

メダカの脳におけるメス特異的性ステロイド受容  
ニューロンの構造・機能解析

梶山(平木) 十和子

東京大学 大学院農学生命科学研究科  
水圏生物学専攻 水族生理学研究室

2014年12月

# 目次

目次 .....	1
序論 .....	2
第1章 メス特異的性ステロイド受容ニューロンの発見	
緒言 .....	5
材料と方法 .....	6
結果 .....	8
考察 .....	9
図表 .....	14
第2章 メス特異的性ステロイド受容ニューロンにおける <i>npb</i> の発現・機能解析	
緒言 .....	23
材料と方法 .....	24
結果 .....	33
考察 .....	37
図表 .....	43
第3章 メス特異的性ステロイド受容ニューロンにおける <i>npc</i> の発現と <i>npb/npc</i> シグナルの機能解析	
緒言 .....	64
材料と方法 .....	65
結果 .....	67
考察 .....	68
図表 .....	72
総合考察 .....	83
要旨 .....	89
謝辞 .....	93
引用文献 .....	94

## 序論

脊椎動物には様々な雌雄の違い、性差が存在する。中でも、メス特異的な性周期を生み出す内分泌のパターンや性行動、攻撃行動などの行動パターンには、生殖器官の構造や機能と並んで特に明瞭な性差がみられる。こうした性特異的な内分泌パターンや行動パターンがなぜ生じるのかについては、古くから関心が寄せられ、多くの研究がなされてきた。内分泌のパターン、性行動のパターンのいずれについても 1960 年代までに、ラットやモルモットにおいて出生前後の一定の期間にアンドロゲンを投与されたメスではオス型のパターンを示すことが報告され(Phoenix *et al.*, 1959; Barraclough, 1961)、性ステロイドが脳をオス型、メス型に分化させることによって内分泌や行動の性差が生じるという考え方が提示された。この現象はその後詳細に研究され、以下のような哺乳類の脳の性分化のメカニズムが明らかになっていった。オスでは出生前後に精巣からアンドロゲンが一過性に大量に分泌されるアンドロゲンシャワーとよばれる現象が起こる。ラットやマウスにおいては、このアンドロゲンは脳内で芳香化酵素(アロマターゼ)によりエストロゲンに転換され、このエストロゲンの作用により脳はオス型となる。このようなイベントがないと、脳はメス型になる(McCarthy and Arnold, 2011; McCarthy *et al.*, 2012)。こうして作られる脳の性差の実体が解明され始めたのは 1970 年代のことであり、ラットの脳において、シナプスの数やニューロンの数に性差があることが報告された(Raisman and Field, 1973; Gorski *et al.*, 1978)。その後、脳の形態学的性差は主にマウス、ラットにおいて次々と報告され、大脳(終脳)(皮質、扁桃核、海馬、中隔、分界条床核)や間脳(視索前野、視床下部、視交叉上核、室傍核、視索上核、視床下部腹内側核)、中脳(青斑核、中脳中心灰白質)、延髄(縫線核)など脳内の多くの領域に性差があることが明らかになっている(山内と新井, 2006)。これらの性差の多くは出生前後に性ステロイドのはたらきにより起こることが知られていたが、その分子メカニズムについて明らかになってきたのは比較的近年のことである。そのメカニズムの一つは細胞死(アポトーシス)であり、出生前後に性ステロイドの作用により雌雄どちらかで多く細胞死が起こることにより性差が起こることが明らかになってきた(Davis *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 2000)。メカニズムのもう一つは、エピジェネティックな修飾である。これについては部分的にしか明らかになっていないが、オスの脳とメスの脳ではヒストン修飾や、DNA のメチル化の度合いに差があることがわかってきている(Tsai *et al.*, 2009; Westberry *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2014)。細胞死やエピジェネティックな修飾を経ることからわかるように、哺乳類において発見された脳の性差の多くは不可逆であり、生涯にわたって脳の性を固定し続けると考えられている。

魚類においても、行動や内分泌のパターンに性差がみられることから、脳に性差が存在すると考えられる。一方で、魚類の中には自然条件下でも性転換を行う種が多く知られている (Godwin, 2010)。自発的には性転換しない種であっても、人為的にホルモン環境を改変することによって性転換を引き起こせることが、メダカ (*Oryzias latipes*) およびナイルティラピア (*Oreochromis niloticus*) において示されている (Paul-Prasanth *et al.*, 2013)。また、ホルモン投与により容易に異性の性行動や、内分泌パターンを引き起こせることが、キングョ (*Carassius auratus*) など複数の魚種において明らかになっている (Munakata and Kobayashi, 2010; Gonçalves *et al.*, 2014)。このため、魚類の脳の性差は、哺乳類で明らかにされてきた脳の性差とは大きく異なる、可逆性に富んだメカニズムによって形成、維持されていると考えられる。このようにユニークな特徴をもつ魚類の脳の性分化のメカニズムを研究することは、脊椎動物における脳の性分化と性的可逆性の基本原理と多様性について重要な知見をもたらすと考えられる。しかし、魚類の脳がどのようなメカニズムで性分化するのかは全く明らかになっておらず、脳にどのような性差があるのかですら、断片的な情報しかない。本研究は、魚類の脳にどのような性差があるのか、その性差がどのようにしてもたらされるのか、そして、どのような形質の性差をもたらしているのかを明らかにすることを目的として行った。

魚類の性分化と性差を研究するうえで、メダカは多くの利点をもつ。たとえば、メダカは、魚類の中で性決定遺伝子が明らかになっている数少ない種の一つである (Matsuda *et al.*, 2002; Nanda *et al.*, 2002)。さらに、メダカの表現型の性はホルモン投与によって簡単に操作することができる (Yamamoto, 1958)。また、遺伝子改変や遺伝子破壊などの遺伝学的手法を適用することが可能である。そこで本研究では、メダカをモデル魚として用いて研究を進めることとした。まず第 1 章では脳の性分化の起点として、メダカの脳内の性ステロイド受容体 (エストロゲン受容体 (estrogen receptor; ER)、アンドロゲン受容体 (androgen receptor; AR)) の発現部位を詳細に調べ、雌雄で比較した。その結果、ER と AR の両方がほぼメスのみでしか発現していない神経核が見出された。終脳の Vs/Vp (the supracommissural/posterior nuclei of the ventral telencephalic area) と視索前野の PMm/PMg (the magnocellular/gigantocellular portions of the magnocellular preoptic nucleus) である。性ステロイド受容体は核内受容体であり、遺伝子の発現調節を行うため、これらの神経核では、メスのみで性ステロイドによる何らかの遺伝子の発現調節が起こり、メス特異的な形質の発現に寄与していると考えられる。そこで第 2 章ではメス特異的な性ステロイド受容体によってメスのみで発現調節されている標的遺伝子を探索し、*npb* という神経ペプチド遺伝子がメス特異的な性ステロイド受容ニューロンでメスのみで発現していることを見出した。また、*npb* ニュ

ーロンの形態学的性差、軸索の投射パターン、作用部位、電気生理学的特性を解析することで、このニューロンの機能に迫った。さらに、*npb* 遺伝子をノックアウトしたメダカを作出し、その表現型を解析した。第 3 章では、*npb* の新規パラログ遺伝子として先行研究で発見された遺伝子 *npc* の発現を解析し、メス特異的性ステロイド受容ニューロンにおいて、*npb* と *npc* が共発現していることを明らかにした。そのうえで、*npb* と *npc* のダブルノックアウトメダカおよび *npb*、*npc* の受容体のノックアウトメダカを作出し、表現型解析を行った。

# 第 1 章 メス特異的性ステロイド受容ニューロンの発見

## 1-1. 緒言

性ステロイド(エストロゲン、アンドロゲン)は、脊椎動物の脳の性分化において中心的な役割を果たす(McCarthy and Arnold, 2011)。哺乳類においては、脳の性分化は出生前後およびその後の一定の期間に生殖腺から分泌される性ステロイドによって引き起こされる。その際の性ステロイドのはたらきは、結果が終生継続することから、organizational effect とよばれる(McCarthy and Arnold, 2011; Juraska *et al.*, 2013)。また、性ステロイドは性成熟時にも生殖腺から多く分泌され、脳にはたらきかける。そして、生殖内分泌周期の調節、性行動や攻撃行動の昂進などの幅広い作用により、個体の生殖活動に寄与する。こうした成熟後の一過性のはたらきは性ステロイドの activational effect とよばれる(McCarthy and Arnold, 2011)。魚類において性ステロイドの organizational effect が存在するかどうかは不明だが、成熟個体への性ステロイドの投与や生殖腺の除去により行動に変化が起こることから(Munakata and Kobayashi, 2010; Gonçalves *et al.*, 2014)、activational effect は存在すると考えられる。

organizational effect と activational effect、いずれのはたらきも脳内でその起点となるのは、性ステロイド受容体(ER、AR)を発現するニューロンである。性ステロイドの作用の仕方はオスとメスで大きく異なることから、脳内の ER、AR の発現には性差があることが想定される。実際に、様々な脊椎動物において、脳内の ER、AR の発現に性差があることが示されている(Scott *et al.*, 2000; Shah *et al.*, 2004; Voigt *et al.*, 2009)。しかし、魚類においては、これまでに脳内の ER、AR の発現部位を示した研究は複数あるが(Forlano *et al.*, 2005; Forlano *et al.*, 2010; Zempo *et al.*, 2013)、性差について詳細に解析した研究はなかった。そこで本章では、魚類の脳内の ER、AR の発現に性差があるのか、あるとすれば、その性差は非可逆的なものなのかを解析することとした。

メダカを含む魚類は 3 種類の ER(*esr1* (ER $\alpha$ ともよばれる)、*esr2a* (ER $\beta$ 1ともよばれる)、*esr2b* (ER $\beta$ 2ともよばれる))と 2 種類の AR(*ara* (AR $\alpha$ ともよばれる)、*arb* (AR $\beta$ ともよばれる))をもつ(Ikeuchi *et al.*, 1999; Hawkins *et al.*, 2000)。本章ではまず、これらの全ての ER、AR の発現を雌雄で比較し、ほぼメスのみで ER、AR を発現するメス特異的な性ステロイド受容ニューロンを見出した。また、これらのメス特異的な ER、AR の発現は、性ステロイドの一過性で可逆的な作用によってもたらされ、成熟後であっても体内の性ステロイド環境をオス型

にすることによりオス同様にほぼみられなくなることが明らかになり、魚類の脳の多大な性的可逆性に寄与していることが示唆された。

## 1-2. 材料と方法

### 1-2-1. 実験魚

d-rR 系統のメダカを、水温 28°C、14 時間明期/10 時間暗期の条件下で飼育し、ブラインシュリンプ幼生および市販のペレット飼料(おとひめ; 日清丸紅飼料、Tokyo、Japan)を一日 3-4 回与えた。実験には 3-5 ヶ月齢の性成熟した個体を用い、サンプリングは明期開始後 1-3 時間の間に行った。

### 1-2-2. ER および AR のメダカ脳内における発現部位の特定と性差の定量

表 1-1 のプライマーを用いた PCR により、*esr1*、*esr2a*、*esr2b*、*ara*、および *arb* の cDNA 断片を得た。cDNA 断片を pGEM-Teasy ベクター (Promega, Madison, WI, USA) にライゲーションした後、トランスフォーメーション、精製を行い、プラスミドを Spe I 処理により直鎖化した。その後、これらの直鎖化したプラスミドをテンプレートとし、T7 RNA ポリメラーゼ (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)、Digoxigenin RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics) を用いて digoxigenin (DIG) 標識の cRNA プローブを合成した。

性成熟した雌雄のメダカ(各  $n = 4$ )の脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒド (PFA) /phosphate buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 溶液中で、4°C で 6-7 時間固定した。エタノールによる脱水後、パラフィンに包埋したサンプルを 4°C で保管した。マイクローム (RM2255; Leica microsystems、Wetzlar、Germany) を用いてスライドガラス (MAS-GP type A; Matsunami、Osaka、Japan) 上に、厚さ 10 μm の連続切片を作製した。

切片を脱パラフィンし、プロテイナーゼ K (ProK; Wako、Osaka、Japan) /PBS で 37°C、15 分間処理した後、4% PFA/PBS 溶液で 10 分間の再固定を行った。続いて、アセチル化バッファー (0.1 M triethanolamine、0.02 M 塩酸、0.023 M 無水酢酸) 中で 20 分間アセチル化を行った。PBS (5 分、2 回)、5x saline-sodium citrate (SSC; 0.25 M NaCl、0.015 M C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>·2H<sub>2</sub>O) /50%ホルムアミド (10 分) による洗浄の後、ハイブリダイゼーションバッファー (50%ホルムアミド、5x SSC、5x Denhardt's solution (Wako)、2 μg/ml yeast RNA (Roche Diagnostics)、30 μg/ml Calf Thymus DNA (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA)

中で、55°C、2 時間のプレハイブリダイゼーションを行った。続いて、ハイブリダイゼーションバッファー中に 0.3 µg/ml の各 DIG ラベルプローブを加え、55°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。5x SSC/50%ホルムアミド(55°C、20 分)、および 2x SSC(55°C、20 分、2 回)で洗浄した切片を、1.5% Blocking Reagent (Roche Diagnostics)/tris buffered saline (TBS; 150 mM NaCl, 100 mM Tris) 中において室温で 1 時間インキュベートし、同溶液で 2000 倍希釈したアルカリホスファターゼ (AP) 標識ヒツジ抗 DIG 抗体 (Roche Diagnostics) で 4°C で一晩反応させた。サンプルを TBS (20 分、2 回) およびアルカリホスファターゼ緩衝液 (AP バッファー; 0.1 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl (pH 9.5), 0.05 M MgCl<sub>2</sub>) で洗浄した後、AP バッファーに溶解した nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) (Roche Diagnostic) を用いて、遮光条件下で一晩発色させた。その後、サンプルを PBS で 5 分洗浄し、4% PFA により 20 分間後固定処理を行い、再び PBS (5 分) および純水 (5 分) で洗浄した後グリセロールを用いて封入した。

試料標本の観察および撮影は、正立顕微鏡 (BX50; Olympus, Tokyo, Japan) とデジタルカメラ (DXM 1200C; Nikon, Tokyo, Japan)、ソフトウェア (ACT-1C; Nikon) を用いて行った。撮影した画像を Photoshop CS5 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) でモノクロ2階調化し、ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いてシグナルの面積を測定した。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/)) をもとに行なった。

### 1-2-2. ER、AR の発現に対する性ステロイドの影響の解析

性成熟したメスのメダカを MS-222 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) を用いて麻酔し、剃刀とピンセットを用いて開腹し卵巣の摘出の後縫合 (卵巣除去)、あるいは開腹の後縫合のみ (偽手術) を行った。縫合には手術用糸 (夏目製作所, Tokyo, Japan) を用いた。生理食塩水中で 2 日間回復させた後、卵巣を摘出した個体には 100 ng/ml のエストラジオール-17β (E<sub>2</sub>) または 100 ng/ml の 11-ケトテストステロン (11-KT) または溶媒 (エタノール)、擬手術をした個体には溶媒を 5 日間投与した (各群 n = 8)。1-2-1 と同様の *in situ* hybridization 法および定量法を用いて、ER、AR の発現の変動を定量した。

### 1-2-3. 統計処理

統計的な解析には、PRISM (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用した。2 つのグループ間での比較には対応のない両側 Student's *t*-test を用いた。F-test により、分散

がグループ間で異なることが示された場合には、Welch 補正による対応のない両側 Student's *t*-test を用いた。3 つ以上のグループ間で比較を行う場合は、まず Bartlett's test あるいは Brown-Forsythe test によってグループ間の分散の均一性を検証した。分散が均一であった場合は、一元配置分散分析 (one-way analysis of variance (ANOVA)) の後、全てのグループ間で比較を行う場合は Tukey's post hoc test、選択した一部のグループ間で比較を行う場合は Bonferroni's post hoc test を用いて有意差を検定した。一方、分散が均一でなかった場合はデータを標準化するために対数変換した後に、前述の解析を行った。対数変換後にも分散が均一にならなかった場合は、ノンパラメトリックな Kruskal-Wallis test の後、Dunn's post hoc test を用いて有意差を検定した。

### 1-3. 結果

#### 1-3-1. ER、AR の発現部位と発現の性差

性成熟したメダカの脳内における ER (*esr1*, *esr2a*, *esr2b*)、AR (*ara*, *arb*) の発現を *in situ* hybridization により解析した結果、ER (図 1-1)、AR (図 1-2) ともにその発現に性差を示した。メダカの脳内の各神経核の名称と略称は、表 1-2 に記した。2 つ以上の神経核に連続的な発現がみられ、境界を設定することが困難な場合は、合計の発現量を算出し、含まれる神経核名をスラッシュで区切り表記した。

*esr1* は、終脳 (Vp)、視索前野 (PMp, PMm/PMg)、視床下部 (NVT, NPT) で発現していた (図 1-1)。このうち、PMm/PMg における *esr1* の発現はメスでは多く見られたが、オスではほとんど見られず、ほぼメス特異的であった。その他の神経核における *esr1* の発現には性差は見られなかった。

*esr2a* は、終脳 (Vv, Vd/Vs/Vp)、視索前野 (PMp, PPa, pPPp)、視床下部 (NVT/NRP) で発現していた (図 1-1)。このうち、視索前野と視床下部における全ての神経核において、*esr2a* はメスよりもオスで有意に高い発現を示した。

*esr2b* は、終脳 (Vs/Vp)、視索前野 (PMp, PPa, PMm/PMg, pPPp)、視床 (VM)、視床下部 (NAT, NVT, NPT)、中脳被蓋 (IQ/RT) で発現していた (図 1-1)。このうち、Vs/Vp、PMm/PMg、pPPp における *esr2b* の発現はほぼメス特異的であった。

*ara* は、終脳 (Vv, Vs/Vp)、視索前野 (PMp, PPa, aPPp, pPPp)、視床下部 (NVT, NPT)、視蓋 (PGZ3) で発現していた (図 1-2)。NPT における *ara* の発現は、メスよりもオスにおいて有意に高かった。

*arb* は、終脳(Vs/Vp)、視索前野(PMp、PPa、PMm/PMg、pPPP)、視床(VM)、視床下部(NAT、NVT、NPT)、視蓋(PGZ3)で発現していた(図 1-2)。このうち、pPPP、NVT、PGZ3 以外の全ての神経核で *arb* はメスにおいてオスよりも有意に多く発現していた。とりわけ、Vs/Vp、PMm/PMg、NPT においては、*arb* の発現はほぼメスのみでみられた。

メダカの脳における ER、AR 発現の性差の分布を図 1-3 にまとめて記した。ER、AR の発現がみられた神経核のうち、Vs/Vp と PMm/PMg において、ER、AR の全てのアイソフォームがほぼメスのみで発現するという、最も顕著な性差がみられた。

### 1-3-2. ER、AR の発現に対する性ステロイドの影響の解析

続いて、これらの ER、AR の発現の性差に対する性ステロイドの影響を、*in situ* hybridization により神経核別に定量した。メスで多く ER を発現する神経核についての結果は図 1-4 に、メスで多く AR を発現する神経核についての結果は図 1-5 に、オスで多く ER を発現する神経核についての結果は図 1-6 に、オスで多く AR を発現する神経核についての結果は図 1-7 にまとめて記した。

卵巣を除去することで、PMm/PMg における *esr1* の発現、Vs/Vp、PMm/PMg における *esr2b* の発現は有意に減少した。これらの発現は、E<sub>2</sub> の投与により回復した。また、Vs/Vp、PMm/PMg、pPPP における *esr2b* の発現は、卵巣除去個体に 11-KT を投与することにより有意に減少した(図 1-4)。

Vs/Vp、PMp、PPa、NAT、NPT における *arb* の発現は、卵巣除去により大きく減少し、E<sub>2</sub> 投与によって回復した。Vs/Vp においてはさらに、*arb* の発現は 11-KT 投与により減少した(図 1-5)。

PPa、pPPP、NVT/NRP における *esr2a* の発現は卵巣除去、E<sub>2</sub> 投与、11-KT 投与のいずれによってもはっきりとした変化を示さなかった。PMp においては、*esr2a* の発現は卵巣除去によって有意に増加した。PPa において *esr2a* は卵巣除去による増加、11-KT 投与による増加の傾向を示したが、その差は有意ではなかった(図 1-6)。

NPT における *ara* の発現は E<sub>2</sub> 投与によって有意に増加した(図 1-7)。

## 1-4. 考察

魚類の脳内における ER、AR の分布についてはこれまでに複数の研究がなされているが(Forlano *et al.*, 2005; Forlano *et al.*, 2010; Zempo *et al.*, 2013)、その性差については脳全

体の AR の発現量を比較した研究 (Kim *et al.*, 2002)、特定の神経核のみで ER の発現量を比較した研究 (Fergus and Bass, 2013)があるのみである。本研究は、メダカの脳において、ER、AR の発現パターンはオスとメスで大きく異なることを示した。魚類では、メスの血中のテストステロン濃度がオスに匹敵するほど多く、また排卵前に急激な上昇 (T サージ)を示すことが知られている (Katz and Eckstein, 1974)。加えて、魚類の脳におけるアロマターゼの活性は哺乳類、鳥類と比べ 100–1000 倍高い値を示す (Pasmanik and Callard, 1985)。これにより、魚類ではオスの脳においても比較的エストロゲンの濃度は高く保たれる。これらのことにより、魚類の脳における性ステロイド濃度の性差は哺乳類、鳥類と比べ、小さいと考えられる。本研究で観察された ER、AR 発現の大きな性差は、魚類の脳における性ステロイドの作用は、リガンド以上に受容体の量によって調節されていることを示唆している。すなわち、性ステロイド感受性の雌雄の差が、性ステロイドが他の様々な因子に性差を形成する作用を増幅する起点となっていると考えられる。

特筆すべきことに、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体のいずれもほぼメスのみでしか発現しないという甚大な性差を示す神経核がみられた。終脳の Vs/Vp においては雌雄ともに ER、AR を発現しているがこれらの神経核において最も顕著に発現する受容体 (*esr2b* と *arb*) はほぼメスのみで発現している。視索前野の PMm/PMg はメスでは *esr1*、*esr2b*、*arb* を多く発現するが、オスでいずれの受容体もほとんど発現しない。このことは、これらの神経核が、エストロゲン、アンドロゲンの両方をメスのみで受容する神経核であることを示している。性ステロイドをメスのみで受容する神経核の存在は、本研究が初の報告である。すなわち、これらの神経核はメスのみでエストロゲンとアンドロゲンの影響を受け、何らかのメス特異的な機能をもつことが示唆された。PMm/PMg と Vs/Vp はいずれも、これまでの電気刺激や局所破壊実験により、魚類において性行動をコントロールすると考えられている神経核と一致する (Demski *et al.*, 1975; Kyle and Peter, 1982; Koyama *et al.*, 1984; Satou *et al.*, 1984)。そのため、これらの神経核におけるメス特異的な ER、AR の発現は何らかのメス特異的な性行動の調節にはたらいているのではないかと考えられる。

興味深いことに、これらの神経核は、他の脊椎動物においても甚大な性差を示す神経核と一致していた。Vs/Vp は分界条床核 (BNST; bed nucleus of stria terminalis)、扁桃体 (AMY; amygdala) などの大脳辺縁系と、PMm/PMg は哺乳類の室傍核 (PVN; paraventricular hypothalamic nucleus)、視索上核 (SON; supraoptic nucleus) と相同であると考えられている (Northcutt, 1995; Moore and Lowry, 1998; O'Connell and Hofmann, 2011; Goodson and Kingsbury, 2013)。哺乳類の BNST 主核はオスでより大きく、より多くのニュー

ロンを含み、オスの性行動に重要な役割を果たすことが知られている (Hines *et al.*, 1992; Claro *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1997)。哺乳類の BNST は *Ar* をオスでより多く発現する (Lu *et al.*, 1998)。また、近年マウスにおいて BNST で *Esr1* がメスで多く発現するという報告がなされた (Xu *et al.*, 2012; Kelly *et al.*, 2013)。本研究の結果、魚類の Vs/Vp はほぼメスのみで *esr2b*, *arb* を発現することが明らかになり、Vs/Vp は魚類でも哺乳類と同様大きな性差をもち、何らかの性特異的な役割を果たす神経核であることが示唆された。PVN と SON も、哺乳類において性差を示すことが知られる神経核の一つである。これらの神経核において主要なニューロン群であるアルギニンバソプレシン (*Avp*) ニューロンは、哺乳類においてオスで多いことが知られている (Madeira *et al.*, 1993)。反対に、これらの神経核におけるもう一つの主要なニューロン群であるオキシトシン (*Ot*) ニューロンは、メスで多い (Okabe *et al.*, 2013)。魚類の PMm/PMg もこれらの神経ペプチドの相同遺伝子であるアルギニンバソトシン (*avt*) およびイソトシン (*it*) を発現するニューロンを多く含むが、メダカにおいて *avt*, *it* はメス特異的な性ステロイド受容ニューロンでは発現していない (Hiraki *et al.*, 2014)。したがって、メス特異的な性ステロイド受容ニューロンは *avt* ニューロン、*it* ニューロンとは全く別のニューロン群であると考えられる。メダカにおいては PMm/PMg の *avt* ニューロン、*it* ニューロンには大きな性差がないことが示されているが (Kawabata *et al.*, 2012)、本研究によって、別のニューロン群には甚大な性差があることが示され、魚類においても PMm/PMg は性差を示す神経核であることが明らかになった。

メダカで見出されたこれらの神経核における甚大な ER、AR の性差が、他の魚種においても見られるのだろうか。性転換魚であるミツボシキウセン (*Halichoeres trimaculatus*) の脳全体の ER、AR の発現量を定量した研究では、ER (メダカの *esr1* と相同であると考えられる) の発現には性差がなく、AR (メダカの *ara* と相同であると考えられる) の発現は、メスおよびイニシャルフェイズのオス (メス型の体色を示すオス) と比べ、ターミナルフェイズのオス (メスが性転換したオスあるいは、イニシャルフェイズのオスが成長したオス) で高いことが示されている (Kim *et al.*, 2002)。ミツボシキウセンにおける ER (おそらくは *esr1*) に性差がないという結果については、脳全体の総量を測定したことによりオスで高い発現量を示す神経核とメスで高い発現量を示す神経核のが打ち消しあってしまう、性差がないという結果になってしまう可能性が考えられる。メダカにおいても *esr1* は、メス特異的に発現している神経核があるにもかかわらず、脳全体の発現量を調べると、オスでより多い (Hiraki *et al.*, 2012)。一方、*ara* についてはメダカでは神経核別の発現量を調べた場合、脳全体の発現量を調べた場合のいずれにおいてもほとんど性差がないこと明らかになっており (Hiraki *et*

al., 2012)ミツボシキウセンの結果と異なる。この違いの理由については不明であるが、非性転換魚であるメダカのオスは、性転換魚であるミツボシキウセンの、ターミナルフェイズのオスよりもイニシャルフェイズのオスと生理的状态が類似している可能性が考えられる。魚類においてER、ARの発現を神経核別に調べた研究は少ないが、Vs/Vpについては、ミッドシップマンフィッシュ(*Porichthys notatus*)において、性ステロイドの血中濃度が最も高い時期のメスのみで *esr1* の発現がみられたという報告があり(Forlano *et al.*, 2005)、この神経核は他の魚種でもメス特異的に性ステロイドを受容する可能性がある。ER、ARの性差の魚種間保存性については今後さらに検討する必要があると考えられる。

次に、ER、ARの発現の性差がどのようにしてもたらされるのか、その調節機構を探索した。その結果、これらの性ステロイド受容体の発現パターンが性ステロイドによる影響を大きく受けることが明らかになった。中でも、メスで多くER(*esr1*, *esr2b*)を発現する神経核においては、ERはE<sub>2</sub>による正の調節、そして魚類の主要なアンドロゲンである11-KTによる負の調節を受けていた。これらの調節によりメスで多いERの発現がもたらされていると考えられる。哺乳類の脳においては、反対にエストロゲンにより *Esr1* と *Esr2* の発現が抑制されるという報告が多い(Lauber *et al.*, 1991; Shima *et al.*, 2003)。魚類と哺乳類ではエストロゲンによるERの発現調節の機構が異なっていることが示唆される。11-KTはテストステロンと異なり、アロマターゼによるエストロゲンへの変換が不可能なアンドロゲンであるため、ERに対するアンドロゲンの調節は、ERではなくARを介していると考えられる。すなわち、メダカの脳におけるメスで多いERの発現は、ER自体を介したエストロゲンによる正の調節とARを介したアンドロゲンによる負の調節の両方によってもたらされると考えられる。メダカにおいて *esr2a* は、いくつかの神経核においてオスで多く発現していたが、性ステロイド投与によるはっきりとした発現の変動を示さなかった。*esr2a*の発現調節のメカニズムは現在のところ不明である。本研究の結果、*arb*もまたE<sub>2</sub>による正の調節を受けていることが明らかになった。さらに、Vs/Vpにおける*arb*の発現は11-KTによる負の調節を受けていた。エストロゲン/ERシグナルとアンドロゲン/ARシグナルの相互作用がメダカの脳におけるARの発現を調節していると考えられる。リガンド-受容体のフィードバック機構とシグナル経路間の相互作用の両方があることで、脳内の性ステロイド環境の微小な変化に応じて、エストロゲンおよびアンドロゲンの作用を相乗的に拡大または縮小することができる。これは、脳内の性ステロイド環境の性差が他の脊椎動物よりも小さいと考えられる魚類において、効率的な脳の性分化を可能にするメカニズムであると考えられる。

本研究の結果は、脳内の性特異的なER、ARの発現パターンは可逆的であることも示し

ている。メス特異的な ER、AR の発現は、卵巣除去とアンドロゲン投与によってオス同様に低下した。すなわち、メスにおける性ステロイド受容体の発現パターンは、持続的なエストロゲンの供給がなくなり、さらに血中のアンドロゲン濃度が上昇するという状況下ではオス型に変わりうるということである。哺乳類における *Esr1*、*Esr2* の発現の性差は周生期にエピジェネティックな調節を含む永続的で不可逆な作用 (organizational effect) によりもたらされる (Westberry *et al.*, 2010; Schwarz *et al.*, 2010)。しかし、メダカの ER、AR の発現の性差は主に性成熟後の性ステロイドの一過性で可逆的な作用 (activational effect) によりもたらされることが示唆された。このように脳の ER、AR の発現パターンが可逆的であることは魚類の脳が生涯にわたり多大な可逆性をもつ要因となっていると考えられる。同様の性ステロイドの作用による可逆的な発現の性差はアロマターゼについてもいくつかの魚種において報告されている (Diotel *et al.*, 2010; Okubo *et al.*, 2011)。性ステロイド合成酵素と性ステロイド受容体による、エストロゲンシグナルとアンドロゲンシグナルのバランス調整が、魚類の脳の性分化と性転換に大きく寄与していると考えられる。

以上の研究により、終脳と視索前野の神経核 Vs/Vp と PMm/PMg において ER、AR の両方がほぼメスのみで発現し、これらの神経核がメス特異的な性ステロイド受容ニューロンであることが示された。これらの神経核における ER、AR の発現の性差はエストロゲンとアンドロゲンによる一過性で可逆的な作用によりもたらされ、性転換可能であることも明らかになった。これらの神経核は、メス特異的に性ステロイドを受容し、その結果何らかの遺伝子を発現調節し、何らかのメス特異的な現象の調節を行っていると考えられる。

表 1-1. 本章で用いたプライマー

名称	使用目的	塩基配列(5´-3´)
esr1-F1	<i>esr1</i> プローブ作製	GCCTCAAAGCTATTATTTTACTCAACT
esr1-R1	<i>esr1</i> プローブ作製	GATGTAATGAATGAGTGCGTCTG
esr2a-F1	<i>esr2a</i> プローブ作製	GTCCAGAGTCAGAGAGCTCAATC
esr2a-R1	<i>esr2a</i> プローブ作製	CAGAGGAGCTCAGGCACAT
esr2b-F1	<i>esr2b</i> プローブ作製	AGACGAAGGCCAGATCCTC
esr2b-R1	<i>esr2b</i> プローブ作製	CTGATCTGGCGAGATGTAACC
ara-F1	<i>ara</i> プローブ作製	TTCGAAGCTGGAATGACTCTC
ara-R1	<i>ara</i> プローブ作製	GGGTTCTTGCACAGGAAGAT
arb-F1	<i>arb</i> プローブ作製	ACTCCCCAAGGGCAAAAC
arb-R1	<i>arb</i> プローブ作製	GGTAGACTCCTGGAAACAAATCC

名称カラムの中の-F はフォワードプライマー、-R はリバースプライマーを示す。

表 1-2. 神経核の略称と名称

略称	名称
aPPp	anterior part of posterior parvocellular preoptic nucleus
IQ	inferior oblique of the oculomotor nerve nucleus
NAT	anterior tuberal nucleus
NPT	posterior tuberal nucleus
NVT	nucleus ventral tuberis
PGZ3	periventricular gray zone (layer 3)
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
pPPp	posterior part of posterior parvocellular preoptic nucleus
RT	rostral tegmental nucleus
Vd	dorsal nucleus of the ventral telencephalic area
VM	ventromedial nucleus of thalamus
Vp	posterior nucleus of the ventral telencephalic area
Vs	supracommissural nucleus of the ventral telencephalic area
Vv	ventral nucleus of the ventral telencephalic area

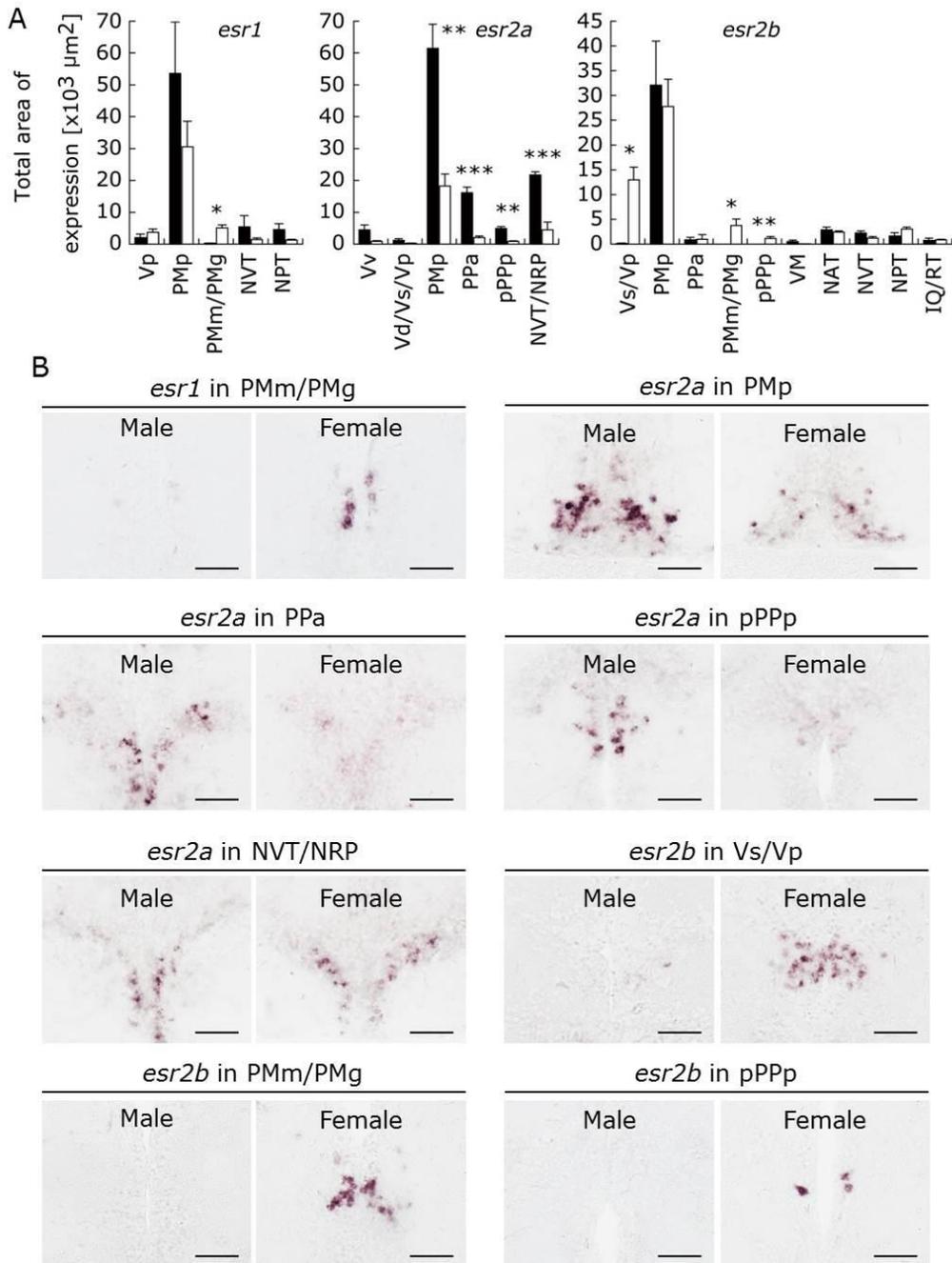


図 1-1. メダカの脳における ER 発現の性差

(A) 雌雄のメダカ (各  $n = 4$ ) の神経核別の *esr1*、*esr2a*、*esr2b* の発現面積。黒のカラムがオス、白のカラムがメスの結果を示す。エラーバーは SEM (standard error of the mean)。雌雄間の有意差を \*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$  で示した。(B) 性差を示した各神経核の代表的な写真。各神経核の略称については表 1-2 を参照。スケールバーは  $50 \mu\text{m}$ 。

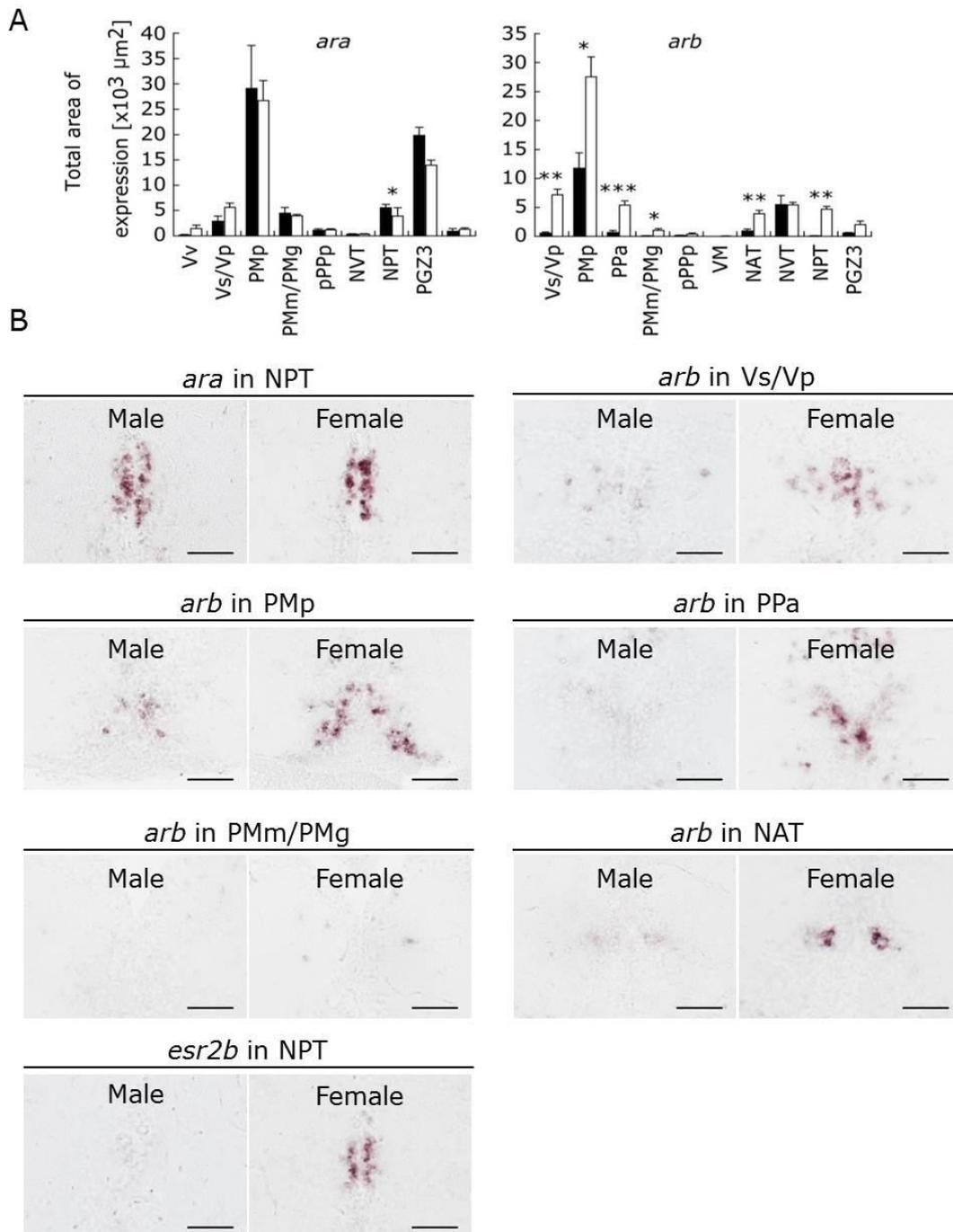


図 1-2. メダカの脳における AR 発現の性差

(A) 雌雄のメダカ (各  $n = 4$ ) の神経核別の *ara*、*arb* の発現面積。黒のカラムがオス、白のカラムがメスの結果を示す。エラーバーは SEM。雌雄間の有意差を\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$  で示した。(B) 性差を示した各神経核の代表的な写真。各神経核の略称については表 1-2 を参照。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。

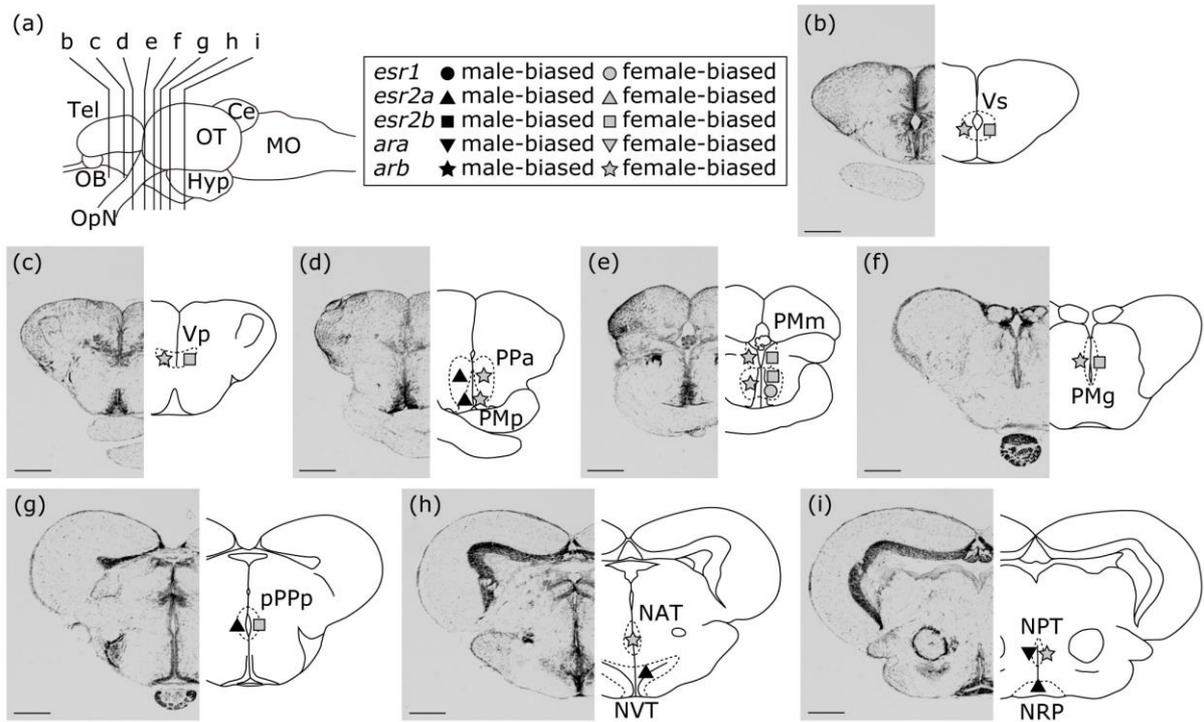


図 1-3. ER、AR 発現の性差の分布

(a) メダカの脳を横から見た図。左側が吻側。(b)–(i) の断面の切り口を示した。Tel、終脳; OB、嗅球; OpN、視神経; OT、視蓋; Hyp、視床下部; Ce、小脳; MO、延髄。(b)–(i) 右側に、*esr1* (丸)、*esr2a* (三角)、*esr2b* (四角)、*ara* (逆三角)、*arb* (星) の発現の性差の部位を示した線画、左側に対応する切片の Nissl 染色像を示した。オスで多い場合は黒色のマーク、メスで多い場合は灰色のマークで示した。各神経核の略称については表 1-2 を参照。スケールバーは 200  $\mu\text{m}$ 。

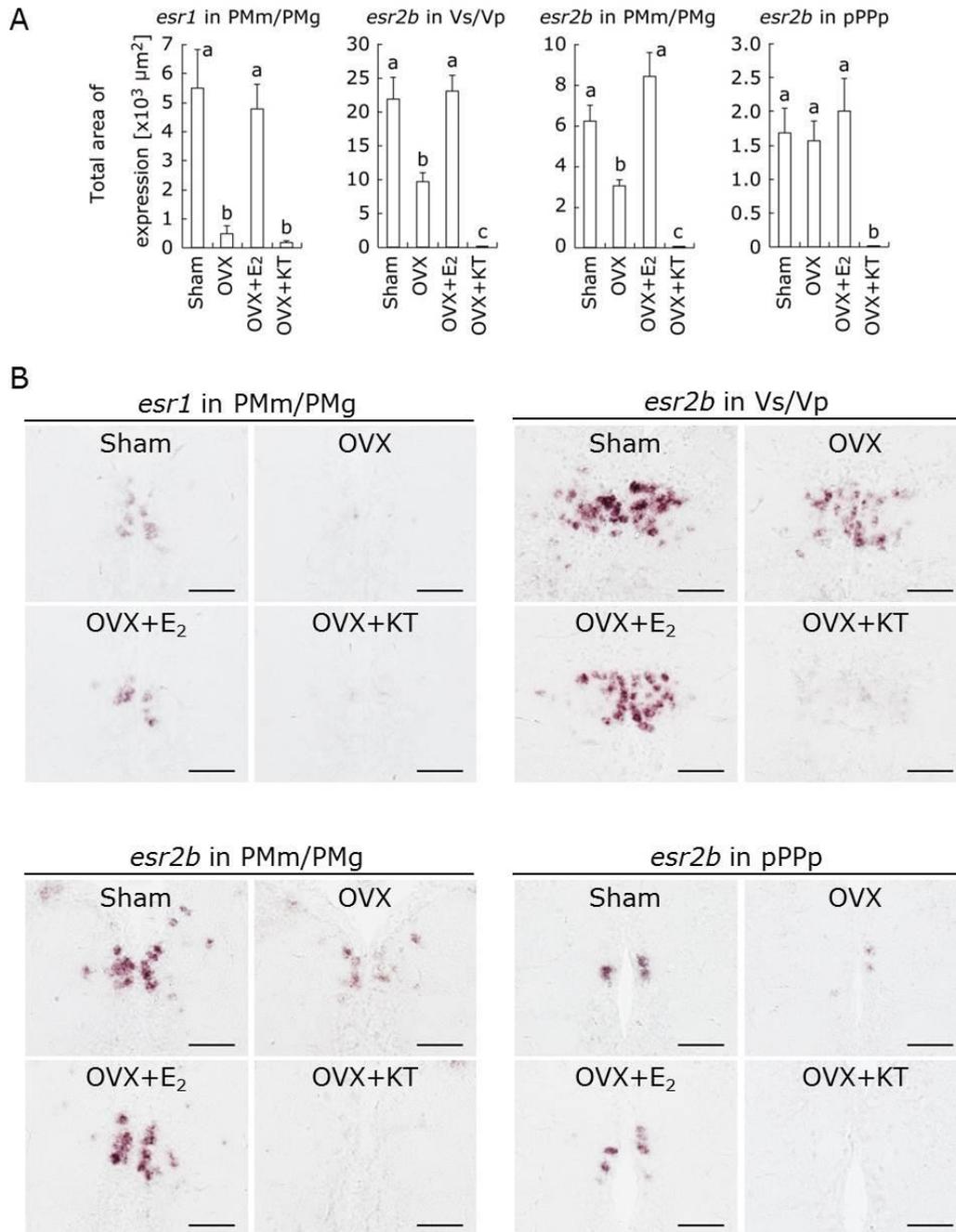


図 1-4. メスで多く ER 発現する神経核における、性ステロイド投与による ER の発現変動 (A) 擬手術群 (Sham)、卵巣除去群 (OVX)、卵巣除去し E<sub>2</sub> を投与した群 (OVX+E<sub>2</sub>)、卵巣除去し 11-KT を投与した群 (OVX+KT) の、PMm/PMg における *esr1*、Vs/Vp、PMm/PMg、pPPP における *esr2b* の発現面積。エラーバーは SEM。グラフ上部の異なるアルファベットは有意な差を示す ( $p < 0.05$ )。 (B) 各神経核の各群の代表的な写真。神経核の略称については表 1-2 を参照。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。

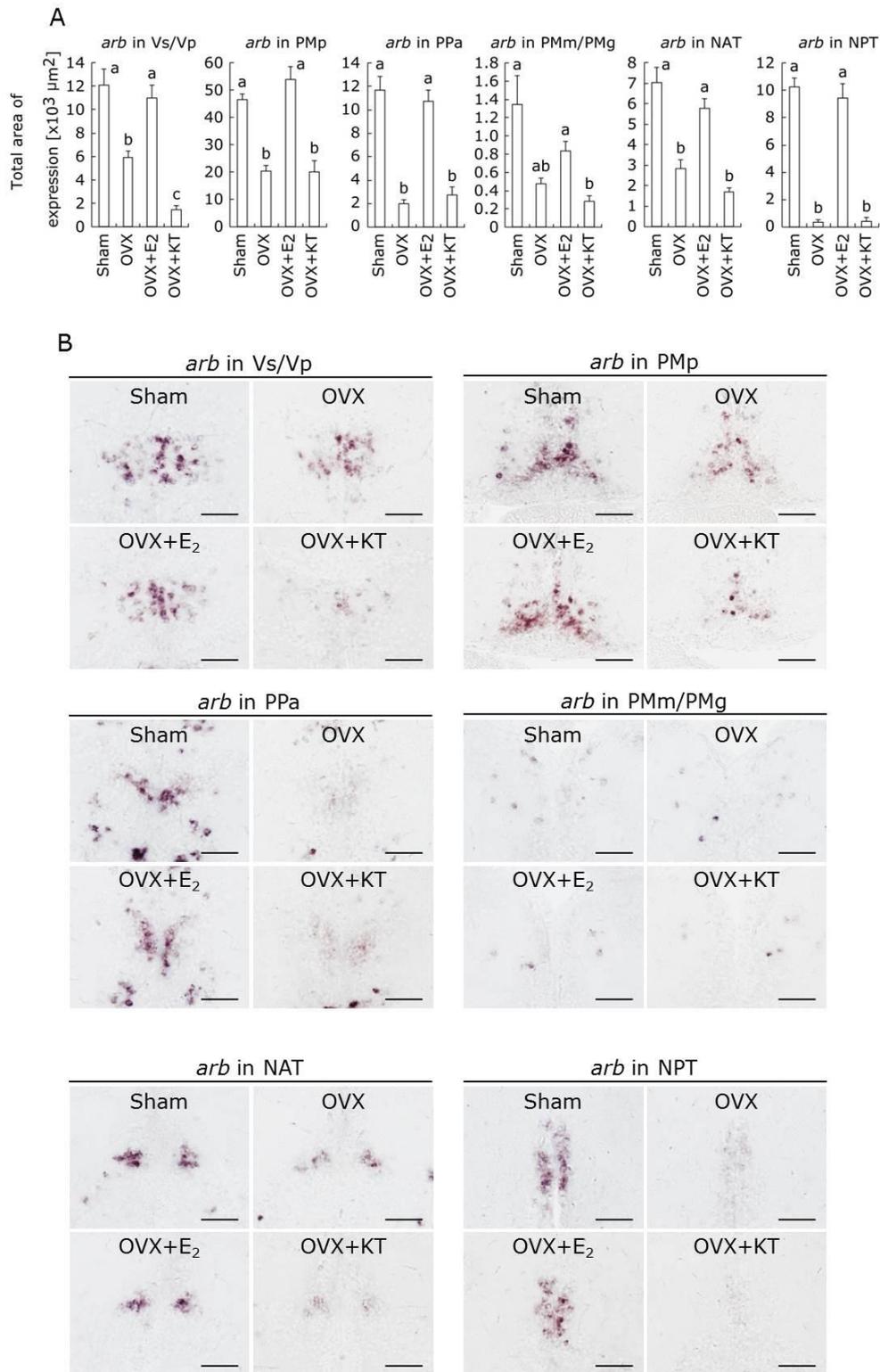


図 1-5. メスで多く AR 発現する神経核における、性ステロイド投与による AR の発現変動 (A) 擬手術群 (Sham)、卵巣除去群 (OVX)、卵巣除去し E<sub>2</sub> を投与した群 (OVX+E<sub>2</sub>)、卵巣除去し 11-KT を投与した群 (OVX+KT) の、Vs/Vp、PMp、PPa、PMm/PMg、NAT、NPT における *arb* の発現面積。エラーバーは SEM。グラフ上部の異なるアルファベットは有意な差を示す ( $p < 0.05$ )。 (B) 各神経核の各群の代表的な写真。神経核の略称については表 1-2 を参照。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。

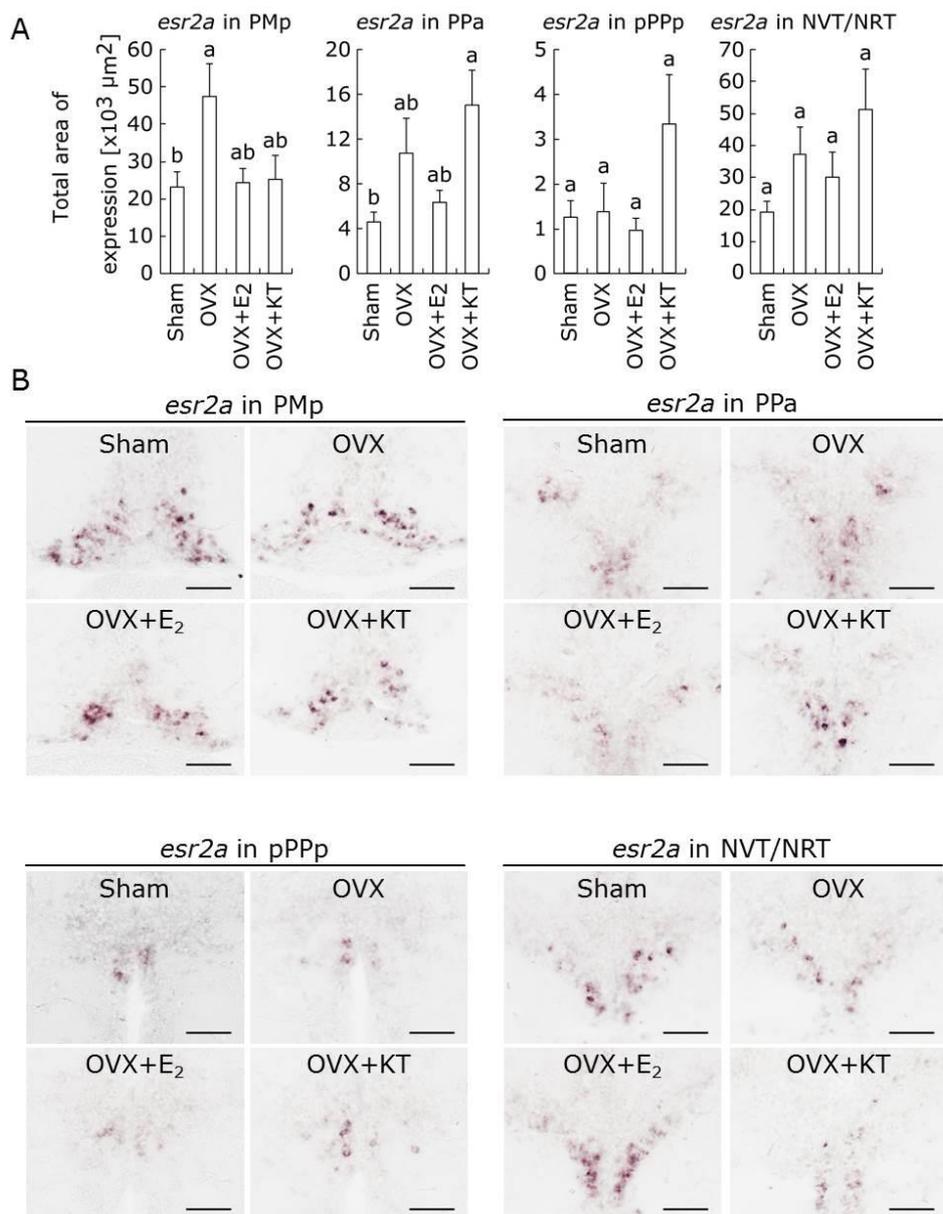


図 1-6. オスで多く ER を発現する神経核における、性ステロイド投与による ER の発現変動 (A) 擬手術群 (Sham)、卵巣除去群 (OVX)、卵巣除去し E<sub>2</sub> を投与した群 (OVX+E<sub>2</sub>)、卵巣除去し、11-KT を投与した群 (OVX+KT) の、PMp、PPa、pPPp、NVT/NRT における *esr2a* の発現面積。エラーバーは SEM。グラフ上部の異なるアルファベットは有意な差を示す ( $p < 0.05$ )。 (B) 各神経核の各群の代表的な写真。神経核の略称については表 1-2 を参照。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。

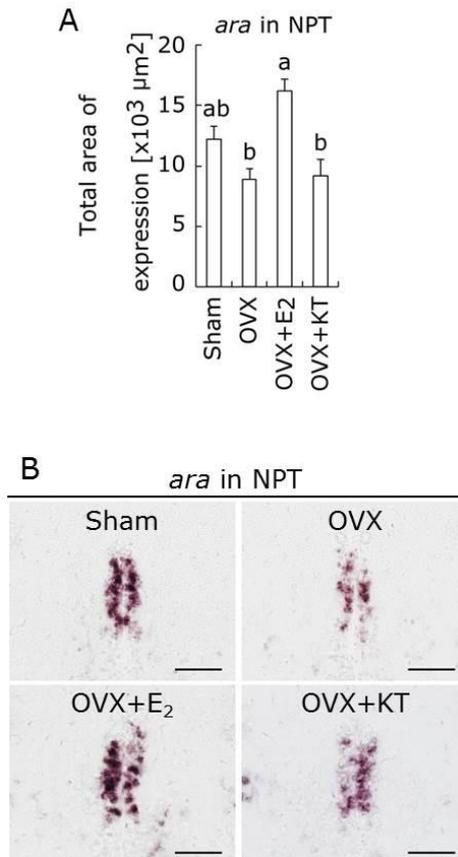


図 1-7. オスで多く AR を発現する神経核における、性ステロイド投与による AR の発現変動 (A) 擬手術群 (Sham)、卵巣除去群 (OVX)、卵巣除去し E<sub>2</sub> を投与した群 (OVX+E<sub>2</sub>)、卵巣除去し、11-KT を投与した群 (OVX+KT) の、NPT における *ara* の発現面積。エラーバーは SEM。グラフ上部の異なるアルファベットは有意な差を示す ( $p < 0.05$ )。 (B) 各群の代表的な写真。神経核の略称については表 1-2 を参照。スケールバーは 50 μm。

## 第 2 章 メス特異的性ステロイド受容ニューロンにおける *npb* の発現・機能解析

### 2-1. 緒言

第 1 章で、メダカの脳内においてほぼメスのみで性ステロイド受容体を発現する神経核（終脳の Vs/Vp、視索前野の PMm/PMg）が見出され、何らかのメス特異的な機能を担っていることが示唆された。性ステロイド受容体はリガンドと結合すると、転写因子として遺伝子の発現調節を行う。これらのニューロンにおいても、メスのみで性ステロイド受容体による発現調節を受け、それによって発現に性差を示す何らかの下流遺伝子が存在し、このニューロンの機能に関与していると考えられる。本研究室の先行研究として行われたメダカの脳内で発現に性差を示す遺伝子の網羅的なスクリーニングによって同定された遺伝子の中に、まさに同じ神経核においてメスのみで発現する遺伝子があった。*Npb* (Neuropeptide b) という神経ペプチドをコードする遺伝子 *npb* である。哺乳類においては *Npb* は *Npw* というパラログス遺伝子をもつが、先行研究の系統樹解析により、*npb* は *Npw* よりも *Npb* と近いことが明らかになっている（深滝ら、未発表データ）。*Npb* と、*Npw* は、オーファン G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の GPR7、GPR8 のリガンドとして 2002 年に同定された (Fujii *et al.*, 2002; Brezillon *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003)。*Npb* は、哺乳類において摂食行動、痛覚受容、情動、下垂体からの内分泌などに作用することが報告されている (Tanaka *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2005; Sakurai, 2013)。しかし、魚類においてはごく最近にナイルティラピアを用い、*Npb* を腹腔内投与し脳と下垂体の遺伝子発現の変動を調べた研究が一つあるのみであり (Yang *et al.*, 2014)、魚類の *npb* がどのような機能をもつのかについては依然としてほとんど明らかになっていない。

本研究室における先行研究により、Vs/Vp、PMm/PMg における *npb* の発現は、卵巣除去により減少し、エストロゲンにより回復することが明らかになった (Hiraki *et al.*, 2014)。また、培養細胞を用いた *in vitro* での解析により、*npb* 遺伝子のプロモーター領域中で、エストロゲンによる *npb* の発現調節に機能していると考えられるエストロゲン応答配列 (ERE; estrogen-responsive element) が同定された (Hiraki *et al.*, 2014)。これらのことから、*npb* がメス特異的な性ステロイド受容体の標的遺伝子であることが強く示唆された。そこで本章では、はじめに *npb* が実際にメス特異的性ステロイド受容ニューロンで発現していることを明らかにした。また、ERE を破壊したメダカを作出し、生体内でエストロゲンにより *npb* が直接発

現調節されていることを確かめた。さらに、メス特異的 *npb* ニューロンの形態学的な性差、軸索の投射先、*npb* 受容体の発現部位を組織学的方法により明らかにした。続いて、メス特異的 *npb* ニューロンの生体内での挙動を調べるために、電気生理学的解析を行った。最後に、*npb* 遺伝子を破壊した *npb* ノックアウトメダカの行動解析を行うことで、*npb* の機能解析を行った。

## 2-2. 材料と方法

### 2-2-1. 実験魚

d-rR 系統のメダカおよびトランスジェニックメダカ、ノックアウトメダカを、水温 28°C、14 時間明期/10 時間暗期の条件下で飼育し、ブラインシュリンプ幼生および市販のペレット飼料（おとひめ；日清丸紅飼料）を一日 3-4 回与えた。実験には 3-5 ヶ月齢の性成熟した個体を用い、別記されていない場合、サンプリングは明期開始後 1-3 時間の間に行った。

### 2-2-2. メス特異的性ステロイド受容ニューロンにおける *npb* と ER、AR の共発現の解析

性成熟したメスのメダカ（各群  $n = 3$ ）の全脳を摘出し、4% PFA/PBS 中で 2 時間固定した。その後、10%、20%、30% のスクロース/PBS 溶液に順次置換し、0.5% アガロース/20% スクロース/PBS 中に包埋し、-80°C のヘキサン中で瞬時に凍結し、-80°C で保管した。クリオスタット (HM550; Thermo Fisher Scientific) を用い、20  $\mu\text{m}$  の厚さの凍結切片をスライドガラス (MAS-GP type A; Matsunami) 上に作製し、-80°C で保管した。

*esr1*、*esr2a*、*esr2b*、*ara*、*arb* の DIG ラベル cRNA プローブを 1-2-2 と同様の方法により合成した。また、表 2-1 のプライマーを用いた PCR によって *npb* の cDNA 断片を得て、1-2-2 と同様の方法でライゲーション、サブクローニング、プラスミドの直鎖化を行った。このプラスミドをテンプレートとし、Fluorescein RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics) を使用して、Fluorescein ラベル cRNA プローブを合成した。

凍結切片を解凍し、乾燥させた後、PBS で 10 分間洗浄し、0.6%  $\text{H}_2\text{O}_2$  水溶液中で 30 分間、内因性のペルオキシダーゼの不活性化を行った。1-2-2 と同様の方法でアセチル化とプレハイブリダイゼーションを行った。続いて、ハイブリダイゼーションバッファー中に、Vs/Vp の観察用には、各受容体のプローブ 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、*npb* プローブ 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、PMm/PMg の観察用には各受容体のプローブ 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、*npb* プローブ 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を加え、55°C で一晩ハイ

ブリダイゼーションを行った。続いて、1-2-2 と同様の方法で洗浄、ブロッキングした後に、Blocking Reagent (Roche Diagnostics) / TBS で DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) を 1000 倍、AP 標識ヒツジ抗 DIG 抗体 (Roche Diagnostics) を 500 倍、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヒツジ抗 Fluorescein 抗体 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を Vs/Vp の観察用には 500 倍、PMm/PMg の観察用には 1000 倍に希釈した反応液中で、4°C で一晩反応させた。1-2-2 と同様の方法で洗浄した後、HRP を Tyramide Signal Amplification (TSA) Plus Fluorescein System (PerkinElmer) を用いて 15–90 分間発色させた。AP は Fast Red Tablets (Roche Diagnostics) を用い 3–6 時間発色させた。PBS で 5 分、2 回洗浄した後、VECTASHIELD Hard Set (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で封入した。

観察、撮影は共焦点蛍光顕微鏡 (C1; Nikon) とソフトウェア EZ-C1 (Nikon) を用いて行い、Photoshop CS5 (Adobe Systems) を用いて画像の明度とコントラストを調節した。

### 2-2-3. *npb* 遺伝子プロモーター中の ERE を破壊したメダカの作出

これまでに行われた培養細胞 (*in vitro*) を用いたルシフェラーゼアッセイによって、*npb* のプロモーター領域中に存在する ERE が、エストロゲンによる *npb* 発現の促進に必要であることが示唆されている (Hiraki *et al.*, 2014)。このことを *in vivo* で証明するために、Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) を利用し、ERE を破壊したメダカ (*npb*-ERE 破壊メダカ) を作出した。*npb* の転写開始点の 4080 bp 上流にある ERE をターゲットとした TALEN を設計し、Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit (Addgene, Cambridge, MA, USA) を使用しテンプレートプラスミドを合成した。テンプレートプラスミドの合成は National Bio Resource Project Medaka (NBRP Medaka) のプロトコルにもとづき行った。(Ansai and Kinoshita, 2013; [http://www.shigen.nig.ac.jp/medaka/download/TALEN\\_protocol.pdf; jsessionid=D7C22E0CE1BC9DE50C04D1EA97BD9F00](http://www.shigen.nig.ac.jp/medaka/download/TALEN_protocol.pdf; jsessionid=D7C22E0CE1BC9DE50C04D1EA97BD9F00))。ゲノム配列中の ERE 配列と、TALEN の設計箇所を図 2-1 に示した。テンプレートをもとに、mMessage mMachine SP6 Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、メダカ胚導入用の mRNA を合成した。RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilgen, Germany) を用いて精製した左右の TALEN の mRNA を各 100 ng/μl、フェノールレッドを 25 μl/ml、PBS に溶解し、1 細胞期のメダカ胚にマイクロインジェクションした。こうして得た F0 個体をスクリーニング、交配し、ERE に欠損が入った系統 ( $\Delta$ ERE 10-2) を得た。欠損個体のスクリーニング、シーケンシングに用いたプライマーの配列を表 2-1 に

記した。欠損部位の詳細な配列を図 2-1 に示した。

#### 2-2-4. *npb*-ERE 破壊メダカの脳内の *npb* 発現の解析

real-time PCR 法と *in situ* hybridization 法により、*npb*-ERE 破壊メダカの脳における *npb* の発現量を解析した。real-time PCR 用には、*npb*-ERE 破壊メダカおよび野生型メダカの雌雄の脳(各群 n = 5–6)を摘出し、RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen)を使用し、RNA を抽出した。抽出した RNA から、SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて cDNA を合成し、テンプレートとした。real-time PCR は、LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics)を用いて、LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics)で行った。得られたデータは *actb* の発現量を内部標準として標準化した。PCR に用いたプライマーは表 2-1 に示した。統計処理は Microsoft Excel 2010 (Microsoft、Redmond、WA、USA)を用いて対応のない両側 Student's *t*-test により行った。

1-2-2と同様の方法で*in situ* hybridizationを行い、2-2-2で作製したテンプレートを用いて合成したDIGラベルプローブにより、*npb*の神経核ごとの発現量を定量した。ProK処理の濃度は2 µg/ml、ハイブリダイゼーションの際のプローブの濃度は0.2 µg/ml、DIG抗体の希釈倍率は2000倍とした。NBT/BCIPの発色時間はPMm/PMgの観察用には15分、その他の神経核用には3時間とした。封入剤はAqua-Poly/Mount (Polysciences、Warrington、PA、USA)を用いた。試料標本の観察および撮影は、正立顕微鏡 (BX53; Olympus)とデジタルカメラ (DP73; Olympus)、ソフトウェア (cellSens; Olympus)を用いて行った。撮影した画像をPhotoshop CS5 (Adobe Systems)でモノクロ2階調化し、ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)を用いてシグナルの面積を定量し、野生型と*npb*-ERE破壊メダカで比較した。統計処理はMicrosoft Excel 2010 (Microsoft)を用いて非対応、両方向のStudent's *t*-testにより行った。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/))をもとに行った。同様の撮影装置を用い、代表的な写真を撮影した。写真はPhotoshop CS5 (Adobe Systems)を用いてコントラストと明度を調節した。

#### 2-2-5. *npb-gfp* トランスジェニックメダカの評価

当研究室の先行研究によって、*npb* のプロモーター領域に緑色蛍光タンパク質の遺伝子 *gfp* を接続した配列をゲノム中に挿入したトランスジェニックメダカ (*npb-gfp* トランスジェニックメダカ)が作出されている(大久保ら、未発表データ)。そこで本研究ではまず、このトラン

スジェニックメダカにおいて *gfp* 発現が正しく *npb* ニューロンを標識していることを二重染色により確かめた。性成熟した雌雄の *npb-gfp* トランスジェニックメダカの脳を摘出し(オス, n = 3; メス, n = 7)、2-2-2と同様の方法で 20  $\mu$ m の厚さの凍結切片を作製した。*npb* の DIG ラベルプローブを 2-2-3 と同様の方法で作製した。*gfp* の Fluorescein ラベルプローブを 2-2-2 と同様の方法で作製した。テンプレートの作成のために用いたプライマーの配列は表 3-1 に示した。2-2-2と同様の方法で、*npb* と *gfp* の二重 *in situ* hybridization を行った。ハイブリダイゼーションの際、PMm/PMg の観察用には、*npb* プローブ、*gfp* プローブ共に 0.05  $\mu$ g/ml とし、その他の神経核の観察用には、*npb* プローブ、*gfp* プローブ共に 0.25  $\mu$ g/ml とした。また、抗体反応の際、DIG 抗体はいずれの神経核の観察用にも 5000 倍希釈し、Fluorescein 抗体は PMm/PMg の観察用には 500 倍、その他の神経核の観察用には 100 倍に希釈した。発色の際は、HRP の発色 (TSA plus Fluorescein system; PerkinElmer) はいずれの神経核の観察用にも 40 分間とした。AP の発色 (Fast Red Tablets; Roche Diagnostics) は、PMm/PMg の観察用には 40 分、その他の神経核の観察用には 20 分とした。観察は共焦点蛍光顕微鏡 (C1; Nikon) を用い、撮影は EZ-C1 (Nikon) を用いて行い、Photoshop CS5 (Adobe Systems) を用いて画像の明度とコントラストを調節した。

## 2-2-6. *npb* ニューロンの形態学的性差の解析

次に前述のトランスジェニックメダカを用いて、*npb* ニューロンの形態学的な性差を解析した。性成熟した *npb-gfp* トランスジェニックメダカの雌雄のメダカの全脳(各 n = 4)を摘出し、4% PFA/PBS 溶液中で、4°C で 3 時間固定した。2-2-2と同様の方法で、アガロースに包埋した後、厚さ 20  $\mu$ m の連続凍結切片を作製した。

*npb* ニューロンの局在を Gfp の蛍光で検出すると同時に、*npb* 同様に PMm/PMg の大細胞性ニューロンで発現することが知られている神経ペプチドであるイソトシン (*it*) の局在を免疫組織化学により可視化した。さらに、蛍光ニッスル染色を用いて全てのニューロンを染色した。免疫組織化学は以下の通りに行った。2% normal goat serum (NGS; Vector laboratories)/PBS 中で 1 時間ブロッキングを行った。その後、PBS 中で、2 分間洗浄した後、抗体希釈液 (2% NGS、1% 牛血清アルブミン (Sigma-Aldrich)、0.01% NaN<sub>3</sub>、0.02% keyhole limpet hemocyanin (KLH; Sigma-Aldrich)/PBS) 中で 10000 倍希釈したウサギ抗オキシトシン抗体 (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准教授のご厚意により譲渡していただいた) と 4°C で一晩反応させた。PBS 中で 2 分、3 回洗浄した後、PBS 中で 1000 倍希釈した二次抗体 (goat anti-rabbit IgG (H+L) Dylight 549 conjugate;

Takara, Otsu, Japan)と4°Cで一晩反応させた。

その後、蛍光 Nissl 染色を以下の通りに行った。PBS で 5 分、2 回の洗浄に続き、PBST (20% polyoxyethylene (10) octylphenyl ether/PBS) で 10 分洗浄、PBS で 5 分、2 回の洗浄した後、NeuroTrace 435/455 Blue Fluorescent Nissl Stain (Thermo Fisher Scientific)を PBS で 20 倍希釈した溶液中で 60 分インキュベートした。その後、PBST 中で 10 分、PBS 中で 5 分、2 回洗浄し、PBS 中で 120 分間インキュベートし、ProLong Gold Antifade Reagent (Thermo Fisher Scientific)で封入した。

共焦点蛍光顕微鏡 TCS SP8 (Leica microsystems)を用いて全ての切片の画像を取得し、直径の最大部分が 12  $\mu\text{m}$  以上の細胞の数を Gfp のシグナルがみられたもの (*npb* ニューロン)、免疫組織化学のシグナルがみられたもの (*it* ニューロン)、いずれのシグナルも見られず、NeuroTrace のシグナルのみみられたもの(その他のニューロン)に分けて計数した。また、雌雄それぞれについて代表的な写真を撮影し、Photoshop CS5 (Adobe Systems)を用いてコントラストと明度を調節した。

## 2-2-7. Npb 抗血清の評価

完全長のメダカ成熟 Npb ペプチド(N 末端はフリー、C 末端はアミド化)を化学合成し(医学生物学研究所、Nagoya, Japan)、このペプチドを KLH にコンジュゲートし、ウサギに免疫することで Npb 抗血清 (lot No. 296-1)を作製した(医学生物学研究所)。この抗血清が正しく Npb ペプチドを認識することを、以下に記した *npb* の *in situ hybridization* と Npb の免疫組織化学の二重染色によって確かめた。

成熟したメスのメダカ ( $n = 6$ )の全脳を摘出し、2-2-2と同様の方法で 20  $\mu\text{m}$  の厚さの凍結切片を作製した。2-2-2と同様の方法で *npb* の Fluorescein ラベルプローブを作製した。

凍結切片を解凍、乾燥した後、PBS で 10 分間洗浄し、0.6%  $\text{H}_2\text{O}_2$  水溶液中で 30 分間内因性ペルオキシダーゼの不活性化を行い、1-2-2 と同様の方法でアセチル化とプレハイブリダイゼーションを行った。続いて、ハイブリダイゼーションバッファー中に *npb* プローブを、PMm/PMg の観察用には 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、その他の神経核の観察用には 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  加え、55°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。5x SSC/50%ホルムアミド(55°C、20 分)、2x SSC (55°C、20 分、2 回)、PBS (10 分)で洗浄した切片を、2% NGS/PBS 中で 30 分間ブロッキングした。PBS で 3 分間洗浄した後、PBS で 500 倍希釈した Npb 抗血清中で 4°C で一晩反応させた。TBS で 20 分、2 回洗浄した切片を 1.5% Blocking Reagent/TBS 溶液中で 1 時間ブロッキングした。PBS で goat anti-rabbit IgG (H+L) Dylight 549 conjugate (Takara)を 500 倍、

DAPIを1000倍、HRP標識ヒツジ抗Fluorescein抗体(PerkinElmer)をPMm/PMgの観察用には1000倍、その他の神経核の観察用には500倍希釈した反応液中で一晩反応させた。0.05% Tween 20(MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)/TBS(TBST)で20分間、2回洗浄した後、HRPをTSA Plus Fluorescein System(PerkinElmer)を用いて2時間発色させた。2-2-2と同様の方法で洗浄、封入した。

観察は共焦点蛍光顕微鏡(C1; Nikon)を用いて行った。撮影はEZ-C1(Nikon)を用いて行い、Photoshop CS5(Adobe Systems)を用いて画像の明度とコントラストを調節した。

### 2-2-8. 免疫組織化学による *npb* ニューロンの軸索の投射先の解析

成熟した雌雄のメダカの脳および脊髄を摘出し、4% PFA 中で、4°C で8時間固定した後、5%アガロース/20%スクロース/PBS に包埋し、凍結した。脊髄は、前部(頭部のすぐ後ろから肛門上まで)、中部(肛門の後ろから背ビレの開始点まで)、後部(背ビレの開始点から最後部まで)の3つの部分に分けて摘出した。脳と脊髄をそれぞれ40 μmの厚さの連続凍結切片にした。免疫組織化学は2-2-6と同様の方法で行った。前述のNpb抗血清を抗体希釈液で1000倍希釈し、4°Cで一晩反応させた。二次抗体はgoat anti-rabbit IgG(H+L)Dylight 549 conjugate(Takara)を用い、PBSで1000倍希釈し、4°Cで一晩反応させた。

サンプルの撮影には共焦点蛍光顕微鏡(C1; Nikon)および撮影ソフト(EZ-C1; Nikon)を用い、撮影した画像のコントラストと明度をPhotoshop CS5(Adobe Systems)を用いて調節した。

### 2-2-9. *npb-gfp* トランスジェニックメダカによる *npb* ニューロンの軸索の投射先の解析

性成熟した雌雄の *npb-gfp* トランスジェニックメダカの全脳および脊髄(各 n = 2)を11時から13時までの間に摘出し、4% PFA/PBS 溶液中で4°Cで3時間固定した。PBS 中で30分間洗浄した後、透明化試薬(SCALEVIEW-A2; Olympus)中で遮光しながら室温で一晩インキュベートした。その後、ディスク走査型顕微鏡(DSU; Olympus)でGfpの蛍光を撮影した。取得した画像は、Photoshop CS5(Adobe Systems)を用いてトリミングを行った。

### 2-2-10. 延髄および脊髄における *npb* の発現解析

性成熟した雌雄のメダカの全脳(各 n = 5)と脊髄(各 n = 3)を摘出し、1-2-2と同様の方法で、連続パラフィン切片を作製した。1-2-2と同様の方法で、*npb* のDIGラベルプローブを

用いた *in situ hybridization* を行い、延髄および脊髄における *npb* の発現を可視化した。ProK の濃度は 2  $\mu\text{g/ml}$ 、ハイブリダイゼーションの際のプロープの濃度は 0.25  $\mu\text{g/ml}$ 、DIG 抗体の希釈倍率は 2000 倍とした。延髄については、神経核ごとの *npb* 発現細胞の数を計測し、雌雄で比較した。脊髄については、切片 30 枚当たりの *npb* 発現細胞の数を計測し、雌雄で比較した。また、それぞれの群について代表的な写真を撮影し、Photoshop CS5 (Adobe Systems) を用いてコントラストと明度を調節した。統計処理は Microsoft Excel 2010 (Microsoft) を用いて非対応、両方向の Student's *t*-test により行った。

### 2-2-11. 脊髄における *npb* 受容体の発現解析

*npb* ニューロンが脊髄のどのようなニューロンに投射しているのかを調べるために、Npb の受容体の発現解析を行った。哺乳類は NPB の受容体として、GPR7 と GPR8 という二つのアイソフォームをもつが、メダカのゲノム中にはこれらと相同性の高い遺伝子は一つしかみられない。この遺伝子の系統樹解析を行うと、*Gpr7* よりは *Gpr8* に近いという結果が得られ、またシクエンシー解析を行うと、メダカにおいては *Gpr7* の相同遺伝子が消失していることを示唆するような結果が得られたため (深滝ら、未発表データ)、メダカの Npb 受容体遺伝子の名称は *gpr8* とした。

性成熟した雌雄のメダカの脊髄 (各  $n = 5$ ) を摘出し、1-2-2 と同様の方法で、連続パラフィン切片を作製した。脊髄は、前部 (頭部のすぐ後ろから肛門上まで)、中部 (肛門の後ろから背ビレの開始点まで)、後部 (背ビレの開始点から最後部まで) の 3 つの部分に分けて摘出した。1-2-2 と同様の方法で、表 2-1 に示したプライマーを使用し、*gpr8* の DIG ラベルプロープを作製した。このプロープを使用し、1-2-2 と同様の方法により、*in situ hybridization* を行い、脊髄における *gpr8* の発現を可視化した。ProK の濃度は 2  $\mu\text{g/ml}$ 、ハイブリダイゼーションの際のプロープの濃度は 0.3  $\mu\text{g/ml}$ 、DIG 抗体の希釈倍率は 2000 倍とした。NBT/BCIP の発色は 26 時間行った。正立顕微鏡 (BX53; Olympus) とデジタルカメラ (DP73; Olympus)、ソフトウェア (cellSens; Olympus) を用いて各群の代表的な写真を撮影した。写真は Photoshop CS5 (Adobe Systems) を用いてコントラストと明度を調節した。

### 2-2-12. 脊髄における *gpr8* の *in situ hybridization* とコリンアセチルトランスフェラーゼの免疫組織化学の二重染色

成熟したメスの d-rR メダカの頭部を切除した後、体部を 4% PFA/PBS 溶液中で 4°C で一晩固定した。固定後のサンプルから、脊椎のみを残し、内臓、筋肉などを除去した後、10%

EDTA/0.1 M Tris 溶液 (NaOH 水溶液で pH 7.2 に調整) 中で、4°C で一晩、脱灰を行った。その後、サンプルを脱水し、キシレン置換を行い、パラフィンに包埋した。1-2-2 と同様の方法により 10  $\mu\text{m}$  の厚さの切片を作製し、4°C で保存した。1-2-2 と同様の方法により脱パラフィンを行い、4  $\mu\text{g/ml}$  ProK/PBS 溶液中で 37°C で 15 分間処理した後、4% PFA/PBS 溶液で 10 分間の再固定を行った。その後 1-2-2 と同様の方法で、アセチル化、プレハイブリダイゼーションを行った。2-2-10 と同様の方法で作製した *gpr8* の DIG ラベルプローブを 0.3  $\mu\text{g/ml}$  加えたハイブリダイゼーションバッファー中で、55°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。1-2-2 と同様の方法で洗浄した後、2% Normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) /PBS 溶液中で、室温で 30 分間ブロッキングを行った。goat anti-choline acetyltransferase 抗体 (AB144P; Merck, Darmstadt, Germany) を PBS で 100 倍希釈した溶液中で、4°C で一晩反応させた。2-2-7 と同様の方法により洗浄した後、Blocking Reagent (Roche Diagnostics) /TBS 中で 1 時間ブロッキングし、PBS で AP 標識ヒツジ抗 DIG 抗体 (Roche Diagnostics) を 1000 倍、Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG (H+L) 抗体 (Thermo Fisher Scientific) を 100 倍、DAPI を 1000 倍希釈した溶液中で、4°C で一晩反応させた。2-2-8 と同様の方法で洗浄した後、AP の発色を Fast Red Tablets (Roche Diagnostics) を用いて 3 時間行った。2-2-2 と同様の方法で洗浄、封入を行った後、共焦点蛍光顕微鏡 TCS SP8 (Leica microsystems) を用いて撮影を行った。取得した画像は、Photoshop CS5 (Adobe Systems) を用いて明度とコントラストを調節した。

### 2-2-13. メス特異的性ステロイド受容ニューロンの電気生理学的解析

性成熟したメスの *npb-gfp* トランスジェニックメダカの全脳を摘出した。サンプリングおよび活動電位の記録は、日中の群 (明期開始 1 時間後から 4 時間以内) と夜の群 (明期開始 10 時間後から 4 時間以内) に分けて行った。半切した左側の脳をリンガー液 (134 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 1.2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 15 mM glucose, NaOH 水溶液で pH 7.4 に調整) に浸し、Gfp の蛍光をマーカーとして蛍光顕微鏡 (E-600FN; Nikon)、カメラ (IR-CCD; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)、マイクロマニピレーター (ROE-200; Sutter instruments, Novato, CA, USA) を用いて PMm/PMg の *npb* ニューロンにパッチピペットを接触させた。パッチピペットは、外径 1.5 mm のガラスキャピラリー (GD-1.5; Narishige, Tokyo, Japan) をマイクロピペットプレー (P-97; Sutter Instruments) により引き伸ばし作製した。パッチピペットの抵抗値は 6–15 M $\Omega$ 、細胞接触時の抵抗値は 15–100 M $\Omega$  を示した。アナログデジタル変換器 (Digidata

1320; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)、アンプ (MultiClamp 700A; Molecular Devices)、ソフトウェア (pCLAMP 9.2; Molecular Devices) を使用し、*npb* ニューロンの活動電流をオンセルパッチクランプ法で記録した。活動電流記録の解析には解析ソフト Clampfit 10.2 (Molecular Devices) を用いた。発火ピークの検出を行い、各記録中の任意の 1 分間の平均発火頻度 (spikes/sec) を算出した。

#### 2-2-14. メス特異的性ステロイド受容ニューロンのエストロゲンによる変化の電気生理学的解析

性成熟したメスの *npb-gfp* トランスジェニックメダカを 1-2-2 と同様の方法で卵巣除去あるいは偽手術し、生理食塩水中で 2 日間回復させた後、5 日間エストロゲンあるいは溶媒 (エタノール) を投与した。その後、全脳を摘出し、2-2-13 と同様の方法で PMm/PMg の *npb* ニューロンの活動電流を記録した。サンプリングおよび記録は明期中に行った。活動電流記録の解析には解析ソフト Clampfit 10.2 (Molecular Devices) を用いた。発火ピークの検出を行い、各記録中の任意の 1 分間の平均発火頻度 (spikes/sec) を算出した。Sham 群と OVX 群、また OVX 群と OVX+E2 群間での有意差の検定は統計ソフト PRISM (GraphPad Software) を使用し、one-way ANOVA の後、Bonferroni's post hoc test により行った。また、各記録の発火間隔の変動係数 (CV; Coefficient of variation (発火間隔の標準偏差/発火間隔の平均)) の算出を行い、イレギュラーな発火活動をするニューロン (CV が 0.5 以上)、レギュラーな発火活動をするニューロン (CV が 0.5 未満) に分類した。

#### 2-2-15. *npb* ノックアウトメダカの作出

TALEN 法を用いて *npb* 遺伝子を破壊したノックアウトメダカを作出した。方法は 2-2-3 と同様とした。ゲノム中で成熟 *Npb* をコードする領域の上流側にあたる配列をターゲットとした TALEN を設計した (ゲノム配列中の TALEN の設計箇所を図 2-2 に示した)。TALEN によりゲノム配列中に欠損が入り、成熟 *Npb* をコードする配列にフレームシフトがおこっていると考えられるノックアウト系統 (*npb-KO* 21-1) を確立した。欠損箇所の詳細な配列を図 2-2 に示した。

#### 2-2-16. *npb* ノックアウトメダカの行動解析

*npb* のノックアウトメダカ、ヘテロノックアウトメダカ、野生型のメダカの、4-5 ヶ月齢の性成熟したメスの個体を行動解析に用いた。同一の群のメスのメダカ 2-4 匹、同数の野生型のオ

スのメダカを一つの水槽に入れ、3-5 日間飼育した。行動実験の前日の明期開始 3-6 時間後に、同じ水槽に入っていた雌雄のメダカを、行動解析用の水槽に1ペアずつ入れた。その際、オスとメスの間に飼育水が通るスリットのある透明なプラスチック製の仕切りを入れた。行動実験当日、明期開始後 1-2.5 時間の間仕切りを取り去り、30 分間ビデオカメラ (HF S11 と HF S21; CANON, Tokyo, Japan および GZ-G5-B, JVC ケンウッド, Yokohama, Japan) を用いて撮影を行った。行動解析前に同じ水槽に入れて準備した 2-4 匹のメスを一つのバッチとして行動の各パラメーターを測定し、その平均値をとった。これを 1n とし、各群  $n = 4-5$  となるまでサンプル数を増やした。

撮影したビデオは、Windows Media Player (Microsoft) を用いて再生し、交接、産卵までに要した時間、求愛ダンス、交接の頻度、産卵に至らなかった交接の回数、産卵の継続時間、追尾から交接までに要した時間、産卵後 5 分間の交接の回数を目視で測定した。また、求愛ダンスを経ずに産卵した個体の割合、産卵に至らなかった個体の割合も算出した。ここで求愛ダンスとは、メスの前をオスが円を描くように素早く泳ぐことで求愛を行う行動を指す。交接とはオスがメスを背ビレと腹ビレを用いて抱えるようにして魚体の側面を密着させ、産卵を促す状態を指す。産卵の継続時間は、オスとメスが密着し、交接を開始してから、オスとメスが離れるまでの時間とした。追尾から交接までに要した時間とは、最初の交接の開始までに、オスが継続して追尾に費やした時間とした。産卵後 5 分間とは、オスとメスが離れてから 5 分間のことを指す。

統計的な解析には、PRISM (GraphPad Software) を使用した。まず Bartlett's test あるいは Brown-Forsythe test によってグループ間の分散の均一性を検証した。分散が均一であった場合は、one-way ANOVA の後、Dunnet's post hoc test によって野生型メダカとノックアウトメダカ、あるいは野生型メダカとヘテロノックアウトメダカのグループ間比較を行った。グループ間の分散が有意に異なることが示されたときはデータを標準化するために対数変換した後に同様の解析を行った。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. メス特異的性ステロイド受容ニューロンにおいて *npb* と ER、AR は共発現する

先行研究 (Hiraki *et al.*, 2014) によって、メス特異的性ステロイド受容ニューロンが存在する脳領域 (Vs/Vp および PMm/PMg) で、*npb* がメスのみで発現することが明らかになっている。

そこで本研究では、*npb* がメス特異的性ステロイド受容ニューロンで発現しているのかを、*npb* と ER (*esr1*, *esr2a*, *esr2b*)、AR (*ara*, *arb*) の二重 *in situ hybridization* により検証した。その結果、Vs/Vp、PMm/PMg の両方において、*npb* ニューロンのほぼ全てが *esr1*, *esr2b*, *ara*, *arb* の全てを共発現することが明らかになった(図 2-3、図 2-4)。*esr2a* は PMm/PMg においては発現しておらず、Vs/Vp においては少量発現するが、*npb* とは共発現していなかった。Vs/Vp、PMm/PMg のいずれにおいても、*esr1*, *ara* を発現するニューロンのほぼ全てが *npb* ニューロンであったが、*esr2b*, *arb* を発現するニューロンの中には、*npb* を発現しないニューロンもみられた。

### 2-3-2. *npb*-ERE 破壊メダカの脳内では *npb* の発現は減少する

*npb* が実際に ER と ERE の結合を介したエストロゲンによる直接的な発現調節を受けていることを生体内で確かめるために、ゲノム編集技術を用いてこの ERE を破壊したメダカ系統( $\Delta$ ERE 10-2)を作出し、*npb* の発現を解析した。real-time PCR の結果、メスの *npb*-ERE 破壊メダカの脳全体の *npb* の発現量は、野生型のメスと比べ有意に減少していた(図 2-5)。オスの *npb*-ERE 破壊メダカの脳全体の *npb* の発現量は、野生型のオスと差がなかった(図 2-4)。

続いて、神経核ごとの *npb* 発現の ERE 破壊による変化を *in situ hybridization* により確かめた。その結果、メスの *npb*-ERE 破壊メダカでは神経核 Vs/Vp、Pbl、PPa、PMm/PMg、rHd、NAT/NPT、IR/MR/IQ において、*npb* の発現が有意に減少していた(図 2-6)。一方、オスの *npb*-ERE 破壊メダカでは *npb* の発現は rHd においてわずかに上昇し、NAT/NPT において減少していたが、ほぼ全ての神経核において変化がみられなかった(図 2-7)。

### 2-3-3. *npb*-*gfp* トランスジェニックメダカの評価

当研究室の先行研究で作出された *npb*-*gfp* トランスジェニックメダカが正しく *npb* 発現ニューロンを標識しているかどうかを、*gfp* と *npb* の二重 *in situ hybridization* で確かめた。その結果、メスの脳では Vs/Vp および PMm/PMg における *gfp* のシグナルの局在は *npb* のシグナルと一致した。また、オスではこれらの神経核において *npb* 同様 *gfp* も全く発現していなかった(図 2-8)。

### 2-3-4. PMm/PMg の *npb* ニューロンはメスのみで大型化している

メス特異的 *npb* ニューロンに相当するニューロンはオスには存在していないのか、あるいは

は *npb* を発現していないだけでオスにも存在するのかを、形態学的に解析した。PMm/PMg のメス特異的 *npb* ニューロンは、他のニューロンと比べ、大型であるという特徴をもつ。全ニューロンを蛍光ニッスル染色により染色し直径 12  $\mu\text{m}$  以上のニューロンを計数し、そのうちの *npb* ニューロン、*it* ニューロン、そのいずれでもないニューロンの個数をそれぞれ計数した。すると、直径 12  $\mu\text{m}$  以上の大型ニューロンはオスよりもメスで多く、さらにその差分は *npb* ニューロンの数とほぼ一致した。*it* ニューロンの数、*npb* ニューロンでも *it* ニューロンでもない大型ニューロンの数は、いずれもオスとメスで差がなかった(図 2-9)。

### 2-3-5. Npb 抗血清の評価

作製した Npb 抗血清が正しく Npb ペプチドを認識していることを確かめるために、Npb の免疫組織化学と *npb* の *in situ* hybridization の二重染色を行った。その結果、細胞体における免疫組織化学のシグナルは、*in situ* hybridization のシグナルと一致した(図 2-10)。

### 2-3-6. 免疫組織化学による *npb* ニューロンの軸索の投射先の解析

メス特異的な *npb* ニューロンの軸索の投射先を、Npb 抗血清を用いた免疫組織化学により解析した。メス特異的 *npb* ニューロンが存在する Vs/Vp および PMm/PMg においてはメスのみで Npb の免疫陽性シグナルが得られ、タンパク質レベルでも Npb はこれらの領域にメスのみで存在することが明らかになった(図 2-11)。またその軸索は脳内を主に尾側の方向に投射し、延髄の先に向かっていた。他にも、視蓋や間脳の様々な領域にメスのみで Npb 陽性な軸索がみられた。一方オスでは、視索前野の神経核 Pbl から下垂体に向かって投射する軸索などごく少数の Npb 陽性の軸索が観察された(図 2-11)。

脊髄においても同様に免疫組織化学を行うと、メスのみで大量の Npb 陽性の軸索が脊髄前部、中部、後部の全てにおいて観察された(図 2-12)。

### 2-3-7. *npb-gfp* トランスジェニックメダカにおける *npb* ニューロンの軸索の投射先の解析

*npb* ニューロンの軸索の詳細な投射様式を、前述の *npb-gfp* トランスジェニックメダカの脳を透明化し、ディスク走査型顕微鏡で撮影することで解析した。その結果、メスのみで Vs/Vp、PMm/PMg から投射する大量の軸索が間脳を通り、延髄、脊髄へとつながっていた。オスでは雌雄共通して *npb* を発現する神経核 Vv、Pbl、NVT において蛍光がみられたが、それらの神経核からは嗅球、下垂体など限られた部位のみに投射していた(図 2-12)。脊髄におい

ては、オスでは **Gfp** 陽性のごく少数の軸索と、複数の細胞体がみられた。メスでは大量の **Gfp** 陽性の軸索が観察された(図 2-13)。

### 2-3-8. 延髄および脊髄においては *npb* の発現に性差はなかった

延髄および脊髄でみられた大量のメス特異的な **Npb** 陽性な軸索が、Vs/Vp、PMm/PMg のメス特異的 *npb* ニューロンから投射しているのか、あるいは延髄、脊髄にもメス特異的な *npb* ニューロンの細胞体が存在し、そこから投射しているのかを確かめるため、延髄と脊髄において *npb* の *in situ* hybridization を行った。延髄においては NVII*s*/i、RS/RM/RI/cm*sp*、NVm、t、NFS/LX、NIX、NTv、oi で *npb* の発現がみられたが、全て雌雄共通の発現であった(図 2-14)。脊髄においては、雌雄ともに後角に明瞭な *npb* 発現を示すニューロンがみられた。また、前角の中心管付近においても弱い発現がみられた。切片 30 枚当たりの *npb* 発現細胞数の平均値には雌雄で差がなかった(図 2-15)。

### 2-3-9. 脊髄における *npb* 受容体の発現解析

脊髄へ投射した *npb* ニューロンから放出される **Npb** がどのような細胞によって受容されるのかを調べるため、**Npb** の受容体遺伝子である *gpr8* の脊髄における発現部位を *in situ* hybridization により解析した。その結果、雌雄ともに、明瞭な *gpr8* の発現が脊髄の前角でみられた。脊髄の後角においても弱い *gpr8* の発現がみられた(図 2-16)。

また、脊髄前角の *gpr8* 発現細胞は運動ニューロンおよび自律神経節前ニューロンのマーカーであるコリンアセチルトランスフェラーゼ(**ChAT**)陽性であった(図 2-16)。

### 2-3-10. メス特異的 *npb* ニューロンはペースメーカー様の発火活動を示した

メス特異的 *npb* ニューロンが生体内でどのような活動をしているのかを確かめるため、電気生理学的解析を行った。PMm/PMg の *npb* ニューロンの発火活動を、パッチクランプ法を用いて記録したところ、これらのニューロンは 2-7 Hz 程度の規則的なペースメーカー様の発火活動を行っていることが明らかになった(図 2-17)。また、日中と夜でその発火頻度には差がなかった(図 2-17)。

### 2-3-11. メス特異的 *npb* ニューロンはエストロゲン依存的な発火活動を示した

メス特異的 *npb* ニューロンの発火頻度は、卵巣除去により有意に低下した。また、卵巣を

除去したメダカにエストロゲンの投与を行うと、その発火頻度は回復し、擬手術群と同程度になった(図 2-18)。発火間隔の変動係数(CV)が 0.5 未満の、規則的な発火パターンを示すニューロンの割合は、擬手術群では 92.9%だったが、卵巣除去によって 68.4%にまで低下した。エストロゲン投与群においては 94.4%のニューロンが規則的な発火パターンを示した(図 2-18)。

### 2-3-12. *npb* ノックアウトメダカの性行動に変化はなかった

*npb* ノックアウトメダカは正常に産卵を行うことができた。性行動の際の様々なパラメータを、*npb* ノックアウトメダカ、*npb* ヘテロノックアウトメダカ、野生型メダカで比較したが、最初の交配までに要した時間、産卵までに要した時間、求愛ダンスの頻度、交配の頻度、産卵に至らなかった交配の回数、産卵の継続時間、追尾から交配までに要した時間、産卵後 5 分間の交配の回数、求愛ダンスを経ずに産卵した個体の割合、産卵に至らなかった個体の割合に有意な差はなかった(図 2-19)。

## 2-4. 考察

第 1 章で、メダカの脳内において神経核 Vs/Vp、PMm/PMg が、メスのみで性ステロイド受容体を発現することが見出された。これらのメス特異的な性ステロイド受容体は、メスのみで何らかの標的遺伝子の発現をもたらすことで機能していると考えられる。第 2 章でははじめに、当研究室の先行研究として行われた、メダカの脳内で発現に性差を示す遺伝子のスクリーニングにより同定された遺伝子の一つである *npb* がこの標的遺伝子であることを明らかにした。*npb* が実際にメス特異的な性ステロイド受容ニューロンで発現し、直接的に性ステロイド受容体による発現調節を受けていることを、本研究では二つの方法により明らかにした。まず、*npb* と ER、AR の二重染色を行ったところ、これらの神経核においてはごくわずかししか発現しない *esr1a* 以外の、ER、AR の全てのアイソフォームが、これらの神経核で *npb* と共発現していた。先行研究において、これらの神経核における *npb* の発現量はエストロゲンにより上昇することが示されているが(Hiraki *et al.*, 2014)、本研究の成果から、このエストロゲンによる *npb* の発現調節は、同じニューロンでメス特異的に発現する ER の直接の作用によるものであることが強く示唆された。

次に、これらの神経核での ER の作用が ERE(エストロゲン応答配列)への結合を介したもののなのかについて、ゲノム編集技術を用いて明らかにした。先行研究により、*npb* 遺伝子

の転写開始点の 4080 bp 上流に ERE が存在し、その ERE に変異を導入すると、培養細胞 (*in vitro*) でのエストロゲン投与による *npb* の転写活性化がなくなることが明らかになっている (Hiraki *et al.*, 2014)。この ERE を TALEN 法を用いて破壊したメダカを作出し、*npb* の発現量を野生型と比較したところ、*npb*-ERE 破壊メダカの脳内の *npb* 発現の総量は、野生型のものの半分以下にまで減少していた。このことから、この ERE が生体内 (*in vivo*) でも機能し、エストロゲンと ER による *npb* の発現量のアップレギュレーションを仲介していることが明らかになった。これは ERE が実際に生体内で機能していることを、ゲノム編集により直接的に確かめた初の報告である。これまで、ERE などの転写調節に関わるシスエレメントの研究は培養細胞を用いたものがほとんどであり、培養細胞内で遺伝子発現を活性化させることが、シスエレメントとして機能していることの指標となっていた。ここで実験に用いられる細胞は多くの場合、研究の対象としているものとは異なる生物種の異なる組織由来であり、また培養細胞に導入する配列は染色体全体ではなく、限られたごく一部の配列である。そのため、多くの転写因子が協働し、大規模なゲノムの構造変化やエピジェネティックな修飾の変化を伴う生体内での転写調節とはかけ離れた現象がおこっている可能性がある。実際に、同じ配列を導入しても培養細胞の種類によって異なる結果が得られることがしばしばある。近年の TALEN 法やそれに続く CRISPR/Cas9 法の開発により、遺伝子改変は従来と比べ格段に容易となり、様々な生物種において遺伝子改変実験が行われるようになってきている (Ansai *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2014)。本研究で示した遺伝子改変によるシスエレメントの機能評価は、今後、転写調節の研究を行う上で重要なアッセイ系となると考えられる。

続いて、ERE の破壊によってどの神経核において *npb* の発現量が減少しているのかを調べたところ、メスにおいては Vv、NRL、NGp を除くほぼ全ての神経核において減少していた。興味深いことに、これらの神経核のうち Pbl、rHd は ER の発現がみられない神経核であった (図 1-1 参照)。これらの神経核における ERE 破壊による *npb* 発現の減少は、ER を介さない、プロモーター領域のゲノム構造の変化による非特異的な減少である可能性がある。しかし、オスにおいては大きな減少はみられなかったため、非特異的な発現の減少がおこっているとは考えにくい。これらの神経核においては *in situ hybridization* では検出できない程度の微量な ER が発現していて、*npb* の発現を調節しているのではないかと推察される。

real-time PCR と *in situ hybridization* のいずれの解析結果においても、メスにおける *npb* 発現はオスと同レベルにまでは減少しなかった。この理由としては三つの可能性が考えられる。一つは、ERE の破壊が不完全であった可能性である。ERE は 3 塩基の非特異的な配列をはさんで 6 塩基の配列 (ハーフサイト) 二つが逆向きに配列した構造をとり、このうちのハー

フサイトだけでもシスエレメントとして機能し得ることが知られている (Gaub *et al.*, 1990)。本研究で作出した ERE 破壊メダカにおいては、二つのハーフサイトのうちの 5'側のハーフサイトしか破壊できていない。そのため、残った 3'側のハーフサイトのみでもシスエレメントとして機能してしまう可能性が考えられる。しかし、本研究室の先行研究でおこなわれた培養細胞を用いた実験では、この ERE はハーフサイトだけでは機能しないという結果が示されている (仲宗根ら、未発表データ)。生体内 (*in vivo*) と培養細胞中 (*in vitro*) では、様々な条件が異なり、一概に同じ現象が起こるとは言えないが、この ERE がハーフサイトだけではたらいってしまう可能性は少ないのではないかと考えられる。二つ目は、ER による *npb* の発現調節に関わるシスエレメントがこの ERE だけではない可能性である。ER には ERE を介さない転写調節の経路も存在し (O'Brien *et al.*, 2006)、ERE 以外のシスエレメントや複数の ERE を含めた大きなゲノム構造の変化により転写の調節が行われることが示されている (Fullwood *et al.*, 2009)。そのため、一つの ERE を破壊しただけでは、エストロゲンによる転写のアップレギュレーションを完全になくすことはできなかった可能性がある。三つ目は、他の遺伝子を介した間接的なエストロゲンによる発現調節がはたらいしている可能性である。メス特異的 *npb* ニューロンや、他のニューロンにおいてエストロゲンによって発現調節される他の遺伝子も、*npb* の発現調節に関わっている場合、ERE の破壊により直接的な発現調節をなくしても、他の遺伝子を介した間接的な発現調節が残ってしまうと考えられる。これまで、ER 以外に *npb* の発現を調節する遺伝子は報告されていないが、未知の *npb* の発現調節に関わる遺伝子が存在する可能性は十分にあると考えられる。

以上の *npb* と ER の二重染色と ERE 破壊メダカの解析により、*npb* はメス特異的性ステロイド受容体の標的遺伝子であり、そのメス特異的な発現の大部分は ER と ERE の結合を介した直接的な転写調節に起因することが明らかになった。

次に、メス特異的に ER、AR および *npb* を発現するニューロン (メス特異的 *npb* ニューロン) に相当するニューロンは、オスには存在しないのか、または ER、AR、*npb* を発現していないだけで、オスにも存在するのかを調べた。PMm/PMg の *npb* ニューロンには、他のニューロンと比べてサイズが大きいという特徴がある。PMm/PMg の大細胞性のニューロンの個数を雌雄で比較するとオスよりもメスで多く、またその差分はちょうどメス特異的 *npb* ニューロンの個数と一致した。このことから、オスにはメス特異的 *npb* ニューロンに相当する大型のニューロンは存在しないことが明らかになった。メス特異的 *npb* ニューロンがオスには完全に存在しないのか、細胞サイズは縮小しているが存在はするのかは本研究からは明らかになっていない。本研究室の先行研究により、成熟後のオスであっても精巣を除去し、6 日間エスト

ロゲンを投与することで、PMm/PMg で *npb* を発現するようになることが明らかになっている(山下ら、未発表データ)。6 日間のうちに神経新生が完了し、*npb* を発現するようになるとは考えにくいので、*npb* ニューロンに相当するニューロンはオスでは縮小して不活性化した状態で存在し、性ステロイドによって活性化される状態になっているのではないかと考えられる。ただし、PMm/PMg の形態学的性差が、性ステロイドの投与により完全に逆転可能なのかどうかはまだ調べられておらず、今後検討する必要がある。ニューロンの大きさに関する性差の報告は本研究がはじめてであるが、脳内の神経核の大きさ、ニューロンの数などの形態学的性差は、哺乳類や鳥類において複数の報告があり、いずれも性特異的な行動や生理機能に重要な役割を果たす神経核であることが明らかになっている(Tsukahara and Yamanouchi, 2002; Roselli *et al.*, 2009; Tsukamura *et al.*, 2010)。メダカにおいて大きな形態学的性差を示す PMm/PMg の *npb* ニューロンもこれらの神経核同様、何らかの性特異的な機能を果たすと考えられる。

続いて、免疫組織化学および *npb-gfp* トランスジェニックメダカの解析により *npb* ニューロンの軸索の投射様式を解析した。脳内ではメスのみで大量の *npb* ニューロンの軸索が Vs/Vp、PMm/PMg のメス特異的 *npb* ニューロンから、間脳、延髄を通過して脊髄へと投射していた。また、メスのみで脊髄の前部、中部、後部全てで大量の *npb* ニューロンの軸索がみられた。脊髄内で *npb* ニューロンの軸索がみられた領域は、脊髄の下降路とされる領域とよく一致した(Oka *et al.*, 1986)。延髄、脊髄における *npb* ニューロンの細胞体は全て雌雄共通のものであったことから、延髄、脊髄にメスのみでみられた大量の *npb* ニューロンの軸索は、延髄、脊髄の *npb* ニューロン由来ではなく、Vs/Vp、PMm/PMg の *npb* ニューロン由来であると考えられる。Vs/Vp、PMm/PMg のいずれのメス特異的 *npb* ニューロンが脊髄に投射しているのかは明らかになっていないが、魚類の PMm/PMg は脊髄に投射することが知られており(Demski *et al.*, 1985; Gregory *et al.*, 1985)、また、PMm/PMg に存在する他のニューロン群である *it* ニューロン、*avt* ニューロンが脊髄に投射するという報告(Saito *et al.*, 2004)もあるため、この神経核の *npb* ニューロンが脊髄に投射しているのではないかと考えられる。Vs/Vp からの *npb* ニューロンの軸索は PMm/PMg へと投射し、そこで PMm/PMg 由来の軸索と一体となっているため、それより尾側へ投射しているかどうかは不明である。しかし、Vs/Vp は破壊実験や電気刺激実験により性行動に変化をもたらすことが知られているため(Kyle and Peter, 1982; Koyama *et al.*, 1984; Satou *et al.*, 1984)、PMm/PMg や他の神経核を介して、あるいは直接、脊髄の運動系への入力をしていると考えられる。

脊髄へ投射した *npb* ニューロンが脊髄内のどのような細胞に投射しているのかを調べる

ために、*npb* の受容体である *gpr8* の脊髄内での発現部位を調べた。すると、脊髄の前角の比較的大細胞性の細胞で *gpr8* の発現がみられた。さらにこの細胞は、コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) の免疫陽性を示した。ChAT はアセチルコリンを伝達物質として用いるニューロンに局在し、脊髄においては運動ニューロン、自律神経節前ニューロンのマーカーである (Woolf, 1991; Pérez *et al.*, 2000)。本研究からは運動ニューロン、自律神経節前ニューロンのどちらで *gpr8* が発現しているのかは明らかになっていないが、脊髄の前部、中部、後部のいずれにおいても *gpr8* のシグナルは脊髄の中心管よりもわずかに上の領域と、中心管より下の前角下端付近にみられた。魚類の脊椎においては、自律神経節前ニューロンは中心管付近でみられ (Funakoshi and Nakamoto, 2007)、運動ニューロンは脊髄の前角でみられることが知られている (Westerfield *et al.*, 1986; Schneider and Sulner, 2006)。そのため、脊髄で *gpr8* を発現するニューロンは、自律神経節前ニューロンと運動ニューロンの両方なのではないかと考えられる。*Npb* がこれらのニューロンに対しどのような作用をするのかは明らかになっていないが、*gpr8* は、リガンドと結合すると細胞内の cAMP 濃度を減少させる Gi 型の G タンパク質と共役するため (Tanaka *et al.*, 2003)、cAMP を介した何らかの作用により情報を伝達あるいは修飾していると考えられる。

メス特異的 *npb* ニューロンの生体内での挙動を調べるために、電気生理学的解析を行った。すると、PMm/PMg の *npb* ニューロンは規則的なペースメーカー様の発火活動を行っていることが明らかになった。また、産卵行動が多く行われる日中の時間帯と、ほとんど行われない夜の時間帯の間で、*npb* ニューロンの活動に差はみられず、これらの *npb* ニューロンは昼夜を問わず一定のはたらきをしていることが示唆された。一方で、卵巣を除去すると、これらの *npb* ニューロンの発火頻度は大きく低下し、またその規則性も低下することが明らかになった。エストロゲンを投与すると、発火頻度と規則性が回復するため、卵巣除去による *npb* ニューロンの活動の低下はエストロゲンの供給がないためであると考えられる。これらのエストロゲンの作用が、*npb* ニューロンに発現する ER を介した直接的なものなのか、あるいは *npb* ニューロンに投射する何らかのニューロンへの作用を介した間接的なものなのかは不明だが、PMm/PMg のメス特異的性ステロイド受容ニューロンは、体内のエストロゲン環境によって *npb* や ER、AR といった遺伝子の発現だけでなく、発火活動のパターンも変動させることが示された。

最後に、メス特異的な *npb* ニューロンが生体内でどのような機能を担っているのかを調べるために、*npb* 遺伝子を破壊したノックアウトメダカを作出し、解析を行った。ここまでの組織学的、電気生理学的解析から、メス特異的 *npb* ニューロンは、脊髄の運動神経系、あるいは

自律神経系を介して何らかの性特異的な現象を支配すると考えられた。しかし、*npb* ノックアウトメダカは野生型メダカと同様に産卵することができ、また、性行動の際の求愛ダンス、交接などの行動様式のタイミングや頻度も野生型メダカと差がなかった。最初の交接までにかかる時間、産卵までにかかる時間は野生型と比べノックアウトメダカで長くなる傾向がみられたが、有意な差ではなく、*npb* のノックアウトによる性行動への影響はあったとしてもわずかなものだということが示唆された。

以上、本研究により、*npb* はメス特異的性ステロイド受容体の標的遺伝子であることが明らかになった。PMm/PMg のメス特異的 *npb* ニューロンはメスのみで大型の細胞がみられるという形態学的性差も示された。メス特異的 *npb* ニューロンは間脳、延髄を通り脊髄に投射し、脊髄内の運動ニューロン、自律神経節前ニューロンに入力していた。メス特異的 *npb* ニューロンは規則的な発火活動を示し、その発火活動は血中エストロゲン濃度により変化した。一方で、*npb* をノックアウトしたメダカの性行動には大きな変化がみられず、*npb* の機能を明らかにすることはできなかった。

表 2-1. 本章で用いたプライマー

名称	使用目的	塩基配列 (5´-3´)
npb-F1	<i>npb</i> プローブ作製	AGCACACAGCCGTTTCCACTGAG
npb-R1	<i>npb</i> プローブ作製	GAAATTACAGCTCACATATGTACATTCATC
npb-ERE-TAL-check-F1	<i>npb</i> -ERE 破壊メダカスクリーニング	GGAAAGGCAATTCCATAAATGTGGA
npb-ERE-TAL-check-R1	<i>npb</i> -ERE 破壊メダカスクリーニング	GGGTTATGCTGCCACACTC
npb-ERE-TAL-seq-F1	<i>npb</i> -ERE 破壊メダカシークエンシング	CATAAATGTGGATTAACACGGAGT
npb-ERE-TAL-seq-R1	<i>npb</i> -ERE 破壊メダカシークエンシング	GCCCACACTCTGTGATACCTGA
npb-F3	<i>npb</i> real-time PCR	ATCTGATTTCTCACAACCTCCAT
npb-R3	<i>npb</i> real-time PCR	GATCCCTTGATTTCTTGGGACA
b-actin-F1	<i>b-actin</i> real-time PCR	CCCCACCCAAAGTTTAG
b-actin-R1	<i>b-actin</i> real-time PCR	CAACGATGGAGGGAAAGACA
gfp-F1	<i>gfp</i> プローブ作製	CCACCATGGTGAGCAAGCAGAT
gfp-R1	<i>gfp</i> プローブ作製	AATTCCTATTACACCCACTCGTG
gpr8-F1	<i>gpr8</i> プローブ作製	AGCTACGCAAACCTCCTGCCTCAAC
gpr8-R1	<i>gpr8</i> プローブ作製	CTCAGGTTTTTGATTGATGACATTGGACT
npb-TAL-check-F1	<i>npb</i> -KO メダカスクリーニング	CAGCCGTTTCCACTGAGCCTCT
npb-TAL-check-R1	<i>npb</i> -KO メダカスクリーニング	CAACACGCTGTTGATCTCCGTCT
npb-TAL-seq-F1	<i>npb</i> -KO メダカシークエンシング	TCCACTGAGCCTCTAAAGCGCA
npb-TAL-seq-R1	<i>npb</i> -KO メダカシークエンシング	TCCGTCTCGCCGCTGTCTGA

名称カラムの中の-Fはフォワードプライマー、-Rはリバースプライマーを示す。使用目的カラム中のスクリーニングとは、ジェノタイピング時のゲノムをテンプレートとしたPCRで用いたことを意味する。同カラム中のシークエンシングとは、ゲノムから増幅したPCR産物のシークエンシングに用いたことを意味する。

表 2-2. 神経核の略称と名称

略称	名称
cmSP	motor spinal column
i	intermediate nucleus of area octavolateralis
IQ	inferior oblique of the oculomotor nerve nucleus
IR	inferior rectus of the oculomotor nerve nucleus
MR	medial rectus of the oculomotor nerve nucleus
NAT	anterior tuberal nucleus
NFS/LX	nucleus of solitary fascicle/lobus vagus
NGp	posterior glomerulosus nucleus
NIX	nucleus of glosso-pharyngeal nerve
NPT	posterior tuberal nucleus
NRL	lateral recess nucleus
NTv	nucleus of descending tract of trigeminal nerve
NVII s	sensory nucleus of facial nerve
NV <sub>m</sub>	motor nucleus of trigeminal nerve
oi	inferior olive
Pbl	basal lateral preoptic nucleus
PMg	gigantocellular portion of the magnocellular preoptic nucleus
PM <sub>m</sub>	magnocellular portion of the magnocellular preoptic nucleus
PPa	anterior parvocellular preoptic nucleus
rHd	right dorsal habenula
RI	inferior reticular nucleus
RM	medial reticular nucleus
RS	superior reticular nucleus
t	tangential nucleus of area octavolateralis
Vp	posterior nucleus of the ventral telencephalic area
Vs	supracommissural nucleus of the ventral telencephalic area
Vv	ventral nucleus of the ventral telencephalic area

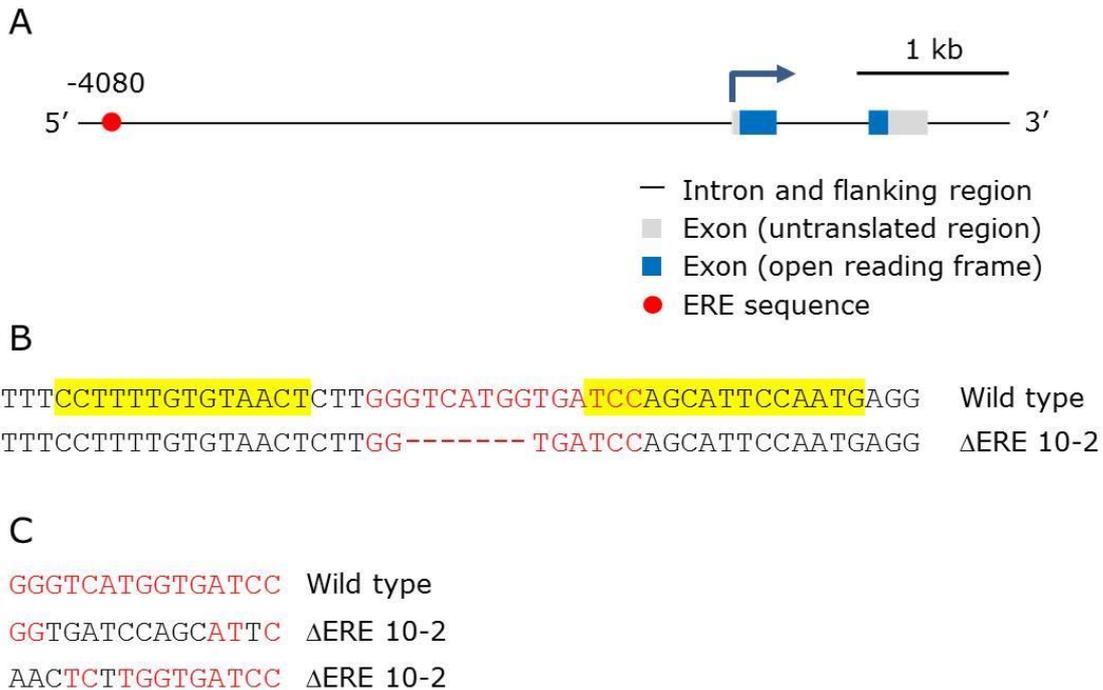


図 2-1. *npb*-ERE 破壊メダカのゲノム情報

(A) TALEN のターゲットとした ERE と *npb* 遺伝子の模式図。*npb* 遺伝子の転写開始点を矢印で示した。転写開始点から 4080 bp 上流にある ERE をターゲットとした。黒線はイントロンおよび隣接領域を、灰色のボックスはエキソン(非翻訳領域)を、青のボックスはエキソン(翻訳領域)を、赤丸は ERE 配列を示す。(B) ターゲットとした ERE と、左右それぞれの TALEN の認識配列。TALEN の認識配列を黄色で示し、ERE を赤文字で示した。上が野生型の配列、下が *npb*-ERE 破壊メダカ(ΔERE 10-2)の配列である。欠損した塩基をハイフンで示した。(C) *npb*-ERE 破壊メダカにおける ERE 配列。野生型の ERE 配列を上段に、欠損した塩基の分を左側に詰めた場合の配列を中段に、右側に詰めた場合の配列を下段に記した。野生型とは異なる塩基を黒で、同じ塩基を赤で表記した。

A

AGCACACAGCCGTTTCCACTGAGCCTCTAAAGCGCACACCCGGACACGGAGATGCAGCCCAA  
CTTACCTCTCCTTCGCAAGTTATTGCTGTGCTGGCAGTTTGCAGTCCGTCAGAGGCATGGTA  
CAAGCAGGTGGCCGGTCCCAGCTACTACTCCGTGGGCAGGGCGTCCGGTTTGTGTCCGGGA  
TCCGGAGGTCACCGCACGTCAGGAGGGAGGAAAGCCCGTCAGACAGCGGCGAGACGGAGATC  
AACAGCGTGTGTCTGATCTGATTTCTCACAACCTCCATCCTCAAAACCATGgtatgtattat  
tttttttcaataactcaactccgaacatttagctggagacaaccttttttcccattaggtga  
gaacaaacagattgtgaaactacttgctgggtttcaaagcaaaggagctgtcacttcagca  
ccatgtgtacactcagcatcctgagattacacaattagaactggacagctttaatctcta  
tatttgtttatgatagacgagagaatgatccatttagtattgacatcatttttaatacaagtt  
attgtaaaaaactgcaagaacatcctataaaataatgtctttgtagagtagaaataccgta  
aaaaacattaatctgtataaaatttgaccattttcagtttttaagcactccataaagaccat  
gaaattatagttttattaggttcattaacttttaatacacagttgtagtaaaactgcacatta  
gaacaaaatgactcacttttacattttcatttatacacttagtggttttaatgtgatattt  
gagtgtcttttactatgaagccatacagtttatgaagtcaacaatgcttttacttgtgaa  
atgccttttttttgtcttctctacaaatagCCCATTTGCCTCAAGGACATTACACCAA  
ACCTGCAGAGCTGCGAATTGTCCAAGAAATCAAGGGATCATTTAAATGCAAAGCAGATGTC  
TTCTCTCCCTGGATTCTTTGGACTGTGCAGGAGACTGAGACACCAGCAACGTTGATGGATG  
ATGGAGGCGAATTCAAGTTATATATAACAACATGAAACAAAGTGTAGAATTAAGGAGAGCA  
ATGTTCTGGATGGAAGTTGTAACTTTTTCCATGTACCATTTTACCTGGTGTATTGATTTTAT  
GGGCAAAAGCTTTTAAACACCTAAACTGCAAAAGCTGTGGATGAATGTACATATGTGAGCT  
GTAATTTCAATAATAAAAAAAGCTTGTGAAAATGCAAAATCTG

B

TTTGCAGTCCGTCAGAGGCATGGTACAAGCAGGTGGCCGGTCCCAGCTACT Wild type  
TTTGCAGTCCGTCAGAGGCATGGT-----GGCCGGTCCCAGCTACT npb-KO 21-1

C

WYKQVAGPSYYSVGRASGLLSGIRRSPhV Wild type  
WWPVPATTPWAGR PVCCPGSGGHR TSGGR npb-KO 21-1

図 2-2. *npb* ノックアウトメダカのゲノム情報

(A) *npb* 遺伝子の構造と TALEN の認識配列。大文字はエキソン、小文字はイントロンを示す。翻訳領域を赤字で記し、そのうち成熟 Npb ペプチドをコードする部分を青文字で記した。左右それぞれの TALEN の認識配列を黄色で示した。(B) 野生型およびノックアウト個体の遺伝子配列。赤字は翻訳領域、青文字は成熟 Npb ペプチドをコードする部分を示す。左右それぞれの TALEN の認識配列を黄色で着色した。上が野生型の配列、下が *npb* ノックアウトメダカ (*npb*-KO 21-1) の配列である。欠損した塩基をハイフンで示した。(C) 野生型およびノックアウト個体の成熟 Npb ペプチドの演繹アミノ酸配列。上が野生型の配列、下が *npb* ノックアウトの配列である。ノックアウト個体において、野生型個体と異なるアミノ酸を赤字で記した。

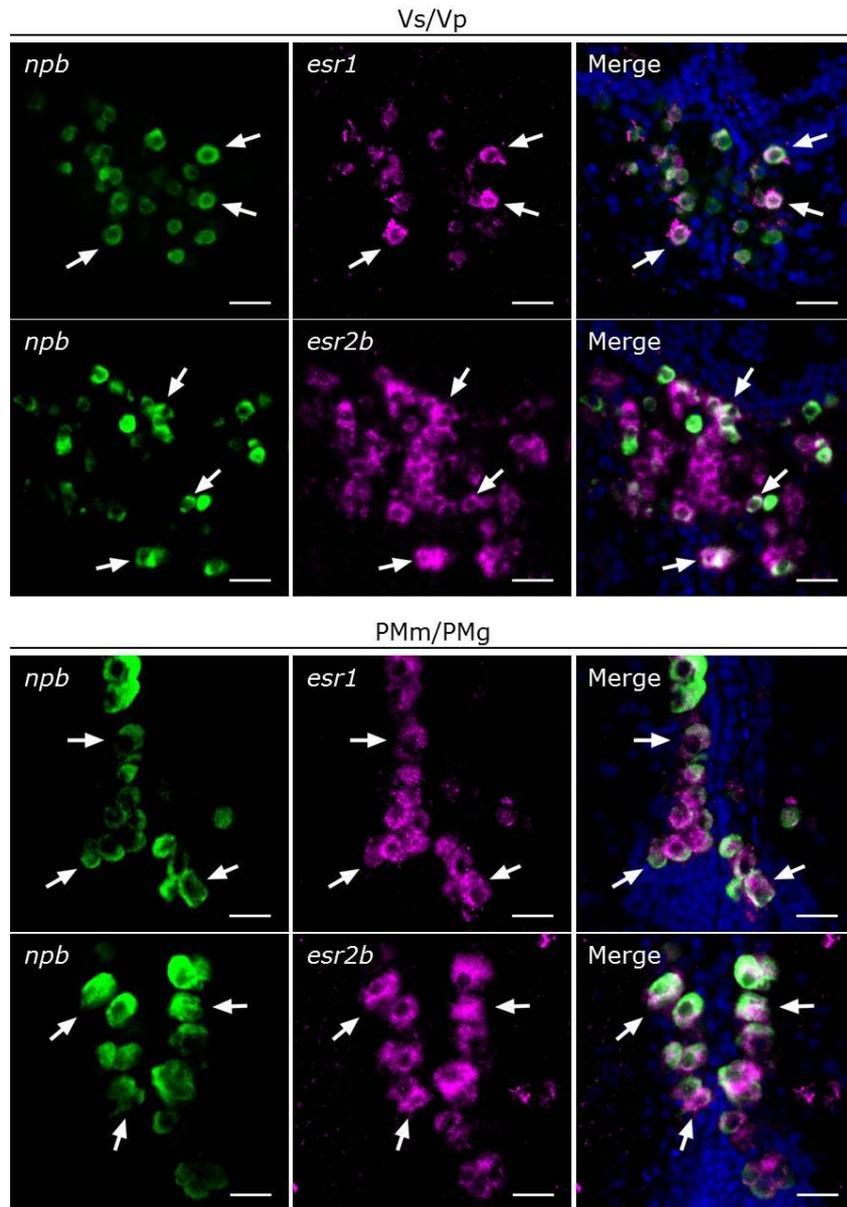


図 2-3. *npb* と ER の共発現

*npb* と ER の蛍光二重 *in situ* hybridization。緑が *npb* のシグナル、マゼンタが ER のシグナル、青は DAPI による対比染色。上が Vs/Vp の結果、下が PMm/PMg の結果を示す。上から、それぞれ *esr1*、*esr2b* との共発現の写真。矢印は共発現しているニューロンを示す。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。

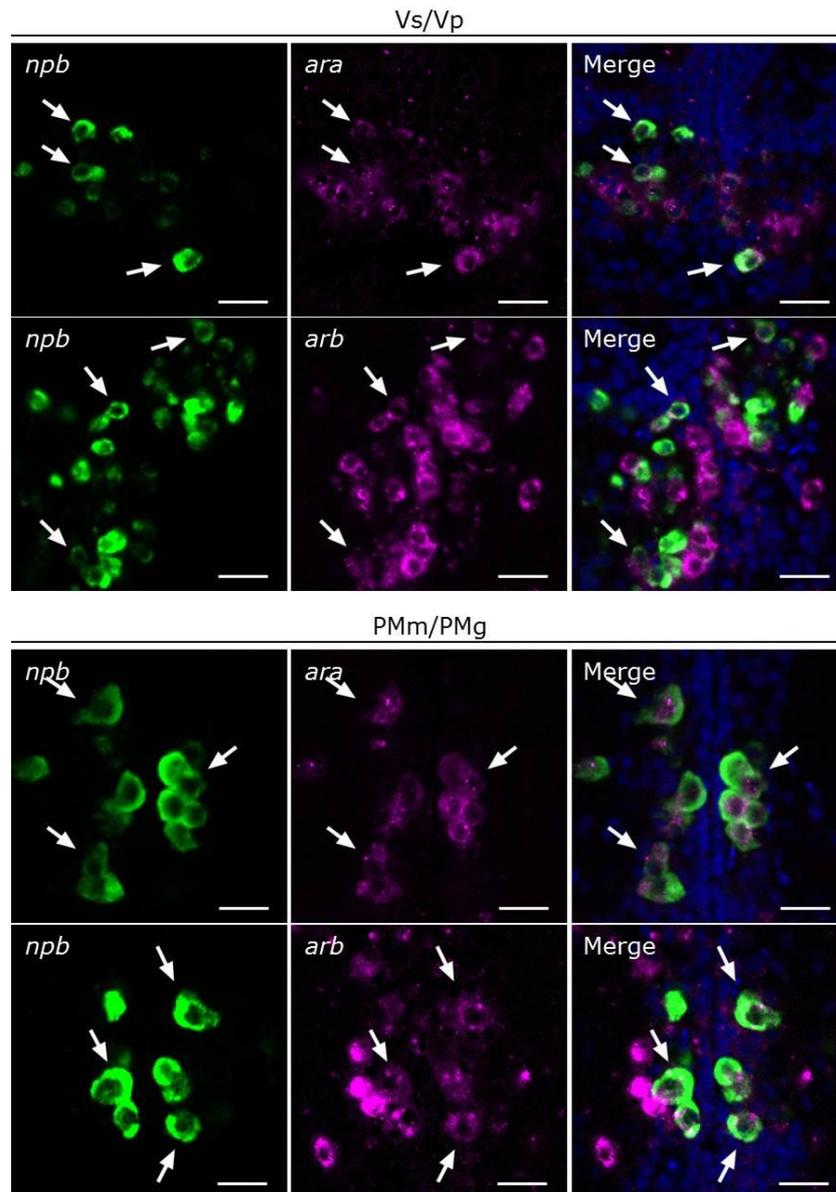


図 2-4. *npb* と AR の共発現

*npb* と AR の蛍光二重 *in situ* hybridization。緑が *npb* のシグナル、マゼンタが AR のシグナル、青は DAPI による対比染色。上が Vs/Vp の結果、下が PMm/PMg の結果を示す。上から、それぞれ *ara*、*arb* との共発現の写真。矢印は共発現しているニューロンを示す。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。

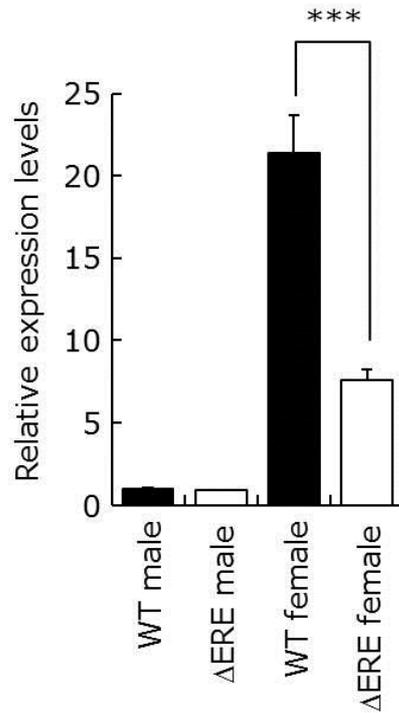


図 2-5. *npb*-ERE 破壊メダカにおける全脳レベルでの *npb* 発現量

野生型メダカ(WT)および *npb*-ERE 破壊メダカ( $\Delta$ ERE)の雌雄において脳全体での *npb* の発現量を real-time PCR によって測定した。縦軸は野生型メダカのオスの発現量を 1 とした相対発現量を示す。黒のカラムは野生型メダカ、白のカラムは *npb*-ERE 破壊メダカを示す。オスの群どうし、メスの群どうしで比較を行った。\*\*\*は  $p < 0.001$  で有意差があることを示す。エラーバーは SEM。

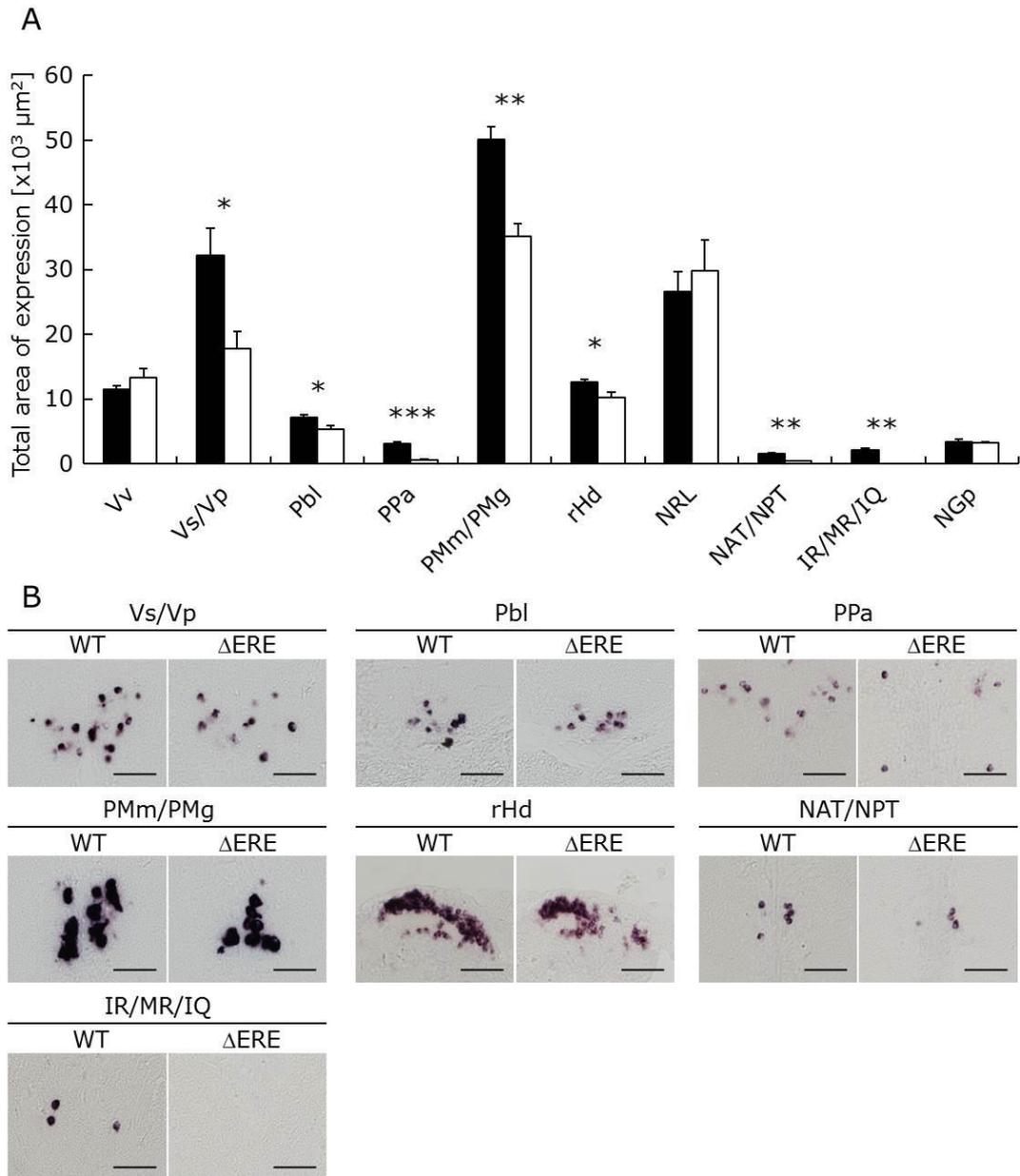


図 2-6. メスの *npb*-ERE 破壊メダカの *npb* 発現

(A) 野生型メダカ (WT) および *npb*-ERE 破壊メダカ ( $\Delta$ ERE) のメスの脳における *npb* の *in situ* hybridization シグナルの面積。黒のカラムは野生型メダカ、白のカラムは *npb*-ERE 破壊メダカを示す。それぞれの神経核ごとの野生型と *npb*-ERE 破壊メダカ間の有意差を\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$  で示した。エラーバーは SEM。(B) 有意な差がみられた各神経核の代表的な写真。左側が野生型、右側が *npb*-ERE 破壊メダカの写真。スケールバーは 50  $\mu$ m。各神経核の略称については表 2-2 参照。

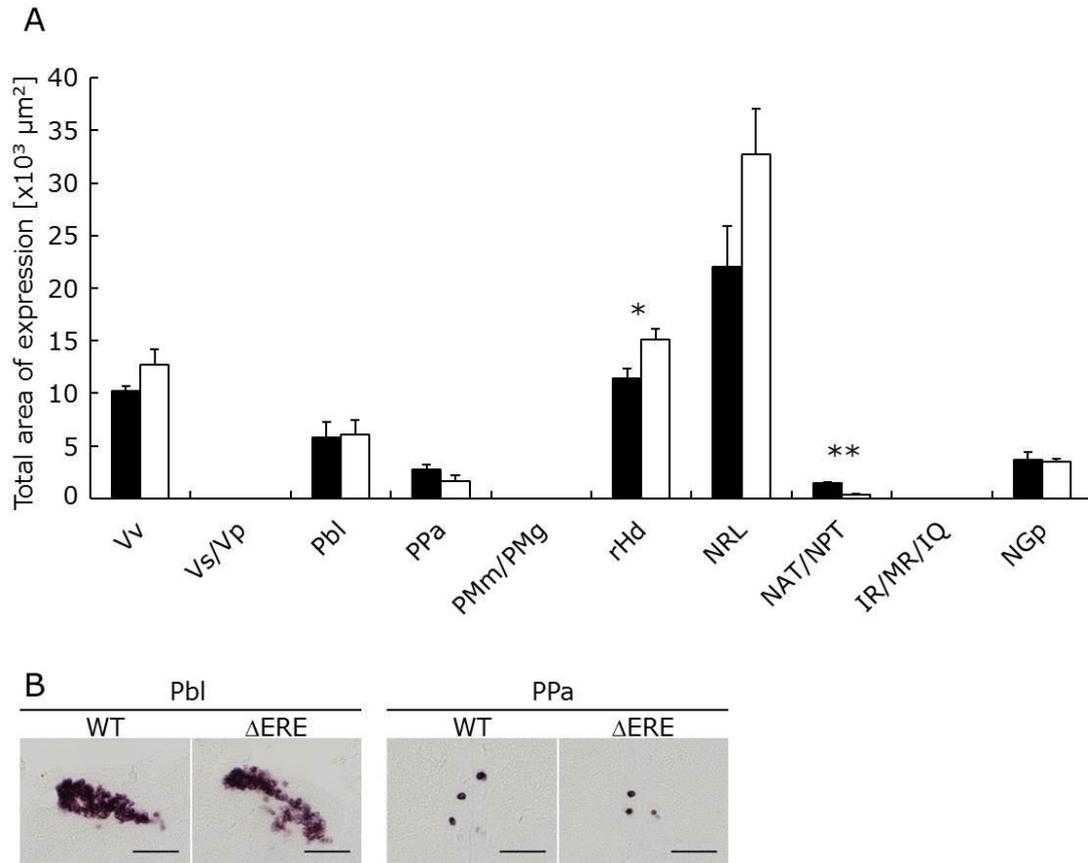


図 2-7. オスの *npb*-ERE 破壊メダカの *npb* 発現

(A) 野生型メダカ (WT) および *npb*-ERE 破壊メダカ ( $\Delta$ ERE) のオスの脳における *npb* の *in situ* hybridization シグナルの面積。黒のカラムは野生型メダカ、白のカラムは *npb*-ERE 破壊メダカを示す。それぞれの神経核ごとの野生型と *npb*-ERE 破壊メダカ間の有意差を\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  で示した。エラーバーは SEM。(B) 有意な差がみられた各神経核の代表的な写真。左側が野生型、右側が *npb*-ERE 破壊メダカの写真。スケールバーは 50  $\mu$ m。各神経核の略称については表 2-2 参照。

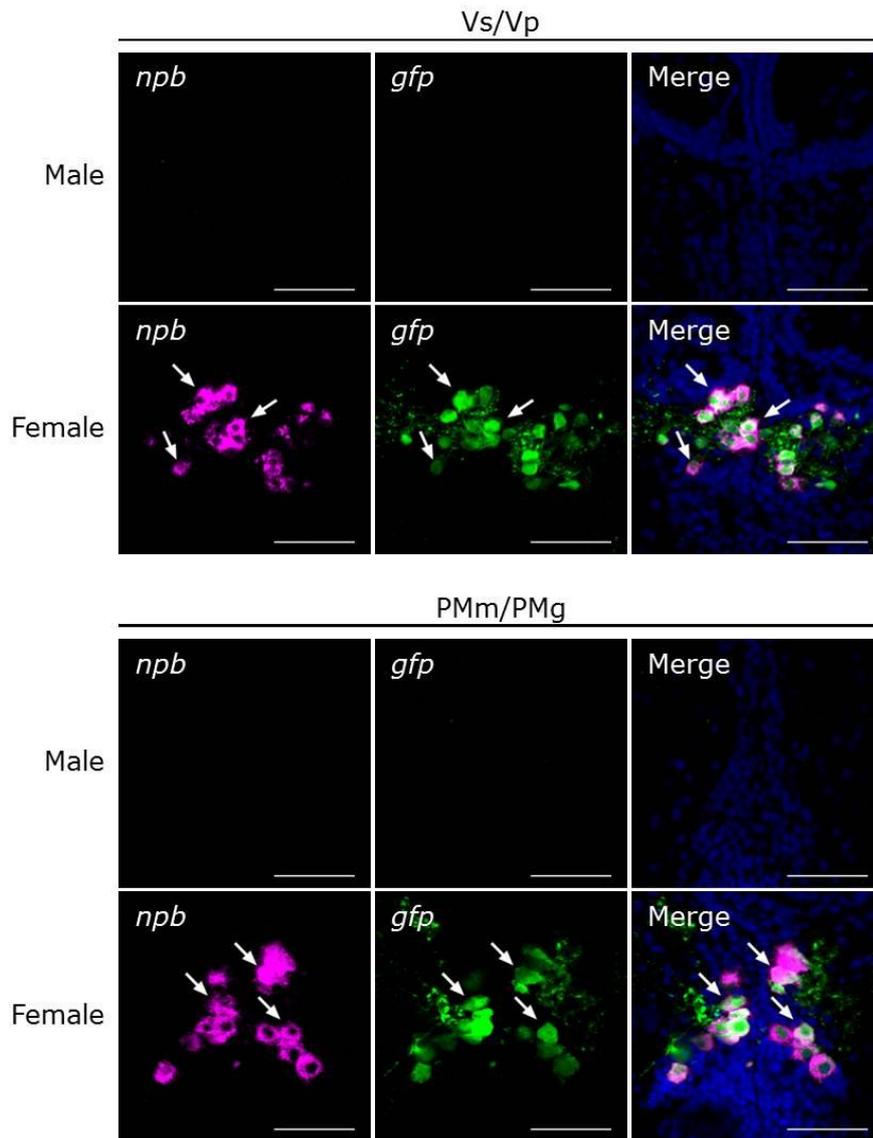


図 2-8. *npb-gfp* トランスジェニックメダカにおける *npb* と *gfp* の共発現

*npb-gfp* トランスジェニックメダカにおける *npb* と *gfp* の共発現を蛍光二重 *in situ* hybridization により確認した。マゼンタが *npb* のシグナル、緑が *gfp* のシグナル、青は DAPI による対比染色。上から順にオスの Vs/Vp、メスの Vs/Vp、オスの PMm/PMg、メスの PMm/PMg の写真。矢印は共発現しているニューロンを示す。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。

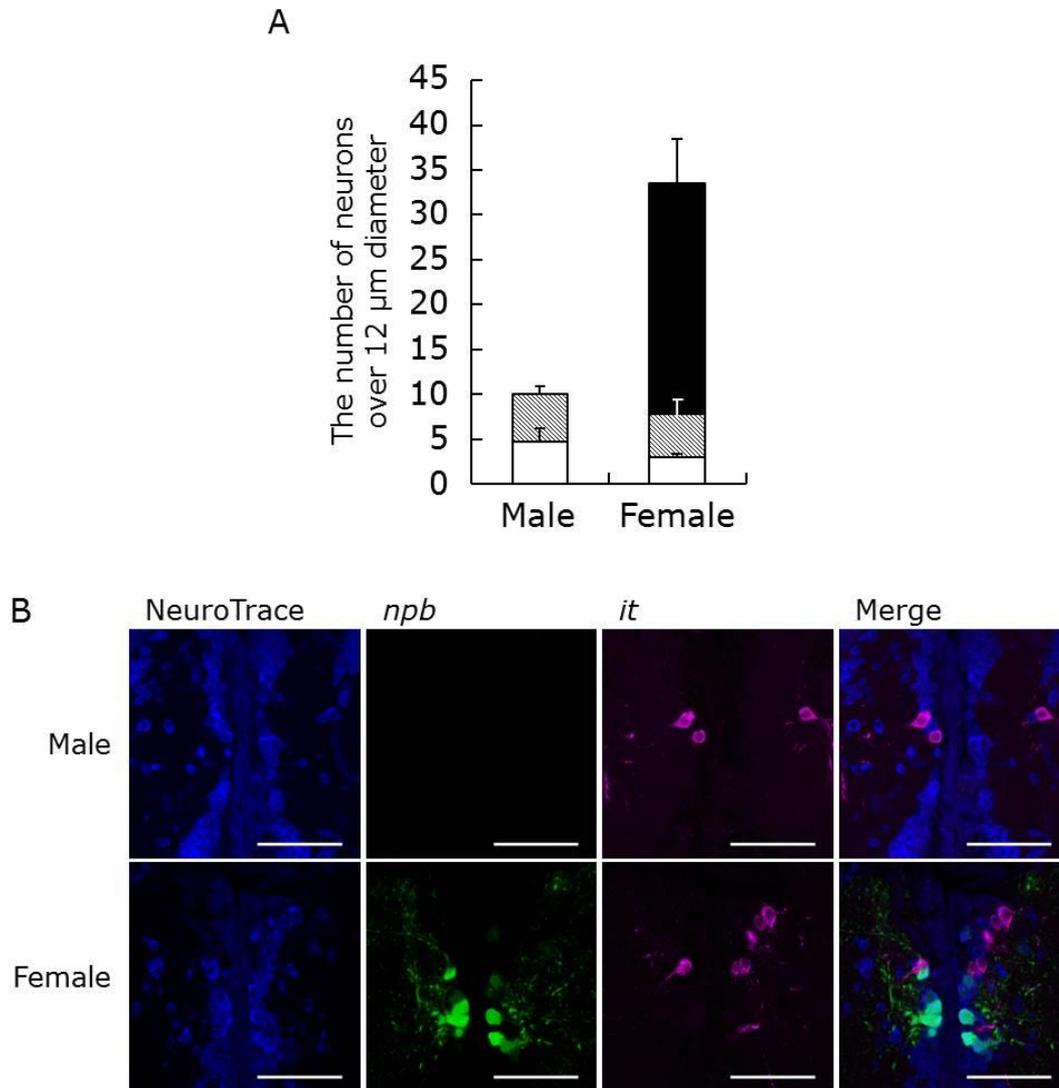


図 2-9. *npb* ニューロンの形態学的性差

(A) PMm/PMg において、最大部分の直径が 12  $\mu\text{m}$  以上のニューロンのうち、*npb* ニューロン(黒のカラム)、*it* ニューロン(網掛けのカラム)、いずれのシグナルも見られなかったニューロン(白のカラム)の個数。左側のカラムがオスの結果、右側のカラムがメスの結果を示す。エラーバーは SEM。(B) 解析に用いた、NeuroTrace(全ニューロンの染色; 青)、*npb-gfp* トランスジェニックメダカの Gfp 蛍光(緑)、It の免疫組織化学(赤)の三重染色の代表的な写真。上段がメスの結果、下段がオスの結果を示す。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。

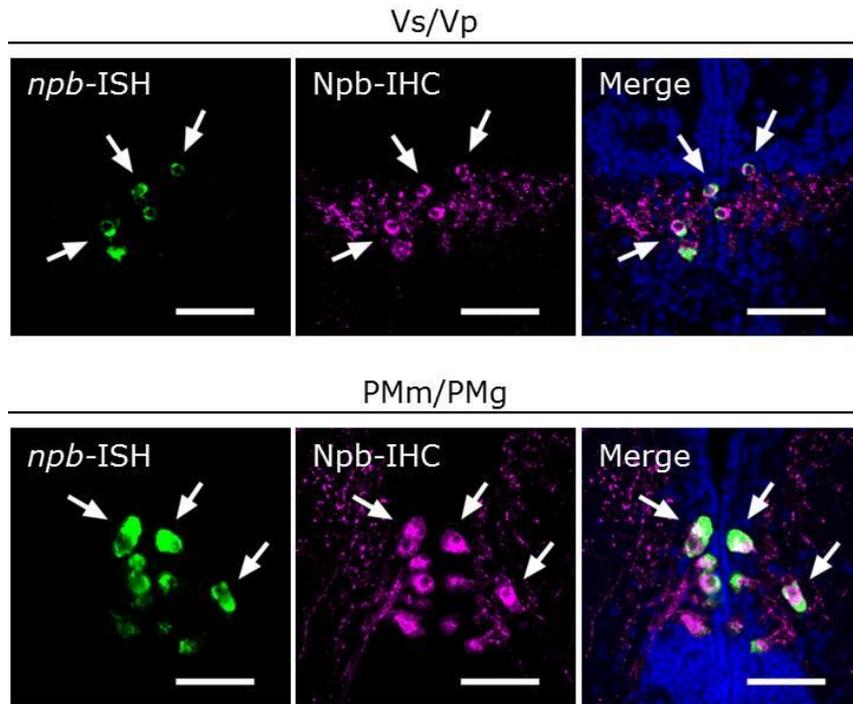


図 2-10. Npb 抗血清の評価

*npb* の *in situ* hybridization (ISH) と、Npb 抗血清を用いた免疫組織化学 (IHC) の二重染色。緑は *npb* の ISH のシグナル、マゼンタは Npb の IHC のシグナル、青は DAPI による対比染色のシグナル。上段が Vs/Vp、下段が PMm/PMg の写真。矢印はシグナルの一致したニューロンを示す。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。

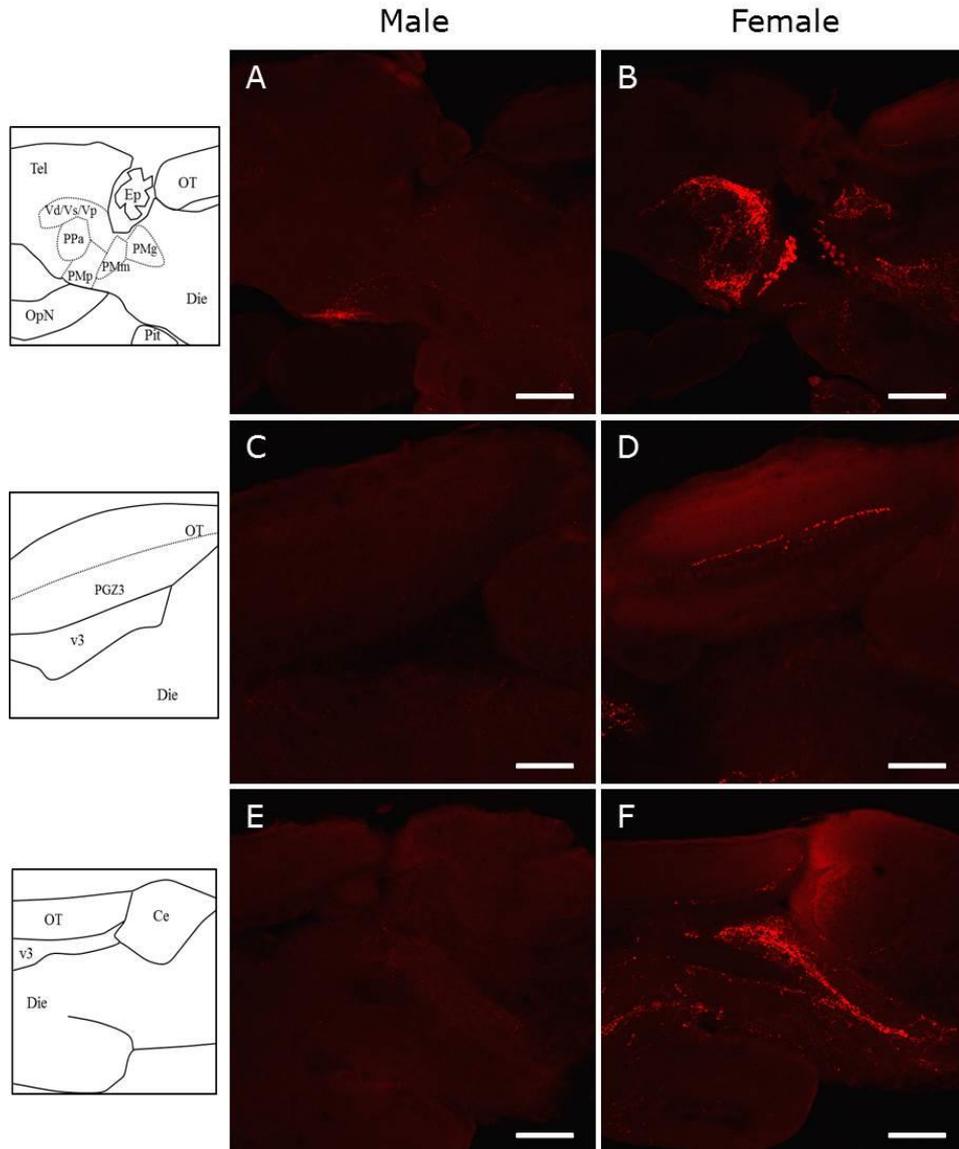


図 2-11. 脳における Npb の免疫組織化学

オス(A、C、E)とメス(B、D、F)のメダカの脳における Npb の局在。A、B は終脳の後部から視索前野、間脳にかけての領域、C、D は視蓋、E、F は間脳の後部を示しており、いずれも sagittal 方向の切片の写真。左手が吻側。各脳領域の模式図を左側に表示した。Ce、小脳; Die、間脳; OpN、視神経; OT、視蓋; Pit、下垂体; Tel、終脳; v3、第三脳室。スケールバーは 200  $\mu\text{m}$ 。各神経核の略称については表 2-2 参照。

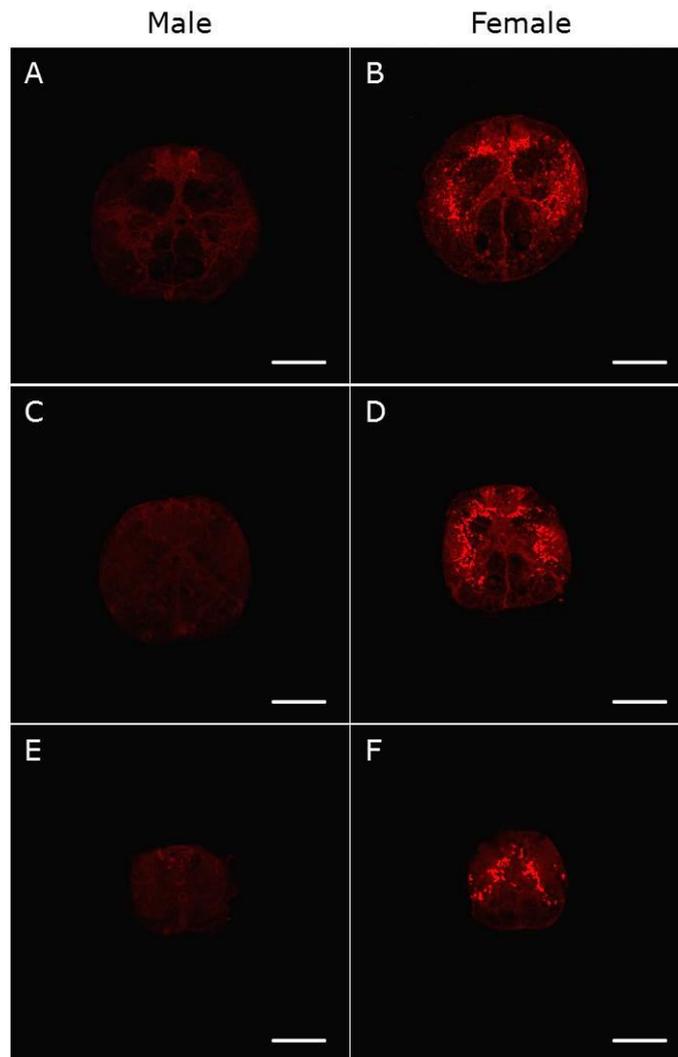


図 2-12. 脊髄における Npb の免疫組織化学  
 オス(A、C、E)とメス(B、D、F)のメダカの脊髄における Npb の局在。A、B は脊髄の前部、C、D は脊髄の中部、E、F は脊髄の後部をしめしており、いずれも前後軸と垂直方向 (coronal) の切片の写真。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

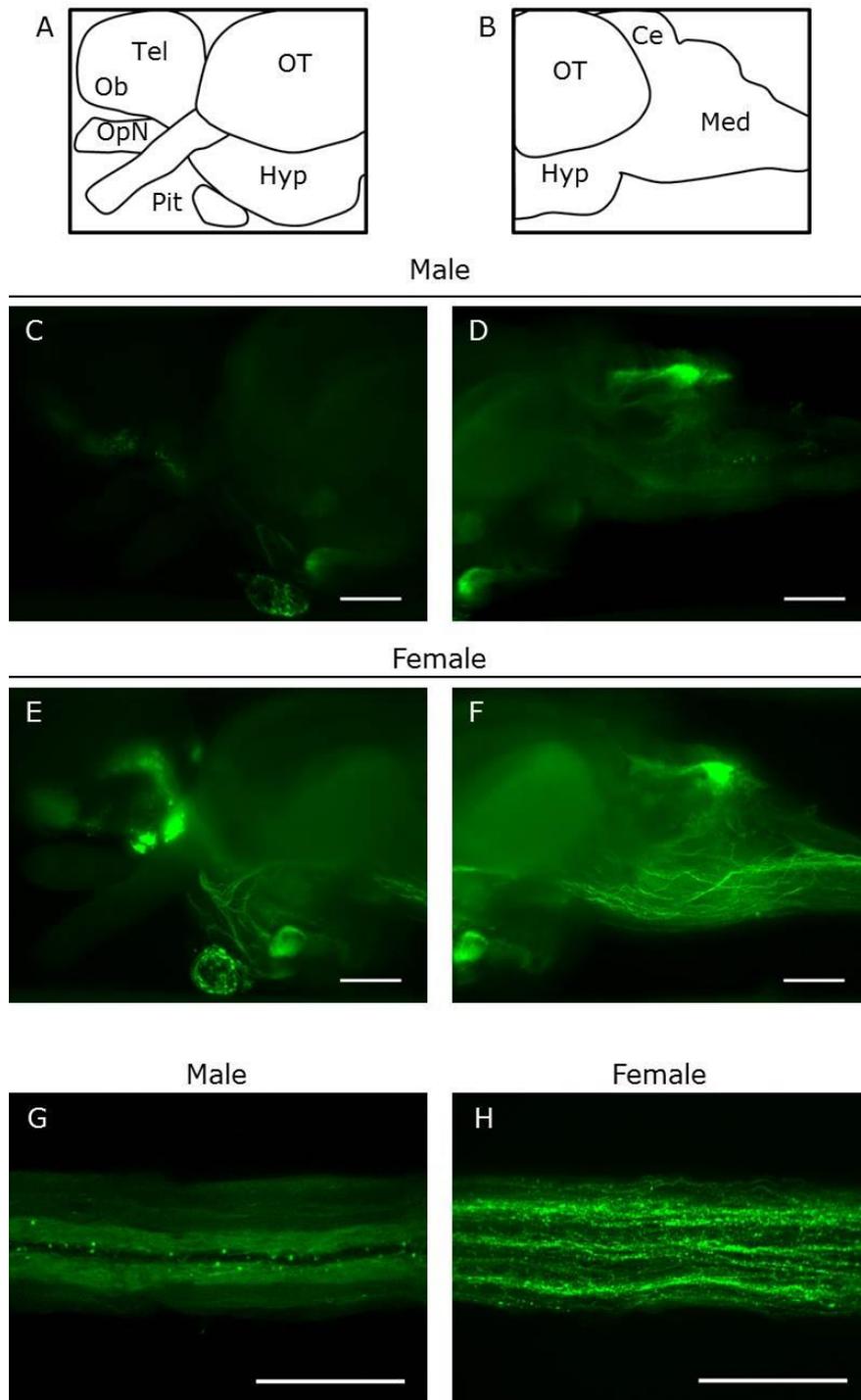


図 2-13. *npb-gfp* トランスジェニックメダカの脳と脊髄

透明化したオス(C、D、G)とメス(E、F、H)の *npb-gfp* トランスジェニックメダカの脳と脊髄の蛍光写真。AはC、E(脳の吻側)の模式図、BはD、F(脳の尾側)の模式図。Tel、終脳; Ob、嗅球; OpN、視神経; OT、視蓋; Hyp、視床下部; Pit、下垂体; Ce、小脳; Med、延髄。G、Hは脊髄の写真。スケールバーは 500  $\mu\text{m}$ 。

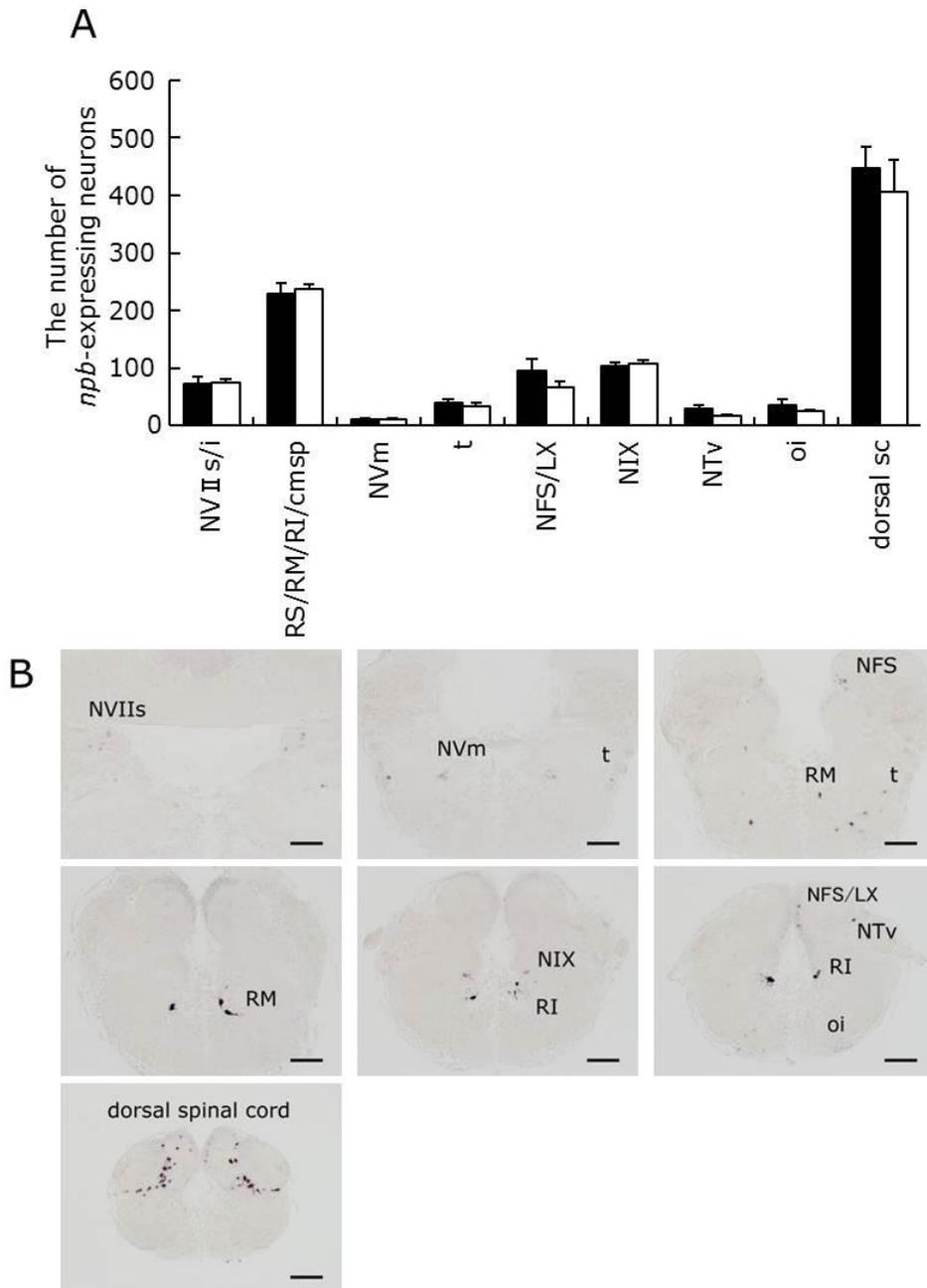


図 2-14. 延髄における *npb* 発現

(A) 延髄から脊髄にかけての神経核別の *npb* 発現ニューロンの個数。黒のカラムがオス、白のカラムがメスの結果を示す。エラーバーは SEM。(B) 各神経核の代表的な写真(全てオス)。スケールバーは 100  $\mu$ m。神経核の略称については表 2-2 を参照。

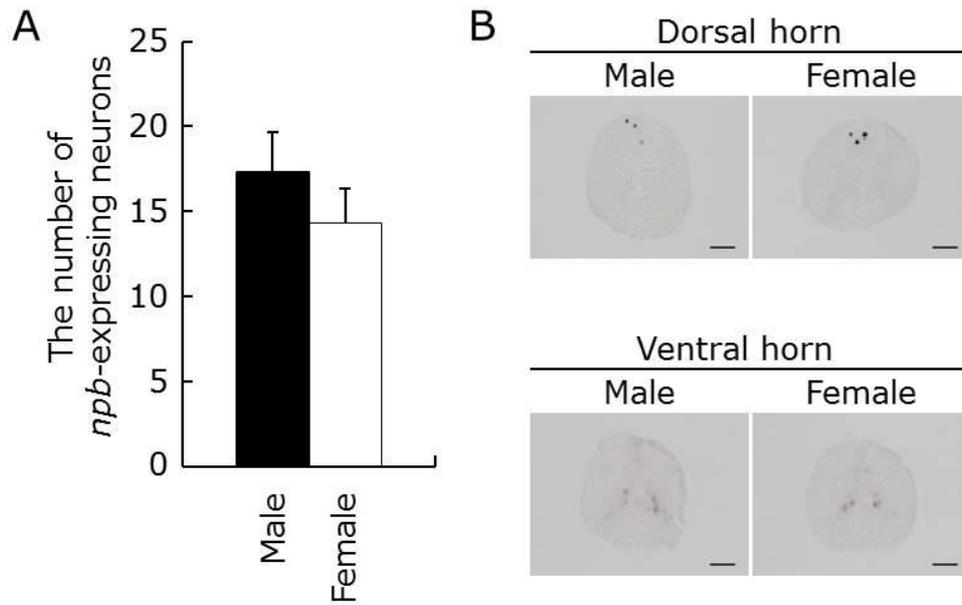


図 2-15. 脊髄における *npb* 発現

(A) 脊髄における、切片 30 枚あたりの *npb* 発現ニューロンの数。黒のカラムがオス、白のカラムがメスの結果を示す。エラーバーは SEM。(B) 脊髄の後角、前角それぞれにおける *npb* 発現の代表的な写真。左がオス、右がメスの写真。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。

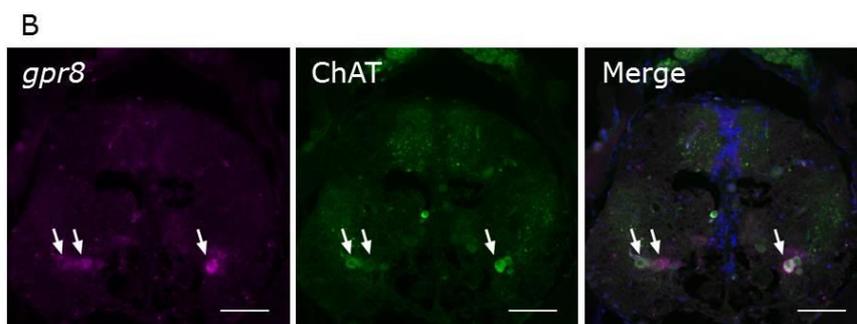
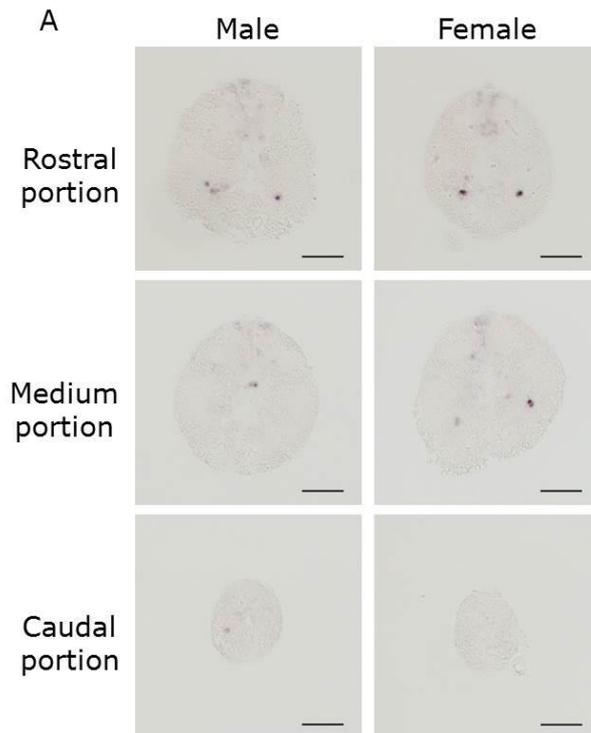


図 2-16. 脊髄における *gpr8* 発現

(A) 脊髄における *gpr8* 発現の代表的写真。左がオス、右がメス、上段から順に脊髄の前部、中部、後部を示す。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。(B) 脊髄における *gpr8* の *in situ* hybridization (マゼンタ)と、ChAT の免疫組織化学(緑)の二重染色。青は DAPI による対比染色。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。

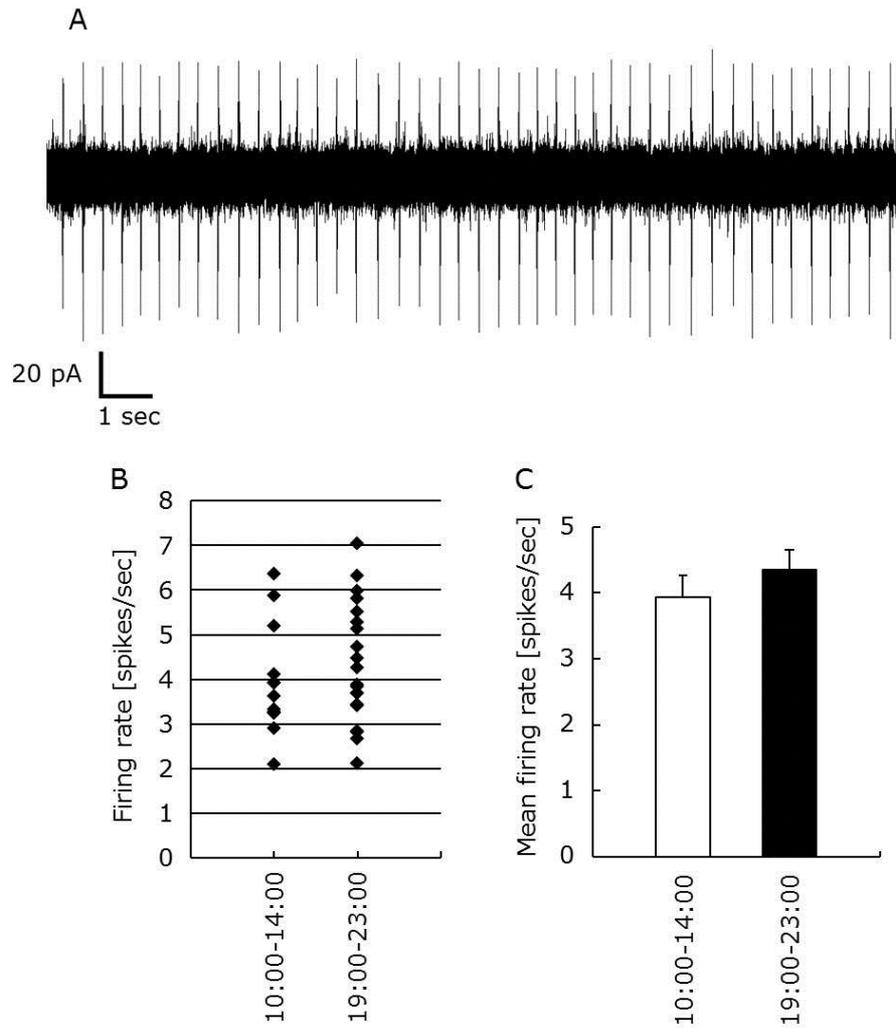


図 2-17. PMm/PMg の *npb* ニューロンの電気生理学的解析

(A) PMm/PMg の *npb* ニューロンの活動電流の波形の代表例。縦軸のスケールバーは 20 pA、横軸のスケールバーは 1 秒を示す。(B) 日中(左)と夜(右)における発火頻度のプロット。縦軸は発火頻度(spikes/second)を表す(C) 日中(白のカラム)と夜(黒のカラム)の *npb* ニューロンの発火活動の比較。縦軸は発火頻度の各時間帯での平均(spikes/second)を表す。エラーバーは SEM。

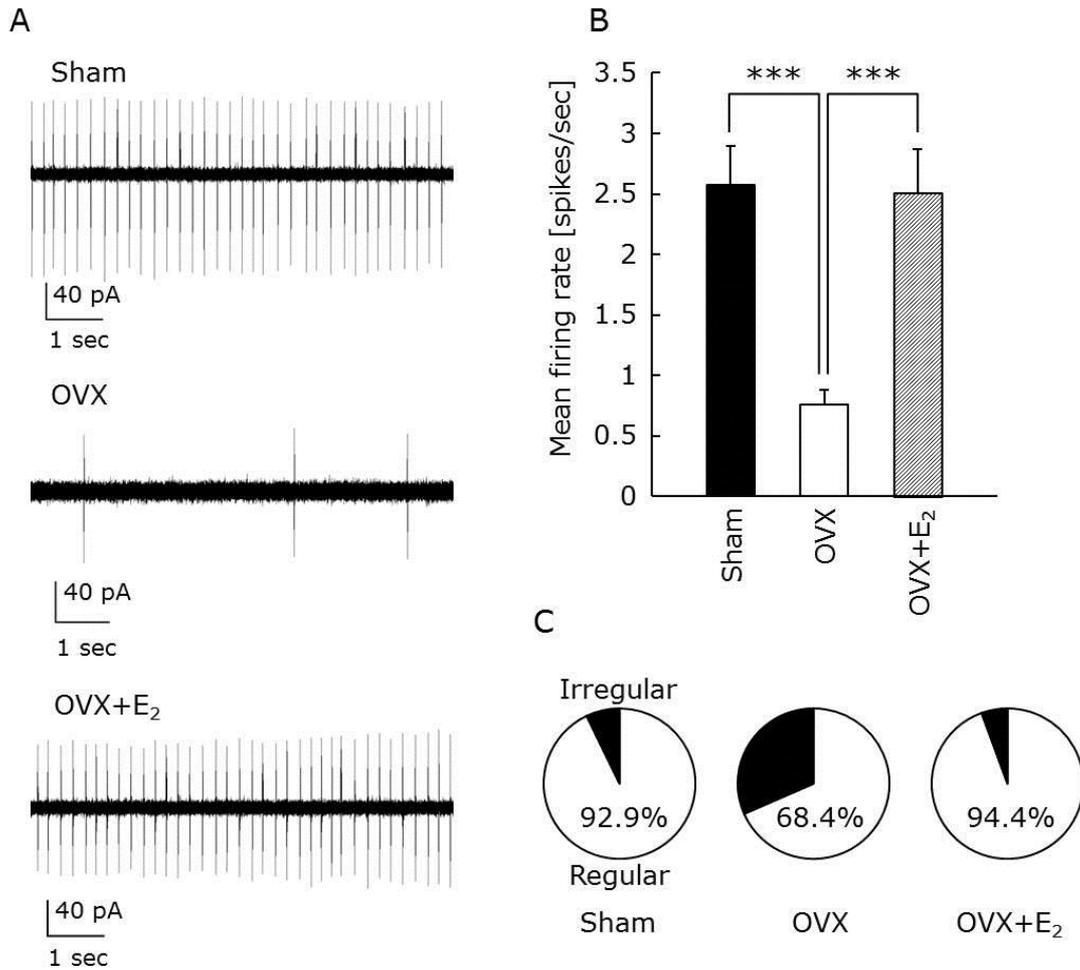


図 2-18. OVX による PMm/PMg の *npb* ニューロンの発火活動の変化

(A) 擬手術群 (Sham)、卵巣除去群 (OVX)、卵巣除去+エストロゲン投与群 (OVX+E<sub>2</sub>) それぞれの、PMm/PMg の *npb* ニューロンの活動電流の波形の代表例。縦軸のスケールバーは 40 pA、横軸のスケールバーは 1 秒を示す。(B) 各群の平均発火頻度の比較。縦軸は、発火頻度の各群での平均(spikes/second)を示す。有意差を\*\*\*  $p < 0.001$  で表示した。エラーバーは SEM。(C) 各群の発火パターンを規則的なもの (Regular; CV が 0.5 未満) と不規則的なもの (Irregular; CV が 0.5 以上) に分類した円グラフ。黒い部分が不規則的、白い部分が規則的な発火パターンを示す。白い部分の中の数字は規則的な発火パターンを示したニューロンの割合。

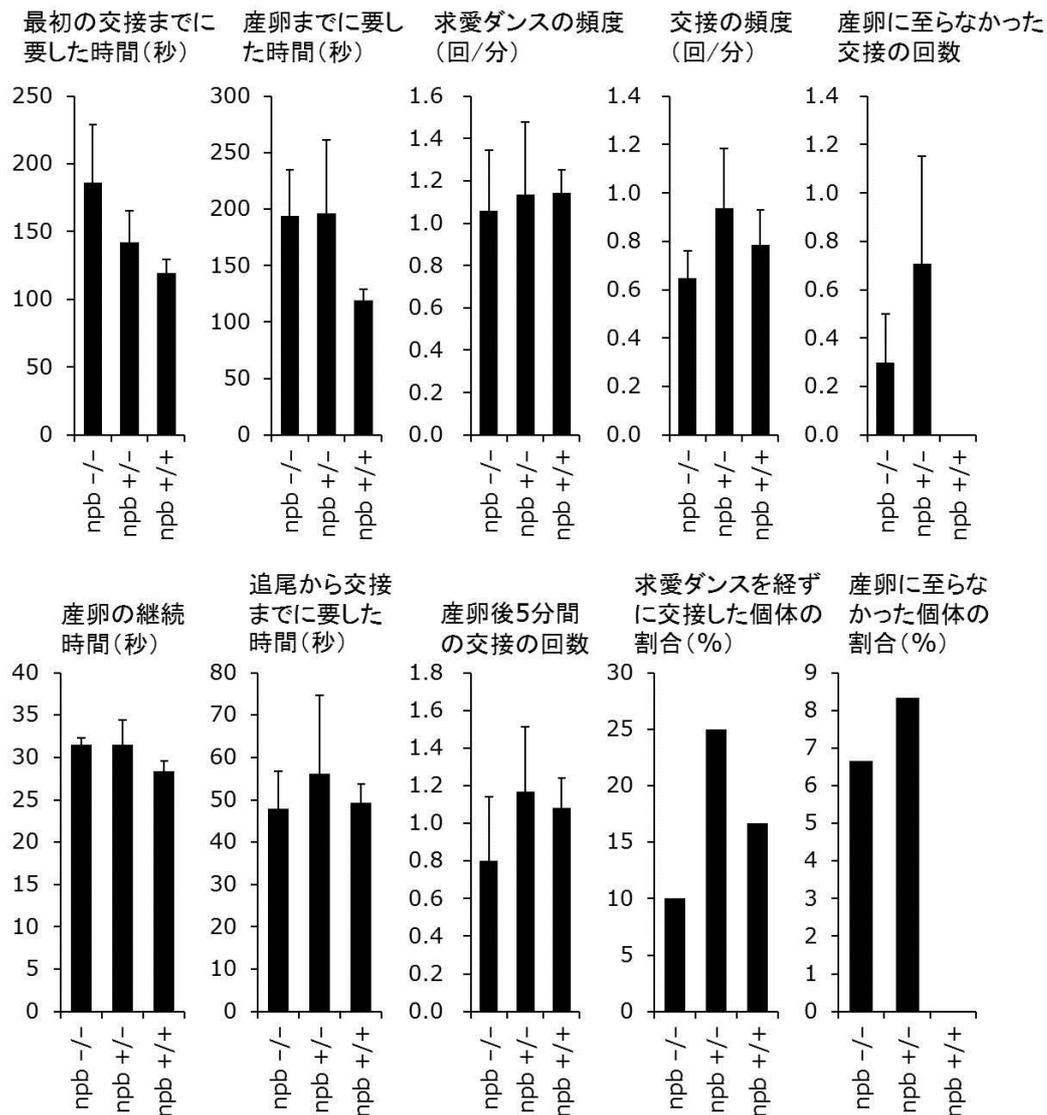


図 2-19. *npb* ノックアウトメダカの性行動解析

*npb* ノックアウトメダカ (*npb* -/-)、*npb* ヘテロノックアウトメダカ (*npb* +/-)、野生型メダカ (*npb* +/+), それぞれの性行動における各種パラメーターを解析し、その結果をグラフで示した。各グラフの縦軸の値の内容と単位はグラフ上部に記述した。エラーバーは SEM。

## 第3章 メス特異的性ステロイド受容ニューロンにおける *npc* の発現と *npb/npc* シグナルの機能解析

### 3-1. 緒言

メス特異的性ステロイド受容ニューロンにおいて、*npb* がメス特異的なエストロゲンの標的遺伝子となっていることが第2章によって明らかとなった。また、このニューロンの軸索はメスのみで脊髄に投射して、運動ニューロン、自律神経節前ニューロンに入力していることが示唆された。さらに、これらのニューロンは、血中のエストロゲン濃度を反映しその発火活動を変化させることも明らかになった。そのため、メス特異的な性ステロイド受容体はエストロゲンによる *npb* のアップレギュレーションと発火活動の昂進を通して何らかのメス特異的な行動や生理状態を調節していると考えられた。しかし、*npb* をノックアウトしたメダカの性行動や産卵動態には大きな変化は見られず、*npb* の機能を明らかにすることはできなかった。

一方で、本研究室での先行研究によって、メダカを含む魚類のゲノム中には *npb* によく似た魚類特有の遺伝子が存在することが明らかとなっていた(大久保ら、未発表データ)。魚類の進化初期に起きた全ゲノム重複によって生じた魚類特有の(哺乳類を含めた四肢動物には存在しない) *npb* のパラログス遺伝子であると考えられる。*npc* と命名されたこの遺伝子から推定されるアミノ酸配列のうち、受容体との結合に重要な部分は *npb* と一致した。また、*Npc* は培養細胞において *Npb* 同様、受容体である *Gpr8* と結合し cAMP を下げる作用を示すことも明らかになっている(深滝ら、未発表データ)。これらのことから私は、*npb* ノックアウトメダカでは *npc* が補償的にはたらいてしまい、*npb* の機能を正確に評価できなかったのかもしれないとの仮説を立てた。

そこで本章ではこの作業仮説にもとづいて種々の実験を行うこととした。まず *npc* の発現を詳細に調べるとともに、二重染色によりメス特異的 *npb* ニューロンにおける *npb* と *npc* の共発現を調べた。すると、メス特異的 *npb* ニューロンにおける *npc* の共発現が確認されたため、*npb* のシングルノックアウトメダカでは、やはり *npc* が補償的にはたらいてしまう可能性が考えられた。そこで *npc* のノックアウトメダカを作出し、*npb* ノックアウトメダカと掛け合わせてダブルノックアウトメダカを作出した。同時に *npb*、*npc* の共通の受容体である *gpr8* のノックアウトメダカを作出した。これらのノックアウトメダカの行動解析を行い、*npb/npc* シグナルがメダカの性行動に対してどのような作用をもっているのかを解析した。

## 3-2. 材料と方法

### 3-2-1. 実験魚

d-rR 系統のメダカおよびノックアウトメダカを、水温 28°C、14 時間明期/10 時間暗期の条件下で飼育し、ブラインシュリンプ幼生および市販のペレット飼料(おとひめ; 日清丸紅飼料)を一日 3-4 回与えた。実験には 3-5 カ月齢の性成熟した個体を用い、サンプリングは明期開始後 1-3 時間の間に行った。

### 3-2-2. *npc* の real-time PCR による発現解析

成熟した雌雄のメダカ(各 n = 6)の脳を摘出し、脳前部(FB; 嗅球、終脳、視索前野、間脳、中脳被蓋を含む)、視蓋(OT)、脳後部(HB; 小脳、延髄を含む)の三つの部位に分け、2-2-4と同様の方法で RNA 抽出を行った。2-2-4と同様の方法で cDNA を合成し、それをテンプレートとして *npc* の real-time PCR を行った。得られたデータは *actb* の発現量を内部標準として標準化した。PCR に用いたプライマーは表 3-1 に示した。

### 3-2-3. *npc* の *in situ* hybridization による発現解析

性成熟した雌雄のメダカの全脳(各 n = 5)を摘出し、1-2-2と同様の方法で、連続パラフィン切片を作製した。1-2-2と同様の方法で、表3-1に示したプライマーを使用し、*npc*のDIGラベルcRNAプローブを作製した。このプローブを使用し、1-2-2と同様の方法により、*in situ* hybridizationを行い、脳内の*npc*の発現部位を特定した。ProKの濃度は2 µg/ml、ハイブリダイゼーションの際のプローブの濃度は0.25 µg/ml、DIG抗体の希釈倍率は2000倍とした。NBT/BCIPの発色は22時間行った。正立顕微鏡(BX53; Olympus)下で、*npc*発現ニューロンを神経核ごとに計数した。デジタルカメラ(DP73; Olympus)、ソフトウェア(cellSens; Olympus)を用いて各群の代表的な写真を撮影した。写真はPhotoshop CS5(Adobe Systems)を用いてコントラストと明度を調節した。

### 3-2-4. *npc* と *npb* の二重染色

性成熟したメスのメダカ(n = 5)の全脳を摘出し、2-2-2と同様の方法で20 µmの厚さの凍結切片を作製した。2-2-2と同様の方法で *npb* の Fluorescein ラベルプローブ、3-2-2と同様の方法で *npc* の DIG ラベルプローブを作製した。2-2-2と同様の方法で、蛍光二重 *in situ* hybridization を行った。ハイブリダイゼーションの際プローブの濃度は、PMm/PMg の観察

用には *npb* プローブ 0.05 µg/ml、*npc* プローブ 0.1 µg/ml、それ以外の神経核の観察用には、*npb* プローブ 0.25 µg/ml、*npc* プローブ 0.5 µg/ml とした。抗体反応の際は、PMm/PMg の観察用には DIG 抗体を 5000 倍、Fluorescein 抗体を 1000 倍、Vs/Vp の観察用には DIG 抗体を 1000 倍、Fluorescein 抗体を 500 倍に希釈した。その他の神経核の観察用には DIG 抗体を 500 倍、Fluorescein 抗体を 500 倍に希釈した。HRP の発色 (TSA plus fluorescein system) は PMm/PMg の観察用には 10 分間、Vs/Vp の観察用には 30 分とした。その他の神経核の観察用には 60 分とした。AP の発色 (Fast Red Tablets) は、PMm/PMg の観察用には 110 分、それ以外の神経核の観察用には 135 分とした。観察は共焦点蛍光顕微鏡 (C1; Nikon) を用い、撮影は EZ-C1 (Nikon) を用いて行い、Photoshop CS5 (Adobe Systems) を用いて画像の明度とコントラストを調節した。

### 3-2-5. *npc* ノックアウトメダカ、*gpr8* ノックアウトメダカの作出

TALEN 法により *npc* 遺伝子あるいは *gpr8* 遺伝子を破壊したノックアウトメダカを作出した。方法は 2-2-3 と同様とした。ゲノム中で *Npc* あるいは *Gpr8* の成熟ペプチドをコードする領域の上流側にあたる配列をターゲットとした TALEN を設計した (ゲノム配列中の TALEN の設計箇所を図 3-1、3-2 に示した)。合成した TALEN の mRNA をメダカ胚にマイクロインジェクションし、成魚まで育て、その後ジェノタイプングと交配を行うことにより、ゲノム配列中に欠損が入り、成熟ペプチドをコードする配列にフレームシフトが起こっていると考えられるノックアウト系統 (*npc*-KO 7-1、*gpr8*-KO 2-2) を確立した。欠損箇所の詳細な配列を図 3-1、3-2、3-3 に示した。さらに、*npc*-KO 7-1 系統と *npb*-KO 21-1 系統の交配により、*npb* 遺伝子と *npc* 遺伝子の両方をノックアウトしたダブルノックアウト (*npb/npb* DKO) メダカを作出した。

### 3-2-6. *npc* ノックアウトメダカの行動解析

*npc* のノックアウトメダカ、ヘテロノックアウトメダカ、野生型のメダカの、4 ヶ月齢の性成熟したメスの個体を行動解析に用いた。各群同じ水槽に入れて準備した 2-4 匹の平均値を  $n = 1$  として、 $n = 3-4$  とした。行動実験の準備および行動実験の手順、ビデオ撮影の方法は、2-2-16 と同様とした。2-2-16 と同様の方法でビデオの解析を行い、統計処理を行った。

### 3-2-7. *npb/npb* ダブルノックアウトメダカ、*gpr8* ノックアウトメダカの行動解析

*npb/npb* のダブルノックアウトメダカ、*gpr8* のノックアウトメダカ、野生型のメダカの、3 ヶ月

齡の性成熟したメスの個体を行動解析に用いた。各群同じ水槽に入れて準備した 2-4 匹の平均値を 1n として、解析全体で  $n = 3-6$  となるようにした。行動実験の準備および行動実験の手順、ビデオ撮影の方法は、2-2-16 と同様とした。2-2-16 と同様の方法でビデオの解析を行い、統計処理を行った。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. npc の発現解析

*npc* のメダカ脳内における発現を real-time PCR により解析した。*npc* の発現は雌雄ともに脳前部、視蓋、脳後部全てで確認された。脳前部と脳後部における *npc* の発現量には性差がなかったが、視蓋においてはオスの方がメスよりも有意に高い *npc* 発現量を示した(図 3-4)。

#### 3-3-2. npc の発現部位の雌雄比較

*in situ hybridization* によりメダカの脳における *npc* の発現部位を詳細に調べ、雌雄で比較した。*npc* の発現は、終脳の Vd/Vs/Vp、視索前野の Pbl、PMp、PMm/PMg/pPPP、視床の VL、PPv/CP/DP、視床下部の NVT、NRP、NPT、pGc、中脳被蓋の MR/IR/DT、IQ/RT、gc、視蓋の PGZ3/TS2、OT、延髄の Ttbc/Tbr/ra、RS でみられた。中でも、Vs/Vp ではほぼメスのみで *npc* の発現がみられ、PMm/PMg/pPPP においてもメスでオスの 2 倍以上の数のニューロンで *npc* の発現がみられるという大きな性差が確認された。NRP においてもわずかにメスの方がオスより多く *npc* を発現していた。VL および PGZ3/TS2 ではオスの方がメスより多く *npc* を発現していた(図 3-5)。*npc* の発現部位と発現量の性差を図 3-6 の模式図にまとめて示した。

#### 3-3-3. npb と npc は Vs/Vp、PMm/PMg で共発現していた

*npc* の *in situ hybridization* により、*npb* を発現することがわかっている複数の神経核 (Vs/Vp、Pbl、PMm/PMg、NPT) において *npc* も発現することが明らかになった。これらの神経核において *npb* と *npc* は同一のニューロンで発現しているのか、近傍の別のニューロンで発現しているのかを確かめるために、*npb* と *npc* の二重 *in situ hybridization* を行った。すると、Vs/Vp と PMm/PMg においては *npb* と *npc* が共発現していることが明らかとなった。これらの神経核において *npb* と *npc* の発現部位はほぼ一致したが、PMm/PMg においては一部 *npc*

のみ発現し、*npb* を発現しないニューロンがみられた(図 3-7)。Pbl、NPT においては *npb* と *npc* は異なるニューロンで発現し、共発現は見られなかった(図 3-7)。

### 3-3-4. *npc* ノックアウトメダカの性行動には変化がみられなかった

*npc* ノックアウトメダカのメスは野生型と同様の通常通りの産卵行動を示した。最初の交接までに要した時間、産卵までに要した時間、求愛ダンスの頻度、交接の頻度、産卵に至らなかった交接の回数、産卵の継続時間、追尾から交接までに要した時間、産卵後 5 分間の交接の回数、求愛ダンスを経ずに産卵した個体の割合、産卵に至らなかった個体の割合を *npc* ノックアウトメダカ、*npc* ヘテロノックアウトメダカそれぞれのメスと、野生型メダカのメスの間で比較したが、各パラメーターに有意な差はなかった(図 3-8)。

### 3-3-5. *npb/npc* ダブルノックアウトメダカ、*gpr8* ノックアウトメダカの性行動には変化がみられた

*npb/npc* ダブルノックアウトメダカのメス、*gpr8* ノックアウトメダカのメスは、産卵を行うことができた。しかし、ダブルノックアウトメダカ、*gpr8* ノックアウトメダカともに追尾から交接までに要した時間が、野生型メダカよりも有意に短くなっていた。さらに、産卵後 5 分間の交接の回数はダブルノックアウトメダカで有意に多くなっていた。求愛ダンスを経ずに産卵した個体の割合は、*gpr8* ノックアウトメダカで有意に多くなっていた。また、産卵の継続時間は、ダブルノックアウトメダカにおいて野生型メダカよりも有意に短くなっていた。一方で、*npb/npc* ダブルノックアウトメダカのメス、*gpr8* ノックアウトメダカのメスともに、最初の交接までに要した時間、産卵までに要した時間、求愛ダンスの頻度、交接の頻度、産卵に至らなかった交接の回数には有意な差がなかった。産卵に至らなかった個体の割合に有意差はみられなかったが、ダブルノックアウトメダカ、*gpr8* ノックアウトメダカともに実験に用いた全ての個体が産卵した(図 3-9)。

## 3-4. 考察

本章でははじめに、*npb* の新規パラログ遺伝子として本研究室の先行研究で見出された *npc* について、その発現を解析し、*npb* に対して補償的にはたらく可能性を検証した。*npc* は、メダカゲノムの上から、*npb* と類似の配列をもつ遺伝子として発見された。先行研究で、*npb*、*npc* と、哺乳類の *Npb*、*Npw* の系統樹解析を行うと、*npb*、*npc* 共に *Npw* よりも *Npb* と相

同性が高いという結果が得られたことから(深滝ら、未発表データ)、*npc* は哺乳類の *Npw* のオーソログ遺伝子ではなく、魚類特有の *nbp* のパラログ遺伝子であると考えられる。配列から推定される成熟 *Npc* ペプチドは *Npb* 同様 29 アミノ酸からなり、アミノ酸配列中で、*NPB* と *GPR8* の反応に必要とされるモチーフ(Kanesaka *et al.*, 2007)は保存されていた。このため *Npc* は *Npb* 同様に、*Gpr8* に対す内因性のリガンドとして機能しうると考えられる。実際に、当研究室の先行研究において、*Gpr8* を発現させた培養細胞に合成 *Npc* を投与すると、*Npb* を投与した場合と同様に、細胞内の *cAMP* 濃度が低下することが示されている(深滝ら、未発表データ)。本研究で、*real-time PCR* および *in situ hybridization* により、メダカの脳内において *npc* が多く発現していることが確認された。*npc* は脳内の幅広い神経核で発現し、その発現には複数の神経核において性差がみられた。視床の *VL*、視蓋および中脳被蓋の *PGZ3/TS2* において *npc* はオスで多く発現していた。反対に *Vd/Vs/Vp*、*PMm/PMg/pPPP*、*NRP* において *npc* はメスで多く発現していた。これらの性差のうち、視蓋における性差は、*real-time PCR* と *in situ hybridization* のいずれにおいても確認されたが、その他の部位の性差は *in situ hybridization* でしか確認されなかった。オスで多い神経核とメスで多い神経核の両方があるために、脳前部全体、脳後部全体で測定すると逆方向の性差が打ち消しあい、全体としては性差が検出不可能になってしまったと考えられる。

*npc* を発現する神経核のうち一部の神経核(*Vs/Vp*、*Pbl*、*PMm/PMg*、*NPT*)は、*nbp* も発現する神経核であった。このため、これらの神経核においては *nbp* と *npc* が同一のニューロンで発現する可能性が示唆された。実際、二重染色によりこのうち *Vs/Vp*、*PMm/PMg* においては *nbp* と *npc* の共発現が認められた。これらのニューロンでは *nbp* をノックアウトしたメダカであっても *nbp* と同様のはたらきをする *npc* が発現し、補償的にはたらいってしまうと考えられる。そのため、これらのニューロンにおける *nbp npc* シグナルの機能を調べるためには、*nbp* と *npc* を両方もたないダブルノックアウトメダカあるいは、*nbp* と *npc* 共通の受容体である *gpr8* のノックアウトメダカの解析を行う必要があると推察された。

そこで *npc/nbp* ダブルノックアウトと *gpr8* ノックアウトメダカを作出し、メスの性行動を解析したところ、表現型に変化がみられた。ダブルノックアウトメダカと *gpr8* ノックアウトメダカで共通して、追尾から交配までに要する時間が野生型メダカと比べ減少していた。一般的に、メスを追いかけて、求愛行動をしていたオスが、交配、産卵行動に移るということは、メスが何らかのオスを受け入れるサインを出したことによると考えられる。ダブルノックアウトメダカおよび *gpr8* ノックアウトメダカのメスに対してオスがより少ない追尾時間の後に交配を行ったということは、メスがより短い時間の求愛により受け入れるサインを出したか、あるいは、受け入れる

サインを出していないのに、オスが交接を行ってしまったという二つの可能性がある。後者の場合は、メスはオスを受け入れたわけではないため、交接したにも関わらず、産卵に至らない現象が起こると考えられる。しかし、ダブルロックアウトメダカおよび *gpr8* ノックアウトメダカにおいて、産卵に至らなかった交接の回数は野生型と有意な差がなく、むしろ減少する傾向にあった。すなわち、追尾の時間が減少したのは、オスが受け入れサインを待たずに交接したためではなく、メスが早期に受け入れサインを出したためであると考えられる。これを裏付ける結果として、*gpr8* のノックアウト個体の行動実験においては、メダカの一連の性行動においては多くの場合行われるオスからメスへの求愛ダンスを経ずに産卵を行った個体が 60% 程度見られ、野生型のメダカの場合の 10% 程度と比較して、大きく増加していた。ダブルロックアウトメダカにおいても、有意な差はなかったものの、求愛ダンスを経ずに産卵した個体の割合は増加する傾向がみられた。これは、通常は求愛ダンスを受けた後に出す受け入れのサインを、*gpr8* ノックアウトメダカのメスはその前に出してしまうことを示唆する。また、産卵した後のメスは、通常では交接を受けることは少なく、産卵後 5 分間に受ける交接の回数は、野生型のメスでは平均 1 回未満になっている。ところが、*npb/npc* ダブルロックアウトメダカでは、この回数が平均 3 回以上となり、有意に増加していた。*gpr8* ノックアウトメダカにおいても野生型と比較して増加傾向がみられる。産卵後は野生型のメダカでは受け入れサインは出さないところを、ノックアウトメダカでは出しているのではないかと考えられる。以上のように、*npb/npc* ダブルロックアウトメダカおよび *gpr8* ノックアウトメダカでは、メスの、オスが交接を行うきっかけとなる何らかのサインを出す機能が昂進している可能性が示唆された。

*npb/npc* ダブルロックアウトメダカにおいても一つ有意な差を示した表現型は、産卵の継続時間である。ダブルロックアウトメダカは野生型と比較し、産卵の継続時間が短かった。これは、産卵を行っている途中でメスが激しく体を動かしたことにより、オスとメスが離れてしまったケースが散見されたことによる。しかし、*gpr8* ノックアウトメダカではこのようなケースは見られず、この動きが何を意味するのかは不明である。

これらの *npb/npc* ダブルロックアウトメダカおよび *gpr8* ノックアウトメダカのメスでみられた性行動パターンの変化の表現型は、*npb* もしくは *npc* のシングルノックアウトメダカでは見られなかったため、*npb* と *npc* の補償がおこりうるニューロン、すなわち *npb*、*npc* が共発現するニューロンの作用によるものであると考えられる。二重染色において *npb* と *npc* の共発現がみられたのはメス特異的性ステロイド受容ニューロンである Vs/Vp と PMm/PMg のみであったため、これらのニューロンの *npb/npc* シグナルが交接を受け入れるサインを抑制する機能

をもつことが示唆された。

では、これらのニューロンから放出された Npb/Npc はどのような神経回路を通じてメスの受け入れサインを抑制するのだろうか。第 2 章で、これらのニューロンの軸索は脊髄に投射し、また *gpr8* が脊髄の自律神経節前ニューロン、運動ニューロンで発現することが明らかになっている。そのため、メス特異的 *npb* ニューロンから脊髄へ運ばれた Npb/Npc が自律神経系や運動神経系に作用することで、直接的にメスの行動やフェロモン放出を変化させ、受け入れサインの表出を抑制している可能性が考えられる。一方で、メス特異的 *npb* ニューロンの軸索は脳内にも広くみられ、また *gpr8* は脳内でも様々な神経核で発現している(大久保ら、未発表データ)ことから、Npb/Npc が脳内の何らかのニューロンに作用し、そのニューロンが受け入れサインをコントロールしているという可能性も考えられる。ごく最近、メダカにおいて、終脳の *gnrh3* を発現する終神経ニューロンがメスの受け入れを調節しているという報告がなされた(Okuyama *et al.*, 2014)。終神経 *gnrh3* ニューロンとメス特異的 *npb* ニューロンの間に何らかの相互作用がある可能性も十分に考えられる。しかし、メス特異的 *npb* ニューロンが *gnrh3* の受容体を発現し *gnrh3* ニューロンの下流側にあたるのか、終神経 *gnrh3* ニューロンが *gpr8* を発現し *npb* ニューロンの下流側にあたるのか、あるいは何らかの他のニューロンを介して間接的に影響し合っているのかは明らかになっておらず、今後の研究が必要である。

以上、本研究により、Vs/Vp、PMm/PMg のメス特異的 *npb* ニューロンには魚類における *npb* の新規パラログ遺伝子である *npc* も共発現することが明らかになり、*npb* のノックアウトメダカにおいては *npc* が補償的にはたらいっていることが示唆された。そこで、補償作用を防ぐために *npb npc* ダブルノックアウトメダカおよび *gpr8* ノックアウトメダカを作出し、行動解析を行った。その結果、両方のノックアウトメダカに共通して、オスがメスに対して交接を行うきっかけとなるようなメスのサインが昂進していることを示唆する表現型が得られた。Vs/Vp および PMm/PMg の *npb npc* シグナルがメスによるオスの受け入れサインの表出の抑制に関与していると考えられる。

表 3-1. 本章で用いたプライマー

名称	使用目的	塩基配列 (5′-3′)
npc-F3	<i>npc</i> real-time PCR	AGTAAAGAGGCGGCCGAGA
npc-R3	<i>npc</i> real-time PCR	GCAGATGGCCATGTCTTTGA
npc-F1	<i>npc</i> プローブ作製	GATCCAAAACCCCGCAGACAAG
npc-R1	<i>npc</i> プローブ作製	GGAAATTCGCCCTACAGTCAACA
npc-TAL-check-F1	<i>npc</i> ノックアウトメダカスクリーニング	GTGTTCCCTCCGCGTCAAAGGT
npc-TAL-check-R1	<i>npc</i> ノックアウトメダカスクリーニング	CCTCTTTACTGTCCGCCAGGA
npc-TAL-seq-F1	<i>npc</i> ノックアウトメダカシークエンシング	GCGTCAAAGGTGCCAGCTCTA
npc-TAL-seq-R1	<i>npc</i> ノックアウトメダカシークエンシング	CGCCAGGACCTCCTCGGACT
gpr8-TAL-check-F1	<i>gpr8</i> ノックアウトメダカスクリーニング	CAACACAGCAGTCATCTATGTCAT
gpr8-TAL-check-R1	<i>gpr8</i> ノックアウトメダカスクリーニング	ACTACCAAGTAGCGATCAATGCT
gpr8-TAL-seq-F1	<i>gpr8</i> ノックアウトメダカシークエンシング	GTCATCTATGTCATTCTGAAGC
gpr8-TAL-seq-R1	<i>gpr8</i> ノックアウトメダカシークエンシング	AAGTAGCGATCAATGCTCATAAC

名称カラムの中の-Fはフォワードプライマー、-Rはリバースプライマーを示す。使用目的カラム中のスクリーニングとは、ジェノタイピング時のゲノムをテンプレートとしたPCRで用いたことを意味する。同カラム中のシークエンシングとは、ゲノムから増幅したPCR産物のシークエンシングに用いたことを意味する。

表 3-2. 神経核の略称

略称	名称
CP	central posterior nucleus of thalamus
DP	dorsal posterior nucleus of thalamus
DT	dorsal tegmental nucleus
gc	central gray
IQ	inferior oblique of the oculomotor nerve nucleus
IR	inferior rectus of the oculomotor nerve nucleus
MR	medial rectus of the oculomotor nerve nucleus
NPT	posterior tuberal nucleus
NRP	posterior recess nucleus
NVT	nucleus ventral tuberis
OT	optic tectum
Pbl	basal lateral preoptic nucleus
pGc	central preglomerular nucleus
PGZ3	periventricular gray zone (layer 3)
PMg	gigantocellular portion of the magnocellular preoptic nucleus
PMm	magnocellular portion of the magnocellular preoptic nucleus
PMp	parvocellular portion of the magnocellular preoptic nucleus
pPPp	posterior part of posterior parvocellular preoptic nucleus
PPv	ventral part of pretectal periventricular nucleus
ra	nucleus raphe
RS	superior reticular nucleus
RT	rostral tegmental nucleus
Tbr	bulboreticular tract
TS2	torus semicircularis (layer 2)
Ttbc	crossed tectobulbar tract
Vd	dorsal nucleus of the ventral telencephalic area
VL	ventrolateral nucleus thalamus
Vp	posterior nucleus of the ventral telencephalic area
Vs	supracommissural nucleus of the ventral telencephalic area

A

ATCCAAAACCCCGCAGACAAGCAGCGCCGTGTTTCCTCCGCGTCAAAGGTGCCAGCTCTATCC  
TAAACATGGACAGGTCGGTCAGGTTTCGCTGTGGTTCGCTCGGAGTGTCTCTGCTCGT **TCC**  
**TGCCACTCAGCTGAAGCCTGGTACAAGCAGTCCACCGGACCCATT**TTTCTACCCGGTGGGGCG  
CGCGTCCGGTTTGTCTGTCCGGCATCAGGAGGTCACCGTACGTCCGGAGAGCCGAGTCCGAGG  
AGGTCCTGGCGGACAGTAAAGAGGCGGCCGAGAACAGCGTGACCCACGACGCCAGCAGGCAG  
ATCTCTGCGCTCAAAGACATGgtgagtccagctgagcgcgcggcgacatccgaacgcagagc  
tgcaggtcaggctgtgaaaccgcgcgtgcgtaaaggcgcacagagcagcggagaaacggtcg  
aaacttaagttttggccgtttgtgcagatcatatttccacaagtgtttgaaaaggaatttt  
taaaaactttgcctccccctctttccccccag**GCCATCTGCGTGAAGGACGTCTCCCCAAC**  
**CTGAAGACATGCGAGCTGCTGCGGGACGGGACCGGAACCTTCCAGTGCAAGGCGGATGTCCT**  
**CCTCACCTGGACTCCTTGGACTGCCTGTCCGCGTGAGCGGAGCACGCGCGCAGCCCCAA**  
TCCTCCACCTGCAAACGCTTCTATTGAGAGGGGGGAGACTGTAAGAAAATCTGGGAGGATG  
CAGGAGAGCGCGCGGGTGGATGAGAATGTTGTTATTGAAACATTTTTGCTTTAGTTTGACAG  
AATTATCTGAAGCCATGTTGACTGTAGGGCGAATTTCCCCAAAACACTGCTTTTATTTTAC  
CTATTAATAAATGAAGAAAGACTGAG

B

CGTTTCCTGCCACTCAGCTGAAGCCTGGTACAAGCAGTCCACCGGACCCATT Wild type  
CGT**TTCCTGCCACTCAGCTGAAGC**-----**AGTCCACCGGACCCATT** npc-KO 7-1

C

WYKQSTGPIFYFVGRASGLLSGIRRSYPV Wild type  
SPPDPFSTRWGARPVCCPASGGHRTSGEP npc-KO 7-1

図 3-1. *npc* ノックアウトメダカのゲノム情報

(A) *npc* 遺伝子の構造と TALEN の認識配列。大文字はエキソン、小文字はイントロンを示す。翻訳領域を赤字で記し、成熟 Npc ペプチドをコードする部分を青文字で記した。左右それぞれの TALEN の認識配列を黄色で示した。(B) 野生型およびノックアウト個体の遺伝子配列。上段が野生型、下段がノックアウト (*npc-KO* 7-1 系統) の配列を示す。赤字は翻訳領域、青文字は成熟 Npc ペプチドをコードする部分を示す。左右それぞれの TALEN の認識配列を黄色で示した。欠損した塩基をハイフンで示した。(C) 野生型およびノックアウト個体の成熟 Npc ペプチドの演繹アミノ酸配列。上が野生型の配列、下が *npc* ノックアウトの配列である。ノックアウト個体において、野生型個体と異なるアミノ酸を赤字で記した。

A

ATGGAGAATGTCTCTGTCCACAGTGCAGAGCTGCCAGCCTGTAACGACTCTGTGGACTTCTA  
CTCCCCAGGTCAGGAAACAGGACGGACTTGAAC TGCACTCACACCTCTGGCTATTATGACC  
TGTACGTCATTTTACCGGTGATCTACTCCATCATCTGTGCTGTGGGACTGACGGGCAACACA  
GCAGTCATCTATGTCATTCTGAAAGCCCCCAAATGAAAACAGTCACCAACATGTTTCATCCT  
GAATTTAGCCATCGCAGATGATTTGTTTACGCTGGTGCTGCCATCAGCATAGCTGAACACT  
TGCTCAGCTACTGGCCCTTTGGTGAGGTTTTGTGCAAAGTCATCCTAAGCATCGACCACTAC  
AACATATTTTCCAGTATTTATTTTCTGACCGTTATGAGCATTGATCGCTACTTGGTAGTTTT  
GGCCACTGTGCGGTCCAAACGCATGCCTTACCGCACCTACAGAGCCGCCAAGATCATCTCTT  
TCTGTGTCTGGATCCTGGTCATCCTCATTGTCATACCATTACCGTTTTTTGCTGGTGTCTAT  
GTCAACCCATTTGACGGACGGAAGAGGTGTGGGCTGAGCCTTCCCAACCCAGAGACGTTATG  
GTTTCAGGACCAGTCGGATCTACACTCTCATTCTGGGTTTTGCCATCCCGGTCTCGACCATCT  
GCATATTATACACCATGATGCTCTACAGGCTCAGGAACATGCGACTCAACAGCAACGCCAAG  
GCGCTGGACAAGGCCAAGAAAAAGGTCACCATCATGGTGTTTATCGTTTTGGCCGTCTGCCT  
GTTCTGCTGGACGCCGTTCCACCTGAGCACCATCGTGGCGCTGACCACAGACCTGAAGACCA  
CGCCCCTACTGATTGGCCTCCTACTTCATCACCAGCCTGAGCTACGCAAACCTCTGCCTC  
AACCCCTTCTGTACGCCCTCCTGGATGACAGTTTTAGGAAAGCTTTTAAGAAGATGTTGGA  
GTGTCGACCAGCGTGA

B

ACTGGCCCTTTGGTGAGGTTTTGTGCAAAGTCATCCTAAGCATCGACCACT WT  
ACTGGCCCTTTGGTGAGGTTTTGT-----CATCCTAAGCATCGACCACT gpr8-KO 2-2

図 3-2. *gpr8* ノックアウトメダカのゲノム情報

(A) *gpr8* 遺伝子の構造と TALEN の認識配列。配列中にイントロンは存在せず、全て翻訳領域である。左右それぞれの TALEN の認識配列を黄色で示した。(B) 野生型およびノックアウト個体の遺伝子配列。上段が野生型、下段がノックアウト(*gpr8-KO 2-2* 系統)の配列を示す。左右それぞれの TALEN の認識配列を黄色で示した。欠損した塩基をハイフンで示した。

```

1 MENVSVHSAELPACNDSVDFYSPRSGNRTDLNCTHTSGYYDLYVILPVIY
1 MENVSVHSAELPACNDSVDFYSPRSGNRTDLNCTHTSGYYDLYVILPVIY

51 SIICAVGLTGNTAVIYVILKAPKMKTVTNMFILNLAIADDLFTLVLPISI
51 SIICAVGLTGNTAVIYVILKAPKMKTVTNMFILNLAIADDLFTLVLPISI

101 AEHLLSYWPFGEVLCKVILSIDHYNIFSSYFLTVMSIDRYLVVLATVRS
101 AEHLLSYWPFGEVLSS*

201 YLVVLATVRSKRMPYRTYRAAKIISFCVWILVILIVIPFTVFAGVYVNPFI
201

301 DGRKRCGLSLPNPETLWFRTSRIYTLILGFaipVSTICILYTMMLYRLRN
301

401 MRLNSNAKALDKAKKKVTIMVFIVLAVCLFCWTPFHLSTIVALTTDLKTT
401

501 PLLIGLSYFITSLSYANSCLNPFLYAFLLDDSFRAFKKMLECRPA*
501

```

図 3-3. *gpr8* ノックアウトメダカにおける **Gpr8** の演繹アミノ酸配列

野生型メダカおよび *gpr8* ノックアウトメダカにおける **Gpr8** の演繹アミノ酸配列。上段が野生型、下段がノックアウトの配列。ノックアウトの配列中、野生型と異なるアミノ酸を赤字で記した。アスタリスクはストップコドンを示す。

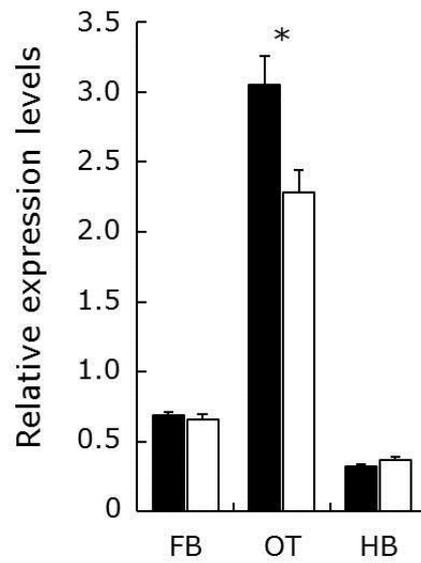


図 3-4. *npc* のメダカの脳における発現

real-time PCR によるメダカの脳の部位別の *npc* 発現量の雌雄比較。黒のカラムはオス、白のカラムはメスの結果を示す。雌雄間での有意差を、\*  $p < 0.05$  で示した。FB、嗅球/終脳/視索前野/間脳/中脳被蓋を含む脳前部；OT、視蓋；HB、小脳/延髄を含む脳後部。エラーバーは SEM。

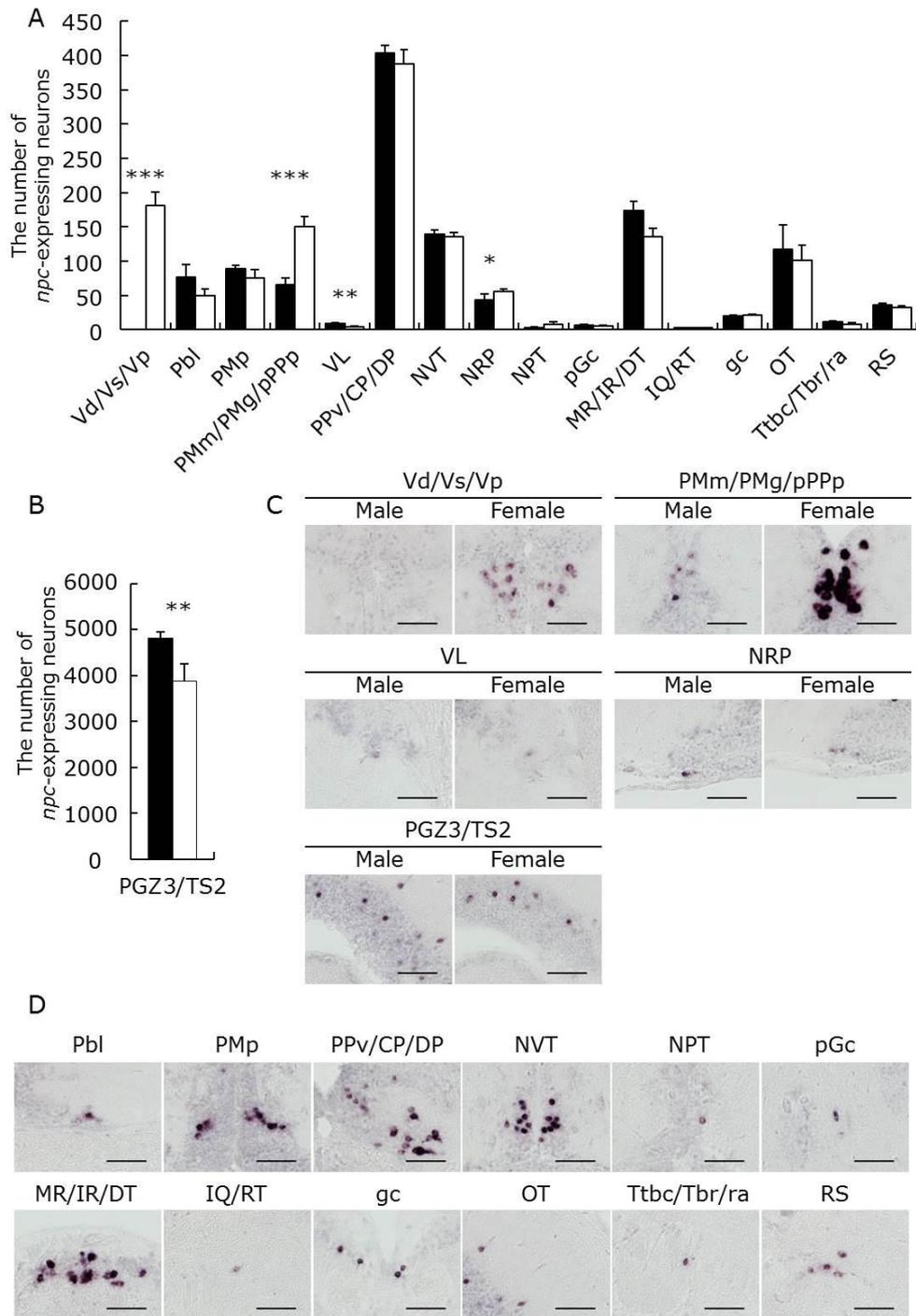


図 3-5. npc の発現部位の雌雄比較

(A)、(B)雌雄のメダカの脳における神経核別の npc 発現ニューロンの数。黒のカラムがオス、白のカラムがメスの結果を示す。各神経核における雌雄間の有意な差を\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$  で示した。エラーバーは SEM。(C)性差が認められた各神経核の代表的な写真。左側がオス、右側がメスの写真。(D)性差がなかった神経核の代表的な写真。全てオスの写真。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。神経核の略称については表 3-2 を参照。

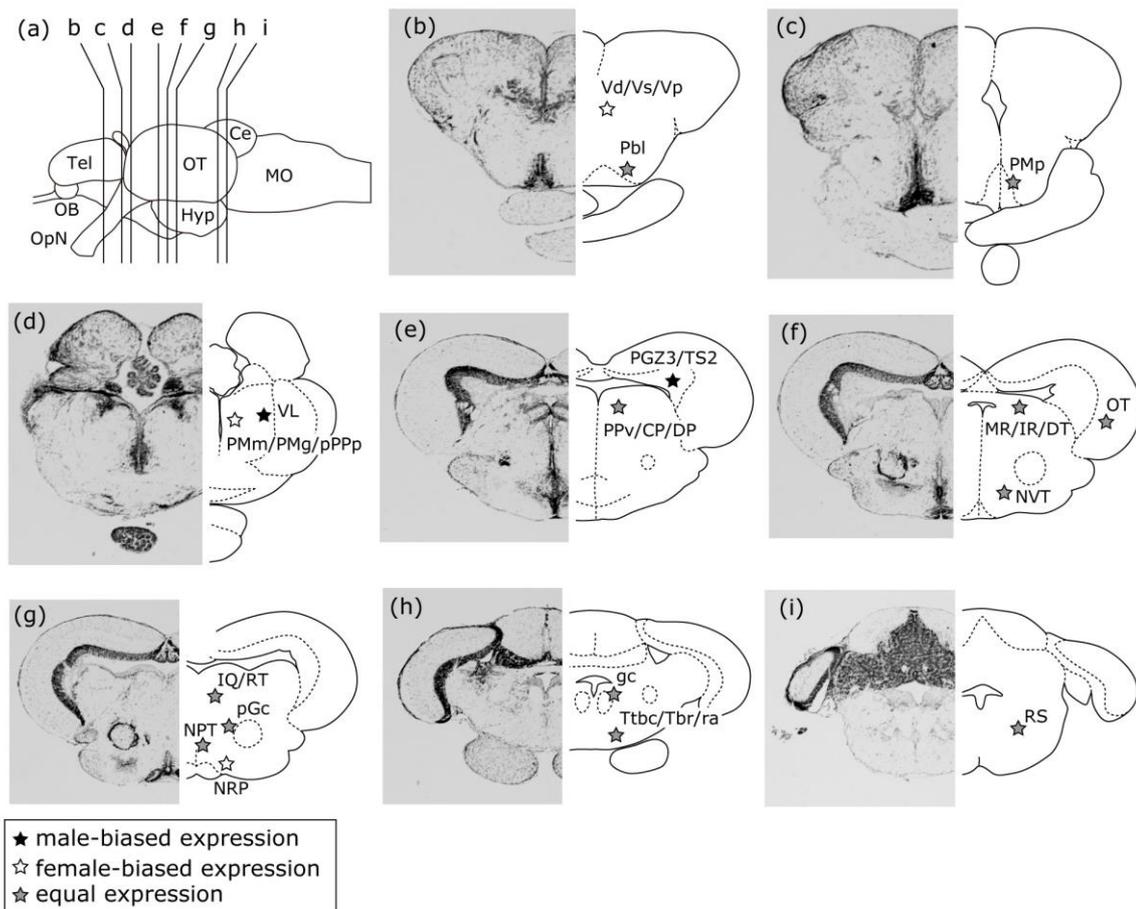


図 3-6. npc 発現の分布

(a) メダカの脳を横から見た図。左側が吻側。(b)–(i) の断面の切り口を示した。Tel、終脳; OB、嗅球; OpN、視神経; OT、視蓋; Hyp、視床下部; Ce、小脳; MO、延髄。(b)–(i) 右側に、npc の発現部位を示した線画、左側に対応する切片の Nissl 染色像を示した。オスで多い発現部位は黒色の星型、メスで多い場合は白色の星型、性差がない場合は灰色の星型で示した。各神経核の略称については表 3-2 を参照。

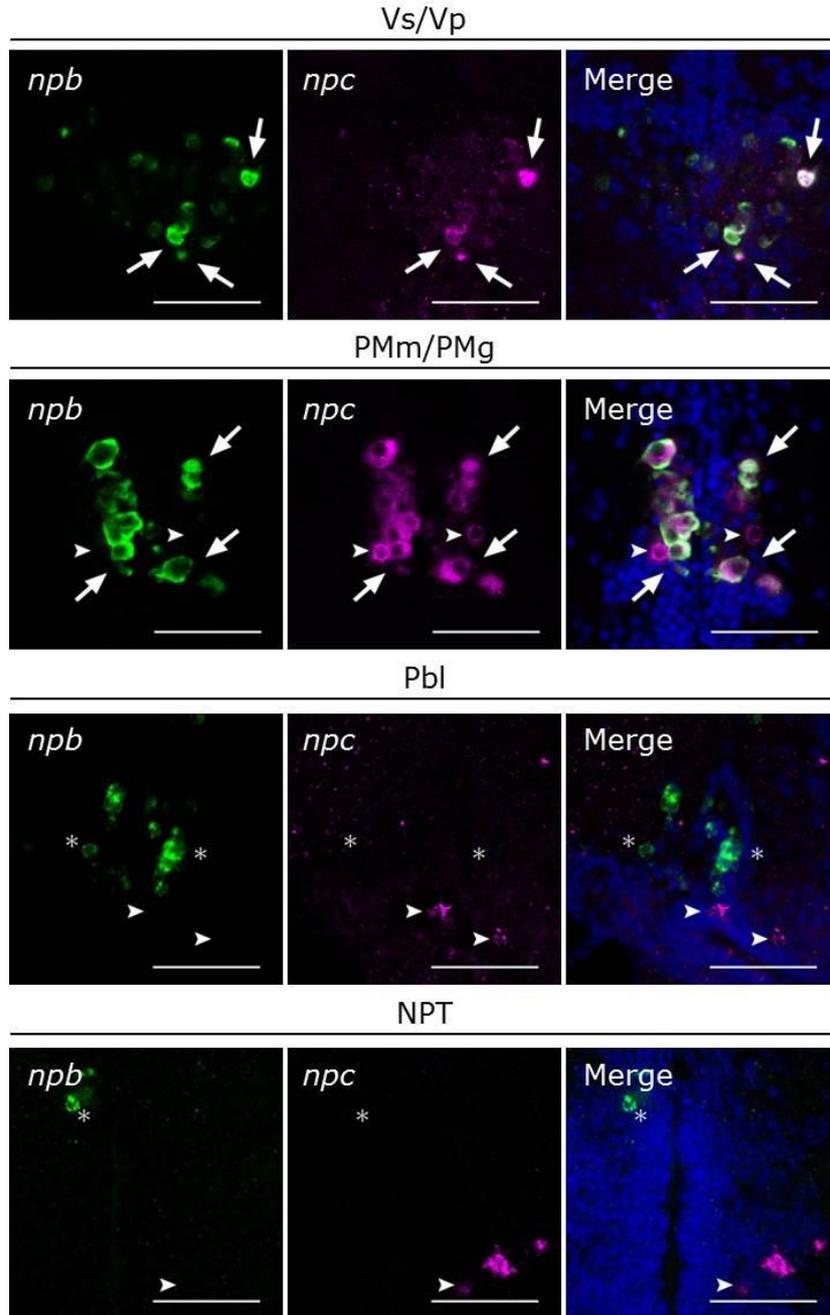


図 3-7. メダカの脳における *npb* と *npc* の共発現

メスのメダカの脳内で *npb*、*npc* の両方を発現する神経核 (Vs/Vp、PMm/PMg、Pbl、NPT) における *npb* と *npc* の二重染色。緑が *npb* の発現、マゼンタが *npc* の発現、青は DAPI による核染色。矢印は *npb* と *npc* を共発現するニューロンを、矢じりは *npc* のみ発現し *npb* を発現しないニューロンを、アスタリスクは *npb* のみ発現し *npc* を発現しないニューロンを示す。上段から Vs/Vp、PMm/PMg、Pbl、NPT の結果を示す。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。神経核の略称については表 3-2 を参照。

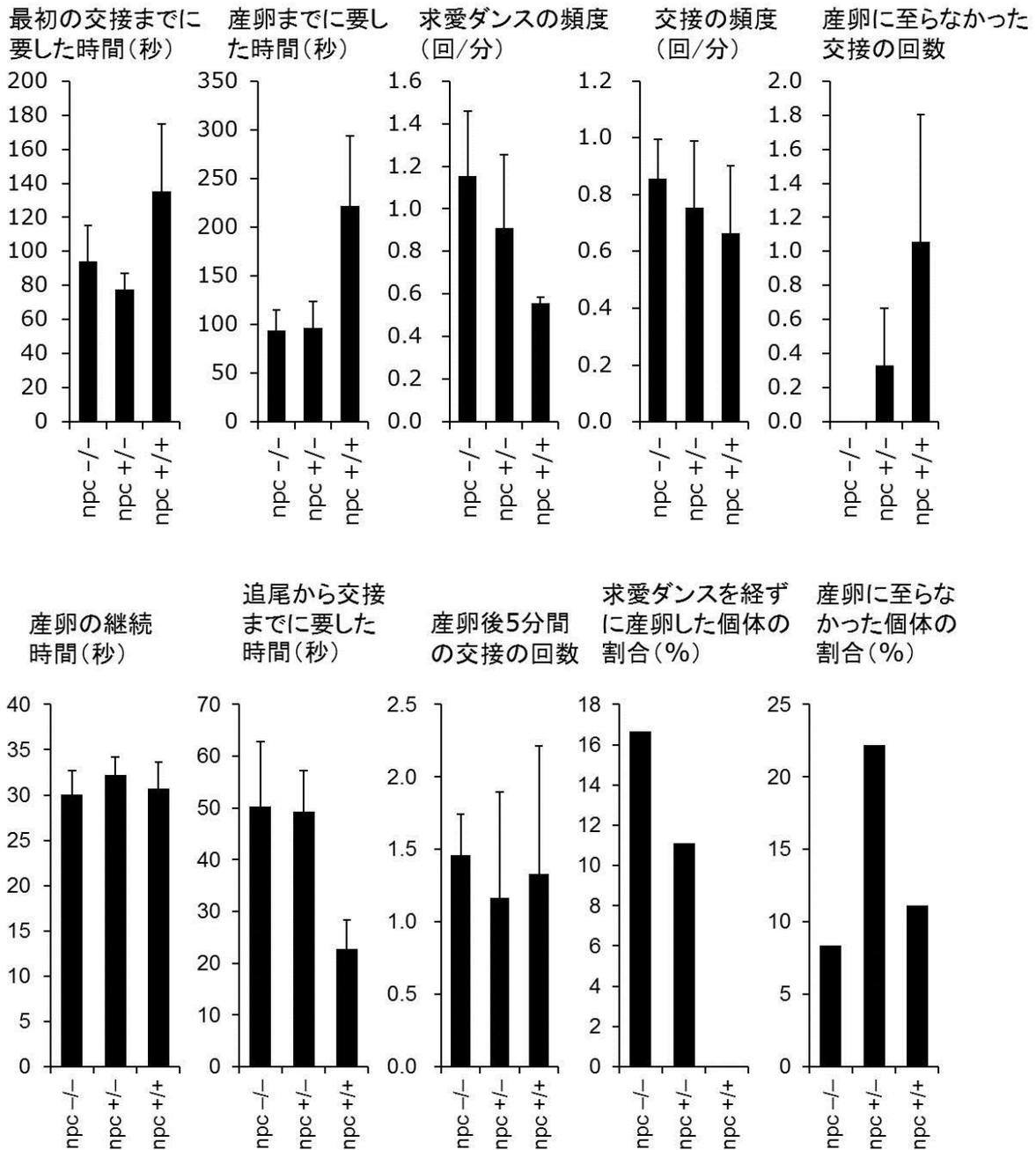


図 3-8. npc ノックアウトメダカの行動解析

npc ノックアウトメダカ(npc -/-)、npc ヘテロノックアウトメダカ(npc +/-)、野生型メダカ(npc +/+), それぞれの性行動における各種パラメーターを解析し、その結果をグラフで示した。各グラフの縦軸の値の内容と単位はグラフ上部に記述した。エラーバーは SEM。

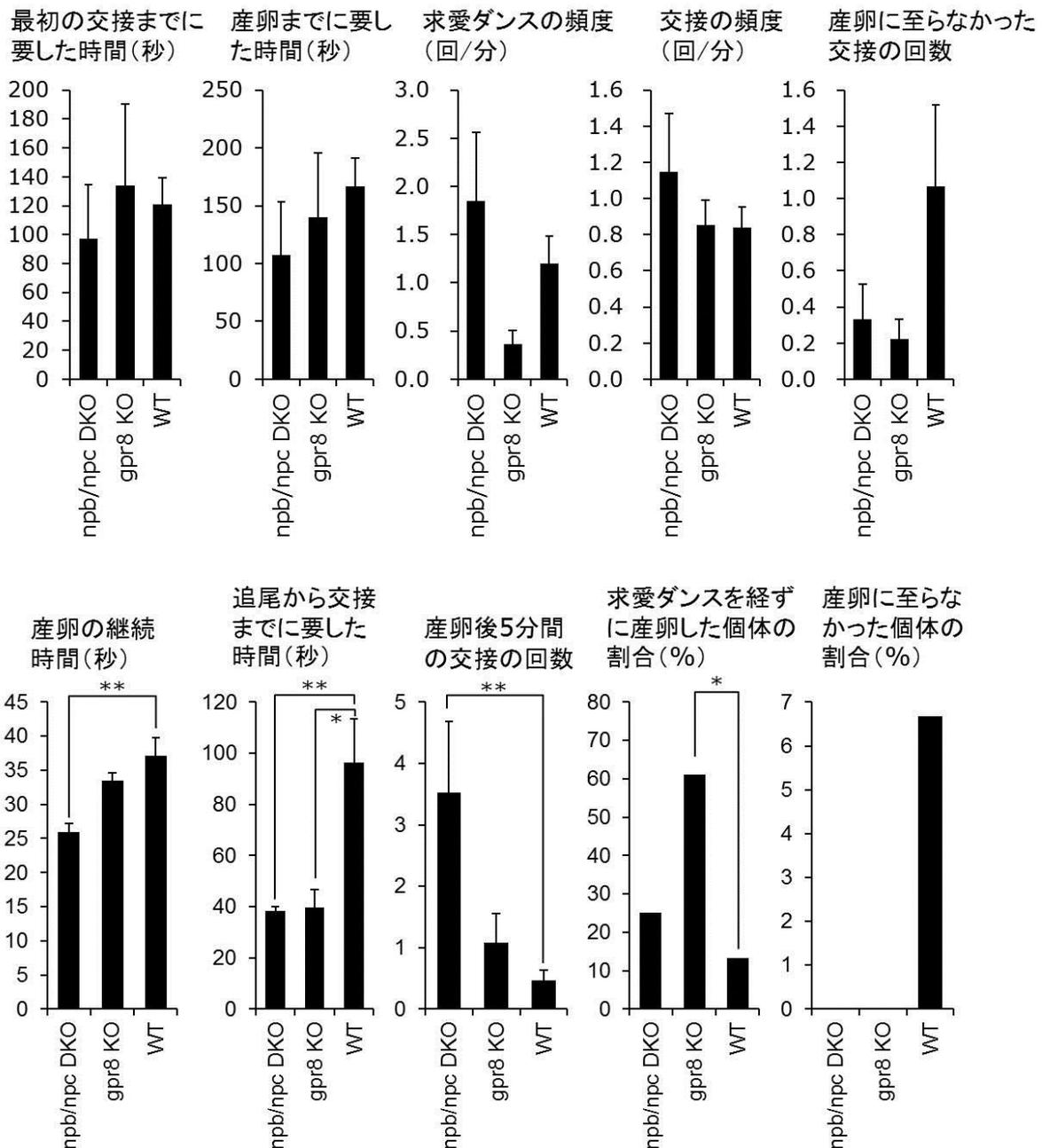


図 3-9. *npb/npb* ダブルノックアウトメダカ、*gpr8* ノックアウトメダカの行動解析  
*npb/npb* ノックアウトメダカ (*npb/npb* DKO)、*gpr8* ノックアウトメダカ (*gpr8* KO)、野生型メダカ (WT)、それぞれの性行動における各種パラメーターを解析し、その結果をグラフで示した。各グラフの縦軸の値の内容と単位はグラフ上部に記述した。各ノックアウトメダカと野生型メダカとの有意な差を、\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  で示した。エラーバーは SEM。

## 総合考察

本研究は、魚類の脳にどのような性差があるのか、その脳の性差がどのようにして生じ、逆転するのか、そしてどのような形質の性差を支配しているのかを明らかにすることを目的とした。この目的のもと研究を進め、メダカの脳内で、メスのみで性ステロイド受容体を発現するニューロンを見出し、また、この性ステロイド受容体発現の性差は性ステロイドによる一過性で可逆的な作用によりもたらされていることを明らかにした。続いてこのメス特異的な性ステロイド受容体の発現調節により *npb* がメスのみで発現し、脊髄の運動ニューロン、自律神経節前ニューロンに作用していることを示した。またメス特異的に発現する *npb/npc* が、メスによるオスの受け入れサインの表出を抑制することを示す結果を得た。このように、性ステロイドによる脳の性分化から、抹消への伝達路、そしてその最終的なアウトプットである性特異的な行動までの一連のカスケードを明らかにした研究は、動物種全般を見渡してもほとんど例を見ない。これまでに知られている性行動の性差に関わる脳内メカニズムとしては、ラットやマウスにおける終脳の中隔外側核 (*lateral septum*; *LS*) から中脳中心灰白質 (*periaqueductal gray*; *PAG*) に投射する神経伝達路があり、オスを受け入れる行動 (ロードーシス) を抑制する伝達路と考えられている。この伝達路は、メスの方がより発達しているが (Tsukahara and Yamanouchi, 2002)、雌雄ともにもち、メスのみでエストロゲンの作用により抑制が解除され、ロードーシスを発現することが可能になる (Tsukahara *et al.*, 2014)。しかし、エストロゲンがどのような因子の発現調節を介してロードーシスを抑制しているのかは明らかになっていない。反対に、ラットやマウスの視床下部腹内側核 (*VMN*) はオス型の性行動を抑制することで、性行動の性差を作っていると考えられている。*VMN* はメスではロードーシスの促進にはたらいっているが (Flanagan-Cato, 2011)、オスでより大きく (Matsumoto and Arai, 1983; Madeira *et al.*, 2001)、破壊することで雌雄ともにオス型の性行動が促進される (Nance *et al.*, 1977; Christensen *et al.*, 1977)。*VMN* にアンドロゲンが作用するとオスの性行動が昂進することが知られているが、アンドロゲンがどのような機構によって作用するのかは不明である (Harding and McGinnis, 2004)。

本研究で明らかになったメダカの終脳・視索前野のメス特異的な性ステロイド受容ニューロンは、上述の哺乳類における性ステロイドの入力を受け性行動の性差を作る神経核と、性ステロイド受容体を発現し、形態学的性差を示し、行動の制御を行っている点は共通しているが、その性差の可逆性においては大きく異なる。哺乳類におけるこれらの神経核と性行動の型 (性差) は、出生前および出生後の一定の期間における性ステロイド投与によってのみ、

異性の型へ変化させることができ、性成熟後の性ステロイド投与によって性転換させることはできない(Sachs *et al.*, 1973; Roselli, 1991; Satou and Yamanouchi, 1999; Tsukahara *et al.*, 2014)。一方、メダカのみス特的異性的性ステロイド受容ニューロンにおける性ステロイド受容体およびその下流遺伝子 *npb* の発現パターンは、性成熟後であっても、短期間の性ステロイド投与によって、容易にメス型からオス型へと変化した(本研究第1章、Hiraki *et al.*, 2014)。また、これらのニューロンのオス型からメス型への変化も観察されている(横山、山下ら、未発表データ)。魚類は成熟後であっても性ステロイドの投与により容易に異性の性行動を示すようになること(Munakata and Kobayashi, 2010)が知られているが、のみス特的異性的性ステロイド受容ニューロンの性的可逆性は、その分子基盤の一つとなっていると考えられる。

本研究はまた、*NPB/npb* が性行動と関連した機能をもつことを示した初の研究である。これまで哺乳類において *NPB* は、自身およびその受容体の発現部位から、主に摂食・代謝、痛覚、情動、下垂体からの内分泌と関わる機能をもつのではないかと考えられ、実際に投与実験、ノックアウト実験からこれらの機能を示唆する結果が得られている(Ishii *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2005; Singh and Davenport, 2006; Sakurai, 2013)。本研究では、これらの研究とは全く異なり、性ステロイド受容体による調節を受け、のみスのみで発現する遺伝子として *npb* に着目した。また、研究の過程で *npb* が性行動と関わることを示唆する形態学的知見が多く得られたことから、性行動に関わる因子として *npb* にアプローチした。そのため、本研究のノックアウト実験においてはこれまで調べられてこなかった性行動の様式を詳細に解析し、野生型と比べ、オスを受け入れるサインが昂進していることを示す新しい知見を得ることができた。すなわち、*npb* はメダカのみスにおいてオスの受け入れを抑制する機能をもつと考えられる。生殖可能なのみスにとって、受け入れを抑制することのメリットとして考えられることは、より適切な配偶者選択を可能にするという点である。多くの動物種は、生殖を行う際、片方の性(多くの場合はのみス)の個体が、配偶者の選択を行い、より大きい、より強いなどの適応的な形質、あるいはより派手、珍しいなどののみスの好みに合った形質をもつ個体を選ばれる。実際にメダカにおいても、のみスが視覚情報をもとにオスの選択を行っていることが報告されている(Grant and Lawrence, 1996; Fujimoto *et al.*, 2014)。のみスがオスを無作為に受け入れてしまわないことは、配偶者選択を行い、より適応的な子孫を残すために非常に重要であると考えられる。オスものみスに対して選択を行っているという報告もあるが(Fukamachi *et al.*, 2009)、メダカにおいてのみスのみが *npb/npc* シグナルにより性行動を抑制するニューロンをもっていることは、メダカにおいて主に配偶者選択を行う性別は、やはりのみスであることを示しているのかもしれない。

魚類で見出されたこの新規の機能が、哺乳類など他の脊椎動物でも保存されているかは不明であるが、*NPB/npb* の脳内での発現部位は、哺乳類と魚類で高い相同性を示すことから(表 4-1)、その機能についても保存されている部分が多いのではないかと考えられる。興味深いことに、*Gpr7* をノックアウトしたマウスは、未知の侵入者マウスに対し接近し、コンタクトをとる時間が長くなっていた(Nagata-Kuroiwa *et al.*, 2011)。また、ヒトにおいても *GPR7* 遺伝子にその機能を阻害するような変異をもつ人が一定割合いるが、そのような遺伝型の人には、人の顔の写真を提示されたとき、どのように感じるかという受け取り方に変化がみられた(Watanabe *et al.*, 2012)。これらはいずれも、自分以外の個体をどのように認識するかという共通の事象を背景にもつ。進化の過程で複雑な社会生活を営むようになるうえで、*NPB/npb* の機能もより複雑化していったが、基礎的な部分は保存されていると考えることもできる。反対に、哺乳類において知られている *NPB* の、摂食・代謝、下垂体からの内分泌の調節、痛覚に対する機能が、魚類にも存在するかどうかは、本研究では明らかになっていない。近年、テラピアを用いた研究で *npb* の発現が摂食状態により変動し、また *Npb* 投与により摂食関連のホルモンである *npy* (neuropeptide y)、*cck* (cholecystokinin) の発現が促進されたことから、魚類においても *npb* が摂食・代謝関連の機能をもつことが示唆された(Yang *et al.*, 2014)。本研究で作出した、*npb*、*npc*、*gpr8* のノックアウトメダカ、*npb/npc* のダブルノックアウトメダカが今後、魚類におけるこうした機能を解析する上でも重要なツールとなることが期待される。

以上、本研究は、終脳と視索前野にメス特異的に性ステロイド受容体を発現するニューロンを見出し、そのニューロンでメス特異的性ステロイド受容体による発現調節を受け、メスのみで発現する標的遺伝子として *npb* を同定した。また、このニューロンが脊髄の運動ニューロン、自律神経節前ニューロンに投射すること、また、このニューロンがエストロゲン依存的な規則的発火活動を行っていることを明らかにした。遺伝子破壊実験により、このニューロンにおける *npb/npc* シグナルの機能は、メスによるオスの受け入れの抑制であることが示唆された。メス特異的性ステロイド受容ニューロンに関するこれらの成果から、本研究の端緒となった疑問「魚類の脳にどのような性差が存在し、その性差がどのように形成され逆転するのか、そしてその性差がどのような形質の性差を支配しているのか」について、その一端を明らかにすることができた(図 4-1 に本研究の内容をまとめたメス特異的性ステロイド受容ニューロンの模式図を示した)。

オスの受け入れを制御することは、適切に配偶者選択を行うために重要であると考えられる。しかし、水産・畜産業や、水族館・動物園などの現場では、雌雄の相性が悪いことから性行動が行われないことが問題となる場合もある。今後、*npb* の性行動に対する役割の研究

を進めることで、こうした事例への応用も可能になると考えられる。一方で、メス特異的性ステロイド受容ニューロンが存在する Vs/Vp、PMm/PMg は破壊すると性行動が行われなくなることが知られ (Demski *et al.*, 1975; Kyle and Peter, 1982; Koyama *et al.*, 1984; Satou *et al.*, 1984)、メスの受け入れ抑制だけがこれらのニューロンの機能ではない可能性もある。また、本研究で見出された *npb/npv* シグナルの機能が他魚種でも保存されているのかも検討する必要がある。今後、これらのニューロンで *npb/npv* 以外に発現する神経ペプチドやその他の因子をメダカおよびその他の魚種において調べることで、魚類の性行動の性差、性的可逆性を支配する脳内のメカニズムが明らかになることが期待される。

表 4-1. *Npb/npb* の発現部位の種間比較

発現部位	マウス <i>Npb</i>	マウス <i>Npw</i>	メダカ <i>npb</i>	メダカ <i>npc</i>
海馬	+	-	ND	ND
手綱核	+	-	+	-
室傍核	+	-	+	+
エディンガーウェストファル核	+	+	ND	ND
三叉神経運動核	+	-	+	ND
三叉神経感覚核	+	-	-	-
傍小脳脚核	+	-	ND	ND
青斑核/青斑下核	+	-	ND	ND
下オリブ核	+	-	+	ND
中脳水道周囲灰白質	-	+	+	+
腹側被蓋野	-	+	ND	ND
縫線核	-	+	-	+

マウスにおける *Npb* と *Npw* の発現部位とメダカにおける *npb* と *npc* の発現部位の比較。マウスにおける発現部位は、Tanaka *et al.*, 2003 から引用した。*in situ hybridization* によりシグナルがみられた神経核には+、シグナルがみられなかった神経核には-を表記した。哺乳類と魚類における神経核の対応に統一した見解のない神経核、また、メダカでは調べていない神経核については ND と表記した。

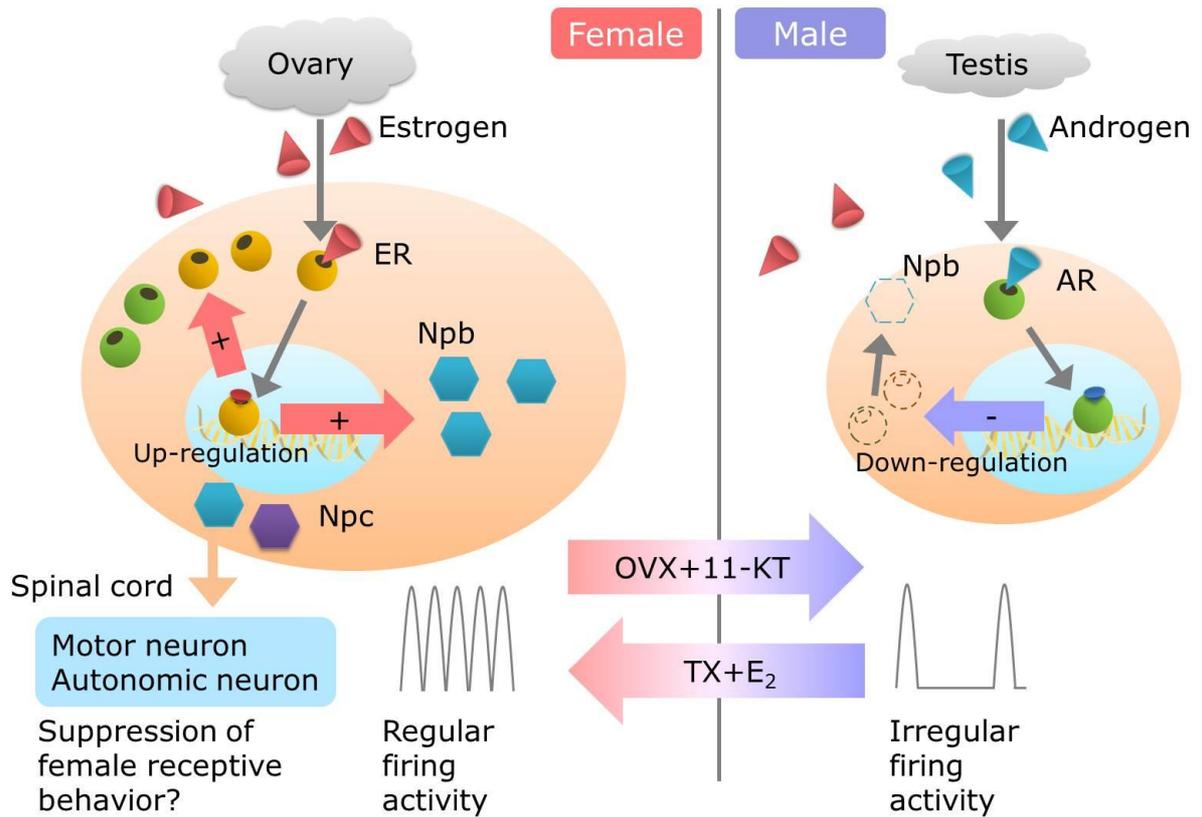


図 4-1. メス特異的性ステロイド受容ニューロンの模式図

本研究から明らかになったメスのメダカにおけるメス特異的性ステロイド受容ニューロンの模式図と、本研究から予想されるオスにおける同ニューロンの模式図。オスにおけるメス特異的性ステロイド受容ニューロンの性質は、適切なマーカーが存在しないため明らかになっていない。そのため、卵巣を除去し、アンドロゲンを投与したメスにから得られた結果をもとに推定し、図示した。

## 要旨

脊椎動物には、様々な雌雄の違い、性差が存在する。中でも、性行動や内分泌のパターンなど生殖に関わる事象にはとりわけ大きな性差がみられる。こうした行動や内分泌の性差は、それを司る脳の中に存在する何らかの性差に起因すると考えられる。脳の性差を研究する材料として、魚類は他の脊椎動物とは大きく異なる特徴をもつ。成熟後であっても性転換可能であるという特徴である。このことは、魚類ではいったん形成された脳の性差が生涯にわたって逆転可能であることを意味している。しかし、魚類の脳に存在する性差や、その形成・逆転機構についての知見はごくわずかしかない。そこで本研究では、モデル動物として確立され、遺伝子改変や遺伝子破壊などの遺伝学的手法を適応しやすいメダカを用い、魚類の脳にどのような性差があるのか、その性差がどのようにしてもたらされ、逆転しうるのか、そして、どのような形質の性差をもたらしているのかを理解することを目的とした。

### 第1章 メス特異的性ステロイド受容ニューロンの発見

脳の性差形成に関わる分子として最もよく知られているのは、性ステロイド(エストロゲン、アンドロゲン)である。第1章ではまず、メダカの脳における性ステロイド受容体(エストロゲン受容体(ER)およびアンドロゲン受容体(AR))の発現の性差を解析することとした。メダカがもつ3種類のER(*esr1*, *esr2a*, *esr2b*)と2種類のAR(*ara*, *arb*)全ての発現を、*in situ hybridization*により神経核別に定量し、雌雄で比較した。その結果、全ての性ステロイド受容体の発現に性差が認められた。中でも、終脳のVs/Vpと視索前野のPMm/PMgでは、ER、ARともに、メスでは多く発現するが、オスではほとんど発現しないという大きな性差がみられた。この結果は、これらのニューロンが、メスのみで性ステロイド感受性をもつニューロン(メス特異的性ステロイド受容ニューロン)であることを示している。このように片方の性のみでエストロゲン、アンドロゲン両方を受容する神経核の存在は、本研究が初の報告である。興味深いことに、これらの神経核は、これまでの研究によって性行動を支配するとされてきた神経核と一致していた。

これらのニューロンにおけるメス特異的な性ステロイド受容体の発現は、卵巣を除去すると減少し、エストロゲンを投与すると回復した。また、卵巣除去とアンドロゲン投与によって体内の性ステロイド環境をオス型に改変すると、オス同様ほぼ消失した。すなわち、これらのニューロンにおける性ステロイド受容体の発現の性差は、エストロゲンとアンドロゲンの両方に

よる一過性で可逆的な調節によって成り立っており、体内の性ステロイド環境に応じて、その性差は逆転可能であることが明らかとなった。

## 第2章 メス特異的性ステロイド受容ニューロンにおける *npb* の発現・機能解析

性ステロイド受容体は核内受容体であり、リガンドと結合すると、ゲノム上のエストロゲン応答配列(ERE; estrogen responsive element)を介して、標的遺伝子の発現調節を行う。したがって、第1章で見出されたメス特異的性ステロイド受容ニューロンにおいて、性ステロイド受容体は何らかの遺伝子の発現をメス特異的に調節していると考えられる。当研究室での先行研究によって同定されたオスよりもメスの脳で多く発現する遺伝子の中に、まさに性ステロイド受容ニューロンと同じ神経核で、メスのみで発現する遺伝子があった。*Npb* (Neuropeptide b)という神経ペプチドをコードする遺伝子 *npb* である。そこで第2章ではまず、*npb* が実際にメス特異的性ステロイド受容ニューロンで発現していることを、二重 *in situ* hybridization により明らかとした。また、Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) を用いて、*npb* 遺伝子上流に存在する ERE を破壊したメダカを作出し、*npb* の発現解析を行った。その結果、脳内の *npb* 発現が減少していたことから、*npb* は確かに ER の標的遺伝子であることが明らかとなった。

続いて、形態学的な解析によって、PMm/PMg におけるメス特異的 *npb* ニューロンに相当するニューロンがオスにも存在するの否かを検証した。その結果、オスの PMm/PMg においては *npb* ニューロンに相当するニューロンは縮小した不活性の状態が存在していることが示唆された。

*npb* ニューロンの軸索の投射様式を、*Npb* の抗血清を用いた免疫組織化学、および *npb* を発現するニューロンで緑色蛍光タンパク質 *gfp* を発現するトランスジェニックメダカの観察により調べたところ、大量の *npb* ニューロンの軸索がメスのみで間脳、延髄を通り、脊髄最後部まで投射している様子が観察された。延髄、脊髄の *npb* ニューロンには性差がなかったため、延髄、脊髄でメスのみでみられた *npb* ニューロンの軸索は、終脳、視索前野のメス特異的な *npb* ニューロンから投射していると考えられた。さらに、脊髄に運ばれた *Npb* の標的細胞を明らかにするために、*Npb* の受容体遺伝子である *gpr8* の脊髄における発現を解析した。その結果、*gpr8* は脊髄前角の運動ニューロンあるいは自律神経節前ニューロンで発現していた。これらの結果から、メス特異的 *npb* ニューロンで産生された *Npb* は脊髄まで運ばれ、メス特異的に何らかの行動の調節、あるいは体内の生理状態の調節を行っていると考えられた。

続いて行った電気生理学的解析により、PMm/PMg メス特異的 *npb* ニューロンは、規則的なペースメーカー様の発火活動を示すことが明らかになった。さらに、その発火活動は、卵巣を除去すると低下し、エストロゲンの投与により回復したことから、これらのニューロンが体内のエストロゲン環境により遺伝子の発現パターンだけでなく、発火活動のパターンも変動させることが明らかになった。

以上の結果により、メス特異的性ステロイド受容ニューロンにおいて *npb* は何らかのメス特異的な性行動の制御に関わる因子であることが示唆されたため、*npb* をノックアウトしたメダカを作出し、メスの性行動を解析した。しかし、野生型との間に表現型の変化は認められず、*npb* の機能を明らかとすることはできなかった。

### 第3章 メス特異的性ステロイド受容ニューロンにおける *npc* の発現と *npb/npc* シグナルの機能解析

本研究室での最近の研究によって、魚類特有の *npb* のパラログス遺伝子が見出された。*npc* と命名されたこの遺伝子は、*npb* 同様 *Gpr8* を活性化させる作用をもつことも示されている。このことから、*npb* ノックアウトメダカでは *npc* が補償的にはたらいでしまい、*npb* の機能を正確に評価できなかったのかもしれないとの仮説を立てた。第3章ではこの仮説にもとづき、まず *npc* の発現部位を *in situ hybridization* により解析した。すると、*npc* は *npb* 同様メス特異的性ステロイド受容ニューロンの存在する Vs/Vp と PMm/PMg で発現していることが分かった。さらに、*npb* と *npc* の二重染色を行うと、メス特異的性ステロイド受容ニューロンにおいて *npb* と *npc* は共発現していることが明らかになった。これらの結果は、上記の仮説を支持するものであった。

そこで、*npc* による補償作用をなくすために、*npc* のノックアウトメダカを作出し、*npb* ノックアウトメダカと交配することで *npb/npc* ダブルノックアウトメダカを作出した。並行して、*Npb/Npc* の受容体遺伝子である *gpr8* のノックアウトメダカも作出した。これらのノックアウトメダカの性行動を解析すると、*npb/npc* ダブルノックアウトメダカと *gpr8* ノックアウトメダカの両方で、オスが追尾を開始してからオスとメスの交接が起こるまでにかかる時間が減少していた。さらに、通常メダカの性行動ではオスによる求愛ダンスの後に産卵が行われるが、*gpr8* ノックアウトメダカでは求愛ダンスを経ずに産卵するメスの割合が有意に高くなっていた。ダブルノックアウトメダカでも有意な差ではなかったものの同様の傾向がみられた。また、ダブルノックアウトメダカにおいて、産卵が終了した後にもかかわらず、オスから交接を受ける回数が有意に増加していた。*gpr8* ノックアウトメダカでも、有意な差ではないが同様の増加がみられた。

これらのことは、メスがオスに対して出す交接のきっかけとなるような受け入れサインがロックアウトのメスでは昂進していることを示唆している。すなわち、メダカにおいて *npb/npc* シグナルはオスの受け入れを抑制する機能をもつことが考えられる。こうした機構の存在が、オスと出会ってすぐ交接するのではなく、求愛ダンスなどの情報を得た上で、より優れたオスを選択したうえで交接し、産卵することを可能にしているのかもしれない。

今後、本研究で見出された、この非常に大きな性差と性的可逆性をもつニューロン群の研究を進めることで、魚類の性特異的な行動と、その可逆性を支配する脳内のメカニズムが明らかになることが期待される。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物学専攻水族生理学研究室の大久保範聡准教授には、研究計画の策定、実験の遂行、研究上の問題解決、論文執筆の全てにおいて多くの助言をいただき、忍耐強く指導していただいた。心からの感謝を申し上げる。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、水族生理学研究室の金子豊二教授、渡邊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東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物学専攻水産化学研究室の潮秀樹教授、東京大学理学系研究科生物学専攻生体情報学研究室の岡良隆教授、水族生理学研究室の金子豊二教授、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准教授に感謝の意を表す。

本研究の電気生理学的解析は生体情報学研究室で行った。その際、岡良隆教授、神田真司助教、赤染康久助教、馬谷千恵氏には実験方法、解析方法を丁寧にご教授いただいた。また西川圭氏、苅郷友美氏、善方文太郎氏、高橋晶子氏、貝瀬峻氏、長谷部政治氏をはじめ同研究室の皆様には重要なご助言を何度もいただき、深く感謝している。

本研究の TALEN 法で用いたベクターは、京都大学大学院農学研究科応用生物学専攻海洋生物機能学分野の木下政人助教からいただいた。その際、京都大学において TALEN 法の実験手法を教えてくださいました安齋賢氏にも心より感謝申し上げます。抗オキシシン抗体を分与していただいた兵藤晋准教授にも感謝申し上げます。

また、本研究の卵巣除去実験において手術を行っていただいた水族生理学研究室の妻木孝泰氏、山下純平氏に心より御礼申し上げます。水族生理学研究室の井ノ口繭氏、進士淳平氏、徐美暎氏、寺西慶太郎氏、古川史也氏、前廣清香氏、宮西弘氏には幾度となく研究の相談に乗っていただき、深く感謝している。長期にわたり共に研究を進め、何度も議論を重ねることにより研究の内容を深めてくれた竹内研生氏、川幡由希香氏、仲宗根潔氏にも心より感謝申し上げます。また、私と同じニューロンの研究を進めてきた細野耕平氏、横山圭子氏、菊池結貴子氏からは多くの重要な知見をいただき、また様々な局面で助力いただいた。多くのご迷惑をおかけしたにもかかわらず、様々な場面で助けてくださった水族生理学研究室の皆様、実験データを提供してくれたメダカたち、そして温かく見守ってくれた家族に深く感謝の意を表す。

## 引用文献

1. **Anken R, Bourrat F** (1998) *Brain atlas of the medakafish*. Paris, France: INRA Editions
2. **Ansai S, Sakuma T, Yamamoto T, Ariga H, Uemura N, Takahashi R, Kinoshita M** (2013) Efficient targeted mutagenesis in medaka using custom-designed transcription activator-like effector nucleases. *Genetics* 193: 739–749
3. **Barraclough CA** (1961) Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate. *Endocrinology* 68: 62–67
4. **Brezillon S, Lannoy V, Franssen JD, Le Poul E, Dupriez V, Lucchetti J, Detheux M, Parmentier M** (2003) Identification of natural ligands for the orphan G protein-coupled receptors GPR7 and GPR8. *J Biol Chem* 278: 776–783
5. **Christensen LW, Nance DM, Gorski RA** (1977) Effects of hypothalamic and preoptic lesions on reproductive behavior in male rats. *Brain Res Bull* 2: 137–141
6. **Claro F, Segovia S, Guilamón A, Del Abril A** (1995) Lesions in the medial posterior region of the BST impair sexual behavior in sexually experienced and inexperienced male rats. *Brain Res Bull* 36: 1–10
7. **Davis EC, Popper P, Gorski RA** (1996) The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Brain Res* 734: 10–18
8. **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
9. **Demski LS, Sloan HE** (1985) A direct magnocellular-preopticospinal pathway in goldfish: implications for control of sex behavior. *Neurosci Lett* 55: 283–288
10. **Diotel N, Le Page Y, Mouriec K, Tong SK, Pellegrini E, Vaillant C, Anglade I, Brion F, Pakdel F, Chung BC, Kah O** (2010) Aromatase in the brain of teleost fish: expression, regulation and putative functions. *Front Neuroendocrinol* 31: 172–192
11. **Fergus DJ, Bass AH** (2013) Localization and divergent profiles of estrogen receptors and aromatase in the vocal and auditory networks of a fish with alternative mating tactics. *J Comp Neurol* 521: 2850–2869
12. **Flanagan-Cato LM** (2011) Sex differences in the neural circuit that mediates female sexual receptivity. *Front Neuroendocrinol* 32: 124–136
13. **Forlano PM, Deitcher DL, Bass AH** (2005) Distribution of estrogen receptor alpha

- mRNA in the brain and inner ear of a vocal fish with comparisons to sites of aromatase expression. *J Comp Neurol*. 483: 91–113
14. **Forlano PM, Marchaterre M, Deitcher DL, Bass AH** (2010) Distribution of androgen receptor mRNA expression in vocal, auditory, and neuroendocrine circuits in a teleost fish. *J Comp Neurol* 518: 493–512
  15. **Fujii R, Yoshida H, Fukusumi S, Habata Y, Hosoya M, Kawamata Y, Yano T, Hinuma S, Kitada C, Asami T, Mori M, Fujisawa Y, Fujino M** (2002) Identification of a neuropeptide modified with bromine as an endogenous ligand for GPR7. *J Biol Chem* 277: 34010–34016
  16. **Fujimoto S, Kawajiri M, Kitano J, Yamahira K** (2014) Female mate preference for longer fins in medaka. *Zool Sci* 31: 703–708
  17. **Fukamachi S, Kinoshita M, Aizawa K, Oda S, Meyer A, Mitani H** (2009) Dual control by a single gene of secondary sexual characters and mating preferences in medaka. *BMC Biol* 7: 64
  18. **Fullwood MJ, Liu MH, Pan YF, Liu J, Xu H, Mohamed YB, Orlov YL, Velkov S, Ho A, Mei PH, Chew EG, Huang PY, Welboren WJ, Han Y, Ooi HS, Ariyaratne PN, Vega VB, Luo Y, Tan PY, Choy PY, Wansa KD, Zhao B, Lim KS, Leow SC, Yow JS, Joseph R, Li H, Desai KV, Thomsen JS, Lee YK, Karuturi RK, Herve T, Bourque G, Stunnenberg HG, Ruan X, Cacheux-Rataboul V, Sung WK, Liu ET, Wei CL, Cheung E, Ruan Y** (2009) An oestrogen-receptor- $\alpha$ -bound human chromatin interactome. *Nature* 462: 58–64
  19. **Funakoshi K, Nakano M** (2007) The sympathetic nervous system of anamniotes. *Brain Behav Evol* 69: 105–113
  20. **Gaub MP, Bellard M, Scheuer I, Chambon P, Sassone-Corsi P** (1990) Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. *Cell* 63: 1267–1276
  21. **Godwin J** (2010) Neuroendocrinology of sexual plasticity in teleost fishes. *Front Neuroendocrinol* 31: 203–216
  22. **Gonçalves D, Costa SS, Teles MC, Silva H, Inglês M, Oliveira RF** (2014) Oestradiol and prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  regulate sexual displays in females of a sex-role reversed fish. *Proc Biol Sci* 281: 20133070

23. **Goodson JL, Kingsbury MA** (2013) What's in a name? Considerations of homologies and nomenclature for vertebrate social behavior networks. *Horm Behav* 64: 103–112
24. **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
25. **Grant JWA and Green LD** (1996) Mate copying versus preference for actively courting males by female Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Behav Ecol* 7: 165–167
26. **Gregory WA, Tweedle CD** (1985) Horseradish peroxidase evidence for a spinal projection from the preoptic area of the goldfish, a light and electron microscopic study. *Brain Res* 341: 82–91
27. **Harding SM, McGinnis MY** (2004) Androgen receptor blockade in the MPOA or VMN: effects on male sociosexual behaviors. *Physiol Behav* 81: 671–680
28. **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
29. **Hines M, Allen LS, Gorski RA** (1992) Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Res* 579: 321–326
30. **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
31. **Ikeuchi T, Todo T, Kobayashi T, Nagahama Y** (1999) cDNA cloning of a novel androgen receptor subtype. *J Biol Chem* 274: 25205–25209
32. **Ishii M, Fei H, Friedman JM** (2003) Targeted disruption of GPR7, the endogenous receptor for neuropeptides B and W, leads to metabolic defects and adult-onset obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10540–10545
33. **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
34. **Juraska JM, Sisk CL, DonCarlos LL** (2013) Sexual differentiation of the adolescent rodent brain: hormonal influences and developmental mechanisms. *Horm Behav* 64: 203–210

35. **Kanesaka M, Matsuda M, Hirano A, Tanaka K, Kanatani A, Tokita S** (2007) Development of a potent and selective GPR7 (NPBW1) agonist: a systematic structure-activity study of neuropeptide B. *J Pept Sci* 13: 379–385
36. **Katz Y, Eckstein B** (1974) Changes in steroid concentration in blood of female *Tilapia aurea* (teleostei, cichlidae) during initiation of spawning. *Endocrinology* 95: 963–967
37. **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
38. **Kelly DA, Varnum MM, Krentzel AA, Krug S, Forger NG** (2013) Differential control of sex differences in estrogen receptor  $\alpha$  in the bed nucleus of the stria terminalis and anteroventral periventricular nucleus. *Endocrinology* 154: 3836–3846
39. **Kelly MA, Beuckmann CT, Williams SC, Sinton CM, Motoike T, Richardson JA, Hammer RE, Garry MG, Yanagisawa M** (2005) Neuropeptide B-deficient mice demonstrate hyperalgesia in response to inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9942–9947
40. **Kim SJ, Ogasawara K, Park JG, Takemura A, Nakamura M** (2002) Sequence and expression of androgen receptor and estrogen receptor gene in the sex types of protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. *Gen Comp Endocrinol* 127: 165–173
41. **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
42. **Kyle AL, Peter RE** (1982) Effects of forebrain lesions on spawning behaviour in the male goldfish. *Physiol Behav* 28: 1103–1109
43. **Lauber AH, Mobbs CV, Muramatsu M, Pfaff DW** (1991) Estrogen receptor messenger RNA expression in rat hypothalamus as a function of genetic sex and estrogen dose. *Endocrinology* 129: 3180–3186
44. **Liu YC, Salamone JD, Sachs BD** (1997) Lesions in medial preoptic area and bed nucleus of stria terminalis: differential effects on copulatory behavior and noncontact erection in male rats. *J Neurosci* 17: 5245–5253
45. **Lu SF, McKenna SE, Cologer-Clifford A, Nau EA, Simon NG** (1998) Androgen receptor in mouse brain: sex differences and similarities in autoregulation.

*Endocrinology* 139: 1594–1601

46. **Madeira MD, Ferreira-Silva L, Paula-Barbosa MM** (2001) Influence of sex and estrus cycle on the sexual dimorphisms of the hypothalamic ventromedial nucleus: stereological evaluation and Golgi study. *J Comp Neurol* 432: 329–345
47. **Madeira MD, Sousa N, Cadete-Leite A, Lieberman AR, Paula-Barbosa MM** (1993) The supraoptic nucleus of the adult rat hypothalamus displays marked sexual dimorphism which is dependent on body weight. *Neuroscience* 52: 497–513
48. **Matsuda KI, Mori H, Kawata M** (2012) Epigenetic mechanisms are involved in sexual differentiation of the brain. *Rev Endocr Metab Disord* 13: 163–171
49. **Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S, Sakaizumi M** (2002) DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417: 559–563
50. **Matsumoto A, Arai Y** (1983) Sex difference in volume of the ventromedial nucleus of the hypothalamus in the rat. *Endocrinol Jpn* 30: 277–280
51. **McCarthy MM, Arnold AP** (2011) Reframing sexual differentiation of the brain. *Nat Neurosci* 14: 677–683
52. **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
53. **Moore FL, Lowry CA** (1998) Comparative neuroanatomy of vasotocin and vasopressin in amphibians and other vertebrates. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 119: 251–260
54. **Munakata A, Kobayashi M** (2010) Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 165: 456–468
55. **Nagata-Kuroiwa R, Furutani N, Hara J, Hondo M, Ishii M, Abe T, Mieda M, Tsujino N, Motoike T, Yanagawa Y, Kuwaki T, Yamamoto M, Yanagisawa M, Sakurai T** (2011) Critical role of neuropeptides B/W receptor 1 signaling in social behavior and fear memory. *PLoS One* 6: e16972
56. **Nance DM, Christensen LW, Shryne JE, Gorski RA** (1977) Modifications in gonadotropin control and reproductive behavior in the female rat by hypothalamic and preoptic lesions. *Brain Res Bull* 2: 307–312

57. **Nanda I, Kondo M, Hornung U, Asakawa S, Winkler C, Shimizu A, Shan Z, Haaf T, Shimizu N, Shima A, Schmid M, Schartl M** (2002) A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11778–11783
58. **Northcutt RG** (1995) The forebrain of gnathostomes: in search of a morphotype *Brain Behav Evol* 46: 275–318
59. **O'Brien JE, Peterson TJ, Tong MH, Lee EJ, Pfaff LE, Hewitt SC, Korach KS, Weiss J, Jameson JL** (2006) Estrogen-induced proliferation of uterine epithelial cells is independent of estrogen receptor  $\alpha$  binding to classical estrogen response elements. *J Biol Chem* 281: 26683–26692
60. **O'Connell LA, Hofmann HA** (2011) The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: a comparative synthesis. *J Comp Neurol* 519: 3599–3639
61. **Oka Y, Satou M, Ueda K** (1986) Descending pathways to the spinal cord in the himé salmon (landlocked red salmon, *Oncorhynchus nerka*). *J Comp Neurol* 254: 91–103
62. **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
63. **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
64. **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
65. **Pasmanik M, Callard GV** (1985) Aromatase and 5  $\alpha$ -reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. *Gen Comp Endocrinol* 60: 244–251
66. **Paul-Prasanth B, Bhandari RK, Kobayashi T, Horiguchi R, Kobayashi Y, Nakamoto M, Shibata Y, Sakai F, Nakamura M, Nagahama Y** (2013) Estrogen oversees the maintenance of the female genetic program in terminally differentiated gonochorists. *Sci Rep* 3: 2862
67. **Peng Y, Clark KJ, Campbell JM, Panetta MR, Guo Y, Ekker SC** (2014) Making

- designer mutants in model organisms. *Development* 141: 4042–4054
68. **Pérez SE, Yáñez J, Marín O, Anadón R, González A, Rodríguez-Moldes I** (2000) Distribution of choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in the brain of the adult trout and tract-tracing observations on the connections of the nuclei of the isthmus. *J Comp Neurol* 428: 50–74
  69. **Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young WC** (1959) Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 65: 369–382
  70. **Raisman G, Field PM** (1973) Sexual dimorphism in the neuropil of the preoptic area of the rat and its dependence on neonatal androgen. *Brain Res* 54: 1–29
  71. **Roselli CE** (1991) Sex differences in androgen receptors and aromatase activity in microdissected regions of the rat brain. *Endocrinology* 128: 1310–1316
  72. **Roselli CE, Estill CT, Stadelman HL, Stormshak F** (2009) The volume of the ovine sexually dimorphic nucleus of the preoptic area is independent of adult testosterone concentrations. *Brain Res* 1249: 113–117
  73. **Sachs BD, Pollak EK, Krieger MS, Barfield RJ** (1973) Sexual behavior: normal male patterning in androgenized female rats. *Science* 181: 770–772
  74. **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
  75. **Sakurai T** (2013) NPBWR1 and NPBWR2: implications in energy homeostasis, pain, and emotion. *Front Endocrinol* 4: 23
  76. **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
  77. **Satou M, Yamanouchi K** (1999) Effect of direct application of estrogen aimed at lateral septum or dorsal raphe nucleus on lordosis behavior: regional and sexual differences in rats. *Neuroendocrinology* 69: 446–452
  78. **Schneider H, Sulner B** (2007) Innervation of dorsal and caudal fin muscles in adult zebrafish *Danio rerio*. *J Comp Neurol* 497: 702–716

79. **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
80. **Scott CJ, Tilbrook AJ, Simmons DM, Rawson JA, Chu S, Fuller PJ, Ing NH, Clarke IJ** (2000) The distribution of cells containing estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and ER $\beta$  messenger ribonucleic acid in the preoptic area and hypothalamus of the sheep: comparison of males and females. *Endocrinology* 141: 2951–2962
81. **Shah NM, Pisapia DJ, Maniatis S, Mendelsohn MM, Nemes A, Axel R** (2004) Visualizing sexual dimorphism in the brain. *Neuron* 43: 313–319
82. **Shen EY, Ahern TH, Cheung I, Straubhaar J, Dincer A, Houston I, de Vries GJ, Akbarian S, Forger NG** (2014) Epigenetics and sex differences in the brain: A genome-wide comparison of histone-3 lysine-4 trimethylation (H3K4me3) in male and female mice. *Exp Neurol* (In Press)
83. **Shima N, Yamaguchi Y, Yuri K** (2003) Distribution of estrogen receptor  $\beta$  mRNA-containing cells in ovariectomized and estrogen-treated female rat brain. *Anat Sci Int* 78: 85–97
84. **Singh G, Davenport AP** (2006) Neuropeptide B and W: neurotransmitters in an emerging G-protein-coupled receptor system. *Br J Pharmacol* 148: 1033–1041
85. **Tanaka H, Yoshida T, Miyamoto N, Motoike T, Kurosu H, Shibata K, Yamanaka A, Williams SC, Richardson JA, Tsujino N, Garry MG, Lerner MR, King DS, O'Dowd BF, Sakurai T, Yanagisawa M** (2003) Characterization of a family of endogenous neuropeptide ligands for the G protein-coupled receptors GPR7 and GPR8. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6251–6256
86. **Tsai HW, Grant PA, Rissman EF** (2009) Sex differences in histone modifications in the neonatal mouse brain. *Epigenetics* 4: 47–53
87. **Tsukahara S, Kanaya M, Yamanouchi K** (2014) Neuroanatomy and sex differences of the lordosis-inhibiting system in the lateral septum. *Front Neurosci* 8: 299
88. **Tsukahara S, Yamanouchi K** (2002) Sex difference in septal neurons projecting axons to midbrain central gray in rats: a combined double retrograde tracing and ER-immunohistochemical study. *Endocrinology* 143: 285–294
89. **Tsukamura H, Homma T, Tomikawa J, Uenoyama Y, Maeda K** (2010) Sexual

- differentiation of kisspeptin neurons responsible for sex difference in gonadotropin release in rats. *Ann N Y Acad Sci* 1200: 95–103
90. **Voigt C, Ball GF, Balthazart J** (2009) Sex differences in the expression of sex steroid receptor mRNA in the quail brain. *J Neuroendocrinol* 21: 1045–1062
  91. **Watanabe N, Wada M, Irukayama-Tomobe Y, Ogata Y, Tsujino N, Suzuki M, Furutani N, Sakurai T, Yamamoto M** (2012) A single nucleotide polymorphism of the neuropeptide B/W receptor-1 gene influences the evaluation of facial expressions. *PLoS One* 7: e35390
  92. **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
  93. **Westerfield M, McMurray JV, Eisen JS** (1986) Identified motoneurons and their innervation of axial muscles in the zebrafish. *J Neurosci* 6: 2267–2277
  94. **Woolf NJ** (1991) Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog Neurobiol* 37: 475–524
  95. **Xu X, Coats JK, Yang CF, Wang A, Ahmed OM, Alvarado M, Izumi T, Shah NM** (2012) Modular genetic control of sexually dimorphic behaviors. *Cell* 148: 596–607
  96. **Yamamoto T** (1958) Artificial induction of functional sex-reversal in genotypic females of the medaka (*Oryzias latipes*). *J Exp Zool* 137: 227–263
  97. 山内 兄人, 新井 康允 (2006) 脳の性分化, 東京, 日本: 裳華房
  98. **Yang L, Sun C, Li W** (2014) Neuropeptide B in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: molecular cloning and its effects on the regulation of food intake and mRNA expression of growth hormone and prolactin. *Gen Comp Endocrinol* 200: 27–34
  99. **Yoshida M, Yuri K, Kizaki Z, Sawada T, Kawata M** (2000) The distributions of apoptotic cells in the medial preoptic areas of male and female neonatal rats. *Neurosci Res* 36: 1–7
  100. **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* 521: 1760–1780