

博士論文(要約)

メダカの視索前野において  
ステロイドホルモン感受性に性差を示すニューロン群

菊池 結貴子

# 目次

目次 .....	1
序論 .....	2
第1章 視索前野の神経ペプチド産生ニューロンにおけるグルココルチコイド受容体発現の性差	
諸言 .....	6
材料と方法 .....	7
結果 .....	11
考察 .....	13
図表 .....	18
第2章 視索前野のメス特異的 Npba ニューロンのエストロゲン応答性	
諸言 .....	24
材料と方法 .....	25
結果 .....	30
考察 .....	33
図表 .....	37
第3章 .....	46
本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。	
総合考察 .....	47
要旨 .....	49
謝辞 .....	52
引用文献 .....	54

## 序論

生殖腺に精巣と卵巣があるように、脳にもオス型とメス型があり、その違いが種々の行動や内分泌のパターンに雌雄の違いをもたらしている (McCarthy and Arnold, 2011; McCarthy *et al.*, 2012, 2017)。ラットやマウスでは脳の基本形はメス型で、オスでは出生前後に精巣から大量のアンドロゲンが体内に放出され、これが脳内で芳香化酵素アロマターゼによってエストロゲンに変換されて脳に作用することで脳をオス型に性分化させることが知られている (McCarthy and Arnold, 2011; McCarthy *et al.*, 2012)。この作用は“アロマターゼ仮説”として 1972 年に提唱された (Naftolin *et al.*, 1972; MacLusky and Naftolin, 1981)。マウスの性分化は“critical period”または“sensitive period”とよばれる出生前後の 7 日から 10 日ほどの間に起こり、この期間にマウスの脳は性ステロイドに対して特に高い感受性をもつことから、この期間は“perinatal sensitive window”ともよばれる (McCarthy and Arnold, 2011; McCarthy *et al.*, 2017)。critical period に形成された脳の性差は不可逆的なものであり、哺乳類では脳の性は生涯にわたって固定される。性ステロイドと脳の性分化の関係については 1800 年頃から研究が行われており、1959 年には、critical period に形成されて体内のステロイド環境によらず固定化される性ステロイドの効果は“organizational effect”、一方でその時のステロイド環境によって即時的にもたらされる効果は“activational effect”と定義された (Phoenix *et al.*, 1959; Arnold *et al.*, 1985)。activational effect は critical period に性分化が起こった上でそれぞれの性に特徴的な形質が個体の生理状態に応じて発現するもので、その代表的な例としては性成熟後の個体の性行動を性ステロイドが促進する効果が挙げられる。

これに対し、真骨魚類の脳の性分化の様子は哺乳類とは異なる。真骨魚類の中には、性成熟後も性が固定化されておらず、自然条件下で性転換を行うものがある。性転換の研究はスキューバダイビング装置が開発され、潜水観察による研究が可能となった 1950 年代から活発に行われるようになり、1969 年には総説が出版されるまでになった (Ghiselin, 1969)。1972 年には、野生のホンソメワケベラ (*Labroides dimidiatus*) のうちメス型の性行動を行っていた個体が、周囲に同種のオスがみられなくなるとオス型の性行動をとるようになるという、社会的地位に応じた自発的な性転換も報告された (Robertson, 1972)。さらにキンギョハナダイ (*Pseudanthias squamipinnis*) においても、飼育下、自然環境下の両方での性転換が報告された (Fishelson, 1970; Shapiro, 1980)。そのほか、これまでに数多くの魚種で性転換が報告されてきた (Godwin, 2010)。現在、真骨魚類全体のおよそ 2% の種で自然条件下での性転換が確認されている (Liu *et al.*, 2017)。これらの魚種はさまざまな分類群にみられ、性

転換が進化のどの段階で獲得された形質なのか、また実際に真骨魚類のうちどの程度の種が性転換を行うのかは明らかになっていない。しかしながら、自然条件下では性転換を行わない魚種でも、ホルモン操作によって性行動のパターンが本来とは逆の性別のものに変化する例が多数報告されており(Munakata and Kobayashi, 2010; Paul-Prasanth *et al.*, 2013; Ghosal and Sorensen, 2016; Göppert *et al.*, 2016)、真骨魚類はその大部分が、少なくとも体内のホルモンバランスに応じて性転換する能力を有していると考えられる。このことは、真骨魚類の脳は性分化した後でもその性を逆転させうる、つまり生涯にわたって性的な可逆性をもつことを意味している。

真骨魚類の性転換の事例では、生殖腺や体色といった体の性も、行動パターンに表れる脳の性も逆のものに変化する。これは **critical period** に不可逆的に性を決定する哺乳類では考えられない現象である。人では性同一性障害当事者に対しホルモン投与や性別適合手術による治療が行われることがあるが、これは人為的にホルモンバランスと生殖器を逆の性のもにすることで体の性を変更するものである(Garg and Marwaha, 2018)。このように体の性を変更することは哺乳類でも可能だが、脳の性は治療によって変更されない。その一方で、典型的な男性・女性の枠に当てはまらない人の存在は古くから認識されていた上に、近年ではさらに広く知られるようになり、性を雌雄の二項対立ではなく連続する表現型として捉えることが一般的になりつつある。性転換する魚は生涯に 2 つの性を経験し、また性転換中は雌雄どちらの性ともいえないという点で、真骨魚類の性転換は示唆に富む現象である。そのため、真骨魚類においてその脳の性的可逆性のメカニズムを解明することは、動物全体における脳の性分化の多様性を理解し、また連続する表現型としての雌雄の概念を確立する上で非常に重要である。

性転換のパターンはメスからオスへの性転換(雌性先熟)、オスからメスへの性転換(雄性先熟)、双方向の 3 つに分けることができる。そのいずれにおいても、性転換によってそれぞれの個体の適応度が高まるのが古くから提唱されていた(Ghiselin, 1969)。性転換のきっかけとしては、成長とともに決まった方向へ性転換が起こる雌性先熟や雄性先熟では個体の年齢や体サイズ、季節の変化が挙げられる。しかし、それらを含めたほとんどの事例で、個体を取り巻く社会的な環境が少なくとも一部の要因となって性転換が起こると考えられている(Liu *et al.*, 2017)。たとえば双方向性転換を行うホンソメワケベラのメスからオスへの性転換では、群れから成熟したオスがいなくなって数分から数時間のうちに、本来のメスがオスの性行動をとるようになる。この時点ではその個体の生殖腺は卵巣のままであり、群れにオスが入ってきた場合にはその個体がメスに戻ることも確認されている。生殖腺が精巣に変

化し、放精まで行えるようになるには最短で2週間を要する(Robertson, 1972)。つまり、性転換時には社会的な環境に応答してまずは脳内で何らかの変化が起こり、次に生殖腺での変化が始まり、ホルモンバランスの変化によって全身の形質が逆の性のものになると考えられる。しかし現在、こうした脳の性的可逆性のメカニズムは未解明である。それどころか、その基盤となる、形質の性差につながるような脳の性差についても断片的な知見しか得られていない。

真骨魚類の脳の性差については、1970年代以降に局所破壊実験や局所的な電気刺激実験によって性差のある行動(性行動)を制御する領域が推定されてきた。その中で、終脳と、終脳と間脳の境界に位置する、視索前野とよばれる領域が性行動を制御することが示された(Koyama *et al.*, 1984; Satou *et al.*, 1984)。さらに近年、メダカを用いて脳内で発現に性差を示す遺伝子の探索が行われ、いくつかの神経核において神経ペプチドや性ステロイド受容体の発現に性差が見出された。例えば終脳ではアンドロゲン受容体遺伝子(*arb*)、エストロゲン受容体遺伝子(*esr2b*)、Neuropeptide B 遺伝子(*npba*, *npbb*)がメスに、ゴナドトロピン放出ホルモン1 遺伝子(*gnrh1*)がオスに偏って発現するほか、間脳腹側では *arb* がメスに、神経ペプチドをコードするキスペプチン遺伝子(*kiss-1*)、バソトシン遺伝子(*vt*)がオスに偏って発現する(Kanda *et al.*, 2008; Okubo *et al.*, 2011; Hiraki *et al.*, 2012, 2014; Kawabata *et al.*, 2012)。このように発現量がメスに偏っているものとオスに偏っているものの両方が発見され、また性差のみられた脳部位も終脳から間脳まで多岐にわたっていた。その中でも、視索前野では *arb*, *esr2b*, *npba*, *npbb*、トランスグルタミナーゼファミリー遺伝子の1つ(*fl3a1a*)、エストロゲン合成酵素遺伝子(*cyp19a1a*)がメスに偏って発現することから(Okubo *et al.*, 2011; Hiraki *et al.*, 2012, 2014; Maehiro *et al.*, 2014)、この脳領域は特にメスの形質形成に重要であると考えられたため、本研究では真骨魚類の視索前野にみられる性差に着目した。

本研究では、メダカ(*Oryzias latipes*)をモデル生物として用いた。メダカはヒレの形状や色彩といった外部形態に明瞭な性差を示すため雌雄判別が容易であり、真骨魚類の中で性決定遺伝子が明らかになっている数少ない種の一つである(Matsuda *et al.*, 2002; Nanda *et al.*, 2002)。メダカでは自然環境下での性転換は確認されていないが、ホルモン処理によって外形や性行動の性転換を起こすことができ、性的可逆性に関する実験も可能である(Yamamoto, 1958; Paul-Prasanth *et al.*, 2013)。また、飼育が容易で世代交代が早く、低コストで実験に必要な個体を揃えられることに加え、ゲノムデータベースや expressed sequence tag (EST) データベースが十分に整備されていること、トランスジェニック系統の作出やゲノム

編集に必要な種々のツールが揃っていること(Wittbrodt *et al.*, 2002; Kasahara *et al.*, 2007; Sasado *et al.*, 2010; Takeda and Shimada, 2010; Kirchmaier *et al.*, 2015)などもモデル生物としての大きな利点である。

本論文は3章構成とした。まず第1章では、ストレスホルモンとして知られるグルココルチコイドの受容体(GR)の脳内における発現パターンを解析し、雌雄で比較した。多くの脊椎動物において、ストレスに対する脳の応答には性差があることが知られており(Wendelaar Bonga, 1997; Kudielka and Kirschbaum, 2005; Bourke *et al.*, 2012; Handa and Weiser, 2014)、これは脳におけるグルココルチコイド感受性の性差に起因すると考えられた。さらに、グルココルチコイドが真骨魚類の性決定や性転換のプロセスに大きく影響することを示唆する現象が多数報告されていることから、グルココルチコイドシグナルの性差が真骨魚類の性転換メカニズムの一部を担う可能性も考えられた。これまで、主要なステロイドホルモンのうちエストロゲンとアンドロゲンの受容体遺伝子の脳内における発現パターンとその性差は詳細に調べられていた(Hiraki *et al.*, 2012)にもかかわらず、グルココルチコイド受容体の発現パターンと性差に関する知見は真骨魚類で一切得られておらず、ステロイドホルモン感受性の性差に関する知見は不十分であった。そこで、本研究ではメダカの脳内におけるGR発現の性差を解析した。その結果、視索前野の複数の神経核においてメスに偏った発現がみられたため、それらがどのような表現型につながるか解析することを試みた。

第2章では研究対象をGR発現ニューロンから変更し、数年前に発見された、メダカの脳内ではほぼメス特異的にエストロゲン受容体とアンドロゲン受容体を発現する神経核PMm/PMgに含まれるペプチドニューロンを対象とした。これらはNeuropeptide B(Npba)を発現する大細胞性ニューロンで、メダカの視索前野においてメスにはみられるがオスには全くみられないという、雌雄で表現型が完全に分かれる“性的二型”をもっていた。また、これらのニューロンは性ステロイド環境に応答して *npba* の発現量を可逆的に変化させていた(Hiraki *et al.*, 2014; 横山, 2015)。このことから、これらのメス特異的なNpbaニューロンは性ステロイドの影響を強く受け、性的なゆらぎをもつと考えられた。しかし、これまでの研究はこれらのニューロンにおける *npba* や性ステロイド受容体遺伝子の発現のみに着目して行われており、ニューロンの他の形質や他の遺伝子発現の面からの性状解析は行われてこなかった。そこで、本章ではこれらのニューロンの制御機構と機能の解明を目標として、ニューロン自体に着目した多角的な解析を行うこととし、まずはその詳細な形態解析を行った。

本項のこれ以降の内容は学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

# 第1章 視索前野の神経ペプチド産生ニューロンにおける グルココルチコイド受容体発現の性差

## 1-1. 諸言

ストレスホルモンとして知られるグルココルチコイドは、副腎皮質(真骨魚類では間腎腺)から分泌されるステロイドホルモンの一種である。グルココルチコイドの主な標的器官の一つが脳であり、脳はストレスに対して行動や内分泌の面で様々な応答をする(Whirledge and Cidlowski, 2013; Myers *et al.*, 2014)。グルココルチコイドは標的細胞においてグルココルチコイド受容体(GR; Glucocorticoid receptor)に結合する。GRは核内受容体であり、転写因子として標的遺伝子の転写を促進あるいは抑制することで機能する。

真骨魚類においては、ストレスの受容によって視床下部で副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH; Corticotropin-releasing hormone)の分泌が促進され、次にCRHによって脳下垂体前葉からの副腎皮質刺激ホルモン(ACTH; adrenocorticotrophic hormone)の分泌が促進されて、ACTHのはたらきによって間腎腺での真骨魚類の主要なグルココルチコイド兼ミネラルコルチコイドであるコルチゾルの分泌が促進される。コルチゾルの生体内での作用は糖新生の促進・海水適応・免疫応答の抑制・生殖抑制など多岐にわたる(Aluru and Vijayan, 2009)。この一連の制御系はHypothalamus-Pituitary-Interrenal(HPI)軸と呼ばれる。さらに、HPI軸にはネガティブフィードバック機構が存在し、その主な調節は脳におけるコルチゾルシグナルの受容が担っている(Wendelaar Bonga, 1997; Bourke *et al.*, 2012)。しかし、中枢神経におけるグルココルチコイドの直接的な標的細胞や標的遺伝子に関する知見は数少なく、脳を介したグルココルチコイドシグナルの下流にあるカスケードはいまだ十分には理解されていない。

その一方で、多くの脊椎動物において、ストレスに対する脳の応答には性差があることが発見されており、オスよりもメスでグルココルチコイドシグナルが亢進している例が数多く存在する(Wendelaar Bonga, 1997; Kudielka and Kirschbaum, 2005; Bourke *et al.*, 2012; Handa and Weiser, 2014)。このことから、HPI軸のフィードバック機構の一部である、グルココルチコイドの脳への作用にも性差があることが考えられる。実際に、培養細胞を用いた実験でエストロゲンがGRのはたらきを調節することが報告されており(Bourke *et al.*, 2012)、マウス海馬と室傍核(PVN; paraventricular hypothalamic nucleus)ではGR発現の性差が見つまっている(Goel and Bale, 2010; Pooley *et al.*, 2018)。しかし、これら以外に脳でのGR発現の性差

に関する報告はなく、真骨魚類においてはこれまで全く知見がなかった。

また、近年、グルココルチコイドが真骨魚類の性決定や性転換のプロセスに大きく影響することを示す現象が多数報告されている。たとえば、メダカ、ヒラメ(*Paralichthys olivaceus*)、ペヘレイ(*Odontesthes bonariensis*)、ブラック・シーバス(*Centropristis striata*)、ミツボシキュウセン(*Halichoeres trimaculatus*)において、コルチゾルの濃度が上昇すると、本来卵巣に分化するはずのものも含めて未分化な生殖腺が精巣に分化する(Hattori *et al.*, 2009; Hayashi *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2010; Fernandino *et al.*, 2012; Yamaguchi and Kitano, 2012; Nozu and Nakamura, 2015; Miller *et al.*, 2019)。さらに、クマノミ(*Amphiprion ocellaris*)では性転換中は血中コルチゾル濃度が通常よりも高くなるという報告もある(Iwata *et al.*, 2012)。グルココルチコイド濃度の上昇が生殖腺をオス化させる要因としては、グルココルチコイドが生殖腺におけるエストロゲン合成酵素 Cyp19a1a の遺伝子発現を低下させること(Hayashi *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2010)や、アンドロゲン合成酵素 Hsd11b2 の遺伝子発現を上昇させること(Fernandino *et al.*, 2012, 2013)が考えられている。グルココルチコイドシグナルが脳において性分化や性転換に関わることを証明した研究はまだないが、これらの報告から、真骨魚類の脳におけるグルココルチコイドシグナルの伝達に性差があり、それが性分化や性転換に寄与するかもしれないと考えられた。

この可能性を検証するため、本章ではメダカの脳内における GR の発現パターンを解析し、それを雌雄で比較した。これにより、視索前野と間脳の複数の神経核において GR の発現がメスでより高いという性差を見出した。さらに、それらのうち視索前野の神経核では、行動や神経内分泌に関与するとされる神経ペプチドを産生するニューロンに占める GR 発現ニューロンの割合がメスでより高いことも明らかになった。これらのデータから、脳における行動や神経内分泌の制御に対するグルココルチコイドの作用に性差があることが示唆された。

## 1-2. 材料と方法

### 1-2-1. 実験魚

実験には d-rR 系統のメダカを使用した。これらを水温 28°C、14 時間明期/10 時間暗期の条件で飼育し、ブラインシュリンプ幼生および市販のペレット飼料(おとひめ; 日清丸紅飼料, Tokyo, Japan)を 1 日 3 回与えた。実験には 3-5 ヶ月齢の性成熟した個体を用い、明期開始後 1-3 時間の間にサンプリングした脳を解析に供した。



## 1-2-2. GR のメダカ脳内における発現部位の特定と発現面積の定量

メダカを含む真骨魚類の多くは2種類のGR遺伝子(*gr1*, *gr2*)をもつ(Alsop and Vijayan, 2008, 2009)。メダカのGR1とGR2はともに *in vitro* でコルチゾル応答性が確認されており(Miyagawa *et al.*, 2015)、またGR2は *in vivo* での生理作用も確認されている(Trayer *et al.*, 2013;)。メダカのESTクローンのうち、*gr1* (clone ID, oleb52f22; GenBank accession numbers, XM\_004076127)、*gr2* (clone ID, olgi51k04; GenBank accession numbers, NM\_001163133)に該当するものについて、National BioResource Project (NBRP) Medaka (<http://www.shigen.nig.ac.jp/medaka/>) から譲渡を受けた。5' -AGTTGTTGACGGATCCGCGAGA-3' /5' -CCTGGCAAGCCTGAGGCAGA-3' (*gr1*)、5' -CTAATGGCCAGTTGCACAGCGT-3' /5' -GAGAGCTTGAGAAAGCCTCACT-3' (*gr2*)のプライマーセットを用いたPCRにより、ESTクローンから *gr1* (1451 bp)と *gr2* (1416 bp)のcDNA断片を得た。cDNA断片をpGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA)にライゲーション、大腸菌にトランスフォーメーションした後、プラスミド精製を行い、SpeIあるいはNcoI処理によって直鎖化した。その後、これらの直鎖化プラスミドを鋳型として、T7 RNAポリメラーゼあるいはSP6 RNAポリメラーゼ、およびDigoxigenin RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)によってdigoxigenin (DIG)で標識したcRNAプローブを合成した。これらのcRNAプローブを用いて、以下の方法に従って *in situ* hybridization (ISH)を行った。なお、プローブの交差反応を避けるため、*gr1*と*gr2*のcRNAプローブには互いに最も相同性の低い、5'-UTRとOpen reading frameの5'側の配列を用いた。

雌雄のメダカ(各 n = 5)の脳を摘出後、4°Cにおいて4% paraformaldehyde (PFA)/phosphate buffered saline (PBS) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)中で7時間固定し、エタノールで脱水して-20°Cで一晩以上インキュベートした。これをキシレンで透徹した後、パラフィン(Paraplast; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)に包埋し、マイクローム(RM2255; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)を用いて、脳前端部から小脳後端部までの厚さ10 µmの連続冠状切片を作製した。切片はスライドガラス(MAS-GP type A; Matsunami, Osaka, Japan)に載せ、42°Cのホットプレート(NHP-M20; Nissin Rika, Tokyo, Japan)上で2時間乾燥させた後、ISHに供するまで4°Cで保存した。

切片をキシレンおよびエタノールで脱パラフィンし、プロテイナーゼK(ProK; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)/PBS中で37°Cにて15分間処理した後、4% PFA/PBS溶液で10分間再固定した。次にアセチル化バッファー(0.1 M triethanolamine、0.021 M 塩

酸、0.026 M 無水酢酸) 中で 15 分間アセチル化を行い、PBS、5× saline-sodium citrate (SSC; 0.25 M NaCl, 0.015 M C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>·2H<sub>2</sub>O)/50%ホルムアミドによる洗浄の後、ハイブリダイゼーションバッファー (50%ホルムアミド、5× SSC、5× Denhardt's solution (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)、2 µg/ml yeast RNA (Roche Diagnostics)、30 µg/ml Calf Thymus DNA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 中で、55°C、2 時間のプレハイブリダイゼーションを行った。続いて、ハイブリダイゼーションバッファー中に各 DIG ラベルプローブ (終濃度 0.3 µg/ml) を加え、55°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。55°C にて 5× SSC/50%ホルムアミドおよび 2× SSC で洗浄した後、1.5% Blocking Reagent (Roche Diagnostics)/ tris buffered saline (TBS; 150 mM NaCl, 100 mM Tris) を用いて室温で 1 時間ブロッキングした。続いて、同溶液で 2000 倍希釈した Alkaline phosphatase (AP) 標識ヒツジ抗 DIG 抗体 (Roche Diagnostics) と 4°C で一晩反応させた。TBS および AP バッファー (5 M NaCl, 1 M Tris-HCl (pH 9.5)、1 M MgCl<sub>2</sub>) で洗浄した後、AP バッファーに溶解した nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) (Roche Diagnostics) を用いて、遮光条件下で 7 日間発色させた。PBS で洗浄し、4% PFA により 15 分間の後固定処理を行い、再び PBS および純水で洗浄した後、Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Warrington, PA, USA) を用いて封入した。

切片の観察および写真撮影は、正立顕微鏡 (BX53; Olympus, Tokyo, Japan) とデジタルカメラ (DP72; Olympus)、および写真撮影のためのソフトウェア (cellSens; Olympus) を用いて行った。発現面積の定量のため、全ての脳切片を同じ撮影条件で撮影し、Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) を用いてモノクロ二階調化し、各神経核におけるシグナルの面積を ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて算出した。神経核の同定は、メダカの脳アトラス (Anken and Bourrat, 1998; Ishikawa *et al.*, 1999; [http://www.shigen.nig.ac.jp/medaka/medaka\\_atlas/](http://www.shigen.nig.ac.jp/medaka/medaka_atlas/))、および当研究室の先行研究 (Hiraki *et al.*, 2012, 2014; Kawabata *et al.*, 2012) のデータをもとに行った。

解析に用いた全てのメダカの月齢と体サイズをほぼ同じに揃えたこと、また各個体の全切片を定量に用いたこと、互いに比較したサンプルは全て同時に、同条件下で染色に供したことから、データの補正は特に行わなかった。

### 1-2-3. 視索前野の神経核における *gr1* と *vt/it/gnrh1* の共発現の定量

PCR によって得られたバソトシン (*vt*; vasotocin) (845 bp)、イソトシン (*it*; isotocin) (738 bp)、ゴナドトロピン放出ホルモン 1 (*gnrh1*; gonadotropin-releasing hormone 1) (428 bp) の

cDNA断片をpGEM-Teasyベクター(Promega)にサブクローニングしたもの(Kawabata *et al.*, 2012にて作製、当研究室に保管)を鋳型とし、T7 RNAポリメラーゼとFluorescein RNA Labeling Mix(Roche Diagnostics)によって、Fluorescein標識された*vt*、*it*、*gnrh1*のcRNAプローブを合成した。これらと1-2-2の項で作製したDIG標識された*gr1*のcRNAプローブを用いて、以下の方法に従って蛍光二重ISHを行った。

メダカの脳(*gr1/vt*、*gr1/it*、*gr1/gnrh1*それぞれの組み合わせに対し、雌雄ともにn = 4–8)を摘出し、4% PFA/PBS (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)中で3時間固定した。10%、20%、30%スクロース/PBSを用いて段階的にスクロース置換し、5%アガロース/20%スクロース/PBSに包埋した後、-80°Cのヘキサン中で急速凍結させ、使用まで-80°Cにて保存した。その後、クリオスタット(Microm HM550; Thermo Fisher Scientific)を用いて厚さ20 µmの連続冠状切片を作製し、これをスライドガラス(MAS-GP type A; Matsunami)上に載せて3時間室温にて乾燥させた後、使用するまで-80°Cにて保存した。

解凍した切片を30分程度乾燥させ、PBSで洗浄した後、0.6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS中で30分間インキュベートすることで、内因性のペルオキシダーゼを失活させた。PBSで洗浄後、アセチル化バッファー(0.1 M triethanolamine、0.021 M 塩酸、0.026 M 無水酢酸)を用いて15分間アセチル化処理を行った後、PBSおよび5×SSC/50%ホルムアミドで洗浄した。55°Cにおいてハイブリダイゼーションバッファー(50%ホルムアミド、5×SSC、5×Denhardt's solution (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)、2 µg/ml yeast RNA (Roche Diagnostics)、30 µg/ml calf thymus DNA (Thermo Fisher Scientific))中で2時間のプレハイブリダイゼーションを行った後、Fluorescein標識した*vt*、*it*、*gnrh1*のcRNAプローブ(終濃度0.05 µg/ml(*vt*、*it*)、0.1 µg/ml(*gnrh1*))とDIG標識した*gr1*のcRNAプローブ(終濃度0.5 µg/ml)を加え、55°Cにて一晩ハイブリダイゼーションした。55°Cにて5×SSCおよび2×SSCで洗浄した後、1.5% Blocking Reagent (Roche Diagnostics)/TBS中で、室温にて1時間ブロッキングを行った。その後、1.5% Blocking Reagent/TBSを用いて1000倍に希釈した核染色試薬4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Roche Diagnostics)、1000倍に希釈したアルカリホスファターゼ(AP)標識ヒツジ抗DIG抗体(Roche Diagnostics)、および100倍に希釈したHorseradish peroxidase (HRP)標識ヒツジ抗Fluorescein抗体(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)と4°Cで一晩反応させた。0.05% Tween 20 (MPOA Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)/TBS (TBST)で洗浄の後、*vt*、*it*、*gnrh1*検出のために、Tyramide Signal Amplification (TSA) Plus Fluorescein System (PerkinElmer)を用いて遮光条件下で48–79分間TSA反応を行った。次に、TBSTでの洗浄とAPバッファー(0.12 M NaCl、0.12 M Tris-HCl (pH 8.0))、

0.06 M MgCl<sub>2</sub>)での平衡化を行った後、*gr1* 検出のために、Tris-HCl (pH8.2)に溶解した Fast Red Tablets (Roche Diagnostics)を用いて 1 時間発色させた。PBS で洗浄後、Vectashield Hard Set (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を用いて封入した。サンプルは 4°C で 1 時間乾燥させた後、撮影するまで -80°C にて保存した。

蛍光二重 ISH 後の切片の撮影には共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP8 (Leica microsystems)を用い、PMm/PMg のメス特異的 Npba ニューロンの画像を取得した。取得した画像は Photoshop CS6 (Adobe Systems)を用いて明度とコントラストを調節した。写真撮影時の励起光の波長と検出波長のレンジは、DAPI では 405 nm/410–480 nm、Fluorescein では 488 nm/495–545 nm、Fast Red では 552 nm/620–700 nm とした。PPa と Pbl を含む全ての切片の画像を取得し、*vt*、*it*、*gnrh1* をそれぞれ発現するニューロンと、*vt/it/gnrh1* と *gr1* を共発現するニューロンの数を目視にて計測した。*vt/it/gnrh1* を発現するニューロンに占める *gr1* 発現ニューロンの割合を算出し、雌雄の間で比較した。

#### 1-2-4. 体内のコルチゾル量の測定

雌雄のメダカ(それぞれ 2 個体をプールしたものを 1 サンプルとし、n = 5)を PBS 中でホモジナイズし、ステロイドホルモンをクロロホルム/メタノール溶液 (2:1 v/v) で抽出した後、Sep-Pak C18 cartridge (Waters Corporation, Milford, MA, USA)を用いてろ過した。これらのサンプルを用い、コルチゾルの量を測定した。測定には Cortisol EIA Kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)をメーカー指定の方法で使用した。

#### 1-2-5. 統計解析

統計解析には、GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を使用した。各神経核における *gr1* の発現面積の性差の検定には対応のない両側 Student's *t*-test、全身におけるコルチゾル量の性差の検定には対応のない両側 Welch's *t*-test を用いた。*vt/it/gnrh1* を発現するニューロンに占める *gr1* 発現ニューロンの割合の性差の検定には Mann-Whitney test を用いた。データは全て平均値±標準誤差の棒グラフで示した。

### 1-3. 結果

#### 1-3-1. 脳内の GR の発現部位と発現面積の性差

メダカのもつ 2 つの GR である *gr1*、*gr2* の脳内での発現パターンを半定量的 ISH 法によ

り解析した。その結果、*gr1* についてのみ広範囲でシグナルが得られ、複数の神経核において発現面積に有意な性差がみられた。神経核の略称と名称を表 1-1 に記す。2 つあるいはそれ以上の神経核に連続してシグナルが見られ、各神経核を区別して解析することが困難な場合には、それらの神経核にまたがったシグナルの総計を解析し、神経核の名前はラッシュで区切って記載した。*gr2* についてはシグナルが得られず、定量は不可能であった。脳において、*gr2* の発現は RT-PCR による解析では検出されており、*gr1* より高い発現がみられている (Miyagawa *et al.*, 2015) ことから、今回 ISH による検出ができなかったことは発現そのものがなかったことではなく、細胞あたりの発現量が ISH による検出限界を下回っていたことに起因すると考えられる。

*gr1* を発現する各神経核の代表的な写真と脳内におけるそれらの位置を図 1-1 に、その定量結果を図 1-2 にまとめた。*gr1* は終脳の dDm/dDI、vDI、視索前野の PMP、PPa、Pbl、PMm/PMg、間脳の aNVT、NDTL、pNVT/NAT/NRL、NGp、視蓋の PGZ3、小脳の CbSg で発現していた。これらの神経核のうち、PPa、Pbl、NGp での *gr1* の発現面積はメスで有意に大きかった (PPa、Pbl、NGp についてそれぞれ  $p = 0.014$ 、 $p = 0.003$ 、 $p = 0.049$ )。また、統計的に有意な差は検出されなかったものの、他にも複数の神経核でメスの方が発現面積が大きい傾向がみられた。*gr1* センスプローブを用いた ISH では一切のシグナルがみられなかったことから、今回用いた *gr1* アンチセンスプローブは *gr1* 遺伝子に対して十分に特異性をもっていると考えられる (図 1-3)。

### 1-3-2. 視索前野における *gr1* と行動・神経内分泌関連遺伝子の共発現の性差

*gr1* の発現面積がメスで有意に大きかった神経核のうち、PPa と Pbl は行動や神経内分泌系に関わる重要な神経ペプチド遺伝子を発現している。PPa では *vt*、*it*、*gnrh1*、Pbl では *gnrh1* の発現が、それぞれ確認されている (Kawabata *et al.*, 2012)。PPa と Pbl で *gr1* の発現に性差がみられたことから、これらのペプチドニューロンにおいても *gr1* がメスに偏って発現している可能性が考えられたため、*gr1* とこれらの神経ペプチド遺伝子の二重 ISH を行い、共発現の性差を定量した。

その結果、まず、*gr1* は PPa において *vt*、*it*、*gnrh1* と、Pbl において *gnrh1* と共発現していることが確認できた (図 1-4A)。さらに、PPa における *vt/it/gnrh1* ニューロン、Pbl における *gnrh1* ニューロンのうち、*gr1* を発現するニューロンの割合を算出したところ、PPa における *vt*、*gnrh1* ニューロンのうち *gr1* を発現するものの割合はメスの方が高いことが明らかになった (図 1-4B)。 *gr1* 発現ニューロンの割合は、PPa の *vt* ニューロンではメスで 78.8% (448 細胞中

353 細胞)、オスで 61.7% (522 細胞中 322 細胞)、PPa の *gnrh1* ニューロンではメスで 47.5% (99 細胞中 47 細胞)、オスで 29.4% (211 細胞中 62 細胞) で、それぞれメスで有意に高かった (PPa の *gnrh1* ニューロンで  $p = 0.0022$ 、*vt* ニューロンで  $p < 0.0001$ )。PPa の *it* ニューロンではメスで 71% (739 細胞中 492 細胞)、オスで 66.6% (407 細胞中 289 細胞)、Pbl の *gnrh1* ニューロンではメスで 45.4% (251 細胞中 114 細胞)、オスで 50.6% (233 細胞中 118 細胞) で、雌雄の間に有意な差はみられなかった。

### 1-3-3. 体内のコルチゾル量の性差

GR の発現の性差について、その主なりガンドであるコルチゾルの体内における濃度にも性差がある可能性が考えられた。この可能性を検証するために平常状態の雌雄のメダカの体内におけるコルチゾルの量を測定・比較したところ、メスの方がコルチゾル量が高い傾向がみられたものの、有意な差はみられなかった ( $p = 0.1339$ ) (図 1-5)。

## 1-4. 考察

本章では、メダカ脳内における *gr1* の発現パターンを詳細に解析し、視索前野の神経核 PPa、Pbl と、間脳の神経核 NGp においてその発現面積がメスでより大きいことを示した。また、統計的に有意な差がみられなかった他の神経核の多くにおいても、*gr1* の発現面積はメスでより大きい傾向にあった。脊椎動物において、平常状態の GR の発現パターンを全脳で解析し、雌雄で比較した研究は本研究が初めてである。全脳における GR の発現パターンは哺乳類では詳しく調べられているが (Sousa *et al.*, 1989; Morimoto *et al.*, 1996; Handa and Weiser, 2014)、真骨魚類での知見は少なく、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) において Gr1 の免疫陽性細胞の分布が報告されている (Teitsma *et al.*, 1998, 1999) のみであり、性差に関する知見はこれまでなかった。*gr1* のニジマスとメダカにおける発現パターンを比較すると、大部分においては一致するが、ニジマスにおいてはメダカで発現が見られない Vd/Vs/Vp や中脳被蓋にも *gr1* の発現がみられる。Vs/Vp は局所破壊実験や局所的な電気刺激実験の結果から、真骨魚類の性行動中枢であると考えられており (Koyama *et al.*, 1984; Satou *et al.*, 1984)、この神経核における *gr1* の発現パターンがニジマスとメダカの間で異なるとすれば、これらの魚種間ではストレスが性行動に与える影響にも違いがあるのかもしれない。

PPa、Pbl はともに、哺乳類で雄の性行動に深く関わる視索前野と相同な領域に含まれる (Forlano and Bass, 2011; Karigo *et al.*, 2012)。これらの神経核には行動や内分泌を制御す

る神経ペプチドを産生するニューロンがみられ、PPa には Vt、It、GnRH1、Pbl には GnRH1 を産生するニューロンが局在する(Kawabata *et al.*, 2012)。これらのペプチドニューロンと PPa と Pbl での *gr1* 発現の性差の間に何らかの関係があることが考えられたため、次に *gr1* と *vt/it/gnrh1* の共発現の有無と、共発現の割合の性差を調べた。その結果、PPa では *it*、*vt*、*gnrh1* と *gr1* が、Pbl では *gnrh1* と *gr1* が、それぞれ共発現することが確認され、これらの遺伝子の発現をグルココルチコイドシグナルが調節することで配偶子形成や行動パターンに影響を与えていることが強く示唆された。さらに、PPa においては *vt*、*gnrh1* を発現するニューロンのうち *gr1* を発現するニューロンの割合がオスよりもメスで高かった。メダカの PPa の Vt ニューロンと GnRH1 ニューロンそのものの数に性差はみられない(Kawabata *et al.*, 2012)ため、GR1 を介したシグナル伝達の性差がこれらのニューロン群の機能に性差をもたらしている可能性が考えられる。Vt ニューロン、GnRH ニューロンにおける GR の発現は、真骨魚類を含む脊椎動物においてこれまでも報告されている(Teitsma *et al.*, 1999; Bond *et al.*, 2007)が、これらのペプチドニューロンにおける GR 発現の性差を報告したのは本研究が初めてである。この結果は、Vt、GnRH1 を介した行動や内分泌パターンの形成にグルココルチコイドシグナルが及ぼす影響に性差がある可能性を示している。

Vt は哺乳類のアルギニンバソプレシン(AVP)、It は哺乳類のオキシトシン(OXT)とオロソログスで、攻撃行動、つがい行動、性行動に関わると考えられている(Balment *et al.*, 2006; Goodson and Thompson, 2010; 川幡, 2016)。これらの神経ペプチド遺伝子はストレスによる発現調節を受けると考えられる。たとえば、Vt と It はともに、イトヨ(*Gasterosteus aculeatus*)、ヨーロッパヘダイ(*Sparus auratus*)で高密度飼育のストレスによって血中あるいは全脳中のタンパク質量が上昇する(Mancera *et al.*, 2008; Kleszczyńska and Kulczykowska, 2013)。これらのことから、PPa の Vt ニューロンと It ニューロンで発現する GR がこれらの神経ペプチドの発現を調節し、これらを介して種々の行動に影響を及ぼす可能性は高いと考えられた。

PPa を含む視索前野の小細胞性の Vt ニューロンについては、これらが脳下垂体に投射し、ACTH の分泌促進によって HPI 軸を活性化することが示唆されている(Gilchrist *et al.*, 2000)。ニジマスにおいては、視索前野の小細胞性ニューロンにおける *vt* 発現が急性のストレス刺激に伴って増加する(Gilchrist *et al.*, 2000)。その一方で、真骨魚類では検証されていないものの、哺乳類においてはグルココルチコイドがネガティブフィードバックを介して直接的に *Avp* の発現を抑制することが知られている(Kovács *et al.*, 2000; Keller-Wood, 2015)。これらの先行研究と今回得られた結果をあわせると、グルココルチコイドによる HPI 軸のネガティブフィードバックが *vt* の発現を制御し、PPa における *vt* の発現制御はメスでより強力に行

われていると考えられる。そこで本研究においても、メダカにコルチゾルあるいは GR アンタゴニストを投与して脳内での *vt* の発現量が変化するかどうか検証したが、再現性のある結果は得られなかった。PPa の *vt* の発現量にグルココルチコイドシグナルが影響することはまだ証明できておらず、この点については今後検討する必要がある。

また、アフリカンシクリッド (*Astatotilapia burtoni*) では、視索前野の小細胞性ニューロンにおける *vt* の発現量が優位オスで劣位オスよりも低い (Greenwood *et al.*, 2008)。具体的な検証はされていないものの、この領域における *vt* の発現は優位オスに特徴的な行動を抑える、あるいは劣位オスに特徴的な行動を促進する可能性がある。また、チョウチョウオの一種 (Multiband butterflyfish; *Chaetodon multicinctus*) においては、個体の攻撃性の高さと視索前野の小細胞性ニューロンにおける *Vt* ニューロンの数、大きさにはそれぞれ負の相関がみられる (Dewan and Tricas, 2011)。これらのことから、PPa の *vt* ニューロンにおける *gr1* 発現の性差が、メダカの社会性行動、特にストレス環境下での攻撃行動に性差をもたらす可能性も考えられる。

GnRH1 は配偶子形成の鍵となる分子であり、メダカの Pbl で産生される GnRH1 は脳下垂体前葉に放出され、生殖腺刺激ホルモンである lutenizing hormone (LH) と follicle stimulating hormone (FSH) を分泌させる (Okubo *et al.*, 2006; Okubo and Nagahama, 2008; Karigo and Oka, 2013)。その一方で、PPa の GnRH1 ニューロンは脳下垂体へは投射しないと考えられており (Karigo *et al.*, 2012)、その投射先や機能は未知である。ラットにおいて、GnRH 投与によってメスの性行動が促進される一方で LH と FSH に GnRH と同等の効果はないこと (Moss and McCann, 1973)、脳下垂体を除去したメスで GnRH 投与によって性行動が促進されること (Pfaff, 1973) が報告されており、これらのことから脳下垂体以外の部位への GnRH の作用が性行動を促進すると考えられている。また、*in vivo* と *in vitro* 両方の実験系において、グルココルチコイドが *gnrh1* の転写を抑制することも報告されている (Chandran and DeFranco, 1999; Sapolsky *et al.*, 2000)。これらの知見を踏まえると、PPa で発現する *gr1* は *gnrh1* を介してストレス環境下での性行動を抑制しており、その抑制効果はオスよりもメスでより高いという可能性が考えられる。

PPa、Pblに加えて、NGpにおいても *gr1* の発現面積はメスでより大きかった。現時点ではメダカの NGp で産生される他の神経ペプチドについての所見は乏しく、どのようなニューロンが NGp での *gr1* 発現の性差を形成しているのか知ることはできなかった。NGp は視覚神経路上にあることが知られている。NGp は視蓋前域吻側部の皮質核を介して視覚の一時中枢である視蓋からの入力を受け、間脳下葉に投射している (Sakamoto and Ito, 1982)。この



皮質核-糸球体核-下葉系の機能はいまだ不明であるが、今回の結果は視覚伝達にストレスが与える影響に性差がある可能性を示しており、この点については今後さらに探求する余地がある。また、他の複数の脳領域においても、メスの方が *gr1* の発現面積が大きい傾向にあり、このことはグルココルチコイドシグナルが脳の広い範囲に対してメスでより強い影響を及ぼす可能性を示している。ただし、今回非ストレス環境下で観察された *gr1* 発現の性差がストレス環境下でも同様にみられるかどうかは調べておらず、個体のストレス状態によって発現パターンが異なる可能性も考えられる。

メダカの全身のコルチゾル量を測定した結果、オスとメスの間に統計的に有意な差はないものの、メスの方がより量が多い傾向がみられた。非ストレス環境下で、コルチゾル-GR シグナル系は受容体だけでなく、リガンドのレベルでもメスの方が亢進しているのかもしれない。非ストレス環境下でのコルチゾル濃度の性差はニジマスをはじめとするサケ科魚類にもみられ、これらの魚種でもメスの方が濃度が高い (McQuillan *et al.*, 2003)。げっ歯類でも、一般的にグルココルチコイド濃度はオスよりもメスの方が高く、メスの中でも卵巣由来のエストロゲン量が多い発情前期には特に高くなる (Bangasser and Valentino, 2014)。これに加え、血中グルココルチコイド濃度が卵巣除去によって低下し、卵巣除去個体にエストロゲンを投与すると回復することも報告されている (Seale *et al.*, 2004a, 2004b)。これらのことと本研究の成果を合わせると、メスに偏ったグルココルチコイドシグナルは真骨魚類と哺乳類の間で保存されており、またその性差はエストロゲンによって形成されていると考えられる。

その一方で、GR 発現の性差は真骨魚類と哺乳類の間では保存されていないようだ。GR はマウスの海馬ではオス、ラットの室傍核ではメスに偏って発現する (Goel and Bale, 2010; Pooley *et al.*, 2018) ことが報告されている。これに加えて、ラットの海馬や培養細胞の COS-7 ではエストロゲンが GR の発現を抑制することから (Turner, 1997; Bourke *et al.*, 2012)、哺乳類の GR は脳全体でメスに偏った発現を示すメダカの *gr1* とは異なる発現パターンを示すと考えられる。これについて、現段階で機能の面での考察は難しいが、哺乳類ではメスではリガンド濃度が高いのに対して受容体の発現量を下げ、シグナル伝達経路のバランスを保っているのに対し、真骨魚類ではリガンドも受容体もメスでより多く、哺乳類よりも強固にメスでシグナル伝達系を亢進させていると解釈できる。

直接的な証拠は得られていないものの、今回みられた GR の発現の性差には性ステロイドシグナルが関与していると考えられる。当研究室の先行研究によって、PPa ではエストロゲン受容体 *esr2a* と *esr2b*、アンドロゲン受容体 *ara* と *arb* が発現することが明らかになっている (Hiraki *et al.*, 2012)。PPa でのメスに偏った *gr1* の発現は、これらの受容体を介したエストロ

ゲンによる発現促進、あるいはアンドロゲンによる発現抑制によって形成されたと考えられる。その一方で、Pbl と NGp ではエストロゲンやアンドロゲンの受容体の発現は確認されていない(Hiraki *et al.*, 2012)ため、これらの神経核における *gr1* の発現の性差に性ステロイドが関わっているとすれば、その作用は他の細胞を介した間接的なものである可能性が高い。

以上の研究により、メダカの脳における *gr1* の発現面積には性差があり、視索前野の *vt* ニューロンと *gnrh1* ニューロンではメスの方が *gr1* 発現ニューロンの割合が高いことが明らかになった。これらのペプチド産生ニューロンを介してグルココルチコイドシグナルが内分泌や行動のパターンに与える影響は、オスよりもメスの方が大きいと考えられる。また、Vt と Gnrh1 は真骨魚類の性転換プロセスへの関与が繰り返し示唆されてきている(Godwin, 2010; Liu *et al.*, 2017)。グルココルチコイドシグナルについても多くの魚種で性分化や性転換への影響が報告されている(Hattori *et al.*, 2009; Hayashi *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2010; Fernandino *et al.*, 2012; Yamaguchi and Kitano, 2012; Nozu and Nakamura, 2015; Miller *et al.*, 2019)ことから、今回みられた *vt* ニューロン、*gnrh1* ニューロンにおける *gr1* 発現の性差が真骨魚類の脳の性的可逆性に寄与する可能性も考えられる。

表 1-1. 神経核の略称と名称

---

aNVT	anterior part of the ventral tuberal nucleus
CbSg	granular layer of cerebellum
dDI	dorsal part of the lateral nucleus of the dorsal telencephalic area
dDm	dorsal part of the medial nucleus of the dorsal telencephalic area
NAT	anterior tuberal nucleus
NDTL	diffuse nucleus of lateral torus
NGp	posterior part of the glomerular nucleus
NRL	lateral recess nucleus
Pbl	basal lateral preoptic nucleus
PGZ3	periventricular gray zone (layer 3)
PMg	gigantocellular portion of the magnocellular preoptic nucleus
PMm	magnocellular portion of the magnocellular preoptic nucleus
PMp	parvocellular portion of the magnocellular preoptic nucleus
pNVT	posterior part of the ventral tuberal nucleus
PPa	anterior parvocellular preoptic nucleus
PPp	posterior parvocellular preoptic nucleus
Vd	dorsal nucleus of the ventral telencephalic area
vDI	ventral part of the lateral nucleus of the dorsal telencephalic area
vDm	ventral part of the medial nucleus of the dorsal telencephalic area
Vp	posterior nucleus of the ventral telencephalic area
Vs	supracommissural nucleus of the ventral telencephalic area

---

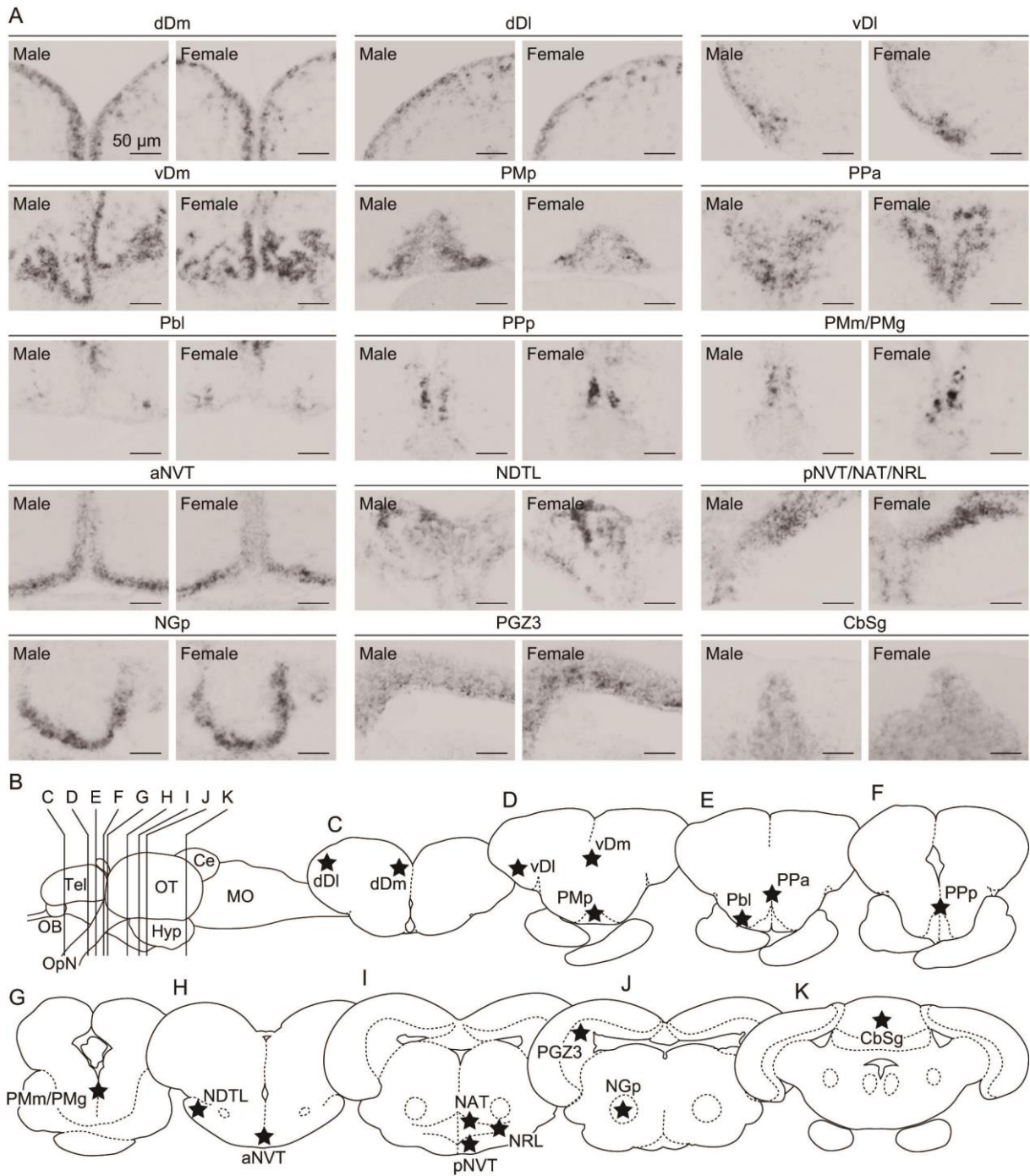


図 1-1. メダカの脳における *gr1* 発現ニューロンの分布

(A) 各神経核における *gr1* の ISH 結果の代表的な写真。スケールバーは全て 50 μm。(B) メダカの脳を側面から見た模式図。左が吻側、右が尾側、上が背側、下が腹側。C-K の面における断面をパネル C-K に示す。Ce は小脳、Hyp は間脳、MO は延髄、OB は嗅球、OpN は視神経、OT は視蓋、Tel は終脳を示す。(C-K) *gr1* 発現ニューロンの分布を黒い星マークで示した線画。各神経核の略称については表 1-1 を参照のこと。

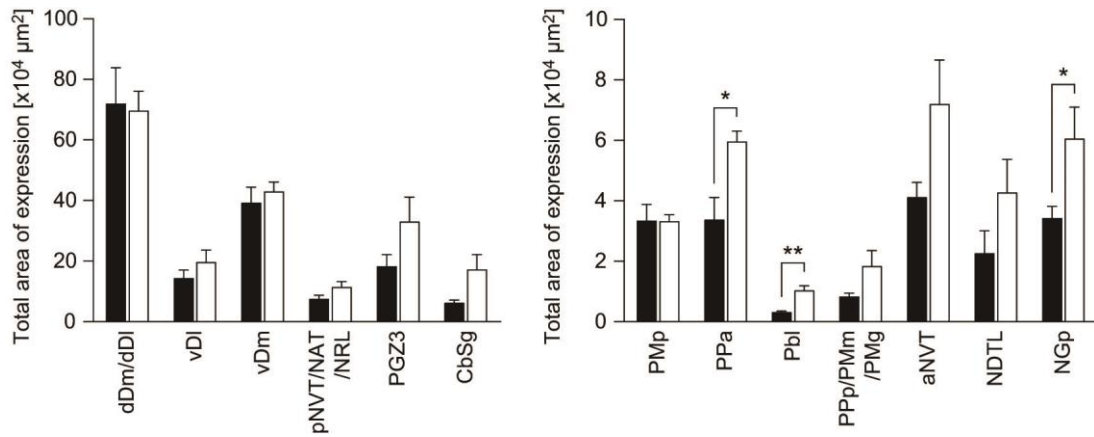


図 1-2. メダカの脳における *gr1* 発現の性差

雌雄のメダカ(各  $n = 5$ )の神経核別の *gr1* の発現面積。黒のカラムがオス、白のカラムがメスの結果を示す。視認性の向上のためグラフを2つに分割してある。雌雄間の有意差を\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  で示した(Student's *t*-test)。神経核の略称については表 1-1 を参照のこと。

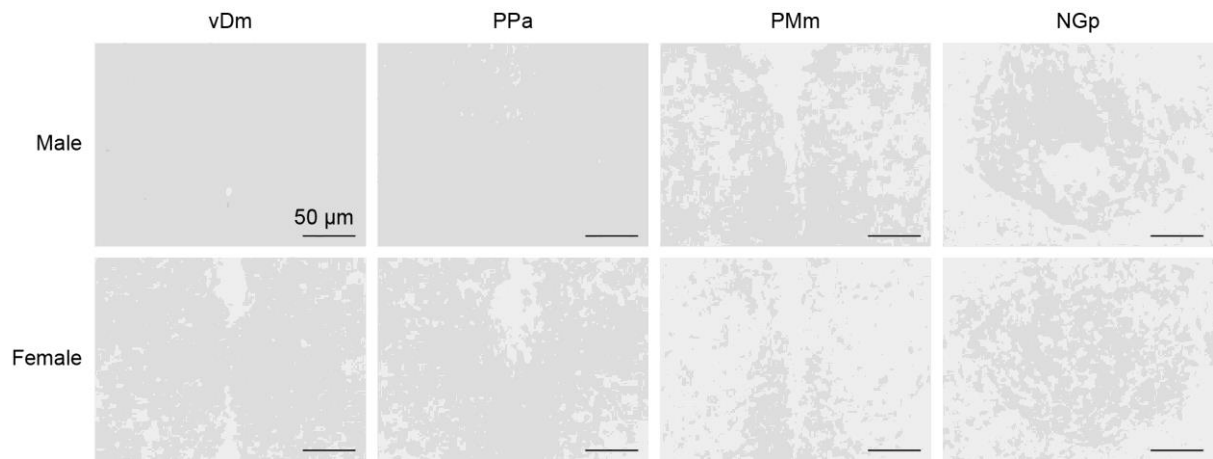


図 1-3. *gr1* のセンスプローブを用いた ISH の結果

神経核 vDm、PPa、PMm、NGp における ISH 結果の代表的な写真。スケールバーは全て 50  $\mu\text{m}$ 。これら以外の神経核においても、センスプローブを用いた染色では一切のシグナルがみられなかった。神経核の略称については表 1-1 を参照のこと。

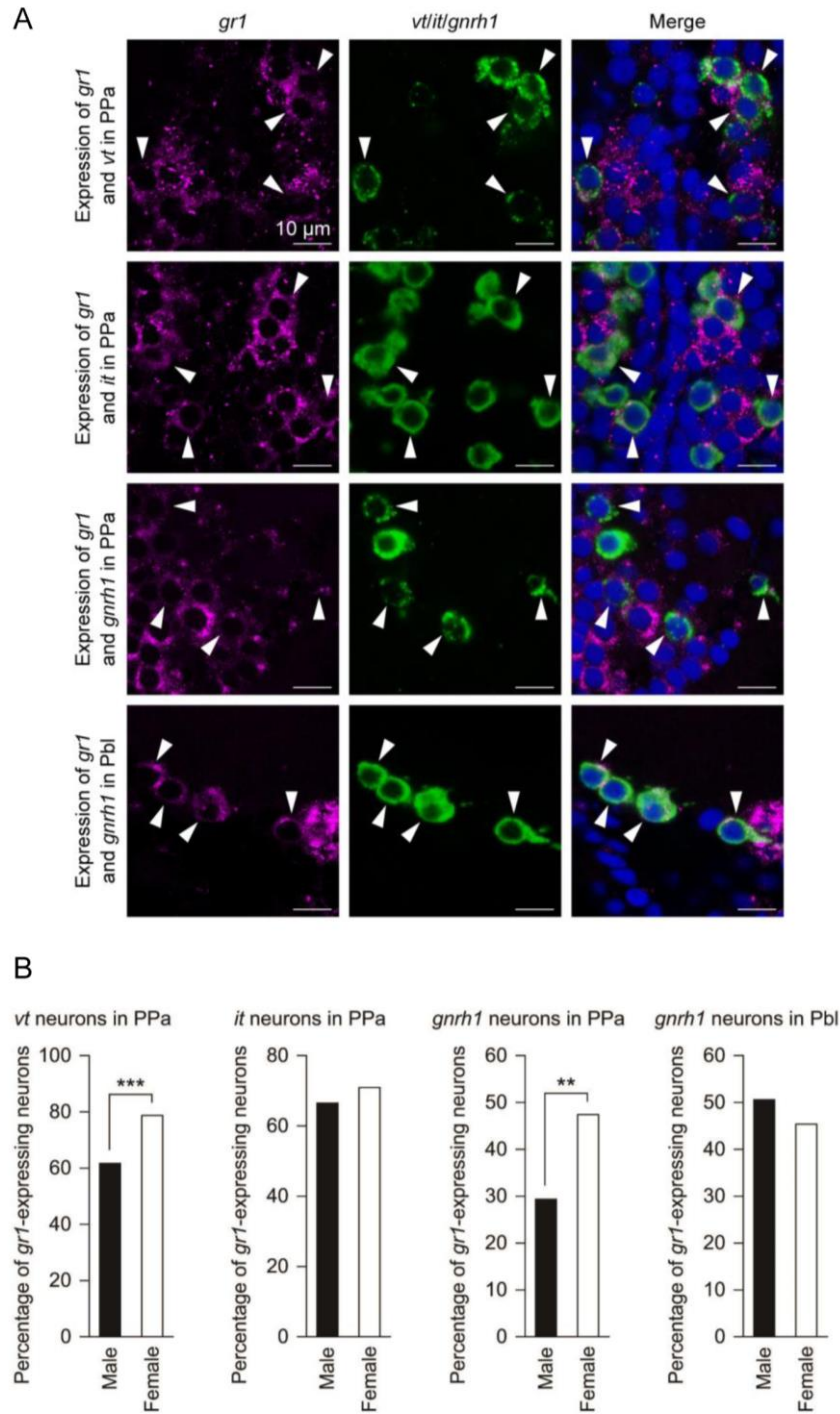


図 1-4. *gr1* と *vt*, *it*, *gnrh1* の共発現

(A) 上から、PPa の *vt/it/gnrh1* ニューロン、Pbl の *gnrh1* ニューロンにおける *gr1* の発現。マゼンタは *gr1* の、緑は *vt/it/gnrh1* のシグナルを、青は DAPI による対比染色を示す。スケールバーは全て 10  $\mu\text{m}$ 。(B) PPa の *vt/it/gnrh1* ニューロン、Pbl の *gnrh1* ニューロンのうち *gr1* を発現するニューロンの割合。黒のカラムがオス、白のカラムがメスの結果を示す。雌雄間の有意差を\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$  で示した (Mann-Whitney test)。神経核の略称については表 1-1 を参照のこと。

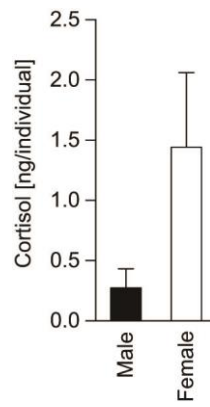


図 1-5. 体内コルチゾル量の性差

非ストレス環境下でのメダカ全身のコルチゾル量。黒のカラムがオス、白のカラムがメスの結果を示す。



## 第2章 視索前野のメス特異的 Npba ニューロンの エストロゲン応答性

### 2-1. 諸言

序論で述べたように、真骨魚類の脳は生涯にわたって性的な可逆性をもつことが知られながらも、その可逆性のメカニズムはまったく明らかになっておらず、脳内に存在する性差についても断片的な知見しか得られていなかった。こうした中、第1章では脳の性差に関する新たな知見として、メダカの脳内においてストレス応答を担う GR の発現には性差があり、視索前野の *vt* ニューロンと *gnrh1* ニューロンにおいてオスよりもメスで GR 発現ニューロンの割合が高いことが示された。第1章で見出された性差は雌雄の表現型が連続的であり、解析したサンプルの中にはメスの表現型に近いオスや、オスの表現型に近いメスも存在していた。他脊椎動物も含め、これまでに発見されている脳内の性差にはこれと同様のものが多い (Ball *et al.*, 2014; Joel *et al.*, 2015)。

これに対し、メスの表現型とオスの表現型が完全に分かれており、その形質から個体の性別を判断できるほど顕著な性差もわずかながら発見されている。これらは“性的二型 (sexual dimorphisms)”と表現され、近年は平均値の違い程度の性差 (sex differences) と分けて捉えるべきと考えられている (McCarthy *et al.*, 2012; Ball *et al.*, 2014)。神経解剖学的な性的二型の例としては、鳥類の中でオスが求愛としてのさえずり行動を行うカナリア (*Serinus canaria*) やキンカチョウ (*Taeniopygia guttata*) にみられる“song system”の性的二型、ラットをはじめとする哺乳類の視索前野の神経核“SDN-POA”の性的二型が挙げられる。song system はオス特異的なさえずり行動の学習と発現に不可欠な神経核群で、その一部はメスよりもオスで顕著に大きい (Nottebohm and Arnold, 1976)。SDN-POA は視索前野の神経核で、メスよりもオスで3-5倍程度大きく (Gorski *et al.*, 1978, 1980)、その機能は完全には解明されていないものの、性指向や性行動への関与が示唆されている (Arendash and Gorski, 1983; Houtsmuller *et al.*, 1994)。

そのような状況の中、メダカの脳でも性的二型とよべる性差が発見された。真骨魚類の性行動中枢として知られる視索前野の神経核 PMm/PMg (the magnocellular/gigantocellular portions of the magnocellular preoptic nucleus) (Koyama *et al.*, 1984; Satou *et al.*, 1984) において、エストロゲン受容体とアンドロゲン受容体がほぼメス特異的に発現していることがその一つである (Hiraki *et al.*, 2012)。また、この神経核は magnocellular/gigantocellular の名の

通り、比較的大細胞性のニューロンで構成されているが、その中でも一際大きいニューロン  
の一群(以降、この一群を大細胞性ニューロンと称する)がみられ、その細胞数はオスよりも  
メスで顕著に多かった(大久保ら, 未発表データ)。その後、この PMm/PMg の大細胞性ニュー  
ロンの大部分は Neuropeptide B (Npba) という神経ペプチドをコードする遺伝子 *npba* を発  
現すること、PMm/PMg の大細胞性 Npba ニューロンはオスには全くみられずメスのみにみら  
れることがわかった(梶山(平木), 2015)。この PMm/PMg の Npba ニューロンの数の性差も  
性的二型とよべる顕著なものであった。さらに、これらのメス特異的な Npba ニューロンは、脳  
の性的可逆性の観点でも興味深い特徴を有していた。これらはメダカのもつ 5 種類の性ステ  
ロイド受容体 (*esr1*, *esr2a*, *esr2b*, *ara*, *arb*) のうち 4 種類 (*esr1*, *esr2b*, *ara*, *arb*) を発現し、  
エストロゲンに応答して *npba* を発現する一方で、アンドロゲンに応答して *npba* の発現を消  
失させていた(Hiraki *et al.*, 2014; 横山, 2015)。このことから、PMm/PMg のメス特異的な  
Npba ニューロンは性ステロイドの影響を強く受け、性的なゆらぎをもつと考えられ、その制御  
機構と機能を明らかにできれば、真骨魚類の脳の性転換メカニズム解明の糸口になると考  
えられた。そこで本章以降では、研究対象を PMm/PMg の Npba ニューロンに変更し、これら  
のニューロンの性状解析を行った。

本章では、まず PMm/PMg のメス特異的な Npba ニューロンに対して透過型電子顕微鏡  
と細胞小器官マーカーの免疫組織化学を用いた形態観察を行った。また、これらのニュー  
ロンのクロマチンに特徴的な化学修飾を見出した。さらに、これらのニューロンの形態と化学  
修飾がエストロゲン依存的かつ可逆的に保たれていることを発見した。続いて、メスの大細  
胞性 Npba ニューロンに相当するニューロンがオスにも存在するかどうか、エストロゲン投与  
実験によって確かめた。

## 2-2. 材料と方法

### 2-2-1. 実験魚

当研究室において、*npba* のプロモーター領域に緑色蛍光タンパク質遺伝子 *gfp* を接続  
した配列をゲノム中に挿入したトランスジェニックメダカ (*npba*-GFP トランスジェニックメダカ)  
が作出され、GFP の蛍光が *npba* 発現ニューロン特異的にみられることが確認されている(梶  
山(平木), 2015)。実験にはこの *npba*-GFP トランスジェニックメダカまたは d-rR 系統のメダカ  
を用いた。メダカは水温 28°C、14 時間明期/10 時間暗期の条件下で飼育し、ブラインシュリ  
ンプ幼生およびは市販の固形飼料(おとひめ; 日清丸紅飼料)を 1 日 3 回もしくは 4 回与え

た。脳の摘出は明期開始後 1–3 時間の間に行った。実験には 3–4 ヶ月齢の性成熟した個体を用い、明期開始後 1–3 時間の間にサンプリングした脳を解析に供した。

## 2-2-2. PMm/PMg のメス特異的 Npba ニューロンの細胞内構造の観察

*npba*-GFP トランスジェニックメスメダカ 6 匹の脳を摘出し、3 匹分を 4% PFA (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) and 0.1% glutaraldehyde (GA) (Polysciences) in 0.15 M PBS、3 匹分を 4% PFA (Electron Microscopy Sciences) and 0.05% GA (Polysciences) in 0.15 M PBS 中で 2.5 時間浸漬固定した後、30%スクロース in 0.1 M リン酸緩衝液 (phosphate buffer; PB) 中で一晩インキュベートした。これを O.C.T. Compound (サクラファインテックジャパン, Tokyo, Japan) 中に包埋し、厚さ 40  $\mu\text{m}$  の凍結冠状切片を作製した。蛍光実体顕微鏡下で、この中から GFP の蛍光を指標に PMm/PMg を含む切片を選別し、ウサギ抗 Npba ポリクローナル抗体 (梶山 (平木), 2015) による免疫組織化学を行った。免疫組織化学の手法は Sawai *et al.*, 2012 に倣った。メタ過ヨウ素酸溶液 (0.213 g メタ過ヨウ素酸 in 100 ml PBS) を用いて 20 分間、内在性ペルオキシダーゼの不活化を行ったのち、ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (R) (ニチレイバイオサイエンス, Tokyo, Japan) 構成試薬のブロッキング試薬 (Triton X-100 入り PBS (PBST; 0.03% Triton X-100 in PBS) で 2 倍希釈) 中で室温にて 2 時間ブロッキングし、Npba 抗体を Triton X-100、NGS 入り PBS (TNBS; 0.03% Triton X-100 and 1% Normal Goat Serum in PBS) で 1000 倍希釈した液中で 4°C にて 3 日間インキュベートした。この際、各個体につき 1 枚の切片を Npba 抗体を含まないブロッキング試薬中でインキュベートし、ネガティブコントロールとした。PBST で 5 分、2 回の洗浄ののちヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (R) (ニチレイバイオサイエンス) 構成試薬の、ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体 (動物種: ヤギ) を PBST で 2 倍希釈した液中で室温にて 2 時間インキュベートした。PBST で 5 分、3 回の洗浄ののち、ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (R) (ニチレイバイオサイエンス) 構成試薬のペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを PBST で 2 倍希釈した液中で室温にて 2 時間インキュベートした。PBS で 5 分、2 回、0.05 M Tris buffer で 5 分の洗浄ののち、3, 3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩 (DAB) 発色液 (0.8% DAB and 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.5) 中で 10 分から 11 分間発色させた。これらの切片を光学顕微鏡下で観察したところ、Npba 抗体を使用して染色した切片には DAB の発色による免疫陽性シグナルが認められた一方で、Npba 抗体を使用しなかったネガティブコントロール群の切片はどれも免疫陽性シグナルをもたなかった。電子顕微鏡での観察のため、切片を 1% OsO<sub>4</sub> in 0.1 M PB (pH 7.4) 中で室温にて 30 分間後固定し、エ

タノール系列による脱水を行ったのち、Quetol 812 (日新 EM, Tokyo, Japan) に包埋した。EM-UC7 (Leica Microsystems) を用いて超薄切片を作製したのち、透過型電子顕微鏡 (TEM) (JEM 1400-Plus; 日本電子, Tokyo, Japan) を用いて観察、写真を撮影した。超薄切片の作製は、日本医科大学大学院医学研究科共同研究施設形態解析研究室の安達彰子氏にお願いした。電子顕微鏡下においても、ネガティブコントロールとした切片では免疫陽性シグナルはみられなかった。

### 2-2-3. PMm/PMg のメス特異的 Npba ニューロンにおける細胞小器官と化学修飾の免疫組織化学

ab9050 を除く一次抗体については、免疫組織化学は以下の通りに行った。d-rR メスメダカの脳(それぞれの一次抗体について  $n = 5$ ) を摘出し、1-2-3 の項と同様の方法で連続冠状切片を作製した。解凍した切片を 30 分程度乾燥させ、PBS で洗浄した後、2% normal goat serum (NGS; Vector Laboratories)/PBS 中で 30 分間ブロッキングを行った。PBS で洗浄の後、抗体希釈液 (2% NGS、1% 牛血清アルブミン (Sigma-Aldrich)、0.01%  $\text{NaN}_3$ 、0.02% スカシガイヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin; Sigma-Aldrich)/PBS) 中で Npba 抗体 (500 倍希釈) および小胞体マーカーとゴルジ体マーカー (それぞれ KDEL と 58K Golgi protein)、あるいはリン酸化 RNA Polymerase II (RNAPII) または各種ヒストン修飾に対する抗体を希釈した液中で  $4^\circ\text{C}$  にて一晩抗体反応を行った。一次抗体はそれぞれ RNAPII の C 末端ドメインのセリン 2 またはセリン 5 がリン酸化されたもの (RNAPII-Ser2P、RNAPII-Ser5P)、メチル化されたヒストン H3 のリジン 4 (H3K4)/9 (H3K9)/27 (H3K27)/36 (H3K36)/ヒストン H4 のリジン 20 (H4K20)、アセチル化された H3K9/H3K27/H4K20 を認識するものを使用した。これらの一次抗体の詳細および希釈濃度を表 2-1 にまとめた。PBS で洗浄した後、PBS 中で 500 倍希釈した Alexa Fluor 405-、488-、555-標識抗ウサギ二次抗体および 1000 倍希釈した蛍光標識抗マウス二次抗体 (表 2-1 を参照のこと、全て Thermo Fisher Scientific)、1000 倍希釈した DAPI (Roche Diagnostics) と  $4^\circ\text{C}$  で一晩反応させた。ウサギポリクローナル抗体を用いて H3K36 トリメチル化を検出する際には *npba*-GFP トランスジェニックのメスメダカを使用し、Npba ニューロンを GFP の蛍光で検出した。PBS で洗浄後、Vectashield Hard Set (Vector Laboratories) を用いて封入した。 $4^\circ\text{C}$  で 1 時間乾燥させた後、撮影するまで  $-80^\circ\text{C}$  にて保存した。撮影には共焦点レーザースキャン顕微鏡 TCS SP8 (Leica Microsystems) を用い、取得した画像のうち数値化に用いないものは Adobe Photoshop (Adobe Systems) を用いて明度とコントラストを調節した。写真撮影時の励起光の波長と検出波長のレンジは、DAPI、

Alexa Fluor 405 では 405 nm/410–480 nm、Alexa Fluor 488 では 488 nm/495–545 nm、Alexa Fluor 555 では 552 nm/620–700 nm とした。免疫組織化学の結果、小胞体マーカーとゴルジ体マーカーに対する抗体は細胞質中のそれぞれ一部分に、リン酸化 RNAPII とヒストン修飾に対する抗体の多くは核にシグナルがみられたことから、標的分子を特異的に認識していると考えられた。ただし、H3K9 モノメチル化、H3K9 アセチル化、H3K36 トリメチル化、H4K20 アセチル化に対する抗体では核以外の場所でシグナルがみられたため、これらを標的とした免疫組織化学の結果は特異性に欠けると判断し、定量に用いるデータから除外した。

卵巣除去または偽手術個体を用いた解析では、以下の処理を施した個体を用いて上記の解析を行った。性成熟したメスのメダカを MS-222 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) を用いて麻酔し、剃刀とピンセットを用いて開腹し卵巣の摘出の後縫合(卵巣除去)、あるいは開腹の後縫合のみ(偽手術)を行った。縫合には手術用糸(夏目製作所, Tokyo, Japan)を用いた。生理食塩水中で 2 日間、飼育水中で 3 日間回復させた後、卵巣除去個体には 100 ng/ml のエストラジオール-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) または溶媒(エタノール)、偽手術個体には溶媒を 6 日間投与し、それぞれ OVX+E<sub>2</sub> 群、OVX 群、Sham 群とした。なお、本研究で投与した E<sub>2</sub> の濃度は、過去に報告のあるメダカの血中 E<sub>2</sub> 濃度 (15–500 pg/ $\mu$ l) (Foran *et al.*, 2002, 2004; Tilton *et al.*, 2003) をもとに決定した。

#### 2-2-4. RNAP II とヒストン修飾の免疫陽性シグナルの数値化

共焦点蛍光顕微鏡 TCS SP8 (Leica microsystems) を用いて、PMm/PMg の全ての Npba 免疫陽性シグナルをもつニューロンを含む切片の画像を取得した。免疫陽性シグナルの数値化には解析ソフト「Las X Lite」(Leica microsystems) を使用した。各画像中の全ニューロンに対し、免疫陽性シグナルのある領域を選択し、その領域に対してソフトが算出した免疫陽性シグナルの輝度を、同じ領域の DAPI の輝度(クロマチンの密度を反映する)で割った数値を単位クロマチンあたりの修飾強度とみなし、これを各ニューロンの生データとした。この補正は各種の免疫陽性シグナルの強度がクロマチンの密度に依存して変化することを考慮して行った。さらに、切片内での深度の違いによるシグナル強度の違いを補正するために、各 Npba ニューロンと同一視野内の、Npba 免疫陽性シグナルをもたないニューロンを 3 個以上選択し、これらの免疫陽性シグナルの平均値で生データを割った。Npba 免疫陽性シグナルをもたないニューロンを 3 個以上選択できない視野はデータ化しなかった。比較に用いた切片は全て同時に、同一条件下で処理した。

### 2-2-5. PMm/PMg の Npba ニューロンの形態に対するエストロゲンの影響の解析

性成熟した *npba*-GFP トランスジェニックのメスマダカに対して 2-2-3 と同様に手術を施した後、生理食塩水中で 2 日間、飼育水中で 3 日間回復させ、卵巣除去個体には 100 ng/ml の E<sub>2</sub> または溶媒(エタノール)、偽手術個体には溶媒を 6 日間投与した。これらのメダカの脳を摘出し、1-2-3 の項と同様の方法で連続冠状切片を作製した(各群 n = 5)。

これらの切片に対し、以下の通りに蛍光ニッスル染色と核染色を行った。解凍した切片を 30 分乾燥させた後、PBS 中で 40 分インキュベートし、0.1 % Triton X-100 入り PBS で 10 分、PBS で 5 分、2 回の洗浄後、NeuroTrace 530/615 Red Fluorescent Nissl Stain (Thermo Fisher Scientific) を PBS で 20 倍希釈した溶液中で 60 分インキュベートした。その後、0.1 % Triton X-100 入り PBS 中で 10 分、PBS 中で 5 分、2 回洗浄し、DAPI を PBS で 1000 倍希釈した液中で 120 分間インキュベートし、Vectashield Hard Set (Vector Laboratories) で封入した。共焦点蛍光顕微鏡 TCS SP8 (Leica microsystems) を用いて、GFP の蛍光を指標に PMm/PMg の Npba ニューロンを含む全ての切片の画像を取得した。写真撮影時の励起光の波長と検出波長のレンジは、DAPI では 405 nm/410–480 nm、GFP では 488 nm/495–545 nm、NeuroTrace 530/615 Red Fluorescent Nissl Stain では 552 nm/620–700 nm とした。全ての Npba ニューロンの画像を出力し、GFP の蛍光の外縁を細胞体の輪郭、DAPI での染色によって得られたシグナルの外縁を核の輪郭として Adobe Photoshop (Adobe Systems) を用いてモノクロ二階調化し、それぞれの面積を ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて算出した。各細胞の細胞体・核の断面積の数値を 1 サンプルとした。また、各群の代表的な写真に対し、Adobe Photoshop (Adobe Systems) を用いてコントラストと明度を調節した。

### 2-2-6. オスマダカへのエストロゲン・BrdU 投与実験

性成熟した d-rR のオスマダカ (n = 5) に対し、100 ng/ml の E<sub>2</sub> と 307.1 µg/ml の 5'-ブromo-2'-デオキシウリジン (BrdU) (ナカライテスク, Kyoto, Japan) を 9 日間投与した。これらのメダカの脳を摘出し、1-2-3 の項と同様の方法で連続冠状切片を作製し、PBST 中で 10 分インキュベートの後、30°C で 30 分塩酸と反応させ、PBST 中で 10 分インキュベートした後、Npba と BrdU を標的とする免疫組織化学を行った。免疫組織化学の方法は 2-2-3 と同様だが、BrdU の検出にはマウス抗 BrdU モノクローナル抗体 (347580; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) を 1000 倍希釈、Alexa Fluor 488-標識抗マウス二次抗体 (Thermo Fisher Scientific) を 500 倍希釈で使用した。2-2-3 と同様の方法で画像を取得し、E<sub>2</sub> 投与群でみら

れた Npba 免疫陽性ニューロンにおける核の最大径と DAPI の輝度を Las X Lite (Leica Microsystems) を用いて算出した。

### 2-2-7. 統計解析

統計的な解析には、GraphPad PRISM (GraphPad Software) を使用した。全てのデータに対し、false-positive rate を 1% とした ROUT 検定によって外れ値を検定し、検出された場合にはその値を解析から除外した。2 群間の比較では F-test、3 群以上の間での比較では Bartlett's test または Brown-Forsythe test によって、それぞれ群間の等分散性を検証した。ほとんどの実験においてデータが等分散性をもたないと判定されたことから、全てのデータに対して検定方法をノンパラメトリックな手法に統一した。2 群間の比較は Mann-Whitney test を用いて行い、3 群以上の間での比較は Kruskal-Wallis 検定の後、Dunn's *post hoc* test を用いて行った。データは全て中央値と四分位範囲で表し、Tukey 法によって得られた箱ひげ図で描画した。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. PMm/PMg のメス特異的 Npba ニューロンの形態

PMm/PMg のメス特異的 Npba ニューロンに対し、Npba 抗体を用いた免疫組織化学を行い、TEM でその細胞内構造を観察した (図 2-1A)。Npba 抗体は当研究室にて以前作製され、その特異性も確認済である (梶山 (平木), 2015)。Npba 免疫陽性ニューロンは円形で大型の核をもち、その中にヘテロクロマチン領域はほぼみられなかった。一方、近傍の Npba 免疫陽性シグナルをもたないニューロンは Npba 免疫陽性ニューロンよりも小さい核をもち、識別可能なヘテロクロマチン領域を含んでいた。また、Npba 免疫陽性ニューロンは軸索に近い位置の細胞質中には多数の顆粒状の構造を、軸索とは反対側の細胞質中には発達した小胞体を含んでいた。顆粒状の構造は、高濃度の免疫陽性シグナルを呈していたこととその大きさから分泌顆粒と考えられた。

また、これまで行われてきた光学顕微鏡による形態観察では、PMm/PMg の大細胞性ニューロンは直径 12  $\mu\text{m}$  以上であった (梶山 (平木), 2015) が、TEM での観察でみられたニューロンの直径は直径 10–12  $\mu\text{m}$  程度とより小さかった。光学顕微鏡での実験系よりも厳しい条件で脱水を行ったこと、樹脂へ包埋したことによって、先行研究での実験よりも組織が縮小したと考えられる。

TEM での観察では、免疫陽性シグナルを得るために組織の固定を弱くせざるを得なかったことから細胞小器官の膜構造を保持できず、小胞体、また小胞体とともに神経ペプチドの分泌に必須であるゴルジ体の局在をはっきりと確認することができなかった。そこで次に、小胞体とゴルジ体の特異的に認識する抗体を用いた免疫組織化学を行い、これを光学顕微鏡で観察した(図 2-1B)。その結果、細胞質の大部分を占める小胞体を改めて確認するとともに、細長く発達したゴルジ体が小胞体とは異なる位置に局在することを確認できた。

### 2-3-2. PMm/PMg のメス特異的 Npba ニューロンで亢進している化学修飾

TEM での観察により、PMm/PMg のメス特異的 Npba ニューロンはユークロマチン化したクロマチンをもつことが推測され、PMm/PMg のメス特異的 Npba ニューロンでは他のニューロンと比べて転写が活性化されている可能性が考えられた。そこで次に、RNAPII-Ser2P、RNAPII-Ser5P の核全体における修飾レベルを定量した。これら 2 種類の化学修飾は活発に転写を行っている RNAPII 複合体のマーカースとして知られる (Moore and Proudfoot, 2009)。その結果、Npba ニューロンの核では他のニューロンと比べてこれらの修飾のレベルが有意に高かった(図 2-2A、B) (両方とも  $p < 0.0001$ ) ことから、Npba ニューロンでは実際にゲノム中の広範囲で転写が活性化されていると考えられた。

また、これらの Npba ニューロンにおける転写活性をさらに検証するため、種々のヒストン修飾、H3K4・H3K9・H3K27・H3K36・H4K20 のメチル化と、H3K27 のアセチル化のレベルを免疫組織化学によって定量した。その結果、これらのどの化学修飾も、PMm/PMg のメス特異的 Npba ニューロンでは近傍の他のニューロンよりも DAPI 染色強度あたりの修飾強度が平均して 1.2 倍程度高かった(図 2-3)。全ての化学修飾が Npba ニューロンで亢進しているとは考えにくく、この差は免疫陽性シグナルを数値化する際に行った DAPI 染色の強度による補正によって生じたアーティファクトだと考えられた(Npba ニューロンは大きい核をもち、DAPI 染色の強度も他のニューロンに比べて低かった)。しかし、その中でも H3K36 モノメチル化(H3K36me)・H3K36 ジメチル化(H3K36me<sub>2</sub>)の修飾強度は PMm/PMg のメス特異的 Npba ニューロンでは近傍の他のニューロンよりも平均して 2.4 倍以上高く、これらは他の化学修飾と比べて明らかに亢進していると考えられた(図 2-2B) (両方とも  $p < 0.0001$ )。これらの修飾強度の違いは、組織切片からも見て取れた(図 2-2A)。

### 2-3-3. PMm/PMg のメス特異的 Npba ニューロンの特徴のエストロゲン依存性

緒言で述べたように、PMm/PMg のメス特異的 Npba ニューロンはエストロゲン受容体を



発現し、PMm/PMg における *npba* の発現は体内の性ステロイドの影響を受けて可逆的に変化する(Hiraki *et al.*, 2014; 横山, 2015)。このことから、*npba* の発現と同様に、形態や転写活性についてのこれらのニューロンの特徴もエストロゲン依存的に保たれている可能性が考えられた。そこで次に、PMm/PMg のメス特異的 *Npba* ニューロンにおける上記の特徴を、Sham 群・OVX 群・OVX+E<sub>2</sub> 群のメダカの間で比較した。

細胞体と核の大きさはどちらも OVX 群では Sham 群と比べて低下し(どちらについても  $p < 0.0001$ )、OVX+E<sub>2</sub> 群では Sham 群と同程度まで回復していた(どちらについても  $p < 0.0001$ ) (図 2-4A、B)。また、DAPI 染色の強度は OVX 群で上昇し、OVX+E<sub>2</sub> 群で低下していた(どちらについても  $p < 0.0001$ ) (図 2-4A、B)。DAPI 染色の強度はクロマチンの密度を反映するため、クロマチンがユークロマチン化され核が大型化している通常の *Npba* ニューロンでは強度が低い一方で、核が小型化している OVX 群では強度が高くなったと解釈できる。また、通常の PMm/PMg のメス特異的 *Npba* ニューロンで亢進していることが示された RNAPII-Ser2P、RNAPII-Ser5P、H3K36me、H3K36me<sub>2</sub> の免疫陽性シグナルの強度も OVX 群で Sham 群と比べて低下し(全ての修飾で  $p < 0.0001$ )、OVX+E<sub>2</sub> 群では Sham 群と同程度まで回復していた(RNAPII-Ser2P では  $p = 0.0053$ 、RNAPII-Ser5P と H3K36me<sub>2</sub> では  $p < 0.0001$ 、H3K36me では  $p = 0.0002$ ) (図 2-5)。この結果から、PMm/PMg の *Npba* ニューロンは複数の特徴をエストロゲン依存的に維持していることが示された。

#### 2-3-4. エストロゲン投与下のオスにおける PMm/PMg の *Npba* ニューロンの誘導

上に述べたように、メスのメダカにおいて、PMm/PMg の *Npba* ニューロンは E<sub>2</sub> 依存的に *npba* を発現している。その一方で、オスのメダカにおいても PMm/PMg における *npba* の発現は E<sub>2</sub> によって誘導される。通常、オスのメダカは PMm/PMg で *npba* をほとんど発現しないが、E<sub>2</sub> を投与すると数日で発現量が上昇することが、*in situ hybridization* 法によって示されている(横山, 2015)。また、オスメダカの PMm/PMg にも大細胞性のニューロンは存在するが、これらの細胞数は少なく、メスにもみられる *Npba* 非発現の大細胞性ニューロンと同等のものだと考えられた(梶山(平木), 2015)。これらのことから、オスメダカの PMm/PMg にはメスの *Npba* ニューロンに相当する大細胞性ニューロンは通常存在せず、E<sub>2</sub> 投与下で *npba* を発現する大細胞性ニューロンが新たに誘導されると考えられる。このことについて、真骨魚類では他の脊椎動物に比べて成体での神経新生がより広い範囲で数多く起こること(Chapouton *et al.*, 2007; Ganz and Brand, 2016)、脊椎動物では一般にエストロゲンは成体での神経新生を促進すること(Mahmoud *et al.*, 2016; Heberden, 2017; Ponti *et al.*, 2018)を

踏まえると、2つの可能性が考えられた。E<sub>2</sub>投与下のオスの PMm/PMg では Npba ニューロンが神経新生によって誘導される可能性と、既存のニューロンの活性化によって誘導される可能性である。このどちらが正しいか検証するため、オスのメダカに E<sub>2</sub> を投与して PMm/PMg の Npba ニューロンを誘導するとともに、BrdU を投与して分裂を経た細胞をラベルし、Npba 抗体と BrdU 抗体を用いて免疫組織化学を行った。その結果、Npba 免疫陽性細胞と BrdU 免疫陽性細胞の両方が確認されたが、5 個体でみられた 25 個の Npba 免疫陽性細胞の中に BrdU 免疫陽性シグナルを有するものはなかった(図 2-6A)。Npba 免疫陽性細胞はその位置からグリア細胞ではなくニューロンであると推測され、これらは周囲の他のニューロンと比べて有意に大きな核をもち、DAPI 染色の強度は低かった(どちらについても  $p < 0.0001$ ) (図 2-6B)。この結果により、E<sub>2</sub> を投与された成熟オスの PMm/PMg では Npba ニューロンが新たに誘導され、この誘導は神経新生ではなく既存のニューロンの活性化によって起こることが示された。

## 2-4. 考察

本章では、視索前野のメス特異的な Npba ニューロンの性状解析を行った。これらのニューロンは PMm/PMg のメス特異的大細胞性ニューロンとして発見され、エストロゲンによるメス型性行動の制御の一端を担うと考えられる(Hiraki *et al.*, 2014; 梶山(平木)ら, 未発表データ)。NPB とその類似ペプチドである Neuropeptide W (NPW) はオーファン受容体 GPR7、GPR8 のリガンドとして同定され(Fujii *et al.*, 2002; Brezillon *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003)、哺乳類では摂食やエネルギー代謝、痛覚受容、社会性を含む多様な生理機構への関与が報告されている(Sakurai, 2013; Watanabe and Yamamoto, 2015)。メダカでは、*npba* とそのパラログ *npbb* はともに一部の神経核でエストロゲン依存的に、メスに偏って発現し、これらのダブルノックアウト(DKO)メダカではメスの性行動に異常がみられた。いずれもシングルノックアウトでは表現型に変化がみられなかったが、DKO によってその両方の機能を消失させたメスは、オスから求愛を受けた際にそれを受け入れるまでにより多くの時間を必要とした。これらの遺伝子は脳内で広く発現するが、両方がエストロゲン依存的にメスに偏って発現する神経核は PMm/PMg と Vs/Vp のみである。このことから、DKO メダカでみられた表現型に PMm/PMg のメス特異的な Npba ニューロンが関与している可能性はきわめて高い。なお、1-4 で述べたように、Vs/Vp も性行動中枢として知られる神経核であり、こちらの機能解析も今後行う必要がある。また、本研究によって、PMm/PMg の Npba ニューロンは *npba*、*npbb*

の発現のほかにも多くの面でエストロゲン依存的であることが明らかになったが、求愛の受け入れもまたエストロゲン依存的に起こることから(Whalen, 1974)、Npba ニューロンが求愛の受け入れに関わる可能性は高いと考えられた。

本章では電子顕微鏡による形態観察と小胞体・ゴルジ体マーカーの免疫組織化学によって、これらのニューロンが大型の細胞体と核、ユークロマチン化したクロマチンと、よく発達した小胞体とゴルジ体をもつことがわかった。PMm/PMg は解剖学的に哺乳類の室傍核(PVN; paraventricular hypothalamic nucleus)と相同だと考えられており、これらの神経核はAVP/Vt、OXT/It ニューロンを含む(Godwin and Thompson, 2012; Herget *et al.*, 2014)。AVP/Vt、OXT/It ニューロンは大型の細胞体と核、発達した小胞体を持ち、これは活発にペプチド産生を行うニューロンの典型的な構造とされる(Morris and Dyball, 1974; Kalimo, 1975; Gregory and Tweedle, 1983)。今回みられたPMm/PMg のNpba ニューロンはこれによく似た細胞内構造をもつ。その一方で、PVN の AVP/OXT ニューロンが脳下垂体へ軸索を投射し神経内分泌を行うのに対し、PMm/PMg のメス特異的な Npba ニューロンの軸索は脳下垂体よりも脳内の広い範囲と脊髄に投射している(梶山(平木), 2015)ため、神経内分泌は行わないと考えられる。また、PVN にも脳幹や脊髄に投射する AVP/OXT ニューロンが存在するが、これらは小細胞性であり(Swanson and Sawchenko, 1980)、メダカの Npba ニューロンとは対応しないと考えられる。これらの点から、PMm/PMg の Npba ニューロンは PVN の AVP/OXT ニューロンと似た形態をもつものの、その機能は異なると考えられる。また今回、これらの Npba ニューロンの大型の細胞体と核は卵巣由来のエストロゲンに依存しており、細胞体と核の大きさを維持するには一定濃度のエストロゲンが必要であることもわかった。このことは、これらの Npba ニューロンにおける(Npba タンパク質を含む)さまざまなタンパク質の合成とプロセッシングがエストロゲン依存的に起こっていることを示唆している。

近年、性分化や性転換を研究する上でエピジェネティックな修飾を調べるのがますます重要視されてきている。DNA のメチル化やヒストンのメチル化・アセチル化・リン酸化といったゲノムへの化学修飾がエピジェネティックな修飾であり、これらは細胞間や組織間で異なる遺伝子発現プロファイルを形成するために重要だと考えられている(Allis and Jenuwein, 2016)。生殖腺の性転換においては、卵巣における Cyp19a1a 遺伝子のプロモーター領域における DNA のメチル化レベルが性転換に伴って変化することがわかっている(Liu *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018)。脳は体内の器官の中でも特に複雑な仕組みをもつため、脳内の細胞の機能分化にはエピジェネティックな修飾が深く関与していると考えられ、エピジェネティックな修飾が性ステロイドによる脳の性分化カスケードの一部を担う例も知られている

(McCarthy *et al.*, 2009; McCarthy and Nugent, 2013; McCarthy and Nugent, 2015)。また、真骨魚類におけるエピジェネティクス研究も近年増えており、特定のニューロン群の制御にヒストン修飾が関わる例もいくつか報告されている (Best *et al.*, 2018)。PMm/PMg のメス特異的 Npba ニューロンにおいても、エピジェネティックな制御機構が活発な遺伝子発現とタンパク質産生をもたらしている可能性が考えられた。そこで、RNAPIIのリン酸化修飾や各種のヒストン修飾が Npba ニューロンでどの程度起きているかを免疫組織化学によって解析した。その結果、PMm/PMg のメス特異的な Npba ニューロンでは RNAPII-Ser2P、RNAPII-Ser5P と H3K36me、H3K36me2 が亢進していることが明らかになった。

亢進がみられた RNAPII-Ser2P、RNAPII-Ser5P はそれぞれ転写初期段階、転写伸長中の RNA Polymerase II に特徴的な修飾として知られ、特に RNAPII-Ser2P は機能的な mRNA の転写に必須とされる (Komarnitsky *et al.*, 2000; Phatnani and Greenleaf, 2006; Brookes and Pombo, 2009)。H3K36me、H3K36me2 は転写が活発な遺伝子の近傍によくみられ、転写の際にクロマチン状態を正常に保つことで、遺伝子の途中から転写が開始することを防ぐ (Wagner and Carpenter, 2012; Smolle *et al.*, 2013)。この作用は H3K36 につくメチル基が多いほど強いようだが (Venkatesh *et al.*, 2012)、今回使用した抗体のうち H3K36me3 をターゲットとする抗体は細胞質にもシグナルがみられたため特異性に問題があると考えられ、定量は行わなかったため、メチル基の数の違いによる修飾強度の違いは検討できなかった。また、リン酸化された RNAPII-Ser は H3K36 のメチル化と相互作用し、活発に転写されている遺伝子の H3K36 のメチル化を促進することが知られており (Xiao *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007)、Npba ニューロンにおいても RNAPII-Ser の亢進が高レベルな H3K36 メチル化を引き起こすと考えられる。今回得られた結果は PMm/PMg のメス特異的 Npba ニューロンでの転写が活発な状態にあることを示している。核全体における免疫陽性シグナル強度の解析によってこうしたデータが得られたことから、転写が活性化されている遺伝子は多数あると考えられたが、ヒストン修飾のターゲット遺伝子を解析するには  $10^6$  個程度の細胞が必要となり、H3K36 のメチル化がどの遺伝子の近傍で起きているか具体的に解析することはできなかった。ところが、ごく最近、 $10^2$  個の細胞から同様の解析を行える技術が開発された (Harada *et al.*, 2018)。今後、こうした技術を応用することで、これらの Npba ニューロンのエピジェネティックな制御機構についてのさらなる理解が期待される。

今回亢進がみられた RNAPII-Ser2P、RNAPII-Ser5P、H3K36me、H3K36me2 について、これらの修飾のレベルが全てエストロゲン依存的に高く保たれていることも明らかになった。このことは、Npba ニューロンにおけるタンパク質の合成とプロセッシングがエストロゲン依存的

に起こっていることを別の角度から示している。また、これらは性的可逆性の観点からも重要な知見である。げっ歯類においては周生期の性ステロイド環境が長期的に、あるいは生涯にわたって脳の性を方向づけるが、この方向付けはエピジェネティクスを介すると考えられている (McCarthy and Nugent, 2015; Forger, 2016; McCarthy *et al.*, 2017)。これに対し、今回メダカの *Npba* ニューロンでみられたヒストン修飾の強度の変化は、これらのニューロンにおける化学修飾は周生期の性ステロイド環境の影響を受けないか、性成熟後でも性ステロイド環境に応じて容易に変化する可能性を示している。エストロゲンの消失に伴って H3K36 のメチル化レベルが低下したことから、後者の可能性がより高いと考えられる。

また、本研究により、エストロゲン投与下のオスの PMm/PMg では *Npba* ニューロンが神経新生を経ずに誘導されることも示された。この結果から、これらの *Npba* ニューロンにみられる性的二型は、PMm/PMg の一群のニューロンがエストロゲンによって活性化されるか否かによって生じていると考えられる。この点は神経新生や神経細胞の細胞死によって性的二型が形成される song system や SDN-POA とは対照的である (Balthazart *et al.*, 2010; Ball *et al.*, 2014)。成体での活発な神経新生は真骨魚類の脳の性転換の上で重要な役割を果たすとされる (Le Page *et al.*, 2010) が、本研究では神経新生よりもむしろ、既存のニューロンの活性化/不活性化が脳の性転換に関与している可能性が示された。この活性化/不活性化のメカニズムは、*Npba* ニューロンがオス型からメス型へ、あるいはメス型からオス型へ容易に性転換することを可能にしていると考えられる。

以上の研究により、PMm/PMg のメス特異的 *Npba* ニューロンは形態や化学修飾の面で活発なペプチド産生ニューロンに特徴的な形質をもち、これらの形質はエストロゲン依存的に維持されていることが明らかになった。今回得られたデータは *Npba* ニューロンにみられる性特異的な形質がエストロゲンの有無に応じて可逆性をもつことを示唆しており、この点は早期に不可逆的に性差が固定される song system や SDN-POA とは異なる新奇なものである。また、これまでに報告されている脳の性差の事例には、エストロゲンを含む性ステロイドが神経回路をオス型化させるものが多い。これに対して、メダカの PMm/PMg の *Npba* ニューロンはエストロゲンによってメス化する点もユニークである。これまでに発見されていた *Npba* 発現のエストロゲン依存性に加え、本研究ではこれらの *Npba* ニューロン自体の形態や化学修飾における性ステロイド応答性が示された。

表 2-1. 免疫組織化学に用いた抗体の情報

Target	Supplier	Catalog number	Host species, isotype	Dilution	Secondary antibody
Endoplasmic reticulum	MBL, Nagoya, Japan	M181-3	Mouse, monoclonal IgG2a	1:200	Alexa Flour 488 Goat Anti-Mouse IgG2a
Golgi apparatus	abcam, Cambridge, UK	ab27043	Mouse, monoclonal IgG1	1:250	Alexa Flour 555 Goat Anti-Mouse IgG1
RNAPII-Ser2P	MBL	MABI0602	Mouse, monoclonal IgG1	1:1000	Alexa Flour 555 Goat Anti-Mouse IgG1
RNAPII-Ser5P	MBL	MABI0603	Mouse, monoclonal IgG1	1:1000	Alexa Flour 555 Goat Anti-Mouse IgG1
H3K4me	MBL	MABI0302	Mouse, monoclonal IgG2b	1:1000	Alexa Flour 555 Goat Anti-Mouse IgG2b
H3K4me2	MBL	MABI0303	Mouse, monoclonal IgG1	1:1000	Alexa Flour 555 Goat Anti-Mouse IgG1
H3K4me3	MBL	MABI0304	Mouse, monoclonal IgG1	1:1000	Alexa Flour 555 Goat Anti-Mouse IgG1
H3K9me	MBL	MABI0306	Mouse, monoclonal IgG1	1:1000	Alexa Flour 555 Goat Anti-Mouse IgG1
H3K9me2	MBL	MABI0307	Mouse, monoclonal IgG1	1:1000	Alexa Flour 555 Goat Anti-Mouse IgG1
H3K9me3	MBL	MABI0318	Mouse, monoclonal IgG1	1:1000	Alexa Flour 555 Goat Anti-Mouse IgG1
H3K9ac	MBL	MABI0305	Mouse, monoclonal IgG2b	1:1000	Alexa Flour 555 Goat Anti-Mouse IgG2b
H3K27me	MBL	MABI0321	Mouse, monoclonal IgG2a	1:1000	Alexa Flour 488 Goat Anti-Mouse IgG2a
H3K27me2	MBL	MABI0324	Mouse, monoclonal IgG2a	1:1000	Alexa Flour 488 Goat Anti-Mouse IgG2a
H3K27me3	MBL	MABI0323	Mouse, monoclonal IgG1	1:1000	Alexa Flour 555 Goat Anti-Mouse IgG1
H3K27ac	MBL	MABI0309	Mouse, monoclonal IgG1	1:1000	Alexa Flour 555 Goat Anti-Mouse IgG1
H3K36me	MBL	MABI0331	Mouse, monoclonal IgG1	1:1000	Alexa Flour 555 Goat Anti-Mouse IgG1
H3K36me2	MBL	MABI0332	Mouse, monoclonal IgG1	1:1000	Alexa Flour 555 Goat Anti-Mouse IgG1
H3K36me3	MBL	MABI0333	Mouse, monoclonal IgG1	1:1000	Alexa Flour 555 Goat Anti-Mouse IgG1
H3K36me3	abcam	ab9050	Rabbit, polyclonal IgG	1:2000	Alexa Flour 555 Goat Anti-Rabbit IgG
H4K20me	MBL	MABI0421	Mouse, monoclonal IgG1	1:1000	Alexa Flour 555 Goat Anti-Mouse IgG1
H4Kme2	MBL	MABI0422	Mouse, monoclonal IgG1	1:1000	Alexa Flour 555 Goat Anti-Mouse IgG1
H4Kme3	MBL	MABI0423	Mouse, monoclonal IgG1	1:1000	Alexa Flour 555 Goat Anti-Mouse IgG1
H4K20ac	MBL	MABI0420	Mouse, monoclonal IgG2a	1:1000	Alexa Flour 488 Goat Anti-Mouse IgG2a

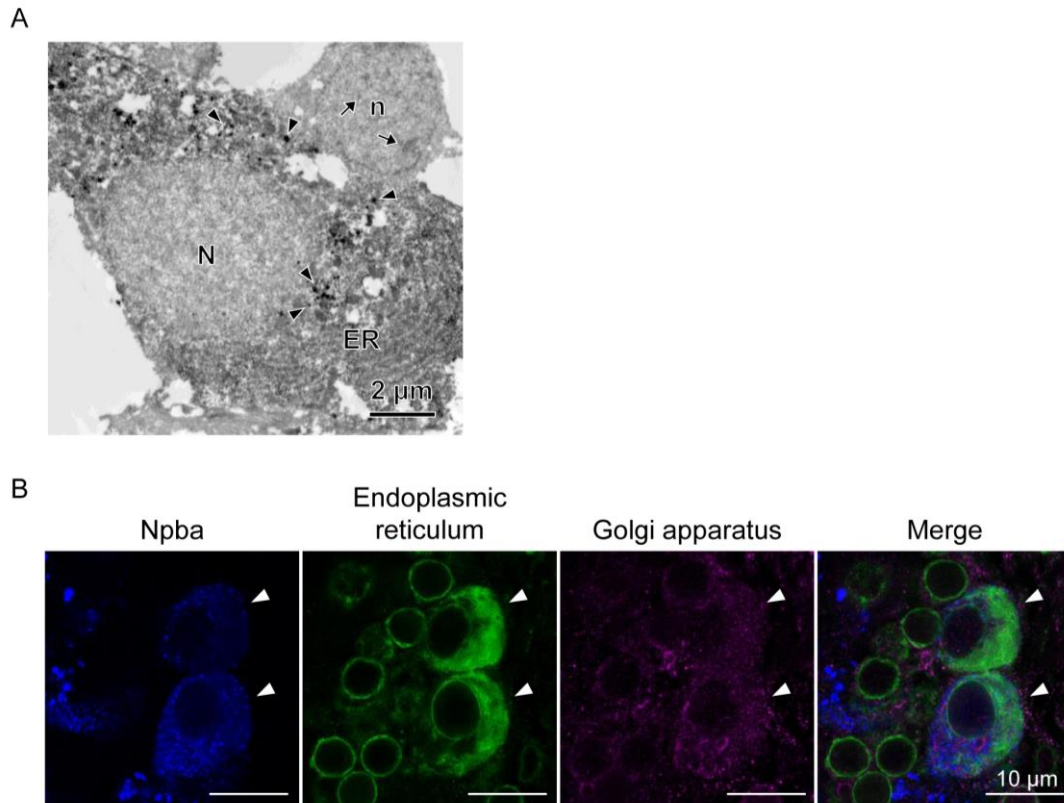


図 2-1. PMm/PMg のメス特異的 Npba ニューロンの形態

(A) TEMにて撮影したPMm/PMgのメス特異的Npbaニューロンの代表的な写真。GA濃度0.05%で固定したもの。スケールバーは2 μm、ERは小胞体、NはNpba免疫陽性ニューロンの核、nは近傍の他のニューロンの核、矢じりは免疫陽性シグナル、矢印はヘテロクロマチン領域を示す。(B)Npbaと小胞体、ゴルジ体マーカーの三重免疫組織化学の代表的な写真。青がNpba、緑が小胞体、マゼンタがゴルジ体のシグナル。Npbaニューロンを矢じりで示した。スケールバーは10 μm。

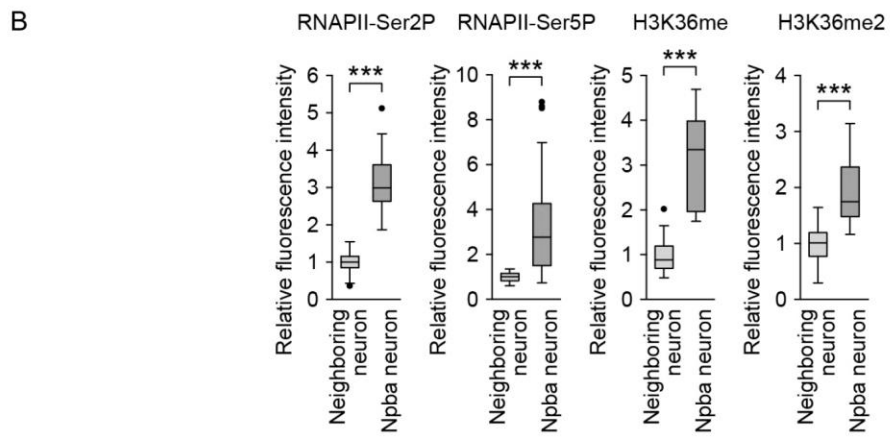
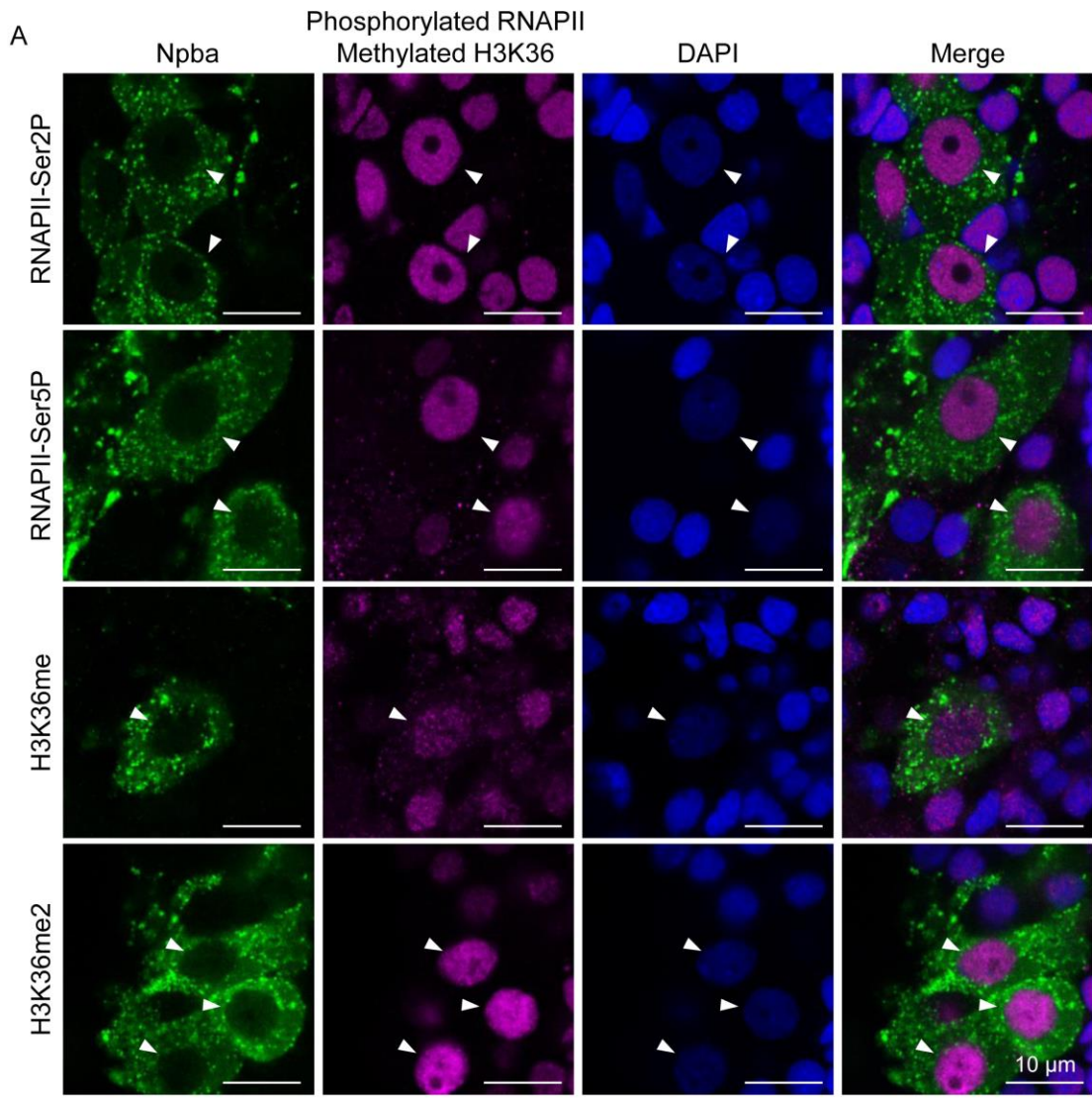


図 2-2. PMm/PMg の Npba ニューロンにおける RNAP II -Ser2P、RNAP II -Ser5P、H3K36me、H3K36me2 の免疫組織化学



(A) NpbaとRNAPII-Ser2P、RNAPII-Ser5P、H3K36me、H3K36me2の二重免疫組織化学の代表的な写真。緑が Npba、マゼンタが各種化学修飾のシグナル。青は DAPI による対比染色。Npba ニューロンを矢じりで示した。スケールバーは全て 10  $\mu\text{m}$ 。(B) 上記 4 種類の化学修飾の免疫陽性シグナルの強度の定量結果。左のカラムが Npba 免疫陽性ニューロン、右のカラムが他のニューロンの結果を示す。解析に用いた細胞数は、Npba 免疫陽性ニューロンでは、RNAPII-Ser2P、RNAPII-Ser5P、H3K36me、H3K36me2 についてそれぞれ 53、24、9、39 であった。他のニューロンでは、RNAPII-Ser2P、RNAPII-Ser5P、H3K36me、H3K36me2 についてそれぞれ 97、42、21、70 細胞を用いた。有意差を\*\*\*  $p < 0.001$  で示した (Mann-Whitney test)。

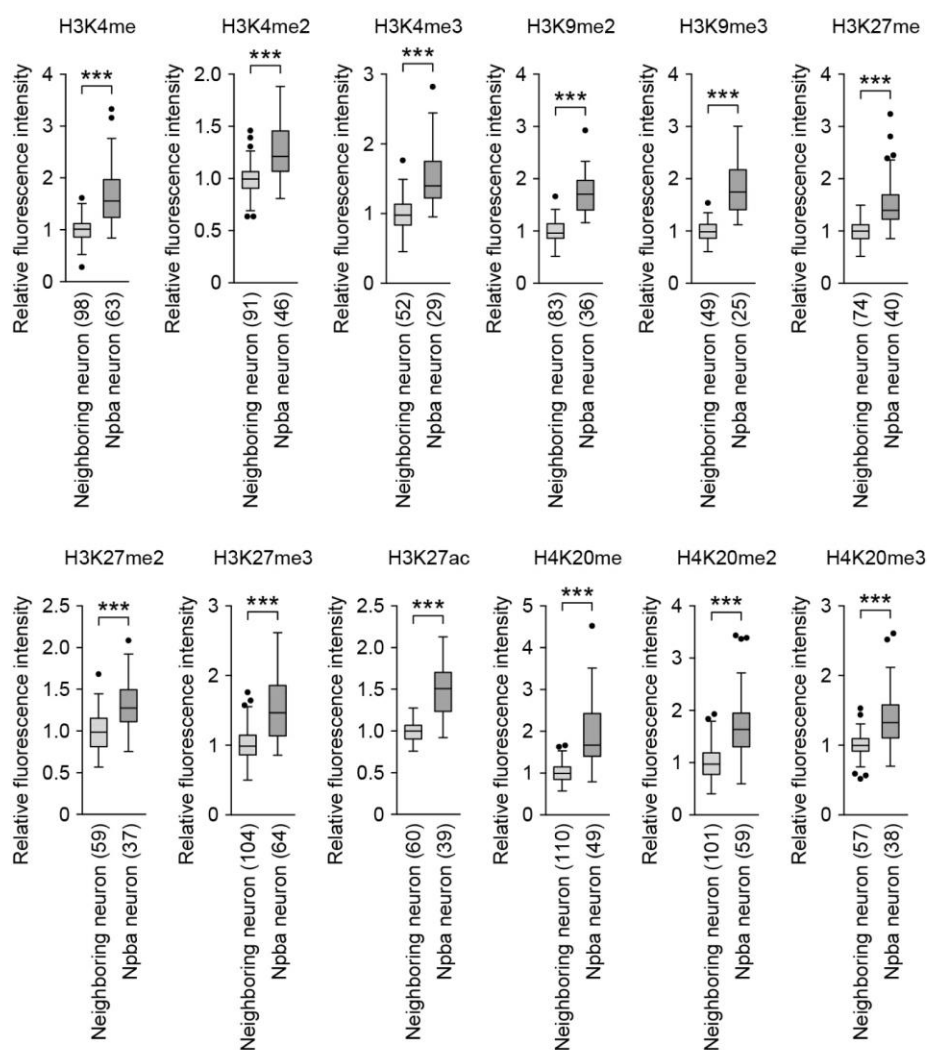


図 2-3. 各種ヒストン修飾の免疫陽性シグナルの強度の定量結果

左のカラムが Npba 免疫陽性ニューロン、右のカラムが他のニューロンの結果を示す。解析に用いた細胞数を各カラムの下に括弧付きで示した。有意差を\*\*\*  $p < 0.001$  で示した (Mann-Whitney test)。

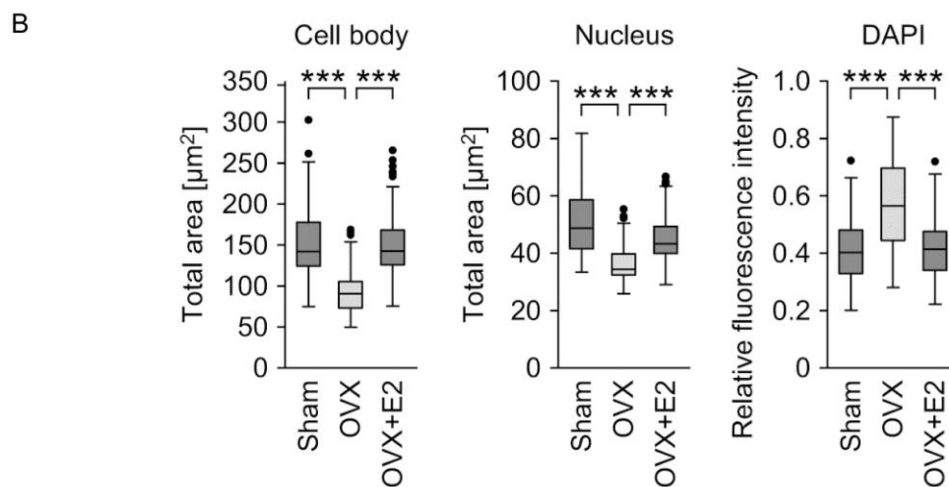
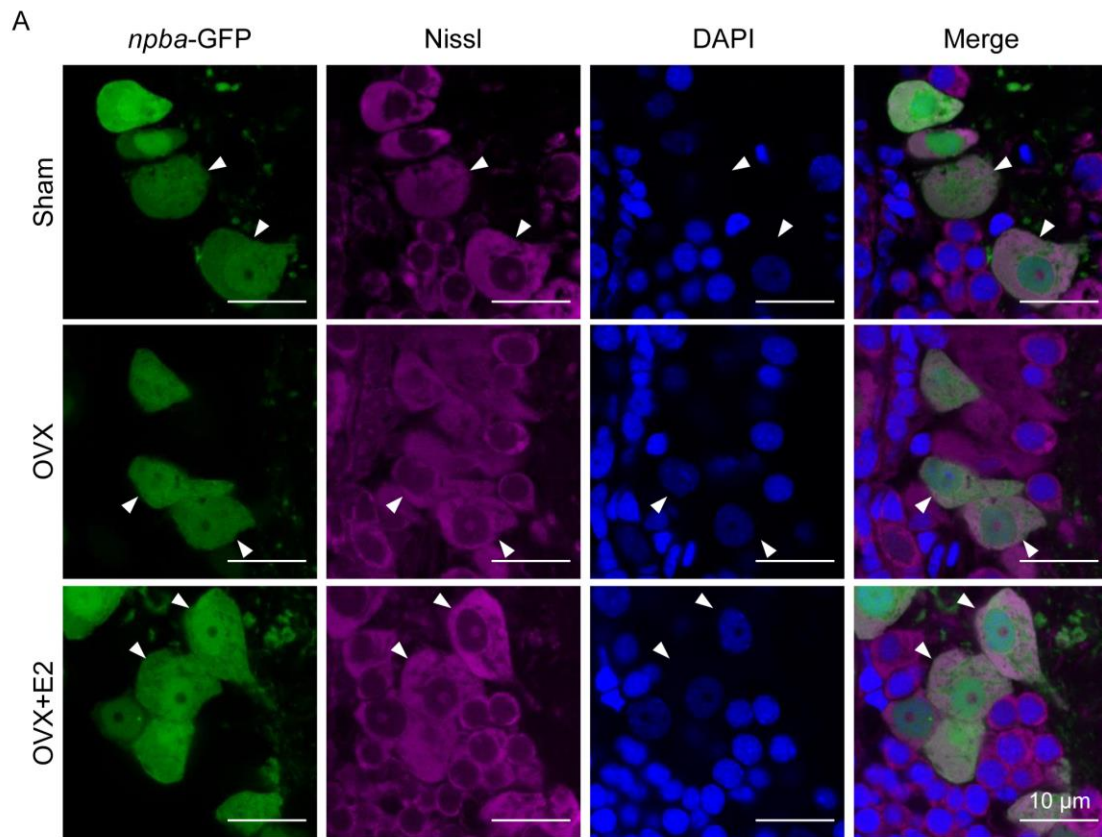


図 2-4. エストロゲンの有無による *Npba* ニューロンの形態の変化

(A) 蛍光ニッスル染色にて可視化した PMm/PMg の *Npba* ニューロンの代表的な写真。上から Sham・OVX・OVX+E<sub>2</sub> 群。緑は *npba*-GFP トランスジェニックメダカ の GFP、マゼンタはニッスル染色、青は DAPI による対比染色を示す。*Npba* ニューロンを矢じりで示した。スケールバーは全て 10  $\mu\text{m}$ 。(B) 3 群における細胞体のサイズ、核のサイズ、DAPI 染色の強度を定量した結果。解析に用いた細胞数は、細胞体の定量では Sham 群で 148、OVX 群で 138、OVX+E<sub>2</sub> 群で 180、核の定量では Sham 群で 100、OVX 群で 106、OVX+E<sub>2</sub> 群で 154、DAPI

染色強度の定量では Sham 群で 128、OVX 群で 152、OVX+E<sub>2</sub> 群で 223 であった。有意差を\*\*\*  $p < 0.001$  で示した (Dunn's *post hoc* test)。

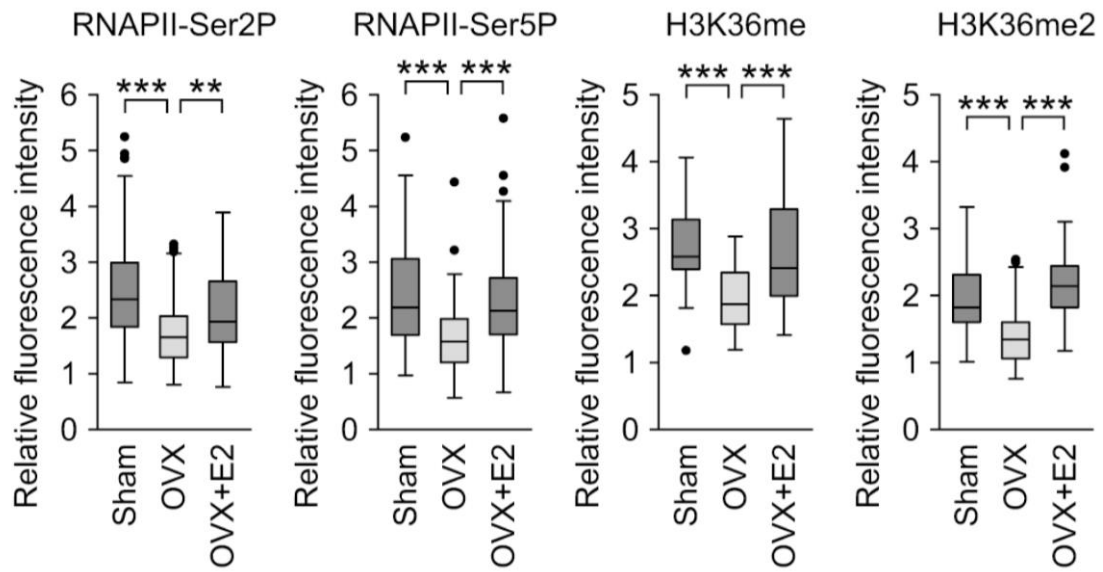


図 2-5. エストロゲンの有無による Npba ニューロンの化学修飾の変化

Sham・OVX・OVX+E<sub>2</sub> 群における RNAPII-Ser2P、RNAPII-Ser5P、H3K36me、H3K36me2 の免疫陽性シグナルの強度を定量した結果。解析に用いた細胞数はそれぞれ 37–143 であった。有意差を\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$  で示した (Dunn's *post hoc* test)。

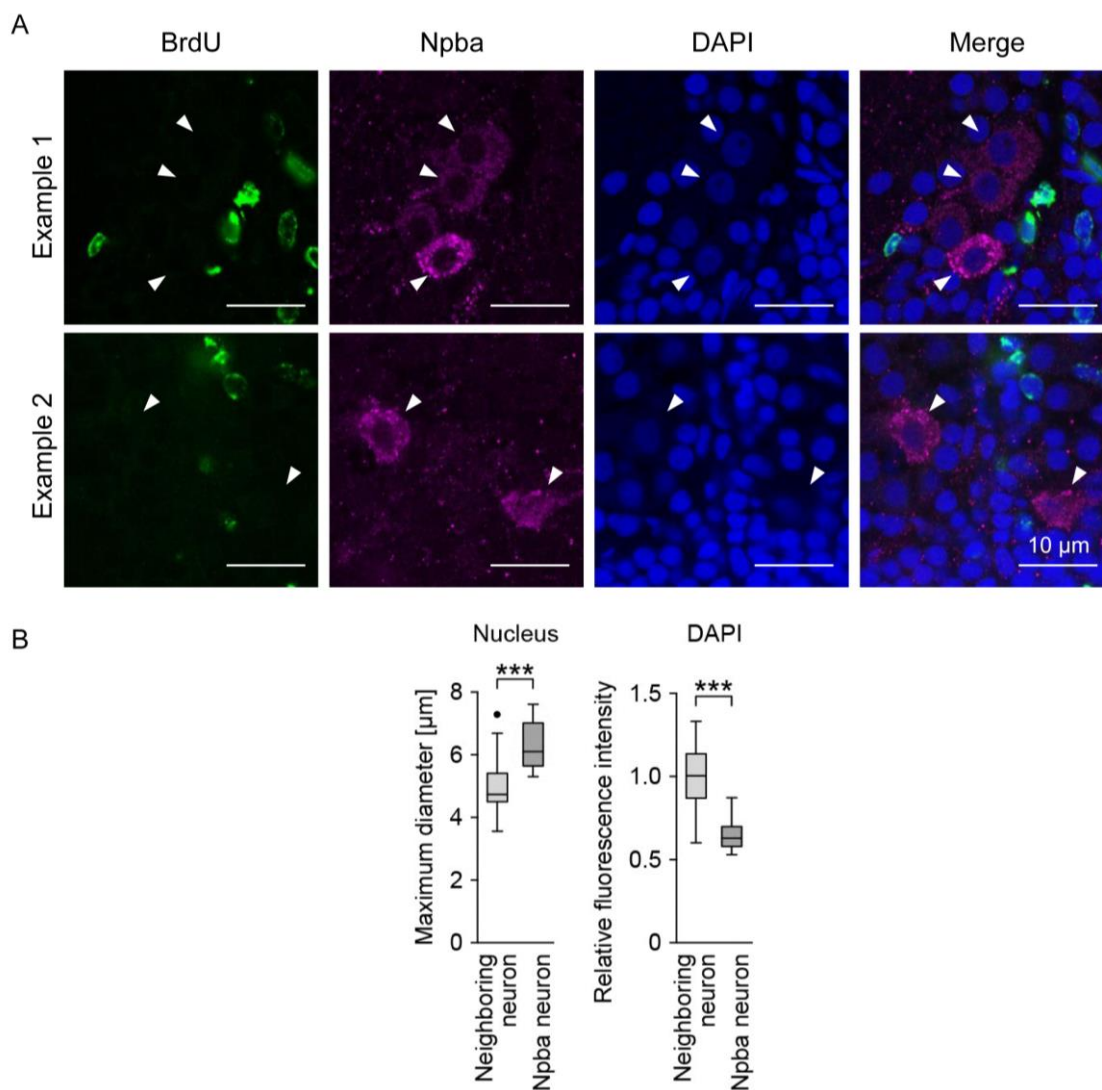


図 2-6. オスメダカの PMm/PMg に出現した Npba ニューロン

(A) オスメダカの PMm/PMg に出現した Npba ニューロンの代表的な写真(2例)。緑は BrdU、マゼンタは Npba の免疫陽性シグナル、青は DAPI による対比染色を示す。Npba ニューロンを矢じりで示した。スケールバーは全て 10  $\mu\text{m}$ 。(B) オスメダカの PMm/PMg に出現した Npba ニューロンの核の大きさ、DAPI 染色の強度を定量した結果。解析に用いた細胞数は核サイズの定量では Npba ニューロンが 19、他のニューロンが 51、DAPI 染色強度の定量では Npba ニューロンが 25、他のニューロンが 58 であった。有意差を\*\*\*  $p < 0.001$  で示した (Dunn's *post hoc* test)。

## 第3章

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内  
に出版予定。

## 総合考察

本研究は、真骨魚類に特徴的な脳の性的可逆性のメカニズムの解明を最終目標とし、そのための基礎的な知見として、形質に性差をもたらす脳内の性差について明らかにすることを目的に行った。この目的のもと、メダカの脳内における GR 発現の性差を解析するとともに、当研究室において発見された視索前野のメス特異的な Npba ニューロンについて、その形態や化学修飾、トランスクリプトームといった形質やそれらのエストロゲン依存性を切り口に多角的な性状解析を行い、またこれらのニューロンで機能しメスの形質を形成すると考えられる遺伝子を発見した。真骨魚類の性的可逆性とその基盤となる性差についてはこれまでもいくつかの知見が得られていたが、主要なステロイドホルモンのうちグルココルチコイドの受容体の性差は全く調べられておらず、また真骨魚類で特定のニューロン群に対して多角的な性状解析を行った例も数少ない (White *et al.*, 2002; Semsar and Godwin, 2003; Bass and Forlano, 2008)。本研究ではこうした過去に例がない、あるいは少ない解析により、新規性の高い知見を得ることができた。

第 1 章では、メダカの全脳における GR の発現パターンを解析し、雌雄で比較した。その結果、真骨魚類ではこれまでに報告されていない、視索前野の神経核 PPa と Pbl、間脳の神経核 NGp における性差を発見した。これらの性差について特に興味深いのは、PPa と Pbl では重要な生理作用をもつ神経ペプチド Vt、It、GnRH1 が産生されていることである。その後の解析により、GR がこれらの神経ペプチドの産生ニューロンで発現すること、また PPa の Vt ニューロンと GnRH1 ニューロンにおける GR 発現ニューロンの割合はメスの方が高いことがわかった。

これまで、哺乳類においても真骨魚類においてもストレスに対する脳の応答には性差があることは知られていた (Wendelaar Bonga, 1997; Kudielka and Kirschbaum, 2005; Bourke *et al.*, 2012; Handa and Weiser, 2014) が、脳内でのグルココルチコイドシグナル伝達の性差に着目した研究はほとんどされておらず、真骨魚類においては全く例がなかった。また、脊椎動物全般において Vt ニューロン、GnRH1 ニューロンでの GR の発現に性差を見出したのも本研究が初めてである。このデータから、メダカの視索前野にはグルココルチコイド感受性に性差を示すペプチドニューロン群が存在することが明らかになった。この結果は、これらのペプチドニューロン群がストレス応答の性差を形成することを示唆している。PPa の Vt ニューロンは脳下垂体に投射し、ACTH の分泌を促進することで HPI 軸を活性化すると考えられている (Gilchrist *et al.*, 2000) が、PPa の GnRH1 ニューロンの機能は未知であり、今回見出し



れた GR 発現の性差がどのようなアウトプットをもたらすのか知るにはさらなる解析が必要である。本研究においても、メダカにコルチゾルあるいは GR アンタゴニストを投与して性行動や攻撃行動、脳内での遺伝子発現パターンに変化が出るかどうか検証したが、再現性のある結果を得ることはできなかった。この点について十分に検証するためには実験系を抜本的に改善し、有効な実験系を構築する必要がある。

第2章と第3章では、同じく視索前野でステロイドホルモン感受性に性差を示すニューロン群として、PMm/PMg の Npba ニューロンに研究対象を変更し、その性状解析を行った。当研究室でこれまで行われてきた研究では、これらのニューロンにおける *npba* や性ステロイド受容体遺伝子の発現に着目しており、ニューロンの他の形質や他の遺伝子発現の面からの性状解析は行われてこなかった。そこで本研究ではこれらのニューロンの制御機構と機能の解明を目標として、ニューロン自体に着目した多角的な解析を行った。その結果、これらのニューロンは活発なペプチドニューロンに特徴的な構造 (Morris and Dyball, 1974) をもつこと、RNAPII-Ser2P、RNAPII-Ser5P、H3K36me、H3K36me2 といった、転写の活性化との関連が知られている化学修飾 (Komarnitsky *et al.*, 2000; Phatnani and Greenleaf, 2006; Brookes and Pombo, 2009; Wagner and Carpenter, 2012; Smolle *et al.*, 2013) が亢進していることが示された。さらに、これらの特徴は卵巣由来のエストロゲンに依存して保たれていることも明らかになった。これらの結果から、Npba ニューロンにおける活発な遺伝子発現もエストロゲン依存的であると考えられた。

本項のこれ以降の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

## 要旨

生殖腺に精巣と卵巣があるように、脳にもオス型とメス型があり、その違いが種々の行動や内分泌のパターンに雌雄の違いをもたらしている。脳の性分化について、真骨魚類は脳が性分化した後でもその性を逆転させる、つまり生涯にわたって性的な可逆性をもつという、他の脊椎動物とは異なる大きな特徴をもつ。真骨魚類のもつ脳の性的可逆性のメカニズムを解明することは、動物全体における脳の性、またその多様性を理解する上で非常に重要である。しかし現在、真骨魚類のもつ脳の性的可逆性のメカニズムはまったく未解明であり、その基盤となるはずの真骨魚類の脳の性差についても知見が不足している。

こうした状況の中、近年、真骨魚類の脳内で発現に性差を示す遺伝子の探索が行われ、性行動の中枢として知られる終脳と間脳の境界領域、視索前野において多数の遺伝子の発現に性差が見出された。そこで本研究では、モデル動物として確立され性差研究において数々の利点をもつメダカを用い、視索前野に存在する性差をさらに深く探求する目的で、視索前野においてステロイドホルモン感受性に性差を示すニューロン群の探索やその性状解析を行った。

### 第1章 視索前野の神経ペプチド産生ニューロンにおけるグルコルチコイド受容体発現の性差

本章では、ストレスホルモンとして知られるグルコルチコイドの受容体 (GR) の全脳における発現パターンを解析し、雌雄で比較した。多くの脊椎動物において、ストレスに対する脳の応答には性差があることが知られており、これらには脳におけるグルコルチコイド感受性の性差が関与すると考えられた。さらに、グルコルチコイドが真骨魚類の性決定や性転換のプロセスに大きく影響することを示唆する現象も複数報告されており、脳におけるグルコルチコイドシグナル伝達の性差が真骨魚類の性転換メカニズムの一部を担う可能性も考えられた。また、これまで主要なステロイドホルモンのうち、エストロゲンとアンドロゲンの受容体遺伝子の脳における発現パターンとその性差は詳細に調べられていたにもかかわらず、グルコルチコイド受容体の発現パターンと性差に関する知見は真骨魚類で一切得られておらず、ステロイドホルモン感受性の性差に関する知見は不十分であった。そこで本研究では、メダカの脳におけるグルコルチコイド感受性の性差を解析した。

解析の結果、視索前野の神経核 PPa、Pbl と、間脳の神経核 NGp において、GR がメスに偏って発現していることが明らかになった。PPa と Pbl では攻撃行動や性行動、性成熟へ

の関与が示されている神経ペプチドバソトシン (Vt)、イソトシン (It)、ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) 1 が産生されていることから、次にこれらの神経ペプチド産生ニューロンにおける GR の発現を検証した。その結果、GR がこれらの神経ペプチド産生ニューロンで発現すること、また PPa の Vt ニューロンと GnRH1 ニューロンに占める GR 発現ニューロンの割合はメスの方が高いことがわかった。PPa の Vt ニューロンは脳下垂体を介したストレス応答、あるいは社会性行動に参加すると考えられる一方、PPa の GnRH1 ニューロンの機能は未知であるが、本研究により、これらのこれらの神経ペプチドニューロンを介した生理作用にストレスが与える影響はオスよりもメスでより大きいことが示唆された。

## 第 2 章 視索前野のメス特異的 Npba ニューロンのエストロゲン応答性

第 2 章からは対象を GR 発現ニューロンから変更し、数年前に発見された、メダカの脳内でほぼメス特異的にエストロゲン受容体とアンドロゲン受容体を発現する視索前野の神経核 PMm/PMg に含まれるペプチド産生ニューロンに着目して研究を行った。これらは Neuropeptide B (Npba) を発現する大細胞性ニューロンで、メスにはみられるがオスには全くみられないという顕著な性差を示す。さらに、これらのニューロンは性ステロイド環境に応答して *npba* の発現量を可逆的に変化させていることも知られていた。これらのメス特異的な Npba ニューロンはこのように性ステロイドの影響を強く受けることから、性的なゆらぎをもつと考えられた。しかし、これまでの研究はこれらのニューロンにおける *npba* や性ステロイド受容体遺伝子の発現のみに着目して行われており、ニューロンの他の形質や他の遺伝子発現の面からの性状解析は行われてこなかった。そこで、本章ではこれらのニューロンの制御機構と機能の解明を目標として、ニューロン自体に着目した多角的な解析を行うこととし、まずはその詳細な形態解析を行った。

その結果、これらのニューロンは大型の細胞体と核、発達した小胞体とゴルジ体を持ち、核内にはユークロマチン領域を多く有するといった活発なペプチドニューロンに特徴的な形態をもつことがわかった。また、これらの核では RNAPII-Ser2P、RNAPII-Ser5P、H3K36me、H3K36me2 といった、転写の活性化との関連が知られている化学修飾が亢進していた。さらに、これらの特徴は卵巣除去によって失われ、卵巣を除去した個体にエストロゲンを投与すると回復することも明らかになった。このことから、これらの特徴はエストロゲン依存的に保たれており、可逆的に変化することが示唆された。

また、本来オスのメダカは PMm/PMg にメスの Npba ニューロンに相当する大細胞性ニューロンをもたないが、エストロゲンを投与すると Npba ニューロンが神経新生を経ずに誘導さ

れることも示された。この結果は、オスのメダカにエストロゲンを投与するとそれまでオス型の不活性な形態をとっていたニューロンが活性化されてメス型の大細胞性ニューロンになるとともに **Npba** を発現するようになること、つまりこれらのニューロンがオス型からメス型へ性転換することを示唆している。このことから、**PMm/PMg** の **Npba** ニューロンに相当するニューロンは雌雄どちらにも存在し、それらがエストロゲンの有無によって活性化、あるいは不活性化することで可逆的な性的二型を形成していると考えられた。

本項のこれ以降の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。  
5年以内に出版予定。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、東京大学大学院農学生命研究科水圏生物科学専攻水族生理学研究室の大久保範聡准教授には研究方針の策定、実験の実行から結果の解釈、論文の執筆に至るまで、常に丁寧に忍耐強く指導して頂いた。心より感謝を申し上げる。また、セミナーや実験の指導を通して数多くのご助言を頂いた水族生理学研究室の金子豊二教授、東京大学大学院農学生命科学研究科水産化学研究室の渡邊壮一准教授に深く感謝している。

また、本論文を査読して頂いた東京大学大学院農学生命科学研究科水産化学研究室の潮秀樹教授、水族生理学研究室の金子豊二教授、東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物工学研究室の木下滋晴准教授、東京大学大気海洋研究所海洋生命科学部門生理学分野の兵藤晋教授に感謝の意を表す。

日本医科大学大学院医学研究科解剖学・神経生物学分野の小澤一史教授と松本恵介氏、水族生理学研究室の金子豊二教授と角村佳吾研究員には、免疫電顕法のご指導を計2年にもわたって賜った。また、日本医科大学大学院医学研究科共同研究施設形態解析研究室の安達彰子氏には電子顕微鏡の操作方法を指導して頂いたとともに、美しい超薄切片の作製をして頂いた。東京大学大学院農学生命科学研究科電子顕微鏡室の石綱史子氏にも電子顕微鏡を含め多数の機器の操作方法をご指導頂いた。ご多用の中、長期にわたりご指導を頂き、心から感謝している。

九州大学大学院医学研究院の馬場崇助教(現:同准教授)には、次世代シーケンサーでの解析用のライブラリー調整とシーケンスをして頂いた。九州大学大学院生体防御医学研究所の齋藤大助研究員(現:同助教)には、シーケンスデータの解析をして頂いた。実験方法、解析方法について丁寧に何度も打ち合わせに応じて頂き、最適な処理と解析をして頂いたことに深く感謝している。少数細胞からのRNA-seq用cDNAサンプルの調整は、本研究で用いたQuartz-seq法の開発者である理化学研究所情報基盤センターバイオインフォマティクス研究開発ユニットの笹川洋平上級センター研究員(現:理化学研究所生命機能科学研究センター上級研究員)、東京大学理学系研究科生物科学専攻動物発生学研究室の稲森貴一氏、東京大学理学系研究科生物科学専攻生体情報学研究室の岡良隆教授、神田真司助教(現:東京大学大気海洋研究所准教授)、苅郷友美氏(現:カリフォルニア工科大学研究員)より実験に関する重要なご助言を頂いたことにより遂行することができた。心より感謝申し上げます。

また、トランスクリプトーム解析に用いたメダカの卵巣除去実験において手術を行って頂いた元水族生理学研究室の山下純平氏に心より御礼申し上げます。東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所の細谷将助教、元水族生理学研究室の宮西弘氏、古川史也氏、井ノ口繭氏、前廣清香氏、進士淳平氏、竹内研生氏、梶山(平木)十和子氏、坂田(川幡)由希香氏、仲宗根潔氏、水族生理学研究室の細野耕平氏、宮副大地氏には幾度となく、実験のご指導や貴重な御助言を頂き、深く御礼申し上げます。また、水族生理学研究室において私と同じニューロンの研究を進めている立澤雅也氏、*tac1-KO*、*tac4a-KO* 系統の表現型解析を引き継いでくれた石川海杜氏からは多くの重要なアドバイスを頂いたとともに、メダカの飼育の面で多大な助力を頂いた。これまでの研究生活において多くのご迷惑をお掛けしたにもかかわらず、日常の議論を通じて多くの知識や示唆をくださり、共に濃密な研究生活を過ごして下さった水族生理学研究室の皆様、実験データを提供してくれたメダカたち、そして寛大に博士課程までの進学を許してくれた両親に、深く感謝の意を表す。

## 引用文献

1. **Akhmadeev AV** (2010) Localization of CART-positive neurons in the amygdaloid body and the relationship between their immunoreactivity and the sex steroid level. *Neurosci Behav Physiol* 40: 435–439
2. **Allis CD, Jenuwein T** (2016) The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet* 17: 487–500
3. **Alsop D, Vijayan M** (2009) The zebrafish stress axis: molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event. *Gen Comp Endocrinol* 161: 62–66
4. **Alsop D, Vijayan MM** (2008) Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R711–719
5. **Aluru N, Vijayan MM** (2009) Stress transcriptomics in fish: a role for genomic cortisol signaling. *Gen Comp Endocrinol* 164: 142–150
6. **Amateau SK, McCarthy MM** (2004) Induction of PGE2 by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior. *Nat Neurosci* 7: 643–650
7. **Anken R, Bourrat F** (1998) Brain atlas of the medakafish. INRA Editions, Paris, France
8. **Ansai S, Kinoshita M** (2014) Targeted mutagenesis using CRISPR/Cas system in medaka. *Biol Open* 3: 362–371
9. **Arendash GW, Gorski RA** (1983) Effects of discrete lesions of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area or other medial preoptic regions on the sexual behavior of male rats. *Brain Res Bull* 10: 147–154
10. **Arnold AP, Breedlove SM** (1985) Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior: a reanalysis. *Horm Behav* 19: 469–498
11. **Baba T, Otake H, Sato T, Miyabayashi K, Shishido Y, Wang CY, Shima Y, Kimura H, Yagi M, Ishihara Y, Hino S, Ogawa H, Nakao M, Yamazaki T, Kang D, Ohkawa Y, Suyama M, Chung BC, Morohashi K** (2014) Glycolytic genes are targets of the nuclear receptor Ad4BP/SF-1. *Nat Commun* 5: 3634
12. **Balkan B, Gozen O, Koylu EO, Keser A, Kuhar MJ, Pogun S** (2012) Region- and sex-specific changes in CART mRNA in rat hypothalamic nuclei induced by forced swim stress. *Brain Res* 1479: 62–71
13. **Ball GF, Balthazart J, McCarthy MM** (2014) Is it useful to view the brain as a

- secondary sexual characteristic? *Neurosci Biobehav Rev* 46: 628–638
14. **Balment RJ, Lu W, Weybourne E, Warne JM** (2006) Arginine vasotocin a key hormone in fish physiology and behaviour: a review with insights from mammalian models. *Gen Comp Endocrinol* 147: 9–16
  15. **Balthazart J, Charlier TD, Barker JM, Yamamura T, Ball GF** (2010) Sex steroid-induced neuroplasticity and behavioral activation in birds. *Eur J Neurosci* 32: 2116–2132
  16. **Bangasser DA, Valentino RJ** (2014) Sex differences in stress-related psychiatric disorders: neurobiological perspectives. *Front Neuroendocrinol* 35: 303–319
  17. **Bardet PL, Obrecht-Pflumio S, Thisse C, Laudet V, Thisse B, Vanacker JM** (2004) Cloning and developmental expression of five *estrogen-receptor related* genes in the zebrafish. *Dev Genes Evol* 214: 240–249
  18. **Bass AH, Forlano PM** (2008) Neuroendocrine mechanisms of alternative reproductive tactics: the chemical language of reproductive and social plasticity. In *Alternative reproductive tactics: an integrative approach* (Oliveira RF, Taborsky M, Brockmann HJ, eds), Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 109–131
  19. **Berger A, Benveniste P, Corfe SA, Tran AH, Barbara M, Wakeham A, Mak TW, Iscove NN, Paige CJ** (2010) Targeted deletion of the tachykinin 4 gene (*TAC4*<sup>-/-</sup>) influences the early stages of B lymphocyte development. *Blood* 116: 3792–3801
  20. **Berger A, Tran AH, Dida J, Minkin S, Gerard NP, Yeomans J, Paige CJ** (2012) Diminished pheromone-induced sexual behavior in neurokinin-1 receptor deficient (*TACR1*<sup>-/-</sup>) mice. *Genes Brain Behav* 11: 568–576
  21. **Best C, Ikert H, Kostyniuk DJ, Craig PM, Navarro-Martin L, Marandel L, Mennigen JA** (2018) Epigenetics in teleost fish: from molecular mechanisms to physiological phenotypes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 224: 210–244
  22. **Bond H, Warne JM, Balment RJ** (2007) Effect of acute restraint on hypothalamic pro-vasotocin mRNA expression in flounder, *Platichthys flesus*. *Gen Comp Endocrinol* 153: 221–227
  23. **Bonnelye E, Vanacker JM, Dittmar T, Begue A, Desbiens X, Denhardt DT, Aubin JE, Laudet V, Fournier B** (1997a) The ERR-1 orphan receptor is a transcriptional activator expressed during bone development. *Mol Endocrinol* 11: 905–916



24. **Bonnelye E, Vanacker JM, Spruyt N, Alric S, Fournier B, Desbiens X, Laudet V** (1997b) Expression of the estrogen-related receptor 1 (ERR-1) orphan receptor during mouse development. *Mech Dev* 65: 71–85
25. **Borbély É, Helyes Z** (2017) Role of hemokinin-1 in health and disease. *Neuropeptides* 64: 9–17
26. **Bourke CH, Harrell CS, Neigh GN** (2012) Stress-induced sex differences: adaptations mediated by the glucocorticoid receptor. *Horm Behav* 62: 210–218
27. **Brezillon S, Lannoy V, Franssen JD, Le Poul E, Dupriez V, Lucchetti J, Detheux M, Parmentier M** (2003) Identification of natural ligands for the orphan G protein-coupled receptors GPR7 and GPR8. *J Biol Chem* 278: 776–783
28. **Brookes E, Pombo A** (2009) Modifications of RNA polymerase II are pivotal in regulating gene expression states. *EMBO Rep* 10: 1213–1219
29. **Chandran UR, DeFranco DB** (1999) Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene transcription. *Behav Brain Res* 105: 29–36
30. **Chapouton P, Jagasia R, Bally-Cuif L** (2007) Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates. *Bioessays* 29: 745–757
31. **Charest-Marcotte A, Dufour CR, Wilson BJ, Tremblay AM, Eichner LJ, Arlow DH, Mootha VK, Giguère V** (2010) The homeobox protein Prox1 is a negative modulator of ERR $\alpha$ /PGC-1 $\alpha$  bioenergetic functions. *Genes Dev* 24: 537–542
32. **Cheng G, Coolen LM, Padmanabhan V, Goodman RL, Lehman MN** (2010) The kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cell population of the arcuate nucleus: sex differences and effects of prenatal testosterone in sheep. *Endocrinology* 151: 301–311
33. **Derks NM, Gaszner B, Bernhardt K, Roubos EW, Kozicz T** (2009) Sex-specific expression of BDNF and CART in the midbrain non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus in the rat. *Peptides* 30: 2268–2274
34. **Dewan AK, Tricas TC** (2011) Arginine vasotocin neuronal phenotypes and their relationship to aggressive behavior in the territorial monogamous multiband butterflyfish, *Chaetodon multicinctus*. *Brain Res* 1401: 74–84
35. **Dornan WA, Malsbury CW, Penney RB** (1987) Facilitation of lordosis by injection of substance P into the midbrain central gray. *Neuroendocrinology* 45: 498–506
36. **Douglass J, McKinzie AA, Couceyro P** (1995) PCR differential display identifies a rat

- brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci* 15: 2471–2481
37. **Dun SL, Brailoiu GC, Yang J, Chang JK, Dun NJ** (2003) Neuropeptide W-immunoreactivity in the hypothalamus and pituitary of the rat. *Neurosci Lett* 349: 71–74
  38. **Dutton A, Dyball RE** (1979) Phasic firing enhances vasopressin release from the rat neurohypophysis. *J Physiol* 290: 433–440
  39. **Fernandino JI, Hattori RS, Kishii A, Strüssmann CA, Somoza GM** (2012) The cortisol and androgen pathways cross talk in high temperature-induced masculinization: the 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase as a key enzyme. *Endocrinology* 153: 6003–6011
  40. **Fernandino JI, Hattori RS, Moreno Acosta OD, Strüssmann CA, Somoza GM** (2013) Environmental stress-induced testis differentiation: androgen as a by-product of cortisol inactivation. *Gen Comp Endocrinol* 192: 36–44
  41. **Fishelson L** (1970) Protogynous sex reversal in the fish *Anthias squamipinnis* (Teleostei, Anthiidae) regulated by the presence or absence of a male fish. *Nature* 227: 90–91
  42. **Foran CM, Peterson BN, Benson WH** (2002) Transgenerational and developmental exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to ethinylestradiol results in endocrine and reproductive differences in the response to ethinylestradiol as adults. *Toxicol Sci* 68: 389–402
  43. **Foran CM, Weston J, Slattery M, Brooks BW, Huggett DB** (2004) Reproductive assessment of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure. *Arch Environ Contam Toxicol* 46: 511–517
  44. **Forger NG** (2016) Epigenetic mechanisms in sexual differentiation of the brain and behaviour. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci* 371: 20150114
  45. **Forlano PM, Bass AH** (2011) Neural and hormonal mechanisms of reproductive-related arousal in fishes. *Horm Behav* 59: 616–629
  46. **Fujii R, Yoshida H, Fukusumi S, Habata Y, Hosoya M, Kawamata Y, Yano T, Hinuma S, Kitada C, Asami T, Mori M, Fujisawa Y, Fujino M** (2002) Identification of a neuropeptide modified with bromine as an endogenous ligand for GPR7. *J Biol Chem* 277: 34010–34016
  47. **Fujimori C, Ogiwara K, Hagiwara A, Rajapakse S, Kimura A, Takahashi T** (2011)

- Expression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin receptor EP4b mRNA in the ovary of the medaka fish, *Oryzias latipes*: possible involvement in ovulation. *Mol Cell Endocrinol* 332: 67–77
48. **Fujimori C, Ogiwara K, Hagiwara A, Takahashi T** (2012) New evidence for the involvement of prostaglandin receptor EP4b in ovulation of the medaka, *Oryzias latipes*. *Mol Cell Endocrinol* 362: 76–84
  49. **Ganz J, Brand M** (2016) Adult Neurogenesis in Fish. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: 8
  50. **Garg G, Marwaha R** (2018) Gender Dysphoria (Sexual Identity Disorders). *StatPearls Publishing*
  51. **Ghiselin MT** (1969) The evolution of hermaphroditism among animals. *Q Rev Biol* 44: 189–208
  52. **Ghosal R, Sorensen PW** (2016) Male-typical courtship, spawning behavior, and olfactory sensitivity are induced to different extents by androgens in the goldfish suggesting they are controlled by different neuroendocrine mechanisms. *Gen Comp Endocrinol* 232: 160–173
  53. **Göppert C, Harris RM, Theis A, Boila A, Hohl S, Rüegg A, Hofmann HA, Salzburger W, Böhne A** (2016) Inhibition of aromatase induces partial sex change in a cichlid fish: distinct functions for sex steroids in brains and gonads. *Sex Dev* 10: 97–110
  54. **Giguère V** (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 20: 689–725
  55. **Gilchrist BJ, Tipping DR, Hake L, Levy A, Baker BI** (2000) The effects of acute and chronic stresses on vasotocin gene transcripts in the brain of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Neuroendocrinol* 12: 795–801
  56. **Godwin J** (2010) Neuroendocrinology of sexual plasticity in teleost fishes. *Front Neuroendocrinol* 31: 203–216
  57. **Godwin J, Thompson R** (2012) Nonapeptides and social behavior in fishes. *Horm Behav* 61: 230–238
  58. **Goel N, Bale TL** (2010) Sex differences in the serotonergic influence on the hypothalamic- pituitary-adrenal stress axis. *Endocrinology* 151: 1784–1794
  59. **Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CV,**

- Jafarzadehshirazi MR, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Ciofi P, Clarke IJ** (2007) Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* 148: 5752–5760
60. **Goodson JL, Thompson RR** (2010) Nonapeptide mechanisms of social cognition, behavior and species-specific social systems. *Curr Opin Neurobiol* 20: 784–794
61. **Gorski RA, Gordon JH, Shryne JE, Southam AM** (1978) Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res* 148: 333–346
62. **Gorski RA, Harlan RE, Jacobson CD, Shryne JE, Southam AM** (1980) Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. *J Comp Neurol* 193: 529–539
63. **Greenwood AK, Wark AR, Fernald RD, Hofmann HA** (2008) Expression of arginine vasotocin in distinct preoptic regions is associated with dominant and subordinate behaviour in an African cichlid fish. *Proc R Soc B Biol Sci* 275: 2393–2402
64. **Gregory WA, Tweedle CD** (1983) Maturation of the goldfish preoptic area: ultrastructural correlates of position and maturation of neurosecretory cells. *Neuroscience* 10: 425–448
65. **Handa RJ, Weiser MJ** (2014) Gonadal steroid hormones and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Front Neuroendocrinol* 35: 197–220
66. **Harada A, Maehara K, Handa T, Arimura Y, Nogami J, Hayashi-Takanaka Y, Shirahige K, Kurumizaka H, Kimura H, Ohkawa Y** (2018) A chromatin integration labelling method enables epigenomic profiling with lower input. *Nat Cell Biol* (in press)
67. **Hattori RS, Fernandino JI, Kishil A, Kimura H, Kinno T, Oura M, Somoza GM, Yokota M, Strüssmann CA, Watanabe S** (2009) Cortisol-induced masculinization: does thermal stress affect gonadal fate in pejerrey, a teleost fish with temperature-dependent sex determination? *PLoS One* 4: e6548
68. **Hayashi Y, Kobira H, Yamaguchi T, Shiraishi E, Yazawa T, Hirai T, Kamei Y, Kitano T** (2010) High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. *Mol Reprod Dev* 77: 679–686
69. **Heberden C** (2017) Sex steroids and neurogenesis. *Biochem Pharmacol* 141: 56–62
70. **Herget U, Wolf A, Wullmann MF, Ryu S** (2014) Molecular neuroanatomy and

- chemoarchitecture of the neurosecretory preoptic-hypothalamic area in zebrafish larvae. *J Comp Neurol* 522: 1542–1564
71. **Hiraki T, Nakasone K, Hosono K, Kawabata Y, Nagahama Y, Okubo K** (2014) Neuropeptide B is female-specifically expressed in the telencephalic and preoptic nuclei of the medaka brain. *Endocrinology* 155: 1021–1032
  72. **Hiraki T, Takeuchi A, Tsumaki T, Zempo B, Kanda S, Oka Y, Nagahama Y, Okubo K** (2012) Female-specific target sites for both oestrogen and androgen in the teleost brain. *Proc Biol Sci* 279: 5014–5023
  73. **Houtsmuller EJ, Brand T, de Jonge FH, Joosten RN, van de Poll NE, Slob AK** (1994) SDN-POA volume, sexual behavior, and partner preference of male rats affected by perinatal treatment with ATD. *Physiol Behav* 56: 535–541
  74. **Hu G, Lin C, He M, Wong AO** (2014) Neurokinin B and reproductive functions: “KNDy neuron” model in mammals and the emerging story in fish. *Gen Comp Endocrinol* 208: 94–108
  75. **Ishii M, Fei H, Friedman JM** (2003) Targeted disruption of GPR7, the endogenous receptor for neuropeptides B and W, leads to metabolic defects and adult-onset obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10540–10545
  76. **Ishikawa Y, Yoshimoto M, Ito H** (1999) A brain atlas of a wild-type inbred strain of the medaka, *Oryzias latipes*. *Fish Biol J Medaka* 10: 1–26
  77. **Iwamatsu T** (2004) Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mech Dev* 121: 605–618
  78. **Iwata E, Mikami K, Manbo J, Moriya-Ito K, Sasaki H** (2012) Social interaction influences blood cortisol values and brain aromatase genes in the protandrous false clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris*. *Zoolog Sci* 29: 849–855
  79. **Jackson VR, Lin SH, Wang Z, Nothacker HP, Civelli O** (2006) A study of the rat neuropeptide B/neuropeptide W system using in situ techniques. *J Comp Neurol* 497: 367–383
  80. **Joel D, Berman Z, Tavor I, Wexler N, Gaber O, Stein Y, Shefi N, Pool J, Urchs S, Margulies DS, Liem F, Hänggi J, Jäncke L, Assaf Y** (2015) Sex beyond the genitalia: the human brain mosaic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 15468–15473
  81. **Kagawa N, Honda A, Zenno A, Omoto R, Imanaka S, Takehana Y, Naruse K** (2016)

- Arginine vasotocin neuronal development and its projection in the adult brain of the medaka. *Neurosci Lett* 613: 47–53
82. **Kalimo H** (1975) Ultrastructural studies on the hypothalamic neurosecretory neurons of the rat. III. Paraventricular and supraoptic neurons during lactation and dehydration. *Cell Tissue Res* 163: 151–168
  83. **Kanda S, Akazome Y, Matsunaga T, Yamamoto N, Yamada S, Tsukamura H, Maeda K, Oka Y** (2008) Identification of KiSS-1 product kisspeptin and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in Medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology* 149: 2467–2476
  84. **Karigo T, Kanda S, Takahashi A, Abe H, Okubo K, Oka Y** (2012) Time-of-day-dependent changes in GnRH1 neuronal activities and gonadotropin mRNA expression in a daily spawning fish, medaka. *Endocrinology* 153: 3394–3404
  85. **Karigo T, Oka Y** (2013) Neurobiological study of fish brains gives insights into the nature of gonadotropin-releasing hormone 1-3 neurons. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 177
  86. **Kasahara M, Naruse K, Sasaki S, Nakatani Y, Qu W, Ahsan B, Yamada T, Nagayasu Y, Doi K, Kasai Y, Jindo T, Kobayashi D, Shimada A, Toyoda A, Kuroki Y, Fujiyama A, Sasaki T, Shimizu A, Asakawa S, Shimizu N, Hashimoto S, Yang J, Lee Y, Matsushima K, Sugano S, Sakaizumi M, Narita T, Ohishi K, Haga S, Ohta F, Nomoto H, Nogata K, Morishita T, Endo T, Shin-I T, Takeda H, Morishita S, Kohara Y** (2007) The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature* 447: 714–719
  87. **Kawabata Y, Hiraki T, Takeuchi A, Okubo K** (2012) Sex differences in the expression of vasotocin/isotocin, gonadotropin-releasing hormone, and tyrosine and tryptophan hydroxylase family genes in the medaka brain. *Neuroscience* 218: 65–77
  88. **Keller-Wood M** (2015) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis-feedback control. *Compr Physiol* 5: 1161–1182
  89. **Kirchmaier S, Naruse K, Wittbrodt J, Loosli F** (2015) The genomic and genetic toolbox of the teleost medaka (*Oryzias latipes*). *Genetics* 199: 905–918
  90. **Kleszczyńska A, Kulczykowska E** (2013) Stocking density influences brain arginine vasotocin (AVT) and isotocin (IT) levels in males and females of three-spined

- stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Gen Comp Endocrinol* 183: 14–16
91. **Komarnitsky P, Cho EJ, Buratowski S** (2000) Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* 14: 2452–2460
  92. **Kovács KJ, Földes A, Sawchenko PE** (2000) Glucocorticoid negative feedback selectively targets vasopressin transcription in parvocellular neurosecretory neurons. *J Neurosci* 20: 3843–3852
  93. **Koyama Y, Satou M, Oka Y, Ueda K** (1984) Involvement of the telencephalic hemispheres and the preoptic area in sexual behavior of the male goldfish, *Carassius auratus*: a brain-lesion study. *Behav Neural Biol* 40: 70–86
  94. **Kudielka BM, Kirschbaum C** (2005) Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol Psychol* 69: 113–132
  95. **Kuramochi A, Tsutiya A, Kaneko T, Ohtani-Kaneko R** (2011) Sexual dimorphism of gonadotropin-releasing hormone type-III (GnRH3) neurons and hormonal sex reversal of male reproductive behavior in Mozambique tilapia. *Zoolog Sci* 28: 733–739
  96. **Le Page Y, Diotel N, Vaillant C, Pellegrini E, Anglade I, Mérot Y, Kah O** (2010) Aromatase, brain sexualization and plasticity: the fish paradigm. *Eur J Neurosci* 32: 2105–2115
  97. **Li B, Carey M, Workman JL** (2007) The Role of Chromatin during Transcription. *Cell* 128: 707–719
  98. **Li M, Sun L, Wang D** (2018) Roles of estrogens in fish sexual plasticity and sex differentiation. *Gen Comp Endocrinol* (on-line information)
  99. **Liu H, Todd EV, Lokman PM, Lamm MS, Godwin JR, Gemmell NJ** (2017) Sexual plasticity: a fishy tale. *Mol Reprod Dev* 84: 171–194
  100. **Luo J, Sladek R, Carrier J, Bader J, Richard D, Giguère V** (2003) Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor  $\alpha$ . *Mol Cell Biol* 23: 7947–7956
  101. **MacLusky NJ, Naftolin F** (1981) Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 211: 1294–1302
  102. **Maehiro S, Takeuchi A, Yamashita J, Hiraki T, Kawabata Y, Nakasone K, Hosono K, Usami T, Paul-Prasanth B, Nagahama Y, Oka Y, Okubo K** (2014) Sexually

- dimorphic expression of the sex chromosome-linked genes *cntfa* and *pdlim3a* in the medaka brain. *Biochem Biophys Res Commun* 445: 113–119
103. **Mahmoud R, Wainwright SR, Galea LA** (2016) Sex hormones and adult hippocampal neurogenesis: regulation, implications, and potential mechanisms. *Front Neuroendocrinol* 41: 129–152
104. **Mancera JM, Vargas-Chacoff L, García-López A, Kleszczyńska A, Kalamarz H, Martínez-Rodríguez G, Kulczykowska E** (2008) High density and food deprivation affect arginine vasotocin, isotocin and melatonin in gilthead sea bream (*Sparus auratus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 149: 92–97
105. **Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S, Sakaizumi M** (2002) *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417: 559–563
106. **McCarthy MM, Arnold AP** (2011) Reframing sexual differentiation of the brain. *Nat Neurosci* 14: 677–683
107. **McCarthy MM, Arnold AP, Ball GF, Blaustein JD, De Vries GJ** (2012) Sex differences in the brain: the not so inconvenient truth. *J Neurosci* 32: 2241–2247
108. **McCarthy MM, Auger AP, Bale TL, De Vries GJ, Dunn GA, Forger NG, Murray EK, Nugent BM, Schwarz JM, Wilson ME** (2009) The epigenetics of sex differences in the brain. *J Neurosci* 29: 12815–12823
109. **McCarthy MM, Nugent BM** (2013) Epigenetic contributions to hormonally-mediated sexual differentiation of the brain. *J Neuroendocrinol* 25: 1133–1140
110. **McCarthy MM, Nugent BM** (2015) At the frontier of epigenetics of brain sex differences. *Front Behav Neurosci* 9: 221
111. **McCarthy MM, Nugent BM, Lenz KM** (2017) Neuroimmunology and neuroepigenetics in the establishment of sex differences in the brain. *Nat Rev Neurosci* 18: 471–484
112. **McQuillan HJ, Lokman PM, Young G** (2003) Effects of sex steroids, sex, and sexual maturity on cortisol production: an in vitro comparison of chinook salmon and rainbow trout interrenals. *Gen Comp Endocrinol* 133: 154–163
113. **Miller KA, Kenter LW, Breton TS, Berlinsky DL** (2019) The effects of stress, cortisol



- administration and cortisol inhibition on black sea bass (*Centropristis striata*) sex differentiation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 227: 154–160
114. **Miyagawa S, Lange A, Tohyama S, Ogino Y, Mizutani T, Kobayashi T, Tatarazako N, Tyler CR, Iguchi T** (2015) Characterization of *Oryzias latipes* glucocorticoid receptors and their unique response to progestins. *J Appl Toxicol* 35: 302–309
115. **Montgomery J, Wittwer CT, Palais R, Zhou L** (2007) Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nat Protoc* 2: 59–66
116. **Moore FL, Lowry CA** (1998) Comparative neuroanatomy of vasotocin and vasopressin in amphibians and other vertebrates. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 119: 251–260
117. **Moore MJ, Proudfoot NJ** (2009) Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* 136: 688–700
118. **Morimoto M, Morita N, Ozawa H, Yokoyama K, Kawata M** (1996) Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci Res* 26: 235–269
119. **Morris JF, Dyball RE** (1974) A quantitative study of the ultrastructural changes in the hypothalamo-neurohypophysial system during and after experimentally induced hypersecretion. *Cell Tissue Res* 149: 525–535
120. **Morris JF, Nordmann JJ, Dyball RE** (1978) Structure-function correlation in mammalian neurosecretion. *Int Rev Exp Pathol* 18: 1–95
121. **Moss RL, McCann SM** (1973) Induction of mating behavior in rats by luteinizing hormone-releasing factor. *Science* 181: 177–179
122. **Munakata A, Kobayashi M** (2010) Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 165: 456–468
123. **Murashita K, Kurokawa T** (2011) Multiple cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) genes in medaka, *Oryzias latipes*: cloning, tissue distribution and effect of starvation. *Gen Comp Endocrinol* 170: 494–500
124. **Murashita K, Kurokawa T, Ebbesson LO, Stefansson SO, Rønnestad I** (2009) Characterization, tissue distribution, and regulation of agouti-related protein (AgRP), cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and neuropeptide Y (NPY) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gen Comp Endocrinol* 162: 160–171

125. **Myers B, McKlveen JM, Herman JP** (2014) Glucocorticoid actions on synapses, circuits, and behavior: implications for the energetics of stress. *Front Neuroendocrinol* 35: 180–196
126. **Naftolin F, Ryan KJ, Petro Z** (1972) Aromatization of androstenedione by the anterior hypothalamus of adult male and female rats. *Endocrinology* 90: 295–298
127. **Nanda I, Kondo M, Hornung U, Asakawa S, Winkler C, Shimizu A, Shan Z, Haaf T, Shimizu N, Shima A, Schmid M, Scharl M** (2002) A duplicated copy of *DMRT1* in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11778–11783
128. **Narita Y, Tsutiya A, Nakano Y, Ashitomi M, Sato K, Hosono K, Kaneko T, Chen RD, Lee JR, Tseng YC, Hwang PP, Ohtani-Kaneko R** (2018) Androgen induced cellular proliferation, neurogenesis, and generation of GnRH3 neurons in the brain of mature female Mozambique tilapia. *Sci Rep* 8: 16855
129. **Narumiya S** (2007) Physiology and pathophysiology of prostanoid receptors. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 83: 296–319
130. **Navarro VM, Bosch MA, León S, Simavli S, True C, Pinilla L, Carroll RS, Seminara SB, Tena-Sempere M, Rønnekleiv OK, Kaiser UB** (2015) The integrated hypothalamic tachykinin-kisspeptin system as a central coordinator for reproduction. *Endocrinology* 156: 627–637
131. **Nottebohm F, Arnold AP** (1976) Sexual dimorphism in vocal control areas of the songbird brain. *Science* 194: 211–213
132. **Nozu R, Nakamura M** (2015) Cortisol administration induces sex change from ovary to testis in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. *Sex Dev* 9: 118–124
133. **Ogawa S, Akiyama G, Kato S, Soga T, Sakuma Y, Parhar IS** (2006) Immunoneutralization of gonadotropin-releasing hormone type-III suppresses male reproductive behavior of cichlids. *Neurosci Lett* 403: 201–205
134. **Ogawa S, Ramadasan PN, Goschorska M, Anantharajah A, Ng KW, Parhar IS** (2012) Cloning and expression of tachykinins and their association with kisspeptins in the brains of zebrafish. *J Comp Neurol* 520: 2991–3012
135. **Oka T, Oka K, Scammell TE, Lee C, Kelly JF, Nantel F, Elmquist JK, Saper CB** (2000) Relationship of EP<sub>1-4</sub> prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups

- involved in lipopolysaccharide fever responses. *J Comp Neurol* 428: 20–32
136. **Okubo K, Nagahama Y** (2008) Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. *Acta Physiol (Oxf)* 193: 3–15
137. **Okubo K, Sakai F, Lau EL, Yoshizaki G, Takeuchi Y, Naruse K, Aida K, Nagahama Y** (2006) Forebrain gonadotropin-releasing hormone neuronal development: insights from transgenic medaka and the relevance to X-linked Kallmann syndrome. *Endocrinology* 147: 1076–1084
138. **Okubo K, Takeuchi A, Chaube R, Paul-Prasanth B, Kanda S, Oka Y, Nagahama Y** (2011) Sex Differences in Aromatase Gene Expression in the Medaka Brain. *J Neuroendocrinol* 23: 412–423
139. **Ono Y, Uematsu T** (1957) Mating Ethogram in *Oryzias latipes*. *J Fac Sci Hokkaido Univ* 13: 197–202
140. **Page NM** (2004) Hemokinins and endokinins. *Cell Mol Life Sci* 61: 1652–1663
141. **Page NM** (2006) Characterization of the gene structures, precursor processing and pharmacology of the endokinin peptides. *Vascul Pharmacol* 45: 200–208
142. **Paul-Prasanth B, Bhandari RK, Kobayashi T, Horiguchi R, Kobayashi Y, Nakamoto M, Shibata Y, Sakai F, Nakamura M, Nagahama Y** (2013) Estrogen oversees the maintenance of the female genetic program in terminally differentiated gonochorists. *Sci Rep* 3: 2862
143. **Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA** (2004) Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci* 74: 1445–1463
144. **Peyon P, Saied H, Lin X, Peter RE** (2000) Preprotachykinin gene expression in goldfish brain: sexual, seasonal, and postprandial variations. *Peptides* 21: 225–231
145. **Pfaff DW** (1973) Luteinizing hormone-releasing factor potentiates lordosis behavior in hypophysectomized ovariectomized female rats. *Science* 182: 1148–1149
146. **Phatnani HP, Greenleaf AL** (2006) Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev* 20: 2922–2936
147. **Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young WC** (1959) Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 65: 369–382
148. **Ponti G, Farinetti A, Marraudino M, Panzica G, Gotti S** (2018) Sex steroids and

- adult neurogenesis in the ventricular-subventricular zone. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9: 156
149. **Pooley AE, Benjamin RC, Sreedhar S, Eagle AL, Robison AJ, Mazei-Robison MS, Breedlove SM, Jordan CL** (2018) Sex differences in the traumatic stress response: PTSD symptoms in women recapitulated in female rats. *Biol Sex Differ* 9: 31
150. **Regan JW** (2003) EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub> prostanoid receptor signaling. *Life Sci* 74: 143–153
151. **Robertson DR** (1972) Social control of sex reversal in a coral-reef fish. *Science* 177: 1007–1009
152. **Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK** (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26: 139–140
153. **Sakamoto N, Ito H** (1982) Fiber connections of the corpus glomerulosum in a teleost, *Navodon modestus*. *J Comp Neurol* 205: 291–298
154. **Sakurai T** (2013) NPBWR1 and NPBWR2: implications in energy homeostasis, pain, and emotion. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 23
155. **Samarut É, Lissouba A, Drapeau P** (2016) A simplified method for identifying early CRISPR-induced indels in zebrafish embryos using High Resolution Melting analysis. *BMC Genomics* 17: 547
156. **Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU** (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21: 55–89
157. **Sárvári M, Kalló I, Hrabovszky E, Solymosi N, Tóth K, Likó I, Molnár B, Tihanyi K, Liposits Z** (2010) Estradiol replacement alters expression of genes related to neurotransmission and immune surveillance in the frontal cortex of middle-aged, ovariectomized rats. *Endocrinology* 151: 3847–3862
158. **Sasado T, Tanaka M, Kobayashi K, Sato T, Sakaizumi M, Naruse K** (2010) The National BioResource Project Medaka (NBRP Medaka): an integrated bioresource for biological and biomedical sciences. *Exp Anim* 59: 13–23
159. **Sasagawa Y, Nikaido I, Hayashi T, Danno H, Uno KD, Imai T, Ueda HR** (2013) Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA-Seq reveals non-genetic gene expression heterogeneity. *Genome Biol* 14: R31

160. **Satou M, Oka Y, Kusunoki M, Matsushima T, Kato M, Fujita I, Ueda K** (1984) Telencephalic and preoptic areas integrate sexual behavior in hime salmon (landlocked red salmon, *Oncorhynchus nerka*): results of electrical brain stimulation experiments. *Physiol Behav* 33: 441–447
161. **Sawai N, Iijima N, Takumi K, Matsumoto K, Ozawa H** (2012) Immunofluorescent histochemical and ultrastructural studies on the innervation of kisspeptin/neurokinin B neurons to tuberoinfundibular dopaminergic neurons in the arcuate nucleus of rats. *Neurosci Res* 74: 10–16
162. **Seale JV., Wood SA, Atkinson HC, Bate E, Lightman SL, Ingram CD, Jessop DS, Harbuz MS** (2004a) Gonadectomy reverses the sexually diergic patterns of circadian and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in male and female rats. *J Neuroendocrinol* 16: 516–524
163. **Seale JV., Wood SA, Atkinson HC, Harbuz MS, Lightman SL** (2004b) Gonadal steroid replacement reverses gonadectomy-induced changes in the corticosterone pulse profile and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male and female rats. *J Neuroendocrinol* 16: 989–998
164. **Semsar K, Godwin J** (2003) Social influences on the arginine vasotocin system are independent of gonads in a sex-changing fish. *J Neurosci* 23: 4386–4393
165. **Shapiro DY** (1980) Serial female sex changes after simultaneous removal of males from social groups of a coral reef fish. *Science* 209: 1136–1137
166. **Simavli S, Thompson IR, Maguire CA, Gill JC, Carroll RS, Wolfe A, Kaiser UB, Navarro VM** (2015) Substance P regulates puberty onset and fertility in the female mouse. *Endocrinology* 156: 2313–2322
167. **Smolle M, Workman JL, Venkatesh S** (2013) reSETting chromatin during transcription elongation. *Epigenetics* 8: 10–15
168. **Sousa RJ, Tannery NH, Lafer EM** (1989) In situ hybridization mapping of glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid in rat brain. *Mol Endocrinol* 3: 481–494
169. **Steinhoff MS, von Mentzer B, Geppetti P, Pothoulakis C, Bunnett NW** (2014) Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. *Physiol Rev* 94: 265–301

170. **Suehiro Y, Yasuda A, Okuyama T, Imada H, Kuroyanagi Y, Kubo T, Takeuchi H** (2009) Mass spectrometric map of neuropeptide expression and analysis of the  $\gamma$ -prepro-tachykinin gene expression in the medaka (*Oryzias latipes*) brain. *Gen Comp Endocrinol* 161: 138–145
171. **Swanson LW, Sawchenko PE** (1980) Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology* 31: 410–417
172. **Tachibana T, Takagi T, Tomonaga S, Ohgushi A, Ando R, Denbow DM, Furuse M** (2003) Central administration of cocaine- and amphetamine-regulated transcript inhibits food intake in chicks. *Neurosci Lett* 337: 131–134
173. **Takahashi T, Hagiwara A, Ogiwara K** (2018) Prostaglandins in teleost ovulation: a review of the roles with a view to comparison with prostaglandins in mammalian ovulation. *Mol Cell Endocrinol* 461: 236–247
174. **Takeda H, Shimada A** (2010) The art of medaka genetics and genomics: what makes them so unique? *Annu Rev Genet* 44: 217–241
175. **Tanaka H, Yoshida T, Miyamoto N, Motoike T, Kurosu H, Shibata K, Yamanaka A, Williams SC, Richardson JA, Tsujino N, Garry MG, Lerner MR, King DS, O’Dowd BF, Sakurai T, Yanagisawa M** (2003) Characterization of a family of endogenous neuropeptide ligands for the G protein-coupled receptors GPR7 and GPR8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6251–6256
176. **Teitsma CA, Anglade I, Lethimonier C, Le Dréan G, Saligaut D, Ducouret B, Kah O** (1999) Glucocorticoid receptor immunoreactivity in neurons and pituitary cells implicated in reproductive functions in rainbow trout: a double immunohistochemical study. *Biol Reprod* 60: 642–650
177. **Teitsma CA, Anglade I, Toutirais G, Muñoz-Cueto JA, Saligaut D, Ducouret B, Kah O** (1998) Immunohistochemical localization of glucocorticoid receptors in the forebrain of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Comp Neurol* 401: 395–410
178. **Thomas HR, Percival SM, Yoder BK, Parant JM** (2014) High-throughput genome editing and phenotyping facilitated by high resolution melting curve analysis. *PLoS One* 9: e114632
179. **Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP** (2013) Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*

14: 178–192

180. **Tilton SC, Foran CM, Benson WH** (2003) Effects of cadmium on the reproductive axis of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 136: 265–276
181. **Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, Van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L** (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 28: 511–515
182. **Trayer V, Hwang PP, Prunet P, Thermes V** (2013) Assessment of the role of cortisol and corticosteroid receptors in epidermal ionocyte development in the medaka (*Oryzias latipes*) embryos. *Gen Comp Endocrinol* 194: 152–161
183. **Tsuge K, Iwasaki R, Morimoto K, Inazumi T, Kawahara O, Kawahara A, Tsuchiya S, Sugimoto Y** (2013) Molecular and pharmacological characterization of zebrafish 'relaxant' prostanoid receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 436: 685–690
184. **Turner BB** (1997) Influence of gonadal steroids on brain corticosteroid receptors: a minireview. *Neurochem Res* 22: 1375–1385
185. **Venkatesh S, Smolle M, Li H, Gogol MM, Saint M, Kumar S, Natarajan K, Workman JL** (2012) Set2 methylation of histone H3 lysine 36 suppresses histone exchange on transcribed genes. *Nature* 489: 452–455
186. **Volkoff H, Peter RE** (2000) Effects of CART peptides on food consumption, feeding and associated behaviors in the goldfish, *Carassius auratus*: actions on neuropeptide Y- and orexin A-induced feeding. *Brain Res* 887: 125–133
187. **Wagner EJ, Carpenter PB** (2012) Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 115–126
188. **Walter RO, Hamilton JB** (1970) Head-up movements as an indicator of sexual unreceptivity in female medaka, *Oryzias latipes*. *Anim Behav* 18: 125–127
189. **Watanabe N, Yamamoto M** (2015) Neural mechanisms of social dominance. *Front Neurosci* 9: 154
190. **Wendelaar Bonga SE** (1997) The stress response in fish. *Physiol Rev* 77: 591–625
191. **Whalen RE** (1974) Estrogen-progesterone induction of mating in female rats. *Horm Behav* 5: 157–162

192. **Whirledge S, Cidlowski JA** (2013) A role for glucocorticoids in stress-impaired reproduction: beyond the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 154: 4450–4468
193. **White SA, Nguyen T, Fernald RD** (2002) Social regulation of gonadotropin-releasing hormone. *J Exp Biol* 205: 2567–2581
194. **Wittbrodt J, Shima A, Scharl M** (2002) Medaka--a model organism from the far East. *Nat Rev Genet* 3: 53–64
195. **Wright CL, Burks SR, McCarthy MM** (2008) Identification of prostaglandin E2 receptors mediating perinatal masculinization of adult sex behavior and neuroanatomical correlates. *Dev Neurobiol* 68: 1406–1419
196. **Xiao T, Hall H, Kizer KO, Shibata Y, Hall MC, Borchers CH, Strahl BD** (2003) Phosphorylation of RNA polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast. *Genes Dev* 17: 654–663
197. **Yamaguchi T, Kitano T** (2012) High temperature induces *cyp26b1* mRNA expression and delays meiotic initiation of germ cells by increasing cortisol levels during gonadal sex differentiation in Japanese flounder. *Biochem Biophys Res Commun* 419: 287–292
198. **Yamaguchi T, Yoshinaga N, Yazawa T, Gen K, Kitano T** (2010) Cortisol is involved in temperature-dependent sex determination in the Japanese flounder. *Endocrinology* 151: 3900–3908
199. **Yamamoto T** (1958) Artificial induction of functional sex-reversal in genotypic females of the medaka (*Oryzias latipes*). *J Exp Zool* 137: 227–263
200. **Yamashita J, Kawabata Y, Okubo K** (2017) Expression of isotocin is male-specifically up-regulated by gonadal androgen in the medaka brain. *J Neuroendocrinol* 29
201. **Zhang Y, Paige CJ** (2003) T-cell developmental blockage by tachykinin antagonists and the role of hemokinin 1 in T lymphopoiesis. *Blood* 102: 2165–2172.
202. **Zhang ZB, Hu JY, Sai SX, Zhao YB, Huang C, Tian XJ** (2008) Gene cloning, sequence analysis and tissue expression of estrogen-related receptor alpha (Erralpha) in Japanese medaka and its transcriptional responses after differential EDCs exposure. *Huan Jing Ke Xue* 29: 3153-3158
201. **梶山(平木)十和子** (2015) メダカの脳における性ステロイド受容ニューロンの構造・機能解析. 博士論文
202. **川幡由希香** (2016) メダカの脳と下垂体における神経伝達物質・神経修飾物質関連



遺伝子の性差. 博士論文

203. 妻木孝泰 (2012) メダカの脳において性依存的に発現する遺伝子群の制御機構解析. 修士論文
204. 細野耕平 (2015) メダカの脳におけるコルチコトロピン放出ホルモン(CRH)ファミリー作用系の性差. 修士論文
205. 前廣清香 (2013) メダカの脳において発現に性差を示す遺伝子の探索と発現制御解析. 博士論文
206. 横山圭子 (2015) メダカの脳でメスのみに存在する性ホルモン受容性ペプチドニューロンの性的可逆性. 修士論文
207. 山下純平 (2018) メダカの視索前野で発現に性差を示す神経ペプチド:性差の形成機構と生理的意義. 博士論文