

氏名(本籍)	浅場明莉(神奈川県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	甲第65号
学位授与年月日	平成28年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 茂木一孝 (副査) 菊水健史 代田真理子 伊藤潤哉

論文内容の要旨

【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、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ロジオール値を反映している糞中のエストロジオール値が雄の USVs によって上昇するかを調べた。齧歯類の糞中のエストロジオール値は、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ロ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、糞中エストロ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ロ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ロ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、エストロ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(ArcD)と外側部(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は、提示した刺激によって差があった。ArcL 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。

論文審査の結果の要旨

動物の雌雄間における繁殖活動は、まず様々な感覚を利用したコミュニケーションにより適切な交配相手を選択することから始まる。そのコミュニケーションのシグナルは配偶者選択の情報となるだけでなく、たとえばいくつかの動物種においては雄の音声は雌の排卵を促進するといった効果をもつことも示唆されている。近年、マウスにおいても雄が雌と出会った際に鳥類のさえずりと同様な歌構造を有する超音波領域の音声 (Ultrasonic vocalizations; USVs) を発することが発見されたが、これまで雄マウスが発する USVs は系統によって周波数やパターンが異なり、それらは遺伝的支配を受けていることが明らかとなっている。著者は博士前期過程においてこの雄マウスが発する USVs の生物学的役割を調べ、雌マウスは自身とは異なる系統の雄が発する USVs へ嗜好性を示すことを明らかにし、雄マウスの USVs が子孫の遺伝的多様性をもたらす配偶者選択に利用されていることを提唱してきた。また、雄の USVs への雌マウスの嗜好性は雄のフェロモンが存在している際に顕著に現れることから、この USVs を利用した配偶者選択には感覚統合が関与することも示してきた。さらに、USVs を多く発声する雄とペアになった雌マウスは出産回数が増えることも明らかにしており、雄の USVs には雌マウスの繁殖機能を活性化作用がある可能性も見出してきた。そこで本研究では、雄マウスが発する USVs が雌マウスの繁殖機能を促進させるメカニズムの解明を目指し、以下の第1章と第2章の研究において、USVs とフェロモンの感覚統合および繁殖促進メカニズムを調べた。

第1章では配偶者選択のための感覚統合メカニズムを明らかにすることを目的として、USVs とフェロモン情報を統合する神経核の同定を目指した。実験1では、C57BL/6J (B6)系統の雌マウスの神経活動を調査するために、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 と、雄フェロモンである Exocrine gland-secreting peptide 1 (ESP1)を共提示し、活性化した神経細胞の脳内局在を *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。結果として、バックグラウンドノイズ (Noise) と ESP1 を共提示された群と比較し、USVs と ESP1 を共提示した群では内側前頭前皮質 (mPFC) において *c-fos* 陽性反応の顕著な上昇がみられた。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)、扁桃体外側基底核 (BLA)などにおいても同様な反応上昇がみられたが、逆に扁桃体内側基底核 (BMA)では反応低下がみられた。これら *c-fos* 陽性反応に有意な差があった領域について相関解析をしたところ、投射関係のある多くの領域間では *c-fos* 陽性反応に正の相関がみられたが、mPFCの反応が高まるほど BMAの反応が弱まるといった負の相関がみられたものもあった。

実験2および実験3では、複数の感覚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 の共提示により神経活性化が検出された mPFC のなかでも前辺縁皮質 (PrL) と下辺縁皮質 (IL) に着目し、それらの神経活性と雌マウスの行動との関連、また関与する神経細胞の特性を調査し

た。実験 2 では USVs を再生するスピーカーへの雌マウスの行動を録画した後、免疫組織化学法により c-fos 陽性細胞数を解析した。USVs と ESP1 を共提示した群では、対照群である Noise と ESP1 を共提示した群や Noise と溶媒を共提示した群に比べて、PrL の c-fos 陽性細胞数の発現が有意に多く観察された。また、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法を用い、USVs と ESP1 の共提示により PrL で活性化した神経細胞の特性を調べた。その結果、c-fos 陽性細胞の 98% は興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の陽性細胞と重なっていたが、抑制性神経伝達物質である GABA (γ -aminobutyric acid: ガンマ-アミノ酪酸) の陽性細胞とはほとんど重なっていなかった。これらのことから、USVs と ESP1 の複合的な刺激により PrL で活性化した神経細胞はその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 章では USVs による繁殖促進メカニズムを明らかにすることを目的として、USVs が雌の生殖内分泌へ及ぼす効果を調べた。実験 4 および実験 5 では、雌性ホルモンであるエストロゲンへの影響に着目し、まず実験 4 では雌マウスの糞中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。非発情期、発情期、発情前期、また卵巣を除去した雌マウスに Noise または USVs を提示した後、排泄した糞中のエストラジオール濃度を測定したが、本実験では USVs 提示による糞中エストラジオール濃度の明瞭な増加は認められなかった。次に、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から、実験 5 では非発情期または発情前期の雌マウスに Noise または USVs を提示した後、視床下部と聴覚野のエストラジオール濃度を測定した。しかし、どちらの領域においても USVs による影響は認められなかった。実験 1 では USVs とフェロモンの共提示によって、聴覚野や視床下部の一部に神経活性化が起こることを見出しているため、マウスの場合には鳥類とは異なり、聴覚のみの刺激ではなく、嗅覚シグナルとの複合的な刺激を受けることがこれらの脳部位の活性化に必要であると考えられた。

実験 6 では嗅覚シグナルの影響を加味し、USVs が視床下部の生殖内分泌中枢へ及ぼす影響を調べた。二重免疫組織化学法を用いて、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、主に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 のパルス状分泌を制御し、主に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) を指標に解析した。その結果、AVPV で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 領域においては、USVs を ESP1 または溶媒と共提示した群の活性化キスペプチン陽性細胞の割合が Noise と溶媒を共提示した群に比べて有意に多かった。このことから、雄マウスの発する USVs は雌マウスの Arc におけるキスペプチンニューロンを活性化し、卵胞発育に貢献している可能性が示された。

本研究では、著者が博士前期過程で提唱した雄マウスの発する USVs の生物学的役割、即ち雄フェロモン情報との感覚統合によって子孫の遺伝的多様性をもたらすような雌マウスの嗜好性発現へ寄与するとともに繁殖機能を促進すること、これらの神経メカニズムの解明を目指した。本研究から、雌マウスは雄の USVs 情報とフェロモン情報を mPFC の PrL で統合し、適切な雄へ接近行動を示すことが見出された（第 1 章）。また USVs は視床下部の Arc におけるキスペプチンニューロンを活性化することが明らかとなり、USVs は生殖内分泌中枢を刺激することで雌の繁殖を促進する可能性も示唆した（第 2 章）。動物同士はコミュニケーションの過程で複数のシグナルを受容して感覚統合し、場面ごとに適切な社会行動を選択する。本研究はこの社会行動に重要な感覚統合メカニズムという新たな研究分野を開拓するものである。また、USVs によって繁殖能力が促進されるメカニズムの一端を解明した本研究は、音声コミュニケーションの新たな側面に脚光を当てるものでもあり、将来的に産業動物や野生動物における応用的価値を生み出すことが期待される。

以上のことから、本研究は博士（学術）の学位を授与するのにふさわしい業績と判断した。