

論文の内容の要旨

Genetic studies on the role of vasotocin and isotocin in social motivation of medaka fish

(メダカの社会性動機付けにおけるバソトシンとイソトシンの機能に関する
遺伝学的研究)

横井佐織

序論

集団で生活する多くの動物は、他者との関係に基づいてその社会性行動を変化させる。例えば、一般にオスは相手がメス(異性)であれば求愛行動、オス(同性)であれば敵対(攻撃)行動を示す。さらに、同種他個体を記憶・識別する能力をもつ動物は、個体間の親密度やヒエラルキーによっても行動を変化させる。このような、様々な社会関係に基づいて示される社会性行動は、動物が社会性進化の過程で自らの適応度を上昇させるために獲得したと考えられる。

これまでに、求愛行動や攻撃行動といった単純な二者関係(同性・異性関係)に関する分子基盤の研究例は数多くあり、バソプレシンやオキシトシン等の神経ペプチドの関与が報告されている(Young *et al.*, 2003)。しかし、既存のモデル生物では、三者が関係する行動や親密度依存の行動変化といった複雑な社会性行動はほとんど観察されないため、その分子基盤の解明は進んでいない。私はこの問題に取り組むため、高度な社会生活を営むメダカに着目し、3匹(オス、オス、メス)のメダカを同一水槽に入れると、1匹のオス(♂1)が、ライバルオス(♂2)とメスとの接近を防ぐよう、2匹の間の位置を維持する、「割り込み行動」を示すことを発見した(図1)。さらにこの「割り込み行動」がメダカにおける「配偶者防衛行動(ライバルオスからメスを守る行動)」であることを発見した。そしてこの観察を元に、実験室で当該行動の再現性よいアッセイ系を確立することで、配偶者防衛行動(三者関係)の遺伝学的解析を初めて可能とした。また、当該行動に異常を示す変異体候補としてバソトシン(バソプレシンの魚類ホモログ)に着目し、その行動を解析した。さらに、イソトシン(オキシトシンの魚類ホモログ)変異体が、配偶者防衛行動を含む様々な社会性行動において、相手との親密度(同一水槽で飼育したか否か)依存に異常を示すことを発見した。

結果

まず、メダカの割り込み行動の観察結果を元に、オスの中心角度が90度以上となり、割り込み状態にある頻度を「割り込み頻度」と定義し(図1)、各グループで比較することで、当該行動定量アッセイ系を確立した。また、このアッセイ系と、父親検定テストとを組み合わせることで、割り込み行動において優位な傾向にあるオスは、自らの子孫を残す上でも優位である傾向が示された。この結果は、割り込み行動が「他のオスとメスとの配偶行動を防ぐ」という配偶者防衛行動の定義に合致することを示しており、割り込み行動はメダカにおける配偶者防衛行動であると考えられた(以下、割り込み行動を配偶者防衛行動と表記する)。

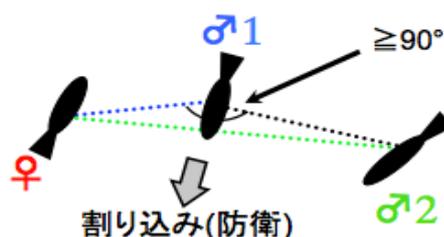


図1 割り込み行動(配偶者防衛行動)概要

オスの中心角度が90度以上である頻度を算出することで行動を定量。

次に、当該行動にどのような分子が関与するかを明らかにすべく、神経ペプチドである、バソトシンに着目した。バソトシンを含むバソプレシンファミリーが、求愛や攻撃行動に関与することは様々な動物種で報告されていた(Goodson *et al.*, 2001)が、配偶者防衛行動への関与は検証されていなかった。そこで私は TILLING法を用いて、メダカのバソトシン、及び2種類のバソトシン受容体 (V1a1、V1a2) の一塩基変異体を作成し、これら変異体における配偶者防衛行動を定量した。その結果、V1a2受容体ホモ変異体オスは配偶者防衛行動を示さなかった。よって、V1a2受容体は配偶者防衛行動の誘起に必要であると考えられた。また、これら変異体において、同腹のホモ変異体オスとヘテロ変異体オスを用いて、どちらが配偶者防衛行動においてより優位か、割り込み頻度を比較したところ、バソトシンとV1a2受容体ホモ変異体オスは、ヘテロ変異体オスと比較して劣位となる傾向が得られた。このことから、メダカでは、バソトシンがV1a2受容体を介して配偶者防衛行動を促進していることが示唆された。

次に、先行研究と同様、メダカにおいても、バソトシン及び V1a2 受容体ホモ変異体オスにおいて、異性や同性に対する行動の動機付けに異常が生じているかを検定するために、メスへの求愛行動とオスへの攻撃行動を検定した。その結果、バソトシン、V1a2受容体ホモ変異体オス共に、メスへの求愛頻度が低かった(表1)。よってこれらのホモ変異体オスではメスに対する性的動機付けが低下しており、この異常が配偶者防衛行動における劣位性の原因となった可能性がある。その一方で、V1a2受容体ヘテロ変異体オスは先述のように、配偶者防衛行動は正常に示したが、オスへの攻撃性が有意に低下していた(表1)。このことは、同性間(オス2匹)における攻撃行動と、三者(メス1匹とオス2匹)関係における配偶者防衛行動は異なる分子機構を介していることを示唆している。

金魚等の他魚類ではイソトシンがバソトシンと協調的に働くことが示唆されている(Thompson *et al.*, 2004)。そこで、次にメダカの配偶者防衛行動におけるイソトシンの

関与を検討した。TILLING法を用いてイソトシンの一塩基変異体、TALEN法を用いてイソトシン受容体(ITR1)のノックアウト個体を作成し、配偶者防衛行動を検定した結果、両変異体オスともに配偶者防衛行動を示すことが明らかになった。そこで、次にこれら変異体オスの配偶者防衛行動における優劣を検定した。その結果、イソトシン、イソトシン受容体ITR1ホモ変異体オスともに、配偶者防衛行動で優位となる傾向があった。従って、イソトシンはその受容体ITR1を介して配偶者防衛行動を抑制している可能性が考えられた。

さらに、バソトシン変異体オスを用いた解析と同様に、イソトシン変異体オスの求愛・攻撃行動を定量した結果、イソトシンホモ変異体オスと野生型オスとの間で有意差は検出されなかった(表1)。従って、イソトシン変異体オスで生じた配偶者防衛行動異常は、異性(メス)に対する性的動機付けや同性(オス)に対する攻撃性における社会性行動の動機付け亢進ではなく、三者関係に特有な動機付けに異常が生じることに起因すると考えられた(表1)。

社会行動 変異体	配偶者 防衛	求愛	攻撃	考察
バソトシン	×	×	○	メスに対する性的動機付け低下 →配偶者防衛低下
V1a2ホモ	×	×	×	
V1a2ヘテロ	○	○	×	オスに対する攻撃性低下 →配偶者防衛に影響無し
イソトシン	◎	○	○	イソトシンシステムは 三者関係固有の動機付けを制御
ITR1	◎	○	-	

表1 各変異体オスにおける、配偶者防衛、求愛、攻撃行動

また、哺乳類ではオキシトシン(イソトシンの哺乳類ホモログ)が親密性に関わるとの報告があるが(Ferguson et al., 2000)、上記の実験では全て親密度の高い(同じ水槽で生育した)個体を用いて行動アッセイを行っていた。そこで私は、先ず親密度がメダカの配偶者防衛行動に影響するかを調べ、さらにイソトシン変異が親密度依存の配偶者防衛行動に影響を及ぼすかを検証した。その結果、野生型オスは親密度の低い(別の水槽で生育した)メスに対しても配偶者防衛行動を示したのに対し、イソトシンとその受容体ITR1のホモ変異体オスは、親密度の低いメスに対しては配偶者防衛行動を示さなかった。また、これらのホモ変異体オスでは、親密度の低いメスに対する求愛行動と、親密度の低いオスに対する攻撃行動の頻度も、親密度の高い個体に対する行動の頻度と比較して有意に低かった。しかしながら、ホモ変異体オスにおけるこれらの行動異常は、親密度の低い個体と同じ水槽で飼育(親密化)することで回復した。よって、両変異体オスにおける親密度は、成魚における経験依存に変化し、刷り込みのように不可逆的ではないと考えられた。さらに、野生型メスは親密度の低いオスの求愛を拒絶する傾向をもつが、これらの遺伝子のホモ変異体メスは親密度の低いオスの求愛をほとんど拒絶しなかった。以上の結果から、メダカではイソトシンとその受容体は、オスの配偶者防衛行動、求愛、攻撃行動、メスの求愛受け入れにおいて、性差に関わらずに親密度の低い個体に対する社会性行動を促進していると考えられた(表2)。

社会行動 (行動主体)	野生型		イソトシン 変異体	
	高	低	高	低
配偶者防衛(オス)	○	○	○	×
求愛(オス)	○	○	○	×
攻撃(オス)	○	○	○	×
オスの拒絶(メス)	-	○	-	×

表 2 イソトシン変異体の親密度依存行動変化

まとめと考察

本研究ではまず、実験室で再現可能な配偶者防衛行動アッセイ系を世界で初めて確立し、モデル動物であるメダカを用いることで、配偶者防衛行動の分子基盤解析を初めて可能とした。具体的には、バソトシンは同性（オス）間の攻撃行動の誘起には必要ではないが、メスの存在によって誘起される配偶者防衛行動（＝オス、オス、メスによる三者関係）の誘起には必要であることを示した。これまで配偶者防衛行動は、オス間での攻撃行動の一環ととらえられてきたが、本研究により、オス間での攻撃動機付けと、配偶者防衛行動の動機付けは異なる分子・神経機構を介して生じることが示唆された。

一方、イソトシン関連遺伝子変異体オスは親密度の高いメスに対して過剰な配偶者防衛行動を示す一方で、親密度の低い個体（オス、メス）に対する社会性行動の動機付けが低いことが分かった。マウスのオキシトシン（イソトシンホモログ）変異体オスは親密度依存の社会性行動に異常を生じるが、これはこの変異体が親密な個体を記憶できないためと解釈されてきた。しかし、メダカのイソトシンとその受容体遺伝子の変異体は少なくとも親密度の高い個体と低い個体を区別できたことから、メダカでは両者は、親密な個体の記憶ではなく、社会性行動の動機付けに働くと考えられた。これは親密度に基づく社会性行動の動機付けの分子基盤を解析した初めての例である。特に、親密な個体の認識と、その後の社会性行動の動機付けの過程が区別されたことは、行動選択の分子基盤を理解する上で重要な知見である。今後、メダカの研究で解明された分子・神経機構が哺乳類でも保存されているか検討することで、哺乳類のバソプレシン・オキシトシンファミリーの新規機能や、魚類からヒトまで、脊椎動物に広く保存された社会行動の動機付けの機構の解明に繋がることを期待している。