

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 31 日現在

機関番号：32701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14881

研究課題名(和文)性シグナル伝達を司る神経回路の機能実証

研究課題名(英文)Functional demonstration of sexual signal neural circuits

研究代表者

菊水 健史(Kikusui, Takefumi)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：90302596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウスのオスとメスはお互いの性を認知し、適切な性行動を発現する。この性シグナルの伝達から行動にいたる回路の機能を調べた。ESP1は雄マウスの涙に含まれるフェロモンであるが、雌ではESP1の前提示によって交尾の受容姿勢であるロードシスが上昇した。一方、雄では攻撃性が上昇した。これらの性差にかかわる神経核を、神経活性マーカーであるC-fosを指標に可視化した。さらにこの性的2型の神経核を薬理遺伝学的手法をもちいて人為的に活性化したところ、性行動ならびに攻撃行動が再現され、その性差の機能の実証に成功した。

研究成果の概要(英文)：Male and female mice can recognize the conspecific sex information and show adaptive behavior to the counterpart. In this study, we aimed to reveal the functional differences in male and female brain conveying the sex-related signals. ESP1 is a male pheromone secreted into male tears. ESP1 stimulates female receptive behavior and enhances male aggression. We identified the nuclei that were activated by ESP1 both in male and females, using neural activity marker C-fos. By pharmacogenetics approach, we artificially activated these nuclei and were able to reproduce the female sexual behavior and male aggression. Therefore, we demonstrated the functional sex differences in the brain that regulating ESP1-related sex-specific behavior.

研究分野：行動神経科学

キーワード：フェロモン 性差 嗅覚 性行動

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物は雌雄2つの性による有性生殖を行うが、そのためには他個体の性を知り雌雄それぞれが適切な社会行動を示す必要がある。これまでの研究から他個体の性を知る性認知には嗅覚が重要であることが示されている。特にマウスではフェロモン情報伝達経路である鋤鼻神経系が性認知に深く関与することが明らかになっている (Dulac and Trello, Nat Rev Neurosci, 2003; Kimchi et al., Nature, 2007)。しかし、実際に雌雄の性認知に利用されるフェロモンは同定されていない。

2005年、Kimotoらは雄マウスの眼窩外涙腺で産生され、涙の中に分泌されるペプチド性の雄フェロモンESP1を報告した (Kimoto et al., Nature, 2005)。申請者らは(1)ESP1が鋤鼻器のフェロモン受容体の1つであるV2Rp5に特異的に結合すること、(2)雌マウスがこのV2Rp5を介した情報伝達により雌特異的な社会行動である性行動中の雄受容姿勢を高頻度で示すことを明らかにした(業績(1)-4)。これらの結果から、ESP1は雌マウスが「雄」を認知するために利用するフェロモンであることが確定した。一方で、ESP1を受容した雄マウスでも雌マウスと同様に鋤鼻神経細胞が活性化するが、実際にESP1がどのような生理作用を及ぼすかは不明なままであった。

### 2. 研究の目的

ESP1を受容した雌の性認知に利用される雄フェロモンであることから、雄の性認知にも利用される可能性を考えた。そこで、(課題1)「雄マウスが雄に対して示す攻撃行動にESP1が与える影響」を調べた。課題1からESP1を受容した雄マウスの攻撃行動を促進することが明らかになったため、(課題2)「社会行動発現に関わる神経回路の性差の解明」を試みた。

### 3. 研究の方法

(課題1)雄マウスが雄に対して示す攻撃行動にESP1が与える影響

雄マウスは他個体を「雄」と認知すると激しい攻撃行動を示す(図1)。一方で雌に対しては攻撃行動を示さない。この雄マウスの攻撃行動の発現にESP1がどのように影響するのかを、咬みつつき行動を指標に評価した。

(課題2)社会行動発現に関わる神経回路の性差の解明

鋤鼻神経系は鋤鼻器から副嗅球、扁桃体を経て視床下部に至る神経回路である(図2)。視床下部には、雌雄の社会行動を制御する脳領域が存在している。鋤鼻器でのV2Rp5の発現量や副嗅球のESP1への反応性に性差がないことから(業績(1)-4)、ESP1作用の性差発現の起点は扁桃体に存在する可能性が高い。そこで扁桃体の中でも副嗅球から多くの投射を受ける扁桃体内側核に着目し、解剖学的

または機能的側面から性差の有無を解析した。

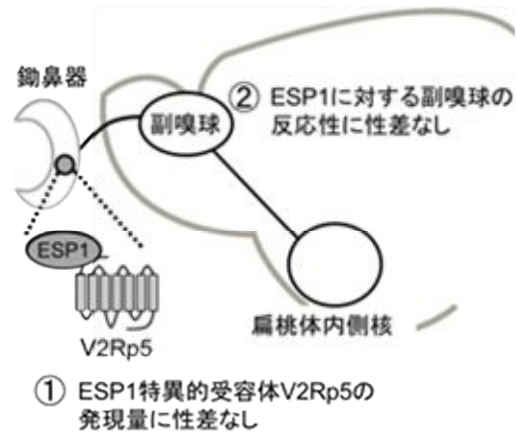


図:ESP1の受容から扁桃体内側核に至る鋤鼻神経回路の一部とESP1への反応性

### 4. 研究成果

(課題1)雄マウスが雄に対して示す攻撃行動にESP1が与える影響

(1)ESP1は雄尿の存在下で雄マウスの攻撃行動を促進する

雄マウスに対しESP1と雄尿を組み合わせ提示した。その後、雄を侵入させ、咬みつつき行動を観察した。その結果、ESP1と雄尿を同時に提示すると、侵入者へ激しい咬みつつき行動を示し、攻撃行動が促進されることを明らかにした。

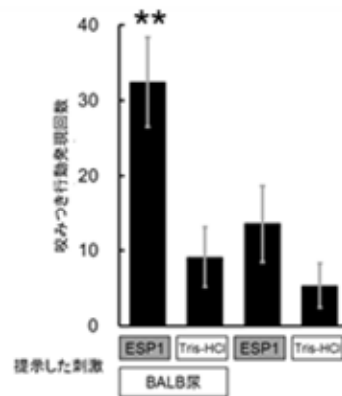


図:ESP1と雄尿の同時提示により咬みつつき行動は増加する。

(2)ESP1作用は、その特異的受容体V2Rp5が欠損すると消失する

ESP1による攻撃行動促進効果が、ESP1特異的受容体V2Rp5を介した情報伝達によるものかを検証するため、V2Rp5を欠損した雄マウスへESP1と雄尿を組み合わせ提示した。その結果、ESP1を受容できないV2Rp5欠損型雄マウスでは攻撃行動が促進されないことを明らかにした。

(3)ESP1を分泌する雄マウスは、自らが分

泌した ESP1 を受容することで自身の攻撃行動を促進する。

雄マウスには ESP1 を分泌する系統と分泌しない系統が存在する。ESP1 を分泌する系統の雄マウスは ESP1 と雄尿の同時提示だけでなく、雄尿の単独提示であっても激しい咬つき行動を示した。このことから、自らが分泌した ESP1 を受容することで ESP1 作用を得ている可能性が考えられた。そこで ESP1 を分泌するが V2Rp5 を欠損した雄マウスへ ESP1 と雄尿を組み合わせて提示した。その結果、V2Rp5 欠損型雄マウスでは攻撃行動が減弱しており、ESP1 を分泌する系統の雄マウスは自らが分泌した ESP1 により自身の攻撃行動を促進していることを明らかにした。

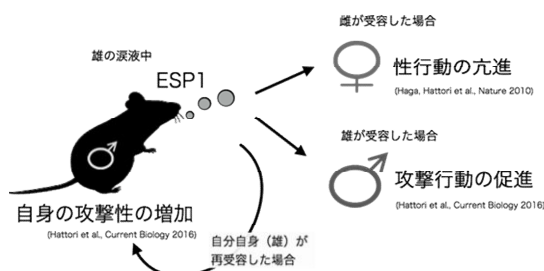
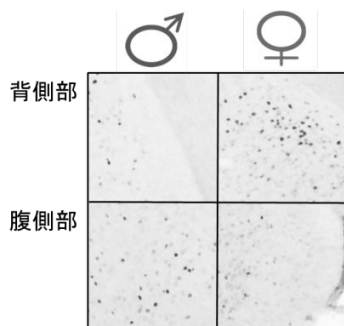


図: ESP1 は他個体に伝わり、攻撃性を上昇させるのみではなく、自分自身にも作用し、攻撃性を上昇させた。

(課題 2) 社会行動発現に関わる神経回路の性差の解明

(4) 活性化する扁桃体内側核の神経細胞の局在に性差が存在する

雌雄マウスへ ESP1 を提示し、鋤鼻神経系の各脳領域、特に扁桃体内側核での神経細胞の活性を比較した。神経活動マーカーである c-Fos を指標に観察した結果、扁桃体内側核へ神経投射が見られる副嗅球では神経活動に性差が認められなかった。一方で扁桃体内側核では、雄の腹側部で、雌の背側部でそれぞれ高い神経活動を示し、活性化した神経細胞の局在に性差を見出した。すなわち ESP1 に対する神経細胞の反応性の性差は扁桃体内側核において最初に現れることを明らか



にした。

図: 扁桃体内側核における ESP1 の神経活性化の雌雄差

(5) ESP1 に対する神経細胞の反応性の性差は雌雄の社会行動の制御に重要である

ESP1 情報への神経細胞の反応性の性差が雌雄の社会行動の制御に重要であることを明らかにするため、刺激特異的に活性化した神経細胞のみを薬理遺伝学的に再活性化できる遺伝子改変マウスを用いた。まず、この雌雄マウスへ ESP1 を提示し活性化した神経細胞を人為的に再活性化した。このとき ESP1 が存在しないにもかかわらず雌雄マウスで、結果(4)と同様の扁桃体内側核における神経活動の性差が認められた。

続いて、ESP1 によって活性化する神経細胞を人為的に再活性化し、雌雄の社会行動を評価した。その結果、雄マウスでは攻撃行動が促進され、雌マウスでは性行動中の雄受容姿勢の亢進が認められた。すなわち、ESP1 提示により活性化する神経回路は雌雄マウスの社会行動を増強し、この神経回路の性差が雌雄の社会行動の制御に重要であることを示した。

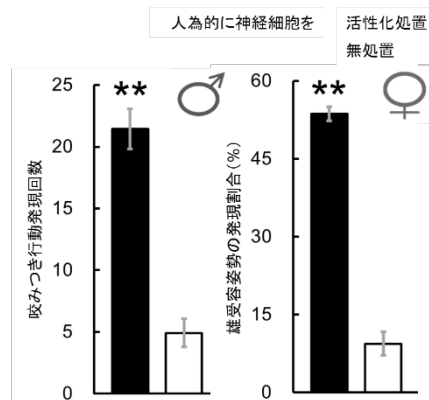


図: ESP1 により活性化した神経細胞を再活性化した時の雌の性行動と雄の攻撃行動

(6) この性特異的な回路が、メスの繁殖制御に及ぼす影響を調べた。メスマウスは交尾後、交尾相手の雄のフェロモンに曝されても正常に妊娠が維持され、出産する。しかしながら交尾相手と異なる雄のフェロモンに曝露されると流産する。これをブルース効果と呼ぶ。これまで、ブルース効果におけるフェロモン分子は不明であった。雄マウスのブルース効果発現には系統差があり、B6 オスと交配したメスにおいて、ESP1 を分泌する BALB 系統、DBA 系統はブルース効果を発現することができた。興味深いことに、BALB オスと交配したメスでは DBA はブルース効果を誘起しなかった。多くの系統間を比較したところ、雄マウスの ESP1 の分泌のある無し、をメスが認知し、異なった組み合わせ(あるとなし)では流産することがわかった。また ESP1 の事前提示だけでも、おなじように、ESP1 の有無の違いによるブルース効果が認められた。ESP1 の特異的な受容体を欠損したマウスで

はこれらの作用がすべて消失した。これらのことから、ESP1 の多少が、雌マウスに記録され、ブルース効果の手がかり刺激として使われていることが明らかとなった。

#### 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 6 件 )

1. Shota Okabe, Yousuke Tsuneoka, Aki Takahashi, Rumi Oyama, Akiyuki Watarai, Sayaka Maeda, Yuka Honda, Miho Nagasawa, Kazutaka Mogi, Katsuhiko Nishimori, Masaru Kuroda, Tsuyoshi Koide, Takefumi Kikusui. Pup exposure facilitates retrieving behavior via the oxytocin neural system in female mice. **Psychoneuroendocrinology**. 2017 May;79:20-30. doi: 10.1016/j.psyneuen.2017.01.036
2. Mogi K, Takakuda A, Tsukamoto C, Oyama R, Okabe S, Koshida N, Nagasawa M, \*Kikusui T. Mutual mother-infant recognition in mice: The role of pup ultrasonic vocalizations. **Behav Brain Res** 2016, 325, 138-146. doi: 10.1016/j.bbr.2016.08.044.
3. Kikusui T, Ishio Y, Nagasawa M, Mogil JS, \*Mogi K Early weaning impairs a social contagion of pain-related stretching behavior in mice. **Dev Psychobiol** 2016, 58, 1101-1107. doi: 10.1002/dev.21443.
4. Mogi K, Ishida Y, Nagasawa M, \*Kikusui T Early weaning impairs fear extinction and decreases brain-derived neurotrophic factor expression in the prefrontal cortex of adult male C57BL/6 mice. **Dev Psychobiol** 2016, 58, 1034-1042. doi: 10.1002/dev.21437.
5. Hattori T, Osakada T, Matsumoto A, Matsuo N, Haga-Yamanaka S, Nishida T,

Mori Y, Mogi K, \*Touhara K, \*Kikusui T  
Self-exposure to the male pheromone  
ESP1 enhances male aggressiveness in  
mice. **Curr Biol** 2016, 26: 1229-1234.

DOI: 10.1016/j.cub.2016.03.029 |

6. Asaba A, Kato M, Koshida N, \*Kikusui T  
Determining ultrasonic vocalization  
preferences in mice using a two-choice  
playback test. **J Vis Exp** 2015, (103). doi:  
10.3791/53074. doi: 10.3791/53074.

[ 学会発表 ] ( 計 10 件 )

1. Kikusui T. Oxytocin forms inter-individual relationship. ICP2016 Symposium “New Horizons in Cognitive Neuroscience: Face-to-face social interactions between two individuals probed by hyperscanning, neuronal recording, and neuroendocrinological approaches. 2016.7.25 ( Pacifico Yokohama, Yokohama, Kanagawa )
2. Hattori T, Osakada T, Matsumoto A, Matsuo N, Haga S, Nishida T, Mori Y, Mogi K, Touhara K, Kikusui T. Self-Exposure to the Male Pheromone ESP1 Enhances Male Aggressiveness in Mice The 39<sup>th</sup> JNS Annual Meeting 2016.7.20-22 ( PACIFICO Yokohama, Yokohama, Kanagawa )
3. Kikusui T. The social function of male mouse pheromone ESP1. ISOT Satellite Symposium “Olfaction: from Chemosensory Signals to the Brain” 2016.6.5 (The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo)
4. Kikusui T. Oxytocin forms inter-individual relationship. 38<sup>th</sup> JNS Annual Meeting Symposium “Cutting edge of neuroendocrinology: various actions and effects of oxytocin, CRH and steroids“ (invited) 2015.7.30 ( Kobe International Conference Center, Kobe, Hyogo )
5. Kanno K, Kikusui T. Individual differences in male mice ultrasonic vocalizations to females are correlated with sexual motivation and neuronal activity in the ventral tegmental area. SfN2015 2015.10.18 (McCormick Place, Chicago USA)

6. Asaba A, Mogi K, Kikusui T. Male mice ultrasonic vocalizations enhance female reproductive function. SfN2015 2015.10.18 (McCormick Place, Chicago USA)
7. Watarai A, Arai N, Miyawaki S, Miura K, Mogi K, Kikusui T. Non-breeder's alloparenting behaviors are enhanced by coprophagy in eusocial rodents, the naked mole-rats. SfN2015 2015.10.18 (McCormick Place, Chicago USA)
8. Kanno K, Kikusui T. Individual differences in mice courtship vocalizations are correlated with sexual emotion and neuronal activity in the ventral tegmental area. 38<sup>th</sup>JNSS Annual Meeting 2015.7.29 (Kobe International Conference Center, Kobe, Hyogo)
9. Mogi K, Ishida Y, Nagasawa M, Kikusui T. Early weaning impaired fear extinction and decreased BDNF expression in the prefrontal cortex in adult C57BL/6 mice. 38<sup>th</sup>JNSS Annual Meeting 2015.7.28 (Kobe International Conference Center, Kobe, Hyogo)
10. Asaba A, Mogi K, Kikusui T. Multisensory integration of male vocalizations and pheromone in female mice. The 75<sup>th</sup> JSAP Annual Meeting 2015.9.11 (Japan Women's University, Bunkyo, Tokyo)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
 ホームページ等  
<http://azabu.carazabu.com/car/>

6. 研究組織  
 (1) 研究代表者  
 菊水健史 (KIKUSUI, Takefumi)  
 麻布大学・獣医学部・教授  
 研究者番号：90302596