

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03044

研究課題名(和文)性ホルモンによる魚類の生殖行動・攻撃行動の制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Sex steroid-dependent regulatory mechanisms of reproductive and aggressive behaviors in fish

研究代表者

大久保 範聡 (Okubo, Kataaki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：10370131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：魚類を含め、脊椎動物では、生殖行動と攻撃行動はいずれも卵巣や精巣から分泌される性ホルモンの支配下にあることが知られている。本研究では、「魚類において、脳に届いた性ホルモンが生殖行動や攻撃行動を引き起こす際に、脳内でどのような機構が作動するのか」を明らかにすることを目的として、メダカで解析を進めた。その結果、雄性ホルモンが視索前野でガラニンという神経ペプチドの発現を促進し、それにより攻撃行動の一つである追い払い行動を引き起こされることなどが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、雄性ホルモンが魚類の攻撃行動を引き起こす際の脳内メカニズムの一端が明らかとなった。今回明らかとなったのは、追い払い行動という攻撃行動の一要素を引き起こす脳内メカニズムに過ぎないが、研究をさらに進めることで、性ホルモンが生殖行動や攻撃行動を引き起こす際の脳内メカニズムの全容が見えてくることが期待される。そこで得られる成果は、基礎生物学的に価値があるだけでなく、水産増養殖への応用にもつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In vertebrates, including teleost fish, reproductive and aggressive behaviors are under the control of sex steroid hormones secreted from the ovaries and testes. In this study, we conducted a series of analyses in medaka to clarify "what brain mechanisms mediate the effects of sex steroid hormones on reproductive and aggressive behaviors in teleost fish". Our results showed, for example, that androgens stimulate the expression of the neuropeptide galanin in the preoptic area, which in turn triggers aggressive chases.

研究分野：魚類生殖生理学

キーワード：性ホルモン 魚類 生殖行動 攻撃行動

1. 研究開始当初の背景

魚類を含め、脊椎動物では、生殖行動と攻撃性はいずれも、性ホルモン(雄性ホルモン、雌性ホルモン、黄体ホルモン)の支配下にあることが知られている。主として生殖腺(卵巣あるいは精巣)で産生された性ホルモンが脳へと届き、脳内で何らかの機構が作動した結果、生殖行動や攻撃行動が引き起こされるのである。オキシトシンやバソプレシン、ゴナドトロピン放出ホルモンといった脳内で産生される神経ホルモンが生殖行動や攻撃性の程度を修飾することは古くから知られていたが、生殖行動や攻撃行動を引き起こす脳内機構の本体は長年、謎のままとなっていた。ところが近年のマウスやラットでの研究により、その機構の一端が明らかになりつつあり、広く注目を集めている(Xu *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2017)。しかし今もなお、機構の全体像や、性ホルモンがそれらの機構をどのように制御しているのかについては、明らかとなっていない。

性ホルモンは、転写因子として作用する性ホルモン受容体と結合し、種々の遺伝子の転写を制御する。しかし、生殖行動や攻撃行動が引き起こされる際に、脳内で性ホルモンの直接の標的となっている遺伝子も見つかっていない(Yang and Shah, 2014)。一方、魚類でのこの分野の研究は、「体内の性ホルモンの種類や量を改変すると、生殖行動・攻撃行動が変化する」という現象の提示にとどまっており、性ホルモンと生殖行動・攻撃行動をつなぐ脳内メカニズムは、未だブラックボックスとなっていた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、「魚類において、脳に届いた性ホルモンが生殖行動や攻撃行動を引き起こす際に、脳内でどのような機構が作動するのか」という問いに解答を与えることを目標に掲げた。

3. 研究の方法

本研究の開始時までには、雌性ホルモン受容体遺伝子の一種 *esr2b* (メダカがもつ3種類の雌性ホルモン受容体遺伝子の一種) をノックアウトしたメスマダカは生殖行動に異常を示すこと、脳内の雄性ホルモンを雌性ホルモンに転換する酵素の遺伝子 *cyp19a1b* をノックアウトしたメダカは、雌雄のいずれも生殖行動に異常を示し、オスはさらに攻撃行動にも異常を示すことを見出していた。このことは、*esr2b* と *cyp19a1b* が、性ホルモンによって生殖行動や攻撃行動が引き起こされる際に作動する脳内機構の起点となっていることを意味する。

そこで本研究ではまず、*esr2b* と *cyp19a1b* のノックアウト系統の脳内で、発現が亢進あるいは抑制されている遺伝子を探索することで、*esr2b* と *cyp19a1b* の下流ではたらく脳内遺伝子を同定することとした。その目的のもと、両ノックアウト系統の野生型とホモ変異体の脳を領域ごとに分割し、それぞれの脳領域のトランスクリプトーム解析を行った。脳を分割して解析を進めたのは、目的の遺伝子が脳内で広く発現するにも関わらず、特定の脳領域だけで発現に差を示す場合、全脳をサンプルとすると、その差が他の脳領域での発現にマスクされてしまい、うまく検出できない恐れがあるためである。その後、得られたトランスクリプトーム情報を解析し、雌性ホルモンの支配下で生殖行動や攻撃行動を制御している候補遺伝子を絞り込んだ。続いて、それらの遺伝子の *in silico* クローニングを行い、その正体を明らかにするとともに、それらの遺伝子の発現解析を進めた。

また、それらのノックアウト系統に加え、ゲノム編集技術(CRISPR/Cas9法)を用いて、生殖行動や攻撃行動に何らかの表現型を示す可能性が考えられる雄性ホルモン受容体遺伝子(*ara* および *arb*)、雄性ホルモンの合成酵素遺伝子(*11bhsd2*)、黄体ホルモン受容体遺伝子(*pgr*)のノックアウトメダカ系統も作出し、それらの生殖行動と攻撃行動を解析した。

さらに、性ホルモンの支配下で生殖行動や攻撃行動を制御している候補遺伝子として、視索前野 PMP 領域で発現に性差を示す神経ペプチドであるガラニン(*gal*) (オス>メス)、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(*adcyap1*) (オス>メス)、血管作動性腸管ペプチド(*vip*) (オス<メス)に着目し、それらの遺伝子の発現解析・機能解析を進めた。

4. 研究成果

esr2b と *cyp19a1b* のノックアウト系統の野生型とホモ変異体の脳のトランスクリプトーム情報から、雌性ホルモンの支配下で生殖行動や攻撃行動を制御している候補遺伝子が絞り込まれた。それらの遺伝子の正体を明らかにした後、発現解析を進めたところ、ノックアウト系統で確かに発現が変化している遺伝子がいくつか確認されたが、そのほとんどは、期待されるほどの変化の度合いや期待される脳部位での発現を示さなかった。そこで現在、解析対象とする遺伝子の数を増やし、改めて解析を進めている。

ara、*arb*、*11bhsd2*、*pgr* のノックアウト系統の生殖行動や攻撃行動の表現型解析を進めた結果、*ara* と *arb* はリガンドを共有しつつも機能分化しており、生殖行動や攻撃行動の異なる要素を制御していることが明らかとなった。今後、それらの受容体の下流ではたらく遺伝子を解析することで、生殖行動や攻撃行動の制御メカニズムを高い解像度で明らかにすることができると期待される。

gal の発現解析を進めたところ、*gal* は PMP 領域において、雄性ホルモン/Ara シグナルの下流でほぼオス特異的に発現することが明らかとなった。また、生殖行動や攻撃行動における *gal* の役割を調べるために、*gal* のノックアウトメダカの行動の表現型を解析したところ、接近してきた同性の他個体を追い払う行動が、オスのノックアウト個体で有意に減少していることが分かった (図1)。追い払い行動は攻撃行動の一種であるが、噛みつきや威嚇など、その他のオスの攻撃行動に変化はみられなかった (図1)。また、メスの攻撃行動や、雌雄いずれの配偶行動にも変化はみられなかった。これらの結果から、*gal* には、オスが他のオスを追い払う行動を特異的に促進する作用があることが明らかとなった。*gal* が PMP 領域でほぼオス特異的に発現していることを考慮すると、そこで産生されるガラニンが追い払い行動を促進する役割を担っていると想像される。そこで、この考えを検証するため、引き続き以下の解析を行った。

脊椎動物では一般に、メスよりもオスの方が高い攻撃性を示し、メダカも例外ではない。オスの高い攻撃性は、精巣から放出される雄性ホルモンによって引き起こされると考えられているが、我々は今回、成熟したメスのメダカに雄性ホルモンを投与すると、PMP 領域での *gal* 発現が誘導されるとともに、同性を追い払う行動を含め、通常は稀にしか示さない各種の攻撃行動の頻度が増加することを見出した。そして、*gal* ノックアウトメスにも雄性ホルモンを投与し、攻撃行動を解析したところ、噛みつきや威嚇などの頻度は野生型メスと同程度に増加したが、同性を追い払う行動だけは、野生型メスほど増加しなかった (図2)。脳内の4つの領域に存在する *gal* 発現ニューロンのうち、雄性ホルモンへの応答性をもち、オス優位な性差を示すのは PMP 領域のニューロン群だけである。このことを考え合わせると、やはり PMP 領域で産生されたガラニンが追い払い行動を促進する役割を担っており、それゆえに、追い払い行動は通常、ほぼオスだけで引き起こされると考えられた。

一方、*adcyp1* と *vip* の発現解析を進めたところ、これらの遺伝子は PMP 領域内の同じニューロン群で発現しており、いずれも雌性ホルモンの制御を受けていることが分かった。*adcyp1* の発現は雌性ホルモンによって抑制されるためにオス優位となり、*vip* の発現は雌性ホルモンによって促進されるためにメス優位となることが分かった。*adcyp1* と *vip* を発現するニューロンは雌性ホルモン受容体を発現していることもわかり、雌性ホルモンはこれらの遺伝子の発現を直接制御している可能性が考えられた。

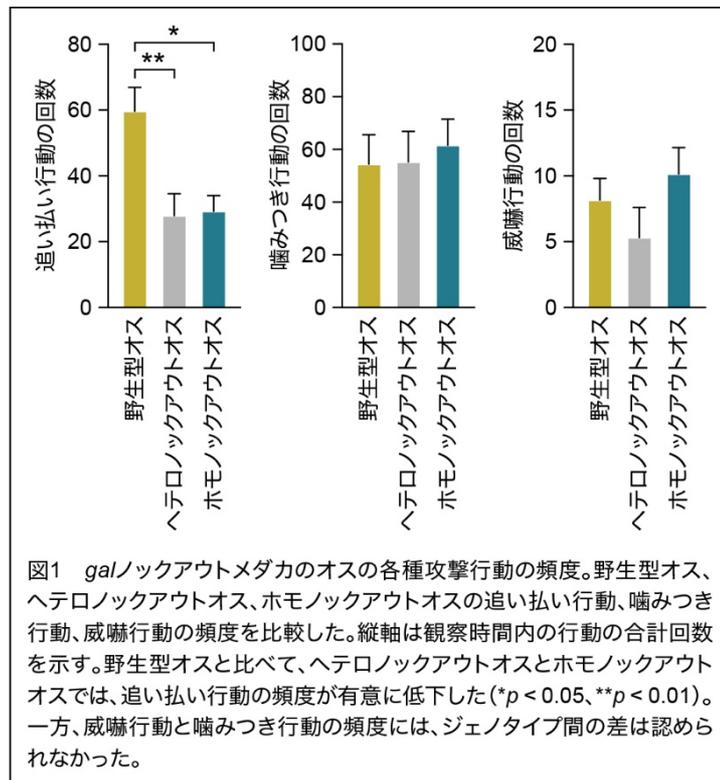


図1 *gal*ノックアウトメダカのオスの各種攻撃行動の頻度。野生型オス、ヘテロノックアウトオス、ホモノックアウトオスの追い払い行動、噛みつき行動、威嚇行動の頻度を比較した。縦軸は観察時間内の行動の合計回数を示す。野生型オスと比べて、ヘテロノックアウトオスとホモノックアウトオスでは、追い払い行動の頻度が有意に低下した(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。一方、威嚇行動と噛みつき行動の頻度には、ジェノタイプ間の差は認められなかった。

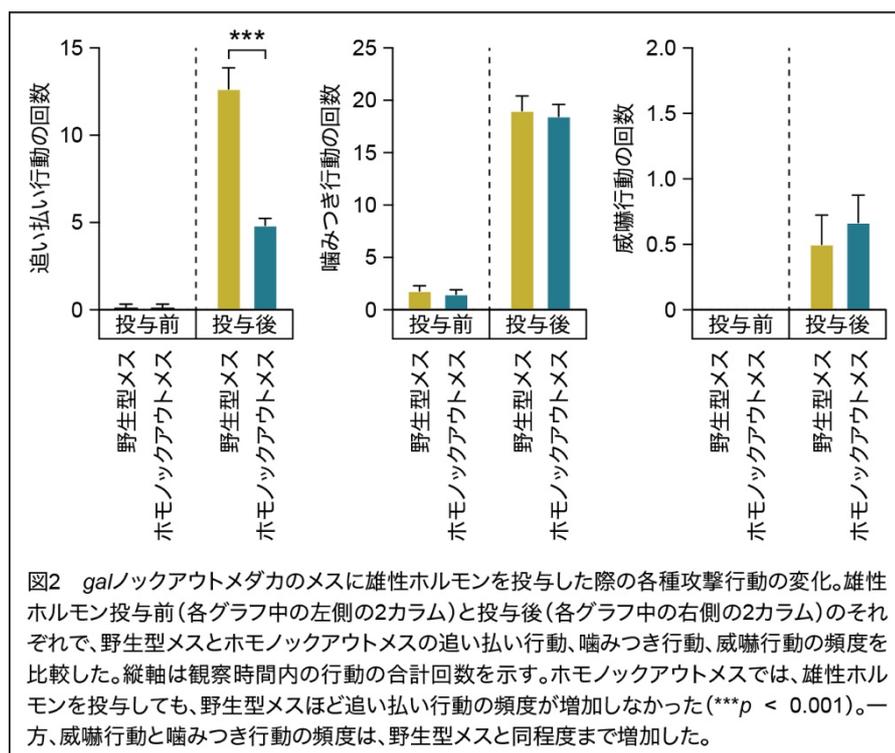


図2 *gal*ノックアウトメダカのメスに雄性ホルモンを投与した際の各種攻撃行動の変化。雄性ホルモン投与前(各グラフ中の左側の2カラム)と投与後(各グラフ中の右側の2カラム)のそれぞれで、野生型メスとホモノックアウトメスの追い払い行動、噛みつき行動、威嚇行動の頻度を比較した。縦軸は観察時間内の行動の合計回数を示す。ホモノックアウトメスでは、雄性ホルモンを投与しても、野生型メスほど追い払い行動の頻度が増加しなかった(***)。一方、威嚇行動と噛みつき行動の頻度は、野生型メスと同程度まで増加した。

また、*adcyp1* と *vip* を発現する PMp 領域のニューロンの投射先を解析したところ、主に下垂体前葉に投射していることが分かった。したがって、これらの遺伝子は行動というより内分泌系を制御していると考えられた。

<引用文献>

- ① Lee H, Kim DW, Remedios R, Anthony TE, Chang A, Madisen L, Zeng H, Anderson DJ (2014) Scalable control of mounting and attack by *Esr1*+ neurons in the ventromedial hypothalamus. *Nature* 509:627–632
- ② 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
- ③ Yang CF, Chiang MC, Gray DC, Prabhakaran M, Alvarado M, Juntti SA, Unger EK, Wells JA, Shah NM (2013) Sexually dimorphic neurons in the ventromedial hypothalamus govern mating in both sexes and aggression in males. *Cell* 153:896–909
- ④ Yang CF, Shah NM (2014) Representing sex in the brain, one module at a time. *Neuron* 82:261–278
- ⑤ Yang T, Yang CF, Chizari MD, Maheswaranathan N, Burke KJ Jr, Borius M, Inoue S, Chiang MC, Bender KJ, Ganguli S, Shah NM (2017) Social Control of Hypothalamus-Mediated Male Aggression. *Neuron* 95:955–970

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamashita J, Nishiike Y, Fleming T, Kayo D, Okubo K	4. 巻 4
2. 論文標題 Estrogen mediates sex differences in preoptic neuropeptide and pituitary hormone production in medaka	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 948
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endo/bqab261	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishiike Y, Miyazoe D, Togawa R, Yokoyama K, Nakasone K, Miyata M, Kikuchi Y, Kamei Y, Todo T, Ishikawa-Fujiwara T, Ohno K, Usami T, Nagahama Y, Okubo K	4. 巻 31
2. 論文標題 Estrogen receptor 2b is the major determinant of sex-typical mating behavior and sexual preference in medaka	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1699-1710
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2021.01.089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita J, Takeuchi A, Hosono K, Fleming T, Nagahama Y, Okubo K	4. 巻 9
2. 論文標題 Male-predominant galanin mediates androgen-dependent aggressive chases in medaka	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e59470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.59470	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawabata-Sakata Y, Nishiike Y, Fleming T, Kikuchi Y, Okubo K	4. 巻 287
2. 論文標題 Androgen-dependent sexual dimorphism in pituitary tryptophan hydroxylase expression: relevance to sex differences in pituitary hormones	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences	6. 最初と最後の頁 20200713
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rspb.2020.0713	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiraki-Kajiyama T, Yamashita J, Yokoyama K, Kikuchi Y, Nakajo M, Miyazoe D, Nishiike Y, Ishikawa K, Hosono K, Kawabata-Sakata Y, Ansai S, Kinoshita M, Nagahama Y, Okubo K	4. 巻 8
2. 論文標題 Neuropeptide B mediates female sexual receptivity in medaka fish, acting in a female-specific but reversible manner	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.39495	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 大久保範聡
2. 発表標題 魚類の性行動パターンの性差形成と性的可逆性
3. 学会等名 日本内分泌学会第37回内分泌代謝学サマーセミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西池雄志、大久保範聡
2. 発表標題 性ステロイド環境に応じてメダカの性行動パターンをメス型化する脳内メカニズム
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Okubo K
2. 発表標題 How do evolutionarily conserved neural substrates give rise to variation in social behaviors across species?
3. 学会等名 Japan-Norway Symposium on Fish Endocrinology and Genomics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nishiike Y, Okubo K
2. 発表標題 Estrogen receptor 2b plays an essential role in establishing female mating behavior in medaka
3. 学会等名 Japan-Norway Symposium on Fish Endocrinology and Genomics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fleming T, Okubo K
2. 発表標題 Prostaglandin receptor 4b (ptger4b) regulates female receptivity in medaka
3. 学会等名 Japan-Norway Symposium on Fish Endocrinology and Genomics (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------