

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K03144

研究課題名（和文）雄マウス求愛発声と性的動機づけを担うドーパミン神経投射経路の同定

研究課題名（英文）Identification of the dopaminergic projection pathways responsible for courtship vocalizations and sexual motivation in male mice

研究代表者

菅野 康太（Kanno, Kouta）

鹿児島大学・法文教育学域法文学系・准教授

研究者番号：80722470

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、超音波でなされるマウスの求愛発声に表現される情動状態と、ドーパミン神経の活動との関係に対応づけることを目的として行われた。つまり、性的動機づけが高い雄は、雌と出会うと高頻度で特徴的な発声を行い、ドーパミン神経が活性化していると仮説立てたわけである。そこで、神経活動の操作とイメージングによりこれら仮説の検証を試みたが、しかし、実験系が確立できず、仮説検証に至らなかった。一方、行動学的な解析では成果があった。性的動機づけが高まっている際の声の「盛り上がり」とも言える音響特徴を定量できる方法を開発した。さらに、複数個体間でこのような盛り上がりを観察できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私はこれまでに一貫してマウス超音波発声の内容が示す生物学的意義を研究してきた。このことにより、近年、生物医学・神経科学分野では、コミュニケーションに障害が見られる発達障害のモデルマウスにおいて超音波発声が頻繁に解析されている。本研究の成果も、そのような病態モデルマウスの行動表現型に対する解析・解釈に今後貢献しうる。高精度な実験・解析手法が蓄積されることにより、動物実験心理学や神経科学分野の研究者に広く技術を提供することにもつながる。また、本研究は、感情表現にも繋がる情動の表出とそのメカニズムを探るもので、そのような基礎研究の進展に貢献する意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the relationship between the emotional state expressed in ultrasonic courtship vocalizations of mice and dopaminergic activity. We hypothesized that males, which are highly sexually motivated, frequently exhibit characteristic vocalizations when they encounter females and that dopaminergic neurons are activated. We attempted to test these hypotheses by manipulating and imaging neural activity, but were unable to establish such experimental systems and could not test the hypotheses. In contrast, the behavioral analysis was successful. We developed a method to quantify the acoustic features that can be described as the "rise" of the vocalizations when sexual motivation is heightened. Furthermore, we demonstrated the possibility of observing such a rise among multiple individuals.

研究分野：齧歯類社会行動、音声コミュニケーション、行動神経科学

キーワード：超音波発声 音声コミュニケーション マウス

1. 研究開始当初の背景

私はこれまでに、超音波で発せられるマウスの音声コミュニケーションについて研究をしてきた。特に、成体雄マウスから雌に対して発せられる求愛発声に関して多くの研究を行っており、若手研究(2018-2020年度)や新学術領域研究(公募、2019-2020年度)を通じて、この発声の頻度の高さが快情動の表出となっていること(Kuwaki & Kanno, 2021)、求愛発声は社会的・性的経験によって促進される上に発声の多い個体は繁殖成功確率が高いこと(Kanno & Kikusui, 2018)などを示してきた。つまり、雄マウスの求愛発声は、性経験や繁殖能力とも連動した性的動機づけという、個体の情動状態の表出として機能していると言える。次なる研究の関心は、それがどのような神経基盤に支えられているかということであった。また、発声の頻度のみならず、音響特性としても特定の情動状態が表現され、特定の神経活動と対応していることも期待できる。

2. 研究の目的

本研究は、超音波でなされるマウスの求愛発声に表現される情動状態と、特定の神経活動との関係に対応づけることを目的として行われた。特に我々は、動機づけを制御するドーパミン神経系に着目していた。つまり、雌と出会った際に多くの発声を示す雄個体はドーパミン神経の活性化によって性的動機づけが高まっており、この内的状態が発声として表出されていると仮説立てていた。そして、ドーパミン神経系の中でも特異的にこの現象を担う神経投射経路を同定することを目的としていた。また、発声の頻度の高さのみならず、性的動機づけが高い個体の超音波発声には、音響特性としても情動状態が表出されているだろうとも予想していた。ドーパミン神経の活性が高まることで、特徴的な声が発せられると想定したわけである。

そこで本研究では、大きく以下2つの実験研究を試みた。

(1) 求愛発声と対応する神経活動とその操作：カルシウムイメージングと光遺伝学を組み合わせ、上記仮説の検証を試みた。

(2) 超音波発声の各音節の抑揚の定量：性的動機づけの強さが表出されるであろう音響特性の候補として音節内の周波数変動(抑揚)が挙げられる。この変動を定量することを試みた。

3. 研究の方法

(1) 求愛発声と対応する神経活動とその操作

本実験では、ファイバーフォトメトリーによる神経活動観察と光遺伝学による神経活動の操作を、求愛発声の観察と同期記録しながら行うことを試みた。本研究ではドーパミン(DA)神経系に着目しており、その神経活動の観察と神経活動操作をするための分子ツールを発現させる必要がある。DA神経系特異的に各種ツールの遺伝子を発現させるために、DA合成に必要な酵素であるチロシン水酸化酵素(TH)遺伝子のプロモーター下流でDNA組換え酵素であるCreを発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター(TH::Cre)を用いた。さらに、分子ツールの遺伝子配列が逆向きに挿入されているAAVで、Cre存在下では組換えによりその向きが正常になり、遺伝子発現がなされるDIO(doublefloxed inverted open-reading-frame)のシステムを用い、Cre::THと特定の脳部位・回路で2重感染させることで、DA神経特異的に分子ツールを発現させる計画をした。分子ツールとしては、神経活動が上昇した際のカルシウムイオン濃度の上昇に応じて緑色蛍光の強度が増すCa²⁺センサーであるGCaMP6を用いた。神経活動操作においては、560nm付近の光に応答し神経活動を抑制するArchTを用いた。これらの手法を用いて、DA神経活動と発声の多さや複雑さとの因果を示し、さらに責任神経回路(投射経路)を機能的に同定することも計画した。そこで、神経投射経路特異的な神経活動操作のために、特定の神経投射での逆光性感染を行うためのAAV2retroも用意した。

(2) 超音波発声の各音節の抑揚の定量

各音節の周波数に対する変動係数([標準偏差 / 平均値]で算出される)を定量することで、抑揚の定量を自動で行うシステムを開発した。これは、すでに共同研究で開発していた齧歯類超音波発声の解析システムUSVSEG(Tachibana et al., 2020)に機能を追加することで可能となった。さらに、共同研究によって新たに開発したUSVCAMというシステムによって、このような解析を音源定位と組み合わせる行うことが可能にもなった(Matsumoto et al., 2022 業績参照)。

4. 研究成果

(1) 求愛発声と対応する神経活動とその操作

C57BL/6J系統(B6)を用いて実験を行った。残念ながら、これら実験系の立ち上げは成功せ

ず、仮説検証に至らなかった。原因はよく分からない。また、事前に発声頻度の高い雄個体を選んで実験を行っても、ファイバーフォトメリーや光遺伝学を行うための光ファイバーカニューラを脳に刺入すると、発声を示さなくなるといことも頻繁に見られ、行動観察自体が難しい状況が多々あった。今後は、カニューラが刺入されてもあまり気にしないような、環境変化によって行動があまり抑制されない系統（経験的にはICR系統など）を使用するなど検討したい。

(2) 超音波発声の各音節の抑揚の定量

右の図1は、USVSEGで定量した抑揚を評価する新たな指標である cvfreq の説明の模式図である。狙い通り、この指標の定量化が USVSEG 上で可能となり、新たな version をリリースした (Lan et al., 2023 業績参照)。発声回数が多い雄個体は性的動機づけが強いと考えられるが、発声回数が多い個体では cvfreq の値も高いという相関が見られており (未発表)、このことから cvfreq を用いた超音波発声の音響特性の解析は、性的動機づけの強さを声の質の面から評価できると考えて良いだろう。

音節の周波数の変動係数 (cvfreq) :

$$\frac{\text{音節の周波数の標準偏差 (SD)}}{\text{音節の平均周波数}} \quad \text{平均周波数から何割くらいの範囲で上下するか (ズれるか)}$$

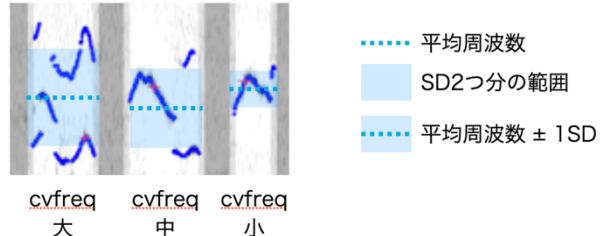


図1. 抑揚の指標 cvfreq の模式的説明

さらに我々が開発した音源定位装置 USVCAM を用いた行動解析で (図2)、新たな知見が得られた。過去の先行研究の蓄積により、雌雄間での観察では、雄が主に発声をしていることが分かっていた。これを根拠に、雌雄がいる場合の観察で記録される超音波発声は雄の求愛発声であるとみなして行われる研究が多い。しかし、未知の実験文脈や新たに用いられる系統においては、実験的検証を必要とする。この USVCAM によって、これまで主に用いてきた B6 ではなく、ICR 系統を用いて観察を行ったところ、次のことがわかった。雄のホームケージに雌を侵入させることで発声の観察を行うと、これまでに他の系統で知られていたように雄が発声を示していたが、雌のホームケージに雄を侵入させたところ、雌雄双方が発声を示していることが分かった。この発声は、記録音源のソナグラム上で2匹の発声がオーバーラップするほどに活発な発声が観察されるが、USVCAM では、音声シグナルが重なっていたとしても、それぞれを分離して音源定位することも可能である (図3)。

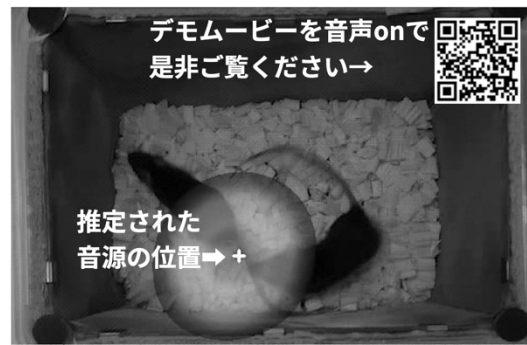


図2. 超音波カメラUSVCAMによる音源定位

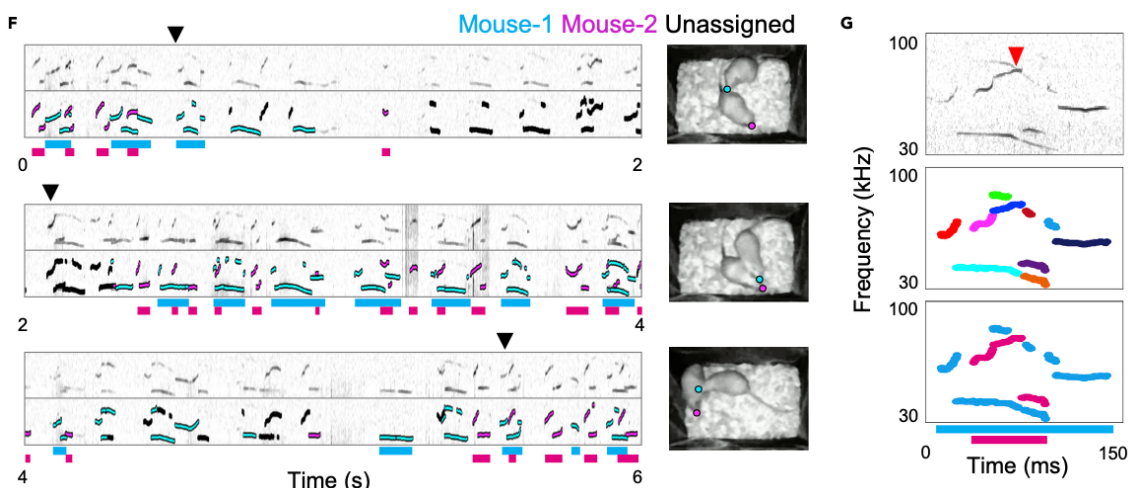


図3. 右記 DOI で示す業績の Fig. 1F より (<https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104812>)

本研究で新たに導入した cvfreq によって、声の言わば「盛り上がり」が定量可能となったわけだが、ICR 系統では2 個体双方が発声を示すことから、今後は「声にみられる盛り上がり、双方からのコミュニケーションを盛り上げるか?」といったことを検証する研究も可能になり、動物の音声コミュニケーションにおける新たな方向性が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Lan Ziguo, Tachibana Ryosuke O., Kanno Kouta	4. 巻 230
2. 論文標題 Chronic exposure of female mice to selective serotonin reuptake inhibitors during lactation induces vocal behavior deficits in pre-weaned offspring	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmacology Biochemistry and Behavior	6. 最初と最後の頁 173606 ~ 173606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pbb.2023.173606	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okabe Shota, Kanno Kouta	4. 巻 -
2. 論文標題 Acoustic Properties and Biological Significance of Ultrasonic Vocalizations in Rodents: Emotional Expressions.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 In: Seki, Y. (eds) Acoustic Communication in Animals (Chapter 10, pp153-173). Springer, Singapore.	6. 最初と最後の頁 153 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-99-0831-8_10	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 菅野 康太	4. 巻 75
2. 論文標題 動物の鳴き声の"個性" -特集 脳と個性 . "個性"の実験的理解	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 69 ~ 73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.2425201817	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 岡部 祥太、菅野 康太	4. 巻 79
2. 論文標題 情動表出としてのげっ歯類超音波発声	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本音響学会誌	6. 最初と最後の頁 41 ~ 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20697/jasj.79.1_41	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mai Lingling, Inada Hitoshi, Kimura Ryuichi, Kanno Kouta, Matsuda Takeru, Tachibana Ryosuke O., Tucci Valter, Komaki Fumiyasu, Hiroi Noboru, Osumi Noriko	4. 巻 25
2. 論文標題 Advanced paternal age diversifies individual trajectories of vocalization patterns in neonatal mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104834 ~ 104834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104834	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsumoto Jumpei, Kanno Kouta, Kato Masahiro, Nishimaru Hiroshi, Setogawa Tsuyoshi, Chinzorig Choiijiljav, Shibata Tomohiro, Nishijo Hisao	4. 巻 25
2. 論文標題 Acoustic camera system for measuring ultrasound communication in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104812 ~ 104812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104812	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 菅野康太
2. 発表標題 性特異行動としてマウス超音波発声
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会シンポジウム「性差に着目した神経科学研究最前線」(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菅野康太
2. 発表標題 情動表出としてのマウス超音波発声 -その発声の種類と個体差-
3. 学会等名 日本音響学会第149回 (2023年春季) 研究発表会「スペシャルセッション (ヒトと動物の情動発声と声の社会性)」(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 栗脇開世、菅野康太
2. 発表標題 Mice emit ultrasonic vocalizations in the context with a running wheel
3. 学会等名 日本動物心理学会 第82回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ziguo Lan, Noriko Osumi, Kouta Kanno
2. 発表標題 Chronic maternal SSRI exposure during the prenatal and/or postnatal period induced vocal behavior deficits and affected serotonergic neurogenesis in the mouse offspring
3. 学会等名 FENS Forum 2022, The Federation of European Neuroscience Societies (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kouta Kanno, Jumpei Matsumoto, Masahiro Kato, Hiroshi Nishimaru, Tsuyoshi Setogawa, Choijiljav Chinzorig, Tomohiro Shibata, Hisao Nishijo
2. 発表標題 USVCAM: acoustic camera system for measuring ultrasound communication in mice (USVCAM: マウス超音波発声を計測する超音波カメラ)
3. 学会等名 NEURO2022 (第45回日本神経科学大会・第65回日本神経化学会大会・第32回日本神経回路学会大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅野康太
2. 発表標題 マウス超音波発声による情動状態とその個体差の評価
3. 学会等名 シンポジウム2「感情の評価:多彩な方法を極める」:第40回日本生理心理学会大会・日本感情心理学会第30回大会 合同大会2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桑木共之、菅野康太
2. 発表標題 マウスの快情動を定量化する方法
3. 学会等名 第44回神経科学大会（日本神経科学学会）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蘭子国、大隅典子、菅野康太
2. 発表標題 母胎内における妊娠期・授乳期の長期的SSRI曝露は仔マウスの音声行動およびセロトニンニューロン形成に影響する
3. 学会等名 第44回神経科学大会（日本神経科学学会）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

菅野研究室HP https://cannonolab.com Vocal Communication Japan https://sites.google.com/view/vocalcommuj/home 鹿児島大学研究者総覧 http://ris.kuas.kagoshima-u.ac.jp/html/100006503_ja.html Researchmap https://researchmap.jp/can-no/?lang=ja

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	奥野 浩行 (Okuno Hiroyuki) (80272417)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------