

博士論文(要約)

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

山下 純平

## 序論

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。例えば、脊椎動物全般を通してメスに比べオスのほうが攻撃性が高い。また、多くの脊椎動物がオスからメスに対して求愛行動を示し、メスがそれを受け入れるというように、雌雄で異なる性行動様式を示す。他にも性成熟や成長のスピードが雌雄で異なる動物種も多く存在する。こういった行動や内分泌パターン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。

生殖腺に精巣と卵巣の性的二型があるように、脳にもオス型とメス型があり、その違いによってさまざまな行動や内分泌のパターンに雌雄の違い(性差)がもたらされていると考えられる。哺乳類では、脳のデフォルトはメス型であるが、遺伝的なオスでは出生前後の時期に精巣から大量のアンドロゲンが一過性に分泌され、そのアンドロゲンの作用により脳の性がオス化する。そして、その時期のアンドロゲンの有無によって、不可逆的かつ永久的な脳の変化が引き起こされるため、そこでオス型あるいはメス型に分化した脳の性は、その生活史において逆転することがない(McCarthy and Arnold, 2011; McCarthy *et al.*, 2012)。

ところが魚類では、性成熟後でも性ステロイド処理によって異性に特徴的な行動パターンを示すようになる(Munakata and Kobayashi, 2010)。また、自然条件下で自発的に性転換を起こす魚種も少なくない(Godwin, 2010)。これらの現象は、魚類の脳は性分化後でも性的な可逆性を保持しており、種々の要因によって、脳の性が容易に逆転し得ることを意味している。したがって、魚類の脳は哺乳類とは明らかに異なるメカニズムによって性分化しているはずである。しかし、そのメカニズムの実体についての研究は国内外を通してほとんどなく、そもそも、魚類の脳にどのような性差が存在するのかについても、断片的な知見しかなかった。

このような背景のもと、当研究室において、メダカ(*Oryzias latipes*)の脳内で発現に性差を示す遺伝子の網羅的スクリーニングが行われ、雌雄のいずれかに偏って発現する十数種類の遺伝子が単離・同定された(Okubo *et al.*, 2011; Kawabata *et al.*, 2012; Hiraki *et al.*, 2012, 2014; Nakasone *et al.*, 2013 など)。単離・同定された遺伝子の中には、複数の神経ペプチド遺伝子が含まれていた。神経ペプチドは、神経系で産生される生理活性ペプチドで、神経末端から放出された神経ペプチドは、後シナプスの特定の受容体を介して神経興奮の制御

に関わる神経伝達物質としてはたらくほか、ホルモンとしてののはたらきもある。現在、約 100 種類種類ほど見つかっており、様々な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。

そこで、性差がみられた神経ペプチド遺伝子の発現を解析したところ、いくつかの神経ペプチド遺伝子が視索前野とよばれる脳領域において発現に性差を示すことが明らかとなった (Kawabata *et al.*, 2012; Hiraki *et al.*, 2014; 当研究室、未発表データ)。魚類において、視索前野は、parvocellular portion of the magnocellular preoptic nucleus (PMp)、anterior parvocellular preoptic nucleus (PPa)、posterior parvocellular preoptic nucleus (PPp)、magnocellular/gigantocellular portions of the magnocellular preoptic nucleus (PMm/PMg) に分けることができ (図 0-1)、PMp、PPa、PPp は哺乳類の視索上核 (SON; supraoptic nucleus) や内側視索前野 (mPOA; medial preoptic area) と、PMm/PMg は哺乳類の室傍核 (PVN; paraventricular hypothalamic nucleus) とそれぞれ相同であると考えられている (Forlano and Bass, 2011; Godwin and Thompson, 2012; Herget *et al.*, 2014)。哺乳類におけるこれらの脳領域は、性行動や攻撃行動などの行動に深く関わる脳領域として知られており、魚類においても視索前野は、電気刺激実験や局所破壊実験、あるいは解剖学的な解析によって、性行動を制御する脳領域であることや下垂体ホルモンの制御にも関与することが報告されている (Demski *et al.*, 1975; Kyle and Peter, 1982; Koyama *et al.*, 1984; Satou *et al.*, 1984; Okubo and Nagahama, 2008)。したがって、メダカの視索前野において発現に性差がみられた神経ペプチド遺伝子は、魚類の行動パターンや内分泌パターンの性差に寄与している可能性が高い。実際、視索前野においてメス特異的に発現する神経ペプチド遺伝子 *npb* は、性行動時、オスの受け入れを制御することが示唆された (梶山, 2014)。つまり、メスで高い発現を示す神経ペプチド遺伝子が、メスの性行動の一部を制御していることになる。このことは、視索前野における神経ペプチド遺伝子の性差が形質の性差に寄与している可能性を強く示唆している。

視索前野の中でも哺乳類において魚類の PMp に相当する mPOA のニューロンを光遺伝学的手法を用いて活性化すると雌雄の性行動や攻撃行動が誘起されることが報告されている (Wu *et al.*, 2014; McHenry *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2018)。また、mPOA のニューロンの多くは、性ステロイド受容体を発現しており、高い性ステロイド応答性を示す (Simerly *et al.*, 1990; Jahan *et al.*, 2015)。性ステロイドが性行動や攻撃行動などの制御因子であることはよく知られており、mPOA のニューロンが性ステロイドを介した性特異的な行動の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。魚類においても性行動や攻撃行動などの性特異的な行

動は性ステロイドによって制御されていることから、魚類の PMp において性ステロイド応答性の神経ペプチド遺伝子が性特異的な行動の制御に関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 PMp において明確な性差を示す神経ペプチド遺伝子、*gal*、*adcyap*、*vip*、*it* に着目し、これらの遺伝子が魚類の性特異的な行動および内分泌系の制御に関わっているのではないかとの考えのもと、メダカにおけるこれらの遺伝子の発現制御機構や作用機序、機能を解析することで、哺乳類と異なる魚類の脳の性分化のメカニズムを明らかにするとともに、魚類の性特異的な行動および内分泌系の制御メカニズムを明らかにすることを目指した。

第 1 章では *gal* に着目した。*gal* はガラニン (GAL) をコードする遺伝子で、メダカでは、視索前野や視床下部で発現し、中でも PMp において特に大きな性差を示す。*gal* の PMp における発現は、前部の anterior part of PMp (aPMp) と後部の posterior part of PMp (pPMp) に分けることができ、前部の aPMp での *gal* の発現は、雌雄で有意な差はみられないのに対し、後部の pPMp では、ほぼオス特異的に発現する(当研究室、未発表データ)。魚類における *gal* の機能についての知見は、摂食の促進や下垂体ホルモンの分泌などに限られたものであり、あまり明らかとなっていない (volkoff *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2017)。一方、哺乳類において、PMp に相当する mPOA の Gal は、育児行動や性行動、攻撃行動などの性特異的な行動の制御に関与することが示されている (Bloch *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 2014)。また、いくつかの魚種を含め、多くの動物種で脳内の発現に性差が確認されており、哺乳類ではエストロゲンとアンドロゲンの両方で発現促進がみられる (Bloch *et al.*, 1993; Rao *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1997; Mathieson *et al.*, 2000)。これらのことから、メダカの pPMp においてほぼオス特異的に発現する *gal* は、性特異的な行動の制御に関わっていることが推察されるが、これまでに脊椎動物を通して *gal* の発現の性差と形質の性差の関係を示した知見はない。そこで、メダカの pPMp における *gal* の発現制御機構、作用機序、機能について包括的に解析することで、*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。

第 1 章において、pPMp における *gal* のオスに偏った発現がオス型の行動を制御することが示された。また、PMp のニューロンは下垂体以外にも様々な脳領域へと軸索を伸ばしていることが明らかとなり、様々な機能の制御に関わっていると推察される。そこで第 2 章では、同じく PMp において明確な性差がみられた神経ペプチド遺伝子である *adcyap* と *vip* に着目した。*adcyap* は、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP; pituitary adenylate cyclase activatinr polypeptide) をコードする遺伝子で、メダカは *adcyap1* と *adcyap2* の 2 種類の *Adcyap* 遺伝子をもつ。どちらも脳全域に広く分布しており、PMp においてオス

で高い発現を示す。しかし、性差の度合いは *adcyap1* がメスに比べ、オスが約 4.5 倍多く発現するのに対し、*adcyap2* は、約 1.2 倍しか変わらない(当研究室、未発表データ)。一方の *vip* は、血管作動性腸管ペプチド(VIP; vasoactive intestinal peptide)をコードする遺伝子で、メダカでは、*adcyap* と同様に脳の広い範囲で発現するが、PMp における性差の方向は *adcyap* とは逆で、メスでオスに比べ約 1.6 倍高い発現を示す(当研究室、未発表データ)。また、PACAPとVIPはともにセクレチン/グルカゴンファミリーに属し、共通の受容体に結合して作用を発揮することが知られている。このことをふまえると、メダカのPMpで*adcyap*と*vip*の両者が逆方向の性差を伴って発現していることは、何らかの情報伝達系を活性化するのに雌雄間でリガンドが使い分けられている、そのような仕組みが存在することを連想させる。哺乳類においてPACAPは、摂食やストレス応答、下垂体ホルモンの分泌など、多様な機能をもつ(Osuga *et al.*, 1992; Agarwal *et al.*, 2005; Mounien *et al.*, 2009)。一方、VIPは、摂食や概日リズムの調節、下垂体ホルモンの分泌など、PACAPと似たような機能をもつことから(Aton *et al.*, 2005; Matsuda *et al.*, 2005)、リガンドを使い分けがみられてもおかしくはない。そこで、メダカのPMpにおける*adcyap*と*vip*の発現制御機構、作用機序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について検討することとした。

第3章では、別の神経ペプチドであるイソトシン(IT; isotosin)をコードする遺伝子*it*に着目した。*it*は、終脳腹側部と視索前野において発現しており、視索前野における細胞当たりの発現量がメスで高い可能性が示唆されている(Kawabata *et al.*, 2012)。イソトシンの哺乳類オースログであるオキシトシン(OXT)は、脳内で作用して育児行動や向社会的行動を促進するほか、末梢でも作用し、子宮の収縮や母乳分泌を促進することが知られているが(Kiss and Mikkelsen, 2005; Ross and Young, 2009; Marlin and Froemke, 2017)、魚類における機能はほとんどわかっていない。また、OXTの発現は性ステロイドの影響を受けることが齧歯類で報告されているが、どの性ステロイドがどのようにOXTの発現を制御するかについては、報告によって異なる結果が得られている。哺乳類におけるOXTと性ステロイドの関係は、統一的な結果は得られていないものの、多くの成果が報告されている。しかし、魚類におけるITと性ステロイドの関係については全く調べられていない。そこで、メダカの*it*発現における性ステロイドの作用を解析することで魚類における*it*の発現制御機構を明らかにすることを目指した。

第1章から第3章までの解析によって、今回着目した神経ペプチド遺伝子の発現の性差は、生殖腺から放出される性ステロイドの作用によって形成されること、さらに、人為的な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。性ステロイド

は多くの場合、核内受容体のサブファミリー3に属する性ステロイド受容体(エストロゲン受容体(ER;estrogen receptor)およびアンドロゲン受容体(AR;androgen receptor))への結合を介して作用を発揮する。性ステロイド受容体は、リガンド依存型の転写因子であり、リガンドである性ステロイドと結合すると、種々の標的遺伝子の転写を活性化、あるいは不活性化する。性ステロイドは性ステロイド受容体を発現する細胞にしか作用することができないことや、細胞あたりの性ステロイド受容体の発現分子数が性ステロイドへの感受性を決めることを考えると、性ステロイドの脳内作用は、脳に存在する性ステロイド受容体なしには、考えることができない。興味深いことに、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た(Hiraki *et al.*, 2012)。特に、終脳腹側部の supracommissural/posterior nuclei of the ventral telencephalic area (Vs/Vp)と視索前野の PMm/PMg、この二つの神経核においては、ER と AR がほぼメス特異的に発現しており、体内の性ステロイド環境をオス型に改変すると、メスであっても発現が消失することが見出された(Hiraki *et al.*, 2012)。この知見をきっかけとして、魚類の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。その一方で、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い。そこで第4章では、そのメカニズムを解明する足掛かりとして、オスでも体内の性ステロイド環境をメス型に改変すれば、Vs/Vp と PMm/PMg においてみられる ER と AR のメス特異的な発現が誘導されるのか、また、逆にオスで高い発現を示す ER の一種の発現がメスレベルまで抑制されるのかを検証することとした。そしてそこで得られた知見を、第1章から第3章までの解析で得られた結果の解釈に利用することを目指した。

表 0-1. 神経核の略称と正式名称

略称	正式名称
aPMp	anterior part of parvocellular portion of the magnocellular preoptic nucleus
aPPa	anterior part of anterior parvocellular preoptic nucleus
PMg	gigantocellular portions of the magnocellular preoptic nucleus
PMm	magnocellular portion of the magnocellular preoptic nucleus
PMp	parvocellular portion of the magnocellular preoptic nucleus
PPa	anterior parvocellular preoptic nucleus
pPMp	posterior part of parvocellular portion of the magnocellular preoptic nucleus
PPp	posterior parvocellular preoptic nucleus
pPPa	posterior part of anterior parvocellular preoptic nucleus

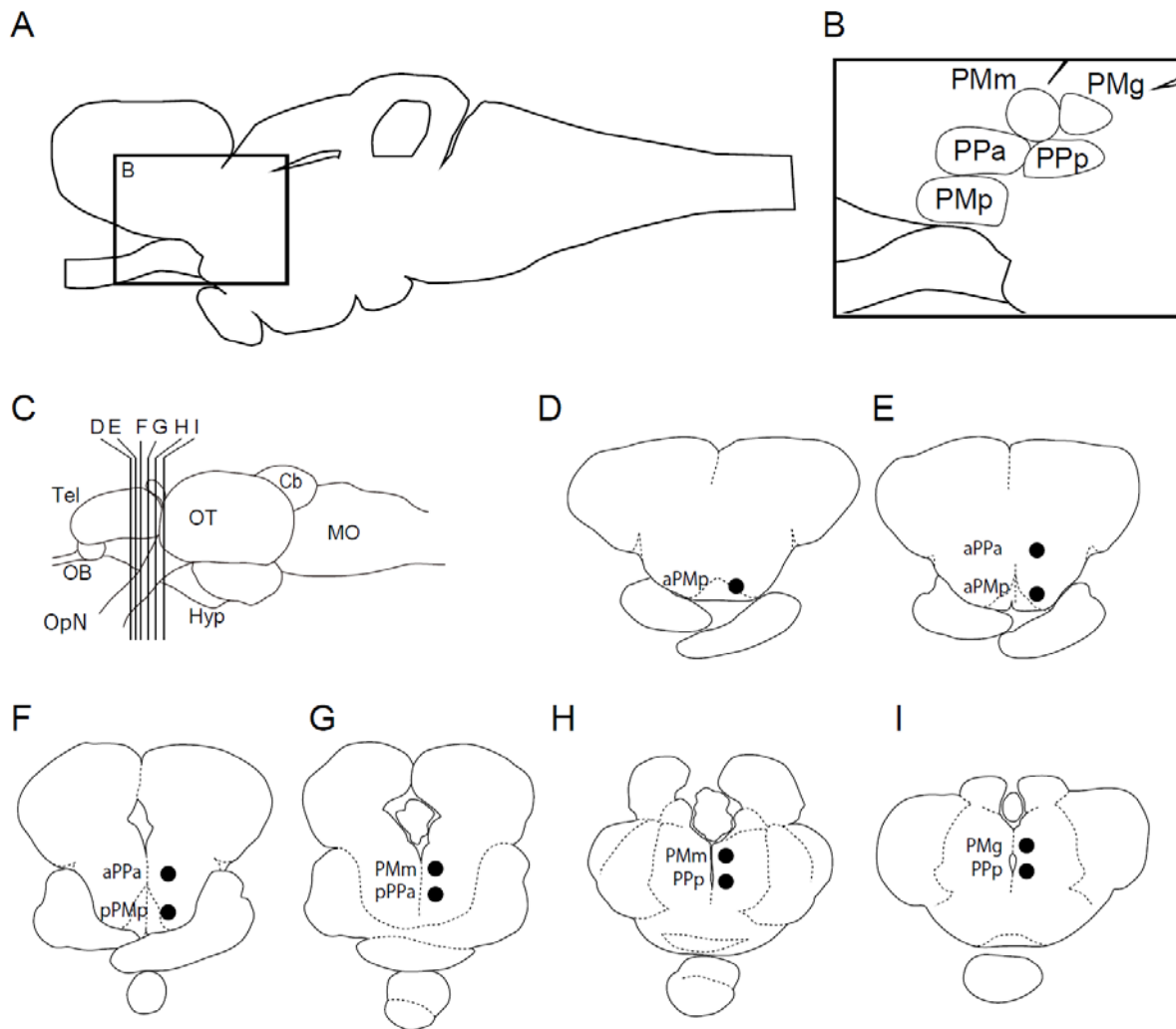


図 0-1.メダカの視索前野の脳地図

メダカの視索前野の脳地図。(A、C)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。B の部分を拡大したものをパネル B に示し、D-I のラインで切った断面をパネル D-I に示す。Cb は小脳、Hyp は視床下部、MO は延髄、OB は嗅球、OpN は視神経、OT は視蓋、Tel は終脳を示す。各神経核の正式名称については、表 0-1 を参照のこと。



## 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

本章の内容は、学術誌論文に投稿する計画があるため、公表できない。現在は投稿準備中であり、5 年以内に出版予定である。

## 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

本章の内容は、学術誌論文に投稿する計画があるため、公表できない。現在は投稿準備中であり、5 年以内に出版予定である。

## 第3章 メスで高い発現を示す遺伝子 *it* の発現制御機構

### 3-1. 緒言

ここまでの解析の結果、PMp において性差を示す神経ペプチド遺伝子の発現は、性ステロイドに依存しており、オスに偏った性差は、オスにおいて精巣由来のアンドロゲンによる発現促進作用とメスにおいて卵巣由来のエストロゲンによる発現抑制作用の二つのメカニズムのどちらかもしくは両方がはたらくことで形成されている。一方メスに偏った性差は、卵巣由来のエストロゲンによる促進作用によって形成されることが示された。そこで、同じく PMp を含めた視索前野で性差を示す神経ペプチド遺伝子 *it* の性差形成も同様のメカニズムによって成り立っているのか検証した。

*it* はイソトシン(IT)をコードする遺伝子である。IT は、アミノ酸 9 個からなる神経ペプチドで、哺乳類のオキシトシン(OXT)の魚類におけるオースログである。OXT は、主に視床下部の視索上核(SON)と室傍核(PVN)で産生され、下垂体後葉に運ばれた後、末梢へと放出される。末梢に放出された OXT は、子宮の収縮や母乳分泌の促進など、様々な作用を発揮する(Kiss and Mikkelsen, 2005)。また、PVN で産生された OXT は下垂体後葉以外にも様々な脳領域へと運ばれ、育児行動や向社会的行動を促進する(Ross and Young, 2009; Marlin and Froemke, 2017)。それらのイベントはいずれも性ステロイドに依存することから、OXT の発現も性ステロイドによる影響を受けると想像される。実際に、エストロゲンやエストロゲン活性を有するアンドロゲン代謝物 3 $\beta$ -diol が、ER の一種 ESR2 を介して *Oxt* の転写を直接活性化していることが、齧歯類でのいくつかの研究で報告されている。一方、アンドロゲンが AR を介して OXT の発現を調節しているという報告はこれまでにない(Acevedo-Rodriguez *et al.*, 2015)。しかし、*Oxt* 発現に対する性ステロイドの効果を調べたこれまでの研究の間で完全に一致した結果が得られているわけではなく、上記の報告とは逆に、エストロゲンが *Oxt* の発現を抑制するという報告も複数ある(Shughrue *et al.*, 2002; Okabe *et al.*, 2013)。

*it* は、主に視索前野の PMp、PPa、および PMm/PMg で発現している(Goodson *et al.*, 2003; Saito *et al.*, 2004; Kawabata *et al.*, 2012)。PMp と PPa は哺乳類の SON や内側視索前野(mPOA)と相同であり、PMm/PMg は哺乳類の PVN と相同であると考えられており(Forlano and Bass, 2011; Godwin and Thompson, 2012; Herget *et al.*, 20014)、*Oxt* と *it* の間で発現するニューロンの局在は保存されているようだ。加えて、トラフグ(*Takifugu rubripes*)の *it* をラットやマウスにトランスジェニックすると、*Oxt* の発現がみられる PVN と SON のニューロン

で *it* の発現が確認されたことや、外部刺激に対して *it* でも *Oxt* 様の応答がみられたことから、発現の細胞特異性や外部刺激に対する応答性は、*Oxt* と *it* の間でよく保存されていると考えられている (Venkatesh *et al.*, 1997; Gilligan *et al.*, 2003)。これらのことから、性ステロイドによる発現制御機構も、*Oxt* と *it* の間で保存されている可能性が高いと考えられ、齧歯類における性ステロイドの効果の実験結果が一致しないことを解釈する手掛かりにもなり得る。しかし、*it* の発現に対する性ステロイドの効果を調べた研究はまだない。

先行研究で、*it* は視索前野の PMp、PPa、PMm/PMg においてメスで高い発現を示すことが明らかになった (Kawabata *et al.*, 2012)。そこで、本研究では、*it* の遺伝子発現における性ステロイドによる作用を解析することで、*it* の遺伝子発現における性差の形成機構を明らかにするとともに、免疫組織化学によって作用部位を解析することで性差の生理的意義を解析することとした。

## 3-2. 材料と方法

### 3-2-1. 実験魚

実験には、水温 28°C、14 時間明期 (9 時～23 時)/10 時間暗期 (23 時～9 時) で飼育した 2～4 カ月齢の性成熟した雌雄のメダカ (d-rR 系統) を用いた。餌はブラインシュリンプ幼生、または市販の固形飼料 (おとひめ; 日清丸紅飼料、東京、日本) を 1 日 3、4 回与えた。

### 3-2-2. *it* の発現に対する生殖腺除去と性ステロイド処理の影響の解析

生殖腺除去と性ステロイド処理を行った雌雄のメダカの脳における *gal* の発現を、定量的 ISH によって解析した。1-2-2 に記載した方法で生殖腺除去とステロイド処理を行った。実験群として、オスでは、(1) 偽手術を施した後、エタノールを投与した群 (Sham 群)、(2) 精巣を除去した後、エタノールを投与した群 (CX 群)、(3) 精巣を除去した後、アンドロゲン (11KT) を投与した群 (CX+KT 群)、(4) 精巣を除去した後、エストロゲン (E2) を投与した群 (CX+E2 群) の計 4 群を設定した (各群  $n=5$ )。メスでは、(1) 偽手術を施した後、エタノールを投与した群 (Sham 群)、(2) 卵巣を除去した後、エタノールを投与した群 (OVX 群)、(3) 卵巣を除去した後、11KT を投与した群 (OVX+KT 群)、(4) 卵巣を除去した後、E2 を投与した群 (OVX+E2 群) の計 4 群を設定した (各群  $n=5$ )。

メダカの脳由来の cDNA プールを鋳型として、表 3-1 に記したプライマーを用いた PCR によって得られた *it* (738 bp) の cDNA 断片を pGEM-Teasy ベクター (Promega) にサブクロー

ニングしたものを鋳型として、T7 RNA ポリメラーゼ、および DIG RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics) を用いて、DIG で標識された cRNA プローブを合成した。脳のサンプリング、連続コロナル切片の作製、ISH は 1-2-3 に記載した方法で行った。プロテナーゼ K/PBS の濃度は 2 µg/ml、ハイブリダイゼーションのプローブ濃度は 0.2 µg/ml、AP 標識抗 DIG 抗体の希釈率は 2000 倍とした。NBT/BCIP (Roche Diagnostics) による発色時間は、オスでは 20 分、メスでは 10 時間とした。

### 3-2-3. *it* とアンドロゲン受容体との共発現解析

視索前野において *it* と AR (*ara*, *arb*) が共発現しているか否かを検証するため、下記の方法に従って蛍光二重 ISH を行った。

メダカの脳由来の cDNA プールを鋳型として、表 3-1 に記したプライマーを用いた PCR によって得られた *it* (738 bp)、*ara* (1181 bp)、*arb* (1015 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; Hiraki *et al.*, 2012) を鋳型として、Fluorescein 標識された *it* の cRNA プローブと、DIG 標識された *ara*、*arb* の cRNA プローブを合成した。*it* のプローブ標識には、T7 RNA ポリメラーゼと Fluorescein RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics) を、*ara*、*arb* のプローブ標識には、T7 RNA ポリメラーゼと DIG RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics) を用いた。

脳のサンプリング、連続コロナル切片の作製、蛍光二重 ISH は、1-2-4 に記載した方法で行った。ハイブリダイゼーション時のプローブ濃度は 0.5 µg/ml、Fluorescein 抗体の希釈率は 1000 倍、DIG 抗体の希釈率は 500 倍、DAPI の希釈率は 1000 倍とした。*it* 検出のための TSA Plus Fluorescein System (PerkinElmer) による発色時間は 45 分間、AR 検出のための Fast Red (Roche Diagnostics) による発色時間は 3 時間半とした。

### 3-2-4. 視索前野の *it* 発現にキスペプチンが関与する可能性の検証

メダカでは、視床下部の ventral tuberal nucleus (NVT) に存在するキスペプチンニューロン (キスペプチンの一種である *kiss1* を発現するニューロン) が、*it* 発現ニューロンに密に投射していることや、*it* 発現ニューロンがキスペプチン受容体 *gpr54-2* を発現していることが報告されている (Kanda *et al.*, 2013; Hasebe *et al.*, 2014)。さらに、NVT の *kiss1* 発現ニューロンの数はメスに比べてオスで多いことも報告されている (Kanda *et al.*, 2008)。また、メダカでは確認されていないが、視床下部の lateral recess nucleus (NRL) に存在し、別のキスペプチン (*kiss2*) を発現するニューロンも、*it* 発現ニューロンが存在する脳領域に密に投射しているこ

とが、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) において報告されている (Servili *et al.*, 2011)。これらの知見から、*kiss1* と *kiss2* のどちらか、もしくはその両方がアンドロゲンシグナルを *it* 発現ニューロンへと伝えているのではないか、という仮説を立てた。その仮説を検証する端緒として、生殖腺除去と性ステロイド処理を行ったオスメダカの脳におけるキスペプチン遺伝子 (*kiss1*、*kiss2*)、およびキスペプチン受容体遺伝子 (*gpr54-1*、*gpr54-2*) の発現を、real-time PCR によって解析した。実験群として、(1) 偽手術を施した後、エタノールを投与した群 (Sham 群)、(2) 精巣を除去した後、エタノールを投与した群 (CX 群)、(3) 精巣を除去した後、アンドロゲン (11KT) を投与した群 (CX+KT 群)、(4) 精巣を除去した後、エストロゲン (E2) を投与した群 (CX+E2 群) の計 4 群を設定した (各群 n = 6~8)。

脳のサンプリングは明期開始後 1~2.5 時間の間に行った。その際、生殖腺除去個体については生殖腺が体内に残っていないことを、偽手術個体については生殖腺が無傷で残っていることを確認した。サンプリングした脳は、RNAlater 中で、4°C で一晩インキュベートした後、RNAlater を完全に取り除き、RNA 抽出に供するまで -80°C で保存した。

RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen, Hilgen, Germany) を用いて、全脳の RNA を抽出した後、SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて逆転写を行い、cDNA を合成した。real-time PCR は、LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いて、LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics) 上で行った。PCR に用いたプライマーを表 1-1 に示した。得られた各遺伝子の発現量は  $\beta$  アクチン遺伝子 (*actb*) の発現量で補正し、Sham 群の値を 1 とした場合の相対値で示した。

### 3-2-5. 免疫組織化学を用いた *it* 発現ニューロンの投射先の解析

*it* 発現ニューロンの投射先を解析するため、以下の方法に従って、It ペプチドの免疫組織化学を行った。脳のサンプリング、連続サジタル切片または coronal 切片の作製、免疫組織化学は 1-2-5 に記載した方法で行った。一次抗体には、抗体希釈液で 5000 倍に希釈したウサギ抗 OXT 抗体 (東京大学大気海洋研究所の兵藤晋教授のご厚意により譲渡していただいた) を、二次抗体には、PBS で 1000 倍に希釈した Alexa Flour 488 Goat Anti-Rabbit IgG を用いた。

### 3-2-6. 顕微鏡観察および撮影

3-2-2 で得られた ISH 後の切片の観察および撮影は、正立顕微鏡 (BX53; Olympus、

Tokyo, Japan)とデジタルカメラ(DP73; 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。*it* の発現がみられた全ての神経核について、シグナル陽性ニューロンの数を正立顕微鏡下で、マニュアルにてカウントした。カウントは2回行い、その平均値を最終的なデータとした。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/))、および本研究室で作製されたメダカの脳のニッスル染色連続切片(kawabata *et al.*, 2012)をもとに行った。

3-2-3 および 3-2-5 で得られた蛍光組織切片の観察及び撮影は、共焦点レーザースキャン顕微鏡(TCS SP8; Leica Microsystems)を用いて行った。TCS SP8 での Fluorescein および Alexa488 の検出には 488 nm の励起光と 495~545 nm の蛍光検出波長域を、Fast Red の検出には 552 nm の励起光と 620~700 nm の蛍光検出波長域を、DAPI の検出には 405 nm の励起光と 410~480 nm の蛍光検出波長域を用いた。また、免疫組織化学で得られた蛍光組織切片は、各切片を Z 軸方向 1  $\mu$ m 毎に撮影し、重ね合わせた。撮影した画像のコントラストと明度は、Photoshop CS6(Adobe Systems, San Jose, CA, USA)を用いて調整した。

### 3-2-7. 統計解析

グラフ中のデータは全て、平均値 $\pm$ 標準誤差で表示した。統計処理は、統計処理ソフトウェア GraphPad PRISM(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いて、以下の方法によって行った。Bartlett 検定と Brown-Forsythe 検定によって等分散性を検証し、等分散が認められた場合は、一元配置分散分析の後、Bonferroni 法によって、オスの場合は CX 群とその他の群、メスの場合は OVX 群とその他の群との有意差をそれぞれ検定した。等分散が認められなかった場合は、データを対数変換し、それで等分散が認められれば、一元配置分散分析の後、Bonferroni 法によって CX 群とその他の群との有意差を検定した。対数変換後も等分散が認められなかった場合は、ノンパラメトリックの Kruskal-Wallis 検定の後、Dunn 法によって CX 群とその他の群との有意差を検定した。

## 3-3. 結果

### 3-3-1. 各神経核における *it* 発現に対する生殖腺除去と性ステロイド処理の影響

*it* 発現に対する生殖腺由来の性ステロイドの影響を解析するため、生殖腺除去と性ステロイド投与が雌雄のメダカの脳内の *it* 発現に及ぼす影響を、定量的 ISH によって解析した。

ISH のシグナルが得られた神経核の略称と正式名称を表 3-2 に示した。オスでは、PMp および PPa の *it* 発現ニューロンの数が精巣除去によって有意に減少し、アンドロゲン投与によって回復した。一方、エストロゲン投与では有意な差はみられなかった(図 3-1A、B、D)。また、PMm/PMg では、精巣除去および性ステロイド投与の影響に有意な差はみられなかった(図 3-1C)。メスでは、いずれの神経核においても卵巣除去や性ステロイド投与の影響に有意な差はみられなかった(図 3-2)。

### 3-3-2. *it* とアンドロゲン受容体の共発現の有無

上記の生殖腺除去と性ステロイド投与の実験によって、PMp と PPa における *it* の発現は、オスでのみアンドロゲンによる促進作用を受けることが示された。では、アンドロゲンは直接的に PMp や PPa の *it* 発現ニューロンに作用できるのだろうか。このことを検証するために、蛍光二重 ISH によって、それらの神経核における *it* と AR の共発現を解析した。メダカを含め、魚類は 2 種類の AR、*ara* と *arb* の両方について発現を解析した。解析の結果、オスでは、aPMp、PPa、aPPp において *ara* が、そのうち、aPMp と PPa においては *arb* も多く発現していたが、どちらの AR も *it* 発現ニューロンでは発現していなかった(図 3-3)。メスではさらに、pPMp でも *ara* と *arb* の発現がみられたが、オスと同様に、*it* 発現ニューロンでは発現していなかった。メスでは、PMm/PMg でも *ara* と *arb* の両方の発現がみられたが、やはり *it* ニューロンでは発現していなかった(図 3-4)。

### 3-3-3. アンドロゲンに依存した *it* の発現にキスペプチンが関与する可能性

ここまでの結果で、オスの PMp と PPa での *it* 発現は、アンドロゲンによって促進されるにもかかわらず、AR とは共発現していないことが明らかとなった。このことは、アンドロゲンは別の細胞を経由して、PMp と PPa の *it* 発現ニューロンにはたらきかけることを意味している。そこで私は、過去の報告を参考にして、このアンドロゲンに依存した *it* の発現はキスペプチンを介したものかもしれないとの仮説を立てた。その仮説を検証するため、精巣除去手術と性ステロイド処理を施したオスの脳における 2 種類のキスペプチン遺伝子(*kiss1* と *kiss2*)および 2 種類のキスペプチン受容体遺伝子(*gpr54-1* と *gpr54-2*)の発現を real-time PCR によって解析した。その結果、*kiss1*、*gpr54-1*、*gpr54-2* の発現は、精巣を除去しても、精巣除去した個体にアンドロゲンおよびエストロゲンのいずれを投与しても、有意な差はみられなかった(図 3-5A、C、D)。一方、*kiss2* の発現は、精巣を除去すると減少傾向を示し、アンドロゲンを投与することで有意に増加した。エストロゲン投与では、*kiss2* の発現に有意な差はみられな



かった(図 3-5B)。

#### 3-3-4. 免疫組織化学を用いた *it* 発現ニューロンの投射先

オス特異的にアンドロゲンによる制御を受ける PMp および PPa の *it* 発現ニューロンの投射先を明らかにするために、抗 OXT 抗体を用いた免疫組織化学を行った。その結果、PMm/PMg の *it* 発現ニューロンが尾部側の脳領域へと投射する様子が確認された一方で、PMp および PPa の *it* 発現ニューロンのほとんどは雌雄のいずれにおいても、視床下部の腹側を経由して下垂体へと投射していることが明らかとなった(図 3-6)。

### 3-4. 考察

本章では、OXT の魚類オースログとして知られている *it* の脳内発現に対する性ステロイドの影響を解析した。オスでは、PMp および PPa の *it* 発現は、アンドロゲンによって促進される一方、PMm/PMg の *it* 発現は性ステロイドによる影響を受けないことが明らかとなった。メスでは、いずれの神経核の *it* 発現も、性ステロイドによる影響を受けないことが明らかとなった。

過去の異種間のトランスジェニック実験において、発現の細胞特異性や外部刺激に対する応答性は、*Oxt* と *it* の間でよく保存されていることが示されている(Venkatesh *et al.*, 1997; Gilligan *et al.*, 2003)。このことから、*Oxt/it* の性ステロイドによる制御も、齧歯類と魚類との間で保存されていると予想された。しかし、今回得られた結果は、それを否定するものであった。齧歯類では、アンドロゲンではなく、エストロゲンやエストロゲン活性を示すアンドロゲン代謝物 3 $\beta$ -diol が、雌雄両方の PVN の *Oxt* の発現を促進することが報告されている(Aceved-Rodriguez *et al.*, 2015)。逆に、エストロゲンやテストステロンが *Oxt* の発現を抑制することも報告されているが(Shughrue *et al.*, 2002; Okabe *et al.*, 2013; Aceved-Rodriguez *et al.*, 2015)、いずれにせよ、今回メダカで得られた結果とは明らかに異なる。

齧歯類では、ESR2 が PVN の OXT ニューロンで高発現しており、ESR2 を介してエストロゲンや 3 $\beta$ -diol が *Oxt* 発現を促進する(Alves *et al.*, 1998; Nomura *et al.*, 2002; Shalma *et al.*, 2012; Hiroi *et al.*, 2013)。ESR2 は、*Oxt* プロモーター領域の estrogen responsive element (ERE) と結合することで *Oxt* の転写を活性化する(Richard and Zingg, 1990; Adan *et al.*, 1993; Koohi *et al.*, 2005)。この知見をもとに、メダカの *it* のプロモーター領域の配列を解析したところ、いくつかの ERE 様配列が見つかった(Yamashita *et al.*, 2017)。性ステロイドによ

る *Oxt/it* の制御に関わるシスエレメントは齧歯類と魚類で保存されているにもかかわらず、実際の制御機構は *Oxt* と *it* の間で大きく異なるようになった可能性が考えられる。

オス特異的なアンドロゲンによる制御は、齧歯類における研究と一致しないだけでなく、魚類の脳の性分化の観点からも意外な発見であった。魚類、少なくともメダカにおいては、性ステロイドを投与した際に起こる脳内の遺伝子発現の変化は、雌雄間で共通であることが繰り返し報告されてきた (Okubo *et al.*, 2011; Nakasone *et al.*, 2013; 当研究室、未発表データ)。他の脊椎動物とは異なり、魚類の脳は不可逆的な性分化過程を経ないために、雌雄間で共通の変化が起こると解釈できる (Hiraki *et al.*, 2012; Okubo *et al.*, 2011)。なぜアンドロゲンに依存した *it* 発現のメカニズムがオスにしか備わっていないのかは、まだ分からないが、もしかしたら、そのメカニズムは不可逆もしくは不可逆に近い形で性分化しているのかもしれない。OXT ニューロンの電気活動パターンが出生前後の時期に精巣から分泌されるテストステロンの影響で不可逆的に性分化することが、最近のラットの研究で示された (Israel *et al.*, 2014)。また、ブラックモーリー (*Poecilia sphenops*) における脳の *it* の濃度は、メダカと同じくメスで高いが、オス化したメスでも通常のメスと同程度の濃度を示し、性転換しても性差は逆転しないという報告もある (Kulczykowska *et al.*, 2014)。したがって、メダカの *it* ニューロンにも不可逆な性分化機構が存在するのかもしれない。

本研究の投与実験で使用したアンドロゲンは、エストロゲンに転換されないタイプのアンドロゲン (11KT) であるため、今回確認されたアンドロゲンによる *it* 発現の促進は、AR を介していると考えられる。しかし、*ara* と *arb*、いずれの AR 遺伝子も、*it* 発現ニューロンでの発現はみられなかった。このことから、*it* 発現に対するアンドロゲンの作用は、直接的なものではなく、別の細胞を経由すると考えられる。齧歯類では、PVN のおよそ半分のニューロンが AR を発現しているにもかかわらず (Bingaman *et al.*, 1994)、*Oxt* 発現ニューロンでは AR の発現はみられない (Zhou *et al.*, 1994)。この状況は、今回明らかとなったメダカでの状況とよく似ている。*Oxt/it* 発現ニューロンが AR を高発現する脳領域に位置しながら、自身は AR を発現しないことは、齧歯類と魚類において保存されているようだ。にもかかわらず、魚類だけで *Oxt/it* の発現がアンドロゲン/AR 依存的であるのは実に不思議である。魚類は、アンドロゲンに応答して *it* の発現を促進する固有の神経回路を発達させたのかもしれない。

メダカにおいて、NVT の *kiss1* 発現ニューロンが *it* 発現ニューロンに密に投射していることや、*it* 発現ニューロンが *gpr54-2* を発現すること、NVT の *kiss1* 発現ニューロンの数はオスの方が多いたことが報告されている (Kanda *et al.*, 2008; Kanda *et al.*, 2013; Hasebe *et al.*, 2014)。ゼブラフィッシュでは、NRL の *kiss2* 発現ニューロンも *it* 発現ニューロンが存在する脳領域

に密に投射していることが報告されている (Servili *et al.*, 2011)。また、メダカの *gpr54-2* は *Kiss1* に比べ *Kiss2* に対して高い親和性を示す (Kanda *et al.*, 2013)。これらの知見から私は今回、*kiss1* と *kiss2* のどちらか、もしくはその両方がアンドロゲンシグナルを *it* 発現ニューロンへと伝えているのではないかという仮説を立て、その検証を行った。この仮説が正しければ、キスペプチンもしくはその受容体の発現が、アンドロゲン投与によって促進されるはずである。解析の結果、*kiss1*、*gpr54-1*、*gpr54-2* の発現にはアンドロゲンによる効果は認められなかったが、*kiss2* の発現がアンドロゲン投与によって促進された。したがって、アンドロゲンによって促進される *it* の発現は、*kiss2* によって仲介されている可能性がある。しかし、今回の研究では、キスペプチンと *it* の関係を直接的に示せたわけではないため、この仮説を証明するためには、さらなる解析が必要である。

先行研究によって、メダカの *it* 発現ニューロンの数には雌雄間で差はないが、脳全体の発現量は、オスよりメスのほうが高いことが示されている (Kawabata *et al.*, 2012)。今回明らかとなったオス特異的な *it* 発現の促進機構は、一見、この知見と矛盾するように思える。オス特異的な促進機構がはたらいているのであれば、発現量はオスの方が高くなるのでは、と考えるのが自然だからである。この点について、アンドロゲンによるオス特異的な *it* 発現の促進がもつ生理的意義と絡めて考察してみたい。IT は作用部位に応じて異なる生理的役割を示す。視索前野で合成された IT は、(1)別の脳領域に運ばれ、行動に作用する、(2)下垂体前葉に運ばれ、下垂体ホルモンの分泌を制御する、あるいは(3)下垂体後葉に運ばれた後、全身へと放出され、末梢で作用する、のいずれかの道をたどる (Knobloch and Grinevich, 2014)。今回、PMp と PPa のニューロンのほとんどが下垂体後葉へ軸索を伸ばしていることが明らかとなった。この結果から、オス特異的なアンドロゲン応答によって合成された IT ペプチドは主に下垂体へと運ばれ、末梢で作用していると考えられる。下垂体を経由して末梢に向けて分泌される IT ペプチドが、魚類においてどのような役割を担っているのかについては、未だにはっきりとした結論が得られていないが、IT のオーソログである OXT が、分娩時の子宮筋収縮や授乳期の射乳だけでなく、輸精管の収縮や浸透圧調節にも関与することが報告されており (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004; Clément *et al.*, 2008; Gutkowska *et al.*, 2014)、IT/OXT は雌雄のどちらにも必要な分子であると考えられる。仮に、アンドロゲンによるオス特異的な *it* の促進機構がなければ、下垂体に運ばれる IT ペプチドの量は、メスの方が圧倒的に多くなるはずである。IT が雌雄のどちらでも同じくらい重要なはたらきをしているとすれば、このような大きな性差はあまり好ましいことではないだろう。アンドロゲンによるオス特

異的な *it* の促進機構は、このような状況を防ぐために存在するのかもしれないと考えられる。言わば、性差を打ち消すための性差である。

最近、ゼブラフィッシュにおいて IT がイオン調節において重要なはたらきを示すことが証明された (Chou *et al.*, 2011)。IT は幹細胞の増殖および分化を刺激して、皮膚や鰓の塩類細胞の密度を増加させることで、イオン輸送を促進しているようだ (Chou *et al.*, 2011)。イオン調節は、雌雄で同様に重要なはたらきであり、アンドロゲンによるオス特異的な発現促進はイオン調節に関与しているのかもしれない。イオン調節の機能は、*Oxt* とそのオーソログで保存されているにもかかわらず、OXT と IT がどのようにイオン調節に関与するかは、哺乳類と魚類の陸生と水生の進化の過程で多様化したように思われる。この多様化は、*Oxt* と *it* 発現の性ステロイドによる制御の違いとも関係しているのかもしれない。さらに、ヨーロッパヘダイ (*Sparus aurata*) において、イオン制御関連ホルモンとして知られているコルチゾルが *it* の発現を刺激することが報告されているほか、メダカの全身のコルチゾル濃度はオスよりメスで高いことが知られている (Cadiz *et al.*, 2015; Kikuchi *et al.*, 2015)。したがって、アンドロゲンには、コルチゾルによってメスに偏った *it* の発現を補うはたらきがあるのかもしれない。今後の研究に期待したい。

表 3-1. 第 3 章で用いたプライマー

名称	標的遺伝子	使用目的	塩基配列 (5′-3′)
ara-F1	<i>ara</i>	ISH	TTCGAAGCTGGAATGACTCTC
ara-R1	<i>ara</i>	ISH	GGGTTCTTGCACAGGAAGAT
arb-F1	<i>arb</i>	ISH	ACTCCCCAAGGGCAAAAC
arb-R1	<i>arb</i>	ISH	GGTAGACTCCTGGAAACAAATCC
bACTIN-qPCR-F2	<i>actb</i>	qPCR	CCCCACCCAAAGTTTAG
bACTIN-qPCR-R2	<i>actb</i>	qPCR	CAACGATGGAGGGAAAGACA
GPR54-1-F6	<i>gpr54-1</i>	qPCR	CTTCTGTCCATCCCTGTGGT
GPR54-1-R6	<i>gpr54-1</i>	qPCR	TCGCTGCAGTAAATCTGTGG
GPR54-2-qPCR-F12	<i>gpr54-2</i>	qPCR	ATCTGGACGAGGATGAGGAG
GPR54-2-qPCR-R12	<i>gpr54-2</i>	qPCR	CGAGAAGAACAAGGGACCA
it-F1	<i>It</i>	ISH	ACAGGGACCTCAGAAGTCACAAGG
it-R1	<i>It</i>	ISH	TTTATTTTCAGCATGCAGATTTCTGGATGAT
kiss1-qPCR-F7	<i>kiss1</i>	qPCR	ATCTGATGGAGGGACTCCAATG
kiss1-qPCR-R7	<i>kiss1</i>	qPCR	TGGCGTTTCTTTATAGCCACAG
kiss2-qPCR-F10	<i>kiss2</i>	qPCR	TGAAGCTCCCTCTGATGTCC
kiss2-qPCR-R10	<i>kiss2</i>	qPCR	CCACCCACATGTCCTTGAC

名称中の-F はフォワードプライマー、-R はリバースプライマーであることを示す。使用目的の qPCR は real-time PCR のことを、ISH は *in situ* hybridization のことを示す。

表 3-2. 神経核の略称と正式名称

略称	正式名称
aPMp	anterior part of parvocellular portion of the magnocellular preoptic nucleus
aPPp	anterior part of posterior parvocellular preoptic nucleus
pPMp	posterior part of parvocellular portion of the magnocellular preoptic nucleus
PMg	gigantocellular portion of the magnocellular preoptic nucleus
PMm	magnocellular portion of the magnocellular preoptic nucleus
PMp	parvocellular portion of the magnocellular preoptic nucleus
PPa	anterior parvocellular preoptic nucleus
PPp	posterior parvocellular preoptic nucleus

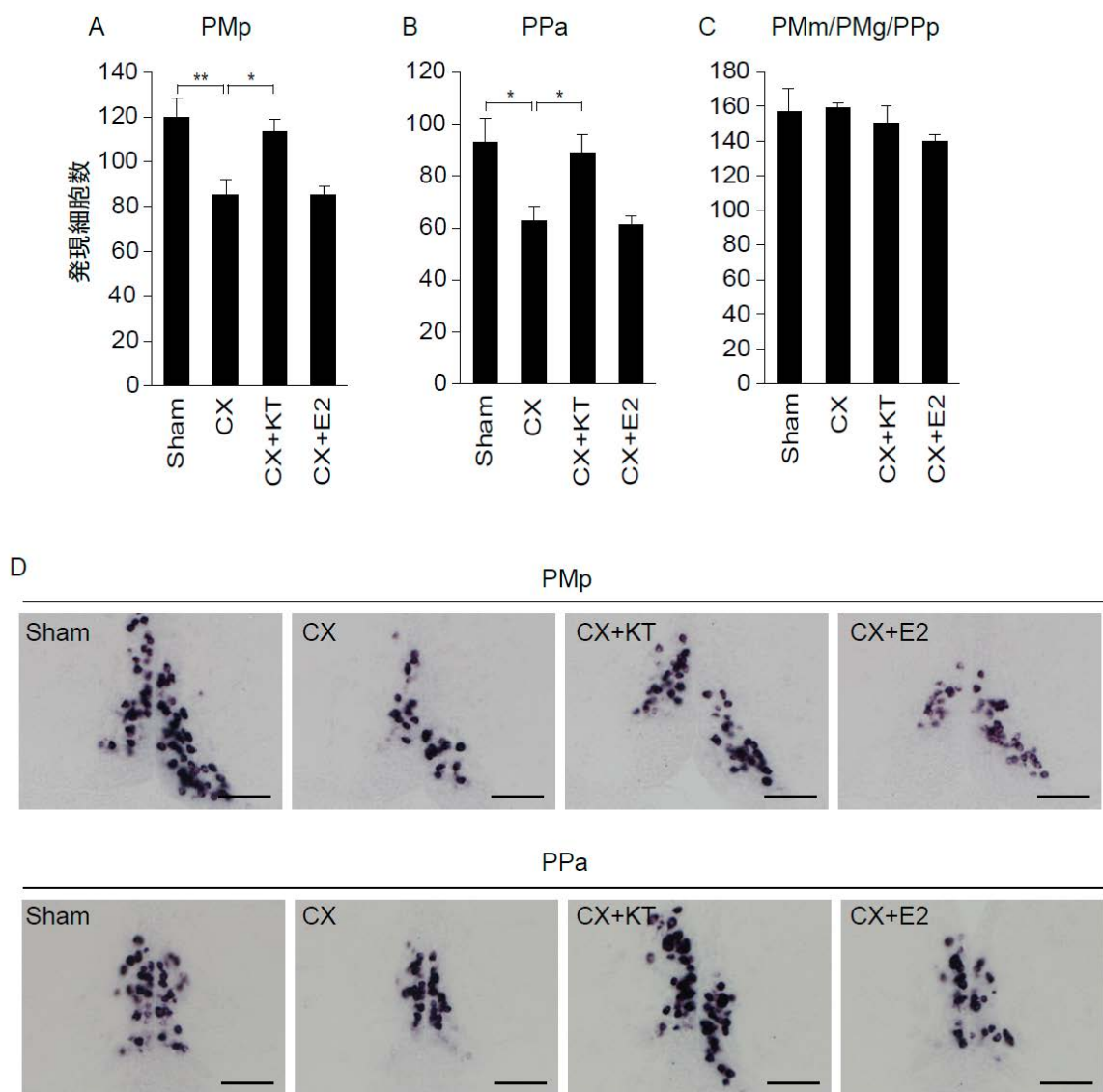


図 3-1. 精巣除去と性ステロイド投与がオスの脳における *it* の発現に与える影響

(A–C) 偽手術 (Sham) 群、精巣除去 (CX) 群、精巣除去+アンドロゲン投与 (CX+KT) 群、精巣除去+エストロゲン投与 (CX+E2) 群のオスメダカにおける各神経核での *it* 発現ニューロン数。横軸は実験群を、縦軸は発現ニューロン数を示す。有意差を\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  で示した。(D) 精巣除去と性ステロイド投与に有意な効果が認められた神経核 (PMp (上段) および PPa (下段)) における *it* の発現を示した代表的な写真。スケールバーは全て 50  $\mu\text{m}$ 。各神経核の正式名称については、表 3-2 を参照のこと。

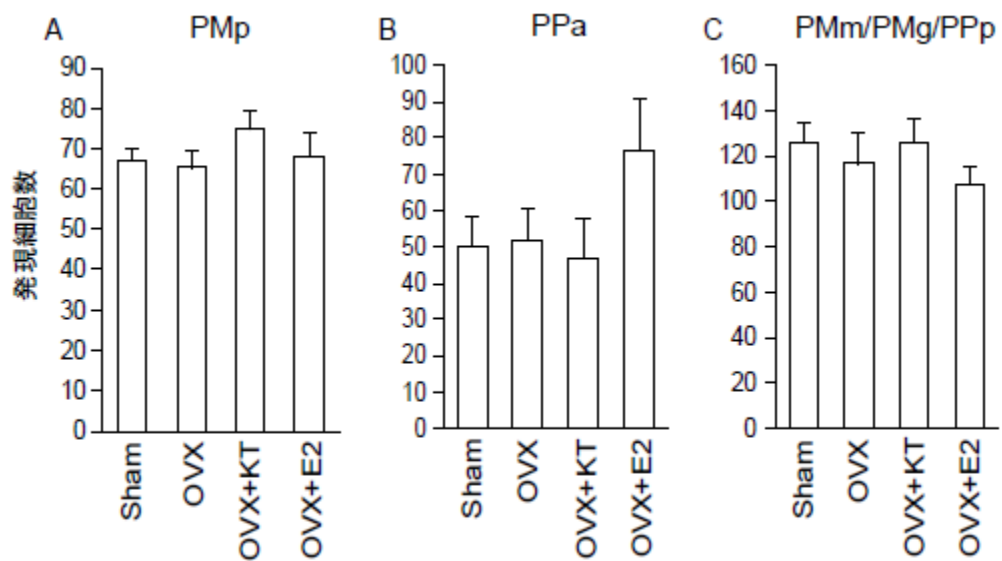


図 3-2. 卵巣除去と性ステロイド投与がメスの脳における *it* 発現に与える影響

偽手術 (Sham) 群、卵巣除去 (OVX) 群、卵巣除去+アンドロゲン投与 (OVX+KT) 群、卵巣除去+エストロゲン投与 (OVX+E2) 群のメスメダカにおける (A) PMp、(B) PPa、(C) PMm/PMg/PPp での *it* 発現ニューロン数。横軸は実験群を、縦軸は発現ニューロン数を示す。各神経核の正式名称については、表 3-2 を参照のこと。



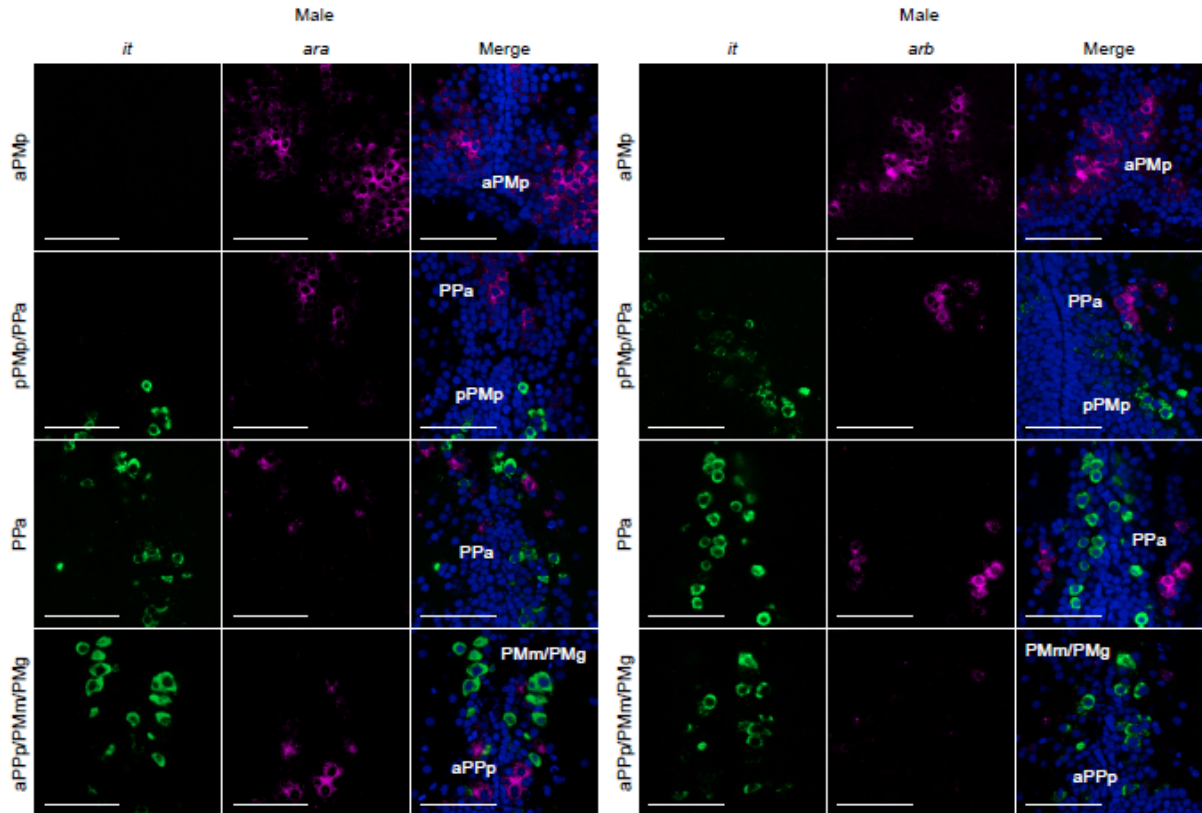


図 3-3. オスの各神経核における *it* と AR の共発現

オスの各神経核(上から aPMp、pPMp/PPa、PPa、aPPp/PMm/PMg)における *it* とアンドロゲン受容体の共発現の有無を示した代表的な写真。左側半分のパネルは *ara* の写真を、右側半分のパネルは *arb* の写真を示す。緑は *gal* の発現を、マゼンタは *ara* もしくは *arb* の発現を、青は DAPI による核染色を示す。スケールバーは全て 20  $\mu$ m。各神経核の正式名称については、表 3-2 を参照のこと。

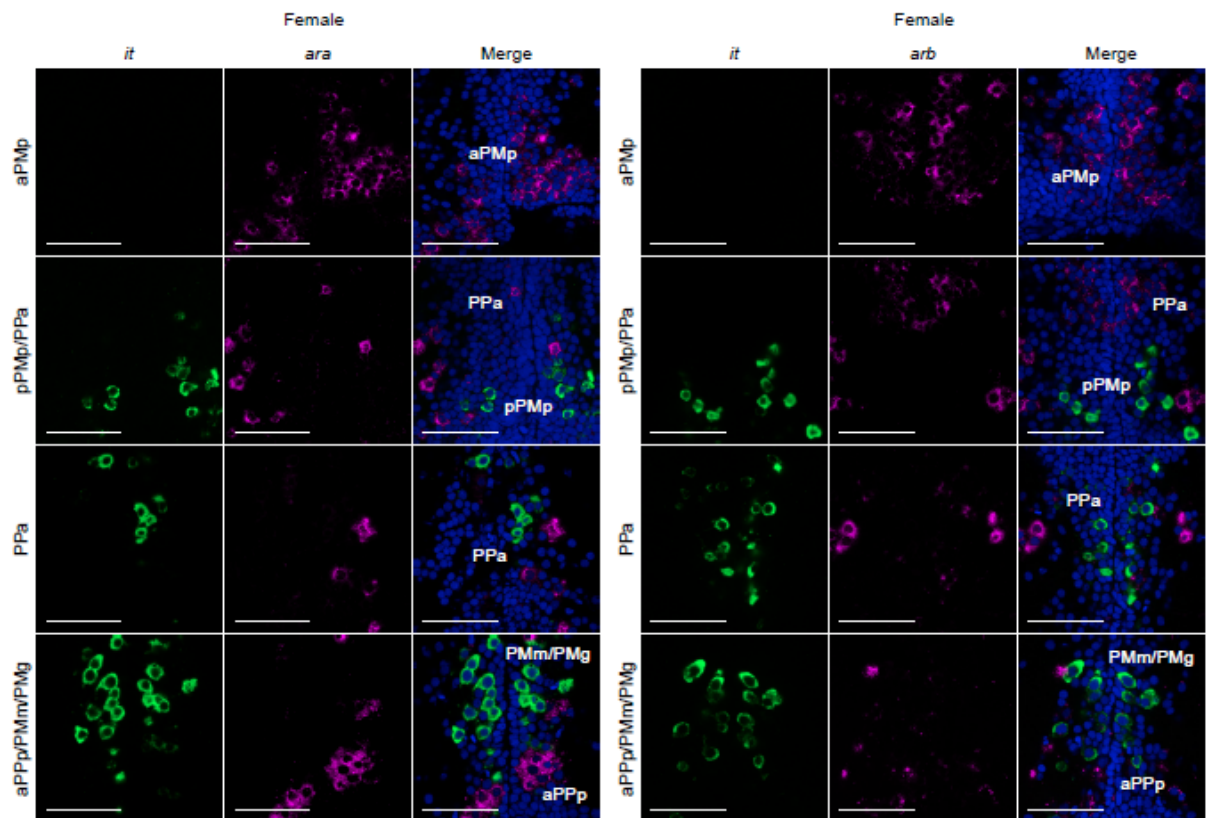


図 3-4. メスの各神経核における *it* と AR の共発現

メスの各神経核(上から aPMp、pPMp/PPa、PPa、aPPp/PMm/PMg)における *it* とアンドロゲン受容体の共発現の有無を示した代表的な写真。左側半分のパネルは *ara* の写真を、右側半分のパネルは *arb* の解析結果を示す。緑は *gal* の発現を、マゼンタは *ara* もしくは *arb* の発現を、青は DAPI による核染色を示す。スケールバーは全て 20  $\mu$ m。各神経核の正式名称については、表 3-2 を参照のこと。

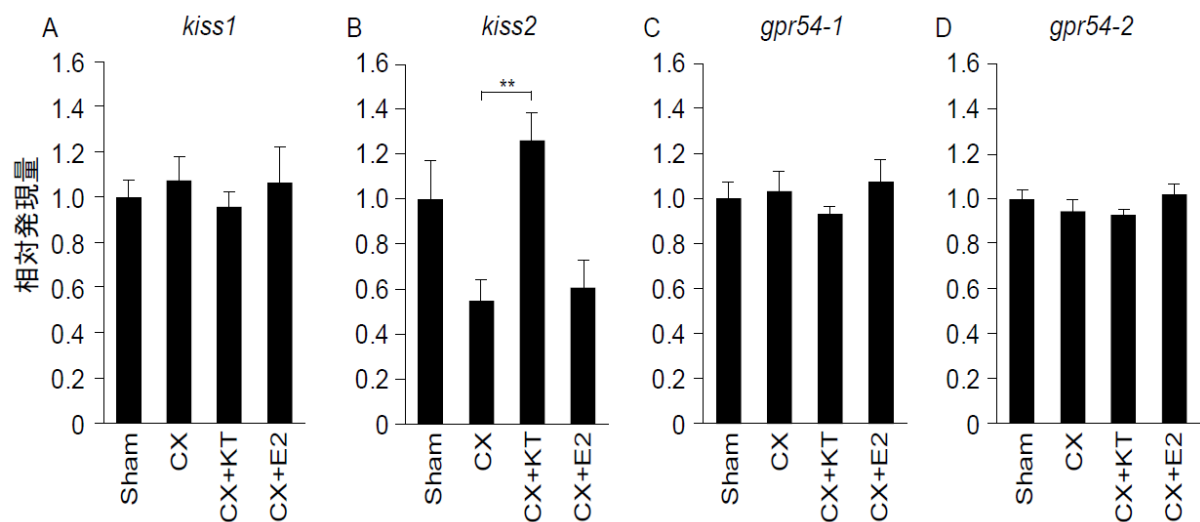


図 3-5. オスの脳内におけるキスペプチンとその受容体の遺伝子発現に対する性ステロイドの影響

偽手術 (Sham) 群、精巣除去 (CX) 群、精巣除去+アンドロゲン投与 (CX+KT) 群、精巣除去+エストロゲン投与 (CX+E2) 群のオスメダカにおける (A) *kiss1*、(B) *kiss2*、(C) *gpr54-1*、(D) *gpr54-2* の全脳レベルでの相対発現量。横軸は実験群を、縦軸は相対発現量を示す。エラーバーは SEM。有意差を\*\*  $p < 0.01$  で示した。

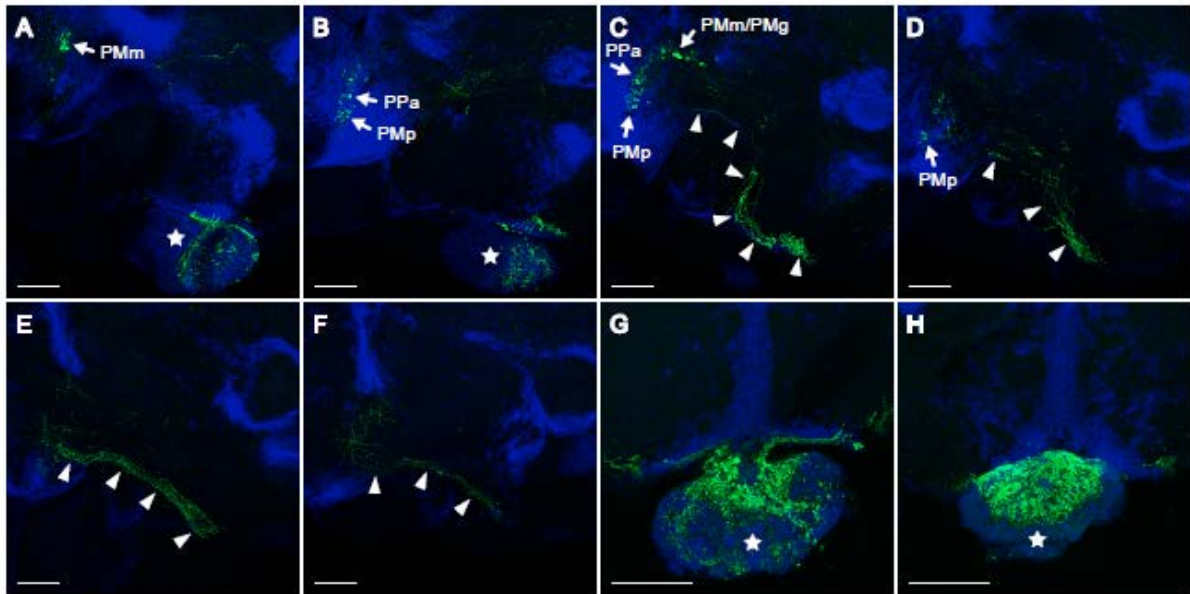


図 3-6. *it* 発現ニューロンの軸索の投射先

IT ペプチドの免疫組織化学の結果を示した代表的な写真。(A–F) サジタル切片上で *it* 発現ニューロンの軸索の投射を示した代表的な写真。(A) から正中線に近い順に並んでおり、(A) が正中線に最も近く、(F) が正中線から最も遠い。いずれの写真も、左が吻部側で上が背側。(G、H) コロナル切片上での下垂体の代表的な写真。(G) は吻部側の切片、(H) は尾部側の切片。細胞体の免疫陽性シグナルを矢印、軸索の免疫陽性シグナルを矢頭、下垂体を星印で示した。スケールバーは全て 100  $\mu\text{m}$ 。各神経核の正式名称については、表 3-2 を参照のこと。

## 第 4 章 性ステロイド受容体の発現の性的可逆性

本章の内容は、学術誌論文に投稿する計画があるため、公表できない。現在は投稿準備中であり、5 年以内に出版予定である。

## 総合考察

総合考察の内容は、学術誌論文に投稿する計画があるため、公表できない。

## 要旨

要旨の内容は、学術誌論文に投稿する計画があるため、公表できない。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、東京大学大学院農学生命科学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、終始はっきりとした指針を示していただいた。ここまで豊富で有意義なデータを得ることができたのも、大久保准教授が適切な助言を与えてくださったおかげである。さらに、研究室へのストレスで研究から離れた時期もあり、大変申し訳なく、そして環境改善に努めてくださったことに心より感謝申し上げる。また、セミナーや実験の指導を通して有益なご助言を多くいただいた同研究室の金子豊二教授、渡辺壮一助教に深く感謝している。

本論文を査読してくださった金子豊二教授、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、東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物科学専攻水圏工学研究室の浅川修一教授、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。

また、兵藤教授にはイソトシンの免疫組織化学で用いた抗体を譲渡いただき、非常に有益なデータを得ることができた。重ねてお礼申し上げます。岡良隆教授、同研究室の神田真司准教授には、セミナーの場などで、本研究を進める上での有益なご助言をいただいた。神田准教授には、本研究のもととなる精巣摘出手術法も教授いただいた。深く感謝申し上げます。

実験手法のご指導や助言をいただいた宮西弘氏、前廣清香氏、梶山(平木)十和子氏、竹内研生氏、仲宗根潔氏、古川史也氏、進士淳平氏には深く感謝申し上げます。特に川幡由希香氏には、非常に多くの相談に乗っていただいた。心より御礼申し上げます。

そして、最後まで切磋琢磨しあい、多くの楽しさや辛さを共有してきた細野耕平氏には心より感謝している。細野耕平氏がいてくれたおかげでここまで研究を続けることができた。本当に感謝している。

また、琉球大学時代にご指導いただいた美ら島財団の中村將先生には卒業後も気にかけていただいた。深く感謝申し上げます。同じく琉球大学時代厳しくも楽しくご指導いただいた野津了氏、村田良介氏に深く感謝申し上げます。

最後に 2 年という短い期間ではあったが、ともに研究に励んだ同期の皆様、実験データを提供してくれたメダカたち、そして、ここまで私の好きなことをさせてくれ応援してくれた両親に深く感謝申し上げます。



## 引用文献

1. **Acevedo-Rodriguez A, Mani SK, Handa RJ** (2015) Oxytocin and estrogen receptor  $\beta$  in the brain: an overview. *Front Endocrinol* 6: 160
2. **Adan RA, Cox JJ, Beischlag TV, Burbach JP** (1993) A composite hormone response element mediates the transactivation of the rat oxytocin gene by different classes of nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol* 7: 47–57
3. **Adell A, Celada P, Abellán MT, Artigas F** (2002) Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res Brain Res Rev* 39: 154–180
4. **Agarwal A, Halvorson LM, Legradi G** (2005) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mimics neuroendocrine and behavioral manifestations of stress: Evidence for PKA-mediated expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene. *Brain Res Mol Brain Res* 138: 45–57
5. **Alexander LD, Sander LD** (1994) Vasoactive intestinal peptide stimulates ACTH and corticosterone release after injection into the PVN. *Regul Pept* 26: 221–227
6. **Alves SE, Lopez V, McEwen BS, Weiland NG** (1998) Differential colocalization of estrogen receptor beta (ERbeta) with oxytocin and vasopressin in the paraventricular and supraoptic nuclei of the female rat brain: an immunocytochemical study. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3281–3286
7. **Amano M, Amiya N, Hiramatsu M, Tomioka T, Oka Y** (2009) Interaction between neuropeptide Y immunoreactive neurons and galanin immunoreactive neurons in the brain of the masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Neurosci Lett* 462: 33–38
8. **Anken R, Bourrat F** (1998) Brain atlas of the Medaka fish. Paris: INRA Editions
9. **Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LL, Valença MM, McCann SM** (2004) Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* 84: 169–208
10. **Ansai S, Hosokawa H, Maegawa S, Naruse K, Washio Y, Sato K, Kinoshita M** (2017) Deficiency of serotonin in raphe neurons and altered behavioral responses in tryptophan hydroxylase 2-knockout medaka (*Oryzias latipes*). *Zebrafish* 14: 495–507
11. **Aton SJ, Colwell CS, Harmar AJ, Waschek J, Herzog ED** (2005) Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci* 8: 476–483

12. **Bingaman EW, Baeckman LM, Yracheta JM, Handa RJ, Gray TS** (1994) Localization of androgen receptor within peptidergic neurons of the rat forebrain. *Brain Res Bull* 35: 379–382
13. **Black MP, Reavis RH, Grober MS** (2004) Socially induced sex change regulates forebrain isotocin in *Lythrypnus dalli*. *Neuroreport* 15: 185–189
14. **Blechman J, Levkowitz G** (2013) Alternative splicing of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor PAC1: mechanisms of fine tuning of brain activity. *Front Endocrinol* 4: 55
15. **Bloch GJ, Eckersell C, Mills R** (1991) Distribution of galanin-immunoreactive cells within sexually dimorphic components of the medial preoptic area of the male and female rat. *Brain Res* 620: 259–268
16. **Bloch GJ, Butler PC, Eckersell CB, Mills RH** (1998) Gonadal steroid-dependent GAL-IR cells within the medial preoptic nucleus (MPN) and the stimulatory effects of GAL within the MPN on sexual behaviors. *Ann N Y Acad Sci* 863: 188–205
17. **Bloch GJ, Butler PC, Kohlert JG, Bloch DA** (1993) Microinjection of galanin into the medial preoptic nucleus facilitates copulatory behavior in the male rat. *Physiol Behav* 54: 615–624
18. **Branchek TA, Smith KE, Gerald C, Walker MW** (2000) Galanin receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 21: 109–117
19. **Cádiz L, Román-Padilla J, Gozdowska M, Kulczykowska E, Martínez-Rodríguez G, Mancera JM, Martos-Sitcha JA** (2015) Cortisol modulates vasotocinergic and isotocinergic pathways in the gilthead sea bream. *J Exp Biol* 218: 316–325
20. **Cao Y, Wu R, Tai F, Zhang X, Yu P, An X, Qiao X, Hao P** (2014) Neonatal paternal deprivation impairs social recognition and alters levels of oxytocin and estrogen receptor  $\alpha$  mRNA expression in the MeA and NAcc, and serum oxytocin in mandarin voles. *Horm Behav* 65: 57–65
21. **Cardoso JC, de Vet EC, Louro B, Elgar G, Clark MS, Power DM** (2007) Persistence of duplicated PAC1 receptors in the teleost, *Sparus auratus*. *BMC Evol Biol* 7: 221
22. **Cardoso JC, Félix RC, Martins RS, Trindade M, Fonseca VG, Fuentes J, Power DM** (2015) PACAP system evolution and its role in melanophore function in teleost fish skin. *Mol Cell Endocrinol* 411: 130–145

23. **Cardoso JC, Power DM, Elgar G, Clark MS** (2004) Duplicated receptors for VIP and PACAP (VPAC1R and PAC1R) in a teleost fish, *Fugu rubripes*. *J Mol Endocrinol* 33: 411–428
24. **Carter CS** (2007) Sex differences in oxytocin and vasopressin: implications for autism spectrum disorders? *Behav Brain Res* 76: 170–186
25. **Cerdá-Reverter JM, Schiöth HB, Peter RE** (2003) The central melanocortin system regulates food intake in goldfish. *Regul Pept* 115: 101–113
26. **Chaillou E, Tramu G, Tillet Y** (1999) Distribution of galanin immunoreactivity in the sheep diencephalon. *J Chem Neuroanat* 17: 129–146
27. **Cheung CC, Hohmann JG, Clifton DK, Steiner RA** (2001) Distribution of galanin messenger RNA-expressing cells in murine brain and their regulation by leptin in regions of the hypothalamus. *Neuroscience* 103: 423–432
28. **Chou MY, Hung JC, Wu LC, Hwang SP, Hwang PP** (2011) Isotocin controls ion regulation through regulating ionocyte progenitor differentiation and proliferation. *Cell Mol Life Sci* 68: 2797–2809
29. **Chow BK, Yuen TT, Chan KW** (1997) Molecular evolution of vertebrate VIP receptors and functional characterization of a VIP receptor from goldfish *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* 105: 176–185
30. **Claessens F, Denayer S, Van Tilborgh N, Kerkhofs S, Helsen C, Haelens A** (2008) Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nucl Recept Signal* 6: e008
31. **Clément P, Peeters M, Bernabé J, Denys P, Alexandre L, Giuliano F** (2008) Brain oxytocin receptors mediate ejaculation elicited by 7-hydroxy-2-(di-N-propylamino) tetralin (7-OH-DPAT) in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 154: 1150–1159
32. **Coen CW, Montagnese C, Opacka-Juffry J** (1990) Coexistence of Gonadotrophin-Releasing Hormone and Galanin: Immunohisto-chemical and Functional Studies. *J Neuroendocrinol* 2: 107–111
33. **Cornbrooks EB, Parsons RL** (1991) Sexually dimorphic distribution of a galanin-like peptide in the central nervous system of the teleost fish *Poecilia latipinna*. *J Comp Neurol* 304: 639–657
34. **De Jonge FH, Louwerse AL, Ooms MP, Evers P, Endert E, van de Poll NE** (1989)

- Lesions of the SDN-POA inhibit sexual behavior of male Wistar rats. *Brain Res Bull* 23: 483–492
35. **Demski LS, Bauer DH, Gerald JW** (1975) Sperm release evoked by electrical stimulation of the fish brain: a functional-anatomical study. *J Exp Zool* 191: 215–232
  36. **Dumais KM, Veenema AH** (2015) Vasopressin and oxytocin receptor systems in the brain: Sex differences and sex-specific regulation of social behavior. *Front Neuroendocrinol* 40: 1–23
  37. **Faccidomo S, Quadros IM, Takahashi A, Fish EW, Miczek KA** (2012) Infralimbic and dorsal raphe microinjection of the 5-HT(1B) receptor agonist CP-93,129: attenuation of aggressive behavior in CFW male mice. *Psychopharmacology (Berl)* 222: 117–128
  38. **Filby AL, Paull GC, Hickmore TF, Tyler CR** (2010) Unravelling the neurophysiological basis of aggression in a fish model. *BMC Genomics* 11: 498
  39. **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
  40. **Forlano PM, Bass AH** (2011) Neural and hormonal mechanisms of reproductive-related arousal in fishes. *Horm Behav* 59: 616–629
  41. **Freudenberg F, Carreño Gutierrez H, Post AM, Reif A, Norton WH** (2016) Aggression in non-human vertebrates: Genetic mechanisms and molecular pathways. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 171: 603–640
  42. **Fujimoto S, Kawajiri M, Kitano J, Yamahira K** (2014) Female mate preference for longer fins in medaka. *Zoolog Sci* 31: 703–708
  43. **Gilligan P, Brenner S, Venkatesh B** (2003) Neurone-specific expression and regulation of the pufferfish isotocin and vasotocin genes in transgenic mice. *J Neuroendocrinol* 15: 1027–1036
  44. **Godwin J** (2010) Neuroendocrinology of sexual plasticity in teleost fishes. *Front Neuroendocrinol* 31: 203–216
  45. **Godwin JR, Thomas P** (1993) Sex change and steroid profiles in the protandrous anemonefish *Amphiprion melanopus* (Pomacentridae, Teleostei), *Gen Comp Endocrinol* 91: 144–157

46. **Godwin J, Thompson R** (2012) Nonapeptides and social behavior in fishes. *Horm Behav* 61: 230–238
47. **Goodson JL, Evans AK, Bass AH** (2003) Putative isotocin distributions in sonic fish: relation to vasotocin and vocal-acoustic circuitry. *J Comp Neurol* 462: 1–14
48. **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
49. **Gozes I, Werner H, Fawzi M, Abdelatty A, Shani Y, Fridkin M, Koch Y** (1989) Estrogen regulation of vasoactive intestinal peptide mRNA in rat hypothalamus. *J Mol Neurosci* 1: 55–61
50. **Grafer CM, Halvorson LM** (2013) Androgen receptor drives transcription of rat PACAP in gonadotrope cells. *Mol Endocrinol* 27: 1343–1356
51. **Gutkowaska J, Jankowski M, Antunes-Rodrigues J** (2014) The role of oxytocin in cardiovascular regulation. *Braz J Med Biol Res* 47: 206–214
52. **Ha CM, Kang JH, Choi EJ, Kim MS, Park JW, Kim Y, Choi WS, Chun SY, Kwon HB, Lee BJ** (2000) Progesterone increases mRNA levels of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and type I PACAP receptor (PAC(1)) in the rat hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res* 78: 59–68
53. **Haller J** (2018) The role of central and medial amygdala in normal and abnormal aggression: A review of classical approaches. *Neurosci Biobehav Rev* 85: 34–43
54. **Handa RJ, Kerr JE, DonCarlos LL, McGivern RF, Hejna G** (1996) Hormonal regulation of androgen receptor messenger RNA in the medial preoptic area of the male rat. *Brain Res Mol Brain Res* 39: 57–67
55. **Hasebe M, Kanda S, Shimada H, Akazome Y, Abe H, Oka Y** (2014) Kiss1 neurons drastically change their firing activity in accordance with the reproductive state: insights from a seasonal breeder. *Endocrinology* 155: 4868–4880
56. **Hashimoto H, Ogawa N, Hagihara N, Yamamoto K, Imanishi K, Nogi H, Nishino A, Fujita T, Matsuda T, Nagata S, Baba A** (1997) Vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor chimeras reveal domains that determine specificity of vasoactive intestinal polypeptide binding and activation. *Mol Pharmacol* 52: 128–135
57. **Hawkins MB, Thornton JW, Crews D, Skipper JK, Dotte A, Thomas P** (2000)

- Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10751–10756
58. **Herget U, Wolf A, Wullimann MF, Ryu S** (2014) Molecular neuroanatomy and chemoarchitecture of the neurosecretory preoptic-hypothalamic area in zebrafish larvae. *J Comp Neurol* 522: 1542–1564
  59. **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
  60. **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
  61. **Hiroi R, Lacagnina AF, Hinds LR, Carbone DG, Uht RM, Handa RJ** (2013) The androgen metabolite, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (3 $\beta$ -diol), activates the oxytocin promoter through an estrogen receptor- $\beta$  pathway. *Endocrinology* 154: 1802–1812
  62. **Hosono K, Yamashita J, Kikuchi Y, Hiraki-Kajiyama T, Okubo K** (2017) Three urocortins in medaka: identification and spatial expression in the central nervous system. *J Neuroendocrinol* 29
  63. **Hyodo S, Urano A** (1991) Changes in expression of provasotocin and proisotocin genes during adaptation to hyper- and hypo-osmotic environments in rainbow trout. *J Comp Physiol B* 161: 549–556
  64. **Ikeuchi T, Todo T, Kobayashi T, Nagahama Y** (1999) cDNA cloning of a novel androgen receptor subtype. *J Biol Chem* 274: 25205–25209
  65. **Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Takahashi K, Nagata S** (1992) Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron* 8: 811–819
  66. **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
  67. **Israel JM, Cabelguen JM, Le Masson G, Olier SH, Ciofi P** (2014) Neonatal testosterone suppresses a neuroendocrine pulse generator required for reproduction. *Nat Commun* 5: 3285
  68. **Jahan MR, Kokubu K, Islam MN, Matsuo C, Yanai A, Wroblewski G, Fujinaga R,**

- Shinoda K** (2015) Species differences in androgen receptor expression in the medial preoptic and anterior hypothalamic areas of adult male and female rodents. *Neuroscience* 284: 943–961
69. **Jiang Q, Ko WK, Lerner EA, Chan KM, Wong AO** (2008) Grass carp somatolactin: I. Evidence for PACAP induction of somatolactin-alpha and -beta gene expression via activation of pituitary PAC-I receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: 463–476
  70. **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
  71. **Kanda S, Akazome Y, Mitani Y, Okubo K, Oka Y** (2013) Neuroanatomical evidence that kisspeptin directly regulates isotocin and vasotocin neurons. *PLoS One* 8: e62776
  72. **Kaplan LM, Gabriel SM, Koenig JI, Sunday ME, Spindel ER, Martin JB, Chin WW** (1988) Galanin is an estrogen-inducible, secretory product of the rat anterior pituitary. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7408–7412
  73. **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
  74. **Kikuchi Y, Hosono K, Yamashita J, Kawabata Y, Okubo K** (2015) Glucocorticoid receptor exhibits sexually dimorphic expression in the medaka brain. *Gen Comp Endocrinol* 223: 47–53
  75. **Kiss A, Mikkelsen JD** (2005) Oxytocin-anatomy and functional assignment: a minireview. *Endocr Regul* 39: 97–105
  76. **Klein S, Jurkevich A, Grossmann R** (2006) Sexually dimorphic immunoreactivity of galanin and colocalization with arginine vasotocin in the chicken brain (*Gallus gallus domesticus*). *J Comp Neurol* 499: 828–839
  77. **Knobloch HS, Grinevich V** (2014) Evolution of oxytocin pathways in the brain of vertebrates. *Front Behav Neurosci* 8: 31
  78. **Kobayashi M, Nakanishi T** (1999) 11-ketotestosterone induces male-type sexual behavior and gonadotropin secretion in gynogenetic crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Gen Comp Endocrinol* 115: 178–187

79. **Koohi MK, Ivell R, Walther N** (2005) Transcriptional activation of the oxytocin promoter by oestrogens uses a novel non-classical mechanism of oestrogen receptor action. *J Neuroendocrinol* 17: 197–207
80. **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
81. **Kozak M** (1981) Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res* 9: 5233–5262
82. **Kozak M** (1984) Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 12: 857–872
83. **Kulczykowska E, Kalamarz-Kubiak H, Nietrzeba M, Gozdowska M** (2014) Brain nonapeptide and gonadal steroid responses to deprivation of heterosexual contact in the black molly. *Biol Open* 4: 69–78
84. **Kulick RS, Chaiseha Y, Kang SW, Rozenboim I, El Halawani ME** (2005) The relative importance of vasoactive intestinal peptide and peptide histidine isoleucine as physiological regulators of prolactin in the domestic turkey. *Gen Comp Endocrinol* 142: 267–273
85. **Kyle AL, Peter RE** (1982) Effects of forebrain lesions on spawning behaviour in the male goldfish. *Physiol Behav* 28: 1103–1109
86. **Lang R, Gundlach AL, Holmes FE, Hobson SA, Wynick D, Hökfelt T, Kofler B** (2015) Physiology, signaling, and pharmacology of galanin peptides and receptors: three decades of emerging diversity. *Pharmacol Rev* 67: 118–175
87. **Larm JA, Shen PJ, Gundlach AL** (2003) Differential galanin receptor-1 and galanin expression by 5-HT neurons in dorsal raphe nucleus of rat and mouse: evidence for species-dependent modulation of serotonin transmission. *Eur J Neurosci* 17: 481–493
88. **Lema SC, Nevitt GA** (2004) Exogenous vasotocin alters aggression during agonistic exchanges in male Amargosa River pupfish (*Cyprinodon nevadensis amargosae*). *Horm Behav* 46: 628–637
89. **Lorén I, Emson PC, Fahrenkrug J, Björklund A, Alumets J, Håkanson R, Sundler F** (1979) Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain. *Neuroscience* 4: 1953–1976



90. **Lutz EM, Sheward WJ, West KM, Morrow JA, Fink G, Harmar AJ** (1993) The VIP2 receptor: molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *FEBS Lett* 334: 3–8
91. **Lynn SE, Egar JM, Walker BG, Sperry TS, Ramenofsky M** (2007) Fish on Prozac: a simple, noninvasive physiology laboratory investigating the mechanisms of aggressive behavior in *Betta splendens*. *Adv Physiol Educ* 31: 358–363
92. **Maney DL, Erwin KL, Goode CT** (2005) Neuroendocrine correlates of behavioral polymorphism in white-throated sparrows. *Horm Behav* 48: 196–206
93. **Marlin BJ, Froemke RC** (2017) Oxytocin modulation of neural circuits for social behavior. *Dev Neurobiol* 77: 169–189
94. **Mathieson WB, Taylor SW, Marshall M, Neumann PE** (2000) Strain and sex differences in the morphology of the medial preoptic nucleus of mice. *J Comp Neurol* 428: 254–265
95. **Mathieu M, Ciarlo M, Trucco N, Griffero F, Damonte G, Salis A, Vallarino M** (2004) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the brain, spinal cord and sensory organs of the zebrafish, *Danio rerio*, during development. *Brain Res Dev Brain Res* 151: 169–185
96. **Mathieu M, Tagliafierro G, Angelini C, Vallarino M** (2001) Organization of vasoactive intestinal peptide-like immunoreactive system in the brain, olfactory organ and retina of the zebrafish, *Danio rerio*, during development. *Brain Res* 888: 235–247
97. **Mathieu M, Tagliafierro G, Angelini C, Vallarino M** (2002) Neuropeptide tyrosine-like immunoreactive system in the brain, olfactory organ and retina of the zebrafish, *Danio rerio*, during development. *Brain Res Dev Brain Res* 139: 255–265
98. **Matsuda K, Maruyama K, Nakamachi T, Miura T, Uchiyama M, Shioda S** (2005) Inhibitory effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) on food intake in the goldfish, *Carassius auratus*. *Peptides* 26: 1611–1616
99. **Matsuda K, Nejigaki Y, Satoh M, Shimauro C, Tanaka M, Kawamoto K, Uchiyama M, Kawauchi H, Shioda S, Takahashi A** (2008) Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on prolactin and somatolactin release from the goldfish pituitary in vitro. *Regul Pept* 145: 72–79

100. **McCarthy MM and Arnold AP** (2011) Reframing sexual differentiation of the brain. *Nat Neurosci* 14: 677–683
101. **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
102. **McHenry JA, Otis JM, Rossi MA, Robinson JE, Kosyk O, Miller NW, McElligott ZA, Budygin EA, Rubinow DR, Stuber GD** (2017) Hormonal gain control of a medial preoptic area social reward circuit. *Nat Neurosci* 20: 449–458
103. **Mensah ET, Blanco AM, Donini A, Unniappan S** (2017) Brain and intestinal expression of galanin-like peptide (GALP), galanin receptor R1 and galanin receptor R2, and GALP regulation of food intake in goldfish (*Carassius auratus*). *Neurosci Lett* 637: 126–135
104. **Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH** (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164: 567–574
105. **Miyata A, Jiang L, Dahl RD, Kitada C, Kubo K, Fujino M, Minamino N, Arimura A** (1990) Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun* 170: 643–648
106. **Montpetit CJ, Shahsavarani A, Perry SF** (2003) Localisation of VIP-binding sites exhibiting properties of VPAC receptors in chromaffin cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 206: 1917–1927
107. **Mounien L, Do Rego JC, Bizet P, Boutelet I, Gourcerol G, Fournier A, Brabet P, Costentin J, Vaudry H, Jégou S** (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits food intake in mice through activation of the hypothalamic melanocortin system. *Neuropsychopharmacology* 34: 424–435
108. **Munakata A, Kobayashi M** (2010) Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 165: 456–468
109. **Murakami T, Morita Y, Ito H** (1983) Extrinsic and intrinsic fiber connections of the telencephalon in a teleost, *Sebastiscus marmoratus*. *J Comp Neurol* 216: 115–131
110. **Nakamura M, Hourigan TF, Yamauchi K, Nagahama Y, Grau EG** (1989) Histological and ultrastructural evidence for the role of gonadal steroid hormones in sex change in the protogynous wrasse *Thalassoma duperrey*. *Env Biol Fishes* 24: 117–136

111. **Nakasone K, Nagahama Y, Okubo K** (2013) *hebp3*, a novel member of the heme-binding protein gene family, is expressed in the medaka meninges with higher abundance in females due to a direct stimulating action of ovarian estrogens. *Endocrinology* 154: 920–930
112. **Nemeth J, Tamas A, Jozsa R, Horvath JE, Jakab B, Lengvari I, Arimura A, Lubics A, Regládi D** (2006) Changes in PACAP levels in the central nervous system after ovariectomy and castration. *Ann N Y Acad Sci* 1070: 468–473
113. **Nomura M, Korach KS, Pfaff DW, Ogawa S** (2003) Estrogen receptor beta (ERbeta) protein levels in neurons depend on estrogen receptor alpha (ERalpha) gene expression and on its ligand in a brain region-specific manner. *Brain Res Mol Brain Res* 110: 7–14
114. **Nomura M, McKenna E, Korach KS, Pfaff DW, Ogawa S** (2002) Estrogen receptor-beta regulates transcript levels for oxytocin and arginine vasopressin in the hypothalamic paraventricular nucleus of male mice. *Brain Res Mol Brain Res* 109: 84–94
115. **Nugent BM, Wright CL, Shetty AC, Hodes GE, Lenz KM, Mahurkar A, Russo SJ, Devine SE, McCarthy MM** (2015) Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. *Nat Neurosci* 18: 690–697.
116. **O'Donnell D, Ahmad S, Wahlestedt C, Walker P** (1999) Expression of the novel galanin receptor subtype GALR2 in the adult rat CNS: distinct distribution from GALR1. *J Comp Neurol* 409: 469–481
117. **Okabe S, Kitano K, Nagasawa M, Mogi K, Kikusui T** (2013) Testosterone inhibits facilitating effects of parenting experience on parental behavior and the oxytocin neural system in mice. *Physiol Behav* 118: 159–164
118. **Okada R, Yamamoto K, Ito Y, Mochida H, Tonon MC, Fournier A, Leprince J, Vaudry H, Kikuyama S** (2007) VIP and PACAP stimulate TSH release from the bullfrog pituitary. *Peptides* 28: 1784–1789
119. **Okubo and Nagahama** (2008) Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. *Acta Physiol* 193: 3–15
120. **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
121. **Okuyama T, Yokoi S, Abe H, Isoe Y, Suehiro Y, Imada H, Tanaka M, Kawasaki T,**

- Yuba S, Taniguchi Y, Kamei Y, Okubo K, Shimada A, Naruse K, Takeda H, Oka Y, Kubo T, Takeuchi H** (2014) A neural mechanism underlying mating preferences for familiar individuals in medaka fish. *Science* 343: 91–94
122. **Oliverreau M, Oliverreau J** (1991) Galanin-like immunoreactivity is increased in the brain of estradiol- and methyltestosterone-treated eels. *Histochemistry* 96: 487–497
123. **Osuga Y, Mitsunashi N, Mizuno M** (1992) In vivo effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide 38 (PACAP 38) on the secretion of luteinizing hormone (LH) in male rats. *Endocrinol Jpn* 39: 153–156
124. **Ota Y, Ando H, Ban M, Ueda H, Urano** (1996) Sexually different expression of neurohypophysial hormone genes in the preoptic nucleus of pre-spawning chum salmon. *Zool Sci* 13: 593–601
125. **Park JJ, Baum MJ, Tobet SA** (1997) Sex difference and steroidal stimulation of galanin immunoreactivity in the ferret's dorsal preoptic area/anterior hypothalamus. *J Comp Neurol* 389: 277–288
126. **Perreault HA, Semsar K, Godwin J** (2003) Fluoxetine treatment decreases territorial aggression in a coral reef fish. *Physiol Behav* 79: 719–724
127. **Pinto P, Velez Z, Sousa C, Santos S, Andrade A, Alvarado MV, Felip A, Zanuy S, Canário AVM** (2017) Responsiveness of pituitary to galanin throughout the reproductive cycle of male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen Comp Endocrinol* 250: 152–161
128. **Pisegna JR, Wank SA** (1993) Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6345–6349
129. **Rao PD, Murthy CK, Cook H, Peter RE** (1996) Sexual dimorphism of galanin-like immunoreactivity in the brain and pituitary of goldfish, *Carassius auratus*. *J Chem Neuroanat* 10: 119–135
130. **Richard S, Zingg HH** (1990) The human oxytocin gene promoter is regulated by estrogens. *J Biol Chem* 265: 6098–6103
131. **Robinson SM, Fox TO, Sidman RL** (1985) A genetic variant in the morphology of the medial preoptic area in mice. *J Neurogenet* 2: 381–388
132. **Rodríguez MA, Anadón R, Rodríguez-Moldes I** (2003) Development of galanin-like

- immunoreactivity in the brain of the brown trout (*Salmo trutta fario*), with some observations on sexual dimorphism. *J Comp Neurol* 465: 263–285
133. **Rodríguez Díaz MA, Candal E, Santos-Durán GN, Adrio F, Rodríguez-Moldes I** (2011) Comparative analysis of Met-enkephalin, galanin and GABA immunoreactivity in the developing trout preoptic-hypophyseal system. *Gen Comp Endocrinol* 173: 148–158
  134. **Ross HE, Young LJ** (2009) Oxytocin and the neural mechanisms regulating social cognition and affiliative behavior. *Front Neuroendocrinol* 30: 534–547
  135. **Said and Mutt** (1970) Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science* 169: 1217–1218
  136. **Saito D, Komatsuda M, Urano A** (2004) Functional organization of preoptic vasotocin and isotocin neurons in the brain of rainbow trout: central and neurohypophysial projections of single neurons. *Neuroscience* 124: 973–984
  137. **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
  138. **Schumacher M, Balthazart J** (1986) Testosterone-induced brain aromatase is sexually dimorphic. *Brain Res* 370: 285–293
  139. **Semsar K, Kandel FL, Godwin J** (2001) Manipulations of the AVT system shift social status and related courtship and aggressive behavior in the bluehead wrasse. *Horm Behav* 40: 21–31
  140. **Servili A, Le Page Y, Leprince J, Caraty A, Escobar S, Parhar IS, Seong JY, Vaudry H, Kah O** (2011) Organization of two independent kisspeptin systems derived from evolutionary-ancient kiss genes in the brain of zebrafish. *Endocrinology* 152: 1527–1540
  141. **Sharma D, Handa RJ, Uht RM** (2012) The ER $\beta$  ligand 5 $\alpha$ -androstane, 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (3 $\beta$ -diol) regulates hypothalamic oxytocin (*Oxt*) gene expression. *Endocrinology* 153: 2353–2361
  142. **Sherwood NM, Krueckl SL, McRory JE** (2000) The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr Rev* 21: 619–670
  143. **Shughrue PJ, Dellovade TL, Merchenthaler I** (2002) Estrogen modulates oxytocin gene

- expression in regions of the rat supraoptic and paraventricular nuclei that contain estrogen receptor-beta. *Prog Brain Res* 139: 15–29
144. **Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW** (1990) Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 1990 294: 76–95
  145. **Simerly RB, Young BJ** (1991) Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus by sex steroid hormones. *Mol Endocrinol* 5: 424–432
  146. **Skoglösa Y, Takei N, Lindholm D** (1999) Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide mRNA in the developing rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 65: 1–13
  147. **Soyano K, Saito T, Nagae M, Yamauchi K** (1993) Effects of thyroid hormone on gonadotropin-induced steroid production in medaka, *Oryzias latipes*, ovarian follicles. *Fish Physiol Biochem* 11: 265–272
  148. **Schwarz JM, Nugent BM, McCarthy MM** (2010) Developmental and hormone-induced epigenetic changes to estrogen and progesterone receptor genes in brain are dynamic across the life span. *Endocrinology* 151: 4871–4881
  149. **Takahashi A, Nagayasu K, Nishitani N, Kaneko S, Koide T** (2014) Control of intermale aggression by medial prefrontal cortex activation in the mouse. *PLoS One* 9: e94657
  150. **Tanaka K, Osako Y, Yuri K** (2010) Juvenile social experience regulates central neuropeptides relevant to emotional and social behaviors. *Neuroscience* 166: 1036–1042
  151. **Tobet SA, Zahniser DJ, Baum MJ** (1986) Differentiation in male ferrets of a sexually dimorphic nucleus of the preoptic/anterior hypothalamic area requires prenatal estrogen. *Neuroendocrinology* 44: 299–308
  152. **Tsuneoka Y, Tokita K, Yoshihara C, Amano T, Esposito G, Huang AJ, Yu LM, Odaka Y, Shinozuka K, McHugh TJ, Kuroda KO** (2015) Distinct preoptic-BST nuclei dissociate paternal and infanticidal behavior in mice. *EMBO J* 34: 2652–2670
  153. **Tynan SH, Lundeen SG, Allan GF** (2004) Cell type-specific bidirectional regulation of the glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) gene by estrogen. *J Steroid Biochem Mol Biol* 91: 225–239
  154. **Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H** (2009) Pituitary adenylate cyclase-

- activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev* 61: 283–357
155. **Venkatesh B, Si-Hoe SL, Murphy D, Brenner S** (1997) Transgenic rats reveal functional conservation of regulatory controls between the Fugu isotocin and rat oxytocin genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12462–12466
  156. **Volkoff H, Canosa LF, Unniappan S, Cerdá-Reverter JM, Bernier NJ, Kelly SP, Peter RE** (2005) Neuropeptides and the control of food intake in fish. *Gen Comp Endocrinol* 142: 3–19
  157. **Wei YC, Wang SR, Jiao ZL, Zhang W, Lin JK, Li XY, Li SS, Zhang X, Xu XH** (2018) Medial preoptic area in mice is capable of mediating sexually dimorphic behaviors regardless of gender. *Nat Commun* 18: 9: 279
  158. **Weitekamp CA, Nguyen J, Hofmann HA** (2017) Neuromolecular Regulation of Aggression Differs by Social Role during Joint Territory Defense. *Integr Comp Biol* 57: 631–639
  159. **Westberry JM, Trout AL, Wilson ME** (2010) Epigenetic regulation of estrogen receptor  $\alpha$  gene expression in the mouse cortex during early postnatal development. *Endocrinology* 151: 731–740
  160. **Wong AO, Leung MY, Shea WL, Tse LY, Chang JP, Chow BK** (1998) Hypophysiotropic action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the goldfish: immunohistochemical demonstration of PACAP in the pituitary, PACAP stimulation of growth hormone release from pituitary cells, and molecular cloning of pituitary type I PACAP receptor. *Endocrinology* 139: 3465–3479
  161. **Wu Z, Autry AE, Bergan JF, Watabe-Uchida M, Dulac CG** (2014) Galanin neurons in the medial preoptic area govern parental behavior. *Nature* 509: 325–330
  162. **Xu M, Long L, Chen L, Qin J, Zhang L, Yu N, Li E** (2012) Cloning and differential expression pattern of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and the PACAP-specific receptor in darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 161: 41–53
  163. **Yamamoto K, Hashimoto H, Hagihara N, Nishino A, Fujita T, Matsuda T, Baba A** (1998) Cloning and characterization of the mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene. *Gene* 211: 63–69

164. **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: e12545
165. **Yon L, Alexandre D, Montéro M, Chartrel N, Jeandel L, Vallarino M, Conlon JM, Kikuyama S, Fournier A, Gracia-Navarro F, Roubos E, Chow B, Arimura A, Anouar Y, Vaudry H** (2001) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors in amphibians. *Microsc Res Tech* 54: 137–157
166. **Zempo B, Kanda S, Okubo K, Akazome Y, Oka Y** (2013) Anatomical distribution of sex steroid hormone receptors in the brain of female medaka. *J Comp Neurol* 1: 1760–1780
167. **Zhou L, Blaustein JD, De Vries GJ** (1994) Distribution of androgen receptor immunoreactivity in vasopressin- and oxytocin-immunoreactive neurons in the male rat brain. *Endocrinology* 134: 2622–2627
168. 岩松鷹司 (2006) 新版メダカ学全書. 大学教育出版, 岡山市.
169. 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
170. 外川理絵 (2014) 脳内で発現に性差を示す遺伝子のノックアウトメダカの作出と表現型解析. 修士論文
171. 仲宗根潔 (2013) メダカの脳内でメスに偏った発現を示す遺伝子群の制御機構. 修士論文
172. 梶山(平木)十和子 (2014) 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
173. 榎 (2016) メダカにおける脳型アロマターゼの生理的役割. 修士論文
174. 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