

論文の内容の要旨

論文題目

Genes differentially expressed between the sexes in the medaka brain

メダカの脳において発現に性差を示す遺伝子の探索と発現制御解析

氏名

前廣 清香

序論

脊椎動物の行動や内分泌のパターンには明瞭な性差が存在する。そしてこれらの性差は、脳内に存在する何らかの性差に起因しているものが多いと考えられる。

脊椎動物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るのかについては、これまで齧歯類を用いた研究が中心的に進められてきており、そこから導かれた「出生期に女性ホルモンであるエストロゲンが脳をオス化させ、その際に形成された性差は不可逆的である」という考えが、あたかも脊椎動物に普遍的な原理であるかのように認識されてきた。

しかし近年、ヒトやサルなどの哺乳類やニワトリなどの鳥類などいくつかの動物種において、これらの知見と矛盾する報告がなされてきている。中でも魚類には成体になっても性転換を行う種が多く存在し、魚類の脳は一生涯にわたって性的な可塑性を保持していることが知られる。この事象は齧歯類の研究から提唱されてきたような「出生期に決定された脳の性は一生涯変わることはない」という基本コンセプトとは全く相容れず、これがすべての脊椎動物に当てはまる一般原則とは成り得ないことを示している。

そこで私は、脊椎動物における脳の性差とその形成メカニズムの基本原理を理解すること、特に、脳の性の確かさや揺らぎやすさを決める分子基盤を理解することを目指して、魚類（メダカ）の脳における性差とその形成のメカニズム、可逆性のメカニズムを解析することとした。

第1章 メダカの脳内で発現に性差を示す遺伝子の探索

第1章では、メダカ成魚の脳内に存在する性差を遺伝子レベルで見出すために行ったスクリーニングの結果を報告する。DNA マイクロアレイを用いて脳内で発現に性差を示す遺伝子をスクリーニングした後、real-time PCR による確認を行い、真に発現に性差を示すことがわかった遺伝子については、全長 cDNA のクローニング、およびアノテーション作業を行った。

その結果、これまでに脊椎動物の脳内で発現に性差を示すことが報告されていない3種類の遺伝子が同定できた。1つ目は、メスの脳で約15倍高い発現を示すことが明らかとなった transglutaminase 遺伝子であり、ゼブラフィッシュの遺伝子 *f13a1a* の ortholog であったため、メダカの *f13a1a* であると判断した。2つ目は、神経幹細胞の自己増殖や分化を促進することが報告されている ciliary neurotrophic factor a 遺伝子 (*cntfa*)、3つ目は、心筋の発生に必須であることが示されている PDZ and LIM domain 3 a 遺伝子 (*pdlim3a*) であり、それぞれ *cntfa* は約5.6倍、*pdlim3a* は約3.6倍、どちらもオスの脳で高い発現を示すことがわかった。加えて配列解析の結果から、*f13a1a* は常染色体に存在する一方で、*cntfa* と *pdlim3a* は、ともに性染色体上の X と Y に共通な領域に存在することが明らかとなった。

第2章 メスで高い発現を示す遺伝子 *f13a1a* の解析

第2章では、メスの脳で高い発現を示す遺伝子 *f13a1a* についての解析結果を報告する。

まずは脳での発現部位と性差を調べるため、メダカ成魚の脳を三分割したそれぞれの領域で組織レベルでの発現解析を行ったところ、*f13a1a* は全ての脳領域で発現しており、いずれの領域においてもメスに偏った発現パターンを示すことがわかった。

続いて細胞レベルでの発現部位の同定を行った結果、*f13a1a* は視索前野内の2つの神経核 (parvocellular portion of the magnocellular preoptic nucleus (PMp) および magnocellular portions of the magnocellular preoptic nucleus (PMm)) において、メスのみで発現していることが明らかとなった。また脳髄膜周辺部にも発現細胞がみられ、メスにより多く観察された。発現部位から、*f13a1a* は性行動や下垂体ホルモン分泌の性差に関与している可能性が示唆された。

次に *f13a1a* の発現に性差が現れる時期を特定するため、月齢別の個体を対象に発現解析を行った。その結果、*f13a1a* の発現は2ヶ月齢からメスで有意に高くなることが明らかとなり、脳内の *f13a1a* の発現は性成熟に伴いメス特異的に上昇していることがわかった。

ここで *f13a1a* の発現の性差が性染色体上に存在する遺伝的な性差によって直接もたらされている可能性を考え、人為的に性転換を起こさせた個体 (XX オス、XY メス) を用いて、全脳における発現解析を行った。その結果、性転換オスと通常オスは同様に発現が低く、性転換メスと通常メスの発現が同様に高かったことから、*f13a1a* は性染色体とは関係なく、生殖腺の性に一致した発現パターンを示すことが明らかとなった。

そこで *f13a1a* の発現が生殖腺由来のホルモンにより制御されている可能性を検証するため、卵巣除去個体とそこに性ホルモンを投与した個体を用いた *f13a1a* の発現解析を行った。

結果、PMp および PMm におけるメス特異的な *fl3a1a* の発現が、卵巣除去で消失し、エストロゲン投与で回復すること、またエストロゲン投与によってオスでも誘導されることわかった。さらに、PMp、PMm における *fl3a1a* ニューロンはエストロゲン受容体を発現していること、また *fl3a1a* の推定プロモーター領域にはエストロゲン応答配列様の配列が存在することも明らかとなった。

以上の結果から、PMp および PMm におけるメス特異的な *fl3a1a* の発現は、卵巣由来のエストロゲンに起因すること、その性差は成魚の段階でも完全に可逆的であること、そこでのエストロゲンの作用は直接的なものであることが強く示唆された。

第3章 オスで高い発現を示す遺伝子 *cntfa* と *pdlim3a* の解析

第3章では、オスの脳で高い発現を示す遺伝子 *cntfa* と *pdlim3a* についての解析結果を報告する。

これらの遺伝子の脳での発現部位と性差を調べるため、全脳を三分割した領域での発現解析を行った結果、両遺伝子とも全ての脳領域で発現がみられ、いずれにおいてもオスに偏った発現パターンを示すことがわかった。

続いて、脳における *cntfa* と *pdlim3a* の発現に性差が現れる時期を特定するため、月齢別の個体を対象に発現解析を行った。その結果、*fl3a1a* の場合とは異なり、どちらの遺伝子も性成熟前から脳内で大きな性差を示すことが明らかとなった。

人為的に性転換を起こさせた個体の全脳における発現解析を行ったところ、*cntfa*、*pdlim3a* ともに性転換オスでは通常メスと同程度に発現が低いのに対し、性転換メスと通常オスはそれよりも顕著に発現が高くなっていることがわかった。したがって両遺伝子とも、性染色体の性に応じた発現パターンを示すことが明らかとなった。また、両遺伝子が性染色体に位置することをふまえ、ゲノム中に含まれる両遺伝子の存在量を雌雄で比較したが、顕著な違いは認められなかった。

さらに、*cntfa* と *pdlim3a* の発現における性ホルモンの影響を確認するため、生殖腺除去、および除去後性ホルモンを投与した個体を用いて、全脳における発現解析を行った。その結果、*cntfa* においては、卵巣除去後にエストロゲンを投与することで発現が上昇したため、メスにおいてエストロゲンによる発現促進傾向がみられることがわかった。また *pdlim3a* においては、精巣を除去することで発現が増加し、そこにアンドロゲンを投与することで発現が減少したことから、オスにおいてアンドロゲンによる発現抑制傾向がみられることがわかった。この結果から、*fl3a1a* と比較するとその程度は低いが、両遺伝子の発現も性ホルモンの影響を受けていることが明らかとなった。

これらの結果から、*cntfa* と *pdlim3a* 両遺伝子ともに Y 染色体アレルからの発現の方が X 染色体アレルからの発現よりも高く、その結果、オスに偏った発現の性差を示すものと考えられた。また、性ホルモンによる制御も受けており、両遺伝子の発現の性差は、genetic な制御と hormonal な制御が合わさった結果であることが強く示唆された。

まとめと考察

以上のように、本研究を通して、私は脳内で発現に性差を示す遺伝子を新たに 3 種類同定することができた。

またこれらの遺伝子の解析を通じて、メダカの脳における性差とその形成メカニズムの一端を示すことができたと考えられる。具体的には、メダカは性成熟後でも、脳内の遺伝子発現の性差が完全に逆転し得ること、またニューロン以外の脳領域にも性差が存在すること、また性決定遺伝子とされるもの以外にも性染色体上に乗っている遺伝子の中に脳内で性差を示すものが存在すること、そして、発現に性差を示す遺伝子の制御機構には **hormonal** なものと **genetic** なものが存在することなどが挙げられる。

これらいくつかの新規の知見によって、齧歯類での報告とは明らかに異なる性差形成のメカニズムの存在が見えてきた。今後は今回解析を行った 3 つの遺伝子が、それぞれ個体レベルでどのような性差に寄与しているかという点に着目して研究を進めていくことで、脊椎動物の脳の性差と、それを規定するメカニズムの普遍性・多様性を分子レベルで理解することができるようになるものと期待できる。