

# 論文の内容の要旨

## Neuroendocrinological studies on the neural circuit that activates female sexual behavior in a teleost medaka

(メダカを用いた真骨魚類のメス性行動を賦活する  
神経回路に関する神経内分泌学的研究)

氏名 富原 壮真

### 序論

真骨魚類は脊椎動物の中でも特に種分化が進んだ系統群であり、それぞれの種が示す性行動も多様化している。その一方で、一般に性行動は雌雄個体が生殖可能な生理状態になって初めて起こるという点は共通していることから、生殖腺が生殖可能な生理状態にあることを脳に伝え、性行動を賦活する神経内分泌メカニズムの存在が示唆されていた。

私は、真骨魚類のメスの卵巣から分泌される性ステロイドホルモンの一種であるエストロジェン (E) に着目した。E は、脳/脳下垂体へのフィードバック調節により生殖腺の機能を調節することが報告されている (Kanda, 2019)。本研究では、この E が脳内の性行動中枢において受容されることで性行動の賦活に関与するという仮説を立て、明瞭な性行動パターンを示すために性行動の解析が容易であり、E をはじめとする生殖に関する神経内分泌学的知見が豊富なメダカのメスを用いて検証を行った。また、一連の性行動の解析を行うにあたり、効率的な解析を実現する実験系の構築を行った。

### 1. 効率的な行動解析実験系の確立

メダカの性行動解析を含め、現在行動解析において最もよく用いられるビデオカメラによる行動の撮影と手作業による行動指標の記録は、実験操作が煩雑で実験誤差が生じやすい。この問題を解消するため、シングルボードコンピュータ Raspberry Pi にカメラを接続したユニットを作製し、動画の撮影とデータの整理を全自動で行う系を構築した。また無線 LAN を介した複数 Raspberry Pi の同時操作により、複数台のカメラに

よる動画撮影を同時かつ遠隔で行うことが可能になり、実験者の介入を減らすことで実験個体間での誤差が生じる可能性を抑えた実験系を構築した。一方、撮影された動画を見ながら行動指標が生じた瞬間にPCのキーを押下することで行動をExcelのシートに記録するとともに、行動指標のラスタープロットを出力する機能をもつプログラムを作製し、効率的な行動指標の記録と行動の時間的変遷の視覚的な理解を容易にした。この実験系を用いて実験系統のメダカと野生メダカの性行動を解析し、二つの系統間で性行動に関する複数の指標に差があることを定量的に示した (Fig.1) (Tomihara *et al.*, 2021)。

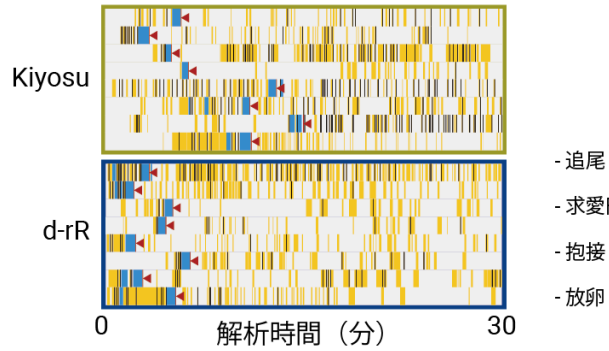


Fig.1 野生型メダカ (Kiyosu) と実験系統メダカ (d-rR) の性行動解析の結果。作製した Excel マクロを用いて解析し、ラスタープロットで表した。d-rR のペアの方が放卵までの潜時間が短いなど、複数の指標で有意な差があることを示した。

## 2. E の性行動に関する寄与の検証

この行動解析実験系を用いて、メスのメダカの性行動賦活に対する E の寄与について検証した。まず、E の合成酵素であるアロマトラーゼの阻害剤 Fadrozole を投与したメスをオスと混泳させ性行動を解析したところ、メスはオスから正常に求愛を受けるにもかかわらず、求愛を受けた後にオスを受容する抱接行動を示さなかった。そこで、卵巣を除去し、性行動を行わなくなったメスに E を投与し同様の解析を行ったところ、通常の抱接行動よりは短いものの、一部個体で抱接様の行動が回復した。以上より、メスの受容性は卵巣由来の E に依存して上昇することが示唆された。これを踏まえ、所属研究室で作出された E 受容体の一種である *esr2b* ノックアウト (KO) メス (Kayo *et al.*, 2019) の性行動を解析したところ、オスから正常に求愛を受けるにもかかわらずそれを拒否するような行動をとり、抱接行動を示さなかった (Fig.2)。一方で、*esr2b* KO メスの生殖腺の機能や第二性徴の発現は正常であり、卵巣からの E 分泌も正常であることが示唆された。このことから、*esr2b* KO メスは正常な生殖機能をもつものの、性行動を行わないという表現型であることが分かった。*esr2b* は脳内の複数の神経核に存在するニューロンで発現することが知られているため (Zempo *et al.*, 2013)、*esr2b* を発現するニューロンが卵巣由来の E を受容し、何らかの形でメスの受容性の上昇に寄与することが示唆された。

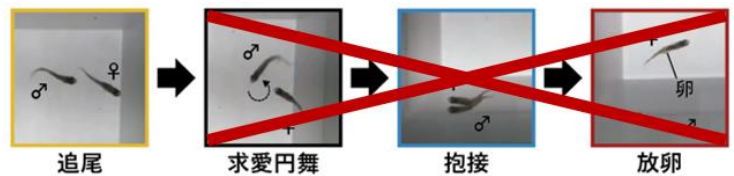


Fig.2 *esr2b* KO メスの性行動パターンを表した模式図。通常、オスから求愛円舞を受けたメスは抱接行動に移行しやがて放卵に至るが、*esr2b* KO メスはオスから求愛円舞を拒否し、抱接行動に移行しない。

## 3. メスの抱接行動の定量的解析

メスの性行動の賦活に関与する神経回路の探索を行うにあたり、メス抱接行動をさらに詳細に理解するため、抱接行動においてメスがオスの背鰭と腹鰭によって抱えられている際に、メスの尾側部が湾曲する角度を解析した。その結果、放卵に至った際に行った抱接時におけるメスの吻側部に対する尾側部の角度は、放卵に至らなかった抱接行動におけるものより有意に大きいことが分かった (Fig.3)。このように、尾側部湾曲行動と放卵に強い相関が見られ

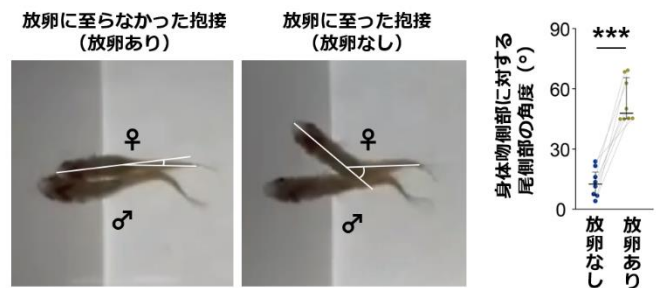


Fig.3 抱接行動時のメスにおける、身体吻側部に対する尾側部の角度の解析。口吻の先端、総排出腔および尾鰭基部から成される角度を  $180^\circ$  から除した角度を定量、解析した。放卵に至った抱接において、メスの尾は大きく湾曲し、オスの身体に自身の身体を押し付けるような行動をとる (\*\*\*) ( $p < 0.001$ , Wilcoxon signed-rank test)。

たことから、メダカメスの抱接時において尾側部を湾曲させる行動を積極的に行い、これが放卵を直接引き起こすことが示唆された。

#### 4. メス性行動の賦活に関するニューロンの同定

性行動解析の結果より、脳内のいずれかの神経核に存在する *esr2b* 発現ニューロンが性行動の賦活に関与することが示唆された。このため、オスと混泳させ放卵を行ったメスと、メスと混泳させ放卵しなかったメスの脳においてニューロン活動マーカーである初期応答遺伝子の一種 *egr1* 遺伝子の *in situ* hybridization (ISH) を行い、*esr2b* 発現ニューロンが存在する神経核において *egr1* 標識細胞数を比較した。その結果、終脳腹側野 Vd/Vs/Vp において、性行動を行ったメスで *egr1* 標識細胞数が有意に多かった (Fig.4A)。Vd/Vs/Vp は他魚種において性行動に関与することが知られており (Satou *et al.*, 1984; Koyama *et al.*, 1984)、メダカにおいても、*esr2b* 発現ニューロンや、*egr1* 発現を伴って性行動時に活動が変化するニューロンが存在することから、Vd/Vs/Vp が性行動賦活に関与する神経回路を含むことが示唆された。さらに、この *egr1* の発現上昇がオスとの性行動のうちどのタイミングで上昇するのかを明らかにするため、放卵を行ったメスと行わなかったメスにおいて、Vd/Vs/Vp の *egr1* 発現を ISH により解析した (Fig.4B)。その結果、放卵を行ったメスにおいて *egr1* 発現細胞数が有意に多かった。このことから、*egr1* 発現を伴って性行動時に活動が変化するニューロンは、放卵行動の賦活に特異的に関与することが示唆された。

このニューロンが *esr2b* 発現ニューロンである可能性を検証するため、*egr1* と *esr2b* の二重 ISH を行ったところ、*egr1* と *esr2b* のシグナルはそれぞれ Vd/Vs/Vp の背側/腹側に局在し、両シグナルが共局在するニューロンはほとんど存在しなかった。このことから、Vd/Vs/Vp 内に隣接する *egr1* 発現ニューロン (*egr1*<sup>Vd/Vs/Vp</sup> ニューロン) と *esr2b* 発現ニューロン (*esr2b*<sup>Vd/Vs/Vp</sup> ニューロン) は別のニューロンであることが分かった (Fig.4C)。さらに、レーザーマイクロダイセクションにより両ニューロン発現領域を独立に回収し、RNA-Seq により各ニューロンの神経伝達物質を探索し、候補遺伝子の *egr1* および *esr2b* の二重 ISH を行うことで、これらのニューロンが発現する神経伝達物質の同定を試みた。その結果、*esr2b*<sup>Vd/Vs/Vp</sup> ニューロンの神経伝達物質として cholecystokinin (CCK), C-type natriuretic peptide 1 (CNP1)、*egr1*<sup>Vd/Vs/Vp</sup> ニューロンの神経伝達物質として GABA を同定した。さらに、*egr1*<sup>Vd/Vs/Vp</sup> ニューロンにおいて、CCK および CNP1 の受容体が発現することを示唆する結果を得た。このことから、*esr2b*<sup>Vd/Vs/Vp</sup> ニューロンが CCK や CNP1 を介して *egr1*<sup>Vd/Vs/Vp</sup> ニューロンに神経伝達を行っていることが示唆された。

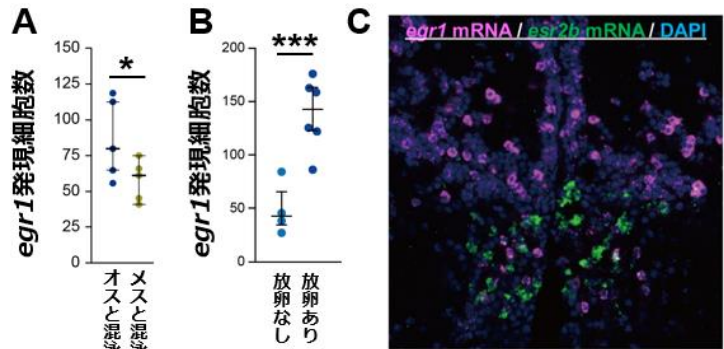


Fig.4 (A) (B) VdVsVp における *egr1* 発現細胞数の比較。(A) オスと混泳し性行動を行った個体における *egr1* 発現細胞数は、メスと混泳し性行動を行わなかったメスよりも有意に高かった (\* $P < 0.05$ , Mann-Whitney *U* Test)。(B) 尾側部湾曲行動および放卵を行ったメスにおける *egr1* 発現細胞数は、行わなかったメスよりも有意に高かった (\*\*\* $P < 0.001$ , Mann-Whitney *U* Test)。(C) *egr1* と *esr2b* の二重 ISH。マゼンタ、緑はそれぞれ *egr1* と *esr2b* のシグナルを示す。Vd/Vs/Vp の *egr1* 発現ニューロンと *esr2b* 発現ニューロンは別のニューロンである。

#### 考察

本研究により、新たに確立した行動解析系を用いて、メダカメスの性行動は繁殖状態のメスの卵巣から分泌される E が脳内 *esr2b* 発現ニューロンで受容されることにより賦活されることが明らかになった。一方で、実際オスとの性行動時、メスが自発的に行う尾側部湾曲行動と放卵が起きる時に Vd/Vs/Vp の背側に局在する *egr1*<sup>Vd/Vs/Vp</sup> ニューロンが高い *egr1* 発現を示すことから、*egr1*<sup>Vd/Vs/Vp</sup> ニューロンがメスが行う放卵行動、即

ち尾側部湾曲行動の賦活に直接的に関与することが示唆された。一方、*egr1<sup>Vd/Vs/Vp</sup>*ニューロンの近傍に*esr2b*発現ニューロン (*esr2b<sup>Vd/Vs/Vp</sup>*ニューロン) が存在することが明らかになった。

また、RNA-Seq と組織学的な解析により、*esr2b<sup>Vd/Vs/Vp</sup>*ニューロンは神経伝達物質である CCK/CNP1 の遺伝子が発現することを示し、一方で*egr1<sup>Vd/Vs/Vp</sup>*ニューロンで CCK/CNP1 の受容体を発現することが示唆する結果を得た。このことから、メス放卵行動の賦活に直接的に関与することが予想される GABA 作動性の*egr1<sup>Vd/Vs/Vp</sup>*ニューロンに対し、非常に近傍に存在する *esr2b<sup>Vd/Vs/Vp</sup>*ニューロンが CCK や CNP1 を介して神経修飾作用をもたらすような入力を行う局所的な神経回路が存在することが、形態学的に示唆された。

Vd/Vs/Vp は、他の真骨魚類においても性行動に関与することが知られていたものの、当該神経核に分布するニューロンが形成する神経回路に関する詳細な理解は得られていなかった。本研究ではメダカを用いて、当該神経核において生殖腺から分泌された E を直接受容し、性行動の賦活に関与する局所的な神経回路の存在を示唆した (Fig.5)。この神経回路は、真骨魚類の間で広く保存されているメス性行動賦活の神経回路であることが考えられるため、本研究の進展によって、真骨魚類メス性行動賦活の共通原理の理解が進むことが期待される。

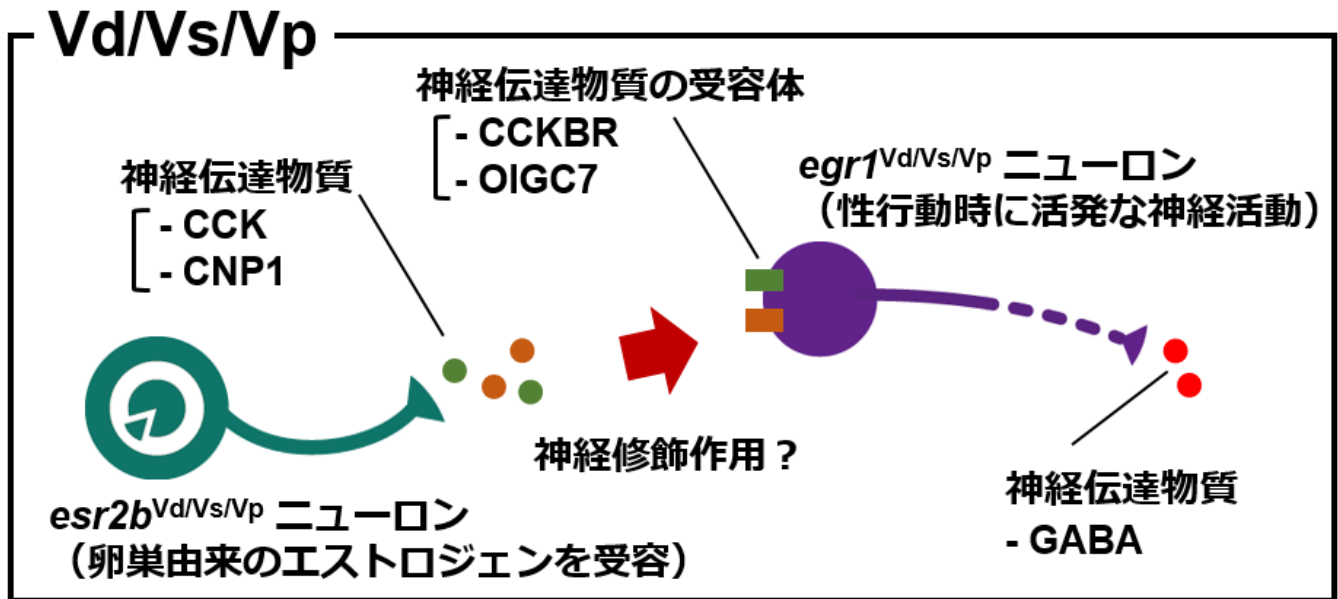


Fig.5 メダカのメス性行動を賦活する神経回路に関する作業仮説