

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500313

研究課題名(和文) 代謝型グルタミン酸受容体7型遺伝子欠損マウスにおける性行動異常のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of deficit in sexual behavior of metabotropic glutamate receptor subtype 7 knockout mice

研究代表者

時田 美和子(馬杉 美和子) (TOKITA MIWAKO (MASUGI MIWAKO))

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：10420712

研究成果の概要(和文)：代謝型グルタミン酸受容体7型遺伝子欠損マウス(mGluR7 KO)は繁殖が困難である。その原因を解明するために、社会的行動の詳細な解析を行った。mGluR7 KOの性行動の解析の結果、マウンティング、挿入の頻度については野性型マウスと大きく違わなかったが、射精の頻度が有意に低下していた。また mGluR7 KO では攻撃行動が有意に低下していた。mGluR7 KO では血中テストステロンが低値であった。テストステロンを補充して、性行動および攻撃行動を観察したが、補充前の動物と変化なかった。

研究成果の概要(英文)：We examined the sexual behavior in male wild-type and metabotropic glutamate receptor subtype 7 knockout mice (mGluR7 KO) littermates. We found that mGluR7 KO has difficulty in ejaculation. Furthermore, we also examined the aggressive behavior of these mice, using a resident-intruder paradigm. Wild-type mice displayed intense aggression against olfactory bulbectomized intruders. In comparison, mGluR7 KO showed significantly reduced levels of aggression. mGluR7 KO showed reduced plasma testosterone level. Castration reduced both sexual and aggressive behavior to equivalent low levels in both wild type and mGluR7 KO. Testosterone replacement restored these behaviors to pre-castration levels in both genotypes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経微細形態学、性行動、分子神経生物学、グルタミン酸

1. 研究開始当初の背景

グルタミン酸は中枢神経系の主要な興奮性神経伝達物質である。本研究では中枢神経

系に広く発現し、主にシナプス前膜の伝達物質放出部位近傍に存在する mGluR7 に注目した。mGluR7 は数種類の細胞に対して出力

する神経細胞において、特定の細胞への出力部位にのみ局在する、標的細胞特異的な発現を示し (Shigemoto et al., Nature 1996)、また可塑性の方向性を決めるスイッチであることが示唆されるなど (Pelkey et al., Neuron 2005, 2008)近年注目されているが、その生体内での役割は不明な点が多い。

研究代表者は mGluR7 遺伝子欠損マウス (mGluR7 KO)において恐怖反応 (すくみ反応) の低下、及び味覚嫌悪学習の障害という二つの異なる扁桃体依存性行動の異常を見いだした (Masugi et al., J Neurosci. 1999)。また、またこのマウスはホモ同士では繁殖しなかった。恐怖反応の低下はこのマウスでストレス反応の低下がおこっていることを示唆している。そこで、mGluR7 KO の行動異常のメカニズムを解明することにより、ストレスと性行動の関係のメカニズムの解明の糸口になると考えるに至った。

一方、研究代表者の所属する研究機関ではすでにストレス負荷による心因性勃起障害 (ED)のメカニズム、およびそれを回復させる方法を見いだしつつある (坂本: 研究分担者 (現所属は岡山大学))。これらの成果もふまえた上で mGluR7 KO の解析を総合的に進める。

2. 研究の目的

mGluR7 KO の性行動および恐怖反応の異常の原因として

仮説 I. 「海馬および視床下部・下垂体・副腎系のいずれかの部位の異常」

仮説 II. 「生殖器系の異常」

仮説 III. 「上記 I 以外の脳の部位の異常」

の3つの可能性が挙げられる。これらを検証し、責任領域の特定および異常のメカニズムの解明が最終目的である。まず、mGluR7 KO の性行動および内分泌学的異常を詳細に解析し、次いで薬理学的手法および形態学的手法により、行動および内分泌の異常との関係を明らかにしていく。

3. 研究の方法

(1) 動物

12-19 週齢の野性型マウスおよび mGluR7 KO の雄を使用した。すべてのマウスは個別飼いにし、明期 12 時間 (午後 10 時~午前 10 時)、暗期 12 時間 (午前 10 時~午後 10 時) の光条件下で飼育した。すべての行動実験は暗期に赤色光の下で行った。

(2) 性行動

雄マウスの 30 分間の性行動を一週間おきに 3 回観察した。雌マウスとして、卵巣除去した ICR に estradiol benzoate および progesterone の処理により発情させたもの

を使用した。雄マウスのマウンティング、挿入、射精の回数、潜時、持続時間をカウントした。

(3) 血漿テストステロンの測定

イソフルレンにより麻酔したマウスを断頭し、体幹側の血液を断頭後 2 秒以内に採取した。血漿テストステロン濃度を ELISA 法により測定した。

(4) 去勢およびテストステロン補充

10-16 週齢の野性型マウスおよび mGluR7 KO の精巣を除去した。テストステロン補充動物については内径 1.57mm のシリコンチューブに全長 10mm のテストステロンを充填したものを背部皮下に埋めた。性行動および攻撃行動には手術後 2 週間おいたものを使用した。

(5) 攻撃行動

Resident-intruder パラダイムにより 15 分間の攻撃行動を一週間おきに 3 回観察した。すなわち、個別飼いした野生型あるいは mGluR7 KO (resident)のホームケージに、新規侵入者 (intruder)を入れて行動を観察する。intruder として嗅球除去した ICR の雄を使用した。攻撃行動は以下のカテゴリーに区分した

- ① Intense aggression: かみつく、格闘
- ② Mild aggression: 追尾、マウンティング
- ③ Sexual behavior: マウンティングして相手の体幹を前肢を用いてこする (本来雌マウスのロルドーシスを誘発するために行う性行動である)

(6) その他の社会的行動

攻撃行動の観察と同時に、以下の行動もカウントした。

- ① 肛門生殖器付近をかぐ
- ② 首筋、背中など他の部分をかぐ
- ③ 相手の毛繕い

4. 研究成果

(1) mGluR7 KO およびコントロール動物を用いて性行動を解析した。観察の初日からコントロール動物ではマウンティング、挿入を盛んに行うのに対し、mGluR7 KO は殆ど行わなかった。しかしながら観察 3 週目にはマウンティング、挿入の回数共にコントロールと mGluR7 KO の間に有為差は認められなかった (図 1 Intact)。一方でコントロール動物は目を追うにつれて、射精に至る割合が増加したが、mGluR7 KO では殆ど射精することがなかった (図 1 Intact、表 1 Intact)。観察を 6 週目まで行った場合でも、mGluR7 KO は射精を行わなかった。

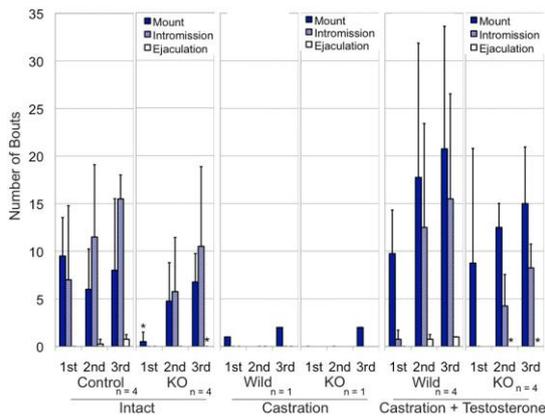


図1 性行動の観察

	1st	2nd	3rd	weeks
Control (Wild or hetero) Intact	0/4	1/4	3/4	
KO Intact	0/4	0/4	0/4	
Wild Castration	0/1	0/1	0/1	
KO Castration	0/1	0/1	0/1	
Wild Castration + Testosterone	0/0	3/4	4/4	
KO Castration + Testosterone	0/4	0/4	0/4	

表1 射精の回数

(2) マウスの性行動はテストステロン依存性であることが知られている。ELISA法により血漿テストステロンの値を測定したところ、mGluR7 KOでは有為にテストステロンの値が低下していた(図2)。

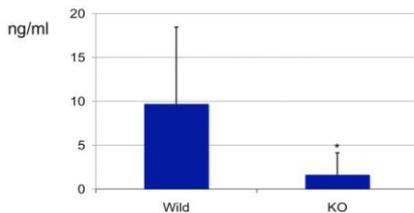


図2 血漿テストステロンの値

(3) 血漿テストステロンの低下が、mGluR7 KOにおける性行動の異常の原因であるか否かを確認するために、テストステロン補充実験を行った。去勢により、コントロール動物、mGluR7 KO共にほとんど性行動を示さなくなった(図1 Castration)。去勢した動物にテストステロンを補充したところ、去勢前の動物とほぼ同様の行動を示した。すなわち、テストステロン補充によりmGluR7 KOの射精の異常は回復しなかった(図1 Castration + Testosterone、表1 Castration + Testosterone)。

(4) 性行動の観察中に、mGluR7 KOが他のマウスに対して、野性型マウスと異なるふるまいをするのを見いだした。他のマウスに対する行動を観察する系として、Resident-intruderパラダイムによる攻撃行動の観察を選択した。

野性型マウスは、新規な侵入者に対して激しい攻撃行動を示したのに対し、mGluR7 KOは攻撃行動を殆ど示さなかった。また、mGluR7 KOは本来雌に対して行う性行動である、マウンティングして相手の体幹を前肢を用いてこするような行動を、侵入者の雄に対して頻繁に行った(図3 Intact)。

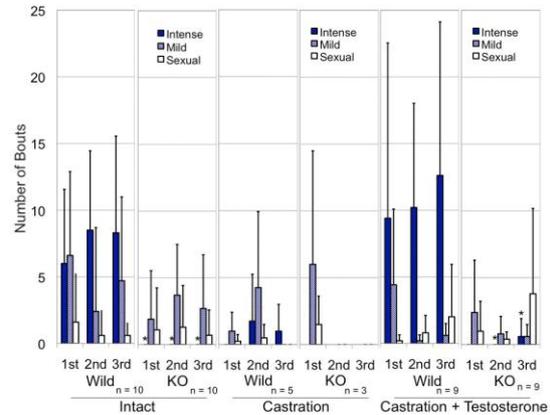


図3 攻撃行動の観察

Resident-intruderパラダイムによる攻撃行動の観察と同時に、攻撃行動以外の行動についても観察した。野性型マウスは侵入者の肛門生殖器付近のにおいを頻繁にかぐのに対し、mGluR7 KOは肛門生殖器以外の首筋や背中などのにおいを頻繁にかいだ。またmGluR7 KOは侵入者の毛繕いを頻繁に行うことが観察された(図4 Intact)。

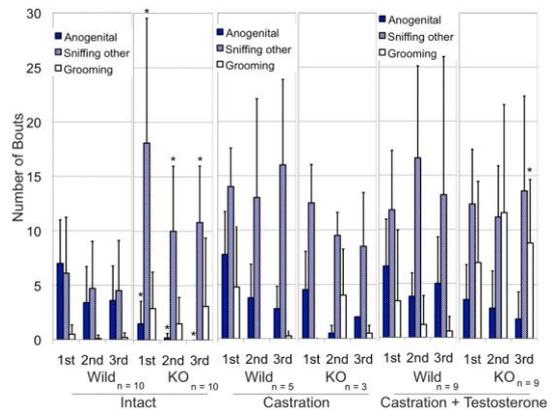


図4 社会行動の観察

(5) マウスの攻撃行動はテストステロン依存性であることが知られている。血中テストステロンの低下が、mGluR7 KOにおける攻撃行動の異常の原因であるか否かを確認するために、テストステロン補充実験を行った。去勢により、野性型マウス、mGluR7 KO共に攻撃行動が減少した(図3 Castration)。テストステロン補充によって、野性型マウス、mGluR7 KO共に、去勢前とほぼ同様の行動様式を示した(図3 Castration + Testosterone)。

(6) これらの結果は、mGluR7 が性行動および攻撃行動といった社会的行動に重要な役割を果たすことを示すものである。性行動、攻撃行動共に、テストステロン依存性であることが知られており、さらに mGluR7 KO においてテストステロンの低下が観察されたため、テストステロン補充実験を行ったが、mGluR7 KO における行動異常は回復できなかった。

(7) mGluR7 KO における性行動および攻撃行動の異常の発見は、これまで知られていなかった mGluR7 の重要な役割を見いだしたものであり、その意義は大きい。しかしながら、そのメカニズムの解明には研究期間中には至らなかった。現在メカニズムの追求のためにさらに解析を続けている。具体的には、性行動・攻撃行動のいずれも嗅覚に強く依存することが知られているが、mGluR7 KO における、においの好みが野生型と異なることを示唆する結果を得ている。今後、嗅覚とこれらの行動異常との関係を解析し、論文にまとめる予定である。

一方で、性行動のうち特に射精が障害されているという結果は、脳に発現する mGluR7 ではなく、脊髄などの局所の mGluR7 が射精に関わっている可能性を示唆する。ガストリン放出ペプチド (gastrin-releasing peptide: GRP) は、腰部脊髄で勃起、射精などを調節している神経ペプチドであることを研究分担者である坂本らが発見したが (Sakamoto et al., *Nature Neurosci.* 2008)、研究代表者は mGluR7 KO において GRP の発現に異常があることを見いだした。今後、mGluR7 と GRP の関係についての解析をさらに深めることにより、男性性機能障害の治療にも応用できる基礎的データが得られると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① M. Kawata, M. Nishi, K.-I. Matsuda, H. Sakamoto, N. Kaku, M. Masugi-Tokita, K. Fujikawa, Y. Hirahara-Wada, K. Takanami, H. Mori: Steroid receptor signalling in the brain-lessons learned from molecular imaging. *J Neuroendocrinol.* 20, 673-676 (2008). 査読有

[学会発表] (計 3 件)

① 馬杉 (時田) 美和子, 代謝型グルタミン酸受容体 7 型ノックアウトマウスにおける社会的行動の

解析, 第 32 回日本神経科学大会, 2009 年 9 月 16-18 日, 名古屋

② 馬杉 (時田) 美和子, mGluR7 ノックアウトマウスにおける社会的行動の解析, 第 33 回 日本神経科学大会, 2010 年 9 月 2-4 日, 神戸

③ 馬杉 (時田) 美和子, 代謝型グルタミン酸受容体 7 型を介した攻撃行動および性行動調節の分子機構の解明, 第 116 回 日本解剖学会総会, 2011 年 3 月 28-30 日, 横浜 (震災のため誌上開催)

[図書] (計 1 件)

① Y. Fukazawa, M. Masugi-Tokita, E. Tarusawa, H. Hagiwara, R. Shigemoto: SDS-digested freeze-fracture replica labeling (SDS-FRL). In *Handbook of Cryo-preparation Methods for Electron Microscopy*. Edited by Cavalier A, Spehner D, Humbel BM. CRC Press, pp567-586 (2008).

[その他]

ホームページ等

<http://www.kpu-m.ac.jp/k/anat1/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

時田 美和子 (馬杉 美和子)

(TOKITA MIWAKO (MASUGI MIWAKO))

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：10420712

(2) 研究分担者

坂本 浩隆 (SAKAMOTO HIROTAKA)

岡山大学大学院・自然科学研究科・准教授

研究者番号：20363971