedler, J.R., Wei, Y., Adams, E.L., Thombare, S., Golf, S.R., Neve, R.L., Tessier-Lavigne, M., Ding, J.B., and Shah, N.M. (2019). Periodic remodeling in a neural circuit governs timing of female sexual behavior. *Cell* *179*, 1393-1408. 10.1016/j.cell.2019.10.025.
  - Ishii T., Omura, M., and Mombaerts, P. (2004). Protocols for two- and three-color fluorescent RNA in situ hybridization of the main and accessory olfactory epithelia in mouse. *J. Neurocytol.* *33*, 657-669. 10.1007/s11068-005-3334-y.
  - Ishii, K.K., and Touhara, K. (2019). Neural circuits regulating sexual behaviors via the olfactory system in mice. *Neurosci. Res.* *140*, 59-76. 10.1016/j.neures.2018.10.009.
  - Ishii, K.K., Osakada, T., Mori, H., Miyasaka, N., Yoshihara, Y., Miyamichi, K., and Touhara, K. (2017). A labeled-line neural circuit for pheromone-mediated sexual behaviors in mice. *Neuron* *95*, 123-137. 10.1016/j.neuron.2017.05.038.
  - Ishii, T., and Mombaerts, P. (2008). Expression of nonclassical class I major histocompatibility genes defines a tripartite organization of the mouse vomeronasal system. *J. Neurosci.* *28*, 2332-2341. 10.1523/JNEUROSCI.4807-07.2008.

- Ishii, T., Hirota, J., and Mombaerts, P. (2003). Combinatorial coexpression of neural and immune multigene families in mouse vomeronasal sensory neurons. *Curr. Biol.* *13*, 394-400. 10.1016/s0960-9822(03)00092-7.
- Isogai, Y., Si, S., Pont-Lezica, L., Tan, T., Kapoor, V., Murthy, V.N., and Dulac, C. (2011). Molecular organization of vomeronasal chemoreception. *Nature* *478*, 241-245. 10.1038/nature10437.
- Isogai, Y., Wu, Z., Love, M.I., Ahn, M.H.-Y., Bambah-Mukku, D., Hua, V., Farrell, K., and Dulac, C. (2018). Multisensory logic of infant-directed aggression by males. *Cell* *175*, 1827-1841. 10.1016/j.cell.2018.11.032.
- Itakura, T., Murata, K., Miyamichi, K., Ishii, K.K., Yoshihara, Y., and Touhara, K. (2022). A single vomeronasal receptor promotes intermale aggression through dedicated hypothalamic neurons. *Neuron* *110*, 2455-2469. 10.1016/j.neuron.2022.05.002.
- Jemiolo, B., Alberts, J., Sochinski-Wiggins, S., Harvey, S., and Novotny, M. (1985). Behavioural and endocrine responses of female mice to synthetic analogues of volatile compounds in male urine. *Anim. Behav.* *33*, 1114-1118. 10.1016/S0003-3472(85)80170-6.
- Jemiolo, B., Harvey, S., and Novotny, M. (1986). Promotion of the Whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *83*, 4576-4579. 10.1073/pnas.83.12.4576.
- Kaur, A.W., Ackels, T., Kuo, T.-H., Cichy, A., Dey, S., Hays, C., Kateri, M., Logan, D.W., Marton, T.F., Spehr, M., and Stowers, L. (2014). Murine pheromone proteins constitute a context-dependent combinatorial code governing multiple social behaviors. *Cell* *157*, 676-688. 10.1016/j.cell.2014.02.025.
- Kimchi, T., Xu, J., and Dulac, C. (2007). A functional circuit underlying male sexual behaviour in the female mouse brain. *Nature* *448*, 1009-1014. 10.1038/nature06089.
- Kimoto H., Haga, S., Sato, K., and Touhara, K. (2005). Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature* *437*, 898-901. 10.1038/nature04033.
- Kimoto, H., Sato, K., Nodari, F., Haga, S., Holy, T.E., and Touhara, K. (2007). Sex-and strain-specific expression and vomeronasal activity of mouse ESP family peptides. *Curr. Biol.* *17*, 1879-1884. 10.1016/j.cub.2007.09.042.
- Knight, Z.A., Tan, K., Birsoy, K., Schmidt, S., Garrison, J.L., Wysocki, R.W., Emiliano, A., Ekstrand, M.I., Friedman, J.M. (2012). Molecular profiling of activated neurons by phosphorylated ribosome capture. *Cell* *151*, 1126-1137. 10.1016/j.cell.2012.10.039.
- Knoedler, J.R., Inoue, S., Bayless, D.W., Yang, T., Tantry, A., Davis, C.-H., Leung, N.Y., Parthasarathy, S., Wang, G., Alvarado, M., Rizvi, A.H., Fenno, L.E., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., and Shah, N.M. (2022). A functional cellular framework for sex and estrous cycle-dependent gene expression and behavior. *Cell* *185*, 654-671. 10.1016/j.cell.2021.12.031.
- Koide, T., Miyasaka, N., Morimoto, K., Asakawa, K., Urasaki, A., Kawakami, K., and Yoshihara, Y. (2009). Olfactory neural circuitry for attraction to amino acids revealed by transposon-mediated gene trap approach in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *106*, 9884-9889.

10.1073/pnas.0900470106.

- Krieger, J., Klink, O., Mohl, C., Raming, K., and Breer, H. (2003). A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* *189*, 519-526. 10.1007/s00359-003-0427-x.
- Kurzweil V.C., Getman, M., NISC Comparative Sequencing Program, Green, E.D., and Lane, R.P. (2009). Dynamic evolution of V1R putative pheromone receptors between *Mus musculus* and *Mus spretus*. *BMC Genomics* *10*, 74. 10.1186/1471-2164-10-74.
- Kwon, J.-T., Ryu, C., Lee, H., Sheffield, A., Fan, J., Cho, D.H., Bigler, S., Sullivan, H.A., Choe, H.K., Wickersham, I.R., Heiman, M., and Choi, G.B. (2021). An amygdala circuit that suppresses social engagement. *Nature* *593*, 114-118. 10.1038/s41586-021-03413-6.
- Larsson, M.C., Domingos, A.I., Jones, W.D., Chiappe, M.E., Amrein, H., and Vosshall, L.B. (2004). Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron* *43*, 703-714. 10.1016/j.neuron.2004.08.019.
- Lee, D., Kume, M., and Holy, T.E. (2019). Sensory coding mechanisms revealed by optical tagging of physiologically defined neuronal types. *Science* *366*, 1384-1389. 10.1126/science.aax8055.
- Lee, H., Kim, D.-W., Remedios, R., Anthony, T.E., Chang, A., Madisen, L., Zeng, H., and Anderson, D.J. (2014). Scalable control of mounting and attack by *Esr1*<sup>+</sup> neurons in the ventromedial hypothalamus. *Nature* *509*, 627-632. 10.1038/nature13169.
- Leinders-Zufall, T., Ishii, T., Chamero, P., Hendrix, P., Oboti, L., Schmid, A., Kircher, S., Pyrski, M., Akiyoshi, S., Khan, M., Vaes, E., Zufall, F., and Mombaerts, P. (2014). A family of nonclassical class I MHC genes contributes to ultrasensitive chemodetection by mouse vomeronasal sensory neurons. *J. Neurosci.* *34*, 5121-5133. 10.1523/JNEUROSCI.0186-14.2014.
- Leinders-Zufall, T., Brennan, P., Widmayer, P., S, P.C., Maul-Pavicic, A., Jäger, M., Li, X.-H., Breer, H., Zufall, F., and Boehm, T. (2004). MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science* *306*, 1033-1037. 10.1126/science.1102818.
- Lenschow, C., and Lima, S.Q. (2020). In the mood for sex: neural circuits for reproduction. *Curr. Opin. Neurobiol.* *60*, 155-168. 10.1016/j.conb.2019.12.001.
- Leybold, B.G., Yu, C.R., Leinders-Zufall, T., Kim, M.M., Zufall, F., and Axel, R. (2002). Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *99*, 6376-6381. 10.1073/pnas.082127599.
- Liberles, S.D., Horowitz, L.F., Kuang, D., Contos, J.J., Wilson, K.L., Siltberg-Liberles, J., Liberles, D.A., Buck, L.B. (2009). Formyl peptide receptors are candidate chemosensory receptors in the vomeronasal organ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *106*, 9842-9847. 10.1073/pnas.0904464106.
- Liman, E.R., and Innan, H. (2003). Relaxed selective pressure on an essential component of pheromone transduction in primate evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *100*, 3328-3332. 10.1073/pnas.0636123100.
- Loconto, J., Papes, F., Chang, E., Stowers, L., Jones, E.P., Takada, T., Kumánovics, A., Lindahl, K.F., and Dulac, C. (2003). Functional expression of murine V2R pheromone receptors involves selective association with the M10 and M1 families of MHC class Ib molecules. *Cell* *112*, 607-618.

10.1016/s0092-8674(03)00153-3.

- Lupien, S.J., McEwen, B.S., Gunnar, M.R., and Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 434-445. 10.1038/nrn2639.
- Ma, W., Miao, Z., and Novotny, M.V. (1999). Induction of estrus in grouped female mice (*Mus domesticus*) by synthetic analogues of preputial gland constituents. *Chem. Senses* *24*, 289-293. 10.1093/chemse/24.3.289.
- Mandiyan, V.S., Coats, J.K., and Shah, N.M. (2005). Deficits in sexual and aggressive behaviors in *Cnga2* mutant mice. *Nat. Neurosci.* *8*, 1660-1662. 10.1038/nn1589.
- Martel, K.L., and Baum, M.J. (2009). Adult testosterone treatment but not surgical disruption of vomeronasal function augments male-typical sexual behavior in female mice. *J. Neurosci.* *29*, 7658-7666. 10.1523/JNEUROSCI.1311-09.2009.
- Martini, S., Silvotti, L., Shirazi, A., Ryba, N.J., and Tirindelli R. (2001). Co-expression of putative pheromone receptors in the sensory neurons of the vomeronasal organ. *J. Neurosci.* *21*, 843-848. 10.1523/JNEUROSCI.21-03-00843.2001.
- Matsunami, H., and Buck, L.B. (1997). A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell* *90*, 775-784. 10.1016/s0092-8674(00)80537-1.
- McHenry, J.A., Otis, J.M., Rossi, M.A., Robinson, J.E., Kosyk, O., Miller, N.W., McElligott, Z.A., Budygin, E.A., Rubinow, D.R., and Stuber, G.D. (2017). Hormonal gain control of a medial preoptic area social reward circuit. *Nat. Neurosci.* *20*, 449-458. 10.1038/nn.4487.
- Menon, R., Süß, T., Oliveira, V.E.M., Neumann, I.D., and Bludau, A. (2022). Neurobiology of the lateral septum: regulation of social behavior. *Trends Neurosci.* *45*, 27-40. 10.1016/j.tins.2021.10.010.
- Meredith, M. (1998). Vomeronasal, olfactory, hormonal convergence in the brain. Cooperation or coincidence? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *855*, 349-361. 10.1111/j.1749-6632.1998.tb10593.x.
- Nagel, M., Niestroj, M., Bansal, R., Fleck, D., Lampert, A., Stopkava, R., Stopka, P., Ben-Shaul, Y., and Spehr, M. (2024). Deciphering the chemical language of inbred and wild mouse conspecific scents. *Elife* *12*, RP90529. 10.7554/eLife.90529.
- Nakagawa, T., Pellegrino, M., Sato, K., Vosshall, L.B., and Touhara, K. (2012). Amino acid residues contributing to function of heteromeric insect olfactory receptor complex. *PLoS ONE* *7*, e32372. 10.1371/journal.pone.0032372.
- Nance, D.M., Shryne, J., and Gorski, R.A. (1975). Effects of septal lesions on behavioral sensitivity of female rats to gonadal hormones. *Horm. Behav.* *6*, 59-64. 10.1016/0018-506x(75)90023-9.
- Nei, M., Niimura, Y., and Nozawa, M. (2008). The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity. *Nat. Rev. Genet.* *9*, 951-963. 10.1038/nrg2480.
- Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M.A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N.J.P., and Zuker, C.S. (2002). An amino-acid taste receptor. *Nature* *416*, 199-202. 10.1038/n416031a.
- Ng, H., Ohmura, N., Miyazawa, E., Yoshihara, C., Okuma, L., and Kuroda, K.O. (2023). Effects of oxytocin ablation on pup rescue, nursing behaviors and response to pup separation in early-to-mid postpartum mice. *J. Neuroendocrinol.* *35*, e13247. 10.1111/jne.13247.

- Nikaido, M. (2019). Evolution of V1R pheromone receptor genes in vertebrates: diversity and commonality. *Genes Genet. Syst.* *94*, 141-149. 10.1266/ggs.19-00009.
- Nikaido, M., Noguchi, H., Nishihara, H., Toyoda, A., Suzuki, Y., Kajitani, R., Suzuki, H., Okuno, M., Aibara, M., Ngatunga, B.P., Mzighani, S.I., Kalombo, H.W.J., Masengi, K.W.A., Tuda, J., Nogami, S., Maeda, R., Iwata, M., Abe, Y., Fujimura, K., Okabe, M., Amano, T., Maeno, A., Shiroishi, T., Itoh, T., Sugano, S., Kohara, Y., Fujiyama, A., and Okabe, N. (2013). Coelacanth genomes reveal signatures for evolutionary transition from water to land. *Genome Res.* *23*, 1740-1748. 10.1101/gr.158105.113.
- Nikaido, M., Suzuki, H., Toyoda, A., Fujiyama, A., Hagino-Yamagishi, K., Kocher, T.D., Carleton, K., and Okada, N. (2013). Lineage-specific expansion of vomeronasal type 2 receptor-like (OlfC) genes in cichlids may contribute to diversification of amino acid detection systems. *Genome Biol. Evol.* *5*, 711-722. 10.1093/gbe/evt041.
- Nodari, F., Hsu, F.-F., Fu, X., Holekamp, T.F., Kao, L.-F., Turk, J., and Holy, T.E. (2008). Sulfated steroids as natural ligands of mouse pheromone-sensing neurons. *J. Neurosci.* *28*, 6407-6418. 10.1523/JNEUROSCI.1425-08.2008.
- Novotny, M., Harvey, S., and Jemiolo, B. (1990). Chemistry of male dominance in the house mouse, *Mus domesticus*. *Experientia* *46*, 109-113. 10.1007/BF01955433.
- Novotny, M., Jemiolo, B., Harvey, S., Wiesler, D., and Marchlewska-Koj, A. (1985) Adrenal-mediated endogenous metabolites inhibit puberty in female mice. *Science* *231*, 722-725. 10.1126/science.3945805
- Oboti, L., Pérez-Gómez, A., Keller, M., Jacobi, E., Birnbaumer, L., Leinders-Zufall, T., Zufall, F., and Chamero, P. (2014). A wide range of pheromone-stimulated sexual and reproductive behaviors in female mice depend on G protein *Gαo*. *BMC Biol.* *12*, 31. 10.1186/1741-7007-12-31.
- Ohmoto, M., Kitamoto, S., and Hirota, J. (2020). Expression of *Eya1* in mouse taste buds. *Cell Tissue Res.* *383*, 979-986. 10.1007/s00441-020-03311-9.
- Ohmoto, M., Matsumoto, I., Yasuoka, A., Yoshihara, Y., and Abe, K. (2008). Genetic tracing of the gustatory and trigeminal neural pathways originating from T1R3-expressing taste receptor cells and solitary chemoreceptor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* *38*, 505-517. 10.1016/j.mcn.2008.04.011.
- Osakada, T., Abe, T., Itakura, T., Mori, H., Ishii, K.K., Eguchi, R., Murata, K., Saito, K., Haga-Yamanaka, S., Kimoto, H., Yoshihara, Y., Miyamichi, K., and Touhara, K. (2022). Hemoglobin in the blood acts as a chemosensory signal via the mouse vomeronasal system. *Nat. Commun.* *13*, 556. 10.1038/s41467-022-28118-w.
- Osakada, T., Ishii, K.K., Mori, H., Eguchi, R., Ferrero, D.M., Yoshihara, Y., Liberles, S.D., Miyamichi, K., and Touhara, K. (2018). Sexual rejection via a vomeronasal receptor-triggered limbic circuit. *Nat. Commun.* *9*, 4463. 10.1038/s41467-018-07003-5.
- Pankevich, D.E., Baum, M.J., and Cherry, J.A. (2004). Olfactory sex discrimination persists, whereas the preference for urinary odorants from estrous females disappears in male mice after vomeronasal organ removal. *J. Neurosci.* *24*, 9451-9457. 10.1523/JNEUROSCI.2376-04.2004.
- Papes, F., Logan, D.W., and Stowers, L. (2010). The vomeronasal organ mediates interspecies

- defensive behaviors through detection of protein pheromone homologs. *Cell* *141*, 692-703. 10.1016/j.cell.2010.03.037.
- Patro, R., Duggal, G., Love, M.I., Irizarry, R.A., and Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat. Methods* *14*, 417-419. 10.1038/nmeth.4197.
  - Picone, B., Hesse, U., Panji, S., Van Heusden, P., Jonas, M., and Christoffels, A. (2014). Taste and odorant receptors of the coelacanth--a gene repertoire in transition. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* *322*, 403-414. 10.1002/jez.b.22531.
  - Pitts, R.J., Fox, A.N., and Zwiebel, L.J. (2004). A highly conserved candidate chemoreceptor expressed in both olfactory and gustatory tissues in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *101*, 5058-5063. 10.1073/pnas.0308146101.
  - Rivière, S., Challet, L., Fluegge, D., Spehr, M., and Rodriguez, I. (2009). Formyl peptide receptor-like proteins are a novel family of vomeronasal chemosensors. *Nature* *459*, 574-577. 10.1038/nature08029.
  - Roberts, S.A., Simpson, D.M., Armstrong, S.D., Davidson, A.J., Robertson, D.H., McLean, L., Beynon, R.J., and Hurst, J.L. (2010). Darcin: a male pheromone that stimulates female memory and sexual attraction to an individual male's odour. *BMC Biology* *8*, 75. 10.1186/1741-7007-8-75.
  - Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2010). edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* *28*, 139-140. 10.1093/bioinformatics/btp616.
  - Rodriguez, I., Del Punta, K., Rothman, A., Ishii, T., and Mombaerts P. (2002). Multiple new and isolated families within the mouse superfamily of V1r vomeronasal receptors. *Nat. Neurosci.* *5*, 134-140. 10.1038/nn795.
  - Rodriguez, I., Feinstein, P., and Mombaerts P. (1999). Variable patterns of axonal projections of sensory neurons in the mouse vomeronasal system. *Cell* *97*, 199-208. 10.1016/s0092-8674(00)80730-8.
  - Ryoba, N.J., and Tirindelli, R. (1997). A new multigene family of putative pheromone receptors. *Neuron* *19*, 371-379. 10.1016/s0896-6273(00)80946-0.
  - Saraiva, L.R., and Korsching, S.I. (2007). A novel olfactory receptor gene family in teleost fish. *Genome Res.* *17*, 1448-1457. 10.1101/gr.6553207.
  - Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Nakagawa, T., Vossahl, L.B., and Touhara, K. (2008). Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature* *452*, 1002-1006. 10.1038/nature06850.
  - Shi, P., and Zhang, J. (2007). Comparative genomic analysis identifies an evolutionary shift of vomeronasal receptor gene repertoires in the vertebrate transition from water to land. *Genome Res.* *17*, 166-174. 10.1101/gr.6040007.
  - Silva, L., and Antunes, A. (2017). Vomeronasal receptors in vertebrates and the evolution of pheromone detection. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* *5*, 353-370. 10.1146/annurev-animal-022516-022801.

- Silvotti, L., Cavalca, E., Gatti, R., Percudani, R., and Tirindelli, R. (2011). A recent class of chemosensory neurons developed in mouse and rat. *PLoS ONE* 6, e24462. 10.1371/journal.pone.0024462.
- Sirinathsinghji, D.J.S., Rees, L.H., Rivier, J., and Vale, W. (1983). Corticotropin-releasing factor is a potent inhibitor of sexual receptivity in the female rat. *Nature* 305, 232-235. 10.1038/305232a0.
- Speca, D.J., Lin, D.M., Sorensen, P.W., Isacoff, E.Y., Ngai, J., and Dittman, A.H. (1999). Functional identification of a goldfish odorant receptor. *Neuron* 23, 487-498. 10.1016/S0896-6273(00)80802-8.
- Stern, J.M., and Johnson, S.K. (1990). Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. *Physiol. Behav.* 47, 993-1011. 10.1016/0031-9384(90)90026-z.
- Stowers, L., Holy, T.E., Meister, M., Dulac, C., and Koentges, G. (2002). Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* 295, 1493-1500. 10.1126/science.1069259.
- Sun, J., Nishiyama, T., Shimizu, K., and Kadota, K. (2013). TCC: an R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC Bioinformatics* 14, 219. 10.1186/1471-2105-14-219.
- Suzuki, H., Nishida, H., Kondo, H., Yoda, R., Iwata, T., Nakayama, K., Enomoto, T., Wu, J., Moriya-Ito, K., Miyazaki, M., Wakabayashi, Y., Kishida, T., Okabe, M., Suzuki, Y., Ito, T., Hirota, J., and Nikaido, M. (2018). A single pheromone receptor gene conserved across 400 My of vertebrate evolution. *Mol. Biol. Evol.* 35, 2928-2939. 10.1093/molbev/msy186.
- Tachikawa, K.S., Yoshihara, Y., and Kuroda, K.O. (2013). Behavioral transition from attack to parenting in male mice: a crucial role of the vomeronasal system. *J. Neurosci.* 33, 5120-5126. 10.1523/JNEUROSCI.2364-12.2013.
- Trouillet, A.-C., Keller, M., Weiss, J., Leinders-Zufall, T., Birnbaumer, L., Zufall, F., and Chamero, P. (2019). Central role of G protein *Gai2* and *Gai2*<sup>+</sup> vomeronasal neurons in balancing territorial and infant-directed aggression of male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 116, 5135-5143. 10.1073/pnas.1821492116.
- Trouillet, A.-C., Moussu, C., Poissenot, K., Keller, M., Birnbaumer, L., Leinders-Zufall, T., Zufall, F., and Chamero, P. (2021). Sensory detection by the vomeronasal organ modulates experience-dependent social behaviors in female mice. *Front. Cell. Neurosci.* 15, 638800. 10.3389/fncel.2021.638800.
- Tsukahara, S., Kanaya, M., and Yamanouchi, K. (2014). Neuroanatomy and sex differences of the lordosis-inhibiting system in the lateral septum. *Front. Neurosci.* 8, 299. 10.3389/fnins.2014.00299.
- Tsunoda, M., Miyamichi, K., Eguchi, R., Sakuma, Y., Yoshihara, Y., Kikusui, T., Kuwahara, M., and Touhara, K. (2018). Identification of an intra- and inter-specific tear protein signal in rodents. *Curr. Biol.* 28, 1213-1223. 10.1016/j.cub.2018.02.060.
- von Campenhausen, H., and Mori, K. (2000). Convergence of segregated pheromonal pathways from the accessory olfactory bulb to the cortex in the mouse. *Eur. J. Neurosci.* 12, 33-46.

10.1046/j.1460-9568.2000.00879.x.

- Vosshall, L.B., Amrein, H., Morozov, P.S., Rzhetsky, A., and Axel, R. (1999). A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell* 96, 725-736. 10.1016/s0092-8674(00)80582-6.
- Vosshall, L.B., Wong, A.M., and Axel, R. (2000). An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* 102, 147-159. 10.1016/s0092-8674(00)00021-0.
- Wong, W.M., Cao, J., Zhang, X., Doyle, W.I., Mercado, L.L., Gautron, L., and Meeks, J.P. (2020). Physiology-forward identification of bile acid-sensitive vomeronasal receptors. *Sci. Adv.* 6, eaaz6868. 10.1126/sciadv.aaz6868.
- Woodson, J., Niemeyer, A., and Bergan, J. (2017). Untangling the neural circuits for sexual behavior. *Neuron* 95, 1. 10.1016/j.neuron.2017.06.035.
- Wu, Y.E., Pan, L., Zuo, Y., Li, X., and Hong, W. (2017). Detecting activated cell populations using single-cell RNA-seq. *Neuron* 96, 313-329. 10.1016/j.neuron.2017.09.026.
- Wu, Z., Autry, A.E., Bergan, J.F., Watanabe-Uchida, M., and Dulac, C.G. (2014). Galanin neurons in the medial preoptic area govern parental behaviour. *Nature* 509, 325-330. 10.1038/nature13307.
- Yang, C.F., Chiang, M.C., Gray, D.C., Prabhakaran, M., Alvarado, M., Juntti, S.A., Unger, E.K., Wells, J.A., and Shah, N.M. (2013). Sexually dimorphic neurons in the ventromedial hypothalamus govern mating in both sexes and aggression in males. *Cell* 153, 896-909. 10.1016/j.cell.2013.04.017.
- Yang, H., Shi, P., Zhang, Y.-P., and Zhang, J. (2005). Composition and evolution of the V2r vomeronasal receptor gene repertoire in mice and rats. *Genomics* 86, 306-315. 10.1016/j.ygeno.2005.05.012.
- Yang, T., Yang, C.F., Chizari, M.D., Maheswaranathan, N., Burke Jr., K.J., Boriuss, M., Inoue, S., Chiang, M.C., Bender, K.J., Ganguli, S., and Shah, N.M. (2017). Social control of hypothalamus-mediated male aggression. *Neuron* 95, 955-970. 10.1016/j.neuron.2017.06.046.
- Yin, L., Hashikawa, K., Hashikawa, Y., Osakada, T., Lischinsky, J.E., Diaz, V., and Lin, D. (2022). VMHvll<sup>Cckar</sup> cells dynamically control female sexual behaviors over the reproductive cycle. *Neuron* 110, 3000-3017. 10.1016/j.neuron.2022.06.026.
- Young, J.M., and Trask, B.J. (2007). V2R gene families degenerated in primates, dog and cow, but expanded in opossum. *Trends Genet.* 23, 212-215. 10.1016/j.tig.2007.03.004.
- Young, J.M., Massa, H.F., Hsu, L., and Trask, B.J. (2010). Extreme variability among mammalian V1R gene families. *Genome Res.* 20, 10-18. 10.1101/gr.098913.109.
- Zapilko, V., and Koursching, S.I. (2016). Tetrapod V1R-like ora genes in an early-diverging ray-finned fish species: the canonical six ora gene repertoire of teleost fish resulted from gene loss in a larger ancestral repertoire. *BMC Genomics* 17, 83. 10.1186/s12864-016-2399-6.
- Zatorin, N.L., Malsbury, C.W., and Pfaff, D.W. (1975). Suppression of lordosis in the hormone-primed female hamster by electrical stimulation of the septal area. *Physiol. Behav.* 14, 595-599. 10.1016/0031-9384(75)90187-0.
- Zhang, X., Zhang, X., and Firestein, S. (2007). Comparative genomics of odorant and pheromone

- receptor genes in rodents. *Genomics* 89, 441-450. 10.1016/j.ygeno.2007.01.002.
- Zhang, Z., and Nikaido, M. (2020). Inactivation of ancV1R as a predictive signature for the loss of vomeronasal system in mammals. *Genome Biol. Evol.* 12, 766-778. 10.1093/gbe/evaa082.
  - Zhang, Z., Sakuma, A., Kuraku, S., and Nikaido, M. (2022). Remarkable diversity of vomeronasal type 2 receptor (OlfC) genes of basal ray-finned fish and its evolutionary trajectory in jawed vertebrates. *Sci. Rep.* 12, 6455. 10.1038/s41598-022-10428-0.
  - Zhao, G.Q., Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N.J.P., and Zuker, C.S. (2003). The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* 155, 255-266. 10.1016/s0092-8674(03)00844-4.
  - Zufall, F., Ukhanov, K., Lucas, P., Liman, E.R., and Leinders-Zufall, T. (2005). Neurobiology of TRPC2: from gene to behavior. *Pflügers Arch.* 451, 61-71. 10.1007/s00424-005-1432-4.

## 謝辞

本研究を進めるにあたり自由に実験できる環境と方針に関する多大なご助言をいただき、また、私が一人前の研究者となれるよう日頃から懇切丁寧にご指導いただきました廣田順二先生（東京科学大学生命理工学院、バイオサイエンスセンター）に心より感謝申し上げます。RNA シーケンス解析を始め、ancV1R の機能解明に共同研究にて大変お世話になりました二階堂雅人先生（東京科学大学生命理工学院）と鈴木彦有博士（株式会社 digzyme）に感謝申し上げます。抗 Vmn2r116 (V2Rp5) 抗体とリコンビナント ESP1 を分与いただき、また、本研究に多くの建設的ご意見をいただいた東原和成先生、佐藤幸治先生、村田健先生（東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻）に感謝申し上げます。AncV1R 欠損マウスの作出と、実験全般に関するご助言をいただいた岩田哲郎先生（東京科学大学生命理工学院、バイオサイエンスセンター）に感謝いたします。AncV1R 欠損マウスの行動解析と高次中枢神経系の応答解析に携わっていただきました輿石りせる様と奥口開斗様（東京科学大学生命理工学院）に感謝いたします。マウスの行動解析に関しアドバイスをいただきました菊水健史先生（麻布大学獣医学部動物応用科学科）と小坂田拓哉先生（東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻、現東京科学大学生命理工学院）と黒田公美先生（東京科学大学生命理工学院）に感謝申し上げます。組織化学の実験手法に関してご指導いただいた應本真先生（東京工業大学バイオ研究基盤支援総合センター、現高崎健康福祉大学健康福祉学部健康栄養学科）と榎本孝幸博士（東京科学大学オープンファシリティセンター）に感謝いたします。また、マウスの飼育補助や実験の指導、結果に関する議論をいただきました畠中靖恵様と廣田研究室の皆様感謝いたします。

本研究はここに示す大変多くの方々のご協力の下に進行することができました。ここに重ねて御礼申し上げます。