

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 25 年度博士課程進学

氏名 川幡由希香

指導教員名 大久保範聡

論文題目 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

魚類を含め、脊椎動物ではごく一般的に、形態や色彩、攻撃行動や性行動などの行動パターン、性成熟、成長、ストレス応答などに関わる内分泌パターンに顕著な性差が認められる。これらの形質にみられる性差の多くは、脳内や下垂体に存在する何らかの性差に起因すると考えられる。しかし、魚類の脳内や下垂体に存在するどのような性差が、これらの形質に性差をもたらしているのかは明らかとなっていない。

一方、いくつかの魚種におけるこれまでの研究で、上記の形質との関連が示されている 4 種類の神経伝達物質・神経修飾物質関連ファミリーの脳内での発現に、性差が存在することが報告されている。攻撃行動や性行動への関与が示されているバトシン(VT)・イソトシン(IT)神経ペプチドファミリー、性成熟や性行動を促進することが知られているゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)ファミリー、そして、様々な行動や内分泌系に関わることが報告されている生体アミン系ホルモンを合成するチロシン水酸化酵素(TH)ファミリーとトリプトファン水酸化酵素(TPH)ファミリーである。しかし、これらの神経伝達物質・神経修飾物質関連ファミリーの性差についての知見はいずれも断片的なものであり、これまで体系立った解析がなされてこなかった。

そこで本研究では、これらのファミリーの発現の性差が、魚類の各種形質に性差をもたらしているのではないかの推測のもと、メダカをモデル魚に用いて、まずはそれらの遺伝子の発現を詳細に解析することとした。その結果、VT 遺伝子と TPH 遺伝子の発現に特に顕著な性差が認められたので、次に、その性差がどのようなメカニズムによってもたらされ、どのような形質に寄与するのかを解析することとした。

第 1 章 神経伝達物質・神経修飾物質関連ファミリー遺伝子の性差

まずは、これまでにメダカで同定されていなかった VT、IT、TH、TPH をコードする各遺伝子を単離・同定した。その結果、メダカは 1 種類の VT 遺伝子(*vt*)と IT 遺伝子(*it*)、2 種類の TH 遺伝子(*th1* および *th2*)と TPH 遺伝子(*tph1* および *tph2*)をもつことが明らかとなった。そこで、すでに同定されていた 3 種類の GnRH 遺伝子(*gnrh1*、*gnrh2*、*gnrh3*)を含め、全 9 種類の遺伝子について、メダカの脳と下垂体での発現の性差を解析することとした。

解析の結果、*vt* で最も顕著な性差が認められ、その発現は視床下部の神経核 pNVT および NPT においてオス特異的であった。また、*tph1* も下垂体においてほぼオス特異的な発現を示した。オスに偏った性差は、*gnrh1*、*tph1*、*tph2* の一部の神経核での発現においても認められた。それに対し、*it* と *gnrh3* では、全脳レベルでの発現量がメスで高いことが分かった。一方、*gnrh2*、*th1*、*th2* の発現には目立った性差は認められなかった。

以上の結果を、これらの遺伝子の機能に関するこれまでの知見や、発現に性差が認められた神経核や部位の機能と考え合わせると、今回明らかとなった発現の性差が、攻撃行動や性行動などの行動パターンや何らかの内分泌パターンの性差に関与している可能性は十分にあり得ると考えられた。

第2章 *vt* のオス特異的発現をもたらすメカニズムとその生理的意義

続いて、最も顕著な性差が認められた *vt* について解析を進めることとした。多くの魚種ではオスの方がメスよりもはるかに高い攻撃性を示すが、攻撃性を高める主因子はアンドロゲンであること、VT が攻撃行動に関与することがこれまでに報告されている。また、アンドロゲンとその受容体の複合体は転写因子として機能することが知られている。そこで、第1章の結果とこれらの知見を考え合わせ、「精巣から放出されたアンドロゲンの転写促進作用によって、VT の発現が pNVT および NPT でオス特異的に誘導され、そこで産生された VT がオス特異的に攻撃行動を誘導する」という作業仮説を立てた。

その作業仮説のもと、まずは、オス特異的な *vt* の発現がアンドロゲンによって誘導されるかを検証した。精巣を除去した成熟オスにアンドロゲンを投与し、*vt* の発現を解析した結果、pNVT における *vt* 発現は精巣除去によって著しく低下し、アンドロゲン投与によって回復することが分かった。次に、アンドロゲンが *vt* 発現ニューロンに直接作用し得るかを検証するために、*vt* とアンドロゲン受容体の共発現の有無を解析した。その結果、pNVT の *vt* 発現ニューロンは、2種類のアンドロゲン受容体遺伝子 (*ara* および *arb*) のうちの *arb* を共発現していることが分かった。また、*in vitro* でのプロモーターアッセイによって、アンドロゲンが *vt* の転写活性に与える影響を解析したところ、アンドロゲンが作用するシスエレメントを同定するまでには至らなかったが、アンドロゲンは *Arb* を介して *vt* の転写を大きく活性化し得ることが明らかとなった。以上の結果から、精巣由来のアンドロゲンが *Arb* を介して pNVT におけるオス特異的な *vt* 発現を直接的に誘導することが示唆された。

次に、オス特異的に産生された VT の作用部位を明らかにするために、Vt ペプチドの脳内局在を解析した。その結果、pNVT においてオス特異的な Vt 陽性の軸索がみられたが、その投射先までは確認できなかった。一方、各種 Vt 受容体の発現解析を行った結果、Vt 受容体遺伝子は脳内で広く発現しており、どの Vt 受容体も発現に性差を示さないことが分かった。このことから、Vt の作用の性差はリガンド依存的に決まると考えられた。また、VT とアンドロゲン、攻撃行動との関係を明らかにするために、メスのメダカにアンドロゲンや Vt ペプチドを投与し、その際の攻撃行動や *vt* 発現を解析した。その結果、メスでもアンドロゲン投与によって攻撃行動が誘導され、それと同時に、本来はオス特有である pNVT での *vt* 発現が誘導されること、また、Vt ペプチド単独の投与でも攻撃行動が誘導されることが明らかとなり、「アンドロゲンによって誘導された pNVT でのオス特異的な *vt* 発現が攻撃行動を誘導する」という作業仮説が支持された。そこで、より直接的な証拠を得るために、*vt* ノックアウトメダカのメスにアンドロゲンを投与しても攻撃行動が誘導されないことの確認を試みたが、予想に反して、ノックアウト個体でも野生型個体と同様に攻撃行動が誘導された。この結果は作業仮説とは合致しないものであるため、オス特異的な *vt* 発現の生理的意義については、作業仮説の修正が必要であると考えられた。

第3章 *tph1* のオスに偏った発現をもたらすメカニズムとその生理的意義

本章では、下垂体でのほぼオス特異的な *tph1* 発現に着目し、解析を進めることとした。TPH1 は、様々な内

分泌系を制御する生体アミン系ホルモン(セロトニン(5-HT)およびメラトニン(MT))の生合成に関わるため、下垂体におけるその発現の性差は、何らかの内分泌パターン性の性差を生み出すと推察される。そこで、オスに偏った *tph1* の発現がどのようなメカニズムによって生じ、下垂体ホルモンにどのような影響を及ぼすのかを解析した。

まずは、下垂体における *tph1* の発現も *vt* と同様、アンドロゲンによって促進されるとの推測のもと、メスのメダカにアンドロゲンを投与し、下垂体での *tph1* 発現を解析した。その結果、メスでもアンドロゲン投与によって *tph1* の発現が誘導された。逆に、オスのメダカにアンドロゲン受容体のアンタゴニストを投与すると、*tph1* の発現が減少した。次に、このアンドロゲンの作用が直接的なものかどうかを検証するため、下垂体での *tph1* とアンドロゲン受容体の共発現の有無を解析した。その結果、*ara* と *arb* のいずれも *tph1* 発現細胞で発現していることが分かった。さらに、*in vitro* でのプロモーターアッセイによって、アンドロゲンは *Arb* を介して *tph1* の転写を大きく活性化し得ることが明らかとなった。またその際には、アンドロゲンが *tph1* のプロモーター領域に存在する二つのアンドロゲン応答配列が協調して機能することが明らかとなった。以上の結果から、下垂体におけるほぼオス特異的な *tph1* の発現もやはり、*Arb* を介したアンドロゲンの直接的な転写促進作用によってもたらされていることが示唆された。一方、*tph1* を発現する下垂体細胞種を特定するために、*tph1* と各種下垂体ホルモン遺伝子との共発現を解析した結果、*tph1* を発現しているのは、プロオピオメラノコルチン(POMC)産生細胞であることが分かった。

オスに偏った *tph1* の発現は、オスに偏った 5-HT あるいは MT の生合成をもたらすと考えられる。そこで、下垂体におけるこれら生体アミン系ホルモンの作用を調べることで、*tph1* 発現の性差の生理的意義を解析することとした。5-HT あるいは MT がいずれかの下垂体ホルモンの発現を調節するとの推測のもと、下垂体培養系にそれらの生体アミン系ホルモンを添加し、各種下垂体ホルモン遺伝子の発現量を測定した。その結果、5-HT はいずれの遺伝子の発現にも有意な影響を及ぼさなかったが、MT は成長ホルモン遺伝子(*gh*)とソマトラクチン遺伝子(*sl*)の発現量を低下させることが分かった。メダカの下垂体における *gh* と *sl* の発現量は、いずれもオスよりもメスで高いことが知られているが、オスの POMC 産生細胞で発現する *tph1* によって産生された MT がパラクライン的に作用することで、*gh* と *sl* の発現量がオスで抑制されることが、その一因となっている可能性が考えられた。また、成長ホルモンとソマトラクチンはともに、成長ホルモンファミリーに属し、成長や体色に関わることが報告されている。メダカではそれらの形質に性差が認められるので、下垂体でのほぼオス特異的な *tph1* 発現は、それらの性差に寄与しているのかもしれないと考えられた。

以上の研究によって、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発現の性差を体系的に把握するとともに、視床下部 pNVT におけるオス特異的な *vt* 発現と、下垂体 POMC 細胞におけるほぼオス特異的な *tph1* 発現をもたらすメカニズムを明らかにすることができた。それらの性差の生理的意義についても、解明への道筋がみえてきた。本研究を発展させることで、近い将来、それらの性差がどのような形質に寄与するかが明らかになると期待される。