

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16247

研究課題名（和文）メダカオキシトシン遺伝子に着目した、配偶者防衛行動の神経基盤解析

研究課題名（英文）Analysis of neural basis of mate-guarding behavior focusing on medaka oxytocin

研究代表者

横井 佐織 (Yokoi, Saori)

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：10772048

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではオキシトシンに着目し、メダカの配偶者防衛行動の神経基盤解析を行った。オキシトシンやその受容体遺伝子を欠失させたメダカのオスでは、初対面のメスに対する性的モチベーションが低く、配偶者防衛行動をほとんど示さなかった。一方、生まれてから性成熟まで同じ水槽で飼育したメスに対しては、正常オスよりも強い配偶者防衛行動を示した。トランスクリプトーム解析により、シナプス刈り込みに関与するc1qの構成要素の全ての遺伝子の発現量がオキシトシン変異メダカにおいて減少していることが明らかになった。オキシトシン変異メダカオスにおける配偶者防衛行動異常も神経刈り込み異常が原因になっている可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オキシトシンは、哺乳類において性別によらず絆形成に重要なホルモンであると考えられている。しかしながら、本研究で作出したオキシトシン変異メダカオスは、親密なメスに対してのみ過剰な配偶者防衛行動を示しており、これはメダカオスにおいてオキシトシンが絆形成を負に制御することを意味している。したがって、動物種や性別によってはオキシトシンの効果が異なるということ、今後念頭に置いて研究する必要があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on oxytocin and analyzed the neural basis of mate-guarding behavior in medaka fish. Male medaka lacking oxytocin or its receptor gene showed low sexual motivation toward females they had never met before and exhibited little mate-guarding. On the other hand, when we used females kept in the same tank from birth to sexual maturity, male medaka lacking oxytocin or its receptor gene showed excessive mate-guarding. Transcriptome analysis revealed that the expression levels of all genes of the c1q component involved in synaptic pruning were decreased in oxytocin mutant medaka. It is possible that the abnormal mate-guarding behavior in oxytocin mutant males is caused by abnormal neural pruning.

研究分野：行動遺伝学

キーワード：オキシトシン メダカ 配偶者防衛

1. 研究開始当初の背景

配偶者防衛行動は「オス、オス、メス」の三者関係において観察される行動であり、「オスがメスに追従し、他のオスとメスとの交配を阻止する行動」と定義されている。当該行動は多くの動物種で報告例が存在し、オスの適応度上昇に寄与すると考えられているが、その分子神経基盤には未だ不明な点が多い。研究代表者はこれまでに、分子遺伝学的のモデル生物であるメダカが配偶者防衛行動を示すことを発見し、行動を定量する新規アッセイ系を確立した。さらに、神経ペプチドの一種であるオキシトシンの魚類ホモログ(以下オキシトシン)が当該行動を負に制御することを明らかにしていた。しかしながら、オキシトシンがどのように行動を制御しているのかについては明らかになっていなかった。また、オキシトシン関連遺伝子変異体メスメダカは「見知った個体を配偶相手として選ぶ」という配偶者選択行動に異常を示すことが明らかになっており、オスにおいても親密度依存のメスの選好性に異常がある可能性が考えられた。特に、配偶者防衛行動はメスへの性的モチベーションに由来することを研究代表者は以前報告しており(PLoS Genetics, 2015)、オキシトシン関連遺伝子変異由来の配偶者防衛行動異常に関し、メスとの親密度や、性的モチベーションとの相関についても考慮すべきであると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、オキシトシン関連遺伝子による配偶者防衛行動の制御がどのようなメカニズムで起きているかを明らかにすることを最終目的として、以下の3点を小目的とする。

- (1) オキシトシン関連遺伝子変異体オスを用いた行動異常のより詳細な記載
- (2) オキシトシン関連遺伝子変異体の脳でどのような異常が起きているかを分子パスウェイレベルで予想し、行動異常に関与する候補遺伝子をピックアップ
- (3) (2)で同定した候補遺伝子が実際に配偶者防衛行動に関与するかを検証。また、その作用機序について検証

3. 研究の方法

(1) オキシトシン関連遺伝子変異体オスにとって見知ったメス(生まれた時から同じ水槽で飼育したメス)を用いた際、これら変異体オスが過剰な配偶者防衛行動を示すことや、正常な求愛行動を示すことがわかっていたため、見知らぬメス(本実験が初対面のメス)を用いた際の配偶者防衛行動や求愛行動を検証した。

(2) 野生型、オキシトシンとその受容体の変異体から脳を抽出し、抽出したRNAを用いてRNAseq解析を実施し、オキシトシンパスウェイの異常が脳でどのような遺伝子の転写に影響を与えているかを網羅的に検証する。また、GO解析やパスウェイ解析により、特にどの経路に関連する遺伝子の発現変動が多く起きているかについて明らかにした。

(3) (2)で明らかになった、オキシトシン関連遺伝子変異により転写量に影響をうけた遺伝子のうち、興味をひいたものについて、遺伝子発現を可視化したり、遺伝子変異体を作製し、配偶者防衛行動を示すか否か、配偶者防衛における優位性に関与するか否か、を検証した。

4. 研究成果

(1) オキシトシン関連遺伝子変異体オスを用いた配偶者防衛行動異常のより詳細な記載

オキシトシン関連遺伝子変異体オス2匹と、2匹にとって見知らぬメス1匹を用いた際の配偶者防衛行動を検証したところ、見知らぬメスに対してオキシトシン関連遺伝子変異体オスは配偶者防衛行動を示さないことが明らかになった(図1)。また、オキシトシン関連遺伝子ホモ変異体オス1匹とヘテロ変異体オス1匹、そして両オスにとって見知らぬメス1匹を用いて、配偶者防衛行動における優位性を検証したところ、ヘテロ変異体オスが優位となる傾向が観察された。一方、求愛行動に関しては、オキシトシン関連遺伝子ホモ変異体オスの見知らぬメスに対する求愛頻度は見知ったメスに対してよりも有意に低く、これは見知らぬメスに対する性的モチベーションが低いことを示唆している。以上の結果と、背景でも述べた先行研究(Yokoi et al., PLoS Genetics, 2015)

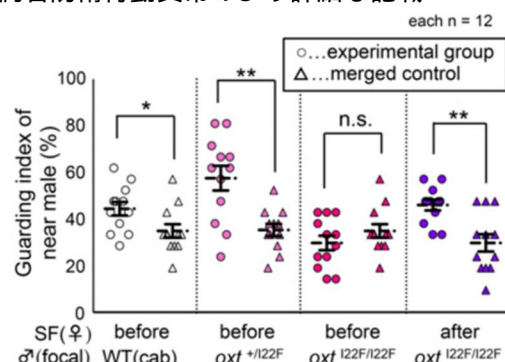


図1 オキシトシン変異体オスの配偶者防衛 experimental groupにおけるguarding indexが merged controlよりも有意に高ければオスが配偶者防衛を示したことを意味する。SF(social familiarization)前はオキシトシンホモ変異体オスは配偶者防衛を示さなかったが、SF後は示した。

を併せて考えると、オキシトシン関連遺伝子変異体オスの見知らぬメスに対する性的モチベーションの低さが、見知らぬメスに対して配偶者防衛行動を示さないという異常につながっていると考えられた。実際、見知らぬメスとオキシトシン関連遺伝子変異体オスを同じ水槽で 20 日程度飼育 (social familiarization) すると、求愛頻度異常、配偶者防衛行動異常が共に回復しており、この仮説を裏付けている。

一方、オキシトシン関連遺伝子変異体オスの見知ったメスに対する求愛頻度は野生型オスと有意な差が検出されなかったことから、見知ったメスに対する過剰防衛に関しては性的モチベーション以外の要素が関与する可能性が示唆された。

(2) RNAseq によるトランスクリプトーム解析

野生型、オキシトシン変異体、オキシトシン受容体 (*otr1*) 変異体、の脳から抽出した RNA を用いて RNAseq 解析を実施し、オキシトシン変異体とオキシトシン受容体変異体の両方で発現変動している遺伝子を網羅的に探索した。配偶者防衛行動はオス特異的な行動であるため、その発現変動の雌雄差についても解析した。その結果、メス特異的に発現変動する遺伝子が一番多く、その次に両性で発現変動する遺伝子、オス特異的に発現変動する遺伝子の順で多いことが明らかになった (図 2)。オス特異的に発現変動した遺伝子について GO 解析とパスウェイ解析をおこなったところ、発現低下した遺伝子に関しては有意な GO やパスウェイは検出されず、発現上昇した遺伝子に関しては ECM proteoglycans などのパスウェイが検出された一方で、有意な GO は検出されなかった。ECM 関連遺伝子に関しては、樹状突起の伸長に関与することが知られている (Novak et al., J.Clin.Neurosci, 2000)。

次に、両性で発現変動した遺伝子について GO 解析とパスウェイ解析をおこなったところ、発現上昇した遺伝子に関しては有意な GO やパスウェイは検出されなかった一方で、発現低下した遺伝子に関しては GO 解析とパスウェイ解析の両方で補体系に関わる遺伝子が多く含まれることが示された (図 3)。なかでも、C1q を構成するサブユニットをコードする遺伝子の全て (*c1qa*, *c1qb*, *c1qc*) の発現量が低下していた。C1q は *c1qa*, *c1qb*, *c1qc* で 3 量体を形成し、自然免疫経路の開始部分を担うが、近年シナプス刈り込みなどの神経発達に関与することが報告されており、自閉症関連遺伝子としても報告がある (Fang et al., Brain Disord.Ther, 2015)。

以上より、オキシトシン関連遺伝子変異体オスでは樹状突起伸長や神経発達といった、神経回路形成レベルでの異常により配偶者防衛行動に異常を示す可能性が考えられた。

これらの研究成果は 2020 年に Proceedings of the National Academy of Sciences 誌に掲載された (研究代表者が第一著者兼共同責任著者)。プレスリリースの結果、北海道新聞、日本経済新聞、読売新聞、日刊工業新聞に記事が掲載され、NHK ニュース全国版でも放送された。

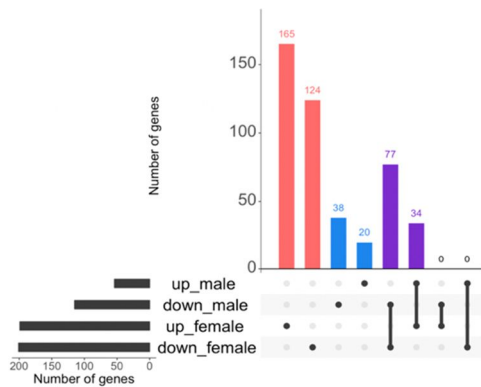


図2 オキシトシン関連遺伝子変異により発現変動した遺伝子数

赤色の棒グラフがメス特異的、青色の棒グラフがオス特異的、紫色の棒グラフが両性で発現変動した遺伝子数を表している。

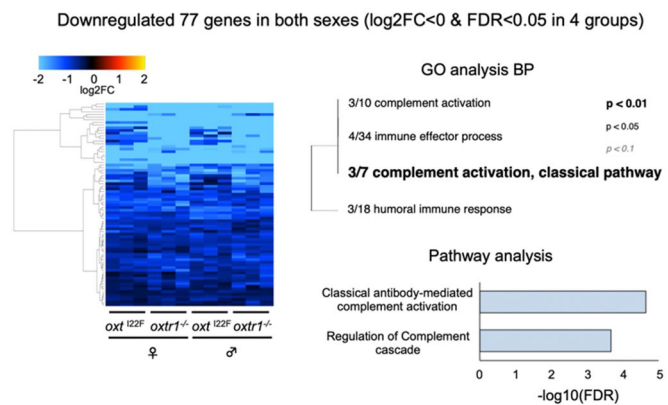


図3 両性で発現低下した遺伝子

ヒートマップはクラスタリング解析の結果(左)。GO解析、パスウェイ解析とともに補体系に関与する遺伝子が濃縮されていることを示した(右)。

(3) オキシトシン関連遺伝子変異により発現変動した遺伝子の機能解析

オキシトシン関連遺伝子変異により発現低下した *c1q* 関連遺伝子のうち、もっとも野生型における発現量が多かった *c1qb* について変異体を作製し、*c1qb* 変異体オス 2 匹とこれらのオスにとって見知ったメス 1 匹の 3 匹を用いて実験をしたところ、*c1qb* 変異体オスは配偶者防衛行動を示し、シナプス刈り込みの異常があったとしても、配偶者防衛行動の誘起には支障がないと考えられた。一方、*c1qb* 変異体オスと野生型オスとを、見知ったメスを巡って競わせると、*c1qb* 変異体オスが劣位となる傾向が検出された。したがって、神経刈り込みによる神経回路の成熟は、正常な配偶者防衛行動のモチベーションに必要であると考えられた。先述の通り、オキシトシン関連遺伝子変異体メダカオスにおいては、見知ったメスを用いた際に配偶者防衛が過剰になり、野生型オスと競わせた際に優位になる傾向にある。*C1qb* 変異体オスの結果はこうしたオキシト

シン関連遺伝子変異体オスとは真逆のものではあるが、オキシトシン関連遺伝子変異体オスでは c1qb の発現量が野生型よりも少ないものの、発現自体はしており、部分的には神経刈り込みが正常に起きている可能性が高い。したがって、c1q による神経刈り込みが起きる部位によっては、配偶者防衛行動のモチベーションを正にも負にも制御できるのではないかと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahashi Osamu, Tanahashi Mayuko, Yokoi Saori, Kaneko Mari, Yanaka Kaori, Nakagawa Shinichi, Maita Hiroshi	4. 巻 27
2. 論文標題 The cell type specific ER membrane protein UGS148 is not essential in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 43 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12910	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 Watanabe Yuko, Okuya Kazuho, Takada Yuki, Kinoshita Masato, Yokoi Saori, Chisada Shinichi, Kamei Yasuhiro, Tatsukawa Hideki, Yamamoto Naoyuki, Abe Hideki, Hashimoto Hisashi, Hitomi Kiyotaka	4. 巻 168
2. 論文標題 Gene disruption of medaka (<i>Oryzias latipes</i>) orthologue for mammalian tissue-type transglutaminase (TG2) causes movement retardation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 213 ~ 222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa038	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 Yokoi Saori, Naruse Kiyoshi, Kamei Yasuhiro, Ansai Satoshi, Kinoshita Masato, Mito Mari, Iwasaki Shintaro, Inoue Shuntaro, Okuyama Teruhiro, Nakagawa Shinichi, Young Larry J., Takeuchi Hideaki	4. 巻 117
2. 論文標題 Sexually dimorphic role of oxytocin in medaka mate choice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 4802 ~ 4808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1921446117	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 該当する
1. 著者名 Yokoi Saori, Isoe Yasuko, Wang Mu-Yun, Daimon Masahiro, Okuyama Teruhiro, Takeuchi Hideaki	4. 巻 181
2. 論文標題 Quantifying Social Interactions in Medaka Fish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Behavioral Neurogenetics	6. 最初と最後の頁 93 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2321-3_7	査読の有無 無
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 Yokoi Saori、Young Larry J.、Takeuchi Hideaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Comparative Perspectives on the Function of Oxytocin in Fish and Mammals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Spectrum of Sex	6. 最初と最後の頁 135 ~ 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-19-5359-0_8	査読の有無 無
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 該当する

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 横井佐織
2. 発表標題 配偶者選択におけるオキシトシンの性的二形性
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中豪, 成瀬清, 郷康広, 辰本将司, 豊田敦, 勝村啓史, 中川真一, 横井佐織
2. 発表標題 新規クロースドコロニー系統メダカを用いた不安様行動における個性の分子神経基盤解析
3. 学会等名 小型魚類研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Saori Yokoi
2. 発表標題 Sexually dimorphic role of oxytocin in medaka mate choice
3. 学会等名 neuro2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuntaro inoue, Shinichi Nakagawa, Saori Yokoi
2. 発表標題 Searching for novel functional long non-coding RNAs expressed in the brain of adult medaka fish
3. 学会等名 第26回小型魚類研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横井佐織
2. 発表標題 オキシトシンが制御する、メダカにおける親密度依存の社会性行動
3. 学会等名 次世代薬理学セミナー 2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横井佐織
2. 発表標題 メダカ成魚脳で発現する機能性 lncRNA の探索
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横井佐織
2. 発表標題 Analysis of molecular/neural basis underlying decision making according to social familiarity in small fish, medaka
3. 学会等名 Neuro 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuntaro inoue, Shinichi Nakagawa, Saori Yokoi
2. 発表標題 Searching for novel functional lncRNAs expressed in brain of adult medaka fish.
3. 学会等名 The 25th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横井佐織
2. 発表標題 メダカの恋愛学
3. 学会等名 第38回 国際生物学賞記念シンポジウム "魚の生物学:その生態、進化と発生" (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横井 佐織, 水戸 麻里, 岩崎 信太郎, 中川 真一
2. 発表標題 メダカを用いたmalat1の機能解析
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横井 佐織
2. 発表標題 メダカの魚型物体に対する接近行動の解析
3. 学会等名 日本動物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kumi Sakurai, Shuntaro Inoue, Koki Nagamori, Shinichi Nakagawa, Saori Yokoi
2. 発表標題 Functional analysis of the farp1_2 expressed specifically in the brain of medaka
3. 学会等名 The 28th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsuyoshi Tanaka, Kiyoshi Naruse, Yasuhiro Go, Shoji Tatsumoto, Atsushi Toyoda, Takafumi Katsumura, Shinichi Nakagawa, Saori Yokoi
2. 発表標題 Analysis of the molecular basis of animal behavioral personality in medaka
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kumi Sakurai, Shuntaro Inoue, Koki Nagamori, Shinichi Nakagawa, Saori Yokoi
2. 発表標題 Functional analysis of the farp1_2 expressed especially in the brain of medaka
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yume Masaki, Shinichi Nakagawa, Saori Yokoi
2. 発表標題 Physiological function analysis of Hmgn2 in medaka fish
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

オキシトシンによる異性の好み メダカで性差が明らかに
<https://www.hokudai.ac.jp/news/2020/02/post-628.html>

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			
米国	エモリー大学			