

雄マウス超音波音声による
雌の繁殖機能促進メカニズムの解明

Elucidation of Mechanism for Enhancing Female
Reproductive Function by Male Ultrasonic Vocalizations

2016年2月

麻布大学大学院 獣医学研究科
動物応用科学専攻 博士後期課程
伴侶動物学

DA1302 浅場明莉

目次

要旨	5
Abstract.....	8
総合緒言	11
雄マウスの USVs について	11
雄の USVs に対する雌マウスの反応	12
本研究の目的	13
第 1 章 雄の超音波音声とフェロモンの統合神経核の同定	14
1.1 緒言	14
1.2 実験 1 雄の USVs と雄のフェロモンにより活性化する雌の脳領域の網羅的探索	15
1.2.1 実験 1 の材料と方法	15
動物	15
雄の USVs 録音	15
雄の USVs とバックグラウンドノイズの編集	16
USVs の再生	16
再生ケージ	16
前提示フェロモン物質の準備	16
刺激提示手続き	17
in situ ハイブリダイゼーション	17
染色画像解析	17
統計解析	18
1.2.2 実験 1 の結果	18
Figure 1	20
Figure 2	21
Figure 3	22
Figure 4	23
Figure 5	24
1.3 実験 2 雄の USVs とフェロモンにより活性化する雌の脳領域と行動との関連調査	25
1.3.1 実験 2 の材料と方法	25
動物	25
USVs の再生	25
再生ケージ	25
前提示フェロモン物質の準備	25
刺激提示手続き	25
行動解析	25
免疫組織学的手法	26
染色画像解析	26
統計解析	26
1.3.2 実験 2 の結果	27
Figure 6	28
Figure 7	29
1.4 実験 3 雄の USVs とフェロモンにより活性化する雌の前辺縁皮質における神経細胞の特徴の調査	30
1.4.1 実験 3 の材料と方法	30
動物	30

USVs の再生	30
再生ケージ	30
前提示フェロモン物質の準備	30
刺激提示及びサンプリング手続き	30
二重免疫組織学的手法	30
染色画像解析	30
1. 4. 2 実験 3 の結果	31
Figure 8	31
1. 5 考察	32
1. 5. 1 聴覚野の活性	32
1. 5. 2 内側前頭前皮質の活性	32
1. 5. 3 視床下部の活性	33
1. 5. 4 扁桃体基底核の活性	34
1. 5. 5 雄の USVs とフェロモンを統合する雌の神経回路	34
1. 5. 6 内側前頭前皮質の活性と行動の関連	35
1. 5. 7 ESP1 と USVs により活性化した神経細胞の特性の同定	35
1. 5. 8 結論	36
Figure 9	37
第 2 章 雄の USVs が雌の生殖内分泌へ及ぼす効果の調査	38
2. 1 緒言	38
2. 2 実験 4 雄の USVs が雌の糞中エストラジオール値に及ぼす効果の調査	40
2. 2. 1 実験 4 の材料と方法	40
動物	40
USVs の再生	40
再生ケージ	40
糞中エストラジオール抽出	40
糞中エストラジオール値測定	40
統計解析	41
2. 2. 2 実験 4 の結果	41
Figure 10	42
2. 3 実験 5 雄の USVs が雌の脳内エストラジオール濃度に及ぼす効果の調査	43
2. 3. 1 実験 5 の材料と方法	43
動物	43
USVs の再生	43
再生ケージ	43
刺激提示及びサンプリング手続き	43
脳組織中エストラジオール抽出	43
脳組織中エストラジオール値測定	44
統計解析	44
2. 3. 2 実験 5 の結果	44
Figure 11	45
2. 4 実験 6 雄の USVs が雌の生殖内分泌中枢に及ぼす効果の調査	46
2. 4. 1 実験 6 の材料と方法	46
動物	46
USVs の再生、再生ケージ、提示フェロモン物質、刺激提示手続き、行動解析	46
二重免疫組織学的手法	46
染色画像解析	47
統計解析	47

2.4.2 実験6の結果.....	47
Figure 12.....	48
Figure 13.....	49
Figure 14.....	50
Figure 15.....	51
Figure 16.....	51
2.5 考察.....	52
2.5.1 雄 USVs が雌の糞中エストロジオール値に及ぼす効果.....	52
2.5.2 雄の USVs が雌の視床下部と聴覚野のエストロジオール値に及ぼす効果.....	52
2.5.3 雄の USVs が雌のキスペプチンニューロン活性化に及ぼす効果.....	52
総合考察.....	54
嗅覚と聴覚シグナルの感覚統合.....	54
雄の USVs が雌の生殖内分泌中枢に及ぼす影響.....	55
雄の USVs は雌の接近行動を誘発する.....	55
参考論文.....	56
参考文献.....	57
謝辞.....	63

要旨

【総合緒言】

動物の繁殖は、適切な交配相手を見つけ、認知し、求愛することによって始まり、その際に、雄と雌は様々な感覚を利用してコミュニケーションをとりあう。その一つである音声による雌雄間コミュニケーションは、これまで鳥類やシカなどで詳しく調べられており、雄の鳴き声には雌を誘引する効果があるだけでなく、排卵を促進するといった繁殖機能を活性化させる効果があることも報告されている。

雄マウスも雌に出会うと、ヒトには聞こえない超音波領域で鳥類のさえずりのような歌 (Ultrasonic vocalizations; USVs) を発する。マウスの USVs 研究の多くは、様々な発達過程や環境下、系統や疾患モデルにおける発声パターンの解析に焦点が当てられてきた。しかしながら、雌マウスにおける USVs の受容と伝達に関わる神経回路と繁殖制御機構に対する効果については未だ不明な点が多い。博士前期課程の研究では、雌は自身とは異系統の雄の USVs へ嗜好性を示し、子孫の遺伝的多様性をもたらす配偶者選択に寄与することを示唆してきた。また、雌の USVs への嗜好性は雄の床敷や雄フェロモンが存在している際に顕著に現れることを明らかにしている。このことから、雌は雄が発する聴覚シグナルと嗅覚シグナルを脳内で統合することで、適切な USVs への嗜好性を示す可能性が考えられた。そこで、本研究の第1章では、雄の USVs が雌の接近行動に対して効果を示すための聴覚シグナルと嗅覚シグナルの統合機構を明らかにすることを目的として、USVs とフェロモンの共提示により活性化させる脳部位の同定を目指した。

雄の USVs が雌の繁殖機能を促進させるかについては、博士前期過程の研究で、USVs を多く発声する雄とペアになった雌は出産回数が増えることを明らかにしている。このことから、雌が雄の USVs を受容することで繁殖制御中枢が活性化し、交尾行動や排卵の促進によって繁殖効率が向上するメカニズムの存在が考えられた。しかし、USVs がどのように雌の繁殖制御機構に作用しているのかは明らかになっていない。そこで、第2章では、雌性ホルモンであるエストラジオールと、生殖内分泌中枢を司るキスペプチンニューロンに着目し、雄の USVs の提示によりその活性レベルが高まるかを調査した。

【第1章 雄の超音波音声とフェロモンの統合神経核の同定】

実験1では、雌の性的覚醒を高めることが報告されている雄フェロモンである Exocrine gland-secreting peptide 1 (ESP1) (Haga et al., 2010) と雄の USVs、あるいは ESP1 とバックグラウンドノイズ (Noise) を提示された C57BL/6J (B6) 系統の雌の神経活動を比較した。再生音には、B6 系統の雄の USVs よりも嗜好性を示すことが明らかになっている BALB/c 系統の雄の USVs を用いた。活性化した神経細胞の脳内局在は、c-fos の mRNA 発現を指標に、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて全脳領域で解析した。その結果、内側前頭前皮質 (mPFC) において、ESP1 と USVs を共提示した群は、ESP1 と Noise を提示した群に比べて c-fos 陽性反応の顕著な上昇が見られた。また、一次聴覚野 (Au1) の 2-4 層、視床下部の腹内側部背内側核 (VMHdm)、扁桃体基底核 (BLA) においても ESP1

と USVs を共提示した群では c-fos 陽性反応が有意に高かった。

実験 2 では、複数の刺激に由来する情報を統合する領域だと考えられており、実験 1 で雄の ESP1 と USVs の共提示により高い神経活性があることが検出された mPFC の前辺縁皮質 (PrL) と下辺縁皮質 (IL) に着目して、その神経活性と雌の行動との関連を調査した。その結果、ESP1 と USVs を共提示した群では、対照群である溶媒 (Tris) と Noise を共提示した群や ESP1 と Noise を共提示した群に比べて、PrL の c-fos タンパク質の発現が有意に多く観察された。再生音提示中の行動と相関分析を行った結果、PrL の c-fos 陽性細胞数と再生開始から 5 分間のスピーカー探査行動の持続時間には、正の相関が認められた。

実験 3 では、二重免疫組織化学的手法を用いて ESP1 と USVs により活性化した神経細胞の特性を調べた。皮質における神経細胞は、使用している神経伝達物質によって抑制性ニューロンと興奮性ニューロンに大きく分類され、抑制性ニューロンは GABA (γ -aminobutyric acid: ガンマ-アミノ酪酸) を、興奮性ニューロンはグルタミン酸を伝達物質として使用している。そこで、GABA 作動性ニューロンならびにグルタミン酸作動性ニューロンに着目して解析を行った。その結果、c-fos 陽性細胞の多くが、GABA 陽性細胞よりも、グルタミン酸作動性ニューロンのマーカーとして用いた GLS2 (Phosphate activated glutaminase 2) 陽性細胞と重なっていた。このことから、USVs と ESP1 の複合的な刺激により PrL で活性化する神経細胞の多くが興奮性のグルタミン酸ニューロンであり、情報を他の領域へ伝達し、USVs に対する接近行動を制御している可能性が示された。

【第 2 章 雄の USVs が雌の生殖内分泌へ及ぼす効果の調査】

超音波スピーカーによる雄の USVs の提示により、雌の生殖内分泌中枢が活性化されるかを末梢 (実験 4)、中枢 (実験 5)、神経細胞 (実験 6) 単位で調査した。実験 4 では、末梢に蓄積されたエストラジオール値を反映している糞中のエストラジオール値が雄の USVs によって上昇するかを調べた。齧歯類の糞中のエストラジオール値は、雌の性成熟や性周期に応じて変化することが認められている (Chelini et al., 2005)。本実験では、非発情期の雌、発情期の雌、発情前期の雌、卵巣を除去した雌に Noise または USVs を提示し、その後、排泄した糞中のエストラジオール濃度を測定した。しかし、Noise 提示群と USVs 提示群の間で、糞中エストラジオール濃度に明瞭な差は見られなかった。

実験 5 では、非発情期の雌と発情前期の雌に、Noise または USVs を提示し、その後、視床下部と聴覚野のエストラジオール濃度を測定した。鳥類では、雄の歌によって視床下部や聴覚野のエストラジオール値が上昇することが報告されている (Maney and Pinaud, 2011)。しかし、マウスを用いた本実験では、どちらの領域においても Noise 提示群と USVs 提示群の間で、エストラジオール濃度に明瞭な差は見られなかった。実験 1 では、雌に雄の USVs とフェロモンを共提示することによって、聴覚野や視床下部の一部により高い神経活性が起こることを見出している。マウスの場合、USVs のみの刺激ではなく、雄の聴覚シグナルと嗅覚シグナルの複合的な刺激を受けることが、これらの

脳部位の活性を効果的に高めるために必要であると考えられた。

そこで、実験6では、雄の嗅覚シグナルとの共提示の影響を加味し、視床下部の神経細胞に着目して解析を試みた。性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) のサージ状分泌を制御し、また排卵の誘発に関与する前腹側周囲核 (AVPV) におけるキスペプチンニューロンと、GnRH のパルス状分泌と FSH 分泌を制御し、また卵胞発育に関与する弓状核 (Arc) におけるキスペプチンニューロンの活性を、リン酸化 cAMP 応答配列結合タンパク (pCREB) を指標に二重免疫組織化学的手法により観察した。その結果、AVPV における活性化キスペプチン陽性細胞の割合は、提示した刺激の違いによる差が認められなかった。一方、Arc を背側部 (Arc D) と外側部 (Arc L) の2領域に分けて解析した結果、Arc L における活性化キスペプチン陽性細胞の割合は、提示した刺激によって差があった。Arc L では pCREB 陽性細胞数とキスペプチン陽性細胞数に違いはなかったが、USVs を提示した Tris + USVs 群と ESP1 + USVs 群は、Tris + Noise 群に比べて活性化キスペプチン陽性細胞の割合が高い傾向が見られた。これらの結果から、雄の USVs は Arc におけるキスペプチンニューロンに作用していることが示唆された。

【総合考察】

本研究の解析から、雄の USVs と ESP1 の共提示により雌の PrL の神経がより活性化することが明らかになった。PrL は感覚統合や意思決定に関連していることが報告されていることから、雌は雄の聴覚情報と嗅覚情報をこの部位で統合し、適切な雄への嗜好性や接近行動を示すことを見出した。加えて、USVs は Arc におけるキスペプチンニューロンに作用し、卵胞発育を促進する可能性も示した。本研究は、雄の USVs がフェロモンと共に雌の感覚統合機構に作用して適応的な繁殖行動を誘発するという雌雄間コミュニケーションの新たなメカニズムを明らかにし、さらに雄の USVs が雌の繁殖内分泌中枢を活性化することで、繁殖機能促進に寄与していることを示唆した。

Abstract

Male-female interaction is important for selecting a suitable mating partner and for ensuring reproductive success. It was suggested that male sexual signals such as vocalizations are attractive to females in many animals. Male mice emit song-like “ultrasonic vocalizations (USVs)”, when they encounter female or female’s urinary pheromones. The characteristics of male USVs differ among inbred strains (Panksepp et al., 2007; Kikusui et al., 2011; Sugimoto et al., 2011), and their USV profiles are suggested to be regulated genetically. On the other hand, the biological significance of these repertoires of USVs has not been identified. To demonstrate that female mice could discriminate different male USVs, we recently conducted playback experiments to assess the responses of female mice to USVs of male mice from various strains. We found that inbred female mice could discriminate the characteristics of USVs, and that they preferred the USVs of mice that were from different strains than their own strains. It was suggested that this preference of females for USVs of males from a different strain contributes to disassortative mating, which is an important mate choice strategy for avoiding inbreeding and facilitating the heterozygosity of offspring. In addition, we also found that the preference of females for USVs from a different strain was only observed when females were concomitantly exposed to the male pheromone, “Exocrine gland-secreted peptide 1 (ESP1)” (Asaba et al., 2014). This implies that the preference for male USVs is governed by the multisensory integration of both acoustic and olfactory signals. In Chapter 1, to understand the underlying neural mechanism, we searched the nuclei that were activated when exposed to both male USVs and pheromone in female mice.

Male vocalizations are not only attracting to females but could also promote female fertility in some animals. However, it had not been studied intensively in mice USVs. We recently investigated the relationship between the numbers of delivery in breeding pairs for 4 months and numbers of USVs syllables emitted from males of those pairs during 3 minutes of sexual encounter with unfamiliar females. Interestingly, there was a positive correlation between these two indices, suggesting a possibility that male USVs could promote female’s fertility. We also examined the effect of male USVs on sexual behavior in females, and found that females approached towards vocalizing-males more frequently as compared to devocalized-males. In Chapter 2, to understand how male USVs activate reproductive function in females, we examined whether male USVs could increase estradiol level and activate Kisspeptin neurons, key neurons to regulate reproductive function in the hypothalamus.

Chapter 1: Multisensory integration of male USVs and pheromone in female mice

In experiment 1, we analyzed the c-fos expression pattern by *in situ* hybridization in the whole brain areas of female mice when exposed to male USVs generated by the ultrasound speakers after ESP1 exposure. The results demonstrated that the higher expression of c-fos mRNA was observed in the medial prefrontal cortex (mPFC) when females were exposed to “ESP1 and USVs” with compared to “ESP1 and noise” as control. This area has been identified as a key region for multisensory integration and decision-making. Additionally, a higher expression of c-fos mRNA was also observed in the primary auditory cortex (Au1), the ventromedial hypothalamic nucleus dorsomedial part (VMHdm), and the basolateral amygdaloid nucleus (BLA).

In experiment 2, we focused on the mPFC and analyzed the relationship between its neural activity using immunocytochemistry and behaviors. Females were exposed to either male USVs or noise control combination with either ESP1 or Tris-HCL (vehicle for ESP1) exposure. Compared with exposure of “Tris and noise”, the larger number of c-fos-immunoreactive (IR) cells in the prelimbic region (PrL) of the mPFC and longer time in searching behavior to the speaker were observed in females exposed to “ESP1 and USVs”. In addition, there was a positive correlation between these 2 matters, suggesting that females exposed to the USVs had a larger number of c-fos-IR cells in the PrL and a longer time searching.

In experiment 3, to examine characteristic of neurons in the PrL that were activated by “ESP1 and USVs”, we conducted dual-label immunocytochemistry with c-fos and either GABAergic or glutamatergic neuronal marker. As a glutamatergic neuronal marker, GLS2 (phosphate activated glutaminase 2) was used. As results, most of c-fos-IR cells in the PrL also expressed GLS2, indicating that the neurons activated by ESP1 and USVs are excitatory glutamatergic neurons. It is suggested that these neurons transmit neural signals to another region and regulate approaching behavior to male USVs.

Chapter 2: Effect of male USVs to reproductive neuroendocrine system in female mice

In experiment 4, we measured estradiol concentration in the feces when exposed to male USVs or noise control by enzyme immunoassays. It has suggested that the fecal estradiol concentration reflects peripheral estradiol level (Chelini et al., 2005). However, there was no significant difference in the fecal estradiol concentration between the groups.

In experiment 5, we focused on estradiol in brain and measured estradiol concentration in the hypothalamus and auditory cortex. Previous studies have revealed that the estradiol level in

this brain area is increased by exposure of male vocalization in birds (Maney and Pinaud, 2011). However, there was no significant difference in the estradiol concentration between USVs exposure group and noise exposure group in these areas.

In experiment 6, the activation of kisspeptin neurons were examined using dual-label immunocytochemistry with cAMP response element-binding protein phosphorylation (pCREB) in females exposed to “Tris and noise”, “ESP1 and noise”, “Tris and USVs”, and “ESP1 and USVs”. We focused on two distinctive populations of kisspeptin neurons located in the anteroventral periventricular nucleus (AVPV) and the arcuate nucleus (Arc) in the hypothalamus. In the AVPV, there was no significant difference in the rate of kisspeptin neurons expressing pCREB between the groups. On the other hand, in the Arc, the rate of kisspeptin neurons expressing pCREB significantly increased in both “Tris and USVs” and “ESP1 and USVs” exposure groups as compared with “Tris and noise”. Kisspeptin neurons in the Arc have been known to be the proximate source of the GnRH pulse secretion that is essential for basal FSH secretion, thereby promoting follicular development. These results suggest that male USVs could increase female fertility by activating the kisspeptin neurons in the Arc.

In conclusion, we discovered that higher neural activity was evoked in the PrL of mPFC when female mice were exposed to both male pheromone and USVs. We suggest that the preference for male USVs is induced by multisensory integration with pheromonal cue in PrL. Additionally, our results suggest that male USVs activate kisspeptin neurons in the Arc, implying that male USVs contribute to follicular development in female mice. The present study uncovers new possibilities for studying the molecular and neural mechanisms of multisensory integration, and contributes to reveal the mechanism for enhancing female reproductive function by male signals in animals.

総合緒言

動物の繁殖は、適切な交配相手を見つけ、認知し、求愛することによって始まる。一般的に動物が配偶子にかかる栄養や時間は、卵母細胞を提供する雌では大きく、精子を提供する雄では小さい。この貴重な雌の配偶子を獲得するため、雄では際立った特徴や求愛行動が進化してきた。大きな身体、大きな角、求愛ダンス、求愛歌、性フェロモンなど、視・聴・嗅にわたり特徴的なシグナルを有しているのは多くの場合、雄である。

雌は、この雄のシグナルの良し悪しを判断して、パートナーを選択する。雄の匂いや (Xiao et al., 2004)、体毛色 (West and Packer, 2002)、筋肉 (Roney and Simmons, 2008) や、鳴き声 (Pasch et al., 2011) は、雄性ホルモンによって強く制御されている。雄性ホルモンのレベルは、雄の社会的な地位と相関していることから、雌は、より優秀で雄特異的なシグナルを有している個体を配偶者として選択する傾向がある。また、雌は、病気に感染した雄の匂いを嗅ぎ分けることができ、より健康で強健な雄を選択する傾向にあることがわかっている (Kavaliers, 1995)。さらに、絶えず変化し続ける環境やウイルスの脅威に耐え抜き子孫が生き残る可能性を高めるため、雌は自分と同じような遺伝子を持つ兄弟や親との近親交配を避け、なるべく異なる遺伝子を持つ相手を選ぶことも知られている (Penn and Potts, 1998)。このような配偶者選択は、子孫を残す上で重要な意思決定であり、進化の重大要素の一つである性選択として機能してきた。

それだけでなく、雄が発するシグナルは雌の生殖機能を活性化させることも報告されている。とくに、雄の嗅覚シグナルであるフェロモンが雌に及ぼす効果は強力で、多数の報告がある。例えば、マウスでは、雌の発情を促進させる Whitten 効果や (Whitten, 1956)、性成熟を促進させる Vandenberg 効果 (Vandenberg, 1969)、妊娠を阻止する Bruce 効果 (Bruce and Parrott, 1960) などが知られている。匂いのみならず、雄の鳴き声にも、雌の生殖内分泌を活性化させる効果がある。雌のカエルは、繁殖期に雄の鳴き声を聞くと、雌性ホルモンであるエストロゲン値が上昇し、雄への接近行動が誘発される (Lynch et al., 2006)。ハトでは、繁殖期に観察される雄の特殊な鳴き声が、雌の生殖内分泌を司る神経細胞を興奮させることも明らかとなっている (Cheng, 1992)。さらに、シカやヤギなどの哺乳類においても、同様の報告がなされており (Shelton, 1980; McComb, 1987; Delgado et al., 2012)、雄が発する求愛歌や鳴き声は、雌の繁殖に関与する行動のみならず、生殖に関わる神経・内分泌を活性化させていることが考えられる。このように、多くの動物種にわたって、雄のシグナルは雌に対して多様な効果がある。

雄マウスの USVs について

実験動物として広く用いられているマウス (*Mus musculus*) の雄も、雌に出会うとヒトには聞こえない 20 kHz 以上の超音波領域の音声 (Ultrasonic vocalizations; USVs) を発する (Nyby et al., 1977)。マウスの USVs は、鳴禽類が発声する「歌」に似ていて、ひとつの音素である“Syllable”と、Syllable が複数組み合わせ合わせた“Sequence”で構成されている (Holy and Guo, 2005)。この USVs の構造については、詳細な解析が盛んに行われており、

様々な環境下や発達過程、遺伝的系統や疾患モデルマウスなどで調べられている。

例えば、マウスは幼少期に親や巣から隔離されると分離時特異的な USVs を発生する (pup USVs) (Ehret, 2005)。この仔マウスの USVs に比べて、成熟したマウスが他個体に対して発する USVs は、よりバリエーションに富んだ音素で構成されていて、周波数が安定している (Grimsley et al., 2011)。また、USVs の特徴は、方言のようにマウスの系統によって異なる (Panksepp et al., 2007; Kikusui et al., 2011; Sugimoto et al., 2011)。本研究室でも、C57BL/6 (B6) 系統と BALB/c (BALB) 系統の雄マウスの USVs の周波数、Syllable の発現率や、Syllable の持続時間には系統差があり、里子操作実験をしても変化がなかったことから、発声パターンは学習ではなく遺伝的要因に制御されていることを明らかにしてきた (Kikusui et al., 2011)。このように、マウスの USVs 発声パターンは、主に遺伝的に制御されていて学習によって変化する余地は少ないが、環境や社会的地位や文脈によって変化することもわかってきた。雄の USVs の発生回数は社会的地位によって変化し、同じケージの中で優位な雄ほど、多く USVs を発生する (Wang et al., 2011)。また、雄の USVs 発声は雄性ホルモンによる制御を受けていて、雄らしさを強調するような行動であると考えられている (Dizinno and Whitney, 1977; Nunez et al., 1978; James et al., 2006)。さらに、個飼いの期間が長いと、マウスは他個体に対してより多く USVs を発声するようになる (Chabout et al., 2012)、個体を提示した場合と尿を提示した場合で発生回数やパターンが異なるなど (Chabout et al., 2015)、社会的文脈によっても USVs 回数やパターンは変化する。

雄の USVs に対する雌マウスの反応

雌マウスはこのような雄の USVs を聞き分け、その情報をどのように利用しているのだろうか。著者がこれまで発表してきた研究では、雌マウスは雄の USVs に対して接近行動を示すことを明らかにしている。超音波スピーカにより、雄の USVs とバックグラウンドノイズを同時に再生した実験では、雌は雄の USVs に対して長い時間探索行動を示した (Asaba et al., 2015)。一方から人工音や pup USVs を再生し、もう一方からは雄の USVs を再生した場合、雌は雄の USVs が再生されるスピーカに対してより長い時間接近することも明らかになっている (Hammerschmidt et al., 2009)。このことから、雄の USVs は雌を誘引する作用があると考えられる。

雌マウスに好まれる USVs の特徴を調べた研究についても、いくつか報告がある。雌は、シンプルなシラブルを有する発声パターンよりも、より複雑なシラブルを含む発声パターンに対して、より接近する (Chabout et al., 2015)。また、雌が雄を拒む際に表出される行動と、雄の USVs の発声パターンの関連を調べたところ、ある種の発声パターンが、雌の拒否行動を減少させ、雌を誘引することも知られている (Sugimoto et al., 2011)。近縁グループ間の USVs の違いが雌の嗜好性に影響することも調べられていて (Musolf et al., 2010; Hoffmann et al., 2012)、博士前期過程の研究では、系統差があることが先に明らかになっている B6 または BALB 系統の雄マウスから録音してきた USVs の違いを雌が聞き分け、繁殖パートナーの選択に役立てるかを検証してきた (Asaba et al., 2014)。雌

に対して2系統の雄の USVs を同時に再生して、雌の行動を観察した結果、どちらの系統の雌マウスも、自身と異系統の雄マウスの USVs が再生された側の音源に対する探査時間が同系統の USVs を再生した側のもの比べて有意に長く、雌マウスは自身と異なる系統の USVs を嗜好することが明らかとなった。つまり、雌マウスは、雄の USVs により、社会的な関係性や自分との近縁関係を認知している可能性が考えられている。

本研究の目的

しかしながら、雌マウスにおける USVs の受容と伝達に関わる神経回路と繁殖制御機構に対する効果については未だ不明な点が多い。博士前期課程の研究では、雌の異系統雄の USVs への嗜好性が、雄の床敷や雄フェロモンが存在している際に顕著に現れることを明らかにしている(Asaba et al., 2014)。この雄フェロモンには、雄マウスの眼窩外涙腺の涙に含まれており、雌の性的覚醒を高めることが報告された ESP1 (Exocrine gland-secreting peptide 1) を用いている (Haga et al., 2010)。このことから、雌は雄の聴覚シグナルと嗅覚シグナルを脳内で統合することで、特定の USVs に対して嗜好性を示す可能性が考えられた。そこで、本研究の第1章では、雄の USVs が雌の接近行動に対して効果を示すための聴覚シグナルと嗅覚シグナルの統合機構を明らかにすることを目的として、USVs とフェロモンの共提示により活性化する脳部位の同定を目指した。

雄の USVs が雌の繁殖機能を促進させるかについては、これまでの研究で、USVs を多く発声する雄とペアになった雌は出産回数が増えることを明らかにしている (浅場, 修士論文, 2013)。このことから、雌が雄の USVs を受容することで繁殖制御中枢が活性化し、交尾行動や排卵の促進により繁殖効率が向上するメカニズムの存在が考えられた。しかし、USVs がどのように雌の繁殖制御機構に作用しているのかは明らかになっていない。そこで、第2章では、雌性ホルモンであるエストラジオールと、生殖内分泌中枢を司るキスペプチンニューロンに着目し、雄の USVs の提示によりその活性レベルが高まるかを調査した。

第 1 章 雄の超音波音声とフェロモンの統合神経核の同定

1.1 緒言

動物は複数の感覚器から情報を取り入れ、周囲環境の状況を判断し、行動を実行する。その中で、脳は情報を統合し、価値を判断し、そして意思を決定するために重要な役割を担っている。複数の感覚から得た情報を統合することが適応的な認知に重要であることは、ヒトの fMRI (functional magnetic resonance imaging) などの機能的脳イメージングでも調べられ、例えば、母親に赤ちゃんの泣き声と写真を共に提示すると活性化する部位が同定されてきている。しかし、技術的限界から、その活性部位において単一の神経細胞レベルで起こる情報の統合を結論するには至っていない。

ヒト以外の動物でも、マルチモーダルな感覚情報処理は、母子間の適切な個体認知とコミュニケーションを確実にすることが報告されている。例えば、ラットやマウスの母親は仔の発する嗅覚シグナルを受容することで、仔の発する聴覚シグナル (pup USVs) に対してより顕著に接近する (Farrell and Alberts, 2002; Okabe et al., 2013)。また、マウスを用いた電気生理学的研究により、仔の嗅覚シグナルを受容した母親では pup USVs に対する聴覚野の神経活動が増加することが報告されている (Cohen et al., 2011)。

本研究室の先行研究より、雌マウスが異系統の雄 USVs へ嗜好性を示すためには、雄の嗅覚情報との共提示が必要であることが明らかになった (Asaba et al., 2014)。この実験では、USVs のみを再生していた場合では、雌は落ち着きなくテストケージの中を行き来しているように見受けられたが、雄の床敷やフェロモンを提示すると、再生された USVs が意味を得たかのように雌が反応し始めた。このことから、雌は雄の聴覚情報と嗅覚情報を統合させている可能性が示された。

これらの知見をもとに、雄が発する嗅覚シグナルや聴覚シグナルは別個に機能するだけでなく、複合的に機能することで雌の接近行動や性行動をより強固に誘起する可能性が考えられた。また、複数の感覚器から雄のシグナルを受容することによって、単一の感覚器に由来するシグナルよりも神経活性が強まる部位が存在する可能性も考えられる。

そこで、本研究の第 1 章では、USVs が接近行動を誘起する効果を示すための聴覚情報と嗅覚情報の統合機構を明らかにすることを目的とし、USVs とフェロモンによる雌の神経活性部位の同定を目指した。

動物の脳活動を評価する指標として、最初期遺伝子である c-fos の検出による評価が広く用いられている。c-fos は神経活動に伴って、mRNA レベルでは 30 分ほど、タンパク質レベルでは 1.5 時間で速やかに誘導がかかる遺伝子である (Kaczmarek and Chaudhuri, 1997)。この c-fos の mRNA やタンパク質が発現した細胞を検出することで、活性化した脳領域について評価することが可能である。また、ある細胞種に特異的に発現しているマーカー分子と c-fos に対する二重染色を試みれば、刺激に対して反応した神経細胞の種類を同定することも期待できる。

そこで、実験 1 では、雌の性的覚醒を高めることが報告されている雄フェロモンである Exocrine gland-secreting peptide 1 (ESP1) (Haga et al., 2010) と雄の USVs、あるいは ESP1

と対照音 (バックグラウンドノイズ) を提示された B6 系統の雌の神経活動を比較した。再生音には、BALB 系統の雄が雌に対して発した USVs (B6 系統の雌が嗜好性を示すことが明らかになっている (Asaba et al., 2014)) を用いた。活性化した神経は、c-fos を指標に、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて全脳領域で解析した。

実験 2 では、ESP1 と USVs 提示群、ESP1 とノイズ提示群、溶媒と USVs 提示群、溶媒とノイズ提示群の計 4 群を作出し、免疫組織学的手法を用いて c-fos 陽性細胞数を比較した。同時に、再生音提示中の雌の行動を解析し、神経活性との関連を調べた。

実験 3 では、二重免疫組織学的手法を用いて ESP1 と USVs により活性化した脳部位の神経細胞の特性の同定を試みた。皮質における神経細胞は、使用している神経伝達物質によって抑制性ニューロンと興奮性ニューロンに大きく分類される。抑制性ニューロンは GABA (γ -aminobutyric acid: ガンマ-アミノ酪酸) を、興奮性ニューロンはグルタミン酸を伝達物質として使用している。そこで、GABA 作動性ニューロンならびにグルタミン酸作動性ニューロンに着目して解析を行った。

1.2 実験 1 雄の USVs と雄のフェロモンにより活性化する雌の脳領域の網羅的探索

1.2.1 実験 1 の材料と方法

全ての実験は Ethics Committee of Azabu University, Japan に従って行った。

動物

録音に用いた雄と再生実験に用いた雌は、日本クレア株式会社より導入し、本研究室において繁殖維持されていた BALB/c (BALB) 系統の雄と C57BL/6J (B6) 系統の雌マウスを用いた。すべての動物は 12 時間の明暗周期 (6 時点灯、18 時消灯)、一定の室温 ($24 \pm 1^\circ\text{C}$)、湿度 ($45 \pm 5\%$) に保たれた飼育室にて、飼育ケージ ($175 \times 245 \times 125 \text{ mm}$) に床敷 (Corncob, Shepherd Specialty Paper) と巣材 (パルマス μ 、天然素材探索研究所) を敷いて飼育した。水と飼育用固形飼料 (MM-3、株式会社船橋農場) は自由摂取とした。

ESP1 とバックグラウンドノイズ提示 (ESP1 + Noise) 群と ESP1 と BALB 雄の USVs 提示 (ESP1 + USVs) 群の各群において 6 匹ずつ B6 雌を用いた。実験時の雌の週齢は、12~30 週齢であった。

雄の USVs 録音

USVs を超音波スピーカーで再生するため、BALB 雄が雌に対して発声した USVs を録音した。録音は、音の反響を防ぐため、内側に厚さ 6.5cm のスポンジが取り付けられた防音箱 ($60.5 \times 69.5 \times 62.5 \text{ cm}$ 、室町機械) の中で行った。防音箱の中央に録音対象の雄を入れる小ケージ (マウス S-PC、日本クレア) を置いた。床敷としてマウスの足音によるノイズが出にくい床敷 (Alpha-dri, Shephard Specialty Papers) を敷き詰めた。ケージの横には直径 6 cm の穴を開けて金網で塞ぎ、そのケージの金網越しに USVs の録音が可能なマイク (CM16/CPMA, Avisoft Bioacoustics) を設置した。検出した音は A/D コンバータ

(Aviisoft-UltraSoundGate116H, Avisoft Bioacoustics) を通じてデジタル信号に変換し、コンピュータに入力した。入力した音声は、録音ソフトウェア (RECORED USGH, Avisoft Bioacoustics) を用いて、サンプリングレート 300,000 Hz、16 bit 形式の音声ファイルとして保存した。

雄の USVs とバックグラウンドノイズの編集

録音した BALB 雄の USVs ファイルは、音声編集ソフトウェア (Audition 3.0, Adobe) を用いて編集した。BALB 雄の USVs から代表的な特徴をもつものを 20 秒選択し、再生音として使用した。再生に適した音量にするため、雑音などが含まれている 45,000 Hz 以下の音はハイパス・フィルターにより取り除いた。45,000 Hz 以上の雑音は、ノイズリダクション機能 (レベル 40 に設定) により取り除いた。編集し終えた BALB 再生音はステレオが可能な音声ファイルとして保存した。

バックグラウンドノイズには、先に作製した BALB 再生音のうち、USVs が含まれていない部分を選んだものを用いた。それを 20 秒になるまで繰り返しコピーしたものを音声ファイルとして保存し、バックグラウンドノイズとした。

USVs の再生

超音波再生スピーカーとして、Nc-Si emitter を用いた。Nc-Si emitter はナノクリスタルシリコン (nano-crystalline silicon; Nc-Si) とクリスタルシリコンを交互に配置して熱を加えた場合に、二つの物質の熱特性により機械振動なしで超音波が再生できるという理論を元に開発されたスピーカーである (Shinoda et al., 1999; Kihara et al., 2006)。USB を経由して、コンピュータに D/A コンバータ (NI USV-6251 BNC, National Instruments) を接続して、デジタル信号をアナログに出力できるようにした。過負荷を防ぐためのアッテネータ (自作、加藤建築環境研究所・加藤雅裕先生) を経由して、D/A コンバータにアンプリファイアー (自作、株式会社山武) を接続した。このアンプリファイアーに、Nc-Si emitter を接続した。再生ソフトウェア (RECOREDR NI-DAQ, Avisoft bioacoustics) を用いて、雄の USVs とバックグラウンドノイズの再生をコントロールした。

上記の USVs の録音、編集、再生については、Journal of Visualized Experiments にて報告している (Asaba et al., 2015)。

再生ケージ

再生実験の対象となる雌を入れるケージを用意した。小ケージ (マウス S-PC、日本クレア) の二辺の短壁にそれぞれ直径 6 cm の穴を開けて金網で塞いだ。その金網越しに超音波スピーカーを設置できる。このケージに通常飼育で使用している床敷と巣材を敷き、雌を 1 匹ずつ導入した後、10 日以上飼育・維持してから再生実験を行った。

前提示フェロモン物質の準備

ESP1 は、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻・東原和成教授から提

供を受けた。0.1M Tris-HCl (pH 7.5) を用いて、200 µg/ml に ESP1 の濃度を調節し、100µl ずつ分注した。実験開始までは-20℃で冷凍保存した。提示開始の 30 分前に、ESP1 を三角形に切ったコットンに塗布し、37.5℃に設定したインキュベーター (ICV-300、アズワン株式会社) 内で静置し、水分を蒸発させた。

刺激提示手続き

実験の前日まで雌の発情状態を確認し、非発情期の雌を再生実験に用いた。雌の発情状態は、11:00 から 14:00 の間に膣液を採取し、McLean らの手法 (McLean et al., 2012) に準じて判断した。

実験当日、自由摂取させていた餌と水を除き、雌を再生ケージごと防音箱に移動した。金網越しに超音波スピーカーを設置した後、防音箱の扉を閉め、そこに馴化させた。6 時間後、ESP1 を含ませたコットンを再生ケージにそっと導入して提示した。その 30 分後、雄の USVs またはバックグラウンドノイズを、ループ再生で 6 分間提示した。

in situ ハイブリダイゼーション

in situ ハイブリダイゼーションを行うために、再生音提示 30 分後に雌マウスを灌流固定した。イソフルランによる吸入麻酔による深麻酔下にて、0.1 M Sodium phosphate buffer saline (PBS) に続く 4%パラホルムアルデヒド (PFA) を含む 0.1 M PBS (4% PFA) を用いて全身灌流固定を行った。抜脳後、4% PFA に浸漬し、4℃の冷蔵庫で 24 時間保存した。その後、脳サンプルをアルコール系列で脱水し、キシレンで透徹した後、自動包埋装置 (RH-12DM、サクラ精機) を用いてパラフィン包埋した。組織切片自動作製装置 (AS-200S、クラボウ) を用いて、冠状断面で 5 µm 連続切片を作製し、スライドガラスに貼り付けた。切り出した切片は 90 µm 間隔で染色・解析に使用した。*in situ* ハイブリダイゼーションにおける脱パラフィンから対比染色までの一連の工程は、全自動染色システムの操作手順に従って行った (XT-Discovery, Ventana Medical Systems)。c-fos 遺伝子に対応する RNA プローブは、大阪バイオサイエンス研究所の松尾朋彦氏が報告したものを使用した (Matsuo et al., 2015)。XT-Discovery 専用のリボマップシステム (RiboMap Kit, Roche) を用いて、ジゴキシゲニン (DIG) 標識した c-fos の RNA プローブ (1:200) で、74℃で 3 時間、ハイブリダイゼーションした。その後、biotin-conjugated anti-DIG 抗体 (1:500; Jackson ImmunoResearch) で切片を 37℃で 28 分反応させた。発色キット (BlueMap Kit, Roche) で切片を 37℃で 6 時間反応させ、対比発色キット (Red counterstain kit, Roche) で切片を 37℃で 4 分間反応させた。最後に、自動封入装置 (Tissue-Tek Glas, サクラ精機) で染色切片を封入した。

染色画像解析

染色された切片をバーチャルスライドスキャナ (NanoZoomer 2.0-RS、浜松ホトニクス) を用いて解像度の高いデジタルデータに変換した。発現した c-fos 遺伝子は、画像編集ソ

フト (Photoshop CS5, Adobe) を用いて定量した。画像をグレースケールに変換して白黒反転し、そのグレー値 (輝度値) を *c-fos* 遺伝子発現量と見なした。領域を冠状断面で示す脳地図 “*The mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Paxinos George, 2008)” と “*Allen brain atlas* (<http://mouse.brain-map.org/>)” を参照し、各領域から 0.25×0.25 mm の範囲を選択して、左右の平均値を算出した。解析した切片に対応する脳地図のページ番号は結果を示す図中のグレーの帯に示した (Figure 1~4)。Bregma (矢状縫合と冠状縫合の交点) を基準とした切片の距離は脳地図を参照のこと。

統計解析

各領域の *c-fos* 発現量について、ESP1 + Noise 群と ESP1 + USVs 群の 2 群で比較した。統計分析ソフトウェア (SPSS statistic 22, IBM) を用い、Student's *t*-test を行った。有意水準は 5% とした。また、統計分析ソフトウェア (JMP 12, SAS Institute) を用い、領域間の *c-fos* 発現量の相関解析を行った (Figure 5)。相関解析の有意水準は 5% とし、Pearson の相関係数の値に応じてカラーマップを作製した。

1.2.2 実験 1 の結果

雌マウスに ESP1 とバックグラウンドノイズ、または ESP1 と BALB 雄の USVs を組み合わせて提示した後、様々な脳領域における *c-fos* mRNA 発現量を解析した。解析した脳領域を皮質 (嗅覚野、聴覚野、前頭前皮質、その他皮質)、外側中隔核、視床、視床下部、扁桃体、海馬、中脳に分けてそれぞれグラフに示した。

嗅覚野 (Figure 1A)

どの領域においても、ESP1 + Noise 群と ESP1 + USVs 群の間で有意な差は見られなかった。

聴覚野 (Figure 1B, C)

ESP1 + USVs 群の *c-fos* mRNA 発現量が ESP1 + Noise 群に比べて有意に多かった領域は、脳地図の 55 ページ (Bregma -2.92 mm) における AuD (2ary auditory cortex, dorsal: 二次聴覚野背側部) の 2-4 層であった [Figure 1B, $t(9.96) = 2.56, p = 0.028$]。脳地図 46, 50, 55 ページにおける Au1 (primary auditory cortex: 一次聴覚野) の 2-4 層の平均値を比較した場合、ESP1 + USVs 群の *c-fos* mRNA 発現量が ESP1 + Noise 群に比べて有意に多かった [Figure 1C, $t(8.75) = 2.33, p = 0.046$]。その他の領域では、ESP1 + Noise 群と ESP1 + USVs 群の間で有意な差は見られなかった。

前頭前皮質 (Figure 2A, C)

PrL (prelimbic cortex: 前辺縁皮質)、IL (infralimbic cortex: 下辺縁皮質)、DP (dorsal peduncular cortex)、脳地図 26 ページ (Bregma 0.62 mm) における Cg2 (cingulate cortex, area 2: 帯状皮質) では、ESP1 + USVs 群の *c-fos* 発現量が ESP1 + Noise 群に比べて有意に多

かった [PrL, $t(9.57) = 5.15, p = 0.0005$; IL, $t(8.90) = 5.03, p = 0.001$; DP, $t(9.82) = 2.34, p = 0.042$; Cg2 (Brain map 26 page), $t(6.41) = 2.69, p = 0.034$]。その他の領域では、ESP1 + Noise 群と ESP1 + USVs 群の間で有意な差は見られなかった。

その他皮質 (Figure 2B)

どの領域においても、ESP1 + Noise 群と ESP1 + USVs 群の間で有意な差は見られなかった。

外側中隔核 (Figure 3A)、視床 (Figure 3B)

どの領域においても、ESP1 + Noise 群と ESP1 + USVs 群の間で有意な差は見られなかった。

視床下部 (Figure 3C, D)

脳地図 43 ページ (Bregma -1.46 mm) における VMHdm (ventromedial hypothalamic nucleus, dorsomedial part: 視床下部副内側部、背内側核) では、ESP1 + USVs 群の c-fos 発現量が ESP1 + Noise 群に比べて有意に多かった [Figure 3D, $t(6.47) = 2.96, p = 0.023$]。その他の領域では、ESP1 + Noise 群と ESP1 + USVs 群の間で有意な差は見られなかった。

扁桃核 (Figure 4A)、

BLA (basolateral amygdaloid nucleus: 扁桃核外側基底核) では、ESP1 + USVs 群の c-fos 発現量が ESP1 + Noise 群に比べて有意に多かった [$t(5.54) = 2.70, p = 0.039$]。一方、BMA (basomedial amygdaloid nucleus: 扁桃核内側基底核) では、ESP1 + Noise 群の c-fos 発現量が ESP1 + USVs 群に比べて有意に多かった [$t(8.84) = 2.48, p = 0.035$]。その他の領域では、ESP1 + Noise 群と ESP1 + USVs 群の間で有意な差は見られなかった。

海馬 (Figure 4B)、中脳 (Figure 4C)

どの領域においても、ESP1 + Noise 群と ESP1 + USVs 群の間で有意な差は見られなかった。

領域間の相関 (Figure 5)

ESP1 + Noise 群と ESP1 + USVs 群の間で、c-fos 発現量に有意な差があった領域について相関解析を行った。Figure 5 より、c-fos 発現量に相関がみられた領域間の多くに投射関係が存在していることがわかる。多くの領域間の c-fos 発現量は正に相関していたが、BMA においては、IL の c-fos 発現量が高まると BMA における c-fos 発現量が低くなるという負の相関が得られた。

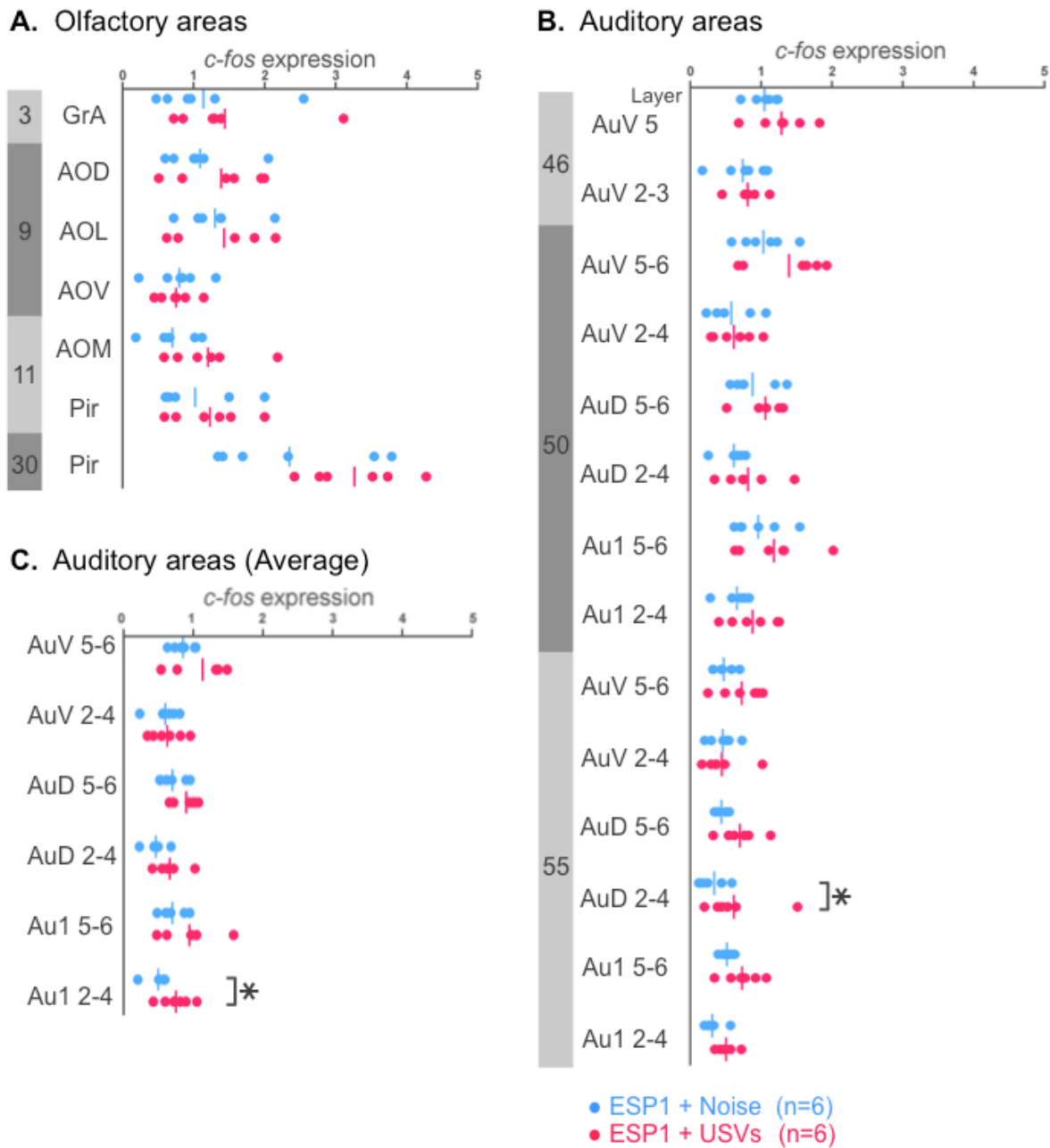


Figure 1

ESP1 とバックグラウンドノイズ、または ESP1 と USVs 提示後の雌の嗅覚野 (A)、聴覚野 (B, C) における c-fos mRNA 発現量

個体ごとの値をドットで示した。各群の直線は平均値を示す。グレーの帯の数値は解析した切片に対応する脳地図のページ番号 (“*The mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Paxinos George, 2008)) を示す。*; $p < 0.05$ (Student’s *t*-test).

略語 GrA (granule cell layer of the accessory olfactory bulb), AOD (anterior olfactory area, dorsal part), AOL (anterior olfactory area, lateral part), AOV (anterior olfactory area, ventral part), AOM (anterior olfactory area, medial part), Pir (piriform cortex), AuV (secondary auditory cortex, ventral area), AuD (secondary auditory cortex, dorsal area), Au1(primary auditory cortex).

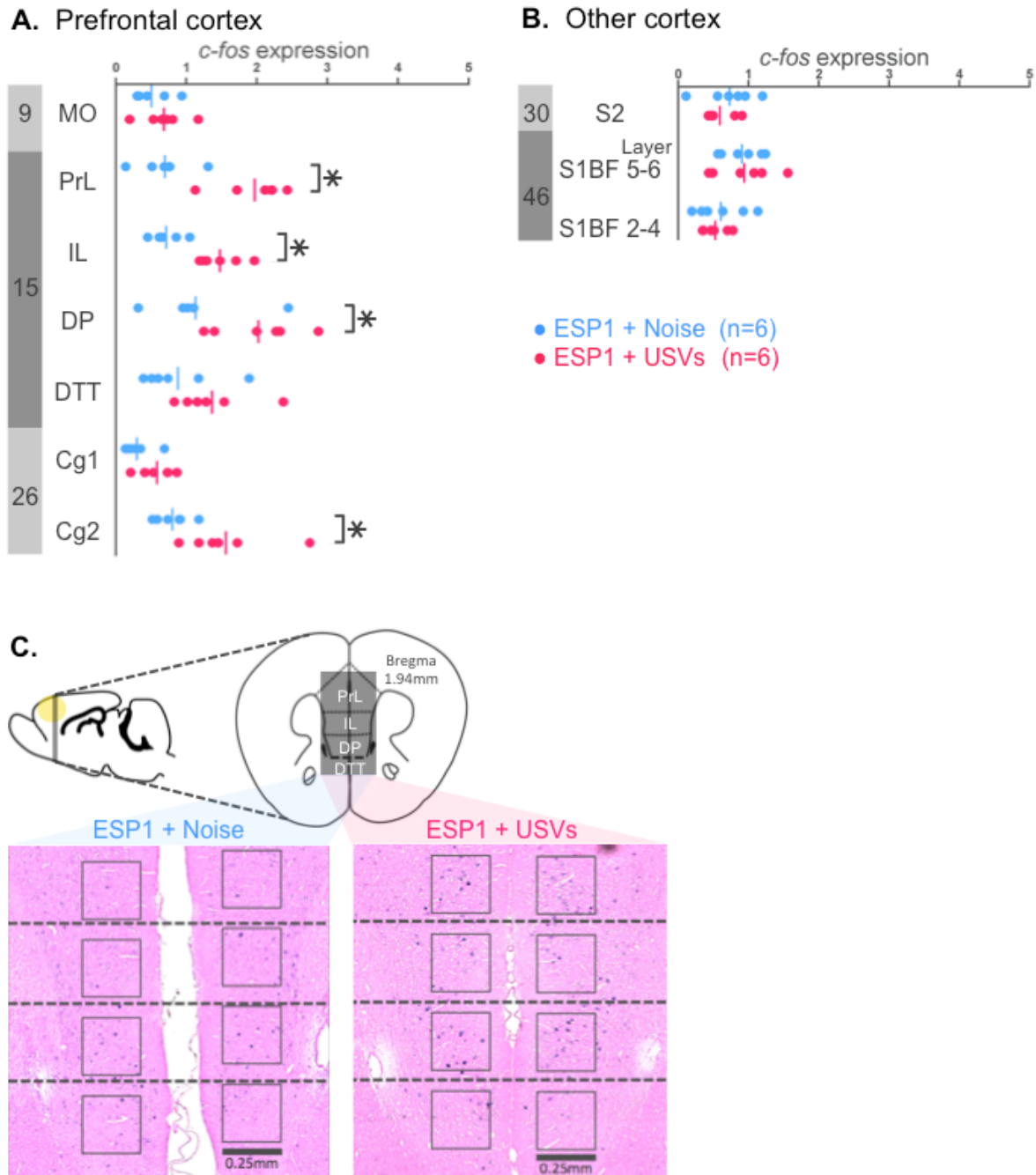


Figure 2

ESP1 とバックグラウンドノイズ、または ESP1 と USVs 提示後の雌の前頭前皮質 (A)、その他皮質 (B) における c-fos mRNA 発現量

個体ごとの値をドットで示した。各群の直線は平均値を示す。*; $p < 0.05$ (Student's *t*-test).

略語 MO (medial orbital cortex), PrL (prelimbic cortex), IL (infralimbic cortex), DP (dorsal peduncular cortex), DTT (dorsal tenia tecta), Cg1 (cingulate cortex, area 1), Cg2 (cingulate cortex, area 2), S2 (secondary somatosensory cortex), S1BF (primary somatosensory cortex barrel field).

(C) 雌での前頭前皮質における c-fos mRNA 発現の様子

c-fos mRNA が発現していると青色に可視化される。

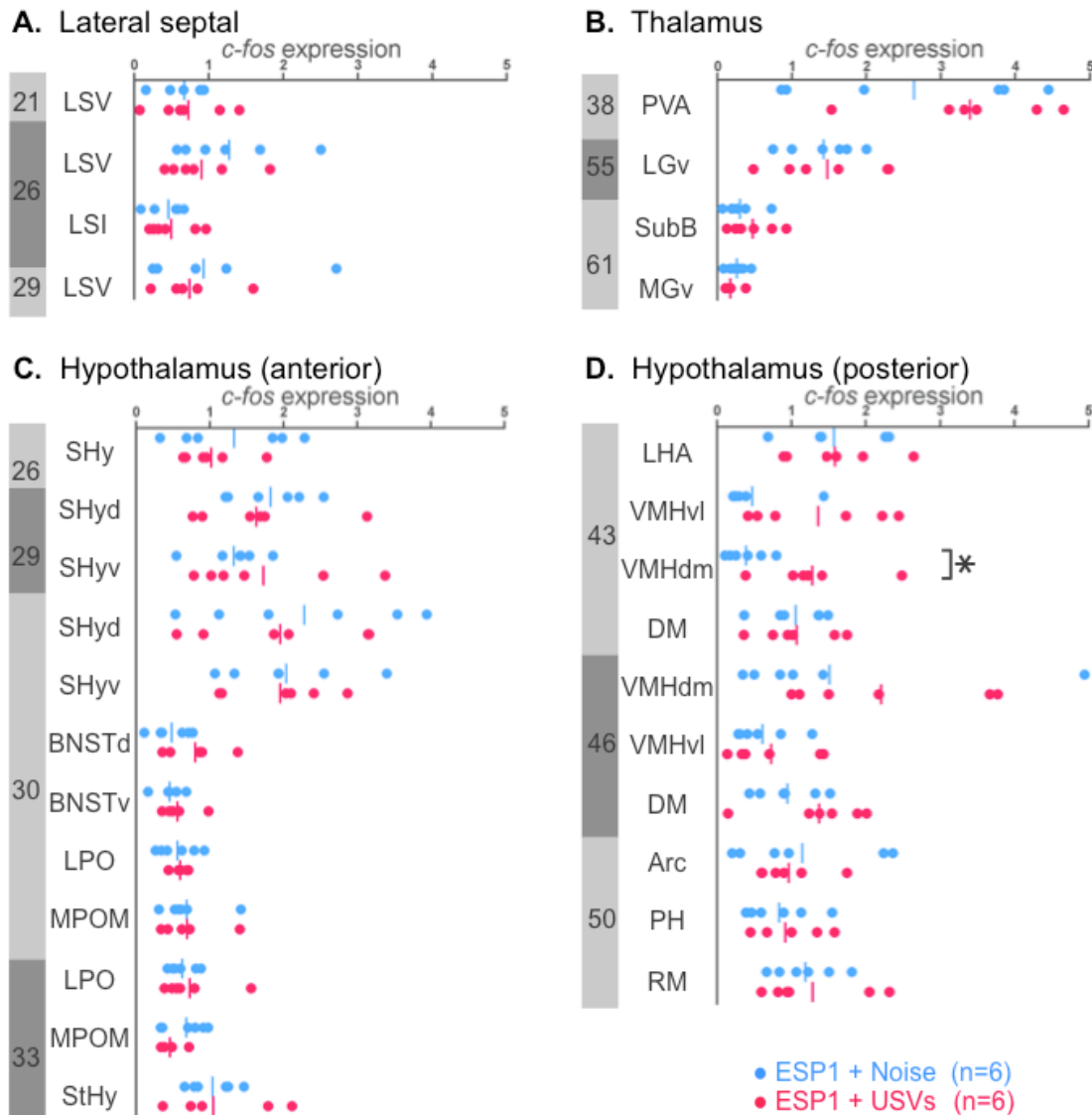


Figure 3

ESP1 とバックグラウンドノイズ、または ESP1 と USVs 提示後の雌の外側中隔核 (A)、視床 (B)、視床下部 (C, D) における *c-fos* mRNA 発現量

個体ごとの値をドットで示した。各群の直線は平均値を示す。*; $p < 0.05$ (Student's *t*-test).

略語 LSV (lateral septal nucleus, ventral part), LSI (lateral septal nucleus, intermediate part), PVA (paraventricular thalamic nucleus, anterior part), LGv (lateral geniculate nucleus, ventral part), SubB (subbrachial nucleus), MGv (medial geniculate nucleus, ventral part), SHy (septohypothalamic nucleus), SHyd (septohypothalamic nucleus, dorsal part), SHyv (septohypothalamic nucleus, ventral part), BNSTd (bed nucleus of the stria terminalis, dorsal part), BNSTv (bed nucleus of the stria terminalis, ventral part), LPO (lateral preoptic area), MPOM (medial preoptic nucleus, medial part), StHy (striohypothalamic nucleus), LHA (lateral hypothalamic area), VMHvl (ventromedial hypothalamic nucleus, ventral part), VMHdm (ventromedial hypothalamic nucleus, dorsomedial part), DM (dorsomedial hypothalamic nucleus), Arc (arcuate hypothalamic nucleus), PH (posterior hypothalamic nucleus), RM (retromammillary nucleus).

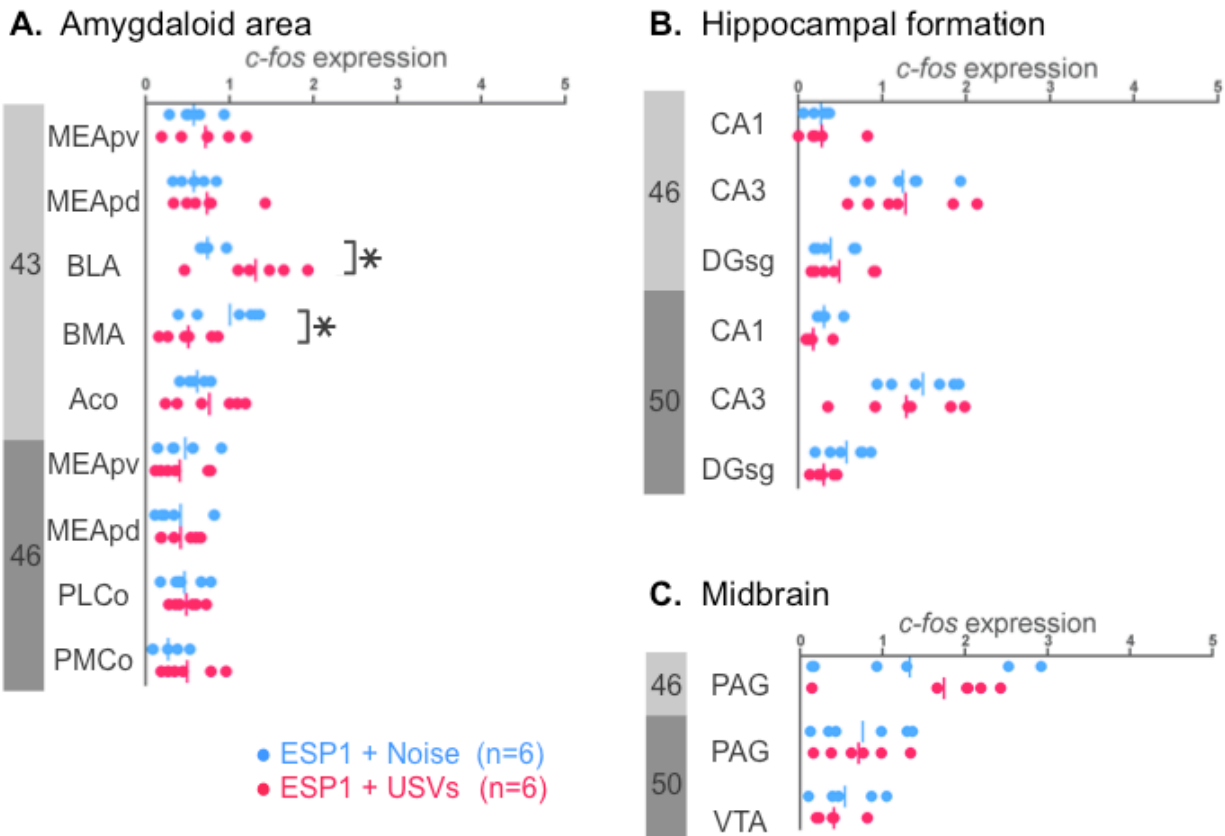


Figure 4

ESP1 とバックグラウンドノイズ、または ESP1 と USVs 提示後の雌の扁桃体 (A)、海馬 (B)、中脳 (C) における *c-fos* mRNA 発現量
 個体ごとの値をドットで示した。各群の直線は平均値を示す。*; $p < 0.05$ (Student's *t*-test).

略語 MEApv (medial amygdaloid nucleus, posteroventral part), MEApd (medial amygdaloid nucleus, posterodorsal part), BLA (basolateral amygdaloid nucleus), BMA (basomedial amygdaloid nucleus), Aco (anterior cortical amygdaliod area), PLCo (posterolateral cortical amygdaloid area), PMCo (posteromedial cortical amygdaloid area), CA1 (field CA1 of the hippocampus), CA3 (field CA3 of the hippocampus), DG-sg (dentate gyrus, granule cell layer), PAG (periaqueductal gray), VTA (ventral tegmental area)

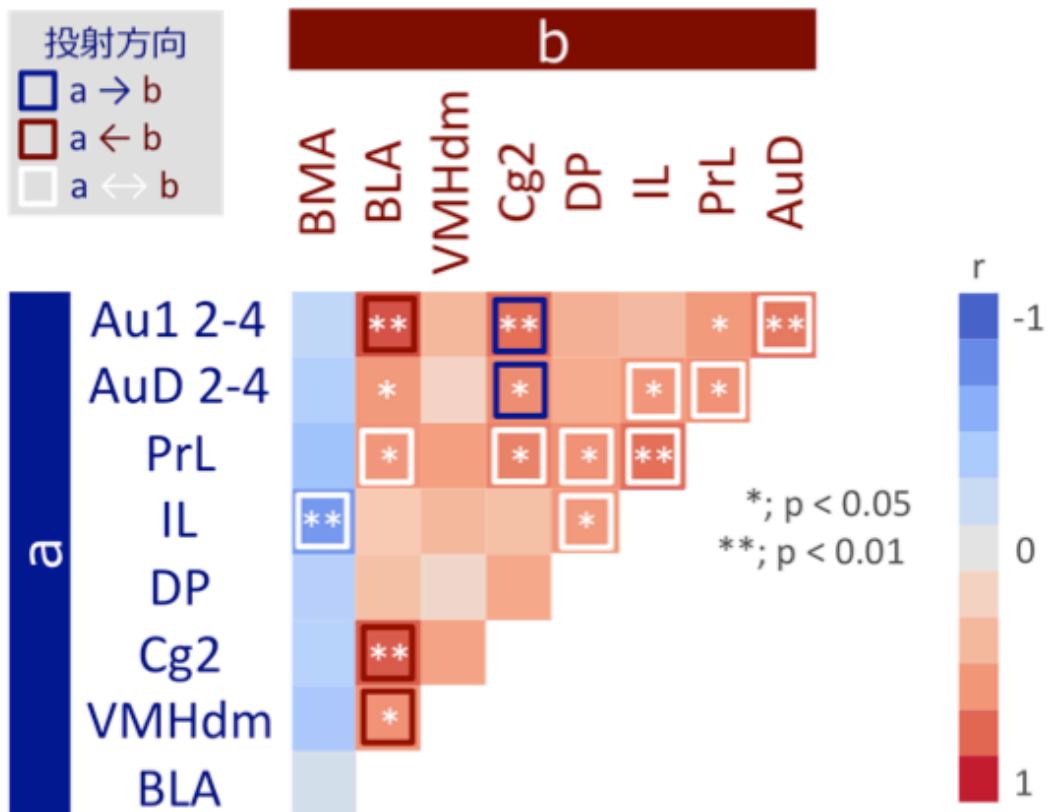


Figure 5

ESP1 + Noise 群と ESP1 + USVs 群の間で c-fos 発現量に差があった領域について、ペアごとの相関係数を示したカラーマップ

“Allen brain connectivity atlas (<http://connectivity.brain-map.org/>)” を参照し、領域間の神経投射の有無と方向を正方形と色で示した。

1.3 実験2 雄のUSVsとフェロモンにより活性化する雌の脳領域と行動との関連調査

1.3.1 実験2の材料と方法

動物

飼育方法については、実験1に準じた。B6雌を用いた。ESP1の溶媒のみとノイズ提示 (Tris + Noise) 群 (n=8)、ESP1とノイズ提示 (ESP1 + USVs) 群 (n=9)、溶媒とUSVs提示 (Tris + USVs) 群 (n=9)、ESP1とUSVs提示 (ESP1 + USVs) 群 (n=9) の計4群を作出した。実験時の雌の週齢は、13~28週齢であった。

USVsの再生

実験1に準じた。

再生ケージ

実験1に準じた。雌を1匹ずつ導入した後、7日以上飼育・維持してから再生実験を行った。

前提示フェロモン物質の準備

実験1に準じた。ESP1の対照として、溶媒であるTris-HClを三角形に切ったコットンに塗布し蒸発させたものを用いた。

刺激提示手続き

実験1に準じて実験の前日まで雌の発情状態を確認し、非発情期の雌を再生実験に用いた。実験当日、自由摂取させていた餌と水を除き、雌を再生ケージごと防音箱に移動した。金網越しに超音波スピーカーを設置した後、防音箱の扉を閉め、そこに馴化させた。4時間後、ESP1またはTris-HClを含ませたコットンを再生ケージにそっと導入して提示した。その30分後、雄のUSVsまたはバックグラウンドノイズを、ループ再生で20分間提示した。実際には、持続的な再生による超音波スピーカーの劣化を防ぐため、4分30秒間再生後、30秒間停止を4回繰り返した。

行動解析

コットン提示中 (30分) と再生音提示 (20分) 後に加えて10分間 (計1時間) の雌の行動を防音箱に設置されたCCDカメラで記録した。解析対象にした時間は、スピーカー音提示前の5分間、5分ごとに分けたスピーカー音提示中の20分間、スピーカー音提示終了後の5分間とした。録画した動画より行動解析Excelマクロ (イベントレコーダー、Programmed by Noaoto Akagawa & Takeru Yamamoto) を用いて、下記の行動を解析した。

- (1) スピーカー (スピーカーの前に張った金網) 探査行動の初回発現潜時と持続時間
- (2) スピーカーゾーン (再生ケージを中央で分断した際、スピーカーが置いてある側)

滞在時間

(3) 不動・睡眠の持続時間

免疫組織学的手法

免疫組織学的手法のために、再生音提示 1.5 時間後に雌マウスを灌流固定した。灌流固定の方法は実験 1 に準じた。抜脳後、4%PFA に浸漬し、4°C の冷蔵庫で一晩保存した。後固定のために 0.1M PBS で溶解したスクロース液 (30%) に置換した。脳をクライオスタット (CM1850, LEICA) にて 30 μm ずつ冠状に切り出した。脳地図である“*The mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Paxinos George, 2008)”を参考に 15 ページ (Bregma 1.94 mm) における PrL, IL を標的として切片を選択して免疫染色を行った。PBS を用い切片を洗浄し、さらに界面活性剤 (Triton X-100, Alfa Aesar) を 0.5% 含む PBS (PBST) にて切片を 3 回、各 10 分ずつ洗浄した。ブロッキングのために PBST で 5% になるように希釈した正常ロバ血清 (Normal Donkey Serum, Jackson ImmunoResearch) に切片を 1 時間浸漬した。その後、神経活性の指標となるヤギ由来の c-fos の抗体 (SC52-G, Santa Cruz Biotech) をブロッキング液で 1:250 になるように希釈し、この一次抗体液で切片を 4°C にて二晩反応させた。その後、PBST で 3 回、各 10 分ずつ洗浄した。ヤギ由来の抗体を赤色に蛍光標識できる二次抗体 (Goat IgG Alexa594, Jackson ImmunoResearch) をブロッキング液で 1:250 になるように希釈し、この二次抗体液で切片を 4°C にて一晩を反応させ陽性細胞を可視化した。その後、PBST にて切片を 3 回洗浄した後、PBS で切片を洗浄した。染色した切片をスライドガラスに貼り付け、核染色封入剤 (Dapi-Fluoromount-G, SouthernBiotech) にて切片を封入した。蛍光画像は顕微鏡 (BX51-N, OLYMPUS) に装着した蛍光観察用照明と顕微鏡用デジタルカメラ (DP71, OLYMPUS) にて撮影した。

染色画像解析

顕微鏡で切片の写真を 10 倍率で撮影した (cellSens Standard, OLYMPUS)。撮影した画像は画層処理ソフトウェア (ImageJ, NIH) で読み込み、実験条件について盲検者が c-fos 陽性細胞数を手動で計測した。代表的な蛍光染色画像を **Figure 6A, B** に示した。

統計解析

PrL と IL における c-fos 陽性細胞数を各刺激条件群で比較するために、前提示フェロモン物質 (ESP1 か Tris) と提示音 (USVs か Noise) を因子として、Two-way factorial analyses of variance (ANOVA) を用い主効果を検定し、その後、Tukey HSD test にて後検定を行った。5 分ごとに解析した行動については、各刺激条件群で比較するために Tukey HSD test を行った。有意水準は全て 5% とした。また、各領域における c-fos 陽性細胞数と 5 分ごとに解析した行動の相関性については、有意水準を 5% とし、Pearson の相関係数を用いて解析した。

1.3.2 実験2の結果

c-fos 陽性細胞数解析の結果

Two-way ANOVA の結果、提示音に主効果が認められたが ($F_{[1, 31]} = 8.16, p = 0.008$)、前提示フェロモン物質×提示音の種類の間には相互作用は認められなかった。各刺激条件群を Tukey HSD test で多重比較した結果、ESP1 + USVs 群の PrL における c-fos 陽性細胞数が、Tris + Noise 群に比べて有意に多かった ($p = 0.035$, **Figure 6C**)。IL においては、各刺激条件群の間で有意な差は見られなかった (**Figure 6D**)。

行動解析の結果 (Figure 7A)

Two-way ANOVA with repeated measures の結果、スピーカー音提示時間 ($F_{[3.39, 105.12]} = 8.56, p = 0.000017$) と刺激条件 ($F_{[3, 31]} = 4.21, p = 0.013$) に主効果が認められた。また、スピーカー音提示時間と刺激条件の交互効果が認められた ($F_{[10.17, 105.12]} = 2.41, p = 0.012$)。

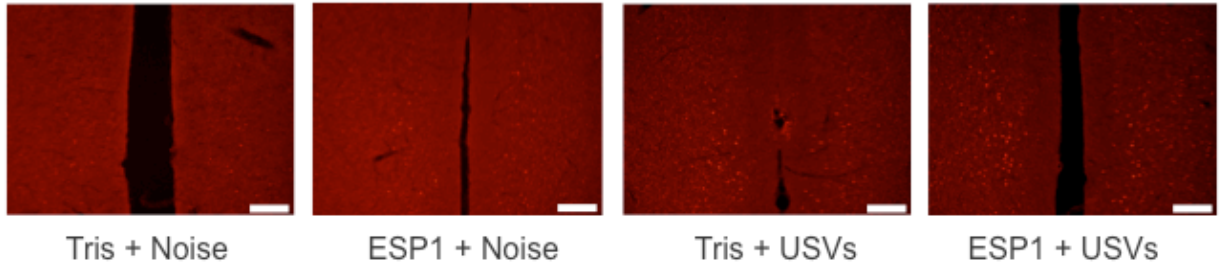
後検定に Bonferroni 法を用いた結果、Tris + USVs 群において、再生音提示開始後 5 分間のスピーカー探索時間 (0~5 min) は再生音提示前の 5 分間 (-5~0 min; $p = 0.003$) と再生終了後 5 分間 (20~25 min; $p = 0.003$) のものより有意に長かった。再生後 5~10 分の間 (5~10 min) のスピーカー探索時間は、再生終了後 5 分間 (20~25 min; $p = 0.039$) のものよりも有意に長かった。ESP1 + USVs 群においても、再生音提示開始後 5 分間のスピーカー探索時間 (0~5 min) は再生音提示前の 5 分間 (-5~0 min; $p = 0.001$) と再生後 15~20 分の間 (15~20 min; $p = 0.012$) 再生終了後 5 分間 (20~25 min; $p = 0.002$) のものより有意に長かった。再生後 5~10 分の間 (5~10 min) のスピーカー探索時間は、再生後 15~20 分の間 (15~20 min; $p = 0.005$)、再生終了後 5 分間 (20~25min; $p = 0.009$) のものより有意に長かった。

各刺激提示群間のそれぞれの提示時間におけるスピーカー探索時間を Tukey HSD test で多重比較した。その結果、最初の 5 分間 (0~5 min) において、Tris + USVs 群は ESP1+Noise 群よりも有意にスピーカー探索時間が増加した (a vs b, $p = 0.039$)。また、ESP1 + USVs 群は Tris + Noise 群 (c vs d, $p = 0.034$)、ESP1 + Noise 群 (c vs d, $p = 0.018$) よりも有意にスピーカー探索時間が増加した。再生後 5~10 分の間 (5~10min) において、ESP1 + USVs 群は ESP1 + Noise 群よりも有意にスピーカー探索時間が増加した (e vs f, $p = 0.044$)。その他の解析項目においては、各刺激条件群の間で有意な差は見られなかった。

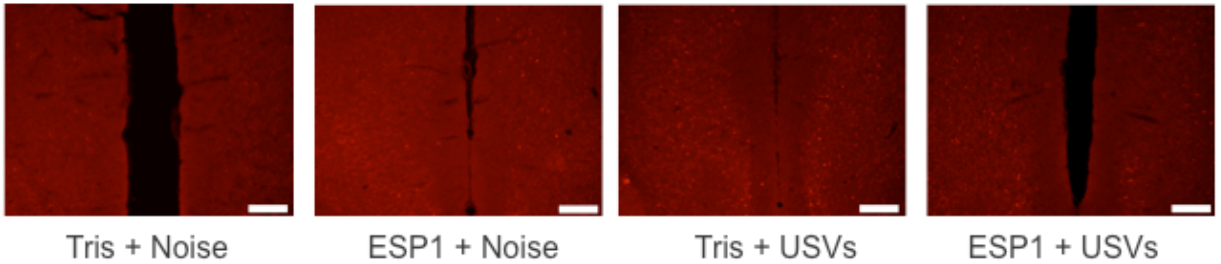
c-fos 陽性細胞数と行動解析の相関分析の結果 (Figure 7B)

PrL における c-fos 陽性細胞数とスピーカー探索行動の関係を見るために、相関分析を行った。その結果、PrL の c-fos 陽性細胞数と再生開始から 5 分間のスピーカー探索行動の持続時間には、正の相関が認められた (Pearson $r = 0.4473$; $p = 0.0071$, **Figure 7B**)。Figure 7B より、ESP1 + USVs 群や Tris + USVs 群では、2つの指標が比較的高いことがわかる。

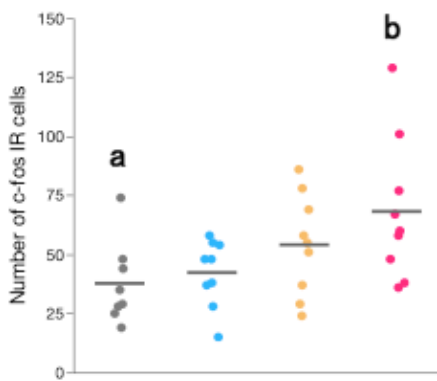
A. PrL



B. IL



C. PrL



D. IL

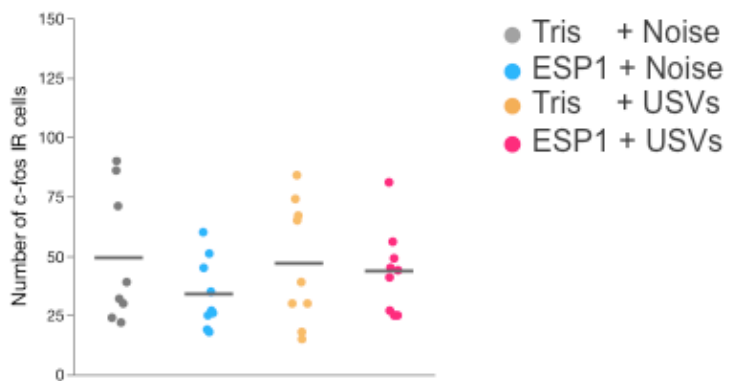
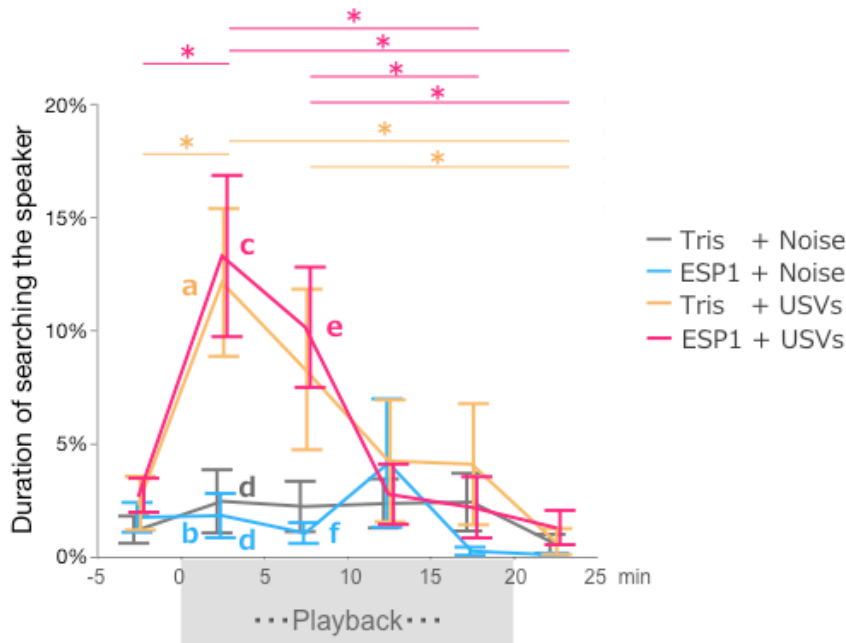


Figure 6

(A, B) PrL と IL における c-fos 陽性細胞の蛍光染色画像。赤色に発色しているのが一つ一つの陽性細胞。スケールバーは 0.2 mm を示す。

(C, D) 各提示群における PrL と IL の c-fos 陽性細胞数。個体ごとの値をドットで示した。各群の直線は平均値を示す。ESP1 と USVs の共提示により PrL の c-fos 陽性細胞数の増加が見られた。a vs b, $p < 0.05$, Tukey HSD test.

A.



B.



Figure 7

(A) 5分毎のスピーカー探索行動の持続時間。ESP1 + USVs 群と Tris + USVs 群では、スピーカーから音を再生し始めてから最初の 5 分間と 5~10 分の間において、再生前の 5 分間や、再生後 15~20 分の間、再生終了後の 5 分間に比べて探索時間が有意に長かった。

Mean \pm SEM, *, $p = 0.05$, Two-way ANOVA, Bonferroni test.

スピーカーから音を再生し始めてから、最初の 5 分間と再生後 5~10 分の間において、Tris + USVs 群と ESP1 + USVs 群は Tris + Noise 群と ESP1 + Noise 群よりも有意にスピーカー探索時間が増加した。a vs b, c vs d, e vs f, $p < 0.05$, Tukey HSD test.

(B) PrL の c-fos 陽性細胞数と再生開始から 5 分間のスピーカー探索行動との相関。二つの指標の間に正の相関が認められた。

1.4 実験3 雄のUSVsとフェロモンにより活性化する雌の前辺縁皮質における神経細胞の特徴の調査

1.4.1 実験3の材料と方法

動物

飼育方法については、実験1に準じた。ESP1とUSVsを提示した雌を1匹用意した。実験時の雌の週齢は、25週齢であった。

USVsの再生

実験1に準じた。

再生ケージ

実験1に準じた。

前提提示フェロモン物質の準備

実験1に準じた。

刺激提示及びサンプリング手続き

実験2に準じた。

二重免疫組織学的手法

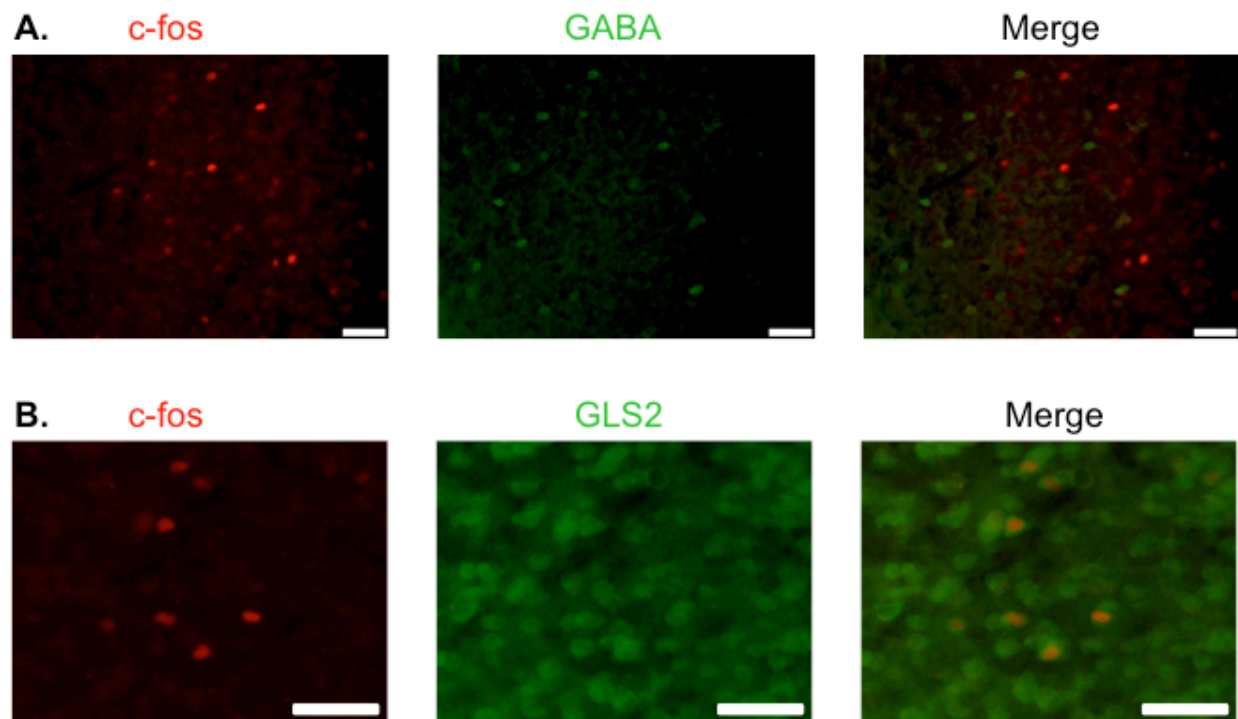
灌流固定、脳の切片化、組織の封入、撮影については、実験2に準じた。GABA作動性ニューロンのマーカーには抑制性の神経伝達物質GABAの抗体を用いた。グルタミン酸作動性ニューロンのマーカーとして、グルタミンをグルタミン酸に変換する細胞内代謝酵素であり、GABAとの交差がないことが認められているGLS2 (Phosphate activated glutaminase 2) (Kaneko and Mizuno, 1994)の抗体を用いた。GABAとc-fos、GLS2とc-fosの2種類の組み合わせで二重免疫組織学的手法を行い、ESP1とUSVs刺激により反応するc-fos陽性細胞の特徴を検討した。実験2のc-fosに対する抗体を用いた免疫染色の手順に準じ、一次抗体液にウサギ由来のGABA抗体 (A2052, Sigma-Aldrich) またはGLS2抗体 (ab113509, Abcam) をそれぞれ1:5000または1:1000の濃度で加えた。二次抗体液にはウサギ由来の抗体を緑色に蛍光標識できる二次抗体 (Rabbit IgG Alexa 488, Jackson ImmunoResearch) を1:250の濃度で加えた。

染色画像解析

顕微鏡で切片の写真を20倍率で撮影した。赤色 (c-fos) と緑色 (GABA、またはGLS2) の蛍光標識画像を重ね合わせ、c-fos陽性細胞数とGABAまたはGLS2とc-fosの共発現細胞数を手動で計測した。代表的な蛍光染色画像を **Figure 8A, B** に示した。

1.4.2 実験3の結果

c-fos 陽性細胞数と GABA または GLS2 と c-fos の共発現細胞数を **Figure 8C** に示した。c-fos 陽性細胞の多くが GABA 陽性細胞よりも GLS2 陽性細胞と重なっていた。ESP1 と USVs の提示によって活性化する PrL の神経細胞の多くは興奮性ニューロンであることがわかった。



C.

	Immunoreactive cells		
	c-fos	Merge	Merge / c-fos (%)
GABA	95	6	6.3
GLS2	51	50	98.0

Figure 8

(A, B) PrL における c-fos とマーカーの陽性細胞の蛍光染色画像。赤色に発色しているのが c-fos 陽性細胞。緑色に発色しているのが GABA 陽性細胞または GLS2 陽性細胞。スケールバーは 50 μm を示す。

(C) 陽性細胞数の計測結果。

1.5 考察

本章では、雄 USVs が雌の接近行動を誘起する効果を示すための聴覚情報と嗅覚情報の統合機構を明らかにすることを目的とし、USVs とフェロモン提示により活性化する脳部位を調査した。

1.5.1 聴覚野の活性

実験 1 では、雄フェロモンである ESP1 と BALB 雄の USVs、あるいは ESP1 とバックグラウンドノイズを提示された B6 雌の神経活動を前初期遺伝子である *c-fos* を指標に、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて全脳領域で解析した。その結果、雄刺激として ESP1 だけを提示した場合よりも、ESP1 と雄の USVs を共提示すると、いくつかの領域で高い神経活性が起こることを見出した。

音情報の処理を行う聴覚野では、二次聴覚野 (AuD) の 2-4 層と一次聴覚野 (Au1) の 2-4 層が雄刺激の組み合わせによって神経活性が高まる領域として検出された (**Figure 1B, C**)。Au1 の 2-3 層は、母マウスにおいて、仔マウスの匂い刺激と USVs の共提示によって活性が増強されることが報告されている領域である (Cohen and Mizrahi, 2015)。彼らは電気生理学的な手法により、Au1 の 2-3 層におけるグルタミン酸作動性錐体細胞 (Pyramidal glutamatergic neurons: PyrNs) の活性を調べ、養育経験のある個体ほど pup USVs に対する特異的な神経応答が高まり、さらに、その応答は仔の嗅覚シグナルの存在下で一層強まることを明らかにしている。PyrNs の細胞体周辺には、抑制性のシナプスを形成しているパルブアルブミン発現性ニューロン (Parvalbumin-expressing neurons: PVNs) が存在している。このことから、仔の嗅覚シグナルが PVNs の反応を抑制することによって PyrNs の反応を強めることが示唆されている。本研究も、Cohen らの研究と一致して、雄のフェロモンと雄の USVs を共に提示することで、Au1 の 2-4 層の神経応答が強くなることがわかった。実験 1 で用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法では、活性化した細胞の形態や他細胞とのネットワークを明らかにすることはできないが、皮質における 2-3 層の PyrNs は他の皮質に出力するネットワークを有することが知られている。今後は、聴覚野で高まった雄の USVs に対する反応した神経細胞が、皮質のどの領域に投射するのかを検討する必要がある。

1.5.2 内側前頭前皮質の活性

聴覚野以外の皮質では、ESP1 と USVs の共提示によって活性化する領域として、PrL, IL, DP, Cg が検出された (**Figure 2A, C**)。これらの領域は内側前頭前皮質 (medial prefrontal cortex, mPFC) と呼ばれる領域で、感覚統合、注意の切り替え、ワーキングメモリなど高次機能に関わっている領域である (Gill et al., 2000; Ongür and Price, 2000)。ヒトや霊長類の研究では、これらの領域が社会行動の理解や他個体とのコミュニケーションに関連していることが報告されており (Damasio, 1996; Adolphs, 2009)、知っているヒトと見知らぬヒトを見分けるような対人関係に関わる判断にも関与していることがわかっている (Krienen et al., 2010)。また音情報への嗜好性にも関わっていることがわかって

おり、ヒトが好みの音楽を選ぶときには、意思決定に関与することが知られている PFC の辺縁皮質が活性化する (Levitin and Tirovolas, 2009)。齧歯類の研究でも、mPFC の損傷実験によって、この領域が意思決定に関与していることが明らかにされている (Kvitsiani et al., 2013)。

ICR 系統のマウスでは、特定の音楽を生後 10~20 日の間に聞かせ続けると、大人になったときにその音楽に対して嗜好性が形成されることが報告されている (Jouhaneau and Bagady, 1984)。B6 系統のマウスでも、臨界期の音声環境が、大人になったときの音嗜好性に影響し、さらに mPFC における神経活性の関与も認められている (Yang et al., 2012)。つまり、マウスにおいても、音に対する嗜好性を形成し発現する際、mPFC が重要な役割を担っていることが示唆されている。ヒトが作り出した音楽のみならず、本研究室の先行研究では、雌マウスの異系統雄の USVs に対する嗜好性は幼少期の音声環境によって獲得されることが里子操作実験で明らかになっている (Asaba et al., 2014)。雌マウスが雄の USVs の価値を判断し、嗜好性を発現する際には、幼少期の音声環境によって形成された mPFC の神経細胞が活性化しているかもしれない。雄の USVs のみならず、個体そのものが適切なパートナーであるかを USVs や匂いなどを踏まえて判断し、嗜好性を示す際にも mPFC が関与していることも考えられる。今後は、嗜好性を示すことがわかっている異系統の USVs を聞かせた場合と、同系統の雄の USVs を聞かせた場合で、mPFC の神経活性を比較し、検討する必要がある。一方、フェロモンなどの嗅覚情報を伝達する鋤鼻神経系 (Vomeronasal system: VNs) が直接 mPFC に投射しているという報告は少ない。鋤鼻器で受容された情報は扁桃体 (MeA) と視床下部に投射することが一般的に知られている。しかし、近年の見解では、解剖学的に扁桃体から PFC への神経回路が存在し、感情的な行動に関与していることが報告されている (McDonald et al., 1996; Marek et al., 2013)。本実験で提示した ESP1 の情報が mPFC にどのような経路で情報を伝え、USVs と統合されるかについては、MeA と mPFC 経路に着目して検討する余地があるだろう。

1.5.3 視床下部の活性

視床下部では、腹内側部の背内側核 (VMHdm) が ESP1 とノイズを提示した場合より、ESP1 と USVs の共提示によって活性化した (**Figure 3D**)。VMHdm は、MeA から情報入力を受け、雌特異的な社会行動を制御する領域で、雌に ESP1 を提示すると c-fos タンパク質の発現が多く観察される (Haga et al., 2010)。この領域が、USVs との共提示によって、さらに活性化したことは特筆すべき点である。雄のフェロモンが個別に機能するだけでなく、雄の USVs と複合的に機能することで、雌の性行動をより強固に誘起するかもしれない。実際、先行研究では、雌マウスは USVs を発声できないように処置した雄よりも、USVs が発声できる偽処置の雄に対して、頻繁に接近行動や性行動を示す (浅場, 修士論文, 2013)。雄の USVs が、雌の性行動や生殖内分泌に関わる視床下部に及ぼす影響については、次章にて詳細に後述する。

1.5.4 扁桃体基底核の活性

扁桃体基底核 (BLA) も USVs と ESP1 の受容によって活性化した (**Figure 4A**)。BLA は嗅覚情報と聴覚情報の両方を受容することが知られている (Campeau and Davis, 1995; Maren, 1999)。また、仔マウスの匂いと USVs の共提示によって BLA は活性化し、母性行動を駆動することも報告されている (Okabe et al., 2013)。このような知見から、雌の BLA も雄の嗅覚刺激と聴覚刺激の統合処理の座の一つである可能性が実験 1 により示された。

1.5.5 雄の USVs とフェロモンを統合する雌の神経回路

Figure 5 の c-fos 発現量の相関分析をもとに、雄の USVs とフェロモンの暴露を受けた際に活性化する雌の神経回路を推測し、**Figure 9** に示した。鋤鼻系は、フェロモン受容器である鋤鼻器から始まる経路である。フェロモン情報は、鋤鼻感覚神経によって AOB (accessory olfactory bulb: 副嗅球) へ伝達され、さらに扁桃体を経て、視床下部へ伝達される (Kevetter and Winans, 1981; Brennan and Zufall, 2006)。この投射経路は、雌マウスの性特異的な社会行動である雄への接近行動や性行動中の雄受容姿勢 (Lordosis) を促進することが知られている (Haga et al., 2010)。実験 1 により、この経路に含まれる BLA と VMH は ESP1 と USVs の共提示によりさらに活性が高まることがわかった。このことから、雄の USVs が嗅覚情報伝達経路とその後に出力される雌特異的な社会行動の発現をさらに高めることが期待できる。実際、博士前期過程に行った研究では、無声化処置を施した雄を作出し、偽処置の雄と比較して、雌の性行動が変化するかを調べた結果、偽処置雄提示群の雌は、無声化処置雄提示群の雌に比べて、雄への接近回数やその持続時間が有意に高くなり、その後続く Lordosis が増加する傾向が見られている。

マウスの聴覚情報伝達経路は一般的に、聴覚感覚神経が蝸牛神経核へと軸索を伸ばし、上オリーブ核へと神経を投射する。上オリーブ核から、下丘、内側膝状体を経て、Au (auditory cortex: 聴覚野) へ情報が伝達される (Charitidi, 2012)。Au からは、Cg、PrL、IL への神経投射が存在していることが確認されている (**Figure 9**)。Au、Cg、PrL、IL など、聴覚情報の情報が伝達されるこれらの領域は、BLA からの神経投射が存在している。このような扁桃体と mPFC の間での神経投射はとくに情動を伴う行動をコントロールしていることも報告されている (McDonald et al., 1996; Marek et al., 2013)。このことから、BLA に伝達された嗅覚情報が、Au、Cg、PrL、IL などへも情報を伝達し、神経の活性をさらに高めた可能性も考えられた。また PrL は BLA に対して相互に投射関係を結んでいることから、BLA と続く VMH の活性は PrL などの神経活性に由来するものなのかもしれない。実験 1 の結果より、IL の活性が高まると BMA の活性が低くなるという負の相関があったことから、IL が BMA の活性を抑制していることも考えられた。IL の制御より BMA の活性が高まることは、不安の抑制に関与していることが報告されている (Adhikari et al., 2015)。本実験においても、スピーカーにより人工的に再生した USVs への探查行動が不安を含んだ行動である可能性が示唆された。

Figure 9 に示した部位以外に、ESP1 と USVs 提示、ESP1 と Noise 提示の間で有意な違いが検出されなかった部位でも、領域間で相関が得られた部位はいくつか検出されている。これらを踏まえ、投射関係について推測することは留まりを知らず広がってしまうため、ここで筆を置くことにする。今後、トレーサーなどを用いた実験技術により、雄の USVs とフェロモンを統合する雌の神経回路の全容が明らかになることを期待したい。

1.5.6 内側前頭前皮質の活性と行動の関連

実験 2 では、複数の刺激に由来する情報を統合する領域だと考えられており、実験 1 で雄のフェロモンと USVs 提示でより高い神経活性があることが検出された PrL と IL に着目して、その神経活性と雌の行動との関連を調査した。その結果、ESP1 と USVs を提示した雌では、対照群である Tris とノイズを提示した雌に比べて、PrL の c-fos タンパク質の発現が有意に多く観察された (**Figure 6C**)。しかし、ESP1 とノイズを提示した群、Tris と USVs を提示した群とは、この領域の c-fos 発現に有意な差は認められなかった (**Figure 6C**)。そのため、二つの刺激を同時に提示することが、単一の刺激を提示したときよりも、PrL の活性を高めているとは言い切れない。実験 1 のように、ESP1 と USVs 提示と ESP1 とノイズ提示の間で PrL の神経活性に差が見られなかったのは、実験手順や再生音提示時間の違いによるものなのかもしれない。実験 2 では、スピーカー音の再生を 20 分間とした。**Figure 6A** に示したように、スピーカーから USVs を再生した場合、雌のスピーカー探査を最も持続し続けていたのは、再生開始後の 5 分であった。一般的に、雄マウスが雌に出会うと、出会った時から射精に至るまで、5 分以上 USVs を発声し続ける。再生実験では雄の実体が伴わないため、雌はスピーカーに対する接近行動を持続させることができなかつたのかもしれない。雌の雄 USVs 嗜好性を調べた実験においても、10 分間の再生実験のうち雄の USVs への反応が高いのは再生開始後の 5 分間であった (Asaba et al., 2015)。実験 2 の行動解析でも、USVs 提示実験に効果的な再生時間は 5 分間が適切であることが示された。**Figure 6B** で示したように、この再生開始後の 5 分間におけるスピーカー探査行動の持続時間と PrL における c-fos 陽性細胞数の間に正の相関があった。特に、ESP1 と USVs を提示した雌や、Tris と USVs を提示した雌では比較的高い値が得られている。これらの結果から、雄の USVs の暴露により、PrL の神経活性が高まり、音源への探査行動が誘発される可能性が示された。前述したように、PrL は感覚統合や意思決定に関連している領域であることは報告されていたが、本実験では、マウスにおいて、雌が雄の聴覚情報である USVs と嗅覚情報である ESP1 をこの部位で統合し、USVs への接近行動を示す可能性を初めて見出した。

1.5.7 ESP1 と USVs により活性化した神経細胞の特性の同定

実験 1 と 2 により、雌の脳内で雄の USVs と ESP1 を統合し、音源への接近行動に関連している領域が PrL である可能性が示されたため、実験 3 では同じ刺激により PrL で活性化した神経細胞の特徴を調査した。細胞の特徴を明らかにすることは、聴覚情報と

嗅覚情報の統合および行動を発現するまでに至る神経回路を解明する一助となりうる。神経細胞の特性として、PrL における興奮性グルタミン酸ニューロンならびに抑制性 GABA ニューロンに着目して解析を行った。その結果、USVs と ESP1 の複合的な刺激により PrL で活性化する神経細胞の多くが興奮性のグルタミン酸ニューロンであることが明らかになった。抑制性の GABA 作動性ニューロンは無棘性の非錐体細胞の形態をとるが、興奮性のグルタミン酸作動性ニューロンは錐体細胞の形態をとり、他の領域へ情報を伝達する。本章の実験では、投射経路を明らかにすることはできなかったが、実験 1 の *in situ* ハイブリダイゼーションの全脳解析の結果から、投射先の候補として BLA や VMHdm があげられる。雄のシグナルを受けることによって、雌で表出される適応的な反応としては、性行動、生殖内分泌中枢の活性化などが考えられる。このような作用に関わる脳領域に対して、PrL を起点とした機能的なネットワークが存在するかどうかについては、今後さらなる検証が必要である。

1.5.8 結論

本章の結論として、雌マウスは雄の USVs とフェロモンの両方を受容すると音源に対してより接近行動を示すことが明らかとなった。また、聴覚と嗅覚の複合的な刺激の受容により、AuD と Au1 の 2-4 層、mPFC, BLA, VMHdm が高い活性を示したことから、これらの領域が異なる感覚器に由来する刺激の統合処理を行い、雄への接近行動に寄与していることが示唆された。とくに mPFC における PrL は感覚統合や意思決定の制御中枢であり、活性化した神経細胞は興奮性ニューロンで他領域に投射し情報を伝達する可能性が示された。雄のシグナル認知機構とそれに対する雌特異的な行動制御機構は PrL を中心としたネットワークにより支持されているのかもしれない。

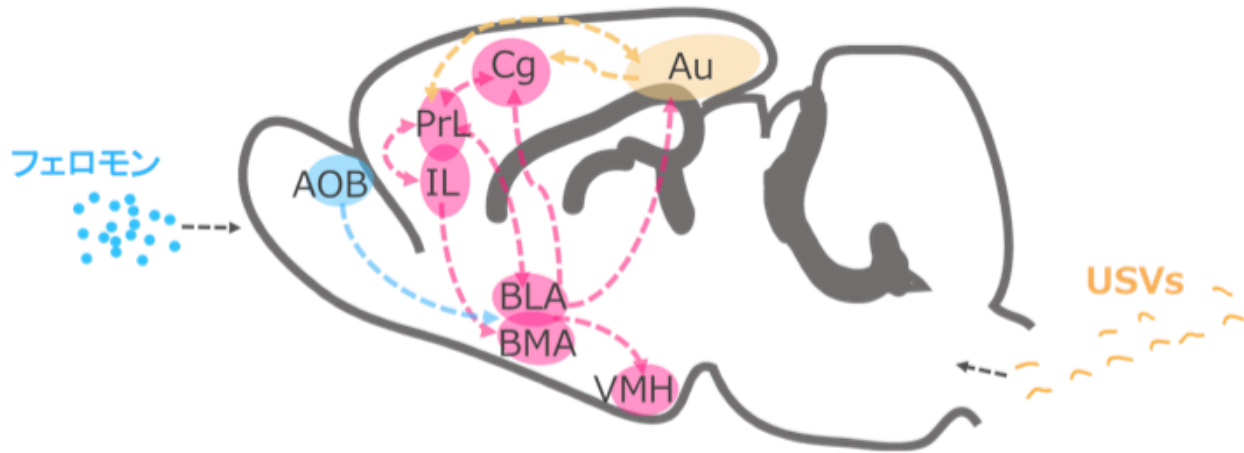


Figure 9

USVs とフェロモンの統合経路

鋤鼻系の主な経路は水色、聴覚系の主な経路は黄色で示した。実験 1 により ESP1 と USVs の共提示により活性に変化が起きた領域はピンク色で示した。

略語 Au (auditory cortex), AOB (accessory olfactory bulb), BLA (basolateral amygdaloid nucleus), BMA (basomedial amygdaloid nucleus), Cg (cingulate cortex), IL (infralimbic cortex), PrL (prelimbic cortex), VMH (ventromedial hypothalamic nucleus).

第 2 章 雄の USVs が雌の生殖内分泌へ及ぼす効果の調査

2.1 緒言

いくつかの動物では、雄の鳴き声や求愛行動が雌の接近行動や排卵を促すことが報告されており (Shelton, 1980; McComb, 1987; Cheng, 1992; Lynch et al., 2006; Delgado et al., 2012)、多くの動物種にわたって雄による鳴き声が雌の繁殖に関する行動のみならず、神経内分泌機構も活性化させていることが考えられる。実際、鳥類やヤギ、シカなどでは、雄の鳴き声が雌性ホルモンであるのエストロゲンや、LH (luteinizing hormone: 黄体形成ホルモン) の分泌を刺激することが認められている (McComb, 1987; Bentley et al., 2000; Delgado et al., 2012)。

雄マウスも雌に出会うと USVs を発声するが、この USVs が雌の繁殖制御機構に及ぼす影響については明らかになっていないことが多い。先行研究では、B6 のペア間における 4 ヶ月間の出産回数と、そのペアの雄が見知らぬ雌に 3 分間遭遇した際に発した発声回数を測定し、相関を調べている (浅場, 修士論文, 2013)。その結果、雌に遭遇した際の発声回数が多い雄のペアは出産回数が多く、高い正の相関が得られた。このことから、雌が雄の USVs を受容することで繁殖制御中枢が活性化し、交尾行動や排卵の促進により繁殖効率が向上するメカニズムの存在が考えられた。また、雌の USVs に対する嗜好性を調べた先行研究では、性周期の影響も調べており、非発情期により顕著に嗜好性が示された (Asaba et al., 2014)。エストロゲンの放出を担っている卵巣の除去手術を施した雌マウスを用いたところ、異系統の雄 USVs への嗜好性が消失し、エストロゲンを投与すると、その嗜好性が回復した。他の研究でも、雌マウスの雄の USVs に対する嗜好性は、卵巣除去手術によって消失し、エストロゲンの投与によって回復することを示している (Pomerantz et al., 1983)。このことから雄の USVs 嗜好性は雌のエストロゲン値に依存することが示唆された。つまり、雌マウスは性周期によって雄の USVs に対する反応が変化するため、性周期の影響を加味して、繁殖制御機構への効果を調べる必要がある。そこで、第 2 章では、スピーカーによる雄の USVs の提示により、雌の生殖内分泌中枢が活性化されるかを末梢、中枢、神経細胞単位で調査した。

まず、実験 4 では、末梢を循環するエストラジオール値を反映している糞中のエストラジオール値が雄の USVs によって上昇するかを調べた。血中のステロイドホルモンは、主に肝臓で代謝され、糞や尿とともに体外へ排泄される。糞や尿中のホルモンの調査は、非侵襲的であるため、希少動物の繁殖生理を内分泌学的に把握するために、広く用いられている (Onuma et al., 2002; Imon et al., 2014)。齧歯類でも、糞中のエストラジオール値が雌の性周期に応じて変化することが認められている (Muir et al., 2001; Chelini et al., 2005)。性周期や卵巣の除去の影響を加味して、雌の糞中のエストラジオール濃度を EIA 法 (enzyme immunoassay: 酵素免疫抗体法) により測定し、Noise 提示群と USVs 提示群の間で比較した。

卵巣から血中に放出されるエストロゲンは、脳内の視床下部に到達し、GnRH (gonadotropin releasing hormone: 性腺刺激ホルモン放出ホルモン) の分泌を調節する。ま

た、エストロゲンが脳内で作用する部位は視床下部のみならず、聴覚野にも作用することが近年の研究で明らかになってきた。鳥類では、雄の歌によって、聴覚野のエストロゲンが上昇することが報告されている (Maney and Pinaud, 2011)。一方で、エストラジオールの存在によって、鳴き声に対する反応が高まることも報告されている (Sisneros et al., 2004; Remage-Healey et al., 2008; Tremere et al., 2009; Remage-Healey et al., 2012)。マウスでも、中枢の聴覚情報の処理経路において、エストロゲン受容体 α と β の存在が認められ (Stenberg et al., 1999; Charitidi and Canlon, 2010; Charitidi et al., 2010)、エストロゲン拮抗薬を投与することによって、聴覚フィードバックシステムに変化がおこることが報告されている (Thompson et al., 2006)。しかし、マウスにおいて、聴覚経路のエストロゲンレベルが高まったために USVs への反応性が高まるのか、雄の USVs によって聴覚経路のエストロゲンレベルが高まるのかは不明である。したがって、エストロゲンレベルが変化することを踏まえて性周期ごとに USVs の効果を調査する必要がある。実験 5 では、非発情期と発情前期における雌マウスの視床下部と聴覚野のエストラジオール濃度を EIA 法により測定し、Noise 提示群と USVs 提示群の間で比較した。

実験 6 では、エストロゲンの作用を受け GnRH の分泌を調節するキスペプチンニューロンに着目して、USVs の効果を調査した。マウスのキスペプチンニューロンは、AVPV (anteroventral periventricular nucleus: 前腹側室周囲核) と Arc (arcuate nucleus: 弓状核) の 2 箇所に着目する (Figure 12) (Ohkura et al., 2011)。AVPV におけるキスペプチンニューロンは、卵巣由来のエストロゲンにより正のフィードバックを受けると、GnRH のサージ状分泌を促す。それにより、LH のサージ状分泌が促進され、排卵が誘起される。一方、Arc に着目するキスペプチンニューロンは、エストロゲンの負のフィードバックにより、GnRH のパルス状分泌を制御する (Okamura et al., 2013)。それにより、FSH (follicle-stimulating hormone: 卵胞刺激ホルモン) と LH の分泌が制御され、卵巣の卵胞発育が誘起される。そこで、AVPV と Arc におけるキスペプチンニューロンの活性化を神経活性化の指標である pCREB (phosphorylation of cyclic AMP response element binding: リン酸化 cAMP 応答配列結合タンパク) を用いた二重免疫組織学的手法により調べた。pCREB は、第 1 章で用いた最初期遺伝子である c-fos の誘導に関わるタンパク質で、領域によっては c-fos タンパク質と同じ発現パターンを示す (Pascual et al., 2009)。また、pCREB はエストロゲン依存的に発現し、GnRH ニューロンとも共発現することがわかっている (Abrahám et al., 2003; Grattan et al., 2007)。投与したエストラジオールの濃度依存的に AVPV の pCREB の発現が増加することも報告されていることから (Sárvári et al., 2009)、キスペプチンニューロンにおいても、活性化に伴い pCREB が発現する可能性がある。実験 6 では、雄フェロモンである ESP1 との共提示の影響を加味して、実験 2 と同様に Tris と Noise 提示群、ESP1 と Noise 提示群、Tris と USVs 提示群、ESP1 と Noise 提示群の計 4 群を作出し、AVPV と Arc における活性化キスペプチンニューロンの割合を比較した。同時に、再生音提示中の雌の行動を解析し、活性化キスペプチンニューロンとの関連を調べた。

2.2 実験4 雄のUSVsが雌の糞中エストラジオール値に及ぼす効果の調査

2.2.1 実験4の材料と方法

動物

飼育方法については、実験1に準じた。Noiseを提示した非発情期の雌5匹、発情期の雌6匹、発情前期の雌5匹、実験の2ヶ月前（10週齢時）に卵巣を除去した雌4匹、USVsを提示した非発情期の雌4匹、発情期の雌6匹、発情前期の雌6匹、卵巣を除去した雌6匹を用意した。実験時の雌の週齢は、13~21週齢であった。

USVsの再生

実験1に準じた。

再生ケージ

再生ケージは実験1に準じた。糞を簡便に採取するため、顆粒状の床敷ではなく、紙ワイプ（エリエールプロワイプソフトマイクロワイパー、大王製紙）を敷いた。

刺激提示及びサンプリング手続き

実験の当日、11:00から14:00の間に膣液を採取し、McLeanらの手法 (McLean et al., 2012) に準じて雌の発情状態を確認した。18:00から19:00のあいだに、雌を再生ケージに導入し防音箱に移動した。金網越しに超音波スピーカーを2箇所設置した後、防音箱の扉を閉めた。持続的な再生による超音波スピーカーの劣化を防ぐため、1つのスピーカーにつき5分間ずつ、雄のUSVsまたはバックグラウンドノイズをループ再生し、計10分間提示した。その後、再生ケージ内で餌と水を自由摂取させ、24時間後に全ての糞を採取した。

糞中エストラジオール抽出

採取した糞をトレーに載せ、インキュベーターで2時間以上乾かして水分を蒸発させた。粉碎器（セラミックコーヒーマル、ポーレックス）で粉碎し、糞0.05gをキャップ付きのガラスチューブ（ねじ口試験官 N-16、マルエム）に入れ、1.5mlの超純水を加えて、10分間、攪拌機（ダイレクトミックス TS-100、サーマル化学産業）でよく混ぜた。さらに5mlのジエチルエーテル（Wako）を加えて、10分間、攪拌機でよく混ぜたのち、30分間静置した。冷却器（ECS-50, EYELA）で-80℃に冷却したメタノール（Kanto Chemical）槽へ移し、10分間浸漬後、ジエチルエーテル層のみを別の試験官へと移し、凍結した糞と水層を除去した。ジエチルエーテル層は60℃の恒温槽（MG-2200, EYELA）で蒸発凝固させた。これに500µlのEIA buffer（Estradiol EIA kit 582251, Cayman）を加えて、室温にて10分間攪拌し、定量に用いた。

糞中エストラジオール値測定

エストラジオール定量用キット（582251, Cayman）を用い、操作手順に従って測定し

た。測定は、マイクロプレートリーダー (680XR, Bio Rad) を用いて波長 405-420 nm の吸光度を設定し、標準エストラジオールの吸光度から得た検量線をもとにエストラジオール濃度 (ng/g) を算出した。

統計解析

発情状態ごとに、USVs と Noise のどちらを提示された場合に糞中のエストラジオール値が高くなるかを、Student's *t*-test により解析した。

2.2.2 実験 4 の結果

Student's *t*-test の結果、Noise または USVs 提示後のいずれの条件においても糞中エストラジオール値に差は認められなかった (**Figure 10B**)。また、各性周期条件の間にも、糞中エストラジオール値に差は認められなかった (**Figure 10A**)。

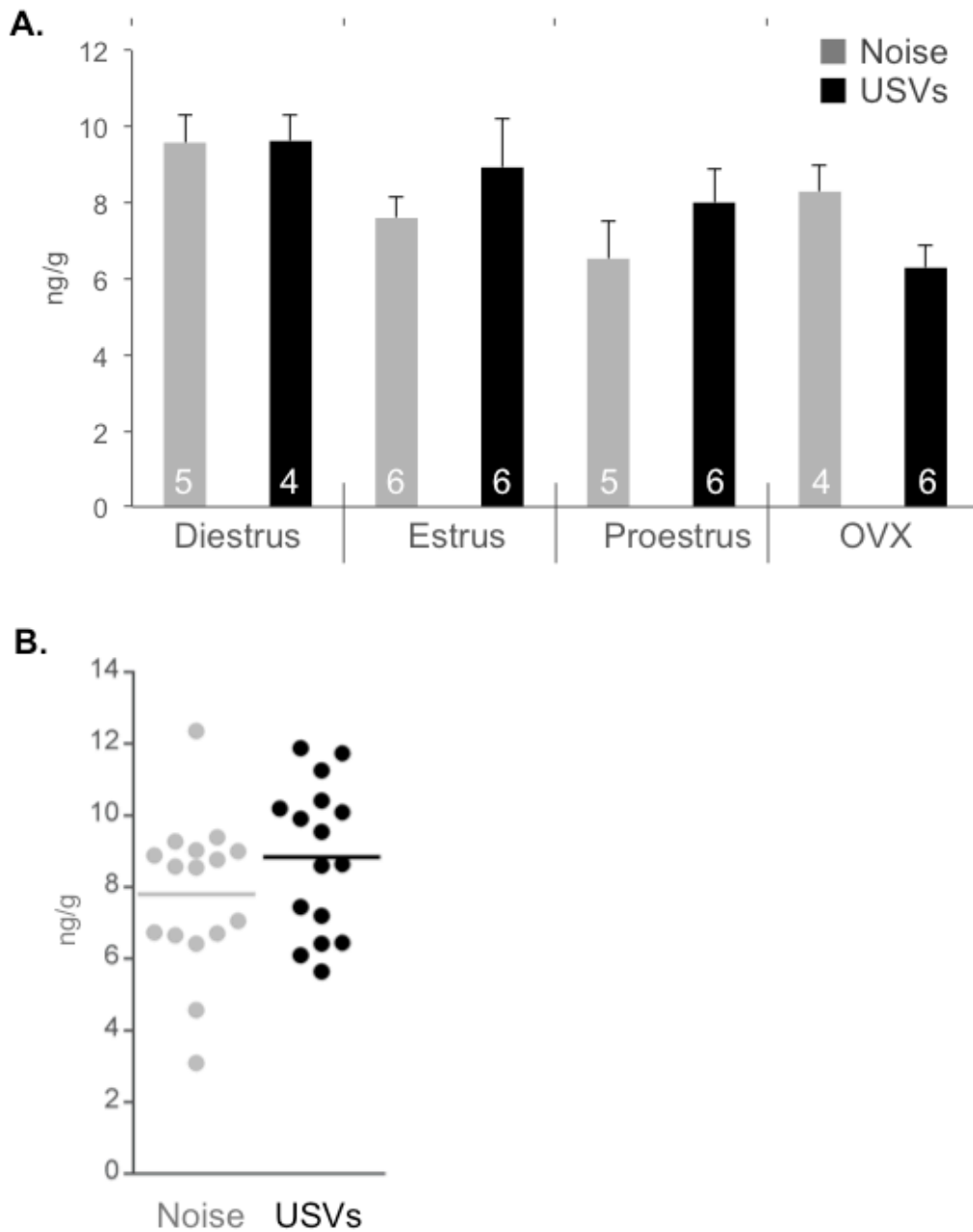


Figure 10

(A) 雌の性周期 (Diestrus, 非発情期; Estrus, 発情期; Proestrus, 発情前期) と処置 (OVX, 卵巣除去) ごとに分類した、Noise または USVs 提示後の糞中エストラジオール値。Mean \pm SEM, Student's *t*-test.

(B) 各性周期を統合した場合の、Noise または USVs 提示後の糞中エストラジオール値。個体ごとの値をドットで示した。各群の直線は平均値を示す。

2.3 実験 5 雄の USVs が雌の脳内エストラジオール濃度に及ぼす効果の調査

2.3.1 実験 5 の材料と方法

動物

飼育方法については、実験 1 に準じた。Noise を提示した非発情期の雌 8 匹、発情前期の雌 6 匹、USVs を提示した非発情期の雌 8 匹、発情前期の雌 8 匹を用意した。実験時の雌の週齢は、9~26 週齢であった。

USVs の再生

実験 1 に準じた。

再生ケージ

再生ケージは実験 1 に準じた。このケージに通常飼育で使用している床敷と巣材を敷き、雌を 1 匹ずつ導入した後、7 日以上飼育・維持してから再生実験を行った。

刺激提示及びサンプリング手続き

実験 1 に準じて実験の前日まで雌の発情状態を確認し、非発情期の雌を再生実験に用いた。実験当日、自由摂取させていた餌と水を除き、雌を再生ケージごと防音箱に移動した。金網越しに超音波スピーカーを 2 箇所設置した後、防音箱の扉を閉め、そこに馴化させた。8 時間後、雄の USVs またはバックグラウンドノイズを、ループ再生で 20 分間提示した。持続的な再生による超音波スピーカーの劣化を防ぐため、1 つのスピーカーにつき 5 分間ずつ、雄の USVs またはバックグラウンドノイズをループ再生し、計 20 分間提示した。10 分後、脳組織を採取するため、頸椎脱臼により安楽死させ、断首し、迅速に脳を摘出した。氷上で冷やした金属亜鉛製のブレインスライサー (RBM-2000C, ASI) 上で、切開用刃 (0560, バイオリサーチセンター) を用い、摘出した脳を厚さ 1mm の冠状切片にした。脳地図 “*The mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Paxinos George, 2008)” を参照し、直径 2 mm の芯抜き器 (18035-02, Fine Science Tools) を用いて、視床下部 (Hyp) と聴覚野 (Au) を切片からパンチアウトにて採取した。詳細な標的部位は **Figure 11A** に示した。採取した脳組織は、2 ml チューブ (AS ONE) に入れ、重量を測定した。

脳組織中エストラジオール抽出

抽出は、早稲田大学 教育・総合科学学術院の産賀崇由氏の手順に準じた (Ubuka et al., 2014)。2 ml チューブに入った重量測定済みのサンプルに、粉碎のためのビーズ、PBS 800 μ l、酢酸エチル 800 μ l を入れ、毎秒 30 回で 3 分間振動させて組織を粉碎した。遠心力 15,000 g、4°C で 10 分間遠心し、上層である酢酸エチル層のうち 700 μ l を新しい 2 ml チューブに移した。70°C の恒温槽で一晩かけて蒸発凝固させた。これに 160 μ l の EIA buffer を加えて、室温にて攪拌し、定量に用いた。

脳組織中エストラジオール値測定

実験 4 と同様に、エストラジオール定量用キットを用い、操作手順に従って測定した。

統計解析

Hyp と Au において、発情状態ごとに、USVs と Noise のどちらを提示された場合にエストラジオール値が高くなるかを、Student's *t*-test により解析した。

2.3.2 実験 5 の結果

Student's *t*-test の結果、Noise または USVs 提示後のいずれの条件においても、Hyp と Au のエストラジオール値に差は認められなかった (**Figure 11B**)。また、各性周期条件の間にも、エストラジオール値に差は認められなかった。

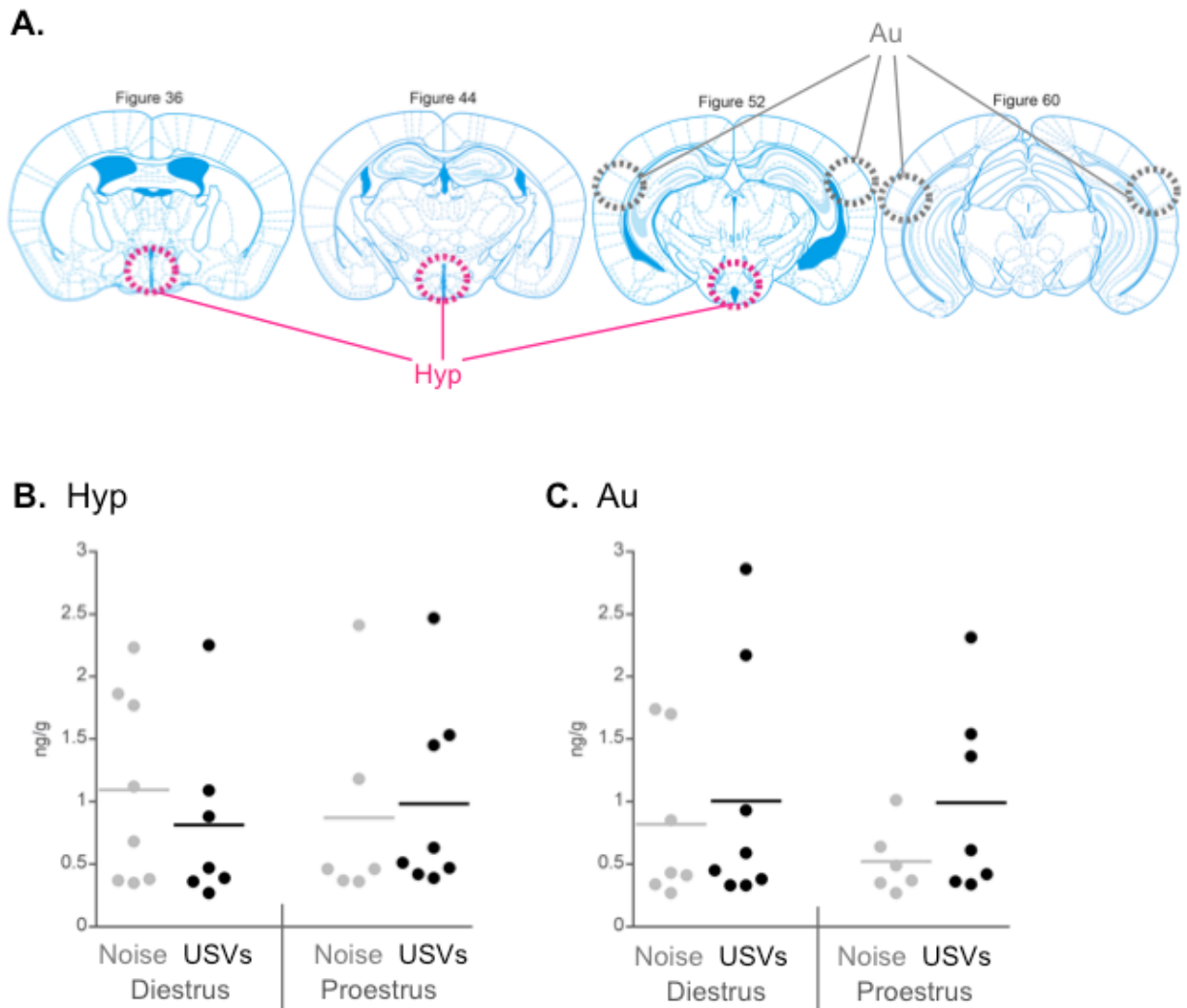


Figure 11
(A) 視床下部 (Hyp) と聴覚野 (Au) のサンプリング標的部位。
(B, C) Noise または USVs 提示後の雌の視床下部、聴覚野におけるエストラジオール値。個体ごとの値をドットで示した。各群の直線は平均値を示す。これらの領域には暴露した再生音の間で違いはなかった (Student's *t*-test)。

2.4 実験 6 雄の USVs が雌の生殖内分泌中枢に及ぼす効果の調査

2.4.1 実験 6 の材料と方法

動物

飼育方法については、実験 1 に準じた。実験 2 と同じ雌から得たサンプルを用いた。また、pCREB とキスペプチンの二重免疫組織学的手法が雌のキスペプチンニューロンの活性を調査するために妥当であるかを確認するために、非発情後期の状態を 3 週間以上維持し、性周期が停止している雌のサンプル（刺激提示なし）を用いた。

USVs の再生、再生ケージ、提示フェロモン物質、刺激提示手続き、行動解析
実験 2 に準じた。

二重免疫組織学的手法

灌流固定、脳の切片化、実験 2 に準じた。脳地図である“*The mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Paxinos George, 2008)”を参考に、30 ページ (Bregma 0.14 mm) における AVPV、45 ページ (Bregma -1.70 mm) における Arc を標的として切片を選択して免疫染色を行った。PBS を用い切片を洗浄し、切片内在性のペルオキシダーゼを失活させるために、0.5 % の過酸化水素を添加した 40 %メタノール PBS に切片を 5 分間浸漬した。PBST にて切片を 3 回、各 10 分ずつ洗浄した。ブロッキングのために、PBST で 5 % になるように希釈した正常ヤギ血清 (Normal Goat Serum, Vector) に切片を 1 時間浸漬した。その後、ウサギ由来の抗キスペプチン抗体 (AB9754, Millipore) をブロッキング液で 1:1000 になるように希釈し、この一次抗体液で切片を 4℃にて一晩反応させた。その後、PBST で 3 回、各 10 分ずつ洗浄した。二次抗体液である EnVision + System HRP Labeled Polymer Goat Anti-Rabbit IgG (K4003, Dako) の原液に浸漬し、4℃にて一晩反応させた。その後、PBST で 3 回、各 10 分ずつ洗浄した。DAB 溶液 (3,3'-diaminobenzidine, SIGMA) にてキスペプチン陽性細胞を可視化した。pCREB の抗体検出に用いる一次抗体もウサギ由来であるため、pH 2.2 に調整したグリシン緩衝液で 3 回、各 30 分ずつ洗浄し、抗体を除去した。再度、PBS で切片を洗浄し、0.5 % の過酸化水素を添加した 40 %メタノール PBS に切片を 5 分間浸漬した。ブロッキング液で切片を 1 時間浸漬し、その後、ウサギ由来の pCREB 抗体 (9198S, Cell Signaling Technology) をブロッキング液で 1:500 になるように希釈し、この一次抗体液で切片を 4℃にて二晩反応させた。その後、切片を PBST で 3 回、各 10 分ずつ洗浄し、二次抗体 Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG (BA-1000, Vector) をブロッキング液で 1:200 になるように希釈した二次抗体液に常温で 1 時間反応させた。Vectastain Elite ABC Standard Kit (PK-6100, Vector) をブロッキング液で 1:200 になるように希釈し、シグナルの増感を行った。その後、塩化ニッケル(II) 六水和物 (nacalai tesque) を加えた DAB 溶液にて pCREB 陽性細胞を青色で可視化した。染色した切片をスライドガラスに貼り付けた後、脱水作業を経て、封入剤 (Entellan new, Millipore) で封入した。

染色画像解析

顕微鏡で切片の写真を20倍率で撮影した (cellSens Standard, OLYMPUS)。撮影した画像は画層処理ソフトウェア (ImageJ, NIH) で読み込み、実験条件について盲検者が pCREB 陽性細胞 (青)、キスペプチン陽性細胞 (茶)、活性化キスペプチン陽性細胞 (黒) の数を手動で計測した。代表的な染色画像を **Figure 13A** と **Figure 14A** に示した。測定した領域の面積を計測し、1 mm²あたりの陽性細胞数を算出して統計に用いた。Arc については、背側部 (Arc D)、外側部 (Arc L) に分けて解析した (**Figure 14A**)。

統計解析

各領域における pCREB 陽性細胞数、キスペプチン陽性細胞数、活性化キスペプチン陽性細胞の割合を各刺激条件群で比較するために、前提示フェロモン物質 (ESP1 か Tris) と提示音 (USVs か Noise) を因子として、Two-way factorial analyses of variance (ANOVA) を用い主効果を検定した。その後、Tukey HSD にて後検定を行った。有意水準は全て 5% とした。また、各領域における活性化キスペプチン陽性細胞の割合と実験 2 で解析したスピーカーへの接近行動の相関性については、有意水準を 5% とし、Pearson の相関係数を用いて解析した。

2.4.2 実験 6 の結果

Two-way ANOVA の結果、ArcL の活性化キスペプチン陽性細胞の割合について、提示音に主効果が認められたが ($F_{[1,31]} = 8.28, p = 0.007$)、前提示フェロモン物質×提示音の種類の交互作用は認められなかった。各刺激条件群を Tukey HSD test で多重比較した結果、Tris + Noise 群に比べて ESP1 + USVs 群 ($p = 0.032$) と Tris + USVs 群 ($p = 0.037$) の活性化キスペプチン陽性細胞の割合が多い傾向にあった (**Figure 14C**)。AVPV (**Figure 13B**)、Arc D (**Figure 14B**) の pCREB 陽性細胞、キスペプチン陽性細胞、活性化キスペプチン陽性細胞の数においては、各刺激条件群の間で有意な差は見られなかった。

ArcL の活性化キスペプチン陽性細胞の割合とスピーカー探査行動の関係を見るために、相関分析を行った。その結果、2つの指標の間に正の相関が認められた (Pearson $r = 0.4855; p = 0.0031$, **Figure 15**)。Figure 15 より、ESP1 + USVs 群や Tris + USVs 群では2つの指標の値が比較的高いことがわかる。

性周期が停止している雌の AVPV と Arc における pCREB とキスペプチンの二重免疫染色した結果を **Figure 16** に示した。この個体の AVPV では、キスペプチン陽性細胞は観察されたが、pCREB 陽性細胞の発現がわずかで、pCREB 陽性細胞とキスペプチン陽性細胞が共染色された活性化キスペプチン陽性細胞が見られなかった (**Figure 16A**)。周辺の VMH や正中隆起においては pCREB 陽性細胞の発現が観察できたが、Arc においては pCREB 陽性細胞の発現が少ないことも観察された (**Figure 16B**)。

Hypothalamus

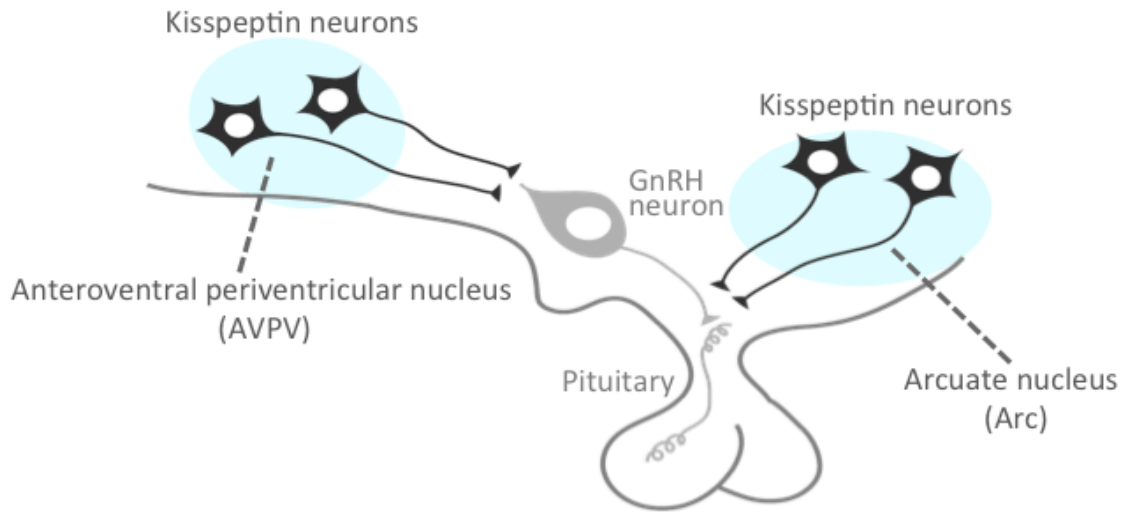
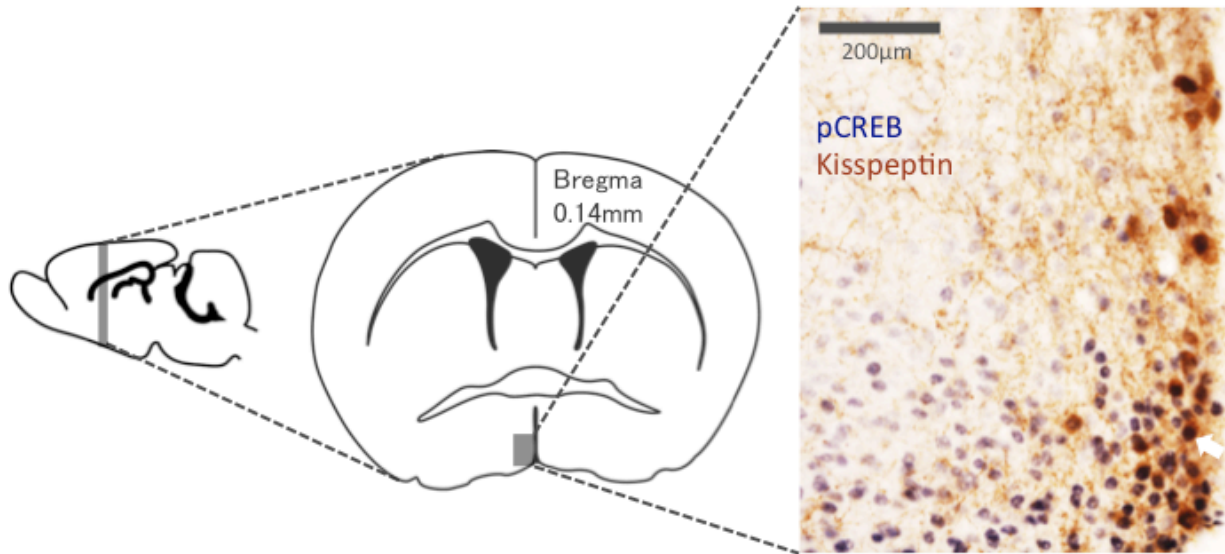


Figure 12

視床下部の AVPV, Arc におけるキスペプチンニューロンと GnRH ニューロンの模式図

A. AVPV



B.

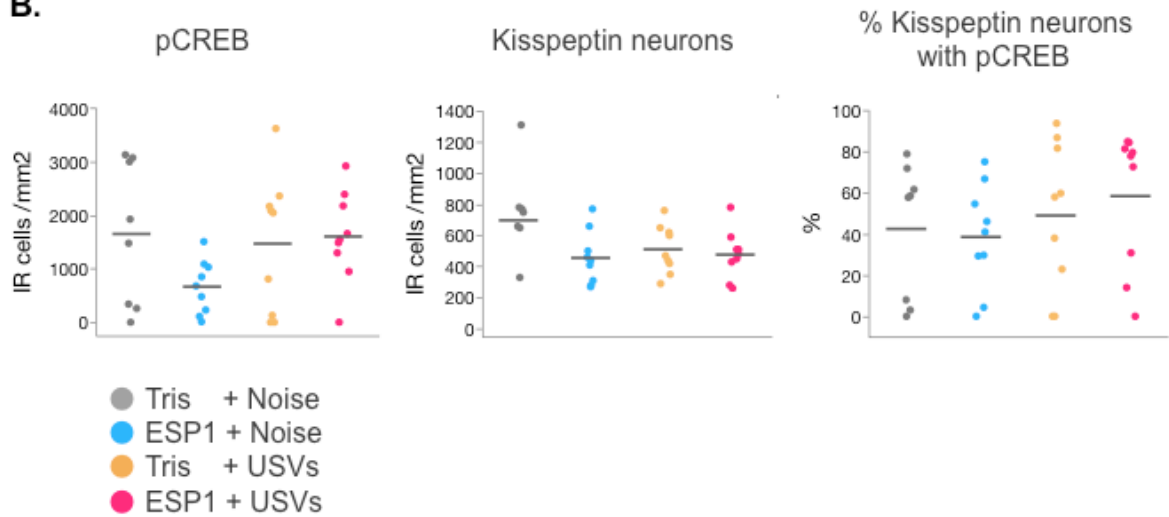


Figure 13

(A) ESP1 + USVs を提示した雌の AVPV における pCREB 陽性細胞 (青)、キスペプチン陽性細胞 (茶)、活性化キスペプチン陽性細胞 (黒)。代表的な活性化キスペプチン陽性細胞を白い矢印で示した。

(B) 各刺激提示群の AVPV における pCREB 陽性細胞数、キスペプチン陽性細胞数、活性化キスペプチン陽性細胞の割合。提示した刺激の間で違いはなかった。

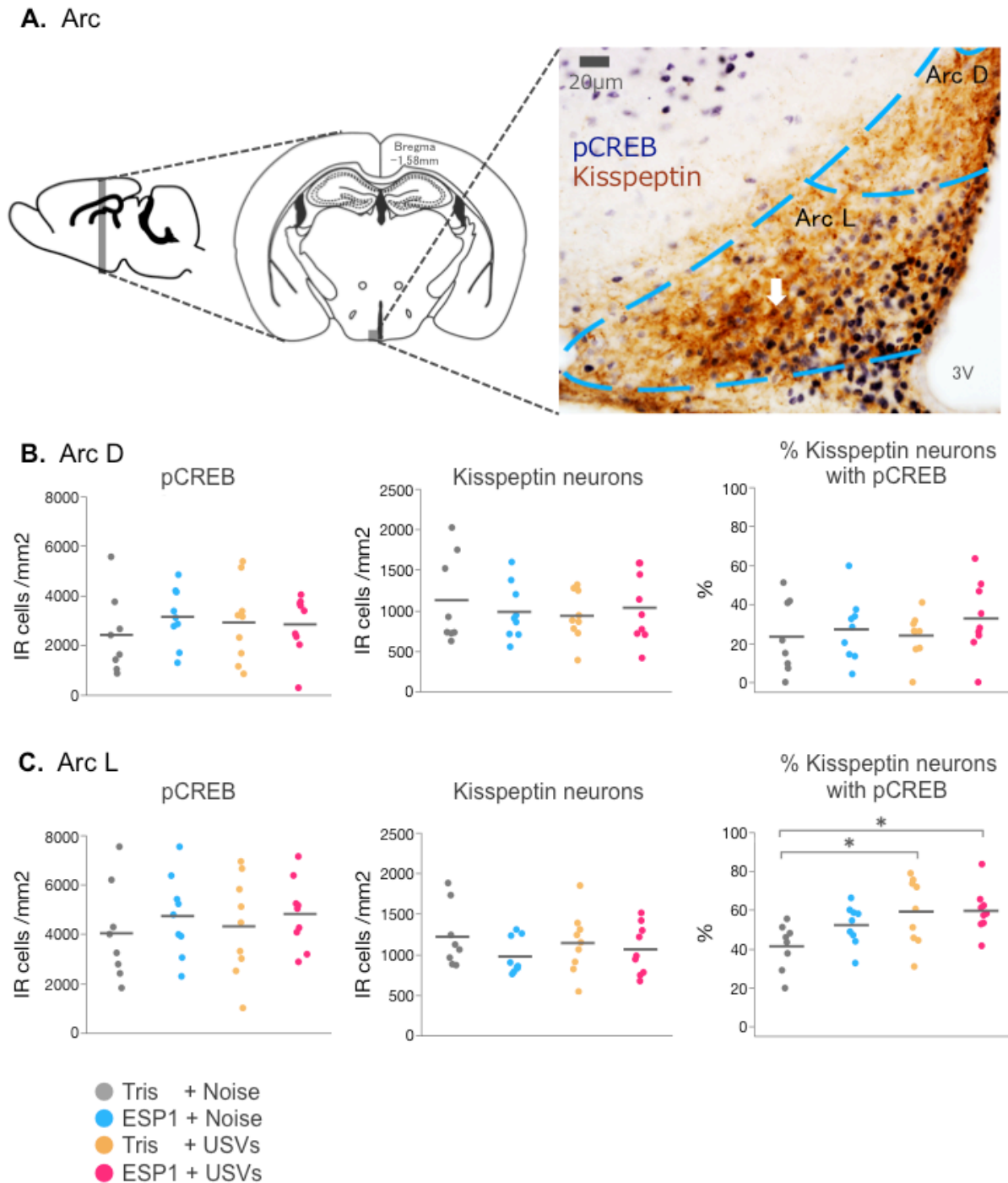


Figure 14

(A) ESP1 + USVs を提示した雌の Arc における pCREB 陽性細胞 (青)、キスペプチン陽性細胞 (茶)、活性化キスペプチン陽性細胞 (黒)。代表的な活性化キスペプチン陽性細胞を白い矢印で示した。

(B, C) 各刺激提示群の Arc D, L における pCREB 陽性細胞数、キスペプチン陽性細胞数、活性化キスペプチン陽性細胞の割合。ESP1 + USVs 群と Tris + USVs 群の ArcL における活性化キスペプチン陽性細胞の割合は、Tris + Noise 群に比べて有意に多かった。*, $p < 0.05$, Tukey HSD test.

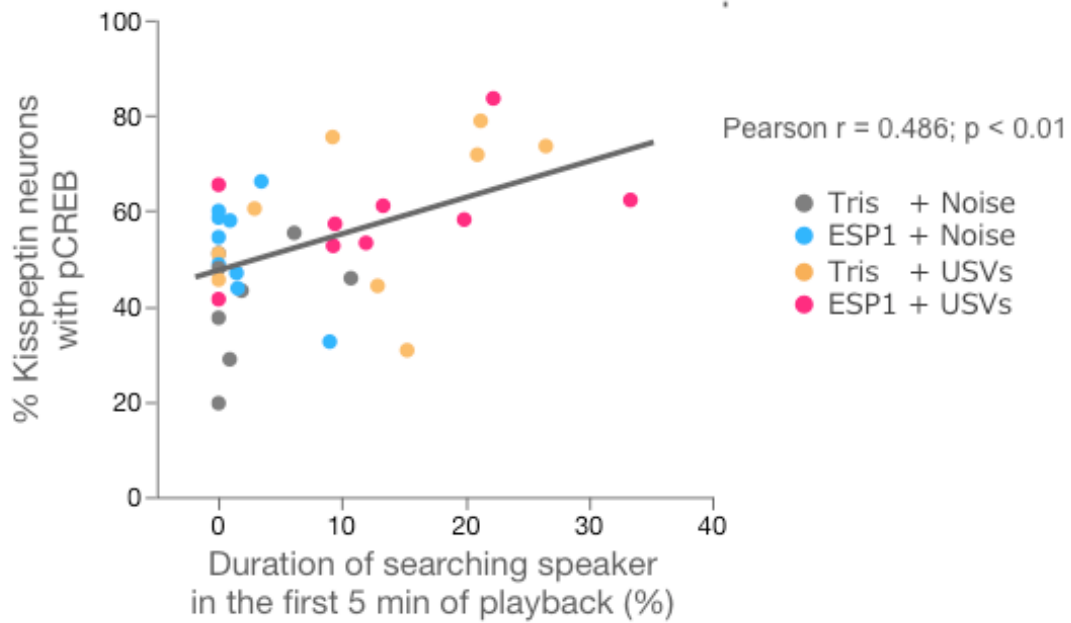


Figure 15

Arc L の活性化キスペプチン陽性細胞の割合と再生開始から 5 分間のスピーカー探査行動との相関。二つの指標の間に正の相関が認められた。

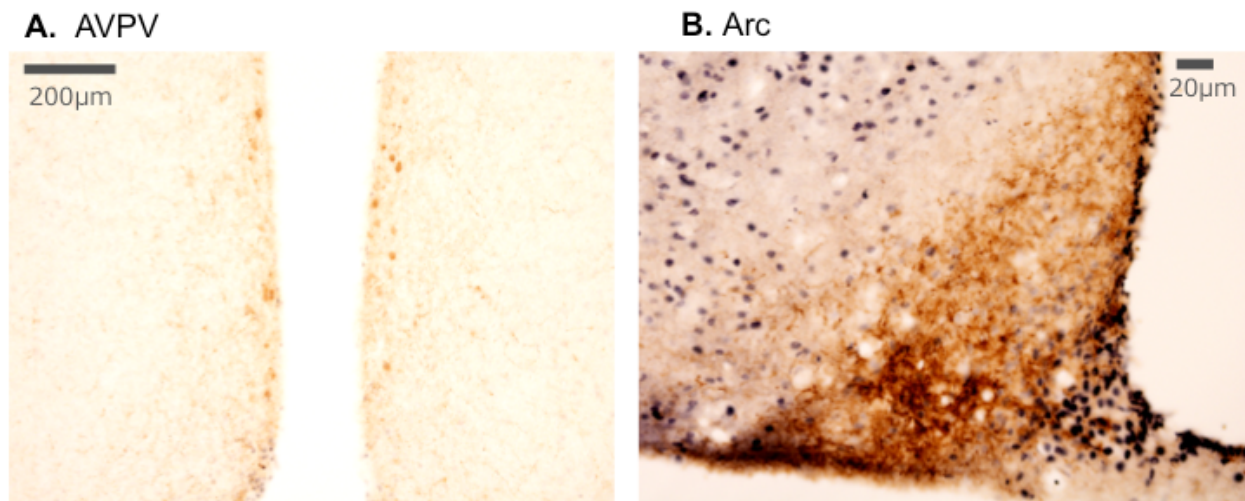


Figure 16

非発情期状態を維持している雌のキスペプチンニューロン
(A) AVPV, (B) Arc

2.5 考察

本章では、雄の USVs が雌の生殖内分泌に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、USVs 提示により、雌の末梢と中枢のエストラジオールの濃度や、キスペプチンニューロンの活性に変化が起こるか調査した。

2.5.1 雄 USVs が雌の糞中エストラジオール値に及ぼす効果

実験 4 では、非発情期の雌、発情期の雌、発情前期の雌、卵巣を除去した雌に Noise または USVs を提示し、その後、排泄した糞中のエストラジオール濃度を測定した。しかし、Noise 提示群と USVs 提示群の間で、糞中エストラジオール濃度に明瞭な差は見られなかった (**Figure 10B**)。音刺激提示後 24 時間の間に排泄された糞が USVs の効果を反映するのに適していなかったのかもしれない。実験 4 で用いた糞中ステロイドホルモン抽出手法とエストラジオール測定手法は、本研究室において雌のハダカデバネズミの妊娠状態や泌乳の有無を反映したものと同様であった (度会, 卒業論文, 2016)。しかし、実験 4 では雌マウスにおける性周期や卵巣除去操作の影響が糞中エストラジオール濃度に反映されていなかった (**Figure 10A**)。血液中に存在しているエストロゲンは、肝臓で分解され、胆汁に排出される。そのため、体内から腸へと排出され糞中に含まれるのは分解産物であるプレグナンジオールである。今後は、このような代謝物を測定対象にし、測定系を見直す必要があると考えられた。

2.5.2 雄の USVs が雌の視床下部と聴覚野のエストラジオール値に及ぼす効果

実験 5 では、非発情期の雌と発情前期の雌に、Noise または USVs を提示し、その後、Hyp と Au のエストラジオール濃度を測定した。鳥類では、雄の歌によって視床下部や聴覚野のエストラジオール値が上昇することが報告されている (Maney and Pinaud, 2011)。しかし、マウスを用いた本実験では、どちらの領域も、Noise 提示群と USVs 提示群の間で、エストラジオール濃度に明瞭な差は見られなかった。**Figure 11A** のサンプリング標的部位の模式図に示したように、Hyp と Au の範囲は矢状方向に広く、多くの神経核を含んでおりその役割は多岐にわたっている。標的部位を限局してエストラジオール濃度を測定することによって、より詳細で繊細な解析ができたかもしれない。第 1 章の研究では、雌に雄の USVs とフェロモンを共提示することによって、聴覚野や視床下部の一部により高い神経活性が起こることを見出している。マウスの場合、USVs のみの刺激ではなく、雄の聴覚シグナルと嗅覚シグナルの複合的な刺激を受けることが、主要となる部位の活性を効果的に高めるために必要であると考えられた。

2.5.3 雄の USVs が雌のキスペプチンニューロン活性化に及ぼす効果

実験 4 と実験 5 にて、糞中や脳組織中のエストラジオール値に明瞭な差が見られなかったことから、実験 6 では、雄の嗅覚シグナルとの共提示の影響を加味して、限局した神経核における神経細胞に着目して解析を試みた。GnRH のサージ分泌を制御し、排卵の誘発に参与する AVPV におけるキスペプチンニューロンと、GnRH のパルス分泌を制

御し、卵胞発育に関与する Arc におけるキスペプチンニューロンを標的として、その細胞の活性について pCREB を指標に観察した。pCREB とキスペプチンの二重免疫組織学的手法が雌のキスペプチンニューロンの活性を調査するために妥当であるかを確認するために、性周期が停止している雌のサンプルで AVPV と Arc におけるキスペプチンニューロンを観察したところ、どちらの領域においても pCREB 陽性細胞数が少なく、キスペプチン陽性細胞と共染色されている細胞数も少なかった。この個体の性周期が停止している原因は不明であるが、キスペプチンニューロンが pCREB と共発現しておらず、活性化していないことが確認できた。

Tris + Noise 群、ESP1 + Noise 群、Tris + USVs 群、ESP1+USVs 群の間で比較した結果、AVPV における活性化キスペプチン陽性細胞の割合については、提示した刺激による違いによる差は認められなかった (**Figure 13B**)。一方、Arc を背側部 (ArcD)、外側部 (ArcL) の 2 領域に分けて解析した結果、ArcL における活性化キスペプチン陽性細胞の割合が、提示した刺激によって異なることがわかった。pCREB 陽性細胞数とキスペプチン陽性細胞数に違いはなかったが、USVs を提示した Tris + USVs 群と ESP1 + USVs 群は、Tris + Noise 群に比べて、ArcL における活性化キスペプチン陽性細胞の割合が高かった (**Figure 14D**)。これらの結果から、雄の USVs は雌の卵胞発育に関与する Arc におけるキスペプチンニューロンに作用していることが示唆された。実験 6 では、全て非発情期の雌を用いた。このことから、雄の USVs は非発情期の雌の卵胞発育を促進することで、雌の繁殖効率を高めている可能性が示された。**Figure 15** で示したように、再生開始後の 5 分間におけるスピーカー探査行動の持続時間と、ArcL における活性化キスペプチン陽性細胞の割合の間に正の相関があった。特に、ESP1 と USVs を提示した雌や、Tris と USVs を提示した雌では比較的高い値が得られている。これらの結果から、雄の USVs に接近し暴露を受けるほど、Arc のキスペプチンニューロンの活性が高まり、卵胞発育がより促進される可能性が考えられた。雌の USVs に対する嗜好性を調べた先行研究では、非発情期により顕著に嗜好性が示されている (Asaba et al., 2014)。非発情期の雌が嗜好性を示す異系統の雄の USVs は、その雌の卵胞発育に、より寄与しているかもしれない。今後は、同系統の雄の USVs を提示した場合と比較することで、その可能性を検証する必要があるだろう。

総合考察

繁殖行動は全ての動物に共通してみられるが本能的な行動である。最終的な交尾行動は、雌雄が出会ったときに、唐突に始まるのではなく、匂いや鳴き声などの様々なシグナルを用いてコミュニケーションをとり互いを知り合う過程を経る。このときに、相手が配偶者として適しているかを選択することは、子孫を残す上で重要な意思決定である。動物が出会うと、嗅覚・聴覚・視覚などの複数の感覚器から異性のシグナルを受容するが、複合的なシグナルを統合して、行動の発現に至るまでの神経メカニズムの全容は未だ明らかにされていない。そして、性認知に利用された異性のシグナルがどのような神経メカニズムによって、生殖機能活性化を導くのかという点も未だに不明な点が多く残る研究領域である。本研究では、モデル動物としてマウスを用い、雄が雌に出会った際に発声する USVs に対する反応を、雄のフェロモンである ESP1 との共提示による効果を考慮しながら、行動・神経・内分泌的観点から調査した。

嗅覚と聴覚シグナルの感覚統合

第1章では、雌マウスは雄の USVs とフェロモンの両方を受容すると音源に対してより接近行動を示すことを明らかにした。また、聴覚と嗅覚の複合的なシグナルの受容により、AuD と Au1 の 2-4 層、mPFC、BLA、VMHdm が高い活性を示したことから、これらの領域が2つの異なる感覚器に由来する刺激の統合処理を行い、雄への接近行動に寄与していることが示唆された。特に mPFC における PrL は感覚統合や意思決定の制御中枢であり、活性化した神経細胞は興奮性ニューロンで他領域に投射し情報を伝達する可能性が示された。しかし、実験で用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法や免疫組織学的手法では、他神経細胞とのネットワークなどを解析することは不可能であった。また、USVs によって活性化した神経細胞と ESP1 によって活性化した神経細胞を区別することができなかったため、*c-fos* を発現して活性化したとされる神経細胞が、感覚統合に関わる神経細胞であるという確証は持っていない。これに対して、*in vivo* で神経細胞の活性をリアルタイムでイメージングできる研究が有用だろう (Boyd et al., 2015)。さらに、嗅覚と聴覚シグナルの統合神経細胞のみを人為的に抑制し、USVs への接近行動が消失すれば、同定した神経細胞の機能を実証することができるだろう。近年開発された、神経活性特異的に抑制性 G タンパク受容体を発現させて神経活性を抑制できる DREADDs (Designer Receptors Exclusively by Designer Drugs)-Gi^{c-fos} 遺伝子改変マウスや (Alexander et al., 2009; Rogan and Roth, 2011)、TRAP (Targeted Recombination in Active Population) 遺伝子改変マウス (Guenther et al., 2013) を用いた実験系が有用だと考えられる。今後、これらの新規手法を用いた実験を継続することで、複数の感覚器受容に由来する異性のシグナルを統合し、行動を発現するに至るメカニズムが解明できるだろう。

雄の USVs が雌の生殖内分泌中枢に及ぼす影響

先行研究により、雄マウスの USVs が雌の繁殖効率を上昇させている可能性が示されていた (浅場, 修士論文, 2013)。他の動物種でも、雄の鳴き声が雌のエストロゲン上昇や排卵を促すことが報告されていることから、マウスでも雌が雄の USVs を受容することで生殖内分泌中枢が活性化すると仮定をたてて、第 2 章の研究を行った。生殖内分泌を司っているキスペプチンニューロンの活性を調べた実験 6 より、雌マウスに雄の USVs を提示すると Arc のキスペプチンニューロンの活性が高まる傾向にあり、卵胞発育がより促進される可能性が考えられた。今後は、血中の LH の測定や、卵胞発育について詳細な解析を進め、USVs が非発情期の雌の卵胞発育に作用していることを実証していく必要がある。

雄の USVs は雌の接近行動を誘発する

しかし、実験 4, 5 では、末梢や中枢のエストラジオール値に USVs の効果が見られず、実験 6 で解析した ArcL におけるキスペプチンニューロンの活性が高まった程度であり、USVs の効果に確証が持っていない。このことから、USVs は雌の生殖内分泌中枢を活性化させるよりも、まず雌の接近行動を誘発させることに寄与していると考えた方が妥当である。実際、本研究室では、性行動における雄の USVs の役割を調べるために、無声化処置を施した雄を作出し、偽処置の雄と比較して、雌の性行動が変化するかを調べている (浅場, 修士論文, 2013)。その結果、偽処置雄提示群の雌は、無声化処置雄提示群の雌に比べて、雄への接近回数やその持続時間が有意に高くなることが明らかになった。この結果と、先行研究を踏まえて (Hammerschmidt et al., 2009; Asaba et al., 2015)、雄の USVs は雌の接近行動を誘発している可能性が考えられた。Chabout らは、雄に雌個体そのものを提示したときよりも、雌の尿を提示したときのほうが、USVs のパターンが複雑化し、音量も大きくなることを報告している (Chabout et al., 2015)。彼らも、雄の USVs は少し遠くにいる雌の接近行動を誘発する “Calling song” であることを提唱しており、実際、雌はこの複雑で音量が大きな雄の USVs に対してより接近することを明らかにしている。雄の USVs が雌の接近行動を誘引すると、自ずと雄が雌に交尾行動をする機会も増えてくる。それに伴い、ESPI など雌の性的覚醒を高めるようなフェロモンの暴露を受けやすくなるだろう。すると、雌は雄の交尾行動を受け入れやすくなり、円滑な性行動が可能になる。先行研究において、よく USVs を発声する雄とペアになった雌では (浅場, 修士論文, 2013)、雄の USVs によって誘発される円滑な性行動に由来して出産回数が増えたのかもしれない。

雄の USVs に対して接近するかしないかの決定に、第 1 章で検出された mPFC が関与している可能性が考えられた。本研究の全ての実験では、B6 雌にとって、異系統である BALB 系統の雄の USVs と雄のフェロモンの組み合わせで提示実験を行い、活性脳領域や接近行動を調査した。しかし、この組み合わせに、同系統である B6 系統の雄の USVs や、仔の USVs や匂いを組み合わせた場合と比較検証しなければ、嗜好性を示す雄のシグナルの組み合わせ特異的な神経活性と適応的な行動を見出したとは言い切れない。

様々な刺激の組み合わせに対する神経回路を解明することは、複雑なネットワークが絡み合い困難な研究ではあるが、動物は常に様々な刺激にさらされ、その中で価値判断、意思決定を自然とこなしている。雌の繁殖行動に関与していると考えられる雄のフェロモンと USVs の感覚統合細胞が同定でき、その受容と伝達のメカニズムが詳細に明らかになれば、より洗練された繁殖効率の上昇に貢献できるだろう。例えば、感覚統合細胞に特異的な治療薬などが開発できれば、繁殖が困難である動物に対して、最大限の繁殖効率を発揮できるようになるかもしれない。本研究で得られた知見が、動物の性行動制御中枢と感覚統合の関係性を探る重要な布石となるだけでなく、雌と雄のコミュニケーションに秘められた能力を解明し、恋愛のルーツを見出すことに少しでも貢献できることを期待したい。

参考論文

本論文の一部は以下に公表した。

Asaba A, Okabe S, Nagasawa M, Kato M, Koshida N, Osakada T, Mogi K & Kikusui T: Developmental social environment imprints female preference for male song in mice. *PLoS ONE*, **9** (2), e87186, 2014

Asaba A, Hattori T, Mogi K, & Kikusui T: Sexual attractiveness of male chemicals and vocalizations in mice. *Frontiers in Neuroscience*, **8** (231), 1–13, 2014

Asaba A, Kato M, Koshida N & Kikusui T: Determining Ultrasonic Vocalization Preferences in Mice Using a Two-Choice Playback Test. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (103), 1-8, e53074, 2015

参考文献

- Abrahám, I. M., Han, S.-K., Todman, M. G., Korach, K. S., and Herbison, A. E. (2003). Estrogen receptor beta mediates rapid estrogen actions on gonadotropin-releasing hormone neurons in vivo. *J. Neurosci.* 23, 5771–5777. doi:23/13/5771.
- Adhikari, A., Lerner, T. N., Finkelstein, J., Pak, S., Jennings, J. H., Davidson, T. J., et al. (2015). Basomedial amygdala mediates top-down control of anxiety and fear. *Nature* 527, 179–185. doi:10.1038/nature15698.
- Adolphs, R. (2009). The social brain: neural basis of social knowledge. *Annu. Rev. Psychol.* 60, 693–716. doi:10.1146/annurev.psych.60.110707.163514.
- Alexander, G. M., Rogan, S. C., Abbas, A. I., Armbruster, B. N., Pei, Y., Allen, J. A., et al. (2009). Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing evolved G protein-coupled receptors. *Neuron* 63, 27–39. doi:10.1016/j.neuron.2009.06.014.
- Asaba, A., Kato, M., Koshida, N., and Kikusui, T. (2015). Determining Ultrasonic Vocalization Preferences in Mice Using a Two-Choice Playback Test. *J. Vis. Exp.*, e53074. doi:10.3791/53074.
- Asaba, A., Okabe, S., Nagasawa, M., Kato, M., Koshida, N., Osakada, T., et al. (2014). Developmental social environment imprints female preference for male song in mice. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0087186.
- Bentley, G. E., Wingfield, J. C., Morton, M. L., and Ball, G. F. (2000). Stimulatory effects on the reproductive axis in female songbirds by conspecific and heterospecific male song. *Horm. Behav.* 37, 179–189. doi:10.1006/hbeh.2000.1573.
- Boyd, A. M., Kato, H. K., Komiyama, T., and Isaacson, J. S. (2015). Broadcasting of cortical activity to the olfactory bulb. *Cell Rep.* 10, 1032–9. doi:10.1016/j.celrep.2015.01.047.
- Brennan, P. a., and Zufall, F. (2006). Pheromonal communication in vertebrates. *Nature* 444, 308–315. doi:10.1038/nature05404.
- Bruce, H. M., and Parrott, D. M. (1960). Role of olfactory sense in pregnancy block by strange males. *Science* 131, 1526. doi:10.1126/science.131.3412.1526.
- Campeau, S., and Davis, M. (1995). Involvement of subcortical and cortical afferents to the lateral nucleus of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. *J. Neurosci.* 15, 2312–2327.
- Chabout, J., Sarkar, A., Dunson, D. B., and Jarvis, E. D. (2015). Male mice song syntax depends on social contexts and influences female preferences. *Front. Behav. Neurosci.* 9, 1–16. doi:10.3389/fnbeh.2015.00076.
- Chabout, J., Serreau, P., Ey, E., Bellier, L., Aubin, T., Bourgeron, T., et al. (2012). Adult male mice emit context-specific ultrasonic vocalizations that are modulated by prior isolation or group rearing environment. *PLoS One* 7, 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0029401.
- Charitidi, K. (2012). The Role of Estrogen Receptors in the Auditory System.
- Charitidi, K., and Canlon, B. (2010). Estrogen receptors in the central auditory system of male and female mice. *Neuroscience* 165, 923–33. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.11.020.
- Charitidi, K., Frisina, R. D., Vasilyeva, O. N., Zhu, X., and Canlon, B. (2010). Expression

- patterns of estrogen receptors in the central auditory system change in prepubertal and aged mice. *Neuroscience* 170, 1270–1281. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.08.010.
- Chelini, M. O. M., Souza, N. L., Rocha, a. M., Felipe, E. C. G., and Oliveira, C. a. (2005). Quantification of fecal estradiol and progesterone metabolites in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 38, 1711–1717. doi:/S0100-879X2005001100021.
- Cheng, M.-F. (1992). For whom does the female dove coo? A case for the role of vocal self-stimulation. *Anim. Behav.* 43, 1035–1044. doi:10.1016/S0003-3472(06)80016-3.
- Cohen, L., and Mizrahi, A. (2015). Plasticity during Motherhood: Changes in Excitatory and Inhibitory Layer 2/3 Neurons in Auditory Cortex. *J. Neurosci.* 35, 1806–1815. doi:10.1523/JNEUROSCI.1786-14.2015.
- Cohen, L., Rothschild, G., and Mizrahi, A. (2011). Multisensory integration of natural odors and sounds in the auditory cortex. *Neuron* 72, 357–369. doi:10.1016/j.neuron.2011.08.019.
- Damasio, a R. (1996). The somatic marker hypothesis and the possible functions of the prefrontal cortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 351, 1413–1420. doi:10.1098/rstb.1996.0125.
- Delgadillo, J. A., Vielma, J., Hernandez, H., Flores, J. A., Duarte, G., Fernández, I. G., et al. (2012). Male goat vocalizations stimulate the estrous behavior and LH secretion in anestrus goats that have been previously exposed to bucks. *Horm. Behav.* 62, 525–530. doi:10.1016/j.yhbeh.2012.08.014.
- Dizinno, G., and Whitney, G. (1977). Androgen influence on male mouse ultrasounds during courtship. *Horm. Behav.* 8, 188–192. doi:10.1016/0018-506X(77)90035-6.
- Ehret, G. (2005). Infant rodent ultrasounds - A gate to the understanding of sound communication. *Behav. Genet.* 35, 19–29. doi:10.1007/s10519-004-0853-8.
- Farrell, W. J., and Alberts, J. R. (2002). Maternal responsiveness to infant Norway rat (*Rattus norvegicus*) ultrasonic vocalizations during the maternal behavior cycle and after steroid and experiential induction regimens. *J. Comp. Psychol.* 116, 286–96. doi:10.1037//0735-7036.116.3.286.
- Gill, T. M., Sarter, M., and Givens, B. (2000). Sustained Visual Attention Performance-Associated Prefrontal Neuronal Activity: Evidence for Cholinergic Modulation. *J. Neurosci.* 20, 4745–4757. doi:20/12/4745.
- Grattan, D. R., Jasoni, C. L., Liu, X., Anderson, G. M., and Herbison, A. E. (2007). Prolactin regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons to suppress luteinizing hormone secretion in mice. *Endocrinology* 148, 4344–4351. doi:10.1210/en.2007-0403.
- Grimsley, J. M. S., Monaghan, J. J. M., and Wenstrup, J. J. (2011). Development of social vocalizations in mice. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0017460.
- Guenther, C., Miyamichi, K., Yang, H. H., Heller, H. C., and Luo, L. (2013). Permanent genetic access to transiently active neurons via TRAP: Targeted recombination in active populations. *Neuron* 78, 773–784. doi:10.1016/j.neuron.2013.03.025.
- Haga, S., Hattori, T., Sato, T., Sato, K., Matsuda, S., Kobayakawa, R., et al. (2010). The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behaviour through a specific vomeronasal receptor. *Nature* 466, 118–122. doi:10.1038/nature09142.

- Hammerschmidt, K., Radyushkin, K., Ehrenreich, H., and Fischer, J. (2009). Female mice respond to male ultrasonic “songs” with approach behaviour. *Biol. Lett.* 5, 589–592. doi:10.1098/rsbl.2009.0317.
- Hoffmann, F., Musolf, K., and Penn, D. J. (2012). Spectrographic analyses reveal signals of individuality and kinship in the ultrasonic courtship vocalizations of wild house mice. *Physiol. Behav.* 105, 766–771. doi:10.1016/j.physbeh.2011.10.011.
- Holy, T. E., and Guo, Z. (2005). Ultrasonic Songs of Male Mice. *PLoS Biol.* 3, e386. doi:10.1371/journal.pbio.0030386.
- Imon, S., Adachi, I., Kusuda, S., Taniguchi, A., Karasawa, M., Kondo, N., et al. (2014). Change in oestradiol-17 β content and behaviors in female cheetahs *Acinonyx jubatus* in response to changes in captivity conditions. *哺乳類科学* 54, 257–264. doi:10.11238/mammalianscience.54.257.
- James, P. J., Nyby, J. G., and Saviolakis, G. A. (2006). Sexually stimulated testosterone release in male mice (*Mus musculus*): roles of genotype and sexual arousal. *Horm. Behav.* 50, 424–31. doi:10.1016/j.yhbeh.2006.05.004.
- Jouhaneau, J., and Bagady, a (1984). Effect of early auditory stimulation on the choice of acoustical environment by adult Swiss albino mice (*Mus musculus*). *J. Comp. Psychol.* 98, 318–326. doi:10.1037/0735-7036.98.3.318.
- Kaczmarek, L., and Chaudhuri, A. (1997). Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 23, 237–256.
- Kaneko, T., and Mizuno, N. (1994). Glutamate-synthesizing enzymes in gabaergic neurons of the neocortex: A double immunofluorescence study in the rat. *Neuroscience* 61, 839–849. doi:10.1016/0306-4522(94)90407-3.
- Kavaliers, M. (1995). Odours of parasitized males induce aversive responses in female mice. *Anim. Behav.* 50, 1161–1169. doi:10.1016/0003-3472(95)80032-8.
- Kevetter, G. a, and Winans, S. S. (1981). Connections of the corticomедial amygdala in the golden hamster. II. Efferents of the “olfactory amygdala”. *J. Comp. Neurol.* 197, 99–111. doi:10.1002/cne.901970108.
- Kihara, T., Harada, T., and Koshida, N. (2006). Wafer-compatible fabrication and characteristics of nanocrystalline silicon thermally induced ultrasound emitters. *Sensors Actuators, A Phys.* 125, 422–428. doi:10.1016/j.sna.2005.07.021.
- Kikusui, T., Nakanishi, K., Nakagawa, R., Nagasawa, M., Mogi, K., and Okanoya, K. (2011). Cross fostering experiments suggest that mice songs are innate. *PLoS One* 6, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0017721.
- Krienen, F. M., Tu, P.-C., and Buckner, R. L. (2010). Clan mentality: evidence that the medial prefrontal cortex responds to close others. *J. Neurosci.* 30, 13906–13915. doi:10.1523/JNEUROSCI.2180-10.2010.
- Kvitsiani, D., Ranade, S., Hangya, B., Taniguchi, H., Huang, J. Z., and Kepecs, a (2013). Distinct behavioural and network correlates of two interneuron types in prefrontal cortex. *Nature* 498, 363–6. doi:10.1038/nature12176.

- Levitin, D. J., and Tirovolas, A. K. (2009). Current Advances in the Cognitive Neuroscience of Music. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1156, 211–231. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04417.x.
- Lynch, K. S., Crews, D., Ryan, M. J., and Wilczynski, W. (2006). Hormonal state influences aspects of female mate choice in the tungara frog (*Physalaemus pustulosus*). *Horm. Behav.* 49, 450–457. doi:10.1016/j.yhbeh.2005.10.001.
- Maney, D., and Pinaud, R. (2011). Estradiol-dependent modulation of auditory processing and selectivity in songbirds. *Front. Neuroendocrinol.* 32, 287–302. doi:10.1016/j.yfrne.2010.12.002.
- Marek, R., Strobel, C., Bredy, T. W., and Sah, P. (2013). The amygdala and medial prefrontal cortex: partners in the fear circuit. *J. Physiol.* 591, 2381–91. doi:10.1113/jphysiol.2012.248575.
- Maren, S. (1999). Long-term potentiation in the amygdala: A mechanism for emotional learning and memory. *Trends Neurosci.* 22, 561–567. doi:10.1016/S0166-2236(99)01465-4.
- Matsuo, T., Hattori, T., Asaba, A., Inoue, N., Kanomata, N., Kikusui, T., et al. (2015). Genetic dissection of pheromone processing reveals main olfactory system-mediated social behaviors in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E311–E320. doi:10.1073/pnas.1416723112.
- McComb, K. (1987). Roaring by red deer stags advances the date of oestrus in hinds. *Nature* 330, 648–649. doi:10.1038/330648a0.
- McDonald, A. J., Mascagni, F., and Guo, L. (1996). Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: A Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience* 71, 55–75. doi:10.1016/0306-4522(95)00417-3.
- McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S., and Bennett, S. a. L. (2012). Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. *J. Vis. Exp.*, 4–9. doi:10.3791/4389.
- Muir, C., Spironello-Vella, E., Pisani, N., and deCatanzaro, D. (2001). Enzyme immunoassay of 17 beta-estradiol, estrone conjugates, and testosterone in urinary and fecal samples from male and female mice. *Horm. Metab. Res.* 33, 653–658. doi:10.1055/s-2001-18692.
- Musolf, K., Hoffmann, F., and Penn, D. J. (2010). Ultrasonic courtship vocalizations in wild house mice, *Mus musculus musculus*. *Anim. Behav.* 79, 757–764. doi:10.1016/j.anbehav.2009.12.034.
- Nunez, A. A., Nyby, J., and Whitney, G. (1978). The effects of testosterone, estradiol, and dihydrotestosterone on male mouse (*Mus musculus*) ultrasonic vocalizations. *Horm. Behav.* 11, 264–272. doi:10.1016/0018-506X(78)90030-2.
- Nyby, J., Wysocki, C. J., Whitney, G., and Dizinno, G. (1977). Pheromonal regulation of male mouse ultrasonic courtship (*Mus musculus*). *Anim. Behav.* 25, 333–341. doi:10.1016/0003-3472(77)90009-4.
- Ohkura, S., Uenoyama, Y., Tomikawa, J., and Inoue, N. (2011). Kisspeptin / metastin a novel neuropeptide controlling reproduction. *日本産業動物獣医学会誌* 64, 39–44.
- Okabe, S., Nagasawa, M., Kihara, T., Kato, M., Harada, T., Koshida, N., et al. (2013). Pup Odor and Ultrasonic Vocalizations Synergistically Stimulate Maternal Attention in Mice. *Behav. Neurosci.* 127, 432–438. doi:10.1037/a0032395.

- Okamura, H., Tsukamura, H., Ohkura, S., Uenoyama, Y., Wakabayashi, Y., and Maeda, K. (2013). Kisspeptin and GnRH Pulse Generation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 784, 297–323. doi:10.1007/978-1-4614-6199-9.
- Ongür, D., and Price, J. L. (2000). The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cereb. Cortex* 10, 206–219. doi:10.1093/cercor/10.3.206.
- Onuma, M., Suzuki, M., Uchida, E., Niiyama, M., and Ohtaishi, N. (2002). Annual changes in fecal estradiol-17beta concentrations of the sun bear (*Helarctos malayanus*) in Sarawak, Malaysia. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 309–313. doi:10.1292/jvms.64.309.
- Panksepp, J. B., Jochman, K. a., Kim, J. U., Koy, J. K., Wilson, E. D., Chen, Q., et al. (2007). Affiliative behavior, ultrasonic communication and social reward are influenced by genetic variation in adolescent mice. *PLoS One* 2. doi:10.1371/journal.pone.0000351.
- Pasch, B., George, A. S., Campbell, P., and Phelps, S. M. (2011). Androgen-dependent male vocal performance influences female preference in Neotropical singing mice. *Anim. Behav.* 82, 177–183. doi:10.1016/j.anbehav.2011.04.018.
- Pascual, M. M., Pastor, V., and Bernabeu, R. O. (2009). Nicotine-conditioned place preference induced CREB phosphorylation and Fos expression in the adult rat brain. *Psychopharmacology (Berl)*. 207, 57–71. doi:10.1007/s00213-009-1630-4.
- Paxinos George, F. K. (2008). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact | 978-0-12-374244-5 | Elsevier*. Available at: <https://www.elsevier.com/books/the-mouse-brain-in-stereotaxic-coordinates-compact/paxinos/978-0-12-374244-5>.
- Penn, D., and Potts, W. K. (1998). Chemical signals and parasite-mediated sexual selection. *Trends Ecol. Evol.* 13, 391–396. doi:10.1016/S0169-5347(98)01473-6.
- Pomerantz, S. M., Nunez, A. A., and Bean, N. J. (1983). Female behavior is affected by male ultrasonic vocalizations in house mice. *Physiol. Behav.* 31, 91–96. doi:10.1016/0031-9384(83)90101-4.
- Remage-Healey, L., Dong, S. M., Chao, A., and Schlinger, B. A. (2012). Sex-specific, rapid neuroestrogen fluctuations and neurophysiological actions in the songbird auditory forebrain. *J. Neurophysiol.* 107, 1621–1631. doi:10.1152/jn.00749.2011.
- Remage-Healey, L., Maidment, N. T., and Schlinger, B. A. (2008). Forebrain steroid levels fluctuate rapidly during social interactions. *Nat. Neurosci.* 11, 1327–1334. doi:10.1038/nn.2200.
- Rogan, S. C., and Roth, B. L. (2011). Remote control of neuronal signaling. *Pharmacol. Rev.* 63, 291–315. doi:10.1124/pr.110.003020.
- Roney, J. R., and Simmons, Z. L. (2008). Women’s estradiol predicts preference for facial cues of men's testosterone. *Horm. Behav.* 53, 14–19. doi:10.1016/j.yhbeh.2007.09.008.
- Sárvári, M., Szego, É. M., Barabás, K., Jávora, a., Tóth, S., Kovács, Z., et al. (2009). Genistein induces phosphorylation of cAMP response element-binding protein in neonatal hypothalamus in vivo. *J. Neuroendocrinol.* 21, 1024–1028. doi:10.1111/j.1365-2826.2009.01925.x.
- Shelton, M. (1980). Goats Influence of Various Exteroceptive Factors on Initiation of Estrus and

- Ovulation. *Int. Goat Sheep Res.* 1, 156–162. Available at: CABI:19810160543.
- Shinoda, H., Nakajima, T., Ueno, K., and Koshida, N. (1999). letters to nature Thermally induced ultrasonic emission from porous silicon. 400, 853–855. doi:10.1038/23664.
- Sisneros, J. a, Forlano, P. M., Deitcher, D. L., and Bass, A. H. (2004). Steroid-dependent auditory plasticity leads to adaptive coupling of sender and receiver. *Science* 305, 404–407. doi:10.1126/science.1097218.
- Stenberg, A. E., Wang, H., Sahlin, L., and Hultcrantz, M. (1999). Mapping of estrogen receptors α and β in the inner ear of mouse and rat. *Hear. Res.* 136, 29–34. doi:10.1016/S0378-5955(99)00098-2.
- Sugimoto, H., Okabe, S., Kato, M., Koshida, N., Shiroishi, T., Mogi, K., et al. (2011b). A role for strain differences in waveforms of ultrasonic vocalizations during Male-Female interaction. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0022093.
- Thompson, S. K., Frisina, R. D., and Zhu, X. (2006). Estrogen blockade reduces auditory feedback in CBA mice. *Otolaryngol. Head. Neck Surg.* 135, 100–5. doi:10.1016/j.otohns.2006.02.004.
- Tremere, L. a, Jeong, J. K., and Pinaud, R. (2009). Estradiol shapes auditory processing in the adult brain by regulating inhibitory transmission and plasticity-associated gene expression. *J. Neurosci.* 29, 5949–5963. doi:10.1523/JNEUROSCI.0774-09.2009.
- Ubuka, T., Haraguchi, S., Tobari, Y., Narihiro, M., Ishikawa, K., Hayashi, T., et al. (2014). Hypothalamic inhibition of socio-sexual behaviour by increasing neuroestrogen synthesis. *Nat. Commun.* 5, 3061. doi:10.1038/ncomms4061.
- Vandenbergh, J. G. (1969). Male odor accelerates female sexual maturation in mice. *Endocrinology* 84, 658–660. doi:10.1210/endo-84-3-658.
- Wang, F., Zhu, J., Zhu, H., Zhang, Q., Lin, Z., and Hu, H. (2011). Bidirectional Control of Social Hierarchy by Synaptic Efficacy in Medial Prefrontal Cortex. *Science.* 334, 693–697. doi:10.1126/science.1209951.
- West, P. M., and Packer, C. (2002). Sexual selection, temperature, and the lion’s mane. *Science* 297, 1339–1343. doi:10.1126/science.1073257.
- Whitten, W. K. (1956). Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. *J. Endocrinol.* 13, 399–404. doi:10.1677/joe.0.0170307.
- Xiao, K., Kondo, Y., and Sakuma, Y. (2004). Sex-specific effects of gonadal steroids on conspecific odor preference in the rat. *Horm. Behav.* 46, 356–361. doi:10.1016/j.yhbeh.2004.05.008.
- Yang, E. J., Lin, E. W., and Hensch, T. K. (2012). Critical period for acoustic preference in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 17213–17220. doi:10.1073/pnas.1200705109.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの方々からご指導とご協力を賜りました。

菊水健史先生と茂木一孝先生には、研究全般にわたり適切な指導とあたたかい励ましをいただきました。菅野康太先生には、実験の手技技法や研究の進行等、細部にわたりご助言ご指導をいただきました。先生がたのもとで研究に携われたことを誇りに思うとともに、心より御礼申し上げます。

比較毒性学研究室の代田真理子先生、動物繁殖学研究室の伊藤潤哉先生には学位審査の副査をお引き受けいただきました。本論文の執筆や研究成果発表のみならず、博士後期課程進学前の大きな課題であった日本学術振興会特別研究員の模擬面接等において、数々のご助言をいただきましたことを、この場をお借りして深く感謝致します。

加藤建築環境研究所の加藤雅裕代表には、超音波再生に関する機器の製作と幾度と重なる修理をしていただき、実験の立ち上げにお力添えいただくとともに有益なご助言をたくさんいただきました。大阪バイオサイエンス研究所(研究当時)の小早川令子先生、小早川高先生、松尾朋彦先生には、本研究に必要不可欠であった *in situ* ハイブリダイゼーションによる脳活動の解析にあたって、多大なデータをご提供いただきました。また、東京大学大学院・生物化学研究室の東原和成先生と小坂田拓哉氏には、本研究の重要な鍵となる ESP1 を送付していただき、フェロモン受容機構に関して多くの適切なアドバイスをいただきました。脳組織中のエストラジオール濃度測定には、早稲田大学、教育・総合科学学術院の筒井和義先生と産賀崇由先生に多大な協力とアドバイスをいただきました。皆様に心より御礼申し上げます。

日々励まし合い、共に研究に励んできた伴侶動物学研究室の皆様には、動物の世話など多方面でご協力と支援賜りました。また、研究活動で疲れた心を癒してくださった、犬達にも感謝しています。これからの皆様のご活躍を心よりお祈り申し上げます。

皆様と共に、本研究室で活動でき、研究を心から楽しむことができことを幸せに思います。そして、本研究の実施にあたり、貴い命を持って協力をいただいた多くの動物たちに深く感謝するとともに、あらためてご冥福をお祈り申し上げます。

最後に、研究を見守ってくださった家族に心から感謝致します。

2016年2月 浅場 明莉