

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月13日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22688015

研究課題名（和文） 魚類の脳における性差の形成機構の解明

研究課題名（英文） Understanding the mechanisms that generate sex differences in the teleost brain

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・准教授

研究者番号：10370131

研究成果の概要（和文）：魚類の行動や内分泌のパターンには、顕著な性差が認められる。しかし、これらの性差が、どのような脳内メカニズムによって生じるのかについては、明らかとなっていない。本研究の結果、卵巣から放出される女性ホルモン（エストロゲン）のはたらきによって、メダカの脳内の特定領域で、性ホルモン代謝酵素の一種や、性ホルモン受容体がメスのみ、あるいはメスで多く発現するようになることが明らかとなった。このような脳内の性差が、個体の性差を生み出す一因となっていることが予想される。

研究成果の概要（英文）：Teleost fish exhibit sex differences in a variety of behavioral and endocrine patterns. However, virtually nothing is known about what brain mechanisms underlie these sex differences. The present study has revealed that a steroidogenic enzyme and sex steroid receptors are female-specifically or female-preferentially expressed in several regions of the medaka brain, resulting from the action of estrogen derived from the ovary. These systems within the brain may be relevant to sex differences in some behavioral and/or physiological traits.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学、水産学一般

キーワード：魚類・脳・メダカ・性差

1. 研究開始当初の背景

哺乳類では出生前後の時期に、脳がどちらか一方の性に機能的な分化をする。それにより、分化した方の性に応じた性行動や内分泌パターン（生殖や成長、ストレス応答に関わる内分泌パターン）が発現するようになる。そして通常、オス・メスそれぞれの性行動や内分泌パターンが、その生活史において逆転することはない。魚類においても、性行動や

内分泌パターンに顕著な性差が認められるが、その一方で哺乳類とは異なり、性成熟後でも性ホルモン処理によって、異性の性行動が誘導され得ることが知られている。さらには、自然条件下で性転換を起こす魚種も少ない。このことは、魚類の性行動や内分泌パターンの性差は、哺乳類とは明らかに異なるメカニズムによって規定されていることを意味している。しかし、その分子の実体に

関する研究は、国内外を通してほとんどなく、全くのブラックボックスである。それどころか、そもそも魚類の脳には、どのような形態学的・分子的な性差が存在するのかさえはつきりしていない。

そこで、我々はこれまで、魚類の脳機能の性差を理解するために、メダカをモデルに用いて研究に取り組んできた。その過程で、メダカの脳内で発現に性差を示す遺伝子群の網羅的スクリーニングを行い、新規遺伝子や機能が未知な遺伝子を含め、脳で性特異的に発現する遺伝子群（以下、性特異的遺伝子群とよぶ）を単離・同定してきた。そして、それらの遺伝子群の発現解析から、メダカにおいては、性成熟が開始されるまで脳の性は確立しないこと、また、脳の性差の確立・維持には、性ホルモンが重要な役割を担っており、性染色体の影響は存在するとしても、極めて小さいことを示唆するデータを得てきた。そのような機構が、魚類の脳における性の揺らぎやすさを生み出す要因であることが考えられた。

2. 研究の目的

上記のスクリーニングによって得られた性特異的遺伝子群の中には、魚類の脳機能の性差を理解する上で、重要な鍵となることが推測される数種の遺伝子が含まれていた。メスで高い発現を示し、アンドロゲンをエストロゲンに転換する酵素であるアロマターゼをコードする遺伝子 (*cyp19a2*)、性行動を支配すると考えられており、実際に性行動中に活性が高まることが明らかとなった神経核で、メス特異的に発現する機能未知な分泌性タンパク質遺伝子 (*npb*)、下垂体を制御するためにオス特異的に発現する分泌性タンパク質遺伝子 (*gal*) である。

そこで本研究では、これらの遺伝子の機能、作用機序、制御機構に関する解析を進めることで、魚類の脳の性差形成機構を理解することを目指すこととした。

3. 研究の方法

詳細な発現解析や、人為的な性転換、性ホルモンの投与実験、トランスジェニックの作出などを組み合わせて、*cyp19a1b*、*npb*、*gal* の機能解析、作用機序解析、制御機構解析を行った。また、それらの遺伝子の機能や作用機序、制御機構を考える上で鍵となることが予想される各種の神経伝達物質・神経修飾物質、エストロゲン受容体・アンドロゲン受容体についても、発現解析を行った。さらに、研究の過程で、新規のヘム結合タンパク質をコードする遺伝子 *hebp3* の重要性に気が付き、その発現解析も行った。

4. 研究成果

(1) *cyp19a1b* の機能・作用機序・制御機構の解析

スクリーニングによって、メスの脳でより高い発現を示す遺伝子の一種として得られた *cyp19a1b* (アンドロゲンをエストロゲンに転換する酵素であるアロマターゼをコードする遺伝子) に着目した研究から、いくつかの新知見を報告することができた。

まず、メダカの脳においては、視蓋で *cyp19a1b* がメス特異的に発現することが明らかになった。その後の発現解析によって、視蓋におけるメス特異的な発現は、性染色体のはたらきによって直接引き起こされているのではないこと、その代わりに、卵巣から放出されるエストロゲンによって引き起こされていることが明らかとなった。また、*cyp19a1b* 発現細胞は脳室周辺部に限定して密集していることから、メスの脳における *cyp19a1b* は、メスの脳をアンドロゲンから保護し、脳がオス化してしまうことを防ぐ役割を担っていることが考えられた。

また、魚類の脳ではこれまで、*cyp19a1b* は成熟したラディアルグリア細胞で発現するとされてきたが、メダカの視蓋におけるメス特異的な *cyp19a1b* 発現細胞を詳細に解析したところ、その正体は、細胞増殖を終えた未熟なラディアルグリア細胞であることが明らかとなった。従来考えられてきたよりも若い細胞で *cyp19a1b* がメス特異的に発現することになるが、このことから、*cyp19a1b* が細胞ライフサイクルに何らかの性差をもたらす役割を担っている可能性が予想された。そこで、メダカの視蓋における細胞ライフサイクルの性差を検証した。その結果、細胞増殖、ラディアルグリア細胞への分化、細胞死のいずれにおいても、メスで亢進している結果を支持する結果を得た。視蓋自体の大きさに性差は認められなかったため、細胞の誕生と死の両者がメスで亢進しており、全体で見れば細胞数に雌雄差はない状態に保たれているものと推察された。

(2) *cyp19a1b*、*npb*、*gal* の発現を可視化したトランスジェニックメダカラインの作出とイメージング系の確立

cyp19a1b、*npb*、*gal* の発現パターン、および、その発現細胞の投射様式や活動電位を、全脳の形態を保ったままモニタリングすることを可能とするためのモデルとして、それらの発現を蛍光タンパク質で可視化したトランスジェニックメダカを作出し、そのライン化に取り組んだ。途中、東日本大震災時のアクシデントにより、ラインのコンタミネーションが起きたようであるが、スクリーニングをやり直すことで、再びライン化することができた。

そして、蛍光タンパク質の蛍光を指標に、

着目した遺伝子を発現するニューロンの細胞体、および軸索走行をイメージングする実験系の確立を試みた。組織透明化試薬と、低倍率の共焦点顕微鏡を組み合わせることで、比較的きれいな画像を取得できることが明らかとなった。

(3) *cyp19a1b*, *npb*, *gal* と共発現することが考えられる神経伝達物質・神経修飾物質の性差の解析

cyp19a1b, *npb*, *gal* と共発現することが考えられる、いくつかの神経伝達物質・神経修飾物質の発現にも性差が存在するかを検証するために、それらの発現解析を行った。解析したのは、ゴナドトロピン放出ホルモン、バソトシン、イソトシン、チロシン水酸化酵素、トリプトファン水酸化酵素である。その結果、*npb* がメス特異的に発現する神経核において、ゴナドトロピン放出ホルモンがわずかにオスで高い発現を示すこと、逆に、イソトシンがわずかにメスで高い発現を示すことが明らかとなった。しかし、*cyp19a1b*, *npb*, *gal* と共発現しているような、それ以外の目立った性差は認められなかった。

(4) エストロゲン受容体・アンドロゲン受容体の発現解析

cyp19a1b, *npb*, *gal* との発現の性差が性ホルモン（エストロゲンとアンドロゲン）のはたらきと関連していることを示すデータが得られたことから、メダカの脳内のエストロゲン受容体とアンドロゲン受容体の発現部位と、その性差をしっかりと理解しておく必要があると考えた。

そこで、メダカの脳におけるエストロゲン受容体・アンドロゲン受容体の発現解析を行い、その結果を雌雄で比較した。その結果、性行動を支配すると考えられており、*npb* をメス特異的に発現する全ての神経核において、エストロゲン受容体・アンドロゲン受容体の両者が、やはりメス特異的に発現していることが明らかとなった。これらの神経核では、メスのみがエストロゲンならびにアンドロゲンを受容できることになる。エストロゲンのみならず、アンドロゲンを受容できるのもメスだけ、というのは全くの予想外であった。また、それらのメス特異的発現は、エストロゲン自身による促進、アンドロゲン自身による抑制という二重の支配を受けており、両ホルモンのバランスを人為的に改変すると、性成熟後でも、その性特異性が逆転することも明らかとなった。このようなシステムが、魚類の脳で見られる性的可逆性の基盤となっている可能性が高いと考えられた。

(5) 新規のヘム結合タンパク質をコードする遺伝子 *hebp3* の同定と発現解析

cyp19a1b, *npb*, *gal* に加え、同じくスクリーニングによって得られた新規のヘム結合タンパク質をコードする遺伝子 *hebp3* の発現解析も行うこととした。

まず、メダカの脳においては、脳髄膜で *hebp3* がメスに偏った発現を示すことが明らかになった。その後の発現解析によって、このメスに偏った発現は、*cyp19a1b* と同様、性染色体のはたらきによって直接引き起こされているのではないこと、その代わりに、卵巣から放出されるエストロゲンによって引き起こされていることが明らかとなった。また、エストロゲンによる *hebp3* の発現促進は、エストロゲンの直哲的な転写促進能によるものだということが分かった。

以上のことから、*hebp3* が脳ではたらく新規のエストロゲン標的遺伝子であること、脳髄膜にも遺伝子レベルでの性差が存在することが、全動物種を通して明らかとなった。*hebp3* が魚類の脳の性差形成に何らかの役割を担っている可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Nakasone K, Nagahama Y, Okubo K (2013) *hebp3*, a novel member of the heme-binding protein gene family, is expressed in the medaka meninges with higher abundance in females due to a direct stimulating action of ovarian estrogens. *Endocrinology* 154: 920–930 (査読有り) DOI: <http://10.1210/en.2012-2000>
- ② Hiraki T, Takeuchi A, Tsumaki T, Zempo B, Kanda S, Oka Y, Nagahama Y, Okubo K (2012) Female-specific target sites for both oestrogen and androgen in the teleost brain. *Proc Biol Sci* 279:5014–5023 (査読有り) DOI: <http://10.1098/rspb.2012.2011>
- ③ 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 (査読有り) DOI: <http://10.1016/j.neuroscience.2012.05.021>
- ④ 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 (査読有り) DOI: <http://10.1111/j.1365-2826.2011.02120.x>

[学会発表] (計9件)

- ① 大久保範聡 (2013年3月29日) 魚類の脳の性成熟機構に関する研究. 平成25年度日本水産学会春季大会, 東京都港区 (東京海洋大学品川キャンパス) (招待講演)
- ② 仲宗根潔, 大久保範聡 (2012年3月27日) メダカの脳髄膜においてメスで高い発現を示す遺伝子の同定. 平成24年度日本水産学会春期大会, 東京都港区 (東京海洋大学品川キャンパス)
- ③ 川幡由希香, 大久保範聡 (2012年3月27日) メダカの脳における神経伝達物質・神経修飾物質関連遺伝子の性差. 平成24年度日本水産学会春期大会, 東京都港区 (東京海洋大学品川キャンパス)
- ④ Nakasone K, Okubo K (November 23, 2011) Identification of a gene that is predominantly expressed in the female medaka meninges. 1st Strategic Meeting for Medaka Research, Okazaki, Aichi, Japan
- ⑤ Kawabata Y, Okubo K (November 23, 2011) Sex differences in the expression of neuromodulator/neurotransmitter-related genes in the medaka brain. 1st Strategic Meeting for Medaka Research, Okazaki, Aichi, Japan
- ⑥ Okubo K (August 10, 2011) Sex differences in estrogen and androgen signaling in the medaka brain. *9th International Symposium on Reproductive Physiology*, Kochi, India (招待講演)
- ⑦ Takeuchi A, Okubo K (August 10, 2011) Sexually dimorphic expression of aromatase in the medaka brain. *9th International Symposium on Reproductive Physiology*, Kochi, India
- ⑧ Hiraki T, Okubo K (August 10, 2011) Sex-dependent expression of estrogen and androgen receptor genes in the medaka brain. *9th International Symposium on Reproductive Physiology*, Kochi, India
- ⑨ 大久保範聡 (2011年2月24日) メダカの脳の性が決まる仕組み. 琉球大学熱帯生物圏研究センター共同利用研究会「動物の性決定機構」, 沖縄県本部町 (招待講演)

[その他]

ホームページ等

- ① <http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2012/20121017-1.html> 「生殖行動における、メスの脳とオスの脳の違いをメダカで発見」にて成果発表を行った。
- ② <http://www.a.u-tokyo.ac.jp/pr-yayoi/56.pdf> 「メスの脳だけに存在する性ホルモン受容部位」にて成果発表を行った。
- ③ 雑誌論文①の成果が、Endocrine News で

取り上げられた (Eric Seaborg "Gene affects fish sexuality" Endocrine News, March 2013, p10)。

- ④ 雑誌論文②の成果がナショナルジオグラフィック, サイエンスポータル, マイナビニュース, 日経プレスリリース, JC-NET, Yahoo!ニュースなどのメディアで取り上げられた。

6. 研究組織

(1) 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・准教授

研究者番号 : 10370131

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし