

論文の内容の要旨

水圏生物科学 専攻

平成 24 年度 博士課程進学

氏名 梶山 (平木) 十和子

指導教員名 大久保 範聡

論文題目 メダカの脳におけるメスト異性的ステロイド受容ニューロンの構造・機能解析

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 メスト異性的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変更すると、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で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ノ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配し、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。