

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 山下純平

指導教員名 大久保範聡

論文題目 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

脊椎動物では、攻撃行動や性行動などの行動パターンや成長や性成熟、ストレス応答などの内分泌パターンに性差がみられる。これらの形質の性差は脳内に存在する何らかの性差に起因すると考えられるが、そのメカニズムの実体は明らかとなっていない。

このような背景のもと、当研究室での先行研究によって、メダカの脳内で発現に性差を示す遺伝子の探索が行われ、視索前野とよばれる脳領域において発現に明瞭な性差を示す複数の神経ペプチド遺伝子が同定された。視索前野は一般に、性行動や攻撃行動などの行動や、下垂体ホルモンの分泌などの内分泌系に深く関わる脳領域として知られている。また、種々の神経ペプチドを発現しており、それらが行動や内分泌系の制御に重要な役割を果たしていることが知られている。これらのことから、メダカの視索前野における神経ペプチド遺伝子の発現の性差は、何らかの形質の性差形成に寄与している可能性が考えられる。

そこで本研究では、メダカの視索前野において発現に性差がみられた四つの神経ペプチド遺伝子 *gal*、*adcyp1*、*vip*、*it* に着目し、これらの遺伝子の性差がどのように形成され、どのような形質に寄与しているのかを解析することとした。さらに、解析の過程で、それらの神経ペプチド遺伝子の発現の性差は、生殖腺由来の性ステロイドの作用によって雌雄で逆転し得ることを見出したので、その逆転のメカニズムについても解析を行った。

第 1 章 オスで高い発現を示す遺伝子 *gal* の性差の形成機構と生理的意義

本章では、視索前野の PMp の尾部側 (pPMp) でほぼオス特異的に発現する遺伝子 *gal* に着目した。*gal* は神経ペプチドであるガラニンをコードする遺伝子で、哺乳類では性行動や攻撃行動、育児行動などへの関与が報告されている。また、魚類を含めた様々な動物種で *gal* の発現に性差があることが報告されているが、その性差が何らかの形質に寄与するという知見はない。そこで本研究では、*gal* の性差の形成

機構と生理的意義を明らかにすることを目的とした。

まず、pPMp におけるほぼオス特異的な発現がどのように引き起こされるのかを明らかにするために、生殖腺除去と性ステロイド投与を行った。その結果、pPMp におけるオスに偏った *gal* の発現は、アンドロゲンの促進効果によって形成されていることが明らかとなった。また、メスではエストロゲンによる抑制効果もみられた。次に、この性ステロイドによる制御が直接的なものかを検証するため、性ステロイド受容体との共発現の有無を解析したところ、アンドロゲン受容体 *ara* と 3 種類のエストロゲン受容体(ER)が pPMp の *gal* 発現ニューロンで発現していることが分かった。このことから、性ステロイドは *gal* の発現に直接的に作用している可能性が考えられる。

次に、pPMp の *gal* 発現ニューロンがどこで作用しているのか検証するため、Gal の免疫組織化学を行ったところ、PMp の頭部側(aPMp)に位置し、雌雄に共通な *gal* 発現ニューロンは下垂体へ、pPMp のほぼオス特異的な *gal* 発現ニューロンは、終脳、視蓋、小脳、延髄、脊髄へと軸索を投射していることが明らかとなった。また、それらの部位では、Gal の受容体の発現も確認された。

次に、*gal* がどのような機能を有しているのかを検証するため、CRISPR/Cas9 法によって *gal* ノックアウトメダカを作製し、表現型を解析した。その結果、攻撃行動の一種である追いかけの回数が、オスのノックアウト個体で有意に減少した。追いかけは、メダカにみられる攻撃行動のうち最も頻度の高い攻撃行動の一つであり、他の攻撃行動の起点になることが多いことをふまえると、攻撃性の強弱を示す指標であると考えられる。pPMp でオスに偏って発現する *gal* には、オスの攻撃性を高める作用があると考えられる。

第 2 章 受容体を共有する神経ペプチド Pacap と Vip の遺伝子発現における性差の形成機構と生理的意義

魚類を含めた多くの脊椎動物の研究で、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(Pacap)と血管作動性腸管ペプチド(Vip)は同じ受容体に結合することが知られている。Pacap をコードする遺伝子 *adcyap1* と Vip をコードする遺伝子 *vip* は、メダカの PMp において、オスでは *adcyap1* が、メスでは *vip* がそれぞれ高い発現を示す。同じ脳領域で発現していることから、Pacap と Vip の作用部位は同じである可能性が高い。つまり、共通の情報伝達系を活性化するのに雌雄間でリガンドの種類を使い分けている可能性が考えられる。そこで本章では、それぞれの遺伝子の性差の形成機構とその生理的意義について解析することで、雌雄間でのリガンドの使い分けの可能性を検証することとした。

まず、*adcyap1* と *vip* の性差がどのように形成されるのかを調べるため、生殖腺除去とステロイド投与を行った。その結果、*adcyap1* はメスにおけるエストロゲンによる抑制効果、*vip* はメスにおけるエストロゲンの促進効果によって性差が形成されていることが明らかとなった。そこで、両遺伝子のエストロゲンにおける制御は直接的なものかを検証するため、ER との共発現の有無を解析したところ、*adcyap1* と *vip* どちらの

遺伝子についても、PMp で 3 種類全ての ER との共発現がみられた。したがって、*adcyp1* と *vip* のいずれも、エストロゲンによって直接的に制御されている可能性が考えられる。

次に *adcyp1* と *vip* が同じニューロンで発現しているかを解析したところ、*adcyp1* と *vip* の発現ニューロンはモザイク状に混在しており、一部のニューロンでは共発現もみられた。したがって、二つの遺伝子は PMp 内でも同じニューロン群に属すると考えられる。また、PMp 内の同じ領域に存在する *it* や *gal* のニューロンが下垂体に投射していることから、Pacp と Vip は下垂体で作用していると考えられた。そこで、下垂体における受容体遺伝子の発現を解析したところ、*pac1a*、*pac1b*、*vpac2b* の発現がみられ、なかでも *vpac2b* はオスに偏って発現していた。このことから、PMp の *adcyp1* と *vip* の雌雄でのリガンドの使い分けは、下垂体ホルモンの性差の形成に関与している可能性が示唆された。哺乳類において PACAP と VIP は、様々な下垂体ホルモンの分泌制御に関わっていることが報告されている。現時点では、メダカの Pacp と Vip がどの下垂体ホルモンに作用するのかを特定するには至っていないので、今後、解析を進めていく必要がある。

第 3 章 メスで高い発現を示す遺伝子 *it* の発現制御機構

本章では、視索前野においてメスで高い発現を示す *it* に着目した。*it* は、哺乳類のオキシトシン (*Oxt*) に対する魚類のオーソログで、神経ペプチドのイソトシンをコードする遺伝子である。哺乳類では向社会行動や子宮の収縮などへの関与が報告されている。*Oxt* の発現はエストロゲンによって促進されることが齧歯類において報告されているが、促進されない、あるいは逆に抑制されるという報告もあり、統一見解は得られていない。また、他の動物種における *Oxt* やそのオーソログの性ステロイドによる制御の報告は全くない。そこで本章では、*it* の発現制御機構を明らかにすることを目指した。

まず、*it* の発現が性ステロイドの影響を受けるかを調べるため、生殖腺除去と性ステロイド投与を行ったところ、視索前野の PMp と PPa で *it* の発現がオスのみでアンドロゲンによって促進されることが分かった。*it* はメスで高い発現を示すにも関わらず、オスのみでアンドロゲンによって発現が促進されることは意外であった。次に、このアンドロゲンの作用が直接的なものか検証するため、*it* 発現ニューロンにおけるアンドロゲン受容体 (AR) の発現の有無を解析した。その結果、2 種類のアンドロゲン受容体遺伝子 (*ara*、*arb*) のいずれについても、*it* 発現ニューロンでの発現は認められなかった。したがって、オスのみでみられたアンドロゲンによる制御は間接的なものであると考えられる。

次に、アンドロゲンの制御下で PMp と PPa で産生される IT がどこで作用しているのか調べるため、IT の免疫組織化学を行ったところ、PMp と PPa の *it* 発現ニューロンのほとんどが下垂体の神経葉へと軸索を伸ばしていることが明らかとなった。つまり、PMp や PPa で産生された IT ペプチドは、下垂体から血中へと放出され、末梢で作用していると考えられる。末梢中の IT は浸透圧調節など雌雄に関係なく重要な

はたらきを担っていることを考え合わせると、何らかの機構でメスに偏ってしまう *it* 発現の性差を打ち消すために、オス特異的にアンドロゲンが *it* の発現を促進していると考えられる。

第4章 性ステロイド受容体の発現の性的可逆性

前章までの研究で、神経ペプチド遺伝子の発現は、生殖腺からの性ステロイドによって性差が形成され、さらに性ステロイド処理によってその発現の性差は逆転し得ることが明らかとなった。先行研究によって、メダカの脳内の性ステロイド受容体の発現には性差が存在すること、また、その発現パターンは体内の性ステロイド環境に応じて、メス型からオス型へ転換し得ることが見出されている。これらの研究によって脳がメス型からオス型に転換するメカニズムが明らかになりつつある一方で、オス型の脳からメス型の脳へ転換するメカニズムについては全く分かっていなかった。そこで本章では、そのメカニズムを解明する足掛かりとして、性ステロイド受容体の発現がオス型からメス型へ転換し得るのかを検証した。

精巣除去を施したオスにエストロゲンを投与すると、Vs/Vp と PMm/PMg にみられる *esr2b* と *arb* のメス特異的な発現がオスの脳でも誘導され、オスで高い *esr2a* の発現はメスレベルまで低下した。この結果から、性ステロイド受容体の発現はオス型からメス型に転換し得ることが明らかとなった。先行研究での知見と考え合わせると、脳内の性ステロイド受容体の発現は、性成熟後であっても両方向に性的可逆性を有することになる。体内の性ステロイド環境に応じて、脳内の性ステロイド受容体の発現、つまり性ステロイドに対する脳の感受性が逆転することが、*gal*、*pacap1*、*vip*、*it* などの性ステロイド応答遺伝子の性特異的発現が逆転する一因となっていると考えられる。

本研究によって、視索前野における *gal*、*pacap1*、*vip*、*it* の性特異的発現の形成機構や生理的意義の一端が明らかとなった。今後、解析を続けることで、それらの神経ペプチド遺伝子が関わる形質を改変し、魚類により良い経済形質をもたせる技術を開発することにもつながると期待される。