



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	雌マウスの同系統雄に対する忌避行動における鋤鼻系とエストロゲンの寄与
Author(s)	矢野, 沙織
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第12179号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12179
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62806
Type	doctoral thesis
File Information	Saori_Yano.pdf



雌マウスの同系統雄に対する忌避行動における
鋤鼻系とエストロゲンの寄与

矢野 沙織

目次

緒論	1
1. 雌による繁殖相手の選択.....	1
2. 匂いコミュニケーションと鋤鼻系.....	2
3. エストロゲンと繁殖相手選択.....	4
4. 本研究の目的	5
材料および方法	7
1. 実験動物	7
2. 発情周期の判定	7
3. エストラジオール投与.....	8
4. エストラジオール濃度測定.....	9
5. 鋤鼻器切除	9
6. 尿サンプル	11
7. Y 字迷路による行動実験.....	11
8. 尿暴露	13
9. 免疫染色	14
10. 有意差検定	15
結果	20
1. BALB/c 雌マウスによる匂い選択性.....	20
2. C57BL/6 雌マウスによる匂い選択性.....	20
3. 同系統の雄に対する忌避性.....	21
4. 匂い選択性に及ぼすエストロゲンの効果.....	22

5. 匂い選択性に対する鋤鼻系の寄与.....	23
6. エストロゲンの鋤鼻系に及ぼす効果.....	23
考察	37
1. 遺伝的に近縁な雄に対する雌の忌避行動は鋤鼻器での尿の匂いの受容を介して起こる	37
2. エストロゲンは遺伝的に近縁な雄に対する雌の忌避性を増強する	38
3. エストロゲンの鋤鼻系への作用.....	39
4. まとめ	41
総括	43
謝辞	46
参考文献	47
英文抄録	54

緒論

1. 雌による繁殖相手の選択

多くの動物種において雌は繁殖相手を選択するが、雌による選択は雄によるそれと比較して繁殖の成功に重要な意味を持つとも言えるかもしれない。なぜならば、卵細胞形成のエネルギーは精子形成と比較して大きい上 (Janetos, 1980)、多くの種の雌では繁殖期中の交配可能な時期や回数は雄に比べて限られている (Uy et al., 2001)。さらに哺乳類では子の授乳、養育にもエネルギーを要し、一生涯に残し得る子の数は雄と比べて限られている。そのため、雄では多くの子を産することが繁殖の成功につながるのに対し、雌では環境適応能に優れ、生き残る可能性の高い子を得ることが有効な繁殖戦略となり得る。雌が繁殖相手を選択する際、雄特有の体色、かざりや求愛行動等の視覚刺激、求愛歌等の聴覚刺激、尿、汗、涙等の分泌物による嗅覚刺激が選択の手掛かりとなっており、このような感覚刺激を介した選択は魚類、両生類、鳥類、哺乳類の幅広い生物種で確認されている (Asaba et al., 2014; Kavaliers et al., 2004; Milinski et al., 2005; Mossman and Drickamer, 1996; Schwartz et al., 2001; Sherborne et al., 2007; Wedekind et al., 1995)。雌はこれらを手掛りとして、年齢、寄生虫や感染症の有無、繁殖能力、社会的地位等の繁殖相手候補の情報を得ると考えられている (Hamilton and Zuk, 1982; Kennedy et al., 1987; Wedekind et al., 1995)。そして健康で繁殖能力の高い雄と交尾することによって、より生存能と繁殖能の高い子孫を得ることが可能となる。

近親交配の回避もまた繁殖において重要な課題である。近親交配が避けられることで、子孫の遺伝的多様性が維持され、環境適応能が向上し、劣性遺伝疾患の発生を抑制できる。実際に近親交配の回避は昆虫、鳥類、マウスやヒトを含む哺乳類まで幅広い種で示唆されており (Pusey and Wolf, 1996; Wedekind et al.,

1995)、その概要を知る目的で様々な実験が行われている。哺乳類の近親交配の研究には、系統の種類が充実しており行動実験も行いやすいマウスが主な研究対象として用いられている。多数のマウスを人工的フィールドで飼育した実験では、ヘテロ接合体を持つ個体が予測値よりも有意に多く生まれるという結果が得られている (Potts et al., 1991)。この結果は、マウスが何らかの手段により遺伝的に近縁な個体を避けることで、近親交配が防がれていることを示唆している。

2. 匂いコミュニケーションと鋤鼻系

マウスの種内コミュニケーションにおいて、特に重要な役割を果たすのは匂いである。例えば雄マウスは尿の匂いを嗅ぐことで、雌のわずかな遺伝的差異を識別することができ、遺伝的に近縁な雌を避ける (Beauchamp et al., 1988; Yamazaki et al., 1979)。一方、雌マウスの場合は近親交配の回避が行われていることを示唆する研究は存在するものの (Potts et al., 1991; Roberts and Gosling, 2003; Sherborne et al., 2007)、それが匂いを介して行われていることを示す決定的な報告はない。

匂いコミュニケーションにおいて、鋤鼻系は重要な役割を担っている (Munger et al., 2009)。鋤鼻系は鋤鼻器、副嗅球、そして内側扁桃体、分界条床核、視床下部内側視索前野等の領域から成る。鋤鼻器は鼻中隔に沿って存在する左右一対の管状の組織で、鋤鼻腔を挟んで感覚上皮と非感覚上皮が向き合っている。感覚上皮管腔側には鋤鼻神経の樹状突起が整列しており、先端には微絨毛が存在する。微絨毛膜には鋤鼻受容体が発現しており、ここに化学物質が結合することで鋤鼻神経が興奮する。そのシグナルは軸索を通じて嗅球の背尾側に位置する副嗅球へと送られる。鋤鼻神経の軸索は副嗅球の糸球体層で僧帽細胞の樹状突起とシナプスを形成し、僧帽細胞へとシグナルを伝達する。僧帽細胞

の樹状突起は顆粒細胞の樹状突起と相反性シナプスを形成している。僧帽細胞からのグルタミン酸放出を受けて顆粒細胞は興奮し、 γ -アミノ酪酸 (GABA) の放出によって僧帽細胞の興奮を抑制する。僧帽細胞は大腦皮質を介さず内側扁桃体に直接軸索を伸ばし、シグナルは最終的に分界条床核や視床下部内側視索前野、視床下部腹内側核等に伝達され、内分泌系や自律神経系が制御される。同種他個体の神経系や内分泌系に作用し、行動や生理機能に特定の反応を引き起こす匂い物質のことをフェロモンと呼ぶが、一般的にフェロモンの受容は鋤鼻器で行われるとされている。鋤鼻器を切除すると、疾病個体に対する忌避行動 (Boillat et al., 2015)、ロードシス発現促進 (Haga et al., 2010; Keller et al., 2006)、雄の匂いによる雌の発情誘起 (Oboti et al., 2011) 等のフェロモンに対する反応が消失する。このように、鋤鼻系は匂いを介した種内コミュニケーションにおいて重要な位置を占める。もし近親交配の回避もまた匂いを介して起きているとするならば、その匂いの受容に鋤鼻系が関与している可能性が大きい。

鋤鼻神経は、発現する受容体とそれに共役する G タンパク質の種類により大きく 2 種類に分類される (Munger et al., 2009)。一方は $G_{\alpha 2}$ 共役型の V1R 受容体を発現し、感覚上皮の粘膜層側に分布する。これらの鋤鼻神経は一般的に揮発性の化学物質を受容する (Del Punta et al., 2002; Munger et al., 2009)。他方は $G_{\alpha o}$ 共役型の V2R 受容体を発現し感覚上皮基底側に分布する鋤鼻神経群で、主にペプチドやタンパク質などの不揮発性物質を受容する (Haga et al., 2010; Leinders-Zufall et al., 2004; Munger et al., 2009)。これらの鋤鼻神経群の投射先である副嗅球内においても、その分布は明瞭に分かれており、V1R 発現鋤鼻神経群は副嗅球の吻側に、V2R 発現鋤鼻神経群は副嗅球尾側に投射する。結合する化学物質の種類が異なること、およびその投射域が分かれていることから、これら 2 種の鋤鼻神経は匂いの受容と、それにより引き起こされる行動や生理機能上の反応において異なる働きをしていると推察される。

3. エストロゲンと繁殖相手選択

雌の行動は発情周期に伴う体内のホルモン濃度の変動により変化する (McEwen and Alves, 1999)。例えば、発情期の雌マウスは雄に乗駕されるとロードシスを示すが、非発情期の雌は示さない (Beach, 1976)。このような性行動の発現には卵巣から分泌される性ホルモンが必須であり、エストロゲンやプロゲステロンの投与により非発情期の雌に発情期特有の行動を誘発することが可能である (McEwen and Alves, 1999; Whalen, 1974)。同様に、匂いを介した繁殖相手の選択にも発情周期や性ホルモンが関与することが示唆されている。一例として、雌マウスは社会的地位の低い雄より高い雄を好むが、この性質は非発情期には観察されない (Mossman and Drickamer, 1996)。また、去勢雄より未処置の雄の匂いを好むという性質は卵巣を摘出された雌ラットでは観察されなくなるが、卵巣摘出後にエストロゲンとプロゲステロンを投与することでこの選択性が再現される (Xiao et al., 2004)。これらの報告は、匂い選択性の発現が発情周期に依存することを示唆するが、一方で雌マウスは幼若な雄より成熟した雄の匂いに対して常に関心を示すように (Mossman and Drickamer, 1996)、発情周期に依存しない選択性も存在する。

エストロゲンなどの性ホルモンは鋤鼻系に対して影響を及ぼすことも知られている。性ホルモンやその代謝物自体が匂い物質として鋤鼻神経を興奮させる他 (Turaga and Holy, 2012)、他の匂い物質に対する鋤鼻神経の感受性を調節する機能も報告されている (Cherian et al., 2014; Dey et al., 2015; Halem et al., 2001)。最初期遺伝子産物 c-Fos の発現解析によって鋤鼻神経の匂いに対する応答性を検証した実験では、エストロゲンの投与によって雄の匂いに応答する鋤鼻神経の数が増加することが示されている (Halem et al., 2001)。鋤鼻器だけでなく、鋤鼻系のより中枢に性ホルモンが作用する可能性も考えられる。例えば、扁桃体や

視床下部は、自律神経系、内分泌系、性行動、情動を制御する領域であり、これらの領域には性ホルモン受容体を持つ神経が多数分布している (Yang and Shah, 2014)。また鋤鼻系の一次中枢である副嗅球では、抑制性神経とシナプスを形成することにより、中枢に送られるシグナル強度が調節され、内分泌系、行動等の匂いに対する反応性に影響する。副嗅球のシナプス可塑性は匂いの記憶に強く関わっており、雄の繁殖相手の選択性には幼少期の匂い記憶が影響することから (Ichikawa, 2003)、現時点では性ホルモンによる副嗅球への直接作用を示唆する報告はないものの、雌の繁殖相手選択について調べる上でも注目すべき領域である。

4. 本研究の目的

そこで本研究では、匂いコミュニケーションに着目し、雌マウスが遺伝的に近縁な雄を忌避するメカニズムを明らかにすることを目的とした。まず、2系統の雌を用いた行動実験により、雌マウスが遺伝的に近縁な雄を忌避する行動が雄マウスの尿の匂いによって引き起こされるか否かを検証した。続いて、卵巣摘出雌マウスにエストロゲンを投与し行動解析を行うことで、この忌避行動とエストロゲンの関連性について検討した。さらに、鋤鼻器を摘出した雌マウスの行動解析により、この忌避行動への鋤鼻系の寄与を検討した。最後に、エストロゲンを投与した雌マウスの鋤鼻器と副嗅球での神経興奮を評価することで、鋤鼻系のどの領域がエストロゲンによって調節されているか探索を行った。

なお本成績は、以下の二編の原著論文として公表されている。

- 1) Yano, S., Sakamoto, K.Q., Habara, Y., 2012. Estrus cycle-related preference of BALB/c female mice for C57BL/6 males is induced by estrogen. J Vet Med Sci 74, 1311-1314.

- 2) Yano, S., Sakamoto, K.Q., Habara, Y., 2015. Female mice avoid male odor from the same strain via the vomeronasal system in an estrogen-dependent manner. *Chem Senses* 40, 641-648.

材料および方法

1. 実験動物

本研究は、全て北海道大学大学院獣医学研究科において行う動物実験に関するガイドラインに従って実施された。また全ての動物実験に関するプロトコルは、同研究科動物実験委員会および国立大学法人北海道大学動物実験委員会の承認を受けた（動物実験許可番号：獣 1084, 獣 1123, 獣 13041）。

日本クレア（東京，日本）より購入した 10～37 週齢の BALB/cByJJcl (BALB/c)、C57BL/6JJcl (C57BL/6) マウスを実験に供した。全てのマウスは交尾経験を持たず、雌雄別のケージで飼育した。餌と水は自由摂取とし、室温 $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$ 、明期：暗期 12 時間：12 時間とし、明期開始を 7:00 に設定した。

2. 発情周期の判定

膣スメアの観察により雌の発情周期を判定した。以下に発情周期判定の手順を述べる。

- 1) 先端部を切り落とし、研磨した注射針にキムワイプ（日本製紙クレシア，東京，日本）を巻きつけ、これを生理食塩水に浸した後、膣に丁寧に挿入し数回回転させることで膣スメアを採取した。行動実験終了後、膣スメアの採取を 13:00～18:00 の間に行った。
- 2) 得られた膣スメアをスライドグラスに塗布し乾燥させた。これを 99.8%メタノールで 30 秒間固定し、2%ギムザ染色液（和光純薬，大阪，日本）で 40～50 分間染色した。その後流水で洗浄し、鏡検した。
- 3) 以下に示した組織学的特徴に基づき発情周期を判定した。

発情前期：膣スメア像は有核上皮細胞と角化上皮細胞で構成され、白血球は殆ど観察されない。

発情期：ほぼ全ての細胞が角化上皮細胞であり、ごく少数の有核上皮細胞

が観察される。白血球と粘液は見られない。

発情後期: 発情期の膣スメア像に似るが、白血球または粘液が混じる。

発情休止期: 多数の白血球と粘液が認められ、少数の有核上皮細胞と角化上皮細胞が混在する。

なお、一般に発情期とは交尾許容期のことを指すが、本研究では膣スメアの採取を明期に行ったため、ここで述べる膣スメアで判定した「発情期」とは交尾許容期が終了した直後の期間を指す。従って、本論文では上述の膣スメア法で判定された発情期を「膣スメア上の発情期」と表現した。

3. エストラジオール投与

血中エストラジオール濃度を制御する目的で、BALB/c 雌の卵巢を摘出し、所定量のエストラジオールを充填したシリコンチューブ (エストラジオールチューブ) を皮下に包埋した (Bronson, 1976; Dubal et al., 2001; Okada et al., 2005)。以下に手順を述べる。

- 1) エストラジオール-17 β (和光純薬) を 270 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で胡麻油 (ナカライテスク, 京都, 日本) に溶解し、溶液 15 μl をシリコンチューブ (内径: 1.5 mm, 外径: 2.5 mm, 長さ: 14 mm) に注入し、シリコン接着剤で密栓した。また、胡麻油のみを充填したシリコンチューブを作製し、コントロールチューブとして使用した。作製したエストラジオールチューブとコントロールチューブそれぞれを 37°C の生理食塩水に一晩浸漬した後使用した。
- 2) ペントバルビタール (ネンブタール; ホスピーラ, イリノイ州, アメリカ合衆国; 40 mg/kg b.w., i.p.) とイソフルラン (アボット, イリノイ州, アメリカ合衆国) による吸入麻酔下、またはケタミン (フジタ, 東京, 日本; 1 mg/kg b.w., i.p.) とメデトミジン (ドミツール; ゼノアック, 福島, 日本; 1 mg/kg b.w., i.p.) による麻酔下で、卵巢を摘出した。同時に、尾根部皮下にエストラジオー

ルチューブまたはコントロールチューブを移植した。ケタミンとメドトミジンによる麻酔を使用した場合は、覚醒のためにアチパメゾール (アンチセダン; ゼノアック; 1 mg/kg b.w., s.c.) を投与した。術後 3 日間、鎮痛と感染症予防のためにカルプロフェン (リマダイル; ファイザー, ニューヨーク州, アメリカ合衆国; 4 mg/kg b.w./day, s.c.) とアンピシリン (三共, 東京, 日本; 5 mg/kg b.w./day, s.c.) を投与した。

- 3) 術後 3 日目から腔スメアの観察を再開した。コントロールチューブ移植個体は多数の白血球と粘液を主とする腔スメア像を呈した。エストラジオールチューブ移植個体の腔スメアは多数の角化上皮細胞から成り、術後 7 日目から 9 日目にかけて徐々に粘液または白血球が出現し始めた。術後 4 日目から 6 日目にかけて行動実験を実施した。

4. エストラジオール濃度測定

エストラジオールチューブ移植個体から、移植後 1、2、4、6 日目に採血を行い、800 x g、10 分間の遠心分離により血清を得た。同様にコントロールチューブ移植個体からも、移植後 4 日目の血清を得た。使用時まで血清を-80℃で保存した。Estradiol EIA Kit (ケイマン, ミシガン州, アメリカ合衆国) を用いて血清エストラジオール濃度を測定した。

5. 鋤鼻器切除

5-1. 鋤鼻器切除術

BALB/c 雌 6 匹に鋤鼻器切除 (VNX) を、同雌 6 匹に偽手術を施した。ケタミン、メドトミジン麻酔下で、上口蓋を正中切開し、鋤鼻器を軟骨カプセルに包まれた状態で露出した。軟骨カプセルの吻側端をドリルで削り、尾側端を鋏で切り、丁寧に捻って軟骨カプセルと共に鋤鼻器を除去した後、上口蓋の切開部

を縫合した。偽手術群では、上口蓋を切開した後、鋤鼻器を切除することなく切開部を縫合した。術後、マウスを覚醒させ、術後 3 日間、鎮痛と感染症予防処置を行い、呼吸困難や出血が無いことを確認した。術後 3 週間後から行動実験を開始した。

5-2. 鋤鼻器切除の成否検証

行動実験が完了した後、鋤鼻器が完全に切除されていたか否かを組織学的に検証した。副嗅球の糸球体層には鋤鼻神経が投射しており、当該神経の軸索にはレクチンの一種である大豆アグルチニン (SBA) が結合する。この性質を利用して、西洋ワサビ標識大豆アグルチニン (SBA-HRP) 染色を副嗅球上で行い、染色の有無から切除の成否を判定した (Keller et al., 2006; Key and Giorgi, 1986)。副嗅球が SBA-HRP で染色されなければ、鋤鼻器が完全に切除されていたことを意味する。ケタミン、メドミジン麻酔下のマウスにリン酸緩衝バッファー (PBS) および固定液を順次経心的に注入した (灌流固定)。PBS の組成は、137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 8.1 mM Na₂HPO₄; 1.5 mM KH₂PO₄ (pH = 7.4) である。固定液として PBS に 4%の終濃度となるようパラホルムアルデヒド (和光純薬) を添加したものを使用した。得られた嗅球を固定液中に 1 晩浸漬し、PBS で洗浄した後、10% および 20% スクロース添加 PBS にそれぞれ 1 晩浸漬した。その後、嗅球を OCT コンパウンド (フナコシ, 東京, 日本) 内で凍結し、切片作製時まで -80°C で保存した。副嗅球を含む矢状面で 20 μ m の厚さに嗅球を薄切し、MAS コートスライドグラス (松浪硝子工業, 大阪, 日本) に張り付けた。3% ヤギ血清 (和光純薬) ・ 1% H₂O₂ 添加 PBS を滴下し、室温で 2 時間ブロッキング処理と内在性ペルオキシダーゼの不活化を行った。SBA-HRP (シグマ, ミズーリ州, アメリカ合衆国; 15 μ g/ml) 添加 PBS と 40 分間室温で反応させた後、0.5 mg/ml ジアミノベンジジン (シグマ) ・ 0.1% H₂O₂ 添加 PBS (DAB 溶液) を滴下し室温で 5 分間発色さ

せた。手順毎に切片を PBS に浸漬し、5 分間振盪することを 3 回繰返し洗浄した。光学顕微鏡で切片を観察し、染色の有無を判定した。

6. 尿サンプル

腹部マッサージにより C57BL/6 雄、BALB/c 雄、BALB/c 雌から新鮮尿を採取した。得られた尿サンプルを系統、性別毎に混合し、-18℃で保存し 3 ヶ月以内に使用した。対照となる尿ドナー個体の週齢、尿保存期間を一致させて使用した。

7. Y 字迷路による行動実験

7-1. 装置と実験手順

5 mm 厚の不透明黒色アクリル板を二塩化メチレンで接着して Y 字迷路 (アーム長: 50 cm, 幅: 10 cm, 高さ: 10 cm, 3 アーム) (Yamaguchi et al., 1981) を作製した (図 1)。2 mm 厚の無色透明アクリル板を蓋として用いた。1 本のアームの先端から約 20 cm の区画をスタート区画とし、取り外し可能なプラスチック製の網を仕切りとして設置した。他の 2 本のアームの先端から 10 cm の区画に尿サンプル 50~100 μ l を滴下した脱脂綿を配置し、マウスが直接接触できないようプラスチック製の網を仕切りとして設置した。この仕切りから 20 cm の区画を尿サンプル近傍区画とした。この 2 本のアームの先端に、送風ファンに接続したポリ塩化ビニル製ホースを挿入し、スタート区画のあるアーム先端の蓋に空気送出孔をあけ、尿サンプル側からスタート区画側へ送風した。

直射日光の入らない薄暗い部屋または簡易暗室内で 7:30 から 18:00 の間に行動実験を行った。被検体をスタート区画に導入し、1 分後に仕切りを取り外した。以降 10 分間の行動を目視観察、または赤外光照明下でのビデオ撮影により記録し、被検体の尿サンプル近傍区画滞在時間を計測した。1 トライアル毎に 70%エ

タノールで Y 字迷路全体を清拭し、温風で完全に乾燥させた。行動実験終了後、膣スメアの観察により被検体の発情周期を判定した。

7-2. 装置の有効性

Y 字迷路内でのマウスの行動に偏りが無いことを確かめるため、尿サンプルの代わりに 50~100 μ l の蒸留水を用いてコントロール実験を実施した。その結果、左右のアームのサンプル近傍区画滞在時間に有意な差は認められなかった (滞在時間: 左側区画: 152.4 ± 4.5 sec/trial, 右側区画: 144.2 ± 3.5 sec/trial, number of trials = 113, $n = 18$, $p > 0.05$, paired Student's *t*-test) (図 2)。さらに、以降の実験では 1 個体あたりの 1 日の実験回数を 2 回までとし、装置の構造に起因する想定外の因子が実験結果に影響を及ぼす可能性を最小限に抑えるため、2 回目の実験で使用する尿サンプルの位置は 1 回目の実験時のそれとは逆転させることとした。なお同じ個体を再度実験に用いる場合は、次の行動実験開始までに 15 分以上の間隔をあけた。

さらに、作製した Y 字迷路で、匂い物質に対する選択性の検出が可能であることを確認するため、「雄マウスは、雄の尿よりも雌の尿に対して嗜好性を示す (Pankevich et al., 2004)」という性質を利用して予備実験を行った。BALB/c 雄マウスを被検体とし、BLAB/c 雄および雌それぞれの尿を配置して Y 字迷路行動実験を行ったところ、雄マウスは雄尿サンプル近傍区画より雌尿サンプル近傍区画に有意に長時間滞在した (雄: 147.5 ± 12.9 sec/trial, 雌: 216.2 ± 12.8 sec/trial, number of trials = 15, $n = 3$, $p < 0.01$) (図 3)。過去の知見と一致する結果を得られたことから、本装置を用いて尿サンプル近傍区画滞在時間を指標としてマウスの匂い選択性を評価することが可能であると判断した。

7-3. D_{ratio} の算出

同系統の雄の匂いに対する忌避性の水準、すなわち忌避度を評価するため、異系統雄および同系統雄の尿サンプル近傍区画滞在時間から D_{ratio} を算出した (Boillat et al., 2015)。

$$D_{ratio} = \log_2 \frac{D_{dif}}{D_{same}}$$

D_{dif} は被検体とは異系統の雄由来の尿サンプル近傍区画滞在時間を示し、 D_{same} は被検体と同じ系統の雄由来の尿サンプル近傍区画滞在時間を示す。 $D_{ratio} = 0$ は、両サンプル近傍区画滞在時間が等しいことを意味する。 $D_{ratio} > 0$ は、同系統雄由来の尿サンプル近傍区画より異系統雄由来の尿サンプル近傍区画に長時間滞在したことを意味し、 $D_{ratio} < 0$ は異系統雄由来の尿サンプル近傍区画より同系統雄由来の尿サンプル近傍区画に長時間滞在したことを意味する。例えば $D_{ratio} = 0.3$ の時、異系統雄由来の尿サンプル近傍区画滞在時間は、同系統雄由来の尿サンプル近傍区画滞在時間の $2^{0.3}$ 倍、つまり約 1.23 倍であることを示す。

8. 尿暴露

卵巣摘出およびエストロゲンチューブ移植処置後 4 日目の BALB/c 雌に BALB/c 雄尿、C57BL/6 雄尿、蒸留水のいずれかを提示した。直接接触を防ぐため尿または蒸留水をしみこませた脱脂綿を直径 4.5 cm のティーボールに入れて未使用の飼育ケージ (縦: 20 cm, 横: 31 cm, 高さ: 17 cm) に配置し、被検マウスを導入した。4 匹または 5 匹の雌マウスを各条件で使用した。暴露開始から 90 分後、ケタミンとメデトミジンによる麻酔下で灌流固定し、鋤鼻器と脳を採材した。前述の手順で脳を固定、凍結保護、凍結を行った。鋤鼻器については、固定後 3 日間 5% EDTA・7%スクロース添加 PBS で脱灰処置した後に凍結保護、凍結を行った。

9. 免疫染色

Egr-1 や c-Fos は最初期遺伝子産物と呼ばれ、神経細胞において電位依存性カルシウムチャネルを介したカルシウムイオン流入などにより発現が誘導される (Sheng and Greenberg, 1990)。最初期遺伝子産物は数十分前の神経活動をよく反映するため、神経活動のマーカーとして利用される (Boillat et al., 2015; Isogai et al., 2011)。尿暴露により興奮した神経を評価するため、鋤鼻器と副嗅球において Egr-1 または c-Fos タンパク質の免疫染色を実施した。以下に実際の手順を示す。

鋤鼻器を冠状面で 20 μm 厚に薄切し、MAS コートスライドガラスに張り付けた。400 μm 毎に 1 枚、1 個体のマウスから 6-7 枚の左右一対の鋤鼻器切片を得、染色に供した。PBS で 10 分間 3 回洗浄した後、室温 2 時間のブロッキングを行った。ブロッキング溶液として 0.1% Triton X-100 添加 PBS (PBSx) に 7.5% ヤギ血清を添加したものを使用した。ブロッキング溶液を取り除いた後、一次抗体混合液を滴下し 4°C で 1 晩静置した。一次抗体混合液として、抗 Egr-1 ウサギ IgG (sc-189; サンタクルーズ, テキサス州, アメリカ合衆国; 1:250) と抗 G α_{i2} マウスモノクローナル IgG (05-1403; メルク, ダルムシュタット, ドイツ; 1:800) を 3% ヤギ血清添加 PBSx に加えたものを使用した。洗浄後、二次抗体混合液を滴下し室温で 30 分間反応させた。二次抗体混合液として、Rhodamine Red 標識抗ウサギ IgG ロバ抗体 (711-296-152; 和光純薬; 1:200) と FITC 標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (sc-2010; サンタクルーズ; 1:200) を 3% ヤギ血清添加 PBSx に加えたものを使用した。洗浄後、DAPI (フナコシ; 1:2000) 添加 PBS で核を染色し、封入した。特に記載のない場合、切片を PBS に浸漬し 5 分間振盪することを 3 度繰り返すことで洗浄を行った。

嗅球の左右いずれかを使用し、副嗅球を含む矢状面で 20 μm 厚に薄切し、PBSx 中に浮遊させた。100 μm 毎に 1 枚、1 個体のマウスから 3-4 枚の切片を得た。

PBSx で 10 分間の洗浄を 3 回行った後、7.5%ヤギ血清添加 PBSx で室温 2 時間のブロッキング処理を行った。ブロッキング溶液を取り除いた後、抗 c-Fos ウサギ IgG (Ab5, メルク; 1:16000)、3%ヤギ血清を加えた PBSx を滴下し 4℃で 1 晩静置した。洗浄後、Biotin 標識ウサギ IgG ヤギ抗体 (ABC Elite kit; フナコシ; 1:200)、3%ヤギ血清を加えた PBSx を滴下し、室温で 30 分間反応させた。洗浄後、室温で 1 時間アビジン、ビオチン標識ペルオキシダーゼ混合液 (ABC Elite kit) と反応させることで増感し、洗浄後 DAB 溶液を 4 分間加えて発色させた。続いて抗 G_{ai2} マウスモノクローナル IgG (05-1403; メルク; 1:800)、3%ヤギ血清を加えた PBSx と室温で 2 時間反応させ、洗浄後、FITC 標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (sc-2010; サンタクルーズ; 1:200) および 3%ヤギ血清添加 PBSx と室温で 30 分間反応させた。浮遊切片を MAS コートスライドグラスに貼り付け、封入した。上記の手順において洗浄の方法について特に記載のない場合、浮遊切片を PBSx に浸漬し 5 分間振盪することを 3 度繰り返すことで洗浄を行った。

切片をオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-9000; キーエンス, 大阪, 日本) で鏡検した。鋤鼻感覚上皮を G_{ai2} 陽性、陰性の 2 領域に、副嗅球の僧帽細胞層と顆粒細胞層を糸球体層の G_{ai2} 陽性神経の投射域から吻側、尾側の 2 領域に分け、盲検的に Egr-1 または c-Fos 陽性細胞を計数し、単位面積あたりの陽性細胞数を求めた。Egr-1 または c-Fos 陽性細胞数の増減を、各部位の興奮性の増減とみなし、エストロゲンが鋤鼻系の興奮性に及ぼす効果を評価した。

10. 有意差検定

行動実験において、被検体が一方の尿サンプル近傍区画に長時間滞在し続け移動しない現象がまれに観察された。一方の区画滞在時間と他方の区画滞在時間との差が 5 分以上の場合を非典型的な行動としてデータ解析から除外した (全 681 トライアル中 10 トライアル)。全てのデータを平均値 ± 標準誤差で表示

した。R ver. 2.12.0 (R Development Core Team, 2010) を用いて有意差検定を行った。行動実験において、各尿サンプル近傍区画滞在時間の比較には **paired Student's *t*-test** を用いた。 D_{ratio} の比較には **Welch's *t*-test** を用いた。Egr-1 および c-Fos 陽性細胞数の比較には **Student's *t*-test** を用いた。全ての検定において、 $p < 0.05$ のとき有意差ありと判定した。

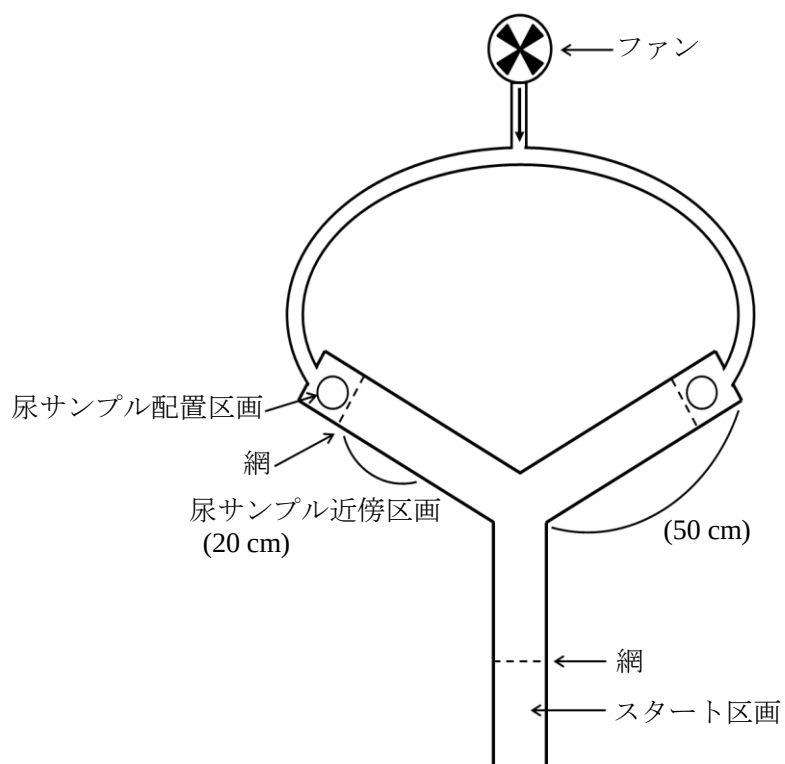


図1. Y字迷路模式図

行動実験に用いた Y 字迷路を模式図で示す。尿サンプル 50~100 μl を滴下した脱脂綿を左右 2 アームの先端区画に配置した。

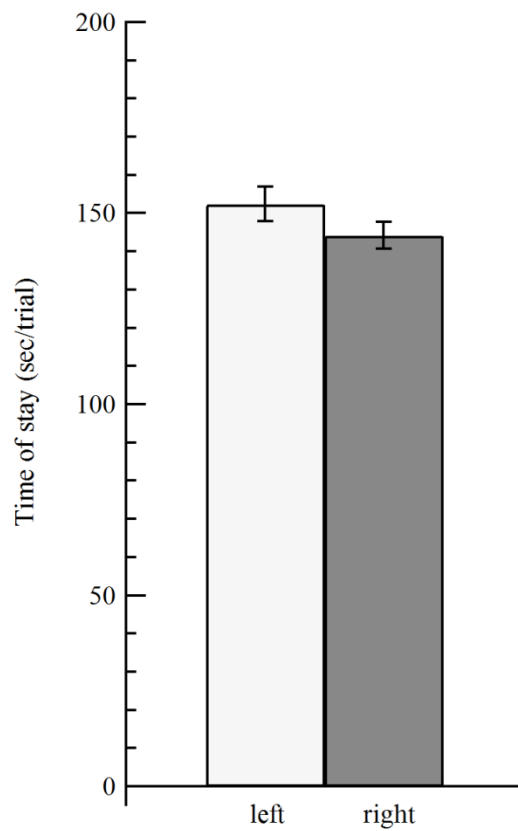


図2. Y 字迷路コントロール実験

Y 字迷路の左右尿サンプル配置区画に蒸留水を配置し、BALB/c 雌を被検体としてコントロール実験を行った際の尿サンプル近傍区画の滞在時間を示した (number of trials = 113)。白色カラムは左側区画、灰色カラムは右側区画の滞在時間を示し、バーは標準誤差を示す。

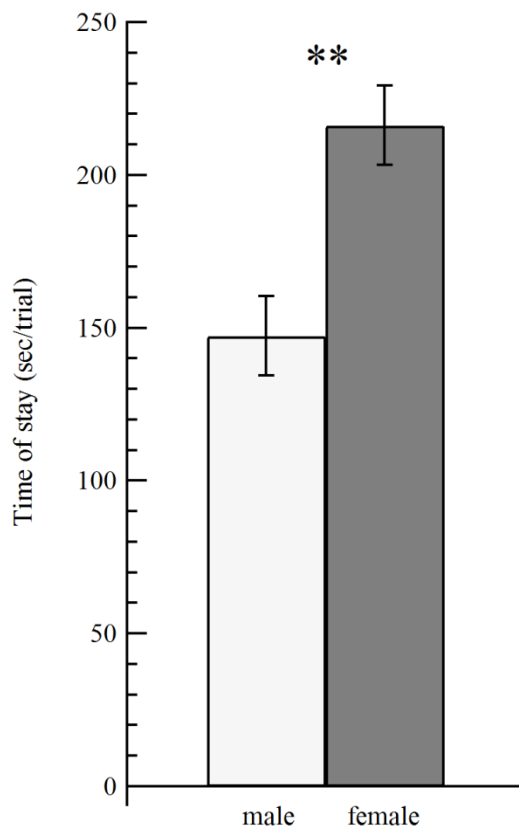


図3. 雄マウスを被検体とした Y 字迷路コントロール実験

Y 字迷路実験の有効性を検討するため、左右尿サンプル配置区画に BALB/c 雌と BLAB/c 雄の尿を配置し、BALB/c 雄を被検体としてコントロール実験を行った際の尿サンプル近傍区画の滞在時間を示した (number of trials = 15)。白色カラムは雄の尿近傍区画、灰色カラムは雌の尿近傍区画の滞在時間を示し、バーは標準誤差を示す。** は雄の尿と 雌の尿との間で paired Student's *t*-test を行い、 $p < 0.01$ で有意差があったことを示す。

結果

1. BALB/c 雌マウスによる匂い選択性

BALB/c 雌マウスの匂い選択性を調べるため、BALB/c 雄と C57BL/6 雄の尿を尿サンプルとして配置し、BALB/c 雌 18 匹を被検体として Y 字迷路行動実験を行った。全 89 トライアルにおける尿近傍滞在時間を比較したところ、C57BL/6 雄の尿近傍滞在時間は BALB/c 雄の尿近傍滞在時間と比較して有意に長かった (BALB/c: 138.3 ± 3.8 sec/trial, C57BL/6: 158.6 ± 4.5 sec/trial, $p < 0.01$)。

次に、膣スメアの観察により判定した発情周期毎にこの結果を分類し、雄の尿の匂いに対する選択性と発情周期との関連性を検討した (図 4)。膣スメア上の発情後期、発情休止期、発情前期には、C57BL/6 雄の尿近傍滞在時間が BALB/c 雄の尿近傍滞在時間と比較して有意に長かった (発情後期: BALB/c: 127.1 ± 6.8 sec/trial, C57BL/6: 150.4 ± 8.0 sec/trial, number of trials = 21, $p < 0.05$; 発情休止期: BALB/c: 138.2 ± 5.3 sec/ trial, C57BL/6: 159.4 ± 5.3 sec/trial, number of trials = 26, $p < 0.01$; 発情前期: BALB/c: 137.2 ± 5.5 sec/trial, C57BL/6: 170.0 ± 8.3 sec/trial, number of trials = 24, $p < 0.01$)。これに対して、膣スメア上の発情期では BALB/c 雄と C57BL/6 雄の尿近傍での滞在時間に有意な差は認められなかった (BALB/c: 151.3 ± 12.5 sec/trial, C57BL/6: 152.4 ± 13.9 sec/trial, number of trials = 18, $p > 0.05$)。

2. C57BL/6 雌マウスによる匂い選択性

膣スメア上の発情後期から発情前期にかけて、BALB/c 雌は BALB/c 雄の尿より C57BL/6 雄の尿近傍に長時間滞在した。この選択性が同系統雄忌避によるものであるか否かを確認するため、被検体として C57BL/6 雌 12 匹を用いて反対実験を実施したところ、C57BL/6 雌の選択性もまた発情周期に応じて変化してい

た (図 5)。しかし、膣スメア上の発情後期、発情休止期、発情前期には、C57BL/6 雄と BALB/c 雄の尿近傍での滞在時間に有意な差が認められなかった (発情後期: C57BL/6: 156.4 ± 6.4 sec/trial, BALB/c: 167.3 ± 6.4 sec/trial, number of trials = 28, $p > 0.05$; 発情休止期: C57BL/6: 182.7 ± 9.4 sec/trial, BALB/c: 175.3 ± 10.2 sec/trial, number of trials = 32, $p > 0.05$; 発情前期: C57BL/6: 180.1 ± 10.6 sec/trial, BALB/c: 172.9 ± 8.0 sec/trial, number of trials = 32, $p > 0.05$)。また膣スメア上の発情期には、異系統 BALB/c 雄の尿近傍より同系統 C57BL/6 雄の尿近傍に有意に長時間滞在していた (C57BL/6: 202.4 ± 11.0 sec/trial, BALB/c: 158.4 ± 8.7 sec/trial, number of trials = 33, $p < 0.05$)。

3. 同系統の雄に対する忌避性

C57BL/6 雌を被検体とした行動実験において、尿近傍滞在時間の単純比較では、発情後期から発情前期にかけても C57BL/6 雄の尿と BALB/c 雄の尿近傍滞在時間に有意な差は認められなかった。しかしながら、 D_{ratio} について比較すると、膣スメア上の発情期の値が膣スメア上の発情後期から発情前期にかけての値に比較して小さい傾向があった (図 6)。BALB/c 雌の行動実験の結果も再検討したところ、C57BL/6 雌を被検体とした場合と同様に、膣スメア上の発情期の D_{ratio} が膣スメア上の発情後期から発情前期にかけての D_{ratio} と比較して小さい傾向が見られた (図 6A)。膣スメア上の発情後期から発情前期にかけて血中エストロゲン濃度は上昇傾向にあり、膣スメア上の発情期には低下することから (Walmer et al., 1992)、行動実験の結果を、膣スメア上の発情後期から発情前期 (phase M-P) および膣スメア上の発情期 (phase E) に再分類し比較した。その結果、C57BL/6 雌による同系統雄に対する忌避度が、phase M-P より phase E で有意に低下することが判明した (D_{ratio} ; phase E: -0.36 ± 0.14 , phase M-P: -0.01 ± 0.07 , $p < 0.05$) (図 6B)。BALB/c 雌においても同様の結果が得られ、phase E の同系統

雄忌避度は phase M-P の忌避度より有意に低かった (D_{ratio} ; phase E: -0.03 ± 0.10 , phase M-P: 0.25 ± 0.05 , $p < 0.05$) (図 6B)。

4. 匂い選択性に及ぼすエストロゲンの効果

雌の匂い選択性が発情周期依存性に変化したことから、匂い選択性とエストロゲンの関連性に着目し、血中エストラジオール濃度制御下で行動実験を行った。まず、卵巣摘出およびエストラジオールチューブ移植後の血清エストラジオール濃度を測定した (図 7)。エストラジオールチューブ移植群 (エストラジオール群: $n = 3$) の翌日の血清エストラジオール濃度は 76.3 ± 8.8 pg/ml と高値であったが、時間経過とともに血清エストラジオール濃度が低下し、行動実験を開始した 4 日目では 48.6 ± 4.7 pg/ml、6 日目は 29.7 ± 2.0 pg/ml であり、発情周期のエストラジオール濃度が高い時期の値 (Nelson et al., 1981; Walmer et al., 1992) と近い濃度であった。一方、卵巣摘出後胡麻油のみを充填したチューブを移植したコントロール群 ($n = 3$) では、行動実験を開始した 4 日目の時点で 7.4 ± 2.5 pg/ml であった。この濃度は交尾許容期終了時のエストラジオール濃度 (Nelson et al., 1981; Walmer et al., 1992) と類似している。

エストラジオールチューブ移植後 4 日目から 6 日目に行った行動実験において、エストラジオール群の BALB/c 雌は、同系統の BALB/c 雄より異系統の C57BL/6 雄の尿近傍に長時間滞在した (BALB/c: 144.7 ± 7.8 sec/trial, C57BL/6: 175.4 ± 10.4 sec/trial, number of trials = 29, $n = 5$, $p < 0.05$) (図 8A)。コントロール群では、両尿近傍での滞在時間に有意な差は認められなかった (BALB/c: 157.1 ± 8.1 sec/trial, C57BL/6: 150.4 ± 8.5 sec/trial, number of trials = 30, $n = 5$, $p > 0.05$) (図 8A)。また、 D_{ratio} を算出して比較したところ、エストラジオール群の D_{ratio} よりコントロール群の D_{ratio} が有意に低かった (D_{ratio} ; エストラジオール群: 0.26 ± 0.12 , コントロール群: -0.08 ± 0.11 , $p < 0.05$) (図 8B)。

5. 匂い選択性に対する鋤鼻系の寄与

同系統雄忌避と鋤鼻系の関連を調べるため、鋤鼻器を切除した BALB/c 雌 (鋤鼻切除群: $n = 6$, 偽手術群: $n = 6$) を被検体として行動実験を行った。偽手術群 (図 9A) では未処置雌 (図 4) と類似した行動が観察され、膣スメア上の発情後期から発情前期にかけて、同系統雄の尿近傍より異系統雄の尿近傍に長時間滞在した (発情後期: BALB/c: 117.3 ± 4.9 sec/trial, C57BL/6: 134.6 ± 5.9 sec/trial, number of trials = 38, $p < 0.05$; 発情休止期: BALB/c: 103.5 ± 5.5 sec/trial, C57BL/6: 123.5 ± 5.2 sec/trial, number of trials = 34, $p < 0.05$; 発情前期: BALB/c: 111.9 ± 6.8 sec/trial, C57BL/6: 138.3 ± 6.9 sec/trial, number of trials = 28, $p < 0.05$)。これに対して鋤鼻切除群では全発情周期において各尿近傍滞在時間に有意な差は認められなかった (図 9B)。 D_{ratio} についても、偽手術群の膣スメア上の発情期の同系統雄忌避度は膣スメア上の発情後期、発情休止期、発情前期と比較して小さい傾向が見られ (図 10A)、phase E の同系統雄忌避度は phase M-P と比較して有意に小さかった (D_{ratio} ; phase E: 0.03 ± 0.10 , phase M-P: 0.28 ± 0.07 , $p < 0.05$) (図 10B)。これに対し鋤鼻切除群の同系統雄忌避度については、phase E と phase M-P 間で有意な差は認められなかった (図 10C, D)。

行動実験完了後、鋤鼻器が完全に切除されているか否かを確認するため、副嗅球の SBA-HRP 染色を行った。偽手術群の副嗅球には、SBA-HRP により染色された糸球体層が確認されたのに対し、鋤鼻切除群全てで糸球体層が完全に脱落していた (図 11)。この結果は、鋤鼻切除群全てにおいて鋤鼻器が完全に切除されていたことを示す。

6. エストロゲンの鋤鼻系に及ぼす効果

鋤鼻系のどの部位にエストロゲンが作用するのかを調べるため、卵巣摘出後エ

ストラジオールチューブを移植した BALB/c 雌を雄の尿または蒸留水の匂いに暴露し、最初期遺伝子産物 Egr-1 または c-Fos の発現を部位毎に評価した。鋤鼻器では、エストラジオール群とコントロール群の間で Egr-1 陽性細胞数に有意な差は見られなかった (図 12, 13)。これに対して副嗅球では、同系統雄の尿に暴露した後の c-Fos 陽性細胞数がエストラジオール処置された雌で増加していた (図 14, 15)。特に僧帽細胞層において、c-Fos 陽性細胞が有意に増加した (c-Fos 陽性細胞数/0.1 mm²; 吻側; コントロール群: 23.6 ± 4.2, エストラジオール群: 50.1 ± 9.7, $p < 0.05$, 尾側; コントロール群: 18.9 ± 1.7, エストラジオール群: 33.7 ± 3.5, $p < 0.05$) (図 15A, B)。顆粒細胞層においても、c-Fos 陽性細胞数はエストラジオール処置により増加傾向にあったが、有意差は認められなかった (図 15C, D)。同系統の雄の尿に暴露した場合とは対照的に、蒸留水や異系統の雄の尿に暴露した場合には、エストラジオール処置はいずれの領域でも c-Fos 陽性細胞数に影響を及ぼさなかった (図 15A-D)。

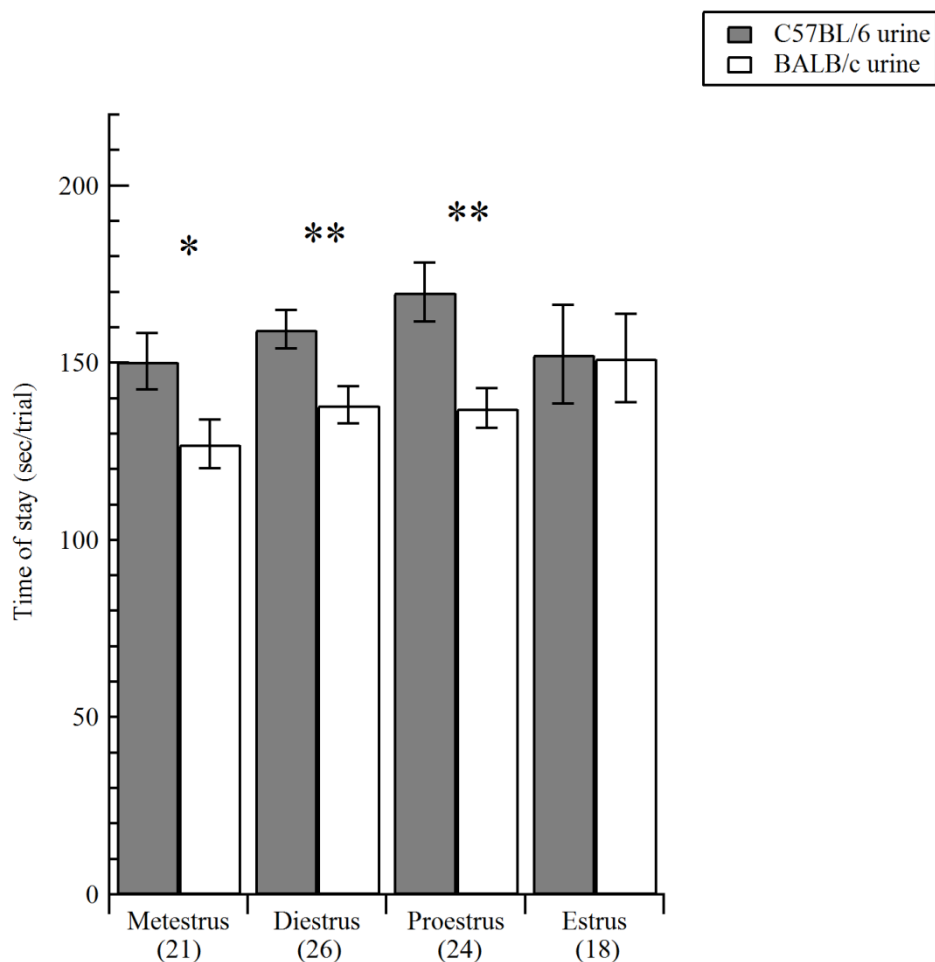


図4. BALB/c 雌による選択性の性周期依存性変化

BALB/c 雌を被検体とし、BALB/c 雄と C57BL/6 雄の尿を尿サンプル配置区画に配置して Y 字迷路行動実験を実施した。灰色カラムは C57BL/6 雄尿近傍区画、白色カラムは BALB/c 雄尿近傍区画に滞在した時間を示し、バーは標準誤差を示す。() 内の数字はトライアル数を示す。BALB/c 雄尿近傍区画滞在時間と C57BL/6 雄尿近傍区画滞在時間との間で paired Student's *t*-test を行った。* は $p < 0.05$ 、** は $p < 0.01$ で、BALB/c 雄尿と C57BL/6 雄尿との間に有意差があったことを示す。

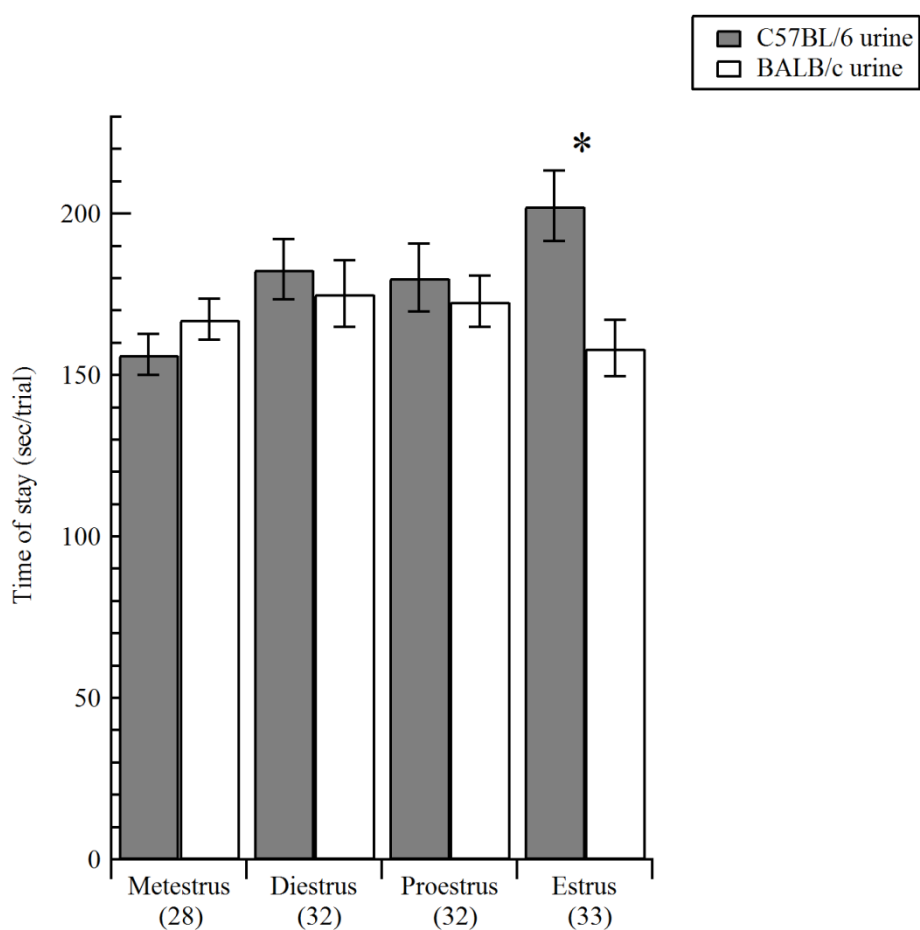


図5. C57BL/6 雌による選択性の性周期依存性変化

C57BL/6 雌を被検体とし、BALB/c 雄と C57BL/6 雄の尿を尿サンプル配置区画に配置して Y 字迷路行動実験を実施した。灰色カラムは C57BL/6 雄尿近傍区画、白色カラムは BALB/c 雄尿近傍区画に滞在した時間を示し、バーは標準誤差を示す。() 内の数字はトライアル数を示す。BALB/c 雄尿近傍区画滞在時間と C57BL/6 雄尿近傍区画滞在時間との間で paired Student's *t*-test を行った。* は BALB/c 雄尿と C57BL/6 雄尿との間に $p < 0.05$ で有意差があったことを示す。

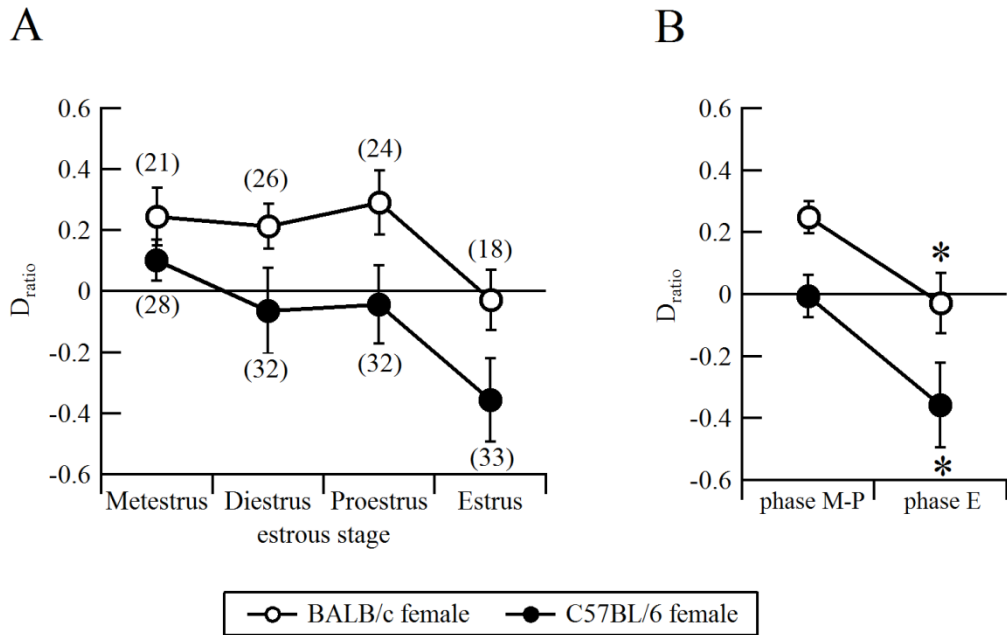


図6. BALB/c 雌、C57BL/6 雌を被検体としたときの D_{ratio} の変化

被検体と同系統の雄、異系統の雄尿近傍区画滞在時間からそれぞれ D_{ratio} を算出した。白円は BALB/c 雌を、黒円は C57BL/6 雌を被検体としたときの結果であり、バーは標準誤差を示す。 $D_{ratio} > 0$ は同系統雄より異系統雄の尿近傍に長時間滞在したことを示し、 $D_{ratio} < 0$ は異系統より同系統雄の尿近傍に長時間滞在したことを示す。(A) には各発情ステージ毎の D_{ratio} を示した。() 内の数字はトライアル数を示す。(B) には phase M-P と phase E に分類した後の D_{ratio} を示した。* は phase M-P と phase E との間で Welch's t -test を行い、 $p < 0.05$ で有意差があったことを示す。

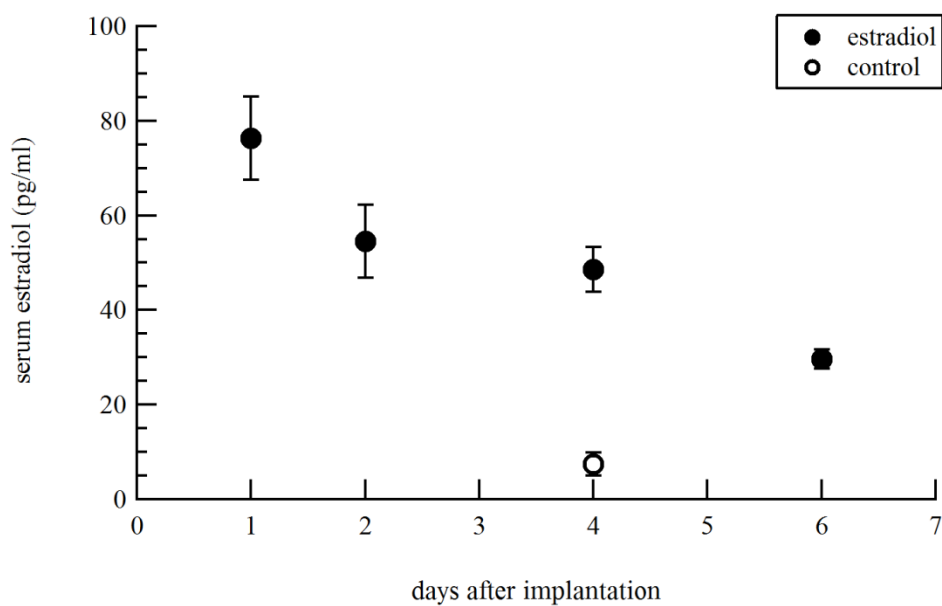


図7. エストラジオールチューブ移植後の血清エストラジオール濃度の変化

エストラジオールチューブまたはコントロールチューブ移植後の血清エストラジオール濃度を示す。縦軸はエストラジオール濃度、横軸はチューブ移植後の日数とした。黒円はエストラジオールチューブ移植後、白円はコントロールチューブ移植後の結果を示し、バーは標準誤差を示す。3個体からデータを得た。

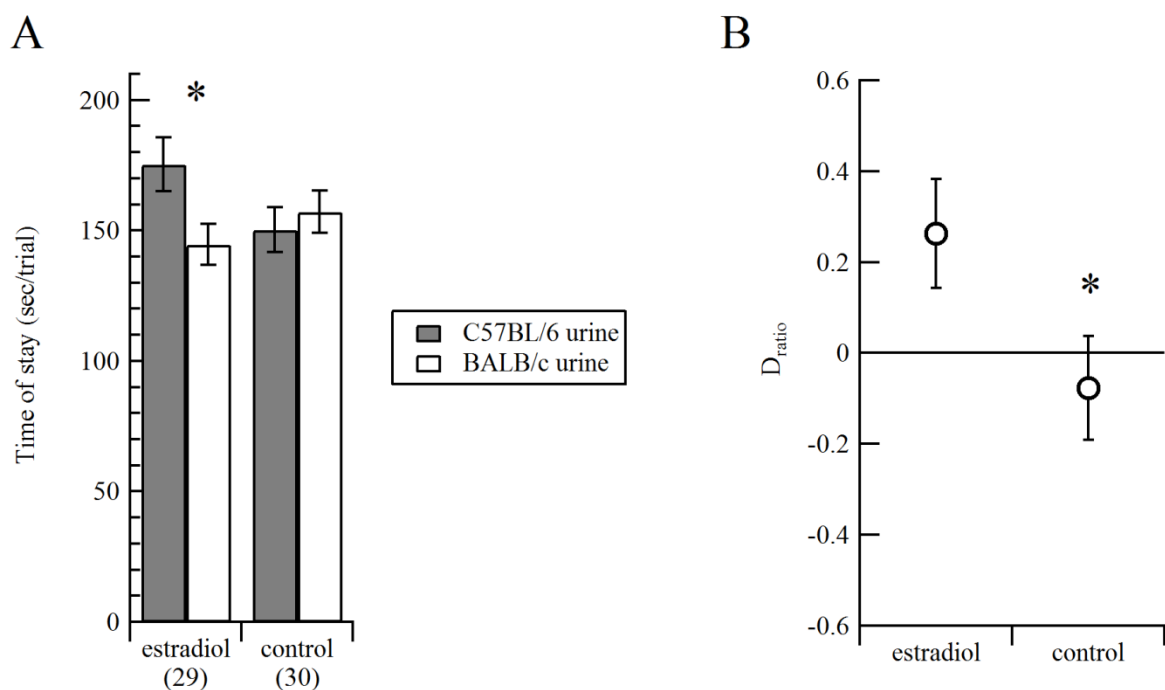


図8. エストラジオールチューブ移植後の BALB/c 雌の選択性

卵巣摘出 BALB/c 雌にエストラジオールチューブまたはコントロールチューブを移植し、移植後4日目から6日目に Y 字迷路行動実験を実施した。(A) 灰色カラムは C57BL/6 雄尿近傍区画、白色カラムは BALB/c 雄尿近傍区画に滞在した時間を示す。() 内の数字はトライアル数を示す。* は BALB/c 雄尿近傍区画滞在時間と C57BL/6 雄尿近傍区画滞在時間との間で paired Student's *t*-test を行い、 $p < 0.05$ で有意差があったことを示す。(B) 同系統、異系統雄尿近傍区画滞在時間から算出した D_{ratio} を示す。* はエストラジオール群とコントロール群との間で Welch's *t*-test を行い、 $p < 0.05$ で有意差があったことを示す。いずれのグラフにおいても、バーは標準誤差を示す。

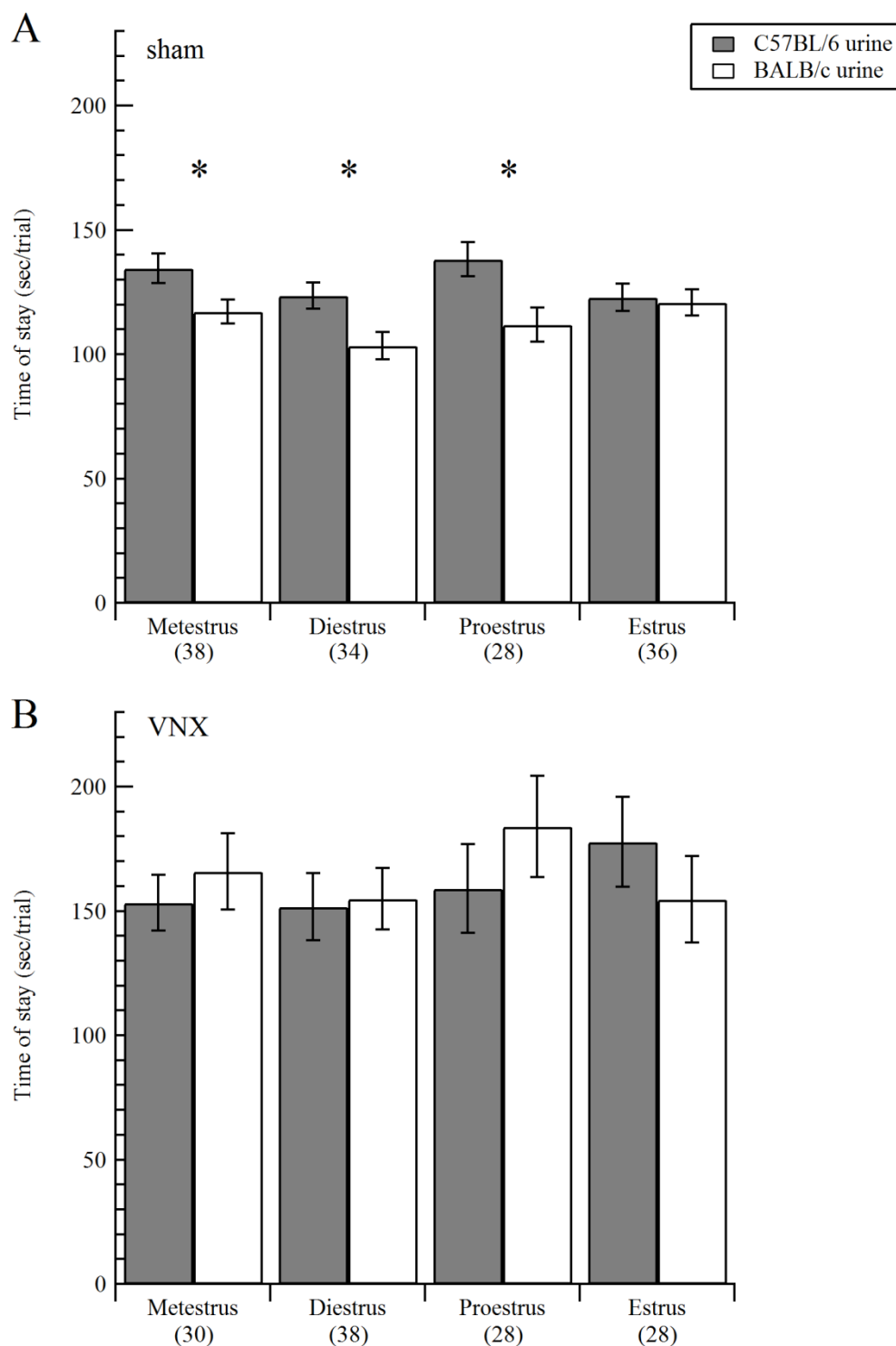


図9. 鋤鼻器切除後の BALB/c 雌の選択性

BALB/c 雌に偽手術 (A) または鋤鼻器切除術 (VNX) (B) を施した際の Y 字迷路行動実験の結果を示す。灰色カラムは C57BL/6 雄尿近傍区画、白色カラムは BALB/c 雄尿近傍区画に滞在した時間を示し、バーは標準誤差を示す。() 内の数字はトライアル数を示す。* は BALB/c 雄尿近傍区画滞在時間と C57BL/6 雄尿近傍区画滞在時間との間で paired Student's *t*-test を行い、 $p < 0.05$ で有意差があったことを示す。

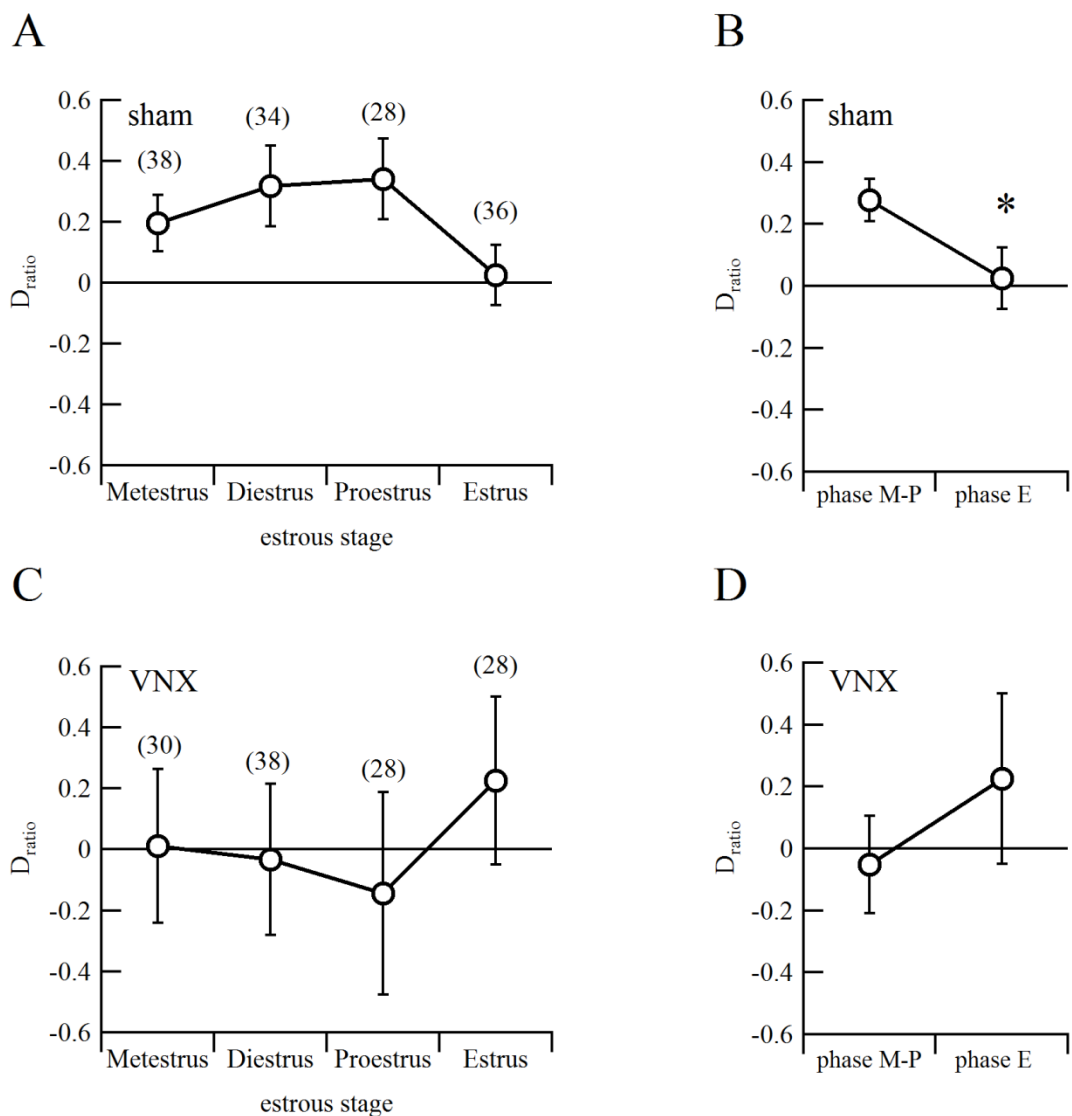


図10. 鋤鼻器切除後の BALB/c 雌の選択性

BALB/c 雌に偽手術 (A, B) または鋤鼻器切除術 (VNX) (C, D) を施した際の Y 字迷路行動実験の結果を示す。(A, C) には各発情ステージ毎の D_{ratio} を示した。(B, D) には phase M-P と phase E に分類した後の D_{ratio} を示した。バーは標準誤差を示す。() 内の数字はトライアル数を示す。* は phase M-P と phase E との間で Welch's *t*-test を行い、 $p < 0.05$ で有意差があったことを示す。

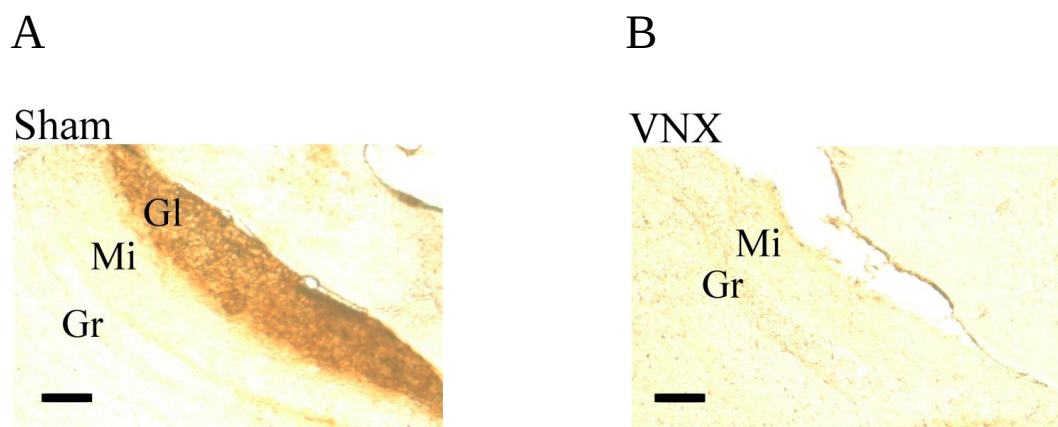


図11. 鋤鼻器切除後の副嗅球における SBA-HRP 染色像

鋤鼻器が完全に切除されたことを、副嗅球の SBA-HRP 染色により確認した。偽手術を施した個体の副嗅球 (A) では、糸球体層 (Gl) が確認されたのに対し、鋤鼻器を切除 (VNX) した個体の副嗅球 (B) では糸球体層が脱落していた。Gl、Mi、Grはそれぞれ糸球体層、僧帽細胞層、顆粒細胞層を示す。スケールバーは 100 μm 。

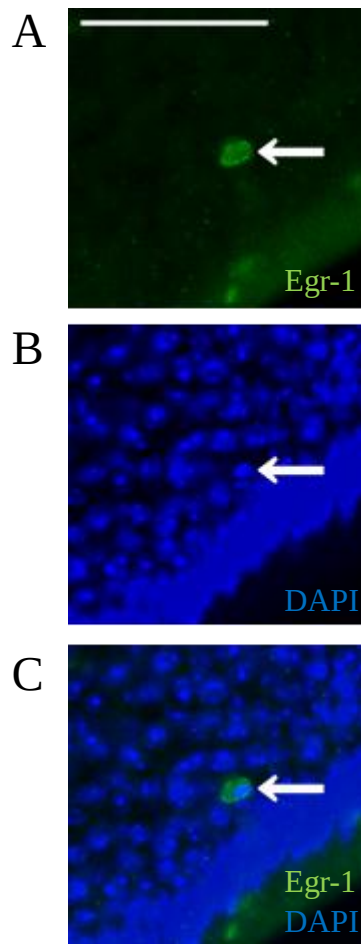


図12. 鋤鼻器における Egr-1 染色例

鋤鼻器感覚上皮を抗 Egr-1 抗体 (A) と DAPI (B) で染色した結果の一例を示す。(C) は Egr-1 (緑) と DAPI (青) の合成像。矢印は Egr-1 陽性細胞を示す。スケールバーは 50 μm 。

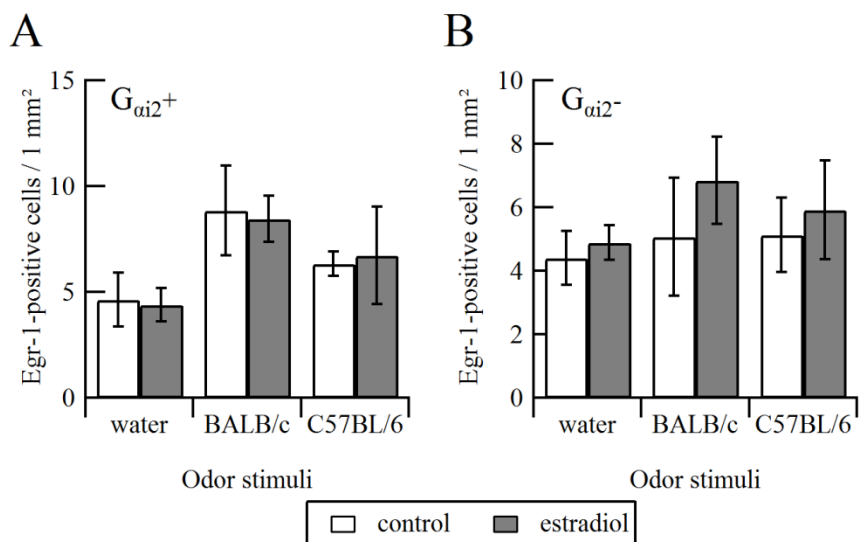


図13. 鋤鼻器における 単位面積当たりの Egr-1 陽性細胞数

BALB/c 雌を BALB/c 雄尿、C57BL/6 雄尿、蒸留水に暴露した後に鋤鼻器を抗 Egr-1抗体で染色し、1 mm² 当たりの Egr-1 陽性細胞数をもとめた。(A) には G_{ai2} 陽性細胞層、(B) には G_{ai2} 陰性細胞層での結果を示す。白色カラムはコントロール群、灰色カラムはエストラジオール群での結果を示し、バーは標準誤差を示す。各群、4 または 5 個体の結果から成る。

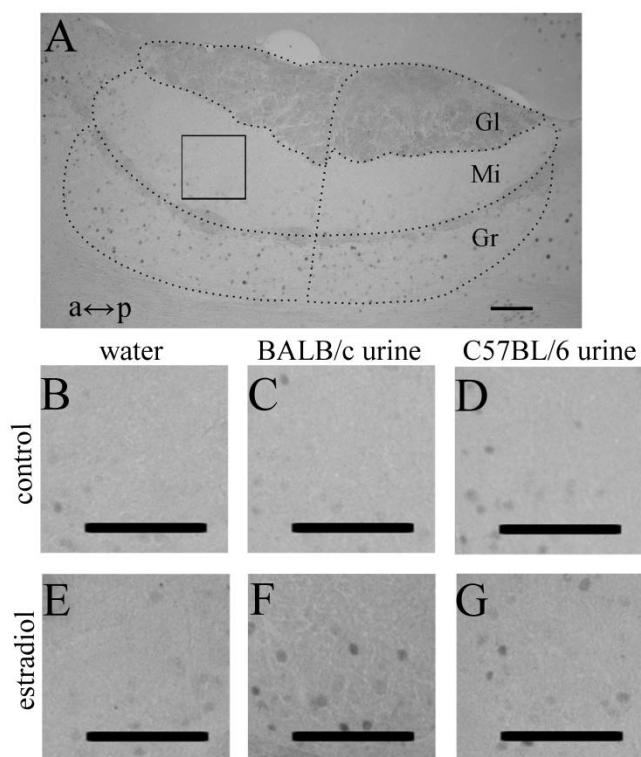


図14. 副嗅球における c-Fos 染色例

副嗅球を抗 c-Fos 抗体 で染色した際の染色例を示す。(A) は副嗅球の矢状断面である。Gl、Mi、Gr はそれぞれ糸球体層、僧帽細胞層、顆粒細胞層を示し、a は吻側、p は尾側方向を示す。(B-G) は僧帽細胞層の吻側 (四角で囲まれた部分) の拡大図である。(B-D) はコントロールチューブ移植個体、(E-G) はエストラジオールチューブ移植個体であり、(B, E)、(C, F)、(D, G) はそれぞれ蒸留水、BALB/c 雄尿、C57BL/6 雄尿に暴露された個体由来の像である。スケールバーは 100 μm 。

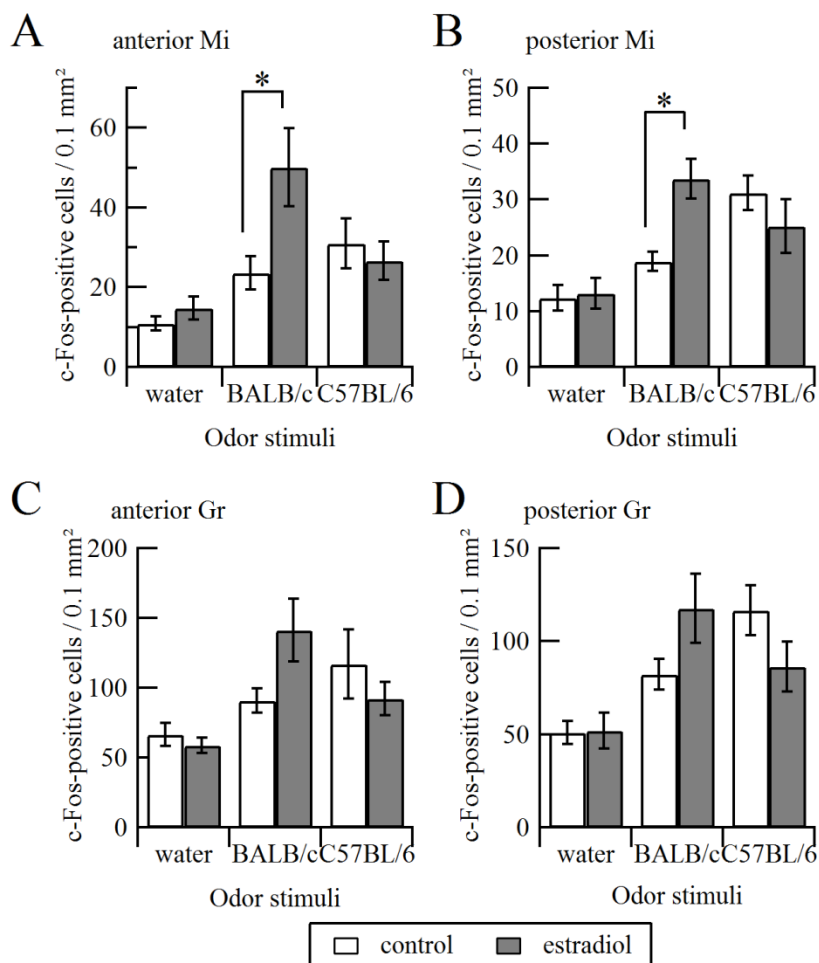


図15. 副嗅球における単位面積当たりの c-Fos 陽性細胞数

BALB/c 雌を BALB/c 雄尿、C57BL/6 雄尿、蒸留水に暴露した後に副嗅球を抗 c-Fos 抗体で染色し、0.1 mm² 当たりの c-Fos 陽性細胞数をもとめた。(A, C) には吻側、(B, D) には尾側での結果を示す。(A, B) は僧帽細胞層、(C, D) は顆粒細胞層の結果である。白色カラムはコントロール群、灰色カラムはエストラジオール群での結果を示し、バーは標準誤差を示す。各群は 4 または 5 個体の結果から成る。* はコントロール群とエストラジオール群との間で Student's *t*-test を行い、*p* < 0.05 で有意差があったことを示す。

考察

1. 遺伝的に近縁な雄に対する雌の忌避行動は鋤鼻器での尿の匂いの受容を介して起こる

BALB/c 雌と C57BL/6 雌の両系統において、同系統雄の尿の匂いに対する忌避性が phase M-P に増大した (図 6)。この結果は、遺伝的に近縁な雄の尿の匂いが雌の忌避行動を引き起こす要因であることを示唆している。また、同系統雄に対する忌避性が鋤鼻器の切除により消失したことから (図 9, 10)、尿の匂いを受容する鋤鼻系が遺伝的に近縁な雄を忌避する行動の誘発に関与していることが示唆された。マウスの匂い感覚器には、本研究で注目した鋤鼻器の他、嗅上皮、Grüneberg 神経節、マセラ器がある (Munger et al., 2009)。これらの鋤鼻器以外の匂い感覚器が関与する可能性も否定できないが、少なくとも鋤鼻系が近縁な雄に対する忌避行動に必要であることが本研究によって明らかになった。

ある種の尿中物質が、遺伝的近縁度を示す指標として機能していることが知られている (Hurst et al., 2001)。特に MUPs (major urinary proteins) と MHC クラス 1 分子が、遺伝的近縁度の指標となる匂い物質候補として有力視されている (Hurst et al., 2001; Roberts and Gosling, 2003)。MUPs はマウスの尿中に豊富に含まれるリポカリンファミリータンパク質で、尿中の組成パターンが個体毎に異なるため個体識別に関わっている (Hurst et al., 2001)。例えば縄張りの維持において、雄マウスは MUPs の組成の異なる尿を他個体由来の尿と認識し、カウンターマーキングを行う (Hurst et al., 2001; Kaur et al., 2014)。MUPs 自体が鋤鼻神経を刺激し興奮させるだけでなく (Chamero et al., 2007)、揮発性小分子と結合するキャリアとして当該分子の揮発を遅らせ、匂い消失までの時間を延長させる (Hurst and Beynon, 2004)。このことから MUPs の多様性は揮発性物質の多様性として反映される (Hurst and Beynon, 2004)。また、MHC クラス 1 分子も MUPs 同

様に尿中の揮発性小分子やペプチドの組成に影響し、これらの尿中物質もまた個体識別や遺伝的近縁度の指標となり得る (Wyatt, 2014)。鋤鼻器は MHC リガンドペプチドの 1 アミノ酸残基の変異も検出できる高い識別能を持つ (Leinders-Zufall et al., 2004; Sturm et al., 2013)。さらに、雄マウスによる近親交配回避は MHC パターン依存性であることが、MHC コンジェニックマウスを使用した行動実験で明らかにされている (Yamazaki et al., 1988)。今回使用した BALB/c、C57BL/6 の 2 系統間では、MUPs パターンも MHC パターンも異なっており (Roberts et al., 2010; Thom et al., 2008)、こうした尿中因子が忌避性を引き起こしている可能性がある。

2. エストロゲンは遺伝的に近縁な雄に対する雌の忌避性を増強する

同系統の雄に対する忌避性は雌の発情周期に依存して変化し、特に phase E と比較して phase M-P で高い忌避性を示した (図 6)。また卵巣を摘出した BALB/c 雌は忌避性を示さず、エストラジオールを投与することにより同系統雄に対する忌避性が再現された (図 8)。これらの結果は、遺伝的に近縁な雄に対する忌避性がエストロゲンによって誘発されることを示唆している。ただし、膣スメア上の発情後期や発情休止期のエストロゲン濃度と膣スメア上の発情期のエストロゲン濃度の差がわずかであることから (Nelson et al., 1981; Walmer et al., 1992)、同系統雄に対する忌避行動にエストロゲン以外の因子も関係している可能性も排除できない。Dey et al. (2015) は、プロゲステロンが MUPs 応答性の鋤鼻神経の興奮を阻害し、雌マウスの MUPs に対する嗜好性を抑制するという報告をしており、プロゲステロン等の性周期関連ホルモンが遺伝的に近縁な雄に対する忌避行動に関係している可能性もある。しかし Dey et al. (2015) は鋤鼻神経への MUPs の直接投与や匂い物質と直接接触可能な暴露処置を行っているのに対し、本研究では尿への直接接触ができない条件で実験を行っている。直接接触を防

いした場合、不揮発性の MUPs は鋤鼻神経に到達できないため、Dey et al. (2015) の結果から本研究を解釈する際には注意を要する。

また予想に反して、phase M-P にあっても C57BL/6 雌の D_{ratio} は 0 に近かった (図 5) が、これは未知の尿中因子が同系統雄に対する忌避性を妨げたことによるのかもしれない。雄の尿は様々な物質から構成されており、その一部は雌にとって誘引作用や忌避的な効果を持つ (Brechtbühl et al., 2008; Roberts et al., 2010)。これらの尿中物質の組成は個体によって異なる。特に実験用に確立されたマウスの系統の一部で、野生マウスに通常存在する物質が完全に失われている例がある。例えば、MUPs の一種である Darcin は野生の雄マウスの尿に通常存在し、雌マウスに対して誘引効果を示す。この Darcin は C57BL/6 雄の尿中に検出される一方で、BALB/c 雄の尿には検出されない (Roberts et al., 2010)。こうした尿中物質が C57BL/6 雄の尿の雌に対する誘引性を増強し、C57BL/6 雄の尿に対する雌の忌避性を相殺した可能性もある。

排卵や交尾は phase M-P の最終段階である膣スメア上の発情前期直後の暗期に起こる。本研究では暗期の実験は行っていないため、交尾許容期に遺伝的に近縁な雄に対する忌避性が見られるかは確認できていない。しかし膣スメア上の発情前期に特定の雄から遠ざかれば、交尾許容期にその雄と遭遇、交尾する確率は低下すると考えられる。また、遺伝的に近縁な雄に対する忌避行動が膣スメア上の発情前期だけでなく発情後期や発情休止期にも起こることから、雌に認められたこの特性は雌を遺伝的に近縁な雄から遠ざけ、近親交配を防ぐのに役立っているかもしれない。

3. エストロゲンの鋤鼻系への作用

副嗅球において、同系統雄の尿により誘導される c-Fos 陽性細胞数はエストラジオールの投与により増えた (図 15)。その一方で、鋤鼻器ではエストラジオー

ルは効果を示さなかった (図 13)。これらの結果から、エストロゲンは鋤鼻器レベルではなく、副嗅球レベルで神経の興奮性を調節している可能性が示唆された。一方で、Halem et al. (1999) は鋤鼻神経の c-Fos 発現がエストラジオールの投与によって増強されると報告している。この理由は明らかではないが、可能性として使用した刺激物質の違いが挙げられる。本研究では匂い刺激として尿を使用した、Halem et al. (1999) は床敷きを利用した。床敷きは尿だけでなく、糞、毛、汗、涙等の鋤鼻神経を興奮させる他の物質も含んでおり (Haga et al., 2010)、これが結果の違いに影響したのかもしれない。

エストロゲンによる興奮細胞数の増加は、特に副嗅球僧帽細胞層で明瞭に観察された (図 15)。僧帽細胞は扁桃体とシナプスを直接形成しており (Baum and Kelliher, 2009)、僧帽細胞の興奮は扁桃体に伝達され、性行動や内分泌を変化させる (Ichikawa, 2003)。エストロゲンによる僧帽細胞の興奮性変化の機序については不明である。エストロゲンが直接副嗅球に作用しているとする、副嗅球上にエストロゲンの受容体が存在するはずだが、エストロゲン受容体 ER- α 、ER- β は副嗅球上でこれまで確認されていない (Mitra et al., 2003)。近年、新規のエストロゲン受容体が発見されたが、このエストロゲン受容体が副嗅球の匂いに対する興奮性に関与しているのかもしれない。例えば G-protein coupled receptor 30 (GPR30) はエストロゲンと結合することで、神経細胞の活動電位発生パターンを変化させることが示唆されている (Cherian et al., 2014)。GPR30 は脳、腎臓、卵巣、鋤鼻器で発現が認められている (Cherian et al., 2014; Revankar et al., 2005)。これまで GPR30 を含む新規エストロゲン受容体の分布は副嗅球で報告されておらず、エストロゲンの副嗅球での作用機序を解明するためには受容体の発現解析をまず行う必要がある。一方、もし副嗅球がエストロゲンの作用を間接的に受けているとすると、扁桃体や視床下部等エストロゲン受容体の発現が確認されている領域からの神経投射を通じた調節ということになるかもしれない。

(Baum and Kelliher, 2009)。また、 G_{ai2} 陽性、 G_{ai2} 陰性鋤鼻神経投射両領域でエストロゲン投与の効果が同じく観察されたことから (図 15)、エストロゲンは副嗅球の吻側、尾側の両領域の調節に関与していると考えられる。

本研究では雌が同系統雄より異系統雄の尿近傍に滞在する現象を「同系統雄に対する忌避行動」と捉えたが、「忌避」とは「嗜好性」の裏返しとも考えられる。しかしながら、エストラジオールは同系統雄の尿に暴露された時にのみ神経興奮を増強し、異系統雄の尿に暴露された時には増強が認められなかった (図 15) ことから、雌は遺伝的に近縁な雄を避け、そしてエストラジオールは同系統雄の尿に対する忌避効果を増強した、と考えることができる。結論を出すには今後の研究を待たねばならないが、本研究の結果は、遺伝的に近縁な雄に対する「忌避性」を雌マウスが示すことを支持すると考えられる。

4. まとめ

本研究において、近縁な雄に対する雌マウスの忌避性が、鋤鼻系での尿の匂い受容を介して引き起こされることが明らかとなった。雄マウスは尿を用いたマーキングによりテリトリーを維持しているが (Hurst and Beynon, 2004; Kaur et al., 2014)、雌マウスが近縁な雄の尿の匂いを忌避するという特性は、そのテリトリーでの滞在時間を短縮する結果をもたらす。従って、近縁な雄の尿の匂いに対する雌マウスの忌避行動は、近親交配の回避につながると考えられる。また、この忌避性は発情周期に応じて変化し、少なくともエストロゲンに依存して発現することが判明した。排卵および交尾許容期前には血中エストロゲン濃度が上昇するため、交配相手の選択に関わる時期にのみ忌避性が発現していると考えられる。しかしエストロゲンだけでは説明がつかない部分もあるため、プロゲステロン等エストロゲン以外の性ホルモンの関与も考慮する必要がある。本研究では、エストロゲンの作用部位が副嗅球レベルであることを示唆する結果

を得た。これまで、鋤鼻器や中枢レベルでの調節が注目されてきた一方で (Cherian et al., 2014; Yang and Shah, 2014)、副嗅球レベルでの研究はほとんどなく、詳細な作用機序の解明は今後の課題である。本研究ではマウスを対象として実験を行ったが、近親交配の回避現象はマウスだけでなく幅広い動物種で確認されている。今回観察されたような匂いを介した近親交配の回避は、マウス以外の動物にも存在すると考えられる (Wedekind et al., 1995)。本研究の成果を契機として、繁殖相手の選択と嗅覚との関連性について、一層の解明が進むことを期待したい。

総括

多くの動物種において雌は繁殖相手を選択する。雌の繁殖は雄と比較して多くのエネルギーを要し、一生涯に残し得る子の数が限定されるため、繁殖相手の選択を通じて環境適応能に優れ生き残る可能性の高い子を産することが有効な繁殖戦略となり得る。特に近親交配の回避は幅広い種で確認されている現象であり、子孫の遺伝的多様性が維持され、環境適応能が向上し、劣性遺伝疾患の発生が抑制される。近親交配回避に関する研究は、マウスを用いて行われることが多い。マウスの種内コミュニケーションにおいて、特に重要な役割を果たすのは匂いである。匂いコミュニケーションは近親交配回避にも関与している可能性があるが、決定的な報告は未だ成されていない。本研究では、雌マウスが遺伝的に近縁な雄を忌避する行動が、尿の匂いを介して誘発されるか否かを検証するとともに、その特性について検討を行った。

Y 字迷路上に BALB/c 雄および C57BL/6 雄の尿を直接接触できないよう配置し、BALB/c 雌を被検体としてその行動を解析したところ、BALB/c 雌は BALB/c 雄尿より C57BL/6 雄尿近傍に長時間滞在した。この選択性は膣スメア上の発情後期から発情前期にかけて観察された一方で、膣スメア上の発情期（交尾許容期終了直後にあたる）には消失する発情周期依存性が確認された。この匂い選択性が同系統忌避にあたるか否かを検証するため、C57BL/6 雌を被検体として反対実験を行った。C57BL/6 雌による同系統雄に対する忌避行動は明瞭ではなかったものの、BALB/c 雌と類似した発情周期依存性が確認され、C57BL/6 雌、BALB/c 雌ともに、同系統雄に対する忌避性が膣スメア上の発情期に低下していた。以上の結果から、雌マウスによる遺伝的に近縁な雄に対する忌避性が尿の匂いを介してもたらされること、さらに発情周期に依存することが明らかになった。

雄マウスは尿のマーキングによりテリトリーを維持しており、雌が近縁な雄の尿の匂いから遠ざかることによって、当該雄との遭遇の可能性が低下すると考えられる。

また本忌避性は繁殖に影響しやすい交尾許容期前により明瞭になった。排卵および交尾許容期前には血中エストロゲン濃度が上昇することから、忌避性の発情周期依存性を生じさせる候補因子としてエストロゲンを考え、卵巢摘出およびエストラジオールチューブ移植を施した BALB/c 雌を被検体として行動解析を実施した。卵巢摘出を施した雌では同系統雄に対する忌避性が消失した一方で、エストラジオールチューブ移植個体では同系統雄に対する忌避性が再現された。膣スメア上の発情後期および発情休止期と膣スメア上の発情期との間のエストロゲン濃度の差はわずかであるため、エストロゲン以外の性ホルモンも関係している可能性も排除できないが、同系統雄に対する忌避性が少なくともエストロゲンに依存することが示唆された。

続いて、マウスの種内コミュニケーションにおいて重要な役割を果たす鋤鼻系の関与を検討するため、鋤鼻器を切除した BALB/c 雌の同系統雄忌避性を解析した。偽手術を施した雌は、未処置雌と同様に、発情周期依存性の同系統雄に対する忌避性を示したが、鋤鼻器を切除した雌では忌避性が完全に消失しており、同系統雄に対する忌避性が鋤鼻系を介して生じることが示唆された。

鋤鼻系は、受容器である鋤鼻器、一次中枢である副嗅球、さらに中枢域にあたる扁桃体や視床下部等の領域から構成される。この内どの部位がエストロゲンによる調節を受けているかを明らかにするため、BALB/c 雌を尿の匂いに暴露した後、最初期遺伝子産物 Egr-1 および c-Fos を神経興奮のマーカーとして、鋤鼻器および副嗅球の神経興奮をエストラジオール投与の有無によって比較した。エストラジオールの投与によって、鋤鼻器における Egr-1 陽性細胞数は変化しなかったが、副嗅球、特にその僧帽細胞層において c-Fos 陽性細胞の増加が観察さ

れた。エストラジオールによる副嗅球の c-Fos 陽性細胞の増加は、同系統雄の尿の匂いに暴露された場合にのみ観察され、蒸留水や異系統雄の尿の匂いに暴露された場合には認められなかった。これらの結果は、エストロゲンによる神経興奮の調節が副嗅球レベルで起きていることを示唆する。

本研究では、マウスを対象として、雌による遺伝的に近縁な雄に対する忌避性を検証し、忌避性が鋤鼻系での匂い受容を介して起こること、さらに発情周期およびエストロゲンに依存することが明らかとなった。これらの成果は、近親交配回避に関する研究や、鋤鼻系調節機構研究に新たな展開をもたらす重要な知見であると思われる。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に関して終始懇切丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました葉原芳昭教授 (北海道大学大学院獣医学研究科生理学教室) に深く感謝致します。また、本論文をご精読頂き、有用なご助言を頂きました片桐成二教授 (同繁殖学教室)、永野昌志准教授 (同繁殖学教室)、下鶴倫人准教授 (同野生動物学教室)、坂本健太郎講師 (同生理学教室) に心から感謝致します。

並びに、本研究を遂行するにあたり、免疫組織化学的手法では東原和成教授 (東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命科学専攻生物化学研究室)、市居修准教授 (北海道大学大学院獣医学研究科解剖学教室) にご協力を頂きましたことを感謝致します。また、終始暖かく応援して頂きました生理学教室員の皆様、動物施設ならびに共通利用機器の維持管理を行っていただきました技術職員の皆様、さらにセミナーやインターンシップ等博士課程在籍中にまたとない機会を与えてくださいましたリーディング大学院の関係者の皆様にも感謝いたします。本研究の一部は本学リーディングプログラム院生科研費によります。

最後に、本研究の為に尊い生命を捧げてくれた動物達の冥福をお祈りするとともに、心より感謝の意を表します。

参考文献

- Asaba, A., Okabe, S., Nagasawa, M., Kato, M., Koshida, N., Osakada, T., Mogi, K., Kikusui, T., 2014. Developmental social environment imprints female preference for male song in mice. *PLoS One* 9, e87186.
- Baum, M.J., Kelliher, K.R., 2009. Complementary roles of the main and accessory olfactory systems in mammalian mate recognition. *Annu Rev Physiol* 71, 141-160.
- Beach, F.A., 1976. Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Horm Behav* 7, 105-138.
- Beauchamp, G.K., Yamazaki, K., Bard, J., Boyse, E.A., 1988. Prewaning experience in the control of mating preferences by genes in the major histocompatibility complex of the mouse. *Behav Genet* 18, 537-547.
- Boillat, M., Challet, L., Rossier, D., Kan, C., Carleton, A., Rodriguez, I., 2015. The vomeronasal system mediates sick conspecific avoidance. *Curr Biol* 25, 251-255.
- Brechbühl, J., Klaey, M., Broillet, M.C., 2008. Grueneberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice. *Science* 321, 1092-1095.
- Bronson, F.H., 1976. Serum FSH, LH, and prolactin in adult ovariectomized mice bearing silastic implants of estradiol: responses to social cues. *Biol Reprod* 15, 147-152.
- Chamero, P., Marton, T.F., Logan, D.W., Flanagan, K., Cruz, J.R., Saghatelian, A., Cravatt, B.F., Stowers, L., 2007. Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature* 450, 899-902.
- Cherian, S., Wai Lam, Y., McDaniels, I., Struziak, M., Delay, R.J., 2014. Estradiol

- rapidly modulates odor responses in mouse vomeronasal sensory neurons. *Neuroscience* 269, 43-58.
- Del Punta, K., Leinders-Zufall, T., Rodriguez, I., Jukam, D., Wysocki, C.J., Ogawa, S., Zufall, F., Mombaerts, P., 2002. Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. *Nature* 419, 70-74.
- Dey, S., Chamero, P., Pru, J.K., Chien, M.S., Ibarra-Soria, X., Spencer, K.R., Logan, D.W., Matsunami, H., Peluso, J.J., Stowers, L., 2015. Cyclic regulation of sensory perception by a female hormone alters behavior. *Cell* 161, 1334-1344.
- Dubal, D.B., Zhu, H., Yu, J., Rau, S.W., Shughrue, P.J., Merchenthaler, I., Kindy, M.S., Wise, P.M., 2001. Estrogen receptor α , not β , is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1952-1957.
- Haga, S., Hattori, T., Sato, T., Sato, K., Matsuda, S., Kobayakawa, R., Sakano, H., Yoshihara, Y., Kikusui, T., Touhara, K., 2010. The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behaviour through a specific vomeronasal receptor. *Nature* 466, 118-122.
- Halem, H.A., Baum, M.J., Cherry, J.A., 2001. Sex difference and steroid modulation of pheromone-induced immediate early genes in the two zones of the mouse accessory olfactory system. *J Neurosci* 21, 2474-2480.
- Halem, H.A., Cherry, J.A., Baum, M.J., 1999. Vomeronasal neuroepithelium and forebrain Fos responses to male pheromones in male and female mice. *J Neurobiol* 39, 249-263.
- Hamilton, W., Zuk, M., 1982. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science* 218, 384-387.

- Hurst, J.L., Beynon, R.J., 2004. Scent wars: the chemobiology of competitive signalling in mice. *Bioessays* 26, 1288-1298.
- Hurst, J.L., Payne, C.E., Nevison, C.M., Marie, A.D., Humphries, R.E., Robertson, D.H., Cavaggioni, A., Beynon, R.J., 2001. Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins. *Nature* 414, 631-634.
- Ichikawa, M., 2003. Synaptic mechanisms underlying pheromonal memory in vomeronasal system. *Zoolog Sci* 20, 687-695.
- Isogai, Y., Si, S., Pont-Lezica, L., Tan, T., Kapoor, V., Murthy, V.N., Dulac, C., 2011. Molecular organization of vomeronasal chemoreception. *Nature* 478, 241-245.
- Janetos, A.C., 1980. Strategies of female mate choice: a theoretical analysis. *Behav Ecol Sociobiol* 7, 107-112.
- Kaur, A.W., Ackels, T., Kuo, T.H., Cichy, A., Dey, S., Hays, C., Kateri, M., Logan, D.W., Marton, T.F., Spehr, M., Stowers, L., 2014. Murine pheromone proteins constitute a context-dependent combinatorial code governing multiple social behaviors. *Cell* 157, 676-688.
- Kavaliers, M., Choleris, E., Agmo, A., Pfaff, D., 2004. Olfactory-mediated parasite recognition and avoidance: linking genes to behavior. *Horm Behav* 46, 272-283.
- Keller, M., Pierman, S., Douhard, Q., Baum, M.J., Bakker, J., 2006. The vomeronasal organ is required for the expression of lordosis behaviour, but not sex discrimination in female mice. *Eur J Neurosci* 23, 521-530.
- Kennedy, C., Endler, J., Poynton, S., McMinn, H., 1987. Parasite load predicts mate choice in guppies. *Behav Ecol Sociobiol* 21, 291-295.
- Key, B., Giorgi, P.P., 1986. Soybean agglutinin binding to the olfactory systems of the

- rat and mouse. *Neurosci Lett* 69, 131-136.
- Leinders-Zufall, T., Brennan, P., Widmayer, P., S, P.C., Maul-Pavicic, A., Jäger, M., Li, X.H., Breer, H., Zufall, F., Boehm, T., 2004. MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science* 306, 1033-1037.
- McEwen, B.S., Alves, S.E., 1999. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 20, 279-307.
- Milinski, M., Griffiths, S., Wegner, K., Reusch, T., Haas-Assenbaum, A., Boehm, T., 2005. Mate choice decisions of stickleback females predictably modified by MHC peptide ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4414-4418.
- Mitra, S.W., Hoskin, E., Yudkovitz, J., Pear, L., Wilkinson, H.A., Hayashi, S., Pfaff, D.W., Ogawa, S., Rohrer, S.P., Schaeffer, J.M., McEwen, B.S., Alves, S.E., 2003. Immunolocalization of estrogen receptor β in the mouse brain: comparison with estrogen receptor α . *Endocrinology* 144, 2055-2067.
- Mossman, C.A., Drickamer, L.C., 1996. Odor preferences of female house mice (*Mus domesticus*) in seminatural enclosures. *J Comp Psychol* 110, 131-138.
- Munger, S.D., Leinders-Zufall, T., Zufall, F., 2009. Subsystem organization of the mammalian sense of smell. *Annu Rev Physiol* 71, 115-140.
- Nelson, J.F., Felicio, L.S., Osterburg, H.H., Finch, C.E., 1981. Altered profiles of estradiol and progesterone associated with prolonged estrous cycles and persistent vaginal cornification in aging C57BL/6J mice. *Biol Reprod* 24, 784-794.
- Oboti, L., Schellino, R., Giachino, C., Chamero, P., Pyrski, M., Leinders-Zufall, T., Zufall, F., Fasolo, A., Peretto, P., 2011. Newborn interneurons in the accessory olfactory bulb promote mate recognition in female mice. *Front Neurosci* 5, 113.

- Okada, A., Niwa, Y., Katase, T., Kai, O., 2005. Controlled release of estradiol-17 β and bisphenol A from a silicone tube for long-term administration in mice. *Anim Sci J* 76, 535-539.
- Pankevich, D.E., Baum, M.J., Cherry, J.A., 2004. Olfactory sex discrimination persists, whereas the preference for urinary odorants from estrous females disappears in male mice after vomeronasal organ removal. *J Neurosci* 24, 9451-9457.
- Potts, W.K., Manning, C.J., Wakeland, E.K., 1991. Mating patterns in seminatural populations of mice influenced by MHC genotype. *Nature* 352, 619-621.
- Pusey, A., Wolf, M., 1996. Inbreeding avoidance in animals. *Trends Ecol Evol* 11, 201-206.
- R Development Core Team, 2010. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria.
- Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., Prossnitz, E.R., 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307, 1625-1630.
- Roberts, S.A., Simpson, D.M., Armstrong, S.D., Davidson, A.J., Robertson, D.H., McLean, L., Beynon, R.J., Hurst, J.L., 2010. Darcin: a male pheromone that stimulates female memory and sexual attraction to an individual male's odour. *BMC Biol* 8, 75.
- Roberts, S.C., Gosling, L.M., 2003. Genetic similarity and quality interact in mate choice decisions by female mice. *Nat Genet* 35, 103-106.
- Schwartz, J., Buchanan, B., Gerhardt, H., 2001. Female mate choice in the gray treefrog (*Hyla versicolor*) in three experimental environments. *Behav Ecol Sociobiol* 49, 443-455.
- Sheng, M., Greenberg, M.E., 1990. The regulation and function of c-fos and other

- immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4, 477-485.
- Sherborne, A., Thom, M., Paterson, S., Jury, F., Ollier, W., Stockley, P., Beynon, R., Hurst, J., 2007. The genetic basis of inbreeding avoidance in house mice. *Curr Biol* 17, 2061-2066.
- Sturm, T., Leinders-Zufall, T., Maček, B., Walzer, M., Jung, S., Pömmerl, B., Stevanović, S., Zufall, F., Overath, P., Rammensee, H.G., 2013. Mouse urinary peptides provide a molecular basis for genotype discrimination by nasal sensory neurons. *Nat Commun* 4, 1616.
- Thom, M.D., Stockley, P., Jury, F., Ollier, W.E., Beynon, R.J., Hurst, J.L., 2008. The direct assessment of genetic heterozygosity through scent in the mouse. *Curr Biol* 18, 619-623.
- Turaga, D., Holy, T.E., 2012. Organization of vomeronasal sensory coding revealed by fast volumetric calcium imaging. *J Neurosci* 32, 1612-1621.
- Uy, J.A., Patricelli, G.L., Borgia, G., 2001. Complex mate searching in the satin bowerbird *Ptilonorhynchus violaceus*. *Am Nat* 158, 530-542.
- Walmer, D.K., Wrona, M.A., Hughes, C.L., Nelson, K.G., 1992. Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology* 131, 1458-1466.
- Wedekind, C., Seebeck, T., Bettens, F., Paepke, A.J., 1995. MHC-dependent mate preferences in humans. *Proc Biol Sci* 260, 245-249.
- Whalen, R.E., 1974. Estrogen-progesterone induction of mating in female rats. *Horm Behav* 5, 157-162.
- Wyatt, T., 2014. Pheromones and animal behavior: chemical signals and signatures. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Xiao, K., Kondo, Y., Sakuma, Y., 2004. Sex-specific effects of gonadal steroids on

- conspecific odor preference in the rat. *Horm Behav* 46, 356-361.
- Yamaguchi, M., Yamazaki, K., Beauchamp, G.K., Bard, J., Thomas, L., Boyse, E.A., 1981. Distinctive urinary odors governed by the major histocompatibility locus of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 5817-5820.
- Yamazaki, K., Beauchamp, G.K., Kupniewski, D., Bard, J., Thomas, L., Boyse, E.A., 1988. Familial imprinting determines H-2 selective mating preferences. *Science* 240, 1331-1332.
- Yamazaki, K., Yamaguchi, M., Baranoski, L., Bard, J., Boyse, E.A., Thomas, L., 1979. Recognition among mice. Evidence from the use of a Y-maze differentially scented by congenic mice of different major histocompatibility types. *J Exp Med* 150, 755-760.
- Yang, C.F., Shah, N.M., 2014. Representing sex in the brain, one module at a time. *Neuron* 82, 261-278.

The contribution of vomeronasal system and estrogen to female avoidance behavior toward males of the same strain in mice

Saori Yano

Laboratory of Physiology, Department of Biomedical Sciences, Graduate School of
Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060-0818, Japan

In many species, females choose their mating partners. For successful reproduction, mate choice by females is more crucial than that by males because the cost of bearing and nursing children is generally higher and the chance of mating in each breeding season is more limited in females than in males. Inbreeding avoidance results in genetic diversity of offspring, potential adaption to various environments, and protection from recessive diseases. Most of the studies on mammalian inbreeding avoidance have been conducted in mice. Odor plays important roles in intraspecific communication in mice. Odor communication may also contribute to female inbreeding avoidance but whether female inbreeding avoidance occurs through odor communication or not remains to be elucidated. In the present study, our aim is to investigate female avoidance of odor of male urine from genetically similar males and to evaluate potential contribution of the vomeronasal system and estrogen to that behavior.

Behavioral assays were conducted using Y-maze on which male urine collected from BALB/c males and C57BL/6 males was placed. BALB/c females stayed longer near the urine from C57BL/6 males than BALB/c males. When categorized according to their estrous stages estimated by their vaginal smear, the avoidance was observed from

metestrus to proestrus but not in estrus, which indicates after a mating phase. To assess whether or not female mice avoid odor from genetically similar males, the opposite experiments were conducted using C57BL/6 females as subjects. Although the avoidance behaviors toward the same strain were ambiguous in C57BL/6 females, the degree of avoidance was in a similar tendency to that of BALB/c females. In both strains, the avoidance of male urine from the same strain was faint in estrus. These results suggest that urinary odor is a presumed factor of the avoidance of genetically similar males and that the avoidance is dependent on their estrous cycle. Because male mice hold their territories by means of urine, the avoidance of urinary odor from a particular male would reduce the chance of encountering that male.

The avoidance was reinforced during the period prior to ovulation and mating phases, when the blood estrogen level increases. To evaluate potential involvement of estrogen in the avoidance behavior, effects of ovariectomy carried out in BALB/c females were examined and those of estradiol administration on the behavior were investigated. The avoidance was not observed in ovariectomized females, whereas administration of estradiol to the ovariectomized females reproduced the avoidance of male urine from the same strain. These results suggest that estrogen is, at least in part, essential for the avoidance behavior, although the possible involvement of other sex hormones may not be excluded.

The vomeronasal system plays important roles in the murine intraspecific communication. To examine whether the vomeronasal system mediates the females' avoidance behavior toward urinary odor of genetically similar males, behavioral experiments were conducted using BALB/c females whose vomeronasal organs were removed. While sham-operated females showed the estrous cycle-dependent avoidance behavior, which is similar to that of intact females, the avoidance behavior was

completely disappeared after the vomeronasal removal. These findings indicate that the vomeronasal system is involved in the avoidance behavior.

The vomeronasal system consists of the vomeronasal organ, the accessory olfactory bulb, and subcortical areas such as the amygdala and the hypothalamus. In an attempt to identify which area in the vomeronasal system is affected by estrogen, neural activation induced by male urine was evaluated by counting the number of immediate early gene products (Egr-1 and c-Fos)-positive cells in estradiol-treated BALB/c females. In the vomeronasal organ, estradiol did not change the number of Egr-1-positive cells. In the accessory bulb, estradiol increased the number of c-Fos-positive cells induced by urine from BALB/c males but did not increase that by either urine from C57BL/6 males or distilled water. Significant increases were found in the anterior and posterior mitral cell layer in the accessory olfactory bulb. These results suggest that the excitability of mitral cells in the accessory olfactory bulb is regulated by estrogen.

The present study demonstrates that female mice avoid urinary odor from genetically similar males in an estrogen-dependent manner via the vomeronasal system and the excitability of mitral cells in the accessory olfactory bulb is presumed to be regulated by estrogen. This machinery may induce the females' inbreeding avoidance.