

## 論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 27 年度博士課程進学

氏名 細野耕平

指導教員 金子豊二

論文題目 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

現在の水産養殖が直面する課題の一つに、魚類が養殖環境から受けるストレスの軽減が挙げられる。過密飼育や水質の悪化などの環境ストレスが、魚類の生殖機能や成長、免疫力を低下させることは、経験的にも実験的にも古くから知られている。したがって、ストレスによる魚類の生理機能の低下をいかに防ぐかが、今後の魚類養殖にとって大きな意味をもつ。この問題に対するこれまでのアプローチは、ストレスとなる環境要因をいかに取り除くかというものであった。その一方、ストレスから生じるネガティブな生理的影響をいかに抑えるかという取り組みもあって然るべきだが、実際にはほとんど見受けられない。その要因は、そもそも魚類のストレス応答の生理機構自体がほとんど理解されていないことにあると考えられる。

ストレスホルモンと称される副腎皮質ホルモン(コルチコイド)や副腎皮質刺激ホルモン(コルチコトロピン)の役割や血中濃度の挙動をはじめとして、末梢組織レベルでの理解は進んできたものの、あらゆるストレス応答の出発点である中枢レベルの生理機構に関しては、わずかな知見しかない。脊椎動物全般で、CRH ファミリーとよばれる一群の神経ペプチドが脳内のストレス応答分子として機能することが知られているが、魚類における CRH ファミリーの分子構成、制御機構、生理機能については研究が進んでいない。また、性成熟や成長のスピード、自発的な性行動の行いやすさなど、ストレスに影響される形質の多くに性差が存在するが、これらの形質の性差は、脳内の CRH ファミリー作用系に関わる何らかの性差に起因する可能性が高いと考えられる。

そこで本研究では、魚類におけるストレス応答の脳内メカニズムを理解するという目標のもと、メダカをモデル魚として用いて性差に着目しつつ、CRH ファミリーの分子構成、制御機構、生理機能の解析を行った。

## 1. メダカにおける CRH ファミリーペプチド作用系の分子構成と各分子の発現

他の動物種における既知の CRH ファミリーとその受容体の配列を参考にして、メダカから *crh*、*uts1*、*ucn2*、*ucn3* の 4 種類の CRH ファミリー遺伝子と、*crhr1* と *crhr2* の 2 種類の CRH 受容体遺伝子をクローニングした。その後、各遺伝子のメダカの脳内における発現を解析したところ、すべての遺伝子の発現が確認された。

発現の性差についても解析したところ、*crh* が、視索前野背側部の神経核 PMm/PMg ではメス特異的に発現し、視索前野腹側部の神経核 PMp では逆に、オスの方で顕著に多く発現していることが見出された。PMm/PMg は魚類の性行動中枢と考えられている神経核であり、そこでのメス特異的な *crh* の発現は、ストレスが性行動に及ぼすメス特異的な影響を連想させた。一方、PMp は下垂体に投射する神経核であることから、下垂体からのコルチコトロピン分泌の促進を介した全身性のストレス応答内分泌系が、オスでより亢進している可能性が考えられた。

## 2. 魚類特有の新規 CRH ファミリーメンバーの発見

第 1 章では CRH ファミリー作用系を構成する既知の遺伝子群について解析したが、その過程で、CRH ファミリーに属する真骨魚類特有の新規遺伝子を見出した。そこで、その遺伝子をテレオコルチン (*tcn*) と命名し、本章ではその詳細な解析を行った。

*tcn* は既知の CRH ファミリーと高い相同性を示す成熟ペプチドをコードするだけでなく、CRH ファミリーに特徴的な前駆体タンパク質の構造やエキソン/イントロン構造なども有していた。また、系統樹解析およびシグネチャー解析により、*tcn* の起源は真骨魚類と四足動物の分岐前まで遡るが、両者の分岐後すぐに四足動物の祖先において *tcn* が失われたため、現在では真骨魚類特有の遺伝子として保存されていることが示唆された。メダカの脳における *tcn* の発現を調べたところ、幾つかの神経核での発現が確認されたが、そのほとんどは *crh* と同一ニューロンで発現していることがわかった。また Tcn は、メダカがもつ 2 種類の CRH 受容体に対して、Crh と同等の活性化能をもつことも明らかとなった。これらの結果から、*tcn* は機能的な新規 CRH ファミリーメンバーであり、*crh* とある程度の機能を共有していることが考えられた。

## 3. メダカの脳内での *crh* 発現に性差をもたらす分子基盤

第 1 章でメダカの脳内における *crh* 発現に顕著な性差が認められたことを踏まえ、本章ではそうした

発現の性差をもたらす制御機構を解析した。

*crh* の発現に性差がみられた PMm/PMg と PMp では、性ステロイド受容体が発現することが知られていることから、生殖腺由来の性ステロイドが、それぞれの神経核に局在する性ステロイド受容体と結合し、その複合体が *crh* の転写を直接的に制御することで、PMm/PMg におけるメス特異的な *crh* 発現、および PMp におけるオスでより多い *crh* 発現が生じているのではないかと考えた。そこでこの仮説をもとに実験を行ったところ、PMm/PMg のメス特異的な *crh* 発現は卵巣由来のエストロゲンにより促進されること、そして PMm/PMg の CRH ニューロンが実際にエストロゲン受容体を発現していることが判明した。同様に、PMp のオスでより多く見られる *crh* 発現は精巣由来のアンドロゲンにより促進されること、そして PMp の CRH ニューロンが実際にアンドロゲン受容体を発現していることも判明した。続いて *crh* の推定プロモーター領域における転写因子結合サイトを解析したところ、2 つのエストロゲン応答配列様の配列が確認された。そこでまずはエストロゲンによる *crh* の転写制御機構の解明を目指し、ルシフェラーゼを用いたプロモーターアッセイにより、*crh* の転写がエストロゲンにより活性化され得るのかについて解析したところ、エストロゲンは濃度依存的に *crh* の発現を制御することが明らかとなった。しかし続くアッセイにより、エストロゲンによる制御には 2 つのエストロゲン応答配列様の配列は関与しないこと、そしてプロモーター領域には、転写開始点直後を含む幾つかの領域に、独立して機能するシスエレメントが散在する可能性が高いことが明らかとなった。また上記のコンストラクトはアンドロゲンに対しても応答性を示すことから、アンドロゲンが *crh* の発現を制御する際に機能するシスエレメントも、上記の領域に含まれていると考えられた。

#### 4. PMm/PMg においてメス特異的に生産される Crh の機能解析

本章では、これまでの研究で明らかになった *crh* の発現の性差がもつ意味を解するために、PMm/PMg においてメス特異的に発現する *crh* に着目し、その機能の解析を目指した。

機能解析に先立ち、まずは PMm/PMg の CRH ニューロンの性質を調べるために、同ニューロンで発現する他の遺伝子を調べた。その結果 CRH ニューロンは、性行動への関与が示唆されており、やはりメス特異的に発現するニューロペプチド B (*npb*) を発現していることが明らかとなった。メダカは雌雄ペアで産卵を行い、その過程でオスがメスに求愛ダンスを踊るが、NPB 受容体の変異体メダカのメスは、オスの求愛ダンスを受けずに産卵に至る割合が増えることがわかっている。したがってこのニューロンでメス特異的に発現する *crh* もまた、求愛ダンスに対するメス側の受容とかかわる可能性が考えられた。そこでゲノム編集により Crh を欠損したメダカを作出し、まずは特定の強いストレスがない条件の下で性行

動の解析を行った。その結果、Crh 変異体メスでは、産卵のトリガーとなる求愛ダンスから産卵開始までの時間が長くなることが判明した。一方、Crh の欠損はメスの生殖を制御する遺伝子群の発現や、卵巣重量、また、オスの性行動に対しては影響を及ぼさなかった。このように Crh の欠損がメスの性行動のみ影響を及ぼしたこと、そして先述した NPB 受容体の変異体メダカのメスも求愛ダンスの受け入れに変化が生じることを踏まえると、PMm/PMg においてメス特異的に発現する Crh の機能欠損が、求愛ダンスから産卵までの時間が長くなった原因である可能性が高いと考えられた。続いて 2 種類ある Crh の受容体について、それぞれ変異体メダカを作製し、同様の解析を行ったところ、Crhr2 を欠損したメスにおいてのみ、Crh を欠損したメスと同じ表現型が確認された。この結果から、CRH-CRHR2 カスケードの機能不全が、最後の求愛ダンスから産卵までの時間が長くなる原因だと考えられた。では、求愛ダンスから産卵までの時間が長くなることは、何を意味するのだろうか？この問いに対する答えとして、①オスの求愛ダンスをメスが評価し、受け入れるか否かを判断するのに時間がかかる(インプットに問題が生じた)可能性と、②オスを受け入れているにもかかわらず、それをうまく行動に表すことができない(アウトプットに問題が生じた)可能性が考えられた。PMm/PMg の CRH ニューロンは、軸索を終脳と脊髄に投射していることが知られているが、情動を司る終脳への投射は①の可能性と、行動を出力する脊髄への投射は②の可能性とリンクする。そこで投射先における受容体の発現を解析したところ、終脳でのみ crhr2 の発現が確認された。これにより CRH-CRHR2 カスケードの欠損は、オスの求愛ダンスを受けた際のメス側のインプット、つまりオスの求愛ダンスをメスが評価し、受け入れるか否かの判断を下す神経回路に影響を与えた可能性が高いと考えられた。

本研究により、特定の強いストレスがない条件下では CRH がメスの性行動を制御することが示された。今後はこれを足がかりとし、種々のストレス条件下における CRH の機能についても詳細に解析することで、ストレス応答の脳内メカニズムの全体像を明らかにする必要がある。